

食塩の血圧応答に関する文献研究 —塩分給源としての味噌の評価をめぐって—

五明 紀春

Meta-analysis on the Influences of Salt on Blood Pressure
— Evaluation of Miso as Salt Source —

Toshiharu GOMYO

*Kagawa Nutrition University
Chiyoda 3-9-21, Sakado, Saitama, Japan 350-0288*

はしがき

本報告は、(社)中央味噌研究所の20年度委託研究「味噌の血圧変動に及ぼす影響—集積データ解析」に係るものである。

味噌は、主に味噌汁として利用され、わが国の食生活において基幹的な調味品である。

従来、味噌の塩分は、血圧上昇をもたらすおそれがあるとされ、その利用を制限する傾向が続いてきた。しかし食塩感受性の人でも、たんぱく質の同時摂取により血圧上昇しにくい、という報告もあり、また食塩感受性のあるDahl系ラット(雌雄)で、食塩単独に対して味噌摂取による血圧上昇はないことが実証されている(渡邊敦光先生/広島大学名誉教授)。これらのことは、味噌に含まれる食塩は食塩単独摂取とは異なる作用を有することを示唆している。

塩分摂取と血圧の関係については、主に疫学的立場からの調査研究データがすでに多数集積しているが、必ずしも食塩の昇圧効果が実証されているわけではない。近年の研究では、食塩の昇圧効果

に関しては、多数のパラメーターが関与していることが明らかにされつつあり、両者間の因果関係を断定することに疑問が投げかけられている。

一方、塩分給源の相違に基づく昇圧効果の解析はほとんど見当たらないのが現状である。特に味噌を塩分給源とした場合の両者の相関について検討の必要があると考えられる。

本研究では、過去に集積した文献データをソースとして、メタ解析的手法により、食塩の昇圧効果を検証し、塩分給源としての味噌(汁)に対する従来の評価の妥当性について考察を加える。

序章

食塩摂取と血圧の相関——論点整理

一般に、食塩摂取量と血圧応答は正相関にある、と信じられている(食塩仮説)。しかし、公表されている多数の研究報告レビューにおいては、必ずしも見解が一致しているとは言いがたい。試験・調査データ自体の食い違いはもちろん、それ

らのデータの解釈を異にする場合もある。しかし、食塩／血圧の相関には、多数のパラメーターが関与していることがしだいに明らかになりつつある。パラメーターの扱い如何によって、矛盾する結果がもたらされるものと推察される。以下、食塩摂取量と血圧応答は正相関にあるとの「食塩仮説」に対して、論点別に、肯定的、否定的、中立的見解を掲げる。

論点1 疫学的調査研究に関して

<肯定的見解>

- Dahlらは1957年報告で、食塩摂取量の多い群ほど高血圧者の頻度が高くなることを示し、世界各地の調査から、食塩摂取量と高血圧症に相関がみられると指摘した。¹⁾²⁾³⁾
- 加齢による血圧上昇が食塩摂取と相関するという事実は多数の疫学調査によって示されてきた。⁴⁾
- 食塩摂取量の多い民族や集団では、血圧レベルが高く、高血圧者の頻度も高く、集団間では食塩摂取量と血圧水準の間には正の相関関係が認められるとする多くの横断的研究・疫学的研究がある。⁵⁾⁶⁾
- 日本では佐々木らが、秋田県での調査から、食塩摂取量の多い地域では高血圧症、脳血管障害の頻度が高くなるとして食塩摂取量に関する注意の必要性を示した。²⁾

<否定的見解>

- 大集団対象のスコットランド報告は食塩摂取量の血圧への影響は極めてわずかとした。⁷⁾
- Dahlの提示した食塩—血圧の相関図（食塩仮説）は科学的根拠が薄弱である。⁸⁾
- National Health and Nutrition Examination Survey NHANESのデータでは低塩食が全死因及び心臓血管疾患死因を改善するとの考えを支持していない。⁷⁾
- Inter Salt Study（大規模疫学調査／32か国52センター／10,079人）のデータでは食塩摂取量と高血圧との関係はないか、あっても弱いものであった。⁸⁾
- 一定の集団内においては、食塩摂取量と血圧水準には、正の相関がみられないという報告が多

い。²⁾⁵⁾

- 1日1gの減塩群（米国／10年間追跡調査）では、予想に反して心臓病死亡率や全体の死亡率が高かったとの報告がある。¹⁰⁾
- 日本人の食塩摂取量は欧米に比べて多いが、血圧水準は欧米に比べて高くない。¹¹⁾

<中立的見解>

- INTERMAPにおける1980年代以降の調査研究によって、血圧水準はアルコール摂取、肥満によっても直接影響を受けることが示されてきた。¹²⁾
- 集団間比較では食塩摂取量の多いほど高血圧症発症頻度が高い一方、各集団内の個人には両者の相関がみられない。²⁾
- 食塩摂取量が1日30gと5g以下の両極端においては、食塩摂取量と高血圧の間に相関が見られるが、その中間の摂取量では相関は明白ではない。¹⁾
- 疫学的断面調査ではナトリウム排出量と血圧中央値（高血圧罹患率）との相関は、集団の選び方に依存した。⁷⁾
- 一般に横断的な調査では、幼児以降の食塩摂取履歴による影響が見逃されている。⁸⁾

論点2 低塩食文化圏における調査研究に関して

<肯定的見解>

- ヤノマモ族（ブラジル）で20～50歳代まで血圧上昇が見られないのは、ほとんど食塩を摂取しないためとされている。⁶⁾彼らの血清ナトリウムは正常値（140mEq/L）であり、血圧のホメオスタシスは維持されている。¹²⁾
- ニューギニア高地民族の食塩摂取量は1g/day以下、高血圧発現頻度は40歳以上で3%である。²⁾
- 塩分摂取量の多いソロモン群島部族（漁業）では、加齢による血圧上昇が見られる。³⁾
- ケニアでは都市移住後に住民の食塩摂取が増えて、血圧を上げたとの報告がある。²⁾
- 食塩摂取量1日5g以下のイヌイトでは高血圧罹患率はわずか2%であった。¹⁾

<否定的見解>

- ネパールの丘陵農村住民（特に男）は、食塩摂

取量1日11~13gで、加齢による血圧上昇が見られなかった。⁶⁾

- ・ポリネシアの部族では、血圧値と24時間尿中ナトリウムには相関関係がなかった。²⁾

<中立的見解>

- ・ソロモン群島での調査では、個人レベルの血圧値は必ずしも食塩摂取量だけに支配されていないことが示唆された。²⁾

論点3 減塩指導の評価研究に関して

<肯定的見解>

- ・日本では、国際指針6g/day以下達成の高血圧患者は極めて少ない。¹⁴⁾
- ・東北地方の脳卒中死亡率の低下は、長年の減塩指導の成果とされている。²⁾

<否定的見解>

- ・研究報告(1966-1997)のメタ解析は、減塩の降圧効果を支持していない。⁸⁾
- ・食塩の目標摂取量(1日10g以下)は科学的根拠に欠けるとの指摘がある。¹⁰⁾¹⁵⁾
- ・個体差を無視した一律減塩にはQOLを損なうリスクがある。¹⁸⁾¹⁰⁾
- ・高血圧患者の半数以上は減塩しても降圧しない。⁸⁾¹⁰⁾

<中立的見解>

- ・集団の減塩による降圧効果は根拠薄弱であるが、高血圧患者、特に食塩感受性患者においては減塩はそれなりに有効である。⁹⁾
- ・食塩感受性の鑑別診断は現実には困難なため、食塩非感受性患者も含めた減塩指導はやむをえない。¹⁰⁾

論点4 減塩療法・介入試験研究に関して

<肯定的見解>

- ・本態性高血圧患者の食塩摂取制限により5mmHgの降圧効果が認められた。⁷⁾
- ・本態性高血圧患者に高塩分食(1日23g程度)を与えると高血圧となった。¹³⁾
- ・食塩制限による高血圧患者の血圧低下は経験的に知られている。²⁾
- ・高血圧者の約60%は高塩分食で昇圧し、減塩食で降圧するとの報告がある。¹⁶⁾

- ・高血圧自然発症ラットの開発により遺伝子多型による腎機能障害がナトリウム排出を阻害、昇圧をもたらすことが明らかにされた。⁴⁾

<否定的見解>

- ・減塩の集団内血圧応答は正規分布を示し血圧上昇の場合もある。⁸⁾
- ・高血圧患者を減塩食治療しても全例に降圧効果がみられるわけではない。⁶⁾
- ・減塩を要する高血圧患者は100人のうち2~3人との報告がある。¹³⁾

<中立的見解>

- ・高血圧発症率を下げようとするれば相当過酷な減塩を幼児の頃から続ける必要がある。⁸⁾
- ・減塩療法のみでの血圧低下には、3g/日以下の塩分制限が必要であるとの報告がある。³⁾
- ・減塩による血圧低下は、減量や野菜摂取による血圧低下を上回るものではなく、血圧改善には包括的アプローチが望まれる。⁷⁾
- ・ナトリウム摂取量を減らすことのみが、高血圧患者の血圧を下げる最善の方法ではないとする報告がある。¹³⁾
- ・食塩感受性の差についての研究は比較的最近まで報告されていなかった。²⁾
- ・食塩感受性と非感受性の高血圧症の比較に際しても、1つ1つの因子だけで説明するのは非常に困難である。²⁾

論点5 食塩の血圧効果(因果関係)に関して

<肯定的見解>

- ・高血圧患者ではナトリウムイオンと水の負荷によって著しく血圧が上昇した。⁶⁾
- ・腎機能障害者では塩分排出が遅く血圧が上昇する。¹⁶⁾
- ・高血圧者への食塩負荷による血圧上昇にはナトリウム貯留に基づく心拍出量の増大、自律神経系反応の関与の可能性が報告されている。²⁾

<否定的見解>

- ・血液ナトリウムイオン濃度は厳重に制御され、食塩摂取量で増減せず、血圧に影響することはないと考えられる。¹⁸⁾
- ・腎機能が健全であれば塩分を体外排出し、血圧への影響はない。¹⁶⁾

- ・体重60kgの人の体内には、食塩に換算して約320gものナトリウムが存在する。¹⁰⁾

<中立的見解>

- ・食塩と高血圧との関係に関するメカニズムは実証されているとは言いがたい。⁸⁾
- ・「本態性高血圧症」には多くの因子がからみ、原因が特定できないのが現状である。¹¹⁾
- ・食塩摂取と血圧の因果関係を認めにくいとする報告の一方、両者の関係を示す臨床試験、動物実験、疫学研究が少なくないとの指摘もある。¹⁵⁾

論点6 栄養的観点からの研究に関して

<肯定的見解>

- ・なし

<否定的見解>

- ・栄養素摂取が高血圧に深く関わることをわかってきた。⁶⁾
- ・脳出血の減少は、減塩運動の成果ではなく、栄養素摂取状況の改善によるためである。¹⁰⁾
- ・高食塩食でも、動物性たんぱく質を豊富に摂ると、血圧の上昇は抑制される。¹⁰⁾¹³⁾
- ・高食塩食（1日23g程度）でもNa/Kの値を3以下に下げると血圧も低下する。¹³⁾
- ・高血圧者にカルシウム剤を投与すると、収縮期血圧および拡張期血圧が下降するという臨床報告がある。⁵⁾
- ・DASH食の組み合わせを変えることにより、減塩とは独立に血圧を下げた。¹²⁾
- ・青森県では隣接する秋田県に比べて高血圧症が低く、これはカリウムの多いリンゴを多食するためとされている。²⁾

<中立的見解>

- ・高血圧患者の食事療法として塩分制限のほかにカリウム摂取量も重要である。³⁾⁵⁾
- ・高血圧と肥満は密接かつ複雑な関係にある。⁵⁾

論点7 食文化に関して

<肯定的見解>

- ・数千年前に起こった食塩摂取増は加齢に伴う血圧上昇をもたらすことになった。⁴⁾
- ・離乳後の高塩食習慣が、将来の高血圧を助長している可能性が指摘されている。¹⁵⁾

<否定的見解>

- ・減塩によって塩味が薄くなるとまずくなり食欲がわかなくなる傾向がある。⁸⁾
- ・ごはん主食では、食塩を摂ることが味覚の上で必須である。¹⁰⁾
- ・食塩の摂取量を減らすことは、民族の伝統的な食生活を崩す可能性がある。
- ・減塩運動の標的である味噌汁はカリウムやマグネシウムの摂取源としての機能を持つ。¹¹⁾

<中立的見解>

- ・減塩しなくても野菜、果物、低脂肪乳製品の摂取で食生活の改善で血圧を下げられるといった結果も発表されている。⁸⁾
- ・脳内ナトリウムセンサー分子は、塩分の過剰摂取を抑制、高血圧症を未然に防いでいると考えられる。¹⁷⁾

1章 食塩摂取と血圧の相関

1 疫学調査（観察型研究）

「食塩摂取が血圧上昇に関与する」との仮説の妥当性を調べるために、一般に疫学的研究手法が用いられている。これには、観察型研究（記述疫学／分析疫学）と介入研究（フィールド試験／地域介入型研究）がある。

記述疫学では、Surgeon General（米国公衆衛生局長諮問委員会）の5基準が知られる。

- 1) 関連の一致性 (consistency) … 違う状況でも同じ事が起こるか
- 2) 関連の強固性 (strength) … 効果が定量的か
- 3) 関連の特異性 (specificity) … 因果関係の存在を想定させるか
- 4) 関連の時間性 (temporality) … 原因→結果の継起性を想定させるか
- 5) 関連の整合性 (coherence) … 既知の経験・知識に妥当するか

分析疫学では、記述疫学で得た仮説の要因を仮定し、対照研究を行う（要因対照研究）。これには、前向き要因対照研究 (prospective factor control study) 後向き要因対照研究 (retro-spective factor control study) があるが、一般に低コストの後向

き研究が多い。

また、対象群に関して、横断研究と縦断研究がある。横断研究cross-sectional methodは、対象群の属性を特定し、比較する。負担が少なく、多量のデータ取得が可能である。一方、縦断研究longitudinal methodでは、同一対象者を時系列的に調査し、その変化を知ることができる。負担は大きく、大きな集団の場合は多くの困難を伴う。両者共通に、コーホート要因（共通の集団特性）を考慮して調査結果を解釈する必要がある。一般的に、横断研究が多い。

横断研究、縦断研究の結果を、表1 [食塩摂取と血圧の相関（疫学調査）] にまとめてある。疫学調査報告9例のうち、食塩摂取量と血圧水準との

間に、統計学的に有意の相関を認めたものは、3例であった。他の調査報告では、明確な相関が認められず、疫学的方法による「食塩仮説」の実証は、きわめて困難であると推測された。

横断研究

浜野ら¹⁹⁾は疫学的観察から、食塩摂取量が多いほど高血圧者が多く、高血圧者は遺伝的素因が大きい、としている。一方、権藤ら²⁰⁾の沖縄西表島（亜熱帯地方）の調査からは、食塩消費量と血圧には、年令的因子を加味した場合、相関傾向は認められなかった。一方、片山ら²¹⁾は、三重県の脳卒中死亡率の高率地区で米単作地帯の40～60歳住民の血圧と栄養摂取状態を調べた結果、高血圧世帯は、非高血圧世帯にくらべて動物性タンパク、

表1 食塩摂取と血圧の相関（疫学調査）

	調査対象	調査時期	調査内容	調査結果	文献
浜野ら	1970 東京都養育院老人ホーム入居者・入院患者207名	昭和43年4月～44年3月	食習慣アンケート調査	『食塩』摂取の多いほど高血圧者が多かった	19)
権藤ら	1973 沖縄西表島稲作地区住民20才以上男女	1971年7月～8月	食塩消費量と血圧の相関を年令的因子を加味して検討	年令と血圧以外では相関傾向は認められなかった	20)
片山ら	1976 三重県、脳卒中死亡率高率地区40～60歳	昭和49年5, 6, 7月	食事調査（栄養調査） 血圧測定	食塩摂取量は、高血圧世帯と非高血圧世帯の間に有意差は認められなかった	21)
大塚ら	1983 山村健康調査受診者30歳以上70歳未満53人	血圧と尿中Na排泄量、K排泄量のクレアチニン補正值およびNa/K比との関係を検討	高血圧と食塩過剰摂取は相関するとした	22)
佐々木ら	1983 青森県内2地区 平均年齢49歳 中年男女農民26名	昭和36年/56年（同時期）	血圧長期観察者の3日間蓄尿による食塩排泄量を測定	個人ごとの血圧値は加齢による上昇は認められなかった	23)
鈴木ら	1989 乳幼児	昭和55年12月から6歳児に至る昭和62年2月	食塩摂取量に関する6年間の追跡調査	高血圧家系と非高血圧家系のナトリウム摂取量に有意差はなく、母児間で、ナトリウム摂取量と血圧にも相関は認められなかった	24)
Tian et al.	1996 中国住民 都市部 農村部	Na, 食塩, 醤油の摂取量調査, 血圧を測定	食塩, 醤油の摂取総量は教育水準が高い層ほど少なく、血圧と教育水準の間では逆相関が認められた	25)
中川ら	2002 Inter Salt研究参加者476人	研究開始8年目に調査を実施 Ca摂取量と血圧の相関を調べた	Caの高血圧予防効果が示唆された	59)
小林ら	2004 長野県八千穂村住民	塩分摂取と血圧の関係を調査	高塩分食でも血圧に変化がない人が75%であった	26)
Ikeda et al.	2008 20歳以上 男90554人 女101903人	1986-2002国民栄養調査（毎年断面調査）	SBPと抗高血圧治療、ライフスタイル因子、BMI、生活活動強度、アルコール摂取量、喫煙、塩分摂取量の関係を調査	調査期間における日本人の平均SBPの低下理由は不明とした	27)

脂肪、ビタミンB₂およびビタミンAなどの摂取不足、糖質の多量摂取を認めている。大塚ら²²⁾は、山村の健康調査受診者（30歳以上70歳未満53人）を対象に、血圧と尿中Na排泄量を測定、最大血圧とNa/Cr（クレアチニン）比（ $r=0.433$ ）、最小血圧とNa/Cr比（ $r=0.476$ ）、最大血圧とNa/K比（ $r=0.398$ ）、最小血圧とNa/K比（ $r=0.362$ ）との間に有意な相関を認め、高血圧には食塩の過剰摂取が影響しているとした。

Tianら²³⁾は、中国人のNa摂取量は都市部では農村部より少なく、K摂取量は都市部の方が多かった。Na、食塩、醤油の摂取総量は教育水準が高い層ほど少なく、血圧が低いことを認めている。小林ら²⁴⁾は、長野県山村（八千穂村）では、高塩分食であっても血圧に変化がない人が75%であったと報告している。

これら横断的調査研究の結果から、食塩摂取と血圧の相関に関して、必ずしも一致していないことがわかった。

縦断研究

佐々木ら²⁵⁾は、青森県内2地区の平均年齢49歳の中年男女農民26名について、昭和36年と56年に、3日間食塩排泄量を測定、1日1人当たり17.0gから11.9gへの減少を観察、また、個人ごとの加齢による血圧値の上昇は認めなかったとしている。

乳幼児の6年間の食塩摂取量を追跡調査した鈴木ら²⁶⁾は、1) 高血圧家系グループと非高血圧家系グループのナトリウム摂取量に有意差はなく、2) 母児間で、ナトリウム摂取量と血圧にも相関は認めなかった。

1986-2002国民栄養調査（毎年断面調査）データに基づいて、Ikedaら²⁷⁾は、20歳以上の男90554人女101903人の収縮期血圧（SBP）と抗高血圧治療、ライフスタイル因子、BMI、生活活動強度、アルコール摂取量、喫煙、塩分摂取量の関係を調べた。この期間の日本人の平均SBPの低下の真の理由は不明であるが、SBPの一層の低下は体重管理、塩分摂取量、飲酒量、高血圧治療の改善によって期待されるとしている。

多くの疫学研究はカルシウム（Ca）摂取と血圧の間に負の相関を認めているが、否定的な報告

もあり議論は分かれている。中川ら²⁸⁾は、塩と血圧に関する国際共同研究・インターソルト研究にわが国から参加した大阪、栃木、富山の3地域（476人）について、研究開始8年目に調査を実施した。年齢とBMIを調整した場合、Ca摂取量100mgあたり収縮期血圧0.92mmHg、拡張期血圧0.83mmHg低下し、統計的に有意な負相関が認められた。Caの高血圧予防効果が示唆された。

2 介入研究

介入研究（intervention study）は、対象群に対して、要因を人為的に操作して、結果に及ぼす影響・効果を調べる研究である。大規模研究では、大きなコストがかかる。

1) 減塩介入による降圧効果

過去30年にわたって、多数の減塩介入研究が行われている。対象人数、対象属性、介入期間、実施プロトコルは、研究者によって区々である。以下の報告（18例）では概ね減塩介入による血圧の降下を認めている成功事例と解釈される。結果を、表2〔食塩摂取と血圧の相関（介入研究）〕にまとめてある。

高血圧者対象

中根ら²⁹⁾は、肥満高血圧症患者を対象に、食事記録による食事指導を行いながら食塩摂取量を算出、尿中Naを測定、それらと血圧・体重との相関を調べ、次のような結果を得ている。

- 1) 最大・最小血圧ともに平均158mmHgから128mmHgに、100mmHgから80mmHgに低下した
- 2) 尿中Na排泄量は平均14.4gから6.8gに減少した（ $p=0.01$ ）
- 3) 血圧と尿中Na排泄量の相関があり、減塩指導の有効性を認められた

相良ら³⁰⁾は、昭和54年9月より57年3月まで、高血圧者133名を18のグループに編成、減塩指導を行なった。食事の味つけ、味噌汁・漬物の食べ方など減塩を実行、血圧は151~95mmHgが146~93mmHgに改善傾向が認められたとして、グループ活動による減塩指導の有効性を報告している。

南部ら³¹⁾は、未治療の本態性高血圧症患者を対象に、塩分摂取量の減少が確認された症例の約2

表2 食塩摂取と血圧の相関（介入研究）

	試験対象	試験内容	試験結果	文献
中根ら	1978 肥満高血圧症患者18人 (34-62歳)	食事記録指導により摂取食塩量, 尿中Naを測定, 血圧, 体重, との相関をみた	最大・最小血圧ともに全例高血圧が改善 血圧と尿中Na排泄量が相関した	28)
相良ら	1982 高血圧者133名 18グループ編成	高血圧者の減塩を主とした生活指導 昭和54年9月より57年3月	1日塩分摂取量が減り, 血圧は151~95が146~93に低下。グループ活動による減塩指導が有効であった	29)
小林ら	1982 富山県一農山村 男女39人 (30~59歳)	比較的食塩を多く摂取していた者に減塩指導し, 追跡調査	漬物, 煮物と味噌汁からのNa摂取量が約70%, 最大血圧と最小血圧は尿中のNa/K比と有意に相関した	30)
南部ら	1985 未治療本態性高血圧症患者	塩分制限 (平均4.8g/日のNaCl排泄量の減少) による降圧効果を観察	塩分摂取量減少群の約2/3に5%以上の血圧低下を認め, 降圧効果頻度は50%であった	31)
高村ら	1989 WHO分類: 地域住民 高血圧21名, 境界域29名, 正常12名	24時間尿から食塩の排泄量を算出, 個別的な減塩食指導, 約1年にわたり経過を観察	高血圧, 境界域, 正常のいずれの群でも減塩指導の後, 有意に改善, 1年後も維持した	33)
新明ら	1991 工場社員 降圧剤非服用者 男12人 (平均年齢38.9歳)	個人減塩指導 集団成人病衛生教育	指導30日後に有意な食塩摂取量減少 (27%), 45日後に有意な血圧低下が見られた	34)
中塚ら	1996 減塩教室参加者 介入群19人, 対照群15人	食塩摂取制限による血圧低下の観察	Na摂取量, 尿中Na排泄量とも低下 (11.0-8.4g/day), 血圧は有意に低下 (132-117mmHg, SBP) した	36)
山本	1997 境界域高血圧者36名 (女29人, 男7人: 40~69歳)	2週間毎に減塩指導3回, 対照群には減塩指導なし。 1994-1995	減塩指導により食塩摂取量約20%減。随時血圧 (SBP/DBP) 及び24時間血圧 (SBP/DBP) に有意差は認められなかった	38)
岩井ら	1998 高血圧治療高齢者	ダイエットによる血圧コントロール効果	塩分制限と体重制限の両方を組み合わせた群が, もっとも血圧管理に成功した	39)
中村ら	2000 低Na調味料 (醤油, 味噌) 使用者	低Na調味料 (醤油, 味噌) の一般集団 長期使用による血圧低下を観察	高血圧者では収縮期血圧, 拡張期血圧ともに低Na調味料群で低下する傾向がみられたが, 有意差はなかった	40)
野原	2001 20-69歳血圧140/90mmHg以上, 2002 180/110mmHg以下504人	体重減少, 塩分摂取量変化の血圧効果を観察	6ヶ月間指導により収縮期血圧平均5.2mmHg, 拡張期血圧2.0mmHg低下した	41)
横山ら	2002 高血圧合併2型糖尿病患者 33人	減塩指導による血圧効果を観察	収縮期血圧, 拡張期血圧とも, 指導1カ月後有意に低下, 患者の動機付けに基づく血圧管理の有用性を認めた	42)
木村	2003 DASH・Sodium研究参加者 コントロール食集団188人	食塩摂取量3レベル (140, 104, 62mmol/day) 摂取の血圧効果の観察	食塩摂取量の血圧変動に及ぼす影響は, 個人差が大きく, 再現性はなかった	43)
Ohta et al.	2004 高血圧患者534人	塩分制限実行の有無をクレアチニン排出量を指標として観察。1998-1999	塩分排出量は塩分制限留意群では非留意群より有意に少なかった	44)
Ohta et al.	2005 日本人高血圧患者389人 (女230 男159)	長期塩分制限 (6g/day) の血圧効果の観察	食塩排出量は低下。6g/day達成率は2.3% (男0.6% 女3.5%)。高血圧患者の塩分制限遵守は困難であった	45)
Kawano et al.	2007 高血圧患者	メタアナリシス 大規模臨床介入試験データ解析	6g/day未満食塩摂取により有意な血圧低下が認められた	47)
Schmidlin et al.	2007 正常血圧黒人23人	腎臓Na保留と食塩による昇圧効果を検証	多くの正常血圧黒人においては動脈機能不全が食塩による昇圧効果発現に決定的であると結論した	48)
Zhao et al.	2009 中国人集団1906人 (16歳以上)	低Na食, 高Na食, K添加高Na食の7日間摂食による血圧効果の観察	血圧応答は低ナトリウム食と高ナトリウム食の間, 高ナトリウム食とカリウム添加食の間で中程度の相関のあるとした	49)

／3に5%以上の血圧低下を認めたが、指導後に体重減少を伴った症例を除くと塩分制限（平均4.8g／日のNaCl排泄量の減少）による降圧効果頻度は50%であったとしている。

高村ら³⁹は、地域住民（男20名、女42名）を対象に、24時間尿から食塩の排泄量を算出、個別的な減塩食指導を行い、約1年にわたり経過を観察した。WHO分類による高血圧21名、境界域29名、正常12名の3群間で、高血圧の家族歴、肥満度、年齢に差はなかった。高血圧、境界域、正常のいずれの群でも減塩指導後、有意に改善し、1年後も維持された。血圧は収縮期、拡張期とも高血圧群および境界域群では有意な低値が1年後も持続したが、正常群では変化は認めなかった。

新明ら³⁰は、都内某工場社員から軽症高血圧者と高値正常血圧者で降圧剤非服用者男性12人（平均年齢38.9歳）に個人減塩指導を実施、介入30日後に有意な食塩摂取量減少（27%）、45日後に有意な血圧低下を認めた。当時期のK排泄量とNa／K比は介入前に比べ有意な差を示し、K摂取増加による降圧作用が示唆された。

山本³⁸は、基本健康診査受診者40歳以上1208名のうち、境界域高血圧者36名（女性29名、男性7名：40～69歳）を対象に減塩介入試験を行った。介入群は2週間毎に減塩指導会に3回参加、対照群は減塩指導を受けなかった。尿中ナトリウム排泄量は、介入後第2回検査時では両群の差は44mmol（食塩換算量2.6g）となり、有意差（ $p=0.046$ ）を認めた。減塩指導により食塩摂取量が約20%減らしたとしている。しかし、随時血圧（SBP/DBP）及び24時間血圧（SBP/DBP）では有意差はなかった。

岩井ら³⁹は、高血圧治療における介入試験 [A randomized controlled trial of nonpharmacologic interventions in the elderly (TONE)] で、有効、安全、実行可能なダイエットによって、降圧薬を減量、中止しても血圧を制御できることを示した。塩分制限と体重制限の両方を組み合わせた群が、もっとも血圧制御に成功したことから、肥満高血圧患者には両方の制限が必要であるとした。

中村ら⁴⁰は、低Na調味料（醤油、味噌）の一般集団における長期使用の実行可能性、その血圧低

下効果について二重盲検無作為化比較対照試験を実施した。高血圧者では収縮期血圧、拡張期血圧ともに低Na調味料群で低下する傾向がみられたが、有意差はなかった。低Na調味料は、一般集団において良好に受け入れ可能であり、減塩対策の一手段と成りえるとした。

統一プロトコールによる生活習慣介入効果を調べる目的で、野原⁴¹は、前年度の血圧検診結果が140/90mmHg以上、180/110mmHg以下のもので、高血圧個別健康教育の参加者のうち504名（20-69歳、平均57.3±9.1歳）を対象に、特に体重減少、塩分摂取量の変化と血圧の変化について検討した。その結果、6ヶ月間高血圧保健指導により収縮期血圧で平均5.2mmHg、拡張期血圧で2.0mmHgの低下が認められた。

横山ら⁴²は、高血圧合併2型糖尿病患者（33名）の減塩指導で、食塩含有量5g/day、7g/day、10g/dayに調製した汁の食味から、自宅での汁の摂取食塩量を推定させた。指導前（収縮期血圧147±4mmHg、拡張期血圧76±3mmHg）に比べて、指導1ヵ月後血圧（収縮期血圧131±4mmHg、拡張期血圧68±2mmHg）は有意に低下した（それぞれ $p<0.005$ 、 $p<0.01$ ）。低下率はそれぞれ10.8±1.3%、14±4.3%であった。患者の動機付けに基づく血圧管理の有用性を認めている。

塩分制限実行の有無をクレアチニン排出量を指標とし、Ohtaら⁴³は、外来高血圧患者534人から24時間尿を採取（自宅）した結果、尿中塩分排出量は1.5-23.4g/day（平均9.7±3.9g/day）であった。塩分排出量は、男は女より多かった（男：10.6±4.0女：9.2±3.7g/day、 $p<0.01$ ）。塩分排出量は塩分制限留意群では非留意群より有意に少なかった（留意：9.4±3.8非留意：10.6±4.0、 $p<0.01$ ）。しかし体重補正した場合は両群間には有意差はなかった（留意：0.16±0.06非留意：0.17±0.07g/day）。塩分制限に留意している患者でも、実際の減塩に結びつかなかったことから、減塩実行のためには24時間尿による塩分摂取をモニターし、実際の塩分摂取量を対象者に伝えることの重要性が示唆された。

日本人高血圧患者における長期塩分制限の効果について調べる目的で、Ohtaら⁴³は、患者389人

(女230男159平均年齢58+/-11)について一年以上の間隔を置いて三回以上24時間尿を採取。フォローアップの期間中(平均3.5年)患者は平均4.6回尿検査を受けた。最後の尿検査では最初に比べて食塩排出量は低下した。(8.7+/-3.4対9.6+/-4.1g/day, $p < 0.01$)この期間中にカリウム排出量も有意に低下した(2.0+/-0.7対1.9+/-0.7g/day, $p < 0.05$)。平均4.6回尿検査のうち患者の45.2%(男34.6%女52.6%)が少なくとも一回は食塩排出量 < 6 g (100mmol)を達成した。平均食塩排出量 < 6 g/day達成率は10.3%(男4.4%女14.3%)に低下した。全尿検査を通じて < 6 g/dayの達成率はわずか2.3%(男0.6%女3.5%)であった。塩分制限遵守者と非遵守者の間で年齢、飲酒習慣、喫煙習慣、運動習慣、仕事状況に関して有意差はなかった。反復尿検査が塩分制限の注意喚起には重要であるとした。

大規模な臨床介入試験により、Kawanoら⁴⁷⁾は、6g/day未満食塩摂取により有意な血圧低下が認められ、またメタ解析の結果は高血圧患者において1g/dayの塩分低下により1mmHgの血圧低下が示されたと報告している。日本の指針も含めて高血圧治療指針は6g/day未満とされているが、これは特に日本では達成困難であるとしている。

一般成人対象

減塩指導を目的に、小林ら³⁰⁾は、富山県農山村の30~59歳の男女39人につき追跡調査した。その結果、漬物・煮物・味噌汁からのNa摂取量が約70%を占め、最大血圧と最小血圧は尿中のNa/K比と有意に相関した。また、減塩指導により漬物摂取が有意に減少、炒め物やサラダなどが増す傾向を認めた。

食塩摂取制限が血圧制御に効果的であるか否かを知る目的で、中塚ら³⁶⁾は、減塩教室で全日程を終了した介入群19人(女17人(平均年齢66.5±4.8歳)男2人)対照群15人(女13人(同60.2±9.6),男2人)について調べた結果、Na摂取量、尿中Na排泄量とも低下(11.0→8.4g/day)、血圧は有意に低下(132→117mmHg, SBP)することを認めた。

木村⁴⁹⁾は、DASH・Sodium研究参加者のうち無

作為にコントロール食に振り分けられた対象(n=188)に、低(Na:62mmol/day)、中(Na:104mmol/day)、高(Na:140mmol/day)の3レベルの食塩をランダム順で30日間ずつ摂取させ、収縮期血圧の変化と再現性について検討した。平均年齢49歳、BMI29.6の肥満集団で、女性と黒人が半数以上を占めた。40%が高血圧患者で、通常のNa、K排泄量は、153、53mmol/dayであった。同じ高Naレベル(run-inと高Na食期)でくり返し測定した収縮期血圧の差は平均1.9mmHgで有意差を認めなかった。一方、高Naから低Na食へ移行したときの収縮期血圧の差は、平均-6.4mmHgであったが、-32~+17mmHgの幅広い分布を示した。個々の症例で、高Naから低Naに移行したときの収縮期血圧の変化と高Naから中レベルのNa排泄量に移行したときの収縮期血圧の変化の相関は有意ではあるが、相関は強くなかった。

腎臓での異常なナトリウム保留が食塩による昇圧効果(食塩感受性)とする伝統的仮説を検証するために、Schmidlinら⁴⁸⁾は、メタボリックシンドロームを持たない正常血圧の黒人23人を選び、食塩負荷により平均血圧MAP(mean arterial pressure)を5mmHg以上上げるかどうかにより、食塩感受性群SSと非感受性群SRに分けた。7日間の低Na食(30mmol/day)の最後の3日間、それに続く7日間の高Na食(250mmol/day)の間、毎日4時間間隔で心臓拍出量及び体血管抵抗SVR(Somatic vascular resistance)を測定した。SS群11人はSR群12人に比べて食塩負荷はNaイオンバランス、血漿ボリューム、心臓拍出量に影響しなかった。しかし、食塩負荷2日目から7日目にかけてSS群のMAP変化はSR群から進行的に外れて行った。食塩負荷2日目から4日までのSS群MAPの増加はSR群に対してSVRの調節不調を反映していた。SS群SR群共通に、食塩負荷2日目のMAP及びSVRの変化は7日目のMAP変化を予測させた。多くの正常血圧黒人においては動脈機能不全が食塩による昇圧効果発現に決定的であると結論している。

Zhaoら⁴⁹⁾は、中国人16歳以上1906人を対象に低Na食(51.3mmol/day)高Na食(307.8mmol/day)K添加高Na食(K:60mmol/day)をそれぞれ7日

間摂取させた。低Na食及び高Na食の血圧応答との相関係数は収縮期血圧-0.47 (-0.51~-0.44), 拡張期血圧-0.47 (-0.50~-0.43), 平均動脈圧-0.45 (-0.49~-0.42)であった。高Na食及びK添加食の血圧応答との相関係数は収縮期血圧-0.52 (-0.56~-0.49), 拡張期血圧-0.48 (-0.52~-0.45), 平均動脈圧-0.52 (-0.55~-0.48)であった。これらから, 血圧応答に関して低Na食と高Na食の間, 高Na食とK添加食の間で中程度の相関があるとした。

2) 減塩教育の妥当性

減塩のための教育的介入(指導)に関する実施例が報告されている。実際的な立場から, 減塩への留意を促す継続的な「教育」に重点が置かれ, 実施妥当性がポイントとなる。減塩のための行動変容が, 成果指標となる。

磯ら³²⁾は, ハウス農業による発汗に伴う食塩喪失量を推定, 高温下作業従事者に対する減塩指導の妥当性を検討した。発汗量と汗の平均食塩濃度より求めた値は(汗の食塩濃度を0.3%) 2~9gの範囲であった。1日の食塩摂取量と同じ日の尿中食塩排泄量の差より求めた値は2~9gの範囲であった。ハウス農業従事者に対しても, 健康人に対しては食塩摂取量1日10g以下という減塩指導は妥当であるとしている。

減塩指導の実施状況を知る目的で, 竹森は³⁵⁾, 全国の保健所保健婦または栄養士を対象に, 郵送法による無記名自記式質問票により調査した。それによると, 減塩指導実施率は96.6%, 食塩摂取量測定の実施率は79.9%, 個人の食塩摂取量の変化観察の実施率は37.4%であった。厚生省(当時)の目標値「10g以下」が実質的には「10g」と受け取られており, このことがわが国の食塩摂取量の低下を鈍化させている一要因であると述べている。

島田ら³⁷⁾は, Na34.1mmol/日(食塩相当量約2g)の食塩無添加食を成人男16名に7~11日間摂取させたところ, 血漿アルドステロン濃度は顕著に亢進し, Na再吸収率は99.95%を持続, Naバランスは被験者16名全員が正を示した。7日目頃に被験者全員が食塩に対する垂涎感を訴えたことか

ら, 食塩無添加食では体液調節機能に変調を来す可能性があることから, 成人におけるNa最小必要量は34.1 mmol/日以上であることが示唆した。

Yokotaら⁴⁶⁾は, 地域血圧コントロールプログラムを系統的に実施, 高血圧一次予防のための減塩教育を実施してきた。味噌汁の塩分濃度に関しては1.1%以下の人の割合は1985-2004に47%から66%に増えた。40歳から69歳の年齢調整塩分摂取量は1982-1986と2000-2004の間に男14gから11gへ, 女12gから10gへ減少した。媒体を使った長期の系統的教育プログラムは妥当かつ有効であることが示された。杉浦ら⁵²⁾は, 高血圧予防教室を実施, 牛乳は増加し, 米加工品, 漬物, しょうゆが減少した, としている。岡本ら⁵⁴⁾は, 若年女性の減塩指導では, 51.8%に行動変容がみられたが, 味覚嗜好別には, 減塩指導後の行動変容に差がなかったとしている。また, 塩分摂取の意識付けには, 味噌汁の塩分濃度が判断指標になりえる, としている。

Shimboら⁵⁵⁾は, 全国11県, 1980年1990年の10年の間隔を置いて冬季二度に渡って30-60歳の非喫煙主婦を対象に24時間内に摂取した全食物の陰膳を集め, 塩分摂取量を推定, 当該期間の減塩運動によって, 塩分総摂取量が減少したことを示した。漬物からの食塩摂取量は著しく減り, 味噌からの摂取量はわずかに減ったものの醤油塩分摂取量の増加により食塩総摂取量の減少は押さえられた。

岡山ら⁵⁶⁾は, 脳卒中死亡が高い(1985~1989のSMR男123, 女147)農村地域における減塩指導を行った。参加者は1989年614人(20回)が, 1995年3,320人(111回)と増加した。この期間に, 味噌汁塩分濃度1%を越えるものの割合は, 92%(1981)から22%(1995)に激減した。しかし, 基本健康診査結果による高血圧者の割合は1985年は男14%女10%, 1995年は男14%女9%とほとんど変化がみられなかった。

減塩指導を受けた患者の認識と行動の調査から, 小松は⁵⁷⁾「漬物・みそ汁を減らす」「そばやうどんの汁を残す」は殆どが実行し, 「焼き味の利用」は殆どが実行していなかったとしてい

る。また、減塩実行の意志や自己評価と充足率との関係はみられなかった。

中村ら⁶¹⁾は、PD施行施設での食塩コントロール指導は「うまくいっていない」と回答した施設が半数以上であり、指導回数・体制の不備、患者コンプライアンス不良がその理由として挙げている。

高血圧治療ガイドライン⁶²⁾の栄養治療として、減塩、野菜・果物・魚の積極的摂取、減量、節酒などがある。減塩の降圧効果として、食塩摂取量1g/日の減少につき随時血圧は1-2mmHg下降するとされる。日本高血圧学会では食塩6g/日のメニューの1週間分の料理と調理法のパンフレットを作成している。

2章 減塩指導・減塩政策

1 塩分摂取量

1) 実態調査

いずれの調査でも、摂取塩分総量を調べているが、塩分給源の内訳は明らかではない。後述のように、給源の種類によっては、食塩の血圧効果が異なることを示唆する報告もある。塩分摂取実態に関する調査報告を、表3 [塩分摂取量(実態調査)] にまとめてある。

鈴木ら⁵⁰⁾は、昭和35年夏期と36年2月との2回、高塩分食を好む長野県農村住民119名を対象に、塩化NaClの尿排泄量は1日15~19gであることを示し、予想よりも食塩摂取は多くはなかったとしている。

香月ら⁵¹⁾は和風食材の食塩含量は一般に高いが、一方でインスタント麺1食分の食塩量は5~6gで、生うどん1食分の約2倍であると指摘している。1日食塩所要量を5g程度が適当とし、味噌、醤油、漬物、塩干魚、佃煮等の高塩食品の摂取量を制限し、インスタント食品の乱食をさけることを勧めている。大塚ら⁵²⁾は、低塩分食の和歌山県T市を取り上げ、その地域の調理形態を紹介している。

柳ら⁶⁰⁾は、日常食摂取時及び実験食摂取時の、尿中Na濃度の平均値、尿細管の濾液におけるNa濃度の平均値を測定、さらに、Na・クリアランスと食塩摂取量の相関及び尿中塩分排泄量と食塩摂取量の相関などを検討し、若い世代の女性の食塩摂取量を明らかにした。日常食摂取時の塩分排泄量は1日当たり平均で9.3g (Na 159.2mmol当量)と推定され、1週間食事摂取内容からの平均食塩摂取量は1日当たり8.8g (Na 150.6mmol当量)と計算された。これらから、日常食からの食塩摂取量は、1日当たり平均値で10g未満であることが実測された。

表3 塩分摂取量(実態調査)

	調査対象	調査時期	調査内容	調査結果	文献
鈴木ら	1963 長野県農村4部落119名	1960(夏季) 1961(冬季)	血圧測定 塩化ナトリウム排泄量	1日食塩摂取量15~19gは予想より多くない、とした	50)
香月ら	1978	日常食での食塩給源の調査	一日食塩摂取量5gには、味噌、醤油、漬物、塩干魚、佃煮等の制限が必要としている	51)
大塚ら	1984 山村:46世帯, 小都市:33世帯	昭和56年11月	塩分の食品群別摂取比率調査	減塩食パターンの調理形態を明らかにした	53)
柳ら	2007 日本人健康女性	尿中塩分排泄量と食塩摂取量	若い女性の食塩摂取量は1日平均10g未満であった	60)
片瀬ら	2008 減塩指導の工夫が奏功した高血圧症の1例	減塩指導に対する理解度や実行度の把握	1日摂取食塩の7割は塩やしょうゆなど、3割は食品からであった	62)
南	2009 メタ解析	減塩の降圧効果 メタ解析	食塩摂取量1g/日の減少につき随時血圧は1-2mmHg下降	63)

片瀬ら⁶²⁾は、通常、1日摂取食塩のうち、7割は塩やしょうゆなどの調味料から、後の3割は食品中から得られているとしている。

2) 塩分簡易測定法

遠藤ら⁶⁴⁾は、尿中食塩濃度測定用の試験紙の使用可能性を検討，“吸い物”では炎光分光光度計測定値と良い相関がみられた。しかし，“みそ汁”では試験紙法の誤差は大きかった。

高橋ら⁶⁵⁾は、原子吸光法では、塩分計の約1.2～1.3倍の測定値であった。また、食品成分表による計算値は、原子吸光法による定量値の約1.2倍であったと指摘している。

小菅⁶⁶⁾は、即席麺や即席汁物の利用の際には、表示以上の稀釈を行うべきとしている。日本高血圧協会減塩ワークグループ⁶⁷⁾は、高血圧自己管理のための塩分摂取測定法として、算出機能付き塩分センサーが、信頼度は低いが簡便であり、日常的な塩分コントロールに適しているとしている。

2 減塩食調理

減塩食調理の例を、表4 [減塩食 (調理例)] にまとめてある。

口羽ら⁶⁸⁾は、減塩食調理の食味について、甘味、塩味、酸味の適正配合を検討、次のような結果を得ている。

- 1) 塩味は砂糖が増すにしたがって減少する。
- 2) 酸味は食塩が増すにしたがって減少する。
- 3) 少量の食酢添加により塩味が増強する (減

塩調理では少量の食酢添加が効果的である) 浅草ら⁶⁹⁾は、「ゆで」「水洗い」「浸漬」「湯通し」などの下調理による脱塩量を測定、次のような結果を得ている。

- 1) めん類をゆでると食塩の70%以上が急速に溶出する。
- 2) 塩蔵海藻類の脱塩には、水洗いと短時間の浸漬の併用が効果的である。
- 3) たくあん漬の食塩は、短冊切り、浸漬30分で70%脱塩する。
- 4) 塩蔵数の子は、番茶湯による脱塩がもっとも効果的である。
- 5) しらす干しは、湯通しにより半分以上脱塩する。

石垣ら⁷⁰⁾は、低塩分即席白菜漬として、夏季は食塩添加2% (12時間経過)、冬期は食塩添加2% (24～36時間経過) が最適味としている。

玉川ら⁷¹⁾は、減塩調味の際の酸味、甘味の適切な配合割合を検討、次のような結果を得ている。

- 1) 煮物に適した調味の最適配合：食塩/砂糖
配合比は、0.3%/1%, 0.5%/2%, 0.8%/2.5%, 1%/3% (食材による差はない)
- 2) 二杯酢に適した調味の最適配合：食塩/二杯酢配合比
<じゃがいも・ほうれんそう> 0.5%/7%, 0.8%/8%, 1%/10%, 0.3%/8%, 0%/10%
<鶏肉・あじ> 0.5%/12%, 0.8%/12%, 1%/15%, 0.3%/13%, 0%/18%

表4 減塩食 (調理例)

	調製内容	調製結果	文献
口羽ら 1980	減塩食調理の甘味、塩味、酸味の最適配合を比較検討	塩味は砂糖の添加量が増すにしたがって減少。酸味は食塩添加で減少。少量の食酢添加で塩味が増す。	68)
浅草ら 1981	「ゆで」「水洗い」「浸漬」「湯通し」などの下調理による脱塩量を計測	めん類は70%以上。塩蔵海藻類は、水洗いと短時間の浸漬の併用が効果的。たくあん漬は、短冊切、浸漬30分で70%。塩蔵数の子は、番茶湯が効果的。しらす干しは、湯通しにより半以下に。	69)
石垣ら 1985	低塩濃度でおいしく食べられる白菜漬物の試作	食塩濃度は、夏期は1.56%、冬期は1.20～1.24%で、市販品よりうすくてよい味の即席漬けが得られた	70)
玉川ら 1990	実際調理 (煮物、二杯酢、三杯酢) における適正減塩調味配合の検討	酢は減塩限界濃度を下げた	71)

3) 三杯酢に適した調味の最適配合：ほぐした鶏肉・あじの食酢の配合割合は二杯酢と同様の傾向であったが、じゃがいも・ほうれんそうでは酢の量が少ない方が良かった。酢を用いることによって減塩限界濃度を下げることができた。

3 塩味嗜好

食塩嗜好は成長段階で刷り込まれた味覚といわれるが、食塩嗜好は子供の頃、ピークがあり、加齢による低下を示唆する報告が多い。しかし、そのプロセスの詳細は必ずしも明らかではない。食塩嗜好は子供の頃の食習慣に基づくものではない、とされる一方、食習慣形成期に、成人後の食塩嗜好が支配されることも否定されていない。

食塩嗜好には地域差があることは、よく知られており、ある年齢までに地域の塩味に順応すると考えられている。成人後も、食塩嗜好は数ヶ月で変化し、たとえば薄味に慣れることも事実である。

一方、食塩嗜好は、生理状態でも大きく変わることは経験的にもよく知られている。塩分バランスの適否を味覚が判断、調整していると考えられている。

また、動物性タンパク質摂取量が増えると食塩嗜好が低下し、食塩摂取量が減ることも知られている。大豆タンパク質にも食塩嗜好を抑える働きのあることが、動物実験で示されている。旨味調味料(グルタミン酸モノNa塩)や辛味成分カプサイシン(唐辛子)も食塩嗜好を低下させるといわれる。

加齢により味覚感度が低下、塩味閾値が上昇し、食塩嗜好が高くなるとされるが、解明はされていない。

塩味嗜好に関する調査報告を、表5〔塩味嗜好調査〕にまとめてある。

小林⁷⁶⁾は、老人ホーム居住者について、NaCl水溶液に対する塩味嗜好と血圧水準および尿中のNaとKの排泄量を測定、それらの相関関係は認めなかった。

大学寮生を対象とした食塩摂取量の精密分析の結果から、香川⁷⁷⁾らは、日本人の食塩摂取量の著し

い地域差は、塩味嗜好の地域差に由来するとしている。また、食塩摂取量の地域差は他の栄養素のそれに比して著しく大きいことも明らかにした。

集団給食における汁物の塩味管理の観点から、殿塚ら⁷⁴⁾は、給食施設を利用する女子短大生(33~82名)を対象に嗜好実験を行い、次のような結果を得ている。

- 1) 食塩水濃度差が0.05%の場合、食塩水濃度が0.8%以上になると弁別不可能であった。濃度差0.1%、0.2%の場合および0.1%食塩濃度量のだし汁の場合では、それぞれの食塩濃度が1.4%以上になると弁別が不可能であった。
- 2) 異なる喫食時期での塩味識別能には有意差は認められなかった。
- 3) 汁中食塩量が食事全体の食塩量の50%を越す場合に、食事中、次第に塩味を強く感じるようになってきた。

松本ら⁷⁸⁾は、女子学生(寮生)が、1日摂取食塩量10g目標の食事を1年間喫食したとき、減少した食塩量の間食による補填はなく、低塩味嗜好を自覚するようになった者は81.7%に上った、と報告している。

地域住民(三重県)への減塩指導の観点から、渡辺ら⁷⁹⁾は、受講者920名を対象に、味噌汁の味覚調査を実施、食塩濃度0.8%を「ちょうどよい」または「からい」とした者が56%、また1.0%および1.5%で「ちょうどよい」または「うすい」とした者が43%であった($p=0.01$)。修了者716名のうち、意識的にうす味を選ぶようになった者は89.7%(受講前55%)であった($p=0.01$)。高木ら⁸⁰⁾は、名古屋市「くらしの健康展」参加者のうち2610名を対象に塩味覚調査を行った。50~60℃保温の“すまし汁”約40mlを試飲、塩味評価させ、次のような結果を得ている。

- 1) だしが濃い方が塩味は強く感じられる。
- 2) 男性より女性のほうがうす塩味嗜好である。
- 3) 男性の若年層は濃い塩味嗜好である。
- 4) 健康状態がよい時のほうが、塩味を強く感じる傾向にある。
- 5) 男性は塩味を強く感じる傾向にあるのは程よい空腹感の時であり、女性は空腹感の影響

表5 塩味嗜好調査

	対象	内容	試験結果	文献
小林	1977 老人ホーム居住者	塩味嗜好, 血圧水準, NaCl摂取量および尿中NaとKの排泄を測定調査	塩味嗜好と血圧水準および尿中のNaとKの排泄量との相関関係は認めなかった	72)
香川ら	1980 自治医科大学寮生19~21歳109名(うち女子3名)	出身地別に嗜好調査。1年後再現性を確認	摂取食塩量にはわずかの出身地差があった。塩味嗜好は均一化することなく, 幼児期の地域差を著しく残しているとした	73)
殿塚ら	1982 給食施設利用女子短大生(33~82名)	集団給食における汁物の塩味管理	食塩水濃度が0.8%以上では濃度差0.05%の弁別は不可能であった	74)
松本ら	1984 女子学生	1日摂取食塩量10g給食で間食による食塩補給有無の実態調査(アンケート)	減塩食実行期間中の間食による塩分補填はなかった	75)
渡辺ら	1984 地域住民(受講者920名 三重県)	減塩指導	減塩指導の結果, うす味になった者は89.7%(受講前55%)であった	76)
高木ら	1985 名古屋市「くらしの健康展」参加者2610名	50~60℃のすまし汁約40mlの塩味評価	だしが濃い方が塩味は強く感じられた。男より女は塩味嗜好, 若年男は濃い塩味嗜好	77)
丸山ら	1988 減塩食事療法を行った者	味覚検査	食事療法により, “うす味” 識別能力が獲得された	78)
丸山ら	1990 健常者(N群391人) 高血圧患者(HT群138人)	年齢による塩味覚の実態	味覚閾値は50~54歳で高血圧者群が有意に高かった	79)
丸山ら	1990 都内大手商社男性社員	塩味の知覚閾値の影響因子を明らかにする	塩味閾値は, 健常者群, 高血圧患者群ともに, 20-44歳群に比べて45~69歳群のほうが高値であった	80)
矢倉ら	1990 高血圧既往状況の異なる3群世帯	世帯群別の味覚識別能測定	家族高血圧既往群は高血圧既往のない群より塩味味覚識別能が敏感であった	81)
石田ら	1991 成人女子8人(21-25歳)	塩化ナトリウム水溶液の検知閾値と認知閾値の測定比較	検知閾値, 認知閾値共通の回帰式 $y = 1.0x - 0.3$ が得られた(x, 滴下法; y, 全口腔法, とともに対数変換値)	82)
宮崎ら	2003	食塩塩味に対する天然にがりの効果	にがり主成分塩化マグネシウムに塩味増加効果があった	83)
岡野ら	2004 女子学生	味噌汁の濃度テスト・嗜好テスト食物摂取状況調査	味噌汁の濃い味を好む者は減塩を「心がけてない」が約6割を占めていた	84)

はあまり受けない。

減塩食事療法の実践者の味覚検査のために, 丸山ら⁷⁹⁾は, 食塩味覚閾値判定用濾紙を考案・作製した。塩味の知覚閾値は, 健常者に比べて, 一般住民群と病院患者群で有意に高かった。食事療法により, 食塩に対する感度が高まり, “うす味”の識別能力が獲得されたことが示された。つづいて, 丸山ら⁷⁹⁾は, 大都市における日本人成人男性の食塩味覚感度を, 食塩味覚閾値判定濾紙を用いて, 年齢による塩味覚の実態を把握し, 健常者(N群391人)と高血圧患者(HT群138人)の違いを比較検討した。その結果, 次のような結果を得ている。

- 1) 味覚閾値は, 50~54歳でHT群がN群より有意に高かった。
- 2) N群, HT群とも45歳以上で味覚が鈍く, 特にHT群ではその傾向が顕著であった。
- 3) N群, HT群とも高血圧家族歴及び, 12-17歳時居住地域の年齢層による差は認められなかった。

さらに, 丸山ら⁸⁰⁾は, 都内某大手商社の男性社員を対象として, 食塩味覚閾値判定濾紙を用いて, 諸因子と味覚感覚との関係について検討した。その結果, 次のような結果を得ている。

- 1) 塩味の知覚閾値は, 健常者群, 高血圧患者群ともに, 20-44歳群に比べて45-69歳群のほ

うが高値であった。

- 2) 健常者群の45-69歳では、アルコールを1日平均30g以上摂取する者は、30g未満の者に比べて、塩味の知覚閾値が高かった。
- 3) 高血圧群の20-44歳では、喫煙者は非喫煙者及び喫煙経験者に比べて、塩味の知覚閾値が高値であった。
- 4) 義歯の影響については、一定の傾向がみられなかった。

矢倉ら⁸⁰⁾は、高血圧既往が親子ともにある20世帯55人(以下、A世帯群)、両親あるいはいずれか一方の親に高血圧既往のある38世帯111人(以下、B世帯群)、親・子ともに高血圧既往のない33世帯99人(以下、C世帯群)について味覚識別能を調べた。その結果、高血圧既往群(A世帯群、B世帯群)は、高血圧既往のない群(C世帯群)に比較して、塩味味覚識別能が敏感であり、特に子においては有意差があった。また、A世帯群はその他の世帯群よりも識別能が高かった。親子・夫婦間の味覚識別能の相関関係は、A世帯群においてはいずれの間においても、B世帯群においては夫婦間においてのみ有意な関係がみられたが、C世帯群ではいずれの間にも有意な関係はみられなかった。

石田ら⁸¹⁾は、成人女子8人(21-25歳)を対象に、強制選択3滴法と一対比較強制選択全口腔法を用いて、塩化ナトリウム水溶液の検知閾値と認知閾値の測定、測定方法間の比較及び閾値の時刻による変動を調べて、次のような結果を得ている。

- 1) 検知閾値、認知閾値とも、滴下法よりも全口腔法のほうが有意に低値を示した。
- 2) 滴下法、全口腔法ともに閾値の時刻による変動は認められなかった。
- 3) 測定方法間に、検知閾値、認知閾値共通の回帰式 $y = 1.0x - 0.3$ が得られた (x , 滴下法; y , 全口腔法, ともに対数変換値)。
- 4) 方法別にみた両閾値の変動係数に有意差は認められなかった。

宮崎ら⁸²⁾は、食塩塩味に対して天然にがり主成分塩化マグネシウムに増強効果があることを示した。

岡野ら⁸³⁾は、短大生と大学生を対象に味噌汁の

濃度テストと嗜好テストおよび質問紙法によるアンケートによる食物摂取状況調査、次のような結果を得ている。

- 1) 塩分濃度比較の正答率は70.7%であった。
- 2) 塩味認知閾値は低い(0.6%), 高い(1.2%)の正答率が高くなった。
- 3) 家庭で使用する味噌は合わせ味噌が最も多く、正答率も高かった。
- 4) 嗜好度については白味噌は「うすい」、合わせ味噌は「ちょうどよい」、赤味噌は「濃い」の評価が多かった。
- 5) 味噌汁の濃い味を好む者は減塩を「心がけてない」が約6割を占めていた。

4 減塩政策 公衆保健活動(日本/世界/米国)

表6 [減塩政策] に、従来、国内外で政策的に展開されてきた減塩運動についてまとめてある。食塩摂取イコール高血圧、という短絡的な図式に基づく減塩運動については、近年の研究に基づいて、反省が迫られていると言える。食塩感受性の遺伝子レベルでの研究は、一律減塩は妥当性を欠いていることを示している。また、適正な食塩摂取量(1日10g以下:厚労省)についても、疑問が出されてきている。さらに、組織的な減塩運動の弊害として、「伝統的な食生活の破壊」の危険も指摘されている。日本では、特に、伝統食文化の中核的調味品である味噌汁や漬物の追放と結びついていることが懸念されている。

また、高血圧予防の効果が疑わしい減塩政策(運動)は、国民のQOLを損なう可能性がある、との指摘もある。

血圧制御と高血圧における栄養的因子は重要である。DASH (Dietary Approach to Stop Hypertension) 食は、米国(ハーバード大、ジョンズホプキンス大、デューク大、ペニンントン生物医学研究所)で開発された食事による血圧コントロール法である。次のような食品構成が推奨されている。日本食パターンは、複合食に似る。

- 1) 果物・野菜食(穀物・低脂肪乳製品↓野菜・果物↑)
- 2) 複合食(果物・野菜↑脂肪・赤肉・砂糖↓ K・Mg・Ca↑ 食物繊維↑ 低脂肪乳製品・穀

表6 減塩政策

調査対象	調査内容	調査結果	文献	
Suter et al. 2002	報告事例のメタ解析	血圧制御と高血圧における栄養的因子について多数の報告を総括	高血圧予防には五つの習慣（高塩分食、高ナトリウム/カリウム比、飲酒量、カロリー過多、気ままなライフスタイル）の改善が効果的	85)
Kris-Etherton et al. 2002	報告事例のメタ解析	心疾患リスク低下のための食物による包括的アプローチと食事パターンについて、多数の報告を総括	アメリカ心疾患協会推奨の新しい食事パターンは心疾患リスク低減のための包括的アプローチである	86)
Moriguchi 2004	45-59歳の沖縄県民234人 ブラジル移住沖縄人160人	ブラジル日系人の心疾患に及ぼす食事効果調査	沖縄県民とブラジル移住沖縄人の心疾患罹患率の違いは食事パターンの違いによる	87)
Tokui et al. 2005	日本人 JACC Study.	胃ガンと食習慣の関係についての大規模な前向き調査 1988-1990	高塩分食品（味噌、漬物）の摂取頻度と胃ガン死亡率の間には有意の相関はなかった	88)
He et al. 2008	世界的減塩計画	最近の各国の減塩政策の成果を総括	開発国での減塩は加工食品への食塩添加量の漸減持続により達成可能	89)
Tsuda 2008	日本人	高血圧のための推奨栄養基準	1) 塩分制限（6 g/day未満） 2) 野菜と果物の摂取 3) コレステロール及び飽和脂肪酸摂取コントロール 4) 体重コントロール	90)
Brown et al. 2009	1985-87 INERSALT 1996-99 INTERMAP	標準化24時間ナトリウム排泄量、観察研究及び介入試験研究による塩分摂取量及びナトリウム排泄量に関するデータに基づいて、世界の食塩摂取量を推計	最大のナトリウム摂取源はイギリス、アメリカではシリアルとパン類。日本、中国では料理用食塩や醤油。減塩政策にはナトリウム主要源を標的とする	91)
Mohan et al. 2009	世界各国	動物研究、疫学研究、臨床的介入研究まで広範なデータに基づき食塩摂取と高血圧の関連性を総括	減塩は集団健康増進を図るもっとも低コストの戦略である	92)
Horky 2009	報告事例のメタ解析	血圧の加齢上昇、高血圧症罹患率は塩分供給量に直接的に比例することを多数の報告を総括	人口当たり食塩供給量を減らすことで、加齢による血圧上昇並びに高血圧心疾患罹患率に影響を与えることが期待される	93)
Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009	米国成人	疾病、ナトリウム摂取量調査 2005-2006	ナトリウム摂取増は高血圧リスクを高める	94)
Palar et al. 2009	米国成人 National Health Nutrition Examination Surveyデータ	減塩による高血圧・心臓血管疾患の罹患率低下の算定 断面シミュレーションアプローチ 1999-2004	集団平均でナトリウム摂取を上限目標量2300mg/dayまで減らせば高血圧患者1100万人減、医療費180億ドル削減につながる可能性がある	95)
Kurokawa 2001	高血圧者	本態性高血圧の病理理解	高血圧罹患を効果的に減らすための減塩政策実施について提案	96)

類・鶏肉・魚・ナッツ+)

Suterら⁸⁵⁾は、集団内、年齢層内での高血圧罹患率の違いは、ある種の栄養素摂取量の違いに基づいているとしている。血圧は高Na、アルコール、たんぱく質の摂取量と正相関している。またK, Ca, Mgとは負相関している。一方、食塩感受性患者を検知するための安価で簡単な方法はな

いのが現状である。高血圧の他のリスク因子には肥満、運動不足がある。最良の戦略は適度の減塩（6-7 g/day）と降圧剤との組み合わせ、同時にDASH食（野菜果物の十分量摂取）の採用である。DASH食においては、CaもMgも重要な降圧要因となる。高血圧予防のためには一つのリスク因子のために厳格な介入をする代わりに五つの習

慣（高塩分食，高Na/K比，飲酒量，カロリー過多，気ままなライフスタイル）の改善がもっとも現実的かつ効果的な戦略であると指摘している。

心疾患リスク低下のための食事パターンについて多数の知見がある。Kris-Ethertonら⁸⁰は，アメリカ心疾患協会（American Heart Association）により推奨された新しい食事パターンは心疾患リスク低減のための包括的アプローチを勧めており，同協会は四つの目標

- 1) 健康的食事の達成
- 2) 健康的体重の達成
- 3) 脂質レベルの改善
- 4) 血圧の改善

を掲げて，適正な食物を推奨している。これらには果物，野菜，穀類（全粒），魚，低脂肪肉，鶏肉，無脂肪・低脂肪乳製品，豆類がある。心疾患予防効果を期待してナッツ類，大豆，豆類，アルコール，茶，にんにくも推奨飲食物であるとしている。

Moriguchiら⁸¹は，45-59歳の沖縄県民234人とブラジル移住沖縄人160人の既往症，食事歴，血圧，心電図，血液検査，24時間摂取食物，24時間尿を調べ，心疾患リスクは遺伝子によるだけでなく，食習慣の遺伝子発現に及ぼす影響が大きいことを示している。

- 1) 沖縄からのブラジル移住者の心疾患死亡率は高く，平均余命は短い。
- 2) 沖縄県民とブラジル移住沖縄人の心疾患罹患率の違いは食事の違いによる。
- 3) 沖縄県民はブラジル移住沖縄人よりも肥満者37%，高血圧者50%少なかった。
- 4) ブラジル移住沖縄人の肉摂取量は沖縄人より34%多く，沖縄県民の魚摂取量は七倍であった。
- 5) 心電図異常（虚血性）は沖縄県民はブラジル移住者の半分であった。

減少傾向にあるものの，胃ガンは日本人にとって依然として主要なガンである。Tokuiら⁸²は，胃ガンと食習慣の関係についての大規模な前向き調査行っている（1988-1990）。33種の食品について摂取頻度調査に基づき，食品摂取レベルに対す

る胃ガンのリスクをハザード比（HR：95% CI）を用いて比較した。洋風朝食頻度は男性で胃ガンリスクと負の相関にあった（HR=0.49，95% CI：0.35-0.70）。レバーを高頻度で摂取する女性では胃ガンリスクは有意に増加した（週3-4回HR=2.02，95%CI：1.12-3.63，毎日1回以上HR=3.16，95%CI：1.16-8.62）。レバー摂取は用量依存的に胃ガンリスク（女性）を高めることが示唆された。一方，胃ガン死亡率と果物（みかん），ニンジン，ほうれんそう摂取頻度との相関は見られなかった。高塩分食品（味噌，漬物）の摂取頻度と胃ガン死亡率の間にも有意の相関はなかった。この研究から洋風朝食が胃ガンリスク低減に寄与する可能性が示唆された。

Heら⁸³は，世界的減塩計画の最近の経験から，高血圧は心臓血管疾患のもっとも重要なリスク因子であり，脳卒中の62%，冠状動脈疾患の49%を占めると総括している。さらに高塩分食は昇圧効果とは独立に脳卒中，心臓肥大，腎疾患のリスク因子を増すことがわかってきた。ほとんどの開発国での減塩は加工食品への食塩添加量の漸減持続により達成可能である。また，減塩達成国として，日本（1960-1970），フィンランド（1975以降），英などを挙げている。

Tsudaら⁸⁴は，高血圧のための推奨栄養基準として，

- 1) 塩分制限（6 g/day未満）
 - 2) K及びMg確保のために野菜と果物の摂取
 - 3) コレステロール及び飽和脂肪酸摂取コントロール
 - 4) 体重コントロール
- の四つを挙げている。

Brownら⁸⁵は，INERSALT（1985*87）INTERMAP（1996*99）の国際的研究における塩分摂取量及びNa排泄量データに基づいて，成人の世界平均摂取量は100mmol/dayを超えており，多くの特にアジア諸国では200mmol/day以上であるとしている。Na摂取源は世界各国で異なる。欧米では主に加工食品から食塩ナトリウムを摂取（摂取量のほぼ75%）する。英米での最大のNa摂取源はシリアルとパン類である。日本，中国では料理用食塩や醤油がNaの最大給源である。集団レベルで

の効果的減塩政策にはNa主要源に的を絞った政策展開が求められるとしている。

Mohanら⁹⁰⁾は、食塩過剰摂取と集団的減塩戦略の重要性の関連性を評価し、いくつかの国における減塩戦略を取り上げ、動物研究、疫学研究、臨床的介入研究まで広範なデータに基づき食塩摂取と高血圧の関連性を示している。さらに動物研究から人間対象の短期介入試験研究は高塩分食に伴う健康リスクを過少評価しがちであると指摘している。最近の介入試験研究は減塩食によって心臓血管疾患の減少を明らかにしている。WHO推奨集団レベル塩分摂取量5g/day以下の達成は、集団健康増進を図る低コストの戦略であると主張している。

血圧の加齢上昇、高血圧症罹患率は塩分供給量に直接的に比例することが多数の報告から確認されている。Horkyは⁹¹⁾、人口当たり食塩供給量を減らすことで、加齢による血圧上昇並びに高血圧心疾患罹患率に影響を与え、成人の30%を超える非感染性疫病抑制への寄与が期待されるとしている。

Centers for Disease Control and Prevention (CDC).⁹²⁾は、2005-2006年米国成人の29%が高血圧症、28%は前高血圧症と推定している。2005-2006年2歳以上の米国人のNa平均摂取量は推定3436mg/dayであった。2005年米国保健省及び農務省は成人Na摂取量として2300mg/day(ティースプーン一杯)以下を推奨した。しかし、高血圧者、中高年者、黒人では1500mg/day以下とした結果、2005-2006年において低Na推奨対象者は米国成人の69.2%に上った。

集団レベル(米国人)での減塩による高血圧・心疾患率低下がもたらす社会的利得をデータに基づいて算定することは、保健政策を推進する上できわめて重用である。Palarら⁹³⁾は、National Health Nutrition Examination Survey 1999-2004の集団レベルでのデータ(血圧、降圧剤使用量、Na摂取量)をナトリウム効果、発症率、医療コスト、QOLに関する研究文献から収集したパラメーターで相互に関連づけして利得算出モデルを構築した。集団平均でNa摂取を上限目標量2300mg/dayまで減らせば高血圧患者1100万人減、医療費

180億ドル削減につながる可能性が期待された。集団レベルの持続的な減塩は社会的に大きな利益をもたらすことが期待できるとしている。

Kurokawa⁹⁴⁾は、本態性高血圧の病理に関係している一連の要因を取り上げ、

- 1) 全身組織血圧の二つの要因-細胞外液量とレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の関係
- 2) 細胞外液量変化の腎臓によるセンシング
- 3) 食塩摂取文化の歴史的背景
- 4) 高血圧遺伝子分析結果の解釈

について検討している。高塩分食に対する血圧応答について考察し、高血圧を効果的に減らすための実際的な保健政策実施について提案している。

3章 食塩感受性

1 食塩感受性の人種差

日本人(白人)の血圧正常者の15~26%、高血圧(あるいは境界型高血圧)患者の30~50%が食塩感受性とされる。黒人の場合、正常血圧、高血圧患者で各々27%、50%という報告がある。食塩感受性は、人種差、遺伝・環境因子(気候、食生活など)以外にも、検査方法によっても、その頻度は変わると考えられている。特に、人種差を調べるためには統一プロトコールによる比較研究が重要となり、国際的な研究者組織により、データベースを構築する必要がある。食塩感受性の人種差に関する報告例を、表7[食塩感受性 人種差]にまとめてある。

黒人は白人よりも集団として、食塩感受性が高いといわれる。この理由として、Flackら⁹⁵⁾は、ナトリウム利尿能を制限している先天的または高血圧誘導腎不全、Na K ATPaseポンプ活性の低下、他の膜イオン輸送障害、心理的ストレス、インスリン抵抗性の増大、食事因子(Ca K摂取不足)などのすべてが関与している可能性を挙げている。将来、より鋭敏な食塩感受性診断により食塩感受性の人種間差異はさらに理解されるようになるだろうとしている。

表7 食塩感受性 人種差

	調査対象	調査内容	調査結果	文献
Flack et al.	1991 多数の人種集団	食塩血圧応答の人種的要因	異人種を含む集団では黒人は白人よりも食塩感受性が高いと指摘している	97)
Rhoades	1996 北米大陸原住民 200万人	高血圧罹患率の調査	北米原住民の高血圧罹患率は一般のアメリカ人より低い	98)
Chrysant et al.	1997 拡張期血圧95-115mmHg 1916人	大規模多元プラセボ対照研究により食塩感受性高血圧患者における低塩食および高塩食への血圧応答に及ぼす人種差を比較	食塩感受性高血圧患者における食塩摂取血圧応答に人種差は有意の影響は与えなかった	99)
家森	1999 ミシシッピ州ジャクソン市 黒人白人	食塩負荷による血圧変動測定	一週間の食塩負荷による血圧上昇は、黒人のみで、日本人もブラジルの白人も、有意に上昇しなかった	100)
Aviv et al.	2004 黒人	血圧のナトリウム感受性	黒人高血圧発症はNa-K-2Clのコトランスポートの増強に起因し、これによりナトリウム及び水分保留が増大する	101)
Lindhorst et al.	2007 都市黒人 都市白人	黒人と白人の間の高血圧発症の差を調査	黒人高血圧患者は白人患者よりも食塩感受性が高く、腎臓でのナトリウム保留傾向が高いためであるとした	102)
Young	2007 人類集団	人類集団間の高血圧感受性の差異の比較	寒冷気候よりも熱帯気候に対して高血圧感受性が大きい、としている	103)
Katori et al.	2008 黒人 白人	高塩分摂取ですべての人は血圧食塩感受性を示すか？	ナトリウム負荷は低カリクレイン群では高カリクレイン群よりも収縮期血圧上昇効果が大きい	104)
Dwivedi et al.	2009 多数の人種集団 高血圧患者	高血圧症の人種的要因	高血圧症は人種の遺伝特性よりも環境因子やライフスタイルに大きく関係している指摘している	105)

約200万人の北米大陸原住民の高血圧罹患率は、一般のアメリカ人より低い。Rhoades⁹⁸⁾は、近年、肥満者、糖尿病患者の増加に伴い高血圧患者は増加していると指摘している。特に糖尿病合併症の腎機能障害が高血圧患者の増加に拍車をかけているという。

Chrysantら⁹⁹⁾は、大規模多元プラセボ対照研究により食塩感受性高血圧患者における降圧剤エナラプリルマレートまたはイスラピジンの降圧作用に及ぼす低塩食及び高塩食の影響を調べた。3週間食塩自由摂取(100-200mmol/day)後、拡張期血圧が95-115mmHgの1916人について3週間低塩食(50-80mmol/day)とし、さらに3週間高塩食(200-250mmol/day)に変えた。1916人のうち624人は低塩食から高塩食への切り替えによって拡張期血圧5mmHg以上上昇した群を食塩感受性ありとした。このうち367人は白人、156人は黒人、92人はヒスパニック、8人はアジア人、1人はアメリカインディアンであった。また男315

人、女309人であり、351人は55歳未満、273人は55歳以上であった。195人はBMI27以下、429人はBMI27超であった。患者全グループで血圧は食塩制限により低下し、食塩負荷により上昇した(p=0.001)。食塩に対する血圧変動は人種、年齢、性別、体重の間で統計的有意差はなかった。食塩感受性高血圧患者における食塩摂取血圧応答に対して、人種、年齢、性別、体重は統計的に有意の影響は与えなかった。

WHOセンター(循環器疾患の一次予防に関する国際共同研究センター)による世界25カ国、60地域で栄養と循環器疾患の研究から、50~54歳を中心とする中年層では、平均20%が境界域以上の高血圧であるといわれる。また、世界中では、食塩摂取が多い程、収縮期、拡張期血圧も高いという。米国在住の黒人には重症の高血圧が多く、脳卒中の死亡率も高い。家森ら¹⁰⁰⁾のミシシッピ州ジャクソン市の調査では、黒人の方が白人よりも高血圧が多かった。黒人は野菜や果物に多いKの

摂取が少なく、Na/K比は黒人で高いことも理由として挙げられるが、米国の黒人は高血圧の遺伝素因が強いのではないかとした。一方、食塩を負荷して血圧が有意に上昇したのは、黒人のみで、日本人もブラジルの白人も、1週間の食塩負荷で血圧の有意な上昇はなかったと報告している。

Avivらは¹⁰¹⁾、黒人における血圧Na感受性は、Na-K-2Clのコトランスポートの増強に起因し、これによりNa及び水分保留が増大するとしている。

Lindhorstら¹⁰²⁾は、高血圧罹患率は都市黒人で白人に比べて高く、また血圧レベルによらず標的臓器の障害程度も大きいとした。一般に白人に比べて黒人は利尿剤やCa拮抗剤によく反応する一方、ベータ拮抗剤やACE阻害剤への反応は鈍い。一般に、黒人患者は白人患者よりも食塩感受性が高く、これは腎臓でのNa保留傾向が高いためとされ、イオン輸送機構、腎上皮Naチャンネル、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、血管作動物質など内因的差異によって一部説明可能であるとしている。しかし、現在、この差異を完全に説明することは困難であるとしている。

遺伝的高血圧は進化の過程で増幅され、人類集団間の高血圧感受性の差異は3万年から10万年前にアフリカから世界中に拡散する間に選択されてきたものといわれる。Young¹⁰³⁾によれば、もっとも重要な選択圧は気候であり、これが緯度による変異を作り出してきたとされる。それゆえ最近の高血圧疾患分布は近代文明（高塩分食）と祖先の血圧感受性との相互作用に基づくものであるとしている。

正常血圧者の3分の1、高血圧者の半分が食塩感受性といわれる。Katoriら¹⁰⁴⁾は、食塩感受性の原因の一つに尿中カリクレインレベルの低下が挙げられる。実際、尿中キニン生成しないキノーゲン欠ラットは食塩感受性を示す。生成キニンは集合管からのNa再吸収を阻害する。黒人白人とも本態性高血圧患者では正常血圧者に比べて尿中カリクレインは少ない。しかし正常血圧黒人は高血圧白人と同レベルであった。小規模研究ではNa負荷は、低カリクレイン群では高カリクレイ

ン群よりも収縮期血圧上昇効果が大きいとされる。

高血圧及びその合併症はアフリカ系南アジア系コミュニティではヨーロッパ系のそれに比べて多く、インドやアフリカの農村では少ない。一方、発展途上国の都市化地域では、高血圧症は大きな問題になっている。それゆえ高血圧症は人種的遺伝特性によるというより、むしろ環境因子やライフスタイルに大きく関係していると指摘されている。アフリカ人種とヨーロッパ人種の間の高血圧罹患率の差は社会経済的因子の補正により、縮小することがわかっている。Dwivediら¹⁰⁵⁾は、アフリカ系高血圧患者ではレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性が著しく抑制されている。この結果、アフリカ系高血圧者は低塩食にもかなり血圧上昇感受性を示す。日本人や中国人の高血圧患者では共通してレニン活性が低いが、ヨーロッパ人種との比較研究はまだない。

2 食塩感受性遺伝子

食塩感受性遺伝子に関する研究は、候補遺伝子座のSNP（多型）の探索を主としている。食塩の関与する血圧関連臓器の腎臓は、水・電解質（Na）平衡を担っている。食塩摂取量の増加に各種の生理的経路が応答して、平衡を維持をする。この応答は大きく二つある。

- 1) レニン-アンジオテンシン系をはじめとする食塩‘貯留’ホルモンの活性低下
- 2) 心房性利尿ペプチドをはじめとする食塩‘排泄’ホルモンの分泌増加

これらのホルモン変動はカリクレイン-キニン系やプロスタグランジン系（腎臓内分泌システム）を通じて、腎交感神経活性の低下をもたらす。食塩感受性とは、これら多段階・多因子の複合効果である。これらの各因子に遺伝子多型が多様に関わっていると考えられる。これらの研究報告例を、表8〔食塩感受性遺伝子〕にまとめてある。

- 1) レニン-アンジオテンシン-アルドステロン（RAA）系遺伝子多型
レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系（Renin-Angiotensin-Aldosterone System；RAAS）

表8 食塩感受性遺伝子 その1

	調査対象	調査内容	調査結果	文献
Kojima et al.	1994 日本人 本態性高血圧患者 104人	血圧食塩感受性と多型因子の関係を調べた	血圧食塩感受性はハプトグロビンフェノタイプと相関したが、ACE遺伝子型とは相関しなかった。しかし血漿レニン活性の塩分制限応答はACE遺伝子型により異なることを示した	106)
Hiraga et al.	1996 日本人 本態性高血圧患者 66人	食塩感受性と遺伝的な因子との関係を調べた	アンギオテンシン変換酵素遺伝子のI/D多型は、日本人本態性高血圧患者における血漿レニン活性とは無関係な食塩感受性血圧に関係する遺伝子ファクターであることを示唆した	107)
藤田ら	1998 ネパール人	ACE遺伝子多型の食塩感受性の人種間比較	I型が西欧諸国(仏, 豪, 米, オランダ)と比較して有意に高い傾向にありp<0.001, 日本人, 中国人とはほぼ同様(p<0.05)であった。ACE I/D多型の食塩感受性への影響度は低いことを示唆した	108)
香川ら	2001 日本人	食塩感受性遺伝子	食塩を体内に貯え、血圧を高く維持する酵素のSNPが高血圧と有意に相関していることを示した	109)
Katsuya et al.	2003 日本人 白人	食塩感受性遺伝子多型を調べるため、日本人と白人との間で5つの候補遺伝子の対立遺伝子頻度を比較した	すべての対立遺伝子頻度は白人より日本人において著しく、この差は食塩感受性頻度の人種間差異を裏づけているとした	110)
Swift et al.	2004 アフリカ系黒人	高血圧リスク因子(上皮細胞ナトリウムチャンネルの遺伝子変異)を調べた	黒人にはレニン活性の低い者が多く、減塩により血圧が下がる傾向が強く、腎臓のナトリウム処理異常が黒人集団における高血圧の重要な病因となっているものと推定した	111)
Jones	2004 DASH-Sodium Trial	食塩感受性の実地判別を確認するため多重測定を行った	食塩感受性の検出は困難であったことから、結果的に集団への減塩実施を支持した	112)
Wrona et al.	2004 ポーランド人68人	ナトリウム各レベルの動脈血圧, 糸球体濾過速度, ナトリウム利尿, PRA, ALDO, ALDO/PRAに関してCYP11B2遺伝子型を照合した	白人種ではT(-344)C CYP11B2多型は食塩感受性高血圧並びにレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系活性に関与していないことを示唆した	113)
Yamagishi et al.	2004 日本農村地域 30-74歳 男女2823人	AGT多型と血圧の関係を調べた	アンギオテンシノーゲン(AGT)T174M多型は若い非肥満の日本人ではDBP上昇と相関。この相関は高塩分摂取によりより明確になった	114)

は、血圧調節に関わるホルモン系である。血圧低下や循環血液量の低下に伴って活性化される。この系が活性化するとさまざまな昇圧物質が分泌され、高血圧の原因の一つとなる。

血圧低下を感知すると、たんぱく質分解酵素レニンを血液中に分泌、このレニンは、アンジオテシノーゲンを加水分解しアンジオテンシンIに変換する。アンジオテンシンIは、アンジオテンシン変換酵素(ACE)によってアンジオテンシンIIに変換される。アンジオテンシンIIは、副腎皮質球状帯に作用してアルドステロンの分泌を、また、脳下垂体に作用してバソプレッシン(ADH)の分泌を促進する。さらに、アンジオテンシンII

はアンジオテンシンIIIに変換される。アンジオテンシンII, III, バソプレッシンは血管を収縮し、昇圧作用がある。また、アンジオテンシンII, アルドステロンは尿細管でNa⁺, Cl⁻の再吸収を促す。さらに、バソプレッシンは集合管で水の再吸収を促す。

アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACE阻害薬)は、アンジオテンシンII, IIIの産生を抑制し、高血圧の治療に用いられている。アンジオテンシンIIの受容体をブロックするアンジオテンシン受容体ブロッカー(ARBs)も、血圧上昇を抑制するため、高血圧の治療に用いられている。

