

大豆の生理機能に及ぼす摂取時刻の影響

織野 芽衣、佐伯 雄一、窄野 昌信、榊原 啓之
宮崎大学 農学部

1. 目的

日本人にとって欠かすことのできない大豆は、特徴的なタンパク質や脂質、サポニンやイソフラボン等の機能性成分を豊富に含んだ農産物であり、多くの動物個体レベル (*in vivo*) 試験により抗高脂血症、抗肥満、抗酸化等の様々な効果が期待できることが報告されている。しかしながら、臨床的にその効果が確認できないことがある。その要因はヒトと実験動物の種の違いと考えることもできるが、近年の研究で興味深い知見が得られている。すなわち、我々ヒトを含めた生体には広く体内時計が存在しており、その制御下にある多くの生命現象、例えばエネルギー代謝や生体内抗酸化系には活性が高い時間帯と低い時間帯 (日内リズム) があるため、動物個体レベルで食品の機能性を評価する際には、食べる時間帯を考慮に入れて評価すべきとの考え方である。実際、マウスやラットなどの実験動物は夜行性であるにもかかわらず、多くの試験が明期、即ち実験動物にとっての睡眠期に試験が実施されることが多い。本研究では、これまで報告がある大豆の生理機能が摂取時刻によって影響を受ける可能性について、動物個体レベルで評価することを目的として実施した。

2. 方法

2-1. 試料と試薬

ダイズは、宮崎県の施肥基準にしたがって宮崎大学圃場で栽培・収穫されたキヨミドリを用いた。キヨミドリはデシケーター内で十分に乾燥させた後、ミルで粉砕した。動物試験でマウスに供した餌は、AIN-93M 組成に従って改良した食餌をコントロール食とし、ダイズ食にはキヨミドリ粉末を 10% 含む食餌を与えた (表 1)。その他の試薬類は市販の試薬特級を用いた。

表 1. 食餌組成 (%)

	コントロール食	ダイズ食
β-コーンスターチ	46.5692	44.1631
カゼイン	14.0	9.956
キヨミドリ粉末*	-	10.0
α-コーンスターチ	15.5	14.6991
スクロース	10.0	10.0
コーン油**	4.0	1.824
セルロース	5.0	4.427
ミネラルミックス	3.5	3.5
ビタミンミックス	1.0	1.0
L-システチン	0.18	0.18
重酒石酸コリン	0.25	0.25
第 3 ブチルヒドロキノン	0.0008	0.0008
計	100	100

*大豆食は、キヨミドリ粉末を 10% 加え、代わりに五訂増補食品成分表 2006³⁾による大豆のタンパク質、脂質、炭水化物、食物繊維の割合 (40:22:32:5.7) を基に、カゼイン、コーン油、β-コーンスターチと α-コーンスターチ、セルロースを減らした。

**AIN-93M で用いる油は大豆油であるが、油由来のダイズ成分の影響を除外するために、コーン油を用いた。

表 2. 飼育群

群	朝食時間帯 (ZT6-18)*	夕食時間帯 (ZT18-6)**
朝タコントロール食	コントロール食	コントロール食
夕食ダイズ食	コントロール食	ダイズ食
朝食ダイズ食	ダイズ食	コントロール食
朝タ大豆食	ダイズ食	ダイズ食

※ZT: Zeitgeber time の略。動物室内の照明が点灯した時間を ZT0 と定め、24 時間で表記する。つまり、本試験では ZT0-12 が明期、ZT12-24 が暗期となる。またマウスは夜行性であるため、ZT12 が朝食の時間帯、ZT24 (0) が夕食の時間帯となる。

