

米麴による食塩無添加大豆発酵粉末の 高脂肪飼料誘導肥満マウスに対する抗肥満効果

小島正明^{*1}, 落俊行¹, 明尾一美¹
田内遊², 大谷元²

(2007年5月31日受付; 2009年3月2日受理)

要旨: 食塩無添加で蒸し大豆を米麴により発酵後, 凍結乾燥した大豆発酵粉末 (便宜上, 無塩味噌粉末と命名) の抗肥満作用を検討した。0, 20 および 40% の無塩味噌粉末を含む高脂肪飼料ならびに標準飼料で ICR 系マウスを 12 週間飼育した。その結果, 無塩味噌粉末無添加の高脂肪飼料群のマウスは標準飼料群のマウスと比べて体重, 肝臓重量, 腹腔内脂肪組織重量が有意に増加した。また, 肝臓および血清中の脂質量と, 血清グルコース量も標準飼料群と比べて有意に増加した。しかし, 高脂肪飼料に無塩味噌粉末を添加することにより, 体重, 肝臓重量, 腹腔内脂肪組織重量および血清グルコース量の上昇は抑制された。一方, 脂肪組織中のレプチンおよびレジスチン mRNA の発現量は無塩味噌添加高脂肪飼料群で無塩味噌無添加高脂肪飼料群に比べ有意に低下し, アディポネクチン (ACRP30) mRNA の発現量は上昇した。以上の結果は, 無塩味噌のマウスへの経口投与は高脂肪飼料誘導肥満に対して抗肥満効果があることを示している。

キーワード: マウスの肥満, 無塩味噌, 高脂肪飼料, 予防効果

近年, 食品の有する生体調節機能が注目され, 大豆にはさまざまな生体調節物質が含まれることが明らかにされている。中でも, 大豆タンパク質の血中コレステロール低下作用¹⁾²⁾, イソフラボンの骨粗しょう症予防作用³⁾ および大豆オリゴ糖の整腸作用⁴⁾ に着目した特定保健用食品が開発されていることは周知のところである。

一方, わが国の伝統的発酵大豆食品の一つである味噌は, 日本人に欠かせない調味料である。味噌には大豆が本来有する生体調節機能を有する物質に加えて, 発酵過程に生じる物質の生体調節機能も確認されている。たとえば, 味噌の色素であるメラノイジン⁵⁾⁶⁾ や香気成分である 4-ヒドロ-2 (または 5) エチル-5 (または 2) メチル-3(2H)-フラノン⁷⁾⁸⁾ は抗酸化作用やラジカルスカベンジング作用を有しており, 機能性食品素材として期待されている。しかし, 一般に味噌の製造時には大豆や麴とともに高濃度の食塩が原料として添加されるため, 味噌は強い塩味を有している。また, 高濃度の食塩の摂取は高血圧⁹⁾ や胃がん¹⁰⁾ の要因と考えられている。そのため, 味噌の食品としての摂取可能量には制限があり, その利用は調味料の域を脱しないのが現状である。

筆者らは, 味噌の短所をなくした食品素材を開発する目的から, 味噌の製造設備を利用して, 蒸した大豆を食塩を全く加えずに米麴で発酵させ, 最終塩分濃度がきわ

めて少ない大豆発酵粉末 (食塩を加えずに発酵していることから味噌の定義には合致しないが, 以下便宜上, 無塩味噌粉末という) の大量製造法を確立した。合わせて, 製造した無塩味噌粉末は加工食品素材として優れた性質を有することを見出した。

そこで, 本無塩味噌粉末添加の高脂肪飼料で飼育したマウスの増体重, 臓器重量, 中性脂肪, 血清成分および肥満に関係するサイトカイン mRNA 発現に及ぼす影響を調べた。

実験方法

1. 供試粉末

蒸し大豆 10 に対して, *Aspergillus oryzae* の孢子 (ピオック, 愛知) を加えて 30-35°C, 湿度 75-95% で 45 時間培養して調製した米麴 7 および 60% 酒精液を 1 の割合で加えて, 45°C で 1 週間, さらに 30°C で 30 日間発酵後, 凍結乾燥し, 無塩味噌粉末 (商品名, “酵豆粉”: 伊那食品工業(株)より販売, 製造社: 宮坂醸造(株)とした。大豆粉末 (Whole Bean Powder) はエー・ディー・エム・ファーイースト社 (東京) から購入した。

2. リパーゼ阻害活性の測定

無塩味噌粉末 5 g を含む 40 mM マックルバイン緩衝液溶液 (pH 7.4, 50 mL) の遠心分離 (5,000×g, 10 分)

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: mkojima@kantenpp.co.jp)

