

# 豆腐よう抽出物の抗インフルエンザウイルス効果の解析

作道章一<sup>\*1</sup>・瀬底正康<sup>2</sup>

<sup>1</sup>琉球大学医学部保健学科生体代謝学分野

<sup>2</sup>琉球セメント株式会社事業開発部食品開発室

## Effects of Tofuyo (Fermented Soybean Food) Extract on Influenza Virus

Akikazu SAKUDO<sup>\*1</sup> and Masayasu SESOKO<sup>2</sup>

Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, Faculty of Medicine,  
University of the Ryukyus, Okinawa 903-0215

### ABSTRACT

In this study, possible anti-influenza virus activity in Tofuyo (fermented soybean food) extract was investigated. Tofuyo was diluted with water and subjected to homogenization, filtration, and centrifugation. The resultant supernatant was used as Tofuyo extract. The extract was mixed with an influenza virus-infected cell culture medium. After incubation, the effect of Tofuyo extract on influenza virus was analyzed by immunochromatography of influenza virus nucleoprotein (NP). The comparison between Tofuyo extract and ethanol, which is known to have anti-influenza virus activity, showed that Tofuyo extract did not have a strong inhibitory effect. This finding was confirmed by virus activity assay using embryonated eggs. In contrast, Tofuyo had a good balance among lipids, proteins, and carbohydrates and abundant Vitamin B<sub>2</sub>, suggesting that Tofuyo has high nutritive value and may contribute to the promotion of good health. Therefore, we are currently proceeding to further analyze the impact of Tofuyo extract *in vivo* using influenza virus-infected animals. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 146-149, 2011.

Key words : influenza, kojis, okinawa, tofuyo, virus

沖縄の郷土料理である豆腐よう（とうふよう、豆腐鯨、唐芙蓉）は琉球王朝時代には、高貴な人々の間で病後の滋養食としても重宝されたといわれている。この豆腐ようは、豆腐を麴と泡盛に漬け、醗酵させて作る。作るのに約半年かかる上、作製には熟練を要する

ことが知られている。現在でも、沖縄では酒の肴として大変好まれるが、泡盛の香りが濃厚で、ウニのようなチーズのような味がして、うちなんちゅ（沖縄人）の間でも好物の人と苦手な人がいる。近年の研究により、豆腐ようには各種機能性成分が含まれており、胃壁や粘膜の保護やコレステロール合成阻害にも効果があるなど、健康食品としての多くの機能性が明らかに

<sup>\*</sup>〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原207

されている<sup>1,2)</sup>。2009-10シーズンには、全国で新型インフルエンザが猛威を振るったが、インフルエンザウイルスは鼻粘膜や気道を介して感染するため、豆腐のようにインフルエンザウイルス感染阻害効果がないかに興味もたれる。そこで、本研究ではインフルエンザの原因となるインフルエンザウイルスに対する豆腐よう抽出物の感染防御効果の可能性について、試験管内実験において検討した。

## 方 法

株式会社 紅濱より入手した紅麹から作製された豆腐ようを使用した。以前の報告に従い<sup>1)</sup>、豆腐ようを蒸留水で薄めてホモジナイズとろ過を行った後、遠心した上清を実験に用いた (Fig. 1A-D, Fig. 2A)。この豆腐よう抽出物の抗インフルエンザウイルス効果を以下の2点について解析した。なお、インフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスA型PR8株[A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)]を用い<sup>3)</sup>、安全キャビネット内で実験を行った (Fig. 2B)。PR8株感染培養細胞の培養上清 ( $3.16 \times 10^{14}$  TCID<sub>50</sub>/mL) を豆腐よう抽出物と混合し、インキュベート後にイムノクロマトグラフィー (エスプライン インフルエンザA&B-N, 富士レビオ) によりインフルエンザウイルスのヌクレオプロテイン量の変化を調べた。また、同様にその混合液を、発育鶏卵内部に注入することで、発育鶏卵へのインフルエンザウイルスの感染性の変化を解析した。さらに、日本食品標準成分表、加工食品の栄養成分分析表および衛生試験法注解に従い、豆腐ようの漬け汁

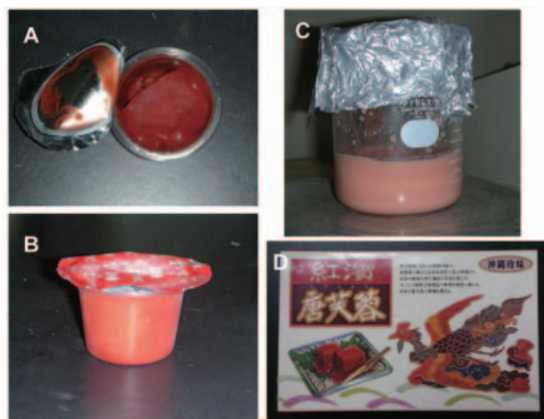


Fig. 1. (A) Tofuyo prepared from red and yellow kojis (BENIHAMA), (B) container, (C) Tofuyo diluted with distilled water and homogenized, (D) package.

