

ルとして有用であると判断された遺伝的に腹腔内に脂肪を蓄積しやすいKKマウスと成長に伴って脂肪を蓄積していく成長期ラットを用いて、さらに詳細な検討を行った。

食品素材としては、糖代謝・エネルギー代謝に影響を及ぼすとされている成分、抗酸化成分、食物繊維素材を選択した。

### (1) 実験Ⅰ：KKマウスによる健康食品成分の個別評価

#### ①試験試料

実験にはいわゆる健康食品に使用されている3種類の素材を用いた。素材A (Material A) は、オオバコの種子から抽出された植物ガム質で、水溶性食物繊維として用いられている。AOAC法にて分析した結果、食物繊維含量は90%であった。素材B (Material B) は、細胞のミトコンドリアに存在し、生体のエネルギー産生反応における補酵素として働く含硫化合物である。体内でも合成されるビタミン様物質で抗酸化物質でもある。素材C (Material C) は、柑橘類由来のポリフェノール一種で、ビタミンPとも呼ばれている。糖転移反応により $\alpha$ -グルコシル化した配糖体を用いた。

#### ②動物実験

実験飼料のControlはAIN-93G組成を基本とし、脂肪エネルギー比が50%となるように、 $\alpha$ -コーンスターチをラードと置換した高脂肪飼料を用いた (TABLE I-1)。素材Aは、セルロースと置換して総食物繊維量が5.0%になるように飼料中に5.6%添加した。素材Bは、0.5%を $\alpha$ -コーンスターチと置換して添加した。素材Cは、1.0%を $\alpha$ -コーンスターチと置換して添加した。

4週齢、雄のKKマウス (日本クレア株式会社) を1週間予備飼育した後、1群8匹の4群に群分けした。TABLE I-1に示した実験飼料と水をそれぞれ55日間、自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。

糞は、実験最終週の3日間分を採取し、表面を洗浄して、凍結乾燥後、粉碎し、分析用試料とした。飼育終了後、4時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取、肝臓、副睾丸周辺脂肪組織、後腹壁脂肪組織 (腎周囲脂肪組織を含む)、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量測定した。肝臓は凍結乾燥後、粉碎し、脂肪組織は10%ホルマリン溶液で固定し、それぞれの分析用の試料とした。

#### ③血清生化学値の分析

血清生化学値としては、総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸、グルコース濃度を分析した。総コレステロール濃度の定量には「コレステロール E-テストワコー」、トリグリセリド濃度の定量には「トリグリセライド E-テストワコー」、遊離脂肪酸の定量には「NEFA C-テストワコー」、グルコースの定量には「グルコースCII-テストワコー」 (いずれも和光純薬工業株式会社) を使用した。

#### ④肝臓脂質の分析

肝臓を凍結乾燥、粉碎し、クロロホルム：メタノール(2:1)溶液を用いたFolch法により抽出、水洗後、総コレステロール、トリグリセリド濃度を酵素法にて分析した。総コレステロールの定量には「コレステロールE-テストワコー」、トリグリセリドの定量には「トリグリセライドE-テストワコー」 (いずれも和光純薬工業株式会社) を使用した。

#### ⑤糞中ステロールならびに総脂質の分析

酸性ステロールの定量は、凍結乾燥、粉碎した糞を80℃の熱エタノールで抽出後、総胆汁酸濃度を分析した。胆汁酸の定量には「総胆汁酸-テストワコー」 (和光純薬工業株式会社) を使用した。総中性ステロールの定量には、内部標準として5 $\alpha$ -コレスタン (Sigma社) を加え、アルカリメタノールでケン化後、石油エーテルで抽出した。抽出液をTMS化させ、ヘキササンに溶解後、キャピラリーガスクロマトグラフィー (GC/MS) で分析した。総脂質は、4%酢酸含有Folch溶液により抽出後、Folchの水洗法により、塩類を除去し、重量法により測定した。

#### ⑥脂肪細胞のサイズと数の計測

副睾丸周辺脂肪、後腹壁脂肪、腸間膜脂肪組織は、ホルマリンに浸漬して固定した後、5 $\mu$ mに切り出し、脱水、脱脂、パラフィン浸透、パラフィン包埋、薄切、伸展、乾燥後、ヘマトキシリン・エオジン染色し、封入した。各脂肪細胞を光学顕微鏡で観察し、標本をデジタルカメラで撮影した。同時に撮影したスケール付きのプレパラートの目盛りから各脂肪細胞の画像をScion Image4.0.3.2を用いてマウス1匹当たり100個の細胞の直径を測定して平均値を求めた。各脂肪組織の脂肪細胞数は、Catherineらの方法 (1998) により計算により求めた。

#### ⑧統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

### (2) 実験Ⅱ：KKマウスにおける健康食品成分の併用の影響

#### ①試験試料

素材A (Material A) は、実験Ⅰで用いた素材Bと同一のものを使用した。素材B (Material B) は、筋肉にリン酸塩の形で貯蔵される成分で、アスリート向けのサプリメントとして使用されている。素材C (Material C) は、イソプレノイド側鎖を複数個持つキノン化合物で電子伝達系に必須の因子で、抗酸化作用も有する。素材B, Cについては脂肪蓄積に関して単独の効果に関する報告がないため、素材Aとの併用による影響を調べた。

#### ②動物実験

実験飼料のControlはAIN-93G組成を基本とし、脂肪エネルギー比が50%となるように、 $\alpha$ -コーンスターチをラードと置換した高脂肪飼料を用

いた (TABLE II-1)。素材A単独群は、素材A 0.5%を $\alpha$ -コーンスターチと置換して添加した。併用群は、素材A 0.5%に素材B 1.0%添加した群ならびに素材A 0.5%に素材C 0.2%添加した群とした。

4週齢、雄のKKマウス (日本クレア株式会社) を1週間予備飼育した後、1群8匹の4群に群分けした。TABLE II-1に示した実験飼料と水をそれぞれ51日間、自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。

飼育終了後、4時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取、肝臓、副睾丸周辺脂肪組織、後腹壁脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量測定した。肝臓は凍結乾燥後、粉碎し、脂肪組織は10%ホルマリン溶液で固定し、それぞれの分析用の試料とした。

#### ③血清生化学値の分析

血清生化学値は、総コレステロール、トリグリセリド、グルコース濃度を実験Iと同様に行った。

#### ④肝臓脂質の分析

肝臓脂質の分析は実験Iと同様に行った。

#### ⑤血清レプチンおよびアディポネクチンの分析

血清レプチンは血清を20倍希釈し、マウス・レプチン・イノムアッセイキット (R&Dシステムズ社製) を用いて、ELISA法にて分析した。血清アディポネクチンは、血清を100201倍希釈し、マウス/ラットアディポネクチンELISAキット (大塚製薬株式会社) を用いて、ELISA法にて分析した。

#### ⑧脂肪細胞のサイズと数の計測

副睾丸周辺脂肪、後腹壁脂肪、腸間膜脂肪組織の脂肪細胞のサイズと数の分析は実験Iと同様に行った。

#### ⑧統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

### (3) 実験III: KKマウスの脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす健康食品成分の影響

#### ①試験試料

素材A (Material A) は、甲殻類から抽出され、脱アセチル化処理された動物性食物繊維素材で、AOAC法にて分析した結果、純度は90%であった。素材B (Material B) は、実験Iで用いた素材Bと同一のものをを用いた。素材C (Material C) は、脂肪酸がミトコンドリア内膜を通過するために必要な成分では純度99%以上のものをを用いた。

#### ②動物実験

実験飼料のControlはAIN-93G組成を基本とし、脂肪エネルギー比が50%となるように、 $\alpha$ -コーンスターチをラードと置換した高脂肪飼料を用いた (TABLE III-1)。素材Aは、セルロースと置換して総食物繊維量が5.0%になるように飼料中に5.6%添加した。素材Bは、0.5%を $\alpha$ -コーンスターチと置換して添加した。素材Cは、1.0%を $\alpha$ -コーンスターチと置換して添加した。

4週齢、雄のKKマウス (日本クレア株式会社)

を1週間予備飼育した後、1群8匹の4群に群分けした。TABLE III-1に示した実験飼料と水をそれぞれ49日間、自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。

飼育終了後、4時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取、肝臓、後腹壁脂肪組織を摘出して瞬時に液体窒素にて凍結した。

#### ③後腹壁脂肪のmRNA発現量の分析

凍結した後腹壁脂肪組織約0.2gから常法によりフェノール、クロロホルム、イソプロパノールを用いてRNAを抽出した。次に、ランダムプライマーを用いて逆転写を行い、cDNAを調製した。mRNAの発現量は、36B4を内部標準としてリポタンパク質リパーゼ (LPL)、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2 (DGAT2)、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) をリアルタイムPCR (ABI社製) を用いて相対定量した。得られたCt値よりControl群を100%として相対的に表した。

#### ④肝臓のmRNA発現量の分析

凍結肝臓約0.2gから後腹壁脂肪組織と同様の手順でcDNAを調製した。mRNAの発現量は、36B4を内部標準としてジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ1 (DGAT1)、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2 (DGAT2)、脂肪酸合成酵素 (FAS)、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) をリアルタイムPCR (ABI社製) を用いて相対定量した。

#### ⑧統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

### (4) 実験IV: KKマウスによる食物繊維素材の評価

#### ①試験試料

素材A (Material A) は海藻多糖類の1腫であり、水溶性で強い粘性をもつ。素材B (Material B) はインド地方に生育する豆科植物の種子胚乳部から精製されたキシログルカンである。素材C (Material C) はN-アセチル-D-グルコサミン残基が結合した多糖類から化学処理をしたものである。水には不溶性であるが、脂質などに対する吸着作用が強く、糞中への脂質排泄促進が報告されている。

