

大豆残渣中に含まれる免疫調節因子の特定および 体内デトックス代謝機能に及ぼす影響評価

安田 伸^{*1,3}・河本佳奈江³・小野政輝^{1,3}・梶田聖孝^{2,3}・井越敬司^{1,3}

¹東海大学農学部バイオサイエンス学科 ²東海大学農学部応用動物科学科

³東海大学大学院農学研究科

Challenges in Determination of Immunomodulatory Effects and/or Molecules in Soybean Residues (Okara), and Evaluation of Detoxification Mechanisms of Okara Constituents

Shin YASUDA^{*1,3}, Kanae KAWAMOTO³, Masateru ONO^{1,3},
Kiyotaka KABATA^{2,3} and Keiji IGOSHI^{1,3}

¹Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto 869-1404

²Department of Animal Science, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto 869-1404

³Agricultural Sciences in Master's Program, Graduate School of Agriculture,
Tokai University, Kumamoto 869-1404

ABSTRACT

The current study was designed to investigate the potential of bioavailability of the insoluble soybean residue (okara) generated as a by-product in soymilk and tofu manufacturing. We first challenged to examine whether okara was capable of showing functional advantages in an inflammation murine cell model. Upon lipopolysaccharide (LPS) stimulation, an excess amount of nitric oxide (NO) was generated into the culture media from RAW264.7 mouse macrophage-like cells after 24 h incubation. Under this experimental setting, cells cultured in the presence of okara extract demonstrated a significant suppression of NO production in a concentration-dependent manner. In parallel experiments, okara extract also showed suppressive effects on LPS-induced interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α generation as representative inflammatory cytokines. In the case of prostaglandin (PG)E₂ levels, okara showed a small decrease only at high concentration. These results indicate the existence of immunosuppressive molecule(s) in okara extract on a murine macrophage cell model. Determination of the active molecule(s) in okara for further health-beneficial use in anti-inflammation still remains to be clarified. Whether the anti-inflammatory molecule(s) can demonstrate characteristic detoxification effects in our body may be an interesting

*〒869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽

issue. As a part of our overall study, further work is warranted to achieve this goal.
Soy Protein Research, Japan **14**, 150-156, 2011.

Key words : okara, nitric oxide, cytokine, inflammation, macrophage

大豆食品製造工程で排出される食品残渣としてのおから（豆腐粕）は年間70万トンに達する^{1,2)}。大部分は産業廃棄物として焼却処理されているが、環境への負荷も無視できないことから未利用資源としての有効利用法の開発が急務である。一方で近年の消費者の健康食志向より、抗酸化または抗炎症（抗アレルギー）作用などを有する茶葉などをはじめとした機能性食品素材への関心が高まっている^{3,4)}。炎症時には起炎酵素の賦活化等が知られるものの、細胞レベルでは活性型マクロファージより産出される過剰な一酸化窒素（NO）^{5,6)}が炎症性ケミカルメディエーターであるインターロイキン類やプロスタグランジン類^{7,8)}とともに重要なセカンドメッセンジャーとして応答することが報告されている。従って、炎症時に誘導される過度のNOやこれらの炎症性サイトカイン類を食品素材や成分で制御することで不調時の我々の体調バランスを改善できることが期待される。

本研究は大豆残渣としてのおからの利用価値と生理機能を明らかにすることを主目的としており、健康増進への活用を企図しておから中に残存する有用成分の探索と特定を試み、さらには体内解毒代謝酵素に及ぼす影響評価を行うものである。最初の取組みとして、おからが有しうる免疫調節機能について検証を行うこととし、大腸菌由来リポ多糖（LPS）により亢進させた培養マクロファージ様細胞株から放出される一酸化窒素および炎症性サイトカインを指標に、これらに対する抑制効果を市販の大豆製品と比較評価することとした。

