

| | |
|---------|---|
| 氏名 | こばやし まき 小林 麻貴 |
| 学位の種類 | 博士（食物栄養学） |
| 学位記の番号 | 乙第 61 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 26 年 3 月 20 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 学位論文の題目 | Effects of Lactic Acid-Fermented Soymilk on Lipid Metabolism in Rat Liver ラット肝臓脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の効果 |
| 論文審査委員 | 主 査 田代 操 副 査 堀江 登 副 査 松浦 寿喜 副 査 福田 満 |

論文内容の要旨

食事摂取過剰や運動不足が続くと、脂質異常症の抑制は困難であるが、最近、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。本論文は、豆乳、特に乳酸発酵豆乳の脂質代謝調節作用に注目し、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果について実験動物を用いて明らかにしたものである。本論文は、緒論、第一章から第六章、結論で構成されている。

緒論では研究の背景と主たる目的を述べている。先進国では食事摂取過剰や運動不足により脂質異常症が増加傾向にあり、日本国内でも脂質異常症の増加を抑制する事は容易ではない。脂質異常症を予防するためには食事内容の質的向上が重要である。最近の日本人の食生活では脂質代謝改善に有効な大豆食品の摂取量は不足しがちであるため、大豆食品の摂取量の増加を目的として、比較的摂取容易な豆乳に注目した。豆乳は大豆の機能性成分のほとんどすべてを含むが、大豆臭があり積極的に摂取しにくい一面もある。そのため豆乳をより一層摂取容易にするため、植物性食品起源の乳酸菌 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L 株) で発酵させた乳酸発酵豆乳を使用した。乳酸発酵豆乳はヨーグルト状であるが、大豆臭が低減化され摂取しやすい食品である。乳酸発酵豆乳に含まれる代表的な機能性成分として大豆タンパク質とイソフラボンがある。大豆タンパク質の脂質代謝改善効果については数多くの報告があり、大豆タンパク質分解物である大豆ペプ

チドのコレステロール低減作用、難消化性大豆タンパク質の胆汁酸吸着によるコレステロール排泄促進作用、大豆タンパク質の成分のひとつである β -コングリシニンの血中トリグリセリド (TG) 低下作用が実験動物等で報告され、大豆タンパク質の肝臓における脂質代謝改善効果はほぼ確立されている。しかしながら、イソフラボンの脂質代謝改善効果を調べた研究はほとんどなく、動物実験で大豆タンパク質のエタノール処理でイソフラボン除去すると脂質代謝改善作用が減少するという報告、ヒトを対象としたメタ解析でイソフラボンは血中の TC 濃度を低下させる等の報告があるのみである。乳酸発酵豆乳は、発酵により豆乳中に存在するイソフラボン配糖体の大部分がアグリコンに変換されている特徴をもっている。イソフラボン配糖体がアグリコン型に変換すると腸管吸収が容易になり、生理効果が向上する可能性がある。そのため、1. 乳酸発酵豆乳と豆乳による肝臓の脂質代謝改善効果を比較することでイソフラボンのアグリコン割合が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにする。また 2. 乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果を精査し、大豆タンパク質とイソフラボンの関連寄与を分析することにより、イソフラボンの作用メカニズムを明らかにする。以上を目的として、「ラット肝臓脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の効果」に関する研究に着手した。

第一章ではラットにおいて脂質代謝改善作用を示す乳酸発酵豆乳濃度の検討を行った。大豆の脂質代謝改善作用についての報告のほとんどは、実験動物に大豆タンパク質 20%を含む飼料を投与したものである。一方、脂質代謝改善作用を示す飼料中乳酸発酵豆乳濃度に対応する大豆タンパク質濃度は明確ではない。そのため試料中の大豆タンパク質濃度が 5%、10%となるように乳酸発酵豆乳を資料に配合し、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善作用を検討した。7 週齢 SD 系雄性ラットに基準食 AIN-93G を投与して 1 週間予備飼育を行った後、①コントロール食 (AIN-93G)、②12.5%乳酸発酵豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 5%)、③25%乳酸発酵豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 10%) を投与して 5 週間飼育した。その結果、普通食摂取ラットにおいて 25%乳酸発酵豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 10%) が血中脂質成分および肝臓脂質成分を低下させて脂質代謝改善効果を示すことを明らかにした。

