味噌粕抽出物の *in vitro* における生体防御担当細胞に対する作用

有福一郎*・垣内利仁**・小堀真珠子***・篠原和毅***

Effect of Extracts of Miso Dregs on Several Cultured Biophylactic Cell Lines

Ichiro ARIFUKU*, Toshihito KAKIUCHI**, Masuko KOBORI***
and Kazuki SHINOHARA***

* Food Industrial Research Institute, Tottori Prefecture, Sakaiminato, Tottori 684

** Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., 5-2-3 Tokodai, Tsukuba, Ibaraki 300-26

*** National Food Research Institute, The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305

To study physiological functions of miso at cellular level, the effects of extracts of some miso dregs on the cultured biophylactic cell lines such as monocytic (U-937), macrophage-like (U-M), hybridoma (HB4C5) and T Cell-derived (MOLT-3) cell lines were examined. The dialyzates of 0.1 N NaOH extract of barley and rice miso dregs enhanced the nitroblue tetrazolium (NBT) reducing activity of U-937 monocyte and U-M macrophage-like cell lines. The dialyzates of 0.1 N NaOH extract of barley miso dregs enhanced the IgM production of human-human hybridoma cell line, HB4C5. It was also found that the dialyzates of 0.1 N NaOH extract of rice miso dregs activated the T-cell-derived Molt-3 cell line.

(Received Jun. 10, 1992)

近年、食品のもつ体調節機能が注目され、多くの食品から生理的機能成分が明らかにされてきている。日常的に摂取する食品の生理的機能として注目されるものの一つが生体防御能の賦活化作用である。生体中には、生体が異物と認識するがん細胞のようなものを排除する種々の生体防御系が存在している。これら生体防御機能の一翼を担当している細胞群がマクロファージや T 細胞や B 細胞等のリンパ球であり、これら細胞群が相互に作用しあって、生体防御機能を構成している。われわれは先に、種々の野菜抽出物の生体防御機能をヒト由来のマクロファージ様細胞や B リンパ球の性質を持つヒト型ハイブリドーマ細胞などの培養細胞を用いて調べ、

ホウレンソウやブロッコリーなどの野菜中にマクロファージ様細胞を活性化する成分やハイブリドーマ細胞による抗体分泌を促進する成分が存在していることを認めた¹⁾²⁾。これらの結果は野菜が生体防御系を活性化する可能性のあることを示唆するものである。一方、わが国の伝統食品の一つである味噌の生理的機能については、味噌の不溶性残渣のアルカリ抽出物の非透析性可溶部に Sarcoma 180 に対する抗腫瘍活性があること³⁾、ラットの食餌に味噌を添加すると血清コレステロール濃度が低下すること⁴⁾⁵⁾、および味噌の脂溶性区分のリノレン酸エチルエステルが TrpP-1 やベンズピレンに対して抗変異原性を有すること⁶⁾⁷⁾、などが報告されているが、

* 鳥取県食品加工研究所 (〒684 鳥取県境港市中野町 2032-1)

** 藤沢薬品工業株式会社 (〒300-26 茨城県つくば市東光台 5-2-3)

*** 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

生体防御能賦活化作用についての報告は見られない。

そこで、本研究においては、味噌の生体防御能賦活化作用を明らかにする目的で、市販の米、麦および大豆味噌の不溶性残渣から種々の抽出物を調製し、それらのヒト由来マクロファージ系およびリンパ球系の培養細胞に対する作用を検討した。

実験方法

1. 味噌残渣抽出物の調製

Fig. 1 に示すように、市販の豆味噌、麦味噌および米味噌 500 g に 2 倍量の超純水を加え攪拌し、5 000 rpm, 30 分遠心分離して上清画分と残渣画分に分けた。残渣に 0.1 N NaOH および 0.1 N HCl を加え、室温で 2 時間放置し、アルカリおよび酸抽出を行った。抽出液を中和、透析後、透析内液および外液を凍結乾燥した。乾燥試料はリン酸緩衝液 (PBS) に溶解した後、0.45 μ m のミリポアフィルターを通し試験に供した。

