

# 研究助成報告

平成29年度研究助成による研究報告

研究報告

麹菌ゲノム情報と質量分析装置を活用した  
味噌の糖類に関する基盤研究

徳岡 昌文, 柏木 豊, 本田 千尋, 小林 泉美, 崔 淋鈞

Studies on the saccharides in Miso based on genome information of  
*Aspergillus oryzae* and mass spectrometry

Masafumi TOKUOKA, Yutaka KASHIWAGI, Chihiro HONDA, Izumi KOBAYASHI,  
Linkin SAI

*Department of Fermentation Science and Technology,  
Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8502, Japan.*

【背景】

味噌中の糖は、色、味、物性、微生物の消長といった様々な側面と関連していると言われ、その由来は大豆と麹原料に大きく分けられる。大豆由来の糖は多糖であるセルロースやアラビノガラクトサン、ペクチンなどが主であり、味噌の「こし」の強さや「きめ」の良し悪しに関わっている。一方、代表的な麹原料である米に由来する糖としてはグルコースが重要であり、米味噌の甘味の主体を担うほか、大豆に由来するペントースとともに褐変にも関わるとされている<sup>1)</sup>。オリゴ糖については、2糖として、サケビオース、コージビオース、イソマルトース、メリビオース、3糖としてパノース、イソマルトトリオース、マンニトリオースの存在が報告されており<sup>2, 3)</sup>、これらオリゴ糖の生成には、麹菌に由来する糖転移酵素が関わっていることが示唆されている<sup>3)</sup>。オリゴ糖は遊離糖の中の20~25%を占めていると報告されているが、詳細な解析例は少なく、最も多いイソマルトースが1.2%程度と定

量されている他は<sup>3)</sup>、個別の定量値は定かでないとともに、重合度が4以上のオリゴ糖については存在すら確認されていない。

我々は同じ醸造物の清酒におけるオリゴ糖分析法を構築し、清酒中のオリゴ糖が従来考えられていたよりも複雑で多様であることを明らかにしており、麹菌酵素による穀物分解を介して製造される醸造物が、麹菌の糖転移酵素などの影響により、ユニークな糖組成を持っていることを示した<sup>4)</sup>。さらに、最近では同じ醸造物である甘酒についての研究から、甘酒中のオリゴ糖がユニークな組成であることが報告されており<sup>5)</sup>、味噌中のオリゴ糖についても興味を持たれる。

そこで本研究では、種々の味噌について、親水性相互作用クロマトグラフィー・飛行時間型質量分析器 (HILIC-TOF/MS) による分析を行うことで、詳細なオリゴ糖の検出と、プロファイルの比較を行った。また、ゲノム情報から麹菌 *Aspergillus oryzae* の $\alpha$ -グルコシダーゼオルソログの抽出と、主要酵素の遺伝子破壊株の作製、さらにその米麹中のオリゴ糖

の分析から、味噌中オリゴ糖生成への麹菌酵素の役割についての検討を行った。

## 【方法】

### 1. 試料

各種味噌は一般社団法人中央味噌研究所より分譲頂いたもの42点（米味噌34点，麦味噌6点，豆味噌2点）を用いた。

### 2. 分析方法

HILIC-TOF/MSを用い、既報<sup>4)</sup>に従い分析を行った。2糖と3糖の同定には、Shodex SUGAR SZ5532 (6.0 x 150mm) (昭和電工株式会社)を用い、次のHPLC条件により分析した。移動相80%アセトニトリル水，流速0.9ml/min，カラム温度80℃，試料導入量3  $\mu$ l。TOF/MSの設定は既報<sup>4)</sup>に従った。また，イオン化促進のためにポストカラムで塩化リチウムを導入した。

分析試料は味噌10 gをMilli-Q水100mlによく溶解させ，ろ紙 (Advantec No. 2) でろ過し，ろ液をMilli-Q水で20倍希釈後，アセトニトリルと等量混合させたものを0.45  $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過し，調製した。

### 3. $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の探索と遺伝子破壊

麹菌ゲノムデータベースとして，独立行政法人酒類総合研究所のデータベースCAoGD (<https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/>) を利用し， $\alpha$ -グルコシダーゼのオルソログを抽出した。シグナル配列の予想には，PSORT (<https://psort.hgc.jp/>) を用い，米麹における発現はCAoGDを参照した。

### 4. 製麹及び酵素活性測定

製麹及び米麹からの代謝物の抽出は既報<sup>6)</sup>に従った。酵素活性測定は糖化力測定キット (キッコーマンバイオケミファ株式会社) を用いた。酵素抽出は国税庁所定分析法に従った。

## 【結果・考察】

### 1. 味噌中のオリゴ糖の検出

味噌中のオリゴ糖の分析に，清酒の分析法として構築したHILIC-TOF/MSによるオリゴ糖分析法が適用できるかについて検討を行った。HILIC-TOF/MSでは，液体クロマトグラフィーの移動相がTOF/

MSの導入部イオンソースにおいて気化される過程がある。そのため，移動相又は試料中に不揮発性塩が含まれると，塩が析出して分析が行えない場合がある。味噌は食塩を5～10%程度含むことから脱塩又は十分に希釈した試料を用いる必要があるが，TOF/MSは非常に検出感度が高いため，試料を十分に希釈することで，分析が可能と考えた。そこで，味噌10 gを100 mlになるように水で溶いたのちろ過した試料について，段階的に希釈した試料を調製し，HILIC-TOF/MSによる分析に供したところ，400倍希釈において，オリゴ糖検出が可能であり，この際，塩の析出やそれによる感度低下は見られないことを確認した。

米味噌試料をHILIC-TOF/MSで分析した結果，これまでに存在が確認されていたグルコース単位が重合度 (DP) 3までのオリゴ糖に加えて，DP 5～8のオリゴ糖と質量電荷比値 ( $m/z$ ) が一致するピークが検出された (図1)。本分析法は重合度が大きいオリゴ糖ほど溶出時間が遅くなることから，これらのピークは，味噌中のオリゴ糖であると考えられた。また，本結果においてDP 2～5のオリゴ糖においては，同じ重合度のオリゴ糖でも複数のピークが検出されたことから，これらオリゴ糖の構造異性体が検出されたと考えられた。これは，既に本藤らが味噌中のDP 2のオリゴ糖として，イソマルトースやコージビオース，サケビオース及びメリビオース，DP 3のオリゴ糖として，イソマルトトリオース，パノースを検出した報告<sup>3)</sup>とも一致する。なお，DP 7，8のクロマトグラムにおいて溶出時間12分以下で検出されるシグナルは，これら試料におけるDP 7，8のオリゴ糖量が少ないことによるノイズと考えられる。

DP 2，3についてはHILIC-TOF/MSを用いた別のカラムによる分離・検出を試みたところ (図2)，標準品との溶出時間の比較から，DP 2についてはイソマルトース，コージビオース，サケビオース及びメリビオースに加えて，溶出時間10.6分と16.0分の未知糖を検出し，DP 3については，イソマルトトリオースとマンニトリオースを検出したほか，マイナーな複数のピークが検出された。これらは上記の本藤らの結果<sup>3)</sup>と一致するが，未同定のオリゴ糖が新たに見出された。

### 2. 味噌中のオリゴ糖の含量の推定

HILIC-TOF/MSによる分析から，味噌中のオリゴ糖を網羅的に検出できていることが期待された。そこで，味噌試料42点についてHILIC-TOF/MS分析を行い，直鎖 ( $\alpha$ -1, 4のみ) マルトオリゴ糖を標準品としたオリゴ糖含量の推定を行った。米味噌，麦

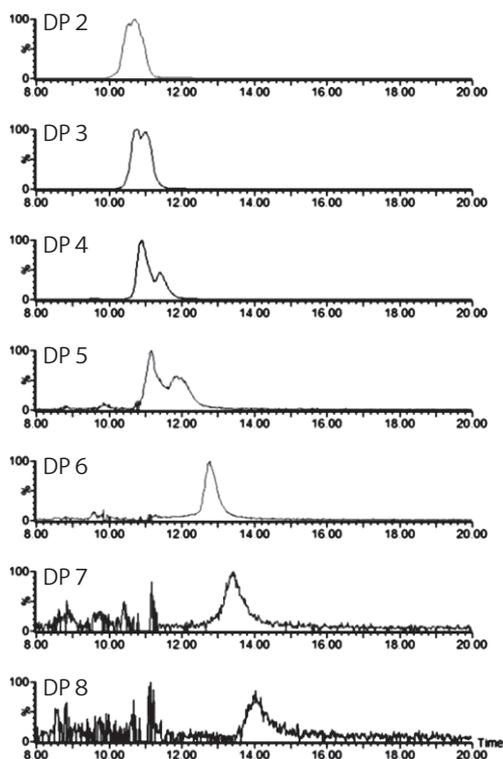


図1. 米味噌試料のオリゴ糖 (DP 2~8) の HILIC-TOF/MS (アミノカラム) における抽出イオンクロマトグラム  
縦軸は各クロマトグラムでの試料内の相対値。

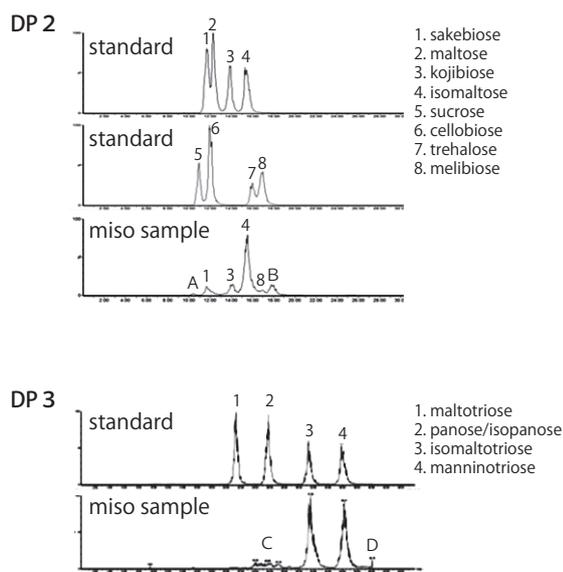


図2. 標準品との比較による米味噌中オリゴ糖 (DP 2, 3) の抽出イオンクロマトグラム  
A~Dは標品と一致しない味噌中の未知糖。

味噌及び豆味噌それぞれについて平均値と最大値, 最小値を表1に示した。麦味噌と豆味噌の試料数が少ないが, 平均値を比較すると, 米味噌と麦味噌は, DP 2, 3, 7, 8の含有量は近く, DP 4, 5については麦味噌の方が多い傾向であった。また, 炭水化物量が少ない豆味噌は明らかにオリゴ糖量が少なかったが, DP 8については米味噌や麦味噌との差は相対的に小さかった。試料中の最大値と最小値の差はDP 4以上で特に大きく, 試料数が多い米味噌では8~20倍の差があった。これは麴歩合の影響が大きいと考えられ, 甘味噌, 甘口味噌, 辛味噌など, 麴歩合が大きく異なる試料が含まれるためと考えられる。麦味噌同士, 豆味噌同士では, 米味噌よりは含有量のバラツキは小さく, 麴歩合の差が米味噌ほどは大きくないと考えられた。なお, 水飴が添加された米味噌 (No. 28, 29) のDP 5~8の含有量が顕著に多く, 特徴的であった (data not shown)。

