ラット脂質代謝を改善する 乳酸発酵豆乳の有効投与量

原田智子, 田中麻貴*, 都築公子**, 菅原 誠**,
高木尚紘, 福田 満[§]

武庫川女子大学大学院生活環境学研究科食物栄養学専攻

* 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科

** マルサンアイ株式会社・開発統括部

Effective Dosage of Lactic Fermented Soymilk
for Improving Lipid Metabolism in Rats

Tomoko Harada, Maki Tanaka*, Kimiko Tsuzuki**,
Makoto Sugawara**, Naohiro Takagi
and Mitsuru Fukuda[§]

Food Science and Nutrition, Graduate School of Human
Environmental Sciences, Mukogawa Women's
University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558

* Department of Food Science and Nutrition, School of
Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's
University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558

** Marusan-ai Co., Ltd., 1, Aza-arashita, Nikki-cho,
Okazaki, Aichi 444-2193

Soy protein has hypolipidemic action on blood and liver. We thus manufactured lactic fermented food from soymilk and investigated the physiologically effective dosage of fermented soymilk. Male Sprague-Dawley rats were fed a soy protein-free diet (control), or a diet containing 12.5% (soy protein 5%) or 25.0% (soy protein 10%) fermented soymilk. Rats fed the soy protein diets showed significant suppression of hepatic lipids and total cholesterol level in plasma, as well as a tendency in the decrease of visceral fat. These effects depended on the amount of fermented soymilk supplemented in the diet. Supplementation of more than 10% fermented soymilk was necessary to achieve significant physiological effects.

(Received Nov. 18, 2009 ; Accepted Jan. 4, 2010)

Keywords : soymilk, lactic fermentation, lipid metabolism, rat, cholesterol

キーワード : 豆乳, 乳酸発酵, 脂質代謝, ラット, コレステロール

最近, メタボリックシンドローム症状を示す人々は増加傾向である¹⁾. 食生活の欧米化や運動不足などの生活習慣の乱れが主な原因と考えられる. 日本人の最近の食生活で大豆摂取量が減少傾向にあるが, 大豆には機能性因子である大豆タンパク質, イソフラボン等が多く含まれ, 血中コ

レステロール上昇抑制作用や肝臓脂質蓄積抑制作用等メタボリックシンドローム予防効果が報告されている²⁾³⁾. 今日まで日本人が健康状態で長寿を維持できたのは, 豆腐や納豆などの大豆食品を摂取する日本型食生活が要因の一つであったと推定される. それゆえ, 日常の食生活において多くの大豆食品を摂取することがメタボリックシンドローム予防対策になると推測される. そこで, 大豆タンパク質等を豊富に含む豆乳に注目し, さらに豆乳を植物性食品起源の乳酸菌で発酵させた「乳酸発酵豆乳」を作成した. 当該食品は, 牛乳ヨーグルトと同様の形状であり, 食品として容易に継続摂取が可能と考えられる. 乳酸発酵豆乳については既に脂質代謝改善に関する生理作用が報告され⁴⁾⁵⁾, 著者らも乳酸発酵豆乳の血中コレステロール低下作用, 肝臓脂質蓄積抑制作用という脂質代謝改善作用を既に報告している⁶⁾. しかしながら, 脂質代謝改善作用を発現する乳酸発酵豆乳の有効投与量は明確ではない. 本論文においては, 脂質代謝改善に有効な乳酸発酵豆乳の投与量について, ラットの血中脂質濃度の経時的变化および肝臓脂質蓄積量等に及ぼす影響の観点から明らかにし, それぞれの作用発現に必要な乳酸発酵豆乳の有効投与量について明らかにしたので報告する.

1. 実験方法

(1) 実験用試料

飼料原料となる乳酸発酵豆乳(以下発酵豆乳)は, マルサンアイ株式会社(愛知県岡崎市)が凍結乾燥試料として調製したものを使用した. 発酵豆乳は, 豆乳を植物性食品起源の乳酸菌(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 菌株 SNC33)で15時間発酵させて作成した. 発酵豆乳の成分組成を Table 1 に示した. 発酵豆乳以外の飼料原料は, 日本クレア株式会社および和光純薬工業株式会社から購入したものを使用した.