¹ 伊那食品工業株式会社研究開発部 (399-4498 長野県伊那市西春近 5074)

² 信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻 (399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村 8304)

上澄み液を、リパーゼ阻害活性測定のための試験試料とした。リパーゼ阻害活性は Shimura *et al.* の方法に従って測定した¹¹⁾。すなわち、0.2 M マックルバイン緩衝液 (pH 7.4) に溶解したリパーゼ溶液 (250 単位/mL, プタ腓臓由来, Elastin Products Company, USA) 50 μ L と試験試料 1 mL を混合し、37°C で 3 分間反応後、エタノールに溶解した 1 mM 4-メチルウンベリフェリルパルミテート (Sigma, USA) 溶液 1 mL を加えて同温度でさらに反応させた。20 分後、0.1 M 塩酸溶液 1 mL を加えて反応を停止させ、その蛍光強度を分光蛍光光度計 (Ex: 320 nm, Em: 450 nm, RF-1500, 島津製作所) で測定した。試験試料の代わりにマックルバイン緩衝液を用いて同様の処理を行うとともに、既知量のウンベリフェロン (Sigma, USA) を用いて検量線を作成し、酵素反応により遊離したウンベリフェロン量を求めた。また、リパーゼ阻害活性は以下の公式により算出した。

阻害活性 (%) = (1 - 試験試料存在下で遊離したウンベリフェロン量/緩衝液を用いたときに遊離したウンベリフェロン量) \times 100

3. マウスの飼育試験

本動物実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号, 平成 14 年一部改正) を遵守し、「独立大学法人信州大学動物実験指針」に則って実施した。

4 週齢の ICR 系雌マウス (体重 27.9 \pm 0.6 g, 日本クレア株, 東京) から購入後、市販飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株, 東京) で 1 週間予備飼育後、Table 1 に示

した飼料で 12 週間試験飼育した。なお、無塩味噌無添加高脂肪飼料、無塩味噌 20% 添加高脂肪飼料および無塩味噌 40% 添加高脂肪飼料は、無塩味噌中に含まれる糖質量、脂質量、タンパク質量およびミネラル量を考慮し、コーンスターチ、ショ糖、牛脂、カゼインおよびミネラル Mix 量を変えることにより、各栄養素量とエネルギー量を統一した。また、各飼料群のマウスは 8 匹で 4 匹ずつの群飼いとするとともに、飼育は 22 \pm 1°C, 湿度 55 \pm 5%, 12 時間周期のライトサイクルで行い、飼料および水は自由摂取とした。マウスの体重は 1 週間に 1 回測定し、糞便量は飼育第 4 週目と第 12 週目の 2 回、1 週間分を一括して凍結乾燥し測定後、分析に供した。糞便の採取は、ケージの木片チップごと凍結乾燥し 10 メッシュの篩にかけ、チップと糞便を分別後、目視にて糞便のみを選別した。また、12 週間の試験飼育後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、腹部大動脈より採血した。次いで、そのマウスにさらにジエチルエーテルを過剰吸引させることにより屠殺し、腓臓、肝臓、脾臓、小腸および腹腔内脂肪組織を摘出し、分析に供した。

4. 分 析

血清中のグルコース、総コレステロール、LDL-コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質、尿素窒素およびクレアチニン量の測定は三菱ビーシーエル株 (東京) に依頼した。凍結乾燥糞便中の総脂質量はソクスレー抽出法により測定した。肝臓のトリグリセリド (および総コレステロール量は、それぞれトリグリセリド E-テストワコーおよびコレステロール E-テストワコー

Table 1 Compositions of experimental diets and nutrients of non-salty soybean paste.

Composition:

Component	High-fat diet without non-salty soybean paste (g/100 g)	High-fat diet with 20% non-salty soybean paste (g/100 g)	High-fat diet with 40% non-salty soybean paste (g/100 g)
Beef tallow	30.0	27.2	24.5
Cornstarch	21.0	15.5	10.0
Sugar	10.0	5.0	0
Mineral Mix	4.0	3.3	2.5
Vitamin Mix	1.0	1.0	1.0
Casein	34.0	28.0	22.0
Non-salty soybean paste	0	20.0	40.0
Calories (kcal)	530	530	530

Standard diet was used a commercial diet (MF, Oriental Yeast, Tokyo) of 360 kcal/100 g.

