◇◇◇◇ 原著論文 ◇◇◇◇

超音波照射は、黒酢による脂肪の分解を亢進させる

新井千加子[†], 國方敏夫, 中村次郎, 政木直也, 岩城完三, 福田恵温

林原生物化学研究所 研究センター 医薬研究部門

Ultrasound Application Promoted the Lipolytic Effect of Kurosu

Chikako ARAI[†], Toshio KUNIKATA, Jiro NAKAMURA, Naoya MASAKI,
Kanso IWAKI, and Shigeharu FUKUDA

*Biomedical Institute, Research Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., 675-1 Fujisaki,
Okayama 702-8006, JAPAN*

Generally, it is known that ultrasound application (UA) induces fat mobilization through increasing in norepinephrine secretion from sympathetic nerves in the white adipose tissue. On the other hand, Kurosu, a vinegar made from sweet potatoes, has been reported to improve lipid metabolism. In this study, we have examined the effect of combined treatment with UA plus Kurosu administration on fat mobilization, and analysed the changes of serum Triglyceride (TG) and Free Fatty Acids (FFA). The rats were administered 5 times/week with 4 mg/kg or 400 mg/kg of Kurosu by gastric intubation for a month. At the same time, the rats were subjected to the application of 715kHz ultrasound for 30 min at twice/week. After 14 times and 24 times of Kurosu administration (6 and 10 times of UA, respectively), significant decrease in the non-fasting serum FFA was observed in Kurosu and UA combined treated rats compared with control rats administered distilled water. Moreover, the rates of increase in serum TG and FFA before and 1 hr after the UA were correlated with the dose of Kurosu, and were higher than that of control group. These findings suggest that the lipolytic effect of Kurosu was further promoted by UA.

Keywords: ultrasound application, Kurosu, lipolytic, TG, FFA

1. 緒 言

近年の食生活の高カロリー化、およびモータリゼーションの発達に伴う運動量の低下により、肥満に悩む人間が増えている。このような状況にあって、瘦身効果を求めた機器あるいは種々の食品の需要が増えている。瘦身を目的とした機器にはさまざまなものがあるが、その1つに超音波照射装置がある。その原理として、三輪[1]らは超音波を局所に照射すると、中枢とは無関係に脂肪組織中の交感神経からノルアドレナリンが分泌され、これが末梢の脂肪細胞を活性化し、脂肪細胞に蓄えられていた脂肪が遊離脂肪酸 (free fatty acid, 以下 FFA) とトリグリセリド (triglyceride, 以下 TG) に分解され、血中に放出され、瘦身につながると報告し

ている。

黒酢とは醸造用アルコールを使わずに玄米や大麦だけを原料に壺の中で1年以上寝かせて作ったもので、脂質代謝改善作用や赤血球変形能改善作用 [2]、高血圧改善作用 [3] が報告されている。大南 [4,5] らはラットへのコーンオイル投与試験を行い、同時に黒酢を投与すると TG、総コレステロール、FFA が対照群に比べ、減少すると報告している。Mizunuma [6] らは黒酢中のアミノ酸が脂肪細胞における脂肪合成を抑制すると報告している。さらには黒酢の主成分の1つである短鎖脂肪酸の酢酸にも TG を低下させる作用が報告されている [7]。以上のように、黒酢に含まれる種々の成分により脂肪細胞における脂肪の蓄積が阻害され、肥満を予防する可能性が示唆されている。

そこで、我々は脂肪の分解を促進するといわれている超音波照射と TG や FFA を低下させる作用を有する黒酢を併用し、脂肪分解に対する効果を調べた。

(受付 2006 年 5 月 30 日, 受理 2006 年 8 月 24 日)

〒702-8006 岡山市藤崎 675-1

Fax: 81-86-276-6885, e-mail: fujisaki@hayashibara.co.jp

2. 方 法

2.1 動 物

4週齢, ウィスター系ラット雄をチャールズリバーより購入し, 予備飼育後5週齢で実験に使用した. 水は水道水を自由摂取とし, 餌はNMF固形飼料(オリエンタル酵母)を与えた. なお, 動物実験は社内のガイドラインに従って行った.