(2) 実験動物および飼育条件

既報⁶⁾では5週齢 Sprague-Dawley 系ラットを用いたが, 食餌量および血中成分の安定化を考慮して, 本研究では7週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを用いた. まず, AIN-93G の組成に基づいた基準飼料⁷⁾で1週間飼育した. その後, 引き続き基準飼料を投与したコントロール群($n=6$, 以下 CO 群), CO 群飼料の12.5%を乾燥発酵豆乳で置換した飼料を投与する FSM-5 群(大豆タンパク質5%置換に相当した飼料投与群, $n=6$), 同様に, 25.0%を乾燥発酵豆乳で置換する飼料を投与した FSM-10 群(大豆タンパク質10%置換に相当した飼料投与群, $n=6$)の3群に分け, 5週間各飼料を投与して飼育した(Table 2). 飼育期間中, ラットは個別の金網ケージに入れ, 室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 7\%$ の環境下において12時間の明暗サイクル(明期 8:00~20:00)で自由摂食, 自由摂水させた. なお, 本動物実験は武庫川女子大学動物飼育委員会の規定に基づいて実施した.

〒663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46

* 〒663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46

** 〒444-2193 愛知県岡崎市仁木町字荒下 1

[§] 連絡先 (Corresponding author), senjuoka@mukogawa-u.ac.jp

Table 1 Composition of freeze-dried fermented soymilk

Component	Fermented soymilk
Water (%)	8.1
Protein (%)	40.0
Fat (%)	32.4
Carbohydrate (%)	7.4
Dietary fiber (%)	6.7
Ash (%)	5.4
Energy (kcal/100 g)	494.4

(3) 血漿採取と成分の測定

採血は、8 時間絶食後、ジエチルエーテル麻酔下で、ヘパリン処理（ヘパリンナトリウム「味の素」注入）した注射器で尾部動脈より行った。これを遠心分離後（3000 rpm, 4°C, 15 min），血漿を採取し、分析時まで -80°C で冷凍保存した。

血漿中の総コレステロール（以下 TC），トリグリセリド（以下 TG）について、それぞれ市販の測定キットであるコレステロール E-テストワコー，トリグリセライド E-テストワコー（以上和光純薬工業）を用いて測定した。

(4) X 線 CT スキャン

飼育 5 週目のラットを用いた。イソフルラン（フォーレン®，アボットジャパン）による麻酔下で、X 線 CT スキャン装置 LaTheta LCT-200（Aloka）で、胸骨第 12 番目から精巣付け根までの範囲を CT スキャンし、内臓脂肪および皮下脂肪の重量を解析した。スキャンスライス間隔は 3 mm 間隔で行った^{8)~10)}。

(5) 糞重量および糞中胆汁酸濃度の測定

飼育 5 週目に 2 日間の糞を採取し、凍結乾燥後、糞重量の測定を行った。凍結乾燥させた糞を乳鉢で粉碎後、0.25 g を 2.5 ml の加熱アルコール（70°C, 60 分）で抽出した。続いて、2.5 ml のクロロホルム-メタノール混液（1:1, v/v）洗浄を 2 回繰り返す、抽出液と洗浄液を合わせ、溶媒除去および 100% エタノールに溶解後、市販の測定キットである総胆汁酸-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した。

(6) 臓器摘出

飼育期間終了後、ジエチルエーテル麻酔下で心臓より脱血後、肝臓、盲腸を摘出し、湿重量を測定した。肝臓は、分析時まで -80°C で冷凍保存した。

(7) 肝臓脂質量の測定

肝臓脂質は Folch ら¹¹⁾の方法に従い、クロロホルム-メタノール混液で抽出した後、溶媒除去して粗脂肪とした。抽出した粗脂肪を 5% TritonX-100 含有イソプロパノールに溶解後、血漿成分分析と同様のキットを用いて、肝臓コレステロール（以下肝臓 Chol）およびトリグリセリド（以下肝臓 TG）を測定した。

(8) 統計処理

Table 2 Composition of experimental diets (weight%)

Ingredient	Diet group		
	CO	FSM-5	FSM-10
Casein ¹	20.0	14.2	8.4
Cornstarch ¹	39.8	39.8	37.0
Dextrinized cornstarch ¹	13.2	13.1	11.3
Sucrose ¹	10.0	10.0	10.0
Purified soybean oil ¹	7.0	3.1	0.0
Cellulose ¹	5.0	4.1	3.2
Mineral mix (AIN-93G-MX) ¹	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-93 VX) ¹	1.0	1.0	1.0
L-Cystine ²	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate ²	0.25	0.25	0.25
tert-Butylhydroquinone ²	0.0014	0.0014	0.0014
Fermented-soymilk ³	—	12.5	25.0

¹Japan CLEA, Osaka. ²Wako pure chemical industries, Osaka. ³Marusan-ai, Okazaki.

