

# みそサイエンス研究会 研究プロジェクト報告

平成26・27年度研究助成（共同研究）

## 味噌の生体防御能の賦活機能に関する 基盤研究

河村 幸雄

Studies on elevation of self-defense ability with orally administrated Miso

Yukio KAWAMURA

*Department of Food Biochemistry, Kyoto women's University  
35 kitahiyoshi-cho Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto, 605-8501, Kyoto, Japan.*

味噌が生活習慣病予防機能にとどまらず、ガン、感染症、脳神経機能変調などの負の健康寿命規程因子に対して多機能な防御／予防的な機能を有しているのではないかと考え、本研究プロジェクトを遂行した。

日本を含めて多くの先進国ではガン、感染症、脳神経機能異常による健康からの逸脱が増加している。これらはいずれも、広い意味で生体防御系の破綻に起因する。生体防御能の低下防止及び賦活化が上記の疾病予防に重要であることから、味噌摂取が単に栄養改善の面からでなく、疾病予防にどのように機能しているのかは興味のある所である。本研究プロジェクトでは、味噌とガン予防、味噌と感染症予防、学習とストレス誘導性記憶と鬱や認知症との関係について検討した。

### I. 味噌の新規ガン予防作用（mRNA 成熟阻害を指標とした抗ガン作用）

最近、細胞増殖を阻害する因子スプライソスタチンやプラジェノライドなどが、抗ガン剤の可能性を持つ化合物として、大きく注目されている。

これらは、いずれも mRNA スプライシング過程の阻害因子であることが判明している。したがって mRNA スプライシングを含む成熟過程の阻害因子には、ガン予防機能が期待される。そこで mRNA 成熟過程の阻害という新しい指向性を持つ抗ガン機能性化合物を効率的に検出する探索系を開発し、この系を用いて様々な化合物の宝庫（生理機能性物質ライブラリー）と見なせる味噌の活性画分を探索し、活性成分の単離道程、活性発現に必要な構造、機能、標的タンパク質の同定、標的遺伝子の道程などの解析を遂行した。

### 味噌中の mRNA 成熟阻害活性の評価と活性体の同定

中央味噌研究所より提供頂いた味噌試料につき、mRNA 成熟阻害活性を測定したところ、いくつかに mRNA 成熟阻害活性があることを見いだした。活性成分の単離を試みたところ、特定の構造を持つ複数のフラボノイドに活性を確認した。それらの中で、アピゲニン、ルテオリン、クリシンは特に強い活性を持っていた。他のフラボノイド類については、弱い活性を持つもの、活性

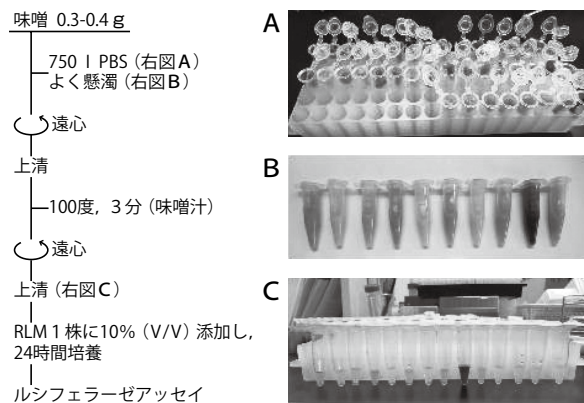
を全く持たないものが見られた。このことから、mRNA 成熟阻害活性は、フラボノイド類一般に観察される抗酸化活性などを通して間接的に効果を示しているわけではなく、特異的な効果であると考えられる。そこで構造—活性相関について検討した。その結果、mRN 成熟阻害活性を示すフラボノイド類に見られ、フラボノール、イソフラボン等といった類似の異なる構造を持つ化合物に活性は観察されなかった。このことから、アピゲニン、ルテオリン、クリシンは、特異的に mRNA 成熟を阻害していることと示唆された。

### 味噌中の mRNA 成熟阻害活性の評価

次いで、これらフラボノイドによる mRNA 成熟過程の阻害の作用機構を解析した。活性の観察されたフラボノイドの中で特に強い活性の見られ

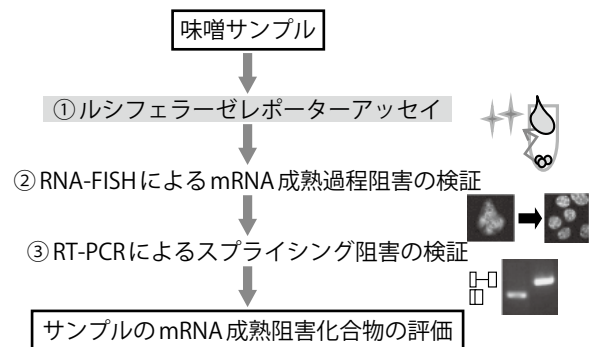
たアピゲニン、ルテオリン、クリシンについて、核内における mRNA の蓄積部位を観察した。これら 3 種のフラボノイド添加を行うと mRNA はスペckルに蓄積した。スペckルは mRNA スプライシング因子が集結する核内構造体である。従って、mRNA 成熟過程の阻害は mRNA スプライシングに問題が生じたと考えられた。

次に、細胞内の標的タンパク質の同定を行うために、フラボノイドをビーズに固定化し、核抽出液と混合して標的タンパク質を取得した。得られたサンプルを質量分析器にて解析した。その結果、まず U2 snRNP の構成因子、U2AF と呼ばれる U2 snRNP 関連因子を見出した。これらの因子は mRNA スプライシングにおいて除去するイントロンの 3' 末端側の境界を決定する因子である。加えて hnRNP と呼ばれる一群の RNA 結



#### 1 次スクリーニングの結果

低下		上昇	
1 回目	再現性	1 回目	再現性
45/100	8/45	8/100	4/8



#### 活性上昇の再現性

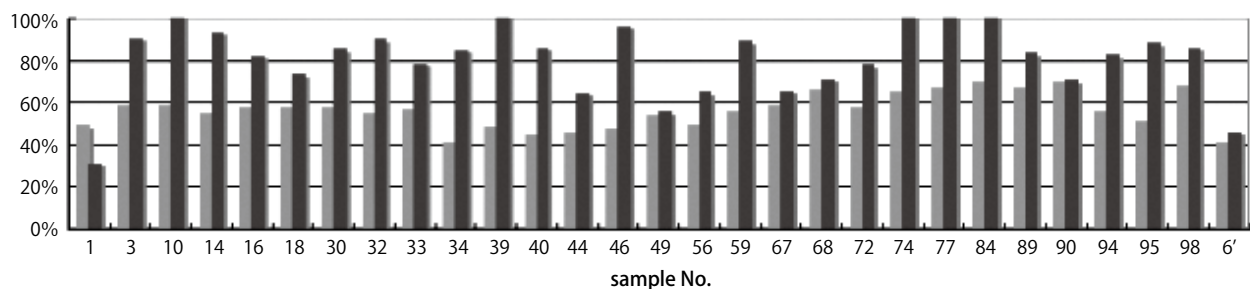
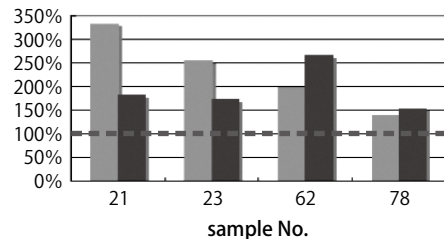


図 1. mRNA の成熟阻害評価法と味噌の mRNA 成熟阻害活性

合タンパク質も見出した。hnRNP は mRNA に結合して選択的 mRNA スプライシングを制御する因子群である。これらの解析から、フラボノイドの作用機構は、mRNA スプライシングの阻害にある事が強く示唆された。

### フラボノイドが制御する遺伝子（群）の解析

フラボノイド添加によって mRNA 成熟過程が阻害されると遺伝子発現の変化が生じる。この遺伝子発現の変化を観察するために、次世代シーケンサーによる網羅的な解析を計画した。解析対象となる RNA サンプルの評価を行うために、フラボノイド処理により変化する個別の遺伝子情報を得ることとした。そのために様々な遺伝子のイントロンを挟む形でエキソンを増幅させた。その結果、PIM1 や Caspase-9 においてフラボノイド添加の効果が観察された。ただしその変化量は少なく、次世代シーケンサーによる大規模解析に十分耐えるかどうか評価できなかったため、引き続き個別の遺伝子発現について観察することとした。選択的スプライシングで生じる Caspase-9a と Caspase-9b という2つのアイソフォームを比較したところ、フラボノイド添加により Caspase-9b が顕著に減少していた。このことからフラボノイドが作用していることを如実に観察できる標的が見いだされたと判断できた。

これまでの観察から、フラボノイド3種は mRNA スプライシングの阻害だけでなく、選択的スプライシングの制御にも関わっていることが示唆された。この観察を正確に評価するために、次世代シーケンサーによる大規模解析が必須であると考えられた。現在、実施のためのサンプルを調製している。

味噌より、3種類のフラボノイドに mRNA 成熟阻害活性を見出し、その機能と作用機構についての解析を進めてきた。3種類のフラボノイドには mRNA 成熟阻害活性に加えて選択的 mRNA スプライシングを制御している結果を得た。特に今回観察した Caspase-9b は、Adaf-1 と相互作用する領域を欠くために抗アポトーシス活性を持つ<sup>1)</sup>。フラボノイド添加により Caspase-9b の発現が減少すると細胞はアポトーシスを起こし

やすくなる。よって、3種類のフラボノイドは mRNA 成熟阻害以外にも特定の遺伝子の選択的スプライシングを制御することでガン細胞を死滅させる可能性が見出された。

## II. 味噌摂取による敗血症の改善／予防

敗血症は、微生物の生体内感染に伴い例えば細菌由来のエンドトキシンが血液中へ侵入（菌血症）し、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等の各種炎症性サイトカインが産生されることにより全身症状（敗血症、多臓器不全）に至ると考えられている。TNF- $\alpha$  は、様々な免疫・炎症反応に関与し、種々の炎症性疾患の病態にも深く関わる。従って、感染菌の増殖抑制あるいは TNF- $\alpha$  の異常産生を抑制あるいは阻害する物質は、敗血症を始めとする種々の炎症性疾患の予防、改善に有用である。

味噌は、素材の大豆、米、麦由来物質に加えて、発酵微生物（菌体）とそれらによる無数の代謝産物を多く含む多成分系の発酵食品である。そのため、生理機能の未解明な物質が生成している可能性が高い。特に、麹菌だけでなく酵母などの多種類の微生物の細胞壁由来物質が存在していることはこの可能性を強く示唆する。そこで本研究では、大腸菌やサルモネラ菌などによって引き起こされる菌血症／敗血症が、味噌（成分）を摂取することで、初期生体防御系の賦活化による敗血症の予防やそれからの回復が可能かどうかを検討した。

すなわち、大腸菌をマウスの腹腔内に投与するモデル敗血症マウスを用いて、大腸菌感染による敗血症死が、味噌成分の経口摂取により防御されるか、症状から回復するかどうかあるいは遅延するかどうかを検討した。

その結果、味噌（抽出物）には、大腸菌感染に続く敗血症死を改善する作用のあることが示された。このことは日常的に味噌を消費することにより、細菌感染による全身性炎症症状を軽減化することや軽度の細菌の初期感染そのものを抑制できる可能性を示している。しかし、サルモネラ菌感



### Dose Dependent Survival of *E. coli*-infected Mouse by Orally Administrated Miso Ext.

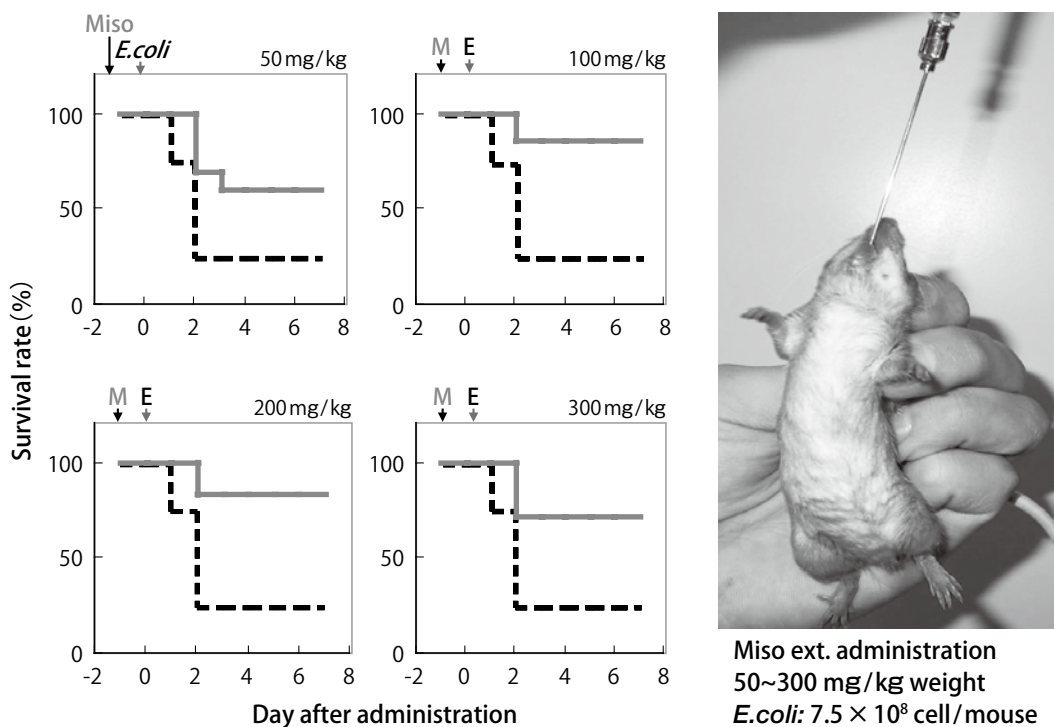


図2. 経口摂取味噌抽出物による大腸菌感染マウスの生存率の向上

染に対しては大腸菌に対してより効果が小さいため、感染微生物によりその効果は異なることも示された。従って、このことが菌により生体内で作動する感染防御系が異なることを意味するのか、産生毒素の違いによるのかなど、今後その防御機構や毒素生産性などの更なる検討が必要である。

現在、感染防御系賦活化物質の探索/同定とともに、その賦活化メカニズムを検討している。

### Ⅲ. 味噌摂取はストレス誘導性認知/学習/記憶能の喪失を防止するか？

近年、平均寿命の伸びに伴うアルツハイマー型およびレビー小体型認知症やパーキンソン病など脳神経系異常に起因する認知症症状に大きな社会的関心が集まっている。その理由は、これらの疾患が老化に伴い誰にでも起こりうる状態であり、不可逆性が大きく予防が必須の疾病あるいは生理的状況であるためである。現在、これらの疾病と

亜鉛ホメオスタシスとの関係に注目が集まっている。亜鉛欠乏が神経機能を低下させ、鬱や神経機能低下、自閉症の発症と関連することが強く示唆されている。最近、我々は、亜鉛に富む食品の摂取が、記憶の衰弱抑制に効果のあることを示した。

マウスは、繰り返し拘束ストレス負荷により容易に鬱状態に陥り、そのような状況の継続は、周囲に対する無関心から短期記憶の喪失（一種の認知症状）につながる事が知られている。味噌摂取がこのような記憶喪失に対してどのような効果をもたらすのかを、強度水中拘束ストレスマウスを使って検討した。

マウスに7日間、1日1時間水中拘束ストレスを負荷すると、ストレスから解放されると外見上の行動はそれほど大きな変化は示さないが、学習させた位置記憶を水迷路試験で検証すると、日ごとの経過（ストレスの蓄積）と共に徐々に位置記憶が不確実となり、5日目で記憶水準が強度に低下、以後6、7日目で最低レベルとなった。この位置記憶喪失状態は、ストレス解放後も少なくとも

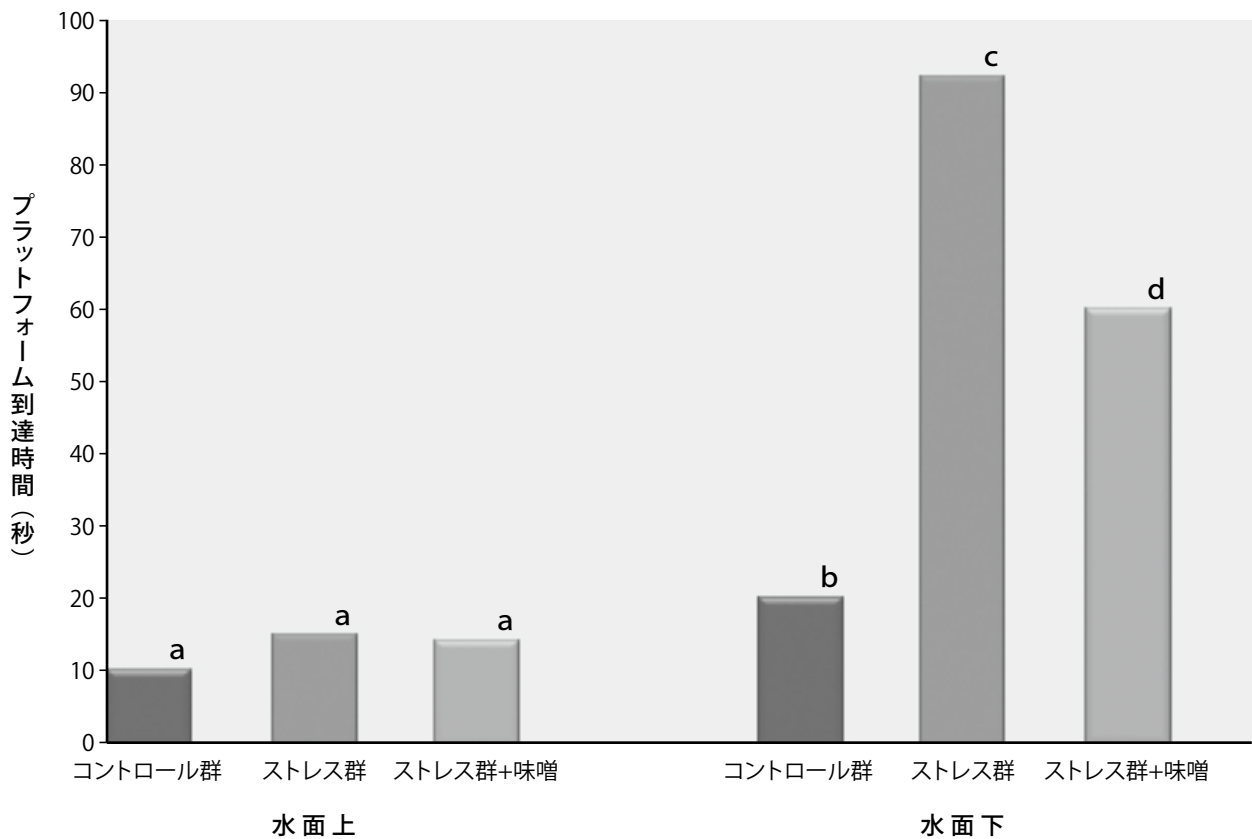


図3. ストレス誘導性記憶減衰に対する味噌食の改善効果

も2週間までは継続していた。この拘束ストレスによるマウスの位置記憶喪失は、味噌アルコール抽出物を1%添加した給餌群では、添加しないコントロール群と比べて有意 ( $n=5, p<0.05$ ) に軽度であった。この位置記憶喪失が、ストレス誘導性であるため単なる味噌(成分)の抗ストレス作用を測定したものであるのか、あるいは記憶喪失そのものを抑制したのかの明確な判断は現時点では下せないが、どちらであるかに興味を持たれる。今後、本現象の確認( $n$ 数を増やす、濃度依存性、ポジ群の設定など)と有効成分(単独効果/相加・相乗効果?)の単離同定を進める必要がある。さらに、現在、老化促進マウス(SAMマウス)を用いた老化に伴う記憶能の衰弱(認知症)に対する効果について検討中である。

#### IV. 脳内亜鉛代謝に関わる亜鉛トランスポーター ZnT3 の発現・活性増強に効果を有する味噌含有成分の探索

海馬神経細胞のシナプス小胞には亜鉛が多量に蓄積されており、この小胞内亜鉛は、記憶、学習行動やうつなどと密接に関係することが知られる。したがって、消化管から ZIP4 により吸収された亜鉛を、ZnT3 を介して神経細胞シナプス小胞に効率よく輸送することができれば、人々の健康に大きく貢献することが可能となる。ZnT3 の発現・活性を増加させる味噌由来成分を探索するために、遺伝子操作が容易な DT40 細胞を用いて ZnT3 の発現と亜鉛輸送活性を評価できる細胞を樹立した(Kambe, 2014)。本系を用いて、味噌抽出物のスクリーニングを進めているが、現在までのところ有用な因子の同定には至っていない。また、神経細胞内に亜鉛を取り込む亜鉛トランスポーター ZIP12 に対する味噌の効果を検証する

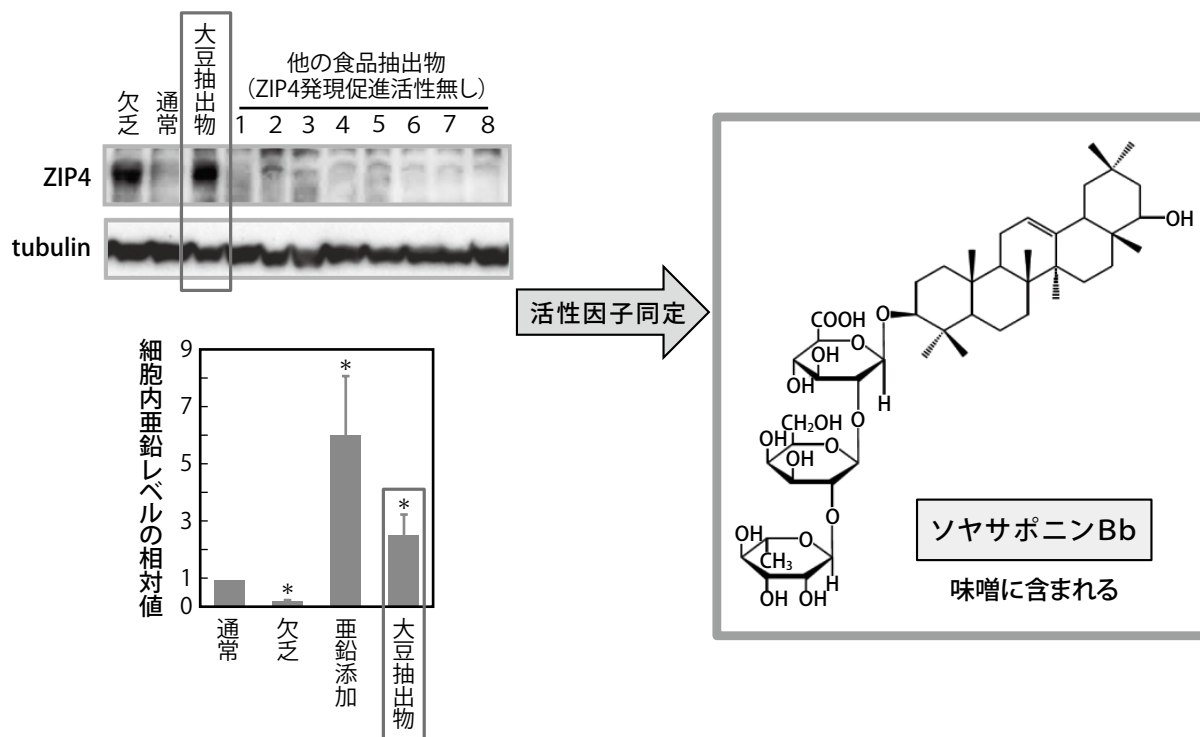


図4. 亜鉛欠乏を予防する効果が期待される ZIP4 発現促進因子の同定

ために、ZIP12 の発現・活性評価系の構築を進めている。

#### 消化管における ZIP4 発現の亜鉛応答性に関する解析

消化管からの亜鉛吸収効果が期待されるソヤサポニンの ZIP4 発現増強効果と、神経細胞シナプス小胞内への亜鉛輸送活性増強させる味噌成分の評価を、ラットを使用して実施している。しかしながら、ラット消化管における ZIP4 の発現様式についてはこれまで全く報告がなく、ZIP4 の発現様式に関して予備的知見を蓄積する必要があった。そこでまず、ラットを亜鉛十分・亜鉛欠乏食群に分けて飼育し、ZIP4 の発現パターンについて解析した。その結果は、ラット ZIP4 は、亜鉛欠乏食 2 日目で劇的に発現が増加することがみとめられ (Hashimoto et al., 2016), このことは、ラットが速やかに食事性の亜鉛欠乏症に陥ることを示している。したがって、ZIP4 に直接働きかける (直接作用する) ソヤサポニン Bb のような味噌成分は、*in vivo* での ZIP4 の発現を増加させ

ることが大いに期待できると考えられ、現在、その確認を進めている。

#### 文献

- 1) Maushagen R, Reers S, Pfannerstill AC, Hahlbrock A, Stauber R, Rahmzadeh R, Rades D, Pries R, Wollenberg B. J Cancer Res Clin Oncol. (2016) 142:1261-71. doi: 10.1007/s00432-016-2150-3.
- 2) 松田 桂, 佐賀菜月, 中西夏美, 木屋佳奈恵, 河村幸雄 マウスの空間的位置認識の定量的解析の検討 ―記憶と食品の研究Ⅲ―, 第33回日本微量栄養素学会 講演要旨集 p8, (2016)
- 3) Hashimoto, A., Ohkura, K., Takahashi, M., Kizu, K., Narita, H., Enomoto, S., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., Irie, K., et al. (2015). Soybean extracts increase cell surface ZIP4 abundance and cellular zinc levels: a potential novel strategy to enhance

zinc absorption by ZIP4 targeting. *Biochem J* 472, 183-193.

## 謝 辞

この研究は、河村幸雄（京都女子大学大学院家政学研究科）をプロジェクトリーダーに、増田誠司（京都大学大学院生命科学研究科）、神戸大朋（京都大学大学院生命科学研究科）からなる研究班により実施された。

本プロジェクト研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました一般社団法人中央味噌研究所に厚く御礼申し上げます。

# 研究助成報告

平成25年度研究助成による研究報告

# 女性の生殖環境における糖化最終産物と味噌食品の抗老化作用に関して

藤井 絵里子

The anti-aging effects of miso food on Toxic AGEs in the samples from the women undergoing assisted reproductive technology (ART)

Eriko FUJII

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University,  
840 Shijo-cho, Kashihara City, Nara 634-8522, Japan.

