



## 醤油の機能性に関する研究

古林 万木夫



### Functional Research and Development of Soy Sauce

Makio Kobayashi (Research Laboratory, Higashimaru Shoyu Co. Ltd., 100-3 Tominaga, Tatsuno, Hyogo 679-4167) Seibutsu-kogaku 86: 65-72, 2008.

#### はじめに

日本の伝統的な醤油づくりでは、有用微生物の機能を十分に発揮させながら醸造することを特徴としている(図1)<sup>1)</sup>。最初に、蒸煮大豆と焙炒割砕小麦の混合物に麹菌を生育させて麹をつくり、種々の酵素を固体培養により生産させる。続いて、麹と食塩水を混合して諸味(もろみ)とし、半年から1年をかけて原料の分解と乳酸菌や酵母による発酵を行わせ、熟成を経て醤油特有の香味と色を醸成させる。最後に熟成諸味を圧搾し、得られた生揚(きあげ、生醤油のこと)を火入れして製品醤油ができていく。

醤油は日本を代表する発酵調味料の一つであり、日本の食文化の発展に大きく寄与してきた。これまで醤油を支える醸造研究として、微生物(酵素)の働きによる醤油原料(糖質、タンパク質、脂質)の分解や代謝について、特に「色、味、香」の観点から重点的に研究が行わ

れてきた。残念ながら、日本での醤油の消費量は年々低下しており、その減少傾向に歯止めをかけるためにも、醤油の基本的な価値、すなわち「おいしさ」を演出する「色、味、香」に加えて、新たな切り口で醤油の機能性(魅力)を明らかにし、成熟した醤油市場を活性化することが重要であろうと思われる。しかしながら、醤油の機能性研究に関しては、醤油色素(メラノイジン)やペプチド、アミノ酸など、主要な醤油成分について、抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗血小板作用、血圧降下作用など、いくつかの研究が報告されているものの、厳密な臨床試験においてその生理機能が確認されたものは非常に少ない<sup>2)</sup>。

そこで我々は、醤油の新しい機能性について臨床試験を実施して醤油成分の抗アレルギー作用や鉄吸収促進効果を明らかにするとともに、醤油から生まれた花粉症対策のサプリメントや鉄分吸収をサポートする機能性醤油を開発することができた。また、免疫学的研究により醬

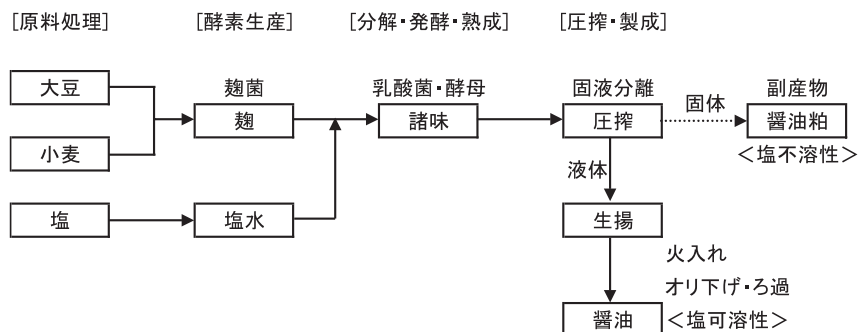


図1. 醤油の醸造工程

油醸造における原料小麦や大豆のアレルゲン分解機構を明らかにした。本稿では、これらの機能性研究の知見とともに研究や商品開発の背景についても解説する。

### 1. 醤油醸造における原料アレルゲンの分解

醤油の主原料の一つである小麦は、卵、乳とともに三大食物アレルゲンの一つであり、食品への表示が義務づけられている。厚生労働省が実施した食物アレルギーの実態および誘発物質の解明に関する研究では、乳幼児（1歳児）では鶏卵（45%）がトップで、以下は乳製品（16%）、小麦（7%）となっている。ところが、成人になると小麦（15%）が大きい割合を占めている。アレルギー症状としては、じんましんなどの皮膚症状が最も多く、喘息、唇の腫れ、下痢などの症状があらわれる場合もある。したがって、小麦アレルギーは乳幼児に多く発症し、大人になっても運動誘発アナフィラキシーなどの重篤なアレルギー症状を引き起こすことがあることから、特に問題視されている食物アレルギーの一つである<sup>1,3)</sup>。原料の一つに小麦を使用している醤油の場合、実際の臨床現場では医師が小麦アレルギー患者には通常の醤油を使用しないように指導しており、患者（やその家族）は特殊な醤油（米醤油など）を使用せざるを得ない状況にある<sup>1,3)</sup>。

田辺らの研究により<sup>4-6)</sup>、小麦中のアレルゲンとして、グルテン、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターなどが明らかにされてきた。しかしながら、醤油醸造中ではさまざまなタンパク質分解酵素によって、これらの小麦アレルゲンが分解・消失する可能性が高いと考えられた。さらに、麴を食塩水で仕込むため小麦アレルゲンの一部が不溶化することや、火入れにより小麦アレルゲンが熱変性を受けて不溶化することも考えられた。もう一つの主原料である大豆については、これまでにマウスのモノクローナル抗体を用いて市販醤油から主要な大豆アレルゲン（Gly m Bd 30K）が検出されないことが報告されているものの<sup>7,8)</sup>、醤油醸造中において大豆アレルゲンがどのように分解を受けているかは不明であった。小麦についても、大豆の場合と同様に醤油醸造中で小麦アレルゲンが分解されると想像されたが、実際のところ醤油中の小麦アレルゲン分解に関してまったく研究が行われていなかった。そこで我々は、重症小麦アレルギー患者5名のプール血清（小麦RAST値として5~6、かつ小麦製品でアレルギー症状が出現した患者）を用いて、3種類の免疫学的検査手法を組み合わせた小麦アレルゲンの測定系を確立し、醤油醸造中に小麦アレルゲンが消失することを明らかにした<sup>1,3,9-11)</sup>。

