

# 委 託 研 究 報 告

平成24年度社団法人中央味噌研究所委託研究による研究報告

## 市販味噌に混入した食中毒菌の死滅特性に関する 実証データの収集

細谷幸恵, 齊藤美枝, 川崎晋, 稲津康弘\*

\* 責任著者 (Corresponding author)

Fate of *Escherichia coli* O157 contaminated into commercially supplied  
salt fermented soybean paste (Miso)

Yukie HOSOTANI, Mie SAITO, Susumu KAWASAKI and Yasuhiro INATSU\*

英文所属

2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

2011年および2012年に発生した、いわゆる「ユッケO157食中毒事件」や「白菜浅漬けO157食中毒事件」など、国内において大小の食中毒事件の発生が後を絶たない。厚生労働省「食中毒統計」によると、2002年から2012年の10年間に発生した味噌を原因食品とする食中毒事件は、2008年の「なめ味噌」を原因とする黄色ブドウ球菌食中毒事件が唯一のものであり、他の種類の食品と比較した場合、国内で販売される味噌が特に危険な状態にあるというわけではない。とはいえ、「食の安全」に対する消費者の不安の聲に答えるためには、安全性を立証するための根拠となる、信頼のおける実験的な証拠が必要であるのも事実である。

味噌の微生物学的安全性は発酵によって生成したアルコール、有機酸、および加塩による水分活性の低下等の相乗効果によって担保されると考えられている。1980～90年代に行われた研究<sup>1-5)</sup>によると製造工程中に混入させた大腸菌は熟成過

程で死滅し、また製造後の味噌に混入した大腸菌は特定の保存条件下では検出限界以下まで減少するものの、冷蔵下では10日以上生存することが判明している。しかしながらこれらの実験は菌の種間による死滅特性の違いや、味噌の種類の違いについて十分な検討が行われているとはいいがたく、また十分な反復試験が行われていないために、結果の信頼性を評価することが困難である。これに加え、近年では「減塩」「だし入り」等、種々の味噌製品が製造されていることから、これら製品の特性を考慮した上で、微生物学的安全性の再検討を行う必要もあるといえよう。そこで本研究では複数の腸管出血性大腸菌O157を用いて、低温～常温の温度域における、各種味噌中での同菌の死滅特性を測定し、もって市販味噌の微生物学的安全性に関する科学的証拠を得ることを目的とした。

## 材料および方法

市販味噌の販売状況を元に中央味噌研究所が選定した 24 種類（原料：米 16 種類，豆 2 種類，麦 3 種類および調合 3 種類）を実験に用いた（表 1）。商品開封直後に一部の味噌を取り，電極法あるいは酵素法を用いて，その pH 値，塩分濃度，水分活性（Aw）およびエタノール濃度の測定を行った。

それぞれの味噌を滅菌済みの 200mL プラスチックカップに約 200g 入れ，これに大腸菌 O157 株の 37°C 一晚培養液（リファンピシン添加ブレインハートインフュージョン培地，5mL）混合物を 1.0mL 混入させることで，およそ 8 log CFU/g の初発大腸菌 O157 数を持つ検体を作成した。大腸菌を混入させた検体は 5，10，20 および 30°C の 4 温度帯で保存し，一定時間ごとに十分，混合後，10g をサンプリングした。実験に用いた大腸菌 O157 株（CR-3，MN-28，MY-29，DT-66 および CE-278）はいずれもウシ糞便から分離された，ベロ毒素生産性を有しない株である。これらのリファンピシン耐性自然突然変異株を味噌に接種し，リファンピシンを含むトリプティケースソイ寒天（TSA）培地で計数した。この方法を用いると，ソルビトールマッコンキー寒天培地等の選択培地を用いる場合よりも高い効率で，共存するほとんどの微生物による妨害を受けることなく，損傷菌の一部をも含めた大腸菌数を計数することができる<sup>6)</sup>。寒天平板法の検出限界は 200CFU/g であるため，これより低い生菌数（最頻値）はリファンピシン添加トリプティケースソイ培地を用いた MPN5 本法で測定した。培養後の MPN 管より液体培地を 1 白金耳取ってこれをリファンピシン加 TSA に接種し，生じたコロニーのインドール反応を確認することで，MPN 管内の大腸菌の存在の有無を確認した。

以上の実験は数ヶ月おきに異なるロットの味噌を用いて 5 回繰り返した。得られた生菌数（最頻値）は対数化の後，ノンパラメトリックな統計解析を行った。

表 1. 実験に用いた検体

原 料	アルコール添加			従来製法
	減 塩	だし入り	だし無し	
大 豆		1		1
調 合		1		2
大 麦			2	1
米	1	2	3	10

表内の数字は検体数を示す。

## 結 果

実験に使用した 24 検体の pH，エタノール濃度，塩分濃度および水分活性の平均値およびそれらの母平均の 95% 信頼区間はそれぞれ 5.44 (5.49-5.40)，0.15 (0.15-0.14%)，12.0% (12.4-11.7%) および 0.74 (0.75-0.73) であった。分散分析および多重比較検定の結果，pH と水分活性についてはそれぞれ異なる検体の組み合わせで 1 組ずつについて有意な違いが検出され，その違いの大きさは 0.59 および 0.12 であった。塩分濃度については 1 検体のみ他検体と比較して有意に低い (5.5%) ものが存在した。エタノール濃度については検体間の有意な差は検出されなかった (以上，データは省略)。

24 検体の大腸菌 O157 生菌数の変化を 5 反復で測定した。いずれの保存温度においても，24 検体全体として見た場合，味噌の原料あるいはアルコール添加の有無による，実用上意味のある大腸菌の死滅特性の違いは見いだされなかった (データは省略)。そこで各貯蔵期間後における 24 検体 × 5 反復の全測定値を用いて箱ひげ図を作成した。8 log CFU/g の初発菌量からスタートした場合，5 °C 保存では 105 日後においても中央値 2.5 log CFU/g (最大値 4.5 log CFU/g ~ 最低値 -0.7 log MPN/g 以下) の大腸菌の生存が確認された (図 1)。10°C 保存では 70 日目に少なくとも全体の 75% から大腸菌が検出されなくなったが (検出限界 -0.7 log MPN/g)，95 日目においても 1.5 log MPN/g の生菌数を示したものが存在した (図 2)。20°C 保存では 12 日目に少なくとも全体の 75% から大腸菌が検出されなくなったが，18 日目においても 2.2 log MPN/g の生菌数を示

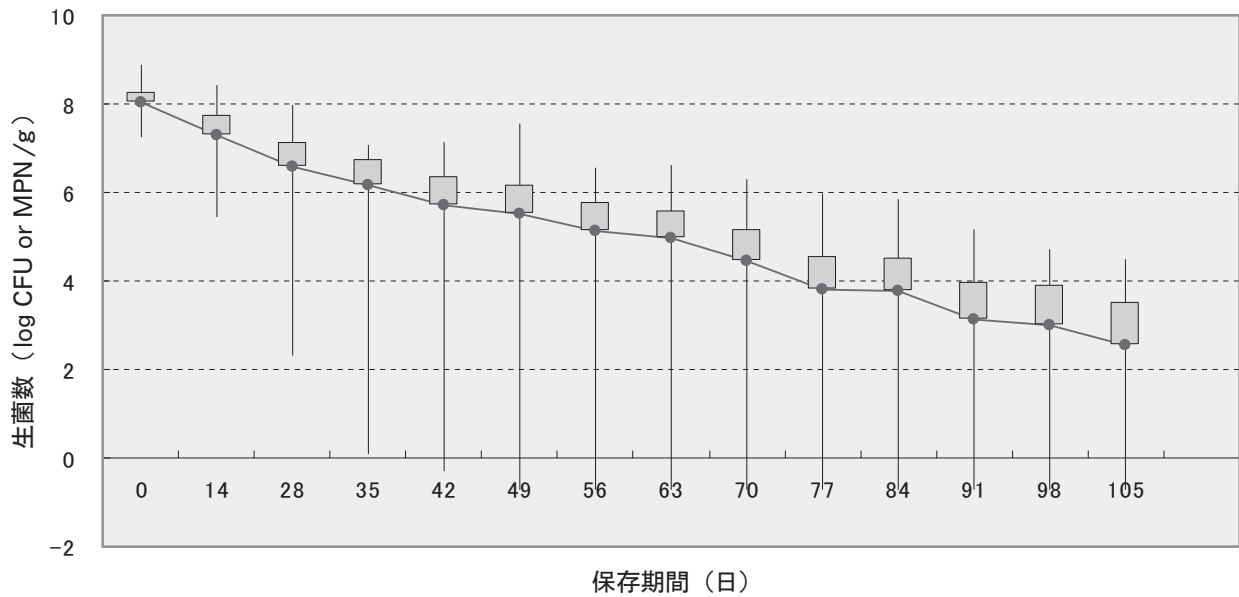


図1. 5°C保存における大腸菌 O157生菌数の減少

24献体5反復測定 (n=120) による生菌数の0 (最低値), 25, 50 (中央値: ●), 75および100 (最大値) パーセンタイル値を示した (図2~4も同様)

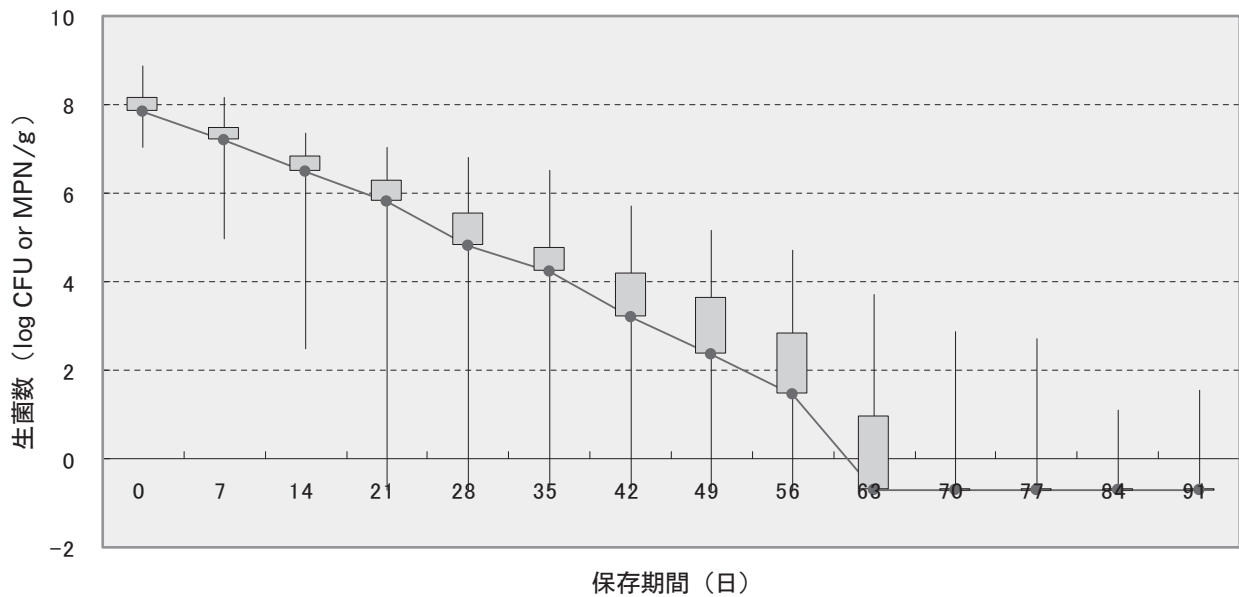


図2. 10°C保存における大腸菌 O157生菌数の減少

したものが存在した (図3)。30°C保存では少なくとも6日目までは全体の75%以上から大腸菌が検出され (図4), 12日目においても2.2 log MPN/gの生菌数を示したものが存在した (データは省略)。

## 考察

味噌製品中に混入した食中毒菌の挙動に関する先行研究の結果として, 次に挙げたようなものが報告されている。

1. 伊藤ほか 味噌の科学と技術. 24 (2) 32-33 (1976)

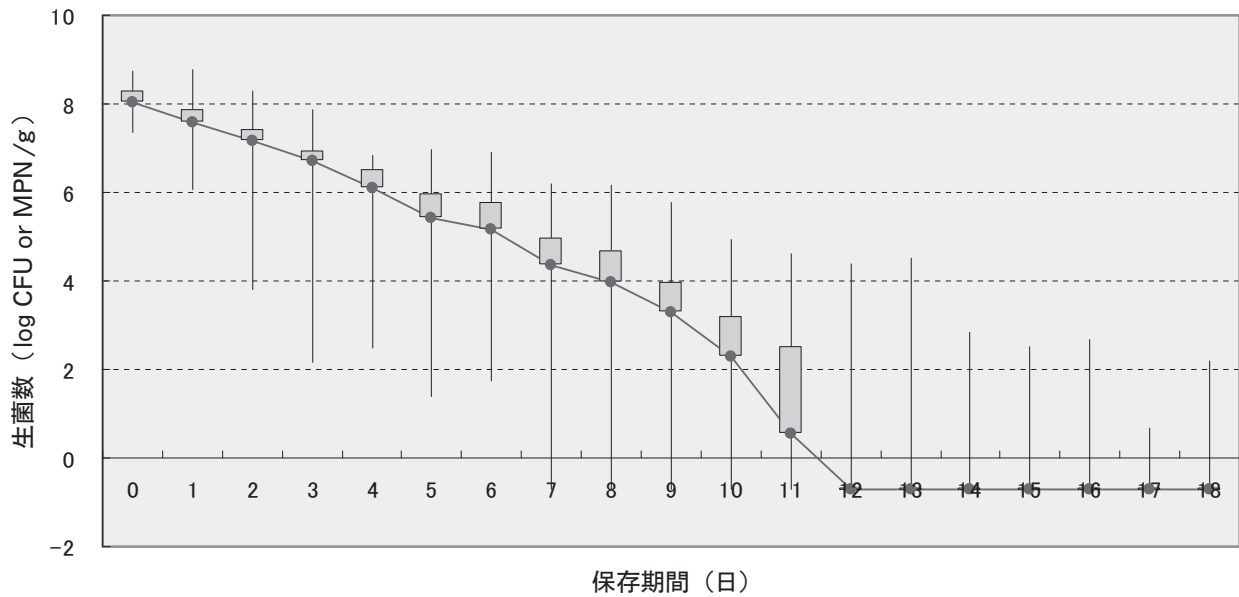


図 3. 20°C保存における大腸菌 O157 生菌数の減少

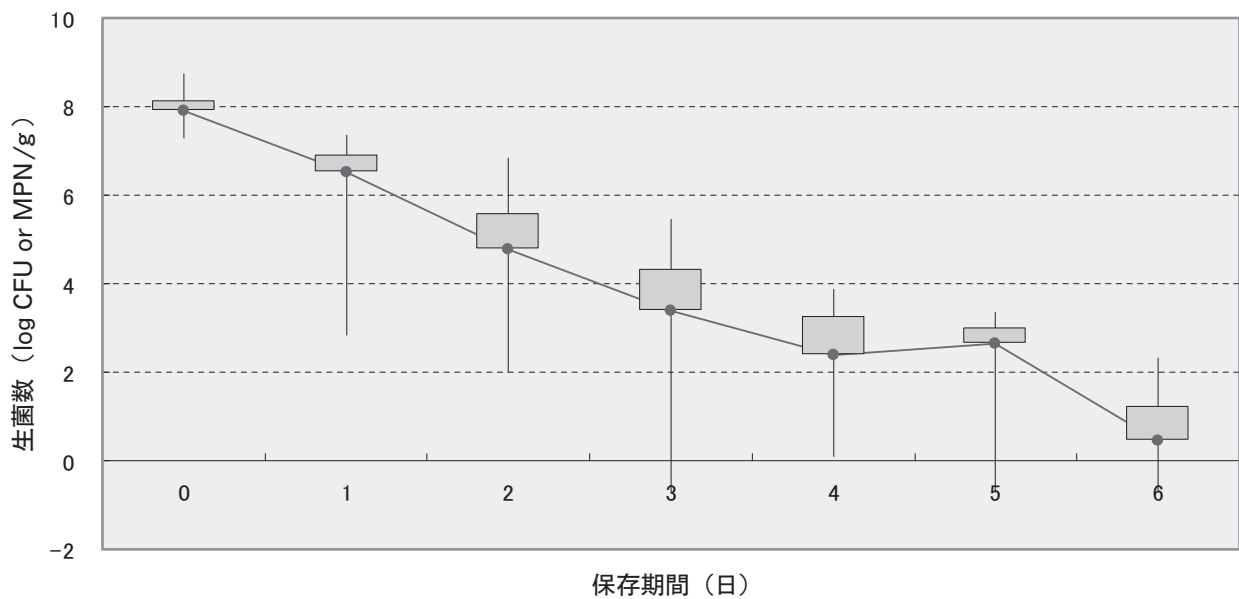


図 4. 30°C保存における大腸菌 O157 生菌数の減少

全国各地の市販味噌 101 点（水分 37.5～59.7%，食塩濃度 5.1～14.3%，pH4.61～5.22%，全糖 3.9～36.1%）の大腸菌群，腸炎ビブリオおよび黄色ブドウ球菌を検査した結果，大腸菌群および腸炎ビブリオは全て陰性，32 点（65 工場中 29 工場）がブドウ球菌陽性（全てコアグラゼ陰性）であった。

## 2. 窪田ほか 醸協 . 76 (12) 821-826 (1981)

食塩濃度 0，2.6，5.2，8.6 および 12.3% の味噌に大腸菌（8 log CFU/g），ブドウ球菌（6 log CFU/g）および腸炎ビブリオ（3.5 log CFU/g）を混入し，30°C で保存した結果，7 日後には無塩味噌を含め，全ての検体で菌数が検出限界以下まで低下した。試験に使用した味

噌の pH は 4.85 ~ 5.02 と増殖下限に近く、水分活性は 0.752 (塩濃度 18.3%) ~ 0.903 (塩濃度 0%) で、これも使用した菌の増殖下限に近かった。無塩味噌で大腸菌数が 6 log CFU/g から 1 log CFU/g まで落ちるのに必要な時間は 5°C で 20 ~ 30 日、室温 (12.0 ~ 34.5°C) で 4 ~ 6 日、30°C で 4 日であった。低塩味噌 (食塩 11.2%) で大腸菌数が 7 log CFU/g から 1 log CFU/g まで落ちるのに必要な時間は 5°C で 10 日、室温で 2 ~ 4 日、30°C で 2 日であった。無塩味噌でブドウ球菌数が 6 log CFU/g から 1 log CFU/g まで落ちるのに必要な時間は室温で 15 日、30°C で 6 ~ 10 日であり、5°C では 4-3 log CFU/g までしか落ちなかった。低塩味噌 (食塩 11.2%) でブドウ球菌数が 7 log CFU/g から 1 log CFU/g まで落ちるのに必要な時間は室温で 10 ~ 15 日、30°C で 4 - 6 日であり、5°C では 4-2 log CFU/g までしか落ちなかった。

### 3. 伊藤ほか 味噌の科学と技術 . 31 (3) 102-106 (1983)

仕込み混合時に大腸菌を 4 log CFU/g 混入させ、30°C 熟成中の菌数変化を測定したところ、塩濃度 0 ~ 12% のいずれの検体も 2 ~ 4 日で検出限界以下まで菌数が低下した。

### 4. 著者なし 味噌の科学と技術 . 45 (7) 274-282 (1997)

味噌 12 種類 (米味噌 8 種類、麦味噌 2 種類、豆味噌 1 種類、混合味噌 1 種類) に大腸菌 O157 : H7 (ATCC43890, ATCC43895 単独) を 5 log CFU/g 接種して 30, 20 および 5°C で保存 (24hr および 72hr) したところ、30°C では 24 時間後に 3 log CFU/g ~ 検出限界以下、72 時間後には全て検出限界以下、20°C では 24 時間後に 4 log CFU/g ~ 検出限界以下、72 時間後にも 4 log CFU/g ~ 検出限界以下、5°C では 24 時間後に 5 ~ 4 log CFU/g、72 時間後には 4 log CFU/g ~ 検出限界以下まで、それぞれ菌数が低下した。

### 5. 伊藤ほか 味噌の科学と技術 . 47 (7) 243-246 (1999)

米味噌 6 種類にサルモネラ (IFO3313) を 5

log CFU/g 接種して 30, 20 および 5°C で保存したところ、30°C では 1 ~ 3 日で検出限界以下、20°C では 2 ~ 10 で検出限界以下、5°C ではアルコール添加のものは 7 ~ 30 日で検出限界以下まで菌数が低下したが、アルコール未添加のものは 30 日後も 3 log CFU/g ほどの菌が検出された。

本研究で得られた結論のうち、保存温度の影響については、先行研究で得られていた知見とおおむね一致する傾向がみられた。すなわち、8 log CFU/g という極めて高い菌数から開始した場合でも、常温 (20°C) で保存するとほとんどの場合、2 週間以内に検出限界以下まで生菌数が下がる (しかし例外的に 16 日目に 2-3 log CFU/g の生菌数を示す場合もある)。30°C で保存すると、ほとんどの場合、6 日以内に検出限界以下まで生菌数が下がる (しかし例外的に 6 日目に 2 log CFU/g の生菌数を示す場合もある)。一方、10°C 保存で同様の状況に至るのに必要な日数は少なくとも 77 日であり、5°C で保存した場合は 112 日後においてもまれに 3 log CFU/g の生菌数を示す場合があることが判明した。以上の結果から、味噌中に大腸菌が混入した場合に菌が増殖することはないものの、保存温度の如何によっては長期間にわたり菌が残存する場合もありえることが判明した。とはいえ、通常の単体生味噌の流通過程から考えると、パッケージ直前にごく微量 (2 log CFU/g 程度) の大腸菌 O157 が混入したとしても、常温流通の過程でほとんどの場合は完全に死滅することが期待できる。一方、調理現場等でこれら製品の開封後に大腸菌 O157 汚染が発生した場合、その後の常識的な期間の低温保存では菌の死滅が期待できない。それゆえ、開封後 (商品購入後) の交差汚染の防止を図ることが、食中毒防止のためには重要であるといえる。なお、本実験の結果、大腸菌の生存・死滅性に関しては原料の違いによる大きな違いは見られておらず、また味噌の pH 値、塩分濃度、エタノール濃度または乳酸濃度と菌の死滅性の間に実用上、意味のあるレベルの明確な関連も確認できなかった。ゆえに上述した結論は、市販の大抵の味噌について

妥当するものと考えられる。ただし，特に水分が多いあるいは塩濃度が低いといった商品についてまで，この結果が適用できるか否かについては不明である。

#### 参考文献

- 1) 伊藤ほか 味噌の科学と技術 . 24 (2) 32-33 (1976)
- 2) 窪田ほか 醸協 . 76 (12) 821-826 (1981)
- 3) 伊藤ほか 味噌の科学と技術 . 31 (3) 102-106 (1983)

- 4) 著者不明 味噌の科学と技術 . 43 (7) 274-282 (1997)
- 5) 伊藤ほか 味噌の科学と技術 . 47 (7) 243-246 (1999)
- 6) Inatsu et al. J. Food Prot. 67(7). 1497-1500 (2004)

#### 謝 辞

本研究は（一社）中央味噌研究所の研究助成と試験材料の提供にもとづき実施した。関係者各位に感謝申し上げます。

# 習慣的味噌汁摂取による 抗高血圧作用の機序に関する研究

上原 誉志夫

宮本 悠紀, 海老澤 香里, 吉永 真理子

The mechanisms of antihypertensive effects of long term intake of Miso soup

Yoshio UEHARA

Yuki MIYAMOTO, Kaori EBISAWA, Mariko YOSHINAGA

*Laboratory of Clinical Nutrition, Faculty of Home Economics, Kyoritsu Woman's University  
2-2-1 Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8437, Japan*

## はじめに

我々はすでに、習慣的味噌汁摂取が Dahl 食塩感受性高血圧を減弱し、心臓・腎臓の機能的組織学的障害を軽減することをみいだしてきた。その降圧機序として、①消化管での食塩吸収抑制、②血管壁への直接的降圧作用、または③腎臓・心臓・血管への機能保護効果を介した血圧下降の可能性が考えられた。特に、味噌成分による臓器保護に関しては、これまでの試験的研究から味噌には酸化ストレスを減少する効果があることがわかっている（未発表）。酸化ストレスの減少は血管内皮機能を保護し、一酸化窒素産生能を高めることで血管拡張、臓器血管保護に働く。これらを踏まえ、本研究では、味噌による降圧機序を明らかにするため、味噌による血管内皮機能保護の有無とそれによる一酸化窒素代謝系の活性化に焦点を当てて動物実験で実証するとともに、人間ドック受診者を対象に臨床的に検証することを目的とした。

## 1) 食塩の消化管吸収調節と味噌汁の効果

我々はすでに習慣的味噌汁摂取が Dahl 食塩感受性ラットにおける食塩依存性高血圧を減弱し、含有される食塩の 30% の減塩効果があることを報告した。機序として消化管でのナトリウム吸収を抑制する可能性があり、この点を明らかにするため糞便中へのナトリウム排泄に及ぼす習慣的味噌汁摂取の効果について代謝ケージを用いたバランス・スタディを実施し検討した。食塩摂取により影響を受けない Wistar 系ラットを用い、5% 味噌汁摂取群（0.6% 食塩水に相当）と 0.6% 食塩水摂取群に分け、糞便中のナトリウム排泄量を比較検討した。ナトリウム量は電極法を用いて測定した。

## 【目的】

味噌は伝統的な日本の食品で、大豆と麴と食塩を混ぜ合わせ発酵熟成させたものであり、たんぱく質、炭水化物、脂質、ビタミン、灰分、食物繊維



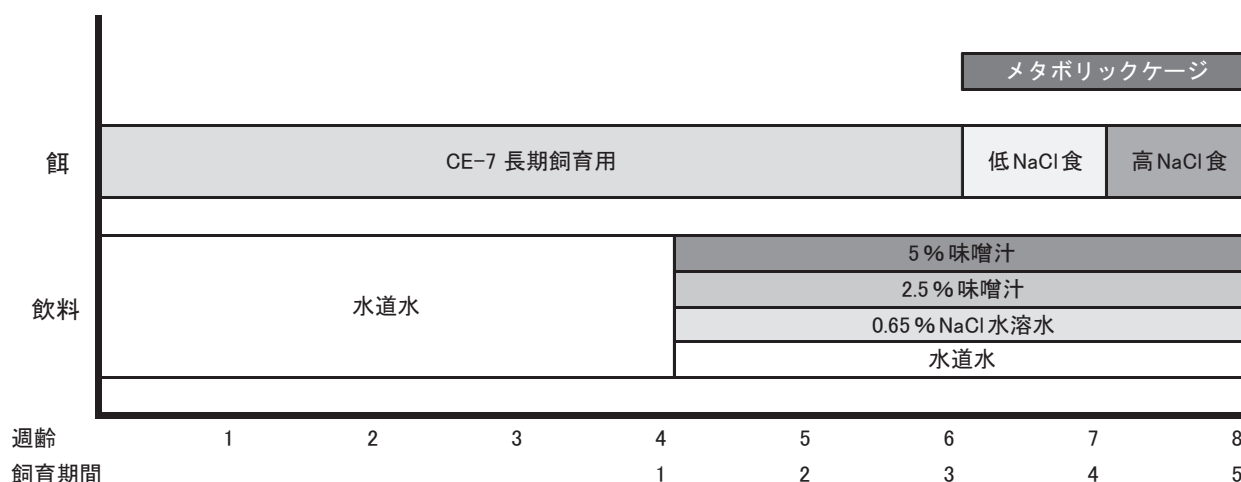


図1. 飼育期間

- ① 餌は、5週目まで日本クレア株式会社製マウス・ラット・ハムスターCE-7長期飼育用を与え、6週目から0.3%低NaCl食、7週目から4%高NaCl食を与えた。
- ② 飲水は、4週目まで水道水を与え、5週目から7匹に5%味噌水を、7匹に2.5%味噌水を、7匹に0.65%NaCl水溶液を、5匹に水道水を分けて与えた。
- ③ 尿は、6週目から毎日測定した。
- ④ 糞は、6週目から毎日測定した。

維など多くの栄養素を含んでいる。前年の研究結果より、味噌に含まれる塩分は食塩単独で摂取するときよりも血圧の上昇を抑えているということが分かった。機序として、味噌による消化管でのNaCl吸収抑制作用もしくは直接的血管作用に由来するものと考えられた。我々は、降圧機序を明らかにするためにウイスター系ラットを用いて味噌が消化管における食塩吸収効率に及ぼす影響について研究を行った。

#### 【方法】

4週齢 Wistar (Wi) 系雄ラット 26匹を三協ラボサービス株式会社(東京)から購入した。ラットは一定の温度(23 ± 2℃)並びに湿度(55 ± 10%)の条件の下、12時間暗12時間明の明暗サイクルのある部屋で飼育した。ラットは、5週目から図1のように①5匹の水道水投与対照群(control)、②7匹の0.65%食塩水群(0.65%NaCl(5%味噌水に相当))、③7匹の2.5%味噌水群(2.5% Wi)及び④7匹の5%味噌水群(5% Wi)の計4群に分け、8週間飼育した。味噌は米味噌市販品(麴歩合:5歩, 塩分:12.5%, 原料:米(国産)・塩(国産)・大豆(北米産))を

用いた。味噌水は、味噌を水に溶解したものをホモジナイザーで粉碎しオートクレーブにかけて作成した。味噌水と、和光純薬工業株式会社製塩化ナトリウムを使用した食塩水および水は毎日交換した。餌は、5週目まで日本クレア株式会社製マウス・ラット・ハムスターCE-7長期飼育用を使用し、6週目は0.3%低NaCl食を、7週目は4%高NaCl食をそれぞれ使用した。試験期間中は自由摂食、自由飲水とした。6週目に(Wi)ラットをメタボリックケージへ移動させ、1日の慣らし期間を経た後で24時間の尿量、糞量、飲水量、餌摂取量を測定した。血圧はtail-cuff法(MANOMETER-TACHOMETER KN-210-1)にて7,8週目に測定した。体重は毎日、体重計(YAMATO製)を用いて測定した。尿並びに糞は6週目から8週目の2週間毎日収集し、収集量並びに塩化ナトリウム摂取量を測定した。

#### 【成績】

実験日ごとのNaCl摂取量の累計結果を図2に示す。Control, 0.65%NaCl, 2.5%Wi, 5%Wiすべての群において用量依存的な食塩摂取の増加がみられた。低NaCl食摂取期間, 高NaCl

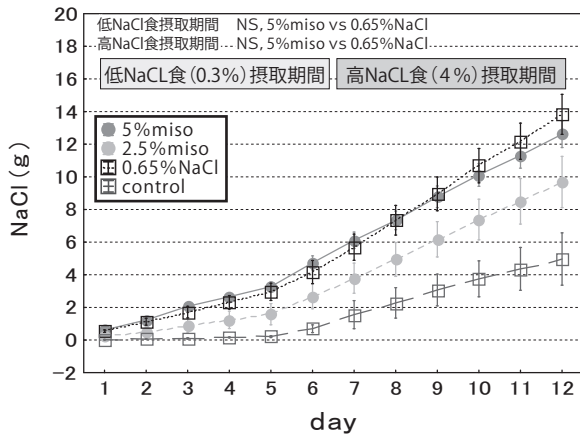


図2. 摂取NaCl累積量 (g)

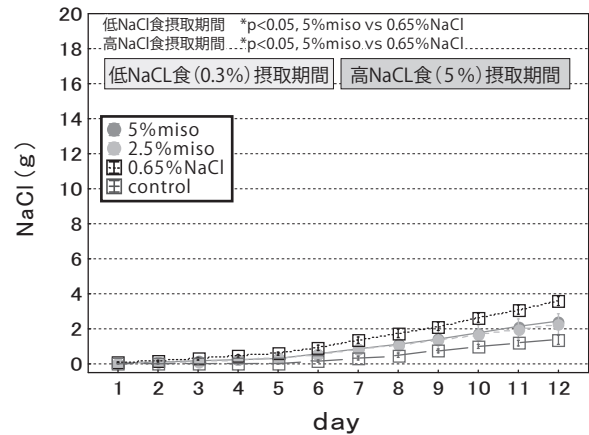


図3. 尿中NaCl累積量 (g)

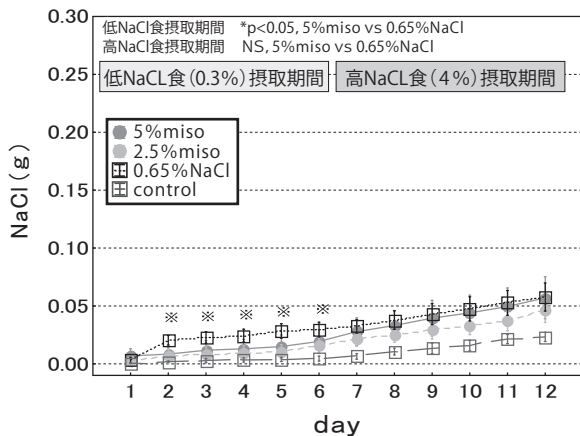


図4. 糞中NaCl累積量 (g)

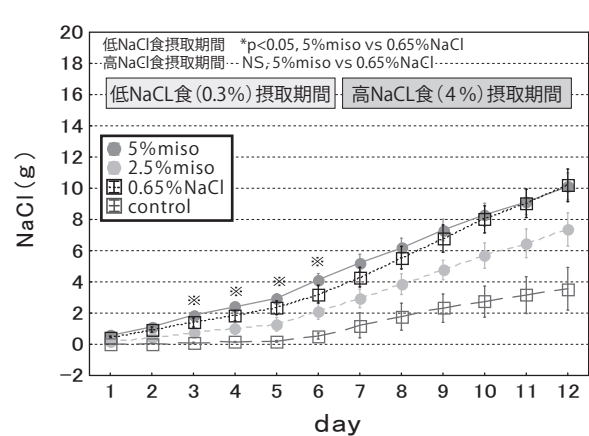


図5. 体内NaCl累積量 (g)

食摂取期間両期間において5% Wi, 0.65% NaCl 両群で有意な差は認められなかった。

尿中 NaCl 排泄累積量を図3に示す。低 NaCl 食摂取期間, 高 NaCl 食摂取期間の両期間において, 0.65% NaCl は5% Wi と比較して有意に高値を示した (3.58g vs 2.44g,  $p < 0.05$ )。

糞中 NaCl 排泄量の累計結果を図4に示す。低 NaCl 食摂取期間では, 0.65% NaCl は5% Wi と比較して糞中への NaCl 排泄量が有意に高値を示していた (0.029g vs 0.019g)。一方, 高 NaCl 食摂取期間では, 5% Wi, 0.65% NaCl 両群間において有意な差は認められなかった。

これらの成績から体内 NaCl 累積量計算した結果を図5に示す。低 NaCl 食摂取期間では, 5% Wi は0.65% NaCl と比較して有意に高値を

示していた (4.13g vs 3.22g,  $p < 0.05$ )。一方, 高 NaCl 食摂取期間の両期間において5% Wi, 0.65% NaCl の両群で有意な差は認められなかった。

### 【結論】

長期味噌摂取時の食塩感受性高血圧の抑制作用は一部, 消化管での NaCl 吸収抑制に由来していると考えられていたが, 今回の成績により味噌摂取時では食塩過剰摂取における消化管での NaCl 吸収抑制作用は認められなかった。従って, 味噌の降圧は主に直接的血管作用に由来する可能性が高いと結論された。

本研究では, 体内 NaCl 蓄積量は一部 0.65% NaCl に対して5% Wi が有意に高く, これは糞中 NaCl 排泄量の一部, 並びに尿中 NaCl 排泄量

が5% Wi に対して0.65% NaCl で有意に高値を示したことによる。

低 NaCl 食期間に糞中 NaCl 排泄量で、5% Wi と比較して0.65% NaCl が有意に高値を示し、高 NaCl 食期間では有意な差がみられなかったことから、味噌は摂取 NaCl 濃度によって消化管での NaCl 吸収率を変化させることが示唆された。更に、体内 NaCl 累積量では、低 NaCl 食摂取期間に0.65% NaCl に比べて5% Wi が有意に高値を示し、高 NaCl 摂取期間では有意差は認められなかった。以上のことから、味噌に含まれるなんらかの成分が、ある一定の塩分濃度の範囲内では消化管での NaCl 吸収を促進するのではないかと考えられる。

また、尿中 NaCl 排泄量で5% Wi と比較して0.65% NaCl が有意に高値を示したことから、味噌摂取時では尿中への NaCl 排出を遅らせる機構があるのではないかと予想される。

今後は、味噌成分の血管内注入実験を行うと同時に、味噌摂取時の摂取 NaCl 濃度が消化管での NaCl 吸収率に影響を与えるかの検討が必要だと思われる。

## 2) 味噌汁成分による血管壁平滑筋細胞一酸化窒素産生能に及ぼす影響

味噌の血管壁への直接作用としては味噌汁が強力な心臓・腎臓保護効果があることを証明しており、このことから、血管拡張・臓器保護効果を有する血管壁 (constitutional) 一酸化窒素産生が増加している可能性が示唆される。constitutional 一酸化窒素には強力な血管拡張作用と血管・臓器保護作用があり、味噌汁の Dahl 食塩感受性ラット (一酸化窒素産生が低下している) での血圧・臓器への効果を考慮すると、味噌汁成分には血管壁 (constitutional) 一酸化窒素産生を促進する因子の存在することが強く示唆される。さらに、その constitutional 一酸化窒素産生増の機序には、味噌にみられる酸化ストレスの低下作用 (未発表) が関係していることが考えられる。実験は血管平滑筋の培養細胞 (装置

は設置済) を使用する。味噌汁成分の分子量分画 (3000-5000 dalton) による SOD 活性促進効果 (同仁化学の測定キットを使用する) による酸化ストレスの低下 (脂質の過酸化を MDA として測定) と constitutional 一酸化窒素産生増加 (Griess 法にて培養液中の窒素酸化物として測定) について検討した。しかし、実験では血管平滑筋細胞からの NO 産生能は極めて低濃度であることが分かり、Griess 法での測定は不可であった。今後は HUVEC のような血管内皮細胞系を用いるか、もしくは mRNA レベルで検討するかを選択する必要がある。

これに関連し、われわれは味噌上清中の培養血管平滑筋増殖に与える影響を検討した。血管平滑筋培養細胞の増殖亢進は、内皮機能障害時に各種成長因子の影響下に動脈硬化発症する重要なステップとされる。様々な降圧薬において、細胞増殖周期上の G1 期が延長し、増殖抑制が生じることが知られている。血管平滑筋細胞増殖抑制効果は、動脈硬化の進展を抑制することが期待される。

### 第 36 回日本高血圧学会総会にて発表

#### 味噌水上清中の血管平滑筋細胞増殖抑制活性

共立女子大学臨床栄養学研究室

Du DongDong, 吉永真理子, 上原誉志夫

#### 【目的】

長期味噌汁摂取では Dahl 食塩感受性ラットにおける食塩依存性高血圧を減弱し、腎・心筋障害を軽減することを報告した (Nutrition 2012; 28: 924-931)。臓器保護効果については、血圧の低下とともにナトリウム利尿、酸化ストレス低下などが関与するが、本研究では臓器・血管障害に関連する血管平滑筋細胞 (VSMC) 増殖について、味噌成分による VSMC 増殖抑制作用の有無を検討した。

#### 【方法】

雄 Dahl 食塩感受性ラットより胸部大動脈を摘出し、大動脈壁切片として explant 法により

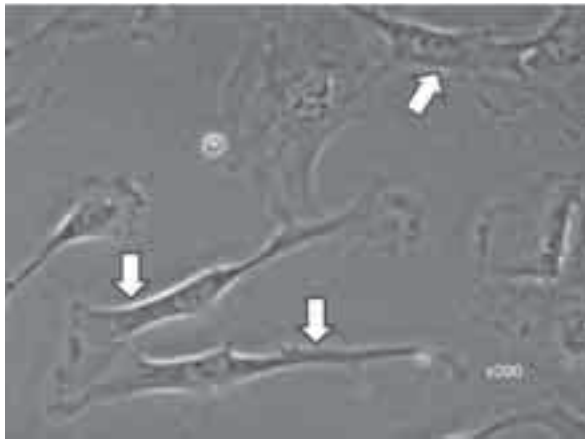


FIGURE 1  
Micrograph of Randomly Cycling VSMC

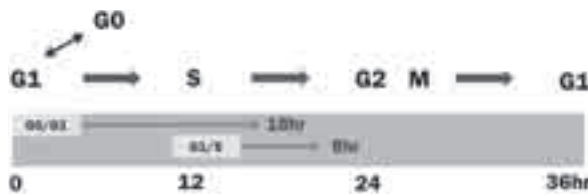


FIGURE 2  
Cell Cycle and G0/G1 and G1/S Boundary

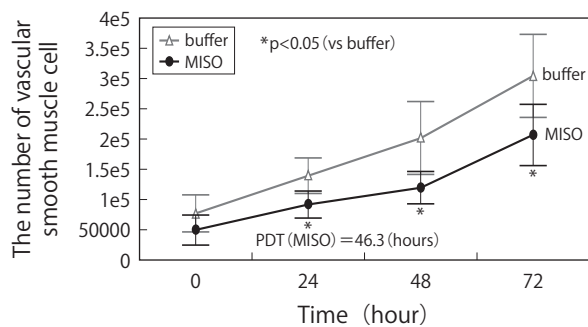


FIGURE 3  
Randomly Cycling VSMC and Doubling Time

VSMC を作成した (FIGURE 1)。実験には、4 - 6 継代 VSMC を semi-confluent で使用した。1) VSMC 倍加時間の測定：Random Cycling VSMC に 0.1 g/mL 味噌水 10,000 × g 上清または D-PBS を添加し、24 時間ごとに細胞数を計測して倍加時間を算出した。2) G0/G1 期同調 VSMC の細胞増殖への効果 (FIGURE 2)：FBS

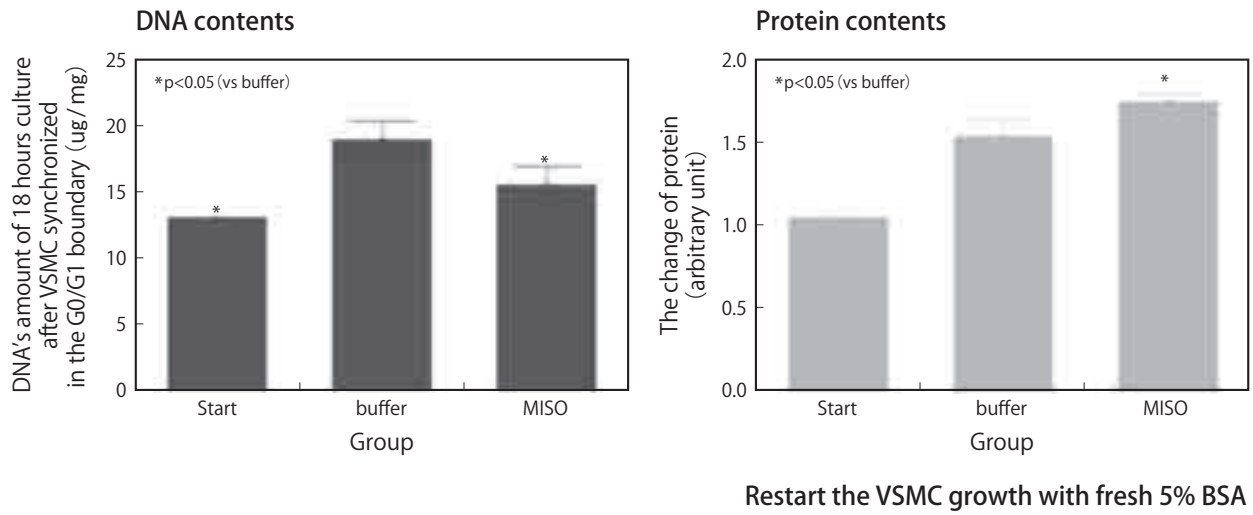
free D-MEM にて G0/G1 期に同調した VSMC を用い、FBS にて増殖再開時の 0.1 g/mL 味噌水 10,000 × g 上清の DNA 合成に与える影響を調べた。3) G1/S 期同調 VSMC の増殖への効果 (FIGURE 2)：1mM hydroxyurea で G1/S 期に同調した VSMC を用いて、0.1 g/mL 味噌水 10,000 × g 上清または味噌水 10,000 × g 上清の MW < 3kDa 分画を加え 8 時間培養し、DNA 合成への影響を測定した。4) DNA の定量法：VSMC から High Pure PCR Template Preparation Kit を用いて DNA を精製し、Nano Photometer を用いて DNA 量を測定した。

#### 【成績】

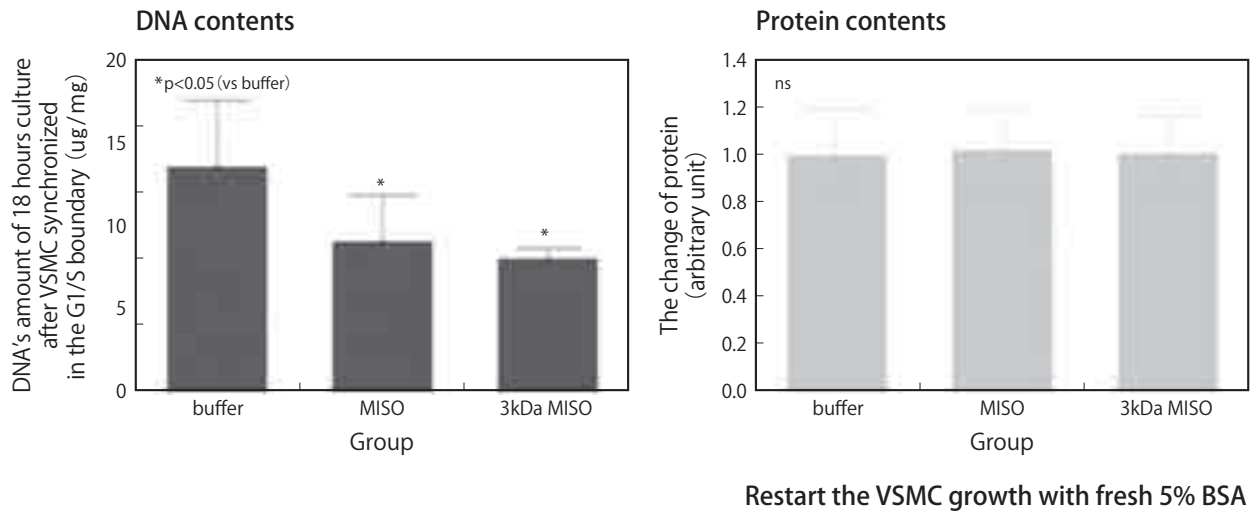
1) 味噌水 10,000 × g 上清を添加した random cycling VSMC では緩衝液添加群に比し、細胞増殖の倍加時間が有意に長かった (46.3 vs 35.6 hours,  $p < 0.05$ ) (FIGURE 3)。2) 味噌水 10,000 × g 上清添加群では緩衝液添加群に比較して、G0/G1 に同調した VSMC の増殖開始から 18 時間後 (G0/G1 ~ S 期) の DNA 含量を有意に低下させた (15.5 vs 18.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein,  $p < 0.05$ ) (FIGURE 4)。3) G1/S 期に同調した VSMC では細胞増殖再開 8 時間後の DNA 含量 (S 期) は、味噌水 10,000 × g 上清添加群及び味噌 10,000 × g 上清 MW < 3kDa 分画添加群では緩衝液群に比較して、いずれも有意に低値を示した (9.0 vs 13.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein;  $p < 0.05$ ; 8.0 vs 13.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein,  $p < 0.05$ ) (FIGURE 5)。

#### 【結論】

味噌水上清は VSMC の倍加時間を有意に延長することから、味噌中には VSMC の増殖を抑制する因子活性が存在することが示された。増殖抑制には、G0/G1 期と S 期延長が関与することが示唆された。VSMC 増殖抑制作用は味噌による腎・心筋障害の軽減に関連することが考えられた。



**FIGURE 4**  
G0/G1 Synchronized VSMC DNA and Protein Synthesis



**FIGURE 5**  
G1/S Synchronized VSMC DNA and Protein Synthesis

### 3) 習慣的味噌汁摂取がヒト動脈硬化に及ぼす効果についての検討

動物実験と並行してヒトでの血管内皮機能を検討するため、エコーを用いた血管拡張機能の評価することとしたが、本年度は予備的研究として味噌汁摂取習慣がヒトでの動脈硬化を抑制するか予備的研究を行った。東京都公務員共済三楽病院の人間ドックとの共同研究。

#### 第36回日本高血圧学会総会にて発表

#### 習慣的味噌汁摂取が血管年齢に与える影響

共立女子大学臨床栄養学研究室

飯田比奈子, 宮田優香, 佐々木亜衣,  
山崎香純, 吉永真理子, 上原誉志夫,  
三楽病院  
山田 薫

#### 【目的】

味噌に含まれる塩分に対する懸念から、その健康効果が過小評価されてきた味噌の有用性を実証するため、本研究では、味噌汁摂取頻度と生活習慣病関連疾患および血管年齢との関連について明らかにするため横断的研究を行った。

#### FIGURE 血管年齢と習慣的味噌汁摂取との関係

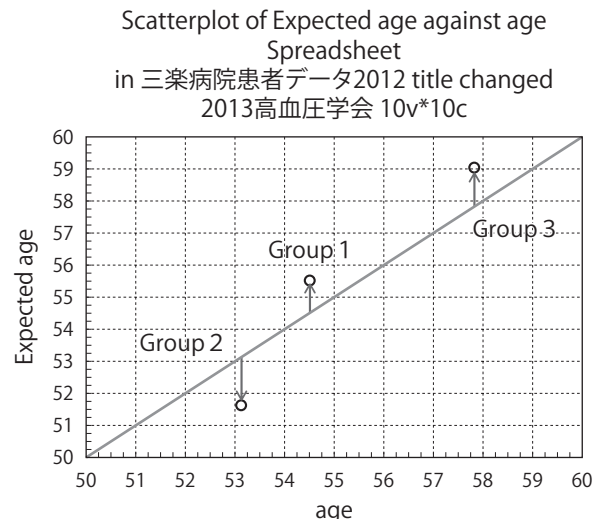
横軸は実際の年齢、縦軸はそのCAVI値から予測される血管年齢をします。  
Group 1, 0~2回味噌汁低頻度摂取群; Group 2, 3~5回中頻度摂取群; Group 3, 6~15回高頻度摂取群。  
矢印は年齢から期待される血管年齢との乖離を示す。上向きは血管年齢の実測値が実年齢より高いことを示し、下向きは実測値が実年齢より低いことを示す。Group 2ではGroup 3に比し有意に血管年齢が若いことが示された。

#### 【方法】

都内にある中規模病院の人間ドック受診者とした男性102名に対して、聞き取り法による味噌汁摂取回数を含む食物摂取頻度調査を実施し、人間ドックでの成績との関連性について調べた。食物嗜好性調査は、食物摂取頻度調査表 (FFQg Ver3.5) を用い、結果の解析はSTATISTICA統計ソフトを用い分散分析法によった。味噌汁摂取回数による群分けは7日間に摂取する回数で評価し、0~2回を味噌汁低頻度摂取群、3~5回を中頻度摂取群、6~15回を高頻度摂取群とした。また、食塩摂取量から1日の食塩摂取量が9g未満/日を1群、9g以上を2群と分けて検討した。血管年齢の測定についてはフクダ電子株式会社のVS-5000Aシリーズの血圧脈波検査装置を用いて測定した。血管年齢は脈波伝搬速度を血圧値で補正したCAVI値により評価した。

#### 【結果】

味噌汁摂取回数の平均は1回/日であり、食塩摂取量の平均は8.6g/日であった。食塩摂取2群では1群に対して、高血圧の家族内発症が上昇傾向を示したが ( $0.05 < p < 0.1$ )、一方、味噌汁摂取頻度と高血圧の家族歴とは一定の関係はみられず、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、肝機能、脂質代謝、糖代謝、腎機能、電解質についても味噌汁摂取頻度とは一定の関係がみられなかった。しかし、食塩摂取量と関係では、ALTが食塩摂



取の多い2群で1群に比し有意に高く (28 vs 22,  $p < 0.05$ ), 中性脂肪も食塩1群に対して食塩2群では上昇傾向を示した (115 vs 148,  $p < 0.1$ )。糖代謝, 腎機能, 電解質については一定の関係は見られなかった。味噌汁高頻度摂取群では動脈硬化促進に働く栄養素と抑制に働く栄養素の双方を多く摂取し, 味噌汁低頻度摂取群では双方ともに摂取量が低値であった。味噌汁中頻度摂取群では動脈硬化促進及び抑制の栄養を適切量摂取していることが分かった。実際, 食塩摂取量と血管年齢CAVI値との間には一定の関係はみられなかったが, 味噌汁摂取頻度では味噌汁中頻度群でCAVI値が最も低値であり, 高頻度群との間に有意な差がみられた (7.2 vs 7.6,  $p < 0.05$ ) (FIGURE)。

#### 【結論】

味噌汁を1日約1杯摂取する食環境では, 家族歴や身体所見, 血液生化学所見に影響を与えること無く, CAVI値に示されるように抗動脈効果作用を示すことが明らかになった。また, 味噌中の食塩は塩分摂取量増大にみられる血圧上昇や代謝への影響には関与していないことが示された。味噌には抗高血圧・抗動脈硬化作用をもつ生理活性因子が含有される可能性が示唆され, 本因子の同定が必要になると考える。

#### おわりに

味噌による降圧機序として, 消化管でのNa吸収抑制(遅延)効果の可能性が考えられてきた。先行研究では, 腎尿細管Na排泄率が味噌群で大きくなっていないことがその推測の根拠となっている。しかし, 今回の正確なNaバランス研究から, 味噌汁摂取は消化管でのNa吸収を遅延しないことが示された。このことは, 味噌による降圧

作用が, 腎からのNa排泄の増加, または直接的な血管拡張作用, 内皮機能促進効果などによることを示唆している。先行研究ではNa負荷が極めて大であったことから, 糸球体濾過量の増大が, 腎尿細管レベルでのNaハンドリング能を超えたため, Na排泄率がマスクされた可能性がある。腎でのNa排泄への影響については, より低濃度での味噌汁を使用した研究を実施する必要がある。

さらに, 今回直接的に内皮機能への影響を調べることができなかった。しかし, 血管平滑筋細胞増殖を抑制したことから, 血管壁再構築抑制を介した血管壁コンプライアンス改善による血圧低下の可能性が示唆され, より長期的な血圧の安定化に係る可能性が示唆された。実際ヒトでの研究では, 脈波伝搬速度(CAVI)が低下しており, 味噌汁摂取群では動脈硬化の進行が抑制されていることが示された。味噌汁高頻度群ではCAVI値が高かったが, これには高頻度群でのエネルギーや脂肪摂取量の増加が関与していることが考えられた。適切な食事バランスと味噌汁摂取の有用性が基礎的, 臨床的に実証されたといえる。

このように, 健康食材としての味噌の有用性を科学的に実証し, その成果を国内外への情報の発信することは, 食材としての味噌の再評価に結び付き, 広く味噌の利用に道を開くものである。味噌はこれまで含有される食塩量が過剰に強調される傾向があった。食塩以外の成分についてその有用性を基礎的にまた臨床的に実証することは味噌の使用を国内外に広めるのみならず, 古い歴史を有する味噌を日本食文化の中心として後生に伝えていくよりどころともなる。味噌業界のみならず, 人々の健康に与えるメリット, 日本食文化の形成維持に与える影響は大といえよう。

# 短波帯瞬間加熱処理による包装済み味噌の発酵抑制技術の開発

植村 邦彦

Inactivation of yeast in Packed Miso Paste by Radio-Frequency Heating

Kunihiko UEMURA

National Food Research Institute, NARO  
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

