

酒粕を混合した味噌風調味料のアポトーシス誘導能

鳥居貴佳^{*1}、近藤徹弥^{*1}、森川 豊^{*1}

Apoptosis-inducing Activity of Miso-like Seasoning Prepared with Sake Cake

Takayoshi TORII^{*1}, Tetsuya KONDO^{*1} and Yutaka MORIKAWA^{*1}

Food Research Center,AITEC^{*1}

酒粕、大豆麹、食塩、種水を混合し、熟成して味噌風調味料(酒粕添加率 40%および 80%)を調製した。味噌風調味料の 60%エタノール抽出物を RPMI-1640 培地に添加して HL-60 細胞を培養すると、経時的に生細胞率が低下した。生細胞率が最も低下した試料(酒粕添加率 80%)について顕微鏡観察を行ったところ、アポトーシス小体と考えられる細胞の断片化が生じ、さらに DNA のヌクレオソーム単位の分解が電気泳動により検出された。以上のことから試作した味噌風調味料にはアポトーシスを誘導する物質が存在すると考えられた。

1. はじめに

近年、健康長寿に対する意識の高まりから健康効果に関する研究が多く行われている。清酒や酒粕には血圧低下作用¹⁾、コレステロール低下作用²⁾、糖尿病予防作用³⁾などの効果が見出され、我々も酒粕抽出物が HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導することを確認した⁴⁾。しかし、酒粕の用途は限定されることが多く、食品として利用されることは少ない。我々は酒粕を用いた調味料の開発を行い、機能性の有効活用と用途拡大を目指し、酒粕を添加した味噌風調味料を試作した。本研究では試作品のアポトーシス誘導作用について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 酒粕を添加した味噌風調味料の調製

愛知県内の豆味噌製造業者および清酒製造業者より提供を受けた大豆麹、酒粕を用い、目標塩分 10.5%、目標水分 48%となるように食塩と種水を混合した。ナイロン製袋に密封後、室温(5~35℃)で 8ヶ月熟成させて味噌風味調味料の試作品を調製した。大豆麹に対する酒粕の添加率は 40、80%とし、対照として酒粕無添加品を調製した。

2.2 色度の測定

測色計(ND-Σ80型、日本電色工業㈱製)により測定し、L^{*}、a^{*}、b^{*}値として表した。

2.3 エタノール抽出物の調製

味噌風調味料 100g を蒸留水 500mL にけん濁させ、上澄み液をガラスカラム管に詰めた合成吸着剤ダイヤイ

オン HP 20(三菱化学(株)製)に吸着させた。素通りした画分を回収後、カラムを蒸留水で洗浄し、20、40、60%エタノールで段階的に吸着物を溶出させた。それぞれの画分をエバポレーターで濃縮した後、凍結乾燥を行い細胞培養時に添加する試料として用いた。

2.4 供試細胞及び培養条件

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60(JCRB0085)はヒューマンサイエンス研究資源バンクより提供を受けた。10%ウシ胎児血清、硫酸ストレプトマイシン、ペニシリン G を含む RPMI-1640 培地(Sigma 製)を用いて、37℃、95% Air-5% CO₂ の条件で培養した。

2.5 HL-60 細胞数の測定

エタノール抽出物が細胞の増殖に及ぼす影響を調べるために、トリパンブルー色素排除試験法を用いて HL-60 細胞数を計測した。血球計算盤を用いて全細胞数と生細胞率(全細胞数に対して色素染色されなかった細胞の割合)を計測した。

2.6 アポトーシスの検出

アポトーシスに伴うクロマチン DNA のオリゴヌクレオソーム単位の切断物(断片化 DNA)を検出するため、HL-60 細胞から DNA を抽出し、アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

