

女性高齢者を対象とした新規大豆加工食品の開発

福岡女子大学 国際文理学部 食・健康学科
江頭 和佳子

1. 研究の目的と背景

近年、食品分野において急速に進行する高齢化社会への対応が急務とされている。当研究グループではこれまでに、各種食品産業用酵素製剤を用いて高齢者を対象とした新規大豆加工食品の開発を試みてきた。その過程で、酵素モルシンで豆腐を処理すると、モルシン中の β -グルコシダーゼにより、大豆イソフラボンが体内に吸収されにくい配糖体型から吸収されやすいアグリコン型に変換され、イソフラボンアグリコンが増加することを見出した¹⁾。

大豆イソフラボンは女性ホルモンであるエストロゲン様の生理作用を持っており²⁾、その摂取は骨粗鬆症の予防³⁾や乳がんなどの発生抑制⁴⁾に有用であると言われている。食品中に含まれる大豆イソフラボンは配糖体型で存在しているものが多く⁵⁾、腸内で産生される β -グルコシダーゼによりアグリコン型に変換され体内に吸収される⁶⁻⁸⁾が、この β -グルコシダーゼの産生には個人差があるため⁹⁾、イソフラボンアグリコンとして摂取する方が望ましい。

本研究では、モルシン処理した豆腐（モルシン処理豆腐）がイソフラボンアグリコンを多く含有することに着目し、その機能性について検討を行うため、抗酸化活性の測定や乳がん細胞への影響を検討した。本研究によりモルシン処理豆腐の機能性が明らかになれば、他の大豆食品への応用が考えられ、女性高齢者向けの新規大豆食品の開発が期待される。

2. 研究の方法

(1) モルシン処理豆腐の作製

食品用酵素製剤としてモルシンF（キッコーマン株式会社）を使用した。モルシン処理豆腐の作製には、市販の絹ごし豆腐（さとの雪食品株式会社）、食塩（財団法人塩事業センター）を使用した。モルシン処理豆腐は、Nishinoakiらの方法¹⁾に従って作製した。モルシンの代わりに蒸留水を使用して同様に作製したものを、コントロール豆腐とした。

(2) イソフラボンの抽出

Nishinoakiらの方法¹⁾に従って、モルシン処理豆腐およびコントロール豆腐よりイソフラボンの抽出を行った〔抽出イソフラボン (M) および抽出イソフラボン (C)〕。

(1) で作製した豆腐を凍結乾燥したもの 10 mg に 90% メタノール/0.5% 酢酸溶液を加えてイソフラボンを抽出

し、70% メタノール 1 ml に溶解した。

(3) 抗酸化活性の測定

SOD Assay Kit-WST（株式会社同人化学研究所）のプロトコルに従って、イソフラボンの抗酸化活性を測定した。イソフラボンは、標準物質として配糖体型のダイジン、ゲニスチン（共に和光純薬工業株式会社）と、アグリコン型のダイゼイン、ゲニステイン（共に和光純薬工業株式会社）をそれぞれメタノールに溶解し、抽出したイソフラボンと共に抗酸化活性を測定した。

(4) 細胞培養

乳がん細胞は、ヒト乳がん細胞 MCF7（ATCC Number: HTB-22）を使用し、35 mm の細胞培養ディッシュ（Nunc）中で培養を行った。培地は、DMEM 培地（SIGMA）に 10% 牛胎児血清（FBS）（invitrogen）を加えたものを使用した。

(5) イソフラボンの MCF7 への影響

抽出したイソフラボン 20 μ l を培地中に添加して培養を行い、MCF7 の増殖能を検討した。標準物質のダイゼインとゲニステインについても、それぞれ 1 μ M と 100 μ M となるよう培地中に添加して培養を行った。DMEM 培地中のフェノールレッドには弱いエストロゲン様の作用があるため、イソフラボン添加後はフェノールレッド除去培地 DMEM（SIGMA）に換え、FBS は活性炭（チャコール）処理されたホルモンフリーの cFBS（invitrogen）を使用した。DMEM に 10% cFBS と L-Glutamin（SIGMA）を加えた培地にイソフラボンを添加し、3 日間培養を行った。培養後 0 日目、1 日目、2 日目、3 日目に細胞数をカウントし、それぞれのサンプルについて、グルタチオン測定キット（Northwest Life Science Specialities, LLC）のプロトコルに従って、細胞内の抗酸化活性を測定した。細胞中のタンパク質や酵素はグルタチオン測定に影響を与える可能性があるため、サンプルは全て除タンパク処理を行った。

3. 研究の実施経過

(1) イソフラボンの抗酸化活性の測定

ダイジン、ゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステインおよび抽出したイソフラボンについて抗酸化活性を測定したが、いずれにおいても明らかな活性は認められなかった

(データ示さず)。

(2) イソフラボンの MCF-7 への影響

MCF7 にダイゼイン、ゲニステインおよび抽出したイソフラボンを添加し、3日間培養を行った結果、ゲニステイン 1000 μM では培養1日目から、ダイゼイン 100 μM

では培養2日目から MCF7 の増殖能が低下した。抽出イソフラボン (M) はイソフラボンを添加せずに培養を行ったもの (コントロール) と差が見られなかった (図 1)。

