

本態性高血圧モデル動物における黒大豆乳酸発酵物の血圧上昇抑制機能とその機序の解明

研究期間 平成 30 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

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 年度の学長裁量研究で、黒大豆の体脂肪低減作用や脂質濃度低下作用は、乳酸発酵により高められること、平成 29 年度の学長裁量研究では、黒大豆は乳酸発酵することで血糖値の上昇抑制作用やインスリン感受性の改善作用を示すようになることを示唆する結果を得た。乳酸発酵黒大豆の広範な機能性を明らかにするために、今年度は乳酸発酵黒大豆の血圧調節機能について検討を行った。乳酸発酵黒大豆の諸機能には、発酵に用いた乳酸菌による機能と、その発酵物による機能があると考えられるため、本研究では、MU-1 乳酸菌のみの影響についても合わせて検討した。

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。黒大豆きな粉を乳酸菌(古漬け由来の *L. pentosus* (MU-1 乳酸菌))を用いて、48 時間嫌気培養して調製した乳酸発酵物を凍結乾燥し、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¹⁾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。乳酸菌の影響について検討するために、F-BSOY 食に含まれる菌数と同程度の 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 週齢の雄性高血圧自然発症ラット (SHR/Izm; 日本エスエルシー (株)、静岡) を市販固形試料 (Type NMF; オリエンタル酵母 (株)) により 1 週間予備飼育した。予備飼育後にラットの尾部の血圧を測定し (MK-2000、室町機械、東京)、体重および血圧に群間で差が出ないように 1 群 6 匹ずつ 4 群に分け、各実験食を 7 週間自由摂食させた。摂食期間中、2 週間ごとに血圧を測定した。飼育期間終了後、6 時間絶食し、イソフルラン麻酔下でヘパリン処理したシリンジで大動脈採血を行い血漿を調製した。また、肝臓、腎臓、胸部大動脈を摘出し、血圧調節関連遺伝子の発現を測定した。

実験結果は、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer 法により統計的有意差 ($p < 0.05$) を

検定した。

なお、本実験は「長崎県立大学動物実験指針」に従い、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年 6 月 1 日環境省告示第 88 号)」に則して実施した。

III. 結果および考察

飼育期間終了後の終体重、摂食量および食餌効率は各群間で有意差はみられなかった (Table 1)。飼育期間中の血圧は、Fig. 1 に示すように、実験食を摂食して 4 週目に収縮期血圧が対照群に比べ、黒大豆群で低くなる傾向が現れ、発酵黒大豆群では有意に低い値を示した。飼育開始 6 週目には、対照群に比べ、発酵黒大豆群だけでなく黒大豆群においても収縮期血圧は有意に低い値を示した。同様の傾向は拡張期血圧においても認められた。このことから、黒大豆の血圧上昇抑制作用は、乳酸発酵することにより高められることが明らかとなった。MU-1 群の血圧は対照群と同様に推移したことから、血圧上昇抑制効果には MU-1 乳酸菌自体はほとんど関与しておらず、乳酸発酵生成物の効果である可能性が示唆された。

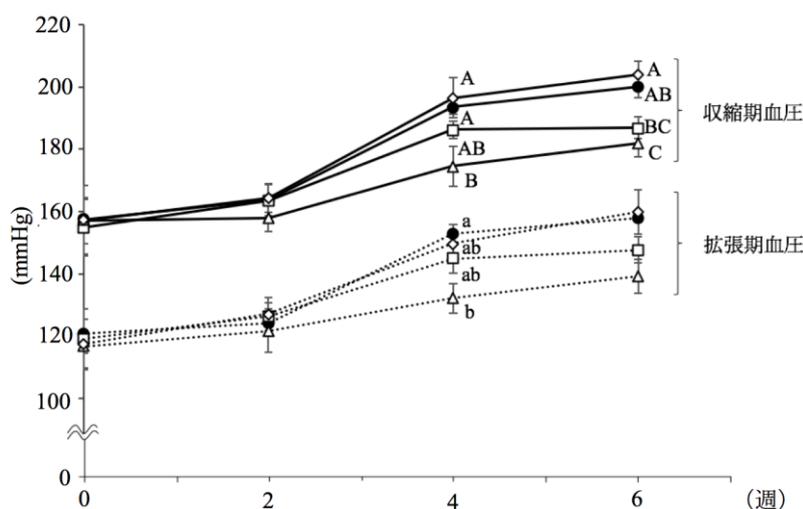


Fig. 1. 乳酸発酵黒大豆が SHR の収縮期および拡張期血圧に及ぼす影響
 ●対照 (CONT), □黒大豆 (BSOY), △発酵黒大豆 (F-BSOY),
 ◇MU-1 乳酸菌 (MU-1)
 平均±SE (n=6) ABC, ab: 異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

