

研究助成報告

平成25年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成による研究報告

製麴及び味噌製造におけるポリアミン量の評価と その変動要因の解明

—市販味噌中ポリアミン量と米味噌熟成中ポリアミン量の消長に関する調査—

小林 和也*, 渡辺 聡

Evaluation of changes in polyamine contents of koji and miso
during production process

—Comparison of polyamine levels in the commercial miso and determination of polyamine variation
during the fermentation process—

Kazuya KOBAYASHI*, Satoshi WATANABE

*Food Research Center, Niigata Agricultural Research Institute
2-25 Shin-ei cho, Kamo, Niigata 959-1381, Japan*

緒言

ポリアミンは、複数のアミノ基を有する脂肪族ポリカチオンの総称で、細菌からヒトに至るまでの全ての生物に遍在している。スペルミン (SPM) およびスペルミジン (SPD) とジアミンのプトレッシン (PUT) が、代表的なポリアミンである。ポリアミンは、遺伝子発現を制御する働きを持つことから、生命活動に欠かすことのできない化合物である¹⁾。また、早田らは、ポリアミンが動脈硬化や炎症に関与していることを報告している^{2,3)}。さらに、細胞内のポリアミン濃度は加齢に伴い減少し⁴⁾、その結果として病因につながることから、ポリアミンの補給はアンチエイジングに寄与すると考えられている。ポリアミンは食品から補給することができ、継続的な高ポリアミン食の摂取が血中ポリアミン濃度を増加させることが確認されている⁵⁾。このような背景から、種々の食

品に含まれるポリアミン量に関心が持たれている。

すでに食品中のポリアミン量に関する研究がなされており、豆類とその加工品、キノコ類および魚介類等のポリアミン量が高いと報告されている^{4,6,7)}。また、乳製品にはポリアミンがほとんど含まれていないものの、青カビを用いて発酵させたチーズからはPUTおよびSPDが検出されることから、微生物発酵を利用することで食品中のポリアミンを増加できることが示唆されている。しかし、ポリアミンを豊富に含む大豆を原料とした味噌は、大豆と比べるとポリアミンが非常に少なく、その原因は明らかになっていない。

そこで本研究では、市販品と試醸した味噌中のポリアミン量を分析した。その結果、味噌製造におけるポリアミンの消長に関する基礎的な知見を得たので報告する。

実験方法

1. 製麴および味噌の試醸

米は新潟県産こしいぶき、大豆は北海道産とよみづきを使用した。味噌の製造に使用する米麴は、次のように製造した。まず、一晚浸漬した精白米を60分間蒸きょう後、37℃まで放冷し味噌用種麴（日本醸造工業(株)製）を接種した。種付けを終えた蒸米を35℃に設定したインキュベータに移し、適宜手入れをしながら製麴し、44時間出麴とした。また、大豆は、一晚浸漬後、加圧蒸煮（0.1MPa・12分間）し、らい砕（濾し網、3mm）した。

米味噌は、麴歩合8歩、塩分濃度12.0%、予定水分50%になるように処理大豆、米麴、食塩を混合し、味噌酵母（*Zygosaccharomyces rouxii* S96）の培養液を仕込総量に対して3%量（10⁶/g味噌）添加した後、約30℃・90日間発酵・熟成させた。

2. 分析

1) ポリアミンの分析

サンプル1gを分取し、内部標準（ジエチレントリアミン3塩酸塩）溶液（1μmol/ml）を1ml添加した。その後5%トリクロロ酢酸で3回抽出し、抽出液を25ml容メスフラスコに取り、定容した。このサンプル液1mlをBond Elut®SCXで固相抽出（洗浄液：0.5N HCl 1ml×2、溶出液：6N HCl 0.5ml×2）して、遠心エバポレータ

にて濃縮乾固し、その後Schenkelらの方法⁸⁾を基に、ベンゾイル誘導体化した。すなわち、サンプルに1mlの2M NaOHと5μlの塩化ベンゾイルを添加して30分間適宜攪拌した。その後、2mlの飽和食塩水を加えて混和し、ジエチルエーテルで3回抽出した。これを濃縮乾固し、1mlのメタノールで溶解したものをHPLCに供した。

2) 味噌の分析

味噌の水分およびpHは基準みそ分析法⁹⁾に準じて測定した。Y値の測定には、測色計（CM-3500d、コニカミノルタ製）を用いた。乳酸、アルコールの測定には、それぞれHPLC/CDD（CDD-6A、島津製作所製）、GC/FID（GC-2014、島津製作所製）を用いた。アミノ酸の測定には、アミノ酸分析計（L-8800、日立製）を用いた。

結果と考察

1. 市販味噌の分析

市販味噌10種類の分析結果を表1に示した。SPDは10.5～108.5nmol/gであったのに対して、SPMは未検出～14.0nmol/gであった。分析結果を解析したところ、味噌ポリアミン量はタンパク質および脂質との間に正の相関関係が認められ（SPD vs. タンパク質：r=0.752）、大豆の原料割合の高い大豆ほどポリアミン量が高いこ

表1. 市販味噌中ポリアミン量およびその他の成分量

味噌	kcal* g/100g	タンパク質* g/100g	脂質* g/100g	炭水化物* g/100g	食塩* g/100g	水分 %	Y %	pH	グルタミン酸 mg/100g	ポリアミン nmol/g		
										PUT	SPD	SPM
白甘味噌	240	7.3	4.0	43.7	4.9	46.6	30.4	5.60	172	269	57.2	9.1
米味噌(減塩)	211	12.3	6.0	26.9	5.2	56.9	20.8	5.62	398	208	58.8	6.8
米味噌1	193	9.3	4.7	28.0	11.3	53.8	17.7	5.42	517	282	21.9	3.7
米味噌2	194	8.8	4.7	29.0	12.0	51.3	11.1	5.21	425	218	19.3	2.4
米味噌3	185	10.8	6.2	21.5	13.1	51.9	8.8	5.30	369	132	39.1	4.5
米味噌4	194	8.9	3.9	30.8	10.7	46.8	12.0	5.28	321	250	10.5	n.d.
米味噌5	200	11.1	5.7	26.0	11.7	51.3	12.8	5.28	454	219	22.0	3.4
豆味噌	221	17.2	8.9	17.9	10.4	46.5	1.5	4.88	1194	128	108.5	14.0
麦味噌1	207	8.7	3.7	34.6	10.4	49.5	11.2	5.15	382	183	31.0	4.7
麦味噌2	206	9.0	4.1	33.2	10.9	47.5	17.7	5.23	435	292	43.2	11.5

※栄養成分表示から転記した。Glu：グルタミン酸、PUT：プトレッシン、SPD：スペルミジン、SPM：スペルミン。n.d.：未検出。

とを示した。特に、豆味噌は、タンパク質含量の少ない米や麦が使用されず大豆のみが原料であることが影響したものと考えられた。また、SPD量とSPM量との間に高い相関関係が認められ ($r=0.883$), SPD量とSPM量の変動は類似することが明らかになった。

以上の結果から、味噌中SPD量およびSPM量は、大豆中のSPD量 (700~1500 nmol/g D.W.) 比べると低く、さらに各製品間で数値が大きく異なっていたものの、既報のポリアミン量と同程度であった^{4,6,7)}。また、大豆の使用割合の高い味噌ほどポリアミン量が高いと示唆されたため、味噌中ポリアミン量は大豆に由来するものと考えられた。

2. 新潟県産味噌の分析

次に、新潟県内の味噌メーカーが製造した米味噌の分析結果を表2に示した。味噌中ポリアミン量は、SPDが0.6~141.5 nmol/g, SPMは未検出~31.7 nmol/gであった。また、味噌中SPD量とSPM量との間に高い相関関係が認められた ($r=0.923$)。

市販味噌と比較すると、著しくポリアミン量の低いものが、県産味噌には認められた。これまでSPDおよびSPMが味噌から検出されない事例が報告されている^{4,6,7)}。また、味噌熟成に伴い低下するpHとSPDあるいはSPMの間には、弱い正の相関関係が認められた (それぞれ, $r=0.621$,

表2. 新潟県産味噌中ポリアミン量, Y値, pHおよびグルタミン酸量

工場	Y %	pH	グルタミン酸 mg/100g	ポリアミン nmol/g		
				PUT	SPD	SPM
A	16.1	5.14	553	431	34.3	0.1
B	11.9	5.09	517	575	58.4	2.4
C	28.6	5.43	362	290	120.2	22.8
D	16.9	5.11	321	445	0.6	n.d.
E	21.4	5.30	511	408	36.6	0.4
F	15.1	5.16	429	296	64.0	17.9
G	20.2	5.29	342	234	141.5	31.7
H	15.4	5.20	359	294	1.5	n.d.

PUT: プトレッシン, SPD: スペルミジン, SPM: スペルミン。
n.d.: 未抽出。

$r=0.573$)。さらに、供試した味噌は、いずれも米辛口味噌で大豆の原料割合が同程度であることから、味噌の発酵・熟成中にSPDおよびSPMが減少している可能性を示していた。

3. 異なる製造条件の米味噌中ポリアミン量

米味噌の製造条件がポリアミン量に及ぼす影響を把握するために、発酵条件 (微生物の添加および温度), 麴歩合 (5割, 8割および15割), 大豆処理 (加圧蒸し, 半煮半蒸および水煮) および塩分濃度 (9%, 12%および14%) を変動させて米味噌を製造し、ポリアミン量および味噌の発酵状態を示す性状を測定した (表3)。

麴歩合の違いでは、麴歩合が低い、すなわち大豆の原料割合が高い試験区ほど仕込直後のSPM量が高く、熟成後も減少はしているものの傾向は同様であった。

発酵条件の異なる味噌を分析した結果、酵母あるいは乳酸菌の接種に応じてアルコールあるいは乳酸が検出されたため、接種した微生物の増殖が確認された。しかし、熟成後の味噌中ポリアミン量は、いずれの発酵微生物の有無に関わらず熟成中に減少した。当初、味噌中ポリアミン量は微生物発酵と関連すると推測していたが、以上の結果は、発酵条件が味噌中ポリアミンに影響しないことを示した。

製造試験の結果、全ての製造条件で味噌中ポリアミン量が熟成中に減少することが明らかになった。さらに、熟成中の減少は、製造条件の差異にほとんど影響されなかった。食品加工中のポリアミンの減少原因としては、高温 (121~220℃) での加熱処理が報告されているものの^{10,11)}, 味噌の熟成温度はこれほどの高温ではない。味噌熟成中には、主に米麴から供給された酵素による成分分解とメイラード反応が進行している。ポリアミンの減少にもこれらの反応が関わっていると推察されるが、この要因については詳細な検討を要する。

まとめると、市販味噌の分析結果から、味噌中ポリアミンは大豆に由来するため、大豆の使用割合の高い味噌ほどポリアミンが多い傾向が認められた。しかしながら、発酵・熟成中に味噌中ポリ

表3. 製造条件の異なる味噌の比較

概要	仕込直後				熟成途中 ¹⁾								製品 ²⁾					
	Y %	ポリアミン nmol/g			Y %	pH	アルコ ール %	乳酸 %	ポリアミン nmol/g			Y %	pH	アルコ ール %	乳酸 %	ポリアミン nmol/g		
		PUT	SPD	SPM					PUT	SPD	SPM					PUT	SPD	SPM
対照	33.1	284.6	433.9	86.5	21.5	5.55	1.81	n.d.	408.4	193.4	53.7	11.5	5.23	1.15	n.d.	381.8	128.2	31.0
発酵条件	同上	同上	同上	同上	20.5	5.65	0.24	n.d.	459.9	243.4	59.0	9.0	5.21	0.16	n.d.	310.8	139.7	24.4
酵母無添加	同上	同上	同上	同上	20.6	5.49	n.d.	0.27	384.0	237.0	56.0	9.7	5.08	0.22	0.39	231.8	121.9	9.1
乳酸菌添加	同上	同上	同上	同上	—	—	—	—	—	—	—	13.0	5.32	—	—	339.6	226.4	43.0
麹歩合 5割	33.8	216.8	390.5	112.0	—	—	—	—	—	—	—	11.4	5.08	—	—	311.6	254.3	15.1
15割	33.5	249.8	310.4	75.8	—	—	—	—	—	—	—	10.9	5.16	—	—	407.2	170.3	31.1
大豆 半煮半蒸	38.4	294.8	328.2	73.1	—	—	—	—	—	—	—	13.5	5.22	—	—	868.2	175.0	33.2
処理 水煮	36.1	262.8	354.8	64.2	—	—	—	—	—	—	—	9.2	5.23	—	—	564.1	226.3	22.1
塩分 塩分9%	31.9	252.7	403.3	82.7	—	—	—	—	—	—	—	13.3	5.28	—	—	648.7	143.1	30.4
濃度 塩分14%	32.9	251.4	297.6	76.0	—	—	—	—	—	—	—							

PUT：プトレッシン，SPD：スペルミジン，SPM：スペルミン。n.d.：未検出。

1) 熟成途中：30日目，2) 製品：90日目

アミンが減少し，一部の味噌ではポリアミンがほとんど消失することが明らかになった。

謝 辞

本研究は，一般社団法人中央味噌研究所平成25年度研究助成により実施されました。関係各位に深く感謝いたします。また，味噌を提供頂いた各社とその際にご協力頂きました一般社団法人中央味噌研究所および新潟県味噌工業協同組合連合会に感謝いたします。

引用文献

- 1) Cohen, S. S.: A Guide to the Polyamines (Oxford University Press, New York), 1-543 (1998)
- 2) Soda, K., Kano, Y., Nakamura, T., Kasono, K., Kawakami, M. and Konishi, F.: *J. Immunol.*, 175, 237-245 (2005)
- 3) Soda, K., Kano, Y., Chiba, F., Koizumi, K. and Miyaki, Y.: *PLoS One*, 8, e64357 (2013)

- 4) Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K. and Igarashi, K.: *J. Biochem.*, 139, 81-90 (2006)
- 5) Soda, K., Kano, Y., Sakuragi, M., Takao, K., Lefor, A. and Konishi, F.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 361-366 (2009)
- 6) Okamoto, A., Sugi, E., Koizumi, Y., Yanagida, F. and Udaka, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1582-1584 (1997)
- 7) Nishibori, N., Fujihara, S. and Akatuki, T.: *Food Chemistry*, 100, 491-497 (2007)
- 8) Schenkel, E., Berlaimont, V., Dubois J, Cambier, H. M. and Hanocq, M.: *J. Chromatogr. B*, 668, 189-197 (1995)
- 9) 好井久雄，伊藤寛，今井誠一，安平仁美，海老根英雄，毛利光之，藤波博子：基準みそ分析法，（全国味噌技術会，東京）48-53（1995）
- 10) Verciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A. and Vidal-Carou, M. C.: *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4324-4328 (1997)
- 11) Oliveira, D. S., Franca, S. A., Glória, A. B. M. and Borges, A. L. M.: *Food Chemistry*, 90, 287-291 (2005)

研究助成報告

平成26年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成による研究報告

味噌製造工程と 味噌の新規抗高血圧機能性に関する研究

上原 誉志夫

Manufacturing Process of Japanese Traditional Miso and Expression of
Anti-hypertensive Property

Yoshio UEHARA

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

はじめに

われわれはこれまで、習慣的味噌汁摂取により Dahl 食塩高血圧ラットの血圧上昇が抑制されることをみだし、血圧抑制には腎臓での Na 利尿促進因子と循環血液を介する降圧因子が関与することを報告してきた。しかし、この降圧成分が味噌の製造工程の何に由来するのか、また製造上の材料の何に由来するのか明らかではなかった。これには味噌の降圧活性を簡便に再現性良く検出する測定系がこれまで存在しなかったことに一因がある。

最近、われわれは、味噌上清 3k-5kDa 分画を腹腔内投与することで、Dahl 食塩感受性ラットの血圧が用量依存的に低下することから、味噌中の降圧活性を測定する系として使用できることをみだした。この測定系を用いて、降圧因子を精製同定することで、さらに物理化学的な降圧因子評価法を確立することが可能と考えた。したがって、本研究では、新規抗高血圧因子の単離を試み、簡易な降圧因子評価法をみだして、①味噌によ

る降圧活性が製造工程のどこで発現するか、②味噌製造上の材料や熟成度との関連、③味噌製造の地域差の有無を検証し、味噌の降圧機能性を強化する方策などへの応用を試みることを目的とした。

1. 新規抗高血圧因子の精製と同定

皮下投与による抗高血圧因子は、50 mg 味噌からの抽出物を 24 hr で持続皮下投与したところ、14 日目には約 20 mmHg の血圧低下がみられ、かつ腎からの Na 排泄には変化がみられなかった。これから、経口投与時にみられた腎 Na 利尿因子とは異なると結論され、抗高血圧因子の精製を試みた。SDS-PAGE では 3kDa 近辺と 5kDa 近辺にバンドがみられ、native PAGE 上では 3 ピークが同定できたが、そのうちの 1 ピークからの抽出物に主な降圧活性がみられた。この降圧因子の C₁₈HPLC 分離パターンを図 1 の上段に示した。ニコチアミンの標品からは、RT1.5-1.6 にピークがみられ、RT2.6 は未知の降圧因子と考え

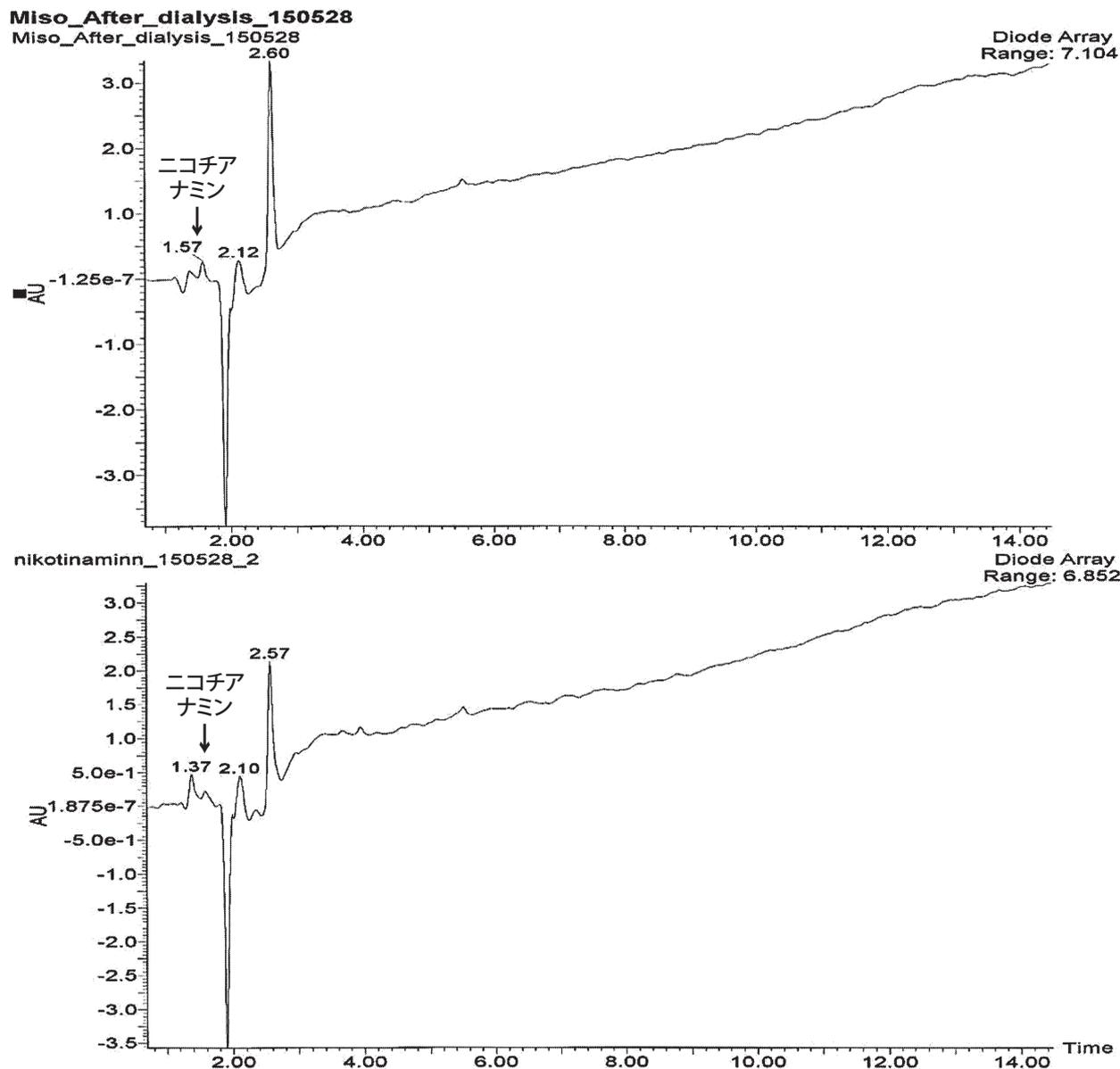


図1. native PAGE上の降圧因子（上段）と大豆由来ニコチアナミン粗分画の分析 C₁₈-HPLC 分離パターン

られた。大豆からのニコチアナミンの粗分画（秋田県総合食品研究センター 高橋砂織博士から提供）の C₁₈HPLC の分離パターンでは 1.6 近辺と 2.57 にピークがみられた（図1下段）。本粗分画は Dahl 食塩感受性ラットの血圧抑制効果がみられたが、混入する RT2.57 の因子による可能性もあり、味噌に含まれるニコチアナミンが降圧に関与するか現在のところ明らかではない。

一方、3k-5kDa 味噌分画の分画用 C₁₈HPLC の分離パターンからは5つのピークが同定でき、そのうちの3ピークに降圧活性がみられた。その一

つのピークは、分析 HPLC 上 RTが2.6分近辺の新規降圧物質であり、他の2ピークも新規の降圧因子であると考えられた。一方、ニコチアナミンに一致する分画には降圧活性はみられなかった。このようにいくつかの降圧因子がみられたが、このうち RT2.6 分の分画を使用することで、味噌の相対的な降圧活性の評価が可能と考えられた。本研究の一部は、第38回日本高血圧学会総会(平成27年10月9-11日松山)にて発表した(清水奈美子: Young Investigator Forum 研究奨励賞受賞)。

味噌に含まれる高血圧抑制因子の部分精製の試み —電気泳動による降圧因子の抽出およびHPLC を用いた分析—

Purification of the hypertensive inhibitor contained in miso

-Extraction of the anti-hypertension using PAGE and HPLC analysis-

味噌は製造上塩分を使用することから高血圧への影響が推測されてきた。しかし、我々は、これまでの研究から味噌には交感神経や血管壁、血管平滑筋細胞に影響を与え、血管を直接的に拡張する物質が含まれることを報告してきた。しかし、これらの作用を発現させる物質の特定には至っていない。本研究では電気泳動及びHPLCを用い、味噌機能性成分の一つである抗高血圧因子の抽出・精製を試みた。

POLYTRON ホモジナイザーを用いて10% (10g/100mL) 味噌溶液を作成し、加熱滅菌処理後、遠心分離 (3000 rpm) にて可溶性分画を分取した。本上清から限外濾過法によって分子量3kDa～5kDa分画を作成し、native-PAGE、C₁₈-HPLCでの精製に用いた。降圧活性の評価には、4週間高食塩食 (4%) を与えた8週齢雄Dahl食塩感受性ラット (Dahl-S) を用いた。精製試料 (0.5mL) を腹腔内投与し4時間後の収縮期血圧を1.3%食塩水投与ラットと比較した。血圧測定にはtail-cuff法を用いた。

加熱滅菌味噌溶液について、膜濾過法による分子量分画の結果、<3kDa分画には降圧活性はみられず、<5kDaと味噌溶液との比較では<5kDa分画に降圧活性が存在することから、本アッセイ系での降圧物質は3k～5kDaに存在することが示唆された。本分画をさらに、SDS-PAGEで解析したところ、銀染色陽性のバンドが3kDaと5kDa近辺にみられ、さらにnative-PAGEでの解析では、陽極方向にブロードのバンドが、それに続き3本のバンドが分離された。PAGEから溶出された抽出物質の降圧活性を検討したところ、陰性荷電の低いバンドに最も強い降圧活性がみられた。本抽出物質を透析後にC₁₈-HPLCにて分析したところ、retention time 2.48 minにsingle peak が得られた。

味噌に含まれる高血圧抑制因子は、味噌上清中の3-5kDa分画に多く含まれていることがわかった。また、native-PAGEとHPLCの結果より高血圧抑制因子は味噌中のタンパク質に含まれている可能性が示唆され、その中でも最も陽性に荷電していた分画において高い降圧活性がみられた。その含有量は、HPLCで得られたピークの高さから味噌上清中に数百ng/mlであることがわかった。今後はこれらの実験によって検出されたピークについて降圧特性を検討し、また化学構造を同定する必要がある。

2. 新規抗高血圧因子の特性

味噌の降圧活性の特性を検討した。味噌は大豆と麴、塩で製造するため、原料による降圧活性を調査したところ、大豆のホモジネートには皮下注射による降圧活性はみられなかった。さらに、麴のホモジネートを30日間経口投与したが、Dahl食塩感受性ラットの高血圧には影響がみられず、大豆の発酵により降圧活性が発現されると考えられた。

また、製造条件では3ヶ月発酵味噌での降圧活性が高く、一方12ヶ月発酵では降圧活性がほぼ消失することから、比較的早い時期の味噌が効果的であることが示された。

今後は、簡易なHPLCを用いた物理科学的な定量法を応用し、地域性のある各種味噌における降圧活性の発現をスクリーニングし、製造工程との関係についても究明する。

3. 味噌汁摂取が血圧に及ぼす影響

味噌は大豆と麴と食塩から作られる日本の伝統的な食品であるが、日本人の食事に占める味噌汁由来の食塩摂取の割合は9.7%との報告もあり、味噌摂取は高血圧発症のリスクを高めると考えられてきた。しかし、味噌摂取が血圧に影響するかについては必ずしも実証されていない。我々はDahl食塩感受性ラットを用いて長期にわたる味

表 1. 正常血圧者および正常高値血圧以上者における味噌摂取の違いと血圧値との関係

Frequency of Miso Soup Intake	n	Salt Intake (g/day)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)
BP < 130/85 mmHg				
Miso-1	37	7.6 ± 2.8	118.9 ± 6.5	73.9 ± 6.6
Miso-2	130	8.8 ± 2.9	117.5 ± 7.8	73.1 ± 5.8
Miso-3	27	11.3 ± 2.9	119.0 ± 6.5	74.7 ± 5.7
BP ≥ 130/85 mmHg				
Miso-1	41	7.7 ± 2.7	136.3 ± 8.3	87.7 ± 6.8
Miso-2	74	9.6 ± 3.0	138.0 ± 9.9	87.6 ± 7.6
Miso-3	21	11.3 ± 4.0	140.3 ± 6.8	86.6 ± 7.5

味噌汁摂取が一日0.5杯未満を1群(Miso-1)、0.5杯以上1.5杯未満を2群(Miso-2)、そして1.5杯以上を3群(Miso-3)とした。味噌汁摂取回数の増加とともに食塩摂取量の有意な増加がみられたが、血圧は収縮期(SBP)、拡張期(DBP)ともに有意な変化はみられなかった。

味噌汁摂取がむしろ食塩感受性高血圧を抑制すること、高血圧性心・腎障害を軽減することを見出し報告してきた。さらに、味噌には血管拡張・交感神経活性抑制・腎 Na 利尿効果増強など機能性物質が含まれることを発表してきた。今回は味噌汁摂取と血圧との関連性をヒトで検証するため、人間ドック受診者 330 人を対象に実施した 5 年間の観察研究の結果をまとめ、第 38 回日本高血圧学会総会(平成 27 年 10 月 9-11 日松山)にて発表した(作山裕恵)。

習慣的味噌汁摂取が血圧に及ぼす影響 ～ 5 年間の観察研究～

2010 年から 2014 年までの 5 年間に東京都教職員互助会三楽病院における人間ドックを受診した者で、高血圧・心臓病・腎疾患及び代謝性疾患などの生活習慣病で治療を受けていない男性 330 人を無作為に抽出した。健診実施後、直近 1～2 か月のうちの 1 週間について、聞き取り法による食事嗜好性調査・味噌汁摂取状況を調査した(FFQg ver3.0)。味噌汁摂取状況と血圧との関連を分散分析、重回帰分析にて解析した(STATISTICA ver.12)。変量は平均±標準偏差で表し、有意差水準は $p < 0.05$ とした。

味噌汁摂取回数は 5 年間で 0.83 杯 ± 0.56 から 1.31 杯 ± 1.01 と平均一日 0.48 杯増加し、食塩摂取量も 9.09g ± 3.23 から 10.05g ± 3.36 へと平均一日 0.96g 増加したが、食塩摂取量の増加にも関わらず収縮期及び拡張期血圧には変化がみられなかった。さらに、味噌汁摂取回数の増加は血圧値

に変化を与えず、正常血圧群と正常高値～高血圧群とに分けた検討では、いずれの血圧群においても味噌汁摂取量は血圧に影響を与えなかった(表 1)。味噌汁摂取時の血圧決定因子を重回帰分析で検討したところ、血清 Na, K 値及び BMI が独立因子として抽出されたが、これらに影響する栄養素摂取量は血圧の決定因子には関与しなかった。

5 年間の追跡調査から、味噌汁摂取の増加は血圧値に影響せず、食塩摂取増により予測される血圧上昇の抑制が示唆された。このような味噌による効果は、正常血圧者のみならず正常高値～高血圧者においても観察された。味噌摂取はヒトにおいて食塩摂取増による血圧への影響を抑制することが示され、本成績はこれまでの Dahl 食塩感受性ラットにおける実験結果を支持するものであった。

おわりに

味噌における降圧因子は複数あると考えられ、その一つにはニコチアナミンの存在が推測される。しかし 3k-5kDa の分画にはそれ以外にも複数の新規降圧因子が関与することが示された。HPLC の分離上は RT が 2.6-2.8 分近辺にあり、この部位の吸収を指標に味噌製造方法との関連を調査している。ニコチアナミン粗分画にも経口投与により血圧低下作用があるが、味噌の降圧活性にニコチアナミンが関与しているとする、

3kDa以下の分画にあり HPLC パターンから評価指標として使用される可能性もある。さらに、HPLC 上は未知の降圧因子が検出見出されており、現在この活性因子の同定を進めているが、それとともにこの吸収を指標に味噌の評価方法を構築することも視野にいれている。降圧機能性因子の同定を進め、効率的な評価方法の確立と応用之道を繋げる予定である。

文献

- 1) 清水奈三子, 作山裕恵, 上原誉志夫: 味噌に含まれる高血圧抑制因子の部分精製の試みー電気泳動による降圧因子の抽出および HPLC を用いた分析ー. 第 38 回日本高血圧学会総会. 平成 27 年 10 月 11 日 第 5 会場 (愛媛県県民文化会館 (ひめぎんホール) 第 5・7 会議室).
- 2) 作山裕恵, 立崎成葉, 南茂彩, 上原誉志夫: 習慣的味噌汁摂取が血圧に及ぼす影響. 第 38 回日本高血圧学会総会. 平成 27 年 10 月 11 日 第 5 会場 (愛媛県県民文化会館 (ひめぎんホール) 第 5・7 会議室)
- 3) Shimizu N, Du D, Sakuyama H, Ito Y, Sonoda M, Kawakubo K, Uehara Y: Continuous Subcutaneous Administration of Miso Extracts Attenuates Salt-Induced Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats. Food and Nutrition Sciences 2015;6 (8):693-702. doi: 10.4236/fns.2015.68072.
- 4) 上原誉志夫: 高血圧ならみそ汁を飲みなさい! 実業之日本社 2015.
- 5) 上原誉志夫: みそ汁は多機能な食品。塩分を排泄し, 血管を拓げるから心臓病, 高血圧, がんを防ぐ。脳卒中, 心筋梗塞, 突然死を防ぐ 101 のワザ. 主婦の友インフォス情報社 / 東京. pp134-135, 2015.
- 6) 上原誉志夫: 第 3 章大豆加工食品の機能性 4. 味噌. 家森幸男監修 大豆の栄養と機能性. シーエムシー出版 / 東京. pp107 ~ 115. 2014.
- 7) Du D, 海老澤香里, 宮本悠紀, 吉永真理子: 習慣的味噌汁摂取の抗高血圧作用の機序. 日本醸造協会誌 2014;109 (3):128-136.