#### ②動物実験

実験飼料のControlはAIN-93G組成を基本とし、食物繊維素材はControl飼料のcelluloseと置換した。飼料中の脂肪は7%とした (TABLE IV-1)。

4週齢、雄のKKマウス (日本クレア株式会社) を3日間予備飼育した後、1群9匹の4群に群分けした。TABLE IV-1に示した実験飼料と水をそれぞれ45日間、自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。

飼育終了後、3-4時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取、肝臓、副睾丸周辺脂肪組織、後腹壁脂肪組織、腸間膜脂肪組織

を抽出し、重量測定した。肝臓は凍結乾燥後、粉碎し、脂肪組織は10%ホルマリン溶液で固定し、それぞれの分析用の試料とした。

### ③血清生化学値の分析

血清生化学値は、総コレステロール、トリグリセリド濃度を実験Ⅰと同様に行った。血清レプチンは血清を20倍希釈し、マウス・レプチン・インムアッセイキット(R&Dシステムズ社製)を用いて、ELISA法にて分析した。血清アディポネクチンは、血清を100201倍希釈し、マウス/ラットアディポネクチンELISAキット(大塚製薬株式会社)を用いて、ELISA法にて分析した。

### ④肝臓脂質の分析

肝臓脂質の分析は実験Ⅰと同様に行った。

### ⑤脂肪細胞のサイズと数の計測

副辜丸周辺脂肪、後腹壁脂肪、腸間膜脂肪組織の脂肪細胞のサイズと数の分析は実験Ⅰと同様に行った。

### ⑥統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値±標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

## 2) 成長期ラットによる食物繊維素材の評価

### ①試験試料

この実験で用いた素材は1) 実験Ⅳと同じである。

### ②動物実験

実験飼料は1) 実験Ⅳと同じものを用いた。

実験動物は、4週齢、雄のSprague Dawley系ラット(日本クレア株式会社)を用い、3日間予備飼育した後、1群6匹の4群に群分けした。TABLE IV-1に示した実験飼料と水をそれぞれ44日間、自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。

飼育終了後、3時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取、肝臓、副辜丸周辺脂肪組織、後腹壁脂肪組織、腸間膜脂肪組織を抽出し、重量測定した。肝臓は凍結乾燥後、粉碎し、脂肪組織は10%ホルマリン溶液で固定し、それぞれの分析用の試料とした。

### ③血清生化学値の分析

血清生化学値の測定は1) 実験Ⅳと同様に行った。

### ④肝臓脂質の分析

肝臓脂質の分析は実験Ⅳと同様に行った。

### ⑤脂肪細胞のサイズと数の計測

副辜丸周辺脂肪、後腹壁脂肪、腸間膜脂肪組織の脂肪細胞のサイズと数の分析は実験Ⅳと同様に行った。

### ⑥統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値±標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

## 2. 抗変異原性を標榜する健康食品成分の有効性の評価

食品成分の抗変異原性は、DNA損傷誘発の抑制作用によって評価した。すなわち、個々の細胞のDNA損傷を検出するコメットアッセイ、およびDNAの酸化的障害により生成する8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の分析をICRマウスの肝臓を用いて行った。なお食品素材は、昨年度行った骨髄での染色体損傷を検出する小核試験と同様の6種類を用いた。

### 1) 実験Ⅰ:コメットアッセイによる評価

#### ①コメットアッセイの原理

コメットアッセイ(Single Cell Gel Assay)とは、1988年にSinghらによって開発された変異原性試験のひとつで、個々の細胞レベルにおけるDNA損傷が検出できることから、*in vivo*、*in vitro*において応用可能である。動物組織や培養細胞を、シングルセルに分散させた後、アガロースゲルに包埋し、強アルカリ下で電気泳動にかけると、損傷を受けて断片化したDNAが陽極側に移動する。断片化の程度によって様々な彗星状の像が蛍光顕微鏡下で観察されることから、コメットアッセイと命名された。

#### ②試験飼料

実験には昨年行ったAmes試験において、*Salmonella typhimurium*に抗変異原性を示す食品素材から、ポリフェノールの構造をもつ6種類を選んだ。素材A(Material A)は、植物に含まれるフラボノイドの一種で大豆に多く含まれている。今回用いた素材は、大豆からの抽出物であり、素材Aとしての含量はHPLCによる分析によると40.38%である(業者分析値)。素材B(Material B)は茶の渋み成分であり、今回用いた素材は緑茶からの抽出物である。素材Bとしての含量はHPLCによる分析によると95.03%である(業者分析値)。素材C(Material C)はビタミンPの一種で、ヘスペリチンの配糖体である。レモンから単離されたフラボノイドで、ミカンなどの柑橘類に多く含まれている。素材D(Material D)はケルセチンと二糖類ルチノースからなる配糖体であり、ソバ、特に韃靼ソバに多く含まれている。素材E(Material E)はウコンの根茎に存在する黄色色素で、腸管でテトラヒドロクルクミンに変化する。素材F(Material F)は、天然に広く分布する黄色色素で、特にベリー類に多く含まれている

#### ③実験動物

本実験では7週齢のICR雄マウス(チャールス・リバー株式会社)を対照飼料で3日間予備飼育した後、1群5匹の7群に分け、TABLE VI-1に示した飼料で3週間飼育した。すなわち、AIN-93G組成を基本とする対照飼料、および上記の食品素材6種類をそれぞれ0.5%配合する各試験飼料を与えた。飼料と水は自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。なお、飼育環境は室温22±1℃、12時間の明暗サイクル(明期:9~21時)とした。

解剖4時間前に、オリーブオイルに溶解したN-Nitrosodiethylamine (diethylnitrosamine: DEN)を腹腔内投与(80mg/B.W.kg)し、肝臓におけるDNA損傷を誘発させた。解剖時は頸椎脱臼後に開腹し、肝臓を摘出した。

#### ④コメットアッセイ

摘出した肝臓の一部は、150  $\mu$ mのナイロンメッシュを通して単一細胞に分け、アガーロースコーティングしておいたスライドガラスに封入した。すなわち、0.5%アガロースの薄層を作成しておいたスライドガラス上にメッシュを通した肝臓懸濁液と低融点アガロースを混和して重層し、カバーガラスをかけて氷上で約30分間固化させた。固化後にカバーガラスを取り除き、TritonX-100を含む細胞溶解液に浸し、1時間以上冷蔵庫中で静置した。このスライドをpH13の強アルカリ液を注いだサブマリン泳動層に並べ、定電圧モード(30V)で泳動した。その後、スライドは0.4M-Tris-HCl(pH7.5)に浸して中和し、臭化エチジウムで染色して蛍光顕微鏡下で観察した。

コメットアッセイにおけるコメットの解析法としては、様々な方法が提案されているが、今回はFig.VI-1に示した式により、DNAの損傷度を求めたFig(縦軸の単位はピクセル)。

#### ⑤統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値±標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

### 2) 実験II: 8-OHdGの分析による評価

#### ①試験飼料

実験試料は実験1と同様である。

#### ②実験動物

本実験では7週齢のICR雄マウス(チャールス・リバー株式会社)を対照飼料で3日間予備飼育した後、1群5匹の7群に分け、TABLE VI-1に示した飼料で3週間飼育した。すなわち、AIN-93G組成を基本とする対照飼料、および上記の食品素材6種類をそれぞれ0.5%配合する各試験飼料を与えた。飼料と水は自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。なお、飼育環境は室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12時間の明暗サイクル(明期:9~21時)とした。

解剖48時間前に小核誘発物質としてB[a]Pを腹腔内投与(125mg/kg)し、解剖前に尾静脈より採血した末梢血をアクリジン・オレンジで蛍光染色し、小核試験に用いた。解剖時は頸椎脱臼後に開腹し、肝臓を摘出した。

#### ③8-OHdGの分析

摘出した肝臓の一部は、Nucleic Acid Purification System Model-341(Applied Biosystems)を用いてDNAを抽出した後、HPLC(LC10AD: Shimadzu)で8-OHdGを検出した。なお、カラムは Beckman

Ultrasphere-ODS 5  $\mu$ m 4.6 X 250 mm、移動相は8% Methanol/10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、流速1.0 ml/分、検出器はESA Coulochem II、Tosdoh UV-8020(290nm)で測定した。

#### ④統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値±標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

## C. 研究結果

### 1) KKマウスによる健康食品素材の評価

#### ①成長結果

3種の素材を与えたマウスの成長結果をTABLE I-2に示す。素材Bは、飼料摂取量が他の群に比べて有意に少なかったが、終体重、体重増加量には有意差がなかった。また、体重増加量と飼料摂取量から算出した飼料効率にも差が認められなかった。

#### ②臓器重量と脂肪細胞のサイズと数

マウスの臓器重量をTABLE I-3に、脂肪細胞のサイズと数をTABLE I-4に示す。肝臓重量は、素材AがControlに比べて有意に低かった。後腹壁脂肪組織重量は、Controlに比べて素材A, B, Cともに蓄積が抑制される傾向にあった。特に、素材AはControlとの間に有意差が認められた。腸間膜脂肪組織重量は、素材Bでのみ有意に低下した。

後腹壁脂肪細胞のサイズは、素材A, Bが他の2群に比べて有意に小さく、次いで素材CはControlに比べて有意に小さかった。副睾丸周辺脂肪細胞のサイズは、素材Bで有意に小さかった。腸間膜脂肪細胞のサイズは、Controlとの間に各素材ともに有意差が認められなかった。

後腹壁脂肪細胞の数は素材A, BがControlに比べて有意に多かった。副睾丸周辺脂肪細胞ならびに腸間膜脂肪細胞の数はControlとの間に有意差は認められなかった。

