

カルシウムと乳成分によるメタボリックシンドローム予防改善作用に関する研究

長岡 利

岐阜大学応用生物科学部

概要 食生活、運動、飲酒などの生活習慣の蓄積によって生じる高脂血症や肥満は、近年、日本をはじめとした先進国で深刻な社会問題であり、食品による高脂血症や肥満の予防改善も重要課題である。摂取したタンパク質源あるいはカルシウム摂取量の違いが体脂肪あるいは体重を変化させる可能性があることは若干報告されているが、十分な検討はなされていない。そこで、食品タンパク質・ペプチドの中でも脂質代謝に対する影響が報告されている乳清タンパク質単離物に着目し、カルシウムの同時摂取による脂質代謝に対する影響について、C57BL/6J マウスを用いて検討した。実験群は次のような4群で構成されている。グループ1は高カルシウム(1.5%)を含むカゼイン食(HC群)、グループ2は高カルシウム(1.5%)を含む乳清タンパク質分離物食(HW群)、グループ3は通常カルシウム(0.5%)を含むカゼイン食(NC群)、グループ4は通常カルシウム(0.5%)を含む乳清タンパク質分離物食(NW群)である。これらを与えて70日間飼育した。飼育70日目に解剖し、血清脂質、血糖値及び肝臓脂質、脂肪組織(精巣上体、腎周囲、腹膜、腸間膜)重量を測定した。その結果、70日間の飼育期間における体重増加量、食餌摂取量、肝臓重量は3群間で有意な変化は観察されなかった。HW群はHC群と比べてマウスの血清トリグリセリド値と血清LDL+VLDLコレステロール値を有意に低下させた。HW群はHC群と比べて体脂肪は減少傾向を示した。高Caと乳清タンパク質単離物の同時摂取は肥満モデルマウスの脂質代謝に対し、有意な変化を与えることを明らかにした。

1. 研究目的

日本の人口は戦後爆発的に増加し、2007年を境に人口の増加から減少に転じている。人口の内訳も65歳以上の高齢者が5人に1人を占めるという先進諸国の中でも特に著しい高齢化社会を迎えている。高齢者が健康に生きていくためには若年層からの生活習慣の蓄積によって起因する疾病である「生活習慣病(life-style related disease)」の予防が不可欠である。生活習慣病は食生活、運動、ストレス、喫煙、飲酒といった生活習慣の蓄積によって生じるものであるが、生活習慣病と一口に言ってもその病態は極めて多様であり、その中でも近年問題となっているのが肥満症である。肥満症の定義とは「BMI (Body Mass Index) が25以上のもののなかで、肥満に起因ないしは関連する健康障害(2型糖尿病、脂質代謝異常、高血圧を含む10項目)を合併するか、その合併が予測され、医学的に減量を必要とする病態、ならびにBMI25以上の

もののなかで上半身肥満が疑われ、臍部CT検査によって確定診断された内蔵型脂肪型肥満となっているもの」である。定義にもある通り、肥満症は糖尿病、高脂血症、高血圧などの疾病を併発しやすく、これらを併発した状態は「死の四重奏」と呼ばれ、心筋梗塞、脳卒中を誘発する可能性が10倍以上に膨らむとされている。細胞レベルにおける肥満とは中性脂肪(トリグリセリド)が細胞内に異常に蓄積した結果、脂肪細胞の肥大した状態であり、肥大脂肪細胞はインスリン抵抗性を惹起する。一口に脂肪細胞といってもその存在部位や機能に違いがあり、脂肪細胞が実は数多くのサイトカインやホルモンを発現し分泌する内分泌臓器であることが過去の研究によって明らかにされてきた。現在では、レプチン、アディポネクチン、TNF- α 、レジスチンをはじめとするアディポサイトカインと病態との関連が明らかにされ、その中でもTNF- α 、レジスチンはインスリン抵抗性惹起性のサイトカインや生理活性分子を過剰