第二章では、豆乳の乳酸発酵処理がラット肝臓の脂質代謝に及ぼす影響を検討した。7 週齢 SD 系雄性ラットに予備飼育後、①コントロール食 (AIN-93G)、②豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 10%)、③乳酸発酵豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 10%) を投与して 5 週間飼育した。豆乳群および乳酸発酵豆乳群において肝臓の TG 量、コレステロール量は、5 週間投与後に低値を示した。血中 TC 濃度は豆乳群、乳酸発酵豆乳群とも投与 1 週間後より 5 週間後まで低値を示した。その効果は豆乳群より乳酸発酵豆乳群に強く現れた。肝臓の遺伝子発現量を調べると、脂肪酸合成関連遺伝子の発現量は豆乳群、乳酸発酵豆乳群で著しく抑制された。逆にコレステロールの異化代謝の律速酵素コレステロール 7- α ヒドロキシラーゼ (Cyp7a1) 遺伝子の発現量は著しく促進された。この傾向は豆乳群よりも乳酸発酵豆乳群で顕著であった。そのため Cyp7a1 遺伝子の発現を誘導する生理活性物質が乳

酸発酵により新たに生成、あるいは増量し、血中 TC 濃度を低下させたと推定した。

第三章では乳酸発酵豆乳中の脂質代謝改善作用を示す有効成分について、イソフラボンに焦点を絞って検討した。豆乳及び乳酸発酵豆乳から 70%エタノールでイソフラボン抽出物を調製した。大豆タンパク質の非共存下および共存下で、豆乳および乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物の脂質代謝改善効果を比較検討した。まず、大豆タンパク質非共存下の実験として 7 週齢 SD 系雄性ラットに予備飼育後、①コントロール食 (AIN-93G)、②豆乳のイソフラボン抽出物食、③乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物で 5 週間飼育した。次に大豆タンパク質共存下の実験として①コントロール食 (AIN-93G)、②脂質代謝改善効果の少ない濃度の豆乳食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%)、③豆乳+豆乳のイソフラボン抽出物食 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%)、④豆乳+乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物 (飼料中の大豆タンパク質濃度 4%) を投与して 5 週間飼育した。その結果、大豆タンパク質が共存する豆乳+乳酸発酵豆乳イソフラボン抽出物群で血中 TG 濃度と肝臓の脂質量の両者に低下を認めた。血中 TG 濃度の低下効果は豆乳群、豆乳+豆乳イソフラボン抽出物群と比較しても低値を示した。肝臓遺伝子発現量の変化では、大豆タンパク質非共存下で豆乳及び乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物を摂取させるとコレステロール異化系の遺伝子だけでなく、コレステロールの合成系および脂肪酸合成系遺伝子の発現も促進された。しかし、大豆タンパク質と豆乳および乳酸発酵豆乳のイソフラボン抽出物が共存すると、脂肪酸成型遺伝子の発現が抑制され、コレステロール合成および異化系の遺伝子発現量は促進された。そのため、大豆タンパク質は主に脂肪酸合成系の遺伝子発現を抑制し、イソフラボンはコレステロール合成および異化系の遺伝子発現を促進する可能性が示唆された。また、コレステロールの異化代謝にかかわる Cyp7a1 遺伝子の発現は大豆タンパク質共存時、非共存時ともに豆乳イソフラボン抽出群よりも乳酸発酵豆乳イソフラボン抽出物群で促進されたので、イソフラボンのアグリコン割合の増加が CYP7a1 遺伝子の発現を促進したと示唆された。

第四章では、脂質異常症予防の観点から、高コレステロール食投与ラットの乳酸発酵豆乳による脂質代謝改善作用について検討した。7 週齢 SD 系雄性ラットに予備飼育後、①1%コレステロール食、②乳酸発酵豆乳 (飼料中の大豆タンパク質濃度 5%) を含む 1%コレステロール食、③乳酸発酵豆乳 (飼料中の大豆タンパク質濃度 10%) を含む 1%コレステロール食を投与して 5 週間飼育した。高コレステロール食投与ラットにおいて飼料中の大豆タンパク質濃度 5%、10%を含む乳酸発酵豆乳投与により、濃度依存的に肝臓脂質蓄積抑制効果が認められた。また、血中 TC 濃度および non-HDL-C 濃度は飼料中大豆タンパク質濃度 10%の乳酸発酵豆乳でさらに低値を示した。一方、乳酸発酵豆乳の投与は肝臓 Cyp7a1 遺伝子の発現を促進し、また高コレステロール食のためコレステロール合成系 SREBP-2 遺伝子の発現は抑制され、結果として肝臓のコレステロール蓄積は抑制されたと推定した。