### 3. 味噌の種類の違いによるクロマトグラムの比較

オリゴ糖の分子種について, 米味噌及び麦味噌, 豆味噌間での相違を調べた。DP4以上については, 現在までにクロマトグラムから分子種を特定することはできないため, 本実験ではマスキングクロマトグラムの比較からその相違を調べることにした。

各種類の味噌の間では, クロマトグラム形状は概ね似ていたことから, 量には差があるものの, 含まれるオリゴ糖分子種については同じ種類の味噌には, 同じ分子種のオリゴ糖が含まれる傾向が示唆された。一方, 米味噌, 麦味噌, 豆味噌のクロマトグラムの違いは顕著であり, 麴原料の違いが, 味噌中のオリゴ糖分子種に影響していることが示された (図3)。DP 2については, 米味噌, 麦味噌ともイソマルトースが多いが, 麦味噌には, セロビオースと予想される分子が多いことが示された。DP 3については米味噌と麦味噌ともイソマルトトリオースが多いことが確認された一方で, 麦味噌には溶出時間の早い未知のDP 3のオリゴ糖が比較的多く含まれることが分かった。これらオリゴ糖については, 標準品との比較を詳細に実施するか, NMRなどにより構造決定を行うことが望ましく, 各味噌に特徴的なオリゴ糖については興味深い。なお, 図3には, 34種の米麴のプロファイルの比較から, 中間的なクロマトグラムと判断したNo. 18の試料の結果を示した。また, DP 7, 8については, クロマトグラムのノイズシグナルが多いため, プロファイル比較は行わなかった。

表 1. 味噌中オリゴ糖 (DP2~8) の推定量 (ppm)

	DP2			DP3			DP4			DP5		
	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.
米味噌	7903	10807	5963	4837	6850	3094	1424	4469	412	287	942	105
麦味噌	7920	8176	7561	6089	7052	5645	2226	3272	1505	680	971	390
豆味噌	566	798	334	458	678	238	91	97	84	74	76	71

	DP6			DP7			DP8		
	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.
米味噌	179	781	96	180	1474	78	105	518	66
麦味噌	248	346	147	153	252	91	139	223	88
豆味噌	61	61	61	73	74	73	71	72	71

米味噌34点, 麦味噌6点, 豆味噌2点の平均値 (Ave.), 及び最大値 (Max.), 最小値 (Min)

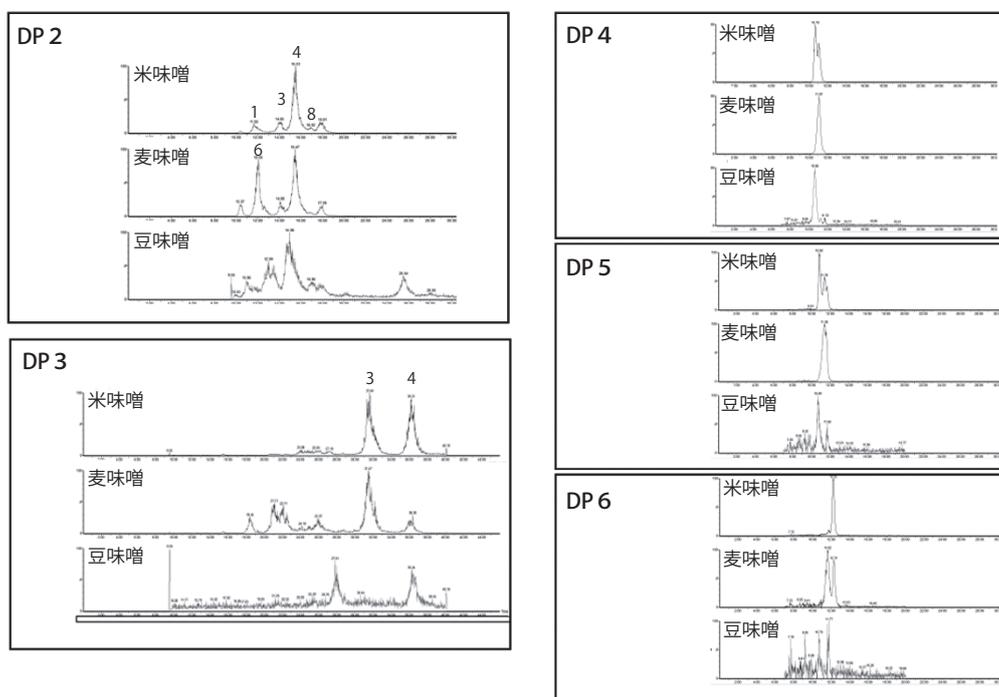


図 3. 各味噌の DP2~6 のマスクロマトグラムの比較

米味噌 (No.18), 麦味噌 (No.40), 豆味噌 (No.27), を試料とした。縦軸はクロマトグラム内の最も強いピークの強度を 100%とした試料内の相対値。DP 2, 3 のクロマトグラム上の数字は図 2 の標準品に対応。

#### 4. オリゴ糖プロファイルの主成分解析

米味噌, 麦味噌, 豆味噌合計42点について, HILIC-TOF/MSによるオリゴ糖分析におけるピーク面積について, 主成分解析を実施した (図 4)。スコアプロットから, 第 1 主成分に麦味噌と豆味噌が, 第 2 主成分では豆味噌のみが分離され, 麴原料により糖組成に特徴があることが確認された。ローディングプロットからは, 第 1 主成分に寄与の大きい成分として, DP4.3, DP2.5, DP2.3が抽出された。クロマトグラムからは, DP4.3は溶出時間11.07分のピークで

あり, 米味噌では検出される試料は34試料中11試料であるのに対して, 麦味噌では6試料すべてにおいて検出された。一方, 豆味噌においては検出されなかった。相関係数を調べると, DP4.3は, DP5.2及びDP6.3と強い正の相関 (0.955及び0.982) があったことから, これらオリゴ糖は共通したメカニズムで生成する可能性がある。DP2.5はイソマルトースであり, 米味噌, 麦味噌ともに最も多く含まれるオリゴ糖と考えられるが, 麦味噌に, より多い傾向がみられた。DP2.3は麦味噌で多い 2 糖であり, 溶出時間から, セ

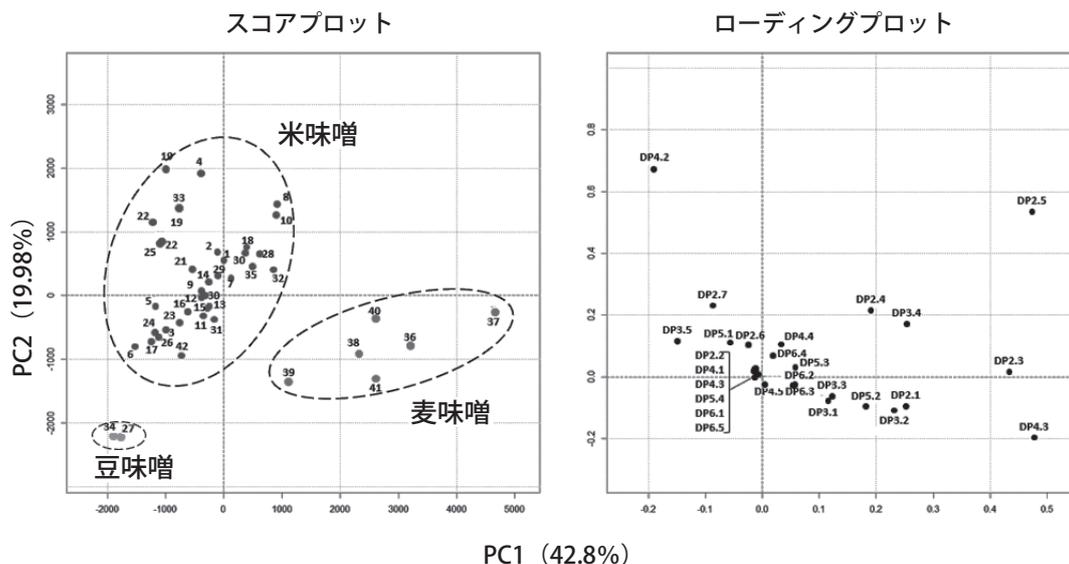


図4. 味噌試料 (42点) オリゴ糖の主成分解析

ロビオースと考えられ、麦中のセルロースの分解物と考えられる。第1主成分の負の方向への寄与が大きい成分として、DP4.2及びDP2.5が抽出された。DP4.2は、米味噌、麦味噌、豆味噌で検出される成分であり、豆味噌の4糖としても最も多い成分であった。

相関行列表から、DP2.1, DP2.3, DP3.1~3, DP4.3, DP5.2, DP6.2~3の存在パターンは同様の傾向で、麦味噌の試料すべてに含まれ、米味噌では一部の試料のみに含まれるという特徴的な成分であることが明らかとなった。DP2.3以外のオリゴ糖は未知であるが、麦に多く含まれる糖類の分解物であることが予想される。

#### 5. ゲノム情報からの麹菌 *Aspergillus oryzae* の $\alpha$ -グルコシダーゼオルソログの推定

味噌中のオリゴ糖の生成には、麹中のデンプンの分解と、 $\alpha$ -グルコシダーゼによる糖転移が関わっていることが示唆されている<sup>3)</sup>。そこで、*A. oryzae* のゲノム情報を利用し、 $\alpha$ -グルコシダーゼ (AGL) の遺伝子を探し、その遺伝子破壊と遺伝子破壊株におけるオリゴ糖生成について解析を行うこととした。*A. oryzae* のゲノム情報からは、 $\alpha$ -グルコシダーゼをコードしていると予想されるオルソログが14遺伝子が見いだされた (表2)。さらにこれら遺伝子のアミノ酸配列情報に対して、局在予測プログラムを用いて、シグナル配列の有無を調べたところ、5遺伝子が分泌型  $\alpha$ -グルコシダーゼをコードすると予想された。そこでこれら5遺伝子について遺伝子発現データベースを

用いて、米麹での発現量を調べたところ、特に強く発現している遺伝子は *agdA* であった。*agdA*<sup>7)</sup> はゲノム上において、麹菌アミラーゼ系遺伝子のデンプンによる誘導に関わる主要な転写因子コードする *amyR* と、アミラーゼ遺伝子 *amyA* と並んで存在していることから、麹菌のデンプン分解においては主要であると予想されてきたが、実際に米麹における  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性に対する寄与については、調べられていなかった。そこで、対照株とともに米麹を作製し、 $\alpha$ -グルコシダーゼ力価を調べたところ、対照株は0.080U/g・koji、*agdA* 破壊株は0.038U/g・kojiであり、*agdA* 破壊により  $\alpha$ -グルコシダーゼ力価が50%以下に低下したことから、AglA酵素は米麹における主要な  $\alpha$ -グルコシダーゼであることが確認された。

#### 6. $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子破壊が米麹中オリゴ糖組成へ及ぼす影響

作製した *agdA* 破壊株の米麹について、対照株の米麹及び味噌用米麹とともに、含まれるオリゴ糖を分析したところ、各米麹にはDP2~6のオリゴ糖が同様に含まれ、それらのクロマトグラムの形状はほぼ同一であったことから、米麹中のオリゴ糖組成や量については、*agdA* のみの遺伝子破壊では影響しないことが分かった。また、標準品として用いた  $\alpha$ -1,4結合のみを持つ直鎖マルトオリゴ糖DP2~6とは、わずかに溶出時間が早い、1本のピークが検出されたことから、直鎖ではないオリゴ糖が含まれることが分かっ