分泌することが示されている。インスリン抵抗性の状態では脂肪細胞からの脂肪動員抑制作用も低下するので脂肪組織からの脂肪酸放出が高まる。また、リポタンパク質の加水分解を担う酵素であるリポタンパク質リパーゼの活性も低下するため、動脈硬化惹起性の強いトリグリセリド高含有リポタンパク質が血中に停滞して高脂血症を遷延する。一方、高インスリン血症は肝臓における脂肪酸合成の鍵を担う転写因子、SREBP1-c を活性化して肝臓でのトリグリセリド合成やVLDLの放出を促進し、高脂血症を増悪させるのである。これらより、インスリン抵抗性を誘発する肥満の予防が重要であることは明らかである⁽¹⁾。肥満症の減少のために、厚生労働省は平成12年に「21世紀における国民健康づくり運動(健康日本21)」という、従来にも増して健康を増進して、発病を予防する「一次予防」に重点を置いた対策を推進している。肥満症が、「一次予防」の第一に挙げられる栄養・食生活に大きく依存していることは疑いのないことであり、以前にもまして食品が持つ生体の防御や恒常性を保つ上での種々の新しい機能(三次機能)に関心が集められている。そのような背景から、現在までに様々な食品の抗肥満作用に対する研究がされてきた。脂肪細胞へのトリグリセリドの蓄積を予防する食品として近年、脚光を浴びているのがカルシウムである。1988年から1994年に米国保健省の機関であるNational Center for Health Statistics(NCH)が実施した第三回米国全国健康・栄養調査(National Health and Nutrition Examination Survey III; NHANESIII)からのデータで、以下のことが示された。調査した女性の380人の年齢、エネルギーレベル、活動レベル、人種および民族性を調整した後、体脂肪が高い人の割合は、カルシウム摂取量の最も少ないグループ(平均255 mg/日)を1.0とすると、カルシウム摂取量の最も多いグループ(平均1,346 mg/日)では0.16という割合であった。カルシウム摂取量に依存して高い体脂肪の人の割合は減少しており、男性においても同様な逆相関は認められている⁽²⁾。また、MaruquesらはPortuguese Health Interview Survey 1998-1999を用いて、18歳以上の計37,513人の男女の乳製品の摂取量とBMIについて調査した。その結果、男性と55歳以下の女性で乳製品を多く摂取した人の肥満や過体重の人の割合は普通の体重の人の割合よりも低下しており、これより、カルシウム摂取量の増加がBMIと負の相関があることを提案

している。これらの疫学調査により、カルシウム摂取量が体脂肪を減少させる可能性があることが示唆され、この結果を支持する研究が*in vitro*、*in vivo*の両方で報告されている。2000年にZemelらはヒトの細胞とマウスの研究から、カルシウムの重要性を提案している⁽³⁾。彼らはヒトの皮下脂肪組織から採取した脂肪細胞において、甲状腺ホルモンと1,25-(OH)₂-D₃が細胞内のカルシウム濃度を上昇させ、それに伴い脂肪分解の抑制を刺激していることを明らかにし、aP2-agoutiトランスジェニックマウスを用いて、Caによる抗肥満作用を報告している。aP2とは細胞内脂肪酸結合タンパク質(FABPs)ファミリーに属し⁽⁴⁾、白色及び褐色脂肪細胞のサイトゾルに発現する脂肪酸結合タンパク質である⁽⁵⁾。aP2-agoutiトランスジェニックマウスはaP2プロモーターのコントロール下で脂肪組織におけるagouti遺伝子を発現するマウスである。この特別なマウスは通常の固形飼料を与えているときには肥満になることはなく、高脂肪・高炭水化物食を与えたときに脂肪組織が著しく発達し食事性肥満を引き起こすのである。高カルシウム濃度である1.2%の食餌を6週間与えたとき、マウスの体重の減少、体温の上昇、脂肪組織重量の減少、インスリン抵抗性の改善、脂肪酸合成酵素の減少、グリセロール放出量の増加がなされたのである。しかし、全ての研究でカルシウムの抗肥満作用が示されているわけではなく、Zhangらは食事性カルシウムとラットの体重増加量には影響がないことを報告している⁽⁶⁾。彼らの研究ではCaCO₃を単一のカルシウム源としてカルシウムだけの抗肥満作用を評価したものである。Sprague-Dawleyラットに低濃度、通常濃度、高濃度のカルシウム食をそれぞれ10週間飼育したときに肥満にさせたラットでは食餌摂取量、体重増加量、屠体中の脂肪の割合には影響しないという結果を報告した。また、カルシウムの抗肥満作用を評価する際にカルシウムの供給源として乳製品が用いられているケースが多くあり、それらの研究の中ではカルシウムを単一で与えるよりも優れた抗肥満作用を示している⁽⁷⁻¹¹⁾。これらの結果は、乳製品の中にも肥満を抑制させるような生理活性物質が含まれているか、または、カルシウムの抗肥満作用を増強させる物質の存在が示唆されている。乳製品のタンパク質の中で特に注目をされているのは乳清タンパク質である。乳中のタンパク質のおおよそ80%はカゼインが占め、20%は乳清タンパク質が占めている。乳清タンパク質は栄養面で優れ