#### ③血清生化学値

血清生化学値をTABLE I-5に示す。血清総コレステロール値は、各群間で有意差は認められなかった。血清トリグリセリド、遊離脂肪酸、グルコース濃度は、Controlと比べ、素材Bが有意に低下した。

#### ④肝臓脂質量

肝臓中の各脂質濃度をTABLE I-6に示す。肝臓全体で見ると、コレステロールおよびトリグリセリド蓄積量は、素材A, B, CともにControlに比べて有意に低くなった。

#### ⑤糞中脂質排泄量

糞中脂質をTABLE I-7に示す。総脂質排泄量は素材Aが他の群に比べて有意に多く、見かけの脂質の消化吸収率は、素材Aが他の群に比べて有意に低下した。胆汁酸排泄量も有意差はなかったが、素材Aが多い傾向にあり、中性ステロール排泄量は素材Aが他の群に比べて有意に多かった。

## 2) 実験Ⅱ：KKマウスにおける健康食品成分の併用の影響

### ①成長結果

マウスの成長結果をTABLEⅡ-2に示す。素材Aを加えた群はいずれも終体重、体重増加量、飼料摂取量において低くなる傾向にあった。終体重ならびに体重増加量は、素材AとCとの併用においてControlと有意差が認められた。しかし、飼料効率には有意差が認められず成長を大きく阻害するレベルではなかった。本結果は、実験Ⅰの素材Bの結果と一致した。

### ②臓器重量と脂肪細胞のサイズと数

マウスの臓器重量をTABLEⅡ-3に、脂肪細胞のサイズをTABLEⅡ-4に示す。肝臓重量は、各群間で差が認められなかった。

素材Aおよび素材A+Cの後腹壁脂肪組織と腸間膜脂肪組織重量は類似しており、Controlに比べて低値を示した。実験Ⅱにおいて素材Aは、有意差が検出されなかったものの、重量に差が現れた部位は後腹壁脂肪と腸間膜脂肪組織であったことは実験Ⅰと一致した。特に、素材A+Cではいずれの脂肪組織重量もControlとの間に有意差が認められた。一方、素材A+Bは、素材Aよりもいずれの組織重量も重く、Controlに近い重量であった。

脂肪細胞のサイズは副睾丸周辺脂肪細胞のサイズが素材Aと素材A+CがControlに比べて有意に小さかった。後腹壁脂肪細胞のサイズも同様の傾向にあったが、有意差が検出されたのは素材A+Cのみであった。腸間膜脂肪細胞のサイズは他部位の脂肪細胞に比べて小さく、差は認められなかった。実験ⅠおよびⅡにおいて脂肪細胞のサイズに影響が現れた部位は後腹壁脂肪組織ならびに副睾丸周辺脂肪組織であった。

脂肪細胞の数は副睾丸周辺脂肪の細胞数が素材AにおいてControlより有意に多かった。後腹壁脂肪および腸間膜脂肪の細胞数には差が認められなかった。

### ③血清生化学値およびアディポサイトカイン濃度

血清生化学値およびアディポサイトカイン濃度をTABLEⅡ-5に示す。血清コレステロール濃度は、Controlと比べ、いずれも有意差は見られなかった。血清トリグリセリド濃度においても、Controlと比べ、いずれも有意差は見られなかった。血糖値はControl群に比べ、いずれも有意差は見られなかった。血清レプチン濃度はControlに比べ、素材A+Cが有意に低かった。血清アディポネクチン濃度は、各群間にいずれも有意差は認められなかった。

### ④肝臓脂質量

肝臓脂質量をTABLEⅡ-6に示す。肝臓コレステロール量はControlと比べ、素材A+Cが有意に低く、素材Aにおいても同様の傾向が認められた。肝臓トリグリセリド量は、Controlと比べ、素材A+Cでやや低下する傾向が認められたが、いずれ

も有意差は見られなかった。肝臓トリグリセリド量については実験Ⅰと必ずしも一致しなかった。

## 3) 実験Ⅲ：KKマウスの脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす健康食品成分の影響

### ①成長結果および脂肪組織重量への影響（データ省略）

素材A, B, CをKKマウスに与えた結果、終体重、体重増加量、飼料効率は、素材AとBがControlに比べて有意に低下した。

後腹壁脂肪重量は、Controlと比べ、素材Bが有意に低く、後腹壁脂肪細胞のサイズは、素材AとBがControlに比べて有意に小さくなった。

### ②後腹壁脂肪のmRNA発現量の分析

リポタンパク質リパーゼ (LPL)、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2 (DGAT2)、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) のmRNA発現量をFigⅢ-1に示す。後腹壁脂肪組織において脂肪酸の取り込みに関わるLPLやトリグリセリド合成に関わるDGAT2には有意差が認められなかった。一方、脂肪組織中トリグリセリドの分解に関わるHSLのmRNA発現は素材Bで有意に増加した。

### ④肝臓のmRNA発現量の分析

ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ1 (DGAT1)、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2 (DGAT2)、脂肪酸合成酵素 (FAS)、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) のmRNA発現量をFigⅢ-2に示す。肝臓における脂質代謝関連酵素のmRNA発現量は各群間で有意な差は検出されなかった。VLDL分泌に関わるDGAT1のmRNA発現がControlに比べて有意に低下したが、血清トリグリセリド量に差がなかったことから肝臓からのトリグリセリド分泌に影響を与えるほどの変化ではないと考えられる。

## 4) 実験Ⅳ：KKマウスによる食物繊維の素材の評価

### ①成長結果

3種の食物繊維素材を与えたマウスの成長結果をTABLEⅣ-2に示す。素材Bは、終体重、体重増加量をもっとも高く、素材Aに比べて有意に高かったが、その他の食物繊維はControlと差がなかった。また、素材Bでは飼料効率も素材Aと比べて有意に高くなった。

### ②臓器重量と脂肪細胞のサイズと数

マウスの相対臓器重量をTABLEⅣ-3に、脂肪細胞のサイズと数をTABLEⅣ-4に示す。肝臓重量は、素材Cが素材Bに比べて有意に低かった。後腹壁脂肪組織重量は、Controlと他の素材の間で有意差はなかった。副睾丸周辺脂肪と腸間膜脂肪は素材Bで高く、前者は素材Aに比べて、後者はControlに比べて有意差があった。Controlに比べて有意差はないものの、素材Aは全般的に脂肪蓄積が抑制される傾向にあった。

副睾丸周辺脂肪細胞と腸間膜脂肪細胞のサイズは、Controlとの間に各素材ともに有意差が認められなかった。後腹壁脂肪の細胞サイズは、い

ずれの食物繊維素材でも低くなる傾向があり、B, CではControlに比べて有意に小さかった。また、皮下脂肪細胞サイズでは素材AはControlに比べて有意に小さかった。

副睪丸周辺脂肪細胞ならびに腸間膜脂肪細胞の数はControlと比べて素材A, B, Cでは高くなる傾向があり、素材Cでは有意差が認められた。腸管膜脂肪では素材AではControlに比べて有意に多かった。後腹壁脂肪細胞の数では素材CではControlに比べて有意に多かったが、他の素材では差がなかった。

### ③血清生化学値

血清生化学値をTABLEIV-5と6に示す。血清総コレステロールと遊離脂肪酸値は、各群間で有意差は認められなかった。血清トリグリセリド濃度は、Controlと比べ、素材Bが有意に高かった。

血清のレプチン濃度は、素材Bでは有意に高く、脂肪組織重量を反映していた。アディポネクチン濃度はいずれの食物繊維素材でも影響が見られなかった。

### ④肝臓脂質量

肝臓中の各脂質濃度をTABLEIV-7に示す。肝臓全体で見ると、コレステロール蓄積量は、素材A, B, CともにControlに比べて有意に低くなった。他方、トリグリセリド蓄積量は素材A, Cでは低い傾向であったが、いずれもControlに比べて有意差はなかった。

## 5) 成長期ラットによる食物繊維素材の評価

### ①成長結果

3種の食物繊維素材を与えたラットの成長結果をTABLE V-1に示す。いずれの食物繊維素材も、ラットの終体重、体重増加量には差がなかった。素材Bでは素材AやControlに比べて飼料摂取量が有意に低く、素材Aは飼料効率がやや高く、素材Cとの間に有意差があった。

### ②臓器重量と脂肪細胞のサイズと数

ラットの相対臓器重量をTABLE V-2に、脂肪細胞のサイズと数をTABLE V-3に示す。肝臓重量は、全ての食物繊維素材の間で差がなかった。また後腹壁脂肪と副睪丸周辺脂肪も群間に差がなかった。しかし、腸管膜脂肪はControlに比べて全ての食物繊維素材で有意に低下した。

副睪丸周辺脂肪細胞のサイズは素材CのみControlに比べて有意に小さくなった。後腹壁脂肪細胞のサイズは、いずれの食物繊維素材でもControlに比べて有意に小さく、皮下脂肪細胞のサイズは素材AではControlに比べて有意に小さくなった。腸間膜脂肪細胞のサイズは、Controlとの間に各素材ともに有意差が認められなかった。

副睪丸周辺脂肪細胞の数は素材A, Cでは有意に多く、後腹壁脂肪細胞の数では素材AではControlに比べて有意に多かったが、他の素材では差がなかった。腸間膜脂肪細胞の数はControlと比べていずれの素材でも差がなかった。

### ③血清生化学値

血清生化学値をTABLE V-4と5に示す。血清総コレステロール、遊離脂肪酸濃度には、各群間で有意差は認められなかった。血清トリグリセリド濃度は、Controlと比べ素材Bは有意に高かった。

血清のレプチンとアディポネクチン濃度は、いずれの素材もControlに比べて差はなかった。

### ④肝臓脂質量

肝臓中の各脂質濃度をTABLE V-6に示す。肝臓全体で見ると、コレステロール、トリグリセリド、リン脂質の蓄積量はいずれの素材もControlに比べて差がなかった。他方、濃度で見ると、トリグリセリドは素材BではControlに比べて有意に低くなった。

