

2 型糖尿病モデル動物における黒大豆乳酸発酵物の抗糖化作用

研究年度 平成 31 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

I. はじめに

これまでに、長崎県産古漬け由来の乳酸菌 MU-1 (*Lactobacillus pentosus*) による発酵黒大豆の機能性について調べてきた。平成 28 年度学長裁量研究で、黒大豆の体脂肪低減作用や脂質濃度低下作用が、乳酸発酵により高められることを肥満モデルラットを用いた摂食実験で明らかにした。平成 29 年度学長裁量研究では、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、2 型糖尿病モデルマウスを用いた摂食実験で観察した。その際、発酵黒大豆の摂取が 2 型糖尿病の進行を遅らせる可能性があることも示唆された。そこで本研究では、糖尿病の進行の主要な要因の一つである糖化に注目し、黒大豆とその乳酸発酵物の摂取が 2 型糖尿病モデルマウスに対し抗糖化作用を示すかについて検討した。

II. 実験方法

市販の黒大豆（長崎県佐世保産）を粉砕・粉末化した黒大豆きな粉を「黒大豆」の試験試料として用いた。また、黒大豆きな粉を、乳酸菌（古漬け由来 *L. pentosus* (MU-1 乳酸菌)) を用いて、嫌気条件下で 48 時間乳酸発酵し、凍結乾燥したものを「乳酸発酵黒大豆」の試験試料とした。

AIN-93G 組成に準拠して調製した食餌¹⁾ を対照 (CONT) 食とした。対照食の 30% を黒大豆 (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（日本クレア（株）、東京）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出ないように 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。実験食による飼育開始 0 週目、2 週目および 4 週目にマウスを 6 時間絶食させ、尾部より採血し、グルコメーター（アキュチェック アビバ、ロッシュ DC ジャパン（株）、東京）を用いて血糖値を測定した。飼育開始 5 週目に 6 時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で大静脈採血し、血清を調製した。肝臓および白色脂肪組織（睪丸周辺、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た。肝臓は常法によりミトコンドリア/ペルオキシソーム画分、サイトソール画分、ミクロソーム画分に分画し、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

飼育期間中の空腹時血糖値の経時的変化を Fig. 1 に示した。CONT 群では、飼育期間の経過とともに血糖値は上昇した。一方、BSOY 群および F-BSOY 群では飼育期間の経過に伴う血糖値の上昇が観察されず、飼育開始 2 週目で BSOY 群および F-BSOY 群の血糖値は CONT 群に比べ低い傾向、4 週目では有意に低い値を示した。このような効果は、MU-1 群では認められなかった。今回と同様の実験系で KK-Ay マウスのインスリン感受性への影響について調べた平成 29 年度の学長裁量研究では、BSOY 群については血糖値の上昇抑制作用は観察されなかった。結果の違いの理由については明確でなく、効果の再現性について確認する必要がある。しかし、今回の結果からは、血糖値の上昇抑制作用は黒大豆由来の成分によることが示唆され、その作用は乳酸発酵物でも認められ、乳酸菌そのものによる効果ではないことが示唆された。

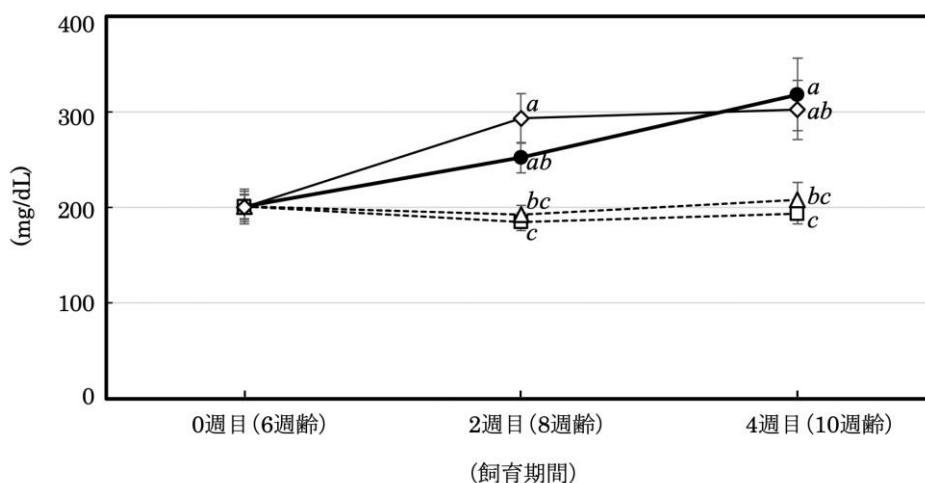


Fig. 1. 発酵黒大豆摂取がKK-Ayマウスの空腹時血糖値の経時的変化に及ぼす影響

● CONT(対照), □ BSOY(黒大豆), △ F-BSOY(発酵黒大豆), ◇ MU-1(MU-1乳酸菌)
 平均値±SE(n=6), 異符号間で有意差あり($p < 0.05$)

