

活性酸素産生能および抗酸化能と食品（納豆）の関係

武田 秀 勝（札幌医科大学 保健医療学部）

小林 千 恵（山形県立日本海病院 リハビリテーション室）

棚橋 嘉 美（札幌第一病院 リハビリテーション科）

秋月 一 城（松田整形外科病院 歯科口腔外科）

橋本 伸 也（藤女子大学 人間生活学部）

日下部 未 来（北海道教育大学 大学院教育学研究科）

神 林 勲（北海道教育大学 岩見沢校）

近年、活性酸素による生体構成成分の酸化損傷が、老化や生活習慣病をはじめとする多くの疾患に深く関わっていることを示す報告がなされ、特に、食品として摂取する抗酸化物質が細胞の老化や生活習慣病の予防に有効ではないかと期待されている。日本古来の食文化「納豆」にはビタミンEやイソフラボンなどの抗酸化物質が含まれており、納豆の摂取は健康の維持増進に効果的であるといわれている。また、生体内の恒常性維持のためには、活性酸素の生成系と消去系のバランスを保つ事が重要であり、加齢に伴い酸化ストレスは増大し、免疫力は低下するということが報告されている。このことから、中高齢者における納豆摂取が、酸化ストレスや免疫機能にどのような影響を与えるか、そして納豆の摂取が体内の酸化ストレスや免疫機能に与える影響についての基礎的実験例を紹介する。

キーワード：活性酸素種、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、抗酸化、納豆

1. 活性酸素及び抗酸化作用とヒトのからだ

近年、「活性酸素」による生体構成成分の酸化損傷が、老化や生活習慣病をはじめとする多くの疾患に関与していることが示されている¹⁾。

活性酸素は生体内で酸素を利用してエネルギーを産生する際や、マクロファージが病原菌などの外来異物を攻撃したり、不要になった細胞を処理する際など、細胞内の正常な代謝過程に伴って不可避免的に発生する²⁾。また、異常時など迅速な情報伝達が必要な場合の情報伝達手段としても発生するなど、本来、生体の維持に必要かつ有用なものである。しかし一方で、生活習慣などに由来して不要あるいは過剰に発生した活性酸素は、その強力な酸化力のために細胞内の蛋白質や遺伝子DNAなどの生体構成成分を「錆び」させ、生体機能を低下させるといわれている³⁾。

これに対し、生体内には活性酸素を消去する抗酸化システムが備わっており、活性酸素の毒性から生体を保護する機能を担っている。すなわち、活性酸素による酸化力に打ち勝つ抗酸化システムがあれば、生体は正常な状態を維持できる³⁾。生体内で発生する活性酸素による酸化損傷力と抗酸化システムによる抗酸化力との差は「酸化ストレス」と定義されており、酸化ストレスの制御は生活習慣病などの予防に有効ではないかと期待されている³⁾⁴⁾。酸化ストレスは過食、深酒、過度の運動、睡眠不足といった生活習慣、喫煙、紫外線、放射線、農薬などの化学物質といった環境因子によって惹起される。また、病気にかかること自体が酸化ストレスを惹起する例が知られており、例えば糖尿病においては発症によってさらに酸化ストレスが亢進するという悪循環に陥る場合がある³⁾⁴⁾。

生体内の抗酸化システムは、スーパーオキシドディ

スムターゼ (superoxide dismutase; SOD)、カタラーゼ (catalase; CAT) などの抗酸化酵素群、酵素活性を支える微量ミネラル、ビタミン群などで構築されている⁹⁾。SODをはじめとする抗酸化酵素群や、尿酸、ビリルビンなどの低分子抗酸化物質は体内で合成されることが明らかとなっているが、例えば抗酸化ビタミンとして知られているビタミンEやビタミンCは、両者とも体内では合成されず、その供給を食物に頼っている。さらに食品中にはビタミンCやビタミンE以外にもさまざまな抗酸化物質が存在しており、野菜や果実に多いカロテノイド類やフラボノイド類がその代表的なものである⁹⁾。すなわち、生体内の抗酸化システムは食事により支えられており、生体内の抗酸化力は生活習慣に左右されているといえる。