2-2. 動物試験

本研究で実施した動物試験は、宮崎大学実験動物規則に従い実施した(承認番号:2015-013)。雌性の C57BL/6 マウス(12 週齢)を日本エスエルシー株式会社より搬入後、1 ケージ(幅 172 mm×奥行 240 mm×高さ 129 mm)当たり 3 匹で飼育した。動物飼育室内は室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ に調節し、12 時間の明暗サイクル(明期:7:00~19:00)下で、AIN-93M 組成に準じたコントロール食およびイオン交換水を自由摂取させた。1 週間の順化期間後、表 2 に示した 4 つの群に分け、摂食試験を行った。2 週間後、絶食期間は設けずに ZT12 にジエチルエーテル麻酔下で採血、ならびに肝臓を採取した。血液は室温で 30 分静置後、遠心分離(3,000 rpm、10 分)を行い、血清画分を得た。血清および肝臓試料は、採取後分析まで -80°C で保存した。

2-3. 脂質分析

血清中のトリグリセリド、総コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質濃度を、それぞれの酵素法キットであるトリグリセリド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、HDL-コレステロール E-テストワコー、リン脂質 C-テストワコー(和光純薬工業株式会社、大阪)を用い、指定のプロトコルに従って測定した。肝臓脂質は、Folch らの方法¹⁾に従って抽出し、抽出液を濃縮乾固後、10% Triton X-100 を含むイソプロパノールに再溶解し、トリグリセリド、総コレステロール、遊離コレステロールおよびリン脂質量についてそれぞれの酵素法キットを用いて測定した。

2-4. ダイズ中のイソフラボン含量の測定

ダイズ中のイソフラボン含量は、Sakakibara 等の既報²⁾に従って測定した。具体的には、ダイズ粉末 50 mg に対して 2 mL の 0.5%酢酸を含む 90%メタノールを添加し、十分に攪拌することで抽出した。遠心分離(3,000 rpm、10 分)した上清を回収した。残差は、同量の 0.5%酢酸を含む 90%メタノールによる抽出を計 3 回繰り返して抽出液をすべてまとめて濃縮乾固した。続いて抽出溶媒(500 μL)に再溶解し、以下に示す条件で HPLC 分析に供した:カラム、Capcell pak C18 UG120;検出、SPD 検出器(200~600 nm);移動相、リン酸緩衝液(pH3.3)とメタノールによる低圧グラジエント;流量、1.0 mL/分;カラム温度、 35°C ;注入量、10 μL 。

2-5. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。統計処理は Student's-t-test および Tukey-Kramer を用い、有意水準は 5%未満とした($p < 0.05$)。解析ソフトウェアには Statview (Version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いた。

3. 結果と考察

試験に供したダイズ中のイソフラボンの総含量は 1.15 g/100 g であったことから、ダイズ粉末を 10%含む食餌(表 1)中のイソフラボン含量は 1.15 g/kg と計算される。このダイズ粉末を含んだ食餌を表 2 のスケジュールに従って与えたところ、2 週間の摂食期間中の 4 つの群間の体重推移および総摂食量に差異は見られなかった(表 3)。また、摂食期間中の夕食ダイズ食摂取群、朝食ダイズ食摂取群、朝夕ダイズ食摂取群の一日当たりのイソフラボン摂取量はそれぞれ、 $0.83 \pm 0.28 \text{ mg}$ 、 $1.71 \pm 0.19 \text{ mg}$ 、 $3.36 \pm 0.22 \text{ mg}$ であった(表 4)。自由摂食条件下のマウスの摂食量は、通常、朝食期間が夕食期間と比較して高まることが知られている。実際、朝夕コントロール食群(図 1A)と朝夕ダイズ食群(図 1D)の摂食量は、朝食時間帯の方が有意に高い。しかしながら、朝食のみダイズ

表3. ダイズ食摂取が成長パラメーターに与える影響

	朝夕コントロール食	夕食ダイズ食	朝食ダイズ食	朝夕ダイズ食
体重 (g)				
開始時	19.8±0.5	19.8±0.2	19.8±0.3	19.7±0.3
終了時	22.0±0.5	22.4±0.4	22.5±0.3	22.2±0.5
肝臓 (g)	1.1±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.1±0.1
摂食量 (g/day)	3.3±0.1	3.2±0.1	3.1±0.1	3.1±0.1
イソフラボン摂取量 (mg/day)	—	0.83±0.28	1.71±0.19	3.36±0.22