第五章では高コレステロール食投与ラットにおいて豆乳と乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果を比較し、さらにイソフラボンアグリコン化の違いが脂質代謝改善効果に及ぼす影

響を調べた。イソフラボンアグリコン化能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アグリコン化能力の低い *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た。7 週齢 SD 系雄性ラットに予備飼育後、①1%コレステロール食、②豆乳（飼料中の大豆タンパク質濃度 10%）を含む 1%コレステロール食、③イソフラボンのアグリコン割合の低い 4404 菌乳酸発酵豆乳（飼料中の大豆タンパク質濃度 10%）を含む 1%コレステロール食、④イソフラボンのアグリコン割合の高い 4408 菌乳酸発酵豆乳（飼料中の大豆タンパク質濃度 10%）を含む 1%コレステロール食を投与して 5 週間飼育した。高コレステロール食群と比較して豆乳を含む高コレステロール食群、4404 菌乳酸菌乳酸発酵豆乳を含む高コレステロール食群はいずれも同様の肝臓脂質蓄積抑制効果を示した。また血中 TC 濃度および non-HDL-C 濃度の上昇抑制作用は、高コレステロール群に対して他の 3 群いずれにも認められ、特に 4408 菌乳酸発酵豆乳を含む高コレステロール食群が最も強い上昇抑制効果を示した。したがって、高コレステロール食投与時において豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合が高いと肝臓の脂質代謝改善効果は上昇し、血中コレステロール濃度が低下したと推定された。

第六章では、脂質負荷食投与時の 2 種類の乳酸発酵豆乳摂取が肝臓脂質代謝に及ぼす影響を比較検討した。7 週齢 SD 系雄性ラットに予備飼育後、①脂質負荷食（15%TG、0.125%コレステロール）、②イソフラボンのアグリコン割合の低い 4404 菌乳酸発酵豆乳（飼料中の大豆タンパク質濃度 10%）を含む脂質負荷食、③イソフラボンのアグリコン割合の高い 4408 菌乳酸発酵豆乳（飼料中の大豆タンパク質濃度 10%）を含む脂質負荷食で 5 週間飼育した。脂質負荷食群と比較して 4404 菌乳酸発酵豆乳を含む脂質負荷食群、4408 菌乳酸発酵豆乳食を含む脂質負荷食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。また、その作用は 4404 菌乳酸発酵豆乳を含む脂質負荷食群よりも 4408 菌乳酸発酵豆乳を含む脂質負荷食群の方が強く現れた。肝臓のイソフラボンアグリコン濃度は 4404 菌乳酸発酵豆乳を含む脂質負荷食群に比較して 4408 菌若干高値を示した。また、肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現量の変化も 4408 菌乳酸発酵豆乳食を含む脂質負荷食群では顕著な変化が認められた。以上の結果から、脂質代謝改善作用は 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、脂質負荷食投与時においても乳酸発酵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改善効果に影響したと示された。

結論では本論文の総括を述べている。乳酸発酵豆乳は普通食だけでなく、高コレステロール食、脂質負荷食投与時のラットにおいて肝臓脂質代謝改善効果を示すことが明らかとなった。そのため、食生活の欧米化による脂質異常症を乳酸発酵豆乳摂取により一次予防できる可能性が示唆された。また、イソフラボン抽出物単独では脂質代謝改善効果が弱く、大豆タンパク質共存時に強い効果を発揮した。さらにアグリコン割合の高い 4408 菌乳酸発酵豆乳がアグリコン割合の低い 4404 菌乳酸発酵豆乳よりも強い脂質代謝改善効果を示し

た。このようにして、大豆タンパク質とアグリコン割合の高いイソフラボンが共存する場合に、強い脂質代謝改善効果を発揮することを初めて明らかにした。よって、大豆タンパク質とイソフラボンアグリコンの両方を豊富に含む乳酸発酵豆乳は肝臓の脂質代謝改善に最も適した大豆加工食品であり、乳酸発酵豆乳の摂取はメタボリックシンドローム予防に寄与すると結論するに至った。