表2. ゲノムデータベースから抽出された $\alpha$ -グルコシダーゼのオルソログ

ID	Ortholog	相同性(%)	Signal peptide	米麴での発現
A0090003001209	<i>A. niger</i> An04g06920/ <i>agdA</i>	76.9	+	>10,000
A0090038000471	<i>A. nidulans</i> AN8953/ <i>agdB</i>	81.6	+	>8,000
A0090026000034	<i>A. niger</i> An02g13240/ <i>agdC</i>	56.8		
A0090103000378	<i>A. niger</i> An02g13240/ <i>agdC</i>	54.4		
A0090001000649	<i>A. nidulans</i> AN7505/ <i>agdD</i>	78.3		
A0090005001084	<i>A. nidulans</i> AN0941/ <i>agdE</i>	74.8		
A0090038000234	A0090038000129 ( <i>malt</i> )	55.5		
A0090020000176	<i>A. nidulans</i> AN4843/ <i>agdG</i>	77.9		
A0090701000639	<i>A. niger</i> An09g03300/ <i>axIA</i>	20.8	+	<100
A0090701000558	<i>A. niger</i> An07g00350/ <i>agdG</i>	71.9	+	<100
A0090102000559	<i>A. niger</i> An09g05880/ <i>agdE</i>	85.2	+	4,000
A0090023000288	<i>A. niger</i> An18g05620/ <i>agdF</i>	88.3		
A0090005000768	<i>A. niger</i> An01g04880/ <i>axIB</i>	99.9		
A0090026000111	<i>A. nidulans</i> AN10935	64.3		

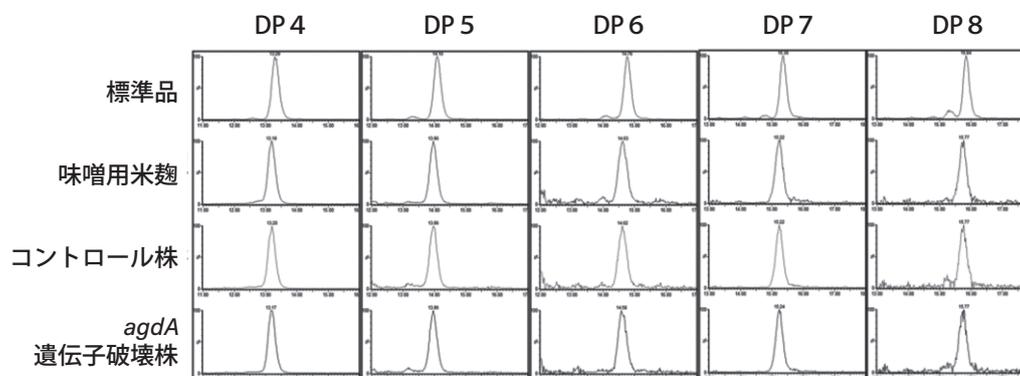


図5. 米麴中オリゴ糖 (DP 4~8) の比較 (抽出イオンクロマトグラム)

た。しかし、米麴中オリゴ糖のクロマトグラムは、米味噌中オリゴ糖のクロマトグラムと異なることから、米味噌中のオリゴ糖は、仕込み後に生成することが強く示唆された。麴中のオリゴ糖が単に味噌に移行するのではなく、仕込み後にオリゴ糖がさらに生成することを考えると、本実験のみからでは、AgdAが味噌中のオリゴ糖生成に及ぼす影響を論じるには不十分である。今後、これら遺伝子破壊株を用いた、味噌の仕込

みを行い、味噌中のオリゴ糖生成への $\alpha$ -グルコシダーゼの影響について調べる予定である。

#### 7. 米麴からの $\alpha$ -グルコシダーゼの精製

これまで $\alpha$ -グルコシダーゼについては麴菌酵素製剤や液体培養からの酵素が報告されているが、味噌製造の観点からは味噌用米麴からの酵素の検討が望ましいと考えられる。そこで、米麴500gを出発材料とし

て、0.5%食塩水抽出、硫酸沈殿、イオン交換クロマト、ゲルろ過クロマトにより部分精製したところ、SDS-PAGEにより分子量約100kDaの染色バンドが得られた。分子量からはAgdA (109kDa)に近いタンパク質であったことから、AgdAと類似した $\alpha$ -グルコシダーゼであると考えられた。

### 【総括と展望】

本実験は味噌中のオリゴ糖を詳細に分離・検出した初めての研究であり、味噌中のオリゴ糖が非常にバリエーションに富んだ組成であることを明らかにした。技術的問題から、分子種を決定することは部分的にしかな達成できていないが、各味噌において特徴的なオリゴ糖については、味噌の品質との関りや機能性などの観点から興味深く、今後の構造解析などの詳細な研究が望まれる。また、本研究では、ゲノム情報からオリゴ糖の生成に関わる糖転移酵素を絞り込むことはできなかったが、オリゴ糖は仕込み後の過程で生成することが分かったことから、実際の味噌醸造を介さなければ研究が難しいことが判明した。今後は部分精製した味噌用米麴の $\alpha$ -グルコシダーゼについての特徴付けや、ゲノム情報から明らかとなった分泌型の $\alpha$ -グルコシダーゼについての遺伝子破壊又は高発現株による味噌醸造などを行うことで、味噌中のオリゴ糖の詳細な生成メカニズムが明らかにしていきたいと考えている。

### 【謝辞】

本研究は一般社団法人中央味噌研究所の研究助成と試料提供により実施したものです。研究遂行に多大なご支援を賜りました一般社団法人中央味噌研究所の常任理事の中野京子氏をはじめ、関係者の方々に心より感謝申し上げます。

### 【文献】

- 1) 本藤 智・他；日本食品工業学会誌, 26, 509-513 (1979)
- 2) 本間 伸夫・他；醗酵工学雑誌, 33, 517-522 (1955)
- 3) 本藤 智・他；日本食品工業学会誌, 26, 469-474 (1979)
- 4) Tokuoka M., *et al.* ; Journal of Bioscience and Bioengineering, 124, 171-177 (2017)
- 5) Oguro Y., *et al.* ; Journal of Bioscience and Bioengineering, 127, 570-574 (2019)
- 6) Tokuoka M., *et al.* ; Journal of Bioscience and Bioengineering 110, 665-669 (2010)
- 7) Minetoki T., *et al.* ; Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 59, 1516-1521 (1995)

# 研究助成報告

平成30年度研究助成による研究報告

研究報告

## 味噌健康機能性の多様性と合わせみその可能性に関する 探査的応用研究

小野 明日香, 石田 安理紗, 上原 誉志夫

Multiple health benefits of miso and usefulness of its combination

Asuka ONO, Arisa ISHIDA, Yoshio UEHARA

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

本年度の研究では、麦麴味噌および豆麴味噌の健康機能性を明確にしたのち、健康機能性から判断した合わせみその有用性を実証することを目指した。

### I. 麦麴味噌と豆麴味噌における血圧、糖代謝への有用性、米麴味噌との違い

我々は、最近開発した麦麴発酵食品がフルクトース負荷での2型糖尿病発症を抑制することを見出している。本研究では、これまで米麴味噌で実施してきた研究手法に準じ、麦麴味噌による血圧、糖代謝への健康機能性について検討した。7週齢Dahl食塩感受性ラットに5%麦麴味噌水を4週間投与することで、実験期間中の血圧の推移と体重、食餌および飲水摂取量を計測するとともに、実験終了時には代謝ケージに移し、24hr尿を採取し糖尿病性腎機能障害の防止効果についても検討した。単位食塩摂取量当たりの血圧は、麦麴味噌で食塩水群に比し有意に低下したが、腎でのNa排泄量には変化がみられず、米麴味噌についてのこれまでの成績とは異なる結果であった(図1)。また、血糖値は麦麴味噌で低下し、したがって

HOMA-Rも有意に低下したことからインスリン感受性が麦麴味噌で改善することがあきらかとなった(図2)。

豆麴菌発酵食品の健康機能性については系統的に検討されたものがなく、不明の点が多い。しかし、ヒトでは米麴味噌によりLDL-C及びTGが低下することも見出している(薬理と臨床 2016;44(11):1601-1612.)。これは、大豆由来であることが考えられることから、豆麴味噌の健康機能性については、脂質代謝を含めたメタボリック症候群関連についてスクリーニング的に検討するのが適切と考えた。7週齢Dahl食塩感受性ラットを用い5%豆麴味噌水を与え、メタボリック症候群の対象項目である、血圧、糖代謝への影響を調べた。麦麴味噌と同様に、単位食塩摂取量当たりの血圧は、豆麴味噌で食塩水群に比し有意に低下したが、腎でのNa排泄量には変化がみられず、米麴味噌についてのこれまでの成績とは異なる結果であった(図1)。豆麴味噌では、血糖値、血清インスリン値ともに変化はなく、糖代謝には影響しないことが明らかとなった。

このように、麴の種類により、健康機能性には違いがみられる。甘酒や酒粕でも、腎Na利尿作用が亢進

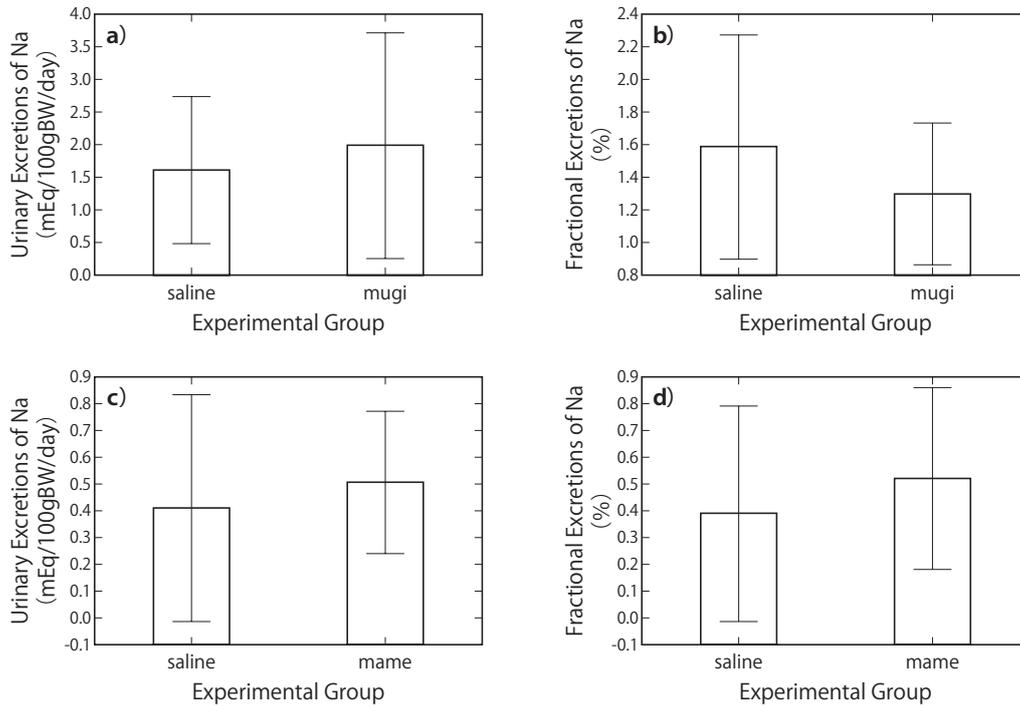


図1. Dahl 食塩感受性ラットにおける麦味噌及び豆味噌水投与と腎 Na 利尿との関係

Dahl 食塩感受性ラットに 5% 麦味噌水 (graph-a, b) または 5% 豆味噌水 (graph-c, d) を与えた時の腎での Na 排泄量 (graph-a, c) と Na 排泄分画に及ぼす影響を食塩水群 (0.6% saline) との比較。いずれも有意な変化はみられず、麦味噌水及び豆味噌水には米味噌水にみられるような腎 Na 利尿作用がないことが分かる。

