

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00937

研究課題名(和文)大豆発酵食品による酸化ストレスレベルおよび炎症レベルの低減効果の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the reducing effect of oxidative stress and inflammation level induced by fermented soybean food

研究代表者

及川 佐枝子(多田佐枝子)(Tada-Oikawa, Saeko)

椋山女学園大学・生活科学部・講師

研究者番号：90610585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：東海地方で多く利用されている豆味噌について、ヒトマクロファージ様を用い抗酸化・抗炎症作用を検討した。また、若年女性を対象に豆味噌摂取による血中・尿中の酸化ストレスレベルの低減効果を検討した。

豆味噌抽出物は、ヒトマクロファージ様細胞THP-1の酸化ストレスを介する細胞死および細胞内活性酸素種(ROS)の生成を抑制した。さらに炎症反応誘導における炎症性サイトカインIL-1の産生を抑制した。また、若年健康女性を対象にした豆味噌の味噌汁の2週間摂取により、血中・尿中酸化ストレスが低減する傾向が認められたが有意ではなかった。豆味噌には、酸化ストレスを低減する作用があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義として、これまで味噌の抗酸化作用については、多くが試験管レベルで研究されてきたが、培養細胞さらにヒトを対象にした研究はほとんど行われていなかった。本研究で、細胞レベル、生体レベルで抗酸化・抗炎症作用を明らかにすることは、豆味噌を取り入れた伝統的な日本食を見直すことにつながる基礎的なデータとなると考えられる。

研究成果の社会的意義として、近年、生活習慣病が国民の健康問題となっているが、本研究の成果は、日本の伝統的な食材を取り入れた食生活が生活習慣病の予防に貢献することの科学的根拠の一つになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I examined antioxidant and anti-inflammatory action of soybean miso using human macrophage-like THP-1 cells. In addition, I examined the reduction effect of the oxidation stress caused by soybeans miso intake in blood and urine at young women. The soybean miso extract controlled the cell death via oxidative stress and generation of the reactive oxygen species (ROS). Furthermore, the soybean miso extract controlled production of inflammatory cytokine IL-1 in inflammatory state. In addition, the tendency of blood and urinary oxidation stress reduction induced by soybean miso were observed, but its effects were not significant. It was suggested that soybean miso was able to reduce the oxidation stress.

研究分野：食生活学

キーワード：豆味噌 抗酸化作用 抗炎症作用 大豆発酵食品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

炎症反応の持続、すなわち慢性炎症は、アレルギー性疾患や自己免疫疾患、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎やクローン病）などの炎症関連疾患を引き起こす。近年、慢性炎症はそれらの疾患だけでなく、肥満や糖尿病、がん、動脈硬化などの生活習慣病の発症、さらに老化にも密接に関わっていることが明らかになってきている。肥満は種々の生活習慣病のリスク因子となるが、最近、肥満状態において、炎症の環境を作り出されることが報告されている（Lyons, *Nutrients*, 2016）。また、炎症反応により誘導される炎症性サイトカインのインターロイキン - 1（IL-1）や IL-18 の産生は、II 型糖尿病の促進に関わることが報告されている（Larsen, *Engl J Med*, 2007, Trøseid M, *Cardiovasc Diabetol*, 2010）。IL-1 や IL-18 産生による炎症反応は、肥満や糖尿病に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあり、生活習慣病予防の観点からも特に注目されている。

