

乳酸菌と酵母による豆乳発酵産物に関する研究

(Studies on soybean milk fermented with lactic acid bacteria and yeast)

新 良一

乳酸菌と酵母による豆乳発酵産物に関する研究

(Studies on soybean milk fermented with lactic acid bacteria and yeast)

新 良一

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教員：藤澤 倫彦)

平成 29 年 3 月

目次

緒論	- - - 1
第 1 章 豆乳発酵産物（SFP）のヒト腸内環境改善作用と 粘膜免疫増強作用	
1-1 序論	- - - 6
1-2 材料と方法	- - - 7
1-3 成績	- - - 9
1-4 考察	- - - 10
1-5 小括	- - - 13
表および図	- - - 14
第 2 章 SFP の大腸がん抑制作用	
2-1 序論	- - - 20
2-2 材料と方法	- - - 20
2-3 成績	- - - 23
2-4 考察	- - - 24
2-5 小括	- - - 26
表および図	- - - 28
第 3 章 SFP の発酵菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> BF-LP284 株 （LP284）の抗腫瘍活性	
3-1 序論	- - - 32

3-2 材料と方法	- - - 33
3-3 成績	- - - 37
3-4 考察	- - - 39
3-5 小括	- - - 43
表および図	- - - 44

第 4 章 SFP-s (SFP soluble fraction) の高血圧改善作用

4-1 序論	- - - 52
4-2 材料と方法	- - - 53
4-3 成績	- - - 55
4-4 考察	- - - 56
4-5 小括	- - - 57
表および図	- - - 58

第 5 章 SFP-s の肝・腎機能障害改善作用

5-1 序論	- - - 62
5-2 材料と方法	- - - 63
5-3 成績	- - - 66
5-4 考察	- - - 68
5-5 小括	- - - 70
表および図	- - - 71

第 6 章 SFP-s の関節炎抑制作用

6-1 序論	- - - 78
--------	----------

6-2 材料と方法	- - - 78
6-3 成績	- - - 82
6-4 考察	- - - 84
6-5 小括	- - - 86
表および図	- - - 87
総括	- - - 94
表および図	- - - 99
謝辞	- - - 100
引用文献	- - - 101

緒論

近年において、健康食品を包括的な医療（1）あるいは科学的事実に基づいた医療（EBM: Evidence Based Medicine）（2, 3）に取り入れることが世界的な動向となっており、これは健康食品が認知あるいは容認されていくためには必要なことである。とりわけ乳酸菌は古くから食品に利用され、その健康効果に関しては多くの研究がなされてきた。1907 年、Metchnikoff はヨーグルト長寿説の中で、ブルガリア地方に長寿者が多い理由をヨーグルト中の乳酸菌であるブルガリア菌（*Lactobacillus bulgaricus*）が腸内に住み着き、これが腸内腐敗菌を駆逐する為と考え酸乳の飲用を推奨した（4）。その後ヨーロッパにおいては乳酸菌やビフィズス菌を用いた発酵乳が広く飲用され、その機能性は腸内有用菌の増加、便通改善、腸内腐敗物質の減少、免疫賦活、感染防御、脂質代謝改善など多岐にわたることが報告されている（5, 6）。日本においては 1900 年代初頭に、発酵乳、乳酸菌飲料、殺菌酸乳、乳酸菌生産物質などが開発・販売されていた（7, 8）。1919 年に三島海雲はモンゴルの発酵乳からヒントを得て殺菌酸乳「カルピス」を販売、1935 年には代田稔がヒトの糞便から分離したカゼイ菌（*L. casei*）を用い、ヒトに保健効果をもたらす乳酸菌飲料「ヤクルト」の販売を始めた。戦後、1950 年には明治乳業からヨーグルトが発売され、その後もビフィズス菌、アシドフィルスグループの乳酸菌を加えたものやケフィールなども販売され、各乳業メーカーは独自の乳酸菌、ビフィズス菌株を用いた製品を研究・開発し、現在では消費者の健康志向と相まって一大ヨーグルト市場を形成するに至った。

一方で、1945 年正垣一義は、培養基に牛乳ではなく植物性たんぱく質（大豆）を用い、複数種の乳酸菌と酵母の共生培養による乳酸菌発酵エキスの研究に着手した（7, 8）。これが「乳酸菌生産物質（乳酸菌の豆乳発酵産物）」の起源であり、現在では健康食品素材としての市場が確立されている。大豆はタンパク質、ペプチド、オリゴ糖をはじめ、リン脂質、イソフラボン、サポニン、ミネラル、ビタミンなど、

人の健康に有益な成分を豊富に含有し (9)、これらの成分が種々の微生物の発酵により組成的、機能的に様々な変化を起こすことが知られている。たとえば、タンパク質は微生物のプロテアーゼやペプチダーゼによって多種多様のペプチドに分解され、免疫賦活、血圧調整などの生理活性作用を示す (10, 11)。またイソフラボンやサポニンの配糖体は細菌性 β -グルコシダーゼによってアグリコンに変換され (12, 13)、これらのアグリコンは配糖体よりも人体への吸収性が高い特徴を有する (14)。大豆を用いた発酵食品は数多く存在するが、とりわけ東アジアの国々に多く、醤油 (乳酸桿菌や酵母) (15) や納豆 (納豆菌) (16)、テンペ (麹菌) (17) などがある。これらの食品のほとんどはカビや酵母や細菌、あるいはこれらの微生物の組み合わせで発酵して製造される。中でも乳酸菌と酵母の組み合わせ (共生) の例は数多く知られており、生態や生育環境が類似しているため相性がよく、共に協力しながら適応・進化してきたといわれている (18, 19)。一般に乳酸菌は栄養要求性が高く、アミノ酸、不飽和脂肪酸、ビタミンなどを要求する。このため、貧栄養環境下でも酵母と共存すれば生育が可能となる場合がある。さらに、乳酸菌はカタラーゼを持っておらず、酸化ストレスに対する感受性が高いが、酵母はカタラーゼを持っている。これは乳酸菌が好氣的な環境で生育するうえで重要な要素となりうる。また乳酸菌は自ら生産した乳酸により死滅する場合があるが、酵母は酸素存在下で乳酸をはじめとする有機酸を資化することができるため、乳酸の作用が緩和される。このように、乳酸菌と酵母は相互に生育のための基質を依存している場合が多く、発酵物の機能性に与える影響は非常に大きいと考えられる。Rekha ら (20) は、*L. acidophilus*、*L. bulgaricus*、*L. casei* といった乳酸菌と *Saccharomyces boulardii* のそれぞれ 1 菌ずつの組み合わせで培養することにより、乳酸菌の持つ β -グルコシダーゼ活性、ならびにイソフラボンアグリコンの生成量が上昇することから、乳酸菌と酵母の混合培養が発酵液の機能性を高めると報告している。このように、乳酸菌と酵母の共生の有用性については明らかとなっているにも関わらず、健康の維

増進を目的とした、いわゆる健康食品としての豆乳発酵製品は少なく、ビフィズス菌（21）あるいは乳酸菌（22）の単菌培養による製品が存在するのみである。本研究に用いた豆乳発酵産物（SFP: Soybean milk-Fermented Product）は、多菌種の乳酸菌と酵母の共生を利用して増殖を促し、両菌による豆乳の機能性の向上を目指した発酵生成物である。過去の研究において、乳酸菌と酵母を混合培養することにより、乳酸菌単独培養時に比較して pH 低下が速やかにもかかわらず乳酸菌、酵母の生菌数が高く維持されることや、乳酸を主とする有機酸生成量が増加する成績を得ている。

近年、腸内細菌叢（腸内フローラ）が宿主と共生しながらエネルギー産生、蠕動運動・消化吸収の促進、胆汁酸やコレステロールの代謝調節、感染防御、免疫賦活、発がん促進・抑制など生体への重要な役割を担っていることが明らかになっている（23）。腸内フローラ研究の進展は高度嫌気性菌の培養技術の確立や、分子生物学、免疫学などの研究の進展によるところが大きく（24）、培養法による個々の細菌種の分離と解析に加え、メタ 16S 解析法（25）、メタゲノム解析法（26）の発展により腸内フローラが肥満や糖尿病、がん、アレルギー、自己免疫疾患、老化など、多くの疾患と深く関わっていることが明らかとなってきた（27-30）。腸内フローラに影響を与える因子は宿主の加齢、ストレス、食事、薬物、病原体など多数あげられる。特に食事の影響が大きく、健康の維持・増進に寄与する食品は機能性食品と呼ばれる。機能性食品は作用機序の観点からプロバイオティクス、プレバイオティクス、バイोजェニクス の3つに分類される（7, 31, 32）。プロバイオティクスは腸内細菌バランスを改善することによって宿主に有益な効果をもたらす細菌群で、主に乳酸菌、ビフィズス菌、酵母などがある。プレバイオティクスは難消化性の食物成分で、大腸の有害菌の増殖を抑制することによって有用菌の増殖を促進し、宿主の健康に有益に働く。オリゴ糖、食物繊維、難消化性澱粉などがある。なお、プロバイオティクスとプレバイオティクスを一緒に摂取すること、またはその両方を含

む飲料や製剤などはシンバイオティクスと呼ばれる (33)。バイオジェニクスは発酵物、乳酸菌の効用の中で、有効性を生菌に帰せない場合があることをもとに光岡 (32) により提唱された用語で、直接あるいは腸内フローラを介して免疫賦活、抗変異原性、コレステロール低下作用、腸内腐敗抑制など宿主の健康に役立つ物質で、生物学的反応修飾物質 (BRM: Biological Response Modifier)、カロテノイド、フラボノイド、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、ラクトリペプチド、免疫賦活物質などがこれに含まれる。BRM は腫瘍細胞に対する宿主の反応を修飾することによって治療効果をもたらす物質を指し (34)、インターフェロンやインターロイキン、乳酸菌の菌体成分や *Streptococcus pyogenes* から調製される OK-432 (35) などがある。光岡 (7) が分類した発酵乳、乳酸菌飲料、殺菌酸乳、豆乳発酵物の4つのタイプのうち、殺菌酸乳、豆乳発酵物がバイオジェニクスに該当する。バイオジェニクスの具体例として Takano ら (36, 37) は、*L. helveticus*、*Saccharomyces cerevisiae* による発酵乳中のトリペプチド (Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro など) が、アンジオテンシンI変換酵素を阻害することにより降圧作用を示すことを報告している。また Shiina ら (38) は、乳酸菌の菌体成分の機能性に着目し、デオキシコール酸 (DCA) 負荷により惹起された肝・腎障害モデルラットに対して *Enterococcus faecalis* AD1001 株および *L. reuteri* AD0002 株の加熱処理死菌体が、肝・腎機能障害の改善作用を示すこと、またコレステロール飼料を負荷したウサギに *E. faecalis* AD1001 株の加熱死菌体を経口投与することにより血清コレステロール値の上昇抑制ならびに動脈壁への脂質沈着の著明な抑制を認めたことを報告している (39, 40)。さらに、これらの研究は通常動物を用いた試験であったが、Shin ら (41) は腸内細菌の関与を排除した無菌マウスを用いた研究から、乳酸菌の菌体成分が直接生体の肝機能、脂質代謝に影響を及ぼした可能性を見だしている。

一方、豆乳発酵物の機能性成分は豆乳由来成分と発酵菌と考えられるが、腸内細菌に対する影響やヒトの健康に対する有益性など詳細に関する研究は未だ不十分

である。そこで本研究では SFP について、第 1 章で通常食摂取時におけるヒト腸内フローラおよび唾液中分泌型 IgA (s-IgA) に対する影響ならびに肉食摂取時における腸内フローラと β -グルクロニダーゼ活性に与える影響を調べた。第 2 章では大腸発がんモデルマウスに対する SFP の腫瘍抑制効果を調べ、その機序を Meth-A 移植がんマウスを用いて検討した。第 3 章では、SFP の発酵菌の中からサイトカイン産生性の高い乳酸菌 *L. plantarum* BF-LP284 株を選抜し、本菌株の加熱死菌体の腫瘍抑制効果とその機序を Meth-A 移植がんマウスを用いて検討した。第 4 章では、SFP の構成成分の機能性を調べるため、SFP の可溶性画分 (SFP-s: SFP soluble fraction) の血圧降下作用を自然発症高血圧ラットを用いて検討した。第 5 章では、SFP-s の肝・腎機能障害の改善作用を胆汁酸負荷肝・腎障害モデルラットおよびガラクトサミン誘発肝障害モデルラットを用いて検討した。またその機序を肝・腎初代培養細胞を用いて検討した。さらに第 6 章では、SFP-s のリュウマチ性関節炎に対する改善作用をコラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いて検討した。最後に各章の検討結果からバイオジェニクスとしての SFP の有用性を総括した。

第1章 SFP のヒト腸内環境改善作用と粘膜免疫増強作用

1-1 序論

ヒトの消化管には 10^3 種以上の菌種で 10^{14} 個以上の細菌が生息するとされている (42-44)。これら腸内フローラは培養が困難な菌が多いため、宿主に及ぼす影響は明らかでない点が多い。Turnbaugh ら (30) が肥満マウスの腸内フローラを移植した無菌マウスが肥満になった事で腸内フローラが肥満の病態や生理に関与している事を明らかにするなど、腸内フローラが宿主の健康に重要な役割を担っている事が明らかにされつつある。近年、この腸内フローラの意義を解明する事を目的に、European metagenomics of the human intestinal tract や The US human microbiome project が組織され、宿主に及ぼす腸内フローラの役割解明に向けて研究が推進されている (44)。既に、多くのプロバイオティクスやプレバイオティクスが腸内フローラを *Bifidobacterium* 優位に誘導する事が明らかにされている (23, 33, 45)。一方、Inoguchi ら (46) は、豆乳をケフィアで発酵させた発酵物 (以下 FSM: Fermented soybean milk) が、ヒトの *Bifidobacterium* を増やし *Clostridium* を減少させ、さらに糞便中硫化物も減少させて腸内環境を改善する事を明らかにしており、FSM はプロバイオティクスとプレバイオティクスの両方の側面を持つとしている。このような腸内環境改善を示すプロバイオティクスやプレバイオティクスは、免疫賦活、感染防御、炎症制御などを誘導する事も明らかにされている (47-49)。

今回、SFP の腸内環境改善作用を調べるため、一般的な日本食を摂食したボランティアの SFP 飲用前後の腸内フローラの変化ならびに唾液中分泌型 IgA (s-IgA) 濃度の変化を測定した。また肉食中心の欧米食を摂食したボランティアの腸内フローラの変化ならびに発がん誘因物質の排泄に関連するとされる糞便中 β -グルコニダーゼ活性を測定した。

1-2 材料と方法

1-2-1 SFP の調製

培養基としての豆乳 (SM: Soymilk) は低農薬栽培した北海道産「鶴の子」品種の大豆から調製した。大豆を水に一晩浸漬し、破碎後 98℃で 30 分間加熱し、その絞り汁を SM として用いた。SM の発酵には乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 株、*L. acidophilus* ALAL005 株、*L. casei* ALAL003 株、*L. fermentum* ALAL013 株、*L. mali* ALAL014 株、*L. reuteri* ALAL001 株、*L. rhamnosus* ALAL004 株、*Lactococcus lactis* ALAL018 株と酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ALAY001 株等を用いた。これらの菌株は A、B、C、D の 4 つの種培養のグループに分け、それぞれのグループには乳酸桿菌 2 株、乳酸球菌 1 株および酵母 1 株となるよう割り当てた。種培養液の調製は、各凍結保存菌体を適量の豆乳に接種し 37℃で 2 日間培養後、乳酸菌と酵母の接種菌数がそれぞれ $1 \times 10^5/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^4/\text{ml}$ となるよう新しい豆乳培地に接種し 37℃で 2 日間培養した。本培養は 4 つの種培養液を混合し、100 倍量の新しい豆乳培地に接種し、37℃で 4 日間培養した。培養後の豆乳は 98℃で 30 分間加熱した後、室温まで冷却し、エチルアルコールを 14% (v/v) 添加した。2 週間放置後、エタノールをエバポレーターで除去し、凍結乾燥して試験に用いた。

SFP の栄養成分を **Table 1-1** に示す。SFP の 6 成分組成はタンパク質 51.2%、脂質 20.0%、灰分 9.3%、糖質 16.3%、食物繊維 2.3%であった。また、総有機酸 19.1%、総イソフラボン 0.2%を含み、有機酸およびイソフラボン種の組成は表中に示す通りであった。

1-2-2 通常食摂食ヒト糞便中細菌叢解析および唾液中 s-IgA 濃度の測定

一般的な日本食 (TJD: Traditional Japanese Diet) を摂取している 20~26 歳のボランティア 11 名 (男 7 名, 女 4 名) に SFP 450mg/日、10 名 (男 7 名, 女 3 名) に

SFP と同量のプラセボ（デキストリン）を 14 日間連日摂取させ、摂取前と摂取最終日に糞便約 1g、また唾液 1ml を採取した（**Fig. 1-1**）。なお、ボランティアは食事内容に制限は設けず、摂食内容の記録のみを依頼した。また発酵食品と腸内フローラに影響を及ぼす医薬品の摂取を禁止した。ヒトを用いた試験は株式会社エイ・エル・エイ「ヒト倫理委員会規定」に従って実施した。

糞便中細菌叢の検索は細菌の構成の差異を簡便に調べることができる方法として広く用いられている 16S rDNA 部分塩基配列の T-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法（テクノスルガ・ラボ株式会社；静岡県清水市）を用いて占有率で解析した（50-52）。即ち、細菌の DNA を抽出し、PCR で 16S rDNA を増幅後に制限酵素処理を行い、DNA シーケンサーでフラグメント解析してそれぞれの細菌占有率を算出した。さらに、糞便中細菌叢の変化は Nagashima（51）の方法に従って個々のボランティアの占有率の変化量〔（摂取後の占有率/摂取前の占有率-1）×100〕を算出し、25%以上増減したボランティアを「増加」、「減少」、25%以内を「変化なし」の3段階に分け、当該ボランティア数で比較した。

