

2 型糖尿病モデル動物における黒大豆乳酸発酵物の糖代謝および脂質代謝調節機能

研究期間 平成 29 年度

研究代表者名 古場 一哲

共同研究者名 松澤 哲宏、湯浅 正洋、河村 俊哉
永田 保夫

I. はじめに

乳酸発酵は、食品の栄養価や吸収性を高めたり、発酵生成物により食品に新たな機能性を付加することが知られ、食品加工への応用が期待される。私たちは、長崎県産古漬け由来の乳酸菌 MU-1 (*Lactobacillus pentosus*) を用いて発酵した黒大豆の機能性に関する研究に取り組んでいる。平成 28 年度の研究で、黒大豆の脂肪組織低減作用および肝臓脂質濃度低下作用は、MU-1 乳酸菌で発酵した黒大豆で高められることを明らかにし、その効果は発酵物に含まれる乳酸菌によるものではないことを示唆した。そこで本研究では糖代謝にも着目し、2 型糖尿病発症モデルマウスを用いて、黒大豆乳酸発酵物が糖代謝ならびに脂質代謝改善作用を示すのかについて調べた。

II. 実験方法

市販の黒大豆(長崎県佐世保産)を用い、これを粉碎・粉末化した「黒大豆きな粉」を試験試料とした。乳酸菌(古漬け由来の *L. pentosus* (MU-1 乳酸菌))を用いて、黒大豆きな粉を乳酸発酵した。乳酸発酵物を凍結乾燥し、乳酸発酵黒大豆試料とした。

実験食として、AIN-93G 組成に準拠した食餌²⁾を対照 (CONT) 食とした。対照食の 30% を黒大豆きな粉 (BSOY) または乳酸発酵黒大豆 (F-BSOY) で置き換え、タンパク質、脂質および炭水化物の不足分をカゼイン、大豆油およびコーンスターチでそれぞれ補正した実験食を調製した。乳酸菌そのものの影響についても検討するために、F-BSOY 食に含まれる菌数と同等の MU-1 乳酸菌を対照食に添加した食餌 (MU-1 食) も調製した。

5 週齢の雄性 KK-Ay マウス(日本エスエルシー(株)、静岡)を 1 週間予備飼育し、体重および空腹時血糖値に群間で違いがないように 1 群 6 匹ずつ 4 群に分け、それぞれの実験食を 5 週間自由摂食させた。飼育期間中、0 週目、2 週目および 4 週目にラット尾部より採血して空腹時血糖値を測定し、4 週目にインスリン耐性試験 (ITT; 1.0 IU/kg) を行った。5 週目に 6 時間絶食し、イソフルラン麻酔下で大静脈採血し、血清を調製した。また、肝臓および白色脂肪組織(辜丸周辺、腎臓周辺、腸間膜周辺)をそれぞれ摘出し、重量を測定後、 -80°C で保存した。血清成分の分析は市販キットを用いて行い、肝臓の脂質濃度および肝臓での脂肪酸代謝関連酵素の活性を測定した。

実験結果は、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer の多重解析法により統計的有意差 ($p < 0.05$) を検定した。

III. 結果および考察

終体重、摂食量および食餌効率に、各群間で有意差はみられなかった (Table 1)。

100g 体重あたりの組織重量において、肝臓は BSOY 群に比べて F-BSOY 群で軽かった。睾丸周辺白色脂肪組織重量は CONT 群および BSOY 群に比べ、F-BSOY 群で軽い傾向、MU-1 群で有意に軽かった。腎臓周辺脂肪組織は、CONT 群に比べ BSOY 群および MU-1 群で軽い傾向を示し、F-BSOY 群においては有意に低い値を示した。したがって、黒大豆は乳酸発酵物にすることで体脂肪低減作用が明確になりその作用には乳酸菌そのものの影響も含まれることが示唆された³⁾⁶⁾。