## 2. 抗変異原性を標榜する健康食品成分の有効性の評価

### 1) 実験I: コメットアッセイによる評価

#### ①成長結果

6種の素材を与えたマウスの成長結果をTABLEVI-2に示す。いずれの群間でも終体重、体重増加量に有意な差はみられなかったが、素材Aでの体重増加量が少ない傾向にあった。なおマウスの飼育は各群5匹を同一ケージで飼育したため、飼料摂取量は5匹の合計であり、飼料効率は算出していない。

#### ②DENによるDNA損傷を抑制する食品成分の影響

DENによって誘発したDNA損傷を抑制する食品成分の影響をFig. VI-2に示す。コントロール群に比べ、素材B, Cで約20%、素材D, Fで約10%の抑制傾向はみられたが、いずれの群間でも有意な差異は認められなかった。

### 2) 実験II: 8-OHdGの分析による評価

#### ①成長結果

6種の素材を与えたマウスの成長結果をTABLEVII-1に示す。いずれの群間でも終体重、体重増加量に有意な差はみられなかったが、素材Aでの体重増加量が少ない傾向にあった。なおマウスの飼育は各群5匹を同一ケージで飼育したため、飼料摂取量は5匹の合計であり、飼料効率は算出していない。

#### ②B[a]Pによる酸化的損傷を抑制する食品成分の影響

B[a]Pによって誘発した酸化的損傷を抑制する食品成分の影響をFig. II-1に示す。マウス肝臓における8-OHdG量は、コントロール群に比べ、素材を添加した全ての群で有意な減少が認められた。コントロール群に比べた抑制割合は、素材Dで37%、素材Cで32%、素材Eで27%、素材BとFで11%、素材Aで9%であった。

この8-OHdGを分析したマウスにおいて、昨年行った小核試験の結果をFig. II-2に示す。B[a]Pによって誘発した骨髄での染色体損傷を抑制する食品

成分の影響をみた結果、コントロール群に比べ、素材を添加した全ての群で有意な減少が認められた。コントロール群に比した抑制割合は、素材Cで78%、素材Eで73%、素材Dで71%、素材Fで69%、素材Bで65%、素材Aで47%であった。

## D. 考察

平成17年には我が国でもメタボリックシンドロームの定義が提案され、その中では内臓脂肪組織の機能低下が重視されている。そこで、昨年に引き続いて、今年度もメタボリックシンドロームに関連して肥満抑制を標榜して販売されている健康食品素材を用いて、その有効性の評価方法の検討をKKマウスを中心に行ない、あわせて成長期ラットについても検討した。

### 1) 実験 I : KKマウスによる健康食品素材の評価

素材Bは、食欲抑制作用を有するという報告があり、本実験においても飼料摂取量が有意に低かった。しかし、過食のKKマウスにおいては、その低下量は終体重や飼料効率に大きく影響するほどの抑制ではなかったと考えられる。

脂肪細胞のサイズの結果から、その影響の程度は異なるものの、本実験に用いた素材A, B, Cは、脂肪細胞の肥大化を抑制することが認められた。特に、後腹壁脂肪細胞のサイズに影響が現れやすいことが認められた。素材AおよびBにおいて後腹壁脂肪重量が少なかったのは脂肪細胞の肥大化抑制によるものと考えられる。

血清脂質の結果より、素材Bは血清トリグリセリド、遊離脂肪酸濃度を低下させた。特に遊離脂肪酸は、脂肪細胞の機能低下やインスリン抵抗性の増悪因子と考えられており、素材Bには脂肪細胞の機能低下を予防できる可能性が示唆された。特に、内臓脂肪は門脈につながっているため、内臓脂肪から放出された遊離脂肪酸は直接肝臓に流入し、高脂血症、高血糖、さらにインスリンの異化障害を起こし、インスリン抵抗性につながると考えられている。また、脂肪細胞より分泌される生理活性物質（アディポサイトカイン）が関与し、それらの産生調節異常（分泌過剰と分泌不全）がメタボリックシンドロームの病態と密接に関連することが重要なメカニズムとして注目されている。インスリン抵抗性に関与する腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やレジスチン、高血圧に関与するレプチンやアンジオテンシノーゲン、そして動脈硬化の成因に関与する血栓形成促進因子である plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) が、脂肪組織、特に内臓脂肪より過剰分泌され、メタボリックシンドロームの各因子の発症に影響することが示唆されている。本実験に用いたKKマウスのオスは、一般飼料でも生後17~18週齢で80%前後が尿糖陽性を示すが、本実験のような高脂肪の精製飼料を与えると、さらに早期に血糖

値が上昇し尿糖陽性を呈すると報告されている。血糖値の上昇は体重が35~40gを越える頃に発現することから、体脂肪の蓄積(肥満)が高血糖発症の一義的役割を果たしていると考えられている。素材Bは、他の群と比べて血清グルコース濃度(血糖値)が有意に低く、糖代謝の改善あるいはインスリン抵抗性の改善を介した機能も期待される。

肝臓脂質量の結果より、素材A, B, CにはいずれもKKマウスにおいて肝臓トリグリセリドならびにコレステロールの蓄積を抑制する作用を有することが確認された。しかし、見かけの脂質の消化吸収率、胆汁酸、中性ステロールの排泄パターンの結果より、素材Aは素材B, Cとは作用メカニズムは異なると考えられた。

素材Aにおける体脂肪蓄積抑制作用は、脂質の直接的な吸収抑制作用が主体であり、胆汁酸のミセル形成阻害などにより体内への脂質吸収を抑制し排出させる効果があると考えられる。それは、本結果での糞中総脂質排泄量の増加と消化吸収率の低下が見られたことから明らかである。素材Aの脂質排泄作用として、水に可溶であるため高粘性となり、胆汁酸と脂肪のミセル化ならびにそれに続く消化吸収を抑制する作用が考えられる。

素材Bは、グルコースの代謝やインスリンの抵抗性を改善し、糖尿病の改善、糖尿病合併症の予防改善が期待できると考えられている。また、骨格の筋組織でAMPKを活性化させて、インスリン感受性をよくする作用があると報告されている。素材Bを0.5%飼料に添加し、糖尿病モデルのOLETFラットに投与した結果、糖尿病発症を抑制したという報告があり、本実験ではこの添加量を採用した。血清脂質量、肝臓脂質量、脂肪重量および脂肪細胞のサイズは、すべて低下した。したがって、KKマウスを用いた本評価系は素材Bのような性質の素材を感度良く評価できると考えられる。しかしながら、近年本素材を用いたサプリメントでインスリン自己免疫症候群になったという症例がいくつか報告されており、ある遺伝的素因がある場合や疾病の治療中の服用は注意が必要であると考えられる。

素材Cには、血圧降下作用や、血清トリグリセリド低下作用、抗アレルギー作用などが報告されている。本実験では、低マグネシウム食を用いたラットの実験で脂質代謝に改善が見られたという添加量を採用した。本実験では、後腹壁脂肪細胞のサイズならびに肝臓脂質などの蓄積脂肪には有効性が認められたが、血清生化学値には有効性は認められなかった。本結果の違いは、過食により糖尿病になるKKマウスの特性かもしれない。

以上の結果より、効果の現れやすさには違いはあるものの、素材A, B, CはKKマウスにおいて肝臓脂質の蓄積抑制ならびに脂肪細胞の肥大化を抑制する作用が認められた。しかし、それぞれの作用機序は異なると考えられ、吸収抑制、摂食抑

制、脂肪分解促進、脂肪合成抑制作用が複数関与しているものと考えられ、メカニズムの更なる検索がヒトへの適用に向けて必要である。特に、素材B,Cなどのような吸収されて代謝に影響を及ぼす成分の場合はさらなる検討が必要である。

## 2) 実験II：KKマウスにおける健康食品成分の併用の影響

本実験では、マウスの各脂肪細胞重量とサイズにおいて、素材Aは重量を減少させ、サイズを縮小させた。特に、素材Cとの併用によりその効果が明確になった。しかし、素材Bと併用したことによって、素材A単独で摂取した場合や素材Cと併用した場合よりも脂肪細胞の重量が増加しサイズも肥大した。素材Bは、筋肉がエネルギー源としてATPを使い高エネルギーを必要とする時には直接ATP供給に関与する。そのため、利用可能なエネルギー源を増加させることが期待される。しかし本実験では、素材Bとの併用により逆効果となった。

アディポサイトカインとは、脂肪組織由来内分泌因子の総称である。アディポサイトカインは、何らかの生理的作用を有し、恒常性の維持に関わるが、肥満時、つまり脂肪蓄積状態においては、その産生・分泌が過剰あるいは過小となり、このバランスの破綻が生活習慣病などの発症・進展に深く関与することが明らかになってきている。レプチンは、脂肪蓄積とともに脂肪細胞より分泌される。その作用は主に視床下部食欲中枢に作用して、食欲の抑制作用、エネルギー消費増強作用を介して、体重を減少させる。レプチンの濃度は脂肪量と関係しており、脂肪量が多いほどレプチン量も多くなる。本実験結果では、レプチン濃度はControlと比較して素材A+Cが有意に低かった。これは脂肪組織重量やサイズの結果と一致する。一方、アディポネクチンは脂肪組織に特異的に発現した遺伝子の産物であるアディポサイトカインである。アディポネクチンは血中に高濃度に存在し、肥満者や男性において低下し、減量によって増加する。これまで、血中アディポネクチンの総量を測定することが、その時のインスリン抵抗性やメタボリックシンドロームと強く相関すること、また血中アディポネクチンの総量が低いことが、将来の糖尿病発症の最も強い予測因子となることが報告されている。しかし、本実験では有意差は認められなかった。したがって、KKマウスを用いた2ヶ月程度の飼育期間での評価において、レプチンは脂肪組織重量またはサイズを反映するが、肥満に見られるレプチン抵抗性までは至っていないと考えられる。同様に、この実験系においてアディポネクチンが低下するほどの脂肪細胞の機能低下は起こっていないと考えられる。ヒトにおいて有用とされるアディポサイトカインの指標をKKマウスに適用する場合にはさらなる実験条件の検討が必要であろう。