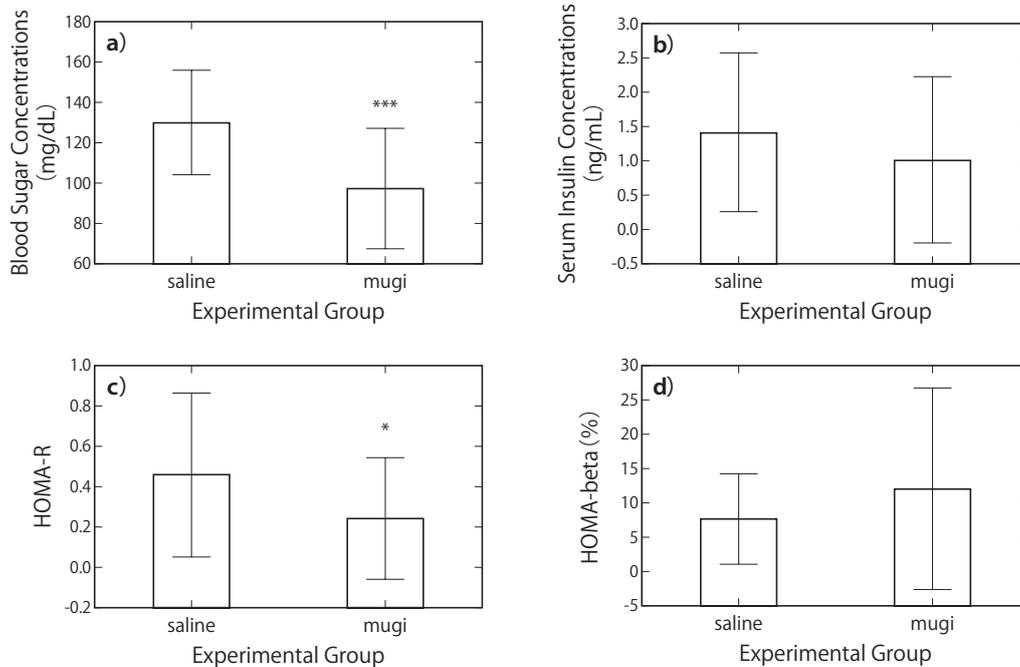
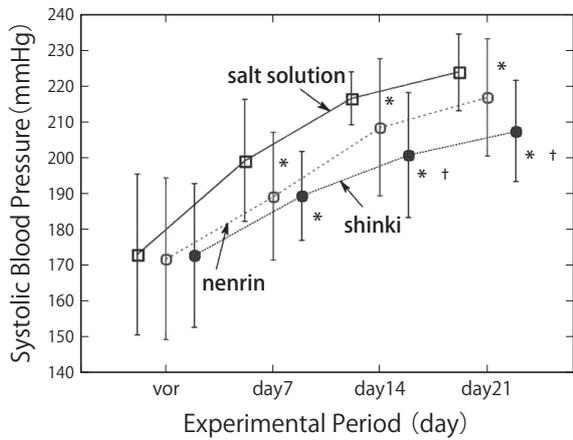


図2. Dahl 食塩感受性ラットにおける麦味噌水が糖代謝に及ぼす影響

Dahl 食塩感受性ラットに 5% 麦味噌水を与えた時の血糖 (a), 血清インスリン値 (b), HOMA-R (c) および HOMA-beta 値 (d) を示す。\*P<0.05, \*\*\*P<0.005 vs saline 群。

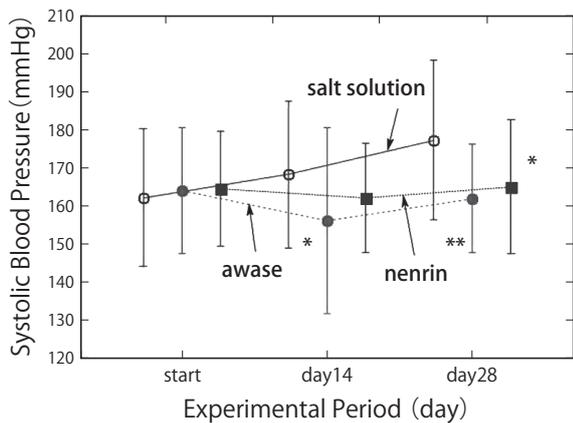


**図3. Combination effects of Marukome shinki miso with Marukome Nenrin on salt-induced hypertension of Dahl rats**

Salt solution, group given salt solution; shinki, Marukome shinki miso with ACE inhibitory activity; and nenrin, Marukome Nenrin miso group. The difference was analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher LSD test. The values in graph were expressed as means  $\pm$  SD (n=8 in each group).

\*P < 0.05 vs salt solution group, † P < 0.05 vs nenrin miso group.

Ref. Hypertension Research 2019;42:790-800.



**図4. Combination effects of Marukome shinki miso with Marukome Nenrin on salt-induced hypertension of Dahl rats**

Salt solution, group given salt solution; awase, combination of Marukome shinki and Marukome Nenrin miso; and nenrin, Marukome Nenrin miso group. The difference was analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher LSD test. The values in graph were expressed as means  $\pm$  SD (n=8 in each group).

\*P < 0.05, \*\*P < 0.001 vs salt solution group.

することから、腎Na利尿作用には米麹発酵が関与することがわかる。一方、血管拡張によると考えられる抗高血圧作用は、麦麹、豆麹味噌にもみられ、米麹味噌のこれまでの成果とも合わせると、大豆の発酵過程で出現することが考えられた。実際大豆の発酵を欠いた豆乳では降圧作用や腎Na利尿作用はみられていない。

ところで、味噌と腎Na・利尿活性を論じる場合、大豆由来のアンジオテンシン変換酵素阻害活性（ACE）を避けてはとおれない。ACE阻害はアンジオテンシンII産生を抑制し、アルドステロン分泌を低下させることで腎Na・利尿を増強する。我々はACE阻害活性を増強した味噌を作成してその降圧への影響を調べたところ、自然発症高血圧モデルラット（SHRSP/Izm）では通常の市販味噌より強い降圧活性を示した（図3）。しかし、通常の味噌で見られる尿中Na排泄の増加はACE阻害活性を強化した味噌では観察されなかった。このことは、味噌にみられる腎でのNa利尿活性は、ACE阻害では説明できず、別のメカニズムが働いていることが考えられる。

## 文献

- 1) 滝田莉菜, 根本清花, 石田安里紗, 稲井里恵, 小野明日香, 神保彩妙, 永山千帆里, 上原誉志夫: 豆麹味噌の健康機能性に関する研究. 第65回日本栄養改善学会学術総会. 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター/新潟. 2018年9月3-5日
- 2) 石田安里紗, 根本清花, 神保彩妙, 滝田莉菜, 稲井里恵, 上原誉志夫: 味噌製造方法と健康機能性発現との関係性に関する研究. 第16回日本機能性食品医用学会 総会. 新潟. 11/15-16, 2018
- 3) 小野明日香, 石田安里紗, 上原誉志夫: 味噌に含まれる各種機能性成分の解明. 日本醸造協会誌 2019;114:402-411.
- 4) 上原誉志夫: 1st Brain Storm Conference on Miso 味噌醸造と健康機能関連の最前線. 共立女子大学地下一階B101教室, 平成30年10月25日13:00~17:00pm

## II. 合わせ味噌の有効性を検証する一動物実験

しかし、このように味噌や発酵食品では個々の食品に特徴的な健康機能性を発揮することが明らかになったことから、健康機能性の増強を目指した合わせ味噌の検討が必要となる。これまで合わせ味噌は嗜好性の

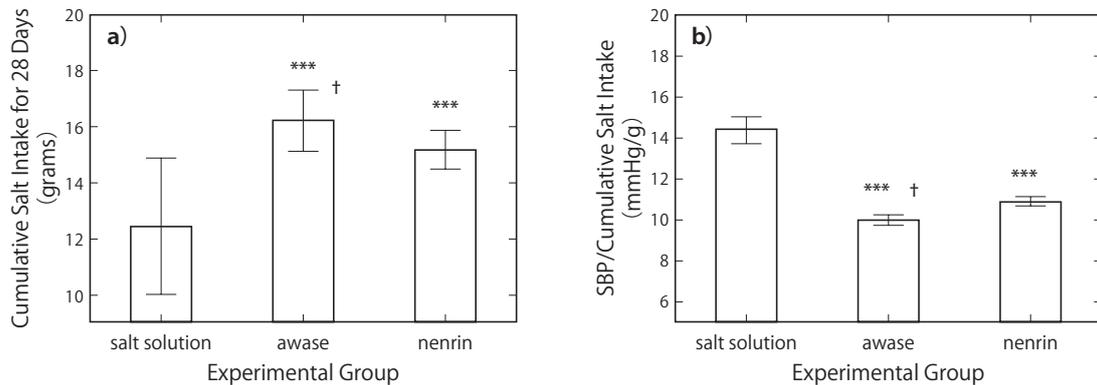


図5. Cumulative salt intake and normalized SBP on day 28 to cumulative salt intake

Based on amount of solutions intake and food consumption during 28 days, cumulative salt intake is estimated as shown in graph (a). SBP normalized by cumulative salt intake during the experiment is shown in graph (b). Salt solution, group given salt solution; awase, combination Marukome shinki and Marukome Nenrin miso; and nenrin, Marukome Nenrin miso group. The values in graph were expressed as means  $\pm$  SD (n=8 in each group). The difference was analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher LSD test.

\*\*\*P < 0.001 vs salt solution, † P < 0.05 vs nenrin.