## 1. 研究背景

晩婚化・少子高齢化社会において、加齢による女性の生殖機能の老化は重大な社会問題でもある。時間的老化に対する卵子の染色体や細胞質に関わる研究成果が、一般的な生殖女性に対して治療応用されるのは現時点では困難であろう。一方、卵子の成育環境を向上させるために、安全かつ日常的に実行可能な抗老化法は、今後のエビデンスの集積などにより発展が期待される分野でもある。

近年、酸化ストレスなどの老化因子の1つとして糖化ストレス：最終糖化産物 (Advanced Glycation End Products: AGEs) の体内蓄積とそのレセプター RAGE 系制御による生体内反応の影響が報告されている (図1)。多様に存在する AGEs の中でも、Glyceraldehyde 由来のものは病理的な関与が多く報告されており、toxic AGEs (TAGE) とも呼ばれている。我々はこれまでに生殖年齢女性における老化メカニズムの中で AGEs (CML, pentosidine) とそのレセプ

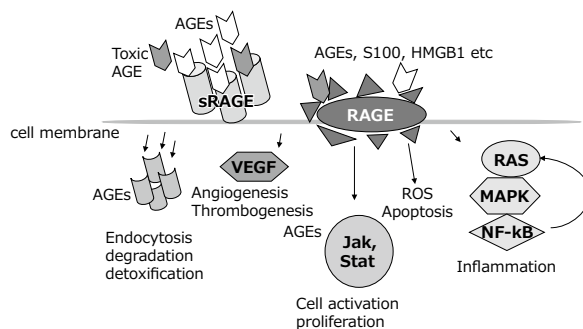


図1. Receptors for AGEs (advanced glycation end products) と生体反応

ター RAGE 可溶性分画 (sRAGE) 発現に着目し、加齢による生殖機能の低下と RAGE-AGEs 系制御、sRAGE の detox 作用の関与について成果を報告してきた。

一方、味噌は日本のみならず海外でも抗酸化作用を有する健康食品としての地位を確立しているが、その熟成の過程で生じる類の AGEs は味噌の有効成分の一つとされる。

今回の我々の検討のねらいは、毎日の積極的な

味噌汁摂取により生殖年齢女性から採取された血清、卵胞液中における糖化ストレスマーカー (sRAGE, TAGE) 値が変化するかを検討し、生殖補助医療 (ART) における影響を調べることとした。

## 2. 研究計画と方法

本研究は成育医療研究センター倫理委員会において介入研究として審査承認された [No.706]。

**研究対象：**高崎 ART クリニックで生殖補助医療などの診療を受ける女性の中から参加者をリクルートした。糖尿病、腎臓病などの慢性疾患がなく、問診 (既往歴など)・臨床検査値・超音波検査等により明らかな子宮内膜症や多嚢胞卵巣の所見を有しない生殖年齢女性に対して、成育医療研究センターの倫理規定に基づいて研究の趣旨説明を施行した。「研究内容・余剰の採血・採卵後の余剰サンプル (血清・卵胞液) の利用」に同意された患者を研究参加者とした。質問票により味噌製品 (味噌汁) の摂取頻度が週5日以内の参加者に対しては、さらに味噌汁積極的摂取介入研究への参加者としてのリクルートを行った。収集したサンプルおよび ART に関する臨床データは、研究用匿名化番号により整理保管され、個人の特特定ができないように配慮した。

**被験者数の設定：**研究期間中におけるクリニックでの体外受精周期患者の同意者予想数を考慮し、コントロールグループ (味噌積極的摂取は参加せず、残余検体使用のみ同意)、味噌摂取グループ (毎日味噌汁を摂取する)：それぞれ約20例ずつを目標とした。

### 研究方法：

①研究参加者の採血時に余剰血清を、また、体外受精周期には採卵決定時採血の余剰血清と採卵時の余剰卵胞液を収集した。②収集したサンプルは匿名化研究用番号で登録し、高崎 ART クリニック内 ART ラボにて  $-20^{\circ}\text{C}$  で一定期

間保存した後、匿名化研究番号で対応・整理記録された必要臨床情報資料 (ART 記録等) とともに成育医療研究センターへ送られた。同サンプルは成育医療研究センター研究所内周産期病態研究部内の所定フリーザー内で ELISA 等に供するまで保管し、残余検体は破棄した。また送付された資料は成育医療研究センター医局内の鍵付き書類保管庫で保管した。③味噌汁摂取グループでは統一規格の市販\*<sup>1</sup>を提供し、摂取味噌の種類による差異がないように考慮した。1日1~2食中にみそ汁 (味噌約10-15g/杯、塩分量0.6から1.2g/杯)を摂る食生活を4~12週 (1採卵周期~3採卵周期) 続行し普段以上の糖質は過食しないことのみを指導した。④ ELISA kit (市販)\*<sup>2</sup>を用い、サンプル中糖化関連マーカー：sRAGE, TAGE を測定した。⑤採卵周期における臨床検査値、採卵数などの情報資料について測定値と比較して影響を考察した。

\*<sup>1</sup>味噌：信州赤みそ、減塩 (58%) 味噌の組み合わせ使用 [中央味噌研究所より提供]

\*<sup>2</sup>ELISA kit：① sRAGE (soluble receptor of Advanced Glycation End-Products) Human ELISA [Bio Vendor R&D, Czech Republic]  
② Glycer-AGE ELISA kit (Human) Selista.Inc. Japan

**統計的評価：**測定値は統計的に処理し、各群間における差異は逸脱値の棄却検定後に Student's-test を行い、また2項目間の相関関係は Pearson 係数を算出し、有意差  $P < 0.05$  を以って評価した。

## 3. 結果

### 1) 研究参加者リクルート概要 (図2)

研究参加者はコントロール  $n = 85$ 、味噌摂取研究参加者  $n = 28$  をエントリーした (登録開始時より18人、コントロール群から、味噌群への途中参加患者10人、途中棄権が3人)。



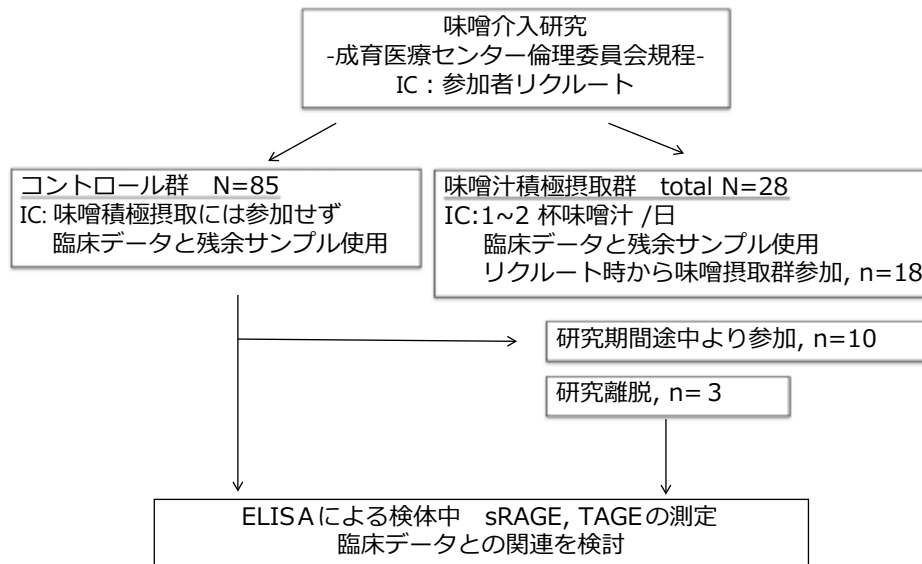


図2. 研究参加者リクルート概要

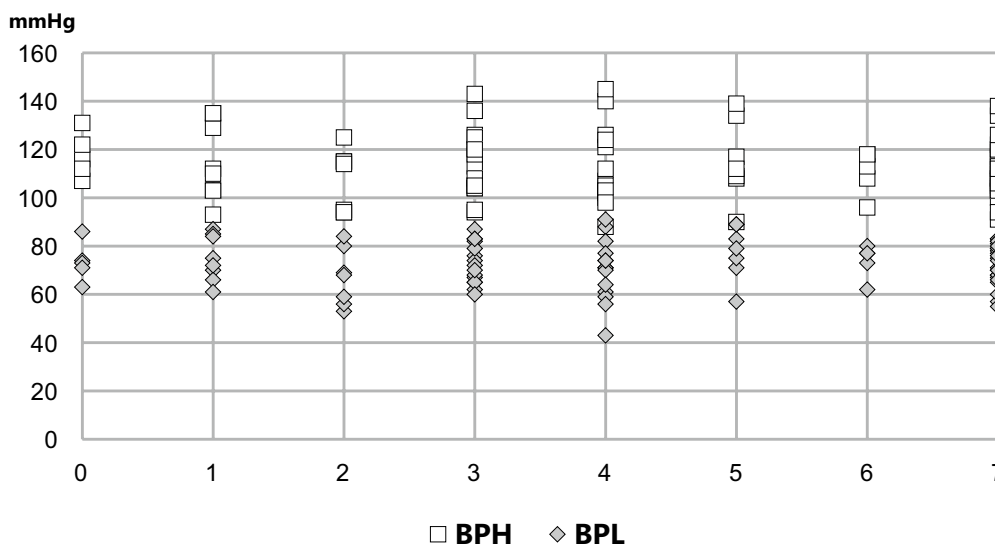


図3. 血圧と味噌摂取頻度 日/週 (コントロール群 n=85)

BPH: 最高血圧 BPL: 最低血圧 味噌摂取日数 (日/週) と血圧の関連

2) 味噌頻度: 味噌頻度 (日 / 週) と最高血圧 / 最低血圧などの項目関連

コントロール群 (n = 85) に対して味噌汁摂取頻度アンケートを施行した。コントロールの年齢層は 27 才から 45 才(中央値 37 才)であり、年齢と最高血圧 / 最低血圧には年齢との有意な関連はなく [相関係数 :BPH  $r = -0.036$ , BPL  $r = -0.132$ ], 味噌摂取頻度 (日 / 週) と最高血圧 / 最低血圧に関しても関連性は認めなかつ

た [相関係数 :BPH  $r = -0.066$ , BPL  $r = 0.032$ ] (図3)。

3) sRAGE 濃度とコントロール患者年齢

今回の研究対象の年齢層においては、コントロール群患者血清中および卵胞液中の sRAGE 濃度は、若年群 27 ~ 38 < 歳, 高年群  $\geq 38 \sim 45$  歳の年齢群において、いずれの検体においても有意な差異を認めなかつた (表1)。

#### 4) 味噌積極摂取介入群における経時的糖化マーカーの変化

味噌積極摂取群では、「提供味噌を用いて合わせ味噌の割合や具材は自由に、毎日1-2回の味噌汁摂取と過度な糖質摂取の制限のみを条件」として協力頂いた。各種サンプルは患者のART治療サイクルに伴い、経時的に初回ARTサイクルS1からS2, S3, S4として収集し、測定誤差を少なくするため一期的に血清中、卵胞液中のsRAGEおよびTAGE濃度を測定比較した。

血清中および卵胞液中のsRAGEに関して

表1. 年齢群とsRAGE濃度

		若年<38	高年≥38	P
sRAGE	血清 pg/ml	906±41, n=38	929±47, n=35	0.7
	卵胞液 pg/mg alb	22±2.0, n=38	27±2.4, n=38	0.13

コントロール検体（血清・卵胞液）中のsRAGE濃度に関して、若年群と高年群における比較  
Dataはmean±SE, n=標本数

は、積極的摂取による変化は認められなかったが、血清中TAGEに関してはS1からS2, S3, S4と減少傾向が認められ、S1とS4のTAGE濃度には有意差 ( $P=0.014$ ) を認めた。しかしながら、卵胞液では検体数も少数であり、

表2. 味噌摂取期間における経時ARTサイクル採取サンプルの糖化マーカー変化

		味噌摂取期間				P
		S1	S2	S3	S4	
		mean±SE (n)				
sRAGE	血清 pg/ml	844±43 (24)	845±39 (23)	859±36 (22)	936±67 (11)	N/S
	卵胞液 pg/mg albumin	27.0±5.1 (7)	26.7±2.3 (26)	27.2±2.6 (10)	/	N/S
TAGE (Toxic AGE)	血清 μg/ml	4.5±0.4 (13)	3.8±0.4 (13)	3.8±0.5 (11)	2.6±0.6 (8)	*p=0.014
	卵胞液 ng/mg albumin	120±29 (4)	96±7 (12)	103±15 (6)	/	N/S

S1~S4: ART経時サイクルグループでのsRAGE, TAGE濃度を mean ± SE (n) で示した。  
統計的有意差は、棄却検定後 Student's t test より有意差  $P<0.05$  を以て評価した。S1とS4の血清TAGE値は有意な減少が認められた。  
N/S: not significant 有意差なし。

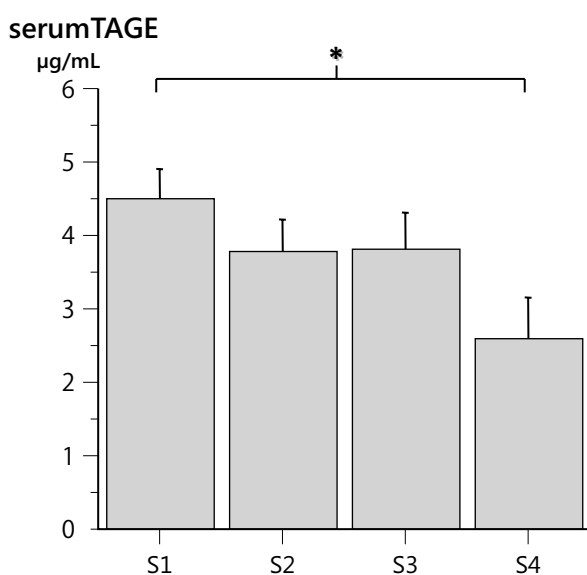


図4. 味噌摂取期間の経時ARTサンプルにおける血清中TAGEの変化

Dataはmean±SEで表示, \* $P<0.05$  で有意差を示す。表2参照

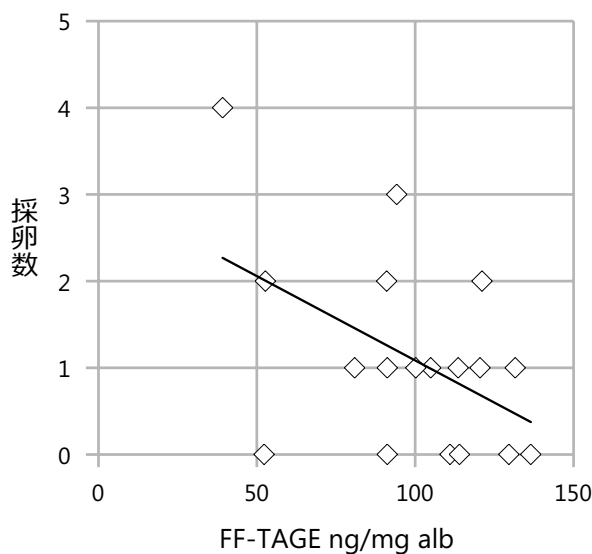


図5. 卵胞液中TAGE濃度と採卵数における相関  
卵胞液中単位アルブミン当たりのTAGE量は、採卵数と有意な負の相関を示した。

$r=-0.483$ ,  $P=0.041$ ,  $n=18$ , FF:卵胞液

TAGE量の有意な変化は示されなかった（表2，図4）

#### 5) 卵胞液中 TAGE 量と採卵数

血清中の TAGE 濃度と採卵数には有意な関連は認められなかった。一方，卵胞液中の TAGE 量と採卵数では負の相関 ( $r = -0.483$ ,  $P = 0.041$ ,  $n = 18$ ) が認められた（図5）。

#### 8) 血清中と卵胞液中の TAGE 濃度相関

ART 周期において，各患者で同一周期に収集された卵胞液中の TAGE 量と血清中の TAGE 濃度の相関を検討したところ，有意ではないが，正相関の傾向 ( $r = 0.435$ ,  $P = 0.081$ ,  $n = 17$ ) が示唆された（図6）。

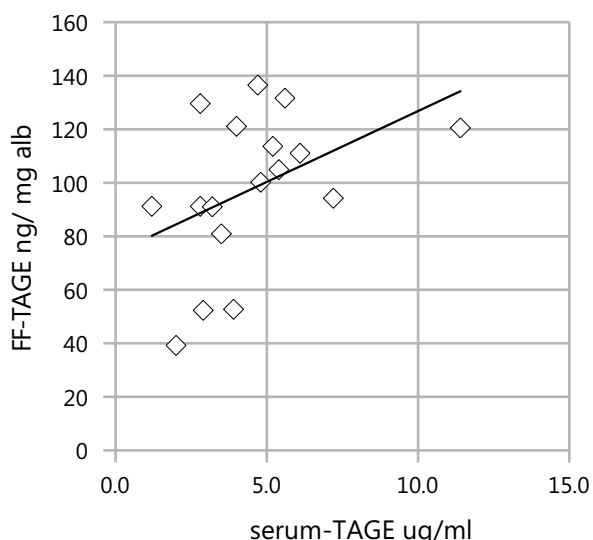


図6. 血清中と卵胞液中のTAGE濃度相関

同サイクルの卵胞液中単位アルブミン当たりのTAGE量と血清中TAGE濃度には正相関傾向が示唆された。  
 $r = 0.435$ ,  $P = 0.081$ ,  $n = 17$ , FF: 卵胞液

## 4. 考察

我々の検討は，動物を用いた研究とは異なり，「患者に味噌汁を積極的に摂取してもらおう」という介入研究であるため，検体数，環境要因の統一，倫理的配慮等，準備に関しての膨大な準備を要し，

また，ART 医療との関連性の比較等も非常に困難であった。しかしながら，参加者リクルートの際には味噌汁（味噌食品）の摂取頻度や日常血圧（測定）調査などを行い，一般的な生殖年齢層での味噌汁摂取状況や血圧との関連もデータとして知見が得られた。ほぼ毎日味噌汁を摂取する患者から一週間に0日という人まで頻度は様々であったが，クリニック受診の生殖年齢女性においては，味噌汁摂取頻度と年齢に有意な関連はなく，また摂取頻度と日常血圧にも有意な差異を認めなかった。研究計画倫理審査段階で味噌汁中の塩分濃度に関して厳しく制限事項が提示されたが，味噌汁摂取頻度と日常高血圧について，生殖年齢女性においては関連性を認めなかった。

以前の報告で我々は，血漿検体中の sRAGE 濃度は高年 (35-46 才) 群と比較して若年 (23-34 才) 群で高く，sRAGE が detox 的に作用している一要因と考察したが，今回の検討では参加対象の若年 (27-37 才) 高年 (38-45 才) と年齢幅が小さいためか，年齢群での有意な差は認められなかった。同様に卵胞液中の sRAGE においても年齢群での有意差は認められなかった。

味噌摂取期間中の ART サイクルにおいて，ART 1 周期目サンプルを S1，経時的に S2～S4 として収集したが，卵胞刺激反応不良によるキャンセル周期や受精卵凍結保存により ART 周期から卒業する場合もあり，サンプル数は経時的に減少した。経時的サンプル数の減少は計画上で予測されたことではあるが，このような介入研究によって信頼性を高めるデータを得るには，さらに多くの ART 患者をリクルートする必要がある。sRAGE 濃度は，味噌汁介入においてもコントロール群と同じく血清，卵胞液ともに変化が認められなかったが，TAGE に関しては，統計上は S1-S4 間で有意な減少となった。しかし n 数が少数であるため，今後のさらなる検討が必要である。一方，卵胞液中の TAGE では有意な変化が見られなかった。

今回の検討では受精率や良好な胚成育など，より詳細な ART 成績との関連は検討数が少なく解析データ不足により，採卵数との関連のみ検討された。

このような研究状況にもかかわらず、興味深いことに卵子の成育環境に対してより直接的に関与すると考えられる卵胞液中の TAGE 量は、採卵数と有意な負の相関を示した。また、同一個人において同時採卵サイクル時に収集した患者の血清・卵胞液中では TAGE 濃度に正の相関傾向が示唆された。今回の検討では、味噌汁積極摂取の TAGE 減少効果は、卵胞液中 TAGE ではなく血清中で示唆されたのだが、同一個人内での血清・卵胞液の相関傾向から、TAGE 量減少が卵胞内/卵子発育環境を改善する可能性が考えられる。

今回の検討では sRAGE には積極的味噌汁摂取による変化が認められなかった。このことから、血清中 TAGE 減少が味噌汁摂取の効果によるならば、そのメカニズムは sRAGE による detox 作用を介せず、直接的に味噌中の有効成分が関与しているのかもしれないが、さらなる検討が必要である。

今回の preliminary な検討において、味噌汁の積極的な摂取と生殖女性の抗老化作用について、日常生活レベルにおける改善のヒントが得られた。

今後、積極的味噌汁摂取によって、血清中の TAGE が減少することが確認され、さらに卵胞液中の TAGE の減少効果まで確実なデータが得られれば、採卵数のみならず、他の生殖医療成績にも効果が反映されることが期待される。

## 5. 結論

今回の検討により、生体内の老化原因物質の一つとされるである AGEs：特に病理学的にも悪玉とされる TAGE が、味噌汁の積極摂取により血清中で減少する可能性が示唆された。preliminary な本研究成果では十分に解析可能なレベルには及ばないが、今後さらに研究成果を示すことにより、これまでの健康食品としての味噌の位置づけに、「生殖機能の抗老化」という新しい観点を加えられることが期待される。

## 参考文献

- Campbell, D. J., Somaratne, J. B., Jenkins, A. J., Prior, D. L., Yui, M., Kenny, J. F., . . . Kelly, D. J. (2012). Diastolic dysfunction of aging is independent of myocardial structure but associated with plasma advanced glycation end-product levels. *PLoS One*, 7 (11), e49813. doi:10.1371/journal.pone.0049813
- Conroy, S. M., Maskarinec, G., Park, S. Y., Wilkens, L. R., Henderson, B. E., & Kolonel, L. N. (2013). The effects of soy consumption before diagnosis on breast cancer survival: the Multiethnic Cohort Study. *Nutr Cancer*, 65 (4), 527-537. doi:10.1080/01635581.2013.776694
- Deane, R., Singh, I., Sagare, A. P., Bell, R. D., Ross, N. T., LaRue, B., . . . Zlokovic, B. V. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 122 (4), 1377-1392. doi:10.1172/JCI58642
- Du, D. D., Yoshinaga, M., Sonoda, M., Kawakubo, K., & Uehara, Y. (2014). 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*, 36 (5), 359-366. doi:10.3109/10641963.2013.827702
- Fleming, T. H., Humpert, P. M., Nawroth, P. P., & Bierhaus, A. (2011). Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini-review. *Gerontology*, 57 (5), 435-443. doi:10.1159/000322087
- Fujii, E. Y., & Nakayama, M. (2010). The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging. *Fertil Steril*, 94 (2), 694-700. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.03.029

- Gella, A., & Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 3 (1), 88-93.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, 114 (6), 597-605. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854
- Henderson, V. W., St John, J. A., Hodis, H. N., Kono, N., McCleary, C. A., Franke, A. A., & Mack, W. J. (2012). Long-term soy isoflavone supplementation and cognition in women: a randomized, controlled trial. *Neurology*, 78 (23), 1841-1848. doi:10.1212/WNL.0b013e318258f822
- Hodis, H. N., Mack, W. J., Kono, N., Azen, S. P., Shoupe, D., Hwang-Levine, J., . . . Women's Isoflavone Soy Health Research, G. (2011). Isoflavone soy protein supplementation and atherosclerosis progression in healthy postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Stroke*, 42 (11), 3168-3175. doi:10.1161/STROKEAHA.111.620831
- Hooper, L., Madhavan, G., Tice, J. A., Leinster, S. J., & Cassidy, A. (2010). Effects of isoflavones on breast density in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Reprod Update*, 16 (6), 745-760. doi:10.1093/humupd/dmq011
- Jinno, M., Takeuchi, M., Watanabe, A., Teruya, K., Hirohama, J., Eguchi, N., & Miyazaki, A. (2011). Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Hum Reprod*, 26 (3), 604-610. doi:10.1093/humrep/deq388
- Kang, X., Zhang, Q., Wang, S., Huang, X., & Jin, S. (2010). Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy. *CMAJ*, 182 (17), 1857-1862. doi:10.1503/cmaj.091298
- Kokubo, Y., Iso, H., Ishihara, J., Okada, K., Inoue, M., & Tsugane, S. (2007). 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*, 116 (22), 2553-2562. doi:10.1161/circulationaha.106.683755
- Kweon, S. S., Shu, X. O., Xiang, Y., Cai, H., Yang, G., Ji, B. T., . . . Epplein, M. (2013). Intake of specific nonfermented soy foods may be inversely associated with risk of distal gastric cancer in a Chinese population. *J Nutr*, 143 (11), 1736-1742. doi:10.3945/jn.113.177675
- Lin, L., Park, S., & Lakatta, E. G. (2009). RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 1403-1413.
- Luevano-Contreras, C., & Chapman-Novakofski, K. (2010). Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*, 2 (12), 1247-1265. doi:10.3390/nu2121247
- Maillard-Lefebvre, H., Boulanger, E., Daroux, M., Gaxatte, C., Hudson, B. I., & Lambert, M. (2009). Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*, 48 (10), 1190-1196. doi:10.1093/rheumatology/kep199
- Mangano, K. M., Hutchins-Wiese, H. L., Kenny, A. M., Walsh, S. J., Abourizk, R. H., Bruno, R. S., . . . Kerstetter, J. E. (2013). Soy proteins and isoflavones reduce interleukin-6 but not serum lipids in older women: a randomized controlled trial. *Nutr Res*, 33 (12),

- 1026-1033. doi:10.1016/j.nutres.2013.08.009
- Maskarinec, G., Watts, K., Kagihara, J., Hebshi, S. M., & Franke, A. A. (2008). Urinary Isoflavonoid Excretion is Similar after Consuming Soy Milk and Miso Soup in Japanese-American Women. *The British journal of nutrition*, *100* (2), 424-429. doi:10.1017/S0007114508898686
- Merhi, Z. (2014). Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. *Hum Reprod*, *29* (1), 135-145. doi:10.1093/humrep/det383
- Messina, M. (2014). Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, *100 Suppl 1*, 423S-430S. doi:10.3945/ajcn.113.071464
- Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2009). RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts. *J Leukoc Biol*, *86* (3), 505-512. doi:10.1189/jlb.0409230
- Takeuchi, M., Takino, J., & Yamagishi, S. (2010). Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: a novel therapeutic strategy. *Curr Drug Targets*, *11* (11), 1468-1482.
- Talaei, M., Koh, W. P., van Dam, R. M., Yuan, J. M., & Pan, A. (2014). Dietary soy intake is not associated with risk of cardiovascular disease mortality in Singapore Chinese adults. *J Nutr*, *144* (6), 921-928. doi:10.3945/jn.114.190454
- Uchiki, T., Weikel, K. A., Jiao, W., Shang, F., Caceres, A., Pawlak, D., . . . Taylor, A. (2012). Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). *Aging Cell*, *11* (1), 1-13. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00752.x
- Yoshinaga, M., Toda, N., Tamura, Y., Terakado, S., Ueno, M., Otsuka, K., . . . Uehara, Y. (2012). Japanese traditional miso soup attenuates salt-induced hypertension and its organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *Nutrition*, *28* (9), 924-931. doi:10.1016/j.nut.2011.09.010





# 研究助成報告

平成26年度研究助成による研究報告

# 味噌・大豆製品摂取とインスリン抵抗性および メタボリックシンドローム構成因子との関係に関する 縦断研究

酒井 徹, 中本 真理子

Prospective study of the favorable effects of higher dietary miso intake on  
component of metabolic syndrome in Japanese work site population

Tohru SAKAI, Mariko NAKAMOTO

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

## 背景

勤労者において、長時間労働やシフト勤務などの労働条件により、労働者の食習慣、運動習慣を含めた生活習慣全般の乱れが起りやすい環境になっている。それにともない、肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病のリスクが増大している<sup>1)</sup>。特に近年では、内臓脂肪型肥満、インスリン抵抗性を基盤とした耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧などが複数集積した病態であるメタボリックシンドロームを発症する中高年者は多く、その予防、改善が必要とされている<sup>2)</sup>。

一方、味噌は日本の食卓では欠かすことのできない食品のひとつとされ、古くから食生活の中で重要な役割を担ってきた<sup>3)</sup>。大豆、米、麦に加えて食塩を主原料とする味噌は、微生物による発酵を経て、消化吸収、保存性、風味が向上した食品となる。栄養、風味、健康の面から「健康機能性食品」として見直されている。これまでに、味噌の人への健康効果が検証されており、コレステロ

ール低下作用、癌抑制作用、抗酸化作用、放射線障害抑制作用などが報告されている<sup>4)</sup>。これらの健康効果は、味噌の原料大豆に含まれるイソフラボンや他の成分、あるいは味噌が製造される過程で受ける発酵作用が関与している可能性が考えられている<sup>5)</sup>。ラットを用いた先行研究において、食塩は胃がんを進行させるものの、同量の食塩を含む味噌は胃がんを進行させないことが報告されている<sup>6)</sup>。さらに、ラットに熟成期間の異なる味噌を餌に混合させ、癌の進行を検証したところ、熟成期間や熟成の度合いにより、味噌の機能性が変化し、癌の発症・進行に与える影響が異なることが報告されている<sup>7)</sup>。また、癌抑制効果だけでなく、味噌には血圧やコレステロールを低下させる作用があることも報告されている<sup>8),9)</sup>。堀井らはラットを用いた研究において、味噌がコレステロールの胆汁酸への異化と体外排出を高めることを報告し<sup>8)</sup>、小久保らは吹田研究において地域住民を10年間追跡したところ、味噌汁1杯以上の摂取は、高血圧および高脂血症の発症リスクを下

げることが報告している<sup>9)</sup>。このように、これまでの研究で味噌が、癌や高血圧・高脂血症といった生活習慣病を予防する可能性があるとして示されている。しかしながら、これまでの報告は動物を用いた検討が多く、ヒトを対象にして味噌摂取と健康との関係を探る見解は少ないのが現状である。そこで、本研究では徳島県内の企業に勤務する勤労者において、メタボリックシンドロームの構成因子に対して味噌摂取がどのような影響を及ぼすかについて検討を行うことを目的とした。

## 方法

### 対象者

本調査は、徳島県勤労者を対象とした糖尿病の病因を探る目的で実施されている前向きコホート調査に参加した者を対象としている。本研究の解析対象者は、2009年度（2009～2010年）に実施されたベースライン調査時に参加していた20～63歳の成人735名（男性479名、女性256名）のう

ち、2012年度（2012～2013年）に実施した追跡調査に参加し、解析に必要な項目に欠損がない452名（男性300名、女性152名）とした（図1）。

### 食事摂取状況

2009年5月～2010年3月の期間に行われた健康診断時に、自己記入式質問票を用い、食事内容、食行動や休養・運動を含む生活習慣について質問を行った。調査票は、健康診断実施当日までに各職域施設に郵送し、対象者本人に記入してもらった。健康診断当日に調査票を持参してもらい、研究担当者が対象者立会いの下、回答確認および調査票の回収を行った。習慣的な食事内容については、過去1ヶ月間の食事について、1週間単位で摂取量と摂取頻度を尋ねる食事摂取頻度調査法を用いた「エクセル栄養君 食事摂取頻度調査 FFQg ver.2.0 調査票」（建帛社）を使用した<sup>10)</sup>。また、味噌摂取量については、過去1年間を振り返ってもらい、習慣的に摂取する味噌のポーションサイズと頻度を選択してもらい、味噌摂取量を換算した。食行動および休養・運動を含む

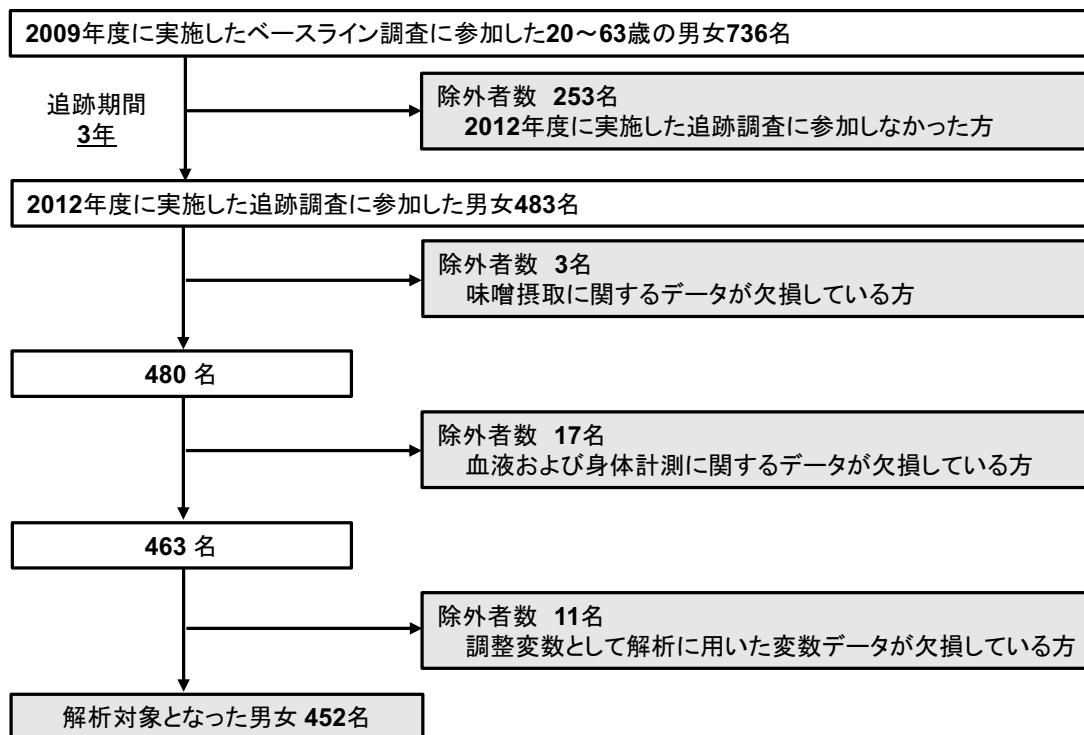


図1. 解析対象者の抽出フローチャート

生活習慣については、欠食、間食、夜食、外食、それぞれの1週間当たりの頻度、過去の運動習慣、現在の運動習慣、喫煙習慣、飲酒習慣について質問を行った。

### 身体計測および採血

本調査は午前中に実施した。対象者に調査前10時間以内の食事およびエネルギー含有水分の摂取を控えてもらった状態で身体計測および採血が実施された。身長、体重、腹囲径および血圧測

