

豆腐よう抽出物の抗インフルエンザウイルス効果の*in vivo*解析

作道章一^{*1}・瀬底正康²

¹琉球大学医学部保健学科生体代謝学分野 ²琉球セメント株式会社事業開発部食品開発室

Effect of Tofuyo (Fermented Soybean Food) Extract on Influenza Virus-Infected Animals

Akikazu SAKUDO^{*1} and Masayasu SESOKO²

¹Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa 903-0215

²RyuKyu-Cement Co., Ltd.

ABSTRACT

This study investigated the possible *in vivo* activity of Tofuyo (fermented soybean food) extract against influenza. Tofuyo was diluted with water and subjected to homogenization, filtration and centrifugation. The resultant supernatant was used as Tofuyo extract. Nude mice (BALB/cSlc-*nu/nu*) were given drinking water supplemented with Tofuyo extract the day before intranasal inoculation with influenza. In addition, a control group was given water to drink without Tofuyo extract. Forty percent of the control group was dead within 14 days, while all the mice drinking Tofuyo extract-containing water survived. Tofuyo contains proteins, carbohydrates, vitamins and minerals that provide nutritive value and may contribute to the promotion of good health. We are currently analyzing the mechanisms by which Tofuyo extract relieves the symptoms of infection with influenza. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 176-180, 2012.

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、豆腐飴、唐芙蓉）はたん白質が多く栄養価が高く、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。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されている^{1,2)}。冬季には毎年インフルエンザが猛威を振るっているが、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をもたれる。昨年度行った*in vitro*解析では、直接的な阻害効果は確認されなかったが、栄

*〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原207

養組成の解析により高い栄養成分をもつことが確認されたため、その健康増進効果による防御効果が期待できるものと考えられた。そこで、本研究ではインフルエンザに対する豆腐よう抽出物の効果を動物実験 (*in vivo* 解析) において明らかにするとともに、その栄養成分についてもより詳細に解析を行った。

方 法

株式会社紅濱より入手した紅麹と黄麹から作製された豆腐ようを使用した。以前の報告に準ずる方法で¹⁾、豆腐ようを3倍量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 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. 1)。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解析した。なお、インフルエンザウイルスは、PR8株 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] を用い³⁾、安全キャビネット内で感染実験を行った (Fig. 2A)。また、感染動物はセオビット (SEOBiT) 感染動物ユニット中で飼育を行った (Fig. 2B)。PR8株を発育鶏卵に接種し、48時間後に回収したインフルエンザウイルス感染漿尿液 (HA (血球凝集素) 価で 10^9) を 10^5 希釈したものを麻酔をしたヌードマウス (BALB/cSlc-*nu/nu*) の鼻から吸引させ、経鼻接種を行った。なお、豆腐よう抽出物投与群は、接種前日より豆腐よう抽出物を200 mLあたり1 mL加えた液を飲料水として与えた (Fig. 3)。コントロール群は水を飲料水として与えた。接種後のマウスは、経時的に体重変化の観察を行った。そして、死亡したマウスと接種後14日まで生存していたマウスの両方について肺を回収した。回収した肺より0.5%ホモジネートを調製し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。さらに、日本食品標準成分表分析マニュアル⁴⁾ に従い、豆腐よう抽出物のエネルギー、水分、たん白質、脂質、糖質、灰分、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、鉄、亜鉛、銅、マンガン、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンB₆、水溶性食物繊維、不溶性食物繊維、食物繊維総量、食塩相当量、アルコールの測定をおこなった。また、アミノ酸自動分析法や高速液体クロマトグラフ法を用い、アルギニン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、グリシン、プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、トリプトファン、シスチンの測定を行った。

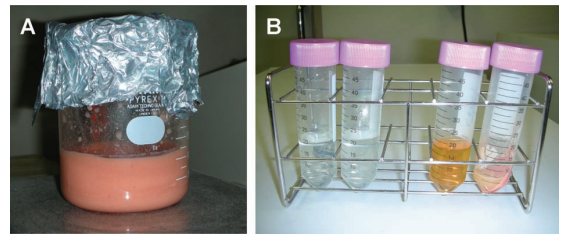


Fig. 1. (A) Tofuyo diluted with distilled water and homogenized. (B) Left to right; PBS, 8.5% ethanol, supernatant and pellets of Tofuyo after filtration and centrifugation. Modified from Figs. 1 and 2 in Sakudo et al.⁵⁾



