

味噌を用いた入院患者（経口・経腸栄養管理）の 下痢に対する有用性について

川口 美喜子

Beneficial effect of classical Japanese food “miso” on enteral
nutrition related diarrhea

Mikiko KAWAGUCHI

*Clinical Nutrition, Shimane University Hospital
89-1 Izumo, Japan 693-8501*

1. 背景

経口摂取が困難な病状にある入院患者の栄養投与は、多くの場合が栄養剤を胃腸に直接投与する経管経腸栄養法を行なう。しかし、栄養剤の投与開始時は下痢、膨満感や嘔気・嘔吐などの消化器症状のため経管栄養の継続あるいは目標栄養量の投与が困難な場合が多く、特に下痢は高頻度に発症し患者の栄養状態に悪影響を及ぼす。当院では、経験的に経腸栄養剤の投与によって生じる下痢の対応に味噌を使用してきた。

これまでの研究で、経腸栄養剤による下痢の原

因は患者が経腸栄養を開始するまでの絶食期間、抗生物質の使用期間、炎症反応の程度に影響を受けることを明らかにしている。

2. 目的

入院患者の経腸栄養法開始時に引き起こされる下痢に対する「味噌」の効果について検討を行なった。

3. 方法、結果

・味噌スープ作り方と投与方法

使用味噌：山印信州味噌 低温熟成米麹味噌：
米麹6割 25℃ 発酵熟成、材料は大豆、米、
塩、酒精、食塩相当量は1,000mg/100g

①季節の野菜・フルーツなどを鍋に入れ、3
時間程度煮詰め野菜だしスープを作る。

②野菜のだし100ccに対して味噌8グラムを

Subjects: Thirty-six patients with diarrhea (19) and without diarrhea (17)

Multiple logistic regression analysis

Factors	odds ratio	p-value
Fasting period (per day for extension)	11.4	0.001
Period using antibiotics (per day for extension)	19.7	<0.001
Serum level of CRP (Every rise in 1 mg/dl)	10.3	0.001

島根大学医学部附属病院 栄養治療室 〒693-8501 島根県出雲塩冶町89-1

TEL: (0853) 20-2073 FAX: (0853) 20-2074

E-mail: k-mikiko@med.shimane-u.ac.jp

弱火で溶かし、味噌スープを作る。

③味噌スープをペーパータオルで漉し、100ccに計量する。

④暖かい状態で病棟に配膳する。

※削り節、煮干しやだしの素などは使用しない。

[1] 先行研究結果

対象：当院入院患者32名（平均年齢76.7±11.9歳）、小児患者1名（2歳）

研究開始時、全員が経管経腸栄養を実施中であった。

方法：①味噌スープ100ccを27名に2-3回/日投与する。

②対照として10名に、GFO（グルタミン、オリゴ糖、食物繊維を含む）を同様に投与する。

③栄養剤投与前に味噌スープあるいはGFOの投与を終える。

結果：

Method of treatment (number of patients)	Improvement of diarrhea	No improvement of diarrhea
Miso-soup (19)	16	3
GFO (3)	0	3
Switch from GFO to miso-soup (7)	4	3
Stop laxatives (3)	3	0
Total (32)	23	9

対象患者の味噌スープ投与前の便のpHを抗生物質の投与の有無別に比較した。

pH of the stool before EN infusion

Patients with antibiotics (19)	pH 6.5 ± 1.3
Patients without antibiotics (5)	pH 5.7 ± 0.3

[2] 研究結果

対象：下痢を一日に数回認めた当院入院患者88名（男性60名 平均年齢71.7±13.9歳、女性28名 平均年齢75.5±13.0歳）。

経鼻経管栄養患者（Nasogastric tube）50名、胃瘻患者（Gastric Fistula）19名、腸瘻患者（Intestinal Fistula）10名。

下痢改善の判断は、1日3回以上の水様便の発症が治まった日とした。

結果：

EN access (number of patients)	Miso-soup Effective*	Days until the recovery	Miso-soup Ineffective*
Nasogastric tube (50)	42	3.6±2.0	5
Gastric Fistula (24)	19	3.7±1.9	1
Intestinal Fistula (14)	10	2.8±1.3	2
Total (88)	71	2.7±1.9	8

*: We judged effective or ineffective by days until the recovery from watery diarrhea (less than 3 times a day).

- GFO使用によって下痢の改善がなかった患者28名中20名は、味噌スープによって改善した。
- 8名は下痢や心理的な影響のため、経腸栄養の継続投与が困難となったが、味噌スープを投与することで、経腸栄養の継続が可能となった。
- 下痢の改善までの期間は、平均2.7±1.9日であった。

4. まとめ

経腸栄養開始時発症する厳しい下痢は患者の栄養状態を不良にするが、その対策には苦慮する事が多い。味噌スープは、このような下痢の改善に有効であることが示唆された。

今後、さらに臨床の現場における味噌の機能性について明らかにする必要があると思われる。

第34回欧州静脈経腸栄養学会議（2012. 09. 08-11: Barcelona, Spain）に於いて発表

醸造用麹菌における熱ショックタンパク質遺伝子を利用したプロテアーゼ高生産株の育種

柏木 豊

Expression of a protease gene in *Aspergillus oryzae* by a promoter of heat shock protein gene

Yutaka KASHIWAGI

Tokyo University of Agriculture
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8502 Japan

緒言

本研究では、味噌醸造用麹菌 *Aspergillus oryzae* において熱誘導遺伝子プロモーターを用いたプロテアーゼ高生産性株を遺伝子工学的方法により作成し、高温における遺伝子発現誘導機構の解明を行うことを目的とする。味噌、醤油、清酒などの醸造に用いられる麹菌 *A. oryzae* は、固体培養においてプロテアーゼ、アミラーゼなどの酵素を多量に生産する。清酒麹においては製麹工程後期に品温を高温とすることにより α -アミラーゼ生産を促進する温度管理が行われ¹⁾、味噌麹におけるプロテアーゼ生産は高温の製麹で抑制されるため、低温の温度管理が行われている²⁾。製麹工程の温度管理によって酵素生産性が大きく異なることは、酵素遺伝子の発現において温度制御機構が存在することが考えられる。味噌麹のプロテアーゼ生産性向上のための基礎的知見を得ることを目的として、麹菌の熱誘導性タンパク質（熱ショックタンパク質、HSP）遺伝子のプロモーター領域を用いてプロテアーゼ遺伝子の高発現組換え株

を作出するとともに、これを用いて高温における遺伝子発現制御機構を解明する。

2005年に麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40株の全ゲノム情報が解読され公開されている³⁾。同時に近縁菌として米国、EUにおいて *A. nidulans* 及び *A. fumigatus* のゲノム情報が解読され^{4,5)}、*Aspergillus* 属糸状菌の遺伝子情報の利用は容易となった。また、味噌用麹菌等における有用遺伝子の解析は、麹菌ゲノム情報を利用した研究進展が期待されている。

熱誘導タンパクHSPの遺伝子機能解析は、動物物において研究が進んでいるが、*A. oryzae* においては、HSP遺伝子プロモーターの構造解析の研究としてMatsushitaらの報告⁶⁾があるのみで、ほとんど研究が進んでいない。

一方、組換えDNA技術による異種タンパク質遺伝子の高発現には、*amyB*⁷⁾、*glaA*⁸⁾、*agdA*⁹⁾、*melO*¹⁰⁾、*tefI*¹¹⁾、*enoA*¹²⁾等の遺伝子プロモーターの利用があり、これらは固有の誘導物質を必要とする。これに対してHSPプロモーターによる遺伝子発現は温度変化のみにて発現制御が可能であり

有用と考えられるが、その研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、高温誘導性遺伝子プロモーターと麹菌アスパルチルアミノペプチダーゼ遺伝子*dapA*¹³⁾との融合遺伝子を麹菌に形質転換し、その遺伝子発現について検討するとともに、融合遺伝子の遺伝子導入形式について検討した。

熱ショックタンパク質誘導因子 (HSF) 遺伝子を高発現させることにより、高温誘導遺伝子の発現誘導を高めることが考えられる。そのためには、HSF遺伝子の他に、HSPプロモーターに連結した酵素遺伝子等の複数遺伝子の導入が必要と考えられ、多重の遺伝子導入系が必要となる。これには形質転換宿主株として*pyrG* 遺伝子破壊株の利用が知られている¹⁷⁾。そこで本研究においては、*A. oryzae* RIB40株に対する遺伝子破壊による、ウラシル要求性株 $\Delta pyrG$ 株の創成を検討した。

方法

菌株と培地

麹菌*Aspergillus oryzae* RIB40株および米白株を遺伝子源ならびに形質転換用宿主菌として用いた。大腸菌*Escherichia coli* DH5 α をプラスミド調製等の分子生物学実験操作に用いた。*A. oryzae* は、potato-dextrose agar (PDA) 培地上に接種し、30°Cにて生育させた。*A. oryzae* 形質転換株の選択培地として、ピリチアミン添加Czapeck-Dox培地 (PT-CD培地, 0.1 μ g/L pyrithiamine, 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 10mg/L FeSO₄·7H₂O, 3% Glucose, 2% Agar) および5-FOA添加CD培地 (5FOA-CD) とウラシル添加CD培地を用いた。

E. coli 培養には、LB培地 (1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) を用い、必要に応じて抗生物質を添加した。

形質転換と形質転換菌の選択

A. oryzae の形質転換には、プラスミドベクター pPTRI (タカラバイオ) を用いた。本ベクターは*Aspergillus* 属糸状菌細胞内では自律的に複製

せず、染色体に組み込まれた状態でのみ安定に保持される。選択マーカーとしてピリチアミン耐性遺伝子*ptrA*¹⁴⁾を含み、この遺伝子が麹菌に組み込まれるとピリチアミン耐性の形質転換コロニーが得られる。

A. oryzae の形質転換は、五味らの方法¹⁵⁾に従って行った。すなわち、*A. oryzae* RIB40をCD液体培地に接種し、30°Cにて振とう培養を行い、生育した菌糸を滅菌ミラクロス (Carbiochem) にてろ過集菌し、滅菌水にて洗浄した。集菌した菌糸をプロトプラスト化液 [0.015g/mL Yatalase (タカラバイオ), 0.005g/mL CELLULASE “ONOUZUKA” R-10 (ヤクルト) を含む0.8M NaCl - 10mM Na Phosphate Buffer (pH6.0)] に懸濁し、30°Cにて緩やかに振とうして溶菌を行い、同緩衝液にて洗浄し、プロトプラストを得た。プロトプラスト-PEG4000法による形質転換を行い、ピリチアミン耐性コロニーを検索した。

ウラシル要求性変異株は、5-fluoroorotinic acid (5-FOA) 添加CD培地を用いて、生育する麹菌コロニーを分離し、ウラシル栄養要求性株を検索した。

プラスミドの構築

麹菌の熱ショックタンパク質遺伝子*hsp30*プロモーター⁶⁾の-1~-476bp領域を、麹菌ゲノムDNAを鋳型として、PCR用プライマー、P-d9; 5' CAAGCTAGCGTTGATCTGGAG-GTC3', および P-hsp30Pro3_DAP14475R; 5' GGCGATTTTCGAAGTCATTTTGGC-TGTGTGTTGAGGTAG3', を用いて増幅した。麹菌のアスパルチルアミノペプチダーゼ遺伝子*dapA*のコード領域 (1970bp) を、麹菌ゲノムDNAを鋳型として、プライマーP-hsp30Pro3_DAP14475F; 5' CAACACACAGCCAAAATGACTTCGAAAA-TCG-CCCAAAATTTG3', およびP-DAP14473R; 5' GCCTATGTCAAAGTTTCTAATAAC3', を用いて増幅した。増幅された各断片を混合し、プライマー P-d9およびDAP14473Rを用いてフュージョンPCRを行い、*hsp30*プライマー領域と*dapA*領域の融合遺伝子*hsp30Pro-DAP*を作成した (図1)。プラスミドベクター pPTRI (タカラ

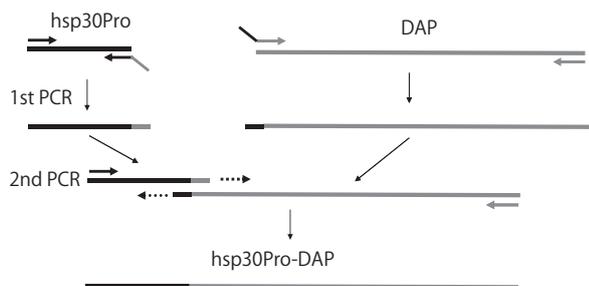


図1 フュージョンPCRによる融合遺伝子の作成

1st PCRによって、末端部分にオーバーラップ領域を付加してそれぞれの目的の遺伝子領域を増幅し、2nd PCRによって融合遺伝子を増幅した

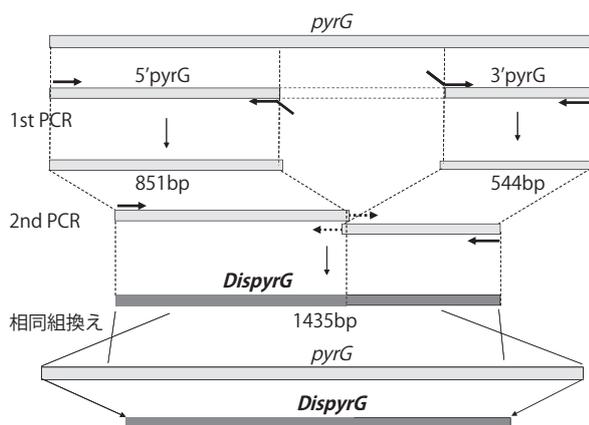


図2 *DispyrG*遺伝子の作成と相同組換えの概要

バイオ)のSmaIサイトに融合遺伝子P-hsp-dapを連結し、組換えプラスミドpPTRI-Phsp-dapを作成した。

麹菌ゲノムデータベースから得られたオロチジ-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(*pyrG*) (DOGAN, ID AO090011000868) データを参考にし、プライマー AoODC_F ; 5' GAGGATCCCTGGTGGTTCTCCACTTG3' および AoODC_R ; 5' CTGAATTTCGAGATG-ATCCAATCAC3' を用いて *pyrG* 領域 (3kb) をPCRにより増幅した。

pyrG 遺伝子の5' 側領域 (851bp) をプライマー AoODC_P5 ; 5' TATGTCGACCAAGCCGCTG-CTGGAATTGA3' , AoODC_P6 ; 5' GGTATGCATCCAGAATACTGCAGTTGATG3' を用い、3' 側領域 (544bp) をプライマー AoODC_P7 ; 5' GCAGTATTCTGGATGCATACCTGAAG-CGT3' , AoODC_P8 ; 5'

CAAAAGCTTATCAATACCGTACGGGAGAT 3' を用いて増幅し、各増幅断片をテンプレートとし、プライマー AoODC_P5およびAoODC_P8を用いてフュージョンPCRを行い、*pyrG* 遺伝子破壊用断片 *DispyrG* (1435bp) を作成した (図2)。これをプラスミドベクター pTA2に組み込み、遺伝子破壊用プラスミド pTA2-DisPyrGj を作成した。

PCR

DNA断片のPCR増幅は、Pfu-X DNA polymerase (グライナー) を用い、添付のプロトコルに従って反応条件を設定して反応をおこなった。

酵素活性の測定

本酵素の活性測定は、基質としてGlu-pNA (Glutamyl ρ -nitroanilide) を用い、酵素反応によって遊離する ρ -nitroanilide (ρ NA) を405 nmの吸光度によって定量した。酵素活性の1単位は1分間に1 μ moleの ρ NAを遊離する酵素量とした。

タンパク質定量

タンパク質は、Pierce BCA Protein Assay Kit (タカラバイオ) を用い、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として測定した。方法は、添付のプロトコルに従って行った。

DNAシーケンス

DNAシーケンスは、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) によってシーケンス反応を行い、ABI 3730xl Analyzer (ABI) によって塩基配列解析を行った。シーケンス解析は、株式会社マクロジェンジャパンによって行われた。

結果と考察

遺伝子のクローニングと組換えプラスミドの構築

麹菌 *A. oryzae* RIB40株は、独立行政法人酒類総合研究所において保存菌株であり、種々の菌株

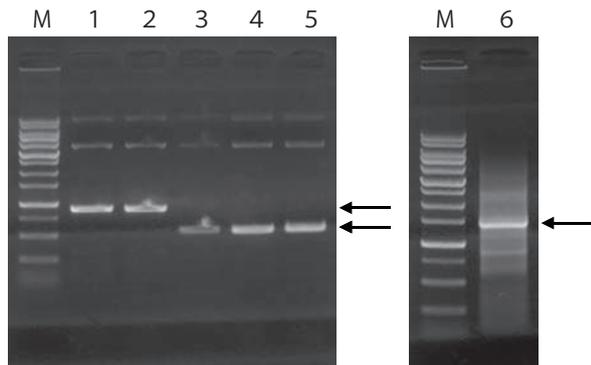


図3 *DispyrG*遺伝子の作成
 レーン1, 2, 3, 4, 5; 1stPCR産物,
 6; 2ndPCR産物, M; 1kbラダーマーカー

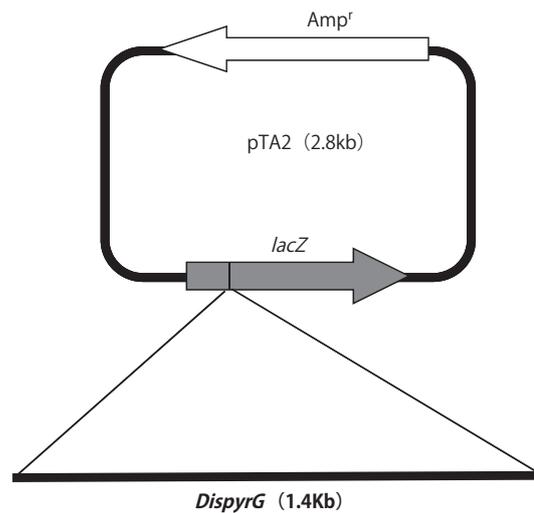


図4 組換えプラスミドpTA2-*DispyrG*の概要
 ベクターpTA2のlacZ内部のSmaIサイトにPCRによって、
 作成したDispyrGを組み込んだ

の中でも、野生株に近いものと考えられている。本菌株は、清酒、甘酒、味噌等の発酵食品製造において実用株としての使用が可能であるとされ、麹菌ゲノム解析の対象菌株として全ゲノム配列が解明されており、麹菌の遺伝子資源として研究において有用な菌株である。

麹菌 *A. oryzae* RIB40株のゲノムDNA70ngを鋳型DNAとして、*hsp30* プロモーターに対応する467bp増幅断片およびDAP酵素遺伝子をコードする1970bp増幅断片を取得した。得られた *hsp30* プロモーター断片とDAP遺伝子断片を混合し、プライマー P-d9およびP-DAP14473Rを用いてフュージョンPCRを行い、PCR産物として約2.47kbの融合遺伝子 *hsp30Pro-DAP* を取得した(図3B)。得られた融合遺伝子のDNAシーケンスを解析し、配列置換がないことを確認した。*hsp30Pro-DAP* をpPTRIのSmaIサイト連結し、組換えプラスミド pPTRI-P-*hsp30-DAP* を構築した。

pyrG 遺伝子破壊ベクターの構築

領域を麹菌ゲノムデータベースから得られたオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (*pyrG*) (DOGAN, ID AO090011000868) データを参考にして、プライマー AoODC_F; および AoODC_Rを用いて *pyrG* 領域 (3kb) をPCRにより増幅した。

pyrG 遺伝子の5' 側領域 (851bp), 3' 側領域 (544bp) を増幅し、各増幅断片をテンプレートとし、プライマー AoODC_P5およびAoODC_P8

を用いてフュージョンPCRを行い、*pyrG* 遺伝子破壊用断片 *DispyrG* (1435bp) を作成した(図3)。これをプラスミドベクター pTA2に組み込み、遺伝子破壊用プラスミド pTA2-DisPyrGを構築した(図4)。

