

黒酢もろみ末のⅡ型糖尿病モデルマウス KK-A^y に対する高血糖抑制効果

長野正信, 上野知子, 藤井 晓, 侯 德興*, 藤井 信*[§]

坂元醸造株式会社

* 鹿児島大学農学部生物資源化学科

Anti-Hyperglycemic Effect of *Kurozu Moromi Powder* in Type II Diabetic Model KK-A^y Mice

Masanobu Nagano, Tomoko Ueno, Akira Fujii, De-Xing Hou* and Makoto Fujii*[§]

Sakamoto Kurozu, Inc., 21-15 Uenosono-cho, Kagoshima, 890-0052

* Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065

Kurozu is a food which has been traditionally made in Kagoshima and it is noted that *kurozu* has many physiological activities. In this paper, the anti-hyperglycemic effect of *kurozu moromi powder* (*Kmp*), the fermentation residue of *kurozu*, was examined by using type II diabetic model KK-A^y mice. Mice fed normal diet or normal diet with 0.5% *Kmp* or normal diet with 0.01% pioglitazone (Pio) for 51 days. The blood glucose level of Pio group significantly decreased after the day 10, but that of *Kmp* group decreased after the day 40 against the control group. Serum total cholesterol (T-CHO) and triglyceride (TG), and muscle T-CHO significantly decreased in *Kmp* group and Pio group. Liver TG significantly decreased only in *Kmp* group. The translocated-glucose transporter 4 (GLUT4), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), and phosphorylated-AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in muscle increased in *Kmp* group and Pio group. The insulin receptor β (IR β) increased in *Kmp* group and phosphorylated-IR β increased in *Kmp* group and Pio group in liver. The PPAR γ increased in Pio group, but it decreased in *Kmp* group in adipose tissue. These results suggested that *Kmp* could be an effective food for the prevention of hyperglycemia and hyperlipidemia.

(Received Mar. 18, 2010 ; Accepted May 26, 2010)

Keywords : *kurozu moromi powder* (*Kmp*), insulin resistance, GLUT4, PPARs, pioglitazone (Pio)

キーワード : 黒酢もろみ末, インスリン抵抗性, グルコーストランスポーター4, ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体, ピオグリタツン

現在, “メタボリックシンドローム”は多くの国で深刻な問題であり, わが国も例外ではない。厚生労働省が2007年に示した国民健康・栄養調査¹⁾によると, 40~74歳において, 男性の2人に1人, 女性の5人に1人が, メタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群)が強く疑われる, 又は予備群とされている。また, 糖尿病が強く疑われる人は約890万人, 糖尿病の可能性が否定できない人は約1320万人, 合わせて約2210万人と推定された。2003年に発表された糖尿病実態調査²⁾によると, 糖尿病が強く疑われる人および可能性を否定できない人の合計は約1620万人で, この数年間で患者数は一気に増加したことが分かる。メタ

ボリックシンドロームは主に, 食事, 運動といった日常生活習慣と密接に関係しており, これらの改善が病気の進行を遅らせるための有効な手段となる。食品の中には, 血糖改善作用や脂質代謝改善作用を有するものが数多く存在しており³⁾⁴⁾, 大豆や米といった穀類でもその作用が報告されている⁵⁾⁶⁾。

黒酢は, 鹿児島県霧島市福山町で伝統的に造られている食酢である。原料は, 蒸し米, 米麹, 地下水のみであり, それらをひとつの陶器の壺に入れて造られる。壺の中では, 糖化, アルコール発酵, 酢酸発酵といった過程が順次進行し熟成していく。この熟成した黒酢に混和している不溶性発酵残渣が黒酢もろみであり, これを乾燥させて粉末化したものが黒酢もろみ末である。黒酢もろみ末の有用性は, すでに, 抗アレルギー作用, 血清コレステロール低下

〒890-0052 鹿児島県鹿児島市上之園町21番地15

* 〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号

[§]連絡先 (Corresponding author), mfujii@ms.kagoshima-u.ac.jp

作用^{7)~9)}、抗腫瘍作用¹⁰⁾などが動物実験、臨床実験で報告されている。また、黒酢もろみ末の高血糖抑制効果に関してもすでに報告されている¹¹⁾。しかし、この研究は現象のみを捉えた研究であり、その詳細なメカニズムに関しては検討されていなかった。よって、本研究では、II型糖尿病モデルマウス KK-A^yに対する黒酢もろみ末の高血糖抑制効果を再確認し、さらに各臓器中のタンパク質発現も検討し、高血糖抑制のメカニズムを解明することを目的とした。併せて、経口血糖降下剤として広く用いられているチアゾリジンジオン系薬剤“ピオグリタゾン”をポジティブコントロールとし、黒酢もろみ末とピオグリタゾンの作用を比較した。

実験方法

1. 黒酢もろみ末の調製

黒酢もろみ末（坂元醸造（株）製）は、黒酢もろみを濾過圧搾機で圧搾し、搾り液と搾り粕に分離後、その搾り粕を真空乾燥機にて110°C、6.5時間乾燥させ、粉碎、さらに148°C、0.2 MPa、4~5秒殺菌して調製した。

2. 実験動物

5週齢の雄性 KK-A^y/Ta マウス（日本クレア（株））を23°C±2°C、12時間明暗サイクル下（7時~19時）で個別飼育した。1週間の馴化飼育後、平均体重がほぼ均一になるように8匹ずつ3群に分けた。飼料は市販飼料 CE-2（日本クレア（株））をコントロール食に、試験食として、黒酢もろみ末0.5%含有CE-2、ポジティブコントロール食としてピオグリタゾン0.01%含有CE-2を日本クレア（株）にて作製した。本動物実験は、鹿児島大学実験動物倫理委員会の指針に従って行った。

3. 血糖値の測定

飼育0・10・20・30・40・50日目の非空腹時の血糖値は、尾静脈から、簡易血糖値測定器アキュチェックコンパクト（ロシュダイアグノスティク（株））を用いて午前10時に測定した。

