

Aspergillus oryzae で発酵させたおから(おから麴)の 生体内抗酸化作用

松 尾 眞砂子 (岐阜女子大学教養部教授)

1. はじめに

近年、生体内過酸化脂質は各種の疾病や老化の誘因として危険視され、成人病予防の立場から生体内で抗酸化力を有する食品の開発が待たれている。大豆にはトコフェロール¹⁾やイソフラボン²⁾のような抗酸化物質が豊富に含まれており、豆腐粕である『おから (以後 OC と略す)』にも微量のトコフェロールが残存している³⁾。また、大豆のイソフラボンはその大部分が胚軸部に集中して存在している⁴⁾ことから、かなりの量のイソフラボンが OC へ移行していると考えられる。さらに、味噌、納豆やテンペのような大豆発酵食品は原料大豆より強い抗酸化性を有している⁵⁻⁶⁾。OC を味噌麹菌 (*Aspergillus oryzae*) で発酵させた『おから麴 (以後 OK と略す)』は *in vitro* で原料である OC より強い抗酸化性があることが知られている⁷⁾。また最近、大豆を *Rhizopus oligosporus* で発酵させたテンペから強力な抗酸化物質として 3-hydroxyanthranilic acid (HAA) が発見された⁸⁾。OK は大豆製品の一種として味噌やテンペと同様の抗酸化物質を含有する可能性がある。OK は抗酸化性のみならず血漿コレステロール上昇抑制作用や肝脂肪蓄積予防作用があり、成人病の予防に適した食品素材として推奨されている⁹⁾。OK の抗酸化性が *in vivo* でも有効であれば成人病予防食品としての OK の価値はさらに大きくなるであろう。

OK に含まれている既知抗酸化性物質を分析すると強力な抗酸化性物質である HAA が比較的

多く含まれており、OK の抗酸化性は HAA によるところが大きいと思われた。HAA の抗酸化性は極く最近発見されたもので、その抗酸化機構はまだ解明されいない。一方、 β -カロチンは植物性の有力な抗酸化性物質として知られているが、最近、腫瘍細胞の成長を抑制する作用が報告された¹⁰⁾。

本研究ではラットを用い、OK を飼料として *in vivo* における抗酸化性を確認した。次いで HAA に β -カロチンと同様の作用を期待してヒトの肝ガン細胞由来細胞に対する HAA の細胞毒性を検討したところ、アポトーシスが誘導された。この HAA によるアポトーシスの誘導メカニズムを酸化的ストレス面から追求した。

2. 実験方法

材料 おから麴 (OK, 商品名うの花麴) とおから (OC, 商品名ビーンフラワー) はみずすコーポレーションから分与していただいた。

リノール酸の酸化

(1) 自動酸化法: 20mM リノール酸 1ml と検液 0.1ml に 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて 2.0ml とし、40°C で 7 日間加温した。検液のヘキサン抽出物は粉末 OK5g にヘキサン 20ml を加え一夜攪拌して得られた抽出液を濃縮して 10 ml とした。メタノール抽出物はヘキサン抽出残渣に 80% メタノール 20ml を加え、70°C で 20 分間還流し、抽出液を 10ml に濃縮した。水抽出液はメタノール抽出残渣を水 20ml で 10 分間煮沸し、得られた抽出液を濃縮して 10ml とした。過酸化

物の定量はロダン鉄法¹¹⁾によった。

(2) 酵素酸化法: リノール酸のヒドロペロキシサイドに存在する共役二重結合に基づく234nmの吸収増¹²⁾と β -カロチンの褪色に基づく460nmの吸収減¹³⁾によって測定した。

(3) ラジカル捕捉法: 酵素酸化法によるリノール酸酸化用反応溶液にフリーラジカル試薬である1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)を加え、プロトンの脱離による褪色を517nmで正確に3分間室温で測定した。

TLCによる抗酸化物質の検出 TLC用シリカゲル(Wakogel B-5F)プレートをを用い、*n*-ヘキサン/メタノール(1/20)で展開し、254nmのUV吸収(UVP, MINERALIGHT)とDPPHによるラジカル消去作用¹⁴⁾により抗酸化性物質の存在を検出した。

トコフェロールの定量 OK中のトコフェロールはカラムにFinePack SILC₁(JASCO, 6.0mm×150mm)を、移動相には*n*-ヘキサン/イソプロパノール/酢酸(100/0.5/0.5)を用い、流速0.8/min, Ex298nm, Em325nmで分析した。血漿中の α -トコフェロールはカラムにShim-pack CLC-NH₂(SIMAZU, 6.0mm×150mm)を、移動相には*n*-ヘキサン/イソプロパノール(25/1)を用いて297nmにおける吸収を測定した。標準物質には α -トコフェロールアセテート(エーザイ株式会社)を使用した。OKのトコフェロールはOK粉末5gと*n*-ヘキサン15mlを40°Cで60分振盪して抽出した。血漿のトコフェロール¹⁵⁾は水で1/2に希釈した血漿に6倍量のエタノール/*n*-ヘキサン(1/5)の混液を加え、激しく振盪して抽出した。