表1. 味噌摂取量によるベースライン時の対象者特性 (男性)\*

		Q 1 n=38	Q 2 n=118	Q 3 n=55	Q 4 n=89	p 値
年齢	(year)	40.5 ± 9.3	40.7 ± 9.6	40.9 ± 9.0	42.8 ± 8.8	0.342
Body mass index	(kg/m <sup>2</sup> )	23.3 ± 3.4	23.7 ± 3.2	23.3 ± 2.8	23.4 ± 3.0	0.826
腹囲	(cm)	84.2 ± 9.3	85.2 ± 8.4	85.2 ± 7.8	86.2 ± 7.7	0.646
中性脂肪	(mg/dL)	104.0 ± 77.4	127.6 ± 101.3	128.1 ± 104.5	126.6 ± 85.6	0.569
HDLコレステロール	(mg/dL)	61.2 ± 15.2	56.5 ± 13.7	57.0 ± 14.4	56.3 ± 12.0	0.261
収縮期血圧	(mmHg)	117.7 ± 14.4	122.0 ± 13.3	122.7 ± 13.8	121.4 ± 14.9	0.355
拡張期血圧	(mmHg)	78.7 ± 11.8	79.1 ± 11.2	79.2 ± 10.1	79.9 ± 12.5	0.94
血糖値	(mg/dL)	88.8 ± 7.8	89.6 ± 8.8	91.8 ± 9.4	89.2 ± 8.5	0.292
喫煙習慣	(%)					
現在あり		8 ( 21.1)	45 ( 38.1)	14 ( 25.5)	18 ( 20.2)	0.042
現在なし		24 ( 63.2)	55 ( 46.6)	27 ( 49.1)	47 ( 52.8)	
過去あり		6 ( 15.8)	18 ( 15.3)	14 ( 25.5)	24 ( 27.0)	
運動習慣	(%)					
なし		22 ( 57.9)	73 ( 61.9)	36 ( 65.5)	56 ( 62.9)	0.911
あり		16 ( 42.1)	44 ( 37.3)	19 ( 34.5)	33 ( 37.1)	
エネルギー摂取量	(kcal/day)	1742.3 ± 397.5	1770.4 ± 426.6	1855.4 ± 399.4	2005.7 ± 478.5	0.001
アルコール摂取量	(g/day)	19.7 ± 25.4	17.1 ± 27.9	22.9 ± 46.1	18.8 ± 24.8	0.713
味噌摂取量	(g/day)	2.5 ± 1.1	8.3 ± 2.2	15.2 ± 1.3	23.5 ± 6.1	<0.001

\* 連続変数についてはANOVAを用い、カテゴリ変数については $\chi^2$ 検定を用いて、味噌摂取量の4群間でのベースライン時における対象者の基本特性の違いを検討した。

表2. 味噌摂取量によるベースライン時の対象者特性 (女性)\*

		Q 1 n=33	Q 2 n=67	Q 3 n=27	Q 4 n=25	p 値
年齢	(year)	35.4 ± 10.3	39.0 ± 9.3	41.5 ± 9.3	41.0 ± 8.3	0.05
Body mass index	(kg/m <sup>2</sup> )	22.4 ± 3.3	21.4 ± 3.2	20.8 ± 2.2	21.0 ± 2.6	0.145
腹囲	(cm)	79.7 ± 9.4	76.8 ± 9.3	75.0 ± 8.3	75.7 ± 7.7	0.196
中性脂肪	(mg/dL)	58.0 ± 25.6	63.3 ± 33.8	58.1 ± 24.7	60.5 ± 22.3	0.79
HDLコレステロール	(mg/dL)	69.4 ± 14.2	69.0 ± 13.4	70.6 ± 14.9	75.8 ± 15.4	0.21
収縮期血圧	(mmHg)	111.3 ± 11.3	111.2 ± 13.9	109.6 ± 16.4	110.6 ± 11.7	0.959
拡張期血圧	(mmHg)	71.1 ± 10.3	68.7 ± 10.1	70.0 ± 11.6	67.8 ± 8.8	0.602
血糖値	(mg/dL)	86.5 ± 6.6	86.6 ± 7.1	86.6 ± 6.3	85.5 ± 7.5	0.905
喫煙習慣	(%)					
現在あり		2 ( 6.1)	2 ( 3.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.412
現在なし		29 ( 87.9)	59 ( 88.1)	27 (100.0)	24 ( 96.0)	
過去あり		2 ( 6.1)	6 ( 9.0)	0 ( 0.0)	1 ( 4.0)	
運動習慣	(%)					
なし		15 ( 45.5)	30 ( 44.8)	20 ( 74.1)	13 ( 52.0)	0.066
あり		18 ( 54.5)	37 ( 55.2)	7 ( 25.9)	12 ( 48.0)	
エネルギー摂取量	(kcal/day)	1541.2 ± 338.5	1589.7 ± 396.3	1655.0 ± 352.7	1795.7 ± 269.0	0.044
アルコール摂取量	(g/day)	2.1 ± 5.1	2.8 ± 5.9	3.4 ± 4.0	2.3 ± 4.1	0.76
味噌摂取量	(g/day)	2.0 ± 1.3	8.0 ± 2.1	14.9 ± 1.2	23.0 ± 5.9	<0.001

\* 連続変数についてはANOVAを用い、カテゴリ変数については $\chi^2$ 検定を用いて、味噌摂取量の4群間でのベースライン時における対象者の基本特性の違いを検討した。

定、静脈血採血は専門の保険スタッフによって行われた。腹囲径は、立位軽呼吸時の臍高位径とした。血圧は5分以上の座位安静後、水銀血圧計を用い、右上腕で測定した。静脈血は肘正中静脈から採取し、血清総コレステロールおよび血漿グルコース（血糖）の測定を外部検査機関で行った。メタボリックシンドローム構成因子の3年間の変化率（%）は、{(追跡調査時の測定値－ベースライン時の測定値)／ベースライン時の測定値}×100で算出した。

### 統計解析

全てのデータは、連結不可能匿名化へ変換後、統計解析に用いた。統計解析はSPSS 18.0J for windowsを用いた。連続データは平均±標準偏差で、カテゴリ変数は割合（%）で記した。味噌摂取を4分位により4群に分け、4群間で対象者特性に違いがみられるかを検討するために、一元配置分散分析およびカイ2乗検定を使用した。味噌摂取とメタボリックシンドローム構成因子（腹囲、血中HDLコレステロール、中性脂肪濃度、収縮期血圧、拡張期血圧および空腹時血糖値）の各指標との関係性を評価するために、メタボリックシンドローム構成因子の各指標の3年間の変化率を従属変数、ベースライン時の味噌摂取を独立

変数、ベースライン時の年齢、Body mass index（BMI）、運動習慣の有無、喫煙、飲酒、エネルギー摂取量を調整因子とした重回帰分析を用いた。重回帰分析による検討は、全体および男女で層別化して行った。また男性においては、特定保健指導の対象年齢となる40歳以上と対象外の40歳未満とに層別化した検討も行った。すべての統計解析は両側検定で行い、有意水準は5%とした。

### 結果

#### 対象者特性

味噌摂取群別の対象者特性は表1および2に示す。男女ともに味噌およびエネルギー摂取量は、味噌摂取が多くなるほど高かった。男性では、味噌摂取によって喫煙習慣の割合に有意な違いが見られた。女性では、味噌摂取が多くなると年齢が高くなる傾向が見られた。

#### メタボリックシンドローム構成因子に対する味噌摂取の影響

重回帰分析を用いて男女併せて味噌摂取とメタボリックシンドローム構成因子との関係性を検討

表3. メタボリックシンドローム構成因子の変化率に対する味噌摂取の影響

採血・身体測定項目	偏回帰係数	標準偏差誤差	標準偏回帰係数(β)	p値
<b>性・年齢調整モデル<sup>1</sup></b>				
腹囲変化率	-0.199	0.215	-0.044	0.357
中性脂肪変化率	-2.140	3.224	-0.032	0.507
HDLコレステロール変化率	0.482	0.359	0.064	0.180
収縮期血圧変化率	-0.620	0.598	-0.049	0.300
拡張期血圧変化率	-0.370	0.489	-0.036	0.450
血糖値変化率	0.135	0.348	0.019	0.699
<b>多変量調整モデル<sup>2</sup></b>				
腹囲変化率	-0.140	0.225	-0.031	0.532
中性脂肪変化率	-1.196	3.371	-0.018	0.723
HDLコレステロール変化率	0.281	0.374	0.038	0.453
収縮期血圧変化率	-0.759	0.625	-0.061	0.225
拡張期血圧変化率	-0.564	0.512	-0.055	0.271
血糖値変化率	0.179	0.363	0.025	0.623

<sup>1</sup> 解析において、性別、年齢を調整因子として調整した。

<sup>2</sup> 解析において、性別、年齢、BMI、運動習慣の有無、喫煙、飲酒、エネルギー摂取量を調整因子として調整した。

表4. 性別でのメタボリックシンドローム構成因子の変化率に対する味噌摂取の影響\*

採血・身体測定項目	偏回帰 係数	標準偏差 誤差	標準偏回帰 係数(β)	p 値
<b>男性 (n=300)</b>				
腹囲変化率	-0.546	0.260	-0.124	0.037
中性脂肪変化率	-0.003	4.776	0.000	0.999
HDLコレステロール変化率	0.694	0.432	0.094	0.109
収縮期血圧変化率	-0.978	0.780	-0.075	0.210
拡張期血圧変化率	-0.875	0.584	-0.088	0.135
血糖値変化率	0.147	0.473	0.019	0.755
<b>女性 (n=152)</b>				
腹囲変化率	0.828	0.422	0.175	0.052
中性脂肪変化率	-3.714	2.240	-0.148	0.099
HDLコレステロール変化率	-0.693	0.720	-0.088	0.338
収縮期血圧変化率	0.101	1.068	0.009	0.925
拡張期血圧変化率	0.422	1.045	0.037	0.687
血糖値変化率	0.248	0.545	0.042	0.650

\*すべての解析において、年齢、BMI、運動習慣の有無、喫煙、飲酒、エネルギー摂取量を調整因子として調整した。

表5. 男性における年代別でのメタボリックシンドローム構成因子の変化率に対する味噌摂取の影響\*

採血・身体測定項目	偏回帰 係数	標準偏差 誤差	標準偏回帰 係数(β)	p 値
<b>40歳未満 (n=131)</b>				
腹囲変化率	-0.941	0.383	-0.208	0.016
中性脂肪変化率	-6.897	5.368	-0.116	0.201
HDLコレステロール変化率	1.369	0.676	0.176	0.045
収縮期血圧変化率	0.385	1.131	0.031	0.734
拡張期血圧変化率	-0.737	0.816	-0.078	0.368
血糖値変化率	0.398	0.523	0.069	0.448
<b>40歳以上 (n=169)</b>				
腹囲変化率	-0.204	0.359	-0.047	0.570
中性脂肪変化率	4.761	7.470	0.052	0.525
HDLコレステロール変化率	0.192	0.576	0.027	0.740
収縮期血圧変化率	-1.545	1.066	-0.115	0.149
拡張期血圧変化率	-0.757	0.840	-0.075	0.369
血糖値変化率	0.274	0.750	0.030	0.715

\*すべての解析において、年齢、BMI、運動習慣の有無、喫煙、飲酒、エネルギー摂取量を調整因子として調整した。

したものの、有意な関連は認められなかった(表3)。次に、男女別に味噌摂取とメタボリックシンドローム構成因子の3年間での変化率との関連を検討した(表4)。男性において、ベースライン時の味噌摂取量は3年間の追跡期間における腹囲の変化率と有意な負の関連を示した[標準偏回帰係数(β)=-0.124, p=0.037]。一方、女性においては有意な関連は認められなかった。男性において腹囲変化率と味噌摂取とに有意な関連が認

められたことから、男性において特定保健指導の対象年齢となる40歳以上と対象外の40歳未満とに層別化し、さらなる検討を行った(表5)。その結果、40歳未満においてのみ有意な負の関連が認められた[標準偏回帰係数(β)=-0.208, p=0.016]。また、ベースライン時の味噌摂取を4分位数により4群に分け、各群の腹囲の平均変化率を比較したところ、40歳未満者において最大四分位数以上の群(Q4)と比較し、最小四

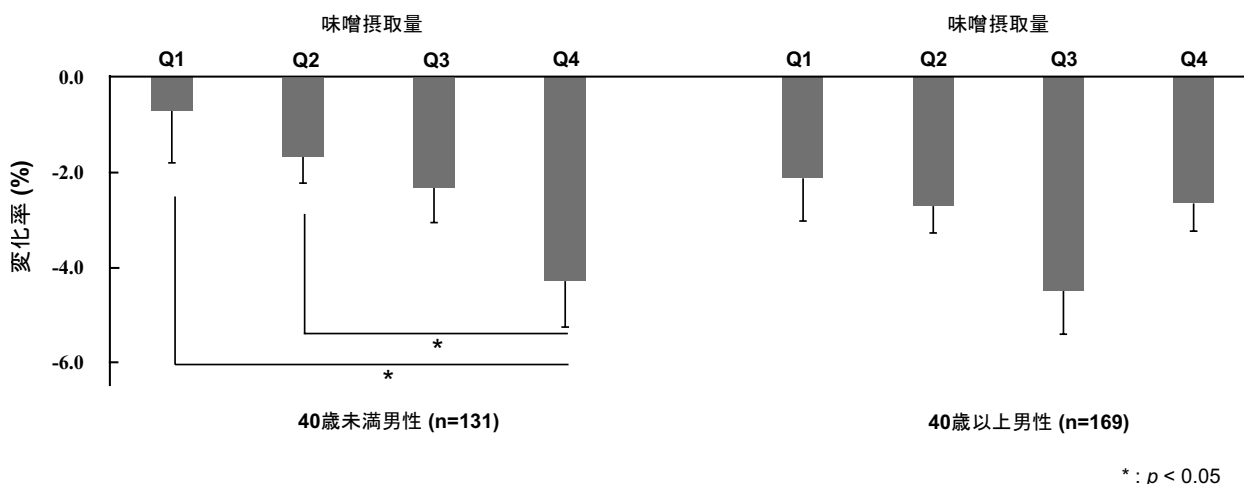


図2. 味噌摂取量別の腹囲測定値の変化率

分位数未満の群（Q1）および第2四分位群（Q2）において有意に平均変化率が小さかった（図2）。

## 考 察

本研究において、味噌摂取とメタボリックシンドローム構成因子の追跡期間中での変化率との関係は、男性の腹囲においてのみ有意な関連が認められ、特にその関連は40歳未満の勤労男性において顕著であることがわかった。一方で、女性においては、味噌摂取とメタボリックシンドローム構成因子との関係において有意な関連は認められなかった。これらの結果は、味噌摂取の増加に伴い変化するような食品群を調整しても変わらなかった（data not shown）。

これまでの研究で味噌が、癌や高血圧、糖尿病、高脂血症といった生活習慣病を予防する可能性があることと示されている<sup>8),9),11)</sup>。堀井らはラットを用いた研究において、味噌がコレステロールの胆汁酸への異化と体外排出を高めることを報告し<sup>8)</sup>、小久保らは吹田研究において地域住民を10年間追跡したところ、味噌汁1杯以上の摂取は、高血圧および高脂血症の発症リスクを低下させると報告している<sup>9)</sup>。また、大豆の脂質異常症に対する改善効果を検討した介入研究のメタ分

析では、大豆たんぱく質の投与によって総コレステロール、LDLコレステロール、中性脂肪が低下し、HDLコレステロールが上昇することを報告している<sup>11)</sup>。男性における本研究結果では、サンプルサイズが小さいなどの理由から有意な関連は認められなかったものの、収縮期および拡張期血圧を低下させたり、HDLコレステロールを上昇させたりする傾向がみられており（表4）、これまでの研究と類似した結果が得られていると考えられる。しかし、今回味噌摂取群別で、エネルギー消費量にそれぞれ違いがあるかを確認するために、1週間あたりの運動回数について2009年度と2012年度で対応のあるt検定による比較検討したところ、男性の味噌を最も多く摂取していた群（Q4）のみで、有意に運動回数が増加していることが分かった（図3）。また、男性を年齢で層別化した場合も同様に検討したところ、40歳未満の男性において、味噌を最も多く摂取していた群（Q4）のみで、有意に運動回数が増加していた（図4）。3年間の追跡期間で、味噌をより多く摂取していた群の消費エネルギー量が増加したことが影響して、メタボリックシンドローム構成因子に変化をもたらした可能性も否定できない。

結果に性差が認められたことについては、本解析対象者の男女間にもともと大きな特性の違いがあったことが影響していると考えられる。本解析



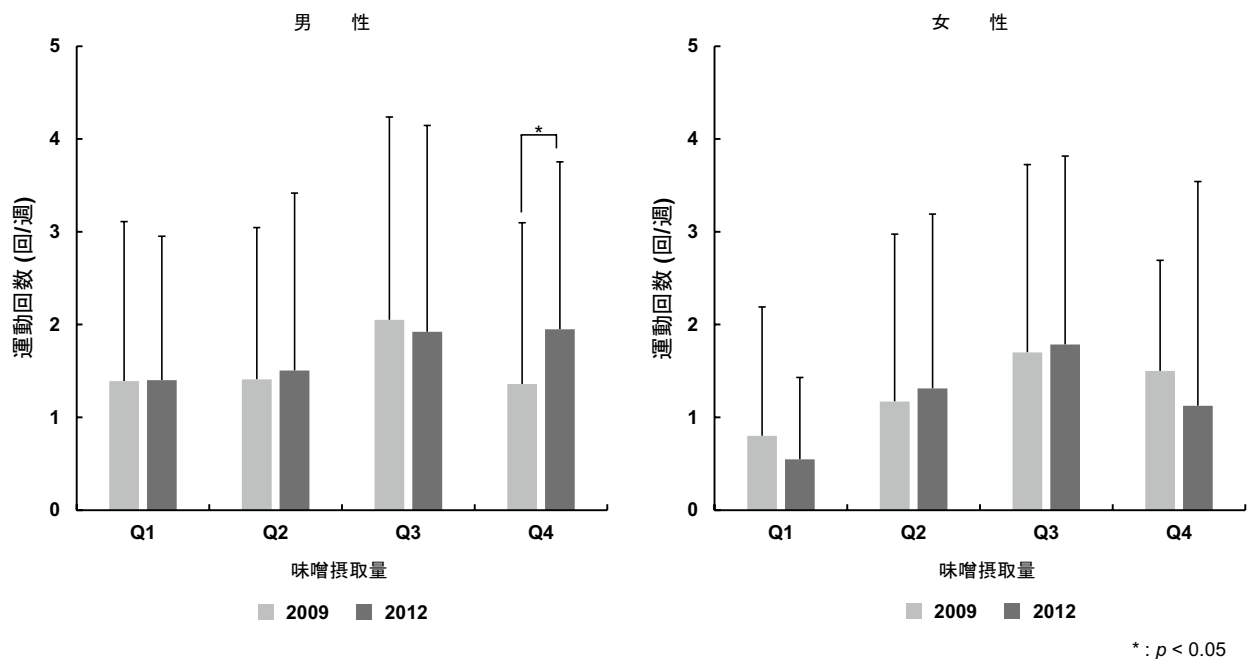


図3. 性・味噌摂取量別の運動頻度の変化

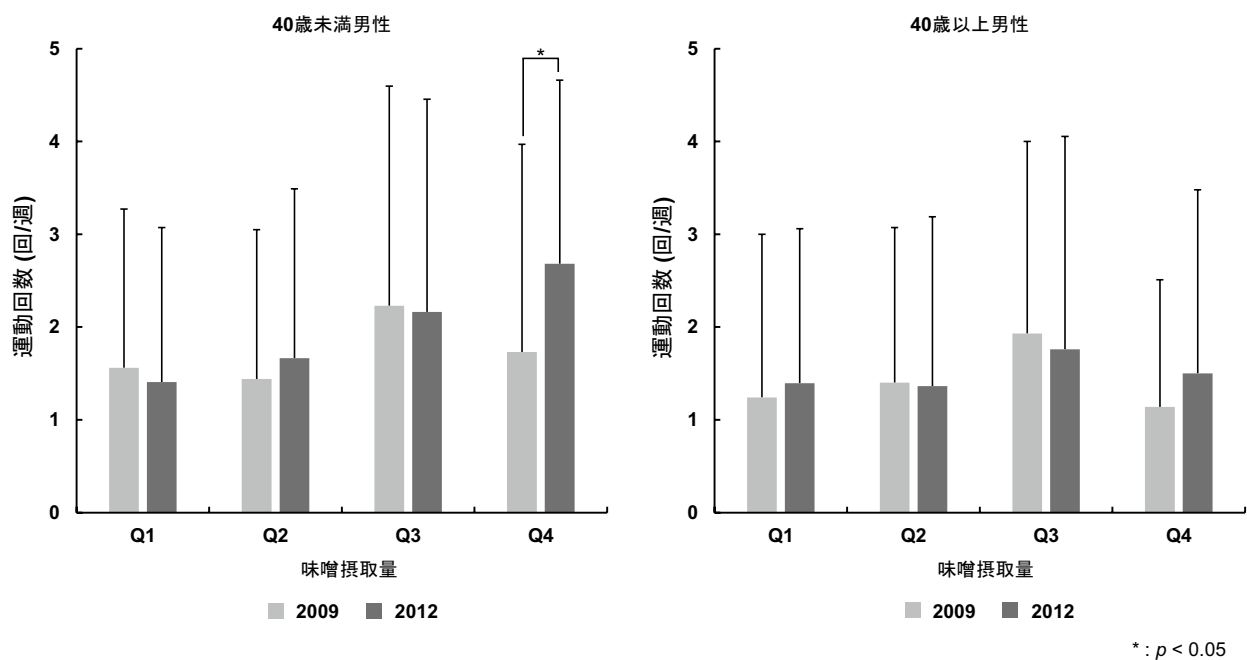


図4. 男性における年代・味噌摂取量別の運動頻度の変化

対象者の男性は女性に比べると、ベースライン時の中性脂肪、血糖値、血圧、腹囲などのメタボリックシンドローム構成因子の値が女性よりも有意に高かった (data not shown)。女性の身体計測値をみると、正常値に該当する者が多く、男

性に比べて健康的な対象者が多かった。そのため、女性は男性ほど味噌を含む食事摂取が身体計測値の変動に与える影響が少なかった可能性が考えられる。また、本研究対象者のうち女性は152名であり、サンプル数が少なかったことから、今

回得られた結果は偶然の結果の可能性も否定はできない。

また、男性の中でも特に40歳未満において、味噌摂取と腹囲変化率との間に有意な関連が示された。その理由として、上述した消費エネルギーの増加以外に、特定保健指導の対象年齢となる40歳以上だと一般的に様々な疾患の発症や既往などを有するリスクが高くなる点も挙げられる。実際に、男性において40歳未満・以上で生活習慣病などの既往状況を比較したところ、有意ではないが生活習慣病の既往状況は40歳未満で13.7%、40歳以上で17.2%となり40歳以上で高い割合であった (data not shown)。そのため、40歳以上においてはメタボリックシンドローム構成因子の変動に影響を与えうる他の潜在的な因子が、味噌摂取の影響よりもより大きいために、味噌摂取の影響を見えにくくしている可能性がある。また、より高齢になるほど、和食など味噌を摂取するような食生活を好むようになって考えられるため、40歳以上の集団の食生活のばらつきよりも40歳未満の集団の食生活のばらつきが大きいことが考えられる。そのため、40歳未満の若い世代において、味噌を摂取する効果がより得られやすかったのかもしれない。

本研究では、3年間の追跡期間を設けて前向きに検討したという強みもあるが、その一方で、いくつかの限界点もある。1つ目に、日本人の職域集団という限られた集団を対象にしており、サンプルサイズが小さいことである。特に女性に関しては男性の半分程度のサンプル数しか得られていないため、結果が偶然得られたものである可能性は否定できない。2つ目に、ベースライン調査と追跡調査のどちらにも参加した方を対象としていることである。これまでに、追跡調査に参加する人は、研究途中で脱落し解析除外者になる者に比べると、心身ともに健康で、生活習慣も良好であり、健康意識が高い特徴があることが報告されている<sup>12)</sup>。そのため、結果の解釈には十分留意する必要があるだろう。3つ目に、味噌摂取を食物摂取頻度調査において評価しているため、今回の対象者の味噌摂取量は、実際の摂取量とは乖離している可能性がある。最後に、本研究では調整仕切

れていない潜在因子が存在する可能性がある。しかしながら、本研究で結果は示していないが、年齢、BMI、身体活動、喫煙、飲酒、エネルギー摂取量といった要因に加えて、緑黄色野菜、果物、魚介類、肉類といった食品群の摂取量をさらにモデルに加えてもなお同様の結果が得られることを確認している。

本研究結果から、日本人の勤労男性の中でも、特に40歳未満の勤労男性において、習慣的な高味噌摂取が3年間の腹囲を低下させる可能性が示唆された。今後対象者を増やした検討が必要であるが、本研究から得られた成果を勤労者の食支援策に役立てたいと考えている。

## 謝 辞

本研究を実施するに当たり、ご援助賜りました(一社)中央味噌研究所に厚く御礼申し上げます。また、本研究にご参加くださった徳島県内の企業に勤める勤労者の皆様に感謝致します。

## 参考文献

- 1) 石川俊次 (2009) 生活習慣病を引き起こすメカニズム 労働. *Modern Physician*. 29: 760-2.
- 2) Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112: 2735-52.
- 3) Christine M DB, Chee-Beng T and Sindey M (2008) The world of soy, p144-60. University of Illinois Press, Champaign.
- 4) 川野一之 (2007) 伝統食品の科学—ルーツ, おいしさ, 機能—6. *日本味と匂学会誌* 14: 137-44.

- 5) 渡邊敦光 (2010) お味噌の効能. *日本醸造協会誌* 105: 714-23.
- 6) Watanabe H, Uesaka T, Kido S, Ishimura Y, Shiraki K, Kuramoto K, Hirata S, Shoji S, Katoh O, Fujimoto N (1999) Influence of concomitant miso or NaCl treatment on induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Oncol Rep.* 6: 989-93.
- 7) Ohara M, Lu H, Shiraki K, Ishimura Y, Uesaka T, Katoh O, Watanabe H (2002) Inhibition by long-term fermented miso of induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in CD (SD) rats. *Oncol Rep.* 9: 613-3.
- 8) Horii M, Ide T, Kawashima K, Yamamoto T (1990) Hypocholesterolemic Activity of Desalted Miso in Rats Fed an Atherogenic Diet. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 37: 148-53.
- 9) Kokubo Y, Watanabe M, Furukawa Y, Miyamoto Y. (2013) Moderate miso soup consumption may reduce the risk of cardiovascular risk factors in Japanese prospective cohort study: The Suita study. *Ann Nutr Metab.* 63 (supple 1) : 1347.
- 10) 高橋啓子, 吉村幸雄, 開元多恵ら (2001) 栄養素および食品群別摂取量推定のための食品群をベースとした食物摂取頻度調査票の作成および妥当性. *栄養学雑誌* 59: 221-32.
- 11) Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 333: 276-82.
- 12) Gill TM, Williams CS, Richardson ED, Berkman LF, Tinetti ME (1997) A predictive model for ADL dependence in community-living older adults based on a reduced set of cognitive status items. *J Am Geriatr Soc.* 45: 441-445.

## *in vitro* ストレス環境下における神経幹細胞の生存および増殖・分化障害に対する味噌による改善効果の検証

瀬尾 誠<sup>1,2</sup>, 荒木 智之<sup>2</sup>, 村越 隆之<sup>2</sup>

Miso improves the viability, and the dysfunction of proliferation and differentiation for neural stem cells under *in vitro* stress condition

Makoto SEO<sup>1,2</sup>, Tomoyuki ARAKI<sup>2</sup>, Takayuki MURAKOSHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University,  
1 Sanzo, Gakuen-cho, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Saitama Medical University,  
38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan.