4. インスリン・レプチン・アディポネクチン濃度の測定

飼育47日目に前日の夕方から16時間絶食させたマウスの尾より採血し、遠心分離し血清を得た。インスリン、レプチン、アディポネクチン濃度の測定には、ELISAキット（マウス/ラットアディポネクチンELISAキット：大塚製薬（株）、レプチン測定キット、インスリン測定キット：（株）森永生化学研究所）を用いた。

5. 耐糖能試験

飼育42日目に、前日から16時間絶食させたマウスにグルコース溶液（2 g/kg）を経口投与し0・15・30・60・90・120分後の血糖値を測定した。

6. 臓器および血液の回収

飼育51日目に、前日から16時間絶食させたマウスに、インスリン（10U/kg；ナカライトスク（株））を腹腔投与

し、15分後にジエチルエーテル麻酔下で解剖し、臓器・血液を得た。

7. 血液分析

解剖時に心臓採血により得られた血液を対象とし、HbA_{1c}、T-CHO 濃度、TG 濃度を測定した。測定は、鹿児島市医師会臨床検査センター（鹿児島）に依頼した。

8. 臓器中脂質分析

肝臓・筋肉中の脂質は、Folch らの方法¹²⁾により抽出・濃縮し、TG-EN カイノスおよび T-CHO カイノス（（株）カイノス）を用いて測定した。

9. タンパク抽出溶液の作製

タンパク抽出溶液の作製は Nishiumi らの方法¹³⁾に従って行った。臓器（肝臓、筋肉、脂肪）0.3 g に可溶化バッファー（Tris-HCl pH 8.0 : 10 mM, NaCl : 150 mM, NP-40 : 1.0%, デオキシコール酸 : 0.5%, SDS : 0.1%, DTT : 0.5 mM, PMSF : 1 mM, インヒビターカクテル : 1%）を 1.0 ml 加えてホモゲナイズし、時々混和しながら氷上に 1 時間静置した。16 000×g, 4°C で 20 分遠心し、上清を回収後、Protein assay reagent（サーモフィッシューサイエンティフィック（株））を用いてタンパク濃度を測定した。測定は、メーカーのインストラクションマニュアルに従って行った。

10. glucose transporter 4 (GLUT4) の抽出

GLUT4 の抽出は、Nishiumi らの方法¹³⁾に従って行った。筋肉 0.1 g に 0.1% NP-40 含有バッファー（Tris-HCl pH 8.0 : 50 mM, DTT : 0.5 mM, フッ化ナトリウム : 10 mM, オルトバナジン酸ナトリウム : 1 mM, PMSF : 1 mM, インヒビターカクテル : 1%）を 0.5 ml 加えてホモゲナイズし、25G の針を 3 回通した後 1 000×g, 4°C で 10 分遠心し、上清を回収した。沈殿に NP-40 free バッファーを 0.5 ml 加えて再懸濁し、氷上に 10 分間静置した後 1 000×g, 4°C で 10 分間遠心し、初回の上清と混合した。このときの沈殿に 1.0% NP-40 含有バッファーを 0.5 ml 加えて再懸濁し、時々混和しながら氷上に 60 分間静置した後 16 000×g, 4°C で 20 分遠心し、上清を回収した。この上清を細胞膜画分とした。一方、0.1% NP-40 および NP-40 free バッファーで回収した上清も 16 000×g, 4°C で 20 分間遠心し、上清を回収した。この上清を細胞膜除去画分とした。その後、Protein assay reagent（サーモフィッシューサイエンティフィック（株））を用いてタンパク濃度を測定した。測定は、メーカーのインストラクションマニュアルに従って行った。

11. ウェスタンプロッティング

臓器ホモジネート溶液および GLUT4 抽出溶液は SDS 处理後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、さらに PVDF メンブラン上に転写した。プロッキング後、特異的抗体（IR β , PPAR γ , α Tubulin : Santa Cruz Biotechnology, inc., p-IR β , GLUT4, PPAR α , β Actin : Abcam KK., AMPK α , p-AMPK α : Cell signaling Technology, Inc.）反応を経て洗浄、さらに二次抗体（Rabbit

IgG secondary antibody, Mouse IgG secondary antibody : Santa Cruz Biotechnology, Inc., Goat IgG secondary antibody : Cell signaling Technology, Inc.) と反応させた後, 化学発光により可視化した。検出には Immobilon Western (ミリポア(株)) を用いた。検出は、メーカーのインストラクションマニュアルに従って行った。

12. 統計解析

各実験の結果は、平均値±標準誤差で示した。統計処理は *t* 検定を用い、コントロール群に対して、*p*<0.05 で有意差ありと判定した。

実験結果

1. 血糖値および体重の変化

コントロール群の非空腹時血糖値は、飼育期間全体を通して高い値を示したが、黒酢もろみ末群の血糖値は飼育40日目以降、コントロール群に対して有意に低下した。また、ポジティブコントロールとして用いたピオグリタゾン群では、飼育期間全体を通して、低い値を示した (Fig. 1-A)。

また、コントロール群および黒酢もろみ末群の体重に差は見られなかったが、ピオグリタゾン群の体重は飼育20日目以降、コントロール群に対して有意に増加した (Fig. 1-B)。

2. 耐糖能試験

黒酢もろみ末群では、糖負荷0・15・60・90・120分後の血糖値が、コントロール群に対して有意に低下した。一方、ピオグリタゾン群とコントロール群間には差は見られなかった (Fig. 2)。

3. 臓器重量および血液性状

解剖時の肝臓重量が、黒酢もろみ末群ではコントロール群に対して有意に低下したが、ピオグリタゾン群では有意に増加した。また、腎周辺および副睾丸周辺脂質重量には差は見られなかった (Fig. 3)。

