乳酸発酵豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合が高脂肪高コレステロール食投与ラットの肝臓脂質代謝へ及ぼす影響

小林麻貴^{1*}, 榊原里恵², 江草信太郎², 福田 満¹

¹ 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科

² マルサンアイ株式会社開発統括部研究・開発課

Effects of Isoflavone Aglycone Ratio in Lactic Acid-Fermented Soymilk on Hepatic Lipid Metabolism in Rats Fed a High Fat and High Cholesterol Diet

Maki Kobayashi^{1*}, Rie Sakakibara², Shintaro Egusa² and Mitsuru Fukuda¹

¹ Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558

² Research Development Division, Marusan-Ai Co., Ltd., 1 Aza-Arashita, Nikki-cho, Okazaki, Aichi 444-2193

We investigated the effects of different isoflavone aglycone ratios in lactic acid-fermented soymilk on hepatic lipid metabolism in rats fed a high fat and high cholesterol diet. Male Sprague-Dawley rats (7 weeks old) were fed a control diet (AIN-93G), high fat and high cholesterol diet, or high fat and high cholesterol diet containing fermented soymilk with a low isoflavone aglycone ratio or fermented soymilk with a high isoflavone aglycone ratio for 5 weeks. Both lactic acid-fermented soymilks exhibited lipid metabolism-modulating function, and the function was stronger in fermented soymilk with a high isoflavone aglycone ratio than in that with a low isoflavone aglycone ratio. It was proposed that isoflavone aglycones stimulated the lipid metabolism-modulation effects in liver. (Received Apr. 25, 2013; Accepted May 22, 2013)

Keywords : isoflavone, aglycone, lactic acid fermentation, lipid metabolism, high fat and high cholesterol diet

キーワード : イソフラボン, アグリコン, 乳酸発酵, 脂質代謝, 高脂肪高コレステロール食

近年、食生活の欧米化や運動不足によりメタボリックシンドロームが増加傾向にあり¹⁾, その予防に効果的な大豆食品、特に摂取容易な豆乳に期待が寄せられている。食事摂取量を減らさずにメタボリックシンドロームを予防するためには食事内容の質的改善が必要である。しかし、最近の日本人の食生活では健康改善効果のある豆乳の摂取量は不

足しがちである。大豆には機能性因子である大豆たんぱく質²⁾、大豆ペプチド³⁾⁴⁾、イソフラボン⁵⁾、サポニン⁶⁾などが豊富に含まれ、脂質代謝改善作用を示すことが報告されている。そこで我々は大豆の機能性因子の大部分を含む豆乳に注目し、特に乳酸発酵させた豆乳の脂質代謝改善効果を検討してきた。乳酸発酵豆乳はヨーグルト状であるが、コレステロールをまったく含まず、大豆臭が低減化され摂取しやすい状態である。また、乳酸発酵処理により豆乳中のイソフラボン配糖体がアグリコン型に変換されるため⁷⁾、体内でイソフラボンが吸収されやすくなる⁸⁾。

我々は以前、普通食投与ラットにおいて豆乳と乳酸発酵豆乳の摂取効果を比較すると乳酸発酵豆乳が強い脂質代謝改善効果を示すことを報告した⁹⁾。また高コレステロール食¹⁰⁾、高脂肪食¹¹⁾、高脂肪高コレステロール食¹²⁾投与時に乳酸発酵豆乳を摂取させると脂質代謝改善作用を示すことも報告した。豆乳の乳酸発酵処理によるイソフラボンのアグリコン化が、脂質代謝改善効果の促進に関係すると推測したので、既報^{9)~12)}で用いたイソフラボンのアグリコン化変換力の高い植物性食品起源の乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L 株と、同じ乳酸菌種でイソフラボンのアグリコン型変換力の低い *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4404L 株を使用してそれぞれ乳酸発酵豆乳を作成し、ラットに摂取させた場合の脂質代謝に及ぼす影響を調べた。このようにして、本研究では乳酸発酵豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合の違いがラットの脂質代謝へ及ぼす影響を明らかにしようとした。

