

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットにおける 大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の有用性

小林 亮 平*¹⁾ 大野 良 文*²⁾ 長崎 大*³⁾
齊藤 大 蔵*¹⁾ 庄 秋 栄*¹⁾ 内藤 正 和*³⁾
水藤 弘 史*³⁾ 佐藤 祐 造*³⁾

背景: メタボリックシンドローム (MS) の根底にある肥満はインスリン抵抗性を誘発する最も重要な危険因子である。MSを改善させる食品として、大豆、シナモン、また、n-3系不飽和脂肪酸が豊富な紫蘇油が報告されている。そこで本研究では、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて、大豆タンパク、シナモン、紫蘇油を8週間自由摂取させ、大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の有用性について検討した。

方法: 8週齢の雄性OLETFラットを無作為に4群に分けた。コントロール群、大豆タンパク群、シナモン群、紫蘇油群とし、8週間自由摂取させ、体重、摂餌量、空腹時血糖値、血清インスリン値、インスリン抵抗性、副睾丸脂肪重量について評価した。インスリン抵抗性の指標はHomeostasis Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR) により評価した。

結果: 血清インスリン値は、紫蘇油群でコントロール群と大豆タンパク群に比べ増加傾向が認められた (各々 $P=0.053$, $P=0.063$)。その他の評価項目には有意差を認めなかった。

結論: OLETFラットにおける大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の8週間の自由摂取は、大豆タンパク群とシナモン群では、体重、摂餌量、血清インスリン値、インスリン抵抗性に影響を及ぼさなかったが、紫蘇油群で血清インスリン値が増加傾向を示した。以上の結果より、紫蘇油がOLETFラットのインスリン抵抗性を増悪させる可能性が推察された。

キーワード: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, Soy protein, Cinnamon, Perilla oil, Insulin resistance

I. 背景

近年、食生活の欧米化やライフスタイルの変化に伴う運動不足によりメタボリックシンドローム (MS) が急激に増加している¹⁾。このような中、MSは動脈硬化性疾患が高頻度に発症することが明らかとなり、診断基準が確立された²⁾。MSの基本病態である肥満はインスリン抵抗性^{3,4)}を誘発する最も重要な危険因子である。インスリン抵抗性は糖代謝異常、高血圧、脂質異常症といった病態の基盤になり、心筋梗塞、脳

卒中などの動脈硬化性疾患へとつながる。

MSを改善させる機能的食品として、大豆、シナモン、また、n-3系不飽和脂肪酸が豊富な紫蘇油が報告されている。大豆は、抗酸化作用や抗肥満作用があり、血清コレステロール低下作用を有しているとの報告もある^{5,6)}。さらに、骨格筋の糖利用の増加⁷⁾や肝臓におけるインスリン抵抗性を改善するという報告もある⁸⁾。シナモンは、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルラットのインスリン抵抗性を改善させる作用も確認されている⁹⁾。紫蘇油は、抗酸化作用があ

* 1) 愛知学院大学大学院心身科学研究科健康科学専攻

* 2) 愛知学院大学客員研究員心身科学部

* 3) 愛知学院大学心身科学部健康科学科

(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 E-mail: K0ba84agu@yahoo.co.jp

り, α リノレン酸を多く含んでいる。さらに, α リノレン酸を多く摂取するとインスリン抵抗性が改善するとの報告もある¹⁰⁾。このように, MS の改善に大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油が影響を与える可能性が推察される。

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットは, ヒトの肥満を伴う 2 型糖尿病のモデル動物として開発され, その特徴として過食, 肥満, インスリン抵抗性, インスリン分泌不全など, 2 型糖尿病患者にみられる危険因子を多数有している。また, OLETF ラットでは, 糖尿病発症後には糖尿病腎症の発症などの合併症も認められるため, 糖尿病の遺伝子解析や抗糖尿病薬などの開発に用いられている¹¹⁾。

そこで, 本研究では大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油の自由摂取が, OLETF ラットのインスリン抵抗性に及ぼす影響について検討を加えた。