HbA_{1c}については、ピオグリタゾン群のみコントロール群に対して有意に低下し、黒酢もろみ末群でも若干の低下が認められた (Fig. 4-A)。

血清中の総コレステロールおよび中性脂肪濃度は、黒酢もろみ末群、ピオグリタゾン群いずれもコントロール群に対して有意に低下した (Fig. 4-B)。

飼育47日目における血中インスリン濃度は、各群間で差は見られなかった。一方、アディポネクチンおよびレプチニン濃度は、ピオグリタゾン群で有意に上昇していたが、黒酢もろみ末群では変化が見られなかった (データ省略)。

4. 臓器中の脂質濃度

筋肉中の総コレステロール含量はコントロール群に対して、黒酢もろみ末群、ピオグリタゾン群いずれも有意に低下した (Fig. 5-A)。一方、肝臓中の総コレステロール含量には変化が見られなかった。筋肉中の中性脂肪含量は変化

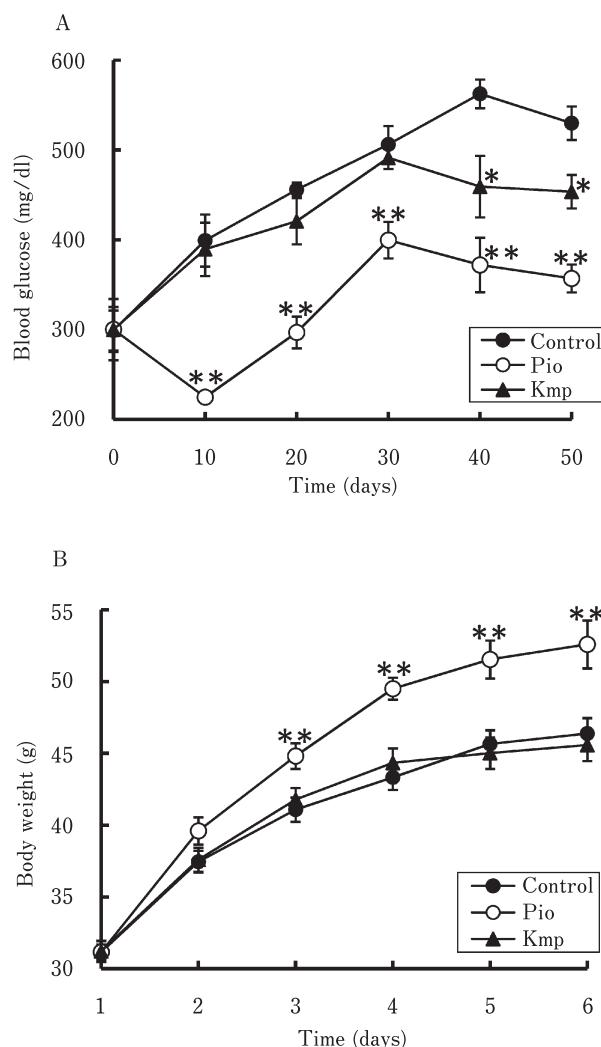


Fig. 1-A Blood glucose levels of KK-A^y mice

Fig. 1-B Body weight gain of KK-A^y mice

Data represent the mean±S.E.

*Significant *p*<0.05, **Significant *p*<0.01 compared with the control.

が見られなかったものの、肝臓中々性脂肪含量は、ピオグリタゾン群で有意な増加、黒酢もろみ末群で有意な低下が確認された (Fig. 5-B)。

5. 筋肉における各種タンパク発現

細胞膜上に移行した GLUT4 量を検討したところ、黒酢もろみ末群、ピオグリタゾン群で有意な膜移行の増加が確認された (Fig. 6-A, B)。一方、細胞内に留まっている GLUT4 量も検討したが差は見られなかった (Fig. 6-B)。また、GLUT4 の上流に位置しインスリンによって刺激を受ける Insulin receptor β (IRβ) 量およびそのリン酸化量を検討したが影響は見られなかった (データ省略)。インスリン刺激に依存せず GLUT4 の膜移行を促進する AMP-activated protein kinase α (AMPKα) のリン酸化量は、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群で有意に増加した

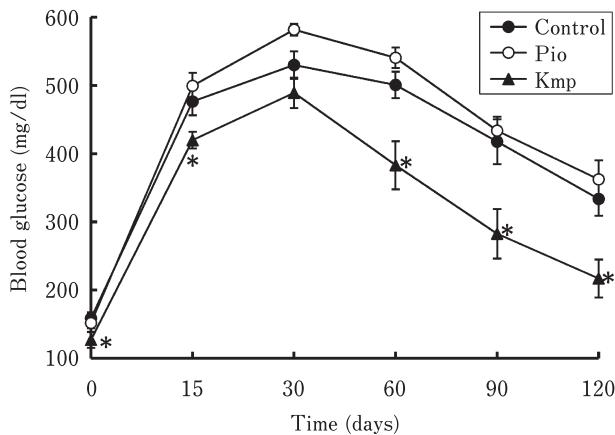


Fig. 2 Blood glucose levels after loading of 2 g/kg B.W. of glucose in KK-A γ mice

Data represent the mean \pm S.E.

* Significant $p < 0.05$ compared with the control.

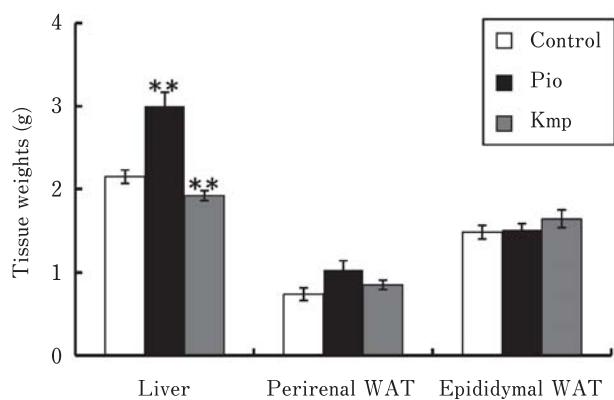


Fig. 3 Tissue weights of KK-A γ mice

Data represent the mean \pm S.E.