日本人の血圧食塩感受性と多型因子の関係を明

表 8 食塩感受性遺伝子 その2

	調査対象	調査内容	調査結果	文献	
Matayoshi et al.	2004	チアザイド利尿剤 (TZD) の抗圧効果感受性遺伝子多型について調べた	76人中, 17遺伝子に関して48人にSNPが認められた。食塩感受性と非感受性の遺伝子多型分布は有意に異なっていた。TZDに対する血圧低下応答は二つのSNPに対応することが認められた。	115)	
眞田ら	2005	日本人高血圧患者	食塩感受性に関わる遺伝子を解析した	日本人において, 食塩感受性高血圧遺伝子モデルは, GRX4の3種類の変異 (R65L, A142V A486V) すべてを合わせたもので, 食塩感受性と非感受性群を94.4%予見した	116)
Isaji et al.	2005	日本人 正常血圧535人 高血圧360人	CYP11B2特殊遺伝子型における左心室肥大と尿中ナトリウム排出との相関を検討した	CYP11B2における-344CC遺伝子型またはイントロン2変換(-/-)遺伝子型が食塩感受性心肥大のリスク因子である可能性があるとした	117)
Tamaki et al.	2005	滋賀市郊外信楽受診者2902人	食塩感受性遺伝子とその高血圧効果の相互関係を調べた	塩分摂取量は高血圧と相関しなかった。AGTとADD1複合遺伝子多型が高血圧に関与していると示唆した	118)
Sanada et al.	2006	日本人高血圧未治療患者184人	Gタンパク共役レセプターのキナーゼ4型 (GRK4) を含む10遺伝子の多型を検討した	GRK4変異型スクリーニングは食塩感受性検知のための診断補助に有用であろうとした	119)
Katori et al.	2006	蓄積データ	過去蓄積されたデータに基づいて腎臓のカリクレイン-キニン系の活性低下機構を解明した	血圧食塩感受性は大部分人種差とカリウム摂取量に依存することを示唆した	120)
Katori et al.	2008	黒人 白人	食塩感受性には尿中カリクレインの減少に起因する可能性を検討した	正常血圧黒人のカリクレイン平均値は高血圧白人と同レベルであった。カリウム摂取の厳密なコントロール下で, 食塩感受性と尿カリクレインレベルの関係解明が必要であるとした	121)
Cohen	2008	報告事例のメタ解析	食塩感受性概念の根拠について検討した	食塩感受性の再現性が実証されているとはいえない。摂取ナトリウムと血圧の関係は根拠を欠いている。したがって食塩感受性の概念は複合的, 多面的, 可変的であることに留意するべきとした	122)
Zhang et al.	2009	日本人 男238人	CYP3A5*1*3の血圧への影響を潜在的な遺伝子環境相互作用として日常的食塩摂取量を考慮に入れて調べた	CYP3A5 遺伝子変異型は日本人男の血圧食塩感受性の決定因子である可能性があるとした	123)

らかにするために, Kojimaら¹⁰⁶⁾は, 本態性高血圧患者104人の塩分制限による血圧応答に関して食塩感受性群と非感受性群に分けて, アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 遺伝子多型に関して intron16alu配列における挿入/欠失多型を調べた。ACE遺伝子型はアレル配列にしたがってII, ID, DDに分類された。ハプトグロビンは三つのフェノタイプ1-1, 2-1, 2-2に分類された。塩分制限に対する血漿レニン活性の応答はDD型では他の二つの型より大きかったが, いずれの間でも有意差はなかった。しかし, フェノタイプ2-1では2-2よりも感受性は高かった。血圧食塩感受性はハプトグロビンフェノタイプと相関したが,

ACE遺伝子型とは相関しなかった。しかし血漿レニン活性の塩分制限応答はACE遺伝子型により異なることを示した。

Hiragaら¹⁰⁷⁾は, 本態性高血圧患者66人を, 低塩食 (50mmol/day) 1週間から高塩食 (340mmol/day) 1週間の期間中の平均血圧変化から食塩感受性と非感受性の二群に分けた。食塩感受性, 抵抗性はACE遺伝子の287bpの挿入/欠失 (I/D) 多型との関連で調べた。アンジオテンシン変換酵素遺伝子型IIはID及びDDより食塩感受性は高かったが, 血漿レニン活性には差はなかった。食塩感受性群ではIアレルの頻度は食塩抵抗性群に比べて有意に高かった。しかしハプトグロ

ビンフェノタイプと食塩感受性の間には有意の相関はなかった。これらのデータはアンジオテンシン変換酵素遺伝子のI/D多型は、日本人本態性高血圧患者における血漿レニン活性とは無関係な食塩感受性血圧に関係する遺伝子ファクターであることを示唆しているとした。

ネパール人を遺伝的な食塩抵抗性のモデルとして、藤田ら¹⁰⁸⁾は、ACE遺伝子多型の食塩感受性の人種間比較をした。ネパール人におけるACE遺伝子多型の頻度は、I型が西欧諸国(仏、豪、米、オランダ)と比較して有意に高い傾向にあり($p < 0.001$)、日本人、中国人とはほぼ同様($p < 0.05$)であった。ACE I/D多型の食塩感受性への影響度は低いことを示唆した。

高血圧の感受性遺伝子は約20種が知られている。香川ら¹⁰⁹⁾は、日本人ではアンジオテンシノーゲンT235Mも、ACE遺伝子多型(I/D)、アルドステロン合成酵素R173Kなど、食塩を体内に貯え、血圧を高く維持する酵素のSNPが高血圧と有意に相関しているとしている。

先行研究から食塩感受性はインスリン抵抗性、交感神経興奮、夜間血圧低下減少に関係することが示されてきた。Katsuyaら¹¹⁰⁾は、いくつかの社会集団を対象に食塩感受性遺伝子多型の重要性を調べ、アンジオテンシノーゲン遺伝子(AGT)は儉約遺伝子であり、Na及び体液の体内貯留を高め、これにより疾患リスクを増大させることを示した。遺伝子多型AGT/T+31CのCC遺伝子型はM235多型のTT遺伝子型と完全結合不均衡にあるが、Ohasama Studyにおける夜間血圧低下の減少と関係している。他方、 α 提示遺伝子ADD1のGly460Trpは赤血球Na輸送に関与し、尿細管Na再吸収を促し、高血圧リスクを高める。また、Ohasama StudyにおいてADD1のTrp460対立遺伝子は低レニン活性を伴う若年性高血圧に関与していることを明らかにした。これらの多型に加えて、アルドステロン合成酵素遺伝子(CYP11B2)プロモーターのT(-344)C多型及びGタンパク β 3サブユニット遺伝子(GNB3)のC825T多型は食塩感受性リスク候補遺伝子と考えられた。日本人と白人との間で5つの候補遺伝子の対立遺伝子頻度を比較した。その結果、すべての対

立遺伝子頻度は白人より日本人において著しく高かった。この興味深い結果は食塩感受性頻度の人種間の大きな差異を裏づけているとした。

アフリカ系黒人の高血圧リスク因子(上皮細胞Naチャンネルの遺伝子変異)を調べたSwiftら¹¹¹⁾は、黒人にはレニン活性の低い者が多く、減塩により血圧が下がる傾向が強く、腎臓のナトリウム処理異常が黒人集団における高血圧の重要な病因となっているものと推定している。

アンジオテンシノーゲン(AGT)T174M多型と血圧の相関に及ぼす塩分摂取量の影響を明らかにするために、Yamagishiら¹¹²⁾は、日本農村地域の30-74歳男女2823人を対象にAGT多型と血圧の関係を調査した。血圧は年齢(30-64, 65-74)、肥満度指数(BMI:中央値)、食事調査及び24時間尿から算出した塩分摂取量(中央値)をそれぞれ層化して解析した。ここでの仮説は174M遺伝子アレルを持つ特に若い痩せ型では、高塩分摂取量に対して血圧が上がりやすく、それゆえ高塩分摂取によってT174M多型と血圧の相関がより明確になるというものである。収縮期または拡張期(SBPまたはDBP)血圧はTTとTM+MMの遺伝子型の間で有意差はなかった。しかし、TM+MM型とTT型の平均DBPの差は若年者で+1.0 mmHg ($p=0.06$)、非肥満者で(BMI<23.5kg/m²) +1.7 mmHg ($p=0.01$)、若い非肥満者で+2.3 mmHg ($p=0.002$)であった。さらに若い非肥満者では血圧差は尿中高Na排出者(+3.1 mmHg, $p=0.03$)、Na/K排出比高値者(+4.1 mmHg, $p=0.007$)、現在Na高摂取者(+3.0 mmHg, $p=0.003$)、過去Na高摂取者(+3.4 mmHg, $p=0.001$)の順で高くなった。結論としてアンジオテンシノーゲン(AGT)T174M多型は若い非肥満の日本人ではDBP上昇と相関していることがわかった。この相関は高塩分摂取によりより明確になった。

Shigaraki Studyにおいて、Tamakiら¹¹³⁾は、日本人について食塩感受性遺伝子とその高血圧効果の相互関係に関する調査研究を行った。滋賀市郊外信楽の1999年受診者2902人を対象とした。高血圧治療薬を用いていない1647人について、アンジオテンシノーゲンAGTとアデュージンADD1の遺伝子多型複合解析の結果、235Thrまたは460

Trpの二重ホモ接合性は高血圧に関与していないことが明らかになった。多重ロジスティック回帰分析によって年齢（オッズ比OR：1.07, 95%信頼区間CI：1.06-1.08）、肥満度指数BMI（OR：1.18, 95% CI：1.13-1.23）、飲酒量（OR：1.39, 95% CI：1.16-1.66）、高血圧家族歴（OR：1.57, 95% CI：1.18-2.07）及びAGTM 235T Thr/ThrとADD1 Trp/Trpの複合多型（OR：1.37, 95% CI：1.03-1.82）は高血圧に関与していることがわかった。しかしながら塩分摂取とAGTとADD1複合遺伝子多型の間には相関はなく、さらに多変量解析の結果、塩分摂取量は高血圧と相関しないことがわかった。したがってAGTとADD1複合遺伝子多型が高血圧に関与していると思われる。しかし、塩分摂取に関する簡単な質問票では、塩分摂取量と高血圧あるいは食塩感受性の相関を判定するには不十分と考えられた。

米国では食塩感受性高血圧者は三千万人以上に上る。これらはしばしば血漿レニン活性低下を伴っている。Sanadaら¹¹⁹⁾は、食塩感受性高血圧者及び低レニン高血圧者の遺伝子診断の有効性を検証した。高血圧診断を受けた未治療の日本人患者184人についてGタンパク共役レセプターのキナーゼ4型（GRK4）を含む10遺伝子の多型を検討した。これらの遺伝子の変異は高血圧と関連し、D1レセプターを損なう変異型である。この変異は腎臓Na輸送を阻害する。食塩感受性（高塩分摂取により10%以上昇圧）あるいは低レニンに関わる遺伝子型の決定に多因子解析を行った。またGRK4遺伝子型とD1レセプター機能損傷との関係を決定するためにドカルパミン（ドパミンプロドラッグ）のNa利尿効果をGRK4遺伝子型保持と非保の正常血圧者18人を対象にテストした。その結果、GRK4R65L, GRK4A142V, GRK4A486Vに基づく遺伝子モデルによる食塩感受性高血圧予測率は94.4%であった。低レニン高血圧予測率はGRK4A142Vの1-locus変異型では78.4%, GRK4A142VとCYP11B2C-344Tの2-locus変異型では77.8%であった。Na排出は高血圧者ではGRK4変異型の数に逆相関し、ドパミン刺激によるNa利尿応答はGRK4変異型を3つ以上ある正常血圧者では阻害された。GRK4変異型は食塩感受性高

血圧及び低レニン高血圧に関係している。しかし、食塩感受性高血圧予測遺伝子モデルは低レニン高血圧予測モデルとは異なっている。これら二つのフェノタイプ（発現型）の遺伝子が異なっていることを示唆している。GRK4変異型スクリーニングは食塩感受性検知のための診断補助に有用であろうとした。

2) カリクレイン-キニン系遺伝子多型

カリクレイン（キニノゲニン, キニノゲナーゼとも、kallikrein）は、血圧降下作用を持つタンパク質分解酵素の一種である。血漿カリクレインと腺性カリクレインの二つに分類される。キニノーゲンを加水分解し、血圧降下作用を持つキニン（ブラジキニンないしカリジン）を生成する。キニンはオートコイドに属する。ヒトカリクレインの遺伝子は第10染色体のp13.4にあるKLKで、酵素ファミリーを形成しているとされる。

Katoriら¹²⁰⁾は、蓄積データに基づいて腎臓のカリクレイン-キニン系の活性低下に今まで提唱されている機構で抜けている部分があるとしている。腎臓カリクレインは末梢結合管状細胞から分泌される。カリクレイン-キニン系構成要素は末梢ネフロン集合血管に沿って分布している。生成したブラジキニンはただちにカルボキシペプチダーゼY様エキソペプチダーゼ及び中性エンドペプチダーゼによって分解される。これらの酵素は血しょう中キナーゼとは独立しており、あたかもアンギオテンシン変換酵素のように作用する。血圧食塩感受性は大部分人種差とK摂取量に依存する。興味深いことにKとATP感受性Kチャンネルブロック剤は腎臓カリクレイン分泌を促し、高血圧動物の血圧上昇を押さえる。尿中カリクレイン定量は正常血圧者高血圧者において必要となるかもしれない。さらに腎臓カリクレイン放出剤例えばK-ATPチャンネルブロック剤及びエベラクトンBのようなキナーゼ阻害剤の開発研究は新降圧力薬剤の開発につながる可能性があるとした。

さらに、Katoriら¹²⁰⁾は、高塩分血圧感受性の一因として、尿中カリクレインの減少を挙げている。その根拠は、尿中キニン産生不能のキニノーゲン欠損ラットにおける食塩感受性によるとして

いる。腎臓カリクレインは糸球体細胞で分泌され、この細胞は、厚班または管状糸球体フィードバックシステムのちょうど末端に位置する。腎臓において過剰Naは末梢管にオーバーフローし、集合管に再吸収される。産生キニンも集合管へのNa再吸収を阻害する。本態性高血圧の黒人、白人ともに正常血圧者に比べてカリクレインの尿排出が少ない。しかし正常血圧黒人のカリクレイン平均値は高血圧白人と同レベルであった。アフリカ系アメリカ人は白人よりK摂取量は少ない。KとATP感受性Kチャンネルブロッカーは腎臓カリクレイン放出因子である。小規模臨床研究ではK摂取の厳密なコントロールの下で、感受性と尿カリクレインレベルの関係の関係を解明することが必要であるとしている。

3) Na調節系遺伝子多型

摂取Naのほとんどは腎臓から尿に排泄する。腎臓機能（血液ろ過機能）の最小単位ネフロン（200万個以上）は腎小体と尿細管から成り、腎小体は、糸球体毛細血管網と、それを包むボーマン嚢から成っている。糸球体膜の内外圧力差により血漿成分はボーマン嚢にろ過されてくる。最終的に尿として排泄される。糸球体でろ過されたNaは尿細管でほとんど再吸収される。糸球体でろ過されるNa量は、1日500～700グラムにもなり、塩分換算で1200～1800グラムとなる。この塩分の約99%以上は尿細管で再吸収されている。水分も同様で、ろ過量の99%以上は尿細管で再吸収される。摂取Na量とほぼ等量が排泄されるので、血液中Na濃度は一定に保たれる。腎機能が正常であれば、通常の塩分負荷（10-20g/day）によっては血液中Na濃度はきわめて変動しにくいと考えられる。

Wronaら¹¹³⁾は、ポーランド人68人のDNAを採取し、各人については一週間づつ普通レベル、低レベル、高レベルでNaを摂取させた（120-140, 20-40, 240-260mmol Na/day）。食塩感受性は低レベルと高レベルの各平均動脈血圧の差（delta MAPH-L）で表した。末梢血赤血球細胞のDNAについて多型域プライマーでPCR増幅し、C（-344）アレルをHae3制限サイトのゲインにより同定

した。その結果、14TTホモ接合型20.6%、35TCヘテロ接合型51.5%、19CCホモ接合型27.9%の割合であった。Na各レベルの間では動脈血圧、糸球体濾過速度、Na利尿、PRA、ALDO、ALDO/PRAに関してCYP11B2遺伝子型で有意差はなかった。これらの結果は白人種ではT（-344）C CYP11B2多型は食塩感受性高血圧並びにレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系活性に関与していないことが示唆された。

Matayoshiら¹¹⁴⁾は、チアザイド利尿剤（TZD）の抗圧効果感受性遺伝子多型について調べている。TZD服用により5 mmHg以上の血圧低下が認められた患者をTZD応答者とした。76人中、17遺伝子に関して48人にSNPが認められた。食塩感受性と非感受性の遺伝子多型分布は有意に異なっていた。TZDに対する血圧低下応答は二つのSNPに対応することが認められた。

高血圧症患者の90%以上を占める本態性高血圧症は、日本人で3,500万人と推定されている。眞田ら¹¹⁵⁾は、Na調節経路の蛋白をコードする遺伝子のSNPsが発見されたことにより、高血圧の有無に拘わらず食塩感受性の新しい診断ツールとして食塩感受性の遺伝子マーカーを確定し、早期の介入が重要であるとし、食塩感受性に関わる遺伝子を解析した。その結果、日本人において、食塩感受性高血圧遺伝子モデルは、GRX4の3種類の変異（R65L, A142V A486V）すべてをあわせたもので、食塩感受性と非感受性群を94.4%予見した。検出能力をあげるために遺伝子多型を考慮することの重要性を示唆した。また、日本人でGRK4変異を3以上もつものは、つねに食塩感受性があり、慢性的なNaの過剰負荷に対する反応が障害されていることを示した。

Isajiら¹¹⁷⁾は、CYP11B2特殊遺伝子型における左心室肥大と尿中Na排出との相関を調べて、CYP11B2における-344CC遺伝子型またはイントロン2変換（-/-）遺伝子型が食塩感受性心肥大のリスク因子である可能性があるとした。CYP11B2遺伝子型分布の人種差を食塩摂取の差と結びつけることで従来の報告の食い違いを説明することが可能であろうと示唆している。

最近、チトクロームP450 3A5（CYP3A5）遺伝

子の腎臓Na再吸収及び血圧制御への関与が明らかにされている。CYP3A5*1（エクプレッサー）とCYP3A5*3（レプレッサー）の異型遺伝子の血圧に及ぼす遺伝効果について、アフリカ系アメリカ人、白人を対象の研究はあるが、アジア人については未検討であった。Zhangら¹²⁰⁾は、日本人男性238人についてCYP3A5*1*3の血圧への影響を潜在的な遺伝子環境相互作用として日常的食塩摂取量を考慮に入れて調べた。CYP3A5*1*3自体は収縮期血圧SBPには関係なく、拡張期血圧DBPとわずかに関係あるのみだった（*1/*1 vs *3/*3 p=0.038）。この関係は年齢、BMIで調整した結果より明確になった。（*1/*1 vs *3/*3 p=0.007；*1/*1 vs *1/*3 p=0.045）遺伝子型と食塩摂取量の有意の相互作用がSBP（p=0.046）、DBP（p=0.003）ともに認められた。SBPとDBPは*3/*3では塩分摂取量と有意に相関（p=0.001）していたが*1変異型では相関はなかった。低塩分摂取群においてのみ*1変異型は*3/*3変異型より高い血圧を示した。これらの結果からCYP3A5遺伝子変異型は、日本人男性の場合、血圧食塩感受性の決定因子である可能性があるとした。

4) 食塩感受性の判別について

採血による遺伝子診断によって、食塩感受性高血圧症と食塩非感受性高血圧症が容易に鑑別されれば、的確な個別治療が可能になる。

しかし、一方では減塩は無害であり、食塩感受性の有無によらず、すべての人に利益をもたらすとし、食塩感受性判別法がないので集団全体に減塩を実施すべき、という考え方がある。他方、減塩の利益をもっとも強く受ける人たちは、高血圧者、50歳以上、黒人、腎臓病患者、糖尿病患者であり、他の人たちでは減塩による利点はない。減塩食は高くつき、不便であり、食中毒の可能性もあるので、食塩感受性を臨床的に判別する方法を探究すべき、という主張もある。食塩血圧感受性の問題として、

- 1) 食塩感受性を与える所要期間は？
- 2) 食塩感受性の実際的な検出法は？
- 3) 食塩-血圧関係の機構は？
- 4) 血圧無関係な心臓疾患に及ぼす食塩の効果

は？

の4つを挙げられている。Jones¹²¹⁾は、女199人について正常血圧者と高血圧者に、低塩食（20mEq/day）高塩食（200mEq/day）を与えたところ、食塩感受性は黒人と白人で変わりなかったが血圧変動の大きさは黒人で大きく、食塩感受性は赤血球Na、血清Ca、血清Na/K比、血清Ca/Mg比と相関したと報告している。DASH-Sodium Trialでは食塩感受性の実地判別を確認するため先の研究データを検証するため多重測定を行ったが食塩感受性の検出は困難であったことから、結果的に集団への減塩実施を支持している。

食塩感受性は「不安定」と関連するとの報告があるが、この場合の食塩感受性とは何を意味するのか、吟味を要する。Cohen¹²²⁾は、食塩感受性の概念を論じて、多数の減塩介入試験の結果は血圧コントロールのために減塩が有効とする一般的な見方に疑問を投げかけている。もしNaに対する血圧応答がガウス分布に従うとするなら、実質的に大多数の人にとって減塩効果はほとんどないか、全くないことになる。また、減塩はある人にはかえって血圧上昇をもたらすことが予測される。論理的には食塩感受性の人に対しては減塩効果はあるであろう。しかし、その人とは誰なのか？ 食塩感受性の判別に関する重大な疑問は、それが生涯不変の特性なのか、時期や環境によって変動するものなのかどうかという点である。実際、Kの適量摂取が食塩感受性を緩和するとの観察報告がある。また、食塩感受性には遺伝的要素があると信じられている。個人において、DNA塩基配列は安定であるが、遺伝子があるからと言ってその遺伝子が発現するとは限らない。遺伝子発現の有無は変動するからである。総じて、ある期間にわたる食塩感受性の再現性が実証されているとはいえない。研究によって食塩感受性の測定方法、測定間隔、対象サイズがまちまちであるため、得られたデータの相互矛盾は驚くに当たらない。摂取Naと血圧は生体では独立変数ではない。しかし、両者の関係は一定しており、普遍的かつ直接的であるとの通念は実証的にも論理的にも根拠を欠いている。したがって食塩感受性という概念は複合的、多面的、可変な広範にわたる要因から成

ることに留意するべきである。

橋本¹⁹⁶⁾によって、以下のような食塩感受性の段階的簡易テスト法を提案されている。

- 1) 普段の食塩摂取量(24時間尿)と血圧を記録する。
- 2) 2g/dayの減塩を2週間続け、血圧が140/90mmHg以上であれば、食塩感受性高血圧ではないとする。血圧がそれらの値以下であれば、食塩感受性高血圧とする。
- 3) 食塩感受性高血圧患者に食事に加える1グラム入りの食塩小包を与え、段階を1週間続け、血圧を測定する。最低血圧が90mmHg以上になる時の食塩摂取量を食塩限界値とする。

これにより、食塩感受性者は高血圧患者の半数弱、減塩効果には大きな個人差があり、食塩限界値は約3グラムから約17グラムまで幅広い、と報告している。

3 血圧支配遺伝子

本態性高血圧には、遺伝的特性として、食塩感受性遺伝子多型のほかにもいくつかの遺伝子が関与している。関連する研究報告例を表9 [血圧支配遺伝子] にまとめてある。

これらには、高Na—Liカウンタートランスポート、低尿中カリクレイン排出、空腹時高血漿インスリン、脂質パターン、高密度LDL、BMIなどが関与している。Williamsら¹²⁰⁾によると、8

つの遺伝子座1, 6, 8, 17, 19が関連しているとも述べている。

Kuriyamaら¹²⁵⁾は、エリスロポエチン(Epo)治療を要する腎性貧血患者についてEpo誘導高血圧とアンジオテンシノーゲン(AGT)遺伝子多型の関係を調べた。患者にはEpo6000単位をヘマトクリット値5%増まで週一回づつ投与した。全患者に対してAGT遺伝子多型分析の結果、T235T(T/T)31例61% M235T(M/T)19例37% M235M(M/M)1例2%であった。Epo投与治療による高血圧誘導は11例、すべてT/Tであった。他方、高血圧非誘導の患者におけるT/T頻度は50%(T/T:M/T=20:19)であり有意に差があった(p=0.003)。AGTT235多型がEpo誘導性高血圧の決定遺伝子であることが示唆された。

食塩感受性、血圧決定因子、心臓血管疾患、寿命などの相互関連について研究報告がある。食塩感受性に寄与するメカニズムとしてレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の不活化、心房性Na利尿因子ペプチドの発現不足、動脈圧反射感受性の鈍化などが考えられている。正常血圧者及び高血圧者における食塩感受性は心臓血管疾患の増加ならびに死亡率増加に関係しているといわれる。Francoら¹²⁶⁾は、一般集団においてはNa摂取量/排泄量と血圧の間にはあまり強い相関のないことがわかってきたとしている。また、減塩による降圧は微々たるものであり、Na摂取量/排泄量の減少と血圧との相関はなく、死亡率や心臓

表9 血圧支配遺伝子

	調査対象	調査内容	調査結果	文献
Williams et al.	1994 家族性高血圧患者	本態性高血圧の人種差解析	六つの関連遺伝特性が判明	124)
Kuriyama et al.	2001 腎性貧血患者	アンジオテンシノーゲン遺伝子多型分析	AGTT235多型がEpo誘導性高血圧の決定遺伝子であることが示唆された	125)
Franco et al.	2006 社会集団高血圧者	食塩感受性、血圧決定因子、心臓血管疾患、寿命について、従来の研究報告を総括	食事改善、体重制御など特に高リスク群における食塩感受性を下げる戦略的取り組みが急務であると指摘	126)
Mashimo et al.	2008 独立した二集団	TNFRSF4遺伝子の本態性高血圧への関与について独立集団間で比較	TNFRSF4は女性特有の本態性高血圧感受性遺伝子であることが示唆された	127)
Rudnicki et al.	2009 心臓血管疾患、腎臓疾患	レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAAS)遺伝子多型を解析	RAAS遺伝子多型と高血圧の関係は多数の因子が関与するため混迷している	128)

血管疾患に対しても減塩効果の証拠はないこともわかってきたという。食塩感受性及び食塩抵抗性には遺伝子、人種、年齢、除脂肪体重、食事内容(栄養素摂取状況)、関連疾患(高血圧、糖尿病、腎不全)などが関与し、食塩感受性は食事により調整可能であるとしている。例えばDASH食では血圧Na尿排出曲線の傾斜を高めることで食事感受性を低下することが認められている。食事改善、体重制御など特に高リスク群における食塩感受性を下げる戦略的取り組みが急務であると指摘している。

Mashimoら¹²⁷⁾は、TNFRSF4遺伝子の本態性高血圧への関与について、独立した二つの集団について調べている。全遺伝子の一塩基多型を調べた結果、その遺伝子はone linkage disequilibrium blockに存在することが示唆された。また4つの一塩基多型は主要なハプロタイプであることがわかった。二つの集団において最頻ハプロタイプC-C-A-Aは有意に低く($p=8.07 \times 10^{-5}$)、次いで高頻度のハプロタイプC-T-G-Aが高血圧者において有意に高かった($p=6.07 \times 10^{-4}$)。この差は女性患者でのみ認められた。C-T-G-Aハプロタイプは他のハプロタイプに比べてプロモター活性は低く高血圧感受性との関係が示唆された。TNFRSF4は女性特有の本態性高血圧感受性遺伝子であることが示唆された。

心臓血管疾患および腎臓疾患におけるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAAS)遺伝子多型が関与している。人種、環境、塩分摂取も影響するためほとんどの研究はますます複雑化している。Rudnickiら¹²⁸⁾は、心臓血管疾患、腎臓疾患においてはRAASがまず活性化しており、アンジオテンシンI変換酵素(ACE)インヒビターその他のブロッカーが降圧剤として利用されている。血漿及び組織におけるACEレベルは少なくとも一部はイントロン16の287塩基対の挿入(I)欠損(D)に基づく遺伝子多型によって決定される。特にDD遺伝子型のアジア系人種(ACE高活性)では心臓、腎臓疾患リスクが高いと報告されている。RAAS阻害による高血圧治療のためにACEI/D多型などRAAS遺伝子多型の役割に関して多数の研究がある。

4 血圧変動要因

血圧は、就寝時は1日で最低であり、また、早朝よりも日中の血圧が高くなる。正常人でも、血圧の上下に影響する変動要因には、以下のように多様である。

- 1) 加齢により収縮期血圧が上がる(拡張期血圧はあまり変化しない)
- 2) 男よりも女の血圧は5~10mmHg低い
- 3) 寒冷時に血圧が上がり温暖時に血圧が下がる
- 4) 食後は上昇し、一定時間で元に戻る
- 5) 一般的に運動で血圧は上がる
- 6) 熱めの入浴は血圧を上げ、適温ではわずかに下がる
- 7) 緊張や興奮によって血圧は上がる
- 8) ストレスにより血圧が変動する
- 9) 喫煙は血圧を上げる
- 10) 適度の飲酒は血圧を下げる

食塩が血圧上昇を促すことは知られているが、NaとClの両者、またはいずれかが昇圧に必要であるかについては決着を見ていない。これら食塩以外の血圧変動要因に関連する報告例を表10〔血圧変動要因〕にまとめてある。

吉村ら¹²⁹⁾は、Na、K、Ca、Mgの摂取過多または不足の血圧への影響例をまとめている。高Na高Cl食投与ラットでのみ有意な高血圧を認め、高Na低Cl食では高血圧を認めていない。ヒトにおいても同様な成績が報告されている。従って、NaまたはClのみの過剰摂取は血圧上昇を促さず、NaとClをともに含んだ食塩を過剰に摂取すると血圧上昇を促すことから、NaはClと相互に働いて昇圧を促すとしている。食塩の過剰摂取は循環血漿量を増大させ、他方Naの単独過剰摂取では増大させない。一方、Na単独またはNaClの増量摂取はともに心拍出量を増大させることから、Naは中枢性に交感神経活動を促進させるものと考えられている。一方、Clの摂取増量は、腎のtubuloglomerular feedbackを介して腎血管抵抗を増大させると考えられ、特にNaClの摂取が増量すると抵抗の上昇が著しく、全身の血圧が上昇する。

食塩感受性高血圧症患者では、高食塩を摂取し

表10 血圧変動要因

	対象	調査内容	調査結果	文献
吉村ら	1991 蓄積データ	ナトリウム(Na), カリウム(K), カルシウム(Ca), マグネシウム(Mg) 摂取過多または不足を来した際の血圧への影響に関する報告例を総括	食塩感受性高血圧症患者では、高食塩を摂取した際の尿中Na排泄量が非感受性患者と比べて低いことから、腎でのNa排泄低下に基づく体内Na貯留が血圧上昇の一要因と考えられた	129)
木村	2000 腎異常患者	食塩摂取制限の効果判定	食塩感受性群ではnon-dipper型の特異な血圧日内リズムを呈し、糸球体濾過やNa+排泄に関する日内リズムが障害され、食塩制限によって日内リズムが正常化することが明らかになった	130)
Zoccali et al.	2000 蓄積データ	個人の食塩感受性同定	近い将来、個人の食塩感受性は血圧支配遺伝子や環境リスク因子の解明に基づいて診断されることになるだろうと予測	131)
Isezu	2003 黒人本態性高血圧患者	本態性高血圧の要因を検討	本態性高血圧は主に血流量変動、NO失活、アンジオテンシンII、インスリン抵抗性による食塩感受性に主に関連するとした	132)
中元ら	2005 非肥満健康学生有志(18~24歳)17名 外来軽症高血圧症例13名(51~77歳)	食塩感受性と血圧の日内変動を検討	大学生ではnon-dipperや塩分感受性は低頻度で、高塩分が非肥満における高血圧の成因とは考え難いとした	133)
Fang et al.	2006 正常血圧者60人(20-60歳) 中国北部農村地域	食塩感受性正常血圧者の血漿ジメチルアルギニン(ADMA)への食塩負荷効果とカリウム補給による保護効果を検討	高カリウム摂取は血圧、ADMAレベルを低下させ、一方、食塩負荷による食塩感受性正常血圧者のNOを活性化し、食塩抵抗性のアジア人被験者ではNO活性化は見られなかった	134)
Suzuki et al.	2007 肥満閉経女性慢性腎不全高血圧患者	NOの血圧-ナトリウム利尿機構に及ぼす効果を検討	食塩制御は高血圧及び腎臓病理において極めて重要であるとした	135)
Chen et al.	2009 中国人非糖尿病患者	メタボリックシンドロームと血圧食塩感受性の相関検討	メタボリックシンドロームは食塩感受性を高めることを示唆。減塩食はメタボリックシンドロームの多重リスク因子を持っている人の血圧を下げるためには特に有効とした	136)

た際の尿中Na排泄量が非感受性患者と比べて低いことから、腎でのNa排泄低下に基づく体内Na貯留が血圧上昇の一要因と考えられる。全国民を対象の食塩制限こそ重要視されるべきであるとの立場から、木村¹³⁰⁾は、食塩感受性の高い、つまり腎異常患者に食塩摂取量を制限すると、全身の血圧が低下するのみならず、糸球体血圧が低下し、尿蛋白排泄量が減少し、血圧日内リズムがnon-dipper型からdipper型へ正常化すると考えられ、最終的には腎および心血管系臓器障害の進行を抑制することにつながると述べている。

人間は動物よりも生活行動が複雑なため、食塩摂取量に対する血圧応答試験の結果がしばしば相互に矛盾している。Zoccaliら¹³¹⁾は、近い将来、個人の食塩感受性は血圧支配遺伝子や環境リスク

因子の解明に基づいて診断されることになるだろうと予測している。食塩の臓器障害との関係は、動脈圧との関係よりも密接である。左心室重量は食塩摂取量と密接に相関している。腎臓では高塩分摂取は濾過亢進を誘発し、糸球体圧を高める。心臓や腎臓に対する食塩の障害可能性は持続的な動脈圧応答とはほとんど関係ない。集団における減塩普及は健康上の利点を有すると考えられるが近い将来、大々的に人々が減塩活動に取り組むとは思えない、としている。

Isezu¹³²⁾は、黒人における本態性高血圧は主に血流量変動、NO失活、アンジオテンシンII、インスリン抵抗性による食塩感受性に主に関連するとしている。

中元ら¹³³⁾は、日常生活又は外来レベルで塩分感

受性と血圧の日内変動を検討した。非肥満健康学生有志(18~24歳)17名,高齢者との比較のために,外来軽症高血圧症例13名(51~77歳)も対象とした。学生では,non-dipperと塩分感受性はそれぞれ17名中1名(6%)と低頻度であった。一方,高齢者症例(軽症高血圧)では,non-dipperは62%,塩分感受性は20%と,ともに学生に比して高頻度であった。尿中NaCl排泄量は,高塩分下平均15~17g,低塩分下では2~4gでありほぼ基準を満足していた。大学生ではnon-dipperや塩分感受性は低頻度で,高塩分が非肥満における高血圧の成因とは考え難い。血圧の塩分感受性の評価は入院下に施行されているが,日常又は外来レベルにおいて,管理栄養士による適切かつ詳細な食事指導下で24時間血圧モニター(ABPM)による塩分感受性とdipper評価が可能であるとしている。

食塩感受性正常血圧者の血漿ジメチルアルギニン(ADMA)への食塩負荷効果とK補給による保護効果が検討されている。Fangら¹³⁴⁾は,ジメチルアルギニンは内因性のNOシンターゼ阻害物質である。内皮系NO経路は食塩感受性高血圧患者において阻害されているため,血漿ADMAが食塩感受性正常血圧者への継続的食塩負荷による変動の有無とそのNOとの関連を調べた。さらに食事性K補給がこれらの変動に及ぼす影響を調べた。被験者として正常血圧者60人(20-60歳)を中国北部農村地域から集めた。全員,始めの7日間は低塩食(3g/day, NaCl),次の7日間は高塩食(18g/day),終わりの7日間は高塩食(18g/day)に加えてK(4.5g/day, KCl)を補給した。食塩負荷により食塩感受性被験者で血漿ADMA濃度は著しく上昇した($0.89 \pm 0.02 \mu\text{mol/L} \leftarrow 0.51 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}; p < 0.05$)が,一方で血漿NOxは相当程度低下した($41.8 \pm 2.1 \mu\text{mol/L} \leftarrow 63.5 \pm 2.1 \mu\text{mol/L}; p < 0.01$)。食事性Kの補給によって患者のすべてが正常化した(ADMAに対して $0.052 \pm 0.03 \mu\text{mol/L} \leftarrow 0.89 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, NOxに対して $58.152 \pm 0.9 \mu\text{mol/L} \leftarrow 41.8 \pm 2.1 \mu\text{mol/L}$)。食塩感受性正常血圧者に食塩を負荷した場合,統計学的に血漿ADMAレベル,平均血圧,NOレベルの間に統計学的に有意の相関が認められた。こ

の研究により高K摂取は血圧,ADMAレベルを低下させ,一方,食塩負荷による食塩感受性正常血圧者のNOを活性化し,食塩抵抗性のアジア人被験者ではNO活性化は見られなかった。

肥満閉経女性や慢性腎不全の高血圧患者における昇圧は血圧-Na利尿機構に基づくと考えられている。Suzukiら¹³⁵⁾は,この機構においてNa処理は主に神経-ホルモン制御によるとする。NOは血圧-Na利尿機構に強い影響を与える。この機構に基づいて慢性腎障害の進行は食塩摂取に支配される。さらに食塩感受性の遺伝的素因は高血圧家系の正常血圧者において重要である。したがって食塩制御は高血圧及び腎臓病理において極めて重要であると述べている。

インスリン抵抗性はメタボリックシンドロームの基礎的要因なのでインスリン抵抗性の高い人においては食塩感受性が高い可能性がある。Chenら¹³⁶⁾は,中国人非糖尿病患者におけるメタボリックシンドロームと血圧食塩感受性について報告している。16歳以上の中国人非糖尿病患者1906人について低Na食(51.3mmol/day)を7日間与え,続いて高Na食(307.8mmol/day)を7日間与えた。メタボリックリスク因子情報不明者あるいは介入試験未完者は解析データから除いた。介入試験開始前ベースライン血圧及び開始後2,5,6,7日血圧を測定。メタボリックシンドローム診断基準には①腹部肥満 ②高血圧 ③高中性脂肪 ④低HDLコレステロール ⑤高血糖のうち3項目以上に該当とした。食塩高感受性基準には平均血圧が低Na食及び高Na食それぞれで5mmHg低下及び上昇する場合とした。メタボリックシンドローム情報を有する1881人のうち283人はメタボリックシンドローム該当であった。低Na食介入試験完了者1853人高Na食完了者1845人であった。多変量調節平均血圧は低Na食高Na食のいずれにおいてもメタボリックシンドローム該当者では有意に高かった($p=0.0001$)。さらに食塩感受性リスクはメタボリックシンドロームリスク因子の項目数の多い人ほど高かった。リスク因子を持たない人たちと比べてリスク因子を4ないし5項目持っている人では食塩高感受性の確率は低Na食では3.54倍(信頼区間95% 2.05-6.11)高Na食では

3.13倍（信頼区間95% 1.80-5.43）であった。これらの結果はメタボリックシンドロームは食塩感受性を高めることを示唆している。減塩食はメタボリックシンドロームの多重リスク因子を持っている人の血圧を下げるためには特に有効と言える。

5 食塩と血圧 動物試験

食塩の血圧応答に関する動物実験に関連する報告例を、表11 [食塩の血圧効果（動物実験）] にまとめている。斉藤ら¹³⁷⁾は、水洗白米と溶剤抽出ダイズあるいはカゼインからなる高食塩飼料を与えたネズミの血圧は飼料にコンブ灰分あるいはコンブ水抽出物を添加しても影響はないがコンブそのものを配合すると血圧上昇が阻止されることを示した。また、この高食塩飼料に、コンブやコンブ水抽出残渣を加えるとネズミの肝臓および腎臓のリボフラビン含量が高まり尿中Naの排泄が増加した。肝臓および腎臓にリボフラビン含量が増加した原因はコンブに含まれるリボフラビンよりもこれを食べた結果腸内細菌によるリボフラビンの合成が増したためのものである。肝臓および腎臓にリボフラビンが増した結果、Naの排泄を増し、血圧上昇を阻止し得たのであろうとした。

自然発症高血圧ラット（SHR）や自然発症心筋梗塞ラットのモデル動物を使って心疾患の早期発見や予防には食物摂取などの環境因子のコントロールが重要な意義を持つことが明らかにされ、高血圧や心筋梗塞などの遺伝的病理には食物摂取状況も関連することがわかってきた。Yamori¹³⁸⁾は、SHRやSHRSPの血管平滑筋細胞（VSMC）における肥大、塩分感受性、膜機能異常などは高血圧の早期発見に有効な情報であるとした。

Iwai¹³⁹⁾らは高血圧及び食塩感受性に関与するクロモソーム1を単離した。自然発症高血圧ラット（SHR）から、血圧制御に関与する遺伝子はラットSa域の染色体1の位置確認のために、Wister-Kyotoラット（WKY）の染色体1領域をD1Mit3とMTPAをマーカーとしてSHRの染色体相当域で置換した。ゲノム全域について65の多型マーカーを検索、WKY.SHR-D1Mit3/Rat57なる新種ラットの置換遺伝子域を同定した。この雄ラットについてラジオテレメーターで昼間、夜間の平均血

圧を測定したところ元のWKYに比べて著しい昇圧を認めた。さらにWKY.SHR-D1Mit3/Rat57は食塩負荷による昇圧効果はWKYより著しく大きかった。この実験から高血圧遺伝子並びに食塩感受性遺伝子の存在が染色体上で実証された。ここで開発された遺伝子類縁種ラットは食塩感受性高血圧関連遺伝子の詳細研究を可能にするものである。

血圧は血管抵抗性と循環血流量で決まる。Takeuchi¹⁴⁰⁾は、血管アンジオテンシンIIまたはトロンボキサンレセプターの活性化はほとんど前者に関与し、腎臓プロスタグランジンEP3レセプターまたはチアゾール感受性食塩共役トランスポーターの機能は後者に関与するとしている。これら血圧制御ファクターの遺伝子（ラット）をクローニングし、それらの遺伝子発現を調べている。

遠位尿細管にはカリクレイン-キニン系のすべての機能因子があり、血漿カリクレイン-キニン系とは独立している。キニノーゲン先天欠損のBrown-Norway KatholiekラットとブラジキニンB2レセプターのノックアウトマウスではナトリウム過剰摂取やアンジオテンシンIIによるアルドステロンの放出によるNa体内蓄積によってカリクレイン-キニン系は作動し、Na排出及び尿排出を誘導することが明らかになった。Katoriら¹⁴¹⁾は、これからカリクレイン-キニン系はNa蓄積に対する安全弁として働くことが推測している。高血圧動物モデルや本態性特に食塩感受性高血圧患者についての多数の研究は尿カリクレイン分泌低下傾向を示している。この低下はK摂取や腎障害に影響される。腎カリクレイン分泌低下はこれの分泌因子の遺伝子欠損による可能性があり、これが食塩感受性高血圧を引き起こすと推測される。

高血圧関連インスリン抵抗性における食塩摂取の役割について報告されている。食塩過剰摂取は昇圧を誘発し、しばしばインスリン抵抗性を伴うことがよく知られている。しかし、インスリン抵抗性が食塩によってどのように惹き起こされるのか不明である。Ogiharaら¹⁴²⁾は、三つの食塩感受性ラットモデル①高塩分食Sprague-Dawleyラット ②食塩感受性Dahlラット ③アンジオテンシン2継続注入ラット、におけるインスリン抵抗

表11 食塩の血圧効果（動物実験）

	実験動物	実験内容	実験結果	文献
斉藤ら	1971 シロネズミ	高食塩飼料を与えたシロネズミの血圧および尿中ナトリウム排泄に及ぼすコンブの影響	コンブの配合は血圧上昇を阻止	137)
Yamori	1991 自然発症高血圧ラット (SHR) 自然発症心筋梗塞ラットモデル動物	SHRやSHRSPの血管平滑筋細胞 (VSMC) における肥大, 塩分感受性, 膜機能異常の検索	高血圧や心筋梗塞などの遺伝的病理には食物摂取状況も関連するとした	138)
Iwai et al.	1998 自然発症高血圧ラット (SHR)	血圧制御関与遺伝子の位置確認のために, ラット (WKY) 染色体1領域ゲノム全域について65の多型マーカーを検索	高血圧及び食塩感受性に関与するクロモソーム1を単離。高血圧遺伝子並びに食塩感受性遺伝子の存在が染色体上で実証した	139)
Takeuchi	2002 ラット	血圧制御ファクターの遺伝子 (ラット) をクローン化し, それらの遺伝子発現を確認	血管抵抗性: 血管アンギオテンシンIIまたはトロンボキサンレセプター 循環血流量: 腎臓プロスタグランジンEP3レセプターまたはチアゾール感受性食塩共役トランスポーター	140)
Katori et al.	2003 高血圧動物モデル本態性特に食塩感受性高血圧患者	尿カリクレイン分泌低下傾向の観察	腎カリクレイン分泌低下はこれの分泌因子の遺伝子欠損による可能性があり, これが食塩感受性高血圧を引き起こすと推測	141)
Ogihara et al.	2003 食塩感受性ラットモデル	高血圧関連インスリン抵抗性における食塩摂取の役割を総括	酸化ストレスの増大がアンギオテンシン及び高塩分食インスリン抵抗性のいずれにおいても決定的に関与していると思われる。カリウム補給や抗酸化剤の投与などの有効性が期待されるとした	142)
長澤ら	2007 食塩感受性ラット	酸化ストレスの総括	モデルDahlラットについて酸化ストレスとの関連を総括	143)
Ohashi et al.	2007 マウス	アディポネクチンと高血圧の関係を血圧と心拍数を頸動脈カテーテルで直接測定, 尾部で自動脈波計を用いて間接測定	低アディポネクチン症は肥満関連高血圧発症を引き起こすことを示唆。これにはインスリン抵抗性効果も寄与している。アディポネクチン療法はメタボリックシンドロームによる高血圧治療に有効でありうるとした	144)

性例を示している。共通点はIRとIRSの活性化からPI3-5kinase Akt活性化への初期段階のインスリンシグナリングが明らかに増強したことである。このことは食塩感受性高血圧に関係するインスリン抵抗性は独特の分子機構によることを示唆している, としている。インスリン抵抗性の原因として, 初期のインスリンシグナリングを抑制する肥満がある。しかし高塩分食関連インスリン抵抗性にはインスリンシグナリングのさらに下流域において障害がある可能性がある。さらに, 酸化ストレスの増大がアンギオテンシン及び高塩分食インスリン抵抗性のいずれにおいても決定的に関与していると思われる。K補給や抗酸化剤の投与などの有効性が期待されるとしている。

食塩摂取と高血圧との関連の歴史, および, 食塩感受性ラットの開発の経緯, また, モデルとし

てつかわれているDahlラットについて, 長澤ら¹⁴³⁾は, 酸化ストレスとの関連を述べている。

肥満者は高血圧になりやすい。血漿アディポネクチンレベルは肥満によって低下, またアディポネクチンは肥満関連疾患例えば糖尿病や冠状動脈疾患を防止する機能が知られている。Ohashiら¹⁴⁴⁾は, アディポネクチンと高血圧の関係をマウスを用いて検討する。血圧と心拍数を頸動脈カテーテルで直接測定, 尾部で自動脈波計を用いて間接測定した。21週齢肥満KKAyマウスはC57BL/6J対照マウスに比べて血漿アディポネクチンは有意に低下, また収縮期血圧は有意に上昇した。アデノウイルス産生アディポネクチンはKKAyマウスの血圧を有意に低下させた。アディポネクチン遺伝子ノックアウト (KO) マウスにおいてアディポネクチンのインスリン抵抗性なしの状態下での

血圧に及ぼす直接的役割を調べた。アディポネクチンKOマウスではインスリン抵抗性なしで高塩分食（8% NaCl）を与え続けると高血圧を発症した。高塩分食アディポネクチンKOマウスの高血圧は内皮細胞NOシンターゼ及び大動脈のプロスタグランジン1-2のmRNAレベルの低下、内皮細胞NOシンターゼ及び血漿プロスタグランジン1-2のメタボライトレベルの低下に関係していた。アディポネクチン療法は血圧上昇を抑制し、上記のmRNAレベルを正常化した。以上の結果は低アディポネクチン症は肥満関連高血圧発症を引き起こすことを示唆している。これにはインスリン抵抗性効果も寄与している。アディポネクチン療法はメタボリックシンドロームによる高血圧治療に有効でありうる。

Galanisら¹⁴⁵⁾は、無作為抽出したハワイ日系人11,907人（男性6,297人、女性5,610人）の集団を対象に飲料、タバコ、アルコール、13種の食品の摂取頻度調査を行った。追跡は平均14.8年、胃ガン108例（女性44例、男性64例）をHawaii Tumor Registryにより確認した。ハザード分析の結果、男女とも週七回以上の果物摂取により胃ガンリスクは有意に低下した（相対ハザードRH0.6,95%CI:0.4-1.0, p=0.03）また男性集団だけでも有意に低下した（p=0.05）。男女とも漬物、味噌汁、干魚、塩漬魚、肉加工品の摂取量は胃ガン罹患率と相関しなかった。毎日カップ一杯コーヒーを飲む人は飲まない人に比べて胃ガンリスクを有意に高めた（RH:2.5, 95%CI:1.0-6.1, p=0.05）が、用量依存関係はなかった。男性に関して喫煙、飲酒は胃ガンリスクとの相関は認められなかった。果物野菜の胃ガンリスク低下は抗ニトロソ化効果による可能性がある。コーヒーによるリスク上昇は偶然要素によると考えられた。

4章 味噌と血圧

1 味噌の摂取状況

食塩摂取量をそれまでの1日15gから10g以下への設定（1979厚生省）によって、味噌汁が、減塩運動の標的になった。この40年間に、年間一人

当たり味噌消費量は、ほぼ半減した（右表）。この長期現象傾向は、減塩運動によるよりも、この間に急速に進んだ「食生活の洋風化」に帰せられるべきものであろう。しかし、

	年間購入量 (g/人)
1970	3,960
1980	3,288
1990	2,683
2000	2,479
2010	2,124

し、少なくなった味噌汁摂取に対して、現在でも、医師や栄養士の指導の下、薄味の味噌汁が推奨され、まずい味噌汁に我慢している人が多いのが現状と思われる。また、KやMgの摂取源としての味噌汁機能を無視した減塩は、Mg欠乏などをまねく危険を伴う、との指摘もある。この間の味噌（汁）摂取の実態についての調査報告は、表12 [味噌汁摂取（実態調査）] にまとめてある。

味噌（汁）の摂取状況に関しては、多数の報告がある。Watanabe¹⁴⁶⁾は、自家製及び市販品味噌の食塩含量の地域差を調べている。全国20県39地域から収集した自家製味噌973種の食塩含量は地域ごと平均で9.1%から18.2%の広範囲に渡っていた。一方、市販味噌の食塩含量は10%から12%で一定でかなり低かった。地域または県別に分けると味噌からの塩分摂取量と脳血管疾患死亡率との間には有意に正の相関があった。

壺坂ら¹⁴⁷⁾は、女子学生を対象に、3年間にわたって、味噌汁の摂取状況と、その食塩濃度を調べた結果、味噌汁摂取頻度は、1週間に平均3~4回、最高頻度の東北地方と比較すると1/3~1/4であった。また、味噌汁食塩濃度は、うすくなる傾向にあった。田藤¹⁴⁸⁾は、朝食において米飯食の副食に味噌汁の頻度が高く、年代・地域に関係なく浸透していることを確認している。また、壺坂ら¹⁴⁹⁾は、前回の調査を受けて、女子学生を対象に味噌汁摂取状況を1984年~1989年にわたって調べ、味噌汁の摂取頻度は、週平均3~4回であり、ごはん群では朝食時に平均4回の味噌汁を飲み、パン群では、味噌汁だけでなく他の汁物もほとんど飲まれていないことを確認した。

深見¹⁵⁰⁾は、女子大生310名を対象に各家庭の味噌汁濃度を測定、次のような結果を得ている。

- 1) 適正塩分濃度（ $\leq 1\%$ ）味噌汁は28.4%、塩からい（ $< 1.3\%$ ）味噌汁は46.4%、塩からすぎる（ $\geq 1.3\%$ ）味噌汁は25.2%であり、塩

表12 味噌汁摂取（実態調査）

	調査対象	調査内容	調査結果	文献
Watanabe et al.	1982 全国20県39地域の自家製味噌973種	自家製及び市販品味噌の食塩含量の地域差調査	味噌からの塩分摂取量と脳血管疾患死亡率との間には有意に正の相関があった	146)
壺坂ら	1984 女子大生	3年間、味噌汁の摂取状況と、その食塩濃度を調査	味噌汁食塩濃度は、うすくなる傾向にあった	147)
田藤	1987 一般人	日常食における副食の種類に関して比較検討	朝食米飯食の副食に味噌汁の頻度が高く年代・地域に関係なく浸透、夕食汁物料理は味噌汁、すまし汁に集中した	148)
壺坂ら	1989 女子大生	味噌汁摂取状況調査 1984-89	味噌汁摂取頻度、週平均3～4回ごはん群朝食時平均4回	149)
深見	1993 女子大生310名	各家庭の味噌汁濃度を測定し、それをもとに塩分嗜好調査	味噌汁の摂取回数は一週間に平均4.6回	150)
川島	1995 看護学生（3年生66名と2年生78名）。	食物摂取状況調査		151)
壺坂ら	1997 女子大生	味噌汁摂取状況調査	食の多様化が進む中で、学生の減塩意識が浸透し、家庭の味噌汁食塩濃度が低下傾向にあった	152)
西堀	1997 日本人	味噌汁の利用状況調査	味噌汁を好んで飲んでいる人が9割以上であった	153)
小菅ら	1999 女子大生	食事等に関するアンケート調査	家での摂取頻度が高かったのは、味噌汁、焼き魚、カレーライスであった	154)
Ogawa et al.	2002 日本東北地方（宮城県）農村地域 男性59人 女性60人	栄養素摂取源の調査	脂質の7.1%、ナトリウムの17.1%は味噌汁から摂取していた	155)
Iso et al.	2005 JACC研究（40-79歳） 男46465人、女64327人	日本人男女における食物摂取頻度と栄養素推定摂取量を検討	女性は男性に比べて味噌汁は少なかった	156)

分過剰の味噌汁は予想外に多く71.6%に達した。

- 2) 塩分過剰の味噌汁を摂取している学生のうち、これらの味噌汁が塩からくないと思っている学生が96%もいた。
- 3) 減塩を心がけていると主張する調理者が作った味噌汁でも71.8%は塩分過剰の味噌汁であった。
- 4) 減塩を心がけていない調理者が作った味噌汁では塩分過剰の味噌汁は72.8%で、減塩主張者のものとの間に差が殆どなかった。したがって味噌汁に関しては、減塩していると思っても殆ど効果があらわれていないといえる。
- 5) 味噌汁の摂取回数は一週間に平均4.6回で清汁、スープを入れると平均7回の汁物をと

っていることになる。

- 6) 減塩を心掛けている家族は全家族の34.6%と少なく、高血圧者であっても減塩を心掛けているのは58.7%にすぎなかった。

川島¹⁵¹⁾は、看護学生の食物摂取状況について報告している（3年生66名と2年生78名）。味噌汁は日本人の食生活に深い関わりをもつ。また、その味は家庭の味を代表し、その摂取は食生活と深く関わっていることを示した。

壺坂ら¹⁵²⁾は、味噌汁の摂取頻度とその食塩濃度を報告している。摂取頻度は、週に平均3回程度であるが、そのほとんどは夕食時に飲んでいた。味噌汁の摂取頻度と相関のある要因としては、①朝食内容、②祖父母同居の有無、③味噌汁の好き嫌いをあげている。高血圧者の有無に拘らず80%以上が「減塩している」と答えている。減塩方法

としては、「麺類の汁を飲まない」39.4%、「調味料を減らして薄味にする」35.7%、「塩辛い食品を減らす」29.9%であった。「その他の調味料」（風味調味料、めんつゆ、ブイヨン、焼き肉のたれを含む）からの食塩摂取量は、1987年まで0.3-0.4g/日、1988年より1.3~2.0gと急上昇した。

西堀¹⁵³⁾は、アンケート調査の結果、味噌汁を好んで飲んでいる人が9割以上いると報告している。また、味噌の地域性へのこだわりもなくなっている傾向を認めている。小菅ら¹⁵⁴⁾は、女子大生対象のアンケート調査の結果、家庭での摂取頻度が高かったものは、味噌汁、焼き魚、カレーライスであった。

Ogawaら¹⁵⁵⁾は、日本東北地方（宮城県）の二つの農村地域で男性59人女性60人の栄養素摂取源を調べた。年間4シーズン、3日間づつの食事記録を収集、197食品に分類した。米はエネルギーの29.8%、たんぱく質の13.0%、炭水化物の45.3%を占めていた。味噌汁は脂質の7.1%、Naの17.1%を占めていた。

Isoら¹⁵⁶⁾は、JACC研究（The Japan Collaborative Cohort Study：文科省科研費助成による。約12万人の協力を得て、日本人の生活習慣とガンに関連を調べることを目的としたコホート研究）において食物摂取頻度調査の回答者（40-79歳）男性46465人、64327人を対象に、日本人男女における食物摂取頻度と栄養素推定摂取量を検討した。女性は男性に比べて野菜、海藻、果物、菓子類、ウーロン茶、洋風朝食が多く、ご飯、味噌汁は少なかった。男性では牛肉、鶏肉、乳製品、鮮魚、魚製品、米、味噌汁は高齢者では高頻度で摂取していた。

2 味噌汁の塩分

現在、日本人1日一人当たり食塩摂取量は11~12gであり、そのうち味噌の寄与率は5%程度と試算される。したがって、減塩を念頭に味噌汁を減らすことの実際的な意味はほとんどない、と言ってよい。また、40年前（1970）の日本人の食

食塩相当量 g/100g	
米みそ	甘みそ 6.1
	淡色辛みそ 12.4
	赤色辛みそ 13
麦みそ	10.7
豆みそ	10.9

五訂増補 日本食品標準成分表

塩摂取量と味噌消費量から試算すると、その寄与率は7%程度であるから、塩分給源としての味噌汁の位置は決して大きくはなかった。しかし、国民的な減塩運動を背景に、味噌汁塩分濃度に関する調査研究が盛んに行われてきた。これらの報告は表13「味噌汁塩分濃度（実態調査）」にまとめられている。なお、通常、味噌汁の適切な（おいしい）塩分濃度は0.8~1%程度である。これは、だし汁130ccで大きじ半分の味噌を使ったときの塩分濃度とされる。

減塩推進の立場から、春名⁵⁸⁾は、味噌汁塩分を65歳未満男女823名を対象に調査したところ、平均男1.0%、女0.97%であり、男性は若いほど、女性は年代が上がるにつれ塩分濃度が高かった。女性に比べて男性は、1日の塩分摂取量10g以下に対する理解度が低く、濃い味付けを好み、外食利用で塩分を摂りやすい状況にあった。また、若い世帯ほど減塩意識・実行度が低くなっていた。

山田ら¹⁵⁷⁾は、住民の味噌汁食塩濃度とその減塩意識について、三重県における平坦地の市街化地域である鈴鹿市庄野小学校区45世帯および山間部農村である大山田村東小学校区の40世帯、計85世帯の住民を対象に調査している。両地区の各家庭におけるみそ汁の食塩濃度は、最低0.6%より最高2.2%の間にほぼ正規分布をしていた。

中野ら¹⁵⁸⁾は、名古屋市周辺に居住する男性（40~60歳代）41人と女性（30~50歳代）52人を無作為抽出、昭和57年10月19日~12月3日に、食物摂取状況のアンケート調査用紙を配布し、自記式または聞き取り調査を行った。その結果、家庭味噌汁の平均塩分濃度は1.03%（食塩量1.42g）、煮物の平均塩分濃度は0.70%（食塩量0.78g）であった。

味噌汁塩分濃度の調査研究に伴い、食塩濃度の簡便測定法の研究も行われてきた。大野ら¹⁵⁹⁾は、Mohr法、簡易測定紙法、食塩濃度計法により味噌汁塩分を測定、それぞれ0.91±0.14%、0.83±0.15%、0.77±0.15%であった。簡易測定紙法と食塩濃度計法による測定値は、Mohr法測定値をやや下回る傾向を示した。簡易測定紙の測定精度は概ね良好であり、測定が容易で簡便であった。

表13 味噌汁塩分濃度（実態調査）

	調査対象	調査内容	調査結果	文献
山田ら	1982 三重県 市街化地域45世帯 山間部農村40世帯	味噌汁食塩濃度とその減塩意識調査	うす味回答は市街化地域46.1%で、農山村地域31.4%であった	157)
中野ら	1984 名古屋市 男(40~60歳代)41人 女(30~50歳代)52人	家庭内の食事状況調査 味噌汁・煮物の食塩量測定 昭和57年10月19日~12月3日	味噌汁、煮物からの食塩量摂取量は父親21.4%、母親19.7%、学生16.98%であった	158)
大野ら	1989	味噌汁（具は標準的な分量の場合）の食塩濃度を、Mohr法、簡易測定紙ならびに食塩濃度計法で比較測定	簡易測定紙の測定精度は概ね良好であった	159)
上野	1989 主婦12名	一般家庭味噌汁の食塩濃度調査	味噌汁60品の食塩濃度の平均値は0.84%であった	160)
上野	1989 女子学生	12名主婦調製72種類の味噌汁官能検査	わかめ・とうふ・じゃがいも味噌汁が好まれた	161)
松井ら	1994 福島県岩瀬地方の自家製みそ（岩瀬みそ）23検体	水分活性、生菌数、Na・K含量、食塩濃度、Na/K比 測定		162)
小菅	1994 女子大生	家庭味噌汁とすまし汁の食塩濃度を10年に渡り3回測定	味噌汁食塩濃度は経年的に有意に減少した	163)
野崎	1997 女子短大生	喫食味噌汁の塩分量年次推移を追跡 90年以降	味噌汁の喫食回数は減少傾向にあった	164)
Sasaki et al.	2003 JPHC研究	米と味噌汁の半定量的摂取頻度の地域性を5年間追跡調査		165)
堀尾	2008 男女大学生96名（18歳~29歳） その両親192名（42歳~70歳） 兄弟姉妹74名（12歳~30歳）	塩味噌好性の親子・兄弟の関係を調査	塩味噌好は、家族内の類似性が高く、濃い味噌汁の家庭ほど塩味噌好が高いことが示唆された	166)

一般家庭で食される味噌汁の食塩濃度及び、味噌汁の具によって食塩濃度に差があるか否かを知る目的で、上野¹⁶⁰⁾は、主婦に五種類の味噌汁作りを依頼し、食塩濃度を測定した。すべて0.5%以下であった者が1名、すべて1%以上であった者1名、他は中間の濃度であった。味噌汁60品の食塩濃度の平均値は0.84%であった。さらに、上野¹⁶¹⁾は、女子学生対象に味噌汁嗜好調査を行った結果、「わかめ」味噌汁・「とうふ」味噌汁の摂取頻度が高く、また、「じゃがいも」味噌汁が最も好ましいと判定された。

松井ら¹⁶²⁾は、福島県岩瀬地方の自家製みそ（岩瀬みそ）の水分活性、生菌数、Na・K含量、食塩濃度、Na/K比の平均値を調べ、それぞれ0.601、4.33log/g、5,366.6mg/100g、310.8mg/100g、13.6%及び17.9であった。

小菅¹⁶³⁾は、女子大生の家庭の味噌汁とすまし汁の食塩濃度を10年に渡り3回測定した。昭和56年（178家庭）、昭和63年（126家庭）、平成3年（96家庭）の味噌汁の食塩濃度の平均値は1.27%、1.02%、0.95%であり、すまし汁のそれは0.91%、0.86%、0.79%であった。味噌汁食塩濃度は経年的に有意に減少していた。

野崎¹⁶⁴⁾は、女子短大生の喫食している味噌汁の塩分量年次推移を追跡、90年以降、塩分量の分布ピークは0.2%低くなり、「ふつう」と言われる1.0%が半数以上を占めることを明らかにした。また、味噌汁の喫食回数は減少していた。JPHC研究（Japan Public Health Center-based prospective Study：厚生省がん研究班による多目的コホート研究）に基づき、Sasakiら¹⁶⁵⁾は、米と味噌汁の半定量的摂取頻度の地域性を5年間追跡調査してい

る。

塩味嗜好は、家族内の類似性が高いことが示唆されているが、堀尾¹⁶⁶⁾は、健康な男女大学生96名(18歳~29歳)、その両親192名(42歳~70歳)、兄弟姉妹74名(12歳~30歳)、計362名について、塩味に対する味の嗜好性の親子・兄弟の関係について調べた。その結果、娘は父・母ともに塩分濃度の嗜好に正の相関関係が見られ、息子も母とは嗜好の相関関係が見られ、母の塩分嗜好は男の子、女の子ともに非常によく似ていた。姉妹(女一女)では0.9%味噌汁で有意な正の相関関係が見られた。兄弟(男-女)の相関関係では0.6%食塩水、0.6%味噌汁で、0.9%味噌汁で有意な正の相関関係が見られた。兄弟(男-男)の相関関係では0.6%食塩水、1.4%味噌汁で有意な正の相関が見られた。父と母では0.6%食塩水、0.9%食塩水で、1.4%食塩水、0.6%味噌汁で有意な正の相関が見られた。

3 味噌汁と血圧

減塩のために味噌汁摂取量を減らすと、KやMgなど高血圧抑制に働くミネラルの欠乏を招く恐れが指摘されている。また味噌汁の具(野菜・いも類・海藻など)にはKが多い。煮汁に溶出してしまうこれらのミネラルを味噌汁として摂取できるという利点もある。少なくとも塩分給源としての味噌汁には、血圧上昇抑制作用のあることは重要な事実である。現在までのところ、味噌汁摂取と血圧の相関を示すデータは見出されていない。表14 [味噌汁摂取と血圧の相関] にまとめている。

血圧と味噌汁塩濃度との関係を既往歴、父母の生死、死因などとの関連で検討した報告がある。角南ら¹⁶⁷⁾は、昭和51年8月、11月、12月に岡山県でも脳卒中死亡率が低い南西部田園地帯の町の住民を対象に循環器検診を行った。年齢別受診者数は30歳代3人、40歳代38人、50歳代68人、60歳代63人、70歳代12人、80歳代3人であった。その結果、高血圧群と非高血圧群では味噌汁塩濃度に有意差はなかった。

渡辺ら¹⁶⁸⁾は、昭和55年、三重県各保健所の健康教室、集団検診などの参加者1,201世帯を対象

に、持参させた味噌汁の食塩濃度を測定し、次のような結果を得ている。

- 1) 味噌汁の食塩濃度は平均1.08%、著しいバラツキがみられた。
- 2) 味噌汁の適正濃度(0.8%)以上の「からずき」世帯率において、高血圧者在宅世帯と非高血圧者在宅世帯との間には相関はなかった。
- 3) 保健所別脳血管疾患死亡率と「からずき」世帯率との間には相関はなかった。

正常血圧者における高血圧の将来リスクとライフスタイル因子の関係を研究するために、Kandaら¹⁶⁹⁾は、35歳から89歳の445人の正常血圧者を対象にベースライン質問及び四年間の追跡調査を実施した。60歳から69歳の対象者について4年間の血圧変化は男では米飯摂取量と、女では日本茶摂取量との間で負の相関が認められた。多変量重回帰分析により1日2杯以上の味噌汁摂取により追跡調査期間中高血圧が予防されることが明らかに(p=0.05)。

石崎ら¹⁷⁰⁾は、鹿児島県の町住民を対象の食品摂取頻度調査から、汁物は味噌汁がもっとも多く、1週間当り、朝5.7回、昼3.2回、夕1.8回であった。また、高血圧者群では味噌汁の塩分濃度が有意に高かった。

Nakamuraら¹⁷¹⁾は、二重盲検無作為抽出プラセボ対照によって、一般日本人における低Na醤油及び低Na味噌の長期間使用可能性とそれの血圧に及ぼす効果を調べた。男40人女24人低Na群(32)と対照群(32)に無作為に分けた。試験には普通品よりNa含量が25%(醤油)20%(味噌)低い試料を用いた。6週間の介入試験の後に血圧変化を測定した。介入試験前には両群間に年齢、性別、BMI、血圧については有意の差はない。6週間介入試験後、全コホートに関して血圧の有意差はなかった。しかし、40歳以上の集団においては、低Na群では拡張期血圧は6.4mmHgの正味の低下を示したが、収縮期血圧には有意の低下はなかった。低Na調味の味覚評価は良好であった。普通タイプの醤油や味噌の低Naタイプへの置き換えは一般人の間で実行可能であり、日本人の食事における減塩戦略の基礎となりうるとした。

表14 味噌汁摂取と血圧の相関

	調査対象	調査内容	調査結果	文献
角南ら	1979 岡山県田園地帯一般地域住民循環器受診者	味噌汁食塩濃度を測定 昭和51年8月, 11月, 12月	高血圧群と非高血圧群では食塩濃度が全く同じであった	167)
渡辺ら	1984 三重県集団検診参加者1201世帯	参加者持参味噌汁の食塩濃度を測定 昭和55年	「からずき」世帯率において、高血圧者在宅世帯と非高血圧者在宅世帯との間には相関関係はみられなかった	168)
Kanda et al.	1999 35歳から89歳の445人正常血圧者	4年間追跡調査	1日2杯以上の味噌汁摂取により高血圧が予防されることが明らかになった (p=0.05)	169)
石崎ら	2000 鹿児島県I町	食品摂取頻度調査, 食生活実態を把握	高血圧群に味噌汁の塩分濃度が有意に高かった	170)
Nakamura et al.	2003 男40人女24人 低ナトリウム群 (32) と対照群 (32) に無作為分離	低ナトリウム醤油及び低ナトリウム味噌 6週間の介入試験の後に血圧変化を測定	全コホートで血圧に有意差はなかった	171)
渡辺	2006 動物実験	血圧に及ぼす味噌と食塩の効果を比較	大豆成分。発酵生成物に血圧抑制作用がある。味噌食塩は食塩単独とは血圧作用は異なる	172)
Watanabe et al.	2006 食塩感受性Dahl系及びSD系の雌雄ラット	血圧に及ぼす味噌と食塩の効果を比較	味噌飼料には血圧上昇効果はない	173)
Yamakoshi et al.	2007 自然発症ラットSHR	ガンマアミノ酪酸GABA含有低ナトリウム醤油の降圧効果	GABA含有低ナトリウム醤油飼料群では6週飼育で収縮期血圧は低ナトリウム醤油群, 食塩水群に比べて低下	174)

大豆そのものにも血圧抑制作用があるが、更に発酵製品（味噌）にはより強力な血圧抑制作用物質が食塩の昇圧作用を妨げている可能性がある。これを調べるために、渡辺¹⁷²⁾、¹⁷³⁾は、Dahl系及びSD系の雌雄ラットの血圧に及ぼす味噌と食塩の効果を比較した。味噌飼料（食塩2.3%）、塩分飼料（食塩2.3%）、塩分飼料（食塩1.9%）、通常飼料（食塩0.3%MF）の四種類の飼料で飼育、2、4、8、12週間後に収縮期血圧と拡張期血圧を測定（SBP/DBP）。12週間後に解剖した。Dahl系雄ラットの拡張期血圧は塩分飼料（食塩2.3%）で飼育四週間後に著しく上昇した半面通常飼料（食塩0.3% MF）及び味噌飼料（食塩2.3%）では各p<0.01, p<0.05で上昇は抑制された。その後、高塩分飼料群ではいずれも味噌飼料（食塩2.3%）、通常飼料（食塩0.3% MF）と比べて著しく血圧が上昇した。Dahl系雌ラットでは塩分飼料（食塩2.3%）8週間後から収縮期血圧も上昇した。また塩分飼料（食塩2.3%）Dahl系雌雄ラットでは8週間後には腎障害が見られた。なおSD系では腎症はなかった。これらの結果は味噌飼料には血

圧上昇効果のないことが示された。

Yamakoshiら¹⁷⁴⁾は、自然発症ラットSHRにおけるガンマアミノ酪酸（GABA）含有低Na醤油の降圧効果の機構を研究した。試験群では6週飼育で収縮期血圧は低Na醤油群、食塩水群に比べて低下した。腎交感神経活動RSNA及びポジティブNaバランスが低下、Na尿排出量の増加傾向を認めた。また胸部大動脈及び結腸腎臓小葉間動脈の肥厚は抑制傾向にあった。これらの結果は醤油のGABAによるRSNA阻害の結果としてのNa尿排出促進による体内Na貯留阻止が降圧効果に寄与していることを示唆している。

5章 大豆成分と血圧

1 大豆たんぱく質

大豆は20~40%のタンパク質を含み、その70~80%貯蔵タンパク質であり、さらにその半分がグリシニンである。グリシニンは血中コレステロールや中性脂肪を低下させるとされる。大豆タンパ

ク質構成アミノ酸に占める必須アミノ酸8種類（イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリン）のバランスに優れ、きわめて良質のタンパク源として知られる（畑の肉）。

近年、大豆タンパク質の血圧上昇抑制作用が注目されるようになってきた。大豆タンパク質の消化中間体ペプチドは、昇圧関与酵素のアンジオテンシンI変換酵素（ACE）を強く阻害することがわかっている。ACE阻害薬は血圧降下剤として用いられているため、大豆タンパク質にも血圧上昇の抑制効果があると考えられている。味噌等の大豆発酵食品には、アンジオテンシンI変換酵素（ACE）阻害ペプチドによる血圧抑制作用が報告されている。¹⁹⁷⁾¹⁹⁸⁾これらの報告例を表15〔大豆たんぱく質摂取と血圧の相関〕にまとめてある。

友利ら¹⁷⁵⁾による沖縄における蛋白性食品の消費構造の調査から、37%を肉類に、34%を魚介類に支出し、卵、乳・豆および豆製品にそれぞれ約10%支出していることがわかった。豆及び豆製品と魚介類にそれぞれ50g、肉類に33g卵と乳がそれぞれ17g購入していることになる。肉類、魚介類、豆及び豆製品の調理法としては、味噌汁、煮物が多く、焼きもの、和えもの、酢のもの、蒸物は少なかった。豆及び豆製品では豆腐が最も多かった。

菜食主義者は相対的に血圧は低く、たんぱく質摂取量は少ない。従ってたんぱく質補給による昇圧効果が予想される。これを確かめるために、Sacksら¹⁷⁶⁾は、たんぱく質サプリメントを摂取している菜食主義者の血圧安定性を調べた。18人の菜食主義者を二群に分けて大豆：小麦たんぱく質（60：40）58g/dayとサプリメントとして米たんぱく質7g/dayを6週間摂取させた。エネルギーは同水準とした。低たんぱく質群（非サプリメント）、高たんぱく質群（サプリメント）のたんぱく質摂取量はそれぞれ63g/day、119g/dayであった。平均血圧は高たんぱく質食群109/72mmHg、低たんぱく質食群108/71mmHgとなった。他の栄養素摂取量、平均体重、Na・K排泄に有意の差はなかった。栄養的に適正な菜食主義者の食事へのたんぱく質補給（6週間介入試験）では、血圧

に有意の影響はなかった。

Wuら¹⁷⁷⁾は、大豆たんぱく質由来のアンジオテンシン変換酵素阻害性ペプチドの自然発症高血圧ラットに及ぼす降圧効果及び生理効果を報告している。大豆たんぱく質からアルカラゼ作用によって調製したアンジオテンシンI変換酵素（ACE）阻害性ペプチドの自然発症高血圧ラット（SHR）に及ぼす降圧効果を調べた。比較のため、広く使われている高血圧治療薬カプトプリルも用いた。大豆由来ACE阻害ペプチドを3段階レベル（100, 500, 1000mg/kg/day）で経口投与したところ収縮期血圧は有意に低下した（ $p=0.05$ ）。半面、正常ラットでは最高レベルの投与量でも血圧にほとんど変化はみられなかった。最低レベル投与量でも、1ヶ月飼育後、開始時よりほぼ38mmHg低下し、その降圧効果は持続的に高まった。大豆ペプチドでは3週間後に明白な血圧変動が見られたが、この間カプトプリルはより強い降圧効果を示した。SHRへのACE阻害ペプチド投与による血清、大動脈、肺のACE活性及び血清脂質量は対照群と有意の差はなかった。一方、カプトプリル投与群に対しては、血清ACE活性は有意に上昇、大動脈ACE活性は有意に低下した（ともに $p=0.05$ ）。血清Naイオン濃度はペプチド投与群とカプトプリル投与群いずれも対照群に対して有意に減少した。一方、血清K濃度、血清Ca濃度に対する低下効果は見られなかった。これらの結果から大豆たんぱく質由来ACE阻害ペプチドの降圧効果は一部体液塩分バランスに及ぼす作用に起因することが示唆された。

Shinら¹⁷⁸⁾は、韓国味噌のアンジオテンシンI変換酵素（ACE）阻害ペプチドHis-His-Leuのin vivoにおける降圧活性を報告している。韓国味噌から単離したペプチド画分のACE阻害活性はすでにin vitro実験で証明されている。このペプチド画分をさらに精製し、in vivoにおいてその降圧効果を確認した。HPLCにより単離したACE阻害ペプチドはHis-His-Leu（HHL）であった。これのACE活性半減濃度IC₅₀は2.2microg/mL（in vitro）であった。さらに合成HHLを自然発症高血圧ラットに注射、対照に対して大動脈ACE活性及び収縮期血圧SBPの顕著な低下を認めた。三回注

表15 大豆たんぱく質摂取と血圧の相関

調査対象	調査内容	調査結果	文献
友利ら 1969 沖縄	蛋白性食品の消費構造について調査	豆および豆製品にそれぞれ約10%支出していた。豆及び豆製品にそれぞれ50g、豆及び豆製品の調理法としては、味噌汁。豆及び豆製品では豆腐が最も多かった	175)
Sacks et al. 1984 菜食主義者	たんぱく質サプリメントを摂取している菜食主義者の血圧安定性	栄養的に適正な菜食主義者の食事へのたんぱく質サプリメントの補給は6週間介入試験では血圧に有意の効果はなかった	176)
Wu et al. 2001 自然発症高血圧ラット	大豆たんぱく質由来のアンジオテンシン変換酵素阻害性ペプチドの自然発症高血圧ラットに及ぼす降圧効果及び生理効果	大豆たんぱく質由来ACE阻害ペプチドの降圧効果は一部体液塩分バランスに及ぼす作用に起因することが示唆された	177)
Shin et al. 2001 自然発症高血圧ラット	韓国味噌のアンジオテンシン1変換酵素阻害ペプチドHis-His-Leuのin vivoにおける降圧活性	韓国味噌に含まれるACE阻害ペプチドにはin vivoにおける降圧効果が示された	178)
Matoba et al. 2003 高血圧自然発症ラット	オボアルブミン由来降圧ペプチドに基づく遺伝子組換え大豆たんぱく質の設計	大腸菌で発現させたリコンビナントRPLKPWで組み換えた α サブユニットを経口投与したSHRで降圧効果を示した。RPLKPW組み換え α サブユニットは遺伝子組み換え生理活性ペプチドの最初の例である	179)
Nagata et al. 2003 男294人女330人(うち閉経前246人 閉経中後84人)	大豆製品他の食品摂取と血圧との断面調査による相関検討	女では大豆製品摂取量と拡張期血圧の間で有意の相関はなかった。大豆摂取は男では血圧低下に弱い効果があると結論された	180)
Yang et al. 2005 40-70歳45694人(上海女性健康研究参加者)	2-3年間にわたり、大豆食品を通常に摂取、血圧を追跡測定調査	大豆たんぱく質<2.5g/day摂取群に比べて>25g/day摂取群では平均収縮期血圧、拡張期血圧は低かった	181)

射(一回5mg/kg)でSBPは61mmHg(p=0.01)低下した。これらの結果から韓国味噌に含まれるACE阻害ペプチドにはin vivoにおける降圧効果が示された。

食物たんぱく質由来の降圧ペプチドは、ほとんどアンジオテンシンI変換酵素(ACE)を阻害する一方、オボアルブミンのキモトリプシン消化物であるオボキニン(2-7)(RADHPF)には、NO依存性動脈弛緩作用がある。このオボキニンを経口投与した高血圧自然発症ラット(SHR)では血圧が低下することがわかっている。Matobaら¹⁷⁹⁾は、オボアルブミン由来降圧ペプチドに基づく遺伝子組換え大豆たんぱく質の設計を試みている。アミノ酸置換したオボキニン(2-7)アナログ(RPLKPW)はきわめて強い降圧効果を示した。このペプチドの経口投与(0.1mg/kg)でSHRの血圧は下げたが、正常血圧Wister-Kyotoラット(WKY)には影響はなかった。この強力な降圧ペプチドの新規用途を開発するために、RPLKPWを大豆 β コングリシニン α サブユニットの同属配

列構造に組み換えた。大腸菌で発現させたリコンビナントRPLKPWで組み換えた α サブユニットを経口投与したSHRで降圧効果を示した。RPLKPW組み換え α サブユニットは遺伝子組み換え生理活性ペプチドの最初の例である。

大豆食の高血圧抑制は動物実験で示唆されているが、Nagataら¹⁸⁰⁾は日本人男女における大豆製品他の食品摂取と血圧との断面調査による相関を調べた。総合病院による健康チェックアッププログラムに参加した男294人女330人(うち閉経前246人閉経中後84人)について血圧を測定した。食品群及び栄養素摂取量は半定量的食品摂取頻度質問表回答から推定した。その結果、男では、大豆製品摂取量は年齢、総エネルギー、喫煙状況、BMI、アルコール摂取量、塩分摂取量、海藻摂取量で修正した場合、拡張期血圧と有意に負相関を示した($r=-0.12$ p=0.04)。収縮期血圧との相関は有意境界であった($r=0.10$ p=0.09)。女では大豆製品摂取量と拡張期血圧の間で有意の相関はなかった。大豆摂取は男では血圧低下に弱い効果

があると結論された。

小規模短期大豆食の血圧調整効果を示す研究はいくつかあるが集団対象の長期間の大豆食効果に関する研究はほとんどない。Yangら¹⁸⁰⁾は、大豆食品摂取と中高年中国人女性の血圧に関する縦断的研究を行っている。2～3年間にわたり、大豆食品を通常に摂取した40-70歳45694人（上海女性健康研究参加者）の血圧を追跡測定した。なお、参加者は高血圧、糖尿病、心臓血管疾患の病歴のないことを確かめている。多重回帰分析モデルにより大豆食品摂取レベルと血圧との相関を調べた結果、大豆たんぱく質摂取量と収縮期血圧及び拡張期血圧は年齢、BMI、ライフスタイル、他の食事因子で補正を加えた後、逆相関を示した。大豆たんぱく質<2.5g/day摂取群に比べて>25g/day摂取群では平均収縮期血圧は1.9mmHg (95% CI: -3.0, -0.8mmHg)、拡張期血圧は0.9mmHg (-1.6, -0.2mmHg) 低かった。年齢が高いほど逆相関性は高かった (p=0.05)。60歳以上では対応する差は収縮期血圧 -4.9mmHg (95% CI: -8.0, -1.9mmHg) 拡張期血圧 -2.2mmHg (95% CI: -3.8, -0.6mmHg)であった。

Heら¹⁸²⁾は、無作為抽出した中国人35～64歳302人（収縮期血圧130～159mmHg、拡張期血圧80～99mmHg）を対象に、大豆たんぱく質40gを12週間投与、収縮期血圧及び拡張期血圧それぞれ正味の変化は、-4.31mmHg (p<0.001)、-2.76mmHg (p<0.001)であった。