2. 供試細胞株

供試したヒト由来の細胞株は、ヒト非リンパ性白血病細胞の樹立株で、マクロファージ系の性質を有する単芽

球細胞株、U-937 および U-937 細胞を発ガンプロモーターである TPA によって分化誘導し、樹立したマクロファージ様細胞株 U-M[®], B リンパ球系の細胞として、ヒトの肺がんの特異的なモノクローナル抗体を分泌するヒト-ヒトハイブリドーマ細胞、HB 4 C 5 および急性リンパ性白血病細胞由来の T リンパ系細胞株、MOLT-3 を使用した。これらの細胞は、市販合成培地 eRDF 培地 (極東製薬株式会社製) にインスリン (I: 5 μ g/ml), トランスフェリン (T: 10 μ g/ml), エタノールアミン (E: 5 μ g/ml) および亜セレン酸塩 (S: 4.3 μ g/ml) の混合物を添加した eRDF-ITES あるいは 5~10% 仔牛胎児血清 (FCS) を添加した培地中で、37°C, 5%CO₂, 95%空気 CO₂ インキュベーター内で培養した。以下のアッセイには継代培養後 2~3 日目の細胞を用いて行った。

3. U-937 および U-M 細胞活性化作用の検定

単球やマクロファージ系の細胞は活性化を受けると活性酸素を放出する。このような活性化マクロファージ細胞にニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 試薬を作用させると活性酸素により NBT が還元され、青色色素

Fig. 1 Preparation of extracts of soybean, barley and rice miso dregs

を生成する。そこでこのような活性酸素放出に伴う NBT 還元作用を指標とし、味噌抽出物の U-937 および U-M の細胞活性化作用を検定した。即ち、細胞懸濁液 (1×10^6 個/ml) 1 ml と味噌抽出液あるいは PBS 30 μ l を 15 ml 遠沈管に入れ、1 時間前培養した後、培養上清を捨てる。これに NBT 試薬 (NBT 試薬 10 mg をジメチルスルホキシド (DMSO) 150 μ l に溶解し、5% FCS を含む PBS 溶液で 10 ml にする) 1 ml を加え、2 時間培養した。培養後 1 N HCl を 1 ml 加え反応を停止させ、2000 rpm で 10 分間遠心分離して色素を集めた後、上清を捨て、DMSO 1 ml に溶解し、572 nm の吸光度を測定し、PBS 添加区に対する百分率を求めた。

4. 抗体分泌促進作用の検定

HB 4 C 5 における抗体分泌促進作用はペルオキシダーゼ標識抗体を用いた ELISA 法によって検定した。即ち、細胞懸濁液 (1×10^5 個/ml) 1 ml および味噌抽出液または PBS 30 μ l を 24 穴プレートに加え、4 時間培養した後、培養上清および IgM 標準溶液 50 μ l を抗ヒト κ 鎖、 λ 鎖抗体を固定した 96 穴イムノプレートに加え、4℃ で一晩放置し結合させた。0.05% Tween 20 含有 PBS 溶液 (TPBS) で洗浄後、TPBS で 2000 倍

に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト抗体溶液 100 μ l を加え、37℃ で 1 時間反応させた。TPBS でプレートを洗浄した後、0.006% H_2O_2 を含む 0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) と 0.4 mg/ml ABTS (2, 2'-アジノービス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム塩溶液) を 1:1 に混合した基質溶液 100 μ l を加え、10 分間反応させた。1.5% 蔞酸溶液 100 μ l を加えて反応を停止した後、415 nm の吸光度を測定し、PBS 添加区に対する百分率を求めた。

5. MOLT-3 細胞増殖の検定

味噌抽出物の MOLT-3 細胞の増殖に対する作用は細胞の生死あるいは増殖の検定に使用されている方法の一つである MTT (臭化 3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾリル)-2, 5-ジフェニル 2 H-テトラゾリウム) 法⁹⁾ によって検定した。この MTT 法は淡黄色の MTT が、生細胞内に取り込まれ、ミトコンドリアの呼吸酵素により暗青色のフォルマザンに変わることを利用したものである。即ち、細胞懸濁液 (3×10^5 個/ml) 1 ml と味噌抽出液あるいは PBS 100 μ l を 24 穴プレートに加え、6 時間培養した後、細胞懸濁液 120 μ l を 96 穴マクロプレートに移し 1 時間前培養した。その後 PBS に溶解した MTT 試薬 (5 mg/ml) 20 μ l を加え、さらに 2 時間培

