

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580265  
 研究課題名（和文） 納豆成分による鶏卵のコレステロール低減化に関する研究  
 研究課題名（英文） Studies on yolk cholesterol reduction by the supplementation of fermented soybean, natto ingredients  
 研究代表者  
 宮口 右二（MIYAGUTI YUJI）  
 茨城大学・農学部・准教授  
 研究者番号：60520990

研究成果の概要：低コレステロール卵の生産と納豆飼料のニワトリ体内での作用機序との関係について検討した。その結果、低コレステロール化は、納豆中の不溶性成分に由来することが示唆された。また、同給与はニワトリのコレステロール合成系には影響を及ぼさず、コレステロールの輸送系に関わる apoVLDL II の発現あるいは機能に影響を及ぼすことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学、草地学

キーワード：ニワトリ、コレステロール、鶏卵、胆汁酸、apoVLDL II

## 1. 研究開始当初の背景

持続可能な農業・畜産の生産基盤の安定化が望まれる一方で、食の安全・安心に関心が寄せられている。そこで、地域のバイオマス資源の飼料化についての検討が進められている。とくに茨城県の特産品で、プロバイオティクスの *Bacillus var. natto* を含む納豆に着目し、納豆の養鶏用飼料価値を検討した。これまでに、ニワトリへの納豆給与は、鶏卵の低コレステロール化を促進することが確認された。ただし、納豆給与により、鶏卵の低コレステロール化は確認されたが、ニワトリ体内でのコレステロール代謝との関係はこれまでのところ明らかにされていない。そこで、鶏卵の低コレステロール化に及ぼす納

豆の作用機序解明が必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

脂質やコレステロール代謝は、ストレスが強く影響することが知られている。すなわち、飼料中の栄養素の影響以外に、ストレスの影響もあるものと考えられた。そこで、本研究では①、納豆成分のニワトリへの給与が、ストレス行動を抑制し、ニワトリ体内でのストレス物質（コルチコステロン）の軽減が起こるのかを検証した。さらに、②納豆成分のニワトリのストレス抑制効果とコレステロール代謝の関係性について評価するため、納豆を種々の性質に分画し、給餌試験後のニワト

リ血中成分（遊離脂肪酸、コレステロール）および糞中の胆汁酸あるいは鶏卵の品質について調べ、納豆成分の影響を評価することとした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 供試動物

初生のオスヒナ（ジュリア子）および 190 日齢以上のメス成鶏の白色レグホーン種またはロードアイランドレッド種を用いた。

#### 2) 飼料

市販納豆を温風乾燥後、粉碎したものを納豆飼料（N）とした。また、N に水を加え、ホモジナイズ後に得られた上清を水抽出物（WS）として回収した。さらに、その残さを水不溶性部（WI）とし、WI を n-ヘキサンに分散後、ヘキサン可溶部（HS）および同不溶部（HI）に分画した。これら有機溶媒を乾燥器に入れて、除き、N、WS、WI、HS、HI 粉末をそれぞれ、指定の量（3%以内）になるように、基礎飼料に添加したものを用意した。

#### 3) 飼養試験

ヒナを用いた試験では、1 試験区 10 羽ずつ、ケージによる群飼を最長 7 日間行った。その際、単離ストレス 10 分間をかけた。飼養試験では、190 日齢以降の産卵鶏を群飼し、最長 12 週間、上記飼料を給与した。その後、鶏をと殺し、血液および肝臓を採取した。

#### 4) コルチコステロン

EDTA 処理で得られた血漿をサンプルとし、血漿コルチコステロン量を ELISA による市販キットで測定した。

#### 5) 血中成分

4) の血漿中の遊離脂肪酸、HDL、コレステロールはいずれも和光純薬製のキットを用いて測定した。

#### 6) 卵黄コレステロール

卵黄から表面のカラザ層を除いた後、攪拌し、均一化した。その一定量を採取した後、けん化し、イソプロパノールの定容した。コレステロールの定量は市販キットによる比色分析で行った。

#### 7) 卵質検査

卵殻の硬さは、専用の卵殻強度計で測定した。また、ハウユニットはエッグマルチテスターによる自動解析を行った。

#### 8) 肝臓 RNA の定量

肝臓中のコレステロール代謝関連遺伝子である HMG-CoA 還元酵素、コレステロール 7 $\alpha$  脱水素酵素、apoVLDLII の mRNA 量を常法に従って抽出した後、サイバークリーンを用いたリアルタイム RT-PCR で定量した。

### 4. 研究成果

#### 1) オスヒナを用いた納豆給与試験

動物のストレス軽減は、動物福祉の観点からヨーロッパを中心に高まっている。例えば、

ウィンドレス鶏舎の使用、密飼い、産卵性向上のための強制換羽などがある。また、昨今の地球温暖化による暑熱ストレスが産卵成績の低下をもたらすとされており、養鶏業者にとって、ストレス軽減には強い関心がある。