Table 1. 体重、摂食量および各臓器重量

	群名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
初体重(g)	27.7 ± 0.3	27.7 ± 0.4	27.9 ± 0.4	27.6 ± 0.6
終体重(g)	41.5 ± 0.9	41.7 ± 1.1	41.1 ± 0.7	40.8 ± 0.3
摂食量(g/day)	5.22 ± 0.17	5.44 ± 0.21	5.15 ± 0.13	5.53 ± 0.08
食餌効率(g gain/g diet)	0.084 ± 0.004	0.087 ± 0.007	0.087 ± 0.005	0.078 ± 0.004
糞湿重量	0.57 ± 0.06	1.00 ± 0.10	0.84 ± 0.07	0.65 ± 0.02
組織重量(g/100g体重)				
肝臓	5.68 ± 0.23 ^{ab}	5.90 ± 0.27 ^a	4.95 ± 0.15 ^b	5.50 ± 0.24 ^{ab}
睾丸周辺脂肪組織	4.05 ± 0.07 ^a	4.01 ± 0.11 ^a	3.89 ± 0.11 ^{ab}	3.51 ± 0.13 ^b
腎臓周辺脂肪組織	1.99 ± 0.08 ^a	1.83 ± 0.09 ^{ab}	1.71 ± 0.16 ^b	1.77 ± 0.09 ^{ab}
腸間膜脂肪組織	2.11 ± 0.09	1.83 ± 0.10	2.01 ± 0.03	1.86 ± 0.05

CONT : 対照, BSOY : 黒大豆, F-BSOY : 発酵黒大豆, MU-1 : MU-1乳酸菌
平均±SE (n=5 or 6), ab:異なる記号間で有意差あり ($p < 0.05$)

血清脂質濃度に食餌の違いによる差は認められなかった (Table 2)。血清アディポネクチン濃度も各群間で違いは認められなかった。これまでに、黒大豆にも含まれる β -コングリシニンというタンパク質に血清アディポネクチン濃度上昇作用が知られているが^{1, 4)}、本研究で血清アディポネクチン濃度に違いが認められなかったことについては、今後検討する必要がある。一方、血清レプチン濃度は、対照群、BSOY 群、F-BSOY 群の順に低く、対照群に比べ、両群で有意な低値を示した。この結果には、脂肪組織重量の変化が関与しているものと考えられた⁵⁾。

Table 2. 発酵黒大豆摂取が血清成分に及ぼす影響

	群名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
トリグリセリド(mg/dL)	189 ± 26	224 ± 27	201 ± 16	190 ± 19
コレステロール(mg/dL)	80.1 ± 7.9	78.1 ± 5.7	73.1 ± 4.0	77.3 ± 10.2
リン脂質(mg/dL)	438 ± 38	447 ± 52	350 ± 12	460 ± 36
遊離脂肪酸(mmol/L)	1.52 ± 0.43	1.54 ± 0.14	1.41 ± 0.15	1.57 ± 0.24
グルコース(mg/dL)	417 ± 37 ^{ab}	491 ± 61 ^a	303 ± 30 ^b	369 ± 24 ^{ab}
アディポネクチン(μg/dL)	8.37 ± 1.90	7.55 ± 1.46	7.44 ± 0.74	8.53 ± 0.57
インスリン(ng/mL)	9.17 ± 2.37	14.7 ± 4.6	14.5 ± 1.7	13.8 ± 3.3
レプチン(ng/mL)	50.6 ± 7.1	45.4 ± 5.0	36.4 ± 1.8	36.6 ± 4.8

CONT: 対照, BSOY: 黒大豆, F-BSOY: 発酵黒大豆, MU-1: MU-1 乳酸菌
平均±SE (n=5 or 6), ab:異なる記号間で有意差あり (p<0.05)

飼育期間中の空腹時血糖は、CONT 群および BSOY 群で経時的な上昇がみられた。これらの群と比較し、F-BSOY 群および MU-1 群の血糖値は 2 週目以降、低く推移し、黒大豆乳酸発酵物は血糖値上昇抑制作用があることが示唆され、その作用には乳酸菌そのものの効果が含まれる可能性も示唆された (Fig. 1)。

インスリン耐性試験において、インスリン投与後の CONT 群で変化がみられられず、インスリン抵抗性の可能性が示唆された。CONT 群と同様に、BSOY 群においてもインスリン投与後の血糖値の大きな変化は認められなかった。一方、F-BSOY 群および MU-1 群においては、インスリン投与 30 分後には、血糖値の低下が観察され、その傾向は 120 分後まで観察された。したがって、黒大豆を乳酸発酵することによるインスリン感受性改善効果が示唆され、その効果には乳酸菌そのものが関与していると推察された (Fig. 2)。

