高脂肪食肥満モデルマウスに対する乳酸菌 *Enterococcus faecalis* FK-23 の影響

元永智恵[§], 近藤正敏, 林 篤志, 岡森万理子,
北村良久, 嶋田貴志

ニチニチ製薬株式会社中央研究所

Effect of *Enterococcus faecalis* FK-23 on Anti-obesity
in Diet-induced Obesity Mice

Chie Motonaga[§], Masatoshi Kondoh, Atsushi Hayashi,
Mariko Okamori, Yoshihisa Kitamura
and Takashi Shimada

Central Research Laboratories, Nichinichi Pharmaceutical
Co., Ltd., 239-1 Tominaga, Iga City, Mie 518-1417

We examined the effect of heat treated *Enterococcus faecalis* FK-23 on anti-obesity. C57BL/6J mice (male, 5 weeks old) were fed control diet (Control group), high fat diet (High fat group) or high fat diet supplemented with 2% *E. faecalis* FK-23 mixture in water (FK-23 group) for 67 days. The effect of FK-23 on body weight, food intake, percent body fat, fat mass, epididymal fat pad weight, liver weight, lipids in liver, blood glucose, total cholesterol, adiponectin and leptin of these obese mice was examined. Body weight, fat mass, epididymal fat pad weight, blood glucose and leptin were significantly different between mice fed the high fat and FK-23 diets, while differences in food intake, percent body fat, liver weight, lipids in liver, total cholesterol and adiponectin were not significant.

(Received Mar. 27, 2009 ; Accepted Jun. 22, 2009)

Keywords : *Enterococcus faecalis* FK-23, body weight, leptin, obesity, mice

キーワード : *Enterococcus faecalis* FK-23, 肥満, レプチン, マウス

肥満とは「身体に占める脂肪組織の過剰に蓄積した状態」と定義されている¹⁾。脂肪の蓄積部位により皮下脂肪型肥満と内臓脂肪型肥満の二種類に分けられ、BMI (Body Mass Index) が30を越えると肥満症と判別される。皮下脂肪型肥満では、睡眠時無呼吸症候群や、重負荷によって膝や股関節に疼痛が生じる変形性膝関節症を発症しやすい。一方、内臓型肥満の場合には血清脂質異常、糖代謝異常および高血圧などの健康障害が現れ、非肥満者と比較して動脈硬化や脳梗塞などに罹るリスクが高くなるといわれている。腹囲が男性は85 cm以上、女性は90 cm以上の肥満者で、血清脂質異常、高血糖および高血圧のうち、二つ以上の疾患が重複した病態をメタボリックシンドロームと

よび、2008年4月より厚生労働省が発信する特定健康診断の対象項目となっている。メタボリックシンドロームの治療には減量が有効であるとされており、治療法として食事療法と運動療法、これらに薬物を併用する薬物療法などがある。

我々が保有する乳酸菌 *Enterococcus faecalis* FK-23 は、これまでに血清コレステロールの上昇抑制や脂質代謝異常の改善²⁾、血圧降下作用³⁾などの機能性が報告されており、肥満症に対しても何らかの効果が期待できる。そこで本試験では、C57BL/6J 雄性マウスに高脂肪食と *E. faecalis* FK-23 を摂取させ、摂取量、体重、体脂肪率、体脂肪量、血糖値、血清中総コレステロール、アディポネクチン、レプチンおよび臓器重量を指標として、脂質の過剰摂取に由来する肥満に対する影響を検討した。

1. 実験方法

(1) 被験物質

E. faecalis FK-23 を液体培地 (グルコース 2%, 酵母エキス 2%, ペプトン 2%, リン酸水素二カリウム 4%) で 37°C, 18 時間培養した。Microfiltration 膜で集菌および洗浄し、生菌菌体を回収した。これを 110°C, 10 分間の殺菌処理し、スプレードライで得られた乾燥菌末を FK-23 とした。

(2) 実験動物および飼育条件

4 週齢の C57BL/6J 雄性マウス (日本チャールスリバー社) を一般飼料 (CE-2, 固形飼料, 日本クレア社) で 1 週間の予備飼育後、試験に供した。試験期間中の飼料として、60 kcal% 脂肪食 (高脂肪食, 固形飼料, リサーチダイエツト社) および同じ組成で脂質を 10 kcal% 含有する対照食 (固形飼料, リサーチダイエツト社) を摂取させた。各飼料の組成については Table 1 に示した。飲用水はカートリッジフィルター (オルガノ社) で濾過した水道水を自由摂取させた。飼育環境は温度 24.0 ± 2.0°C, 湿度 55.0 ± 10.0%, 照明サイクル 12 時間 (明期 6:00~18:00) を条件とし、マウスはポリカーボネートケージにて飼育した。本試験は、ニチニチ製薬株式会社動物実験指針に則り、「実験動物の飼養および保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月, 総理府告示第 6 号, 一部改正平成 14 年 5 月 28 日)」に基づいて実施した。