Fig. 2. (A) Safety cabinet used for virus preparation (AIRTECH Japan Ltd.) and B.B.H. Infected Animal Rearing System SEOBiT. (B) B.B.H. Infected Animal Rearing Unit (SEOBiT). Cited from Fig. 1 in Sakudo et al.⁶⁾

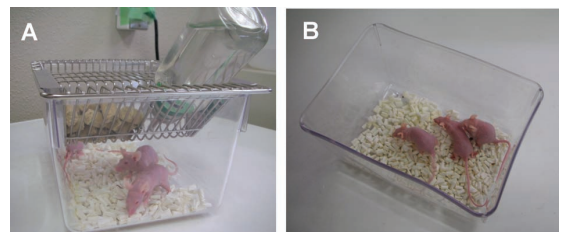


Fig. 3. (A) Picture of nude mice (BALB/cSlc-*nu/nu*) showing the food and water supply. (B) Nude mice immediately after intranasal inoculation with influenza virus [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)].

結 果

PR8株感染漿尿液を 10^5 希釈した液をヌードマウスへ経鼻接種し、接種後14日まで体重の変化を測定しながら飼育を行った。豆腐よう抽出物含有水を接種前日より飲んでいていたマウスは5匹中5匹全頭生存したが、水を飲んでいていたマウスは接種後9日と12日に1匹ずつ死亡し、生存したマウスは5匹中3匹のみであった (Fig. 4)。また、体重変化を比較すると、豆腐よ

う抽出物投与群が水投与群よりも有意に体重減少が少なかった ($p<0.05$, Paired t -test) (Fig. 5). 死亡したマウスおよび接種後14日に屠殺したマウスの肺について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存在の有無を調べると、死亡したマウスはいずれもヌクレオプロテインが検出された (Fig. 6). このことから、死亡したマウスはインフルエンザウイルスの感染により死亡したことが示唆された。また、生存したマウスを含めたすべてのマウスについて比較すると、豆腐よう抽出物投与群5匹中2匹と水投与群で5匹中3匹にヌクレオプロテインが検出されたことから、豆腐よう抽出物の投与は感染防御自体には働いていないものと考えられた。豆腐よう抽出物の栄養成分分析では、エネルギー 47 kcal/100g, 水分 88.8 g/100g, たん白質 1.0 g/100g, 脂質 0 g/100g, 糖質 6.9 g/100g, 灰分 1.2 g/100g, ナトリウム 420 mg/100g, カリウム 28 mg/100g, カルシウム 6 mg/100g, マグネシウム 13 mg/100g, リン 0 mg/100g, 鉄 0.1 mg/100g, 亜鉛 0 mg/100g, 銅 0.01 mg/100g, マンガン 0.01 mg/100g, ビタミンB₁ 0 mg/100g, ビタミンB₂ 0.02 mg/100g, ビタミンB₆ 0.02 mg/100g, 水溶性食物繊維 0 g/100g, 不溶性食物繊維 0 g/100g, 食物繊維の総量 0 g/100g, 食塩相当量 1.1 g/100g, アルコール 2.1 g/100gの値を示した (Table 1). また、豆腐よう抽出物のアミノ酸分析では、アルギニン 21 mg/100g, リジン 56 mg/100g, ヒスチジン 22 mg/100g, フェニルアラニン 48 mg/100g,

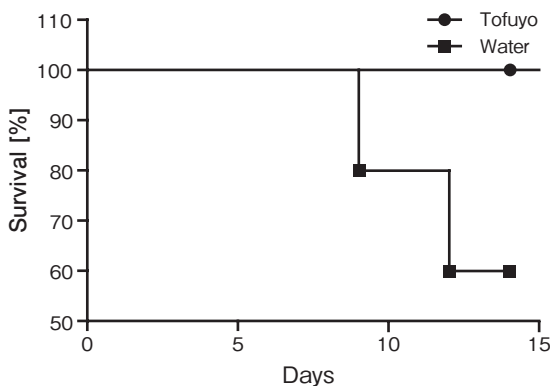


Fig. 4. Graph showing the survival percentage of two groups of nude mice (BALB/cSlc-*nu/nu*) after intranasal infection with influenza virus [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)]. The control group was given water to drink, while the other group was given water containing Tofuyo extract.