イソフラボンの定量 カラムはCrestpack C₁₈S(JASCO, 6.0×150mm), 40°Cで移動相にはA:水/酢酸(95/5)とB:メタノール/酢酸(95/5)を用い、流量1.0(ml/min)でA/B

(90/10)で10分間保持した後、直線的にA/B(40/60)まで40分間グラジエントし、その後A/B(40/60)を5分間保持して溶出し、UV262nmで検出した。検液には粉末OK1.0gを70%メタノール10mlで室温下24時間振盪し、遠心分離により得られた上澄液を用いた。

3-ヒドロキシアントラニル酸(HAA)の定量 カラムはDevelosil ODS-S(NOMURA, 6.0mm×150mm), 移動相は1%トリフルオロ酢酸を含む5%アセトニトリルを用い、UV298nmで検出し、定量した。検液はイソフラボン用検液と同様にして調製した。

12-ヒドロキシエイコサテトラエノイック酸(12-HETE)の定量 マウスの肺を生理食塩水で5%濃度にホモジネートした液1.0mlを30°Cで60分培養し、氷冷酢酸エチル2.0mlを添加して反応を停止すると同時に酢酸エチル可溶物を抽出した。酢酸エチル抽出液は窒素気流下で濃縮乾固した後、0.1mlのメタノールに溶解して12-HETE定量用検液とした。カラムはCrestpack C₁₈S(JASCO, 6.0mm×150mm), 移動相は5mM酢酸アンモニウム/1mM EDTEを含むメタノール(30/70)(pH5.7), UV234nmで検出し、定量した。

TBA値の測定 1,1,3,3-テトラエトキシプロパンを標準物質にして532nmで比色定量した²¹⁾。

グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Py)活性 GSH-Py活性はグルタチオンを基質にし、NADPHの減少量を340nmの吸光度で測定した²²⁾。

グルタチオンの酸化 25 μ Mグルタチオン-リン酸緩衝液(pH8.0)を40°Cで60分加温し、残存グルタチオン量をDTNBと反応させ、反応生成物のチオニトロフェノレートアニオンを412nmで測定した¹⁶⁾。ただし、酸化型HAAによる吸収はグルタチオン不在反応液の吸収に相当するとも

なして測定値から差し引いた。天然抗酸化物質によるグルチオンの酸化は $100\mu\text{M}$ 濃度で測定した。

スーパーオキシドデスムターゼ (SOD) 活性
スーパーオキシドアニオンによるチトクロームcの還元¹⁷⁾によって測定した。

動物と飼育法 マウスはMF飼料(オリエンタル酵母株式会社)で飼育した8週齢のBALB/c雌5匹を用いた。ラットは5週齢のWistar/ST系、雄(日本エスエルシー株式会社)に脂肪源として最初の19日間はビタミンE欠の非酸化油を、次の17日間は酸化油を投与した。ビタミンE欠(非酸化)油はサラダ油を活性炭を用いてビタミンEを除去し¹⁹⁾、酸化油(POV204)はサラダ油を 70°C で10日間加温して調製した。飼料組成は、OCまたはOK50, 分離大豆タンパク質10, 脂肪10, 塩混合4, コリン塩酸塩0.15, ビタミン混合1, 蔗糖5にコーンスターチを加えて100とした。ビタミンE欠ビタミン混合(VE-)はハーバービタミン混合からビタミンEを除去したもの(オリエンタル酵母工業株式会社)を用いた。各飼料のビタミンE含量はOC(VE+) 308.7mg/kg, OC(VE-) 8.7mg/kg, OT(VE-) 4.2mg/kgでビタミンEを補給したOC(VE+)を対照飼料とした。OC(VE-)とOT(VE-)飼料はビタミンE欠飼料に属する²⁰⁾。

ヒト細胞の培養 Nakamuraらの方法¹⁹⁾に準じて行った。1%のFCSと2%ラクトアルブミン加水分解物を含むRPMI 160 (Gibco Brl)で継代培養したヒトの肝ガン細胞由来細胞HuH-7を用いた。細胞の増殖に対するHAAの影響は細胞を1%FCSを含むRPMI 1640でウェル当たり10万個になるように播き、5%CO₂, 37°C で培養した。24時間後、細胞をHanks洗浄液で3回洗浄し、FCSを加えないRPMI 1640で48時間培養した。その後、HAAをRPMIを含まない培養液に溶かして添加し、トリパンブルー染色排