また、最近では、食生活の乱れや、精神的ストレスの増加が問題視されている。現在、日本は高齢社会を迎えており、世界一の長寿国でもある。加齢に伴って活性酸素の生成が増加する¹⁰⁾ことや、加齢に伴いSODの血中活性が低下することが報告されている点から⁹⁾、今後、酸化ストレスの増加を抑制し、老化や生活習慣病を予防していく必要があると考えられる。活性酸素は生体内抗酸化酵素のみならず食物中の抗酸化物質により解毒されることが知られており、特に食品として摂取する抗酸化物質が細胞の老化や生活習慣病の予防に有効ではないかと期待されている。

2. 納豆について

日本古来の食文化「納豆」は、ビタミンEやイソフラボンなどの抗酸化物質を含んでおり、納豆の摂取は健康の維持増進に効果的であるといわれている⁷⁾。しかしながら、納豆の摂取が体内の酸化ストレスや免疫機能に与える影響については知られていない。

日本の伝統食品である『納豆』は、近年、高い抗酸化能力を持つ健康食品として、その価値が見直されている。『納豆』は、ナットウキナーゼ、プロウロキナーゼアクチベーター、あるいはビタミンK₂などの血液凝固—線維素溶解系に係わる生理活性物質を含んでおり¹¹⁾、血栓溶解等における循環器学疾患予防について報告されている。さらに、腸内での善玉菌を増やしたり、悪玉菌の増殖を抑制したりする作用を持つ納豆菌や、コレステロール低下作用を持つリノール酸なども含んでいる。そして、納豆の原料である大豆自体にも、イソフラボン、サポニン、セレンなどのように活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) を消去する作用を持つ成分が含まれている。さらに、『納豆』のような大豆発酵食品には非常に強力な活性酸素消去系

の酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) やカタラーゼ (Catalase; CAT) が高濃度含まれていることも報告されている¹²⁾。

3. 活性酸素種とは

ROSは、ATPの合成をはじめとする細胞内の正常な代謝過程に伴い不可逆的に発生するほか、紫外線・放射線・科学物資・あるいは喫煙などの酸化ストレスを増加させるような外因によっても生ずる。これらROSは、その高い反応性から、周囲の細胞成分を非特異的に酸化障害する危険がある。それが酸素ストレスによる病態発生のメカニズムとなっている。そのため生体内には、これらの発生を最小限におさえ、或いは無毒化するため、SODをはじめとする抗酸化酵素など巧妙なシステムが用意されている。一方で、好中球やマクロファージは能動的に大量のROSを産生し、生体防御機構の重要な一翼を担っている²⁾。その他にも、一酸化窒素 (nitric oxide; NO) をはじめとするフリーラジカルが血液循環やエネルギー代謝の調節に関与し生体機能を積極的に維持調節している事も明らかになっている²⁾。これらことから、生体にとってはこのフリーラジカルやROSの産生系と消去系のバランスが保たれる事が重要であり、これが大きく崩れると、様々な病態が出現すると考えられている¹³⁾。

しかしながら、加齢とともにROSの消去系である抗酸化酵素活性が減弱することが報告されており、尿酸やビリルビンなどの、抗酸化酵素以外の生体内抗酸化物質も、加齢と共に血中濃度が低下することが報告されている¹⁴⁾。

現在、日本は高齢社会を迎えており、世界一の長寿国となっている。加齢と共に生体内の抗酸化系が弱体してしまうのであれば、それに対して体外から抗酸化機能を有する物質群を補う事が、中高年者における疾病の発現を抑え、健康を保つ為に重要となってくる。