#### 1-1. ウェスタン解析による小麦アレルゲンの検出

まず、醤油醸造の各工程から得られた塩可溶性および

塩不溶性画分について、重症小麦アレルギー患者5名のプール血清を用いたウェスタン解析により、各試料に存在する小麦アレルゲンを定性的に検出した。その結果、原料の塩可溶性および塩不溶性画分ともに複数のタンパク質が小麦アレルゲンとして検出されたが、生揚、醤油粕、および火入れ後の醤油からは小麦アレルゲンが検出されなかった<sup>9,10)</sup>。したがって、醤油醸造工程中において原料小麦のタンパク質（アレルゲンを含む）はペプチドやアミノ酸まで低分子化され、醤油中では小麦アレルゲンが消失していることが示唆された。そこで次に、醤油醸造工程における小麦アレルゲン分解について、Inhibition ELISAにより原料から最終製品である醤油まで定量的に追跡することを試みた。

#### 1-2. Inhibition ELISAによる小麦アレルゲンの定量

Inhibition ELISAでは、試料中の小麦アレルゲン濃度を阻害率として評価することができる<sup>9,10)</sup>。なお、小麦アレルゲンの検出限界は、阻害率として5%（陽性対照のパンクレアチン分解物0.1  $\mu\text{g/ml}$ に相当）とした。醤油醸造工程の原料、処理原料、麴、諸味、および生揚、火入れ醤油の各試料から塩可溶性画分を調製し、Inhibition ELISAを行った。醸造工程ごとの阻害率の経時変化を調べたところ、原料から処理原料にかけて阻害率が減少した後、製麴で一時増加した後は経時的に減少し、生揚や火入れ後の醤油では阻害率がゼロとなり、試料中に小麦アレルゲンが残存しないことが明らかとなった（図2）<sup>9,10)</sup>。以上の結果より、塩可溶性画分に含まれる小麦アレルゲンは醤油醸造工程中で完全に分解を受けることが推察された。

#### 1-3. Direct ELISAによる小麦アレルゲンの定量

塩不溶性画分は尿素で可溶化するため、Inhibition ELISAでは尿素を含む塩不溶性画分について阻害率を測定することができない。そこで、醤油醸造工程の塩可溶

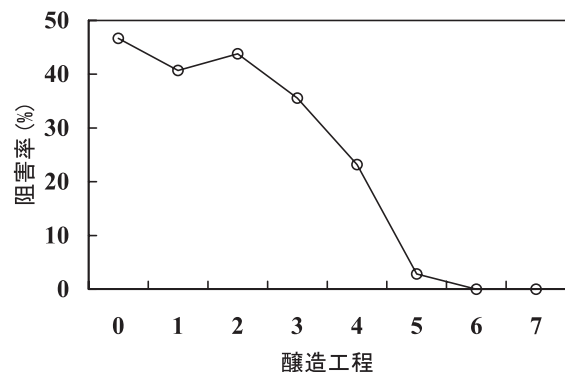


図2. Inhibition ELISAによる醸造工程中の小麦アレルゲン（塩可溶性）の経時変化。0, 原料；1, 処理原料；2, 麴；3, 諸味10日；4, 諸味48日；5, 諸味67日；6, 生揚；7, 火入れ醤油。○, 塩可溶性画分。

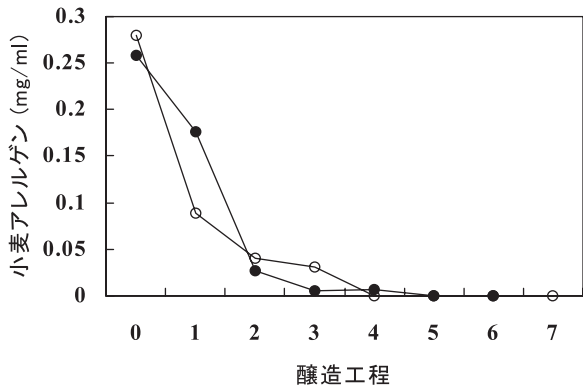


図3. Direct ELISAによる醸造工程中の小麦アレルゲン（塩可溶性・塩不溶性）の経時変化。0, 原料；1, 処理原料；2, 麴；3, 諸味10日；4, 諸味48日；5, 諸味67日；6, 生揚・醤油粕；7, 火入れ醤油。○, 塩可溶性画分；●, 塩不溶性画分。

性および塩不溶性画分の小麦アレルゲンの分解機構を明らかにするため、Inhibition ELISAに用いた試料と同一の塩可溶性および塩不溶性画分について、醸造工程ごとの小麦アレルゲン量の経時変化をDirect ELISAにより調べた<sup>9,10)</sup>。その結果、塩不溶性画分については処理原料から製麴にかけて急激に小麦アレルゲンが減少し、その後の諸味初期でも経時的に減少して、諸味中の小麦アレルゲンが不検出となった。一方、塩可溶性画分については、製麴以降も緩やかに減少しており、塩不溶性画分と比べると高濃度の小麦アレルゲンが、諸味初期まで残存する傾向を示した（図3）。