## 諸言<sup>1)</sup>

パック詰めされた味噌は、ガス発生に伴い袋が膨潤することが問題である。ガス発生の原因は、酵母の二次的アルコール発酵（湧き）であり、これを防ぐ手段として、味噌の加熱処理とアルコール処理が一般に利用されている。加熱処理は、多管式連続加熱方式と呼ばれる味噌を85℃10分間処理するものであり、アルコール処理とは、食用のアルコールを添加し（淡色系辛口味噌では2%、淡色系麦味噌では2.5%添加）、酵母の活性を抑えるものである。加熱処理の場合は、熱交換器壁面の過加熱部分の変色や熱交換器から離れた部分の未加熱の存在が問題となる。また、アルコール処理では、添加される食用のアルコールのコストが高いことや味噌の軟化、香りの変化といった問題がある。

味噌に含まれるプロテアーゼは、たんぱく質のペプチド結合、すなわちアミノ酸同士のアミノ基(-NH<sub>2</sub>)とカルボキシル基(-COOH)との結合を切断する。プロテアーゼは、酵母、乳酸菌の発酵を促進させ、香味に寄与する必要不可欠な成分

であるが、酵素発酵が十分に進み、香味が完成してからパック詰めした後で酵素活性が高いと、香味が変化するため、保存中に品質が変化することが問題である。したがって、製品中のプロテアーゼの活性を低減することも目的とした。

本研究では、短波帯加熱処理により、パック詰め味噌中の酵母およびプロテアーゼ活性の低減を目指す。

## 方法

### 試験材料

市販の味噌（信州系淡色辛口米みそ）を近くのスーパーマーケットで購入した。味噌に含まれる酵母数を培養計測したところ100 cfu/g以下であった。酵母の失活効果を検討するためには、初発菌数を多くする必要があったため、味噌から採取した酵母を液体培地（DEFKO, YM-broth）で25℃、16時間培養したものを味噌700gに再添加し、酵母の初期値を10<sup>4</sup> cfu/gとしたものを試料とした。



## インピーダンス測定

味噌の短波帯の電界印加の模式図およびその電氣的等価回路を図1に示した。味噌は(2)式にしたがった発熱エネルギーを得て、昇温する。

$$i = \frac{v}{z} = \frac{v}{R_{miso} + \frac{2}{j\omega C_{film}}} \quad (1)$$

$$P_{miso} = R_{miso} \times i^2 = \frac{R_{miso}}{Z} vi \quad (2)$$

ただし、 $v$  : 短波帯交流の出力電圧、 $i$  : 短波帯交流の出力電流、 $C_{film}$  : 味噌の包装用フィルムのキャパシタンス、 $R_{miso}$  : 味噌の短波帯交流抵抗、 $z$  : 味噌および包装フィルム全体の短波帯交流インピーダンスである。

味噌および味噌と包材試料を加熱インピーダンスアナライザー (アジレントテクノロジー, 4910), 誘電体測定用電極 (アジレントテクノロジー, 9124B) を用いて測定した<sup>2)</sup>。

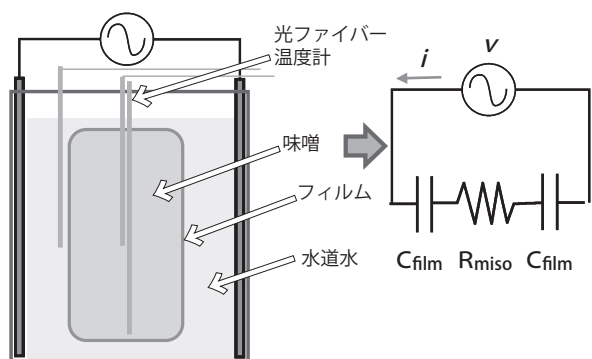


図1. 短波帯瞬間加熱処理の模式図および等価回路

## 従来の加熱処理

85°Cに設定した恒温水槽に、袋詰め味噌500gを20分間浸して、加熱した。味噌中心に温度計(MADGE TECH, HiTemp140 Data Logger)を挿入し、味噌の温度変化を測定した。

## 短波帯瞬間加熱処理

150mm × 150mm × 106mmの水槽中に150mm × 160 × 3mmのチタニウム製電極2枚を100mm間隔で平衡に設置し、両電極間の

中央に袋詰めした味噌500gを置き、味噌の上端まで水道水を満たした。味噌中央の下端、下端から40mmの位置の温度変化および、水道水の温度変化を、光ファイバー温度計(アステック, Reflex)で計測した。27MHz, 4kWの高周波電源(Caser, USA)から整合器(ノダテクノロジー, NRFNM5M27)を経由して、両電極に短波帯交流を印加した。短波帯加熱処理が終了した味噌は、パック詰めしたまま水に浸して冷却した。

## 酵母菌数の測定

サンプルの味噌1gに9mlのリンゲル水を加え、スタマッカーで溶解し、必要に応じてリンゲル液で希釈した。YM Agar (DIFCO, USA)平板上に、希釈したサンプルを100μl塗布し、30°Cの恒温槽で48時間培養後、酵母のコロニー数をカウントした。

## プロテアーゼ活性の測定

プロテアーゼは、たんぱく質のペプチド結合、すなわちアミノ酸同士のアミノ基(-NH<sub>2</sub>)とカルボキシル基(-COOH)との結合を切断する酵素の総称であり、分解形式によってプロティナーゼとペプチダーゼに分けられる。しかし、味噌の分野では通常その2つを区別せずに、総合的にプロテアーゼとして活性を測定することが多い。その場合、基質pHに対する作用特性などから酸性(pH3.0)、中性(pH6.0付近)、アルカリ性(pH7.5)の各プロティナーゼに分けて測定する。今回の実験では味噌の色調、たんぱく溶解率、同分解率及び官能評価と高い相関関係を有するpH6.0のプロティナーゼの活性をしょうゆ試験法<sup>3)</sup>に基づいて測定した。

## 結果および考察

### 味噌および包材フィルムのインピーダンス特性

味噌単体、および味噌と包材のプラスチックフィルム全体のインピーダンスを測定した(図2)。味噌のインピーダンスは測定の周波数に寄らず1Ω程度での値であったが、味噌とフィルム

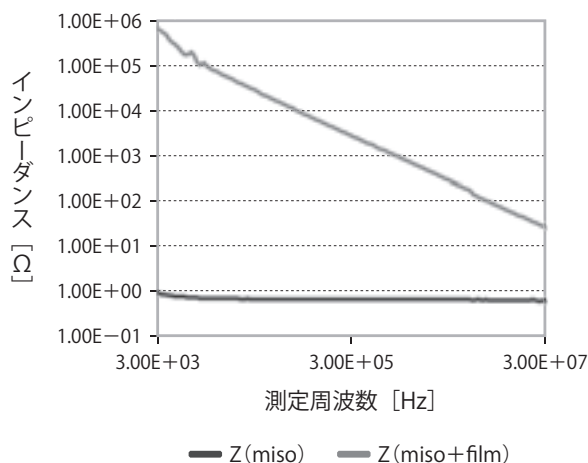


図2. 味噌およびポリエチレンフィルムのインピーダンス特性

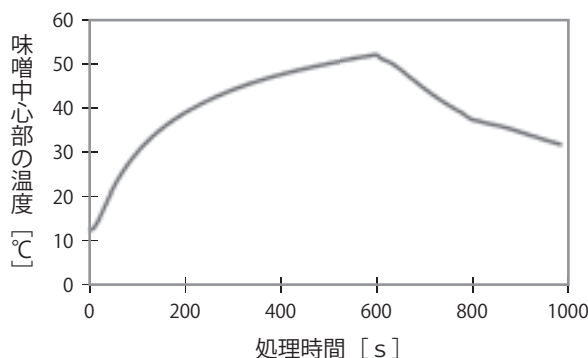


図3. 袋詰め味噌を85℃温浴中に10分間浸漬した時の、味噌の中心部の温度変化

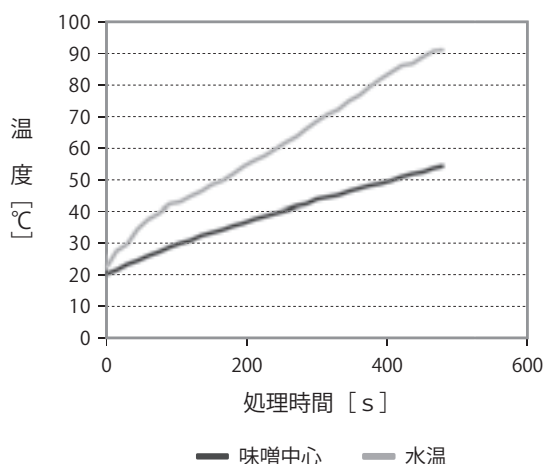


図4. 袋詰め味噌に27MHz, 2000Wの短波帯電界を印加した時の、味噌中心部および周囲の水の温度変化

全体のインピーダンスは、周波数の上昇とともに低下し、27MHzのとき29.2Ωとなった。味噌とフィルムのインピーダンスが100Ω以下になると、整合回路でインピーダンス整合を取ることが可能となるため、短波帯電界による包装済み味噌の加熱が実現できると考えられる。

#### 短波帯瞬間加熱および従来加熱処理の温度変化

図3に従来加熱における味噌中心部の温度変化を示す。85℃の温浴中で、10分加熱した場合、味噌中心部の温度は200s程度までは素早く昇温するが、徐々に昇温速度が低下し、600sで52.1℃となった。

図4に27MHz, 2.5kWの短波帯交流電界を印加した時の、味噌の底部、中心部、水の温度変化を示した。短波帯加熱は水温および味噌中心の温度は処理時間に比例して昇温し、味噌よりも水温の昇温速度が高く、交流電界を405s印加した時に、水温が84℃、味噌中心の温度が50℃となった。

#### 短波帯瞬間加熱による酵母の変化

短波帯瞬間加熱の最高到達温度が酵母の失活に与える影響について、図5にプロットした。図より、到達温度の上昇に比例して、酵母菌の対数値が減少し、56℃まで処理した場合、4対数オーダー失活した。

#### 短波帯加熱によるプロテアーゼ活性の変化

図6に短波帯瞬間加熱の最高到達温度が残存プロテアーゼ活性に与える変化を示した。図より、短波帯加熱の温度上昇に比例して残存プロテアーゼ活性が低下し、最高到達温度が50℃の時に20%以下に低下した。

#### 短波帯瞬間加熱処理と従来の加熱処理との比較

2500W, 300sの短波帯処理および85℃の温浴槽で600s浸し、それぞれ、味噌の中心温度が50℃まで昇温したサンプルを用いて、酵母活性とプロテアーゼ活性の変化を比較した。図より、従来加熱と比較して、短波帯処理の方が酵母の失活率ならびにプロテアーゼ失活効果が高いことが分かった。

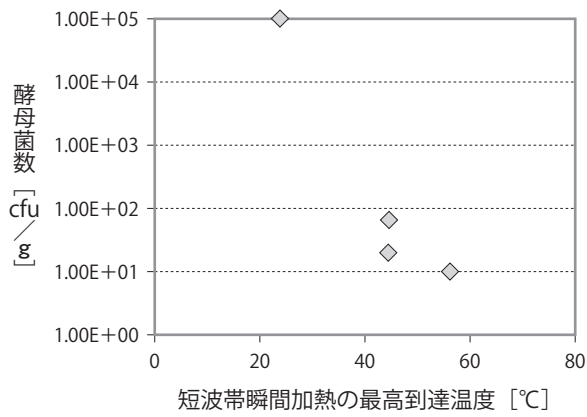


図5. 短波帯瞬間加熱処理における最高到達温度が味噌酵母に与える影響

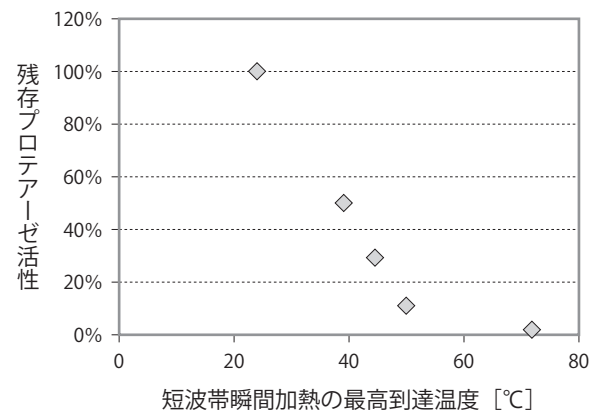


図6. 短波帯瞬間加熱処理における最高到達温度がプロテアーゼ活性に与える影響

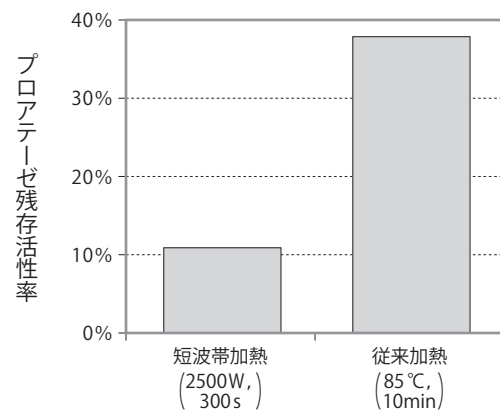
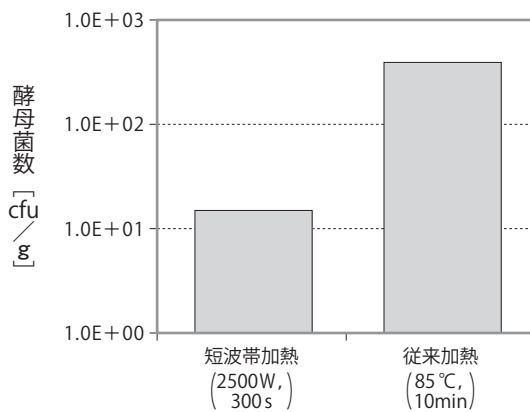


図7. 短波帯瞬間加熱および従来加熱による酵母, プロテアーゼ活性の比較

## 要約

短波帯の交流電界を包装済みの味噌に適用することにより、味噌の中心温度を短時間で昇温可能なことが分かった。また、短波帯加熱の温度が高いほど、味噌酵母およびプロテアーゼ活性を低減した。また、短波帯加熱と従来の加熱を比較したところ、同温条件のときは短波帯加熱処理の方が両者の低減効果が高いことが分かった。今後は、印加する短波帯電力を増強して処理時間の短縮を図るとともに、最適な処理条件の検討が必要であると考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行にご尽力いただきました一般社団法人中央味噌研究所赤羽理事長、中野理事を始め、各関係者の方々に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 新・みそ技術ハンドブック付 基準みそ分析法 全国味噌技術会 p1 (2006)
- 2) Agilent Technology インピーダンス測定ハンドブック p5 (2003)
- 3) しょうゆ試験法, (財)日本醤油研究所, P286 (1985)

# 味噌摂取が血圧上昇に繋がらない機構解明に関する研究 (味噌汁摂取量が中心血圧へおよぼす影響からの考察)

小原 克彦

Why miso intake does not increase blood pressure ?  
(Study of the effect of miso soup consumption on central blood pressure)

Katsuhiko KOHARA

*Department of Geriatric Medicine and Neurology,  
Ehime University Graduate School of Medicine,  
Toon City, Ehime 791-0295, Japan*

## 【緒言】

食塩摂取は血圧上昇の主要な原因であり、高血圧治療ガイドラインにおいても、生活習慣の改善として減塩が勧められている。一方、味噌は発酵食品であり、主成分である大豆タンパクには降圧効果が報告されている [1]。さらに、食塩感受性高血圧の実験モデルである Dahl 食塩感受性ラットにおいて、味噌摂取は、食塩量負荷を増大させるにもかかわらず、昇圧が抑えられることが示されている [2]。

日常臨床での血圧計測は、上腕で行われるが、大動脈などの中心血圧は、上腕を含む末梢血圧とは異なることが知られている。末梢血圧よりも中心血圧の方が、脳・心・腎・大血管などの臓器灌流圧に近く、臓器障害や心血管事故との関連性が高いことが報告されている [3]。

しかし、これまで、味噌摂取が中心血圧に及ぼす影響を検討した成績はない。

本研究では、味噌汁摂取の血圧への影響を中心

血圧を含めて検討した。また動脈硬化の指標である頸動脈肥厚に及ぼす影響についても検討を行った。さらに、研究参加者の一部において、味噌汁摂取と 24 時間尿中塩分排泄量との関係を検討した。

## 【方法】

平成 24 年 7 月から平成 25 年 4 月までの愛媛大学付属病院抗加齢ドック受診者 186 名を対象とした。味噌汁摂取は全員面接のもと直接聞き取りアンケートにより求め、1 週間の平均飲用数（杯）を算出し、週間の味噌汁摂取量から全体を 3 群に分け検討した。血圧は 5 分間以上の安静の後、坐位で測定した。通常の上腕血圧に加えて、中心血圧指標を計測した。オムロン・ヘルスケア社製の HEM9000AI を用いて左橈骨脈波型を計測し、中心血圧の指標である収縮期血圧第 2 成分（SBP2）を求めた。上腕血圧は、HEM-9000AI に内臓動

されている自動血圧計を用いてオッシロメトリック法により求めた。動脈硬化指標として頸動脈エコーにより総頸動脈内膜中膜厚（IMT）を計測した。

一部の症例（n=104）では、携帯型蓄尿装置（ユリンメート）を用いて24時間蓄尿を行い、尿中ナトリウム排泄量から24時間塩分排泄量を求めた。

### 【結果】

味噌汁摂取量で分けた3群の臨床的背景を表1にまとめる。

3群間の上腕収縮期血圧（SBP）、拡張期血圧（DBP）、中心収縮期血圧（SBP2）には有意な差はなかった。一方、年齢で補正した総頸動脈

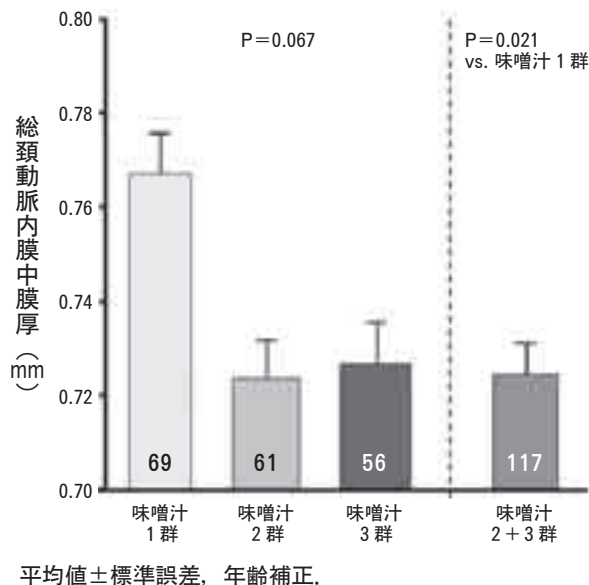


図1. 味噌汁摂取と頸動脈硬化

表1. 味噌汁摂取3群の臨床的背景

	味噌汁1群 (2杯/週以下)	味噌汁2群 (3-6杯/週)	味噌汁3群 (7杯/週以上)	P
人数 (男性/女性)	69 (35/34)	61 (26/35)	56 (23/33)	0.50
年齢, 歳	65.7 ± 11.8	65.8 ± 10.5	69.9 ± 9.9	0.066
身長 (cm)	158.8 ± 8.9	158.7 ± 8.1	156.8 ± 8.3	0.36
体重 (kg)	60.9 ± 13.0	57.9 ± 9.8	56.6 ± 10.8	0.097
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.0 ± 3.9	22.9 ± 2.8	22.9 ± 3.1	0.11
降圧薬使用n (%)	25 (36)	26 (43)	14 (25)	0.13
上腕収縮期血圧, mmHg	129.1 ± 20.0	128.0 ± 15.5	126.3 ± 16.4	0.67
上腕拡張期血圧, mmHg	72.7 ± 12.8	70.6 ± 9.5	69.9 ± 9.8	0.33
中心収縮期血圧(SBP2), mmHg	121.9 ± 21.7	120.9 ± 15.4	118.0 ± 17.0	0.48
心拍数, bpm	65.2 ± 9.1	64.6 ± 9.6	66.3 ± 11.2	0.64
頸動脈内膜中膜厚 (mm) *	0.77 ± 0.11	0.72 ± 0.11	0.73 ± 0.12	0.067
	0.77 ± 0.11	0.73 ± 0.11		0.02

平均値 ± 標準偏差, \* 年齢にて補正。

表2. 総頸動脈内膜中膜厚に対する多変量解析

	モデル1		モデル2		モデル3	
	β	p	β	p	β	p
年齢, 歳	0.51	<.0001	0.51	<.0001	0.52	<.0001
性別, 男性	0.08	0.25	0.08	0.27	0.07	0.35
BMI, kg/m <sup>2</sup>	0.19	0.0075	0.19	0.0076	0.18	0.01
SBP2, mmHg	0.04	0.54	0.04	0.56	0.03	0.61
空腹時血糖, mg/dl	0.01	0.93	0.02	0.88	0.01	0.95
HbA1c, %	0.05	0.60	0.04	0.67	0.06	0.56
総コレステロール, mg/dl	0.07	0.37	0.07	0.37	0.08	0.29
HDLコレステロール, mg/dl	-0.15	0.067	-0.16	0.052	-0.16	0.052
中性脂肪, mg/dl	-0.02	0.82	-0.02	0.80	-0.03	0.65
降圧薬内服, 有	0.06	0.41	0.06	0.38	0.04	0.61
味噌汁1群 (vs. 2+3群)	0.14	0.03	0.14	0.03	0.14	0.025
SBP2* 味噌汁群	—	—	0.10	0.11	—	—
年齢* 味噌汁群	—	—	—	—	0.12	0.057

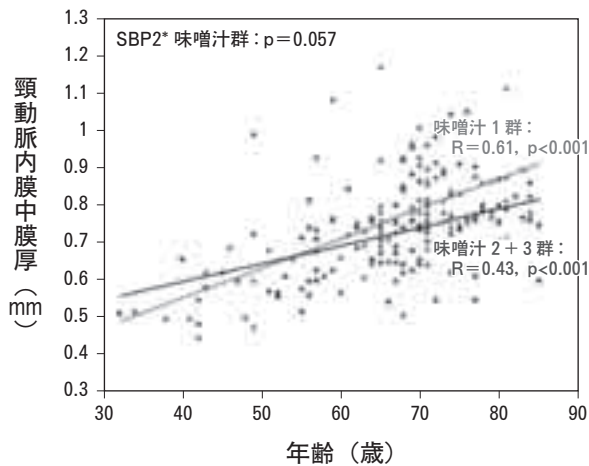


図 2. 味噌汁摂取 2 群間の年齢と総頸動脈内膜中膜厚の関係

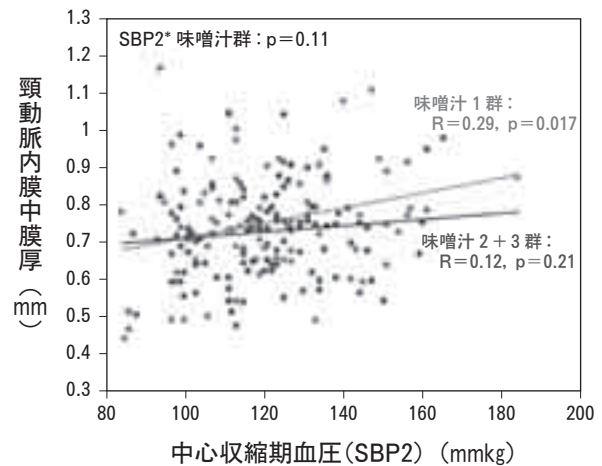


図 3. 味噌汁摂取 2 群間の中心血圧と総頸動脈内膜中膜厚の関係

IMT は、3 群間で異なる傾向を示し、味噌 1 群を対象とした場合、味噌 2 + 3 群では、有意な低値を示した (図 1)。

他の交絡因子で補正を行っても、総頸動脈 IMT は、味噌汁 2 群間 (味噌汁 1 群 vs. 2 + 3 群) で有意に異なっていた (表 2)。

さらに興味深い所見として、総頸動脈 IMT に対する多変量解析の結果、年齢と味噌汁 2 群間との交互作用が有意な傾向を示した (表 2)。

すなわち、加齢に伴う総頸動脈 IMT の肥厚が、味噌汁 2 + 3 群では 1 群に比し、抑制される傾向が示された (図 2)。中心血圧 SBP2 と味噌汁摂取との間にも同様の関係が示唆されたが、有意差は得られなかった (図 3)。

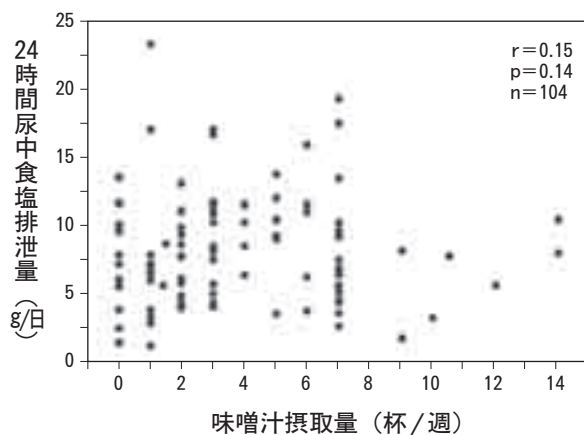


図 4. 味噌汁摂取量と推定 24 時間尿中食塩排泄量

味噌汁摂取量と 24 時間尿中塩分排泄量との間には有意な関係は認められなかった (図 4)。

#### 【まとめ】

今回の横断面研究の成績をまとめると、

- ① 味噌汁摂取は、上腕血圧、中心血圧には影響を与えなかった。
- ② 週当たりの味噌汁摂取の多い群では、少ない群に比し、総頸動脈 IMT が有意に小であった。
- ③ 加齢にともなう頸動脈 IMT の上昇に対して、味噌汁摂取の多い群では、抑制的に作用する可能性が示唆された。
- ④ 味噌汁摂取量は 24 時間尿中塩分排泄量と有意な相関はなかった。

#### 【結論】

以上の結果から、味噌汁摂取は、食塩摂取量の増加につながらず、中心血圧を含めて、血圧には影響を与えないと考えられる。さらに、味噌汁摂取には、動脈硬化進展抑制作用が存在する可能性があり、加齢性の頸動脈硬化を抑制すると考えられる。

## 参考文献

- 1) He J, Wofford MR, Reynolds K, Chen J, Chen CS, Myers L, Minor DL, Elmer PJ, Jones DW, Whelton PK. Effect of dietary protein supplementation on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2011;124:589-595.
- 2) 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* 2012;28:924-931.
- 3) Kohora K. Central BP and end-organ damages. *Curr Hypertens Rev* 2012;8:100-107.

## 習慣的味噌摂取量と気分障害予防に関する栄養疫学的検証

須賀 ひとみ

Nutritional epidemiological study in effect of miso-paste on the prevention of depression

Hitomi SUGA

*Division of Social Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo  
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan*

### 【背景および目的】

近年、うつ病の患者数は増加傾向にあり、厚生労働省の患者調査によると、平成8年には20.7万人であったうつ病患者数は平成23年には70.8万人と15年間で3.4倍に増加している<sup>1)</sup>。うつ病の罹患は自殺の重要な一因であり、うつ病への予防対策は強く求められている。

これまでの研究から大豆食品の抗うつ作用について動物実験によって明らかにされており<sup>2)</sup>、またヒトを対象とした疫学研究においても、大豆製品を多く摂取する集団においてうつ罹患率が低下する傾向が示唆されている<sup>3)</sup>。しかしながら味噌をはじめとする大豆製品の摂取とうつ病発症との関連は主に閉経後女性を対象としたものがほとんどであり、それ以外の年代を対象とした研究は非常に少ない。本研究では若年期女性(18～20歳)および中年期女性(主に40歳代)を対象にして、習慣的味噌摂取量および大豆摂取量と抑うつ傾向発症との関連を検証した。

### 【方法】

#### 研究対象者

本研究は「家庭環境を考慮した女性3世代の食習慣と健康状態に関する栄養疫学的横断研究」(文部科学研究費補助金(基盤A))の一環として実施した。2012年4月に主に東日本(東北, 関東地方および新潟, 山梨, 長野, 静岡)の栄養関連教育施設(大学, 短大, 専門学校)27校に入学した新入生(2591名)およびその母を対象として食習慣および生活習慣に関する質問票への回答を依頼し, 学生1,834名, 母1,543名の協力を得た。これを春調査とする。

さらにこれらの参加者のうち, 22校の学生1626名, 母1330名に対し, 2012年12月～2013年2月にかけて, うつ症状の有無に関する追加調査を行い, 学生755名, 母563名の協力を得た。これを冬調査とする。調査スケジュールを図1に示す。

春調査および冬調査に協力を得られた参加者のうち, 21歳以上の学生(6名), 男子学生(52名), 身長, 体重, 年齢, 居住地の回答を得られ



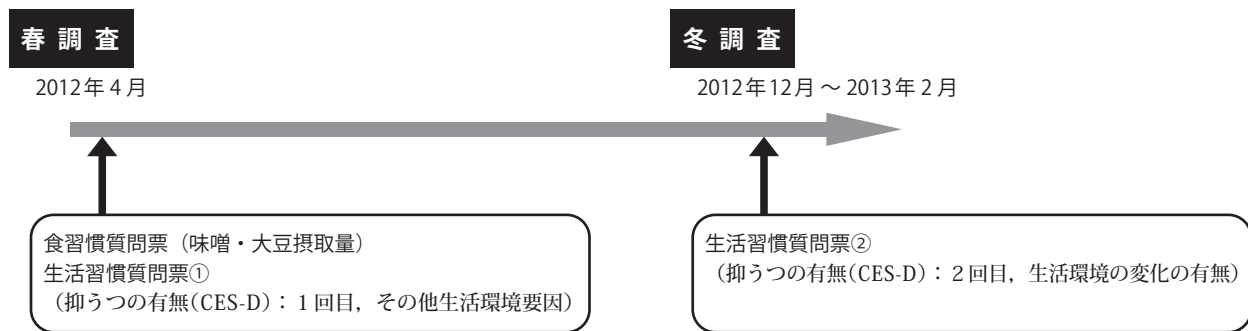


図1. 本研究の調査スケジュール

なかった者（学生2名），食事質問票から算出した摂取エネルギー量が500kcal/day未満および4000kcal/day超の者（学生6名，母2名），精神疾患の既往がある，または精神疾患，糖尿病，甲状腺疾患の治療中の者（学生15名，母26名）および女性ホルモン剤を内服中の者（学生3名，母4名），春調査の時点で抑うつ傾向を示した者（学生348名，母126名）を除外し，最終的に学生323名，母405名を解析対象とした。

#### 味噌，大豆製品摂取量および栄養素摂取量

味噌，大豆および栄養素摂取量は自記式食事歴法質問票（Diet History Questionnaire: DHQ）により算出した<sup>4)</sup>。

DHQは，過去1か月間の平均的な食習慣の回答を得て，日本食品標準成分表2010を用いて主要な食品および栄養素摂取量を算出することができる。味噌摂取量に関しては味噌汁の摂取頻度と1回あたりの摂取量および，味噌汁以外の料理に調味料として味噌を使用した頻度と1回あたりの使用量から算出した。

#### 抑うつ傾向の評価

抑うつ傾向の評価にはうつ病自己評価尺度（Center for Epidemiologic Studies Depression Scale: CES-D）を使用した<sup>5)</sup>。これは一般人におけるうつ病の発見を目的として，開発された質問票で，過去1週間の心の状態に関する20の質問にそれぞれ4つの選択肢から1つを選択する。0～60点評価で16点以上を抑うつ傾向ありとする。

#### 統計解析

各食品群，栄養素摂取量は密度法によるエネルギー調整を行った。対象者を冬調査のCES-Dスコアに基づき，抑うつ傾向あり群，なし群の2群に分け，基本属性および食事関連変数を検討し，Studentのt検定およびFisherの正確検定を行って5%有意水準で有意差を検討した。また対象者を味噌および大豆摂取量で5群に分け，うつ傾向あり群/なし群のオッズ比と95%信頼区間を算出した。

#### 【結果】

解析対象者（学生323名，母405名）の基本属性を表1に示す。CES-Dスコア16点以上の抑うつ傾向を示した者は学生110名（34.1%），母53名（13.1%）であった。基本属性および食事関連変数に関して，Studentのt検定およびFisherの正確検定を抑うつ傾向あり・なしの2群間で行ったところ，学生，母ともに各項目に有意差を認めなかった。味噌および大豆摂取量に関しては，学生，母ともに抑うつ傾向あり群において摂取量が多い傾向を認めたが，統計学的有意差は認めなかった。

学生，母それぞれの味噌および大豆摂取量を少ない方からQ1～5の5群に分け，冬調査における抑うつ傾向あり群/なし群の粗および調整後オッズ比と，95%信頼区間を算出した。表2に学生，表3に母の結果を示す。

表1. 冬調査解析対象者の基礎属性および冬調査時点でのうつ発症の有無によるエネルギー、味噌および大豆摂取量の比較

	学 生			P <sup>2</sup>
	合計 (n=323)	抑うつ傾向なし群 <sup>1</sup> (n=213)	抑うつ傾向あり群 <sup>1</sup> (n=110)	
年齢 (歳)	18.1 ± 0.3	18.1 ± 0.3	18.1 ± 0.3	0.83
身長 (cm)	158.0 ± 5.4	158.1 ± 5.4	157.7 ± 5.4	0.61
体重 (kg)	52.4 ± 8.4	52.8 ± 8.4	51.7 ± 8.4	0.28
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.0 ± 3.0	21.1 ± 3.0	20.8 ± 3.1	0.35
居住地ブロック [人(%)]				0.06
北海道, 東北	8 ( 2.5)	6 ( 2.8)	2 ( 1.8)	
関東	253 (78.3)	174 (81.7)	79 (71.8)	
北陸, 東海	62 (19.2)	33 (15.5)	29 (26.4)	
近畿	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
中国, 四国	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
九州	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
喫煙 [人(%)]	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	—
飲酒 [人(%)]	12 ( 3.7)	9 ( 4.2)	3 ( 2.7)	0.76
サプリメント使用 [人(%)]	24 ( 7.4)	15 ( 7.0)	9 ( 8.2)	0.82
既往歴あり [人(%)]	133 (41.2)	88 (41.3)	45 (40.9)	1.00
内服薬あり [人(%)]	32 ( 9.9)	24 (11.3)	8 ( 7.3)	0.33
生活環境の変化あり [人(%)] <sup>3</sup>	65 (20.1)	47 (22.1)	18 (16.4)	0.24
同居者あり [人(%)]	235 (72.8)	158 (74.2)	77 (70.0)	0.43
婚姻状況 [人(%)]				0.19
現在結婚している	6 ( 1.9)	2 ( 0.9)	4 ( 3.6)	
結婚していない (離別, 死別含む)	317 (98.1)	211 (99.1)	106 (96.4)	
エネルギー (kcal/日)	1684 ± 456	1676 ± 436	1700 ± 494	0.65
味噌摂取量 (g/1000kcal) <sup>4</sup>	4.8 ± 4.2	4.5 ± 3.4	5.3 ± 5.5	0.11
大豆摂取量 (g/1000kcal) <sup>4</sup>	27.4 ± 27.1	26.7 ± 27.7	28.7 ± 25.8	0.52

	母			P <sup>2</sup>
	合計 (n=405)	抑うつ傾向なし群 <sup>1</sup> (n=352)	抑うつ傾向あり群 <sup>1</sup> (n=53)	
年齢 (歳)	48.3 ± 3.8	48.4 ± 3.8	47.8 ± 4.0	0.31
身長 (cm)	157.5 ± 5.1	157.4 ± 5.1	157.7 ± 5.4	0.71
体重 (kg)	54.4 ± 7.8	54.5 ± 8.0	53.4 ± 6.5	0.31
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.9 ± 3.0	22.0 ± 3.1	21.5 ± 2.7	0.24
居住地ブロック [人(%)]				0.06
北海道, 東北	39 ( 9.6)	31 ( 8.8)	8 (15.1)	
関東	305 (75.3)	266 (75.6)	39 (73.6)	
北陸, 東海	60 (14.8)	55 (15.6)	5 ( 9.4)	
近畿	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
中国, 四国	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
九州	1 ( 0.3)	0 ( 0.0)	1 ( 1.9)	
喫煙 [人(%)]	25 ( 6.2)	19 ( 5.4)	6 (11.3)	0.12
飲酒 [人(%)]	208 (51.4)	180 (51.1)	28 (52.8)	0.88
サプリメント使用 [人(%)]	111 (27.4)	96 (27.3)	15 (28.3)	0.87
既往歴あり [人(%)]	215 (53.1)	183 (52.0)	32 (60.4)	0.30
内服薬あり [人(%)]	87 (21.5)	72 (20.5)	15 (28.3)	0.21
生活環境の変化あり [人(%)] <sup>3</sup>	56 (13.8)	46 (13.1)	10 (18.9)	0.28
同居者あり [人(%)]	402 (99.3)	349 (99.2)	53 (100.0)	1.00
婚姻状況 [人(%)]				0.50
現在結婚している	384 (94.8)	335 (95.2)	49 (92.5)	
結婚していない (離別, 死別含む)	21 ( 5.2)	17 ( 4.8)	4 ( 7.6)	
就労状況 [人(%)] (母のみ)				0.71
就労あり (パート・アルバイト含む)	325 (80.3)	281 (79.8)	44 (83.0)	
就労なし	80 (19.8)	71 (20.2)	9 (17.0)	
エネルギー (kcal/日)	1810 ± 455	1800 ± 452	1879 ± 472	0.24
味噌摂取量 (g/1000kcal) <sup>4</sup>	6.2 ± 6.2	6.0 ± 6.0	7.6 ± 7.4	0.07
大豆摂取量 (g/1000kcal) <sup>4</sup>	35.9 ± 25.3	35.5 ± 25.3	38.9 ± 25.2	0.36

連続変数は平均±標準偏差, カテゴリ変数は該当者の人数 (%) で示した。

<sup>1</sup> 冬調査CES-Dスコア16点以上の者を抑うつ傾向あり群とした。

<sup>2</sup> 連続変数はStudentのt検定, カテゴリ変数はFisherの正確検定を行った。

<sup>3</sup> 春調査と冬調査において居住地, 家族の人数に変化があった対象者

<sup>4</sup> 密度法によるエネルギー調査値を使用

表2. 春調査における味噌・大豆摂取量の五分位による冬調査時抑うつ傾向のオッズ比と95%信頼区間(学生)

	Q 1 (n=64)	Q 2 (n=65)	Q 3 (n=65)	Q 4 (n=65)	Q 5 (n=65)	P for trend
味噌摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤1.29	1.30-3.10	3.12-4.88	4.90-7.28	≥7.32	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	22/42	24/41	21/44	21/44	22/42	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	1.12 (0.54-2.30)	0.91 (0.44-1.90)	0.91 (0.44-1.90)	1.00 (0.48-2.07)	0.80
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	1.14 (0.54-2.41)	0.96 (0.45-2.06)	1.00 (0.46-2.14)	1.01 (0.47-2.17)	0.90
大豆摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤11.2	11.4-16.9	16.9-24.8	24.8-38.2	≥38.3	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	24/40	15/50	20/45	24/41	27/37	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	0.50 (0.23-1.08)	0.74 (0.36-1.54)	0.98 (0.48-1.99)	1.22 (0.60-2.47)	0.21
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	0.56 (0.25-1.25)	0.76 (0.36-1.61)	1.09 (0.52-2.28)	1.28 (0.61-2.69)	0.19

<sup>1</sup>密度法によるエネルギー調整値を使用。

<sup>2</sup>冬調査CES-Dスコア16点以上の者を抑うつ傾向あり群とした。

<sup>3</sup>年齢(連続値), 冬調査時の居住地ブロック(北海道・東北, 関東, 北陸・東海, 近畿, 中国・四国, 九州), BMI(連続値), 飲酒(あり, なし), サプリメントの使用(あり, なし), 内服薬(あり, なし), 婚姻の有無(あり, なし), 生活環境の変化(あり, なし), エネルギー摂取量(連続値)で調整。

表3. 春調査における味噌・大豆摂取量の五分位による冬調査時抑うつ傾向のオッズ比と95%信頼区間(母)

	Q 1 (n=81)	Q 2 (n=81)	Q 3 (n=81)	Q 4 (n=81)	Q 5 (n=81)	P for trend
味噌摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤2.01	2.04-3.61	3.62-5.72	5.74-8.83	≥8.85	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	12/69	7/74	6/75	13/68	15/66	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	0.54 (0.20-1.46)	0.46 (0.16-1.29)	1.10 (0.47-2.58)	1.31 (0.57-3.00)	0.21
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	0.49 (0.18-1.35)	0.45 (0.15-1.29)	0.94 (0.38-2.33)	1.16 (0.48-2.77)	0.35
大豆摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤16.9	16.9-25.7	25.8-36.4	36.4-48.8	≥49.1	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	8/73	7/74	16/65	8/73	14/67	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	0.86 (0.30-2.50)	2.25 (0.90-5.59)	1.00 (0.36-2.81)	1.91 (0.75-4.83)	0.17
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	0.86 (0.29-2.58)	2.20 (0.85-5.72)	0.91 (0.31-2.68)	1.80 (0.67-4.83)	0.28

<sup>1</sup>密度法によるエネルギー調整値を使用。

<sup>2</sup>冬調査CES-Dスコア16点以上の者を抑うつ傾向あり群とした。

<sup>3</sup>年齢(連続値), 冬調査時の居住地ブロック(北海道・東北, 関東, 北陸・東海, 近畿, 中国・四国, 九州), BMI(連続値), 飲酒(あり, なし), 喫煙(あり, なし), サプリメントの使用(あり, なし), 内服薬(あり, なし), 婚姻の有無(あり, なし), 就労の有無(あり, なし), 生活環境の変化(あり, なし), エネルギー摂取量(連続値)で調整。

学生におけるもっとも味噌摂取量の少ない群(Q 1)を基準とした抑うつ傾向調整後オッズ比(95%信頼区間)は, Q 3群で0.96(0.45-2.06)とわずかな低下傾向を認めたが, 有意な関連は認めなかった(P = 0.90)。大豆摂取量についても, Q 2群で0.56(0.25-1.25), Q 3群で0.76(0.36-1.61)と抑うつ傾向調整後オッズ比の低下傾向を認めたものの, 有意な関連は認めなかった(P = 0.19)。

母に関しても同様に, 味噌および大豆摂取量の最も少ない群(Q 1)を基準として算出した調整後オッズ比は, 味噌においてQ 2群で0.49(0.18-1.35), Q 3群で0.45(0.15-1.29)と低下傾向を認めたが, 有意な差は認めず(P = 0.35), 大豆に関してはQ 2およびQ 4群で調整後オッズ比の

わずかな低下を認めたが有意な差は認めなかった(P = 0.28)。

### 【考察】

本研究において, 春調査で得た習慣的味噌および大豆摂取量と, 冬の抑うつ傾向発症との間に有意な関連は認められなかった。その理由として, 以下の理由が考えられる。

- ①研究対象者のイベント(大学等への入学)が抑うつ傾向の有無に影響した可能性: 本研究では, 学生の46.2%(348名)が春調査時点で抑うつ傾向を示したため, 解析対象から除

外した。本研究は栄養関連教育施設の新入生を対象として行ったため、講義・授業が食習慣に影響を与える前の入学直後に春調査を実施しているが、入学直後の生活の変化から生じる不安感等が各自のCES-Dスコアに影響した可能性がある。しかしながら、CES-Dを思春期や青年期のうつ病のスクリーニングとして用いた場合、16点をカットオフ値とするとほぼ半数が16点を超えるとの報告があったこと<sup>6),7)</sup>、また、春と冬のCES-Dスコアの変化量と味噌・大豆摂取量との関連を解析した場合においてもほぼ同様の結果であったことから、本研究の対象者において入学直後という調査時期による影響は比較的小さいと思われる。

②冬調査の参加割合が解析対象者の味噌・大豆摂取量、抑うつ傾向発症者の分布に影響を与えた可能性：本研究において、冬調査への協力を得られたのは、春調査参加者の約40%であった。協力を得られなかった60%の春調査参加者の中には長期欠席、休学、退学をしている者も含まれており、これらの参加者の中にメンタル不調を抱えた者が多く含まれている可能性がある。また、特に東北地方在住者において冬調査への回答率が低く、解析対象者の居住地分布に偏りが生じた。東北地方は味噌の摂取量が最も多い地方であるため<sup>8)</sup>、味噌を多く摂取する集団における抑うつ状態発症の状況の把握が不十分である可能性がある。

表4. 春調査における味噌・大豆摂取量の五分位による春調査時抑うつ傾向のオッズ比と95%信頼区間（学生）

	Q 1 (n=328)	Q 2 (n=329)	Q 3 (n=329)	Q 4 (n=329)	Q 5 (n=329)	P for trend
味噌摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤1.06	1.06–2.76	2.77–4.56	4.56–7.00	≥7.00	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	185/143	159/170	159/170	151/178	162/167	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	0.72 (0.53–0.98)	0.72 (0.53–0.98)	0.66 (0.48–0.89)	0.75 (0.55–1.02)	0.06
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	0.73 (0.53–0.99)	0.72 (0.53–0.99)	0.66 (0.48–0.90)	0.77 (0.57–1.05)	0.08
大豆摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤10.9	11.0–17.0	17.0–25.3	25.3–38.8	≥38.9	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	188/140	161/168	157/172	165/164	145/184	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	0.71 (0.53–0.97)	0.68 (0.50–0.93)	0.75 (0.55–1.02)	0.59 (0.43–0.80)	0.0038
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	0.72 (0.53–0.99)	0.67 (0.49–0.92)	0.74 (0.54–1.00)	0.58 (0.42–0.79)	0.0023

<sup>1</sup>密度法によるエネルギー調整値を使用。

<sup>2</sup>春調査CES-Dスコア16点以上の者を抑うつ傾向あり群とした。

<sup>3</sup>年齢 (連続値)、春調査時の居住地ブロック (北海道・東北、関東、北陸・東海、近畿、中国・四国、九州)、BMI (連続値)、飲酒 (あり、なし)、サプリメントの使用 (あり、なし)、内服薬 (あり、なし)、婚姻の有無 (あり、なし)、エネルギー摂取量 (連続値) で調整。

表5. 春調査における味噌・大豆摂取量の五分位による春調査時抑うつ傾向のオッズ比と95%信頼区間（母）

	Q 1 (n=285)	Q 2 (n=286)	Q 3 (n=286)	Q 4 (n=286)	Q 5 (n=285)	P for trend
味噌摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤1.84	1.84–3.42	3.43–5.34	5.34–8.33	≥8.34	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	83/202	70/216	84/202	73/213	61/224	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	0.79 (0.54–1.14)	1.01 (0.71–1.45)	0.83 (0.58–1.21)	0.66 (0.45–0.97)	0.08
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	0.78 (0.54–1.14)	0.99 (0.69–1.44)	0.81 (0.56–1.18)	0.67 (0.46–0.99)	0.09
大豆摂取量 (g/1000kcal) <sup>1</sup>	≤16.6	16.6–24.3	24.4–34.3	34.4–49.0	≥49.1	
抑うつ傾向あり/なし 比 <sup>2</sup>	84/201	65/221	84/202	71/215	67/218	
粗オッズ比 (95%信頼区間)	1.00 (ref)	0.70 (0.48–1.03)	1.00 (0.69–1.43)	0.79 (0.55–1.14)	0.74 (0.51–1.07)	0.23
調整後オッズ比 (95%信頼区間) <sup>3</sup>	1.00 (ref)	0.70 (0.48–1.03)	1.02 (0.71–1.48)	0.79 (0.54–1.15)	0.72 (0.49–1.06)	0.21

<sup>1</sup>密度法によるエネルギー調整値を使用。

<sup>2</sup>春調査CES-Dスコア16点以上の者を抑うつ傾向あり群とした。

<sup>3</sup>年齢 (連続値)、春調査時の居住地ブロック (北海道・東北、関東、北陸・東海、近畿、中国・四国、九州)、BMI (連続値)、飲酒 (あり、なし)、喫煙 (あり、なし)、サプリメントの使用 (あり、なし)、内服薬 (あり、なし)、婚姻の有無 (あり、なし)、就労の有無 (あり、なし)、エネルギー摂取量 (連続値) で調整。

③観察期間（約8か月）が、味噌および大豆の習慣的摂取量とうつ発症との関連を検証するには短い可能性：本研究では、春調査実施時に抑うつ傾向を認めず、冬調査時に抑うつ傾向を認めた対象者を抑うつ傾向あり群とした。8か月という観察期間が、習慣的味噌および大豆摂取量と抑うつ傾向発症との関連を見るには不十分であった可能性がある。

春調査時点での抑うつ傾向の有無と、習慣的味噌および大豆摂取量との関連を本研究と同様の解析で横断的に検証したところ（表4および5）、学生の大豆摂取量との関連においては摂取量の多い群において有意なオッズ比の低下を認め、学生、母の味噌摂取量および母の大豆摂取量との関連においても有意ではないが、摂取量の多い群においてオッズ比の低下傾向を認めた。この解析は横断的解析であり、また味噌を多く摂取することに関連するライフスタイル因子の交絡を十分に調整できていない可能性があるため、因果関係の検証は不可能であるが、より長期的な観察をすることにより、味噌および大豆摂取量と抑うつ傾向との関連が明らかになる可能性があると考えられる。

## 【結論】

本研究では、観察期間8カ月の追跡調査における、味噌摂取と抑うつ発症抑制との関連は認められなかった。しかし、横断的解析で、習慣的味噌摂取量が多い集団において抑うつ発症リスクが低い傾向を示しており、より長期的に味噌摂取量と抑うつ傾向発症との関連を観察する必要があるものと思われた。

## 【謝辞】

本研究の冬調査は（一社）中央味噌研究所の研究助成を受け実施した。春調査のデータは文部科学研究費補助金（基盤A）「家庭環境を考慮した女性3世代の食習慣と健康状態に関する栄養疫学的横断研究」のデータを使用した。

## 【参考文献】

- 1) 厚生労働省 平成23年度患者調査
- 2) Blake C, Fabick KM, Setchell KD, Lund TD, Lephart ED. Neuromodulation by soy diets or equol: anti-depressive & anti-obesity-like influences, age- & hormone-dependent effects. *BMC Neuroscience*, 12: 28-40.
- 3) Nanri A, Kimura Y, Matsushita Y, Ohta M, Sato M, Mishima N, Sasaki S, Mizoue T. Dietary patterns and depressive symptoms among Japanese men and women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64: 832-9.
- 4) Kobayashi S, Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Hirota N, Notsu A, Fukui M, Date C. Comparison of relative validity of food group intakes estimated by comprehensive and brief-type self-administered diet history questionnaires against 16 d dietary records in Japanese adults. *Public Health Nutr* 14: 1200-1211.
- 5) Radloff, LS. The CES-D Scale: A Self Report Depression Scale for Research in the General. *Applied psychological measurement* 1: 385-401.
- 6) 小林幸太, 小林玲子, 久保清香, 園田智子, 森満 抑うつ症状とその関連要因についての検討 北海道内の一短期大学における調査から *日本公衆衛生雑誌* 52: 55-65.
- 7) Roberts RE, Andrews JA, Lewinsohn PM, et al. Assessment of depression in adolescents using the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale. *Psychol Assess* 2: 122-128.
- 8) 総務省 家計調査 品目別都道府県所在市及び政令指定都市ランキング（平成22～24年平均）  
<http://www.stat.go.jp/data/kakei/zuhyou/rank08.xls>



# 研究助成報告

平成23年度社団法人中央味噌研究所研究助成による研究報告  
平成24年度社団法人中央味噌研究所研究助成による研究報告

# 味噌由来新規機能性ペプチドの網羅的探索と構造決定

岩崎 崇

Screening of novel functional peptides derived from miso

Takashi IWASAKI

*Laboratory of Bio-Regulatory Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University  
4-101 Koyamacho-Minami, Tottori-shi, Tottori 680-8553, Japan*

## 1. 研究目的

発酵食品の原材料に含まれているタンパク質の大部分は発酵過程により分解され、極めて多様な短鎖ペプチドを派生する。これらの短鎖ペプチドは、もとのタンパク質中では不活性であるが、発酵過程の分解によって様々な機能を獲得し、さらに低分子化されることで腸管吸収され易い構造と熱安定性を獲得する。即ち、日常生活における調理・摂取によって機能を発揮することが期待される。発酵食品であるみそは、「機能性ペプチドの宝庫」と言っても過言ではない。

本研究では、原材料・産地の異なるみそ（米みそ、麦みそ、豆みそ）をペプチド資源とし、健康増進に役立つ生理活性を有する機能性ペプチドの網羅的探索を行う。これにより、複数の機能性ペプチドの発見と特定を目指す。

## 2. 研究手法

### 2-1. ペプチド抽出・精製

中央味噌研究所よりご提供頂いた以下6種のみ

そを研究材料として用いた。

- |           |           |
|-----------|-----------|
| ①米みそ（富山産） | ④米みそ（長野産） |
| ②米みそ（京都産） | ⑤豆みそ（愛知産） |
| ③米みそ（宮城産） | ⑥麦みそ（大分産） |

上記6種のみそから、ペプチドを含む低分子化合物の抽出を行った。まず、各みそサンプル100gを蒸留水100mlに溶き、10分間100℃で熱処理することで、プロテアーゼを含むタンパク質を変性・失活させた。次いで、凍結乾燥法によりサンプルを乾固させ、ミキサーで破碎することにより粉末状のみそサンプルを得た。その後、サンプルに十分量の冷アセトンを添加し、3日間冷却することでペプチド・タンパク質・低分子有機化合物を不溶化させ、脂質（脂溶性化合物）を抽出・除去した。不溶化したペプチド・タンパク質・低分子有機化合物を回収し、80%エタノール中で3日間冷却することで、低分子であるペプチド・低分子有機化合物の抽出を行った。

ペプチド・低分子有機化合物を含むエタノール抽出液からエタノールを揮発除去した後に、逆相クロマトグラフィーによる粗精製を行った。サ



ンプル溶液を Waters Sep-Pak C<sub>18</sub> カラムにロードし、ペプチド・低分子有機化合物をカラムに吸着させた後、6段階のアセトニトリル上昇系列 (ACN10%～60%) により溶出を行った。これにより、みそサンプル6種×アセトニトリル上昇系列6段階=36種のみそ抽出画分を得た。次いでエバポレーターを用いて、全画分からアセトニトリルを揮発除去した後に、全画分をそれぞれ二等分割し、一方のサンプルに対してプロテアーゼ処理 (ProteaseK 100 μg/ml, 37°C, 10min) を行うことで、ペプチド分解画分と未分解画分を得た。その後、以下に記載する種々のバイオアッセイにおいて、プロテアーゼ処理画分 (ペプチド分解画分) およびプロテアーゼ未処理画分 (ペプチド未分解画分) の活性比較を行うことで、機能性ペプチドの探索を行った (一次スクリーニング)。

## 2-2. 抗腫瘍活性試験

抗腫瘍活性試験においては、理研細胞バンクから購入した細胞株を使用した。正常細胞としてマウス繊維芽細胞 (NIH-3T3: RCB2767), および腫瘍細胞としてヒト腎臓癌細胞 (HepG2: RCB1886), マウス神経膠腫細胞 (U251: RCB0270), ヒト肺癌細胞 (RERF-LC-AI: RCB0444), ヒト骨肉腫細胞 (HT1080: RCB1956), ヒトTリンパ性白血病細胞 (Jurkat: RCB0806), ヒトバーキットリンパ腫細胞 (RAJI: RCB1647) を用いて、腫瘍細胞選択的に細胞増殖抑制活性を示す因子の探索を行った。細胞培地として、NIH-3T3, HepG2, U251 には D-MEM 培地 (ウシ胎児血清 10% 含有), RERF-LC-AI, HT1080 には MEM 培地 (ウシ胎児血清 10% 含有), Jurkat, RAJI には RPMI 培地 (ウシ胎児血清 10% 含有) を使用した。各細胞株を 8.0x10<sup>4</sup> cells/ml になるように調製した細胞溶液 90 μl と、みそ抽出画分 (みそ 100mg 相当) 10 μl を 96well プレート上で混合し、37°C, 5.0% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。次いで、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を 10 μl/well 添加し、37°C, 5.0% CO<sub>2</sub> 条件下で 4 時間培養した。その後、マルチプレートリーダーにて 450nm の吸光度を測定し、細胞の増殖率を評価した。