疫学的研究は大豆食が心疾患罹患率を減らすことを示唆している。Weltyら¹⁸³⁾は、大豆の高血圧、正常血圧、中間血圧の閉経期女性における血圧及び脂質レベルに及ぼす効果を報告している。40-70歳では収縮期血圧20mmHg (115/75)、拡張期血圧10mmHg (185/115)の上昇で心疾患罹患リスクが倍増する。健康な閉経女性60人にTherapeutic Life Style Change (TLC)食と大豆たんぱく25g置換イソフラボン（アグリコン）101mg添加したTLC食を8週間に渡って無作為交差法により摂取させた。TLC食のみに比べて大豆添加TLC食では、高血圧者（収縮期血圧140mmHg以上）の収縮期、拡張期血圧は9.9%、6.8%低下した。また、正常者（収縮期血圧120mmHg以下）で

はそれぞれ5.2%、2.7%低下した。前期高血圧者についても同様の傾向を示した。また、大豆添加によりLDLコレステロールは高血圧者、正常血圧者ともに11%、8%減少した。大豆添加食は血圧、血中脂質の改善に有効であり心疾患リスク低下に寄与することが示唆された。

Nascaら¹⁸⁴⁾は、閉経女性の高血圧者及び正常血圧者における接着分子と炎症マーカーに及ぼす大豆の効果を比較している。高血圧治療食（TLC食）において大豆を採り入れることにより閉経後高血圧者の収縮期・拡張期血圧はそれぞれ9.9%、6.8%低下し、また閉経後正常血圧者でもそれぞれ5.2%、2.9%低下するとしている。健康な閉経女性60人（正常血圧者48人、高血圧者12人）をTLC食またはたんぱく質の25gを大豆たんぱく質（+101mgイソフラボン）25gで置換した大豆TLC食を無作為交差法により8週間摂取させた。TLC食に比べて、大豆TLC食では可溶性細胞接着分子molecular-1は高血圧者において著しく低下した（623.6±153.8vs553.8±114.4ng/mL, p=0.003）。他方、正常血圧者では有意の差は認められなかった。大豆置換は正常血圧者におけるC反応性たんぱく質の減少傾向と関連していた。可溶性細胞間接着分子molecular-1、インターロイキン-6、細胞外マトリックス金属プロテイナーゼ-9に関しては大豆置換効果は全く認められなかった。高血圧者における可溶性血管細胞接着分子molecular-1の大豆置換による減少は、上皮細胞機能の改善を示唆しており、これにより動脈硬化に関与する炎症の全般的改善効果を反映していると結論された。

Panら¹⁸⁵⁾は、大豆たんぱく質摂取は、脂質プロフィール、糖代謝、血圧を改善すると報告している。50～70代の中国人男女2811人の断面研究を行った。大豆摂取中央値は7.82g/day（7.64男、8.02女）。大豆摂取量は血圧と負相関（p=0.049）を示した。

2 大豆イソフラボン

イソフラボン (isoflavone) はフラボノイドの一種、多くは配糖体として分布する。大豆などのマメ科植物に多い。イソフラボンエストロゲン（女性ホルモン）類似の作用を示す。エストロゲ

ン受容体に結合してアゴニストとして機能する（植物エストロゲン）。

大豆は最も一般的なイソフラボン類の給源であり、ゲニステインとダイゼインが主なものである。豆腐・味噌などの大豆製品においても、イソフラボンは高いレベルで維持されている。ほとんどのイソフラボン類は、配糖体や配糖体のマロン酸あるいはアセチル化抱合体として存在、水溶性である。

大豆イソフラボンは、そのエストロゲン様活性により、更年期障害や2型糖尿病の改善効果、骨粗鬆症予防効果があると考えられている。特定保健用食品として「骨の健康維持に役立つ」という表示が許可されたものがある。一方、食品安全委員会は「現在までに入手可能なヒト試験に基づく知見では、大豆イソフラボンの摂取が女性におけ

る乳がん発症の増加に直接関連しているとの報告はない」と報告している（2006）。

イソフラボンは甲状腺へのヨウ素取り込みを阻害するため、ヨウ素欠乏の状態での大豆製品の多食やイソフラボン過剰摂取は甲状腺肥大の可能性があるとされる。通常の日本食では海藻類にヨウ素が含まれているので問題はない。食品安全委員会「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方」では、大豆イソフラボンアグリコン換算量は、安全な一日の上乗せ摂取量の上限値を30mgとしている。

大豆イソフラボンと血圧に関する報告例を表16 [大豆イソフラボン摂取と血圧の相関] にまとめてある。

日本人におけるフラボノイド及びイソフラボノイド摂取量を調べた報告がある。Kimiraら¹⁸⁶⁾は、

表16 大豆イソフラボン摂取と血圧の相関

調査対象	調査内容	調査結果	文献
Kimira et al. 1998 日本人 ボランティア女性50人	摂取量調査1996年9月の3日間 因子1フラボノイド及び抗酸化ビタミン、 因子2イソフラボノイド	因子1は年齢及びHDLコレステロールと正に相関、ト リグリセリドと負に相関 因子2はクレアチニン及び尿酸値と正に相関	186)
Moline et al. 2000 蓄積データ	フラボノイド摂取量と心疾患死亡率の相 関。メタ解析	高フラボノイド食では高血圧罹患率は低い可能性があ る	187)
Kreijkamp -Kaspers et al. 2004 オランダ人60 - 75歳の 閉経女性301人	閉経女性におけるフィトエストロゲンの 低摂取による動脈に及ぼす効果	フィトエストロゲン摂取量による効果は見られなかつ たがリグナンには弱いながら血圧を下げる作用が見ら れた	188)
Sagara et al. 2004 スコットランド ルイス島・ハリス島 住民	大豆たんぱく質及びイソフラボン摂取の 血圧、コレステロールレベルに及ぼす効 果。介入試験	5週間のイソフラボン投与により高リスク中年男性で はCHD（心疾患）リスクの低下が期待された	189)
Yamori 2004 25ヵ国60地域住民	世界的な肥満症候群調査データの解析	肥満指標BMIは血圧及び心疾患と相関していることが 判明	190)
Liang et al. 2006 健康人50～76歳 男108人女105人	血圧及び血中脂質に及ぼすフィトエスト ロゲンの効果を報告	大豆投与群では尿中フィトエストロゲンが増量、血圧 は低下した	191)
Teede et al. 2006 高血圧患者	血圧及び動脈機能に及ぼすイソフラボン ／大豆たんぱく質の効果	イソフラボン含有大豆サプリメントは動脈機能、24時 間平均血圧パラメーター、中心血圧に何らの効果は認 められなかった	192)
Sacks et al. 2006 一般人	イソフラボンの心臓動脈疾患予防	大豆たんぱく質及びイソフラボンは心臓動脈疾患予防 に注目され、血圧低下が認められた	193)
Douglas et al. 2006 ラット	超長期、イソフラボンを投与、離乳期か ら3月齢6月齢に渡って動脈血圧を測定	イソフラボン除去食に切り替えても血圧に影響はなかつ た	194)
Rosero et al. 2008 蓄積データ	血圧低下におけるフィトエストロゲンの 有用性の検証：系統的レビュー及びメタ 解析	フィトエストロゲンまたは大豆たんぱく質の血圧低下 効果を検証、フィトエストロゲン処方によって血圧に 有意の差は認められなかった	195)

フラボノイド及びイソフラボノイド摂取量を予備的データベースに基づいて推定した。ボランティア女性50人について1996年9月の3日間の摂取量を記録、合わせて身体的にチェックした。フラボノイド平均1日摂取量はケンフェロール4.9mg, ケルセチン8.3mg, ルチン1.5mg, ミリセチン0.6mg, ルテオリン0.3mg, ミリシトリン0.01mg, フィセチン0.4mg, エリオデイクチオール0.3mgであった。一方、イソフラボノイドは野菜から16.2mg, 果物から23.27mg, 総イソフラボノイドは39.46mgであった。イソフラボノイドはダイゼイン, ゲニステインなどである。主成分分析の結果, 因子1はフラボノイド及び抗酸化ビタミンであり, 年齢及びHDLコレステロールと正に相関, トリグリセリドと負に相関した。また, 因子2は主にイソフラボノイドであり, クレアチニン及び尿酸値と正に相関していた。しかしこれらの因子は骨密度, BMI, 血圧と有意の相関はなかった。

果物, 野菜, ワイン, 茶の高血圧を危険因子とする心疾患の予防効果に関する多数の研究がある。フラボノール, フラボン, イソフラボンなどのフラボノイドは食事性抗酸化物質の代表である。Molineら¹⁸⁷⁾は, フラボノイド摂取量と心疾患死亡率は負相関にあると報告している。高血圧者では血中フラボノイド値は低いと考えられる。高フラボノイド食では高血圧罹患率は低い可能性がある。食事性抗酸化物質の摂取増による血圧低下は高血圧合併症を低減することが期待される。

閉経女性におけるフィトエストロゲンの低摂取による動脈に及ぼす効果も調べられている。Kreijkamp-Kaspersら¹⁸⁸⁾は, オランダ人60-75歳の閉経女性301人を対象に食事頻度調査によりフィトエストロゲン摂取量を調査した。最低ターマイル中央値0.2mg最高ターマイル中央値11.4mg。またリグナン摂取量はそれぞれ0.8mg, 2.2mgであった。フィトエストロゲン摂取による降圧効果は見られなかったが, リグナンには弱いながら降圧効果が見られた。

Sagaraら¹⁸⁹⁾は, スコットランドのルイス島ハリス島住民を対象に, 大豆たんぱく質及びイソフラボン摂取の血圧, コレステロールレベルに及ぼす

効果を, 無作為抽出, 二重盲検, プラセボ, パラレル介入試験により, 調べた。高血圧及び高コレステロールの45-59歳61人について, 大豆たんぱく質20gイソフラボン80mgで5週間摂取させた結果, 両群間で24時間尿イソフラボンに有意差があった。収縮期, 拡張期血圧, 総コレステロール, non-HDL-Cは有意に低下したが, オリーブ油プラセボには有意差はなかった。5週間の大豆たんぱく質イソフラボン投与により高リスク中年男性ではCHD(心疾患)リスクの低下が期待されるとした。

WHO「心疾患と栄養比較研究」(CARDIAC)とそのフォローアップMONALISA研究(25ヵ国60地域)は発展途上国においてさえ世界的に肥満症候群が広がっていることを示した。Yamori¹⁹⁰⁾は, このような世界的な肥満症候群を背景に, 日本食への期待があると述べている。肥満指標BMIは血圧及び心疾患と相関していることが判明した。心疾患死亡率は大豆・魚摂取量, 尿中イソフラボン・タウリン量と負相関にあることもわかった。大豆・魚摂取群では非摂取群よりも心疾患の危険因子であるBMI, 血圧, 血清コレステロールは有意に低いことがわかった。さらにBMIは大豆摂取量のバイオマーカーである尿中イソフラボン, 魚摂取量のバイオマーカーである尿中ヒスチジンとそれぞれ負の相関にあった。フィトエストロゲンとしてのイソフラボン, ヒスタミン前駆体であるヒスチジンは食欲中枢に影響する可能性があるため大豆と魚は肥満コントロールの推奨食品と言える。

Liangら¹⁹¹⁾は, 健康人における血圧及び血中脂質に及ぼすフィトエストロゲンの効果を報告している。50~76歳の男108人, 女105人に大豆たんぱく質(40g, 118mgイソフラボン)を3ヶ月投与した。プラセボ(カゼイン)を使い, 無作為, ダブルブラインド法で追跡比較した。その結果, 大豆投与群では尿中フィトエストロゲンが増量し, 血圧は低下した。Teedeら¹⁹²⁾は, 高血圧患者の血圧及び動脈機能に及ぼすイソフラボン/大豆たんぱく質の効果について, 無作為, プラセボ対照, 交叉試験を行った。高血圧患者においてはグルテンプラセボに対してイソフラボン含有大豆サプリ

メントは動脈機能、24時間平均血圧パラメーター、中心血圧に何らの効果は認められなかった。24時間血圧曲線プロフィールは大豆摂取により日中血圧はグルテンに比べると高いことが示された。Sacksら¹⁸⁹⁾は、大豆たんぱく質及びイソフラボンは心臓動脈疾患予防に注目され、血圧低下が認められている、としている。Douglasら¹⁹⁰⁾は、超長期のイソフラボンをラットに投与、離乳期から3月齢6月齢に渡って動脈血圧を測定した。イソフラボン除去食に切り替えても血圧に影響はないとした。Roseroら¹⁹¹⁾は、血圧低下におけるフィトエストロゲンの有用性:系統的レビュー及びメタアナリシスを試み、フィトエストロゲンまたは大豆たんぱく質の血圧低下効果を検証、フィトエストロゲン処方によって血圧に有意の差は認められなかった。

終章 総括

味噌汁の評価を中心に

従来の調査研究をまとめると、「食塩は昇圧のリスク因子ではあっても、その原因ではない」と考えられる。通念あるいはスローガン（運動目標）としての「食塩仮説」（食塩と血圧応答は正相関にある）は、公表されている多数の研究報告を見るかぎり、根拠に乏しいと言える。リスク因子としての食塩が昇圧を結果するには、食塩感受性遺伝子、摂取栄養素、生理的・環境的条件など、多数のパラメーターが関与することが明らかにされてきている。これらのパラメーターを考慮に入れて、食塩と血圧との関係について、実証的な立場から再整理する必要がある。

以上を踏まえて、序章「食塩摂取と血圧の相関——論点整理」における、論点に沿って、「食塩給源」としての味噌に対する評価を、以下に概括する。

1) 疫学的調査研究に関して

- 味噌摂取量と高血圧者頻度の相関を示す報告は見当たらない。
- 1日2杯以上の味噌汁摂取により高血圧が予防されたとの報告がある。¹⁶⁹⁾

2) 減塩指導の評価研究に関して

- 東北地方脳卒中死亡率の低下が長年の減塩指導によるとしても、それが味噌汁減量によるものかは疑問である。減塩の降圧効果を直接支持する報告は見当たらないからである。
- 食塩の目標摂取量を1日10g以下（厚生省）としているが、現在、日本人平均11~12gであり、そのうち味噌食塩の寄与率は5%程度（0.5g）と試算される。したがって、減塩のための味噌汁減量指導には実際的な意味はないと考えるべきである。また、40年前（1970）の日本人の食塩摂取量と味噌消費量から試算すると、その寄与率は7%程度であるから、過去にさかのぼっても、食塩給源としての味噌汁の比重は決して大きくはなかった。しかし、国民的な減塩運動の中で、味噌汁が過度にその標的とされてきたと言えるだろう。

3) 減塩療法・介入試験研究に関して

- 本態性高血圧患者に高塩分食（1日食塩23g程度）を与えると高血圧となったとの報告¹³⁾があるが、これは味噌汁換算で平均15杯に相当する食塩量である。減塩による血圧低下を味噌汁減量に期待することは無意味であると言える。
- 血液ナトリウムイオン濃度は厳重に制御され、食塩摂取量で増減せず、血圧に影響することはないと考え方が有力である。体重60kgの人体内には、食塩換算約320gが存在し、味噌汁塩分の追加供給は無視しうる量である。
- 食塩感受性の差を無視した一律減塩政策の一環として、味噌汁減量を推奨することには問題がある。

4) 食塩の血圧効果（因果関係）に関して

- 本態性高血圧には多くの因子が関与し、原因が特定できないのが現状である。
- 大豆タンパク質の消化中間体ペプチドは、昇圧に関与するアンジオテンシンI変換酵素（ACE）を強く阻害することがわかっている。味噌等の大豆発酵食品には、血圧抑制作用成分を含んでおり、この点を考慮した味噌

汁の評価が必要である。

- 味噌成分の大豆イソフラボンの降圧効果を示唆する報告例も多く、味噌汁評価の重要な論点である。

5) 栄養的観点からの研究に関して

- 高血圧予防のためには、摂取栄養素が重視され、味噌汁は多様な具材の媒体として、野菜・いも・海藻などの合理的な摂取方法として評価されるべきである。
- 味噌汁は、カリウムやマグネシウムなど降圧作用ミネラルの摂取源としても評価されるべきである。

6) 食文化に関して

- 飯主食の食文化において、食塩給源としての味噌汁は味覚上で必須である。
- 味噌汁減量は、日本人の伝統的な食生活を歪める可能性がある。

参考文献

- 1) 藤田敏郎「減塩運動は見直しが必要 血圧上昇を抑制するカリウムやマグネシウムの摂取には「みそ汁」が最適」味噌の科学と技術 (0369-1047) 44巻1号 Page17-21(1996.01)
- 2) 稲垣義明, 斉藤俊弘, 坂口明「高血圧症と血圧の食塩感受性」栄養学雑誌, 45(2): 51~58, 1987.
- 3) 戸嶋裕徳, 熊谷英一郎「高血圧の治療- e. 減塩療法, 運動療法」日本臨牀, 42(2): 428-434, 1984.
- 4) de Wardener HE. : Sodium and hypertension, Arch Mal Coeur Vaiss. 1996 Sep;89 Spec No 4:9-15. Review. French.
- 5) 青木伸雄「高血圧と食生活」栄養学雑誌, 46(2): 65~72, 1988.
- 6) 川崎晃一「食塩と健康—高血圧との関わり」化学と生物 37(3), 196-201, 19990325
- 7) Luft FC.:Salt and hypertension at the close of the millenium. Wien Klin Wochenschr. 1998 Jul 31;110(13-14):459-66. Review.
- 8) 橋本壽夫「食塩摂取量と高血圧の因果関係をめぐって」栄養学雑誌 (0021-5147) 57巻5号 Page249-258(1999.10)
- 9) Chrysant GS, Bakir S, Oparil S.: Dietary salt reduction in hypertension--what is the evidence and why is it still controversial?, Prog Cardiovasc Dis. 1999 Jul-Aug;42(1):23-38. Review.
- 10) 高田明和「資料 食塩についての正しい知識」味噌の科学と技術 48(12), (562) 414-419, 2000/12
- 11) 上島弘嗣「高血圧の疫学 わが国における高血圧の実態」医学のあゆみ (0039-2359) 214巻5号 Page285-290(2005.07)
- 12) Stamler J, Elliott P, Dennis B, Dyer AR, Kesteloot H, Liu K, Ueshima H, Zhou BF; INTERMAP Research Group. : INTERMAP: background, aims, design, methods, and descriptive statistics (nondietary)., J Hum Hypertens. 2003 Sep;17(9):591-608. Review.
- 13) 海老根英雄「食塩は果して高血圧と直接関係があるのか?」味噌の科学と技術 33(3), p71-82, 1985/03
- 14) Tsuchihashi T. : [Health guidance for patients with mild hypertension] Nippon Rinsho. 2008 Aug;66(8):1537-41. Review. Japanese.
- 15) 佐々木直亮「高血圧と食塩摂取」栄養と食糧 Vol.31 No.4, 301-310 (1978)
- 16) Haddy FJ, Pamnani MB. : Role of dietary salt in hypertension. J Am Coll Nutr. 1995 Oct;14(5):428-38. Review.
- 17) 渡辺英治「中枢神経系による塩分摂取制御機構」日本味と匂学会誌, 10(2) : 207-216, 2003.
- 18) 奥田拓道「食塩による血圧上昇は塩素が原因? キトサンを用いて過剰摂取による上昇のしくみを解明」化学と生物 34(2), 72-73, 19960225
- 19) 浜野美代子, 桑原丙午生「高血圧に関する疫学的研究(その2)「食習慣」ならびに「遺伝」に関する統計学的観察」栄養学雑誌 Vol.28 No.1, 30-36(1970)
- 20) 権藤美和子他「沖縄に西表島における住民の血圧と食塩および数種の食品の消費量について

- て」栄養学雑誌 第31巻 第4号 170-176
- 21) 片山信, 田山綾子, 関本千恵子, 丹羽壮一
「米単作地帯における高血圧世帯および非高血圧世帯の栄養素摂取状況」栄養学雑誌 Vol.34 No.3, 127-137(1976)
 - 22) 大塚量子, 堺みどり, 笠松隆洋, 宮下和久, 潮見重毅, 岩田弘敏 一山村地区における健康と食生活に関する調査研究 栄養学雑誌, 41(6): 379~389, 1983.
 - 23) 佐々木直亮 (弘前大学 衛生学), 福士襄, 高橋政雄「東北地方農民の食塩摂取量と血圧水準の推移についての縦断的疫学調査」弘前医学 (0439-1721) 35巻 2号 Page232-242(1983.06)
 - 24) 鈴木カツ子, 菊地亮也, 神坂陽, 他「秋田県における乳幼児の食塩摂取量に関する6年間の追跡調査(第2報)食塩摂取と血圧との関係について」小児保健研究 (0037-4113) 48巻 5号 Page560-564(1989.09)
 - 25) Tian HG, Hu G, Dong QN, et al. : Dietary sodium and potassium, socioeconomic status and blood pressure in a Chinese population. *Appetite*. 1996 Jun;26(3):235-46. Links
 - 26) 小林一彦, 内津喜重, 出浦守康, 渡辺主税, 青柳正子*, 黒澤礼子*, 輿水数恵*, 出浦啓子*, 黒澤紀恵*, 上田愛子*, 渡辺文子*, 内藤ヨシ子*, 黒澤妙子*, 佐藤みゆき*, 柳沢俊江*, 篠原八重子*「塩分摂取量の測定及び血圧との関連の調査」日本農村医学会雑誌 52(5)861, 2004
 - 27) Ikeda N, Gakidou E, Hasegawa T, Murray CJ. : Understanding the decline of mean systolic blood pressure in Japan: an analysis of pooled data from the National Nutrition Survey, 1986-2002. *Bull World Health Organ*. 2008 Dec;86(12):978-88.
 - 28) 中根孝子, 香川芳子「肥満高血圧症患者の低エネルギー食による血圧とナトリウム摂取量の変化」栄養と食糧 Vol.31 No.1, 79-85(1978)
 - 29) 相良佐枝子, 本岡健一「282. 高血圧管理対象者の小集団活動方式による減塩指導(産業看護)」産業医学 24(7), 890-891, 19821220
 - 30) 小林真智子 [他]「農山村の食塩摂取状況と減塩指導の評価」栄養学雑誌 40(5), p259-267, 1982/10
 - 31) 南部征喜, 都島基夫, 西大条靖子 他「本態性高血圧症に対する塩分制限と体重減少の効果」動脈硬化 (0386-2682) 13巻 5号 Page 1107-1114(1985.12)
 - 32) 磯博康 [他]「循環器疾患対策のための高温下作業従事者に対する減塩指導の妥当性に関する検討」日本公衆衛生雑誌 34(8), p413-419, 1987/08
 - 33) 高村一郎, 伊藤一輔, 安田寿一, 杉田泰宏「11) 高血圧と新しい減塩指導教育の長期評価:」日本循環器学会第56回北海道地方会 *Japanese circulation journal* 53(Supplement1), 3, 19890401
 - 34) 新明ローザ怜美, 川田智之, 鈴木庄亮「330 減塩指導による某化学工場社員集団の有意な血圧値の減少(健康管理・健康診断, 一般演題, 第64回日本産業衛生学会・第50回日本産業医協議会)」産業医学 33(7), 681, 19911220
 - 35) 竹森幸一「全国の保健所保健婦, 栄養士の減塩指導の現状と問題点」日本公衆衛生雑誌 38(6), p438-445, 1991/06
 - 36) 中塚晴夫, 小山洋, 佐藤洋, 岩谷昌子, 車谷典夫, 田中平三「減塩指導による栄養素摂取の変化と血圧への影響について」日本公衆衛生雑誌 = JAPANESE JOURNAL OF PUBLIC HEALTH 43(10), 822, 19961015
 - 37) 島田豊治「わが国成人のナトリウム最小必要量に関する基礎研究」大阪市医雑誌46巻, 3・4号 (1997) 237-253
 - 38) 山本博司「ライフスタイル改善による一般住民の高血圧予防に関する介入研究: 減塩指導の降圧効果」大阪市医学会雑誌 46(3/4), 255-267, 19971226
 - 39) 岩井邦充, 松本正幸: Sodium reduction and weight loss in the treatment of hypertension in older persons: A randomized controlled trial of nonpharmacologic interventions in the elderly(TONE) 血圧, 5(10): 1083-1085, 1998.
 - 40) 中村美詠子「食塩摂取量及び血圧に対する低

- Na調味料の二重盲検無作為化試験」研究課題番号：12670350代表者2000年度～2002年度
- 41) 野原勝「体重・食塩摂取の変化と血圧値の改善効果に関する定量的研究」研究者番号：60285583
 - 42) 横山恵美, 能登実枝子, 銭亀初江, 陶山久子, 斎藤美恵子, 衛藤雅昭, 加来浩平「高血圧合併2型糖尿病患者への簡便な減塩指導の試み」糖尿病 45(12), 905-910, 20021230
 - 43) 木村玄次郎「食塩摂取による血圧変動の個人差：DASH-Sodium 研究」血圧 vol.11 no.2 (2004) 126-127
 - 44) Ohta Y, Tsuchihashi T, Ueno M, Kajioka T, Onaka U, Tominaga M, Eto K. : Relationship between the awareness of salt restriction and the actual salt intake in hypertensive patients. *Hypertens Res.* 2004 Apr; 27(4): 243-6.
 - 45) Ohta Y, Tsuchihashi T, Onaka U, Eto K, Tominaga M, Ueno M. : Long-term compliance with salt restriction in Japanese hypertensive patients. *Hypertens Res.* 2005 Dec;28(12):953-7.
 - 46) Yokota K, Harada M, Wakabayashi Y, et al. [Evaluation of a community-based health education program for salt reduction through media campaigns] *Nippon Koshu Eisei Zasshi.* 2006 Aug;53(8):543-53. Japanese.
 - 47) Kawano Y, Ando K, et al. : Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (1) Rationale for salt restriction and salt-restriction target level for the management of hypertension. *Hypertens Res.* 2007 Oct; 30(10):879-86.
 - 48) Schmidlin O, Sebastian AF, Morris RC Jr. What initiates the pressor effect of salt in salt-sensitive humans? Observations in normotensive blacks. *Hypertension.* 2007 May; 49(5): 1032-9. Epub 2007 Mar 19
 - 49) Zhao Q, Gu D, Chen J, et al. : Correlation Between Blood Pressure Responses to Dietary Sodium and Potassium Intervention in a Chinese Population. *Am J Hypertens.* 2009 Sep 17. [Epub ahead of print]
 - 50) 鈴木慎次郎他「農村における高血圧症の栄養学的研究（第6報 昭和35年度長野県）」*栄養学雑誌* 第21巻 第3号 62-76
 - 51) 香月文子, 福田靖子 他「食品の食塩含量：高血圧の疫学的立場から」*大手前女子短期大学・大手前文化学院研究集録* 3, 157-163, 19780000205
 - 52) 杉浦喜美子, 田沼順子, 猪俣保子, 中島洋子, 樋口京子, 松田美智子, 大久保妙子, 唐島美鶴, 土屋真紀子, 森桂子, 小西邦子, 関谷和恵, 大田紀子, 立松道子, 石川順子, 白石京子, 渡辺純子, 豊川裕之, 小野田博一「高血圧予防教室に関する実践的研究」*栄養学雑誌*, 41(4): 209～216, 1983.
 - 53) 大塚量子, 堺みどり, 岩田弘敏「山村と小都市でみた食物摂取構造と塩分摂取量」*信愛紀要* 24, 6_a-1_a, 19840200
 - 54) 岡本朋子, 稲垣裕子, 清野喜美子, 及川イサ子「看護学生に対する減塩指導効果の一考察—第2報—」*神戸市立短期大学紀要* 5, 87-97, 19860331
 - 55) Shimbo S, Hatai I, Saito T, et al. : Shift in sodium chloride sources in past 10 years of salt reduction campaign in Japan. *Tohoku J Exp Med.* 1996 Nov; 180(3): 249-59. Links
 - 56) 岡山奈美, 山崎美保子, 森植穂, 森田菊恵, 岩崎昭子, 窪田純子, 別役由香, 毛利好孝「減塩指導への取り組みの効果についての検討：味噌汁塩分調査を通して」*日本公衆衛生雑誌 = JAPANESE JOURNAL OF PUBLIC HEALTH* 43(10), 155, 19961015
 - 57) 小松万喜子「減塩指導を受けた患者の認識と行動」*日本看護研究学会雑誌* 22(3), 122, 19990630
 - 58) 春名かをり「町・組織と協同した生活習慣病予防への取り組み」*臨床栄養*, 96(4) : 343, 2000.
 - 59) 中川秀昭, 森河裕子「カルシウム摂取と血圧」*血圧*, 9(6) : 560-561, 2002.
 - 60) 柳元和, 島田豊治「わが国健康女性のナトリウム摂取量に関する基礎研究：尿中ナトリウ

- ム排泄量を根拠とした若い女性の食塩摂取量」帝塚山大学現代生活学部紀要 3, 25-36, 20070200
- 61) 中村みどり, 寺脇博之, 中山昌明, 伊藤貞嘉「腹膜透析患者に対する塩分コントロール指導の実態」日本透析医学会雑誌 = Journal of Japanese Society for Dialysis Therapy 40(6), 523-529, 20070628
- 62) 片瀬久代, 小谷和彦「日常診療のピットフォール—減塩指導の工夫が奏功した高血圧症の1例」レジデントノート 9(10), 1495-1497, 2008/1
- 63) 南順一「高血圧ガイドラインにおける栄養治療の位置づけと実際」栄養 評価と治療 Vol.26 No.2 (2009.4) (28(106)-31(109))
- 64) 遠藤幸江 [他]「減塩指導のための食塩濃度簡易測定法」栄養学雑誌 45(2), p77-83, 1987/04
- 65) 高橋リエ, 岩井初枝, 森文平「女子学生の食事の食塩量—塩分計および原子吸光法による定量法の比較—」栄養学雑誌, 42(3): 167~174, 1984.
- 66) 小菅充子「即席麺および即席汁物中の食塩」和洋女子大学紀要. 家政系編 29, 85-94, 19890331
- 67) Kawano Y, Tsuchihashi T, et al. : Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (2) Assessment of salt intake in the management of hypertension. Hypertens Res. 2007 Oct; 30(10): 887-93.
- 68) 口羽章子, 玉川和子, 松下ツイ子「減塩食調理の食味について(第3報)」栄養学雑誌, 38(2): 129~139, 1980.
- 69) 浅草すみ, 渡辺久子, 秋山房雄「低塩食に関する研究(第3報)—下調理における脱塩—」栄養学雑誌, 39(6): 267~273, 1981.
- 70) 石垣志津子, 芳本信子「即席白菜漬の食塩濃度について」栄養学雑誌, 43(5): 233~240, 1985.
- 71) 玉川和子, 口羽章子, 松下ツイ子, 櫛田寿恵「減塩食調理の食味について(第4報)—調味料の適切な配合—」栄養学雑誌, 48(4): 177~185, 1990.
- 72) 小林正枝「老人ホーム居住者の食塩摂取量および塩味嗜好と血圧に関する調査」栄養学雑誌 Vol.35 No.3, 143-151 (1977)
- 73) 香川靖堆, 岩田弘*, 太田抜徳*, 工藤快訓*, 武藤信治*, 西村葉子**, 佐東準子**, 所沢和代**, 手塚統夫*「寮内学生の食塩摂取量と塩味嗜好の出身地地域差 生化学分析による検討」栄養学雑誌 Vol.38 No.3 155-162 (1980)
- 74) 殿塚婦美子, 谷武子, 松本仲子「集団給食の汁物の塩味に関する研究」栄養学雑誌, 40(2): 69~77, 1982.
- 75) 松本仲子, 福田加代子「1日摂取食塩量10gを目標とした食事下における間食について」栄養学雑誌, 42(6): 339~343, 1984.
- 76) 渡辺瑞代, 越山日出子, 佐藤康子, 岩崎ひろ子, 山田芳子, 丹羽壮一「三重県民健康大学における受講生の食塩濃度別みそ汁の味覚調査ならびにその受講後の減塩意識, 主食パターン, みそ汁の摂取状態についての検討」鈴鹿短期大学紀要 4, 17-38, 19840200
- 77) 高木恵子, 戸田ゆりこ, 石川昌子「かつおだし濃度の異なったすまし汁中の食塩濃度に関する味覚調査」栄養学雑誌, 43(6): 319~325, 1985.
- 78) 丸山千寿子, 仲森隆子, 中西靖子, 林田益子, 福島撮子「食塩味覚閾値判定濾紙の改良と減塩食事療法における評価」栄養学雑誌, 46(5): 211~216, 1988.
- 79) 丸山千寿子, 村田素子, 富山順子, 隅元恵里, 松尾里美, 布川直子, 村上智子, 相沢力「健常者及び高血圧患者の食塩味覚閾値について(第1報)」栄養学雑誌, 48(3): 121~126, 1990.
- 80) 丸山千寿子, 天海紀代美, 東千恵美, 松沢美帆, 奥脇泉, 吉見千代子, 阿原智美, 村上智子, 相沢力「健常者及び高血圧患者の食塩味覚閾値について(第2報)」栄養学雑誌, 48(6): 267~271, 1990.
- 81) 矢倉紀子, 蓑原美奈恵, 住田導彦「成人の味覚識別能と減塩指導との関連性」日本公

- 衆衛生雑誌 37(10), p867-872, 1990/10
- 82) 石田裕美, 菊池正一「塩化ナトリウムに対する味覚閾値の全口腔法と選択3滴法による差異」栄養学雑誌, 49(3): 139~145, 1991.
- 83) 宮崎栄子, 韓立坤, 奥田拓道「皮膚温度および食塩の塩味に及ぼす天然にがりの影響」栄養学雑誌, 61(3): 183~187, 2003.
- 84) 岡野節子, 堀田千津子「味覚についての一考察」鈴鹿国際大学短期大学部紀要 24, 11-18, 20040000
- 85) Suter PM, Sierro C, Vetter W. Nutritional factors in the control of blood pressure and hypertension. *Nutr Clin Care*. 2002 Jan-Feb; 5(1): 9-19. Review.
- 86) Kris-Etherton PM, Etherton TD, Carlson J, Gardner C. Recent discoveries in inclusive food-based approaches and dietary patterns for reduction in risk for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2002 Aug; 13(4): 397-407. Review.
- 87) Moriguchi EH, Moriguchi Y, Yamori Y. Impact of diet on the cardiovascular risk profile of Japanese immigrants living in Brazil: contributions of World Health Organization CARDIAC and MONALISA studies. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004 Dec; 31 Suppl 2: S5-7.
- 88) Tokui N, Yoshimura T, Fujino Y, Mizoue T, Hoshiyama Y, Yatsuya H, Sakata K, Kondo T, Kikuchi S, Toyoshima H, Hayakawa N, Kubo T, Tamakoshi A; JACC Study Group. Dietary habits and stomach cancer risk in the JACC Study. *J Epidemiol*. 2005 Jun; 15 Suppl 2: S98-108. Apr; 27(2): 173-80
- 89) He FJ, MacGregor GA. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J Hum Hypertens*. 2009 Jun; 23(6): 363-84. Epub 2008 Dec 25. Review.
- 90) Tsuda K. [Nutritional recommendation for hypertension] *Nippon Rinsho*. 2008 Aug; 66(8): 1547-51. Review. Japanese.
- 91) Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol*. 2009 Jun; 38(3): 791-813. Epub 2009 Apr 7.
- 92) Mohan S, Campbell NR. Salt and high blood pressure. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Jun 2; 117(1): 1-11. Review.
- 93) Horky K. [Reducing food salt content--a neglected approach to hypertension prevention and treatment in the population] [Article in Czech] *Vnitr Lek*. 2009 Sep; 55(9): 797-801.
- 94) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Application of lower sodium intake recommendations to adults--United States, 1999-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 Mar 27; 58(11): 281-3.
- 95) Palar K, Sturm R. Potential societal savings from reduced sodium consumption in the U.S. adult population. *Am J Health Promot*. 2009 Sep-Oct; 24(1): 49-57
- 96) Kurokawa K. Salt, kidney and hypertension: why and what to learn from genetic analyses? *Nephron*. 2001 Dec; 89(4): 369-76.
- 97) Flack JM, Ensrud KE, et al. Racial and ethnic modifiers of the salt-blood pressure response. *Hypertension*. 1991 Jan; 17(1 Suppl): I115-21. Review
- 98) Rhoades ER. American Indians and Alaska Natives--overview of the population. *Public Health Rep*. 1996; 111 Suppl 2: 49-50. Review.
- 99) Chrysant SG, Weir MR, et al. There are no racial, age, sex, or weight differences in the effect of salt on blood pressure in salt-sensitive hypertensive patients. *Arch Intern Med*. 1997 Nov 24; 157(21): 2489-94
- 100) 家森幸男 日本人は高血圧人種? *CLINICIAN* '99 NO.481, p475-479
- 101) Aviv A, Hollenberg NK, Weder A. Urinary potassium excretion and sodium sensitivity in blacks. *Hypertension*. 2004 Apr; 43(4): 707-13. Epub 2004 Feb 16. Review.
- 102) Lindhorst J, Alexander N, Blignaut J, Rayner

- B. Differences in hypertension between blacks and whites: an overview. *Cardiovasc J Afr.* 2007 Jul-Aug; 18(4): 241-7. Review.
- 103) Young JH. Evolution of blood pressure regulation in humans. *Curr Hypertens Rep.* 2007 Mar; 9(1): 13-8. Review.
- 104) Katori M, Majima M. Are all individuals equally sensitive in the blood pressure to high salt intake? (Review article). *Acta Physiol Hung.* 2008 Sep; 95(3): 247-65. Review.
- 105) Dwivedi G, Beevers DG. Hypertension in ethnic groups: epidemiological and clinical perspectives. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2009 Aug; 7(8): 955-63.
- 106) Kojima S, Inenaga T, Matsuoka H, Kuramochi M, Omae T, Nara Y, Yamori Y. The association between salt sensitivity of blood pressure and some polymorphic factors. *J Hypertens.* 1994 Jul; 12(7): 797-801.
- 107) Hiraga H, Oshima T, Watanabe M, Ishida M, Ishida T, Shingu T, Kambe M, Matsuura H, Kajiyama G. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension.* 1996 Mar; 27(3 Pt 2): 569-72.
- 108) 藤田孝之, 石上友章, 日比潔, 田村功一, 木原実, 小林泉, 落合久夫, 梅村敏, 石井當男, 川崎晃一 「食塩感受性の遺伝的因子としてのACE遺伝子多型についての検討: ネパール人と本邦人の集団遺伝学的検討」 *Japanese circulation journal* 62 (Supplement I) 307 19980228 00471828
- 109) 香川靖雄, 柳沢佳子, 阿部三枝子, 佐藤史 「遺伝子多型と日本人の栄養」 *栄養学雑誌*, 59(5): 213~220, 2001.
- 110) Katsuya T, Ishikawa K, Sugimoto K, Rakugi H, Ogihara T. Salt sensitivity of Japanese from the viewpoint of gene polymorphism. *Hypertens Res.* 2003 Jul; 26(7): 521-5. Review.
- 111) Swift PA, Macgregor GA. Genetic variation in the epithelial sodium channel: a risk factor for hypertension in people of African origin. *Adv Ren Replace Ther.* 2004 Jan; 11(1): 76-86. Review.
- 112) Jones DW. Dietary sodium and blood pressure. *Hypertension.* 2004 May; 43(5): 932-5. Epub 2004 Mar 29. Review. No abstract available.
- 113) Wrona A, Widecka K, Adler G, Czekalski S, Ciechanowicz A. [Promoter variants of aldosterone synthase gene (CYP11B2) and salt-sensitivity of blood pressure] *Pol Arch Med Wewn.* 2004 Feb; 111(2): 191-7. Polish.
- 114) Yamagishi K, Iso H, Tanigawa T, Cui R, Kudo M, Shimamoto T. High sodium intake strengthens the association between angiotensinogen T174M polymorphism and blood pressure levels among lean men and women: a community-based study. *Hypertens Res.* 2004 Jan; 27(1): 53-60.
- 115) Matayoshi T, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Takami Y, Tanaka C, Banno M, Horio T, Nakamura S, Nakahama H, Yoshihara F, Inenaga T, Miyata T, Kawano Y. The thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter gene, C1784T, and adrenergic receptor-beta3 gene, T727C, may be gene polymorphisms susceptible to the antihypertensive effect of thiazide diuretics. *Hypertens Res.* 2004 Nov; 27(11): 821-33.
- 116) 眞田寛啓, 緑川早苗, 米田実 [他] 「食塩感受性高血圧の遺伝子指標としてのG蛋白質共役型受容体キナーゼ4 (GRK4) 遺伝子多型の意義 (プロジェクト研究 (医学: 2年度) 心・血管系における食塩感受性を規定する因子の解明) 財団法人ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告集 2005年度, 21-27, 2005
- 117) Isaji M, Mune T, Takada N, Yamamoto Y, Suwa T, Morita H, Takeda J, White PC. Correlation between left ventricular mass and urinary sodium excretion in specific genotypes of CYP11B2. *J Hypertens.* 2005 Jun; 23(6): 1149-57

- 118) Tamaki S, Nakamura Y, et al. Combined analysis of polymorphisms in angiotensinogen and adducin genes and their effects on hypertension in a Japanese sample: The Shigaraki Study. *Hypertens Res*. 2005 Aug; 28(8): 645-50.
- 119) Sanada H, Yatabe J, et al. M, Jose PA, Felder RA. Single-nucleotide polymorphisms for diagnosis of salt-sensitive hypertension. *Clin Chem*. 2006 Mar; 52(3): 352-60. Epub 2006 Jan 26.
- 120) Katori M, Majima M. A missing link between a high salt intake and blood pressure increase. *J Pharmacol Sci*. 2006; 100(5): 370-90. Epub 2006 Apr 29.
- 121) Katori M, Majima M. Are all individuals equally sensitive in the blood pressure to high salt intake? (Review article). *Acta Physiol Hung*. 2008 Sep; 95(3): 247-65. Review.
- 122) Cohen HW. Who is salt-sensitive? *Am J Hypertens*. 2008 Dec; 21(12): 1274. No abstract available
- 123) Zhang L, Miyaki K, Wang W, Muramatsu M. CYP3A5 polymorphism and sensitivity of blood pressure to dietary salt in Japanese men. *J Hum Hypertens*. 2009 Oct 8. [Epub ahead of print]
- 124) Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, Hasstedt SJ, Wu LL, Lalouel JM. Tabulations and expectations regarding the genetics of human hypertension. *Kidney Int Suppl*. 1994 Jan; 44: S57-64. Review.
- 125) Kuriyama S, Tomonari H, Tokudome G, Kaguchi Y, Hayashi H, Kobayashi H, Horiguchi M, Ishikawa M, Hara Y, Hosoya T., Association of angiotensinogen gene polymorphism with erythropoietin-induced hypertension: a preliminary report. *Hypertens Res*. 2001 Sep; 24(5): 501-5.
- 126) Franco V, Oparil S. Salt sensitivity, a determinant of blood pressure, cardiovascular disease and survival. *J Am Coll Nutr*. 2006 Jun; 25(3 Suppl): 247S-255S. Review
- 127) Mashimo Y, Suzuki Y, Hatori K, Tabara Y, Miki T, Tokunaga K, Katsuya T, Ogihara T, Yamada M, Takahashi N, Makita Y, Nakayama T, Soma M, Hirawa N, Umemura S, Ohkubo T, Imai Y, Hata A. Association of TNFRSF4 gene polymorphisms with essential hypertension. *J Hypertens*. 2008 May; 26(5): 902-13.
- 128) Rudnicki M, Mayer G. Significance of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular and renal disease., *Pharmacogenomics*. 2009 Mar; 10(3): 463-76. Review.
- 129) 吉村学, 高橋伯夫, 中西正「ナトリウム, カリウム, カルシウム, マグネシウムの昇圧・降圧機序と高血圧食事療法」*栄養学雑誌*, 49(2): 53~62, 1991.
- 130) 木村玄次郎「食塩感受性・非感受性高血圧」*Pharma Medica*, 18(6): 63-68, 2000.
- 131) Zoccali C, Mallamaci F. The salt epidemic: old and new concerns. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000 Jun; 10(3): 168-71. Review.
- 132) Isezu SA. Systemic hypertension in blacks: an overview of current concepts of pathogenesis and management. *Niger Postgrad Med J*. 2003 Sep; 10(3): 144-53. Review.
- 133) 中元昌則, 三浦理菜, 大野裕子, 亀井俊朗, 後岡祐輔, 大山清香, 木村悠希, 名引順子, 足立友美, 植田福裕, 池田美千子, 中島譲, 原納優「大学生における24時間血圧モニターによる塩分感受性と夜間血圧低下 (dipper) の評価—日常又は外来レベルでの24時間血圧モニター」*日本病態栄養学会誌*, 8(3): 219-227, 2005.
- 134) Fang Y, Mu JJ, He LC, Wang SC, Liu ZQ., Salt loading on plasma asymmetrical dimethylarginine and the protective role of potassium supplement in normotensive salt-sensitive asians. *Hypertension*. 2006 Oct; 48(4): 724-9. Epub 2006 Sep 11.
- 135) Suzuki H, Takenaka T, Kanno Y, Ohno Y,

- Saruta T., Sodium and kidney disease. *Contrib Nephrol.* 2007; 155: 90-101. Review
- 136) Chen J, Gu D, Huang J, et al. Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *Lancet.* 2009 Mar 7; 373(9666): 829-35. Epub 2009 Feb 14.
- 137) 齊藤憲, 晴山信一, 小柳達男「高食塩飼料を与えたシロネズミの血圧および尿中ナトリウム排泄に及ぼすコンブの影響」*栄養と食糧* Vol.24 No.1, 20-24(1971)
- 138) Yamori Y. Overview: studies on spontaneous hypertension-development from animal models toward man. *Clin Exp Hypertens A.* 1991; 13(5): 631-44. Review.
- 139) Iwai N, Tsujita Y, Kinoshita M. Isolation of a chromosome 1 region that contributes to high blood pressure and salt sensitivity. *Hypertension.* 1998 Oct; 32(4): 636-8.
- 140) Takeuchi K. Molecular biology of blood pressure regulatory genes. *Tohoku J Exp Med.* 2002 May; 197(1): 1-8. Review.
- 141) Katori M, Majima M. The renal kallikrein-kinin system: its role as a safety valve for excess sodium intake, and its attenuation as a possible etiologic factor in salt-sensitive hypertension. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003 Feb; 40(1): 43-115. Review.
- 142) Ogihara T, Asano T, Fujita T. Contribution of salt intake to insulin resistance associated with hypertension. *Life Sci.* 2003 Jun 20; 73(5): 509-23. Review.
- 143) 長澤将, 森建文, 伊藤貞嘉「食塩感受性ラット」*血圧*, 14(10): 963-969, 2007.
- 144) Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N, Maeda K, Shibata R, Walsh K, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. *Hypertension.* 2006 Jun; 47(6): 1108-16. Epub 2006 May 1. Erratum in: *Hypertension.* 2007 Feb; 49(2): e14.
- 145) Galanis DJ, Kolonel LN, Lee J, Nomura A. Intakes of selected foods and beverages and the incidence of gastric cancer among the Japanese residents of Hawaii: a prospective study. *Int J Epidemiol.* 1998
- 146) Watanabe T, Miyasaka M, Koizumi A, Ikeda M. Regional difference in sodium chloride content in home-made and store-bought preparations of miso paste. *Tohoku J Exp Med.* 1982 Jul; 137(3): 305-13. Links
- 147) 壺坂美智子, 島利恵美子「本学学生における味噌汁摂取頻度ならびに食塩濃度」*甲子園短期大学紀要* 4, 39-45, 1984, 1010
- 148) 田磨幸子「食生活に関する一考察(第4報): 年代・住環境別の副食傾向について」*Beacon* 22, 67-74, 19870310
- 149) 壺坂美智子, 西村智子「本学学生における味噌汁摂取頻度ならびに食塩濃度: 第2報 昭和59年以降の追跡調査」*甲子園短期大学紀要* 9, 21-30, 1989, 1225
- 150) 深見良子「味噌汁の塩分濃度から見た女子短大生の塩分嗜好と塩分摂取の問題点」*帝塚山短期大学紀要. 人文・社会科学編・自然科学編* 30, 202-216, 19930300
- 151) 川島佳千子「看護学生の食物摂取状況に関する研究: 3年生と2年生の比較」*足利短期大学研究紀要* 16(1), 61-75, 19950401
- 152) 壺坂美智子, 福田友美「本学学生における味噌汁摂取頻度ならびに食塩濃度: 第3報 食塩摂取量再上昇との関連」*甲子園短期大学紀要* 15, 7-15, 1997, 0301
- 153) 西堀すき江「日本人の食生活に関する研究(第6報): 味噌汁の摂取状況」*紀要 Bulletin* 32 pp.73-84 19970901
- 154) 小菅充子, 橘庸子, 柳沢幸江, 大島文枝「本学学生の食生活等に関する調査」*和洋女子大学紀要. 家政系編* 39, 45-56, 1999030
- 155) Ogawa K, Tsubono Y, Nishino Y, Watanabe Y, Ohkubo T, Watanabe T, Nakatsuka H, Takahashi N, Kawamura M, Tsuji I, Hisamichi S. Dietary sources of nutrient consumption in a rural Japanese population.

- J Epidemiol. 2002 Jan; 12(1): 1-8.
- 156) Iso H, Date C, Noda H, Yoshimura T, Tamakoshi A; JACC Study Group. Frequency of food intake and estimated nutrient intake among men and women: the JACC Study. J Epidemiol. 2005 Mar; 15 Suppl 1: S24-42
- 157) 山田芳子, 岩崎ひろ子, 片山信, 金津良一, 丹羽壮一「三重県における地域別食生活実態の公衆栄養学的考察: 第11報 三重県における鈴鹿市庄野小学校区および大山田村東小学校区住民のみそ汁食塩濃度とその減塩意識について」鈴鹿短期大学紀要 3, 31-41, 19821200
- 158) 中野典子, 森奥登志江「名古屋周辺地区の中高齢者の食生活状況—味噌汁と煮物の食塩量—」栄養学雑誌, 42(6): 351~360, 1984.
- 159) 大野幸子, 青木比佐枝, 浅草すみ「簡易測定紙によるみそ汁食塩濃度の測定精度」栄養学雑誌, 47(3): 151~156, 1989.
- 160) 上野洋子「食塩の摂取量に関する研究(3): 味噌汁一碗分の食塩について」北海道教育大学紀要. 第二部. C, 家庭・養護・体育編 39(2), 1-8, 19890300
- 161) 上野洋子「食塩の摂取量に関する研究(4): 味噌汁の風味, 好みについて」北海道教育大学紀要. 第二部. C, 家庭・養護・体育編 40(1), 9-16, 1989, 1000
- 162) 松井千恵子, 鈴木里子, 会田久仁子, 角野猛, 山田幸「福島県岩瀬地方の自家製みその水分活性, ナトリウム, カリウム含量及び遊離アミノ酸組成について」栄養学雑誌, 52(5): 251~257, 1994.
- 163) 小菅 充子「本学学生の実験室における汁物の食塩濃度の経年変化」和洋女子大学紀要. 家政系編 34, 45-53, 19940331
- 164) 野崎恵子「味噌汁中の塩分量の年次推移について」紀要 Annual reports of studies 41 pp. 63- 69 19971200
- 165) Sasaki S, Kobayashi M, et al. Self-administered food frequency questionnaire used in the 5-year follow-up survey of the JPHC Study: questionnaire structure, computation algorithms, and area-based mean intake. J Epidemiol. 2003 Jan; 13(1 Suppl): S13-22. Links
- 166) 堀尾強「転載 味噌汁における塩分嗜好の家族類似性」味噌の科学と技術 56(2), (636) 81~87, 2008/3
- 167) 角南重夫 他「女子の血圧と味噌汁の食塩濃度の関係」医学と生物学 99(3), p195-199, 1979/09
- 168) 渡辺瑞代, 越山日出子, 衛藤京子, 渡辺真理子, 一色純子, 佐藤康子, 二井万寿, 青木久美子, 花守やす子, 弓場紀子, 坂下優子, 西田ゆかり, 堀後淳子, 森本みゆき, 岩崎ひろ子, 山田芳子, 金津良一, 丹羽壮一「三重県地域住民に対するみそ汁の減塩指導の実践についての検討」鈴鹿短期大学紀要 4, 39-47, 19840200
- 169) Kanda A, Hoshiyama Y, Kawaguchi T., Association of lifestyle parameters with the prevention of hypertension in elderly Japanese men and women: a four-year follow-up of normotensive subjects. Asia Pac J Public Health. 1999; 11(2): 77-81.
- 170) 石崎由美子, 山中隆夫, 草野健, 尾上佳代子, 青山公治, 内野政子, 若原延子, 松下敏夫「農村地域における食品摂取頻度にみる食生活状況」日本農村医学会雑誌, 49(4): 638, 2000.
- 171) Nakamura M, Aoki N, Yamada T, Kubo N. Feasibility and effect on blood pressure of 6-week trial of low sodium soy sauce and miso (fermented soybean paste). Circ J. 2003 Jun; 67(6): 530-4.
- 172) 渡辺敦光「味噌の塩分が血圧や胃がんに及ぼす影響」味噌の科学と技術 54(6), (628) 327~339, 2006/11
- 173) Watanabe H, Kashimoto N, Kajimura J, Kamiya K. A miso (Japanese soybean paste) diet conferred greater protection against hypertension than a sodium chloride diet in Dahl salt-sensitive rats. Hypertens Res. 2006 Sep; 29(9): 731-8.
- 174) Yamakoshi J, Fukuda S, Satoh T, Tsuji R,

- Saito M, Obata A, Matsuyama A, Kikuchi M, Kawasaki T. Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 Jan; 71(1): 165-73. Epub 2007 Jan 7.
- 175) 友利知子, 金城須美子「沖縄における蛋白性食品の消費構造について (家政学科)」琉球大学農学 学術報告16, 347-355, 19691001
- 176) Sacks FM, Wood PG, Kass EH. Stability of blood pressure in vegetarians receiving dietary protein supplements. *Hypertension.* 1984 Mar-Apr; 6(2 Pt 1): 199-201.
- 177) Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.* 2001 Jan; 49(1): 501-6.
- 178) Shin ZI, Yu R, Park SA, et al. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *J Agric Food Chem.* 2001 Jun; 49(6): 3004-9.
- 179) Matoba N, Yamada Y, Yoshikawa M. Design of a genetically modified soybean protein preventing hypertension based on an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2003 Jun; 1(2): 197-202
- 180) Nagata C, Shimizu H, et al. Association of blood pressure with intake of soy products and other food groups in Japanese men and women. *Prev Med.* 2003 Jun; 36(6): 692-7.
- 181) Yang G, Shu XO, Jin F, Zhang X, Li HL, Li Q, Gao YT, Zheng W. Longitudinal study of soy food intake and blood pressure among middle-aged and elderly Chinese women. *Am J Clin Nutr.* 2005 May; 81(5): 1012-7.
- 182) He J, Gu D, Wu X, Chen J, Duan X, Chen J, Whelton PK. Effect of soybean protein on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2005 Jul 5; 143(1): 1-9.
- 183) Welty FK, Lee KS, Lew NS, Zhou JR. Effect of soy nuts on blood pressure and lipid levels in hypertensive, prehypertensive, and normotensive postmenopausal women. *Arch Intern Med.* 2007 May 28; 167(10): 1060-7.
- 184) Nasca MM, Zhou JR, Welty FK. Effect of soy nuts on adhesion molecules and markers of inflammation in hypertensive and normotensive postmenopausal women. *Am J Cardiol.* 2008 Jul 1; 102(1): 84-6. Epub 2008 Apr 16.
- 185) Pan A, Franco OH, Ye J, Demark-Wahnefried W, Ye X, Yu Z, Li H, Lin X. Soy protein intake has sex-specific effects on the risk of metabolic syndrome in middle-aged and elderly Chinese. *J Nutr.* 2008 Dec; 138 (12): 2413-21.
- 186) Kimira M, Arai Y, Shimoi K, Watanabe S. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol.* 1998 Aug; 8(3):168-75.
- 187) Moline J, Bukharovich IF, Wolff MS, Phillips R. Dietary flavonoids and hypertension: is there a link? *Med Hypotheses.* 2000 Oct; 55(4): 306-9.
- 188) Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Bots ML, Grobbee DE, van der Schouw YT. Dietary phytoestrogens and vascular function in postmenopausal women: a cross-sectional study. *J Hypertens.* 2004 Jul; 22(7): 1381-8.
- 189) Sagara M, Kanda T, Njelekera M, Teramoto T, Armitage L, Birt N, Birt C, Yamori Y., Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle-aged men in Scotland. *J Am Coll Nutr.* 2004 Feb; 23(1): 85-91.
- 190) Yamori Y. Worldwide epidemic of obesity: hope for Japanese diets. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 Dec; 31 Suppl 2: S2-4.
- 191) Liang YL, Teede H, Dalais F, McGrath BP. The effects of phytoestrogen on blood pressure and lipids in healthy volunteers. *Zhonghua*

- Xin Xue Guan Bing Za Zhi. 2006 Aug; 34(8): 726-9. Chinese.
- 192) Teede HJ, Giannopoulos D, Dalais FS, Hodgson J, McGrath BP. Randomised, controlled, cross-over trial of soy protein with isoflavones on blood pressure and arterial function in hypertensive subjects. *J Am Coll Nutr.* 2006 Dec; 25(6): 533-40.
- 193) Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Winston M; Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation.* 2006 Feb 21; 113(7): 1034-44. Epub 2006 Jan 17.
- 194) Douglas G, Armitage JA, Taylor PD, Lawson JR, Mann GE, Poston L., Cardiovascular consequences of life-long exposure to dietary isoflavones in the rat. *J Physiol.* 2006 Mar 1; 571(Pt 2): 477-87. Epub 2006 Jan 12.
- 195) Rosero Arenas MA, Rosero Arenas E, Portaceli Arminana MA, Garcia Garcia MA. [Usefulness of phyto-oestrogens in reduction of blood pressure. Systematic review and meta-analysis] *Aten Primaria.* 2008 Apr; 40(4): 177-86. Review. Spanish.
- 196) 橋本壽夫「食塩感受性を検出する試験の一例」「塩と健康の科学」シリーズ, たばこ産業塩専売版 1995. 02. 25
- 197) 岡本章子, 柳田藤治「シリーズ/ダイズのヘルシーテクノロジー (8) 大豆発酵食品の機能性-- アンギオテンシン変換酵素阻害能と高血圧抑制作用を中心として」*食品工業*, 40 (8) 70-79(1997)
- 198) 河村幸雄「ダイズのヘルシーテクノロジー— 10—大豆タンパク質のアンギオテンシン変換酵素阻害ペプチドと血圧降下作用」*食品工業*, 40 (12) 73-82(1997)

謝辞

本研究は、(社)中央味噌研究所「平成20年度委託研究」(別紙参照)によるもので、研究遂行に当たりご配慮賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。また、文献収集に当たって、多大のご協力をいただきました古川知子氏(女子栄養大学生涯学習講師)に厚く御礼申し上げます。

(平成23年 8月31日)

習慣的な味噌摂取と高血圧および 生活習慣病予防に関する臨床的研究

上原 誉志夫

The Role of Long-term Miso Preferences in Protection of Hypertension and
Metabolic Disorders in Humans

Yoshio UEHARA

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

はじめに

発酵技術を駆使した味噌は代表的な日本の食文化の一つである。その歴史は、遠く大宝令(701年)にさかのぼり、927年の延喜式には生活に溶け込んだ味噌の様子が記載されている。味噌はさまざまな栄養素を豊富に含み、健康維持や生活習慣病予防への効果が期待されてきた。しかし、一方で含有される食塩に対する懸念から、味噌の健康におよぼす効果について過少評価されてきたきらいがある。味噌には食塩以外に多くの栄養素が含まれ、これらの栄養素には消化管でのナトリウム吸収を抑制する作用や血管壁への直接的な保護作用も期待されことから、食塩による影響以上に血管臓器への保護効果が高いことが推察される。これらを背景に、本研究では食品としての味噌の健康への有用性を科学的に実証し、日本食文化のよさを広く世界に発信するため、長期的な味噌の摂取習慣が及ぼす高血圧や生活習慣病への予防効果、脳卒中・心疾患・腎障害発症防止効果について、全国的な疫学的データの解析、健康診断集団

での横断的研究、また味噌に含まれる食塩の意義について基礎的、臨床的に検討した。

I 味噌と健康に関する全国的疫学データ解析

食塩と高血圧は半世紀におよぶ高血圧研究のメイン・テーマであり、未だに多くの研究者の興味を引く、古くて新しい問題である¹⁾。食塩と高血圧の関連性については、これまで国内外での多くの疫学調査があ。Intersalt研究をはじめとした国際的調査によると食塩摂取量と血圧値と間には一定の関係があることが実証されている²⁾。しかし、たとえば、日本国内のような狭い地域間での食塩摂取量と血圧値との間には関連性が認められないことが多い。

ところで、味噌には現在製法上の工夫がなされ、含有される食塩量も一食あたり1グラムほどに低下している。一部の味噌では、0.5グラムを達成している。しかし、味噌と塩への理解は未だ

十分ではなく、また、味噌と血圧、生活習慣病との関係については科学的検証に乏しいのも事実である。疫学的統計データも味噌の食品としての位置づけが一定でないため、長期のデータについては限界がある。食塩消費量と血圧や脳・心・腎などの血管臓器障害との関係が味噌にも外挿できるか科学的には必ずしも明らかではない。これらの問題点について現在検証できる範囲で答えを得るため、本研究では現在利用可能な疫学調査結果を用いて、味噌と生活習慣病受診状況との関係を統計学的に解析し、生活習慣病予防効果の有無について検討した。

解析のために以下のデータベースを用いた。

- ① 1世帯・1人当たり年間味噌支出金額・購入数量 1970-2010 および味噌1人当たり地域別購入数量・単価 1971-2010 総務省「家計調査」(全国味噌工業協同組合連合会) (<http://www.zenmi.jp/data.htm>)
- ② 専売制度下における塩の消費量 (財団法人塩事業センター) (<http://www.shiojigyo.com/>)
- ③ 厚生労働省 国民健康・栄養調査 (平成6-21年) (http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou_eiyou_chousa.html)
- ④ 厚生労働省 患者調査 (平成17年度版)
- ⑤ 厚生労働省 人口統計

1) 味噌購入量の年次変化

味噌の1世帯当たりまたは1人当たりの購入量の年次変化を図1に示した。2011年の時点で

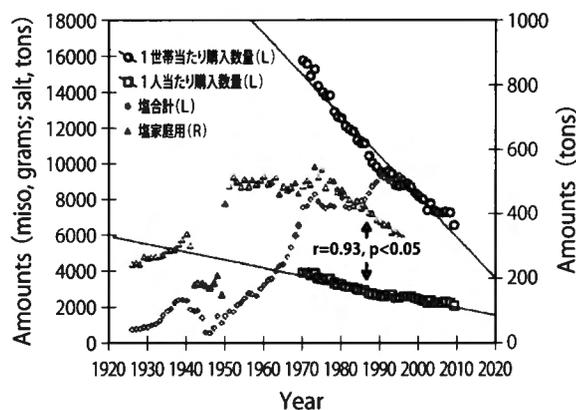


図1 1人当たり味噌購入量と家庭塩の年次変化

1970-2009年までの統計資料が利用可能であった。この40年間、1人当たり味噌購入量は減少を続け、最近では1970年代の約50%まで減少している。一方、食塩の家庭での使用状況(1975-1996年)は味噌と同様に1975年ごろから減少しはじめ、統計データの解析可能な年次のみで相関関係を算出すると、図に記載したように両者の間には $r=0.93$ ($p<0.05$) という高い正の相関関係がみられた。

国民健康・栄養調査の結果でも、1985年1人当たり1日の食塩摂取量は12.1グラムであり、1999年に12.3グラムのあと漸減し、2009年には10.3グラムまで低下している。日本高血圧学会2009では食塩摂取量を1日6グラム未満としたが、日本における減塩の傾向はそれより30年以上も前から生じていたことがわかる⁹⁾。公衆衛生学的な減塩への試みとともに、食生活の欧米化にともなう食品構成の変化も味噌購入量減少の原因となることが窺えた。

2) 味噌購入量と各種生活習慣関連疾患の受療状況

厚生労働省による患者調査の結果で現在利用可能な最新版は平成17年患者調査である。このデータベースには1979-2005年までの各疾患別の受診者数が掲載され、年次経過のデータが使用可能となっている。したがって、1979-2005年のデータを用いて、味噌購入量と家庭用食塩量との年次的な関係について検討した(図2)。

受療者数(単位:1000人)は、糖尿病(DM)との間に $r=-0.84$ の負の相関関係がみられた。同様に、腎疾患とは $r=-0.90$ 、悪性新生物とは $r=-0.95$ の負の相関関係がみられた。一方、虚血性心疾患とは $r=0.94$ の正の相関関係がみとめられた。高血圧および脳血管障害との間には一定の関係がみられなかった。

本研究では、単相関での解析であることから、味噌購入量と疾患受療者数との間の因果関係は不明である。この成績からは、味噌購入量が多いほど、糖尿病、腎疾患および悪性新生物の受療者数が減少し、一方心疾患が増加することを示している。これには、近年の味噌購入量の減少と糖尿

味噌購入量と受療率の関係

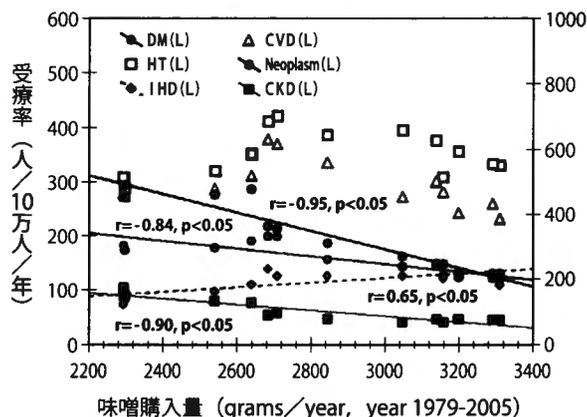


図2 味噌購入量と家庭用食塩量との年次の関係
DM, 糖尿病; HT, 高血圧症; IHD, 虚血性心臓病;
CVD, 脳血管障害; Neoplasm, 悪性新生物;
CKD, 慢性腎臓病

病, 腎臓病や悪性新生物が増加してきた社会的な疾病構造の変化が原因していることも考えられるが, 食塩と最も関連性が強いと考えられる高血圧や脳卒中との関連が明確でなかったことは, 味噌購入量減から見込まれる食塩摂取量の低下は高血圧受診率の低下と関連がないこと, 換言すれば, 味噌から摂取される食塩量は高血圧の受療率の変化には関係しないことが考えられた。これらの可能性を明確にするには, 集団における横断的調査, または前向き観察研究が必要であると判断された。

3) 日本の地域別味噌購入量と各種生活習慣関連疾患の受療状況

われわれは, 厚生労働省患者調査のうち最新版(平成17年度版)を用いて, 日本の地域別味噌購

入量と各種生活習慣関連疾患の受療状況との関連を調べた(表1)。

日本全国を10地域(北海道, 東北地方, 関東地方, 北陸地方, 東海地方, 近畿地方, 中国地方, 四国地方, 九州地方および沖縄地方)に分け, それぞれの地域での味噌購入量と各種疾患受療率(人口10万人当たりで算出)との関係を調べた。表は味噌購入量とこれら疾患受療率の間の単相関関係を示した。日本国内での横断的調査では, 味噌購入量と各種疾患の間には一定の関係がみられなかった。

横断的調査で味噌購入量と各種生活習慣関連疾患の受療状況でみられたような関連性はみられなかったが, 一般的に食塩と高血圧の関連も国際間では関連性がみられるものの, 日本国内での調査では関係を実証することが難しく, 原因は不明であるが, 分布域が狭いことも一因と考えられた。

4) 文献

- 1) Adrogle JH, Madias NE: Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. N Engl J Med 356;1996, 2007.
- 2) Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group BMJ 297 (6644):319, 1988.
- 3) 高血圧治療ガイドライン2009. 日本高血圧学会/ライフサイエンス出版, 2009.

表1 日本の地域別味噌購入量と各種疾患受診率との関連

	Miso	Cancer	Stomach Ca	DM	HT	HD	IHD	CVD
Miso	1.00	-0.27	-0.07	-0.28	0.15	-0.04	0.06	0.11
Cancer	-0.27	1.00	0.76	0.71	0.71	0.66	0.57	0.55
Stomach Ca	-0.07	0.76	1.00	0.56	0.54	0.66	0.48	0.48
DM	-0.28	0.71	0.56	1.00	0.72	0.88	0.86	0.81
HT	0.15	0.71	0.54	0.72	1.00	0.84	0.85	0.87
HD	-0.04	0.66	0.66	0.88	0.84	1.00	0.96	0.89
IHD	0.06	0.57	0.48	0.86	0.85	0.96	1.00	0.89
CVD	0.11	0.55	0.48	0.81	0.87	0.89	0.89	1.00

II 厚生労働省 国民健康・栄養調査(平成6-21年)からの食塩摂取量と各種疾患の受療率との関連

平成6-21年度の国民健康・栄養調査は食事摂取状況を聞き取り調査し、そのデータをもとに各種栄養素の摂取量を年次的に調査追跡したものである。本調査結果は、各年度に実際食している栄養素量を算出することからより実態に即した、信頼性が高い成績と考えられる。この調査項目には、味噌摂取量が単独で算出されていないため、このデータを味噌の解析には使用できない。しかし、食塩については年次的に算出されていることから、実態に即した摂取状況を把握することができる。本データを使用して、食塩摂取量と各種疾患での受療率の年次傾向と関係を検討した。表には各項目の単相関係数を示し、相関係数で有意な値は赤字で印した。表2に示すように、食塩摂

取量はいずれの疾患受療率との間に一定の関連がみられなかった。

III 健康診断データと食事嗜好性聞き取り調査

国民健康・栄養調査における味噌摂取量の扱いは、調味料としてまとめられているため、その内訳については明らかではない。日本の国民が1人当たり味噌を実際どの程度摂取しているか、全国的調査はないため食塩と同様な解析はできない。味噌と生活習慣病関連疾患罹患との関係をより正確に検出するためには、観察研究または横断調査が必要である。

これらの点を踏まえて、味噌摂取と健康との関連を明らかにするため、東京都内の中規模病院での人間ドック受診者に対して、聞き取り法による

表2 国民健康・栄養調査でみる食塩摂取量と各種疾患受診率との関係

	DM	HT	IHD	CVD	Neoplasm	CKD	energy	protein	lipid	carbohydrate	Ca	NaCl
DM	1.00	0.35	-0.26	0.78	0.82	0.61	-0.69	-0.07	0.44	-0.82	-0.15	0.10
HT	0.35	1.00	0.71	0.67	-0.19	-0.47	0.28	0.54	0.37	0.15	0.51	0.19
IHD	-0.26	0.71	1.00	0.24	-0.70	-0.84	0.80	0.73	0.18	0.72	0.71	0.32
CVD	0.78	0.67	0.24	1.00	0.35	0.06	-0.23	0.22	0.45	-0.38	0.16	0.09
Neoplasm	0.82	-0.19	-0.70	0.35	1.00	0.92	-0.90	-0.33	0.30	-0.98	-0.38	-0.01
CKD	0.61	-0.47	-0.84	0.06	0.92	1.00	-0.91	-0.55	0.03	-0.89	-0.60	-0.09
energy	-0.69	0.28	0.80	-0.23	-0.90	-0.91	1.00	0.63	0.11	0.91	0.59	0.15
protein	-0.07	0.54	0.73	0.22	-0.33	-0.55	0.63	1.00	0.61	0.37	0.95	0.60
lipid	0.44	0.37	0.18	0.45	0.30	0.03	0.11	0.61	1.00	-0.30	0.44	0.13
carbohydrate	-0.82	0.15	0.72	-0.38	-0.98	-0.89	0.91	0.37	-0.30	1.00	0.40	0.12
Ca	-0.15	0.51	0.71	0.16	-0.38	-0.60	0.59	0.95	0.44	0.40	1.00	0.61
NaCl	0.10	0.19	0.32	0.09	-0.01	-0.09	0.15	0.60	0.13	0.12	0.61	1.00

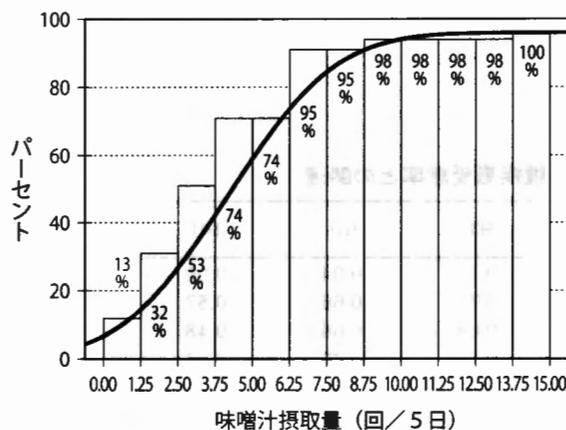


図3 味噌汁摂取の累積回数

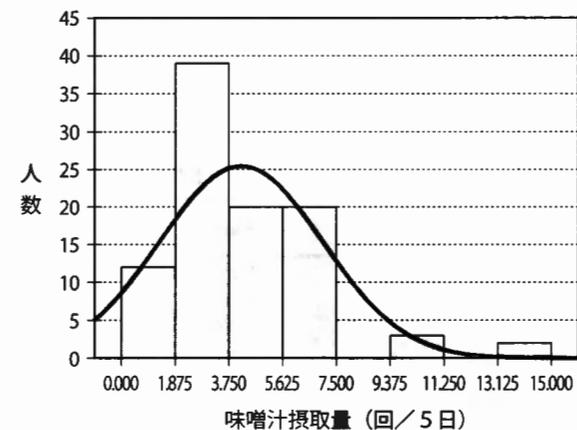


図4 味噌汁摂取回数の分布

味噌汁摂取回数を含む食事嗜好性調査を実施し、人間ドックでの成績との関連性について調べた。食事嗜好性調査は、食物摂取頻度調査 (FFQ g Ver3.0) (1)を用い、結果の解析は分散分析と重回帰分析によった。味噌摂取量については、5日間に摂取する回数で評価し調査した。味噌汁摂取回数の積算の分布を図3に示した。5日間の味噌汁摂取回数は、対象者の半数で3.75回以下であり、1日で計算すると0.75回であった。た、約90%の対象者では6.25回以下であった。さらに図4には、味噌汁摂取回数の分布を示す。一番多い摂取回数は2-4回/5日であり、この分布からも大多数の対象者では、平均的には1日1回摂取するか、しないかの状況にあることが分かった。さらに、この分布から、大多数のグループとは別に、毎日2-3回摂取している高摂取グループのいることも示された。また、図5には、この集団における食塩摂取の分布を示した。92%は1日10-12グラムの摂取量であった。味噌汁一杯で、現在研究室で使用している、市販されている味噌の食塩含量が約13%であり、一杯8グラム使用すると1グラムの食塩摂取になることから、食塩摂取量における味噌汁一杯の寄与率は約10%と推定された。

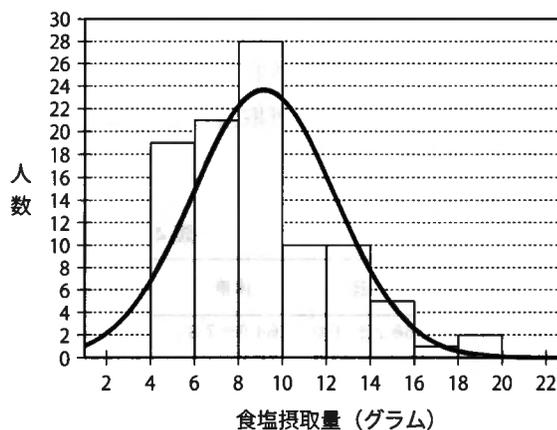


図5 食塩摂取量の分布

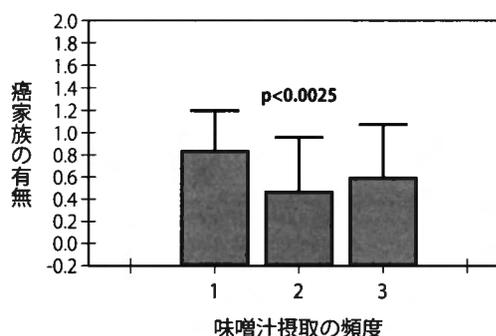


図6 味噌摂取回数と家族内癌発症との関係

1) 疾病の家族歴と味噌汁摂取回数との関係

このような集団を用いて、各種疾病の家族歴と味噌汁摂取回数との関係について検討した。味噌汁の摂取回数は、0-2回をカテゴリ1、3-5回をカテゴリ2、そして5-15回をカテゴリ3とし、各群間での違いを分散分析を用いて統計学的に検

討した。調査項目は、高血圧、糖尿病、脂質異常症、脳卒中、心臓病、癌の6疾患とした。図6にも示される通り味噌摂取回数の増加とともに、家族内での癌の発症が有意に低下することが示された。1日1回の摂取で癌発症が低下する可能性が示された。

一方、脳卒中の発症は味噌汁摂取回数の多いもので増加するが、これは図5の分布で1日2回以上摂取する集団に起因することが分かった。これ

表3 味噌および食塩摂取量と各疾患の家族内発症

カテゴリ	高血圧症	糖尿病	脂質異常症	脳卒中	心臓病	癌
味噌 1	0.677±0.475	0.354±0.486	0.290±0.461	0.225±0.425	0.290±0.461	0.838±0.373
味噌 2	0.625±0.490	0.250±0.438	0.325±0.474	0.350±0.483	0.300±0.464	0.475±0.505
味噌 3	0.680±0.476	0.320±0.476	0.400±0.500	0.600±0.500	0.160±0.374	0.600±0.500
p value	ns	ns	ns	<0.025	ns	<0.01
食塩 1	0.631±0.495	0.315±0.477	0.368±0.495	0.210±0.418	0.368±0.495	0.684±0.477
食塩 2	0.617±0.493	0.382±0.493	0.294±0.462	0.500±0.507	0.294±0.462	0.588±0.499
食塩 3	0.697±0.464	0.232±0.427	0.348±0.482	0.348±0.482	0.186±0.393	0.627±0.489
p value	ns	ns	ns	ns	ns	ns

味噌：1, 0-2回/週 ; 2, 3-5回/週 ; 3, 6回以上/週。
食塩：1, 4-6グラム/日 ; 2, 6-9グラム/日 ; 3, 9グラム以上/日。

らの成績からは、味噌汁の摂取量は1日1回あれば十分であることも推測された。

この集団における食塩摂取量と各種疾患の家族

内発症との関係と比較した(表3)。食塩摂取量は各種疾患の家族内発症との間に関連性はみられなかった。特に味噌にみられた癌発症の低下が観

表4 味噌および食塩摂取量と身体計測値

カテゴリ	身長	体重	肥満度	BMI	体脂肪率	腹囲	収縮期血圧	拡張期血圧	
味噌	1	168.2±6.0	64.5±7.8	3.7±12.9	22.8±2.8	18.6±4.6	82.3±8.1	123±22	81±7
	2	163.2±21.9	66.5±7.1	6.7±10.2	23.5±2.2	20.2±4.0	83.8±6.4	123±13	79±8
	3	167.6±5.0	64.1±8.7	3.6±12.4	22.8±2.7	19.0±4.2	82.3±7.8	125±11	79±8
p value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
食塩	1	166.6±5.6	62.7±2.6	2.6±10.1	22.5±2.2	18.8±4.2	81.2±7.2	120±27	79±6
	2	162.7±23.7	64.4±8.2	2.8±11.9	22.8±2.6	18.5±4.4	82.3±7.6	123±12	80±9
	3	168.3±5.3	67.0±7.5	7.7±11.8	23.6±2.6	20.3±4.2	84.2±7.1	125±12	81±7
p value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

味噌：1, 0-2回/週 ; 2, 3-5回/週 ; 3, 6回以上/週。

食塩：1, 4-6グラム/日 ; 2, 6-9グラム/日 ; 3, 9グラム以上/日。

表5 味噌および食塩摂取量と血液検査 (ANOVA)

Variable	Analysis of Variance (DB-miso and must date in 病院のデータ 味噌汁を含む 必須項目) Marked effects are significant at p < .05000							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	P
赤血球数	0.8941	2	0.4470	33.5	93	0.360	1.242477	0.293415
ヘモグロビン	0.1942	2	0.0971	93.4	93	1.004	0.096708	0.907912
ヘマトクリット	44.1389	2	22.0695	2296.8	93	24.697	0.893607	0.412661
血小板数	210.7640	2	105.3820	175138.2	93	1883.206	0.055959	0.945610
白血球数	1.6649	2	0.8324	124.1	93	1.334	0.623929	0.538062

表6 味噌および食塩摂取量と血液生化学検査 (ANOVA)

Variable	Analysis of Variance : Marked effects are significant at p < .05000							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
総タンパク	0.03	2	0.015	10.6	93	0.114	0.131847	0.876638
アルブミン	0.10	2	0.049	3.6	93	0.039	1.275889	0.284024
A/G比	0.07	2	0.037	3.0	93	0.032	1.148499	0.321568
総ビリルビン	0.43	2	0.214	7.2	93	0.078	2.746634	0.069351
AST	169.14	2	84.571	4757.3	93	51.154	1.653259	0.197001
ALT	454.67	2	227.335	15749.2	93	169.346	1.342430	0.266224
γ-GTP	3249.00	2	1624.498	167154.7	93	1797.363	0.903823	0.408546
ALP	14436.40	2	7218.201	158393.6	93	1703.157	4.238131	0.017318
コリンエステラーゼ	11545.17	2	5772.583	526801.3	93	5664.530	1.019075	0.364923
LDH	760.39	2	380.193	80606.8	93	866.739	0.438648	0.646235
ZTT	15.52	2	7.758	597.1	93	6.421	1.208278	0.303357
血清アミラーゼ	459.83	2	229.914	60473.1	93	650.249	0.353578	0.703111
総コレステロール	42.67	2	21.334	80093.8	93	861.224	0.024772	0.975539
HDLコレステロール	589.21	2	294.607	23946.7	93	257.492	1.144142	0.322939
中性脂肪	8429.76	2	4214.878	795540.2	93	8554.196	0.492726	0.612544
LDLコレステロール	1477.91	2	738.956	89496.7	93	962.331	0.767882	0.466914
尿酸	1.05	2	0.527	99.5	93	1.070	0.492189	0.612870
空腹時血糖	413.75	2	206.875	28062.2	93	301.744	0.685597	0.506317
HbA1c	0.16	2	0.078	11.8	93	0.127	0.610973	0.544987
尿素窒素	10.52	2	5.258	1382.0	93	14.860	0.353833	0.702933
クレアチニン	0.01	2	0.007	1.0	93	0.011	0.612007	0.544431
ナトリウム	6.01	2	3.005	204.6	93	2.200	1.365998	0.260197
カリウム	0.07	2	0.035	7.7	93	0.083	0.426371	0.654144
クロール	2.42	2	1.211	350.2	93	3.766	0.321714	0.725709
カルシウム	81.71	2	40.853	5477.0	93	58.893	0.693688	0.502297
CRP	0.04	2	0.018	1.1	93	0.012	1.426576	0.245335