唾液中分泌型 s-IgA 濃度は、ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法（53, 54）にて測定した。すなわち、Maxisorp immunoplate（Nunc, Roskilde, Denmark）を 1/400 希釈の Goat anti-human s-IgA（ICN Biomedicals, Irvine, CA）でコーティングし、1/4000 希釈の唾液サンプルとヒト IgA 標品（Zymed, South San Francisco, CA）を添加した。結合した IgA は 1/2000 希釈の Biotinylated goat anti-human IgA（Sigma）、Streptavidin-alkaline phosphatase conjugate（Life Technology, Gaithersburg, MD）、Disodium 4-nitrophenylphosphate substrate（Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan）とインキュベートして吸光度 405nm で検出した。SFP 摂取による s-IgA 濃度の変化率（%）は、（摂取後の s-IgA 濃度/摂取前の s-IgA 濃度-1）×100 で算出した。

1-2-3 肉中心食摂取ヒト糞便中細菌叢解析および β -グルクロニダーゼ活性の測定

TJD を摂取している 20～40 歳のボランティア 5 名（男 3 名、女 2 名）の糞便中細菌叢を検索し、その後、昼食のみ肉中心の欧米型食（WD: Western Diet、肉摂取量約 300 g、900kcal）を 3 日間摂取させた。その後 3 週間 TJD に戻して WD の影響を排除し、再度昼食のみ WD を摂取させると共に SFP（900mg/head/day）を食後 30 分以内に摂取させた（**Fig. 1-2**）。それぞれの糞便中細菌叢は食物の消化管内移動時間を考慮し（54）、WD および SFP 摂取最終日の翌々日に検索した。また、 β -グルクロニダーゼ活性を糞便中細菌叢を検索した際の糞便検体を用い、Reddy ら（55, 56）の方法に従い Phenolphthalein glucuronide（Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc, USA Milwaukee）を基質として測定した。

1-2-4 統計解析

統計解析は StatMate IV software（ATMS Co., Ltd, Tokyo Japan）を用いた。ヒト試験のプラセボと SFP の 2 群間の比較には t 検定または Mann-Whitney の U 検定を、SFP 摂取前後の比較には対応のある t 検定を用いた。なお、統計的有意水準は 5%未満とした。

1-3 成績

1-3-1 通常食時における SFP 摂取が腸内フローラおよび唾液中 s-IgA 濃度に及ぼす影響

TJD に SFP を摂取させた前後の糞便中細菌叢とその変化を **Table 1-2** に示した。SFP 群の *Bifidobacterium* 占有率は投与前後で差が認められなかったが、占有率の変化量が 25%以上増減したボランティアの数で比較したところ、*Bifidobacterium* が増

加した人数は SFP 群がプラセボ群より有意に多かった ($P<0.05$)。また唾液中 s-IgA 濃度の変化率はプラセボ群 -12.3 ± 55.5 (%) に対して SFP 群 53.7 ± 68.9 (%) と、有意 ($P<0.05$) な増加が見られた (**Fig. 1-3**)。

1-2-3 肉中心食時における SFP 摂取が腸内フローラおよび β -グルクロニダーゼ活性に及ぼす影響

TJD、WD さらに WD に SFP を摂取 (WD+SFP) させた糞便中細菌叢の変化を **Table. 1-3** に示した。TJD 時の *Bifidobacterium* の占有率は 3.2 ± 2.1 (%) で、WD を摂取しても 5.4 ± 5.3 (%) と変化が認められなかったが、WD+SFP では 12.8 ± 10.1 (%) と有意 ($P<0.05$) に増加した。TJD の *Clostridium* 占有率は 31.8 ± 7.9 (%) で、WD にすると 41.1 ± 8.9 (%) に増加し ($P<0.05$)、さらに WD+SFP では TJD と同等のレベルにまで減少した ($P<0.05$)。TJD の *Bacteroides* 占有率 32.3 ± 15.1 (%) は WD にしても 28.0 ± 8.6 (%) と差が認められなかったが、WD+SFP では 19.8 ± 7.7 (%) に減少した ($P<0.05$)。

糞便中の β -グルクロニダーゼ活性の結果を **Fig. 1-4** に示した。 β -グルクロニダーゼ活性は、昼食を WD にすると TJD 摂取時の 5 倍以上に増加したが ($P<0.01$)、WD+SFP 摂食時には TJD 摂食時と同レベルにまで減少した ($P<0.05$)。

1-4 考察

腸内細菌は宿主の健康に重要な役割を担っている事が知られている (30)。また腸内で *Bifidobacterium* が増えると整腸作用や免疫賦活作用など健康に有用な働きが期待できると考えられており、プロバイオティクスやプレバイオティクスは腸内を *Bifidobacterium* 優位にして健康に資する事を目的に広く用いられている (23, 44, 57)。SM を発酵させた FSM はプロバイオティクスとプレバイオティクス両方の側

面を有し、腸内フローラを *Bifidobacterium* 優位に導く事が明らかにされている (46)。今回、SM を乳酸菌で発酵させた後、加熱処理して調製した SFP を一般的な日本食を摂取しているボランティアに 2 週間摂取させ、腸内フローラに及ぼす影響を検討した。その結果、*Bifidobacterium* の占有率変化量が 25% 以上増加した人数は SFP 群がプラセボ群より多かった事から、SFP は多くのプロバイオティクスやプレバイオティクスと同様に *Bifidobacterium* を増やす作用を有すると考えられた (23, 44, 46)。しかし、本検討では、SFP の投与量が少なかったためか *Clostridium* の変化は認められず、Inoguchi らの FSM の結果と異なった (46)。SM の発酵に用いた菌種の違いが影響した可能性も否定できない。

体液性免疫機構として粘液中に分泌される s-IgA はパイエル板に存在する IgA 前駆 B 細胞から分化した形質細胞によって産生され、殺菌作用はないが病原微生物やアレルゲンをコーティングすることにより遮断抗体として作用し、異物の侵入を排除する最前線の防御を担う (58, 59)。SFP 摂取により唾液中 s-IgA が増加したことから、SFP が感染防御、食物アレルギーの抑制に働く可能性が示唆された。一方、腸管の s-IgA 抗体と腸内細菌叢は双方向に制御が行われていることが報告されており (60, 61)、その恒常性が崩れると炎症性腸疾患をはじめとする免疫疾患や大腸がん発症につながると考えられている (62)。今回の s-IgA の産生増強と腸内フローラ改善との因果関係は不明であるが、乳酸菌が s-IgA 産生を増強することが知られていることから (63, 64)、SFP に含まれる乳酸菌菌体による s-IgA 増強が腸内フローラ改善の一因となり、大腸発がん抑制に働く可能性が示唆された。

一方、腸内フローラは食事で影響を受ける事が知られており、WD 摂取は大腸がんのリスクファクターとなる可能性が指摘されている (32, 47, 65-67)。今回の結果では、WD 摂取時の *Bifidobacterium* は TJD と比べ差が見られなかったが、SFP 摂取で *Bifidobacterium* の増加が認められ、多くのプロバイオティクスやプレバイオティクスと同様な結果 (23, 44) が得られた。SFP に含まれる大豆オリゴサッカラ

イドであるラフィノースやスタキオースなどを資化して *Bifidobacterium* が増殖した可能性が考えられるが (46, 68)、SM 群は Inoguchi ら (46) の豆乳群と同様に有意な増加が認められなかった。したがって、発酵によって *Bifidobacterium* 増殖因子が生成した可能性も考えられるが、詳細な機序は今後の検討課題と考えられた。また、有害菌と考えられている *Clostridium* は TJD より WD で多い事が知られているが (67, 68)、今回の検討でも WD を摂取させた際に増加し、さらに SFP を摂取させると TJD のレベルにまで減少した。以上の腸内フローラの変化は FSM を摂取させた Inoguchi ら (46)、他のプロバイオティクスやプレバイオティクスの結果 (23, 44) と同じ傾向であった。*Bacteroides* は SFP を摂取させると TJD を摂取させた時より減少したが、この意義は明らかでない。

臨床において、糞便中の β -グルクロニダーゼ活性は大腸がん患者が健常者より高いことが知られており、 β -グルクロニダーゼ活性は大腸がん発症のバイオマーカーの一つと考えられている (47, 70, 71)。今回の検討結果では、 β -グルクロニダーゼ活性は WD を摂取させた時に著しく上昇し、それに SFP を摂取させると TJD を摂取させたレベルにまで減少した。この推移は β -グルクロニダーゼ活性を有する菌種とされている *Clostridium* の変化と一致し (47)、大腸がん患者で *Clostridium* が多い事 (72) を考え併せると *Clostridium* の消長に相関する β -グルクロニダーゼ活性が大腸がん発がんに必要な役割を担っていると考えられた。また、SFP 摂取時に増加した *Bifidobacterium* は *Clostridium* 抑制に関与し (73)、ひいては β -グルクロニダーゼ活性低下に導いた可能性が推察された。

以上示した SFP の腸内環境改善作用は、多くのプロバイオティクスやプレバイオティクスでの報告 (57) やポリープ切除患者ならびに大腸がん患者にシンバイオティクス (*Bifidobacterium lactis*、*L. rhamnosus* と oligofructose を含む) を投与すると、腸内細菌叢は *Bifidobacterium* 優位、*Clostridium* 抑制状態となり (74)、消化管内の二次胆汁酸などの大腸がん発がん因子が減少し、大腸がんを抑制する可能性を明ら

かにした報告 (57, 74) と一致しており、SFP が大腸がん発がんリスクを軽減できる可能性が示唆された。

1-5 小括

TJD を摂食したボランティアに SFP (450mg/日) を 14 日間飲用させると、糞便中 *Bifidobacterium* の占有率の変化量が 25% 以上増減したボランティア数は有意 ($P<0.05$) に増加した。また唾液中 s-IgA 濃度の増加率はプラセボ群に比べ有意 ($P<0.05$) に高値を示した。一方、WD を昼食のみ 3 日間摂食したボランティアの糞便中 *Clostridium* の占有率は有意 ($P<0.05$) に増加したが、WD と同時に SFP を飲用 (900mg/日) することにより減少し ($P<0.05$)、さらに *Bifidobacterium* の占有率が増加した ($P<0.05$)。糞便中 β -グルクロニダーゼ活性は、WD 摂食時は TJD 摂食時の 5 倍に増加したが ($P<0.01$)、SFP 飲用時は増加しなかった ($P<0.05$)。以上の結果より SFP はフローラを介して腸内環境を改善し、粘膜免疫の増強による炎症抑制や発がん誘引物質の生成抑制により大腸がん等の発がんリスクを軽減する可能性が示唆された。

Table 1-1. Nutritional composition of soybean milk-fermented product (SFP)

Nutrients	g/100g dry wt.	Analytical Method
Protein	51.2	Kjeldahl method ^{*1}
Fat	20.9	Acid hydrolysis method ^{*2}
Carbohydrates	16.3	
Fiber	2.3	Prosky's method
Ash	9.3	Direct Ash method
Organic acids		HPLC
Lactic acid	16.7	
Acetic acid	1.6	
Malonic acid	0.5	
Succinic acid	0.3	
Total	19.1	
Isoflavones		HPLC
Daidzin	0.007	
Daidzein	0.073	
Genistin	0.014	
Genistein	0.084	
Total	0.177	

^{*1}Nitrogen-to-protein conversion factor: 6.25

^{*2}Formula in accordance with Notification No. 176 (2003) Standards for Nutrition Labeling; Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: 100-(Moisture + Protein + Fat + Ash + Dietary fiber)

Table 1-2. Effect of soybean milk-fermented product (SFP) on fecal bacterial occupation rate and incidence of volunteers fed traditional Japanese diet in 2 groups ^a

Bacteria	Placebo group (n=10)					SFP group (450mg/day, n=11)					P value
	Occupation rate (%)		Incidence of volunteers ^b			Occupation rate (%)		Incidence of volunteers			
	Before	After	Inc ^c	Dec ^d	NC ^e	Before	After	Inc	Dec	NC	
<i>Bifidobacterium</i>	6.5 ± 7.9	5.4 ± 7.1	1	5	4	10.9 ± 7.5	12.2 ± 9.2	7	2	2	0.041 *
<i>Lactobacillales</i>	3.8 ± 5.1	6.5 ± 7.2	5	2	3	5.7 ± 6.6	4.5 ± 3.1	3	4	4	0.454
<i>Bacteroides</i>	33.0 ± 17.0	27.2 ± 16.1	2	4	4	28.1 ± 14.7	29.1 ± 15.4	4	3	4	0.627
<i>Prevotera</i>	7.7 ± 11.9	11.1 ± 14.7	2	0	8	13.1 ± 15.5	12.6 ± 16.3	1	3	7	0.626
<i>Clostridium</i> ^f	37.0 ± 10.9	39.1 ± 11.5	4	2	4	27.8 ± 12.0	27.7 ± 9.6	3	3	5	0.678
Others	12.0 ± 7.8	10.7 ± 6.2	1	2	7	14.4 ± 9.6	14.0 ± 6.9	4	3	4	0.113

^aThe occupation rate of fecal bacteria was analyzed by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) method. Values are expressed as mean ± S. D. of occupation rate of fecal microflora (%). ^bNumber. ^cInc: 25 % or more relative rate [(Occupation rate after treatment / occupation rate before treatment-1) × 100]. ^dDec: 25 % or less relative rate. ^eNC: No Change. ^fThe total value of cluster (IV, XI, XVIII) and subcluster (XIVa). **P*<0.05, placebo vs. SFP group at number of volunteers' distribution (Mann-Whitney's U test).

Table 1-3. Effect of soybean milk-fermented product (SFP) on fecal bacterial composition in 5 volunteers fed western diet mainly meat meals^a

Bacteria	TJD ^b	WD ^c	WD +SFP (900mg/day)
<i>Bifidobacterium</i>	3.2 ± 2.1	5.4 ± 5.3	12.8 ± 10.1 ^{*e}
<i>Lactobacillares</i>	2.0 ± 1.8	2.3 ± 2.2	2.0 ± 2.2
<i>Bacteroides</i>	32.3 ± 15.1	28.0 ± 8.6	19.8 ± 7.7 ^{*e}
<i>Prevotella</i>	18.2 ± 12.9	12.1 ± 11.3	18.4 ± 15.6
<i>Clostridium</i> ^d	31.8 ± 7.1	41.1 ± 8.9 ^{**f}	29.7 ± 11.4 ^{*g}
others	12.6 ± 5.6	11.2 ± 4.4	17.4 ± 6.4

^aThe composition of fecal bacteria was analyzed by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) method. Values are expressed as mean ± S. D. of composition of fecal microflora (%). ^b TJD, traditional Japanese diet. ^c WD, Western diet mainly meat meal (approximately, a total amount of meat ingestion 300g, 900kcal) at the only lunch for 3 days. ^d The total value of cluster (IV, XI, XVIII) and subcluster (XIVa). ^e $P < 0.05$, significantly different from the value of WD (Two-sided paired t test). ^f $P < 0.01$, significantly different from the value of TJD (Two-sided paired t test). ^g $P < 0.05$, significantly different from the value of WD (Two-sided paired t test).

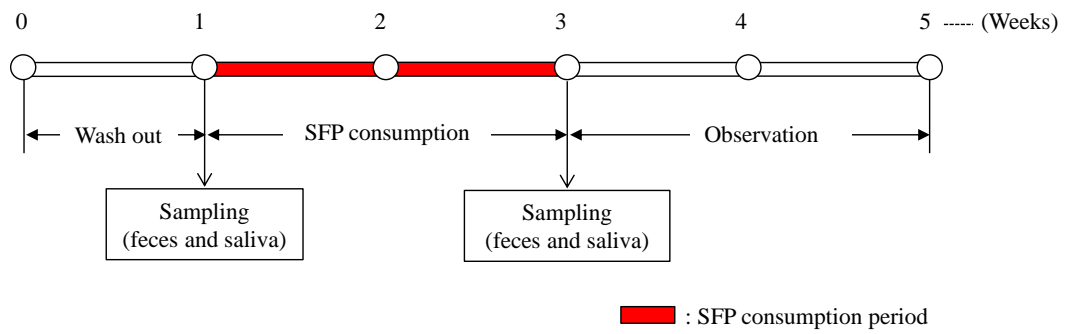


Figure 1-1. Time schedule of SFP consumption and sampling

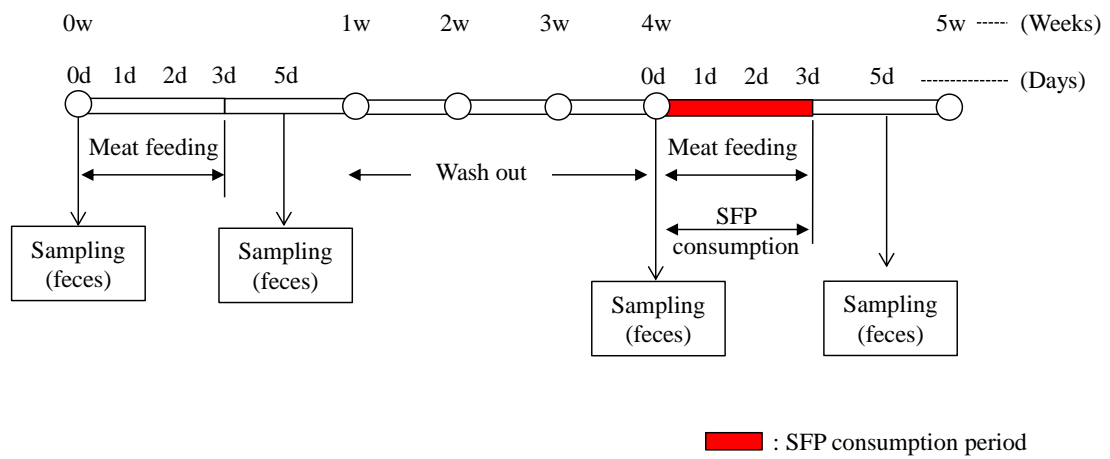


Figure 1-2. Time schedule of SFP consumption and sampling

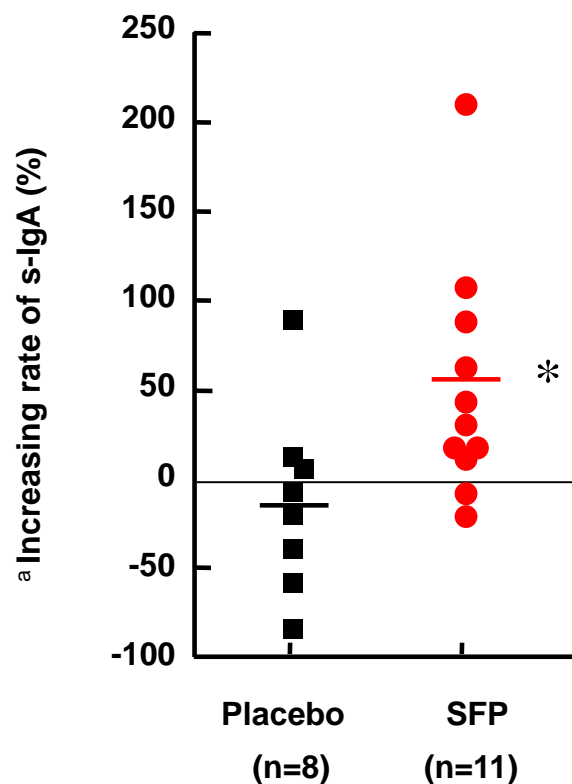


Figure 1-3. Effect of soybean milk-fermented product (SFP) on s-IgA in saliva of volunteers fed traditional Japanese diet in 2 groups. ^aThe increasing rate of s-IgA in saliva was analyzed by ELISA method [(s-IgA after treatment / s-IgA before treatment-1) $\times 100$ (%)]. * $P < 0.05$, Significantly different from the value of placebo (t test).