方 法

材料および試薬類

市販のフクユタカ品種丸大豆製品（おから、豆乳、きなこ）およびイワイグロ品種黒大豆製品（黒大豆、きなこ）は熊本県内で購入または入手し、これらより50%メタノール抽出物を調製して濃縮乾固させたものを本研究に使用した。マウス由来マクロファージ様細胞株RAW264.7はDSファーマバイオメディカル社より購入した。培養には10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用い、37℃、5% CO₂の条件下で細胞を

維持した。大腸菌由来リポ多糖（LPS）はSigma社より、BD OptEIA Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA SetおよびMouse IL-6 ELISA SetはBD Biosciences社より、Prostaglandin E₂ Express EIA Kit-MonoclonalはCayman Chemical社より入手した。DIAION HP-20分離カラムはSigma-Aldrich社より購入した。

培養上清中のNO、炎症性サイトカイン類の測定

RAW264.7細胞を0.5x10⁵ cells/100 μL/wellとなるよう96 wellマイクロプレートに播種し、3時間前培養を行った。その後各ウェルへおから等大豆試料またはLPSを含む培地を25 μLずつ添加し、さらに24時間培養した。培養上清中に放出されたNO量の測定はGriess法により、炎症性サイトカイン類（TNF-α、IL-6およびPGE₂）は市販のELISAキットを用いて測定した。

おから抽出物の分画

おから抽出物50 mg/mLを1 mLの水に溶解し、DIAION HP-20オープンカラムに負荷し、カラムベッドボリューム（15 mL）と等量の水（Fr. 1）、25%、50%、75%および100%エタノール（Fr. 2から5）、そして2回分のアセトン（Fr. 6および7）で順次溶出させ、計7画分を得た。

結果と考察

LPS誘導のNO産生亢進に及ぼすおからの影響

RAW264.7細胞を100 ng/mLのLPSで刺激し、炎症時の活性型マクロファージのモデルとした。丸大豆由来のおから、豆乳およびきな粉、そして黒大豆きな粉を含む計4種類の大豆製品抽出物（500 μg/mL）をそれぞれLPSと共に細胞に24時間処理し、上清中のNO産生量に及ぼす影響を調べた。その結果、LPS誘導のNO産生を100%としたとき、おからはNO産生を5.1%にまで有意に低下させた（Fig. 1A）。他の大豆製品では、豆乳で42.9%、きな粉で44.6%、そして黒大豆きな粉で59.6%の値が得られたことより、おからによるNO産生抑制効果は他の大豆製品による抑制効果よりも強いものであった。このとき、おからは1,500 μg/mLまでの濃度範囲において用量依存的な抑制作用を示し、232 μg/mLのIC₅₀値が得られた（Fig. 1B）。