(3) 群構成および投与方法

試験 0 日目に体重に基づいて 3 群に分け、それぞれを Control 群, High fat 群および FK-23 群とした。Control 群には対照食を, High fat 群および FK-23 群には高脂肪食をそれぞれ自由摂取させた。FK-23 群の飲用水中に FK-23 を 2% (w/w) 懸濁して摂取させた。摂取開始日を試験 0 日として 68 日間自由摂取させ、摂取量および摂水量を週 2 回測定した。

(4) 体重, 体脂肪率および体脂肪量

試験期間中は一般状態の観察を毎日行い、体重を週 2 回測定した。試験 65 日目に骨塩量測定装置 (DCS-600EX-III

〒518-1417 三重県伊賀市富永 239-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), lab@nichinichi-phar.co.jp

Table 1 Compositions of the two experimental diets

Variable	Control diet		High fat diet	
Ingredients	g%	kcal%	g%	kcal%
Protein	19	20	26	20
Carbohydrate	67	70	26	20
Fat	4	10	35	60
Total kcal/g	3.8	100	5.2	100
Ingredients	g	kcal	g	kcal
Casein, 80mesh	200	800	200	800
L-cystine	3	12	3	12
Corn Starch	315	1260	0	0
Maltodextrin 10	35	140	125	500
Sucrose	350	1400	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Corn Oil	25	225	25	225
Lard	20	180	245	2205
Mineral Mix, S10026	10	0	10	0
Dicalcium Phosphate	13	0	13	0
Calcium Citrate	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, H ₂ O	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mx, V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0	0	0
FD&C Red Dye #40	0	0	0.05	0
Total	1055.05	4057	773.85	4057

Formulated by Research Diets, Inc.

R: アロカ社) を用いて足根部から胸部(剣状突起)までの体脂肪率を求めた。また、得られた体脂肪率値と最近日の体重から、以下の計算式により体脂肪量を算出した。

$$\text{脂肪重量(g)} = \text{体脂肪率(\%)} \times \text{体重(g)} / 100$$

(5) 精巣周囲脂肪量, 肝臓重量および肝脂質量

採血後に精巣周囲脂肪および肝臓を摘出して重量を測定し、空腹時の体重より体重比臓器重量を算出した。肝臓は、凍結乾燥して粉碎した後、酸分解法⁴⁾により肝脂質量を測定した。

(6) 血糖, 総コレステロール, アディポネクチンおよびレプチン

試験 68 日から 24 時間絶食した後、全個体からエーテル麻酔下で心臓採血し、自己検査用グルコース測定器アドバンテージ(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を用いて血糖を測定した。遠心分離(2500×g, 20 minute)で得られた血清を用いて、総コレステロール量はコレステロール-テスト E ワコー(和光純薬工業社), アディポネクチンはアディポネクチン測定キット(大塚製薬社), レプチンはモリナガレプチン測定キット(森永生科学研究所)にてそれぞれ測定した。

(7) 統計処理

結果は平均値±標準偏差で表した。統計ソフトは Stat View (version5.0, SAS Institute Inc.) を用い、Student's t-test にて検定を行った。危険率は 5% 未満を有意として表示した。

2. 実験結果および考察

全個体において、異常な行動および状態は認められなかった。一日あたりの平均摂餌量は、Control 群, High fat 群および FK-23 群それぞれ 2.6 g, 3.1 g および 3.1 g を示した。各群間で有意な差は認められなかった。

各群の体重変動は Fig. 1 に、試験 65 日目に測定した体脂肪率と体脂肪量は Table 2 に示した。試験開始日の体重は、いずれの群においてもおおよそ 19±1 g で、試験 13 日以降、FK-23 群が High fat 群と比較して低値を示した。試験最終日には、Control 群, High fat 群および FK-23 群の各群の体重は、それぞれ 28.9 g, 40.7 g および 38.3 g となった。試験 13 日目を除いて、20 日, 65 および 67 日を除いて、FK-23 群が High fat 群と比較して有意な低値を示した。

Control 群, High fat 群および FK-23 群の体脂肪率はそれぞれ 25.6%, 61.6% および 57.7% を示し、高脂肪食を与えた群間で有意な差は認められなかった。Control 群, High fat 群および FK-23 群の体脂肪量は、それぞれ 7.4 g, 25.0 g および 22.0 g を示した。FK-23 群が High fat 群と比較し