除法により生細胞数を計測した。

DNA断片化検出法 $800\mu\text{M}$ のHAAで処理した細胞のDNAはNakamuraらの方法¹⁹⁾に従って抽出した。抽出したDNAは2%アガロースゲル(pH8.0)を用い100V, 1.5時間電気泳動した後エチルブロマイドで染色して泳動パターンを確認した。

3. 結 果

抗酸化物質の推定

OKの抗酸化物質の溶解性を調べるためにリノール酸にOKのヘキサン抽出物, メタノール抽出物や水抽出物を加えて 40°C で7日間加温し, 生成された過酸化物を測定し, その結果をFig.1に示す。OKの抽出物は溶剤のいかにかわらず, いずれも強い抗酸化性を示し, 麴菌により極性の強いものから極性の弱いものまで多種類の抗酸化物質が生産されたことを示唆していた。中でも, メタノール抽出物は最も強い抗酸化性を示し, OK原末と同等の抗酸化性を示した。

OKのヘキサン, メタノール, 水抽出物を溶媒に対する溶解性により部分精製してシリカゲルTLCを行うとヘキサン抽出物には α -トコフェロールの存在が確認され, メタノール抽出物にはHAAとイソフラボンの他に少なくとも4個の抗酸化物質が検出された。OKの疎水性抗酸化物質を推定するため, OKの抽出物中ヘキサン抽出物とメタノール抽出物(Fig.1)につきトコフェロール類, イソフラボン類とHAAの含量を分析し, その結果をTable 1に示す。OKはOCにくらべ, トコフェロール類の含量はいずれも少なかったが, OKのヘキサン抽出物はOCのヘキサン抽出物より抗酸化性が著しく強い(Fig.1)のでトコフェロール以外に強力な抗酸化性物質の存在が示唆された。イソフラボンはダイジンとゲニスチンは少なかったが, それらの配糖体であるダイ

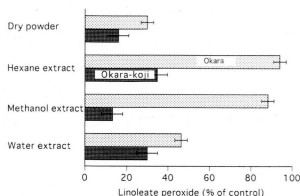


Fig.1 Antioxidant Activity of Okara and Okara-koji.

Okara-koji powder was extracted with 2 volume of n-hexane, 80% methanol, or water. One ml of 20 mM linoleate was incubated with 0.1 ml of each extract at pH 7.0, 40°C for 7 days, and the linoleate peroxides in those solution were measured by the thiocyanate method.

Table 1 Hydrophobic Antioxidants of Okara and Okara-koji.

Antioxidant ($\mu\text{g/g}$)	Okara	Okara-koji
α -Tocopherol	9	8
β -Tocopherol	363	143
δ -Tocopherol	213	134
Daizin	320	ϕ
Genistin	630	230
Daizein	150	480
Genistein	240	380
3-Hydroxyanthranilic acid	0	36

ゼイン、ゲニステインが多かった。これらのイソフラボンの抗酸化性はゲニステインが最強である²⁾ことからOKのイソフラボン類による抗酸化性はゲニステインによるところが大きいであろう。さらに、OKにはHAAが含まれていた。この事実は注目に値する。HAAの含量はゲニステインの1/10であるが、抗酸化力はゲニステインの約7倍強いと報告されている⁸⁾。したがって、OKの抗酸化性にはHAAも大きく寄与しているのであろう。

ex vivo における抗酸化性の検討

OKのex vivoにおける抗酸化性の検討のため、絶えず多量の空気に曝されており、しかも単一層の細胞で構成されている組織として肺を実験材料として選び、OK原末と同等の抗酸化力を有する80%熱メタノール抽出物 (Fig. 1) が膜脂質にお

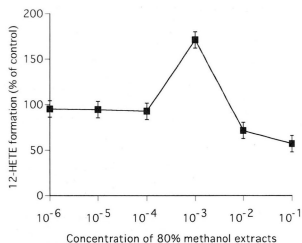


Fig.2 Effect of Methanol Extracts Okara-koji on 12-HETE Formation in Mice Lung.

Eighty % methanol extract of Okara-koji was added to 5% mice lung homogenate, and incubated for 60 min at 30°C. The 12-HETE formation in the homogenate was measured.

ける初発酸化反応に及ぼす影響を調べた。すなわち、膜脂質の主たる不飽和脂肪酸であるアラキドン酸²³⁾に12-リポキシゲナーゼとグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-py) が連続的に作用して生成される12-HETE^{23,24)}量を測定し、Fig. 2に示す。OKのメタノール抽出物は12-HETEの生成に関し 10^{-2} 以上では抑制効果を示したが、 10^{-3} では、促進効果を示した。すなわち、特定濃度では脂肪酸の酸化を促進した。OKメタノール抽出物の腸管吸収率や体内代謝速度が不明なのでOK摂取によるメタノール抽出物の体内濃度が12-HETEの生成、ひいてはアラキドン酸の酸化を促進するか、抑制するかの推定は困難であった。OKのメタノール抽出物の体内代謝にはOKのその他の成分が当然関連しているであろうから、in vivoにおけるOKの抗酸化性はOKそのものを用いた動物実験で判定する必要がある。