肝臓脂質の結果から、素材Aを投与した群でコ

レステロール量が減少した。特に素材A+Cを併用した群でさらにその値は減少した。またトリグリセリド量においても同様の傾向が見られたが個体差が大きく有意差は認められなかった。一方、血清脂質については実験Iと一貫した結果は得られなかった。

以上の結果から、素材AにはKKマウスの腹腔内脂肪蓄積抑制効果があることが実験I、IIの結果より推定されたが、素材Cとの併用によりその効果が明確になることが認められた。しかし、この作用は相乗的な作用なのか素材Cが促進因子として働くのかは本結果のみでは判断できない。また、効果がより明確になることは、毒性の作用量を変化させる可能性もあり、本結果は慎重に検討する必要がある。一方、素材Bを併用すると素材Aの脂肪蓄積抑制効果が減弱したことから、素材Bは素材Aの作用を腸管吸収あるいは代謝レベルで阻害または拮抗した可能性が考えられる。

素材Aは、実験Iでは、脂肪組織に作用し内臓脂肪の蓄積抑制ならびに脂肪細胞の肥大化抑制が認められた。3週齢のWister系雄ラットに素材Aを投与した実験では、安静時エネルギー代謝の促進効果が確認されている。また、SD系雄ラットに素材A無添加食あるいは添加食(0.1、0.25および0.5%)を与えた実験では、素材Aに脂質低下作用があることが明らかとなっている。これは、血清インスリン濃度低下に基づく、肝臓での脂肪酸合成低下に起因すると推定されている。また、素材Aの血糖低下作用に血清アディポネクチン濃度上昇に伴う、組織でのグルコース消費増加が関与している可能性があるとしている。一方、素材Bは、主に骨格筋に含まれており、体内のエネルギー産出に主な役割を果たし、体内で高エネルギー分子のリン酸化合物に転換される。男性被験者に、素材B(20g)を摂取させた群、素材B(20g)とスクロース(100g)を摂取させた群、素材B(20g)とスクロース(100g)、素材A(1000mg)を摂取させた群に分けて行った実験では、素材Bとスクロース、または素材Bのみを摂取した場合と比較して素材Bを少量のスクロースと素材Aと共に摂取すると、筋肉中の素材B濃度が上昇するという結果が報告されている。このことから本実験においても併用効果が期待されたが、反する結果となった。

また、素材Cは、生体内においてミトコンドリアでのエネルギー産生に関与する補酵素で、生体には必須の因子である。さらに、エネルギーを供給する働きに加えて、強力な抗酸化作用を持っている。素材Cとカルニチンをマウスに併用投与した実験においては、体重増加抑制が観察され、「脂肪酸合成経路抑制」及び「電子伝達系上昇」に寄与する遺伝子発現に影響を及ぼし、同時摂取による相乗効果の存在が示唆されている。また、アポリポたんぱく質E遺伝子ノックアウトマウスに素材C(0.5%)を投与した群、ビタミンE(0.



2%)を投与した群、二つを同時に与えた群に分けて行った実験では、二つを同時に与えた群により高い抗アテローム効果があったという報告がある。本実験では、素材Aと素材Cとの併用投与により脂肪重量、脂肪のサイズ、アディポサイトカイン、肝臓脂質に対し大きな影響を与えた。素材A、素材Cともに強い抗酸化力を持つためにこの抗酸化力がマウスの体脂肪蓄積に影響を与えた可能性がある。しかし、本実験では素材Cがどのようなメカニズムで素材Aの作用を高めたのか明らかではない。

いわゆる健康食品市場を見ると、その素材を単独で摂取することはまれである。最近では、すでにいくつかのいわゆる健康食品素材を組み合わせられて売られているものも少なくない。しかし、本実験で明らかになったように、複数の素材を組み合わせることにより効果が強まることもあるが、逆にその効果が阻害されてしまうこともあるため、安全性も含めて考えると安易に組み合わせることには注意を要する。

### 3) 実験Ⅲ：KKマウスの脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす健康食品成分の影響

後腹壁脂肪組織ならびに肝臓の脂質代謝関連酵素のmRNA発現の解析結果より、素材Bは脂肪組織のHSL発現量を増加させることによりHSLの酵素量および活性が上昇し、脂肪の分解が亢進した結果、組織重量の低下および肥大化を抑制した可能性が示唆された。素材Bは、ラットを用いた実験においても脂質代謝関連遺伝子の発現を介して肝臓の脂質代謝を改善することが報告されている。素材Aは昨年報告したように、脂質の吸収抑制を介して、肝臓および脂肪組織に影響を及ぼしており、そのような場合にはKKマウスの脂質代謝関連酵素のmRNA発現には影響を及ぼさないことが認められた。素材Cは肝臓、脂肪組織において有効性が認められず、mRNA発現においても影響はなかった。

一方、肝臓の脂質代謝関連酵素のmRNA発現は今回の素材ではあまり変化していないことが認められた。しかし、実験Ⅰ、Ⅱで見られたように肝臓や血清脂質の応答はKKマウスにおいて一致しない部分もあり、実験条件の検討が必要かもしれない。また、今回の相対比較はいずれもKKマウス間での比較であった。データには示さないが、C57BL/6JをControlとしてKKマウスを比較すると、脂質合成に関わるmRNA発現が約10倍に増加していた。したがって、KKマウスは脂質合成が亢進したモデル動物であると言える。

以上の結果より、素材のメカニズム評価には肝臓ならびに脂肪組織の脂質代謝関連遺伝子のmRNAの発現を調べることでメカニズムの絞り込みにも有用であると考えられた。しかし、1系統のマウスでは種特異性も考えられることから、高脂肪食を投与した通常マウスとの比較も必要であると考えられる。

### 4) 食物繊維素材の評価におけるKKマウスと成長期ラットの比較

これまで食物繊維については、多くの素材が血清脂質改善や血糖値改善の効果が報告されてきたが、瘦身効果に関しては実験Ⅳや2)の実験に用いた素材Cについて食事脂質の吸収抑制による効果が示されているに過ぎなかった。素材Cを用いた市販のいわゆる健康食品では、試験管内での素材Cによる脂質の吸着を根拠にしており、科学的な評価はされていなかった。他方、食物繊維は同じ多糖類の中で消化吸収されやすいデンプンなどと比較してエネルギーが低いところから、ダイエット効果が標榜されることもあった。

これまで食物繊維で観察されてきた血清脂質や血糖値改善効果は、メタボリックシンドロームとの関係を示唆するものであった。また、池上は有機塩素系環境汚染物質の代謝との関連で、ある種の食物繊維が、脂肪組織縮小効果のあることを報告してきた。そこで、食物繊維をメタボリックシンドローム対応素材としての有効性を評価することを中心として検討した。

昨年度の実験では成長期ラットを用いて食物繊維素材の有効性を評価することを試み、特に水溶性で粘性のある食物繊維と不溶性であるが、脂質吸着作用のある素材では脂肪組織の重量が低く、脂肪細胞のサイズ低下を示し、成長期ラットでの評価法として有効性も示した。この実験では飼育期間は3週間であり、さらに長期の飼育の有効性を評価した。その結果、むしろ長期飼育は結果が不明確になることが分かった。おそらく、成長初期では脂肪組織への脂肪の蓄積が急速に進むために、食物繊維素材の効果がより鮮明に現れるのかもしれない。他方、長期飼育での食物繊維の効果の不鮮明さは、正常ラットでは脂肪組織への脂肪の蓄積は正常な過程であり、当然であるのかもしれない。しかし、成長期ラットで今年度測定した腸間膜脂肪組織に対する食物繊維の効果が顕著に表れた。

遺伝的に肥満を惹起するKKマウスを用いて、成長期ラットと同じ素材で比較検討した。その結果、成長期ラットより、KKマウスでの効果はさらに不明確であった。とくに、比較的粘性の低い食物繊維素材Bでは、むしろ脂肪組織重量がもっとも重く、血中トリグリセリドも高くなった。この理由については今後さらに検討する必要があると思われる。食物繊維素材によっては、むしろ脂肪蓄積の亢進があるかもしれない。

実験ⅠからⅢまではKKマウスを高脂肪食で飼育している。実験Ⅳでは飼料中の脂肪含量は正常条件とした。飼料中の脂肪含量の実験結果に影響する可能性も考えられる。

本研究では脂肪細胞サイズの測定という方法を用いた。この方法は、メタボリックシンドロームが脂肪細胞の成熟という過程と大きく関わっているところから評価法として有効なものであ

ると考えられる。このサイズを基に、脂肪組織の細胞数を数式で表す方法が提案されている。これを用いて、各脂肪組織の細胞数を算出したが、結果に一貫性がなく、この方法の検討も課題である。また、脂肪組織の種類によって、素材の影響の現れ方に違いがみられ、これらも今後の課題である。現在、体内の脂肪組織ではいわゆる内臓脂肪とされる腸間膜脂肪が注目される場所であるが、その他の脂肪組織にもいわゆる健康食品素材の効果がみられるところから、各脂肪組織の機能に関しても検討が必要である。

## 5) 人における評価との関連

これまでに検討した動物を用いた痩身や脂質代謝、あるいはメタボリックシンドロームへの効果が標榜されるいわゆる健康食品素材の評価法は、これまでの方法に比べてさらに進んだ評価法であると考えられる。