CO, Control; FSM-5, fermented soymilk corresponding to soy protein 5%; FSM-10, fermented soymilk corresponding to soy protein 10%.

各実験結果は、平均値±標準誤差（mean±SE）で示した。データの解析は、SPSS for Windows 12.0j を用いて、Tukey の多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統計的に有意とした。

2. 実験結果および考察

(1) 体重、摂餌効率、組織重量

体重、摂餌効率、組織重量、内臓脂肪量、皮下脂肪量、脂肪含有率を Table 3 に示した。最終体重および摂餌効率に有意差は認められなかったが、CO 群に比較し、発酵豆乳投与群で低値傾向を示した。肝臓重量に有意差は認められなかった。盲腸重量は、CO 群と比較し、FSM-10 群で有意に高値を示した。これは、豆乳中に豊富に含まれる水溶性食物繊維およびオリゴ糖を栄養源にして腸内細菌が増殖したためと推定される。発酵豆乳の摂取による腸内細菌活動促進および腸内フローラへの影響が推定される⁴⁾。内臓脂肪重量、脂肪含有率には有意差は認められなかったが、発酵豆乳の投与量依存的に減少傾向を示した。皮下脂肪重量は発酵豆乳投与群でわずかに低値を示した。

(2) 血中脂質

血漿 TC 濃度および TG 濃度の経時的変化を Table 4 に示した。血漿 TG 濃度に有意差は認められなかったが、発酵豆乳投与群は CO 群に比較して常に低値を示した。血漿 TC 濃度は FSM-10 群で投与 3 週目に CO 群と比較して有意に低値（ $p = 0.042$ ）となり、5 週目には低値傾向（ $p = 0.051$ ）を示した。

(3) 肝臓脂質

肝臓脂質濃度の測定結果を Table 5 に示した。肝臓 Chol および TG は CO 群と比較し、発酵豆乳投与群で低値傾向を示し、FSM-10 群で Chol および TG ともに有意に低値を

Table 3 Initial and final body weight, feeding efficiency, and tissue weight of rats fed fermented soymilk diets for 5 weeks

	CO	FSM-5	FSM-10
Initial body weight (g)	254.3±3.6 ^a	253.5±3.9 ^a	254.4±4.3 ^a
Final body weight (g)	487.8±15.4 ^a	475.0±9.6 ^a	475.3±19.2 ^a
Feeding efficiency (g B.W. gain/g diet)	0.29±0.01 ^a	0.28±0.02 ^a	0.27±0.01 ^a
Tissue weight (% B.W.)			
Liver	4.1±0.1 ^a	4.0±0.1 ^a	3.9±0.1 ^a
Cecum	0.6±0.1 ^a	0.7±0.0 ^a	0.9±0.1 ^b
Visceral fat	6.6±0.7 ^a	5.9±0.5 ^a	5.2±0.7 ^a
Subcutaneous fat	4.4±0.5 ^a	3.8±0.3 ^a	4.1±0.5 ^a
Fat percentage (%)	19.4±2.0 ^a	17.6±1.3 ^a	16.7±2.0 ^a

CO, Control ; FSM-5, fermented soymilk corresponding to soy protein 5% ; FSM-10, fermented soymilk corresponding to soy protein 10%.

Each value is the means±SE of 6 rats. ^{a,b} Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

Table 4 Plasma total cholesterol and triglyceride of rats fed fermented soymilk diets for 5 weeks

		CO	FSM-5	FSM-10
Total cholesterol (mg/dl)	0 W	68.0±3.6 ^a	69.8±5.9 ^a	68.2±6.6 ^a
	3 W	90.3±5.4 ^a	80.3±9.7 ^{ab}	62.4±6.1 ^b
	5 W	88.1±5.3 ^a	76.7±7.9 ^a	64.3±6.0 ^a
Triglyceride (mg/dl)	0 W	86.2±12.1 ^a	70.5±8.7 ^a	56.4±4.9 ^a
	3 W	163.0±8.7 ^a	142.0±39.0 ^a	111.2±21.5 ^a
	5 W	179.6±4.9 ^a	157.5±49.2 ^a	138.4±36.7 ^a

CO, Control ; FSM-5, fermented soymilk corresponding to soy protein 5% ; FSM-10, fermented soymilk corresponding to soy protein 10%.