しかし、現在『納豆』の効果については、前述の通り血栓の溶解等における循環器学疾患予防など多くの調査が行われている。しかしながら、『納豆』の摂取が、体内の酸化ストレスや好中球スーパーオキシド生成能、血清総抗酸化作用などにどのような影響を与えるのか否かについての研究は極めて少ない。このことから、中高年者における納豆摂取が活性酸素産生能及び酸化ストレスや免疫機能にどのような影響を与えるかについて基礎的研究を行い、幾つかの知見が得られたので紹介します。

4. 実験の方法

(1) 被験者および実験プロトコール

健康な日常生活を営んでいる52歳から56歳までの夫婦4組（身長163.8±3.7 cm、体重62.6±4.8 kg、BMI 23.1±0.9 kg/m²）を対象とした。

実験プロトコールを図1に示した。納豆の摂取は被験者をA・B群に分けたクロスオーバー方式で実施した。

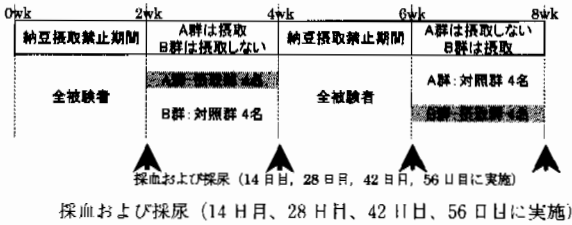


図1. 実験プロトコール

(2) 採尿および採血

採尿および採血は、摂取期、対照期の前後、計4度行った。

実験当日の早朝尿を全量採取した。

(3) 尿中8-OHdG排泄量の測定

酵素免疫測定法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay法：ELISA法）による測定キット（8-OHdG check、日本老化研究所製）にて尿中8-OHdG濃度を測定した。

(4) 好中球スーパーオキシド生成能の測定

2%デキストラン溶液を用いた比重勾配遠心法にて好中球を分離し、単離好中球のみの1mlの好中球浮遊液を作成した。また、マイクロチューブ内の好中球数および生存率を自動血球カウンター（NucleoCounter、ChemoMetec社製）を用いて好中球数をカウントした。刺激剤としてホルボールミリスチンアセテート（PMA）を用い、シトクロムC還元法にて二波長分光光度計（556型二波長自記分光光度計、日立製作所製）で測定した。

5. 実験の結果

(1) 尿中8-OHdG排泄量

尿中8-OHdG排泄量（ng/kg/h）は、図2、表1に示した。被験者全体の平均値は、摂取期前2.71±0.34、摂取期後2.75±0.43、対照期前2.93±0.65、対照期後3.30±0.78であった。男女別にみると、男性の平均値は、摂取期前3.31±0.89、摂取期後3.37±1.34、対照

期前3.90±2.10、対照期後4.67±2.44であった。一方、女性の平均値は、摂取期前2.11±0.54、摂取期後2.13±0.61、対照期前1.95±0.73、対照期後1.94±0.24であった。

摂取期・対照期前後での被験者8名の平均値の差について、二元配置分散分析の後、対応のあるt検定を用いて分析を行った。また、男女差について対応のないt検定を用いて分析を行った。被験者全体では、摂取期、対照期ともに前後で有意差は認められなかった。また、男女間で有意差は認められなかったものの、女性よりも男性において高値を示した。

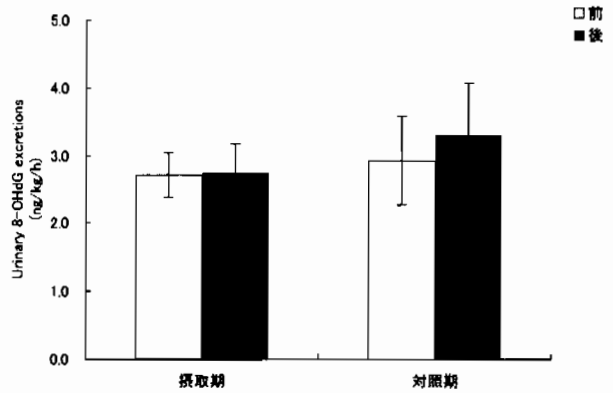


図2. 尿中8-OHdG排泄量 全体（平均±標準誤差）

表1 尿中8-OHdG排泄量

	摂取期		対照期	
	前	後	前	後
A	3.49	3.45	7.33	8.78
B	2.57	2.12	2.25	1.97
C	2.41	2.53	1.62	3.55
D	1.61	1.29	0.83	1.55
E	2.65	1.99	3.27	2.41
F	1.53	2.09	1.89	2.19
G	4.69	5.50	3.39	3.92
H	2.72	3.01	2.84	2.05