組換え麹菌の選択

麹菌 *A. oryzae* のプロトプラスト 4×10^7 に対して、組換えプラスミド pPTRI-*hsp30Pro-DAP* の16 μg を添加して形質転換を行い、PT-CD培地上にピリチアミン耐性 (PTr) コロニーが生育した。全形質転換コロニー数は約50コロニーであり、形質転換率は約3.12コロニー/ μg であった。pPTRIによる形質転換率は約6.6コロニー/ μg との報告¹⁶⁾があり、本実験における形質転換率は、やや低いものの既報とほぼ同等の値であった。これらの菌株について菌体抽出液のグルタミンアミノペプチダーゼ活性を測定した。

pyrG 遺伝子破壊プラスミド pTA-*DispyrG* を *A. oryzae* RIB40プロトプラストに対して形質転換し、5-FOA添加CD寒天培地上にて、5-FOA耐性コロニーを生育させ、形質転換コロニー21株を取得した。得られた形質転換コロニーについて、ウラシル要求性を確認したところ、ウラシル添加CD培地にのみ生育することが確認されたことから、ウラシル要求性株が得られ、ウラシル要

7日目におけるアスパルチルアミノペプチダーゼ活性測定

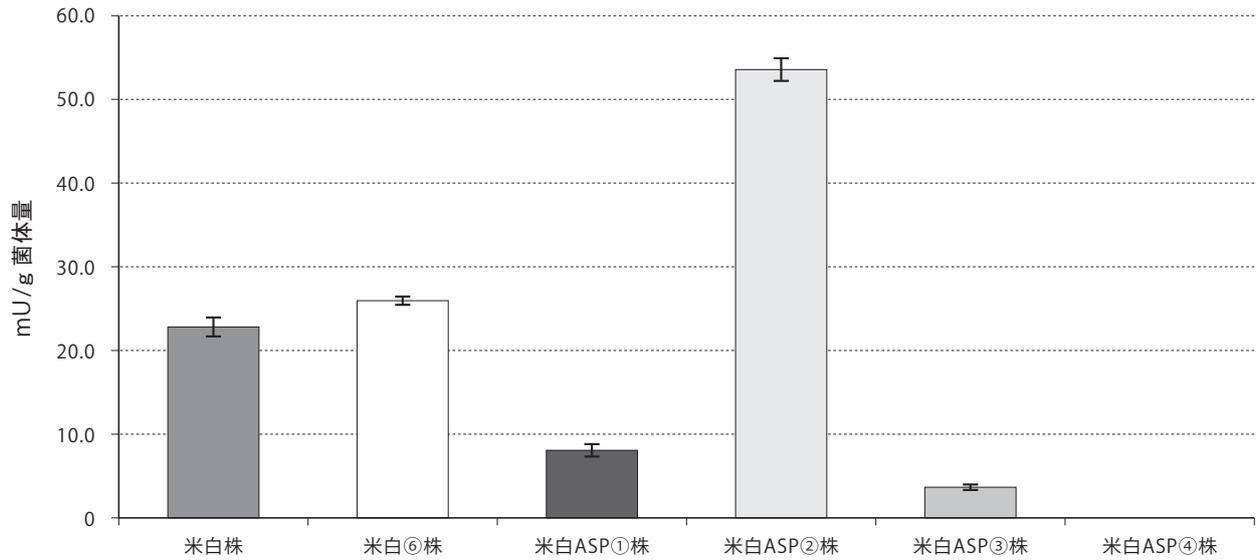


図5 形質転換株の菌体重量当たりの酵素活性の比較

求性相補による形質転換系の宿主株の創成に成功した。同時に、麴菌の *pyrG* 遺伝子のPCRクローニングにも成功している。

DAP酵素生産株の取得

組換え麴菌をCD液体培地に接種し、30℃ および37℃ にて5日間振とう培養を行い、培養菌体を取得した。培養菌体を液体窒素存在下乳鉢にて

粉碎し、菌体抽出液の酵素活性を測定したところ、4株について酵素活性が検出されたため、それぞれをAsp①～④株とした。米白株を対照として、菌体量当たりの酵素活性を比較したところ、Asp②株が対照株よりも約4倍の酵素生産性を示した(図5, 6)。酵素生産性が高いことから形質転換による *dap* 遺伝子の導入に成功したと考えられる。続いて、Asp①～④株についてコロニーPCRによってPhsp-*dap*融合遺伝子の増幅を行ったところ、融合遺伝子断片の増幅は観察されなかった。融合遺伝子領域の増幅が検出されなかったことは、染色体に組込まれた融合遺伝子に何らかの変異が生じたことが原因の一つと考えられ、今後検討する必要がある。

培養温度条件の変化によるアスパルチルアミノペプチダーゼ活性測定

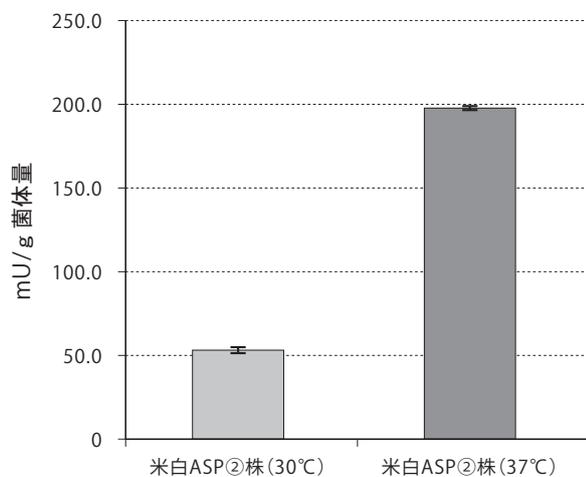


図6 培養温度による酵素活性生産の影響

形質転換株ASP②株30℃及び37℃培養し、菌体抽出液の酵素活性を比較した

謝 辞

本研究は、平成23年度社団法人中央味噌研究所研究助成によって実施されたものである。

参考文献

- 1) 村上英也編著, 麴学, 日本醸造協会, pp.218 (1986)
- 2) 村上英也編著, 麴学, 日本醸造協会, pp.259

- (1986)
- 3) M. Machida et al., *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)
- 4) J. E. Galagan et al., *Nature*, 438, 1105-1115 (2005)
- 5) W. C. Nierman et al., *Nature*, 438, 1151-1156 (2005)
- 6) M. Matsushita et al., *J. Biosci. Biotechnol.*, 107, 345-351 (2009)
- 7) S. Tada et al., *Mol. Gen. Genet.*, 229, 301-306 (1991)
- 8) Y. Hata et al., *Gene*, 108, 145-150 (1992)
- 9) T. Minetoki et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1516-1521 (1995)
- 10) H. Ishida et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 85-92/131-137 (2001)
- 11) N. Kitamoto et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 85-92 (1998)
- 12) T. Toda et al., *Curr. Genet.*, 40, 260-267 (2001)
- 13) K. I. Kusumoto et al., *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1711-1719 (2008)
- 14) T. Kubodera et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64, 1416-1421 (2000)
- 15) K. Gomi et al., *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2549-2555 (1987)
- 16) http://catalog.takara-bio.co.jp/product/tech_info_detail2.asp?unitid=U100004022&masterid=M100002019 (2011. 10. 15)
- 17) J. Maruyama, et al., *Biotechnol. Lett.*, 30, 1811-1817 (2008)

味噌汁摂取量と動脈硬化の関連に関する疫学的検討

— 大迫研究 —

菊谷昌浩¹, 佐藤倫広², 大久保孝義³, 坪田恵⁴, 目時弘人¹, 戸恒和人³, 今井潤²

- 1) 東北メディカルメガバンク機構 予防医学・疫学部門
- 2) 東北大学大学院薬学研究科 医薬開発構想寄附講座
- 3) 滋賀医科大学社会医学講座 公衆衛生部門
- 4) 国立健康栄養研究所
- 5) 東北福祉大学総合福祉学部産業福祉学科

Epidemiological association of miso soup with atherosclerosis
— the Ohasama study —

Masahiro KIKUYA¹, Michihiro SATOH², Takayoshi OHKUBO³, Megumi TSUBOTA⁴,
Hirohito METOKI¹, Kazuhito TOTSUNE⁵ and Yutaka IMAI²

¹ Department of Preventive Medicine and Epidemiology, Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University,.

2-1, Seiryō-cho, Aoba-ku Sendai, Miyagi 980-8575, Japan

² Department of Planning for Drug Development and Clinical Evaluation, Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences.

6-3, Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

³ Department of Health Science, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan.

Seta Tsukinowa-cho, Otsu, Shiga 520-2192, Japan

⁴ National Institute of Health and Nutrition.

1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan

⁵ Department of Social Welfare, Faculty of Synthetic Welfare, Tohoku Fukushi University, Aoba-ku, Sendai, Japan

1-8-1 Kunimi, Aoba-ku, Sendai 981-8522, Japan

背景

塩分過剰摂取は高血圧の原因として広く知られており、減塩が世界的に推進されている。しかし、本邦の塩分摂取量は依然10 g/日を下回らず、欧米の塩分摂取量（8 g/日）や世界保健機構が掲げる減塩目標値（6 g/日）と比較しても

未だに塩分摂取過剰である。

塩分摂取過剰は、高血圧ひいては動脈硬化と関連することが報告されており^{1,2)} これまで本邦の減塩手段として、味噌汁の安易な制限が行われてきた。しかし、味噌には単に塩分だけではなく、高血圧や動脈硬化を抑制するとされるカリウムやイソフラボンが含まれている。実際、動物実験に

て、味噌自体が高血圧を予防する可能性が示唆されている。^{3),4)} また、一般地域住民を対象とした我々の研究において、味噌汁摂取頻度が多いほど家庭血圧に基づく高血圧の有病率が低率である傾向が、2011年度の中央味噌研究所研究助成の成果として報告されている。⁵⁾ 従って、味噌汁摂取は高血圧、さらには高血圧が一因である動脈硬化や臓器障害を抑制する可能性が考えられる。しかし、味噌汁と動脈硬化の関連を明確に示した疫学研究は存在しない。

動脈硬化の一つの指標として、頸動脈内膜中膜壁厚 (IMT: intima-media thickness) が挙げられる。IMTとは、三層構造を持つ頸動脈壁の内膜と中膜を併せた厚さであり、高血圧や糖尿病、脂質異常などの古典的な危険因子との関連性や、冠動脈および末梢動脈疾患との相関が示されている。^{6),7)} さらに、多くの前向き研究においても、頸動脈病変は脳心血管疾患発症のリスクとなることが報告されている。^{8),9)}

以上から本研究の目的は、一日の平均味噌汁摂取量 (味噌汁摂取頻度) と動脈硬化の指標であるIMTとの関連を検討することとした。

方法

対象

本研究は大迫研究の一環である。^{10),11)} 大迫研究とは1986年に開始された岩手県花巻市大迫町の一般地域住民を対象とした高血圧・循環器疾患に関するコホート研究である。対象者は、大迫町在住の55歳以上の一般地域住民のうち、2011年以降の高齢者健診を受診し、同意の得られた131名である。このうち、味噌汁に関するアンケートの回答が得られなかった4名、頸動脈エコー検査を実施しなかった2名を除外した125名を解析対象者とした。

味噌汁摂取頻度

味噌汁摂取頻度を計るにあたり、摂取頻度および一日摂取量を、面接形式のアンケートにて調査した。摂取頻度を「ほとんど飲まない」、「月に1

表 1. 味噌汁の摂取日数

味噌汁をどのくらいの頻度で飲みますか？	頻度
ほとんど飲まない	0
月に1～3日	0.07
週に1～2日	0.214
週に3～4日	0.5
週に5～6日	0.786
毎日飲む	1

表 2. 味噌汁の一日摂取量

朝・昼・夕食あわせて、一日におよそ何杯飲みますか？	杯数
1杯未満	0.5
1杯	1
2杯	2
3杯	3
4杯	4
5杯	5
6杯	6
7～9杯	8
10杯以上	11

～3日」、「週に1～2日」、「週に3～4日」、「週に5～6日」、および「毎日飲む」の選択肢から、また、一日摂取量を「1杯未満」、「1杯」、「2杯」、「3杯」、「4杯」、「5杯」、「6杯」、「7～9杯」、および「10杯以上」の選択肢から、表1および表2に示す換算値によって算出した。これらの値を基に、味噌汁摂取頻度 (杯/日) を「頻度×杯数」として算出した。算出された味噌汁摂取頻度によって対象者を、味噌汁≤1杯/日群、味噌汁2杯/日群、および味噌汁≥3杯/日群の3群に分類した。

頸動脈エコー検査

頸動脈エコー検査は、2名の熟練した医師により、下記の標準化された方法に基づいて評価された。エコー断層装置は、Toshiba Sonolayer SSA-250A、および7.5 MHzアニュアレイ型Bモード超音波プローブ (エコー距離分解能: 0.25 mm) を用いた。IMTを、座位にて測定し、プラークによる肥厚を除外した、各領域での最大の内膜中膜複合体の厚さと定義した。^{8),12),13)} 左右およびnear wall, far wallのIMTを3方向 (前斜位, 側方位, 後斜位) から測定し、各壁において、頸動脈分岐部よりおよそ1 cm 心臓側での最大IMT

を検出した。本研究では、先行研究に準じて、左右および near wall, far wall の計 4 ポイントにおける最大IMTの平均 (mean IMT) を指標とした。なお、欠損値がある場合は、残りの地点の最大IMTの平均とした。

血圧測定

家庭血圧測定には、HEM747ICN (Omron Health-care, Kyoto, Japan)¹⁴⁾ を用いた。日本高血圧学会の指針¹⁵⁾ に従い、起床後 1 時間以内、排尿後、朝食前、服薬前、座位 2 分間の安静後の条件下で測定された。家庭血圧は、4 週間にわたって測定された朝 1 機会 1 回目の全測定の平均値とした。

随時血圧測定は、健診時に少なくとも 2 分間の安静後、座位で 2 回行われ、その平均値を随時血圧と定義した。測定装置には、自動血圧計 (HEM 907; Omron Healthcare Co. Ltd)¹⁶⁾ を用いた。

本研究では、日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン 2009 の基準に基づき¹⁷⁾、家庭高血圧を家庭血圧 $\geq 135/85$ mmHg または降圧薬服用、随時高血圧を随時血圧 $\geq 140/90$ mmHg または降圧薬服用と定義した。

統計解析

味噌汁摂取頻度と基礎特性の関連は、性別および年齢で補正後の共分散分析 (ANCOVA: analysis of covariance) および多重ロジスティック回帰分析を適宜用いて解析された。味噌汁摂取頻度と高血圧有病の関連の検討は、性別、年齢、および各種危険因子 (body mass index, 喫煙習慣, 飲酒習慣, 高脂血症既往, 糖尿病既往, 脳心血管疾患既往歴) を補正項目として加えた多重ロジスティック回帰分析によって解析された。味噌汁摂取頻度と Mean IMT の関連は、補正項目として上記の項目の他に家庭収縮期血圧および降圧薬服用を追加した ANCOVA によって解析された。

結果

味噌汁摂取頻度別による基礎特性と家庭高血圧有病

対象者特性を表 3 に示す。味噌汁 ≤ 1 杯/日群は 30 名 (24.0%)、味噌汁 2 杯/日群は 56 名 (44.8%)、および ≥ 3 杯/日以上群は 39 名 (31.2%) であった。平均年齢は 68.6 ± 7.1 歳、女性は 76 名 (60.8%)、body mass index は 23.8 ± 3.2 kg/m²、およ

表 3. 対象者の基礎特性

平均値 \pm SD	味噌汁摂取頻度				性別・年齢補正後 P
	全体 (n=125)	≤ 1 杯/日 (n=30)	2 杯/日 (n=56)	≥ 3 杯/日 (n=39)	
女性, % *	60.8	76.7	62.5	46.2	0.03
年齢, 歳 *	68.6 ± 7.1	66.8 ± 7.6	69.5 ± 6.8	68.9 ± 6.9	0.2
Body mass index, kg/m ²	23.8 ± 3.2	24.6 ± 3.8	23.3 ± 3.0	23.8 ± 3.1	0.1
脳心血管疾患既往歴, %	13.6	6.7	16.1	15.4	0.4
糖尿病, %	14.4	13.3	12.5	17.9	0.7
高脂血症, %	44.8	63.3	44.6	30.8	0.04
喫煙, %	13.6	16.7	8.9	17.9	0.4
飲酒, %	43.2	36.7	42.9	48.7	0.9
降圧薬服用, %	53.6	66.7	55.4	41.0	0.006
家庭血圧					
収縮期, mmHg	133.1 ± 12.9	130.6 ± 11.3	132.8 ± 13.7	135.4 ± 12.9	0.8
拡張期, mmHg	76.4 ± 8.4	76.0 ± 8.6	76.8 ± 8.4	76.1 ± 8.5	0.6
高血圧, %	67.2	73.3	69.6	59.0	0.048
随時血圧 (122名)					
収縮期, mmHg	138.7 ± 18.8	138.9 ± 18.4	134.3 ± 18.3	145.2 ± 18.4	0.03
拡張期, mmHg	74.3 ± 10.4	74.1 ± 9.8	74.1 ± 11.1	74.7 ± 10.2	0.8
高血圧, %	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.7

* 性別・年齢で補正は行っていない。

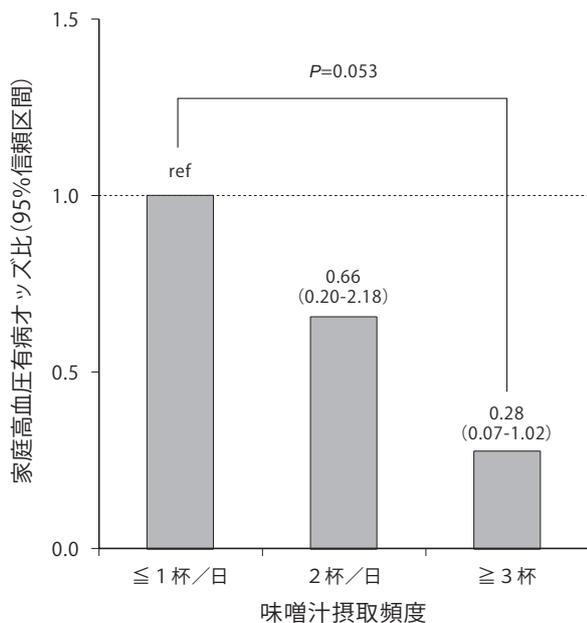


図1. 味噌汁摂取頻度と家庭高血圧有病との関連

味噌汁摂取頻度 ≤ 1 杯/日未満を基準とした、性別、年齢、body mass index、喫煙習慣、飲酒習慣、高脂血症既往、糖尿病既往、および脳心血管疾患既往歴で補正後の家庭高血圧有病オッズ比(95%信頼区間)を示す。家庭高血圧を、家庭血圧 $\geq 135/85$ mmHgまたは降圧薬服用と定義している。解析には多重ロジスティック解析を用いた。

びmean IMTは 0.648 ± 0.083 mmであった。味噌汁摂取頻度が高値となる毎に、女性の割合が有意に低値であった。一方、性別・年齢補正後、高脂血症、降圧薬服用、および家庭高血圧有病の割合は有意に低値であった。随時収縮期血圧と味噌汁摂取頻度の関連は有意であったが、2杯/日群で随時収縮期血圧が最も低値と一貫した関連は認められなかった。

前回の報告⁵⁾の再現性を確立するため、味噌汁摂取頻度と家庭高血圧有病の関連を解析した。各種因子補正後、味噌汁摂取頻度が高値となる毎に、家庭高血圧有病オッズ比が低値となる傾向が認められた(図1)。同様の解析を随時高血圧有病に関しても行ったが、味噌汁 ≤ 1 杯/日群を基準としたときの随時高血圧有病オッズ比は、味噌汁2杯/日群で0.61(95% C.I.: 0.19-1.98, $P=0.4$)、および ≥ 3 杯/日以上群で0.79(95% C.I.: 0.21-2.92, $P=0.7$)と、有意な関連は認められなかった。

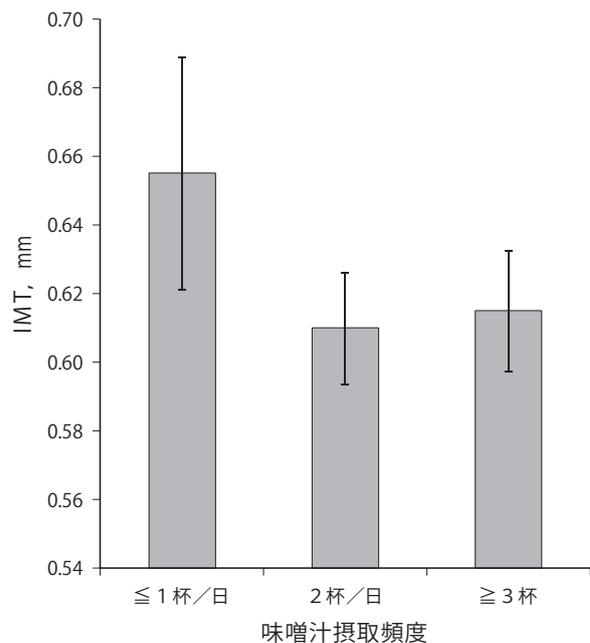


図2. 女性76名における、味噌汁摂取頻度とIMT (mm)の関連

性別、年齢、body mass index、喫煙習慣、飲酒習慣、高脂血症既往、糖尿病既往、脳心血管疾患既往歴、降圧薬服用および家庭収縮期血圧で補正後の平均値 \pm 標準誤差(エラーバー)を示す。ANCOVA $P=0.09$ 。