** Significant $p < 0.01$ compared with the control.

(Fig. 7-A, C). 脂肪酸燃焼に関わる因子である peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) 量も、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群で有意に増加した (Fig. 7-B, C).

6. 肝臓における各種タンパク発現

肝臓におけるインスリン刺激に関わるタンパクの発現を検討したところ、IR β 量が黒酢もろみ末群で有意に増加した (Fig. 8-A, C)。また、インスリン刺激による IR β のリン酸化量が、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群で有意に増加した (Fig. 8-B, C)。肝臓における脂肪酸燃焼に関わる因子である PPAR α 、AMPK α および脂肪肝の誘導に関わる因子である PPAR γ の発現に黒酢もろみ末は影響を与えたなかった (データ省略)。

7. 脂肪におけるタンパク発現の変化

脂肪における PPAR γ 量がピオグリタゾン群で有意に増加することが確認され、これはピオグリタゾンが PPAR γ のアゴニストとして働くという事実と一致した。一方、黒

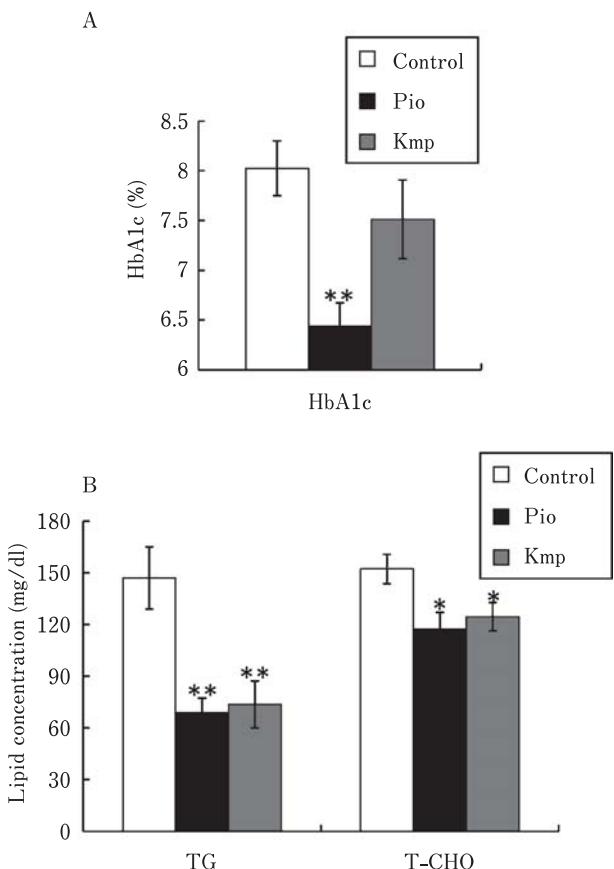


Fig. 4-A HbA1c levels of KK-A γ mice

Fig. 4-B Serum lipid concentrations of KK-A γ mice

Data represent the mean \pm S.E.

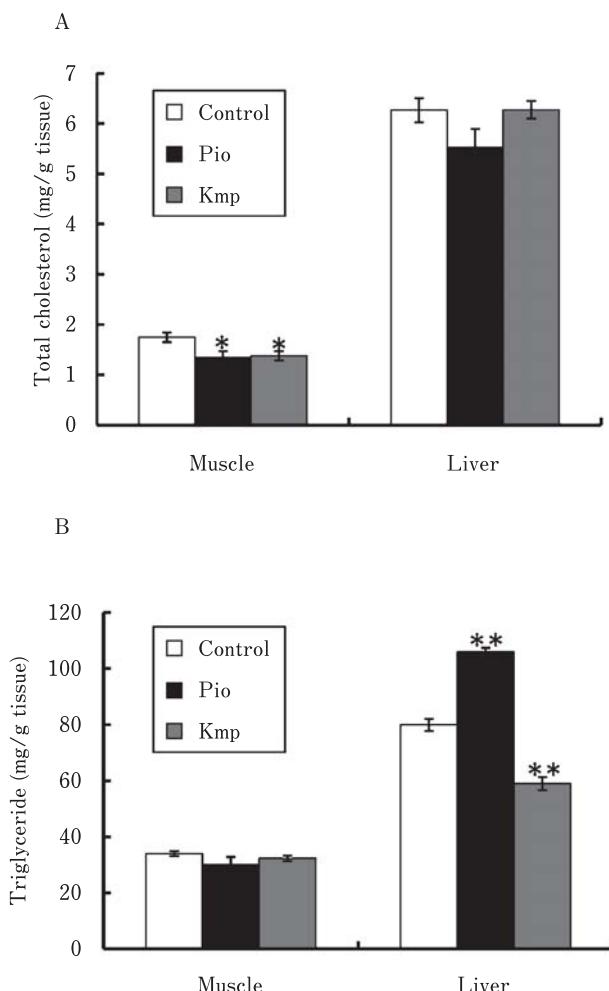
* Significant $p < 0.05$, ** Significant $p < 0.01$ compared with the control.