(2) 好中球スーパーオキシド生成能

好中球スーパーオキシド生成能（nmol/min/10⁷ cells）は、図3、表2に示した。被験者全体の平均値は、摂取期前71.80±15.09、摂取期後78.43±16.29、対照期前68.92±11.15、対照期後62.11±27.49であった。男女別にみると、男性の平均値は、摂取期前73.48±24.07、摂取期後78.44±29.97、対照期前74.50±27.27、対照期後57.87±11.90であった。一方、女性の平均値は、摂取期前69.12±55.26、摂取期後78.43±57.85、対照期前63.34±34.42、対照期後66.35±36.52であった。

被験者全体では、摂取期前と比較して摂取期後に向上する傾向が観察された（p<0.1）。男女間で有意差は

認められなかった。夫婦間での相関を PEASON 積率相関分析を用いて分析した結果、中程度の相関が認められた ($r=0.49$)。

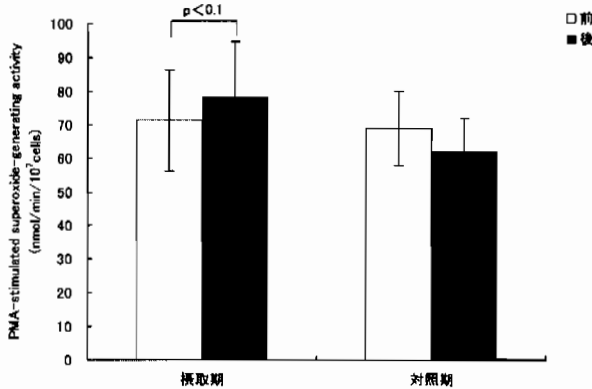


図 3. 好中球スーパーオキシド生成能全体 (平均±標準誤差)

表 2 好中球スーパーオキシド生成能

	摂取期		対照期	
	前	後	前	後
A	82.01	67.06	78.49	63.89
B	46.84	53.49	40.41	38.51
C	99.29	120.61	67.68	64.28
D	160.14	174.38	105.59	110.94
E	34.07	38.43	37.78	37.30
F	11.60	20.17	20.20	23.11
G	78.55	87.65	114.04	65.99
H	57.91	65.68	87.14	92.85

(3) スーパーオキシドラジカル消去能

スーパーオキシドラジカル消去能は、対象者 A~H まで、S 群、C 群での摂取前、摂取後に分けて、結果を表 3 に示した。S 群と C 群の納豆摂取前後におけるスーパーオキシドラジカル消去能については図 4 に示した。S 群では摂取前の平均値は 56.54 ± 2.48 であり、摂取後は 47.25 ± 2.19 であった。C 群では摂取前の平均値は 58.17 ± 2.05 であり、摂取後は 50.35 ± 1.92 であった。S 群 C 群共に摂取前と比較して摂取後に有意 ($p<0.05$) に減少が観察された。

表 3 スーパーオキシドラジカル消去能

	S 期		C 期	
	前	後	前	後
A	56.27	53.09	61.80	48.37
B	51.87	51.70	59.55	50.77
C	59.36	53.35	65.76	45.78
D	66.32	48.91	64.33	48.57
E	64.08	39.18	52.88	51.44
F	58.90	48.49	50.79	55.18
G	48.54	36.87	51.61	42.65
H	46.99	46.40	58.64	60.05