1. 実験方法

(1) 実験試料

飼料原料として用いた2種類の乳酸発酵豆乳は、マルサンアイ(岡崎)で凍結乾燥試料として調製したものを使用した。どちらの乳酸発酵豆乳も、豆乳を植物性食品起源の乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4404L、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L で、それぞれ15時間発酵させて製造した。乳酸発酵豆乳の成分組成をTable 1に示した。乳酸発酵豆乳以外の飼料原料は日本クレア(東京)、和光純薬(大阪)およびナカライテスク(京都)より購入したものをを使用した。

(2) 実験動物および飼育条件

7週齢の雄性Sprague-Dawley系ラット24匹を日本エスエルシー(浜松)より購入した。AIN-93Gの組成に基づいた基準飼料¹³⁾で1週間予備飼育後、体重および血漿総コレステロール濃度が近似になるように4群に分け各飼料を5週間投与した。コントロール群($n=6$;以下C群)にはAIN-93G組成基準飼料を投与した。高脂肪高コレステロール食群($n=6$;以下H群)には基準飼料の9.4%を粉末牛脂に置換して正味動物脂肪率を7.4%とし、大豆油と合わせて飼料中トリアシルグリセロール(TG)含有率を

¹ 〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46

² 〒444-2193 愛知県岡崎市仁木町字荒下1

* 連絡先 (Corresponding author), maki@mukogawa-u.ac.jp

Table 1 Composition of freeze-dried fermented soymilk

Component	Fermented soymilk TUA4404L		Fermented soymilk TUA4408L	
	%	Energy (kcal/100 g)	%	Energy (kcal/100 g)
Water	1.9	—	2.4	—
Protein	45.7	182.8	44.7	178.8
Fat	37.0	333.0	37.3	335.7
Carbohydrate	2.6	10.4	2.6	10.4
Dietary fiber	7.2	14.4	7.3	14.6
Minerals	5.6	—	5.7	—
Total energy	—	540.6	—	539.5

Fermented soymilk TUA4404L, lactic acid-fermented soymilk using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4404L ;

Fermented soymilk TUA4408L, lactic acid-fermented soymilk using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L

15%とし、0.125%をコレステロールで置換した飼料を与えた。本飼料の脂質エネルギー比は約33%であった。高脂肪高コレステロール食のTUA4404L株乳酸発酵豆乳群 ($n=6$; 以下N群)は既報¹⁴⁾に基づき、脂質代謝改善に有効な濃度である大豆たんぱく質10%相当を含むように、H群飼料の22.0%をTUA4404L株で発酵させた乾燥発酵豆乳で置換した飼料を投与した。高脂肪高コレステロール食のTUA4408L株乳酸発酵豆乳群 ($n=6$; 以下A群)は大豆たんぱく質10%相当を含むように、H群飼料の22.4%をTUA4408L株で発酵させた乾燥発酵豆乳で置換した飼料を投与した。

各飼料はTable2に示した組成に基づき配合し、3群間で飼料エネルギーおよびたんぱく質、脂質、炭水化物の組成がほぼ同一になるように調整した。ラットは飼育期間中金網ケージに入れ、飼育温度 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm7\%$ 、12時間明暗サイクル(明期8:00~20:00)の環境下において、自由摂食および自由飲水させた。摂餌量および体重は飼育期間中隔日に測定した。なお本動物実験は武庫川女子大学動物実験規定に基づいて実施した。

(3) 血漿成分の測定

採血は、毎週1回8時間絶食後、麻酔下でヘパリン処理(ヘパリンナトリウム、味の素株式会社、東京)したシリンジで尾動脈より行った。採血した血液を遠心分離(3000rpm, 4°C , 15分)した後、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)、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) 臓器摘出、肝臓脂質濃度、肝臓水分量、肝臓糖質量の測定

