

ラット脂質代謝に影響を及ぼす豆乳の有効濃度について

福田 満¹⁾, 原田 智子²⁾, 西村 侑子²⁾, 高木 尚紘²⁾,
北脇 涼子¹⁾, 岩崎 充弘³⁾, 都築 公子³⁾

¹⁾武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科,

²⁾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,

³⁾マルサンアイ株式会社・開発統括部

Effective Concentration of Soymilk Affecting Lipid Metabolism in Rats

Mitsuru Fukuda¹⁾, Tomoko Harada²⁾, Yuko Nishimura²⁾, Naohiro Takagi²⁾, Ryoko Kitawaki¹⁾,
Mitsuhiro Iwasaki³⁾ and Kimiko Tsuzuki³⁾

¹⁾Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa
Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

²⁾Food Science and Nutrition Major, Graduate School of Human Environmental Sciences, Mukogawa
Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

³⁾Marusan-ai Co., Ltd., 1, Aza-Arashita, Nikki-cho, Okazaki, Aichi 444-2193

It is known that soy protein has the hypolipidemic action on blood and liver. We investigated to clarify physiologically effective concentration of soymilk. Male Sprague-Dawley rats aged 7weeks were fed a control diet (AIN-93G, soy protein free), or a test diet in which 10.78% (corresponding to soy protein 5%) or 21.55% (corresponding to soy protein 10%) of the diet was replaced with soymilk, respectively. The rats were fed the control diet or the test diet for 5weeks. The administration of soymilk significantly suppressed total cholesterol level in plasma and decreased liver lipid and visceral fat. These effects depended on the concentration of administrated soymilk. It was suggested that soymilk improved the lipid metabolism in rat. Moreover, it was found that the administration of amount of soymilk corresponding to more than 10% soy protein was necessary to obtain a significant physiological effect in a short period.

緒 言

近年、メタボリックシンドロームが強く疑われる者又は予備群と考えられる者は増加傾向にある¹⁾。これは、食生活の欧米化や運動不足などの生活習慣の乱れが原因とされている。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満を共通の要因として高血糖脂質異常、高血圧が引き起こされる状態で、それぞれの疾患が重複した場合は命にかかわる重篤な病状を招くこともある。ところで、現代の日本人で摂取量が減少傾向にある大豆には

大豆タンパク質が多く含有され、血漿コレステロール上昇抑制や肝臓脂質低下効果を有することが知られている^{2,3)}。従来日本人が健康で長寿であった理由の一つに、豆腐や納豆など大豆を含む日本型食生活があったと推定される。それゆえ、大豆食品を日常の食生活に容易に導入することがメタボリックシンドロームの予防対策として望ましいと考える。そこで、大豆タンパク質を豊富に含む豆乳に注目した。本研究においては、「豆乳」について約1ヶ月投与によるラットの血中及び肝臓脂質等に及ぼす影響を明らかにし、生理作用の

発現に関して有効な豆乳の濃度について詳細に検討したので報告する。

実験方法

1. 実験試料

飼料原料となる豆乳は、マルサンアイ株式会社(愛知県岡崎市)から凍結乾燥試料として製造したものを使用した。豆乳の成分組成を固形物換算で Table 1 に示した。分析値はマルサンアイ株式会社で求めた値を使用した。その他の飼料原料は、日本クレア株式会社及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

7 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを日本クレア株式会社から購入し実験に供した。本実験の基準飼料は、AIN-93G の組成に基づいて調製した⁴⁾。基準飼料で 1 週間の予備飼育を行った後、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 10.8% を乾燥豆乳で置換した飼料投与の SM-5 群(大豆タンパク質 5% 置換相当の飼料, n=5)、同様に、21.6% を乾燥豆乳で置換した飼料投与の SM-10 群(大豆タンパク質 10% 置換相当の飼料, n=5)の 3 群に分け、5 週間各飼料を投与した (Table 2)。