II. 方法

1. 実験動物

実験には雄性 OLETF ラットを大塚製薬株式会社徳島研究所から供給を受け, 6 週齢より飼育を開始した。動物は, 個別ケージ内で飼育し, 餌と水は自由摂取とした。飼育室は, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 10\%$, 12 時間明暗サイクル (点灯; AM 8:00, 消灯; PM 8:00) の条件に設定した。本研究は愛知学院大学心身科学部動物実験委員会動物実験指針に従って実施した。

2. 実験薬物

普通固形飼料 (CE-2, 日本クレア) に混合した大豆タンパク質 (不二製油株式会社) 20% 含有食, シナモン (株式会社ギャバン) 1.0% 含有食, 紫蘇油 (紅花食品株式会社) 4.0% 含有食の 3 種類の餌を作成し実験に用いた。

3. 実験プロトコール

8 週齢より OLETF ラットを無作為に 4 群に分けた。コントロール群 (n=3), 大豆タンパク群 (n=3), シナモン群 (n=3), 紫蘇油群 (n=2) とし, 8 週間自由摂取させた。8 週齢と 16 週齢に血糖値を測定し, 最終採血終了後, 副睾丸脂肪を摘出し, 重量を測定した。

4. 体重および摂餌量の測定

体重は週に 1 回測定し, 摂餌量は週に 2 回測定し,

平均値をその週の摂餌量とした。

5. 空腹時血糖値および血清インスリン値の測定

空腹時血糖値および血液検査値の測定は, 14~16 時間絶食後, 尾静脈から約 0.8ml 採血し, 直ちにグルコースアナライザー (Yellow Springs Instrument Inc, Yellow Springs, USA) にて血糖値を測定した後, 約 1 時間後に日立多用途小型遠心機を用いて遠心処理し, 血清サンプルとして -85°C で保存し, 血清インスリン値の測定に用いた。血清インスリン値はインスリン測定キット (シバヤギ製薬株式会社) を用いて測定した。またインスリン抵抗性の指標である Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR) は空腹時血糖値 \times 空腹時血清インスリン値 / 405 の式で算出した¹²⁾。

6. 統計分析

得られた測定値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で標記した。得られた結果は, 空腹時血糖値に関しては, 二元配置分散分析を, その他の項目に関しては, 一元配置分散分析を行った後, Tukey の多重比較検定法を用いて統計的に解析した。危険率 5% 未満を統計的に有意差ありと判定した。データは SPSS (12.0 J for Windows) を用いて解析した。

III. 結果

1. 大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油の摂取が体重に及ぼす影響 (図 1)

全ての群の体重は加齢とともに増加したが, 大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油の 8 週間自由摂取中の体重はコントロール群と比較して他の 3 群で有意差は認められなかった。

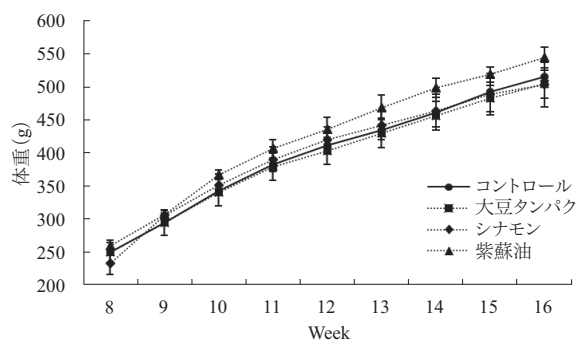


図 1 体重に対する大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油の影響

2. 大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の給餌が摂餌量に及ぼす影響 (図2)

全ての群の摂餌量は約30gであった。大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の8週間自由摂取中の摂餌量はコントロール群と比較して他の3群で有意差はなかった。

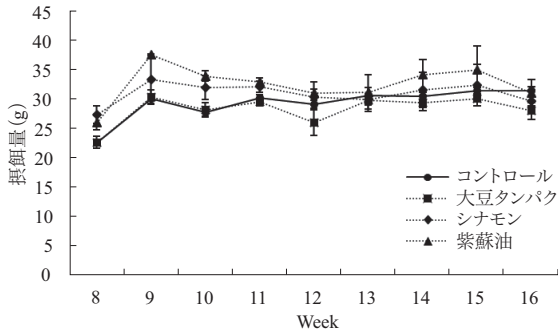


図2 摂餌量に対する大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の影響

3. 空腹時血糖値に及ぼす影響 (図3)