米味噌の抗酸化能を高める製造方法に関する研究

桐原 広成, 古口 久美子

Study on Manufacturing Technology of Rice Miso
for Increase of Antioxidant Capacities

Hironari KIRIHARA and Kumiko KOGUCHI

*Industrial Technology Center of Tochigi Prefecture
1-5-20 Yuinomori, Utsunomiya-shi Tochigi 321-3226, Japan*

I 緒言

味噌は我が国の伝統的な発酵調味料であり、古来より日常的に食されている。近年、味噌、大豆は栄養補給の観点だけではなく様々な健康機能^{1),2)}が報告されている。特に、抗酸化作用は体内で発生する活性酸素を除去し、がんや老化の原因である細胞や遺伝子の損傷を抑えることが期待される。

抗酸化能を測定する方法に、亜硝酸法、ロダン鉄アンモニウム法、チオバルビツール酸法及びDPPH (1, 1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)ラジカル消去法があるが、それぞれ特徴があるものの、測定値の相互比較は困難であった。

1992年に Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法が開発され、その後改良が加えられ水溶性と脂溶性の抗酸化能を分別測定できるようになった。また、アメリカでは以前、農産物や食品の ORAC 法による測定結果が公表されており、我が国でも Antioxidant Unit 研究会が発足するなど ORAC 法の普及促進の動きがある。

そこで本研究では、米味噌の抗酸化能を高める

ため、ORAC 法及び DPPH 法により味噌の製造工程における抗酸化能の変化及び米味噌への大豆散麴利用による抗酸化能増加効果について検討を行った。抗酸化能変化の要因について、原材料(大豆麴を含む)、発酵微生物、熟成期間、試料中の抗酸化性成分等を検討し、いくつかの知見を得たので報告する。さらに抗酸化能利用の一例として、油脂劣化防止効果についても検討したので、併せて報告する。

II 方法

1 抗酸化能及び関連成分等の分析法

分析試料の前処理

ORAC 法による抗酸化能測定及び関連成分の分析用試料は凍結乾燥を行い、粉碎して試験に供した。DPPH 法による抗酸化能測定については、微生物の培養液及び小仕込味噌試料に限り、凍結乾燥を行わない生の試料から抽出を行った。味噌の DPPH での抗酸化能は試料の湿重量あたり、それ以外の結果は試料乾物重量

あたりの数値を示した。

抗酸化能測定

ORAC 測定は渡辺ら³⁾の方法を参照し、蛍光プレートリーダー (InfiniteF200, TECAN 社製) を用いた。水溶性抗酸化能 (H-ORAC) の成分抽出には AWA 溶液 (アセトン:70, 超純水:29.5, 酢酸:0.5 の混合液), 脂溶性抗酸化能 (L-ORAC) の成分抽出にはアセトンおよび RM 溶液 (アセトン:50, 超純水:43, メチル- β シクロデキストリン:7 の混合液) を用いた。ORAC とのみ表記した測定値は, 水溶性抗酸化能 (H-ORAC) と脂溶性抗酸化能 (L-ORAC) の合計値を示した。DPPH 法の試料は, 松尾ら⁴⁾の方法をもとに 80% エタノールで抽出し, 須田⁵⁾の測定法に準じた。

抗酸化成分等の分析

総ポリフェノール量は 80% エタノールで抽出し, 沖⁶⁾の方法により測定した。イソフラボンは, 菊地ら⁷⁾の方法により前処理し, 江崎ら⁸⁾の方法に従い, 内部標準を添加しイソクラシック HPLC 法で定量分析した。イソフラボン以外の抗酸化成分は, HIROTA ら⁹⁾の方法に準じ前処理し, イソクラシック HPLC 法で定量分析した。 β -グルコシダーゼは池田ら¹⁰⁾の方法により測定した。

2 大豆散麴の製造条件

大豆散麴は, 大豆を洗浄, 2 時間浸漬し 2 時間水切後, 高压釜により 0.7MPa, 45 分間蒸煮した大豆 100 に対して, ビーンフラワー 10, 種麴 1 の割合で混合し, ガラスシャーレに入れて恒温恒湿庫で製麴し分析試料とした。種麴の比較試験は, 市販種麴 3 種類 (米味噌用、豆味噌用、清酒もと立て用) を用い, 製麴温度 35℃, 湿度 95%, 3 日麴と 5 日麴で比較を行った。製麴温度の比較試験は, 30℃, 45℃ の 2 試験区 (湿度 95%) で, 製麴中の湿度の比較試験は, 85~90%, 90~95% の 2 試験区 (製麴温度 35℃) で, いずれも種麴は米味噌用, 製麴時間 1~3 日で試料を採取し比較を行った。

3 味噌原料抽出液添加による発酵微生物の培養

味噌用耐塩性酵母及び耐塩性乳酸菌の培養は, 液体培地 (耐塩性酵母用:タンパク加水分解物 (淡口味液) 5%, 食塩 (最終濃度) 12%, グルコース 5%, 酵母エキス 0.5%, リン酸 2 カリウム 0.5% (pH5.2), 耐塩性乳酸菌用:タンパク加水分解物 (淡口味液) 5%, 食塩 (最終濃度) 12%, グルコース 1%, 酵母エキス 0.5%, ポリペプトン 0.5%, リン酸 2 カリウム 0.5% (pH7.0)) を基本培地とした。培地を作成する際に, 味噌, 米麴, 大豆散麴を, それぞれ等量の蒸留水で 5℃一晩抽出後, ろ紙でろ過した抽出液を用いて培地を調製した。対照区は蒸留水にて調製した。培地の pH は, 耐塩性酵母用が pH5.3, 耐塩性乳酸菌が pH7.0 に調製した。培養は 30℃で耐塩性酵母は振盪培養で, 耐塩性乳酸菌は静置培養で培養期間中 1 日に 1~2 回 pH7.0 となるようアルカリで中和し培養を行った。

4 味噌の小仕込試験

味噌原材料である米麴, 蒸煮大豆, 大豆散麴及び粉碎大豆散麴は, 県内味噌製造企業 2 社から提供を受けた。

味噌の小仕込み試験では, 大豆散麴の添加割合と発酵微生物の添加の有無について試験区を設定し, 試験を行った。仕込配合は, 8 歩麴の米味噌とし, 大豆散麴の添加割合を仕込総重量の 0%, 3%, 10%, 20% の 4 試験区とした。凍結乾燥後の食塩, 米原料, 大豆原料の重量比率が一定となるよう, 大豆散麴の添加割合に応じて蒸煮大豆を減じ, 種水の添加量で対水食塩濃度 21% に調製した。味噌の食塩濃度は 12.1% (大豆麴 20% 添加) ~ 12.4% (大豆麴 0%) となる。それぞれの試験区に対して, 発酵微生物の影響を見るため, 耐塩性酵母及び耐塩性乳酸菌の併用, 耐塩性酵母の単独使用及び発酵微生物無添加の 3 試験区を設定し, 全 12 試験区を設定した。熟成温度は 30℃で, 分析試料を採取しながら 48 週目まで熟成を行った。

また, 別途, 大豆原料の全てを大豆麴とした小仕込み試験も行った。使用した大豆散麴は, 抗酸化能及び β -グルコシダーゼ力価に特徴のある

大豆散麴 2 種類で、味噌の仕込配合は、対水食塩濃度 21%，米麴が 8 歩麴，大豆散麴の添加量を仕込総重量の 40%とした。味噌の食塩濃度は 11.6%とした。2 種類の大豆麴に対して、発酵微生物の有無で 3 試験区（耐塩性酵母のみ添加，耐塩性乳酸菌のみ添加及び発酵微生物無添加）を設定し，合計 6 試験区で小仕込み試験を行った。熟成温度は 30℃とし，原料混合時，熟成 1 ヶ月及び熟成 2 ヶ月で試料を採取した。

5 小仕込み味噌による過酸化物質抑制試験

小仕込み味噌の抗酸化能を，魚油に対する酸化防止効果で確認するため，過酸化物質を指標とし，以下の試験を設定した。

山崎ら¹¹⁾の報告を参考に，生サンマ魚肉をミンチにしてガーゼに包み，ガーゼの外側を生サンマ魚肉と等量の小仕込み味噌で覆い，30℃で保存した。

使用した味噌は，熟成期間 48 週目の味噌のうち，大豆散麴を 20%添加した味噌と大豆散麴無添加の味噌を使用した。対照区には味噌を使用せず，用いた小仕込み味噌の食塩量に相当する食塩を生サンマ魚肉に添加した。生サンマ魚肉からジエチルエーテルにより油脂を抽出し，食品衛生検査指針¹²⁾の過酸化物質価（クロロホルム法）により測定した。

6 統計分析

分析結果の比較は，Tukey の方法に基づく多重比較により行い，危険率 5%未満の場合を有意差ありとした。

III 結果及び考察

1 味噌原材料の抗酸化能

味噌の抗酸化能に寄与する要因を検討するため，味噌原材料の抗酸化能を ORAC 法にて測定した。図 1 に水溶性抗酸化能（H-ORAC）を，図 2 に脂溶性抗酸化能（L-ORAC）を示す。

米麴，蒸大豆，大豆散麴及びチョッパーで粉碎した大豆散麴（粉碎大豆散麴）の抗酸化能を比較

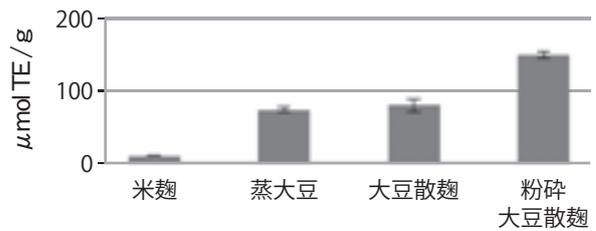


図 1. 味噌原材料の水溶性抗酸化能（H-ORAC）

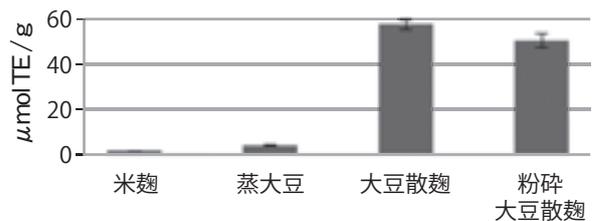


図 2. 味噌原材料の脂溶性抗酸化能（L-ORAC）

したところ，粉碎した大豆散麴が有意に高値であることが分かった。大豆散麴と粉碎大豆散麴の比較では，H-ORAC は粉碎した効果が有意に高い（図 1）が，L-ORAC は粉碎しない大豆散麴が有意に高かった（図 2）。粉碎大豆散麴では，粉碎により褐変が進み，粉碎前的大豆散麴と比較すると，明らかに褐色に着色している。粉碎による褐変は，早瀬¹³⁾のポリフェノールの非酵素的褐変と考えられる。

2 大豆散麴の抗酸化能

大豆散麴の抗酸化能とポリフェノール量の関係

伊藤ら¹⁴⁾は有色素米の抗酸化能（ORAC 法）とポリフェノール含量の相関を，中村ら¹⁵⁾は水溶性抗酸化能と大豆食品中のポリフェノール量の相関を報告している。そこで，大豆散麴の抗酸化能と大豆散麴中の総ポリフェノール量との関連性及び製麴中の経時変化を調べるため，味噌醸造現場で大豆散麴製造中に，経時的に試料を採取し抗酸化能（ORAC，DPPH）と総ポリフェノール量を測定した。

図 3 及び図 4 に大豆散麴の抗酸化能の経時変化を，図 5 に総ポリフェノール量の経時変化を示す。

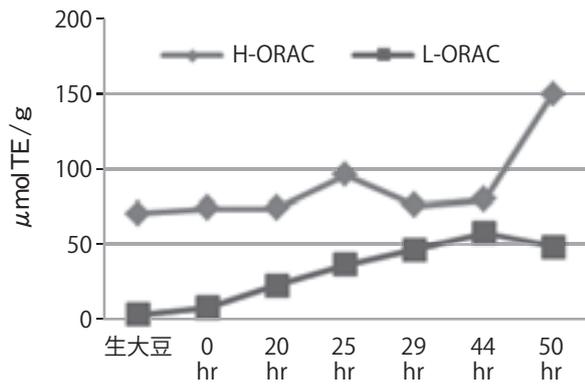


図3. 大豆散麴の抗酸化能 (ORAC) の経時変化

ORACでみた抗酸化能(図3)では、H-ORAC(水溶性)は、製麴前半の経時的な変化は小さく、製麴後半に増加する一方、L-ORAC(脂溶性)は製麴過程全体で増加していた。図4のDPPHによる抗酸化能の経時変化は、H-ORACと同様の傾向を示していた。H-ORACとDPPHの相関係数は0.70、H-ORACとポリフェノールの相関係数は0.88であり、伊藤¹⁴⁾や中村¹⁵⁾の報告と一致した。

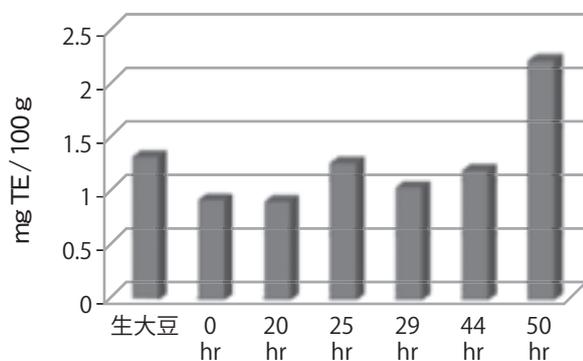


図4. 大豆散麴の抗酸化能 (DPPH) の経時変化

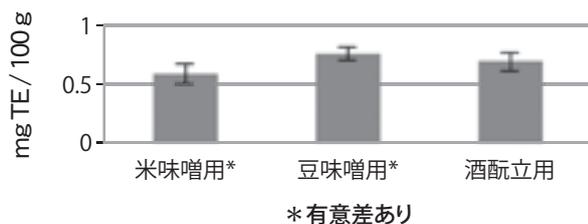


図6. 大豆散麴(3日麴)の抗酸化能(DPPH): 種麴の違い

大豆散麴の製造条件と抗酸化能

大豆散麴の製造条件について抗酸化能に寄与する要因を検討するため、種麴の種類、製麴温度、製麴中の湿度を変えて試験を行った。抗酸化能はDPPHで測定した。

(1) 種麴と製麴時間の影響

大豆散麴の抗酸化能に対する種麴の影響を調べるため、3種類の種麴を用いて大豆散麴を製麴し比較した。

大豆散麴の抗酸化能を図6、図7に示す。3日麴(図6)では、米味噌用種麴と豆味噌用種麴との間に有意差があったが、5日麴(図7)では、抗酸化能に有意差はなかった。3日麴と5日麴とでは5日麴の方が抗酸化能が高く、その差は種麴の差よりも大きかった。

(2) 製麴中の温度、湿度と製麴時間の影響

大豆麴の抗酸化能に対する製麴温度と湿度の影響を調べるため、製麴温度2種類、湿度条件2種類について比較試験を行った。

図8に製麴温度と大豆散麴の抗酸化能との

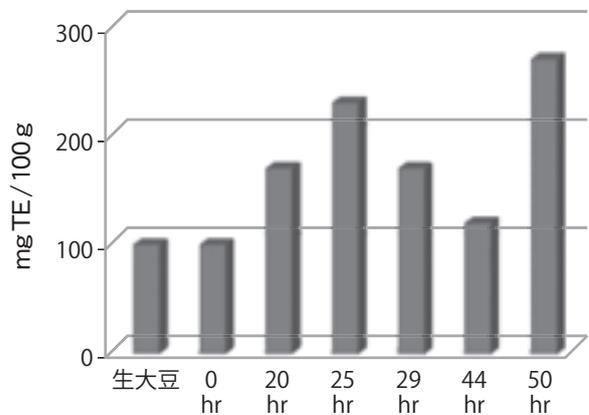


図5. 大豆散麴の総ポリフェノール量の経時変化

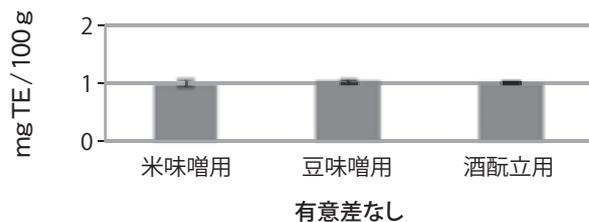


図7. 大豆散麴(5日麴)の抗酸化能(DPPH): 種麴の違い

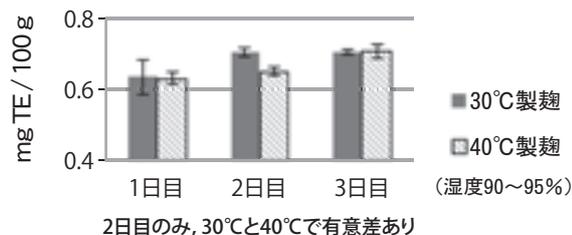


図8. 製麴温度と大豆散麴の抗酸化能 (DPPH)

関係を示す。製麴2日目のみ、30℃と40℃で有意差が見られたが、3日目では有意差は見られなかった。

図9に製麴中の湿度と大豆散麴の抗酸化能を示す。製麴日数が同じ場合、湿度85～90%区と湿度90～95%区では、抗酸化能に有意差は見られなかった。この場合も湿度条件による差より、製麴日数が長くなることによる抗酸化能の上昇の方が大きかった。

これらの結果、大豆散麴の抗酸化能は製麴時間を長くすることにより高まることわかった。

3 発酵微生物培養液の抗酸化能

味噌では仕込み時に耐塩性酵母及び耐塩性乳酸菌を培養液の状態に添加することがある。

そこで、味噌仕込試験に先立ち、水溶性の抗酸化成分に対する発酵微生物の影響を検討するため、培養液を調製する際、米麴、味噌及び大豆散麴の水抽出液を添加し、発酵微生物培養試験を行い、培養液の抗酸化能の経時的変化を水溶性抗酸

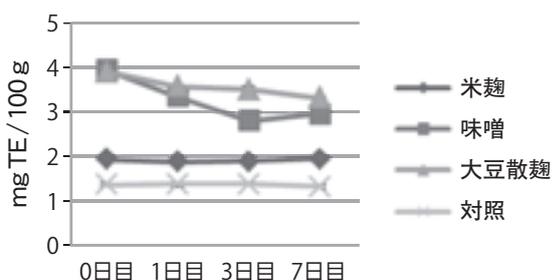


図10. 耐塩性酵母培養液の抗酸化能 (DPPH) の変化

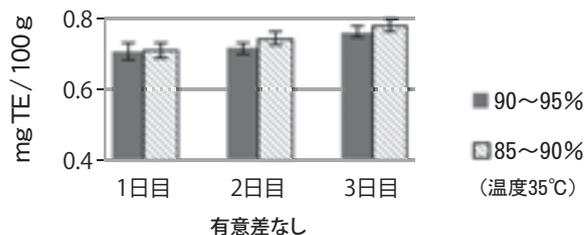


図9. 製麴中の湿度と大豆散麴の抗酸化能 (DPPH)

化能 (H-ORAC) 及び DPPH により測定した。併せて大豆散麴で抗酸化能と相関関係が見られた総ポリフェノール量についても測定した。

図10～13に発酵微生物培養液の抗酸化能 (DPPH) と総ポリフェノール量の経時変化を示す。米麴、味噌及び大豆散麴の水抽出液の添加により、培地中の DPPH で見た抗酸化能及び総ポリフェノール量は対照区より高くなるが、両者とも耐塩性酵母、耐塩性乳酸菌の培養時間が長いほど減少した。

水溶性抗酸化能 (H-ORAC) で見た抗酸化能について、図14、図15に示す。耐塩性酵母培養液では、培地ごとに培養0日目と7日目との H-ORAC を比較した場合、有意差は見られず、DPPH 法による抗酸化能の傾向と一致しなかった。耐塩性乳酸菌培養液では、H-ORAC は全ての培地で培養7日目の方が0日目より減少しており、H-ORAC と DPPH での抗酸化能は同じ傾向であった。

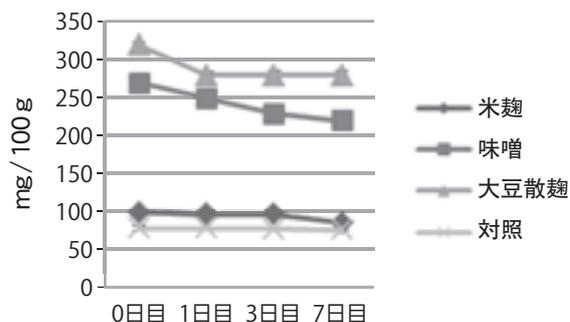


図11. 耐塩性酵母培養液の総ポリフェノール量の変化

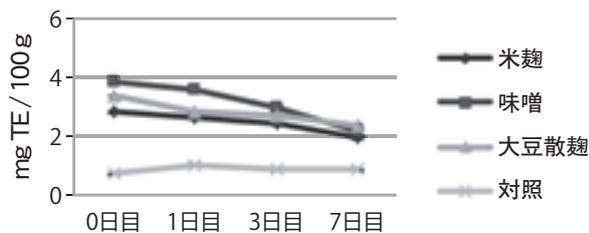


図12. 耐塩性乳酸菌培養液の抗酸化能 (DPPH) の変化

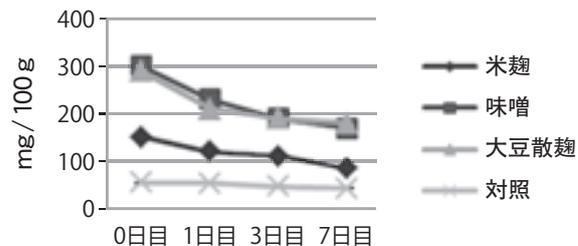


図13. 耐塩性乳酸菌培養液の総ポリフェノール量の変化

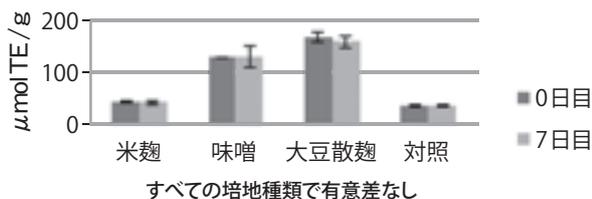


図14. 耐塩性酵母培養液の抗酸化能 (H-ORAC)

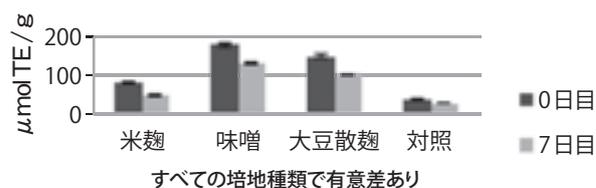


図15. 耐塩性乳酸菌培養液の抗酸化能 (H-ORAC)

耐塩性酵母, 耐塩性乳酸菌とも培養液中の菌数増加を確認していることから, 総ポリフェノール量の減少は, 微生物の生育により消費された可能性がある。

水溶性抗酸化能 (H-ORAC) が, 耐塩性乳酸菌でのみ低下した要因は不明であるが, 神戸ら¹⁶⁾が, 醤油の耐塩性乳酸菌は菌株により培養液の還元作用が異なることを報告しており, 本試験での抗酸化能の低下の一因と考えられる。

4 大豆麴を添加した米味噌仕込試験

大豆散麴添加量を変えた米味噌小仕込試験

米味噌に対する大豆散麴添加及び発酵微生物添加の有無が, 味噌の抗酸化能に与える影響を検討するため, 小仕込み試験を行った。仕込配合は 8 歩麴の米味噌を基本とし, 大豆散麴の添加割合を仕込総重量の 0%, 3%, 10%, 20% の 4 試験区とした。発酵微生物の影響を見るため, 対水食塩濃度を 21% に統一し, それぞれの試験区に対し耐塩性酵母及び耐塩性乳酸菌の併用, 耐塩性酵母の単独使用及び発酵微生物無添加の 3 試験区を設定した。全 12 試験区で仕込試験を行った。

(1) 抗酸化能 (DPPH) に対する大豆散麴, 微生物の影響

図 16 ~ 18 は, 30 °C で温醸した米味噌の抗酸化能 (DPPH) の経時変化を示す。大豆散麴添加量が多い味噌の方が高い傾向が見られた。DPPH では, 熟成初期と熟成後期に抗酸化能の増加が見られた。12 週目までの発酵初期では, 発酵微生物併用区, 耐塩性酵母単独添加区, 発酵微生物無添加区の順で DPPH の増加が早かった。DPPH が最も高かったのは発酵期間 48 週目の発酵微生物併用区味噌 (大豆散麴 20% 添加) の 7.41 mg TE/100 g であった。

(2) 抗酸化能 (ORAC) に対する大豆散麴, 微生物の影響

図 19 ~ 21 に抗酸化能 (ORAC) の経時変化を示す。DPPH と同様に, ORAC も大豆散麴添加量が 10% ~ 20% と多い味噌の方が高い傾向が見られた。発酵微生物の影響について 4 週目で比較すると, 発酵微生物併用区は, 耐塩性酵母単独添加区及び発酵微生物無添加区より ORAC が高かったが, その後の変化は少なかった。48 週目に最も ORAC が高かったのは, 耐塩性酵母単独添加区 (大

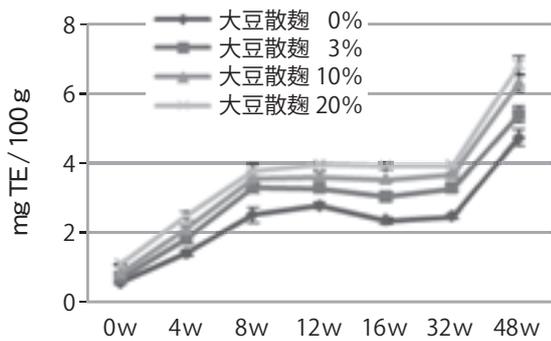


図16. 発酵微生物併用味噌の抗酸化能 (DPPH)
(耐塩性酵母, 耐塩性乳酸菌併用)

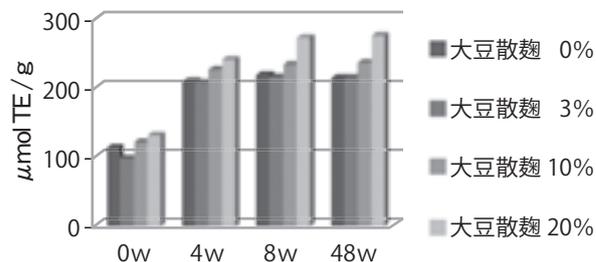


図19. 発酵微生物併用味噌の抗酸化能 (ORAC)
(耐塩性酵母, 耐塩性乳酸菌併用)

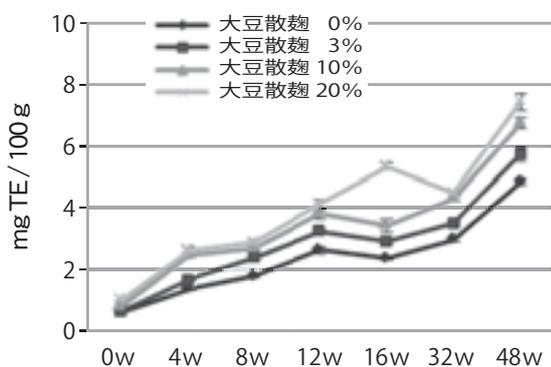


図17. 耐塩性酵母単独添加味噌の抗酸化能 (DPPH)

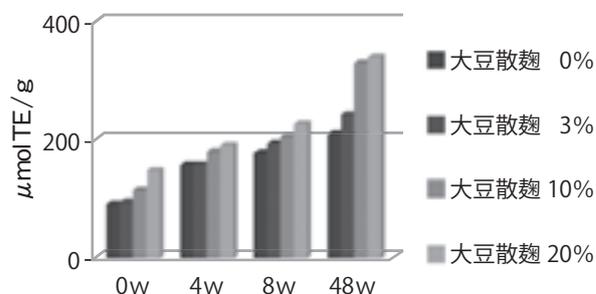


図20. 耐塩性酵母単独添加味噌の抗酸化能 (ORAC)

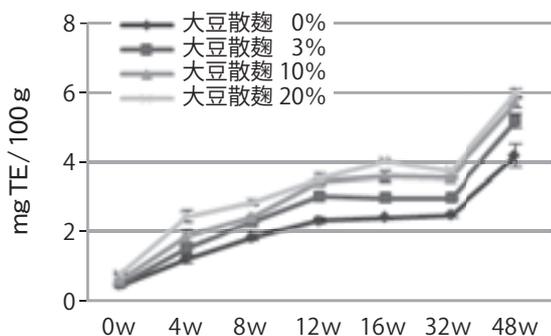


図18. 発酵微生物無添加味噌の抗酸化能 (DPPH)

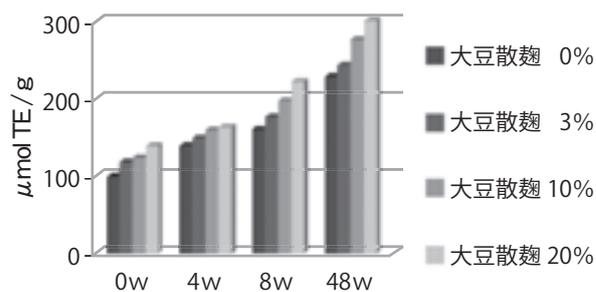


図21. 発酵微生物無添加味噌の抗酸化能 (ORAC)

豆散麴 20%添加) の $338 \mu\text{mol TE/g}$, 次いで耐塩性酵母単独添加 (大豆散麴 10%添加) の $328 \mu\text{mol TE/g}$ であった。

(3) 総ポリフェノール量の経時変化

図22~24に総ポリフェノール量の経時変化を示す。総ポリフェノール量についても発

酵期間が同じであれば、大豆散麴添加量が多い方が多かった。発酵微生物併用区、耐塩性酵母単独添加区では12週目が最大となり、その後減少した。発酵微生物無添加区では、12週目まで増加した後は48週目まで大きな変化はみられなかった。

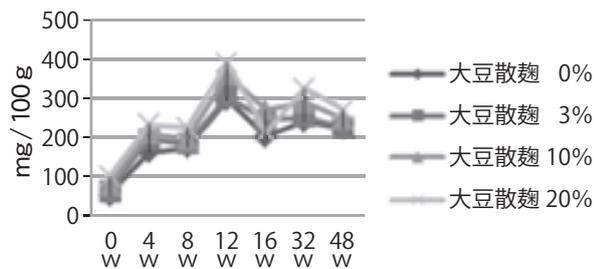


図22. 発酵微生物併用味噌の
総ポリフェノール量
(耐塩性酵母, 耐塩性乳酸菌併用)

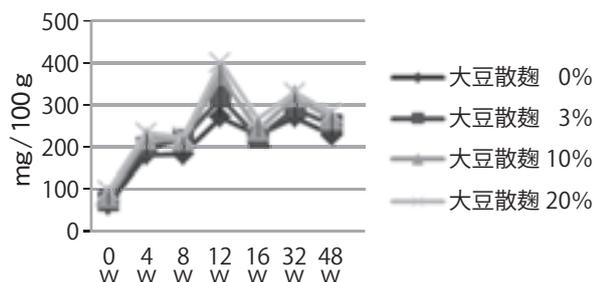


図23. 耐塩性酵母単独添加味噌の
総ポリフェノール量

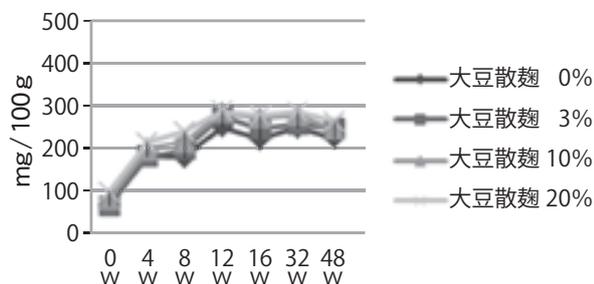


図24. 発酵微生物無添加味噌の
総ポリフェノール量

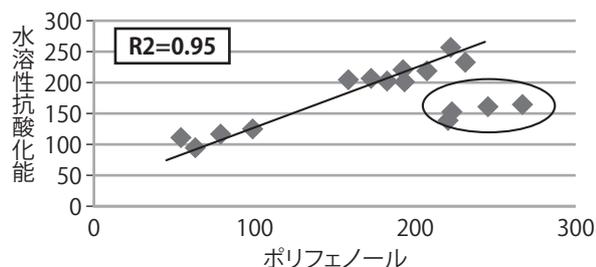


図25. 発酵微生物併用味噌の抗酸化能 (H-ORAC)
と総ポリフェノール量の関係 (0~8週目)

*参考値: 48週目 (○囲み, 相関係数の計算から除外)

(4) 抗酸化能と総ポリフェノール量の相関関係

図25に、発酵微生物併用味噌の発酵初期から8週目までの抗酸化能 (ORAC) と総ポリフェノール量の相関を示す。48週目のデータ (図25中○囲み) も参考値として記載したが相関係数の計算からは除いた。0~8週目までのデータには相関係数 0.95 で正の相関関係があった。耐塩性酵母単独添加味噌と発酵微生物無添加味噌の相関係数はそれぞれ 0.83, 0.77 であり同様に正の相関を示した。また、抗酸化能 (DPPH) と総ポリフェノール量にも正の相関が見られた。

このことから味噌の熟成初期 (0~8週目) の抗酸化能 (H-ORAC, DPPH) の増加は、総ポリフェノール量増加との関連性があることが示唆された。

(5) 味噌の着色と抗酸化能 (DPPH)

表1に小仕込み試験味噌の色 (Y値) を示す。味噌の着色は大豆麹添加量の多い試験区で色が濃く、48週目の味噌はY値で3.8~4.4と、かなり着色が進んでいた。

竹内ら¹⁷⁾, HAYASE¹⁸⁾は、高分子の褐変物質であるメラノイジンには抗酸化能があることを報告している。竹内ら¹⁷⁾は、味噌の抗酸化能 (DPPH) は着色度と相関があり、豆味噌ではメラノイジンの寄与率が高いと報告している。本試験では大豆麹を添加して小仕込み試験を行っているので、全量を大豆麹として作られる豆味噌と同様に、メラノイジンが味噌の熟成後期での DPPH 増加の要因であると考えられる。