Nutrients:

Chemical composition	Mineral composition	
Carbohydrate (g/100 g)	43.1	Na (mg/100 g) 24.5
Protein (g/100 g)	24.8	K (mg/100 g) 911.0
Fat (g/100 g)	11.4	Ca (mg/100 g) 12.6
Ash (g/100 g)	3.0	Mg (mg/100 g) 54.0
Water (g/100 g)	17.7	Fe (mg/100 g) 3.7
Dietary fiber (g/100 g)	12.8	P (mg/100 g) 60.4
Isoflavone (mg/100 g)	90.1	

Table 2 Primers used for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

	Forward	Reverse	T_m
ACRP30	5'-CCTGTTCTCTTAATCCTGCC-3'	5'-AACTTGCCAGTGCTGCCG-3'	49°C
Leptin	5'-AACCCATCAAGACCATTGTCA-3'	5'-ATTCTTGGGAGCCTGGTGG-3'	50°C
Resistin	5'-GAGTTGTGTCCTGCTAAGTCC-3'	5'-TCTCCTCCACCATGTAGTTT-3'	47°C
28S rRNA	5'-AAGAGAGAGTTCAAGAGGG-3'	5'-TCGGAGGGAACCAGCTAC-3'	45°C

ACRP30, adipocyte complement-related protein of 30 kDa.

(ともに和光純薬工業(株), 大阪) を用いて測定した。脂肪組織の遊離脂肪酸量は, NEFA C-テストワコー (和光純薬工業(株)) を用いて測定した。

5. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

腹腔内脂肪から ISOGEN (株ニッポンジーン, 富山) を用いて, その説明書に準じ全 RNA を抽出し, 総 RNA 量を 260 nm の吸光度から求めた。抽出した RNA 1 μ g を用いて, ランダム 9 mer をプライマーとして TaKaRa RNA PCR Kit (タカラバイオ(株), 京都) を用いてその説明書に準じて RT-PCR を行った。なお, 使用したプライマーの塩基配列とアニーリング温度は Table 2 に示したとおりである。また, PCR のサイクル数はカイネティクス分析法¹²⁾ に従い, 25 サイクルから 45 サイクルまで 5 サイクルまたは 3 サイクルずつサイクル数を変えて行った。PCR 産物を, 1% アガロースゲルを担体として電気泳動を行い, バンドをエチジウムブロマイドで染色後, その相対蛍光強度を NIH Image (National Institutes of Health, USA) で解析した。個体間の mRNA の発現量は, 28S rRNA の発現量を基準に用いて補正した。

6. 統計処理

各測定値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で表示し, 各群間の有意差の有無を Dunnett 法による多重比較検定により Microsoft Excel 2002 を使用し危険率 5% で調べた。

実験結果

原料として用いた大豆粉末および無塩味噌のリパーゼ阻害活性を Table 3 に示した。用いた酵素反応系での大豆粉末のリパーゼ阻害活性は 68.7% であるのに対して, 無塩味噌のリパーゼ阻害活性は 97.5% であり, 発酵処理によりリパーゼ阻害活性は増加した。

一方, 12 週間の試験期間における各飼料群の体重変化を Figure 1 に示した。無塩味噌無添加高脂肪飼料群では, 第 1 週目から標準飼料群と比べて体重増加が大きく, 第 3 週目からの体重は標準飼料群と比べて有意に増加しており ($p < 0.05$), 第 12 週目の体重は標準飼料群の 1.4 倍であった。一方, 無塩味噌を 20% または 40% 添加した高脂肪飼料群の体重増加は, 標準飼料群と比べて全試験期間で統計的有意差はみられず, 第 12 週目の体重増加も前者で標準飼料群の 9.8% であり, 後者も 4.0% であった。

各試験群の, 第 4 週目と第 12 週目の糞便重量と糞便中の脂質量を Table 4 に示した。糞便量は無塩味噌無添加の高脂肪飼料群が最も少なく, 最も多い標準飼料群のお

Table 3 Lipase inhibitory activities of soybean powder and non-salty soybean paste.

Sample	Inhibitory activity (%)
Soybean powder	68.7
Non-salty soybean paste	97.5

One milliliters of sample extract (0.2 M McIlvaine buffer, pH 7.4) was mixed with 50 μ L of 250 U/mL of porcine pancreatic lipase at 37°C for 3 min, then reacted with 1 mL of 1 mM 4-methylumbelliferyl palmitate in ethanol at 37°C for 20 min. Lipase reaction was terminated by adding 1 mL of 0.1 M HCl, then liberated umbelliferone was measured by spectrofluorometer. Inhibitory activity was calculated as follows:

$$(1 - \text{Amount of released umbelliferone in test solution} / \text{Amount of released umbelliferone in control solution}) \times 100$$

Control : 1 mL of 0.2 M McIlvaine buffer (pH 7.4) was used instead of sample extract.