### 【緒言】

生体にストレスをもたらす刺激因子「ストレッサー」には、物理的（温度，騒音など），化学的（栄養不足，薬剤など）および精神的（人間関係，精神的苦痛）など様々な種類がある。一般的にいわれる「ストレス」とは，それらの中でも「精神的ストレッサー」を意味することが多いと考えられる。我々は現代社会を生きていく上でストレスに曝される機会が非常に多く，うつ病などの精神疾患罹患率の増加は近年著しく，今後もさらに増加していくものと考えられる。

我々は，過年度のみそサイエンス研究会での報告会において，慢性拘束ストレス負荷したマウスに生じる脳機能低下に対し，日本各地の約20種類の味噌を飲水摂取させたところ，複数の味噌ならびにそれらの高分子ペプチド分画に顕著な改善効果がある可能性を見出してきた<sup>1),2)</sup>。

本研究課題では，マウスに拘束ストレス負荷した際に高値を示したコルチコステロン存在下を模

した *in vitro* ストレス環境下でのマウス神経幹細胞の生存および増殖・分化障害に対して味噌が改善効果を示すか否かを検証した。

### 【方法】

#### 1) マウス神経幹細胞の培養および分化誘導

マウス神経幹細胞 (OriCell™ Strain C57BL/6 Mouse Neural Stem Cells [NSCs], DS ファーマ) を NSCs 専用増殖培地 (OriCell™ NSC Growth Medium, DS ファーマ) にてニューロスフェアを形成した状態で増殖・維持した。分化誘導時には，ポリリジンコートしたチャンバースライド (Falcon) に細胞を播種して増殖因子 (EGF, FGF2) の代わりに血清を添加した培地にて7日間培養することで神経細胞，アストロサイト，オリゴデンドロサイトに分化することを各細胞特異的のマーカートンパク質（神経幹細胞では Nestin, 神経細胞では  $\beta$ III-Tubulin, アストロサイトで

は GFAP, オリゴデンドロサイトでは O4) を Neural Lineage Functional Identification Kit (R&D Systems) を用いて免疫染色により確認した。

## 2) 味噌サンプルの調製

味噌サンプルは, 過年度 (H24年度) に最も抗ストレス効果を示した味噌のペプチド分画を用いた。すなわち Vivaspin 20 (5,000 Mw 用と 3,000 Mw 用, ザルトリウス社) を用いた限外濾過法により 5-3 kDa のペプチド分画と 3 kDa 以下のペプチド分画を調製し, -20°C で保存した。

## 3) *in vitro* ストレス環境モデルでのマウス神経幹細胞および分化誘導時の生存率

*in vitro* ストレス環境モデルとして, 過年度より行ってきた拘束ストレスマウスの血清中コルチコステロン濃度やコルチコステロンによる細胞増殖障害に関する文献<sup>3),4)</sup>を参考に, 培地にコルチコステロンを添加した。マウス神経幹細胞およびそれらを分化誘導した際の生存率変化は, MTT法により生成したホルマザン色素をイソプロパノール-HCl で溶解し, 吸光度を測定した。

## 4) *in vitro* ストレス環境モデルでの Caspase-3 活性の測定

高濃度コルチコステロンは様々な細胞にアポトーシス誘導することが知られている<sup>4)</sup>。そこで,

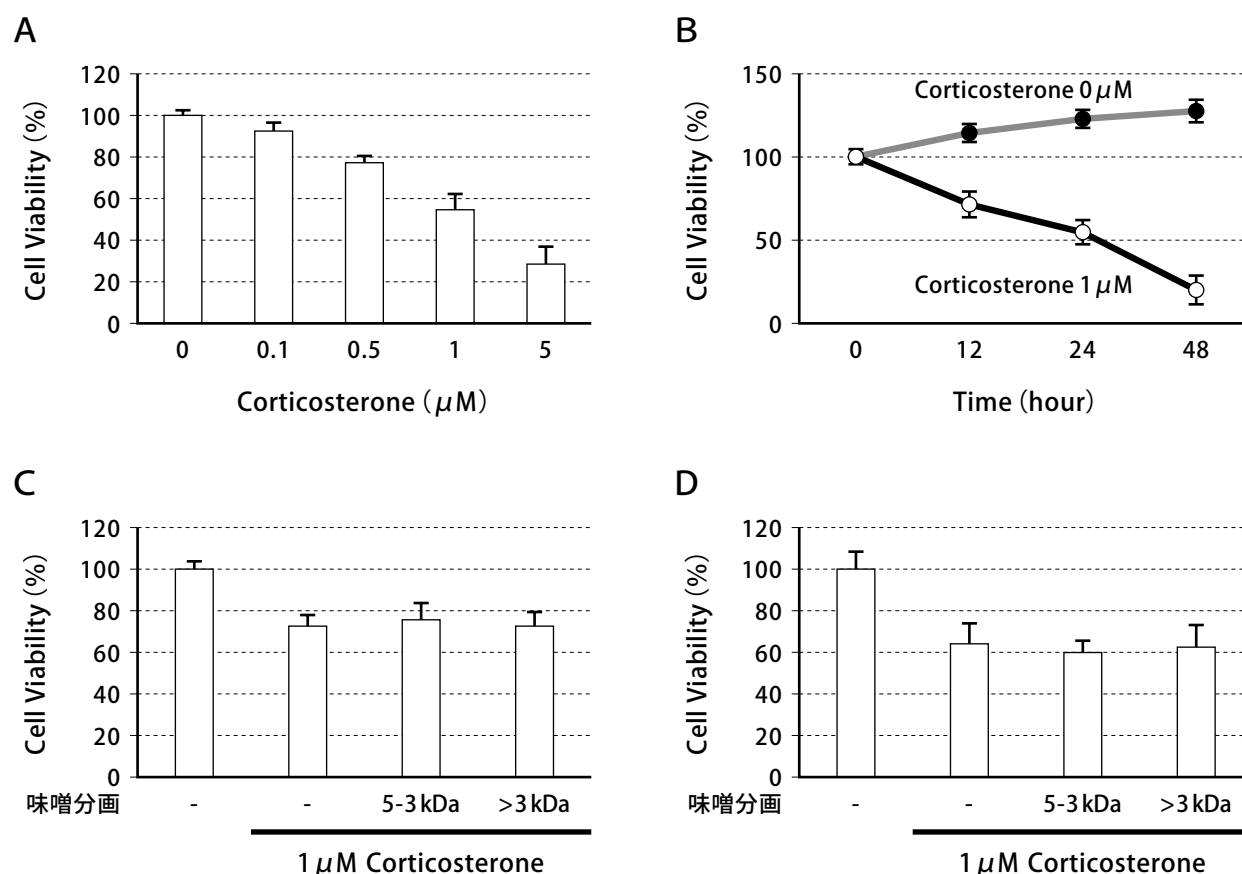


図 1. *in vitro* ストレス環境下での神経幹細胞および分化誘導後の細胞の生存率に対する味噌サンプルの影響

ストレス環境モデルとしてコルチコステロン添加による神経幹細胞の生存率の変化を各コルチコステロン濃度 (A) と処理時間 (B) について検討した。また, コルチコステロンと味噌の各分画を共存させた際の神経幹細胞 (C) および分化誘導 7 日目の細胞 (D) を用いて評価した。

神経幹細胞および分化誘導7日後の細胞を用い、コルチコステロン単独および味噌サンプル共存下で12時間培養した細胞を回収し、Caspase-3 活性測定キット（プロメガ社）を用いて Caspase-3 活性を測定した。

#### 5) *in vitro* ストレス環境モデルでのマウス神経幹細胞の分化プロファイル

神経幹細胞の分化誘導初日に、コルチコステロン単独および味噌サンプル共存下で12時間培養し、以後7日目までは通常の分化誘導培地にて培養した。1) に記載した神経細胞などの特異的マーカータンパク質を Neural Lineage Functional Identification Kit で免疫染色した。神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化

プロファイルは、DAPI で染色された 200 細胞あたりの各細胞特異的マーカータンパク質を発現した細胞数の割合を指標に解析した。

#### 【結果】

#### 1) *in vitro* ストレス環境モデルでの神経幹細胞および分化誘導時の生存率に対する味噌の影響

マウス神経幹細胞は、培地に添加したコルチコステロン濃度依存的に生存および増殖障害を受けることが確認された (図 1 A)。半数程度の神経幹細胞が細胞死を起こした 1  $\mu$ M コルチコステロン濃度で経時的な生存率の変化を検討したところ、24時間後から顕著な生存率の低下を確認した (図 1 B)。

そこで神経幹細胞および分化誘導7日後の細胞を用い、コルチコステロン 1  $\mu$ M を添加した培地に味噌サンプル 5-3 kDa および 3 kDa 以下のペプチド分画を添加し、12時間後の生存率におよぼす影響を検討したのであるが、生存率を回復させる効果は特に認められなかった (図 1 C, D)。

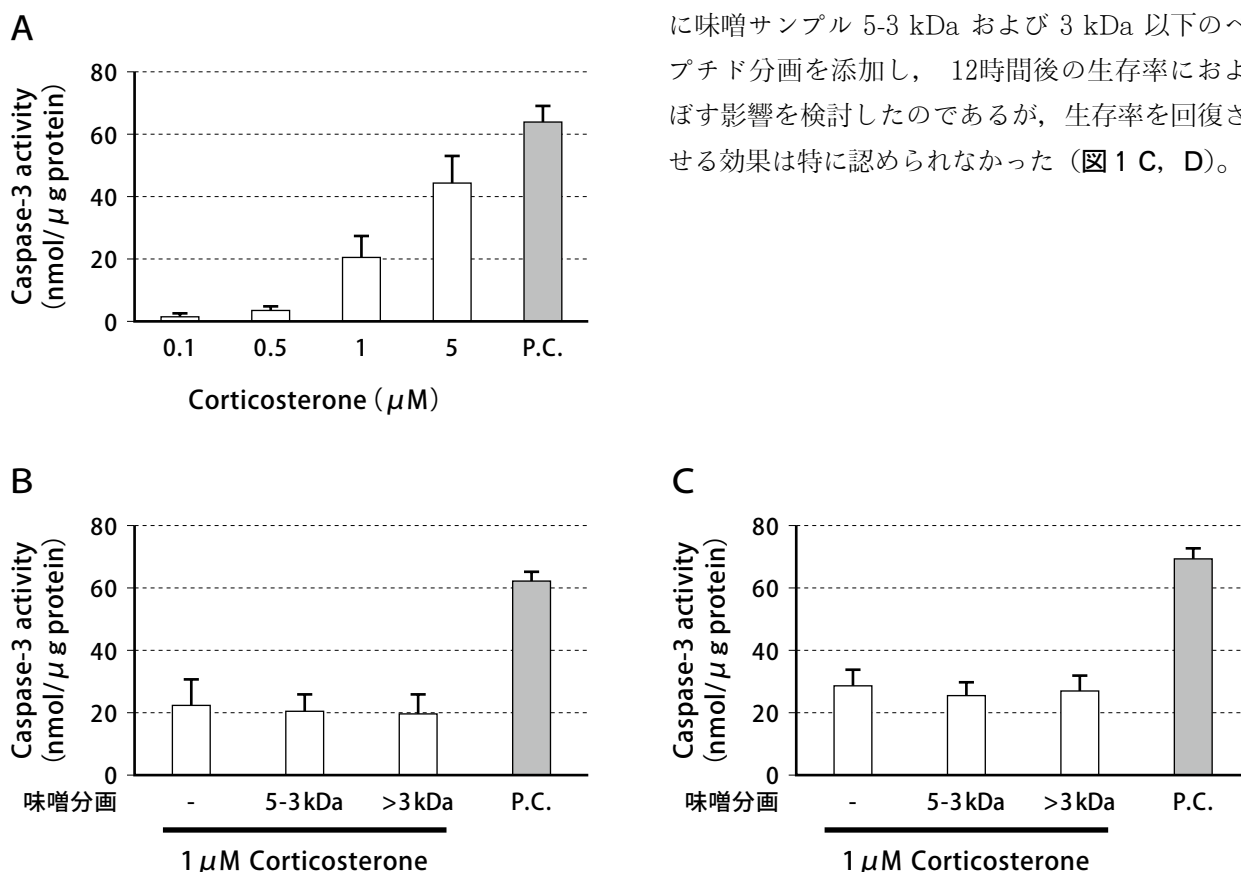


図 2. *in vitro* ストレス環境下での神経幹細胞および分化誘導後の細胞へのアポトーシス誘導に対する味噌サンプルの影響

コルチコステロン添加による神経幹細胞へのアポトーシス誘導を Caspase-3 活性を指標にした (A)。また、コルチコステロンと味噌の各分画を共存させた際の神経幹細胞 (B) および分化誘導7日目の細胞 (C) を用いて評価した。各グラフの P.C. は、アポトーシス誘導の陽性対照化合物 Actinomycin D (10  $\mu$ M) の結果を示した。

## 2) *in vitro* ストレス環境モデルでの Caspase-3 活性に対する味噌の影響

マウス神経幹細胞は、培地に添加したコルチコステロン濃度依存的に Caspase-3 活性が上昇した (図 2 A) ことから、コルチコステロンによるアポトーシス誘導による細胞死であることが推察された。

次に、コルチコステロン 1  $\mu$ M を添加した培地に味噌サンプル 5-3 kDa および 3 kDa 以下のペプチド分画を添加した際の Caspase-3 活性におよぼす影響を検討したのであるが、Caspase-3 活性の抑制効果は特に認められなかった (図 2 B, C)。この結果は 1) でコルチコステロンによる生存率の低下に対して味噌による改善効果が認められなかったことと相関するものであった。

## 3) *in vitro* ストレス環境モデルでのマウス神経幹細胞の分化プロファイルに対する味噌の影響

マウス神経幹細胞を分化誘導時にコルチコステロンを添加すると、1), 2) で示してきたように全体の細胞数自体が減少した。また未分化の神経幹細胞の指標となる Nestin 陽性細胞の割合が多く、神経細胞およびグリア細胞に分化した細胞の割合も低下した。

次に、神経幹細胞の分化誘導初日に、コルチコステロンおよび味噌サンプル 5-3 kDa および 3 kDa 以下のペプチド分画を添加した際には、分化誘導後の神経細胞およびグリア細胞に分化した細胞の割合が増加する傾向が認められた (図 3)。

しかし、本項目は実施できた回数が十分でないため、今後さらに実施回数を重ねて味噌によりアストロサイトが増加することについて確証を得る必要がある。

### 【考察】

本研究において、*in vitro* ストレス環境モデルとして、コルチコステロン存在下でマウス神経幹細胞および分化誘導時の生存が低下すること、また神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞への分化過程においてコルチコステロンが悪影響をおよぼすことを示すことができた。

そこで、過年度の慢性拘束ストレス負荷した動物実験において、顕著なストレス緩和効果を示したの味噌サンプルを選定し、5-3 kDa および 3 kDa 以下のペプチド分画を調製し、本研究の *in*

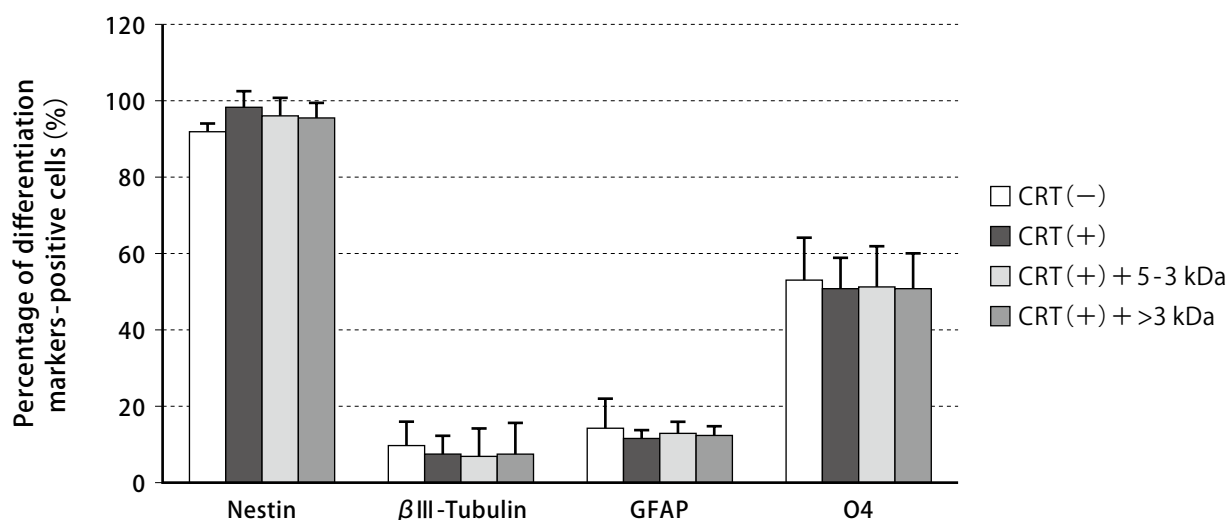


図 3. *in vitro* ストレス環境下での神経幹細胞の分化プロファイルに対する味噌サンプルの影響

DAPI により核染色された 200 個の細胞を選び、神経幹細胞、神経細胞およびグリア細胞に特異的のマーカートンパク質を共発現していた細胞の割合を指標に分化プロファイルを評価した。



*in vitro* ストレス環境モデルでの神経幹細胞の生存率や分化障害の改善を期待して検討を行ったのであるが、いずれも特に顕著な改善効果が認められなかった。

本研究では、これまでの3週間の慢性拘束ストレス負荷したマウスで恒常的に高値になった血清中コルチコステロン濃度とこれまでのコルチコステロン処理による培養細胞の生存・増殖障害に関する報告を参考に設定したのであるが、本来生体内でのコルチコステロン濃度は厳密に調節されており、強いストレス負荷に対しての短時間での濃度変動だけでなく、日内変動も大きい（起床時に高値に最も高値になり、就寝に向けて低値になる）ことが知られている。よって、本 *in vitro* ストレス環境モデルでの神経幹細胞および分化誘導後の細胞は、常に高濃度のコルチコステロンに曝されていたため、味噌を共存させても期待した改善効果がみられなかった可能性がある。

また、マウスを用いた動物実験では、慢性拘束ストレスを施す4週間前から味噌を摂取させ、合計7週間味噌を摂取させ続けたことが功を奏したのかもしれない。また、摂取した味噌が生体内に吸収され、血中に移行して脳血管関門を通過して脳内で作用する際には、アミノ酸レベルまたはジペプチドなどかなり低分子まで代謝される必要があると考えられる。しかし、本研究で用いた味噌サンプルのペプチド分画は、提供していただいたそのままの状態です試験に用いてしまったため、期待した改善効果がみられなかった可能性がある。

本研究での *in vitro* ストレス環境モデルにおいて、神経幹細胞および分化誘導した細胞の生存率や分化障害に対し、味噌（ペプチド分画）での

改善効果は残念ながら認められなかったのであるが、今後はより緩やかなコルチコステロン負荷条件の検討や味噌のペプチド分画をプロテアーゼ処理（こちらの処理条件も検討が必要）したものを調製して検証することが必要であると考えている。

#### 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、味噌サンプルのご提供ならびに本研究のご支援・ご協力頂きました一般社団法人中央味噌研究所をはじめ各関係者の方々に深謝申し上げます。

#### 【引用文献】

- 1) 瀬尾誠, 村越隆之 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, 35, 119-128, 2014.
- 2) 瀬尾誠, 荒木智之, 村越隆之 慢性拘束ストレスによる脳機能低下を改善する味噌中の生理活性ペプチドの探索. 中央味噌研究所研究報告, 36, 65-72, 2015.
- 3) Liu B, Zhang H, Xu C, Yang G, Tao J, Huang J, Wu J, Duan X, Cao Y, Dong J Neuroprotective effects of icariin on corticosterone-induced apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, 23, 59-67, 2011.
- 4) Mao QQ, Ip SP, Ko KM, Tsai SH, Zhao M, Che CT Peony glycosidides protect against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol.*, 29, 643-647, 2009.



# 研究助成報告

平成27年度研究助成による研究報告

## みそ汁の摂取による酸化ストレスの低下と それに伴う胃癌リスクの低減

荒木 智之<sup>1</sup>, 瀬尾 誠<sup>2</sup>

Decreasing of oxidative stress due to intake of miso soup and  
reduction of gastric cancer risk associated therewith

Tomoyuki ARAKI<sup>1</sup>, Makoto SEO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Saitama Medical University,  
38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan.*

<sup>2</sup>*Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University,  
1 Sanzo, Gakuen-cho, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan.*

### 【緒言】

日本人の死因の第一位は悪性新生物（癌）であり、特に胃癌は発症者数が全癌の中の一位を占め、これの予防と根絶は国民的悲願となっている。ヒトの体細胞は約60兆個からなるが、そのうちの2000個程度は日々癌細胞に生まれ変わっているとされている。通常、これらの癌細胞は免疫系によって排除されるため、疾病としての“癌”となることはないが、加齢・ストレス・その他の健康衰弱状態において癌細胞の新生・排除のバランスが崩れると癌が発症する。正常細胞が癌細胞に生まれ変わる原因の一つが酸化ストレスであり、細胞内に発生した活性酸素種がDNAに傷害を与えることにより癌化を引き起こす<sup>1-3)</sup>。また、活性酸素は細胞の老化を早め、癌以外にも様々な弊害を引き起こすことが知られている。本研究は、平山の先行研究<sup>4)</sup>に準じ、みそ汁が細胞内の酸化ストレスを軽減させることにより発癌リスクを軽減させていると予想し、みそ汁ががん予

防に与える効果について解明することを目的とした。

### 【材料と方法】

#### 1) 味噌試料

中央味噌研究所より供与いただいた、米みそ9種、豆みそ1種、麦みそ2種を各々10g秤量し、90℃の蒸留水100mlで溶いた後、ペーパーフィルターでろ過し、更に0.45 μmのフィルターでろ過したものを味噌試料とした。味噌の濃度は先行研究<sup>5)</sup>に従った。味噌試料は少量ずつ小分けし、-30℃で保存した。各々の実験の対照区には味噌汁の平均的な塩分量(NaCl相当)を計算し、NaCl水溶液(1g/100ml)として用いた。

#### 2) 味噌の抗酸化性の測定と細胞内SOD活性の測定

味噌の抗酸化性の比較は先行研究<sup>6)</sup>の方法に従

っておこなった。また、細胞内 SOD 活性の測定は SOD Assay kit-WST (DOJINDO) を用い、キットのプロトコールに従って行った。

### 3) 実験動物と培養細胞

実験動物は4週齢オスマウスを使用した。マウスは個別飼育とし、飲水(味噌抽出液)は毎日交換した。培養細胞は、ヒト胃がん由来培養細胞7種(AGS, KATOIII, MKH3, MKN1, MKN45, MKN74, NUGC3)は10%のウシ胎児由来血清を含むRPMI-1640培地(GIBCO社製)中で、37℃・5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した。細胞数の測定は、グリッド付きガラスボトムディッシュ(松浪硝子社製)上で細胞を培養した後、味噌試料と培地の混合液(1:1)に置換し、30分後に顕微鏡下でおこなった。

### 4) アポトーシスの検出(ウエスタンブロッティング)

通常培養をおこなった細胞培養液を味噌試料と培養液の混合液(1:1)に置換しインキュベーター中で静置した。30分後に細胞をPBSで洗浄し、細胞溶解液によって全タンパク質を抽出した。電気泳動とメンブレンへの転写は通常の方法でおこない、抗カスパーゼ3抗体(Cell Signaling社製)でプロットした。シグナルの検出はChemiDoc(BioRad社製)でおこなった。アポトーシスの数値化は、未成熟型カスパーゼ3の量に対する成熟型カスパーゼ3の量比でおこなった。

## 【結果と考察】

### 1) 味噌の抗酸化作用と細胞内SOD活性

味噌12種(図1A)に対し、各々が持つ抗酸化作用を測定した(図1B)。豆A味噌が最も抗酸化作用が強く、最も値の低かった米Aの3倍強の値を示した。この結果は、味噌抽出液の色の濃さと相関しているようであり、色の濃いものほど強い抗酸化作用をもつことが示唆された。味噌の色の濃さは熟成期間に関連し、メイラード反応によ

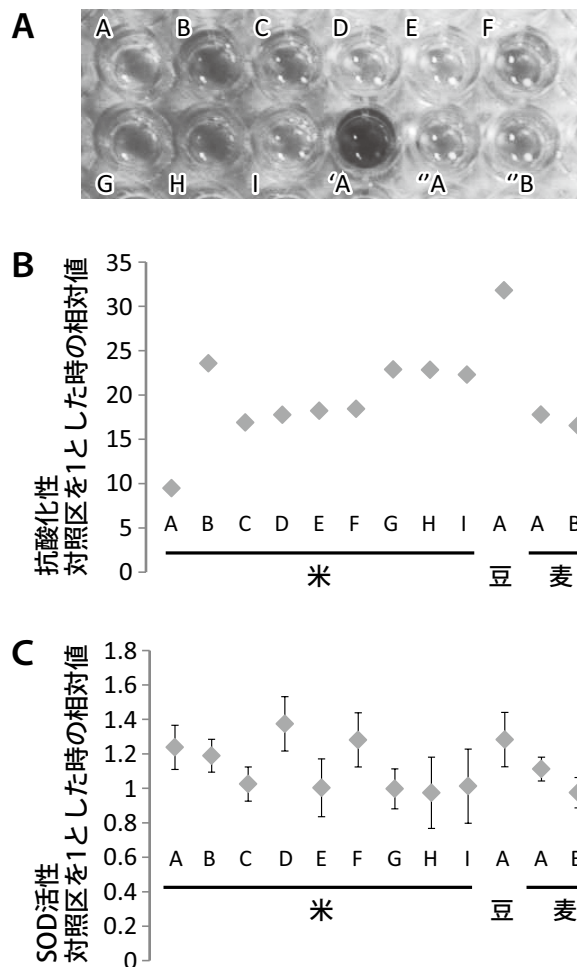


図1. 味噌抽出液と抗酸化ストレス能

- A: 味噌抽出液。各々のシンボルは米(無印)、豆(◕)、麦(◖)由来の味噌を示す。  
 B: 味噌抽出液の抗酸化能。  
 C: 味噌抽出液を投与したマウス胃のSOD活性。

るメラノイジン量の増加が抗酸化作用の増大につながったものと考えられる。また、大豆には抗酸化物質が豊富に含まれていることが知られており、米・麦由来の味噌に比べ高い抗酸化性を発揮したものと考えられる。

次に、味噌がもつ抗酸化作用が細胞内のフリーラジカルの減少を引き起こすかの検証を行うため、細胞内SODの活性を測定した。味噌抽出液をマウスの飲水とし、2週間後に胃細胞を取り出しキットによる測定をおこなった。対照区(蒸留水)を1として各味噌抽出液摂取群を比較した結果は図1Cのとおりである。各々の群において平均値として差が認められたものの、有意差は得られなかった。また、各味噌のもつ抗酸化作用の強

度との相関は認められなかった。これは、味噌抽出液が直接、胃細胞に作用するのに加え、消化管から吸収された有効成分が様々な修飾・分解を受け、体の内側から胃細胞に作用することにより、現象がより複雑になっていることを示唆している。

## 2) 味噌抽出液による細胞剥離の影響

味噌抽出液が癌細胞の増殖に与える影響を調べるため、胃癌由来培養細胞 (NUGC3) に味噌抽出液を添加しその影響を観察した。味噌抽出液と培養液を1:1の比で混合し、増殖期にある細胞に添加して0分後および30分後の顕微鏡像が図2Aである。豆味噌Aを添加した場合において、強い細胞剥離が認められた。一方、その他の味噌ではそのような影響は認められなかった (図2B)。また、豆味噌Aによる細胞剥離の影響は濃度依存的であった。更に、豆味噌Aによる細胞剥離の効果が細胞種によって異なるかどうかを調

べるため6種<sup>(註)</sup>の胃癌由来細胞 (AGS, MKH3, MKN1, MKN45, MKN74, NUGC3) に対し、同様の実験をおこなった。全ての細胞種において細胞剥離が認められたが、その効果は細胞種によって大きく異なっていた (図2C)。これは細胞種によって発現している受容体が量的に異なっていること、あるいは (同時に) 活性化されている細胞内シグナル伝達経路が異なっているためであると推察される。次に、静止期 (G1期) にある細胞に同様の効果があるかどうかを調べるため、培養ディッシュ内で100%コンフルエントに達した細胞群に対し上記の試験をおこなった。図2Dに示すとおり、それぞれに細胞剥離の影響が認められたが、その効果は増殖期に比べ低い値となった。また、更に長時間 (~1時間) まで培養時間を延長したところ、図2Cと同様、高い剥離率が認められた (データは示さない)。これらの結果から、高濃度の豆味噌A抽出液に曝された増殖途中にある胃癌細胞 (株) は細胞間接着が解除さ

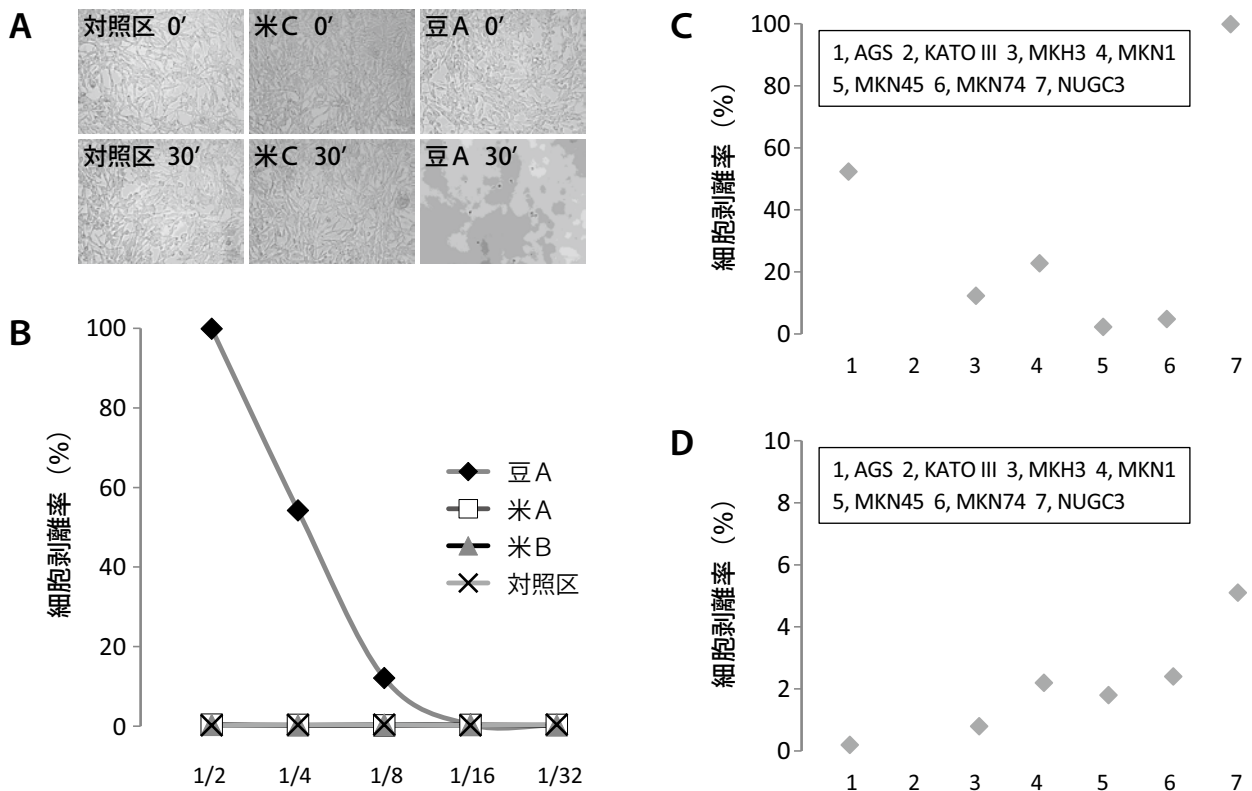


図2. 味噌抽出液と細胞剥離率

A: 味噌抽出液添加後0分と30分後の顕微鏡像。 B: 味噌の濃度と細胞剥離率。横軸は味噌抽出液の希釈倍率。 C: 増殖期の細胞剥離率。 D: 静止期の細胞剥離率。

れ、遊離状態になる一方、静止期にある細胞はその効果が薄いことが明らかとなった。

(注)：本実験課題のために用意した細胞種は7種であるが、KATOIIIは浮遊細胞であるため、本実験からは除外した(他の6種は接着細胞)。

### 3) 味噌抽出液による細胞死の誘導

図2の結果から、味噌抽出液は癌組織内において活発な増殖状態にある細胞群を組織から切り離す(結果として、癌組織を縮退させる)効果が期待されることが明らかとなったが、静止状態にある癌細胞群には効果が限定的であることが示唆された。そこで、静止期にある細胞群に対し、癌抑制効果が無いか調べるため、細胞死(アポトーシス)の検出をおこなった。静止期にある細胞群(NUGC3)に対し、味噌抽出液と培地の1:1混合液を添加し、30分後に全タンパク質を抽出して、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ3(caspase-3)を検出した結果が図3Aである。細胞剥離率の測定結果と異なり、豆味噌A以外にも多くの味噌でアポトーシスの誘導効果が認め

られた。しかし、米味噌Aはアポトーシスが検出されない(もしくは検出限界以下である)という結果になり、味噌種によって大きな差があることが明らかとなった。次にアポトーシス誘導効果の細胞種による違いを調べた結果が図3Bである。細胞剥離率の実験と同様、細胞種によって大きな違いが認められた。また、細胞剥離率とアポトーシスの誘導効果には相関性がなかった。

### 【総括と今後の展望】

本実験は酸化ストレスと胃癌との影響に焦点を当て、味噌摂取による影響を実験動物と培養細胞を使用して検証する計画としてスタートしたが、これには有意な差を認めなかった。しかしその一方で、味噌には 1) 活発に増殖している癌細胞間の接着を緩め細胞を遊離し、2) 静止期の細胞にあっても細胞死を誘導する効果があることが明らかとなった。今後は更に多くの種類の味噌においてこの効果を検証し、原料・成熟期間などによる違いを検証していきたいと考えている。また、酸化ストレスと同様、胃癌のリスクファクターであるピロリ菌に対し味噌が与える影響について調べていきたいと考えている。