表1. 小仕込み試験味噌の色 (Y値) の変化

	0週目	6週目	48週目
大豆麹 0%添加味噌	29.2	17.6	4.4
大豆麹 3%添加味噌	28.3	14.0	4.1
大豆麹 10%添加味噌	27.2	11.5	3.9
大豆麹 20%添加味噌	25.7	9.8	3.8

*小仕込み試験12試験区味噌のY値を大豆麹添加量ごとに平均した。

(6) 味噌熟成期間と抗酸化能 (ORAC) に占める H-ORAC と L-ORAC の比率

図26～28に、発酵微生物併用味噌の大豆麹添加量別の抗酸化能 (ORAC) の水溶性抗酸化能 (H-ORAC) 及び脂溶性抗酸化能 (L-ORAC) の割合について、0週目、8週目及び48週目の結果を示す。中村ら¹⁵⁾は、豆味噌が他の味噌と比べて抗酸化能が高く、かつ脂溶性抗酸化能の割合が高いと報告している。本試験でも、熟成が進み ORAC が高くなった48週目では、特に L-ORAC の割合が高くなっていた。

抗酸化能及びβ-グルコシダーゼ力価に特徴のある大豆散麴を用いた米味噌小仕込試験

本試験の小仕込味噌は、凍結乾燥後の原材料重量比率を全試験区で統一しているため、大豆散麴添加量が多い試験区で ORAC が高くなったのは、大豆原料を麹として添加することの効果と考えることができる。そこで、抗酸化能

(ORAC) 及びβ-グルコシダーゼ力価に特徴のある2種類の大豆散麴を用い、大豆原料の全てを大豆散麴とした小仕込み試験を行った。大豆散麴添加量は仕込総量の40%となる。併せて、発酵微生物の影響を個々に検討するため、発酵微生物(耐塩性酵母及び耐塩性乳酸菌)無添加及びそれぞれの単独添加区を設定し、小仕込み試験を行った。

(1) 小仕込試験に用いた大豆散麴の特徴

使用した大豆散麴の特徴を図29に示す。大豆散麴Aは大豆散麴Bより有意に抗酸化能 (ORAC) が高く、一方、大豆散麴Bは大豆散麴Aよりβ-グルコシダーゼ活性が相対的に高かった。

(2) 大豆散麴に特徴のある小仕込み味噌の ORAC と発酵微生物の影響

特徴の異なる2種類の大豆散麴を40%添加した小仕込み味噌の ORAC 法による抗酸化能を図30～32に示す。

水溶性抗酸化能 (H-ORAC) は、発酵微

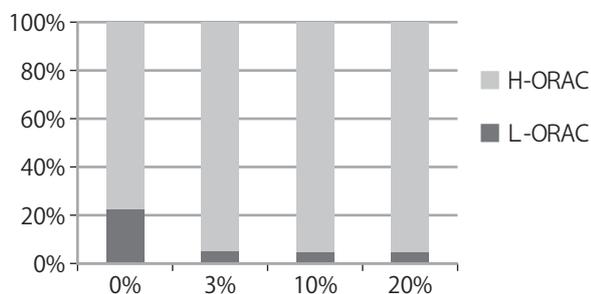


図26. 発酵微生物併用味噌0週目の抗酸化能
水溶性抗酸化能 (H-ORAC) と脂溶性抗酸化能 (L-ORAC) の割合

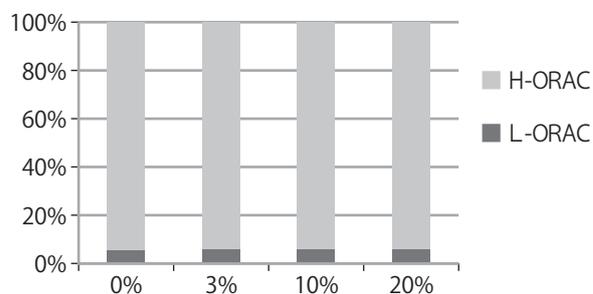


図27. 発酵微生物併用味噌8週目の抗酸化能
水溶性抗酸化能 (H-ORAC) と脂溶性抗酸化能 (L-ORAC) の割合

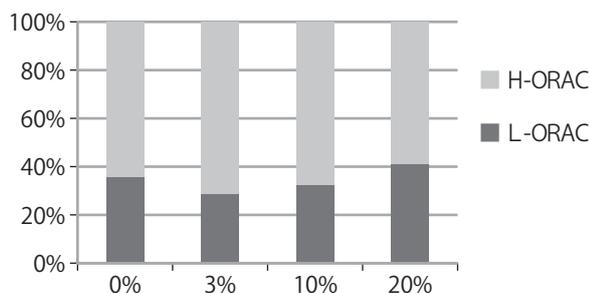


図28. 発酵微生物併用味噌48週目の抗酸化能
水溶性抗酸化能 (H-ORAC) と脂溶性抗酸化能 (L-ORAC) の割合

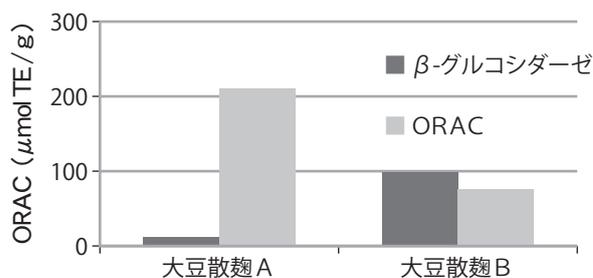


図29. 2種類の大豆散麴の特徴
(β-グルコシダーゼは大豆散麴Bを100として比較)

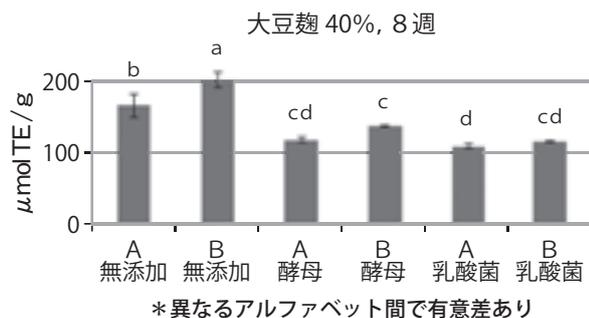


図30. 小仕込み味噌の水溶性抗酸化能 (H-ORAC)

A : 大豆散麴A B : 大豆散麴B 無添加 : 発酵微生物無添加
 酵母 : 耐塩性酵母単独添加 乳酸菌 : 耐塩性乳酸菌単独添加

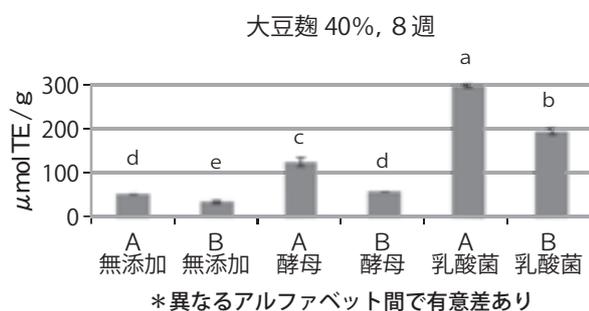


図31. 小仕込み味噌の脂溶性抗酸化能 (L-ORAC)

A : 大豆散麴A B : 大豆散麴B 無添加 : 発酵微生物無添加
 酵母 : 耐塩性酵母単独添加 乳酸菌 : 耐塩性乳酸菌単独添加

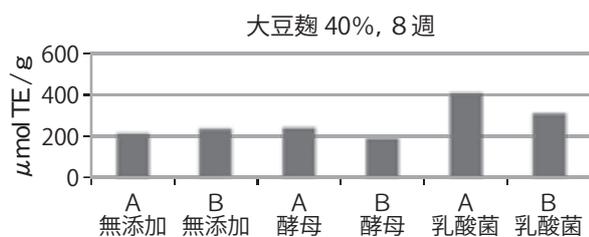


図32. 小仕込み味噌の抗酸化能 (ORAC)

水溶性抗酸化能 (H-ORAC) と脂溶性抗酸化能 (L-ORAC) の合計
 A : 大豆散麴A B : 大豆散麴B 無添加 : 発酵微生物無添加
 酵母 : 耐塩性酵母単独添加 乳酸菌 : 耐塩性乳酸菌単独添加

生物無添加区の場合、大豆散麴Bを使用した試験区で有意に高かった(図30)。その一因として大豆散麴Bではβ-グルコシダーゼ活性が相対的に高いことが影響すると考えられた。

また、発酵微生物無添加区と比較すると、

耐塩性酵母単独添加区及び耐塩性乳酸菌単独添加区は、H-ORACが有意に低かった。これは、発酵微生物培養液での微生物の生育による抗酸化能(DPPH)の低下と傾向が一致した。

一方、脂溶性抗酸化能(L-ORAC)は、大豆散麴Aを使用した試験区で有意に高かった(図31)。こちらは大豆散麴Aの方が、ORAC値が高いことが影響したものと考えられる。微生物の影響をみると、L-ORACでは、発酵微生物無添加区より微生物を添加した試験区の方が有意に高く、耐塩性乳酸菌単独添加区が特に高かった。

図32に水溶性及び脂溶性抗酸化能の合計値でみたORACでの抗酸化能を示す。大豆散麴Aを添加し、かつ耐塩性乳酸菌単独で添加した味噌では約400μmol TE/gと特に高かった。

味噌の熟成期間が長くなると脂溶性抗酸化能(L-ORAC)のORAC値に占める割合が高まることから、L-ORACが耐塩性乳酸菌により高まることが抗酸化能(ORAC)を高める結果となったと考えられた。

5 小仕込み味噌の抗酸化成分の相対比較

Esakiら¹⁹⁾は豆味噌中の抗酸化成分をDPPHにより特定している。そこで、これらの抗酸化成分について、大豆散麴の無添加(対照)と20%添加した場合の比較を行った。熟成時期として8週目と48週目に着目し、対照をそれぞれ100としたときの相対値を表2に示す。大豆散麴無添加の場合、熟成が進むと概ね抗酸化成分が減少したが、大豆散麴20%添加の場合、イソフラボンアグリコンが増加し、抗酸化成分の減少率は低かった。

6 小仕込み味噌の過酸化物質の抑制効果

米味噌の小仕込試験において、大豆麴を添加することにより抗酸化能が高まることが確認できたので、抗酸化能による油脂劣化防止効果を検討した。大豆麴20%添加味噌について、8週目、48週目の味噌を用い、生サンマの魚肉を小仕込みした味噌で漬け込み、魚肉油を抽出して過酸化物質

表2. 仕込味噌中の抗酸化成分の変化

(48週目の味噌：仕込8週目を100とした相対値)

	大豆麹 0% 添加味噌	大豆麹 20% 添加味噌
ダイゼイン *	40	130
ゲニステイン *	100	230
4-ヒドロキシ安息香酸	30	8
バニリン酸	3	40
シリング酸	10	100
クマル酸	5	50
フェルラ酸	5	100

*：イソフラボンアグリコン

を測定した。対照区は生サンマ魚肉に味噌に含まれた食塩のみを添加した。

図33は30℃で5日間、図34は30℃で10日間保存時の過酸化物価を示す。熟成期間8週目、48週目の味噌とも、対照区と比較して過酸化物価を有意に抑えていた。また熟成期間8週目の方が、48週目より有意に過酸化物価を抑えていた。

IV まとめ

米味噌製造中における抗酸化能を向上させる製造方法についてORAC法及びDPPH法により評価した。その結果、大豆散麹及び耐塩性乳酸菌の添加と熟成期間により、抗酸化能が向上することを見出した。抗酸化能増加の要因として、熟成初期はポリフェノール類、熟成後期はメラノイジンの可能性が高く、大豆散麹を添加した場合はイソフラボンアグリコンが増加する他、抗酸化成分の減少率が低いこと及び耐塩性乳酸菌の酵素なども一因と考えられる。

小仕込み味噌の抗酸化能は、最大で約400 μmol TE/gとなり、豆味噌に匹敵する抗酸化能を有する米味噌を製造することができた。

謝辞

本研究の実施にあたり、研究用試料を御提供いただきました栃木県味噌工業協同組合所属の味噌

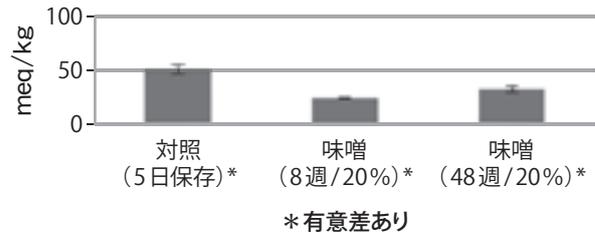


図33. 小仕込み味噌（熟成度の違い）の過酸化物価への効果（30℃，5日間保存）

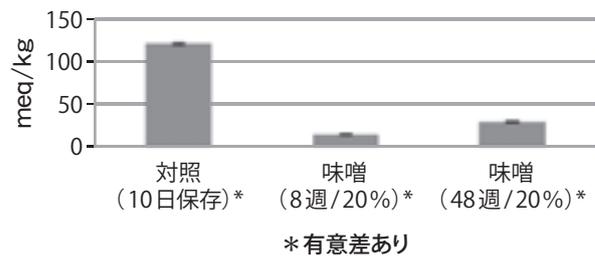


図34. 小仕込み味噌（熟成度の違い）の過酸化物価への効果（30℃，10日間保存）

製造企業様に深謝いたします。

また、本研究は一般社団法人中央味噌研究所から平成26年度研究助成を受け実施しました。ここに記して深謝いたします。

参考文献

- 1) 渡邊敦光：日本醸造協会誌，105，(11)，714-723，(2010)
- 2) 菅野道廣，高松清治：日本醸造協会誌，99，(3)，148-155，(2004)
- 3) 渡辺純，沖智之他：化学と生物，47，(4)，237-243，(2009)
- 4) 松尾真砂子，人見英里：日本食品科学工学会誌，54，(11)，503-508，(2007)
- 5) 須田郁夫：食品の機能性評価マニュアル集，16-18
- 6) 沖智之：食品機能性評価マニュアル集第Ⅲ集，1-7
- 7) 菊地洋子，島村保洋，広門雅子，安田和男，

- 西島基弘：食品衛生学雑誌，40，(6)，444-454，(1999)
- 8) 江崎秀男，川岸舜朗，井上昂，大澤俊彦：日本食品科学工学会誌，48，(1)，51-57，(2001)
- 9) Akira HIROTA 他：iosci. Biotechnol. Biochem.，64，(5)，(2000)
- 10) 池田稜子，太田直一，渡辺忠雄：日本食品科学工学会誌，42，(5)，322-327，(1995)
- 11) 山崎歌織，河村フジ子：日本調理科学会誌，30，(2)，122-126，(1997)
- 12) (社)日本食品衛生協会：食品衛生検査指針理化学編 2005，635-637
- 13) 早瀬文孝：日本食品工業学会誌，36，(1)，89-90，(1989)
- 14) 伊藤満敏，大原絵里他：日本食品科学工学会誌，58，(12)，576-582，(2011)
- 15) 中村好志，江崎秀男：日本醸造協会誌，108，(1)，16-23，(2013)
- 16) 神戸千幸，内田金治：日本農芸化学会誌，58，(5)，487-490，(1984)
- 17) 竹内徳男，稲荷妙子他：岐阜女子大学紀要，33，(2004)
- 18) Fumitaka Hayase 他：Agric. Biol. Chem. 53，(12)，(1989)
- 19) Hideo Esaki 他 Biosci. Biotechnol. Biochem. 63，(9)，1637-1639，(1999)

発酵期間による味噌の血圧抑制効果

笹谷めぐみ, 渡邊 敦光

Blood pressure decreasing effect by miso of different fermented time

Megumi Sasatani and Hiromitsu Watanabe

*Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, Hiroshima 734-8553, Japan*

研究の目的

2014年に発表された厚生労働省の人口動態統計¹⁾によると、1年間の死亡者数は、約126万人である。その死因は、第一位の「がん」の37万人に次いで、心不全や心筋梗塞などの「心疾患」の19.6万人と、脳梗塞や脳内出血などの「脳血管疾患」の11.3万人である。高血圧を第一危険因子とする心疾患と脳血管疾患の両者を併せると約25%にも達し、高血圧に対する予防は大変重要な課題となっている。

味噌や大豆蛋白質は、降圧作用を有することが多数の疫学的研究により明らかにされており²⁻⁴⁾、薬によらず日常的な食習慣で高血圧を予防できることは、国民にとって極めて有効な手段と言える。日本人が世界の長寿を達成したことは、日本人の味噌や大豆を取り入れたバランスのとれた食事がその一因と推定されている。

我々は、その中で、味噌に着目をして研究を続けており、これまでに味噌が様々な生理活性を有する事や、味噌の発酵度の違いが、これらの生物効果に影響を与えることを明らかにしてきた^{5,6)}。さらに、ヒトの本態性高血圧症のモデル動物であ

るDahl S/Jr Sea ラットを用いて、味噌の降圧作用について研究を行ってきた。その結果、味噌が、食塩による血圧上昇作用を抑制する効果があることを明らかにした⁷⁾。また、同様の結果が、Uehara等により報告されている⁸⁻¹¹⁾。実際に、ヒトでも味噌が、高血圧の抑制に同様なことが証明されている¹⁰⁻¹²⁾。更にIto等はCPOマウスの圧付加新肥大モデルを用いて習慣的味噌摂取は視床下部MR-ATIR経路活性化により食塩感受性交感神経活性化を抑制し、味噌により間接的に血圧の低下をきたし、心不全を軽減する可能性を示唆した¹³⁾。更にKokubo等は大豆やイソフラボン摂取量をよく食べる女性グループで脳梗塞・心筋梗塞のリスクが低下し、同じ効果は味噌にも弱い関係があることが報告された。このように味噌には、降圧作用のみならず、脳梗塞や心筋梗塞を抑制させる作用があることが示唆される¹⁴⁾。

そこで本研究では、Dahlラット(Dahl S/Iwai)を用いて、味噌の発酵熟成度の違いによる血圧上昇の差が生じるかにつきに検討した。また、実験結果の考察として、今回用いた味噌の放射線防護作用についても検討した。

研究方法

1. 味噌の降圧作用

(1) 味噌

味噌は中央味噌研究所より拝受した辛口米味噌の熟成1か月（食塩量 22.9%）、熟成6か月（食塩量 21.8%）並びに熟成23か月（食塩量 23.2%）を用いた。各味噌を、MF 飼料（オリエンタル酵母）に10%混入し固形飼料を作成した。また、本研究に用いる味噌に含まれる食塩の影響を調べるため、2.32%の食塩を添加した固形飼料を作成した。

(2) ラット

4週齢のDahl食塩感受性雄ラット [DIS/EisSlc (Dahl S/Iwai)] ラットをエスエルシー株式会社より購入した。実験群は以下の5群からなり、各群8匹を使用した。

1. MF 飼料	
2. 10%辛口米味噌	(熟成1か月) (食塩濃度 2.29%)
3. 10%辛口米味噌	(熟成6か月) (食塩濃度 2.18%)
4. 10%辛口米味噌	(熟成23か月) (食塩濃度 2.32%)
5. 2.32%食塩	(食塩濃度 2.32%)

実験開始後、血圧は、ソフトロン社の血圧計 (BP-98E) により尻尾から2週間に1度、午後測定した⁷⁾。一部は別の同系の血圧計を用いて測定した。体重は同時期に測定した。また、経時的に、摂餌量及び摂水量を測定した。実験開始後、約3ヶ月目に剖検を行った。

(3) 実験動物の飼育

ラットの飼育は、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。飼育室の飼育

ケージは、週に2回オートクレーブ滅菌した新しいケージに交換した。ラットには、餌、及び飲料水は自由に摂取させた。実験動物の飼育、管理、及び取扱は、広島大学実験動物取り扱い指針に従って行った。

(4) 剖検

実験開始後約3ヶ月目に剖検を行った。剖検では、全臓器の肉眼的観察と主要臓器の重量測定を行った。同時に病理学的観察のため動物はエーテルで麻酔後、脱血し、臓器を取り出し、重量を測定後、中性フォルマリン液で数日かけて固定した。固定後、臓器を十分に水洗し、臓器を小片に切り、組織切片を包埋用のカセットに入れ、自動包埋器で一晩かけて脱水し、手動でパラフィンに包埋ために切り出しを行った。包埋した組織を $3\ \mu\text{m}$ に薄切し、乾燥後脱パラフィン、アルコール系列で水まで戻し、HE染色、アザンマロリー染色並びにアルシアンブルーパス染色を行い、病理学的観察を行った。腎臓のProtein castや脂肪肝はその広がり度で半定量的に0から2迄のスコアを取った。

(5) 統計的解析：

得られた結果は、 X^2 検定、student t 検定、Dunnett 法等を用いて統計的な解析を行った。

(6) 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したがい、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行った。また、マウスの飼育は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等に従い、広島大学に実験計画を申請し、承認を得て実施した。

2. 味噌の放射線防護作用

5週齢雄 B6C3F1 マウスを用いた。以下の7群を設定し、粉末 MF 飼料に10%の味噌、10%醤油（マルシマ）ならびに3.2%食塩を混入した飼料を、マウスに自由摂取させた。

1. MF 飼料	
2. 10%味噌	(1か月熟成) (食塩濃度 2.23%)
3. 10%味噌	(6か月熟成) (食塩濃度 2.18%)
4. 10%味噌	(11か月熟成) (食塩濃度 2.24%)
5. 10%味噌	(23か月熟成) (食塩濃度 2.32%)
6. 10%醤油	(2年熟成) (食塩濃度 3.20%)
7. 天日塩	(食塩濃度 3.2%)

6週齢のマウスに、 γ 線（ガンマセル40 エグザクタ MDS Nordion 社製, 1Gy/min）10 Gyを照射した⁶⁾。照射後体重並びに摂水量並びに摂餌量を測定し、約3.5日後に頸椎脱臼で剖検し、小腸を取り出した。回収した小腸を洗浄後、カルノア液で1~2時間固定を行い、70%エタノール固定後、輪切りにして切り出しを行い、包埋し、薄切切片を作成し、HE染色を施した。顕微鏡下で、小腸の再生腺窩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。得られた結果は、

Table 1. Intake of diet (g/day/rat)

Group	1 month	2 months	3 months
Control (MF diet)	19.2±1.2	20.0±0.3	18.9±0.4
1 month Miso	19.1±1.2	20.1±0.4	19.1±0.5
6 months Miso	19.1±1.2	20.6±0.3	18.8±1.9
23 months Miso	19.7±1.1	22.7±1.0**	20.6±0.6
NaCl	20.0±1.2	21.8±0.4**	20.2±0.6

** Significantly different from Control P<0.01

Dunnett 検定を用いて有意検定を行った。

結果

1. 味噌の降圧作用

実験開始1か月目で食塩投与群は対照群と比較して、摂食量の増加傾向が観察された。実験開始2か月目で23か月味噌投与群並びに食塩投与群は、MF 飼料投与群（対照群）に比べて有意に摂餌量が増加した。その後3か月目でも同様な傾向を呈した（Table 1）。

摂水量は味噌投与群並びに食塩投与群では対照群に比べて有意に増加した（Table 2）。しかし味噌投与群間並びに食塩投与群の間での摂水量に差は検出されなかった。体重は全ての群間で差はなかった（Table 3）。

実験開始後、経時的（1か月、2か月、3か月）に血圧の測定を行う計画を立てた。実験開始2か月（8週目）では、1か月味噌投与群は、対照群と比較して有意な血圧の上昇が観察された。食塩投与群、6か月味噌投与群、23か月味噌投与群は、対照群の血圧と同様の値を示した。

これまでの我々の Dahl S/JrSea ラットを用いた実験では、実験開始8週目から、食塩投与が

Table 2. Intake of drinking water (ml/day/rat)

Group	1 month	2 months	3 months
Control (MF diet)	32.6±4.5	37.0±3.9	35.0±4.6
1 month Miso	37.6±2.4**	40.4±1.7**	39.2±1.5**
6 months Miso	40.1±3.8**	44.5±3.7**	42.0±4.0**
23 months Miso	41.6±3.7**	45.2±3.3**	42.8±3.2**
NaCl	40.7±3.3**	45.0±1.7**	44.8±2.4**

** Significantly different from Control P<0.01

Table 3. Body weight

Group	0 month	1 month	2 months	3 months
Control (MF diet)	93.3±6.9	298.0±8.0	378.9±16.9	423.1±18.9
1 month Miso	94.4±4.5	293.0±7.3	376.9±13.0	420.0±12.9
6 months Miso	92.1±5.9	294.9±6.3	378.3±12.5	422.4±17.6
23 months Miso	93.8±5.6	290.6±13.3	381.4±11.0	424.3±13.5
NaCl	96.5±4.9	298.3±4.7	385.4±11.2	420.5±20.8

Table 4. Blood pressure

Group	4 weeks	8 weeks	10 weeks	12 weeks
Control (MF diet)	119.5 ± 10.5	147.5 ± 19.6	146.8 ± 9.1	143.0 ± 8.4
1 month Miso	123.9 ± 7.2	177.5 ± 9.8**	161.9 ± 9.8*	159.4 ± 13.9*
6 months Miso	126.3 ± 8.8	150.3 ± 19.1	151.3 ± 14.0	159.0 ± 13.0*
23 months Miso	138.8 ± 21.3	155.9 ± 15.9	153.8 ± 8.8	169.9 ± 14.0*
NaCl	131.5 ± 10.5	157.9 ± 5.6	168.8 ± 13.8**	154.6 ± 14.0

* Significantly different from Control (P<0.05)

** Significantly different from Control (P<0.01)

Table 5. Organ weight (g)

Group	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal	Testis
Control (MF diet)	1.832 ± 0.037	0.530 ± 0.085	1.527 ± 0.092	17.77 ± 0.90	0.90 ± 0.05	3.183 ± 0.126	0.070 ± 0.001	3.980 ± 0.094
1 month Miso	1.808 ± 0.08	0.438 ± 0.133	1.587 ± 0.149	18.31 ± 0.86	0.91 ± 0.05	3.627 ± 0.144*	0.068 ± 0.008	4.225 ± 0.620
6 months Miso	1.904 ± 0.223	0.526 ± 0.110	1.633 ± 0.086	16.95 ± 1.46	0.92 ± 0.05	3.550 ± 0.183*	0.067 ± 0.009	4.035 ± 0.210
23 months Miso	1.799 ± 0.045	0.585 ± 0.123	1.550 ± 0.112	16.89 ± 1.91	0.94 ± 0.06	3.617 ± 0.373*	0.068 ± 0.01	3.749 ± 0.977
NaCl	1.767 ± 0.106	0.559 ± 0.078	1.612 ± 0.082	17.69 ± 1.74	0.91 ± 0.05	3.939 ± 0.507**	0.068 ± 0.007	4.035 ± 0.149

* Significantly different from Control (P<0.05)

** Significantly different from Control (P<0.01)

Table 6. Relative weight

Group	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal	Testis
Control (MF diet)	0.426 ± 0.015	0.123 ± 0.018	0.354 ± 0.014	4.123 ± 0.124	0.209 ± 0.011	0.739 ± 0.023	0.016 ± 0.002	0.925 ± 0.031
1 month Miso	0.424 ± 0.015	0.103 ± 0.031	0.372 ± 0.032	4.300 ± 0.223	0.215 ± 0.011	0.851 ± 0.029**	0.016 ± 0.002	0.993 ± 0.160
6 months Miso	0.448 ± 0.057	0.123 ± 0.025	0.384 ± 0.020*	3.976 ± 0.258	0.216 ± 0.009	0.834 ± 0.040*	0.016 ± 0.002	0.947 ± 0.015
23 months Miso	0.419 ± 0.014	0.136 ± 0.029	0.361 ± 0.022	3.926 ± 0.376	0.219 ± 0.009	0.841 ± 0.079**	0.016 ± 0.002	0.870 ± 0.222
NaCl	0.412 ± 0.027	0.130 ± 0.015	0.376 ± 0.025	4.112 ± 0.355	0.213 ± 0.006	0.916 ± 0.113**	0.016 ± 0.002	0.939 ± 0.038

* Significantly different from Control (P<0.05)

** Significantly different from Control (P<0.01)

有意に血圧を増加することを明らかにしている。本研究では、食塩投与群で血圧の増加が検出されなかったため、異なる血圧計を用いて再度測定したが、血圧計に問題はなく、食塩投与群での有意な血圧の上昇は観察されなかった。そこで、実験開始 10 週目で、再度血圧の測定を行った。実験開始 10 週目では、1 か月味噌投与群および食塩投与群は対照群と比較して有意な血圧の上昇が観察された。6 か月味噌投与群、23 か月味噌投与群は、対照群と比較して有意な血圧の上昇は観察されなかった。しかしながら、食塩投与群は、対照群や全ての味噌投与群と比較して、有意差は検出されなかった。また、全ての味噌投与群が対照群

と比較し有意に血圧が増加した (Table 4)。

次に、剖検結果を示す。全ての味噌投与群と食塩投与群で対照群と比較して有意に腎臓重量が増加したが、味噌投与群と食塩投与群の間で差はなかった (Table 5)。6 か月味噌投与群は、対照群に比べて有意に相対的心臓重量が増加した。しかし全ての味噌投与群並びに食塩投与群で有意差は認められなかった (Table 6)。

組織学的観察を行った結果、全群の腎臓で、細胞浸潤や、ヘマトキシリン弱陽性の上皮が観察された。食塩投与群では、対照群と比較して、肝臓の脂肪肝の頻度が増加する傾向が認められた (Table 7)。

Table 7. Histological findings

Group	Brain			Heart		Kidney			Liver		Testis
	Calcification	Atrophy	Fibrosis	Cell infiltration	Pale epithelium	Protein casts	Cell infiltration	Fatty	Mitosis	Atrophy	
Control (MF diet)	25%	12.5%	25%	12.5%	100%	100% 1.0	75%	37.5% 0.4±0.5	12.5%	12.5%	
1 month Miso	25%	0%	37.5%	0%	37.5%	100% 1.6±0.7	62.5%	50% 0.5±0.5	37.5%	12.5%	
6 months Miso	0%	42.9%	0%	28.6%	16.3%	100% 1±0.6	57.1%	57% 0.4±0.5	16.3%	0%	
23 months Miso	37.5%	0%	50%	12.5%	50%	100% 2.5±0.5	37.5%	75% 0.8±0.4	12.5%	12.5%	
NaCl	25%	25%	0%	0%	12.5%	100% 2.1±1.2	50%	87% 1.8±1.2	0%	0%	

2. 味噌の放射線防護作用

Table 8 に小腸腺窩の再生を示した。MF 投与群（対照群）の腺窩再生は 66.5 ± 7.7 であった。23 か月味噌投与群では 93.0, 11 か月味噌投与群は 84.3, 6 か月味噌投与群では 75.8, 1 か月味噌投与群では 66.7 と $y = 1.19x + 67.6$ ($r^2 = 0.9596$ $p > 0.05$) 味噌の熟成期間が長くなると放射線防護作用が増強した。

2 年醤油投与群では 73.1 と味噌の 6 か月熟成投与群と同じ放射線防護作用を示した。しかし天日塩投与群では、放射線防護作用は観察されなかった。

考 察

本研究では、Dahl S/Iwai ラットを用いて、味噌の降圧作用について研究を行った。しかしながら、ポジティブコントロールとなるべき 2.3% 食塩投与群で血圧の増加が観察されなかった。我々は、これまでの研究から、Dahl S/Jr Sea ラットを用いて、2.3% の食塩投与が、実験開始 8 週目以降血圧を増加させる結果を得ている。本研究では、Dahl S/Jr Sea ラットは、現在、以前の業者での生産・販売を中止していたため、同様の食塩感受性高血圧モデルである Dahl S/Iwai ラットを用いた。

なぜ、本研究では、食塩投与群で血圧が増加し

ないという、これまでの結果と矛盾する結果となったのかについて、以下の事が考えられる。

- ①食塩投与群の餌に含まれる食塩量が計算値と異なる。
- ②血圧計が故障していた。
- ③Dahl S/Iwai, Dahl S/Jr Sea ラットで食塩感受性が異なる。

まず、①について検討を行った。本研究で作成した全ての味噌投与群、食塩投与群で用いた餌に含まれる食塩量を測定した。その結果、Table 9 に示すように、全ての群において、最初の計算値

Table 8. Crypt survival

Group	No of surviving crypts /circumference
Control (MF diet)	66.5±7.7
10% 1 month Miso	66.7±6.8
10% 6 months Miso	75.8±6.8**
10% 11 months Miso	84.3±6.8**a
10% 23 months Miso	93.0±8.5**a
10% 24 months Shouyu	73.1±8.3**
3.2% Natural Salt	65.1±8.3
Non-irradiation	115.91±12.3**

** : P<0.01 vs Control

a : 23 months miso vs 11 months miso, 6 months miso, 1 month miso, 10% Shouyu (P<0.01)

b : 11 months miso vs 6 months miso, 1 month miso, 10% Shouyu (P<0.01)

Table 9. Determination of sodium chloride in diet

Group	Planning amount	Determination
Control (MF diet)	0.3%	0.5%
1 month Miso	2.9%	2.9%
6 months Miso	2.4%	2.6%
23 months Miso	2.8%	2.7%
NaCl	2.8%	2.9%

と同様の約2%程度の食塩量が検出されていた。これまでの、我々の長年の味噌の生理効果を調べるための動物実験から、食塩摂取量の増加は摂水量を増加させるという知見を得ている。実際に、本研究においても、味噌投与群、食塩投与群では、対照群と比較して摂水量が増加したことから、味噌投与群、食塩投与群では、食塩摂取量の増加が示唆される。

次に、②について検討を行った。我々の血圧計に問題があることが考えられたため、他の研究室で正常に機能している血圧計を使用して実験を行った。しかしながら、他の血圧計においても、食塩投与群で血圧の増加は観察されなかった。

最後に③について検討を行った。本研究で用いた、Dahl S/Iwai ラットと、我々が以前用いた Dahl S/Jr Sea ラットでは、食塩に対する感

受性が異なることが考えられる。本研究で用いた Dahl S/Iwai ラットは、8%の食塩濃度では、血圧が増加することが販売業者（エスエルシー株式会社）により定期的に確認されているが、2.3%の食塩濃度では、血圧を増加させるのに不十分な濃度かもしれない。しかしながら、Yoshinaga 等や、Du 等により、より低い濃度である1.3%の食塩の摂水が、Dahl S/Iwai ラットの血圧を増加させることが報告されている。そのため、我々は、販売業者（エスエルシー株式会社）に、対照群（食塩0.3%）、1.3%食塩水、3%食塩添加飼料、8%食塩添加飼料の4群での経時的な血圧測定を依頼した。その結果、Figure 1 に示すように、8%食塩添加飼料投与群では、有意な血圧の増加が観察されたが、1.3%食塩水投与群、3%食塩添加飼料投与群では、それぞれ11週齢、12週齢で有意な血圧の増加が観察されたものの、個体間のばらつきが大きく、安定した血圧の増加を保証できないという結果を得た。我々は、Yoshinaga 等や、Du 等と同じ販売業者から、同じ Dahl S/Iwai ラットを購入したが、矛盾のある結果となっている。その理由として、彼らが実験に用いた時期のラットと比べて、現在のラットは、継代を繰り返すうちに、食塩感受性が変化するために、2~3%の食塩濃度では血圧は上昇しない

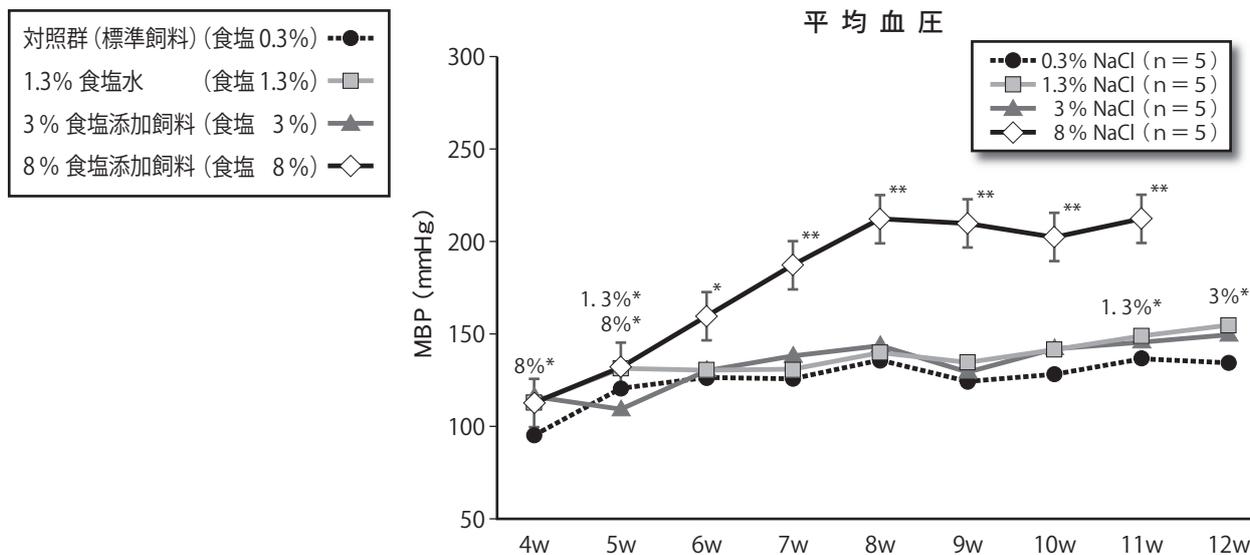


Figure 1. Blood pressure (data from Japan SLC, Inc.)