点から開発されてきたが、各種味噌独自の健康機能性が明らかになったことから、このような考えからの開発も重要である。降圧治療の点からは、利尿薬使用時には腎還流量が低下し、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) が活性化されることで降圧効果を減弱することが知られている。利尿薬使用時には、RASを抑制する操作が必要となる。米麴味噌では腎Na利尿作用が降圧に強く関与するが、理論的にはRASが亢進していると考えられる。したがって、米麴味噌にACE阻害活性が強化された味噌との合わせ味噌では、降圧が強化される可能性が考えられる。我々はACE阻害活性を強化した味噌の降圧特性をSHRSP/Izmラットを用いて検討し、さらに、合わせ味噌が高血圧者の血圧を抑制するかヒト介入試験を実施した。

SHRSP/Izmラットに6%食塩水、5%米麴味噌 (nenrin) または5%MK-34-1味噌水 (shinki) を投与し、4週間血圧への影響を観察した。図3に示すように、RASおよび交感神経活性が血圧上昇に関与するモデルでは、ACE阻害活性を強化したMK-34-1味噌で米麴味噌より有意に強い降圧がみられた。このことは、MK-34-1味噌の降圧にRAS抑制が関わっている可能性が示唆された。

次に本新規味噌を用いて腎Na利尿効果が強い米麴味噌 (nenrin) とMK-34-1味噌との合わせ味噌 (2:1, w/w) のDahl 食塩感受性ラットにおける食塩高血圧への抑制効果をnenrinと比較した (図4)。Awaseおよびnenrinとは同様の降圧作用を示したが、両群間

で食塩摂取量に差がでたため、血圧値を食塩摂取量で標準化したところ、合わせ味噌群では米麴味噌単独群より有意な血圧抑制効果がみられた (図5)。このことは、合わせ味噌中の米麴味噌の降圧効果がMK-34-1味噌で増強したことを示しており、薬物併用治療でみられるような効果が食品でも観察されることを示している。

これらのことは、合わせ味噌により健康機能性が相乗的に増強する可能性が示唆している。米麴味噌と麦麴味噌との合わせにより、食塩感受性高血圧を抑制し、糖代謝改善効果のある味噌を容易に作成可能となることを示唆しており、合わせ味噌の技術は健康機能性の面で応用範囲が広がると考えられる。

## 文献

- 1) Hiroe Sakuyama Tomari, Misa Uchikawa, Aki Yamazaki, Satomi Hirabayashi, Shoko Yamakawa, Manabu Kitagawa, Minami Yamada, Seiki Itou, Tetsuro Yamamoto, Yoshio Uehara: Newly manufactured Marukome MK-34-1 miso with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and its antihypertensive property on genetic hypertensive models of rats. Hypertension Research 2019;42:790-800
- 2) 内川実紗, 佐々木玲子, 山川称子, 上原誉志夫,

小池祥悟, 北川学, 山本哲郎: ACE阻害活性強化短期熟成試験味噌の自然発症高血圧における有効性. 第63回日本栄養改善学会学術総会. 一般演題(口頭) 2016年9月9日, 15:00~16:12, B会場(小会議室〈4〉[3階]) リンクステーションホール青森

3) 内川実紗, 佐々木玲子, 山川称子, 上原誉志夫, 小池祥悟, 北川学, 山本哲郎: ACE阻害活性強化短期熟成試験味噌の自然発症高血圧における有効性. 第39回日本高血圧学会総会. 一般口演. 高得点演題, 2016年10月1日, 仙台国際センター 桜

### Ⅲ. 合わせ味噌の有効性を検証する 一ヒト介入試験

38名の正常高値からステージIの本態性高血圧者を対象に, プラセボ(食塩非添加)比較介入試験を2:1 合わせ味噌(通常米味噌対MK-34-1 ACE活性阻害強化味噌)にて実施した。本研究は, 味噌汁摂取群とプラセボ摂取群(大豆粉末水)の2群について, ランダム化プラセボ対照二重盲検ヒト介入試験である。38名の正常高値からステージIまでの高血圧者に, 一日2杯の合わせ味噌水(2:1(w/w)一般味噌対ACE阻害強化味噌, 食塩含量は一日3.8グラム2:1,w/w)または栄養成分を合わせた大豆粉末水(食塩含量は0グラム)を8週間摂取し, この間の日中の血圧と睡眠中の血圧を測定した。日中の血圧は試験期間中2群間で変化はなかった。しかし, 夜間血圧は, 試験開始前には両群で差はなかったが8週後には午前2時, 午前4時において味噌摂取群で有意に血圧が低下した。ステージIの高血圧者のみのサブ解析を実施しても結果は同様であり, 味噌は高血圧者の夜間血圧を有意に低下させた。これらのことにより, 長期味噌摂取が食塩摂取量の増加にも拘わらず, 高血圧者における夜間血圧を低下させることが初めて実証された。合わせ味噌による健康機能性強化への道筋を示した。詳細は平成31年度日本高血圧学会にて発表した。

### 文 献

- 1) 上原誉志夫, 藤乗嗣泰, 石光俊彦. シンポジウム 9 次世代降圧薬の開発と臨床研究. 食品機能性の解明と新たな非薬物療法の可能性~味噌の基礎的臨床的機能性評価~日本高血圧学会総会 2019/10/26 京王プラザ/東京.
- 2) Hiroaki Kondo, Hiroe Sakuyama Tomari, Shoko Yamakawa, Manabu Kitagawa, Minami Yamada, Seiki Itou, Tetsuro Yamamoto, Yoshio Uehara: Long-term intake of miso soup decreases nighttime blood pressure in subjects with high-normal blood pressure or stage I hypertension. *Hypertension Research* 2019;42:1757-1767. <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0304-9>.

### おわりに

本研究では, 味噌としてのクラス効果とともに, 味噌にはそれぞれに独自の健康機能性を有することが明らかになった。さらに, それらの健康機能性を指標に味噌を合わせることで, 新たな機能性を創出することが可能である。このことは, 個々人の健康上のニーズにあった味噌を作り出すことができることを意味し, 合わせの技術がさらに発展する可能性を秘めている。今後は, さらに各地の味噌の独自性を明らかにして, 合わせ味噌への道を広げることが求められる。

味噌に含有される食塩の健康への影響は科学的にも払拭された現在, 新たな観点から味噌の利用を考える必要があり, 合わせ味噌はそれへの答えの一つと考える。嗜好性や健康機能性の面から積極的な開発や応用が期待される。

研究報告

## 味噌のレジリエンシーを高める効果の分子機構解析

岡田 拓実<sup>1</sup>, 内田 千代子<sup>2</sup>, 内田 隆史<sup>1</sup>

Analysis of Molecular Mechanism behind the effect of miso on the increase of resiliency

Takumi Okada<sup>1</sup>, Chiyoko Uchida<sup>2</sup>, Takafumi Uchida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Cell Science, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,  
468-1 Aoba, Aramaki, Aoba, Sendai, Miyagi 980-0845, Japan.

<sup>2</sup> Department of Human Development and Culture, Fukushima University,  
1 Kanayagawa, Fukushima, Fukushima 960-1296, Japan.

### 要旨

味噌には生体が病気になりかけた時にそれを跳ね返す力（レジリエンシー）があるように思われる。しかし、レジリエンシーについて詳細な検討はされていない。我々はこれまでプロリン異性化酵素であるPin1を欠損させたマウスの解析を行い、Pin1はレジリエンシーを生み出す分子であるという結果を得ている。これらを考え合わせ、我々は、味噌はPin1を介してレジリエンシーを高める機能を発揮しているのではないかという仮説をもつに至った。味噌のPin1のプロリン異性化酵素活性に対する影響について解析した結果、*in vitro*で味噌の水溶解液がPin1のプロリン異性化酵素活性を高めることを見出した。Pin1の活性を低下させる阻害剤や食品についてはこれまでに多くの報告があるが、活性を上昇させる食品はこれまでにまだ報告はない。今後、発見の重要性を鑑み、より慎重に解析を行うとともに、細胞や生体レベルで味噌のPin1活性への影響を調べ、さらにレジリエンシーを高める効果との関連について明らかにしていくつもりである。

### 導入

我々は、これまで約25年にわたり、プロリン異性化酵素Pin1について研究してきた。Pin1は細胞内の情報伝達を促進し、細胞がストレスやホルモンの刺激にタイミングよく迅速に応答する機能を有しており、疾患とも関連がある。細胞が癌化した時には、Pin1が高発現しすぎると癌細胞の増殖シグナルを異常に活性化させるため癌化を促進する危険がある。したがって、Pin1の発現レベルをむやみに高めることは避けるべきである。

しかし、Pin1の活性がある程度高くないと、加齢することで発症することが多くなる疾患の予防ができない。例えば、Pin1の発現量の低下は骨粗しょう症、糖尿病、慢性腎疾患、網膜異常、アルツハイマー病などの神経変性疾患の発症や感染症による臓器障害を引き起こしやすくなることから、Pin1はこれらの疾患を予防する効果があると推察される<sup>1), 2), 3), 4)</sup>。我々は、高齢化と関連している多様な疾患は、Pin1の発現レベルや酵素活性が低下することで、生体のレジリエンシーが低下した結果、り患しやすくなるのだ

と推測している。したがって、もし、低下したPin1の発現レベルまたは酵素活性を回復させることができれば、生体のレジリエンスを高めることができるという仮説を持った。

我々は、味噌摂取がPin1の発現レベルや活性の上昇に関係しているのではないかと推察している。なぜなら、味噌には多くの病気の予防効果や改善効果があることが知られ、またその生理機能を生み出す分子機構も多様であることが報告されており、味噌のレジリエンスの分子機構にはPin1を介した分子機構も存在する可能性があると考えからである。

## 方法

### 味噌試料の調整

10.00 gの味噌（米みそ，中央味噌研究所より供与）に5 mlのMQ水を加え，氷冷しながらすり鉢と乳棒で破碎した。破碎後，MQで100 mlにメスアップし，10,000×g，4℃，15分遠心分離した。上清を回収し，0.2 μmフィルターでろ過した。これを10 g / 100 ml 味噌抽出液とし，本実験に用いた。

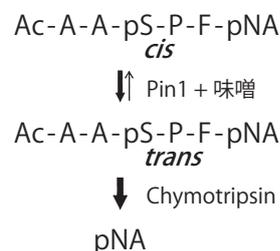
### 活性測定

活性測定は4℃で行った。キュベットに，1500 μL Buffer (35 mM HEPES (ナカライテスク) pH7.8) と味噌溶解液 1.5 μLを加え，Pin1 タンパク質20 μLを入れ10分間攪拌しながら，10 μLのα-chymotrypsin (wako) (30 mg/mL in 0.1 M HCl) を添加し，390 nmの吸光度 (pNA濃度) の測定を開始した。さらに，測定開始から15秒後に，30 mg/mLの合成基質 (30 mg/mLのSuc-A-E-P-F-pNA (BACHEM) in 0.47 M LiCl (wako) /TFE (東京化成工業)) を添加し，0～100秒間の吸光度をAgilent 8453 UV-Vis spectrophotometer (California, USA) で経時的に測定しデータ解析を行った<sup>5)</sup>。

## 結果

今回，我々は味噌がPin1に作用しPin1の活性を上昇させることを*in vitro*でのPin1の活性測定で明らかにした。Pin1は，セリン/トレオニン-プロリンを含むペプチドの蛍光産生性ペプチド基質Ala-phosphoSer-Pro-Phe-pNAのphosphoSer-Pro ペプチド結合の *cis*・*trans* 異性化反応を促進させる。phosphoSer-Proの代わりに酸性アミノ酸であるグルタミン酸 (Glu) を用いることができ，ペプチド合成

を安価にすることが可能である。我々は本実験に適したペプチドをこれまでに調べ，Ala-Glu-Pro-Phe-pNA (Bachem社) が最も適していることを見出した。ここに，プロテアーゼであるトリプシンを加えると，トリプシンは，Glu-Proペプチド結合の *trans* 体のみを特異的に認識し切断し，pNAを遊離させる。遊離したpNAを吸光度測定することでPin1の酵素活性を測定できる。このプロテアーゼカップリングアッセイ系に，味噌懸濁液ろ過液 (味噌懸濁液を0.2 μmのフィルターで濾過することで散乱光を低下させた) を加え，味噌のPin1の酵素活性への影響を調べた。