本研究では、納豆成分のストレス軽減と脂質代謝との関係について評価した。その結果、オスヒナに 3%納豆粉末を給与したところ、単離ストレスの指標となる発声の回数が減少する傾向になり、血漿コルチコステロン濃度も減少する傾向になることが示された。このように、納豆には潜在的にストレス緩和作用を有する成分の存在が示唆されたものの、ストレス緩和と血中のコレステロールあるいは遊離脂肪酸などの脂質成分の間には、明瞭な関係は認められず、納豆は、ストレスに伴う脂質代謝への直接的影響は小さいことが示唆された。

#### 2) 納豆給与が産卵鶏のコレステロール代謝に及ぼす影響

ニワトリのコレステロール代謝は性成熟した雌で特異性のあることが報告されている。そこで、産卵鶏を用い、納豆給与が肝臓コレステロール代謝関連遺伝子の発現に影響するのかどうか検討した。その結果、1.5%あるいは3%の納豆粉末を給与すると、12 週間給与した場合にいずれも卵黄の低コレステロール化が確認された。ただし、血中コレステロール濃度については、納豆給与の影響は見られなかった。これまで、飼料給与で低コレステロール卵の生産を試みた実験では、血中コレステロール量で評価することが多かったが、今回、納豆給与では、血中コレステロール含量には影響を及ぼさないことから、新たなコレステロール低下の指標となるものを検索する必要が生じた。そこで、肝臓中のコレステロール代謝関連遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR で解析したところ、コレステロールの輸送に関与するアポタンパク質の apoVLDLII が、納豆 1.5%および 3.0%給与によっても減少傾向にあることが確認された(図 1)。

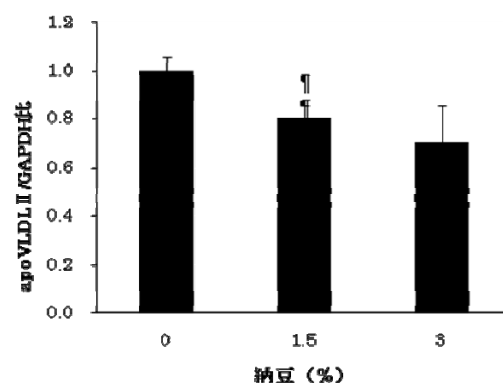


図1 apoVLDLII 遺伝子の発現量に及ぼす納豆給与の影響

一方、コレステロール合成に関与するHMG-CoA還元酵素には、納豆給与の影響は認められなかった。また、コレステロールから胆汁酸に異化するコレステロール7 $\alpha$ 水酸化酵素も、有意な影響は認められなかった。このことから、納豆給与は、従来の飼料添加物の作用機序であるコレステロール合成抑制ではなく、コレステロールの輸送系に影響を及ぼすことが確認された。

### 3) 納豆分画物の産卵鶏への給与がコレステロール代謝に及ぼす影響

ニワトリへの納豆給与がコレステロールの輸送に関与することが示されたことから、納豆のどの成分に、この作用があるのかを検討した。

まず、納豆の水溶性の違いにより分画した2つの画分(W<sub>S</sub>およびW<sub>I</sub>)をそれぞれ3%となるよう、白色レグホン種に4週間給与した。4週間の給与試験の結果、W<sub>I</sub>画分給与区で有意に卵黄コレステロールが低下し、同効果を有する成分の存在が示唆された(図2)。

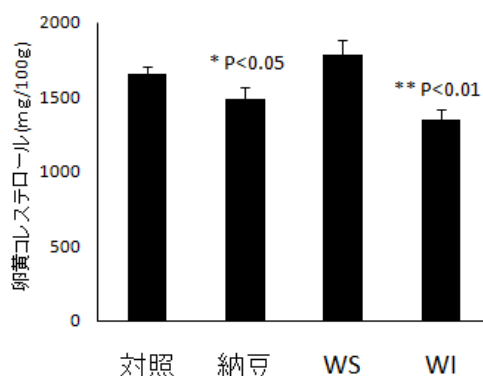


図2 納豆および同分画物の給与が卵黄コレステロール濃度に及ぼす影響

従来、ラットを用いた試験で、血中コレステロールの低下作用を示す成分とし、大豆ペプチドが報告されている。この大豆ペプチドは本実験では、W<sub>S</sub>区に存在していると考えられているが、ニワトリを用いた今回の試験では、血中コレステロール量への影響が認められなかった。また、血中トリグリセリド量も有意差はなかった。一方、卵黄コレステロール量を低下させたW<sub>I</sub>画分の給与は、血中トリグリセリドを有意に減少させることが確認された。ただし、血中コレステロール量はW<sub>S</sub>画分を給与した場合と同じく、有意な減少は認められなかった。このことから、卵黄コレステロールを低下させたのは、納豆の非水溶性成分によるものであり、その効果は、コレステロールの合成を阻害する従来の栄養素とは異なる作用機序で起こっているも