他方、いわゆる健康食品においても人での効果や安全性の確認が必要である。動物実験による評価がまずしっかりと行われてから、人での確認に進むべきである。現状では基礎になる動物実験による方法すら確立していないものが多い。

人での評価は該当する食品によって、綿密な研究計画を構築して、二重盲検法によって行われるべきである。その場合の体重や脂肪組織への影響を評価する測定方法としては、機器を用いて精度高く行われる場合と、比較的簡便な方法によるものがある。こられは次の様に整理できる。

### (1) 機器による計測評価

#### ① 水中体重による評価

体密度の測定は全身の脂肪量の測定として利用される。この方法の代表的なものは水中体重測定であるが、装置が必要であり、被験者の対応によっても測定値に影響がでる。また、メタボリックシンドロームの様な体内脂肪の分布が重要である場合には、この方法では把握が困難である。

#### ② DEXA(Dual-energy X-ray absorptiometry)による評価

低エネルギーのX線を利用して、骨密度が測定されているが、同時に脂肪組織と活性組織を識別して測定することによって体脂肪量が評価できる。

#### ③ アイソトープ法による評価

全身のカリウムアイソトープの放射能測定によって体水分を測定し、体脂肪を間接的に知ることができる。<sup>40</sup>K以外に重水(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O)、NaBrなども利用される。

#### ④ インピーダンス法による評価

組織によって電気抵抗が異なることを利用した方法で、水分量やその分布、脂肪量が算出される。

#### ⑤ CTやNMRによる評価

CT(Computerised tomography)やNMRによる方法では、体脂肪の分布を測定することができる。この方法が望ましいが、測定機器は高価であり、

簡単に使えるものではない。

### (2) 簡便な計測評価

#### ① 体重、BMIによる評価

素材や食品そのものの効果を判定する方法としては体重やBMIから判定するのはもっとも簡便な方法である。しかし、メタボリックシンドロームの様な脂肪分布が重要である場合には、正確な把握はできない。

#### ② 皮脂厚測定

腕や背中中の皮脂厚を測定することで皮下脂肪の厚さが測定できるが、メタボリックシンドロームには適さない。

#### ⑤ ウエスト周囲径、ウエスト/ヒップ比による評価

ウエスト周囲径のみの測定より、ウエスト/ヒップとの比で求める方がより内臓脂肪の蓄積状況が把握できる。

## 6) 抗変異原性を標榜する健康食品成分の有効性の評価

本年度は抗酸化食品成分の有効性を、抗変異原性の面から評価する試験系を構築することを目的として実験を行った。食品成分の抗変異原性は、DNA損傷誘発の抑制作用によって評価した。

代表的な変異原性試験には、遺伝子突然変異を指標とする試験(*Salmonella typhimurium*を用いるAmes試験など)、染色体損傷を指標とする試験(げっ歯類を用いる小核試験など)、DNA損傷を指標とする試験(動物組織や培養細胞を用いるコメットアッセイなど)がある。これらの試験法を応用し、平成16年度はAmes試験を抗変異原性試験として利用するための実験条件を検討し、*Salmonella typhimurium*に誘発される遺伝子突然変異を、ある食品素材が抑制する効果を解析した。抑制効果の評価には、菌株として用いた数種の*Salmonella typhimurium*の性質(8-OH-G除去修復能欠損株、DNA除去修復能欠損株)を参考にした。近年、ヒトS9を用いるAmes試験も開発されているが、Ames試験は*Salmonella typhimurium*を用いる*in vitro*試験であるため、食品素材の抗変異原性評価ためのスクリーニング法としては有用であるが、ヒトへの評価には直接利用できない。平成17年度は、さらに多くの食品素材を用い、*Salmonella typhimurium*に誘発される遺伝子突然変異の抑制効果を解析した。これらの結果を元に、酸化的DNA損傷、およびDNA付加体による損傷の誘発を抑制する食品素材6種を選び、ICRマウスによる*in vivo*小核試験に用いた。その結果、飼料に添加した食品素材6種は、B[a]Pによって誘発したマウス骨髄における染色体損傷を有意に抑制させた。平成18年度は小核試験と同様の飼料を与えたマウスを用い、単一細胞レベルにおけるDNA損傷を検出する*in vivo*コメットアッセイを行った。その結果、飼料に

添加した食品素材の1部で、DENによって誘発したマウス肝臓におけるDNA損傷を抑制する傾向がみられた。 comet assayは投与する物質の種類によって、多臓器への変異原性を評価することが可能な試験法であるが、今回用いた食品素材の影響を鋭敏に評価することはできなかった。一方、平成17年度の小核試験に用いたマウス肝臓の8-OHdGを分析した結果、食品素材を与えた全ての群で8-OHdGの有意な低下が認められた。以上の結果より、マウス骨髄での染色体損傷の指標となる小核試験の結果は、肝臓の8-OHdGの結果と連動していることが示唆された。林らによって開発された末梢血を用いる小核試験は、ラットと異なりマウスでは小核をもつ幼若赤血球が異常赤血球として脾臓で破壊されることなく、末梢血に蓄積されることを利用したものである。また、小核をもつ赤血球も正常な赤血球と同様の寿命をもつことから、化学物質の慢性的な影響を評価できる試験系として期待されているという。なお、素材Aにおける小核数と8-OHdG分析値は、他の素材を添加した群に比べ、抑制割合が最も少なかったが、これだけでは小核数と抗変異原性の強さは判定できない。今回は小核誘発物質として、焙焼食品やタバコの煙、排気ガスなど環境中に広く存在する発がん物質であるB[a]Pを用いた。B[a]P自身にはDNAに対する反応性はないが、肝臓の薬物代謝酵素P-450(CYP)1A1によって代謝を受けると発がん性を示すようになる。また、活性化されたB[a]Pは、*Salmonella typhimurium*にDNA付加体を形成すると同時に活性酸素を生じさせ、遺伝子突然変異を誘発するという報告がある。本研究で行った小核試験、および8-OHdGの分析により、用いた食品素材が抗酸化能を介して抗変異原性を示したことが示唆された。

以上の結果より、ヒトへの応用が可能な抗変異原性試験としては、肝臓での8-OHdG分析値と関連性を示した小核試験が最も簡便で有用な方法であることが示唆された。なお、尿中の8-OHdGが体内での酸化ストレスを反映するという報告もあるので、今後検討する必要があると思われる。

なお、我が国では、がん予防効果を食品では標榜することはできないので、本研究では、採用した方法との関連から、抗変異原性として表記した。

現在我が国において、保健機能食品の中で抗酸化作用の表示が許可されているものは、栄養機能食品のうち以下の2つである。すなわち、「ビタミンCは皮膚や粘膜の健康維持を助けるとともに抗酸化作用をもつ栄養素です」と「ビタミンEは、抗酸化作用により、体内の脂質を酸化から守り、細胞の健康維持を助ける栄養素です」である。一方、2005年2月に厚生労働省令で改正された特定保健用食品制度の中では、条件付き・規格基準型・疾病リスク低減表

示のいずれにおいても、がん予防効果はもちろん、「抗酸化作用」の表示を認めたものもない。現在、疾病リスク低減表示を認める候補としては、「カルシウムと骨粗鬆症」と「葉酸と神経管閉鎖障害」の2つだけである。

他方アメリカでは、FDAが定める健康強調表示として、1990年に制定された栄養表示教育法(NLEA)に基づく13項目の疾病リスク低減表示(ヘルスクレーム)がある。このうち脂肪、繊維を含む穀類・果物・野菜、果物・野菜(脂肪が低く、V. A、V. C、繊維を一つ以上含む)の3項目については、がんに関する科学的根拠があるとされ、ヘルスクレームが認められている。また、疾病リスク低減表示の規制緩和の一環として条件付きヘルスクレーム(Qualified Health Claims)が2003年9月から運用され、8種類の評価結果が公表されている。このうち、セレン、抗酸化ビタミンについては、例えば「ある種のがんのリスクを低減する可能性を示唆する科学的根拠はあるが、FDAでは根拠が限定的であり確立されていないと判断する」などの評価結果が公表されている。さらに現在、緑茶、カルシウム、大豆タンパク、リコペン・トマトとがんとの新たな条件付きヘルスクレームについて評価が検討されているとのことであり、「がんの化学予防」に関する科学的根拠を積極的に利用しようとする傾向が伺える。

## E. 結論

### 1) メタボリックシンドロームに関連した肥満・脂質代謝に関与する健康食品成分の有効性の評価法について

実験動物は、過食で腹腔内脂肪を蓄積しやすいKKマウスを使用することで肥満抑制効果の評価が可能であった。しかし、血清生化学値の変動は通常マウスとは異なるため通常マウスでの比較も必要である。

食物繊維素材を用いた評価では成長期ラットを用いることで、KKマウスより明確に評価することができた。この場合はむしろ腸間膜脂肪組織に有意な影響が観察された。従って、メタボリックシンドロームと関連した脂肪組織の動態を観察する場合には成長期ラットを用いる方法がすぐれている場合もある。この理由としては、いわゆる健康食品素材では、消化管を介して効果を発揮する場合には腸間膜脂肪に影響がしやすいのかもしれない。

他方、KKマウスではいわゆる健康食品素材は後腹壁脂肪(腎周囲脂肪+後腹壁脂肪)に影響が現れやすく、脂肪細胞のサイズを直接測定することにより評価が可能であった。この理由としては、体内の脂肪組織や肝臓での影響を介する様な素材での影響の可能性が考えられる。