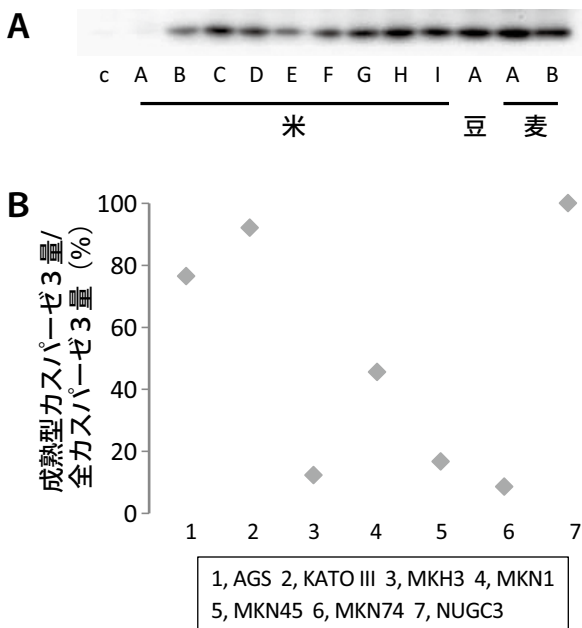


図3. 味噌抽出液と細胞死の誘導

A: 味噌抽出液添加後、30分後のカスパーゼ3のウエスタンブロット像。

B: Aと同様の実験を細胞種毎におこない数値化したもの。

### 【引用文献】

- 1) Simone Reuter et al., Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, Free Radic Biol Med.(2010) Dec 1; 49(11): 1603-1616
- 2) Venus Sosa et al., Oxidative stress and cancer: An overview, Ageing Research Reviews, (2013) Jan; 12(1) 376-390
- 3) Tania Fiaschi and Paola Chiarugi, Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: adiabolic liaison, Int J Cel Biol (2012) vol2012
- 4) 平山雄, みそ汁の摂取頻度と胃がん死亡率との関係 (1981) 日本がん学会年会
- 5) 瀬尾誠, 荒木智之, 村越隆之, 慢性拘束スト

レスによる脳機能低下を改善する味噌中の生理  
活性ペプチドの探索, 中央味噌研究所研究報  
告, 第36号

6) Kai Marxen et al., Determination of DPPH  
radical oxidation caused by methanolic

extracts of some microalgal species by linear  
regression analysis of spectrophotometric  
measurements., Sensors(2007) Oct; 7(10):  
2080-2095



## 味噌に含有される腎ナトリウム利尿因子の構造決定と 味噌製造への応用

千葉 志織, 野中 麻由, 山村 真結子, 清水 奈三子, 作山 裕恵, 上原 誉志夫

Natriuretic substances in Miso extracts and the properties of chemical structure  
— Application to manufacturing novel Miso rich in health benefits —

Shiori CHIBA, Mayu NONAKA, Mayuko YAMAMURA, Namiko SHIMIZU,  
Hiroe SAKUYAMA, 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

我々は、大豆発酵食品味噌を対象に食塩感受性高血圧を減弱する機序を解明することで、日本食文化と健康について科学的に実証することを目指し、これまで味噌関連の情報を発信してきた。味噌による食塩感受性高血圧抑制の意義とその機序を解明し、またそれを担う機能性栄養素を単離同定することは、味噌の機能性栄養素が多岐に渡ることから研究戦略的に困難を伴ってきた。しかし、最近、製造法が異なる複数の味噌について降圧機能特性を調査する機会に恵まれ、特に食塩感受性の抑制に重要であると考えられる腎Na代謝についての知見が進んだ。本報告書ではこれまでの一連の成果を解説するとともに、腎Na代謝と味噌の関係についての新たな成績について報告する。

### 味噌の降圧効果

Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いた研究から、長期味噌摂取は食塩感受性高血圧を抑制することを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。方法的には、味噌摂取と同等量の食塩摂取による食塩感受性高血圧への影響を比較検討した。Dahl 食塩感受性ラットは食塩摂取量に依存して血圧が上昇することから、食塩に対する血圧上昇反応性を測定することで、食塩感受性への影響を評価するものといえる。

すでに詳細に報告したように、長期味噌摂取は、食塩摂取による Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける血圧上昇を有意に抑制することから、本モデルラットでの食塩感受性を低下させたと判断された。一般的には、血圧が低下する場合には腎血流量は低下し腎Na排泄は低下することから、食塩感受性モデルでは血圧低下効果が減弱される。味噌による Dahl 食塩感受性ラットでの血圧抑制では、直接的な血管拡張作用の存在も予想

されたが、腎臓Na排泄促進効果が降圧の主体であると考えられた。

### 食塩感受性の抑制効果

この点を明らかにするために、Dahl 食塩感受性雌ラットを用いて降圧からの腎Na代謝への影響を極力減らした実験状況下で、味噌による腎Na排泄への影響を調べた<sup>2)</sup>。5%味噌水摂取したDahl 食塩感受性ラットでは同量の食塩水摂取群と比較して有意に血圧が低値を示したが、それには腎臓からのNa排泄量の増加（Naクリアランスの増加）とFENaの増加を伴っていた。このことは、味噌摂取により糸球体濾過量が増加して全体での尿中Na排泄が亢進したこと、さらにそれには腎尿細管でのNa再吸収自体の低下も関与していることを意味していた。味噌によるNa利尿は、糸球体濾過量の増加と尿細管機能の二つの側面から説明される。

実際、味噌摂取により食塩感受性高血圧に伴う腎臓の組織的障害の改善はすでに報告したところであり、この腎機能の改善は味噌による糸球体濾過量の増加とそれによるNa利尿に関与している可能性がある。一方、直接的血管拡張作用のあるカルシウム拮抗薬では腎血流量の増加によるNa利尿作用が知られている。味噌による腎血流量の直接的な増加によるNaクリアランス増の可能性も考えられた。

しかし、このような血行動態的な変化は、味噌によるFENaの増加を説明することができない。なんらかの腎尿細管Na再吸収を抑制するメカニズムが存在することが強く示唆された。

### 味噌製造と腎Na代謝への関係

味噌には複数の機能性物質が含まれることから、腎Na利尿因子の特性を明らかにするには本因子を分離精製した分画について調べることが必要である。まず、我々は、味噌の利尿活性が産生される製造上の条件について検討した。

餌	Regular	High Salt (4%)									
	水道水										水道水
週齢											大豆粗精製分画
										4	5
飼育期間	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

図1. 実験のデザイン

最近、味噌にはACE阻害活性があることが高橋らの研究から明らかになってきた<sup>3)</sup>。大豆発酵食品である醤油に含まれるACE阻害活性としてはニコチアナミンが知られている。ニコチアナミンは、大豆に含まれる分子量200~300 Daの低分子物質である。高橋らがACE阻害活性を指標に大豆から部分精製した大豆抽出粗精製分画を用いて、発酵前の大豆抽出物の降圧利尿特性について検討した。

4週齢雄Dahl-Iwai食塩感受性ラット（16匹）を用いて、9週齢から1)高食塩（4% NaCl, w/w）対照群（Control群）（8匹）及び2)高食塩（4% NaCl, w/w）治療群（Active群）（8匹）の2群に分け、4週間飼育した（図1）。Active群には、大豆由来粗精製物質水溶液（soybean crude extract, 大豆由来粗精製物質水溶液；0.45 mg/mL）（秋田県総合食品研究センター食品加工研究所 高橋砂織博士から提供）を、Control群には水を与えた。大豆由来粗精製物質水溶液は血中濃度がIC<sub>50</sub>の10倍（IC<sub>50</sub>=30 µg/mLから300 µg/mL）となるように設定した。図2にHPLC分析パターンを示した。標品ニコチアナミンは、RT 1.55 min近辺にあることが分かっている。大豆由来粗精製物質水溶液中にはそれに一致するピークの他にも、2.10 min及び2.57 minにピークが認められた。

Control群ではDahl食塩感受性ラットの血圧は時間とともに上昇したが、大豆由来粗精製物質水溶液を与えた群では6日目から有意に低下し、実験期間中Control群と比較して血圧の上昇が有意に抑制された（図3）。このときの尿中Na排泄量はControl群は11.30 ± 4.61 mEq/dayに

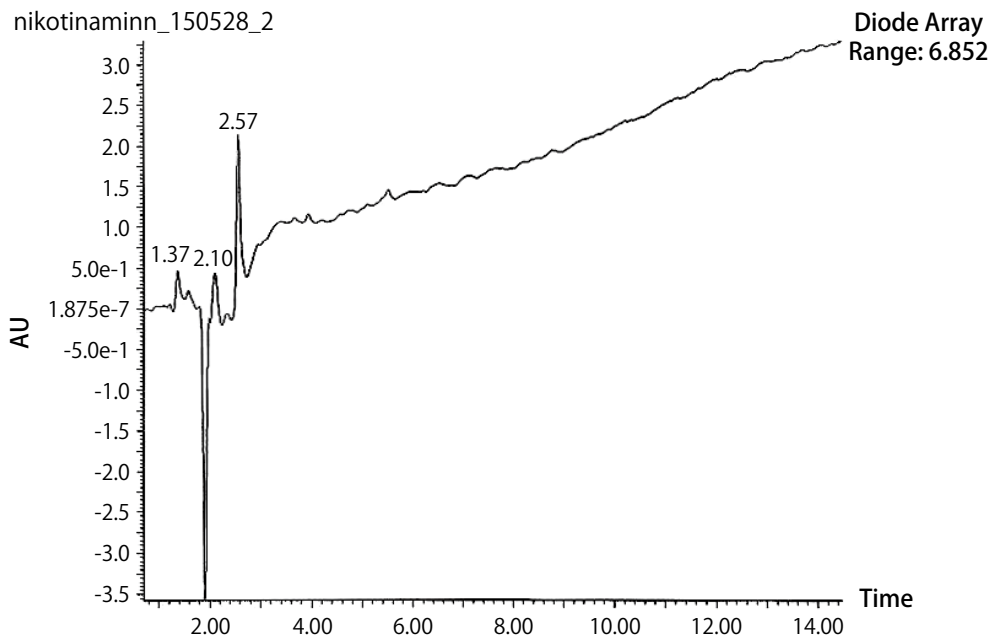


図2. 大豆抽出粗精製分画の C<sub>18</sub>-HPLC 分離パターン

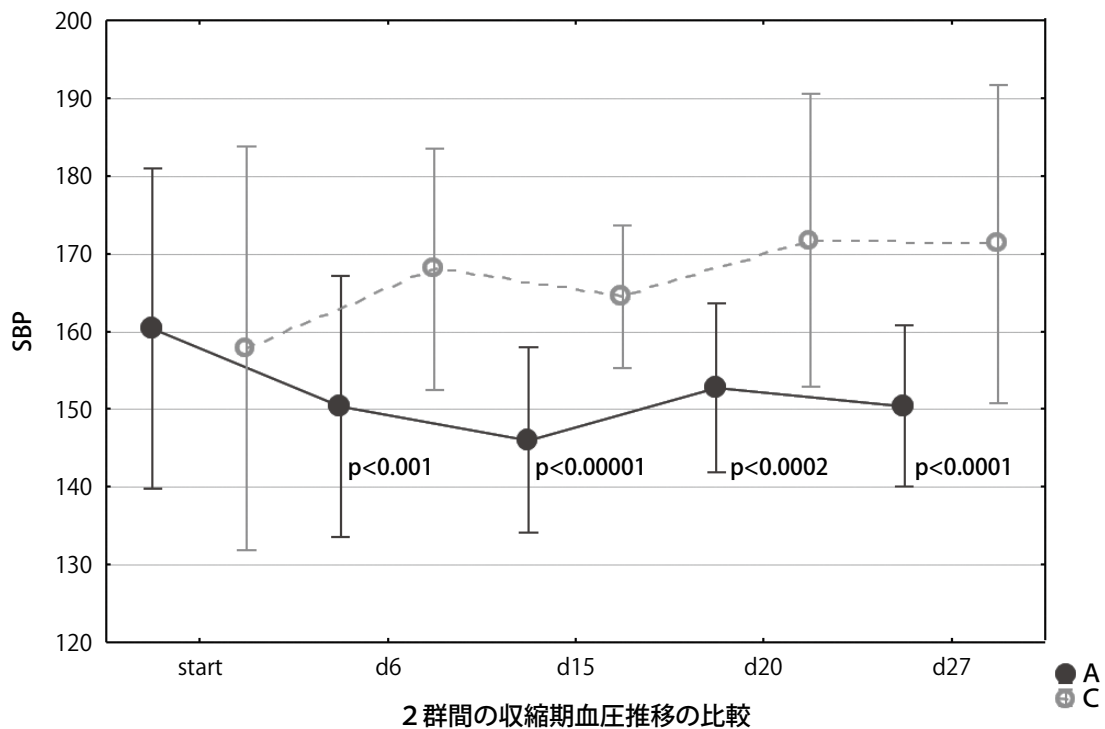


図3. 血圧の変化

Aは大豆抽出粗精製分画投与群を，Cは水摂取群を示す。

対し Active 群では  $11.99 \pm 1.15$  mEq/day と尿中 Na 排泄量に両群で有意な変化はみられなかった (図 4-a)。このことは、ナトリウムクリアラ

ンスを算出しても同様の結果であり、大豆由来粗精製物質水溶液摂取時にはこれまでの熟成味噌にみられたような尿中 Na 排泄は促進されない。

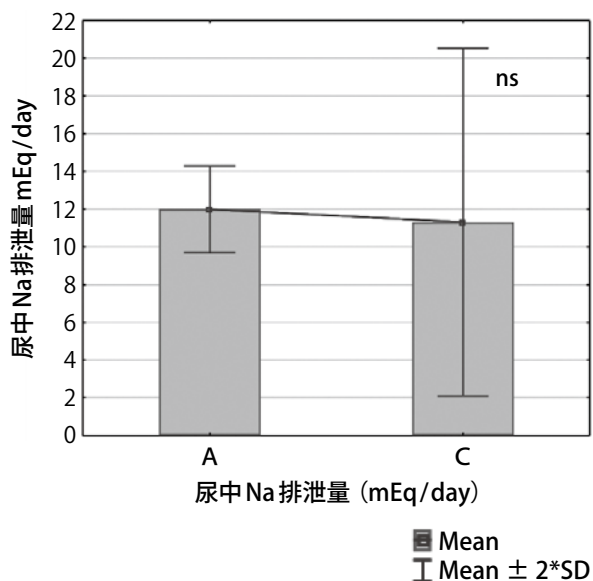


図4-a. 大豆抽出粗精製分画が尿中ナトリウム排泄量に及ぼす影響  
Aは大豆抽出粗精製分画投与群を，Cは水摂取群を示す。

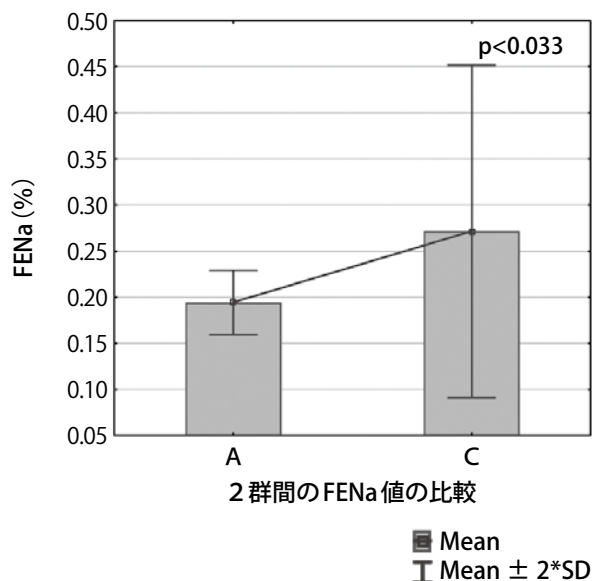


図4-b. 大豆抽出粗精製分画がナトリウム排泄分画 (FENa) に及ぼす影響  
Aは大豆抽出粗精製分画投与群を，Cは水摂取群を示す。

さらに FENa は大豆由来粗精製物質水溶液摂取時には水摂取に対し有意に低値を示した (図4-b)。このことは大豆由来粗精製物質中には腎 Na 排泄を促進する因子は存在しないことを示唆している。したがって、これまで報告してきた熟成味噌の降圧特性とは異なることを示している。大豆成分中には複数の降圧因子が存在していることが考えられるが、その中には腎 Na 排泄促進因子は存在しないと結論された。

#### 短期成熟味噌の降圧活性とその機序

腎 Na 排泄促進因子は味噌の熟成過程で発現されることが明らかになったことから、熟成早期味噌と熟成味噌の降圧特性について比較検討する必要がある。本結果については、平成 28 年度日本高血圧学会総会での発表を予定しているため、詳細は省略する。Dahl 感受性ラットにおける降圧には、Na 利尿依存性機序と非依存性機序とがあり、この両者により味噌の食塩感受性抑制効果が発現されると考えられる。

#### 熟成味噌の降圧機能性分画

味噌の降圧機能性のうちで Na 利尿に依存しない降圧機序として ACE 阻害作用が指摘されてきた。これまでの報告から、ACE 阻害物質としては分子量 1kDa 以下が推測されるため、分子量 <3kDa と >3kDa に分け味噌水の降圧機能性を検討した。白甘味噌を分子量 3kDa でカットし、

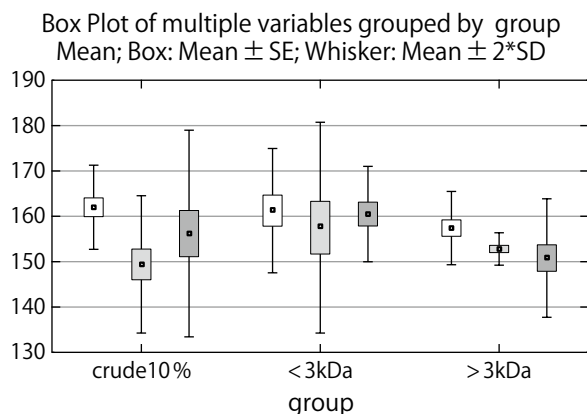


図5. 白甘味噌の分子量分画と降圧活性  
左から試験前値，味噌水投与後 2 時間値及び 4 時間値を表す。

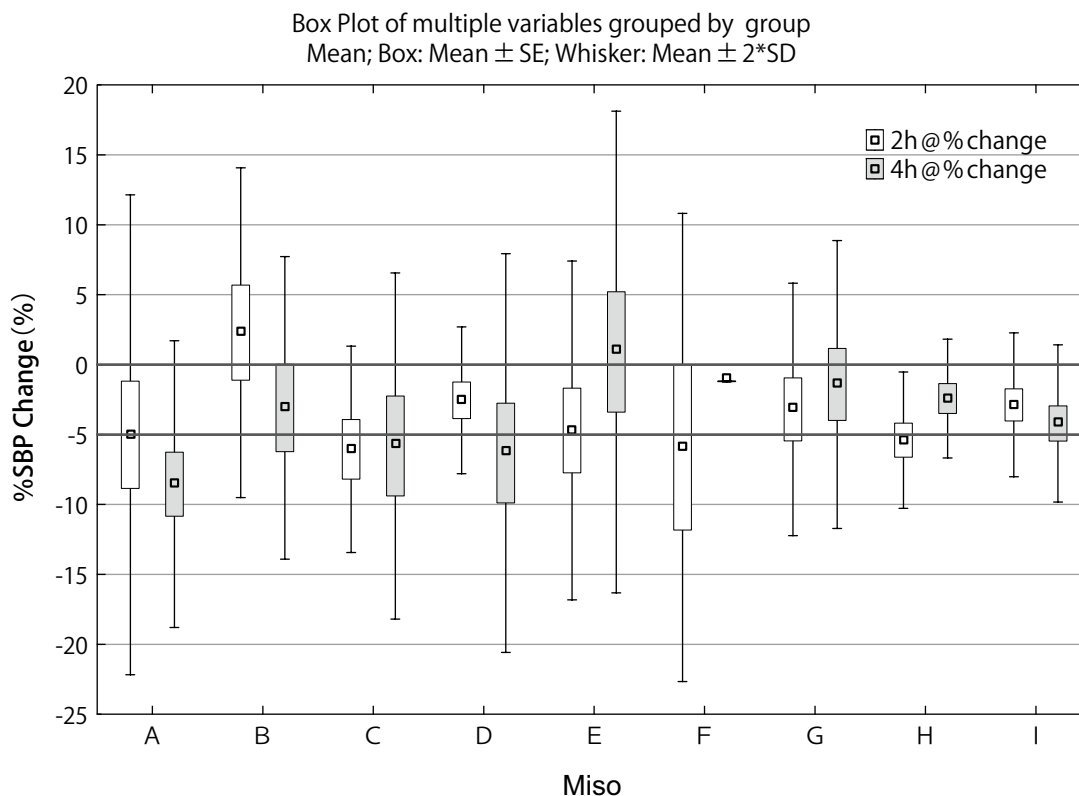


図6. 全国各地の味噌 >3kDa 分画を降圧活性 (Dahl 食塩感受性高血圧)

両者の降圧機能性を食塩高血圧 Dahl ラットに 50 mg 味噌成分を単回腹腔内投与した。図5に示すように、<3kDa 分画にはほとんど降圧活性がみられなかったが、>3kDa では投与後 2 時間、4 時間ともに血圧が低下した。これまで熟成味噌では、>3kDa により強い降圧活性を認めている。これらのことは、腎 Na 利尿に依存しない降圧活性は分子量 >3kDa に存在することが強く示唆された。

この点をさらに検討するため、全国各地の味噌について >3kDa の分画を作成し、降圧活性を 2 時間、4 時間で観察した (図6)。この結果から、味噌には製造法の違いにより 2 時間、4 時間に降圧活性を示す味噌と 2 時間のみに降圧活性を示す味噌があることが明らかとなった。さらに、>3kDa 分画には ACE 阻害活性がほとんど観察されないことから、この分画の降圧機序には ACE 阻害が関与しないことが示唆された。

これらの成績からは、Na 利尿因子の発現には味噌の一定期間の成熟が必要であること、ACE

阻害による降圧への寄与は比較的低いこと、分子量 >3kDa に降圧活性の主成分があること、その発現強度は米味噌 > 豆味噌 > 麦みその順であり、味噌により主たる降圧成分には違いがあることが明らかとなった。

#### 成熟味噌の降圧機能性成分の精製

熟成味噌の全分画には、強い降圧と腎 Na 利尿活性が存在することを明らかにしてきた。降圧活性の主成分が分子量 >3kDa にあることから、約 3 ヶ月熟成味噌の >3kDa 分画について、HPLC の分離パターンと降圧特性の関係について検討した。この分画について C18-HPLC にて構成成分を解析し、降圧特異性との関連性を調べた (図7)<sup>4,5)</sup>。C18-HPLC の分離プロフィールを 5 つに分け、それぞれの分画について Dahl 食塩感受性ラットの腹腔内投与時の降圧活性について調べた。ゾーン 2, 3 及び 5 において降圧活性が検出さ

れ、特にゾーン2において2時間と4時間に降圧が持続する降圧活性が観察された。熟成味噌で腎Na利尿活性が強まること、この活性が分子量3kDa<に存在する可能性が高いことから、ゾーン2が腎Na利尿活性物質であることが考えられた。

### 腎Na利尿機能性因子の検出法

腎Na利尿活性成分の精製には、より高感度のアッセイ系が必要となる。我々は、本アッセイ系の確立に向けて予備的に検討した。4週齢Dahl食塩感受性ラット購入後6週間は通常食塩食(0.75% NaCl, w/w)下で飼育し、自由飲水とした。実験前日は絶食とした。使用する味噌水は、これまで10% (w/v) 味噌水の長期摂取により腎Na排泄増加が認められたことから、本実験でも10%米麴味噌水(1.3% NaCl, w/v)を用いた。味噌溶液はオートクレーブ(120℃・20 min)にかけたものを使用した。

**手術手技：**①ソムノペンチル(100 mg/kgBw)で麻酔下に恥骨上部を切開した。②カニューレ(PE100)の先を加熱して丸めたものを膀胱に切込みを入れた部位から挿入した。③カニューレを糸で膀胱に固定し、縫合した。④その後、口からカニューレを胃内部に挿入し、シリンジで作成した味噌水1.5 mLを15分おきに4回与えた。⑤膀胱内に挿入したカニューレから排泄された尿をマイクロチューブに採取し、重量を測定。⑥尿は5000 rpmで5分間遠心分離を行い、その上清100 μLを新しいチューブに移し、凍結保存した。⑦10%味噌水(1.3% NaCl, w/v)と同じ塩分濃度の1.3%食塩水を作成し、味噌水と同様に実験を行った。電解質の測定方法：尿中Na, KおよびCr濃度は全自動分析器にて測定した(SRL, 東京)。

味噌投与時の尿量の変化を図8に示した。尿量は、食塩水摂取群と味噌水摂取群の両群間では全実験期間において有意な差がみられなかつ

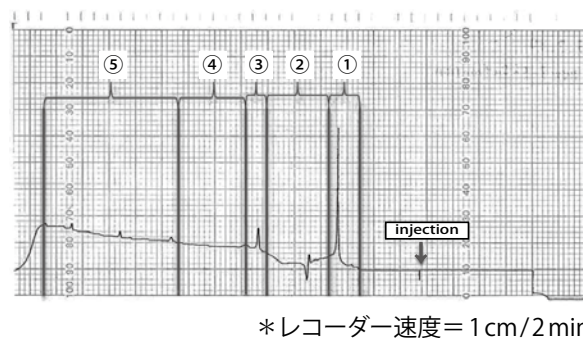
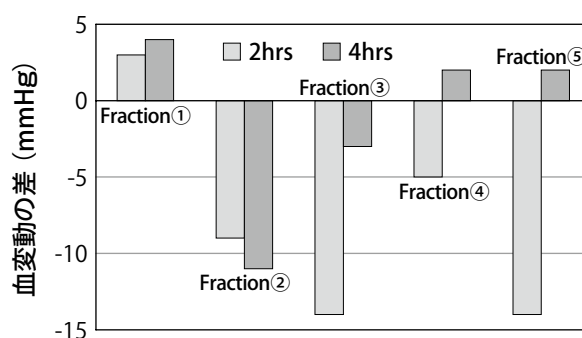


図7. 分取用C<sub>18</sub>-HPLC分離フラクションの降圧活性

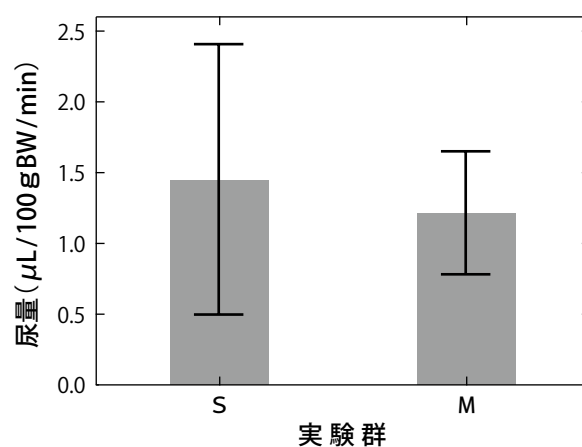


図8. 味噌水または食塩水摂取群の尿量変化  
Sは食塩水を、Mは味噌水を示す。

た(1.45 ± 0.38 vs 0.85 ± 0.70 μL/100 gBW/min, p=ns)。尿中のNa濃度を測定し、味噌水投与による尿中Na排泄量を算出した。尿中Na排泄量は、食塩水群が味噌水摂取群より有意に高値を示した(0.046 ± 0.009 mEq/100 gBW/min vs 0.025 ± 0.005 mEq/100 gBW/min, p<0.05)。味噌水摂取群と食塩水群でNa/K比

に有意な差がみられなかったが、味噌水摂取群ではNa/K比が増加傾向にあった。味噌にはレニン・アンジオテンシン系のアンジオテンシン変換酵素（ACE）の作用を抑制する成分が報告されている。これにより腎臓の尿細管でのアルドステロンの作用が抑制されていることも考えられた。

今回の研究で、味噌水注入で有意な腎Na利尿効果がみられなかったが、味噌を飲ませるタイミングと尿量をはかるタイミングが同じだったことが原因の一つだと考えられる。あらかじめ味噌水摂取を行うなどの実験方法の検討が必要と考えられた。しかし、今回手術方法を確立することはできたので、今後、味噌水の飲ませ方と採尿のタイミング、また腹腔内投与による腎Na利尿の有無の再検討など調査する予定である。

## 終わりに

味噌には、降圧機能性を示す複数の成分があることが分かった。分子量<3kDaにはACE阻害活性を示す大豆由来と考えられる機能性物質が存在するが、この分画は腎Na利尿作用を示さなかった。味噌は、食塩感受性高血圧のみならず自然発症高血圧に対しても降圧活性を示す。一方、分子量>3kDaには熟成味噌で強調される複数の降圧成分が存在し、このうち分析用C18-HPLC上RTが2.07分の分画に腎Na利尿活性がある可能性が強く考えられた。今回確立された腎Na利尿のアッセイ系を用いてこの分画を中心に腎Na利尿活性を検索する予定である。腎Na利尿機能性物質を同定することは、味噌による食塩感受性抑制機序を解明することに繋がり、味噌製造への応用が期待されると考えられる。

## 【文献】

- 1) 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(9):924-931.
- 2) Du D, 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. *Clinical Experimental Hypertension* 2014;36(5):359-366.
- 3) 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* 2014;35:129-140.
- 4) 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.
- 5) 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—電気泳動による降圧因子の抽出およびHPLCを用いた分析—. 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).