#### 1-4. 各種諸味と製品醤油中の小麦アレルゲン

さまざまな原料配合・仕込み期間・仕込み温度で熟成させた圧搾前の淡口諸味10種類、濃口諸味4種類、再仕込み諸味2種類を含む16種類の諸味から得られた塩可溶性画分（生揚）および塩不溶性画分（醤油粕）、さらに生揚オリ3種類、火入れオリ3種類について、Direct ELISAとウェスタン解析を行ったところ、すべて小麦アレルゲンが検出されなかった<sup>9,10)</sup>。また、他社品を含む市販醤油10種類（淡口、濃口、再仕込み、白）についてInhibition ELISA, Direct ELISA, およびウェスタン解析を行った結果、すべて小麦アレルゲンが不検出であった<sup>9,10)</sup>。以上の結果より、当社工場の原料配合、製麴温度、製麴日数、品温経過、仕込み期間の異なる複数の生揚および醤油粕、さらに生揚オリ、火入れオリについても、十分な発酵熟成を経た醤油中には小麦アレルゲンが残存しないことが確認できた。さらに、他社品を含む市販醤油についても小麦アレルゲンが残存しなかったことから、当社の麹菌・乳酸菌・酵母などの微生物を用いて醸造した醤油に限らず、他社が使用している微生物および醸造条件でも小麦アレルゲンが分解・消失し、最終製品である醤油には残存しないことが明らかとなった。

#### 1-5. 醤油醸造における小麦アレルゲンの分解機構

以上述べた通り、小麦アレルギー患者の血清（小麦抗体）を用いてウェスタン解析, Inhibition ELISA, Direct ELISAを行い、醤油醸造工程中での小麦アレルゲンを定性的・定量的に測定することができた<sup>9,10)</sup>。これらの結果から、醤油醸造における小麦アレルゲンの分解機構について考察したい。Inhibition ELISA（図2）では、塩可溶性画分は製麴で一時増加したが、その後、諸味中で経時的に減少し、醤油では小麦アレルゲンが残存しないことがわかった。Direct ELISA（図3）では、処理原料から製麴にかけて塩可溶性画分よりも塩不溶性画分の小麦アレルゲンが急激に減少し、製麴後および諸味初期では塩不溶性画分よりも塩可溶性画分において小麦アレルゲンが高く検出された。以上の結果より、醤油醸造中の小麦アレルゲンの分解機構として、製麴中に原料の塩不溶性タンパク質が麹菌酵素により塩可溶性タンパク質となり、製麴および諸味中で分解を受けて消失することが推察され、小麦アレルゲンの分解には麹菌酵素が大きく関与していることが示唆された<sup>9,10)</sup>。醤油醸造における原料分解では、麴や諸味中での酵素や微生物による分解が最も重要であるが、圧搾工程で生揚から塩不溶性タンパク質である醤油粕や生揚オリを除去すること、火入れ工程で生揚に残存する塩可溶性タンパク質を熱変性させ塩不溶性タンパク質として火入れオリを発生させること、ならびにオリ下げや清澄化工程で火入れオリを完全に除去することも、火入れ醤油中から原料タンパク質の残存を防ぐには重要であろうと考えられる<sup>12,13)</sup>。

本研究により、「醤油中には小麦アレルゲンが残存しない」ことが初めて解明され、これまで醤油を使用することができないと考へておられた小麦アレルギー患者、その家族、担当医師にとって有益な情報の一つになることが期待される。しかしながら、本研究は*in vitro*での試験であり、今後、臨床試験により安全性をさらに確認する必要がある。

なお誌面の都合により割愛したが、我々は市販ELISAキットを用いても醤油中の小麦アレルゲンの定量が十分可能であることや<sup>11)</sup>、もう一つの主原料である大豆についても、醤油醸造中における大豆アレルゲンの分解・除去機構を明らかにしている<sup>12,13)</sup>。

## 2. SPSの抗アレルギー作用

前述の通り、醤油醸造では麹菌の生産する各種酵素により原料の分解が進行し、例えば大豆や小麦に含まれるタンパク質は抗原性を示さないアミノ酸やペプチドにまで低分子化されて<sup>1,3,9-13)</sup>、醤油の重要な旨み成分となる。一方、大豆の多糖類は、麹菌酵素による分解を受け

て可溶化するものの完全には分解されず、製品醤油中においても約1%程度存在している<sup>14,15)</sup>。これを醤油に含まれる多糖類として「醤油多糖類 (SPS: *shoyu polysaccharides*)」と総称している<sup>15)</sup>。SPSは、醤油にエタノールを混合することにより生じる沈殿物や醤油を透析処理した後の非透析物として回収することができる<sup>15)</sup>。SPSは本醸造醤油に特徴的な成分の一つであるが、その健康機能についてはまったく研究が行われていなかった。そこで我々は、醤油本来の機能性成分としてSPSに着目し、*in vitro*や*in vivo*の試験系に加えて<sup>15-17)</sup>、二度にわたる臨床試験でSPSの抗アレルギー作用を明らかにした<sup>18,19)</sup>。すなわち、「醤油は低アレルギー化食品であり抗アレルギー食品である」といえよう<sup>20-23)</sup>。

**2-1. SPSの抗アレルギー活性** ヒアルロニダーゼ (Hyaluronidase, EC 3.2.1.35) は、動物や細菌に存在し、動物の結合組織にあるヒアルロン酸を加水分解する酵素である。この酵素は、それ自体起炎剤としての作用を有し、抗炎症剤や抗アレルギー剤により酵素活性が阻害されることが知られている。ヒアルロニダーゼはアレルギー反応の過程において何らかの関与をしているものと考えられ、ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定がアレルギー抑制の一次スクリーニングとして有用であるとされている<sup>24-27)</sup>。そこで我々は<sup>15,20)</sup>、生揚の非透析物を用いてヒアルロニダーゼ阻害試験を行ったところ、SPSは抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウムに相当する強力なヒアルロニダーゼ阻害活性を有することがわかった。濃口、淡口、溜、白のいずれの本醸造醤油でも、SPSには強いヒアルロニダーゼ阻害活性が認められたが、小麦を主原料とする白醤油ではSPS量が顕著に低かった。また、醤油の原料処理物（蒸煮大豆と焙炒砕砕小麦）から調製したエタノール沈殿物にはヒアルロニダーゼ阻害活性がなく、麴抽出物から得られたエタノール沈殿物にはヒアルロニダーゼ阻害活性が認められた<sup>15,20)</sup>。以上のことから、醤油の機能性成分であるSPSの生成には、大豆と麴菌の両方が必須であるといえる。