たタンパク質であり、そのタンパク質および分解物(ペプチド)には鎮静・鎮痛作用、コレステロール低下作用、血圧上昇抑制作用、免疫調節作用など様々な生理機能が報告されている^(12,13)。BelobrajdicらはWistarラットで赤肉を摂取させた群と比較して乳清タンパク質を摂取させた群では体重増加を抑制し、体脂肪量を減少させたという報告をした⁽¹⁴⁾。

ところで乳清タンパク質の研究は単にその生理活性の発現機構を解明するためだけに行われているのではなく、以下に述べるような状況から、乳清タンパク質の高度有効利用という意味においても、非常に価値のある研究であるといえる。乳清は、チーズ及びカゼイン製造の副産物として、用いた牛乳の70~85%産生される(1987年において世界の乳清生産量は約1億1千万トンにも達している)が、従来その大半はそのまま捨てられたり、あるいは飼料となっており、食糧として用いられているのはごくわずかでしかなかった。チーズ製造量の多い欧米では、乳清の利用は経済的にも重要な問題であったが、固形分が6%程度と少なく、固形分中、乳糖が約70%、無機成分も約9%以上と高い難点があり、しかも保存性が悪く、用途、使用量が制限されるため活発な利用はされていなかった。しかし、乳清中の各成分の栄養・生理的意義、物理的性質などの研究が進み、多くの分野で工業化、利用されるようになってきた。特に最近では、乳清の廃棄による水質汚濁、環境汚染、さらに食料資源不足問題から、積極的に乳清から資源を回収して利用しようという気運が世界的に高まっている。加えて、最近の技術の進歩、たとえば、イオン交換樹脂などによる脱塩、限外濾過法、逆浸透法、ゲル濾過法などによる各成分の分画、濃縮などが可能になってきたため、乳清成分の利用を促進させている。しかしながら、まだその利用は十分であるとはいえない。

ところで、C57BL/6Jマウスは肥満遺伝子であるob遺伝子の105番目のアミノ酸(アルギニン)が停止コドンに変換するナンセンス変異(Arg 105 Stop)により、正常に機能する成熟型レプチンが脂肪組織において生合成・分泌されないために“もう食べなくてもよい”というシグナルが視床下部に伝達されず、顕著な肥満に至ることが知られており、肥満モデル動物として汎用される。

以上のような背景から、カルシウム濃度(高濃度、通常濃度)とタンパク質源(乳清タンパク質、カゼイン)の異なる

計4つの食餌から、カルシウムと乳清タンパク質の脂質代謝に与える相互作用を、高脂肪食の摂取によって肥満を引き起こすC57BL/6J系マウスを用いて検討した。

2. 実験方法

2.1 乳清タンパク質とカゼインのメタボリックシンドロームに対する作用に関する食餌中Ca含量の違いの影響の比較研究

初体重21~25g前後(8週齢)のC57BL/6J系雄マウス(日本SLC株式会社)に市販の固形飼料(MF;オリエンタル酵母工業株式会社)を3日間与え、体重に有意な差が生じないように8匹ずつ4群に分けた。実験群として以下のように分けた。