のではと考えている。

最後に、今回使用した味噌が、使用したロットの問題により有効成分が産生されているのかを確かめるため、マウスを用いた味噌の放射線防御作用についての検討を行った。その結果、味噌の熟成期間に依存して、放射線防護作用が観察された。すなわち、本研究結果から、今回用いた味噌には生理作用があることが確かめられた。

要 約

発酵1か月、6か月、11か月並びに23か月と熟成度の異なる味噌を用い放射線防御作用並びに血圧(11か月は除く)効果作用について検討した。その結果、味噌は、その熟成度に依存して、放射線防護作用を有することを明らかにした。また、本研究で用いた、Dahl S/Iwai ラットは、2.3%の食塩濃度では血圧増加が観察されず、実験に用いることができないことが明らかになった。

参考論文

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikei14/dl/honbun.pdf>
- 2) Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Association of blood pressure with intake of soy products and other food groups in Japanese men and women. *Prev Med.* 2003, 36: 692-697.
- 3) Dong JY, Tong X, Wu ZW, Xun PC, He K, Qin LQ. Effect of soya protein on blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr.* 2011, 106: 317-326.
- 4) Liu XX, Li SH, Chen JZ, Sun K, Wang XJ, Wang XG, Hui RT. Effect of soy isoflavones on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012, 22: 463-70.
- 5) Watanabe H. Beneficial biological effects of miso with reference to radiation injury, cancer and hypertension. *J Toxicol Pathol.* 2013, 26: 91-103.
- 6) 笹谷めぐみ, 渡邊敦光. 味噌による放射線防御作用. 2014, 35: 105-112.
- 7) Watanabe H, Kashimoto N, Kajimura J, Kamiya K. A miso (Japanese soybean paste) diet conferred greater protection against hypertension than a sodium chloride diet in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res.* 2006, 29 :731-738.
- 8) 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.
- 9) Du DD, Yoshinaga M, Sonoda M, Kawakubo K, Uehara Y. Blood pressure reduction by Japanese traditional Miso is associated with increased diuresis and natriuresis through dopamine system in Dahl salt-sensitive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2014, 36: 359-566.
- 10) 上原誉志夫, 宮本悠紀, 海老澤香里, 吉永真理子. 習慣性味噌汁摂取による抗高血圧作用の機序に関する研究. 2014, 35: 46-53.
- 11) 上原誉志夫. 習慣性味噌汁摂取による抗高血圧作用と血管保護作用に関する研究 中央味噌研究所研究報告 2015, 36: 40-45.
- 12) Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Miso (Japanese soybean paste) soup attenuates salt-induced sympathoexcitation and left ventricular dysfunction in mice with chronic pressure overload. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 2014, 105: 48-56.
- 13) Kanda A, Hoshiyama Y, Kawaguchi T. Association of lifestyle parameters with the prevention of hypertension in elderly Japanese men and women: a four-year follow-up of normotensive subjects. *Asia Pac J Public Health.* 1999, 11: 77-81.
- 14) Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group.

Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese

populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I. *Circulation*. 2007, 116: 2553-2562.

プレバイオティクスとしての味噌の効能

錫谷達夫¹, 管野良子¹, 西山恭子¹, 千葉英樹², 石岡 賢¹

Prebiotic potential of Miso

Tatsuo SUZUTANI¹, Ryoko KANNO¹, Kyoko NISHIYAMA¹, Hideki CHIBA²,
Ken ISHIOKA¹

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

²*Department of Basic Pathology, Fukushima Medical University School of Medicine,
1 Hikarigaoka, Fukushima 960-1295, Japan*

【要旨】

C57BL/6J マウスに離乳直後から 20 週にわたって高脂肪食あるいは 5%味噌添加高脂肪食を与え、体重の変化や肥満度、脂肪肝の程度をコントロールのマウスと比較検討した。その結果、高脂肪食による肥満や皮下脂肪・内臓脂肪の増加、脂肪肝の増悪が味噌の添加によって有意に抑制されていることが明らかとなった。

【背景】

我々は、ヒトに換算して 1 日 2 杯に相当する味噌汁をマウスに 5 日間摂取させると、腸内細菌叢中の *Lactobacillus* 属の菌の比率が有意に高まることを見出した。この実験に使用した味噌は加熱殺菌、いわゆる“火入れ”，をした味噌であること、また熱湯に味噌を溶解させたことなどから、味噌由来の生きた真菌や細菌がみそ汁に存在して

いるとは考え難い。従って、マウスで観察できた結果は味噌のプレバイオティクスとしての効果であると結論した。事実、味噌汁を摂食したマウスの便中から味噌に含まれる真菌・細菌は検出できなかった。

近年、腸内細菌叢のバランスと様々な疾患との関連や、免疫や代謝といった我々の生理機能との関連が明らかにされ、医学のトピックスとなっている。特に腸内の乳酸菌が産生する酸に肥満や耐糖能の異常を予防する作用があることが明らかにされ、先進国で大きな問題となっている肥満に伴う生活習慣病の予防にプレバイオティクスやプロバイオティクスの利用が期待されている。

上記の事実から、腸内の乳酸菌を増加させる味噌にメタボリック症候群を予防する効果があるのではないかと考え、高脂肪食摂食による肥満マウスの系で味噌の効果を検討した。

【材料と方法】

味噌

A社から分与された米味噌を実験に用いた。

マウスの飼育と各種検体の採取

3～4日齢 C57BL/6J マウスの頸部に0.5%濃度でアセトンに溶解したDMBA (7, 12-dimethylbenz anthracene) を50 μ l 塗布した。このマウスを4週齢で離乳させ、オス、メスそれぞれを6～10匹ずつの3群に分けた。この3群

それぞれに普通食 (CE-2; クレア), 高脂肪食 (HFD32; クレア), 5%味噌を混和した高脂肪食を20週にわたって自由摂食させた。体重測定, CT撮影, サンプルの採取はマウスを個体識別して以下のように行った。

- 1) **体重の測定**: 体重は生後4週の研究開始から2週ごとに測定した。
- 2) **CT撮影**: 飼育を終了する20週目に実験動物用X線CT装置 Latheta LCT-200 (日立アロカメディカル株式会社) で胸骨下端から寛骨上端の腹部を96 μ mのスライス

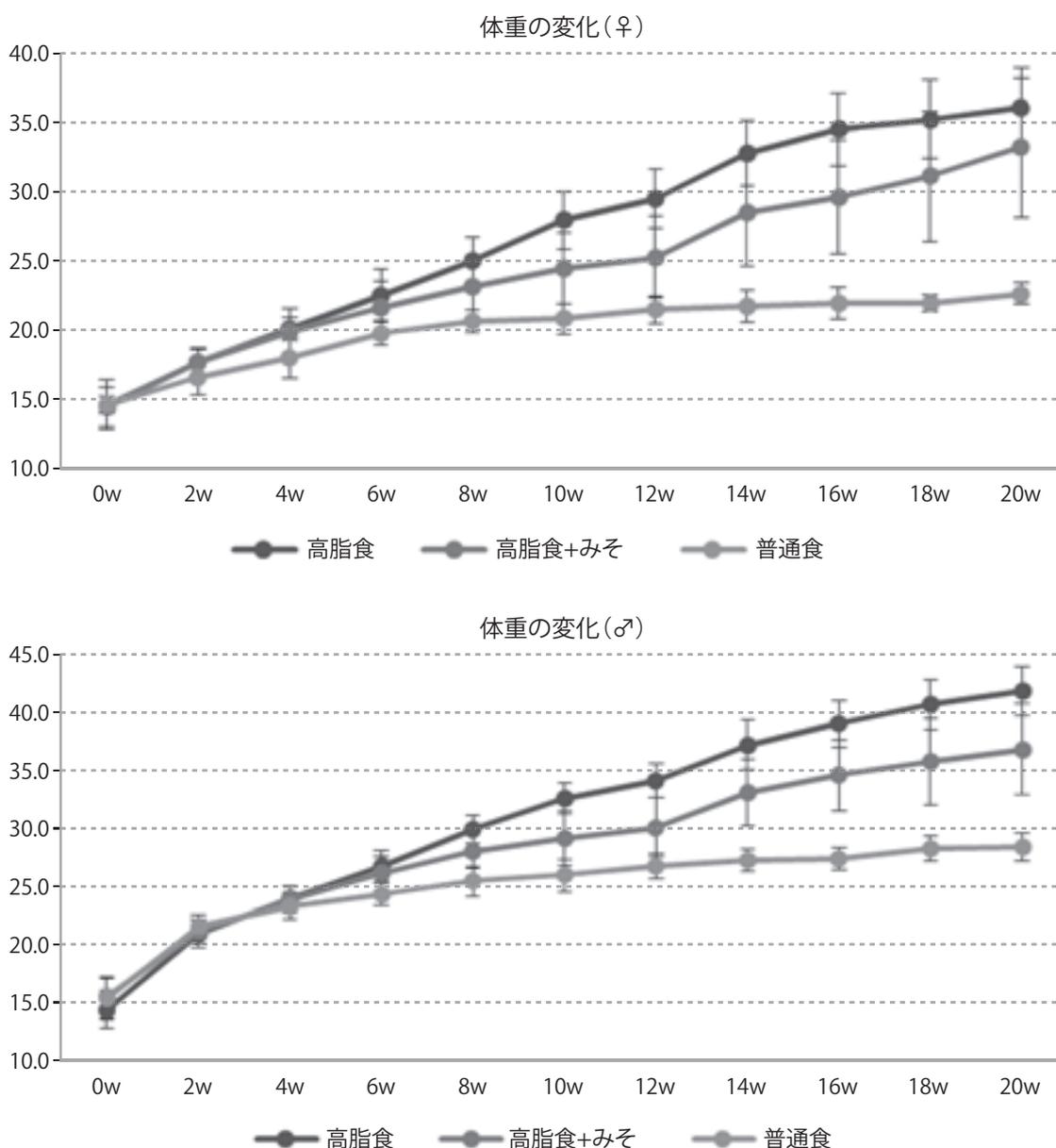


図1. 離乳後20週間のマウスの体重の変化

間隔でCT写真を撮影した。

- 3) 採血並びに肝臓の摘出：麻酔下で鎖骨下静脈から全採血を行った。その後、肝臓を摘出し10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。

CT写真の解析

マウスの第4腰椎(L4)の位置にあたる50スライスの画像を5スライスおきに解析した。それぞれの画像で皮下脂肪と内臓脂肪の弁別を行い、脂肪重量を計測した。

病理解析

パラフィン包埋した肝臓から薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・マッソン染色を行い観察した。

倫理的な配慮：動物実験は福島県立医科大学動物実験委員会の承認のもと、動物愛護の精神を遵守して行った。

【結果】

体重の変化と内臓脂肪量

メス、オスともに離乳食開始後8週目より、普通食、高脂肪食、味噌を添加した高脂肪食の3群間に有意な体重の違いが認められ、週数が進むにつれて差は大きくなった($p < 0.01$; 図1)。味噌には高脂肪食による体重の増加を抑制する効果が認められた。

食餌量の差によって体重増加が抑えられている可能性があったため、食餌量を餌の減少から測定したところ、1日当たりの摂食量に3群間で差は認められなかった。

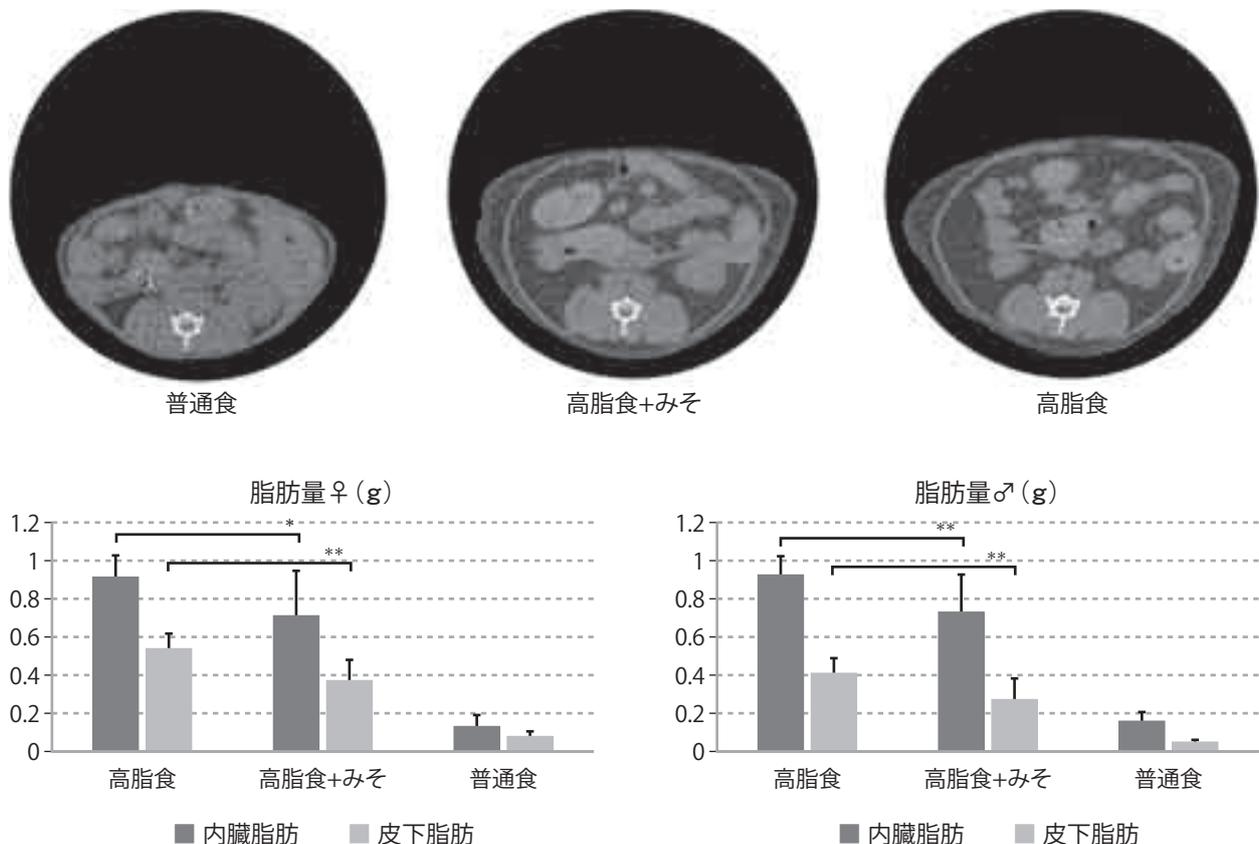


図2. 腹部CTスキャン像と画像から解析した腹部の脂肪量

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

次にCTスキャンで撮影した腹部の画像から皮下脂肪量と内臓脂肪量を測定し、比較した(図2)。メス、オスともに、3群間で体脂肪の蓄積量に有意差が認められ、味噌には高脂肪食摂食による内臓脂肪、皮下脂肪両方の脂肪蓄積を抑制する効果が認められた。

肝臓の外観と病理

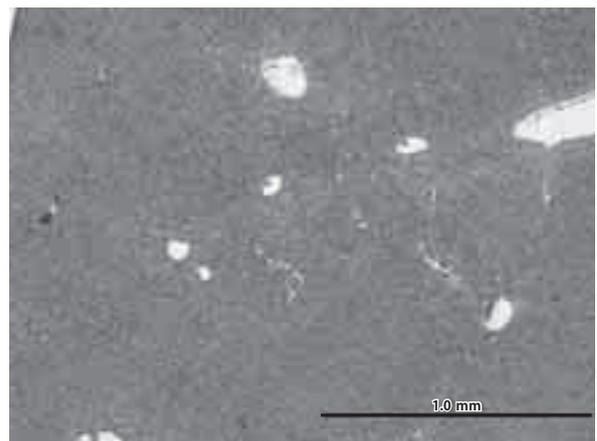
肝臓の肉眼所見では、高脂肪食群の肝臓は普通食群の肝臓に比べて大きく肥大し、色が白っぽくなっていた。味噌添加高脂肪食群の肝臓も肥大はしていたものの、程度はかなり弱く、変化の程度がかなり抑えられていることがわかった。

高脂肪食群では肝臓に著しい脂肪沈着と炎症細

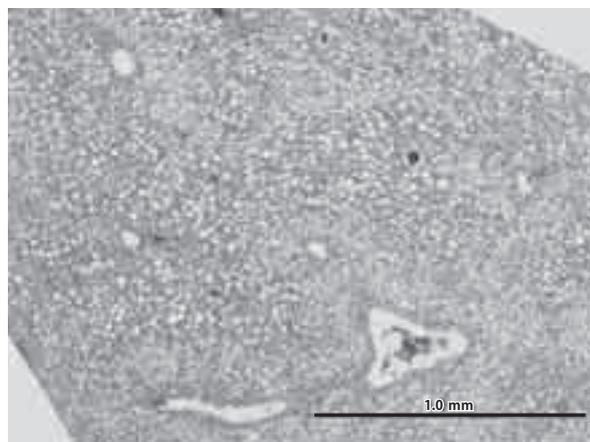
胞浸潤が部分的に認められた。この脂肪変性はメスに比べてオスでより目立ち、オスでは10例全例において、少なくとも80%以上の脂肪沈着が存在した。一方、メスでは8例中4例で脂肪沈着が認められ、その程度も30-50%にとどまっていた。いずれの検体においても、肝細胞の風船状腫大、マロリー小体、肝細胞周囲線維化は認められず、NAFLDのMalleoni分類でいうとGrade 1-2相当する非アルコール性脂肪肝であった。味噌添加脂肪食群の肝は、ほぼ正常~高脂肪食と同程度の脂肪肝の組織所見を示していたが、脂肪沈着の程度は個体や部位によって異なっていた。全体としてみると、味噌添加脂肪食群の脂肪変性の程度は高脂肪食群より軽度であった。



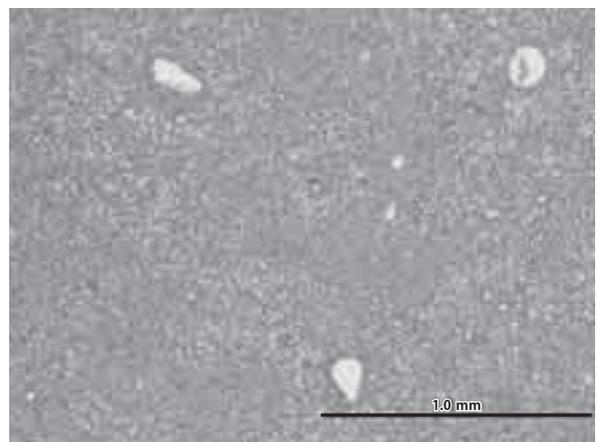
高脂食 高脂食+みそ 普通食



普通食



高脂食



高脂食+みそ

図3. マウスの肝臓の外観と組織像
組織はヘマトキシリン・エオジン染色したもので×40で観察

【考察】

本研究は味噌が腸内細菌中の乳酸菌を増加させることと、腸内の乳酸菌が産生する酸は耐糖能の異常や肥満を防ぐという報告をもとに、味噌に肥満やメタボリックシンドロームを予防する効果があるのではないかと仮説を立てて始めたものである。その結果、マウスの実験系では実際に味噌が肥満を予防し、肥満に伴う脂肪肝の程度を軽減していることが明らかとなった。しかし、この効果がどのような機序でもたらされるのかはまだ明らかにはできていない。実際に血中の乳酸や酢酸濃度が味噌の摂食で高まっているのか、また、耐糖能の異常が予防できているのかは今後の課題である。

味噌の成分中どの成分がこのような効果をもたらすのであろうか？ ヒトでは、血中のコレステロール値が高くても心筋梗塞のような動脈硬化に

起因する疾患が有意に女性では男性よりも起こり難いことが知られている。この違いが女性ホルモンによってもたらされるのであれば、味噌に多く含まれている大豆由来のイソフラボンが関与しているのかもしれない。では、大豆を発酵させなくても効果が認められるのであろうか？ このような疑問を解決するため、現在、大豆と麴を混合させた発酵前の味噌の原料、いわゆる味噌玉、の効能を調べているところである。

いずれにせよ、味噌には大豆が持つ成分のほか、麴由来の成分、真菌の菌体成分と発酵に伴う代謝産物が含まれている。それらが相乗的に作用する可能性も考え合わせるとまだまだ未知の効能を持つことが予想される。今後、肥満や脂肪肝に対する効能はもちろん、免疫に対する作用、癌抑制作用など味噌の効能を多角的に調べ、無形文化遺産「和食」の中核をなす調味料・味噌の機能性食品としての価値を明らかにしていきたい。

味噌由来アンギオテンシン変換酵素 2 作用物質に関する研究

高橋 砂織, 小笠原 博信, 渡辺 隆幸

Studies on angiotensin converting enzyme 2 effectors in miso

Saori TAKAHASHI, 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) は最も重要な血圧調節機構の一つである。我々は、これまでに味噌にレニン阻害活性を見出し、原材料の大豆から食物由来最初のレニン阻害物質としてソヤサポニンIを同定した。また、RASを構成するキマーゼやアンギオテンシン変換酵素 (ACE) など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。その結果、味噌にはこれら酵素の阻害物質が普遍的に存在することを明らかとしている。本研究では、ACE の相同遺伝子として見出された ACE2 に注目し、味噌由来 ACE2 作用物質について検討した。最初に、ACE2 の活性測定方法の開発を目指した。ACE2 の AII 認識部位アミノ酸配列を基に各種蛍光消光基質を合成し、ACE2 の最良基質として Nma-His-Pro-Lys (Dnp) を開発した。本測定系を用いて市販味噌 76 点 (全国味噌 63 点、秋田県産味噌 13 点) の熱水抽出液の ACE2 並び

に ACE 活性に及ぼす影響を検討した。その結果、味噌の熱水抽出液中には普遍的に ACE2 阻害活性並びに ACE 阻害活性の存在することが示された。次に大豆の種類や麹菌の種類の違い、さらには酵母の添加の有無による味噌中の ACE2 作用物質の変動を解析する目的で味噌の試験醸造をおこなった。大豆として国産大豆と中国産大豆を、麹菌として WS61 株及び CK33 株を、また、酵母添加の有無など 8 通りの試験醸造を行った。その結果、ACE2 阻害活性は味噌の仕込み時に高く、熟成にしたがい徐々に阻害活性が低減し、4 週目以降は阻害活性が保持されることが示された。また、大豆や麹菌の違いによる ACE2 阻害活性の大きな違いは認められなかった。味噌中の ACE2 阻害物質の由来を検討したところ、阻害物質は大豆由来であることが判明した。そこで、大豆から各種クロマトグラフィーを用いて ACE2 阻害物質を精製した。さらに、各種機器分析の結果から大豆由来 ACE2 阻害物質をニコチアナミンと同定した。ニコチアナミンは、食物由来最初の ACE2 阻害物質である。

緒言

レニンには主に腎臓で生合成され様々な刺激で血中に分泌される。血中のレニンは肝臓で生合成されたアンギオテンノーゲンに作用して10残基のアミノ酸から構成されるアンギオテンシンI (AI) を生成する。生じたAIは不活性ペプチドで、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) もしくはキマーゼによりC末端2残基が切除され、アンギオテンシンII (AII) となり、アンギオテンシン受容体1 (AT1 receptor) を介して血圧上昇を引き起こす (図1)。これまで研究から味噌には普遍的にレニン、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) やキマーゼの阻害物質の存在することを明らかとしてきた^{1,2)}。本研究では、ACEの相同遺伝子として見出され、多様な作用を持つアンギオテンシン変換酵素2 (ACE2) に注目して、味噌よりその作用物質を探索することを目指した。ACE2は、カルボキシペプチダーゼの一種類で、生理的にはAIからアンギオテンシン1-9 (A1-9) を、また、AIIからは、アンギオテンシン1-7 (A1-7) を生成する^{3,4)}。ACEによりAIから生成したAIIは、血圧上昇を引き起こすが、A1-7及びA1-9は血管弛緩作用を持つことから、血圧降下作用を示す (図1)⁵⁾。また、ACE2は膜タンパク質であり、重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) の原因となるコロナウイルス類が持つスパイクタンパク

質の受容体であることが知られている⁶⁻⁸⁾。したがって、ACE2の活性化因子や阻害因子はこれら疾患の予防や治療に寄与することが期待される。

図2に体細胞型及び睾丸型ACEとACE2の構造模式を示した。体細胞型ACEは、N-ドメイン及びC-ドメインの2つの活性部位を持つ膜結合型酵素である。一方、睾丸型ACEは活性部位としてC-ドメインのみを有している。ACE2の活性中心近傍は、構造的にはACEのN-ドメインの活性部位を含む領域と相同性が高い。また、ACEと同様に1回膜貫通型の膜結合酵素であることが知られている。

ACE2の作用物質探索にはACE2特異的且つ高感度の基質開発が必須である。これまで、ACE2の活性測定にはカスパーゼ用の基質であるMCA-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Lys (Dnp) やMCA-Ala-Pro-Lys (Dnp) などが用いられてきた⁹⁾。しかしながらこれらの基質はACE2の基質特異性を考慮した構造とはなっておらず、便宜的に用いられているにすぎない。そこで、本研究では最初にACE2の基質開発に取り組んだ。その結果、高感度蛍光消光基質Nma-His-Pro-Lys (Dnp) の開発に成功した。次に、本基質と組換え型ヒトACE2を用いてACE2阻害活性検定法を確立し、各種市販味噌抽出液のACE2活性に及ぼす影響を検討した。その結果、味噌には普遍的にACE2阻害物質の存在することを見出した。さらに、味噌中のACE2阻害物質が大豆

図1. レニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構

レニンは、アンギオテンノーゲンに作用してAIを生成する。生じたAIは、ACEによりAIIとなって、AT1レセプターを介して血圧を上昇させる。一方、ACE2は、AIに作用してA1-9をまたAIIに作用してA1-7を生成する。ACE2により生成したA1-9はACEによりA1-7となる。これら一連の酵素反応で生じたA1-7はMASレセプターを介して血圧降下作用を示す。

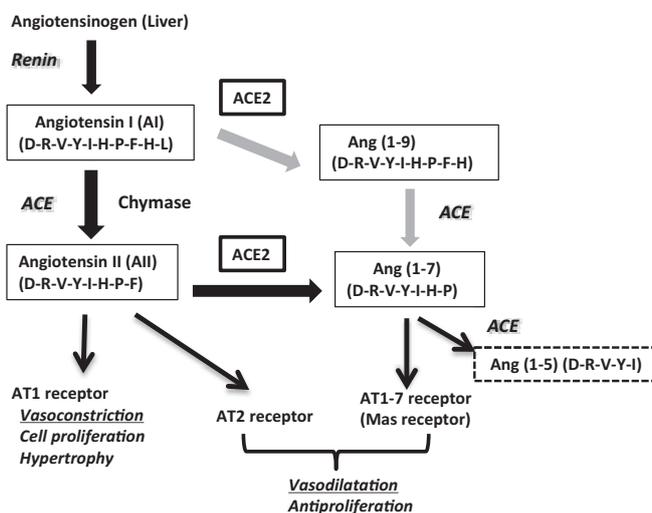
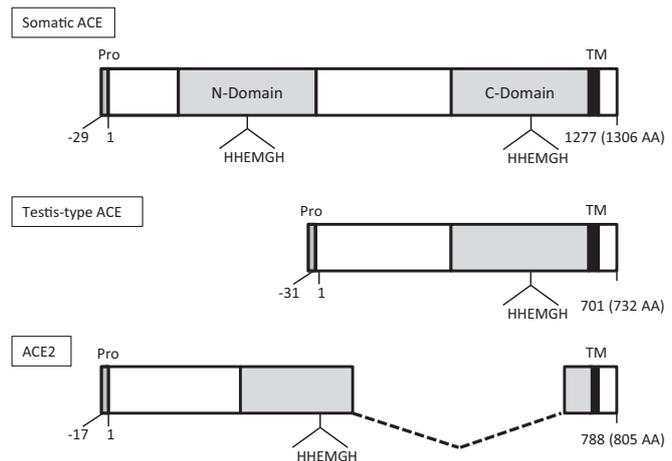


図2. 体細胞型ACE, 睾丸型ACE及びACE2の構造比較

体細胞型ACEは、N-ドメインとC-ドメインの2つの活性中心部位を有する一回膜貫通型の膜タンパク質である。体細胞型ACEは主に肺、腎臓や血管内皮細胞で発現している。睾丸型ACEは、活性中心として体細胞型ACEのC-ドメインのみを持つ一回膜貫通型の膜タンパク質で、睾丸でのみ発現が確認されている。体細胞型ACEと睾丸型ACEは同じ遺伝子由来であり、組織特異的なスプライシングの違いにより異なる酵素として発現している。ACE2は、ACEの相同遺伝子として見出された酵素で、活性中心部位は体細胞型ACEのN-ドメインと相同性が高い。C末端に1回膜貫通領域を持つ。
Pro: プロ配列, N-Domain: N末側活性中心領域, C-Domain: C末側活性中心領域, TM: 膜貫通領域, HHEMGGH: His-His-Glu-Met-Gly-His (活性部位配列)。