続いて、SPSの抗アレルギー活性としてラットの動物細胞でのヒスタミン遊離抑制効果を調べた<sup>15,20)</sup>。ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3) は、I型アレルギー反応に関与する正常好塩基球や肥満細胞と同様な機能を持った培養株で、ヒアルロニダーゼ阻害活性に続く二次スクリーニングとして広範に用いられている<sup>28)</sup>。SPSのヒスタミン遊離抑制効果は濃度依存的であり、1 mg/mlのSPSは抗アレルギー薬であるフマル酸ケトチフェン0.1 mg/mlに相当する活性を有していた。一方、ケトチフェンは1 mg/mlで細胞毒性がみられたが、SPSは10 mg/mlでも細胞増殖にまったく影響を与えなかったことか

ら、SPSはケトチフェンの少なくとも10倍は細胞毒性が低いといえる。

以上のように、*in vitro*での抗アレルギー活性として、ヒアルロニダーゼ阻害活性とヒスタミン遊離抑制効果の間には高い相関があることが報告されているものの、さらに*in vivo*において抗アレルギー活性を確認した研究は非常に少ない。そこで我々は<sup>15,20)</sup>、マウス受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応抑制作用による耳介浮腫抑制効果を調べた。マウスに0.3 mgのSPSを3日間経口投与することによりPCA反応が有意に抑制され、生体でのSPSの抗アレルギー効果が確認できた。マウスへの投与量からSPSの有効投与量を換算すると、約10 mg/kg体重となり、これは醤油として約1 ml/kg体重に相当した<sup>15,20)</sup>。これまでに、いくつかの植物抽出物でPCA反応抑制効果が検討され、例えば、柿葉抽出物<sup>29)</sup>やソバ抽出物<sup>30)</sup>では、ともに有効濃度として100 mg/kg体重であることが報告されている。PCA反応抑制効果が確認されたSPSの投与量は、少なくともこれらの10分の1量であり、SPSは抗アレルギー物質として非常に有効かつ有望な食品成分であるといえる。

**2-2. SPSのTh1/Th2バランス改善効果** 即時型アレルギー (I型) の免疫応答では、まず、花粉症における花粉や通年性アレルギーにおけるハウスダストやダニのような抗原が体内に侵入すると、マクロファージや樹状細胞はこれを貪食し、T細胞に抗原提示を行い、抗原特異的なTh2細胞が分化形成される。Th2細胞はIL-4と呼ばれるサイトカインを産生し、これによってB細胞から抗原特異的なIgE抗体が産生される。その後、IgE抗体は肥満細胞表面のレセプターに接着し、続いて、肥満細胞上のIgE抗体に抗原が接着すると、肥満細胞内から炎症性のヒスタミン、ロイコトリエンなどのメディエーターが放出される。これらのメディエーターは炎症反応を引き起こし、アレルギーが発症する。

T細胞は、その産生するサイトカインにより2つのサブセット、Th1とTh2にわけられ、Th1細胞群は主にIFN- $\gamma$ など細胞性免疫に関わるものを、またTh2細胞群は主にIL-4など液性免疫に関与するサイトカインを産生する<sup>31,32)</sup>。Th1細胞の産生するIFN- $\gamma$ はTh2細胞のIL-4の働きを負に制御し、Th2細胞の産生するIL-4はTh1細胞のIFN- $\gamma$ の働きを負に制御する。このような相互作用により生体内のTh1とTh2のバランスは保たれているが、アレルギー疾患ではサイトカインバランスがTh2に傾くことで、Th2型サイトカインが増加しIgEの産生量が増えている状態となる。それゆえ、アレルギーになりにくくする、あるいは、アレルギーを軽度にするためには、Th1型免疫反応を活性化してTh1/Th2サイトカイ

ンバランスを正常に戻すことが重要と考えられ、このような体質改善機能を有する食品成分や乳酸菌などの探索研究が多くの研究機関で精力的に進められている<sup>33,34)</sup>。

そこで我々は、SPSが抗原提示や異物に対する貪食作用を示すマクロファージの活性、およびTh1/Th2サイトカインバランスに及ぼす影響を*in vitro*や*in vivo*の試験系で評価した<sup>16,17)</sup>。ここでは*in vitro*の結果は割愛するが、マウスに一日あたり3.0 mgのSPSを14日間経口投与することにより、腹腔内マクロファージのグルコース消費活性が有意に上昇していた。また、マウスに一日あたり3.0 mgのSPSを14日間経口投与することにより、脾細胞におけるIL-4産生が有意に抑えられるとともに、IFN- $\gamma$ 産生が有意に促進されていた。その結果、Th1/Th2バランス(IFN- $\gamma$ /IL-4)は有意にTh1側にシフトしていた。

以上の結果から、SPSはTh1/Th2バランスの改善やマクロファージの活性化により、I型アレルギーの発症に関わるIgE抗体量を減少させてアレルギー体質を改善する効果が期待できる。

**2-3. SPSによるアレルギー症状の低減効果** 国民の約3人に1人が何らかのアレルギー症状を発症しているといわれている。潜在的にアレルギー体質をもち、これから発症する可能性のある人も多数存在するといわれており、アレルギーは国民病として社会問題に発展している。アレルギーは発症機構により、即時型アレルギー(I型)から遅延型アレルギー(IV型)まで分類されているが、花粉症に代表されるI型アレルギーの症例数が急増している。I型アレルギーは、遺伝的要因に加え、環境因子、生活習慣の変化、あるいは精神的ストレスが発症の引き金になるといわれており、典型的な現代病の一つに分類されている。一般にアレルギーの治療は長期にわたることが多いことから、副作用の心配がなく日常摂取する安全な食品成分の中に、アレルギー症状を低減する素材を見いだそうとする研究が多く行われている。