今回用いた評価系では血清レプチン濃度と相関する場合がある。しかし、2ヶ月程度の飼育では脂肪細胞の機能低下までは至らず、アディポネクチン濃度の変化はもたらさない。

血清脂質、肝臓脂質のパターンから脂質代謝への影響をある程度評価することは可能であるが、KKマウスの場合には血糖値をモニターする必要がある。さらに消化吸収に影響を及ぼす素材の場合には糞中排泄量を測定することでより明確になる。血液、肝臓脂質の代謝ならびに出納実験を中心に調べる場合にはKKマウス以外のモデルマウスあるいはラットの方が有用であるかもしれない。

代謝調節機構を絞り込む方法として脂質代謝関連酵素の遺伝子発現を網羅的に調べることでよりメカニズムを知る上での手がかりが得られる。

いずれにしても、これらの結果はメタボリックシンドロームに関連した肥満や脂質代謝へのいわゆる健康食品の評価は複数の評価系で確認することが必要かもしれないことを示している。

## 2) メタボリックシンドロームに関連した肥満・脂質代謝に関与する健康食品成分の有効性の評価

### (1) KKマウスを用いた場合

腹腔内脂肪蓄積を起こしやすいKKマウスに食品素材を単独あるいは併用で高脂肪食に添加して給餌し、腹腔内脂肪組織ならびに脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

#### 【実験Ⅰ】

素材A, B, Cはともに脂肪細胞の肥大化を抑制する作用を有することが認められた。特に素材Aは腹腔内脂肪蓄積を抑制した。肝臓脂質蓄積についても同様の結果が得られた。素材Aは、胆汁酸排泄促進による食餌性脂質の吸収抑制を主体とした作用であった。本作用は血清遊離脂肪酸、トリグリセリドにも反映された。抗酸化成分である素材BおよびCは脂質の消化吸収には影響を与えず、肝臓ならびに脂肪組織の代謝に作用したと考えられた。

#### 【実験Ⅱ】

素材AとCを併用すると体脂肪蓄積抑制効果はより明確となった(促進作用)。素材AとBを併用すると、体脂肪蓄積抑制効果は阻害された(抑制作用)。健康食品素材の併用は効果を促進する場合と阻害する場合が存在する可能性が示唆された。安全性と有効性の基礎的検証なしに併用すべきでないと考えられる。

#### 【実験Ⅲ】

素材Aは食餌性脂質の吸収抑制を主体とした作用であり、遺伝子発現レベルでの調節は認められなかった。素材Bは、食餌性脂質の吸収には影響を与えず、ホルモン感受性リパーゼの遺伝子発現を亢進したことから、脂肪組織の代謝に遺伝子レ

ベルで作用した可能性がある。素材Cは、VLDLの分泌に関与するジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ1の発現量を減少させたが、血清脂質、肝臓脂質量に影響がなかったことから影響は小さいと考えられた。

#### 【実験Ⅳ】

3種の食物繊維素材については、素材Aが脂肪組織重量や細胞サイズを抑制する傾向が認められたが、その効果は有意ではなかった。他方、素材Cではむしろ脂肪組織重量を高める傾向がみられた。恐らく素材Cは消化管における消化・吸収を高めるように作用した可能性が考えられる。

### (2) 正常成長期ラットを用いた場合

実験Ⅳと同じ食物繊維素材を用いて、正常・成長期ラットを用いた実験では、その結果は実験ⅣのKKマウスによる結果とは異なっていた。成長期ラットでは食物繊維の効果は腸間膜脂肪に明確に現れ、いずれの素材も腸間膜脂肪組織重量を有意に低下させた。脂肪細胞のサイズは後腹壁脂肪では有意に低下した。KKマウスによる結果との差異の理由は明確ではないが、食物繊維の作用点と用いた動物の代謝系の違いが影響しているものと考えられる。

### 3) 抗変異原性試験による健康食品成分の評価

抗変異原性試験として、マウスの末梢血を用い、骨髄での染色体損傷を評価する小核試験を行った。骨髄は生体防御において重要な役割をもつため、骨髄細胞の染色体損傷は生体にとって重要な影響があると考えられている。従って小核試験は、食品成分の抗変異原性を評価する簡便な方法として最も有効であることが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

青江誠一郎、加藤美智子、堀口美恵子、池上幸江：KKマウスの内臓脂肪蓄積に及ぼす食品素材の影響、第60回日本栄養食糧学会、静岡、2006. 5. 19-21

池上幸江、山岸あづみ、飯塚元美、岡本奈津子、原瀬里美、堀口美恵子、青江氏一郎：ラット脂肪組織に対する食物繊維素材の影響、第60回日本栄養食糧学会、静岡、2006. 5. 19-21

加藤美智子、堀口美恵子、池上幸江、青江誠一郎：KKマウスの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす食品素材の影響、第61回日本栄養食糧学会、京都、2007. 5. 18-20

堀口美恵子、石橋澄子、青江誠一郎、池上幸江：Ames試験による食品成分のDNA損傷抑制効果の評価、第58回日本家政学会大会、秋田、2006.5.27-28

堀口美恵子、石橋澄子、中山陽子、青江誠一郎、池  
上幸江:Evaluation of the inhibitory effects of food  
components on benzo[a]pyrene induced  
chromosomal aberration、第 35 回日本環境変異原学  
会大会、大阪、2006.11.20-21

Table I-1 Composition of the test diet

	Control	Material A	Material B	Material C
Casein	200	200	200	200
L-cystine	3	3	3	3
Corn starch	329.486	323.486	324.526	319.486
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70
Lard	200	200	200	200
Cellulose	50	—	50	50
Material A	—	56	—	—
Material B	—	—	5	—
Material C	—	—	—	10
Mineral mixture(AIN-93G)	35	35	35	35
Vitamin mixture(AIN-93)	10	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
t-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014

TABLE I-2 Body weight, food intake, and food efficiency in KK mice.

	Control	Material A	Material B	Material C
Initial weight (g)	24.3 ± 1.2	24.2 ± 1.1	24.1 ± 1.3	24.1 ± 1.2
Final weight (g)	43.3 ± 2.7	41.8 ± 3.8	38.9 ± 2.0	42.3 ± 3.9
Weight gain (g/day)	0.34 ± 0.05	0.32 ± 0.07	0.27 ± 0.02	0.33 ± 0.06
Food intake (g/day)	3.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.4 <sup>a</sup>
Food efficiency (%)	9.0 ± 0.8	8.6 ± 1.3	8.6 ± 0.8	8.7 ± 1.0

Values are mean ± SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p < 0.05).

TABLE I-3 Weight of liver and adipose tissues in KK mice.

	Control	Material A	Material B	Material C
Liver(g)	2.33 ± 0.46 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.34 <sup>b</sup>	1.94 ± 0.20 <sup>ab</sup>	2.00 ± 0.40 <sup>ab</sup>
Epididymal fat(g)	1.44 ± 0.03	1.46 ± 0.17	1.25 ± 0.18	1.43 ± 0.19
Retroperitoneal fat (g)	0.73 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.62 ± 0.13 <sup>ab</sup>
Mesenteric fat (g)	1.09 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.89 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.16 <sup>ab</sup>

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0

TABLE I-4 Adipose tissue parameters in KK mice.

	Control	Material A	Material B	Material C
Epididymal fat cell size(μm)	94.7 ± 7.4 <sup>ac</sup>	88.3 ± 6.0 <sup>bc</sup>	85.1 ± 4.0 <sup>b</sup>	100.0 ± 6.1 <sup>c</sup>
Retroperitoneal fat cell size(μm)	90.9 ± 4.9 <sup>a</sup>	71.5 ± 5.1 <sup>b</sup>	70.2 ± 4.5 <sup>b</sup>	83.0 ± 5.2 <sup>c</sup>
Mesenteric fat cell size(μm)	62.0 ± 3.2 <sup>ab</sup>	60.7 ± 5.3 <sup>a</sup>	55.8 ± 6.9 <sup>a</sup>	69.0 ± 7.5 <sup>b</sup>
Epididymal fat cell number(×10 <sup>6</sup> )	3.52 ± 0.71 <sup>ab</sup>	4.33 ± 0.75 <sup>a</sup>	4.10 ± 0.65 <sup>a</sup>	2.90 ± 0.48 <sup>b</sup>
Retroperitoneal fat cell number(×10 <sup>6</sup> )	1.99 ± 0.37 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.70 <sup>bc</sup>	3.57 ± 1.26 <sup>b</sup>	2.25 ± 0.69 <sup>ac</sup>
Mesenteric fat cell number(×10 <sup>6</sup> )	9.25 ± 1.33 <sup>ab</sup>	9.31 ± 1.96 <sup>ab</sup>	10.98 ± 3.54 <sup>a</sup>	6.63 ± 1.37 <sup>b</sup>

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).

TABLE I-5 Serum chemistry in KK mice.

	Control	Material A	Material B	Material C
Total cholesterol (mg/dl)	143 ± 16	146 ± 18	131 ± 13	146 ± 11
Triglyceride (mg/dl)	231 ± 21 <sup>a</sup>	215 ± 24 <sup>a</sup>	121 ± 25 <sup>b</sup>	229 ± 26 <sup>a</sup>
NEFA(mEq/l)	0.56 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.03 <sup>a</sup>
Glucose(mg/dl)	400 ± 54 <sup>a</sup>	346 ± 26 <sup>a</sup>	272 ± 34 <sup>b</sup>	350 ± 40 <sup>a</sup>

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).

TABLE I-6 Liver lipid levels in KK mice.