由来であることを見出し、大豆からACE2阻害物質を単離し、その化学構造をニコチアナミンと同定した。今後、ニコチアナミン生体調節機構の解析を進める予定である。

実験方法

• 味噌の入手

実験に供した平成26年度市販味噌50点は中央味噌研究所より供与された。また、秋田県内で市販されている県内外の味噌26点を購入した。

• 組換え型酵素及び試薬類

組換え型ヒトACE及びACE2は、それぞれCalbiochem社製 (San Diego CA, USA, Lot: D00130319) 及びR&D Systems社製 (Minneapolis, MN, USA, Lot: FQJ0207011) を用いた。標準となるニコチアナミンは、Santa Cruz Biotechnology社製 (Dallas, TX, USA, Lot: D0314) を用いた。Bio-Gel P-4 及びSephadex G-15はそれぞれBio-Rad社製 (Hercules, CA, USA) 及びGE Healthcare社製 (Buckinghamshire, UK) を用いた。

• 蛍光消光基質

グループA及びB群基質, N-methylantranyl (Nma)-His-Pro-Lys-2, 4-dinitrophenyl (Dnp) 及びACE活性測定用蛍光消光基質, Nma-Phe-

His-Lys (Dnp) は、(株)ペプチド研究所に依頼合成した。

• 醸造微生物を変えた味噌製造

麹菌の種類が味噌抽出物のACE及びACE2に与える影響を調べるために、秋田県総合食品研究センターと株式会社秋田今野商店とで共同で開発した2種類の麹菌, WS61株およびCK33株を用いて製造試験を行った。WS61株は、味噌用麹菌であるAOK139株 (秋田今野商店製) を、またCK33株は吟醸酒用の麹菌を親株にして非組み換えの麹菌育種方法であるトランスポゾン技術で作出された新規麹菌である。仕込み配合は麹歩合10歩, 目標食塩11.2%, 目標水分44.9%で、大豆は秋田県産大豆 (リュウホウ) 及び中国産大豆を用い、0.8kg/cm², 45分の条件で加圧蒸煮した。区分ごとの具体的な仕込み配合は処理大豆2.0kg, 米麴1.2kg, 食塩0.43kg, 種水0.20kg, 合計3.83kgとした。仕込み後30℃の温醸で12週間熟成した。切り返しは仕込み後4週間目に実施した。

• 味噌抽出液の調整方法

味噌5gに10mlの蒸留水を加え、30秒間ボルトックスで攪拌した後、105℃, 10分間オートクレーブ処理をした。その後10,000 x g, 10分の遠心分離操作を行い、上清を回収し、使用時まで-20℃保存した。

• ACE2 基質の開発

ACE2 の AII 切断部位配列を基に、各種 Nma-Xaa-Pro-Lys (Dnp) を合成し、ACE2 による分解を検討した。Xaa は、システインを除く 19 種類のアミノ酸を用いた。液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS) を用いて生成物の同定を行うことから、同じ分子量を持つ Leu と Ile の識別が不可能である。そこで、Ile と His を含む 9 種類のアミノ酸 (His, Met, Arg, Phe, Gln, Ala, Asp, Thr, Pro) からなるグループ A 基質及び Leu と His を含む 9 種類のアミノ酸 (His, Asn, Tyr, Lys, Trp, Leu, Ser, Glu, Val, Gly) からなるグループ B 基質を合成した。グループ A 及び B 基質を ACE2 と反応し、生成物 Nma-Xaa-Pro を LC-MS で分離・定量した。同時に、残存基質量も定量した。

• ACE2 阻害活性の測定

ACE2 の阻害活性測定は以下の手順で行った。5 μ l の組換え型ヒト ACE2 溶液 (50 ng/ml) に、5 μ l の 5 倍希釈味噌抽出液を加え室温で 5 分間保持した。これに 40 μ l の基質溶液 [20 μ M Nma-His-Pro-Lys (Dnp), 0.1 M HEPES, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 0.01 % Triton X-100, 0.02 % NaN₃] を添加し、37 °C で 30 分間反応した。反応後、0.2 ml の反応停止液 [0.1 M Na-Borate, pH 10.5] 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。

• 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¹⁰⁾。阻害活性測定は以下の手順で行った。すなわち、5 μ l の組換え型ヒト ACE 溶液に、5 μ l の 10 倍希釈味噌抽出液を加え室温で 5 分間保持した。これに 40 μ l の基質溶液 [20 μ M Nma-Phe-His-Lys (Dnp), 0.1 M HEPES, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 0.01 % Triton X-100, 0.02 % NaN₃] を添加し、37 °C で 30 分間反応した。反応後、0.2 ml の反応停止液 [0.1 M Na-Borate, pH 10.5] 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。

• Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィー

味噌抽出液 1 ml を 10 % エタノールで平衡化した Bio-Gel P-4 カラム (1.5 cm x 45 cm) に添加し、10 % エタノールで溶出した。流速は、10 ml/min とし、2 ml ずつ分画した。溶出液の 280 nm の吸光度を測定するとともに、ACE2 及び ACE の阻害活性を測定した。

実験結果及び考察

1) ACE2 基質の開発

グループ A 及びグループ B 基質の分解物の生成速度を図 3 に示した。グループ A 基質を用いた場合には Nma-His-Pro の生成速度が最も速く、30 分反応における生成物の比率は、Nma-His-Pro を 100 % とすると、Nma-Met-Pro (56.1 %), Nma-Arg-Pro (52.9 %), Nma-Phe-Pro (41.9 %), Nma-Gln-Pro (27.1 %) 及び Nma-Ala-Pro (8.45 %) の順番であった。一方、Nma-Asp-Pro, Nma-Thr-Pro, Nma-Ile-Pro 及び Nma-Pro-Pro の生成は検出出来なかった。グループ B 基質を用いた場合も Nma-His-Pro の生成速度が最も速く、30 分反応における生成物の比率は、Nma-His-Pro を 100 % とすると、Nma-Asn-Pro (51.7 %), Nma-Tyr-Pro (43.5 %), Nma-Lys-Pro (26.7 %), Nma-Trp-Pro (23.8 %), Nma-Leu-Pro (19.0 %) 及び Nma-Ser-Pro (5.0 %) の順番であった。一方、Nma-Glu-Pro, Nma-Val-Pro, 及び Nma-Gly-Pro の生成は検出出来なかった。残存基質を定量した結果は、分解物の生成と一致しており、Nma-His-Pro-Lys (Dnp) の分解が最も速く進んでいた (結果省略)。以上の結果より、Nma-His-Pro-Lys (Dnp) が ACE2 の最良の基質であることが示された。

Nma-His-Pro-Lys (Dnp) を基質とした場合の ACE2 の反応最適条件を決定する目的で、至適 pH 及び塩化ナトリウム濃度の影響を検討した (図 4)。HEPES 緩衝液を用いた場合の ACE2 の至適 pH は、pH 7.5 付近であった。ACE2 活性は弱酸性側で急激に低下し、pH 6.0 の場合は、至適 pH の約 15 % しか活性を示さなかった。一方、アルカリ性側では活性は保持され、pH 8.5

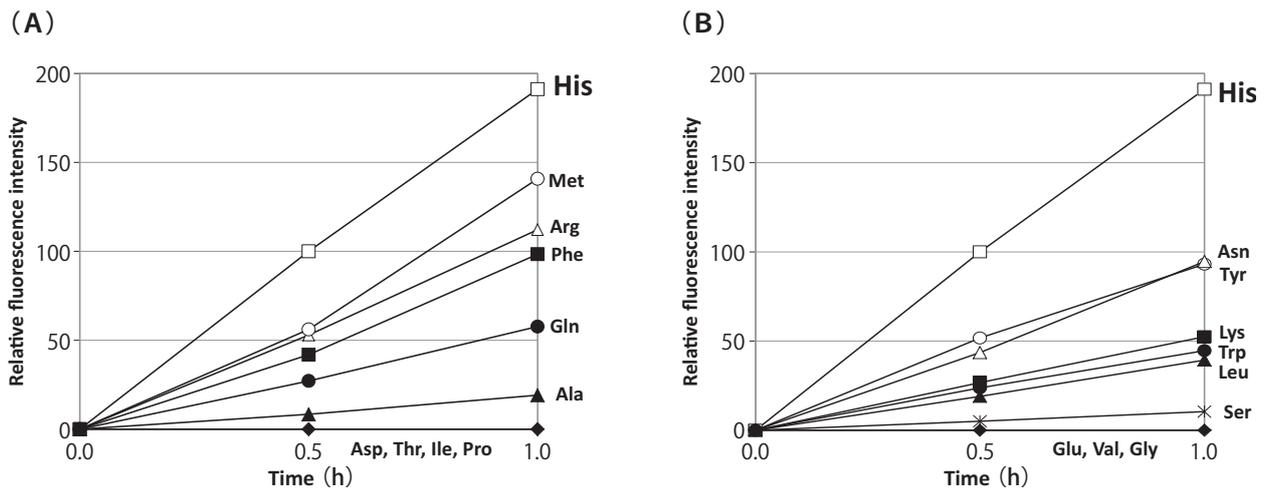


図3. ACE2によるグループA基質及びグループB基質分解の生成量

(A) グループA基質分解物の生成量。生成量は、Nma-Xaa-ProでのXaaに対応するアミノ酸がHis > Met > Arg > Phe > Gln > Ala > Asp, Thr, Ile, Proの順で多いことが分かった。(B) グループB基質分解物の生成量。生成量は、Nma-Xaa-ProでのXaaに対応するアミノ酸がHis > Asn > Tyr > Lys > Trp > Leu > Ser > Glu, Val, Glyの順で多いことが分かった。

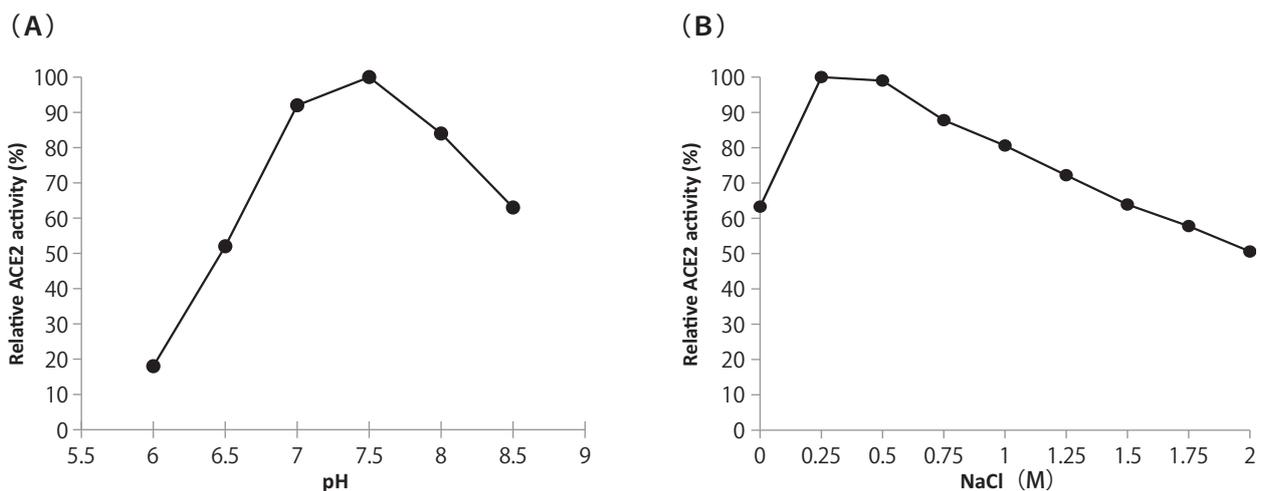


図4. Nma-His-Pro-Lys (Dnp) を基質とした場合のACE2の至適pH及びNaClの影響

(A) 至適pH。0.1 M HEPES 緩衝液を用いてACE2活性を測定した。(B) NaClの濃度依存性。緩衝液として0.1 M HEPES, pH 7.5を用い、NaCl濃度を変化させて活性を測定した。

においては、至適pHの約60%の活性を示した(図4A)。次に、ACE2活性に及ぼすNaClの影響を検討した。HEPES緩衝液pH 7.5を用いた場合、0.25 M ~ 0.5 M NaClの添加で最大活性を示した。NaCl無添加では最大活性の約60%の活性を示した。0.5 M以上のNaCl存在下では濃度依存的に活性が徐々に低下し、2.0 M NaCl存在下では最大活性の約50%に低下した(図4B)。以上の結果より、ACE2の反応緩衝液として0.1

M HEPES, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 0.01% Triton X-100, 0.02% NaN₃を選択した。

2) 市販味噌のACE2及びACE阻害活性

中央味噌研究所よりご恵与頂いた味噌50点を含む全国市販味噌63点及び秋田県産市販味噌13点、計76点の味噌を入手した。内訳は、米味噌65点、麦味噌6点、豆味噌1点及び調合味噌4点で、上記の方法で熱水抽出液を調製した。味噌抽出液を

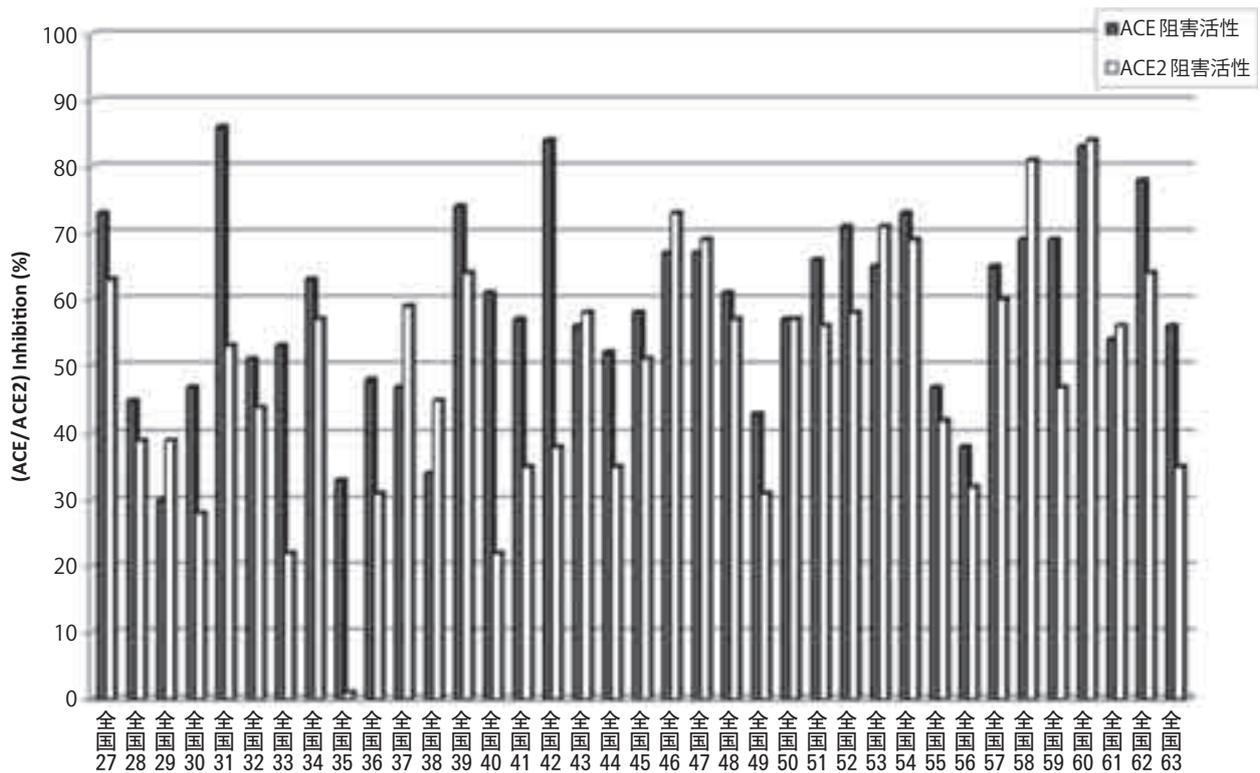
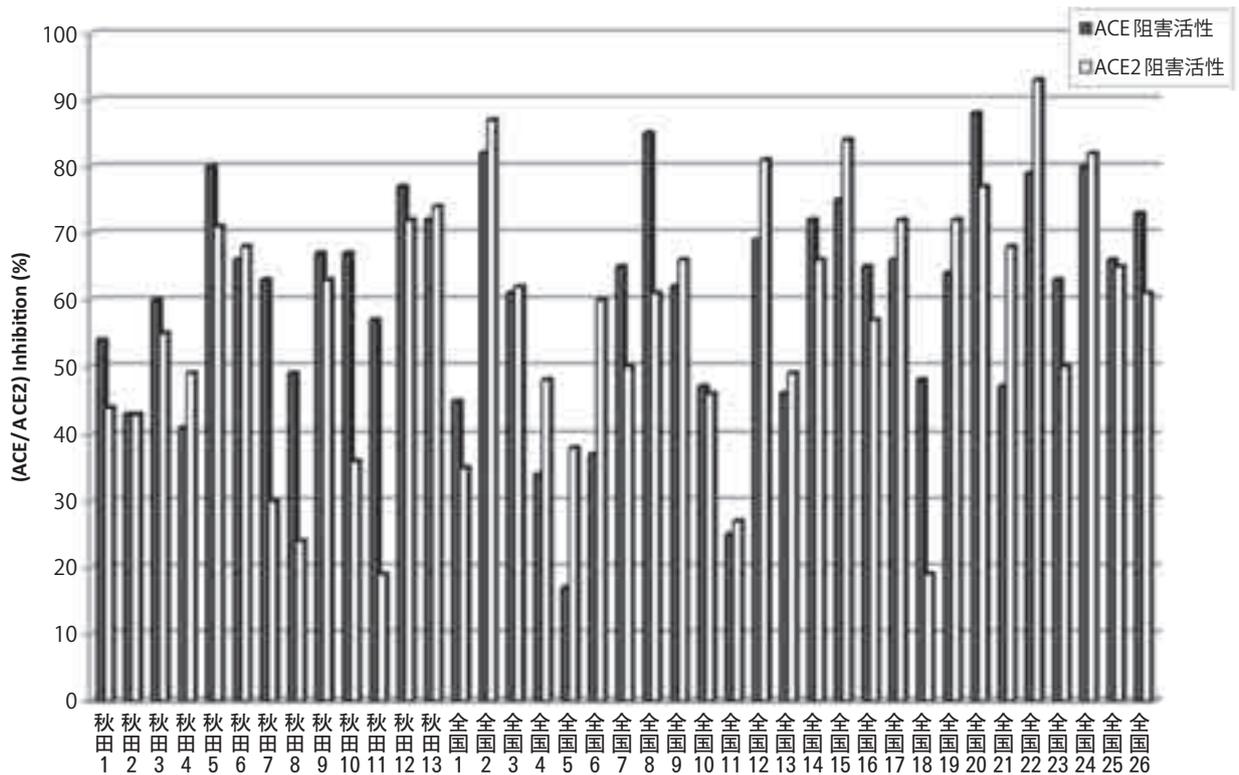


図5. 市販味噌（秋田産味噌及び全国味噌）抽出液のACE及びACE2阻害活性

■: ACE阻害活性 □: ACE2阻害活性

用いて、ACE2及びACE活性に及ぼす影響を検討した。その結果、全ての味噌抽出液に両酵素に

対する阻害活性が認められた(図5)。味噌によっては、ACE2阻害活性が非常に弱いものが見受

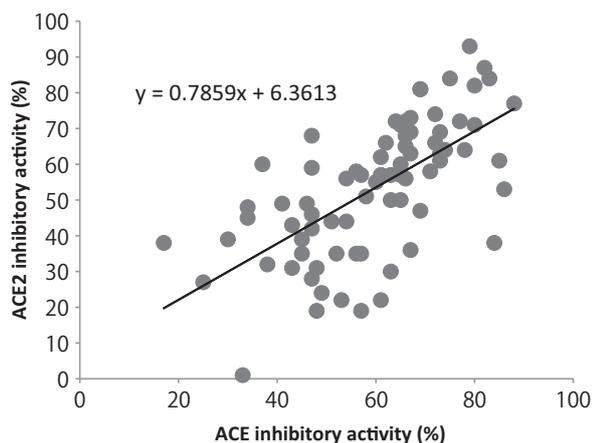


図6. ACE阻害活性とACE2阻害活性との相関

けられた（全国味噌 35 番）。この味噌は、米歩合が高い白味噌であった。その他の味噌抽出液においては ACE2 阻害活性と ACE 阻害活性の割合がほぼ同一の傾向が観察された。そこで、ACE2 阻害活性と ACE 阻害活性との相関関係を調べた。

図6に示す通り、両酵素の阻害活性には比較的高い相関が見られた ($y = 0.7859x + 6.3613$)。このことは、味噌由来 ACE2 阻害と ACE 阻害物質が同一化合物である可能性を示唆するものである。そこで、ACE2 及び ACE 阻害活性のいずれも高い値を示した全国味噌 20 番の抽出液を Bio-Gel P-4 カラムで分画し、ACE2 及び ACE 阻害活性の挙動を検討した。図7に示す通り、試験に供した味噌の ACE2 阻害活性ピークと ACE 阻害活性ピークは完全に一致し、味噌中の ACE2 阻害物質と ACE 阻害物質とは同一分子種であることが強く示唆された（図7）。味噌の原料である麴及び大豆の熱水抽出液中の ACE2 及び ACE 阻害活性を検討した結果、麴抽出液に阻害は殆ど検出されなかった。一方、大豆抽出液には両酵素に対する強い阻害が認められ、大豆抽出液の ACE2 に対する IC50 値は約 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ と求められた。また、大豆抽出液中の ACE2 阻害物質の挙動を Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィーで解析し

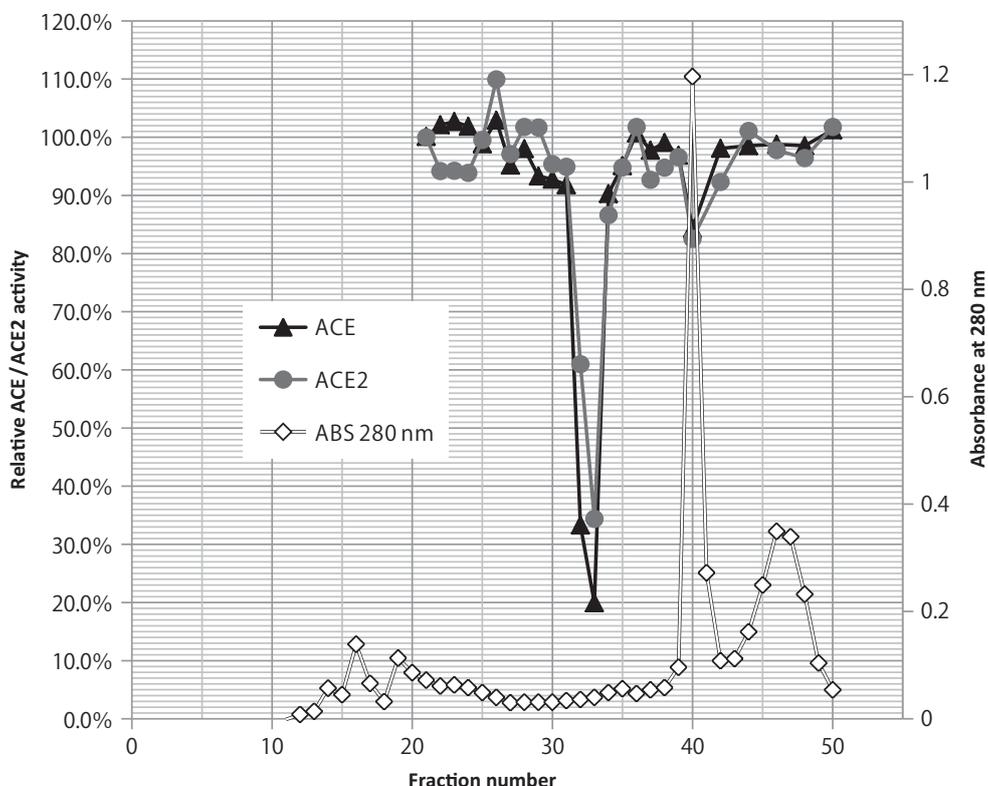


図7. 味噌抽出液の Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィー

全国味噌20番の抽出液 1 ml をカラムに添加した。溶出液の 280 nm における吸光度および ACE と ACE2 の阻害活性を測定した。33 画分に両酵素の阻害ピークが検出された。

た結果、抽出液そのままをカラムに添加した場合の保持容量は、28画分であったが、抽出液に味噌抽出液の食塩濃度と同程度である1.0%食塩を添加してクロマトグラフィーを行うと保持容量が32画分に移動する現象が観察された（結果省略）。この現象を踏まえて、後述するように大豆由来ACE2阻害物質の精製と同定を試みた。

3) 試験醸造味噌中のACE2及びACE阻害活性の変化

大豆の種類、麹菌の種類や酵母添加の有無が味噌中のACE2阻害物質に与える影響を検討する目的で各種味噌の試験醸造を行った。秋田県産及び中国産大豆を原料として、麹菌としてCK33株を用い、酵母添加有無の試験醸造味噌における

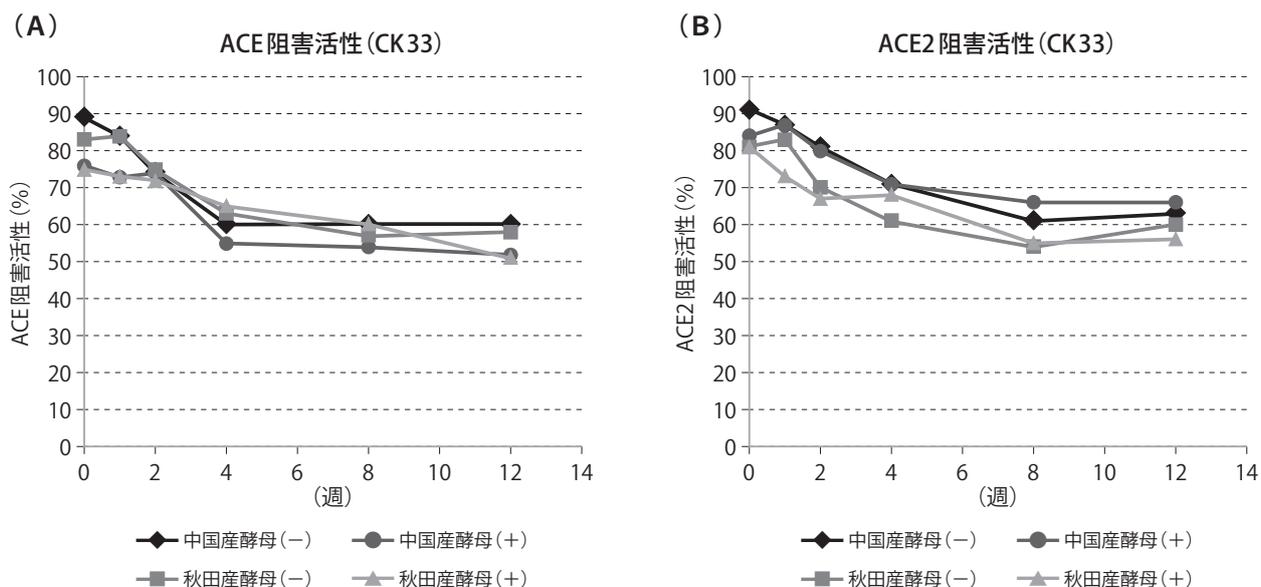


図8. 麹菌CK33株を用いた試験醸造味噌抽出液のACE及びACE2阻害活性

(A) 味噌抽出液のACE阻害活性の時間経過。(B) 味噌抽出液のACE2阻害活性の時間経過。

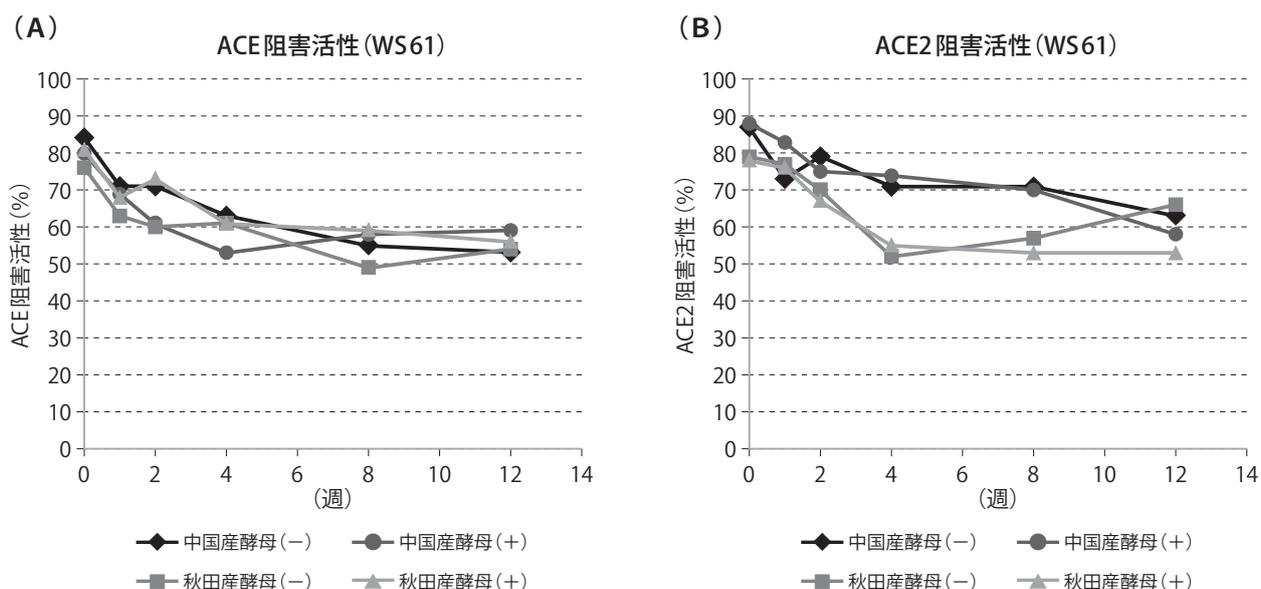


図9. 麹菌WS61株を用いた試験醸造味噌抽出液のACE及びACE2阻害活性

(A) 味噌抽出液のACE阻害活性の時間経過。(B) 味噌抽出液のACE2阻害活性の時間経過。

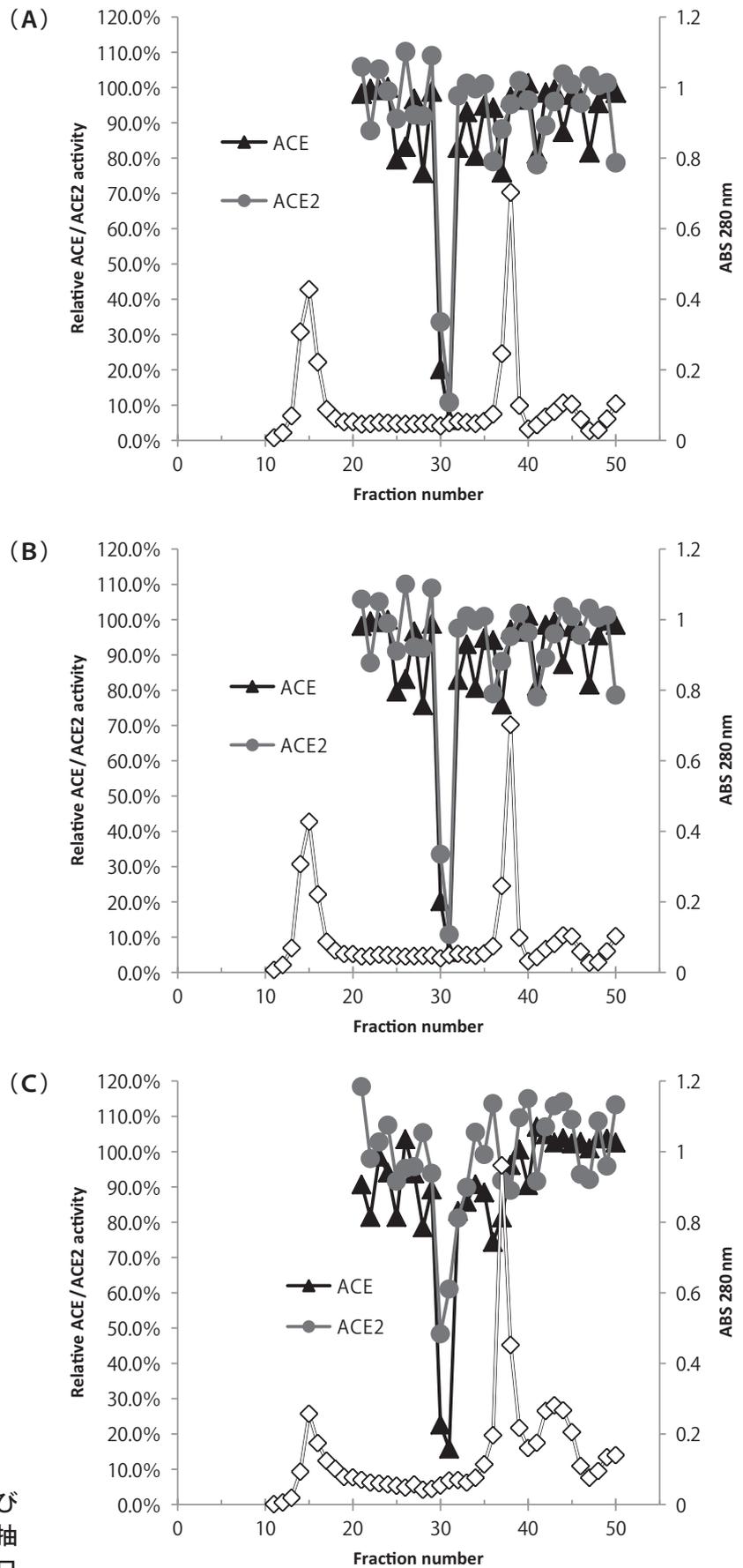


図10. 県産大豆，麹菌WS61株及び酵母添加区の試験醸造味噌抽出液のBio-Gel P-4カラムクロマトグラフィー

(A) 熟成1週間目の試験醸造味噌抽出液。(B) 熟成4週間目の試験醸造味噌抽出液。(C) 熟成12週間目の試験醸造味噌抽出液。各試験醸造味噌抽出液1mlをカラムに添加した。溶出液の280nmにおける吸光度およびACEとACE2の阻害活性を測定した。