Table 1 Effect of extracts of soybean, barley and rice miso dregs on the NBT reducing activity of U-937 and U-M cells

Extracts (75 μ g/ml)	NBT reducing activity (E 572 nm)	
	U-937	U-M
PBS	0.274 $\pm$ 0.002 (100%)	0.156 $\pm$ 0.008 (100%)
Soybean miso		
NaOH extract	0.255 $\pm$ 0.015 (93%)	0.172 $\pm$ 0.016 (110%)
HCl extract	0.274 $\pm$ 0.01 (100%)	0.163 $\pm$ 0.009 (105%)
Non-dialyzate	0.267 $\pm$ 0.008 (97%)	0.160 $\pm$ 0.008 (102%)
Barley miso		
NaOH extract	0.270 $\pm$ 0.015 (99%)	0.181 $\pm$ 0.008 (118%)
HCl extract	0.267 $\pm$ 0.006 (98%)	0.166 $\pm$ 0.004 (106%)
Rice miso		
NaOH extract	0.262 $\pm$ 0.016 (96%)	0.190 $\pm$ 0.007 (122%)
HCl extract	0.274 $\pm$ 0.006 (100%)	0.160 $\pm$ 0.009 (102%)

U-937 and U-M cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with 75 μ g/ml extracts of miso dregs at 37°C for 1 h, and the nitroblue tetrazolium reducing activity of the cells was measured.

Percentage in parenthesis indicate the comparison of value at E 572 nm in the control (PBS) with that in each extract.

Each value represents the mean $\pm$ SD (n=3).

養した。細胞表面に形成したフォルマザンを 0.04 N HCl 含有イソプロパノールで溶解し、540 nm の吸光度を測定し、PBS 添加区に対する百分率を求めた。

尚、測定結果については味噌抽出物無添加区と添加区の 2 群について平均値の有意差検定 (t 検定) を行った。

実験結果

1. U-937 および U-M 細胞の NBT 還元能に及ぼす作用

Table 1 に 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各味噌抽出画分を U-934 お

Fig. 2 Effect of different concentrations of extracts of 0.1 N NaOH-extractable dialyzate of barley (A) and rice (B) miso dregs on the NBT reducing activity of U-937 and U-M cells

The experimental conditions were the same as in Table 1.

U937 cells (●), U-M cells (■)

Each point represents the mean $\pm$ SD (n=6).

Significant difference from control (PBS);

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

よび U-M 細胞に 1 時間作用させた後の NBT 還元値を示した。その結果、U-937 細胞に対しては、いずれの味噌抽出物も NBT 還元能を大きく変化させるものはみられなかった。しかし、U-937 細胞より分化が進んだ U-M 細胞に対しては、大豆、麦および米味噌粕を 0.1 N NaOH で抽出して透析して得た非透析性水溶性画分が NBT 還元能を対照区 (PBS 添加) より若干ながら上昇させる傾向がみられた。

そこで、U-M 細胞の NBT 還元能上昇活性が認められた麦および米味噌粕アルカリ抽出物の非透析水溶性画分について、U-937 および U-M 細胞の NBT 還元能に及ぼす濃度効果を調べた結果 (Fig. 2), 麦味噌の場合には、濃度の増加に伴い、U-M 細胞の NBT 還元値が有意 ($p < 0.01$) に上昇することが認められた。U-937 に対しては 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において有意 ($p < 0.05$) に NBT 還元能の上昇がみられた。一方、米味噌の場合には、U-937 細胞の NBT 還元能の有意な上昇作用は認められなかったが、U-M 細胞の場合に 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において有意な ($p < 0.01$) NBT 還元能の上昇が認め

Table 2 Effect of extracts of soybean, barley and rice miso dregs on the IgM secretion of human-human hybridoma cell line, HB 4 C 5