飼育期間終了後、ラットをイソフルラン(アボットジャパン、東京)麻酔下で絶命させ、心臓より脱血後、肝臓を摘出し湿重量を測定し、使用時まで -80°C で保存した。肝臓脂質はFolch¹⁵⁾らの方法に従って、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。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測定キットを用いて肝臓コレステロール(以下肝臓Chol)およびTG(以下肝臓TG)を測定した。水分量は常圧加熱乾燥法で測定した。また糖質量は肝臓より糖質を抽出し、フェノール硫酸法¹⁶⁾で測定した。

(5) イソフラボン濃度の測定

肝臓は β -グルクロニダーゼでイソフラボンの脱抱合処理を行った。飼料および β -グルクロニダーゼ処理後の肝臓から70%エタノールを用いて室温で24時間イソフラボンを抽出後、12000rpm, 30分、室温で遠心分離を行った。上清をセルロースアセテート膜(東ソー、東京)でフィルターろ過したものをHPLC用試料液とし、HPLCに供した。溶離液はA液として50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)-メタノール(4:1)、B液として50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)-メタノール-アセトニトリル(2:2:1)を用いて、B液20%から100%のグラジエントで分析を行った。カラムはTSK gel ODS-80Ts(東ソー)を用いた。

(6) 肝臓組織からのRNA抽出およびcDNAの合成

解剖時に得た肝臓組織の一部をRNA Later(キアゲン、東京)で即処理し分析時まで -80°C で冷凍保存した。肝臓からのRNA抽出にはRNeasyミニキット(キアゲン)を用いて総RNAを抽出した。肝臓組織から抽出した総RNAから、Prime Script[®]RT試薬キット(タカラバイオ、滋賀)を用いてcDNAを合成した。

(7) 脂質代謝酵素のリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析にはアプライドバイオシステムズ7500リアルタイムPCRシステム(ライフテクノロジーズ・ジャパン、東京)を使用した。Taqman[®]ユニバーサルPCRマスターミックス(ライフテクノロジーズ・ジャパン)と以下のTaqManプライマー-プローブセット(ライフテクノロジーズ・ジャパン)を用い

Table 2 Composition of the experimental diets (weight %)

Ingredient	Diet group			
	C (AIN-93*)	H	N	A
Casein ¹	20.0	20.0	8.4	8.4
Cornstarch ¹	39.8	32.6	31.3	31.0
Dextrinized cornstarch ¹	13.2	10.9	10.4	10.3
Sucrose ¹	10.0	10.0	10.0	10.0
Soybean oil ¹	7.0	7.0	0.0	0.0
Cellulose ¹	5.0	5.0	3.3	3.3
Mineral mix (AIN-93G-MX) ¹	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-93-VX) ¹	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Cystine ²	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate ³	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>tert</i> -Butylhydroquinone ²	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Cholesterol	—	0.125	0.125	0.125
Beef tarrow	—	9.4	9.4	9.4
Fermented soymilk 4404 ⁴	—	—	22.0	—
Fermented soymilk 4408 ⁴	—	—	—	22.4
Total	100	100	100	100

C, control ; H, high fat and cholesterol diet ;

N, high fat and cholesterol diet containing lactic acid-fermented soymilk using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4404L ;

A, high fat and cholesterol diet containing lactic acid-fermented soymilk using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L

¹ Clea Japan, Osaka, Japan

² Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan

³ Nacalai tesque, Kyoto, Japan

⁴ Marusan-Ai, Okazaki, Japan

* Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, Jr, G. C., *J. Nutr.*, **123**, 1939–1951 (1993)

た. Srebf1 (sterol response element binding factor-1, assay ID : Rn01495769_ml, sterol response element binding protein-1 (SREBP-1) mRNA), Fasn (fatty acid synthase, assay ID : Rn00569117_ml, fatty acid synthase (FAS) mRNA), Srebf2 (sterol response element binding factor 2, assay ID : Rn01502638_ml, sterol response element binding protein-2 (SREBP-2) mRNA), Cyp7a1 (cytochrome P450, family 7 subfamily a polypeptide 1, assay ID : Rn00564065_ml, CYP7a1 mRNA) を用いた. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Rn99999916_s1, GAPDH mRNA) (ライフテクノロジーズ・ジャパン) を内因性コントロールとして用いた. すべての遺伝子発現量は GAPDH と比較補正し, C 群を 1 とした比で表現した.