よそ 6 分の 1 であった。しかし無塩味噌の添加により, 糞便量は無塩味噌無添加の高脂肪飼料群と比べて明らかに増加した。また, それら糞便中の脂質量は標準飼料群で 2.0%, 無塩味噌無添加の高脂肪飼料群で 3.1%, 無塩味噌 20% 添加飼料群で 3.3%, 40% 添加飼料群で 3.9% であり, 無塩味噌の添加により糞便中の脂質量は増加する傾向にあった。さらに, 飼料摂取量は標準飼料群が最も多く, 最も少ない無塩味噌無添加高脂肪飼料群のおよそ 1.5 倍であった。また, 飼料摂取量に基づきエネルギー摂取量を換算すると, 40% 無塩味噌添加飼料群が他の群よりわずかに高い値を示したが, 40% 無塩味噌添加飼料群以外の他の 3 群のエネルギー摂取量はほとんど同じであった (Table 4)。

各飼料群の臓器重量と肝臓中の総コレステロールおよびトリグリセリド量を Table 5 に示した。高脂肪飼料群の肝臓重量は標準飼料群より重い, 無塩味噌を 20% 添加することにより肝臓重量は無塩味噌無添加の場合の 71% に低下し, さらに 40% の添加では 64% に低下した ($p < 0.05$)。肝臓中の総コレステロール量は, 無塩味噌無添加高脂肪飼料群と比べて無塩味噌を 20% および 40% 添加することにより, それぞれ 56% および 70% 減少し, これらの量は標準飼料群よりも低かった。肝臓の単位重量当りの総コレステロール量, すなわちコレステロール合成量は無塩味噌無添加高脂肪飼料群と比べて, 無塩味噌を 20% および 40% 添加した飼料群で, それぞれ 39% および 54% 減少した。さらに肝臓中のトリグリセリド量

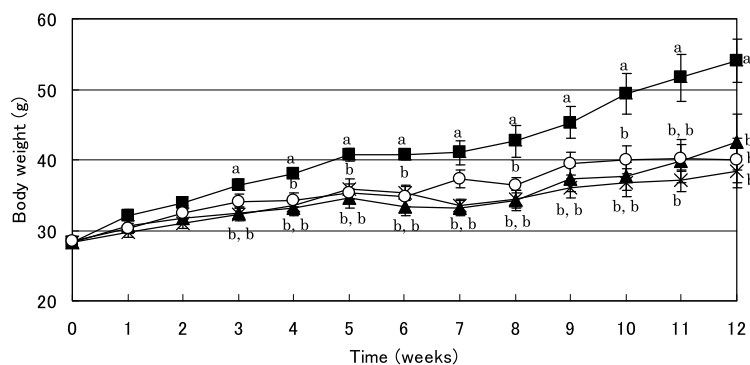


Figure 1 Changes in body weight of mice given 4 kinds of diets for 12 weeks ($n=8$).

×, Standard diet (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan); ■, high-fat diet without non-salty soybean paste; ▲, high-fat diet with 20% non-salty soybean paste; ○, high-fat diet with 40% non-salty soybean paste. Significantly different between different letters at $p < 0.05$.

Table 4 Lipid amount in feces and energy intake in mice given 4 kinds of diets ($n=8$).

	Standard diet	High-fat diet without non-salty soybean paste	High-fat diet with 20% non-salty soybean paste	High-fat diet with 40% non-salty soybean paste
Fecal weight (g)	1.21 ± 0.11	0.20 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.50 ± 0.03
Fecal fat (mg)	24.3 ± 5.91	6.1 ± 0.27	11.2 ± 1.45	19.4 ± 2.24
Food intake (g)	5.24 ± 0.22	3.46 ± 0.55	3.49 ± 0.59	3.68 ± 0.60
Energy intake (kcal)	18.88 ± 0.90	18.36 ± 0.85	18.51 ± 0.91	19.50 ± 0.92

Mean ± SEM. Fecal weight, fecal fat, food intake and energy intake are indicated for one mouse per day.

Table 5 Tissue weights and levels of total cholesterol and triacylglycerol of mice given 4 kinds of diets ($n=8$).

	Standard diet	High-fat diet without non-salty soybean paste	High-fat diet with 20% non-salty soybean paste	High-fat diet with 40% non-salty soybean paste
Liver (g)	1.58 ± 0.11 ^b	2.25 ± 0.18 ^a	1.60 ± 0.13 ^b	1.45 ± 0.07 ^b
Liver total cholesterol (mg)	5.69 ± 1.09 ^b (3.60 ± 0.69) ¹	15.04 ± 1.55 ^a (6.68 ± 0.69)	6.54 ± 1.39 (4.09 ± 0.87)	4.42 ± 0.74 ^b (3.05 ± 0.51)
Liver triacylglycerol (mg)	42.58 ± 3.69 ^b (26.95 ± 2.34)	81.16 ± 5.24 ^a (36.07 ± 2.33)	65.60 ± 5.81 (41.00 ± 3.63)	53.64 ± 6.63 ^b (37.00 ± 4.57)
Spleen (g)	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Pancreas (g)	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.01
Adipose tissue (g)	1.26 ± 0.31 ^b	4.50 ± 0.56 ^a	2.46 ± 0.88	2.43 ± 0.56 ^b

Mean ± SEM. Significantly different between different letters at $p < 0.05$. ¹Number in parentheses is an estimate amount of liver total cholesterol or liver triacylglycerol per 1 g of liver.