酢もろみ末群では PPAR γ 量が有意に低下した (Fig. 9-A, B)。

考 察

本実験で我々は黒酢もろみ末に注目し、II型糖尿病モデルマウス KK-A γ を用いて、その生理機能の解明を行った。II型糖尿病モデルマウス KK-A γ は、早期に高血糖、高インスリン血症を発症するモデルであり¹⁴⁾、多種の素材の糖尿病に対する効果を調べるために広く用いられている。これまでに、II型糖尿病モデルマウス KK-A γ における黒酢もろみ末の効果として、高血糖抑制効果、耐糖能改善効果が報告されている¹¹⁾。しかし、現象面のみを捉えた研究であり、その詳しいメカニズムは解明されていなかった。そこで本研究では、黒酢もろみ末のもつ高血糖抑制効果を再確認し、さらにその詳しいメカニズムを解明することを目的とした。また、血糖降下剤として広く用いられているチアゾリジンジオン系薬剤 “ピオグリタゾン” をポジティブコントロールとして用い、ピオグリタゾンと黒酢もろみ末の作用を比較した。

黒酢もろみ末群は高血糖抑制作用を示したが、効果が確



認されたのは飼育40日目以降であった。一方で、ピオグリタゾン群は飼育10日目より高血糖の抑制が確認された(Fig. 1-A)。HbA_{1c}は、ピオグリタゾン群のみコントロール群に対して有意に低下し、黒酢もろみ末群では低下傾向に留まった(Fig. 4-A)。黒酢もろみ末の高血糖抑制効果を得るために長期的な摂取が必要だと考えられた。耐糖能試験の結果より、黒酢もろみ末は耐糖能を改善することが分かった(Fig. 2)。一方で、ピオグリタゾンは耐糖能の改善効果を示さなかった。黒酢もろみ末の耐糖能改善効果については、これまでにも報告があるが¹¹⁾、その有効成分は特定されていない。また、ob/obマウスにおけるピオグリタゾンの耐糖能改善効果が報告されているが¹⁵⁾、ob/obマウスはレプチシン欠損であるため、本実験で用いたKK-A^γマウスとはその作用が異なると考えられた。

GLUT4は、糖代謝において重要な役割を果たすタンパ

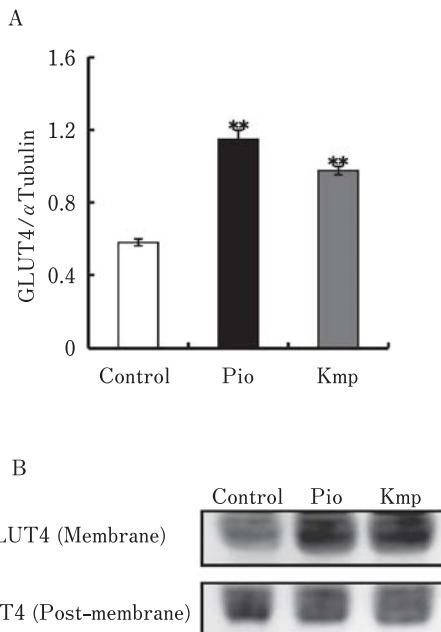


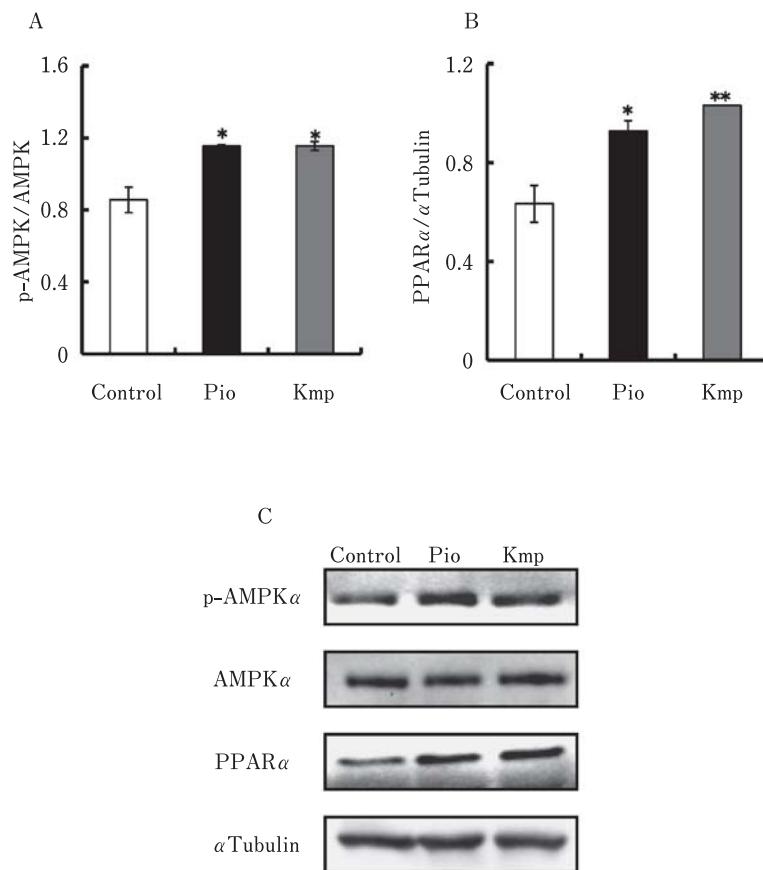
Fig. 6-A GLUT4 expression of muscle in KK-A^γ mice
Data represent the mean \pm S.E.

** Significant $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 6-B Western blotting analysis of GLUT4 in KK-A^γ mice

ク質であり、インスリン刺激によってGLUT4の細胞膜への移行が誘導され、血中の糖が細胞内へと取り込まれることが分かっている¹⁶⁾。本実験において、血中のインスリン濃度を測定したところ、3群間で差が見られなかった(データ省略)。しかし、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群では、血糖値の有意な低下が確認されたことから、インスリン抵抗性の改善が理由として考えられた。そこで、筋肉中のGLUT4発現を検討したところ、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群においてGLUT4の細胞膜移行が著しく誘導されていることが分かった(Fig. 6-A, B)。血糖値の有意な低下が見られた理由として、GLUT4の膜移行が促進されることにより血中の糖が素早く取り込まれたことが考えられた。