Each value is the means±SE of 6 rats. ^{a,b} Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

Table 5 Liver and fecal parameters of rats fed fermented soymilk diets for 5 weeks

		CO	FSM-5	FSM-10
Liver	Cholesterol (mg/g)	3.0±0.1 ^a	2.5±0.2 ^{ab}	2.2±0.1 ^b
	Triglyceride (mg/g)	34.6±4.8 ^a	22.5±1.8 ^{ab}	15.7±0.9 ^b
Feces	Fecal dry weight (g/day)	1.7±0.0 ^a	1.8±0.1 ^a	1.7±0.1 ^a
	Bile acid (mg/g feces)	26.3±3.0 ^a	28.7±5.5 ^{ab}	42.3±3.1 ^b

CO, Control ; FSM-5, fermented soymilk corresponding to soy protein 5% ; FSM-10, fermented soymilk corresponding to soy protein 10%.

Each value is the means±SE of 6 rats. ^{a,b} Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

示した。

(4) 糞重量, 糞中胆汁酸

糞重量に有意差は認められなかったが, 糞中胆汁酸濃度は CO 群と比較し, FSM-10 群で有意に高値を示した (Table 5)。

(5) 脂質代謝に影響を及ぼす乳酸発酵の有効濃度

血漿総コレステロール濃度上昇抑制効果, 肝臓脂質低下効果については, 大豆タンパク質やイソフラボン, 発酵豆乳の効果について既に報告されているが^{2)~5)}, その発酵豆乳の投与効果が現れる有効投与量について検討した研究報告は認められてない。

本研究において, 発酵豆乳投与で体重増加量には有意差

がなかったが、脂肪組織重量は減少傾向であった。大豆タンパク質の摂取により、白色脂肪細胞の UCP 発現が促進されると報告されているので¹²⁾、発酵豆乳投与によっても、UCP 発現が亢進したと推定される。また、肝臓 TG が有意に減少したことから、肝臓の TG 合成抑制および分解促進が生じたと示唆される^{2)~5)13)}。TG 合成抑制は、大豆タンパク質や大豆ヨーグルトの摂取により肝臓で脂肪酸合成酵素を制御する転写因子である SREBP-1 (Sterol regulatory element binding protein-1) と脂肪酸合成酵素 FAS の発現が抑制されると報告されている²⁾¹⁴⁾。肝臓 Chol の低下は、FSM-10 群では胆汁酸の排泄促進が関与していると示唆される。これは難消化性大豆タンパク質が胆汁酸を吸着し排泄する作用¹⁵⁾と大豆タンパク質や大豆ヨーグルト摂取時の肝臓でのコレステロール 7 α ヒドロキシラーゼ (CYP7A1) 遺伝子発現促進による胆汁酸合成系の促進作用¹⁴⁾の結果と推定され、10% 相当大豆タンパク質を含む発酵豆乳の投与が糞中への胆汁酸の排泄を促進すると示唆された。FSM-5 群では胆汁酸排泄が促進されていないにも関わらず、血漿 TC の上昇抑制が観察されたことから、肝臓コレステロール合成抑制が生じていたと推定される。これは、発酵豆乳にはグリコシド型イソフラボンが 18 mg/100 g 乾燥重量、アグリコン型イソフラボンが 109 mg/100 g 乾燥重量の濃度で含まれているので、腸管から吸収しやすいアグリコン型イソフラボンがコレステロール代謝系酵素の転写因子である SREBP-2 の発現調節に作用して血清コレステロールのクリアランスを増加させたためと推定される²⁾。したがって、発酵豆乳も脂質異常症およびアテローム性動脈硬化予防に寄与すると考えられる。

既報⁶⁾では飼料中の大豆タンパク質含有量 8% に相当する発酵豆乳含有飼料の投与により血漿 TC 濃度の有意な低下は 2 週目に認められたが、4 週目には認められなかった。しかし、本研究では飼料中の大豆タンパク質含有量 10% に相当する発酵豆乳含有飼料の投与で血漿 TC 濃度は 3 週目に有意に低値となり、5 週目には低値傾向を示した。したがって、血漿 TC 濃度の継続的低下を得るためには飼料中の大豆タンパク質含有量 10% 以上が有効投与量と示唆される。肝臓 TG およびコレステロール濃度低下について、本研究では大豆タンパク質 10% 含有率の飼料投与で有意な効果が得られた。既報⁶⁾では大豆タンパク質 8% 含有率の発酵豆乳飼料で肝臓 TG に有意な低下効果が認められなかったため、肝臓脂質低下の有効投与量は飼料中含有率大豆タンパク質 10% 以上と示唆される。