プロテアーゼカップリングアッセイ法を用いて味噌の影響を解析する際に，味噌中に麹菌由来のプロテアーゼが存在することを特に注意すべきである。この点に注意し，詳細なコントロール実験を行い，味噌がPin1の酵素活性を上昇させることを明らかにした。この酵素活性には味噌中のプロテアーゼの影響はほとんど認められなかった。

これらの詳細な解析を数回行った結果の平均値を以下に示した。図に示したように，味噌 (100 μg/ml, 50 μg/ml)の添加により，Pin1の酵素活性が上昇した。

Pin1は酵素活性を有するPPIaseドメインのみでなく，リン酸化タンパク質に結合するWWドメインも有しており，こちらのドメインに味噌が作用している可能性もあるので，WWドメインに結合する可能性についても検討するためPin1-FRET法を構築した<sup>6)</sup>。我々の作製したPin1-FRET法で検討した限りではWWドメインへの影響認められなかった。本法は微弱な蛍光を測定する方法であるので，WWドメインへの結合の有無については今度の詳細な検討が必要である。

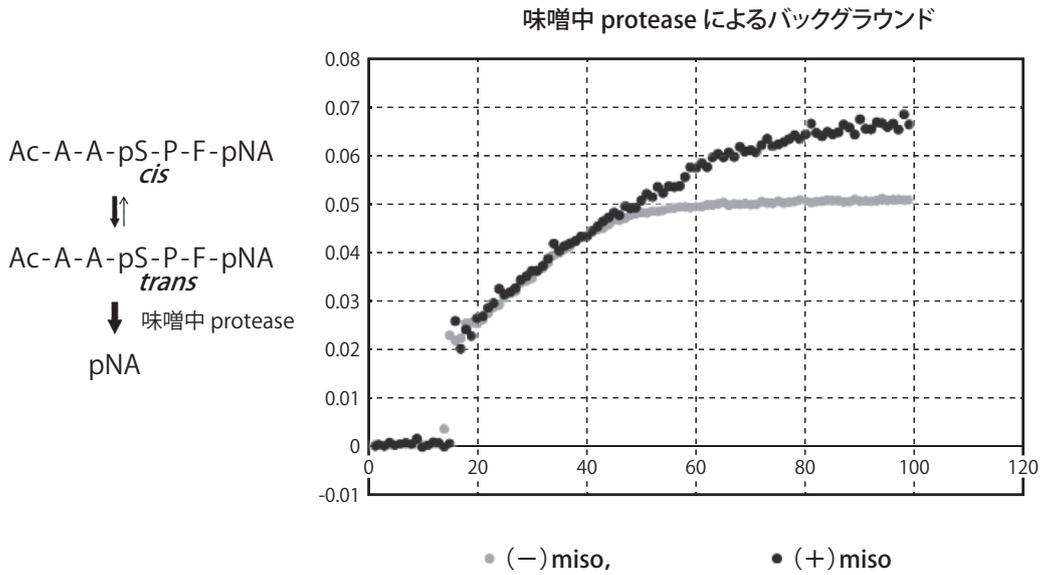
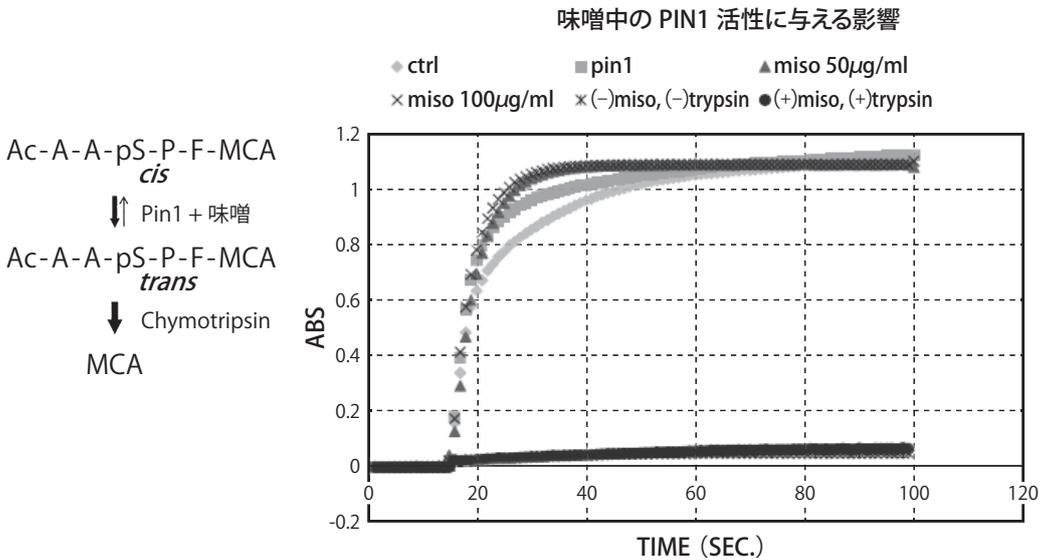
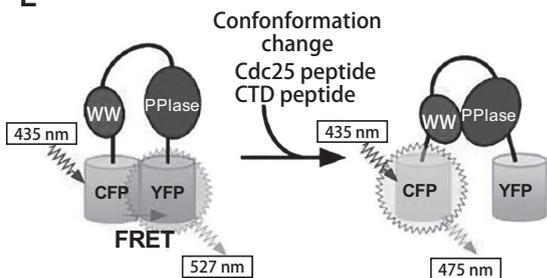


図. Pin1 酵素活性測定 (protease coupling 法) 味噌に含まれる protease によるバックグラウンド



E



考 察

研究当初は、Pin1-KOマウスが肥満を防止することから、味噌の抗肥満効果がPin1の阻害効果によるものだとしたら、我々の仮説と全く逆になるという不安もあった。しかし、実際に測定を行ったところ、味噌はPin1の酵素活性を阻害するのではなく、上昇させることを発見した。

これは約20年ものあいだ、Pin1の活性を調節する化合物を探索してきた我々にとっては大変驚きうれしい結果であった。なぜなら、我々はこれまで阻害剤は発見したが、活性を上昇させる化合物や食品は発見できなかったからである。

Pin1の活性を上昇させる活性を有する食品の発見は初めてであり、そういう意味で味噌は大変貴重な食品であると言える。Pin1欠損マウスは、加齢すると様々なヒトに見られる疾患と同様の症状を示すことから、Pin1は加齢疾患を防ぐ役割を有していると予想している。したがって、Pin1活性を上昇させることができれば、健康長寿が可能になる。特に現在、アルツハイマー認知症の予防や進行防止に有効な薬剤はないことから、味噌がそのような機能を有することが解明されれば意義は大きい。したがって、今後、特に、味噌のアルツハイマー病防御機能について疫学的な検討がなされることが期待される。また、最近、世界的な問題となっている新型コロナウイルスSARS-CoV-2感染では、サイトカインが過剰に産生されることが肺炎を起こす原因となっている可能性が指摘されている。我々は、Pin1が炎症性サイトカインの産生を抑制することを見出している<sup>4)</sup>。Pin1を活性化する味噌が感染症による臓器障害を抑制するかどうかの疫学的検討も今後、期待される。

## 謝 辞

本研究を助成していただいた一般社団法人中央味噌研究所に感謝します。

## 引用文献

- 1) Liou, YC., Sun, A., Ryo, A., Zhou, XZ., Yu, ZX., Huang, HK., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T. and Lu, KP. (2003) Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*, 424, 556-561. 10.1038/nature01832
- 2) Takahashi, K., Uchida, C., Shin, RW., Shimazaki, K. and Uchida, T. (2008) Prolyl isomerase, Pin1: new findings of post-translational modifications and physiological substrates in cancer, asthma and Alzheimer's disease, *Cell and Mol Life Sci.* 65, 359-375. 10.1007/s00018-007-7270-0
- 3) Shimizu, T., Kanai, K., Sugawara, Y., Uchida, C., Uchida, T. (2018) Prolyl isomerase Pin1 directly regulates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in mouse brains. *Front Pharmacol*, 9, 1351. 10.3389/fphar.2018.01351
- 4) Akiyama, H., Misawa, T., Ono, M., Uchida, C., and Uchida, T. (2011) Prolyl isomerase Pin1 protects mice from endotoxin shock *PLoS One*, 6(2): e14656. 10.1371/journal.pone.0014656
- 5) Uchida, T., Takamiya, M., Takahashi, M., Miyashita, H., Ikeda, H., Terada, T., Matsuo, Y., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Fujimori F. and Hunter, T. (2003) Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation, *Cell Chem Biol* 10, 15-24. 10.1016/S1074-5521(02)00310-1
- 6) Hidaka, M., Okabe, E., Hatakeyama, K., Zook, H., Uchida, C., Uchida, T. (2018) Fluorescent resonance energy transfer -based biosensor for detecting conformational changes of Pin1. *Biochem Biophys Res Commun*, 505, 399-404. 10.1016/j.bbrc.2018.09.123

## 研究報告

行動科学に基づく子どもの味噌汁摂取行動の把握と  
その関連要因の検討林 芙美<sup>1</sup>, 武見 ゆかり<sup>1</sup>, 緒方 裕光<sup>2</sup>, 嶋田 雅子<sup>3</sup>

Evaluation of miso soup intake of children and its related factors based on behavioral science

Fumi HAYASHI<sup>1</sup>, Yukari TAKEMI<sup>1</sup>, Hiromitsu OGATA<sup>2</sup>, Masako SHIMADA<sup>3</sup><sup>1</sup> Nutrition Ecology, Kagawa Nutrition University,<sup>2</sup> Epidemiology and Biological Statistics, Kagawa Nutrition University,  
3-9-21 Chiyoda, Sakadoshi, Saitama 350-0288, Japan.<sup>3</sup> Health Promotion Research Center, Japan Association for Development of Community Medicine,  
2-6-4 Hirakawa-cho Chiyoda-ku, Tokyo 102-0093, Japan.