in vivo における抗酸化性の検討

OKが体内の脂質代謝に及ぼす影響をみるために、ラットを用いて次の実験をした。OCやOKを50%含み、酸化油を唯一の脂肪源とする飼料を

ビタミン欠乏にした幼ラットに17日間投与し、摂食量、体重増加量、血漿 TBA 値、血漿トコフェロールレベルと GSH-py 活性を測定すると OC 群ではビタミン E を補給した対照群と比べて摂食量が多いにもかかわらず、体重増加が少なかった。しかし、OK 飼料群は摂食量と体重増加量のい

れも対照群と差が無く (Fig.3), 外見の酸化油の毒性は認められなかった。また血漿トコフェロールレベルは低かったが、TBA 値は上昇していなかった (Fig.4)。さらに、OC 群では血漿と肝臓の GSH-py 活性がいずれも上昇しており (Fig.5)、過酸化脂質の吸収の増大とその消去反

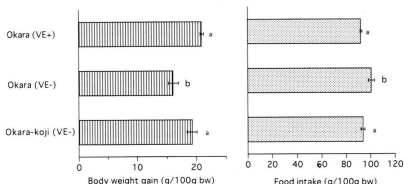


Fig.3 Effect of Oxidized Oil on Body Weight Gain and Food Intake of Rats.

Five-week-old male Wister rats were fed an adequate vitamin E (VE+) diet and two kinds of vitamin E deficient (VE-) diets for 36 days. For the last 17 days during the experimental period, rats were fed 10 % oxidized oil (POV 204).

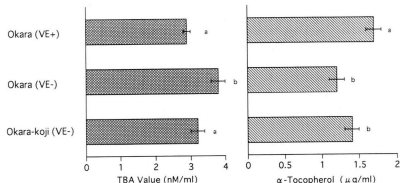


Fig.4 Effect of Oxidized Oil on TBA value and α -Tocopherol Level in Plasma.

The conditions for the rats were the same those described in legend to Fig.3.

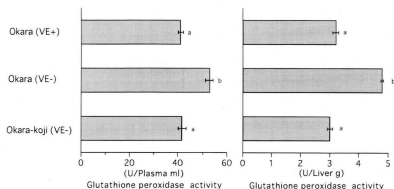


Fig.5 Effect of Oxidized Oil on Glutathione Peroxidase of Plasma and Liver.

The conditions for the rats were the same those described in legend to Fig.3.

応の促進が示唆された。しかし、OK 群の GSH-py 活性は血漿と肝臓のいずれも対照群と同程度であった。この事実と TBA 値が上昇しなかったことから、OK 群では体内の過酸化脂質量が少なく、過酸化脂質の消去を促進させる必要がない状態にあることが示唆された。すなわち、OK は *in vivo* でも抗酸化作用を発揮することが示唆された。

HAA の抗酸化機構

一般に *in vivo* における脂質酸化はリポキシゲナーゼによる脂肪酸のヒドロペロキシデーションによって開始される。また、 β -カロテンはリポキシゲナーゼによって酸化された脂肪酸のヒドロペロキサイドによって酸化されたとの報告がある¹³⁾。

in vivo における HAA の抗酸化性を確認する一法としてリポキシゲナーゼによるリノール酸の過酸化に伴う β -カロテンの褪色に及ぼす HAA の影響を *in vitro* で調べた (Fig.6A)。

HAA は明らかにリノール酸の過酸化を抑制し、 β -カロテンの褪色を防止した。これらの結果は、HAA が生物学的な脂質酸化の初発反応に対し抗酸化物質として作用することを示していた。HAA の抗酸化メカニズムを解明するためにリポキシゲナーゼの添加時と無添加時について HAA と 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジン (DPPH) をリノール酸の過酸化実験用反応液に加え、DPPH の褪色を測定し、Fig.6B に示した。DPPH の褪色はフリーラジカルの捕捉を示し、DPPH の紫色は HAA の濃度に比例して褪色した。リポキシゲナーゼ添加時と無添加時の褪色度の差はリノール酸ラジカルによる褪色によるものであろう。これらのデータは HAA が DPPH とリノール酸の双方のラジカルスカベンジャーであることを示唆していた。HAA は抗酸化物質としてリポキシゲナーゼによる過酸化物の生成を抑制したり、脂肪酸ラジカルを捕捉することにより脂質自動酸化における初発反応を抑制するのであ

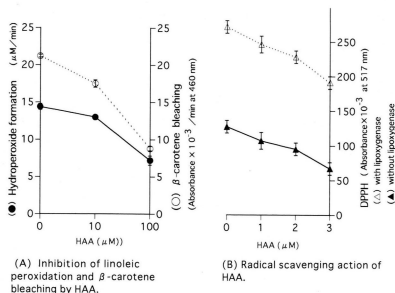


Fig.6 Antioxidant Action of HAA.