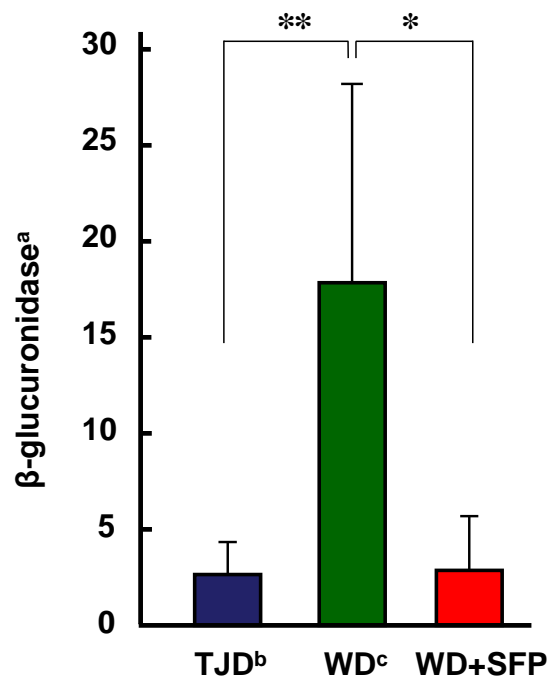


Figure 1-4. Effect of soybean milk-fermented product (SFP, 900mg/day) on the fecal β -glucuronidase in 5 volunteers fed high meat meals. ^aPhenolphthalein liberated $\mu\text{g/hr/mg}$ of feces. ^bTJD: traditional Japanese diet. ^cWD: western diet (mainly meat meal, approximately, a total amount of meat ingestion 300g, 900kcal) at the only lunch for 3 days. Values are expressed as mean \pm S. D. * $P < 0.05$, significantly different from the value of WD (Two-sided paired t test). ** $P < 0.01$, Significantly different from the value of TJD (Two-sided paired t test).

第 2 章 SFP の大腸がん抑制作用

2-1 序論

前章において、SFP が腸内フローラを介して腸内環境を改善し、大腸がん等の発がんリスクを軽減しうる可能性が示唆された。大腸がんは国内における女性のがん死亡原因の第 1 位であり、食の欧米化に伴い、今後も患者数の増加が懸念されている (75) ことから、その予防・抑制は重要な課題である。

腸内環境改善を示すプロバイオティクスやプレバイオティクスは免疫賦活、感染防御、炎症制御などを誘導する事が明らかにされており (76-78)、Bassaganya-Riera ら (79) は *L. casei*、*L. plantarum*、*Bifidobacterium infantis* など 8 菌種のプロバイオティクスが大腸がんの発症抑制作用を示す事、Verghese ら (80) は難消化性繊維であるプレバイオティクスのイヌリンが大腸がんのリスクを低減することを報告している。他方、豆乳を用いた発酵産物の抗腫瘍作用については、*Bif. breve* 発酵産物中のイソフラボンが、乳がん細胞のエストロジェンレセプター (ER: Estrogen Receptor) に作用して増殖を抑制し (81)、*L. helveticus* と *Enterococcus faecium* 発酵産物が宿主免疫能活性化によって ER 陰性マウス乳がん細胞の増殖抑制を示唆した報告があるものの (82)、大腸がんに及ぼす影響を検討した報告はない。

そこで、大腸発がんモデルマウスを用いて SFP の大腸がん抑制作用を検討した。また大腸がん発症の抑制機序を明らかにするため、MethA 移植腫瘍細胞を用いて詳細に検討した。

2-2 材料と方法

2-2-1 実験動物

理化学研究所（埼玉県和光市）で繁殖した 5 週齢の雄性 CF#1 マウス、5 週齢の雌性 BALB/c マウス（日本チャールズリバー；神奈川県横浜市）および自家繁殖した 5 週齢の雌性無菌 BALB/c マウス（株式会社エイ・エル・エイ中央研究所；神奈川県横浜市）を用いた。CF#1 マウスは MF 飼料（オリエンタル酵母工業株式会社；東京都板橋区）、BALB/c マウスは AIN93M 飼料（オリエンタル酵母工業株式会社；東京都板橋区）、無菌 BALB/c マウスは滅菌 AIN93M 飼料を自由摂取させた。飲料水は CF#1 マウスと BALB/c マウスには水道水を、無菌 BALB/c マウスには滅菌水道水を自由飲水させた。実験動物は温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗それぞれ 12 時間で飼育し、1 週間の順化飼育の後、実験に供した。CF#1 を用いた理化学研究所での動物実験は「動物実験実施規定」、その他の動物実験は「株式会社エイ・エル・エイ中央研究所実験動物倫理規定」（承認番号 2012621）に従って実施した。

2-2-2 化学発がんモデル

大腸がんは CF#1 マウスに Mizutani ら (83) の方法に準じて 1, 2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH ; Sigma-Aldrich Chemical Company. Inc, USA Milwaukee) 20mg/kg を 5 週齢から 7 日おきに 10 回、腹腔内に投与して誘起した。SFP 群、SM 群および対照群それぞれ 21 匹のマウスを割り付けた。SFP 群と SM 群には MF 飼料に SFP あるいは SM を 3% (w/w) 添加して摂取させた。対照群は MF 飼料のみ摂取させた。DMH 最終投与後 25 週目に CO₂ ガスで安楽死させた後剖検し、大腸の腫瘍数を計測した。

2-2-3 Meth-A 腫瘍移植モデル

SFP 群、SM 群および対照群はそれぞれ 6 匹の BALB/c マウスを割り付けた。SFP 群と SM 群はそれぞれ SFP、SM を 10mg/0.2ml/head/day、対照群は生理食塩液 0.2ml/head/day を 3 週間連日ゾンデで経口投与し、その翌日に Meth-A 腫瘍

1×10⁶cells を鼠経部皮下に移植した。その後、それぞれの投与検体は隔日にゾンデを用いて経口投与を継続した。腫瘍増殖推移は、ノギスで腫瘍の長径と短径を計測し、その積の平方根で評価した。なお、Meth-A 腫瘍細胞は東北大学細胞センターから寄与された。

2-2-4 宿主免疫能の評価 (Winn assay)

宿主の抗腫瘍免疫能は Winn assay を用いて評価した (84)。即ち、Meth-A 腫瘍移植後 8 日目の SFP 群、SM 群および対照群それぞれ 6 匹の BALB/c マウスの脾細胞 1×10⁷cells と Meth-A 腫瘍細胞 1×10⁶cells を混和し (Effector to target ratio=10:1)、それぞれ新たな 6 匹の BALB/c マウスの鼠経部皮下に移植して腫瘍の増殖推移を経目的に検討した。SFP 群、SM 群および対照群の抗腫瘍作用は Meth-A 腫瘍単独移植群 (MA-Control) の腫瘍増殖推移と比較した。

2-2-5 無菌動物およびノトバイオートモデル

無菌 BALB/c マウスは SFP 群、SM 群および陰性対照群にそれぞれ 5 匹のマウスを割り付けた。陽性対照群はノトバイオートモデルを用い、7 匹のマウスを割り付けた。ノトバイオートモデルの作成は 5 週齢時に *Bif. longum* subsp. *longum* JCM1217 (Microbe Division, RIKEN BioResource Center) (1×10⁸ 個/0.2ml/head) を胃ゾンデにて単回投与した。6 週齢時より SFP 群と SM 群にはそれぞれ SFP および SM 10mg/0.2ml/head/day を、陰性対照群と陽性対照群には滅菌生理食塩液 0.2ml/head/day を Meth-A 腫瘍移植モデルの投与期間に合わせて 4 週間連日ゾンデで経口投与した。全ての投与液は無菌チェックを実施し、陰性を確認して用いた。投与最終日、マウスを CO₂ ガスで安楽死させ、脾臓の細胞数を計測し体重比で算出した。

2-2-6 統計解析

統計解析は StatMate IV software (ATMS Co., Ltd, Tokyo Japan) を用いて一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、群間の比較は Tukey's あるいは Dunnett's の多重比較検定を行った。なお、統計的有意水準は 5%未満とした。

2-3 成績

2-3-1 SFP 投与が DMH 誘発大腸がんに及ぼす影響

大腸がん発症腫瘍数の結果を **Fig. 2-1** に示した。病理組織学的検査の結果、大腸に発症した腫瘍はすべて腺がんであった (Data not shown)。SFP 群の腫瘍数は 2.4 ± 1.2 (個/head) で対照群の 4.3 ± 2.3 (個/head)、SM 群の 4.3 ± 2.7 (個/head) より有意に少なかった ($P < 0.05$)。

2-3-2 SFP 投与が Meth-A 腫瘍の増殖に及ぼす影響

SFP は化学発がんモデルに合わせて Meth-A 腫瘍移植前から試験期間中投与し、移植した Meth-A 腫瘍の増殖推移は **Fig. 2-2** に示した。SFP 群は腫瘍移植 11 日目に対照群より有意に腫瘍増殖が抑制された ($P < 0.05$)。SM 群の腫瘍増殖は対照群と差が認められなかった。

2-3-3 SFP 投与による抗腫瘍作用機序 (Winn assay)

Winn assay における SFP 群、SM 群、対照群および MA Control 群の腫瘍増殖推移を **Fig. 2-3** に示した。SFP 群の脾細胞は Meth-A 腫瘍の増殖を移植 6 日以後 MA Control 群より有意に抑制した ($P < 0.05$)。SM 群と対照群の腫瘍増殖は MA Control 群と差が認められなかった。

2-3-4 SFP 投与による無菌およびノトバイオトマウスの脾臓細胞数

SFP 群、SM 群、陰性対照群および陽性対照群それぞれの脾臓細胞数を **Fig. 2-4** に示した。SFP 群の脾臓細胞数は SM 群、陰性対照群間で差が認められなかった。一方、陽性対照群の脾臓細胞数は SFP 群、SM 群および陰性対照群のそれより多かった ($P<0.05$)。

2-4 考察

豆乳発酵物の抗腫瘍作用は乳がんモデルで報告されているが (81, 82)、大腸がん発症に及ぼす影響は検討されていない。そこで、プレバイオティクスやプロバイオティクスで多く用いられている大腸の化学発がんモデル (85, 86) を用いて SFP が大腸発がん に及ぼす影響を検討した結果、SFP 群の腫瘍数は対照群より少ない事が観察された。SM 群は対照群と差が認められなかったので、SFP の抗腫瘍作用に関与した物質は乳酸菌発酵過程で産生された物質の可能性が推察された。Ohta ら (81) は SM 中に含まれるイソフラボン配糖体などが発酵過程でイソフラボンアグリコンなどに変換され、乳がん細胞のエストロジェンレセプターに作用して抗腫瘍作用を示す事を報告している。ヒト大腸がんの約 50% にはエストロジェンレセプターが発現しているため (87)、イソフラボンアグリコンが抗腫瘍作用を示した可能性も考えられる。また、イソフラボンアグリコンの一つダイゼインは腸内の細菌によってイクオールに代謝される。イクオールはダイゼインよりもエストロジェンレセプターに対する親和性が高いため、乳がんに対して高い抗腫瘍性を示すことが報告されている (88)。また、イクオールは前立腺がんの進展を他のイソフラボンアグリコンよりも強く抑制することも報告されており、Sugiyama ら (89) は、ヒト糞便から単離した *Slackia* sp. NATTS 株がイクオールを産生することを示している。SFP はダイゼイン、ゲニステインを含有するが、含有量と抗腫瘍効果の関連、またイク

オール生成の有無などに関する検討を含め、腫瘍作用を示す発酵由来物質についての更なる検討が必要と考えられた。

一方、プロバイオティクスやプレバイオティクスは宿主免疫能を賦活し抗腫瘍作用を誘導する事が知られている (76, 77, 79, 90)。また Kinouchi ら (82) は、大豆発酵産物が宿主免疫を賦活してエストロジェンレセプターを持たない乳がんの *in vivo* 増殖を抑制した事を明らかにしている。しかし、この免疫賦活作用は *in vitro* でサイトカインの誘導能を示したもので、*in vivo* の抗腫瘍作用機序は検討していない。そこで、SFP の免疫賦活による抗腫瘍作用に注目して機序を検討した。Meth-A 腫瘍移植モデルを用いた検討結果では、SFP 群で腫瘍増殖抑制作用が認められたが、SM 群ではそれが見られず、大腸がんの化学発がんモデルと同様な結果が得られた。

次に、SFP による抗腫瘍作用機序解明を目的に、抗腫瘍作用が認められた時期の脾細胞を Meth-A 腫瘍細胞と混和し Winn assay (84) を行った。その結果、SFP 群のみに MA Control 群に比べ腫瘍の増殖抑制が認められ、SM 群と対照群よりも腫瘍増殖抑制傾向が見られ、少なくとも SFP は担がんマウスの脾細胞中に Meth-A 細胞を傷害する免疫細胞群を誘導する作用を有すると考えられた。インターフェロン γ (IFN- γ) は免疫担当細胞の抗腫瘍作用発現に重要なサイトカインとして知られているが (84, 90)、Kinouchi らは豆乳発酵産物を投与したマウスの脾細胞は豆乳や対照群のそれより多い IFN- γ を産生する事を認め、免疫賦活作用を有する事を明らかにしており、Winn assay の結果も SFP 投与で脾細胞が IFN- γ を産生し、Meth-A 細胞を傷害する活性化されたマクロファージ、NK (ナチュラルキラー) 細胞および細胞傷害性 T 細胞などを誘導した可能性が考えられる (84)。今回の Meth-A 腫瘍移植モデルの結果は Kinouchi らの報告と一致し (82)、異所性の腫瘍にも宿主免疫賦活作用による抗腫瘍作用を示す可能性を示唆する興味深い結果である。

さらに SFP が宿主免疫能に及ぼす影響を検討した。即ち、プロバイオティクスやプレバイオティクスが宿主免疫に及ぼす影響は、それぞれ投与菌体、腸内細菌叢

の修飾に依存すると考えられている (77)。SFP 摂取で増加した *Bifidobacterium* はヒト宿主免疫を修飾する事が報告されており、*Bifidobacterium* を定着させたノトバイオオートマウスでは、自然免疫能のみならず獲得免疫をも修飾する事が知られている (91)。本検討でも生理食塩液を投与した無菌マウスより *Bifidobacterium* の刺激により免疫細胞が増殖し、抗原刺激の入り口であり自然免疫を司る腸間膜リンパ節 (MLN: Mesenteric lymph node) の重量が増し (Data not shown)、獲得免疫を司る脾細胞数 (92) も増加が認められた。しかし、SFP 群と SM 群は無菌 BALB/c マウスに 4 週間に亘って連日経口投与しても腸管膜リンパ節の重量と脾細胞数は生理食塩液を投与した無菌マウス群 (陰性対照群) と差が認められず、宿主免疫に及ぼす影響は腸内細菌に比べて極めて弱いと考えられた。これらのことから SFP の抗腫瘍効果には腸内細菌の存在が必要である可能性が示唆されたが、その詳しい機序については今後の検討が必要である。

2-5 小括

第 1 章の結果に基づき、SFP の大腸がん抑制作用を、DMH 化学発がんモデルマウスを用いて検討したところ、SFP は腫瘍の発生を有意 ($P<0.05$) に抑制した。次に SFP の抗腫瘍作用機序を Meth-A 腫瘍移植モデルで検討した。SFP (10mg/day/マウス) は化学発がんモデルと同様に Meth-A 腫瘍の増殖を抑制した。このときマウスの脾臓細胞を Meth-A 腫瘍細胞と混和し、別の新たなマウスに移植する Winn assay を行ったところ、SFP 投与群は MethA 単独移植群に比べ有意 ($P<0.05$) に腫瘍の増殖を抑制した。この結果から、SFP 投与マウスの脾臓中に抗腫瘍作用を示す免疫細胞群が誘導されたことが示唆された。一方、*Bifidobacterium* 定着ノトバイオオートマウスは無菌マウスより脾細胞数が増加したが、無菌マウスに SFP や SM (10mg/day/マウス) を 4 週間連日経口投与しても脾細胞数は増加しなかった。こ

これらの結果から **SFP** の抗腫瘍効果は宿主免疫の賦活化であり、その賦活化には腸内細菌関与の可能性が示唆された。

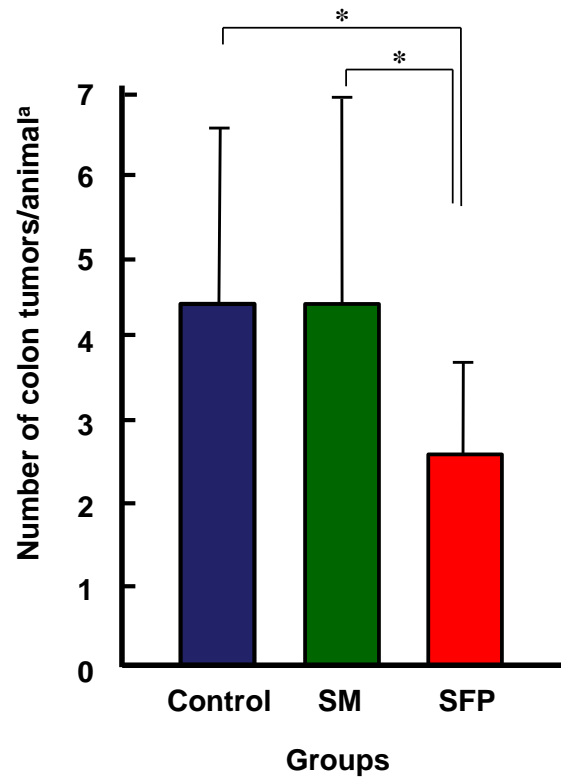


Figure 2-1. Inhibitory effects of soybean milk-fermented product (SFP) on 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) -induced colon tumors in male CF#1 mice.