①HC群(High-Ca Casein):高Ca(1.5%)でカゼインがタンパク質源の食餌

②HW群(High-Ca WPI):高Ca(1.5%)で乳清タンパク質分離物(WPI)がタンパク質源の食餌

③NC群(Normal-Ca Casein):通常Ca(0.5%)でカゼインがタンパク質源の食餌

④NW群(Normal-Ca WPI):通常Ca(0.5%)でWPIがタンパク質源の食餌

食餌組成はTable 1に示した。また、実験では、カゼイン(タンパク質純度87.5%)とWPI(タンパク質純度94.3%)を使用した。カゼインまたは乳清タンパク質分離物(WPI)を食餌性タンパク質とする高脂肪食をマウスに自由摂取させ、70日間飼育した。食餌摂取量の測定は毎日行った。解剖前の絶食は15時~翌9時までの18時間行い、飼育70日目にマウスをエーテル麻酔下で心臓採血により屠殺して血液を採取し、肝臓、脂肪組織を摘出した。

血清は血液を遠心分離(3,000 rpm, 15分間)する事により得て、血糖値、脂質の分析まで-30℃で凍結保存した。得られた血清より血糖値を測定した。血清脂質は総コレステロール値とHDL-コレステロール値、血清トリグリセリド値を測定し、総コレステロール値からHDL-コレステロール値を引いたものをLDL+VLDLコレステロール値として算出し、総コレステロール値からHDL-コレステロール値を引いた値をHDL-コレステロール値で割ったものを動脈硬化指数(Atherogenic index)として算出した。肝臓は0.9% NaCl溶液で洗浄後、湿重量を測定し、肝臓脂質分析用に各々0.7gを秤量して脂質の分析まで-30℃で凍結

保存した。肝臓の残りは -30℃に凍結保存した。肝臓脂質は抽出した脂質から肝臓総脂質と肝臓コレステロール値、肝臓トリグリセリド値を測定した。

精巢上体脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腹膜脂肪組織は 0.9% NaCl 溶液で洗浄後、湿重量を測定した。

なお、結果の統計学的分析には、ダンカン多重範囲検定を用いた。

3. 研究結果

結果は Table 2~4 に示した。70 日間の飼育期間を通じ食事摂取量、体重増加量には群間で有意な変化は観察されなかった。解剖時に摘出した肝臓重量はどの群においても有意な差はなかった。脂肪組織重量(精巢上体脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腹膜脂肪組織)においては HC(高 Ca カゼイン)群と比べ HW(高 Ca 乳清タンパク質)群で低下傾向を示したが、NC(低 Ca カゼイン)群と比べた NW(低 Ca 乳清タンパク質)群では上昇傾向を示した。

飼育 70 日目の血清コレステロール値は HC 群と比べて HW 群で低下傾向を示した。NC 群、NW 群間では有意な変化はなかった。血清 LDL+VLDL-コレステロールは HC 群と比べて HW 群で有意に低下した。血清トリグリセリド値は HC 群と比べて HW 群で有意に低下した。HC 群、NC 群間では変化はなかったが、NC 群と比較して NW 群で低下傾向を示した。血糖値は HC 群と比較して HW 群で上昇傾向を示し、NC 群と比較して NW 群でも上昇傾向を示した。

4. 考察

今回の研究では、カルシウムと乳清タンパク質(WPI)を肥満マウスに摂取させた場合の脂質代謝改善作用について検討した。WPI を高カルシウム濃度(1.5%)の食餌と通常のカルシウム濃度(0.5%)の食餌のタンパク質源とし、マウスに 70 日間自由摂取させたところ、カゼインをタンパク質源としたそれぞれのカルシウム濃度の対照と比較して、総食餌摂取量と体重増加量では群間で有意な差は見られなかったが、WPI をタンパク質源とした高カルシウム食の摂取で血清トリグリセリド値、血清 LDL+VLDL コレステロール値は有意に低下した。肝臓中のトリグリセリド値は有

意な差はないが、体脂肪組織重量では有意ではないが低下傾向を示した。これらの結果より、WPI と高カルシウム食の摂取の相互作用により、マウスの脂質代謝へ影響を与えることが明らかになったが、既報^(6,25)のような乳製品とカルシウムの抗肥満作用はないことが示唆された。