て危険率 1% 未満の有意な低値が認められた。

FK-23 の体重増加抑制作用が認められるのは、本試験のように高脂肪食を摂取した時のみであり、一般飼料摂取時にそのような作用は認められないことをこれまでに報告している⁵⁾。しかし、FK-23 には α -グルコシダーゼならびに膵リパーゼの活性阻害作用が認められなかったこと（データ未発表）、本試験において、摂餌量に差が認められなかったことから、糖質ならびに脂肪の分解とそれとともなう腸管吸収に関与しないこと、中枢性の摂食調節に関与しないことが示唆された。

試験 69 日目に摘出した精巣周囲脂肪量、肝臓の重量ならびに脂質量を測定した結果を Table 2 に示した。Control

Fig. 1 Mean Body weight of each group during the experiment

Each point and bar indicates the mean $\pm$ SD : $\circ$, Control group ; $\bullet$, High fat group ; $\blacktriangle$, FK-23 group.

*, Significantly different from High fat group ($p < 0.05$).

**, Significantly different from High fat group ($p < 0.01$).

群, High fat 群および FK-23 群の精巣周囲脂肪量は、それぞれ、2.80 g/100 g body weight, 6.74 g/100 g body weight および 6.28 g/100 g body weight を示した。FK-23 群が High fat 群と比較して危険率 5% 未満の有意な低値を示した。Control 群, High fat 群および FK-23 群の肝臓重量は、それぞれ 3.60 g/100 g body weight, 2.87 g/100 g body weight および 2.97 g/100 g body weight を示した。肝脂質量は各群それぞれ 38.5%, 46.1% および 45.6% を示した。いずれの項目においても、High fat 群と FK-23 群の間では明らかな差は認められなかった。

試験 69 日目に各個体から得られた血糖、血清中の総コレステロール、アディポネクチンおよびレプチンの測定結果を Table 3 に示した。Control 群, High fat 群および FK-23 群の血糖は、それぞれ 78 mg/dL, 151 mg/dL および 100 mg/dL を示した。FK-23 群が High fat 群と比較して危険率 1% 未満の有意な低値を示した。総コレステロールは、High fat 群と FK-23 群の 2 群間で有意な差は認められなかった。Control 群, High fat 群および FK-23 群のアディポネクチンは、それぞれ、21.3 μ g/dL, 21.4 μ g/dL および 22.3 μ g/dL を示し、High fat 群と FK-23 群との間で有意な差は認められなかった。Control 群, High fat 群および FK-23 群のレプチンは、それぞれ 7.5 ng/mL, 53.5 ng/mL および 32.5 ng/mL を示した。FK-23 群が High fat 群と比較して危険率 1% 未満の有意な低値を示した。

レプチンは体重上昇抑制作用や糖代謝改善作用を有する脂肪細胞由来のペプチドホルモンで、主に視床下部に存在するレプチン受容体 (Ob-Rb) に結合することで摂食抑制やエネルギー代謝を亢進して体脂肪量を調節する⁶⁾。一般的な肥満者では、レプチン遺伝子の発現ならびに血中レプチンは亢進していることが多く、体脂肪量や BMI と正の相関を示す⁷⁾。この成因にレプチン抵抗性が考えられ、レプチン受容体および受容体以降の末梢組織における障害の存在が考えられる。Caro *et al.* は、肥満者において血液脳関門でのレプチンの移行が低下することで、血中レプチンの増加と髄液中レプチンの減少がみられたことを報告して

Table 2 Effects of FK-23 on percent of body fat, fat mass, epididymal fat pad weight, liver weight and lipid in liver

	Experimental group		
	Control	High fat	FK-23
Percent of body fat (%)	25.6 $\pm$ 5.5	61.6 $\pm$ 5.4	57.7 $\pm$ 3.8
Fat mass (g)	7.4 $\pm$ 1.7	25.0 $\pm$ 2.8	22.0 $\pm$ 2.3**
Epididymal fat pad weight (g/100 g body weight)	2.80 $\pm$ 0.46	6.74 $\pm$ 0.31	6.28 $\pm$ 0.65*
Liver weight (g/100 g body weight)	3.60 $\pm$ 0.26	2.87 $\pm$ 0.20	2.97 $\pm$ 0.09
Lipid in liver (%)	38.5 $\pm$ 7.2	46.1 $\pm$ 3.2	45.6 $\pm$ 1.5

Mean $\pm$ SD

*, Significantly different from High fat group ($p < 0.05$).