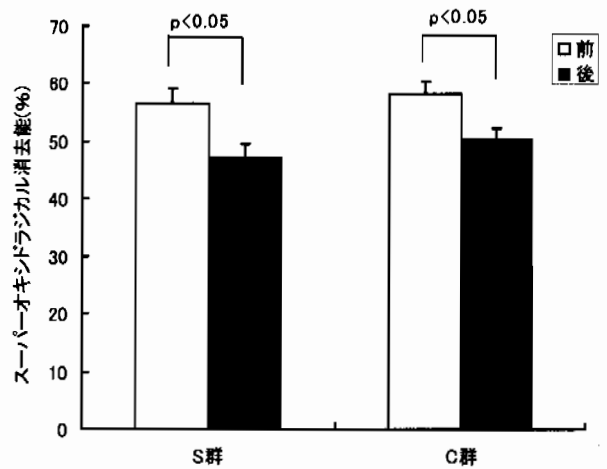


図 4. スーパーオキシドラジカル消去能

(4) ヒドロキシラジカル消去能

ヒドロキシラジカル消去能は、対象者 A~H まで、S 群、C 群での摂取前、摂取後に分けて、結果を表 4 に示した。S 群と C 群の納豆摂取前後におけるヒドロキシラジカル消去能については図 5 に示した。S 群では摂取前の平均値は 38.87 ± 3.36 であり、摂取後は 46.52 ± 1.87 であった。C 群では摂取前の平均値は 36.77 ± 1.67 であり、摂取後は 44.83 ± 1.73 であった。S 群 C 群共に摂取前と比較して摂取後に有意 ($p<0.05$) に増加が観察された。

表 4 ヒドロキシラジカル消去能

	摂取期		対照期	
	前	後	前	後
A	38.54	38.85	33.15	46.70
B	27.10	45.89	37.59	44.43
C	30.69	49.52	42.00	45.71
D	27.30	42.11	33.33	35.12
E	42.36	41.11	32.17	51.79
F	48.91	52.21	32.15	41.24
G	50.55	50.46	43.87	46.64
H	45.49	52.00	39.89	47.02

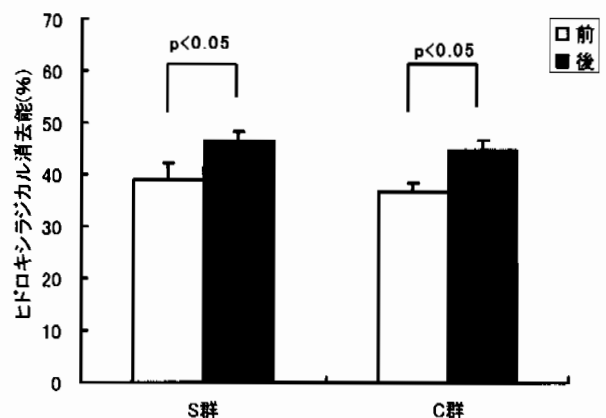


図 5. ヒドロキシラジカル消去能

6. 提言

(1) 尿中 8-OHdG 排泄量

納豆摂取前後で尿中 8-OHdG 排泄量は変化せず、納豆の摂取による抗酸化能の向上は認められなかった。先行研究⁹⁾において、生活習慣や環境汚染物質への暴露によっても酸化ストレスが亢進することが報告されており、放射線、精神的ストレス、アスベスト、紫外線、大気汚染によるヒトでの 8-OHdG レベルの上昇が報告されていることから、食生活以外の生活習慣や環境因子を含めた検討が必要であるものと推察される。さらに、DNA の酸化損傷は、それ自身が生体機能の障害や疾病の原因となることが知られている。すなわち、酸化ストレスは疾病の原因となるとともに疾病によっても生じ、各種の酸化ストレスマーカーはどちらによっても変動する。しかし、この両者を区別することはできない⁹⁾。本研究の被験者には、体調不良やアレルギー性鼻炎などにより服薬中の者も含まれていたため、納豆摂取後における尿中 8-OHdG 排泄量の低下は期待できなかったものと推察される。