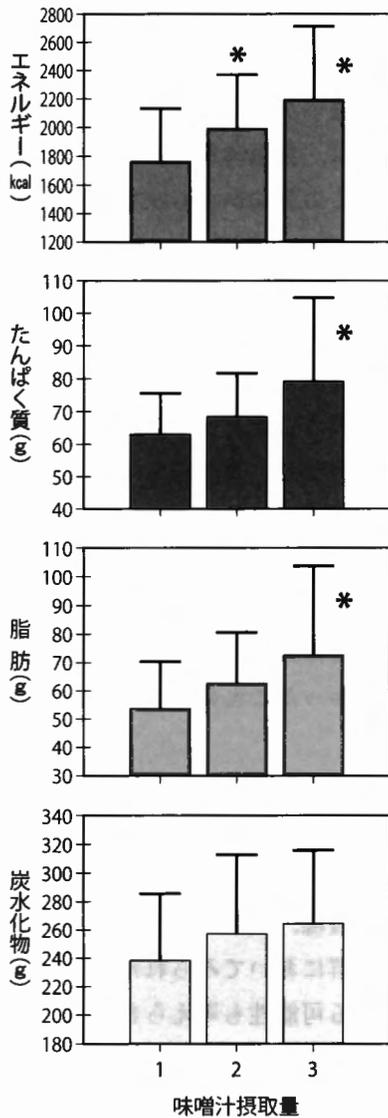


図7 味噌汁摂取と各種栄養素摂取量との関係

*p<0.05 vs Group 1

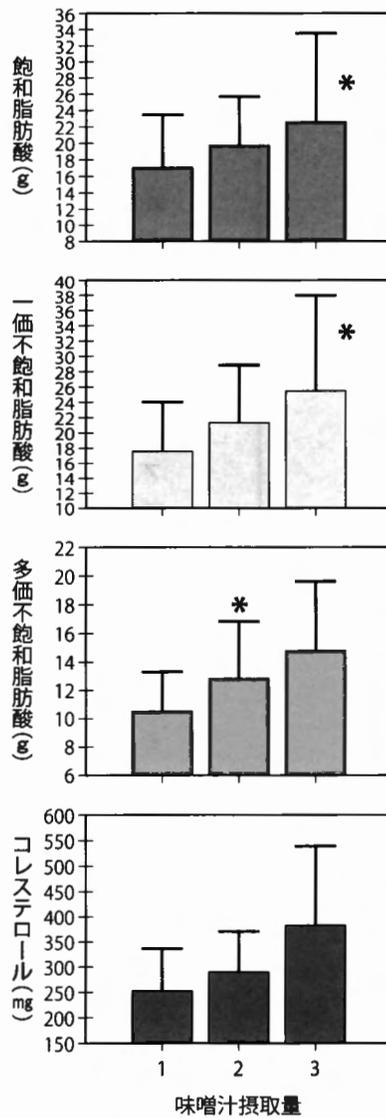


図8 味噌汁摂取と各種脂肪酸摂取量との関係

*p<0.05 vs Group 1

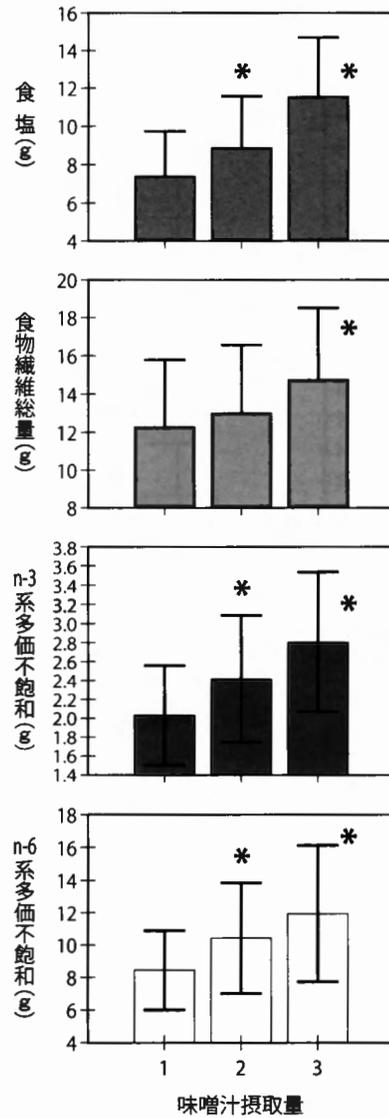


図9 味噌汁摂取と食塩・食物繊維・不飽和脂肪酸摂取量との関係

*p<0.05 vs Group 1

察されなかったことから、味噌の効果は含有される食塩によるものではないことが示唆された。

2) 味噌汁摂取回数と身体所見との関係

味噌汁摂取量と身体所見の間には表4に示す如く一定の関係がみられず、味噌摂取がBMIおよび血圧値に影響を与えないことが示された。これは表下段に示すように、食塩摂取量でも同様であり、食塩摂取量はこれらの変数に影響を与えないことが示された。

3) 人間ドック血液生化学所見と味噌汁摂取回数との関係

味噌汁の摂取回数と血算・生化学データとの関係を検討した。表5、6に示す如く、いずれの検査データにおいても、味噌摂取量は影響を与えなかった。通常量の味噌汁摂取では、肝機能、腎機能、脂質代謝、糖代謝などには影響を与えないことが示された。

4) 味噌汁摂取回数と食物嗜好性との関係

味噌汁摂取量と食物嗜好性の関連性について検討した。嗜好性調査結果から、エネルギー摂取量

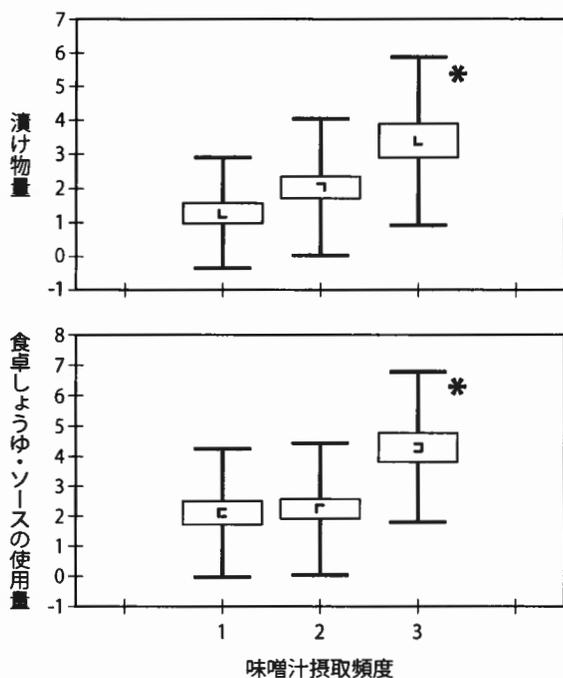


図10 食塩摂取量増加の要因

*p<0.05 vs Group 1

とタンパク質、脂肪、炭水化物摂取量を算出して、味噌摂取量との関係を調べた(図7)。味噌汁摂取の増加とともに、エネルギー摂取量、タンパク質および脂質摂取量は有意に増加した。味噌汁を摂取する献立については、タンパク質、脂質の含量が多いことがうかがえる。

味噌摂取が多くなるほど、脂質の摂取量が大であったことから、味噌汁摂取群における脂質のプロフィールを解析した(図8)。図からも明らかのように、一価、多価不飽和脂肪酸摂取が大であった。一方、味噌摂取が最も高い群ではコレステロール摂取が高い特徴があった。さらに、n-3系、n-6系脂肪酸の摂取量については、味噌摂取が大であるほど高く、好ましい傾向があった(図9)。また、食物繊維量も味噌摂取群で大であり、これらの食物嗜好性の特徴は、抗高血圧、抗動脈硬化作用と関係するものである。一方、食塩摂取量は味噌摂取が最も多い群で大であった。味噌汁摂取が1日一杯以下である群と二杯以上の群では、食塩摂取量、コレステロール摂取量に違いがあった。食塩摂取量の違いがどのような食物嗜好性に由来するものであるか検討してみた(図10)。図からも明らかのように、味噌汁摂取が7

回/5日以上の群では、漬物や食卓醤油・ソースの使用量が極めて大であり、味噌汁摂取が1日1回以下の群に比して違いがみられた。1日1回以内での味噌汁摂取では、食塩含量の多い食品を嗜好することはなく、この意味からも味噌汁摂取は1日1回程度であることが好ましいと考えられた。

これらの食物嗜好性調査の結果からは、1日1回程度の味噌汁摂取はエネルギー、タンパク質、脂肪摂取量の増加を伴うこと、さらに脂肪酸プロフィール、食物繊維量など、高血圧や生活習慣病予防に好ましい栄養素構成となっていることが示された。これらの特性は、疫学調査で生活習慣病関連疾患と味噌摂取が負の相関関係があったことや人間ドックでの身体試験や血液・生化学検査所見に影響を与えなかったことの要因となっていると考えられた。

さらに味噌摂取の量的影響について、1日1回(食塩量1グラム)味噌汁摂取群とそれ以上摂取群の間では、コレステロールや食塩への嗜好性に差があった。より高食塩、高コレステロールへの嗜好性は、これらの群においてみられた脳卒中の家族内発症と関連する可能性も考えられた。

実際、重回帰分析により血圧の決定因子について検討した結果を表7に示した。独立した因子として食卓醤油量が抽出され、味噌の摂取量は血圧には影響を与えないことが明らかとなった。

表7 食物嗜好性からみた血圧の決定因子
血圧の決定因子(食物嗜好性調査結果)

決定因子	収縮期血圧	拡張期血圧
エネルギー:	beta=.649	0.716
たんぱく質(g):	beta=-.10	-.29
脂質(g):	beta=-1.2	-1.3
炭水化物(g):	beta=-.35	-.24
脂肪酸総量(g):	beta=.830	1.01
食物繊維総量(g):	beta=-.01	-0.08
緑黄色野菜(g):	beta=.105	.034
食塩(g):	beta=.237	.149
梅干し・佃煮(g):	beta=-.01	-.00
漬物(g):	beta=.047	-.14
食卓しょうゆ(g):	beta=-.30	0.079
味噌汁(g):	beta=-.03	-.07

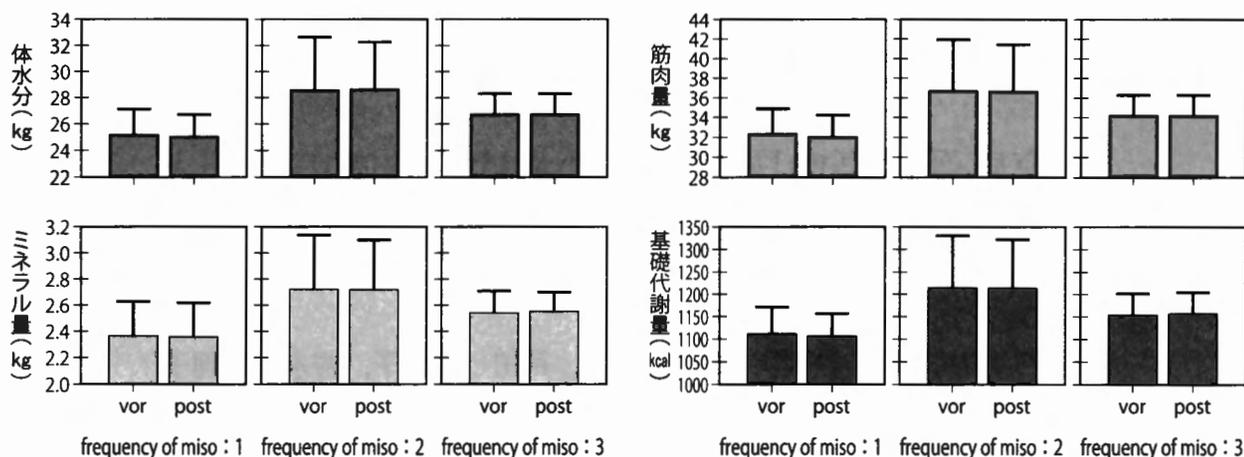


図11

味噌摂取前後での体液量，筋肉量，ミネラル量および基礎代謝量の結果を示す。

IV 味噌と健康に関する機序的研究—臨床研究

これまでの全国的な疫学調査の結果からは、味噌汁摂取による脳・心・腎を含めた健康への影響はみられず、むしろ癌については一貫して減少することが示された。これはこれまでの報告とも一致するものである。食塩摂取量には今回の調査からは癌発症抑制を示唆する所見はみられなかったことから、味噌による癌発症抑制効果は食塩とは異なる要因によることが伺えた。

一方、味噌摂取のこれまでの懸念は主に含有される食塩量に由来する。食塩摂取量は血圧値に影響を与え、ひいては脳・心・腎・血管障害の原因となることが指摘されている。しかし、今回の調査では味噌購入量の減少とともに糖尿病・腎疾患などの生活習慣関連病の増加がみられること、さらに食塩と関連が深い高血圧との間には関連性がみられなかったこと。また、より直接的には人間ドックでの血圧値と味噌汁摂取習慣との間には関連性がなかったことなど、これまでのような味噌に含有される食塩量の健康への影響には否定的な

成績であった。

これらを踏まえ、われわれは、味噌汁摂取が実際体液量の貯留に影響を与えるかについて検討してみた。体液量の測定には3周波数を用いたインピーダンス法 (InBody, Biospace社製) によった。

健常女子 (21-22歳) について、1) 味噌汁として味噌 8g を 1日 1回 (食塩として 1g)、2) 味噌汁として味噌 8g を 1日 2回 (食塩として 2g)、および 3) 味噌汁として味噌 8g を 1日 3回 (食塩として 3g) の 3群として、1週間食した。味噌汁投与開始前と1週間後にInBodyにより、BMI、体液量、蛋白量、脂肪量、ミネラル量および基礎代謝量を算出した。図11には、味噌摂取前後での体液量、筋肉量、ミネラル量および基礎代謝量の結果を示す。体液量は味噌摂取量の違いにかかわらず、前後で差はみられなかった。このことは食塩量が1-3グラムの範囲内での一週間の味噌摂取では、体液量の貯留はみられないこと、したがって、血圧へは影響しないことが示された。これらの所見は疫学研究や人間ドックでの成績を裏付けるものであった。

食塩感受性高血圧ラットにおける味噌の降圧と 高血圧性腎障害保護・体重に関する検討

上野 真依, 田村 優季, 寺門 称子, 戸田 奈津子, 吉永 真理子
指導教員：上原 誉志夫 教授

Japanese Traditional Miso Soup Attenuates Salt-induced Hypertension and its
Organ Damage in Dahl Salt-sensitive Rats

Mai UENO, Yuki TAMURA, Shoko TERAKADO, Natsuko TODA, Mariko YOSHINAGA
Supervisor : Yoshio UEHARA

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

【目的】

味噌は伝統的な日本の食品で、大豆と麴と食塩を混ぜ合わせ発酵熟成させたものであり、たんぱく質、炭水化物、脂質、ビタミン、灰分、食物繊維など多くの栄養素を含んでいる。一方、塩分も多く含有しているため近年では血圧を上昇させる食品として敬遠されがちである。しかし、私達は味噌が血圧を上昇させると言われていることに対して疑問を抱いた。そこで、味噌の降圧とそれに伴う臓器障害保護作用・体重に与える影響について検討するために、食塩感受性ラットを用いて食塩単独並びに同じ濃度の食塩を含む味噌が血圧、心臓・血管・腎臓重量、尿中蛋白排泄量、クレアチニンクリアランス (Ccr)、糸球体組織、体重、餌総摂取量、摂取した餌 1 g 当りの体重増加量、FENa、FEK、心筋内膠原線維、コレステロール、血中グルコースに与える効果を調べた。

【方法】

4 週齢雄 Dahl S (DS) ラット 30 匹を三協ラボサービス株式会社 (東京) から購入した。ラットは一定の温度 (23±2℃) 並びに湿度 (55±10%) の条件の下、12 時間暗 12 時間明の明暗サイクルのある部屋で 1 匹ずつラットケージの中で飼育した。ラットを、① 6 匹の水道水投与対照群 (control)、② 8 匹の 0.9% 食塩水群 (0.9% DS)、③ 8 匹の 1.3% 食塩水群 (1.3% DS) 及び④ 8 匹の 10% 味噌水群 (MISO (1.3% NaCl に相当) とし、計 4 群に分け 8 週間飼育した。味噌は米味噌 (麹歩合：5 歩、塩分：12.5%、原料：米 (国産)・塩 (国産)・大豆 (北米産)、製造：宮坂醸造株式会社) を用いた。味噌水は味噌を水に溶解したものをホモジナイザーで粉碎して作成した。味噌水は毎日交換、和光純薬工業株式会社製塩化ナトリウムを使用した食塩水および水は 2 日に 1 回交換した。餌は日本クレア株式会社製マウス・ラット

共立女子大学家政学部食物栄養学科臨床栄養学研究室
TEL/FAX: (03) 3237-2477
E-mail: yuehara@kyoritsu-wu.ac.jp

〒101-8437 東京都千代田区一ツ橋2-2-1

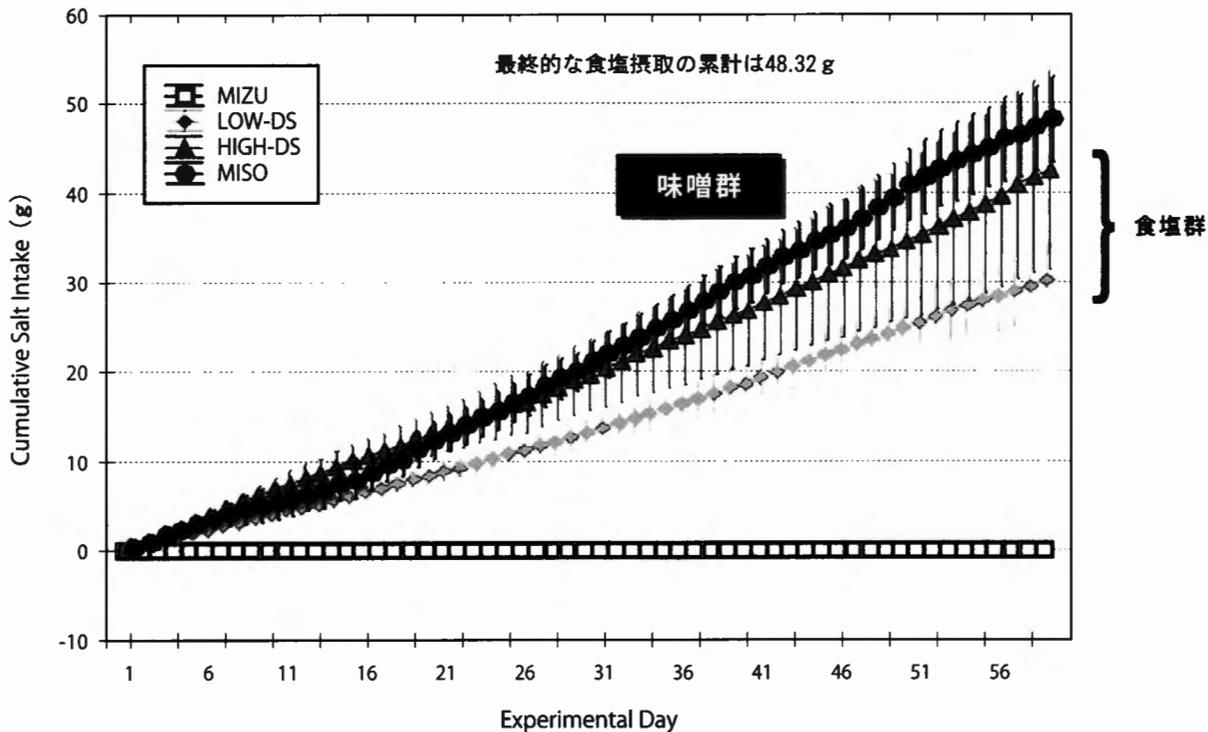


図1 食塩の累計摂取量

・ハムスター CE-7長期飼育用を使用し、試験期間中は自由摂食、自由飲水とした。
2, 4, 8週目において半数ずつDahlラットをメタボリックケージへ移動させ、1日の慣らし期間を経た後で24時間の尿量、飲水量、餌摂取量を測定した。採取した尿中クレアチニン、ナトリウム、カリウム濃度を測定した。血圧はtail-cuff法 (MANOMETER-TACHOMETER KN-210-1) にて1, 2, 4, 6, 8週目に測定した。体重は実験開始時並びに2週間おきに体重計 (YAMATO

製) を用いて測定した。8週後にペントバルビタール麻酔下にDahlラットの腹部大静脈から血液を採取し、血中グルコース、総コレステロール、クレアチニン、ナトリウム、カリウム濃度を測定した。さらに、右腎、心臓、下行大動脈の重量を測定し、臓器は10%ホルマリンで固定し、組織学的な評価に用いた。腎はPAS染色、心臓はアザン・マロリー染色を行った。統計は分散分析、LSD検定、重回帰分析を行った。

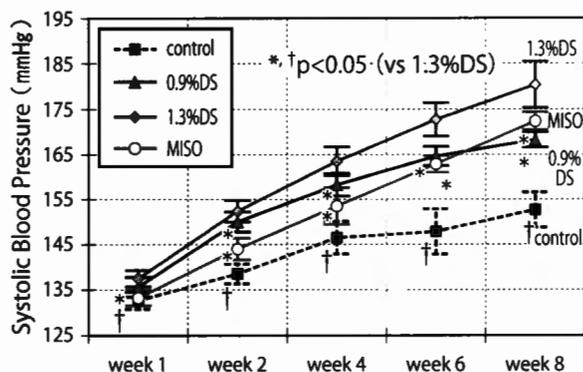
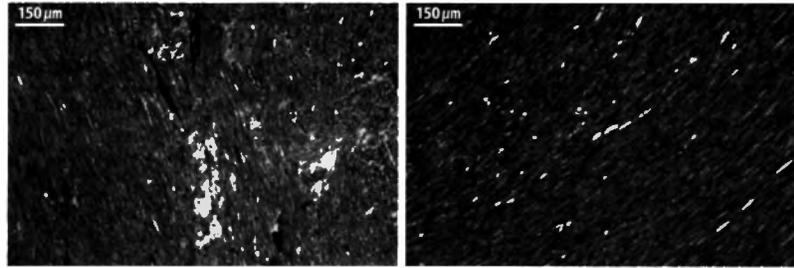
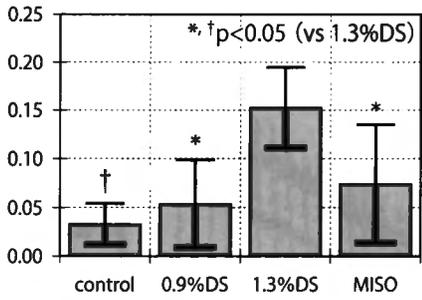


図2 血圧 (mmHg)

【成績】

実験日ごとの食塩摂取量の累計結果を図1に示す。Control, 0.9% DS, 1.3% DSでは用量依存的な食塩摂取の増加がみられた。MISOにおいては1.3% DSに比較して食塩摂取量が高値であった。2週間ごとの収縮期血圧の変化を図2に示す。Controlに比較して、1.3% DSでは血圧が有意に上昇し (153 vs 180mmHg, $p<0.001$), MISOでは1.3% DSに比較して有意に血圧の低下が認められた (172 vs 180mmHg, $p<0.05$)。



(1) 1.3%DSの心筋内膠原線維 (2) MISOの心筋内膠原線維

図3-a 心筋内膠原線維量 (mm/1.234mm²)

図3-b

表1 臓器重量

	心臓重量 (g)	下行大動脈壁重量 (mg/mm ²)	腎臓重量 (g)
control	1.00±0.06 †	0.27±0.07	1.25±0.05 †
0.9%DS	1.15±0.05	0.27±0.09	1.51±0.12
1.3%DS	1.18±0.10	0.25±0.06	1.59±0.08
MISO	1.25±0.11	0.25±0.03	1.58±0.07
p value	<0.05	<0.05	<0.05

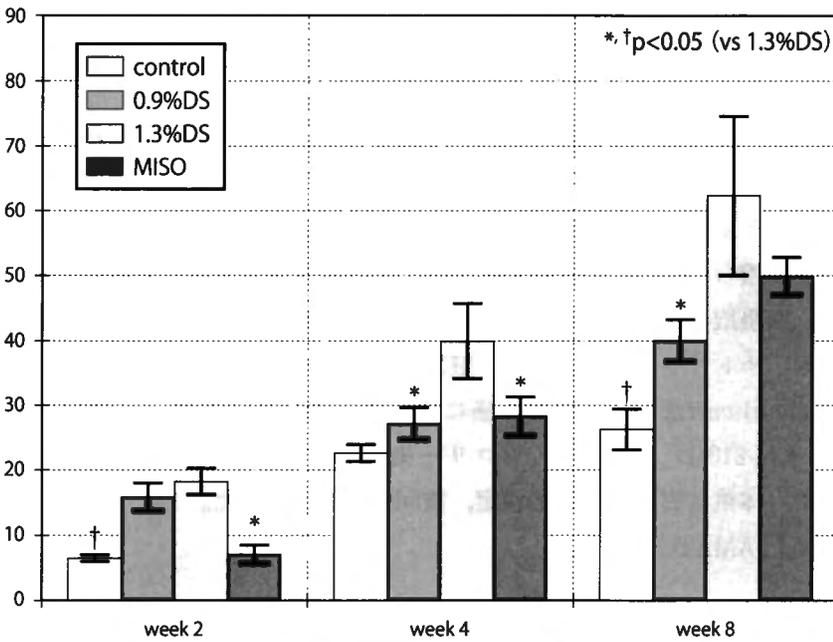
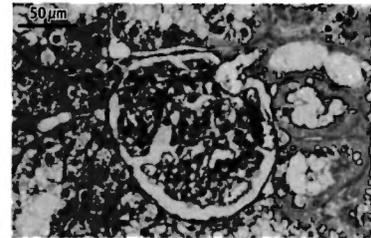
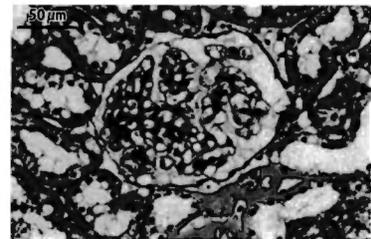


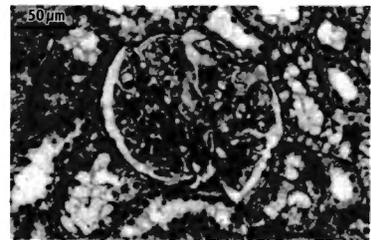
図4 尿中蛋白排泄量 (mg/day)



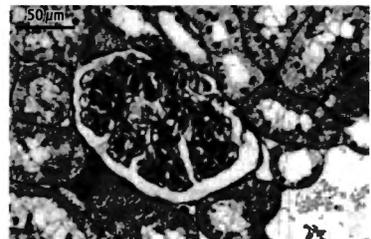
(1) 糸球体硬化度 0%



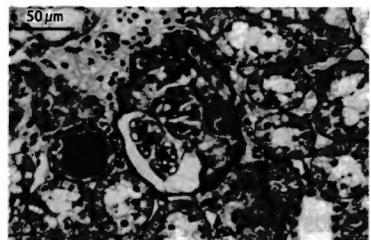
(2) 糸球体硬化度 1~25%



(3) 糸球体硬化度 26~50%



(4) 糸球体硬化度 51~75%



(5) 糸球体硬化度 76~100%

図6-a

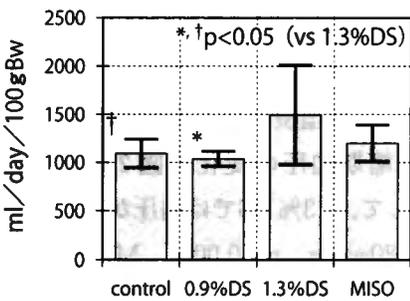


図5 クレアチンクリアランス (Ccr)

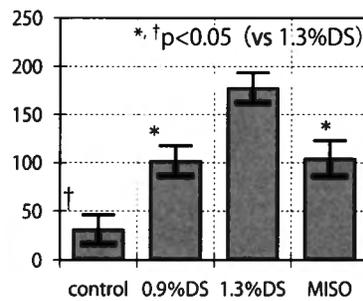


図6-b GS-Score

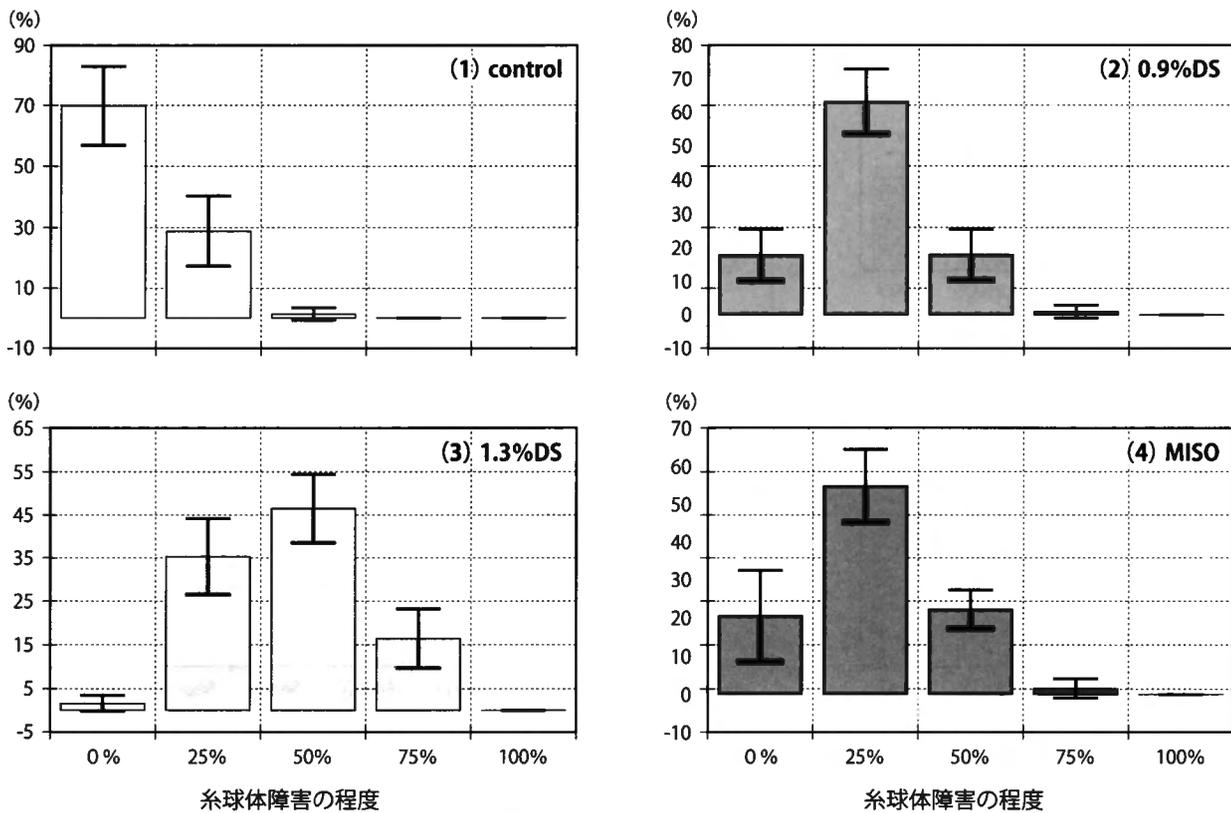


図 6-c 糸球体硬化度

心臓・下行大動脈壁・腎臓の重量はすべての群に有意差はみられなかった(表 1)。アザン・マロリー染色で染色された膠原線維の色波長を解析し、それと同一波長部位の面積を測定し心筋内膠原線維量とした(図 3-a)。Controlに比較して、1.3% DSでは有意に心筋内膠原線維量が増加し(0.033 vs 0.153mm²/1.234mm², p<0.05), MISOでは1.3%DSに比較して有意に減少した(0.074 vs 0.153 mm²/1.234mm², p<0.05)(図 3-b (1), (2))。

尿中蛋白排泄量を図 4 に示す。Controlと比較して1.3%DSでは有意に増加したが(26 vs 62mg/day, p<0.05), MISOでは低下する傾向がみられた(MISO 50 mg/day)。また図 5 にCcrを示す。Controlと比較して血圧の上昇した1.3%DSでは有意に増加したが(1092 vs 1493 mL/day/100gBW, p<0.05), 血圧の低下に伴いMISOではcontrolに近い値を示した(1198 mL/day/100gBW)。糸球体硬化度はPAS染色した腎臓標本から糸球体を約30個選出し、それぞれの糸球体の硬化の割合を0%, 1~25%, 26~50%, 51~75%, 76~100%の5段階に分類し(図 6-a (1) - (5)), それぞれ

に0~4の値を乗じて、GS(糸球体硬化度) scoreを算出した(範囲0~400)。Controlに比較して、1.3% DSでは糸球体硬化度が増加し腎障害が進んだが、MISOでは有意に糸球体硬化度は軽減し、組織学的に腎臓の悪化が抑制された(178 vs 105, p<0.05: 図 6-b)。各群における糸球体硬化像の分布状況を図 6-c (1) - (4) に示した。

FENaは尿中Na排泄量を糸球体通過のNa量で除し算出したものであり、尿細管でのNaの再吸収の程度を示す(図 7)。Controlと比較して1.3% DSでは有意に上昇し、尿中へのNa排泄が増加していることが示されたが(0.24 vs 2.21%, p<0.05), MISOでは低値を示した(MISO 1.36%)。同様にFEKを算出し、尿中Kの再吸収状況について検討した(図 8)。Controlと比較して1.3% DSでは有意に低下し(0.026 vs 0.021%, p<0.05), MISOではFEKは1.3% DSと比較して有意に増加した(0.025 vs 0.021%, p<0.05)。

体重の変化を図 9 に示す。Controlと1.3%DSの間に体重の変化は認められなかったが(352 vs 351g), 全経過中においてMISOでは体重の増加

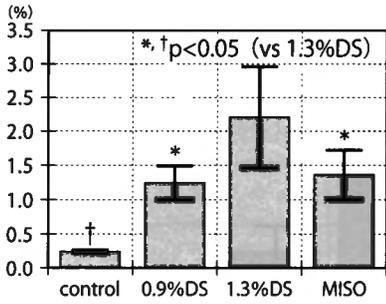


図7 FENa

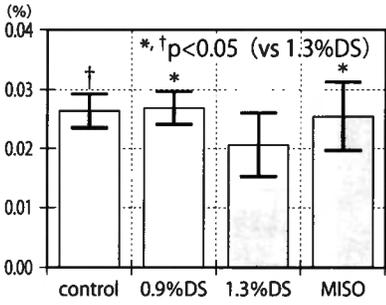


図8 FEK

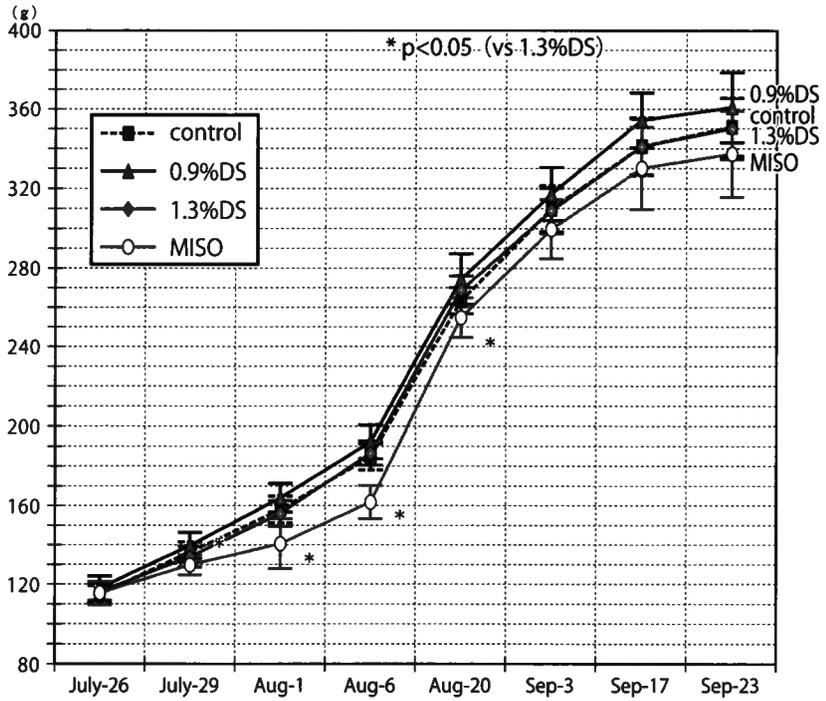


図9 体重

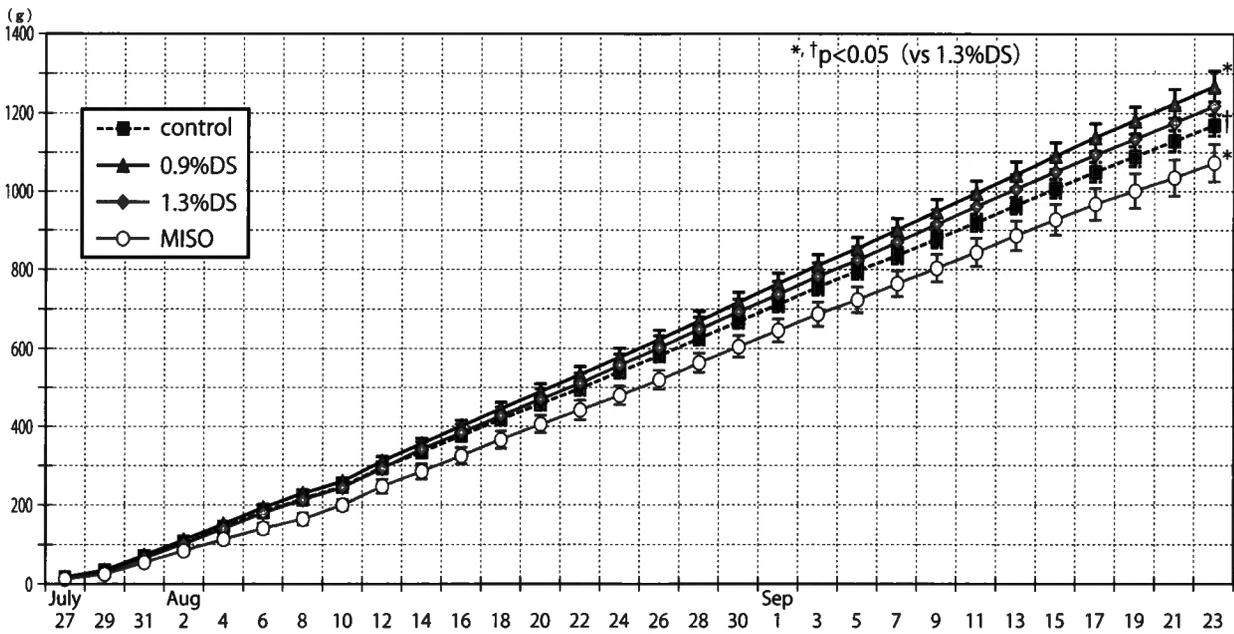


図10 餌総摂取量

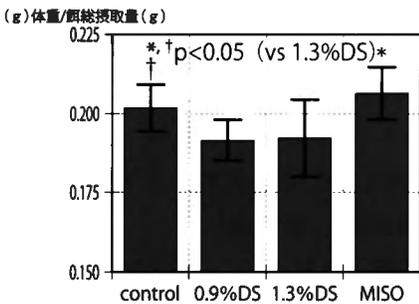


図11 餌総摂取量 1 g 当りの体重増加量

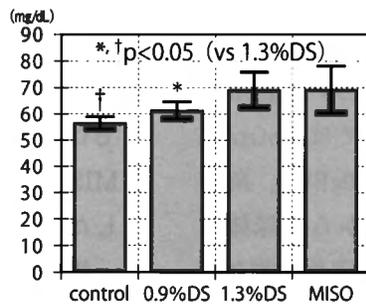


図12 血中総コレステロール

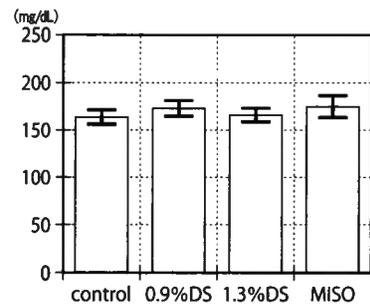


図13 血中グルコース

が低値である傾向がみられた (MISO 338g)。餌総摂取量は1.3% DSに比較してMISOでは有意に低値を示した (1218 vs 1073g, $p < 0.05$) (図10)。飼育期間中の体重増加量を餌の累計食塩摂取量で除して、餌総摂取量 1g 当りの体重増加量を算出した (図11)。1.3% DSに比べてMISOは有意に高値を示した。(0.19 vs 0.21g, $p < 0.05$)。

血中総コレステロール濃度の結果を図12に示す。Controlに比較して、1.3% DSでは有意に上昇し (57 vs 69mg/dL, $p < 0.05$)、MISOでは1.3% DSと同様の総コレステロールの上昇を示した (69 vs 69mg/dL)。血中グルコースはすべての群に有意差はみられなかった (図13)。

【考按】

本研究から、味噌を添加することにより血圧が低下することが示された。Control, 0.9% DS, 1.3% DSの累計食塩摂取量と血圧の相関を図14に示す。累計食塩摂取量を見ると、1.3% DSと比較してMISOが高値を示した。水及び食塩水摂取群と血圧の相関関係からMISOの累計食塩摂取量での血圧値を推定すると、血圧は182mmHgまで上昇することが予測された。しかし、MISO群の血圧

の実測値は172mmHgであり、血圧の低下は10mmHgと結論された。また味噌の血圧測定値は1.3% DSと比較して有意に低値を示していた (172 vs 180mmHg, $p < 0.05$)。さらに、この相関関係から、MISOにおける血圧の実測値から予想される食塩摂取量を推定すると約32gであり、実際の摂取量より30%の減塩効果があることが示唆された。

血圧の低下に伴い尿蛋白が低下、Ccrが正常化したことから、MISOの摂取により、食塩水摂取群より腎臓機能の悪化が抑えられたことがわかった。実際、糸球体硬化度の結果より、1.3% DSに比較して、MISOでは糸球体の障害が軽度であり、腎臓障害が組織学的に軽減されることがわかった。これらのことから味噌はDahlラットに対して血圧上昇を抑制し、高血圧性腎障害を軽減することが強く示唆された。

心臓重量では1.3% DSとMISOで有意差はなかったが、心筋内膠原線維量をみると1.3% DSと比較してMISOでは有意に低値を示した。心臓重量には差がないにも関わらず、心筋内膠原線維量は1.3% DSと比較してMISOが大幅に低値を示したことから、MISOにおいては心筋の線維化が抑制されたと推測された。Dahlラットでは血圧上昇とともに心不全を発症し、死に至ることが知られており、味噌の摂取はDahlラットの心不全へ

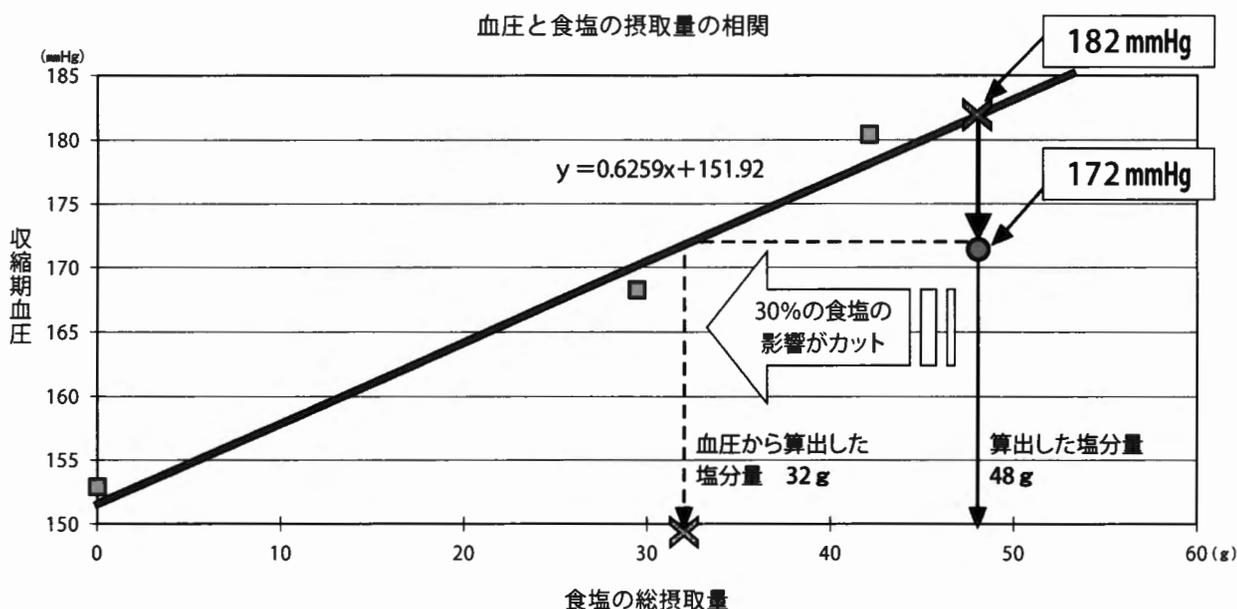


図14 累計食塩摂取量と血圧の相関

の過程が阻止する可能性が示唆された。

FENaが1.3% DSと比較して有意に低値を示したことから、MISOでは塩分摂取量が多かったにも関わらず、尿細管でのNa再吸収が促進されていたと考えられる。またFEKも有意に高値を示した。これは尿細管においてNaイオンの再吸収が促進され、それに伴って尿中に排泄されるKイオンが多くなり、FEKが高値を示したと考えられた。これらのことから、MISOでは消化管でのNa吸収抑制などによって、体内に吸収されたNaが少なかったと考えられた。味噌が食塩感受性による血圧の上昇を抑制する降圧機序として、味噌による消化管でのNa吸収抑制、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系阻害が作用した可能性が推測される。

体重の値をみると飼育期間中は全期間を通じてMISOでは他の群と比較して有意に低値を示しており、最終日においても最も低い値であった。また餌総摂取量もMISOが他の群と比較して有意に低値を示した。餌の摂取量が減少したことで、MISOでは他の群よりも血中グルコースの値が低値を示すと予測されたが、結果には有意差はみられなかった。また血中総コレステロールの値も1.3% DSと差がみられなかったことから、MISOに栄養素の不足はなかったと考えられた。そこで餌総摂取量1g当りの体重増加量を算出したとこ

ろ、MISOは食塩負荷群よりも高値を示したことから、食塩負荷群と比較してMISOのエネルギー効率が高くなっていったと推測された。エネルギー効率が上昇していたにも関わらず体重減少が生じたことから、ラットの体重減少の原因は食欲低下であると考えられた。したがって、味噌にはDahl Sラットに対し、食欲を抑制することで体重の増加を抑える可能性が示唆された。その機序については今後検討していきたい。

【結論】

これまで述べた結果から、味噌に含まれる塩分は食塩単独で摂取するときよりも、血圧の上昇を抑えられているということが示唆された。また降圧作用以外にも、味噌には臓器障害の抑制作用や食欲に与える影響があることが示された。現代に生きる私達は、単に食塩が多く、高血圧の原因になるという理由で味噌を敬遠しがちである。しかし、日本人の命と食文化を古くから支え、親しみを持ち食されてきた味噌を避けるのではなく、積極的に利用していくことで、味噌という日本独自の伝統食品の新たな可能性が見えてくるのではないかと考える。

まとめ

本研究の目標は、血圧及び生活習慣病と食塩消費量との関連に対して、全国的な味噌の消費分布と血圧、生活習慣病罹患状況とは一致しないことを検証することであり、これにより味噌には含有される食塩以上に血管臓器保護効果が存在するとの仮説を疫学的に実証することにあった。

味噌購入量からみたデータによる解析では、味噌摂取量は年次的には減少が続いていること、しかし糖尿病や腎疾患、悪性新生物は増加傾向にあることから、味噌摂取量とは逆の関係がみられた。この因果関係は明らかではないが、高血圧の受療状況をあわせ考えると、味噌摂取がこれら生活習慣病の発症の防止に関連している可能性もあると結論された。

この点は、人間ドックの成績を使用した横断的調査でも同様であり、味噌汁摂取により高血圧や代謝関連疾患を示唆する検査値には影響がみられず、一方、家族内癌発症が有意に低値であることが示された。味噌汁摂取による群での全体的な食塩摂取量は、1日1回程度ではほとんどの飲まない群と同様であり、2回以上の群では他の群より多くなった。それは、漬物類を好むようになることに原因する。また、味噌汁摂取量は血圧値の決定に関与せず、食塩全体に占める味噌からの食塩摂取は、健康に対して影響はみられないことが明らかとなった。適度の味噌汁の摂取を含む食品構成や献立は、食物繊維、不飽和脂肪酸摂取量の増加を伴い、これらが健康維持に関係している可能性が考えられた。横断的な調査からは、1日1回の味噌汁摂取は、食塩摂取への嗜好性に影響を与えず、検討にとってより好ましい食物嗜好性を形

成するのに有効であると考えられた。

味噌汁による食塩摂取については、1日1グラムから3グラムの範囲では、一週間味噌汁を飲んでも体液の構成に影響を与えなかった。このことは、3グラムが恒常性の調節範囲であること、味噌汁からの食塩吸収が実際より低値となること、味噌には食塩摂取による作用に拮抗する成分が含まれることなどの可能性が考えられる。

実際、動物実験での成績では、味噌汁摂取では含有される食塩の約30%の減塩効果があることが証明されており、吸収阻害かほかの成分による抗食塩作用が存在する可能性が示され、味噌による健康維持にはこれら複数の要因が関与するものと考えられた。味噌による臓器保護効果の機序は不明であるが、最近我々は、味噌上清中に組織での脂質過酸化を防ぐ因子が存在することを認めており、REDOX系への作用が推測される。

結語

最後に、以上の成績から、通常味噌汁摂取においては含有される食塩の影響は限定的であり、他の成分による健康への効果が期待される。さらに、横断的調査から1日1回程度の味噌汁の摂取は健康的な食事嗜好性を形成するのに有効であることが明らかになった。味噌汁に含まれる約1グラム程の食塩は食塩供給源として利用しやすいものであり、また、味噌の健康効果も期待できることから、食塩を喪失しやすい高齢者では特に適した食材といえる。味噌の抗食塩効果、健康効果の機序については、今後、さらに検討を要すると考えられる。

味噌による高血圧，動脈硬化，脳梗塞， 及び心臓障害等の予防効果に関する研究

(味噌による血圧並びに脳卒中の予防は可能か)

神谷 研二

研究協力者

渡邊敦光，笹谷めぐみ

Research on the effects and prevention of vascular diseases such as
hypertension, arteriosclerosis, cerebral infarction and heart failure by
Japanese Soy bean paste (Miso)

(Protection of hypertension and stroke by Japanese Soy bean paste (Miso) in SHRSP rats)

Kenji KAMIYA

Research collaborators

Hiromitsu WATANABE, Megumi SASATANI

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

脳卒中は、脳の血管が詰まる脳梗塞、脳内に出
血する脳出血、脳動脈の瘤が破裂して脳表面に出
血するくも膜下出血の総称である。我が国の死亡
統計に於いて、1960年には脳出血が77%、脳梗塞
が13%、くも膜下出血が2%であったが2001年
には脳出血が24%、脳梗塞が62%、くも膜下出血11
%となっている。脳卒中を占める割合は、脳出血
は、年代とともに減少するのに対し、脳梗塞は増
加傾向にある。細小動脈が詰まるラクナ脳梗塞が
減少し、太い動脈の動脈硬化によって起こるアテ

ロームか血栓性脳梗塞や心臓に出来た血栓が流れ
て行き脳動脈に詰まる心原性脳塞栓症が増加し、
これらは欧米白人に多いタイプで、我が国の脳梗
塞は欧米化しつつあることを示唆している¹⁾。

厚生労働省の人口動態統計によると、平成23年
の推計死亡者数は、約126万人である。その死因
は、第一位の「がん」に次いで第二位、第三位が
心不全や心筋梗塞などの「心疾患」と、脳梗塞や
脳内出血などの「脳血管疾患」である。高血圧を
第一危険因子とする心疾患と脳血管疾患の両者を

併せると27%にも達し、高血圧に対する予防は大変重要な課題となっている²⁾。

これまでの研究から、味噌や大豆蛋白質が、降圧作用を有することが多数の疫学的研究により明らかにされており、薬にたよらず日常的な食習慣で高血圧を予防できることは、国民にとって極めて有効な手段と言える。実際に、日本人の心臓血管障害が欧米人に比べて少ないことは日常的に味噌や大豆蛋白質を摂取する習慣を有するためであると欧米の専門誌でも指摘されている。

そこで、本研究は自然に高血圧や脳梗塞を起こすラット（易脳卒中発症高血圧自然発症ラット、SHRSP*）を用いて、味噌の摂取が血圧並びに脳卒中に及ぼす影響を明らかにすると同時に、味噌食による高血圧の予防効果について検討した。

*易脳卒中発症高血圧自然発症ラット

高血圧自然発症ラット（Spontaneously hypertension rat SHR）は1963年に京都大学のOkamotoら³⁾により日本循環器学会誌に掲載されて以来、高血圧研究に寄与してきた。その後、SHR系のA1-sbとA3亜系統を交雑して作出した基礎集団から、毎世代脳卒中で死亡した親からの仔を選抜・交配して1974年に、易脳卒中発症高血圧自然発症ラット（Stroke-prone spontaneously hypertension rat SHRSP）がYamoriら⁴⁾により作出された。脳出血と脳梗塞の両方を発症し、発生部位はanteriomedialやoccipital cortexとbasal gangliaである。脳卒中のみならず心臓血管系障害を高頻度に起こすことから高血圧性臓器障害モデルとして実験に寄与してきた。この系統は食塩摂取量を増加させると週齢による血圧上昇と共に更に血圧が増大し、糸球体硬化や血管変化など悪性高血圧に一致する腎障害を示す。更に骨粗鬆症も発病するラットである。

方 法

動物の飼育

ラットの飼育は、自然科学研究支援開発センター放射線動物実験施設で行った。飼育室は、室温

24±2℃並びに湿度55±10%の条件下で、12時間明暗サイクルで管理した。実験動物の飼育、管理、及び取扱は、広島大学動物飼育指針に従って行った。

SPFの4週齢の雄SHRSP/Izmラットを清水実験材料株式会社より購入した。実験群として以下の3群、1)SHRSPラット対照群（以下、対照群）、2)SHRSPラット+180日熟成辛口米味噌投与群（以下、味噌投与群）、3)SHRSPラット+2%（味噌含有食塩量に相当する）食塩単独投与群（以下、食塩投与群）を用いた。水、餌は自由に摂取させ、摂餌量並びに摂水量を経時的に測定した。各実験群の体重は、月に一度測定を行った。血圧はソフトロン社の血圧計（BP-98E）で尻尾を用い2週間に1回の割合で午後測定した。

剖検・血清生化学的検査

瀕死もしくは実験終了時にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血した。総蛋白、アルブミン、A/G比、GOT、GPT、血糖、中性脂肪、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、アルカリフォスファターゼ、 γ -GTP、LDH、CHE、TTT、ZTT、アミラーゼ、クレアチニン、尿素窒素、尿酸、Na、K、Cl等の定量を行った。

主要臓器重量及び病理組織学的検査

剖検時に、体重を測定し、脳、肝臓、腎臓、精巣、副腎、脾臓、心臓等の臓器を採取し、各臓器重量を測定した。また、臓器毎に体重比を求めた相対的臓器重量を計算した。

臓器重量を測定した各臓器を10%中性ホルマリン液で数日かけて固定した。中性ホルマリン液で固定した臓器を十分に水洗後、臓器を小片に切り、組織切片を包埋用のカセットに入れ、自動包埋器で一晩かけて脱水し、手でパラフィンに包埋した。

包埋した組織は、3 μ mに薄切し、乾燥後脱パラフィン、アルコール系列で水まで戻し、HE染色を行った。さらに、脱水し、キシレンに移し、オイキットで封入し、病理組織標本を作製した。必要に応じ種々の免疫染色、アザンマロリー染

色, アルシアンブルー-PAS染色等の特殊染色を行った。

脳は脳卒中病変(脳出血, 脳梗塞)の有無を肉眼的に観察後, 組織学的に観察した。腎臓は左右より腎門部を通る面の標本作製し, 再生上皮, フィブリノイド壊死, 糸球体を観察した。心臓は右室左室の横断面が現れるように中央部及び前後から4個のブロックを切り出し, 血管炎, 心筋繊維化を観察した。

大動脈は胸部大動脈を切り血管走行に輪切り切片を作成し内膜, 中膜並びに外膜を行った。

精巢は輪切りにし, 精細管の並びに血管を病理学的に観察した。

統計的解析

得られた資料は, 統計手法 X^2 検定, student t検定, ダネット法並びにCox Proportional Hazard Model等を用い統計的な解析を行った。

倫理面への配慮

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

Table 1 Drinking water and diet

	Normal diet	Miso	NaCl
Drinking water (ml/animal/rat)	29.8±4.4	38.3±4.7**	42.6±7.4***
Diet (g/animal/day)	15.7±0.6	15.7±0.8	16.3±1.2

** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)
a : Significantly different from Miso group (P<0.01)

Table 3 Blood pressure

	HR	SBP	MBP	DBP
42 days old				
Normal diet	398.3±37.6	150.2±13.5	111.9±12.2	92.8±17.4
Miso	403.8±40.1	162.7±12.8*	129.4±16.2**	108.9±16.5*
NaCl	445.4±40.5**	161.2±8.7*	126.3±7.8**	109.0±14.3*
56 days old				
Normal diet	407.3±32.5	194.5±7.7	160.9±11.8	144.1±17.2
Miso	380.0±35.2*	194.0±9.7	165.5±10.6	151.3±14.0
NaCl	398.3±23.2	206.1±11.3***	174.0±17.0	157.8±20.9
70 days old				
Normal diet	446.2±57.0	212.4±6.2	180.8±8.7	165.0±12.1
Miso	424.1±53.4	213.1±11.8	177.4±14.5	159.5±18.3
NaCl	416.8±46.4	222.1±9.4*	192.5±17.8**	177.8±23.2*

* : Significantly different from Normal diet group (P<0.05)
** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)
a : Significantly different from Miso group (P<0.01)

結果

摂餌量並びに摂水量

摂餌量は, 1日1匹あたり, 対照群で15.7±0.6g, 味噌投与群で15.7±0.8g, 食塩投与群で16.3±1.2gと, 各実験群における統計的な有意差は検出されなかった。摂水量は, 1日1匹あたり, 対照群で29.8±4.4ml, 味噌投与群で38.3±4.7ml, 食塩投与群で42.6±7.4mlとなり, 食塩投与群, 味噌投与群の値が対照群と比較して有意に高かった。また食塩投与群の摂水量は, 味噌投与群の値と比較して有意に高い値を示した。(Table 1)

体重

91日齢における味噌投与群並びに食塩投与群の体重は, 対照群に比べて減少していた。(Table 2)

血圧

各実験群における血圧を経時的に測定した結果, 42日齢(実験開始2週目)における味噌投与群並びに食塩投与群の平均血圧は対照群に比べて

Table 2 Body weights

Days old	Normal Diet	Miso	NaCl
28	67.0±3.1	66.9±3.7	63.4±4.6
42	145.5±5.5	142.8±6.0	142.6±5.9
56	207.3±8.6	207.6±11.0	215.2±9.3
70	237.1±11.7	238.6±13.0	243.5±9.5
84	254.8±14.4	243.3±37.2	234.5±28.4
91	257.2±28.4	232.7±36.6*	220.2±19.2**

* : Significantly different from Normal diet group (P<0.05)
** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)

有意に高かった。56日齢における食塩投与群の収縮期血圧は、対照群並びに味噌投与群に比べて有意に高かった。70日齢における食塩投与群の平均血圧は対照群並びに味噌投与群と比較して有意に増加した。(Table 3)

生存率

実験期間中、各実験群のラットの健康状態を観察し、チアノーゼ、麻痺、行動の異常が観察された症例、瀕死状態並びに死亡した症例を記録した。異常が観察された動物の症状の進行は急速で、朝正常だったが、昼から観察すると瀕死状態である症例が数例観察された。Fig. 1にその結果を示す。食塩投与群は74日齢で異常が現れたラットが観察され、91日齢で全て剖検した。味噌投与群は83日齢で死亡したラットが観察され、その後85日齢以降は92日齢まで生存した。対照群では87日齢で行動の異常がみられるがラットが観察され、92日齢で全て剖検した。Table 4に92日齢まで生存している動物数を示す。92日齢における食塩投与群の生存率は、味噌投与群並びに対照群に比べて有意に減少した。Cox Proportional Hazard Modelで生存率を検定した結果、対照群と味噌投与群では差は認められないが(P=0.126)食塩投与群と他の群間では有意(P=0.0008)に生存期間が短縮した。

臓器重量

剖検時に各臓器重量を測定し、その集計を行った。味噌投与群における心臓重量は食塩投与群、対照群と比較して有意に増加した。味噌投与群並びに食塩投与群における副腎重量は対照群に比べて有意に増加した。食塩投与群における胸腺重量は対照群に比べて有意に減少した。(Table 5)

食塩投与群における精巣相対重量は、他の群に比べて有意に減少した。(Table 6)味噌投与群並びに食塩投与群における副腎の相対重量は対照群に比べて有意に増加した。食塩投与群における胸腺相対重量は対照群に比べて有意に減少した。

生化学的所見

味噌投与群並びに食塩投与群における血糖、全コ

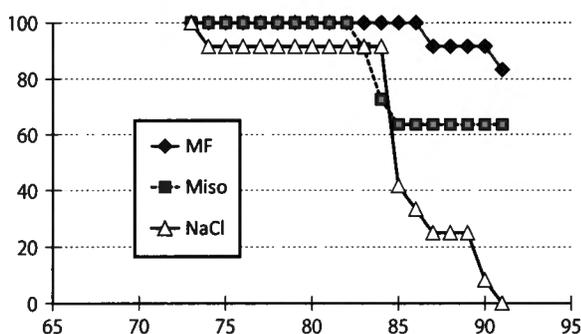


Figure 1 Animal survival after treatments

Table 4 Number of surviving rats at 92 days old

Group	Used animals	Surviving animals
Normal diet	12	10 (83%)
Miso	11	7 (54%)
NaCl	12	0* (0%)

* : Significantly different from Normal or Miso diet groups (P<0.05)

Table 5 Organ weights

	Normal Diet	Miso	NaCl
Heart	1.32±0.11	1.47±0.25*	1.30±0.14*
Brain	1.78±0.09	1.75±0.13	1.82±0.11
Liver	9.84±1.37	9.50±1.65	8.85±1.45
Kidney	2.17±0.14	2.23±0.23	2.22±0.24
Spleen	0.57±0.09	0.58±0.10	0.61±0.15
Testis	2.86±0.12	2.84±0.13	2.71±0.12**
Adrenal	0.048±0.006	0.058±0.007**	0.056±0.008**
Thymus	0.275±0.058	0.245±0.042	0.187±0.058**

* : Significantly different from Normal diet group (P<0.05)

** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)

a : Significantly different from Miso group (P<0.05)

Table 6 Relative organ weight (Organ/Body weight x100)

	Normal Diet	Miso	NaCl
Heart	1.32±0.11	1.45±0.25*	1.30±0.14*
Brain	1.78±0.09	1.75±0.13	1.82±0.11
Liver	9.84±1.37	9.50±1.65	8.85±1.45
Kidney	2.17±0.16	2.23±0.23	2.22±0.24
Spleen	0.57±0.09	0.56±0.10	0.61±0.15
Testis	2.86±0.12	2.84±0.13	2.71±0.12**a
Adrenal	0.048±0.006	0.058±0.007**	0.056±0.008**
Thymus	0.28±0.06	0.25±0.04	0.19±0.06**

* : Significantly different from Normal diet group (P<0.05)

** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)

a : Significantly different from Miso group (P<0.05)

レステロール, LDHコレステロール, 並びに動脈硬化指数は対照群における値と比較して、有意に増加した。食塩投与群における全コレステロール, LDHコレステロール並びに動脈硬化指数は味噌投与群に比べて有意に増加した。(Table 7) クレアチニン並びに尿素窒素は食塩投与群で普通餌に比べて有意に増加した。一方全蛋白, ア

Table 7 Biochemical markers (I)

	Normal Diet	Miso	NaCl
Total protein	6.61±0.27	6.17±0.42**	6.19±0.45**
Albumin	4.58±0.26	4.19±0.30**	4.15±0.28**
A/G ratio	2.30±0.30	2.16±0.31	2.06±0.27*
TTT	0.45±0.24	0.48±0.32	0.39±0.20
ZTT	0.39±0.17	0.46±0.50	0.37±0.29
Sugar	174.5±40.7	267.3±132.5*	241.4±67.7*
Neutral fat	110.3±61.6	95.9±29.6	127.2±61.1
Total cholesterol	74.6±15.4	93.6±19.7**	114.1±26.2** ^a
HLD cholesterol	34.9±2.7	38.4±7.6	41.6±8.4*
LDH cholesterol	4.25±1.96	5.21±1.85 ^a	8.78±5.46** ^a
LDH cholesterol calculated	17.6±24.4	35.9±16.2*	47.1±21.9**
Arthrosclerosis index	1.14±0.33	1.44±0.28**	1.75±0.44** ^a

* : Significantly different from Normal diet group (P<0.05)

** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)

a : Significantly different from Miso group (P<0.05)

Table 8 Biochemical markers (II)

	Normal Diet	Miso	NaCl
GOT	924.0±294.3	593.1±285.1	493.0±155.2
GPT	56.5±11.3	51.6±16.7	51.9±22.8
LDH	683.0±406.2	595.4±285.5	626.2±348.9
ALP	924.0±294.3	593.1±285.1**	493.0±155.2**
γ-GTP	1.50±0.52	1.79±0.58	1.78±0.55
Choline esterase	4.42±1.56	5.07±2.30	5.17±1.98
Amylase	1005.5±284.4	1040.6±438.4	967.2±147.9
Creatinine	0.22±0.05	0.25±0.08	0.28±0.04**
Uric acid	2.00±1.11	2.51±1.06	3.33±2.89
Urea nitrogen	21.8±6.3	25.9±6.4	26.0±3.8*
Na	143.1±3.3	138.6±7.0*	138.4±5.6*
K	3.49±0.35	3.59±1.08	3.43±0.62
Cl	99.6±3.6	93.9±6.7*	92.9±5.4**

* : Significantly different from Normal diet group (P<0.05)

** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)

ルブミン、アルカリフォスファターゼ、Na並びにClは味噌投与群並びに食塩投与群で対照群に比べて有意に減少した。(Table 8)

病理学的観察 (Table 9)

食塩投与群では、肉眼的に脳に大きな出血像が観察され、(Fig. 2) その発症頻度は、対照群と比較して有意に高い値を示した。病理組織標本を用いて解析を行った結果、大出血が観察される組織付近にはPCNA陽性細胞が認められた。また小範囲の出血が認められたが、その頻度は群間で差はなかった。食塩投与群では、全てのラット脳内に血栓が観察され、その発症頻度は対照群と比較して有意に高い値を示した。各実験群において、冠状動脈の外膜の肥厚が観察されたが、その発生率に



Figure 2 Macroscopic finding of brain bleeding, NaCl group

は差がみられなかった。食塩投与群では、心筋の萎縮が観察され、その頻度は対照群よりも有意に高かった。肝臓では髄外造血が味噌投与群で有意に減少した。細胞浸潤が食塩投与群で有意に増加した。分裂像や脂肪肝が見られたが統計的な有意な差は認められなかった。腎臓では、Fibrinoid necrosisや糸球体の消失が認められたが各実験群における差は認められなかった。腎障害の程度は食塩投与群で最も強く、味噌投与群では中間的で、対照群で軽度であった。精巣では小血管の外膜の肥厚が観察され、その頻度は、味噌投与群並びに食塩投与群では対照群と比較して、高い傾向が観察された。

考 察

本実験で味噌投与群では食塩投与群に比べて、血圧の減少が観察された。味噌投与群における脳卒中の発生は食塩群と比較して有意に遅延した。更に、味噌投与群においては、対照群と比較して、血中コレステロールの減少が認められた。

脳卒中の危険因子は高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙、飲酒、肥満等が上げられている。カロリー制限、食塩制限の他に野菜並びに果物の摂取、魚の摂取は、血清総コレステロール値を低下させることが報告されている。また、高繊維食は拡張期血圧低下や血清総コレステロール、中性脂

Table 9 Histological findings (%)

	Normal Diet	Miso	NaCl
Bleeding in brain (macro)	0/12 (0)	0/10 (0)	6/12 (50)**
Bleeding in brain (micro)	1/12 (8)	6/10 (60)	7/12 (58)
Coagulation in brain vessel	7/12 (58)	8/11 (72)	12/12 (100)*
Calcification in brain	8/12 (67)	6/10 (60)	10/12 (83)
Thickened outer layer in coronary artery	9/12 (75)	7/10 (70)	6/12 (50)
Atrophy in heart muscle	3/12 (25)	6/10 (60)	12/12 (100)**
Bile duct hyperplasia in liver	10/12 (83)	9/10 (90)	11/12 (92)
Extramedullary hematopoiesis in liver	9/12 (75) ^b	1/10 (10)	5/12 (42)** ^b
Cell infiltration in liver	0/12 (0)	3/10 (30)	5/12 (42)**
Mitosis in liver	2/12 (17)	3/10 (30)	3/12 (25)
Fatty liver	0/12 (0)	3/10 (30)	3/12 (25)
Fibrinoid necrosis in kidney	6/12 (50)	10/10 (100)	12/12 (100)
Glomerular disappear in kidney	4/12 (33)	6/10 (60)	6/12 (50)
Thickened outer layer in testicular arteria	1/12 (8)	4/10 (40)	6/12 (50)

* : Significantly different from Normal diet group (P<0.05)

** : Significantly different from Normal diet group (P<0.01)

a : Significantly different from Miso group (P<0.05)

b : Significantly different from Miso group (P<0.01)

肪を低下させることが知られている。更に有酸素運動による血清フィブリノーゲン低下、血小板凝集能の低下、HLDコレステロールの上昇が挙げられている^{5,6)}。国立がんセンターを中心とする多目的コホート研究(JPHC study)では⁷⁾大豆を週に5日以上摂取する女性グループでは週に0-2日摂取する女性グループに比べて、脳梗塞のリスクが0.64倍(95%信頼区間 0.43-0.95)低いと報告している。大豆を週に5日以上摂取する女性グループでは、その他心筋梗塞や循環器疾患も減少していることが判明した。同様の弱い傾向が味噌汁、インゲンなどの他の豆類の摂取量と循環器疾患による死亡リスクの間に見られた。しかし男性ではそのような傾向は認められなかった。次にイソフラボン摂取量を算出し多い順に並べると最も摂取量の多いグループの脳梗塞のリスクは最も少ないグループの0.35倍で低下していた。更に閉経前と後で調べると特に閉経後の女性でイソフラボン摂取量が多いほど脳梗塞や心筋梗塞リスクが低いという関連が見られたと報告している。イソフラボンには血中のコレステロールや血圧、血糖耐性を改善するという報告がある^{8,9)}。日本人の大豆摂取量は他の国に比べて遙かに多く摂取量が多い。イソフラボンの構造は女性ホルモンと類似しているため、特に閉経のため血中エストロゲン濃度が低下している女性で食事からのイソフラボン摂取の予防効果があったのではとKokuboらは考

えている。日本人の塩の主な摂取源である味噌汁を多く食べている女性は脳梗塞が有意の差はないが減少する傾向があると報告している。更に彼らは食塩摂取で血圧が上昇し、脳卒中の原因であるが、味噌汁は豆腐、海藻や野菜を多く含まれているため心臓血管系の疾患を減少するのであろうと考えている。しかし本研究では食塩を含む味噌を動物に与えて脳卒中の発症を遅延させたことから血圧や胃がんに関与すると考えられる食塩であるが、味噌の中の食塩は食塩単独とは異なった働きをしているように思われる。Aldermanは食塩の摂取量が多いのにもかかわらず日本人は長寿であると述べている¹⁰⁾。更にAndersonらは日本人の食塩摂取量は味噌よりも醤油の方が多く、又多く食塩を摂取しているにもかかわらず血圧は低いことを述べている¹¹⁾。Hirayamaは味噌汁を多く取る人には胃癌が少ないことを報告¹²⁾し、Kandaらは味噌汁を一日2杯飲む人は高血圧の発症が抑えられることを報告している¹³⁾。我々は以前にMNNGで誘発したラットの胃腫瘍の発生は食塩単独では増加するが味噌では増加しない¹⁴⁾ことを又Dahl食塩感受性ラットを用い味噌には食塩単独に比べて血圧を有意に上昇しない事を報告した¹⁵⁾。このようなことや今回の研究で味噌の中の食塩は食塩単独とは異なった作用を行っていること示唆される。

YamoriらはSHRSPラットに1%の食塩を与

えると脳卒中で全滅するが、大豆や魚の蛋白や、乳製品に多いカルシウム、マグネシウムを与えたり、野菜に多いカリウムや食物繊維を与えることで脳卒中が予防できたと報告している¹⁶⁾。Chibaらは炭水化物でなく蛋白が脳卒中の発生を遅らせることを報告した¹⁷⁾。Yamoriら¹⁸⁾はアメリカと日本のラットの餌を与えて飼育すると日本の餌がアメリカの餌よりも早く脳卒中が生じることを見出しその差は餌に含まれる蛋白の量ではないかと述べている。又1.5%のメチオニンを飲料水に加えると脳卒中の発生率が減少した。Gilani等はイソフラボンのない餌にメチオニンを添加すると脳卒中の発生が遅延されることを報告した¹⁹⁾。トリプトファンを100mg/体重与えると、グルコース代謝や血圧を改善するとArdiasyahは報告している²⁰⁾。宗らは大豆イソフラボンアグリコンによりSHRSPの血圧を下げる事を観察した²¹⁾。更にGilani等はイソフラボンをカゼイン餌に加えると長生きすることを見出している²²⁾。この様にSHRSPは食生活を変えることにより遺伝子の影響も克服出来るのではないかと考えられる。

本研究では味噌そのものを投与し、その結果脳卒中の発症を遅延させた。人との違いがあるにしても味噌は脳卒中の発生を遅らせる可能性を示している。味噌により生活習慣病を予防することが出来るかも知れないため、日常の生活で味噌を取ることが脳卒中の予防に大切と考える。今後更に詳しい解析が必要であろう。

結 論

脳梗塞を起こし易い自然発症高血圧ラットSHRSPラットを用いて、味噌の摂取が血圧並びに脳卒中に及ぼす影響について検討した。SHRSPラットを対照群、味噌投与群および、(味噌含有食塩量に相当する)食塩投与群の3群に分類し、経時的に血圧を測定した。体調に変調が観察された時点で屠殺し、92日齢で生存した全てのラットを屠殺した。

味噌投与群は、食塩投与群と比較して、血圧が有意に低下する傾向が観察された。さらに、味噌

投与群では、食塩投与群と比較して、脳卒中発症頻度が有意に遅延した。味噌投与群における血中総コレステロール並びにLDHコレステロールは食塩投与群に比べて有意に減少した。

これらの結果から、味噌の摂取は食塩単独摂取と比較して、脳卒中の発症を遅延させる事が示唆された。

参考文献

- 1) 中山博文: かわりつつある脳卒中 一新時代の黎明と我が国の現状— あいみっく 25, 9-12, 2004.
- 2) 厚生労働省: 人口動態統計 2010
- 3) Okamoto, K., Aoki, K.: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 27, 282-293, 1963.
- 4) Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Okamoto K.: Proceedings: Studies on stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). (I). Local factor analysis on stroke. *Jpn Heart J.* 16, 29-31. 1975.
- 5) 棚橋紀夫: 脳卒中の危険因子 診断と治療 99, 123-128, 2011.
- 6) O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusuf K, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Weimar C, Wang X, Yusuf S; INTERSTROKE: investigators. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet.* 376, 112-123, 2010.
- 7) Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group. : Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I. *Circulation.* 116, 2553-2562, 2007.

- 8) Harland JI, Haffner TA : Systematic review, meta-analysis and regression of randomised controlled trials reporting an association between an intake of circa 25 g soya protein per day and blood cholesterol. *Atherosclerosis*. 200, 13-27, 2008.
- 9) Liu XX, Li SH, Chen JZ, Sun K, Wang XJ, Wang XG, Hui RT.: Effect of soy isoflavones on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials..*Nutr Metab Cardiovasc Dis*. In press 2011
- 10) Alderman MH.: Evidence relating dietary sodium to cardiovascular disease. *J Am Coll Nutr*. 25 (3 Suppl), :256S-261S.2006.
- 11) Anderson CA, Appel LJ, Okuda N, Brown IJ, Chan Q, Zhao L, Ueshima H, Kesteloot H, Miura K, Curb JD, Yoshita K, Elliott P, Yamamoto ME, Stamler J.: Dietary sources of sodium in China, Japan, the United Kingdom, and the United States, women and men aged 40 to 59 years: the INTERMAP study. *J Am Diet Assoc*. 110, 736-745, 2010.
- 12) Hirayama T.: Relationship of soybean paste soup intake to gastric cancer risk. *Nutr Cancer* 3, 223-233, 1982.
- 13) Kanda A, Hoshiyama Y, Kawaguchi T.: Association of lifestyle parameters with the prevention of hypertension in elderly Japanese men and women: a four-year follow-up of normotensive subjects.*Asia Pac J Public Health*. 11, 77-81, 1999.
- 14) Watanabe H, Uesaka T, Kido S, Ishimura Y, Shiraki K, Kuramoto K, Hirata S, Shoji S, Katoh O, Fujimoto N.: Influence of concomitant miso or NaCl treatment on induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Oncol Rep*. 6, 989-993, 1999.
- 15) Watanabe H, Kashimoto N, Kajimura J, Kamiya K.: A miso (Japanese soybean paste) diet conferred greater protection against hypertension than a sodium chloride diet in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*. 29, 731-738, 2006.
- 16) Yamori Y.: Predictive and preventive pathology of cardiovascular diseases. *Acta Pathol Jpn*. 39, 683-705, 1989.
- 17) Chiba T, Itoh T, Tabuchi M, Satou T, Ezaki O.: Dietary protein, but not carbohydrate, is a primary determinant of the onset of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 40, 2828-235, 2009
- 18) Yamori Y, Horie R, Tanase H, Fujiwara K, Nara Y, Lovenberg W.: Possible role of nutritional factors in the incidence of cerebral lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.*Hypertension*.;6, 49-53, 1984.
- 19) Gilani Sarwar G, Nimal Ratnayake WM, Peace RW, Mueller R.: Effects of supplemental cystine or methionine on growth and lifespan of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr*. 95,:443-447, 2006.
- 20) Ardiansyah, Shirakawa H, Inagawa Y, Koseki T, Komai M.: Regulation of blood pressure and glucose metabolism induced by L-tryptophan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Nutr Metab (Lond)*. 8, 1-8, 2011.
- 21) 宋興安, 武部実, 池田克己, 野口孝則, 家森幸男 : 大豆イソフラボンアグリコンは一酸化窒素産生を促進しSHRSPラットの血圧を下げる. *日本未病システム学会雑誌* 7, 30-32 2001.
- 22) Gilani GS, Nimal Ratnayake WM, Mueller R, Mazza G.: Effects of source of protein and supplementary extracted isoflavones and anthocyanins on longevity of Stroke-prone Spontaneously Hypertensive (SHRSP) rats. *J Toxicol Sci*. 34, 335-341, 2009.