## 2-3. イオン交換クロマトグラフィー

一次スクリーニングにおいて抗腫瘍活性を示した画分に対して、イオン交換クロマトグラフィーによる更なる精製を行った。Waters Sep-Pak CM カラム (陽イオン交換カラム) および QMA カラム (陰イオン交換カラム) をタンデムに結合させ、活性画分 (10mM リン酸緩衝液, pH7.4 に調整) をロードすることで、活性物質をカラムに吸着させた。次いで、CM および QMA カラムを分離し、それぞれ 10 段階の NaCl 上昇系列 (NaCl 0.1M～1.0M) (10mM リン酸緩衝液, pH7.4 に調整) により溶出を行った。溶出した各画分を Waters Sep-Pak C<sub>18</sub> カラムにロード・再吸着させ、ACN60% で再溶出させることで、脱塩処理を行った。脱塩処理後の各画分を抗腫瘍活性試験へと供した。

## 2-4. 逆相 HPLC

イオン交換クロマトグラフィーにおいて抗腫瘍活性を示した画分を、ODP-50 6E カラム (Shodex) または CSMOSIL HILIC カラム (ナカライテスク) を用いた逆相 HPLC に供することで、更なる精製を行った。

ODP-50 6E カラムを用いた逆相 HPLC においては、活性画分ならびに移動相 (水またはメタノール) にトリエチルアミン (終濃度 0.5%) を添加することで、化合物の吸着性の向上、ならびにテーリングの抑制を行った。

CSMOSIL HILIC カラムを用いた逆相 HPLC においては、活性画分ならびに移動相 (水またはアセトニトリル) に酢酸アンモニウム (終濃度 10mM) を添加することで、化合物の吸着性の向上、ならびに pH の維持を行った。

## 3. 研究結果

### 3-1. 一次スクリーニング

三反復試験による一次スクリーニングの結果、ペプチド性の抗腫瘍活性物質の存在は認められなかった。しかし一方で、非ペプチド性因子ではあるが、『麦みそ (大分産) 30% ACN 溶出画分』

に『ヒト白血病細胞 Jurkat』に対する選択的かつ強力な抗腫瘍活性が認められた(図1)。そこで、この非ペプチド性の抗腫瘍活性物質の単離および構造解析を目指し、以降の実験を行った。

### 3-2. イオン交換クロマトグラフィー

前述の一次スクリーニングにおいて抗腫瘍活性物質が確認された『麦みそ(大分産)30% ACN画分』を、イオン交換クロマトグラフィーに供することで、活性物質の精製を行った。その結果、『CMカラム NaCl 0.5M 溶出画分』に、抗腫瘍活性物質が存在することが確認された(図2)。

### 3-3. ODP-50 6E カラムを用いた逆相 HPLC

イオン交換クロマトグラフィーにおいて抗腫瘍活性を示した画分(CMカラム NaCl0.5M 溶出画分)を、ODP-50 6Eカラムを用いた逆相 HPLCに供することで、更なる精製を行った。その結果、溶出時間10~12分のピーク部分に、抗腫瘍活性物質の存在が認められた(図3)。

### 3-4. COSMOSIL HILIC カラムを用いた逆相 HPLC

ODP-50 6Eカラムを用いた逆相 HPLCにおいて抗腫瘍活性を示した画分を、COSMOSIL HILICカラムを用いた逆相 HPLCに供することで、更なる精製を行った。その結果、溶出時間2

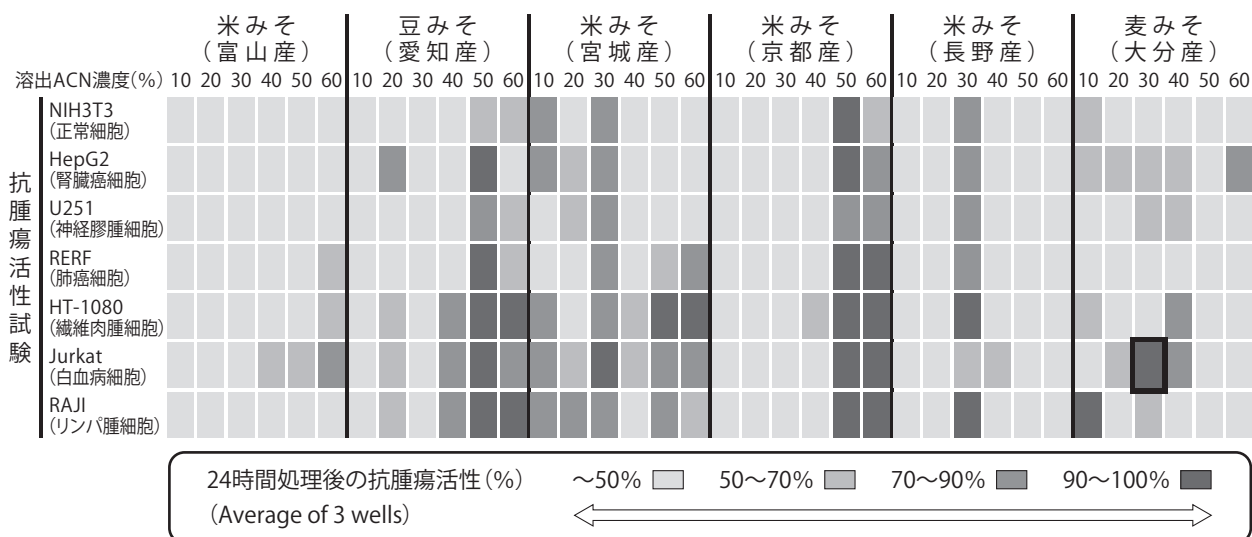


図1. 一次スクリーニングの結果 (三反復試験の平均)

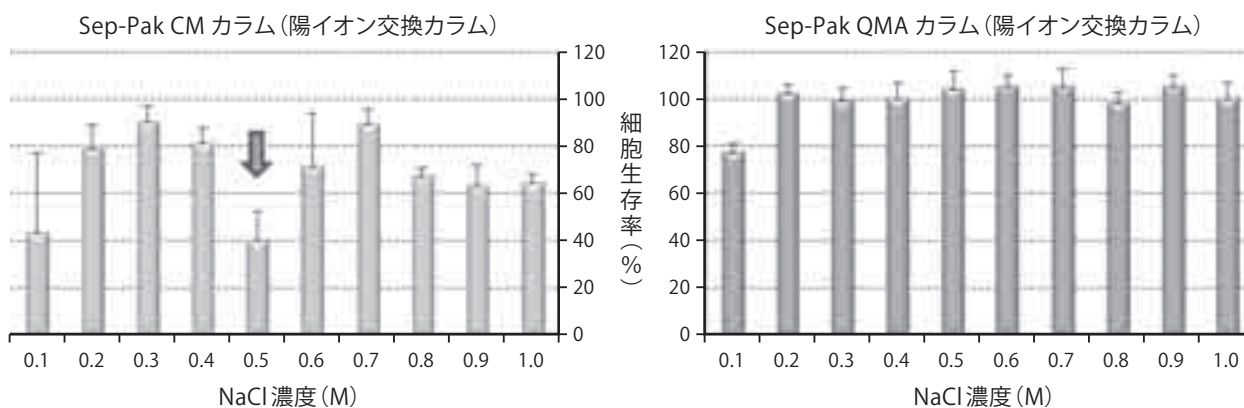


図2. イオン交換クロマトグラフィーの結果

分のピーク部分に、抗腫瘍活性物質の存在が認められた(図4)。このピーク画分を最終精製物として分取した結果、2.1mgの最終精製物を得た。

### 3-5. <sup>1</sup>H-NMRによる構造解析

上記の精製を経て得られた最終精製産物(2.1mg)の構造解析を、核磁気共鳴分光分析装置 Bruker Biospin Avance II 600 (Bruker) を

用いて行った。最終精製産物を重 DMSO (ジメチルスルホキシド) に溶解し、<sup>1</sup>H-NMR による解析を行った。その結果、 $\delta$  H7.0 付近のシグナルから芳香環の存在が、 $\delta$  H1.0 付近のシグナルから多数のアルキル基の存在が示唆された。また、 $\delta$  H3.3 のシグナルは重水由来、 $\delta$  H2.5 のシグナルは重 DMSO 由来のシグナルであると推定された。しかしながら、最終精製物の収量が低かった

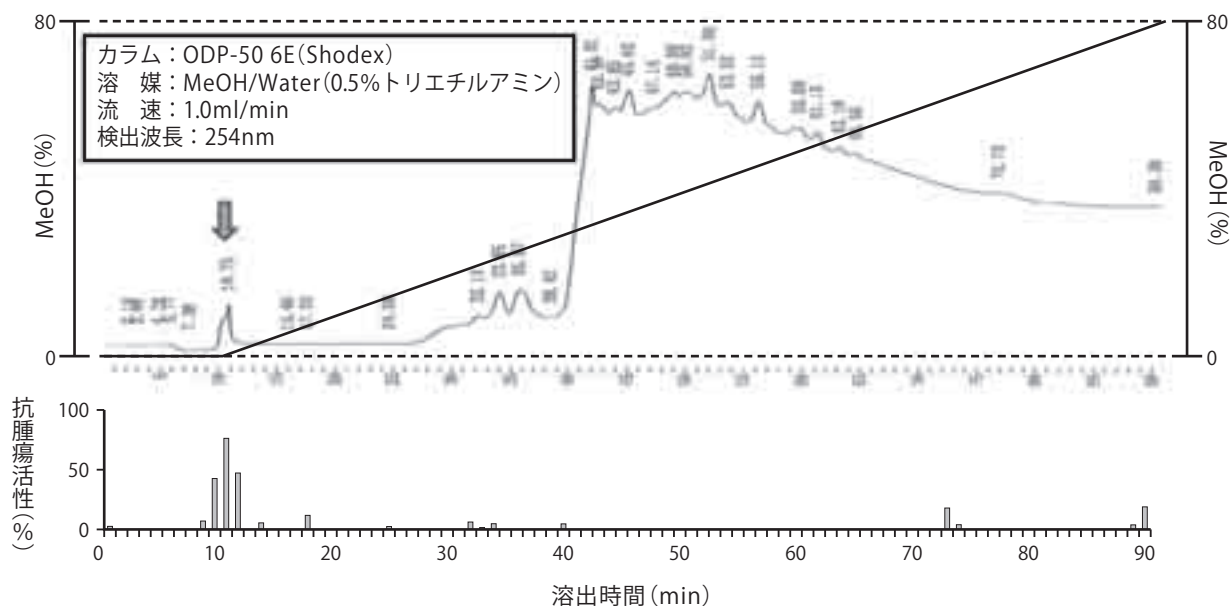


図3. ODP-50 6Eカラムを用いた逆相HPLCの結果

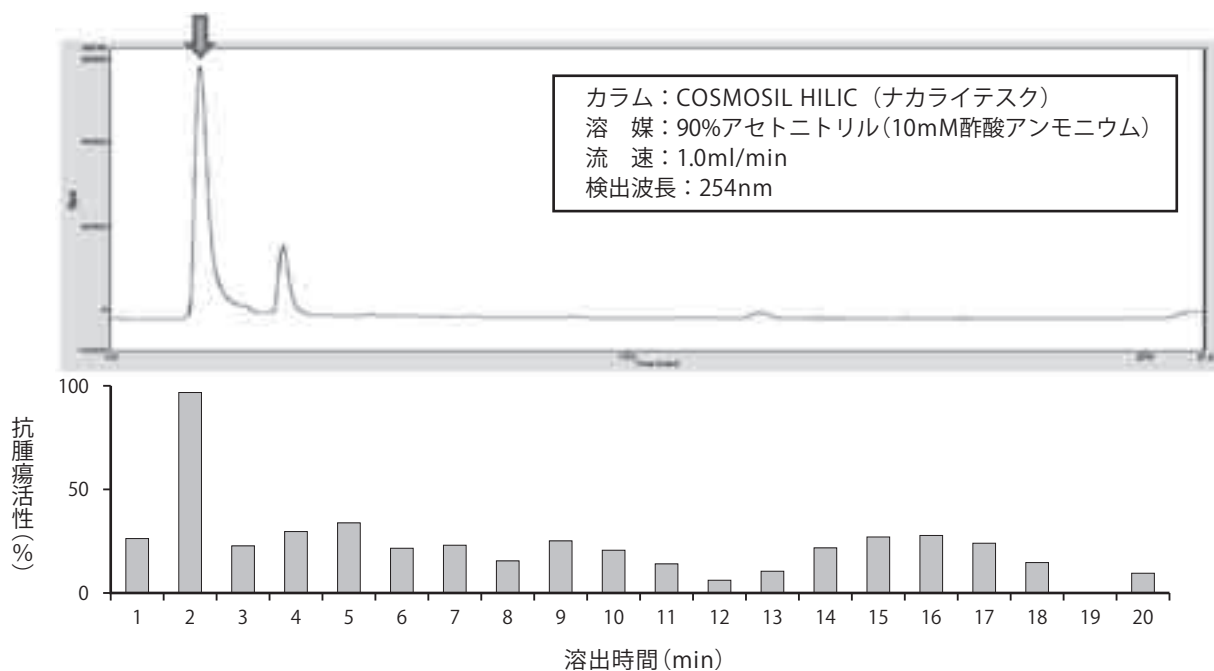


図4. COSMOSIL HILICカラムを用いた逆相HPLCの結果

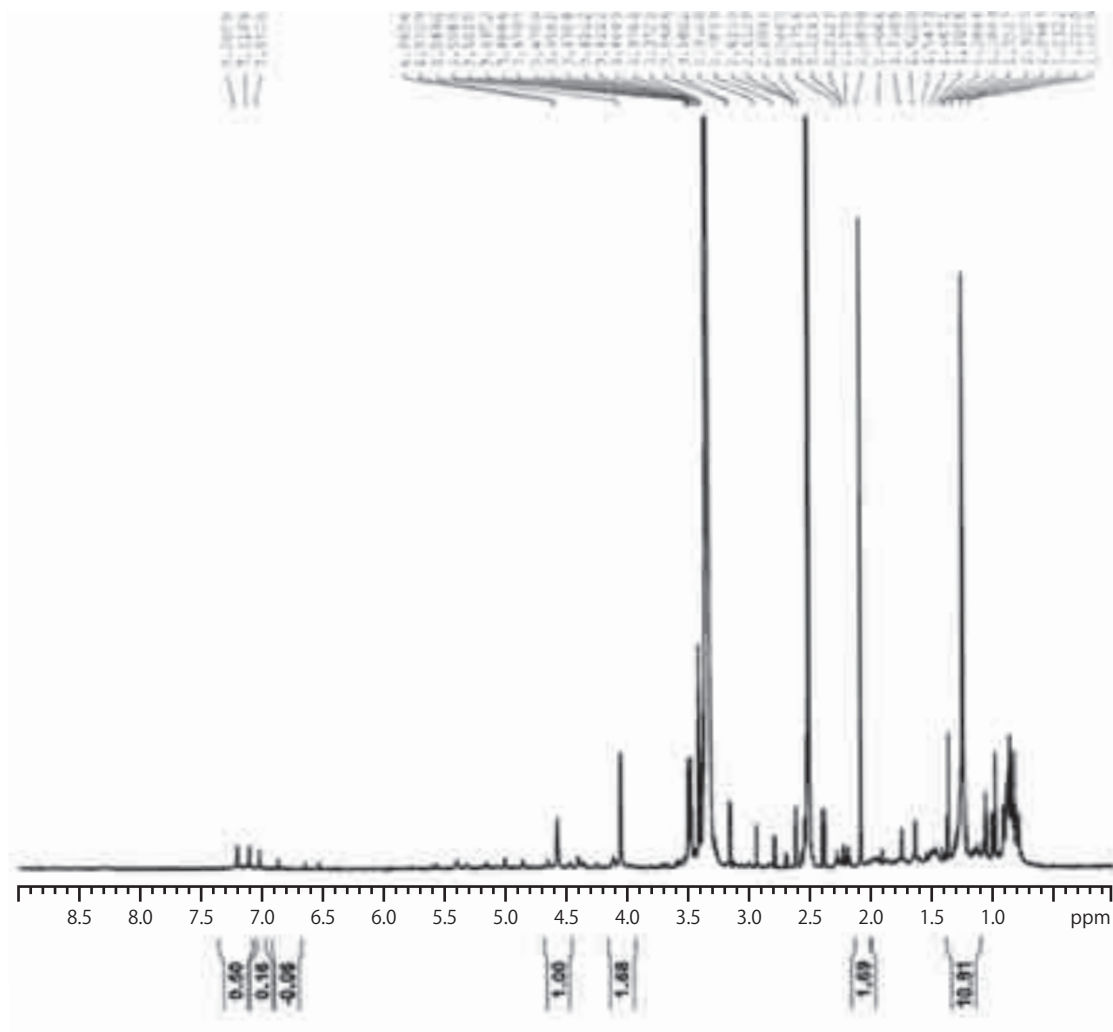


図5.  $^1\text{H-NMR}$ による構造解析の結果

ことから、明確なシグナルを得ることはできず、最終的に麦みそ由来抗腫瘍活性物質の構造決定には至らなかった（図5）。

#### 4. 総括と今後の展開

本研究において、6種のみそを資源とした一次スクリーニング（三反復試験）の結果、『麦みそ（大分産）30% ACN 溶出画分』に『ヒト白血病細胞 Jurkat』に対して選択的な抗腫瘍活性を示す非ペプチド性の抗腫瘍活性物質の存在が確認された。この抗腫瘍活性物質は、Sep-Pak CM（陽イオン交換カラム）に吸着し、NaCl 0.5M という比較的高い塩濃度により溶出されたことか

ら、強い塩基性物質であることが示唆された。しかしながら、この抗腫瘍活性物質は、トリエチルアミンを添加した溶媒を使用したにもかかわらず、ODP-50 6E カラムに吸着しなかったことから、極めて極性の高い化合物であることが示唆された。そこで、HILIC カラムを使用した逆相 HPLC を行ったところ、抗腫瘍活性物質はロード直後に溶出することが確認された。また、この抗腫瘍活性物質は 254nm に吸収を持つことから、芳香環を有する化合物であることが示唆された。 $^1\text{H-NMR}$  による構造解析の結果、微弱ながらも  $\delta$  H7 付近のシグナルが得られたことから、抗腫瘍活性物質には芳香環が存在することが示唆され、前述の物性（吸収波長）と一致することが分かった。しかしながら、最終精製物の収量が少な

かったため、構造に関して更なる情報を得ることはできなかった。

以上の結果から、本研究において発見された麦みそ由来の抗腫瘍活性物質を単離するために、以下の精製スキームを構築した(図6)。現在は、十分量の最終精製物を得るために、10kgの麦みそを出発材料とした大規模精製を行っているところである。研究助成期間は終了するが、今後も、本研究により確立された精製スキームに沿って、麦みそ由来の抗腫瘍活性物質の単離・構造決定を行っていく予定である。

## 5. 謝辞

本研究に対しまして、多大なるご支援を賜りました一般社団法人中央味噌研究所に心から御礼を申し上げます。

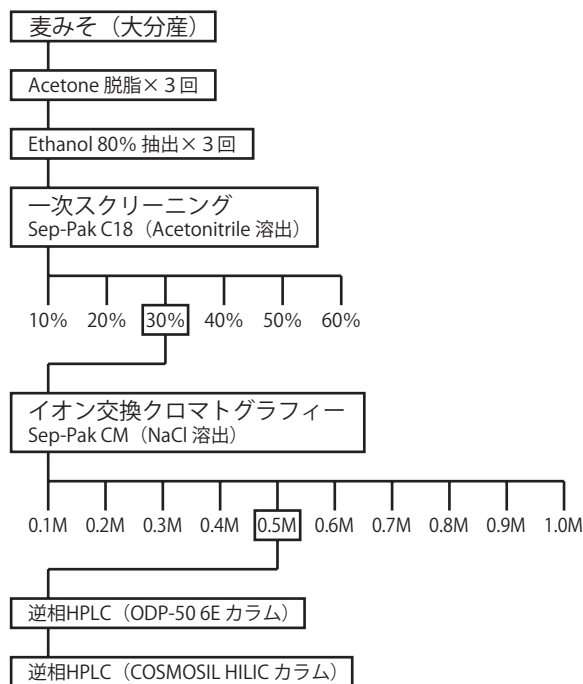


図6. 麦みそ由来抗腫瘍活性物質の精製スキーム

## 亜鉛欠乏予防における味噌の効能に関する基盤研究

神戸 大朋

Study of the effects of Miso (Japanese soybean paste) on protection against zinc deficiency

Taiho KAMBE

*Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University  
Kitashirakawa-Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan*

### 緒言

亜鉛は、味覚機能や免疫機能、創傷治癒などに重要な役割を果たす必須微量栄養素である<sup>1)</sup>。そのため、日々の食事より亜鉛を充足させることは、健康の増進に重要となる。実際、ヨーロッパ各国が共同で実施した疫学調査 ZincAge project において、健康な高齢者は血清亜鉛値が高いことが示されており<sup>2)</sup>、体内亜鉛量を適切に保つことは健全社会の実現への重要な要素の一つとなる。これまで、亜鉛欠乏は途上国の栄養問題とされる傾向があったが、近年、先進国においても高齢者や女性を中心に潜在的な亜鉛欠乏者が増えてきていることが示されている<sup>3)</sup>。平成 22 年の我が国の国民健康・栄養調査の結果では、日々の食事からの亜鉛摂取は、推奨量の 7～8 割程度にしか達していないという報告もなされており、亜鉛欠乏に対しては、より一層の注意が必要な状況になってきている<sup>4)</sup>。

亜鉛は、主に小腸より吸収されるが、その吸収過程には亜鉛トランスポーター ZIP4 が機能する<sup>5)</sup>。ZIP4 遺伝子の変異は、先天性亜鉛欠乏症・

腸性肢端皮膚炎を引き起こすことが知られ<sup>6,7)</sup>、ZIP4 は小腸上皮細胞頂端膜に局在して食事由来の亜鉛を上皮細胞内に取り込む役割を果たしている<sup>8,9)</sup>。従って、この ZIP4 を介した上皮細胞内への亜鉛取り込みが亜鉛吸収量を制御する上で極めて重要となる。消化管における亜鉛吸収効率は 30%程度と低いが、ZIP4 の発現を増加させることができれば、亜鉛吸収率を高めることに繋がると予想される。この「ZIP4 の発現を増加させる食品因子は、亜鉛取り込み量を増加させ、亜鉛欠乏の予防に効果的である」との仮説のもと、我々は ZIP4 発現促進因子の探索に適したスクリーニング系を構築し、様々な食品から活性因子を探索してきた。これまでの解析から、ZIP4 の発現を促進すると思われる味噌を複数種発見し、味噌の共通の主原料である大豆抽出物にも、同様の活性が含まれることを見出している。今年度の解析では、大豆抽出物より活性成分の単離同定を行い、さらに活性因子の ZIP4 に対する作用点に関する解析を実施した。

## 方法

### ① 大豆抽出物からの ZIP4 発現促進因子の同定と構造決定

大豆抽出物を粗精製後、中圧カラムクロマトグラフィーや分取 TLC, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などを用いて分離し、幾つかの単一化合物として精製した。活性因子の構造は、NMR, MS, IR, GC 等機器分析により決定した。

### ② 大豆抽出物の ZIP4 発現促進活性の作用点に関する解析

イリノイ大学の Jack Kaplan 教授より分与して頂いた MDCK FLp-In<sup>TM</sup>T-Rex 細胞株に ZIP4 遺伝子を導入した。導入には pcDNA5/FRT/TO ベクターを使用し、ハイグロマイシンによる耐性を指標に選別した。ZIP4 のカルボキシル末端には HA tag を挿入し、MDCK 細胞膜上での発現部位を解析できるように考慮した。活性成分を含む培養液にて本細胞株を培養し、その作用点につ

いて解析を行った。また、Hepa 細胞を用いてのエンドサイトーシスに関する解析では、対象としてトランスフェリンレセプターとコレラ毒素 B サブユニットを使用した。

## 結果

### 大豆抽出物からの ZIP4 発現促進因子の同定と構造決定

昨年度の解析から、大豆抽出物に強い ZIP4 発現促進活性を認めたため、この大豆抽出物から活性化合物の単離・同定を試みた。予備実験の結果を参考にして、出発材料を増やして精製を開始し、逆相カラムを用いた部分精製の後、ZIP4 の発現促進活性を有する画分をさらに ODS カラムを用いて中圧カラムクロマトグラフィー・高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離した。最終的には、TLC および HPLC 解析において、ほぼ単一化合物を含むと思われる複数の画分の取

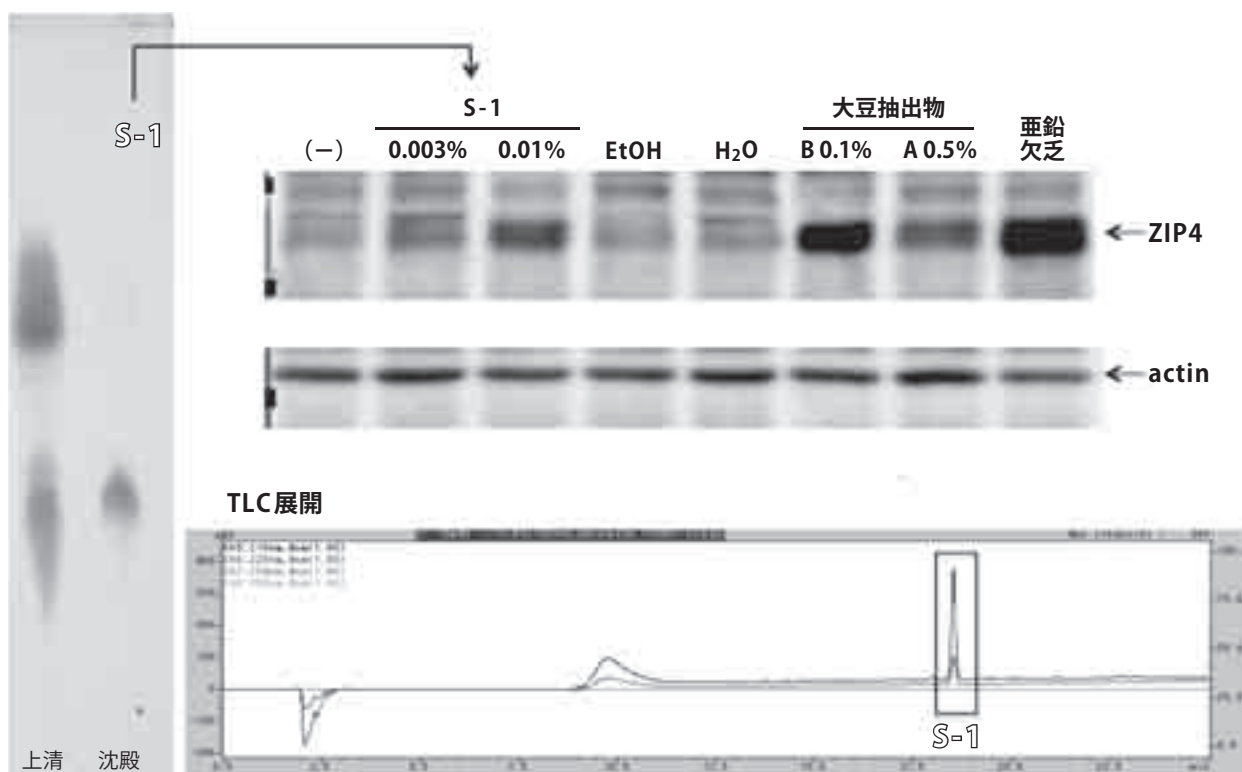


図1. 単一化合物まで精製された大豆由来成分

様々な精製過程を経て、TLCによる展開で単一化合物にまで精製できている活性画分を取得した。NMR, MS, IR, GC等機器分析を用いて、この精製化合物の構造決定を行った。

得に成功した (図 1)。これらの画分の中から、TLC にて単一化合物と確認できたものについては、NMR, MS, IR, GC 等機器分析を用いてその構造を決定した (結果省略)。決定した化合物の解析から、類似の構造を持ちながら、活性を有するものと有さないものが存在することが明らかとなり、ZIP4 の発現促進には、ある種の化合物が特異的に作用することが示唆された。

### 大豆抽出物の ZIP4 発現促進活性の作用点に関する解析

これまでに実施された ZIP4 の発現制御に関する解析から、本研究で見出した大豆抽出物中の活性因子が ZIP4 発現を増加させる作用点としては、(i). ZIP4 遺伝子の転写の促進, (ii). ZIP4 mRNA の安定化, (iii). ZIP4 タンパク質分解の抑制, が考えられた。幾つかの解析の結果、大豆因子添加状態で培養した細胞において、(i) と (ii) の mRNA レベルでの効果は認められなかったことから、(iii). ZIP4 タンパク質分解の抑制が最も有力な作用点と考えられた。作用機序に関してさらに詳細な知見を得るためには、Hepa 細胞を用

いた解析系では検出感度に限界があったため、まず、新たな細胞株の樹立を試みた。

従来の知見により、ZIP4 を安定発現させた株を樹立することは非常に困難であることが知られており、実際に CaCO2 細胞などを用いて ZIP4 安定発現株を樹立することはできなかった。そこで、導入遺伝子の一過的な発現を厳密に調節することが可能な MDCK FLP-In<sup>TM</sup>T-Rex 細胞をイリノイ大学の Jack Kaplan 教授より分与して頂き、ZIP4 遺伝子を導入した。本株を用いることで、通常時の ZIP4 の発現レベルは非常に低いが、ドキシサイクリンの添加により発現を誘導することが可能となる。MDCK FLP-In<sup>TM</sup>T-Rex 細胞を用いた結果、これまで困難とされていた ZIP4 安定発現株の樹立に成功した。本株を用いて、大豆抽出物中の活性因子の ZIP4 に及ぼす作用点を解析した結果、(iii). ZIP4 タンパク質分解の抑制であることを明確に示すことができた (図 2)。

次に、ZIP4 タンパク質分解の抑制に繋がるエンドサイトーシスに及ぼす影響について解析した。その結果、大豆抽出物中の活性因子は、

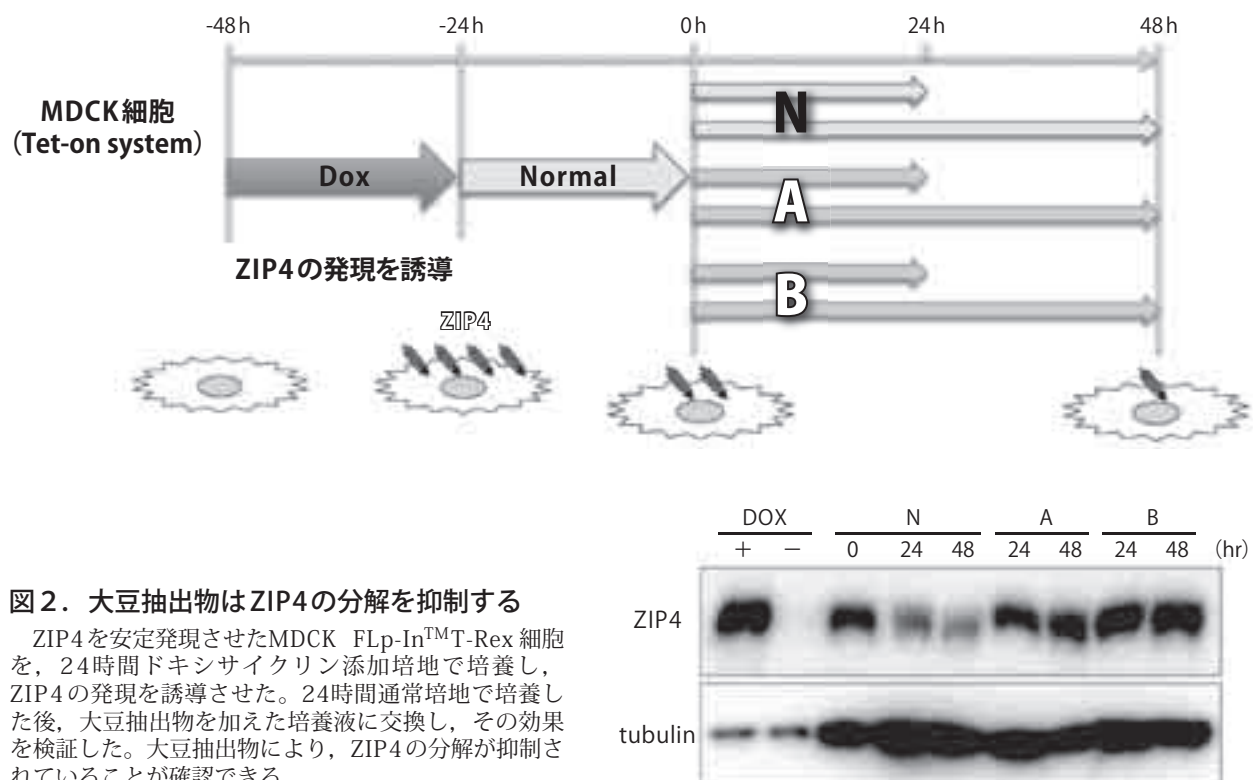


図 2. 大豆抽出物は ZIP4 の分解を抑制する

ZIP4 を安定発現させた MDCK FLP-In<sup>TM</sup>T-Rex 細胞を、24 時間ドキシサイクリン添加培地で培養し、ZIP4 の発現を誘導させた。24 時間通常培地で培養した後、大豆抽出物を加えた培養液に交換し、その効果を検証した。大豆抽出物により、ZIP4 の分解が抑制されていることが確認できる。



ZIP4を細胞膜上に安定に発現させる効果を有しており、トランスフェリンレセプター（クラスリンを介した経路）とコレラ毒素Bサブユニット（脂質ラフトを介した経路）を対象とした比較解析の結果、その効果はZIP4に非常に特異的な効果であることが判明した。これらの結果は、見出した大豆抽出物中の活性因子は、亜鉛吸収促進因子として非常に有効に作用することを示唆する（図3）。

## 考 察

亜鉛欠乏患者は、味覚障害や免疫機能低下、創傷治癒力の低下などの症状を発症することが知ら

れている<sup>10</sup>。さらに最近の亜鉛研究の進展により、亜鉛の多岐にわたる生理機能が明らかにされるにつれ、これら症例に加え、食欲不振や舌痛等様々な症例にも亜鉛欠乏が関与することが明らかにされてきた<sup>11</sup>。従って、亜鉛欠乏患者の“Quality of Life”は大きく低下しており、適切な食事からその予防・治療に努めることは極めて大切となる。また、最近日本においても増加傾向にある加齢黄斑変性の予防には亜鉛サプリメントの摂取が有効であることが実証されている<sup>12</sup>。加齢黄斑変性は、欧米での中途失明の第一の原因であり、日本においても今後、患者数が増加すると予想されている。亜鉛欠乏を防ぐことが第一であるのは言うまでもないが、亜鉛を十分に摂取することは、加齢黄斑変性、さらに、他の疾患の予防に効果的

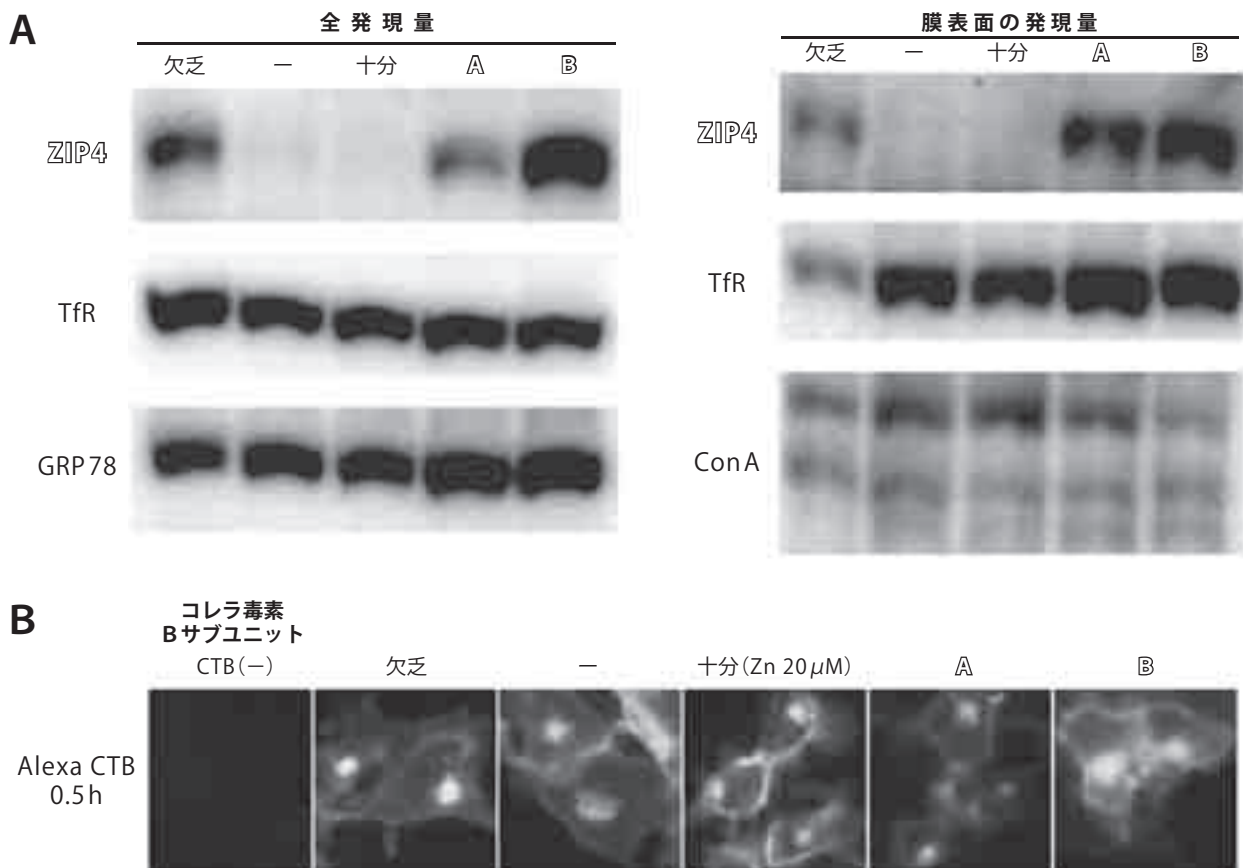


図3. 大豆抽出物はZIP4のエンドサイトーシスを特異的に抑制する

- A** 大豆抽出物を加えた培養液で培養したHepa細胞の細胞膜上のトランスフェリンレセプターの発現レベルを評価した。大豆抽出物によって、細胞膜上の発現レベルがほとんど変化しないことがわかる。
- B** Aの条件で培養したHepa細胞の培養液に、コレラ毒素Bサブユニットを10分間作用させ、そのゴルジ体への輸送が阻害されるかどうか検討した結果。細胞内の大きなドット（ゴルジ体）がコントロール同様に確認でき、大豆抽出物がほとんど阻害効果を持たないことがわかる。-:コントロール

に結びつくことも期待され<sup>13)</sup>、本研究成果の意義は今後さらに大きくなるかもしれない。

味噌は均一な性質を持たないため、今年度の解析のように比較的簡単に活性因子の構造決定にまで至らないと考えられる。味噌の製造過程には、発酵・熟成過程が含まれており、この過程で様々な因子が生成していることが予想され、このことが因子同定をさらに困難にしているのであろう。しかし、一方で、この発酵・熟成において、極めて有効な因子が生み出されている可能性も考えられ、今後は、活性因子を複数同定し、また非活性成分との活性構造相関などの情報を蓄積していくことが重要になってくる。同時に、各活性因子のZIP4の発現に及ぼす作用機序に関する解析を進め、亜鉛吸収の促進に効果的な味噌を生み出すポイントを見極めることも必要であろう。

本研究では、味噌の主原料である大豆より活性因子を同定したが、味噌には本因子以外の活性成分も含まれていることを示す結果も得られており、これら含有される複数の因子は相乗的に働きZIP4の発現を促進させているのかもしれない。今回見出したZIP4発現促進活性因子やこれら成分が含有されている味噌には、亜鉛吸収を促進する効果が期待される。誰もが口にしている味噌から亜鉛吸収促進因子を同定することは、効果的な亜鉛吸収を実現させるために合理的であり、その効能を十二分に活用することは亜鉛欠乏の予防に非常に有効である。本研究から得られた成果を日々の食事にフィードバックさせていきたいと考えている。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご援助賜りました(一社)中央味噌研究所に厚く御礼申し上げます。また、活性成分の単離に関する解析でご協力いただきました福井県立大学高橋正和先生、MDCK FLP-In<sup>TM</sup>T-Rex 細胞を分与頂きましたイリノイ大学の Jack Kaplan 先生に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Fukada T and Kambe T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* 3: 662-674, 2011.
- 2) Haase H, Mocchegiani E and Rink L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology* 7: 421-428, 2006.
- 3) Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr* 130: 1344S-1349S, 2000.
- 4) 厚生労働省総務課生活習慣病対策室, 平成22年国民健康・栄養調査の概要 (2012)
- 5) Andrews GK. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem Soc Trans* 36: 1242-1246., 2008.
- 6) Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J and Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 71: 66-73, 2002.
- 7) Küry S, Dréno B, Bézieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R and Moisan JP. Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet* 31: 239-240, 2002.
- 8) Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T and Andrews GK. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem* 388: 1301-1312, 2007.
- 9) Kambe T and Andrews GK. Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. *Mol Cell Biol* 29: 129-139, 2009.
- 10) 神戸大朋. 「生体機能における亜鉛トランスポーターの重要性, 一亜鉛トランスポーターをめぐる最近の知見一」*亜鉛栄養治療* 1: 54-64,

- 2011.
- 11) 倉澤隆平, 久堀周治郎, 奥泉宏康, 岡田真平. 「血清亜鉛値  $80 \mu\text{g/dL}$  の意味するもの」 *Biomed. Res. Trace Elements* 22: 34-37, 2011.
- 12) Age-Related Eye Disease Study Research Group . A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss. *Arch Ophthalmol* 119: 1417-1436, 2001
- 13) 橋本彩子, 神戸大朋. 「亜鉛吸収を向上させる食品因子の探索—亜鉛栄養研究の現状と今後の展望を含めて—」 *日本醸造協会誌* 107:836-841, 2012.

## 習慣的味噌摂取による高血圧性心不全予防効果の検討

伊藤 浩司

Regular miso intake attenuates cardiac dysfunction in mice  
with pressure overload

Koji ITO

*Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences  
3-1-1 Maidashi Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan*

### 研究背景

我が国において、4000万人という膨大な患者数を有する高血圧症において臓器障害合併を予防することは、患者自身の生活の質を良好に保つ上でも、また増加の一途をたどる医療費抑制の面においても喫緊の課題である。高血圧症において、食塩感受性を有するのは一部であるとされるが、最近我々は圧負荷モデルにおいては、脳内ミネラルコルチコイド受容体(MR)―アンジオテンシン系(RAS)の活性化を介して食塩感受性を獲得することを確認した。つまり、高血圧→心肥大により、食塩感受性を有する割合は増加すると考えられ、その結果生じる交感神経活性化・血圧上昇が心不全をもたらすと考えられる。近年、味噌の多面的な効果が数多く報告されているが、高血圧との関連においても、食塩感受性高血圧モデルにおける血圧上昇を味噌摂取により抑制することが報告されている。味噌が主要な昇圧物質であるアンジオテンシン系抑制作用を有することも報告されている。そこで、本研究では、圧負荷モデルを用いて、食塩摂取によって引き起こされる「脳

内MR-RAS活性化→心不全発症」を味噌摂取により抑制できるか否かを明らかにすることを目的とする。

### 方法

#### 圧負荷心不全モデルの作成

10週齢、雄性ICRマウスを用いて、腎動脈直上の腹部大動脈にbandingを加え、2週間後のモデルを高血圧性心臓病モデルとして使用した。<sup>1-3</sup>

対照群として、sham手術群を作成した。

#### 圧負荷モデルにおける食塩感受性獲得の確認

各群のマウスに対して、高食塩水として、0.5%、1.0%、1.5%食塩水を4週間与えた。4週間後に、24時間蓄尿による尿中カテコラミン排泄量を測定し、交感神経活性の指標とした。

また、同時に尿中Na排泄量も測定し、摂取Na量の指標とし、摂取Naに対する交感神経活性化の程度を両群で比較した。

## 圧負荷群に対する味噌（水溶液）投与と食塩水投与

圧負荷群を対象に、味噌水溶液摂取群と通常の食塩水摂取群を作成した。

摂取水溶液の食塩濃度を一定にするため、まず味噌ドライパウダー溶解液の食塩濃度を測定した。5%味噌水溶液における食塩濃度が、1%になることを確認し、5%味噌水溶液に対応する対照群を、1.0%食塩水とした。

4週間の経口摂取後に以下の評価を行い、両群間の差を確認した。

- 1) 交感神経活動指標としての尿中カテコラミン排泄量の測定
- 2) 心エコーでの心機能評価
- 3) 脳内 MR 発現, アンジオテンシン II レセプター (AT1R) 発現確認

## 結 果

### 圧負荷モデルにおける食塩感受性獲得の確認

Sham 群においては、食塩水濃度上昇（あるいは、尿中 Na 排泄量増加）にかかわらず、尿中カテコラミン排泄量の増加は認めなかったが、圧負荷群においては、食塩水濃度（あるいは、尿中 Na 排泄量増加）に比例して、有意に尿中カテコラミン排泄量、つまり交感神経活性は増加した。

## 圧負荷群に対する味噌（溶解液）投与と食塩水投与

### 1) 交感神経活動

味噌水溶液摂取群は、対照群（1.0% 食塩水摂取）に比べて、飲水量が多く、結果的に、食塩摂取量（尿中 Na 排泄量）も多い結果となった。しかし、それにもかかわらず、尿中カテコラミン排泄量は、味噌水溶液摂取群で有意に低値であったことから、より多い食塩摂取にかかわらず、味噌として摂取することで、食塩感受性交感神経活性化抑制されたことが示唆された。

### 2) 心機能評価

圧負荷+食塩摂取に伴う心機能低下（左室短縮率 % FS 低下）は、味噌水溶液摂取群で有意改善を認めた。

## 3) 脳内 MR, AT1R 発現

Sham 群に比べて圧負荷+食塩負荷（1.0% 食塩水）群では、視床下部における MR および SGK-1（MR 活性化マーカー）、および AT1R 発現の有意な増加を認めた。

この視床下部における MR-AT1R 系発現増加による活性化は、味噌水溶液摂取群では、認められなかった。

## 考 察

今回、圧負荷モデルにおける食塩感受性交感神経活性化と引き続く心機能悪化が、同等以上の食塩摂取を行っても、味噌として摂取することで、これら食塩による塩害を有意に抑制することが確認できた。

さらに、我々はこれまでの研究で、この圧負荷モデルにおける食塩感受性交感神経活性化に、脳室周囲に存在する自律神経中枢である視床下部における MR-AT1R 系活性化が関与することを確認しているが、今回この視床下部における同経路活性化も味噌水溶液摂取で抑制されることが確認できた。

詳細な機序解明には至っていないが、本研究では、尿中 Na 排泄量は増加を来していることから、以前 Dahl-s rat で報告されているような、腸管からの Na 吸収抑制ではなく、吸収された Na に対する反応性の変化が生じていると考えられた。そのひと機序として、脳内 MR-AT1R 経路活性化抑制が関わっていると考えられる。味噌の成分中に ACE 阻害活性物資が含まれることも報告されている。従って、習慣的に味噌を摂取することで、脳内の AT1R 発現にも影響を及ぼしている可能性が考えられた。

本研究は、習慣的味噌摂取が、塩分摂取量が依然多い我が国における心不全悪化抑制に有効である可能性を示した興味深い結果である。今後、患者対象にした臨床研究において、習慣的味噌摂取による食塩感受性交感神経活性化抑制を介した心不全悪化予防効果が確認されることが期待される。

## 味噌摂取による脂質代謝の改善効果に関する研究 — 味噌汁 1 杯分の味噌の長期摂取の効果 —

河村 幸雄

Studies on improvement of lipid metabolism by Miso intake  
— effects of long term intake of Miso extracts derived of a cup of Miso soup —

Yukio KAWAMURA

*Graduate School of Agriculture, Kinki University,  
Naka-Machi 3327-204, Nara, Nara 631-8505, Japan*

高血圧，糖尿病，動脈硬化，心臓ならびに脳血管障害の発症基礎に肥満があると考えられている。世界的に先進国では，肥満に代表される生活習慣病の蔓延が顕著になっている。その中で，日本ではその傾向が比較的軽度であると言われる。その理由の一つに，日本型食事の寄与が考えられている。日本型食事の大きな特徴は大豆食品の多用であるが，果たしてどれくらいの量が有効なのかに関する確実なデータは少ない。

基礎的な観点から，これまで細胞，たんぱく質，遺伝子レベルで，食品成分による抗肥満の研究がなされて来ている。しかし，それらの結果と現実の生体の応答には，まだギャップのあるのが現実である。本研究室では，これまで，味噌の抗血圧上昇予防作用，あるいは骨粗鬆症予防機能などについて研究して来た。骨粗鬆症予防において，本研究計画と同じ発想から，食品の摂食形態に近い動物実験で，味噌汁 1 杯量の味噌成分を含む餌の 6 ヶ月摂取が，骨粗鬆症モデルマウスの骨代謝を改善し，骨組織の健全性を保つのに有効であることを報告した。

この研究過程で，味噌食が 3 - 4 カ月以後，少しであるが有為差をもって，体重の増加（肥満）を抑制する事を見いだした。この事は，薬でなく食品である故に長期間を要するが，味噌に肥満抑制効果のある事を示唆すると考えた。

本研究では，実際の食事量レベルの味噌成分の効果につき解明する事を目的として，味噌の現実的摂取量（1 日味噌汁 1 ~ 2 杯）が，肥満およびその基礎にある脂質代謝にどのような影響を与えるのかを動物レベルで，また肝臓と脂肪細胞レベルで解析した。

味噌は多成分系の食品であり，製造法も異なる。そこで中央味噌研究所の協力を得て現在入手できる代表的なコメ味噌，ムギ味噌，マメ味噌，合計 19 種類を使用し，以下の条件にて検討した。

60min → 70min ; A:B = 0 : 100 → 0 : 100

## 1-2-2 実験方法

### <味噌のサンプル抽出方法>

#### ●アルコール抽出

- 1) 味噌 2g / 20ml 99% EtOH
- 2) ボルテックス (10秒×4回)
- 3) 遠心 (10,000rpm, 10分, 4℃)
- 4) 上清回収
- 5) エバポレーターにてアルコール分を蒸発
- 6) 99% EtOH 5ml で再溶解

#### ●水抽出

- 1) 味噌 2g / 20ml dH<sub>2</sub>O
- 2) ボルテックス (10秒×4回)
- 3) 遠心 (10,000rpm, 10分, 4℃)
- 4) 上清回収
- 5) フィルターろ過
- 6) エバポレーターにて 5ml に濃縮

### < HPLC サンプル化の方法>

#### ●アルコール抽出物の除タンパク操作

- 1) サンプルをアセトニトリルで5倍希釈
- 2) 20min 4℃ 攪拌
- 3) 遠心 (12000rpm 4℃ 3min)
- 4) 10 μl アプライ

#### ●水抽出物の除タンパク操作

- 1) サンプルをエタノールで5倍希釈
- 2) 20min 4℃ 攪拌
- 3) 遠心 (12000rpm 4℃ 3min)
- 4) 10 μl アプライ

### < HPLC 条件>

機器名：島津製作所製 SPD-20A

カラム：ナカライテスク製 5C18-AR- II (4.6 × 250mm)

A液：10%アセトニトリル (0.01%ギ酸)

B液：40%アセトニトリル (0.01%ギ酸)

流速：1 ml / 1 min

波長：260nm

温度：37℃

試料：10 μl 注入

以下の条件でグラジェントをかけた。

0 min → 60min ; A : B = 100: 0 → 0 : 100,

### <味噌エタノール抽出物の Sep-Pak C18 カートリッジによる分離>

- 1) Sample 0.5g 相当量をエバポレーターにて濃縮
- 2) 3%アセトニトリル 1ml で再溶解
- 3) 遠心 (13,000rpm 1min 4℃)
- 4) 上清回収
- 5) 回収物を Sep-PakC18 カートリッジに流す
- 6) 3%アセトニトリル 5ml 流し回収後, 30%・70%アセトニトリル 5ml をそれぞれ流し回収
- 7) それぞれをエバポレーターにて濃縮
- 8) DMSO で 250ml に調製

## 2-2-1・実験材料

### 細胞実験

#### <使用細胞株>

#### ●マウス由来線維芽細胞 3T3-L1 前駆脂肪細胞

#### <細胞培養方法>

3T3-L1 脂肪細胞を培地中で 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養し, 3日毎に継代を行い, 継代の前日に培地交換を行った (継代した日を 0日目とし, 2日目に培地交換, 3日目に継代)。

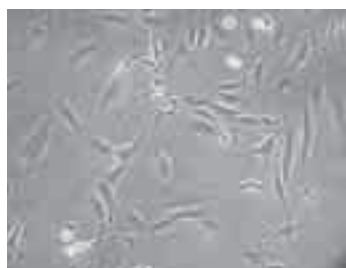


Fig.11 3T3-L1前駆脂肪細胞



Fig.12 分化誘導後3T3-L1脂肪細胞

#### <培地>

Dulbecco's Modified Eagle Medium (ダルベッコ変法イーグル培地: DMEM) L-グルタミン・炭酸水素ナトリウム不含 日水製

DMEM 5g を蒸留水に溶解後、30 分間攪拌しオートクレーブ (121°C, 15min) にかけて。クリーンベンチ内で 10% FBS50ml, ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 1ml, 200mM L-グルタミン酸 10ml, 100mM ピルビン酸 5 ml, 7.5% NaHCO<sub>2</sub>22ml を添加しこれを培地とした。

#### <緩衝液>

Dulbecco's PBS (-) 日水製

#### <試薬>

##### ●トリプシン / EDTA

細胞-器壁間のタンパク質による接着をトリプシンで、細胞-細胞間のカルシウムを介した結合を EDTA で壊すことで細胞を分散させた。

#### <市販分化培地>

TAKARA Adiopo inducer Reagent (for animal cell) を用いた。

#### <細胞>

マウス胎仔由来のマウス線維芽細胞 3T3-L1 (ATCC CaNo. CL-173),

#### <分化培地用添加試薬>

Insulin solution (最終濃度 10  $\mu$ g / ml, Dexamethasone solution (最終濃度 2.5  $\mu$ M, 3-isobutyl-1-methylxanthine solution (最終濃度 0.5 mM)

#### <維持培地用添加試薬>

Insulin solution (最終濃度 10  $\mu$ g / ml)

#### <市販培地を用いた分化方法>

(マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞の場合)

1. 分化培地を調製する (DMEM 培地 10 ml に対し, インスリン 100  $\mu$ l, デキサメタゾ

ン 50  $\mu$ l, イソブチルメチルキサンチン 10  $\mu$ l を添加する)

2. 100% コンフルエント状態になった 2 日後に分化培地に交換し, 48 時間 (2 日) 培養する
3. 分化培地を除去した後, 必要であれば維持培地 (DMEM 培地 10 ml に対しインスリン 100  $\mu$ l を添加する) に交換して 5 ~ 10 日間培養する

#### < 3T3-L1 脂肪細胞への添加>

味噌アルコール抽出物を分化誘導後 4 日の 3T3-L1 脂肪細胞に添加しレジスチン, アディポネクチン, FAS, ACC の発現量を調べた。培地中へのアディポサイトカインの分泌量は ELISA 法により検出し, 細胞への分泌量は Western blotting 法により検出した。

#### <味噌試料の調製>

食品の場合現実的な意味のあるデータが必要であることから, 平均的な味噌汁 1 杯分に相当する味噌からの抽出物量を用いて, スクリーニングならびに動物実験を行なった。すなわち, 平均的な味噌汁 1 杯中の味噌量を 12 ~ 13g と設定し, アルコールまたは水抽出物を調製し, 以下の手順で脂質代謝に対する影響を調べた。まず細胞レベルで代表的な味噌の脂質代謝改善効果を検討した。