摂取前8週齢時および摂取後16週齢時における空腹時血糖値は、コントロール群 (8w: 70.0 mg/dl, 16w: 79.7 mg/dl), 大豆タンパク群 (8w: 68.0 mg/dl, 16w: 73.8 mg/dl), シナモン群 (8w: 72.4 mg/dl, 16w: 71.3 mg/dl), 紫蘇油群 (8w: 65.0 mg/dl, 16w: 79.6 mg/dl) でそれぞれの群間で有意差はなかった。

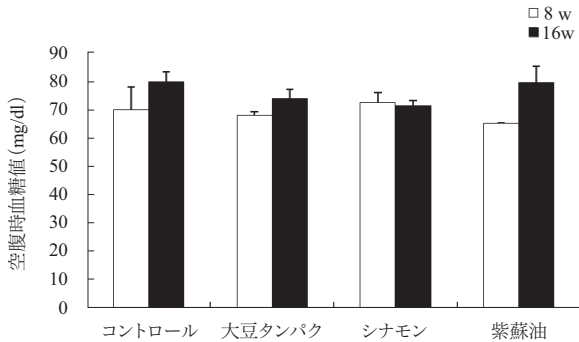


図3 空腹時血糖値に対する大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の影響

4. 血清インスリン値に及ぼす影響 (図4)

16週齢時における血清インスリン値は、コントロール群 (651.5 pg/ml), 大豆タンパク群 (593.4 pg/ml), シナモン群 (797.4 pg/ml), 紫蘇油群 (1892.9 pg/ml) であり、紫蘇油群はコントロール群と大豆タンパク群に比べ増加傾向が認められた (各々 $P=0.053$, $P=0.063$)。

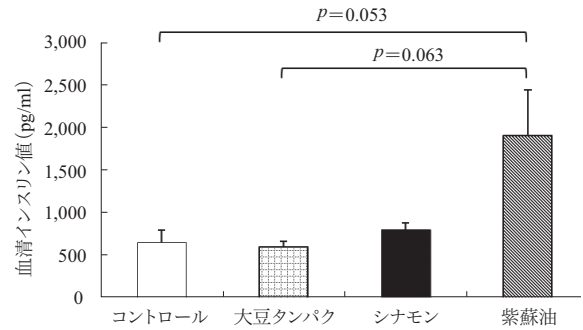


図4 血清インスリン値に対する大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の影響

5. HOMA-IR に及ぼす影響 (図5)

インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は、紫蘇油群ではコントロール群と大豆タンパク群に比べ増加傾向を認めた (各々 $P=0.084$, $P=0.086$)。

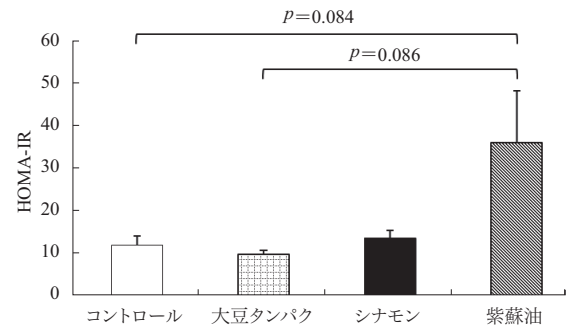


図5 HOMA-IR に対する大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の影響

6. 副睾丸脂肪重量に及ぼす影響 (図6)