Extracts (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	IgM secretion (%)
PBS	100.0 $\pm$ 3.7
Soybean miso	
0.1 NaOH extract	98.3 $\pm$ 6.7
0.1 N HCl extract	89.7 $\pm$ 5.2**
Non-dialyzate*	106.7 $\pm$ 10.0
Barley miso	
0.1 N NaOH extract	113.3 $\pm$ 6.1**
0.1 N HCl extract	85.0 $\pm$ 9.6**
Rice miso	
0.1 N NaOH extract	90.3 $\pm$ 7.4**
0.1 N HCl extract	101.7 $\pm$ 7.0

HB 4 C 5 cells (1×10^5 cells/ml) were incubated with 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ extracts of miso dregs at 37°C for 4 h, and the amount of IgM in the spent medium was measured by ELISA.

Each value represents the mean $\pm$ SD (n = 12).

* 0.1 N NaOH-extractable non-dialyzate of soybean miso

** Significant difference ($P < 0.01$)

られた。150 $\mu\text{g/ml}$ 以上では還元能が低下する傾向が見られた。

2. HB4C5 細胞による抗体分泌に及ぼす影響

各味噌残渣抽出物 (75 $\mu\text{g/ml}$) の肺がん細胞と特異的に反応する抗体 (IgM) を分泌する HB4C5 ハイブリドーマ細胞の抗体分泌作用に及ぼす影響を Table 2 に示した。抽出物の中では、麦味噌粕の 0.1 N NaOH 抽出物の非透析性水溶性画分のみに HB4C5 細胞による IgM 分泌を有意に ($p < 0.01$) 促進させる作用があることが認められた。その他の抽出画分には抗体産生量を増加させる作用は認められなかった。一方、大豆および麦味噌粕の 0.1 N HCl 抽出物および米味噌粕の 0.1 N NaOH 抽出物は HB4C5 細胞の抗体産生を有意に ($p < 0.00$) 低下させた。

また IgM 分泌促進作用がみられた麦味噌粕アルカリ抽出物の非透析性画分について、濃度を変化させた時の抗体分泌の変化を調べた結果、30, 60 および 75 $\mu\text{g/ml}$ 抽出物添加において有意な ($p < 0.01$) 抗体分泌促進作用が認められた (Fig. 3)。

3. MOLT-3 細胞に対する作用

T リンパ球系細胞, MOLT-3 細胞の増殖に及ぼす米味噌粕アルカリ抽出物の非透析性水溶性画分の影響を MTT 法によって調べた結果を Fig. 4 に示す。米味噌残渣の非透析性画分は 6.25-25.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度領域において MOLT-3 細胞の MTT 還元能を上昇すること

Fig. 3 Effect of different doses of 0.1 N NaOH-extractable dialyzate of barley miso dregs on the IgM secretion of human-human hybridoma cell line, HB4C5

The experimental conditions were the same as in Table 2.

Each point represents the mean $\pm$ SD ($n=8$). Significant difference from control (PBS); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fig. 4 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyl tetrazolium bromide) assay of MOLT-3 cells treated with 0.1 N NaOH-extractable dialyzate of rice miso dregs

MOLT-3 cells (3×10^5 cells/ml) were incubated with various concentrations of 0.1 N NaOH-extractable dialyzate of rice miso dregs at 37°C for 6 h, and the cells were applied to the MTT assay.

Each point represents the mean $\pm$ SD ($n=6$). Significant difference from control (PBS); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

が認められた。この還元能の上昇は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の添加において最高値を示し、対照区の PBS 添加より約 50 % MMT 還元能を上昇させた。

考 察

豆味噌、麦味噌および米味噌残渣 (粕) からアルカリおよび酸抽出物を調製し、生体防御能の性質を有する単芽球/マクロファージ系細胞株 (U-937 および U-M)、抗体分泌ハイブリドーマ細胞株 (HB4C5) および T リンパ球系細胞株 (MOLT-3) に対する活性化作用を検討した。その結果、本研究で用いた細胞系に対しては、その活性化作用は大豆、麦、米などの味噌原料によって異なった。U-937 単芽球および U-M マクロファージ様細胞株に作用させた結果、特に麦および米味噌粕を 0.1 N NaOH で抽出し、透析して得られる非透析性水溶性画分に U-M 細胞の NBT 還元能を高める作用が認められ、これらの画分にマクロファージ活性化成分が存在していることが推定された。また、麦味噌粕アルカリ抽出物の非透析性水溶性画分は抗体分泌能を有するハイブリドーマ細胞株, HB4C5 の IgM 抗体分泌作用を促進することも認められた。さらに米味噌粕アルカリ抽出液が T リンパ球系細胞である MOLT-3 細胞の MTT 還元能を高めることも認められ、この画分に T