	Control	Material A	Material B	Material C
Cholesterol (mg/g liver)	7.6 ± 3.3 <sup>a</sup>	4.6 ± 1.7 <sup>ab</sup>	2.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.9 ± 2.1 <sup>ab</sup>
(mg/liver)	14.8 ± 8.1 <sup>a</sup>	6.9 ± 3.1 <sup>b</sup>	3.4 ± 1.5 <sup>b</sup>	7.3 ± 3.1 <sup>b</sup>
Triglyceride (mg/g liver)	86.6 ± 13.7 <sup>a</sup>	61.7 ± 15.6 <sup>b</sup>	59.8 ± 21.5 <sup>b</sup>	66.0 ± 17.6 <sup>ab</sup>
(mg/liver)	160.7 ± 47.7 <sup>a</sup>	91.1 ± 30.7 <sup>b</sup>	79.8 ± 40.1 <sup>b</sup>	101.2 ± 39.7 <sup>b</sup>

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).

TABLE I-7 Fecal excretion of total lipids, bile acids and neutral sterols in KK mice.

	Control	Material A	Material B	Material C
Dietary fat intake (mg/day)	732 ± 71 <sup>a</sup>	730 ± 97 <sup>a</sup>	576 ± 72 <sup>b</sup>	732 ± 160 <sup>a</sup>
Fecal excretion of total lipids (mg/day)	14.6 ± 4.6 <sup>a</sup>	79.8 ± 31.6 <sup>b</sup>	13.6 ± 7.8 <sup>a</sup>	24.0 ± 9.2 <sup>a</sup>
Apparent absorption rate of lipids (%)	98.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	89.0 ± 4.0 <sup>b</sup>	97.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	96.7 ± 1.2 <sup>a</sup>
Fecal excretion of bile acids(μmol/day)	0.67 ± 0.24 <sup>ab</sup>	0.88 ± 0.32 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.19 <sup>ab</sup>	0.35 ± 0.12 <sup>a</sup>
Fecal excretion of neutral sterols(mg/day)	0.56 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.09 <sup>d</sup>	0.30 ± 0.14 <sup>bc</sup>	0.45 ± 0.19 <sup>ac</sup>

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).



Table II-1 Composition of the test diet

(g/kg diet)

	Control	Material A	Material A + Material B	Material A + Material C
Casein	200	200	179	200
L-cystine	3	3	3	3
Corn starch	197.486	192.486	203.486	190.486
α -Corn starch	132	132	132	132
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70
Lard	200	200	200	200
Cellulose	50	50	50	50
Material A	—	5	5	5
Material A + Material B	—	—	10	—
Material A + Material C	—	—	—	2
Mineral mixture(AIN-93G)	35	35	35	35
Vitamin mixture(AIN-93)	10	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
t-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014

Table II-2 Body weight, food intake, and food efficiency in KK mice.

	Control	Material A	Material A + Material B	Material A + Material C
Initial weight (g)	19.6 ± 0.7	19.7 ± 1.0	19.6 ± 0.8	19.6 ± 1.0
Final weight (g)	38.5 ± 2.4 <sup>a</sup>	36.3 ± 2.0 <sup>ab</sup>	35.9 ± 2.2 <sup>ab</sup>	34.1 ± 3.1 <sup>b</sup>
Weight gain (g/day)	0.37 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.32 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.29 ± 0.06 <sup>b</sup>
Food intake (g/day)	3.2 ± 0.3	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.2
Food efficiency (%)	11.6 ± 1.6	11.0 ± 0.4	11.0 ± 1.0	9.9 ± 1.4

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p&lt;0.05).

Table II-3 Weight of liver and adipose tissues in KK mice.

	Control	Material A	Material A + Material B	Material A + Material C
Liver(g)	1.75 ± 0.33	1.63 ± 0.32	1.65 ± 0.33	1.46 ± 0.19
Epididymal fat(g)	1.33 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.32 <sup>ab</sup>	1.22 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.31 <sup>b</sup>
Retroperitoneal fat (g)	0.76 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.66 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.54 ± 0.18 <sup>b</sup>
Mesenteric fat (g)	0.96 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.23 <sup>ab</sup>	0.85 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.65 ± 0.23 <sup>b</sup>

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).

Table II-4 Adipose tissue parameters in KK mice.

	Control	Material A	Material A + Material B	Material A + Material C
Epididymal fat cell size(μm)	104.7 ± 5.3 <sup>ac</sup>	91.6 ± 9.5 <sup>b</sup>	106.9 ± 5.8 <sup>a</sup>	94.2 ± 9.6 <sup>bc</sup>
Retroperitoneal fat cell size(μm)	106.5 ± 9.4 <sup>a</sup>	94.1 ± 13.3 <sup>ab</sup>	97.8 ± 6.9 <sup>ab</sup>	84.8 ± 15.9 <sup>b</sup>
Mesenteric fat cell size(μm)	77.7 ± 8.3	71.5 ± 10.7	79.7 ± 4.3	67.9 ± 11.8
Epididymal fat cell number (×10 <sup>6</sup> )	3.06 ± 0.53 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.80 <sup>b</sup>	2.75 ± 0.69 <sup>a</sup>	3.67 ± 1.16 <sup>ab</sup>
Retroperitoneal fat cell number (×10 <sup>6</sup> )	2.35 ± 0.54	2.67 ± 0.67	2.68 ± 0.52	2.63 ± 0.58
Mesenteric fat cell number (×10 <sup>6</sup> )	3.55 ± 1.76	3.24 ± 1.58	2.67 ± 0.65	3.50 ± 1.02

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).

Table II-5 Serum chemistry and adipocytokines in KK mice.

	Control	Material A	Material A + Material B	Material A + Material C
Total cholesterol (mg/dl)	113.8 ± 28.2	120.4 ± 37.6	108.2 ± 26.6	106.8 ± 34.3
Triglyceride (mg/dl)	131.4 ± 48.0	135.2 ± 43.1	145.0 ± 26.7	124.8 ± 43.1
Glucose(mg/dl)	396.1 ± 89.5	330.6 ± 65.7	352.8 ± 61.2	325.5 ± 90.8
Leptin(ng/ml)	116.4 ± 50.7 <sup>a</sup>	80.9 ± 36.0 <sup>ab</sup>	74.7 ± 32.3 <sup>ab</sup>	48.5 ± 37.9 <sup>b</sup>
Adiponectin(µg/ml)	2.25 ± 0.56	2.35 ± 0.45	2.42 ± 0.64	2.40 ± 0.67

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).

Table II-6 Liver lipid levels in KK mice.

	Control	Material A	Material A + Material B	Material A + Material C
Cholesterol (mg/g liver)	7.2 ± 2.8 <sup>a</sup>	4.4 ± 1.1 <sup>ab</sup>	5.5 ± 3.6 <sup>ab</sup>	3.2 ± 0.8 <sup>b</sup>
(mg/liver)	12.8 ± 6.4 <sup>a</sup>	7.3 ± 2.8 <sup>ab</sup>	9.2 ± 6.2 <sup>ab</sup>	4.8 ± 1.7 <sup>b</sup>
Triglyceride (mg/g liver)	75.9 ± 28.2	68.9 ± 26.6	75.3 ± 36.0	49.3 ± 23.2
(mg/liver)	139.1 ± 67.0	116.5 ± 57.0	133.5 ± 91.7	75.4 ± 42.3

Values are mean±SD

Different superscripts in a row indicate significant difference among the group (p<0.05).

TABLE III-1 Composition of the test diet (g/kg diet)

	Control	Material A	Material B	Material C
Casein	200	200	200	200
L-cystine	3	3	3	3
Corn starch	329.486	323.486	324.526	319.486
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70
Lard	200	200	200	200
Cellulose	50	—	50	50
Material A	—	56	—	—
Material B	—	—	5	—
Material C	—	—	—	10
Mineral mixture(AIN-93G)	35	35	35	35
Vitamin mixture(AIN-93)	10	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
t-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014

Percent of control (each mRNA/36B4)

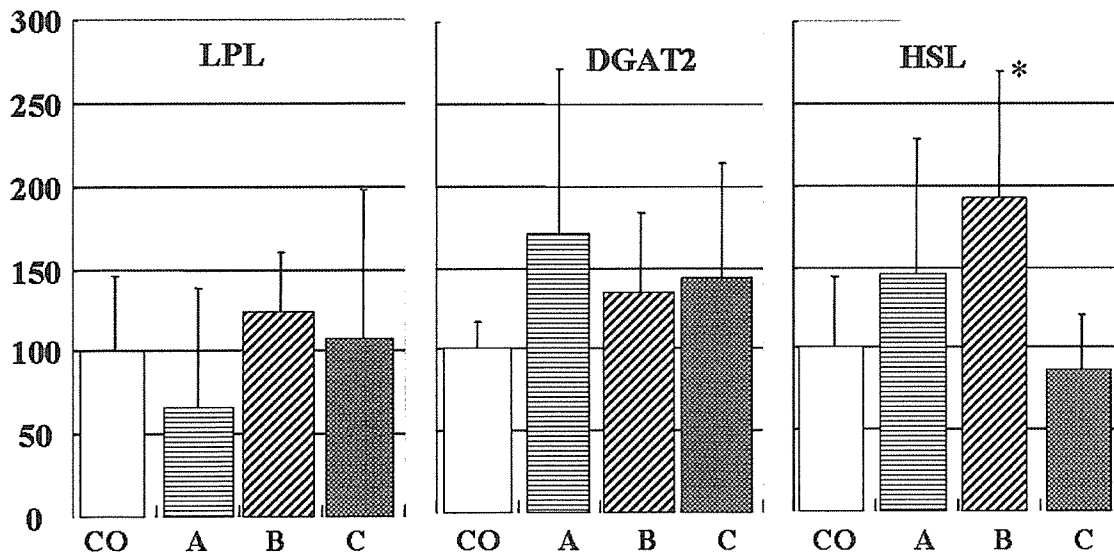


Fig III-1 Expression of mRNAs related to lipid metabolism in the retroperitoneal fat

CO: Control A: Material A, B: Material B, C: Material C

Bars represent mean  $\pm$  SD, n=8.

\*Significantly different from the Control group (p<0.05).