Pilvi らは、WPI をタンパク質源とした 1.8% の高カルシウム食を肥満モデルマウスに 21 週間与えたときに、総食餌摂取量に有意な差はなく、体重増加量、体脂肪、血清総コレステロール値を有意に減少させたと報告している⁽¹⁵⁾。これらの有意な減少は、今回の我々の行った結果からは得られず、逆に我々の実験結果から得られた血清トリグリセリド値の有意な低下は Pilvi らの結果からは得られていなかった。これらの異なった結果の原因としては、食餌中のカルシウム濃度と飼育期間の違いが関係している可能性がある。カルシウム濃度は本研究では 1.5% のカルシウム濃度であるが、Pilvi らの研究では 1.8% であり、飼育期間も彼らが行った期間の半分ほどである。これら実験条件の違いにより、同様の結果が得られなかった可能性が考えられ、今後詳細な検討が必要である。

これまで乳製品に含まれるカルシウム摂取量と BMI についての疫学調査はすでに様々な地域で行われており、その中には乳製品の摂取量と BMI に負の相関があるという報告はされている。しかし、行われた疫学調査の全てで同様な負の相関が得られたわけではない。Murakami らの行った調査のようにカルシウムまたは乳製品と BMI に何の相関関係も持たない報告も出されているのである⁽¹⁶⁾。彼らの行った研究では日本の 18 歳から 20 歳の女子学生 1,905 人の乳製品またはカルシウム摂取量と BMI について調査した結果、これまで報告されてきたカルシウムや乳製品の摂取量が多い人ほど BMI が低いという負の相関を支持しないことが明らかにされた。

Zemel らは乳製品とカルシウムの抗肥満作用を aP2-agouti トランスジェニックマウスを用いて報告している⁽²⁾。彼らの研究では 1.2% のカルシウム濃度の食餌を 6 週間与えたときにおけるマウスの体重増加量や体脂肪の有意な減少といった肥満抑制作用を示しているが、トランスジェニック動物でない他のげっ歯類でも確認できるかどうかは疑問である。aP2-agouti トランスジェニックマウスはカルシウム代謝に影響する遺伝子の欠損があるため、カルシウム濃度を変化させるといった操作に非常に敏感な動

物である。また、彼らは食事性カルシウムの脂肪合成を調節するメカニズムを次のように説明している。食事性カルシウムの増加は、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモン、 $1,25-(OH)_2-D_3$ らが脂肪細胞内でのカルシウム濃度を上昇させて脂肪分解の活性化と遊離脂肪酸合成酵素の発現の抑制をし、また、脂肪組織の脱共役タンパク質 (UCP2) の発現の増加と熱産成増加を引き起こす、という機序である。しかし、Pilvi らの行った研究結果が示すように、副甲状腺ホルモンと $1,25-(OH)_2-D_3$ の有意な低下は必ず体脂肪の低下に繋がるわけではないことが明らかになっており、Zemel らの示す機序が確かであると考えすることはできない。

ここで興味深い報告がある。Zhangらは高濃度のカルシウム食を10週間飼育したときに通常ラットでは体重増加量の抑制作用がみられるが、肥満にさせたラットでは肥満抑制作用はないことを示している⁽⁶⁾。彼らの考察によると、体重増加量では有意な減少を示したものの、最終体重においては有意な差はなく、また同様に行ったマウスを用いた実験では同じ結果にならなかったこと、カルシウムの濃度に依存していない点、肥満にさせたラットではなく通常ラットで体重増加量が抑制されたこと、またラット体内の組成中におけるタンパク質の比率が減少していることを挙げ、カルシウムの抗肥満作用を疑問視した見解を示している。彼らの結果は高カルシウム食では脂肪蓄積に特異的に働いているわけではなく、動物の体の成長を遅らせることで体重増加量を減少させているという考えを提案している。これらの報告により、カルシウムと乳清タンパク質を含んだ乳製品の摂取量の増加は肥満抑制作用を持つ可能性は