リンパ球細胞を活性化成分が存在していることが示唆された。このように、豆、麦および米味噌残渣中に生体防御機能を有するマクロファージやリンパ球を活性化成分が存在していることが推定された。一方、米味噌の不溶性残渣のアルカリ抽出物の非透析性可溶画分がSarcoma 180に対する抗腫瘍性を有することが報告されている³⁾。疫学的研究からも味噌の摂取が胃がん等のがんを予防することも明らかにされている¹⁰⁾。本研究から米味噌不溶性残渣(粕)のアルカリ抽出物の非透析性可溶画分がマクロファージ細胞やTリンパ球を活性化することが示唆されたことから、このような作用が抗腫瘍効果の一要因であることが示唆される。今後、これら味噌抽出物のマクロファージやリンパ球を介した腫瘍細胞壊死効果を検討する必要がある。他方、このようなマクロファージ系細胞やリンパ球系細胞の活性化の他に、大豆および麦味噌粕の酸抽出物および米味噌粕のアルカリ抽出物がHB4C5細胞の抗体産生を有意に低下させることも観察された。この抗体産生抑制は免疫抑制の点から興味深いものであるが、その意義などについてはさらに検討する必要がある。現在、活性本体の分離を進めているが、米味噌アルカリ抽出液中に蛋白性の成分の存在を示唆する結果を得ている。

要 約

豆味噌、麦味噌および米味噌粕残渣からアルカリ(0.1N NaOH)および酸(0.1N HCl)抽出物を調製し、単芽球/マクロファージ様細胞株(U-937およびU-M)に作用させた結果、特に麦および米味噌粕をアルカリ抽出し、透析して得れる非透析性水溶性画分にU-M細胞のニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元能を高める作用が認められた。また、麦味噌粕アルカリ抽出物の非透析性水溶性画分は抗体分泌能を有するハ

イブリドーマ細胞株、HB4C5のIgM抗体分泌作用を促進することおよび米味噌粕アルカリ抽出物の非透析性画分がTリンパ球系細胞株、MOLT-3細胞を活性化することが認められた。

終わりに本研究に対し、ご援助頂いた中央味噌研究所に深謝する。また、本研究の概要は、日本食品工業学会第39回大会(1992, 東京)において報告した。

文 献

- 1) KONG, Z-L., MURAKAMI, H. and SHINOHARA, K.: *Cytotechnology*, **7**, 113 (1991).
- 2) KONG Z-L., FUKUSHIMA, T., TSUTSUMI, M., IINO, K., MURAKAMI, H. and SHINOHARA, K.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**, 79 (1992).
- 3) 海老根英雄: 醸協, **85**, 72 (1990).
- 4) 西郷光彦・中村カオル・滝田聖親・鈴木 郁・和田朋恵: 中央味噌研究所研究報告, **16**, 53 (1988).
- 5) 堀井正治・井出 隆・川島賢二・山本忠志: 日食工誌, **37**, 147 (1990).
- 6) 岡崎 秀・鹿野由美子・阪本康夫・木村修一: 日本栄養食糧学会第37回大会講演要旨集, p. 5, (1983).
- 7) 岡崎 秀・秋葉美智子・木村修一: 昭和59年度日本農芸化学大会講演要旨集, p. 636, (1984).
- 8) KONG, Z-L., MIWA, M., MURAKAMI, H. and SHINOHARA, K.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **26**, 949 (1990).
- 9) KONG, Z-L., TSUSHIDA, T., KUROGI, M., MIWA, M., MURAKAMI, H. and SHINOHARA, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 373 (1990).
- 10) 平山 雄: 予防ガン学 中外製薬株式会社, p. 146 (1984).

(平成4年6月0日受理)