も無塩味噌無添加高脂肪飼料群と比べて20%無塩味噌の添加により19%減少し、40%の添加により34%減少した。しかしながら、単位重量当りのトリグリセリド量は、無塩味噌の添加の影響をほとんど受けなかった。一方、無塩味噌無添加高脂肪飼料群の腹腔内脂肪組織重量は標準飼料群の3.5倍であるのに対して、無塩味噌20%および40%添加によりその重量はそれぞれ45%および46%減少した ($p < 0.05$)。なお、脾臓と膵臓の重量はいずれの飼料群においても大きな違いはみられなかった。

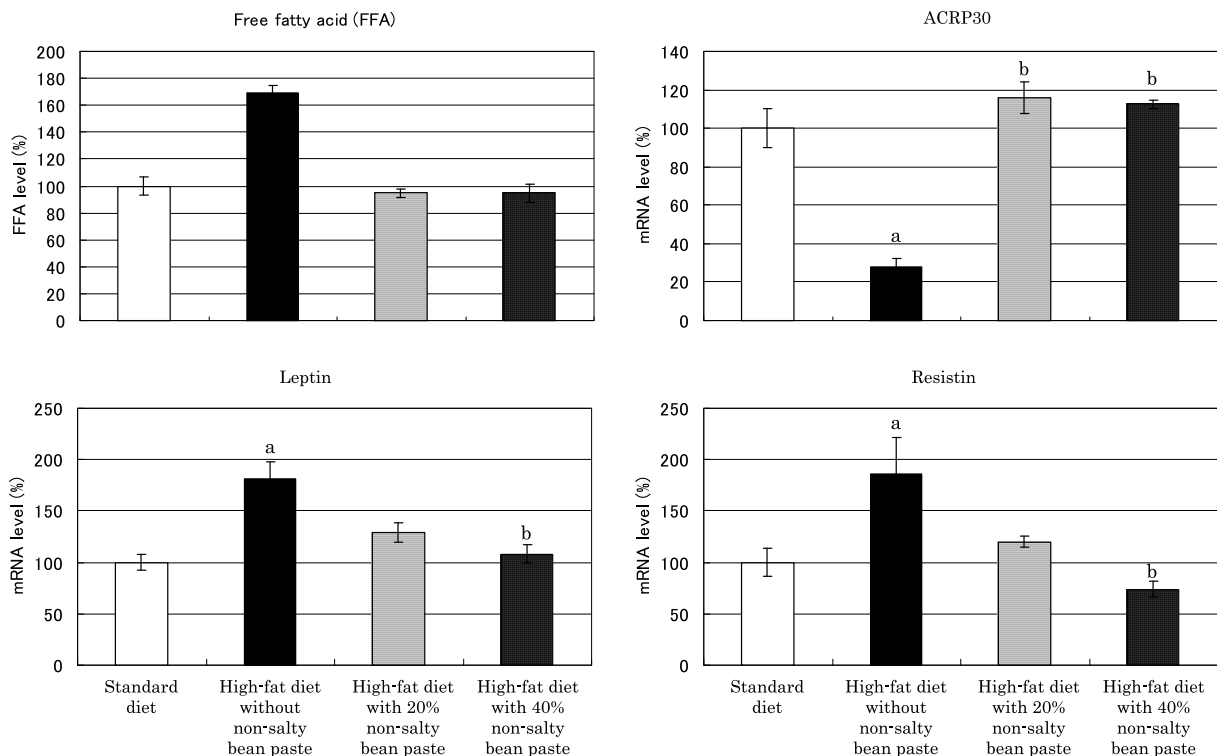
各飼料群のマウス血清中のクレアチニン、尿素窒素、総コレステロール、LDLコレステロール、トリグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸およびグルコース量をTable 6に示した。クレアチニン量は、無塩味噌無添加高脂肪飼料群でわずかに上昇したものの4群間で有意な違いが