あるが、抗肥満作用を確認するためには特殊な条件が必要であることが示唆された。

今回の研究から、たいへん興味深いことに、カルシウムと乳清タンパク質 (WPI) の相互作用は肥満モデルマウスの脂質代謝、特に血清トリグリセリド濃度や LDL-コレステロールなどのメタボリックシンドロームの指標に統計学的に有意な好ましい影響を与えることを明らかにした。しかし、その作用機序については不明であり、既報⁽¹⁵⁾に報告されている顕著な体重増加量減少や体脂肪減少などの抗肥満作用を示すには至らなかった。その理由として、動物の飼育期間の違いはあるものの、文献⁽¹⁵⁾の食餌組成において、重要な食餌中 Ca 含有量の計算根拠の記述がなく、再現性困難な調製法であり、問題があると考え。今後の詳細な再検証が望まれる。

5. 今後の課題

乳成分が心臓血管疾患やメタボリックシンドロームに対して好ましい影響をもたらすことは、ヒト試験や動物実験で既に報告されている。しかし、乳成分のうち、どんな成分が有効成分であるかは論争中である。今回の研究からのメタボリックシンドロームに対して好ましい影響をもたらす有効成分は Ca と乳清タンパク質である可能性が示唆された。Ca や乳清タンパク質がどのような作用機構により、メタボリックシンドロームに対して好ましい影響をもたらすかは明らかにされていない。しかし、抗肥満作用に対する有意な影響は観察できなかったため、今後は別の肥満モデルなどを用いた更なる研究が必要であると考え。今後の研究の進展を期待したい。

Table 1. Composition of diet

Group	HC	HW	NC	NW
Casein (g)	260.0	0.0	265.0	0.0
Whey protein isolate (g)	0.0	244.0	0.0	249.0
Corn starch (g)	160.0	160.0	160.0	160.0
Sucrose (g)	88.2	103.2	108.0	122.7
Cellulose (g)	65.0	65.0	65.0	65.0
Soybean oil (g)	40.0	40.0	40.0	40.0
Lard (g)	300.0	300.0	300.0	300.0
CaCO ₃ (g)	24.8	24.5	0.0	0.0
Potassium phosphate (monobasic) (g)	10.5	18.3	10.5	18.3
Potassium citrate, 1H ₂ O (g)	6.5	0.0	6.5	0.0
Mineral * ¹ (g)	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamine * ² (g)	10.0	10.0	10.0	10.0
Total (g)	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
Energy (KJ/g dry weight)	21.2	21.4	21.6	21.8
Protein (% energy)	18.0%	18.0%	18.0%	18.0%
Carbohydrate (% energy)	21.0%	22.0%	22.2%	23.1%
Fat (% energy)	61.0%	60.0%	59.8%	58.9%
Ca (%)	1.50%	1.50%	0.51%	0.51%
P (%)	0.59%	0.59%	0.59%	0.59%
K (%)	0.90%	0.90%	0.90%	0.90%

	Casein	Whey protein isolate	Corn starch
protein	87.5%	94.30%	
lactose	<0.1%	0.10%	
fat	1.0%	0.30%	
water	9.7%	3.80%	
mineral	1.8%	1.50%	
Na	< 5 mg / 100 g	489 mg / 100 g	
K	1.8 mg / 100 g	57 mg / 100 g	6.5 mg / 100 g
Cl		28 mg / 100 g	
Ca	30.2 mg / 100 g	66 mg / 100 g	2.3 mg / 100 g
P	730 mg / 100 g	44 mg / 100 g	15.7 mg / 100 g

*¹Mineral

AIN-93G mineral mixture. The diets contain following(mg/kg diet): Ca: 5000, P: 1561, K: 3600, S: 300, Na: 1019, Cl: 1571, Mg: 507, Fe: 35, Zn: 30, Mn:10, Cu: 6, I: 0.2, Mo: 0.15, Se: 0.15, Si: 5, Cr: 1.0, F: 1.0, Ni: 0.5, B: 0.5, Li: 0.1, V: 0.1.

*²Vitamin

AIN-93G vitamin mixture. The diets contain following (mg/kg diet): vitamin A (all-trans-retinyl palmitate): 4000IU, vitamin D3 (cholecalciferol): 1000IU, vitamin E (all-rac- α -tocopheryl acetate): 751IU, vitamin K1 (phylloquinone): 0.75, thiamine-HCl: 6.36, riboflavin: 6.0, pyridoxin-HCl: 7.29, nicotinic acid: 3.0, Ca-pantothenate: 16.31, folic acid: 2.0, vitamin B12 (cyanocobalamin): 0.025, biotin: 0.2.