論文審査並びに最終試験の要旨

脂質異常症を予防するためには食生活の改善が有効な手段であることは周知の事実である。本論文では、脂質異常症の予防に有効な機能性食品として乳酸発酵豆乳に注目し、実験動物としてラットを用いて、乳酸発酵豆乳の摂取による肝臓の脂質代謝改善作用の解明を試みた。本論文では、普通食および脂質負荷食投与時に、乳酸発酵豆乳中の有効成分による血中脂質濃度上昇抑制効果、肝臓脂質蓄積抑制効果、肝臓の遺伝子発現調節作用の関係を検討し、次の4点を明らかにしようとした。①脂質代謝改善効果を示す乳酸発酵豆乳の投与濃度、②脂質代謝改善効果を示す乳酸発酵豆乳中の大豆タンパク質とイソフラボンの関係、③豆乳の乳酸発酵処理によるイソフラボンのアグリコン割合の変化が肝臓脂質代謝に及ぼす影響、④高コレステロール食、脂質負荷食投与時の乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果。

まず、脂質代謝改善に必要な試料中の乳酸発酵豆乳濃度は25%以上、すなわち試料中の大豆タンパク質濃度に換算すると、10%以上大豆タンパク質が必要であり、当該濃度以上で血中脂質成分および肝臓脂質成分を有意に低下させることを示して「①脂質代謝改善効果を示す乳酸発酵豆乳の投与濃度」を明らかにした。先行研究では、試料中の大豆タンパク質濃度が20%以上必要とされていたが、乳酸発酵豆乳の状態では試料中大豆タンパク質濃度は10%以上で脂質代謝改善作用が現れることを示し、脂質代謝改善には乳酸発酵豆乳中の大豆タンパク質以外に他の有効成分が関与することを示した。次に、豆乳の乳酸発酵処理がラット肝臓の脂質代謝に及ぼす影響を検討した結果、乳酸発酵処理により豆乳から新たに生成あるいは増大した生理活性物質 Cyp7a1 遺伝子の発現を促進し、血中総コレステロール濃度を低下させたと考察した。これにより「②脂質代謝改善効果を示す乳酸発酵豆乳中の大豆タンパク質とイソフラボンの関係」の解明への糸口を開いた。さらに、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善作用について検討を進めた結果、大豆タンパク質は主に脂肪酸合成系の転写調節因子と合成代謝酵素に関する遺伝子発現を抑制し、一方イソフラボンはコレステロール合成系および異化系に関する転写調節因子と遺伝子発現を促進する可能性を示唆した。また、高コレステロール食投与ラットについて乳酸発酵豆乳による脂質代謝改善作用を調べた結果、乳酸発酵豆乳は投与濃度依存的に肝臓脂質蓄積抑制効果を示し、さらに肝臓 Cyp7a1 遺伝子発現の促進、コレステロール合成系 SREBP2 遺伝子発現の抑制によ

って肝臓コレステロール蓄積が抑制されたと推定した。次に、高コレステロール食投与ラットにおいて、イソフラボンのアグリコン化能力の異なる乳酸菌による発酵豆乳の作用を比較したところ、乳酸発酵豆乳中のイソフラボンのアグリコン割合の高い方が肝臓の脂質代謝改善効果が高めることを示した。これによって「③豆乳の乳酸発酵処理によるイソフラボンのアグリコン割合の変化が肝臓脂質代謝に及ぼす影響」を明らかにした。さらに、脂質負荷食ラットにおいても、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果を得て、上記の結果と合わせて「④高コレステロール食、脂質負荷食投与時の乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果」を明らかにし、乳酸発酵豆乳は脂質異常症予防効果を有することを示唆した。

上記の論文は、ラットに対して普通食、高コレステロール食、脂質負荷食投与時のいずれかにおいても、乳酸発酵豆乳を摂取させると、大豆タンパク質とイソフラボンアグリコンの共存によって肝臓脂質代謝改善作用が高まることを明らかにし、さらにイソフラボンという機能性成分の作用メカニズムを推定するに至ったものである。乳酸発酵豆乳中の大豆タンパク質とイソフラボンは脂質代謝改善においてそれぞれ果たす役割が異なり、さらにイソフラボンのアグリコン化がその機能を促進するという知見は先行研究に例を認めない。以上、本研究は新規性があり、大豆機能性食品の脂質代謝研究、脂質異常症の予防研究の発展に貢献するものと評価し、よって本論文は博士学位論文に値するものと判断する。

また、10月23日に行われた公聴会においては、多くの質疑に適切に答弁し、本申請者の研究者としての能力は博士学位取得レベルに達したものであると判断された。以上の結果から、当該博士学士申請者に対する博士の学位授与は十分にふさわしいものと認める。