味噌汁摂取頻度とmean IMT

各種因子、降圧薬服用、および家庭収縮期血圧で補正後の平均mean IMT \pm 標準誤差は、味噌汁 ≤ 1 杯/日群で 0.666 ± 0.014 mm、味噌汁2杯/日群で 0.642 ± 0.010 mm、 ≥ 3 杯/日以上群で 0.641 ± 0.012 mmと、味噌汁摂取頻度が高値となる毎にmean IMT低値となる傾向を示したが、有意差は認められなかった(ANCOVA $P=0.4$)。一方で、性別による層別解析を行ったところ、有意ではなかったものの、女性においてのみ、味噌汁摂取頻度とmean IMTが負に関連する傾向を示した(ANCOVA $P=0.09$) (図2)。男性においては、味噌汁摂取頻度とmean IMTの一貫した関連が認められなかった(味噌汁 ≤ 1 杯/日群: 0.649 ± 0.034 mm, 味噌汁2杯/日群: 0.693 ± 0.016 mm, ≥ 3 杯/日以上群: 0.684 ± 0.018 mm, ANCOVA $P=0.5$)。性別と味噌汁摂取頻度のmean IMTに対する有意な交互作用は認められなかった($P=0.3$)。

考 察

本研究において、味噌汁摂取頻度と家庭高血圧有病が負に関連する傾向を示した。また、女性において、味噌汁摂取頻度とmean IMTは負に関連する傾向を示した。

過去に我々は、1997年のデータを用いて味噌汁摂取頻度が多い群ほど、家庭高血圧有病率が低率であることを示している。⁵⁾ 同様の関連が、2011年度以降のデータを用いた本研究においても認められたことから、味噌汁摂取頻度が高値となる毎に家庭高血圧有病率が低下するという結果の再現性が示された。また、前回の報告⁵⁾と同様に、味噌汁摂取頻度と随時高血圧有病が関連する傾向は認められなかった。随時血圧は医療環境下という特殊な状況における血圧であり、白衣効果などのバイアスが加わった血圧である。¹⁸⁾ 一方、家庭血圧は、随時血圧に比べ、白衣効果などのバイアスを含まず¹⁹⁾、再現性が良好で¹¹⁾、予後予測能においても優れており²⁰⁾、信頼性の高い血圧として知られている。従って、味噌汁摂取頻度と高血圧との関連は、家庭血圧のような非医療環境下の血圧測定に基づいて検討されることで、より明瞭に検出される可能性が考えられる。²¹⁾ 正常血圧者445名を対象とした先行研究において、味噌汁2杯/日以上摂取が、4年後の高血圧発症率と負に関連したことが示されている。²¹⁾ しかし、これは随時血圧に基づく結果であり、味噌汁摂取頻度と高血圧発症の関連が過小評価されている可能性が考えられる。²¹⁾ 今後は、味噌汁摂取が高血圧発症を真に抑制するかを証明するため、非医療環境下の血圧に基づく縦断的な検討が望まれる。

本研究において、女性でのみ、味噌汁摂取頻度は、mean IMT低値と関連する傾向を示した。また、この関連は家庭収縮期血圧および降圧薬服用とは独立した関連であった。我々が知る限り、味噌汁摂取頻度とmean IMTなどの動脈硬化指標の関連を報告した研究は存在しない。本研究は、女性における、味噌汁摂取頻度とmean IMTの負の関連を示した初めての疫学研究であるといえる。

一方で、味噌汁摂取頻度とmean IMTの一貫した傾向は、男性では認められなかった。味噌の原

料は大豆であり、大豆に多く含まれるイソフラボン²²⁾は女性ホルモンであるエストロゲン様の作用を示すことで血管内皮障害を抑制する可能性が示されている。²²⁾ エストロゲンは、血管内皮における一酸化窒素の産生によって直接的に、または血清LDLコレステロールを抑制することで間接的に抗動脈硬化作用を示すことが知られている。²³⁾ 閉経後の女性を対象とした先行研究において、大豆イソフラボンが、一酸化窒素介在の血管拡張作用を有している可能性が報告されている。^{24),25)} 本研究の対象者は、既に閉経期をむかえていると考えられる55歳以上の女性である。従って、味噌汁摂取は大豆イソフラボンのエストロゲン様作用によって、閉経などエストロゲンが欠乏している女性の動脈硬化を抑制している可能性が考えられる。しかしながら、大豆イソフラボン摂取が動脈硬化抑制とは関連しないことを示唆する報告も存在している。^{26),27)} また、本研究における味噌汁摂取頻度と性別のmean IMTに対する交互作用が有意ではなかったことから、味噌汁摂取と動脈硬化に関するさらなる基礎および臨床研究が必要と考えられる。

本研究はいくつかの研究限界を有する。まず、本研究は、横断的検討であるため、味噌汁摂取と高血圧および動脈硬化との間の因果関係について言及することができない。つまり、「高血圧や各種脳心血管疾患リスクを有しているために、味噌汁の摂取を控えている」という要因が含まれている可能性がある。次に、本研究は、東北地方の一地域における一般地域住民を対象に実施されているため、本研究の結果を他の地域あるいは異なる人種に対してそのまま適応することは適切ではない可能性がある。さらに、アンケート調査であるため、味噌汁摂取頻度・一日摂取量が過小申告されている可能性がある。よって、味噌汁摂取頻度とmean IMTの負の関連が過小評価されている可能性がある。今後は、陰膳調査などによって実際の味噌汁摂取量を調査したうえでの検討が望まれる。

結論と展望

女性において、味噌汁摂取頻度は動脈硬化の指標であるmean IMTと負に関連する傾向が示された。味噌汁摂取は、特に女性において、高血圧および動脈硬化に対して防御的に働いている可能性が考えられる。味噌汁摂取が高血圧および動脈硬化を抑制するという因果関係を確立するために、さらに多くの対象者を含んだ縦断的な検討が望まれる。また近年では、大豆が生活習慣病を予防すると報告されていることから²⁹⁾、味噌汁摂取が各種生活習慣病、さらには腎障害、無症候性脳血管障害、および脳卒中などの臓器障害を抑制し、最終的に予後を改善するかを検討する必要がある。以上の関連は、追跡調査を継続している大迫研究によって解析可能であり、今後も検討を続けていきたい。

謝 辞

本研究の遂行にご協力くださった社団法人中央味噌研究所 赤羽総一郎理事長、中野京子理事を始め、各関係者の方々に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) He FJ, MacGregor GA. Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *J Hum Hypertens* 2002; 16:761-770.
- 2) Jablonski KL, Gates PE, Pierce GL, Seals DR. Low dietary sodium intake is associated with enhanced vascular endothelial function in middle-aged and older adults with elevated systolic blood pressure. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2009; 3:347-356.
- 3) 岩下敦子, 高橋裕司, 河村幸雄. 味噌の生理機能. *日本醸造協会誌* 1994; 89:869-872.
- 4) 渡辺敦光, 吉田真衣, 水野久美子, 神谷研二. Dahlの食塩感受性ラットを用いた味噌の高血圧の抑制作用. *味噌の科学と技術* 2007; 55.
- 5) 菊谷昌浩, 佐藤倫広, 坪田恵, 大久保孝義, 目時弘仁, 戸恒和人, 今井潤. 味噌と血圧, 予後および臓器障害に関する疫学研究「味噌汁摂取頻度と家庭血圧の関連」-大迫研究-. *社団法人中央味噌研究所研究助成 報告書* 2011.
- 6) Salonen R, Salonen JT. Determinants of carotid intima-media thickness: a population-based ultrasonography study in eastern Finnish men. *J Intern Med* 1991; 229:225-231.
- 7) Bonithon-Kopp C, Touboul PJ, Berr C, Leroux C, Mainard F, Courbon D, Ducimetiere P. Relation of intima-media thickness to atherosclerotic plaques in carotid arteries. The Vascular Aging (EVA) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:310-316.
- 8) Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96:1432-1437.
- 9) O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340:14-22.
- 10) Kikuya M, Hozawa A, Ohkubo T, Tsuji I, Michimata M, Matsubara M, Ota M, Nagai K, Araki T, Satoh H, Ito S, Hisamichi S, Imai Y. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. *Hypertension* 2000; 36:901-906.
- 11) Ohkubo T, Asayama K, Kikuya M, Metoki H, Hoshi H, Hashimoto J, Totsune K, Satoh H, Imai Y. How many times should blood pressure be measured at home for better prediction of stroke risk? Ten-year follow-up results from the Ohasama study. *J Hypertens* 2004; 22:1099-1104.
- 12) Hara A, Ohkubo T, Kikuya M, Shintani Y,

- Obara T, Metoki H, Inoue R, Asayama K, Hashimoto T, Harasawa T, Aono Y, Otani H, Tanaka K, Hashimoto J, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Detection of carotid atherosclerosis in individuals with masked hypertension and white-coat hypertension by self-measured blood pressure at home: The Ohasama Study. *J Hypertens* 2007; 25:321-327.
- 13) Shintani Y, Kikuya M, Hara A, Ohkubo T, Metoki H, Asayama K, Inoue R, Obara T, Aono Y, Hashimoto T, Hashimoto J, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Ambulatory blood pressure, blood pressure variability and the prevalence of carotid artery alteration: the Ohasama study. *J Hypertens* 2007; 25:1704-1710.
- 14) Imai Y, Abe K, Sasaki S, Minami N, Munakata M, Sakuma H, Hashimoto J, Sekino H, Imai K, Yoshinaga K. Clinical evaluation of semiautomatic and automatic devices for home blood pressure measurement: comparison between cuff-oscillometric and microphone methods. *J Hypertens* 1989; 7:983-990.
- 15) Imai Y, Otsuka K, Kawano Y, Shimada K, Hayashi H, Tochikubo O, Miyakawa M, Fukiyama K. Japanese society of hypertension (JSH) guidelines for self-monitoring of blood pressure at home. *Hypertens Res* 2003; 26:771-782.
- 16) White WB, Anwar YA. Evaluation of the overall efficacy of the Omron office digital blood pressure HEM-907 monitor in adults. *Blood Press Monit* 2001; 6:107-110.
- 17) Ogihara T, Kikuchi K, Matsuoka H, Fujita T, Higaki J, Horiuchi M, Imai Y, Imaizumi T, Ito S, Iwao H, Kario K, Kawano Y, Kim-Mitsuyama S, Kimura G, Matsubara H, Matsuura H, Naruse M, Saito I, Shimada K, Shimamoto K, Suzuki H, Takishita S, Tanahashi N, Tsuchihashi T, Uchiyama M, Ueshima H, Umemura S, Ishimitsu T, Rakugi H. The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2009). *Hypertens Res* 2009; 32:3-107.
- 18) Mancia G, Bertinieri G, Grassi G, Parati G, Pomidossi G, Ferrari A, Gregorini L, Zanchetti A. Effects of blood-pressure measurement by the doctor on patient's blood pressure and heart rate. *Lancet* 1983; 2:695-698.
- 19) O'Brien E, Asmar R, Beilin L, Imai Y, Mallion JM, Mancia G, Mengden T, Myers M, Padfield P, Palatini P, Parati G, Pickering T, Redon J, Staessen J, Stergiou G, Verdecchia P. European Society of Hypertension recommendations for conventional, ambulatory and home blood pressure measurement. *J Hypertens* 2003; 21:821-848.
- 20) Hara A, Ohkubo T, Kikuya M, Shintani Y, Obara T, Metoki H, Inoue R, Asayama K, Hashimoto T, Harasawa T, Aono Y, Otani H, Tanaka K, Hashimoto J, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Detection of carotid atherosclerosis in individuals with masked hypertension and white-coat hypertension by self-measured blood pressure at home: the Ohasama study. *J Hypertens* 2007; 25:321-327.
- 21) Kanda A, Hoshiyama Y, Kawaguchi T. Association of lifestyle parameters with the prevention of hypertension in elderly Japanese men and women: a four-year follow-up of normotensive subjects. *Asia Pac J Public Health* 1999; 11:77-81.
- 22) Siow RC, Mann GE. Dietary isoflavones and vascular protection: activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? *Mol Aspects Med* 2010; 31:468-477.
- 23) Skafar DF, Xu R, Morales J, Ram J, Sowers JR. Clinical review 91: Female sex hormones and cardiovascular disease in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3913-3918.

- 24) Hall WL, Formanuk NL, Harnpanich D, Cheung M, Talbot D, Chowienczyk PJ, Sanders TA. A meal enriched with soy isoflavones increases nitric oxide-mediated vasodilation in healthy postmenopausal women. *J Nutr* 2008; 138:1288-1292.
- 25) Colacurci N, Chiantera A, Fornaro F, de Novellis V, Manzella D, Arciello A, Chiantera V, Improta L, Paolisso G. Effects of soy isoflavones on endothelial function in healthy postmenopausal women. *Menopause* 2005; 12:299-307.
- 26) Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Winston M. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation* 2006; 113:1034-1044.
- 27) Weggemans RM, Trautwein EA. Relation between soy-associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57:940-946.
- 28) Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S. Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I. *Circulation* 2007; 116:2553-2562.
- 29) Zhou JR. Soy and the prevention of lifestyle-related diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31 Suppl 2:S14-19.

味噌・大豆製品摂取量と食生活習慣および生活習慣病との関連を探る臨床疫学研究

酒井 徹

Does miso intake relate to life style and dietary habit ?

Tohru SAKAI

*Department of Public Health and Applied Nutrition,
Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School,
Kuramoto-cho 3-18-15, Tokushima 770-8503 Japan*

一般住民1,460名（男性1,076名，女性384名）を対象として味噌摂取量と身体状況，一般血液生化学検査データ，血中脂肪酸濃度，栄養摂取状況および食行動との関連について解析を行った。男性において味噌摂取量が多い者は，少ない者に比べ，野菜および魚介類の摂取量が多かった。また，味噌摂取量が多い者は血液中のn-3系脂肪酸濃度も高く，魚介類摂取量との関連性が示唆された。味噌摂取が高血圧発症のリスクを上昇させるのか解析を行ったところ，味噌摂取は高血圧発症のリスクを上昇させなかった。同様の結果は女性においても認められた。味噌の摂取状況は，各種栄養素および食品摂取と関連しており，それは特に男性で顕著に認められた。

1 はじめに

大豆製品は，伝統的に日本をはじめとするアジア諸国で多く食されている食品である。大豆製品が注目をされたのは，1990年代に米国国立がん研究所が，食品および食品成分の抗癌効果に関する

研究プログラム「デザイナーフーズプログラム」をスタートさせたことに始まる。この研究は，食品と健康，特にがんをはじめとする疾病の植物性化学物質による予防効果に関するものが中心的課題であり，大豆は最も重要度の高い食品として位置づけられた¹⁾。大豆を多く摂取するアジア地域と欧米では，多くの疾患で発症率が大きく異なっており，その中でもホルモン依存性の悪性腫瘍である乳癌や前立腺癌，骨粗鬆症の発症リスク低下に大豆製品が関わっていることを示す疫学研究が報告されている²⁾。

動物実験やヒト臨床により大豆成分には，脂質代謝，骨代謝や抗腫瘍作用があることが知られている。これまで，大豆および大豆製品に注目した研究は数多く存在するが，大豆の発酵食品である味噌と健康に関する指標に着目し実施された研究は非常に限られている。前年度の研究では，味噌摂取量が多いものが必ずしも血圧が高くない事を示したが，今回は調査対象者を約倍に増やし精度を高めると共に高血圧疾患リスクに関する関連性についても検討を行った。

2 対象と方法

2.1 対象者

徳島県に居住している20歳～60歳代の成人1,460名（男性1,076名，女性384名）を対象とした。本研究は，徳島大学倫理委員会の承認を受け実施された。

2.2 食事調査

食事調査用紙は，各調査施設に郵送し，対象者本人に記入してもらった。検診当日に調査票を持参してもらい，調査担当者が対象者立会いの下，回答確認および調査票の回収を行った。栄養素および食品摂取量は「エクセル栄養君 食事摂取頻度調査FFQg ver.2.0」（建帛社）を使用し算出を行った。味噌の摂取量は，大豆製品に関する聞き取り調査票を作成し，各種大豆製品の写真を示しながら摂取量および摂取頻度について聞き取り調査を行った。

2.3 食行動に関する調査

国民健康栄養調査の生活に関する質問項目を参考に作成された自記式アンケート調査票を，食事摂取頻度調査票と共に対象者に郵送し，回答を得た。

2.4 統計処理

結果は，男女別とし，各種栄養素摂取量などの単純集計および味噌の摂取量と栄養素摂取量・生活習慣等の各因子との関連について，SPSS 16.0J for windowsを用い解析を行った。栄養素・食品群別摂取量については，摂取エネルギーによる影響を除くためエネルギー補正を行った後，解析に供した。味噌の摂取量調査結果より対象者を25パーセント未満（Ⅰ），25パーセントから50パーセント（Ⅱ），50パーセントから75パーセント（Ⅲ）および75パーセント以上（Ⅳ）に分類した。高血圧症の者は収縮期血圧が140 mmHg以上又は拡張期血圧が90 mmHg以上の者とした。各群間の平均値の差については一元配置分散分析，疾患リスクに関してはロジスティック回帰分析を用いて解析を行った。なお，結

果は平均値±標準誤差で示し，統計学的有意水準は5%以下とした。

3 結果・考察

今回の研究では，味噌の摂取量により4群に分類した。男性においては少ない群から多い群の順に摂取量は， 1.8 ± 0.1 g， 4.9 ± 0.1 g， 8.1 ± 0.1 g， 14.5 ± 0.4 g/1,000 kcalであり，女性では 1.2 ± 0.1 g， 3.7 ± 0.1 g， 6.9 ± 0.1 g， 13.4 ± 0.6 g/1,000 kcalであった。まず，男性において解析をしたところ，それぞれの摂取群で，身体状況として年齢，身長，体重，BMI，体脂肪，ウエスト周囲，ヒップ周囲，収縮期血圧および拡張期血圧の値を比較したが，味噌摂取量による差を認めなかった（表1）。血液生化学検査では，サイトカインとしてIL-6，IL-8およびIL-18を測定したが，群間において統計的有意差を認めなかった。さらに一般的な血液生化学検査項目である，CRP，遊離脂肪酸，インスリン，LDLコレステロール，HDLコレステロール，中性脂肪，総コレステロール等をはじめとする19種類の検査項目についても群間比較を行ったが，群間において差を認めなかった。血清中の20種類の脂肪酸について解析を行ったところ，味噌の摂取量が多いものは少ない者に比べてエイコサペンタエン酸，ドコサヘキサエン酸およびドコサペンタエン酸といったn-3系脂肪酸の濃度が高いことが明らかとなった。これらの脂肪酸は血液凝固を抑制し動脈硬化を予防することが示されている脂肪酸である³⁾。これら脂肪酸の供給源は主として魚類であるので魚介類に着目して解析をしてみると味噌の摂取量が多いものは少ない者に比べて魚介類の摂取量が多かった（表1）。また，味噌と各種食品摂取量との相関関係を調べたところ，味噌摂取量と魚摂取量との間に有意な相関関係が認められた（表3）。すなわち，味噌摂取量が多い者はn-3系脂肪酸の血中濃度が高いが，これは魚介類の摂取量が多いことが理由として推察される。食塩摂取は血圧上昇のリスク因子の一つであることは知られている⁴⁾。今回の調査で判明した事は，味噌摂取

表1 味噌摂取量と健康関連指標との関連性 (男性)