(8) 統計処理

各測定結果は, 平均値±標準誤差で示した. 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) 2 種類の乳酸発酵豆乳のイソフラボン量とアグリコン割合の違い

2 種類の乳酸発酵豆乳中のイソフラボン量を Table 3 に

示した. アグリコンであるゲニステイン, ダイゼインの含有量は TUA4404L 株乳酸発酵豆乳よりも, TUA4408L 株乳酸発酵豆乳が多かった. また配糖体であるダイジン, ゲニシチンの含有量は TUA4404L 株乳酸発酵豆乳が TUA4408L 株乳酸発酵豆乳よりも多かった. 表には示していないが, グリシテインおよびその配糖体のグリシチンは豆乳中の含有量が少なく, どちらも菌株間の差は認められなかった. 乳酸発酵豆乳の原料豆乳のアグリコン割合は 2%, TUA4404L 株乳酸発酵豆乳のアグリコン割合は 35%, TUA4408L 株乳酸発酵豆乳のアグリコン割合は 93% であり, TUA4404L 株はアグリコン型への変換力は弱く, TUA4408L 株はアグリコン型への変換力が強いと示唆された.

(2) 体重, 摂餌量, 摂餌効率, 肝臓重量

飼料投与期間中の体重, 摂餌量, 摂餌効率, 肝臓重量を Table 4 に示した. 体重, 摂餌量は飼育期間中に群間に有意差は認められなかった. 摂餌効率は C 群に比較し H 群, N 群で有意に上昇したが, A 群と C 群との間, H 群と N 群, A 群との間には有意差はなかった. 摂餌効率の高い H 群と N 群では脂肪蓄積による体重増加が推定されるが, 体重および摂餌量の有意差はなかったため, 摂餌効率が脂質代謝に及ぼす影響は少ないと考えられる. 肝臓の湿重量

Table 3 Isoflavone level of fermented soymilk ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$ of dried sample)

	Soymilk	Fermented Soymilk TUA4404L	Fermented Soymilk TUA4408L
Genistein	5.6	99.2	254.6
Daidzein	5.5	72.8	191.2
Genistin	290.0	129.1	13.0
Daidzin	201.4	193.9	19.7
Total Isoflavones	502.5	495.0	478.5
Aglycone ratio (%)	2.2	34.7	93.2

Fermented soymilk TUA4404L, lactic acid-fermented soymilk using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4404L ;

Fermented soymilk TUA4408L, lactic acid-fermented soymilk using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L

Table 4 Initial and final body weights, food intake, food efficiency, and liver weights of rats fed on the experimental diets for 5 weeks

	C	H	N	A
Initial body weight (g)	265.2 $\pm$ 4.1 ^a	274.6 $\pm$ 6.1 ^a	269.9 $\pm$ 3.7 ^a	267.8 $\pm$ 4.4 ^a
Final body weight (g)	411.7 $\pm$ 11.0 ^a	440.8 $\pm$ 10.9 ^a	429.7 $\pm$ 3.7 ^a	424.8 $\pm$ 12.6 ^a
Food intake (g/d)	19.8 $\pm$ 0.6 ^a	19.0 $\pm$ 0.5 ^a	18.7 $\pm$ 0.3 ^a	18.8 $\pm$ 0.4 ^a
Food efficiency (g b.w. gain/g diet)	0.24 $\pm$ 0.01 ^a	0.28 $\pm$ 0.01 ^b	0.28 $\pm$ 0.01 ^b	0.27 $\pm$ 0.01 ^{ab}
Liver weight (g)	16.4 $\pm$ 1.0 ^{ab}	18.6 $\pm$ 0.7 ^a	16.7 $\pm$ 0.7 ^{ab}	14.7 $\pm$ 0.8 ^b

C, control ; H, high fat and high cholesterol ; N, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with low isoflavone aglycone ratio ; A, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with high isoflavone aglycone ratio.