1. 中央味噌研究所提供の 19 種類のみそにつき脂肪細胞 3T3L1 細胞の中性脂肪 (TG) 蓄量を検討したところ, 大部分のみそ試料の添加で TG の蓄積が抑制される傾向が示された (図 1)。
2. 脂肪細胞 3T3-L1 または肝臓細胞  
HepG2 を使って, 脂肪合成抑制を指標に, 味噌試料をスクリーニングした。
3. 動物レベル: 正常マウスあるいは卵巣摘出マウスに, 選抜した味噌含有食を対照群と体重に有為差の出る期間食べさせ, 体重のほか非侵襲的に CT 解析により内蔵脂肪量と皮下脂肪量とを分別定量した。また, 血中脂質代謝関連分子のたんぱく質および遺伝子発現変動を解析した。



4. 細胞レベル：味噌抽出物をクロマト操作で培養細胞に対する脂質代謝改善作用を指標に活性成分を分画し、脂肪細胞及び肝臓細胞における脂質代謝変動を、油滴形成、脂質合成ならびに脂質代謝経路上の関連分子の発現変動を解析した。
5. 動物による味噌の抗肥満効果は、最低3ヶ月の飼育期間を要すると考えられるが、最大6ヶ月まで観察した。

## 結果

### <細胞レベルでの味噌の脂質代謝改善効果>

食品の場合現実的な意味のあるデータの必要性から、平均的な味噌汁1杯分に相当する味噌からの抽出物量を用いて、細胞でのスクリーニングならびに動物実験を行なった。

中央味噌研究所提供の19種類のみそにつき、脂肪細胞3T3L1細胞の中性脂肪(TG)蓄積量を検討したところ、大部分のみそ試料でTGの蓄積が抑制される傾向が認められた(図1)。

次に、抑制作用の強かったみそを代表として選び、C-18 Sep-pack カラムによりアルコール濃度による段階的溶出により分画したところ、アルコール濃度30%の画分で顕著なTGの蓄積抑制が認められた。

そこで、これらの画分につき、アディポサイトカインのアディポネクチン、レジスチン、脂質合成系酵素のFASやACCなどの変動を現在詳しく検討した。

### <動物レベルでの味噌の脂質代謝改善効果>

このように細胞レベルで効果の認められた事から、みそ食が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにする目的で、通常マウスおよび肥満モデルとして卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスを用いて、体重、脂質量、脂質代謝関連サイトカインや脂肪酸合成酵素などの変動を検討した。

図2に示すように、通常マウスでみそ食グループは、平均摂餌量がコントロール群と比べて多いにも関わらず、平均体重が通常食群より軽い事が

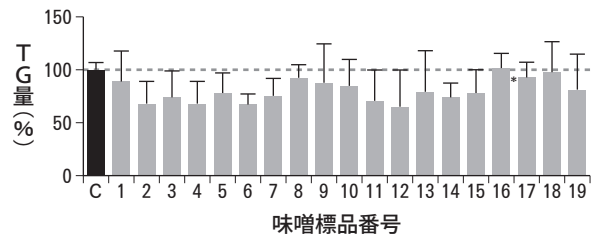


図1

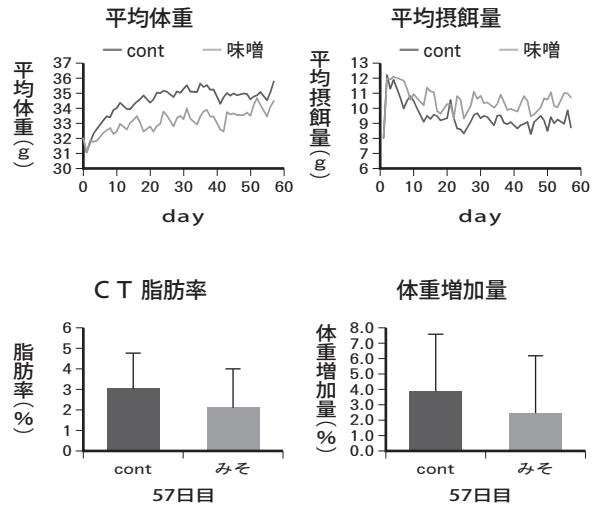


図2

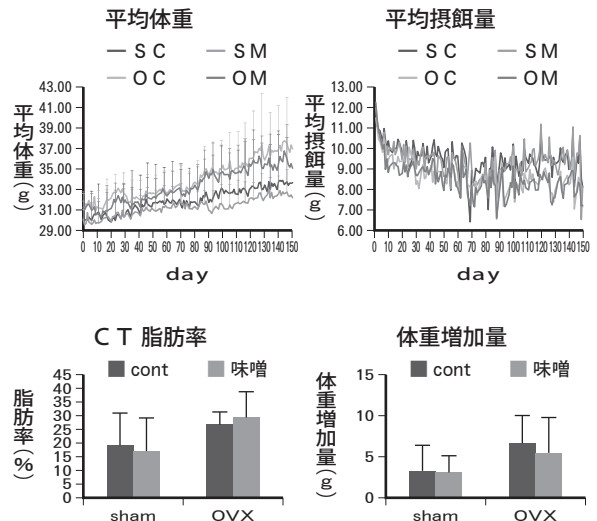


図3

示された。

また、これと一致して、CT断層撮影データからの脂肪率もみそ食群で低い事が示された。肝臓、子宮重量には変化なく全体所見からも異常が認められない事から、おそらくみそには、エネルギー

代謝を促進させ、脂肪蓄積を抑制する作用のある事が推定された。

同様な傾向は、閉経後モデルマウスである卵巣摘出マウスを用いた摂食試験においても認められ、閉経後脂質沈着に対しても効果のあることが示唆された (図3)。

これらの結果に基づいて、血清中性脂質 (TG)、グルコース、総コレステロール、リン脂質、HDL、また血清脂質代謝パラメーターのレプチン、インスリン、レジスチン、アディポネクチン、さらに 肝臓 TG、肝臓コレステロールなど生化学的マーカーを測定した結果、大部分の脂質代謝関連物質ならびに脂質代謝関連サイトカイン、パラメータ類では有意な変動は認められなかった。

しかし、卵巣摘出マウスの血清において総コレステロールが有意に減少、インスリンが有意に

増加していた。

一方、3T3L1 細胞のサイトカイン分泌に対する味噌成分の探索では、Sep-pac 吸着画分にアディポネクチン分泌を促進し、レジスチン分泌を抑制する活性が認められたことから、味噌中には脂質代謝や耐糖性などに優れた成分の存在する事が推定された。

以上の結果は、通常の機能検証の動物実験で用いられる量と比べると摂取量が味噌汁 1 杯量という現実的ではあるがごく少量の摂取から得られた結果である。従って、この事を考慮すると味噌にはもっと長期的に摂取した場合、より明瞭な効果を示す事が期待されるデータであると考えられる。

# 味噌成分は SOS 応答機能を介して 放射線による遺伝子変異発生を抑制する

喜多 和子

Radiation mutagenesis is suppressed via SOS function induced by  
miso components

Kazuko KITA

*Department of Environmental Biochemistry, Graduate School of Medicine, Chiba University  
Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan*

## I. 要旨

平成 21-22 年度本助成研究では、味噌抽出液とその成分がシャペロン GRP78 の細胞内発現量を増加させ、非電離放射線である紫外線による遺伝子変異発生を抑制することを報告した。本研究では、GRP78 以外のシャペロンが味噌によるストレス防御に関わるか、また、味噌による SOS 応答生理機能が X 線などの電離放射線に対しても機能するかを調査することとした。さらに、メカニズム研究として、味噌とその成分が DNA 損傷とその修復能力にどのような影響を及ぼすかを調査した。その結果、シャペロンタンパク質 HSP27 の発現を上昇させ、紫外線致死抵抗性を増大化し、遺伝子変異発生抑制作用を有する味噌抽出液があることを見出した。また、これまでの研究から、遺伝子変異発生抑制作用を有することを見出している 2 種類の味噌抽出液について、X 線に対する作用をストレス高感受性のコケイン症候群患者由来 CS 細胞を用いて調べた。その結果、2 種類の味噌抽出液が、過酸化水素および X 線に対する細胞

の抵抗性を増加させ、DNA 損傷誘発を抑制、あるいは、損傷修復能力を亢進することを見出した。また、味噌の香り成分である HEMF も、CS 細胞の過酸化水素および X 線による DNA 損傷誘発を抑制することを見出した。過酸化水素は、細胞内でヒドロキシラジカルという活性酸素を発生させ酸化ストレスを誘導する。また、X 線は直接的な DNA 損傷の他に酸化ストレスを誘導することも知られている。従って、味噌抽出液と HEMF による過酸化水素および X 線に対する抵抗化は、酸化ストレスに対する防御作用である可能性が考えられる。以上、本研究結果は、味噌成分が放射線による DNA 損傷誘発を抑える、あるいは、損傷修復能力を高めることで、遺伝子変異発生を抑制する可能性を示唆する。

## II. 序論

SOS 応答は、遺伝子変異を起こしてまでも細胞の生存を計るか、それとも損傷 DNA を正確に

修復するか、あるいは変異細胞を除去するために細胞死を誘導するかという選択機能である。遺伝子における変異の発生は、癌化・老化・ウイルス感染症などの種々の疾病の原因や誘因と考えられている。そのような変異の発生を抑制しようとするヒト生理機能が存在することを見出し、SOS 応答と呼称している。我々は、ヒト細胞の SOS 応答として、インターフェロンなどの血液中因子が変異発生を抑制すること<sup>1,2)</sup> や、シャペロン GRP78 や HSP27 の代謝変動を介して変異発生調節が行われること<sup>3,4)</sup> などを見出している。これらの研究成果を生かして、種々の食品の構成分子の中から、変異抑制機能を高める化合物を発見しようとしている。平成 21-22 年度の研究では、味噌抽出液とその成分がシャペロン GRP78 の細胞内発現量を増加させ、紫外線による遺伝子変異発生を抑えることを報告した。本研究では、その成果を展開させ、GRP78 以外のシャペロンが味噌によるストレス防御に関わるか、味噌による SOS 応答生理機能が X 線などの電離放射線に対しても機能するかを調査することとした。さらに、メカニズム研究として、味噌とその成分が DNA 損傷誘発とその修復能力にどのような影響を及ぼすかを調査した。

### Ⅲ. 実験方法

#### Ⅲ. 1 実験材料

味噌製品は、平成 21-22 年度の研究で使用した 27 製品（中央味噌研究所より提供）のうち、シャペロン GRP78 タンパク質の量を増加させ、紫外線による変異発生を抑制した味噌 M19 および M20 と、シャペロン HSP27 タンパク質の量を増加させた M12 を使用した。製品の番号は、No.1 より No.27 まで、Miso の M という字を添えて番号にて記載することとした（平成 21-22 年度中央味噌研究所助成報告書）。抗 HSP27 抗体は、広島大学の細谷先生より分与して頂いた。その他の抗シャペロン抗体は（サンタクルズ）社より購入した。

培養ヒト細胞は、高頻度の変異誘発が可能な

RSa 細胞株（千葉大学医学部微生物学教室桑田次男先生らによりヒト胎児由来線維芽細胞から樹立）<sup>5)</sup> と紫外線高感受性のコケイン症候群患者由来細胞（CS 細胞）（患者線維芽細胞から樹立された細胞で、英国サセックス大学のアラン・レーマン教授より供与）<sup>6)</sup>、また、比較細胞として子宮頸癌由来 HeLa 細胞<sup>7)</sup> を使用した。基本最小培地（MEM）は日水製薬株式会社より、仔牛血清は、Invitrogen 社より購入した。

Taq DNA ポリメラーゼと遺伝子変異検出キットはタカラバイオより購入した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識二次抗体およびエンハンストケミルミネッセンス（ECL）ウェスタンブロット検出液は、GE-Healthcare 社より購入した。DNA 損傷解析用のコメットアッセイキットは Trevigen 社より購入した。その他の化学試薬類は和光純薬より購入した。

#### Ⅲ. 2 細胞培養液に添加する味噌試料の調整

味噌サンプルの調整は、10 g を 20 ml 蒸留水（MilliQ 水）に溶解し、抽出した（平成 21-22 年度中央味噌研究所助成報告書）。抽出溶液は、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存し、各々の試験の際、解凍し味噌サンプルとして使用した。味噌サンプルの濃度は、培養液容量に対する味噌サンプル添加容量の百分率（% v/v）で示した。

#### Ⅲ. 3 細胞培養と味噌サンプル処理

細胞の培養は、既報<sup>8,9)</sup> に従い行った。即ち、RSa 細胞と HeLa 細胞は 5% (v/v) の仔牛血清を含む MEM 培地中、CS 細胞は 10% (v/v) の仔牛血清を含む MEM 培地中で、95% 空気 / 5% 炭酸ガス、 $37^{\circ}\text{C}$  の条件、炭酸ガスインキュベーター内で培養・継代を行った。また、細胞の味噌サンプル処理は次のように行った。シャーレに細胞を撒き、24 時間培養した後、味噌サンプルをシャーレに添加し、さらに 24 時間培養し、各実験に供した。

#### Ⅲ. 4 コロニーサバイバル法によるストレス致死感受性の解析

細胞を直径 100 mm のシャーレに撒き（HeLa

細胞は800個、RSa細胞は1000個、CS細胞は1300個)、紫外線(UVC)照射、X線照射あるいは過酸化水素処理を行った。UVC照射とX線照射は既報に従って行った<sup>8,9)</sup>。その後、10%(v/v)の仔牛血清を含むMEM培地で2週間培養した後、生存する細胞を染色しコロニー数をカウントした。

味噌サンプル処理後のRSa細胞のUVC致死感受性解析では、100mmのシャーレに800個の細胞を撒き、20時間培養した後、シャーレに味噌サンプルを添加し、24時間培養した。その後、UVC照射し、直ちに10%(v/v)の仔牛血清を含むMEM培地を加え、2週間培養した後、生存する細胞を染色しコロニー数をカウントした。CS細胞の過酸化水素とX線照射後の致死感受性解析では、直径60mmのシャーレに $5 \times 10^5$ 個の細胞を撒き、20時間培養した後、シャーレに味噌サンプルを添加し、24時間培養した。その後、細胞をトリプシン処理で回収し、仔牛血清は含まず味噌サンプルを含むMEMに浮遊させ、過酸化水素処理あるいはX線照射のストレス負荷を行った。過酸化水素は室温で25分処理し、X線照射は既報に従った<sup>9)</sup>。ストレス負荷後、直径60mmのシャーレに860個細胞を撒き、味噌サンプルと10%(v/v)の仔牛血清を含むMEM培地で2週間培養した後、生存する細胞を染色しコロニー数をカウントした。

### III. 5 シャペロンタンパク質量の解析

細胞内のシャペロンタンパク質量を既報<sup>10)</sup>に従い、以下のようにウェスタンブロッティング法により解析した。味噌サンプル中で24時間培養したRSa細胞を、適量のSDS-サンプルバッファーで溶解した。溶解液を95℃で5分間加熱し、10%アクリルアミド濃度ゲル中で展開させ、タンパク質をPVDF膜に転写した。転写後、膜を5%スキムミルク-TBS-T(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1%(v/v) Tween 20, pH 7.5)中で適当に希釈した1次抗体液中で、続いてHRP-標識二次抗体中でインキュベーションした。その後、ECL検出システムで生じた発光をX線フィルムに感光させ検出した。タンパク質量

は、フィルム上の目的バンドの黒化度をイメージ解析ソフト(Multi Gauge ver 2.2, 富士写真フィルム)を用いて測定し、さらに、コントロールのactin量で補正した。

### III. 6 遺伝子変異のドットプロット解析

既報<sup>11)</sup>に従い、以下のように遺伝子変異を解析した。UVCまたはmock処理した細胞を4日間培養した後DNAを抽出した。これを鋳型DNAとし、プライマー5'-GACTGAATATAAACTTGTGG-3'および3'-GCTTATACTAGG TTGTTATC-5'を用いて、K-ras遺伝子のコドン12近傍をPCR増幅した。PCR産物をアガロース電気泳動で分離・精製し、ドットプロッター(バイオラッド)を用いてナイロン膜上にスポットした。ナイロン膜上の変異DNAを、ジゴキシゲニン-11-dUTPで標識したK-rasコドン12変異型遺伝子特異的なプローブとハイブリダイゼーションを行った後、アルカリフォスファターゼ-標識抗ジゴキシゲニン抗体と基質5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を用いて検出した。なお、変異型DNA検出の陽性コントロールとして、大腸癌由来SW480細胞のゲノムDNAを鋳型として増幅したDNAを用いた。

### III. 7 コメットアッセイによるDNA損傷と修復能力の解析

CS細胞を、直径35mmのシャーレに $1 \times 10^5$ 個撒き、20時間培養した後、シャーレに味噌サンプルあるいは4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF)を添加し、24時間培養した。その後、仔牛血清は含まず味噌サンプルを含むMEM中で過酸化水素処理(25分)あるいはX線照射のストレス負荷を行った。ストレス負荷後、仔牛血清と味噌サンプルを含むMEM中、示された時間37℃で培養した後に、細胞を回収した。この細胞を、低融点アガロースゲル内に固定し、溶解後、過酸化水素処理細胞はアルカリ条件下で、X線照射細胞は中性条件下で電気泳動した。ゲルを乾燥した後、ゲル内の細胞中のDNAをサイバークリーンで染色し、DNA損傷に伴う彗星上の蛍光を蛍

光顕微鏡で観察した。顕微鏡で取り込んだ画像を、comet score ソフトで解析した。アルカリ条件下で解析した細胞は、彗星の尾に相当する部分の DNA 含量 (Tail % DNA) (含量が多いほど損傷の程度が大きい) を、中性条件下で解析した細胞は、Tail % DNA に tail の長さを掛けた値 (Tail moment) を求めた。それぞれの値を、損傷の程度により 0 (損傷が全く無い) から 4 までの 5 段階に分け、各段階に属する細胞の割合を求め、点数 (0-4) にそれぞれの割合を掛けた値の総和を DNA damage score としてあらわした (図 4)<sup>12)</sup>。DNA damage score の値 0 は損傷が起きている細胞は全く無いことを、400 はすべての細胞が最も強い損傷段階 4 に属することを意味する。

### III. 8 結果の処理

結果は、2 回以上の独立した実験データの平均値で示した。

## IV. 結果

### IV. 1 味噌サンプルの添加による紫外線抵抗化とシャペロン HSP27 タンパク質量の増加

培養液中に M12 味噌サンプルを添加し 24 時間

培養した RSa 細胞は、mock 処理に比し、UVC 照射後の細胞生存率が高く、UVC 致死抵抗性が増加した (図 1A)。次に、UVC による K-ras コドン 12 変異誘導に及ぼす M12 味噌サンプル処理の影響を、ドットプロット解析で調べた。このアッセイでは、ドットの発色が濃くなり黒く示される丸が変異の発生を示し、灰白の丸へと変じれば、変異の発生が抑制されたことを示す。陽性コントロールの SW480 細胞は、K-ras コドン 12 に変異をもっているため、ドットは黒く見える (図 1B)。M12 味噌サンプル処理した RSa 細胞では、mock 処理細胞に比し UVC 誘発変異が抑制された (図 1B)。M12 味噌サンプル 24 時間処理後のシャペロンタンパク質量の変化の解析では、調べた 3 種類シャペロンのうち HSP27 の量が約 1.4 倍に増加した (図 1C)。

### IV. 2 細胞間のストレス致死感受性の比較

これまでの研究で味噌サンプルが細胞を UVC 抵抗化させることを見出した。本研究では、味噌サンプルが X 線抵抗化にも関わるかを調べるために、始めに用いる細胞の検討をした。UVC は直接的な DNA 損傷を<sup>13,14)</sup>、X 線は直接的な DNA 損傷と酸化ストレスによる DNA 損傷を引き起こすといわれている<sup>15,16)</sup>。そこで、UVC と X 線のほかに酸化ストレスとして過酸化水素<sup>17,18)</sup>を用

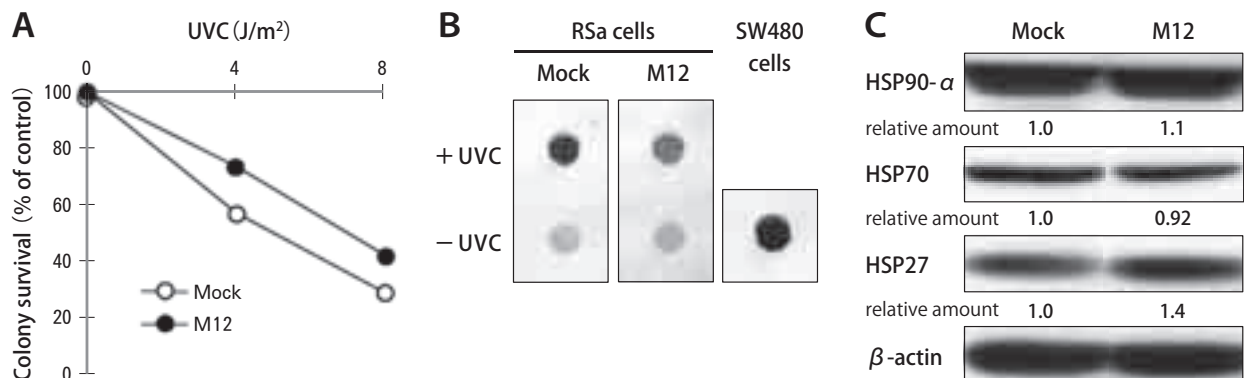


図 1. 味噌サンプルによるRSa細胞のUVC致死抵抗化、変異発生抑制およびシャペロンHSP27タンパク質量の増加

RSa細胞の培養液にM12味噌サンプルを1%添加し、24時間培養した後、UVC致死感受性をコロニーサバイバル法で(A)、遺伝子変異頻度をドットプロット法で(B)、シャペロン HSP90- $\alpha$ 、HSP70、HSP27、および、コントロールとして actin の発現量をウェスタンブロッティング法で(C)解析した。Aの図の縦軸は、UVC照射無しに対するUVC各線量照射後の細胞生存率を示してある。Bでは大腸癌由来SW480細胞の遺伝子を陽性コントロールとして解析した。Cでは、各シャペロンのシグナルをactinで補正し、さらにmock細胞に対する相対値を示してある。

い、HeLa 細胞, RSa 細胞および CS 細胞のストレス致死感受性を比較した。RSa 細胞と CS 細胞は、HeLa 細胞に比し UVC 致死高感受性である (図 2A)。CS 細胞は、過酸化水素に対して RSa 細胞より感受性が高く (図 2B), X 線に対しても、3 種類の細胞のうち最も感受性が高かった (図 2C)。そこで、本研究では CS 細胞を用いることとした。

#### IV. 3 CS 細胞における過酸化水素および X 線抵抗性に及ぼす味噌サンプルの影響

M19 および M20 味噌サンプルで 24 時間処理した CS 細胞は、mock 処理細胞に比し、過酸化水素 (図 3A), X 線 (図 3B) のどちらに対しても致死抵抗性が増加した。その作用は、M20 のほうがより顕著であった。

次に、味噌サンプルによる過酸化水素と X 線に対する致死抵抗化に、DNA 損傷修復機構が関

わっているかを、コメットアッセイで解析し、損傷の程度を score 値で評価した (図 4)。mock 細胞における過酸化水素 ( $50 \mu\text{M}$ ) 処理直後の DNA damage score は約 300 であったが、過酸化水素処理 1 時間後には損傷レベルは直後の約 40% に下がり、3 時間後にはほぼ未処理のレベルに修復された (図 5)。M20 処理細胞では、mock 細胞に比べ、過酸化水素 ( $50 \mu\text{M}$ ) 処理直後の損傷レベルが低く、処理 1 時間後にはほぼ未処理のレベルに修復された (図 5)。一方、M19 処理細胞は、過酸化水素 ( $50 \mu\text{M}$ ) 処理直後の損傷レベルは mock 細胞と同程度であったが、処理 1 時間後には未処理のレベルにまで修復された (図 5)。X 線照射量の差による DNA 損傷程度の解析において、2 Gy と 4 Gy の照射量では、M20 処理細胞は mock 細胞に比べ、損傷の程度が弱かった。しかし、10 Gy では差がなかった (図 6A)。一方、M19 処理細胞は mock 細胞と同

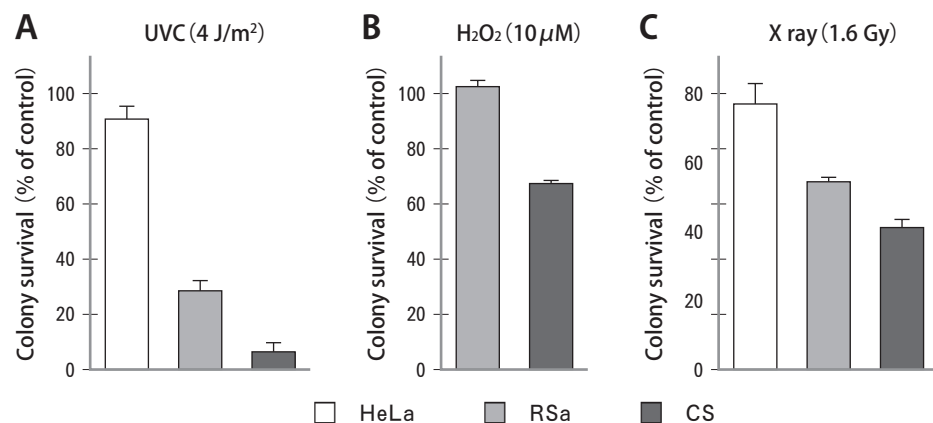


図2. 細胞間のストレス致死感受性の比較

HeLa 細胞, RSa 細胞および CS 細胞の UVC ( $4 \text{ J/m}^2$ ) (A), 過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ( $50 \mu\text{M}$ ) (B), X 線 ( $1.6 \text{ Gy}$ ) (C) に対する致死感受性を、コロニーサバイバル法で解析した。

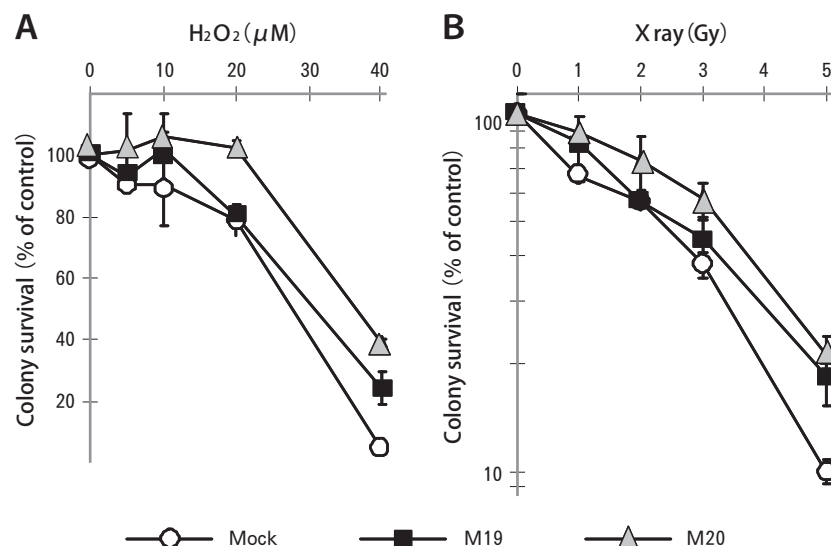


図3. 味噌サンプルによる過酸化水素および X 線致死抵抗化

CS 細胞の培養液に M19 あるいは M20 味噌サンプルを 1% 添加し、24 時間培養した後、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (A) と X 線 (B) に対する致死感受性を、コロニーサバイバル法で解析した。

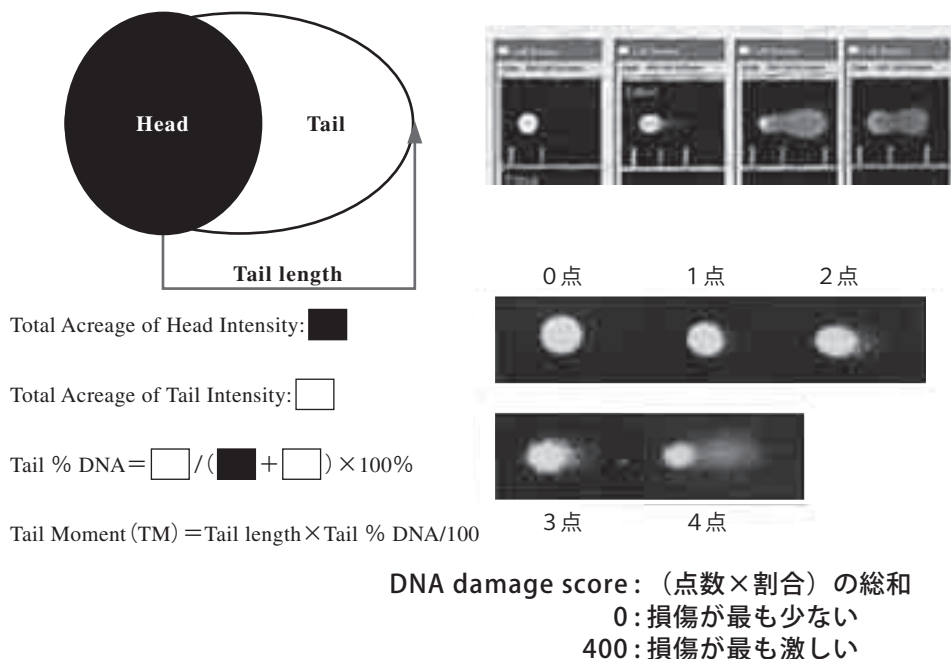


図4. DNA 損傷レベル score による評価

程度の損傷レベルであった (図 6 A)。次に、X 線 4 Gy 照射し、時間経過後の損傷程度を調べた。mock 細胞では、3 時間後および 5 時間後に直後の損傷レベルの約 60-50% が残っていた (図 6 B)。一方、M19 あるいは M20 処理細胞では、3 時間後にほぼ未照射細胞のレベルに修復されていた (図 6 B)。

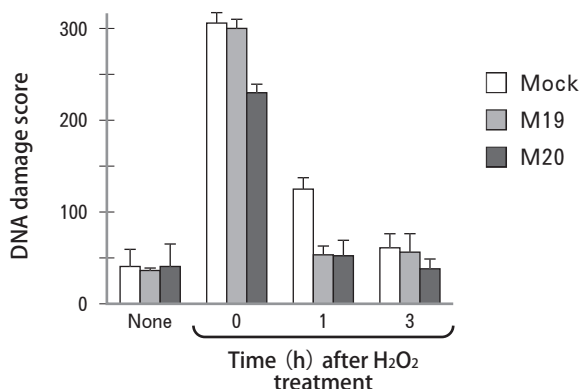


図 5. 過酸化水素誘発 DNA 損傷と損傷修復に及ぼす味噌サンプルの影響

CS 細胞の培養液に M19 あるいは M20 味噌サンプルを 1% 添加し、24 時間培養した後、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (50 μM) で 25 分処理直後にコメット解析したものを、処理 0 時間とした。修復能力を調べるには、過酸化水素処理後、過酸化水素を除去し 37℃ で 1 時間あるいは 3 時間培養した後、コメット解析を行った。図の縦軸は DNA damage score 値を示してある。

#### IV. 4 CS 細胞における過酸化水素および X 線誘発 DNA 損傷に及ぼす味噌成分の影響

味噌サンプル処理された CS 細胞では、過酸化水素および X 線による DNA 損傷誘発が抑制され、より早く損傷が修復されることが分かった。そこで、味噌の香り成分であり、UVC による遺伝子変異誘導を抑制する HEMF<sup>19)</sup> が、過酸化水素および X 線による DNA 損傷誘導抑制作用、あるいは、修復能力亢進作用があるかを調べた。HEMF (1mM) で 24 時間処理した細胞では、過酸化水素と X 線照射のどちらによる DNA 損傷レベルも mock 細胞に比べ低かった。(図 7)。時間経過後の損傷レベルも、HEMF 処理細胞のほうが低かった (結果省略)。

#### V. 考察

平成 21-22 年度の本助成研究では、27 種の味噌製品について、RSa 細胞における紫外線変異誘発に及ぼす影響を調査し、M19 と M20 が GRP78 タンパク質の細胞内レベルを上昇させ、UVC による遺伝子変異の発生を抑制するという示唆を得た。本研究では M12 が、他のシャペロ



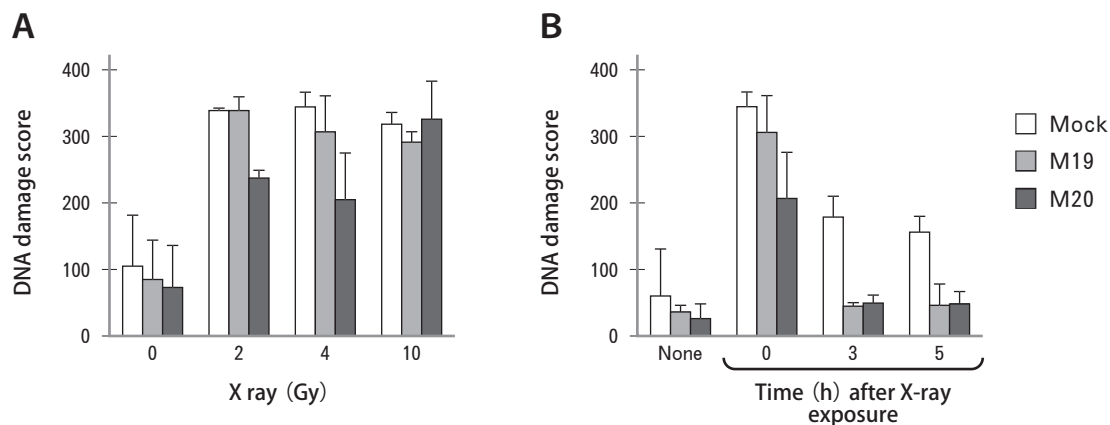


図6. X線誘発DNA損傷と損傷修復に及ぼす味噌サンプルの影響

CS細胞の培養液にM19あるいはM20味噌サンプルを1%添加し、24時間培養した後、各線量のX線照射した後のDNA損傷レベル(A)、と4 Gy照射し各時間経過後の損傷レベル(B)をコメットアッセイで解析した。図の縦軸はDNA damage score値を示してある。

ンタンパク質であるHSP27の発現を上昇させ、UVC致死抵抗性を増大化し、遺伝子変異発生を抑制することを見出した(図1)。HSP27が、味噌による遺伝子変異誘発抑制作用に関わる新たなシャペロン候補となる可能性がある。そこで、HSP27 siRNAによるHSP27発現抑制実験を試みた。しかし、HSP27 siRNA処理による細胞傷害作用が強かったため、調査することができなかった。従って、M12によるHSP27発現上昇とUVC抵抗化とを直接関連付けることは未だできていない。

次に、味噌抽出液が、非電離放射線である紫外線だけでなく、電離放射線であるX線に対する抵抗化にも関わるかを調査した。この研究では、始めに細胞の検討を行った。CS細胞は紫外線損傷DNA除去修復欠損細胞であるが、最近、紫外線だけでなく酸化ストレスにも感受性が高いとの示唆がある<sup>20, 21</sup>)。本研究でCS細胞のストレス感受性を調べた結果、CS細胞は、紫外線だけでなく、過酸化水素とX線に対しても感受性が高いことが明らかになった(図2)。ストレス感受性の高い細胞を使うことにより、外的ストレスによる細胞傷害や傷害作用に対する防御効果を解析しやすいと考えられる。そこで、本研究では、CS細胞を用いて解析し、M19およびM20味噌サンプルが、過酸化水素およびX線に対する細胞の抵抗性を増加させることを見出した(図3)。さらに、CS

細胞において、M19あるいはM20味噌サンプルが、過酸化水素およびX線によるDNA損傷誘発を抑制すること、あるいは、損傷修復能力を亢進することを見出した(図5, 6)。また、味噌香り成分であるHEMFも、CS細胞の過酸化水素およびX線によるDNA損傷誘発を抑制することを見出した(図7)。

過酸化水素は、細胞内でヒドロキシラジカルという活性酸素を発生させ酸化ストレスを誘導する<sup>17, 18</sup>)。また、X線は直接的DNA損傷の他に酸化ストレスも誘導することが知られている<sup>15, 16</sup>)。従って、味噌抽出液とHEMFによる過酸化水素

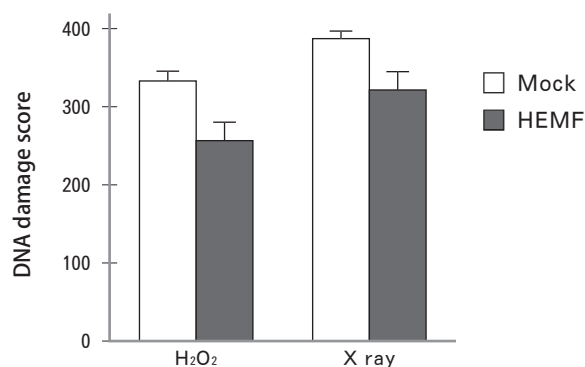


図7. 過酸化水素およびX線誘発DNA損傷に及ぼすHEMFの影響

CS細胞の培養液にHEMFを1 mM添加し、24時間培養した後、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (50 μM) あるいはX線照射(5 Gy)した後のDNA損傷レベルをコメットアッセイで解析した。図の縦軸はDNA damage score値を示してある。

およびX線に対する抵抗化は、酸化ストレスに対する防御作用である可能性が考えられる。本研究では、細胞の前培養、過酸化水素あるいはX線曝露中、ストレス曝露後の培養中のすべてにおいて、味噌抽出液あるいはHEMFを添加した条件で実験を行った。従って、味噌によるストレス抵抗化が、前培養中に細胞に付与されたものか、酸化ストレス負荷時の防御作用(ストレス自体の軽減化)によるものか、あるいは、ストレス負荷後の回復期に発揮される効果なのか、その詳細は不明である。特に、M20は、過酸化水素とX線の両方に対して、ストレス負荷直後のDNA損傷レベルを低下させており、しかも、損傷の回復がコントロールより早いことから、全過程で作用を発揮している可能性が考えられる。一方、M19は両ストレス負荷直後の損傷レベルはコントロールと差がないことから、ストレス自体を軽減化するのではなく、時間経過後の修復能力を高めている可能性が考えられる。

以上、本研究結果は、味噌成分が放射線によるDNA損傷誘発を抑える、あるいは、損傷修復能力を高めることで、遺伝子変異発生を抑制する可能性を示唆する。

## VI. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、中央味噌研究所、および同研究所の中野京子様らに多くのご示唆と種々のご支援をいただいたこと、味噌製造の各社に味噌製品や原材料の素材を快くご提供いただいたこと等に対し、深く感謝を申し上げます。

## VII. 参考文献

- 1) Suzuki N., Suzuki H. Suppression of UV mutagenicity by human interferon. *Mutat. Res.* 202, 179-183, 1988
- 2) Suzuki N., Suzuki H. Suppression of saccharin-induced mutagenicity by interferon- $\alpha$  in human RSa cells. *Cancer*

- Res.* 55, 4253-4256, 1995
- 3) Zhai L., Kita K., Wano C., Wu Y., Sugaya S., Suzuki N. Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human RSa cells. *Exp. Cell Res.* 305, 244-252, 2005
- 4) Wano C., Kita K., Takahashi S., Sugaya S., Hino M., Hosoya H., Suzuki N. Protective role of HSP27 against UVC-induced cell death in human cells. *Exp. Cell Res.* 298, 584-592, 2004
- 5) 鈴木信夫 RSa. 動物培養細胞マニュアル, 瀬野悍二, 小山秀機, 黒木登志夫 編. 共立出版, 東京, 204-205, 1993
- 6) Mayne LV., Priestley A., James MR., Burke JF. Efficient immortalization and morphological transformation of human fibroblasts by transfection with SV40 DNA linked to a dominant marker. *Exp. Cell Res.* 162, 530-8, 1986
- 7) Dong M., Chen S., Kita K., Ichimura Y., Guo W., Lu S., Sugaya S., Hiwasa T., Takiguchi M., Mori N., Kashima A., Morimura K., Hirota M., Suzuki N. Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of Sarcodonin G from *Sarcodon scabrosus* in HeLa cells. *Int. J. Oncol.* 34, 201-207, 2009
- 8) Kita K., Sugita K., Chen S-P., Suzuki T., Sugaya S., Tanaka T., Jin Y-H., Sato T., Tong X-B., Suzuki N. Extracellular recombinant annexin II confers UVC resistance and increases the Bcl-xL to Bax protein ratios in human UVC-sensitive cells, *Radiat. Res.* 176, 732-742, 2011
- 9) Kita K., Sugaya S., Zhai L., Wu Y-P., Wano C., Chigira S., Nomura J., Takahashi S., Ichinose M., Suzuki N. Involvement of Leu-13 in interferon-induced refractoriness of human RSa cells to X-ray cell killing. *Radiation Res.* 160, 302-305, 2003
- 10) Kita K., Jin Y-H., Sun Z., Chen S-P.,

- Sumiya Y., Hongo T., Suzuki N. Increase in the levels of chaperone proteins by exposure to  $\beta$  - estradiol, bisphenol A and 4-methoxyphenol in human cells transfected with estrogen receptor  $\alpha$  cDNA. *Toxicology in Vitro*. 23, 728-735, 2009
- 11) Suzuki H., Suzuki N. Detection of K-ras codon 12 mutation by polymerase chain reaction and differential dot-blot hybridization in sodium saccharin-treated human R5a cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 956-961, 1993
- 12) Visvardis EE., Tassiou AM., Piperakis SM. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* Jan 31, 383(1), 71-80, 1997
- 13) Cadet J., Vigney P. "The photochemistry of nucleic acids. In *Bioorganic Photochemistry*" eds, H. Morrison, J. Wiley & Sons, NY. 1-272, 1990
- 14) Yano A., Chen S-P., Kita K., Jiang X., Ren Q., Sato T., Suzuki N. Involvement of annexin II in resistance to UVB-induced cell death and increased nucleotide excision repair capacity of UV-damaged DNA in human cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* 77, 307-311, 2013
- 15) Shuryak I., Brenner D-J. A model of interactions between radiation-induced oxidative stress, protein and DNA damage in *Deinococcus radiodurans*. *J. Theor. Biol.* 261, 305-317, 2009
- 16) Sordet O., Nakamura A-J., Redon C-E., Pommier Y. DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle*. 9, 274-278, 2010
- 17) Monickaraj F., Aravind S., Nandhini P., Prabu P., Sathishkumar C., Mohan V., Balasubramanyam M. Accelerated fat cell aging links oxidative stress and insulin resistance in adipocytes. *J. Biosci.* 38, 113-122, 2013
- 18) Wu Y., Wang D., Wang X., Wang Y., Ren F., Chang D., Chang Z., Jia B. Caspase 3 is activated through caspase 8 instead of caspase 9 during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in HeLa cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 27, 539-546, 2011
- 19) Jiang X., Ren Q., Chen SP., Tong X-B., Dong M., Sugaya S., Tanaka T., Kita K., Suzuki N. UVC mutagenicity is suppressed in Japanese miso-treated human R5a cells, possibly via GRP78 expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 1685-1691, 2011.
- 20) Stevnsner T., Muftuoglu M., Aamann M-D., Bohr V-A. The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. *Mech. Ageing Dev.* 129, 441-448, 2008
- 21) Menoni H., Hoeijmakers J-H., Vermeulen W. Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions in vivo. *J. Cell. Biol.* 199, 1037-1046, 2012

# 麹菌新規細胞内在ペプチダーゼの生理的機能の解明と味噌加工における役割

楠本 憲一

Function of novel endogenous peptidase of koji mold, in the point of intracellular physiology and brewing of soybean paste

Ken-Ichi Kusumoto

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization  
Tsukuba, Ibaraki 305-8642, JAPAN

## 緒言

麹菌として利用される *Aspergillus oryzae* は、細胞外に多量の加水分解酵素を分泌し、呈味成分である糖質、アミノ酸、ペプチドの生成に寄与する。これらの酵素のうち、タンパク質やペプチドのアミノ末端からアミノ酸を遊離する活性を有するアミノペプチダーゼについては、これまでに多くの種類の性質が解明されている<sup>1-9)</sup>。このうちアスパチルアミノペプチダーゼ (DapA)<sup>5)</sup> は、酸性アミノ酸であり重要な呈味成分であるグルタミン酸及びアスパラギン酸に高い特異性を示し、これらのアミノ酸をペプチドのアミノ末端から遊離する酵素である。また、本酵素は他の細胞内酵素と比較して熱安定性が高いという特徴を有する。また、麹菌の細胞内に局在するアミノペプチダーゼ類の一部が細胞外に出て酵素活性を示すことが明らかになった<sup>9)</sup>。したがって、本酵素は味噌醸造中において、もろみ中で生成するペプチドのアミノ末端のアスパラギン酸やグルタミン酸を遊離し、味噌における旨味アミノ酸生成への寄与

が考えられる。そこで、本研究では、DapA の麹菌細胞内における生理的機能を詳細に解明すると共に、細胞外に放出されることで味噌醸造工程における役割を明らかにすることを目的とする。細胞内生理機能の解明では、RT-PCR 法による準定量発現解析、無細胞抽出液における当該酵素活性に対する金属塩の影響と共に、遺伝子過剰発現株及び遺伝子破壊株を作製して対照株の形態と比較を行った。また、味噌醸造工程における本酵素の機能解明のため、実験室内における米麹作製と酵素活性の抽出について検討を行った。

## 方法

### 菌株と培地

アスパチルアミノペプチダーゼ遺伝子 *dapA* の高発現株 DapA-3OE 株の作製は、*A. oryzae* RIB40 (ATCC42149) 株を宿主として用いた。*A. oryzae* RIB40 株の培養には Czapeck-Dox (CD) 液体培地 (0.3% NaNO<sub>3</sub>, 0.052% KCl, 0.152%

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0% D-glucose, and 0.1 % trace elements solution: [0.1 % FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.88 % ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.04 % CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.01 % Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 0.005 % (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O], pH 6.5) を用いて, 30°C, 3 日間振盪培養した。 *A. oryzae* RIB40 株の形質転換株の取得には, CD 寒天培地 (CD 培地, 2.0% Agar, pH 6.5) に 0.1 mg/l のピリチアミン (pyrithiamine) を加え, 候補株を選抜した。得られた *dapA* 高発現株の培養は, CD 培地の 1.0% の D-glucose の代わりに *amyB* プロモータを誘導する可溶性澱粉 (starch) を用いた CDS 培地で培養した。また, 完全培地として, YPD 液体培地 (1.0% yeast extract, 2.0% polypeptone, 2.0% D-glucose (pH 5.5)) を使用した。

アスパチルアミノペプチダーゼ遺伝子 *dapA* の破壊株  $\Delta$  DapA 株の作製は, ウラシル要求性の  $\Delta$  *ligD*  $\Delta$  *pyrG* 株を宿主に用いた。この宿主株は 20mM のウリジンを添加した YPD 液体培地 (1.0% Yeast extract, 2.0% Polypepton, 2.0% D-Glucose, pH6.5) を用いて 30°C で培養した。

大腸菌 *E. coli* DH5  $\alpha$  [F-  $\Phi$  80d *lacZ*  $\Delta$  M15  $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) *supE44*  $\lambda$  - thi-1 *gyrA96 relA1*] (Toyobo) は, LB 培地 (1.0% Trypton, 0.5% Yeast extract, 1.0% NaCl, pH 6.5) を用いて, 37°C で一晩培養した。

#### 準定量的 RT-PCR 法

培養菌体の全 RNA は, 各条件で振とう培養して得られた菌体から, Isogene (ニッポンジーン) を用いて抽出して得た。さらに全 RNA を DNase I (キアゲン) により処理して混入している DNA を除去した。ReverTraAce- $\alpha$  を用いて逆転写を行い, 以下のプライマー対を用いて PCR を行った。すなわち, *dapA* については SemiQPCR-DapA-5 (5'-GGCATTGTCACACCTGGTTCCGAC-3') 及び SemiQPCR-DapA-3 (5'-GGTACGGCTGCCGATCTCTTCGTG-3'), 内部標準の  $\gamma$ -アクチン遺伝子については, actin-F (5'-ATGACCCAGATTGTCTTCGAGACC-3') 及び actin-R (5'-CATGGTAGTACCACCAGACATGAC-

3'), 同じくヒストン H2B 遺伝子については H2B-F (5'-ATGGCACCCAAGGCTGCTGAGAAG-3') and H2B-R (5'-CAGGATAAGTCTGACAGAGGTCTG-3') を用いた。PCR のサイクル数は 25 回, あるいは 35 回とした。電気泳動にて分離した PCR 産物 (DNA) をエチジウムブロミド染色して撮影した。

#### アスパチルアミノペプチダーゼ遺伝子の高発現株 DapA-3OE 株の作製

*dapA* (His-tag 非附加) を高発現する DapA-3OE 株の作製のため, pKKA17L1-noneHistag プラスミドを, 先の研究 (Kusumoto et al., 2008) で作製した pKKA17L1 プラスミド (*amyB* プロモータ, *dapA* 遺伝子, His-tag の順に遺伝子配列を持つ) を基に改変し作製した。本プラスミド中の *dapA* は, 培地中に炭素源として可溶性デンプンが存在すると *amyB* プロモータの転写活性が増大し, 高発現となる。まず, His-tag 配列相当に停止コドンが入ったプライマー DAPmuta-stop5' (5'-CAATCTTTGTTGACTGACCAGCTTTCTTGTAC-3') とプライマー DAPmuta-stop3' (5'-GTACAAGAAAGCTGGTCAGTCAACAAAGATTG-3') を用いて, pKKA17L1 プラスミドをテンプレートに PCR でプラスミド全体を一周増幅した。PCR は PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (タカラバイオ) で行った。続いて, PCR 産物を, 制限酵素 *Dpn* I で 1 時間処理した。その後, 目的の変異をもつプラスミド DNA を用いて *E. coli* DH5  $\alpha$  を形質転換し, 目的の pKKA17L1-noneHistag プラスミドを取得した。この pKKA17L1-noneHistag プラスミドを *A. oryzae* RIB40 株に形質転換し, 過剰発現株である DapA-3OE 株を取得した。

#### アスパチルアミノペプチダーゼ遺伝子破壊株 $\Delta$ DapA 株の作製

*A. oryzae* RIB40 のゲノムを鋳型として, DapA 遺伝子の 5' 側領域 (849bp) をプライマー DapA-5F1 (5'-AGAAGGAGAGTTTTTCAGCCAAGA-3') とプライマー PyrGDapA-5RV1 (5'-CAGCGGCCATAAACGTGTTGATAGCTTT

TGTTGGAGATGAAATTGCGGA-3' : 下線は pyrG 配列) を用い, dapA 遺伝子の 3' 側領域 (837bp) はプライマー PyrGDapA-3F1 (5'-CCT CAGATGCAAAGACAAGGCCAGGCGTTGGT TACTTGTGTAGATAGG-3' : 下線は pyrG 配列) とプライマー DapA-3RV1(GTGGTGCCTTAGG AGTGAAGAATA) を用いて PCR 法にて増幅した。また, オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 pyrG(834bp) を, プライマー pyrG-F(5'-CTGGCCTTGTCTTTGCATCTGAGG-3') とプライマー pyrG-RV (5'-GCTATCAACACGTTT ATGGCCGCTG-3') で増幅した。この増幅した 3 断片を混ぜ, この混液を鋳型にして, プライマー DapA-5F2 (5'-CTTTCATTGTCTCCCATGCT TTT-3') とプライマー DapA-3RV2 (5'-TCAGT GCACAATAGCACGTAATG-3') でフュージョン PCR を行い破壊株用の PCR 断片 disruptDapA pyrG (3576bp) を取得した。取得した PCR 断片 disruptDapApyrG を, 宿主株の  $\Delta$  ligD  $\Delta$  pryG 株に形質転換し, DapA 遺伝子破壊株である  $\Delta$  DapA を得た。

#### 大腸菌 (*E. coli*) 及び *A. oryzae* の形質転換実験

大腸菌 (*E. coli*) の形質転換実験は, Hanahan (Hanahan 1983) の方法に基づいて行った。

*A. oryzae* の形質転換実験は五味らの方法 (Gomi *et al.*, 1987) を改良して行った。形質転換株の取得には, 選択培地の CD 寒天培地に 0.1 mg/l のピリチアミンを加え選抜した。また, アスパチルアミノペプチダーゼ遺伝子破壊株  $\Delta$  DapA 株の取得はウリジンを含まない CD 寒天培地で選抜した。

#### 米麹の培養方法と酵素液の調製

100ml の三角フラスコに 4g の  $\alpha$ -化米 (徳島精工製) を入れ, オートクレーブ滅菌後, 水分が 33% (W/W) となるように孢子液を添加した。YAMATO Humidic chamber IG420 の中に移し, 湿度 90%, 30°C で 40 時間培養した。培養後, 12ml の 50mM Tris-HCl pH7.5 を加え, 続いて, 4°C の冷蔵庫で 1 時間スターラーで攪拌した。攪拌後, 溶液を回収し, 15000rpm で 10 分間遠心し,

上清を酵素液とした。その酵素液を用いて, 酵素活性測定を行った。

#### 酵素活性測定法

本酵素の活性測定は, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 と 10% (v/v) glycerol の反応液に, 終濃度 1 mM となるように合成基質の Aspartyl-*p*-nitroanilide (Asp-*p*NA) を加えて, 適量の酵素と混ぜ 30°C で反応を行った。酵素反応の停止は, 40% (w/v) の酢酸を反応液の 1/4 量を加えることにより行った。反応後, Mini 1240 UV-vis spectrophotometer (Shimadzu) を用いて, 反応液中に遊離した *p*NA の 415 nm の吸光度を測定した。分子吸光計数 8.8/mM を用い, 酵素活性単位は 1 分間に 1  $\mu$ mol の *p*NA を遊離する酵素量を 1 unit として決定した。

#### 塩基配列の決定

DNA 配列は BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit と ABI 310 automatic sequencer (Applied Biosystems) を用いて決定した。実験方法は付属のプロトコールに従った。決定した塩基配列は GENETYX-MAC sequence analysis software (Genetyx Corp.) を用いて解析した。

#### 結果と考察

*dapA* 遺伝子の麹菌における生理機能性を解明するため, 作製した *dapA* 遺伝子破壊株及び過剰発現株について, ツァベックドックス寒天培地におけるコロニーの生育速度, 形態形成及び孢子形成をそれぞれの対照株 (宿主株) と比較した。その結果, 遺伝子破壊株 (図 1), 過剰発現株 (図 2) いずれの株も対照株と同等の性質を示した。また, 遺伝子破壊株について窒素源濃度をツァベックドックス寒天培地の 100 分の 1 及び 1000 分の 1 に制限した寒天培地上に接種し, コロニーの形態等を観察したところ, 上述と同様に対照株と同等の性質を示した。この結果から, *dapA* は麹菌の生育に必須ではない遺伝子であることが明らかになった。

*dapA* 遺伝子の発現の培養環境の違いを検討するため、一晚培養後の菌体を塩濃度、熱、アルカリの各ストレス条件下で2時間処理した後、RT-PCR法にて転写量を準定量的に測定した。その結果、各ストレス条件と対照条件で転写量は同等であった(図3)。そのため、本遺伝子は供試ストレス条件においても転写制御を受けないことが示唆された。

次に、DapAの活性発現に金属塩が与える影響を検討するため、過剰発現株と対照株のCDS液体培地培養後に、無細胞抽出液を調製した。そして、当該抽出液に金属塩を1mMとなるよう添加した後、DapAの活性測定用合成基質であるAsp-pNA及びGlu-pNAを用いて抽出液中のDapA活性を測定した。その結果、塩化コバルト塩の添加により過剰発現株抽出液における当該酵素活性は塩無添加の場合の約4-5倍となった。また、遺伝子破壊株は、対照株と比較して、Asp-pNA及びGlu-pNA分解活性が有意に低下していた。