	I (n=267)	II (n=267)	III (n=269)	IV (n=268)	統計学的有意差
味噌 (g/1000 kcal)	1.8 ± 0.1*	4.9 ± 0.1	8.1 ± 0.1	14.5 ± 0.4	
(身体状況)					
年齢 (歳)	38.6 ± 0.6	38.7 ± 0.6	41.3 ± 0.6	42.4 ± 0.6	1 vs 3,4 2 vs 3,4
身長 (m)	171.4 ± 0.3	170.8 ± 0.3	170.9 ± 0.3	171.4 ± 0.3	
体重 (kg)	70.2 ± 0.6	70.3 ± 0.7	69.3 ± 0.6	69.9 ± 0.6	
BMI	23.9 ± 0.2	24.0 ± 0.2	23.6 ± 0.2	23.7 ± 0.2	
体脂肪 (%)	22.2 ± 0.5	22.8 ± 0.5	21.9 ± 0.5	22.3 ± 0.5	
ウエスト周囲 (cm)	81.3 ± 0.6	81.9 ± 0.6	81.3 ± 0.6	82.3 ± 0.6	
ヒップ周囲 (cm)	94.6 ± 0.4	94.6 ± 0.4	94.2 ± 0.4	94.6 ± 0.4	
収縮期血圧 (mmHg)	120.8 ± 0.9	122.8 ± 0.9	124.0 ± 0.9	123.9 ± 0.9	
拡張期血圧 (mmHg)	75.4 ± 0.8	76.1 ± 0.7	77.6 ± 0.7	77.5 ± 0.7	
(血液生化学検査)					
IL-6 (ng/ml)	1.23 ± 0.06	1.30 ± 0.10	1.23 ± 0.08	1.17 ± 0.07	
IL-18 (ng/ml)	221 ± 4	210 ± 4	214 ± 4	216 ± 4	
CRP (mg/dl)	0.084 ± 0.155	0.086 ± 0.155	0.119 ± 0.021	0.105 ± 0.02	
遊離脂肪酸 (mEq/L)	475 ± 11	521 ± 41	483 ± 13	523 ± 26	
インスリン (μU/ml)	7.2 ± 0.3	6.9 ± 0.2	6.9 ± 0.3	6.5 ± 0.2	
LDLコレステロール (mg/dl)	119 ± 2	125 ± 2	125 ± 2	123 ± 2	
HDLコレステロール (mg/dl)	56 ± 1	56 ± 1	56 ± 1	56 ± 1	
中性脂肪 (mg/dl)	112 ± 4	111 ± 4	114 ± 4	117 ± 5	
AST (IU/L)	22 ± 1	22 ± 1	24 ± 1	24 ± 1	
ALT (IU/L)	28 ± 1	28 ± 1	30 ± 1	30 ± 1	
γ-GTP (IU/L)	46 ± 3	41 ± 2	46 ± 2	45 ± 2	
総コレステロール (mg/dl)	195 ± 2	200 ± 2	201 ± 2	199 ± 2	
クレアチニン (mg/dl)	0.88 ± 0.07	0.87 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.87 ± 0.01	
尿酸(UA) (mg/dl)	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.0 ± 0.1	
尿素窒素 (mg/dl)	13.4 ± 0.2	13.1 ± 0.1	13.6 ± 0.2	13.1 ± 0.1	
グルコース (mg/dl)	91.2 ± 0.5	91.4 ± 0.5	92.1 ± 0.5	92.1 ± 0.8	
HbA1c (%)	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.1	
ヘモグロビン (g/dl)	15.3 ± 0.1	15.3 ± 0.1	15.3 ± 0.1	15.3 ± 0.1	
血中ナトリウム (mEq/L)	140 ± 1	140 ± 1	140 ± 1	140 ± 1	
アディポネクチン (μg/ml)	7.99 ± 0.20	7.53 ± 0.20	7.61 ± 0.22	7.62 ± 0.21	
(血中脂肪酸)					
エイコサペンタエンサン (μg/ml)	44 ± 2	45 ± 2	54 ± 2	52 ± 2	1 vs 3,4 2 vs 3,4
ドコサペンタエンサン (μg/ml)	16.9 ± 0.4	17.3 ± 0.4	18.9 ± 0.5	18.6 ± 0.4	1 vs 3,4 2 vs 3
ドコサヘキサエンサン (μg/ml)	119 ± 3	122 ± 3	135 ± 3	135 ± 3	1 vs 3,4 2 vs 3,4
(栄養素摂取量)					
エネルギー (kcal)	1990 ± 43	1938 ± 30	1886 ± 26	1695 ± 27	1,2,3 vs 4
タンパク質 (g/1000 kcal)	31.5 ± 0.3	32.0 ± 0.3	33.4 ± 0.3	33.3 ± 0.3	1 vs 3,4 2 vs 3,4
脂質 (g/1000 kcal)	33.6 ± 0.4	33.1 ± 0.4	32.9 ± 0.3	31.1 ± 0.3	1 vs 4 2 vs 3,4
炭水化物 (g/1000 kcal)	131 ± 1	132 ± 1	129 ± 1	133 ± 1	3 vs 4
ナトリウム (mg/1000 kcal)	1497 ± 26	1639 ± 27	1754 ± 27	1903 ± 507	1 vs 3,4 2 vs 3,4 3 vs 4
カリウム (mg/1000 kcal)	1014 ± 12	1035 ± 11	1079 ± 187	1074 ± 12	1 vs 3,4
鉄 (mg/1000 kcal)	3.22 ± 0.04	3.30 ± 0.04	3.55 ± 0.04	3.58 ± 0.04	
多価不飽和脂肪酸 (g/1000 kcal)	6.3 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.6 ± 0.1	1 vs 3,4 2 vs 3
コレステロール (mg/1000 kcal)	155 ± 3	159 ± 3	163 ± 3	161 ± 3	
食物繊維 (g/1000 kcal)	4.6 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.0 ± 1.1	5.7 ± 1.4	1 vs 2,3,4 2 vs 3,4
食塩 (g/1000 kcal)	3.8 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.8 ± 0.1	
脂肪酸 (mg/1000 kcal)	28.9 ± 0.3	28.6 ± 0.3	28.5 ± 0.3	27.0 ± 0.3	1 vs 4 2 vs 4 3 vs 4
n-3系脂肪酸 (g/1000 kcal)	1.02 ± 0.01	1.09 ± 0.02	1.19 ± 0.18	1.18 ± 0.02	1 vs 2,3,4 2 vs 3,4
n-6系脂肪酸 (g/1000 kcal)	5.25 ± 0.06	5.34 ± 0.07	5.56 ± 0.06	5.40 ± 0.03	1 vs 3
(食品摂取量)					
穀類 (g/1000 kcal)	188.0 ± 4.0	197.0 ± 4.0	198.0 ± 3.0	216.0 ± 4.0	1,2,3 vs 4
イモ類 (g/1000 kcal)	9.3 ± 0.5	11.1 ± 0.5	12.9 ± 0.6	11.0 ± 0.6	1 vs 3
緑黄色野菜 (g/1000 kcal)	22.2 ± 1.0	25.2 ± 0.8	28.5 ± 1.0	30.5 ± 1.1	1 vs 3,4 2 vs 4
その他の野菜 (g/1000 kcal)	36.6 ± 1.6	41.4 ± 1.4	49.5 ± 1.6	50.0 ± 1.6	1 vs 3,4 2 vs 3,4
海藻 (g/1000 kcal)	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1 vs 2,3,4 2 vs 3,4
豆類 (g/1000 kcal)	17.3 ± 1.0	19.1 ± 0.8	26.5 ± 1.0	27.4 ± 1.0	1 vs 3,4 2 vs 3,4
魚介類 (g/1000 kcal)	23.2 ± 1.0	27.0 ± 1.1	31.6 ± 1.1	32.0 ± 1.0	1 vs 3,4 2 vs 3,4
肉類 (g/1000 kcal)	49.5 ± 1.4	47.9 ± 1.3	46.7 ± 1.3	43.7 ± 1.2	1 vs 4
卵類 (g/1000 kcal)	16.1 ± 10.1	17.1 ± 9.2	16.4 ± 9.1	15.8 ± 9.0	
果物 (g/1000 kcal)	18.2 ± 1.4	21.4 ± 1.7	23.7 ± 1.6	21.7 ± 1.6	
菓子類 (g/1000 kcal)	41.5 ± 1.6	38.4 ± 1.4	31.9 ± 1.2	27.2 ± 1.2	1 vs 3,4 2 vs 3,4
調味料 (g/1000 kcal)	10.3 ± 0.3	12.8 ± 0.4	14.3 ± 0.4	17.3 ± 0.4	1 vs 2,3,4 2 vs 4
(食行動)					
欠食 (回/週)	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.4	
間食 (回/週)	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.5 ± 0.2	
夜食 (回/週)	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	

* 平均値 ± 標準偏差

表2 味噌摂取量と健康関連指標との関連性 (女性)

	I (n=267)	II (n=267)	III (n=269)	IV (n=268)	統計学的有意差
味噌 (g/1000 kcal)	1.2 ± 0.1*	3.7 ± 0.1	6.9 ± 0.1	13.4 ± 0.6	
(身体状況)					
年齢 (歳)	37.6 ± 1.0	39.3 ± 1.1	37.8 ± 0.9	40.5 ± 1.0	1 vs 3,4 2 vs 3,4
身長 (m)	158.7 ± 0.5	158.5 ± 0.5	158.7 ± 0.6	158.1 ± 0.6	
体重 (kg)	54.5 ± 1.0	53.6 ± 0.8	54.0 ± 0.8	53.2 ± 0.8	
BMI	21.6 ± 0.4	21.3 ± 0.3	21.5 ± 0.3	21.3 ± 0.3	
体脂肪 (%)	28.8 ± 0.9	27.5 ± 0.8	28.9 ± 0.7	28.2 ± 0.8	
ウエスト周囲 (cm)	68.5 ± 0.9	68.1 ± 0.8	67.9 ± 0.7	68.5 ± 0.8	
ヒップ周囲 (cm)	90.8 ± 0.7	90.0 ± 0.6	90.6 ± 0.6	90.2 ± 0.6	
収縮期血圧 (mmHg)	113 ± 2	112 ± 2	110 ± 2	112 ± 2	
拡張期血圧 (mmHg)	68 ± 1	68 ± 1	67 ± 1	67 ± 1	
(血液生化学検査)					
IL-6 (ng/ml)	1.02 ± 0.07	1.35 ± 0.18	1.06 ± 0.13	1.06 ± 0.10	
IL-18 (ng/ml)	219 ± 51	167 ± 6	172 ± 6	170 ± 5	
CRP (mg/dl)	0.038 ± 0.007	0.051 ± 0.001	0.052 ± 0.012	0.052 ± 0.020	
遊離脂肪酸 (mEq/L)	640 ± 28	573 ± 25	544 ± 21	614 ± 25	
インスリン (μU/ml)	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.5 ± 0.2	4.9 ± 0.3	
LDLコレステロール (mg/dl)	108 ± 3	109 ± 3	112 ± 3	108 ± 3	
HDLコレステロール (mg/dl)	69 ± 1	67 ± 1	70 ± 1	70 ± 2	
中性脂肪 (mg/dl)	68 ± 4	65 ± 3	65 ± 3	68 ± 4	
AST (IU/L)	18 ± 1	17 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	
ALT (IU/L)	14 ± 1	14 ± 1	17 ± 1	15 ± 1	
γ-GTP (IU/L)	18 ± 1	17 ± 1	22 ± 2	22 ± 2	
総コレステロール (mg/dl)	192 ± 3	190 ± 3	197 ± 3	194 ± 3	
クレアチニン (mg/dl)	0.67 ± 0.01	0.66 ± 0.01	0.66 ± 0.01	0.66 ± 0.01	
尿酸(UA) (mg/dl)	10.7 ± 0.2	11.2 ± 0.3	11.9 ± 0.3	11.8 ± 0.3	
尿素窒素 (mg/dl)	13.4 ± 0.2	13.1 ± 0.1	13.6 ± 0.2	13.1 ± 0.1	
グルコース (mg/dl)	86.9 ± 0.8	86.1 ± 0.7	86.5 ± 0.6	86.2 ± 0.8	
HbA1c (%)	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1	
ヘモグロビン (g/dl)	13.0 ± 0.1	12.8 ± 0.1	12.7 ± 0.1	12.7 ± 0.1	
血中ナトリウム (mEq/L)	140 ± 1	140 ± 1	140 ± 1	140 ± 1	
アディポネクチン (μg/ml)	11.9 ± 0.4	11.5 ± 0.4	12.2 ± 0.5	12.5 ± 0.6	
(血中脂肪酸)					
エイコサペンタエンサン (μg/ml)	41 ± 3	38 ± 3	39 ± 2	49 ± 3	2 vs 4 3 vs 4
ドコサペンタエンサン (μg/ml)	15.2 ± 0.6	14.2 ± 0.5	14.5 ± 0.4	16.2 ± 0.5	2 vs 4
ドコサヘキサエンサン (μg/ml)	118 ± 4	110 ± 4	117 ± 4	130 ± 4	2 vs 4
(栄養素摂取量)					
エネルギー (kcal)	1713 ± 40	1801 ± 46	1725 ± 40	1656 ± 38	
タンパク質 (g/1000 kcal)	33 ± 0.5	33 ± 0.5	33.5 ± 0.4	34.6 ± 0.5	
脂質 (g/1000 kcal)	35.5 ± 0.5	35.5 ± 0.4	34.3 ± 0.5	33.6 ± 0.5	1 vs 4 2vs 4
炭水化物 (g/1000 kcal)	130 ± 2	130 ± 1	132 ± 1	132 ± 2	
ナトリウム (mg/1000 kcal)	1511 ± 42	1660 ± 39	1852 ± 47	1955 ± 55	1 vs 3,4 2 vs 3,4
カリウム (mg/1000 kcal)	1033 ± 22	1062 ± 17	1055 ± 19	1137 ± 23	1 vs 4
鉄 (mg/1000 kcal)	3.51 ± 0.84	3.53 ± 0.70	3.53 ± 0.60	4.01 ± 0.83	
多価不飽和脂肪酸 (g/1000 kcal)	6.5 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.6 ± 0.1	7.0 ± 0.2	1 vs 4
コレステロール (mg/1000 kcal)	158 ± 5	161 ± 4	160 ± 4	169 ± 5	
食物繊維 (g/1000 kcal)	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.1	6.0 ± 1.1	6.6 ± 1.5	1 vs 4
食塩 (g/1000 kcal)	3.8 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1	5.0 ± 0.1	1 vs 3,4 2 vs 3,4
脂肪酸 (mg/1000 kcal)	30.2 ± 0.5	30.6 ± 0.4	29.8 ± 0.5	28.8 ± 0.5	
n-3系脂肪酸 (g/1000 kcal)	1.07 ± 0.03	1.13 ± 0.03	1.11 ± 0.03	1.26 ± 0.03	1 vs 4 2 vs 4 3 vs 4
n-6系脂肪酸 (g/1000 kcal)	5.37 ± 0.10	5.62 ± 0.11	5.47 ± 0.10	5.74 ± 0.13	
(食品摂取量)					
穀類 (g/1000 kcal)	187.0 ± 5.0	183.0 ± 5.0	199.0 ± 5.0	203.0 ± 5.0	2 vs 4
イモ類 (g/1000 kcal)	15.1 ± 1.5	17.6 ± 1.1	13.4 ± 0.9	17.2 ± 1.3	
緑黄色野菜 (g/1000 kcal)	33.5 ± 2.0	32.2 ± 1.8	34.7 ± 1.9	41.6 ± 2.5	1 vs 4 2 vs 4
その他の野菜 (g/1000 kcal)	57.1 ± 3.2	51.8 ± 2.7	55.9 ± 3.1	71.2 ± 4.0	1 vs 4 2 vs 4 3 vs 4
海藻 (g/1000 kcal)	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1 vs 3,4 2 vs 4
豆類 (g/1000 kcal)	20.3 ± 1.6	24.5 ± 1.9	22.8 ± 1.3	32.7 ± 2.1	1 vs 4 2 vs 4
魚介類 (g/1000 kcal)	26.8 ± 2.0	26.6 ± 1.5	34.2 ± 2.3	28.7 ± 1.0	1 vs 4 2 vs 4 3 vs 4
肉類 (g/1000 kcal)	47.8 ± 2.4	44.7 ± 1.9	46.5 ± 1.7	40.4 ± 1.9	1 vs 4
卵類 (g/1000 kcal)	14.1 ± 0.9	15.4 ± 0.9	15.1 ± 0.7	17.4 ± 1.1	
果物 (g/1000 kcal)	28.1 ± 3.5	31.1 ± 2.9	29.9 ± 2.7	38.5 ± 3.6	
菓子類 (g/1000 kcal)	51.1 ± 3.0	48.9 ± 2.5	44.7 ± 2.5	39.8 ± 2.2	1 vs 4
調味料 (g/1000 kcal)	8.3 ± 0.5	10.9 ± 0.5	13.8 ± 0.7	15.6 ± 0.8	
(食行動)					
欠食 (回/週)	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3	
間食 (回/週)	5.0 ± 0.3	5.5 ± 0.5	5.8 ± 0.3	5.2 ± 0.3	
夜食 (回/週)	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.5 ± 0.1	

* 平均値 ± 標準偏差

表3 血中脂肪酸濃度量および食品摂取量における相関関係（男性）

	ドコサヘキサ エンサン	エイコサペン タエンサン	穀類	いも類	緑黄色野菜	その他の野菜	海藻類	豆類	魚介類	肉類
ドコサヘキサ エンサン	1.000	.810**	.086**	.061*	.163**	.165**	.084**	.148**	.343**	-.105**
エイコサペン タエンサン	.810**	1.000	.123**	.075*	.153**	.189**	.088**	.152**	.322**	-.125**
穀類	.086**	.123**	1.000	-.080**	-.035	-.001	-.031	.004	-.025	-.240**
いも類	.061*	.075*	-.080**	1.000	.196**	.212**	.224**	.173**	.106**	-.006
緑黄色野菜	.163**	.153**	-.035	.196**	1.000	.658**	.251**	.359**	.329**	.065*
その他の野菜	.165**	.189**	-.001	.212**	.658**	1.000	.260**	.328**	.316**	.036
海藻類	.084**	.088**	-.031	.224**	.251**	.260**	1.000	.291**	.200**	-.080**
豆類	.148**	.152**	.004	.173**	.359**	.328**	.291**	1.000	.270**	-.053
魚介類	.343**	.322**	-.025	.106**	.329**	.316**	.200**	.270**	1.000	-.063*
肉類	-.105**	-.125**	-.240**	-.006	.065*	.036	-.080**	-.053	-.063*	1.000
卵類	-.028	.007	.028	.068*	-.001	-.005	.092**	.013	-.030	.041
乳類	-.034	-.024	-.144**	.017	.041	-.027	.034	-.021	-.084**	-.067*
果実類	.169**	.203**	-.041	.208**	.185**	.173**	.148**	.147**	.184**	-.118**
菓子類	-.169**	-.195**	-.408**	-.032	-.237**	-.265**	-.154**	-.202**	-.244**	-.256**
嗜好飲料	-.024	-.056	-.369**	-.138**	-.164**	-.123**	-.032	-.153**	-.085**	-.077*
砂糖類	.071*	.090**	-.061*	.171**	.124**	.134**	.139**	.105**	.083**	-.142**
種実類	.026	.032	-.176**	.052	.006	.037	.063*	.053	.085**	-.053
油脂類	-.062*	-.045	-.217**	.029	.042	.130**	.055	-.073*	-.052	.190**
調味料	.071*	.084**	.048	.025	.063*	.046	.157**	.071*	.081**	-.079**
大豆製品	.172**	.173**	-.004	.123**	.247**	.253**	.263**	.427**	.170**	-.128**
みそ	.104**	.123**	.163**	.072*	.183**	.200**	.259**	.255**	.172**	-.085**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

量の多い者は、食塩および調味料の摂取が多いことである。一方で緑黄色野菜、その他の野菜、海藻類の摂取量が多く、それら食品中には血圧を低下させる作用があるカリウムが含まれている⁵⁾。味噌の摂取量で4群に分類した群で収縮期および拡張期血圧を比較してみるといずれの血圧でも統計的な有為差を認めなかった(表1)。さらに血圧に影響をおよぼすと考えられる要因を調整し高血圧発症のリスクをロジスティック回帰分析により解析したところ味噌摂取量が増えても高血圧発症のリスクは上昇しなかった(表5)。女性にお

いても男性と同様の解析を行ったが、男性ほど味噌摂取量と各種健康関連指標および食品摂取量との関連性は認められなかったが、ほぼ同様の結果を得た(表2, 4および5)。