飼育期間終了後の体重および摂食量は各群間で有意差はみられなかったが、食餌効率率は CONT 群に比べ BSOY 群で高かった (Table 1)。BSOY 群では、他の群に比べ終体重がわずかに重く、摂食量がわずかに少なかったことが重なったためと考えられた。しかし、今回と同様の実験系で KK-Ay マウスのインスリン感受性への影響を調べた平成 29 年度の学長裁量研究では、体重、摂食量および食餌効率にいずれも違いは認められておらず、今回、BSOY の摂食で食餌効率に変化した理由については不明である。

100g 体重あたりの組織重量において、肝臓重量は CONT 群に比べ BSOY 群で重く、F-BSOY 群でも重かった。白色脂肪組織への影響の程度は部位ごとに異なり、特に腸間膜脂肪組織重量は、CONT 群に比べ、BSOY 群および F-BSOY 群で有意に軽かった。このような傾向は、MU-1 群では認められなかった。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強くなることが示唆された²⁾。そしてその作用への乳酸菌そのものの関与の可能性は低いと考えられた。

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)	29.1 ± 0.2	29.1 ± 0.3	29.2 ± 0.3	29.3 ± 0.3
終体重 (g)	37.0 ± 0.4	37.8 ± 0.4	37.5 ± 0.6	36.5 ± 0.3
摂食量 (g/day)	7.15 ± 0.08	7.06 ± 0.13	7.28 ± 0.15	7.27 ± 0.33
食餌効率 (g gain/g diet)	0.070 ± 0.006 ^a	0.093 ± 0.003 ^b	0.080 ± 0.005 ^{ab}	0.073 ± 0.005 ^a
組織重量 (g/100g体重)				
肝臓	5.73 ± 0.25 ^a	8.47 ± 0.35 ^b	6.97 ± 0.18 ^c	5.14 ± 0.30 ^a
率丸周辺脂肪組織	3.92 ± 0.12	3.42 ± 0.17	3.40 ± 0.05	3.72 ± 0.20
腎臓周辺脂肪組織	1.50 ± 0.10 ^{ab}	1.29 ± 0.09 ^a	1.46 ± 0.13 ^{ab}	1.72 ± 0.15 ^b
腸間膜脂肪組織	2.13 ± 0.03 ^a	1.84 ± 0.03 ^b	1.71 ± 0.05 ^b	2.04 ± 0.05 ^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)

血清中の各成分濃度を Table 2 に示した。血清トリグリセリド濃度は、CONT 群に比べ、BSOY 群で有意に低かった。F-BSOY 群においても CONT 群に比べ血清トリグリセリド濃度は有意に低かったが、トリグリセリド濃度低下作用に乳酸菌そのものは関与していないと考えられた。血清アディポネクチン濃度は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^{3, 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、引き続き検討する必要がある。一方、血清インスリン濃度は、CONT 群に比べ、BSOY 群で有意に低く、F-BSOY 群でも低い傾向が認められた。そこで、飼育 4 週目の血糖値を用いて、インスリン抵抗性指標 (血清インスリン濃度(ng/mL)×血糖値(mg/dL)÷405)⁵⁾ を求めたところ、CONT

群、BSOY 群、F-BSOY 群および MU-1 群でそれぞれ、 2.03 ± 0.50 、 0.47 ± 0.03 、 0.87 ± 0.12 、および 1.55 ± 0.52 で、BSOY 群で最もインスリン抵抗性は軽度で、F-BSOY 群でも軽度の傾向であることが示唆された。

代表的な糖化ストレスマーカーの一つである血清ペントシジン濃度を測定したところ、CONT 群に比べ、BSOY 群で高い傾向、F-BSOY 群で低い傾向にあったものの、全体的に低い数値で、各群間で統計的な違いは認められず、抗糖化作用について明確にはならなかった。糖化反応は前期反応、中間体生成および後期反応に分けられるが、ペントシジンは生体内の糖化最終生成物の一つであり、本研究の比較的短期間（5 週間程度）の摂食期間では影響が出にくかった可能性もある。今後、糖化の前期反応で生成するヘモグロビン A1c やグリコアルブミン（HbA1c）についても検討する必要がある⁶⁾。