2.2 黒 酢

黒酢は健康医学社のもろみ芋酢「アマン」(2005年製造)を使用した. 本黒酢はサツマイモおよび麦麴を原料として製造されたものである.

黒酢の投与量の設定は, 一般的にヒトでの黒酢の推奨摂取量が20 mlとされており, 体重50 kgとすると400 mg/kgに相当すること, また, 大南ら[4]がラットを用いた試験で黒酢600 mg/kg投与でTGやFFAの低下を報告していることから, 400 mg/kgに決定した. また, 超音波照射との併用効果を明らかにするために, その1/100の用量である4 mg/kg群も設定した.

2.3 超音波照射

超音波照射装置は超音波振動子(直径28 mm, 富士セラミックス)を有する超音波発生部と, 超音波振動子を振動させる超音波制御部からなる. 制御部は富士セラミックスの情報に従って作製し, 周波数は715 kHzとした.

超音波照射部位としては, きれいに剃毛することが可能であること, および直径28 mmの振動子2個を圧着装着することが可能であることから, 腹部を選択した. 実際の照射は以下に行なった. まず, ラットを50 mg/kgのネンブタールで麻酔し, 腹部をバリカンで剃毛した. 剃毛部分には超音波の伝導性を高めるための伝達媒体として親水性ジェル(ハイピスワコー)を塗布し, 振動子を2個装着した(Fig. 1). 超音波照射の頻度は週2回とし, 50 mW/cm²の出力で30分間照射した. なお, 出力は超音波パワーメータmodel UPM-DT-1(Ohmin社)で測定した.

2.4 実験スケジュール

(1) 黒酢のみの投与試験

5週齢のラットに黒酢4 mg/kg, 400 mg/kgを, 対照には蒸留水(distilled water, 以下DW)を1日1回, 5回/週, 胃ゾンデで約1ヶ月間投与した. 14回投与後の18日目, および24回投与後の32日目に黒酢の投与15分後に採血し, 血中TGおよびFFAを測定した. 黒酢の投与は午前9時~10時の間に行い, また1群の匹数は5匹とした.

(2) 黒酢/超音波照射の併用による試験

5週齢のラットに黒酢4 mg/kgまたは400 mg/kg, 対照群としてDW(各群 $n=5$)を1日1回, 5回/週, ゾンデで約1ヶ月間投与した. その間, 週2回715 kHzの超音波を30分照射した(計10回). 黒酢の投与は午前9時~10時の間に行なった. また黒酢に加えて週2回超音波を照射する場合は, まず黒酢投与を行い, ネンブタールで麻酔した. 次いで黒酢投与30分後より30分間の照射を行なった.

6回目と10回目の超音波照射時には, まず黒酢投与を行った. 次いで, 麻酔注射を行い, 黒酢投与の15分後に尾静脈より超音波照射前の採血を行った. 黒酢投与30分後より30分間超音波を照射し, 照射終了60分後に採血し, 血清を採取した. さらに最終照射日の翌日に剖検し, 内臓周囲脂肪を採取し, 重量を比較した.

2.5 血清中の脂質パラメータの測定

血清中のTGはトリグリセリドE-テストワコー(和光純薬)を, FFAはNEFA C-テストワコー(和光純薬)を用いて測定した.

2.6 統 計

黒酢投与群と対照群とのTGおよびFFA値の比較は2標本 t 検定を用いて行った. また投与32日目の各群における超音波照射前と照射1時間後のFFAの値の比較は1標本 t 検定にて行なった.

Fig. 1 Conditions of ultrasound irradiation.

A: Ultrasonic oscillator, B: Ultrasonic application apparatus

3. 結 果

3.1 超音波照射による FFA 上昇効果

517 kHz あるいは 715 kHz の超音波を照射した後の FFA の推移を調べた (Fig. 2). 両波長ともに照射後 60 分をピークとした FFA の上昇が認められた. ただし,

Fig. 2 Changes in serum FFA after 517kHz and 715kHz ultrasound application (UA) in rats. Control rats were not given UA, but given anesthesia. The data are the mean $\pm$ SD (standard deviation) of each group ($n=7$ rats/group). UA; ultrasound application.