Each value is the mean $\pm$ SE for 6 rats. ^{a, b} Means not sharing a common superscript differ significantly by Tukey's multiple-comparison test ($p < 0.05$).

Table 5 Plasma parameters of rats fed on the experimental diets for 5 weeks

	C	H	N	A
Total cholesterol (mg/dl)				
0W	66.4 $\pm$ 5.8 ^a	66.1 $\pm$ 4.6 ^a	63.0 $\pm$ 5.0 ^a	69.7 $\pm$ 5.4 ^a
1W	57.0 $\pm$ 2.2 ^{ac}	57.2 $\pm$ 2.7 ^a	46.0 $\pm$ 2.1 ^b	46.7 $\pm$ 3.2 ^{bc}
5W	68.4 $\pm$ 2.8 ^a	66.7 $\pm$ 4.4 ^{ab}	55.6 $\pm$ 4.2 ^{ab}	51.6 $\pm$ 4.7 ^b
Triglyceride (mg/dl)				
0W	102.8 $\pm$ 13.4 ^a	102.8 $\pm$ 14.9 ^a	95.6 $\pm$ 7.4 ^a	94.3 $\pm$ 5.4 ^a
1W	144.4 $\pm$ 16.1 ^{ab}	220.4 $\pm$ 30.6 ^a	145.4 $\pm$ 9.6 ^{ab}	117.9 $\pm$ 20.8 ^b
5W	137.4 $\pm$ 6.7 ^a	249.4 $\pm$ 29.6 ^b	244.7 $\pm$ 16.6 ^{bc}	161.6 $\pm$ 26.0 ^{ac}

C, control ; H, high fat and high cholesterol ; N, highfat and high cholesterol, containing fermented soymilk with low isoflavone aglycone ratio ; A, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with high isoflavone aglycone ratio.

Each value is the mean $\pm$ SE for 6 rats. ^{a, b, c} Means not sharing a common superscript differ significantly by Tukey's multiple-comparison test ($p < 0.05$).

は H 群に比較し A 群が有意に低値を示した。

(3) 血漿脂質成分

血漿脂質成分の TC 濃度と TG 濃度を Table 5 に示した。血漿 TC 濃度の変化は C 群と H 群が類似傾向を示し、N 群と A 群が類似傾向を示した。投与 1 週目には H 群に比較し N 群と A 群が有意に低値を示した。投与 5 週目には C 群に比較し A 群が有意に低値を示した。また血漿 TG 濃度は投与 1 週目と 5 週目には H 群に比較し A 群の

み有意に低値を示した。N 群の TG 濃度は投与 5 週目で H 群に比較し有意差が認められなかった。そのため血漿 TG 濃度の低下効果は TUA4404L 株乳酸発酵豆乳よりも、TUA4408L 株乳酸発酵豆乳の方が大きいと示唆された。

(4) 肝臓脂質濃度、肝臓水分量、肝臓糖質量

肝臓中の脂質量は C 群に比較し、H 群は有意に増加したが、N 群と A 群は H 群の増加を有意に抑制した (Table 6)。また、H 群に比較し N 群と A 群は肝臓 Chol 量、肝臓

Table 6 Hepatic parameters of rats fed on the experimental diets for 5 weeks

	C	H	N	A
Crude lipid (g/liver)	2.0±0.2 ^a	4.6±0.3 ^b	3.0±0.3 ^a	2.3±0.3 ^a
Cholesterol (mg/liver)	42.4±3.0 ^a	187.7±11.5 ^b	82.0±14.2 ^a	58.2±10.9 ^a
Triglyceride (mg/liver)	468.3±79.0 ^a	1786.2±174.4 ^b	804.8±171.9 ^a	606.6±116.6 ^a

C, control ; H, high fat and high cholesterol ; N, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with low isoflavone aglycone ratio ; A, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with high isoflavone aglycone ratio.