# 交流電界加熱による 味噌の連続酵素失活処理技術の開発

植村 邦彦

Inactivation of acid phosphatase in miso using a continuous joule heating

Kunihiko UEMURA

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

## 諸言

近年、昆布やかつお節の出しのエキスを加えた出汁入り味噌の販売が増加している<sup>1)</sup>。生の味噌には麴由来のフォスファターゼと呼ばれる酵素が含まれているため、出汁の成分であるグルタミン酸ナトリウムと核酸系調味料がフォスファターゼにより分解されることにより、出汁の味が変質する。したがって、出し入り味噌の製造工程において、出汁を加える前の味噌をあらかじめ85℃以上に加熱することにより、フォスファターゼを失活する加熱工程が設けられている。ただし、従来の加熱で味噌中心部を所望の温度まで昇温するためには、加熱時間が長くなり、ともすると味噌の色、香り、熱に弱い成分が変質することが問題となる。また、低塩味噌や加工用の味噌を製造する場合には、味噌中に含まれる可能性のある枯草菌芽胞のような耐熱性細菌を低減する必要があるため、100℃以上の加熱処理が必要となり、味噌の熱変性がさらに大きな問題となる。

筆者はH24年度の中央味噌研究所の研究助成に

より、パック詰め味噌の水中短波帯交流加熱処理技術を導入し、パック内の味噌の迅速均一加熱を実現した結果、味噌の酵素を従来加熱よりも10℃以上低い温度で失活することを見出した<sup>2)</sup>。

本研究では、実用化に必要な連続加熱処理を可能とするため、連続交流電界処理（連続通電加熱）を行うことにより、味噌を短時間で連続的に加熱し、味噌中のフォスファターゼ活性の低減、さらには耐熱性芽胞を低減することを目指した。

## 方法

### 試験材料

中央味噌研究所から提供された米味噌を供し材料とした。

### 枯草菌芽胞

枯草菌（PCI219）の芽胞懸濁液10 mLを2.5 kgの味噌に混練し、殺菌用の試料とした。



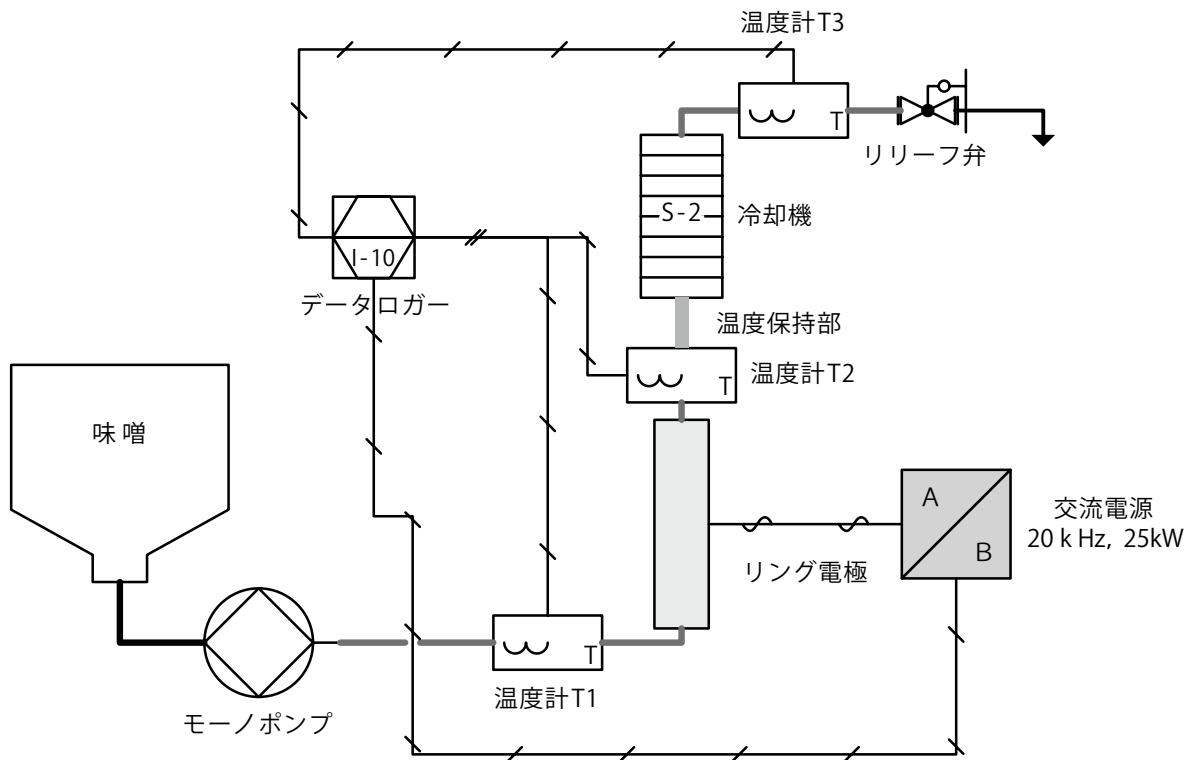


図1. 連続通電加熱装置

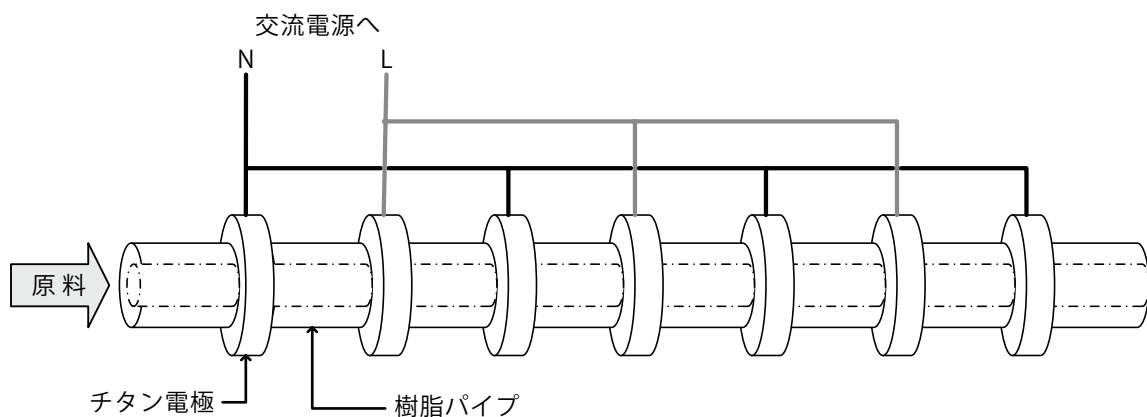


図2. リング電極

### 連続通電加熱装置

図1に示す装置で味噌の連続加熱を行った。モノポンプ（兵神装備，2NL10F）で味噌を1.0 kg/minの一定流速でラインに挿入した。交流電界印加電極ユニットは内径φ10 mm，長さ20 mmのチタニウム製リング状電極7個および内径φ10 mm，長さ45 mmの樹脂製パイプ8個を交互に縦列接続した構造とした（図2）。20 kHz，

25 kWの交流電源の出力の接地側（N）と非接地側（L）ケーブルを7個の電極にNLNLNLNの順番で交互に接続し，電極と電極の間の6個の樹脂パイプ内の味噌中を交流電流が流れて通電加熱されることにより，味噌の温度が上昇する。電極の入口，電極出口の配管中心に熱電対温度計を挿入し，味噌の加熱前温度T1と加熱温度T2をそれぞれ測定した。味噌の加熱温度は，印加

電圧を70 V～130 Vで変化させることにより、50℃～105℃まで上昇した。通電加熱された味噌は2重管の熱交換器で80℃以下に冷却し、温度測定（T3）後、リリースバルブでライン内を0.5 MPaに加圧しながら、処理した味噌を排出した。50 mLの遠沈管にサンプリングした味噌は、直ちに氷水に浸し、室温以下に冷却した。

#### 従来加熱処理 1

味噌50 gをジブロック内で、厚さ5 mm以下になるように薄く延ばし、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃の恒温槽に5分間浸して加熱後、直ちに氷水中で冷却した。

#### 従来加熱処理 2

50 mLのプラスチック遠沈管（アズワン、ECK-50ML, 日本）に50 gの味噌と中心部に温度計を挿入したものを密栓し、100℃の沸騰水中に5分～60分間浸して加熱後、直ちに氷水に浸して冷却した。

#### 酸性フォスファターゼ活性の測定

10 mM p-nitrophenyl phosphate 溶液 1 mL, 50 mM クエン酸緩衝液 (pH5.5) 0.2 mL および純水0.5 mLを含む試験管に、粗酵素液0.2 mLを加えて反応を開始させた。20分後、0.2N NaOH 溶液 2 mLを加えて反応を停止させ、20分間静置した後、405 nmにおける吸光度を測定した。

#### 色差測定

分光型色彩色差計(コニカミノルタ, CM-5)を用いて、味噌の色差L\*, a\*, b\*を測定した。

#### 芽胞菌数の測定

サンプルの味噌1 gに9 mlのリンゲル水を加え、スタマッカーで溶解し、必要に応じてリンゲル液で希釈した。Nutrient Agarと混釈し、37℃の恒温槽で48時間培養後、枯草菌のコロニー数をカウントした。

## 結果および考察

### 従来加熱および通電加熱によるフォスファターゼの失活

味噌をジブロックに入れて加熱（従来加熱1）した時の加熱温度および通電加熱の加熱温度が味噌のフォスファターゼ活性に与える影響を図3に示した。図より、従来加熱では60℃以上で活性が低下し80℃で失活した。通電加熱では50℃で活性が低下し、70℃で失活した。この結果より、通電加熱は従来加熱に比べて約10℃低い温度でフォスファターゼを失活することが分かった。

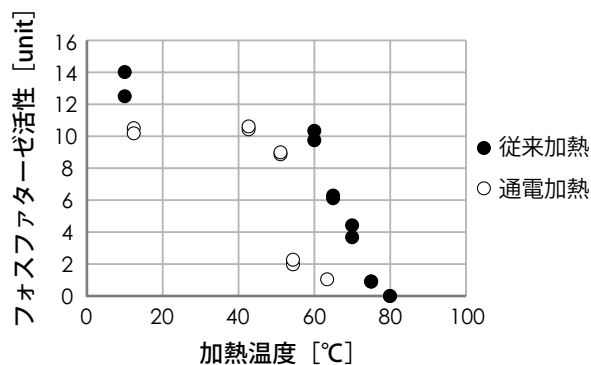


図3. 従来加熱（ジブロック内の味噌）と通電加熱がフォスファターゼ活性に与える影響

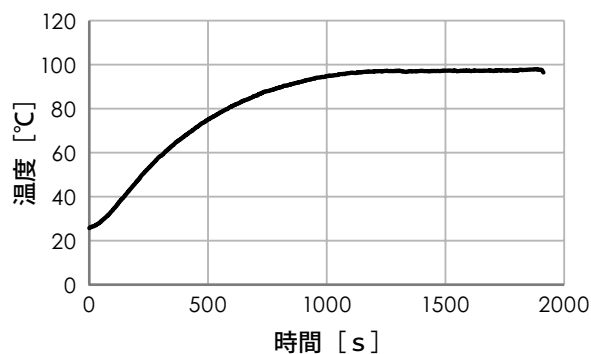


図4. 従来加熱の温度履歴 (50 mL 遠沈管、味噌の中心温度)

**従来加熱および通電加熱の温度履歴**

図4に100℃の温水で30分間加熱（従来加熱2）した場合の、味噌中心部の温度履歴を示した。味噌の中心温度が97℃まで上昇するのに20分かかった。図5に通電加熱で味噌を105℃まで加熱した場合の、味噌の温度履歴を示した。

**従来加熱および通電加熱の枯草菌芽胞の失活効果**

図6に100℃の沸騰水中での加熱時間が枯草菌芽胞の残存菌数に与える影響について示した。この結果より、加熱時間が長くなるにつれて残存菌数が低下し、60分間加熱した時、約1.5対数減少した。

図7に通電加熱による味噌の加熱温度が枯草菌芽胞の残存菌数に与える影響を示した。この結果より、味噌の温度が100℃以上で残存菌数が著しく低下し、105℃で3対数減少した。

**従来加熱および通電加熱が味噌の色に与える影響**

図8より、従来加熱による味噌は加熱時間が長くなるほど褐変し、輝度（L\*）が大きく低下した。通電加熱した味噌は105℃まで昇温した場合

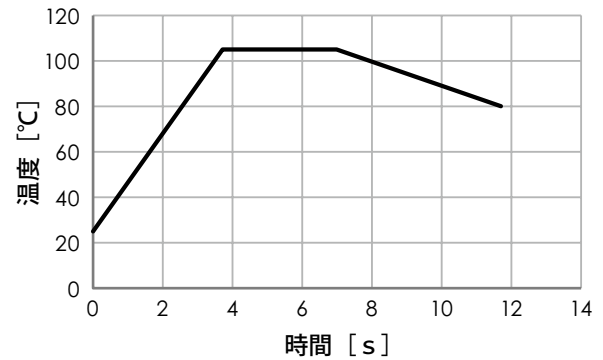


図5. 通電加熱の味噌の温度履歴 (105℃まで昇温)

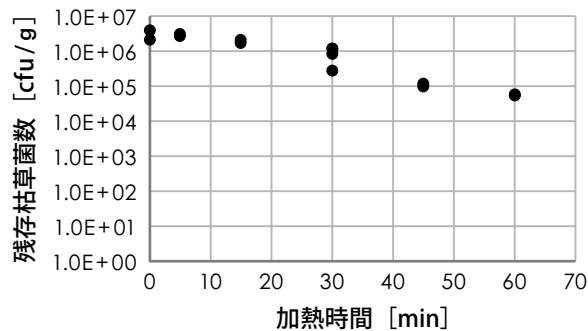


図6. 100℃の温浴加熱時間が残存菌数に与える影響

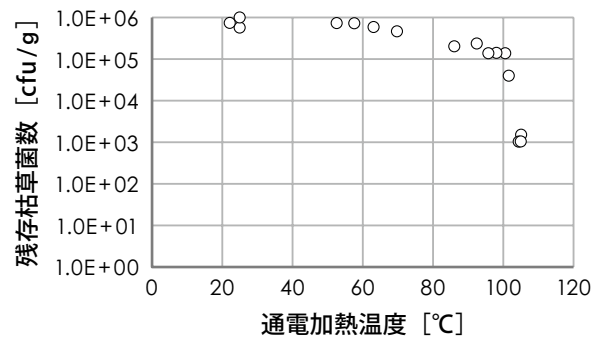


図7. 通電加熱の温度が残存菌数に与える影響

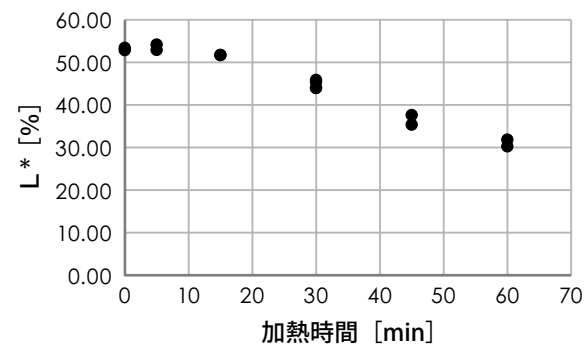


図8. 従来加熱時間が味噌の色（L\*）に与える影響

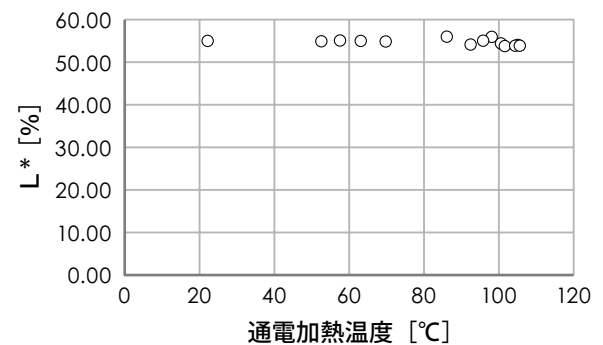


図9. 通電加熱時間が味噌の色（L\*）に与える影響

でも褐変せず，輝度（L\*）の低下は認められなかった。

## 要 約

連続通電加熱を味噌の加熱に適用することにより，味噌中のフォスファターゼを従来加熱よりも10℃低い70℃で失活可能なことが分かった。また，味噌中の耐熱性芽胞の失活では，連続通電加熱で105℃まで加熱した場合，従来加熱よりも短時間の処理で，褐変を生じることなく高い殺菌効果が得られることが分かった。本研究で用いた連続通電加熱処理は，味噌の連続大量処理が可能であることから，今後の実用化が期待される場所である。

## 謝 辞

本研究の遂行では，一般社団法人中央味噌研究所理事長を始め，各関係者の方々のご支援に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 新・みそ技術ハンドブック 付 基準みそ分析法. 全国味噌技術会, p1, (2006)
- 2) 植村邦彦, 高橋千栄子, 小林功, 短波帯加熱処理による包装済み味噌の酵素の失活. 日本食品科学工学会誌, 61(2), 95-99, 2014
- 3) 植村邦彦, 高橋千栄子, 金房純代, 小林功, 連続通電加熱による味噌中のフォスファターゼ失活, 日本食品科学工学会誌, 63(12), 575-577, 2016
- 4) 植村邦彦, 高橋千栄子, 金房純代, 小林功, 連続通電加熱による味噌の殺菌, 日本食品科学工学会誌, 63(11), 516-519, 2016

# 高 HEMF 産生味噌酵母の接合による育種

尾形 智夫

Breeding of miso yeast that produces high HEMF by mating

Tomoo OGATA

Department of Biotechnology, Maebashi Institute of Technology,  
460-1 Kamisadori, Maebashi, Gunma 371-0816, Japan.

## 1. 序論

HEMF (2-(or 5-)-ethyl-5(or 2)-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone) は、味噌酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* が産生する、味噌の品質を高める香気物質であるとともに、強い抗酸化性より、抗ガン性等の生理活性も注目されている物質である。本研究では、HEMFを高産生する味噌酵母 *Z. rouxii* を接合育種する手掛かりを

つかむことをめざしている。接合育種とは、酵母の接合性 **a** を示す細胞と接合性  $\alpha$  を示す細胞間で接合し、**a**/ $\alpha$ 細胞となり、接合性を示さなくなる現象を利用した育種法である（図1）。育種された酵母菌株は、遺伝子組み換え体には該当しないので、有望な酵母育種法であるといえよう。

本研究では、最初に、HEMFのHPLCによる定量法を確立し、次に、接合育種を試みた。最後に、味噌酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の接合性にかかわる遺伝子群の調査をおこなった。

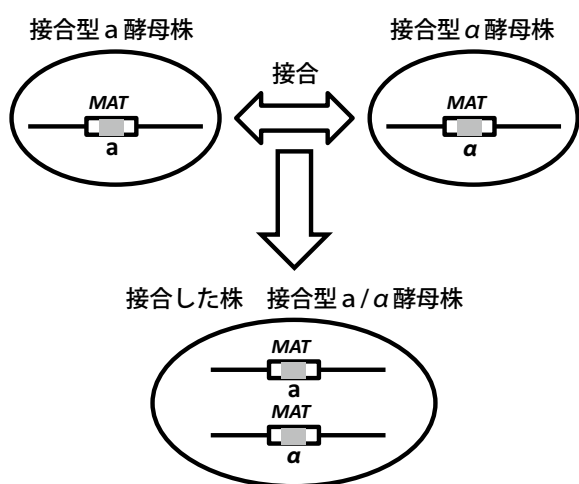


図1. 酵母の接合

## 2. 実験材料と実験方法

### (1) 実験材料と培地

味噌酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* は、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）のバイオテクノロジーセンター（NBRC）より入手した。タイプストレインであるNBRC1130、NBRCの菌株リストに接合性  $\alpha$  と記載されているNBRC0740、1877と、接合性 **a** と記載されているNBRC1876を使用した。培地は、YPD培地（1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose）を使用した。HEMFの産生培地としては、Sugawaraら

の報告<sup>1)</sup>にあった培地 (2.5% ribose, 1% glycine, 7.5% glucose, 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% MgSO<sub>4</sub>, 0.5% yeast extract) を使用した。

## (2) HPLC による HEMF 定量法の確立

培地上清の HEMF は、HPLC によって定量した。Dahlenらの方法に基づき<sup>2)</sup>, HPLC システム 島津製作所製 LC-10AT, カラムは、逆相 Luna C18 (particle size 5 μm), 250×4.6 mm, 検出は、UV285 nm, 分離条件は、0.05%ギ酸 95%, アセトニトリル 5%から、10分間で、0.05%ギ酸 80%, アセトニトリル 20%, その後、20分間で、アセトニトリル 100%となるグラディエント分析をおこなった。

## (3) 味噌酵母 *Z. rouxii* の接合実験

NBRC の菌株リストに、接合性 α と記載されている NBRC0740 に、シクロヘキシミド耐性の選択マーカーを付与した。シクロヘキシミド耐性の付与は、NBRC0740 を、EMS (エチルメタンサルホン酸) で変異処理し、YPD 寒天培地に、シクロヘキシミド 5 μg/ml でコロニーを形成する菌株を分離することでおこなった。分離されたシクロヘキシミド耐性酵母株を、NBRC0740-CYR1 と命名した。接合は、この NBRC0740-CYR1 と、NBRC の菌株リストに、接合性 a と記載されている NBRC1876 を、1細胞ずつ、マイクロマニピュレーターで釣菌し、YPD 寒天培地上に接触させ、形成されたコロニーが接合されているかを調べた。形成されたコロニーが、接合された酵母菌株であるかは、シクロヘキシ

ミド耐性、および *ZYRO0C18458g* 遺伝子座の PCR (プライマー upC18458g, downC18458g) によって確認した。PCR に用いたプライマーの DNA 塩基配列は、表 1 に示した。

## (4) 味噌酵母 *Z. rouxii* の接合関連遺伝子座の PCR

酵母菌株の接合性を確認するため、あるいは、接合されたことを確認するため、味噌酵母の接合性関連遺伝子座 (*MAT* 遺伝子座, *HML* 遺伝子座, *HMR* 遺伝子座) を、PCR によって調べた。*MAT* 遺伝子座, *HML* 遺伝子座, *HMR* 遺伝子座に共通する Y $\alpha$  あるいは Y $\alpha$  と Z に関する PCR は、プライマー Y $\alpha$  と Zrev あるいは、Y $\alpha$  と Zrev を用いた。*HML* 遺伝子座については、プライマー Y $\alpha$  と down HML あるいは、Y $\alpha$  と down HML を、*HMR* 遺伝子座については、プライマー Y $\alpha$  と down HMR あるいは、Y $\alpha$  と down HMR を用いた。*MAT* 遺伝子座の上下流は、プライマー upMAT と downMAT を用いた。各プライマーの DNA 塩基配列は、表 1 に示した。

## 3. 実験結果および考察

### (1) HPLC による HEMF 定量法の確立

味噌酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC 1130 を用いて、Sugawaraらの HEMF 産生培地で、25°C, 1週間培養した培養上清を測定したところ、HEMF が検出された (図 2)。培養上清の

表 1. 本研究で使用したプライマー

プライマー名	配列 (5' - 3')
upC18458g	CCTTCTTTACCTGGAGCGAGCTCTTCTTTGAG
downC18458g	TTAACACCTTCCTCGTTTCGTTAACTGCCGT
Y $\alpha$	ATTGCAAGAAAAGGTAATACATCATAGAAGCCCCA
Y $\alpha$	ATATAGGATGCAGTATTCAGGAATTGTATCACAG
Zrev	CTATAATACAATTAACGCATCAGATAACTACAC
down HML	TCAGTACCAGAAGTGGTCTTTGAAACGATTGCCGC
down HMR	CCTACAATACTCTATTTTCGTCGGTTTATCGTTGGT
upMAT	TGCGCGCAGCGCATGATATGAAACGAAGATGCAAC
downMAT	CTATAACCAACCAGTTAGTGTGTTATCGATAAGTC

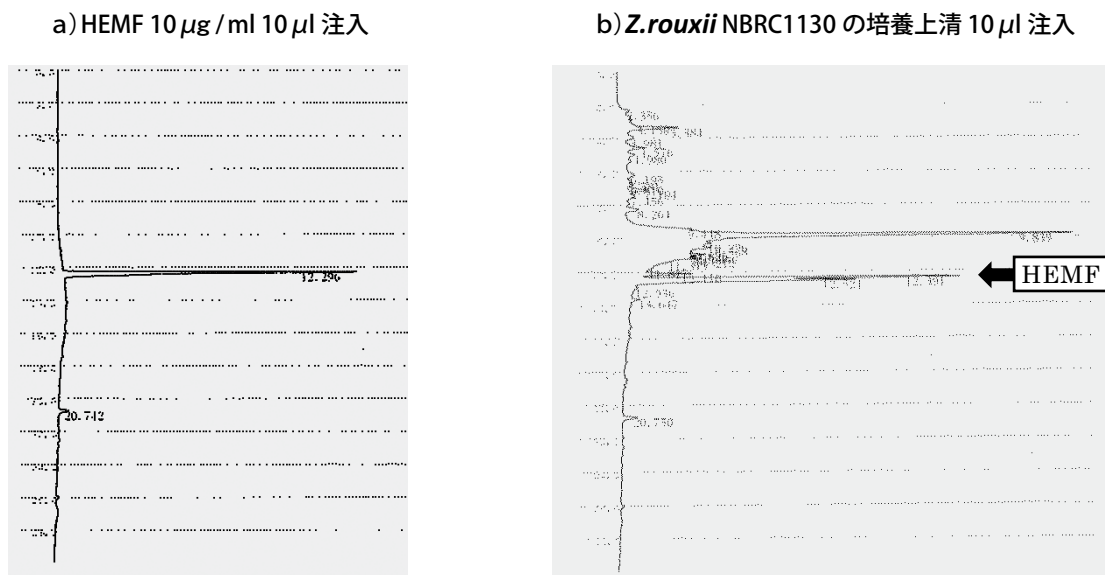


図2. HEMFのHPLCチャート

HEMF濃度は、 $18\mu\text{g/ml}$ であった。SugawaraらのHEMF産生培地は、2% ribose, 1% glycine, 7.5% Glucose等からなる。HEMF (C7化合物)は、味噌酵母内で、ribose等のペントース (C5化合物)とアセトアルデヒド等のC2化合物が反応して形成されると考えられている<sup>2),3)</sup>。これを確認するために、riboseを含まないHEMF産生培地と2% riboseを含むHEMF産生培地で、味噌酵母 *Z. rouxii* NBRC1130を $25^{\circ}\text{C}$  1週間培養し、培養上清のHEMF濃度を測定した。その結果、riboseを含まない培地では、HEMFは産生されず(表2)、HEMF産生には、ribose等のペントースが必要であることが示された。また、この知見を利用して、プリン生合成遺伝子に変異があると、HEMF高産生味噌酵母育種できる可能性が考えられた(図3)。これは、Ueharaらの報告<sup>4)</sup>とも一致しており、今後の展開が期待される。

### (2) 味噌酵母 *Z. rouxii* の接合実験

NBRCの菌株リストに、接合性  $\alpha$  と記載されているNBRC0740に、シクロヘキシミド耐性の選択マーカーを付与した変異株NBRC0740-CYR1を分離した(図4)。この酵母菌株と、NBRCの菌株リストに、接合性  $\mathbf{a}$  と記載されて

表2. HEMF産生に関する培地中riboseの影響

	HEMF濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	1週間培養	2週間培養
ribose 無	N.D.	N.D.
ribose 有	$37.0 \pm 12.2$	$34.5 \pm 3.1$

値は、平均値  $\pm$  標準偏差 で示した。  
N.D. 検出限界 ( $0.1\mu\text{g/ml}$ ) 以下

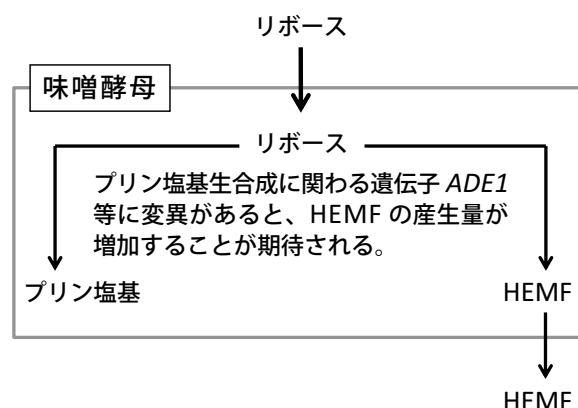


図3. HEMF産生量増加のために考えられる酵母育種

いるNBRC1876を、1細胞ずつ、マイクロマニピュレーターで釣菌し、YPD寒天培地上に接触



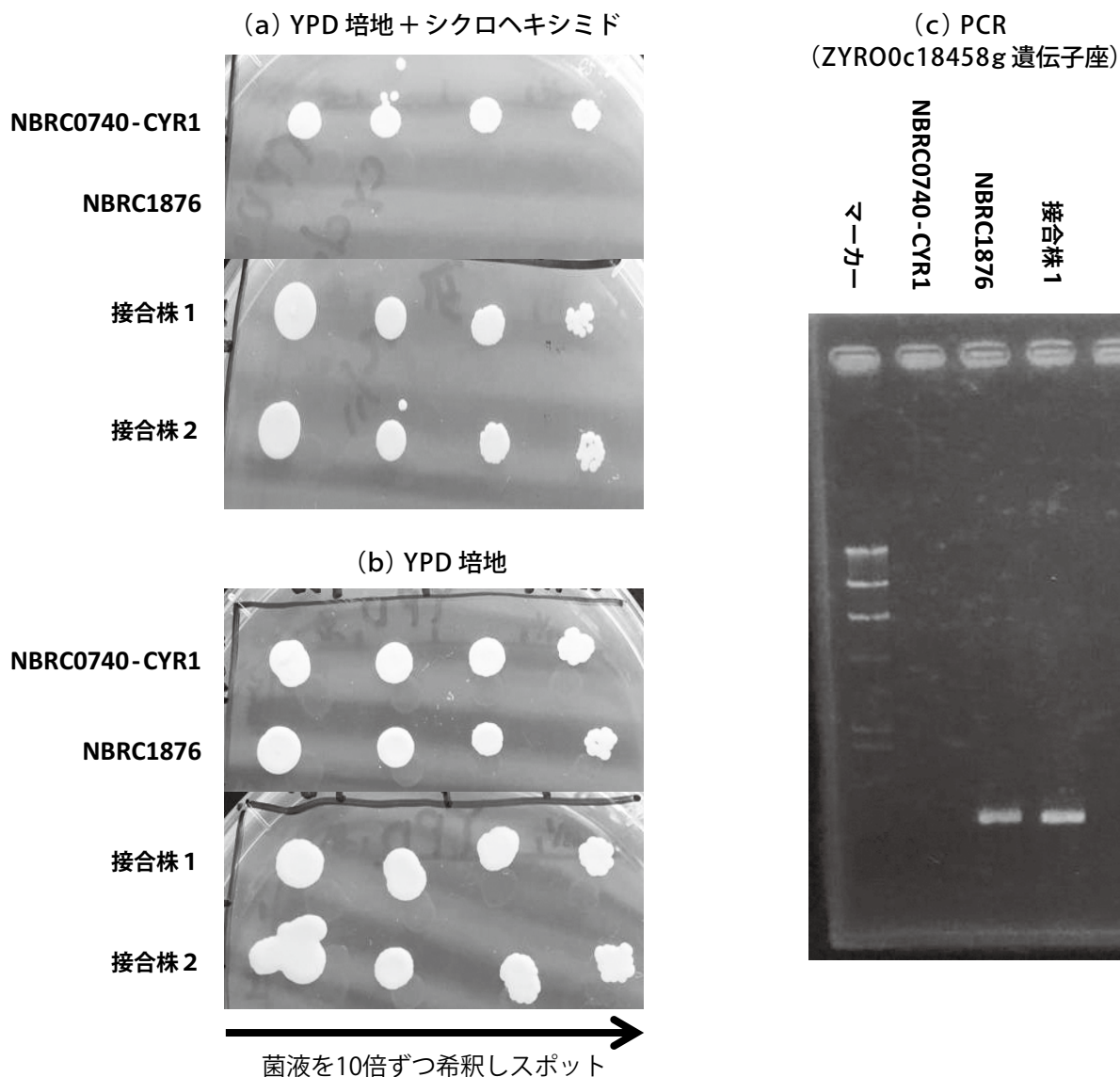


図4. NBRC0740-CYR1 と NBRC1876 の接合の確認

させ、形成されたコロニーのシクロヘキシミド耐性、および *ZYRO0C18458g* 遺伝子座を PCR

表3. 接合株とその親株の HEMF 産生量

	HEMF 産生濃度 (μg/ml)		
	1 週	2 週	3 週
親株 NBRC1876	60	59	75
親株 NBRC0740CYR-1	57	71	60
接合株 NBRC0740-CYR1/1876-1	48	80	46
接合株 NBRC0740-CYR1/1876-2	36	46	49
接合株 NBRC0740-CYR1/1876-3	43	51	44
接合株 NBRC0740-CYR1/1876-4	29	48	43

によって確認した。*ZYRO0C18458g* 遺伝子座は、接合性  $\alpha$  と記載されている NBRC0740 には存在しないので、形成されたコロニーが接合株である場合には、存在することが期待される。結果は、図4に示した。接合株は、一方の親株である NBRC0740-CYR1 のシクロヘキシミド耐性を有していた (図4(a))。一方、接合株は、もう一方の親株である NBRC1876 に有する *ZYRO0C18458g* 遺伝子座を有していた (図4(c))。以上の結果より、形成されたコロニーは、接合株であり、NBRC0740-CYR1/1876-1,2,3,4 と命名した。これらの接合株の HEMF 産生能を培養 3