我が国で古くから利用されてきた味噌は抗酸化作用を有し、がんや生活習慣病さらに老化のリスクを下げることが示唆されている。味噌の抗酸化作用は、色の濃さ（メラノイジンの含有量）と相関し、特に愛知県を中心に東海地方で多く作られている豆味噌が味噌のなかで最も強い抗酸化作用を有することが示されている（下橋ら、*日本食生活学会誌*, 2008）。豆味噌の原料の大豆には、抗酸化作用を示すダイジンやゲニスチンなどのイソフラボン配糖体が含まれており、生体では腸内細菌など働きにより糖がはずれたダイゼインやゲニステインというアグリコンの形で小腸に吸収される。豆味噌中のイソフラボン類は、微生物の持つ酵素によりアグリコンで存在することから、生体内で効率よく吸収される。江崎らは、味噌の発酵段階でイソフラボンアグリコンがさらに水酸化され、8-ヒドロキシダイゼイン(8-OHD)や8-ヒドロキシゲニステイン(8-OHG)、6-ヒドロキシダイゼイン(6-OHD)などの *o*-ジヒドロキシイソフラボン(ODI)に変換されることを明らかにし、ODI がダイゼインやゲニステインより顕著に強い抗酸化作用を示すことを明らかにした（日本食品科学工学会誌、2001, 2002）。以上のことから、豆味噌に含まれるイソフラボンアグリコンや ODI は強い抗酸化作用を示すことから、酸化ストレスを抑制し生体に有益な効果を発揮することが示唆される。しかし、その生体に対する詳細な効果については未だ明らかでない。

## 2. 研究の目的

本研究では、炎症反応を引き起こす ROS や活性窒素種に着目し、味噌による抗酸化・抗炎症機構についてヒトマクロファージ様細胞を用いて詳細に解析する。さらに、若年女性を対象に味噌の摂取による血中および尿中酸化ストレスマーカーや炎症マーカーの変動を解析する。以上から、味噌など大豆発酵食品による抗酸化・抗炎症作用を解析し、生活習慣病に関わる炎症関連疾患の予防法の開発につながる基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 各種味噌抽出物の調製：豆味噌、米味噌を 75%エタノールに溶解し振とう抽出を行った。その後、ヘキサンによる脱脂を 3 回繰り返して、得られた試料に酢酸エチルを加え振とう抽出を行った。硫酸ナトリウムによる脱水を行った後、エバポレーターにより溶媒を除去し、得られた固体を味噌抽出物サンプルとした。これを DMSO に溶解し、各種試験に用いた。
- (2) 味噌抽出物による抗酸化・抗炎症作用の解析：味噌の抗酸化・抗炎症作用を解析するため、ヒト単球細胞 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激しマクロファ

ージ様に分化させた細胞を用いた。

1) 各種味噌による抗酸化作用を解析するため、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) あるいは t-ブチルヒドロペルオキシド (t-BHP) により酸化ストレスを負荷した THP-1 マクロファージ様細胞に調製した味噌抽出物を投与し、味噌抽出物による酸化ストレスを介する細胞死の抑制効果を MTS アッセイ (プロメガ社) にて、活性酸素種 (ROS) 生成の抑制効果を ROS の蛍光プローブ 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用い蛍光光度計にて解析した。

2) 味噌による抗炎症作用を解析するため、リポ多糖 (LPS) により炎症反応を誘導した THP-1 マクロファージ様細胞に味噌抽出物投与し、ELISA 法により培養液中に放出された炎症性サイトカイン、IL-1 の産生量を測定した。

(3) 若年女性を対象にした各種味噌の摂取による抗酸化・抗炎症作用の解析: 味噌の抗酸化作用をヒトで検証するため、健常若年女性を対象に、味噌摂取による血中および尿中の酸化ストレスレベルおよび炎症レベルの低減効果を解析した。インフォームドコンセントが得られた健常若年女性 (20~22 歳、17~20 名/年) を味噌摂取群と非摂取群に分け、2 週間を 1 試験期間として、休止期を挟んだ I 期・II 期のクロスオーバー法で試験を行った。味噌は味噌汁として昼食時に摂取し、摂取前、摂取後に採血と採尿を行った。

1) 味噌摂取前、摂取後の血中酸化ストレスレベルの測定は、フリーラジカル測定装置 (FRAS4、(株) ウィスマー/ウィスマー研究所) で dROMs test、および BAP test により行った。