ACE2 阻害及び ACE 阻害活性の変化を図 8 に示した。全ての醸造試験区において 4 週間の熟成期間中に ACE2 阻害活性と ACE 阻害活性が減少し、それ以降の熟成期間中は両酵素の阻害活性に大きな変化は認められなかった。

麹菌として WS61 株を用いて同様の試験醸造を行った。CK33 株を用いた場合とほぼ同様の結果が得られ、大豆や麹菌、酵母の添加有無における ACE2 及び ACE 阻害活性に大きな違いは認められなかった (図 9)。ただし、中国産大豆を用いた場合の ACE2 阻害活性の減少が国産大豆を用いた場合に比べ遅くなる傾向が見られた。しかしながら、12 週間の熟成では、中国産大豆と国産大豆で殆ど差が認められなかった (図 9 B)。試験醸造の結論として、味噌中の ACE2 及び ACE 阻害活性は、用いる大豆や麹菌さらには酵母の添加有無により大きな影響を受けないことが示された。このことは、市販味噌中に普遍的に ACE2 及び ACE 阻害物質が存在する結果を支持するものである。

4) 試験醸造味噌中の ACE2 及び ACE 阻害物質の挙動

試験醸造味噌中の ACE2 及び ACE 阻害物質の挙動を Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィーで解析した。秋田県産大豆と麹菌として WS61 株を用い且つ酵母を添加して試験醸造した味噌の抽出液のパターンを図 10 に示した。280 nm の吸光度を指標としたペプチドの溶出パターンからすると熟成が進むに従って、ペプチドの低分子化が進んでいることが分かる。また、ACE2 阻害活性と ACE 阻害活性は熟成期間中も全て同じ溶出位置に検出されたことより、熟成中には阻害物質に大きな変化が起こっていないことが推察された。

5) 大豆由来 ACE2 阻害物質 (ACE2iSB) の精製

前述の通り味噌の ACE2 阻害物質は大豆由来である。そこで、大豆からの ACE2 阻害物質 (ACE2 Inhibitor in Soybean, ACE2iSB) の精製を試みた。大豆 (リュウホウ, 100 g) を 1.5 L の蒸留水に浸漬し、1 夜室温で膨潤させた。これ

を 105℃で 30 分間加熱し、冷却後フードプロセッサーで粉碎した。10,000 x g, 30 分間の遠心分離を行い、上清 1.2L を回収した。次に、200 ml の上清を蒸留水で平衡化した Sep-Pak Vac C18 35 cc に添加し、素通り画分を回収した。この操作を計 6 回繰り返して、1.2L の C18 素通り画分を取得し、凍結乾燥した。凍結乾燥品 (9.45 g) を 60 mL の 10% エタノールに溶解後、10% エタノールで平衡化した Bio-Gel P-4 カラム (5.5 x 65 cm) に添加した。10% エタノールでカラムを溶出し、ACE2 阻害活性画分を回収した。阻害活性画分を凍結乾燥後 (120 mg), 20 mL の 10% エタノールに溶解し、10% エタノールで平衡化した Sephadex G-15 カラム (5.5 x 65 cm) に添加した。10% エタノールでカラムを溶出し、ACE2 阻害画分を回収し、凍結乾燥した。凍結乾燥標品 (64.8 mg) を 5 mL の 1.0% NaCl を含む 10% エタノールに溶解し、10% エタノールで平衡化した Bio-Gel P-4 カラム (2.5 x 90 cm) に添加し、4 mL ずつ分画し溶出液の 210 nm の吸光度及び ACE2 阻害活性を測定した。210 nm の吸光度と ACE2 阻害活性が一致する画分を回収後、凍結乾燥を行い ACE2iSB の最終精製標品 9.0 mg を取得した。

6) ACE2iSB の同定と特性解析

精製した ACE2iSB の (M+H)⁺ は、ESI-MS で 304.1 と求められた。この値はニコチアナミンの理論値と一致した。また、¹H-NMR スペクトル、ODS カラムクロマトグラフィーや TSKgel amide-80 カラムクロマトグラフィーでの保持時間やカチオン交換カラムを用いたアミノ酸分析の結果は、標準物質 (ニコチアナミン) と同一であった。したがって、ACE2iSB をニコチアナミンと同定した (図 11)。

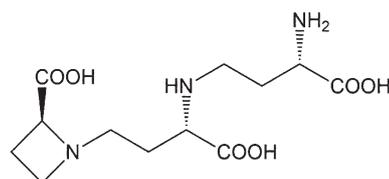


図 11. ニコチアナミンの化学構造

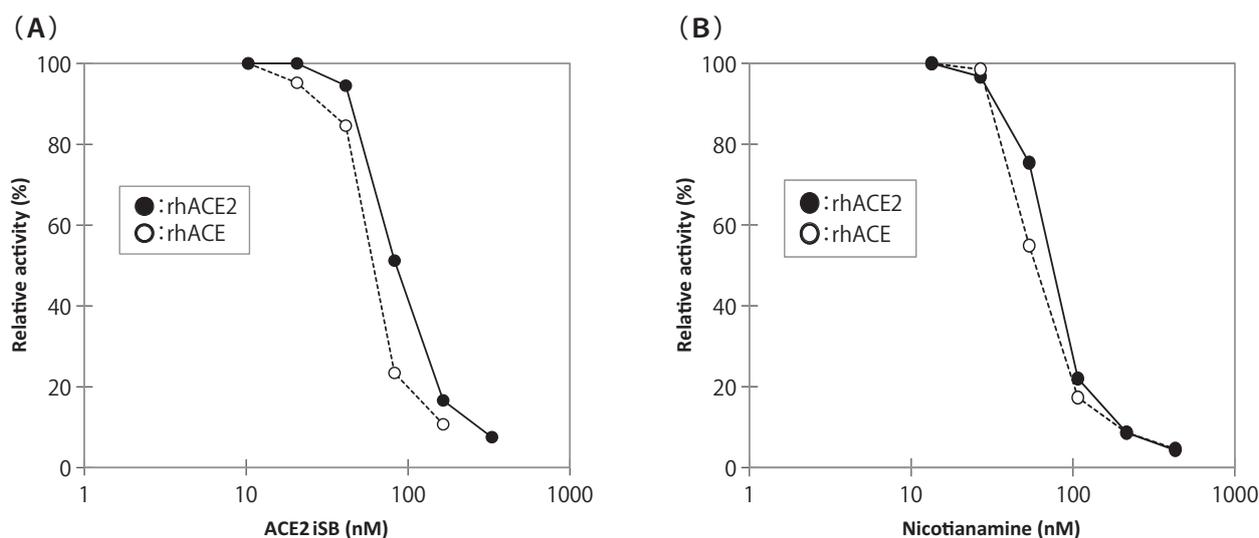


図12. ACE2iSB (A) 及びニコチアナミン (B) によるACE2及びACE阻害

(A) ACE2及びACE活性に及ぼすACE2iSBの影響。(B) ACE2及びACE活性に及ぼすニコチアナミンの影響。

ニコチアナミンは、醤油や野菜由来のACE阻害物質として知られている¹²⁻¹⁴。植物生理学的には、ムギネ酸合成系の中間化合物で高等植物に広く存在が認められている化合物である¹⁵。これまで、食物由来ACE2阻害物質の探索研究は行われておらず、今回初めて、食物由来ACE2阻害物質としてニコチアナミンを同定した。

図12にACE2iSB及びニコチアナミンのACE2及びACE阻害の濃度依存性を示した。ACE2iSBは、濃度依存的にACE2及びACEを阻害し、IC₅₀値はそれぞれ84 nM (ACE2) 及び62 nM (ACE) と求められた(図12 A)。一方、ニコチアナミンもACE2iSBと同様にACE2及びACEを濃度依存的に阻害し、IC₅₀はそれぞれ76 nM (ACE2) 及び59 nM (ACE) と求められた(図12 B)。ACE2iSB及びニコチアナミンのACE2とACEに対するIC₅₀は同一であり、この結果からもACE2iSBがニコチアナミンと同一化合物であることが裏付けられた。

最近、ACE2阻害ペプチドやACE2阻害剤が開発されている。それら阻害物質の中にはSARSコロナウイルスのスパイクタンパク質と細胞との融合を阻止する化合物や腸炎予防効果を示す化合物などが知られている¹⁶⁻¹⁸。ニコチアナミンは食物由来でありその安全性が担保されていることか

ら、生体機能調節物質としての様々な応用が期待される。

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、市販味噌試料50点を提供頂きました(一社)中央味噌研究所に御礼申し上げます。ACE2の基質開発及び大豆由来ACE2阻害物質の構造解析の一部は、秋田県総合食品研究センター・畠恵司博士、(株)ペプチド研究所・熊谷久美子博士、同・吉矢拓博士、秋田大学・杉山俊博名誉教授との共同研究です。実験補助で協力頂きました当研究センター嘱託研究員・須藤あさみ氏に感謝いたします。

引用文献

- 1) 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, 165-177 (2012).
- 2) 高橋砂織, 佐々木康子, 小笠原博信, 渡辺隆幸 血圧降下作用強化を目指した機能性味

- 噌の開発 中央味噌研究所報告 35, 129-140 (2014).
- 3) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, and Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87, e1-e9 (2000).
 - 4) Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, and Tuner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275, 33238-33243 (2000).
 - 5) Yagil Y and Yagil C, Hypothesis. ACE2 modulates blood pressure in the mammalian organism. *Hypertension* 41, 871-873 (2003).
 - 6) Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, and Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450-454 (2003).
 - 7) Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, and Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* 279, 3197-3201 (2004).
 - 8) Li F, Li W, Frazan M, and Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 309, 1864-1868 (2005).
 - 9) Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, and Penninger JM. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature Med* 11, 875-879 (2005).
 - 10) Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, Trichereau J, Ishiguro H, Paolino M, Sigl V, Hanada T, Hanada R, Lipinski S, Wild B, Camargo SMR, Singer D, Richter A, Kuba K, Fukamizu A, Schreiber S, Clevers H, Verrey F, Rosenstiel P, and Penninger JM. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 487, 477-481 (2012).
 - 11) Takahashi S, Ono H, Gotoh T, Yoshizawa-Kumagae K, and Sugiyama T. Novel internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme and carboxypeptidase Y. *Biomed Res* 32, 407-411 (2011).
 - 12) Kinoshita E, Yamakoshi J, and Kikuchi M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci Biotechnol Biochem* 57, 1107-1110 (1993).
 - 13) Hayashi A and Kimoto K. Nicotianamine preferentially inhibits angiotensin I-converting enzyme. *J Nutr Sci Vitaminol* 53, 331-336 (2007).
 - 14) Kuroda K, Ishihara K, and Masuoka N. Characterization of nicotianamine isolated from soybeans. *J Food Res* 2, 49-54 (2013).
 - 15) Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, and Nishizawa NK. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* 15, 1263-1280 (2003).
 - 16) Huentelman MJ, Zubcevic J, Prada JAH, Xiao X, Dimitrov DS, Raizada MK, and Ostrov DA. Structure-based discovery of a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor. *Hypertension* 44, 903-906 (2004).
 - 17) Byrnes JJ, Gross S, Ellard C, Connolly K, Donahue S, and Picarella D. Effects of ACE2 inhibitor GL1001 on acute dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Inflamm Res*

58, 819-827 (2009).
18) Diz DI, Garcia-Espinosa MA, Gegick S, Tommasi EN, Ferrario CM, Tallant EA, Chappell MC, and Gallagher PE. Injection of angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor

MLN4760 into nucleus tracts solitarii reduce baroreceptor reflex sensitivity for heart rate control in rats. *Exp Physiol* 93, 694-700 (2008).

健康有益性を持つ伝統的日本人食における 味噌の役割に関する研究

都築 毅

The role of miso in health beneficial traditional Japanese food

Tsuyoshi TSUDUKI

*Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University
1-1, Tsutsumidori-Amemiyamachi, Sendai, Miyagi 981-8555 Japan*

I. 味噌が肥満進行に与える影響

1. 導入

日本は世界有数の長寿国として知られている¹⁾。我々はその要因として、日本独自の食生活である日本食に着目してきた。以前我々は、日本食の内容が戦後から現代にかけて、時代とともに変化してきていることに着目し、各時代の日本食がマウスの健康状態に与える影響について研究した²⁾。すなわち、食事摂取調査に基づいて再現した2005年、1990年、1975年、1960年の1週間21食の食事を、それぞれ混合、凍結乾燥、粉末化したものマウスに与えた。その結果、現代の日本食に比べて1975年頃の日本食が高い肥満抑制効果を持つことを明らかとした。また、日本食のタンパク質・脂質・炭水化物を精製飼料のみを用いて再現した飼料を用いることで、1975年日本食の肥満抑制効果が、食事のタンパク質・脂質・炭水化物のエネルギーバランスに依存しないことも明らかとした。よって、1975年日本食に含まれるタンパク質・脂質・炭水化物の質的な違いにより、

肥満抑制効果が示されたと考えられた。1975年頃の日本食の特徴の一つに、味噌の摂取量が高いことがあげられた。日本人の味噌摂取量は戦後から現代にかけて減少を続けており、2010年では1975年の約半分になっている^{3),4)}。味噌は大豆、米麹または麦麹、食塩を混ぜ、発酵・熟成させたものであり、主成分である大豆が機能性を持つことに加え、発酵を行うことでアミノ酸、イソフラボン等の栄養素が豊富になり、多様な成分を含む。味噌はこれまでに発がん^{5),6)}や高血圧^{7),8)}、高コレステロール血症などの生活習慣病予防に有効であることが報告されている^{9),10)}。さらに抗酸化作用を持つことから、酸化ストレスによる老化を防ぐ役割も期待されている¹¹⁾。しかし、肥満の予防効果を検討した研究はほとんどない。肥満は脂質異常症、2型糖尿病などの代謝性疾患を誘導し、動脈硬化などの致死性疾患につながるため、予防が重要である。また、これまでの研究は味噌に含まれる単一の食品成分に着目したもののほとんどであり、食事の味噌そのものを摂取した際の機能性を検討した例は少ない。また、成分が過剰である

場合の有効性を検討し他のものが多く、実際の食事で摂取される濃度における有効性を検討したものはほとんどない。そこで本研究では、日本の伝統的食材である味噌に着目し、味噌の摂取が、肥満の進行に与える影響を検討した。食事摂取調査より、1975年(日本食の肥満抑制効果が高い年代)、2010年(現代)における食事での味噌の割合をもとに、普段の食生活で摂取可能な量の味噌添加食を試験食とし、マウスの肥満進行に与える影響を検討した。

2. 方法

(1) 試験飼料の作製

本試験では、米辛口味噌を凍結乾燥処理したものを、試験食の味噌として使用した。国民健康・栄養調査によると、日本人1日当たりの味噌摂取量は1975年で20.8g、2010年で10.8gである^{3),4)}。味噌の水分含量は38.52%であったため、それぞれ12.8g、6.6gに相当する。これより、国民健康・栄養調査による1日の食事全体(ただし水

分は除く)に占める凍結乾燥味噌の割合(w/w)は、1975年で2.6%、2010年で1.6%と算出された。この凍結乾燥味噌2.6%含有食を1975 miso 食、1.6%含有食を2010 miso 食とし、AIN-93G組成を改変したラード20%(w/w)添加高脂肪食に、それぞれの割合の凍結乾燥味噌を添加することで試験食を作製した(Table 1.1)。なお、試験食の一般栄養組成、塩分量を統一するため、2010 miso 食にmimic 味噌(凍結乾燥味噌の一般栄養組成、塩分を精製飼料のみを用いて再現したもの、Table 1.2)を1.0%添加し、凍結乾燥味噌との合計を2.6%とした。mimic 味噌を作製するにあたり、タンパク質としてカゼイン、脂質として大豆油、炭水化物としてコーンスターチ、食塩相当量としてNaCl、その他に相当する成分(灰分、麴粕など)としてセルロールを用いた^{2),12)}。試験食100gあたりのエネルギーはいずれも491kcalであった。

(2) 実験動物と飼育条件

本研究は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定とその解説 第2版」に従って計画を策定し、東北大学総長の承認を得て実施した。全ての操作は東北大学実験動物指針に沿って行われた。実験動物には4週齢の雄性ICRマウス(日本クレア(株))を用いた。粉末飼料(日本クレア(株)、CE-2)で1週間の馴化後、5週齢において各群10匹の2群に分け、2005 miso 食、1975 miso 食を与えた(それぞれ2005 miso 群、1975 miso 群とした)。試験食と水は自由摂食とした。飼育室は温度と湿度を一定に保ち、明暗サイクルを12時間(明期;8:00-20:00)とした。試験期間は8週間とし、体重を週1回、摂食量を3日に1回測定した。13週齢において、12時間絶食後、断頭屠殺し、血液、脳、心臓、肝臓、肺、脾臓、膵臓、白色脂肪組織(腸間膜周囲、腎周囲、精巣周囲)を採取した。採取した血液は遠心分離を行い(15°C, 3000rpm, 15min)、血清を得た。血清と各種臓器は分析に供するまで-80°Cにて保存した。

Table 1.1. Diet composition

	2010 miso	1975 miso
Casein (g/100g)	19.48	19.48
Soybean oil (g/100g)	6.82	6.82
Lard (g/100g)	19.48	19.48
Cornstarch (g/100g)	19.24	19.24
α -Cornstarch (g/100g)	12.86	12.86
Sucrose (g/100g)	9.74	9.74
Cellulose (g/100g)	4.87	4.87
Mineral mix (AIN-93G-MX) (g/100g)	3.41	3.41
Vitamin mix (AIN-93-VX) (g/100g)	0.97	0.97
L-Cysteine (g/100g)	0.29	0.29
Choline Bitartrate (g/100g)	0.24	0.24
tert-Butylhydroquinone (g/100g)	0.0014	0.0014
Freeze dried miso (g/100g)	1.60	2.60
Mimic miso (g/100g)	1.00	0.00
Energy (kcal/100g)	491	491

Table 1.2. Composition of freeze dried miso and mimic miso (/100g)

Freeze dried miso		mimic miso	
Protein	16.59 g	Casein	16.59 g
Fat	8.62 g	Soybean oil	8.62 g
Carbohydrate	47.66 g	Cornstarch	47.66 g
Sodium chloride equivalent	19.03 g	NaCl	19.03 g
Cellulose	8.10 g	Cellulose	8.10 g
Energy	334.6 kcal	Energy	334.6 kcal

(3) 肝臓および白色脂肪組織の組織学的観察

肝臓および精巣周囲脂肪組織の細胞の形態観察を行うため、組織を10%ホルマリン溶液で固定し、パラフィンに包埋した¹³⁾。5 μ mの厚さに薄切後、スライドガラスにマウントし、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、光学顕微鏡（(株)キーエンス、BZ-9000）を用いて組織学的観察を行った。脂肪組織は、一定面積当たりの細胞数を1匹あたり10ヶ所ランダムに測定し、脂肪細胞の面積を算出した。

(4) 生化学パラメーター測定

血清と肝臓の生化学パラメーターは、前報と同

様に測定した^{14),15)}。血清と肝臓のトリアシルグリセロール、総コレステロールは、それぞれトリグリセライドE-テストワコー、総コレステロールE-テストワコー（いずれも和光純薬工業(株)）を、血清のリン脂質、遊離脂肪酸、グルコースはそれぞれリン脂質C-テストワコー、NEFA C-テストワコー、グルコースCIIテストワコー、（いずれも和光純薬工業(株)）を用いて測定した。血清インスリンはマウスインスリン測定キット（(株)森永生化学研究所）を用いて測定した。また、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値は、血清グルコース濃度とインスリン濃度の積より算出した。血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスア

Table 1.3. Primer pairs used for the real time qRT-PCR analysis

Genbank ID	Gene name		Primer sequence (5' to 3')
NM_133904	<i>Acc</i>	Forward	CGCTCACCAACAGTAAGGTGG
		Reverse	GCTTGGCAGGGAGTTCCTC
NM_015729	<i>Aco</i>	Forward	TAACTTCCTCACTCGAAGCCA
		Reverse	CTGGGCGTAGGTGCCAATTA
NM_001163689	<i>Atgl</i>	Forward	CAACGCCACTCACATCTACGG
		Reverse	GGACACCTCAATAATGTTGGCAC
NM_007393	<i>β-actin</i>	Forward	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
		Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
NM_007643	<i>Cd36</i>	Forward	ATGGGCTGTGATCGGAATCT
		Reverse	GTCTTCCCAATAAGCATGTCTCC
NM_007824	<i>Cyp7a1</i>	Forward	GGGATTGCTGTGGTAGTGAGC
		Reverse	GGTATGGAATCAACCCGTTGTC
NM_007988	<i>Fas</i>	Forward	CCTGGATAGCATTCCGAACCTG
		Reverse	TTCACAGCCTGGGGTCATCTTTCG
NM_008062	<i>G6pdx</i>	Forward	TGGGTCCACCCTGCCACTTTTG
		Reverse	ATTGGGCTGCACCGGATGACCA
NM_009204	<i>Glut4</i>	Forward	GTGACTGGAACACTGGTCTTA
		Reverse	CCAGCCACGTTGCATTGTAG
NM_008255	<i>Hmgcr</i>	Forward	AGCTTGCCCGAATTGTATGTG
		Reverse	TCTGTTGTGAACCATGTGACTTC
NM_001039507	<i>Hsl</i>	Forward	TTCTCCAAAGCACCTAGCCAA
		Reverse	TGTGGAAAACCTAAGGGCTTGTG
NM_008509	<i>Lpl</i>	Forward	GGGAGTTTGGCTCCAGAGTTT
		Reverse	TGTGCTTTCAGGGTCCCTTAG
NM_001198933	<i>Me</i>	Forward	CCTCACCCTCGTGAGGTCAT
		Reverse	CGAAACGCCTCGAATGGT
NM_011144	<i>Ppara</i>	Forward	AGAGCCCCATCTGTCTCTC
		Reverse	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA
NM_011480	<i>Srebp1c</i>	Forward	GATGTGCGAACTGGACACAG
		Reverse	CATAGGGGGCGTCAAACAG
NM_011671	<i>Ucp2</i>	Forward	ATGGTTGGTTTCAAGGCCACA
		Reverse	CGGTATCCAGAGGGAAAAGTGAT

Acc, acetyl-Coenzyme A carboxylase beta ; *Aco*, acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl ; *Atgl*, patatin-like phospholipase domain containing 2 ; *β -actin*, actin, beta ; *Cd36*, CD36 antigen ; *Cyp7a1*, cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 ; *Fas*, fatty acid synthase ; *G6pdx*, glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked ; *Glut4*, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 ; *Hmgcr*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase ; *Hsl*, lipase, hormone sensitive ; *Lpl*, lipoprotein lipase ; *Me*, malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic ; *Ppara*, peroxisome proliferator activated receptor alpha ; *Srebp1c*, sterol regulatory element binding transcription factor 1 sterol regulatory element binding transcription factor 1 ; *Ucp2*, uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier).

ミナーゼ (GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) は, トランスアミナーゼ C II テストワコーを用いて測定した。血清と肝臓のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) は過去の報告と同様に測定した^{16),17)}。肝臓リン脂質は Rouser *et al.*¹⁸⁾ の方法を用いて測定した。吸光測定, 蛍光測定にはマイクロプレートリーダー (テカンジャパン(株), Infinite F200) を使用した。

(5) RNA 抽出と mRNA 発現量測定

qRT-PCR 法にて mRNA 発現量を測定するため, 肝臓, 精巣周囲脂肪組織の総 RNA をそれぞれ RNeasy Mini Kit, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (いずれも (株)キアゲン) を用いて抽出した^{14),19)}。抽出した RNA は分析に使用するまで -80 °C で保存した。Primer Script™ RT Master Mix (タカラバイオ(株)) 用いて総 RNA より cDNA を合成した。cDNA は SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ(株)), 遺伝子特異的なプライマー (Table 1.3) と混合され PCR 反応を行った。PCR 反応には Thermal Cycler Dice® Real Time System

Single (タカラバイオ(株)) を使用し, 反応条件は 95 °C で 10 秒間保持された後, 95 °C で 5 秒間, 60 °C で 31 秒間を 40 サイクルで行った。mRNA の発現量は SYBR green の蛍光強度によって測定された。Threshold cycle (Ct 値) を求め, β -actin に対する相対値で mRNA 発現量を算出した。

(6) 統計処理

データは平均 ± 標準誤差で示した。味噌の濃度による影響を調べるため, 対応のない両側 Student's *t* 検定を使用し, $p < 0.05$ のときを有意とした。

3. 結果

(1) 成長パラメーター

終体重に 2 群間で有意な差は認められなかった (Table 1.4)。摂食量, 摂取エネルギーにも有意差は認められなかった。2005 miso 群に対して 1975 miso 群で, 体重あたりの心臓, 腎臓重量が有意に高い値となったが, 素重量に 2 群間で有意差は認められなかった。脳, 肝臓, 肺, 膵臓, 脾臓重量に 2 群間で有意な差は認められなかった。白色脂肪組織重量は, 腸間膜周囲, 精巣周囲, 腎周囲, いずれの部位でも 1975 miso 群で有意に低い値となり, これらの総量も有意に低くなった。白

Table 1.4. Body weights, food intake and tissue weights

	2005 miso	1975 miso
Body weight (g)		
Initial	30.1 ± 0.5	30.0 ± 0.5
Final	46.6 ± 2.2	42.4 ± 1.4
Food intake (g/day)	3.51 ± 0.10	3.45 ± 0.09
Energy intake (kcal/day)	17.2 ± 0.5	16.9 ± 0.4
Tissue weight (g/100g body weight)		
Brain	1.03 ± 0.04	1.15 ± 0.04
Heart	0.41 ± 0.01	0.48 ± 0.02**
Kidney	1.37 ± 0.05	1.59 ± 0.04**
Liver	3.60 ± 0.06	3.63 ± 0.10
Lung	0.65 ± 0.06	0.55 ± 0.02
Pancreas	0.80 ± 0.02	0.80 ± 0.03
Spleen	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0.02
White adipose tissue		
Epididymal	3.66 ± 0.38	2.64 ± 0.18*
Mesenteric	1.49 ± 0.16	0.99 ± 0.11*
Perinephric	2.07 ± 0.19	1.23 ± 0.18**
Total	7.22 ± 0.71	4.66 ± 0.51**

Values are mean ± SE, n = 10. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs 2005 miso).

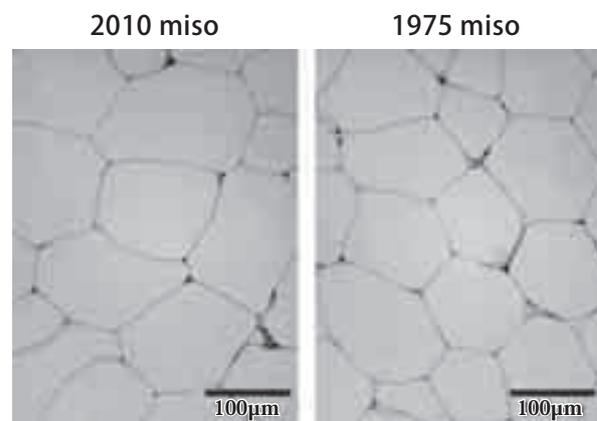


Figure 1.1.

Effect of dietary intake of miso on adipocyte hypertrophy. Hematoxylin-eosin staining of epididymal adipose tissue sections from respective mice of each group (scale bar = 100µm).

色脂肪組織重量に差が認められたため、組織の切片をヘマトキシリン・エオシン染色し、脂肪細胞の大きさを観察した。その結果、2005 miso 群に対して 1975 miso 群で脂肪細胞大きさが小さかった (Figure 1.1)。脂肪細胞の面積を数値化したところ有意差は認められなかったが、2010 miso 群 (1.00 ± 0.22) に対して 1975 miso 群 (0.79 ± 0.09) で約 20% 小さくなった ($p = 0.43$)。

(2) 脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量

高濃度の味噌を摂取した 1975 miso 群で脂肪組織への脂質蓄積が抑制されたメカニズムを検討するため、精巣周囲脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を qRT-PCR 法にて測定した。血中からの脂質の取り込みに関する *Lpl*, *Cd36* は、いずれも 2010 miso 群に対して 1975 miso 群で有意に高くなった (Table 1.5)。脂肪細胞内のトリアシルグリセロールを分解し、血中への脂質分泌を担う *Hsl* に群間で有意な差は認められなかった。血中からのグルコース取り込みに関与する *Glut4* は 2010 miso 群に対して 1975 miso 群で高い傾向を示した ($p = 0.09$)。細胞内に取り込まれたグルコースから脂肪酸への生合成に関わる遺伝子の内、*G6pdx* は 2010 miso 群に対して 1975 miso 群で有意に高い値となった。*Acc*, *Fas*, *Me* は、有意差は認められなかったが、いずれも 1975 miso 群で高い値となった。これら脂肪酸合成に関わる分子の転写因子である *Srebp1c* は、1975 miso 群で有意に高くなった。脂肪細胞の分化に関わる *Ppar γ* の mRNA 発現量に群間で差は認められなかった。熱産生に関わる *Ucp2* は 2010 miso 群に対して 1975 miso 群で有意に高くなった。以上より、低濃度に対して高濃度の味噌の摂取により、脂肪細胞での脂質代謝関連遺伝子は全体的に活性化していることが明らかとなった。

(3) 血清パラメーター

血清脂質パラメーターである総コレステロール量は 2010 miso 群に対して 1975 miso 群で有意に低い値となった。トリアシルグリセロール、リン

Table 1.5. mRNA expression level in epididymal adipose tissue and liver

Gene function	Gene name	2005 miso	1975 miso
Lipid uptake	<i>Lpl</i>	1.00 ± 0.12	$1.45 \pm 0.14^*$
	<i>Cd36</i>	1.00 ± 0.07	$1.58 \pm 0.06^{**}$
Lipolysis	<i>Atgl</i>	1.00 ± 0.14	1.49 ± 0.28
	<i>Hsl</i>	1.00 ± 0.17	1.15 ± 0.14
Glucose uptake	<i>Glut4</i>	1.00 ± 0.14	1.44 ± 0.20
Fatty acid synthesis	<i>Acc</i>	1.00 ± 0.21	1.30 ± 0.19
	<i>Fas</i>	1.00 ± 0.16	1.21 ± 0.21
	<i>Me</i>	1.00 ± 0.25	1.75 ± 0.29
	<i>G6pdx</i>	1.00 ± 0.12	$1.34 \pm 0.09^*$
	<i>Srebp1c</i>	1.00 ± 0.09	$1.52 \pm 0.20^*$
Differentiation	<i>Pparγ</i>	1.00 ± 0.23	0.96 ± 0.14
Thermogenesis	<i>Ucp2</i>	1.00 ± 0.09	$1.47 \pm 0.19^*$

Values are mean \pm SE, $n = 10$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs 2005 miso).

Table 1.6. Biochemical parameters of serum and liver

		2005 miso	1975 miso
Serum			
TG	(mmol/L)	1.07 ± 0.09	1.01 ± 0.08
TC	(mmol/L)	3.58 ± 0.25	$2.84 \pm 0.19^*$
PL	(mmol/L)	2.75 ± 0.14	2.51 ± 0.17
NEFA	(mEq/L)	0.87 ± 0.02	0.89 ± 0.03
Glucose	(mmol/L)	6.29 ± 0.53	6.30 ± 0.70
Insulin	(pmol/L)	41.8 ± 5.5	45.4 ± 6.9
HOMA-IR	(ratio)	1.52 ± 0.23	1.68 ± 0.28
GOT	(IU/L)	71.1 ± 8.1	84.9 ± 11.4
GPT	(IU/L)	6.73 ± 0.36	8.12 ± 0.88
TBARS	(μ mol/L)	5.50 ± 0.33	4.81 ± 0.28
Liver			
TG	(μ mol/g)	56.9 ± 5.2	52.3 ± 4.0
TC	(μ mol/g)	20.2 ± 0.9	20.6 ± 1.3
PL	(μ mol/g)	43.6 ± 0.4	43.8 ± 0.9
TBARS	(nmol/g)	41.3 ± 1.3	$49.8 \pm 2.1^{**}$

Values are mean \pm SE, $n = 10$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs 2005 miso). TG, Triacylglycerol; TC, Total cholesterol; PL, phospholipid; NEFA, non-esterified fatty acid; GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, Glutamate pyruvate transaminase; TABRS, Thiobarbituric acid reactive substances.