チロシン 38 mg/100g, ロイシン 70 mg/100g, イソロイシン 45 mg/100g, メチオニン 11 mg/100g, バリン 48 mg/100g, アラニン 52 mg/100g, グリシン 43 mg/100g, プロリン 58 mg/100g, グルタミン酸 213 mg/100g, セリン 43 mg/100g, スレオニン 35 mg/100g, アスパラギン酸 101 mg/100g, トリプトファン 6 mg/100g, システインとシスチンの合計 10 mg/100gの値を示した (Table 2).

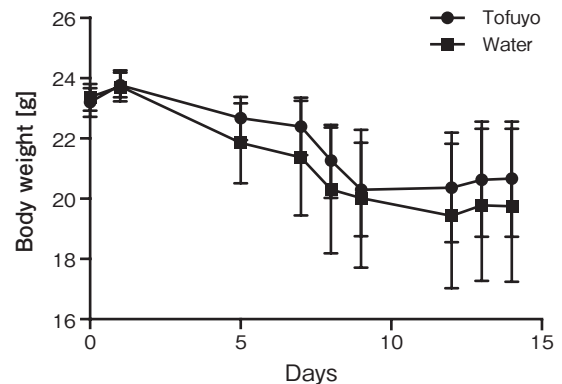


Fig. 5. Tofuyo extract significantly delays the decrease of body weight caused by infection with influenza virus [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] in nude mice (BALB/cSlc-*nu/nu*)*. Tofuyo: nude mice drinking water containing Tofuyo extract; Water: nude mice drinking water. * $p<0.05$, Paired t -test.

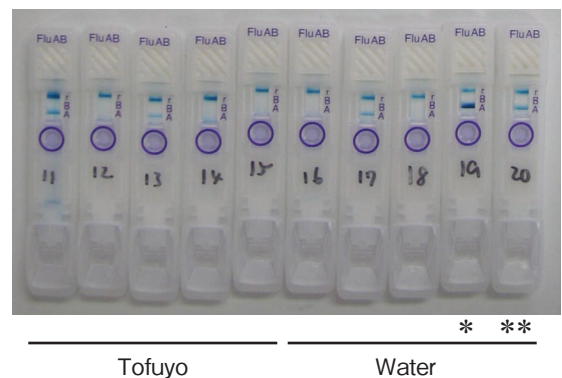


Fig. 6. Lungs of nude mice (BALB/cSlc-*nu/nu*) infected with influenza virus [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] were collected and subjected to immunochromatography. No.11 to 15: mice drinking water containing Tofuyo extract; No. 16-20: mice drinking water. *Dead on day 9; **Dead on day 12. Other mice were killed on day 14.

Table 1. Analysis of nutrient composition in Tofuyo extract

	Value per 100 g Tofuyo extract*	Methods
Energy	47 kcal	Modified Atwater method **
Water	88.8 g	Reduced pressure and drying by heating method ¶
Protein	1.0 g	Modified Kjeldahl method (protein conversion factor 5.71)
Lipid	0 g	Soxhlet extraction method
Carbohydrate	6.9 g	Subtraction method †
Ash content	1.2 g	Direct ashing method
Sodium	420 mg	Atomic absorption method
Potassium	28 mg	Atomic absorption method
Calcium	6 mg	Atomic absorption method
Magnesium	13 mg	Atomic absorption method
Phosphorus	0 mg	Vanadic molybdic acid absorption photometry
Iron	0.1 mg	Atomic absorption method
Zinc	0 mg	Atomic absorption method
Copper	0.01 mg	Atomic absorption method
Manganese	0.01 mg	Atomic absorption method
Vitamin B ₁	0 mg	High-performance liquid chromatographic method
Vitamin B ₂	0.02 mg	High-performance liquid chromatographic method
Vitamin B ₆	0.02 mg	Microbial quantification method
Provide soluble fiber	0 g	Modified Prosky Method
Insoluble dietary fiber	0 g	Modified Prosky Method
Total amount of food fiber	0 g	Modified Prosky Method
Corresponding value of salt	1.1 g	Corresponding value from sodium
Alcohol	2.1 g	Gas chromatography

*Zero means either lower than 0.1 of minimum quantity in food composition shown in table⁷⁾ or undetectable.

**Energy conversion factor is 4 kcal/g (protein), 9 kcal/g (lipid), 4 kcal/g (carbohydrate), 2 kcal/g (food fiber) and 7.1 kcal/g (alcohol).

¶ Water quantity is calculated by dry weight method and subtracted with alcohol quantity.