週間調べた。結果は、表 3 に示した。親株あるいは、接合株に大きな差異は、見い出せなかった。従って、*ZYROOC18458g* 遺伝子およびその周辺の遺伝子の存在が、HEMF 産生に大きな影響をもたらすものではないと考えられた。

### (3) 味噌酵母 *Z. rouxii* の接合性関連遺伝子群の調査

接合に用いる酵母菌株の接合性の確認や接合したことを確認するために、接合性関連遺伝子群を確認する必要がある。味噌酵母 *Z. rouxii* CBS732 (NBRC1130) のゲノム配列解析より、予想される接合型遺伝子群は、図 5 の通りである<sup>5)</sup>。酵母の接合性は、*MAT* 遺伝子座に挿入されている遺伝子配列によって表現されていると考えられている。*MAT* 遺伝子座に、*Ya* 配列が挿入されていると、接合性 *a* となり、*Yα* 配列が挿入されていると、接合性 *α* となる。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、*HML* 遺伝子座には、*Yα* 配列が挿入されており、*HMR* 遺伝子座には、*Ya* 配列が挿入されているが、*HMR* 遺伝子座、*HML* 遺伝子座ともに、遺伝子発現は抑制されている。

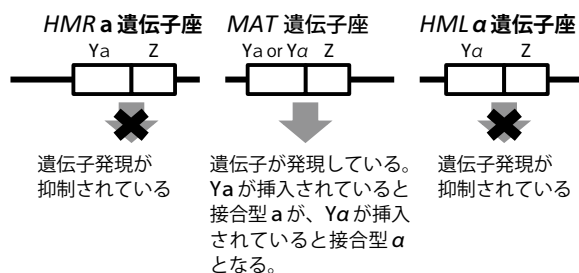


図 5. *Z.rouxii* のゲノム配列解析から予想される酵母の接合性関連遺伝子群について

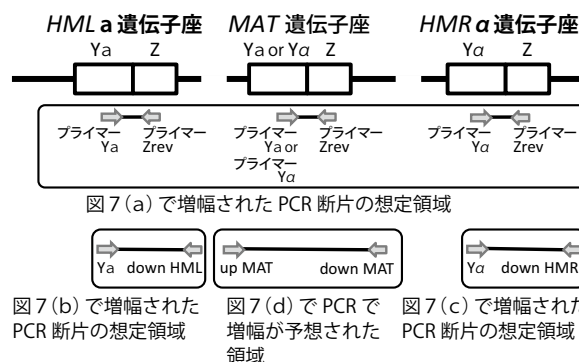


図 6. 味噌酵母 *Z.rouxii* のゲノム配列解読から予想された接合性関連遺伝子群を明らかにするための PCR 実験について

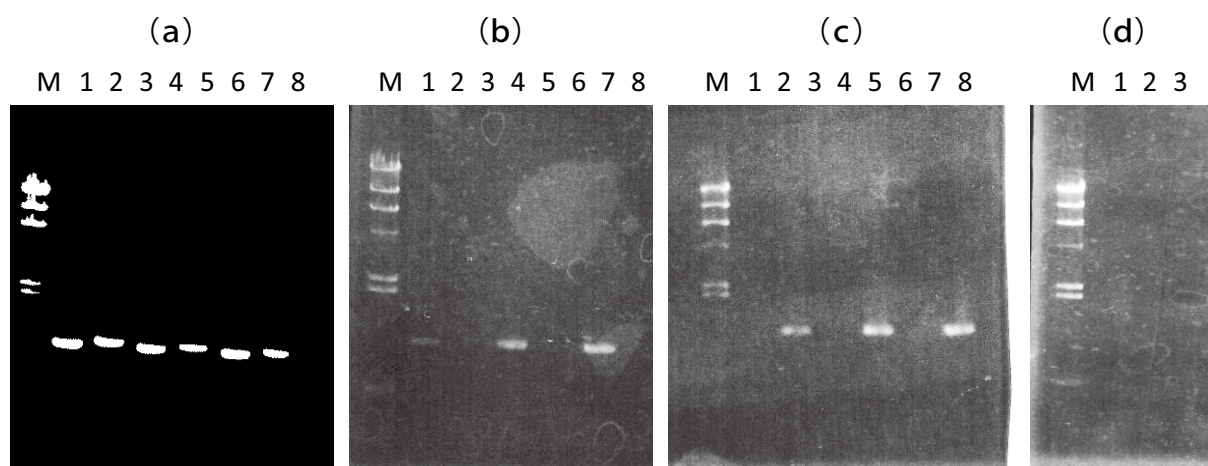


図 7. *Z.rouxii* の接合性関連遺伝子群の PCR 実験結果

- (a) プライマー *Ya*, *Zrev* (lane 1, 3, 5, 7), *Yα*, *Zrev* (lane 2, 4, 6, 8)  
 テンプレート NBRC1130 (lane 1, 2), NBRC1876 (lane 3, 4), NBRC1877 (lane 5, 6)
- (b) プライマー *Ya*, *downHMR* (lane 1, 3, 5, 7), *Yα*, *downHMR* (lane 2, 4, 6, 8)  
 テンプレート NBRC1130 (lane 1, 2), NBRC1876 (lane 3, 4), NBRC1877 (lane 5, 6)
- (c) プライマー *Ya*, *downHML* (lane 1, 3, 5, 7), *Yα*, *downHML* (lane 2, 4, 6, 8)  
 テンプレート NBRC1130 (lane 1, 2), NBRC1876 (lane 3, 4), NBRC1877 (lane 5, 6)
- (d) プライマー *upMAT*, *downMAT*  
 テンプレート NBRC1130 (lane 1), NBRC1876 (lane 2), NBRC1877 (lane 3)

酵母株の接合性には影響しないと考えられている(図5)。接合関連遺伝子群を調べた *Z. rouxii* の菌株は、タイプストレイン(分類標準株)である NBRC1130 と、製品評価技術基盤機構(NITE)の菌株リストに、接合性 **a** と記載されている NBRC1876、接合性  $\alpha$  と記載されている NBRC1877 である。プライマー **Ya** あるいは、 $Y\alpha$  と、*Z rev* による PCR では、**Ya** 配列あるいは、 $Y\alpha$  配列の存在が確認できる(図6)。調べた3株とも、**Ya** 配列、 $Y\alpha$  配列をともに有していると判断された(図7(a))。プライマー down HMR を使用した PCR をすることで、HMR 遺伝子座に挿入されている配列を決定することができる(図6)。プライマー  $Y\alpha$  との PCR で増幅断片が得られたことより、HMR 遺伝子座には **Ya** 配列が挿入されていると判断された(図7(b))。これは、既報と一致していた。さらに、プライマー down HML を使用した PCR をすることで、HML 遺伝子座に挿入されている配列を決定することができる(図6)。プライマー  $Y\alpha$  との PCR で増幅断片が得られたことより、HML 遺伝子座には  $Y\alpha$  配列が挿入されていると判断された(図7(c))。これも、既報と一致していた。一方、プライマー up MAT と down MAT を使用した PCR をすることで、*MAT* 遺伝子座に挿入されている配列を決定することができる(図6)。しかし、いずれの菌株からも PCR 増幅断片を得ることができなかった(図7(d))。以上の接合性関連遺伝子群の PCR より、試みた味噌酵母 *Z. rouxii* 3 株の接合性と遺伝子構造は、ゲノム配列解読結果から予想される *MAT* 遺伝子座の染色体構造とは、異なっていると考えられ、味噌酵母 *Z. rouxii* では、染色体構造変化が頻繁に生じている可能性が示唆された。このことは、他の報告にも見い出されている<sup>5)</sup>。今後、次世代シーケンサーの利用等を行い、接合性を示す *MAT* 遺伝子座の染色体構造を把握することも考えている。

#### 4. 総括

- (1) 味噌の品質を高める香気物質である HEMF の HPLC による定量法を確立した。HEMF 産生には、ribose 等のペントースが必要であることが示された。プリン合成遺伝子に変異があると、HEMF 高産生味噌酵母育種できる可能性が考えられた。
- (2) シクロヘキシミド耐性を利用して味噌酵母菌株間の接合をおこなった。接合に用いた親株間に、*ZYRO0C18458g* 遺伝子座を有しているかに差異があり、この特徴を利用して、接合されたかどうかを確認することができた。
- (3) 味噌酵母の接合性発現に関与する遺伝子群を調査した。調べた味噌酵母菌株は、ゲノム配列解読結果から予想される染色体構造とは、異なっていると考えられ、味噌酵母 *Z. rouxii* では、染色体構造変化が頻繁に生じている可能性が示唆された。

#### 謝 辞

本研究は、一般社団法人中央味噌研究所の平成27年度研究助成を受けて実施したものです。関係各位に深く感謝します。本研究の実施にあたっては、前橋工科大学工学部生物工学科卒業研究生、近藤彬文さんと共同でおこないました。

#### 参考文献

- 1) E. Sugawara, M. Ohata, T. Kanazawa, K. Kubota, Y. Sakurai: Effects of the amino-carbonyl reaction of ribose and glycine on the formation of the 2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone aroma component specific to miso by halo-tolerant yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* Vol.71, p1761-1763 (2007).
- 2) T. Dahlen, T. Hauck, M. Wein, W.

- Schwab: 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone as a secondary metabolite from D-fructose-1, 6-diphosphate metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*. J Biosci Bioeng Vol.91, p352-358 (2001).
- 3) 小浜恵子, 米倉裕一, 菊池智恵子, 大畑素子, 菅原悦子: 味噌酵母の HEMF 生産性と育種 岩手県工業技術センター 第13号, p62-64 (2006).
- 4) K. Uehara, J. Watanabe, T. Akao, D. Watanabe, Y. Mogi, H. Shimoi: Screening of high-level 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone-producing strains from a collection of gene deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol Vol.81, p453-460 (2015).
- 5) J. Watanabe, K. Uehara, Y. Mogi: Diversity of mating-type chromosome structures in the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* caused by ectopic exchanges between *MAT*-like loci. PLoS ONE Vol.8, e621121 (2013).

## 味噌による自然免疫系活性化を介したがん予防

永尾 雅哉

Possibility of cancer prevention by innate immunity regulated by miso ingredients

Masaya NAGAO

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

### 要 旨



味噌の原料である大豆に含まれる、イソフラボン類の一つであるゲニステインに自然免疫系の末梢血ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を活性化する可能性が示されているが、明確な用量依存性が示されていない。そこで、NK細胞株 KHYG-1 の白血病細胞株 K562 への細胞傷害性を測定する系を用いて検討したが、ゲニステインは 1 nM~1  $\mu$ M の範囲で NK 細胞の細胞傷害性を有意には促進しなかった。またゲニステインは芳香族炭化水素受容体（AhR）に作用することが知られているため、AhR の完全アンタゴニストである、CH-223, 191 で当初想定していたゲニステインの NK 活性促進が抑制されるか検討しようとしたが、CH-223, 191 の単独処理は NK 活性を促進するという、意外な結果が得られた。

### 目 的

大豆イソフラボンの一種、ゲニステインが用量依存的に NK 活性を促進することを確認し、ゲ

ニステインが AhR 受容体を介して作用する可能性について検討することを目的とした。

### 方 法

NK 細胞株 KHYG-1 細胞、白血病細胞株 K562 細胞は、JCRB 細胞バンクより購入した。KHYG-1 細胞は 100 IU/ml のインターロイキン-2（IL-2）存在下で培養した。IL-2 存在下で培養した KHYG-1 細胞を、AM 体のカルセインを取り込ませた K562 細胞と共存させ、K562 細胞への細胞傷害活性を上清中に回収されたカルセインで評価するという、宮崎大学の江藤望准教授の開発された系<sup>1)</sup>で、NK 活性を評価した。すなわち、 $2.5 \times 10^5$  cells / well (1.25 ml / 12 well plate) の KHYG-1 を 100 IU/ml の IL-2（WAKO）を含む培地で、24 時間被験物質（ゲニステイン（WAKO）、CH223, 191（Sigma-Aldrich）（）を添加して前処理を行った。ポジティブコントロールとしては、フラボノイドの一種であるノビレチン（東京化成工業）（）を 30  $\mu$ M になるように添加した<sup>2)</sup>。一方、標的となる K562 細胞はリン酸緩衝生理食

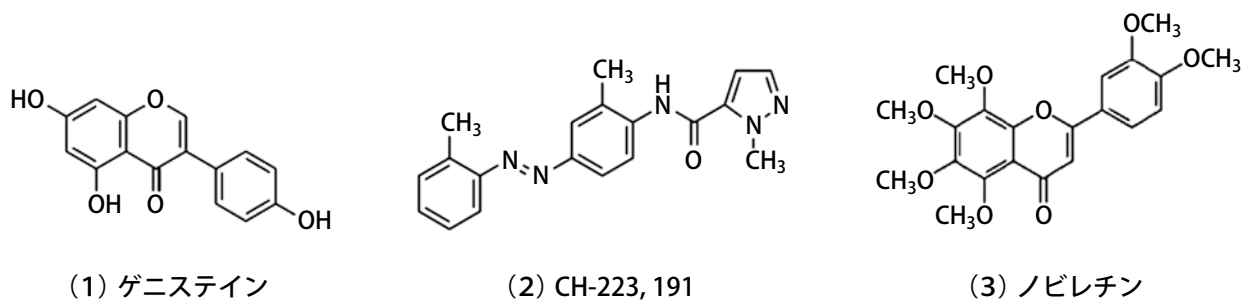


図1. 用いた化合物の構造

(1) ゲニステインは大豆イソフラボンの一種, (2) CH-223, 191 は AhR 受容体のアンタゴニスト, (3) ノビレチンは柑橘類に含まれるフラボノイドの一種

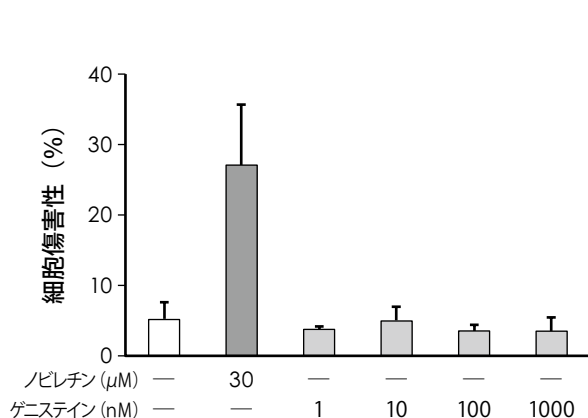


図2. 大豆イソフラボンの一種, ゲニステインのNK細胞の細胞傷害性に対する作用の検討 (n = 3, mean ± SD)

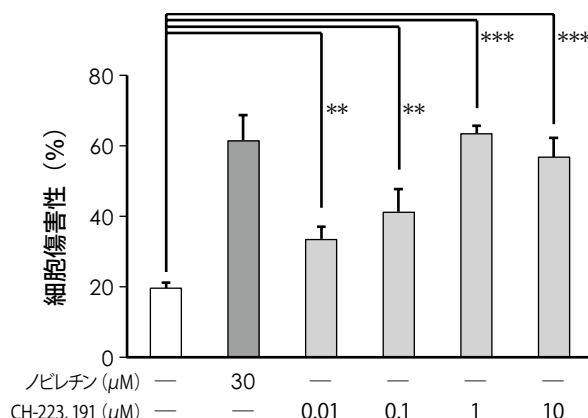


図3. AhRアンタゴニストCH-223, 191のNK細胞の細胞傷害性に対する作用の検討 (n = 5, mean ± SD, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

塩水 (PBS) で洗浄後, 10 μg/ml の calcein-AM を含む血清を含まない RPMI1640 培地で, 30 分間遮光して室温で緩やかに混和し, PBS で洗浄後, 1% のウシ血清アルブミンを含み, フェノールレッドを含まない RPMI1640 培地 (アッセイ培地) を加えて, 96 well plate に 100 μl ずつ, 1 × 10<sup>4</sup> cells/well になるように播種した。これに被験物質で処理した KHYG-1 細胞を PBS で洗浄後, アッセイ培地を加えて, 96 well plate に 100 μl ずつ, 1 × 10<sup>4</sup> cells/well になるように, 先ほど播種した K562 細胞の上に添加した (K562 : KHYG-1 = 1 : 1)。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 4 h 培養後, 上清の calcein の量をプレートリーダー PowerScan 4 (DS Pharma Biomedical) で測定した (excitation/emission = 485 nm/538 nm)。

## 結果

ゲニステインは1 nM~1 μMの範囲では KHYG-1 細胞による K562 細胞に対する細胞傷害性 (ナチュラルキラー (NK) 活性) を促進しなかった (図2)。一方, ゲニステインが AhR を介して NK 活性促進する可能性を検討しようと, AhR の完全アンタゴニストの CH-223, 191 による活性抑制を検討しようとしたが, CH-223, 191 はそれ自身が, 10 nM~1 μM の範囲で用量依存的に NK 活性を促進するという意外な結果となった (図3)。

## 考 察

ゲニステインは大豆に含まれるイソフラボン  
の一種で、ファイトエストロゲンとして、骨損  
失予防などのエストロゲン様の活性を有すると  
されている<sup>3)</sup>。また、チロシンキナーゼの阻害  
剤としても機能することが知られている<sup>4)</sup>。一方  
で、ダイオキシンの受容体として知られ、最近  
では免疫系の制御で注目を浴びる芳香族炭化水  
素受容体 (AhR) のリガンドでもあることが知  
られている<sup>5)</sup>。なお、ある種の AhR リガンドは  
自然免疫系の NK 細胞の細胞傷害活性 (NK 活  
性) を制御することで、抗腫瘍性を示すことが  
報告されている<sup>6)</sup>。さて、信州大学の 大谷元教授  
らは、無塩味噌粉末 (厳密には無塩のものは味  
噌と呼ばない) を C3H/HeN マウスに投与する  
ことで、脾臓中の IL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞、CD49b<sup>+</sup>  
細胞の数が増加することを報告しており<sup>7)</sup>、大谷  
教授らは大豆ペプチドに NK 活性促進作用があ  
る可能性を示しているものの、大豆の他の成分  
がNK活性を促進する可能性も考えられること  
から、AhR のリガンドとしてNK活性を促進す  
る可能性のあるゲニステインに着目した。ゲニ  
ステインのNK活性の促進については、明確な  
用量依存性が示されていなかった<sup>8)</sup>、NK細胞株  
KHYG-1を用いた系で確認したが、ゲニステ  
インは1 nM~1 μMの範囲でNK活性を促進  
できなかった (図2)。一方で、ゲニステインに  
NK活性促進能があることを想定し、AhRを介  
して作用する可能性を考え、AhRの完全アン  
タゴニストであるCH-223,191で抑制されるか検  
討しようとしたが、CH-223,191はそれ自身が  
10 nM~1 μMの範囲で用量依存的にNK活性を  
促進した (図3)。CH-223,191は、AhRのアゴ  
ニスト活性を持たない完全アンタゴニストで、  
代表的な AhR アゴニストである TCDD (2,3,7,8-  
tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) の結合を阻害する  
ものの<sup>9)</sup>、別の AhR アゴニストである BNF (β-  
naphthoflavone) の結合は阻害しないことが示  
されている<sup>10)</sup>。また、AhRのリガンドでトリ  
プトファン代謝物の FICZ (6-formylindolo [3,2-  
b] carbazole) は、TCDDとは異なる様式で

AhR に結合することが考えられており<sup>11)</sup>、構造  
の異なる AhR リガンド類は、いわゆる sAhRM  
(selective AhR modulator) として、AhR に  
様々な様式で結合して、異なる共役因子群をリク  
ルートすることで、異なる遺伝子の発現を制御  
する可能性がある<sup>11)</sup>。AhR アンタゴニストであ  
る CH-223,191 は、今回見出したように、NK 細  
胞においては AhR に結合することでアンタゴニ  
ストとしてではなく、アゴニストとして機能し、  
NK 活性に関連する何らかの遺伝子の発現制御に  
関わっている可能性がある。CH-223,191 による  
NK 細胞の細胞傷害性の促進が、AhR を介する  
のかを含めて、どのようなメカニズムで引き起  
こされているかを明らかにすることは今後の検討課  
題である。

一杯の味噌汁には約 16 g の味噌が含まれ、そ  
の中には 2~10 mg 程度のイソフラボンしか含ま  
れておらず、味噌単独では難しいものの、様々な  
食材を含む味噌汁の自然免疫系活性化効果を期待  
する第一歩として本実験を考えたが、今回の結果  
ではゲニステインにはNK活性の促進能は観察  
出来なかった。なお、もう一種の主要な大豆イ  
ソフラボンであるダイゼインについては現在検  
討中である。また、NK細胞を活性化するとされ  
る AhR に対してアゴニスト活性を示す成分は、  
様々な野菜にも含まれていることが知られている  
<sup>5)</sup>。現在、味噌に含まれるダイゼイン等のイソフ  
ラボン類による、NK活性化因子であるインター  
ロイキン-12 (IL-12) の単球系細胞株 THP-1 での  
産生制御について検討しており、味噌成分による  
自然免疫系活性化の可能性は残されている。

## 謝 辞

本研究は、平成27年度一般社団法人中央味噌研  
究所研究助成のご支援を頂きました。厚く御礼申  
上げます。

## 文 献

- 1) Nagahama K, Eto N, Shimojo T, Kondoh T, Nakahara K, Sakakibara Y, Fukui K, and Suiko M. (2015) : Effect of kumquat (*Fortunella crassifolia*) pericarp on natural killer cell activity *in vitro* and *in vivo*. *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 1327-1336.
- 2) Saito T, Abe D and Nogata Y. (2015) : Polymethoxylated flavones potentiate the cytolytic activity of NK leukemia cell line KHYG-1 via enhanced expression of granzyme B. *Biochem Biophys Res Commun* 456, 799-803.
- 3) Cotter A, and Cashman KD. (2003) : Genistein appears to prevent early postmenopausal bone loss as effectively as hormone replacement therapy. *Nutr Rev* 61, 346-51.
- 4) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, and Fukami Y. (1987) : Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 262, 5592-5595.
- 5) Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Kitagawa H, Fujino J, Sasaki K, Toyoda M, Yoshida T, and Maitani T. (2003) : Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using *in vitro* receptor gene assay. *Biol Pharm Bull* 26, 532-539.
- 6) Shin JH, Zhang L, Murillo-Sauca O, Kim J, Kohrt HEK, Bui JD, and Sunwoo JB. (2013) : Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 12391-12396.
- 7) Karasawa K, Sugiura Y, Kojima M, Uzuhashi Y, and Otani H. (2013) : Fermented soybean powder with rice mold in the absence of salt stimulates the cellular immune system and suppresses the humoral immune response in mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 59, 564-569.
- 8) Zhang Y, Song T T, Cunnick J E, Murphy P A, and Hendrich S. (1999) : Daidzein and genistein glucuronides *in vitro* are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr* 129, 399-405.
- 9) Ramirez JM, Brembilla NC, Sorg O, Chicheportiche R, Matthes T, Dayer JM, Saurat JH, Roosnek E, and Chizzolini C. (2010) : Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *Eur J Immunol* 40, 2450-2459.
- 10) Zhao B, DeGroot DE, Hayashi A, He G, and Denison MS. (2010) : CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicol Sci* 117, 393-403.
- 11) Nuti R, Gargaro M, Matino D, Dolciami D, Grohmann U, Puccetti P, Fallarrino F, and Macchiarulo A. (2014) : Ligand binding and functional selectivity of L-tryptophan metabolites at the mouse aryl hydrocarbon receptor (mAHR) . *J Chem Inf Model* 54, 3373-3383.

# 地域在住中高年者における味噌および大豆製品摂取と 癌による既往・死亡との関係を探る 大規模縦断疫学研究

中本 真理子<sup>1,2</sup>, 大塚 礼<sup>1</sup>, 加藤 友紀<sup>1,3</sup>, 安藤 富士子<sup>1,3</sup>, 下方 浩史<sup>1,4</sup>

Miso intake reduce the risk of cancer mortality in middle-aged Japanese

Mariko NAKAMOTO<sup>1,2</sup>, Rei OTSUKA<sup>1</sup>, Yuki KATO<sup>1,3</sup>, Fujiko ANDO<sup>1,3</sup>, Hiroshi SHIMOKATA<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Section of Longitudinal Study of Aging, National Institute for Longevity Science (NILS-LSA),  
National Center for Geriatrics and Gerontology, Aichi, Japan.

<sup>2</sup>Department of Public Health and Applied Nutrition, Institute of Biomedical Sciences,  
Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan.

<sup>3</sup>Faculty of Health and Medical Sciences, Aichi Shukutoku University, Aichi, Japan.

<sup>4</sup>Graduate School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences, Aichi, Japan.

## 1. 緒言

味噌は日本の食卓では欠かすことのできない食品のひとつとされ、古くから食生活の中で重要な役割を担ってきた<sup>1)</sup>。大豆、米、麦に加えて食塩を主原料とする味噌は、微生物による発酵を経て、消化吸收、保存性、風味が向上した食品となる。そのため、味噌の原料のひとつである大豆に多く含まれるイソフラボンの作用に加え、味噌が製造される過程で受ける発酵作用によって、味噌が栄養・風味・健康の面から「健康機能性食品」として見直されている。

一方、2014年のWorld Cancer Reportによると、世界の癌患者数は1,410万人で年々上昇傾向にあり、2030年には現在の1.5倍の患者数に達すると予測されている<sup>2)</sup>。また、日本においても、

平成26年人口動態統計の結果では、40～89歳までの死因の第1位は悪性新生物となっている<sup>3)</sup>。癌患者は、癌発症後メンタル面も含め患者の症状、治療による副作用、就労状況の変化などさまざまな課題を抱える。そのため、癌発症は自立した生活を維持することを揺るがしうる重大な疾患であることが推測される。高齢社会の日本において、高齢期になっても自立した生活を営む上で、若年期から健康であることが望まれる。このようなことから、癌発症を予防するための方策を見出すことは重要である。

これまでに、味噌の人への健康効果が検証されており、癌抑制作用、抗酸化作用、放射線障害抑制作用などが報告されている<sup>4)</sup>。これらの健康効果は、味噌の原料である大豆に含まれるイソフラボンや他の成分、あるいは味噌が製造される過程



で受ける発酵作用が関与していると考えられている<sup>5)</sup>。ラットを用いた先行研究において、食塩は胃がんを進行させるものの、同量の食塩を含む味噌は胃がんを進行させないことが報告されている<sup>6)</sup>。さらに、熟成期間の異なる味噌を餌に混合させ、ラットの癌進行に与える影響を検証したところ、熟成期間や熟成の度合いにより、味噌の機能性が変化し、癌の発症・進行に異なる影響を与えることが報告されている<sup>7)</sup>。このように、動物を用いた先行研究では、味噌が癌の発症・進行を抑制する可能性を示唆している。疫学研究では、平山らが毎日味噌汁を摂取する群の胃癌による死亡率は、そうでない群に比べ有意に低いことを報告している<sup>8)</sup>。さらに、山本らは40～59歳の女性において、味噌汁1日3杯以上摂取者は1日1杯未満摂取者に比べて、乳癌発症率が40%減少すると報告している<sup>9)</sup>。しかしながら、これまでにヒトを対象に行われた研究報告は少なく、食文化の中に味噌が根付いている日本人において、味噌摂取と全死亡および癌による死亡との関係を探る見解は一致していないのが現状である。

そこで本研究では、地域在住中高年者の味噌摂取がその後12年間の全死亡および癌による死亡に及ぼす影響を明らかにする。

## 2. 方法

### 対象者

「国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）」は、年齢および性で層化無作為抽出された40歳以上の地域住民を対象とした、老化と老年病に関する縦断的コホート調査であり、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター倫理利益相反委員会の了承の下に「調査への参加の文章による同意」の得られた者を対象として行われている<sup>10)</sup>（図1）。

NILS-LSAの第1次調査（1997年11月～2000年4月）に参加した40～79歳の中高年者2,267名のうち、第1次調査時に得た本解析に必要な変数に欠損がなく、癌・脳卒中・心疾患の既往がない2,006名（平均年齢58.8±10.8歳：男性1,001名、女性1,005名）を対象とした（図2、表1）。

### 食事摂取状況の評価

第1次調査において、写真撮影を併用した3日間の食事記録調査（3DR）によって味噌摂取の情報を調査した。得られた食品量の確認と、食品のコード化は栄養士が行い、食品群別摂取量と栄養素等摂取量は日本食品標準成分表2010により算出したものを用いている。味噌摂取量については、味噌汁1杯150mlとした場合に、市販味噌汁の塩分濃度と食品成分表に記載されている各種味噌100gあたりの塩分量から、味噌汁1杯あたりの味噌量（15.0g）を算出し、カットオ

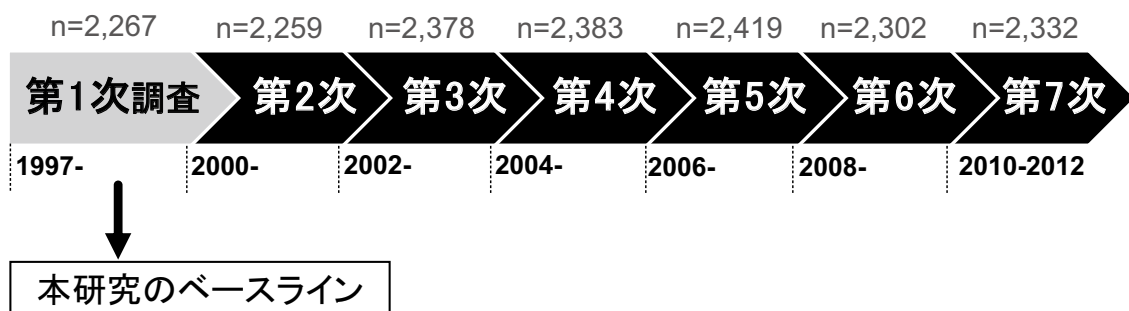


図1. 国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）の概要

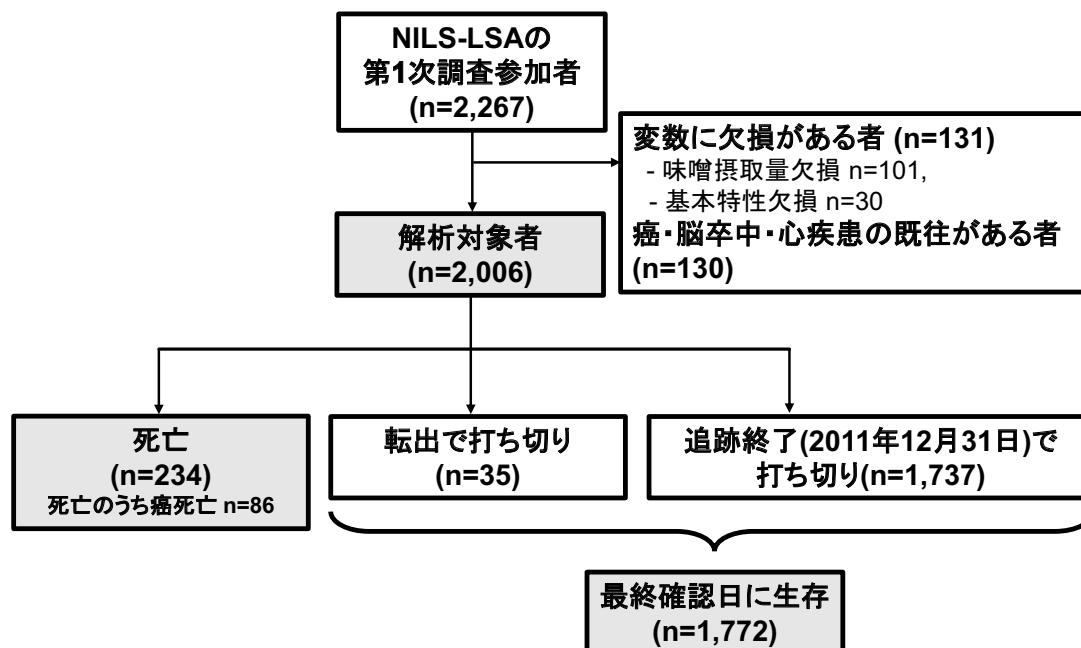


図2. 解析対象者の概要

表1. 第1次調査の本解析対象者の性・年代別人数

	男性 (n = 1,001)	女性 (n = 1,005)
40-49 歳	261 (26.1)	256 (25.5)
50-59 歳	267 (26.7)	255 (25.4)
60-69 歳	248 (24.8)	253 (25.2)
70-79 歳	225 (22.5)	241 (24.0)