脂質、遊離脂肪酸量に群間で有意な差は認められなかった (Table 1.6)。糖代謝指標であるグルコースとインスリン量、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR に、群間で差は認められなかった。肝機能マーカーの GOT, GPT, 過酸化脂質量を示す TBARS に群間で有意な差は認められなかった。

Table 1.7. mRNA expression level in liver

		1975 miso	2010 miso
Fatty acid synthesis	<i>Acc</i>	1.00 ± 0.11	0.91 ± 0.08
	<i>Fas</i>	1.00 ± 0.10	0.80 ± 0.04
	<i>Srebp1c</i>	1.00 ± 0.10	0.96 ± 0.09
β-oxidation	<i>Aco</i>	1.00 ± 0.08	0.78 ± 0.08
	<i>Ppara</i>	1.00 ± 0.08	0.94 ± 0.07
Cholesterol synthesis	<i>Hmgcr</i>	1.00 ± 0.06	1.04 ± 0.11
Cholesterol catabolism	<i>Cyp7a1</i>	1.00 ± 0.15	1.37 ± 0.24

Values are mean ± SE, n = 10.

(4) 肝臓パラメーター

肝臓脂質パラメーターであるトリアシルグリセロール、総コレステロール、リン脂質濃度に群間で有意な差は認められなかった (Table 1.6)。過酸化脂質量を示す TABRS は 2005 miso 群に対して 1975 miso 群で有意に高くなった。

(5) 肝臓における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量

脂肪酸合成に関わる *Acc*, *Fas*, これらの転写因子である *Srebp1c* の mRNA 発現量に群間で差は認められなかった (Table 1.7)。脂肪酸β酸化に関わる *Aco*, その転写因子である *Ppara* の mRNA 発現量に群間で差は認められなかった。コレステロール合成, 排泄に関わる *Hmgcr*, *Cyp7a1* に群間で有意な差は認められなかった。

4. 考察

本試験では 2010 年および 1975 年の食事における味噌の摂取が肥満の進行に与える影響を, 高脂肪食摂取マウスを用いて検討した。2010 年, 1975 年の食事に占める味噌の割合を再現した 1.6% または 2.6% 味噌含有食をマウスに摂取させたところ, 2010 年に対して 1975 年型の高濃度味噌食を摂取したマウスで, 白色脂肪組織重量が有意に減少した。これより, 高濃度の味噌摂取による抗肥満効果が示された。

終体重は群間で有意な差は認められなかったが, 白色脂肪組織重量は 2010 miso 群に対して 1975 miso 群で有意に低くなった。また, 脂肪細胞の大きさも有意差は認められなかったが, 2010 miso 群に対して 1975 miso 群で約 20% 小

くなった。よって, 低濃度に対して高濃度の味噌摂取により, 白色脂肪組織への脂質蓄積が抑制されることが示された。このメカニズムを解明するため, 精巣周囲脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 量を測定した。2010 miso 群に対して 1975 miso 群で脂質の取り込み (*Lpl*, *Cd36*), グルコース取り込み (*Glut4*), 脂肪酸合成 (*Acc*, *Fas*, *Me*, *G6pdx*) に関わる遺伝子の mRNA 発現量が増加しており, 高濃度の味噌摂取により, 脂肪細胞において脂質代謝が全体的に活性化していることが認められた。2010 miso 群に対して 1975 miso 群で脂肪細胞への脂質蓄積の抑制がされていたことから, 味噌の摂取は細胞機能を活性化し, 成熟脂肪細胞を正常な大きさに保つ働きがあることが示唆された。また, 1975 miso 群で脂肪細胞への脂質蓄積が少ないことに応答して, 脂質の取り込み・合成が促進されたことも考えられた。このことの詳細については, 更なる検討が必要である。

肝臓における脂肪酸合成, β酸化, コレステロール代謝に関わる遺伝子発現は, 味噌の濃度によって変化が生じなかったことから, 肝臓は味噌による抗肥満効果に関連しないことが示唆された。肝臓や脂肪組織に加え, 筋肉, 褐色脂肪組織も脂質代謝において重要な役割を担う。今後, 高濃度の味噌摂取がこれら組織に与える影響について検討する必要がある。

味噌は, 大豆に食塩と麦または米由来の麴を加えて発酵したものである。味噌には多くの栄養成分が含まれており, その有用性が報告されている。味噌の主成分である大豆には大豆に特徴的なタンパク (グリシニン, βコングリシニン), 多価不飽和脂肪酸が豊富な脂質に加え, ビタミン E, レシチン, サポニン, イソフラボン (ゲニステイン, ダイゼイン, ダイジン, グリシテイン) などの成分が豊富に含まれている。大豆タンパク^{20),21)}, 大豆イソフラボン²²⁾ は食事性あるいは遺伝性肥満ラットやマウスにおいて, 内臓脂肪蓄積を低減させることが示されている^{23),24)}。しかし, これらの研究のほとんどは, 非常に高濃度での試験である。今後, 実際の食生活に反映できる濃度での有効性の検討が求められる。本試験で見られた味噌によ

る内臓脂肪蓄積抑制効果は、これら多くの成分が相加・相乗的に機能することで現れたと推察された。

本研究では、高い肥満抑制効果を示した1975年日本食²⁾の特徴の一つである味噌が高脂肪食誘導性肥満の進行にどのような影響を与えるか検討した。その結果、1975年型の味噌食で、内臓脂肪蓄積が抑制された。よって、1975年日本食が示した高い肥満抑制効果のひとつに味噌の影響が示唆された。1975年と2010年型試験飼料の味噌重量の差は100gあたり1g程度であるが、肥満の進行に異なる影響が見られた。これは、ヒトに換算すると味噌汁2杯分に相当する。味噌汁2杯分に相当する味噌摂取したマウスの腸内細菌叢は変化することが報告されている²⁵⁾。腸内細菌叢の変化は、多くの疾患発症に影響することが知られていることから、本研究結果に腸内細菌叢が影響した可能性が考えられた。

過去の疫学研究で、味噌の摂取量が多い人は野菜類、魚介類の摂取量が多いことが知られている²⁶⁾。よって、ヒトにおいて習慣的に味噌を摂取することは、食生活改善や健康維持につながることで大いに期待された。

5. 文献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部 (2014) 平成25年簡易生命表. 厚生労働統計協会, 東京.
- 2) 北野泰奈, 本間太郎, 畠山雄有, 治部祐里, 川上祐生, 都築毅, 仲川清隆, 宮澤陽夫 (2014) 時代とともに変化した日本食がマウスの肥満発症リスクに与える影響. 日本栄養・食糧学会誌 67: 73-85.
- 3) 厚生労働省, 国民健康栄養調査 (http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou_eiyou_chousa.html).
- 4) 独立行政法人 国立健康・栄養研究所, 国民健康・栄養調査, 国民栄養の現状 (http://www0.nih.go.jp/eiken/chosa/kokumin_eiyou/).
- 5) Ohara M, Lu H, Shiraki K, Ishimura Y, Uesaka T, Katoh O, Watanabe H (2002) Prevention by long-term fermented miso of induction of colonic aberrant crypt foci by azoxymethane in F344 rats. *Oncol Rep* 9:69-73.
- 6) 平山雄 (1981) みそ汁を飲む頻度と胃がんの死亡率との関係. 国立がんセンター研究所.
- 7) Yoshinaga M, Toda N, Tamura Y, Terakado S, Ueno M, Otsuka K, Numabe A, Kawabata Y, Uehara Y (2012) Japanese traditional miso soup attenuates salt-induced hypertension and its organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *Nutrition* 28: 924-931.
- 8) Watanabe H, Kashimoto N, Kajimura J, Kamiya K (2006) A miso (Japanese soybean paste) diet conferred greater protection against hypertension than a sodium chloride diet in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res* 29: 731-738.
- 9) 海老根英雄 (1990) 味噌の機能性. 日本醸造協会誌 85: 70-75.
- 10) 五明紀春, 味噌の科学と食塩 (www.saltscience.or.jp/symposium/1-gmyou.pdf).
- 11) Santiago LA, Hiramatsu M, Mori A (1992) Japanese soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation. *J Nutr Sci Vitaminol* 38: 298-304.
- 12) 北野泰奈, 中村祐美子, 鄂爽, 畠山雄有, 山本和史, 坂本有宇, 都築毅, 仲川清隆, 宮澤陽夫 (2014) 日本の伝統的食品である「かまぼこ」の脂質代謝系に与える影響. 日本食品科学工学会誌 in press.
- 13) Takasaki M, Honma T, Yanaka M, Sato K, Shinohara N, Ito J, Tanaka Y, Tsuduki T, Ikeda I (2012) Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice. *J Nutr Biochem* 23: 640-645.
- 14) Tsuduki T, Kitano Y, Honma T, Kijima R, Ikeda I (2013) High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of

- mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 59: 384-92.
- 15) 畠山雄有, 北野泰奈, 本間太郎, 鄂爽, 山本和史, 治部祐里, 川上祐生, 都築毅 (2014) 時代と共に変化した日本食が母乳を介して仔マウスの脂質代謝系に与える影響. *日本栄養・食糧学会誌* 67: 255-270.
- 16) Shinohara N, Tsuduki T, Ito J, Honma T, Kijima R, Sugawara S, Arai T, Yamasaki M, Ikezaki A, Yokoyama M, Nishiyama K, Nakagawa K, Miyazawa T, Ikeda I (2012) Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1821: 980-988.
- 17) Yagi K (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15: 212-216.
- 18) Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 494-96.
- 19) Homma T, Shinohara N, Ito J, Kijima R, Sugawara S, Arai T, Tsuduki T, Ikeda I (2012) High-fat diet intake accelerates aging, increases expression of Hsd11b1, and promotes lipid accumulation in liver of SAMP10 mouse. *Biogerontology* 13: 93-103.
- 20) Nagasawa A1, Fukui K, Funahashi T, Maeda N, Shimomura I, Kihara S, Waki M, Takamatsu K, Matsuzawa Y (2002) Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res* 34: 635-639.
- 21) Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T (2000) Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition* 16: 349-354.
- 22) Davis J, Higginbotham A, O'Connor T, Moustaid-Moussa N, Tebbe A, Kim YC, Cho KW, Shay N, Adler S, Peterson R, Banz W (2007) Soy protein and isoflavones influence adiposity and development of metabolic syndrome in the obese male ZDF rat. *Ann Nutr Metab* 51: 42-52.
- 23) Velasquez MT, Bhathena SJ (2007) Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci* 26: 72-82.
- 24) Ørgaard A, Jensen L (2008) The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp Biol Med* 233: 1066-1080.
- 25) 錫谷達夫, 西山恭子, 橋本裕美, 山田結理, 長井健一郎, 石岡賢 (2014) 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影響—. *中央味噌研究所研究報告* 35: 113-118.
- 26) 酒井徹 (2012) 味噌・大豆製品摂取量と食生活習慣および生活習慣病との関連を臨床疫学的研究. *中央味噌研究所研究報告* 33: 150-155.

II. 味噌と運動の併用効果が食事誘導性肥満に与える影響

1. 導入

先の試験では、高い肥満抑制効果を示した1975年頃の日本食の特徴として、味噌の摂取量が高いことに着目し、現代（低濃度）と1975年（高濃度）の味噌の摂取量の差が、肥満の進行に与える影響を、高脂肪食摂取マウスを用いて検討した。その結果、現代に対し1975年型の味噌食で、内臓脂肪の蓄積が抑制されることが明らかとなった。

食事に加えて運動は、肥満の進行を予防する有効な方法である。運動により活動筋肉でのエネルギー需要が増加し、糖や脂質を基質としてミトコンドリアでエネルギーが産生される。筋肉は組織中の基質に加えて、血中からグルコースや脂肪酸を取り込み燃焼する。さらに、脂肪組織では脂質分解が促進して脂肪酸が、肝臓では糖新生によりグルコースが産生され、血中を移動して筋肉へと運ばれる^{1),2)}。このように運動を行うことでエネ

ルギー消費が促進する。カテキンやクロロゲン酸など、食品成分にはこのような経路に作用して、運動の効果を増強する物質が知られている^{3),4),5)}。このような効果をもつ食品は、健康維持に非常に有益であると考えられる。そこで、本研究では運動と味噌の摂取を併用することで、肥満抑制効果が増強されるか否かを検討することとした。

2. 方法

(1) 試験飼料の作製

試験食に使用した凍結乾燥味噌, mimic味噌は、先の試験と同様のものを用いた。すなわち、凍結乾燥味噌は米辛口味噌を凍結乾燥処理したものを、mimic味噌は凍結乾燥味噌の一般栄養組成、塩分を精製飼料のみを用いて再現したものとした (Table 2.1)。AIN-93G 組成を改変したラード 20% (w/w) 添加高脂肪食に、味噌あるいは mimic味噌を合計 2.6% 添加することで試験食を作製した (Table 2.2)。高脂肪食に mimic味噌を 2.6% 添加したものを Control 食、凍結乾燥味噌を 2.6%

Table 2.1. Composition of freeze dried miso and mimic miso (/100g)

Freeze dried miso		mimic miso	
Protein	16.59 g	Casein	16.59 g
Fat	8.62 g	Soybean oil	8.62 g
Carbohydrate	47.66 g	Cornstarch	47.66 g
Sodium chloride equivalent	19.03 g	NaCl	19.03 g
Cellulose	8.10 g	Cellulose	8.10 g
Energy	334.6 kcal	Energy	334.6 kcal

Table 2.2. Diet composition (/100g)

	Control	Miso
Casein (g/100g)	19.48	19.48
Soybean oil (g/100g)	6.82	6.82
Lard (g/100g)	19.48	19.48
Cornstarch (g/100g)	19.24	19.24
α -Cornstarch (g/100g)	12.86	12.86
Sucrose (g/100g)	9.74	9.74
Cellulose (g/100g)	4.87	4.87
Mineral mix (AIN-93G-MX) (g/100g)	3.41	3.41
Vitamin mix (AIN-93-VX) (g/100g)	0.97	0.97
L-Cysteine (g/100g)	0.29	0.29
Choline Bitartrate (g/100g)	0.24	0.24
tert-Butylhydroquinone (g/100g)	0.0014	0.0014
Freeze dried miso (g/100g)	0.00	2.60
Mimic miso (g/100g)	2.60	0.00
Energy (kcal/100g)	491	491

添加したものを Miso 食とした。試験食 100 g あたりのエネルギーは Control 食, Miso 食のいずれも 491 kcal であった。

(2) 実験動物と飼育条件

本研究は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定とその解説 第2版」に従って計画を策定し、東北大学総長の承認を得て実施した。全ての操作は東北大学実験動物指針に沿って行われた。実験動物には4週齢の雄性 ICR マウス (日本クレア(株)) を用いた。馴化期間の1週間、粉末飼料 (日本クレア(株), CE-2) を自由摂食で与えた。さらに、トレッドミル (室町機械(株), MK-680) を用いて 18m/min, 10min/time, 3time/week の走行運動を行った。5週齢において各群 10 匹に群分けし、試験食が Control 食の C 群, 試験食が Control 食で運動を行う C+E 群, 試験食が Miso 食で運動を行う M+E 群の3群を設けた。トレッドミルによる運動条件は 18m/min, 50min/time, 5time/week とした。試験食と水は自由摂食とした。飼育室は温度と湿度を一定に保ち、明暗サイクルを 12 時間 (明期; 8:00-20:00) とした。トレッドミルによる運動は暗期開始直前の 17:00-20:00 に行った。試験期間は 8 週間とし、体重を週 1 回、摂食量を 3 日に 1 回測定した。13 週齢において、12 時間絶食後、断頭屠殺し、血液、脳、心臓、肝臓、肺、脾臓、膵臓、白色脂肪組織 (腸間膜周囲、腎周囲、精巣周囲)、左右の筋肉 (ヒラメ筋、腓腹筋、大腿四頭筋、前脛骨筋) を採取した。採取した血液は遠心分離を行い (15 °C, 3000 rpm, 15 min)、血清を得た。血清と各種臓器は分析に供するまで -80 °C にて保存した。

(3) 肝臓、白色脂肪組織および筋肉の組織学的観察

肝臓、精巣周囲脂肪組織の細胞の形態観察を行うため、組織を 10% ホルマリン溶液で固定し、パラフィンに包埋した⁶⁾。5 μ m の厚さに薄切後、スライドガラスにマウントし、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、光学顕微鏡 ((株)キーエンス, BZ-9000) を用いて組織学的観察を行った。

脂肪組織は、一定面積当たりの細胞数を1匹あたり10ヶ所ランダムに測定し、脂肪細胞の面積を算出した。

(4) 生化学パラメーター測定

血清と肝臓の生化学パラメーターは、前報と同様に測定した^{7,8)}。血清と肝臓のトリアシルグリセロール、総コレステロールは、それぞれトリグリセライド E-テストワコー、総コレステロール E-テストワコー (いずれも和光純薬工業株) を、

血清のリン脂質、遊離脂肪酸、グルコースはそれぞれリン脂質 C-テストワコー、NEFA C-テストワコー、グルコース C II テストワコー、(いずれも和光純薬工業株) を用いて測定した。血清インスリンはマウスインスリン測定キット ((株) 森永生化学研究所) を用いて測定した。また、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR 値は、血清グルコース濃度とインスリン濃度の積より算出した。血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トラ

Table 2.3. Primer pairs used for the real time qRT-PCR analysis

Genbank ID	Gene name		Primer sequence (5' to 3')
NM_133904	<i>Acc</i>	Forward	CGCTCACCAACAGTAAGGTGG
		Reverse	GCTTGGCAGGGAGTTCCTC
NM_015729	<i>Aco</i>	Forward	TAACTTCCTCACTCGAAGCCA
		Reverse	CTGGGCGTAGGTGCCAATTA
NM_009605	<i>Adipoq</i>	Forward	TGTTCTCTTAATCCTGCCCA
		Reverse	CCAACCTGCACAAGTTCCCTT
NM_001163689	<i>Atgl</i>	Forward	CAACGCCACTCACATCTACGG
		Reverse	GGACACCTCAATAATGTTGGCAC
NM_007393	<i>β-actin</i>	Forward	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
		Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
NM_007643	<i>Cd36</i>	Forward	ATGGGCTGTGATCGGAACTG
		Reverse	GTCTTCCCAATAAGCATGTCTCC
NM_007824	<i>Cyp7a1</i>	Forward	GGGATTGCTGTGGTAGTGAGC
		Reverse	GGTATGGAATCAACCCGTTGTC
NM_007988	<i>Fas</i>	Forward	CCTGGATAGCATTCGCAACCTG
		Reverse	TTCACAGCCTGGGGTCATCTTTGC
NM_008062	<i>G6pdx</i>	Forward	TGGGTCCACCACTGCCACTTTTG
		Reverse	ATTGGGCTGCACACGGATGACCA
NM_009204	<i>Glut4</i>	Forward	GTGACTGGAACACTGGTCTTA
		Reverse	CCAGCCACGTTGCATTGTAG
NM_008255	<i>Hmgcr</i>	Forward	AGCTTGCCCGAATTGTATGTG
		Reverse	TCTGTTGTGAACCATGTGACTTC
NM_001039507	<i>Hsl</i>	Forward	TTCTCCAAAGCACCTAGCCAA
		Reverse	TGTGGAAAACCTAAGGGCTTGTG
NM_008509	<i>Lpl</i>	Forward	GGGAGTTTGGCTCCAGAGTTT
		Reverse	TGTGTCTTCAGGGTCCCTTAG
NM_001198933	<i>Me</i>	Forward	CCTCACCACTCGTGAGGTCAT
		Reverse	CGAAACGCCTCGAATGGT
NM_011144	<i>Ppara</i>	Forward	AGAGCCCCATCTGTCTCTC
		Reverse	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA
NM_011146	<i>Pparγ</i>	Forward	TCGCTGATGCACTGCCTATG
		Reverse	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
NM_011480	<i>Srebp1c</i>	Forward	GATGTGCGAACTGGACACAG
		Reverse	CATAGGGGGCGTCAAGCCAG
NM_01167	<i>Ucp2</i>	Forward	ATGGTTGGTTTCAAGGCCACA
		Reverse	CGGTATCCAGAGGAAAGTGAT

Acc, acetyl-Coenzyme A carboxylase beta ; *Aco*, acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl ; *Adipoq*, adiponectin, C1Q and collagen domain containing ; *Atgl*, patatin-like phospholipase domain containing 2 ; *β-actin*, actin, beta ; *Cd36*, CD36 antigen ; *Cyp7a1*, cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 ; *Fas*, fatty acid synthase ; *G6pdx*, glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked ; *Glut4*, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 ; *Hmgcr*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase ; *Hsl*, lipase, hormone sensitive ; *Lpl*, lipoprotein lipase ; *Me*, malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic ; *Ppara*, peroxisome proliferator activated receptor alpha ; *Pparγ*, peroxisome proliferator activated receptor gamma ; *Srebp1c*, sterol regulatory element binding transcription factor 1 sterol regulatory element binding transcription factor 1 ; *Ucp2*, uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier).

ンスアミナーゼ (GPT) は、トランスアミナーゼ C II テストワコーを用いて測定した。血清と肝臓のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) は過去の報告と同様に測定した^{9),10)}。肝臓リン脂質は Rouser *et al.*¹¹⁾ の方法を用いて測定した。吸光測定、蛍光測定にはマイクロプレートリーダー (テカンジャパン(株), Infinite F200) を使用した。

(5) RNA 抽出と mRNA 発現量測定

qRT-PCR 法にて mRNA 発現量を測定するため、肝臓、精巣周囲脂肪組織の総 RNA をそれぞれ RNeasy Mini Kit, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (いずれも (株)キアゲン) を用いて抽出した^{7),12)}。抽出した RNA は分析に使用するまで -80°C で保存した。Primer Script™ RT Master Mix (タカラバイオ(株)) 用いて総 RNA より cDNA を合成した。cDNA は SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(タカラバイオ(株)), 遺伝子特異的なプライマー (Table 2.3) と混合され PCR 反応を行った。PCR 反応には Thermal Cycler

Dice® Real Time System Single (タカラバイオ(株)) を使用し、反応条件は 95°C で 10 秒間保持された後、 95°C で 5 秒間、 60°C で 31 秒間を 40 サイクルで行った。mRNA の発現量は SYBR green の蛍光強度によって測定された。Threshold cycle (Ct 値) を求め、 β -actin に対する相対値で mRNA 発現量を算出した。

(6) 統計処理

データは平均 \pm 標準誤差で示した。3 群間の比較には一元配置分散分析を使用し、Turkey 多重比較を行った。 $p < 0.05$ のときを有意とした。

3. 結果

(1) 成長パラメーター

終体重は、C 群に対して運動を行った C+E 群、M+E 群で有意に低い値となった (Table 2.4)。摂食量、摂取エネルギーに 3 群間で有意な差は認められなかった。体重あたりの脳重量は C 群に対して他の 2 群で有意に高い値となったが、素重量に 3 群間で有意な差は認められなかった。心臓

Table 2.4. Body weights, food intake and tissue weights

	C	C + E	M + E
Body weight (g)			
Initial	30.0 \pm 0.5	30.0 \pm 0.5	30.1 \pm 0.5
Final	42.5 \pm 1.2 ^b	38.7 \pm 1.2 ^a	39.2 \pm 1.0 ^a
Food intake (g/day)	3.62 \pm 0.06	3.49 \pm 0.09	3.35 \pm 0.06
Energy intake (kcal/day)	17.7 \pm 0.3	17.1 \pm 0.5	16.4 \pm 0.3
Tissue weight (g/100g body weight)			
Brain	1.13 \pm 0.03 ^a	1.25 \pm 0.03 ^b	1.24 \pm 0.03 ^b
Heart	0.51 \pm 0.02 ^a	0.58 \pm 0.02 ^b	0.52 \pm 0.01 ^a
Kidney	1.61 \pm 0.04	1.74 \pm 0.05	1.76 \pm 0.05
Liver	3.67 \pm 0.08	3.56 \pm 0.06	3.56 \pm 0.06
Lung	0.69 \pm 0.06	0.77 \pm 0.06	0.79 \pm 0.09
Pancreas	0.84 \pm 0.05	0.84 \pm 0.02	0.85 \pm 0.04
Spleen	0.27 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03	0.26 \pm 0.02
White adipose tissue			
Epididymal	2.59 \pm 0.39 ^b	1.88 \pm 0.23 ^{ab}	1.52 \pm 0.19 ^a
Mesenteric	0.88 \pm 0.12	0.75 \pm 0.07	0.81 \pm 0.11
Perinephric	1.29 \pm 0.16 ^b	0.92 \pm 0.15 ^{ab}	0.70 \pm 0.11 ^a
Total	4.76 \pm 0.65	3.56 \pm 0.42	3.02 \pm 0.38
Muscle			
Gastrocnemius	0.87 \pm 0.02 ^a	0.95 \pm 0.02 ^b	0.92 \pm 0.02 ^{ab}
Quadriceps	0.95 \pm 0.03 ^a	1.08 \pm 0.03 ^b	1.10 \pm 0.03 ^b
Soleus	0.11 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
Tibialis	0.33 \pm 0.01 ^a	0.35 \pm 0.01 ^{ab}	0.36 \pm 0.01 ^b

Values are mean \pm SE, $n = 9-10$. Different superscript letters indicate significantly different means at $p < 0.05$.

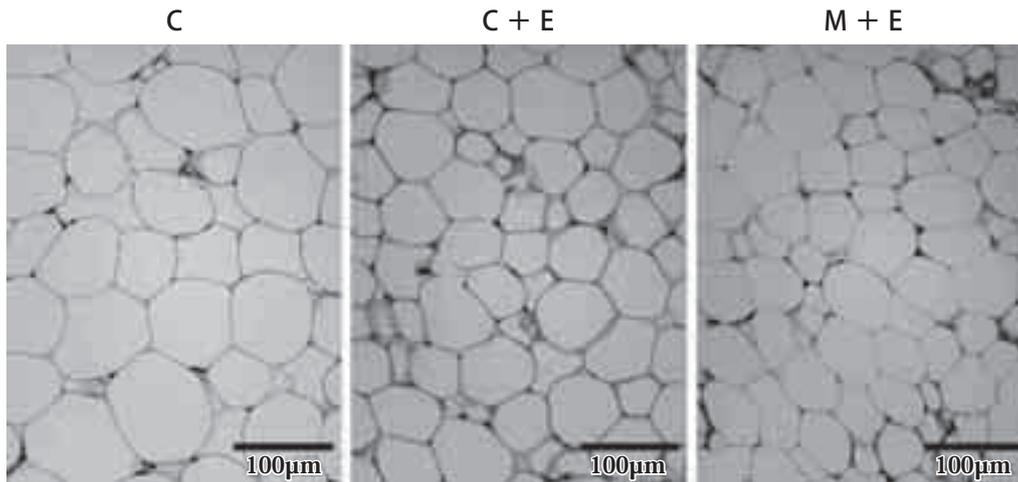


Figure 2.1.

Effect of exercise and dietary intake of miso on adipocyte hypertrophy. Hematoxylin-eosin staining of epididymal adipose tissue sections from respective mice of each group (scale bar = 100µm).

は C+E 群に対して他の 2 群で有意に低く、素重量は、C+E 群と M+E 群の間で有意な差が認められた。腎臓、肝臓、肺、膵臓、脾臓重量に 3 群間で有意な差は認められなかった。白色脂肪組織重量はいずれの部位についても C 群と C+E 群の間で有意な差は認められなかった。精巣周囲、腎周囲脂肪組織重量において、C 群に対して運動に加えて味噌を摂取した M+E 群で有意に低い値となった。さらにこれらの総重量は C 群に対して M+E 群で低い傾向を示した ($p = 0.05$)。白色脂肪組織重量に差が認められたため、組織の切片をヘマトキシリン・エオシン染色し、脂肪細胞の大きさを観察した。その結果、運動を行った群で脂肪細胞の大きさが小さかった (Figure 2.1)。脂肪細胞の面積を数値化したところ、同様の傾向が見られたが、群間での有意な差は認められなかった (C, 1.00 ± 0.08 ; C+E, 0.71 ± 0.19 ; M+E, 0.65 ± 0.05 ; C vs C+E, $p = 0.29$; C vs M+E, $p = 0.17$.)。筋肉の重量は、C 群に対して C+E 群で腓腹筋が、C 群に対して運動を行った群で大腿四頭筋が、C 群に対して M+E 群で前頸骨筋が有意に高い値となった。ヒラメ筋の重量に 3 群間で有意な差は認められなかった。

(2) 脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量

運動と味噌の摂取により脂肪組織への脂質蓄積が変化したメカニズムを検討するため、精巣周囲脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を qRT-PCR 法にて測定した。血中からの脂質の取り込みに関する *Lpl*, *Cd36* の mRNA 発現量に 3 群間で有意な差は認められなかった (Table 2.5)。脂肪細胞内トリアシルグリセロールをジアシルグリセロールに分解する *Atgl* は C 群に対し C+E 群で有意に高くなり、有意差は認められなかったが M+E 群でも高くなった。ジアシルグリセロールをグリセロールと脂肪酸に分解する *Hsl* に 3 群間で有意な差は認められなかった。血中からのグルコース取り込みに関与する *Glut4* に 3 群間で有意な差は認められなかった。細胞内に取り込んだグルコースからの脂肪酸合成に関わる遺伝子の mRNA 発現量を測定したところ、C 群に対して C+E 群で *Acc* の mRNA 発現量が有意に高値となったが、*Fas*, *Me*, *G6pdx* の mRNA 発現量に 3 群間で有意な差は認められなかった。これら脂質合成に関わる遺伝子の転写因子である *Srebp1c* は、C 群に対して C+E 群で有意に高くなった。熱産生に関わる *Ucp2* に 3 群間で有意な差は認められなかった。脂肪細胞の分化・増殖に関わる *Ppar γ* は C 群に対して M+E

Table 2.5. mRNA expression level in epididymal adipose tissue

Gene function	Gene name	C	C + E	M + E
Lipid uptake	<i>Lpl</i>	1.00 ± 0.14	1.28 ± 0.12	1.14 ± 0.10
	<i>Cd36</i>	1.00 ± 0.02	1.21 ± 0.09	1.24 ± 0.10
Lipolysis	<i>Atgl</i>	1.00 ± 0.13 ^a	1.91 ± 0.32 ^b	1.23 ± 0.24 ^{ab}
	<i>Hsl</i>	1.00 ± 0.17	1.45 ± 0.27	1.61 ± 0.22
Glucose uptake	<i>Glut4</i>	1.00 ± 0.16	1.39 ± 0.23	1.26 ± 0.11
Fatty acid synthesis	<i>Acc</i>	1.00 ± 0.15 ^a	1.94 ± 0.27 ^b	1.60 ± 0.23 ^{ab}
	<i>Fas</i>	1.00 ± 0.16	0.82 ± 0.12	0.74 ± 0.10
	<i>Me</i>	1.00 0.27	1.08 0.38	0.74 0.24
	<i>G6pdx</i>	1.00 ± 0.09	1.22 ± 0.09	1.12 ± 0.11
	<i>Srebp1c</i>	1.00 ± 0.13 ^a	1.68 ± 0.29 ^b	1.22 ± 0.08 ^{ab}
Thermogenesis	<i>Ucp2</i>	1.00 ± 0.13	1.41 ± 0.21	1.14 ± 0.09
Differentiation	<i>Pparγ</i>	1.00 ± 0.14 ^a	1.54 ± 0.25 ^{ab}	2.07 ± 0.24 ^b
Adipocytokine	<i>Adipoq</i>	1.00 ± 0.13	1.45 ± 0.25	1.37 ± 0.23

Values are mean ± SE, n = 9-10. Different superscript letters indicate significantly different means at p < 0.05.