16週齢時における副睾丸脂肪重量はコントロール群 (9.0g), 大豆タンパク群 (9.2g), シナモン群 (8.7g),

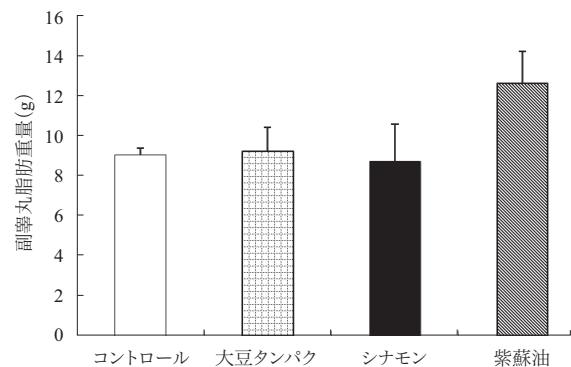


図6 副睾丸脂肪重量に対する大豆タンパク、シナモン、紫蘇油の影響

紫蘇油群 (12.6g) であったが, コントロール群と比較して他の 3 群で有意差はなかった。

IV. 考 察

近年, 糖尿病だけでなく肥満, 脂質代謝異常, 高血圧など多くの疾患でインスリン抵抗性が認められることが明らかとなった¹⁾。本研究で用いた OLETF ラットは, 肥満を伴う 2 型糖尿病のモデル動物として開発され, 離乳直後から体重が顕著に増加し, 生後 10 週齢では 380g 以上となり, 同週齢の LETO ラットと比べ 80g の体重差がみられる。また, 若年期では正常血糖と高インスリン血症およびインスリン抵抗性を示し, 老年期では高血糖と低インスリン血症を示すことが報告されている¹¹⁾。本研究においても 13 週齢の OLETF ラットの体重の平均は 441.8g であった。

本研究において, 体重, 摂餌量, 空腹時血糖値, 副腎丸脂肪重量がコントロール群に比べ他の 3 群との間に有意差は認められなかった。これらの結果は, 大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油の 8 週間摂取が, OLETF ラットの体重, 摂餌量, 空腹時血糖値, 副腎丸脂肪重量に影響を及ぼさなかったことを示唆している。

一方, OLETF ラットの紫蘇油群の血清インスリン値には, コントロール群に比べ, 増加傾向が認められた。これらの結果から, OLETF ラットの紫蘇油群では, 血清インスリン値が増加していることが示唆された。本研究で用いたインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は, 空腹時血糖値が 150mg/dl 以下で膵臓の β 細胞の疲弊がなく, インスリン分泌が十分に保たれていることが必要である。また, HOMA-IR は, 空腹時血糖値と空腹時血清インスリン値を測定するだけで算出できる簡易的な方法である。しかしながら, 簡易的な方法であるため, 本研究のようなわずかなインスリン値の変化に対しては, 厳密に評価できなかったことが示唆される。このようなインスリン値の増加に対して, インスリンシグナル伝達系 (インスリン受容体, IRS-1, PI-3 キナーゼ) が減弱している可能性が示唆される。こうしたインスリンシグナル伝達系を評価する方法として, 現時点では, 最も gold standard method とされているのが euglycemic clamp 法 (正常血糖クランプ) である¹³⁾。正常血糖クランプは, 生化学的, 生理的に骨格筋を中心とした末梢組織のインスリン感受性を定量的に測定する方法であり, 血中インスリン値を一定レベルに保つようにインスリン持続注入下に, 頻回 (10 分間隔) に血糖値をモニターして

ブドウ糖液を注入し, 血糖値を空腹時血糖値に維持するもので, この際必要なブドウ糖注入量はそのインスリン濃度における生体のインスリン感受性の指標とする方法である^{9, 14-17)}。OLETF ラットの紫蘇油群で, コントロール群に比べ, HOMA-IR の増加傾向がみられ, OLETF ラットの紫蘇油群では, インスリン抵抗性を悪化させることが示唆された。

以上のことから, 大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油はインスリン抵抗性を改善させる作用はないことが示唆され, MS に有効な機能性食品とはなりえないことが考えられる。

V. まとめ

肥満誘発性 2 型糖尿病モデル (OLETF) ラットにおける大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油の 8 週間の自由摂取を行った結果, 大豆タンパク群とシナモン群では, コントロール群に比べ, 体重, 摂餌量, 血清インスリン値, インスリン抵抗性に影響を及ぼさなかったが, 紫蘇油群でコントロール群に比べ, 血清インスリン値とインスリン抵抗性が増加傾向を示した。以上の結果より, 大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油はインスリン抵抗性を改善させる作用はないことが示唆された。