(A) Inhibition of linoleic peroxidation and β -carotene bleaching by HAA. Lipid peroxidation (●) was measured by the conjugated diene formation at 234 nm and β -carotene bleaching (○) was measured by the absorbance decrease at 460 nm for the first min of the reaction at 30°C. An increase at 234 nm absorbance of 0.001/min was equivalent to 0.12 μM linoleic peroxide. β -carotene bleaching was induced by oxidized carotene. $M \pm SE$, $n=3$.

(B) Radical scavenging action of HAA. The bleaching of DPPH's purple color is indicating the elimination of proton-radicals. The upper line (△) showed the radical scavenging with HAA under the linoleic peroxidation by lipoxigenase. The lower line (▲) showed the radical scavenging with HAA under the linoleic peroxidation without lipoxigenase. $M \pm SE$, $n=3$.

う。

ex vivo における 12-HETE 生成に及ぼす影響

ホモジネートしたマウスの肺を60分間加温し、生成された過酸化物を HPLC を用いて分析した。12-HETE 生成に対する HAA の影響を測定し、その結果を Fig.7 に示す。HAA は1000 μ M で12-HETE の生成を抑制したが、0.1~100 μ M では濃度依存的に12-HETE の生成を促進した。HAA は高濃度では確かに抗酸化剤として作用したが、低濃度では逆に酸化促進剤として作用した。抗酸化物質である HAA が低濃度で12-HETE の生成を促進した事実は注目に値する。

HAA による酸化的ストレスの誘起

β -カロチンの新しい機能としてヒトの口腔ガン由来細胞に対し活性酸素分子としてグルタチオンレベルや SOD 活性を抑制することが報告された¹⁰⁾。HAA は空気によって徐々に酸化され、無色から黄色に変化し、可視部の吸収スペクトルに新たなピークが420~450nm に出現した。したがって、HAA は酸素に敏感で、酸化した HAA はグルタチオンや SOD に対し β -カロチンと同様の作用を与えるであろうと予測された。そこで、

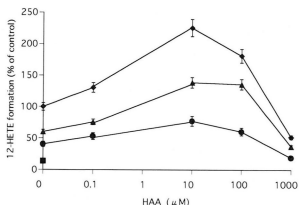


Fig.7 Effect of HAA on 12-HETE Formation in Mice Lung.

Five % lung homogenate was incubated at 37°C for 0 min (■), 20 min (●), 40 min (▲), or 60 min (◆). The reaction products were extracted with ethylacetate, and then the 12-HETE in the extract was analysed with HPLC. M $\pm$ SE, n=3.

次の実験では HAA が *in vitro* でグルタチオンや SOD に及ぼす影響を測定した。その結果、HAA の濃度に依存してグルタチオンは酸化され、SOD 活性は阻害された (Fig.8)。これらの結果から HAA は *in vivo* では酸化還元バランスを崩し、スーパーオキシドアニオン量を増加させ、酸化的ストレスを増加させることが示唆された。

酸化的ストレスの誘起力

HAA, β -カロチンやトコフェロールが酸化的ストレス誘起剤としてグルタチオンや SOD におよぼす影響を *in vitro* で測定した (Fig.9)。HAA のグルタチオン酸化力は β -カロチンと同程度であったが、トコフェロールは SOD を阻害しなかった。 β -カロチンは SOD を阻害したが、その程度は HAA よりも弱かった。HAA の酸化的ストレス誘起剤としての特性は β -カロチンやトコフェロールと異なっており、特異的であった。

HAA による細胞毒性

HAA が *in vivo* で生物学的な酸化を促進する

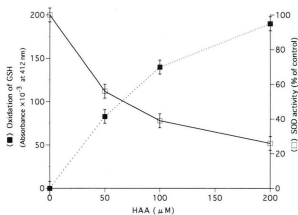


Fig.8 Oxidative Stress Production by HAA.

(A) Oxidation of GSH by HAA (---■---). Twenty five μ M GSH (pH 8.0) were incubated with HAA for 60 min. The GSH oxidation by HAA was measured by the absorbance difference of HAA solution with or without GSH at 412 nm for 2 min. M $\pm$ SE, n=3.

(B) Inhibition of SOD activity by HAA (---○---). The SOD activity was measured by the reduction from cytochrome-c Fe^{2+} to cytochrome-c Fe^{3+} with superoxide anion for 2 min. M $\pm$ SE, n=3.