## I はじめに

味噌汁は我が国の伝統的な日常食であり、汁物としてだけでなく、具材によっては副菜にも主菜にも応用できる。近年では、味噌汁を具沢山にした「一汁一菜」を栄養バランスを整えるための手軽な食事パターンとして提唱する動きもある。しかし、一般的な栄養指導では減塩のために味噌汁の摂取を控えることが提案されることも多く、減塩を意識して味噌汁の回数を減らしている者も少なくない<sup>1)</sup>と考える。味噌汁摂取が食塩摂取量の増加と有意に関連すると報告する研究もある<sup>1)</sup>が、野菜をたっぷり入れた健康に配慮した味噌汁の食べ方は、生活習慣病予防を視野に入れた減塩対策や野菜摂取の改善において実現可能性が高いことを示す先行研究もある<sup>2)</sup>。

1990年代に、宮城県内の2町で行われた食事調査では、味噌汁はナトリウム (Na) 摂取源として寄与率が最も高かった (17.1%) が、同時にカリウム (K) 摂取源でもあった (10.6%) ことが報告されている<sup>3)</sup>。

さらに、味噌汁は日本人で不足しやすい鉄の摂取源としても寄与率が高かった (16.2%)。男性勤労者の野菜摂取と料理の関連を調べた研究<sup>4)</sup>でも、味噌汁はサラダなどに比べると野菜摂取量に寄与する割合は低い<sup>4)</sup>が、野菜摂取量の多い者では少ない者に比べ味噌汁の出現割合が高く、味噌汁摂取が成人男性の野菜摂取を改善する上で有効な手段になりうる。血圧の改善には、野菜、果物などの食品からKを積極的に摂取することが推奨され、Naの摂取量が多い者ほど、Kの降圧効果が顕著であることが示されている<sup>5)</sup>。そこでNaを減らすだけでなく、Kを増やし、Na/K比を下げる<sup>6)</sup>ことが循環器疾患を予防する上で重要と考えられている。日本人の食事摂取基準 (2020年版) でも、DASH食などのいくつかの介入研究の成果を引用し、Na/K比を下げる<sup>6)</sup>ことが、NaあるいはKそれぞれの摂取量を減増させるよりも降圧効果があることを示している<sup>6)</sup>。

しかし、成人での味噌汁摂取に関する報告はいくつかある<sup>1, 3, 4)</sup>ものの、子どもにおいて味噌汁摂取がどの

ような食行動や食物摂取状況，さらに健康・栄養状態と関連するかについて調べた先行研究は限られている。また，先行研究では味噌汁単独ではなく，スープやその他の飲み物と合わせて「汁物」として評価しており<sup>7-9)</sup>，子どもにおける味噌汁摂取行動の実態やその関連要因についての先行研究は著者が調べた限り見当たらない。

そこで，子どもにおける味噌汁の摂取行動の実態を明らかにし，摂取行動に影響する要因を行動科学に基づき検討し，さらに，食物摂取状況との関連を検討する。食物の選択に影響を与える要因には，1) 生理的要因（健康状態，嗜好など），2) 認知的要因（信念，知識，価値観など），3) 環境的要因（周囲のサポート，食物の入手可能性など）等があるが，学童期では環境的要因の影響が強いとされる。そこで，味噌汁の摂取に関連するこれらの要因の影響を検討する。

## II 方法

### 1. 対象と調査方法

2018年9月19日～27日に調査を実施した。対象者は，1町立小学校3校に在籍する5～6年生男女201名とその保護者402名である。調査内容は，1) 質問紙調査，2) 尿検査，3) 食事調査（児童のみ）の3つで，質問紙調査及び尿検査は，全ての児童およびその保護者を対象に実施した。保護者への依頼は，児童1名につき，男性保護者1名，女性保護者1名とした。調査票及び採尿キットの配布はクラス担任を通じて行い，回収も児童を介してクラスごとに行い，調査票及び尿の提出をもって協力に同意したとみなした。食事調査（平日2日，休日2日）は，事前に保護者から書面にて同意が得られた児童のみ（34名）を対象に実施した。依頼状，食事記録票，食事記録の記入例及びマニュアル，デジタルカメラ一式，および写真撮影用のランチョンマットは，調査開始1週間前に担任を通じて配布し，記録用紙等の回収はクラスごとに行った。

### 2. 調査内容

#### 1) 質問紙調査

児童および保護者を対象に無記名自記式質問紙調査を実施した。事前に世帯ごとのIDを割付け，解析の際に児童と保護者の回答を関連づけられるようにした。また，保護者向けの調査票には，表紙に「男性の保護者用」「女性の保護者用」と記載し，誤って異なる調査票に回答することを防いだ。調査項目は，食物選択に関連する要因である，1) 個人内要因（健康状態，嗜好，関心，知識など），2) 個人間要因（家族と

の共食，食事中的関わりなど），3) 環境的要因（家庭や学校，地域での食物の入手可能性など）について回答を求めた。食塩摂取に関する食行動や態度については，先行研究<sup>13, 14)</sup>を参考に調査項目を決定した。調査に先立ち，同年代の複数の親子に回答を依頼し，回答のしやすさなどの確認を行った。

#### 2) 尿検査

児童および保護者を対象に，早朝第一尿の随時尿を用いて，尿中クレアチニン，ナトリウム，カリウムを測定した。測定は株式会社エスアールエルに委託した。1日推定食塩摂取量は，Tanaka式<sup>10)</sup>を用いて算出した。なお，京都府内のK小学校に在籍する9～11歳の児童を対象に行われた先行研究においても，早朝第一尿からの推定食塩摂取量の算出にTanaka式を用いていた<sup>9)</sup>。なお，算出に必要な身長，体重，年齢のデータは，質問紙で把握した。その際，食塩摂取量の推定にこれらの正確な情報が必要であることを質問紙に示し，さらに児童については直前の学校健診時の値の記入を依頼した。また，ナトリウムは便や汗でも分泌され，86%程度が尿中に排泄されることが報告されている<sup>11)</sup>ことから，0.86で除した。その他，尿中ナトリウム・カリウム比（以下，「Na/K比」）も算出した。

#### 3) 食事調査（写真記録法）

4日間（平日2日，休日2日）の食事記録として，飲食したすべての料理及び食品について，デジタルカメラによる写真撮影と，目安量または重量による記録を行った。写真撮影の際には，事前に配布した1辺2cmのチェック模様のランチョンマットを使用してもらい，分析の際に正確な量を把握できるようにした。写真の記録のない食事については，食事記録の解析に用いた栄養計算ソフト「エクセル栄養君Ver.8.2」（建帛社）に登録されている登録料理，すわなち標準化された調理コードを使用した。また，平日の学校給食については，児童は食べた量のみ目安量での記録を行い，調査者が各学校の給食献立を入手し，摂取量の分析を行った。すべての食事記録の解析は，食事調査の解析経験がある4名の管理栄養士が行った。解析の精度を高めるために，複数の管理栄養士で多重のチェックを行った。また，食事記録の解析では標準化を図るために，事前にマニュアルを用意し，随時情報を共有し，共通認識を図りながら解析を進めた。ただし，児童本人に直接内容の確認を行うことはできなかった。

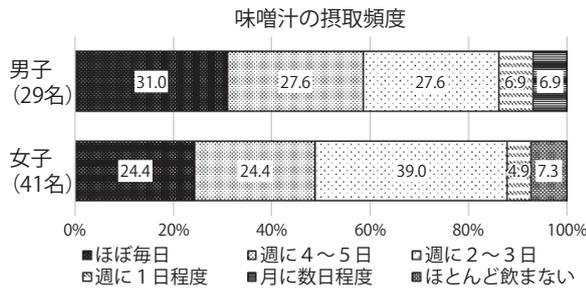


図1. 味噌汁の摂取頻度 (男女別)

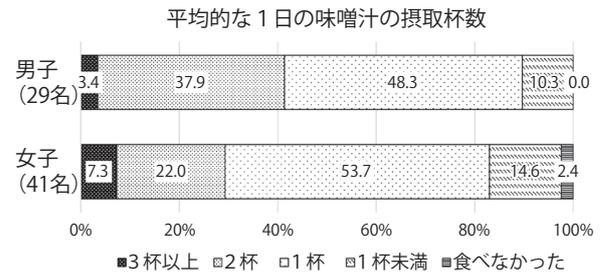


図2. 1日における味噌汁摂取杯数 (男女別)

### 3. 統計解析

質問紙調査は児童70名、保護者122名（男性54名、女性68名）、尿検査は児童64名、保護者108名（男性47名、女性61名）を解析対象者とした。食事調査は児童23名から回答が得られたが、うち1名は調査日数が足りず解析から除外した。

質問紙調査から得られた児童の味噌汁摂取頻度（「ほぼ毎日」から「ほとんど飲まない」の6肢）と平均的な1日の摂取杯数（「食べなかった」から「8杯以上」の9肢）に関する回答（図1～2）をもとに、男女合わせて「ほぼ毎日1杯以上」群（20名）と「それ以外」群（50名）に分け、関連要因や栄養素等摂取状況との検討を行った。欠損値は項目ごとに除外して分析した。尿検査の解析では、平均値±2SDの範囲外の者は除外した。割合の比較は、 $\chi^2$ 検定またはFisherの正確確率検定、平均値の比較は対応のないt検定を用いて検討した。

### 4. 倫理的配慮

本研究は、香川栄養学園倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号第184号：平成30年6月）。

## III 結果

### 1. 味噌汁摂取行動について

児童の味噌汁摂取行動の実態は図1～2の通りである。男子では、摂取頻度を「ほぼ毎日」と回答した者が9名（31.0%）と最も多く、女子では「週に2～3日」が16名（39.0%）と最多であった。平均的な1日の味噌汁摂取杯数は男女とも「1杯」が最も多く、男子14名（48.3%）、女子22名（53.7%）が該当した。なお、いずれも、男女で有意な差はなかったため、以後の解析は男女合わせて行った。

### 2. 味噌汁摂取行動と栄養素等摂取状況について

質問紙調査および尿検査データに不備のない児童61名（「ほぼ毎日1杯以上」群16名、「それ以外」群45名）を対象に尿中Na排泄量から算出した推定食塩摂取量とNa/K比について味噌汁摂取行動別に比較したところ、「ほぼ毎日1杯以上」群の推定食塩摂取量の平均値および標準偏差は $7.7 \pm 1.8$ g、「それ以外」群が $8.4 \pm 1.9$ gであった（ $p=0.23$ ）。また、Na/K比は、「ほぼ毎日1杯以上」群が $5.3 \pm 2.6$ 、「それ以外」群が $6.0 \pm 2.6$ であった（ $p=0.33$ ）。いずれも有意な群間差はみられなかった。

また、質問紙調査および食事記録に不備のない21名で4日間の食事記録から把握した栄養素等摂取状況を味噌汁摂取行動別にみたところ（表1）、「ほぼ毎日1杯以上」群（8名）でたんぱく質エネルギー比率が「それ以外」群（13名）比べて高く（ $p=0.036$ ）、菓子類の摂取量が有意に少なかった（ $p=0.023$ ）。一方、きのこ類の摂取量は、「それ以外」群で有意に多かった（ $p=0.028$ ）。それ以外の栄養素及び食品群別摂取量には、食塩相当量および調味料・香辛料の摂取量も含め、有意な群間差はなかった。

図3に食事記録から算出した食塩相当量に寄与する食品群の割合を示した。総食塩摂取量（8.1g）に対して、最も寄与割合が高かったのは調味料・香辛料で4.8g（59.3%）であった。そのうち、「その他の調味料」が1.8g（22.2%）と最も高く、味噌は0.8g（9.9%）と食塩相当量全体の約1割を占めていた。

### 3. 味噌汁摂取行動と関連するその他の食行動について

味噌汁摂取と関連する児童の食行動では、主食・主菜・副菜が1日2回以上そろふ頻度で有意な差がみられ、「ほぼ毎日1杯以上」群で1日2回以上そろふ頻度がほぼ毎日の者は75%、「それ以外」群では48%であった（ $p=0.04$ ）。その他、過剰な食塩摂取に関わる食行動（主食の重ね食べ、腹いっぱい食べる、等）で