また、本研究においては、尿中 8-OHdG 排泄量は女性よりも男性において高値を示したが、Nakajima らは、尿中 8-OHdG 排泄量はすべての年代で女性は男性よりも平均排泄量が高値を示したことを報告している⁹⁾。先行研究と一致した結果が得られなかったのは、本研究における被験者は、男性は全員有職者であり、女性は全員専業主婦であったため、職場環境における何らかのストレスが表出されたものと推察される。

(2) 好中球スーパーオキシド生成能

納豆の摂取後、好中球スーパーオキシド生成能が向上する傾向が認められ、納豆に含まれるビタミン E やイソフラボン類などの抗酸化物質が生体防御機構の向上に有効である可能性が示唆された。しかし、本研究では、納豆以外の食事内容について制限を設けておらず、夫婦間において中程度の相関が認められたことから、納豆以外の食生活による影響を含めて検討する必要がある。健常者にフラボノイド等の多い食事、または野菜や果物として抗酸化物質を摂取させた先行研究においても、酸化損傷の抑制効果を示した結果と、示さなかった結果が混在している¹⁰⁾。また、ある特定の抗酸化成分を精製し、あるいは合成して高濃度にしたものを補助食品として摂取した場合の生体に及ぼす効果は一樣ではなく、ときには相反する現象のみられることもある¹¹⁾。つまり、それぞれの抗酸化物質の適正な摂取量や、他の物質との相互作用については十分に解明されていない。また、遺伝的な影響や、日常の食生活

で摂取している評価対象成分以外の影響、食生活以外の環境因子などが複雑に影響していると考えられる。実際の食生活に食品性抗酸化物質を活用するためには、今後のさらなる科学的知見の蓄積が必要であると示唆される。

(3) 血清総抗酸化能

本研究では、スーパーオキシドラジカル消去能、ヒドロキシラジカル消去能ともに、納豆摂取期と対照期での差は観察されなかった。このことから、納豆の摂取がこれらの血清総抗酸化能に寄与することはないと考えられる。しかし、先行研究においては、納豆中には活性酸素消去系の酵素である SOD やカタラーゼや含まれていることや¹²⁾、マメ科植物の種子に豊富に含まれている高塩基性ポリアミンは ROS 消去能を有しているとするものがある⁹⁾。本研究において、血清総抗酸化能が納豆摂取によって変化しなかった原因としては、いくつかの点が考えられる。

1つは、納豆以外の食品との食べ合わせの問題である。納豆中には、抗酸化物であるビタミン類やイソフラボンなどが含まれているが、抗酸化食品の中には、ビタミン E、ビタミン C、コエンザイム Q10 のように、複数の栄養素が関連しあって作用するものが存在する⁹⁾。納豆中にはビタミン E は含まれているが、ビタミン C やコエンザイム Q10 は含まれていない。このことから、納豆から摂取したビタミン E がうまく作用しなかった可能性などが推察される。

次に考えられるのは、納豆から摂取した抗酸化物質が機能出来なかった可能性である。生体内の抗酸化システムは、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase; GPx)、CAT などの酵素群、酵素活性を支える微量ミネラル、ビタミン群、スーパービタミンとも呼ばれる抗酸化物質などで構築される抗酸化ネットワークである¹³⁾。つまり、納豆から SOD を摂取することは出来たが、そのほかの要素が不足していたため、SOD が機能しなかった事が推察される。

現代は、各種抗酸化物が満遍なく摂取できていない時代であり、食品そのものの栄養価も、低下していると言われている。これらのことから、栄養不足を補うためには、取れていない栄養素をピンポイントで補給するのではなく、まず総合ビタミンによるトータルの補給を行った後で、個々の弱点に応じた抗酸化物を追加補給することが重要であるといえる¹⁴⁾。

また、本研究ではスーパーオキシドラジカル消去能が、摂取期、対照期ともに摂取後に有意に減少が見られたのに対し、ヒドロキシラジカル消去能は摂取後に有意に増加が見られたが、このメカニズムに関しては