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

Table 7 Hepatic sugar and water of rats fed on the experimental diets for 5 weeks

	C	H	N	A
Water (g/liver)	11.1±0.7 ^a	11.4±0.5 ^a	10.7±0.4 ^a	9.6±0.5 ^a
Sugar (g/liver)	1.4±0.2 ^a	1.4±0.1 ^a	1.4±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a

C, control ; H, high fat and high cholesterol ; N, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with low isoflavone aglycone ratio ; A, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with high isoflavone aglycone ratio.

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

Table 8 Hepatic levels of isoflavones in rats fed the experimental diets for 5 weeks

(nmol/g)	N	A
Genistein	2.2±0.9	3.1±1.0
Daidzein	3.3±0.7	3.8±0.7
Equol	4.5±1.2	5.7±0.7
Total isoflavones	10.0±1.3	12.6±1.9

N, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with low isoflavone aglycone ratio ; A, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with high isoflavone aglycone ratio.

TG 量を有意に抑制した (Table 6). 肝臓中の水分量と糖質量については群間で有意差は認められなかったが, A 群では肝臓あたりの水分量が H 群に対して 1.8 g 低下した (Table 7). そのため A 群での肝臓湿重量 3.9 g の低下は肝臓の脂質含量 2.3 g 低下と水分含量 1.8 g 低下が影響したと考えられる. 乳酸発酵豆乳の摂取により, A 群では顕著に肝臓の脂質, Chol, TG の蓄積を抑制するとともに, 肝臓水分量の低下も原因となって, 肝臓湿重量の減少に影響したと推定される (Table 4). したがって, イソフラボンアグリコン割合の高い乳酸発酵豆乳の方が脂肪肝の予防に適していると推定される.

(5) 肝臓イソフラボン濃度

肝臓のイソフラボン濃度を Table 8 に示した. 肝臓イソフラボン濃度に群間の有意差は認められないが, N 群に比較し A 群ではゲニステイン濃度は 1.4 倍になった. また, N 群と A 群の肝臓中では Table 3 の乳酸発酵豆乳中には存在しなかったエクオールが認められ, 腸内細菌によりダイゼインから産生されたと推定された⁷⁾¹⁷⁾¹⁸⁾. N 群に比較し A 群ではエクオールの濃度は 1.3 倍となった. 肝臓イソフラボン濃度が N 群に比較し A 群で増加したのは, イソフラボンのアグリコン割合の増加による腸管吸収力向上によると推定される⁸⁾.

(6) 肝臓組織の脂質代謝関連遺伝子の発現量

肝臓組織の脂質代謝関連遺伝子の発現量を Fig. 1 に示した. コレステロール異化代謝経路の律速酵素 CYP7a1 遺

伝子¹⁹⁾ の発現量は C 群に比較し N 群, A 群で有意に高値を示した. さらに A 群では H 群に比較し有意に高値を示した. コレステロール合成経路の転写調節因子 SREBP-2 遺伝子の発現量²⁰⁾ は H 群に比較し A 群で有意に高値を示した. 細胞内コレステロールの減少により SREBP-2 の発現上昇が起こることが知られ²¹⁾ またイソフラボンは SREBP-2 の発現を促進することが知られている²²⁾. H 群では肝臓に過剰にコレステロールが蓄積したため, SREBP-2 の発現量は少なかったが, A 群ではイソフラボンのアグリコン割合 93% の飼料を摂取することで, 肝臓内のコレステロール異化が促進し, SREBP-2 の発現が H 群に比較し有意に促進したと推定される.