のエネルギー、たん白質、脂質、炭水化物、灰分、アミノ態窒素、食塩分、カルシウム、マグネシウム、鉄、アルコール、ビタミンなどの測定をおこなった。

## 結 果

PR8株感染細胞の培養上清と豆腐よう抽出物、PBS (Phosphate buffered saline)、および8.5%エタノールの比率を1:9の割合で混合し、37度で30分インキュベート後、イムノクロマトグラフィーでインフルエンザウイルスのヌクレオプロテインの量を比較した。その結果、8.5%エタノールおよび豆腐よう抽出物のいずれもPBSに比較して大きなヌクレオプロテインの量の変化は見られなかった (Fig. 2C)。そこで、次に、上記のインキュベート後のサンプルを、発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、48時間培養後、漿尿液を回収した (Fig. 3A, B)。そして、イムノクロマトグラフィーで漿尿液中のインフルエンザウイルスのヌクレオプロテインの量を比較することで、各処理後のウイルスの感染性の比較を行った。その結果、8.5%エタノール処理ではインフルエンザウイルスの活性は低下していたが、豆腐



Fig. 2. (A) Left to right; PBS, 8.5% ethanol, supernatant of Tofuyo filtrated and centrifuged, pellet of Tofuyo filtrated and centrifuged, (B) Safety cabinet used for virus preparation (AIRTECH Japan Ltd.). (C) Cell culture medium of cells infected with influenza virus PR8 was mixed with the following samples. Then nucleoprotein of influenza virus was detected with immunochromatography (PBS: PBS + influenza virus 37°C 30 min; Eth: 8.5% ethanol + influenza virus 37°C 30 min; Tofu: Tofuyo extract + influenza virus 37°C 30 min).

よう抽出物では感染性が低下していないことが明らかとなった (Fig. 3C). 栄養成分解析では、豆腐よう漬汁は、100 gあたりエネルギー 212 kcal, たん白質5.9 g, 脂質0.4 g, 炭水化物31.4 g, 灰分2.1 g, アミノ態窒素 300 mg, 食塩分1,800 mg, カルシウム17 mg, マグネシウム34 mg, 鉄0.6 mg (汁), 鉄2.0 mg (中身), アルコール分8.5%, ビタミンB<sub>2</sub> 0.1 mgの値を示した。

## 考 察

試験管内解析では、豆腐ようはインフルエンザウイルスに対する防御効果は確認できなかった。一方で、栄養組成解析により、豆腐ようは脂質、たん白質、炭水化物の均衡がとれ、加えてビタミンB<sub>2</sub>を多く含むことが明らかとなった。これらのことから、豆腐ようには健康増進効果が期待される。今後、マウスを用いた動物アッセイで、インフルエンザウイルス感染により引き起こされる体重減少を抑える効果がないかを調べる予定である。

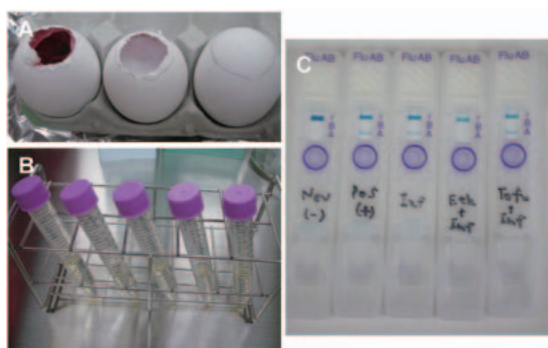


Fig. 3. (A) Left to right; embryonated egg after collection of allantoic fluid, embryonated egg after removal of top shell; embryonated egg, (B) Cell culture medium of cells infected with influenza virus PR8 and treated by the procedures described below was injected into embryonated eggs and incubated for 48 h. Then the allantoic fluids were collected. Left to right; Neg (-); no influenza virus; Pos (+); no treated influenza virus; Inf: influenza virus incubated at 37°C 30 min; Eth + Inf: 8.5% ethanol + influenza virus incubated at 37°C 30 min; Tofu + Inf: Tofuyo extract + influenza virus incubated at 37°C 30 min, (C) The allantoic fluids collected from various preparations were subjected to immunochromatography.

## 要 約

紅麴から作製された豆腐ようを蒸留水で薄めてホモジナイズとろ過を行った後、遠心した上清を得て、豆腐よう抽出物を作製した。この豆腐よう抽出物の抗インフルエンザウイルス効果をイムノクロマトグラフィーによるインフルエンザウイルスのヌクレオプロテイン分解および発育鶏卵への感染性によりアッセイした結果、これまでインフルエンザウイルス感染阻害効果があると知られているエタノールと比較して、強い阻害効果は確認されなかった。一方、常法に従い、使用した豆腐ようの栄養組成の解析をした結果、脂質、たん白質、炭水化物の均衡がとれ、加えてビタミンB<sub>2</sub>を多く含むことが明らかとなった。これらのことから、豆腐ようは栄養価が高く、健康増進効果が期待できることが示唆された。現在、豆腐ようの健康増進効果の新しい側面を見出す可能性について検討するため、動物レベルでの防御効果の解析を進めている。

## 文 献

- 1) Kuba M, Tanaka K, Tawata S, Takeda Y and Yasuda M (2003): Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 1278-1283.
- 2) Yasuda M, Matsumoto T, Sakaguchi M and Kinjo S (1995): Production of tofuyo using combination of red and yellow kojis. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi (in Japanese)*, **42**, 38-43.
- 3) Sakudo A, Baba K, Tsukamoto M, Sugimoto A, Okada T, Kobayashi T and Ikuta K (2009): Anionic polymer, poly(methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus. *Bioorg Med Chem*, **17**, 752-757.