3. 要 約

豆乳を乳酸菌で発酵させた発酵豆乳による脂質代謝改善作用の有効投与量を調べるため、SD 系雄性ラットに 12.5% または 25.0% 発酵豆乳含有飼料 (飼料中大豆タンパク質 5% または 10% 含有) を 5 週間投与した。既報では大豆タンパク質 8% 含有発酵豆乳飼料で肝臓コレステロール濃度

については有意な低下が得られているが、肝臓 TG 濃度では有意な低下は得られていない。本研究では大豆タンパク質 10% 含有発酵豆乳飼料で肝臓 TG 濃度についても有意な低下効果が認められた。一方、大豆タンパク質 10% 含有発酵豆乳飼料で血漿 TC 濃度の有意な低下が認められた。以上の結果から効果的なラットの脂質代謝改善作用を得るためには、飼料中の大豆タンパク質含有量 10% 以上となる発酵豆乳飼料の摂取が必要であることが明らかになった。

文 献

- 1) 厚生労働省, 平成 19 年国民健康・栄養調査結果の概要について。
- 2) Torres, N., Torre-Villalvazo, I. and Tovar, A.R., Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J. Nutr. Biochem.*, **17**, 365-373 (2006).
- 3) Nagata, Y., Ishikawa, N. and Sugano, M., Studies on the mechanism of Antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, **112**, 1614-1625 (1982).
- 4) 荒 勝俊, 大辻一也, 川合修次, 大久保一良, 発酵豆乳の脂質代謝および腸内フローラに及ぼす影響, *食科工*, **48**, 807-815 (2001).
- 5) Kikuchi-Hayakawa, H., Onodera, N., Matsubara, S. and Yasuda, E., Effect of soya milk and bifidobacterium fermented soya milk on plasma and liver lipids, and fecal steroids in hamsters fed on a cholesterol-free or cholesterol-enriched diets. *Br. J. Nutr.*, **79**, 97-105 (1998).
- 6) 北脇涼子, 高木尚紘, 岩崎充弘, 浅尾弘明, 岡田早苗, 福田満, 乳酸発酵させたオカラ豆乳のラット血漿コレステロール低下作用, *食科工*, **54**, 379-382 (2007).
- 7) Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- 8) Yamanouchi, K., Yada, E., Hozumi, H., Ueno, C. and Nishimura, M., Analyses of hind leg skeletons in human growth hormone transgenic rats. *Experimental Gerontology*, **39**, 1179-1188 (2004).
- 9) Goseki-sone, M., Maruyama, R., Sogabe, N. and Hosoi, T., Effects of dietary lactose on long-term high-fat-diet-induced obesity in rats. *Obesity*, **11**, 2605-2613 (2007).
- 10) Ooyama, K., Wu, J., Nosaka, N., Aoyama, T. and Kasai, M., Combined intervention of medium-chain triacylglycerol diet and exercise reduces body fat mass and enhances energy expenditure in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **54**, 136-141 (2008).
- 11) Folch, J., Lees, M. and Stabley, G.H.S., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 12) 福田ひとみ, 木村智恵, 大脇章子, 中森俊宏, 高松清治, 入谷信子, UCP family 発現に対する分離大豆たん白質の影響: ラットの動物実験と初代培養脂肪細胞での研究, 大豆たん白質研究, **8**, 103-107 (2005).
- 13) Ronis, M.J., Dietary soy protein isolate attenuates metabolic syndrome in rats via effects on PPAR, LXR, and SREBP signaling. *J. Nutr.*, **139**, 1431-1438 (2009).
- 14) Kitawaki, R., Nishimura, Y., Takagi, N., Iwasaki, M.,

- Tsudoku, K. and Fukuda, M., Effects of lactobacillus fermented soymilk and soy yogurt on hepatic lipid accumulation in rats fed a cholesterol-free diets. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1484-1488 (2009).
- 15) Higaki, N., Sato, K., Suda, H., Suzuki, T., Komori, T., Saeki, T., Nakamura, Y., Ohtsuki, K., Iwami, K. and Nakamoto, R., Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2844-2852 (2006).
- (平成 21 年 11 月 18 日受付, 平成 22 年 1 月 4 日受理)
-