食群(図 1C)では朝夕の摂食量に違いは見られず、かつ夕食のみダイズ食群(図 1B)では夕食の摂取量がより低くなる傾向がみられたことから、ダイズ食に対する好みが生じている可能性が示唆された。

血清中および肝臓中の脂質含量の測定結果を図 2 に示す。朝食にダイズ食を摂取する群の血中トリグリセリド濃度が他群と比較して有意に上昇した(図 2A)。本研究で採血を実施したのは ZT12(朝食の時間帯)であった。朝食ダイズ食群の夕食時間帯の摂食量が他 3 群と比較して高値であったことから、摂食量の影響を排除することはできないが、脂質代謝の観点からすると、イソフラボンを含む大豆の摂取は朝食時よりも夕食時に摂取することが望ましい可能性がある。その他の脂質量については、顕著な差異は見られなかった。Mezei らの報告³によると、マウスにイソフラボンを 3.11 g/kg 含む食餌を 6 週間与えた時に、血中のトリグリセリド量が有意に低下している。今後は、イソフラボン量を高めた条件で試験を継続していきたい。ただし、摂食時間を考慮に入れたダイズ食の作用を追跡する研究を継続するためには、ダイズ食に対する嗜好性の影響を除外できる方法を用いる必要があると考える。

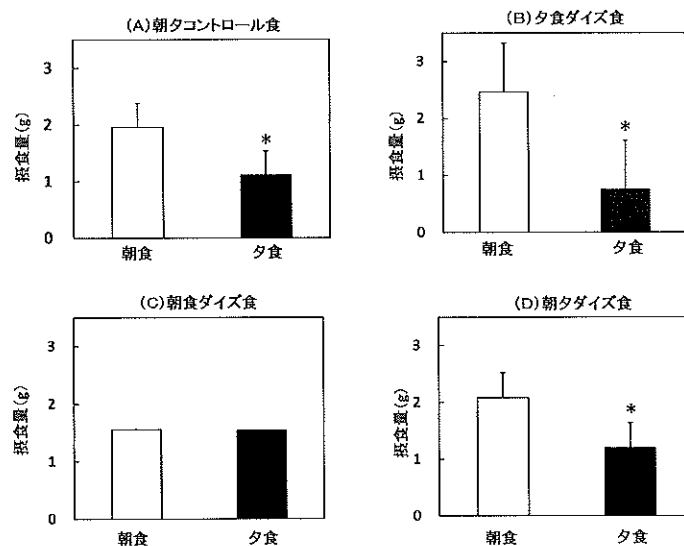


図 1. ダイズ食の摂食タイミングが摂食量に与える影響
 平均値±標準誤差で表示 (n=6)。*P<0.05 vs 朝食 (Student's t-test)。

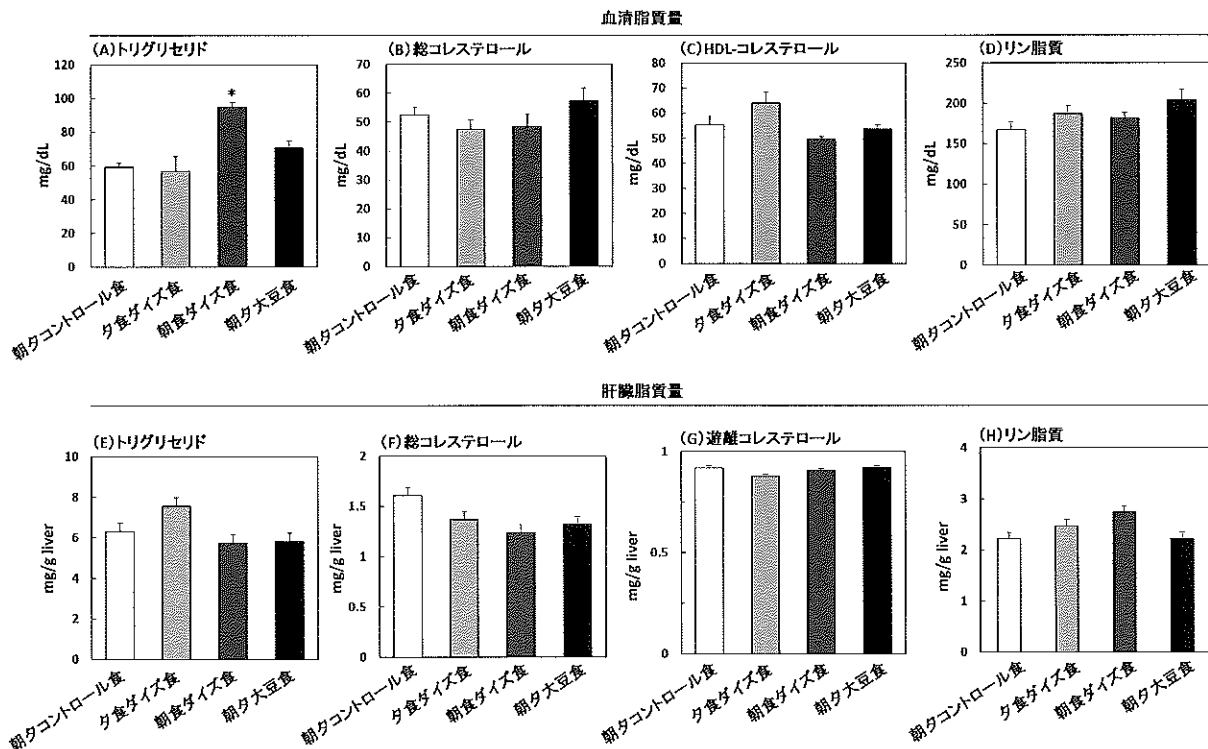


図2. ダイズ食の摂食タイミングが血中および肝臓中脂質量に与える影響
 血清脂質量: (A)トリグリセリド、(B)総コレステロール、(C)HDL-コレステロール、(D)リン脂質
 肝臓脂質量: (E)トリグリセリド、(F)総コレステロール、(G)遊離コレステロール、(H)リン脂質
 平均値±標準誤差で表示 (n=6)。*P<0.05 vs すべての群 (P<0.05, Tukey-Kramer test)。

4. 謝辞