† Carbohydrate is calculated by subtraction with alcohol.

Table 2. Analysis of amino acids in Tofuyo extract

	mg/100g Tofuyo extract	Methods
Arginine	21	Automatic analysis method for amino acids
Lysine	56	Automatic analysis method for amino acids
Histidine	22	Automatic analysis method for amino acids
Phenylalanine	48	Automatic analysis method for amino acids
Tyrosine	38	Automatic analysis method for amino acids
Leucine	70	Automatic analysis method for amino acids
Isoleucine	45	Automatic analysis method for amino acids
Methionine	11	Automatic analysis method for amino acids
Valine	48	Automatic analysis method for amino acids
Alanine	52	Automatic analysis method for amino acids
Glycine	43	Automatic analysis method for amino acids
Proline	58	Automatic analysis method for amino acids
Glutamic acid	213	Automatic analysis method for amino acids
Serine	43	Automatic analysis method for amino acids
Threonine	35	Automatic analysis method for amino acids
Aspartic acid	101	Automatic analysis method for amino acids
Tryptophan	6	High-performance liquid chromatographic method
Cysteine and Cystine	10	Automatic analysis method for amino acids (performic acid oxidation + hydrochloric acid hydrolysis)

考 察

前年度の試験管内解析により、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示さなかったが⁵⁾、動物実験では生存率の増加や体重減少の抑制などインフルエンザ症状の緩和が見られた。しかしながら、豆腐よう抽出物投与群と水投与群にはインフルエンザウイルス感染率には大きな違いが見られなかったため、豆腐よう抽出物はインフルエンザウイルス感染の抑制効果はなく、感染後の健康状態維持に寄与しているものと考えられる。この考えをサポートするように、豆腐ようはたん白質、糖質、ビタミン、ミネラルなどを含んでいたため、健康増進効果があるものと推測され

る。また、アミノ酸分析では、グルタミン酸とアスパラギン酸が多く含まれていたため、旨み成分は抽出物に残っていることが明らかとなった。

以上より、豆腐よう抽出物は、インフルエンザウイルス感染防御にはあまり効果がないが、感染に伴う体重減少や生存率低下を抑制することが示唆された。また、栄養成分分析により、豆腐よう抽出物は糖質やたん白質が含まれ、加えてビタミンやミネラルも様々なものが含まれていたため、これによる健康増進効果により、インフルエンザ症状の抑制が起きた可能性が考えられる。今後、豆腐よう抽出物が持つインフルエンザ症状の発症抑制効果のメカニズムについて解析を進める予定である。

要 約

株式会社紅濱より分与された紅麹と黄麹から作製した豆腐ようを以前の報告に従い (Kuba M et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (6) 1278-1283, 2003), 蒸留水で薄めてホモジナイズとろ過を行った後、遠心した上清得て、豆腐よう抽出物を作製した。本研究では、この豆腐よう抽出物がインフルエンザウイルス感染マウスに与える影響の解析を行った。まず、未接種のヌードマウス (BALB/cSlc-nu/nu) に豆腐よう抽出物を200 mLあたり1 mL加えた液を飲料水として与えた場合では、水を与えた場合と大きな体重の違いは見られなかった。そこで、ヌードマウスに前日より豆腐よう抽出物を飲料水として与えながら、A型インフルエンザウイルスA/PR/8/34 (PR8, H1N1) を経鼻接種を行い、インフルエンザウイルス感染によるマウスの生死に与える影響を調べた。その結果、接種後14日までの観察の結果、飲料水として水を与えたマウスは、5匹中2匹は接種後9日と12日に死亡したが、豆腐よう抽出物を飲料水として与えたマウスは5匹全て生存した。これらの結果から、豆腐よう抽出物が健康増進効果を持つことが示唆された。

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, Kawashita N, Takagi 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.
- 4) 安本教傳, 安井明美, 竹内昌昭, 渡邊智子 (2006): 五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル—食品成分表の専門家がわかりやすく解説する。建帛社, pp. 9-163. 2006.
- 5) Sakudo A and Sesoko M (2011): Effects of Tofuyo (Fermented Soybean Food) Extract on Influenza Virus. *Soy Protein Research, Japan*, **14**, 146-149.
- 6) Sakudo A, Downey G (2011): Interview, Akikazu Sakudo. *NIR news*, **22**, 5-6.
- 7) 香川 芳子 (2012): 食品成分表2012. 女子栄養大学出版部, pp. 1-594.