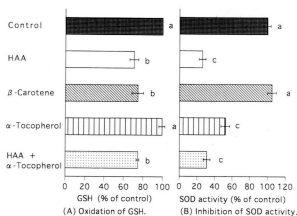


Fig.9 Activity as Oxidative Stress Producer.

(A) Oxidation of GSH. Twenty five μ M GSH were incubated with 100 μ M of HAA, β -carotene or α -tocopherol at 40 °C for 60 min. $M \pm SE$, $n=3$.

(B) Inhibition of SOD activity. The SOD activity was measured with 200 μ M of HAA, β -carotene or α -tocopherol at 25 °C for 2 min. $M \pm SE$, $n=3$.

ば, HAA は生細胞に細胞毒として作用するであろう。 β -カロチンは抗酸化物質として知られているが, 最近, 腫瘍由来細胞に対する細胞毒性が発見された¹⁰⁾。HAA に関しても, 腫瘍細胞に対して細胞毒性を有するか, 否かは重要な問題である。そこで, ヒトの肝ガン由来細胞を用い HAA の影響を調べた。Fig.10A は HAA による細胞毒性の経時的発現状況を示す。HAA が存在しないと細胞はゆっくり増殖したが, 700 μ M の

HAA が存在すると処理後24時間で生存細胞数は減少し始め, 36時間後には極めてわずかの細胞が生存しているにすぎなかった。HAA は明らかにヒトの腫瘍由来細胞に対し細胞毒性を示した。

次の実験では, 細胞毒性を発現させる HAA の濃度範囲を決定した。Fig.10B は細胞の生存に対する HAA の細胞毒性が濃度依存的であることを示していた。生細胞数は HAA が250 μ M から減少し, 600 μ M 以上ではほとんどすべての細胞が死滅した。

HAA によるアポトーシスの誘導

HAA 処理による細胞死をアポトーシスによるものか, ネクローシスによるものかを区別するために, HAA 処理後16, 24, 36時間の染色体 DNA を処理してその電気泳動像を観察すると DNA の断片化が明確に検出された (Fig.11)。HAA は確かに腫瘍由来細胞に対してアポトーシスを誘導させた。

4. 考 察

OK には HAA 以外にも多数の抗酸化物質が存在しているが, そのすべてが同定されているわけではない。また, それらの抗酸化メカニズムや相

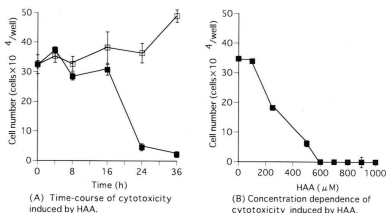


Fig.10 Cytotoxic Action of HAA.

(A) Time-course of cytotoxicity induced by HAA. The cells were treated in FCS-free medium with 700 μ M of HAA (■), or without HAA (□). Viable cells were counted by the trypan-blue dye exclusion method at the indicated time points. $M \pm SE$, $n=3$.

(B) Concentration dependence of cytotoxicity induced by HAA. Viable cells were counted after a 24 hr treatment with HAA at the indicated concentrations in FCS-free medium. $M \pm SE$, $n=3$.

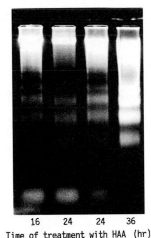


Fig.11 Electrophoretic Profiles of Genomic DNA from HuH-7 Cells after

Treatment with HAA. The Genomic DNA was extracted from the cells after treatment with 800 μM at the indicated times (16, 24 or 36 hr) and loaded onto a 2.0 % agarose gel. The fragmented DNA was visualized with ethidium bromide staining.

相互作用も不明である。したがって、OK の *in vivo* における抗酸化メカニズムの解明は容易ではない。しかし、本研究は、OK 成分の総合作用の結果として OK の *in vivo* における抗酸化作用を示唆する一例となり得るであろう。

一般に化学物質の作用は、*in vitro* と *in vivo* では異なる場合がある。たとえば、 β -カロチンは *in vivo* では SOD を抑制すると報告されている¹⁰⁾が *in vitro* ではなんの影響も与えなかった (Fig.9B)。HAA による酸化的ストレスの生成は本研究で *in vitro* で証明されたにすぎない (Fig.8) が、いずれ *in vivo* でも証明さるであろう。HAA は *in vitro* で脂質の過酸化を抑制した (Fig.6A)。肺組織でも HAA による 12-HPETE 生成の抑制と、それに伴うグルタチオンによる 12-HETE への還元減少、そして結果的に 12-HETE の生成の抑制が予測された。この予測は HAA 濃度が高い時には的中したが、HAA 濃度が低い時には当てはまらなかった (Fig.7)。12-HETE は 12-リポキシゲナーゼの作用によって生成される²³⁾が、この酵素は自殺酵素の一つであり、その反応生成物であるヒドロペロキシド