2) 尿中酸化ストレスレベルは、酸化ストレスマーカーの 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の測定により解析した。尿中の 8-OHdG 量の測定は、ELISA 法 (ELISA キット、日本老化制御研究所) を用いて行った。

(4) 味噌中の抗酸化・抗炎症成分の同定: 味噌中の抗酸化成分を同定するため、ガラスカラム、XAD カラムを用いて味噌抽出物を分画した。HPLC により分画した成分を特定した。

#### 4. 研究成果

(1) 豆味噌による抗酸化作用:  $H_2O_2$  あるいは t-BHP により酸化ストレスを負荷した THP-1 マクロファージ様細胞に豆味噌抽出物を加え、細胞死の抑制効果を検討した。 $H_2O_2$  を使用した場合、酸化ストレスが誘導されず、理由として培地中で分解されたことが考えられたため、培地中で分解されにくい構造の t-BHP を使用することとした。その結果、豆味噌抽出物による酸化ストレスを介した細胞死は抑制される傾向が認められた。また、DCFH-DA を用い細胞内 ROS 生成の抑制を検討した結果、豆味噌の添加により抑制が認められた。以上の結果は、それぞれの年に出来た豆味噌で行ったが、年ごとに抑制作用の強さが違い、味噌の発酵の具合で抗酸化力に違いが出ることを示唆された。

(2) 豆味噌による抗炎症作用: LPS により炎症反応を誘導した THP-1 マクロファージ様細胞に味噌抽出物を投与し、IL-1 産生の抑制効果を検討した結果、豆味噌抽出物により IL-1 の産生が抑制することが認められた。この結果も、(1) と同様に、抑制作用の強さの違いがあった。

(3) 若年女性における味噌摂取、非摂取による血中酸化ストレス度 (d-ROMs、ウィスマー社) と、血中抗酸化力 (BAP) の変化を検討した。酸化ストレス度、抗酸化力ともに試験前後で有意ではなかったが豆味噌摂取群においては非摂取群に比べ酸化ストレス度が低下する傾向がみられた。米味噌についても同様に試験を行ったが、酸化ストレス度、抗酸化力