肝臓では、インスリンの刺激によって糖新生が抑制され、血中への糖の流出が抑えられる。肝臓におけるインスリンシグナル経路関連タンパク質の発現を検討したところ、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群で、IR β が多く発現していた(Fig. 8-A, C)。ヒト肝癌細胞 HepG2において、インスリン濃度が高い状態が続くと、IR β の発現が低下することが知られている¹⁷⁾。このことから、IR β の増加ではなく、発現低下を抑制したと考えられる。また、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群では、IR β のリン酸化が有意に増加していたものの(Fig. 8-B, C)、この下流のAkt発現には変化が見られなかった(データ省略)。本実験は、インスリン刺激15分後の臓器のみを用いて検討を行っているため、刺激時間について更に検討を行う必要が

**Fig. 7-A** p-AMPK expression of muscle in KK-A y mice**Fig. 7-B** PPAR α expression of muscle in KK-A y miceData represent the mean \pm S.E.* Significant $p < 0.05$, ** Significant $p < 0.01$ compared with the control.**Fig. 7-C** Western blotting analysis of protein of muscle in KK-A y mice

あると考えられる。少なくとも、筋肉における糖の取り込みの増加および、肝臓における糖新生の抑制が本実験における血糖値の低下の要因であると考えられた。

PPARは、ステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内受容体であり、 α 、 δ 、 γ の3つのサブタイプが知られている。 α は主に骨格筋、心臓、肝臓等に発現しており、脂肪酸の β 酸化に関与する多くの遺伝子の調整を行っていると考えられている¹⁸⁾。PPAR γ は3つのアイソフォームを持ち、 γ -1は多くの組織で、 γ -2と γ -3は主に白色脂肪組織で発現している。肝臓におけるPPAR γ の発現は脂肪肝によって誘導されることが明らかとなっており¹⁹⁾²⁰⁾、また、脂肪組織における機能についても多数報告されている^{21)~23)}。ピオグリタゾンはPPAR γ アゴニストとして知られており²⁴⁾、KK-A y マウスへのピオグリタゾン投与による体重増加がこれまでに報告されている²⁵⁾。本実験でも、ピオグリタゾン群ではコントロール群に対して急激な体重増加が見られたが、黒酢もろみ末群ではコントロール群と同程度の値を示した(Fig. 1-B)。ピオグリタゾンを摂取すると肥大化した大型脂肪細胞がアポトーシスを起こ

し小型脂肪細胞が増加するが、生活習慣が改められない場合は、この小型脂肪細胞がさらに脂肪を貯蔵するため、結果として大型化し体重が増加してしまう²⁶⁾²⁷⁾。また、PPAR γ は集合管に高発現していることが知られており、マウスにチアゾリジンジオン系薬剤を投与すると、初期より水貯蔵による体重増加も見られる²⁸⁾。黒酢もろみ末ではピオグリタゾンほどの高血糖抑制能は見られないものの、体重増加という副作用が起こらない点にメリットがあると考えられる。本実験で、脂肪組織におけるPPAR γ の発現を確認したところ、ピオグリタゾン群ではコントロール群に対して有意に増加していたのに対し、黒酢もろみ末群では発現が有意に低下していた(Fig. 9-A, B)。PPAR γ の中等度の発現低下は脂肪合成を抑制し、脂肪細胞をインスリン感受性の良好な小型脂肪細胞へと誘導することが知られている。また、PPAR γ 発現の亢進は脂肪細胞の小型化を誘導し、善玉ホルモンとして知られているアディポネクチンやレプチシンの分泌を増加させている²⁹⁾。本実験でもピオグリタゾン群では、これらのホルモンの分泌が上昇していた(データ省略)。また、ピオグリタゾン群

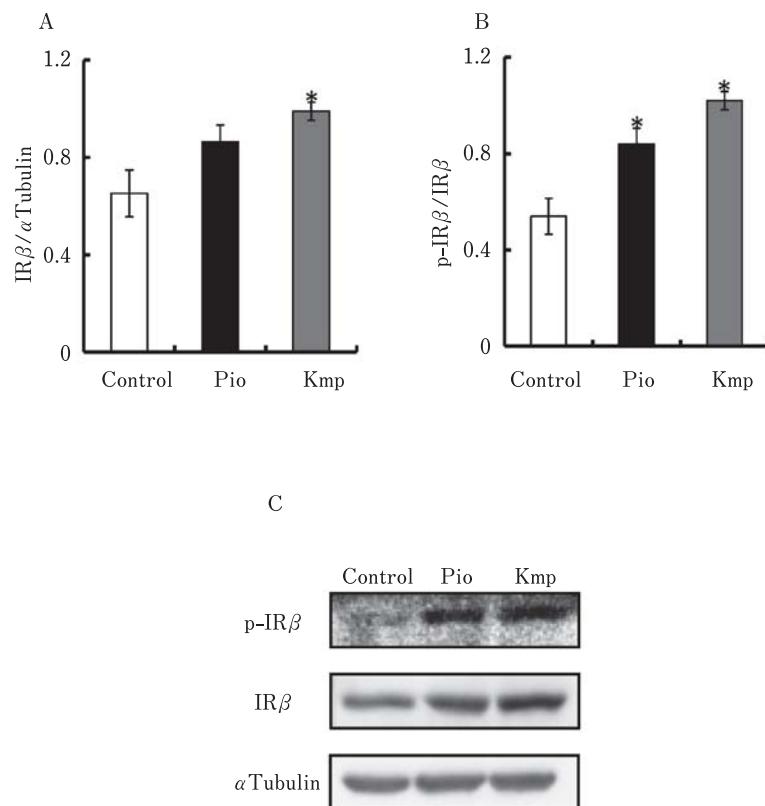


Fig. 8-A IR β expression of liver in KK-A γ mice

Fig. 8-B p-IR β expression of liver in KK-A γ mice

Data represent the mean \pm S.E.

* Significant $p < 0.05$, compared with the control.