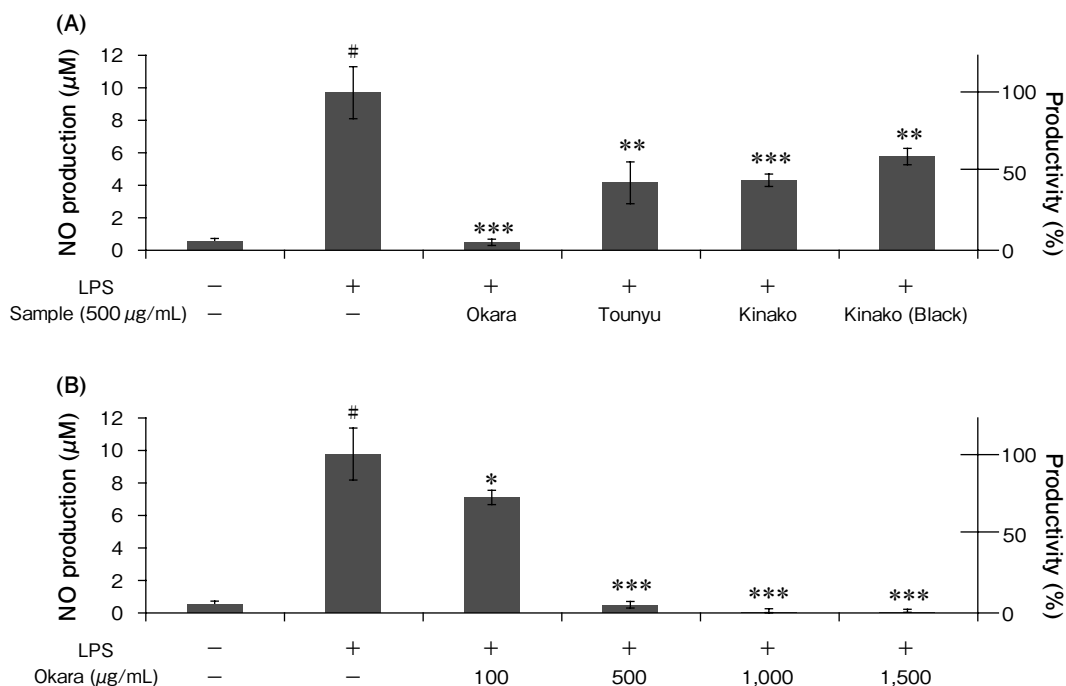


Fig. 1. Effects of extracts prepared from okara and three other soybean products on lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production in RAW264.7 mouse macrophage-like cells. Cells were incubated in the presence of 500 μg/mL of individual sample extracts plus 100 ng/mL LPS (A) or varying concentrations of okara extracts ranging from 100-1,500 μg/mL plus 100 ng/mL LPS (B). The culture media were collected and analyzed for determination of NO level by the Griess method. Data represent mean ± SD from four different determinations. #Significant differences from untreated cells, $p < 0.001$, and *significant differences from LPS-treated cells, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$.

LPS誘導の炎症性サイトカイン産生亢進に及ぼすおからの影響

おからを含む4種類の大豆製品抽出物およびLPSと共にRAW264.7細胞を培養し、培養上清中の炎症性サイトカイン産生量に及ぼす影響を調べた。LPS誘導のIL-6産生を100%としたとき、おからはIL-6産生を28.1%にまで有意に低下させ、他の大豆製品による抑制効果よりも強い作用を示した (Fig. 2A)。このとき、おからは用量依存的な抑制作用を示し、275 μg/mLのIC₅₀値が得られた (Fig. 2B)。次に、培養上清中のTNF-α産生を指標におからによるその調節作用を調べた。LPS誘導のTNF-α産生を100%としたとき、おからはTNF-α産生を30.1%にまで有意に低下させた (Fig. 3A)。このとき、おからは用量依存的な抑制作用を示し、304 μg/mLのIC₅₀値が得られた (Fig. 3B)。一方、培養上清中のPGE₂産生を指標におからによるその調節作用を調べたところ、LPS誘導のPGE₂産生を100%としたとき、おからのみ有意な低下作用を示さなかった (Fig. 4A)。しかしながら、おからは1,500

μg/mLの高濃度処理時にのみ有意な抑制作用を示し67%の値が得られた (Fig. 4B)。

細胞生存率に及ぼすおからの影響

RAW264.7細胞をおからを含む大豆製品抽出物 (500 μg/mL) とともに24時間培養し、WST-8法を用いて比色定量により生細胞数を求め、これを細胞生存率の指標とした。未処理時の生細胞数を100%としたとき、おからおよび他の大豆製品では有意な生細胞数の低下は認められず、これらは細胞生存率に影響を及ぼさなかった (Fig. 5A)。また、おからを1,500 μg/mLまでの濃度範囲で処理しても、生細胞数に変化は認められなかった (Fig. 5B)。

おから抽出物の分画とLPS誘導のNO産生亢進に及ぼす各画分の影響

おから抽出物中の抗炎症作用を示す活性成分の特定に向けて、おから抽出物をHP-20オープンカラムに負荷し、カラムベッドボリュームと等量の水 (Fr. 1)、25%、50%、75%および100%エタノール (Fr. 2から5)、そして2回分のアセトン (Fr. 6および7) で順次溶出さ