実験動物は、飼育温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 7\%$ 、12 時間明暗サイクル(明期 8:00–20:00)の環境下において、個別に金網ケージで飼育を行った。飼育期間中、自由摂食及び自由飲水させた。摂餌量は毎日測定し、体重は飼育期間の隔日に測定を行った。

なお、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。

3. 血漿採取と成分の測定

採血は、飼育 5 週目、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)した注射器で尾動脈より行った。これを遠心分離後(3,000rpm, 4°C , 15min)、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)、HDL-コレステロール(以下 HDL-C)、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、HDL-コレステロール 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 週目に絶食しないラットを用いた。インフルラン(フォーレン[®], アポットジャパン)による麻酔下で、X線 CT スキャン装置 LaTheta LCT-200 (Aloka)を用い、胸骨第 12 番目から精巢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 4mm 間隔で行った⁵⁻⁷⁾。

5. 糞重量及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、0.25g を 2.5ml の加熱アルコール(70°C , 60 分)で抽出した。続いて、2.5ml のクロロホルム-メタノール混液(1:1, v/v)洗浄を 2 回繰り返して、抽出液と洗浄液を合わせ、溶媒除去及び 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

Table 1. Composition of freeze-dried soymilk and fermented soymilk

Component	Soymilk/fermented soymilk
Water(%)	3.00
Protein(%)	46.4
Fat(%)	33.3
Carbohydrate(%)	2.8
Dietary fiber(%)	8.8
Ash(%)	5.7
Energy(kcal/100g)	514.1

Table 2. Composition of experimental diets of control and soymilk (weight %)

Ingredient	Diet group		
	CO	SM-5	SM-10
Casein ¹	20.0	14.2	8.4
Cornstarch ¹	39.8	39.5	39.3
Dextrinized cornstarch ¹	13.2	13.0	12.7
Sucrose ¹	10.0	10.0	10.0
Purified soybean oil ¹	7.0	3.5	0.0
Cellulose ¹	5.0	4.0	3.0
Mineral mix (AIN-93G-MX) ¹	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-93VX) 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
Soymilk ³	–	10.8	21.6

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

CO, Control; SM-5, Soymilk corresponding to soy protein 5%; SM-10, Soymilk corresponding to soy protein 10%.

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Folch⁸⁾らの方法に従い、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)及びトリグリセリド(以下肝臓 TG)を測定した。

8. 統計処理

各実験結果は、平均値 \pm 標準誤差(mean \pm 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。

実験結果

1. 体重, 摂餌効率

体重, 摂餌効率には有意差は認められなかったが, CO群と比較し, 豆乳投与群で低値傾向を示した(Table 3)。

2. 臓器重量

肝臓および盲腸重量の対体重比, X線CTスキャン解析により得られた内臓脂肪および皮下脂肪重量の対体重比, 脂肪含有率をTable 3に示した。肝臓重量には豆乳投与群で有意差は認められなかった。盲腸重量は, 豆乳投与群で高値を示し, CO群と比較し, SM-10群では有意に高値となった。内臓脂肪, 皮下脂肪, 脂肪含有率には有意差は認められなかったものの, 投与豆乳の濃度依存的に減少傾向が示された。

3. 血中脂質

血漿TC濃度は, CO群と比較し, SM-10群で有意に低値を示した。同様に, 血漿non-HDL-cholesterol濃度もSM-10群で有意に低値を示した。血漿TG濃度には, 豆乳投与群で有意差は認められなかった(Table 4)。

4. 肝臓脂質

肝臓脂質濃度の測定結果をTable 4に示した。肝臓Cholおよび肝臓TGのどちらにも豆乳投与

群で有意差は認められなかったが, 低値傾向を示した。

5. 糞中胆汁酸

豆乳投与群で糞重量の有意差は認められなかった。また, 糞中胆汁酸濃度も有意差は認められなかったが, SM-10群で高値傾向を示した(Table 4)。投与豆乳の濃度依存的に増加傾向が示された。