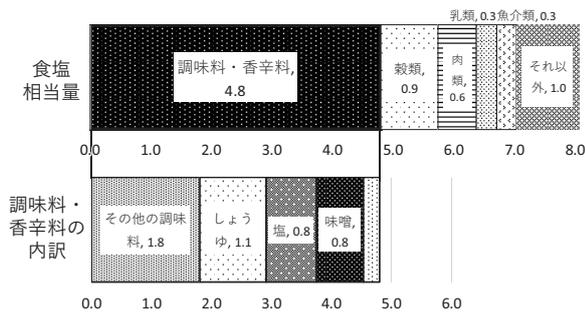


図3. 食塩相当量に寄与する食品摂取源について

関連がみられた項目はなかった。

環境的要因として、児童からみた保護者の食行動では、家庭での食事内容が「ほぼ手づくり」と回答した割合が「ほぼ毎日1杯以上」群で60%、「それ以外」群で22%と有意な群間差がみられた ( $p=0.002$ )。保護者の食態度では、児童の食事について関心があるかとの問いについて、有意ではないが「ほぼ毎日1杯以上」群で「とても大切」の割合が高かった ( $p=0.053$ )。

#### 4. 児童の味噌汁摂取行動と関連する保護者の特性

男性または女性保護者の基本属性、社会経済的状況、食知識、食態度、食行動には関連がみられた項目がほとんどなかったが、女性保護者において、食物選択の動機で「好み」と回答した者の割合が「それ以外」群に比べて「ほぼ毎日1杯以上」群で有意に少なかった ( $p=0.015$ )。保護者のヘルスリテラシーも、児童の味噌汁摂取行動とは関連がみられなかった。

#### 考察

児童において、味噌汁をほぼ毎日1杯以上摂取していた者では、主食・主菜・副菜がそろふ頻度がほぼ毎日の者が多く、菓子類の摂取が少なかった。また、たんぱく質エネルギー比率がそれ以外群に比べて有意に高かった。先行研究のシステマティックレビューでは、主食・主菜・副菜がそろふ食事回数が多い者ほど、エネルギー、たんぱく質、各種ビタミン・ミネラルの摂取量が多いことが報告されている<sup>12)</sup>。本研究でも、結果では示していないが、主食・主菜・副菜が1日2回以上ほぼ毎日そろふ児童では、栄養素等摂取状況が良好であった。足立<sup>13)</sup>は、日常生活の中で活用し

やすい料理選択型栄養教育の枠組みとして、主食・主菜・副菜がそろふ食事を1984年に提唱している。その中で、主食が米飯の場合は、主菜料理や副菜料理の出現率が高く、また、味噌汁を主要な副菜料理の一つとして挙げていた。また、成人男性を対象とした先行研究<sup>4)</sup>でも、野菜摂取量の多い者では少ない者に比べ味噌汁の出現割合が高いことが報告されている。したがって、味噌汁は児童の食事の栄養バランスを整える上で一つの核料理となり得ると考えた。一方、推定食塩摂取量には有意な群間差はなかったことから、ほぼ毎日1杯以上味噌汁を摂取することが食塩の摂取過多につながるわけではないことが示唆された。なお、京都府内のK小学校に在籍する9~11歳の児童を対象とした先行研究<sup>9)</sup>では、ほぼ毎日汁物を摂取する児童ではそれ以外の児童に比べて有意に尿から推定した食塩摂取量が多いことが報告されている。しかし、この先行研究は味噌汁に限定した検討ではないため、本研究の結果とは単純には比較ができない。また、年齢調整した重回帰分析では、推定食塩摂取量と汁物の有意な関連性はみられなくなっていた<sup>9)</sup>。

児童を取り巻く環境的要因では、味噌汁の摂取頻度が高い家庭の食事内容はほぼ手づくりで、児童の食事を大切にしている保護者が多いことが示唆された。一方で、保護者への調査から得られた特性として、食物選択の項目以外に特に関連がみられた項目はなかった。平成27年国民健康・栄養調査では、主食・主菜・副菜がそろふ食事の頻度が高い者では外食や中食の利用が少ないことが報告されている<sup>14)</sup>。本研究では、味噌汁の摂取頻度と家庭食の関係を見ているが、味噌汁摂取頻度が高い児童では主食・主菜・副菜のそろふ食事の頻度も高かったことから、先行研究の結果を一部支持する結果が得られたと考える。以上の結果から、味噌汁を献立の一部とした和食を中心とした食事の実現を推奨することは児童に向けた食育において重要であると示唆された。

本研究の限界点は、横断研究で、対象者が少なく、一地域での調査であることである。また、推定食塩摂取量やNa/K比は1回の早朝第一尿から算出している点に留意が必要である。

表 1. 習慣的な味噌汁の摂取状況別にみた、栄養素等摂取状況

		ほぼ毎日1杯以上 (n=8)		それ以外 (n=13)		p値
		平均値	SD	平均値	SD	
栄養素等摂取量						
エネルギー	kcal	1862	366	1982	242	0.431
たんぱく質	g	70.7	13.4	68.4	10.1	0.688
カリウム	mg	2029.0	480.2	2067.4	350.0	0.848
カルシウム	mg	502.7	102.7	532.6	116.3	0.546
マグネシウム	mg	222.2	55.5	215.4	34.6	0.760
鉄	mg	5.7	1.1	5.9	1.3	0.774
レチノール当量	μg	426.8	126.6	453.5	133.7	0.653
ビタミンD	μg	7.4	3.4	5.0	3.1	0.114
αトコフェロール	mg	6.2	1.7	5.7	1.1	0.486
ビタミンK	μg	148.7	56.4	160.9	63.6	0.653
ビタミンB1	mg	0.9	0.2	1.0	0.2	0.670
ビタミンB2	mg	1.1	0.1	1.1	0.2	0.790
ナイアシン	mg	30.5	8.3	28.1	4.7	0.461
ビタミンB6	mg	1.3	0.5	1.2	0.3	0.469
ビタミンB12	μg	6.7	4.4	4.6	1.9	0.225
葉酸	μg	200.8	44.1	212.1	45.2	0.579
ビタミンC	mg	47.7	12.1	60.0	19.6	0.092
食塩相当量	g	8.2	2.2	8.1	1.4	0.898
食物繊維総量	g	9.9	2.3	11.0	2.4	0.290
たんぱく質エネルギー比率	%	<b>15.2</b>	<b>1.3</b>	<b>13.8</b>	<b>1.4</b>	<b>0.036</b>
脂肪エネルギー比率	%	31.3	4.6	30.4	4.3	0.693
飽和脂肪酸エネルギー比率	%	9.3	1.7	9.9	1.5	0.448
炭水化物エネルギー比率	%	53.5	5.5	55.7	5.1	0.375
食品群別食品摂取量						
穀類	g	390.4	119.8	432.7	101.2	0.419
いも類	g	52.5	35.9	42.8	19.0	0.495
砂糖・甘味料類	g	4.8	3.5	4.0	3.0	0.610
種実類	g	2.6	3.7	1.3	2.9	0.408
野菜類	g	147.8	28.7	161.8	51.7	0.436
緑黄色野菜	g	55.0	23.2	60.1	33.4	0.683
その他の野菜	g	92.9	22.5	101.7	43.4	0.547
果実類	g	30.9	32.7	56.3	44.6	0.150
きのこ類	g	<b>3.2</b>	<b>2.7</b>	<b>8.0</b>	<b>6.4</b>	<b>0.028</b>
海藻類	g	2.7	2.3	2.1	2.1	0.580
豆類	g	57.5	61.2	35.8	23.3	0.364
魚介類	g	42.8	20.8	35.4	20.5	0.437
生魚介類	g	28.3	16.3	24.4	18.0	0.618
魚介加工品	g	14.5	13.9	11.0	5.7	0.510
肉類	g	119.3	42.2	102.7	19.5	0.324
生肉類	g	104.7	35.0	80.3	22.2	0.106
肉加工品	g	14.5	8.7	22.4	14.3	0.135
卵類	g	46.1	18.1	44.4	26.7	0.862
乳類	g	208.7	102.3	233.6	92.1	0.583
油脂類	g	9.5	4.2	8.9	2.9	0.732
菓子類	g	<b>27.3</b>	<b>25.3</b>	<b>66.0</b>	<b>46.0</b>	<b>0.023</b>
嗜好飲料類	g	372.5	348.4	308.7	222.9	0.653
調味料・香辛料	g	90.8	94.0	91.3	49.2	0.991
その他の食品	g	19.5	17.5	17.6	21.5	0.823

質問紙調査と食事調査の両方に回答が得られた22名のうち、データに不備のない21名を対象  
SD: 標準偏差; 統計解析には t 検定を用いた。

## 参考文献

1) Wakasugi M, James Kazama J, Narita I. Associations between the intake of miso soup and Japanese pickles and the estimated 24-hour

urinary sodium excretion: A population-based cross-sectional study. Intern Med 2015; 54: 903-910.

2) 村井陽子, 多門隆子, 大西智美, 他. みそ汁の減塩と野菜の摂取増を目指す高校生対象食育講座「野

- 菜たっぷりみそ汁を作ろう」—官学協働の食育実践事例—。栄養学雑誌 2015; 73: 16-27.
- 3) Ogawa K, Tsubono Y, Nishino Y, et al. Dietary sources of nutrient consumption in a rural Japanese population. *J Epidemiol* 2002; 12: 1-8.
- 4) 新保みさ, 赤松利恵, 玉浦有紀. 男性勤労者における野菜摂取量と料理の関連. *栄養学雑誌* 2014; 72: 101-108.
- 5) Aburto NJ, Hanson S, Gutierrez H, et al. Effect of increased potassium intake on cardiovascular risk factors and disease: systematic review and meta-analyses. *BMJ* 2013; 346: f1378.
- 6) 厚生労働省. 「日本人の食事摂取基準 (2020年版)」策定検討会報告書. 令和2年1月21日 <https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586553.pdf> (2020年2月5日)
- 7) 祓川摩有, 佐野美智代, 大橋英里, 他. 小・中学生の食生活への意識と食習慣との関係. *栄養学雑誌* 2011; 69: 90-97.
- 8) 寺尾美佳, 湊久美子. スポーツ活動に参加している小学生男子の食生活状況. *和洋女子大学紀要* 2012; 52: 153-161.
- 9) Seko C, Taguchi Y, Segawa H, et al. Estimation of salt intake and sodium-to-potassium ratios assessed by urinary excretion among Japanese elementary school children. *Clinical and Experimental Hypertension* 2018; 40, 481-486.
- 10) Tanaka T, Okamura T, Miura K, et al. A simple method to estimate populational 24-h urinary sodium and potassium excretion using a casual urine specimen. *J Hum Hypertens* 2002; 16: 97-103.
- 11) Holbrook JT, Patterson KY, Bodner JE, et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. *Am J Clin Nutr*. 1984; 40: 786-793.
- 12) 黒谷佳代, 中出麻紀子, 瀧本秀美: 主食・主菜・副菜を組み合わせた食事と健康・栄養状態ならびに食物・栄養素摂取状況との関連—国内文献データベースに基づくシステマティックレビュー—. *栄養学雑誌* 2018; 76: 77-88.
- 13) 足立己幸: 料理選択型栄養教育の枠組としての核料理とその構成に関する研究, *民族衛生* 1984; 50: 70-107.
- 14) 厚生労働省: 平成27年国民健康・栄養調査報告, 平成29年3月, <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoubu/dl/h27-houkoku.pdf> (2019年3月26日)