Values are expressed as mean \pm S. D. (n=21). SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. ^a The number of colon tumor nodules at 25 weeks after the last DMH injection. * P <0.05, Significantly different from the value of control or SM (Tukey's test).

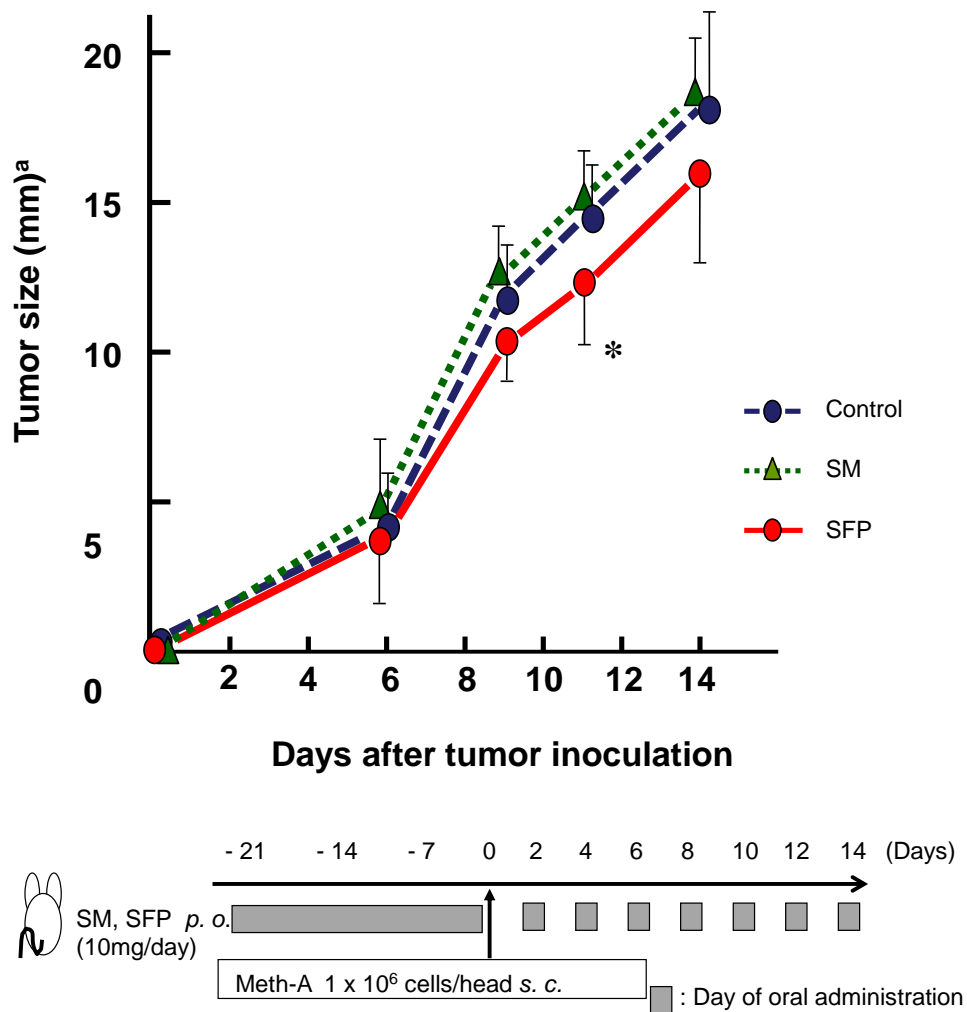


Figure 2-2. Growth inhibition of Meth-A tumor by oral administration of soybean milk-fermented product (SFP) in BALB/c mice.

Values are expressed as mean \pm S. D. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. ^aTumor size was calculated by square root of the value of major axis \times minor axis (mm). * $P < 0.05$, Significantly different from the value of control (Dunnett's test).

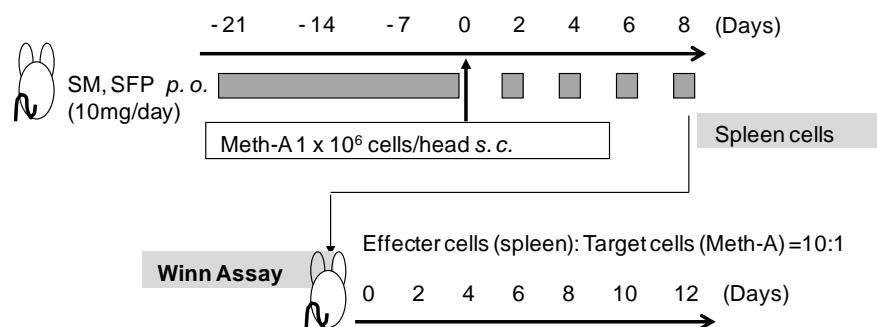
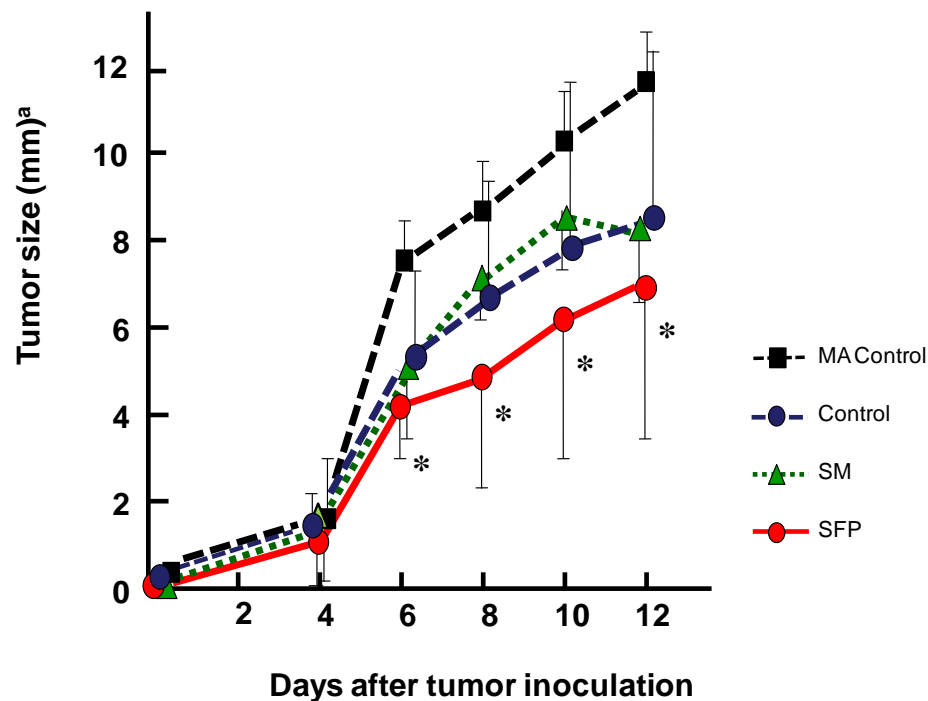


Figure 2-3. Growth inhibition of Meth-A tumor by oral administration of soybean milk-fermented product (SFP) in BALB/c mice (Winn assay).

Values are expressed as mean \pm S. D. MA control: Meth-A tumor alone. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. ^aTumor size was calculated by square root of the value of major axis \times minor axis (mm). * $P < 0.05$, Significantly different from the value of MA-Control (Dunnett's test).

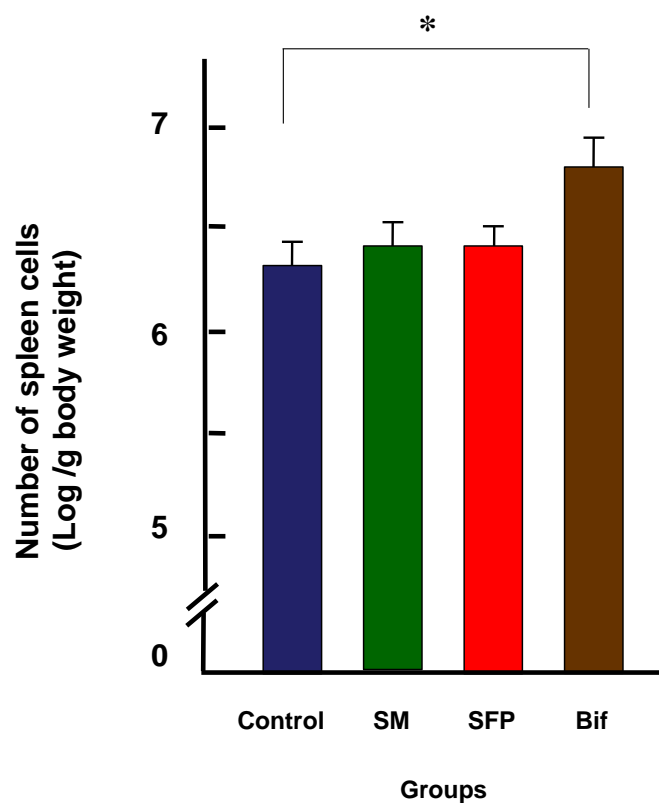


Figure 2-4. Effects of soybean milk-fermented product (SFP) on number of spleen cells in BALB/c germ free mice.

Values are expressed as mean \pm S. D. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. Bif: gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strain as a positive control. * $P < 0.05$, Significantly different from the value of control (Dunnett's test).

第3章 SFP 発酵菌 *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 株 (LP284) の 抗腫瘍活性

3-1 序論

Lactobacilli や *Bifidobacteria* に代表されるプロバイオティクスは、腸内フローラを介してあるいは直接的に働き、整腸作用、アレルギー改善、コレステロール低下作用、感染防御作用、抗腫瘍作用などヒトの健康に有益な働きを有することが知られている (23)。またプロバイオティクスは腸内の代謝の変化、発がん物質の分解、抗変異原物質の生成、宿主自然免疫、獲得免疫の改善により腫瘍形成の発症率を低下させることが、動物実験や臨床試験で明らかになってきている (93-95)。一方、これらの効果は死菌体でも同様な効果が得られることが知られている (96)。Asano ら (97) は *L. casei* LC-9018 の死菌体と生菌体の両方が、種々の投与方法においてもマウスの MBT-2 腫瘍の増殖を抑制したことを報告している。また生菌体と死菌体の免疫修飾活性の差異は菌株の違いによると考えられており、Ou ら (98) は乳酸菌 11 株の加熱死菌体とその生菌体の中で、*Enterococcus faecalis* YM-73 と *Lactobacillus salivarius* AP-32 の死菌体が最も免疫修飾作用が強いことを示した。

死菌体のメリットは長期保存が可能であり、生菌よりも輸送が簡単にできる点にある (96)。さらに生きたプロバイオティクスによって免疫抑制作用などによる生菌そのものの病原性によって引き起こされるマイナス効果のリスクも低く、プロバイオティクスの加熱死菌体を用いることは一般的には安全であると思われる。

プロバイオティクスの経口投与による抗腫瘍効果のメカニズムはまだ良く分かっていないが、プロバイオティクスの加熱死菌体と生菌体は同じ免疫改善作

用を有すると考えられている (96)。特に、経口投与されたプロバイオティクスはパイエル板 (PP; Peyer's patch) のマクロファージや樹状細胞 (DCs; Dendritic cells) に M 細胞を介して取り込まれ、活性型の成分に分解される (94, 99, 100)。これらの細胞は TNF- α 、IL-12、IFN- γ その他のサイトカインを産生する能力を得、宿主の免疫を修飾して抗腫瘍効果を発揮する (101, 102)。Soltan Dallal ら (103) は *L. casei* spp. *casei* 生菌体の経口投与により IL-12 と IFN- γ 産生が増強し、NK 細胞活性が上昇することによりマウスの肺がん細胞の増殖が抑制され生存日数が延びたことを報告している。Matsuzaki ら (104) は加熱処理した *Lactobacillus casei* LC9018 により、活性化マクロファージや DCs から最初に産生される TNF- α によって担がんマウスの生存率が高まったことを報告している。またこれら PP で活性化された免疫細胞は腸間膜リンパ節 (MLN; mesenteric lymph nodes) を経由して脾臓に遊走する (105, 106)。

第 1、2 章において *L. plantarum* BF-LP284 (LP284) を含む複数種の乳酸菌で発酵した SFP が腸内環境を改善し、宿主の免疫機能を高めることによって DMH 誘発の大腸がんの発症を抑制し、同系移植の MethA 腫瘍細胞の増殖を抑制することを示した (107)。SFP のこのような抗腫瘍効果は、少なくとも発酵に用いた乳酸菌死菌体の宿主免疫活性化によるものと考えられることから、抹消マクロファージが産生する TNF- α 産生能に対する発酵菌の作用を調べ、選抜した LP284 を加熱処理した死菌体 (H-Lp: Heat-killed LP284) の宿主の免疫機能に対する作用を調べた。またそれに続いて H-Lp の経口投与による抗腫瘍活性を同系移植の MethA 腫瘍移植マウスにおいて生菌体との比較を行うとともに抗腫瘍メカニズムについて検討した。

3-2 材料と方法

3-2-1 微生物

Lactobacillus plantarum BF-LP284、*L. acidophilus* ALAL005、*L. casei* ALAL003、*L. fermentum* ALAL013、*L. mali* ALAL014、*L. reuteri* ALAL001、*L. rhamnosus* ALAL004 は発酵食品から分離された菌株で株式会社エイ・エル・エイ中央研究所に保管されている。*L. plantarum* JCM1055、JCM1057、JCM1149、JCM1551、JCM6651、JCM8341、JCM8342、JCM8344 は日本微生物保存施設（RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan）から購入した。微生物は 37°C、24h、Man-Rogosa-Sharpe 液体培地（Difco Laboratories, Detroit, MN, USA）で培養した。全ての菌株は蒸留水で 2 回洗浄し、オートクレーブで 115°C、15 分、加熱殺菌した。各菌体は凍結乾燥し、4°C で保存した。LP284 株の生菌は同様に凍結乾燥した。

3-2-2 使用動物

マウスは温度 23 ± 1°C、湿度 50 ± 10%、午前 8 時から明暗サイクル 12 時間の飼育室で飼育した。飼料は MF 通常飼料（オリエンタル酵母工業株式会社；東京都板橋区）または AIN93M 精製飼料（オリエンタル酵母工業株式会社；東京都板橋区）を、飲水は水道水を共に自由に与えた。マウスは 1 または 2 週間の予備飼育後使用した。動物実験の実施にあたっては株式会社エイ・エル・エイ中央研究所動物実験倫理委員会の承認（承認番号 2012611）のもと行った。

3-2-3 抗腫瘍活性試験

5 週齢、雌 BALB/c マウス（日本チャールズリバー；神奈川県横浜市）を体重が均等になるように 3 群に分けた。LP284 生菌体（L-Lp: Live-LP284）と H-Lp を 3 週間経口投与（10 mg/day/head）後、Meth-A 腫瘍細胞を移植し、その後は 1 日おきに 20 日間投与を継続した。コントロール群には同様のスケジュールで生

理食塩水 (Fuso Pharmaceutical Industries, Osaka) を経口投与した。Meth-A 腫瘍細胞 (1×10^6 cells/0.2 ml 生理食塩水) は 3 群すべてのマウスの鼠蹊部皮下に移植した。腫瘍の大きさを試験期間中 3~4 日ごとに計測し、長径と短径の積の平方根 (mm) で表した。Meth-A 腫瘍細胞は東北大学細胞保存センターから寄与された。