今回の結果で明らかになったことをまとめると以下の通りである。味噌摂取量が多い者は、(1)野菜摂取量が多い、(2)魚介類の摂取量が多い、(3)n-3系脂肪酸の摂取量が多い、(3)血中のn-3系脂肪酸の濃度が高い、(5)食塩の摂取量が多い。食塩の摂取量が多いものの、血圧低下に関わる食品摂取量も多いことが特徴と考えられる。近年、

卵類	乳類	果実類	菓子類	嗜好飲料	砂糖類	種実類	油脂類	調味料	大豆製品	みそ
-.028	-.034	.169**	-.169**	-.024	.071*	.026	-.062*	.071*	.172**	.104**
.007	-.024	.203**	-.195**	-.056	.090**	.032	-.045	.084**	.173**	.123**
.028	-.144**	-.041	-.408**	-.369**	-.061*	-.176**	-.217**	.048	-.004	.163**
.068*	.017	.208**	-.032	-.138**	.171**	.052	.029	.025	.123**	.072*
-.001	.041	.185**	-.237**	-.164**	.124**	.006	.042	.063*	.247**	.183**
-.005	-.027	.173**	-.265**	-.123**	.134**	.037	.130**	.046	.253**	.200**
.092**	.034	.148**	-.154**	-.032	.139**	.063*	.055	.157**	.263**	.259**
.013	-.021	.147**	-.202**	-.153**	.105**	.053	-.073*	.071*	.427**	.255**
-.030	-.084**	.184**	-.244**	-.085**	.083**	.085**	-.052	.081**	.170**	.172**
.041	-.067*	-.118**	-.256**	-.077*	-.142**	-.053	.190**	-.079**	-.128**	-.085**
1.000	-.055	.006	-.180**	-.015	.049	-.077*	.087**	.058	.010	.071*
-.055	1.000	.154**	-.034	-.213**	.078*	-.051	-.055	-.086**	-.010	-.055
.006	.154**	1.000	-.026	-.239**	.171**	.048	-.059	-.012	.103**	.022
-.180**	-.034	-.026	1.000	-.144**	-.013	.063*	-.138**	-.153**	-.162**	-.231**
-.015	-.213**	-.239**	-.144**	1.000	-.091**	.065*	.010	.008	.006	-.053
.049	.078*	.171**	-.013	-.091**	1.000	.047	.055	.034	.083**	.025
-.077*	-.051	.048	.063*	.065*	.047	1.000	.055	-.047	.016	-.049
.087**	-.055	-.059	-.138**	.010	.055	.055	1.000	.089**	.027	.044
.058	-.086**	-.012	-.153**	.008	.034	-.047	.089**	1.000	.167**	.374**
.010	-.010	.103**	-.162**	.006	.083**	.016	.027	.167**	1.000	.368**
.071*	-.055	.022	-.231**	-.053	.025	-.049	.044	.374**	.368**	1.000

動物実験であるが味噌汁成分には血圧を低下させる作用があることが示された⁶⁾。大豆成分と血圧に関する11論文のメタアナリシス解析では、高血圧者に対して大豆成分の一種であるイソフラボンに降圧作用があることが示された⁷⁾。

今回の調査では血中のn-3系脂肪酸濃度と味噌摂取量との明確な関連性が示された(表1および2)。これら脂肪酸は魚介類由来であるが、味噌摂取量との明確な関連性が認められたという事は味噌摂取量と魚介類摂取量との間に密接な関連性があることを示すものである。味噌摂取量と魚介類

摂取量との相関関係を調べてみると男性で0.172(表3)、女性で0.147(表4)と必ずしも相関係数は高くないが見た目の数字以上の関連性があるのかもしれない。

今回の研究で味噌摂取量の多い者の特徴の概略をうかがい知る事ができる。味噌摂取を積極的に取り入れた場合、全体の献立に与える影響はどのようなことがあるであろうか。いわゆる伝統的な味噌汁の組み合わせを仮定すると魚や野菜を多く取り入れたメニューになる事が予想される。すなわち味噌汁という一つの料理だけでなく組み合わ

表4 血中脂肪酸濃度量および食品摂取量における相関関係（女性）

	ドコサヘキサ エンサン	エイコサペン タエンサン	穀類	いも類	緑黄色野菜	その他の野菜	海藻類	豆類	魚介類	肉類
ドコサヘキサ エンサン	1.000	.831**	.098	-.007	.225**	.279**	.130*	.118*	.405**	-.088
エイコサペン タエンサン	.831**	1.000	.092	-.004	.196**	.264**	.123*	.064	.383**	-.068
穀類	.098	.092	1.000	-.093	-.069	.004	.061	-.033	.054	-.167**
いも類	-.007	-.004	-.093	1.000	.283**	.254**	.240**	.181**	.038	.017
緑黄色野菜	.225**	.196**	-.069	.283**	1.000	.654**	.277**	.255**	.362**	.029
その他の野菜	.279**	.264**	.004	.254**	.654**	1.000	.318**	.245**	.253**	.001
海藻類	.130*	.123*	.061	.240**	.277**	.318**	1.000	.312**	.208**	-.085
豆類	.118*	.064	-.033	.181**	.255**	.245**	.312**	1.000	.241**	-.107*
魚介類	.405**	.383**	.054	.038	.362**	.253**	.208**	.241**	1.000	-.014
肉類	-.088	-.068	-.167**	.017	.029	.001	-.085	-.107*	-.014	1.000
卵類	.025	.041	.003	.053	.038	.125*	-.004	-.015	.036	-.006
乳類	.061	.054	-.224**	.104*	.046	-.010	.024	.105*	.057	-.069
果実類	.206**	.142**	-.094	.202**	.231**	.261**	.070	.168**	.166**	-.148**
菓子類	-.234**	-.232**	-.481**	-.188**	-.305**	-.354**	-.214**	-.265**	-.357**	-.296**
嗜好飲料	-.065	-.011	-.253**	-.104*	-.121*	-.115*	-.060	-.074	-.140**	.013
砂糖類	.197**	.146**	-.036	.202**	.304**	.264**	.189**	.109*	.095	-.127*
種実類	.082	.035	-.168**	.179**	.176**	.047	.154**	.081	.071	-.093
油脂類	-.064	-.016	-.075	.088	.057	.159**	.033	-.075	-.066	.154**
調味料	.072	.045	.174**	-.036	-.014	.053	.067	.063	.009	-.087
大豆製品	.034	.000	.021	.077	.108*	.152**	.195**	.420**	.036	-.100
みそ	.097	.118*	.191**	-.041	.119*	.216**	.156**	.179**	.147**	-.137**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表5

男性			女性		
味噌摂取量	高血圧のリスク	95%信頼区間	味噌摂取量	高血圧のリスク	95%信頼区間
I	1		I	1	
II	1.151	(0.663-2.001)	II	0.853	(0.260-2.792)
III	1.393	(0.823-2.358)	III	0.374	(0.088-1.592)
IV	1.129	(0.657-1.940)	IV	0.698	(0.206-2.367)

年齢，体重，アルコールおよび喫煙で調整を行った

せといった観点から食生活および健康状態に対する影響を検討する事も必要かと思われる。

卵類	乳類	果実類	菓子類	嗜好飲料	砂糖類	種実類	油脂類	調味料	大豆製品	みそ
.025	.061	.206**	-.234**	-.065	.197**	.082	-.064	.072	.034	.097
.041	.054	.142**	-.232**	-.011	.146**	.035	-.016	.045	.000	.118*
.003	-.224**	-.094	-.481**	-.253**	-.036	-.168**	-.075	.174**	.021	.191**
.053	.104*	.202**	-.188**	-.104*	.202**	.179**	.088	-.036	.077	-.041
.038	.046	.231**	-.305**	-.121*	.304**	.176**	.057	-.014	.108*	.119*
.125*	-.010	.261**	-.354**	-.115*	.264**	.047	.159**	.053	.152**	.216**
-.004	.024	.070	-.214**	-.060	.189**	.154**	.033	.067	.195**	.156**
-.015	.105*	.168**	-.265**	-.074	.109*	.081	-.075	.063	.420**	.179**
.036	.057	.166**	-.357**	-.140**	.095	.071	-.066	.009	.036	.147**
-.006	-.069	-.148**	-.296**	.013	-.127*	-.093	.154**	-.087	-.100	-.137**
1.000	-.064	.012	-.147**	-.062	-.064	-.043	.120*	.066	.022	.210**
-.064	1.000	.110*	-.144**	-.079	.037	-.027	-.085	-.087	.024	-.087
.012	.110*	1.000	-.133**	-.151**	.199**	.101*	-.109*	.003	.120*	.041
-.147**	-.144**	-.133**	1.000	-.037	-.092	.079	-.168**	-.181**	-.109*	-.169**
-.062	-.079	-.151**	-.037	1.000	-.125*	-.019	.017	.052	-.009	-.096
-.064	.037	.199**	-.092	-.125*	1.000	.130*	-.003	.170**	.095	.096
-.043	-.027	.101*	.079	-.019	.130*	1.000	-.041	-.068	.073	-.127*
.120*	-.085	-.109*	-.168**	.017	-.003	-.041	1.000	.035	-.070	.141**
.066	-.087	.003	-.181**	.052	.170**	-.068	.035	1.000	.151**	.415**
.022	.024	.120*	-.109*	-.009	.095	.073	-.070	.151**	1.000	.277**
.210**	-.087	.041	-.169**	-.096	.096	-.127*	.141**	.415**	.277**	1.000

謝 辞

本研究は、(社)中央味噌研究所の研究助成により実施された。

文 献

- 1) 大澤俊彦 「がん予防と食品—デザイナーフードからファンクショナルフードへ」日本食生活学会誌 第20巻 1~16ページ 2009.
- 2) Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a

review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. J Clin Endocrinol Metab, 83: 2223-2235, 2008.

- 3) 山本茂, 酒井徹, 郡俊之 「公衆栄養学」(講談社サイエンティフィック), 2009年
- 4) Cutler JA, Follmann D, Allender PS. Randomized trial of sodium reduction: an overview. Am J Clin Nutr, 65: 643S-651S, 1997.
- 5) Whelton PK, He J, Culter JA et al. Effect of oral potassium on blood pressure. JAMA

277: 1624-1632, 1997.

6) Yoshinaga M, Toda N, Tamura Y, Terakado S, Ueno M, Otsuka K, Numabe A, Kawabata Y, Uehara Y. Japanese traditional miso soup attenuates salt-induced hypertension and its organ damage in Dahl salt-sensitive rats.

Nutrition 28: 924-931, 2012.

7) Liu XX, Li SH, Chen JZ, Sun K, Wang XJ, Wang XG, Hui RT. Effect of soy isoflavones on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trial. Nutr Metab Cardiovascular Diseases. 22:463-470, 2012.

新規ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた 味噌経口摂取による子宮筋腫増殖抑制効果についての検討

武田 卓^{1,2}, 築地謙治², Li Bin², 八重樫伸生²

1) 近畿大学東洋医学研究所

2) 東北大学大学院医学系研究科産婦人科学講座

Antiproliferative effect of *Miso* on uterine leiomyoma cells in vitro and in vivo

Takashi TAKEDA^{1,2}, Kenji TSUIJI², Bin LI², Nobuo YAEGASHI²

¹ Division of Women's Health, Research Institute of Traditional Asian Medicine,
Kinki University School of Medicine

377-2, Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511, Japan

² Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Graduate
Medicine, Sendai, Miyagi, Japan;

1-1, Sendai, Aoba, Sendai, 980-8574, Japan

子宮筋腫は良性疾患だが、女性の約25~50%に認められ過多月経・月経痛・圧迫等によりQOLを著しく障害する¹⁾。外科治療が標準治療とされ、子宮摘出の三分の一は筋腫に対して行われている。筋腫は女性ホルモン（エストロゲン）依存性に増殖するため、閉経でエストロゲン分泌がなくなれば治療の必要性はなくなる。子宮筋腫に対する薬物治療では、エストロゲンによる筋腫細胞増殖機構を抑制するGnRH アゴニストが使用されるが、重篤な副作用のため長期投与できない。閉経前の筋腫増殖速度を抑制し閉経まで乗り切れば子宮温存薬物療法は達成されるが、このような薬物は存在しない。疫学的には、大豆製品摂取による筋腫発症抑制の可能性が報告されている²⁾。大豆中には植物性エストロゲンであるイソフラボ

ンが含まれており、そのなかのジェニステインについては我々の先行研究において子宮筋腫細胞増殖に対するPPAR γ を介する抑制効果を認めている³⁾。我々が最近開発したヒト子宮筋腫モデルマウスは長期間にわたり筋腫の組織学的構造維持が可能である⁴⁾。昨年度の検討では、エストロゲン単独補充下のモデルにおいては、腫瘍サイズの縮小を認めなかった。もともと、このモデルにおいては、エストロゲン単独補充では腫瘍サイズの増大を認めず、そのために味噌による増殖抑制効果が確認できなかった可能性が考えられた。子宮筋腫の増大にはエストロゲンにプロゲステロンを加えることが必要とされる⁵⁾。そこで、本年度はエストロゲン・プロゲステロン両者を補充したモデルを用いて味噌による子宮筋腫増殖抑制効果につ

近畿大学東洋医学研究所 〒589-8511 大阪狭山市大野東377-2

TEL: (072) 366-0221 FAX: (072) 366-6661

E-mail: take@med.kindai.ac.jp

いて検討し、子宮筋腫治療法の新たな展開を目的として実験を行った。

1 実験方法

東北大学利益相反委員会，東北大学倫理審査委員会，動物実験委員会で承認された実験プロトコールに基づいて研究をおこなった。

1) 試料

中央味噌研究所より供与された米味噌（仙台系）を使用した。味噌を等量の蒸留水に溶解懸濁し，約5分間ボイル後に遠心し上清部分を実験に使用した（以下，味噌上清と表記）。

2) ヒト子宮筋腫モデルマウス

患者同意のもと過多月経等の症状のため子宮全摘あるいは子宮筋腫核出により摘出した子宮筋腫組織（6症例）を使用した。子宮筋腫組織を細切し免疫不全マウスであるNOGマウスの皮下に麻酔下で移植しヒト子宮筋腫モデルマウスを作製し

た。NOGマウスには子宮筋腫組織移植の48時間前にエストロゲンサポートのためのエストロゲンペレット（エストラジオール徐放性ペレット）と腫瘍増大を目的としてプロゲステロンペレット（P4 徐放性ペレット）を皮下に留置した。

安楽死後に移植組織片を摘出し，HE染色を行い，子宮筋腫の組織構築および特性を検討した。また，細胞増殖の指標としてKi-67免疫染色，アポトーシスの指標としてTUNEL染色をおこなった。

味噌上清投与は，強制経口ゾンデ方により仙台味噌上清0.1mlを連日投与した。

2 実験結果および考察

ヒト子宮筋腫モデルマウスに味噌上清の経口投与実験をおこなった。味噌はこれまでのin vitroの検討でより強い細胞増殖抑制効果を認めた仙台系を使用し移植後8週まで投与を行った。これまでのエストロゲン単独投与では，移植組織片のサイズの増大を認めなかったのに対して，エストロ

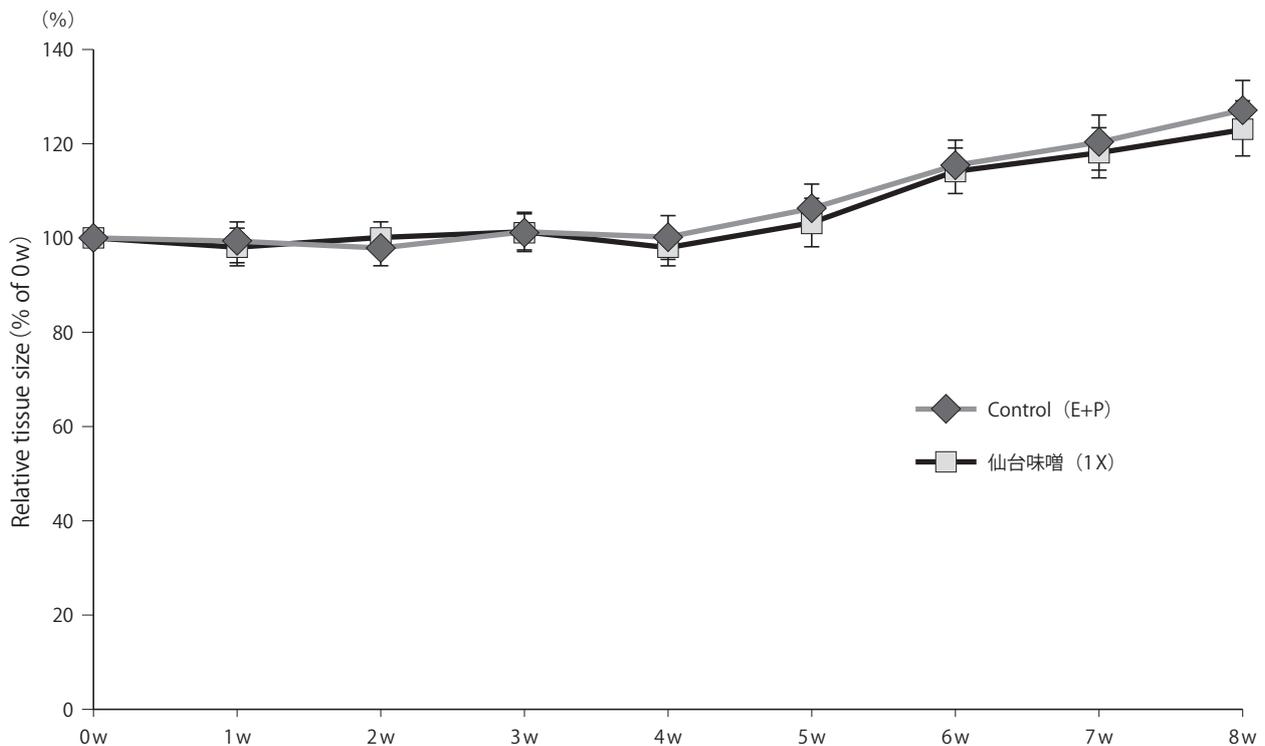
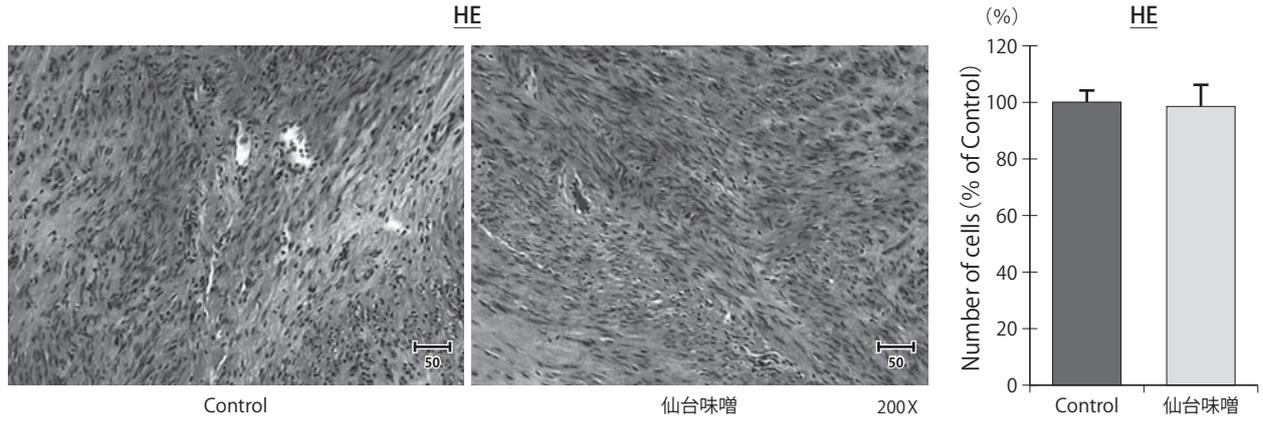
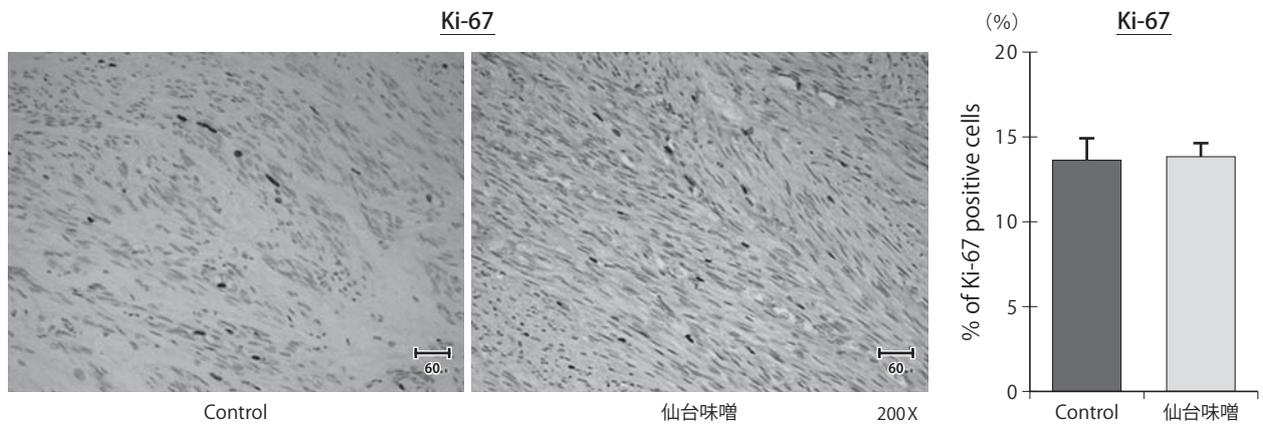