これまでの研究で、醤油に含まれるSPSの抗アレルギー作用<sup>15)</sup>やTh1/Th2バランス改善効果(体質改善効果)<sup>16,17)</sup>について*in vitro*や*in vivo*の試験系でその有効性を確認することができた。そこで実際に、通年性アレルギー<sup>18)</sup>、およびスギ花粉症<sup>19)</sup>の患者を被験者とした臨床試験で、SPSの抗アレルギー効果を評価した。二重盲検法による臨床試験では、SPS群とプラセボ(偽薬)群について、アレルギー症状の改善効果をスコア化により客観的に評価した。

**2-3-1. 通年性アレルギー** 通年性アレルギー患者(イヌ皮膚、ネコ皮膚、ヤケヒョウダニ、ハウスダストなど)を被験者とした二重盲検法による臨床試験(n=21)を4週間実施した<sup>18)</sup>。SPS群(n=11)、プラセボ群(n=10)

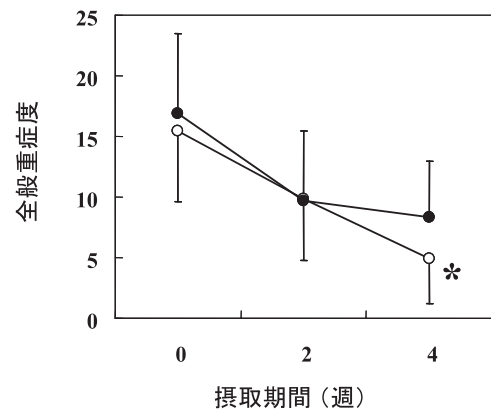


図4. 通年性アレルギーに対するSPSのアレルギー症状改善効果。8項目のアレルギー所見のスコア合計値を全般重症度と定義した。SPS群(n=11)、プラセボ群(n=10)を二群とする二重盲検比較試験を4週間実施した(SPS摂取量は600 mg/日に設定)。Mann-Whitney U-testによる有意差検定を行い、プラセボ群に対し有意差があることを示す(\* $p<0.05$ )。○、SPS群；●、プラセボ群。

とし、SPSの摂取量は、一日あたり600 mgに設定した。「くしゃみ、鼻水、鼻づまり、喉の痛み、目のかゆみ、頭痛、皮膚のかゆみ、日常生活の支障」の8項目についてアレルギー所見の合計点数を求め、アレルギーの全般重症度とした(図4)。プラセボ群では0週から2週までの改善効果のみ認められたが、SPS群では2週、4週と順調にアレルギー症状の改善効果が観察された。摂取4週間後には、SPS群とプラセボ群では全般重症度に有意差があり、プラセボ群と比較して、SPS群では有意なアレルギー症状の改善効果があったと結論できた<sup>18)</sup>。

**2-3-2. スギ花粉症** スギ花粉症患者を被験者とした二重盲検法による臨床試験(n=51)を8週間実施した<sup>19)</sup>。SPS群(n=25)、プラセボ群(n=26)とし、SPSの摂取量は、通年性アレルギーの場合と同様に一日あたり600 mgに設定した。「くしゃみ、鼻水、鼻づまり、目のかゆみ、涙、日常生活の支障」の6項目についてアレルギー所見の合計点数を求め、アレルギーの全般重症度とした(図5)。プラセボ群と比較して、SPSを継続摂取することで4週間後(スギ花粉の飛散開始から1週間後)には、アレルギー症状の改善効果に有意差がみられ、その効果は試験終了(8週)まで持続した<sup>19)</sup>。

以上、二度にわたる臨床試験において、一日あたり600 mgのSPSを継続摂取することで、「くしゃみ、鼻水、鼻づまり」などのアレルギー症状を有意に低減することが確認できた。通年性アレルギーではアレルギー発症後におけるSPSのセラピー効果<sup>18)</sup>として、スギ花粉症ではスギ花粉(抗原)の飛散前、すなわち、アレルギー発症前におけるSPSの予防効果<sup>19)</sup>として、いずれの場合にもSPS摂取によるアレルギー症状の抑制効果がみられた。

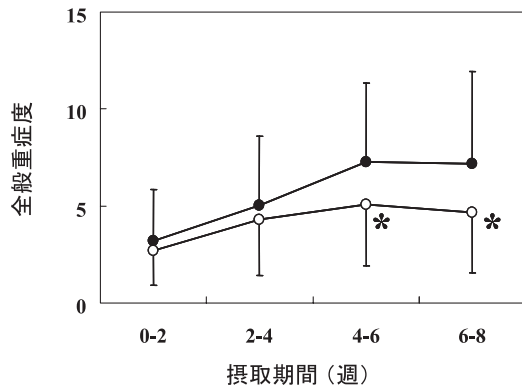


図5. スギ花粉症に対するSPSのアレルギー症状改善効果. 6項目のアレルギー所見のスコア合計値を全般重症度と定義した. 全般重症度は2週間ごとの平均値で示す. SPS群 (n=25), プラセボ群 (n=26) を二群とする二重盲検比較試験を8週間実施した (SPS摂取量は600 mg/日に設定). スギ花粉は摂取3週後に飛散を開始した. Mann-Whitney U-test による有意差検定を行い, プラセボ群に対し有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ ). ○, SPS群; ●, プラセボ群.

さらに, SPSは眠くなるなどの副作用もなく, 血液検査, 尿検査, および医師の診察からも身体の異常はまったく観察されなかったことから, 醤油に含まれる抗アレルギー成分であるSPSの安全性は非常に高いといえる. なお当社では, 2005年に花粉症対策のSPSサプリメントを開発している<sup>35)</sup>.