Table 2. 発酵黒大豆摂取がKK-Ayマウスの血清成分濃度に及ぼす影響

	群 名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
トリグリセリド (mg/dL)	394 ± 26^a	181 ± 31^b	269 ± 30^b	287 ± 31^{ab}
コレステロール (mg/dL)	149 ± 11	171 ± 19	176 ± 14	136 ± 18
リン脂質 (mg/dL)	288 ± 20	308 ± 27	332 ± 10	286 ± 24
遊離脂肪酸 (mmol/L)	1.28 ± 0.29	1.18 ± 0.14	1.56 ± 0.06	1.53 ± 0.12
アディポネクチン ($\mu\text{g/mL}$)	0.331 ± 0.031	0.391 ± 0.056	0.309 ± 0.019	0.309 ± 0.045
インスリン (ng/mL)	2.56 ± 0.49^a	0.989 ± 0.063^b	1.69 ± 0.18^{ab}	1.94 ± 0.50^{ab}
ペントシジン ($\mu\text{g/mL}$)	0.433 ± 0.026	0.731 ± 0.036	0.236 ± 0.058	0.352 ± 0.088

CONT, 対照; BSOY, 黒大豆; F-BSOY, 発酵黒大豆; MU-1, MU-1乳酸菌
平均 \pm SE (n=6 or 5), ^{ab} 異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

平成 29 年度の学長裁量研究で肝臓脂質濃度に BSOY および F-BSOY の摂取は影響しなかったものの、肝臓の脂質代謝関連酵素活性では脂肪酸合成酵素（FAS）の活性が CONT 群に比べ、BSOY 群、さらには F-BSOY 群で抑えられる傾向が認められたため、今回の実験でも肝臓における脂肪酸合成系および β 酸化系酵素活性を測定した（Table 3）。その結果、FAS 活性をはじめとする脂肪酸合成系酵素（リンゴ酸酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素など）の活性は、CONT 群に比べ、BSOY 群および F-BSOY 群でいずれも高い傾向を示した。ミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系への影響は明確でなく、ペルオキシソームの β 酸化能は CONT 群に比べ、BSOY 群および F-BSOY 群で有意に高かった。これらの結果は、平成 29 年度の学長裁量研究の結果と必ずしも一致しておらず、再現性も含めて確認する必要がある。

Table 3. 発酵黒大豆摂取がKK-Ayマウスの肝臓の脂質代謝関連酵素活性に及ぼす影響

	群 名			
	CONT	BSOY	F-BSOY	MU-1
	(nmol/min/mg protein)			
サイトソール FAS	19.2 ± 2.7 ^{ab}	31.1 ± 3.1 ^a	26.2 ± 4.2 ^a	10.6 ± 2.6 ^b
サイトソール ME	173 ± 15 ^{ab}	262 ± 35 ^a	264 ± 19 ^a	127 ± 20 ^b
サイトソール G6PDH	7.11 ± 0.96 ^a	15.7 ± 1 ^b	10.8 ± 0.5 ^a	8.67 ± 1.45 ^a
ミクロソーム PAP	41.0 ± 2.2	51.8 ± 4.1	50.3 ± 2.3	45.1 ± 7.5
ミトコンドリア CPT	13.5 ± 0.3 ^a	9.0 ± 0.7 ^b	12.3 ± 0.9 ^a	14.9 ± 1.0 ^a
ペルオキシソーム ACO	18.3 ± 1.3 ^a	42.9 ± 2.5 ^b	34.6 ± 1.9 ^b	21.8 ± 3.1 ^a

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; ACO, アシルCoAオキシダーゼ

平均±SE (n=6), ^{ab} 異符号間で有意差あり (p<0.05)

以上のことから、2型糖尿病発症モデル動物である KK-Ay マウスにおいて、発酵黒大豆は黒大豆と同程度に血糖値の上昇を抑え、体脂肪低減作用もやや強いことが示唆され、この効果への発酵黒大豆に含まれる乳酸菌の関与は小さいことが示唆された。本研究で糖化ストレスマーカーとして測定した血清ペントシジン濃度に、群間で大きな違いはなく、抗糖化作用については明確な作用は認められなかった。

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確認されたものの、明確な抗糖化作用は認められなかった。今回の実験では、比較的短い摂食期間を設定し、測定した血中ペントシジンは糖化最終産物であるため、糖化への影響を明確にするには、より長期の摂食期間を設定し、糖化の前期反応物質である HbA1c などについても検討することが必要で、この点については今後の検討課題である。

V. 参考文献

- 1) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951.
- 2) Kim Y, Yoon S, Lee S, Han H, Oh H, Lee W, Lee S (2014) *PLoS One*, **9**, e88231.
- 3) 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.
- 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) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) *Diabetologia*, **28**, 412-419.
- 6) 八木雅之, 石崎香, 高部稚子, 米井嘉一 (2018) オレオサイエンス, **18**, 67-73.