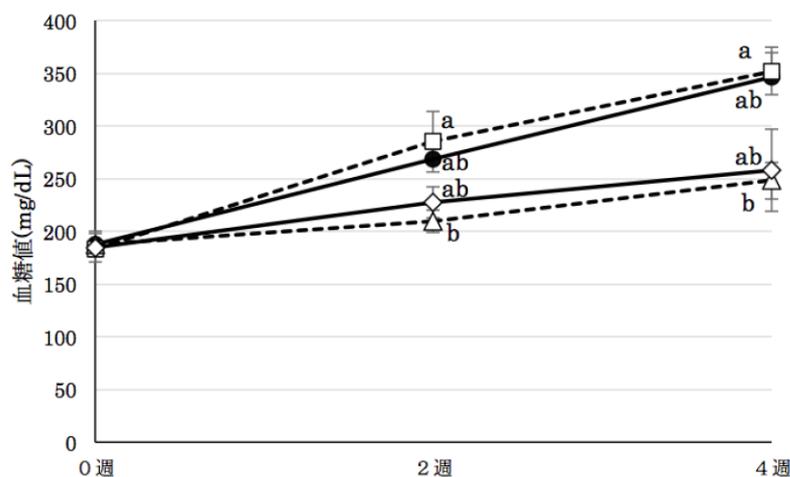


Fig. 1. 発酵黒大豆摂取による空腹時血糖値の経時的変化に対する影響

●CONT: 対照, □BSOY: 黒大豆, △F-BSOY: 発酵黒大豆, ◇MU-1: MU-1 乳酸菌
平均±SE (n=6), ab:異なる記号間で有意差あり (p<0.05)

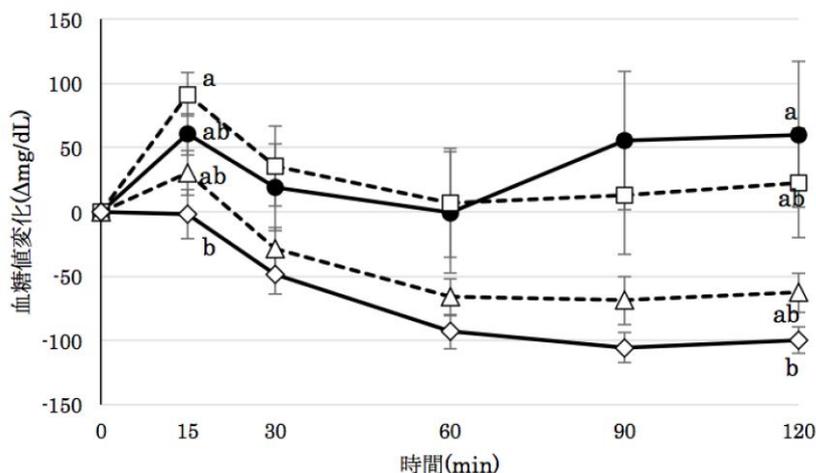


Fig. 2. 発酵黒大豆摂取によるインスリン負荷後の血糖値の変化量に対する影響

●CONT : 対照, □BSOY : 黒大豆, △F·BSOY : 発酵黒大豆, ◇MU-1 : MU-1 乳酸菌

平均±SE (n=6), ab: 異なる記号間で有意差あり (p<0.05)

肝臓のトリグリセリド濃度は、CONT 群に比べて BSOY 群および F·BSOY 群で低い傾向を示した。しかし、この低下傾向は MU-1 群では認められなかった。コレステロール濃度についても同様に、CONT 群に比べて BSOY 群および F·BSOY 群で低い傾向がみられたが、MU-1 群ではその傾向はなかった。したがって、黒大豆の肝臓脂質濃度低下作用は、乳酸発酵しても維持され、その効果には MU-1 乳酸菌は関与しないことが示唆された。

肝臓トリグリセリド濃度に食餌による変化が認められたため、肝臓の脂質代謝関連酵素の活性を測定した (Table 4)。これらの内、脂肪酸合成に関わる FAS 活性が、CONT 群、BSOY 群、F·BSOY 群の順に低値を示し、MU-1 群では CONT 群と同等であったことから、黒大豆および発酵黒大豆の肝臓トリグリセリド濃度低下作用の主要因として肝臓での脂肪酸合成の低下が考えられた。