みられなかった。尿素窒素は、無塩味噌無添加高脂肪飼料群が標準飼料群と比べて0.4 mg/dL上昇したが、20%および40%無塩味噌添加群では有意に減少した ($p < 0.05$)。また、総コレステロールおよびLDLコレステロールも20%および40%無塩味噌添加群で無塩味噌無添加高脂肪飼料群と比べてそれぞれ6.8, 9.5%および14.0, 38.8%減少し、トリグリセリド量は無塩味噌無添加高脂肪飼料群と比べて20%無塩味噌添加群で29.8, 40%添加群で45.3%減少し、リン脂質は20%無塩味噌添加群で15.9, 40%添加群で22.1%減少し、さらに遊離脂肪酸量は20%無塩味噌添加群で21.7, 40%添加群で23.3%減少した。血清グルコース量も無塩味噌無添加高脂肪飼料群と比べ20%添加群で16.3%減少し ($p < 0.05$)、40%添加群で9.5%減少した。また、Figure 2に示すように、無塩

Table 6 Blood serum parameters of mice given 4 kinds of diets ($n = 8$).

	Standard diet	High-fat diet without non-salty soybean paste	High-fat diet with 20% non-salty soybean paste	High-fat diet with 40% non-salty soybean paste
Creatinine (mg/dL)	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Urea nitrogen (mg/dL)	28.68 ± 1.98	29.09 ± 1.59 ^a	22.69 ± 1.27 ^b	21.81 ± 0.87 ^b
Total cholesterol (mg/dL)	94.00 ± 7.10 ^b	151.28 ± 18.86	141.00 ± 11.19	130.14 ± 11.96
LDL-cholesterol (mg/dL)	6.71 ± 0.36 ^b	12.57 ± 0.92 ^a	11.43 ± 1.34	7.71 ± 0.52 ^b
Triacylglycerol (mg/dL)	46.43 ± 5.39	58.00 ± 5.62	40.71 ± 5.72	31.71 ± 4.28
Phospholipid (mg/dL)	158.29 ± 8.75 ^b	251.57 ± 23.52	211.43 ± 11.45	195.85 ± 11.51
Free fatty acids (μEq/L)	1189.57 ± 52.88	1681.43 ± 295.68	1316.29 ± 121.80	1290.00 ± 102.63
Glucose (mg/dL)	132.71 ± 6.35 ^b	196.29 ± 8.43 ^a	164.43 ± 8.06 ^b	177.57 ± 7.06

Mean ± SEM. Significantly different between different letters at $p < 0.05$.

**Figure 2** FFA level and mRNA levels for adipocytokines in adipose tissue of mice given 4 kinds of diets ($n = 8$).

Significantly different between different letters at $p < 0.05$. ACRP30, adipocyte complement-related protein of 30 kDa.

味噌無添加高脂肪飼料群の腹腔内脂肪組織中の遊離脂肪酸量は標準飼料群の平均値のおよそ1.7倍に増加したが、無塩味噌の20%の添加により標準飼料群の平均値のおよそ95%に、40%の添加によりおよそ92%であった。

マウス腹腔の脂肪組織で発現しているアディポサイトカインのmRNA発現レベルをFigure 2に示した。ACRP30で示されるアディポネクチン関連30kDaタンパク質のmRNAの発現量は無塩味噌無添加高脂肪飼料群では標準飼料群のおよそ3分の1であったが、無塩味噌の20%および40%添加飼料群では、標準飼料群とほとんど同じ発現量であった。一方、レプチンのmRNA発現量は、無塩味噌無添加高脂肪飼料群では標準飼料群の約1.8倍に増加したが、無塩味噌20%添加飼料群では約1.3倍であり、40%添加飼料群では標準飼料群とほぼ同じであった。同様にレジスチンのmRNA発現量も、無塩味噌

無添加高脂肪飼料群で標準飼料群の約1.8倍に増加したが、40%無塩味噌添加飼料群は標準飼料群の約74%であった。

考 察

大豆に含まれるタンパクには脂質の吸着排出作用¹³⁾やリパーゼ阻害作用¹⁴⁾などがあり、これらの作用は抗肥満作用として期待できる場所である。本研究で使用した無塩味噌は蒸した大豆を麴で発酵させ、粉末化したものであるために大豆のもつ抗肥満作用とともに、麴菌の発酵代謝による新たな抗肥満因子の産生が期待できる。また、本無塩味噌は従来の味噌のように高濃度の食塩を含まないために多量に摂取しても高血圧や胃がんの原因になる可能性はほとんど考えられない。そこで本研究では、脂質を飼料重量の30%含む高脂肪食でマウスを飼育し