図1 移植子宮筋腫組織片のサイズの影響

(A) HE染色



(B) 細胞増殖への影響 (Ki-67染色)



(C) アポトーシスへの影響

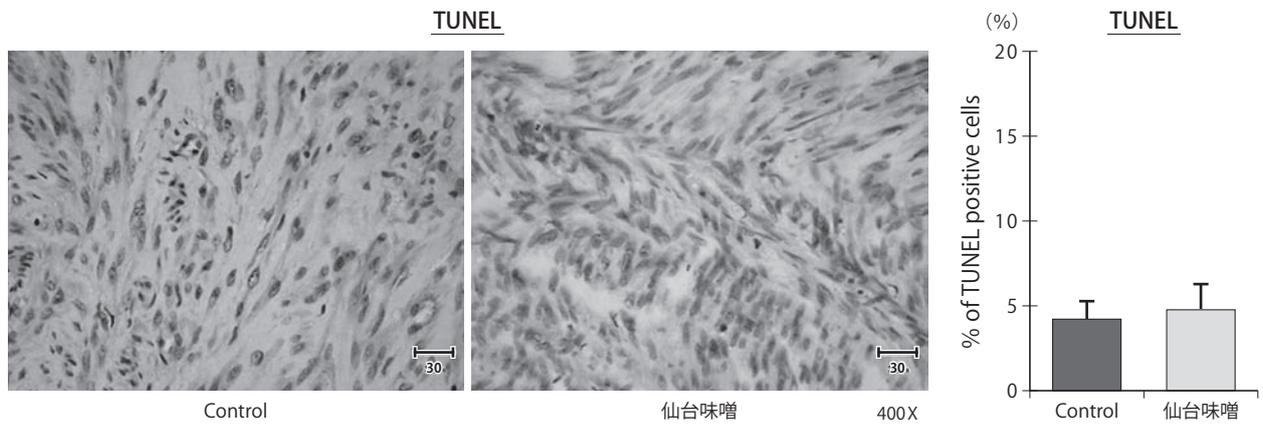


図2 細胞増殖・アポトーシスに及ぼす味噌の影響

ゲン・プロゲステロン併用投与により、移植片は体積で約1.2倍に増大した(図1)。味噌投与によっても移植組織片腫瘍サイズに経過中変化を認めず、摘出した組織からの検討では、HE染色での

組織学的構築に差を認めず、また細胞増殖・アポトーシスについてもKi-67免疫染色・TUNEL染色の評価では差を認めなかった(図2)。

3 要約

ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討では、エストロゲン・プロゲステロン両者を補充することにより、移植組織のサイズの増加を認めた。しかしながら、味噌上清投与による腫瘍増大に対する抑制効果を認めることができず、*in vitro*で認められた抑制効果を*in vivo*で検証することができなかった。

4 文献

- 1) Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 2005;308:1589-1592.
- 2) Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. Soy product intake and premenopausal hysterectomy in a follow-up study of Japanese women. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:773-777.
- 3) Miyake A, Takeda T, Isobe A, Wakabayashi A, Nishimoto F, Morishige K, Sakata M, Kimura T. Repressive effect of the phytoestrogen genistein on estradiol-induced uterine leiomyoma cell proliferation. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:403-409.
- 4) Tsuji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N. Establishment of a Novel Xenograft Model for Human Uterine Leiomyoma in Immunodeficient Mice. *Tohoku J Exp Med*. 2010;222(1):55-61.
- 5) Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology* 2010;151:2433-42.

味噌の美容効果に関する研究

前田 憲寿

Study on beauty effect of miso

Kazuhisa MAEDA

*School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology
1404-1, Katakura, Hachioji, Tokyo 192-0982, Japan*

■ 要 約

大豆の発酵食品である味噌には大豆や麴由来の成分が数多く含まれており、昔から貴重な栄養食品のひとつとして利用されてきた。「みそ」の「三素五強」の効能のひとつに「美素」があり、「美」を養う成分が豊富であるといわれている。そこで、肌にハリを与えてふっくらさせる真皮内ムコ多糖であるヒアルロン酸に対する味噌の効果について調べた。まず、味噌を乾燥させ、含水エタノールに室温で1週間浸漬し、30%、50%、80%の各エタノール抽出物を作成した。次に、これらの抽出物を添加した培地でヒト真皮線維芽細胞を3日間培養し、培養上清中のヒアルロン酸を定量した。このとき、細胞数も測定して、細胞1個あたりのヒアルロン酸量を濃度別に比較した。その結果、味噌の80%エタノール抽出物にヒアルロン酸量を増加させる効果があることがわかった。さらに、味噌に含まれる代表的な遊離脂肪酸であるリノール酸のヒアルロン酸生成に対する効果を調べた結果、リノール酸によって細胞1個あたりに算出したヒアルロン酸量が多くなることがわかった。

■ 緒 言

加齢とともに肌にしわやたるみ、しみが生じてくる。しわやたるみと関係の深い肌の弾力性を測定すると、年齢とともに肌の弾力性は低下し、伸びやすく戻りにくい古くなった輪ゴムのようになる。肌の粘弾性は真皮に存在するコラーゲン繊維やエラスチン繊維といった繊維性タンパク質とヒアルロン酸などの高分子多糖によって構成された組織構築によって決められている。すなわち、これらの量が減少したり、質が低下したりすると、しわやたるみができやすくなる。皮膚の繊維性タンパク質が60代から減少する¹⁾のに対し、ヒアルロン酸は40代後半から減少しはじめることが報告されている²⁾。したがって、40~60代はヒアルロン酸の生成を促進する食品を毎日摂取するようになれば、肌のしわやたるみといった老化を少しでも遅らせることができると期待される。

ヒアルロン酸はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンが交互に結合した高分子多糖で、分子量は数百万にもなり、水分を保持する能力が非常に高く、真皮に多量に存在しており、肌にハリを与えてふっくらさせている。ヒアルロン酸はHAS (Hyaluronan synthase) 1やHAS 2,

HAS3などの3種類の合成酵素により合成され、真皮においては主にHAS2により高分子ヒアルロン酸が合成される³⁾。大豆の発酵食品である味噌のヒアルロン酸生成促進効果を培養真皮線維芽細胞で調べた結果、味噌抽出物にヒアルロン酸の生成を促進する効果があることがわかった。本研究では、ヒアルロン酸の生成を促進する味噌に含まれる美容成分について調べた。

■ 方法

1. 味噌の含水エタノール抽出物の作製

米味噌5gに含水エタノール(30%, 50%, 80%)45gを加え、1週間室温暗所に静置した。抽出エキスをろ過後に回転型エバポレータで溶媒を留去し、固形物を得た。40mg/mlになるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、さらにDMSOで4mg/ml, 0.4mg/mlに希釈した。

2. ヒト真皮線維芽細胞の培養

ヒト真皮線維芽細胞は75cm²フラスコに10% FBS-DMEMを用いて炭酸ガスインキュベーター内で培養し、増殖させた。96穴プレート1枚にヒト真皮線維芽細胞を3,000cells/wellずつ播種し、DMEM GlutaMAXに2%ウシ血清を含む培地(2% FBS-DMEM)で1日培養した。各濃度に調製した味噌抽出物を1μlずつ添加し、炭酸ガスインキュベーターで3日間培養した後に、以下の方法でヒアルロン酸量、細胞数の測定を行った。

3. 培養上清中のヒアルロン酸量の測定

3日間培養した後に培養上清を採取して、培養上清中のヒアルロン酸をELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法で測定した。炭酸緩衝液で200倍希釈したヒアルロン酸結合タンパク質 (hyaluronan-binding protein; HABP, 5μg/ml) 溶液を高吸着96穴プレート (Immulon 4HBX) の各ウェルに100μlずつ入れて4℃で一晩静置した。300μlの洗浄液(0.05% Tween-20 /PBS)で各ウェルを2回洗浄後、風乾した。5% BSAを300μl添加し、4℃で一晩静置した。洗浄液で2回

洗浄した。標準HA溶液(50, 100, 200, 400, 800ng/ml)およびサンプルをassay buffer (0.02% Tween-20, 1% BSA / PBS)で20倍希釈し、ウェルに100μlずつ添加して室温で2時間静置した。washing bufferで4回洗浄した。1,000倍希釈したBiotin-HABP (250ng/ml)を100μlずつ添加し室温で30分静置した。洗浄液で4回洗浄後、純水で1回洗浄した。10,000倍希釈したstreptavidin-HRP (100ng/ml)を100μlずつ添加した。室温で30分静置後、洗浄液で4回洗浄し、純水で1回洗浄した。ABTS [=2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt)]を100μlずつ添加し10~20分静置し、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。

4. 細胞増殖促進効果の測定

Cell Counting kit-8 (同仁化学株式会社)を用いた。Cell Counting kit 溶液を、各ウェルに10μlずつ添加した。炭酸ガスインキュベーター内で2時間反応を行った後に、マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定した。検量線から細胞数を算出した。

5. 味噌に含まれるヒアルロン酸生成促進成分の探索

シリカゲル薄層クロマトグラフィを行い、味噌に含まれる成分を調べた。TLC板に味噌抽出物をアプライし、展開溶媒(クロロホルム:メタノール:水=16:6:1)で展開した。TLC板を乾燥後、発色剤CAMに浸し、キムワイプ等で余分な発色剤を拭き、ホットプレート(110℃)で加熱した。CAMは45mlの蒸留水に5mlの濃硫酸を加え、1.25gの(NH₄)₆Mo₇O₂₄・4H₂O, 2gのCe(NH₄)₄(SO₄)₄・2H₂Oを加え、攪拌して作成した。

6. 培養上清中のヒアルロン酸量と細胞増殖に対する脂肪酸の影響

大豆の脂肪酸組成はリノール酸が約50%, オレイン酸が約20%, パルミチン酸が約10%, リノレン酸が約10%, ステアリン酸が約5%なので、こ

これらの脂肪酸によるヒアルロン酸量と細胞数への影響について調べた。96穴プレート1枚にヒト真皮線維芽細胞を3,000cells/wellずつ播種し、DMEM GlutaMAXに2%ウシ血清を含む培地(2% FBS-DMEM)で1日培養した。1 mg/mlに調製した脂肪酸を1 μ lずつ添加し、炭酸ガスインキュベーターで3日間培養した後に、上記の方法でヒアルロン酸量、細胞数の測定を行った。

7. 統計学的解析

EXCELの対応のないt-検定を用いて有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

■ 結果

味噌を30%、50%、80%の各エタノールで抽出して、それらの抽出物を4 μ g/ml, 40 μ g/ml, 400 μ g/mlになるように培地に加えて3日間線維芽細胞を培養したときの培養上清中に含まれるヒアルロン酸量を測定した。その結果、味噌の80%エタノール抽出物(40 μ g/ml, 400 μ g/ml)によって細胞1個あたりで算出したヒアルロン酸量が増加した(図1)。味噌の50%エタノール抽出物(400 μ g/ml)によってもヒアルロン酸量が増加したが、その作用は80%エタノール抽出物よりも弱かった(図1)。一方、30%エタノール抽出

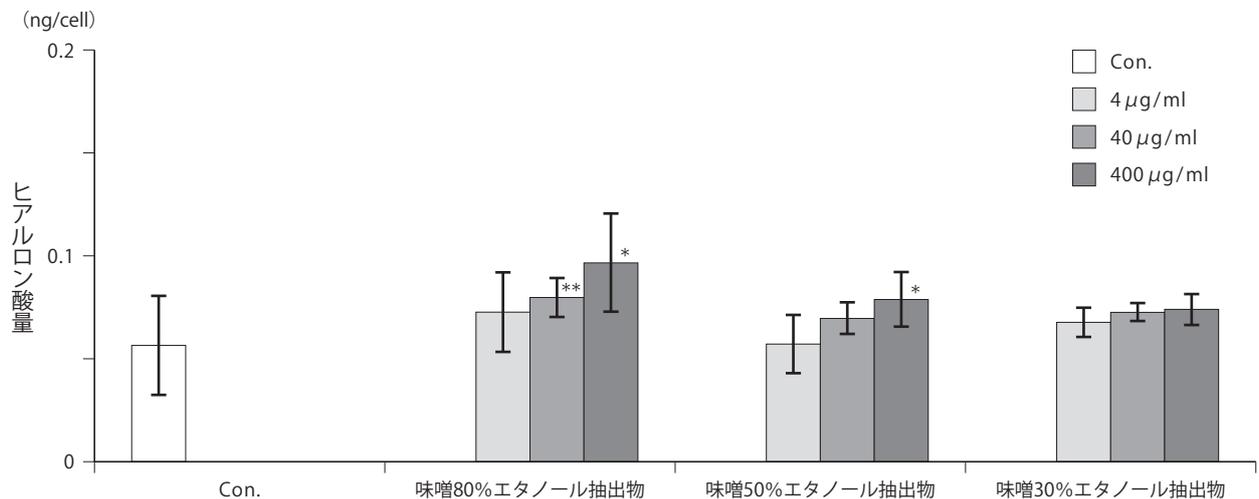


図1. ヒト真皮線維芽細胞のヒアルロン酸量に対する味噌抽出物の作用

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. Con. バーは標準偏差, n=3

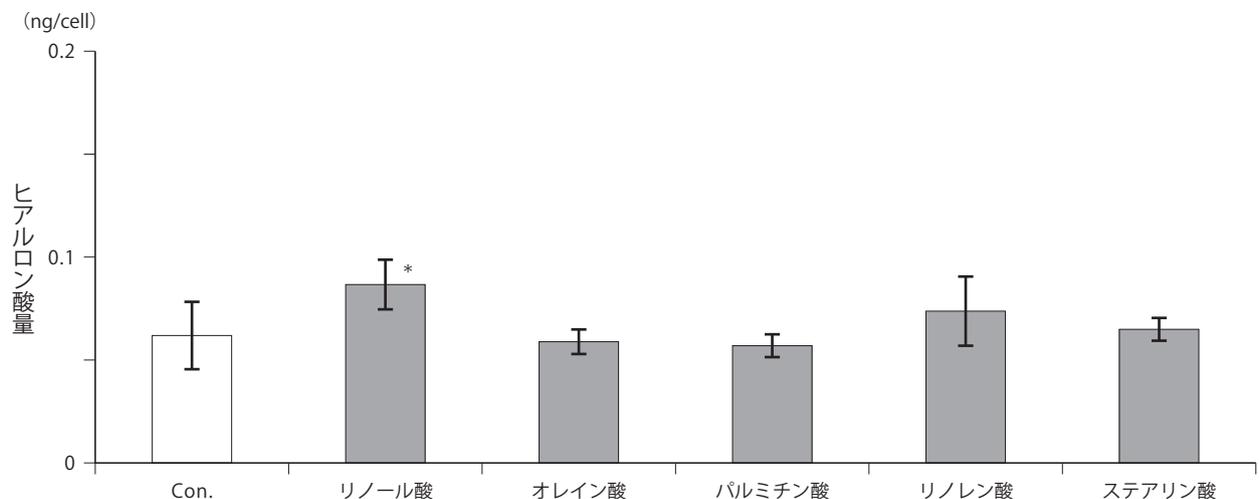


図2. ヒト真皮線維芽細胞のヒアルロン酸量に対する遊離脂肪酸の作用

*: $P < 0.05$ vs. Con. バーは標準偏差, n=3

物 (4 μ g/ml, 40 μ g/ml, 400 μ g/ml) にはヒアルロン酸量を増加させる作用はみられなかった (図1)。TLCで調べた結果, 80%エタノール抽出物と50%エタノール抽出物には遊離脂肪酸が検出され, その量は80%エタノール抽出物のほうが多かった。30%エタノール抽出物には遊離脂肪酸は検出されなかった。

リノール酸 (C18:2), オレイン酸 (C18:1), パルミチン酸 (C16:0), リノレン酸 (C18:3), ステアリン酸 (C18:0) の各1 μ g/mlのヒアルロン酸量への影響を調べた結果, リノール酸によって細胞1個あたりで算出したヒアルロン酸量が増加することがわかった (図2)。

■ 考 察

味噌抽出物を添加した培地でヒト真皮線維芽細胞を培養することによって細胞1個あたりで算出したヒアルロン酸量が増加することから, 味噌にはヒアルロン酸を増やす効果があると考えられた。また, 味噌に含まれる遊離脂肪酸の効果を調べた結果から, リノール酸が味噌に含まれるヒアルロン酸増加因子の一つである可能性が考えられた。一方, 大豆には遊離脂肪酸が結合したアシルホスファチジン酸が1.02mg/g含まれているという特徴もある⁴⁾。アシルホスファチジン酸にはヒ

アルロン酸の生成を促進する作用があるので, 味噌抽出物中のヒアルロン酸の生成促進作用にアシルホスファチジン酸等のその他の成分も関与しているかもしれない。今後, 味噌のどのような成分がどのようなメカニズムで効果を発現するかを調べ, 味噌の美容と健康に対する有用性を明らかにしていく。

参考文献

- 1) Shuster S., Black M.M. and McVitie E., The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br. J. Dermatol.* 93(6):639-643, 1975.
- 2) Longas M.O., Russell C.S. and He X.Y., Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr. Res.* 159(1):127-136, 1987.
- 3) Sugiyama Y., Shimada A., Sayo T., Sakai S. and Inoue S., Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *J. Invest. Dermatol.* 110: 116-121, 1988.
- 4) Weihrauch J.L., and Y.-S. Son, The phospholipid content of foods, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 1971-1978, 1983.