次に、DapA過剰発現株を対照株と共にモデル的に米麴培養を行い、4℃において抽出用緩衝液

中でスターラーを用いてゆるやかに1時間攪拌を行ったのち、抽出液の遠心上清を酵素液とした。

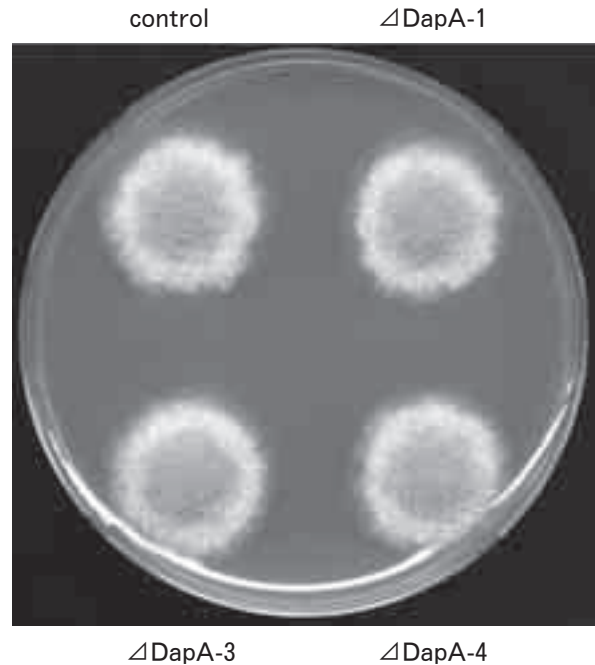
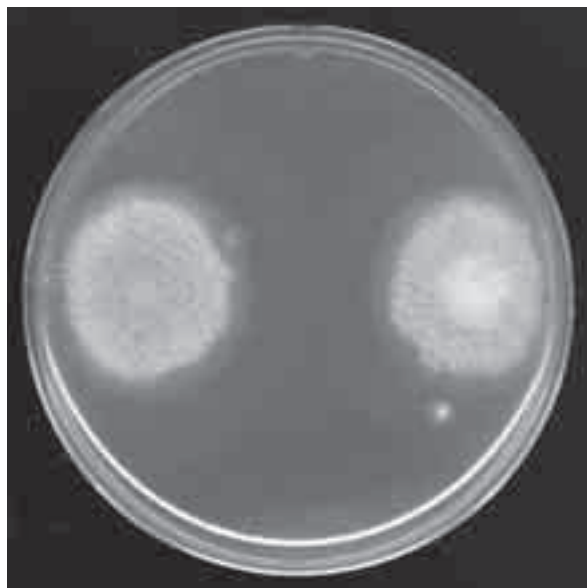


図1. *dapA* 遺伝子破壊株のCDG寒天培地における形態  
30℃ 6日間培養後の各菌株の生育状態を示す。  
Control株 (*ΔligD:pryG/pyrG*),  $\Delta$ DapA-1,  $\Delta$ DapA-3,  $\Delta$ DapA-4, 遺伝子破壊株



CDS 6日目



CDG 6日目

図2. *dapA* 遺伝子過剰発現株のCDS及びCDG寒天培地における形態  
30℃ 6日間培養後の各菌株の生育状態を示す。  
Control株 (RIB40) (左側のコロニー), DapA-3OE株 (遺伝子過剰発現株) (右側のコロニー)

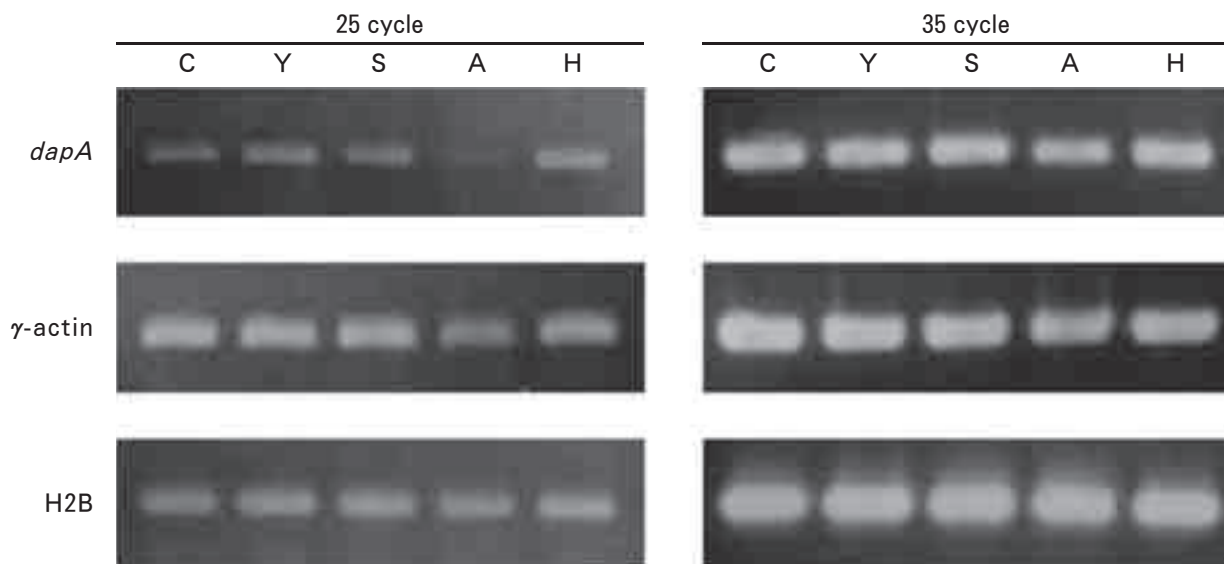


図3. RT-PCRによる *dapA* 遺伝子の培養条件による発現プロファイル

*A. oryzae* RIB40株をYPD培地で30°C20時間培養後、以下の条件でさらに2時間培養した。25サイクルあるいは35サイクルのPCR実施後、電気泳動にて分離したPCR産物 (DNA) の染色バンドを示した。C ; YPD培地30°C, S ; 1M NaCl含有YPD培地30°C, A ; pH10.0調整YPD培地30°C, H ; YPD培地40°C。γ-アクチン及びヒストンH2B遺伝子の発現量 (培養条件によらず一定) を比較対照とした。

そして、上述の合成基質を用いた酵素反応後、活性測定を行った。その結果、DapA 過剰発現株の米麴抽出液中の DapA 活性は、対照株に比べて極めて高い活性を示し、Asp-pNA 基質の分解活性で対象区の約 39 倍の活性を示した (図4)。このことから、DapA は細胞内酵素ながら細胞外に容易に抽出可能な酵素であり、醸造過程において米麴に由来する本酵素が呈味アミノ酸であるグル

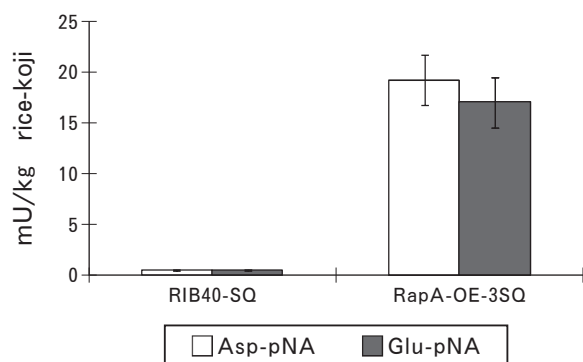


図4. *dapA* 高発現株と対照株の米麴抽出液の合成基質分解活性

米麴 1g 当たりの活性を示した。

タミン酸やアスパラギン酸の増加に寄与している可能性が示唆された。

哺乳類細胞におけるアスパチルアミノペプチダーゼ相当酵素が、細胞内のタンパク質分解の最終段階に関わっていることを示唆する知見が得られている<sup>10)</sup>。また、出芽酵母のアスパチルアミノペプチダーゼ相当酵素が、酵母細胞内で実際にアスパチルアミノペプチダーゼ活性を有することが報告された<sup>11)</sup>。一方、醸造に関連した当該酵素の役割を示唆する研究としては、麹菌のアスパチルアミノペプチダーゼを大腸菌を宿主として遺伝子組み換え技術により生産し、同酵素が耐塩性を示すと共に、本酵素を脱脂大豆部分分解物と反応させると、グルタミン酸の遊離量を増加させたとの報告がある<sup>12)</sup>。本助成研究においては、穏やかな条件で米麴から容易にアスパチルアミノペプチダーゼ活性が調製可能であることが判明した。醸造食品である味噌は、種類によって塩分が5~13% (w/w) 程度含まれる。DapA は内在酵素であるが耐塩性が高い酵素であることが知られる。したがって、このような塩分の高い味噌中で大豆や米に由来するペプチドから本酵素が旨味ア



ミノ酸を遊離することは十分に考えられる。

本研究の結果から、これまでに注目されていないアスパチルアミノペプチダーゼの味噌醸造工程における機能が解明されることが今後期待される。その結果、この酵素の生産性が異なる麹菌株を味噌醸造で用いることにより、味噌中のアミノ酸組成が従来よりも変化した新規な呈味性を有する製品が開発される可能性がある。また、農業と地場食品加工業が結びついた6次産業が活性化される中で新たな発酵食品開発のニーズが出てきている。これまでに、著者らのグループは、麹菌がゲノム上にコードしている100種類以上のプロテアーゼ群について、その酵素活性を網羅的に解明し、70種類以上の酵素活性を明らかにした。その中には、本研究で対象とした酵素も含めた、多くの新規プロテアーゼが含まれていた。従来の醸造用麹菌株からプロテアーゼ生産に関する新たな特性が解明されることにより、今後、新たな地場発酵食品の開発や、種麹産業における菌株の新規用途開拓が期待される。

## 要 旨

麹菌として利用される *Aspergillus oryzae* において、酸性アミノ酸に特異性が高いアスパチルアミノペプチダーゼ (DapA) は、ペプチドのアミノ末端のアスパラギン酸やグルタミン酸を遊離し、味噌における旨味アミノ酸生成への寄与が考えられる。そこで、本研究では、DapA の麹菌細胞内における生理的機能を詳細に解明すると共に、細胞外に放出されることで味噌醸造工程における役割を明らかにすることを目的とした。DapA をコードする遺伝子 *dapA* の破壊株及び過剰発現株の培養試験、並びに転写解析の結果、当該遺伝子は麹菌の生育に必須ではない遺伝子であり、また、供試ストレス条件においても転写制御を受けないことが示唆された。DapA 過剰発現株及び対照株のモデル米麹培養を行い、その攪拌抽出液の当該活性を比較した結果、過剰発現株由来抽出液は極めて高い酸性アミノ酸遊離活性を示した。

## 謝 辞

本研究は、平成24年度社団法人中央味噌研究所研究助成により実施された。

## 参考文献

- 1) Nakadai, T., Nasuno, S., Iguchi, N. : Purification and properties of leucine aminopeptidase II from *Aspergillus oryzae*. *Agr Biol Chem* 37, 767-774 (1973)
- 2) Nakadai, T., Nasuno, S. : Purification and properties of leucine aminopeptidase IV from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* 41, 1657-1666 (1977)
- 3) Nakadai, T., Nasuno, S., Iguchi, N. : Purification and properties of leucine aminopeptidase I from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* 37, 757-765. (1973)
- 4) Nakadai, T., Nasuno, S., Iguchi, N. : Purification and properties of leucine aminopeptidase III from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* 37, 775-782 (1973)
- 5) Kusumoto, K. et al. : Efficient production and partial characterization of aspartyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1711-1719 (2008)
- 6) Matsushita-Morita, M. et al. : Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Appl. Microbiol.* 109, 156-165 (2010)
- 7) Matsushita-Morita, M. et al. : Overexpression and characterization of an extracellular leucine aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Curr. Microbiol.* 62, 557-564 (2011)
- 8) Marui, J. et al. : Comparison of expression and enzymatic properties of *Aspergillus oryzae* lysine aminopeptidases ApsA and ApsB. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2643-2650 (2012)
- 9) Marui, J. et al. : Enzymatic properties of the glycine D-alanine aminopeptidase of

- Aspergillus oryzae* and its activity profiles in liquid-cultured mycelia and solid-state rice culture (rice-koji). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 655–669 (2012)
- 10) Wilk, S., Wilk, E., and Magnusson, R.P. : Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 15961-15970 (1998)
- 11) Yokoyama, R., Kawasaki, H., and Hirano, H. : Identification of yeast aspartyl aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from yeast cells. *FEBS J.* 273, 192-198 (2005)
- 12) Watanabe, J., Tanaka, H., Akagawa, T., Mogi, Y., and Yamazaki, T. : Characterization of *Aspergillus oryzae* aspartyl aminopeptidase expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 2557-2560 (2007)

# 味噌による放射線防護作用

笹谷 めぐみ, 渡邊 敦光

Radioprotection effects on Miso

Megumi SASATANI, Hiromitsu WATANABE

*Research institute for radiation biology and medicine, Hiroshima University  
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, Hiroshima 734-8553, Japan*

## 研究要旨

我々は、これまでに、マウスを用いた研究から、味噌が放射線防護作用や制癌作用といった様々な生理活性を有することを報告してきた。また、味噌の放射線防護作用には、味噌の生産地による差はなく、味噌の熟成（発酵）が関与していることを明らかにしてきた。今回は味噌の熟成度と放射線防護作用との関係を詳細に調べることを試みた。また、米味噌、豆味噌、麦味噌といった様々な味噌を用いて実験を行い、各々の味噌の熟成度と放射線防護作用との関係について解析した。本研究により、味噌のどの発酵期間が最も強い放射線防護作用を示すのかが明らかとなり、各種味噌の放射線防護作用の強い熟成期間が明白になるといえる。

実験を行った結果、米味噌、豆味噌においては、2年発酵した味噌が、もっとも放射線防護作用が強いという結果が得られた。本研究により、味噌の熟成度が放射線防護作用に寄与することが明らかにされた。

## 研究の目的

2011年3月11日に発生した東北地方太平洋沖地震による福島原発事故の影響を受け、放射線による健康影響が問題になっている。放射線の健康影響を評価するためには、科学的根拠に基づいた評価を行うことが重要といえる。我々は、発がんを主とした放射線の生物学的影響について、実験動物を用いた研究を行っている。その中で、マウスを用いた研究から、味噌が放射線防護作用や制癌作用といった様々な生理活性を有することを報告してきた<sup>1)</sup>。また、味噌の放射線防護作用には、味噌の生産地による差はなく、味噌の熟成（発酵）が関与していることを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。今回は味噌の熟成度と放射線防護作用との関係を詳細に調べることを試みた。また、米味噌、豆味噌、麦味噌といった様々な産地の味噌を用いて実験を行い、各々の産地の味噌の熟成度と放射線防護作用との関係についての解析も行った。本研究により、味噌のどの発酵期間が最も強い放射線防護作用を示すのかが明らかとなり、各種味噌の放射線防護作用の強い熟成期間が明白になる。これらが明らかにされれば、更なる味噌の需要が期待でき

るといえる。我々の研究は、味噌を取り入れた食生活が放射線による健康影響を抑えることができることを、科学的に証明することにつながるといえる。

## 研究方法

### 1. 味噌

味噌は中央味噌研究所より、凍結乾燥した淡色米味噌（信州系）、赤色米味噌（仙台系）、豆味噌並びに麦味噌の4種類を供授して頂いた。淡色味噌の通常品（2か月熟成）、2年熟成味噌並びに5年熟成味噌の3種類、赤色味噌は通常品（6か月熟成）並びに2年熟成味噌を用いた。豆味噌は通常品（6か月熟成）、2年熟成並びに870日熟成味噌の3種類、麦味噌は、通常品（4か月熟成）と10年熟成味噌を用いた。目の荒い凍結乾燥品は乳鉢を用いて、更に細かくした。オリエンタル酵母の粉末 MF 餌に凍結乾燥味噌を10%になるように加え、良く混ぜ合わせた。

### 2. 動物の飼育

マウスの飼育は、広島大学原爆放射線医科学研究所放射線動物実験施設で行った。飼育室は、室温  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  並びに湿度  $55 \pm 10\%$  の条件下で、12時間明暗サイクルで管理した。実験動物の飼育、管理、及び取扱は、広島大学動物飼育指針に従って行った。

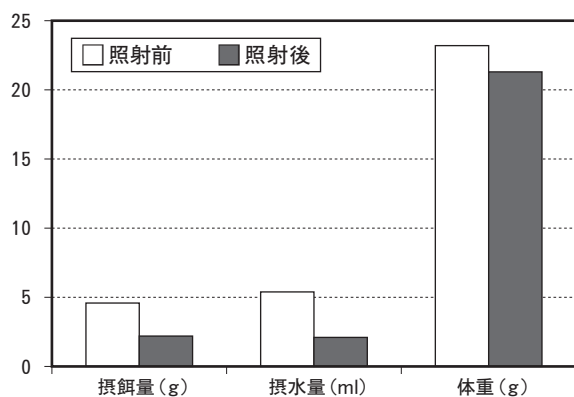


図1. 照射前並びに後の摂餌量、摂水量と体重の変動

表1. 実験群

群	味噌の種類	熟成度
1	淡色米味噌（信州系）	通常品（2か月熟成）
2		2年熟成味噌
3		5年熟成味噌
4	赤色米味噌（仙台系）	通常品（6か月熟成）
5		2年熟成味噌
6	豆味噌	通常品（6か月熟成）
7		2年熟成味噌
8		870日熟成
9	麦味噌	通常品（4か月熟成）
10		10年熟成味噌
11	対照群（MF飼料）（照射）	
12	対照群（MF飼料）（非照射）	

SPFの5週齢のB6C3F1雄マウスをチャールズリバー株式会社より購入した。6週齢で、マウスを12群に分け、1-10群には表1に示した味噌を与えた。残りの2群は、対照群としてMF飼料を与えた。餌、水は自由に摂取させ、摂餌量並びに摂水量を経時的に測定した。

### 3. 照射

7週齢で、ガンマセル40（エグザクタ MDS Nordion社製）を用いて、10Gyの全身照射を行った。線量率は1.02Gy/分である。

### 4. 小腸腺窩の再生による放射線防護作用の測定

照射後3.5日でマウスを剖検し、小腸を採取した。採取した小腸は、カルノア液で1時間固定し、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋した試料は、小腸断面が観察できるように、 $3\mu\text{m}$ の厚さに切り、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。顕微鏡下で小腸腺窩の数を計測することにより、味噌の放射線防護作用を測定した。

### 5. 統計学的解析

Dunnett検定を用いて有意差検定を行った。

#### （倫理面への配慮）

動物の取り扱いに関しては、広島大学実験動物取り扱い指針に従い、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行った。

表2. マウス1匹当たりの摂餌量 (g/day)

群	味噌の種類	放射線照射前	照射 3.5 日後	(%)
1	淡色米味噌—通常品(2か月熟成)	5.8 ± 1.2	2.0	34.8
2	淡色米味噌—2年熟成	4.0 ± 0.5	2.0	50.0
3	淡色米味噌—5年熟成	4.9 ± 0.9	1.7	34.7
4	赤色米味噌—通常品(6か月熟成)	4.9 ± 0.9	1.9	38.8
5	赤色米味噌—2年熟成	4.1 ± 1.0	0.9	22.0
6	豆味噌—通常品(6か月熟成)	3.9 ± 0.4	1.4	35.9
7	豆味噌—2年熟成	4.2 ± 0.6	2.5	33.3
8	豆味噌—870日熟成	4.8 ± 0.8	2.9	59.6
9	麦味噌—通常品(4か月熟成)	4.6 ± 0.8	3.5	76.1
10	麦味噌—10年熟成	4.3 ± 0.4	2.6	76.1
11	対照群(MF飼料)—(照射)	5.2 ± 1.5	3.1	59.6
12	対照群(MF飼料)—(非照射)	5.4 ± 0.9	5.8	107.0

表3. マウス1匹当たりの摂水量 (ml/day)

群	味噌の種類	放射線照射前	照射 3.5 日後	(%)
1	淡色米味噌—通常品(2か月熟成)	5.5	3.1	55.9
2	淡色米味噌—2年熟成	4.9	1.7	35.4
3	淡色米味噌—5年熟成	6.1	1.7	28.6
4	赤色米味噌—通常品(6か月熟成)	5.9	1.3	22.6
5	赤色米味噌—2年熟成	4.9	1.4	27.6
6	豆味噌—通常品(6か月熟成)	5.1	1.4	27.1
7	豆味噌—2年熟成	3.9	1.4	35.8
8	豆味噌—870日熟成	6.8	2.7	39.7
9	麦味噌—通常品(4か月熟成)	6.8	3.5	51.3
10	麦味噌—10年熟成	6.2	2.4	38.1
11	対照群(MF飼料)—(照射)	4.8	2.7	56.2
12	対照群(MF飼料)—(非照射)	6.0	5.2	86.7

表4. 体重の推移 (g)

群	味噌の種類	実験開始時	7日目	増加率(%)	照射 3.5 日後	(%)
1	淡色米味噌—通常品(2か月熟成)	21.3 ± 0.7	23.2 ± 0.7	108.9 ± 5.1	21.3 ± 0.6	92.1 ± 2.0
2	淡色米味噌—2年熟成	20.7 ± 0.6	22.5 ± 0.5	108.9 ± 2.1	21.3 ± 0.5	94.7 ± 3.9
3	淡色米味噌—5年熟成	20.6 ± 1.3	22.9 ± 0.8	111.9 ± 6.6	21.7 ± 1.0	94.9 ± 6.0
4	赤色米味噌—通常品(6か月熟成)	21.2 ± 1.6	24.0 ± 1.3	113.5 ± 8.6	22.1 ± 1.3	92.1 ± 6.8
5	赤色米味噌—2年熟成	20.8 ± 1.1	23.0 ± 1.0	111.0 ± 8.8	22.0 ± 1.2	95.8 ± 8.9
6	豆味噌—通常品(6か月熟成)	20.1 ± 1.1	23.0 ± 0.9	115.2 ± 10.3	20.9 ± 0.9	90.7 ± 4.8
7	豆味噌—2年熟成	20.9 ± 0.5	22.2 ± 0.3	106.0 ± 2.6	20.5 ± 0.2	92.7 ± 1.8
8	豆味噌—870日熟成	21.3 ± 0.9	23.6 ± 1.0	111.0 ± 6.1	21.5 ± 0.8	90.4 ± 5.8
9	麦味噌—通常品(4か月熟成)	21.3 ± 0.9	23.3 ± 1.1	109.5 ± 5.9	21.6 ± 1.0	90.8 ± 2.0
10	麦味噌—10年熟成	21.3 ± 1.1	23.0 ± 1.1	108.7 ± 9.4	20.6 ± 1.1	90.0 ± 7.2
11	対照群(MF飼料)—(照射)	21.6 ± 0.6	23.9 ± 0.9	110.9 ± 4.3	21.8 ± 1.1	91.8 ± 4.1
12	対照群(MF飼料)—(非照射)	20.9 ± 0.7	22.7 ± 0.5	109.0 ± 3.7	23.2 ± 0.4	102.2 ± 0.5

## 結果

### 摂餌量, 摂水量, 体重の推移

照射前のマウス1匹あたりの摂餌量は3.9～5.8g/day(平均4.6g ± 0.9g/day)であった(表2)。対照群と味噌投与群との間に有意な差は検出されなかった。照射3.5日後のマウス1匹あたりの摂餌量は0.9～3.5g/day(平均2.2 ± 0.8

g/day)と、各群において照射後、摂餌量の減少が観察された(図1)。照射による摂餌量の減少率は、対照群と味噌投与群とで有意な差は検出されなかった。照射前のマウス1匹あたりの摂水量は、4.8～6.8ml/day(平均5.4 ± 0.9ml/day)で各群に有意な差は認められなかった(表3)。照射3.5日後のマウス1匹あたりの摂水量は1.3～3.5ml/day(平均2.1 ± 0.8ml/day)に

減少した（図1）。照射による摂水量の減少率は、対照群と味噌投与群とで有意な差は検出されなかった。表4に体重の推移を示した。味噌を摂取させ始めてから一週間後のマウスの体重の増加率は106%から120%（平均110.4 ± 6.7%）であり、対照群と味噌投与群とに統計的な有意差は認められなかった。照射3.5日後の体重は、各群とも約2g減少した（図1）。照射による体重の減少率は、対照群と味噌投与群とで有意な差は検出されなかった。

### 小腸再生腺窩の測定

図2に小腸の断面像を示した。小腸は、構造的に上皮と間質に分けられる。上皮は、増殖をつか

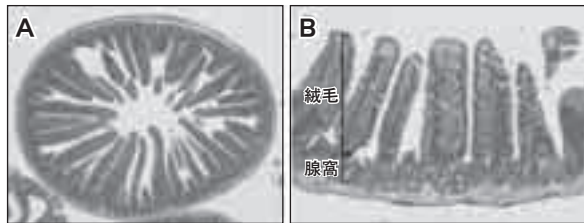


図2. 小腸の断面像（ヘマトキシリン・エオシン（HE染色））

- A 小腸の断面像 (×50)
- B 腺窩と絨毛 (×200)

さどる腺窩とそれから伸びる絨毛に分けられる。腺窩の底部には、小腸の幹細胞が存在し、幹細胞から分裂した細胞がさらに分裂増殖を行うことにより細胞数を増加させる。増加した細胞は腺窩に留まることなく絨毛に移行していく。絨毛に移行した細胞は分化し、機能細胞となり、最終的には絨毛の先端から脱落する。腺窩で生まれた細胞が絨毛の頂点から脱落するまで約3.5日である。放射線の標的は腺窩細胞であり、放射線に対して感受性が高い。放射線照射により腺窩内の細胞が死滅すれば、照射後3.5日には、腺窩が消失する。しかし、腺窩内に1個の細胞が生存した場合には、生存した細胞が再生を行い、再生腺窩が観察される。再生腺窩は、肥厚したエオシン好性の細胞からなる。再生腺窩の計測は、古くから使用されている最もスタンダードな腸の放射線感受性の検定法といえる。

まず、対照群（非照射）における腺窩の数を計測した結果、113.5 ± 22.7であった。次に対照群に10Gy照射した結果、41.9 ± 4.1と再生腺窩の数は、約40%にまで低下した（表5）。次に味噌（信州味噌）投与における小腸再生腺窩の数を計測した。通常品（2か月熟成）投与における小

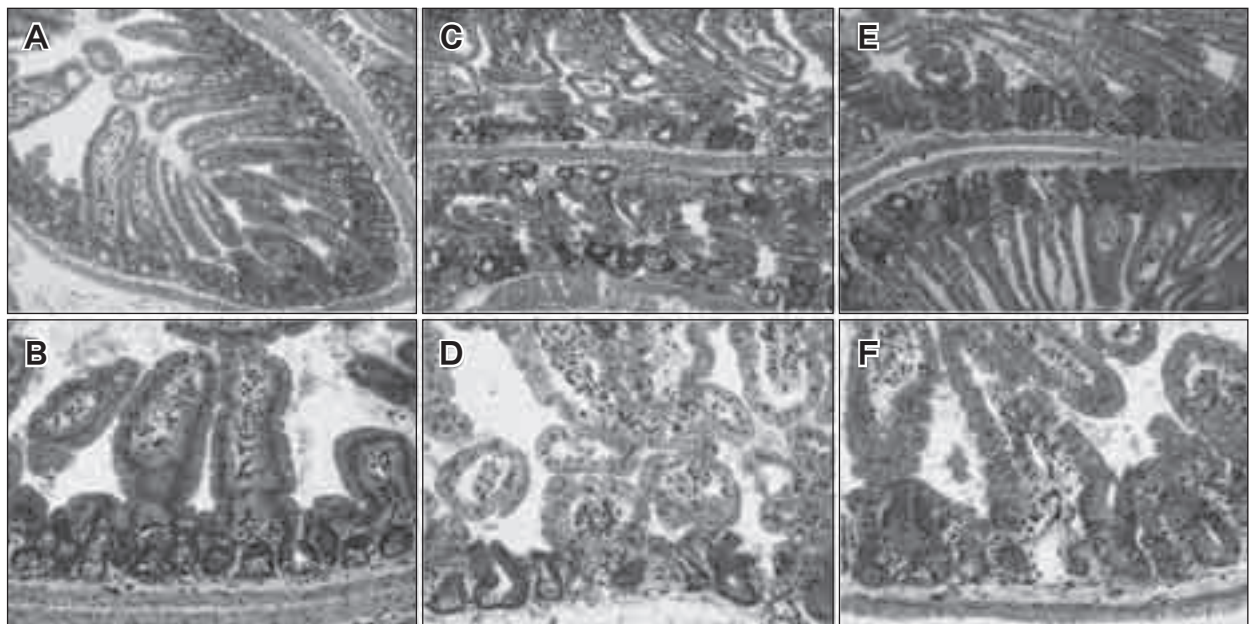


図3. 小腸腺窩の再生像（HE染色（A, C, E (×100), B, D, F (×200)）

- A, B 非照射群
- C, D 対照群 (照射後3.5日目)
- E, F 味噌投与群 (照射後3.5日目)

表 5. 米味噌（淡色米味噌）の小腸腺窩再生

群	腺窩再生
対照群 (MF飼料)―(非照射)	113.5±22.7
対照群 (MF飼料)―(照射)	41.9±4.1
米味噌 (淡色米味噌) 通常品 (2 か月熟成)	73.3±7.7 (175)
2 年熟成	76.5±7.5 (183)
5 年熟成	65.3±8.4** (156)

\*\*：5 年熟成味噌は通常品並びに 2 年味噌に比べて有意に減少 (P<0.01)

表 6. 米味噌（赤色米味噌）の小腸腺窩再生

群	腺窩再生
対照群 (MF飼料)―(非照射)	113.5±22.7
対照群 (MF飼料)―(照射)	41.9±4.1
米味噌 (赤色米味噌) 通常品 (6 か月熟成)	56.6±6.6** (135)
2 年熟成	64.6±6.1 (154)

\*\*：半年熟成味噌は 2 年味噌に比べて有意に減少 (P<0.01)

腸再生腺窩の数は、73.3 ± 7.7、2 年熟成味噌では、76.5 ± 7.5、5 年熟成味噌投与では、65.3 ± 8.4 であった。淡色米味噌（信州系）においては、2 年熟成味噌が最も放射線防護作用が強かった。表 6 に赤色米味噌（仙台系）投与における小腸再生腺窩の数を示した。赤色米味噌（仙台系）投与群では、通常品（6 か月熟成）投与群よりも、2 年熟成味噌投与群の方が、放射線防護作用が強かった。豆味噌投与群については、通常品（6 か月熟成）投与における小腸再生腺窩の数は、57.2 ± 9.4、2 年熟成味噌では、60.1 ± 6.2、870 日熟成味噌投与では、55.4 ± 5.3 であった（表 7）。豆味噌投与群においては、2 年熟成味噌が最も放射線防護作用が強かった。麦味噌では、通常品（4 か月熟成）投与における小腸再生腺窩の数は、57.3 ± 4.5 であるが、10 年熟成させた麦味噌投与群では、41.9 ± 4.1 であった（表 8）。10 年熟成させた麦味噌投与群では、放射線防護作用は検出されなかった。

## 考 察

本研究では米味噌（信州系，仙台系），豆味噌，麦味噌並びに発酵熟成度合いの異なる味噌を用い放射線に対する小腸腺窩の再生を検討した。放射

表 7. 豆味噌の小腸腺窩再生

群	腺窩再生
対照群 (MF飼料)―(非照射)	113.5±22.7
対照群 (MF飼料)―(照射)	41.9±4.1
豆味噌 通常品 (6 か月熟成)	57.2±9.4** (137)
2 年熟成	60.1±6.2 (143)
870日熟成	55.4±5.3** (132)

\*\*：通常品並びに 870 日熟成は 2 年味噌に比べて有意に減少 (P<0.01)

表 8. 麦味噌の小腸腺窩再生

群	腺窩再生
対照群 (MF飼料)―(非照射)	113.5±22.7
対照群 (MF飼料)―(照射)	41.9±4.1
麦味噌 通常品 (4 か月熟成)	57.3±4.5** (136)
10年熟成	41.9±4.1 (100)

\*\*：10年味噌は通常品に比べて有意に減少 (P<0.01)

線照射後，全ての群において，摂餌量，摂水量，体重の減少がみられた。この原因として，10Gy という高線量放射線照射による消化管障害を起したと考えている。放射線照射による消化管障害のため，食欲不振となり，摂餌量，摂水量が減少し，それに伴い，体重が減少したと推測する。

小腸再生腺窩数を測定することにより，各々の味噌の熟成度と放射線防護作用との関係についての解析を行った。米味噌，豆味噌，麦味噌といったそれぞれの味噌同士は糀歩合，天然醸造であるかどうか等が異なる。そのため，異なった糀間で放射線防護作用を比較は出来ない。しかしながら，今回の研究により，全ての味噌において，発酵熟成度により放射線防護作用が異なることが明らかになった。米味噌（仙台系），米味噌（信州系），豆味噌においては，2 年発酵した味噌が最も放射線防護作用が強く，さらに発酵期間が長くなると放射線防護作用は低下した。麦味噌においては，4 か月発酵させた味噌では放射線防護作用が観察されたが，10 年発酵した味噌では放射線防護作用がなかった。このことは糀の種類ではなく，発酵熟成により放射線防護作用を起こす物質が産生されている可能性を示唆している。ケフィアヨーグルト<sup>3)</sup>，テンペ（未発表），サトウキビの絞り粕であるバカス，米ぬか中で発酵させた霊芝菌糸体熱水抽出物である紅芝泉<sup>4)</sup>，植物を発酵させた

萬田酵素<sup>5)</sup> といった、味噌以外の発酵産物にも放射線防護作用が報告されている。このことより、発酵により放射線防護作用を示す成分が作られる可能性が示唆される。我々は以前に発酵初期、4か月熟成並びに6か月発酵熟成した辛口赤米味噌を用い放射線防護作用を検討した。その結果、発酵が進んだ6か月味噌で最も高い放射線防護作用が検出された<sup>6)</sup>。また、東京と広島でつくられた味噌を用いて放射線防護作用を比較したが、地域による差はみられなかった<sup>7)</sup>。我々は、6か月発酵味噌には、放射線防護作用のみならず、高血圧<sup>8)</sup>、脳卒中<sup>9)</sup>、大腸がん<sup>10)</sup>、肺がん<sup>11)</sup> 並びに胃がん<sup>12)</sup> にも効果があることを明らかにしている。これまでの研究結果から、味噌には、発酵熟成過程により、大豆にない有効成分が産生されたと考えている。味噌の発酵過程で生じる物質の一つにメラノイジンがあるが、我々は実際に、メラノイジンが放射線防護作用を示すことを明らかにしている<sup>13)</sup>。

放射線防護作用を示す物質として持続性ビタミンC<sup>14)</sup>、プロポリス<sup>15)</sup>、カイワレダイコン<sup>16)</sup> や fibroblast growth factor (FGF) 群<sup>17)</sup>、keratinocyte growth factor<sup>18)</sup>、transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>19)</sup> 等のサイトカインが知られている。味噌の中に、メラノイジン以外の放射線防護を起こす物質があるのかどうか、また、味噌投与により体内で放射線防護作用を示す物質が生じるか明らかにすることが今後の研究課題であろう。

さて昔ながらの本来の味噌について小瀬<sup>20)</sup> は杜氏の立場で次のように述べている。「寒い冬に時季に仕込んで夏を越し、冬には冬眠させ四季を体験させることで旨い味噌になり、1年半から2年かけて、それ以上になると味噌もだんだん衰えていくような気がすると」。このことと本研究とは通じるところがある。味噌は、日常の食生活で気軽に取り入れることのできる食品である。我々の研究結果は、味噌が放射線の健康被害を抑える可能性を示唆している。今後は2年味噌を用いて今まで以上に味噌の生理活性が高まるかを検討したい。

## 結 語

今回は味噌の発酵度と放射線防護作用との関係を詳細に調べることを試みた。さらに、米味噌、豆味噌、麦味噌といった様々な味噌を用いて実験を行い、各々の味噌の熟成度と放射線防護作用との関係についての解析を行った。その結果、糀が異なっても発酵熟成により放射線防護作用があることが判明した。米味噌、豆味噌では、2年発酵した味噌が最も放射線防護作用が高かった。麦味噌では、6か月発酵味噌では、放射線防護作用が見られたが、10年発酵した麦味噌では放射線防護作用がなかった。

本研究により、味噌の熟成度が放射線防護作用に寄与することが明らかにされた。

## 参考文献

- 1) Watanabe H. Beneficial biological effects of miso with reference to radiation injury, cancer and hypertension J Toxicol Path in press
- 2) 小原正之, 陸恵梅, 濱田仁美, 西岡輝之, 影山典子, 石村美祐, 白木克尚, 上坂敏弘, 加藤修, 渡辺敦光, 川野一之. 完熟味噌によるマウスの放射線防御作用. 味噌の技術と科学, 50, 21-27, 2002.
- 3) Teruya K, Myojin-Maekawa Y, Shimamoto F, Watanabe H, Nakamichi N, Tokumaru K, Tokumaru S, Shirahata S. Protective effects of the fermented milk Kefir on X-ray irradiation-induced intestinal damage in B6C3F1 mice. Biol Pharm Bull. 36, 352-359, 2013.
- 4) Kubo N, Myojin Y, Shimamoto F, Kashimoto N, Kyo E, Kamiya K, Watanabe H. Protective effects of a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma Lucidum* (Rei-shi) mycelia and *Agaricus blazei* murill against X-irradiation in B6C3F1 mice: Increased small intestinal crypt survival and prolongation of average



- time to animal death. *Int J Mol Med.* 15, 401-406, 2005
- 5) 芦田貴行, 明神有紀, 高垣正博, 松浦良紀, 渡邊敦光. 植物発酵産物のX線照射に対する防御効果—小腸の腺窩再生に与える影響—. *日本未病システム学会誌* 12, 129-131, 2006.
- 6) Ohara M, Lu H, Shiraki K, Ishimura Y, Uesaka Y, Katoh O, Watanabe H. Radioprotection effects of miso (fermented soy bean paste) against X-irradiation in B6C3F1 mice: Increased small intestinal crypt survival, crypt lengths and prolongation of average time to death. *Hiroshima J Med Sci.* 50, 83-86, 2001.
- 7) 小原正之, 陸恵梅, 濱田仁美, 西岡輝之, 影山典子, 石村美祐, 白木克尚, 上坂敏弘, 加藤修, 渡邊敦光, 川野一之. 完熟味噌によるマウスの放射線防御作用. *味噌の技術と科学*, 50, 21-27, 2002.
- 8) Watanabe H, Kashimoto N, Kashimura J, Kamiya K. Miso (Japanese soybean paste) was protective against hypertension compared to same amount of sodium chloride diet in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Res.* 29, 731-738, 2006.
- 9) 神谷研二, 渡邊敦光, 笹谷めぐみ. 味噌による高血圧, 動脈硬化, 脳梗塞及び心臓障害等の予防に関する研究. *中央味噌研究所研究報告* 33, 112-119, 2012.
- 10) Ohuchi Y, Myojin Y, Shimamoto F, Kashimoto N, Kamiya K, Watanabe H. Decrease in size of azoxymethane induced colon carcinoma in F344 rats by 180-day fermented miso. *Oncol Rep.* 14, 1559-1564, 2005.
- 11) Shiraki K, Une K, Yano R, Otani A, Mineoka A, Watanabe H. Inhibition by long-term fermented miso of induction of pulmonary adenocarcinoma by diisopropanolnitrosamine in Wistar rats. *Hiroshima J Med Sci.* 52, 9-13, 2003.
- 12) Watanabe H, Uesaka T, Kido S, Ishimura Y, Shiraki K, Kuramoto K, Hirata S, Shoji S, Katoh O, Fujimoto N. Influence of concomitant miso or NaCl treatment on induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Oncol Rep.* 6, 989-993, 1999.
- 13) 渡邊敦光, 塩野忠彦, 河村大造, 川野一之, 梶村順子, 榎本尚樹, 神谷研二.メラノインによる放射線防御作用. *長崎医学* 81, 296-298, 2006.
- 14) Yamamoto T, Kinoshita M, Shinomiya N, Hiroi S, Sugasawa H, Matsushita Y, Majima T, Saitoh D, Seki S. Pretreatment with ascorbic acid prevents lethal gastrointestinal syndrome in mice receiving a massive amount of radiation. *J Radiat Res.* 51, 145-156, 2010.
- 15) El-Ghazaly MA, Khayyal MT. The use of aqueous propolis extract against radiation-induced damage. *Drugs Exp Clin Res.* 21, 229-236, 1995.
- 16) 渡邊敦光, 東敬子, 加茂慎太郎, 菅崇朗, 佐藤一精, 神谷研二. ビタミンB12含有かいわれ大根の抗酸化活性並びに放射線防御作用. *日本未病システム学会* 13, 163-165, 2007.
- 17) Hagiwara A, Nakayama F, Motomura K, Asada M, Suzuki M, Imamura T, Akashi M. Comparison of expression profiles of several fibroblast growth factor receptors in the mouse jejunum: suggestive evidence for a differential radioprotective effect among major FGF family members and the potency of FGF1. *Radiat Res.* 172, 58-65, 2009.
- 18) Potten CS, O'Shea JA, Farrell CL, Rex K, Booth C. The effects of repeated doses of keratinocyte growth factor on cell proliferation in the cellular hierarchy of the crypts of the murine small intestine. *Cell Growth Differ.* 12, 265-275, 2001.
- 19) Wang J, Zheng H, Hauer-Jensen M. Influence of short-term octreotide administration on chronic tissue injury,

transforming growth factor beta (TGF-beta) overexpression, and collagen accumulation in irradiated rat intestine. J Pharmacol Exp Ther. 297, 35-42, 2001.

20) 小瀬正芳. 味噌は, 春, 夏, 秋, 冬を経てやっ  
と一人前になる. 味噌 108-109, 1999. 柴田  
書店.

## 味噌の腸内細菌や免疫に及ぼす作用の検証

### —味噌の腸内細菌叢に及ぼす効果—

錫谷 達夫, 西山 恭子, 橋本 裕美, 山田 結理, 長井 健一郎, 石岡 賢

Effect of Miso-soup on intestinal flora and immunity in mouse

Tatsuo SUZUTANI, Kyoko NISHIYAMA, Hiromi HASHIMOTO, Yuri YAMADA,  
Kenichiro NAGAI, Ken ISHIOKA

*Department of Microbiology, Fukushima Medical University School of Medicine,  
1 Hikarigaoka, Fukushima 960-1295, Japan*

#### 【要旨】

8週齢 ICR マウス, メスに3日間0.2%味噌水溶液を自由摂取させたところ(ヒトに換算して1日2杯の味噌汁に相当する量), 腸内細菌叢のおよそ65%が *Lactobacillus* 属の菌となった。この結果は味噌にプレバイオティクスとしての効果があることを示すものである。

#### 【背景】

動物が外界と接する皮膚, 粘膜上には様々な菌が常在細菌叢を形成し, 基本的には宿主動物と共生している。特に, 大腸には我々の体を構成する細胞よりも多くの菌が定着し, 便の体積の1/3以上が菌である。これらの菌は複雑な生態系を形成し, あるバランスのうえに常在しているが, これらの菌種の多くは培養法が確立されておらず, その詳細は闇の中にあった。ところが, 近年, PCR法を基盤とした培養法を用いない細菌・真

菌の群集解析法 (terminal restriction fragment length polymorphism; t-RFLP) や次世代シーケンサーの登場, 無菌マウスを用いた宿主動物に対する細菌の生理作用の解析法の進歩によって急速に研究が進展してきた。その結果, これまで100種程度しか確認されていなかった腸内細菌叢が1,000種を超える菌によって構成されていること<sup>1)</sup>や, 粘膜下のリンパ組織に定着し, 食物成分や常在細菌に対して免疫寛容を誘導する菌が存在すること<sup>2)</sup>, 菌叢を構成する菌のバランスの違いが痩せる・太るという体質を決定していること<sup>3)</sup>など, 腸内細菌叢が我々の健康に大きな影響力を持っていることが次々と明らかにされている。

我々はこれまで, ある種のキノコを餌として与えることによって, マウスに誘発した喘息を軽快させられることを見出した(未発表データ)。真菌の一種であるキノコにこのような作用がみられることから, 糸状菌によって発酵醸造する味噌にも腸内細菌叢や免疫に影響を与える作用があるのではないかという着想に至った。そこで, 先ず, 本研究ではマウスを用いて味噌の摂取が腸内細菌

叢に及ぼす作用を解析した。

## 【材料と方法】

**味噌：**市販されている10社の米味噌，豆味噌，麦味噌を実験に用いた（表1）。

**塩分濃度の測定：**20%（W/V）に再蒸留水で溶解した味噌の水溶液を用い，塩分計（APAL-ES1，株式会社アタゴ）で測定した。

表1. 市販されている味噌の性状

種類	サンプル名	細菌数 ( $\times 10^3$ /mg)	真菌数 ( $\times 10^6$ /mg)	塩濃度 (%)
米味噌	A	5.5	18	2.4
	B	2.0	33	2.3
	C	900	5.7	1.8
	D	11	11	1.8
	E	580	22	2.2
	F	13	30	2.3
	G	1500	37	0.8
豆味噌	H	28	0.1	2.0
麦味噌	I	23	25	1.9
	J	4.0	9.1	1.6

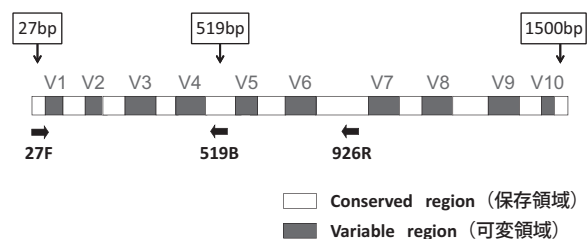


Fig. 1 16S rRNA の構造とプライマーの位置

細菌の解析のreal-time PCRとt-RFLPには27Fと926Rのプライマーセットを，次世代シーケンサーによる解析には27Fと519Bのプライマーセットを用いた。なお，t-RFLPの際には蛍光ラベルした27Fを用いた。

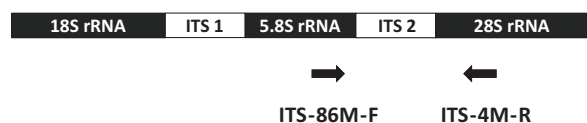


Fig. 2 真菌のInternal transcribed sequence 2 (ITS2) とプライマーの位置

真菌数の解析はITS-86M-FとITS-4M-Rを使ったreal-time PCRで行った。

**マウスへの味噌の投与：**マウスの実験は8週齢ICRマウス，メスを用いて行った。味噌は米味噌（表1中のサンプルA）を沸騰した再蒸留水に使用直前に溶解したものをを用いた。各マウスは個体識別のためのマーキング後，便を採取，3匹を1群とし，0.2%味噌水溶液を水の代わりに自由摂水させた。対象として水を摂水する群，味噌の水溶液とほぼ同等の塩分濃度である0.02%食塩水を摂水する群をおいた。味噌汁は腐敗させないために1日2回交換し，3日間飲ませた。再度便を採取後，味噌汁の投与を中止して水に交換した。味噌汁中止後4日目にもう一度便を採取した。

**検体からのDNAの抽出：**イージービーズ（エーエムアール株式会社）にマウスの便と200 $\mu$ lの滅菌した再蒸留水をいれ，MagNA Lyser（Roche applied Science）で2,500 rpm 90秒間攪拌して菌を破碎した。Phenol/Chloroform抽出後，DNAをエタノール沈殿し，TE bufferに溶解した。このDNA検体は使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

20%（W/V）の味噌水溶液200 $\mu$ lも同様に処理し，DNAを調整した。

**PCR：**はじめに，t-RFLPや次世代シーケンサーでの解析に用いるDNA産物を得るため細菌と真菌のPCRを行った。増幅した部位は，細菌では16SrRNA遺伝子，真菌ではITS2(Internal transcribed sequence 2)領域である。細菌は27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）と5'端に7塩基のテール配列を付加した926R（5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'）でPCRを行ったが，t-RFLP用のDNAを調整する場合は5'端を6-FAMで蛍光標識した27Fを使用した（Applied biosystems; Fig.1）。真菌は5'端に7塩基のテール配列を付加したITS-86M-F（5'-TGAATCATCGAATCTTTGAACGC-3'）とITS-4M-R（5'-TTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATAT-3'）を使用し，t-RFLPには5'端をNEDで蛍光標識したITS-4M-Rを用いた（Applied biosystems;

Fig.2)。

細菌, 真菌の PCR 反応は KOD FX (TOYOBO) を用いて総量 20  $\mu$ l で行った。PCR 反応液 20  $\mu$ l はそれぞれのプライマー 0.15  $\mu$ M, 0.4 mM の dNTPs, KOD FX 0.5 unit, 1  $\times$  PCR buffer for KOD FX と DNA をそれぞれ 2  $\mu$ l 加えて調整した。PCR は GeneAmp PCR System 9700 (Applied biosystems) を用いて行い, 細菌の PCR は 94 $^{\circ}$ C 2 分の熱変性後, 98 $^{\circ}$ C 10 秒の熱変性, 60 $^{\circ}$ C 30 秒のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C 1 分 10 秒の伸長反応を 35 サイクル行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C 7 分の伸長反応を行った。真菌は 94 $^{\circ}$ C 2 分の熱変性後, 98 $^{\circ}$ C 10 秒の熱変性, 60 $^{\circ}$ C 30 秒のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C で 45 秒の伸長反応を 35 サイクル行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C 7 分の伸長反応を行った。

**Real-time PCR** : 味噌中の細菌・真菌量の定量は上記のプライマーセットでサイバーグリーンを用いた real-time PCR で行った。検量線はプラスミドにクローニングした大腸菌 16S rRNA 遺伝子並びに *Candida albicans* ITS2 を用いて実験毎に作成した。

**t-RLFP 法** : 上記のとおり, 蛍光プライマーを用いて PCR で増幅した DNA 産物を制限酵素で切断した。反応は, 細菌の解析では増幅した DNA 1  $\mu$ l, Msp I (TAKARA BAIO) 10 U, 最終濃度 0.02% 牛血清アルブミンを加えた総量 20  $\mu$ l の反応系で行い, 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応させた。真菌は総量 10  $\mu$ l の反応液で行い, 増幅 DNA 1  $\mu$ l, ScrFI (TOYOBO) 10 U で 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応させた。反応終了後, 細菌は反応溶液 1  $\mu$ l, GeneScan 1200 (LIZ) (Applied biosystem) 1  $\mu$ l, HiDi formamide 9  $\mu$ l の計 11  $\mu$ l を ABI PRISM 3130x1 DNA sequencer (Applied biosystem) で泳動し, Peak Scanner でフラグメント解析を行った。真菌は反応溶液 1  $\mu$ l, GeneScan 400HD (ROX) (Applied biosystem) 1  $\mu$ l, HiDi formamide 9  $\mu$ l の計 11  $\mu$ l を同様に泳動し, フラグメント解析を行った。

**次世代シーケンサーによる菌叢解析** : 次世代シーケンサー (GS Junior; Roche applied Science) による 16S rRNA 遺伝子のメタゲノム解析のため, 16S rRNA 遺伝子をユニバーサルプライマー 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 519B (5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3') にて PCR を行い, ライブラリーとした (Fig.1)。このライブラリーを GS Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche applied Science) を用いてサンプルの調整と精製をした後, ミニフルオロメーター TBS-380 (Promega) を用いて DNA 量を定量した。7 種類のライブラリーを GS Junior 1 回のシーケンスランで解析するため, 各ライブラリーを等量ずつ混合し, GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L) (Roche applied Science) でエマルジョン PCR を行った。GS Junior でのシーケンスランはオペレーションソフトウェアの Signal Processing (ベースコール) を Shotgun に設定して実施した。シーケンスデータ ファイルはライブラリーごとにデータを分離し, データの解析は 16S 解析パイプライン (東京大学服部正平研究室で開発された解析ツール) によって解析した。各ライブラリーのリード数は約 2300 ~ 15000 であった。

## 【結果】

### 1. 研究に用いた味噌の特性

市販の 10 種の味噌に含まれる細菌数や真菌数を調べた (表 1)。製品間で細菌数では 1mg 当たり  $2.0 \times 10^3 \sim 1500 \times 10^3$  と 750 倍の, 真菌数では  $0.1 \times 10^6 \sim 37 \times 10^6$  と 370 倍もの差が認められた。サンプル B のように細菌数は少ないが真菌数は多いものやサンプル E, G のようにどちらも多いものなど, 両者の数に一定の傾向はなかった。サンプル G は白味噌で, 塩分濃度が他の味噌よりかなり低く, 細菌数, 真菌数とも最も多い値であった。

以降のマウスの実験には細菌数, 真菌数とも

表 2. 味噌 A に存在する細菌の次世代シーケンサーによる解析

菌 種	コピー数 <sup>a)</sup>	割合 (%) <sup>b)</sup>
<i>Staphylococcus</i> sp. CNJ924 PL04	685	28.7
<i>Leuconostoc citreum</i>	393	16.5
<i>Weissella confuse</i>	393	16.5
<i>Enterococcus faecium</i>	242	10.2
<i>Tetragenococcus muriaticus</i>	149	6.2
<i>Staphylococcus</i> sp. SW80	108	4.5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	101	4.2
<i>Kocuria kristinae</i>	75	3.1
<i>Lactococcus</i> sp. M3T8B4	66	2.8

<sup>a)</sup> 2,387コピーの細菌由来PCR産物のシーケンスを解析した結果。

<sup>b)</sup> 菌由来のPCR産物中に占める割合。

少ないサンプル A を用いた。この味噌については次世代シーケンサーを用いて味噌に含まれる細菌種の同定を行った (表 2)。2.4 % の食塩を含む味噌の中で増える菌であるため、耐塩性を

持つ *Staphylococcus* 属や塩分の多い漬物の発酵に寄与する乳酸菌 (*Leuconostoc* 属や *Weissella* 属, *Enterococcus* 属, *Tetragenococcus* 属, *Lactococcus* 属) が主要な菌種として同定された。

## 2. 味噌摂取によるマウス腸内細菌叢の変化

1] t-RFLP による解析: マウスの腸内細菌叢は個体差が大きく、味噌を飲ませる前からかなり違ったパターンが見られた (Data no shown)。また、コントロールとして水のみを飲ませた群でも菌叢のパターンは安定せずに変動していた (Fig.3)。そのため、味噌を飲ませた群の変化の意義を t-RFLP 法だけで判定することは困難であった。

2] 次世代シーケンスによる解析: 次に飲水群と味噌群の中からそれぞれ 1 匹のマウスについて菌叢の変化を次世代シーケンサーで解

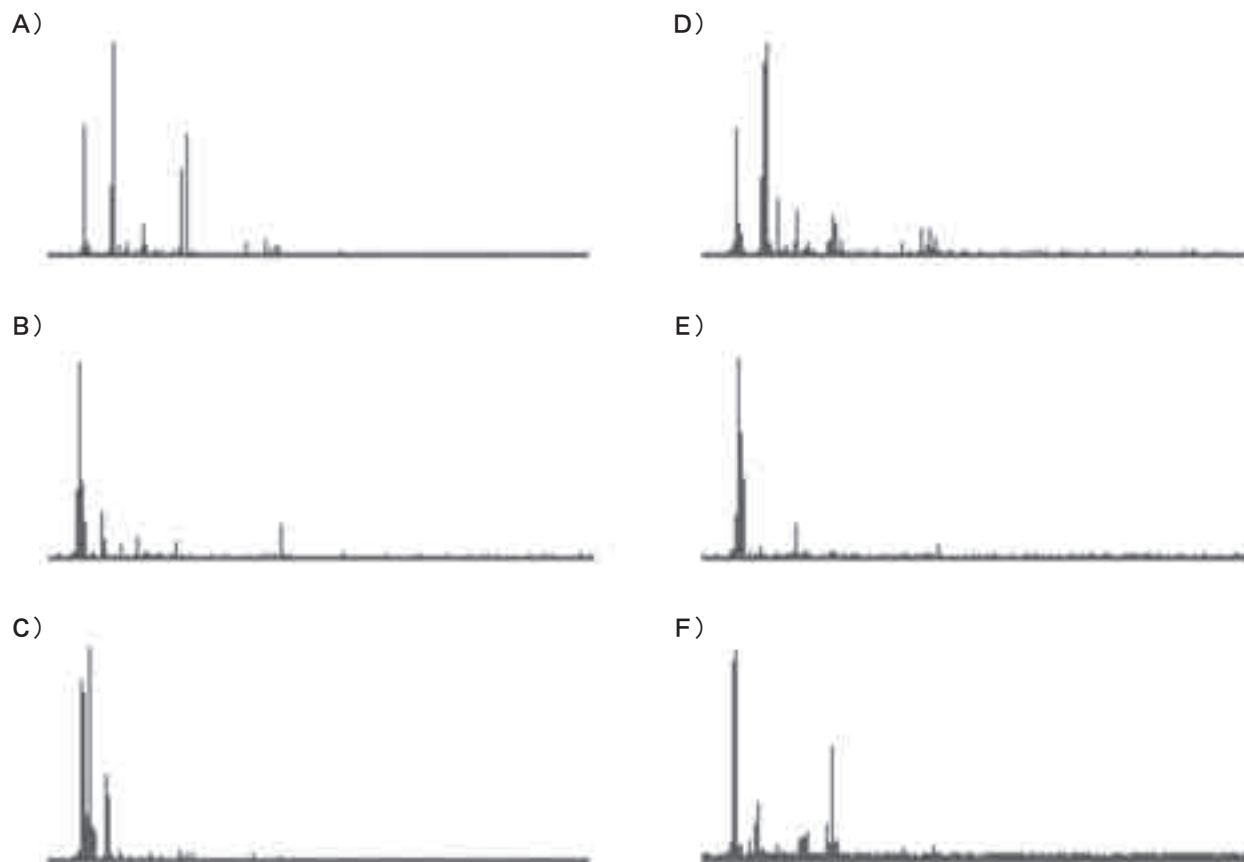


Fig. 3 マウスの腸内細菌叢のt-RFLP解析

水 (A-C) あるいは味噌汁 (D-F) を飲ませたマウスの腸内細菌叢の変化を t-RFLP で解析した結果。実験開始前 (A, D), 3日間コントロールとして水あるいは味噌汁を飲ませた後 (B, E), その後、水のみを4日間飲ませた後 (C, F) の便を採取して解析した。

析した(表3)。その結果、コントロール群では実験前有意であった *Bacteroides* が観察期間後には *Mucispirillum schaedleri* に変化していた。一方、味噌摂取群では Gram-negative bacterium cTPY-13 有意で *Lactobacillus* 属が 11%程度であった菌叢が、味噌の摂取により菌叢全体のおよそ 65%を *Lactobacillus* が占める菌叢に変化し、味噌の摂取を終了した後には乳酸菌が少ない菌叢となっていた。

### 【考察】

本研究では、t-RFLP を用いてマウスの腸内細菌叢に与える味噌の効果解析する予定であった。しかし、マウスの菌叢が個体間でかなり異なっていること、1個体内でも変動し、安定しないことから t-RFLP で簡便に解析することが不可能であることが分かった。そこで次世代シーケンサーによる解析に変更した。

限られた数のマウスの実験結果ではあるが、味噌を摂取したマウスの腸内細菌叢が乳酸菌有意に

なっていたことは非常に興味深い結果である。本研究でマウスに摂食させた味噌の量をヒトに換算すると1日2杯の味噌汁摂取に相当する。この程度の量でマウスの腸内細菌叢が乳酸菌有意な菌叢に変化した事実はプレバイオティクスとしての効果が味噌に期待できることを示すものである。今回用いた味噌は出荷時に加熱処理し、細菌や真菌を殺菌した製品である。従って、この効果は生きた菌が菌叢を変化させたものではなく(プロバイオティクス)、味噌に含まれる成分がマウスの菌叢に変化をもたらしたものである。事実、味噌に存在する菌種(表2)はマウスの便から検出されなかった(表3)。腸内の乳酸菌を増加させる因子としてオリゴ糖がよく知られている。味噌の作用が味噌に含まれているオリゴ糖によるものか、菌体由来の成分か、あるいはオリゴ糖以外の大豆由来の成分かは興味深い問題で、今後明らかにしなければならない。その解決策の一つとして、発酵の度合い(期間)が異なる味噌の比較や“火入れ”していない、生きた菌が入っている味噌との比較検討は有用な情報を与えてくれるものと予想される。今後、マウスの個体数や系統数を増やし、

表3. 次世代シーケンサーによる味噌汁摂取による腸内細菌叢の変化

A) 水摂取群, 摂取前		B) 水摂取群, 摂取直後		C) 水摂取群, 4日水摂取後	
菌種	割合(%) <sup>a)</sup>	菌種	割合(%)	菌種	割合(%)
<i>Bacteroides</i> sp. ASF519	16.6	<i>Mucispirillum schaedleri</i>	19.7	Gram-negative bacterium cTPY-13	46.0
Gram-negative bacterium cTPY-13	14.9	<i>Lactobacillus murinus</i>	15.5	<i>Bacteroides caccae</i>	6.1
<i>Bacteroides caccae</i>	12.9	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	13.4	<i>Parasutterella excrementihominis</i>	5.2
Gram-negative bacterium cL10-2b-4	10.9	<i>Staphylococcus lentus</i>	11.2	Gram-negative bacterium cL10-2b-4	3.2
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	10.3	Gram-negative bacterium cTPY-13	7.1	<i>Bacteroides</i> sp. ASF519	2.6
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	7.5	<i>Lactobacillus reuteri</i>	3.4	Butyrate-producing bacterium L1-93	1.7
<i>Bacterium</i> YE61	6.5	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	3.0	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	1.6
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2.8	<i>Bacteroides caccae</i>	2.8	Lachnospiraceae bacterium DJF VP30	1.6
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	2.1	Gram-negative bacterium cL10-2b-4	2.8	Rumen bacterium NK4A179	1.3

D) 味噌摂取群, 摂取前		E) 味噌摂取群, 摂取直後		F) 味噌摂取群, 4日水摂取後	
菌種	割合(%)	菌種	割合(%)	菌種	割合(%)
Gram-negative bacterium cTPY-13	32.5	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	33.3	<i>Clostridium phytofermentans</i>	12.3
<i>Bacteroides</i> sp. ASF519	16.2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	16.8	Gram-negative bacterium cL10-2b-4	9.3
Gram-negative bacterium cL10-2b-4	10.3	Gram-negative bacterium cTPY-13	7.2	Lachnospiraceae bacterium 28-4	7.3
<i>Bacteroides caccae</i>	5.5	<i>Lactobacillus murinus</i>	6.3	<i>Clostridium scidens</i>	6.3
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	5.5	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	6.1	<i>Mucispirillum schaedleri</i>	5.9
<i>Bacteroides barnesi</i>	4.0	Lachnospiraceae bacterium A4	2.2	Lachnospiraceae bacterium DJF VP30	5.3
<i>Lactobacillus reuteri</i>	3.3	<i>Clostridium phytofermentans</i>	1.8	Lachnospiraceae bacterium A4	2.4
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	2.5	Gram-negative bacterium cL10-2b-4	1.6	Rumen bacterium NK2B42	1.9
Bacillales bacterium T75	1.5	<i>Bacteroides</i> sp. ASF519	1.2	Butyrate-producing bacterium M62/1	1.5

<sup>a)</sup> 解析したDNA断片数はそれぞれ以下のとおり。A) 7,589 B) 8,049 C) 13,081 D) 14,894 E) 13,178 F) 2,373

上記の検討を進める予定である。

本研究でマウスの腸内真菌叢についても解析したが、大半のマウスの腸内の真菌数は real-time PCR の検出感度以下であったため、今回の解析からは除外した。しかし、味噌の中には圧倒的に多数の真菌が存在する（表 1）。従って、加熱処理していない味噌が真菌叢や免疫に与える影響も考えられ、今後検討する必要がある。

#### 【参考文献】

- 1) Arumugam M, Raes J, Pelletier E et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473; 174-180, 2011.
- 2) Kunisawa J and Kiyano H. *Alcaligenes* is commensal bacteria habituating in the gut-associated lymphoid tissue for the regulation of intestinal IgA responses. *Front Immunol* 3: 65, 2012.
- 3) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yasunenkov T et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480-484, 2009.