が過剰になると不活化される²⁵⁾。しかし、一方、その活性化のために低濃度のヒドロペロキシドが必須であることも知られている²⁵⁾。HAA は高濃度 (1,000 μM) の時 12-リポキシゲナーゼの阻害剤として作用したが、低濃度 (0.1~100 μM) の時は 12-リポキシゲナーゼによる初発反応の速度を抑制せず、長時間 (60 分以上) にわたり反応生成物である 12-HETE の生産量を増加させた (Fig.7) のであろう。この実験は 5 % 肺ホモジネートで行った。無傷の細胞に対する HAA の真の影響はホモジネートした細胞に用いた濃度の 20 倍濃い濃度、つまり、ホモジネート中で 10 μM の HAA の影響は細胞培地では 200 μM で現れるであろう。ホモジネート中で 10 μM の HAA は 12-HETE の生成を促進し、培地中の 200 μM の HAA は酸化促進物質として悪性細胞に対し細胞傷害作用を誘導した (Fig.10)。これらの現象は同一濃度の HAA の生理作用として一貫性があり矛盾がない。

OK は HAA を 3.5mg/100g (230 μM) 含んでいる。HAA の消化管からの吸収については、これまで研究されておらず、OK 摂取時の血液や組織内における HAA の濃度が不明である。したがって、HAA が *in vivo* で抗酸化物質として作用するか、酸化促進物質として作用するかの判定が困難である。

酸化的ストレスは、細胞にアポトーシス死を誘発する要因の一つと考えられている²⁶⁾。活性酸素物質、例えば、 O_2 や OH^- は細胞膜中に存在する多価不飽和脂肪酸やコレステロールとたやすく反応し、それらを過酸化させる。過酸化脂質、特に HPETE 類は強力なアポトーシス誘因物質として知られている²⁶⁾。したがって、HAA により伝達されるアポトーシスのメカニズムの一部は以下のようなものであろう。HAA は *in vivo* で SOD を阻害することにより、スーパーオキシドアニオ

ンを増加させ、低濃度の HAA はリポキシゲナーゼを阻害せず、ヒドロペロキシデーションを促進するであろう。さらに、HAA によりグルタチオンが酸化されてグルタチオンレベルが低下すれば、ヒドロペロキシサイドの還元量が減少し、その結果、ヒドロペロキシサイドの濃度が高くなるのだろう。スーパーオキシドアニオンから発生する活性酸素類は、細胞中でヒドロペロキシサイドを含む脂質過酸化やタンパク質の変性を誘発し、DNA に対してアポトーシスを誘導するのであろう。

インドネシアにおける伝統的な発酵大豆食品であるテンペには OK の 1.4 倍の HAA が含まれている⁸⁾。テンペは 16 世紀からインドネシアの人々に食べ続けられてきたが、これまでに、健康的に何らのトラブルも報告されていない。その点から、OK 中の HAA は少なくとも正常細胞に対して細胞傷害作用を発揮しないであろう。むしろ、ある種のガンに対する防御作用すら期待出来るのではなからうか。

5. まとめ

おから (OC) を味噌麹菌 (*Asperugillus oryzae*) で発酵させたおから麴 (OK) の抗酸化性の大部分はメタノールにより抽出され、そのメタノール抽出物にはダイゼインとゲニテスインが多かった。また、少量の 3-hydroxyanthranilic acid (HAA) も含まれていた。OK のメタノール抽出物は *in vitro* で 10^{-3} の濃度ではアラキドン酸の酸化を促進し、 10^{-2} 以上の濃度では酸化を抑制した。

OC や OK を 50% 含み、酸化油を脂肪源とする飼料をビタミン E 欠乏にした幼ラットに投与すると、OC 群は体重増加量が少なく、血漿の TBA 値や血漿と肝臓のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-py) 活性が上昇したが、OK 群は体重増加量、TBA 値、GSH-py 活性のいずれもビタミ

ン E を補給した対照群と差が認められなかった。すなわち、OK は過酸化物を除去することにより *in vivo* で抗酸化作用を発揮することが示唆された。

HAA は生物的脂肪酸化に対する抗酸化剤として脂肪酸のフリーラジカルを消去したり、リポキシゲナーゼによる脂肪酸の過酸化物生成を抑制して、脂肪の自動酸化における初発反応を抑制することが示唆された。

しかし、*ex vivo* の実験では、HAA は確かに高濃度の時は抗酸化剤として作用したが、低濃度の時には逆に酸化促進剤として作用した。また、HAA は酸化的ストレス誘起剤としてグルタチオンを酸化したり、スーパーオキシドジスムターゼを抑制した。さらに、HAA はヒトの肝ガン細胞由来細胞の増殖を阻害し、アポトーシス死を誘導した。

本研究を遂行するに当たり、多額の研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝の意を表しますと共に貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