味噌からの抗ガン剤ターゲットとしての mRNA成熟阻害成分の探索と 各種味噌中の活性成分含有量の比較

増田 誠司

Screening of the mRNA maturation inhibitor as a target of anti-cancer drug from
Miso and comparison of its content

Seiji MASUDA

*Laboratory of Molecular Biology of Bioresponse Graduate School of Biostudies, Kyoto University
Kitashirakawa Oiwakecho Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan*

要 旨

ガンは日本人の死因第1位となつて久しい。このためガンと戦う化合物を探索し、抗がん剤や特定健康食品として実用化することは、健康な生活を送る上で大きな助けとなる。最近 mRNAの成熟過程が抗ガン剤の有望な標的として注目されている。したがって mRNAの成熟過程をモニタリングする系を用いて mRNA成熟の阻害活性を持つ化合物、すなわち抗ガン活性を持つ化合物を探索する系を構築すること、さらにその探索系を用いた活性化合物の単離が期待されている。探索の標的として様々な原材料と微生物による発酵過程を経ることで化合物の宝庫となっている味噌やその原材料を用いることで活性化合物を探索した。

まず探索系の構築を行った。レニラ・ルシフェラーゼによる1次スクリーニング、RNA-FISHによる2次スクリーニング、mRNAスプライシングを評価する3次スクリーニングにより

mRNAの成熟過程をモニタリングするシステムの構築に成功した。次いで味噌サンプルより活性化化合物を含む可能性を持ついくつかのサンプルを得た。加えて原材料に多く使用される大豆より活性画分の探索を行いイソフラボン画分に mRNA成熟阻害活性を見いだした。今後活性化合物の精製単離を目指したい。

緒 言

日本は他に例を見ないスピードで高齢化社会を迎えつつある。死因のうち、ガンによる死亡は1981年に第1位となつて以降、他の死因を引き離して第1位を占めている。このことからガンを予防する化合物の探索は、日本において非常に重要な意味を持っている。発ガンの原因には、化学物質、ウイルス、紫外線や原発事故による放射線、ストレスなど、さまざまなものが挙げられる。よ

ってガンになりにくい食事の摂取が必要であるとともに、一歩進んでガンを抑制する活性化化合物を様々な食品中から探索し、積極的に利用することで健康な長寿社会の実現に近づく。

従来、ガンに効く、動脈硬化を防止する等の活性を持つ食品成分が数多く報告されてきた。その一部は特定保健用食品として認可されている。しかし既知のスクリーニングが数多く行われた現在、同様の手法では新たな活性化化合物の発見は難しくなっている。このため新たな指標による活性化化合物の探索が求められている。最近、mRNAの成熟過程は、新たな抗ガン剤の重要なターゲットとして期待されている (Kaida *et al.*, 2007; Kotake *et al.*, 2007)。私たちの研究グループは、mRNAの成熟因子に関する研究を行ってきたことから (Strasser *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2010)、mRNAの成熟阻害という作用機序の明らかなアッセイ系を用いて、mRNAプロセッシングを制御する因子の探索系を開発した (Fujiwara *et al.*, 2010)。また、この探索系に加えて、mRNAスプライシングの阻害を判定するアッセイ系を構築することで、簡便に抗ガン活性化化合物を探索・利用するためのスクリーニング・評価系として利用できると考えられた。本研究は、mRNAプロセッシングを制御する因子の探索系を用いて、mRNA成熟過程を阻害する化合物の探索に使用できるよう改変すること、さらにこのアッセイ系を用いて mRNA成熟過程を阻害する味噌を探索することとした。

方法

RLM 1 株の作製

pRL-CMVプラスミドのイントロン部分 ATA 領域を ATG に変異したプライマーを用いて、2 段階の PCR により変異レニラ・ルシフェラーゼ発現ベクターを定法により構築した (平成 22 年度報告書)。変異部位は DNA シークエンスにより確認した。変異プラスミドを、HeLa 細胞に薬剤耐性遺伝子を含む pApuro とともに導入した。ピューロマイシン 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育したコロニー

をピックアップし、レニラ・ルシフェラーゼの発現をルミノメータで測定した。10 個のコロニーからレニラ・ルシフェラーゼを発現する 4 つのコロニーを同定した。この内、発現の高かった RLM 1 ならびに RLM 7 株を凍結保存した。なお、以後の実験には RLM 1 株を用いて解析した。

RNA-in situ hybridization による mRNA の局在の解析

RNA-in situ hybridization (FISH) は、既報告の方法により行った (Fujiwara *et al.*, 2010)。簡単には、細胞をカバーガラス上に培養し、サンプルを添加後適切な時間培養した。その後、PBS で洗い、10%ホルムアミドで固定化した。さらに 0.1% Triton X100 で細胞を透過化した。これを 2xSSC で洗浄し、Ambion 社の oligo-hybrid buffer で 1 時間処理した。その後 Cy3 で標識した oligo-dT と一晩ハイブリダイズした。翌日、2xSSC, 0.5xSSC, 0.1xSSC で洗浄した後、DAPI を用いて核を対比染色した。mRNA と染色体 DNA の局在を蛍光顕微鏡で観察した。

Reverse transcription (RT)-PCR によるレニラ・ルシフェラーゼ mRNA のスプライシング状態の解析

試料を添加した細胞から Sepasol を用いて定法により total RNA を抽出した。この内、0.5 μg の total RNA を逆転写し、cDNA を作製した。ついでレニラ・ルシフェラーゼのイントロンを挟む形で RT-PCR を行った。増幅した産物を 1% のアガロースゲルで電気泳動し、増幅したバンドを FAS-IV を用いて観察した。

サンプルのアッセイ

今回使用したサンプルは、中央味噌研究所のご協力により全国の味噌製造会社より収集した味噌と大豆分画物を使用した。味噌の原材料は、豆、米、麦の多岐にわたる。味噌 0.4g を 1 ml の水に懸濁した後、10 分間加熱処理した。固形物を除去するために遠心した。その後、上澄を回収してフィルター滅菌した。サンプルは、使用まで -20°C

で保存した。そのほかのサンプルは、DMSOあるいはPBSに溶解後、使用まで-20℃で保存した。サンプルを添加後、24時間培養した。その後、細胞を回収し、レニラ・ルシフェラーゼ用溶解液を使用してレニラ・ルシフェラーゼ測定用サンプルを調整した。

結果

スクリーニング系

本研究で使用したスクリーニング系を図1に示した。

テスト化合物スプライソスタチンを用いたアッセイ系の構築

アッセイ系が、味噌成分からの mRNA成熟因子探索に適しているかについて、すでに mRNA スプライシングを阻害することが報告されている化合物スプライソスタチン (SSA) を用いて検

味噌成分からの mRNA成熟阻害因子の探索とその評価系

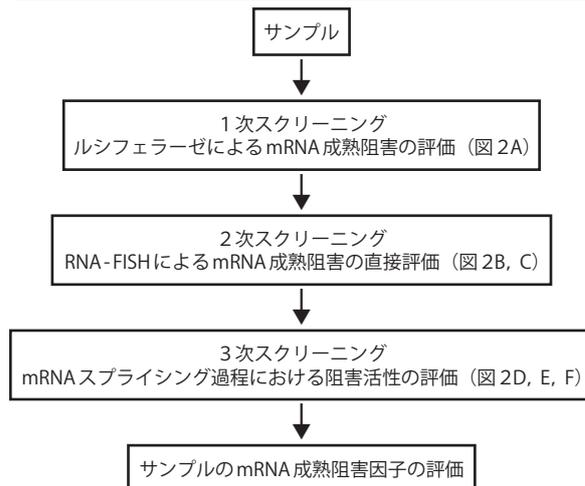


図1 本研究のスキーム

討した。まず SSA を RLM1株に添加後 24時間培養したもののルシフェラーゼ活性を測定した (図 2A)。

SSAの濃度依存的にルシフェラーゼの活性が低下していることがわかる。次いで mRNAの挙

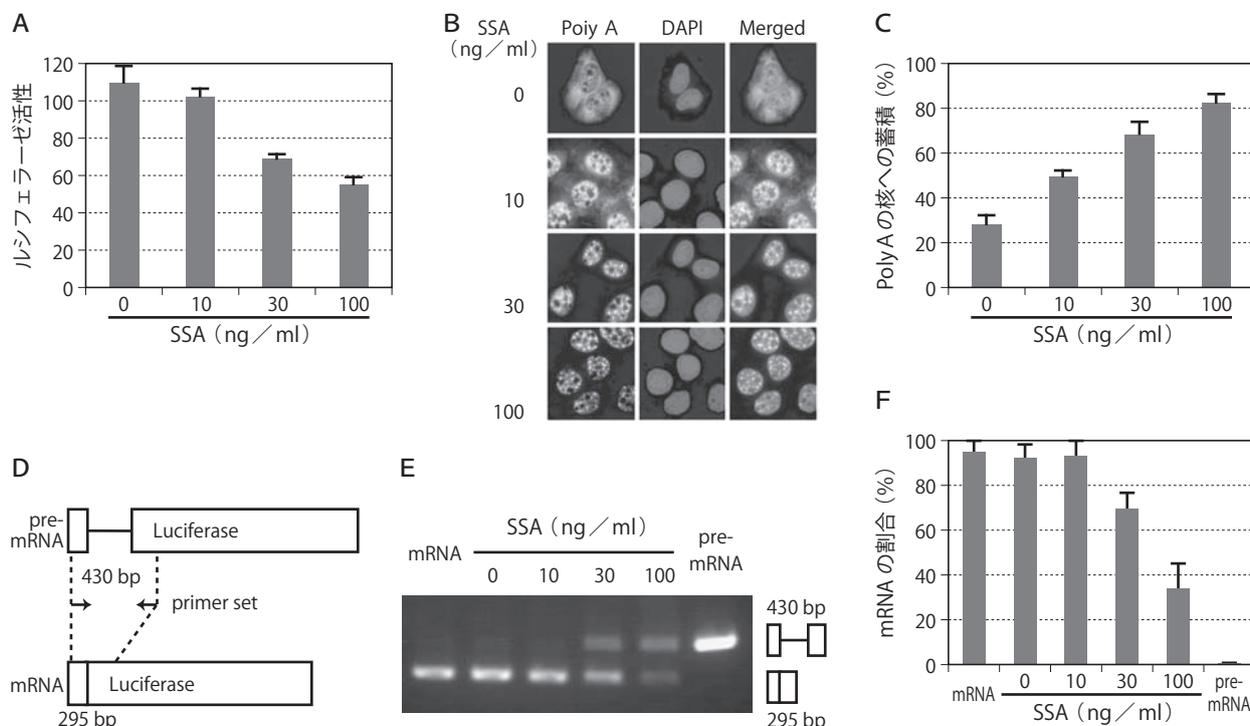


図2 スプライソスタチン (SSA) を用いたアッセイ系の検証

A ; SSAによるルシフェラーゼ活性の低下, B ; RNA-FISHによる mRNAの核内の蓄積, C ; Bのデータの定量化, D ; RT-PCR法によるルシフェラーゼ mRNAのスプライシング阻害の検出, E ; RT-PCRによるスプライシング阻害の検出, F ; Eのデータの定量化

動について RNA-FISH を用いて観察した (図 2 B, C)。SSA を処理しない場合, mRNA (赤色) は主として細胞質に存在していた。SSA を処理するとその局在は徐々に細胞質から核に移り, 100ng/ml SSA では, ほとんどの mRNA は核に局在し, mRNA の細胞質への輸送が阻害されていることを観察できた。最後に, スプライシングの状態について RT-PCR 法を用いて検討した。図 2 D は, ルシフェラーゼ遺伝子と PCR の増幅に使用した領域を示している。スプライシングが行われた mRNA は, 295 塩基対の大きさとなり, スプライシングが阻害されたことでイントロンが除去されない場合, 430 塩基対の大きさとなる。SSA を処理すると濃度依存的に 430 塩基対のバンドが生じていた (図 2 E, F)。これらの結果より, 本アッセイ系は, 味噌成分からの mRNA 阻害因子の探索に適したものに改変することに成功した (Fujita *et al.*, 2012)。

味噌からの mRNA 阻害活性の検出

今度は, 味噌サンプル中の mRNA 成熟阻害活性の測定を行った。これらを RLM 1 株に終濃度

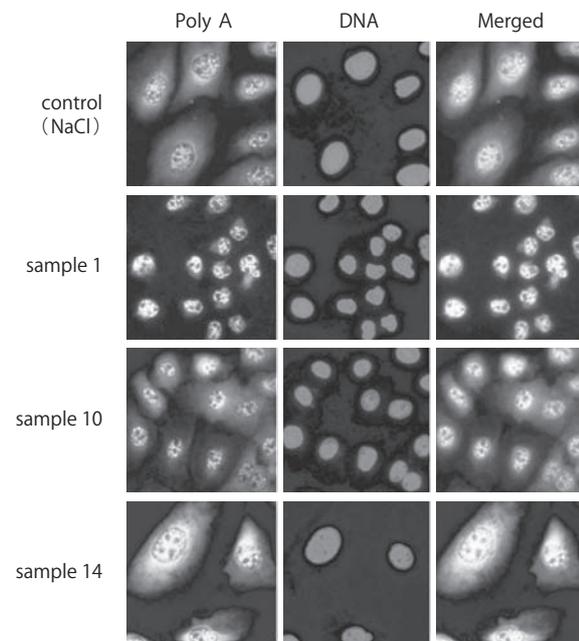


図 3 RNA-FISH を味噌サンプルを添加した細胞で観察した例

Poly A 欄は細胞内の mRNA の局在を, DAPI は染色体 DNA を示している。

1%, 3%, 10% (w/v) となるように添加し, 24 時間培養後, ルシフェラーゼの活性と細胞量の指標としてタンパク質量を測定した。すると終濃度 10% 添加した場合, いずれの味噌サンプルでも細胞のタンパク質量が大きく減少していた。一方 3% 添加の場合, 細胞のタンパク質量はコントロール群と差はなかった。そこで以後の実験においては 3% とした。

提供された 100 種類の味噌サンプルについて解析したところ, 1 回目の測定において, 45 種類に活性の低下が見られた。また 8 種類には活性の上昇が見られた。これら活性に変化の見られたサンプルについて再度検討したところ, 活性の低下した 45 種類中 9 種類において再現性が見られた。また活性上昇の見られた 8 種類のうち, 4 種類において再現性が見られた。

このようにいくつかの種類 of 味噌サンプルにおいてレニラ・ルシフェラーゼ活性の変化を観察できた。

RNA-FISH による核内 mRNA 蓄積の観察

いくつかのサンプルについて, RNA-FISH を行った。その結果, 味噌サンプル 1 では, コントロールに比べて優位に mRNA が核内に蓄積していた (図 3)。またサンプル 10 もその傾向が観察された。一方サンプル 14 では, コントロールと差は見られなかった。

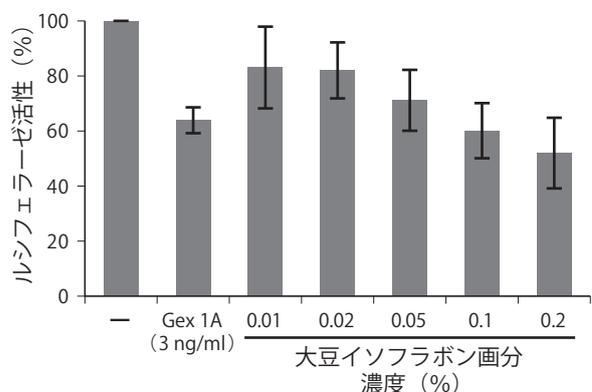


図 4 イソフラボン画分におけるルシフェラーゼ阻害活性

大豆由来のイソフラボン画分によるルシフェラーゼ阻害活性の測定, Gex1A は, mRNA スプライシングを阻害する化合物

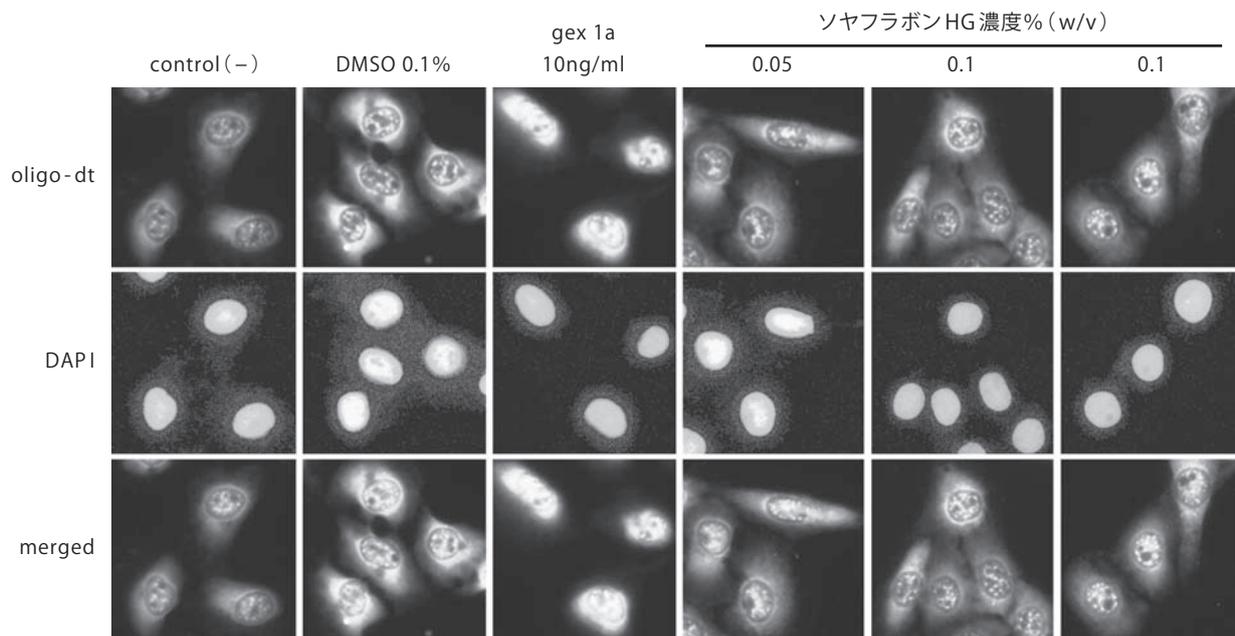


図5 イソフラボン添加サンプルでのNA-FISHの観察例
Oligo-dT欄は細胞内のmRNAの局在を、DAPIは染色体DNAを示している。

大豆イソフラボン画分中の mRNA成熟阻害活性の検出

いくつかの味噌サンプル中に mRNA成熟阻害活性が検出されたことから、その原材料として使用されている、大豆、米、麦成分中に mRNA阻害活性が存在するかについて解析した。今年度は、大豆に焦点を当てて解析を行った。するとイソフラボン画分に mRNA成熟阻害活性を検出した。まずルシフェラーゼ活性の結果を図4に示す。イソフラボンの添加濃度依存的にルシフェラーゼ活性が低下した。そこで2次スクリーニング系として RNA-FISH解析を行った。その結果、イソフラボン添加濃度依存的に核内 mRNAの蓄積が観察された (図5)。

考 察

本研究では、まず mRNAの成熟を阻害するアッセイ系を構築することにより mRNAの成熟を阻害する活性を持つ化合物を探索した。そのためにテスト化合物として mRNAスプライシング阻害活性を持つスプライソスタチンを用い、活性化合物の探索に適切なスクリーニング系を構築した

(Fujita *et al.*, 2012)。この探索系を用いて味噌サンプルについて検討した。様々な地方から集められた味噌サンプルを用いてアッセイしたところ、レニラ・ルシフェラーゼ活性の減少するもの、変わらないもの、増加するものが見られた。このことから、味噌によって中に含まれている化合物には多様性のあることが推察された。その中で再現性の得られた9種類の減少サンプルと4種類の増加サンプルは、さらなる解析が必要であると考えられた。また RNA-FISHを行い、mRNAの成熟を阻害するサンプルが存在していた。

いくつかのサンプル中に活性が存在すると考えられたため、その原材料中の活性化化合物の可能性を検討した。大豆・米・麦などの原材料より大豆に焦点を絞って解析したところ、ルシフェラーゼアッセイ並びに RNA-FISHアッセイからイソフラボン画分に活性化化合物の存在が認められた。今後は、RT-PCRによりスプライシングの阻害活性があるか、また活性化化合物の単離同定を進めていきたい。

謝 辞

本研究にあたり、味噌サンプルをご提供いただいた味噌製造各社に厚く御礼申し上げます。なお味噌サンプルの提供には、中央味噌研究所の御支援をいただきました。この場をお借りして御礼申し上げます。最後に本研究を支援していただいた社団法人中央味噌研究所に深謝いたします。

引用文献

- Fujiwara, N., Yoshikawa, M., Yamazaki, T., Kambe, T., Nagao, M., and Masuda, S. (2010). A screening method tuned for mRNA processing factors in human cells by evaluation of the luciferase reporter activity and the subcellular distribution of bulk poly(A)⁺ RNA. *Biosci Biotechnol Biochem* 74, 1512-1516.
- Fujita, K-I., Okamura, M., Nishimoto, S., Kurihara, T., Momma, K., Miyamae, Y., Kambe, T., Nagao, M., Narita, H. and Masuda, S. (2012) Establishment of the monitoring system which detects the inhibition of mRNA processing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 1248-1251
- Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2007). Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol* 3, 576-583.
- Kotake, Y., Sagane, K., Owa, T., Mimori-Kiyosue, Y., Shimizu, H., Uesugi, M., Ishihama, Y., Iwata, M., and Mizui, Y. (2007). Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol* 3, 570-575.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev* 19, 1512-1517.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304-308.
- Yamazaki, T., Fujiwara, N., Yukinaga, H., Ebisuya, M., Shiki, T., Kurihara, T., Kioka, N., Kambe, T., Nagao, M., Nishida, E., and Masuda, S. (2010). The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression. *Mol Biol Cell* 21, 2953-2965.