考 察

大豆タンパク質やイソフラボンの投与による血漿総コレステロール濃度上昇抑制効果, 肝臓脂質濃度低下効果については数多く報告されている^{2,3,9-11)}。しかし, このような精製された成分ではなく, 大豆食品状態としての投与によって生理効果が現れる大豆タンパク質の有効濃度について検討した研究例は少ない。

本研究では, 豆乳投与により体重および摂餌効率に有意差が認められなかったが, わずかに低下傾向を示したのは, 内臓脂肪および皮下脂肪の減少傾向に起因すると推測される。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おり¹²⁾, 本研究でも, UCP発現が亢進したと推定される。

肝臓TGが減少傾向であったことから, 肝臓でTGの合成抑制および分解促進が生じたと推定される^{2,3,9-11,13)}。TGの合成抑制は, 大豆タンパク質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)の発現低下が生じることで, 脂肪酸合成酵素FASの合成が抑制されると報告されている^{2,13)}。

肝臓Cholの低下は, SM-10群で認められた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て排泄すること^{11,14)}と, 大豆タンパク質摂取によりコレステロール7 α ヒドロキシラーゼ(CYP7A1)の肝臓での遺伝子発現が上昇し, コレステロールから胆汁酸の合成が促進されることが関与していると推定される^{10-11,13)}。しかし, SM-5群については, 胆汁酸排泄が促進されていないにも関わらず, 血漿コレステロール濃度の低下が認められたことから, 肝臓でコレステロール合成抑制が生じていたと推定される。

盲腸重量の増加は, 豆乳中に豊富に含まれる水

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

	CO	SM-5	SM-10
Initial body weight (g)	260.4 ± 3.5 ^a	263.2 ± 4.0 ^a	260.7 ± 5.6 ^a
Final body weight (g)	482.9 ± 10.3 ^a	471.3 ± 14.4 ^a	477.2 ± 16.2 ^a
Feeding efficiency (g B.W. gain / g diet)	0.287 ± 0.006 ^a	0.269 ± 0.006 ^a	0.269 ± 0.007 ^a
Tissue weight (% B.W.)			
Liver	4.14 ± 0.11 ^a	3.86 ± 0.10 ^a	3.87 ± 0.05 ^a
Cecum	0.664 ± 0.055 ^a	0.709 ± 0.030 ^a	0.941 ± 0.074 ^b
Visceral fat	6.3 ± 0.7 ^a	5.8 ± 0.5 ^a	5.1 ± 0.7 ^a
Subcutaneous fat	4.7 ± 0.5 ^a	4.0 ± 0.2 ^a	3.8 ± 0.5 ^a
Fat percentage (%)	19.2 ± 1.8 ^a	17.2 ± 0.8 ^a	15.6 ± 1.9 ^a

CO, Control; SM-5, Soymilk corresponding to soy protein 5%; SM-10, Soymilk corresponding to soy protein 10%

Each value is the means ± SE of 5~6 rats. ^{a, b}Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison (p < 0.05) B.W.: Body weight**Table 4.** Plasma and liver lipids and fecal parameters of rats fed soymilk diets for 5 weeks

	CO	SM-5	SM-10
Plasma			
Total cholesterol (mg/dl)	75.8 ± 3.4 ^a	63.8 ± 8.3 ^{ab}	47.8 ± 5.4 ^b
non-HDL-cholesterol (mg/dl)	35.2 ± 2.8 ^a	28.8 ± 4.5 ^a	14.5 ± 2.4 ^b
Triglyceride (mg/dl)	118.9 ± 17.0 ^a	134.3 ± 17.3 ^a	123.4 ± 20.7 ^a
Liver			
Cholesterol (mg/g)	3.46 ± 0.29 ^a	3.21 ± 0.22 ^a	2.98 ± 0.12 ^a
Triglyceride (mg/g)	24.8 ± 6.0 ^a	20.7 ± 2.9 ^a	15.0 ± 2.0 ^a
Feces			
Fecal dry weight (g/day)	1.2 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.0 ^a	1.3 ± 0.1 ^a
Bile acid (mg/g feces)	22.5 ± 2.7 ^a	22.1 ± 3.7 ^a	35.7 ± 6.2 ^a