ともに有意な変化はみられなかった。

- (4) 味噌中の抗酸化成分を同定するため、ガラスカラム、XAD カラムを用いて味噌抽出物を分画し、HPLC により成分を検討した結果、この抽出物にはダイゼイン、ゲニステイン、8-OHD が含まれていることが示唆された。今後、これらの分画した成分の抗酸化・抗炎症作用を詳細に解析していく必要がある。
- (5) 若年女性における味噌摂取、非摂取による尿中酸化ストレス度を、8-OHdG を指標に検討した。8-OHdG を測定する前に、脂質過酸化物質に指標となるマロンジアルデヒド (MDA) を指標に検討を行ったが、尿には脂質がほとんど含まれていないことからうまく値が出なかったため、8-OHdG を測定することとした。その結果、豆味噌摂取群、非摂取群ともに、有意な変化は認められなかった。しかし、非摂取群に比べ、摂取群では8-OHdG の生成を抑制する傾向が認められた。米味噌についても検討を行ったが、摂取群、非摂取群とも有意な変化は認められず、また、8-OHdG の生成を抑制する傾向も認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mori Yurie, Oikawa Shinji, Kurimoto Shota, Kitamura Yuki, Tada-Oikawa Saeko, Kobayashi Hatasu, Yamashima Tetsumori, Murata Mariko	4. 巻 19-78
2. 論文標題 Proteomic analysis of the monkey hippocampus for elucidating ischemic resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.3164/jcfn.19-78">https://doi.org/10.3164/jcfn.19-78</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 江崎 秀男, 林 実咲, 志村 亜希子, 長谷川 淑己, 及川 佐枝子	4. 巻 51
2. 論文標題 豆味噌のDipeptidyl peptidase- 阻害作用および活性因子の分離と同定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 椋山女学園大学研究論集 自然科学篇	6. 最初と最後の頁 23-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 江崎 秀男, 志村 亜希子, 長谷川 淑己, 及川 佐枝子	4. 巻 50
2. 論文標題 大豆発酵食品のアンジオテンシン 変換酵素阻害作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 椋山女学園大学研究論集 自然科学篇	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 桑原晶子, 津川尚子, 岡田真平, 小切間美保, 及川（多田）佐枝子, 中野哲雄, 奥泉宏康, 田中清	4. 巻 92
2. 論文標題 日本人のための「ビタミンD欠乏チェック質問票」作成のためのパイロット研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 303-312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukatsu H, Koide N, Tada-Oikawa S, Izuoka K, Ikegami A, Ichihara S, Ukaji T, Morita N, Naiki Y, Komatsu T, Umezawa K.	4. 巻 18
2. 論文標題 NF- B inhibitor DHMEQ inhibits titanium dioxide nanoparticle-induced interleukin-1 production: Inhibition of the PM2.5-induced inflammation model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 5279-5285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2018.9533.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Y, Mise N, Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Izuoka K, Zhang L, Zong C, Takai A, Yamada Y, Ichihara S.	4. 巻 19
2. 論文標題 MicroRNAs as Potential Mediators for Cigarette Smoking Induced Atherosclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19041097.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yokoyama Yuka, Mise Nathan, Suzuki Yuka, Tada-Oikawa Saeko, Izuoka Kiyora, Zhang Lingyi, Zong Cai, Takai Akira, Yamada Yoshiji, Ichihara Sahoko	4. 巻 19
2. 論文標題 MicroRNAs as Potential Mediators for Cigarette Smoking Induced Atherosclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19041097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 及川 (多田) 佐枝子、江口茉那、吹田佳鈴、池上昭彦、市原学、市原佐保子
2. 発表標題 シリカナノ粒子の消化管上皮細胞に対する炎症反応誘導作用
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Fukatsu, Tamami Ukaji, Saeko Tada-Oikawa, Kiyora Izuoka, Yoshikazu Naiki, Takayuki Komatsu, Naoki Koide, Akihiko Ikegami, Sahoko Ichihara, Kazuo Umezawa
2. 発表標題 Inhibition of titanium dioxide nanoparticle-induced inflammatory reaction by NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ in human macrophage-like cells.
3. 学会等名 21st International Symposium on Molecular Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 及川(多田)佐枝子、高田咲子、高尾みのり、志村亜希子、村田真理子、江崎秀男
2. 発表標題 豆味噌抽出液のヒトマクロファージ様細胞に対する抗酸化作用および抗炎症作用
3. 学会等名 第88回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇梶珠未、深津仁見、及川佐枝子、出岡淑、市原佐保子、梅澤一夫、小出直樹
2. 発表標題 NF- $\kappa$ B阻害剤DHMEQによるTiO <sub>2</sub> ナノ粒子に誘導される炎症反応の抑制
3. 学会等名 第64回トキシシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 深津仁見、宇梶珠未、及川佐枝子、出岡淑、市原佐保子、小出直樹、梅澤一夫
2. 発表標題 NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ によるナノ粒子誘導 IL-1 産生の抑制
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 古畑 公、松村 康弘、鈴木 三枝、中嶋 加代子、高野 美奈子、本田 佳代子、高松 まり子、内堀 佳子、宮川 淳美、大木 和子、及川 佐枝子、小林 知未、今井 具子、吉野 佳織、岡田 文江、小林 陽子、藤澤 由美子、高橋 佳子</p>	<p>4. 発行年 2020年</p>
<p>2. 出版社 光生館</p>	<p>5. 総ページ数 229</p>
<p>3. 書名 公衆栄養学 第8版</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	<p>氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)</p>	<p>所属研究機関・部局・職 (機関番号)</p>	<p>備考</p>
<p>研究 分担 者</p>	<p>江崎 秀男  (Esaki Hideo)  (90097642)</p>	<p>椋山女学園大学・生活科学部・教授    (33906)</p>	