3-2-4 TNF- α 産生による *Lactobacillus* 加熱菌体のスクリーニング

腹腔滲出細胞 (Peritoneal exudate cells ; PECs) は Ueda ら (108) の方法に従って調製した。すなわち、7 週齢の雄、ICR マウス (日本エスエルシー、静岡県浜松市) を CO₂ ガスにて安楽死させた後、加熱非動化した仔牛血清 (FCS; Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を 1% (v/v) 加えた RPMI1640 培地 (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD) で PECs を収集した。PECs は 5% FCS 加 RPMI1640 培地で 2×10^6 cells/ml に調整した。マクロファージは次の方法で調製した。PECs (200 μ l) を 96 穴平底培養プレート (Nunc®, Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) に入れ、37°C で 2 h、5% CO₂ インキュベーターで培養し、培養プレートに非接着の細胞を取り除いた。加熱死菌体溶液 (0.2 μ g/200 μ l、5% FCS 加 RPMI1640 培地) を各ウェルに添加し、24 時間培養後培養上清を収集した。各培養上清中の TNF- α は ELISA キット (Duo Set™ Mouse TNF- α ; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

3-2-5 パイエル氏板細胞 (Peyer' s patch cells ; PPCs) のサイトカイン産生

PP 細胞溶液は Hill ら (109) の方法に従って調製した。7 週齢雌 BALB/c マウス小腸から眼科ばさみを用いて PP を採取し、コラゲナーゼ処理 (1mg/ml、37°C、1h) により PPCs を調製した。PPCs を 5% FCS 加 RPMI1640 培地で 5×10^6 cells/ml に調整し、培養プレートに PPCs 懸濁液 (5×10^5 cells/well) と H-Lp あるいは L-Lp

(各 0.1 $\mu\text{g/ml}$) を添加した。5%CO₂ インキュベーターで 3 日間培養したのち培養上清を回収した。培養上清中 TNF- α と IFN- γ 濃度を ELISA アッセイキット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

3-2-6 担がんマウスの PPCs による TNF- α 産生

Meth-A 腫瘍細胞移植 16 日目に H-Lp あるいは生理食塩水を投与したマウスから PPCs を調製した。PPC 細胞液を 5×10^5 cells/well に調整し、5% FCS 加 RPMI1640 培地に懸濁した H-Lp (2.5 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、5% CO₂ インキュベーター中で 7 日間培養後、培養上清を回収した。TNF- α は ELISA アッセイキット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

3-2-7 担がんマウスの脾臓細胞によるサイトカイン産生

脾臓細胞は Saito ら (110) の方法に従って調製した。すなわち、H-Lp あるいは生理食塩水を投与したマウスの脾臓を Meth-A 腫瘍細胞移植 16 日目に取り出し、1% FCS 加 RPMI 1640 培地中でシリンジプランジャーを用いて押しつぶした後、200 メッシュのナイロンウールでろ過した。脾細胞を 5%FCS 加 RPMI 1640 培地に $5 \times 10^6/\text{ml}$ となるよう調整した。細胞浮遊液 (5×10^5 cells/well) を 5% FCS 加 RPMI 1640 に懸濁した H-Lp (0.02 $\mu\text{g/ml}$) あるいは培地のみと 3 日間培養し、培養上清を回収した。TNF- α 、IL-12p40、IFN- γ を ELISA アッセイキット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で測定した。

3-2-8 Winn アッセイ

Winn アッセイは Saito ら (84) の方法に従って行った。H-Lp あるいは生理食塩水を投与したマウス (n=6/group) から Meth-A 腫瘍細胞移植後 16 日目に脾臓を取り出した。脾臓細胞は上述の方法と同様にして調製し Winn アッセイのエフ

エクター細胞とした。エフェクター細胞 (1×10^7 個) と Meth-A 腫瘍細胞 (1×10^6 個) を 10:1 の比に混合し、新たな BALB/c マウスの鼠蹊部皮下に移植した。その後 3~4 日おきに腫瘍サイズを計測した。

3-2-9 抹消血単核球細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMCs) のフローサイト分析

PBMCs は MacFarland ら (III) の方法で調製後、Lee ら (II2) のプロトコールに従って分析した。すなわち、Meth-A 腫瘍細胞移植 18 日目に抹消血サンプルをヘパリンコーティングしたシリンジを用いて下大静脈から採取し、各群のマウス (n=4) ごとにプールした。1% ammonium chloride solution で溶血したあと、5% FCS 加 RPMI1640 培地で PBMCs (5×10^6 cells/ml) を調製した。PBMCs に Phycoerythrin (PE) -CyTM5-conjugated anti-mouse CD3 ϵ 、Fluorescein isothiocyanate (FITC) -conjugated anti-mouse CD4、PE-conjugated anti-mouse CD8a (Biolegend, San Diego, CA, USA) を添加し、氷上で 60 分間反応させたのち、Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Inc. USA) を用いて解析した。

3-2-10 統計解析

統計解析は StatMate IV software (ATMS Co., Ltd, Tokyo Japan) を用いて一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、群間の比較は Tukey's あるいは Dunnett's の多重比較検定を行った。なお、統計的有意水準は 5% 未満とした。

3-3 成績

3-3-1 *Lactobacillus* 株加熱菌体の TNF- α 産生

Table 3-1 に示す如く、LP284 株の加熱死菌体は他の *Lactobacillus* 菌株に比べ最

も高い TNF- α (1.14 ± 0.11 ng/ml) を産生した (Exp. 1)。さらに、*Lactobacillus plantarum* BF-LP284 は試験した 9 株の *L. plantarum* の中でも最も高い TNF- α (1.04 ± 0.04 ng/ml) 産生を示した (Exp. 2)。

3-3-2 PPCs のサイトカイン産生

PPCs の TNF- α 産生は H-Lp 刺激のみで見られ (15.7 ± 1.7 pg/ml)、IFN- γ 産生は H-Lp 刺激により L-Lp の 5 倍強かった (**Fig. 3-1**)。

3-3-3 腫瘍増殖抑制作用

腫瘍の増殖は H-Lp の投与により腫瘍移植後 12 日目 (7.54 ± 2.89 mm) から 20 日目にかけて対照群 (それぞれ 12 日目 11.82 ± 0.46 mm、20 日目 19.21 ± 1.18 mm) と比較して有意 ($P < 0.01$) に抑制された (**Fig. 3-2**)。L-Lp の投与では 14 日目 (11.16 ± 1.39 mm) に対照群 (13.05 ± 1.05 mm) と比べて有意に抑制された (13.05 ± 1.05 mm)。

3-3-4 担がんマウスの PPCs からの TNF- α 産生

Fig. 3-3 に示すように H-Lp 投与マウスの Meth-A 腫瘍細胞移植後 16 日目の PPCs から TNF- α (24.1 ± 3.3 pg/ml) は産生されたが、無刺激の対照細胞からは産生されなかった。また、対照の担がんマウスの PPCs からは H-Lp 刺激によっても TNF- α は産生されなかった。

3-3-5 脾臓細胞のサイトカイン産生

H-Lp あるいは生理食塩水を投与した担がんマウスの脾臓細胞の IFN- γ 、TNF- α 、IL-12p40 の産生を **Fig. 3-4** に示す。IFN- γ は H-Lp 刺激 (4.2 ± 1.5 pg/ml) により無刺激 (2.1 ± 0.5 pg/ml) に比較して有意に産生が増強された ($P < 0.05$)。生理

食塩水を投与されたマウスでは H-Lp 刺激 (2.1 ± 1.5 pg/ml) と無刺激 (2.1 ± 0.4 pg/ml) で差は見られなかった。対照マウスの脾細胞からの TNF- α あるいは IL-12p40 は刺激にも関わらず産生が見られなかった。

3-3-6 Winn アッセイ

Meth-A 腫瘍細胞移植後 10 日目における H-Lp 投与群の腫瘍サイズ (7.87 ± 2.04 mm) は対照群 (9.94 ± 0.91 mm) に比べて有意に ($P < 0.05$) 小さかった (**Fig. 3-5**)。なお、Meth-A 腫瘍細胞移植後 16 日目の脾臓細胞の数は H-Lp 群、コントロール群それぞれ $6.4 \pm 1.8 \times 10^7$ 、 $6.3 \pm 2.0 \times 10^7$ であった。これら担がんマウスの脾細胞数は無処置マウス (2.5×10^7 cells/head) の約 2.5 倍であった。

3-3-7 フローサイトによる PBMCs の解析

Meth-A 腫瘍細胞移植後 18 日目の H-Lp 投与マウスの抹消血中 CD3⁺ T 細胞の割合 (22.6%) はコントロールマウス (17.0%) に比較して 1.33 倍多かった。しかしながら CD4⁺ cells (ヘルパー T 細胞) と CD8⁺ cells (キラー T 細胞) は群間に差は認められなかった (**Fig. 3-6**)。

3-4 考察

今回、LP284 の加熱死菌体が *in vitro* において生菌体よりも強い TNF- α 産生性を示し、さらに Meth-A 腫瘍細胞移植マウスにおいて経口投与で腫瘍の増殖を抑制した。この結果から SFP の免疫賦活作用 (107) には LP284 の加熱死菌体が寄与している可能性が示唆された。乳酸菌の免疫修飾にはマクロファージあるいは DCs がペプチドグリカンやリポテイコイン酸のような細胞壁成分を補足し認識する必要があることが知られている (113, 114)。これら抗原提示細胞と T 細胞

は TNF- α 、IFN- γ をそれぞれ産生する (115, 116)。In vitro における H-Lp による PECs と PPCs の TNF- α 産生はマクロファージあるいは DCs により認識されたことを示し、また、IFN- γ の産生は T 細胞の活性増強を示すものと考えられた。また、PECs における TNF- α 産生性の差異は、Ou ら (98) が示した細胞表面の形態学的変化の差によるものや、菌株の差異によるもの (94, 115) と考えられるが、詳細は今後の検討課題である。

乳酸菌の生菌体に関しては、経口投与により腫瘍の発生や増殖が抑制されることが証明されている (94)。しかし、抗腫瘍活性について生菌と死菌の比較に関する研究は少ない。そこで H-Lp と L-Lp の抗腫瘍効果の差異を Meth-A 移植腫瘍細胞を用いて in vivo で検討した。その結果、H-Lp の経口投与は対照あるいは L-Lp よりも強力に腫瘍の増殖を抑制した。この差異は PPCs における H-Lp と L-Lp の刺激活性の違いによるものと推測された。

Streptococcus pyogenes から調製されるペニシリン様物質の OK-432 は経口投与でがんの免疫療法に用いる強力な BRM として知られている (35)。経口摂取した OK-432 は PP の M 細胞を介してマクロファージ、DC に取り込まれ、腫瘍細胞に対する宿主免疫を刺激する (35)。H-Lp は OK432 と類似した BRM と推測されることから、H-Lp を経口投与した担がんマウスにおいて PP におけるマクロファージ、DC の活性化は必須と考えられる。今回観察された PP における TNF- α の高産生性は、H-Lp の構成成分がマクロファージ、DC に貪食されたことを示すものと考えられた。次に、抗原によって刺激されたマクロファージと DC は MLN に移行することが報告されており (99, 106)、プロバイオティクスは腸管内だけではなく MLN や脾臓のような免疫器官の免疫を修飾する (105)。予備的な試験では、担がんマウスの MLN 細胞は H-Lp 投与マウスにおいて TNF- α のレベルが無処置マウスよりも高い結果を得ている (Data not shown)。これは H-Lp で活性化した PP の免疫細胞が MLN に移行したことを示すものと考えられ

た。

今回、Meth-A 腫瘍細胞移植マウスの脾臓の IFN- γ 誘導活性は H-Lp によって増強されることを観察した。Murosaki ら (117) および Fujiki ら (118) は、IFN- γ はヘルパーT (Th) -1 細胞の分化を誘導し、腫瘍増殖抑制に対する自然免疫と獲得免疫のリンクを形成することを示唆している。よって H-Lp で刺激された免疫細胞は IFN- γ を高産生し、腫瘍増殖抑制のための獲得免疫に寄与していることが推測される。Takeda ら (119) は IFN- γ だけではなく IL-12p40 の遺伝子発現が *L. plantarum* 06CC2 の経口投与によって増加することを示している。しかしながら、今回の研究で H-Lp は IL-12p40 には影響しなかった。この違いを明らかにするために腫瘍細胞移植 16 日目における脾細胞数を検討した。脾細胞数が H-Lp 投与、コントロールの両担がんマウス群で無処置のマウス群よりも高かったことから、脾細胞数の増加は H-Lp 投与によるものではなく、がん細胞の存在によるものと考えられた。すなわち担がんマウスの脾臓における細胞数の増加はがん抗原によって誘導された免疫細胞の遊走と集積によるものと思われた (105)。よって H-Lp とコントロール群間に IL-12p40 産生の違いが見られなかった理由として、H-Lp で刺激を受けた PP から遊走した免疫細胞数が、がん抗原で刺激された免疫細胞数よりも少なかったことによるものと推測された。

Yazdi ら (120) および Maroof ら (121) は、*L. acidophilus* の経口投与によりがん抗原によって刺激を受けた脾臓細胞における IFN- γ 、IL-12 の産生増強によって免疫反応が修飾され、がん状態下では抗腫瘍免疫細胞活性化のための Th1 反応が誘導されると報告している。さらに、腫瘍部位から脾臓に集積した免疫細胞はエフェクター細胞に分化誘導され腫瘍増殖抑制に働く (122)。われわれの結果とこれらの報告から、脾臓における抗腫瘍効果を持った細胞障害性リンパ球（キラーT細胞やナチュラルキラーT細胞など）や NK 細胞、細胞障害性マクロファージなどの種々のエフェクター細胞の誘導が H-Lp による抗腫瘍効果

のキーポイントであるといえる。Winn アッセイの結果は抗腫瘍エフェクター細胞が H-Lp によって脾臓に誘導されたことを示していると考えられる。

一方、Lim ら (123) は *L. rhamnosus* GG 摂取マウスにおいて、脾臓細胞中の CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 細胞レベルが膀胱がん形成抑制の要因としている。Lee ら (112) は担がんマウスの PBMCs 中 CD3⁺ and CD8⁺ cells の数が *L. casei* と *Bif. longum* の細胞質画分の経口投与により増加することを示している。がんの進展を予防あるいは抑制するために必要とされるこれらの免疫エフェクター細胞 (124) は血流を介して腫瘍部位に移動すると考えられる (105)。さらに Lim ら (123) は *L. rhamnosus* GG の摂取により腫瘍部位における免疫細胞の浸潤が増加し、腫瘍の増殖を抑制することを報告している。これらの免疫細胞 (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ cells) は担がんマウスにおいて脾細胞から腫瘍細胞へ移動すると推測される。今回の試験において H-Lp によってもたらされた CD3⁺ cells レベルの増加は、血流を介して脾臓から腫瘍部位へ CD3⁺ cells を増加させている可能性が考えられた。しかしながら、CD4⁺ (helper T cell) と CD8⁺ (killer T cell) の組成は H-Lp とコントロール間で差は見られなかった。その理由については今後さらなる検討が必要と考えられた。

これらの結果を総合すると、H-Lp は PPCs における TNF- α と IFN- γ の産生を促すことによって腫瘍増殖を抑制する強力な免疫修飾物質であることが示された。また PP で H-Lp によって活性化されたマクロファージと DC は、MLN を経由して脾臓に移動することが Winn アッセイによって確かめられ、最終的に抗腫瘍免疫細胞 (CD3⁺ cells) が血流を介して腫瘍部位に遊走し、腫瘍の増殖を抑制すると推測された。さらに詳細なメカニズムについては今後の課題である。

3-5 小括

SFP には発酵に使用した乳酸菌の死菌体が含まれる。乳酸菌の菌体成分は免疫賦活作用を有することが知られていることから、発酵菌 7 株の死菌体の免疫賦活活性をマウス腹腔マクロファージの TNF- α 産生を指標に比較した。その結果、LP284 株が最も強い活性を示したため、本菌株の死菌体を Meth-A 腫瘍移植マウスに経口投与したところ腫瘍の増殖を抑制し、その抑制は生菌体よりも強かった。この結果から SFP の腫瘍抑制作用には LP284 死菌体が大きく寄与している可能性が示唆された。次に LP284 の抗腫瘍メカニズムの検討を行った。LP284 は Meth-A 移植マウスのパイエル板細胞の IFN- γ 産生を増強し、さらに脾臓細胞においても IFN- γ 産生を増強した。これは LP284 により活性化したパイエル板の免疫細胞が脾臓に集積したことを示唆する。そこで LP284 を投与した Meth-A 移植マウスの脾臓細胞を MethA 細胞と混和して新たなマウスに移植すると Meth-A 腫瘍細胞の増殖を抑制した (Winn assay)。また、Meth-A 移植マウスの末梢血リンパ球中、CD3⁺細胞の割合が LP284 により増加した。これらの結果より、LP284 投与によりパイエル氏板細胞における免疫細胞が活性化され、脾臓における獲得免疫が確立し、リンパ球が腫瘍部位に Homing することによって腫瘍の増殖を抑制したと考えられた。

Table 3-1. Screening of heat-killed *Lactobacillus* for production of TNF- α by peritoneal exudate cells (PECs) in ICR mice.