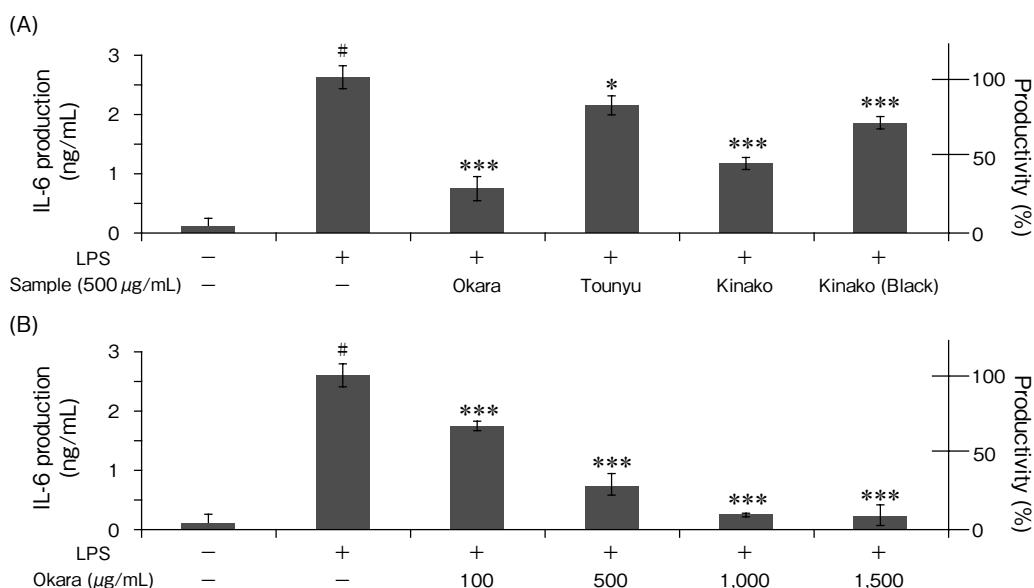


Fig. 2. Effects of extracts prepared from okara and three other soybean products on LPS-induced IL-6 production in RAW264.7 cells. Cells were incubated in the presence of 500 µg/mL of individual sample extracts plus 100 ng/mL LPS (A) or varying concentrations of okara extracts ranging from 100-1,500 µg/mL plus 100 ng/mL LPS (B). The culture media were collected and analyzed for determination of PGE₂ level by ELISA. Data represent mean ± SD from four different determinations. #Significant differences from untreated cells, $p < 0.001$, and *significant differences from LPS-treated cells, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$.