Fig. 8-C Western blotting analysis of protein of liver in KK-A γ mice

では、肝肥大や肝臓中 TG 濃度の有意な上昇が見られたことから (Fig. 3, 5-B), 肝臓における PPAR γ 発現に何らかの変化があるのではないかと考え検討を行ったものの、3群間で差は見られなかった (データ省略)。ピオグリタゾンはII型糖尿病患者の脂肪肝を改善させるという報告もあるが³⁰⁾、本実験ではそのような結果は得られず、むしろ脂肪肝が増悪していた。これは、種差、投与量、摂取期間の違いによるものだと考えられる。PPAR α の発現について検討したところ、筋肉中ではピオグリタゾンおよび黒酢もろみ末群で有意に増加していたもの (Fig. 7-B, C)、肝臓中では変化が見られなかった (データ省略)。PPAR α は β 酸化を促進し、血中の TG 濃度を低下させることが知られている³¹⁾。本実験でも、ピオグリタゾン群および黒酢もろみ末群で、血中の TG 濃度が有意に低下していた (Fig. 4-B)。また、同じく β 酸化を促進する因子として AMPK がある。AMPK はセリン/スレオニンキナーゼに属し、細胞内のエネルギーバランスを調整する因子として知られている³²⁾。AMPK は細胞内 AMP : ATP 比の上昇に反応して活性化され、脂肪酸酸化や糖取り込みなどを促進する。レプチシン、アディポネクチン等のホルモンが、骨格筋において AMPK を活性化することが知られており³³⁾、本実験で

もピオグリタゾン群で筋肉中の AMPK のリン酸化が促進されていた (Fig. 7-A, C)。また、これらのホルモンに変化の見られなかった黒酢もろみ末群でも、AMPK のリン酸化が促進されていたことから、黒酢もろみ末は直接的に AMPK を活性化する可能性が示唆された。

以上の結果より、黒酢もろみ末が高血糖抑制効果を示すことが明らかとなり、そのメカニズムとしてインスリン抵抗性の改善が考えられた。また、コレステロールおよび TG の低下作用も併せ持つことが分かった。そして、その作用機序はピオグリタゾンとは異なっていると考えられた。黒酢もろみ末はメタボリックシンドロームに有用な食品であることが示された。

要 約

黒酢は鹿児島で伝統的に造られてきた食品であり、多くの生理作用を有していることが知られている。本研究では、黒酢の発酵残渣である黒酢もろみ末の高血糖抑制効果についてII型糖尿病モデルマウス KK-A γ を用いて検討を行った。マウスは1週間の馴化飼育後3群にわけ、コントロール食としてCE-2を用い、試験食として0.5%黒酢もろみ末含有CE-2、0.01%ピオグリタゾン含有CE-2を作製し

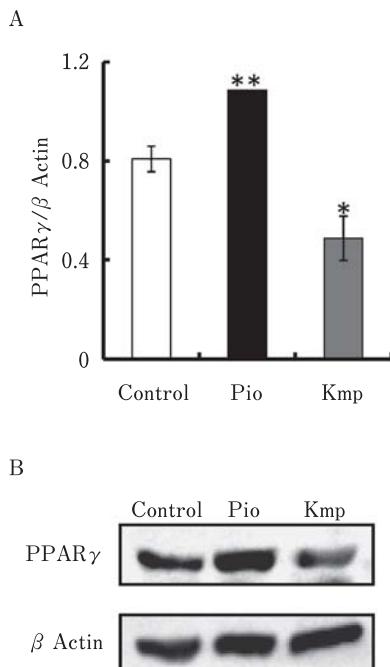


Fig. 9-A PPAR γ expression of adipose tissues in KK-A y mice

Data represent the mean \pm S.E.

* Significant $p < 0.05$, ** Significant $p < 0.01$ compared with the control

Fig. 9-B Western blotting analysis of protein of adipose tissues in KK-A y mice

51日間摂取させた。ピオグリタゾン群の血糖値は飼育10日目よりコントロール群に対して有意に低下し、黒酢もろみ末群の血糖値は飼育40日目よりコントロール群に対して有意に低下した。血中総コレステロール濃度、中性脂肪濃度は黒酢もろみ末群、ピオグリタゾン群いずれでも有意に低下したもの、肝臓中の中性脂肪含量は黒酢もろみ末群のみ有意に低下した。さらに、筋肉、肝臓、脂肪組織中のタンパク質発現を検討したところ、筋肉中のGLUT4の膜移行が黒酢もろみ末群およびピオグリタゾン群で有意に増加した。また、PPAR α およびリン酸化AMPK α も黒酢もろみ末群およびピオグリタゾン群で有意に増加した。一方、肝臓中では、IR β の発現が黒酢もろみ末群で有意に増加しており、そのリン酸化は黒酢もろみ末群およびピオグリタゾン群で有意に増加した。脂肪組織中のPPAR γ について検討したところ、ピオグリタゾン群では有意に発現が亢進したが、黒酢もろみ末群では有意に減少した。以上より、黒酢もろみ末は高血糖抑制および高脂血症抑制に有用な食品であることが示唆された。

文 献

- 1) 厚生労働省 国民健康・栄養調査報告 (2007).
- 2) 厚生労働省 糖尿病実態調査報告 (2003).
- 3) Osada, K., Funayama, M., Fuchi, S., Sami, M., Ohta, Y., Kanda, T. and Ikeda, M., Effects of dietary procyanidins

and tea polyphenols on adipose tissue mass and fatty acid metabolism in rats on a high fat diet. *Journal of Oleo Science*, **55**, 79–89 (2006).