たときの体重増加や肥満関連物質に及ぼす無塩味噌の経口摂取の影響を調べた。

その結果、市販のマウス用標準飼料群と比べて、30%脂肪を含む高脂肪飼料群では、体重、脂肪組織重量および肝臓重量が著しく増加した。しかし、その飼料に20%量および40%量の無塩味噌を添加することによりそれらの増加は有意に抑えられ、結果には示していないが外見的にも標準飼料群と比べてほとんど違いはみられなかった。また、無塩味噌の高脂肪飼料への添加は肝臓のトリグリセリド量および総コレステロール量を低下させ、さらに腹腔内脂肪組織の遊離脂肪酸量やアディポサイトカイン mRNA の発現量も無塩味噌の添加で改善傾向を示した。すなわち、脂質の摂取が原因で増加するサイトカインであるレプチンは高脂肪飼料群において標準飼料群のおよそ1.8倍に増加したが、無塩味噌を飼料に添加することによりその増加割合は低下した。レジスチンも同様に、高脂肪飼料に無塩味噌を添加することで用量依存的に低下し、無塩味噌の40%量の添加で標準飼料群よりも減少した。一般に脂肪組織で産生される遊離脂肪酸やアディポサイトカインは個体の肥満状態と深く関係していることから¹⁵⁾、本試験においても、無塩味噌無添加高脂肪飼料群と無塩味噌添加飼料群ではその発現レベルが明らかに異なっていた。無塩味噌中のどの成分が、これらのアディポサイトカイン mRNA の発現に影響を与えたのかは今回の試験のみでは明らかではなく今後の検討課題である。

飼料中に含まれる脂質は、おもにリパーゼによって分解され、 β -モノグリセリドと脂肪酸となって腸管から吸収される。リパーゼの活性を阻害することにより、脂質の腸管からの吸収は抑制され、肥満が抑制されると予測されており、事実これに基づいた抗肥満薬としてオルリスタットが実用化されている¹⁶⁾。本試験で使用した無塩味噌には *in vitro* での強いリパーゼ阻害活性があり、その IC₅₀ は 9.6 mg/mL である。また、無塩味噌の摂取により糞便中への脂質の排出量が有意に増加し、血中のトリグリセリド濃度も無塩味噌添加群で減少した。これらのことから、無塩味噌添加飼料群では無塩味噌のリパーゼ阻害活性により、高脂肪飼料を摂取しているのにもかかわらず脂肪の分解が抑制されたために体重増加が抑制され、抗肥満作用につながったものと考えられる。本試験結果から、新たに無塩味噌のリパーゼ阻害活性も無塩味噌の抗肥満作用に寄与していることが考えられる。さらに、脂質の合成経路への影響として、肝臓における単位重量当りの総コレステロール量が高脂肪飼料に無塩味噌を添加することにより減少傾向を示したことから、肝臓でのコレステロールの合成が抑制されたことが考えられる。しかしながら、単位重量当りのトリグリセリド量は高脂肪飼料に無塩味噌を添加しても減少することはない、逆に増加傾向を示したことから、無塩味噌には肝臓でのトリグリセリドの合成を抑制する作用はないものと

考えられる。

大豆たんぱく質や大豆たんぱく質分解物には抗肥満効果があることは知られたところである¹⁷⁾。また、大豆イソフラボン¹⁸⁾や大豆食物繊維¹⁹⁾には血中コレステロール低下作用があることが報告されており、無塩味噌 100 g 中にもイソフラボンが 90.1 mg、食物繊維が 12.8 g 含まれていることから、これらの成分が本試験のコレステロールの低下に関与していることが示唆される。

一方、本試験において高脂肪飼料で飼育したマウスの血中グルコース濃度が標準飼料での飼育の場合よりも有意に上昇し、無塩味噌の添加により低下した。また、血糖抑制に関係するアディポネクチンが無塩味噌添加群において標準飼料群よりも増加したにも関わらず、血中グルコース濃度の低下は緩慢であった。これらのことから、無塩味噌中にアディポネクチンを介した血糖抑制経路を阻害する物質が存在することや、無塩味噌中のアミラーゼの作用等が考えられるが、本実験結果からでは明らかでなく、今後、この点を明らかにすることが必要である。

一般に、肥満と高血糖値の間には相関があり、肥満が解消されると血糖値は低下する傾向にあることが知られている²⁰⁾。無塩味噌中のどの成分が血糖値の低下に関与しているかは今回の実験では明らかではなく、現在無塩味噌の抗肥満作用や抗糖尿病作用の観点から、無塩味噌中のそれらの有効成分の探索を行っているところである。