### 3. SPSの鉄吸収促進効果

平成16年国民健康・栄養調査結果によれば<sup>36)</sup>, 鉄分の摂取不足が指摘されている. 特に女性では一日あたり約3 mgの鉄が不足しており, 通常の食品 (食事) を通じて自然に鉄分を摂取することが困難な状況にあるといえる. また, 成人女性の約10%は鉄欠乏性貧血であり, 約40%は鉄欠乏状態 (貧血予備軍) であるといわれている.

食物中の鉄のほとんどは不溶性であるが, 胃液が分泌される胃内では酸性条件下のため鉄は可溶化状態となる. その後, 膵臓から分泌される重炭酸イオンの影響で中性条件下にある十二指腸と空腸上部で鉄イオンは吸収されるが, 吸収可能な鉄は中性条件下において可溶化状態でなければならない<sup>37)</sup>. 最近では, pH中性域での鉄の可溶化状態を高め, かつ安定化させる食品素材の研究も精力的に進められており, 例えば, ラクトフェリンの鉄可溶化能 (キレート力) は, CPP (カゼイン由来のリン酸化ペプチド) よりも10倍高いことが明らかにされている<sup>38)</sup>.

**3-1. 鉄分と醤油の関係** 1976年から1995年にかけて国立健康・栄養研究所が栄養素寄与情報を調査し, 健康栄養情報基盤データベースとして構築している<sup>36)</sup>. 驚くべきことに, 70年代では醤油は卵に次いで鉄の栄養素

寄与が高く, 80年代以降でも醤油は米, 卵, ほうれん草などに次いで鉄の栄養素寄与が高いことが明らかとなった. この事実はあまり知られていないことであろう. さらに1990年には, Baynesらの研究により「醤油は鉄分の吸収を促進する効果がある」ことが臨床試験で明らかにされている<sup>39)</sup>. しかしながら, 醤油中のどのような成分が鉄分吸収を促進するのかは不明であった. このように栄養学的見地からみると, 醤油は鉄と深い関係があるといえるが, その後, 研究が進められることもなく現在に至っていた.

現在, 世界各国では鉄欠乏を改善するためにさまざまな鉄強化食品が開発されており, 特に醤油圏である中国, ベトナム, タイなどの東南アジア地域では, 鉄欠乏症の対策の一つとしてWHO (世界保健機関) により, 鉄化合物を添加した醤油 (魚醤を含む) を学校給食などに積極的に使用することが推進されている<sup>40,41)</sup>. その他の地域では, 小麦粉, 砂糖, 食塩, パン, 米, シリアルなどに鉄強化されている場合もあり, その選択性はそれぞれの国民の食生活に依存しているといえる. しかしながら, 特に液体である醤油の場合には, 一般的な鉄の強化剤である硫酸鉄やフマル酸鉄などでは長期保存中での溶解性や安定性の低下に加えて, 味や臭いなどが官能的に問題となることがあり, 日本では使用が認められていないEDTAの鉄錯体化合物 (EDTA鉄) が, その高い溶解性と安定性のために食品強化政策下での使用が承認され, アジア各国で醤油に添加されているのが現状である<sup>40,41)</sup>. このように, 醤油は毎日の食事に必ず使用する調味料といっても過言ではなく, 鉄剤を強化した醤油は, いわばサプリメント的な要素をもった「サプリ醤油」といえるが, EDTA鉄以外の適当な強化方法がないことが大きな問題であった.

**3-2. SPSの鉄吸収促進効果** 前述の通り, 食物中の鉄分は胃 (pH2) において溶存状態となった後, 小腸上部 (pH7) で吸収されるが, 中性条件下では3価鉄は沈殿を生じるため, 鉄吸収には中性条件下において安定化されること, すなわち, 沈殿せずに可溶化されていることが重要であるといえる. そこで我々は, 各pHにおけるSPSの鉄キレート能を平衡透析法により測定した<sup>42,43)</sup>. pH2では鉄剤単独でも安定して溶解していたが, pH5~7では鉄剤単独では沈殿が生じ, SPSと鉄剤を共存させることにより鉄キレート体を形成させて沈殿を防ぐことができた. 体内での鉄吸収を考えてみると, 鉄とSPSを共存させることで鉄の溶存状態が維持されて, pHが中性域でも鉄の吸収が促進されることが予想された.

続いて, 貧血ラットを用いた動物実験によりSPSの鉄吸収促進効果を検討した<sup>42,43)</sup>. 鉄欠乏食を投与すること

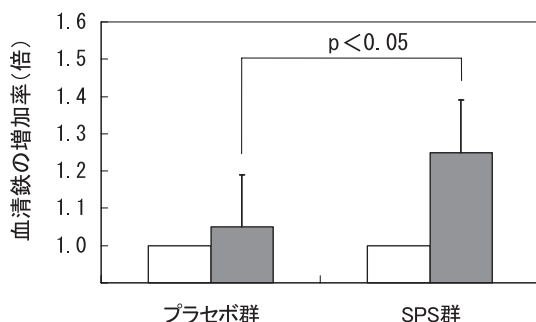


図6. SPSによる鉄吸収促進効果。健康な女性被験者を対象として、SPS群 (n=22)、プラセボ群 (n=23) を二群とする二重盲検比較試験を4週間実施した (SPS摂取量は600 mg/日に設定)。Student's t-testによる有意差検定を行い、プラセボ群に対し有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。□, 0週目; ■, 4週目。

により貧血状態が誘導できる。この貧血ラットに標準食に含まれる濃度の鉄剤、あるいは鉄剤とSPSを共に投与して、貧血状態からの回復を調べた。鉄剤単独の投与に比べて、SPSと鉄剤を共に投与した場合は、貯蔵鉄である肝臓や脾臓中の鉄量が有意に高かった。一方、糞中に排泄される鉄量は、鉄剤単独の投与に比べてSPSと鉄剤を共に投与した場合において有意に低かった。以上の結果から、貧血回復期におけるSPSの鉄吸収促進効果が確認できた。