血圧上昇抑制作用が知られるアディポネクチンの血漿中の濃度は、対照群に比べ黒大豆群および発酵黒大豆群で高い傾向を示した。この傾向は MU-1 群では認められなかった。したがって、血漿アディポネクチン濃度の違いが、黒大豆およびその乳酸発酵物の血圧上昇抑制作用の一因²⁾であることが示唆された。黒大豆食および乳酸発酵黒大豆食の 12% 程度は大豆タンパク質由来と見積られるため、アディポネクチン濃度の上昇の少なくとも一部は黒大豆に含まれるタンパク質の効果によるものと考えられた³⁾。一方で、乳酸発酵生成物の中に

も血圧上昇抑制作用を導く成分が含まれる可能性も示唆された。アディポネクチン以外で最も代表的な調節因子であるレニン-アンジオテンシン系に対する影響についても検討を行った。Table 2 に示すように、血漿のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性は各群間で違いは認められなかった。また、肝臓アンジオテンシノーゲンの mRNA 発現は、対照群に比べ黒大豆群で高かったが、乳酸発酵群では低い傾向にあり、MU-1 乳酸菌そのものの影響は認められなかった (Table 4)。腎臓でのレニンの mRNA 発現は、対照群に比べ、黒大豆群で低い傾向を示したが、乳酸発酵群ではその傾向は観察されなかった。胸部大動脈のアンジオテンシン II 受容体 1a の mRNA 発現は、統計的に有意ではなかったが、対照群に比べ、他 3 群で発現が低下する傾向を示した。したがって今回観察された血圧上昇抑制作用には、レニン-アンジオテンシン系の関与は恐らくあるものの、黒大豆と発酵黒大豆の効果は一樣ではなく、異なる遺伝子発現が関与している可能性が考えられた。

血圧以外への影響についても確認した。Table 1 に示すように、白色脂肪組織重量は、いずれの部位についても黒大豆および発酵黒大豆による影響は明確でなく、肥満モデルラット (OLETF ラット) を用いた研究 (平成 28 年度学長裁量研究) で認められた体脂肪低減作用は認められなかった。そしてこれまでに知られている大豆タンパク質の体脂肪低減作用⁴⁾も、高血圧モデルラットでは明確でないことが示唆された。これは動物種差によるものと考えている。前回用いた OLETF ラットでは、例えば睾丸周辺脂肪組織重量が 5.7g/100g 体重であったのに対し、今回の SHR では 1.4g/100g 体重程度で脂肪蓄積量が格段に低く、一定レベルを超える体脂肪低減作用は現れにくかったと考えられた。

血漿トリグリセリド濃度は、対照群に比べ黒大豆群でやや低い傾向を示した (Table 2)。この傾向は、肝臓トリグリセリド濃度でも認められ、対照群に比べ、黒大豆群および発酵黒大豆群で低い傾向があった。しかし MU-1 群の肝臓トリグリセリド濃度は対照群と同程度で、脂質濃度に対しても MU-1 乳酸菌自体はほとんど関与しておらず、乳酸発酵生成物の効果である可

Table 1. 乳酸発酵黒大豆がSHRの体重、摂食量および各組織重量に及ぼす影響

	群 名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
初体重 (g)	163 ± 4	163 ± 4	163 ± 2	163 ± 3
終体重 (g)	326 ± 5	320 ± 3	329 ± 3	328 ± 3
摂食量 (g/day)	18.2 ± 0.3	18.1 ± 0.1	18.6 ± 0.2	18.2 ± 0.1
食事効率 (g gain/g diet)	0.190 ± 0.002	0.185 ± 0.004	0.190 ± 0.002	0.193 ± 0.003
組織重量 (g/100g体重)				
肝臓	3.52 ± 0.08	3.48 ± 0.06	3.66 ± 0.01	3.45 ± 0.07
睾丸周辺脂肪組織	1.44 ± 0.06 ^{ab}	1.34 ± 0.04 ^a	1.35 ± 0.04 ^a	1.62 ± 0.10 ^b
腎臓周辺脂肪組織	1.71 ± 0.08	1.61 ± 0.06	1.84 ± 0.08	1.82 ± 0.08
腸間膜脂肪組織	0.97 ± 0.02 ^a	0.97 ± 0.02 ^a	1.18 ± 0.04 ^b	1.12 ± 0.06 ^{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=6), ab異符号間で有意差あり (p<0.05)