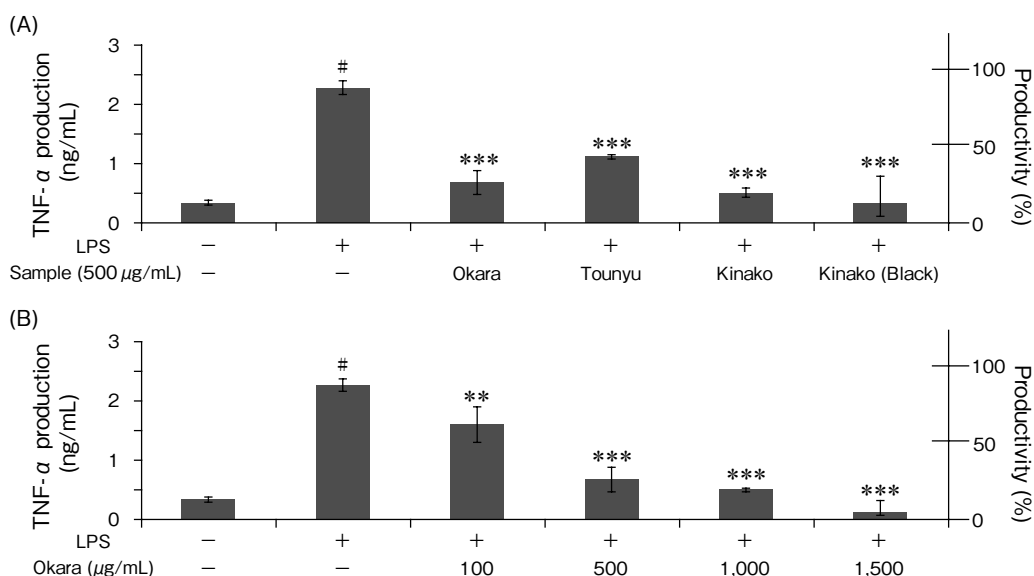


Fig. 3. Effects of extracts prepared from okara and three other soybean products on LPS-induced TNF-α production in RAW264.7 cells. Cells were incubated in the presence of 500 µg/mL of individual sample extracts plus 100 ng/mL LPS (A) or varying concentrations of okara extracts ranging from 100-1,500 µg/mL plus 100 ng/mL LPS (B). The culture media were collected and analyzed for determination of TNF-α level by ELISA. Data represent mean ± SD from four different determinations. #Significant differences from untreated cells, $p < 0.001$, and *significant differences from LPS-treated cells, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$.

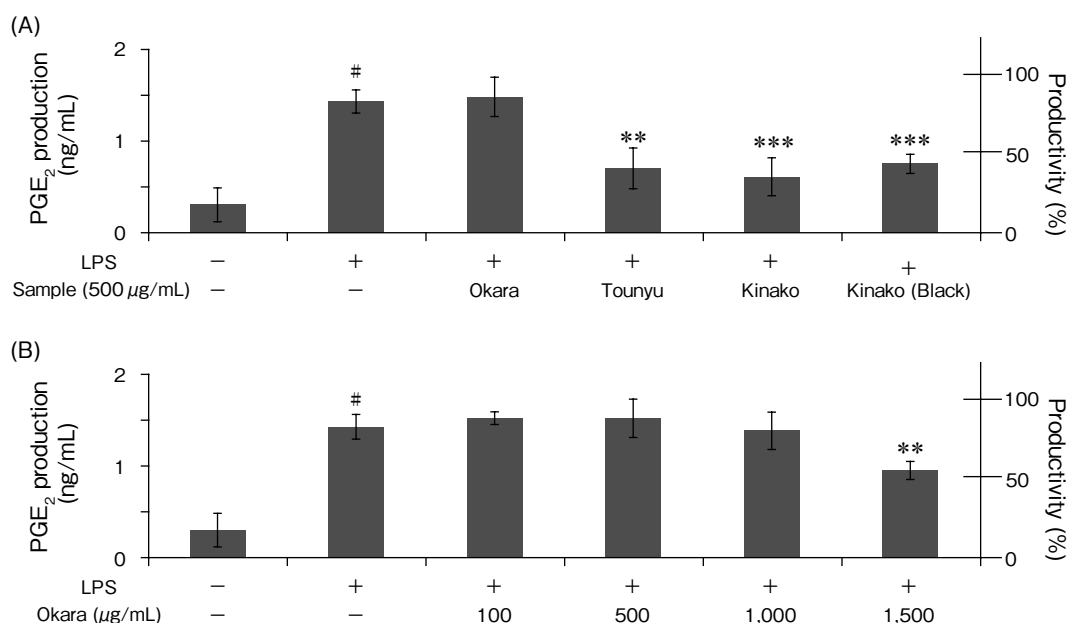


Fig. 4. Effects of extracts prepared from okara and three other soybean products on LPS-induced PGE₂ production in RAW264.7 cells. Cells were incubated in the presence of 500 µg/mL of individual sample extracts plus 100 ng/mL LPS (A) or varying concentrations of okara extracts ranging from 100-1,500 µg/mL plus 100 ng/mL LPS (B). The culture media were collected and analyzed for determination of PGE₂ level by ELISA. Data represent mean \pm SD from four different determinations. #Significant differences from untreated cells, $p < 0.001$, and *significant differences from LPS-treated cells, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$.