Table 2. Effects of WPI and Ca on Body and Liver Weights, Food Intake, Serum lipids, Serum Glucose in C57BL/6J Mice

	Group			
	HC	HW	NC	NW
Body weight gain (g / 70 days)	3.9 ± 1.1 a	3.7±1.3 a	2.6 ± 1.1 a	3.0±1.1 a
Food intake (day 0-70, g)	172.7 ± 7.1 a	172.8 ± 5.8 a	172.5 ± 10.2 a	177.6 ± 10.1 a
Liver weight (g / 100 g body weight)	3.90 ± 0.16 a	4.23 ± 0.23 a	4.28 ± 0.16 a	4.31 ± 0.24 a
Total Cholesterol (mg / dl) [A]	123.0 ± 7.5 a	110.2 ± 8.9 a	100.8 ± 9.9 a	110.2 ± 7.6 a
HDL Cholesterol (mg / dl) [B]	72.1 ± 8.1 a	67.8 ± 7.8 a	56.6 ± 8.6 a	66.1 ± 6.2 a
LDL+VLDL Cholesterol (mg / dl)	50.9 ± 2.7 a	42.4 ± 2.4 b	44.2 ± 4.2 a	44.1 ± 3.3 a
Atherogenic index [(A - B) / B]	0.81 ± 0.14 a	0.70 ± 0.09 a	0.91 ± 0.14 a	0.70 ± 0.07 a
Serum Triglyceride (mg / dl)	65.7 ± 3.5 a	51.3 ± 4.2 b	60.5 ± 8.1 a	56.1 ± 3.0 a
Serum Glucose (mg / dl)	119.5 ± 11.7 a	129.9 ± 14.5 a	102.6 ± 9.3 a	122.5 ± 7.6 a

1. Initial body weight was 22-27 g.
2. A feeding period was for 70 days and a fasting period was for last 18 hours.
3. The data are shown by Means ± SEM of 8 mice.
4. Within a row, means with different letters are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effects of WPI and Ca on Liver lipids in C57BL/6J Mice

	Group			
	HC	HW	NC	NW
Total lipid (mg/g Liver)	97.1±13.5 a	94.2±11.7 a	71.5±8.5 a	79.2±11.3 a
Triglyceride (mg/g Liver)	44.5±8.2 a	45.5±6.2 a	32.9±6.2 a	37.4±7.9 a
Phospholipid (mg/g Liver)	46.4±5.6 a	42.0±7.8 a	33.7±2.8 a	36.6±5.6 a
Total cholesterol (mg/g Liver)	6.2±0.7 a	6.7±1.0 a	4.9±0.7 a	5.2±0.8 a

1. Initial body weight was 22-27 g.
2. A feeding period was for 70 days and a fasting period was for last 18 hours.
3. The data are shown by Means ± SEM of 8 mice.
4. Within a row, means with different letters are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 4. Effects of WPI and Ca on White Adipose Tissue (WAT) Weights in C57BL/6J Mice

	Group			
	HC	HW	NC	NW
Epididymal WAT (g / 100 g body weight)	2.71 ± 0.56 a	2.49 ± 0.53 a	1.75 ± 0.38 a	2.08 ± 0.45 a
Mesenteric WAT (g / 100 g body weight)	0.61 ± 0.18 a	0.60 ± 0.16 a	0.48 ± 0.13 a	0.41 ± 0.12 a
Retroperitoneal WAT (g / 100 g body weight)	1.55 ± 0.24 a	1.32 ± 0.23 a	0.98 ± 0.22 a	1.10 ± 0.15 a
Perirenal WAT (g / 100 g body weight)	0.88 ± 0.22 a	0.72 ± 0.23 a	0.53 ± 0.15 a	0.57 ± 0.17 a
Total WAT (g / 100 g body weight)	5.75 ± 0.30 a	5.13 ± 0.28 a	3.74 ± 0.22 a	4.16 ± 0.22 a