最終的に、我々は臨床試験によりSPSの鉄吸収促進効果を実証した<sup>42,43</sup>。健康な女性被験者を対象として、SPSの単独摂取により日常の食生活からの鉄吸収が促進されるかを検証するため、SPS群 (n=22)、プラセボ群 (n=23) を二群とする二重盲検法による臨床試験を実施した (SPS摂取量は600 mg/日に設定)。血液成分について統計解析を行ったところ、血清鉄をみると、摂取4週間後の群間比較ではSPS群の血清鉄はプラセボ群より有意に増加していた (図6)。また、群内比較では摂取前に比べて、SPS群の血清鉄は経時的に有意に増加していたが、プラセボ群には変化は見られなかった。健康な女性被験者を対象とした臨床試験の結果から、SPSの摂取により日常の食生活からの鉄吸収が促進される可能性を示している。この試験では特に食事制限を行っておらず、被験者は通常の食品に含まれる鉄分を摂取していたと推定でき、SPSのキレート作用や貧血ラットでの結果がSPSの鉄分吸収促進作用を裏付けていると考えている。なお当社では、2006年に鉄分吸収をサポートするSPS醤油 (機能性醤油) を開発している<sup>35</sup>。

#### おわりに

誌面の都合上、醤油中に含まれる新規ペプチドであるピログルタミルペプチド (pGluペプチド) の機能性<sup>44-46</sup>については割愛したが、pGluペプチドには呈味増強効果

や褐変抑制効果があり、だし味を生かし料理素材の色を鮮やかに仕上げる淡口醤油の持ち味をより一層高めることに寄与するものと考えられる。

醤油は日本古来の伝統ある発酵調味料であり、その安全性の高さは食の歴史により証明されている。我々の研究により、原料由来のアレルゲンが醸造過程で消去されることが示され、その安全性はさらに高まったといえる。それに加えて、醤油には抗アレルギーや鉄分吸収促進に有効な機能性成分SPSが相当量存在している。醤油の新しい機能性の発見が、醤油を基本とした日本食の復権だけでなく健全な食生活に結びつけば幸いである。

これまでは単に醤油中に存在するだけの多糖類として認識されていたSPSが、十分実用的かつ魅力的な醤油由来の機能性成分であることが次第に明らかになってきた。SPSの機能性研究は、醤油の付加価値付けのみならず、醤油を原料とする新しい機能性成分として広く食品素材として展開できる可能性がある。今後は、より経済的なSPSの大量生産技術を確立するとともに、SPSの機能性に関するエビデンスを強化する必要がある。醤油と健康の「おいしい関係」をますます進展させて、多くの消費者の健康や快適な生活に貢献できる食品素材としてSPSを発展させていきたいと考えている。

本研究は、以下に示す多くの共同研究者の方々を進めてまいりました。この場を借りて深く感謝申し上げます。アレルゲン分解に関する研究では、当社研究所の橋本裕一郎主任、吉田多恵子研究員、広島大学大学院生物圏科学研究科の田辺創一准教授、関西医科大学小児科の谷内昇一郎教授、日本ハム (株) 中央研究所の宮澤いづみ博士、高畑能久博士、森松文毅博士。SPSの機能性に関する研究では、当社研究所の松下裕昭主任、真岸範浩主任、永谷裕子主任、徳力望副課長、橋本忠明主任研究員、中田佳幸課長、築山良一副所長、兵庫県立工業技術センターの吉田和利主任研究員、京都大学大学院生命科学科学研究科の山本憲二教授、兵庫県立大学環境人間学部の辻啓介教授 (現 畿央大学教授)、今井宏美さん、鈴木誠博士、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科の笠井尚哉教授。pGluペプチドの機能性に関する研究では、当社研究所の岡田崇主任、桂晴美副課長、三木雅也副課長。

また、異業種にもかかわらず、本賞の受賞に際しまして学会への推薦をしていただきました白鶴酒造 (株) の花本秀生常務取締役生産本部長に厚く御礼申し上げます。そして、本研究を遂行するにあたり多大なご協力とご支援をいただきました当社の牛尾公平専務取締役研究所長をはじめとする関係各位の皆様方に心から御礼申し上げます。さらに、本研究の成果を発表する機会を与えていただきました日本生物工学会スローフード微生物工学研究部会の関係各位の皆様方に御礼申し上げます。

最後になりましたが、研究への道にお導きいただいた恩師である広島大学大学院工学研究科 (現 先端物質科学研究科) の永井史郎名誉教授、西尾尚道教授、柿菌俊英准教授に深く感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は、以下に示す農林水産省の研究補助事業として実施したものである（平成14年度新事業創出等食品産業技術開発事業、平成17年度民間結集型アグリビジネス創出技術開発事業、平成18-19年度産学官連携による食料産業等活性化のための新技術開発事業）。

日本生物工学会スローフード微生物工学研究部会では活動の一環として、清酒、焼酎、醤油、味噌、食酢、納豆など日本を代表する発酵・醸造食品の機能性をまとめた成書「醸造物の機能性」<sup>47)</sup>を刊行している。この機会にご一読いただければ幸いです。