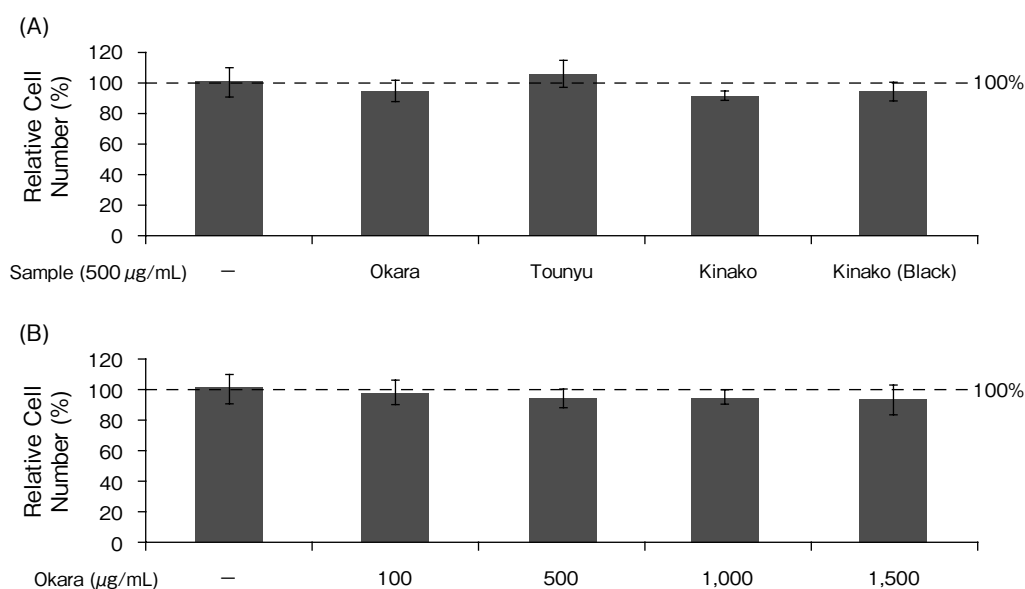


Fig. 5. Effects of extracts prepared from okara and three other soybean products on relative cell number of RAW264.7 cells. Cells were incubated in the presence of 500 µg/mL of individual sample extracts (A) or varying concentrations of okara extracts ranging from 100-1,500 µg/mL (B). Relative viable cell number was determined using WST-8 assay. Data represent mean \pm SD from four different determinations.

せ、計7画分を得た。これらを用いてLPS誘導のNO産生に及ぼす影響を調べた。その結果、LPS誘導のNO産生を100%としたとき、1,000 $\mu\text{g/mL}$ のおから抽出物処理時には5.4%であったのに対し、Fr. 1の水溶出画分で最も低値が認められ、5.2%を示した(Table 1)。一方、Fr. 1ほどの強い抑制作用ではないもののFr. 2からFr. 5までは16.2から36.3%までの低値が得られ、Fr. 6およびFr. 7で再び強い抑制作用が認められた。

以上よりおから中には細胞毒性を発現することなく、起炎時の指標となる過剰なNO産生やIL-6およびTNF- α などの炎症性サイトカイン産生を選択的に抑制しうる成分が残存していること、さらにおからが抗炎症作用を目的とした健康増進面での利用価値を有し

ていることが示唆された。大豆中に存在しうる抗炎症成分がおから中に効率良く残存し機能性を保持していることを示す本結果は、健康食品分野におけるおからの利用価値を支持するものと思われる。これまでにイソフラボンなどのフラボノイド類がたん白質レベルでNO合成酵素(NOS)発現の抑制を介したNO産生抑制作用を示すことが報告されているものの⁹⁾、本研究では未だおから由来の活性本体の特定には至っておらず、有効成分が生体内でNOS活性阻害等を介した免疫抑制作用を示すか、さらには表題に掲げた成分レベルでのデトックス代謝酵素機能に及ぼす影響評価に関する研究の進展は解決に向けて今後更なる検討が必要である。

Table 1. Effects of okara fractions eluted through Diaion HP-20 column on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells

Sample	NO Productivity (%)
Control (Untreated)	0.82 \pm 0.01
LPS (100 ng/mL)	100.0 \pm 6.8#
Okara extract (1,000 $\mu\text{g/mL}$) + LPS	5.4 \pm 1.4*
Fr. 1 (Water eluate) + LPS	5.2 \pm 2.8*
Fr. 2 (25% EtOH eluate) + LPS	16.2 \pm 4.1*
Fr. 3 (50% EtOH eluate) + LPS	17.7 \pm 4.4*
Fr. 4 (75% EtOH eluate) + LPS	25.0 \pm 6.4*
Fr. 5 (100% EtOH eluate) + LPS	36.3 \pm 7.8*
Fr. 6 (100% Acetone eluate) + LPS	11.5 \pm 3.3*
Fr. 7 (100% Acetone eluate) + LPS	8.1 \pm 4.2*

Cells were incubated in the presence of okara extract or fractions plus 100 ng/mL LPS. The culture media were collected and analyzed for determination of NO level by Griess method. Data represent mean \pm SD from four different determinations. #Significant differences from untreated cells, $p < 0.001$, and *significant differences from LPS-treated cells, $p < 0.001$.

要 約

大豆残渣としてのおからは大部分が産業廃棄物として処理されており、未利用資源としての利用法の開発が急務である。一方で、近年消費者の健康志向により抗酸化または抗炎症作用などの食品素材への関心が高まっている。本研究では、おからの利用価値と生理機能を明らかにすることを目的に、まずマウス由来マクロファージ様細胞モデルを用いて一酸化窒素および炎症性サイトカイン産生抑制作用について調べた。その結果、リポ多糖(LPS)によって活性化させたRAW264.7細胞の一酸化窒素(NO)産生亢進をおから抽出物は濃度依存的かつ有意に低下させること、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-6産生および腫瘍壊死因子(TNF)- α 産生を有意に減少させること、プロスタグランジン(PG)E₂産生においては高濃度処理時にのみ有意に抑制することを見出した。以上より、起炎時の指標となる過剰なNO産生や炎症性サイトカイン類産生を選択的に抑制しうる成分がおから中に残存していること、さらにおからが抗炎症作用を目的とした健康増進面での利用価値を有していることが示唆された。しかしながら未だ活性本体の特定には至っておらず、有効成分が生体内でNOS活性阻害等を介した免疫抑制作用を示すか、さらには表題に掲げた成分レベルでのデトックス代謝酵素機能に及ぼす影響評価に関する研究の進展は解決に向けて今後更なる検討が必要である。

文 献

- 1) Ohno A, Ano T and Shoda M (1993): Production of the antifungal peptide antibiotic iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid-state fermentation. *J Ferment Bioeng*, **75**, 23-27.
- 2) O' Toole DK (1999): Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production - a review. *J Agric Food Chem*, **47**, 363-371.
- 3) Yang F, de Villiers WJS, McClain CJ and Varilek GW (1998): Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr*, **128**, 2334-2340.
- 4) Kwon OK, Lee MY, Yuk JE, Oh SR, Chin YW, Lee HK and Ahn KS (2010): Anti-inflammatory effects of methanol extracts of the root of *Lilium lancifolium* on LPS-stimulated Raw264.7 cells. *Ethnopharmacol*, **130**, 28-34.
- 5) Sacco RE, Waters WR, Rudolph KM and Drew ML (2006): Comparative nitric oxide production by LPS-stimulated monocyte-derived macrophages from *Ovis canadensis* and *Ovis aries*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **29**, 1-11.
- 6) Farley KS, Wang LF, Razavi HM, Law C, Rohan M, McCormack DG and Mehta S (2006): Effects of macrophage inducible nitric oxide synthase in murine septic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **290**, L1164-L1172.
- 7) Geng Y, Zhang B and Lotz M (1993): Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. *J Immunol*, **151**, 6692-6700.
- 8) Kim HS, Ye SK, Cho IH, Jung JE, Kim DH, Choi S, Kim YS, Park CG, Kim TY, Lee JW and Chung MH (2006): 8-Hydroxydeoxyguanosine suppresses NO production and COX-2 activity via Rac1/STATs signaling in LPS-induced brain microglia. *Free Radic Biol Med*, **41**, 1392-1403.
- 9) Sheu F, Lai HH and Yen GC (2001): Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, **49**, 1767-1772.