	Strain	TNF- α (ng/ml)
Exp. 1	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF-LP284	1.14 \pm 0.11 ^a
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ALAL005	0.80 \pm 0.05 ^b
	<i>Lactobacillus casei</i> ALAL003	0.74 \pm 0.06 ^b
	<i>Lactobacillus fermentum</i> ALAL013	0.56 \pm 0.05 ^c
	<i>Lactobacillus mali</i> ALAL014	0.75 \pm 0.08 ^b
	<i>Lactobacillus reuteri</i> ALAL001	0.53 \pm 0.03 ^c
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ALAL004	0.75 \pm 0.09 ^b
Exp. 2	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF-LP284	1.04 \pm 0.04 ^a
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1055	0.34 \pm 0.03 ^d
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1057	0.76 \pm 0.03 ^b
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149	0.77 \pm 0.03 ^b
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1551	0.73 \pm 0.05 ^b
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM6651	0.68 \pm 0.07 ^b
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM8341	0.21 \pm 0.05 ^d
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM8342	0.68 \pm 0.11 ^b
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM8344	0.56 \pm 0.06 ^c

PECs were cultured in well plates for 2 h at 37°C and non-plastic adherent cells were removed. Heat-killed bacterial suspensions (0.2 μ g/200 μ l) were added to each well, and then culture supernatants were harvested after cultivation for 24 h. The amount of TNF- α in the supernatants was determined by ELISA kits. Each value is expressed as mean \pm S. D. (n=3). Superscript letters indicate statistically significant differences among the strains ($P < 0.05$, Tukey's test).

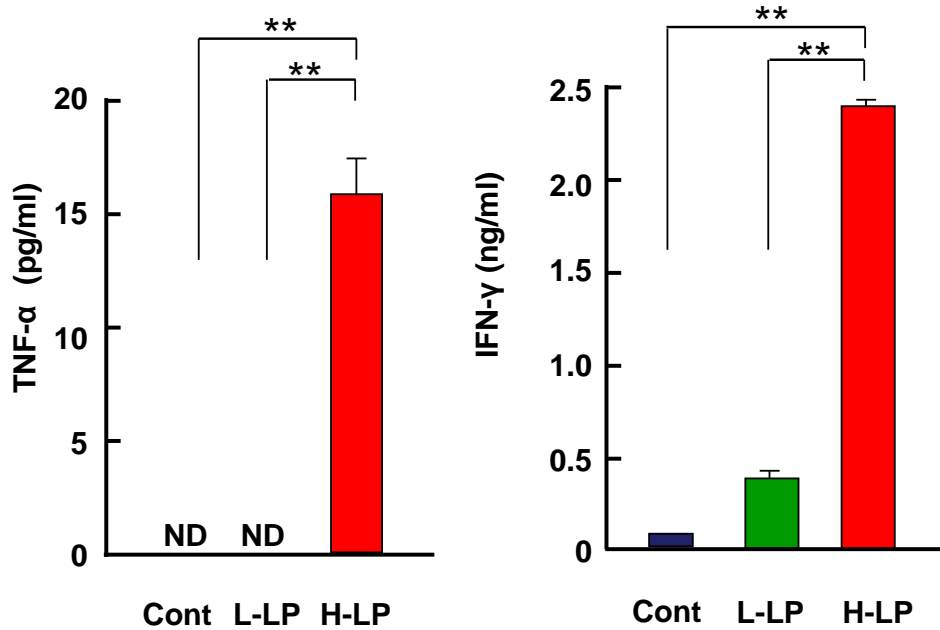


Figure 3-1. Cytokine production by Peyer's patch cells (PPCs) of BALB/c mice by stimulation with heat-killed cells of *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 (H-Lp), live Lp (L-Lp), or medium alone (Cont). PPC suspensions (5×10^5 cells/well) were cultured in well plates with H-Lp or L-Lp (0.1 μ g/ml each) or medium only for 3 days. The amounts of TNF- α and IFN- γ in each culture supernatant were measured using ELISA kits. Values are expressed as mean \pm S. D. (n=3). ND=not detected. ** P <0.01 versus control or L-Lp values (Tukey's test).

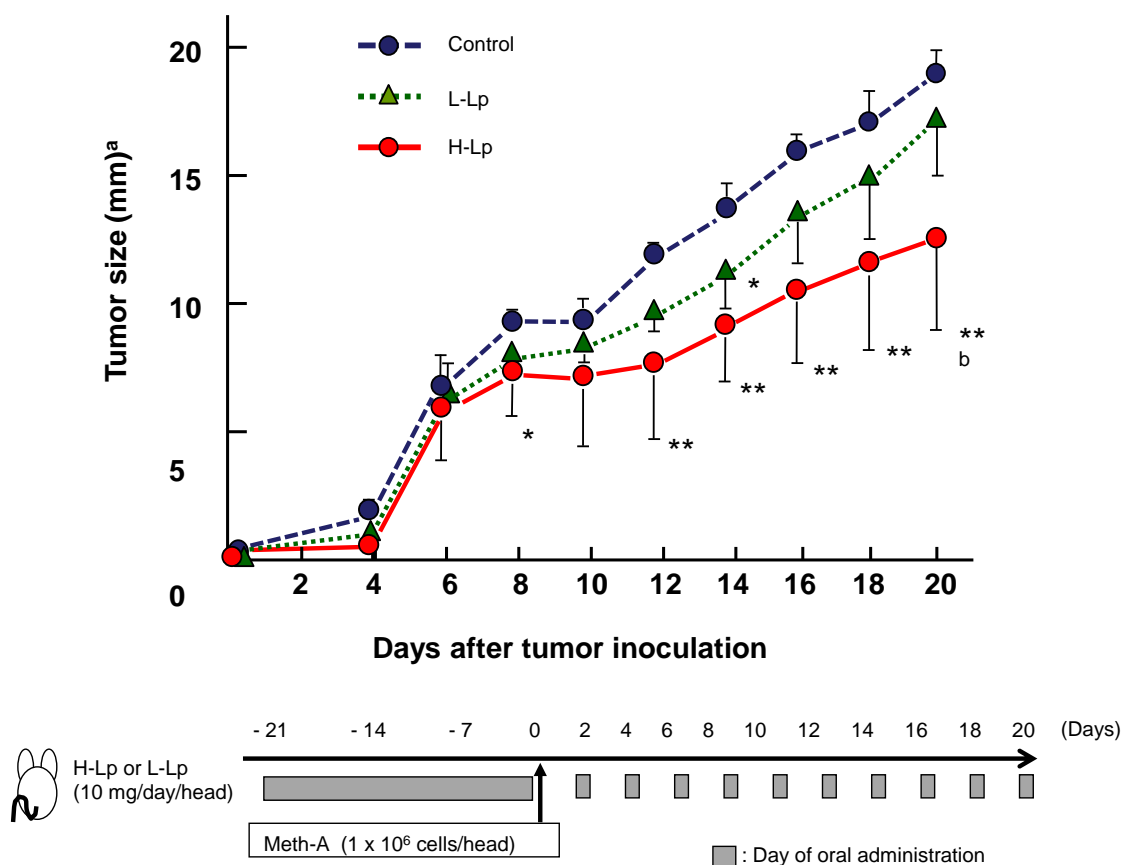


Figure 3-2. Growth inhibition of Meth-A tumors by oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 (H-Lp) or live Lp (L-Lp) in BALB/c mice. H-Lp or L-Lp was administered orally (10 mg/day/head) every day and saline was used as a control. After 3 weeks of administration, Meth-A tumor cells (1×10^6 cells/0.2ml/head) were implanted subcutaneously into the inguinal regions of the mice, and then animals were dosed every other day for 20 days. Values are expressed as mean \pm S. D. ^aTumor size was calculated by the square root of the value of the major axis \times minor axis (mm). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control values (Tukey's test). ^b $P < 0.05$ versus values of L-Lp (Tukey's test).

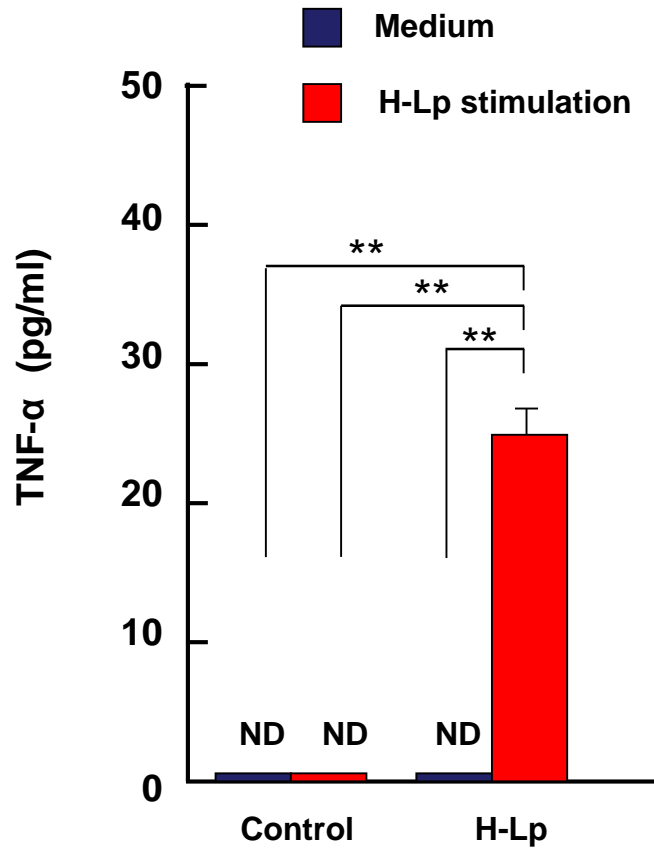


Figure 3-3. Production of TNF- α by Peyer's patch cells (PPCs) in tumor-bearing BALB/c mice administered heat-killed *Lactobacillus plantarum* BF-LP284(H-Lp). PPC suspensions (5×10^5 cells/well) were cultured in well plates with H-Lp (2.5 μ g/ml) or medium only for 7 days. The amounts of TNF- α in culture supernatants were measured using ELISA kits. Values are expressed as mean \pm S. D. (n=3). ** $P < 0.01$ versus control values (Tukey's test).

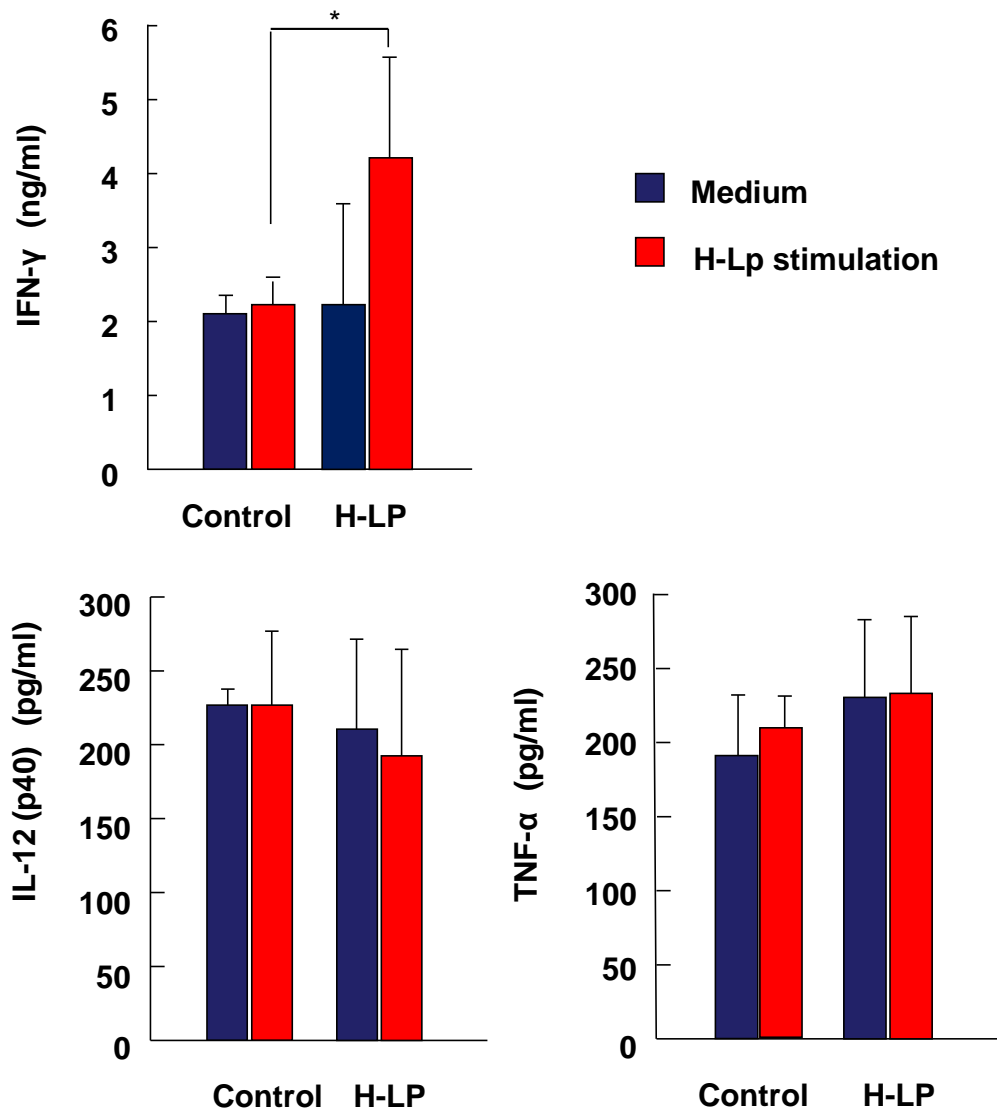


Figure 3-4. Cytokine production in spleen cells of Meth-A tumor-bearing BALB/c mice administered heat-killed *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 (H-Lp). Cell suspensions (5×10^5 cells/well) were cultured in well plates with H-Lp (0.02 μ g/ml) or medium only for 3 days. Values are expressed as mean \pm S. D. (n=4). * P <0.05 versus control values (Tukey's test).

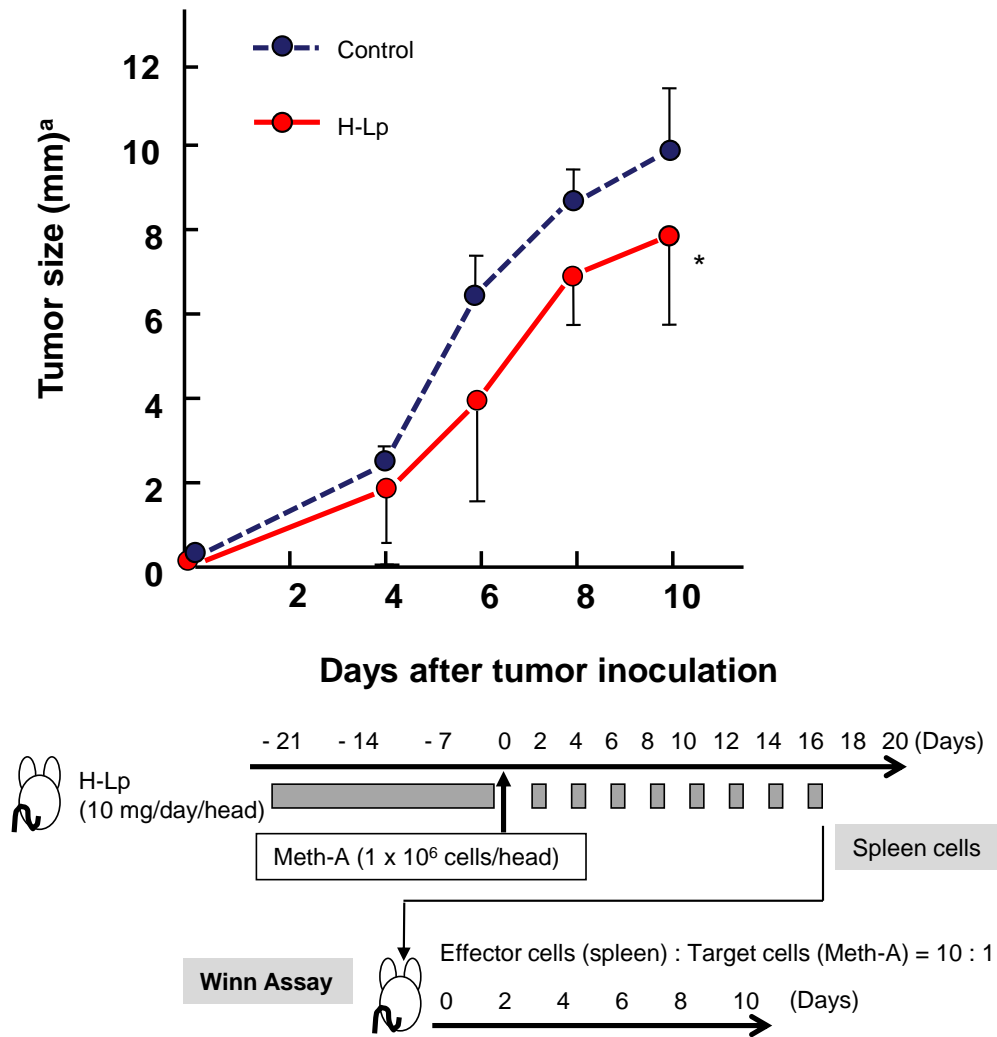


Figure 3-5. Winn neutralization assay of growth inhibition of Meth-A tumors by administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 (H-Lp) in BALB/c mice. Spleens were obtained from mice (n=6/group) administered H-Lp or physiological saline on day 16 after Meth-A tumor cell inoculation. Admixtures of spleen cells (1 × 10⁷) and Meth-A tumor cells (1 × 10⁶) at a 10:1 ratio were injected subcutaneously into the inguinal regions of syngeneic intact BALB/c mice. Values are expressed as mean ± S. D. ^aTumor size was calculated by the square root of the value of the major axis × minor axis (mm). **P*<0.05 versus control (Dunnett's test).