能性が示唆された。黒大豆に含まれる成分としては大豆タンパク質の画分である β -コングリシニンにトリグリセリド濃度低下作用があり、同タンパク質は血清アディポネクチン濃度も上昇させることが知られているため⁵⁾、今回の黒大豆および発酵黒大豆の効果にも関与した可能性が考えられた。このように、SHR に対して、黒大豆および発酵黒大豆は、血圧上昇抑制作用だけでなく、これまでに肥満モデル動物 (OLETF ラット) などで認められてきた脂質濃度低下作用も一部認められ、黒大豆のトリグリセリド濃度低下作用は乳酸発酵黒大豆においても効果が維持されることが示唆された。

Table 2. 乳酸発酵黒大豆がSHRの血漿成分に及ぼす影響

	群 名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
トリグリセリド (mg/dL)	59.0 ± 6.6	40.4 ± 3.0	48.7 ± 6.0	58.0 ± 4.5
コレステロール (mg/dL)	72.5 ± 3.9	63.1 ± 1.8	70.2 ± 2.0	70.9 ± 2.4
リン脂質 (mg/dL)	279 ± 16	258 ± 9	263 ± 9	267 ± 12
遊離脂肪酸 (mmol/L)	0.81 ± 0.08 ^a	0.59 ± 0.03 ^b	0.69 ± 0.07 ^{ab}	0.93 ± 0.04 ^a
アディポネクチン (ng/mL)	5.38 ± 0.33 ^{ab}	6.66 ± 0.42 ^a	6.73 ± 0.40 ^a	4.78 ± 0.27 ^b
ACE (U/L)	192 ± 8	192 ± 8	184 ± 4	188 ± 7

CONT, 対照; BSOY, 黒大豆; F-BSOY, 発酵黒大豆; MU-1, MU-1乳酸菌; ACE; アンジオテンシン変換酵素活性
平均 ± SE (n=6), ab異符号間で有意差あり (p<0.05)

Table 3. 乳酸発酵黒大豆がSHRの肝臓脂質に及ぼす影響

	群 名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
	(mg/g liver)			
トリグリセリド	10.9 ± 0.8	8.2 ± 1.6	7.9 ± 0.3	11.0 ± 0.5
コレステロール	2.75 ± 0.12 ^{ab}	2.41 ± 0.08 ^a	2.46 ± 0.06 ^{ab}	2.78 ± 0.08 ^b
リン脂質	26.0 ± 0.5 ^a	27.7 ± 0.2 ^b	29.5 ± 0.5 ^c	25.7 ± 0.4 ^a

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異符号間で有意差あり (p<0.05)

Table 4. 乳酸発酵黒大豆がSHRの血圧調節関連遺伝子発現に及ぼす影響

	群 名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
	(relative mRNA level)			
AGT (肝臓)	1.00 ± 0.07 ^{ac}	1.52 ± 0.20 ^b	0.81 ± 0.06 ^a	1.28 ± 0.08 ^{bc}
Renin (腎臓)	1.00 ± 0.16	0.82 ± 0.05	1.04 ± 0.02	0.84 ± 0.07
AT1a (大動脈)	1.00 ± 0.25	0.70 ± 0.15	0.77 ± 0.11	0.74 ± 0.21

CONT, 対照; BSOY, 黒大豆; F-BSOY, 発酵黒大豆; MU-1, MU-1乳酸菌; AGT, アンジオテンシノーゲン;
AT1a, アンジオテンシンII受容体1a
平均 ± SE (n=6), ab異符号間で有意差あり (p<0.05)

IV. おわりに

本研究で、長崎県産古漬け由来の MU-1 乳酸菌による発酵が、黒大豆の血圧上昇抑制作用を高めることが示唆され、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。作用機序については少なくとも血漿アディポネクチン濃度の上昇作用を介しているようであるがそれ以外の可能性も示唆された。今後、乳酸発酵による成分変化についても詳細が明らかにできれば、関与成分も含め、乳酸発酵黒大豆の機能性がさらに明らかになると考えられる。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) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951.
- 2) Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N, Maeda K, Shibata R, Walsh K, Funahashi T, Shimomura I (2006) *Hypertension*, **47**, 1108-1116.
- 3) 松澤佑次 (2003) *大豆たん白質研究*, **6**, 1-10.
- 4) 古場一哲 (2004) *日本栄養・食糧学会誌*, **57**, 283-289.
- 5) 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.