本研究成果は、一般財団法人杉山産業化学研究所の助成によって達成いたしました。ここに謹んで感謝申し上げます。

5. 学会発表

- Sakakibara H., Orino M., Saeki Y., Sakono M., Effects of consumption timing of soybean isoflavones on blood lipid levels in mice, 7th International Conference on Polyphenols and Health (Tours, France), 27-30, October 2015.
- 織野 芽衣、佐伯 雄一、窄野 昌信、○榊原 啓之、大豆イソフラボンの摂取時刻の違いが血中脂質濃度に及ぼす影響、2016年度(第20回)生物機能研究会、フェニックス・シーガイヤリゾート コテージヒムカ、2016年7月2日(宮崎)
- 白石 翔太、Ayu Diawi Ismayawati、佐伯 雄一、窄野 昌信、榊原 啓之、ダイズ葉に含まれる成分と抗酸化活性の日内変動解析、第2回 COC+みやざき A&S ヒルズ研究会、2016年11月23日(宮崎)

6. 参考文献

- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **1957**, *226*, 497-509.
- Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K., Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 571-81.

3. Mezei, O.; Li, Y.; Mullen, E.; Ross-Viola, J. S.; Shay, N. F., Dietary isoflavone supplementation modulates lipid metabolism via PPARalpha-dependent and -independent mechanisms. *Physiol Genomics* **2006**, *26*, 8-14.