味噌の低アレルギー性と健康機能性の実証

森山 達哉

Evaluation of Hypoallergenicity and Health-Promoting Effect of Miso

Tatsuya MORIYAMA

*Department of Applied Life Sciences, School of Agriculture, Kinki University,
Naka-machi 3327-204, Nara, Nara, Japan 631-8505*

はじめに

味噌は、古くから食されてきた伝統的な食品で、主に調味料として幅広く使用されている。一般的な味噌の主成分は大豆であるが、大豆にはさまざまな生理機能成分が含まれていることが近年明らかになってきている¹⁾。たとえば、大豆タンパク質やペプチド、イソフラボンやサポニン、レシチン、リノール酸、大豆オリゴ糖などである。従って、主に大豆から製造される味噌にもまたこれらの健康機能成分が含まれており、また他にも米麹由来の成分や、発酵によって新たに生成・増強される有益成分や、ペプチドのように発酵により高機能化される成分などが豊富に含まれる¹⁾。

しかしながら、大豆は5大アレルギー食品として、一定のアレルギー誘発リスクを有していることが知られている²⁾。また、近年、花粉症と関連する新しい大豆アレルギーが明らかとなっており³⁾、小児だけでなく成人においても大豆のアレルギーは健康危惧要因として認識されてきている⁴⁾。このような、新しい大豆アレルギーも含めて味噌ではそのアレルギー性が低減化されていることが示唆されるが、実際に個々のアレルギーに対して解

析した例はほとんど見られない。

このような背景から一昨年度は、我が国における主要な味噌について、そのタンパク質パターンや各種アレルギーレベル、さらには各種味噌のエタノール抽出物のヒト肝細胞に対する脂質代謝適正化能を検討した。その結果、主要な味噌において、主要なアレルギーの存在レベルが低下していることを実証する事ができた。また、味噌抽出中には肝細胞からのアポB含有リポタンパク質（悪玉コレステロール）の分泌を抑制する効果を示すことも明らかにした。さらに、昨年度は、これらの低アレルギー性の相対値をデンストグラムで計測し半定量した⁵⁾。加えて、一部のアレルギーに関しては新たな抗体の作製を行うとともに新規な大豆アレルギー（PM30）のクローニング及び抗体作成にも成功した⁶⁾。

今年度は、これまでの研究をさらに発展させ、大豆以外の主要副産物として、コメや大麦由来のアレルギーの残存を評価するとともに、臨床的な味噌のアレルギーリスクを評価する目的で、大豆やコメアレルギー患者血清を用いた評価などを行った。

実験方法

(1) 味噌サンプル

味噌は中央味噌研究所より一昨年度供与いただいたものを解凍して用いた。実験に使用した味噌とその原材料の一覧を表1に示す。今回検討した味噌は、昨年同様、甘口米みそ1種類、辛口米みそ7種類、麦みそ、豆みそ各1種類である。

表1. 実験に使用した味噌とその原料

実験で使用した各種みその原材料	
甘味米みそ	: 米, 大豆, 食塩, 水飴, 酒精
辛口米みそA	: 米, 大豆, 食塩, 酒精
辛口米みそB	: 大豆, 米, 食塩
辛口米みそC	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
辛口米みそD	: 大豆, 米, 食塩
辛口米みそE	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
辛口米みそF	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
辛口米みそG	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
麦みそ	: 大麦, 大豆, 食塩, 酒精
豆みそ	: 大豆, 食塩

(2) 味噌からのタンパク質の抽出

昨年と同様に、一定量の味噌サンプルに水を一定量加え、ミキサーにて攪拌した。得られた抽出物をタンパク定量し、各アレルギーの検出に適した一定レベルのタンパク質量を電気泳動やウエスタンブロットリング、ELISAなどに供した。

(3) 味噌中に含まれる副産物(コメ, 大麦)のアレルギーレベルの評価

各種味噌サンプルを電気泳動に供し、コメのアレルギー(グリオキサラーゼ, RAG2, LTP1, α -グロブリン)や大麦のアレルギー(LTP)に対する特異抗体を用いてウエスタンブロットリングを行った。ウエスタンブロットリング法の手順としては、まず味噌サンプルをSDS化し、SDS-PAGEにて電気泳動を行ったのち、PVDF膜にセミドライブロットリング法にてタンパク質を転写した。転写後のPVDF膜はスキムミルクにてブロッキング後、各アレルギーに対する抗体(1次抗体)と反応させ、PBSTにて洗浄後、HRP標識抗マウスIgG, HRP標識抗ラビットIgGなどの2次

抗体を用いて反応させ、最終的にはHRPの化学発光基質(ECL western blotting detection reagent)を用いて発光させ、X線フィルムに露光させた。X線フィルムはレンドール、酢酸、レンフィックスを用いて現像・固定した。

(4) 患者血清を用いた味噌のアレルギー性の評価(IgE-ELISA)

同一タンパク質量の大豆・コメ抽出液または各種味噌サンプルをELISAプレートに固相化し、ブロッキング後、大豆やコメに反応する市販のアレルギー患者血清を50倍希釈にて2時間反応させた。その後、ウェルを洗浄し、HRP標識抗ヒトIgE抗体を反応させ、最終的にはTMB発色試薬を用いて発色させ、リン酸にて反応を停止した。反応停止後の黄色の発色をプレートリーダーを用いて450nmの吸光度を測定した。

結果と考察

(1) 各種米味噌での副産物であるコメのアレルギーの評価(イムノブロットリング)

コメの主要アレルギーとして、 α -グロブリン, LTP1, グリオキサラーゼ, RAG2などが知られている。そこで、大豆以外に、味噌の副産物としてのコメのアレルギーに注目した。LTP1はLipid Transfer Proteinであり、もともとは脂質結合タンパク質として機能解析が行われたアレルギーであるが、近年の研究では、これは植物が病害虫被害や生育ストレスに晒された際に生体防御のために発現が増加する感染特異的タンパク質の一種と考えられている⁷⁾。

コメのLTP1に対する特異抗体は、コメ中の本分子を明瞭に検出できたが、米みそ中の本アレルギーはまったく検出できなかった(図1)。従って、コメのアレルギーであるLTP1は味噌の発酵・醸造中に効率的に分解を受けることが判明した。LTP1は、汎アレルギーとして、消化抵抗性があり、食物アレルギー発症において重篤なアナフィラキシー症状を引き起こす強力なアレルギーとして知られている。従って、味噌ではそのリス

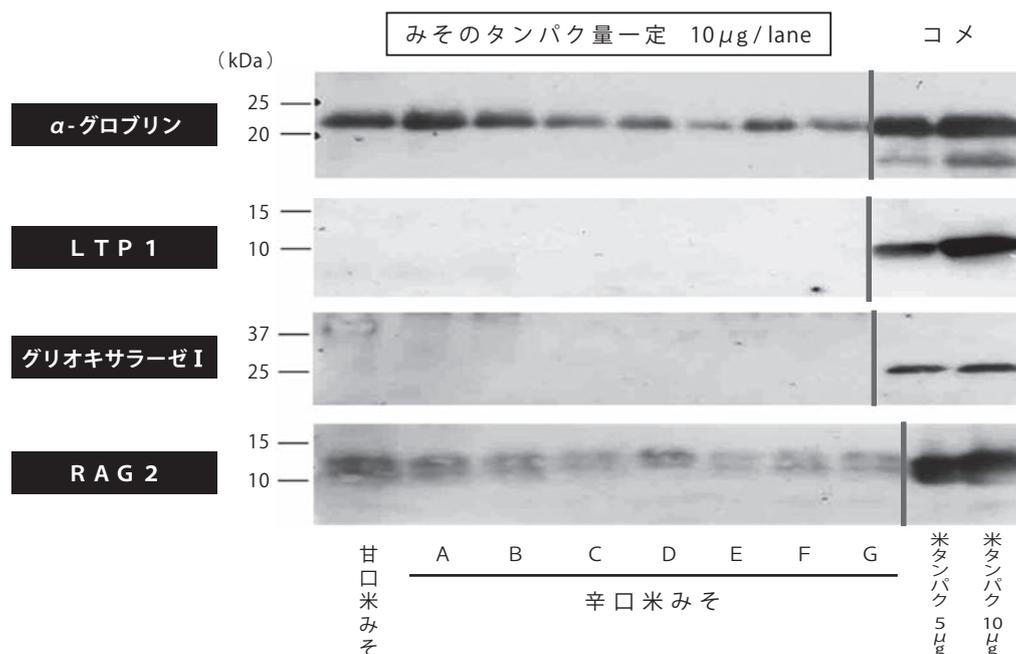


図1. 米味噌における主要米アレルゲンの検出

クは少ないと考えられた。

コメアレルゲンのうち、グリオキサラーゼI[®]についても検討したところ、このアレルゲンもコメ中では明瞭な反応性を示したが、米みそ中では検出出来なかった。従って、本アレルゲンもLTP1と同様に味噌の発酵・醸造過程で分解を受けやすいものと考えられた。

一方、コメアレルゲンのうち、RAG2や α -グロブリンに関しては、味噌中にも有意に検出された(図1)。特に、 α -グロブリンは、甘口米みそや辛口米みそのうちの醸造期間の短いと思われる淡色系の味噌では、ほとんど分解されていないと思われるものも見られた。RAG2に関しても、甘口米みそや辛口米みそのうちの醸造期間の短いと思われる淡色系の味噌では分解の程度が弱いことがわかった(図1)。従って、これらのアレルゲンに感作されているコメアレルギー患者においては、味噌の摂取でも臨床反応を引き起こす可能性が否定できないため、注意が必要である。

(2) 大豆アレルギー患者血清を用いた味噌のアレルゲン性の評価 (IgE-ELISA) (図2)

次に、より臨床的なアレルゲン性を評価するために、大豆に反応する3名の市販アレルギー患者

血清を用いて、各種味噌に対する反応性をIgE-ELISAにて検討した。コントロールとして、大豆抽出液(豆乳)を用いた。その結果、いずれの場合も、大豆抽出液(豆乳)と比べて、いずれの味噌でもIgE結合性は低下しており、特に豆味噌は低かった。甘口米みそや一部の辛口米みそでは、一部反応性の残存が確認されたが、それ以外の味噌ではほとんど検出できなかった。また、これまでの研究でも指摘したとおり、豆味噌においては各種アレルゲンが極めて少ない事が明らかとなっているが、患者血清を用いた本実験においても、豆味噌では反応性が極めて低いことが明らかとなった。これまでに大豆の各種アレルゲンの存在レベルを各アレルゲン特異抗体を用いて検討してきたが、今回はより臨床的なアレルゲン性を評価しうる患者血清を用いた評価を行ったが、同様に低減化が評価できた。従って、これら2つの評価系によって、味噌における大豆アレルゲンリスクの低減化を実証することができた。

(3) 米アレルギー患者血清を用いた味噌のアレルゲン性の評価 (IgE-ELISA) (図3)

同様に、各種米味噌における、米アレルギー患者血清を用いた反応性をIgE-ELISAにて検討し

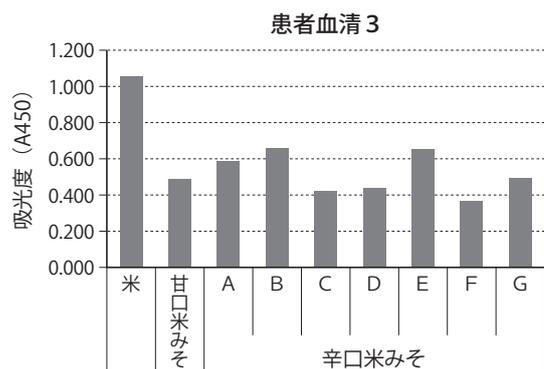
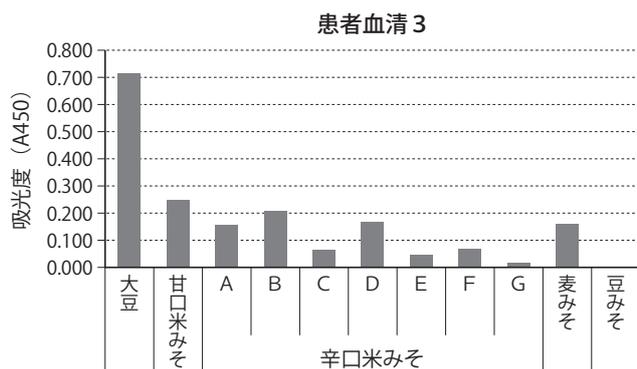
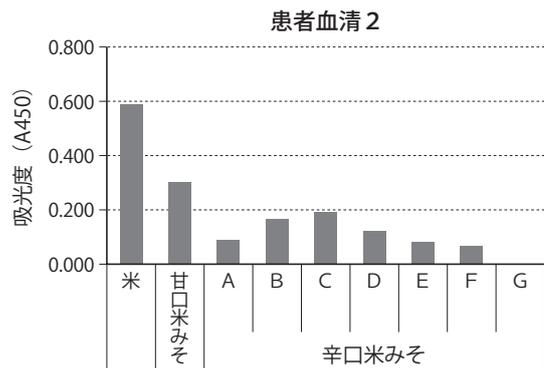
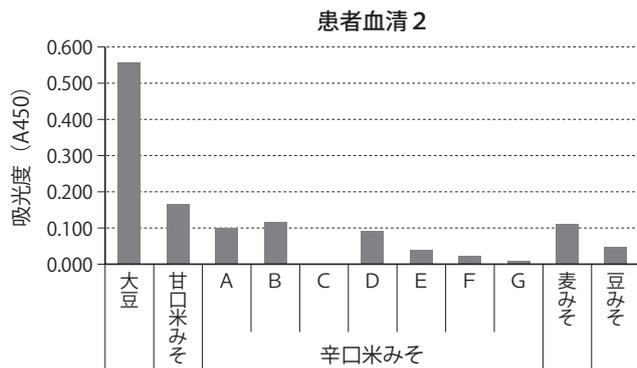
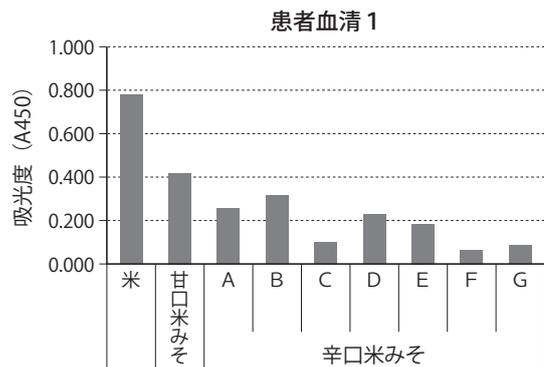
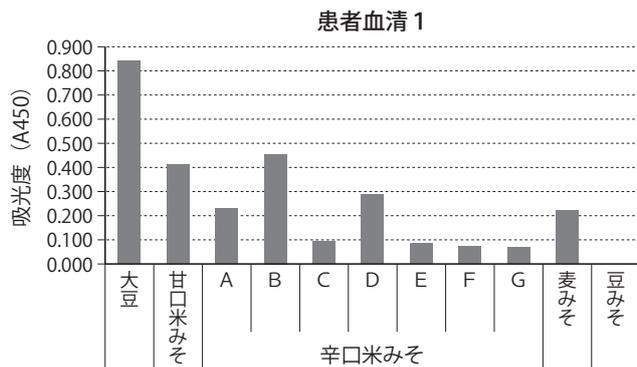


図2. 各種味噌に対する大豆アレルギー患者血清IgEの結合性の検討

図3. 各種米味噌に対する米アレルギー患者血清IgEの結合性の検討

た。コントロールとして、米抽出液を用いた。患者血清として3名分の市販血清を用いた。その結果、いずれの場合も、米抽出液と比べて、いずれの味噌でもIgE結合性は低下していた。ただし、甘口米みそや一部の辛口米みそでは、半分程度の反応性の残存が確認された血清も認められた。特に、患者血清3においては、いずれの味噌でも半分程度の反応性の残存が見られたが、これは、米アレルギーのうち抵抗性のあるRAG2や α -グロブリンが関与している可能性があり、一部の米アレルギー患者では注意が必要である。

(4) 麦味噌における副材料である大麦のアレルゲンの評価 (イムノブロッティング)

麦味噌においては、麦由来のアレルゲンが残存している可能性が考えられた。そこで、大麦の主要アレルゲンであるLTPに対する抗体を用いて、麦味噌に対するイムノブロッティングを行ったが、検出限界以下であり検出出来なかった(データ省略)。そこで現在、より高感度なサンドイッチELISAにて検討を行っている。

(5) 大豆及び味噌の人工消化系における消化抵抗性の評価

一般に、食物アレルギーなどのアレルギー性のタンパク質は、ペプシンやトリプシンなどの消化酵素に対して抵抗性があることが知られている⁹⁾。これは、消化酵素からの分解を免れて腸管へと到着しやすく、未消化で腸管から吸収されることによって感作や発症（惹起）などが引き起こされるためである。また実際に、豆腐と豆乳では含まれるアレルギーの消化抵抗性が大きく異なり、それがアレルギー性の差異に影響している可能性が示されている¹⁰⁾。そこで、今回は味噌の形態中の大豆アレルギーが消化抵抗性を有しているかどうかを人工消化系を用いて検討した。

甘口米味噌（白味噌）は、醸造期間が短いため、味噌の中では比較的アレルギーが残存しているが、これを人工消化系で評価したところ、最も消化性の良いと考えられる液体形態の大豆抽出液（豆乳）と比べて同等の消化性を示した（データ省略）。従って、味噌の被消化性は液体の豆乳と同等であり、アレルギー性と相関する消化抵抗性は賦与されていないと考えられた。よって、味噌は発酵・熟成の過程ですでに大豆・コメ・麦のアレルギーが高度に分解されているのみならず、経口摂取後も被消化性の高い豆乳と同等にアレルギーが消化されることが判明した。さらに、実際の大豆やコメのアレルギー患者の血清IgEの結合性も有意に低く、これまでの結果とも合わせて味噌の低アレルギー性が立証された。

以上の結果より、味噌は、大豆以外の副材料であるコメや大麦のアレルギーも十分に低減化していることが判明した。ただし、コメの場合、RAG2や α -グロブリンに関しては、いずれの味噌でもアレルギーが比較的高レベル残存している事が判明した。また、大豆アレルギーでも、コメアレルギーでも、アレルギー性の低減化は、熟成期間の長い豆味噌が優れており、このことから発酵熟成過程がアレルギー分解や機能成分の増加といった健康機能性に有益な変化をもたらすと考えられた。

謝 辞

本研究は、(社)中央味噌研究所からの研究助成を受けて行われました。関係各位に厚く御礼申し上げます。また、研究の実施にあたりご指導、ご協力頂きました河村幸雄教授、矢野えりか研究員、鶴澤有希研究員に感謝いたします。なお本研究で使用しました大麦LTP抗体は、京都女子大学の成田宏史先生より、コメのアレルギーに対する抗体は、(独)農研機構 食品総合研究所の橋田和美博士より供与いただきました。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 河村幸雄, 大久保一良 編 (1998): *ダイズのヘルシーテクノロジー*. 光琳, 東京.
- 2) Ogawa T., Samoto M., Takahashi K., "Soybean Allergens and Hypoallergenic Soybean Products" *J. Nutr. Sci. and Vitaminol.* Vol. 46, No. 6, p.271-279, (2000).
- 3) 足立厚子, 森山達哉, 原田 晋, 福永 淳, 堀川達弥, 田中 昭, SJORANDER Sigrid, 「豆乳アレルギーにおける Gly m4, Gly m3 特異 IgEの重要性について」 *Journal of environmental dermatology and cutaneous allergology* 5(5), p.431-438, (2011).
- 4) 森山達哉「各種大豆加工食品のアレルギーリスク評価」, *フードジャーナル*, 2012年1月号, p.55, (2012).
- 5) 森山達哉「大豆アレルギーの多様性と味噌の低アレルギー性の検証」 *日本醸造協会誌 (Journal of the Brewing society of Japan)*, 106, p.645-655, (2011).
- 6) 末森佑輔, 矢野えりか, 吉村征浩, 財満信宏, 等々力節子, 森山達哉, 河村幸雄「新規大豆アレルギーPM30のクローニングと変動解析」日本農芸化学会大会(京都)(2012.3)
- 7) Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D, "Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens." *Clin Exp Allergy* 34, p.1336-41, (2004).

- 8) Usui Y, Nakase M, Hotta H, Urisu A, Aoki N, Kitajima K, Matsuda T: "A 33-kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. japonica). cDNA cloning, expression, and identification as a novel glyoxalase I. " *J Biol Chem* 276, p.11376-11381, (2001).
- 9) Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. "Stability of food allergens to digestion in vitro." *Nature Biotechnology* ., 14, p.1269-1273. (1996).
- 10) Adachi, A., Horikawa, T., Shimizu, H., Sarayama, Y., Ogawa, T., Sjolander, S., Tanaka, A., and Moriyama, T., "Soybean β -conglycinin as the main allergen in a patient with food-dependent exercise-induced anaphylaxis by tofu: Food processing alters pepsin resistance" *Clinical & Experimental Allergy* 39(1) p.167-173 (2009).