CO, Control; SM-5, Soymilk corresponding to soy protein 5%; SM-10, Soymilk corresponding to soy protein 10%

Each value is the means ± SE of 5~6 rats. ^{a, b}Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison (p < 0.05)

溶性食物繊維およびオリゴ糖を利用することにより腸内細菌が増殖したと推定される。

したがって、豆乳の摂取は、メタボリックシンドロームの予防および脂質異常症やアテローム性動脈硬化の予防に寄与すると示唆される。また、豆乳を摂取することで、腸内細菌叢の改善も期待される¹¹⁾。

以上の結果から、豆乳摂取により血中コレステロール低下作用が示され、肝臓脂質蓄積抑制傾向、内臓脂肪低下傾向が示唆された。また、大豆タンパク質濃度として10%相当の大豆タンパク質を含む豆乳の投与が糞中への胆汁酸の排泄を促進すると示された。以上のすべての効果を約1ヶ月という比較的短期間に有効に発揮するためには、大豆タンパク質換算で、10%相当を含有する豆乳の投与が必要であることが明らかになった。

要 約

豆乳摂取が脂質代謝に及ぼす影響および有効濃度を調べるため、SD系雄性ラットに豆乳(大豆タンパク質5%相当含有または10%相当含有)を5週間投与した。

豆乳の投与によって血漿コレステロール濃度および血漿 non-HDL コレステロール濃度が有意に低下し、肝臓脂質および内臓脂肪の低下傾向が示された。これらの効果は投与豆乳の濃度依存的に現れることが確認された。

以上の結果より、豆乳は、①血中コレステロール濃度上昇抑制作用、②肝臓脂質蓄積抑制傾向、③内臓脂肪蓄積抑制傾向を有することが示された。このことから、豆乳には、脂質代謝改善作用が存在することが示唆された。また、これらの効果を約1ヶ月という比較的短期間で有効に発揮するためには、大豆タンパク質換算で10%相当を含有する豆乳の摂取が必要であることが示された。

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, AR., *J. Nutr Biochem.*, **17**, 365-73 (2006)
- 3) Nagata, Y., Ishikawa, N., and Sugano, M., *J. Nutr.*, **112**, 1614-1625 (1982)
- 4) Reeves, PG, Nielsen, FH, and Fahey, GC, *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993)
- 5) Yamanouchi, K., Yada E., Hozumi, H., Ueno C., and Nishimura, M., *Experimental Gerontology.*, **39**, 1179-1188 (2004)
- 6) Goseki-sone, M., Maruyama, R., Sogabe, N., and Hosoi, T., *Obesity*, **11**, 2605-2613 (2007)
- 7) Ooyama, K., Wu, J., Nosaka, N., Aoyama T., and Kasai, M., *J. Nutr Sci Vitaminol.*, **54**, 136-141 (2008)
- 8) Folch, J., Lees, M. and Stabley, G.H.S., *J. Biol Chem.*, **226**, 497-509 (1957)
- 9) Chen, JR., Liu, SM., Yang, SC., and Suetsuna, K., *Nutrition.*, **20**, 929-933 (2004)
- 10) Kikuchi-Hayakawa, H., Onodera, N., Matsubara, and S., Yasuda, E., *Bri.J.Nutr.*, **79**, 97-105 (1998)
- 11) 荒 勝俊, 大辻一也, 川合修次, 大久保一良, 日食科工誌, **48**, 807-815 (2001)
- 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, 大豆たん白質研究, **8**, 103-107 (2005)
- 13) Kitawaki, R., Nishimura, R., Takagai, N., Iwasaki, M., Tsuzuki, K., and Fukuda, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1484-1488 (2009)
- 14) Higaki, N., Sato, K., Suda, H., Suzuki, T., Komori, T., Saeki, T., Nakamura, Y., Ohtsuki, K., Iwami, K., and Nakamoto, R., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2844-2852 (2006)