味噌の骨粗鬆症予防に関する研究

河村 幸雄

Studies on anti-osteoporotic action by Miso, Japanese soybean paste

Yukio KAWAMURA

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

緒言

骨粗鬆症は、世界的な長寿命化の傾向、罹患したときのQOLの大きな低下、またその医療費負担の増大から、その予防と治療に世界各国において大きな関心がはらわれている¹⁾。特に予防に関しては、天然物（主として薬品用と）や食品素材中の骨粗鬆症抑制作用物質に興味もたれている。とりわけ大豆食品由来物質に、もっとも大きな期待が掛けられている。しかし、これまで味噌については、食品機能学的観点からの骨代謝との関係の研究は、高血圧、ガン、などとくらべて非常に少ない。その理由の一つは、味噌が中国、韓国など東アジア、東南アジアの国々で使われているが、食事形態を栄養学的あるいはエネルギー摂取レベルから見たときに、日本のように食品摂取やライフスタイルが生活習慣病の一因とはなっていないためと考えられる。一方で、日本では、長寿化が著しいにもかかわらず、欧米諸国と比べて骨粗鬆症を含めて女性の更年期障害が軽いとされている。その理由については、ダイズ食品の摂取量の違いが挙げられている。日本では食形態の変化から味噌の使用は減少したとは言っても、まだみそ汁や噌漬けの様な一般的な形で使われるこ

とが多いことがその一因ではないかと考えられる。しかし、その十分な科学的な証明は無い状況である。

そこで、本研究では現実的な味噌の摂取量に基づいた条件下での味噌の骨粗鬆症予防あるいは改善効果に関して、科学的な証明を試みた。

実験材料と方法

味噌試料は、(社)中央味噌研究所から提供された、代表的なコメ味噌、ムギ味噌、マメ味噌を使用した。細胞レベルでの骨吸収作用は、生体内で唯一の骨分解に関わる破骨細胞の株化細胞RAW 264.7を使用した。

マウスは日本エスエルシー株式会社より購入、生後11週齢で卵巣摘出手術(OVX)または卵巣摘出擬似手術(sham)を行い、13週齢より投与を開始した。餌と水は自由摂取させ、餌はオリエンタル酵母株式会社から購入した実験動物用固形飼料(MF)を用い、水は水道水を与えた。マウスは個別のケージに入れ、25±1℃、12時間の明暗サイクルの環境下で飼育した。

尿、細胞培養液、細胞抽出液、血清、骨髄の骨

形成マーカー、骨吸収マーカー、血糖、血中脂質などは、以下の前報の方法で測定した。すなわち、血清TRAP活性、BAP (Bone Specific Alkaline Phosphatase) 測定は、パラニトロフェニルリン酸を基質とするフォスファターゼ活性により、血中デオキシピリジノリン (Dpd) はオステオリンクスキット (DSファーマ社、抗体結合マイクロプレートマウス抗デオキシピリジノリンモノクローナル抗体結合) により、レプチン測定は、レプチン測定キット (株式会社森永生科学研究所) により、グルコース (Glc) 測定はCII-testキット (和光純薬工業株式会社) により、トリグリセリド (TG) 測定はE-testキット (和光純薬工業株式会社) により測定した。タンパク定量は、Bradford法によった。

Computer Tomography (CT) 撮影は、マウスを麻酔 (イソフルラン、アボットジャパン社) 下、実験動物用X線CT装置 (ラシータ、ALOKA社) により、マウスを生きたまま、中視野のケージに入れ行った。大腿骨は、スライス巾0.2mm、測定範囲は腰部の付け根から膝関節部分までを撮

影し解析を行った内臓脂肪は、スライス巾0.5mmで、測定範囲はみぞおちから尻尾の付け根まで撮影し解析を行った。

結果

味噌は、多成分系の発酵食品であるため、素材由来の成分に加えて、発酵過程や微生物起源の生理活性物質の生成が期待される。そこで、味噌に骨代謝抑制効果が認められるかどうかを、まず細胞レベルで検証した。

1. 味噌試料の骨吸収抑制作用のスクリーニング

味噌は多成分系の食品であり、製造法も異なる。そこで(社)中央味噌研究所の協力を得て現在入手できる代表的な味噌製品を提供していただき、骨髄中で骨の分解 (吸収) に関わる唯一の細胞である株化破骨細胞であるRAW264.7細胞を使用し、その骨吸収活性にかかわる酵素の分泌抑制を指標として、味噌試料の骨基質の分解抑制作用

〈味噌のサンプル抽出〉

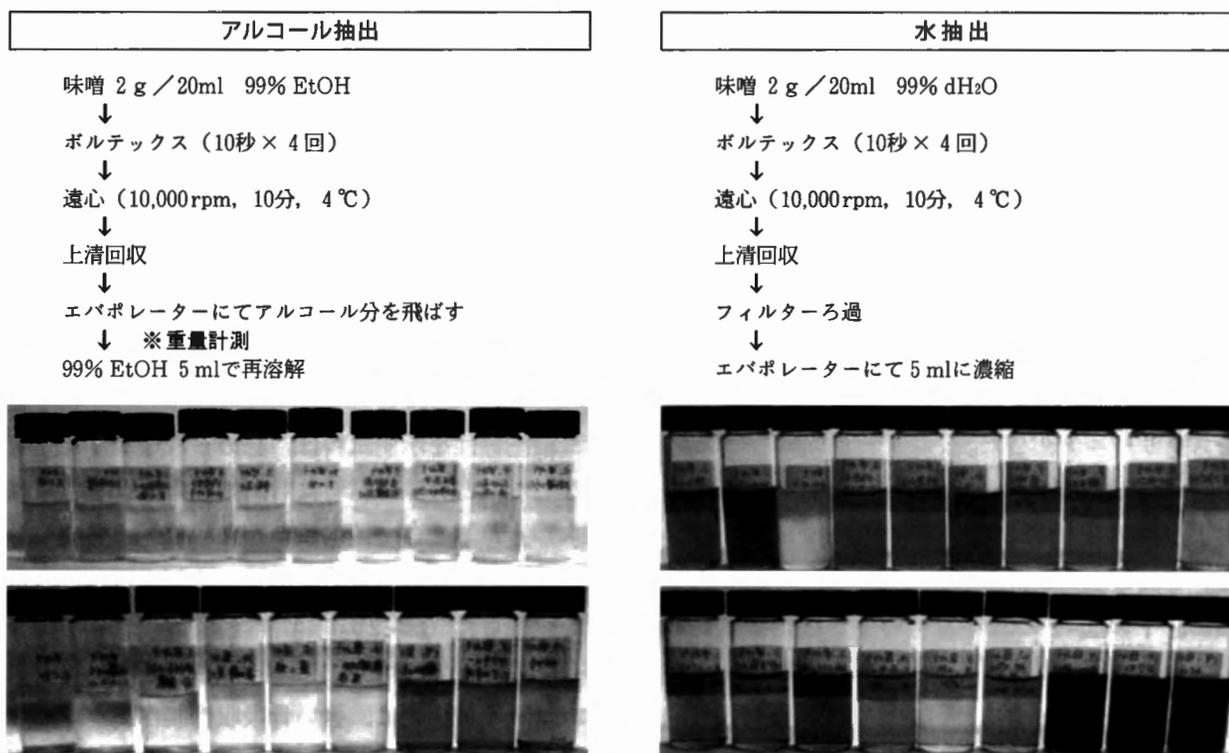


図-1 種々の味噌試料抽出液

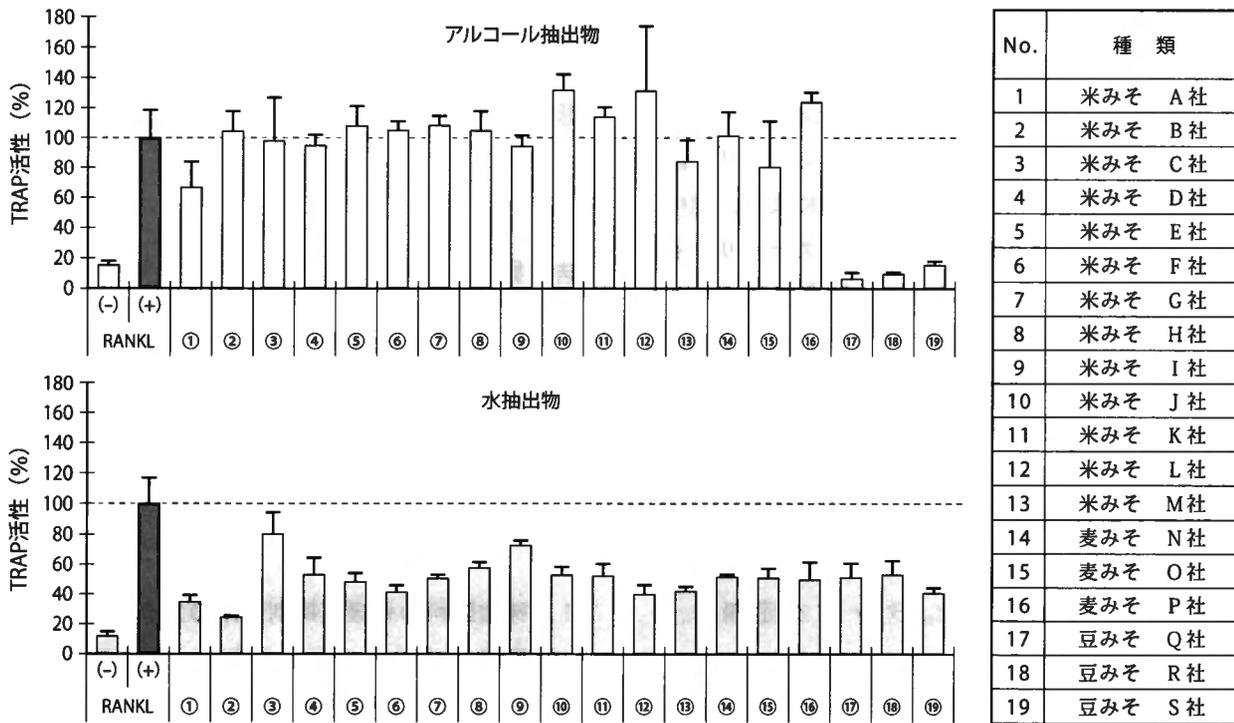


図-2 RAW264.7細胞の分化に対する味噌抽出物の影響

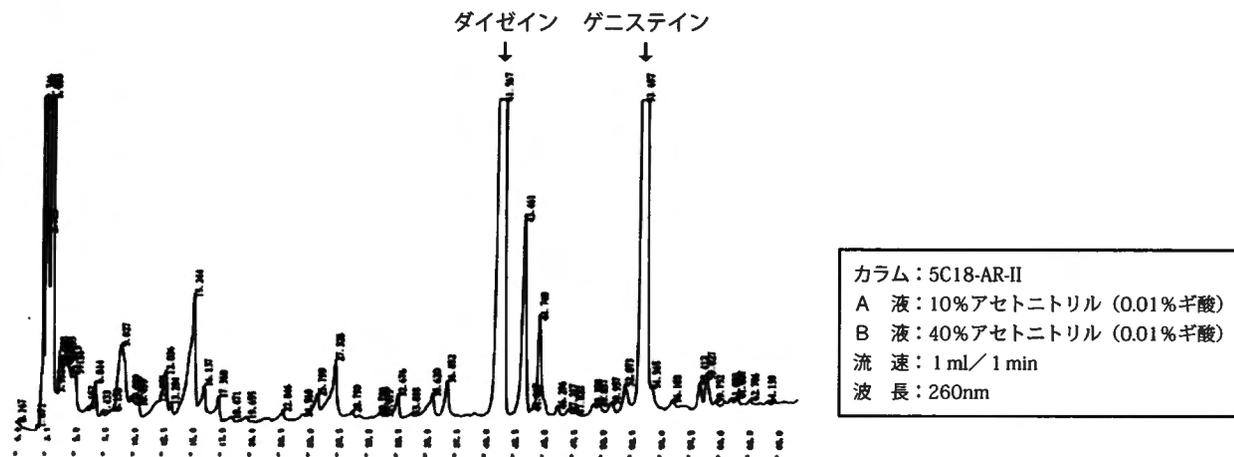


図-3 マメ味噌抽出物のHPLCのクロマトグラム

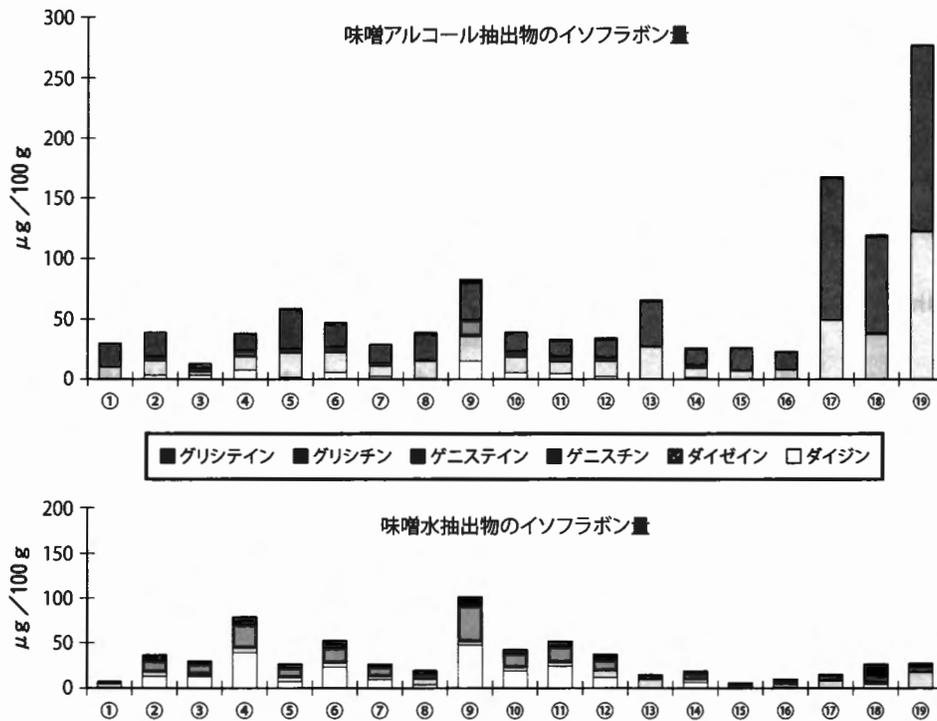
をスクリーニングした。

図-1に、19種類の味噌試料からのアルコールおよび水抽出物の調製法と抽出液の写真を示した。写真の上列左から右へまた下列の左から右へ順に、下の図-2の試料番号の1から19番に対応している。

アルコールおよび水抽出物を前破骨細胞RAW264.7細胞に添加した時の細胞生存率を検討した結果19試料すべてにおいて、RAW264.7細胞

に細胞毒性を示す試料は、認められなかった。すなわち、どの味噌試料にも、細胞毒性は認められなかった。そこで、各試料がRAW264.7細胞の分化成熟、すなわち骨分解活性を抑制するかどうかを検証した(図-2)。

図-2に示すように、試料番号17, 18, 19のアルコール抽出物に、強い骨吸収抑制作用が認められた。この結果は、3回繰り返しても再現性の認められる結果である事から17-19番の試料のアル



No.	種類
1	米みそ A社
2	米みそ B社
3	米みそ C社
4	米みそ D社
5	米みそ E社
6	米みそ F社
7	米みそ G社
8	米みそ H社
9	米みそ I社
10	米みそ J社
11	米みそ K社
12	米みそ L社
13	米みそ M社
14	麦みそ N社
15	麦みそ O社
16	麦みそ P社
17	豆みそ Q社
18	豆みそ R社
19	豆みそ S社

図-4 味噌試料のイソフラボン量

アルコール抽出物には骨吸収抑制物質が存在すると推定した。これらの試料は、いずれも豆味噌に分類される味噌であった。

そこで、これらの試料のイソフラボノイド含量を分析したところ、17-19番のまめ味噌試料で、イソフラボノイド含量の多い事が示された。代表的なHPLCクロマトグラムを図-3に示した。

19種類の味噌試料の抽出物のイソフラボノイド含量をそれぞれ、図-3に示したHPLC分析から定量した結果が図-4である。

破骨細胞の分化抑制活性とよく一致して、味噌試料17から19番のまめ味噌のアルコール抽出物において、イソフラボノイドの含量が多いのが明確に示されている。これらの結果から、19番のまめ味噌に活性成分が多く含まれていると判断されたので、19番目のまめ味噌を以下試料として味噌の骨粗鬆症抑制作用の検討材料とした。

2. 破骨細胞 (RAW264.7細胞) に対する味噌抽出物及び部分精製物の作用

前項19番と同じロットのまめ味噌を(社)中央味噌研究所から提供を受け、前項と同じ方法で多量抽出を行い、細胞実験と次項の動物実験に使用し

た。

まめ味噌からの抽出法(左図)と部分精製法(右図)を図-5に示した。

まめ味噌2.6kgから507gの乾燥抽出物を得た。この粗抽出物について前駆破骨細胞の骨吸収活性の指標となる細胞培地中への酒石酸抵抗性酸性フ

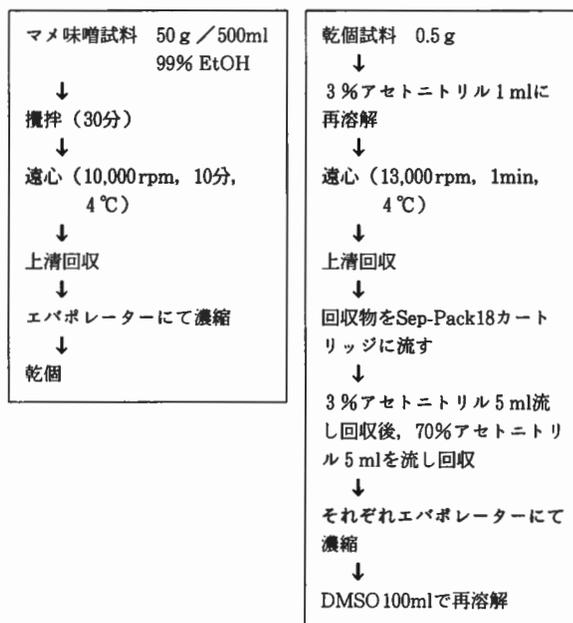


図-5 まめ味噌抽出法と活性物質の部分精製

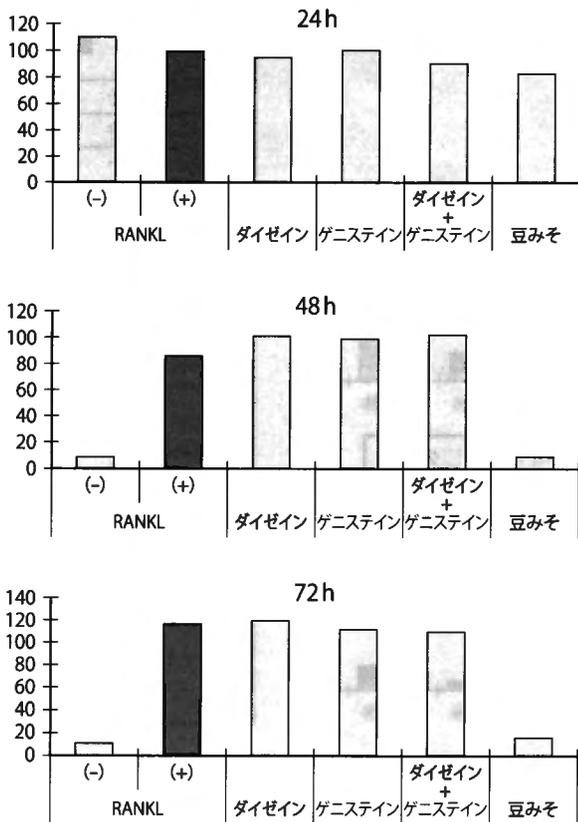


図-6 味噌抽出物、ダイゼイン、ゲニステインのTRAP抑制作用

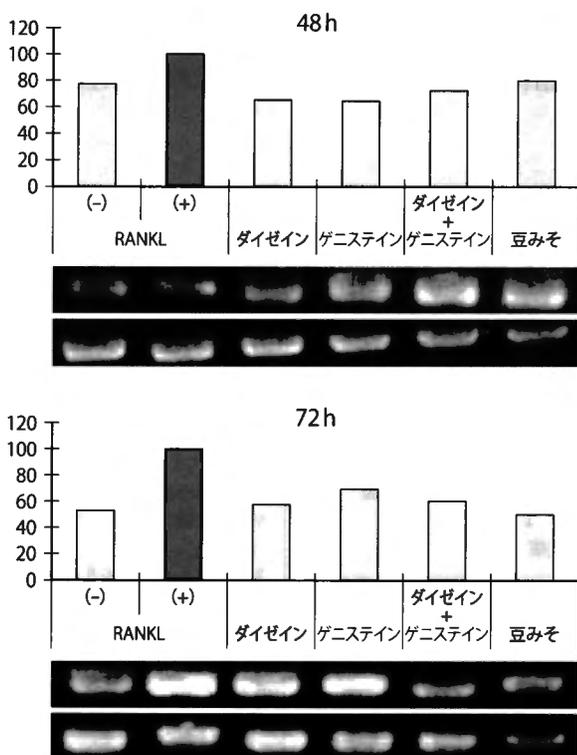


図-7 破骨細胞分化シグナルCathepsin Kの変動解析

オスファターゼ (TRAP) の分泌すなわち分化指標を測定した結果が図-6である。対照として、イソフラボノイドのダイゼインとゲニステインの作用を同時に測定した。その結果、培養日数の進展と共にマメ味噌抽出物の添加により、TRAP活性の分泌が強く抑制されていることが示された。一方、ダイゼイン (50 μ M) とゲニステイン (50 μ M) 単独あるいはその等量混合物では抑制は認められなかった。このことは、味噌抽出物には、骨吸収を抑制するダイゼインやゲニステイン以外の物質が存在することを示している。

さらに、もう一つの骨吸収マーカーのカテプシンKの遺伝子発現をRT-PCRにて解析したところ (図-7)、培養時間の進展と共にマメ味噌抽出液はその発現を抑制した。

これらの細胞実験では、ダイゼイン (50 μ M) とゲニステイン (50 μ M) の濃度をそれらの細胞毒性²³⁾のためにこれ以上上昇させられなかったため、それらにこのような効果が認められない事とは単純には結論づけは出来ない。

以上のことから、前破骨細胞の骨吸収作用に対して、マメ味噌は前破骨細胞の遺伝子発現ならびに酵素タンパク質レベルで抑制作用を示す事が明らかとなった。

3. 骨粗鬆症モデルマウスに対する味噌抽出物の骨吸収抑制作用

細胞レベルでの骨代謝の検討は、すぐれた系であるが感度が高いため、それらと現実の動物やヒトのような生体での骨の実体の増減に及ぼす骨吸収抑制効果との間にはギャップが存在する。そのため、出来る限り長期間の動物の飼育実験ないしはヒトの疫学 (介入) 調査が必要である。この観点から、骨吸収の昂進のモデルとして、卵巣摘出 (OVX) マウスを用いて、味噌 (抽出物) の経口摂取がマウスの骨代謝に及ぼす影響について検討した。

本動物実験ではより実際的な検証をするため、敢えてヒトがみそ汁を一杯飲む時に摂取する少量 (約14g) の味噌にふくまれる量の抽出物をマウスに与えて、その効果を検証した。

マウス (SPF) Slc: d d Y種の雌48匹を4群に

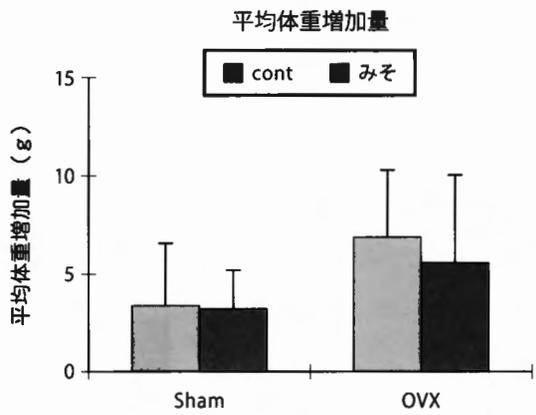
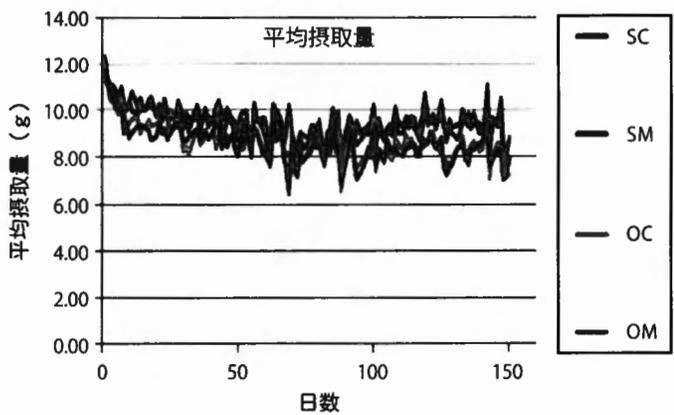
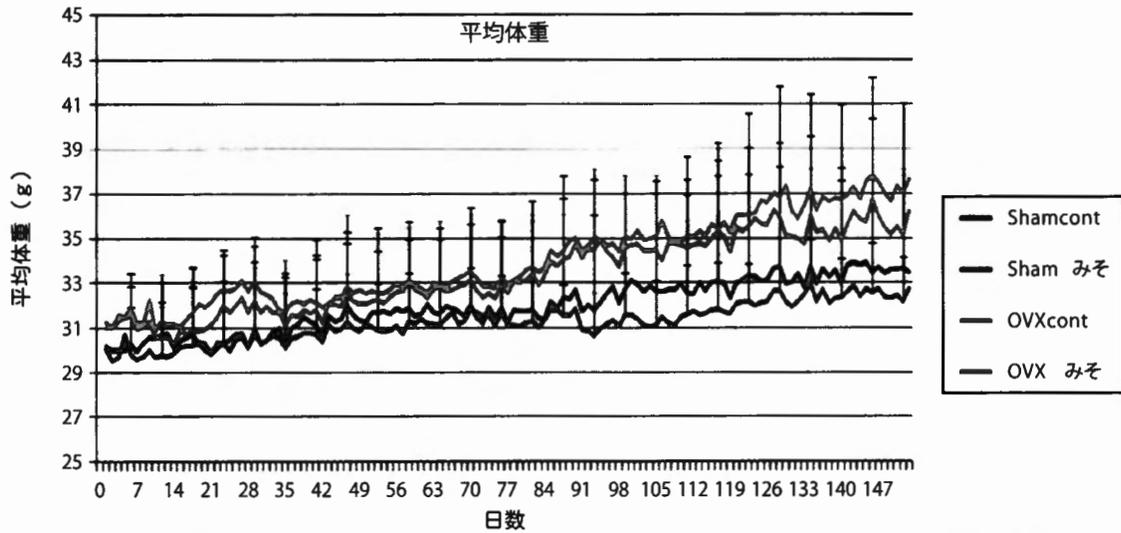


図-8 平均体重・平均摂取量・平均体重増加量

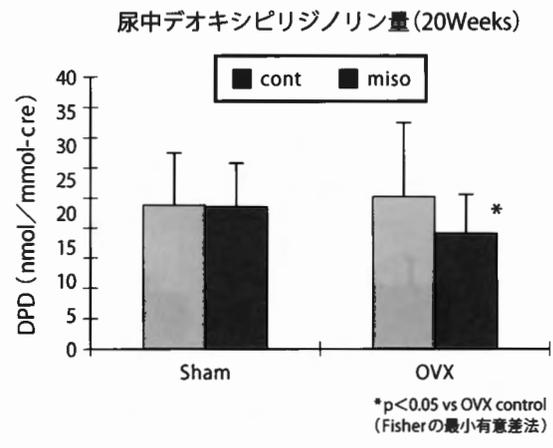
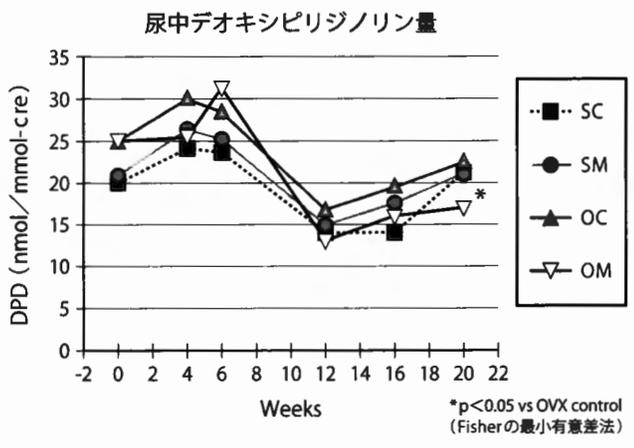


図-9 尿中デオキシピリジノリン (DPD) の変動

分け、2つの群には8週齢で卵巣摘出 (OVX)、他の2群には疑似手術 (Sham) を行い9週齢から1週間馴化後、1群12匹で試験食を開始した。摂食量、及び体重は2日おきに測定し、採尿は2週間おきに1日量を代謝ケージで集尿した。2ヶ

月ごとに採血とCT断層撮影を行った。5ヶ月目に採血、CT撮影を行った後解剖し、臓器重量、血清TRAP活性とBAP活性、摘出骨のCT解析、骨髄TRAP活性、骨髄のTRAP染色等を行った。餌の摂取量、体重、体重増加量を図-8に示し

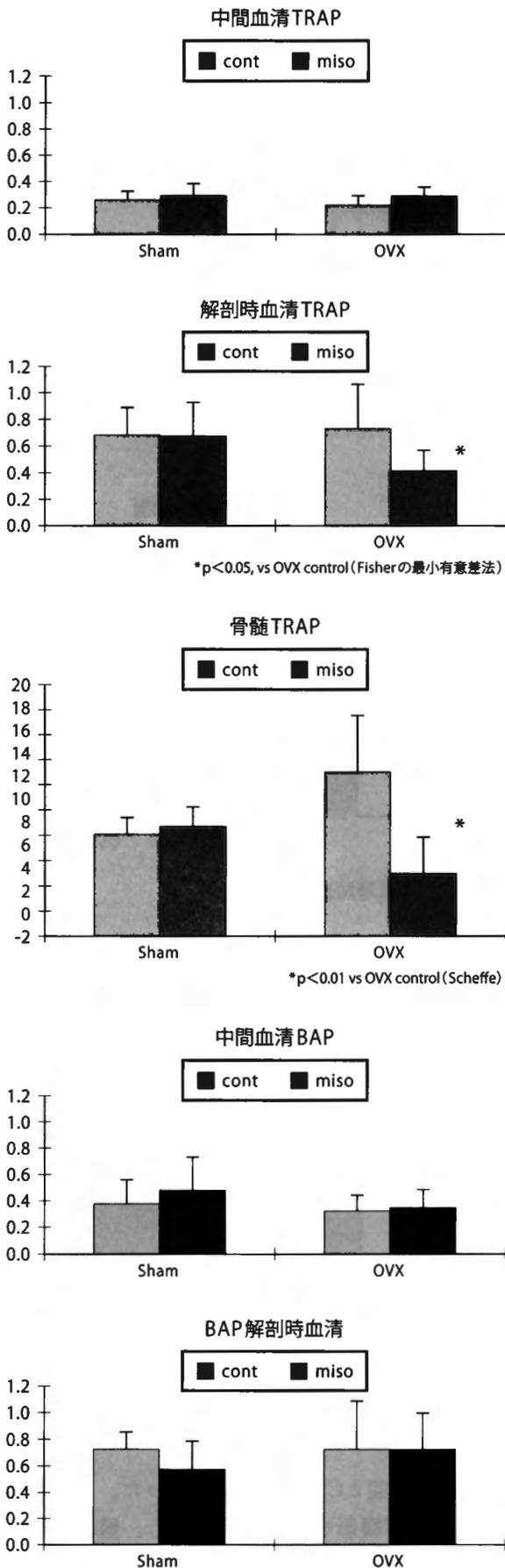


図-10 味噌5ヶ月摂取後の血清及び骨髄のTRAPとBAP活性

た。OVX処理によりエストロゲンの減少に伴い体重は、OVX群でsham群よりも有為に増加した。この増加した体重は、味噌の摂取により4ヶ月目から減少傾向が認められた。一方Sham群ではその傾向は小さかった。餌の摂取量には、差が認められなかったため、体重の差は味噌の摂取如何によるものと考えられる。

味噌摂取期間の尿中の骨吸収マーカーのデオキシピリジノリン (DPD) の変動を図-9左図に示した。140日目の測定値を比較したのが、図-9右図である。Sham群では味噌摂取の如何に関わらず差が認められなかったが、OVX群では味噌摂取群で、有意なDPDの減少が認められ骨吸収の減少していることが示された。

そこで、血清のTRAPとBAP活性を測定した結果、飼育70日目の中間点ではTRAPおよびBAP活性の値は差が認められなかった。一方、150日の血清では味噌摂取群でTRAP活性は有意に減少していたがBAP活性には差が認められなかった。

このことはOVX群での尿中の骨吸収マーカーのDPDの減少が、骨吸収と骨形成の両者すなわち骨代謝全体の減少によるのではなく、骨吸収が抑制されたことを推測させた。

そこで、骨髄のTRAP活性を測定した結果、味噌摂取群の骨髄TRAP活性は大きく減少し、味噌摂取群と非摂取群で有意な差が認められた(図-10)。

次に、骨実質の減少に差が認められるかどうかを、摘出骨の長軸方向研磨標本の実体顕微鏡写真で判定した(図-11)。

その結果、大腿骨遠位部(上部)の骨厚の回復がOVX-味噌群において、認められた。

従って、以上の結果は味噌の摂取は、たとえ一日味噌汁1杯(味噌約14g)というような少量であっても、長期間続けて摂取すれば骨代謝改善効果、特に閉経前から積極的に摂れば骨粗鬆症予防効果が期待できる事を示していると解釈できる。

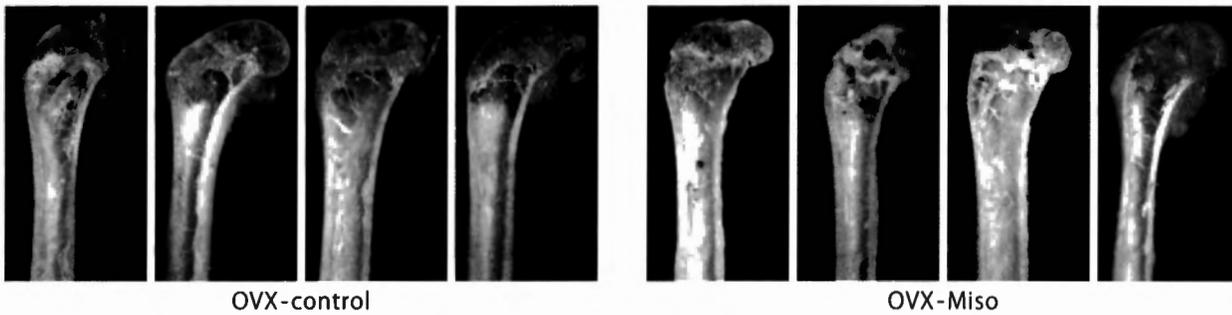


図-11 摘出大腿骨の50%研磨標本顕微鏡像

考 察

20才台を頂点として、骨密度の年齢依存的な減少は生理的なものであり逆行させることは不可能である。そのため、根本的には若年期に最高骨密度をいかに高くするかが加齢に伴う骨減少を防ぐ根本的解決法の一つである。しかし、現実には、最高骨密度には個人差があり、また運動、食事等の環境条件も異なる。特に女性は閉経期を境に、エストロゲンの減少と伴に骨吸収が昂進するのは生理的な現象であり、この速度を如何に遅くするかが問題解決の一つの方法である。

持続的な運動と伴に現実的な方法の一つは、食事である。骨合成のプラス要因であるCa⁴⁾、ビタミンD^{5,6)}やK^{7,8)}の積極的な摂取、あるいは適度に日光を浴びる事の重要性は言うまでもないが、それらの諸点に注意を払ったとしても、生理的には加齢と伴に骨吸収が骨形成を上回るため、骨吸収の抑制が必要である。

食事由来の安全な骨吸収抑制作用物質を継続的に摂取できれば、それが有る程度可能になると考えられる。その一つが、豆類特にダイズに含まれるイソフラボノイド類⁹⁻¹²⁾である。味噌は、ダイズを基本原料とする発酵製品で、特に日本では食生活の西洋化が進んだ現在でも、減りつつあるとは言っても、依然としてみそ汁に代表される様に常食形態の一つである。

本研究では、このような味噌が骨代謝の改善に有用かどうかを実証するために敢えて、現実的な摂取量すなわち一日にみそ汁1杯量の味噌成分を長期間摂取したときの効果について検討した。特に、骨吸収の昂進が著しい閉経後骨粗鬆症のモデ

ル系である卵巣摘出 (OVX) マウスに対する味噌の経口摂取の効果を解析した。

現在の代表的な味噌の種類につき、どの味噌が骨代謝改善効果を示すのかを、骨吸収の実行細胞である破骨細胞の前駆細胞であるRAW264.7細胞を使ってスクリーニングした。その結果、大なり小なりどの味噌にも効果は認められたが、予想通りダイズを原料とするマメ味噌に強い破骨細胞の分化抑制作用が認められた。

その中でも最も分化抑制能の大きい一種を選抜し、その成分組成の分析を行うと伴に部分精製により活性区分を得た。そこにふくまれる主要イソフラボノイドはダイゼインとゲニステインであったので、それらの単品と伴に味噌抽出液を比べたところ、味噌抽出液のほうが強力な破骨細胞の分化抑制作用を示した。ダイゼインとゲニステイン単独では細胞毒性が強く濃度が上げられないため正確な比較は出来ないが、これら以外の活性成分の関与を考える必要性が示された。細胞実験で、味噌 (抽出物) の骨吸収抑制効果が遺伝子及びタンパク質レベルで証明されたので、続いて動物モデルに経口摂取させることにより実際に個体レベルで骨粗鬆症の予防効果が認められるかどうかを検証した。

みそ汁一杯量の味噌に相当する味噌抽出物を餌に混ぜ込んで5ヶ月間摂取させた結果、2ヶ月の時点で骨吸収指標の尿中DPDや血清TRAPの減少は認められた。しかし、非侵襲的なCT断層撮影の画像をコンピューター解析したところ骨の実質の変化は認められなかった。経口摂取を5ヶ月まで続行して始めて、血清の骨吸収マーカー値の改善と伴に骨髄の破骨細胞の分化抑制の反映と考

えられる骨実質の減少の抑制が認められた。

以上のことから、ヒトに換算して一日にみそ汁1杯に相当する少量の味噌の摂取でも長期間毎日摂取すれば、骨吸収の昂進したOVXマウスで5ヶ月ほどで骨吸収の改善が起こることが明らかとなった。

今後さらに明らかにしなければならないことは、マウスでの5ヶ月という期間がヒトにとってどのくらいの期間であるかである。これは評価の難しい問題であるが、たとえそれがヒトの5年に相当するとしても、みそ汁1日1杯摂ることは、そんなに難しいことではないので、現実的な骨代謝改善法であると言える。さらに、このような作用の活性成分が何かと言う点も解明しなければならない。しかし、味噌という食品が、発酵食品であり、製造や貯蔵過程で複雑な化学反応の起っていることや成分の微生物変換も顕著であると考えられるため単一の物質に求めることは困難と考えられる。これらは、今後に残された重要な問題である。

謝 辞

本研究は、(社)中央味噌研究所の研究助成を受けて実施された。ここに記して厚く御礼申し上げます。味噌試料の提供については各社のご協力を得ました。感謝致します。研究の実施に当たっては、近畿大学農学部応用生命化学科応用細胞生物学研究室の教員、研究員各位ならびに大学院生、4回生諸氏のご協力を得ました。ここに感謝致します。

文 献

- 1) Tucker, K. L. Osteoporosis prevention and nutrition. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2009, 7, 111-117.
- 2) Ullah MF, Ahmad A, Zubair H, Khan HY, Wang Z, Sarkar FH, Hadi SM. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. 2011, 55, 553-559.

- 3) Rucinska A, Roszczyk M, Gabryelak T *Cell Biol Int.* 2008 32(8) 1019-23. Epub 2008 Apr 10. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells.
- 4) (2) Welten, D. C.; Kemper, H. C.; Post, G. B.; van Staveren, W. A. A meta-analysis of the effect of calcium intake on bone mass in young and middle aged females and males. *J. Nutr.* 1995, 125, 2802-2813.
- 5) Tsugawa, N.; Shiraki, M.; Suhara, Y.; Kamao, M.; Tanaka, K.; Okano, T. Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83, 380-386.
- 6) Koshihara, Y.; Hoshi, K.; Okawara, R.; Ishibashi, H.; Yamamoto, S. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J. Endocrinol.* 2003, 176, 339-348.
- 7) Tsugawa, N.; Shiraki, M.; Suhara, Y.; Kamao, M.; Tanaka, K.; Okano, T. Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83, 380-386.
- 8) Koshihara, Y.; Hoshi, K.; Okawara, R.; Ishibashi, H.; Yamamoto, S. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J. Endocrinol.* 2003, 176, 339-348.
- 9) Uesugi, T.; Toda, T.; Tsuji, K.; Ishida, H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol. Pharm. Bull.* 2001, 24, 368-372.
- 10) Lee, Y. B.; Lee, H. J.; Kim, K. S.; Lee, J. Y.; Nam, S. Y.; Cheon, S. H.; Sohn, H. S. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol*

Biochem. 2004, 68, 1040-1045.

- 11) Ishida, H.; Uesugi, T.; Hirai, K.; Toda, T.; Nukaya, H.; Yokotsuka, K.; Tsuji, K. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol. Pharm. Bull.* 1998, 21, 62-66.
- 12) Ishimi, Y.; Arai, N.; Wang, X.; Wu, J.; Umegaki, K.; Miyaura, C.; Takeda, A.; Ikegami, S. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 697-701.



研究助成報告

味噌由来新規機能性ペプチドの網羅的探索と構造決定

岩崎 崇

Screening of novel functional peptides derived from miso

Takashi IWASAKI

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

1. 研究目的

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

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

2. 研究手法

2-1. ペプチド抽出・精製

（社）中央味噌研究所よりご提供頂いた以下6種のみそを研究材料として用いた。

- ①米みそ（白みそ）
- ②豆みそ
- ③米みそ（仙台系）
- ④米みそ（麴みそ）
- ⑤米みそ（信州系）
- ⑥麦みそ

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

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

溶液をWaters Sep-Pak C18カラムにロードし、ペプチド・低分子化合物をカラムに吸着させた後、6段階のアセトニトリル上昇系列（ACN10%、20%、30%、40%、50%、60%）により溶出を行った。これにより、みそサンプル6種×アセトニトリル上昇系列6段階=36種のみそ抽出画分を得た。次いでエバポレーターを用いて、全画分からアセトニトリルを揮発除去した後に、全画分をそれぞれ二等分割し、一方のサンプルに対してプロテアーゼ処理（ProteaseK 100 μ g/ml, 37°C, 10min）を行うことで、ペプチド性因子が未分解である画分とプロテアーゼ分解された画分を得た。その後、以下に記載する種々のバイオアッセイにおいて、プロテアーゼ処理/未処理画分の活性比較を行うことで、ペプチド性機能因子の探索を行った。

2-2. 細菌増殖抑制試験

細菌増殖抑制試験においては、製品評価技術基盤機構から購入したグラム陽性細菌：黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus* : NBRC100910）と、グラム陰性細菌・大腸菌（*Escherichia coli* : NBRC102203）を用いて細菌増殖に影響を与える因子の探索を行った。細菌培地（Polypeptone 10g, Yeast extract 2g, MgSO₄ · 7H₂O 1g, 蒸留水 1L）中に5.6x10⁶ CFU/mlになるように調製した細菌溶液90 μ lと、みそ抽出画分（みそ100mg相当）10 μ lを96wellプレート上で混合し、37°Cで24時間培養した。その後、マルチプレートリーダーにて595nmの吸光度を測定し、細菌の増殖率を評価した。

2-3. 腫瘍細胞増殖抑制試験

腫瘍細胞増殖抑制試験においては、理研細胞銀行から購入した細胞株を使用した。正常細胞としてマウス繊維芽細胞（NIH-3T3 : RCB2767）、および腫瘍細胞としてヒト腎臓癌細胞（HepG2 : RCB1886）、マウス神経膠腫細胞（U251 : RCB0270）、ヒト肺癌細胞（RERF-LC-AI : RCB0444）、ヒト骨肉腫細胞（HT1080 : RCB1956）、ヒト大腸癌細胞（CACO-2 : RCB0988）、ヒトTリンパ性白血病細胞（Jurkat : RCB0806）、ヒト

バーキットリンパ腫細胞（RAJI : RCB1647）を用いて、腫瘍細胞選択的に細胞増殖抑制活性を示す因子の探索を行った。細胞培地として、NIH-3T3, HepG2, U251にはD-MEM培地（ウシ胎児血清10%含有）、RERF-LC-AI, HT1080にはMEM培地（ウシ胎児血清10%含有）、CACO-2にはMEM培地（ウシ胎児血清20%含有）、Jurkat, RAJIにはRPMI培地（ウシ胎児血清10%含有）を使用した。各細胞株を8.0x10⁴ cells/mlになるように調製した細胞溶液90 μ lと、みそ抽出画分（みそ100mg相当）10 μ lを96wellプレート上で混合し、37°C, 5.0%CO₂条件下で24時間培養した。次いで、Cell Counting Kit-8（同仁堂）を10 μ l/well添加し、37°C, 5.0%CO₂条件下で4時間培養した。その後、マルチプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定し、細胞の増殖率を評価した。

2-4. 免疫賦活・抗炎症試験

免疫賦活試験においては理研細胞銀行から購入したマウスマクロファージ細胞（RAW264 : RCB0535）を用いて、RAW264細胞を活性化させる因子の探索を行った。MEM培地（ウシ胎児血清10%含有）中にRAW264細胞が2.0x10⁵ cells/mlになるように調製した細胞溶液90 μ lと、みそ抽出画分（みそ100mg相当）10 μ lを96wellプレート上で混合し、37°C, 5.0%CO₂条件下で24時間培養した。次いで、Griess試薬（1% Sulfanilamide, 2.5% Phosphoric acid, 0.1% N-1-Naphthylethylenediamine Dihydrochloride）を100 μ l/well添加し、室温で20分インキュベーションした。その後、マルチプレートリーダーにて540nmの吸光度を測定し、RAW264細胞から産生されたマクロファージ活性化指標物質であるNO₂イオン濃度を定量し、RAW264細胞に対する免疫賦活活性を評価した。

また抗炎症試験においては、細菌細胞壁の構成成分であるLPS（リポポリサッカライド）でRAW264細胞を刺激することで、予めRAW264細胞を過剰に活性化させた状態=炎症状態を誘導し、この炎症状態を抑制する因子の探索を行った。MEM培地（ウシ胎児血清10%、LPS 10 μ g

／ml含有)中にRAW264細胞が 2.0×10^5 cells/mlになるように調製した細胞溶液90 μ lと、みそ抽出画分(みそ100mg相当)10 μ lを96wellプレート上で混合し、37 $^{\circ}$ C、5.0%CO₂条件下で24時間培養した。次いで、Griess試薬を100 μ l/well添加し、室温で20分インキュベーションした。その後、マルチプレートリーダーにて540nmの吸光度を測定し、RAW264細胞から産生されたマクロファージ活性化指標物質であるNO₂イオン濃度を定量し、RAW264細胞に対する抗炎症活性を評価した。

2-5. 抗酸化試験

抗酸化試験においてはDPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 酵素活性試験法を用いて、人工的に安定化させたDPPHラジカルに対する消去能を示す因子の探索を行った。DPPH溶液 {DPPH (0.4mM/EtOH) : MES-Buffer (pH6.0) : 超純水 = 4 : 1 : 3} 190 μ lと、みそ抽出画分(みそ100mg相当)10 μ lを96wellプレート上で混合し、室温で30分インキュベーションした。その後、マルチプレートリーダーにて520nmの吸光度を測定することでDPPHの消去能を定量し、抗酸化活性を評価した。

3. 研究結果

3-1. 一次スクリーニング

細菌増殖抑制試験の結果、グラム陰性細菌である大腸菌の増殖に影響を与えるペプチド性因子はほとんど確認されなかった。しかしその一方で、米みそ(白みそ)由来の抽出画分において、グラム陽性細菌である黄色ブドウ球菌に対して増殖抑制を示すペプチド性因子が複数確認された。また、興味深いことに、米みそ(信州系)由来の抽出画分全てにおいて、黄色ブドウ球菌に対する増殖促進効果が見出された。また、細胞増殖抑制試験においては、マウス繊維芽細胞(正常細胞) NIH-3T3細胞に対して毒性を示さず、且つ腫瘍細胞にのみ選択的細胞毒性を示す抗腫瘍活性因子が多く見出された。その大部分は非ペプチド性因

子であったが、少数のペプチド性因子の存在を示唆する結果が得られた。免疫賦活試験においては5種のペプチド性免疫賦活活性因子の存在が示唆され、また抗炎症試験では僅か1種ではあるがペプチド性抗炎症活性因子の存在が示唆された。抗酸化試験においては、ペプチド性の抗酸化活性因子の存在は確認できなかった(図1)。

3-2. 抗腫瘍活性の再現性確認試験

前述の一次スクリーニングにおいて抗腫瘍活性が確認された広範囲のみそ抽出画分に対して、再現性の確認を行った。広範囲のみそ抽出画分に対して高い感受性を示したヒト白血球細胞Jurkat細胞と、マウス繊維芽細胞(正常細胞) NIH-3T3細胞を用いて、再び細胞増殖抑制試験を行った。その結果、複数のみそ抽出画分について腫瘍細胞選択的な抗腫瘍活性因子の存在が確認され、その中でも『米みそ(白みそ)60% ACN溶出画分』と『米みそ(仙台系)10% ACN溶出画分』にペプチド性の抗腫瘍活性因子の存在が確認された。一次スクリーニングの結果と照らし合わせた結果、唯一ではあるが『米みそ(白みそ)60% ACN溶出画分』においてペプチド性の抗腫瘍活性因子の存在が再現性を持って確認された(図2)。

3-3. イオン交換クロマトグラフィー

前述の一次スクリーニングおよび再現性確認試験においてペプチド性の抗腫瘍活性因子が確認された『米みそ(白みそ)60% ACN画分』を、イオン交換クロマトグラフィーに供することで、活性因子の精製を行った。Waters Sep-Pak CM カラム(陽イオン交換カラム)とWaters Sep-Pak QMA カラム(陰イオン交換カラム)を直列に連結し、『米みそ(白みそ)60% ACN画分』をロードした。画分に含まれる化合物を陽イオン/陰イオン交換カラムに吸着させ、通過液をFT (Flow through) 画分として回収した。その後、陽イオン/陰イオン交換カラムをそれぞれ9段階のNaCl上昇系列(NaCl 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.7M, 0.8M, 1.0M)により溶出を行った。精製後の各画分を用いて、

		米みそ (白みそ)					豆みそ					米みそ (仙台系)					米みそ (麴みそ)					米みそ (信州系)					麦みそ										
溶出 A C N濃度 (%)		10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
細胞・細菌増殖抑制試験	NIH3T3 (正常細胞)																																				
	HepG2 (腎臓癌細胞)																																				
	U251 (神経膠腫細胞)																																				
	RERF (肺癌細胞)																																				
	HT1080 (骨肉腫細胞)																																				
	CACO-2 (大腸癌細胞)																																				
	Jurkat (白血病細胞)																																				
	RAJI (リンパ腫細胞)																																				
	<i>E.coli</i> (大腸菌)																																				
	<i>S.aureus</i> (黄色ブドウ球菌)																																				
抗酸化試験																																					
免疫賦活試験																																					
抗炎症試験																																					

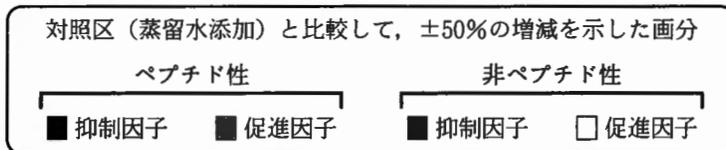


図1 みそ6種における機能性因子の一次スクリーニング

ヒト白血病細胞Jurkat細胞に対する細胞増殖抑制効果を、前述の2-3. 腫瘍細胞増殖抑制試験と同様の方法で測定した。その結果、『FT画分』と『QMAカラムNaCl 0.2M溶出画分』の両画分に、明確な細胞増殖抑制因子が存在することが確認された(図3)。次いで、これらの活性因子のどちら(または両方)がペプチド性の抗腫瘍活性因子であるかを調べるため、両画分に対してプロテアーゼ処理/未処理を行い、プロテアーゼに対する感受性を調べた。その結果、『FT画分』ではプロテアーゼ処理/未処理にかかわらず抗腫瘍活性が完全に消失し、また『QMAカラムNaCl 0.2M溶出画分』ではプロテアーゼ処理によっても抗腫瘍活性は維持されることが確認された(図3)。これらの結果から、『FT画分』および『QMA

カラムNaCl 0.2M溶出画分』のどちらか(または両方)に含まれていると推測されたペプチド性の抗腫瘍活性因子は、失活した可能性が示唆された。

4. 考察と今後の展開

本研究において、6種のみそをペプチド資源とした一次スクリーニングおよび再現性確認試験の結果、『米みそ(白みそ)60%ACN溶出画分』にヒト白血病細胞Jurkatに対して選択的な抗腫瘍活性を示すペプチド性因子の存在が確認された。しかしながら、その後のイオン交換クロマトグラフィーによる精製の結果、上記画分において二種

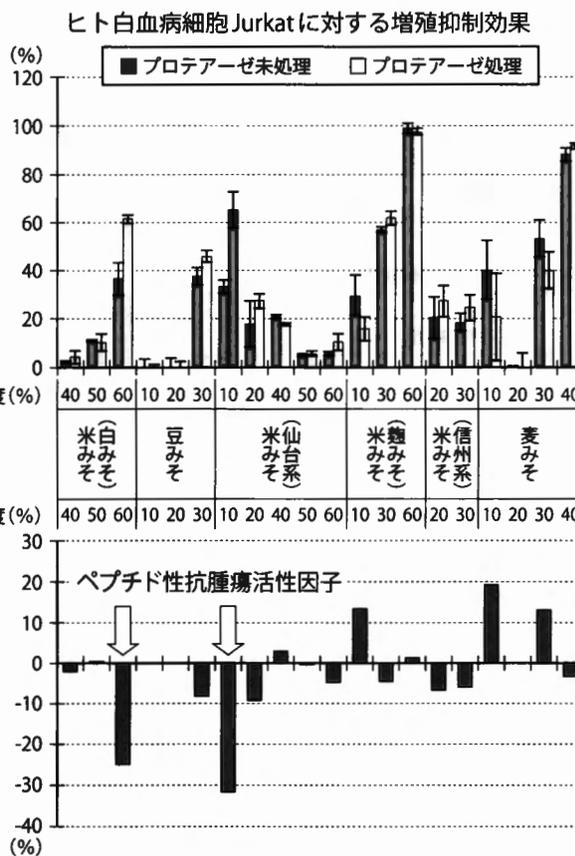
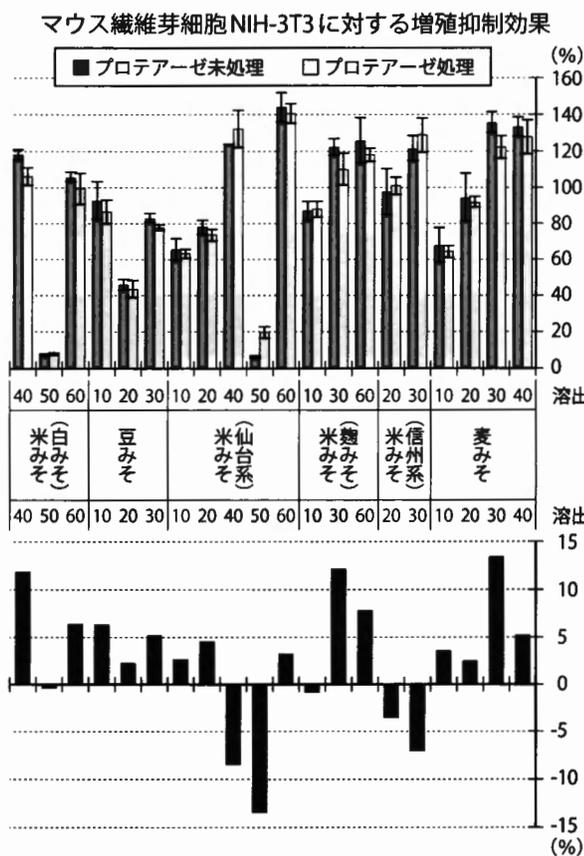


図 2

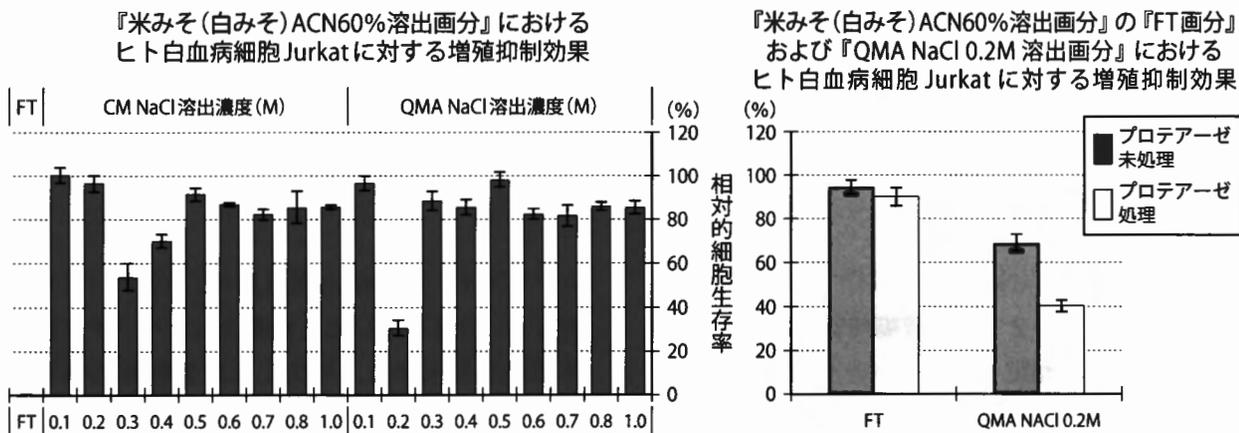


図 3

類の活性因子の存在が確認されたが、そのどちらもプロテアーゼに対して感受性は示さなかったことから、追い求めていたペプチド性の抗腫瘍活性因子は失活した可能性が示唆された。

タンパク質と比べて、ペプチドは低分子であるため構造的に安定であり、変性しにくいと考えられている。しかし、このようなペプチドも一定の条件が揃えば変性することが知られている。変性

の例としては、ペプチドの加水分解、脱アミド化、ピログルタミン酸化、酸化などが挙げられる。加水分解はAsp-Proが含まれる配列中で起こる反応であり、Asp-Proから形成された環状イミド中間体がペプチド結合を切断する。脱アミド化はAsn-GlyまたはGln-Glyが含まれる配列中で起こる反応であり、AsnまたはGlnの側鎖のアミドがカルボン酸へと変換される。また、ピログルタ

ミン酸化はGlnが配列のN末端にある場合に高頻度で発生し、Glnのアミノ基とカルボキシル基が分子内縮合し環状構造を形成する。さらに、酸化は配列中にCysやMetといったS原子を有するアミノ酸が含まれる場合に発生し、特にMetは化学的および光学的な触媒反応により不可逆的に酸化される。

本研究の結果が再現性に乏しく、精製過程において目的物質の活性が消失した原因としては、これらペプチドの変性が関与している可能性が考えられる。このような結果に繋がった直接の原因は、みそ抽出画分の保存方法にあると推測される。本研究では、大量のサンプルと多数のバイオアッセイを組み合わせる実験を行っているため、一次スクリーニングを終えるだけで約3ヶ月の時間を要してしまった。その後、再現性確認試験、イオン交換クロマトグラフィーと精製を進めていったが、その間、みそ抽出画分は蒸留水に懸濁した状態で冷蔵保存されていた。この間に、前述の

ペプチド変性が進行し、最終的にペプチド機能の消失に繋がったものと推測される。

そこで、今後はみそ抽出画分を再度新たに調製し、みそ抽出画分の保存方法に細心の注意を払いつつ、ペプチド性活性因子の探索に再び挑戦する。具体的な対策としては、みそ抽出画分を小分けにした状態で凍結乾燥を行い、粉末状態で-80℃、遮光条件下での保存を徹底する。これにより、みそ抽出画分の凍結・融解の繰り返しを避け、ペプチド変性のリスクを最小限に抑える。また、一次スクリーニングにおける各バイオアッセイを三反復行うことで、『高信頼性なみそ由来機能性因子プロファイル』をまず構築し、このプロファイルに基づいた形で（トリプルポジティブであった画分に焦点を定めて）、精製を進めていく予定である。現在、全てのみそ抽出画分の再調製が終わり、第一回目の一次スクリーニングを実施する段階である。今後は、上記の手法に基づいて、本研究を遂行していく所存である。

亜鉛欠乏予防における味噌の効能に関する基盤研究

神戸 大朋

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

Taiho KAMBE

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

緒言

亜鉛は、味覚機能や免疫機能、創傷治癒などに重要な役割を果たす必須微量栄養素である¹⁾。そのため、日々の食事より亜鉛を充足させることは、健康の増進に重要となる。実際に、ヨーロッパ各国が共同で実施した疫学調査Zinc Age projectにおいて、健康な高齢者は血清亜鉛値が高いことが示されており²⁾、体内亜鉛量を適切に保つことは健全社会の実現への重要な要素の一つとなると考えて良い。しかしながら、近年、先進国においても高齢者や女性を中心に亜鉛欠乏症状を呈する患者が増えてきており、大きな社会問題となりつつある³⁾。我が国も例外ではなく、最近の疫学調査では、全国民の2～3割が亜鉛欠乏傾向にあるとの試算も出されている。亜鉛欠乏の効果的な予防策の確立が強く望まれている⁴⁾。

亜鉛は、主に小腸より吸収されるが、その吸収過程には亜鉛トランスポーターZIP4が機能する⁵⁾。ZIP4は先天性亜鉛欠乏症の原因となる亜鉛吸収における必須分子であり^{6,7)}、小腸上皮細胞頂端膜に局在して、食事由来の亜鉛を上皮細胞内に取り込む機能を果たしている^{8,9)}。しかしながら、消化

管における亜鉛吸収効率は30%程度と低く、亜鉛吸収率を高めるためには、ZIP4の発現を高めることが肝要となると考えられる。我々は、ZIP4の発現を促進する食品因子は、亜鉛取り込み量を増加させ、亜鉛欠乏の予防に効果的であるとの仮説のもと、ZIP4発現促進因子の探索に適したスクリーニング系を構築し、様々な食品からZIP4発現促進因子を探索している。本スクリーニング系を用いた昨年度の解析では、ZIP4の発現を促進すると思われる味噌を複数種見出した。今年度の解析では、本スクリーニング系を改良してより効率的な系として再構築し、その改良型スクリーニング系を利用して、味噌サンプルの再評価を行うとともに、活性成分の単離精製に関する解析を実施した。

方法

①改良型ZIP4発現促進活性因子スクリーニング系の構築とそれを用いた味噌サンプルの亜鉛輸送活性についての検討

細胞内亜鉛濃度に応じて発現が上昇するメタロチオネインプロモーター（マウスMT-I, -236～

+36)の制御により分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を発現する形質を、現行のスクリーニング用細胞株に導入し、細胞内亜鉛量の増加をSEAP活性でモニターできるように改良した(図1)。この樹立細胞を用いて、味噌サンプルのSEAP活性に及ぼす効果を検討した。SEAPの活性測定には、培養液10 μ lを使用し、100 μ lの基質溶液(2mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate in 1M diethanolamine buffer, pH 9.8 containing 0.5mM MgCl₂)を加えた後、室温に放置し、遊離してくる*p*-nitrophenolの量を吸光計にて測定した(波長=405nm)。仔牛ALP(Roche)を用いて検量線を作成し、SEAP活性を求めた。

②味噌サンプルからのZIP4発現促進活性因子同定の試み

複雑な化合物構成を持つ味噌サンプルからの精製を実施する前に、味噌の共通の原料である大豆を用いて精製条件を検討した。大豆抽出物を粗精製後、中圧カラムクロマトグラフィーや分取TLC、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などを用いて分離し、幾つかの単一化合物として精

製した。現在、その構造決定を行っている。この大豆を用いた予備実験で設定したチャート(図3)を精製条件の参考にして、改良型スクリーニング系を用いた解析でZIP4発現促進効果が期待された味噌サンプルからZIP4発現促進活性を示す成分の単離精製を試みている。

結果

改良型スクリーニング系の構築

現在用いているスクリーニング系は、ZIP4発現促進活性のみを反映したものであるため、細胞内亜鉛量の変化をスクリーニングと同時に追跡することができなかった。そこで、現在スクリーニングに使用している培養細胞株に、亜鉛濃度に応じて発現が上昇するメタロチオネインプロモーターの制御により分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を発現する形質を導入し、細胞内の亜鉛濃度の変動をSEAPの活性変動で簡便に評価できるシステムを構築した(図1)。本株の樹立により、さらに精度の高いスクリーニングを実施することが可能となったため、従来のスクリーニン

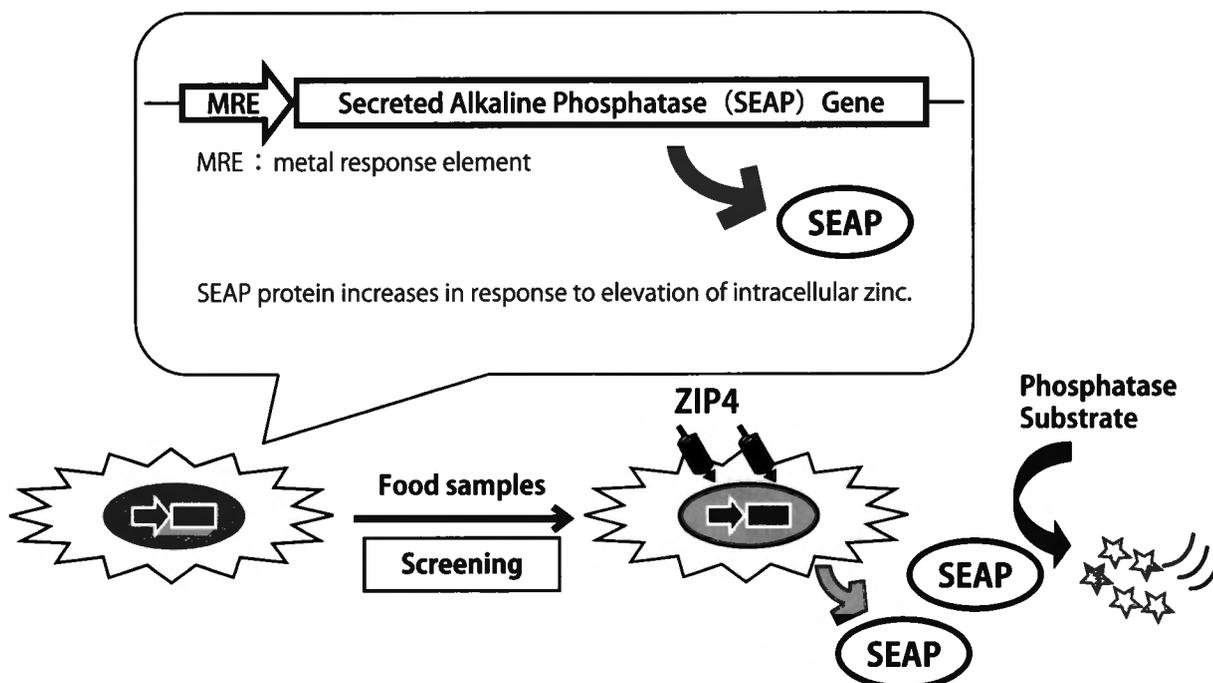


図1. 改良型スクリーニング系の概略

現在スクリーニングに使用している培養細胞株に、亜鉛濃度に応じて発現が上昇するメタロチオネインプロモーター(mouse MT-I, -236~+36)の制御により分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を発現する形質を導入した。

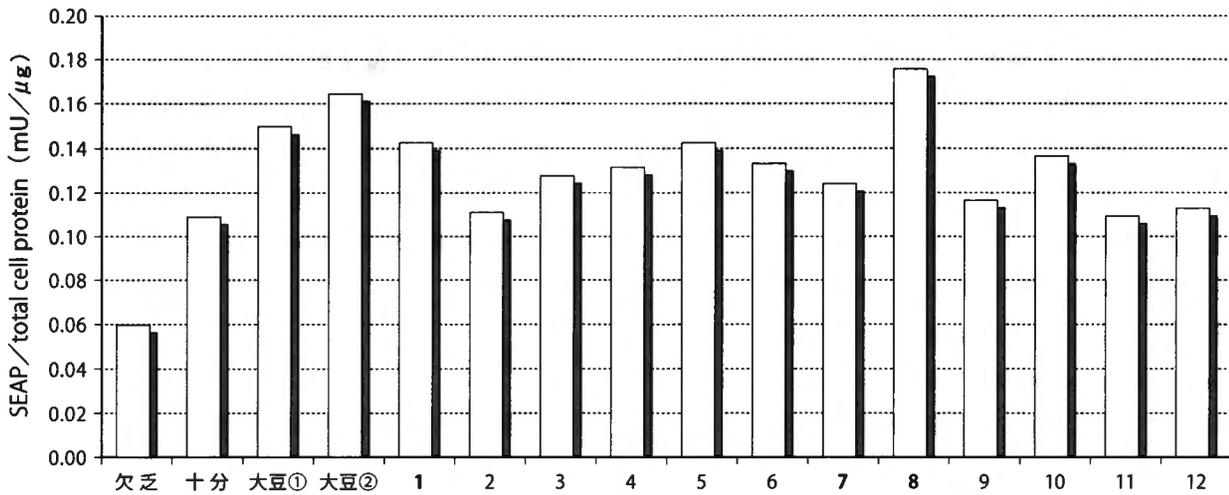


図2. 味噌サンプルの持つ亜鉛取り込み活性の評価

図1で示した改良型スクリーニング系を用いて、これまでにZIP4発現促進活性が認められた味噌サンプルの亜鉛取り込み活性について評価した。欠乏は亜鉛欠乏培地、十分は味噌添加無しのコントロール、大豆①、②はこれまでに活性を認めている2種類の大豆抽出画分（ポジティブコントロール）を示す。太字で示した2つのサンプル（1, 8）は、SEAP活性を増加させている。この2つに加え、ZIP4発現促進活性の強かったサンプル7の3つの味噌から、現在、活性成分の単離精製を試みている。

スクリーニング系を用いた解析でZIP4の発現促進活性が期待された12種類の味噌サンプルについての評価を実施した（図2）。その結果、ZIP4の発現促進活性に付随して、SEAP活性を比較的強く増加させる味噌サンプルを2種同定することができた（図2）。本SEAP活性は、細胞内の亜鉛取り込み活性（吸収促進活性）を反映するものであるため、これらSEAP活性を上昇させた味噌は、亜鉛吸収促進活性が含まれることが期待される。

味噌サンプルからのZIP4発現促進活性因子同定の試み

これまでの解析で、味噌の共通原料である大豆のイソフラボンを多く含む画分にZIP4発現促進活性が認められることを突きとめていたため、まず、この大豆抽出画分から、活性因子の同定を試みた。ZIP4発現促進活性を指標にして図3のチャートに示したように精製を進め（図4）、幾つかの単一化合物の精製にまで成功している（図5）。現在、それら化合物の構造決定を行っているところであり、化合物が特定されれば、その情報をもとにしたアプローチから、味噌成分の探索を行うことを計画している。本予備実験より、味噌サンプルの活性画分である水溶性画分の精製に

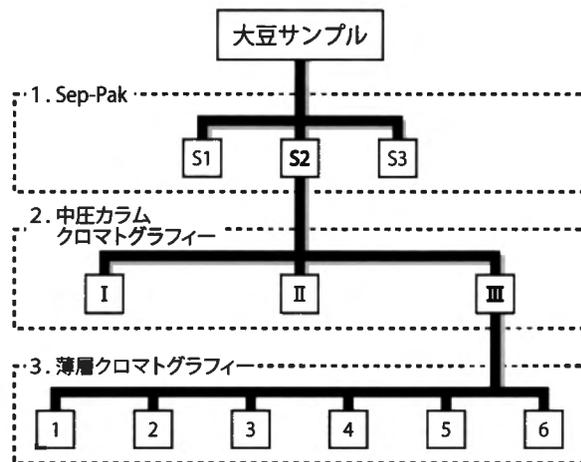


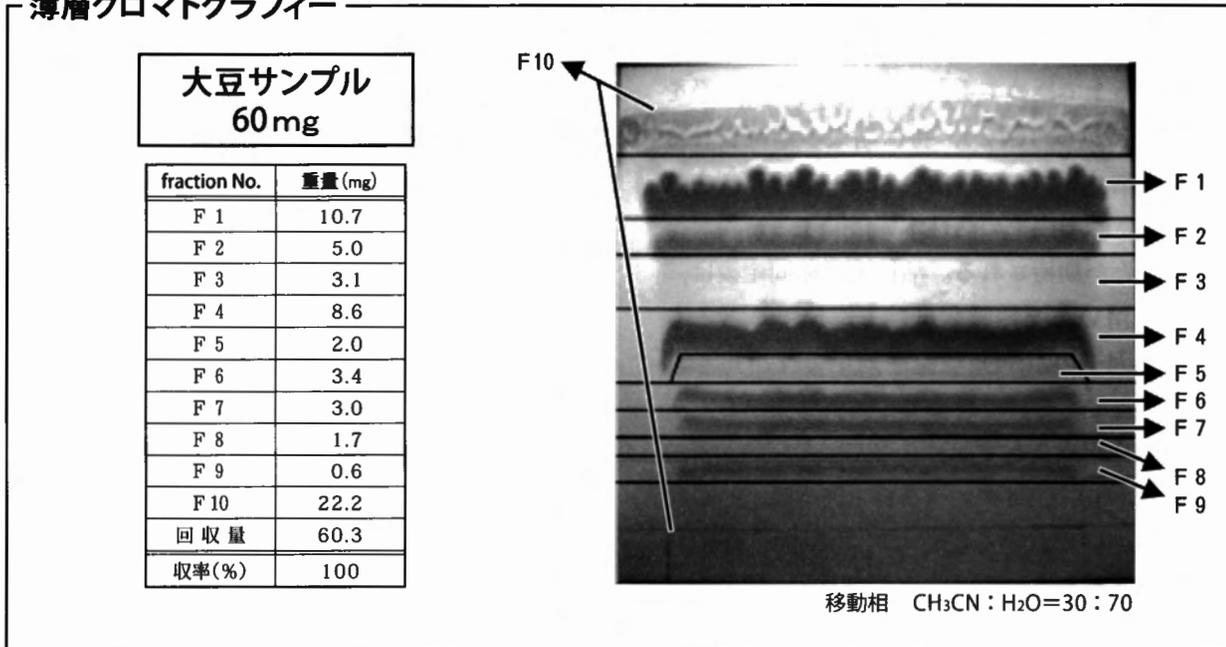
図3. 大豆サンプルの精製に用いたフローチャート
この精製条件を参考にして、味噌サンプルの精製を実施している。

有効と思われる精製方法が確立できたため、まず図2で示した味噌サンプルの活性成分の精製を進めている。

考 察

亜鉛欠乏患者は、味覚障害や免疫機能低下、創傷治癒力の低下などの症状を呈することが知られている¹⁰。さらに最近の亜鉛研究の進展により、亜鉛の多岐にわたる生理機能が明らかにされるにつ

薄層クロマトグラフィー



欠乏 — 精製前 F 1 F 2 F 3 F 4 F 5 F 6 F 7 F 8+9 F 10

ZIP4



図4. 部分精製された大豆抽出画分を用いて実施した予備実験の結果

精製前のサンプルは終濃度0.1%, 精製サンプル(F)は終濃度0.02%になるように培養液に添加した。下図のZIP4の発現の評価からF8+9に促進活性が認められる。この画分の精製を進め、単一化合物まで精製できたものについては、現在、構造決定を行っている。

れ、これら症例に加え、食欲不振や舌痛等様々な症例にも亜鉛欠乏が関与することが明らかにされてきた¹¹⁾。従って、亜鉛欠乏患者の“Quality of Life”は大きく低下しており、適切な食事からその予防・治療に努めることは極めて大切となる。本研究では、効果的な亜鉛吸収を実現させるため、誰もが毎日口にする味噌から亜鉛吸収促進因子を同定することを試みている。昨年度は、我々が樹立したスクリーニング系を用いて、亜鉛吸収の本体であるZIP4の発現を促進する成分が味噌に含まれていることを見出したが、本年度は、従来のスクリーニング系の欠点を克服し、さらに解析を進めた。特に問題となっていたのは、ZIP4の発現と細胞内亜鉛量の変化を同時に解析できない点であったため、スクリーニング用細胞に細胞内亜鉛量に応答してSEAPを発現する形質を導入し、ZIP4の発現と亜鉛濃度変化とを同時に判定

できるスクリーニング系となるように改良した(図1)。亜鉛要求性酵素であるSEAPの活性は細胞内亜鉛量の減少により消失するため¹²⁾、本改良型スクリーニング系は、細胞内の亜鉛量が増加した場合のみ、SEAPの発現の増加と活性の増加とが観察される感度の良い系となっている点の特徴となる。味噌は均質ではないため、本系のような



図5. 単一化合物まで精製された大豆由来成分

TLCによる展開で、F2はほぼ単一化合物にまで精製できていることがわかる。

ZIP4発現促進活性と細胞内亜鉛量を感度良く同時に追跡できる系の確立は、スクリーニングの感度を上げる上で極めて重要である。現在、本系を用いた評価から(図2)、特に効果の期待される3つの味噌サンプルから活性因子の単離精製を試みており、味噌由来の活性本体に関する情報が得られることが期待される。活性因子の同定後は、ラットを用いた亜鉛吸収試験を実施するとともに、同定因子のZIP4発現促進効果の作用点を解析する予定である。これまでの解析結果から、活性因子の作用点としては、(i). ZIP4タンパク質分解の抑制、(ii). ZIP4タンパク質の細胞膜上への移行の促進のいずれかを想定しているが⁹⁾、作用機序の分子メカニズムを提示することで、同定因子の安全面に問題がないことを実証することが可能になると考えている。

一方、味噌の共通原料である大豆を出発点とした精製予備実験では、活性化化合物を単一成分として精製することに成功している(図5)。現在、行っている構造解析で得られた情報を、味噌成分の探索に活用することで、味噌特異的に存在する活性因子の同定につながることを期待される。これら様々なアプローチを上手く融合させ、味噌の亜鉛吸収促進効果について実証していきたい。

緑黄色野菜に比べ、大豆などには比較的亜鉛含量が高いことが知られるが、フィチン酸に代表される亜鉛キレート化合物も多量に含有されるため、それら亜鉛の生体利用効率は低いと考えられている。しかしながら、味噌においては、発酵過程にフィチン酸をほぼ完全に分解してしまうことが知られており¹³⁾、その結果、味噌そのものが亜鉛の良い供給源となる可能性も示唆されている¹⁴⁾。本研究で解析対象である味噌に含まれるZIP4発現促進活性因子は、このような味噌の特徴と融合することで、より効果的に機能すると予想され、亜鉛供給食品の実現につながることを大いに期待される。味噌は日本人の食生活に欠かすことのできない食品であるため、その効能を十二分に活用することは亜鉛欠乏の予防に非常に有効である。本研究から得られた成果を日本人の食事にフィードバックさせていきたいと考えている。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご援助賜りました(社)中央味噌研究所に厚く御礼申し上げます。また、活性成分の単離に関する解析でご協力いただきました高橋正和先生(福井県立大学)に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Fukada T and Kambe T . Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* 3: 662-674, 2011.
- 2) Haase H, Mocchegiani E and Rink L . Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology* 7: 421-428, 2006.
- 3) Hambidge M . Human zinc deficiency. *J Nutr* 130: 1344S-1349S, 2000.
- 4) 長野県国民健康保険団体連合会, 長野県国保直診医師会: 亜鉛欠乏に関する研究会報告書「亜鉛欠乏症について」2006.
- 5) Andrews GK . Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem Soc Trans* 36: 1242-1246., 2008.
- 6) Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J and Gitschier J . A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 71: 66-73, 2002.
- 7) Kury S, Dréno B, Bézieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R and Moisan JP . Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet* 31: 239-240, 2002.
- 8) Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T and Andrews GK . Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem* 388: 1301-1312, 2007.
- 9) Kambe T and Andrews GK . Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. *Mol Cell Biol* 29: 129-139, 2009.

- 10) 神戸大朋. 「生体機能における亜鉛トランスポーターの重要性, 一亜鉛トランスポーターをめぐる最近の知見一」 亜鉛栄養治療 1: 54-64, 2011.
- 11) 倉澤隆平, 久堀周治郎, 奥泉宏康, 岡田真平. 「血清亜鉛値 $80\mu\text{g}/\text{dL}$ の意味するもの」 *Biomed. Res. Trace Elements* 22: 34-37, 2011.
- 12) Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y and Kambe T, Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are GPI-anchored to cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem* 280: 637-643, 2005.
- 13) 橋本彩子, 神戸大朋. 「味噌など大豆発酵食品による亜鉛栄養改善の可能性一亜鉛吸収に機能するトランスポーターの発現に及ぼす効果一」 日本醸造協会誌, 106: 811-817, 2011.
- 14) Kogirima M, Kurasawa R, Kubori S, Sarukura N, Nakamori M, Okada S, Kamioka H and Yamamoto S. Ratio of low serum zinc levels in elderly Japanese people living in the central part of Japan. *Eur J Clin Nutr* 61: 375-381, 2007.

味噌と血圧，予後および臓器障害に関する疫学研究

(味噌汁摂取頻度と家庭血圧の関連)
— 大迫研究 —

菊谷昌浩¹，佐藤倫広¹，坪田恵²，大久保孝義^{1,3}，目時弘人⁴，戸恒和人^{1,5}，今井潤

- 1) 東北大学大学院薬学研究科 医薬開発構想寄付講座
- 2) 国立健康栄養研究所
- 3) 滋賀医科大学社会医学講座 公衆衛生部門
- 4) 東北大学大学院医学系研究科 環境遺伝医学総合研究センター
- 5) 東北福祉大学

Miso soup, blood pressure, and target organ damage: miso soup
and home blood pressure — Ohasama study —

Masahiro KIKUYA¹, Michihiro SATOH¹, Megumi T. UTSUGI², Takayoshi OHKUBO^{1,3},
Hirohito METOKI^{1,4}, Kazuhito TOTSUNE^{1,5} and Yutaka IMAI¹

¹ Department of Planning for Drug Development and Clinical Evaluation, Tohoku
University Graduate School of Pharmaceutical Sciences.

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

² National Institute of Health and Nutrition.

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

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

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

⁴ Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University Graduate School
of Medicine.

2-1 Seiryu-cho, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

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

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

背景

塩分過剰摂取は高血圧の原因として広く知られており，減塩が世界的に推進されている。しか

し，本邦の塩分摂取量は依然10g/日を下回らず，欧米の塩分摂取量（8g/日）やWHOが掲げる減塩目標値（6g/日）と比較しても未だに塩分過剰である。本邦の減らない塩分摂取量の原因

東北大学大学院薬学研究科 医薬開発構想寄付講座 〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3
東北大学大学院薬学研究科C202

TEL: (022) 795-4528 FAX: (022) 795-4532

E-mail:

として日本食が挙げられ、特に味噌汁は主要な塩分摂取源の一つとして見られている。事実、日本を含む世界各地で塩分を厳密に測定したINTERMAP (INTERNational study of MACro- and micronutrients and blood Pressure) 研究のデータにおいても、味噌汁は日本人の塩分摂取源の第3位に挙げられている。¹⁾ これを背景として、高血圧患者および一般住民において、味噌汁の制限を含む食事指導が行われてきた。それに伴い、味噌の消費量はここ40年以上減少の一途を辿っている。²⁾ しかし、味噌汁には単に塩だけでなく、血圧降下作用があるカリウムが多く含まれている。また、動物実験において、味噌自体が高血圧を予防する可能性が示唆されている。^{3,4)} 一方で、ヒトを対象として味噌汁摂取頻度と高血圧の関連を疫学的に検討した研究は非常に限られている。⁵⁾ そこで本研究では、味噌汁と高血圧の関連を、家庭自己測定に基づく家庭血圧を用いて横断的に検討した。

方法

対象

本研究は大迫研究の一環として実施した。^{6,7)} 大迫研究とは1986年に開始された岩手県花巻市大迫町の一般地域住民を対象とした高血圧・循環器疾患に関するコホート研究である。対象者は、岩手県大迫町在住の35歳以上の一般地域住民のうち、一般住民健診あるいはMRI健診を受診し、同意の得られた1838名である。このうち、味噌汁に関するアンケートの回答が得られなかった154名、家庭血圧測定期間が3日未満であった681名、随時血圧非測定者5名を除外し、最終的に998名を解析対象者とした。

血圧測定

家庭血圧測定には、HEM701C (Omron Healthcare, Kyoto, Japan)⁸⁾を用いた。日本高血圧学会の指針⁹⁾に従い、起床後1時間以内、排尿後、降圧薬服用前、朝食前、座位2分間の安静後の条件下で測定された。家庭血圧は、4週間にわたって測定された朝1機会1回目の全測定の平均値とした。

随時血圧測定には、コロトコフ法に基づく自動血圧計USM-700F (UEDA Electronic Works, Tokyo, Japan)⁸⁾を用いた。少なくとも2分間の座位安静の後に繰り返し2回の測定を行い、その平均値を随時血圧値とした。

本研究では、日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン2009 (JSH 2009)の基準に基づき¹⁰⁾、家庭高血圧を家庭血圧 $\geq 135/85$ mmHgまたは降圧薬服用、随時高血圧を随時血圧 $\geq 140/90$ mmHgまたは降圧薬服用と定義した。

味噌汁摂取頻度

味噌汁摂取頻度は自認式アンケートにより摂取頻度および一日摂取量が調査された。頻度に関しては、「ほとんど飲まない」、「月に1~3日」、「週に1~2日」、「週に3~4日」、「週に5~6日」、および「毎日飲む」の選択肢があり、表1にしたがって数値に換算した。摂取量に関しては、「1杯未満」、「1杯」、「2杯」、「3杯」、「4杯」、「5杯」、「6杯」、「7~9杯」、および「10杯以上」の選択肢があり、表2にしたがって摂取量を数値(杯数)に変換した。これらの値を基に、1日平均の味噌汁摂取頻度(杯/日)を「頻度×杯数」として算出した。算出された平均の味噌汁摂取頻度によって対象者を、味噌汁 ≤ 1 杯/日群(≤ 1 杯/日)、1-3杯/日を味噌汁2杯/日群(1-3杯/日)、および ≥ 3 杯/日を味噌汁3杯/日群(≥ 3 杯/日)の3群に分類した。

表1 味噌汁の摂取頻度

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

表2 味噌汁の摂取量

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

栄養摂取量

エネルギー・栄養素摂取量は、東北地区の対象者において信頼性・妥当性の確立されている食物摂取頻度調査法 (FFQ; Food Frequency Questionnaire) に基づいて評価した。¹¹⁾ この調査法は、過去1年間の平均的な食事内容を自記式アンケート調査し、日本食品標準成分表2010を用いて主要な栄養摂取量を算出する方法である。自記式アンケートにおいて、一人前の分量は、頻度、回数、1回当たりの量：目安量より多い (1.5倍以上)、同じ、少ない (半分以下) で計算される。^{11,12)}

統計解析

味噌汁摂取頻度と基礎特性の関連は、性別および年齢で補正後の共分散分析 (ANCOVA) および多重ロジスティック回帰分析を適宜使用した。味噌汁摂取頻度と高血圧有病の関連の検討には、性別、年齢、各種危険因子 (BMI [Body mass index], 喫煙習慣、飲酒習慣、高脂血症既往、糖尿病既往、脳心血管疾患既往歴)、および塩分・カリウム・総エネルギー摂取量 (中央値2分割) で調整した多重ロジスティック回帰分析によって解析した。

結果

味噌汁摂取頻度と家庭高血圧

対象者特性を表3に示す。平均年齢は63.6±10.3歳、男性320名 (32.9%)、BMIは23.5±3.1kg/m²であった。家庭高血圧有病者は421名 (42.2%)、随時高血圧は564名 (56.5%) であった。性別および年齢で補正後、味噌汁摂取頻度が多い群で、女性および降圧薬服用の割合が有意に低値であった (表3)。家庭高血圧有病率は、味噌汁摂取頻度が多くなる毎に低下する傾向を示したが、随時高血圧に関しては一貫した分布が認められなかった (図1)。

味噌汁摂取頻度と家庭高血圧の関連

味噌汁≤1杯/日群を基準としたときの家庭高血圧有病オッズ比は、味噌汁2杯/日群で0.86 (95% C.I.: 0.55 - 1.36, P=0.5)、および≥3杯/日以上群で0.60 (95% C.I.: 0.38 - 0.95, P=0.03) であった。各種因子補正後、有意な関連は消失したが、味噌汁摂取頻度が多いほど家庭高血圧有病率が低値である傾向は残存した (図2)。同様の解析を随時高血圧についても行ったが、一貫した関連は認められなかった (随時高血圧有病

表3 対象者の基礎特性

平均値±SD	味噌汁摂取頻度				性・年齢補正 P
	全体	≤1杯/日 (n=112)	2杯/日 (n=401)	≥3杯/日 (n=485)	
女性, %	67.1	79.5	77.6	55.7	<0.0001*
年齢, 歳	63.6±10.3	63.2±12	63.4±10.3	63.8±9.8	0.7*
BMI, kg/m ² (980名)	23.5±3.1	23.5±3.1	23.6±3.1	23.4±3.1	0.8
脳心血管疾患既往歴, %	13.2	16.1	12.0	13.6	0.4
糖尿病, %	14.4	14.3	16.7	12.6	0.3
高脂血症, %	30.7	34.8	35.9	25.4	0.06
喫煙, %	13.2	8.0	10.0	17.1	0.8
飲酒, %	31.9	26.8	25.9	37.9	0.9
降圧薬服用, %	34.2	35.7	38.2	30.5	0.01
家庭血圧, mmHg					
収縮期	122.3±14.9	121.2±15.2	121.4±13.8	123.3±15.7	0.1
拡張期	75.2±9.1	74.7±9.1	74.4±8.5	76.1±9.6	0.4
随時血圧, mmHg					
収縮期	137.0±18.6	136.2±16.7	138.6±19.7	135.9±18.1	0.08
拡張期	76.1±10.4	75.3±9.3	76.5±10.6	75.9±10.5	0.4
エネルギー・栄養素摂取量					
総エネルギー, kcal/日	1894±1274	1544±630	1747±642	2097±1680	0.0003
塩分, g/日	11.7±7.2	11.3±4.7	11.7±5.9	11.7±8.6	0.3
カリウム, mg/日	2499±940	2578±632	2530±721	2454±1137	0.3

* 性・年齢で補正していない。BMI, Body mass index.