# 慢性拘束ストレス負荷による海馬機能低下に対する味噌摂取による改善効果

瀬尾 誠, 村越 隆之

Miso ingestion improves Chronic Restraint Stress-induced hippocampus dysfunction

Makoto SEO, Takayuki MURAKOSHI

*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Saitama Medical University,  
38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan*

## 【緒言】

神経細胞は、様々な外的要因で変動することが知られており、学習や運動により神経細胞新生が増加する一方で、慢性的なストレス環境下では、大脳辺縁系の海馬神経細胞の変性や神経細胞新生の減少<sup>1),2)</sup>などにより脳機能が低下することで、鬱状態や統合失調症など精神疾患発症の引き金となることが指摘されている。物理的・身体的ストレスや心理的ストレスを受けると、視床下部—脳下垂体—副腎皮質系 (hypothalamo-pituitary-adrenal axis: HPA 系) が活性化され、副腎皮質ホルモンが放出されるのであるが、副腎皮質ホルモンの過剰分泌により、海馬の神経細胞の変性が認められることも知られている。よって、慢性的ストレス負荷や副腎皮質ホルモンの過剰分泌は、海馬の形態的・機能的変化をもたらす、学習・記憶に対して悪影響をおよぼすと考えられている<sup>3)</sup>。

生体に有益な生理機能を数多くもたらす食品の代表である大豆の摂取により、学習・記憶促進作

用や神経細胞新生の増加<sup>4)</sup>、さらに小胞体ストレスによる神経変性疾患の抑制効果<sup>5)</sup>が報告されているが、味噌摂取による精神的ストレスに対する効果の検証はこれまで行われていない。

本研究課題では、マウスに慢性拘束ストレス負荷した際の脳機能の低下、特に海馬の形態的・機能的変化に対し、味噌摂取による改善効果が認められるか否かの検証を行った。

## 【方法】

### 1) 味噌サンプルの調製

中央味噌研究所より提供して頂いた産地や原材料の異なる 10 種類の味噌を 18.75g 秤量して、30mL の蒸留水で溶いた後、90°C で 5 分間加熱処理した。室温で 3,000rpm, 5 分間遠心分離したのち、濾過して得た上清を各味噌サンプル溶液とした。一回の飲水交換に使用する分量で小分けにして、-80°C にて保存した。

## 2) マウスへの慢性拘束ストレス負荷実験

動物実験は、埼玉医科大学動物実験委員会の審査、承認を得た実験計画を遵守して遂行した。

ヒトが一日一杯の味噌汁を摂取した際に含まれる味噌量 (15g) と同等になるように、マウスが一日あたりに摂取する平均飲水量から換算し、味噌サンプル溶液を飲水中に添加して4週間の味噌サンプルの前投与を行った。飲水交換は1日おきに行い、飲水量を記録した。

続いて、小動物用採血ホルダーを用いて、マウスに一日当たり3時間の身体的拘束を3週間連日にわたり行った。なお、拘束ストレス負荷期間中も味噌サンプル溶液の摂取を継続して行った。また、試験期間中は、1週間ごとに体重を計測した。

試験期間最終日前日の拘束ストレス負荷前に、各マウスの眼窩静脈叢より採血を行った。遠心分離して得た血清は、血清中コルチコステロン濃度の測定まで、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

翌日、エーテル麻酔したマウスを脱血処置後、脳、副腎および胸腺を採取した。脳は、一部を4%パラホルムアルデヒド溶液中で固定し、OTCコンパウンドに包埋後、凍結組織切片を作成して、免疫組織染色により後述の各タンパク質の検出を行った。残りの脳は、タンパク質抽出用として $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。副腎および胸腺は、湿臓器重量を測定した。

## 3) 血清中コルチコステロン濃度の測定およびグルココルチコイド受容体発現量の検討

慢性拘束ストレス負荷により過剰分泌するストレスマーカーである、血清中コルチコステロン濃度をCorticosterone EIAキット (Cayman社) を用いて測定した。

次に、脳組織をホモジナイズした後、核タンパク質を抽出し、10% アクリルアミドゲルにて電気泳動した。PVDF膜に転写後、グルココルチコイド受容体 (GR) をウェスタンブロットにて検出した。

さらに、前述 2) で作成した脳の凍結組織切片を用いて、GR をVectastain ABCキット (Vector社) を用いて免疫組織染色により検出した。

## 4) 海馬における神経系細胞の局在変化の検討

前述 2) で作成した脳の凍結組織切片を用いて、神経細胞のマーカータンパク質である  $\beta$ -III Tubulin およびアストロサイトのマーカータンパク質である Glial fibrillary acidic protein (GFAP) の各蛍光色素標識抗体を用いて免疫組織染色により検出した。

## 5) 海馬における神経栄養因子の局在および発現量の検討

前述 2), 3) で作成した脳の凍結組織切片および脳組織のホモジネートを用いて、神経栄養因子である Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) および Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) をウェスタンブロットおよび各蛍光色素標識抗体を用いて免疫組織染色によりそれぞれ検出した。

## 【結果】

### 1) 体重および臓器重量変化に対する味噌の効果

水道水を摂取した拘束ストレス負荷群では、拘束ストレス負荷により、顕著な体重減少と副腎重量の増加および胸腺の萎縮が観察された。それに対し、10種類の各味噌サンプル溶液を摂取した拘束ストレス負荷群では、体重の減少率を顕著に抑制する味噌が4種類あることを見出した (図1 A)。

しかし、副腎重量の増加および胸腺の萎縮を改善した味噌はなかった (図1 B, 1 C)。

### 2) 血清中コルチコステロン濃度および GR 発現量変化に対する味噌の効果

血清中コルチコステロン濃度は、拘束ストレス負荷により顕著に増加した。それに対し、2種類の味噌摂取群では、コルチコステロン濃度の増加が顕著に抑制された (図2)。

GRは、海馬では通常 CA1 や歯状回 (DG) に多く発現しているのであるが、拘束ストレス負荷により DG での発現量が顕著に減少した。それに対し、複数の味噌摂取群では、CA1, DG だけ

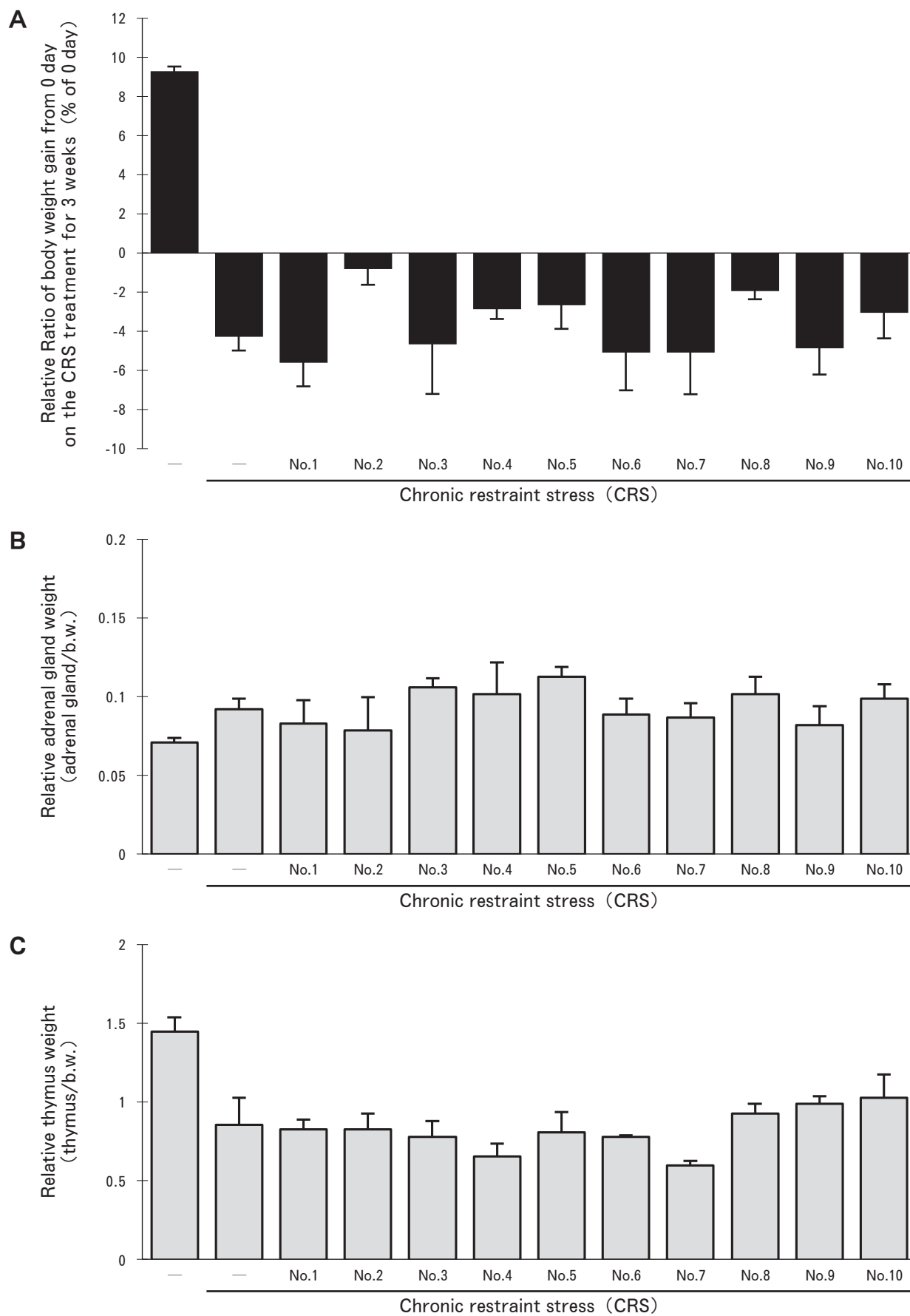


図1. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による体重増加率の変化および臓器重量の変化

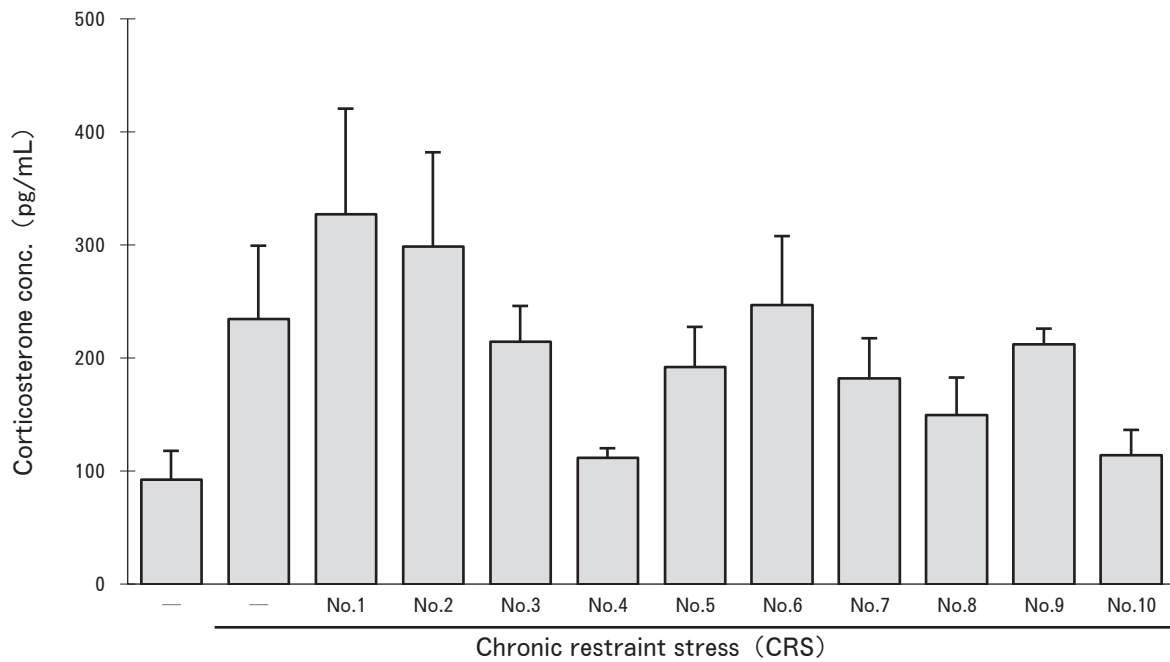


図2. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による血清中コルチコステロン濃度の変化

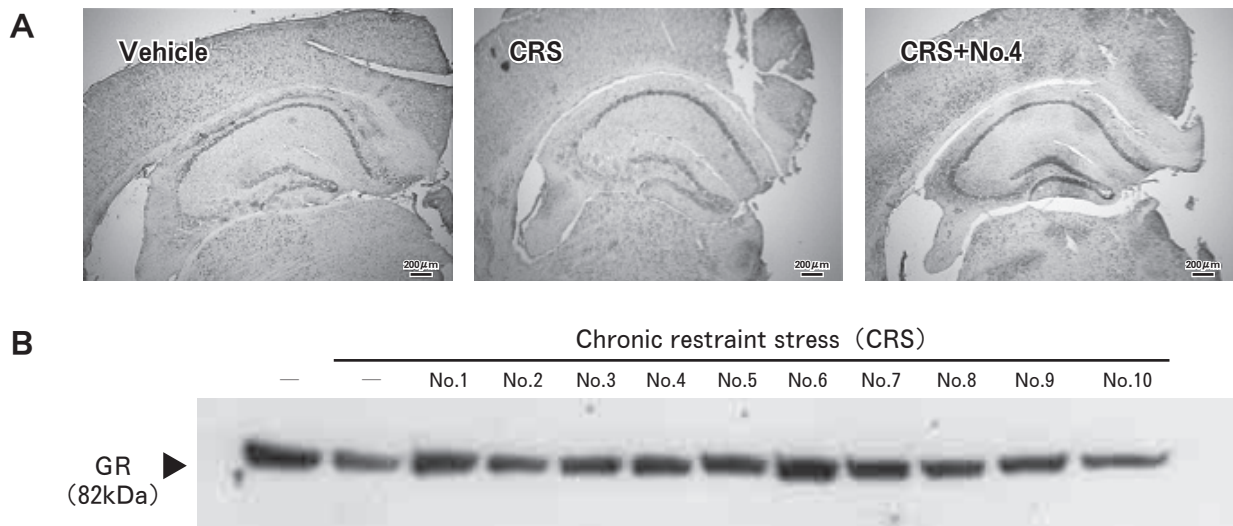


図3. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取によるGRの局在および発現変化

でなく CA3 にも GR 陽性細胞が認められた (図 3 A)。

また、核内の GR レベルも味噌摂取群において正常マウスと同程度に維持されていた (図 3 B)。

### 3) 海馬における神経系細胞の局在変化に対する味噌の効果

神経細胞の特異的マーカータンパク質である  $\beta$

-III Tubulin およびアストロサイトの特異的マーカータンパク質である GFAP を免疫組織染色したところ、拘束ストレス負荷により神経細胞およびアストロサイトの数的減少および神経突起の退縮が認められた。それに対し、数種の味噌摂取群において、特に CA3 および DG の顆粒細胞層付近における神経細胞およびアストロサイトの増加、また神経突起の伸長の回復が認められた (図 4 ~ 図 6)。

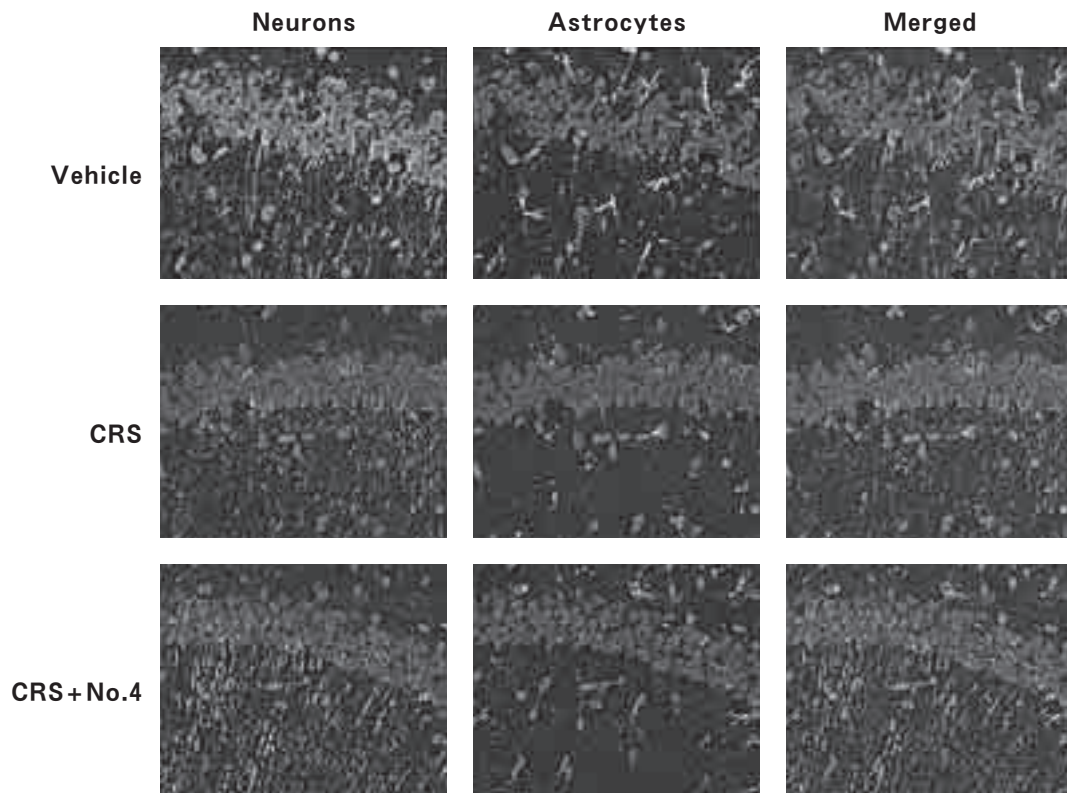


図4. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による海馬CA1における神経細胞およびアストロサイトの局在変化  
 神経細胞は $\beta$ -III tubulin, アストロサイトはGFAPをそれぞれ免疫組織染色して検出した。海馬CA1領域に帯状に並んで見えているのは、DAPIによる核の染色像である。

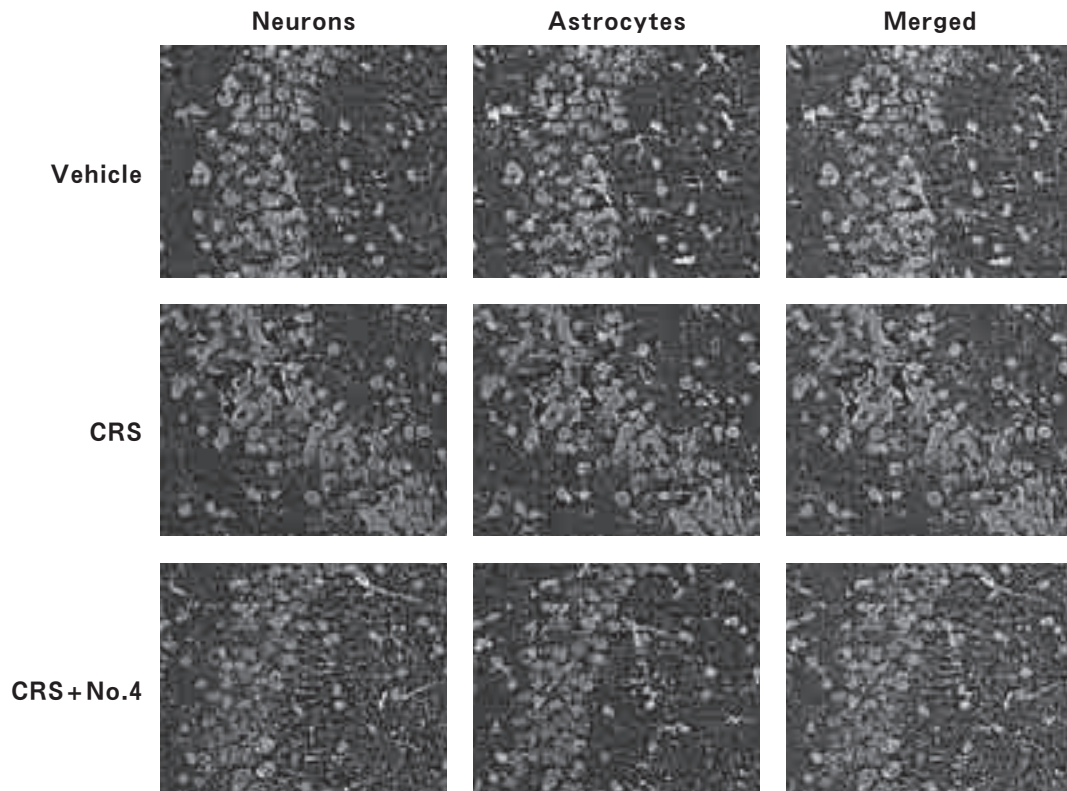


図5. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による海馬CA3における神経細胞およびアストロサイトの局在変化  
 神経細胞は $\beta$ -III tubulin, アストロサイトはGFAPをそれぞれ免疫組織染色して検出した。海馬CA3領域に帯状に並んで見えているのは、DAPIによる核の染色像である。

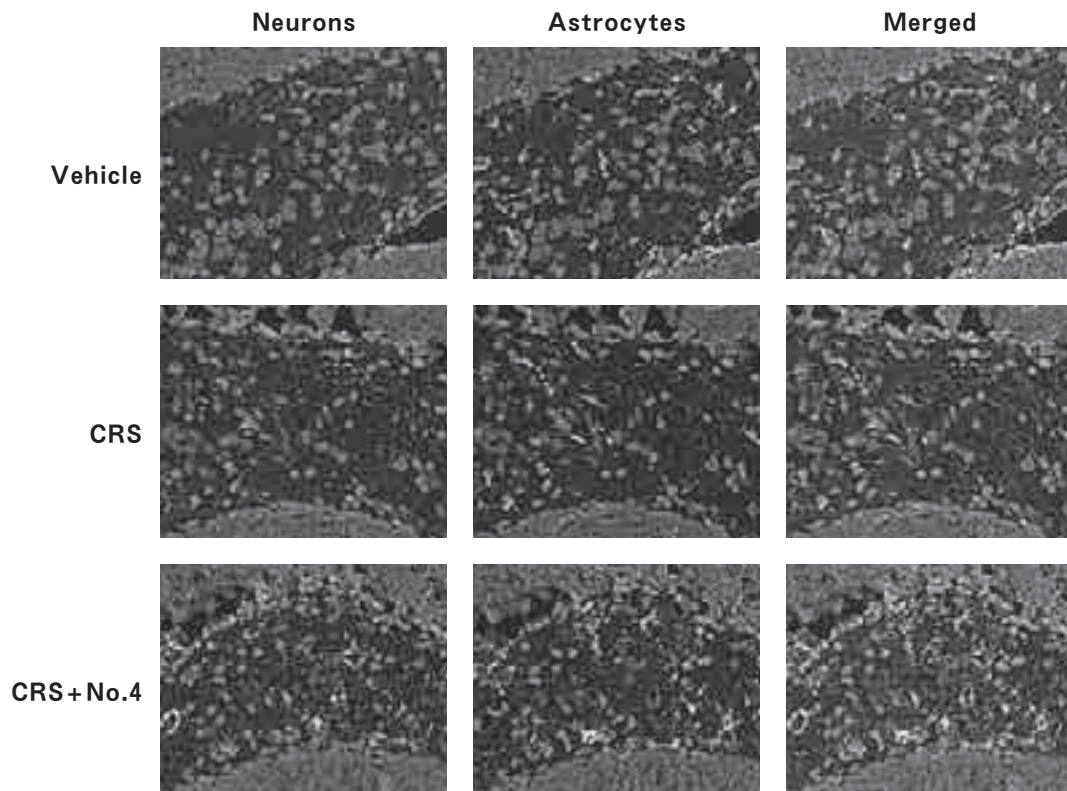


図6. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による海馬 DG における神経細胞およびアストロサイトの局在変化  
 神経細胞は  $\beta$ -III tubulin, アストロサイトは GFAP をそれぞれ免疫組織染色して検出した。海馬 DG 領域に帯状に並んで見えているのは、DAPI による核の染色像である。

#### 4) 海馬における神経栄養因子の局在および発現量変化に対する味噌の効果

神経栄養因子である BDNF および GDNF は、海馬では通常 CA3 および DG に多く発現しているのであるが、拘束ストレス負荷により BDNF の発現量が減少した。それに対し、複数の味噌摂取群において、BDNF 発現量の回復および GDNF 発現量の増加が認められた (図 7 A, 7 B)。

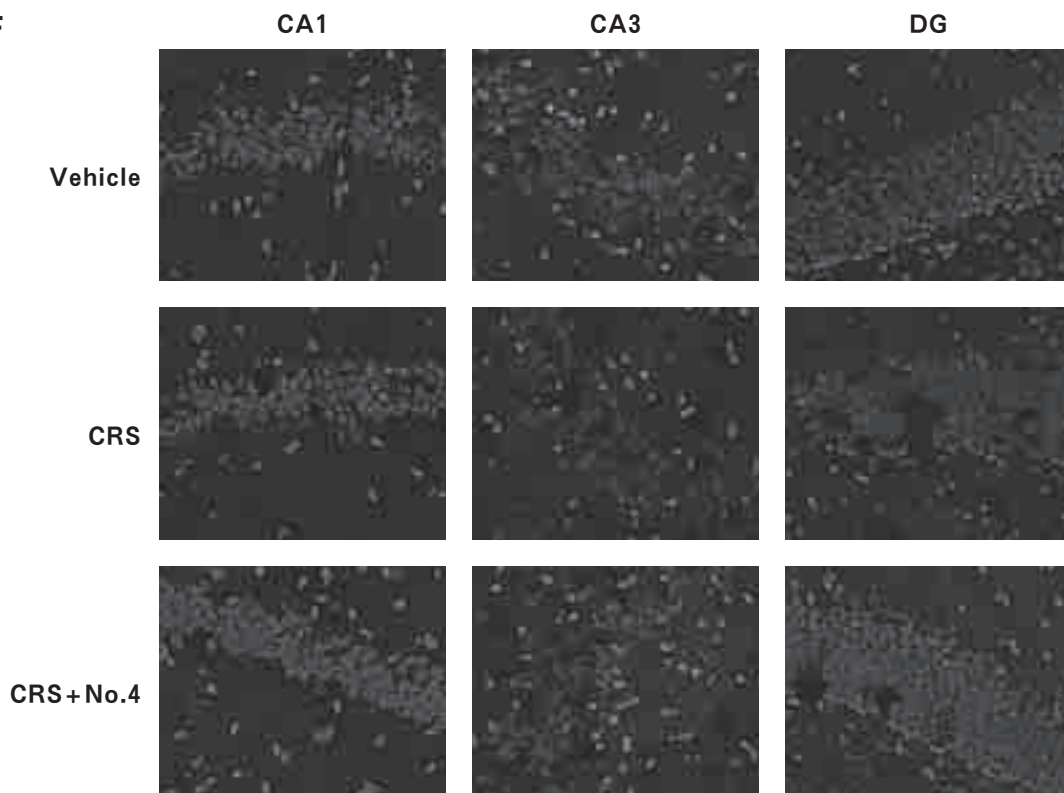
また、味噌摂取により、脳組織における BDNF および GDNF 産生量も同様な傾向を示した (図 7 C)。

#### 【考察】

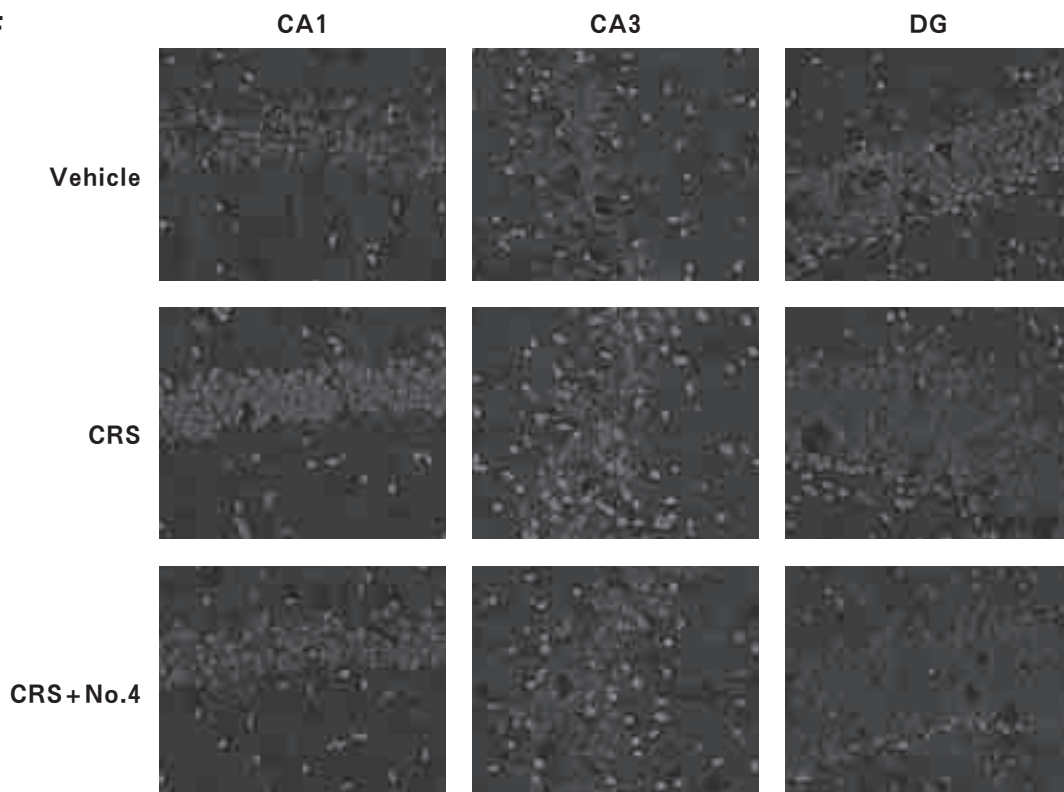
本研究において、日常的に味噌を摂取することで、強いストレス環境下に曝された際のストレスが軽減されるだけでなく、脳、特に海馬において

神経栄養因子の発現を増加させ、神経細胞およびアストロサイトを正常に維持することで脳機能低下を改善する効果があることを示唆する成果を得ることができた。

現代社会は、ライフイベントや職場ストレスなど状況因子が関与する精神的ストレス負荷に曝される機会が多く、鬱病や統合失調症などの精神疾患の罹患率は、今後もさらに増加していくものと考えられる。脳の高次機能に関しては、未だ解明されていない事象が多く、鬱病や統合失調症発症機序などの詳細なメカニズムなども不明な点が多いのが現状であるが、慢性拘束ストレスモデルに関しては、HPA 系の活性化が主軸となることが知られており、ストレスモデル実験として確立された実験方法である。よって、本研究課題では、マウスを用いた慢性拘束ストレス負荷実験を行った。

**A : BDNF****図7 A. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による神経栄養因子の局在変化**

帯状に並んでいるのは、海馬の各領域の細胞の核をDAPIにより染色したものである。それらの周辺に散在している小さな粒子が、BDNFを免疫染色したものである。

**B : GDNF****図7 B. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による神経栄養因子の局在変化**

帯状に並んでいるのは、海馬の各領域の細胞の核をDAPIにより染色したものである。それらの周辺に散在している小さな粒子が、GDNFを免疫染色したものである。

C

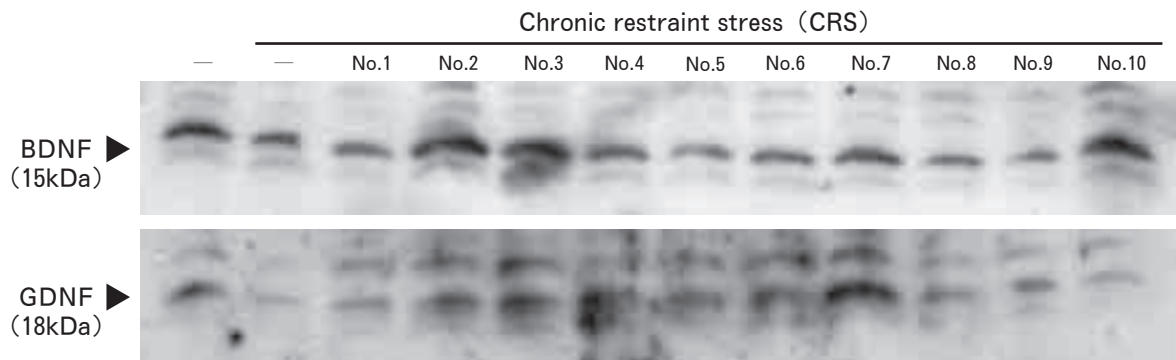


図7C. 慢性拘束ストレス負荷および味噌摂取による各神経栄養因子の発現変化

生体が様々なストレスに直面した際に、物理/化学的ストレスおよび精神的ストレスに共通する症状として、副腎重量の増加や胸腺の萎縮が生じることが知られている<sup>6)</sup>。本研究では、拘束ストレス負荷による顕著な体重減少が、4種類の各味噌を摂取するにより、体重の減少率が軽減することを明らかにした。

ストレスに対する生体応答としては、HPA系の活性化を介して血中にコルチコステロンが放出され、コルチコステロンが海馬のGRと結合すると、ストレス応答の休止シグナルを視床下部に伝達して一連のストレス応答が終了することで恒常性（ホメオスタシス）が維持される。しかし、慢性拘束ストレス負荷により海馬のGRが減少することにより、視床下部に休止シグナルを伝達できなくなることで、コルチコステロンが放出され続けて、ストレス状態が長期化すると同時に、海馬自体の神経突起が萎縮・消失することで、脳がストレスに対して脆弱になると言われている。本研究では、慢性拘束ストレス環境下においても味噌を摂取することで、血清中コルチコステロン濃度を減少させたものを2種類見出すことができた。本結果は、前述の体重減少を抑制した味噌とも相関関係があった。また、味噌摂取により、海馬のGR発現状態および核内移行も上昇していたことから、ストレスに対する生体のホメオスタシスが維持されている可能性が示唆された。

神経幹細胞は、発生期の脳において全ての神経

細胞およびグリア細胞を生成するだけでなく、成体の脳においても存在し、げっ歯類においては海馬や嗅球のようなneurogenic regionと呼ばれる領域に新生神経細胞が供給されている。海馬では、DGの顆粒細胞層と門部の間の下顆粒細胞層で神経細胞新生が見られ、神経幹細胞が存在すると考えられている。神経細胞に分化した神経幹細胞は、軸索をCA3領域にある錐体細胞とシナプスを形成し、軸索伸長とともに嗅内皮質より入力を受けるようになる。

本研究では、慢性拘束ストレスの負荷により、海馬のCA1, CA3, DGにおいて神経細胞およびアストロサイト数の減少が認められたが、各領域、特にCA3およびDGにおいて、神経細胞またはアストロサイト数が正常状態と同程度以上に存在する味噌が数種類あることを見出すことができた。前述のように神経幹細胞は、おもにDG領域に存在して神経細胞およびアストロサイトに分化していくことから、味噌の摂取は、神経幹細胞の維持および分化促進に寄与している可能性が示唆された。

BDNFは、海馬や大脳皮質など中枢神経系に広範囲に分布する神経栄養因子で、神経系の成長、機能維持や可塑性など重要な役割を担っていることが知られている。海馬でのBDNF産生に対し、グルココルチコイドは抑制因子となり<sup>7), 8)</sup>、BDNF発現量が減少することで、神経突起のスパイン数やシナプス数も減少して、前頭前野背外側部-内側前頭葉-扁桃体-海馬などの神経



ネットワーク機能が変化し、鬱病発症につながると推測されている<sup>9)</sup>。また、鬱病では、BDNF や GDNF の産生が低下しており、抗鬱薬によりこれらの産生が増強することが報告されている<sup>10),11)</sup>。

本研究では、数種類の味噌において、慢性拘束ストレス負荷により減少した BDNF および GDNF の産生量および局在を、正常状態まで回復させるものがあることを見出した。味噌を摂取しても、血清中コルチコステロン濃度は正常状態よりも高値なのではあるが、BDNF および GDNF 産生量は、正常状態と同程度以上に維持されたことから、味噌の摂取は、GR を介したストレス応答に対するホメオスタシスの維持だけでなく、神経栄養因子の産生を維持し、神経幹細胞の分化にも寄与している可能性が示唆された。

本研究では、ヒトが一日一杯の味噌汁を摂取した際の味噌量を換算し、マウスに飲水摂取させていることから、日常的な味噌汁の摂取が、日々のストレスを緩和するだけにとどまらず、ストレス負荷による脳機能低下に対する保護作用を有することを強く示唆する成果を得ることができた。また、本研究では、10 種類の味噌を用いて海馬機能低下に対する改善効果を検証したのであるが、味噌は原材料や発酵過程、さらに産地の気候などによって、それぞれ改善効果の程度が異なっていた。今回マウスに摂取させた味噌サンプルは、クルードなサンプルであったことから、今後、特に顕著な改善効果を示した No.4 や No.10 の味噌に含まれる生理活性成分の探索・同定を行っていきたいと考えている。

#### 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、味噌サンプルのご提供ならびに本研究のご支援・ご協力頂きました一般社団法人中央味噌研究所 赤羽総一郎理事長、中野京子常任理事を始め、各関係者の方々に深謝申し上げます。

#### 【引用文献】

- 1) Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.*, 588, 341-345, 1992.
- 2) Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 879-886, 2003.
- 3) Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.*, 114, 1840-1851, 2010.
- 4) File SE, Duffy R, Wiseman H. Soya improves human memory. *Soy & Health 2002, Clinical Evidence-Dietetic Applications*, Descheemaeker K and Debruyne I eds., Garant, Belgium, pp. 167-173, 2002.
- 5) Kataoka-Kato A, Ukai M, Sakai M, Kudo S, Kameyama T. Enhanced learning of normal adult rodents by repeated oral administration of soybean transphosphatidylated phosphatidylserine. *J. Pharmacol. Sci.*, 98, 307-314, 2005.
- 6) Selye H. Asyndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138, 32, 1936.
- 7) Schaaf MJ, de Jong J, de Kloet ER, Vreugdenhil E. Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Res.*, 813, 112-120, 1998.
- 8) Hansson AC, Sommer W, Rimondini R, Andbjør B, Strömberg I, Fuxe K. c-fos reduces corticosterone-mediated effects on neurotrophic factor expression in the rat hippocampal CA1 region. *J. Neurosci.*, 23, 6013-6022, 2003.

- 9) Manji HK, Drevets WC, Chamey DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat. Med.*, 7, 541-547, 2001.
- 10) Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.*, 15, 7539-7547, 1995.
- 11) Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol. Psychiatry.*, 54, 70-75, 2003.

## 血圧降下作用強化を目指した機能性味噌の開発

高橋砂織, 佐々木康子, 小笠原博信, 渡辺隆幸

Development of anti-hypertensive functional miso

Saori TAKAHASHI, Koko SASAKI, Hironobu OGASAWARA, and Takayuki WATANABE

*Akita Research Institute of Food and Brewing,  
4-26, Sanuki Arayamachi, Akita 010-1623, Japan*

### 要旨

レニン・アンギオテンシン系 (RAS) は哺乳類において最も重要な血圧調節機構である。我々は、味噌に初めてレニン阻害活性を見出し、原材料の大豆からレニン阻害物質としてソヤサポニン I を同定した。今回、RAS を構成するレニン以外の律速酵素としてキマーゼやアンギオテンシン変換酵素 (ACE) にも注目してこれら酵素の新規測定法の開発を行うとともに各種味噌抽出液のレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性を検討した。さらに、丸大豆と脱皮大豆について性質の異なる麹菌を用いて味噌の仕込みを行い、RAS 系酵素類を阻害する活性を評価した。その結果、味噌抽出物はいずれもレニン、キマーゼや ACE 活性を阻害することが示され、味噌には普遍的に RSA 酵素群を阻害する物質が含まれていることが明らかとなった。これらの味噌試料における各種酵素活性阻害の相関を解析したところ、レニン阻害活性とキマーゼ阻害活性に高い相関が認められた。しかしながら、ACE 阻害活性とレニン阻害活性や ACE 阻害活性とキマーゼ阻害活性には相関関係が認められなかった。

丸大豆及と脱皮大豆とを原料として3種類の麹菌を用いて試験醸造した味噌の各種酵素阻害活性を検討した。その結果、レニン阻害活性に関しては、丸大豆を用いた場合味噌用麹と WS61 株で、醸造期間が長くなるにつれて阻害が減少する傾向が見られた。AOK139 株では、一過性に阻害が上昇する傾向があった。一方、脱皮大豆を用いた場合に味噌用麹と AOK139 株の場合醸造期間中に阻害活性に大きな変化は認められなかった。しかしながら、WS61 株の場合、レニン阻害活性は1ヶ月目で減少傾向があり、2ヶ月目では増加が観察された。また、キマーゼ阻害活性に関しては、丸大豆と脱皮大豆を用い異なる麹菌を用いた場合、全体的に醸造期間にしたがって阻害が減少する傾向が見られた。しかしながら、WS61 株を用いた場合には1ヶ月目には減少傾向が見られたが、レニン阻害活性の場合と同様に2ヶ月目で阻害の増加が観察された。ACE 阻害活性に関しては、丸大豆及び脱皮大豆を用いた場合のいずれの場合においても麹菌の種類に関わらず熟成が進むにつれて阻害が強くなることが示された。

以上より、脱皮大豆を用いた種麹菌として WS61 株を用いることで、レニン、キマーゼ及び

ACE 阻害活性の強化した味噌の開発が可能と考えられた。

## 緒言

血圧は様々な要因でコントロールされている。その中で、レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system, RAS) は最も解析が進んでいる血圧制御系である。レニンは非常に特性の高いアスパルティックプロテアーゼであり、腎臓の傍糸球体細胞中のレニン顆粒内に貯蔵されている。顆粒内のレニンは、様々な刺激で血中に放出されることで本血圧調節系が作動する。すなわち、血中に放出されたレニンは糖タンパク質であるアンジオテンノーゲンに作用して N 末端 10 番目と 11 番目の結合を特異的に加水分解し、10 残基のアミノ酸からなるアンジオテンシン I (AI) を遊離させる。AI は不活性ペプチドで、血中のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) により N 末端 2 残基が切除されアンジオテンシン II (AII) となり、生理作用を発揮する。AII は直接血管に作用して血管収縮を引き起こすほか、副腎からのアルドステロンの分泌を促進し、ナトリウム貯留を介して血圧を上昇させる (図 1)。一方、ACE 以外にも肥満細胞から分泌されるキモトリプシン様セリンプロテアーゼであるキマーゼが AII 生成

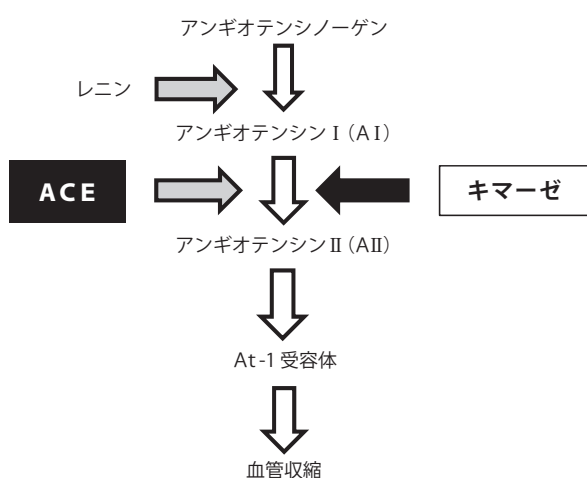


図 1. レニン・アンジオテンシン系による血圧調節機構

に関与することが知られている [1, 2] (図 1)。

これまで、RAS の制御を目指して様々な食材から ACE 阻害物質の探索が行われて来た。その結果、ACE 阻害ペプチド等を含む血圧が高めの方用の特定保健用食品が数多く開発されている。最近、我々は RAS の律速酵素として要の役割を持っているレニンに注目して食物由来阻害物質の探索を進めて来た。レニンは入手が困難で活性測定も煩雑なことから、これまで阻害物質の探索研究は殆ど行われていなかった。私どもは、組換え型ヒト型レニンを大腸菌や昆虫細胞を用いて発現するとともに、ヒトレニン活性測定用の蛍光消光基質を開発した [3-5]。これらを用いて各種食材よりレニン阻害物質を探索した結果、最初に味噌にレニン阻害活性を見出した [3]。検討を重ねた結果、味噌のレニン阻害活性は大豆由来であることを明らかとし、大豆胚軸からレニン阻害物質を初めて単離し、その構造をソヤサポニン I と同定した。さらに各種サポニン類を用いた解析によりサポゲノールの 3 位にグルクロン酸が結合したいわゆるグルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることを明らかとした [5, 6]。また、大豆以外の雑豆類、米、雑穀や山菜などにもレニン阻害物質の存在することを明らかとしている [7-10]。

一方、平成 22 年～ 23 年度の中央味噌研究所助成によりレニン阻害活性を強化した味噌の開発を進めた。その結果、胚軸を配合した味噌は通常の味噌に比べ約 2 倍レニン阻害活性の高いことが示された [11]。これらの成果を基に、本研究では RAS 関連酵素の中で全く阻害物質の探索が行われて来なかったキマーゼに焦点を当てるとともに、新たに開発した新規 ACE 基質を用いて ACE 阻害活性にも注目し、全国の市販味噌中に含まれるこれら酵素の阻害活性を検討した。さらに、丸大豆や脱皮大豆を原材料として各種麹菌による味噌の試験醸造を行い、RAS 関連酵素阻害物質の挙動について検討した。

## 実験方法

### • 味噌の入手

実験に供した平成 22 年度市販味噌 73 点と全国味噌鑑評会優秀見本味噌 7 点は中央味噌研究所より供与された。平成 22 年度秋田県味噌醤油品評会出品味噌 16 点は秋田県味噌醤油工業協同組合より供与された [11]。

### • 組換え型酵素

組換え型ヒトレニン<sup>®</sup>は、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現した。発現したレニンはペプスタチンアフィニティーカラムと Mono Q FPLC で電気泳動的に単一になるまで精製した [4]。組換え型ヒトキマーゼは、R & D Systems 社製をまた、組換え型ヒト ACE は Sigma-Aldrich 社製を用いた。

### • 蛍光消光基質

新規レニン活性測定用蛍光消光基質 (N-methylanthranil (Nma)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\* Val-Ile-Thr-His-Lys-2, 4-dinitrophenyl (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>) 及び ACE 活性測定用蛍光消光基質 (Nma-Phe-His-Lys (Dnp)) は、(株)ペプチド研究所で依頼合成した。

### • 醸造微生物を変えた味噌製造

麹菌が味噌抽出物の各種酵素阻害活性に与える影響を調べるために、3 種類の麹菌、すなわち味噌麹 (株式会社秋田今野商店製)、AOK139 株 (株式会社秋田今野商店製) および秋田県総合食品研究センター開発 WS61 株を用いて製造試験を行った。WS61 株は、AOK139 株を基に、非組み換えの麹菌育種方法であるトランスポゾン技術 [12] で作出された新規麹菌である。AOK139 株の分生胞子を高温ストレス (52°C, 6hr) によるトランスポゾン活性化処理を行い、白色変異株 WS61 を得た。WS61 株は内在性 DNA トランスポゾン Crawler がポリケタイド合成酵素遺伝子 (wA) コード領域内に新たに転移挿入しており、wA が機能しないため分生胞子が白色の表現型を示す。

味噌の仕込み配合は麴歩合 10 歩、目標食塩 11.5%，目標水分 44.5%，大豆は平成 23 年産秋田県産リュウホウ (丸大豆及び脱皮大豆) を用い、0.8kg/cm<sup>2</sup>、45 分の条件で加圧蒸煮した。米は平成 23 年産秋田県産あきたこまちを用い、製麴機を用いて製麴した。区分ごとの具体的な仕込み配合は処理大豆 1.6kg、麴 1.0kg、食塩 0.36kg、種水 0.16kg、合計 3.12kg である。仕込み後 30°C の温醸で 8 週間熟成した。切り返しは仕込み後 4 週間に実施した。

### • 味噌抽出液の調整方法

味噌抽出液の方法は既報に準じて行った [11]。すなわち、味噌 10g に 100ml の蒸留水を加え、ホモジナイザー ((株)日本精機製 MX-8) により 2 分間、ホモジナイズした後、105°C、10 分間オートクレーブ処理をした。その後 3000rpm、30 分の遠心を行い、上清約 100ml を Sep Pak ODS C<sub>18</sub> 35cc (Waters 製) に通し、吸着させた。カートリッジを 200ml の蒸留水にて洗浄後、100ml メタノールにより吸着成分を溶出させた。エバポレーターにより溶出液を濃縮、乾燥し、秤量した。乾燥溶出物は 20mg/ml になるようにジメチルスルホキシドに溶解し味噌抽出液として、-20°C 保存した。