のと考えられた。

さらに、W<sub>I</sub>画分の組成を調べたところ、約40%が脂質で構成されていることが確認された。そこで、W<sub>I</sub>画分をn-ヘキサン処理し、納豆の脂質成分であるHS画分を得た。また、その残さ成分(HI画分)を回収し、HSおよびHI画分をそれぞれ3%となるように基礎飼料に配合し、ロードアイランドレッド種に4週間給与したところ、HSおよびHI画分のいずれの画分にも卵黄コレステロール低下作用のあることが示された。

HS画分は前述のとおり、納豆由来の脂質成分である。その大部分は大豆油と考えられるが、大豆油の給与が卵黄コレステロール量に及ぼす影響についてはこれまでのところ報告がない。納豆菌で大豆を発酵させると、種々の低級脂肪酸が生産されることが知られており、これら低級脂肪酸がHS画分に含まれている可能性がある。今後は、HS画分の脂肪酸組成を調べ、ニワトリに給与する脂肪酸組成と卵黄コレステロール量との関係を検討する必要があると思われる。

一方、HI画分は、非水溶性で、有機溶媒にも不要な成分である。化学分析を行ったところ、粗タンパク質および非蛋白態窒素、粗繊維の順に多く存在していた。すなわち、これらは納豆の難溶性画分である植物繊維や高分子タンパク質等で占められると考えられ、HI画分の給与は、ニワトリ体内には吸収されず、腸管内でのコレステロールの吸収阻害によるものと思われた。実際に、HS画分を給与したニワトリの糞中胆汁酸量は有意に増加しており、コレステロール代謝産物の排出を促進させたことが、卵黄の低コレステロールにつながった可能性が考えられた。

大豆の発酵食品である納豆は、骨代謝の促進や納豆菌のプロバイオティクスとしての効果が示唆されており、ヒトの健康に大きく寄与するとされている。地域のバイオマス資源として利用されない食品の飼料化(エコフィード)が期待されている。消費されなかった納豆は、商品としての価値が低いが、これを廃棄せず、エコフィードとして利用できれば、循環型社会の実現に寄与するとともに、我が国における食料自給率の向上にもつながるものと考えられる。消費されなかった納豆は、発酵が進みすぎているため、呈味性や嗜好性が落ち、商品価値が低下しているが、納豆菌の強い抗菌効果により、腐敗することはほとんどない。

納豆菌と同種のバチルス属の菌培養物をニワトリに給与すると、低コレステロール卵が生産されることが、海外の研究者らが報告している。我が国では、今回の本研究により、納豆の複数の成分がそれぞれ異なる作用機序で卵黄の低コレステロール化を促進していることが示された。アジアの代表的な大豆

発酵食品である納豆の養鶏用飼料としての新たな利用化が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Fujiwara, K., Miyaguchi, Y., Feng, X. H., Toyoda, A., Nakamura, Y., Yamazaki, M., Nakashima, K., and H. Abe “Effects of fermented soybean “Natto” on the production and qualities of chicken meat” Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 21, 1766-1772, 2008, 査読有

②Fujiwara, K., Miyaguchi, Y., Toyoda, A., Nakamura, Y., Yamazaki, M., Nakashima, K. and H. Abe, Effects of fermented soybean “Natto” supplement on egg production and qualities, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 21, 1610-1615, 2008, 査読有

③宮口右二、納豆を飼料にした高品質な鶏肉・鶏卵の生産、栄養整理研究会報, 51, 29-38, 2007), 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①藤田真弓、ニワトリ肝臓中のコレステロール関連遺伝子の発現に及ぼす乾燥納豆給与の影響、日本畜産学会第 107 回大会、2007 年 3 月 29 日、麻布大学 (相模原市)

②藤田真弓、納豆分画物の給与が産卵鶏のコレステロール代謝に及ぼす影響、日本畜産学会第 109 回大会、2008 年 3 月 29 日、常磐大学(水戸市)

③西野景知、鶏卵の低コレステロール化に及ぼす納豆ヘキサソ分画物給与の影響、日本畜産学会第 110 回大会、2009 年 3 月 29 日、日本大学(藤沢市)

④杉田 歩、納豆添加飼料給与とニワトリ脾臓中の炎症性サイトカイン遺伝子の発現、日本畜産学会第 110 回大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学 (藤沢市)

[図書] (計 2 件)

①宮口右二、農村漁村文化協会、農業技術大系 第 5 巻 畜産編 追録 27 号 「納豆残渣の添加による鶏肉のグルタミン酸強化・鶏卵の低コレステロール化」基+152 の 31 の 2-7

②宮口右二、農村漁村文化協会、最新農業技術 畜産 vol.1 (編)、納豆残渣の乾燥粉末添加でグルタミン酸強化と鶏卵の低コレステロール化、pp87-92

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮口 右二 (MIYAGUCHI YUJI)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：60250990

(2) 研究分担者

豊田 淳 (TOYODA ATSUSHI)

茨城大学・農学部・講師

研究者番号：00292483

小針 大助 (KOHARI DAISUKE)

茨城大学・農学部・講師

研究者番号：50396595

(3) 連携研究者

なし