Fig. 3 Effects of Kurosu alone on the changes of serum TG (A) and FFA (B) levels. The data are the mean $\pm$ SD of each group ($n=5$ rats/group). Blood sampling was performed by tail vein puncture at day 18 (14 times of Kurosu administration) and day 32 (24 times of Kurosu administration), respectively.

FFA の上昇程度は 715 kHz の方が高かったため, 以後の実験は 715 kHz で行った.

3.2 黒酢および超音波照射の併用効果

(1) 黒酢投与のみの効果

まず黒酢投与のみの TG および FFA に及ぼす影響を調べた. その結果, 投与 18 日目, 32 日目ともに TG や FFA 値への影響は認められなかった (Fig. 3).

(2) 黒酢 / 超音波照射の併用

黒酢のみでは血清脂質には影響を与えなかったが, 黒酢と超音波を併用することで, 非空腹時の TG および FFA が低下する傾向が認められた (Fig. 4). とくに FFA は投与 18 日目から低濃度の黒酢でも有意な低下が認められ (Fig. 4B), 32 日目では黒酢高濃度群で有意な低下が認められた (Fig. 4B). また黒酢による低下作用は投与した黒酢の濃度に依存していた.

(3) 投与 32 日目の超音波照射後の脂質パラメータの変化

黒酢を投与した個体における, 超音波照射 1 時間後の脂質パラメータの動きを調べた. その結果, DW 群では TG はほとんど変化がないのに対し, 黒酢投与群

Fig. 4 Effects of combined treatment with UA plus Kurosu on the changes of serum TG(A) and FFA(B) levels. The data are the mean $\pm$ SD of each group ($n=5$ rats/group). Blood sampling was performed by tail vein puncture at day 18 (14 times of Kurosu administration) and day 32 (24 times of Kurosu administration), respectively.

ではTGの上昇が認められ、とくに400 mg/kg投与群では顕著であった (Fig. 5A). またFFAはDW群では上昇率はわずかに留まったのに対し、黒酢投与群では黒酢の濃度に依存した有意な上昇が認められた (Fig. 5B).

Fig. 5 The changes of serum TG (A), and FFA (B) levels from pre-UA to 1 hr after UA at day 32 (24 times of Kurosu administration). The data are the mean $\pm$ SD of each group ($n=5$ rats/group). UA; ultrasound application. * $p<0.05$ vs. pre-UA, ** $p<0.01$ vs. pre-UA, # $p<0.001$ vs. pre-UA

4. 考 察

血清脂質に対する超音波照射に関しては、超音波が交感神経を直接刺激して神経終末からノルアドレナリンの放出を促し、このノルアドレナリンが脂肪細胞に作用して蓄えられた脂肪を分解することが想定されている [1]. 今回、我々は715 kHzの超音波を照射することによるFFAの上昇作用を確認することができた。

そこで次に我々は超音波と黒酢投与の併用を考えた

が、その前に基礎データとして黒酢投与単独の非空腹時血清脂質に対する効果を調べた。黒酢を最大400 mg/kg (ヒトで20 g) 投与し、経日的に観察したが、血清脂質への影響はほとんど認められなかった。ところが、超音波を2回/週の頻度で照射することにより、血清中のTGが低下し、FFAも低下した。興味深いことにその低下作用はわずかに黒酢4 mg/kgの投与でも認められた。そこで黒酢を投与した個体における超音波照射前後のFFAの値を比較すると、DW群では上昇はごくわずかであるのに対して黒酢投与群では大きく上昇し、かつ、その上昇の程度は投与した黒酢の濃度に依存していた。このことから黒酢投与が超音波照射による脂肪の分解効果を高めている可能性が考えられる。しかしながら黒酢が超音波による脂肪の分解を高めるメカニズムについては現時点では不明であり、解明は今後の課題である。