文 献

- 1) 山内文男, 大久保一男 (編), 大豆科学, 朝倉書店, 47-48 (1992).
- 2) D.E.Pratt and P.M.Birac: *J. Food Sci.*, **44**, 1720-1722 (1979).
- 3) 松尾真砂子: 農化, **69**, 169-171 (1995).
- 4) S.Kudo, M.Shinoyamada, T.Imura, T.Uchida and K.Okubo: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 859-860 (1989).
- 5) 石川行弘, 守本京三, 井関重康: 油化学, **12**, 855-860 (1984).
- 6) P.György, K.Murata and H.Ikehata: *Nature*, **203**, 870-872 (1964).
- 7) 松尾真砂子: 農化, **63**, 1765-1770 (1989).
- 8) H.Esaki, H.Onozaki, S.Kawakisi and T.Osawa: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 696-700 (1996).
- 9) 松尾真砂子: 農化, **66**, 899-904 (1992).

- 10) Schwartz, J.L., Tanaka, J., Khandekar, V., Herman T. S., and Teicher, B.A.: *Cancer Chemother Pharmacol.* **29**, 207-213 (1992).
- 11) 満田久輝, 安本教傳, 岩見公和: 栄養と食糧: **19**, 60-64 (1966).
- 12) German, J.B., and Kinsella, J.E.: *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 680-683 (1985).
- 13) Klein, B.P., Grossman, S., King, D., Cohen, B.S., and Pinsky, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **793**, 72-79 (1984).
- 14) T.Takao, F.Kitatani, N.Watanabe, A.Yagi, and K. Sakata: *Biosci. Biochem.*, **58**, 1780-1783 (1994).
- 15) 日本ビタミン学会編: ビタミンハンドブック 3, ビタミン分析法, 化学同人, 27-29 (1989).
- 16) Elleman, G.L.: Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959).
- 17) McCord, J.M., and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969).
- 18) Nakamura, N., Shidoji, Y., Yamada, Y., Hatakeyama, H., Moriwaki, H., and Muto, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 382-388 (1995).
- 19) 毛利佳世, 道本千衣子, 活洲はるみ, 五十嵐修: 栄食誌, **36**, 122-124 (1983).
- 20) 石橋恭子, 阿部晴一, 大前雅彦, 阿部靖, 勝井五一郎: ビタミン, **51**, 415-422 (1977).
- 21) 内藤周幸, 山中健: 日本老年医学雑誌, **15**, 187-191 (1978).
- 22) P.D.Wang, P.H.Weswing, and J.A. Schmitz: *J. Nutr.*, **107**, 1298-1307 (1977).
- 23) J.B.German and Hu, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **8**, 441-448 (1990).
- 24) R.W.Bryant, T.C.Simon, J.M.Balley: *J. Biol., Chem.*, **257**, 14937-14943 (1982).
- 25) Berman, J.B., and Kinsella, J.E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **879**, 378-387 (1986).
- 26) Buttke, T.M., and Sandstrom P.A.: *Immunology Today*, **15**, 7-10 (1994).

In vivo Antioxidant Activity of *Okara-koji*, a Fermented Okara with *Aspergillus oryzae*

Masako Matsuo (Gifu Women's University)

The potent antioxidant activity of *Okara-koji* (OK), a fermented *okara* (OC) with *Aspergillus oryzae*, was extracted with methanol. In the OK's methanol extract, genistin, daizein, genistein, and 3-hydroxyanthranilic acid (HAA) were identified by HPLC. The methanol extract accelerated the oxidation of arachidonic acid in membrane lipids at 10^{-3} concentration, but inhibited the formation at higher concentrations than 10^{-3} *ex vivo*. To confirm the total effect of all components of OK on lipid peroxidation *in vivo*, rats fed food deficient in vitamin E were put on diets containing OK or OC with oxidized oil. In rats fed the OK diet, no effect of oxidized oil feeding on the body weight gain, of the TBA value in plasma, or of glutathione peroxidase activities of plasma and liver was observed. But in rats fed the OC diet, the effect of oxidized oil feeding was apparently observed on all of those values. These results suggested that OK would scavenge lipid peroxides *in vivo*.

The next study deals with the antioxidant mechanism of HAA under biological systems and the cytotoxic function of HAA to human malignant cells. HAA eliminated free radicals and inhibited the formation of fatty acid hydroperoxide *in vitro*, suggesting that HAA would serve as an antioxidant in the initial reaction in lipid oxidation systems. Actually HAA inhibited the formation of the dominant peroxide of membrane lipids, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) at a high concentration, while HAA accelerated the 12-HETE formation at a low concentration in mammalian tissue. HAA oxidized glutathione and inhibited superoxide dismutase *in vitro*. Furthermore, HAA inhibited cell growth and induced apoptosis to HuH-7, a human hepatoma-derived cell line. HAA may possibly act as a prooxidant rather than as an antioxidant *in vivo*.