3. 実験結果

3.1 酒粕を添加した味噌風調味料の色調

味噌風調味料の色調は酒粕添加率が高くなるにつれ、L^{*}、a^{*}、b^{*}値が大きくなった(表 1)。また、酒粕を添

^{*1}食品工業技術センター 応用技術室

加した試料には酒粕独特の香りが認められた。

表1 酒粕を添加した味噌風調味料の色調

	酒粕添加率		
	無添加	40%	80%
L*	6.23	8.30	16.55
a*	3.31	5.44	12.52
b*	5.33	7.72	18.38

3.2 酒粕の添加による HL-60 細胞の生細胞率の変化

酒粕の添加率が 0 (無添加)、40、80%の味噌風調味料の 60%エタノール抽出物をそれぞれ 2mg/mL の濃度になるように RPMI-1640 培地に添加し、HL-60 細胞の生細胞率の変化を調べた (図 2)。酒粕を添加した試験区では無添加の試験区より生細胞率が低くなる傾向が見られた。また、酒粕の添加濃度が高く、培養時間が長いほど若干生細胞率は低くなった。

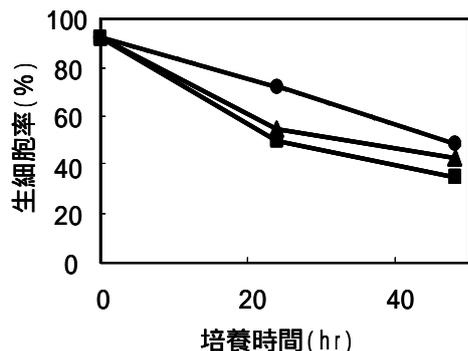


図2 エタノール抽出物添加による HL-60 細胞の生細胞率の経時変化
 , 酒粕無添加 ; , 酒粕 40% ; , 酒粕 80% .

3.3 エタノール抽出物の添加濃度による HL-60 細胞の生細胞率の変化

酒粕添加率 80%の味噌風調味料の 60%エタノール抽出物の添加濃度が生細胞率に及ぼす影響を調べた (図 3)。生細胞率は 1mg/mL の添加試験区で約 80%であったが、2 mg/mL の添加試験区で約 40%と著しく低下したことから、味噌風調味料には HL-60 細胞の生育を阻害する物質が含まれていると考えられた。また、細胞形態観察を行ったところ、2 mg/mL の添加試験区でアポトーシス小体と考えられる細胞の断片化が生じていた。

3.4 アポトーシス誘導作用の検出

酒粕添加率 80%の味噌風調味料の 60%エタノール抽出物を添加して培養した HL-60 細胞から DNA を抽出し、

アガロースゲル電気泳動を行った結果、ヌクレオソーム単位に断片化した DNA が検出された (図 4)。このことからエタノール抽出物によって HL-60 細胞に対してアポトーシスが誘導されていると考えられた。

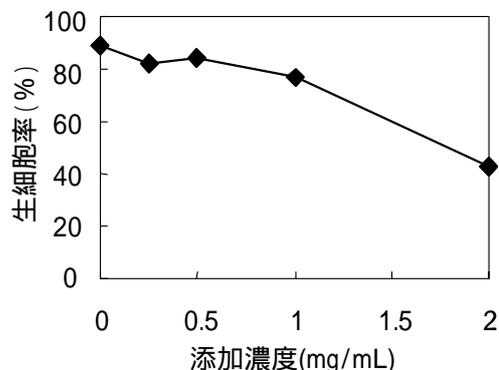


図3 生細胞率に及ぼす添加濃度の影響



図4 断片化 DNA の検出

M, 分子量マーカー; 1, 培養 48 時間; 2, 培養 24 時間.

4. 結び

酒粕を使用して味噌風調味料を調製した。そのエタノール抽出物を HL-60 細胞に添加したところ、アポトーシス小体が観察され、さらにアガロースゲル電気泳動を行った結果、断片化した DNA が検出された。これらのことからエタノール抽出物には HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導する物質が存在すると考えられた。今後の課題として、経口摂取した時の機能維持の可能性などについて検討する必要があると考えられた。

文献

- 1) 今安聡ほか：日本醸造協会誌，94，201 (1999)
- 2) 芦田優子ほか：日本農芸化学会誌，71，137 (1999)
- 3) 谷久典ほか：日本栄養・食糧学会総会講演要旨集 52，248 (1998)
- 4) 鳥居貴佳ほか：愛知県産業技術研究所研究報告，4，146 (2005)