今後の課題として, 「大豆タンパク, シナモン, 紫蘇油」の長期摂取や摂取量の検証, さらに, 正常血糖クランプ法を用いた検証をする必要がある。

引用参考文献

- 1) Sato Y. et al. (2007). Clinical aspects of physical exercise for diabetes/metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*, **77**, suppl 1, 87-91.
- 2) The Examination Committee of Criteria for Metabolic Syndrome. (2005). The definition and criteria of metabolic syndrome. *J Jpn Soc Int Med*, **94**, 794-809.
- 3) Abdul-Ghani M.A. et al. (2010). Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 476279.
- 4) Peppia M. et al. (2010). Skeletal Muscle Insulin Resistance in Endocrine Disease. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 527850.
- 5) Anderson J.W. et al. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J med*, **333**, 276-282.
- 6) Lovati M.R. et al. (2000). Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr*, **130**, 2543-

- 2549.
- 7) Lavigne C. et al. (2001). Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *AM J Physiol*, **281**, 62–71.
 - 8) Maria E. et al. (2009). Soy protein reverses dyslipidaemia and the altered capacity of insulin-stimulated glucose utilization in the skeletal muscle of sucrose-rich diet-fed rats. *Br J Nutr*, **102**, 60–68.
 - 9) Qin B. et al. (2003). Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract*, **62**, (3) 139–148.
 - 10) Muramatsu T. et al. (2010). Higher dietary intake of alpha-linolenic acid is associated with lower insulin resistance in middle-aged Japanese. *Prev Med*, **50**, (5–6) 272–276.
 - 11) Kawano K. et al. (1992). Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, **41**, 1422–1428.
 - 12) Matthews D.R. et al. (1985). Homeostasis model assessment: zinsulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **28**, 412–419.
 - 13) DeFronzo R.A. et al. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, **237**, 214–223.
 - 14) 宇野智子他 (2005). 身体トレーニング効果の生化学的評価 — euglycemic clamp 法を用いた検討 —. 愛知学院大学心身科学部紀要, 1, 75–83.
 - 15) 韓艶清他 (2003). 覚醒ラットにおけるインスリンクランプ法に関して. 総合保健体育科学, **26**, (1) 59–65.
 - 16) Kobayashi R et al. (2012). Effect of bofutsushosan on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *J Trad Med*, in press.
 - 17) Lin L. et al. (1999). Rat C peptide I and II stimulate glucose utilization in STZ-induced diabetic rats. *Diabetologia*, **42**, 958–964.

(最終版平成23年12月1日受理)

Usefulness of soy protein, cinnamon, and perilla oil in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats

Ryohei KOBAYASHI, Yoshihumi OHNO, Masaru NAGASAKI, Daizo SAITO,
Qiurong ZHUANG, Masakazu NAITO, Hiroshi SUITO, Yuzo SATO

Abstract

BACKGROUND: Obesity is a key factor in the development of metabolic syndrome (MS) and is the most important risk factor for the development of insulin resistance. As a food to improve MS, perilla oil with soybean, cinnamon, n-3 PUFA attracts attention. In the current study, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats were used to investigate the usefulness of soy protein, cinnamon, and perilla oil.

METHODS: Male OLETF rats aged 8 weeks were randomly divided into four groups: control, soy protein, cinnamon and perilla oil were allowed free intake for 8 weeks. Body weight, food intake, serum insulin, insulin resistance and epididymis fat weight were evaluated. The homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) was used to evaluate insulin resistance in the rats.

RESULTS: As for the serum insulin level, a tendency to increase was recognized in comparison with the control group and the soy protein group in the perilla oil group ($P = 0.053$, $P = 0.063$, respectively). The other outcome measures showed no significant differences.

CONCLUSIONS: Free intake for 8 weeks of soy protein, cinnamon, and perilla oil in the OLETF rat did not have an influence on body weight, food intake, serum insulin, and insulin resistance, but the serum insulin level showed an increased tendency in the perilla oil group. These results suggest that perilla oil might exacerbate insulin resistance in the OLETF rats.

Keywords: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, Soy protein, Cinnamon, Perilla oil, Insulin resistance