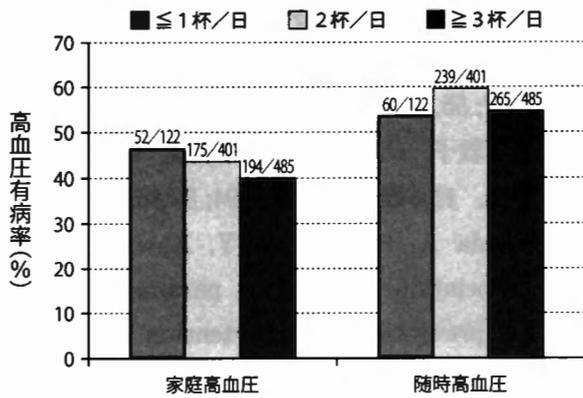


図1 味噌汁摂取頻度と高血圧有病の割合

家庭高血圧は家庭血圧 $\geq 135/85$ mmHgまたは降圧薬服用、随時高血圧は随時血圧 $\geq 140/90$ mmHgまたは降圧薬服用と定義。

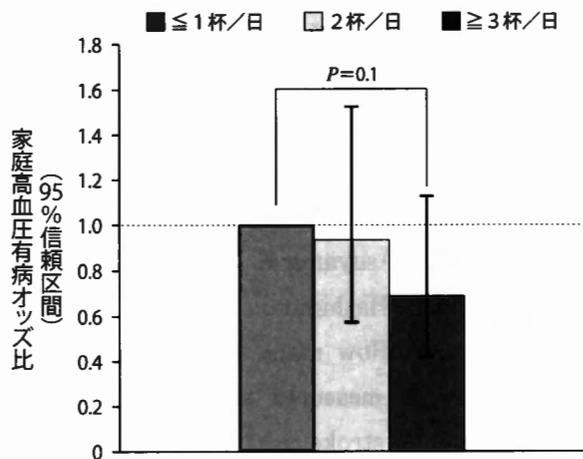


図2 家庭高血圧オッズ比

味噌汁摂取 毎日群と比較した、味噌汁摂取毎日群の高血圧有病オッズ比(95% C.I.)を示す。オッズ比は、性別、年齢、Body Mass Index、脳心血管疾患既往、喫煙、飲酒、糖尿病、高脂血症、塩分・カリウム・総エネルギー摂取量(中央値2分割)で調整。

家庭高血圧は家庭血圧 $\geq 135/85$ mmHgまたは降圧薬服用と定義。

オッズ比 [vs. 味噌汁1杯/日群]: 味噌汁2杯/日群, 1.43 $P=0.2$; 3杯/日以上群, 1.00 $P=1.0$

考察

本研究において、味噌汁摂取頻度が3杯/日以上群は、1杯/日以下の群と比べて家庭高血圧の有病率が低値である傾向が認められた。一方で、味噌汁と随時高血圧有病の一貫した関連は認められなかった。

445名の正常血圧者を対象とした先行研究では、味噌汁2杯/日以上群の摂取が、4年後の高血圧発症率と負に関連したことが示されている。⁵⁾しかし、これは随時血圧に基づいた結果である。⁵⁾随時血圧は医療環境下という特殊な状況における血圧であり、白衣効果などのバイアスが加わった血圧である。¹³⁾一方、本研究は、世界で初めて味噌汁摂取頻度と家庭血圧によって定義された高血圧との関連を検討した研究である。家庭血圧は随時血圧に比べ、白衣効果などのバイアスを含まず¹⁴⁾、再現性が良好で⁷⁾、予後予測能においても優れており¹⁵⁾、信頼性の高い血圧として知られている。本研究において、味噌汁摂取頻度は家庭高血圧有病と負に関連する傾向が認められたが、随時高血圧有病とは一貫した関連が認められなかった。以上のことから、味噌汁と高血圧との関連の厳密な評価は、家庭血圧のような非医療環境下の血圧測定に基づいて実施されるべきであると考えられる。

塩分摂取量が高血圧と関連するという報告に加え、日本人における塩分摂取源の一つとして味噌汁が挙げられていることから、味噌汁は高血圧をもたらすという概念が浸透してきた。しかしながら、本研究において、味噌汁と家庭高血圧有病の正の関連は認められず、むしろ負に関連する傾向が認められた。日本人40462名を12.5年追跡した小久保らの研究においても、味噌汁摂取頻度と脳心血管疾患リスクとの関連は認められなかったと報告されている。¹⁶⁾このことから、味噌汁は少なくとも高血圧とは関連しない可能性が考えられる。味噌汁の原料である大豆には高血圧を抑制するカリウム、および動脈硬化の予防に関与するとされるイソフラボンが豊富に含まれている¹⁷⁾。小久保らの研究では、大豆製品を週に5日以上を食べる女性は、週に0-2日食べる女性に比べ、脳心血管疾患死亡リスクが69%減少していたことが示されている。¹⁶⁾味噌汁の摂取は塩分の摂取につながるが、大豆に含まれるカリウムやイソフラボンの作用を介してむしろ高血圧に対して抑制的に働き、将来の脳心血管疾患の予防に寄与する可能性も考えられる。

本研究はいくつかの研究限界を有する。まず、

本研究は、横断的検討であるため、味噌汁摂取と高血圧との間の因果関係については、言及することができない。つまり、本研究における味噌汁摂取と家庭高血圧の関連には、「高血圧を有しているために、味噌汁の摂取を控えていた」という要因が含まれている可能性がある。次に、日本の東北地方の一地域における一般住民を対象に行ったが、本研究の結果を他の地域あるいは異なる人種に対してそのまま適応することは適切ではない可能性が考えられる。

展 望

一般住民において、味噌汁の摂取は家庭血圧測定に基づく高血圧と関連しないことが示唆された。むしろ味噌汁の摂取が高血圧に対して予防的に働く可能性が考えられ、今後の縦断的な検討が望まれる。また近年では、大豆が生活習慣病を予防することが示されており¹⁸、味噌汁と肥満、糖尿病、あるいは脂質検査値などとの関連を解明することが期待される。

謝 辞

本研究の遂行にご協力くださった社団法人中央味噌研究所の関係者の方々に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Anderson CA, Appel LJ, Okuda N, Brown IJ, Chan Q, Zhao L, Ueshima H, Kesteloot H, Miura K, Curb JD, Yoshita K, Elliott P, Yamamoto ME, Stamler J. Dietary sources of sodium in China, Japan, the United Kingdom, and the United States, women and men aged 40 to 59 years: the INTERMAP study. *J Am Diet Assoc* 2010; 110:736-745.
- 2) 総務省. 「家計調査」. 2010.
- 3) 渡辺敦光, 吉田真衣, 水野久美子, 神谷研二. Dahlの塩分感受性ラットを用いた味噌の高血圧の抑制作用. *味噌の科学と技術* 2007; 55.
- 4) 岩下敦子, 高橋裕司, 河村幸雄. 味噌の生理機能. *日本醸造協会誌* 1994; 89:869-872.
- 5) Kanda A, Hoshiyama Y, Kawaguchi T. Association of lifestyle parameters with the prevention of hypertension in elderly Japanese men and women: a four-year follow-up of normotensive subjects. *Asia Pac J Public Health* 1999; 11:77-81.
- 6) Kikuya M, Hozawa A, Ohokubo T, Tsuji I, Michimata M, Matsubara M, Ota M, Nagai K, Araki T, Satoh H, Ito S, Hisamichi S, Imai Y. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. *Hypertension* 2000; 36:901-906.
- 7) Ohkubo T, Asayama K, Kikuya M, Metoki H, Hoshi H, Hashimoto J, Totsune K, Satoh H, Imai Y. How many times should blood pressure be measured at home for better prediction of stroke risk? Ten-year follow-up results from the Ohasama study. *J Hypertens* 2004; 22:1099-1104.
- 8) Imai Y, Abe K, Sasaki S, Minami N, Munakata M, Sakuma H, Hashimoto J, Sekino H, Imai K, Yoshinaga K. Clinical evaluation of semiautomatic and automatic devices for home blood pressure measurement: comparison between cuff-oscillometric and microphone methods. *J Hypertens* 1989; 7:983-990.
- 9) Imai Y, Otsuka K, Kawano Y, Shimada K, Hayashi H, Tochikubo O, Miyakawa M, Fukiyama K. Japanese society of hypertension (JSH) guidelines for self-monitoring of blood pressure at home. *Hypertens Res* 2003; 26:771-782.
- 10) Ogihara T, Kikuchi K, Matsuoka H, Fujita T, Higaki J, Horiuchi M, Imai Y, Imaizumi T, Ito S, Iwao H, Kario K, Kawano Y, Kim-Mitsuyama S, Kimura G,

- Matsubara H, Matsuura H, Naruse M, Saito I, Shimada K, Shimamoto K, Suzuki H, Takishita S, Tanahashi N, Tsuchihashi T, Uchiyama M, Ueda S, Ueshima H, Umemura S, Ishimitsu T, Rakugi H. The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2009). *Hypertens Res* 2009; 32:3-107.
- 11) Tsubono Y, Ogawa K, Watanabe Y, Nishino Y, Tsuji I, Watanabe T, Nakatsuka H, Takahashi N, Kawamura M, Hisamichi S. Food frequency questionnaire and a screening test. *Nutr Cancer* 2001; 39:78-84.
- 12) Utsugi MT, Ohkubo T, Kikuya M, Kurimoto A, Sato RI, Suzuki K, Metoki H, Hara A, Tsubono Y, Imai Y. Fruit and vegetable consumption and the risk of hypertension determined by self measurement of blood pressure at home: the Ohasama study. *Hypertens Res* 2008; 31:1435-1443.
- 13) Mancia G, Bertinieri G, Grassi G, Parati G, Pomidossi G, Ferrari A, Gregorini L, Zanchetti A. Effects of blood-pressure measurement by the doctor on patient's blood pressure and heart rate. *Lancet* 1983; 2:695-698.
- 14) O'Brien E, Asmar R, Beilin L, Imai Y, Mallion JM, Mancia G, Mengden T, Myers M, Padfield P, Palatini P, Parati G, Pickering T, Redon J, Staessen J, Stergiou G, Verdecchia P. European Society of Hypertension recommendations for conventional, ambulatory and home blood pressure measurement. *J Hypertens* 2003; 21:821-848.
- 15) Hara A, Ohkubo T, Kikuya M, Shintani Y, Obara T, Metoki H, Inoue R, Asayama K, Hashimoto T, Harasawa T, Aono Y, Otani H, Tanaka K, Hashimoto J, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Detection of carotid atherosclerosis in individuals with masked hypertension and white-coat hypertension by self-measured blood pressure at home: the Ohasama study. *J Hypertens* 2007; 25:321-327.
- 16) Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S. Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I. *Circulation* 2007; 116:2553-2562.
- 17) Martin D, Song J, Mark C, Eyster K. Understanding the cardiovascular actions of soy isoflavones: potential novel targets for antihypertensive drug development. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008; 8:297-312.
- 18) Zhou JR. Soy and the prevention of lifestyle-related diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31 Suppl 2:S14-19.

味噌・大豆製品摂取量と食生活習慣 および生活習慣病との関連を探る臨床疫学研究

酒井 徹

Does miso intake relate to life style and dietary habit ?

Tohru SAKAI

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

一般住民735人(男性479人,女性256人)を対象として味噌摂取量と身体状況,一般血液生化学検査データ,血中脂肪酸濃度,栄養摂取状況および食行動との関連について解析を行った。男性において味噌の摂取量が多い者は,少ない者に比べ,野菜および魚介類の摂取量が多かった。味噌の摂取量が多い者は,食塩の摂取量も多いが,収縮期および拡張期血圧のいずれにおいても味噌摂取量の少ない者に比べ変化は認められなかった。同様の結果は女性においても認められた。味噌の摂取状況は,各種栄養素および食品摂取と関連しており,それは男性で特に顕著に認められた。

1 はじめに

大豆製品は,伝統的に日本をはじめとするアジア諸国で多く食されている食品である。大豆製品が注目をされたのは,1990年代に米国国立がん研究所が,食品および食品成分の抗癌効果に関する研究プログラム「デザイナーフーズプログラム」をスタートさせたことに始まる。この研究は,食

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

動物実験やヒト臨床により大豆成分には,脂質代謝,骨代謝や抗腫瘍作用があることが知られている。これまで,大豆および大豆製品に注目した研究は数多く存在するが,大豆の発酵食品である味噌と健康に関する指標に着目し実施された研究は非常に限られている。そこで,今回の研究では,一般住民において味噌の摂取量を調査し,身体状況,一般血液生化学検査データ,血中脂肪酸濃度,食品摂取量および食習慣との関連について疫学研究の一つである横断研究を行い解析を行った。

2 対象と方法

2.1 対象者

徳島県に居住している20歳～60歳代の成人735名(男性479名, 女性256名)を対象とした。本研究は、徳島大学倫理委員会の承認を受け実施された。

2.2 食事調査

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

2.3 食行動に関する調査

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

2.4 統計処理

結果は、男女別とし、各種栄養素摂取量などの単純集計および味噌の摂取量と栄養素摂取量・生活習慣等の各因子との関連について、SPSS 16.0J for windowsを用い解析を行った。栄養素・食品群別摂取量については、味噌の摂取量により群分けをした場合、摂取エネルギー量に有意な差が認められたことから、エネルギー補正を行った後、解析に供した。味噌の摂取量調査結果より対象者を少ない(25パーセント未満: I)、普通(25パーセントから75パーセント: II)および多い(75パーセント以上: III)に分類した。なお、有意水準は5%とした。

3 結果・考察

対象者の年齢は20歳から63歳までの735名であり、男性479名(65.2%)、女性256名(34.8%)であった。また、平均年齢は男性40.9±9.3歳、女性39.5±10.1歳であった。BMIが18.5を下回る「やせ」は、対象者の5.4%(男性1.5%、女性12.9%)、18.5-24.9の「ふつう」に属する対象者は71.4%(男性69.7%、女性74.6%)、25.0を超える「肥満」に属する対象者は23.2%(男性28.8%、女性12.5%)であった(表1)。

表1 対象者の身体的特徴および血液検査値¹

	全対象者 mean±SD	男性 mean±SD	女性 mean±SD	全対象者 No. (%)	男性 No. (%)	女性 No. (%)
n	735	479	256			
年齢(歳)	40.4 ± 9.6	40.9 ± 9.3	39.5 ± 10.1			
20-29				108 (14.7)	61 (12.7)	47 (18.4)
30-39				249 (33.9)	158 (33.0)	91 (35.5)
40-49				223 (30.3)	155 (32.4)	68 (26.6)
50-59				150 (20.4)	103 (21.5)	47 (18.4)
60-63				5 (0.7)	2 (0.4)	3 (1.2)
身長(cm)	166.7 ± 8.2	171.1 ± 5.6	158.5 ± 5.6			
体重(kg)	63.9 ± 11.8	69.2 ± 10.0	54.0 ± 8.1			
体脂肪率(%)	24.2 ± 9.8	22.1 ± 10.1	28.1 ± 8.0			
BMI(kg/m ²)	22.9 ± 3.3	23.6 ± 3.2	21.5 ± 3.3			
< 18.5				40 (5.4)	7 (1.5)	33 (12.9)
18.5-24.9				525 (71.4)	334 (69.7)	191 (74.6)
25.0-29.9				149 (20.3)	122 (25.5)	27 (10.5)
30.0-				21 (2.9)	16 (3.3)	5 (2.0)
収縮期血圧(mmHg)	117.6 ± 14.7	121.2 ± 13.9	111.1 ± 13.8			
拡張期血圧(mmHg)	75.8 ± 12.2	78.8 ± 12.0	70.2 ± 10.5			
腹囲(cm)	82.7 ± 9.6	85.4 ± 8.6	77.6 ± 9.4			
ウエスト周囲径(cm)	78.8 ± 10.6	83.4 ± 8.9	70.4 ± 8.2			
ヒップ周囲径(cm)	93.4 ± 6.5	94.7 ± 6.3	91.0 ± 6.2			

¹データは、平均値 ± 標準偏差として示す。カテゴリカルデータは、該当人数(%)で示す。

今回の研究では、味噌の摂取量が、少ない者、普通および多い者の3群に分類した。分類は、摂取量下位の25%を「少ない者」、上位25%を「多い者」、下位25%から上位25%の間の者を「普通」群とした。男性においては、少ない群の味噌摂取量は 2.1 ± 1.2 g、普通 10.5 ± 3.7 g、多い 23.5 ± 6.3 gであった。それぞれの摂取群で、身体状況として年齢、身長、体重、BMI、体脂肪、ウエスト周囲、ヒップ周囲、収縮期血圧および拡張期血圧の値を比較したが、味噌摂取量による差を認めなかった(表2)。血液生化学検査では、サイトカインとしてIL-6、IL-8およびIL-18を測定したが、群間において統計的有意差を認めなかった。さらに一般的な血液生化学検査項目である、CRP、遊離脂肪酸、インスリン、LDLコレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、総コレステロ

ール等をはじめとする19種類の検査項目についても群間比較を行ったが、群間において差を認めなかった。食塩摂取は血圧上昇のリスク因子の一つであることはであることが知られている³⁾。味噌は食塩を100 g当たり約10 g含んでおり、平成20年度国民健康栄養調査結果では、日本人の摂取食塩のうち約8%は、味噌から摂取していることが報告されている⁴⁾。味噌摂取量と食塩との関連については、味噌摂取量が少ない群の食塩摂取量は 4.0 ± 1.1 g、普通群 4.3 ± 1.1 g、多い群 4.9 ± 1.1 gであり、「少ない群」と「普通群」、「少ない群」と「多い群」、「普通群と多い群」との間で有意差が認められた。血圧に関しては収縮期血圧に関しては、少ない群 121 ± 14 mmHg、普通群 121 ± 13 mmHg、多い群 123 ± 15 mmHgであり、拡張期血圧に関しては、少ない群 79 ± 12 mmHg、普通群

表2 味噌摂取量と健康関連指標との関連性(男性) その1

	少ない I (n=177)	普通 II (n=432)	多い III (n=179)	P値	統計学的有意差
味噌 (g)	$2.1 \pm 1.2^*$	10.5 ± 3.7	23.6 ± 6.4		
(身体状況)					
年齢 (歳)	40.3 ± 9.4	40.4 ± 9.3	42.0 ± 9.1	0.160	
身長 (cm)	171.2 ± 6.1	170.9 ± 5.3	171.4 ± 5.6	0.693	
体重 (kg)	68.2 ± 9.5	69.0 ± 9.4	70.0 ± 11.4	0.557	
BMI	23.5 ± 3.2	23.6 ± 3.0	23.8 ± 3.2	0.784	
体脂肪 (%)	21.8 ± 7.0	21.4 ± 7.2	21.9 ± 7.3	0.793	
ウエスト周囲 (cm)	82.8 ± 8.9	83.1 ± 8.6	84.4 ± 9.3	0.291	
ヒップ周囲 (cm)	94.8 ± 6.1	94.6 ± 6.2	94.8 ± 6.7	0.951	
収縮期血圧 (mmHg)	121.0 ± 13.6	121.2 ± 13.1	122.5 ± 14.6	0.605	
拡張期血圧 (mmHg)	78.6 ± 11.7	78.9 ± 11.0	80.4 ± 12.6	0.425	
(血液生化学検査)					
IL-6 (ng/ml)	1.44 ± 1.48	1.21 ± 0.75	1.29 ± 0.83	0.128	
IL-8 (ng/ml)	9.6 ± 17.8	8.4 ± 46.6	6.3 ± 22.5	0.752	
IL-18 (pg/ml)	212 ± 90	214 ± 109	214 ± 79	0.977	
CRP 8 (mg/dl)	0.114 ± 0.407	0.076 ± 0.139	0.102 ± 0.214	0.377	
遊離脂肪酸 (mEq/L)	468 ± 232	487 ± 218	493 ± 214	0.646	
インスリン (μ U/ml)	6.94 ± 5.16	7.32 ± 6.33	6.88 ± 4.49	0.728	
LDLコレステロール (mg/dl)	118 ± 30	123 ± 29	125 ± 31	0.198	
HDLコレステロール (mg/dl)	60.1 ± 15	56.8 ± 13.9	55.4 ± 12.2	0.022	
中性脂肪 (mg/dl)	113 ± 95	125 ± 94	121 ± 76	0.534	
AST (IU/L)	22.4 ± 7.1	22.7 ± 18.3	24.5 ± 10	0.072	
ALT (IU/L)	25.9 ± 15.7	27.4 ± 18.3	30.5 ± 21.8	0.124	
γ -GTP (IU/L)	45.5 ± 41.9	40.9 ± 34.2	51.2 ± 45.2	0.060	
総コレステロール (mg/dl)	198 ± 34	202 ± 32	201 ± 34	0.612	
クレアチニン (mg/dl)	0.872 ± 0.097	0.891 ± 0.109	0.887 ± 0.134	0.330	
尿酸(UA) (mg/dl)	6.22 ± 1.02	6.22 ± 1.29	6.27 ± 1.29	0.916	
尿素窒素 (mg/dl)	13.3 ± 3	13.5 ± 3.2	13.1 ± 3	0.540	
グルコース (mg/dl)	90.6 ± 12.4	90.7 ± 15	89.8 ± 10.9	0.810	
HbA1c (%)	5.11 ± 0.58	5.16 ± 0.53	5.13 ± 0.4	0.741	
ヘモグロビン (g/dl)	15.0 ± 0.9	15.2 ± 1.0	15.2 ± 0.9	0.206	
血中ナトリウム (mEq/L)	141 ± 2	141 ± 2	142 ± 2	0.389	
血中リン (mg/dl)	3.01 ± 0.4	3.17 ± 0.46	3.15 ± 0.46	0.010	1 vs 2, 1 vs 3
アディポネクチン (mg/ml)	7.53 ± 3.31	6.94 ± 2.89	6.63 ± 3.25	0.065	

* 平均値 ± 標準偏差

79±11 mmHg, 多い群80±13 mmHgで, いずれも差を認めなかった。栄養素摂取量で特徴的な点は, 味噌摂取量が多い群は, 少ない群に比べ, 血圧を低下させる作用があるカリウム摂取量⁹⁾, 動脈硬化を抑制する作用がある多価不飽和脂肪酸, 食物繊維の摂取量が多いことである。食品群別摂取量では味噌摂取量が多い群は, 少ない群に比べて, 緑黄色野菜および淡色野菜の摂取量が多いことが示された。野菜や果物は, カリウムの主要な供給源であることが知られており, 味噌摂取量の多い者は, 野菜の摂取量が多く, そのためカリウム摂取量が増加することが推察される。今回の研究では, 20種類の脂肪酸の血中濃度も併せて測定を行った。味噌の摂取量の多い者は, 抗動脈効果作用を有する脂肪酸である, エイコサペンタエン酸, ドコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸の

血中濃度が高いことが明らかとなった。これらの脂肪酸は主として魚類由来であり, 魚介類摂取量を調べてみると, 味噌摂取量が多い者は, 魚の摂取量も多いことから, 魚介類の摂取がこれらn-3系脂肪酸濃度の上昇と関連していることが推察される。

女性においても, 男性と同様の解析を試みた。男性と同様に, 味噌の摂取量で3群に分け, 身体状況および血液生化学検査項目について解析を行ったが, いずれの項目でも, 味噌の摂取量が「少ない」, 「普通」および「多い」群間で統計学的な有意差を認めなかった(表3)。栄養素および食品群別摂取量を比べると, 男性に比べ群間で差を認めたものは少なく, 味噌の摂取量が多い者は, ナトリウム, 食塩, 海草類, 豆類および大豆製品が多いことが示された(表3)。

表2 味噌摂取量と健康関連指標との関連性(男性) その2

	少ない I (n=177)	普通 II (n=432)	多い III (n=179)	P値	統計学的有意差
(血中脂肪酸濃度)					
エイコサペンタエン酸 (mg/ml)	40.1 ± 25.1	45.9 ± 26.2	49.3 ± 23.3	0.023	1 vs 3
ドコサペンタエン酸 (mg/ml)	14.9 ± 5.2	16.1 ± 6.5	17.3 ± 5.2	0.008	1 vs 3, 2 vs 3
ドコサヘキサエン酸 (mg/ml)	93.4 ± 34.6	105 ± 46.1	112.3 ± 33.8	0.002	1 vs 3, 2 vs 3
(栄養素摂取)					
エネルギー (kcal)	1660 ± 405	1800 ± 483	1988 ± 482	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
蛋白質 (g/1000 kcal)	32.4 ± 5.2	33.6 ± 4.7	34.6 ± 4.8	0.001	1 vs 3
ナトリウム (mg/1000 kcal)	1887 ± 436	1708 ± 435	1943 ± 438	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
カリウム (mg/1000 kcal)	1021 ± 235	1085 ± 215	1135 ± 131	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
マンガン (mg/1000 kcal)	107 ± 21	115 ± 18	124 ± 18	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
鉄 (mg/1000 kcal)	3.36 ± 0.89	3.52 ± 0.67	3.88 ± 0.7	0.000	1 vs 3, 2 vs 3
亜鉛 (mg/1000 kcal)	3.88 ± 0.64	4.06 ± 0.51	4.22 ± 0.51	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
トコフェロール (mg/1000 kcal)	3.64 ± 0.76	3.85 ± 0.73	3.98 ± 0.74	0.000	1 vs 2, 1 vs 3
多価不飽和脂肪酸 (g/1000 kcal)	6.1 ± 1.4	6.6 ± 1.3	7.0 ± 1.4	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
コレステロール (g/1000 kcal)	153 ± 43	163 ± 42	168 ± 47	0.018	1 vs 3
不溶性食物繊維 (g/1000 kcal)	4.0 ± 1.2	4.2 ± 1.1	4.4 ± 1.0	0.003	1 vs 3, 2 vs 3
食物繊維 (g/1000 kcal)	5.5 ± 1.6	5.8 ± 1.5	6.1 ± 1.4	0.008	1 vs 3
食塩 (g/1000 kcal)	4.0 ± 1.1	4.3 ± 1.1	4.9 ± 1.1	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
脂肪酸総量 (g/1000 kcal)	27.8 ± 5.1	29.0 ± 4.9	28.8 ± 4.8	0.050	1 vs 3
n-3系脂肪酸 (g/1000 kcal)	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
n-6系脂肪酸 (g/1000 kcal)	5.1 ± 1.1	5.4 ± 1.1	5.7 ± 1.1	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
(食品群別摂取量)					
緑黄色野菜 (g/1000 kcal)	30.3 ± 19.3	34.3 ± 21.4	36.6 ± 19.1	0.037	1 vs 3
淡色野菜 (g/1000 kcal)	50.1 ± 32.9	55.4 ± 31.8	60.8 ± 33.2	0.018	1 vs 3
海草類 (g/1000 kcal)	1.47 ± 2.09	1.74 ± 1.36	2.21 ± 1.65	0.000	2 vs 3
豆類 (g/1000 kcal)	19.1 ± 18.9	23.7 ± 16.3	30.6 ± 17.9	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
魚介類 (g/1000 kcal)	27.3 ± 18.7	30.5 ± 18.3	34.1 ± 17.9	0.006	1 vs 3
卵類 (g/1000 kcal)	14.0 ± 8.4	15.8 ± 8.8	17.0 ± 10.0	0.022	1 vs 3
菓子類 (g/1000 kcal)	42.4 ± 27.1	38.8 ± 31.4	32.1 ± 21.4	0.005	1 vs 3, 2 vs 3
調味料 (g/1000 kcal)	6.6 ± 4.6	12.5 ± 6.5	16.2 ± 5.5	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
大豆製品 (g/1000 kcal)	76.1 ± 62.8	91.6 ± 65.8	114.2 ± 81.2	0.000	1 vs 3
イソフラボン (mg/1000 kcal)	19.1 ± 16.5	25.2 ± 16.2	35.9 ± 20.1	0.000	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
(食行動)					
欠食回数 (回/週)	1.35 ± 2.29	1.49 ± 2.48	0.87 ± 1.76	0.009	2 vs 3

今回の研究では、女性は男性に比べ、味噌摂取による摂取栄養素および食品に対する影響が少なかった。男性で限定して考察すると、味噌摂取量が多い者の特徴として、以下のことが挙げられる。①野菜の摂取量が多い、②魚介類の摂取量が多い、③大豆製品の摂取量が多い、④食塩の摂取量が多い、⑤調味料の摂取量が多い、⑥欠食回数が少ない、⑦菓子類の摂取量が少ない。日本食は元来魚や野菜を中心としており、その調理形態も

焼く、蒸す、煮る、揚げる等様々である。一般的に、日本食は西欧料理に比べ、塩分摂取量が多くなる傾向がある。今回の結果から推測すると、味噌（味噌汁）を多く摂取する人々は、伝統的な日本食に近い調理形態の料理を食している人が多いと考えられる。

血圧に関して考察すると、味噌摂取量が多い群は少ない群に比べ、食塩摂取量は多かった（表2および3）。しかしながら、収縮期血圧および拡張期血圧

表3 味噌摂取量と健康関連指標との関連性（女性）

	少ない I (n=55)	普通 II (n=141)	多い III (n=57)	P値	統計学的有意差
味噌 (g)	2.1 ± 1.4*	9.5 ± 3.0	22.1 ± 7.9		
(身体状況)					
年齢 (歳)	39.0 ± 11.4	39.0 ± 9.6	40.9 ± 10.0	0.457	
身長 (cm)	158.3 ± 5.9	158.6 ± 5.5	158.2 ± 5.3	0.889	
体重 (kg)	55.9 ± 8.8	53.9 ± 7.9	53.3 ± 7.5	0.138	
BMI	22.3 ± 3.2	21.3 ± 3.2	21.3 ± 3.2	0.147	
体脂肪 (%)	29.7 ± 7.5	27.5 ± 8	27.8 ± 7.9	0.235	
ウエスト周囲 (cm)	72.3 ± 7.5	69.8 ± 8.1	69.6 ± 8.7	0.118	
ヒップ周囲 (cm)	92.4 ± 6	90.8 ± 6.3	90.1 ± 6.1	0.147	
収縮期血圧 (mmHg)	111.5 ± 12.6	110.0 ± 14.3	111.7 ± 14.0	0.649	
拡張期血圧 (mmHg)	71.4 ± 10.5	69.7 ± 10.4	71.4 ± 10.6	0.429	
(血液生化学検査)					
IL-6 (ng/ml)	1.6 ± 0.6	1.2 ± 0.9	1.0 ± 0.7	0.534	
IL-8 (ng/ml)	5.0 ± 6.0	4.1 ± 3.6	3.9 ± 2.8	0.800	
IL-18 (pg/ml)	161 ± 73	222 ± 646	153 ± 86	0.294	
CRP 8 (mg/dl)	0.046 ± 0.11	0.051 ± 0.145	0.024 ± 0.079	0.377	
遊離脂肪酸 (mEq/L)	523 ± 183	517 ± 242	601 ± 229	0.920	
インスリン (μU/ml)	5.88 ± 5.27	5.4 ± 2.98	4.94 ± 2.71	0.025	
LDLコレステロール (mg/dl)	111 ± 29	114 ± 28	108 ± 30	0.574	
HDLコレステロール (mg/dl)	70 ± 14	70 ± 14	71 ± 15	0.858	
中性脂肪 (mg/dl)	61 ± 28	65 ± 30	65 ± 39	0.750	
AST (IU/L)	16.5 ± 4.1	18.5 ± 4.1	18.2 ± 4.0	0.106	
ALT (IU/L)	12.8 ± 5.7	14.2 ± 5.7	13.7 ± 5.3	0.344	
γ-GTP (IU/L)	17.7 ± 13.8	18 ± 10.5	17.4 ± 9.5	0.628	
総コレステロール (mg/dl)	194 ± 30	198 ± 31	195 ± 31	0.618	
クレアチニン (mg/dl)	0.673 ± 0.085	0.682 ± 0.087	0.655 ± 0.09	0.632	
尿酸(UA) (mg/dl)	4.36 ± 0.77	4.43 ± 0.89	4.22 ± 1.00	0.810	
尿素窒素 (mg/dl)	11.1 ± 2.5	12.2 ± 3.1	11.5 ± 2.7	0.353	
グルコース (mg/dl)	86.4 ± 6.8	86.5 ± 7.8	85.5 ± 6.7	0.415	
HbA1c (%)	4.99 ± 0.25	5.1 ± 0.28	4.97 ± 0.23	0.880	
ヘモグロビン (g/dl)	12.7 ± 1.3	12.7 ± 1.1	13.0 ± 1.0	0.391	
血中ナトリウム (mEq/L)	141 ± 2	141 ± 2	141 ± 2	0.691	
血中リン (mg/dl)	3.39 ± 0.46	3.49 ± 0.43	3.55 ± 0.46	0.691	
アディポネクチン (mg/ml)	11.0 ± 4.7	10.9 ± 4.8	14.7 ± 20.4	0.330	
(栄養素摂取)					
エネルギー (kcal)	1558 ± 389	1774 ± 594	1906 ± 488	0.002	1 vs 2, 1 vs 3
ナトリウム (mg/1000 kcal)	951 ± 298	953 ± 319	1106 ± 354	0.006	1 vs 3, 2 vs 3
食塩 (g/1000 kcal)	2.4 ± 0.8	2.4 ± 0.8	2.8 ± 0.9	0.005	1 vs 3, 2 vs 3
(食品群別摂取量)					
海藻類 (g/1000 kcal)	0.71 ± 0.66	0.99 ± 0.84	1.36 ± 1.30	0.001	1 vs 3, 2 vs 3
豆類 (g/1000 kcal)	11.6 ± 13.4	14.1 ± 11.4	17.1 ± 10.9	0.045	1 vs 3
大豆製品 (g/1000 kcal)	67.5 ± 45.8	88.6 ± 65.3	106.5 ± 73.2	0.005	1 vs 3
イソフラボン (mg/1000 kcal)	10.0 ± 8.3	13.7 ± 9.4	19.8 ± 11.1	0.005	1 vs 2, 1 vs 3, 2 vs 3
(食行動)					
夜食回数 (回/週)	0.35 ± 0.82	0.87 ± 1.66	1.17 ± 2.06	0.025	1 vs 3

* 平均値 ± 標準偏差

張期血圧のいずれにおいても味噌摂取量に関連した変化は認められなかった。食塩単独による血圧上昇作用はほぼ確立された事実である⁹⁾。そのため、今回、味噌摂取量により血圧が変化しなかった原因としてはいくつかの可能性が挙げられる。第1は、味噌摂取からの塩分量の違いは、血圧に影響を与えないとするものである。味噌摂取量が多い人は、少ない人に比べ、食塩摂取量が多いが、その程度の差は血圧に直接影響を与えないという考えである。2点目は、味噌摂取量が多い人は、食塩摂取量も多いが、血圧を低下させる作用を有するカリウム摂取量が多いので、血圧には変化がなかったという考えかたである。加えて、味噌摂取量が多い人は、食事内容が良く、その影響があるのかもしれない。事実、男性においては、味噌摂取量が多い人は、欠食の回数が統計学的に有意に少ない(表2)。3番目の考えとしては、大豆に含まれる成分が血圧を低下させ、食塩摂取量が高くても血圧が変わらないという考察もできる。最近報告された、大豆成分と血圧に関する11論文のメタアナリシス解析では、高血圧者に対して大豆成分の一種であるイソフラボンに降圧作用があることが示された⁶⁾。

謝辞

本研究は、(社)中央味噌研究所の研究助成により実施された。

文献

- 1) 大澤俊彦 「がん予防と食品—デザイナーフーズからファンクショナルフーズへ—」日本食生活学会誌 第20巻 1~16ページ 2009.
- 2) Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 2223-2235, 2008.
- 3) Cutler JA, Follmann D, Allender PS. Randomized trial of sodium reduction: an overview. *Am J Clin Nutr*, 65: 643S-651S, 1997.
- 4) 日本健康・栄養調査の現状—平成20年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より—第一出版(東京), 2011年
- 5) Whelton PK, He J, Culter JA et al. Effect of oral potassium on blood pressure. *JAMA* 277: 1624-1632, 1997.
- 6) Liu XX, Li SH, Chen JZ et al. Effect of soy isoflavones on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trial. *Nutr Metab Cardiovascular Diseases*, in press.

唾液アミラーゼを用いた味噌汁の癒し効果測定事業

菅谷 茂

Stress-reducing effect of Japanese miso:
assessment of stress using salivary alpha-amylase

Shigeru SUGAYA

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

I. 要 旨

現代の日本社会の重要課題としてストレス対策があげられる。味噌汁によるリラックス効果が示唆されているが、ヒトの生理応答との関連については不明な点が多い。近年の生命科学技術の発展により、簡易型の測定機器が開発され、またその精度の向上により、ヒトの生理的变化を迅速に解析する研究が進み、従来は測定困難とされてきたストレス状態や癒し効果を科学的根拠に基づき議論することが可能となってきた。我々は、森林・渓流域での滞在による癒し効果をバイオマーカーによる生理・生化学的な調査から明らかにした。本研究では、これまでに得たノウハウを応用し、唾液アミラーゼを用いた味噌汁の癒し効果検証を行ったところ以下のことが明らかとなった。①味噌汁には癒し効果があり、ストレス軽減効果がみられた。②10～20代学生を対象にした大規模調査より、香りや塩分の感じ方はリラックス効果に関わることが示唆された。③運動や講演などのストレス負荷により、唾液アミラーゼ活性が増大したが、味噌汁はこの軽減効果を有する事が示唆された。④日本人のみならず、中国人でも同様のリラ

ックス効果が見られたが、食習慣などにより影響を受ける可能性が示唆された。⑤ストレスを多く抱える者ほど、その軽減効果が期待できる。⑥また、他のストレス度マーカーである唾液コルチコイド量でも味噌汁によるストレス軽減効果が見られた。以上の結果より、味噌が現代人のストレス緩和に役立つ機能性食品であることが示唆された。

II. 序 論

現代は、ストレス社会とも呼ばれ、人々は日々の生活に追われ、心身ともに疲労が蓄積し、日本人の3大疾患として知られる悪性新生物（癌）、心疾患、脳血管疾患は、いずれもストレスが関わる生活習慣病に起因しており、ストレス対策は今後の日本社会の最重要課題である。厚生労働省が報告している厚生労働白書によれば、高齢化社会を迎える今後の日本は、生活習慣病を改善していくこと（一次予防）が重要な課題として求められている。近年、健康長寿志向の増大や医療経済の効率化に伴う食生活習慣の改善が強く望まれている。

る。食品に含まれる化学物質の有用性評価が可能となり、古来から健康に良いとされてきた伝統食品類の健康増進作用に、改めて注目が集まっており、健康維持・病気予防・病状悪化阻止などを食品から計ろうと考える傾向にある。しかし、ヒトのストレス緩和という視点からの生命科学的解明は殆どない。

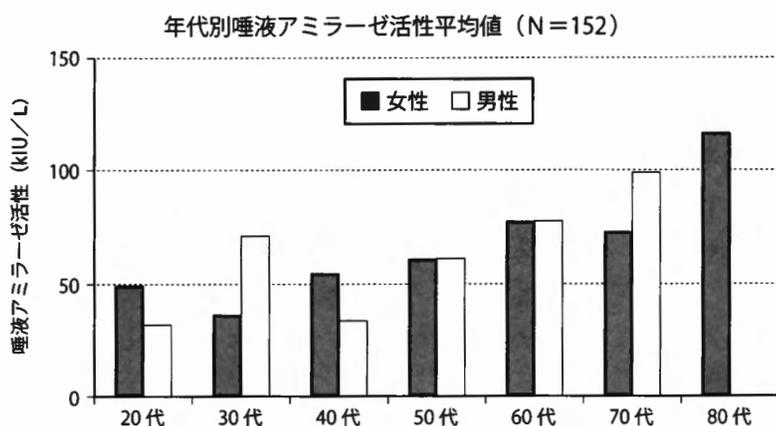
食生活の欧米化や減塩運動に伴い、日本人の味噌の消費量は減っていたが、近年、味噌の健康効果が多くの研究で科学的に解明されるにつれ、味噌の価値が見直されてきている。味噌には、原料の大豆に由来する機能性成分が含まれているだけでなく、発酵・熟成の過程でも新たな機能性成分が生みだされることが示唆されている。

味噌の主成分である大豆に含まれるギャバという化学物質がリラックス効果を持つとの報告がされている。近年では、ギャバを添加した各種商品まで販売されるようになってきているが、ヒト個体へのリラックス効果に関しては、バイオマーカーを指標にした評価報告例はなく、生命科学的根拠において不明な点が多い。これまでに、味噌汁の香りを嗅ぐと、リラックス状態を示す α 波が観察される、との報告例はあるものの、脳波測定には、高価な機器が必要とされ、複雑な操作が必要のため、大規模調査には不向きであり、よって、その詳細について研究することは困難である。従って、これらのリラックス効果に関する生命科学的検証は他の側面からなされる必要がある。

近年の生命科学技術の発展により、簡易型の測定機器が開発され、またその精度の向上により、ヒトの生理的变化を迅速に解析する研究が進み、従来は測定困難とされてきたストレス状態や癒し効果を科学的根拠に基づき議論することが可能となってきた。我々は、森林・渓流域での滞在による癒し効果をバイオマーカーによる生理・生化学的な調査から明らかにした。また、唾液を用いた簡便なストレス検査法を用いることで、大規模な調査が可能となり、結果の信頼性向上に寄与している。本研究では、これまでに得たノウハウを応用し、味噌汁の癒し効果の確証、大規模調査を目指し、また、その結果に対して、生理・生化学的な裏付けを試みた。

Ⅲ. 実験方法

- 1) 唾液アミラーゼ活性 携帯型アミラーゼ測定装置「唾液アミラーゼモニター」(ニプロ社)を用いて測定した。千葉大学医学部学生、市民講座および市民健康まつり参加者よりボランティアを募った。被験者には、実験の目的など十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得た。
- 2) 味噌汁の摂取条件など 一回目の測定後、味噌5gをカップに取り、約100mlの湯を加え、攪拌後摂取。摂取後、口内を湯または水ですすぎ、5分後に2回目の測定を行った。味噌は、予備実験よりストレス軽減効果が期待された米味噌(麴味噌)を使用した。また、大規模調査では、米味噌(粒)も用いた。なお、大規模調査の際は、鍋に、予めお湯を準備し、人数分の味噌を溶かし、紙コップに分注し、配布した。
また、比較のために、甘みそ、麦味噌、豆味噌を用いた。さらに、塩分濃度の比較実験として、0.9%塩水を用いた。
- 3) ストレス負荷実験 市民講座の演者および設営委員の方にご協力を願い、講演終了後、すみやかに一回目の測定を行った。引き続き味噌汁を摂取してもらい、2回目の測定を行った。また、運動負荷によるストレス軽減効果を調査するため、森林(山梨県北杜市または長野県志賀高原)で、1時間の散策または、1時間のスキー活動により、ストレス負荷を行った。運動負荷後、一回目の測定を行った。引き続き味噌汁を摂取してもらい、2回目の測定を行った。
- 4) 外国人を対象とした調査 日本に在住する中国籍およびロシア籍の留学生に協力を願い、味噌汁によるリラックス効果を調査した。また、中国に在住する中国人に対しても、同様の調査を試みた。
- 5) 平時におけるストレス度テストより、50kIU以上の高値を示した50代以上の方を対象に、味噌汁のストレス度軽減効果を調査した。
- 6) 唾液コルチゾール量 唾液をswab storage tube(フナコシ製)を用いて回収し、抗コルチゾール抗体を用いたELISA測定キット(サ



年代	性別	人数
20代	女性	17
	男性	41
30代	女性	4
	男性	3
40代	女性	9
	男性	7
50代	女性	9
	男性	5
60代	女性	18
	男性	13
70代	女性	8
	男性	16
80代	女性	2
	男性	0
総計		152

図1 平常時の唾液アミラーゼ活性 (平常時ストレス度)

リメトリック社製)により測定した。

7) 味噌成分の唾液アミラーゼ活性への影響調査
既報に従い、水抽出味噌成分、熱湯抽出味噌成分が、唾液中のアミラーゼ活性を阻害するか調査した。唾液をswab storage tubeを用いて回収し、水抽出味噌溶液、または、熱湯抽出味噌溶液を10分の1もしくは2分の1量、唾液に添加し、10分間37度保温後、唾液アミラーゼ活性の測定を行った。測定は、20 μ lの各唾液サンプルを測定用チップに加え、唾液アミラーゼモニターにより、行った。比較として、蒸留水(DDW)を用いて、同様の試験を行った。

IV. 結果

1) 唾液アミラーゼ活性を指標としたストレス度調査:

平常時での唾液アミラーゼ活性を調査するため、市民公開講座や市民健康まつりの参加者および千葉大学医学部の学生よりボランティアを募り、アミラーゼ活性調査を行った。総計152名(19歳から76歳)のアミラーゼ活性を測定した。年代別の平均を図1に示した。20代では、男性32kIU、女性49kIUとストレス度の目安となる50kIU以下を示したが、年代が上がるともに平均値も上昇していた。そして、50代以上では、男女いずれも50kIU以上を示した。同様な傾向は、血液中の酸化ストレス度を調べた結果からも得ら

れており、年齢とともにストレスの蓄積が見られることが分かった。また、アミラーゼ活性が100kIU以上の値を示す者も50代以上で20名近く見られた。この結果は、日常において、潜在的にストレスを抱えている場合が多々見られることを示唆しており興味深い。

2) 唾液アミラーゼを指標とした味噌汁摂取によるストレス緩和効果測定:

次に、教室員を対象に味噌汁摂取前後の唾液アミラーゼ活性を測定した。20~60代までの10名を対象に調査を行った。10名中7名で唾液アミラーゼ活性の低下がみられ、リラックス効果が期待された(図2)。一方、うち8名に対し、0.9%塩水を摂取してもらった場合は、6名で上昇がみられ、ストレス負荷となることが示された(図3)。

3) 味噌の種類によるリラックス効果の比較検討:

次に味噌の種類により、リラックス効果を調べた。使用した味噌:甘味噌 4名中3名、麦味噌5名中2名、豆味噌3名中1名で低下し、いずれもリラックス効果が見られた。

4) 医学部学生を対象とした大規模調査

医学部2年次学生を対象とし、米みそ(粒)を用い大規模な調査を行った。調査は2度行った。一回目の調査では、41名中低下29名(70.7%平成21年度)であった。一方、数値が上がった者は9名であった(図4)。参加者した者の感想とし

唾液アミラーゼ活性（味噌汁摂取前後）

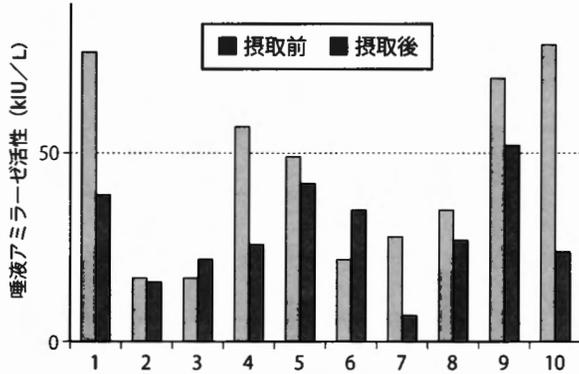


図2 味噌汁によるリラックス効果

10名中7名で、リラックス効果が見られた。

唾液アミラーゼ活性（塩水摂取前後）

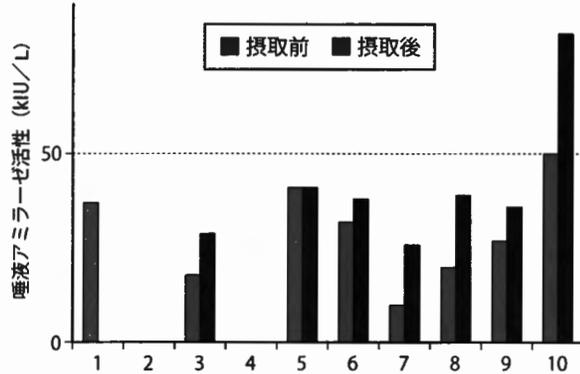


図3 塩水摂取によるストレス効果

塩水では、8名中6名で、ストレス効果が見られた。味噌汁中の塩分以外の成分にリラックス効果があると予想された。

て、香りがよい、味がまろやか、おいしい、落ち着くといった好印象を与える評価が得られた。2回目では、45名中低下23名（51.1% 平成22年度）であった。一方、数値が上昇した者は、7名であった。参加者の意見としては、好印象の者も多かったが、味が薄い、逆に味が濃い、といったものもあり、味噌の種類によっては、個人差が分かかれ易いと感じられ、今後の課題である。また、味噌汁摂取後、米味噌を用いた場合に、唾液アミラーゼの数値は、低下する傾向がみられ、大規模調査によっても、リラックス効果が示唆された。

5) ストレス負荷後の味噌汁摂取効果：

日常生活において、我々は、様々なストレスに接しているが、味噌汁のリラックス効果が、ストレスの解消に役立つか、検討してみた。予備実験より、運動負荷により唾液アミラーゼ活性の上昇が見られることから、まず、運動によるストレス負荷後に、味噌汁を摂取し、ストレス軽減効果が見られるか調べた。1時間の散策により、6名の被験者いずれも数値が上昇した。その後、味噌汁を摂取したところ、全員数値の低下を示した（図5-1）。しかしながら、低下の効果は個人差が大きく、1名（No.6）では、あまり効果が見られなかった。一方で、4名で（No.2, 3, 4, 5）では、ストレス負荷時の半分以下と劇的な効果がみられた。次に精神的なストレス負荷についても味噌汁のリラックス効果が有効であるか

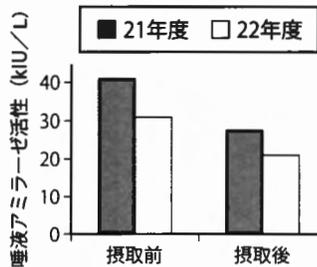


図4 学生を対象とした大規模調査

味噌汁の摂取前後で、唾液アミラーゼ測定。味噌汁を用いた場合、製品によらず数値は低下する傾向がみられた。

21年度	22年度
29名低下↓ (45名)	21名低下↓ (41名)

検証するため、対象として、市民講座で発表もしくは、運営に携わった者に協力をしてもらった。10名の被験者のうち、9名でリラックス効果が見られた（図5-2）。なお、今回はストレス負荷がみられた者を対象としたため、参加者13名中、ストレス度が低かった3名に対しては、味噌汁摂取実験を行っていない（図5-2の被験者番号3, 4, 12番）。

さらに、スキー場でも、運動負荷後の味噌汁のリラックス効果がみられるか調査を行った。スキーは、寒冷地で行うスポーツであることから、暖かい味噌汁によるリラックス効果がより期待できる。実際に、スキー参加者にボランティアを募り、調査を行ったところ13名中9名で低下がみられた（図5-3）。スキーによる運動負荷後であるにもかかわらず数値が高くなっていない者（No. 1-4）がいた。また4名で味噌汁摂取後に上昇

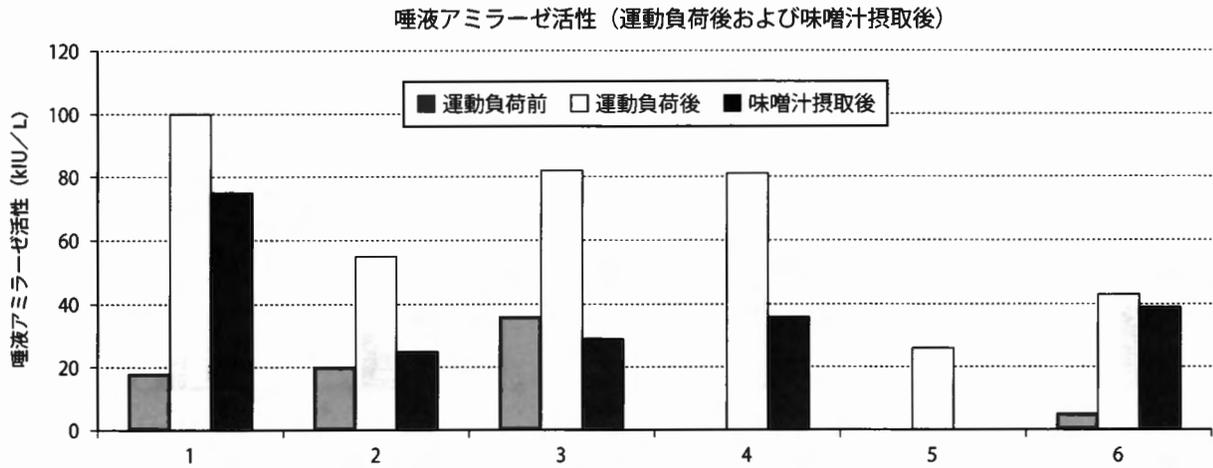


図5-1 ストレス負荷（運動ストレス）後の味噌汁の効果

6名中6名で低下。

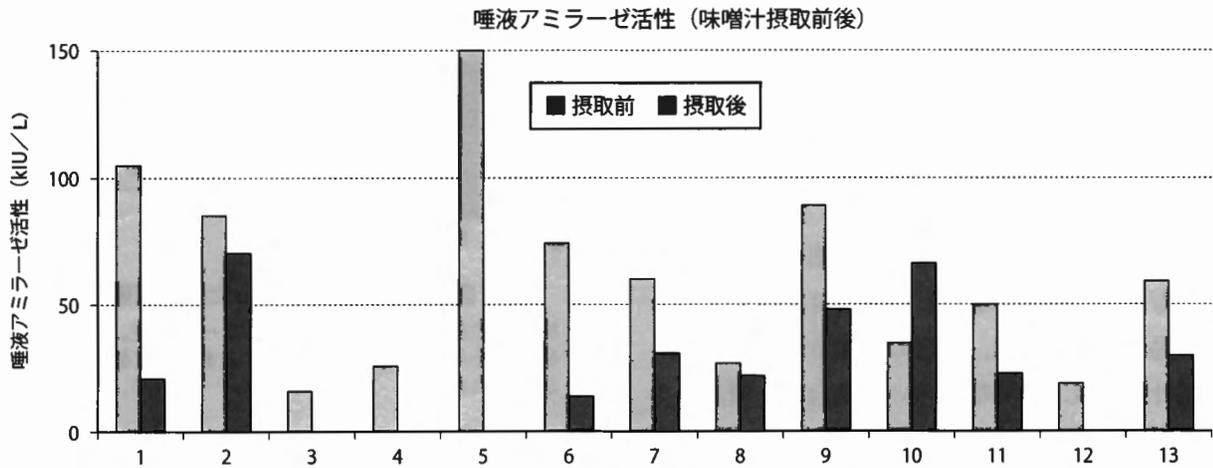


図5-2 ストレス負荷（講演会発表および運営）後の味噌汁の効果

10名中9名で低下。（13名中味噌汁テストは10名のみ参加）

運動や会議などによるストレス負荷後に味噌汁を摂取するとリラックス効果が期待できる。

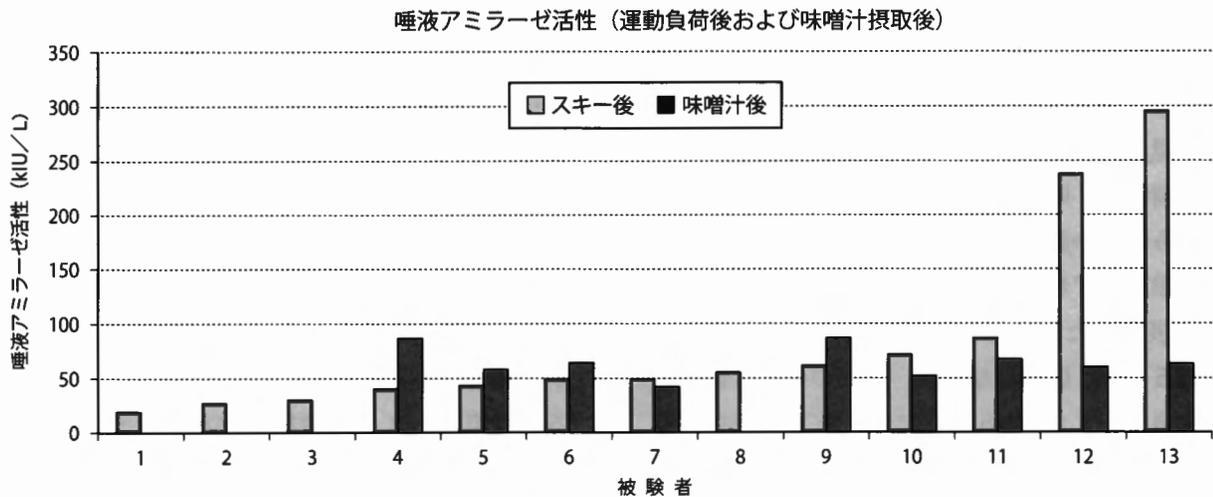
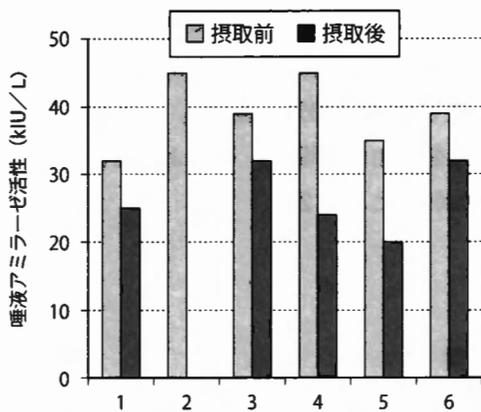


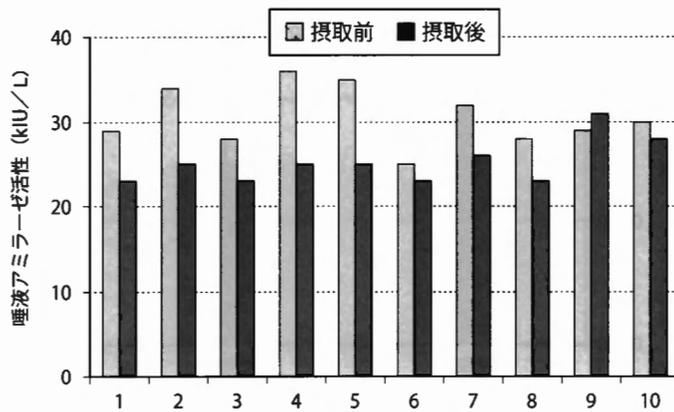
図5-3 ストレス負荷（運動ストレス）後の味噌汁の効果

13名中9名で低下。（4名上昇）

スキーによる運動ストレス負荷後に味噌汁を摂取した→半数以上が味噌汁摂取後、数値が下がった。



1. 中国人留学生（日本在住）
6名全員，リラックス効果が見られた。



2. 中国人学生（中国在住）
10名中9名で，リラックス効果が見られた。

図6 外国人を対象とした味噌汁の効果

中国人に対しては，リラックス効果見られた。

した者もいた。

6) 外国人を対象とした味噌汁の効果：

学生を対象にした大規模調査から，食生活習慣が味噌汁のリラックス効果に関わるか，調査した。まず，ロシアからの女子留学生に対し調査を行ったところ，摂取前が28kIUに対し，摂取後は34kIUと上昇した。特に，彼女の感想としては，塩辛い飲み物で，まずいと感じた，と日本人には，驚くべき結果であった。同時に，日本人学生2名にも一緒に調査に参加してもらったが，いずれも，41→28 kIU，46→29 kIUと摂取後に低下し，美味しいとの感想を得た。

教室在籍の中国人留学生からは，これまでに味噌汁に対して，美味しい食品との感想を得ており，次に，中国人を対象とした調査を行った。まず，千葉大に在籍する中国人留学生に協力してもらい，調査を行ったところ，被験者6名いずれも，味噌汁摂取後にリラックス効果がみられた（図6-1）。日本での生活を通し，味噌汁に慣れてしまっている可能性を考慮し，中国在住の学生を対象に，同様に調査を行ったところ，10名中9名で低下がみられた（図6-2）。また，味噌汁に関しても，美味しい汁という感想を得られた。

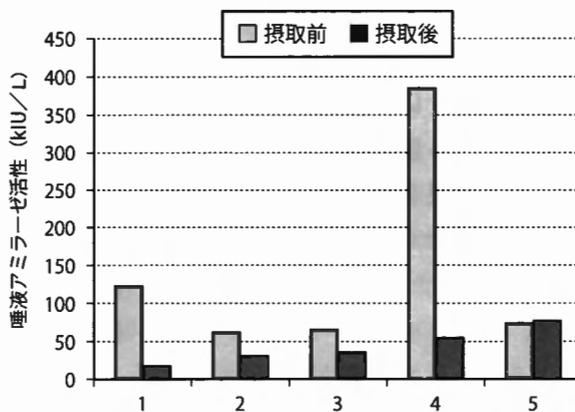


図7 高値ストレス者に対する味噌汁の効果

通常の値が50以上を示した者（高値ストレス者）を対象にリラックス効果を調べたところ，1名（No.5）を除き4名で低下が見られた。

7) 高値ストレス者に対する味噌汁のリラックス効果：

大規模なストレス度調査より，年齢が上がると，平均値の上昇が見られており（図1），中高年では，日常的に高いストレス状態にある者（高値ストレス者）が比較的多く存在する，と考えられた。高値ストレス者に対しても味噌汁のストレス軽減効果が有効か，次に調査した。数値が50 kIU以上を示した50代以上の方，5名に協力を願い，調査に参加していただいた。1名（No.5）を除き，4名で味噌汁摂取後に低下がみられた（図7）。

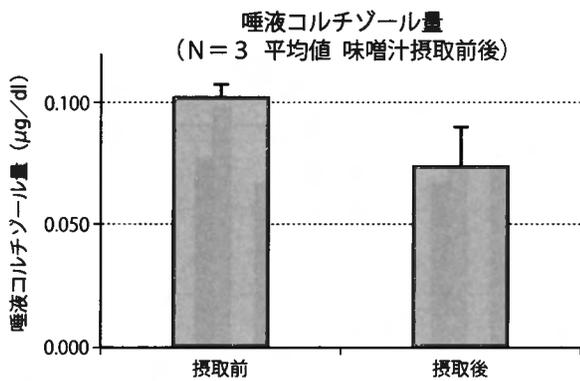


図8 他のバイオマーカーを用いた味噌汁のリラックス効果

他の唾液中のバイオマーカー用いても、味噌汁によるリラックス効果が示唆された。

8) 他のバイオマーカーを用いた味噌汁のリラックス効果の検証：

唾液のストレス度のバイオマーカーと知られるコルチゾール量を指標とし、味噌汁摂取によるリラックス効果を調べた。3回の実験で摂取前の平均は、 $0.103 \pm 0.005 \mu\text{g}/\text{dl}$ であったが、摂取後の平均は $0.074 \pm 0.016 \mu\text{g}/\text{dl}$ であった(図8)。よって、唾液コルチゾールを用いても、味噌汁摂取によるストレス軽減効果が示された。

9) 味噌成分による唾液アミラーゼ活性への影響：

味噌には、アミラーゼ活性阻害物質を含有するとの報告があり、味噌汁摂取によるリラックス効果が、この阻害活性物質によるのであるか、検討する必要がある。そのため、予備実験として、味噌を水で溶いた溶液(水抽出味噌成分)および上記のストレス実験に従い熱湯で溶いた溶液(湯抽出味噌成分)を唾液に添加し、アミラーゼ活性への影響を調査した。比較として蒸留水(DDW)を用いた。既報に従い、唾液に10分の1量または、2分の1量の上記味噌成分を添加し、10分後にアミラーゼ活性を測定した。結果を表2にまとめた。10分の1量添加した場合は、DDWの添加により、アミラーゼが希釈され、活性が低下した(72%)が、水抽出味噌成分(78%)および湯抽出味噌成分(91%)を添加した場合、活性が相対的に高くなる傾向がみられた(表2)。2分の1量添加した場合は、DDWの添加により、アミラ

ーゼが希釈され、活性が低下した(48%)が、さらに水抽出味噌成分を添加するとより活性の阻害効果が示唆された(40%, 表2)。一方で、湯抽出味噌成分を添加した場合、そのような阻害効果はみられなかった(表2)。

V. 考察

ストレスの度合いをバイオマーカーによる科学的裏付けの元議論する必要性に迫られているが従来の調査法は、主に血液中のバイオマーカーを指標としてきた。しかし、採血は、その行為自体が被験者にとってストレスになるため、血液に代わる検査法の開発が求められている。唾液によるストレス度測定法は、比較的安価に大規模調査が簡便に行え、且つ被験者への負担も少ない(表1)。本研究では、近年注目されつつある唾液アミラーゼを指標としたストレス度調査法の有用性の検討を行った。

唾液アミラーゼ活性を指標としたストレス度調査から、健康とされる多くの現代人にも潜在的にストレスがたまっていることが示唆された。特に、年齢とともに、増大する傾向がみられ、普段からのストレスケアが、今後の生活を快適に暮らす上で必要であると考えられる(図1)。

日本人になじみ深い味噌汁で、リラックス効果が見られた。味噌の種類により効果に差があるのか、今後の課題である。

女子栄養大学の五明らは、味噌に含まれるメラノイジンをはじめとする褐色成分にアミラーゼ阻害活性がみられる、との報告をしている(日本栄養・食糧学会誌 Vol.47 No.1 35~41 1994)。検査においては、味噌汁摂取後、口内の成分の影響をできるだけ取り除くため、湯または水で口内を洗うようにした。さらに、今回は、日常の味噌汁摂取を想定した味噌抽出溶液を、唾液に添加し、アミラーゼ活性を測定したところ、水で抽出した場合は、阻害効果がわずかに示唆されたが、熱湯による抽出液では、むしろ、活性が上昇するとの示唆が得られた(表2)。今回は、できるだけ味噌汁摂取に近い条件で、検討を行い、熱湯の

抽出では、阻害効果はみられないと考えられる。味噌の抽出条件や測定条件などにより阻害効果は見られなくなることも、百瀬らにより示唆されている。実際に、今回の結果では、味噌汁摂取後に数値が上がる例もわずかではあるが、みられており、今回の測定方法では、味噌成分の直接的なアミラーゼ阻害作用は、結果に大きな影響を与えていない、と考えた。さらに、唾液コルチゾールなどの唾液ストレスマーカーを用いた結果からも、味噌汁摂取によるストレス軽減効果がみられることが示唆された(図8)。

参加者からの聞き取り調査では、味と香りが重要な因子であることが示唆されている。特に、塩分の感じ方が結果に影響すると考えられ、実際に塩水を摂取した場合は、アミラーゼ活性が増大している(図3)。香りの良い、マイルドな味わいの味噌を用いた方が、リラックス効果が高いと考えられた。

また、海外からの留学生に対して同様の実験を行ったところ、ロシアからの留学生は味噌汁に対して、塩辛いスープという感想を示し、リラックス効果が見られなかった。一方で、塩分を含む中華料理に接する中国人は、味噌汁摂取を美味しいと感じ、リラックス効果も見られた(図6)。今後、中国では、健康に関する意識が高まりつつあることから、健康食品としての味噌汁をアピールすることで、中国での味噌の販売促進につなげていけるかもしれない。日本人であっても、学生を対象にした大規模調査から、特に若い世代では、同じ濃度の味噌汁に対して、薄く感じる者と濃く感じる者がみられ、食習慣の多様性が若い世代に広がっているのかもしれない。普段の食生活での塩分濃度という観点から、今後の味噌汁販売・提供を考えていく必要がある。

いずれにせよ、味噌食品にリラックス作用があるらしいと示唆が得られたことから、今後は、血液、唾液、尿を採取し、他のバイオマーカーも組み合わせて調査を行う予定である。また、運動や精神的なストレスを増大させるような活動後に、味噌汁摂取することでストレス軽減効果が期待できる(図5)ことから、ストレス緩和という視点からの健康食品として、日常のストレス解消

表1 唾液は血液に代わるか

生体中の状態を調べるためのバイオマーカー→血液中のストレスマーカーを調べていた

項目	唾液	血液	尿
痛み	無	有	無
肉体的侵襲	無	有	無
心理的侵襲	無	有	無
試料の取り扱い	感染の危険小	感染の危険大	特に注意は不要
自己採取	容易	困難	容易
随時くり返し採取	可能	不可能	不可能
費用	安価	高価	安価

BIO INDUSTRY vol.24, No.10, p15-19より引用

表2 味噌成分による唾液アミラーゼ活性への影響

味噌抽出溶液を添加し、10分後に測定した。なお、比較として蒸留水(DDW)を用いた。

	添加量 (V/V)	測定量 (μ l)	アミラーゼ 活性 (kIU)	相対活性 (%)
なし(唾液原液)	—	20	116	100
DDW	10分の1	20	83	72
水抽出味噌成分	10分の1	20	90	78
湯抽出味噌成分	10分の1	20	105	91
DDW	2分の1	20	56	48
水抽出味噌成分	2分の1	20	46	40
湯抽出味噌成分	2分の1	20	75	65

今回の測定法では、水抽出味噌成分添加後に、阻害効果が見られたが湯抽出味噌成分では、むしろ、数値は増大する傾向がみられた。

に味噌を活用するべきであろう。そのためには、さらなる詳細な調査が必要であろう。特に、年齢とともにストレスを抱えることが、現代人では予想され(図1)、高値ストレス者に対しても、味噌はストレス緩和に役立つ機能性食品であることが示唆され(図7)、今後は福祉の分野など様々な分野への応用をアピールできると考えている。

VI. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、(社)中央味噌研究所に多くのご示唆と種々のご支援をいただいたこと、味噌製造の各社に味噌製品や原材料の素材を快くご提供いただいたこと等に対し、深く感謝を申し上げます。また、中国での実験開催にあたっては、承德医学院の佟曉波先生に多大なるご協力をいただいた事に感謝を申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) 五明ら：「唾液 α -アミラーゼ活性測定法の開発およびその褐変食品への応用」日本栄養・食糧学会誌 Vol.47 No.1 35～41 1994
- 2) 第1回 マスコミセミナー「GABA（ギャバ），そのストレス軽減の機能性と可能性」GABA（ギャバ）・ストレス研究センター
- 3) 山口 昌樹：「バイオマーカーによる生体計測 2 ストレスの定量評価」臨床栄養，Vol.107, No.7 801-809 2005
- 4) 鈴木信夫・菅谷茂 他 障害児・者への森林療法効果測定事業 報告書，2007，2006
- 5) 杉田克生・菅谷茂「多摩川に集う人の癒し効果」とうきゅう環境財団報告書2010
- 6) 百瀬ら：「味噌の食後血糖に及ぼす影響」日本栄養・食糧学会誌 Vol.57 No.2 63～69 2010

レニン阻害活性を強化した味噌の開発

高橋 砂織, 佐々木 康子, 渡辺 隆幸

Development of high renin inhibitory miso

Saori TAKAHASHI, Koko SASAKI, and Takayuki WATANABE

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

要旨

高血圧の原因酵素であるレニンの阻害に大豆中のソヤサポニンIが関与していることから、本研究では大豆を使用した代表的な発酵食品である味噌のヒト型レニン阻害活性を詳細に検討した。サンプルとして供した全国の市販味噌73点、全国味噌鑑評会優秀見本味噌7点、秋田県味噌醤油品評会出品味噌16点の味噌の抽出物はいずれもレニン阻害活性を示し、味噌には普遍的にレニンの働きを阻害する物質が含まれていることが示された。

また麹菌の違い、酵母、乳酸菌の添加の有無は味噌抽出物のレニン阻害活性に影響を与えないことを小仕込み試験で認めた。さらにソヤサポニンIを多く含むことが予想される大豆胚軸を味噌製造時に大豆の代替えとして使用することにより、最大で2倍のレニン阻害活性を有する味噌の製造が可能であることが示唆された。

緒言

血圧はホルモン、自律神経、塩類の摂取など様々な要因でコントロールされている。高血圧は、血圧が正常より血圧が高い状態が続く症状で、拡

張期血圧が140 mmHg以上、収縮期血圧が90 mmHg以上になると高血圧であると診断される。高血圧の原因酵素の一つとしてレニンが挙げられる。レニンは、腎臓で合成されているタンパク質分解酵素であり、様々な刺激で血中に放出される。レニンは肝臓で合成されるアンギオテンシンノーゲンに作用して、N末端から10番目と11番目の結合を特異的に加水分解し、10残基のアミノ酸で構成されるアンギオテンシンIを遊離する。アンギオテンシンIは不活性ペプチドで、アンギオテンシン変換酵素でC末端2残基が切除されアンギオテンシンIIとなって作用を発揮する。アンギオテンシンIIは、血管に直接作用して血管を収縮させ血圧を上昇させるほか、副腎に作用してアルドステロンの分泌を促進する。アルドステロンは、腎臓でのナトリウムの再吸収を促進し、結果として体液量が増加することでも高血圧を引き起こす。この血圧上昇系をレニン・アンギオテンシン系と呼んでいる(図1)。

これまで、レニン・アンギオテンシン系の制御を目指して各種食材からのアンギオテンシン変換酵素阻害物質探索研究が数多く報告されている。その理由は、酵素が市販されており容易に入手可能であることや活性測定が簡単であることなどによる。レニン・アンギオテンシン系においてレニ

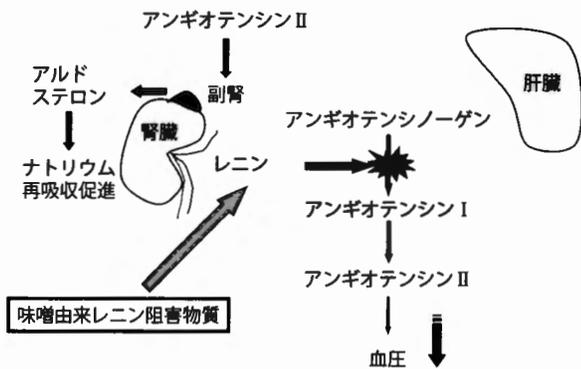


図1 レニン・アンジオテンシン系

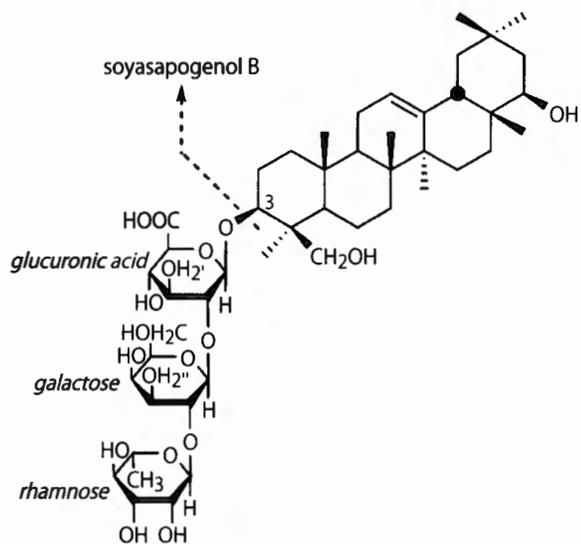


図2 ソヤサポニン I の化学構造

ンは律速酵素として要の役割を持っているが、酵素の入手が困難で活性測定も煩雑であるなどの理由からレニン阻害物質の探索研究は殆ど行われて来なかった。私どもは、ヒト型レニンを大腸菌やバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現することに成功した^{1,2)}。一方、レニン活性測定用の新規蛍光消光基質も開発し、これらを用いた食物由来レニン阻害物質探索系を構築した。その結果、初めて味噌にレニン阻害活性のあることを見いだした³⁾。味噌のレニン阻害活性は大豆由来であることを突き止め、レニン阻害活性が比較的強く認められた大豆胚軸からレニン阻害物質を精製し、その構造をソヤサポニンIと同定した(図2)³⁾。さらに、各種サポニン類を用いた解析によりサポゲノールの3位にグルクロン酸が結合したいわゆるグルクロニドサポニンがレニン阻害サ

ポニンであることを明らかとした⁴⁾。一方、脳卒中モデルラットを用いた実験から、大豆サポニンが高血圧の予防にも効果のあることが明らかとなっている⁵⁾。また、大豆以外の小豆、インゲンやエンドウなどの雑豆類、米や雑穀などにもレニン阻害物質の存在が示されている⁶⁻⁸⁾。

これらの成果を基に、本研究では全国の市販味噌や全国味噌鑑評会優秀見本味噌、秋田県味噌品評会出品味噌のレニン阻害活性を検討し、味噌の種類によるレニン阻害活性の比較を行った。さらに、レニン阻害活性の高い大豆胚軸に注目し、胚軸配合味噌を試作するとともに発酵時間によるレニン阻害活性の変動について解析した。

実験方法

・実験材料(味噌の入手, レニン基質, その他の試薬類)

新規レニン活性測定用蛍光消光基質(N-methylanthranil (Nma)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu* Val-Ile-Thr-His-Lys-2, 4-dinitrophenyl (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂)は、(株)ペプチド研究所で依頼合成した。Sep-Pak Vac 35cc C18カートリッジは、Watersより購入した。

・組換え型レニンの発現と精製

組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現した。発現したレニンはペプスタチンアフィニティーカラムとMono Q FPLCで電気泳動的に単一になるまで精製した²⁾。

・味噌の入手

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

・醸造微生物を変えた味噌製造

味噌製造に用いられる醸造微生物として麹菌(種麹)、酵母、乳酸菌がある。各微生物が味噌抽出物のレニン阻害活性に与える影響を調べるため

に、麴菌については2種類、すなわちA:(株)秋田今野商店製味噌用山吹3号, B:(株)秋田今野商店製AOK139, 酵母は秋田県総合食品研究センター保存株AM-2の添加の有無, 乳酸菌は秋田県総合食品研究センター保存株AL-1添加の有無をそれぞれ変えた8区分の味噌の製造試験を行った。仕込み配合は麴歩合10歩, 目標食塩11.5%, 目標水分44.5%, 大豆は平成21年産秋田県産リュウホウを用い, 0.8kg/cm², 45分の条件で加圧蒸煮した。米は平成21年産秋田県産あきたこまちを用い, 製麴機を用いて製麴した。区分ごとの具体的な仕込み配合は処理大豆1.6kg, 麴1.0kg, 食塩0.36kg, 種水0.16kg, 合計3.12kgである。仕込み後30℃の温醸で8週間熟成した。切り返しは仕込み後4週間目に実施した。

・胚軸を配合した味噌製造試験

胚軸にはレニン活性の阻害が期待できるソヤサポニンIが多く存在している。そこで大豆の一部を大豆胚軸に置き換えた味噌製造試験を実施した。具体的には大豆胚軸0%, 25%, 50%, 100%大豆と代替えた4区分の味噌製造を行った。配合, 使用原料, 原料処理条件, スケール, 熟成方法は上記, 醸造微生物を変えた味噌製造と同様に実施した。なお大豆胚軸の処理は予備試験結果から大豆同様の蒸煮が可能であることを確認したため, 丸大豆と同時に0.8kg/cm², 45分の条件で加圧蒸煮した。仕込み後30日間, 30℃で温醸した後, 切り返しを行い60日間20℃で熟成した。

・味噌抽出液の調整方法

味噌10gに100mlの蒸留水を加え, ホモジナイザー((株)日本精機製MX-8)により2分間, ホモジナイズした後, 105℃, 10分間オートクレーブ処理をした。その後3000rpm, 30分の遠心を行い, 上清約100mlをSep Pak ODS C₁₈ 35cc (Waters Co. LTD)に通し, 吸着させた。200ml蒸留水にて洗浄後, 100mlメタノールにより吸着成分を溶出させた。エバポレーターにより溶出液を濃縮, 乾燥し, 秤量した。乾燥溶出物は20mg/mlになるようにジメチルスルホキシドに溶解し味噌抽出液として, -20℃保存した。

・レニン阻害活性測定

味噌抽出液を水で10倍に希釈した2mg/ml10%ジメチルスルホキシド溶液をサンプルとして試験に供した。ヒトレニンは希釈用緩衝液[20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5, 2 mM EDTA, 10 μM ロイペプチン, 0.2 mM フェニルメタンサルフォニルフルオリド, 1 mg/ml 牛血清アルブミン, 0.02% アジ化ナトリウム]により2.5 μg/mlに希釈し, 新規レニン活性測定用蛍光消光基質 (*N*-methylantranlyl (Nma)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu*Val-Ile-Thr-His-Lys-2, 4-dinitrophenyl (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂) はアッセイ用緩衝液 [50 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.5, 0.02% ツイーン 20, 0.02% アジ化ナトリウム] により40倍に希釈した。

96wellマイクロプレートにサンプル10 μl, レニン10 μl, 基質溶液40 μlを加え, 37℃, 30分反応後, 停止液 [0.1 M トリエタノールアミン緩衝液 pH9.0]を100 μl加えて反応を終了した。蛍光の測色は蛍光マイクロプレートリーダーを用いて (Ex.340nm, Em.440nm, Cut off420nm) で測色した。サンプルブランクはレニンの代わりに希釈用緩衝液を用いて同様に測定した。各測定はサンプル, サンプルブランクとも4連で実施した。サンプル測定値とサンプルブランク測定値との差からレニン活性を計算した。この際, レニンの50%阻害を1Uとし, 強い活性を有するサンプルを用いて作成した阻害曲線を元にサンプル重量あたりの阻害活性を阻害ユニット (IU) として求め, さらに味噌10gからの抽出重量 (mg) を乗することにより全阻害ユニット (TIU) を求めた。

実験結果及び考察

1) 市販味噌のレニン阻害活性

市販味噌73点, 全国味噌鑑評会優秀見本味噌7点, 秋田県味噌醤油品評会出品味噌16点の味噌抽出物のレニン阻害活性を表1に示した。サンプルにより抽出物の重量, 阻害ユニット (IU), 全阻害ユニット (TIU) に差異を認めたものの, 今回測定したすべての味噌にレニンの阻害活性を認め