### • レニン阻害活性の測定

味噌抽出液を水で 10 倍に希釈した 2mg/ml 10%ジメチルスルホキシド溶液をサンプルとして試験に供した。レニン阻害活性測定方法は既報に準じて行った [4, 5, 11]。すなわち、5 $\mu$ l の組換え型ヒトレニン溶液に、5 $\mu$ l の味噌抽出液を加え室温で 5 分間保持した。これに 40 $\mu$ l の基質溶液 [20  $\mu$  M Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-Thr-His-Lys-(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>, 50 mM Na-Phosphate buffer, pH 6.5, 0.02%, Tween 20, 0.02% NaN<sub>3</sub>] を添加し、37°C で 30 分間反応した。反応後、0.2ml の反応停止液 [0.1 M Na-Borate buffer, pH10.5] を加え励起波長 340 nm および蛍光波長 440 nm で蛍光強度を測定した。各測定は 3 連で実施した。阻害物質が存在しない場合のレニン活性を 100% とし、50% 阻害を 1 U

と定義した。強い活性を有するサンプルを用いて作成した阻害曲線を元にサンプル重量あたりの阻害活性を阻害ユニット (IU) として求め、さらに味噌 10g からの抽出重量 (mg) を乗ずることで全阻害ユニット (TIU) を求めた。

#### • キマーゼ阻害活性の測定

これまでに合成した各種蛍光消光基質を用いてキマーゼ活性を検討した結果、反応条件を精密化することでレニン用蛍光消光基質がキマーゼの活性測定にも使用出来ることが明らかとなった。そこで、以下の手順でキマーゼ阻害活性を測定した。5  $\mu$ l の組換え型ヒトキマーゼ溶液に、5  $\mu$ l の味噌抽出液を加え室温で 5 分間保持した。これに 40  $\mu$ l の基質溶液 [20  $\mu$ M Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-Thr-His-Lys-(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>, 0.1 M グリシン-HCl, pH 9.0, 0.1 M NaCl, 0.02 % Triton X-100, 0.02 % NaN<sub>3</sub>] を添加し、37°C で 30 分間反応した。反応後、0.2ml の反応停止液 [0.1 M Na-Borate, pH10.5] を加え励起波長 340 nm および蛍光波長 440 nm で蛍光強度を測定した。阻害ユニットおよび全阻害ユニットはレニン阻害活性測定に準じて計算した。

#### • ACE 阻害活性の測定

新規蛍光消光基質を用いた ACE 活性測定は既報に準じて行った [13]。阻害活性測定は以下の手順で行った。すなわち、5  $\mu$ l の組換え型ヒト ACE 溶液に、5  $\mu$ l の味噌抽出液を加え室温で 5 分間保持した。これに 40  $\mu$ l の基質溶液 [20  $\mu$ M Nma-Phe-His-Lys (Dnp), 0.1 M HEPES-HCl, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 0.01% Triton X-100, 0.02% NaN<sub>3</sub>] を添加し、37°C で 30 分間反応した。反応後、0.2ml の反応停止液 [0.1 M Na-Borate, pH10.5] を加え励起波長 340 nm および蛍光波長 440 nm で蛍光強度を測定した。阻害ユニットおよび全阻害ユニットはレニン阻害活性測定に準じて計算した。

#### • 酸性カルボキシペプチダーゼ活性およびアスパルティックプロテアーゼ活性の測定 麴及び味噌の酸性カルボキシペプチダーゼ活性

は、酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット(キッコーマン社製)を用いて測定した。また、アスパルティックプロテアーゼ活性の測定は、レニン活性測定用蛍光消光基質を用いて測定した。具体的には、5  $\mu$ l の麴抽出液もしくは味噌抽出液に 45  $\mu$ l の基質溶液 [20  $\mu$ M Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-Thr-His-Lys-(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>, 0.1M Na-Citrate, pH 3.0, 0.1 M NaCl, 0.02% Trween, 0.02% NaN<sub>3</sub>] を添加し、37°C で 30 分間反応した。反応後、0.2ml の反応停止液 [0.1 M Na-Borate, pH10.5] を加え励起波長 340 nm および蛍光波長 440 nm で蛍光強度を測定した。

酵素活性測定用の麴抽出液は既報により調整した [14]。また、酵素活性測定用の味噌抽出液は以下の手順により調整した。味噌 5g に蒸留水 25ml を加え室温で 1 時間抽出した。遠心分離にて上清を回収し、酵素活性測定に用いた。

## 実験結果及び考察

### 1) 市販味噌の各種酵素阻害活性

平成 22 年度産市販味噌 73 点、全国味噌鑑評会優秀見本味噌 7 点、秋田県味噌醤油品評会出品味噌 16 点の味噌抽出物のレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性を表 1 に示した。サンプルにより全阻害ユニット (TIU) に差異を認めたものの、今回測定した全ての味噌にレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性を認めた。そこでサンプル種ごとに各酵素の TIU の比較を行った。

レニン阻害に関しては既に報告している通りであり、全国味噌鑑評会出品味噌 7 点 (米味噌 5 点、豆、麦味噌各 1 点) の TIU の平均は 49.9、秋田県味噌醤油品評会出品味噌 (米味噌) 16 点の TIU の平均は 61.5 と平均的な阻害活性に大きな違いを認めなかった。また全国の市販味噌 73 点 (米味噌 60 点、調合味噌 6 点、麦味噌 5 点、豆味噌 2 点) の平均 TIU も 58.6 と全国味噌鑑評会のサンプルと同様の活性を示した [11]。

今回新たにキマーゼ阻害活性を測定した。市販味噌の TIU の平均は 90.6、全国味噌鑑評会優秀

表1 味噌抽出物の各種酵素阻害活性

味噌 No.	種類	レニン 阻害活性 (TIU)	キマーゼ 阻害活性 (TIU)	ACE 阻害活性 (TIU)	味噌 No.	種類	レニン 阻害活性 (TIU)	キマーゼ 阻害活性 (TIU)	ACE 阻害活性 (TIU)	
市販味噌					58	米みそ	37.0	97.6	52.9	
1	米みそ	92.0(14)	211.9(3)	97.4(9)	59	米みそ	34.8	67.5	51.9	
2	米みそ	62.6	58.2	51.0	60	米みそ	47.9	94.4	57.2	
3	米みそ	97.2(12)	190.7(4)	50.4	61	米みそ	37.5	78.9	51.3	
4	米みそ	72.9	82.6	115.0(3)	62	米みそ	39.2	91.7	49.0	
5	米みそ	45.0	64.2	60.2	63	米みそ	27.4	80.3	51.5	
6	米みそ	135.1(2)	82.0(18)	82.9	64	米みそ	34.1	93.2	65.6	
7	麦みそ	39.2	66.7	106.1	65	米みそ	29.6	56.0	52.7	
8	麦みそ	61.1	62.4	55.9	66	米みそ	48.3	63.2	59.0	
9	豆みそ	62.3	117.5(16)	116.5(2)	67	米みそ	30.4	78.6	49.3	
10	調合みそ	71.0	130.5(11)	66.2	68	米みそ	37.1	124.8(16)	59.8	
11	米みそ	33.9	59.5	88.4(13)	69	米みそ	17.8	87.7	48.4	
12	米みそ	84.7(19)	63.1	59.3	70	米みそ	44.7	105.5(20)	44.2	
13	米みそ	93.4(13)	78.1	84.1	71	米みそ	24.3	57.1	50.9	
14	米みそ	87.5(16)	60.1	37.2	72	米みそ	64.5	87.6	64.5	
15	米みそ	40.2	63.2	170.2(1)	73	米みそ	48.0	69.7	73.2(20)	
16	米みそ	109.8(7)	68.1	43.2	74	米みそ	87.3(17)	110.3(19)	88.2(14)	
17	麦みそ	40.6	60.5	36.3	75	米みそ	43.7	64.6	62.3	
18	米みそ	98.0(11)	169.9(6)	54.5	76	米みそ	40.0	91.2	74.8(19)	
19	米みそ	111.4(6)	168.9(7)	34.3	77	米みそ	56.0	213.8(2)	100.5(8)	
20	米みそ	101.4(9)	67.6	68.4	78	米みそ	55.0	96.3	71.6	
21	米みそ	44.4	65.3	95.4(10)	79	米みそ	37.7	79.9	92.0(11)	
22	米みそ	75.5	90.4	61.4	80	豆みそ	131.1(4)	182.7(5)	105.8(6)	
23	米みそ	58.8	96.7	52.1	市販味噌平均			58.6	90.6	61.4
24	米みそ	73.9	102.0	73.2	H22年度 全国味噌鑑評会 優秀見本					
25	米みそ	63.8	98.1	43.5	34	米みそ(優秀見本)	82.4(20)	75.7	22.7	
26	米みそ	67.1	61.8	68.6	35	米みそ(優秀見本)	21.2	22.2	55.2	
27	米みそ	29.6	126.6(15)	42.8	36	米みそ(優秀見本)	41.3	39.5	64.5	
28	米みそ	21.8	87.4	83.5(16)	37	米みそ(優秀見本)	40.0	30.5	39.0	
29	米みそ	88.9(15)	129.0(14)	59.1	38	米みそ(優秀見本)	30.3	39.1	24.7	
30	麦みそ	76.4	115.0(18)	157.9	39	豆みそ(優秀見本)	48.7	93.1	21.8	
31	麦みそ	79.7	57.3	32.8	40	麦みそ(優秀見本)	85.7(18)	83.1	40.3	
32	米みそ	79.2	71.9	57.4	全国味噌鑑評会 サンプル平均			49.9	54.7	38.3
33	米みそ	100.2(10)	129.7(12)	42.1	H22年度 秋田県味噌醤油品評会 出品					
41	米みそ	51.7	58.8	9.4	A4	米みそ	29.4	44.2	36.6	
42	米みそ	50.2	40.6	50.9	A6	米みそ	105.4(8)	138.6(9)	85.4(15)	
43	調合みそ	32.2	59.0	13.4	A8	米みそ	131.5(3)	129.1(13)	90.1(12)	
44	調合みそ	36.5	78.7	39.3	A10	米みそ	56.0	146.4(8)	114.6(4)	
45	米みそ	40.9	55.4	41.7	A12	米みそ	53.1	37.6	39.5	
46	米みそ	40.6	67.7	59.8	A14	米みそ	28.0	48.9	49.9	
47	米みそ	35.7	41.9	41.1	A18	米みそ	29.0	72.1	36.3	
48	米みそ	31.7	31.7	35.2	A20	米みそ	48.2	50.3	35.3	
49	米みそ	34.6	38.4	108.2(5)	A21	米みそ	128.8(5)	137.3(10)	98.2	
50	米みそ	55.5	73.7	8.7	A22	米みそ	44.5	58.0	29.4	
51	米みそ	41.2	69.9	47.9	A23	米みそ	75.8	93.8	71.0	
52	米みそ	169.6(1)	242.2(1)	88.3(17)	A24	米みそ	31.4	47.3	30.2	
53	米みそ	57.3	116.3(17)	43.6	A25	米みそ	69.5	73.2	51.3	
54	調合みそ	39.8	95.6	46.7	A26	米みそ	34.5	62.0	49.1	
55	調合みそ	28.3	79.6	45.8	A27	米みそ	53.8	69.4	48.0	
56	調合みそ	25.3	61.4	41.9	A28	米みそ	65.4	46.0	52.5	
57	米みそ	52.6	74.1	43.1	秋田県品評会 サンプル平均			61.5	78.4	57.3

\*各酵素阻害活性についてTIUの括弧内の数字は、阻害活性上位20番目内の順番を示している。1番は最も阻害活性が強かったことを示す。

見本味噌の平均は 54.7、秋田県味噌醤油品評会 出品味噌の平均は 78.4 で市販味噌にキマーゼ阻害活性の高い傾向が見られた。市販味噌の中では

No.52 がレニン阻害活性、キマーゼ阻害活性ともに最も高い値を示した(表1)。レニンやキマーゼの阻害活性の他に ACE 阻害

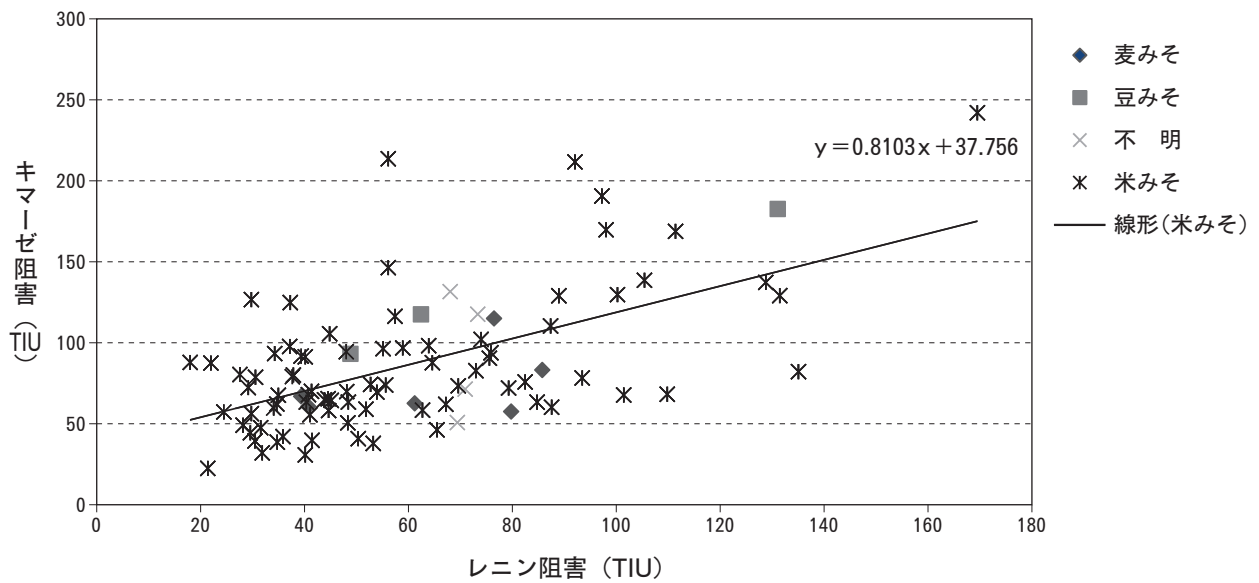


図2. 味噌のレニン阻害とキマーゼ阻害との相関関係

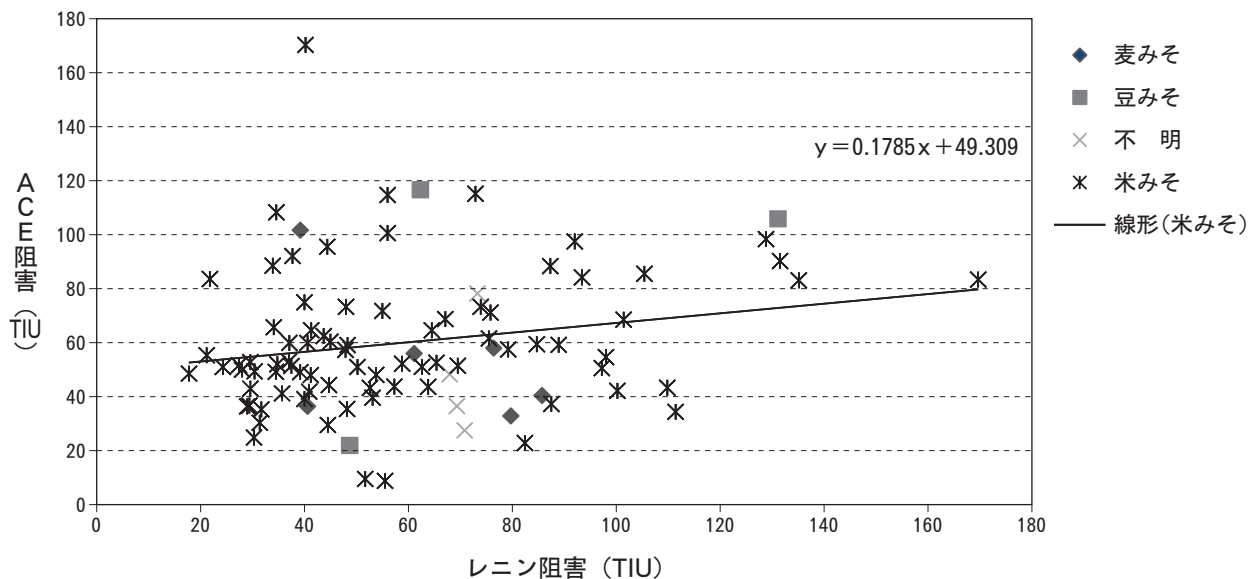


図3. 味噌のレニン阻害とACE阻害との相関関係

活性も併せて検討した。市販味噌のACEのTIU平均は61.4，全国味噌鑑評会優秀見本味噌の平均は38.3，秋田県味噌醤油品評会出品味噌の平均は57.3で市販味噌にACE阻害活性の高い傾向が見られた。市販味噌の中ではNo.15が最も高い値を示した（表1）。

## 2) 阻害活性の相関解析

3種類の酵素を用いて阻害活性を検討したこと

から，それぞれの酵素阻害の相関を検討した。その結果，味噌抽出液中のレニン阻害活性とキマーゼ阻害活性に高い相関が認められた（ $y = 0.8103x + 37.756$ ，図2）。一方，レニン阻害活性とACE阻害活性（ $y = 0.1785x + 49.309$ ，図3）やキマーゼ阻害活性とACE阻害活性との相関は認められなかった（ $y = 0.499x + 55.459$ ，図4）。これまで，味噌由来のレニン阻害物質としてソヤサポニンIや遊離不飽和脂肪酸が知られている [3, 8]。そこ



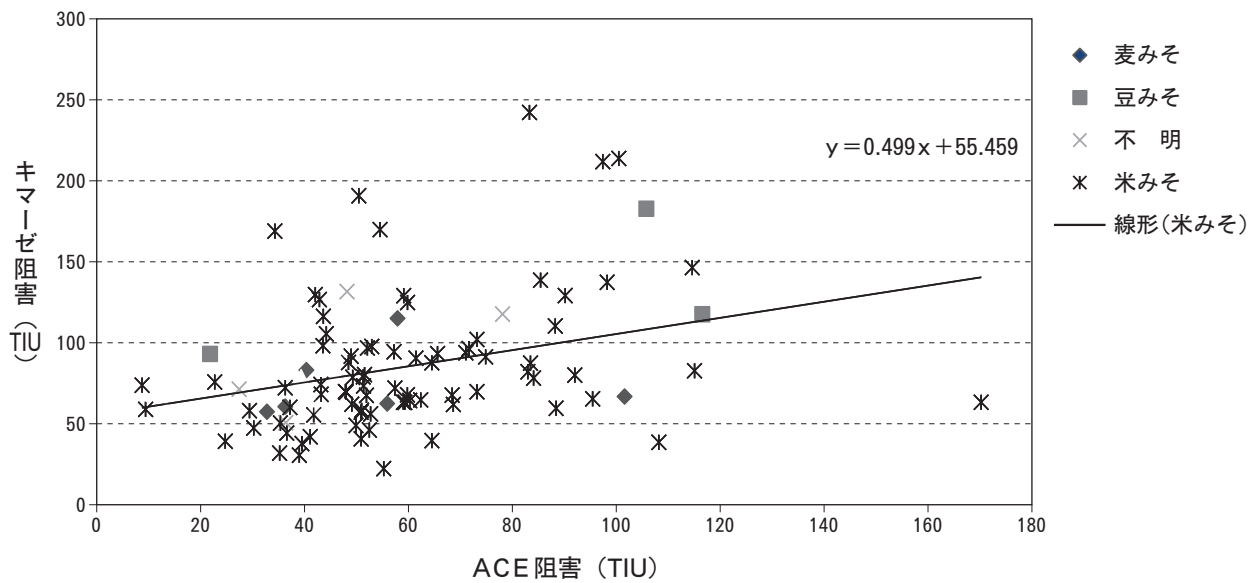


図4. 味噌のACE阻害とキマーゼ阻害との相関関係

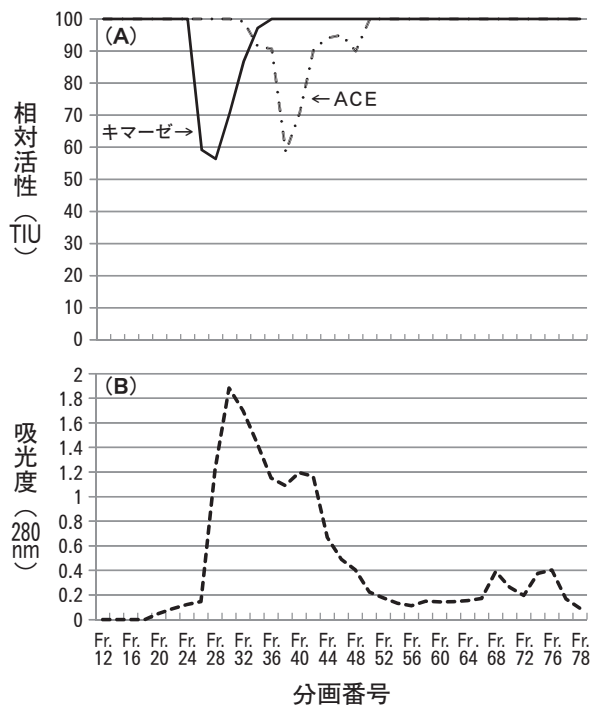


図5. 味噌抽出液 (No.52) のゲル濾過クロマトグラフィー

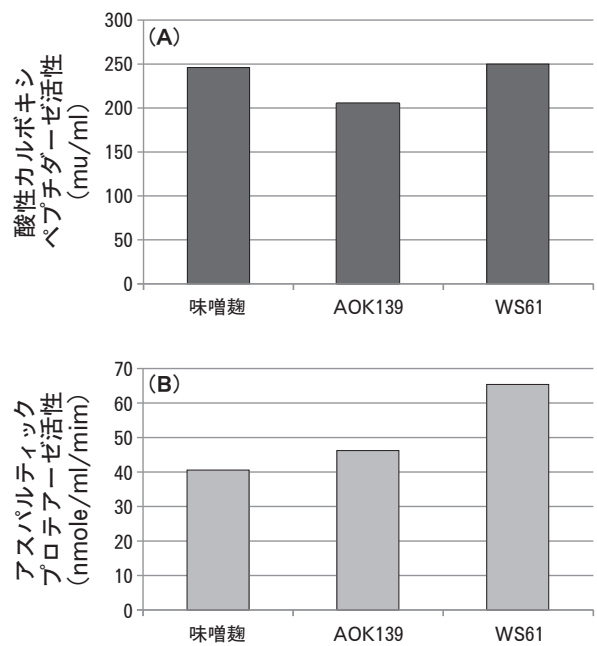


図6. 各種麹の酸性カルボキシペプチダーゼ活性 (A)およびアスパルティックプロテアーゼ活性 (B)

で、ソヤサポニン I や遊離脂肪酸を用いてキマーゼの阻害作用を検討したが、阻害は認められなかった。キマーゼはキモトリプシン様のセリンプロテアーゼであることから、大豆タンパク質由来のペプチド等が阻害物質である可能性が考えられ

る。そこで、以下味噌由来キマーゼ阻害物質の精製について検討した。

### 3) 味噌由来キマーゼ阻害物質の精製検討

市販味噌の中で最も強いキマーゼ阻害活性を示

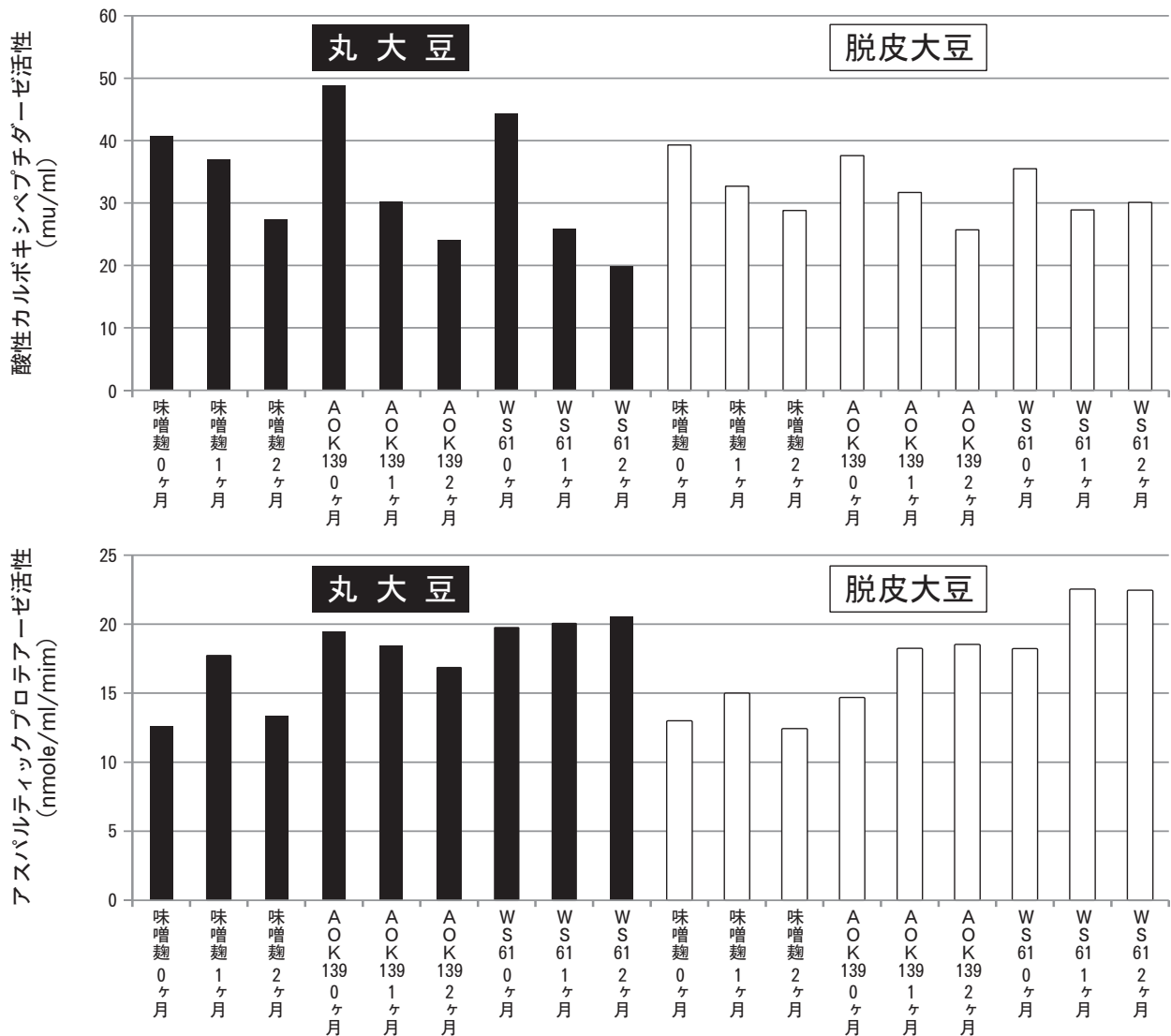


図7. 各種麹を用いて試験醸造した味噌の酸性カルボキシペプチダーゼ活性(A)およびアスパルティックプロテアーゼ活性(B)

した No.52 の味噌抽出液を用いてキマーゼ阻害物質の精製を試みた。No.52 味噌抽出液の Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィーのパターンを図5に示した。本カラムクロマトグラフィーにおいてキマーゼ阻害活性は、排出限界付近に溶出され、阻害物質は比較的分子量が大きいと推察された。比較の為に ACE 阻害活性も検討したが、ACE 阻害活性のピークはキマーゼ阻害活性よりも低分子側に溶出された。キマーゼ阻害画分をさらに逆相カラムクロマトグラフィーで分画したが、阻害活性は複数のピークとして溶出された(非公開データ)。今後、さらなる精製を進め構造を

明らかにしたいと考えている。

#### 4) 麹及び試験醸造味噌中のペプチダーゼ及びプロテアーゼ活性

味噌の品質には用いる大豆や微生物(種麹, 酵母, 乳酸菌など)が大きな影響を与える。今回の製造試験においても用いる大豆と麹菌について検討した。最初に、用いる麹のペプチダーゼ活性等について検討した。図6に麹の酸性カルボキシペプチダーゼ活性とアスパルティックプロテアーゼ活性を示した。3種類の麹の酸性カルボキシペプチダーゼ活性には大きな違いは認められなかつ

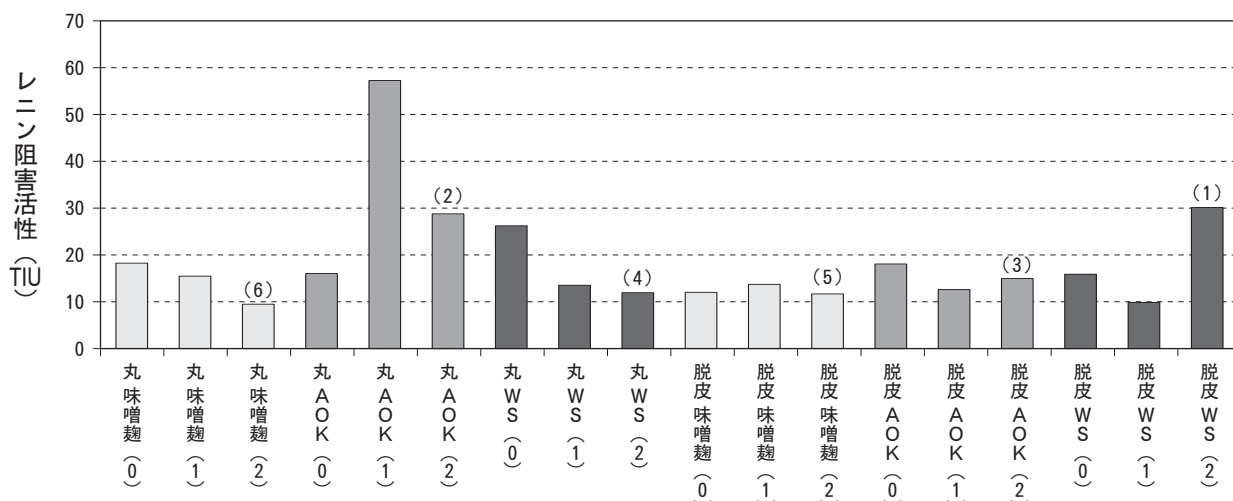


図8. 大豆と麹菌の異なる試験醸造味噌のレニン阻害活性

横軸の丸は、丸大豆をまた、脱皮は脱皮大豆を用いた場合で、AOKはAOK 139株をまたWSはWS 61株を用いた場合を示す。グラフの括弧内数字は、2ヶ月熟成味噌のレニン阻害活性強度の順番を示す。

た。一方、アスパルティックプロテアーゼ活性は、WS61株が最も強く、次いでAOK139株で、味噌麹の活性が最も低い結果となった。

丸大豆及び脱皮大豆を用いて3種類の麹菌による試験醸造味噌中の酵素の活性を図7に示した。味噌中の酸性カルボキシペプチダーゼは、大豆の種類に関わらず熟成とともに低下した。しかしながら、アスパルティックプロテアーゼ活性は熟成によりやや増加する傾向が見られた。これらの酵素は味噌の熟成に重要な役割を持っており、大豆タンパク質からのペプチドやアミノ酸生成に関与している。味噌には高濃度の食塩と多量の大豆タンパク質が含まれており、これらが微生物の繁殖を抑制するとともに酵素の安定化にも寄与していると考えられる。一方で、酵素作用で大豆タンパク質から生じたペプチドが機能性を持つとともに酵素の阻害作用や安定化作用を持つことが予想される。高塩濃度での酵素反応の解析には高塩濃度で測定が可能な酵素基質の開発が必要であり、今後詳細な検討が必要と考える。

#### 5) 試験醸造味噌中の各種酵素阻害活性の変化

図8～図10に丸大豆及び脱皮大豆を用いて3種類の麹菌による試験醸造味噌抽出液中のレニン、キマーゼ及びACE阻害活性を示した。

レニン阻害活性に関しては(図8)、丸大豆を用いた場合味噌用麹とWS61株の場合、醸造期間が長くなるにつれて阻害が減少する傾向が見られた。AOK139株では、一過性に阻害が上昇する傾向があった。一方、脱皮大豆の場合は味噌用麹とAOK139株を用いた場合醸造期間中に阻害活性に大きな変化は認められなかった。しかしながら、WS61株の場合、レニン阻害活性は1ヶ月目で減少傾向があり、2ヶ月目では増加が観察された。

キマーゼ阻害活性に関しては(図9)、丸大豆と脱皮大豆を用い異なる麹菌を用いた場合、全体的に醸造期間が長くなるにつれて阻害が減少する傾向が見られた。しかしながら、WS61株を用いた場合には1ヶ月目には減少傾向が見られたが、レニン阻害活性の場合と同様に2ヶ月目で阻害の増加が観察された。

一方、ACE阻害活性に関しては(図10)、丸大豆及び脱皮大豆を用いた場合のいずれの場合においても麹菌の種類に関わらず熟成が進むにつれて阻害が強くなることが示された。

ACE阻害物質としてはペプチド類が知られており、図7に示したように酸性カルボキシペプチダーゼやアスパルティックプロテアーゼが阻害ペプチド類の生成に関与すると考えられる。いずれ

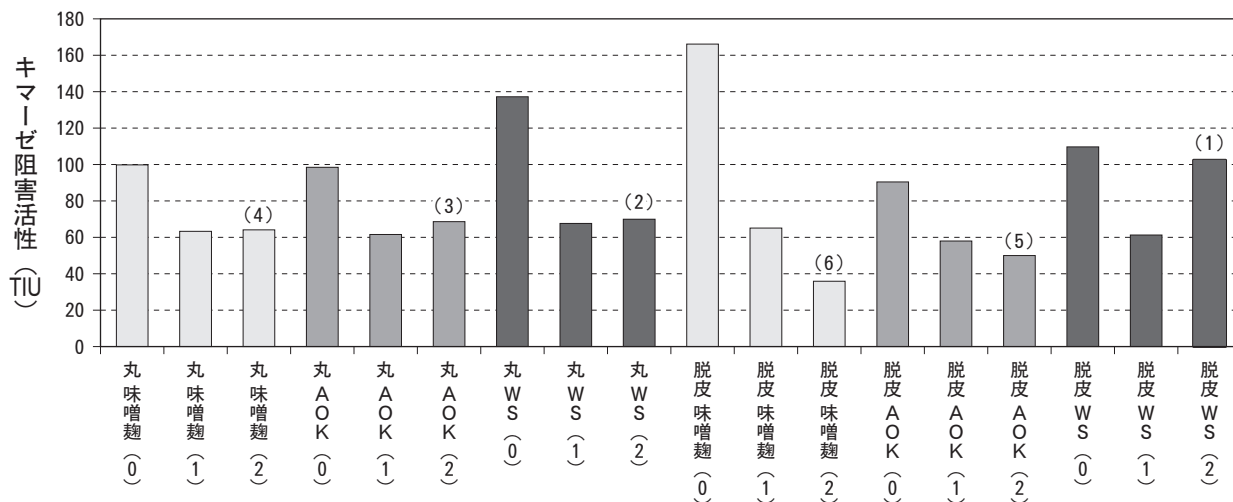


図9. 大豆と麹菌の異なる試験醸造味噌のキマーゼ阻害活性

横軸の丸は、丸大豆をまた、脱皮は脱皮大豆を用いた場合で、AOKはAOK 139株をまたWSはWS 61株を用いた場合を示す。グラフの括弧内数字は、2ヶ月熟成味噌のキマーゼ阻害活性強度の順番を示す。

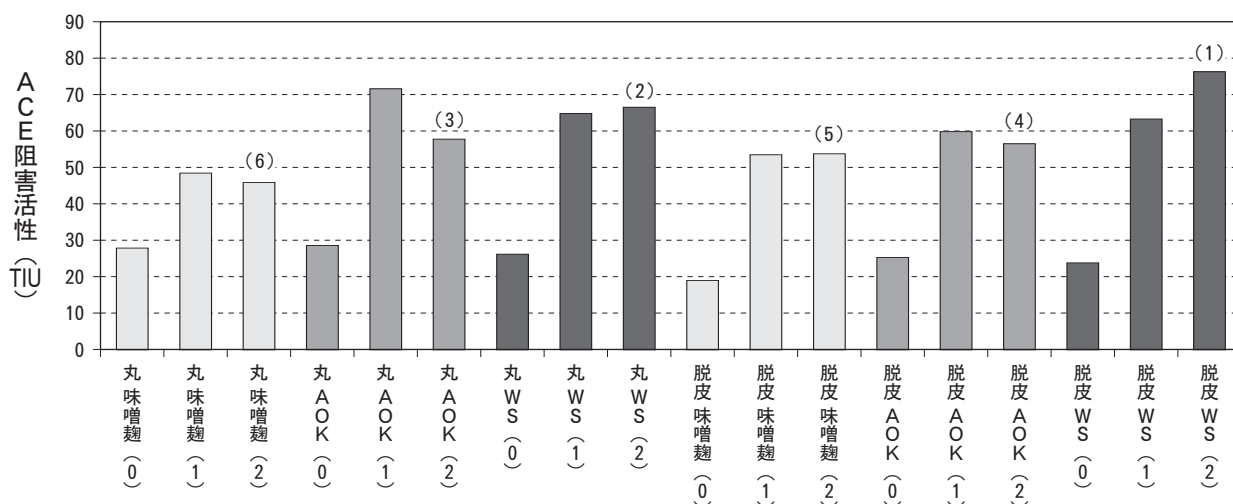


図10. 大豆と麹菌の異なる試験醸造味噌のACE阻害活性

横軸の丸は、丸大豆をまた、脱皮は脱皮大豆を用いた場合で、AOKはAOK 139株をまたWSはWS 61株を用いた場合を示す。グラフの括弧内数字は、2ヶ月熟成味噌のACE阻害活性強度の順番を示す。

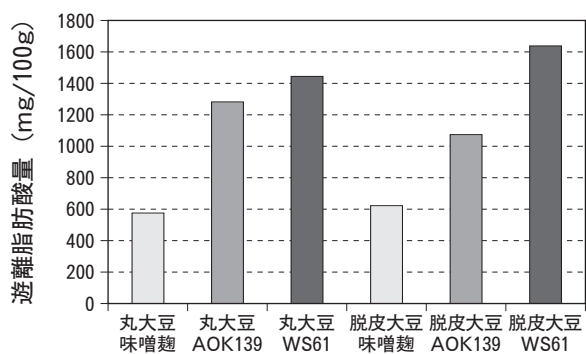


図11. 熟成終了味噌の遊離脂肪酸量

の大豆や麹を用いた場合でもアスパルティックプロテアーゼ活性は、醸造期間とともに増加傾向が認められることから、本酵素がACE阻害ペプチド生成と密接な関連性を持つことが示唆される。図2で示したように、レニン阻害活性とキマーゼ阻害活性とは相関があり、本試験醸造においてもその傾向が観察された。大豆由来レニン阻害物質としてはソヤサポニンIが知られている[5]。一方で、遊離不飽和脂肪酸もレニンを阻害

することが明らかとなっている [8]。そこで、各試験醸造味噌の脂肪酸量を検討した (図 11)。その結果、遊離脂肪酸量は大豆の種類に関わらず WS61 > AOK139 > 味噌用麴の順番に高く、遊離脂肪酸量がレニン阻害活性の一部に反映されていることが考えられた。

以上の結果を総合すると、脱皮大豆を原料としてまた種麴菌として WS61 株を用いることで、レニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性の強化した味噌の開発に繋がることが示唆された。今後、WS61 株を用いた高血圧制御を目指した高機能性味噌の開発が期待される。

## 謝 辞

本研究は、(一社)中央味噌研究所からの研究助成(平成 24 年度分)を受けて行われました。関係各位に感謝申し上げます。また、各種味噌試料を提供頂きました(一社)中央味噌研究所並びに秋田県味噌醤油工業組合に御礼申し上げます。実験補助で協力頂きました当研究センター嘱託研究員・佐藤愛さんに感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Benfey P. N., Yin F. H., and Leder P., Cloning of the mast cell protease, RMCP II. Evidence for cell-specific expression and a multi-gene family. *J. Biol. Chem.*, 262, 5377-5384 (1987).
- 2) Serrafin W. E., Reynolds D. S., Rogelj S. R., Lane W. S., Conder G. A., Johnson S. S., Austen K. F., and Stevens R. L., Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. *J. Biol. Chem.*, 265, 423-429 (1990).
- 3) Takahashi S., Ogasawara H., Watanabe T., Kumagai M., Inoue H., and Hori K., Refolding and activation of human renin expressed in *Escherichia coli*: Application of recombinant human renin for inhibitor screening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2913-2918 (2006).
- 4) Takahashi S., Hata K., Kikuchi K-I, and Gotoh T., High-level expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells: Rapid purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2610-2613 (2007).
- 5) Takahashi S., Hori K., Shinbo M., Hiwatashi K., Gotoh T., and Yamada S., Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin I is the novel human renin inhibitor in soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 3232-3236 (2008).
- 6) Takahashi S., Hori K., Hokari M., Gotoh T., and Sugiyama T. Inhibition of human renin activity by saponins. *Biomed. Res.*, 31, 155-159 (2010)
- 7) Takahashi S., Hori K., Kumagai M., and Wakabayashi S., Human renin inhibitory activity in legumes. *J. Biol. Macromol.*, 7, 49-54 (2007).
- 8) Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Kodama I., Hokari M., Suzuki N., Yoshizawa Y., and Gotoh T., The occurrence of renin inhibitor in rice: Isolation, identification, and structure-function relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1713-1715 (2010).
- 9) Takahashi S., Tokiwano T., Suzuki N., Kodama I., Yoshizawa Y., and Gotoh T., Renin inhibitory activity in rice and cereals. *J. Biol. Macromol.*, 10, 83-91 (2010).
- 10) Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Hokari M., Yoshizawa Y., and Gotoh T., Isolation and identification of human renin inhibitor from *Aralia cordata* (Udo). *J. Biol. Macromol.*, 11, 83-89 (2010).
- 11) 高橋砂織, 佐々木康子, 渡辺隆幸 レニン阻害活性を強化した味噌の開発, 中央味噌研究所報告 33, 165-170 (2012).
- 12) Ogasawara H., Obata H., Hata Y., Takahashi S., and Gomi K., *Crawler*, a novel Tc1/mariner-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress

- conditions. *Fungal Genet. Biol.*, 46, 441-449 (2009).
- 13) Takahashi S., Ono H., Gotoh T., Yoshizawa-Kumagae K., and Sugiyama T., Novel internally quenched substrates for angiotensin I-converting enzyme and carboxypeptidase Y. *Biomed. Res.*, 32, 407-411 (2011).
- 14) 第4改正 国税庁所定分析法注解 pp226-228

# 5つの活性酸素種に対して味噌汁が示す 抗酸化性の総合評価

寺嶋 正明

Comprehensive evaluation of antioxidant activities of “miso soup”  
against five different reactive oxygen species

Masaaki TERASHIMA

*Department of Biosphere Sciences, Kobe College  
4-1 Okadayama, Nishinomiya, Hyogo 662-8505, Japan*

## 1. 緒論

味噌及び味噌汁が5つの異なる活性酸素種に対して示す抗酸化活性を総合的に評価することを目的に本研究を行なった。生体内では種々の活性酸素種が発生するため、例えば「この物質は抗酸化性がある」といっても、どの活性酸素種に対してどの程度の抗酸化性を示すのかを明らかにしなければ、その物質の抗酸化性を正確に評価したことにはならない。我々はミオグロビンの409 nmにおける吸光度が活性酸素種との反応によって減少すること及び抗酸化性物質が共存すると吸光度の減少が抑制されることを利用して、ヒドロキシラジカル(OH)、ペルオキシラジカル(AAPH)、次亜塩素酸イオン(CLO)及びパーオキシナイトライト(ONOO)に対する抗酸化性を評価する方法(ミオグロビン法)を開発した<sup>1)</sup>。また、従来法であるDPPH法の測定結果と合わせて5軸のレーダーチャートに表すことで、食品成分の抗酸化性を総合的に評価する手法を提案している<sup>2)</sup>。この手法により、構造が異なる抗酸化性物質は

レーダーチャートにおいて異なるパターンを示すこと<sup>2)</sup>、構造が類似したフラボノイドでは類似したパターンを示すこと<sup>3)</sup>を明らかにした。また、市販の茶飲料<sup>4)</sup>、ハーブティー<sup>5)</sup>の抗酸化性の特徴を明らかにした。さらに、生野菜の抗酸化性もこの手法を用いることで総合的に評価できることを報告している<sup>6)</sup>。本研究では我々の提案している手法を用いて、10種類の味噌の抗酸化性を総合的に評価した。また、カツオだしと合わせて味噌汁とした場合、味噌汁に具材としてタマネギを用いた場合に抗酸化性がどのように変化するかについても検討した。

## 2. 実験方法

### 味噌試料の調製

市販の味噌10種類(味噌A-味噌J)を試料として用いた。味噌12.0 gに90℃のミリQ水180 mlを加えて攪拌した。遠心分離機(TOMMYTX-201)で10,000 rpm, 10分間の

遠心分離を行い、上清を実験試料として使用した。試料は10 ml ずつファルコンチューブに分注し、-80°Cで保存した。

### 味噌汁の調製

30 g のカツオ削り節を沸騰したミリ Q 水 1000 ml に加え、火を止め、カツオ削り節が鍋の底に沈むまで約 6 分間静置した。ガーゼを用いて固形分を取り除き、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過した。調製した出し汁をミリ Q 水の代わりに用いて、前節と同じ方法で味噌汁を調製した。

具材としてタマネギを用いた場合には、鍋に出し汁 174 ml を加えて沸騰させ、タマネギ 45 g を加えて 13 分間煮た。火を止めた後、11.6 g の味噌（味噌 B）を加えて攪拌した。調製した味噌汁をミキサーにかけて、ホモジナイズした。その後、ガーゼを用いて固形分を取り除き、遠心分離機（TOMMYTX-201）で 10,000 rpm、10 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。さらに、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過したものを測定試料として用いた。

### 抗酸化性測定法

ミオグロビン溶液（0.25 mg/ml）に測定試料、活性酸素種を添加してよく攪拌した後、409 nm の吸光度を分光光度計（Shimadzu UV-1700）を用いて測定した。測定に用いた液量を表 1 に示した。ミオグロビン溶液の吸光度をミオグロビンコ

表 1. 測定に用いた液量

活性酸素種	ミオグロビン溶液	測定試料	活性酸素種
CLO	3.0 ml	0.1 ml	0.5 ml
AAPH	2.5 ml	0.1 ml	1.0 ml
OH	3.0 ml	0.49 ml	0.1 ml
ONOO	3.2 ml	0.1 ml	1.0 ml

### 抗酸化性の定義式

$$\text{ミオグロビン保護率 (\%)} = \left\{ 1 - \frac{(\text{ミオグロビンコントロールの吸光度}) - (\text{試料を添加した場合の吸光度})}{(\text{ミオグロビンコントロールの吸光度}) - (\text{ミリQ水を添加した場合の吸光度})} \right\} \times 100$$

ントロールとし、抗酸化性物質を添加しない場合には代わりにミリ Q 水を所定量加えた。

次亜塩素酸イオン（CLO）は次亜塩素酸ナトリウム溶液を 1/350 に希釈して用いた。ペルオキシラジカル（AAPH）は 50 mM AAPH を用い、試料を混合し、ペルオキシラジカルを発生させるため、47°C で 15 分間インキュベートした後、吸光度を測定した。

ヒドロキシラジカル（OH）の場合は 13 mM 過酸化水素水と 10 mM FeSO<sub>4</sub> 溶液を混合してヒドロキシラジカルを発生させ、直ちに測定に用いた。パーオキシラジカル（ONOO）の場合はパーオキシナイトライト（東京化成）を 20 mM NaOH で 20 倍に希釈したものを測定に用いた。

抗酸化性は次式で定義するミオグロビン保護率（%）を用いて評価した。

### DPPH 法による抗酸化性評価法

DPPH 法は Blos の方法<sup>7)</sup>に従って測定した。ビタミン C を用いて検量線を作成し、ビタミン C 相当濃度（mM）で抗酸化性を表した。

### レーダーチャートを用いた総合評価

ミオグロビン法を用いた 4 つの活性酸素種に対するミオグロビン保護率（%）と DPPH 法による評価結果を 5 軸のレーダーチャートに表して、試料の抗酸化性を総合的に評価した。

## 3. 実験結果及び考察

### 味噌の抗酸化性

図 1 に味噌 A～味噌 J の抗酸化性をレーダーチャートで示した。

全体として、味噌はペルオキシラジカル（AAPH）、次亜塩素酸イオン（CLO）及びパーオキシナイトライト（ONOO）に対して比較的



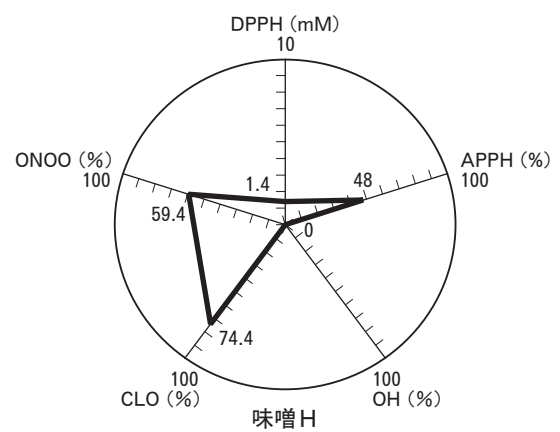
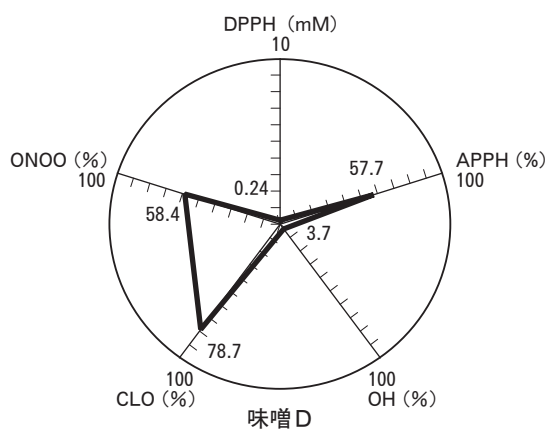
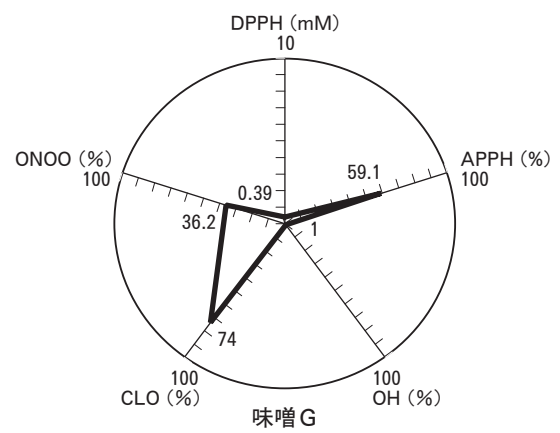
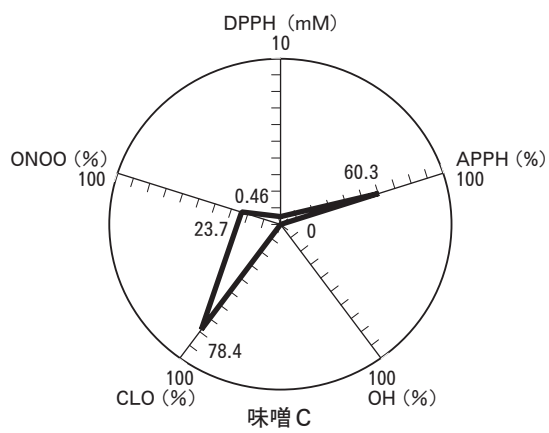
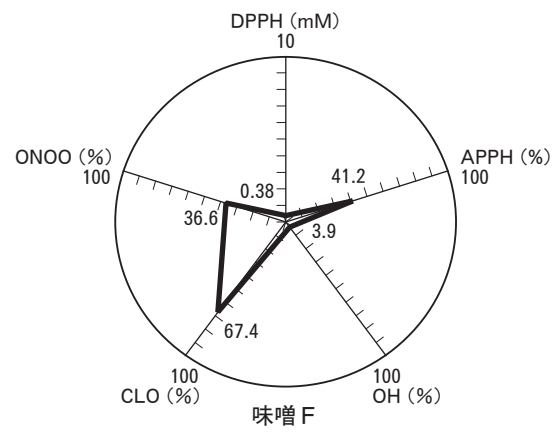
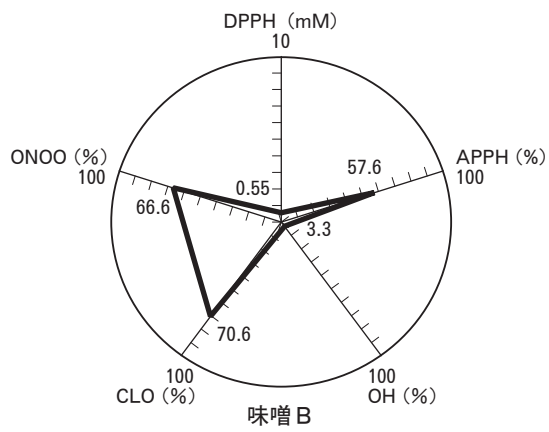
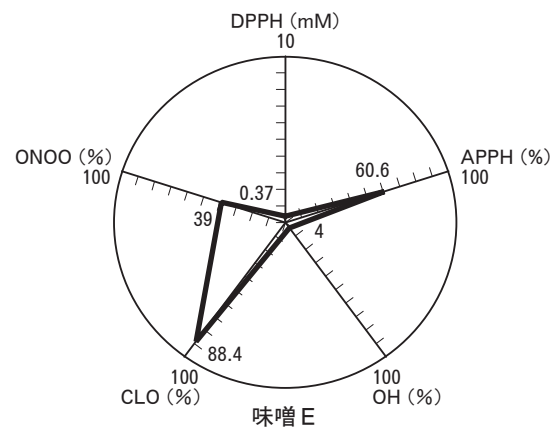
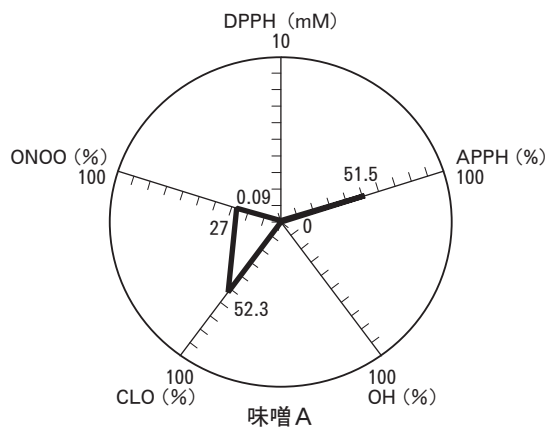


図1. 味噌の抗酸化性

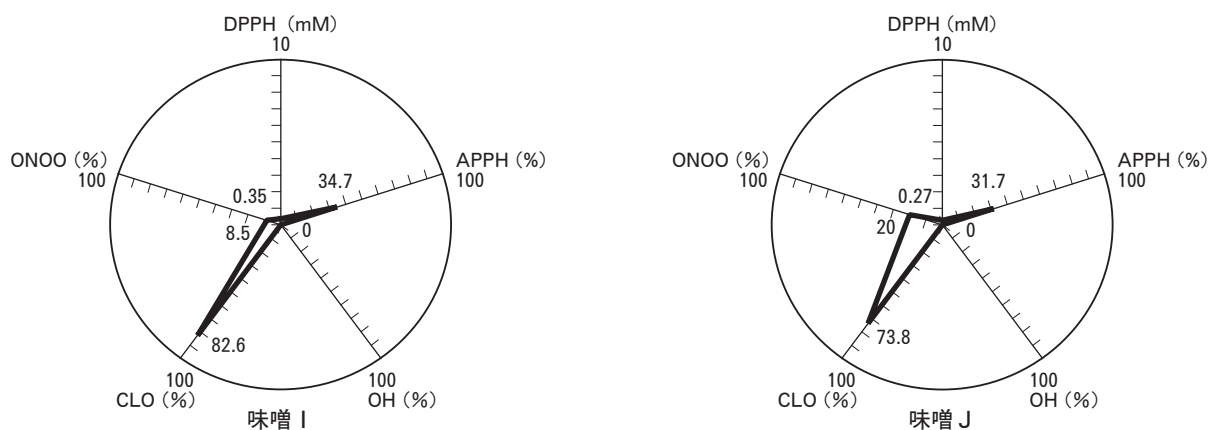


図1. 味噌の抗酸化性 (続)

高い抗酸化性を示すことが明らかとなった。ペルオキシラジカルは脂質の酸化，次亜塩素酸イオンはタンパク質の酸化，パーオキシナイトライトは核酸，脂質，タンパク質の酸化に関与すると考えられている。試験管内での反応ではあるが，味噌はそれらの酸化反応を抑制する効果があると期待できる。また，ONOO に対する抗酸化性が比較的高いもの（味噌 B, D, H），中程度のもの（味噌 A, E, G）および低いもの（C, I, H）に分類できた。味噌の原料，発酵・熟成過程の条件が影響しているものと考えられるが，その詳細は今後の検討課題の一つである。

### だしの抗酸化性との相乗効果

図2に「かつおだし」の抗酸化性および「かつおだし」と味噌Bを用いて調製した味噌汁の抗酸化性を示した。

味噌Bの抗酸化性と「かつおだし」の抗酸化性が相乗的に働いた部分もあり，パーオキシナイトライト（ONOO）と次亜塩素酸イオン（CLO）に対する抗酸化性はミリQ水を用いて調製したものと比べて高くなっている（図1味噌B参照）。

### タマネギを具材として用いた味噌汁の抗酸化性

図3にタマネギ（生）の抗酸化性<sup>6)</sup>とタマネギを具材として用いた場合の抗酸化性を示した。

かつおだし+味噌B+タマネギの味噌汁ではヒ

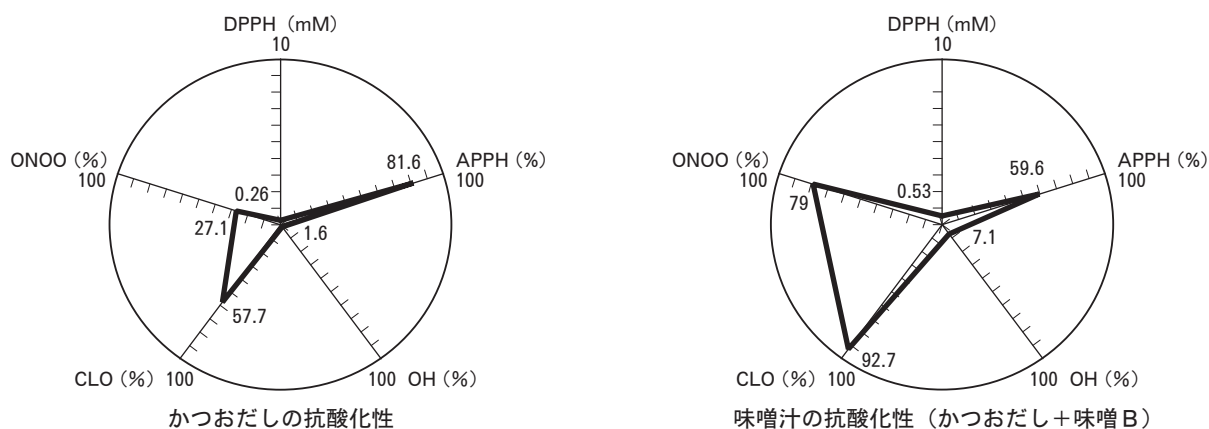


図2. 味噌汁の示す抗酸化性 (1)

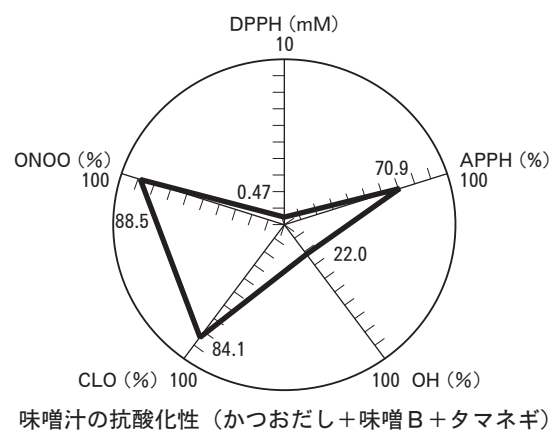
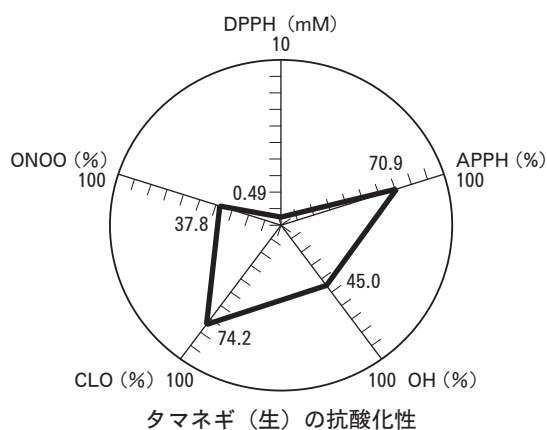


図3. 味噌汁の示す抗酸化性 (2)

ドロキシラジカルに対する抗酸化性がかつおだし+味噌B (7.1%) から22.0%へ増加した。また、生のタマネギはヒドロキシラジカルに対して高い抗酸化活性を示すことから、タマネギ由来の抗酸化性物質が味噌汁の抗酸化性を高めたものと示唆された。

以上の結果から、味噌汁の抗酸化性は味噌、だし、具材の抗酸化性が相乗的に働いているものと考えられることができる。

#### 4. 結論

10種類の市販味噌が5つの活性酸素種に対して示す抗酸化性をミオグロビン法で検討した結果、味噌はペルオキシラジカル、次亜塩素酸イオン、パーオキシナイトライトに対して比較的強い抗酸化性を示すことが示された。また、味噌の種類によって、パーオキシナイトライトに対する抗酸化性が高いもの、中程度のもの、低いものが見られた。味噌、だし、具材を入れた味噌汁ではそれぞれが示す抗酸化性が相乗的に働いていることが示された。

#### 謝辞

本研究を支援していただいた(一社)中央味噌研究所に謝意を表します。研究の実施に多大な協

力をいただいた神戸女学院大学大学院人間科学研究科森川麻美さん、神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科安藤優、喜多麻美、杉田万里絵さんに感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) “New method to evaluate water-soluble antioxidant activity based on protein structural change”, M. Terashima, I. Nakatani, A. Harima, S. Nakamura, M. Shiiba, *J. Agri. Food Chem.*, 55, 165-169 (2007)
- 2) “Comprehensive Evaluation of Antioxidant Activity for Various Substances with 5-axe Cobweb Chart”, M. Terashima, R. Watanabe, M. Ueki, S. Matsumura, *Food Chemistry*, 120, 150-155 (2010)
- 3) “Antioxidant activity of flavonoids evaluated with myoglobin method”, M. Terashima, Y. Kakuno, N. Kitano, C. Matsuoka, M. Murase, N. Togo, R. Watanabe, S. Matsumura, *Plant Cell Reports*, 31 291-298 (2012)
- 4) “茶飲料が示す抗酸化性のレーダーチャートを用いた総合的評価”, 寺嶋正明, 松村知穂, 村井俊子, 外山篤美, 椎葉昌美, *日本食品工学会誌*, 8, 287-294 (2007)

- 5) “レーダーチャートを用いたハーブティが示す抗酸化性の総合的評価”, 寺嶋正明, 新島亜佐子, 岡崎夏子, 吉田麻里, 吉田麻友子, 椎葉昌美, *日本食品工学会誌*, 10, 87-94 (2009)
- 6) “Evaluation of antioxidant activity of leafy vegetables and beans with myoglobin method”, M. Terashima, A. Fukukita, R.