Table 3. 発酵黒大豆摂取が肝臓脂質濃度に及ぼす影響

	群名			
	CONT	BSOY	F·BSOY	MU-1
	(mg/g liver)			
トリグリセリド	35.3 ± 4.5	31.1 ± 2.1	30.8 ± 4.5	38.6 ± 4.2
コレステロール	5.64 ± 0.53 ^{ab}	3.22 ± 0.44 ^a	3.73 ± 0.41 ^{ab}	6.66 ± 1.37 ^b
リン脂質	22.8 ± 0.6 ^a	25.8 ± 0.9 ^b	26.1 ± 0.8 ^b	24.5 ± 0.4 ^{ab}

CONT : 対照, BSOY : 黒大豆, F·BSOY : 発酵黒大豆, MU-1 : MU-1 乳酸菌

平均±SE (n=5 or 6), ab: 異なる記号間で有意差あり (p<0.05)

Table 4. 発酵黒大豆摂取が肝臓酵素活性に及ぼす影響

	群名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
サイトソール FAS	47.5 ± 5.5	39.5 ± 5.8	30.7 ± 4.2	46.8 ± 6.2
サイトソール ME	162 ± 20	148 ± 26	123 ± 6	139 ± 16
サイトソール G6PDH	15.0 ± 1.0	15.6 ± 1.1	14.3 ± 1.6	15.3 ± 1.3
ミクロソーム PAP	3.32 ± 0.35	3.83 ± 0.30	3.10 ± 0.27	3.35 ± 0.27
ミトコンドリア CPT	33.0 ± 1.5	30.0 ± 1.1	29.1 ± 1.5	34.6 ± 2.0
ペルオキシソーム AOX	9.38 ± 2.15	10.4 ± 1.9	8.17 ± 1.70	10.8 ± 2.3

CONT: 対照, BSOY: 黒大豆, F-BSOY: 発酵黒大豆, MU-1: MU-1乳酸菌

FAS: 脂肪酸合成酵素, ME: リンゴ酸酵素, G6PDH: グルコース-6-リン酸脱水素酵素

PAP: ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ, CPT: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ

AOX: アシル-CoAオキシダーゼ

平均±SE (n=5 or 6)

以上のことから、2型糖尿病発症モデルマウスにおいて、発酵黒大豆は黒大豆よりも血糖値の上昇を抑え、インスリンに対する感受性を改善すること、体脂肪低減作用もやや強いことが示唆された。そして、この効果は、乳酸発酵による生成物に加え、発酵黒大豆に含まれる乳酸菌による可能性も示唆された。関与成分の問題については今後さらに詳細に検討していく必要があるものの、本研究により、黒大豆の機能性は乳酸発酵によりさらに高められることが示された。今後、発酵黒大豆の機能性の機序を解明していく上で、乳酸発酵による黒大豆の成分変化についても分析を行う必要があると考えられた。

IV. おわりに

本研究で、長崎県産古漬け由来の MU-1 乳酸菌による発酵により、黒大豆の抗肥満作用と血糖値調節作用が高められることが示唆され、食品の機能性改善を目的とした乳酸発酵の有用性が示された。関与成分については検討が必要である。今後さらに、種々の病態モデル動物を用いた摂食試験により、発酵黒大豆の機能性および乳酸発酵の有用性がさらに明らかになる可能性がある。一連の研究成果がメタボリックシンドローム改善を視野に入れた長崎県独自の機能性食品の開発につながることを期待している。

V. 参考文献

- 1) 古場一哲, 及川大地, 田丸静香, 田中一成, 菅野道廣 (2011) 大豆たん白質研究, **14**, 91-95.
- 2) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951.
- 3) Kim Y, Yoon S, Lee S, Han H, Oh H, Lee W, Lee S (2014) *PLoS One*, **9**, e88231.
- 4) 井上奈穂, 藤原由佳, 船山明日和, 加藤正樹, 池田邦男 (2012) 大豆たん白質研究, **15**, 68-71.

- 5) Koba K, Akahoshi A, Yamasaki M, Tanaka K, Yamada K, Iwata T, Kamegai T, Tsutsumi K, Sugano M (2002) *Lipids*, 37, 343-350.
- 6) 元永智恵, 近藤正敏, 林篤志, 岡本万理子, 北村良久, 嶋田貴志 (2009) 日本食品科学工学会誌, 56, 541-544.