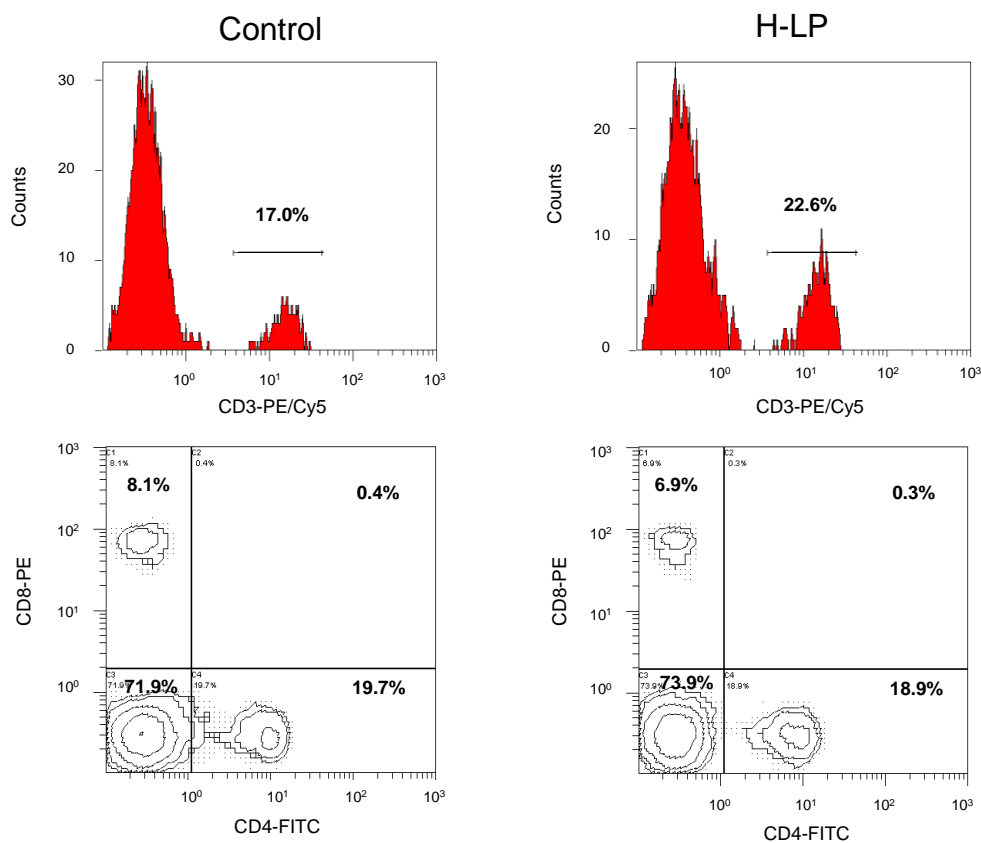


Figure 3-6. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in Meth-A tumor-bearing BALB/c mice. PBMCs were stained with PE/Cy5-conjugated anti-mouse CD3 ϵ , FITC-conjugated anti-mouse CD4, and PE-conjugated anti-mouse CD8a, and cell distribution ratio was evaluated using a Coulter Epics XL device.

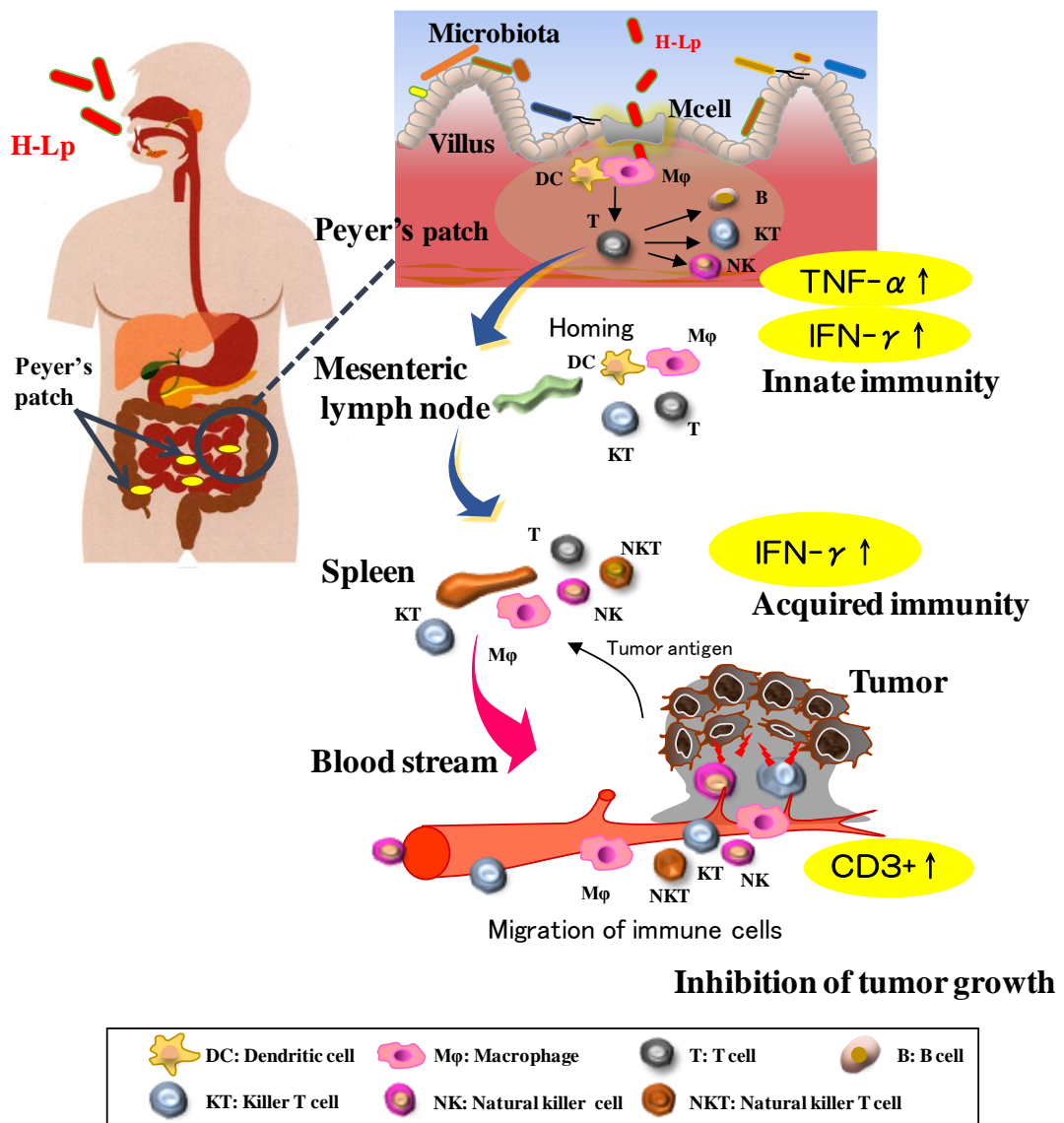


Figure 3-7. Hypothetical anti-tumor mechanisms of heat-killed *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 (H-Lp).

第4章 SFP-s の高血圧改善作用

4-1 序論

高血圧症は遺伝的な因子や生活習慣などの環境因子が関与する慢性疾患であり (125)、過剰な塩分摂取、肥満、過剰な飲酒、精神的ストレス、喫煙、運動不足などが主な原因と考えられている。高血圧状態が長く続くことにより動脈硬化を引き起こし、脳出血や脳梗塞、大動脈瘤、心筋梗塞、心肥大、腎障害などの原因となることから、血圧のコントロールは非常に重要である (126)。

高血圧症の約 90%を占めるといわれる本態性高血圧症の原因の中で、レニン-アンジオテンシン系 (R-A 系) は重要な因子であると考えられている (127)。本系においてアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE: Angiotensin I-Converting Enzyme [EC3.4.15.1]) が中心的な役割を果たしており、ACE はアンジオテンシンノーゲンからレニンの作用によって生成したアンジオテンシン I の C 末端ジペプチド (His-Leu) を切断する。これにより不活性なアンジオテンシン I は強い血管壁平滑筋収縮作用のあるアンジオテンシン II へと変換され血圧が上昇する (Fig. 4-1)。したがって、ACE を阻害することにより血圧の降下が可能と考えられることから、ACE 阻害物質が医薬品や機能性食品として利用されている。特に、乳酸菌を用いた発酵乳から単離された ACE 阻害活性ペプチドに関する研究は多く (128-130)、Takano ら (131, 132) は、*L. helveticus*、*Saccharomyces cerevisiae* による発酵乳中のトリペプチド (Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro など) が、ACE を阻害することにより降圧効果を示すとの一連の研究からこれを機能性食品として上市を果たしている。

一方、SM の発酵物に関しては、Liu ら (133, 134) が *L. plantarum* TWK10 による培養上清がデオキシコルチコステロン誘発高血圧症ラットの血圧を低下さ

せ、その作用機序の一つとして ACE 阻害作用を報告している。また Yeo ら (135) は *L. acidophilus* FTDC8033、*L. casei* ATCC393、*Bifidobacterium* FTDC8943 等の乳酸菌やビフィズス菌をオリゴ糖共存下で培養することにより、*in vitro* における ACE 阻害作用が増強されることを報告している。人に対する効果は、Hariri ら (136) が II 型糖尿病患者を用いたダブルブラインド試験において、*L. plantarum* で発酵した SM の飲用 (200 ml/日、8 週間) で、肥満指数として用いた BMI (Body Mass Index) とウェスト-ヒップ比に差は認めなかったが、収縮期血圧に有意な降下が認められたことを報告している。

このように、SM の発酵液は血圧降下作用を有し、その作用機序の一つとして ACE 阻害作用が考えられることから、SFP にも同様な効果が期待される。そこで、SFP の可溶性画分の SFP-s について ACE 阻害物質の分画を行い、降圧成分の分画を試みた。

4-2 材料と方法

4-2-1 動物

8 週齢の自然発症高血圧ラット (Spontaneously hypertensive rat: SHR) を日本チャールズリバー社 (神奈川県横浜市) より購入した。動物は温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、午前 8 時から明暗サイクル 12 時間の飼育室で飼育した。通常飼料 (MF; オリエンタル酵母工業株式会社; 東京都板橋区) または精製飼料 (AIN93M: オリエンタル酵母工業株式会社; 東京都板橋区)、ならびに飲水は水道水をいずれも自由に与えた。動物は 1 または 2 週間の予備飼育後使用した。動物実験の実施にあたっては ALA 中央研究所動物実験倫理委員会の承認 (平成 18 年 3 月承認) のもと行った。

4-2-2 SFP-s の調製

第 1 章、1-2-1 SFP の調製に従って得られた発酵液を濾紙（東洋濾紙 No.2）にてろ過し上清を分離した。さらにメンブレンフィルター（ $0.45\ \mu\text{m}$ ）にてろ過後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。

4-2-3 検体投与と血圧測定

検体投与前に 1 群 3～5 匹の SHR の血圧を測定した。測定は 37°C の保温箱でラットを加温し、テールカフ法を用いた非観血式血圧測定器（ラット用血圧計 DSR801A、トーイデン工業株式会社）にて血圧を測定した。検体は蒸留水に溶解し、胃ゾンデを用いて単回経口投与（ $10\sim 100\text{mg}/0.5\text{ml/head}$ ）した。投与 5 時間後に再度血圧を測定した。

4-2-4 ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性は Matsui ら (137) の方法にしたがって測定した。すなわち、 $25\ \mu\text{l}$ の被検体と基質として $50\ \mu\text{l}$ の Hyppuryl-L-histidyl-L-leucine（Hip-His-Leu、Sigma Chemical Co.、MO、USA）溶液（ 200mM NaCl 含 2.5mM ホウ酸バッファ、 $\text{pH}8.3$ ）、 $50\ \mu\text{l}$ のウサギ肺 ACE（ 25mU/ml ）を 37°C で 60 分、反応させた。 $125\ \mu\text{l}$ の 0.5N 塩酸で反応を停止し、 pH を 9 に調整後 $25\ \mu\text{l}$ の 2, 4, 6-trinitrobenzen sulfate（TNBS、ナカライタスク、京都）溶液（ 0.1M Na_2SO_3 ）を加えた。 37°C 、20 分インキュベート後、 4.5ml の 4mM Na_2SO_3 （ 0.2M NaH_2PO_4 ）を加え、TNP(Trinitrophenyl)-His-leu 複合体の 416nm の吸収を分光光度計で測定した。ACE 阻害活性は、次式により求めた。

$$\text{ACE 阻害活性 (\%)} = (\text{B}-\text{A}) / (\text{B}-\text{C}) \times 100$$

A; 被検体、B; ブランク、C; ACE 酵素ブランク

4-2-5 降圧物質の分画

SFP-s 8.16 g を Sephadex G-25 superfine カラム (100mmφ×350mm) にアプライし、蒸留水で溶出 (5ml/min) した。溶出液は 25ml ずつフラクションコレクターにより分取し、260nm の吸収を分光光度計で測定した。また、各フラクション 50μl に、8% フェノール 0.1ml、濃硫酸 1ml を加え、10 分後に 492nm の吸収を分光光度計にて測定した。

4-2-6 統計解析

統計解析は StatMate IV software (ATMS Co., Ltd, Tokyo Japan) を用いて、投与前後の比較には対応のある 2 群間の *t* 検定を、また群間の比較には Tukey's の多重比較検定を行った。なお、統計的有意水準は 5% 未満とした。

4-3 成績

4-3-1 SFP、SFP-s の血圧降下作用

SFP (100mg/head) 投与前、投与 5 時間目の収縮期血圧実測値はそれぞれ 201 ± 2 mmHg、 182 ± 9 mmHg で、投与前に対して有意 ($P < 0.05$) な低下を示した。これに対して対照群の生理食塩水投与前、投与 5 時間目の実測値はそれぞれ 200 ± 3 mmHg、 197 ± 3 mmHg と有意な変化は認められなかった (**Fig. 4-2A**)。また、SFP の可溶性画分である SFP-s の投与 (100mg/head) 前、投与 5 時間後の実測値はそれぞれ 207 ± 7 mmHg、 199 ± 4 mmHg で SFP と同様に有意 ($P < 0.05$) な低下を示した (**Fig. 4-2B**)。一方、SM のみの投与 (100mg/head) では投与前 207 ± 7 mmHg に対して投与 5 時間目 210 ± 11 mmHg と有意な低下は認められなかった (**Fig. 4-2C**)。

4-3-2 SFP-s の分画と ACE 阻害活性

SFP-s のカラム溶出液を紫外吸収 (260 nm) およびフェノール・硫酸発色に基づく 492 nm の吸収をモニタリングし、ピーク形状からフラクション 1~5 に分けた (**Fig. 4-3A**)。各フラクションの収率はそれぞれ、Fr. 1; 11.0%、Fr. 2; 8.1%、Fr. 3; 10.2%、Fr. 4; 10.7%、Fr. 5; 59.1% (合計 99.1%) であった。それぞれのフラクション中、Fr. 3 が最も高い ACE 阻害活性を示した (**Fig. 4-3B**)。

4-3-3 分画物 (Fr. 3) の血圧降下容量依存性

SHR に対して Fr. 3 を単回投与 (10、30、60mg/head) することにより、降圧作用に容量依存性が認められた (**Fig. 4-4**)。

4-4 考察

高血圧症は成人のみの疾患ではなく、近年、若年層の高血圧症患者が増加している (128)。高血圧治療には数多くの降圧剤が用いられているが、常用性や副作用の問題から安全に摂取できる食品で高血圧を予防することが望ましい。Hariri ら (136) は未発酵の SM 飲用では血圧降下作用は示さなかったことを報告しているが、我々の SHR を用いた動物実験においても、SM は血圧降下作用を示さず、SFP ならびに SFP-s は血圧降下作用を示した。このことは、乳酸菌による発酵により血圧降下物質が生成したことを示しており、Hariri らの結果と一致した。すなわち、乳酸菌による発酵豆乳が血圧のコントロールに役立つ食品として有用であると考えられる。

これまで乳の酸加水分解物や *L. helveticus* 等の乳酸菌による分解で生成したペプチドがレニン-アンジオテンシン系における ACE 活性を阻害することにより

降圧作用を示すことが明らかにされている (128-132)。しかしながら、SM の乳酸菌発酵物に関しては ACE 阻害作用を機序とする降圧作用は確認されているものの、有効成分に関する報告は見当たらない。今回 ACE 阻害活性を示した粗精製画分 Fr. 3 は糖質の発色を示すことから、乳から分離されたペプチド等とは異なる可能性が考えられた。Washida ら (138) はクズ葉から抽出した ACE 阻害活性作用を有する物質を単離し、Genistein-7-*o*-apiosyl-(1, 6)-glucoside であると同定している。SFP-s 中のイソフラボン類は発酵によりほとんどがアグリコンに変換されていることから、Fr. 3 中にこのようなイソフラボン配糖体が含まれる可能性は少ないが、降圧物質の解明のため今後さらなる分画精製が必要と考えられた。

4-5 小括

自然発症高血圧ラット (SHR) に SFP、SFP-s ならびに豆乳を経口単回投与し、血圧の変化をテールカフ法により非観血的に測定した。その結果、SFP、SFP-s は投与 5 時間目に生理食塩水を投与した対照ラットに対して有意な血圧低下を示した。一方、豆乳は血圧低下作用を示さないことから発酵により血圧低下物質が産生されたことが推測された。そこで SFP の可溶性画分である SFP-s を Sephadex-G25 カラムクロマトグラフィーにて分子量分画した結果、糖質の発色を示す画分に血圧低下作用が認められた。この画分は血圧上昇に関連するアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害活性示したことから、ACE 阻害が降圧作用メカニズムの一つと考えられた。