- 4) Fukumitsu, S., Aida, K., Ueno, N., Ozawa, S., Takahashi, Y. and Kobori, M., Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. *The British Journal of Nutrition*, **100**, 669–676 (2008).
- 5) Moriyama, T., Kishimoto, K., Nagai, K., Urade, R., Ogawa, T., Utsumi, S., Maruyama, N. and Maebuchi, M., Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 352–359 (2004).
- 6) Kanaya, Y., Doi, T., Sasaki, H., Fujita, A., Matsuno, S., Okamoto, K., Nakano, Y., Tsujiwaki, S., Furuta, H., Nishi, M., Tsuno, T., Taniguchi, H. and Nanjo, K., Rice bran extract prevents the elevation of plasma peroxylipid in KKAY diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **66**, 157–160 (2004).
- 7) 中村敏郎, 筒井浩一郎, 西谷博一, 栗本裕, 池之上公, 黒酢粕のアレルギー疾患に対する作用(第1報), 基礎と臨床, **25**, 2529–2533 (1991).
- 8) Hayashi, T., Hasegawa, K., Sakaki, Y., Sagawa, Y., Oka, T., Fujii, A., Hashiguchi, K., Ueno, S. and Nagano, M., Reduction of Development of Late Allergic Eosinophilic Rhinitis by Kurozu moromi Powder in BALB/c Mice. *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 385–390 (2007).
- 9) 藤野武彦, 金谷庄蔵, 有吉恭子, 牧角和宏, 加治良一, 津田泰夫, 酸造酢固形成分の血清コレステロール, 赤血球変形能に及ぼす効果, 健康科学, **12**, 139–141 (1990).
- 10) Fukuyama, N., Jujo, S., Ito, I., Shizuma, T., Myojin, K., Ishiwata, K., Nagano, M., Nakazawa, H. and Mori, H., Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of LOVO cells in a mouse model in vivo. *Nutrition*, **23**, 81–86 (2007).
- 11) 長野正信, 藤井暁, 青山美子, 栗田源彦, 藤井信, 黒酢もろみ末および黒酢濃縮液の糖代謝への影響, 薬理と治療, **34**, 199–206 (2006).
- 12) Folch, J., Lees, M. and Sloane, Stanley, GH., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497–509 (1957).
- 13) Nishiumi, S. and Ashida, H., Rapid Preparation of a Plasma Membrane Fraction From Adipocytes and Muscle Cells : Application to Detection of Translocated Glucose Transporter 4 on the Plasma Membrane. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 2343–2346 (2007).
- 14) Suto, J., Matsuura, S., Imamura, K., Yamanaka, H. and Sekikawa, K., Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK and KK-Ay mice. *Eur. J. Endocrinol.*, **139**, 654–661 (1998).
- 15) Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., Satoh, H., Yano, W., Ogata, H., Tokuyama, K., Takamoto, I., Mineyama, T., Ishikawa, M., Moroi, M., Sugi, K., Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Noda, T., Nagai, R. and Kadokawa, T., Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.*, **281**, 8748–8755 (2006).
- 16) Litherland, G.J., Hajduch, E. and Hundal, H.S., Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues. *Mol. Membr. Biol.*, **18**, 195–204 (2001).

- 17) Yuan, L., Ziegler, R. and Hamann, A., Chronic hyperinsulism induced down-regulation of insulin post receptor signaling transduction in Hep G2 cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, **22**, 313–316 (2002).
- 18) Bragt, M.C. and Popeijus, H.E., Peroxisome proliferator activated receptors and the metabolic syndrome. *Physiol Behav.*, **94**, 187–197 (2008).
- 19) Memon, R.A., Tecott, L.H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A.H., Grunfeld, C. and Feingold, K.R., Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity : troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology*, **141**, 4021–4031 (2000).
- 20) Bedoucha, M., Atzpodien, E. and Boelsterli, U.A., Diabetic KKAY mice exhibit increased hepatic PPARgamma gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J. Hepatol.*, **35**, 17–23 (2001).
- 21) Farmer, S.R., Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int. J. Obes.*, **1**, 13–16 (2005).
- 22) Yamauchi, T., Waki, H., Kamon, J., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Miki, H., Kubota, N., Terauchi, Y., Tsuchida, A., Tsuboyama-Kasaoka, N., Yamauchi, N., Ide, T., Hori, W., Kato, S., Fukayama, M., Akanuma, Y., Ezaki, O., Itai, A., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K., Kagechika, H., Shudo, K. and Kadowaki, T., Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.*, **108**, 1001–1013 (2001).
- 23) Tsuchida, A., Yamauchi, T., Takekawa, S., Hada, Y., Ito, Y., Maki, T. and Kadowaki, T., Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue : comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes*, **54**, 3358–3370 (2005).
- 24) 池田 衡, 杉山泰雄, ビオグリタゾンのインスリン抵抗性改善作用, 日薬理誌, **117**, 335–342 (2001).
- 25) Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S. and Kondo, K., Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, **279**, 33456–33462 (2004).
- 26) Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y. and Kadowaki, T., Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.*, **101**, 1354–1361 (1998).
- 27) Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Ide, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Miki, H., Tsuchida, A., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S. and Kadowaki, T., The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41245–41254 (2001).
- 28) Guan, Y., Hao, C., Cha, D.R., Rao, R., Lu, W., Kohan, D.E., Magnuson, M.A., Redha, R., Zhang, Y. and Breyer, M.D., Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat. Med.*, **11**, 861–866 (2005).
- 29) Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., Satoh, H., Yano, W., Ogata, H., Tokuyama, K., Takamoto, I., Mineyama, T., Ishikawa, M., Moroi, M., Sugi, K., Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Noda, T., Nagai, R. and Kadowaki, T., Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.*, **281**, 8748–8755 (2006).
- 30) Bajaj, M., Suraamornkul, S., Pratipanawatr, T., Hardies, L.J., Pratipanawatr, W., Glass, L., Cersosimo, E., Miyazaki, Y. and DeFronzo, R.A., Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**, 1364–1370 (2003).
- 31) Duval, C., Müller, M. and Kersten, S., PPARalpha and dyslipidemia. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1771**, 961–971 (2007).
- 32) Lage, R., Diéguet, C., Vidal-Puig, A. and López, M., AMPK : a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol. Med.*, **14**, 539–549 (2008).
- 33) Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B. and Kadowaki, T., Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.*, **8**, 1288–1295 (2002).

(平成 22 年 3 月 18 日受付, 平成 22 年 5 月 26 日受理)