Table 2.6. Biochemical parameter of serum and liver

		C	C + E	M + E
Serum				
TG	(mmol/L)	1.06 ± 0.07	1.10 ± 0.12	0.93 ± 0.09
TC	(mmol/L)	2.94 ± 0.09	2.77 ± 0.19	3.05 ± 0.21
PL	(mmol/L)	2.58 ± 0.05	2.41 ± 0.14	2.46 ± 0.15
NEFA	(mEq/L)	0.94 ± 0.03	0.80 ± 0.03	0.94 ± 0.05
Glucose	(mmol/L)	5.72 ± 0.63	4.53 ± 0.22	5.13 ± 0.42
Insulin	(pmol/L)	30.1 ± 5.4	25.2 ± 2.7	36.2 ± 5.4
HOMA-IR	(ratio)	1.35 ± 0.32	0.76 ± 0.11	1.09 ± 0.27
GOT	(IU/L)	70.6 ± 8.9	80.2 ± 6.3	78.1 ± 10.0
GPT	(IU/L)	6.84 ± 0.74	6.70 ± 0.43	6.35 ± 0.30
TBARS	(μmol/L)	5.06 ± 0.08	4.73 ± 0.36	4.79 ± 0.34
Liver				
TG	(μmol/g)	56.6 ± 6.7 ^b	50.6 ± 6.4 ^b	25.5 ± 2.5 ^a
TC	(μmol/g)	19.0 ± 1.6 ^{ab}	20.5 ± 2.0 ^b	14.4 ± 0.8 ^a
PL	(μmol/g)	43.9 ± 1.1	45.2 ± 0.6	44.8 ± 0.7
TBARS	(nmol/g)	46.7 ± 2.5	50.1 ± 0.9	46.6 ± 1.3

Values are mean ± SE, n = 9-10. Different superscript letters indicate significantly different means at p < 0.05. TG, Triacylglycerol; TC, Total cholesterol; PL, phospholipid; NEFA, non-esterified fatty acid; GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, Glutamate pyruvate transaminase; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances.

群で有意に高くなった。アディポカインのひとつであるアディポネクチンをコードする *Adipoq* は、有意差は認められなかったが、C群に対して運動を行った群で高値を示した。

(3) 血清パラメーター

運動と味噌の摂取が血清脂質量、糖代謝に与える影響を検討した。血清脂質パラメーターであるトリアシルグリセロール、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸濃度に3群間で有意な差は認められなかった (Table 2.6)。血清グルコース濃

度、インスリン濃度、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR に3群間で有意な差は認められなかった。肝機能マーカーの GOT, GPT, 過酸化脂質量を示す TBARS に3群間で有意な差は認められなかった。

(4) 肝臓パラメーター

運動と味噌の摂取が肝臓への脂質蓄積に与える影響を検討した。肝臓トリアシルグリセロール濃度は、C群に対してC+E群で有意な差は認められなかったが、運動に加えて味噌を摂取した M+

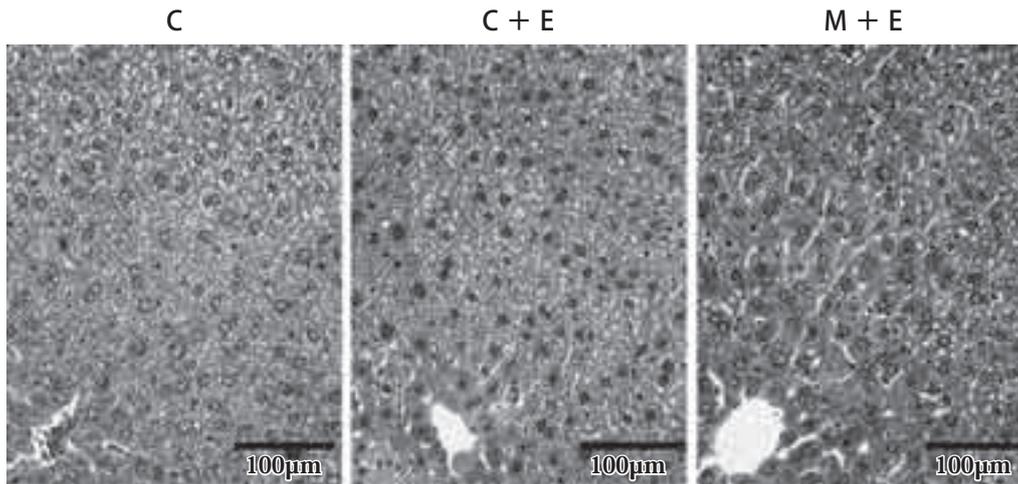


Figure 2.2.

Effect of exercise and dietary intake of miso on liver. Hematoxylin-eosin staining of liver sections from respective mice of each group (scale bar = 100µm).

Table 2.7. mRNA expression level in liver

		C	C + E	M + E
Fatty acid synthesis	<i>Acc</i>	1.00 ± 0.19 ^b	0.85 ± 0.10 ^b	0.39 ± 0.04 ^a
	<i>Fas</i>	1.00 ± 0.12	1.05 ± 0.17	0.88 ± 0.09
	<i>Srebp1c</i>	1.00 ± 0.11	0.95 ± 0.02	1.07 ± 0.12
β-oxidation	<i>Aco</i>	1.00 ± 0.09 ^b	0.81 ± 0.07 ^b	0.39 ± 0.05 ^a
	<i>Ppara</i>	1.00 ± 0.07	1.02 ± 0.08	0.96 ± 0.05
Cholesterol synthesis	<i>Hmgcr</i>	1.00 ± 0.11	1.02 ± 0.13	1.08 ± 0.12
Cholesterol catabolism	<i>Cyp7a1</i>	1.00 ± 0.19	0.92 ± 0.15	0.49 ± 0.07

Values are mean ± SE, n = 9-10. Different superscript letters indicate significantly different means at $p < 0.05$.

E群で有意に低い値となった (Table 2.6)。肝臓の総コレステロール濃度は、C+E群に対してM+E群で有意に低い値となった。リン脂質、TBARS濃度に3群間で有意な差は認められなかった。肝臓への脂質蓄積に差が認められたため、組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色し、細胞の形態観察を行った (Figure 2.2)。その結果、C群とC+E群では脂肪滴が観察されたが、M+E群では脂肪滴が減少し、肝臓への脂質蓄積が抑制されている様子が観察された。

(5) 肝臓における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量

運動に加えて味噌の摂取を行うことで、肝臓への脂質蓄積が抑制されたメカニズムを検討するため、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を qRT-PCR 法にて測定した。脂肪酸合

成に関わる *Acc* は、C群とC+E群の間で有意差は認められなかったが、C群とC+E群に対してM+E群で有意に低値となった (Table 2.7)。*Fas* と脂肪酸合成関連遺伝子の転写因子である *Srebp1c* に3群間で有意差は認められなかった。脂肪酸β酸化に関わる *Aco* は、C群とC+E群の間で有意差は認められなかったが、C群とC+E群に対してM+E群で有意に低値となった。*Aco* の転写因子である *Ppara* の発現量に3群間で有意差は認められなかった。コレステロール合成、排泄に関わる *Hmgcr*, *Cyp7a1* に3群間で有意な差は認められなかった。

4. 考察

先の試験では、高脂肪摂取マウスにおいて、高濃度の味噌の摂取による肥満抑制効果を明らかにした。本節では、肥満予防に有効である運動に味

噌の摂取を組み合わせることで、肥満抑制効果の増強が見られるか否かを検討した。その結果、運動のみを行った場合に対し、運動に加えて味噌の摂取を行うことで、白色脂肪組織および肝臓への脂質蓄積抑制効果が増強されることが明らかとなった。

終体重は、C群に対して運動を行った群で有意に低くなった。また脂肪細胞の大きさは、味噌の摂取による影響はほとんど認められなかったが、運動を行った群で小型化していた。このメカニズムを明らかにするために、脂肪組織の脂質代謝系遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、*Ppar* γ の mRNA 発現は運動により増加し、味噌の摂取が加わることでさらに増加した。*Ppar* γ は脂肪細胞に多く発現する転写制御因子であり、脂肪細胞の分化・増殖を制御する¹³⁾。高脂肪食摂取ラットに *Ppar* γ アゴニストを投与した試験では、肥大化した脂肪細胞は減少し、一方で小型のものが増加した^{14),15)}。よって、*Ppar* γ は脂肪細胞の過度な肥大化を抑制し、正常な大きさに保つために重要な役割を担うと考えられる^{16),15)}。本試験においても運動や味噌により *Ppar* γ の発現が増加したことで、脂肪細胞の肥大化が抑制されたことが考えられた。脂肪細胞は肥大化に伴い炎症性サイトカインの分泌やマクロファージの浸潤が高まることから、肥大化脂肪細胞を抑制することはインスリン抵抗性や肥満予防のために重要である^{17),18),19)}。さらに、これらは様々な臓器の脂質代謝に大きく影響するため、脂肪細胞を肥大化させないことが内臓脂肪量の低下に非常に重要である。本研究の運動と味噌の効果は、脂肪細胞の肥大化を抑制することで、全身に及んでいることが考えられた。

運動による脂肪組織での *Ppar* γ の活性化は *Atgl* を介して脂肪分解を促進する²⁰⁾。また、*Ppar* γ は *Atgl* に加えて脂肪分解を担う *Hsl* も活性化する²¹⁾。本試験では運動や味噌により *Hsl*、*Atgl* の mRNA 発現量が高い傾向を示した。運動による *Hsl*、*Atgl* を介した脂肪分解は、全身への脂肪酸供給に重要であり^{22),23)}、脂肪組織への脂質蓄積抑制につながる。これは運動時のみに見られる一時的な効果ではなく、運動を継続するこ

とで慢性的に確認される効果である。以上より、運動や味噌による *Ppar* γ の活性化により、*Hsl* および *Atgl* による脂質分解が促進され、白色脂肪組織重量が低下したことが考えられた。

運動が全身の代謝に与える効果は急性的なものと同慢性的なものに分けられる。急性効果としては、筋肉でのエネルギー需要の高まりに応じて、血中グルコース、脂肪細胞から分解された脂肪酸の取り込みが増加し、 β 酸化で燃焼される。運動時の筋肉へのグルコース取り込みはインスリンの作用に依存しないため、インスリン抵抗性患者にも運動は有効である。運動を習慣的に継続すると筋繊維の肥大化^{27),28)}、ミトコンドリア含量^{24),25)}や血流の増加が起こる。これは運動時の糖・脂質代謝能を向上し、基礎代謝の増加につながる²⁶⁾。また、慢性的な *Glut4* やインスリンシグナルタンパクの発現増加を通じて、インスリン感受性を増大させることが知られている²⁷⁾。本試験において、運動による筋肉重量は増加したが、糖代謝能の向上は認められなかった。運動14時間後にマウスを解剖しており、運動による効果は慢性的なものの影響が大きいと考えられた。また、本試験の運動条件は最大酸素消費量の50～75%に相当する中程度の運動であり^{28),29)}、ヒトでは軽いランニングに相当する。この運動強度は炭水化物と脂質の両方がエネルギー源として利用されるため³⁰⁾、内臓脂肪蓄積抑制のために有効であると考えられた。筋肉はエネルギー産生以外にも、マイオカインの分泌を通じて全身の代謝を調節する。例えば、運動後に筋繊維から分泌される IL-6 は、脂肪細胞において *Hsl* を促進する。本試験では筋肉の代謝変化やマイオカインの影響を検討していないが、これらの影響を通じて白色脂肪組織への脂質蓄積が抑制された可能性も十分に考えられた。今後、筋肉での代謝変化や、マイオカインの分泌について更なる検討が必要である。

高脂肪食摂取による肝臓への脂質蓄積は、運動のみを行った場合は有意な変化は認められなかったが、運動に加えて味噌を摂取することで有意に抑制された。これより、運動に加えて味噌を摂取することで肝臓への脂質蓄積が抑制されることが明らかとなった。肝臓における *Ace* の mRNA 発

現量は、運動のみでは変化が認められなかったが、運動に加えて味噌を摂取することで有意に低くなった。*Acc* は脂肪酸合成の律速酵素であり、高脂肪食摂取条件下で *Acc* が抑制されることで脂肪肝が抑制される³¹⁾。これより、運動と味噌を組み合わせることで肝臓における脂質合成が抑制されることが考えられた。味噌の成分である大豆タンパクは、遺伝性肥満ラットにおいて肝臓への脂質蓄積を抑制するが、この要因のひとつに肝臓での脂肪酸合成の抑制が報告されている^{32),33)}。イソフラボンも同様の報告がされている^{32),34),35)}。また、運動により肝臓における脂肪酸β酸化関連遺伝子が減少したが、これは脂質量が減ったときに起こる生理的な応答であると考えられた。肝臓への脂質蓄積抑制には、脂質の取り込み・排泄に関わる遺伝子発現の変化も関与するため^{32),34)}、今後これら遺伝子の発現への影響も検討する必要があると考えられる。以上より、運動に加えて味噌に含まれる様々な機能性成分が働くことで、相乗的に肝臓への脂質蓄積が抑制されたことが考えられた。

本研究により、継続的な運動は高脂肪食摂取による白色脂肪組織重量の増加と脂肪細胞の肥大化を抑制することが明らかとなった。この原因として、運動による脂肪組織での *Ppar* γ の発現増加が関与すると考えられた。さらに、運動に加えて味噌を摂取することで、白色脂肪組織重量がより少なくなり、肝臓への脂質蓄積が抑制された。この原因の一つとして、味噌に含まれる何らかの成分による肝臓での脂肪酸合成抑制が考えられた。よって、ヒトにおいて習慣的な運動や味噌摂取は、健康維持に大いに役立つことが考えられた。

5. 文献

- 1) Nomura S, Kawanami H, Ueda H, Kizaki T, Ohno H, Izawa T (2002) Possible mechanisms by which adipocyte lipolysis is enhanced in exercise-trained rats. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 236-242.
- 2) Nomura S, Kawanami H, Ueda H, Kizaki T, Ohno H, Izawa T (2002) Possible mechanisms by which adipocyte lipolysis is enhanced in exercise-trained rats. *Biochem*

Biophys Res Commun 295: 236-242.

- 3) Maki KC, Reeves MS, Farmer M, Yasunaga K, Matsuo N, Katsuragi Y, Komikado M, Tokimitsu I, Wilder D, Jones F, Blumberg JB, Cartwright Y (2009) Green Tea Catechin Consumption Enhances Exercise-Induced Abdominal Fat Loss in Overweight and Obese Adults. *J Nutr* 139: 264-270.
- 4) Ota N, Soga S, Shimotoyodome A, Haramizu S, Inaba M, Murase T, Tokimitsu I (2005) Effects of Combination of Regular Exercise and Tea Catechins Intake on Energy Expenditure in Humans. *J Health Sci* 51: 233-236.
- 5) Ota N, Soga S, Murase T, Shimotoyodome A, Hase T (2010) Consumption of Coffee Polyphenols Increases Fat Utilization in Humans. *J Health Sci* 56: 745-751.
- 6) Takasaki M, Honma T, Yanaka M, Sato K, Shinohara N, Ito J, Tanaka Y, Tsuduki T, Ikeda I (2012) Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice. *J Nutr Biochem* 23: 640-645.
- 7) Tsuduki T, Kitano Y, Honma T, Kijima R, Ikeda I (2013) High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 59: 384-92.
- 8) 畠山雄有, 北野泰奈, 本間太郎, 鄂爽, 山本和史, 治部祐里, 川上祐生, 都築毅 (2014) 時代と共に変化した日本食が母乳を介して仔マウスの脂質代謝系に与える影響. *日本栄養・食糧学会誌* 67: 255-270.
- 9) Shinohara N, Tsuduki T, Ito J, Honma T, Kijima R, Sugawara S, Arai T, Yamasaki M, Ikezaki A, Yokoyama M, Nishiyama K, Nakagawa K, Miyazawa T, Ikeda I (2012) Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong

- antitumor effect in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1821: 980-988.
- 10) Yagi K (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15: 212-216.
 - 11) Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 494-96.
 - 12) Homma T, Shinohara N, Ito J, Kijima R, Sugawara S, Arai T, Tsuduki T, Ikeda I (2012) High-fat diet intake accelerates aging, increases expression of Hsd11b1, and promotes lipid accumulation in liver of SAMP10 mouse. *Biogerontology* 13: 93-103.
 - 13) Janani C, Ranjitha Kumari BD (2015) PPAR gamma gene - A review. *Diabetes Metab Syndr* 9: 46-50.
 - 14) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-61.
 - 15) Takazawa T, Yamauchi T, Tsuchida A, Takata M, Hada Y, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Ueki K, Kadowaki T (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone increases expression of very low density lipoprotein receptor gene in adipocytes. *J Biol Chem* 284: 30049-57.
 - 16) Sugihara H, Yonemitsu H, Toda S, Funatsumaru S, Watanabe K (1997) Proliferation of small fat cells derived from unilocular fat cells of rats in collagen gel matrix culture. *Acta Histochem Cytochem* 30: 63-76.
 - 17) Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U (2009) Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: 999-1003.
 - 18) McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM (2013) Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol* 4: 52
 - 19) Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11: 85-97.
 - 20) Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T, Ishibashi Y, Izawa T, Sumitani Y, Ishida H, Radak Z, Haga S, Ohno H (2012) Higher levels of ATGL are associated with exercise-induced enhancement of lipolysis in rat epididymal adipocytes. *PLoS One* 7: e40876.
 - 21) Deng T, Shan S, Li PP, Shen ZF, Lu XP, Cheng J, Ning ZQ (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. *Endocrinology* 147: 875-84.
 - 22) Hashimoto T, Sato K, Iemitsu M (2013) Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes. *J Appl Physiol* 115: 260-267.
 - 23) Marcelin G, Chua S Jr (2010) Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Curr Opin Pharmacol* 10: 588-593.
 - 24) Pattengale PK, Holloszy JO (1967) Augmentation of skeletal muscle myoglobin by a program of treadmill running. *Am J Physiol* 213: 783-785.
 - 25) Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, Granzotto M, Valerio A, Tedesco L, Fabris R, Serra R, Quarta M, Reggiani C, Nisoli E, Vettor R (2014) Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake

- in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes* 63: 2800-2811.
- 26) Jamurtas AZ, Koutedakis Y, Paschalis V, Tofas T, Yfanti C, Tsiokanos A, Koukoulis G, Kouretas D, Loupos D (2004). The effects of a single bout of exercise on resting energy expenditure and respiratory exchange ratio. *Eur J Appl Physiol* 92: 393-398.
- 27) Chibalin AV, Yu M, Ryder JW, Song XM, Galuska D, Krook A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR (2000) Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: Differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 38-43.
- 28) Hewitt M, Estell K, Davis IC, Schwiebert LM (2010) Repeated bouts of moderate-intensity aerobic exercise reduce airway reactivity in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 243- 249.
- 29) Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM (2004) Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol* 172: 4520-4526.
- 30) Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR (1993) Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 265: 380-391.
- 31) Andrade JM, Paraíso AF, de Oliveira MV, Martins AM, Neto JF, Guimarães AL, de Paula AM, Qureshi M, Santos SH (2014) Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition* 30: 915-919.
- 32) Banz WJ, Davis J, Peterson R, Iqbal MJ (2004) Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rats. *Obes Res* 12: 1907-1913.
- 33) Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K, Ikeda H (1996) Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr* 126: 380-388.
- 34) Gudbrandsen OA, Wergedahl H, Mørk S, Liaset B, Espe M, Berge RK (2006) Dietary soya protein concentrate enriched with isoflavones reduced fatty liver, increased hepatic fatty acid oxidation and decreased the hepatic mRNA level of VLDL receptor in obese Zucker rats. *Br J Nutr* 96: 249-257.
- 35) Peluso MR, Winters TA, Shanahan MF, Banz WJ (2000) A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 130: 2333-2342.

謝 辞

本研究は、一般社団法人中央味噌研究所平成26年度研究助成によって行われました。ご支援いただきました関係者の皆様に、深く御礼申し上げます。

委 託 研 究 報 告

平成26年度一般社団法人中央味噌研究所委託研究による研究報告

味噌成分のクロマチン修飾におよぼす 生理活性プロファイルの解析

新井大祐¹, 杉江啓太², 町田光史², 大塚悟史², 林 陽子³,
木村 宏³, 中尾洋一^{1,2}

Analysis of chromatin modification profiles caused
by constituents of “miso”

Daisuke ARAI¹, Keita SUGIE², Koshi MACHIDA², Satoshi OTSUKA²,
Yoko HAYASHI³, Hiroshi KIMURA³, Yoichi NAKAO^{1,2}

¹Research Institute for Science and Engineering, Waseda University
3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

²Department of Chemistry and Biochemistry, School of Advanced Science and Engineering,
Waseda University

3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

³Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology
4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

1. 研究目的

ヒトの遺伝情報の本体である DNA は、ヒストン 8 量体に巻き付いたヌクレオソームを単位とするクロマチンとして存在する¹⁾。DNA 配列は基本的に不変だが、細胞は環境に応じて遺伝子を様々に使い分ける必要がある。その基盤となっているのが DNA やヒストン分子の化学修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現の制御機構である^{2),3)}。DNA やヒストンの化学修飾は状況によって変化する可塑性と、長期にわたり維持されうる安定性を併せ持ち、細胞の機能や恒常性を保証している。それゆえ、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構の破綻はがんに代表される種々の慢性疾患の原因となることが知られており⁴⁾、新

たな医薬品開発の標的として世界的に注目されている。

これまでに、土壌細菌や海洋生物の共生微生物が産生している天然化合物から DNA やヒストン修飾の酵素阻害剤が見つかっており、医薬品として認可されたものもある⁵⁾。一方、味噌は *Aspergillus oryzae* などの麹菌による発酵食品であり、微生物が作り出すビタミン類やその他の生理活性物質を豊富に含むことが知られている。そこで、ヒストン修飾をコントロールできる成分を味噌中に見出すことができれば、味噌の効用について新たな具体的証拠を示せるのではと考えた。

これまでの研究で、15種類の味噌抽出サンプルをそれぞれ 12画分、計 180画分に分画し、3種類のヒストン化学修飾パターンについてスクリー

ニングを実施し、多数の活性画分を見出した。興味深いことに、活性を有する画分は味噌の種類によって異なった。これは、原料・製法の違いにより変化する様々な微量成分がヒストン修飾に影響をおよぼしていることを意味する。味噌の健康増進作用を具体化する化学的指標の発見や、高い付加価値を有する製品開発へと展開するためには、より広範なスクリーニングが必要であろうと考えた。そこで平成26年度は研究対象とする味噌の種類を大幅に拡大し、観察するヒストン修飾パターンも6種類に増やすことで、さらなる味噌の有効成分を浮かび上がらせるとともに、各有効成分の健康増進作用をより詳細に解析することを目的とした。

2. 実験手法

【スクリーニングサンプル】

中央味噌研究所より供与いただいた117種類の味噌サンプル（米86, 麦10, 豆4, 調合11, その他6種類）各5gを抽出・分画し、合計702（117種類×6画分）のスクリーニング用画分を調製した。

【ヒストン修飾免疫染色】

サンプル溶液を96 well plateの各ウェルに播いたヒト子宮頸がん細胞HeLaの培養液中に添加して20時間培養した。培地除去後、固定液を添加して10分間静置した。PBSで2回洗浄後、1% Triton X in PBSを添加し、20分間攪拌した。PBSで2回洗浄後、Blocking One-Pを添加して20分間ブロッキングを行った。PBSで2回洗浄後、

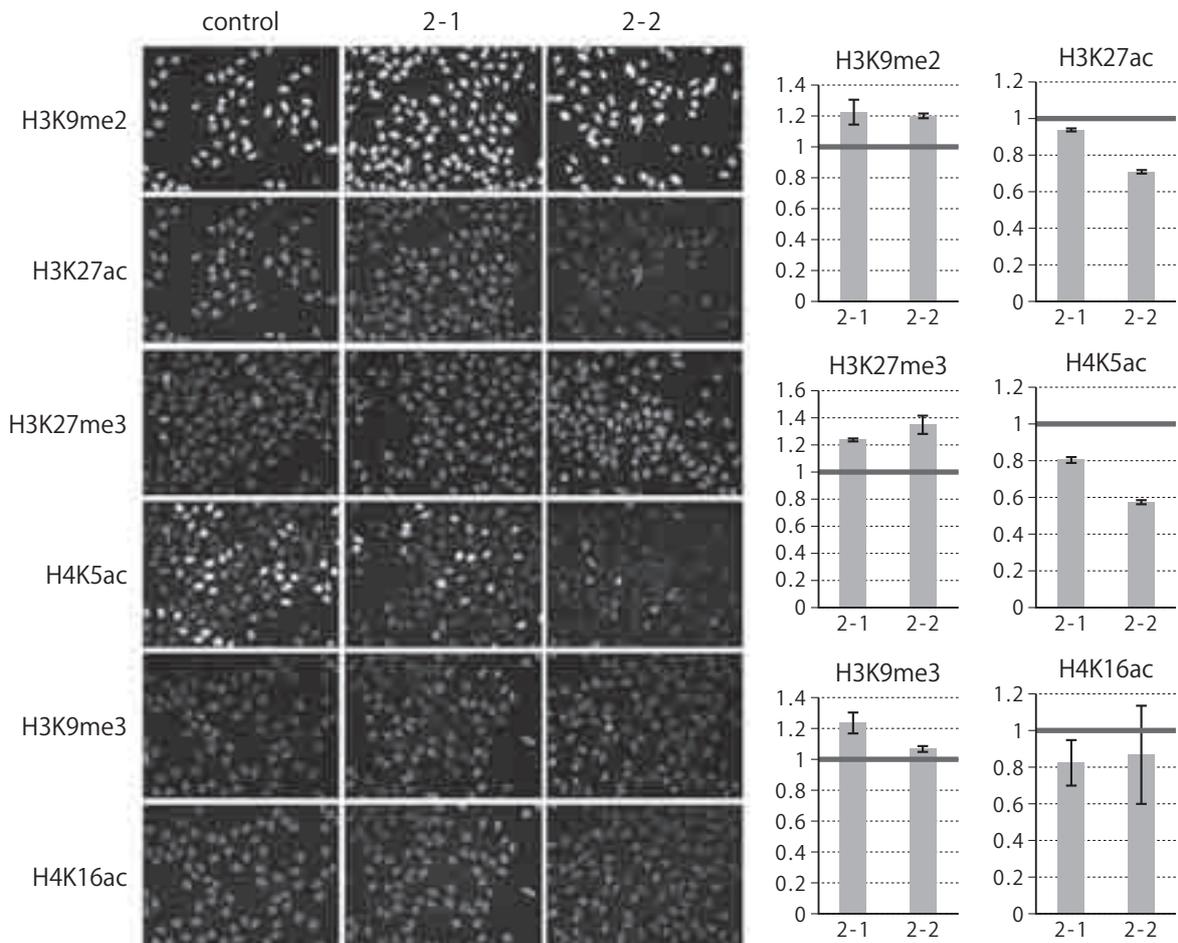


図1. In vivo 抗ストレス活性を示す味噌抽出画分がヒストン修飾におよぼす影響

蛍光標識したヒストン修飾特異的モノクローナル抗体⁶⁾を添加した。抗体反応(2時間)後、PBSで3回洗浄して顕微鏡で観察した。

【活性物質の単離・同定】

瀬尾らによって抗ストレス活性が見出された味噌画分について、逆相 HPLC により精製を進めてふたつの主要成分を単品として得た。MS, NMR などのスペクトル解析によって化合物の同定を行った。

【In vitro 神経分化への作用解析】

Neural Stem Sphere 法によりマウス ES 細胞を in vitro で神経細胞まで分化させた。神経幹細胞からニューロンもしくはアストロサイトへ分化させる過程で味噌成分由来の化合物を添加し、3日後に免疫染色を行って各細胞種への分化効率を決定した。

3. 結果

味噌 117種類より得た702画分を、最終濃度 30 μg/mL となるようにヒト子宮がん細胞 HeLa に添加し、ヒストン H3 の9番目のリジン (H3K9) のジメチル化 (H3K9me2), トリメチル化 (H3K9me3), H3K27 のトリメチル化 (H3K27me3), H3K27 のアセチル化 (H3K27ac), H4K16 のアセチル化 (H4K16ac), および H4K5 のアセチル化 (H4K5ac) の状態を調べた。スクリーニングの結果、702画分中29画分(味噌117種類中25種類)に、ヒストン修飾を特異的に変化させる活性が認められた。また、試験する修飾の種類を増やしたことにより、変化する修飾の組み合わせにも多様性が存在することが明らかになった。

瀬尾らによって抗ストレス活性が見出された味噌⁷⁾の抽出画分について、ヒストン修飾制御活性を調べたところ、H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 レベルを上昇させ、H3K27ac, H4K5ac, H4K16ac レベルを引き下げる活性が認められた(図1)。

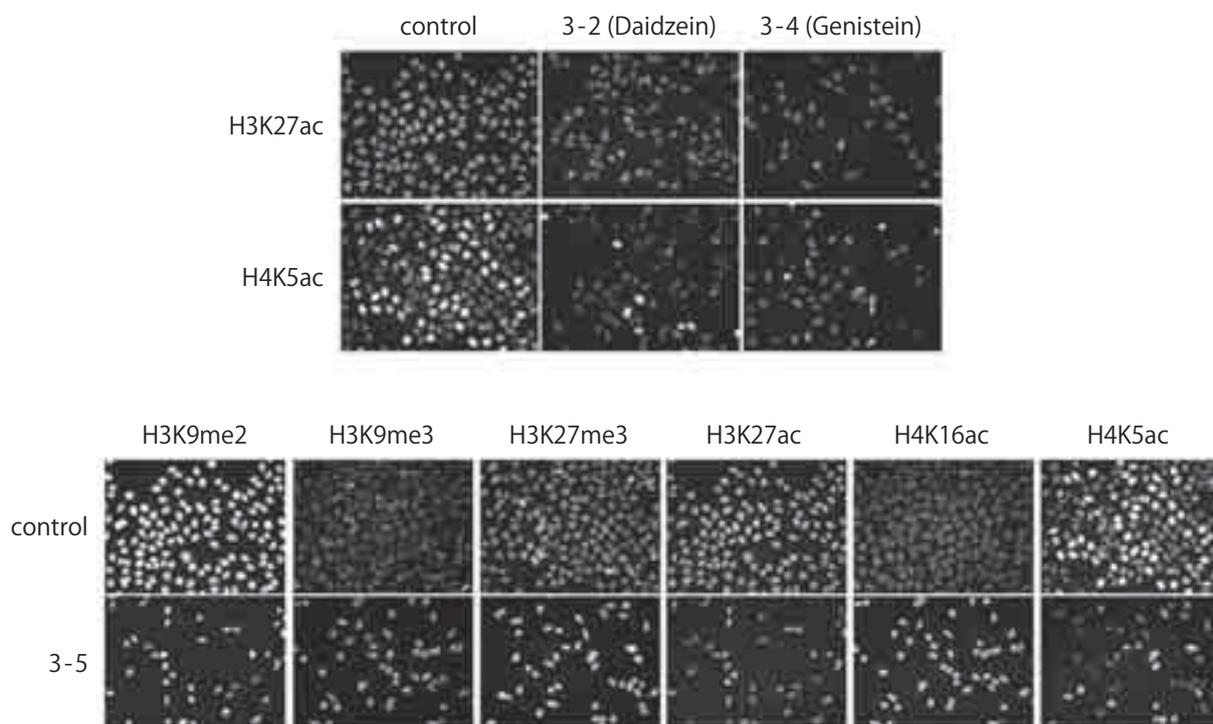


図2. (a) ダイゼインおよびゲニステインのヒストン修飾抑制作用および (b) 活性画分3-5の活性プロファイル



図3. ダイゼインおよびゲニステインの神経分化に対する作用

活性画分をさらに精製したところ、H3K27ac および H4K5ac レベルを抑制する活性成分としてフラボノイド系化合物（ダイゼイン（3-2）およびゲニステイン（3-4））が単離された。市販の標品を用いた実験でも同様の活性が確認された。一方、ダイゼイン・ゲニステインのどちらも含まないと考えられる画分（3-5）に H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3, H4K16ac を亢進させ、H3K27ac, H4K5ac を減少させる成分（3-5）も含まれることが明らかになった（図2）。

フラボノイド類化合物および類縁体について抗ストレス活性との関連を示すため、細胞分化活性を調べた結果、神経幹細胞からニューロンへの分化を促進することがわかった。遺伝子発現解析の結果、フラボノイド類化合物がニューロン分化に関わる特定の遺伝子の発現を変化させることが判明した。

4. 考察

研究で実施したヒストン修飾パターンの大規模なスクリーニングの結果より、味噌にはエピジェネティクスに対して異なる作用を有する様々な成分が含まれ、これらが複合的に働いていると考えられる。また、そのような活性成分の一つと、既に見出されていた抗ストレス作用をリンクさせるデータを提示することができた。すなわち、細胞機能の基盤であるエピジェネティクスを仲立ち

として、味噌に含まれる有効成分と健康増進作用とを紐づけることに成功したといえる。本スクリーニングでは多くの活性画分が確認されていることから、さらに多くの画分から活性本体の単離を進め、それぞれの生理作用を解明していくことで、味噌の効能のさらなる理解へと繋げていきたい。

5. 謝辞

本研究は平成26年度一般社団法人中央味噌研究所委託研究として実施されました。

参考文献

- 1) Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 436-47. (2012)
- 2) Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *J. Hum. Genet.* 58, 439-45. (2013)
- 3) Yagi S, Hirose M, Shiota K. DNA Methylation Profile: A Composer-, Conductor-, and Player- Orchestrated Mammalian Genome Consisting of Genes and Transposable Genetic Elements. *J.*

- Reprod. Dev.* 58, 265–273. (2012)
- 4) Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28, 1057–68. (2010)
- 5) Cherblanc FL, Davidson RW, Di Fruscia P, Srimongkolpithak N, Fuchter MJ. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. *Nat. Prod. Rep.* 5, 605–24. (2013)
- 6) Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N, Nozaki N. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct. Funct.* 33, 61–73. (2008)
- 7) 瀬尾, 村越. 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. 中央味噌研究所研究報告第35号. (2014)