1. Initial body weight was 22-27 g.
2. A feeding period was for 70 days and a fasting period was for last 18 hours.
3. The data are shown by Means ± SEM of 8 mice.
4. Within a row, means with different letters are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

文献

1. Shimomura I, Matsuda M, Hammer, RE, Bashmakov Y, Brown, MS, Goldstein, JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000 6: 77-86.
2. Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 2000 14: 1132-8.
3. Marques-Vidal, P, Goncalves A, Dias CM. Milk intake is inversely related to obesity in men and young women: data from the Portuguese Health Interview Survey 1998-1999. *Int. J. Obes.* (2006) 30, 88-93.
4. Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzler AV, Banaszak LJ. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu. Rev. Nutr.* 1997 17: 277-303.
5. Bernlohr, DA, Doering TL, Kelly TJ, Lane MD. Tissue specific expression of p422 protein, a putative lipid carrier, in mouse adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985 132: 850-5.
6. Zhang Q, Tordoff MG. No effect of dietary calcium on body weight of lean and obese mice and rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004 286: R669-R77.
7. Parra P, Bruni G, Palou A, Sera F. Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J. Nutr. Biochem.* 2008 19: 109-17.
8. Zemel MB, Sun X. Dietary calcium and dairy products modulate oxidative and inflammatory stress in mice and humans. *J. Nutr.* 2008 138: 1047-52.
9. Sun X, Zemel MB. Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in ap2-agouti transgenic mice. *J. Nutr.* 2004 134: 3054-60.
10. Shi H, Dirienzo D, Zemel MB. Effect of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted ap2-agouti transgenic mice. *FASEB. J.* 2001 15: 291-3.
11. Papakonstantinou E, Flatt WP, Huth PJ, Harris RB. High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes. Res.* 2003 11: 387-94
12. Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K, Kuwata T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 281: 11-7.
13. Morikawa K, Kondo I, Kanamaru Y, Nagaoka S. A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 352, 697-702
14. Belobrajdic DP, McIntosh GH, Owens JA. A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in Wistar rats. *J. Nutr.* 2004 134: 1454-8.
15. Pilvi, TK, Korpela, R, Huttunen, M, Vapaatalo, H, Mervaala, EM. High-calcium diet with whey protein attenuates body-weight gain in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Br. J. Nutr.* 2007 98: 900-7.
16. Murakami, K, Okubo, H, Sasaki, S. Norelation between intakes of calcium and dairy products and body mass index in Japanese women aged 18 to 20 y. *Nutrition* 2006 22: 490-5.

The Preventive and Ameliorative Action of Metabolic Syndrome by Dietary Calcium and Milk Components

Satoshi Nagaoka

Department of Applied Life Science, Gifu University, Gifu 501-1193, Japan

Summary

Recently, hyperlipidemia or obesity induced by lifestyle habits such as food practice, exercise, drinking is the serious social problem in the developed country such as Japan. The prevention and improvement of hyperlipidemia or obesity by the food is also an important problem. It is reported that body fat or body weight change by the difference between taken source of protein or calcium intake, however, it is not fully understood about the detailed interaction between protein source and calcium intake. Thus, whey protein isolate which has been reported a hypocholesterolemic effect among food protein and peptide is used in this study about the interaction between whey protein isolate and calcium intake in C57BL/6J mice. The experimental group is consisted of 4 groups as follows: Group 1: casein containing a high calcium (1.5%) diet (HC group), Group 2: whey protein isolate containing a high calcium (1.5%) diet (HW group), Group 3: casein containing an ordinary calcium (0.5%) diet (NC group), Group 4: whey protein isolate containing an ordinary calcium (0.5%) diet (NW group). The feeding period was 70 days. After 70 days, serum lipids, serum glucose, liver lipids and adipose tissue (epididymal, mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous) weights were determined. The body weight gains, food intake and liver weight were not significantly changed among experimental groups for 70 days. Serum triglyceride and LDL+VLDL-cholesterol were significantly decreased in HW group than that of HC group. Adipose tissue weight tended to decrease in HW group than that of HC group. This study suggested that the simultaneous intake of calcium and whey protein isolate induced a significant effects on lipid metabolism in obesity model mice.