脂肪酸生成経路に関わる SREBP-1 遺伝子の発現量は, C 群に比較し H 群で有意に増加したが, A 群では H 群に比較し有意に減少した. SREBP-1 によって遺伝子発現が調節される FAS 遺伝子の発現量は C 群と H 群の間で有意差はなかったが, C 群に比較し A 群では低値傾向 ($p < 0.1$) を示した. したがって, A 群では SREBP-1, FAS 遺伝子の発現抑制によって肝臓 TG 量を顕著に低下させたと推定された. このように H 群に比較し A 群で多くの遺伝子発現に有意な変化が認められたので, 脂質代謝調節作用は TUA4404L 株乳酸発酵豆乳よりも TUA4408L 株乳酸発酵豆乳が強いことが示唆された. イソフラボンのアグリコンは肝臓の脂質代謝調節作用を促進したと推定される⁵⁾⁹⁾²³⁾.

大豆食品による肝臓の脂質代謝効果は主に大豆タンパク質の作用であるが, 乳酸発酵処理により豆乳中のイソフラ

Fig. 1 Expression of lipid metabolism-related genes in the liver of rats fed the experimental diets for 5 weeks

C, control; H, high fat and high cholesterol; N, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with low isoflavone aglycone ratio; A, high fat and high cholesterol, containing fermented soymilk with high isoflavone aglycone ratio.

The expression of mRNA was quantitatively measured using real-time RT-PCR. Each value is the mean $\pm$ SE for 6 rats. The data were normalized to GAPDH RNA expression and are presented as a ratio to the C value. ^{a,b,c} Means not sharing a common superscript differ significantly by Tukey's multiple-comparison test ($p < 0.05$).

ボン配糖体がアグリコン型に変換されると、イソフラボンの腸管吸収率が向上してイソフラボンの肝臓濃度が増加するため、脂質代謝調節作用が促進したと推定される。

4. 要 約

高脂肪高コレステロール食投与ラットにおいて、乳酸発酵豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合の違いが肝臓脂質代謝に及ぼす影響を検討した。2種類の乳酸菌株を使用して乳酸発酵豆乳を調製し、高脂肪高コレステロール食投与ラットに摂取させた。7週齢SD系雄性ラットをAIN-93G組成の基準飼料で1週間予備飼育後、AIN-93G組成基準食群（コントロール群、C群）、基準食の9.4%を粉末牛脂に置換し、大豆油と合わせて飼料中TG含有率を15%とし、0.125%をコレステロールで置換した飼料を与えた高脂肪高コレステロール食群（H群）、H群の飼料の22.0%をアグリコン化能力の低いTUA4404L株乳酸発酵豆乳で置換した群をN群、H群の飼料の22.4%をアグリコン化能力の高いTUA4408L株乳酸発酵豆乳で置換した群をA群とし、4群（各群6匹）に分け5週間飼育した。H群と比較してN群、A群のどちらも血中脂質濃度上昇抑制作用と肝臓脂質蓄積抑制作用を示したが、その作用はN群よりもA群の方が強かった。肝臓のイソフラボンアグリコン濃度はN群に比較しA群で若干高値を示した。また肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現量の変化もH群と比較しA群では大きな変化が認められた。以上の結果から、乳酸発酵豆乳の脂質代謝調節作用はTUA4404L株乳酸発酵豆乳よりも、TUA4408L株乳酸発酵豆乳の方が強いことが明らかになった。したがって、豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合が肝臓の脂質代謝調節効果に影響していると推定された。