表1 味噌抽出物添加時のレニン活性

味噌 No.	種 類	味噌10gから の抽出量 mg	レニン 活性% n=4	標準 偏差	IU (阻害 ユニット)	TIU (全阻害 ユニット)	味噌 No.	種 類	味噌10gから の抽出量 mg	レニン 活性% n=4	標準 偏差	IU (阻害 ユニット)	TIU (全阻害 ユニット)
市販味噌							58	米 み そ	58.8	59.2	3.4	0.63	37.0
1	米 み そ	107.0	53.0	8.9	0.86	92.0	59	米 み そ	51.9	58.1	4.9	0.67	34.8
2	米 み そ	72.8	52.9	1.4	0.86	62.6	60	米 み そ	71.5	58.2	3.1	0.67	47.9
3	米 み そ	91.7	49.4	8.1	1.06	97.2	61	米 み そ	98.6	70.3	6.9	0.38	37.5
4	米 み そ	81.0	52.2	3.9	0.9	72.9	62	米 み そ	89.0	67.8	2.4	0.44	39.2
5	米 み そ	80.3	61.3	8.5	0.56	45.0	63	米 み そ	45.6	60.0	11.5	0.6	27.4
6	米 み そ	93.2	41.0	5.9	1.45	135.1	64	米 み そ	54.2	59.1	2.8	0.63	34.1
7	麦 み そ	145.1	77.9	6.9	0.27	39.2	65	米 み そ	54.9	63.4	3.0	0.54	29.6
8	麦 み そ	130.0	65.7	6.1	0.47	61.1	66	米 み そ	59.6	53.7	3.5	0.81	48.3
9	豆 み そ	102.2	59.6	8.3	0.61	62.3	67	米 み そ	52.4	60.7	2.2	0.58	30.4
10	調 合 み そ	94.6	55.4	8.3	0.75	71.0	68	米 み そ	65.0	61.2	4.1	0.57	37.1
11	米 み そ	82.6	68.4	18.2	0.41	33.9	69	米 み そ	45.7	69.8	8.3	0.39	17.8
12	米 み そ	77.0	48.1	6.8	1.1	84.7	70	米 み そ	47.5	55.8	1.1	0.94	44.7
13	米 み そ	84.9	48.0	7.1	1.1	93.4	71	米 み そ	51.9	66.7	4.8	0.47	24.3
14	米 み そ	57.2	39.6	6.1	1.53	87.5	72	米 み そ	79.6	53.8	6.8	0.81	64.5
15	米 み そ	71.8	61.3	4.5	0.56	40.2	73	米 み そ	87.1	61.9	4.9	0.55	48.0
16	米 み そ	73.2	40.0	4.8	1.5	109.8	74	米 み そ	91.9	55.5	11.9	0.95	87.3
17	麦 み そ	86.4	65.8	2.9	0.47	40.6	75	米 み そ	45.5	54.8	5.6	0.96	43.7
18	米 み そ	79.0	45.2	8.3	1.24	98.0	76	米 み そ	102.5	70.1	2.1	0.39	40.0
19	米 み そ	122.4	52.0	1.9	0.91	111.4	77	米 み そ	143.5	69.8	6.3	0.39	56.0
20	米 み そ	78.6	44.7	1.4	1.29	101.4	78	米 み そ	57.3	54.7	4.8	0.96	55.0
21	米 み そ	83.7	62.8	6.0	0.53	44.4	79	米 み そ	75.4	63.8	2.0	0.5	37.7
22	米 み そ	70.6	48.9	3.8	1.07	75.5	80	豆 み そ	84.6	28.0	12.2	1.55	131.1
23	米 み そ	74.4	54.5	2.1	0.79	58.8	市販味噌平均		83.5	58.7		0.74	58.6
24	米 み そ	73.9	49.9	5.9	1	73.9	H22年度 全国味噌鑑評会 優秀見本						
25	米 み そ	61.3	49.7	3.7	1.04	63.8	34	米みそ(優秀見本)	84.1	50.3	1.8	0.98	82.4
26	米 み そ	75.4	52.3	8.5	0.89	67.1	35	米みそ(優秀見本)	47.2	66.3	12.3	0.45	21.2
27	米 み そ	63.0	65.7	8.7	0.47	29.6	36	米みそ(優秀見本)	58.1	56.4	14.2	0.71	41.3
28	米 み そ	78.0	76.6	23.6	0.28	21.8	37	米みそ(優秀見本)	56.5	56.9	22.3	0.7	40.0
29	米 み そ	67.9	44.0	6.9	1.31	88.9	38	米みそ(優秀見本)	79.8	70.8	6.9	0.38	30.3
30	麦 み そ	80.4	55.1	7.6	0.95	76.4	39	豆みそ(優秀見本)	72.7	57.6	14.0	0.67	48.7
31	麦 み そ	54.6	40.8	4.0	1.46	79.7	40	麦みそ(優秀見本)	79.1	48.7	3.6	1.08	85.7
32	米 み そ	80.8	55.6	3.9	0.95	79.2	全国味噌鑑評会 サンプル平均		68.2	58.1		0.71	49.9
33	米 み そ	70.1	41.2	8.9	1.43	100.2	H22年度 秋田県味噌醤油品評会出品						
41	米 み そ	235.2	82.9	1.4	0.22	51.7	A4	米 み そ	44.6	58.1	17.3	0.66	29.4
42	米 み そ	64.4	54.7	7.5	0.78	50.2	A6	米 み そ	110.9	50.9	8.7	0.95	105.4
43	調 合 み そ	134.0	80.3	1.5	0.24	32.2	A8	米 み そ	121.8	48.7	8.1	1.08	131.5
44	調 合 み そ	140.5	78.4	2.5	0.26	36.5	A10	米 み そ	127.3	67.6	7.9	0.44	56
45	米 み そ	85.2	65.3	2.3	0.48	40.9	A12	米 み そ	36.9	41.2	7.4	1.44	53.1
46	米 み そ	79.7	63.6	1.6	0.51	40.6	A14	米 み そ	50.9	62.1	5.5	0.55	28
47	米 み そ	77.5	66.1	3.1	0.46	35.7	A18	米 み そ	40.3	56.4	7.1	0.72	29
48	米 み そ	69.0	66.3	1.2	0.46	31.7	A20	米 み そ	35.7	43.3	12.2	1.35	48.2
49	米 み そ	54.9	59.4	12.7	0.63	34.6	A21	米 み そ	105.6	45.7	17.0	1.22	128.8
50	米 み そ	79.3	57.1	8.3	0.7	55.5	A22	米 み そ	42.0	49.1	16.3	1.06	44.5
51	米 み そ	95.7	67.5	6.2	0.43	41.2	A23	米 み そ	94.7	54.2	9.7	0.8	75.8
52	米 み そ	151.4	47.9	11.2	1.12	169.6	A24	米 み そ	28.5	48.3	6.6	1.1	31.4
53	米 み そ	85.5	57.9	11.0	0.67	57.3	A25	米 み そ	75.5	51.7	4.6	0.92	69.5
54	調 合 み そ	113.8	72.5	3.2	0.35	39.8	A26	米 み そ	41.6	53.7	1.9	0.83	34.5
55	調 合 み そ	109	78.4	1.4	0.26	28.3	A27	米 み そ	57.8	51.5	11.2	0.93	53.8
56	調 合 み そ	97.4	77.9	2.0	0.26	25.3	A28	米 み そ	43.0	39.2	1.5	1.52	65.4
57	米 み そ	67.4	54.6	6.3	0.78	52.6	秋田県品評会 サンプル平均		66.1	51.4		0.97	61.5

た。そこでサンプル種ごとにTIUの比較を行った。全国味噌鑑評会優秀見本味噌7点(米味噌5点, 豆, 麦味噌各1点)のTIUの平均は49.9, 秋田県味噌醤油品評会出品味噌(米味噌)16点のTIUの平均は61.5と平均的な阻害活性に大きな違

いを認めなかった。また全国の市販味噌73点(米味噌60点, 調合味噌6点, 麦味噌5点, 豆味噌2点)の平均TIUも58.6と全国味噌鑑評会のサンプルと同様の活性を示した。なお味噌の種類ごとのTIUの平均値を比較すると米味噌59.2, 調合味噌

38.9, 豆味噌96.7, 麦味噌59.4となり, やや豆味噌の阻害ユニット量が多い傾向が認められた。私どもがレニン活性阻害成分として同定したソヤサポニンIは大豆由来成分のため, 大豆の使用割合が多いほど阻害活性が高くなり, 豆味噌や麴歩合の低い米味噌, 麴歩合の低い麦味噌ではレニンの阻害が強くなるのが期待される。今回はサンプル数が少ないため比較は難しいが, 味噌の種類, 製造方法がレニン阻害活性に影響を及ぼしていることが示唆された。しかし豆味噌でも阻害活性にバラツキを認めたこと (No.9とNo.80ではTIUに2倍の違い), 米味噌にも相当な活性差があることから (TIUの最大値, 169.6 (No.52), 最小値17.8 (No.69)), 味噌のレニン阻害の原因は複雑である点も示唆された。この原因の探求については今後の課題としたいが, 今回の調査により味噌には普遍的にレニンの働きを阻害する物質が含まれていることが推測されている。

2) 醸造微生物の違いがレニン阻害活性に与える影響

味噌の品質に種麴の違い, 酵母, 乳酸菌の発酵は大きな影響を与える。今回の製造試験において酵母添加味噌は初発菌数 10^5 オーダーであり, 熟成途中に 10^6 オーダーに増加, 熟成終了時に 10^4 前後であった。また乳酸添加味噌の初発菌数は 10^6 オーダーであり, 熟成1ヶ月までその菌数を維持し, 熟成終了時には 10^3 まで減少した。酵母添加味噌には発酵香が感じられ, 乳酸菌添加味噌にはボディ感があり, それぞれタイプの異なる味噌となった。これらの醸造微生物の違う味噌8点のSep Pak ODS C₁₈抽出物のレニン活性に与える影響を図3に示した。どの味噌についても仕込み直後のレニン阻害が強く, 熟成に伴い若干, レニン阻害が弱まる傾向が認められた。しかしながら熟成全般を通して区分間に大きな差異は無く, 麴菌の違い, 酵母, 乳酸菌の有無はレニン阻害活性に大きな影響を及ぼさないことを認めた。

3) 胚軸を配合した味噌製造試験

大豆胚軸はソヤサポニンIを多く含んでいることが予想されるため, 味噌に配合することによ

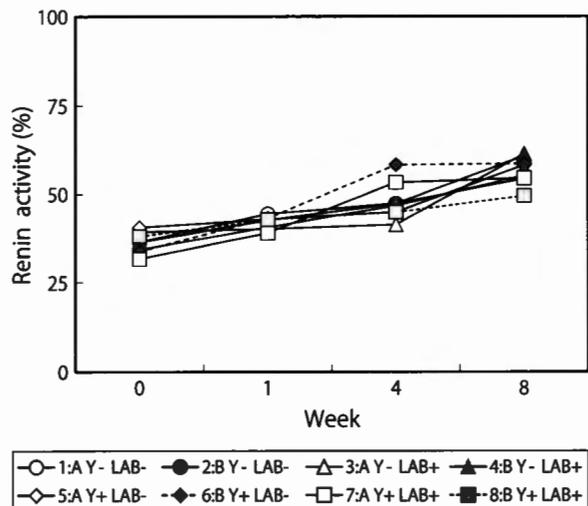


図3 醸造微生物の違いがレニン阻害活性に与える影響

凡例は麴菌A:山吹3号, B:AOK139の違い, 酵母(Y)の有無:-, +, 乳酸菌(LAB)の有無:-, +, を示す。

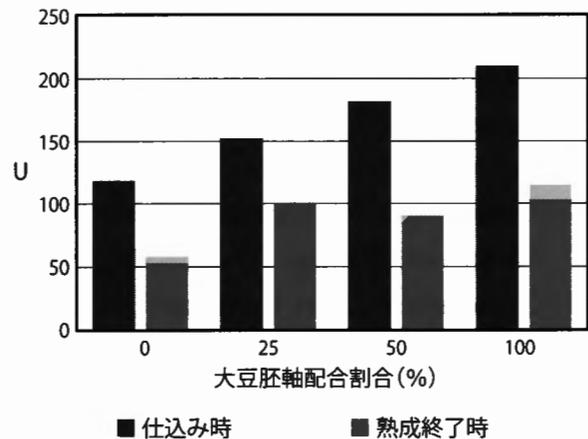


図4 大豆胚軸配合味噌のTIU

り, 味噌のレニン阻害活性を高めることが期待できる。今回実施した仕込み試験の結果 (図4), 大豆胚軸を味噌に配合することにより予想通り, レニン阻害ユニット量が増加することが認められた。大豆胚軸100%の味噌は通常の大豆使用の味噌の約2倍のレニン阻害ユニット量を有しており, 概ね大豆胚軸を多く配合することにより味噌のレニン阻害活性ユニット量の増加が認められた。また熟成に従い, レニン阻害ユニット量の減少が認められたが, これはレニン阻害活性を示すソヤサポニンIが麴由来の酵素群により分解を受けるためだと考えられる。以上のことから大豆胚軸の配合は味噌のレニン阻害活性の増強にきわめ

て有効であることが示唆された。

【引用文献】

- 1) Takahashi S., Ogasawara H., Watanabe T., Kumagai M., Inoue H., and Hori K., Refolding and activation of human renin expressed in *Escherichia coli*: Application of recombinant human renin for inhibitor screening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2913-2918 (2006).
- 2) Takahashi S., Hata K., Kikuchi K-I, and Gotoh T., High-level expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells: Rapid purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2610-2613 (2007).
- 3) Takahashi S., Hori K., Shinbo M., Hiwatashi K., Gotoh T., and Yamada S., Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin I is the novel human renin inhibitor in soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 3232-3236 (2008).
- 4) Takahashi S., Hori K., Hokari M., Gotoh T., and Sugiyama T. Inhibition of human renin activity by saponins. *Biomed. Res.*, 31, 155-159 (2010)
- 5) Hiwatashi K., Shirakawa, H., Hori K., Yoshiki Y., Suzuki N., Hokari M., Komai M., and Takahashi S., Reduction of blood pressure by saponins, renin inhibitor from soybean, in spontaneously hypertensive rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2310-2312 (2010).
- 6) Takahashi S., Hori K., Kumagai M., and Wakabayashi S., Human renin inhibitory activity in legumes. *J. Biol. Macromol.*, 7, 49-54 (2007).
- 7) Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Kodama I., Hokari M., Suzuki N., Yoshizawa Y., and Gotoh T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1713-1715 (2010).
- 8) Takahashi S., Tokiwano T., Suzuki N., Kodama I., Yoshizawa Y., and Gotoh T., *J. Biol. Macromol.*, 10, 83-91 (2010).

謝 辞

本研究は、(社)中央味噌研究所からの研究助成を受けて行われました。関係各位に感謝申し上げます。また、各種味噌試料を提供頂きました(社)中央味噌研究所並びに秋田県味噌醤油工業組合に御礼申し上げます。

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

武田 卓, 築地 謙治, Li Bin, 八重樫 伸生

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

Takashi TAKEDA, Kenji TSUIJI, Bin LI, Nobuo YAEGASHI

Center for Traditional Asian Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine,
1-1 Seiryō-machi, Aoba, Sendai 980-8574, Japan

子宮筋腫は良性疾患だが、女性の約25~50%に認められ過多月経・月経痛・圧迫等によりQOLを著しく障害する¹⁾。外科治療が標準治療とされ、子宮摘出の三分の一は筋腫に対して行われている。筋腫は女性ホルモン（エストロゲン）依存性に増殖するため、閉経でエストロゲン分泌がなくなれば治療の必要性はなくなる。子宮筋腫に対する薬物治療では、エストロゲンによる筋腫細胞増殖機構を抑制するGnRH アゴニストが使用されるが、重篤な副作用のため長期投与できない。閉経前の筋腫増殖速度を抑制し閉経まで乗り切れば子宮温存薬物療法は達成されるが、このような薬物は存在しない。疫学的には、大豆製品摂取による筋腫発症抑制の可能性が報告されている²⁾。大豆中には植物性エストロゲンであるイソフラボンが含まれており、そのなかのジェニスタインについては我々の先行研究において子宮筋腫細胞増殖に対するPPAR γ を介する抑制効果を認めている³⁾。我々が最近開発したヒト子宮筋腫モデルマウスは長期間にわたり筋腫の組織学的構造維持が可能である⁴⁾。昨年度に引き続いてこのモデルを用いて味噌による子宮筋腫増殖抑制効果について

検討し、子宮筋腫治療法の新たな展開を目的として実験を行った。

1 実験方法

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

1) 試料

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

細胞は子宮筋腫モデル細胞株(ELT-3細胞)を用いて、過去に報告されている培養方法により37度のCO₂インキュベーター(5%)下で培養した⁵⁾。

2) SDS-PAGE と Western blotting

ELT-3は10 cm ディッシュで培養し、それぞれの味噌上清(S仙台, X信州)(原液S1・X1,

2倍希釈S2・X2, 5倍希釈(S5・X5)をメディアウム10mlあたりに100 μ l添加し6時間後, 24時間後に細胞を回収した。細胞は1 ml のlysis buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5%Nonidet P-40, 1 mMNaF, 1 mM Vandate, 0.75 mM PMSF, 15% glycerol] で溶解した。各サンプル(25 mg/lane)はSDS-PAGE 10% gelを用いて電気泳動した。PVDFメンブレンに転写し p44/42抗体, リン酸化 p44/42抗体, Akt抗体, リン酸化Akt抗体(Cell Signaling Technology)ならびにインターナルコントロールとして β -actin抗体(Sigma-Aldrich)を用いてWestern blottingを行った。

4) ヒト子宮筋腫モデルマウス

患者同意のもと過多月経等の症状のため子宮全摘あるいは子宮筋腫核出により摘出した子宮筋腫組織を使用した。子宮筋腫組織を細切し免疫不全マウスであるNOGマウスの皮下に麻酔下で移植しヒト子宮筋腫モデルマウスを作製した。NOGマウスには子宮筋腫組織移植の48時間前にエストロゲンサポートのためのエストロゲンペレットを皮下に留置した。

安楽死後に移植組織片を摘出し, HE染色, エストロゲンレセプター免疫染色, プロゲステロンレセプター免疫染色をそれぞれ行い, 子宮筋腫の組織構築および特性を検討した。また, 細胞増殖の指標としてKi-67免疫染色, アポトーシスの指標としてTUNEL染色をおこなった。

味噌上清投与実験では, 強制経口ゾンデ方によ

り仙台味噌上清0.1mlを連日投与した。

2 実験結果および考察

1) 子宮筋腫細胞における味噌上清によるAkt抑制効果

昨年度の検討の結果, 味噌上清添加による細胞増殖抑制効果を認め, その抑制メカニズムとしてはPPAR γ と異なるメカニズムを介することが明らかとなった。

子宮筋腫細胞の増殖系における, Aktシグナル伝達系の活性化が報告されており⁹⁾, 味噌上清添加によるこのシグナル伝達系に対する影響を検討した。6時間添加での変化はあきらかではなかったが, 24時間添加によりリン酸化Aktの減少とAktタンパクの減少を認めた。

同時に細胞増殖系に重要な役割をはたすERKのリン酸化を検討したところ, 6時間・24時間ともに味噌上清添加によるERKリン酸化の活性化を認めた(図1)。

これらより, 味噌上清は子宮筋腫細胞増殖系に対して何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

2) ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討

ヒト子宮筋腫モデルマウスに味噌上清の経口投与実験をおこなった。味噌はin vitroの検討でより強い細胞増殖抑制効果を認めた仙台系を使用し移植後8週まで投与を行った。移植組織片腫瘍サ

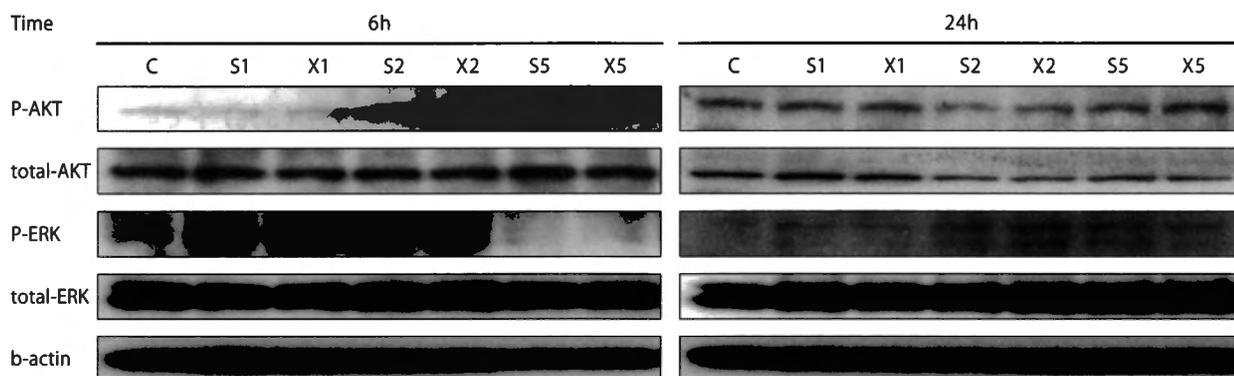


図1 味噌上清によるAkt抑制効果

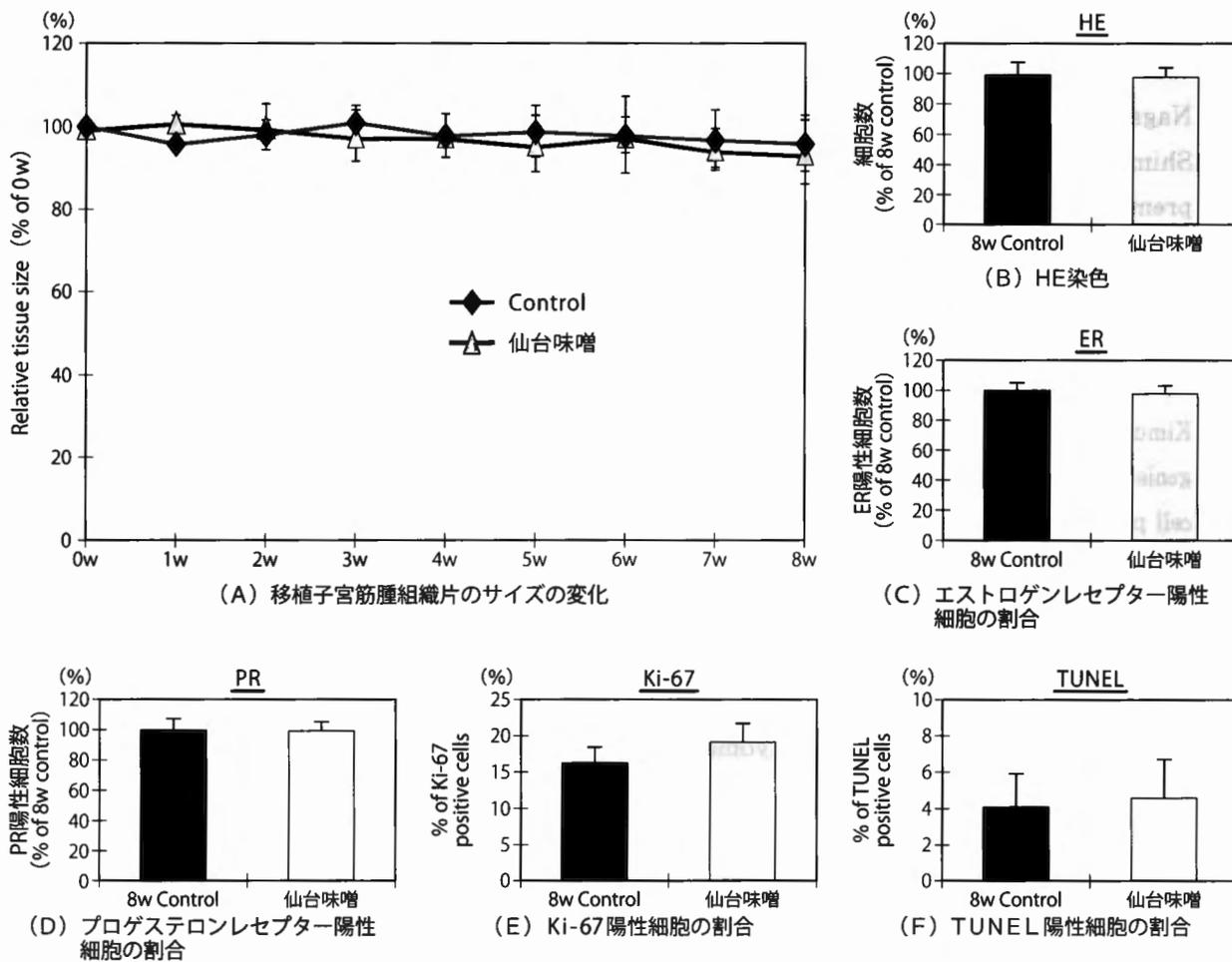


図2 ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討

イズに経過中変化を認めず、摘出した組織からの検討では、HE染色での組織学的構築に差を認めず、エストロゲンレセプター陽性細胞数、プロゲステロンレセプター陽性細胞数、また細胞増殖・アポトーシスについてもKi-67免疫染色・TUNEL染色の評価では差を認めなかった(図2)。エストロゲンとプロゲステロン両者を補充することにより、移植組織は8週間で体積で約1.3倍に増大するが⁴⁾、これを用いて味噌上清の強制経口摂取実験を行っていたが、3月11日に発生した東日本大震災のため動物施設使用不能となり、実験途中で中断となった。これに関しては現在実験を再開中である。

3 要約

子宮筋腫細胞を用いた検討では、Aktシグナルに対して味噌上清は抑制的に作用した。ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討では、投与8週での明らかな抑制効果を認めなかった。エストロゲン・プロゲステロン両者を補充することにより、移植組織のサイズの増加を認めるため、味噌上清の抑制効果を見るためには、エストロゲン単独補充よりも抑制効果がより確認しやすい可能性がある。こちらのモデルを用いてのさらなる検討を進めていきたい。

4 文献

1) Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids:

- the elephant in the room. *Science* 2005;308:1589-1592.
- 2) Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. Soy product intake and premenopausal hysterectomy in a follow-up study of Japanese women. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:773-777.
- 3) Miyake A, Takeda T, Isobe A, Wakabayashi A, Nishimoto F, Morishige K, Sakata M, Kimura T. Repressive effect of the phytoestrogen genistein on estradiol-induced uterine leiomyoma cell proliferation. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:403-409.
- 4) Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N. Establishment of a Novel Xenograft Model for Human Uterine Leiomyoma in Immunodeficient Mice. *Tohoku J Exp Med.* 2010;222(1):55-61.
- 5) Isobe, S. Takeda, T. Sakata, M. Miyake, A. Yamamoto, T. Minekawa, R. Nishimoto, F. Okamoto, Y. Walker, L. Kimura, T. Dual repressive effect of angiotensin II-type 1 receptor blocker telmisartan on angiotensin II-induced and estradiol-induced uterine leiomyoma cell proliferation. *Hum Reprod* 23:440-446, 2008.
- 6) Hoekstra AV, Sefton EC, Berry E, Lu Z, Hardt J, Marsh E, Yin P, Clardy J, Chakravarti D, Bulun S, Kim JJ. Progestins activate the AKT pathway in leiomyoma cells and promote survival. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1768-74.

味噌由来の乳酸菌の機能性に関する研究

—エコール産生に及ぼす影響の検討—

田村 基

Studies on the functionality of lactic acid bacteria isolated from Miso

—Effects of lactic acid bacteria on equol production—

Motoi TAMURA

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

要約

味噌は、主要な発酵食品の一つであり、生活習慣病予防が期待されるイソフラボンを含んでいる。しかし、味噌由来の乳酸菌がエコール産生やイソフラボン代謝に及ぼす影響は検討されていない。本研究では、味噌由来の乳酸菌が*in vitro*でエコール産生やイソフラボン代謝に及ぼす影響を明らかにし、この乳酸菌のマウスへの投与が、マウスの脂質代謝やイソフラボン代謝に及ぼす影響を検討した。

味噌希釈液を接種した1% NaCl-MRS寒天培地で発生するコロニーの微生物の16S rRNA遺伝子配列の相同性解析結果から、1% NaCl-MRS寒天培地では必ずしも乳酸菌が増殖する結果とはならず、味噌の中に種々の細菌が存在することが示唆された。味噌から得られたこれらの乳酸菌にはエコール産生性は認められなかったが、マウス糞便希釈液のエコール産生向上効果を有する菌が存在した。

味噌由来の乳酸菌だけでなく、味噌に存在する菌全てを抽出し、抽出した菌のイソフラボン代謝

性を検討した。味噌から抽出した菌は、ダイジンからダイゼインを産生すると共に、ダイジンからゲニステインを産生した。しかし、味噌抽出菌のいずれもエコールを産生することはなかった。ダイジンからゲニステインへの産生性は味噌によってかなり異なることが示唆された。

味噌由来乳酸菌のエコール産生性やダイジンからゲニステインへの産生性を検討した。味噌由来乳酸菌はダイジンを加水分解して、ダイゼインを産生するとともに、ダイジンからゲニステインを産生した。しかし、これらの乳酸菌は、ダイジンからエコールを産生することはなかった。

イソフラボンを添加した高脂肪食を与えたマウスに味噌由来乳酸菌 *Tetragenococcus* sp.6 を投与した。対照群には、乳酸菌投与群と同じ餌と蒸留水とを投与した。乳酸菌投与群の乾燥糞便重量は、対照群に比べて高い傾向を示した。この乳酸菌は、マウスに対し整腸作用を有していることが示唆された。また、マウスの乾燥糞便中の総胆汁酸量は、乳酸菌投与群で低い傾向 ($P=0.055$) が認められた。尿中ダイゼイン濃度、エコール濃度の平均値は、乳酸菌投与群で高かった。特にダイ

ゼイン濃度は、乳酸菌投与群で高い傾向 ($P=0.053$) が認められ、味噌由来の乳酸菌は、イソフラボン吸収・代謝に好ましい影響を及ぼしていると推察された。さらに、尿中の抗酸化能は、乳酸菌投与群で、対照群に比べて有意に高い傾向となった ($P<0.05$)。

本研究の結果、味噌由来乳酸菌は、ダイジンからゲニステインを産生することで、味噌に含まれるイソフラボンの機能性を強化するとともに、マウスに対する整腸作用を有し、そのイソフラボン代謝性に影響を及ぼし、尿の抗酸化能の強化を通じて、酸化ストレス予防に関与している可能性が示唆された。

緒言

イソフラボンは、大豆に含まれ、種々の生活習慣病予防効果が期待されるフラボノイドの一種である。イソフラボン配糖体は、そのままの形では消化管から吸収されにくいといった報告 (Setchell KD et al., 2002) もあり、大豆イソフラボンの吸収・代謝には、消化管で常在する腸内フローラ (腸内細菌叢) の役割が重要である (Bowel E et al., 2003)。大豆イソフラボンの一つダイジンからは、腸内フローラの代謝でエコールを産生する。腸内でイソフラボンから産生されるエコールは、もとのイソフラボンよりエストロゲン活性が強く (Breinholt V et al., 1998)、エコールの機能性の高さが注目されている。エコールは脂質代謝に影響すると考えられている。大豆加工食品を摂取したヒトの中では、エコール濃度が高いヒトほど血中コレステロールおよび血中トリグリセリド低下効果が顕著であったことが報告されている (Meyer BJ et al., 2004)。また、エコールの癌予防効果も期待されている。乳癌リスクの低さとエコール産生量の多さに相関があるという報告 (Ingram D et al., 1997) やエコール濃度の高い男性では、前立腺癌のリスクが低い可能性があるといった報告がある (Ozasa K et al., 2004)。エコールには弱いエストロゲン活性があるため、エコールによる更年期障害予防効果

(Aso T, 2010) や閉経後の骨粗鬆症予防効果 (Weaver CM et al., 2010) も期待されている。しかし、エコール産生能は、ヒトによって個人差が大きく、50~70%のヒトは、エコール産生能が非常に弱いことが知られている (Setchell KD et al., 2006; Lampe JW et al., 1998; Song KB et al., 2006)。

味噌は、生活習慣病予防が期待される大豆イソフラボンを含み、主要な発酵食品の一つである。味噌には、酵母や乳酸菌が含まれており、味噌の熟成保存期間中にこれらの乳酸菌や酵母がイソフラボン類を代謝変換していると考えられる。しかし、味噌由来の乳酸菌がエコール産生やイソフラボン代謝に及ぼす影響についてはほとんど検討されていない。本研究では、味噌由来の乳酸菌が *in vitro* でエコール産生やイソフラボン代謝に及ぼす影響を明らかにするとともに、味噌由来の乳酸菌をマウスへ投与した場合のマウスの脂質代謝やイソフラボン代謝に及ぼす影響を検討した。

1. 味噌からの乳酸菌の分離

(社)中央味噌研究所より提供していただいた全国の味噌 (表1) から乳酸菌の分離を行った。滅菌白金耳で味噌をかきとり、滅菌生理食塩水600 μL に懸濁し、懸濁液の内約50 μL を1% NaCl-MRS寒天培地に接種し、Anaeropak® (三菱ガス化学) で30°C、3~5日間嫌気培養した。1% NaCl-MRS寒天培地に生じたコロニーを再度滅菌白金耳で採取し、1% NaCl-MRS寒天培地に植継ぎ、再度30°Cで3~5日間培養した。味噌の種類によってコロニー数にばらつきが大きく、比較的コロニー数が多い味噌から乳酸菌を分離することを試みた。今回の試験で1% NaCl-MRS寒天培地に生じたコロニーは、全国の味噌 (表1) では、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14であり、8, 11, 13からはコロニーが検出されなかった。しかし、1% NaCl-MRS寒天培地で発生するコロニーは、コロニーの形状からでは、乳酸菌であるかどうかの鑑別は困難であったため、幾種類かのコロニーを拾い、微生物の遺伝子を抽出し、バクテリア16S rRNA 遺伝子同定用 PCR

表1. 一回目の試験に使用した味噌の種類・原材料・塩分・産地

No	種類	原材料	塩分 (Naとして100gあたり)	産地
1	米みそ	大豆・米・食塩	5	宮城
2	米みそ	大豆・米・食塩	5	新潟
3	米みそ	有機大豆・有機米・食塩	4.7	長野 長野
4	米みそ	大豆・米・食塩	4.7	長野 上田
5	米みそ	大豆・米・食塩	4.7	長野 芽野
6	米みそ	大豆・米・食塩	3.8	長野 小諸
7	麦みそ	大麦・大豆・食塩	4.3	大分
8	麦みそ	はだか麦・大豆・食塩	4.1	長崎
9	豆みそ	大豆・食塩	3.8	愛知
10	調合みそ	麦みそ (大麦・大豆・食塩) 米みそ (大豆・米・食塩)	4.1	広島
11	米みそ			山形
12	米みそ			長野
13	豆みそ			愛知
14	麦みそ			大分

/Sequencing Kit (500 bp 用) を用いて微生物の同定を行った。菌体を滅菌白金耳でエッペンチューブ中の1mLの滅菌水に懸濁し、ボルテックスし、洗浄し、12000rpm, 2分間遠心し、上澄を除去し、インスタジーンマトリクス (BioRad) を200 μ L添加して、56 $^{\circ}$ C 30分インキュベーションした後、10秒間ボルテックスし、8分間水浴で煮沸し、再度10秒間ボルテックスした。次に、12000rpm, 3分間遠心し、上澄をPCR用テンプレートに用いた。PCRは、フォワードプライマーに27f (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') リバースプライマーに1492r (5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3') を用い、PCR酵素は、PremixTaq (Takara Bio) を用いた。PCR条件は、最初の一サイクルは94 $^{\circ}$ C 5分, 94 $^{\circ}$ C 1min, 65 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1.5分を30サイクル行い、最後のサイクル後に72 $^{\circ}$ C, 2分の伸長反応を行った。PCR産物は、0.7%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅の有無をチェックした。増幅が確認されたPCR産物は、QIAquick spin columnsにより精製を行い、バクテリア16S rRNA 遺伝子同定用 PCR/Sequencing Kit (500 bp 用) を用いて16S rRNAシーケンス用のサンプル調整を行い、ABI310ジェネティックアナライザーで遺伝子配列の解析を行った。得られた遺伝子配列は、DDBJのBLASTを用いて16S rRNA遺伝子配列の相同性解析を行った。

2. 味噌由来の乳酸菌の大豆イソフラボン (ダイゼイン) からのエコール産生性の検討とin vitroにおける腸内フローラのエコール産生性に及ぼす味噌由来乳酸菌の影響の検討

5, 6, 9, 10の味噌から得られた乳酸菌は、16S rRNA遺伝子配列の相同性解析結果から *Tetragenococcus* sp.5-1, *Tetragenococcus* sp.5-2, *Tetragenococcus* sp.6, *Tetragenococcus* sp.6-2, *Tetragenococcus* sp.9-1, *Tetragenococcus* sp.10-1 とした。

あらかじめ1%NaCl-MRS寒天培地に上記乳酸菌を接種し、30 $^{\circ}$ C, 3日間培養した。培養した乳酸菌を白金耳ずつ200 μ LのGAM糖分解用半流動培地 (日水製薬) に接種し、大豆イソフラボンの一つダイゼイン20mgを1mLジメチルスルホキシドに溶解したものを0.5 μ L添加し、Anaeropak[®] (三菱ガス化学) で30 $^{\circ}$ C, 24時間嫌気培養した後、メタノール：酢酸 (100:5) 溶液を添加して1mLにして、2分間激しくボルテックスした。12000rpm 5分間遠心分離した後、上澄をフィルターでろ過し、このろ過液20 μ LをフォトダイオードアレイJASCO MD 1515検出器付きHPLCで測定した。HPLC分析条件は、移動相の組成をメタノール：酢酸：水 (35:5:60, V/V/V) とし、カラムオープン温度40 $^{\circ}$ C, 流速1mL/minのアイソクラティック分析とした。分析の結果、5, 6, 9, 10の味噌から得られた乳酸菌は、ダイゼイ

ンからのエコール産生性は認められなかった。

次に、*in vitro*における腸内フローラのエコール産生性に及ぼす味噌由来乳酸菌の影響を検討した。ICRオスマウスにAIN-93Mを給餌して一定期間飼育後、あらかじめエコール産生能を有することを確認したマウス10匹の糞便をサンプリングし、糞便重量に対して30倍量のGAM糖分解用半流動培地（日水製薬）を添加し、滅菌ホモジナイザーでホモジナイズした。この糞便希釈液200 μ Lにダイゼイン2mgを1mLジメチルスルホキシドに溶解したものを0.5 μ L添加し、味噌由来乳酸菌懸濁液5 μ Lを添加し、Anaeropak®（三菱ガス化学）で30 $^{\circ}$ C、48時間嫌気培養した。対照群には、乳酸菌を添加せずに、代わりにGAM糖分解用半流動培地5 μ Lを添加して培養を行った。培養終了後、メタノール：酢酸（100：5）溶液を添加して、1mLにして、2分間激しくボルテックスした。12000rpm 5分間遠心分離した後、上澄をフィルターでろ過し、このろ過液20 μ Lをフォトダイオードアレイ JASCO MD 1515 検出器付きHPLCで測定した。HPLC分析での移動相の組成は、メ

タノール：酢酸：水（35：5：60，V/V/V）とした。カラムオープン温度40 $^{\circ}$ Cで流速1 mL/minのアイソクラティック分析を採用した。

乳酸菌懸濁液は、*Tetragenococcus* sp.5-1, *Tetragenococcus* sp.5-2, *Tetragenococcus* sp.6, *Tetragenococcus* sp.6-2, *Tetragenococcus* sp.9-1, *Tetragenococcus* sp.10-1を1%NaCl-MRS寒天培地で30 $^{\circ}$ C、3日間培養した後、これらの乳酸菌をGAM糖分解用半流動培地に接種し、この培養液の50倍希釈液の600nmの吸光度が0.5~0.9になるように調整した。これらの乳酸菌懸濁液をマウスの糞便希釈液に添加して、マウス腸内フローラのエコール産生性に及ぼす味噌乳酸菌の添加効果を検討した。

3. 味噌から直接抽出した菌のイソフラボン代謝性の検討

味噌1~14番から分離した乳酸菌は、エコール産生性が認められなかったため、(社)中央味噌研究所より追加で提供していただいた全国の味噌

表2. 二回目の試験に使用した味噌の種類・原材料・塩分・産地

No	種類	原材料	塩分 (Naとして100gあたり)	
15	米 み そ	大豆・米・食塩	栄養成分表示なし	長野 松本
16	米 み そ	大豆・米・食塩	栄養成分表示なし	長野 松本
17	米 み そ	大豆・米・食塩	5	宮城
18	米 み そ	大豆・米・食塩	4.7	新潟 新潟
19	米 み そ	大豆・米・食塩	栄養成分表示なし	新潟 長岡
20	米 み そ	有機大豆・有機米・食塩	4.6	長野 飯田
21	米 み そ	米・大豆・食塩	4.8	長野 上田
22	米 み そ	大豆・米・食塩	5	長野 小諸
23	米 み そ	大豆・米・食塩	4.64	長野 上田
24	米 み そ	大豆・米・食塩	4.64	長野 上田
25	豆 み そ	大豆・食塩	3.4	愛知
26	米 み そ	大豆・米・食塩	4.7	北海道
27	米 み そ	米・大豆・食塩	4.7	北海道
28	米 み そ	米・大豆・食塩	4.7	秋田
29	米 み そ	米・大豆・食塩	栄養成分表示なし	秋田
30	調 合 み そ	米・大豆・食塩・大麦	4.3	大分
31	米 み そ	米・大豆・食塩	3.9	長野 長野
32	米 み そ	大豆・米・食塩	5	長野 小諸
33	米 み そ	大豆・米・食塩	4.7	長野 上田
34	米 み そ	大豆・米・食塩	3.8	長野 芽野
35	米 み そ	大豆・米・食塩	4.8	長野 辰野
36	米 み そ	大豆・米・食塩	4.1	長野 諏訪
37	米 み そ	有機大豆・有機米・食塩	4.9	長野 諏訪
38	米 み そ	大豆(有機)・米・食塩	4.6	長野 諏訪
39	米 み そ	大豆・米・食塩		東京
40	米 み そ	大豆・米・食塩		東京

(表2)の味噌15番から40番について、イソフラボン代謝性を検討した。味噌で乳酸菌が比較的よく検出された味噌を選抜した。この味噌を2グラム採取し、滅菌済み5%食塩水を用い、味噌から直接菌を分離し、味噌菌全体でのイソフラボン代謝性を検討した。味噌2グラムに6 mLの5% NaCl添加滅菌水溶液を添加して、ボルテックスで味噌を懸濁し、2500rpmで3分間遠心し、上澄み500 μ Lを滅菌チューブに採取し、滅菌チューブをさらに、14000rpmで10分間遠心し、沈殿した菌体を5% NaCl添加GAM糖分解用半流動培地(日水製薬)400 μ Lに懸濁し、1 μ Lのダイジン(40mg/mL)を添加して、Anaeropak®(三菱ガス化学)で30°C、7~9日間嫌気培養した。培養終了後、メタノール:酢酸(100:5)溶液を添加して、2分間激しくボルテックスした。12000rpm 5分間遠心分離した後、上澄みをフィルターでろ過し、ろ液20 μ LをフォトダイオードアレイJASCO MD 1515検出器付きHPLCで測定した。HPLC分析条件は、移動相の組成をメタノール:酢酸:水(35:5:60, V/V/V)として、カラムオープン温度40°C、流速1 mL/minのアイソクラティック分析とした。

4. 味噌から分離した乳酸菌のイソフラボン代謝性の検討

味噌18番は、1% NaCl-MRS寒天培地で多くの乳酸菌が検出されたため、味噌から直接菌を抽出するのではなく、分離した乳酸菌18no1, 18no2, 18no3, 18no4についてイソフラボン代謝性の検討を行った。乳酸菌の同定は、前述と同様の方法で、バクテリア16S rRNA 遺伝子同定用 PCR/Sequencing Kit (500 bp 用)を用いて16S rRNA シーケンス用のサンプル調整を行い、ABI310ジエネティックアナライザーで遺伝子配列の解析を行った。得られた遺伝子配列は、DDBJのBLASTを用い、16S rRNA 遺伝子配列の相同性解析を行った。

18no1, 18no2, 18no3, 18no4は全て、すべて *Tetragenococcus* に属する乳酸菌と推定された。次に、1% NaCl-MRS寒天培地にこれらの乳酸

菌を接種し、30°C、3日間培養した、培養した乳酸菌を一白金耳ずつ400 μ LのGAM糖分解用半流動培地(日水製薬)に接種し、この培地に大豆イソフラボンの一つダイジン(40mg/mL)を0.5 μ L添加し、Anaeropak®(三菱ガス化学)で30°C、5日間嫌気培養した後、前述の方法と同様にイソフラボン類を抽出し、HPLCで分析を行った。

5. 味噌由来乳酸菌を用いた動物試験

6週齢のICR系雌マウス(14匹)をAIN-93M食で28日間一匹ずつ個別飼育した後、7匹ずつ二群に分けて試験食で28日間個別飼育した。マウスは、ステンレスケージにおける個別飼育とした。マウス飼育室の環境は、温度24 \pm 0.5°C、湿度65%で、12時間の明暗サイクルとした。試験食(表3)は、10%ラードを添加した高脂肪食で、イソフラボンの一つダイゼインを試験食に0.025%添加した。

全てのマウスに同じ試験食を給餌した。試験食給餌14日目から解剖日の28日目までは、対照群には蒸留水を飲水投与し、乳酸菌投与群には、1% NaCl添加 MRS 培地で3日間培養した *Tetragenococcus* sp.6を平板培地から白金耳で採取し、蒸留水に懸濁し、約5.6 \times 10⁷/mLの濃度にして飲水投与した。解剖日より一週間前にマウスを代謝ケージに移し、解剖前46時間の尿を採取した。採取した尿は、イソフラボン類濃度測定と抗酸化能測定に用いた。試験食給餌期間中は、マウ

表3 試験食の組成

Ingredient (g/kg diet)	AIN-93M	試験食
Cornstarch	465.692	405.436
Casein	140	140
α -Cornstarch	155	155
Sucrose	100	100
Lard	—	100
Soy bean oil	40	—
Cellulose	50	50
Mineral mix (AIN-93M-Mix)	35	35
Vitamin mix (AIN-93-Mix)	10	10
L-Cystine	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.014
ダイゼイン(イソフラボン)	—	0.25

スの糞便を全て採取し、-30℃に保存した後、試験終了後に凍結乾燥器で糞便を凍結乾燥し、各マウスの糞便を秤量し、乾燥糞便重量を求めた。飼育試験終了前日午後8時30分に絶食を開始し、次の日の午前9時30分よりマウスの解剖を行った。解剖時に、肝臓、内臓脂肪、盲腸内容物、血漿を採取した。肝臓重量と内臓脂肪重量、盲腸内容物重量を測定し、肝臓と血漿は脂質の測定のため-80℃のフリーザーで凍結保存した。凍結乾燥糞便は、糞便脂質含量と胆汁酸量測定のため冷蔵保存をおこなった。採取した血漿は、血漿総コレステロール濃度、リン脂質、トリグリセリド測定に用いた。

5-1. 糞便重量の測定

乳酸菌を投与した乳酸菌投与群と蒸留水を投与した対照群の糞便は、代謝ケージに移す前は、ステンレスケージの下に敷いた受け皿に全て回収し、回収した糞便は冷凍保存した。代謝ケージ飼育に移してから、糞便はすべて代謝ケージの受け皿に回収し、回収した糞便は同様に冷凍保存した。飼育試験が終了した後に、予備凍結を行い、凍結乾燥器FD-1000 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、トラップ温度-45℃の条件で24時間凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後乳酸菌投与群と対照群の乾燥糞便重量を測定した。

5-2. 糞便中脂質と糞便中胆汁酸含量測定

糞便中脂質含量測定と糞便中胆汁酸含量測定に用いた凍結乾燥糞便は、解剖の前日と前々日に排泄された乾燥糞便を用いた。この凍結乾燥糞便をフードミルTML17 (TESCOM Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて30秒間粉碎し測定用サンプルとした。糞便中脂質含量は、粉碎ずみの乾燥糞便粉末中の脂質をBligh and Dyer法で抽出して測定した。糞便中胆汁酸含量は、粉碎ずみの乾燥糞便粉末10 mgを90%エタノール0.2 mLに懸濁して65℃で1時間インキュベート、遠心分離後の上清と沈澱の洗液を合わせて溶媒を蒸発乾固後、残渣を90%エタノール0.5 mLに溶かしたものを測定用サンプルとした。この測定サンプル中の総胆汁酸濃度は、総胆汁酸テストワコーを用いて

求めた。

5-3. 尿中イソフラボン類濃度測定

代謝ケージで採取したマウスの尿を用いて、尿中イソフラボン類濃度を測定した。尿200μLに200μLのグルクロニダーゼType H-5 (Sigma, MO, USA, 35mg/mL in 0.2M酢酸緩衝液) を添加し、37℃で3時間インキュベーションを行った。反応終了後、400μLの酢酸エチルで二回抽出し、5000 g, 10分間遠心し、上澄をナス型フラスコに移して、エバポレーターを用いて濃縮し、濃縮物を400μLの80%メタノールに溶解し、溶解液を孔径0.2μmのフィルターでろ過し、ろ過液20μLをフォトダイオードアレイJASCO MD 1515検出器付きHPLCで測定した。HPLC分析条件は、移動相の組成はメタノール：酢酸：水(35：5：60, V/V/V)として、カラムオープン温度40℃、流速1 mL/minのアイソクラティック分析とした。

5-4. 尿の抗酸化能測定

尿の抗酸化能は、尿を蒸留水で20倍希釈し、銅イオンの還元反応($\text{Cu}^{++} \Rightarrow \text{Cu}^{+}$)を利用してサンプルの抗酸化能を測定する抗酸化能測定キット「PAO」(日本老化制御研究所)を用いて測定した。

5-5. 血漿脂質濃度測定

マウスの血漿総コレステロール濃度は、コレステロールE-テストワコー(和光純薬, 大阪, 日本)を用いて測定した。血漿トリグリセリド濃度は、トリグリセリドE-テストワコー(和光純薬, 大阪, 日本)を用いて測定した。血漿リン脂質濃度は、リン脂質C-テストワコー(和光純薬, 大阪, 日本)を用いて測定した。

5-6. 肝臓脂質含量測定

総肝臓脂質含量は、肝臓100mgに0.1M酢酸緩衝液を添加して、脂質をBligh and Dyer法で抽出して測定した。マウスの肝臓総コレステロール含量とトリグリセリド含量測定に使用した溶液は、肝臓100mgから抽出した脂質に対して0.5mLのイソプロパノールを添加して、一分間ボルテッ

クスして脂質を溶解した溶液を用いた。マウスの肝臓総コレステロール含量は、コレステロールE-テストワコー（和光純薬，大阪，日本）を用いて測定した。肝臓トリグリセリド含量は，トリグリセライドE-テストワコー（和光純薬，大阪，日本）を用いて測定した。

結果

1. 味噌からの乳酸菌の分離

1% NaCl-MRS寒天培地で発生するコロニーの微生物の16S rRNA遺伝子配列の相同性解析結果からは，1% NaCl-MRS寒天培地では必ずしも乳酸菌が増殖する結果とはならず，味噌の中に種々の細菌が存在することが示唆された（表4）。5, 6, 9, 10の味噌から得られた乳酸菌は，すべて*Tetragenococcus* に属する乳酸菌と推定された。そこで，5, 6, 9, 10の味噌から得られた乳酸菌 *Tetragenococcus* sp.を用いて，大豆イソフラボン（ダイゼイン）からのエコール産生性と *in vitro* における腸内フローラのエコール産生性に及ぼす味噌由来乳酸菌の影響を検討した。

2. 味噌由来の乳酸菌の大豆イソフラボン（ダイゼイン）からのエコール産生性の検討

味噌5, 6, 9, 10から分離した乳酸菌 *Tetragenococcus* sp.5-1, *Tetragenococcus* sp.5-2, *Tetragenococcus* sp.6, *Tetragenococcus* sp.6-2, *Tetragenococcus* sp.9-1, *Tetragenococcus* sp.10-1は，*Tetragenococcus* sp.10-1を除いてマウス糞便希釈液のエコール産生を向上させる効果があった（図1）。中でも*Tetragenococcus* sp.6はマウス糞便のエコール産生を向上させる効果が最も高かった。そこで，イソフラボンの代謝性に及ぼす味噌由来乳酸菌の影響を検討する動物試験では，*Tetragenococcus* sp.6を用いることとした。

表4. 味噌で検出された微生物

味噌番号	菌番号	相同性が高い菌（類縁菌）	ホモロジー (%)
1	1 (1)	<i>Bifidobacterium minimum</i> strain KCTC 3273	83
3	3 (1)	<i>Propionibacterium acnes</i> strain 0299-09	100
4	4	<i>Propionibacterium acnes</i> strain 0299-09	99
5	5 (1)	<i>Tetragenococcus halophilus</i> strain MRC10-7-8	98
5	5 (2)	<i>Tetragenococcus halophilus</i> strain MRC10-7-8	97
6	6	<i>Tetragenococcus halophilus</i> strain MRC10-7-8	98
6	6 (1)	<i>Bacillus</i> sp. QUCASBSD-4	98
6	6 (2)	<i>Tetragenococcus halophilus</i> strain MRC10-7-8	98
6	6 (3)	<i>Propionibacterium acnes</i> strain 0299-09	99
7	7 (1)	<i>Bacterium</i> YCT108	100
9	9 (1)	<i>Tetragenococcus halophilus</i> strain MRC10-7-8	97
10	10 (1)	<i>Tetragenococcus halophilus</i> strain MRC10-7-8	98
10	10 (2)	<i>Bacterium</i> YCT108	100
12	12 (A1)	<i>Bacillus</i> sp.	100
12	12 (A2)	<i>Bacterium</i> YCT108 16S	100
12	12 (A4)	<i>Bacterium</i> YCT108	100
12	12 (B1)	<i>Bacterium</i> YCT108	99
12	12 (B2)	<i>Bacterium</i> YCT108	100
14	14	<i>Propionibacterium acnes</i> clone TX020	99

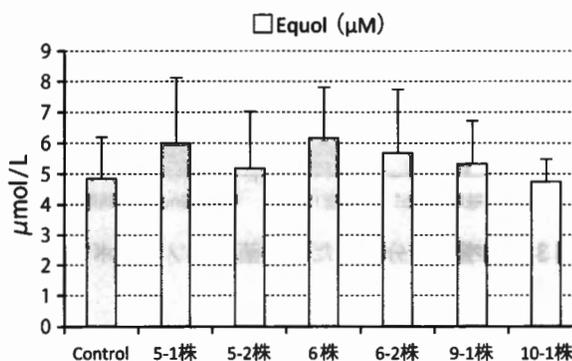


図1. マウス糞便希釈液のエコール産生に及ぼす乳酸菌の添加効果

3. 味噌から直接抽出した菌のイソフラボン代謝性の検討

味噌15, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 37, 39から抽出した菌は全てダイジンからダイゼインを産生すると共に，ダイジンからゲニステインを産生した。しかし，味噌抽出菌のいずれもダイジンからエコールを産生することは無かった。ゲニステインの産生性は，味噌の20, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 37で高かった（図2）。今回の試験では，試験した米味噌の多くがダイジンからゲニステインへの産生性が高い傾向が認められた。活性の高い味噌サンプルの産地は，長野，北海道，秋田，大分と様々であった。

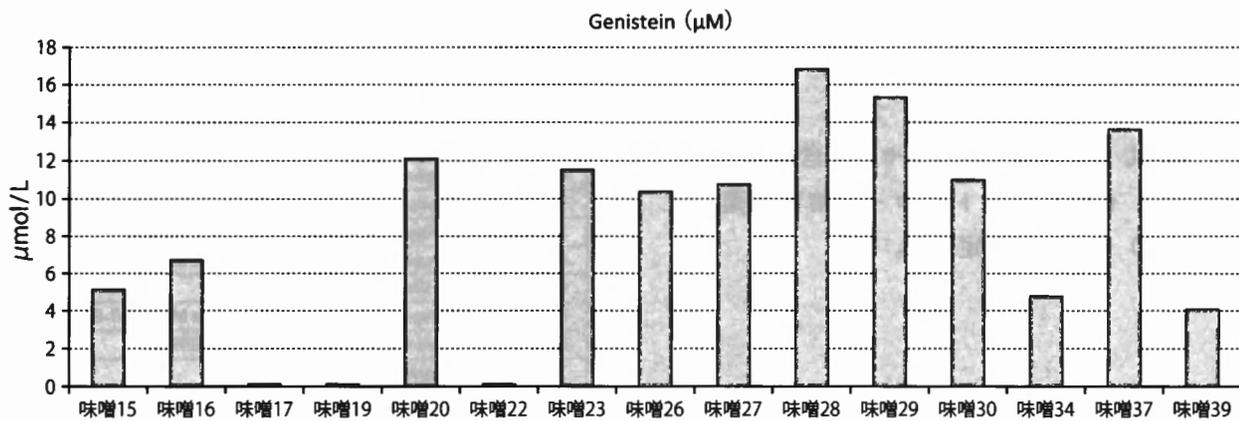


図2. 味噌から直接抽出した菌のイソフラボン代謝

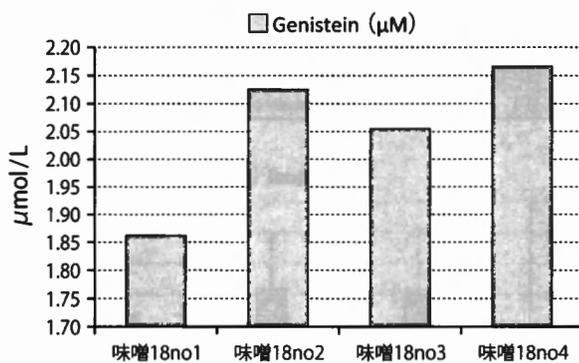


図3. 味噌から分離した乳酸菌のイソフラボン代謝

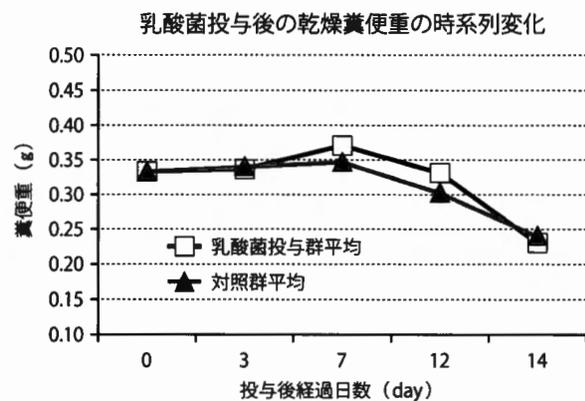


図4. 乳酸菌投与群と対照群における乾燥糞便量の時系列変化

4. 味噌から分離した乳酸菌のイソフラボン代謝性の検討

味噌18から分離した乳酸菌 18no1, 18no2, 18no3, 18no4は全て、ダイジンを加水分解して、ダイゼインを産生するとともに、ダイジンからゲニステインを産生した(図3)。しかし、これらの乳酸菌は、ダイジンからエコールを産生することはなかった。乳酸菌 18no1, 18no2, 18no3, 18no4はイソフラボン配糖体の加水分解活性が高いことが示唆された。

5. 動物試験

乳酸菌を投与した乳酸菌投与群と蒸留水を投与した対照群の2群では、摂食量と体重に有意な差は認められなかった。また、盲腸内容物量、肝臓重量、内臓脂肪重量に有意な差は認められなかった。

5-1. 糞便重量測定結果

乳酸菌投与期間中に乳酸菌投与群と蒸留水投与群(対照群)の糞便排泄量の測定を行った。乳酸菌投与群は対照群に比べて乳酸菌投与期間中の乾燥糞便重量が高い傾向を示した(図4)。

5-2. 糞便中脂質含量測定と糞便中胆汁酸含量測定結果

乾燥糞便中の糞便脂質含量は、乳酸菌投与群で低い傾向が認められた(図5)。乾燥糞便中の総胆汁酸量は乳酸菌投与群で低い結果(図6)($P=0.055$)となり、乾燥糞便中脂質含量と総胆汁酸量とが相関する傾向が認められた。

5-3. 尿中イソフラボン類濃度測定結果

尿中イソフラボン類濃度測定結果では、ダイゼイン濃度は乳酸菌投与群で高い傾向が認められた

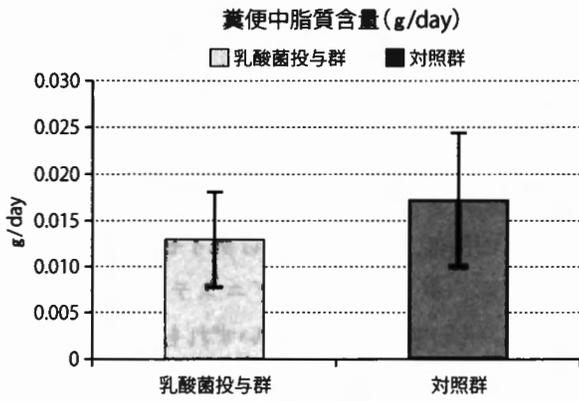


図5. 糞便中脂質含量

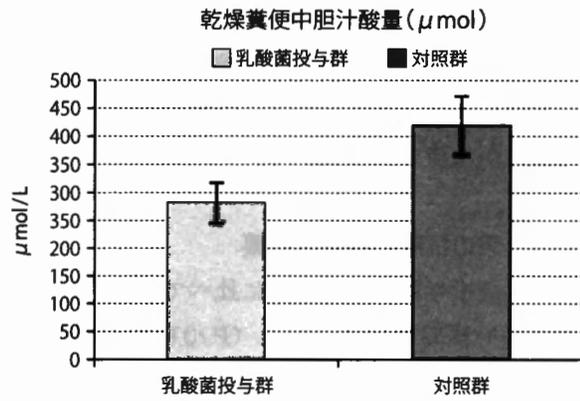


図6. 糞便中胆汁酸量

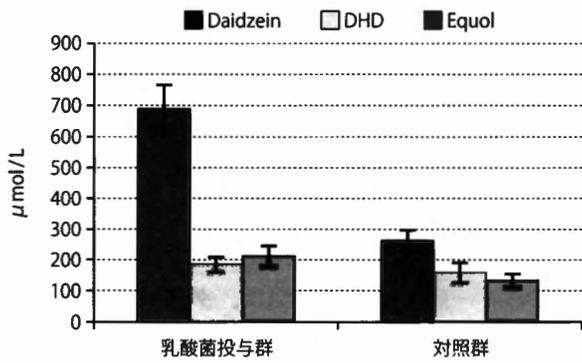


図7. 尿中イソフラボン類濃度

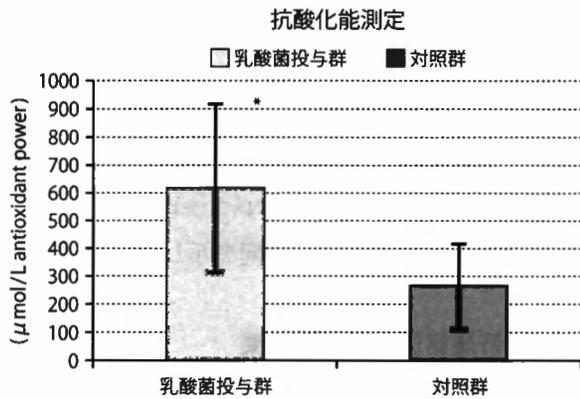


図8. 尿の抗酸化能測定結果

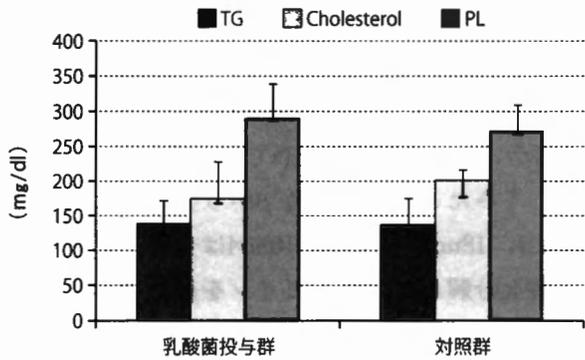


図9. 血漿総コレステロール濃度、血漿トリグリセリド濃度及び血漿リン脂質濃度

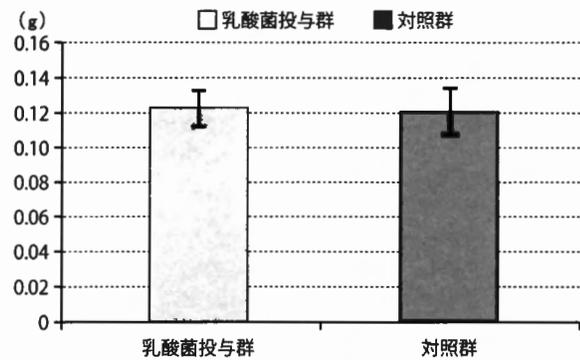


図10. 肝臓脂質含量

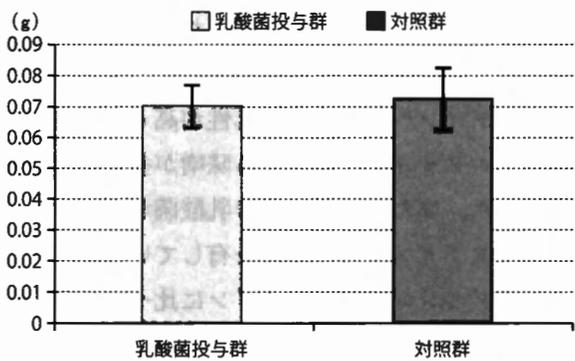


図11. 肝臓トリグセリド量

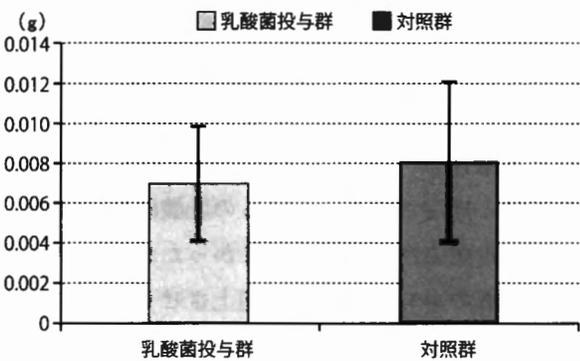


図12. 肝臓総コレステロール量

($P=0.053$)。有意な差はないもののエコール濃度も、乳酸菌投与群の方が高い傾向を示した。この乳酸菌はイソフラボン代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された(図7)。

5-4. 尿の抗酸化能測定結果

乳酸菌投与群は、対照群に比べて抗酸化能が有意に高い傾向が認められた ($P<0.05$)。味噌由来の乳酸菌が、尿の抗酸化性を向上させている可能性が示唆された(図8)。

5-5. 血漿脂質濃度測定結果

マウスの血漿総コレステロール濃度、血漿トリグリセリド濃度、血漿リン脂質濃度は、乳酸菌投与群と対照群とで有意な差は認められなかった(図9)。しかし、血漿総コレステロール濃度は、乳酸菌投与群で少し低い傾向を示した(図9)。

5-6. 肝臓脂質含量測定結果

肝臓脂質量(図10)は、乳酸菌投与群と対照群とで有意な差は認められなかった。また、肝臓のトリグリセリド量(図11)も有意な差は認められなかった。しかし、肝臓総コレステロール量(図12)は、乳酸菌投与群で少し低い傾向が認められた。

考 察

味噌希釈液を接種した1%NaCl-MRS寒天培地で発生するコロニーの微生物の16S rRNA遺伝子配列の相同性解析結果からは、1%NaCl-MRS寒天培地では必ずしも乳酸菌が増殖する結果とはならず、味噌の中に種々の細菌が存在することが示唆された。5, 6, 9, 10の味噌から得られた乳酸菌は、すべて*Tetragenococcus* に属する乳酸菌と推定された。これらの乳酸菌の中には、エコール産生性は認められなかったが、マウス糞便希釈液のエコール産生を向上させる効果を有する菌が存在した。

味噌由来の乳酸菌だけでなく、味噌に存在する菌全てを抽出した場合のイソフラボン代謝性につ

いては、ほとんど情報が無いため、比較的乳酸菌が多いと考えられた味噌15, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 37, 39から5%滅菌食塩水で抽出した菌をダイジンとともに嫌気培養し、ダイジンの代謝性を検討したところ、これらの菌は、ダイジンからダイゼインを産生すると共に、ダイジンからゲニステインを産生した。しかし、味噌抽出菌のいずれもエコールを産生することはなかった。ゲニステインの産生性は、味噌の20, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 37で高く、味噌によってダイジンからゲニステインの産生性は異なることが示唆された。今回の試験では、米味噌の多くがダイジンからゲニステインへの産生性が高い傾向が認められた。活性の高い味噌サンプルの産地は、長野、北海道、秋田、大分と様々であった。味噌は、熟成中にダイジンからゲニステインへの代謝変換が起こっている可能性がある。一般に抗酸化作用は、ダイジンよりもゲニステインが高いことが知られているため、ダイジンからゲニステインへの変換は、味噌の熟成中の酸化を防止する上では、重要であると考えられる。

味噌18には乳酸菌が多く存在していたため、18由来の乳酸菌がエコール産生性やダイジンからゲニステインへの産生性を有しているかどうかを検討してみたところ、味噌18から分離した乳酸菌18no1, 18no2, 18no3, 18no4は全て、ダイジンを加水分解して、ダイゼインを産生するとともに、ダイジンからゲニステインを産生した。しかし、これらの乳酸菌は、ダイジンからエコールを産生することはなかった。乳酸菌 18no1, 18no2, 18no3, 18no4はイソフラボン配糖体の加水分解活性が高いことが示唆された。これらの結果から、今回使用した味噌の中には、ダイジンからダイゼインへの加水分解活性が高く、ダイジンからゲニステインを産生する味噌が多いことが確認された。また、味噌由来の乳酸菌がダイジンからゲニステインへの代謝性を有していた。ダイゼインやダイジンはゲニステインに比べて抗酸化能が低いことが知られているため、味噌由来乳酸菌が味噌の熟成中にダイジンからゲニステインへの代謝変換を行い、味噌の抗酸化能等の機能性を強

化している可能性が示唆された。抗酸化性の増強という点で、味噌中の乳酸菌は、味噌の品質保持に寄与していると思われる。

味噌由来乳酸菌 *Tetragenococcus* sp.6 はマウス糞便のエコール産生を向上させる効果が最も高かった。そこで、イソフラボン代謝性に及ぼす味噌由来乳酸菌の影響を検討する動物試験では、*Tetragenococcus* sp.6 を用いることとした。ダイゼイン0.025%とラード10%を含む高脂肪食を給餌したマウスに味噌由来の乳酸菌を投与した場合と、投与しない場合(対照群)とでは、乳酸菌投与期間中の乾燥糞便重量は、乳酸菌投与群は対照群に比べて高い傾向を示した。乳酸菌投与で乾燥糞便排泄量が増加傾向にあったことから、味噌由来の乳酸菌は糞便排泄促進作用を有していると考えられた。味噌由来の乳酸菌には、整腸作用がある可能性がある。また、乾燥糞便中の脂質含量は、乳酸菌投与群で低い傾向が認められた。さらに、乾燥糞便中の総胆汁酸量は乳酸菌投与群で低い結果(図6)($P=0.055$)となり、乾燥糞便中脂質含量と総胆汁酸量とが相関する傾向が認められた。

マウスの尿中ダイゼイン濃度、エコール濃度の平均値は、乳酸菌投与群で高かった。特にダイゼイン濃度は、乳酸菌投与群で高い傾向($P=0.053$)が認められ、味噌由来の乳酸菌は、イソフラボン吸収・代謝に好ましい影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、尿中の抗酸化能は、乳酸菌投与群で、対照群に比べて有意に高い傾向となった。イソフラボン類は、抗酸化能を有しているため、乳酸菌投与群の尿の高い抗酸化能は、尿中イソフラボン類濃度の高さに関連しているのかもしれない。近年、抗酸化能は、生体の酸化ストレス予防に関連していると考えられている。抗酸化能の高さは、アンチエイジングに寄与していると考えられているため、乳酸菌投与群の尿中の抗酸化能の高さは、アンチエイジングに寄与する可能性がある。

マウスの血漿トリグリセリド濃度と血漿リン脂質濃度は、乳酸菌投与群と対照群とで有意な差は認められなかったが、血漿総コレステロール濃度の平均値は乳酸菌投与群で低い傾向を示した。肝

臓脂質量は、二群で有意な差が認められなかった。しかし、肝臓や血漿の総コレステロール濃度は乳酸菌投与群で少し低い傾向が認められ、味噌由来乳酸菌がコレステロール代謝に影響を及ぼすことが推察された。また、マウスの乾燥糞便中の総胆汁酸量は、乳酸菌投与群で低い傾向($P=0.055$)があった。胆汁酸はコレステロールから合成されるため、味噌由来の乳酸菌がコレステロール代謝に関与した結果、胆汁酸代謝に影響している可能性も考えられるが、詳細なメカニズムは今後の検討課題であろう。

味噌由来乳酸菌は、ダイジンからゲニステインを産生することで、味噌に含まれるイソフラボンの機能性を強化するとともに、マウスの胆汁酸代謝に対し影響を及ぼしていた。また、味噌由来乳酸菌は、整腸作用を有し、イソフラボン代謝を改善し、マウスの尿の抗酸化能の強化を通じて、酸化ストレス予防に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、社団法人中央味噌研究所より研究助成金を賜りましたことを深く感謝いたします。また、イソフラボン類の分析に関して御助力いただいた食品総合研究所 中川 博之博士に感謝いたします。

引用文献

- Setchell, K.D., Brown, N.M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W.T., Wolfe, B.E., Kirschner, A.S. and Heubi, J.E.: Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:447-453, 2002
- Bowey, E., Adlercreutz, H. and Rowland, I.: Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food. Chem. Toxicol.* 41:631-636, 2003
- Breinholt, V. and Larsen, J.C.: Detection of weak

- estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem. Res. Toxicol.* 11:622-629.,1998
- Meyer, B.J., Larkin, T.A., Owen, A.J., Astheimer, L.B., Tapsell, L.C. and Howe, P.R.: Limited lipid-lowering effects of regular consumption of whole soybean foods. *Ann. Nutr. Metab.* 48:67-78.,2004
- Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. and Lopez, D.: Case-control study of phytoestrogens and breast cancer. *Lancet.* 350:990-994.,1997
- Ozasa, K., Nakao, M., Watanabe, Y., Hayashi, K., Miki, T., Mikami, K., Mori, M., Sakauchi, F., Washio, M., Ito, Y., Suzuki, K., Wakai, K. and Tamakoshi, A.: Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. *Cancer. Sci.* 95:65-71.,2004
- Aso, T.: Equol improves menopausal symptoms in Japanese women. *J. Nutr.* 140:1386S-1389S.,2010
- Weaver, C.M. and Legette, L.L.: Equol, via dietary sources or intestinal production, may ameliorate estrogen deficiency-induced bone loss. *J. Nutr.* 140:1377S-1379S.,2010
- Setchell, K.D. and Cole, S.J.: Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *J. Nutr.* 136:2188-2193.,2006
- Lampe, J.W., Karr, S.C., Hutchins, A.M. and Slavin, J.L.: Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217:335-339.,1998
- Song, K.B., Atkinson, C., Frankenfeld, C.L., Jokela, T., Wahala, K., Thomas, W.K. and Lampe, J.W.: Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J. Nutr.* 136:1347-1351.,2006

味噌のヒアルロン酸・ コラーゲン生成促進効果に関する研究

前田 憲寿

Stimulatory effect of miso on hyaluronic acid and collagen
production in cultures

Kazuhisa MAEDA

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

■要 約

大豆の発酵食品である味噌には大豆や麴由来の成分が数多く含まれており、昔から貴重な栄養食品のひとつとして利用されてきた。「味噌の三礎」の効能のひとつに「美礎」があり、「美」を養う成分が豊富であるといわれている。そこで、肌のハリや保湿に大きく関与しているヒアルロン酸とコラーゲンに対する味噌の効果について調べた。含水エタノールで抽出した味噌抽出物のヒアルロン酸とコラーゲンの生成促進効果を培養したヒト真皮線維芽細胞を用いて調べた。その結果、味噌抽出物によって真皮線維芽細胞培養上清中のヒアルロン酸量とコラーゲン量が増加することがわかった。

■緒 言

生活の質の向上や医療の発展により、女性の平均寿命は85歳を超え、高齢化社会を迎えている。

高齢者の「美容と健康」に関する意識調査では、ほとんどの女性が、「美しく、若々しくありたい」と望み、心身ともに「健康」であることが「きれい」の土台として大切と考えている。外観の美しさだけでなく、内面から醸しだされる健康的な美しさを得るために、心身ともに充実した快適な生活と美容によい食事が望まれている。

加齢とともに肌にしわやたるみ、しみが生じてくる。しわやたるみと関係の深い肌の弾力性を測定すると、年齢とともに肌の弾力性は低下し、伸びやすく戻りにくい古くなった輪ゴムようになる。肌の弾力性は真皮に存在するコラーゲン繊維やエラスチン繊維といった繊維性タンパク質とヒアルロン酸などの高分子多糖によって構成された組織構築の完成度によって、その機能性が決められている。すなわち、これらの量が減少したり、質が低下したりすると、しわやたるみができやすくなるといっても過言ではない。皮膚のヒアルロン酸は40代後半と急速に減少し¹⁾、コラーゲンも60歳を過ぎると急激に減少することが報告されている²⁾。したがって、これらヒアルロン酸とコラ

ーゲンの生成を促進する食品を毎日摂取するようにすれば、肌のしわやたるみといった老化を少しでも遅らせることができると期待できる。

■方 法

1. 味噌の含水エタノール抽出物の作製

全国各地の10種類の味噌 5gに含水エタノール(80%エタノール) 45gを加え、1週間室温暗所に静置した。抽出エキスをろ過後に回転型エバポレータで溶媒を溜去し、固形物を得た。40mg/mlになるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、さらにDMSOで4mg/ml, 0.4mg/mlに希釈した。

2. ヒト真皮線維芽細胞の培養

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

3. 培養上清中のヒアルロン酸量の測定

3日間培養した後に培養上清を採取して、培養上清中のヒアルロン酸をELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法で測定した。炭酸緩衝液(0.1M carbonate buffer(pH 9.6))で200倍希釈したヒアルロン酸結合タンパク質(HABP, 5μg/ml)溶液を高吸着96穴プレート(Immulon 4HBX)の各ウェルに100μlずつ入れて4℃で一晩静置した。300μlの洗浄液(0.05% Tween-20/PBS)で各ウェルを2回洗浄後、風乾した。5%BSAを300μl添加し、4℃で一晩静置した。洗浄液で2回洗浄した。標準HA溶液(50, 100, 200, 400, 800ng/ml)およびサンプルをassay buffer(0.02% Tween-20, 1% BSA/PBS)で

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

4. 培養上清中のI型コラーゲン量の測定

3日間培養した後に培養上清を採取し、培養上清中のI型コラーゲン量をELISA法で測定した。希釈した検量線用ウシコラーゲン(0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1μg/ml)と培養上清を50μlずつ高吸着96穴プレートの各ウェルに入れて、4℃で1日置いた。ウェルの溶液を除去し、洗浄液で2回洗浄した。Blocking solution(1%BSA)を300μl/well加え、室温で60分静置しブロッキングした。洗浄液で2回洗浄した後に、Anti-collagen Type I, biotin(100μg/ml)をassay bufferで5,000倍希釈して、20ng/mlに調整し、100μl/well加え、室温で60分静置した。洗浄液で2回洗浄した。streptavidin-HRPをassay bufferで10,000倍希釈し、100μl/well加え、室温で30分静置した。洗浄液で4回、純水で1回洗浄した。ABTS溶液を加え、10分~20分静置し、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。

5. 味噌抽出物の細胞増殖促進効果の測定

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

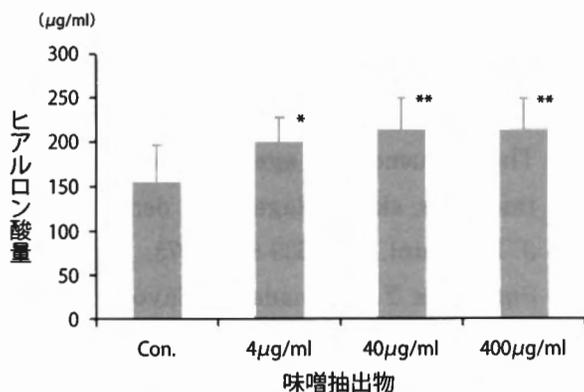


図1 味噌抽出物によるヒト真皮線維芽細胞の培養上清中のヒアルロン酸量

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. Con. バーは標準偏差, $n = 10$

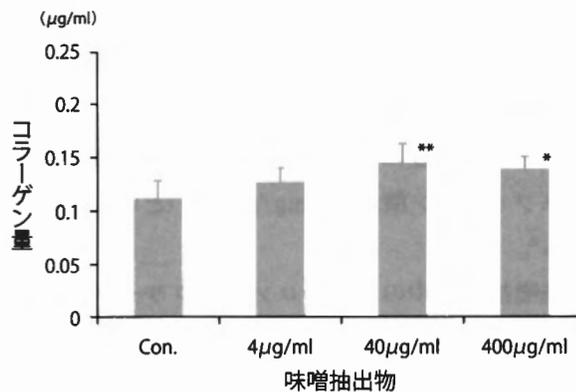


図2 味噌抽出物によるヒト真皮線維芽細胞の培養上清中のI型コラーゲン量

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. Con. バーは標準偏差, $n = 10$

■結果

味噌抽出物のヒアルロン酸生成促進効果を、培養ヒト真皮線維芽細胞を用いて調べた結果、4～400 μg/mlの味噌抽出物によって、培養上清中のヒアルロン酸量が増加することがわかった(図1)。さらに、味噌抽出物のコラーゲン生成促進効果を、培養ヒト真皮線維芽細胞を用いて調べた結果、40～400 μg/mlの味噌抽出物によって培養上清中のI型コラーゲン量が増加することがわかった(図2)。さらに、細胞あたりのヒアルロン酸とコラーゲンの量を算出すると、ともに400 μg/mlの濃度で、コントロールに比べて明らかに増加していた。

■考察

ヒアルロン酸とコラーゲンはともに真皮を構成する重要な成分で、加齢とともに減少することが報告されている^{1,2)}。ヒアルロン酸はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンが交互に結合した高分子多糖で、分子量は数百万にもなり、水分を保持する能力が非常に高く、真皮に多量に存在しており、肌のみずみずしさ、ハリ、弾力性に深く関わっている。ヒアルロン酸はHAS (Hyaluronan synthase) 1やHAS2, HAS3などの3種類の合成酵素により合成され、真皮においては主にHAS2

により高分子ヒアルロン酸が合成される³⁾。一方、コラーゲンは真皮の乾燥重量のうち約70%を占めており、10種類以上が存在している。そのなかでI型コラーゲンが大部分(約80%)を占めている。I型コラーゲンは主に真皮網状層に存在し、太い線維を構成している。次に多いIII型コラーゲン(約15%存在する)は真皮乳頭層や血管・皮膚付属器(毛器官、汗腺など)の周囲に分布し、微細な線維を構成している。I型コラーゲンの分子は線維芽細胞でプロコラーゲン(コラーゲンの前駆体)として作られ細胞外へ分泌される。細胞外で酵素によってプロコラーゲンの両端が切断されるとコラーゲン分子(トロポコラーゲン)が完成し、3本のポリペプチド鎖が螺旋状になったトロポコラーゲンがたくさん集まり、規則的に並んで結合しコラーゲン細線維を形成する。コラーゲン線維は真皮で縦横に網目のように張り巡らされ、まるでクッションのような役目を果たし、肌の弾力を保つ重要な役割に担っている。

ヒト真皮線維芽細胞を味噌抽出物存在下で培養することによって培養上清中のヒアルロン酸とI型コラーゲンの量が増加したことから、味噌には肌のハリとうるおいを保つヒアルロン酸とI型コラーゲンを増やす効果があると考えられた。味噌には遊離脂肪酸が含まれており、その一つであるリノール酸には培養色素細胞のメラニン生成を抑制する効果があることが知られている⁴⁾。リノール酸は必須脂肪酸で、味噌の原料の大豆にはトリ

グリセリドの形で豊富に含まれているが、発酵の過程でトリグリセリドからリノール酸が遊離され、味噌中には遊離リノール酸としても存在する。また、大豆には遊離脂肪酸が結合したアシルホスファチジン酸が1.02mg/gと多いという特徴もある⁵⁾。

味噌抽出物中のヒアルロン酸とコラーゲンの生成を促進する成分については明らかにされていないが、アシルホスファチジン酸にはヒアルロン酸の生成を促進する作用があるので、味噌抽出物中のヒアルロン酸の生成促進作用にこれが関与しているのかもしれない。

今後、味噌のどのような成分がどのようなメカニズムで効果を発現するかを調べ、味噌の美容と健康に対する有用性を明らかにしていく。

■文 献

1) Longas M.O., Russell C.S. and He X.Y.,
Evidence for structural changes in dermatan

sulfate and hyaluronic acid with aging.
Carbohydr. Res. 159(1):127-136, 1987.