**, Significantly different from High fat group ($p < 0.01$).

Table 3 Effect of FK-23 on blood glucose, cholesterol, adiponectin and leptin in sera

	Experimental group		
	Control	High fat	FK-23
Blood glucose (mg/dL)	78±19	160±66	112±43**
Serum cholesterol (mg/dL)	153.4±18.7	180.1±25.3	179.4±20.4
Serum adiponectin (μg/dL)	21.3±3.1	21.4±3.9	22.3±5.0
Serum leptin (ng/mL)	7.5±2.6	53.5±18.1	32.5±13.6**

Mean±SD

**, Significantly different from High fat group ($p < 0.01$).

いる⁸⁾。しかし、レプチンの移行低下が原因となって肥満が起こるのか、肥満によってレプチンの移行低下が起こるのかは定かでない⁹⁾。また、レプチンはグルコース代謝に直接影響するといわれており、レプチン欠損遺伝子マウス (*ob/ob*) へのレプチン投与によって血糖および肝グリコーゲン貯蔵の減少、褐色脂肪細胞や骨格筋でのグルコース取り込みの促進などの糖利用の亢進が認められたという報告^{10)~12)}もある。

今後は FK-23 によるマウス代謝量への影響や血中および髄液中レプチンの比など詳しく検討することで作用機序を明らかにする必要がある。

3. 要 約

5 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに 60 kcal% 脂肪食 (高脂肪食) ならびに FK-23 懸濁液を並行して連日自由摂取させ、体重、摂餌量、体脂肪率、脂肪重量および各種血液生化学的検査に対する影響を検討した。Control 群には対照食を、High fat 群および FK-23 群には高脂肪食をそれぞれ自由摂取させた。FK-23 は FK-23 群の飲用水中に 2% (w/w) 懸濁して摂取させた。その結果、体重、体脂肪量、血糖およびレプチンにおいて FK-23 群が High fat 群と比較して有意な低値を示した。しかし、摂餌量、体脂肪率、精巣周囲脂肪、肝臓重量、肝脂質量、血清中総コレステロールおよびアディポネクチンにおいて FK-23 群と High fat 群で有意な差は認められなかった。

文 献

- 日本肥満学会編, 肥満症治療ガイドラインダイジェスト版 新しい肥満の判定と肥満症の診断基準 (株式会社 協和企画, 東京), pp. 17-24 (2007).
- 山口英世, 安部 茂, 赤岡家雄, 森井浩世, 西沢良紀, 大橋一智, 嶋田貴志, 岩谷綱一, 腸球菌 FK-23 標品の高血圧および脂質代謝に及ぼす効果, 第 1 回中西合作動脈硬化症・血栓症・一次予防国際シンポジウム, 北京 **9**, 19-20 (1992).
- Shimada, T., Kadowaki, Y., Ohmiya, K. and Yamamoto, T., Identification of an RNA fraction from *Enterococcus faecalis* FK-23 cells as the antihypertensive compound. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 109-112 (1996).
- 分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説 財団法人 日本食品分析センター 中央法規 (2001).
- 嶋田貴志, 伊藤健次, 岩谷綱一, 山本哲郎, 乳酸菌標品 (*Enterococcus faecalis* FK-23 株) のラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験, 応用薬理, **55**, 53-60 (1998).
- 西村治男, 小川佳宏, 中尾一和, レプチンの生理作用と病態における意義: レプチンの生理作用および肥満におけるレプチン抵抗性の役割, 医学のあゆみ, **191**, 1081-1084 (1999).
- Hosoda, K., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Miyawaki, T., Hiraoka, J., Hanaoka, I., Yasuno, A., Nomura, T., Fujisawa, Y., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Yamori, Y. and Nakao, K., Development of radioimmunoassay for human leptin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 234-239 (1996).
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K. and Considine, R.V., Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance., *Lancet*, **348**, 159-161 (1996).
- 海老原健, メタボリックシンドローム発症要因としての内臓肥満・脂肪細胞機能異常脂肪組織由来液性因子アディポサイトカインとその役割 レプチン, 日本臨床, 64 巻増刊号 (株式会社日本臨床社, 大阪), pp. 217-224 (2006).
- Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M. and Charron, M.J., Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, **389**, 374-377 (1997).
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Aizawa-Abe, M., Hosoda, K., Suga, J., Ebihara, K., Satoh, N., Iwai, H., Inoue, G., Nishimura, H., Yoshimasa, Y. and Nakao, K., Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation: usefulness of leptin for the treatment of obesity-associated diabetes., *Diabetes*, **48**, 1615-1622 (1999).
- Aizawa-Abe, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Ebihara, K., Satoh, N., Iwai, H., Matsuoka, N., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y. and Nakao, K., Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J. Clin. Invest.*, **105**, 1243-1252 (2000).

(平成 21 年 3 月 27 日受付, 平成 21 年 6 月 22 日受理)