No. (%)

フ値とした。本研究では、味噌汁1杯の味噌使用量15.0g未満群（味噌摂取低群）と味噌摂取量15.0g以上群（味噌摂取高群）とに分けて解析に用いた。

#### 転出・死亡等の状況評価

厚生労働省人口動態調査の二次利用申請を行い、2011年12月末時点の死亡および転出データを得た。NILS-LSA第1次調査対象者2,267名と照合し、死亡者の原死因（ICD-10分類）を推定した。

#### その他の項目の測定

第1次調査時の身体活動量は聞き取り法により算出し、年齢、性、喫煙習慣、既往歴（癌、脳卒中、心疾患、高血圧、高脂血症、糖尿病）は自記式調査票により収集した。第1次調査時の身長、体重の測定値を用いてBody mass index（BMI）を算出した。アルコール、総エネルギーの各摂取量は、第1次調査時に実施した3DRによって評価した。

#### 統計解析

結果は連続変数の場合、平均値±標準偏差を示した。頻度の場合、人数（%）で示した。味噌摂取低群と味噌摂取高群の2群間で対象者特性に違いがみられるかを検討するために、独立2群のt検定およびカイ2乗検定を使用した。味噌摂取低群を対照群とした場合の味噌摂取高群の全死亡および癌死亡リスクを、Cox比例ハザードモデルにより推定した。その際に、第1次調査時の性、年齢、BMI、喫煙習慣、高血圧・高脂血症・糖尿病の既往歴、身体活動量、アルコール、総エネルギー摂取量を調整した。また、60歳未満と

表 2. 第 1 次調査時の味噌摂取別の対象者特性

対象者人数	味噌摂取		p 値
	低群 (15 g/日未満) n = 1130	高群 (15 g/日以上) n = 876	
男性の割合	497 (44.0)	504 (57.5)	<0.001
年齢 (歳)	58.0 ± 11.0	59.9 ± 10.5	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.8 ± 3.0	23.1 ± 3.1	0.044
総身体活動量 (メッツ・分/日)	1963.6 ± 217.3	1951.2 ± 246.5	0.241
教育年数			
≤ 9 年	337 (29.8)	316 (36.1)	0.009
9 < および ≤ 12 年	484 (42.8)	330 (37.7)	
12 年 <	309 (27.4)	230 (26.3)	
就労状況			
無職	221 (19.6)	199 (22.7)	0.011
主婦または主夫	260 (23.0)	160 (18.3)	
フルタイムでの就業	461 (40.8)	392 (44.8)	
パートタイムでの就業	188 (16.6)	125 (14.3)	
喫煙習慣			
現在吸っている	253 (22.4)	194 (22.2)	0.897
現在吸っていない	877 (77.6)	682 (77.9)	
既往歴			
高血圧	263 (23.3)	224 (25.6)	0.234
高脂血症	193 (17.1)	143 (16.3)	0.653
糖尿病	75 (6.6)	72 (8.2)	0.178
総エネルギー摂取量 (kcal/日)	2057.6 ± 413.0	2191.7 ± 438.0	<0.001
総アルコール摂取量 (g/日)	8.5 ± 15.1	10.7 ± 16.6	0.002
味噌摂取量 (g/日)	8.4 ± 4.1	22.1 ± 7.6	<0.001

連続変数の場合、数値は平均値±標準偏差で示し、カテゴリ変数の場合、人数 (%) で示した。味噌摂取低群と高群間での特徴の違いは、独立 2 群の t 検定およびカイ 2 乗検定を使用した。

60 歳以上に層別化した検討も行った。両側検定で 0.05 未満を有意とし、すべての統計解析は、SAS 統計パッケージ (version 9.3) を用いて行った。

### 3. 結果

#### 対象者特性

解析対象者の平均追跡期間は 12.2 ± 2.0 年であった。解析対象者の第 1 次調査時の基本特性を表 2 に示す。味噌高摂取群は味噌低摂取群と比較して、男性の割合、年齢、BMI、総エネルギー摂取量、総アルコール摂取量、味噌摂取量が有意に高く、教育期間が短い者が多かった。

#### 全死亡および癌による死亡に対する味噌摂取の影響

2011 年 12 月時点での全死亡者数は 234 名、癌死亡者数は 86 名であった。

Cox 比例ハザードモデルにより癌による死亡リスクを推定した結果、味噌摂取低群と比べて高群の癌死亡の調整ハザード比は有意でなかったものの、年齢を層別化して検討したところ、60 歳未満において味噌摂取低群を基準とした時の高群の調整ハザード比が有意に低値であった。60 歳未満では、味噌摂取低群に比べて高群で約 70 %、その後の癌による死亡リスクが低下することが示された (表 4)。一方、味噌摂取と全死亡とには有意な関連は認められなかった (表 3)。

以上の結果は、第 1 次調査への参加から 3 年以内に死亡した者を除外した分析でも変わらなかった。

表3. 味噌摂取低群に対する味噌摂取高群の全死亡のハザード比および95%信頼区間

味噌摂取	全死亡者数	性・年齢調整モデル <sup>1</sup>		多変量調整モデル <sup>2</sup>	
		ハザード比 (95%信頼区間)	p 値	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値
全対象者 (n = 2006)					
低群 (15 g/日未満)	119	1.00 (Referent)		1.00 (Referent)	
高群 (15 g/日以上)	115	1.09 (0.84 - 1.41)	0.522	1.11 (0.86 - 1.44)	0.424
60歳未満 (n = 1039)					
低群 (15 g/日未満)	18	1.00 (Referent)		1.00 (Referent)	
高群 (15 g/日以上)	16	0.63 (0.30 - 1.30)	0.209	0.61 (0.29 - 1.28)	0.193
60歳以上 (n = 967)					
低群 (15 g/日未満)	101	1.00 (Referent)		1.00 (Referent)	
高群 (15 g/日以上)	99	1.21 (0.92 - 1.60)	0.179	1.24 (0.94 - 1.65)	0.130

<sup>1</sup>第1次調査時の性および年齢を調整。

<sup>2</sup>第1次調査時の性, 年齢, BMI, 喫煙習慣 (現在喫煙なし, 現在喫煙あり), 既往歴 (高血圧, 高脂血症, 糖尿病), 身体活動量, アルコール摂取量, エネルギー摂取量を調整。

表4. 味噌摂取低群に対する味噌摂取高群の癌死亡のハザード比および95%信頼区間

味噌摂取	癌による死亡者数	性・年齢調整モデル <sup>1</sup>		多変量調整モデル <sup>2</sup>	
		ハザード比 (95%信頼区間)	p 値	ハザード比 (95%信頼区間)	p 値
全対象者 (n = 2006)					
低群 (15 g/日未満)	49	1.00 (Referent)		1.00 (Referent)	
高群 (15 g/日以上)	37	0.85 (0.55 - 1.30)	0.453	0.87 (0.57 - 1.35)	0.543
60歳未満 (n = 1039)					
低群 (15 g/日未満)	15	1.00 (Referent)		1.00 (Referent)	
高群 (15 g/日以上)	4	0.33 (0.11 - 1.00)	0.050	0.30 (0.10 - 0.92)	0.035
60歳以上 (n = 967)					
低群 (15 g/日未満)	34	1.00 (Referent)		1.00 (Referent)	
高群 (15 g/日以上)	33	1.07 (0.66 - 1.72)	0.798	1.14 (0.70 - 1.87)	0.599

<sup>1</sup>第1次調査時の性および年齢を調整。

<sup>2</sup>第1次調査時の性, 年齢, BMI, 喫煙習慣 (現在喫煙なし, 現在喫煙あり), 既往歴 (高血圧, 高脂血症, 糖尿病), 身体活動量, アルコール摂取量, エネルギー摂取量を調整。

#### 4. 考察

本研究において, 60歳未満の地域在住中年者において, 1日15.0g以上の味噌摂取が, その後12年間の癌死亡のリスクを低下させると示された。一方で, 味噌摂取と全死亡とは有意な関連は認められなかった。

40歳以上の265,118名の日本人を対象に行われた前向きコホート研究において, 毎日味噌汁を摂取する群での胃癌による死亡率は, そうでない群に比べ有意に低いことが報告されている<sup>8)</sup>。さらに, 多目的コホート研究 (JPHC研究) に参加する40~59歳の21,852名の日本人女性において, 味噌汁1日1杯未満摂取群を対照とした場合に1日3杯以上摂取群の乳癌発症率は40%減少

すると報告されている<sup>9)</sup>。本研究結果は, 60歳未満の対象者において, 実際に1日15.0g以上の味噌を摂取することが1日15.0g未満の味噌摂取に比べて, 癌による死亡リスクを有意に低下させる可能性を示唆しており, 味噌をより多く摂取することが癌死亡あるいは癌発症のリスクを低下させると報告した先行研究と同様の結果が得られた。しかしながら, 本研究の癌死亡者は86名と少なかったため, 先行研究で検討されているような部位別での詳細な検討は行うことが出来なかった。そのため, 今後さらに死亡者数が増えた状態で, 味噌摂取がその後の癌による死亡状況とどのような関連を示すのかより詳細に明らかにしていく必要があるだろう。

味噌の高摂取が癌による死亡のリスクを低下さ

せる機序のひとつとして、味噌に含まれるイソフラボンやリノレン酸エチルなどの成分が有する抗酸化作用を介している可能性がある。癌細胞株を用いた実験において、味噌中のイソフラボンがジフェニルピクリルヒドラジカルを消去することで、癌細胞の増殖を抑制する働きがあり<sup>11)</sup>、特に豆味噌では発酵過程において大豆イソフラボン配糖体がオルトジヒドロキシイソフラボンに変換されることで、高い抗酸化作用を有すると報告されている<sup>12)</sup>。また、味噌中のリノレン酸エチルが抗酸化作用を介してヒト肺扁平癌細胞の増殖を抑制するという報告もある<sup>13)</sup>。このようなイソフラボンやリノレン酸エチルといった成分の抗酸化作用が癌による死亡の抑制につながったのかもしれない。

今回、特に60歳未満の対象者において、味噌摂取と癌死亡リスクとの間に有意な関連が示された。より高齢になるほど、和食など味噌を摂取するような食生活を好むようになると考えられるため、60歳以上の集団の食生活のばらつきよりも60歳未満の集団の食生活のばらつきが大きいことが考えられる。そのため60歳未満において、味噌摂取の癌死亡に与える影響が得られやすかった可能性がある。

本研究結果では、味噌の高摂取は低摂取と比較して、その後の癌死亡リスクを低下させるものの、全死亡リスクとは関連しなかった。研究対象者の全死亡者234名のうち、癌による死亡者は86名(36.8%)、次いで脳血管疾患による死亡者は33名(14.1%)、心疾患による死亡者は31名(13.2%)であった。これまでに、小久保らは大豆製品摂取が虚血性循環器疾患(脳梗塞および虚血性心疾患)の発症に与える影響について都市部の一般住民を対象に検討を行い、味噌汁摂取が脳梗塞の発症リスクを低下させると報告している<sup>14)</sup>。しかしその一方で、高山研究では大豆摂取は循環器病死亡と有意な関連は示していない<sup>15)</sup>。このように、全死亡の中には味噌摂取の効果が異なるさまざまな病因による死亡が混在することから、必ずしも味噌摂取が全死亡リスクの低下には関連しなかった可能性が考えられる。

本研究の強みは、無作為に抽出された地域在住

中高年者を対象にしており、12年という長期の追跡期間を有する前向き研究である点、さらに食事情報について写真撮影を併用した3DRによって得ている点である。その一方で、いくつかの限界点もある。1つ目に、日本の中高年者を対象にしているため、味噌をはじめ大豆製品の習慣的な摂取量が少ない他の人種・民族で本研究結果を適応することは難しい点である。2つ目に、全死亡者数が少なかったため、結果が偶然得られた可能性は否定できない。そのため、結果の解釈には十分留意する必要があるだろう。最後に、本研究では調整しきれない潜在因子が存在する可能性がある。本報告で結果は示していないが、第1次調査時の性、年齢、BMI、喫煙習慣、高血圧・高脂血症・糖尿病の既往歴、身体活動量、アルコール、総エネルギー摂取量といった要因に加えて、その他の食品としては肉、魚、野菜、果物を、栄養素としてはたんぱく質やビタミンCなどをそれぞれモデルに加えて検討し、味噌摂取と癌死亡との関係は変わらず維持されたことを確認している。しかしながら、それら以外にも調整しきれない潜在因子が存在する可能性はあるため、留意する必要がある。

結論として、60歳未満の地域在住中年者において、1日15.0g以上の味噌摂取が、12年後の癌死亡を抑制する可能性が示された。味噌を含む大豆製品摂取量が年々低下している現況において、味噌摂取と癌死亡との関連を探るさらなる研究が蓄積され、日本の食文化に欠かせない大豆製品を食べることの意義や重要性が明らかにされていくことを期待したい。

## 5. 謝辞

本研究は、平成27年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成金により行われました。また、NILS-LSAにご参加くださった愛知県大府市ならびに東浦町の住民の皆様に感謝致します。

## 参考文献

- 1) Christine M DB, Chee-Beng T and Sindey M (2008) The world of soy, p144-60. University of Illinois Press, Champaign.
- 2) Stewart W, Wild P (2014) World Cancer Report 2014. IARC Nonserial Publication.
- 3) 厚生労働省 (2014) 平成26年我が国の人口動態. 厚生労働省, 東京.
- 4) 川野一之 (2007) 伝統食品の科学—ルーツ, おいしさ, 機能—6. 日本味と匂学会誌 14, 137-44.
- 5) 渡邊敦光 (2010) お味噌の効能. 日本醸造協会誌 105, 714-23.
- 6) Watanabe H, Uesaka T, Kido S, Ishimura Y, Shiraki K, Kuramoto K, Hirata S, Shoji S, Katoh O, Fujimoto N (1999) Influence of concomitant miso or NaCl treatment on induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Oncol Rep.* 6: 989-93.
- 7) Ohara M, Lu H, Shiraki K, Ishimura Y, Uesaka T, Katoh O, Watanabe H (2002) Inhibition by long-term fermented miso of induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in CD (SD) rats. *Oncol Rep.* 9: 613-3.
- 8) Hirayama T (1982) Relationship of soybean paste soup intake to gastric cancer risk. *Nutr. Cancer* 3: 223-33.
- 9) Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, Tsugane S; Japan Public Health Center-Based Prospective Study on Cancer Cardiovascular Diseases Group (2003) Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst.* 95: 906-13.
- 10) Shimokata H, Ando F, Niino N (2000) A new comprehensive study on aging—the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). *J Epidemiol.* 10 (1 Suppl): S1-9.
- 11) Hirota A, Taki S, Kawaii S, Yano M, Abe N (2000) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward cancer cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1038-40.
- 12) Esaki H, Onozaki H, Morimitsu Y, Kawakishi S, Osawa T (1999) Potent antioxidative isoflavones isolated from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 740-6.
- 13) 上岡龍一, 後藤浩一, 山内彰雄 (2005) 味噌のガン抑制効果. 日本醸造協会誌 100, 771-6.
- 14) Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group (2007) 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* 116: 2553-62.
- 15) Nagata C, Takatsuka N, Shimizu H (2002) Soy and fish oil intake and mortality in a Japanese community. *Am J Epidemiol.* 156: 824-31.

## 動脈硬化・DNA 損傷を分子機序とする 大動脈瘤形成に対する味噌の抑制効果

バトムンフ ブムデルゲル, 石田 万里, 石田 隆史, 小久保 博樹,  
渡邊 敦光, 吉栖 正生

The effect of Miso on abdominal aortic aneurysm

Batmunkh BUMDELGER, Mari ISHIDA, Takafumi ISHIDA, Hiroki KOKUBO,  
Hiromitsu WATANABE, Masao YOSHIZUMI

*Department of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University  
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Japan.*

腹部大動脈瘤などの大動脈疾患は、動脈硬化症との強い関連が指摘されている。そのため、高齢化や、生活習慣病の増加に伴って、その罹患率が増加している。一方、生活習慣病を中心とする動脈硬化症のリスクファクターの多くは、がんのリスクファクターと重なっていることが知られている。

最近、我々はヒト血管の動脈硬化巣（プラーク）に DNA 損傷が認められること、同様の DNA 損傷が喫煙者の末梢血単核球で高頻度に認められ、それが禁煙によって改善することを報告した<sup>1)</sup>。

本研究では、マウスの大動脈瘤形成モデル<sup>2),3)</sup>を用いて、味噌が大動脈瘤形成の抑制効果を持つか否かを検討した。本研究の特徴は、動脈硬化とがんに共通する DNA 損傷という現象に着目し、味噌の効果を検討することにある。

### 方法

#### (1) 試験飼料の作製

味噌は中央味噌研究所より供与された2年熟成の米味噌を MF 飼料（オリエンタル酵母）に10%の割合で混入し固形飼料を作成した。

#### (2) 実験動物

本研究は広島大学の研究倫理指針に従い遺伝子組み換え等使用実験計画書および動物実験計画書を策定し、倫理委員会の承認を得て実施した。実験動物にはオステオプロテゲリンノックアウトマウス（Opg-KO）及び野生型マウスを使用した。7週齢で大動脈周囲に0.5 mol/L 塩化カルシウムを塗布し大動脈瘤を誘発した。大動脈瘤誘発手術の2週間前から10%味噌含有飼料あるいは標準飼料を与え、手術後も継続した。手術後1週間、6週間で大動脈を採取し実験に供した。

### (3) 大動脈瘤組織学的解析

採取した大動脈瘤部の外径を計測後パラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリンエオジン染色、Elastica van Gieson 染色、アザン染色、von-Kossa 染色を行った。一部の組織において、DNA 損傷（二本鎖切断）の指標であるリン

酸化ヒストン H2AX 抗体（Abcam, ab26350）を用い、Vectastain ABC システムによる免疫染色を行った。染色した組織は光学顕微鏡（OLYMPUS BX51）にて観察・撮影後解析した。

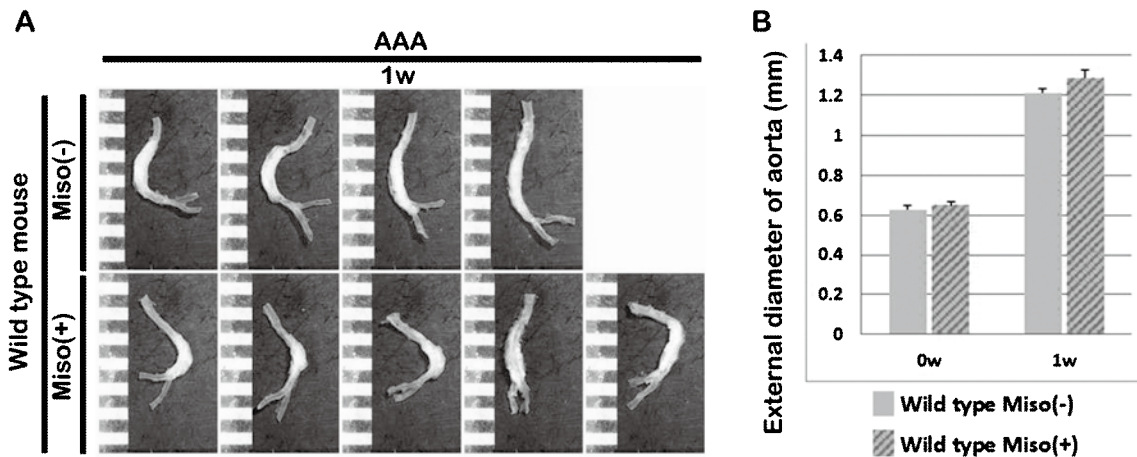


Figure1. A) Representative images of aorta are shown at 1 week after the application of CaCl<sub>2</sub> (AAA) in Miso(-) and Miso(+) group in Wild type mouse. Scale bars indicate 1 mm. B) Measurement of external diameter of aorta at the start (0w), at 1 week after AAA induction. Data are presented as mean  $\pm$  SD.

Figure.1

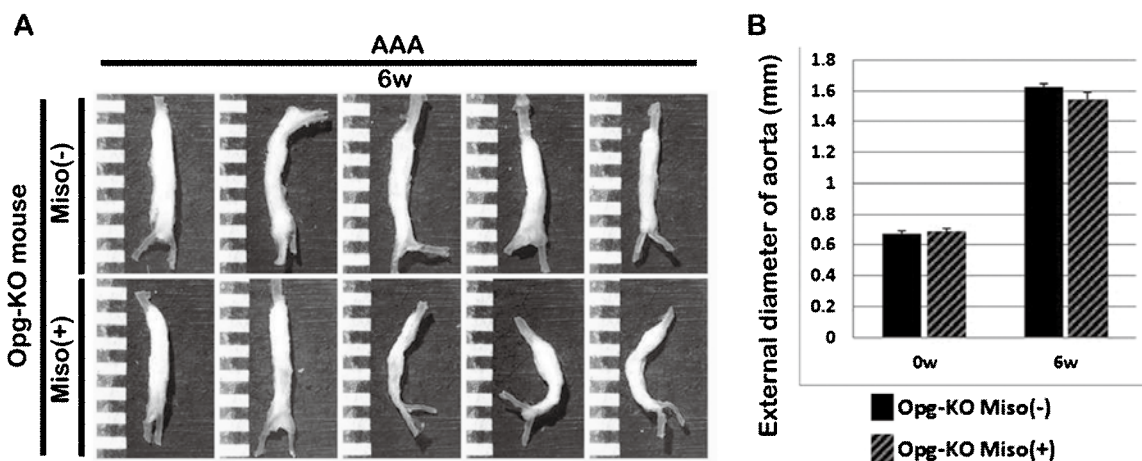


Figure2. A) Representative images of aorta are shown at 6 weeks after the application of CaCl<sub>2</sub> (AAA) in Miso(-) and Miso(+) group in Opg-KO mice. Scale bars indicate 1 mm. B) Measurement of external diameter of aorta at the start (0w), at 6 weeks after AAA induction. Data are presented as mean  $\pm$  SD.

Figure.2



## 結果と考察

### (1) 野生型マウスと Opg-KO マウスにおける大動脈瘤形成と進展

大動脈への塩化カルシウム局所塗布後1週間における大動脈瘤形成は野生型マウスと Opg-KO マウス間で差がなかったが、6週間目には野生型マウスで大動脈瘤径の縮小が認められたのに対し Opg-KO においては動脈瘤の進展が認められた。

Elastica van Gieson 染色により弾性線維の構造を観察すると、術前においては野生型および Opg-KO 共に正常な波状の弾性線維が確認できるのに対し、術後には野生型マウスは線状構造の弾性線維になり、OPG KO マウスの術後6週目では弾性線維の崩壊が観察された。

### (2) 味噌による大動脈瘤形成・伸展への影響

マウスの飼料摂取量から実験期間中マウスは1日 1.3g/kg の味噌を摂取したと考えられた。大動脈への塩化カルシウム局所塗布後、1週間における大動脈瘤部外径は野生型マウスにおいて味噌摂取群と対照群間に差がなかった (Fig.1)。

OPG-KO マウスにおいて塩化カルシウム局所塗布後6週の大動脈瘤外径は味噌摂取群と対照群間で差が認められなかった (Fig.2)。

大動脈瘤部の切片を用いてヘマトキシリンエオ

ジン染色, Elastica van Gieson 染色, アザン染色, von-Kossa 染色を行ったところ、野生型マウスの1週間後の組織では大動脈中膜の菲薄化, 弾性板の線状化, 外膜へのコラーゲン繊維の蓄積および石灰化が認められた。これらの所見は味噌投与によって変化しなかった (Fig.3)。

OPG-KO マウスの術後6週間目の大動脈部では、大動脈中膜の肥厚, 弾性板の断裂, 外膜へのコラーゲン繊維の蓄積および全周性の石灰化が認められた。これらの所見は味噌の投与によって変化しなかった。

### (3) 大動脈瘤における DNA 損傷

大動脈瘤の形成・進展に DNA 損傷の関与があるか否かを検討した。大動脈瘤部の切片を用いて、DNA 損傷 (二本鎖切断) の指標であるリン酸化ヒストン H2AX 抗体で免疫染色を行ったところ、塩化カルシウム局所投与後1週間の病変部は、血管の拡大とともに中膜 (血管平滑筋層) が菲薄化し細胞数の減少が認められた。血管周囲には多数の細胞浸潤と起源不明の細胞の増生があり、それらの細胞の中にリン酸化 H2AX 抗体で染色される DNA 損傷を受けた細胞が多数存在していた (Fig.4; 染まっているのが DNA 損傷を受けた細胞)。

これらの所見は大動脈瘤作成後6週間目には消

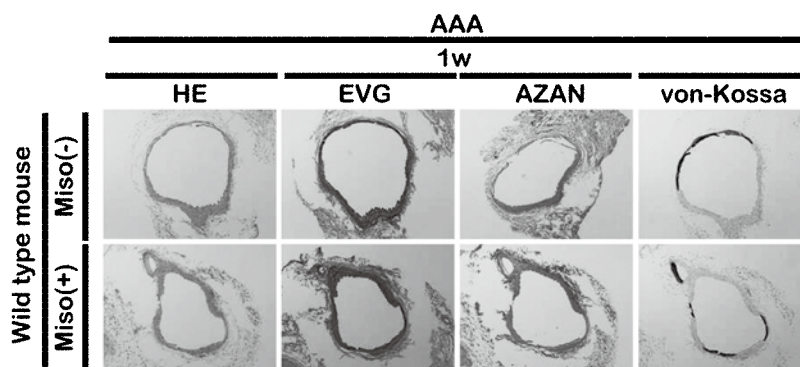


Figure3. Representative Hematoxylin & Eosin (HE), Elastica van Gieson (EVG), AZAN, von-Kossa stainings of aorta are shown at 1 week after application of CaCl<sub>2</sub> (AAA) in Miso(-) and Miso(+) group in Wild type mice.

Figure.3

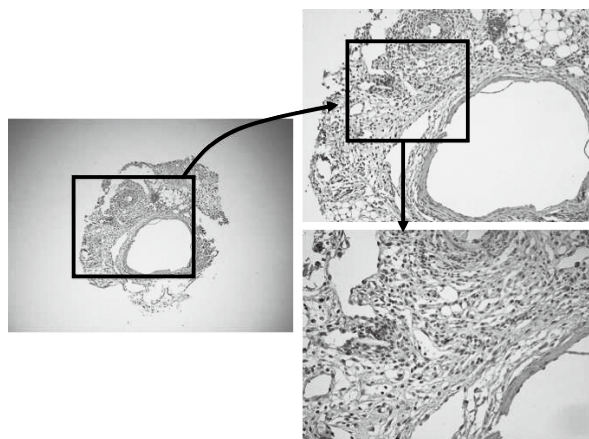


Figure.4

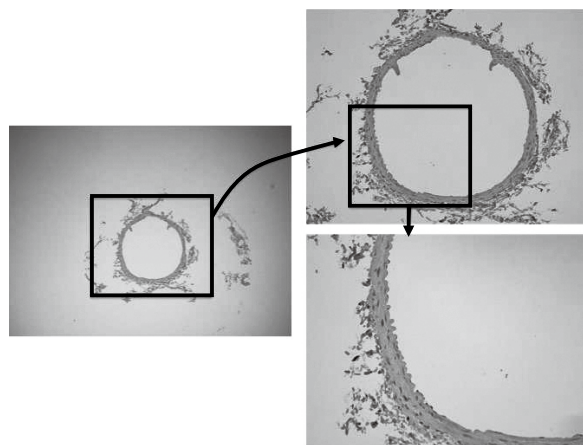


Figure.5

失っていた (Fig.5)。

以上の結果より、1.3g/kg/日の味噌の投与は塩化カルシウム局所塗布による動脈瘤の形成に影響を与えないことが明らかとなった。本モデルは、強い炎症が惹起された後に病変が進行することが明らかになっており、10%味噌含有量では大動脈瘤形成時の炎症性のシグナルや蛋白質分解酵素の活性化を抑制できない可能性がある。

一方、塩化カルシウム局所投与による動脈瘤の形成には大動脈中膜の変化だけでなく、血管周囲の細胞のDNA損傷を引き金とする変化も関与していると考えられた。DNA損傷を引き金とする変化としては、これまでの研究の文献的考察から、DNA損傷の蓄積した細胞が炎症性サイトカインを分泌する可能性を考えており、現在慢性炎症関連遺伝子の発現を検討中である。また、血管周囲に増生している細胞の起源も検討中である。

本研究で用いた大動脈瘤モデルは、野生型のマウスやOPG KOマウスだけではなく、ApoE欠損マウスなどの遺伝子改変マウスでも作成することができる。今後は、ヒトの動脈硬化・大動脈瘤に近い様々なモデルを作り、味噌の効果を検討していく。

#### 参考文献

- 1) Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. PLoS One. 2014 Aug 5;9(8):e103993.
- 2) Osteoprotegerin Prevents Development of Abdominal Aortic Aneurysms. Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Yoshimura K, Aoki H, Orita Y, Ishida T, Ohtaki M, Nagao M, Ishida M, Yoshizumi M. PLoS One. 2016 Jan 19;11(1):e0147088.
- 3) EPA Prevents the Development of Abdominal Aortic Aneurysms through Gpr-120/Ffar-4. Kamata R, Bumdelger B, Kokubo H, Fujii M, Yoshimura K, Ishida T, Ishida M, Yoshizumi M. PLoS One. 2016 Oct 20;11(10):e0165132.