MCF7 の細胞内のグルタチオン濃度は、抽出イソフラボン (M) とコントロールに差が見られなかった (データ示さず)。

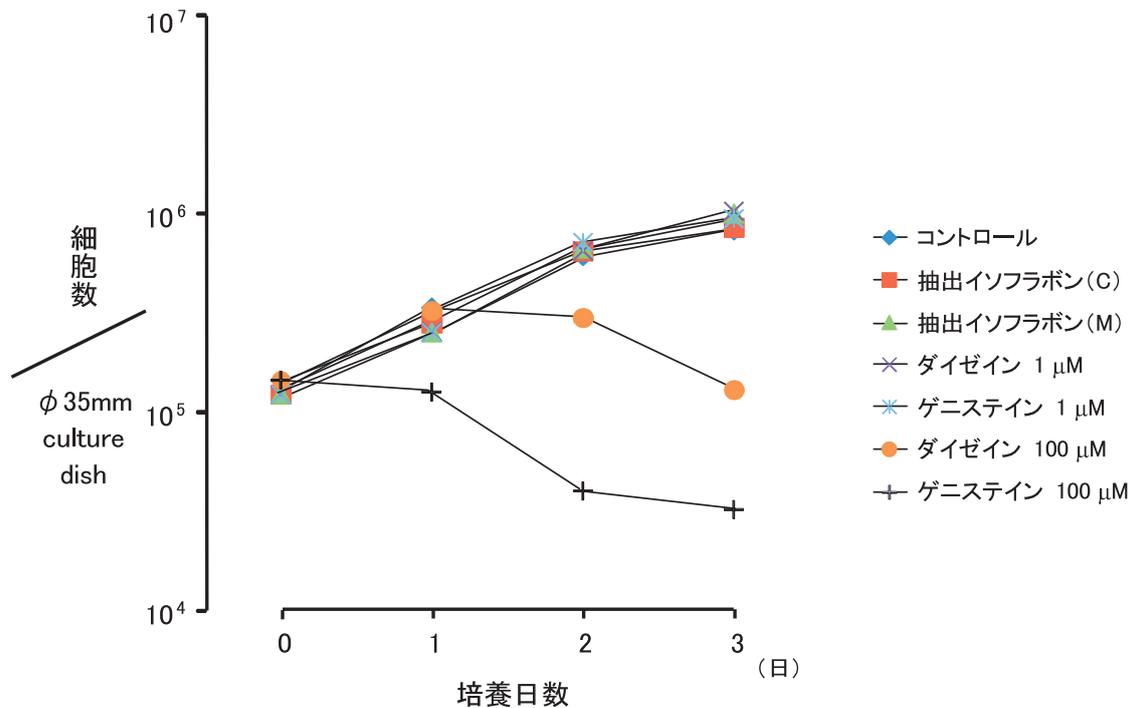


図 1 イソフラボンの MCF7 への影響

4. 研究から得た結論と今後の課題

本研究では、標準物質のダイジン、ゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステインの抗酸化活性が見られなかった。これについては、今回の測定法が適切ではなかった可能性があるが、抗酸化活性の測定法は多種多様あるため、今後は標準物質における抗酸化活性の測定法を確立したうえで、抽出したイソフラボンについて測定を行いたいと考えている。

MCF7 への影響については、モルシン処理豆腐より抽出したイソフラボンを添加したものとコントロールとでは、細胞増殖能とグルタチオン濃度に差が見られなかった。大豆イソフラボンが MCF7 に与える影響を検討した研究では、その濃度に幅があり、今回の条件では明らかな影響が見られなかった可能性があるため、添加量などを詳細に検討したい。細胞内グルタチオンの測定においては、今後、培養条件や測定方法の検討を行う予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係の皆様方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Nishinoaki, M., Asakura, T., Watanabe, T., Kunizaki, E., Matsumoto, M., Eto, W., Tamura, T., Minami, M., Obata, A., Abe, K., and Funaki, J., Application of an *Aspergillus saitoi* protease preparation to soybean curd to modify its functional and rheological properties, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 587-590 (2008).
- 2) 家森幸男, 太田静行, 渡邊昌編:「大豆イソフラボン」, 幸書房 (東京), pp39 (2001).
- 3) 家森幸男, 寺本貴則, 福井寛, 池田克己, 奈良安雄, 大豆イソフラボンによる骨粗鬆症予防の可能性, *Bio. Industry.*, **15**, 5-10 (1998).
- 4) 家森幸男, 太田静行, 渡邊昌編:「大豆イソフラボ

- ン], 幸書房 (東京), pp107-118 (2001).
- 5) Wang, H. and Murphy, P. A., Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1666-1673 (1994).
 - 6) Setchell, K. D. R., Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants, *J. Nutr.*, **130**, 654S-655S (2000).
 - 7) Piskula, M. K., Yamakoshi, J. and Iwai, Y., Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach, *FEBS Letters.*, **447**, 287-291 (1999).
 - 8) Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Nechemias, L. Z., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S. and Heubi, J. E., Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 447-453 (2002).
 - 9) Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K. and Adlercreutz, H., Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako), *J. Nutr.*, **128**, 1710-1715 (1998).