- Kodama, H. Miki, M. Suzuki, M. Ikegami, N. Tamura, A. Yasuda, M. Morikawa, S. Matsumura, *Plant Cell Reports*, 32, 349-357 (2013)
- 7) “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, M. S. Blois, *Nature*, 181, 1199-1200 (1958)

## 味噌中 AGEs 測定を指標とした新規な安全性 および品質評価基準の確立

永井 美芽, 永井 竜児

Measurement of AGEs as new strategy for the safety and quality evaluation

Mime NAGAI, Ryoji NAGAI

*Laboratory of Food and Regulation Biology, Department of Bioscience,  
School of Agriculture, Tokai University  
Kawayou, Minamiaso, Aso-gun, Kumamoto 869-1404, Japan*

### 中央味噌研究所からの味噌サンプル



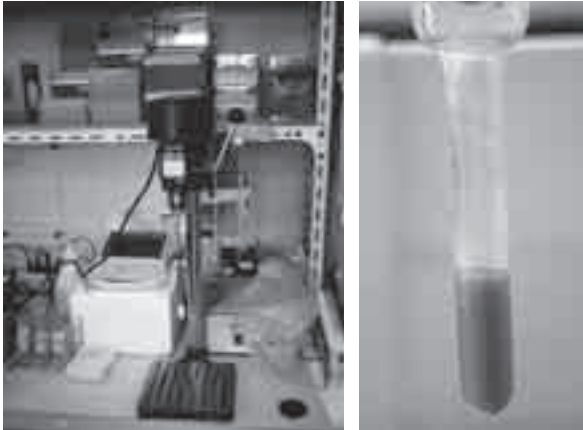
東海大学農学部 〒 869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽  
TEL/FAX: (0967) 67-3918  
E-mail: nagai@agri.u-tokai.ac.jp

## 1. SDS-PAGE

中央味噌研究所からの味噌サンプル12種を SDS-PAGE にかけて。

### 方法

抽出…①味噌1gを量りとり3mLの蒸留水を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズ。



- ② 0.5%になるように TritonX-100 を①に加え攪拌後 4000rpm 10min で遠心
- ③ 上清をとりタンパク定量
- ④ アセトン沈殿にて脱塩
- ⑤ 5-20%アクリルアミドゲルにて SDS-PAGE 後 CBB 染色を行った。

### 結果

#### 1回目 SDS-PAGE



部分は薄く染色されているようだが、はっきりとした染色が見られない。

#### 2回目 SDS-PAGE



ほぼ全てのサンプルに見られるバンドが非常に薄く検出された。

## 2. Western Blotting

SDS-PAGE に使用した各味噌サンプルを 200  $\mu$ g アプライし抗 AGE s 抗体を用い Western Blotting 法により AGE s の検出を試みたが、検出できなかった。

## 3. 褐色色素の単離

中央味噌研究所からの豆味噌サンプル（色が特に濃かった）を SDS-PAGE の時と同様に抽出し、ホクエツ HS、セパビーズなどの樹脂にかけ、NaOH、HCl 等で色素成分を単離した。その結果ホクエツ HS 樹脂にかけ、1N NaOH で溶出することによって、味噌中の色素成分が単離できることが確認された。

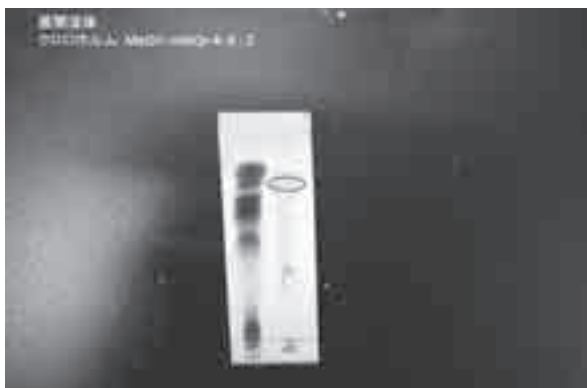


カラムにかける前の豆味噌サンプル



カラムの素通り画分（左）と1N NaOHで溶出した吸着画分（右）

ホクエツHS樹脂樹脂のカラムに味噌抽出液をかけた所。



カラムの素通り画分と1N NaOHで溶出した吸着画分をTLCで分析下結果。現在吸着画分をさらに解析中。

#### 4. 質量分析装置による AGE の測定

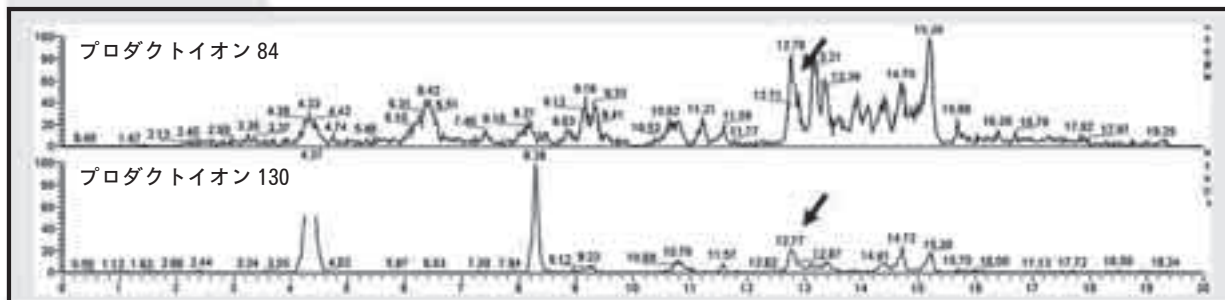
豆味噌サンプルを SDS-PAGE の時と同様に抽出し、分子量フィルターで濾過、脱塩、有機溶媒抽出等で処理条件を検討し、タンデム質量分析装置で AGE 構造体として知られる N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine (CML) の分析を行った。なお、熟成に伴う CML 含量の変化を測定する目的で、未熟成の味噌を作製した。



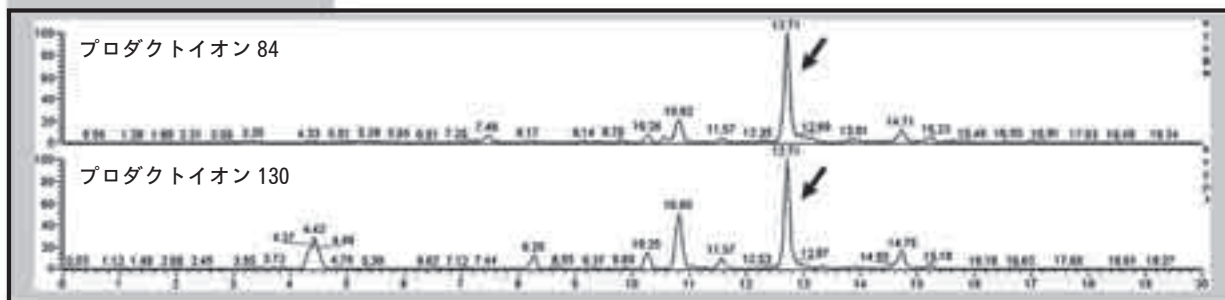
研究室で作製した味噌。熟成した味噌と AGE 含量を比較する目的で作製した。

#### 熟成前と熟成後の味噌中 CML 検出結果比較

Day 0 (未熟成)



Sample 10 (赤味噌)



豆味噌サンプルの低分子画分を抽出することによって、CML（矢印）が綺麗に検出されることが明らかとなった。これに対して、未熟成味噌ではCML含量が非常に低く、測定が困難であった。一方熟成され既に商品として販売されている状態の味噌ではピークが見られた。

## 5. 質量分析装置による味噌中のAGEsの比較

これまでの我々の研究で、AGEの主要な構造体の1つであるCMLは、中央味噌研究所より送付していただいた豆味噌において検出できることが確認できている。

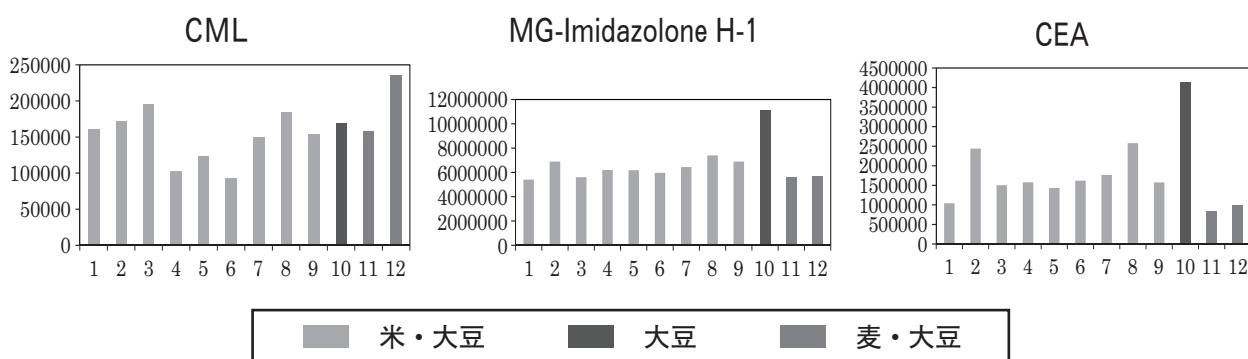
今回は、味噌サンプル12種において様々なAGEsの検出を試みた。

### 方法

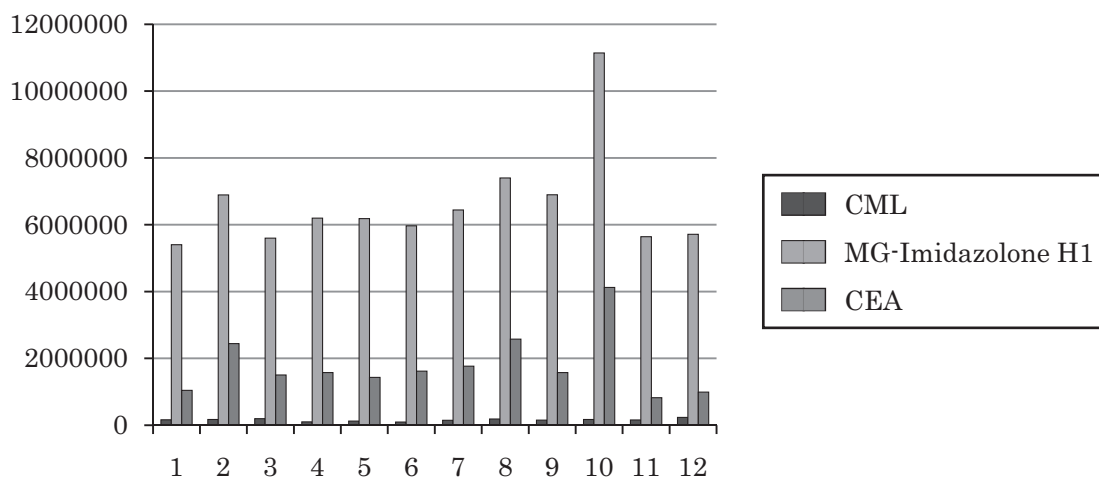
- ①味噌1gを量りとり3mLの蒸留水を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズ。
- ②0.45umフィルターにて濾過
- ③加水分解・カラム処理を行った後、タンデム質量分析装置でAGEs構造体であるCML, MG-Imidazolone, CEAについて測定をおこなった。

### 結果

味噌中に含まれるAGEとしてCML, MG-Imidazolone H1, 新規のAGE構造体であるCEAが確認できた。



### 味噌中のAGEs比較





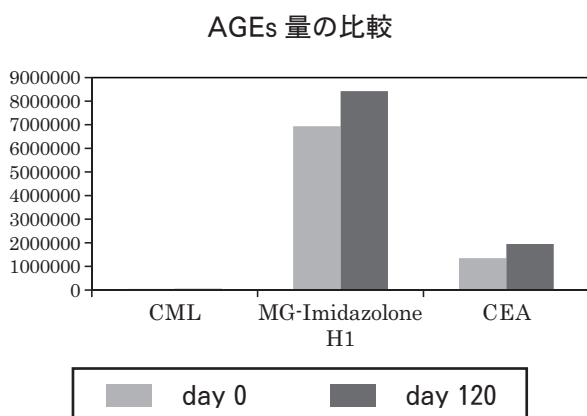
## 6. 熟成度の違いによる AGEs 量の比較

味噌の熟成度が進むにつれ AGEs 量にどのような変化が見られるか確認するため本研究室にて作成した味噌、熟成 0 日、120 日の味噌について AGEs 量の測定を行った。



方法は「5. 質量分析装置による味噌中の AGEs の比較」と同様に行った。

### 結果



## 考 察

### 実験 1・2

SDS-PAGE, Western Blotting により色素中の AGEs, 又は味・品質に関係する物質の単離を試みたが、検出できなかった。発酵が進み、タンパクは非常に細かい状態まで分解されこれらの方法では検出ができなかった可能性がある。

### 実験 3

色素単離のため数種のカラム樹脂に味噌サンプルをかけた後、色素が比較的きれいに分離できたホクエツ HS 樹脂を選んだ。味噌サンプルからの

色素の単離をおこない、色素が移行した吸着画分中の物質の同定が進行中である。

### 実験 4

味噌中に含まれる AGE として CML, MG-Imidazolone H1, CEA が確認できた。CEA が食品中で検出されたのは初めてである。味噌中に含まれる主な AGEs は MG-Imidazolone であることがわかった。CML は他の AGE と異なる挙動を示すが、これは他の AGEs と比べ含有量が微量であり誤差による可能性が考えられる。2SC については検出できなかった。

原材料別に大きく 3 つに分け比較を行った。

- ①米・大豆
- ②大豆
- ③麦・大豆

製品により差はあるものの、「②大豆」で AGEs は高値を示し、「③麦・大豆」で比較的低値を示していることから、AGEs 蓄積量は原材料にも深く関係していることが考えられる。

### 実験 5

本研究室で作成した味噌中 AGEs 量を測定した。CML に関しては含量が微量で比較が難しいが、MG-Imidazolone H1, CEA に関しては熟成が進んだ 120 日後のものでより多くの生成が確認できた。

これらのことより、味噌の種類ごとに基準となる AGEs 蓄積量を予め知ることにより、各製品中の MG-Imidazolone H1, CEA の量を測定することで、色・味などで見積もられてきた味噌の熟成度を数字化できる可能性が考えられ、ひいては品質管理にも応用できると思われる。今後、味噌中の AGEs を測定する簡便な方法を見出し、実用化に向けた研究に取り組みたい。

## 味噌の製造条件と放射性物質の関係

羽生 幸弘<sup>1)</sup>, 高橋 清<sup>2)</sup>, 山田 勝男<sup>2)</sup>

- 1) 宮城県産業技術総合センター,
- 2) 宮城県味噌醤油工業協同組合

Investigation of dynamics of the radioactive material at manufacturing Miso

Yukihiro HANYU<sup>1)</sup>, Kiyoshi TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Katsuo YAMADA<sup>2)</sup>

- 1) *Industrial Technology Institute. Miyagi Prefectural Government*  
2-2, Akedori, Izumi-ku, Sendai 981-3206, Japan
- 2) *Miyagi Miso-Shoyu Industry Association*  
2-11-1, Ichiban-cho, Aoba-ku, Sendai 980-0811, Japan

### 要 旨

東京電力株式会社福島第一原子力発電所の事故に伴い環境中に放出された放射性物質は、我々が日々摂取する農林水産物を含む食品にまで影響を及ぼした。モニタリング調査において宮城県産大豆より放射性セシウムが検出されたことから、それを原料としている納豆、豆腐、味噌などの大豆加工品にもその影響が強く懸念される事態となった。我々は、科学的なデータに基づく正確な情報の提供を行う事によって、消費者の持つ懸念を払拭することを目的とし、製造工程における放射性物質（特にセシウム）の動態を調査した。その結果、大豆を蒸したり煮たりする蒸煮工程によって除去されることが分かり、また、味噌の発酵熟成過程ではセシウムの量に変動が見られないことが分かった。このことから、原料大豆の放射性セシウムが基準値を上回らなければ、最終製品である味噌について基準値を超えるような現象は起こら

ないことが判明した。

### 1. 緒 言

平成 23 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災に伴う東京電力株式会社福島第一原子力発電所の事故により、ヨウ素 131 (I-131) やセシウム 134 (Cs-134), セシウム 137 (Cs-137) などの放射性物質が拡散し、大気、水、土壌のみならず、米等の穀物、野菜や果実などの農産物、キノコなどの林産物、そして水産物など日々摂取する食品にまで影響を及ぼした<sup>1)-2)</sup>。I-131 については、半減期が 8 日間と短く、事故当初放出が見られた分は、現在残留しているとは考えられないが、Cs-134, Cs-137 についてはそれぞれ半減期が約 2 年間、約 30 年間と長期にわたって影響を及ぼすことが想像できる<sup>3)</sup>。実際に国または本県で行っているモニタリング調査においても、基準値を上回る測

定結果が散見されているのも事実である。また、米、大豆の一部で放射性セシウムが検出されたが、ほとんどは暫定基準値（500 Bq/kg）以下であり安全性に問題はない。とはいえ、風評被害により県産原料が消費者から敬遠される可能性も否定できない。また、暫定基準値の見直しによって平成24年4月1日より一般食品の基準値が500 Bq/kgから100 Bq/kgとなり、食品の安全性についてより重要性が高くなった。また、原料では基準値を下回る検査結果が出たとしても、加工方法は多岐にわたり、乾燥、濃縮など最終製品で原料の濃度を上回る可能性がある製造方法も考えられることから、原料由来の放射性物質の量が製造工程でどう変動するのか把握し、最終製品の安全性を確保する事がさらに重要となった。

また、宮城県は全国有数の水揚げ量を誇る水産県であるが、全国6位の米生産量、全国4位の大豆生産量（共に平成23年度）を誇る農業県でもある。特に大豆については、作付面積が北海道に次ぐ2位（平成23年度）であり、全国有数の大豆生産地と言える<sup>4)</sup>。しかしながらモニタリング調査によって宮城県産大豆より放射性セシウムが検出されたことから<sup>2)</sup>、宮城県産大豆に対する消費者の信頼感が損なわれ、その大豆を原料とする、納豆、豆腐、味噌などの大豆加工品についても、放射性物質の影響が懸念された。また、諸外国へ製品を輸出している企業は、自社で最終製品の安全性を証明する必要に迫られ、その測定費用や手間もかなりの負担となっている。

これまで、宮城県内の味噌製造業者では宮城県産原料を使った製品は地産地消や安全安心をアピールして販売してきたが、風評被害を防ぐには、原料や製造工程中の放射性物質についての情報を積極的に提供し、科学的なデータに基づいた対応が必要である。調理・加工における放射性物質の除去については研究結果がまとめられているが<sup>5)</sup>、チェルノブイリ原発事故に関連したデータであり、日本の農産物に対するデータではないこと、また、大豆、特にその加工品での動態についての結果はまとめられていない。そこで本研究では宮城県の重要な製品で仙台味噌としても知られている味噌について製造工程に伴う原料由来の放

射性物質の動態を放射性セシウムに焦点を当てて調査した。

## 2. 方法

### 1) 材料

本研究に使用した大豆は平成23年度産の宮城県産タチナガハで、モニタリング調査によって放射性セシウム(Cs)の検出が見られた大豆である。タチナガハは東北から関東にかけて栽培されている品種で、宮城県内における大豆作付面積は、ミヤギシロメ、タンレイに次いで3番目に多い<sup>6)</sup>。また、脱皮処理は淡色系味噌の製造において行われている処理であるが、本研究においては特に脱皮処理を行わずに処理に供している。

### 2) 大豆処理及び味噌の仕込

#### a) 小スケール処理

大豆の処理工程においてどの工程でセシウムが除去できるのか調査した。一般的な味噌の製造工程（洗浄、浸漬、蒸煮、仕込み、発酵・熟成）のうち、大豆1kgを原料として洗浄、浸漬、蒸煮の各処理を行った。具体的な手順としては、原料大豆の2倍量の水を使用して3回洗浄を行った後、大豆の3倍量の水に一晩浸漬を行った。蒸煮処理については、加圧煮を模して、オートクレーブ処理（121℃、30分、70 kPa）を行い、無圧煮については、4時間煮沸を行った。

#### b) 試験仕込スケール

一般的な味噌の製造工程（洗浄、浸漬、蒸煮、仕込み、発酵・熟成）に則り処理を行った。大豆洗浄及び浸漬に関しては小スケール試験と同様の手順で行っている。なお、製造工程のうち、蒸煮については仙台味噌製造において一般的な処理方法である加圧蒸（117℃、30分、74 kPa）の他に、昔ながらの製法で、大豆に特に圧を加えずそのまま煮る無圧煮（4時間）、現在最も多く採用されている加熱法で、1時間無圧で煮た後、加圧蒸を行う半煮半蒸についても検討を行った。全ての工程について、大豆蒸煮缶（宮城県味噌醬油工業協同組合所有、株式会社フジワラテクノアート製、

ZJ-450, 図1) を用いて行った。

味噌の仕込に関しては総重量 22 kg, 麴歩合 8 分, 水分 12.5%, 塩分 47% とし, 仕込後一ヶ月おきにサンプリングを行い, 放射性セシウムの測定を行った。

### 3) 放射性セシウムの測定

現在, 食品衛生法により基準値が定められているのは, 放射性セシウムであり, そのうち検査対象となっている核種は Cs-137 及び Cs-134 である<sup>7)</sup>。Cs-137 については 661 keV, Cs-134 については主に 604 keV, 795 keV の  $\gamma$  線を放出する核種であり<sup>3)</sup>, ゲルマニウム (Ge) 半導体検出器や NaI シンチレーション検出器での検出が可能である。本研究においては, これらの核種を Ge 半導体検出器 (セイコー・イーザーアンドジー社製) により測定した。方法については「ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー」<sup>8)</sup> を, 測定試料については「緊急時におけるガンマ線スペクトロメトリーのための試料前処理法」<sup>9)-10)</sup> を参考にし, ミキサー等で破碎し



図1. 試験仕込用大豆処理装置

た後, 空隙ができないように専用の容器に均一に詰めた。使用した容器は, 小スケール試験においては主に 250 ml ポリビン, 試験仕込スケールでは, 2 L マリネリ (副原料については 250 ml ポリビン) を用いている (図2)。測定対象は大豆のみではなく, 処理後に発生した浸漬水や煮汁, そして副原料として使用した塩, 米麴, 酵母溶液などについても行った。測定時間についてはいずれも 3000 秒とした。

### 4) 除去率の算出

IAEA のテクニカルレポート<sup>11)</sup> には, 食品の調理・加工後に放射性物質がどの程度残るかを以下の様に残存率 ( $Fr$ ) として定めている。

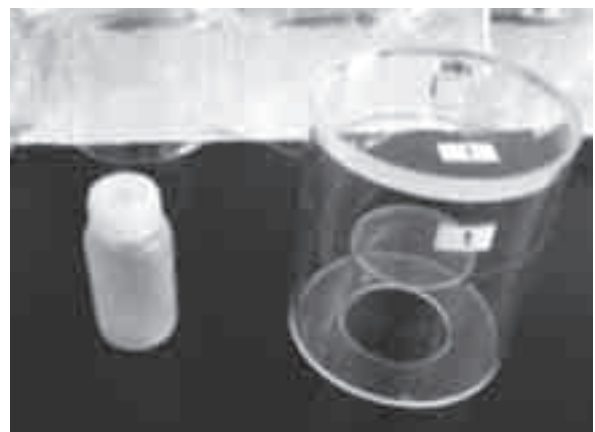
$$Fr = Pf / Pe \dots \dots \dots (1)$$

$Pf$ : 調理・加工前後における放射性物質濃度の比

$Pe$ : 調理・加工前後における重量の比



a) Ge 半導体検出器



b) 測定用容器 (左: 250mlポリビン, 右: 2Lマリネリ)

図2.  $\gamma$ 線スペクトロメトリー

本研究については、大豆の処理前後でどの程度セシウムが除去されているかを除去率 ( $Fm$ ) として以下の様に定め、評価を行った。

$$Fm = 1 - Fr \dots \dots \dots (2)$$

また、味噌製造における大豆の処理方法として、無圧煮、半煮半蒸、加圧蒸という方法がある。無圧煮については、昔ながらの方法であり、現在はほとんど行われていない。仙台味噌においては先にも述べたように、加圧蒸が採用されている。加圧蒸を行う事によって大豆成分の流出を防ぐことができ、旨味を閉じ込めることができる。また、色調については濃くなる傾向となる。半煮半蒸は無圧である程度煮た後に、加圧蒸を行う方法で、無圧煮及び加圧蒸それぞれの長所を持ち合わせた方法である。一般的に加圧蒸、半煮半蒸、無圧煮の順に蒸煮大豆の Y 値 (明度) が高くなり、製品である味噌もこの順に Y 値が高くなると言われている。また、旨味は逆に無圧煮、半煮半蒸、加圧蒸の順に強くなると言われている<sup>11)</sup>。このように、蒸煮方法が味噌の品質 (味、色など) に影響を及ぼしていることから、各蒸煮方法における除去率の違いについても評価した。

### 3. 結果および考察

まず原料大豆の放射性セシウム濃度測定を Ge 半導体検出器にて行った。その結果を図 3 に示す。これより、661 keV に Cs-137 由来の  $\gamma$  線のピークが、604 keV、795 keV に Cs-134 由来の  $\gamma$  線のピークが見られた。また、1460 keV に見られるピークは天然に存在する放射性物質であるカリウム 40 (K-40) 由来のピークである。定量結果としては、Cs-137 が 61 Bq/kg、Cs-134 が 44 Bq/kg、Cs 合計で 105 Bq/kg となった。

#### 1) 小スケール処理

原料大豆を洗浄した大豆および、洗浄後 3 倍量の水に一晩浸漬した大豆の放射性セシウム濃度はそれぞれ、90 Bq/kg、49 Bq/kg となった。また、処理後の重量を考慮した除去率を算出すると、それぞれ 6%、15% となり、ほぼ除去できていない

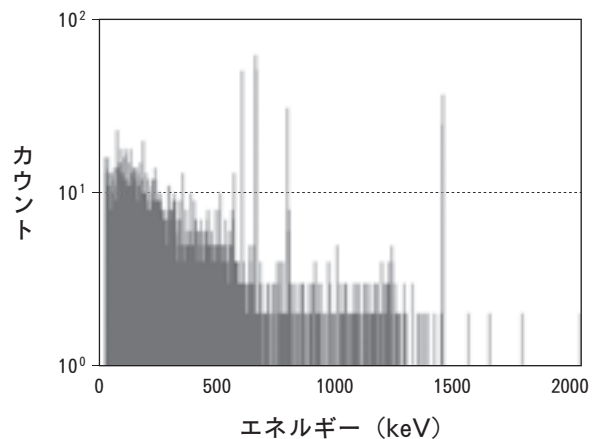


図 3. 原料大豆の  $\gamma$  線スペクトロメトリー結果

ことが分かった。また、洗浄水及び浸漬水については、放射性セシウムは不検出 (<5 Bq/kg) であった。浸漬後の濃度が下がり、除去されているように見えるが、浸漬後の大豆の重量は概ね 2 倍となるため<sup>12)</sup> にこのような結果となったと考えられる。

次に蒸煮については、加圧蒸を模したオートクレーブ処理では、放射性セシウム濃度が 47 Bq/kg、無圧煮については 20 Bq/kg となった。除去率では、オートクレーブ処理では 19%、無圧煮では 60% となり、無圧煮で除去率が高くなった。このことから蒸煮工程でセシウムの除去が可能である事が推察された。無圧煮については煮汁からも放射性セシウムが検出されたことから、大豆に含まれる放射性セシウムは煮汁に移行したものと考えられる。

#### 2) 試験仕込スケール処理

原料大豆 7~9 kg に 3 倍量の水を加え、一晩浸漬させた後、無圧煮、半煮半蒸、加圧蒸の 3 種類の加熱方法により蒸煮を行い、それぞれ総量 22 kg で味噌を仕込んだ。各工程における Cs-134、Cs-137 の測定結果を図 4 に示す。これより、原料で合計 105 Bq/kg であった大豆の Cs 濃度は、浸漬後 49 Bq/kg、蒸煮工程においては無圧煮、半煮半蒸、加圧蒸それぞれの処理後、19 Bq/kg、27 Bq/kg、42 Bq/kg となった。処理後の重量を考慮して原料大豆に対する除去率を求めると、浸

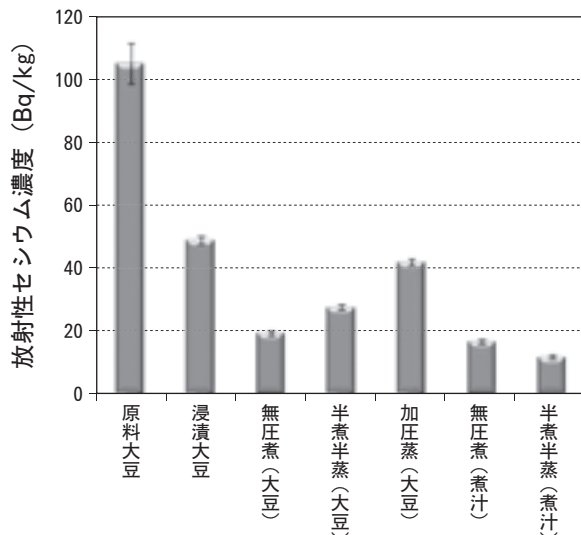


図4. 各大豆処理工程におけるセシウム濃度

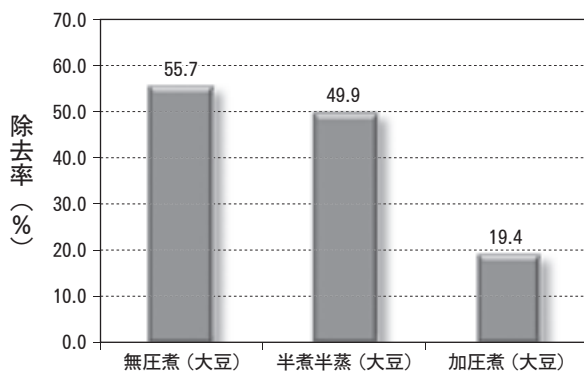


図5. 各蒸煮方法におけるセシウム除去率

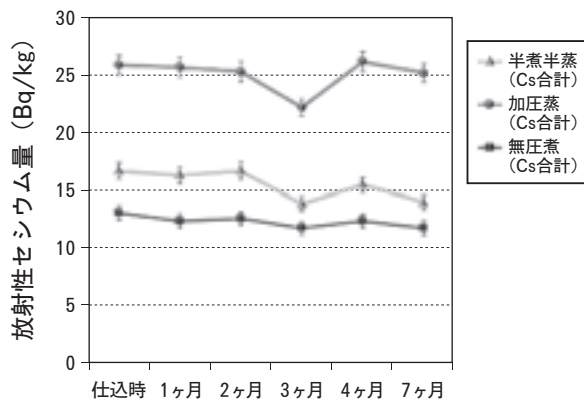


図6. 味噌の熟成過程におけるセシウム濃度の経時変化

漬後は0%, 無圧煮, 半煮半蒸, 加圧蒸それぞれの処理後, 56%, 50%, 19%となり(図5), 浸漬工程ではやはり除去されず, 蒸煮工程でCsの除去が進むことが分かった。また, 蒸煮方法の違いを見ると, 除去率は無圧煮, 半煮半蒸, 加圧蒸の順に高いことから「蒸す」工程よりも多量の水中で「煮る」工程を含む方が高く, その「煮る」工程の時間が長い方がより除去率が高いことが分かった。セシウムはリチウム(Li), ナトリウム(Na), カリウム(K)と同じ族の元素であり, イオン化しやすく, 化合物も水に溶けやすいと言われている。このことが理由で「煮る」工程での除去率が「蒸す」工程と比較して高くなったと考えられる。福島県農業総合センターでは煮豆加工による除去効果を, 蒸煮加工としてオートクレーブ処理, 水煮処理を行って調査しており, 水煮処理により浸漬時の濃度の1/2に, 蒸煮では浸漬と差異が無いということ報告している<sup>13)</sup>。今回の試験においても同じような結果となっている。

また, 味噌の仕込後の熟成過程でCsの濃度変化を追った。仕込直後は無圧煮味噌, 半煮半蒸味噌, 加圧蒸味噌それぞれにおいて13 Bq/kg, 17 Bq/kg, 26 Bq/kgであったが, 仕込後7ヶ月後の濃度は, 12 Bq/kg, 14 Bq/kg, 25 Bq/kgであり, 特に濃度の変動は見られなかった(図6)。

味噌の製造法, 特に大豆処理の方法はいくつかあり, その代表的な3種類の方法を用いて製造工程における放射性物質の動態を調査したが, どの製造方法においても原料大豆と比較すれば濃度の減少が見られ, 処理前後の重量を考慮した除去率についても原料大豆から20%から60%除去できるという結果を得た。以上の事より, 原料大豆について放射性物質の検査を行い, 基準値を下回ることが確認できれば, 最終製品である味噌において基準値を上回る様な現象は起きづらいと考えられる。

#### 4. まとめ

味噌の製造工程ごとに原料大豆の放射性セシウムの除去率を求めたところ, 蒸煮工程の特に煮工

程で除去率が高いことが分かった。仙台味噌の製法の特徴である加圧蒸工程でもセシウムの除去が見られた。

今回の研究において、大豆中のセシウムの存在形態については特に分析を行わなかった。そのため、除去率の向上に繋がる手法の開発までには至らなかった。また、各地方において特徴的な製法もあり、セシウムを効率的に除去できる方法があったとしてもそれを採用することによって、ブランドを名乗れなくなることも想定される。

原料の状態を把握し、安全な製品を提供し続けることが消費者の安心に繋がると考えられる。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご援助いただきました一般社団法人中央味噌研究所に感謝申し上げます。

## 参考資料

- 1) 厚生労働省「食品中の放射性物質の検査結果について」(2012)
- 2) 放射能情報サイトみやぎ, <http://www.r-info-miyagi.jp/r-info/>
- 3) 日本アイソトープ協会編,「アイソトープ手帳 11 版」, 社団法人日本アイソトープ協会 (2011)
- 4) 農林水産省,「大豆関連データ集 都道府県別生産状況」
- 5) 財団法人原子力環境整備センター,「環境パラメーターシリーズ 4 食品の調理・加工による放射性核種の除去率」(1994)
- 6) 農林水産省,「大豆都道府県別品種別作付状況」
- 7) 平成 24 年 3 月 15 日付 食安発 0 3 1 5 第 4 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中の放射性物質の試験法について」(2012)
- 8) 文部科学省,「放射能測定シリーズ No. 7 ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー」財団法人日本分析センター (1976)
- 9) 文部科学省,「放射能測定シリーズ No.24 緊急時におけるガンマ線スペクトロメトリーのための試料前処理法」財団法人日本分析センター (1992)
- 10) 厚生労働省,「緊急時における食品の放射能測定マニュアル」(2002)
- 11) IAEA, Technical Report Series No. 472 (IAEA-TRS-472), IAEA,Vienna (2010)
- 12) 今井誠一, 松本伊左尾,「味噌技術読本」, 新潟県味噌工業協同組合連合会, 新潟県味噌技術会 (1990)
- 13) 丹治克男, 関澤春仁,「大豆の加工に伴う放射性セシウム濃度の動態」日本作物学会第 234 回講演会要旨集 (2012)
- 14) 田上恵子, 内田滋夫,「農作物の調理・加工による放射性セシウムの除去割合 一米を中心に」, 第 13 回「環境放射能」研究会要旨論文集 (2012)

## 味噌に含まれる機能性 RNA の探索

藤岡 宏樹

Investigation of Functional RNA in Miso

Kouki FUJIOKA

*The Jikei University School of Medicine*

*3-25-8 Nishi-shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan*

### 緒言

マイクロ RNA は、20～25 塩基で構成された、タンパク質に翻訳されない RNA である。これらは、動物・植物などで発見されており、我々の体内でも遺伝子の発現を調節する働きをもつことが知られている。最近の研究では、疾病とマイクロ RNA の発現量に関連性が認められるものもあり、例えば、肺癌における let-7 の減少 (Takamizawa J et al., 2004)、肝細胞癌における miR-122 の減少が報告されている (Kutay H et al., 2006)。

また、食物がもつ種々のマイクロ RNA は、わずかながらに体内に移行することが報告されている。移行した RNA の機能については未解明な点が多いが、近年、米に由来する RNA (miR-168a) がコレステロールの調節に関与する可能性が報告された (Zhang L et al., 2011)。現在、精査が進められている段階ではあるが、マイクロ RNA はビタミンやミネラルと同様、食品からもたらされる機能性分子である可能性がある。

食用植物がもつマイクロ RNA については、各国で調査されており、米、麦、大豆などで研究報

告されたものは、データベース化されている。味噌の原料の一つである大豆のマイクロ RNA は、現在までに約 500 種類がデータベース (miRBase) に登録されており、機能解析や遺伝子マーカーとしての利用について研究が進められている。

一方、植物と微生物が調和する味噌については、マイクロ RNA の解析を行った報告はなく、構成されるマイクロ RNA の種類や割合については未解明である。これらを解明することで、味噌製造時の状態変化や、品質の確認などに応用できる可能性があるだけでなく、マイクロ RNA を介した大豆と麹菌の相互作用や、味噌とヒトとの相互作用について新しい発見につながる可能性がある。

そこで、本研究では味噌に含まれるマイクロ RNA を次世代シーケンサを用いて網羅的に解析、由来する生物種の同定、既知マイクロ RNA の種類・検出数の検討、更にヒトマイクロ RNA と相同性のある配列についての調査を行なった。



## 方法

### (1) 味噌サンプル

本検討では、大豆、米、食塩を原材料とする米味噌を用いた。

### (2) 短鎖 RNA の取得

味噌を液体窒素で凍結させた後、乳棒で破碎した。核酸抽出試薬 mirVana (Life Technologies) に、2 種類の精製補助試薬 Plant RNA Isolation Aid (Life Technologies)、及び p-bromoanisole (和光純薬) を組み合わせて精製を行い、短鎖 RNA を含む total RNA を採取した。採取した RNA を Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent) で計測し、RNA の精製度、及び塩基数の分布を検討した。その後、サイズによる選別 (18-30 塩基) を行ない、短鎖 RNA を取得した。

### (3) 短鎖 RNA の網羅的解析

取得した短鎖 RNA を次世代シーケンサ HiSeq 2000 (Illumina) で解析した。マイクロ RNA 配列の照合には、マイクロ RNA の発現が報告されている大豆、イネ、及びヒトの miRBase のデータ、また、生物種の同定には、大豆、イネ、麹菌、酵母菌、及び乳酸菌の GenBank のデータを用いた。

## 結果と考察

### 1. 米味噌から取得した RNA の性状

味噌から RNA を抽出した事例は少なく、抽出・精製法の検討から行なった。試薬の組み合わせを検討した結果、核酸抽出試薬 mirVana と p-ブromoアニソールを組み合わせた手法で最も効果的に精製できることがわかった。

精製した totalRNA を Agilent 2100 バイオアナライザで解析した結果、配列解析の障害となるリボソーム RNA がほとんど検出されなかった (図 1)。また、OD 比が 1.92 と高いため、タンパク質の混入も少ないことが示唆された。

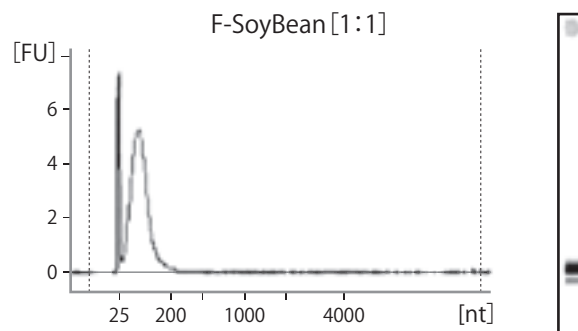


図 1. 米味噌から得られた RNA の解析

### 2. 米味噌に含まれる短鎖 RNA の由来生物種

次世代シーケンサによる解析の結果、21,956,321 個の RNA 配列を取得し、3,122,636 種類の解析に適した短鎖 RNA 配列が得られた。

これらの RNA 配列を GenBank の遺伝子配列に照合した結果、表 1 のように、大豆へのマッピング数が最も多く (40.83%)、麹菌 (31.90%) とイネ (24.83%) を合わせた 3 種の配列で大部分を占めていた。マイクロ RNA を発現しないとされる酵母菌の染色体にも、わずかながらマッピングされており (2.43%)、他の生物種のマイクロ RNA と相同性の高い配列が酵母菌染色体に含まれている可能性や、味噌の製造条件において、マイクロ RNA 様の遺伝子が発現、または残余した可能性がある。乳酸菌へのマッピング数は少なく全体の 0.26%であった。

表 1. 各生物種ゲノムへのマッピング数

	マッピング数	割合 (%)
大豆	8664639	40.83%
イネ	5270727	24.83%
麹菌	6770867	31.90%
酵母菌	496238	2.34%
乳酸菌	56130	0.26%

### 3. マイクロ RNA 配列の解析

miRBase のデータベースとの相同性が見られた配列のうち、最も検出頻度が高かったものが、米由来のマイクロ RNA である osa-miR168a-5p (131,699 カウント) であり、次に、大豆由来の gma-miR156 類 (19,358 カウント)、gma-

表2. 既知の大豆マイクロRNAと相同性の高い配列・計測数

No.	miRNA	Count without base edit	No.	miRNA	Count without base edit
1	gma-miR156b	19358	32	gma-miR3522	5225
2	gma-miR156f	19358	33	gma-miR167e	2819
3	gma-miR1507a	12470	34	gma-miR167f	2819
4	gma-miR1507b	12470	35	gma-miR1510b-5p	2236
5	gma-miR156k	7834	36	gma-miR167j	1624
6	gma-miR156n	7834	37	gma-miR167g	1624
7	gma-miR156o	7834	38	gma-miR2118a-3p	1046
8	gma-miR156h	7834	39	gma-miR2118b-3p	1046
9	gma-miR166p	7328	40	gma-miR168a	986
10	gma-miR166i-3p	7328	41	gma-miR168b	986
11	gma-miR166e	7328	42	gma-miR166r	843
12	gma-miR166g	7328	43	gma-miR166h-3p	835
13	gma-miR166c-3p	7323	44	gma-miR166j-3p	835
14	gma-miR166s	7241	45	gma-miR169m	144
15	gma-miR166t	7241	46	gma-miR169g	144
16	gma-miR166u	7241	47	gma-miR169f	138
17	gma-miR166n	7236	48	gma-miR169a	135
18	gma-miR166o	7236	49	gma-miR169v	135
19	gma-miR166f	7236	50	gma-miR156c	83
20	gma-miR166b	7236	51	gma-miR156m	83
21	gma-miR166d	7236	52	gma-miR156e	83
22	gma-miR166q	7236	53	gma-miR156i	83
23	gma-miR166a-3p	7198	54	gma-miR156g	83
24	gma-miR156u	5620	55	gma-miR156d	83
25	gma-miR156a	5620	56	gma-miR156l	83
26	gma-miR156w	5619	57	gma-miR156j	83
27	gma-miR156v	5618	58	gma-miR1511	17
28	gma-miR156x	5618	59	gma-miR1510a-5p	7
29	gma-miR156y	5618	60	gma-miR169n	2
30	gma-miR156q	5614	61	gma-miR156t	2
31	gma-miR156s	5614	62	gma-miR156p	2

miR1507 (12,470 カウント) が続いた (表 2, 3)。

一番多く検出された米由来の osa-miR-168a は、血中に移行してコレステロールの調整に関与している可能性があるとして報告されたマイクロRNA である (Zhang L et al., 2011)。機能については明らかでないが、米味噌の摂取によって、同様に血中に移行する可能性が考えられる。また、食塩が含まれる味噌製造の条件で安定して存在していることが示唆され、配列特性を調べることで、RNA 医療への応用などにつながる可能性がある。

ヒトへの相互作用の可能性について検討するため、ヒトマイクロRNA 配列との照合を行なった。この結果、11 種類の配列と相同性が認められた (表 4)。肝臓の脂質代謝や恒常性維持に関わる hsa-miR-122 (Sacco J et al., 2012) に相同性の高い配列 (5,430 カウント) や、肺癌での減少が

確認されている let-7 ファミリー (Takamizawa J et al., 2004) に相同性の高い配列 (1,174 カウント) などが得られている。これらの RNA の発現は、検出数全体の 0.3% 以下であることから、

表4. 既知のヒトマイクロRNAと相同性の高い配列・計測数

No.	miRNA	Count without base edit
1	hsa-miR-122-5p	5430
2	hsa-let-7f-5p	1174
3	hsa-miR-10a-5p	786
4	hsa-let-7a-5p	767
5	hsa-let-7b-5p	256
6	hsa-let-7c	155
7	hsa-miR-29a-3p	32
8	hsa-miR-92a-3p	20
9	hsa-let-7e-5p	12
10	hsa-miR-10b-5p	10
11	hsa-miR-29c-3p	5

表3. 既知のイネマイクロRNAと相同性の高い配列・計測数

No.	miRNA	Count without base edit	No.	miRNA	Count without base edit
1	osa-miR168a-5p	131699	24	osa-miR167j	1625
2	osa-miR156d	7834	25	osa-miR167g	1623
3	osa-miR156h-5p	7834	26	osa-miR827b	1349
4	osa-miR156f-5p	7834	27	osa-miR827a	1349
5	osa-miR156j-5p	7834	28	osa-miR166m	843
6	osa-miR166n-3p	7329	29	osa-miR528-5p	517
7	osa-miR166c-3p	7323	30	osa-miR156k	485
8	osa-miR166d-3p	7241	31	osa-miR1846e	364
9	osa-miR166a-3p	7241	32	osa-miR1848	234
10	osa-miR166f	7241	33	osa-miR169b	135
11	osa-miR166b-3p	7236	34	osa-miR169c	135
12	osa-miR156c-5p	5620	35	osa-miR444e	90
13	osa-miR156g-5p	5620	36	osa-miR1868	64
14	osa-miR156b-5p	5620	37	osa-miR444b.2	51
15	osa-miR156a	5618	38	osa-miR444c.2	51
16	osa-miR156i	5618	39	osa-miR444f	14
17	osa-miR156e	5618	40	osa-miR166l-3p	12
18	osa-miR820a	3268	41	osa-miR166k-3p	12
19	osa-miR820b	3268	42	osa-miR531a	4
20	osa-miR820c	3268	43	osa-miR531b	4
21	osa-miR167h-5p	1625	44	osa-miR5801	3
22	osa-miR167d-5p	1625	45	osa-miR5077	3
23	osa-miR167f	1625	46	osa-miR166e-3p	1

今後、ヒトへの機能の有無を明らかにするために、検出された RNA 配列がどのように働くのか、また、機能するために必要な濃度はどのくらい必要であるのかを検討していく必要があるだろう。

#### 4. 新規マイクロRNA候補の検出

最後に、検出配列をマイクロRNA予測プログラム (BGI, Beijing) で解析したところ、大豆、イネにおいて、それぞれ5種類の新規マイクロRNA候補が検出された。今後、発現の精査を行ない、科学財産としてデータベースへの登録につなげたい。

#### 結 語

本研究で、米味噌にマイクロRNAが含まれていることを明らかにした。多くは、大豆、イネ、及び麹菌の遺伝子と相同性の高いものであり、また、血中に移行することが報告されている miR-168a の配列に相同性が高いものも含まれていた。更に、わずかではあるが、ヒトマイクロRNAと

相同性の高い配列が検出されており、今後、機能について検討を進めていくことで、味噌の摂取と健康との関連について新しい切り口を開拓できる可能性がある。

#### 謝 辞

本研究は (一社)中央味噌研究所からの平成 24 年度研究助成によって実施されました。ご支援に感謝いたします。また、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。

#### 参考文献

- Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem.* 2006 Oct 15;99 (3) : 671-8.
- Sacco J, Adeli K. MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2012 Jun;23(3):220-5.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3753-6.

Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X, Yin Y, Wang C, Zhang T, Zhu D, Zhang D, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen J, Wang J, Wang M, Zhang Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 2012 Jan;22(1):107-26.