不明である。しかし、いずれも二週間の周期で増減が見られることから、体内のホルモンや体温など他の数値でも見られる日内変動のような動きが血清総抗酸化能にもある事が推察される。また、この二つの消去系は、活性酸素の消去経路において働く部位が異なる為、その時間差によるものである事が推察される。

文献

- 1) 吉川敏一：フリーラジカルの科学，第4版，講談社サイエンティフィク：東京，1999.
- 2) 土屋正彦・他：生体にとっての活性酸素の意義，ICUとCCU，27巻7号，pp 649-660，2003.
- 3) 越智宏倫・他：生体内酸化ストレス評価と癌予防，医学のあゆみ，Vol.204 No.1，pp 25-31，2003.
- 4) 越智宏倫・他：酸化ストレスプロフィール，臨床病理 51 巻2号，pp 115-125，2003.
- 5) 寺尾純二：食品中の抗酸化物質1，臨床栄養 Vol.88，No.1，pp 13，1996.
- 6) 須見洋行・他：納豆中に見出された強力な活性酸素消去系酵素，日醸協誌 94 巻，pp 1016-1018，1999.
- 7) 大澤俊彦：食品中の抗酸化物質，臨床栄養 Vol. 89，No.5，pp 567-570，1996.
- 8) 神林勲・他：加齢と運動習慣が好中球の生体防御機構に与える影響，デサントスポーツ科学，Vol. 26，pp 153-162.
- 9) 中島早苗・他：一過性の運動負荷による尿中 8-OHdG 排泄量の変動，慈恵医大誌，120，pp 1583-1589，2005.
- 10) 板倉弘重：抗酸化物質の展望，医学のあゆみ Vol.193，No.5，pp 439-444，2000.
- 11) 梅垣敬三：抗酸化食品成分と酸化的なDNA損傷，栄養学雑誌 Vol.62 No.2，pp 65-72，2004.
- 12) 須見洋行・他：納豆中に見出された強力な活性酸素消去系酵素，J. Brew. Soc. Japan，Vol.94 No. 2，pp 1016-1018，1999.
- 13) 土屋正彦・他：生体にとっての活性酸素の意義，ICUとCOU Vol.27 7月号，pp 649-660，2003.
- 14) 越阪部奈緒美：抗酸化サプリメントとアンチエイジング，Geriatric Medicine，Vol.42，No.8，pp 1027-1032，2004.
- 15) 越智宏倫・他：生体内酸化ストレス評価と癌予防，医学のあゆみ，Vol.1，pp 25-31，2004.
- 16) 市川寛：抗酸化食品，薬局，Vol.55 No.5，pp 67-73，2004.

Relationships among Production of Active Oxygen, Antioxidant Capacity and *Natto* Fermented Soybeans

Hidekatsu TAKEDA (Sapporo Medical University)

Chie KOBAYASHI (Nihonkai-Yamagata Prefectural Hospital)

Yoshimi TANAHASHI (Sapporo Daiichi Hospital)

Kazuki AKIZUKI (Matsuda Orthopedic Hospital)

Nobuya HASHIMOTO (Fuji Women's University)

Miku KUSAKABE (Hokkaido University of Education Sapporo)

Isao KANBAYASHI (Hokkaido University of Education Iwamizawa)

Many recent reports have indicated that oxidative injuries to body components caused by active oxygen are deeply linked with aging, lifestyle-related diseases and many other illnesses, and dietary intake of antioxidant-rich food is expected to play an effective role in prevention of cellular aging and lifestyle-related diseases. *Natto*, a traditional Japanese food, contains antioxidants such as vitamin E and isoflavone and eating *natto* is said to be useful to maintain and promote good health. Furthermore, it is reported that the balance between the generating and removing systems of active

oxygen is essential for in vivo homeostasis, and the oxidation stress is increased and the immune system is compromised as people get older. Based on these, the effect of eating *natto* on the oxidation stress and immunity among middle-aged and older people will be discussed and examples of basic experiments will be introduced here.

Key words: ROS (reactive oxygen species), super oxide, hydroxy radical Antioxidant
Natto