- 2) Shuster S., Black M.M. and McVitie E.,
The influence of age and sex on skin
thickness, skin collagen and density. Br.
J. Dermatol. 93(6):639-643, 1975.
- 3) Sugiyama Y., Shimada A., Sayo T., Sakai
S. and Inoue S., Putative hyaluronan
synthase mRNA are expressed in mouse
skin and TGF-beta upregulates their
expression in cultured human skin cells.
J. Invest. Dermatol. 110: 116-121, 1988.
- 4) 新本洋士, みそに含まれる遊離リノール酸
に, メラニン合成抑制作用を確認 みその美
白効果の可能性が示された 食品工業 40(9)
: 88-91, 1997.
- 5) Weihrauch J.L., and Y.-S. Son, The
phospholipid content of foods, J. Am. Oil
Chem. Soc. 60, 1971-1978, 1983.

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

増田 誠司

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

Seiji MASUDA

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

要 旨

ガンは日本人の死因第1位となって久しい。したがってガンと戦う化合物を探索し実用化することは、健康な生活の助けとなる。最近mRNAの成熟過程が抗ガン剤の有望な標的となっている。このことから、まず第1にmRNAの成熟過程をモニタリングできる系を用いてmRNA成熟の阻害活性を持つ化合物、すなわち抗ガン活性を持つ化合物を探索する系を構築すること、次に様々な原材料と微生物による発酵過程を経ることで化合物の宝庫となっている味噌を用いて活性化合物を探索した。レニラ・ルシフェラーゼによる1次スクリーニング、RNA-FISHによる2次スクリーニング、mRNAスプライシングを評価する3次スクリーニングによりmRNAの成熟過程をモニタリングするシステムの構築に成功した。さらに味噌サンプルより活性化合物を含む可能性を持つ

いくつかのサンプルを得た。今後活性化合物の精製単離を目指したい。

緒 言

日本は他に例を見ないスピードで高齢化社会を迎えつつある。死因のうち、ガンによる死亡は1981年に第1位となって以降、他の死因を引き離して第1位を占めている。このことからガンの発生を防止する化合物の探索は、日本において非常に重要な意味を持っている。発ガンの原因には、化学物質、ウイルス、紫外線などの放射線、ストレスなど、様々なものが挙げられる。よってガンになりにくい食事の摂取が必要であるとともに、一歩進んでガンを抑制する活性化合物を様々な食品中から探索し、積極的に利用することで健康な長寿社会の実現に近づく。

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

方法

RLM1株の作製

pRL-CMVプラスミドのイントロン部分ATA領域をATGに変異したプライマーを用いて、2段階のPCRにより変異レニラ・ルシフェラーゼ発現ベクターを定法により構築した。変異部位はDNAシーケンスにより確認した。変異プラスミドを、HeLa細胞に薬剤耐性遺伝子を含むpApuroとともに導入した。ピューロマイシン0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育したコロニーをピックアップし、レニラ・ルシフェラーゼの発現をルミノメータで測定した。10個のコロニーからレニラ・ルシフェラーゼを発現する4つのコロニーを同定した。この内、発現の高かったRLM1ならびにRLM7株を凍結保存した。なお、以後の実験にはRLM1株を用いて解析した (図1)。

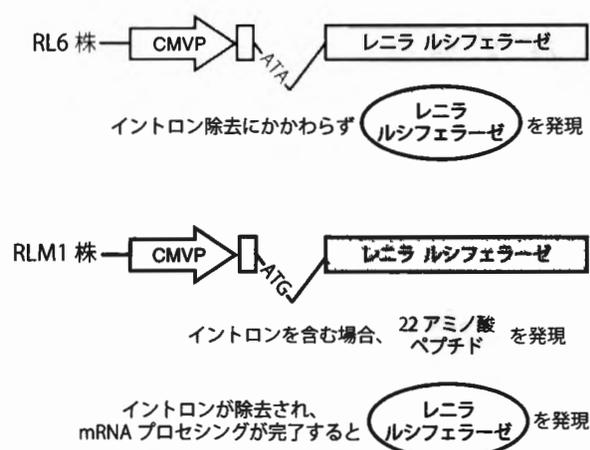


図1 ルシフェラーゼ発現系

RL6株、以前、樹立していた細胞株、RLM1株、本研究で樹立した細胞株 RLM1株は、mRNAプロセッシングを完了して細胞質へと輸送された場合のみレニラ・ルシフェラーゼを発現する。

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

RNA-in situ hybridization (FISH) は、既報告の方法により行った (Fujiwara *et al.*, 2010)。簡単には、細胞をカバーガラス上に培養し、サンプルを添加後適切な時間培養した。その後、PBSで洗い、10%ホルムアミドで固定化した。さらに0.1% TritonX100で細胞を透過化した。これを2xSSCで洗浄し、Ambion社のoligo-hybrid bufferで1時間処理した。その後Cy3で標識したoligo-dTとハイブリダイズした。翌日、2xSSC, 0.5xSSC, 0.1xSSCで洗浄した後、DAPIを用いて核を対比染色した。mRNAの局在を蛍光顕微鏡で観察した。

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

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

味噌サンプルのアクセシ

今回使用した味噌サンプルは、(社)中央味噌研究所のご協力により全国の味噌製造会社より収集した味噌を使用した。味噌の原材料は、豆、米、麦の多岐にわたる。味噌0.4gを1mlの水に懸濁した後、10分間加熱処理した。固形物を除去するために遠心した。その後、上澄を回収してフィルター滅菌した。サンプルは、使用まで-20℃で保存した。味噌サンプルを添加後、24時間培養した。その後、細胞を回収し、レニラ・ルシフェラーゼ用溶解液を使用してレニラ・ルシフェラーゼ測定用サンプルを調整した。

結果

テスト化合物スプライソスタチンを用いたアクセシ系の構築

アクセシ系が、味噌成分からのmRNA成熟因子探索に適しているかについて、すでにmRNAスプライシングを阻害することが報告されている化合物スプライソスタチン (SSA) を用いて検討した。SSAをRL6株に添加後24時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。すると驚いたことにルシフェラーゼの活性の低下は見られなかった (data not shown)。この原因について解析したところ、RL6株で使用したルシフェラーゼ遺伝子にはイントロンが存在するものの、転写開始部位からイントロンを含め開始コドンが存在していなかった。このためイントロンを含むmRNAが細胞質へと輸送された場合、正常なルシフェラーゼを発現すると考えられた。すなわちスプライシングを受けずにイントロンを保持したままのmRNAが細胞質へと輸送されてルシフェラーゼが生産された結果、SSAの効果が見られなかったと考えられた。そこでイントロン領域に変異を入れて、新たにイントロン部分に開始コドンを入れた。この開始コドンから翻訳した場合、22アミノ酸をコードするタンパク質を生合成し、ルシフェラーゼは生合成しない。さらにこの遺伝子を安定に発現するRLM1株を新たに取得した (図1)。

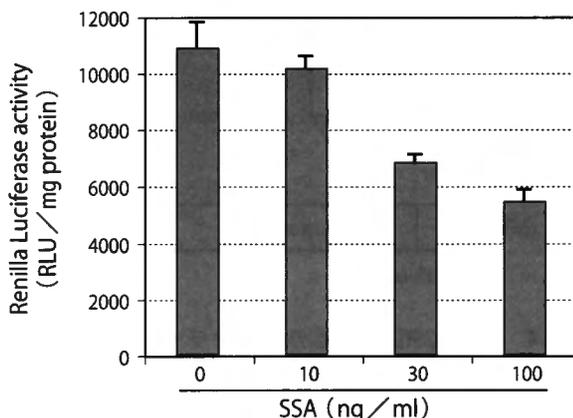


図2 スプライソスタチン (SSA) によるレニラ・ルシフェラーゼ活性の阻害

SSAの濃度依存的にレニラ・ルシフェラーゼ活性は低下している。

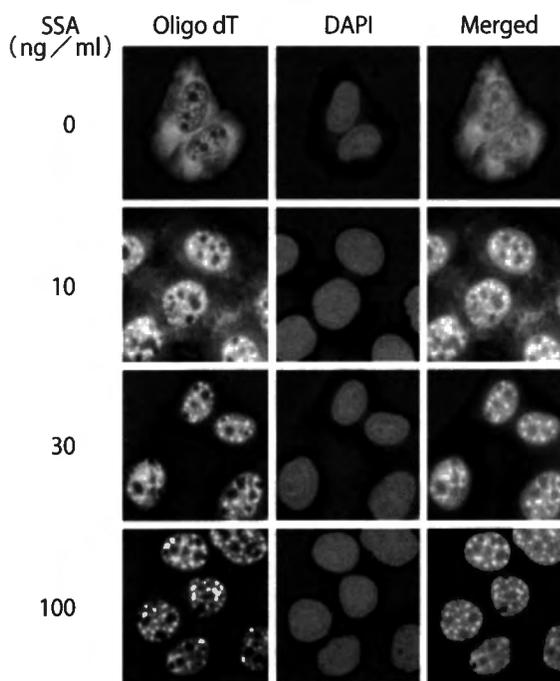


図3 スプライソスタチン (SSA) によるmRNAの核内蓄積

添加したSSAの濃度依存的にmRNAの局在は、細胞質から核へと変化している。このことよりSSAは、mRNAの成熟過程を阻害している。Oligo dT欄は細胞内のmRNAの局在を、DAPIは染色体DNAを示している。

再度SSAでテストしたところ、今度は良好な結果を得た。まずルシフェラーゼの結果を図2に示した。SSAの濃度依存的にルシフェラーゼの活性が低下していることがわかる。次いでmRNAの挙動についてRNA-FISHを用いて観察した (図3)。SSAを処理しない場合、mRNAは主として細胞質に存在していた。SSAを処理す

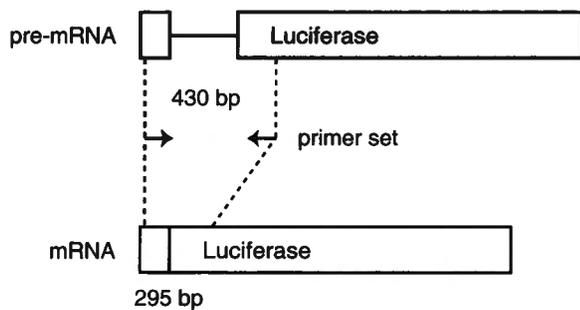


図4 RT-PCR法によるルシフェラーゼmRNAのスプライシング阻害の検出

転写されたpre-mRNAはイントロンを含んでいる。イントロンが除去され、他のプロセッシングを終了すると成熟mRNAとなる。今回使用したプライマーの場合、イントロンを含む未成熟なmRNAは、430塩基対の大きさになる。一方スプライシングを終了したmRNAは、295塩基対となる。

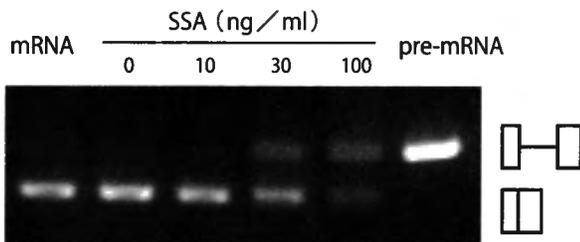


図5 スプライソスタチン (SSA) によるmRNAスプライシングの阻害

SSAの濃度依存的にmRNAスプライシングが阻害されてイントロンを含むmRNAが増えていることがわかる。

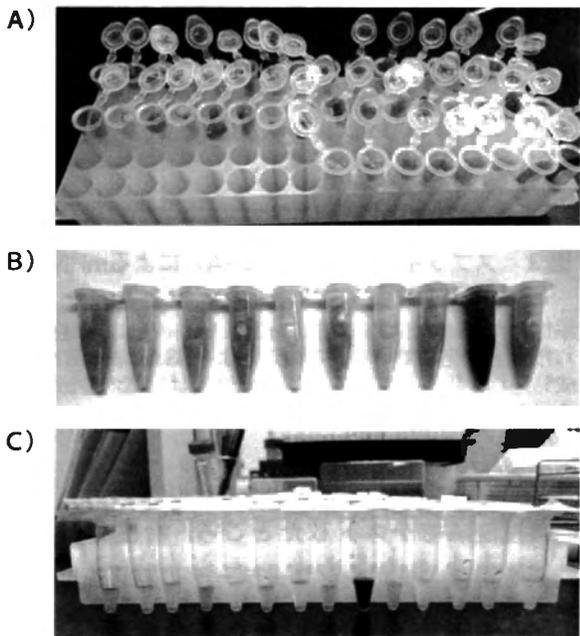


図6 味噌サンプルの調整

- A) 味噌を計量したところ、
- B) 味噌を懸濁したところ、
- C) 遠心分離して上澄みを取得し、フィルター濾過したところ。

るとその局在は徐々に細胞質から核に移り、100ng/ml SSAでは、mRNAのほとんどは核に局在し、mRNAの細胞質への輸送が阻害されていることが観察できた。最後に、スプライシングの状態についてRT-PCR法を用いて検討した。図4は、増幅に使用した領域を示している。スプライシングが行われたmRNAは、295塩基対の大きさとなり、スプライシングが阻害された場合、430塩基対の大きさとなる。SSAを処理するとSSAの濃度依存的に430塩基対のバンドが生じていた(図5)。これらの結果より、本アッセイ系は、味噌成分からのmRNA阻害因子探索に適した系に改変することに成功した。

味噌からのmRNA成熟阻害活性の検出

今回は、味噌サンプル中のmRNA成熟阻害活性の測定を行った。なお、調製した各段階の味噌サンプルを図6に示している。これらをRLM1株に終濃度1%、2%、3%(w/v)となるように添加し、24時間培養後、ルシフェラーゼの活性と細胞量の指標としてタンパク質量を測定した。すると終濃度3%添加した場合、いずれの味噌サンプルでも細胞のタンパク質量が大きく減少していた。一方1%添加の場合、細胞のタンパク質量はコントロール群と差はなかった(data not shown)。そこで以後の実験においては1%とした。

提供された100種類の味噌サンプルについて解析したところ、1回目の測定において、45種類に活性の低下が見られた(図7)。また8種類には活性の上昇が見られた。これら活性に変化に見られたサンプルについて再度検討したところ、活性の低下した45種類中9種類において再現性が見られた。また活性上昇の見られた8種類のうち、4種類において再現性が見られた(図8)。

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

RNA-FISHによる核内mRNA蓄積の観察

いくつかのサンプルについて、RNA-FISHを行った。その結果、味噌サンプル1では、コント

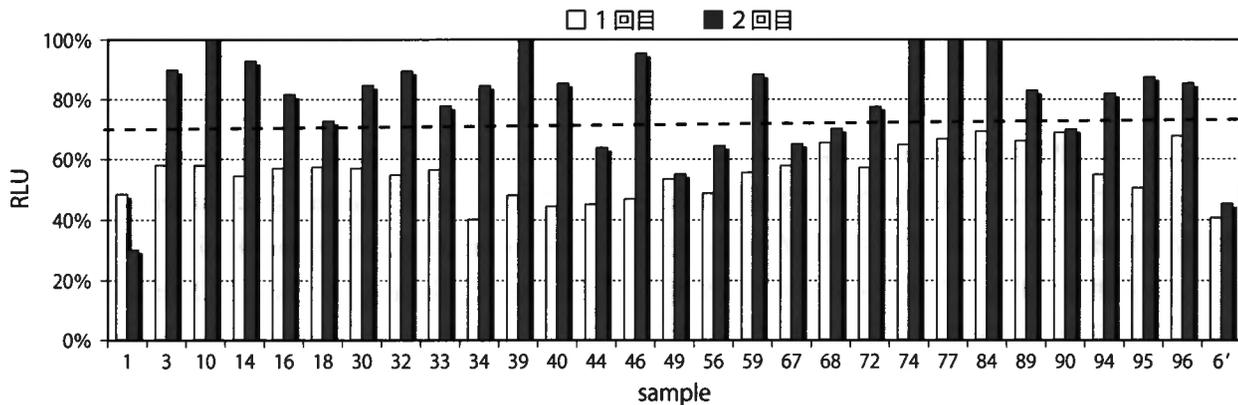


図7 レニラ・ルシフェラーゼの活性低下の観察された例

コントロールに比べて、2/3以下に減少した場合を示している。

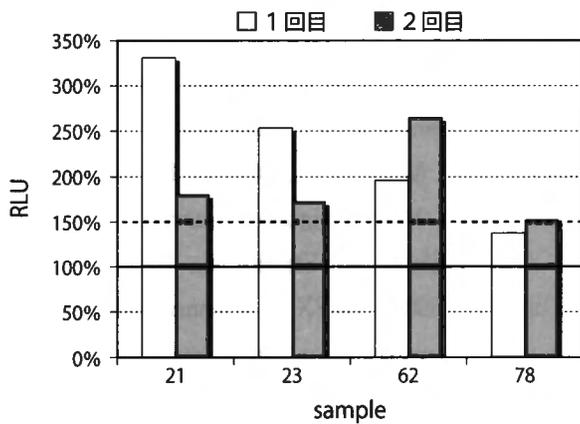


図8 レニラ・ルシフェラーゼの活性増加が観察された例

コントロールに比べて、3/2以上に増加した場合を示している。

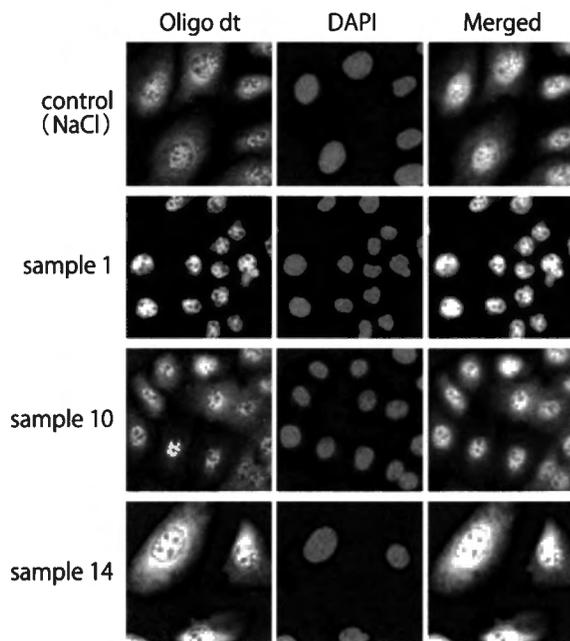


図9 RNA-FISHを味噌サンプルを添加した細胞で観察した例

Oligo dT欄は細胞内のmRNAの局在を、DAPIは染色体DNAを示している。

ロールに比べて優位にmRNAが核内に蓄積していた(図9)。またサンプル10もその傾向が観察された。一方サンプル14では、コントロールと差は見られなかった。

考察

今回、mRNAの成熟を阻害するアッセイ系を構築することにより、味噌よりmRNAの成熟を阻害する活性を持つ化合物を探索した。まず、テスト化合物としてmRNAスプライシング阻害の活性を持つスプライソスタチンを用いて行った。その結果、レニラ・ルシフェラーゼのアッセイ系に問題のあることが判明した。そこでその部分を修正した発現系を構築したところSSAによる阻

害を観察した。これによりこのアッセイ系が成立することを確認した。

次いで味噌サンプルについて検討した。様々な地方から集められた味噌サンプルを用いてアッセイしたところ、レニラ・ルシフェラーゼ活性の減少するもの、変わらないもの、増加するものが見られた。このことから、味噌によって中に含まれている化合物には大きな多様性のあることが推察された。その中で再現性の得られた8種類の減少サンプルと4種類の増加サンプルは、さらなる解析が必要であると考えられた。またRNA-FISH

を行い、mRNAの成熟を阻害するサンプルが存在していた。今後は系統的に進めていくことで、活性化合物を単離する出発の味噌サンプルを決定することが必要と考えられた。加えてmRNAスプライシングのアクセシも組み合わせて活性化合物を精製単離していくサンプルの見極めを行っていくことが重要である。今後、本アクセシ系を用いて、活性化合物を味噌から見いだしていきたい。

謝 辞

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

引用文献

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

味噌の低アレルギー性と健康機能性の実証

森山 達哉

Evaluation of Hypoallergenicity and Health-Promoting Effect of Miso

Tatsuya MORIYAMA

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

はじめに

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

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

このような背景から昨年度は、我が国における主要な味噌について、そのタンパク質パターンや各種アレルギーレベル、さらには各種味噌のエタノール抽出物のヒト肝細胞に対する脂質代謝適正化能を検討した。この研究によって、味噌の低アレルギー性と優れた健康機能性を実証することができたが、アレルギーレベルの定性的な解析しかできず半定量的な解析は行っていなかった。そこで今年は昨年の研究を継続し、より正確な知見を得るために解析回数を増やし、またアレルギーレベルの相対値をデンストグラムで計測し半定量した。さらに、一部のアレルギーに関しては新たな抗体の作製を行った。また、新規な大豆アレルギーのクローニング及び抗体作成にも成功した。

実験方法

(1) 味噌サンプル

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

表1. 実験に使用した味噌とその原料 (昨年と同じ)

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

(2) 味噌からのタンパク質の抽出

昨年と同様に、一定量の味噌サンプルに水を一定量加え、ミキサーにて攪拌した。得られた抽出物をBradford法にてタンパク定量し、各アレルゲンの検出に適した一定レベルのタンパク質を電気泳動やウエスタンブロットングに供した。

(3) アレルゲンレベルの評価

基本的な実験の流れは昨年と同様であるが、今回は各アレルゲンに対して3回実験を行い、得られたウエスタンブロットングのシグナルをデンスシトグラムにて読み取り、半定量した。ウエスタンブロットング法の手順としては、まず味噌サンプルをSDS化し、SDS-PAGEにて電気泳動を行ったのち、PVDF膜にセミドライブロットング法にてタンパク質を転写した。転写後のPVDF膜はブロッキング後アレルゲンに対する抗体(1次抗体)と反応させ、PBSTにて洗浄後、HRP標識抗マウスIgG、HRP標識抗ラビットIgGなどの2次抗体を用いて反応させ、最終的にはHRPの化学発光基質(ECL western blotting detection reagent)を用いて発光させ、X線フィルムに露光させた。X線フィルムはレンドール、酢酸、レンフィックスを用いて現像し、得られた像をtiffデータとしてスキャナにて取り込み、AlphaInotech社の画像解析ソフト(AlphaEase)を用いて定量化した。

(4) 大豆7Sグロブリン(β -コングリシニン)に対する新しい抗血清の作製

昨年の本研究で使用した7Sグロブリンの抗体

では、60kDa付近に反応バンドが検出され、これが非特異的なバンドなのか、7Sグロブリンのサブユニットの分解物なのか判定が困難であった。7Sグロブリンは大豆のクラス1アレルゲンとして重要なため、今回は再度、精製した7Sグロブリンをウサギに免疫し、新たな抗血清を作製した。得られた抗血清の反応性を確認した後、味噌中の本アレルゲンレベルの検出に使用した。

(5) 新規大豆アレルゲンPM30のクローニングと抗体作成

近年、新たに大豆アレルゲン候補分子として報告されたPM30について、そのクローニング、抗体作成を行った。大豆の葉由来cDNAからPCRにて本分子をコードするcDNAを単離した。これをT/Aクローニングしたのち、(His)6-タグ融合タンパク質として発現させるために発現ベクターであるpET30-Xa-Licにサブクローニングした。これを発現用大腸菌に形質転換し、大腸菌にて発現させた。得られた発現タンパク質をアフィニティ精製後、モルモットに免疫し、抗血清を得た。

結果と考察

(1) 各種味噌のアレルゲンレベルの半定量的解析(図1・図2)

特異抗体を用いた各種大豆アレルゲンの検出を行い、大豆そのものと比べた。また味噌間で低減化レベルを相対的に半定量比較した。まず大豆のクラス1食物アレルゲンと考えられるGlymBd30K、GlymBd28K、トリブシンインヒビターについて調べた(図1)。GlymBd30KはOgawaらによって同定された大豆の主要アレルゲンの一つで、乳幼児で発生するクラス1の大豆アレルギーの最も主要なアレルゲンである。定量的解析の結果、大豆そのものと比べていずれの味噌においてもデンスシトグラムで10%以下となり、低減化が進んでいた。甘口米みそや一部の辛口米みそでは、一部残存が確認されたが、それ以外の味噌ではほとんど検出できなかった。

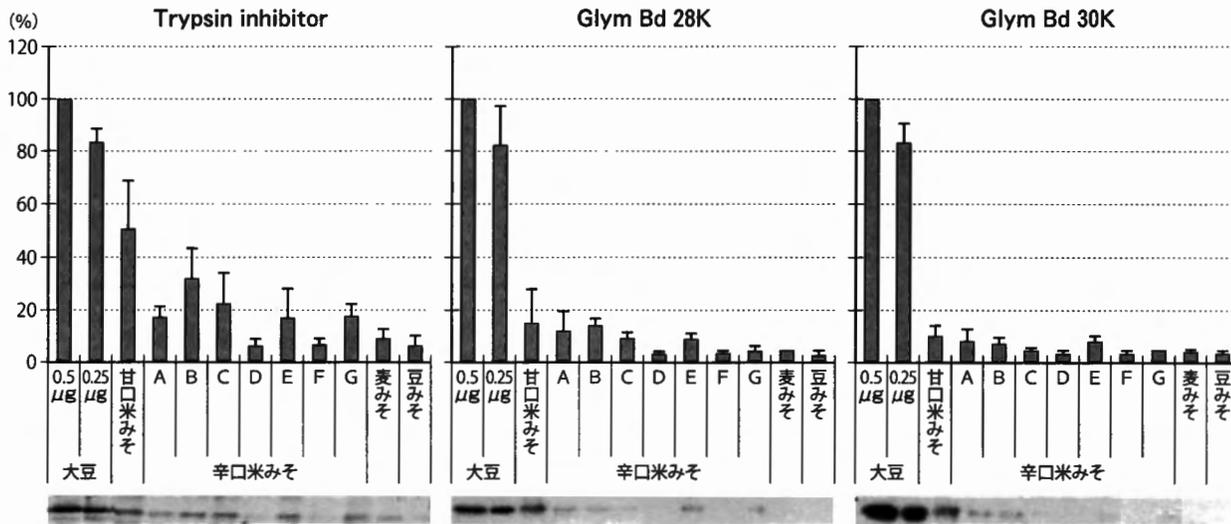


図1. 各種味噌における主要大豆アレルゲンの半定量的評価 (1)

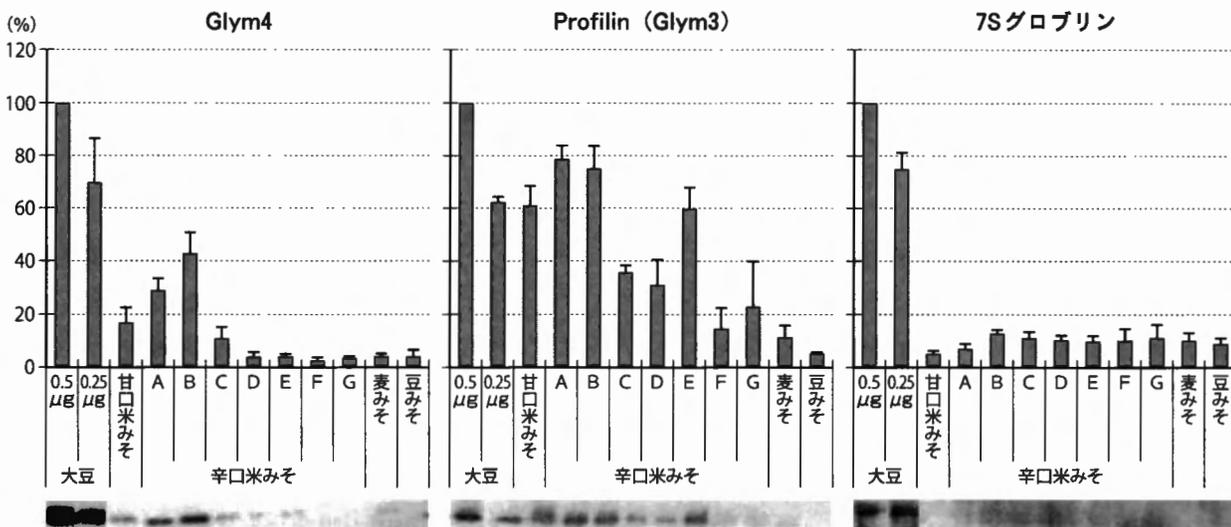


図2. 各種味噌における主要大豆アレルゲンの半定量的評価 (2)

つぎにGlymBd28Kについて検討した。Glym Bd28Kは主に乳幼児で発生するクラス1の大豆アレルギーの2番目に多いアレルゲンであり、蕁麻疹やアトピーなどに関連する。

本分子はビシリンファミリーに属する貯蔵タンパク質の一種である。本アレルゲンの場合もGlymBd30Kの場合と類似の結果を示し、甘口米みそや一部の辛口米みそでは、一部残存(20%以下)が確認されたが、それ以外の味噌ではほとんど検出できなかった(図1)。

一方、トリプシンインヒビターについては、比較的に残存しており、甘口米みそや一部の辛口米みそではデンストグラムとして20%~50%の残存が見

られた。しかしながら、一部の米味噌や麦味噌、熟成期間の長い豆味噌などでは10%以下となった(図1)。

続いて、Glym4, Glym3(プロフィリン), 7Sグロブリンについて検討した(図2)。7Sグロブリンは、乳幼児や成人で発生するクラス1の大豆アレルギーのアレルゲンであり、蕁麻疹や下痢、FDEIAなどに関連することが知られている。症状は比較的重篤とされる。本分子は大豆主要貯蔵タンパク質の一種であり、大豆タンパク質の約1/4を占める。またこのタンパク質は糖鎖を有しており糖タンパク質である。今回新しく作製した抗体は特異的に7Sグロブリンを認識し、非特異

《キレートカラムを用いたHis-Tag融合PM30の精製》

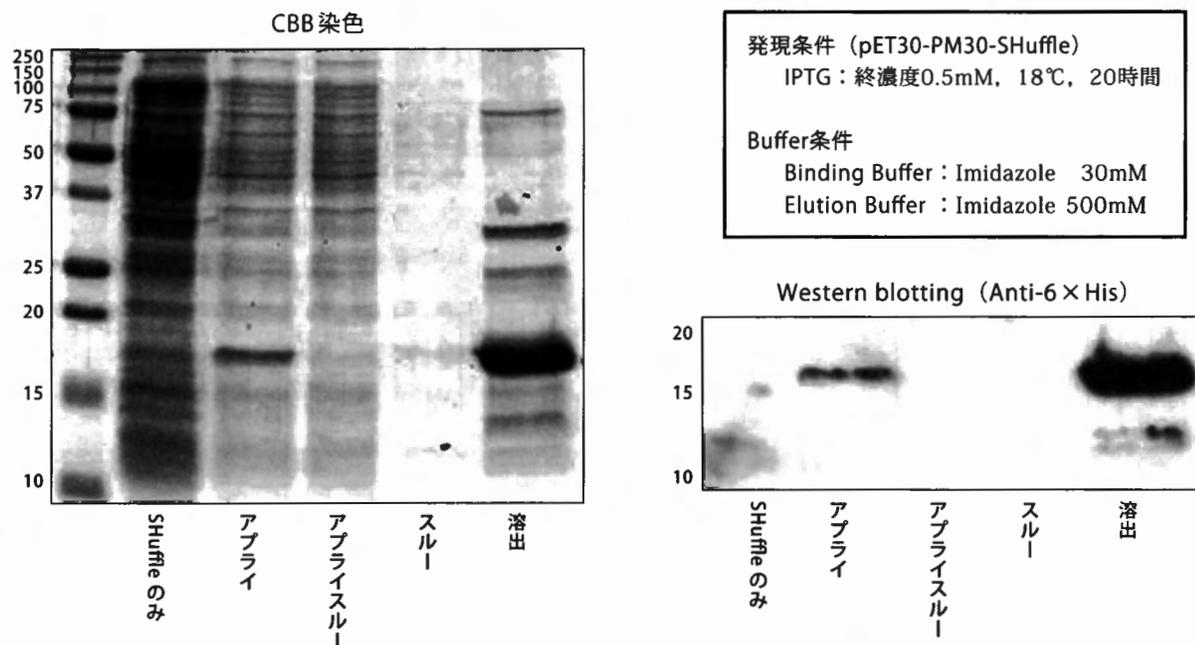


図3. 新規大豆アレルゲンPM30の発現と精製

的なバンドは検出しなかった。本抗体を用いて検出を行ったところ、図2に示すようにいずれの味噌でもデンストグラムとして10%以下に分解されていた。

次に大豆のクラス2アレルゲンについても検討した。クラス2アレルゲンは花粉抗原と交差性が強く、特に大豆の場合はシラカバ、ハンノキ属花粉のアレルゲンであるBetv1及びBetv2と交差するGlym4及びGlym3が知られている。Glym4に関しては、甘口米みそや一部の辛口米みそではデンストグラムとして20%～50%の残存が見られた。しかしながら、それ以外の辛口米みそや麦味噌、熟成期間の長い豆味噌などでは10%以下となった(図2)。Glym3(プロフィリン)は比較的残存しているものも多かった(デンストグラムとして20～80%)。しかしこの場合も麦みそや豆みそでは10%以下となった(図2)。

(2) 新規大豆アレルゲンPM30のクローニングと抗体作成

つぎに、最近報告された新規大豆アレルゲン候補分子であるPM30について各種味噌中にどのくらい含まれているのか検討する目的で、この新規

アレルゲンのクローニング及び抗体作成を行った。まずはじめに、大豆の葉由来cDNAからPCRにて本分子をコードするcDNAを単離した。これをT/Aクローニングしたのち、(His)6-タグ融合タンパク質として発現させるために発現ベクターであるpET30-Xa-Licにサブクローニングした。これを発現用大腸菌に形質転換し、大腸菌にて発現させた。得られた発現タンパク質を精製後(図3)、モルモットに免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清の反応性や力価を解析した。

その反応性を解析したところ、PM30と思われる18kDaのバンドを検出した(図4)。よって特異性の高い抗体が作製できたと考えられた。

こうして得られた抗PM30抗体を用いて、各種味噌中のPM30アレルゲンの検出を試みた。その結果、図5に示すように、PM30と思われる位置以外に、約35kDa付近にも明瞭なバンドを示す味噌があった。これは、PM30の2量体であるか、あるいは非特異的なバンドであるか現時点では不明である。もし、これがPM30の2量体であれば、味噌中にもPM30は有意に残存していることとなり、味噌における大豆アレルゲンリスクの主要な要因となりうる。一方、これが非特異的なバ

《得られた抗PM30血清の抗体確認》

抗体希釈：×2000

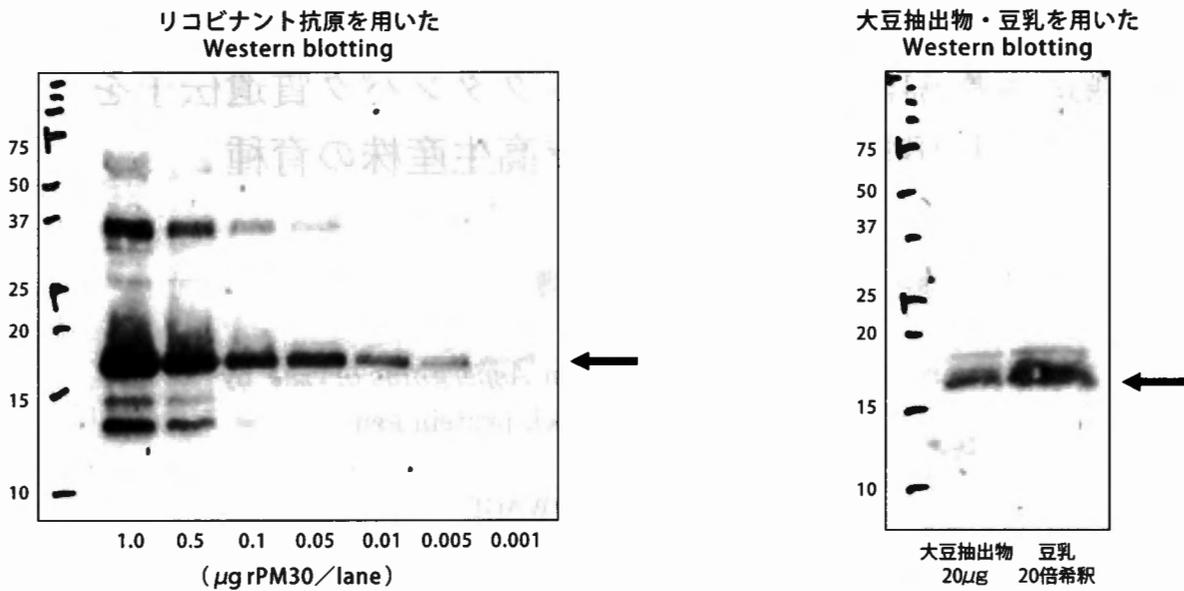


図4. 新規大豆アレルゲンPM30に対する抗体の作成と確認

《各種味噌中のPM30の検出》

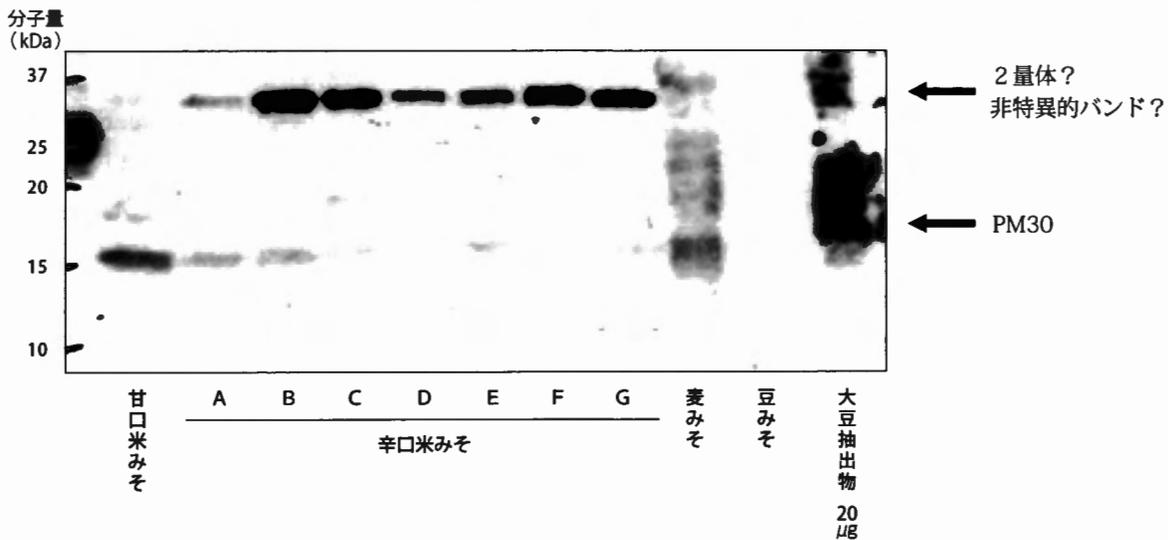


図5. 各種味噌中のPM30アレルゲンの検出

ンドであれば、味噌ではPM30も低減化していることになる。いずれの場合でも、やはり豆味噌では検出されるバンドが見られず、高度に低アレルゲン化していることが示唆される。

今後は、味噌によるアレルギー発症リスクの臨床的な解析（頻度、臨床像など）の調査や副原材料（米、麹菌、麦など）由来のアレルゲンの有無などについても調べていきたい。

謝 辞

本研究は、(社)中央味噌研究所からの研究助成を受けて行われました。関係各位に厚く御礼申し上げます。また、研究の実施にあたりご指導、ご助言、ご協力いただきました河村幸雄教授、矢野えりか研究員、鶴澤有希研究員、実験担当の学生達に感謝いたします。

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

柏木 豊

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

Yutaka KASHIWAGI

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

緒言

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

を作出するとともに、これを用いて高温における遺伝子発現制御機構を解明する。

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

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

一方、組換えDNA技術による異種タンパク質遺伝子の高発現には、*amyB*⁷⁾、*glaA*⁸⁾、*agdA*⁹⁾、*melO*¹⁰⁾、*tefl*¹¹⁾、*enoA*¹²⁾等の遺伝子プロモーターを利用したものがあり、これらは固有の誘導物質の添加を必要とする。これに対してHSPプロモーターによる遺伝子発現は温度制御可能であり有

用と考えられるが、その研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、高温誘導性遺伝子プロモーターを用いて、麹菌のプロテアーゼの一種アスパルチルアミノペプチダーゼ遺伝子 *dapA*¹³⁾ を麹菌に形質転換し、その遺伝子発現について検討した。

方法

菌株と培地

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

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

形質転換と形質転換菌の選択

A. oryzae の形質転換には、プラスミドベクター pPTRI (タカラバイオ) を用いた。本ベクターは *Aspergillus* 属糸状菌細胞内では自律的に複製せず、染色体に組み込まれた状態でのみ安定に保持される。選択マーカーとしてピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA*¹⁴⁾ を含み、この遺伝子が麹菌に組み込まれるとピリチアミン耐性の形質転換コロニーが得られる。

A. oryzae の形質転換は、五味らの方法¹⁵⁾ に従って行った。すなわち、*A. oryzae* RIB40をCD液体培地に接種し、30°Cにて振とう培養を行い、生育した菌糸を滅菌ミラクロス (Carbiochem) にてろ過集菌し、滅菌水にて洗浄した。集菌した菌糸をプロトプラスト化液 (0.015g/mL Yatalase (タカラバイオ), 0.005g/mL CELLULASE

"ONOZUKA" R-10 (ヤクルト) を含む0.8M NaCl - 10mM Na Phosphate Buffer (pH6.0)) 5 mLに懸濁し、30°Cにて緩やかに振とうして、溶菌をおこなった。滅菌ミラクロスにて菌体残渣を除去した後、4°C, 4000rpm, 10分間遠心分離し、プロトプラスト沈殿を得た。プロトプラスト沈殿に0.8M NaCl - 10mM Na Phosphate Bufferを加え再懸濁し、遠心分離により沈殿を分離する洗浄を2回行い、精製プロトプラストを得た。プロトプラストを濃度 2×10^8 /mLとなるようにSolution1 (0.8M NaCl - 10mM CaCl₂ - 10mM Tris-HCl buffer (pH8.0)) に懸濁し、0.2容量のSolution2 (40% (w/v) PEG4000 - 0.8M NaCl - 50mM CaCl₂ - 50mM Tris-HCl buffer (pH8.0)) を加えて穏やかに懸濁し、これにプラスミド液20 μ Lを加え、氷中で30分間静置し、形質転換を行った。

プラスミドの構築

麹菌の熱ショックタンパク質遺伝子 *hsp30* プロモーター¹⁶⁾ の-1~-476bp領域を、麹菌ゲノムDNAを鋳型として、PCR用プライマー、P-d9; 5'caagctagcgttgatctggaggtc3', およびP-*hsp30*Pro3_DAP14475R; 5'ggcgattttcgaagtcattttggctgtgtgtgaggtag3', を用いて増幅した (図1)。

麹菌のアスパルチルアミノペプチダーゼ遺伝子 *dapA* のコード領域 (1970bp) を、麹菌ゲノムDNAを鋳型として、プライマー P-*hsp30*Pro3_DAP14475F; 5'caacacacagccaaaatgacttcgaaaatgcccaaaatttg3', およびP-DAP14473R; 5'gcctatgtcaaagtttctaataac3', を用いて増幅した。

得られたそれぞれの増幅断片を混合し、プライマー、P-d9; 5'caagctagcgttgatctggaggtc3', およびDAP14473R; 5'gcctatgtcaaagtttctaataac3'を用いてフュージョンPCRを行い、*hsp30*プライマー領域と *dapA* 領域の融合遺伝子、*hsp30*Pro-DAPを作成した (図2)。

プラスミドベクター pPTRI (タカラバイオ) を制限酵素 *Sma* I によって消化し、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (東洋紡) を用いて、末端の脱リン酸化を行った。融合遺伝子 P-*hsp-dap* は、T4 polynucleotide kinase (東洋紡) を用いて5'端にリン酸付加した。得られたDNA断片を

```

ccaagttgatctggaggtctaacagccaatcaaattgagtcgcactgcagacgctcgatg
                                CCAAT box
attgaaggtacgagccattccaaggttccacgttctagccggatggagactcccaccaac
ggtgatcgccatcacgtgattcgtcgaaa          cgccagaaagctcccgcaccaaccagagggc
                                HSE1
gtcgagtggaaagctcgaaagtctctcgacg          cctcagggcaccatccagggtcatcctgaagt
                                HSE2
gatgccaccagcagctcagctggttgtgaatcgcagtttctggaacatggctgacaagaga
tataagggggcacaagacctcgtccagttgcacttctcttcatcagaacaacaacaatca
aacacaagaacacaacagcaatcgactacagaccaaatacctctttccactactacttct
-1
atcaaaacaaacttgctctggttactctcttaaacacactacctcaacacacagccaaa

```

図1 HSP30遺伝子プロモーター領域の配列

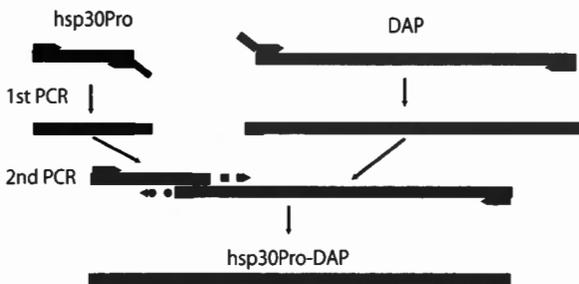


図2 フュージョンPCRの概略

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

T4 DNA ligase (Ligation high, 東洋紡) により連結し、組換えプラスミドを作成した。

PCR

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

酵素活性の測定

本酵素は、Asp-pNAとともにGlu-pNAを基質とすることが知られており¹³⁾、本実験においては、Glu-pNAを基質として用いた。酵素活性の測定は、基質としてGlu-pNA (Glutamyl p-nitroanilide) を用い、酵素反応によって遊離するp-nitroanilideを405nmの吸光度によって定量した。

タンパク質の定量

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

DNAシーケンス

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

結果と考察

遺伝子のクローニングと組換えプラスミドの構築

麹菌 *A. oryzae* RIB40株は、独立行政法人酒類総合研究所 (前・醸造研究所) において保存されている麹菌菌株であり、種々の菌株の中でも、野生株に近いものと考えられている。本菌株は、清酒、甘酒、味噌等の発酵食品製造において実用株としての使用が可能であるとされ、麹菌ゲノム解析の対象菌株として全ゲノム配列が解明されており、麹菌の遺伝子資源として学術的研究においても有用な菌株である。

麹菌 *A. oryzae* RIB40株のゲノムDNA70ngを鋳型DNAとして、プライマー P-d9およびP-hsp30 Pro3_DAP14475Rを用いてPCRを行い、*hsp30*プロモーターに対応する467bpの増幅断片を取得した。また、同様の反応条件で、プライマー P-hsp30 Pro3_DAP14475FおよびP-DAP14473Rを用いてPCRを行い、DAP酵素遺伝子をコードする1970bpの増幅断片を取得した (図3A)。

プライマー P-hsp30Pro3_DAP14475Rの5'側前半部分には、DAP遺伝子5'端の翻訳開始点から18bp領域が連結されている。また、プライマー P-hsp30Pro3_DAP14475Fの5'側部分には*hsp30*プロモーターの-1~-15bp領域が連結されている。このため、*hsp30*プロモーター断片の3'下流にはDAP遺伝子の翻訳開始点以下18bpが、DAP遺伝子断片の5'上流には*hsp30*プロモーターの-1~-15bp領域が存在し、両断片を混合してPCRを行うと両断片が直接連結された増幅断片が得られるように設計されている。

次に、得られた*hsp30*プロモーター断片とDAP遺伝子断片を混合し、プライマーP-d9およびP-DAP14473Rを用いてフュージョンPCRを行い、PCR産物として約2.47kbの融合遺伝子hsp30Pro-DAPを取得した (図3B)。得られた融合遺伝子のDNAシーケンスを解析し、*hsp30*プロモーターの下流にDAPコード領域が正しく連結されていることが確認された。

このhsp30Pro-DAPをpPTRIの*Sma*I消化物にT4 ligaseを用いて連結し、組換えプラスミドpPTRI-P-hsp30-DAPを構築した (図4)。

組換え麹菌の選択

麹菌 *A. oryzae* RIB40のプロトプラスト 4×10^7 に対して、組換えプラスミドpPTRI-hsp30Pro-DAPの16 μ gを添加して、形質転換を行い、PT-CD培地上にピリチアミン耐性 (PT^r) コロニーの生育が確認された (図5)。全形質転換コロニー数は約50コロニーであり、形質転換率は約3.12コロニー/ μ gであった。pPTRIによる形質転換率は約6.6コロニー/ μ gとの報告¹⁶⁾があり、本実験における形質転換率は、やや低いものの既報にほぼ匹敵する値であった。

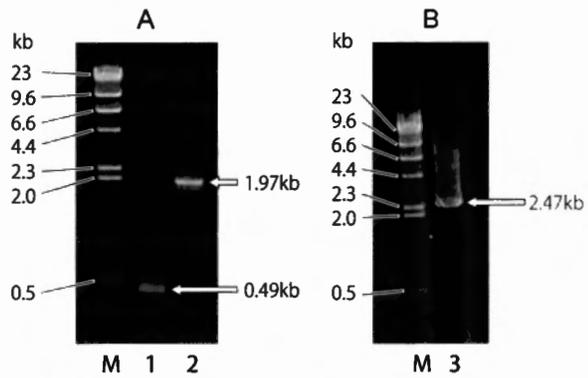


図3 フュージョンPCRによる増幅断片
1 ; hsp30Pro, 2 ; DAP, 3 ; hsp30Pro-DAP,
M ; Lambda/HindIII digest

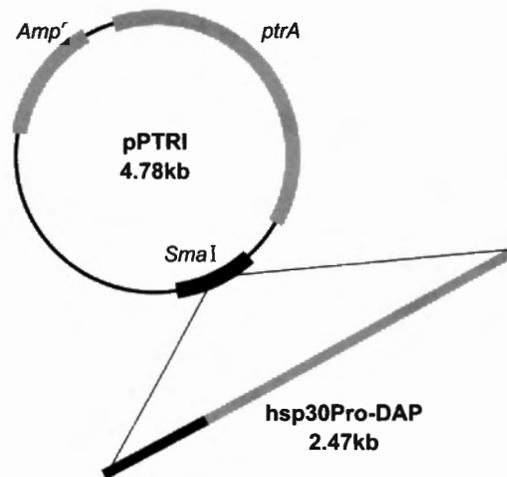


図4 組換えプラスミド pPTRI-hsp30Pro-DAP
pPTRIを*Sma*Iにて消化し、hsp30Pro-DAP融合遺伝子を連結した。



0.1 μ g/mL PT-CD寒天培地

図5 PT-CD寒天培地に生育した形質転換コロニー

酵素活性

組換え麹菌をCD液体培地に接種し、30℃および37℃にて5日間振とう培養を行い、培養菌体を取得する。液体窒素存在下、乳鉢にて粉碎し、菌体抽出液を粗酵素液として、酵素活性を測定している。

謝 辞

本研究は、平成22年度社団法人中央味噌研究所研究助成によって実施されたものである。

参考文献

- 1) 村上英也編著, 麴学, 日本醸造協会, pp.218 (1986)
- 2) 村上英也編著, 麴学, 日本醸造協会, pp.259 (1986)
- 3) M. Machida et al., Nature, 438, 1157-1161 (2005)
- 4) J. E. Galagan et al., Nature, 438, 1105-1115 (2005)
- 5) W. C. Nierman et al., Nature, 438, 1151-1156 (2005)
- 6) M. Matsushita et al., J. B. B., 107, 345-351 (2009)
- 7) S. Tada et al., Mol. Gen. Genet., 229, 301-306 (1991)
- 8) Y. Hata et al., Gene, 108, 145-150 (1992)
- 9) T. Minetoki et al., Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1516-1521 (1995)
- 10) H. Ishida et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 85-92/131-137 (2001)
- 11) N. Kitamoto et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 85-92 (1998)
- 12) T. Toda et al., Curr. Genet., 40, 260-267 (2001)
- 13) K. I. Kusumoto et al., J. Appl. Microbiol., 105, 1711-1719 (2008)
- 14) T. Kubodera et al., Biosci. Biotech. Biochem., 64, 1416-1421 (2000)
- 15) K. Gomi et al., Agric. Biol. Chem., 51, 2549-2555 (1987)
- 16) http://catalog.takara-bio.co.jp/product/tech_info_detail2.asp?unitid=U100004022&masterid=M100002019 (2011. 10. 15)

乾燥おからの香煎代替利用

寺嶋 祐司

Use of dried okara as an alternative to kousen

Yuji TERASHIMA

Marusan-ai Co. Ltd.,
1 Arashita, Nikicho, Okazaki, Aichi 444-2193, Japan.

緒言

香煎とは大麦を炒って粉状にしたものである。東海地方で伝統的に造られている豆みそは、豆麴の製造時に香煎と種麴を混合させて種つけを行う。通常、香煎は原料大豆に対して0.8-2%使用し、2010年の全国豆みそ出荷量は約2万6000tであることから、年間100-260tほどの香煎を豆みそ製造に使用していると想定される。香煎の役割としては、種麴の分散剤、栄養源ならびにみそ玉表面の水分調整やみそ玉同士の結着防止の役割を担っているとされており、現在の豆麴製法では香煎は欠かせない存在となっている。しかし、香煎の原料は大麦・裸麦であり、諸外国では小麦と同様に大麦・裸麦もアレルギー表示対象（グルテン）となっている場合もある。加えて、香煎は原材料の表示問題、香煎製造会社の減少による安定供給の不安、それに伴う価格高騰等の問題がある。これらのことから、香煎を使用しない豆みそ製造方法の確立が望まれる。

そこで、香煎の代替として大豆起源原料である乾燥おからに着目した。乾燥おからを使用した場合の特徴として、大麦・裸麦由来のアレルギー物質がないこと（グルテンフリー）、原材料表示問題の解決の一案となること、安定供給の不安が緩

和されることが挙げられる。これらのことから、味噌業界の発展を見据え、乾燥おからの香煎代替利用法の確立を目指した。

試料

香煎は大麦を原料とする弊社使用の市販品を、乾燥おからは弊社の食品用グレード商品を使用した。このおからは、豆乳製造の副産物として産出され、通常の豆腐製造から産出されるおからに比べ、大豆臭が少なく、白く、きめ細かい特性を有す。試験に使用した香煎と乾燥おからの成分については表1、粒度については図1に示した。

表1 香煎と乾燥おからの構成成分量

	香煎	乾燥おから
水分	5.9	4.7
蛋白質	8.6	22.9
脂質	3.6	18.4
灰分	1.8	4.8
炭水化物	80.1	49.2
(食物繊維)	(16.1)	(42.0)
エネルギー	387.0	370.0

単位：エネルギーはkcal/100g、その他はg/100g

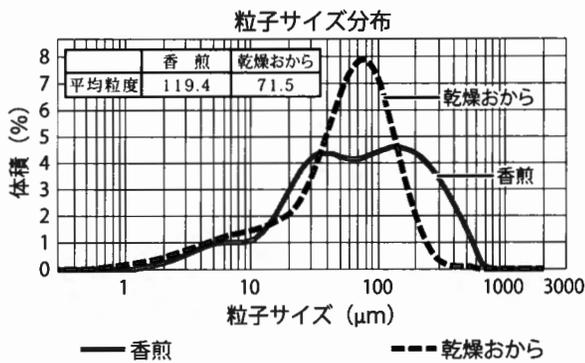


図1 香煎と乾燥おからの粒度分布

方法

乾燥おからの適正使用量を麴蓋製麴により設定し、麴室にて試験を実施した。

試験では、出麴時に香煎使用の豆麴と乾燥おから使用の豆麴の品質比較を行った。品質比較するための分析項目は状貌、水分、pH、 α -アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性（酸性・中性・アルカリ性）の5項目とした。

α -アミラーゼ活性測定は α -アミラーゼ測定キット（キッコマン）を用いた。プロテアーゼ活性は基準みそ分析法を基本としているが、酵素反応時間を60分、反応温度を37℃と改変し、乾物当たり37℃で1分間に1μgのチロシンを遊離する力価を1Uとした。

作成した豆麴による豆みその仕込、温醸熟成は香煎試験区・乾燥おから試験区ともに同条件で管理し、熟成完了後にみその一般成分分析と官能検

査を行った。官能検査方法は両試験区のみそ汁を作成し、3点識別法と3点嗜好法を行った。

豆麴及び熟成後のみそ中のグルテン測定には、Gluten Tox Stick Kit（バイオメダル）を用いた。

また、米用種麴の分散剤としても乾燥おからが使用可能か麴蓋を用いて検討した。試験における各種分散剤の使用量は原料米の0.08%を使用することで統一し、出麴時に豆麴と同様の品質比較をした。

結果・考察

乾燥おからの適正使用量の検討

乾燥おからの適正使用量を確認するため、一般的な香煎使用量と同等量の乾燥おからを使用したものを4/4（原料大豆に対して1.5%）とし、3/4、2/4、1/4と段階的に乾燥おから使用量を減少させた試験区を作成した。それぞれ乾燥おからをみそ玉に均一に散布し、麴蓋による製麴を行い、豆麴の分析比較を行った。その結果、水分、pHには大きな差はなかったが、使用量が1/4、2/4では、はぜ落ちが目立つ傾向にあった。また、 α -アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性は3/4まで右肩上がりに上昇し、3/4と4/4ではほぼ同程度の活性となった（図2）。

この結果は、乾燥おからが麴菌の栄養源やみそ

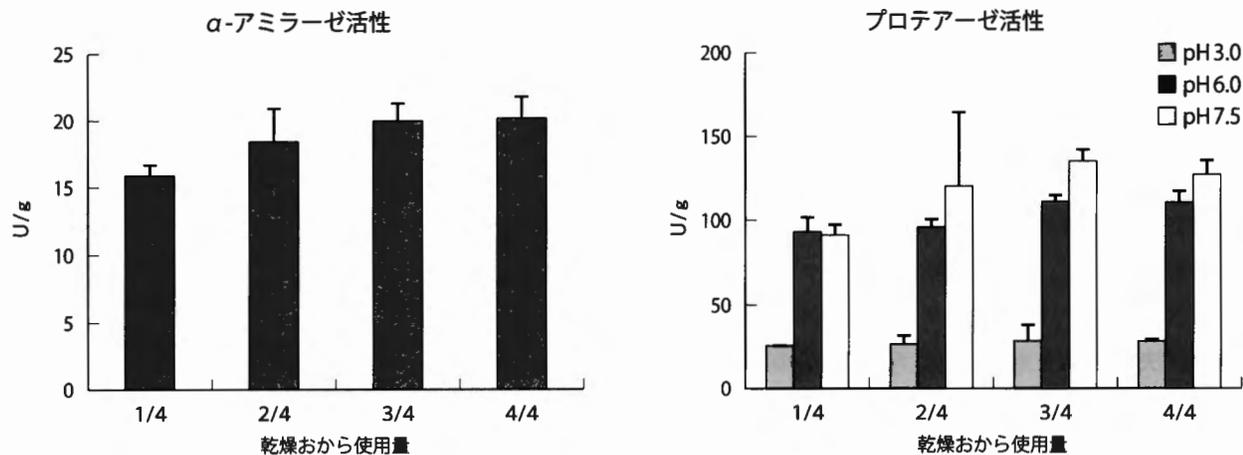


図2 乾燥おから使用量に対する豆麴の酵素活性変化

玉の結着防止の役割として作用し、麴菌の成長（はぜ回り）に影響を及ぼしていると考えられた。

この結果から、以降の試験では乾燥おからの使用量は、香煎使用量と同等量の1.5%と設定した。

乾燥おからの香煎代替利用試験

試験の1段階目として、円盤麴室一室の半分量に従来通りの香煎使用の豆麴，残りの半分量に乾燥おから使用の豆麴の試験区を作成した。この時、室の中心側と外側では製麴条件が変化することが考えられたため、両試験区の引き込み場所を逆にした製麴も行い、分析の平均値で豆麴の品質比較を行った。その結果、香煎と乾燥おからのどちらの分散剤を用いても状貌、水分、pH、プロテアーゼ活性に有意な差は認められなかったが、 α -アミラーゼ活性においては、香煎に比べ乾燥おから使用の方が低い傾向を示した。

次に、一室全て乾燥おから使用豆麴の試験区を

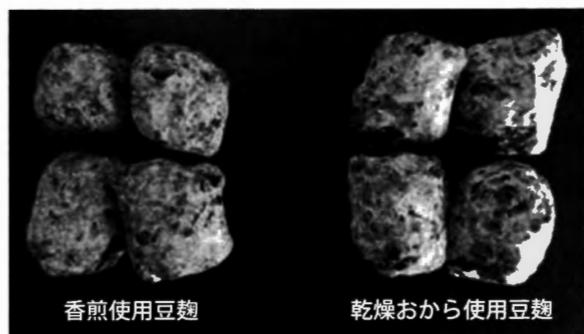


図3 香煎使用麴と乾燥おから使用麴の状貌比較

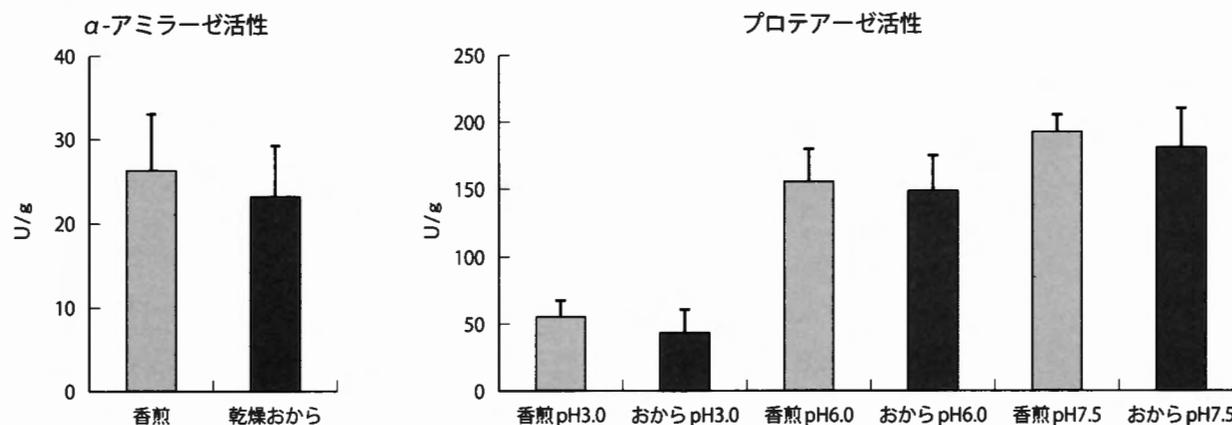


図4 香煎使用豆麴と乾燥おから使用豆麴の酵素活性比較

作成し、香煎使用豆麴の試験区との品質比較を行った。出麴時の分析を行った結果、これまでの結果と同様に両試験区で状貌、水分、pHには差が確認できなかったが、有意差は認められないもののプロテアーゼ活性、 α -アミラーゼ活性ともに若干低い傾向であった（図3、図4）。

乾燥おから使用豆麴の方が香煎使用豆麴より α -アミラーゼ活性が低い傾向にある理由として、分散剤の炭水化物含量差が影響を与えていることが推測された。

温醸熟成後のみそ一般成分分析と官能検査

香煎使用豆麴と乾燥おから使用豆麴をそれぞれ豆みそ仕込み、温醸熟成後、みその一般成分分析を行った結果、酵素活性の影響から乾燥おから使用の方が酸度I・II、蛋白質溶解率・分解率、糖溶解率が若干低い傾向にあった（表2）。しかし、4回の官能検査（参加人数延べ44人）を行っ

表2 香煎使用豆みそと乾燥おから使用豆みその分析値比較

	香煎	乾燥おから
pH	4.9	4.9
L	18.2	17.6
a	10.3	10.2
b	9.2	8.9
酸度 I	20.0	19.7
酸度 II	18.2	17.8
蛋白質溶解率	68.7%	68.3%
蛋白質分解率	32.3%	31.5%
糖溶解率	80.6%	78.5%

た結果では、3点識別法、3点嗜好法とも呈味上の有意な差は認められなかった。

これは、蛋白質分解を主とした長期熟成型の豆みそにおいて、多少の酵素活性差や成分分解差は官能差として大きく認識されないことが考えられた。

グルテン測定

グルテンはセリアック病（グルテン感受性腸炎）患者に有害影響を生じる蛋白質であり、各国で基準は異なるものの、食品の国際規格であるCodexでは20ppm未満のグルテン含有レベルをグルテンフリーとしている。日本では大麦はアレルギー表示対象品目となっていないが、諸外国（EU、カナダ、オーストラリア等）、Codexでは各種麦類がグルテン含有穀類としてアレルギー表示対象品目になっているため、大麦を原料とする香煎を使用した豆みそはアレルギー表示対象となる。そこで、香煎と乾燥おからを使用した試料からグルテン及びグルテン様物質が検出されるか検討した。

イムノクロマト法によるキットを用いた測定の結果、香煎原料、香煎使用の豆麴では陽性反応であったが、香煎使用熟成後豆みそでは陰性反応（10ppm未満）であった。一方で、乾燥おから原料、乾燥おから使用の豆麴、乾燥おから使用熟成後豆みそでは、全ての試料で陰性反応（10ppm未満）であった。

これらの結果から、大豆由来原料である乾燥おからは原料段階からグルテンを持ち込まないため、乾燥おから利用の有効性は高いと考えられた。

米麴への応用展開

米用種麴の散布法としては、分散剤を利用する

方法と種麴を直接散布する方法がある。米麴用の分散剤としては多くは米粉、一部では黄粉や香煎が利用されているが、米麴用の分散剤として乾燥おからが代替可能か検討を行った。麴蓋を用いた製麴後、米麴の分析を行った結果、米粉、黄粉、香煎、乾燥おからのどの分散剤を用いても、分析値（水分、pH、 α -アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性）に大きな差は確認されず、乾燥おからを米麴用分散剤として利用できる可能性が示唆された。

要 旨

豆みそ製造における種麴の分散剤として伝統的に使用されてきた香煎から乾燥おからへ代替可能か検討した。出麴時の豆麴を分析した結果、香煎使用豆麴に比べ乾燥おから使用豆麴の方が、 α -アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性ともに若干低い傾向にあった。熟成後豆みそでは、乾燥おから使用豆みその方が蛋白質分解率、糖分解率が若干低い傾向にあったが、官能検査を実施した結果、両分散剤における呈味上の有意差は認められなかった。また、試料のグルテン測定をした結果、乾燥おから使用の全ての試料でグルテン陰性反応であった。諸外国への豆みその進展のためにも、大豆由来原料である乾燥おからの利用は有効であると考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助賜りました社団法人中央味噌研究所に厚く御礼申し上げます。

麹菌の育種及びそれを利用した みその色調向上に関する研究

戸井田 仁一

Application of Mutants from *Aspergillus oryzae* to Improvement on Color of Miso

Jinichi TOIDA

Nagano Prefecture General Industrial Technology Center Food Technology Department,
205-1 Kurita, Nagano, Nagano Pref., 380-0921, Japan

1 緒言

市販みそのほとんどが包装されている今日、みその品質の中で色調は非常に重要である。色調の鮮やかなさのあるみそを作ることは高度な技術を要し、業界の共通課題である。色調向上のための一つの方法として淡色系ではビタミンB₂を添加する場合があるが、消費者の無添加志向にそぐわない。そこで、特別の高度な技術や添加物を用いることなく、みその色調向上を図る技術として、特徴ある麹菌の育種とその利用に取り組んだ。

古くから麹菌はビタミンB₂類を生産することが知られており、菅間ら¹⁾はフラビン蓄積性麹菌変異株を造成し、みそ醸造への利用の可能性を示唆している。しかし、変異株を育種するとともに、その仕込試験により麹の品質、みその品質・官能評価等を行って、実用性を検討した報告はない。

また、原山ら²⁾は、麹の酵素活性とみその品質の関係を検討した結果、色調の官能評価に対して中性プロテアーゼ活性の寄与率が高いことを報告している。

そこで本研究は、主に淡色系みそ用としてビタミンB₂類の色素生産性が向上した麹菌、あるいは主に赤色系みそ用に中性プロテアーゼ生産性が向上した麹菌を育種・利用することにより、みその色調向上を目指し、菌株のスクリーニング、仕込試験による品質評価等を行った。

2 方法

2.1 菌株、培地

麹菌の親株は当センター保存株である *Aspergillus oryzae* KJ44 を使用した。培養、孢子形成にはポテトデキストロース培地を用いた。仕込試験の対照株は市販味噌用種麹菌BF-1 (株式会社樋口松之助商店) を用いた。プロテアーゼ高生産株は、Sekineらの既報³⁾を参考として0.04%KH₂PO₄、0.2%Na₂HPO₄・12H₂O、0.05%MgSO₄・7H₂O、0.01%NaCl、0.2%カゼイン、2%寒天から成る選択用寒天培地によりスクリーニングした。

2.2 変異処理及びスクリーニング

孢子形成した親株の菌体を0.01% Tween80によ

り集菌し、3G3ガラスフィルターろ過して胞子を集めた。2×10⁶/mlの胞子に対し、ニトロソグアニジン (NTG) 1~5mg/mlにより30℃, 30分変異処理した。ビタミンB₂類高生産株は、シャーレ内で米100g程度を使用して製麴試験を実施し、35℃, 48h培養あるいは更に最大5日後まで放置し、麴の色合いによりスクリーニングした。プロテアーゼ高生産株は選択用寒天培地へ塗布し、30℃, 3~5日培養後、コロニー周辺のハローが大きな株を1次スクリーニングした。更にシャーレによる製麴試験を行い、活性測定により2次スクリーニングした。

2.3 みその仕込試験

スクリーニングした株について、種麴メーカー(株)樋口松之助商店へ種麴製造を委託した。米を常法に従って処理し、種付後小型自動製麴機を用いて37℃, 46時間製麴した。大豆は0.7kg/cm², 20分煮熟処理し、表1の配合によりみそを仕込み(麴歩合10割, 予定水分47%, 予定塩分11%), 28℃, 30~90日間熟成させた。

2.4 麴のプロテアーゼ活性の測定及び

みその成分分析

麴のプロテアーゼ活性及びみその成分は、基準みそ分析法⁴⁾に準じて分析した。プロテアーゼはpH6.0における中性プロテアーゼ活性を測定した。

2.5 ビタミンB₂類の分析

基準みそ分析法⁴⁾のビタミンB₂の分析法を参考に、HPLC法により分析した。試料の調製は、麴またはみそ5gに水を加えてホモジナイズし、50mLに定容後フィルターろ過して試料とした。液体クロマトグラフはWaters1525システム(日本ウォーターズ株), カラムはInertsil ODS-3, 4.6mm×150mm

表1 みその仕込配合

蒸 米	煮 大 豆	5.0 kg
並	麴	2.75 kg
種 水 (酵 母 含 む)	塩	0.96 kg
合	計	0.48 L
		9.2 kg

(ジューエルサイエンス株)を用い、励起波長445nm, 蛍光波長455-530nmの3次元蛍光検出により分析した。標準品としてリボフラビン0.1μg/ml, 1μg/ml溶液を調製し、検量線に用いた。

3 結果および考察

3.1 ビタミンB₂類高生産株の育種

麴菌の親株は実用化を見据えて、みそ用麴から分離された当センター保存株*Aspergillus oryzae* KJ44を用いた。親株をNTGにより変異処理し、シャーレ内で製麴試験を行って、2~5日後麴の色合いによりスクリーニングした。その結果、親株やBF-1菌に比べ麴の色がクリーム色~黄みがかかるR1, R2株を選抜した。これらの株の生育性は親株やBF-1菌よりやや劣っていた。麴の色調は、親株やBF-1菌は製麴時間を延長してもほとんど変化しないあるいはやや灰色がかかるのに対し、選抜した株は時間経過とともに黄みが増していた。

3.2 淡色系みその仕込試験

R1, R2株を種麴として用い、みその仕込試験を行った。製麴時においてR1はBF-1菌より生育が遅く、破精まわりはやや劣っていた。生育が遅いためか結果的に麴の水分含量は高く、プロテアーゼ活性は劣る傾向であった(表2)。一方、R2の破精まわりなどの生育性は、BF-1より若干劣る程度であり、麴の水分含量もほぼ同じであった(表2)。また、プロテアーゼは66U/gと高い活性であった(表2)。

仕込試験の製麴時においても対照株に比べていづれの麴も若干黄みがかっていた。麴のビタミンB₂類含量を図1に示した。対照株の0.78μg/gに対し、R1は2.59μg/g, R2は2.06μg/gであり、

表2 麴の特性

菌 株	水 分 (%)	プロテアーゼ活性(pH6.0) (U/g)
B F - 1	25.0	45
R 1	26.6	34
R 2	24.9	66

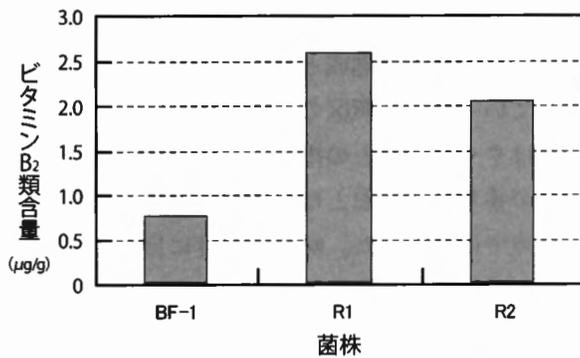


図1 麴のビタミンB₂類含量

3倍程度含まれていた。麴の黄みの由来はビタミンB₂類だけとは限らないが、少なくとも黄み物質の一つであると考えられる。

熟成30日におけるみその成分分析結果及び官能評価結果を示した(表3, 4)。みその測色値は対照区に比べ、試験区はいずれもY(%)がやや低く、赤みのさを示すxや黄みのさを示すyが高い値であった。R1は黄みのyがR2より若干高かった。R2のみそは色の特徴に加え、pHがやや低く、FN(ホルモール窒素)やWSN(水溶性窒素)がやや高めであることから、全体的に熟成が早めに進んでいる印象であった。R2のFNやWSNは対照区より高かったがR1は低めであり、麴のプロテアーゼ活性を反映する結果であった。

官能評価では対照区のみそは全体的に未熟気味で評価は良くなかったが、試験区は総合的に概ね良い評価であった。試験区の色は測色値通り、着色は進んでいるもののsえが強く、色調が向上していた。R1はR2に比べ黄みが強い色合いであり、色度のyや麴のビタミンB₂類含量の結果と

合致していた。R1の色のsえはビタミンB₂類などの黄み成分が主体であるのに対し、R2はそれに加えてプロテアーゼ活性の強さ等も影響していると考えている。試験区の香りはおとなしく、パネラーからは若干未熟臭も指摘された。味はFNやWSNの成分値通りR2が最も強い旨味を感じ、高評価であった。

以上のように、小仕込試験レベルではあるが、淡色系みそについて育種したビタミンB₂類高生産株の利用により、みその色調等の品質向上につながる結果となった。今後、これらの株について工場規模でのスケールアップした仕込試験を実施し、更に実用化に向けた検討を継続する予定である。

3.3 プロテアーゼ高生産株の育種

親株をNTGにより変異処理し、選択用寒天培地へ塗布し、30℃、3~5日培養後、コロニー周辺のハローが大きな株を1次スクリーニングした。更に、シャーレ内で48h製麴し、活性測定により2次スクリーニングした。その結果、60-70U/g程度の活性を持つNP1株を選抜した。破精まわりなどの生育性はBF-1菌よりやや劣る程度であった。

3.4 赤色系みその仕込試験

NP1株を種麴として用い、みその仕込試験を行った。製麴時においてNP1はシャーレ試験と同様、生育性はBF-1菌より若干劣るものの問題となる程度ではなかった。生育性の一つの指標である麴の水分含量もBF-1とほぼ同じであった(表

表3 淡色系みその成分分析値(熟成30日)

菌株	pH	水分 (%)	食塩 (%)	Y (%)	x	y	アルコール (%)	TN (%)	FN (%)	WSN (%)
BF-1	5.23	47.9	10.5	27.3	0.399	0.392	2.28	1.75	0.33	0.98
R1	5.21	46.1	10.8	26.5	0.416	0.402	2.15	1.66	0.29	0.92
R2	5.16	45.9	11.0	24.6	0.415	0.398	2.16	1.64	0.34	1.03

表4 淡色系みその官能評価(5点法, パネル8名の平均値)

菌株	色	香り	味	組成	総合	コメント
BF-1	4.0	3.4	2.9	3.1	3.8	くすみ, 未熟臭, ざらつき, 未熟
R1	2.0	2.3	2.4	2.5	2.1	黄みのsえ強い, 香り良い, 香り弱い, ざらつき
R2	1.6	2.5	2.1	2.0	2.1	てりあり, sえあり, やや未熟臭, 香りおとなしい, 旨味, 塩辛味, ざらつき, 良好

表5 麴の特性

菌株	水分 (%)	プロテアーゼ活性(pH6.0) (U/g)
B F - 1	23.6	49
N P 1	24.0	65

5)。NP1のプロテアーゼ活性は65U/gとシャーレ試験とほぼ同じであり、BF-1の約1.3倍の活性であった。

表6に熟成90日におけるみその成分分析結果を示した。なお、30日めの測色値は、対照区；Y(%)：26.6，x：0.389，y：0.385に対し、試験区；Y(%)：25.3，x：0.408，y：0.397であった。30日及び90日のデータから、みその色は熟成期間を通して試験区は対照区に比べY(%)がやや低く，x値が高めに推移していたことがわかった。しかし，両区分のx値の差異は30日目のほうが明確であり，熟成とともに差が少なくなっていた。熟成度の指標となるpH，FN，アルコールは両区分でほとんど変わらなかったが，WSNは試験区が低かった。FNやWSNは熟成期間を通して試験区は対照区と同等あるいは低い値であり，高いプロテアーゼ活性が反映されなかった。この原因については，高生産されているプロテアーゼが高濃度食塩存在下での作用性が良くない，あるいは酵素基質が測定法（ミルクカゼイン）と実際（大豆タンパク質）が異なっており，大豆タンパクに対して作用性が高くないなどの可能性が考えられる。

次に表7に官能評価結果を示した。明確な差ではないが，全体的に試験区は対照区より若干良い評価であった。試験区の色は成分値通り，対照区よりややさえが強い印象であり，評価点も若干良

かった。しかし，色調の良さは30日目のほうが明確な印象であり，熟成とともに差がわかりにくくなっていった。対照区の香りは強く，パネラーの中にはやや褐変臭との指摘があったのに対し，試験区の香りはややおとなしい印象であったが，悪い評点ではなかった。味は同程度に旨味を感じ，明確な差はなかった。

以上のように，赤色系みそにおいてプロテアーゼ高生産株の育種とその利用を試みたが，色調などの品質の優位性は若干の差異にとどまった。FNやWSNといった窒素成分の分析結果から考えても，プロテアーゼの種類やその水準といった質や量の面で更に株の改良が必要と考えられる。

4 結 論

特別の高度な技術や添加物を用いることなく，みその色調を向上させることを目的として，特徴ある麴菌の育種とその利用を試みた。変異処理により，淡色系用にビタミンB₂類高生産株，赤色系用にプロテアーゼ高生産株を育種した。これらを用いた仕込試験を実施し，みその品質を評価した。

(1) *Aspergillus oryzae* KJ44を変異処理，スクリーニングし，親株やBF-1菌に比べ麴の色がクリーム色～黄みがるR1，R2株を選抜した。これらを用いた仕込試験の結果，麴のビタミンB₂類含量は対照株の0.78μg/gに対し，R1は2.59μg/g，R2は2.06μg/gと高かった。いずれの試験区の色調も対照区よりY(%)がやや低く，xやyが高い値であり，R1のyはR2より若干高かった。R2のFNや

表6 赤色系みその成分分析値（熟成90日）

菌株	pH	水分 (%)	食塩 (%)	Y (%)	x	y	アルコール (%)	TN (%)	FN (%)	WSN (%)
B F - 1	4.92	47.8	10.5	16.4	0.455	0.411	2.25	1.66	0.42	1.23
N P 1	4.94	47.8	10.8	15.3	0.462	0.414	2.27	1.60	0.42	1.14

表7 赤色系みその官能評価（5点法，パネル8名の平均値）

菌株	色	香り	味	組成	総合	コメント
B F - 1	2.5	2.4	2.4	2.5	2.5	てりあり，芳香強い，やや褐変臭，旨味あり，酸味強い，良好
N P 1	2.0	1.9	2.0	2.3	2.1	てり，さえあり，香り良，旨味あり，なめらか，良好

WSNはやや高かったが、R1は低かった。官能的に試験区は総合的に概ね良い評価であった。試験区のみそは着色が進んでいるものさえが強く、色調が良好であった。R1はR2に比べ黄みが強かった。味はR2が強い旨味を感じ、高評価であった。

(2) *A. oryzae* KJ44を変異処理、スクリーニングし、プロテアーゼ活性が60-70U/g程度のNP1株を選抜した。NP1を用いた仕込試験の結果、プロテアーゼ活性は65U/gとシャーレ試験とほぼ同じであった。みその色は熟成期間を通して試験区は対照区に比べY(%)がやや低く、x値が高めに推移していたが、x値の差異は熟成とともに少なくなっていた。pH, FN, アルコールはほとんど変わらなかったが、WSNは試験区が低かった。官能的に明確な差ではないが、全体的に試験区は対照区より若干良い評価であった。試験区の色はややさえが強い印象であり、評価も若干良かった。試験区の香りはややおとなしく、味は対照区と同程度に旨味を感じ、明確な差はなかった。

謝 辞

本研究は、(社)中央味噌研究所委託研究として行われたものであり、関係各位に心より感謝申し上げます。また、製麹機の使用と官能評価にご協力いただいた信州味噌研究所の皆様方に感謝いたします。

参考文献

- 1) 菅間誠之助, 原昌道, 大場俊輝, 山田純, 村上英也. フラビン蓄積性麹菌の造成と変異株の菌学的性質. 味噌の科学と技術, 254, 25-30 (1975)
- 2) 原山文徳, 本道智, 安平仁美. 味噌品質に関する各種酵素の解析. 日本醸造協会誌, 87, 829-837 (1992)
- 3) H. Sekine, S. Nasuno and N. Iguchi. Isolation of Highly Proteolytic Mutants from *Aspergillus sojae*. Agr. Biol. Chem. 33, 1477-1482 (1969)
- 4) 全国味噌技術会編. 基準みそ分析法 (1995)