一方、今回の脂肪低減作用に関しては、黒酢が血中のFFAを速やかに代謝している可能性も考えられる。これに関与する黒酢の成分についてはいくつか考えられるが、その1つに酢酸がある。今回使用した黒酢を有機酸分析システム(ダイオネクス社)にて分析すると、酢酸が100 ml中に4192 mg (有機酸の87%)含まれていた。酢酸は肝臓の5'-AMP-activated kinaseを活性化し [8], その結果FFA燃焼が促進する [9] と考えられている。したがって、今回、超音波照射との併用によって認められたTGおよびFFA低下は、先に述べた超音波照射による脂肪の分解の促進だけでなく、分解によって上昇したFFAの燃焼を酢酸が促進した結果によるものと考えられる。

以上、今回の試験で超音波を併用することによって、より低濃度の黒酢で、血清中のTGおよびFFAの低下を誘導できることが明らかになった。このような血清脂質の低下のみでも生活習慣病予防の観点から考えると十分意義はあるが、実験終了時の体重および精巣周囲脂肪量には差がないこと (data not shown) から、実際の瘦身効果を得るためにはもう少し、長期にわたる超音波照射と黒酢投与が必要と考えられた。

引 用 文 献

- [1] H. Miwa, M. Kino, L. Han, K. Takaoka, T. Tsujita, H. Furuhashi, M. Sugiyama, H. Seno, Y. Morita, Y. Kimura, H. Okuda; Effect of ultrasound application on fat mobilization. *Pathophysiology*, **9**, 13-19 (2002).
- [2] 藤野武彦, 有吉恭子, 牧角和宏, 金谷庄蔵, 大倉洋甫, 醸造酢の人体の血中脂質, 血液レオロジーに及ぼす影響, *健康科学*, **10**, 85-89 (1988).
- [3] 西川 泰, 高田曜子, 永井靖代, 森 強士, 河田智子, 石原伸浩, 高血圧自然発症ラットにおける黒酢エキスの抗

高血圧作用, 日本食品科学工学会誌, **48**, 73-75 (2001).

- [4] 大南宏治, 奥田拓道, くろずの生理活性について, 基礎と臨床, **17**, 53-58 (1983).
- [5] 大南宏治, 松岡栄子, 奥田拓道, 肥満, 糖尿病マウスおよび過酸化脂質投与ラットに及ぼすくろずの作用, 基礎と臨床, **17**, 2581-2584 (1983).
- [6] T. Mizunuma, Y. Takahashi, H. Okuda; Effect of amino Acids on insulin-stimulated glucose metabolism in fat cells. *J. Biochem*, **89**, 407-410 (1981).
- [7] T. Fushimi, K. Suruga, Y. Oshima, M. Fukiharui, Y. Tsukamoto, T. Goda; Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *Br J Nutr*, **95**, 916-924 (2006).
- [8] S. Sakakibara, T. Yamauchi, Y. Oshima, Y. Tsukamoto, T. Kadowaki; Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun*. **344**, 597-604, (2006).
- [9] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, T. Kadowaki; Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, **8**, 1288-1295, (2002).

要 旨

黒酢には脂質代謝改善作用があるといわれている。そこで、我々は超音波照射と黒酢投与を併用し、ラットでの血清脂質パラメータへの影響を調べた。一般的に超音波照射には脂肪分解作用があるといわれている。ラットに黒酢 4 mg/kg または 400 mg/kg を 1 日 1 回, 週 5 回ゾンデで 1 ヶ月間投与した。その間, 週 2 回 715 kHz の超音波を 30 分間照射した。黒酢投与 14 回(超音波 6 回), 24 回後(超音波 10 回)に尾静脈から採血し, TG および FFA を測定した。その結果, 黒酢投与のみでは TG および FFA に変化は認められなかったが, 黒酢と超音波の併用では投与 18 日後に黒酢 4 mg/kg 群で, 投与 32 日後に黒酢 400 mg/kg 群で有意な FFA 値の低下が認められた。さらに 1 ヶ月目に超音波照射の前後で比較すると, 併用群では TG および FFA の上昇率が黒酢の濃度依存的に高い現象がみられた。以上の結果から, 超音波照射が黒酢による脂肪分解効果をさらに高めていると考えられる。