## 文 献

- 1) 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一: 醸協, **100**, 96-101 (2005).
- 2) しょうゆ情報センター: しょうゆを科学する (2004).
- 3) 古林万木夫, 田辺創一, 谷内昇一郎: 日本小児アレルギー学会誌, **21**, 96-101 (2007).
- 4) 田辺創一, 渡辺 純, 園山 慶, 渡辺道子: 化学と生物, **39**, 440-447 (2001).
- 5) 田辺創一: 日調科誌, **34**, 418-423 (2001).
- 6) 田辺創一, 西村敏英, 中村 洋, 山本明美, 谷内昇一郎: 食品工業, **45**(14), 42-48 (2002).
- 7) Ogawa, T., Samoto, M., and Takahashi, K.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **46**, 271-279 (2000).
- 8) 小川 正: 食品工業, **45**(14), 32-41 (2002).
- 9) Kobayashi, M., Hashimoto, Y., Taniuchi, S., and Tanabe, S.: *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 821-827 (2004).
- 10) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一: 醤研, **30**, 213-218 (2004).
- 11) 吉田多恵子, 橋本裕一郎, 古林万木夫, 高畑能久, 森松文毅, 谷内昇一郎: 醤研, **30**, 219-224 (2004).
- 12) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 宮澤いづみ, 高畑能久, 田辺創一, 谷内昇一郎: 醤研, **31**, 217-222 (2005).
- 13) 橋本裕一郎, 吉田多恵子, 古林万木夫, 宮澤いづみ, 高畑能久, 森松文毅, 田辺創一, 谷内昇一郎: 醤研, **31**, 347-351 (2005).
- 14) 菊地忠昭: 醤研, **5**, 71-77 (1979).
- 15) Kobayashi, M., Matsushita, H., Yoshida, K., Tsukiyama, R., Sugimura, T., and Yamamoto, K.: *Int. J. Mol. Med.*, **14**, 879-884 (2004).
- 16) Matsushita, H., Kobayashi, M., Tsukiyama, R., and Yamamoto, K.: *Int. J. Mol. Med.*, **17**, 905-909 (2006).
- 17) 松下裕昭, 古林万木夫, 築山良一, 山本憲二: 醤研, **33**, 101-106 (2007).
- 18) Kobayashi, M., Matsushita, H., Shioya, I., Nagai, M., Tsukiyama, R., Saito, M., Sugita, T., Sugimura, T., and Yamamoto, K.: *Int. J. Mol. Med.*, **14**, 885-889 (2004).
- 19) Kobayashi, M., Matsushita, H., Tsukiyama, R., Saito, M., and Sugita, T.: *Int. J. Mol. Med.*, **15**, 463-467 (2005).
- 20) 古林万木夫: 食品工業, **48**(23), 50-54 (2005).
- 21) 古林万木夫: 化学と生物, **43**, 561-563 (2005).
- 22) Kobayashi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 144-151 (2005).
- 23) 古林万木夫: 日本食生活学会誌, **17**, 304-309 (2007).
- 24) Maeda, Y., Yamamoto, M., Masui, T., Sugiyama, K., Yokota, M., Okada, N., Sugiyama, K., Katayama, H., and Nakagomi, K.: *Eisei Kagaku*, **37**, 205-210 (1991).
- 25) Sawabe, Y., Nakagomi, K., Iwagami, S., Suzuki, S., and Nakazawa, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1137**, 274-278 (1992).
- 26) Kakegawa, H., Matsumoto, H., and Satoh, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1439-1442 (1992).
- 27) Asada, M., Sugie, M., Inoue, M., Nakagomi, K., Hongo, S., Murata, K., Irie, S., Takeuchi, T., Tomizuka, N., and Oka, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1030-1032 (1997).
- 28) Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., and Sakurai, H.: *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 1051-1056 (1998).
- 29) Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Higa, S., Wang, W., Suemura, M., Kishimoto, T., and Tanaka, T.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 159-166 (2000).
- 30) Kim, C. D., Lee, W.-K., No, K.-O., Park, S.-K., Lee, M.-H., Lim, S. R., and Roh, S.-S.: *Int. Immunopharmacol.*, **3**, 129-136 (2003).
- 31) Mosmann, T. R. and Coffman, R. L.: *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 145-173 (1989).
- 32) Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A.: *Nature*, **383**, 787-793 (1996).
- 33) Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., and Kaminogawa, S.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **115**, 278-287 (1998).
- 34) Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **135**, 205-215 (2004).
- 35) <http://www.higashimaru.co.jp/>
- 36) <http://www.nih.go.jp/eiken/>
- 37) 榎本秀一: 日添協会報, **23**(7), 17-24 (2004).
- 38) 川上 浩: 日食科工誌, **51**, 641-644 (2004).
- 39) Baynes, R. D., Macfarlane, B. J., Bothwell, T. H., Siegenberg, D., Bezwoda, W. R., Schmidt, U., Lamparelli, R. D., Mayet, F., and MacPhail, A. P.: *Eur. J. Clin. Nutr.*, **44**, 419-424 (1990).
- 40) 相川律子, 神馬征峰: 国際協力研究, **19**(1), 39-48 (2003).
- 41) 五十嵐香織, 中村寛子, 中西由季子, 中台忠信, 岡安誠, 蛭沼利江子, 榎本秀一, 木村修一: 日栄食誌, **57**, 89-97 (2004).
- 42) Kobayashi, M., Nagatani, Y., Magishi, N., Tokuriki, N., Nakata, Y., Tsukiyama, R., Imai, H., Suzuki, M., Saito, M., and Tsuji, K.: *Int. J. Mol. Med.*, **18**, 1159-1163 (2006).
- 43) 古林万木夫, 真岸範浩: 食品工業, **50**(16), 68-73 (2007).
- 44) 岡田 崇, 桂 晴美, 古林万木夫: 生物工学, **82**, 514-518 (2004).
- 45) 桂 晴美, 岡田 崇, 三木雅也, 古林万木夫: 生物工学, **83**, 2-6 (2005).
- 46) 岡田 崇, 桂 晴美, 古林万木夫: 醸協, **100**, 478-483 (2005).
- 47) 北本勝ひこ編著: 醸造物の機能性, 日本生物工学会スローフード微生物工学研究部会・日本醸造協会, 東京 (2007).