本研究の一部はJSPS科研費24700811の助成を受けたものです。

文 献

- 1) Scott, M. Y., Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 2595-2600 (2004).
- 2) Nagata, Y., Tanaka, K. and Sugano, M., Further studies on the hypocholesterolaemic effect of soya-bean protein in rats. *Br. J. Nutr.*, **45**, 233-241 (1981).
- 3) Nagaoka, S., Awano, T., Nagata, N., Masaoka, M., Hori, G. and Hashimoto, K., Serum cholesterol reduction and cholesterol absorption inhibition in Caco-2 cells by a soy protein peptic hydrolyzate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 354-356 (1997).
- 4) Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y. and Hori, G., Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J. Nutr.*, **129**, 1725-1730 (1999).
- 5) Takahashi, Y., Odbayar, T.-O. and Ide, T., A comparative analysis of genistein and daizein in affecting lipid metabolism in rat liver. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **44**, 223-230 (2009).
- 6) Han, L.K., Zheng, Y.N., Xu, B.J., Okuda, H. and Kimura, Y., Saponins from platycodi radix ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *J. Nutr.*, **132**, 2241-2245 (2002).
- 7) Chun, J., Kim, G.M., Lee, K.W., Choi, I.D., Kwon, G.H., Park, J.Y., Jeong, S.J., Kim, J.S. and Kim, J.H., Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *J. Food. Sci.*, **72**, M39-M44 (2007).
- 8) Izumi, T., Piskula, M.K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y. and Kikuchi, M., Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.*, **130**, 1695-1699 (2000).
- 9) Kobayashi, M., Harada, T., Takagi, N., Tsuzuki, K., Sugawara, M. and Fukuda, M., Effects of lactic acid-fermented soymilk on lipid metabolism-related gene expression in rat liver. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 19-24 (2012).
- 10) Kobayashi, M., Hirahata, R., Egusa, S. and Fukuda, M.,

- Hypocholesterolemic Effects of Lactic Acid-Fermented Soymilk on Rats Fed a High Cholesterol Diet. *Nutrients.*, **4**, 1304-1316 (2012).
- 11) 平畑理映, 小林麻貴, 江草信太郎, 榊原里恵, 福田 満, 高脂肪食摂取ラットの脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の効果, 日本食品科学工学会誌, **59**, 528-532 (2012).
- 12) 平畑理映, 小林麻貴, 江草信太郎, 榊原里恵, 福田 満, 乳酸発酵豆乳は高脂肪高コレステロール食投与ラットの肝臓脂質代謝機能を改善する, 日本食品科学工学会誌, **60**, 72-79 (2013).
- 13) Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, G. C. Jr., 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).
- 14) 原田智子, 田中麻貴, 都築公子, 菅原 誠, 高木尚紘, 福田満, ラット脂質代謝を改善する乳酸発酵豆乳の有効投与量, 日本食品科学工学会誌, **57**, 175-179 (2010).
- 15) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 16) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., A., and Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 17) Setchell, K. D., Clerici, C., Lephart, E. D., Cole, S. J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B. E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N. M., Lund, T. D., Handa, R. J. and Heubi, J. E., S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 1072-1079 (2005).
- 18) Setchell, K. D., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Desai, P., Oldfield, M. F., Botting, N. P. and Cassidy, A., Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **77**, 411-419 (2003).
- 19) Myant, N. B., Mitropoulos, K. A., Cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *J. Lipid Res.*, **18**, 135-153 (1977).
- 20) Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. and Shimano, H., Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.*, **101**, 2331-2339 (1998).
- 21) Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T. and Maeda, M., Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26461-26464 (1996).
- 22) Mullen, E., Brown, R. M., Osborne, T. F. and Shay, N. F., Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in hepG2 cells. *J. Nutr.*, **134**, 2942-2947 (2004).
- 23) Lucas, E. A., Khalil, D. A., Daggy, B. P. and Arjmandi, B. H., Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in Golden Syrian hamsters : A model of postmenopausal hypercholesterolemia. *J. Nutr.*, **131**, 211-214 (2001).
- (平成 25 年 4 月 25 日受付, 平成 25 年 5 月 22 日受理)