文 献

- 1) Rosell MS, Appleby PN, Spencer EA, Key TJ (2004) Soy intake and blood cholesterol concentrations: a cross-sectional study of 1033 pre- and postmenopausal women in the Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* **80**: 1391-6.
- 2) Hoie LH, Morgenstern EC, Gruenewald J, Graubman HJ, Busch R, Luder W, Zunft HJ (2005) A double-blind placebo-controlled clinical trial compares the cholesterol-lowering effects of two different soy protein preparations in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr* **44**: 65-71.
- 3) Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA (2004) The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* **79**: 326-33.
- 4) 原 淑恵, 池田なぎさ, 初見健一, 渡部侑子, 飯野久和, 光岡知足 (1997) 大豆オリゴ糖の低投与量による便秘改善効果. 栄養学雑誌 **55**, 79-84.
- 5) Chuyen NV, Ijichi K, Umetsu H, Moteki K (1998) Antioxidative properties of products from amino acids or peptides in the reaction with glucose. *Adv Exp Med Biol* **434**: 201-12.
- 6) Kamei H, Koide T, Hashimoto Y, Kojima T, Umeda T, Hasegawa M (1997) Tumor cell growth-inhibiting effect of melanoidins extracted from miso and soy

- sauce. *Cancer Biother Radiopharm* **12**: 405–9.
- 7) Kataoka S (2005) Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (Shoyu) and its components. *J Biosci Bioeng* **100**: 227–34.
 - 8) 菅原悦子 (1991) みそ香気成分としての HEMF (4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3(2H)-furanone) の単離. 日本食品工業学会誌 **38**, 491–3.
 - 9) Murray RH, Luft FC, Bloch R, Weyman AE (1978) Blood pressure responses to extremes of sodium intake in normal man. *Proc Soc Exp Biol Med* **159**: 432–6.
 - 10) Charnly G, Tannenbaum SR (1985) Flow cytometric analysis of the effect of sodium chloride on gastric cancer risk in the rat. *Cancer Res* **45**: 5608–16.
 - 11) Shimura S, Tsuzuki W, Kobayashi S, Suzuki T (1993) Screening of lipase inhibitors from natural materials. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **40**: 214–17.
 - 12) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technol* **11**: 1026–30.
 - 13) Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M (2004) Soybean β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of β -oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 352–9.
 - 14) Axelrod B, Cheesbrough MT, Laakso S (1981) Lipoxygenase from soybeans. *Method Enzymol* **71**: 441–51.
 - 15) Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K (2003) Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* **14**: 561–6.
 - 16) 辻 正富, 齊藤宣彦, 井上修二 (2001) 消化吸収阻害系薬物. 日本薬理学雑誌 **118**, 340–6.
 - 17) Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T (2000) Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition* **16**: 349–54.
 - 18) Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC (1998) Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* **128**: 954–9.
 - 19) Hundemer JK, Naber SP, Shriver BJ, Forman LP (1991) Dietary fiber sources lower blood cholesterol in C57BL/6 mice. *J Nutr* **121**: 1360–5.
 - 20) Wing RR, Koeske R, Epstein LH, Nowalk MP, Gooding W, Becker D (1987) Long-term effects of modest weight loss in type II diabetic patients. *Arch Intern Med* **147**: 1749–53.
-

J Jpn Soc Nutr Food Sci **62**: 171–178 (2009)

Original Paper

Anti-obesity Effect of a Non-salty Soybean Paste Fermented with Rice
Yeast on Mice Fed a High-fat Diet

Masaaki Kojima^{*.1}, Toshiyuki Ochi¹, Kazumi Akeo¹,
Yu Tauchi², and Hajime Otani²

(Received May 31, 2007, Accepted March 2, 2009)

Summary: Steamed soybeans were fermented with rice yeast without addition of sodium chloride. This mixture was then freeze-dried and termed non-salty soybean paste (NSBP) powder. ICR mice were then fed standard and high-fat diets containing 0, 20 and 40% NSBP powder for 12 weeks. Body weight and the weights of the liver and parametrial adipose tissue increased significantly in the mice given the high-fat diet. Similarly, the levels of liver and serum lipids and the level of serum glucose were significantly higher in the mice fed the high-fat diet than in mice fed the standard diet. However, the addition of NSBP to the high-fat diet prevented any increases in body, liver and adipose tissue weight, and also prevented any increases in the levels of serum lipids and serum glucose. Levels of fatty acids and the expression of mRNAs for leptin and resistin in adipose tissue were significantly lower in mice fed the high-fat diet with NSBP than in those receiving no NSBP. Expression of adiponectin (ACRP30) mRNA was higher in mice fed the high-fat diet with NSBP than in those receiving no NSBP. These results suggest that oral ingestion of NSBP may protect against obesity induced by a high-fat diet.

Key words: obesity in mice, soybean paste without salt, high-fat diet, protective effect

* Corresponding author (E-mail: mkojima@kantenpp.co.jp)

¹ Ina Food Industry Co., Ltd., 5074 Nishiharuchika, Ina, Nagano 399-4498, Japan

² Graduate School of Agriculture, Shinshu University, 8304 Minamiminowa, Nagano 399-4598, Japan