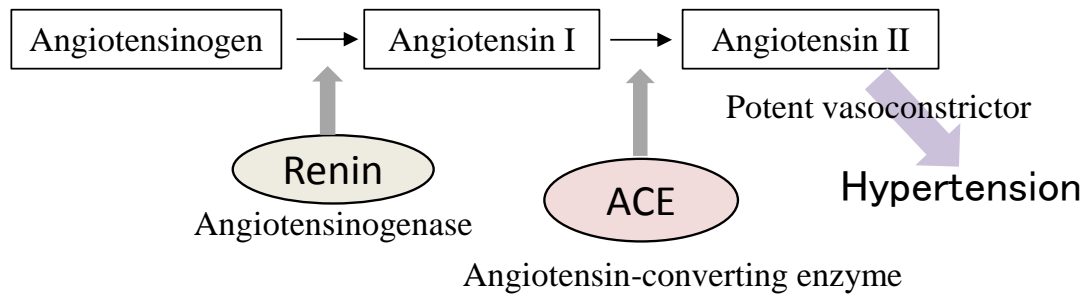


Figure 4-1. The Renin-Angiotensin system

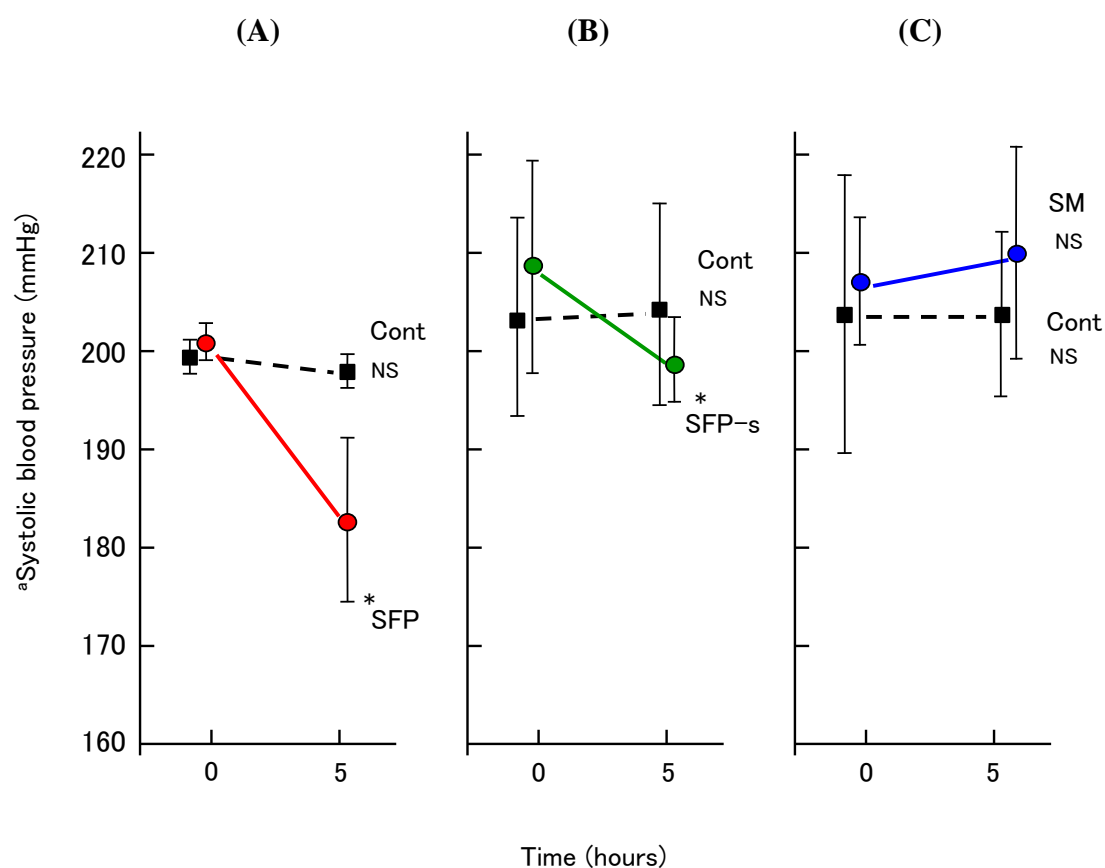


Figure 4-2. Suppression of systolic blood pressure by oral administration of SFP, SFP-s and soymilk (SM) in spontaneously hypertensive rat (SHR). ^aSystolic blood pressure was measured individually at 0 and 5th hour after sample administration. Values are expressed as mean \pm S. D. (A; n=3, B and C; n=5). * P <0.05, significantly lower than that before the administration (Two-sided paired t test). NS, No significance.

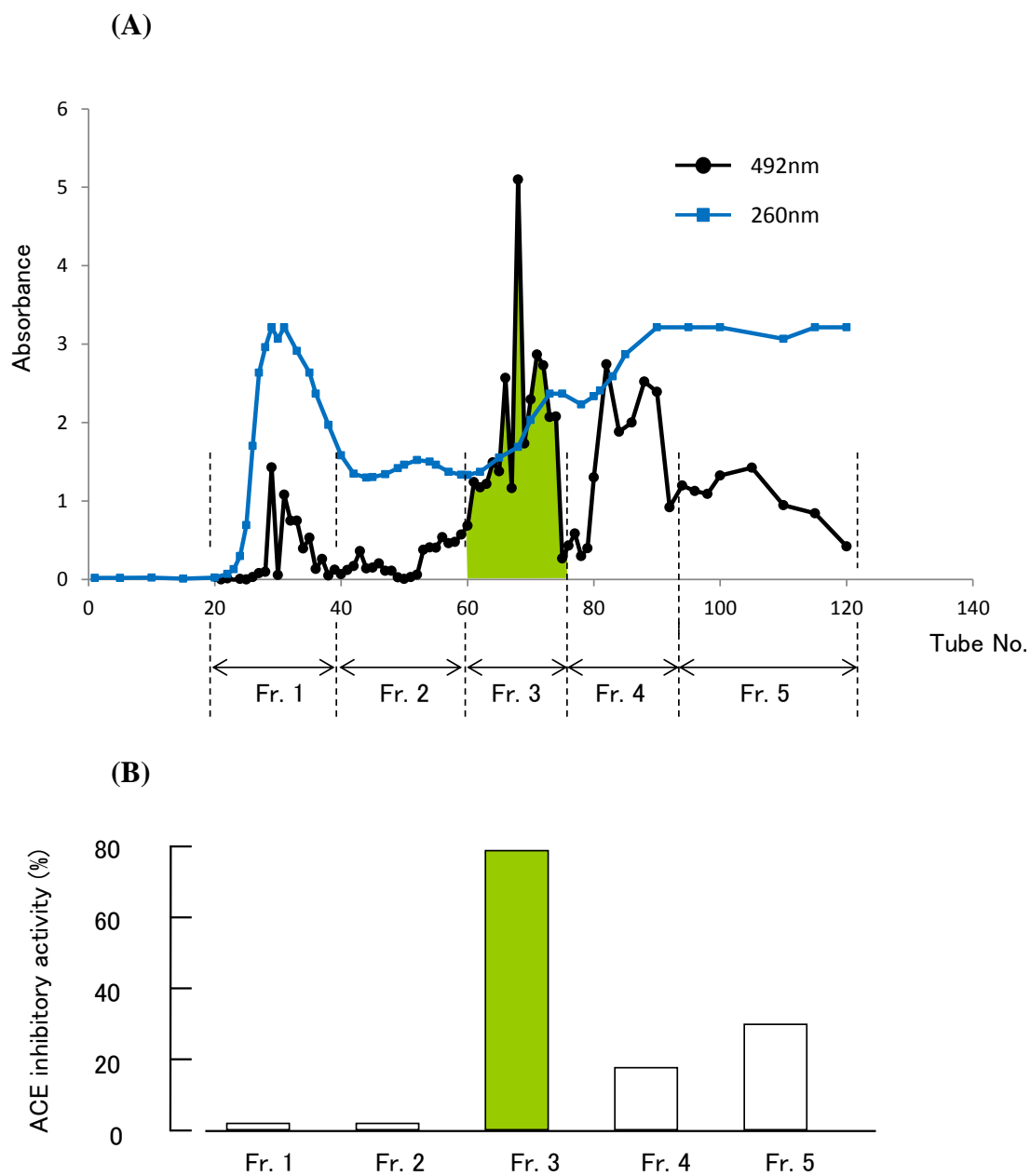


Figure 4-3. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of the fraction of SFP-s by gel column chromatography on Sephadex G25.

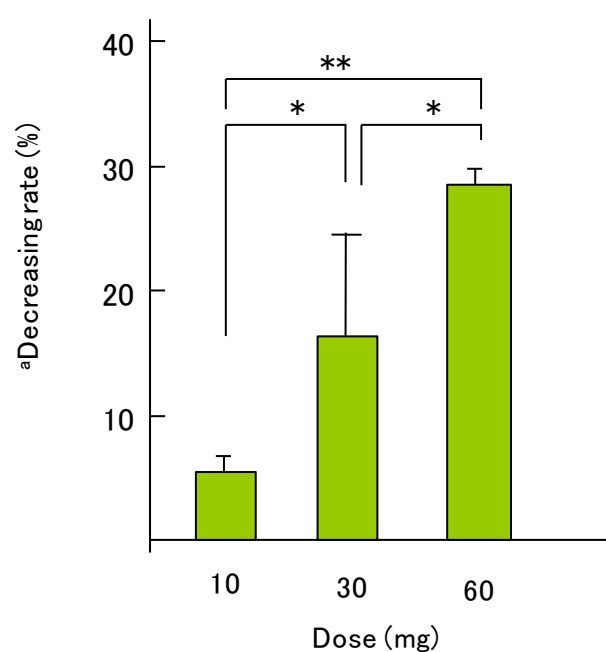


Figure 4-4. Decreasing rate of systolic blood pressure by oral administration of fraction 3 in spontaneously hypertensive rat (SHR). ^aSystolic blood pressure was measured individually at 0 and 5th hour after sample administration. Values are expressed as mean \pm S. D. (n=3). Significant difference by Tukey's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

第 5 章 SFP-s の肝・腎機能障害改善作用

5-1 序論

肝疾患の 3 大原因はウイルス、アルコール、肥満である。ウイルス性肝炎では免疫反応による持続性炎症（肝炎）が引き起こされ、多くは脂肪肝を合併して肝硬変へと進展する。アルコール性肝障害では脂肪肝から肝線維症や肝硬変へ、また肥満者の一部にみられる非アルコール性脂肪性肝炎においても炎症の持続により肝硬変に進展する。肝硬変は肝がんに移行するため、早期の治療が必要である。

近年、プロバイオティクス、プレバイオティクス、シンビオティクスによる腸内フローラの正常化が肝硬変や肝性脳症の改善に働くことが報告されている (139-142)。腸内フローラが関係する肝障害の原因物質として、2 次胆汁酸のデオキシコール酸 (DCA) があげられるが、DCA は肝で合成された 1 次胆汁酸のコール酸が腸管内の *Clostridium* やそれ以外の腸内微生物が持つ 7 α -デヒドロキシラーゼによって変換生成される (143)。DCA は界面活性作用が肝細胞を障害するほか (144)、細胞老化の促進 (145)、発がんプロモーターとしても働く (146) ことが報告されている。したがって腸内フローラの正常化による *Clostridium* 等の減少は腸管内の DCA 濃度を低下させ、肝障害の改善やがん抑制につながると考えられている (143)。Shiina らは DCA を経口で負荷したラットにおいて胆汁鬱滞性の肝・腎障害が惹起され、*Enterococcus faecalis* AD1001 株および *Lactobacillus reuteri* AD0002 株の加熱処理死菌体が、その障害を改善することを報告している (38)。そこで、SFP-s の肝ならびに腎機能改善作用を、DCA 負荷肝障害モデル、ならびにウイルス性肝障害モデルとして知られているガラクトサミン誘発肝障害モデルを用いて検討した。

5-2 材料と方法

5-2-1 SFP-s の調製

第 4 章 4-2-2 SFP-s の調製 と同様に行った。

5-2-2 動物

ウィスター系、雄、5 週齢のラットをチャールズリバー社（神奈川県横浜市）から購入し、温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗 12 時間ずつの照明サイクルの飼育室内で MF 粉末飼料（オリエンタル酵母工業、東京都板橋区）を与えて 1 週間予備飼育した。動物実験の実施にあたっては理化学研究所「動物実験実施規定」（承認番号 62）に従った。

5-2-3 DCA 誘発肝・腎機能障害に対する SPF-s の経口投与試験

6 週齢時にラットの体重の平均とばらつきが等しくなるよう 2 群に分けた。対照群（n=6）には 0.5%濃度の DCA（和光純薬、大阪）を含有する MF 飼料を 6 週間与え、投与群（n=6）には 5%の SFP-s と 0.5%の DCA を含む粉末飼料を与えた。飼料並びに飲水はともに自由に与えた。投与開始後 0、2、4、6 週目に各個体の尾静脈から血液を 0.5ml 採取し血清を分離した。血清中の L-アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST: L-Aspartate aminotransferase）、L-アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT: L-Alanine aminotransferase）、尿素窒素（BUN: Blood urea nitrogen）、尿酸（UA: Uric acid）、総コレステロール値（T-CHL: Total cholesterol）は酵素キット（C-テストワコー；和光純薬工業、大阪）を用いて測定した。実験期間の最終週に各ラットを代謝ケージに移し、1 日の尿排泄量および尿中電解質濃度を測定した。最終的に CO₂ ガス麻酔下で腹部大静脈よりシリ

ンジを用いて採血し臓器重量を測定した。採取した血清は総タンパク質 (TP: Total protein)、アルカリフォスファターゼ (ALP: Alkaline phosphatase)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP: γ -Glutamyl transpeptidase)、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP: Leucine aminopeptidase)、グルコース (GLU: Glucose) はドライケムアナライザー3030 (富士フイルム ; 東京) を用いて測定し、過酸化脂質 (LPO: Lipid peroxide)、 β -リポタンパク (β -LP: β -Lipoprotein)、総胆汁酸 (T-BA: Total bile acids) は酵素キット (C-テストワコー ; 和光純薬工業、大阪) を用いて測定した。

5-2-4 D-ガラクトサミン (GMN: Galactosamine) 誘発肝障害に対する SFP-s の経口投与試験

ウィスター系、雄、6 週齢のラットを体重の平均とばらつきが等しくなるよう 2 群に分けた。対照群 (n=7) には MF 飼料のみを与え、投与群 (n=6) には 5% の SFP-s を含有する MF 飼料を与えた。飼料、水ともに 3 週間自由に与えた。3 週目に GMN (和光純薬工業、大阪) を体重 1kg あたり 500mg 投与となるように調製した溶液を腹腔内に注射した。GMN 投与後 1、2、3、6 日目に尾静脈から 0.5ml の血液を採取し、血清 AST 活性を測定した。

5-2-5 細胞障害の改善作用

ラット肝および腎の初代培養細胞を重クロム酸塩 ($K_2Cr_2O_7$; 関東化学、東京) に暴露することによって細胞障害を誘発し、漏出する乳酸脱水素酵素 (LDH: Lactate dehydrogenase) の濃度を測定する方法を用いて SFP-s の細胞障害改善作用を評価した (147-150)。すなわち、コラゲナーゼ (和光純薬工業、大阪) を含むメディウム E 培地で分散した約 2×10^6 個のラット肝細胞を 60mm のコーニング製ペトリ皿 (イワキガラス、千葉) に播種し、5% CO_2 、95% 空気に調整され

加湿したインキュベーター中で 37℃、3 時間培養した。その後 SFP-s 溶液 (10mg/ml) をこの初代培養細胞の培地中に 1.3、2.5、5.0、10μl/ml 添加して更に 20h 培養した。培地を捨て初代培養細胞のシートに重クロム酸塩 (1mM) と上記の 4 濃度の SFP-s を含む食塩-グルコース培地 {SGM; 50mM 4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジンスルホン酸バッファー (pH7.2)、100mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化カリウム、2mM 塩化カルシウム、5mM グルコース} で覆い、37℃で 8 時間培養した。SGM を回収して 4℃で 1000rpm、5 分間遠心して細胞を除き、細胞から漏出した LDH を Mitchel ら (151) の方法を用いて測定した。SFP-s も重クロム酸塩も添加していない対照の初代培養細胞は SGM で凍結してその後融解した。この凍結-融解の手順は 3 回繰り返した。細胞のシートをゴムへらで掻き取り、超音波破碎機 (モデル UR20-P ; トミー精工社、東京) を用い強度 8 で 1 分間破碎した後、4℃で 10000rpm、10 分間遠心分離した。遠心上清は対照の細胞として LDH の分析に供した。SFP-s と重クロム酸塩で処理した細胞から漏出した LDH の割合は対照の肝細胞から漏出した総 LDH 量に対する割合で算出した。重クロム酸塩処理したラットの初代培養腎細胞に対する SFP-s の影響については、肝細胞と同様の方法で評価した。腎細胞からの LDH 漏出割合は SFP-s 未処理の細胞から SGM 中に漏出した LDH 量に対する SFP-s 処理の細胞から漏出した LDH 量の割合で算出した。

5-2-6 LP0 の測定

分離肝細胞では、重クロム酸化合物による脂質過酸化の過程においてマロンジアルデヒド (MDA: Malondialdehyde) の生成が促進されることが示されている (152) ので、MDA 生成に対する SFP-s の効果を Susa ら (153) の方法でラット初代培養肝細胞を用いて試験した。すなわち、前のセクションにおいて述べた重クロム酸塩処理の後に、細胞を氷冷したリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し、

ペトリ皿から掻き取って除いた。細胞を氷冷した PBS に再懸濁し、超音波破碎したのち、MDA 生成を測定 (154) することによって細胞の過酸化脂質レベルを算出した。

5-2-7 統計処理

統計解析は StatMate IV software (ATMS Co., Ltd, Tokyo Japan) を用いた。データの平均値の有意性は、分散が等しい場合にはスチューデントの t 検定を、分散が等しくない場合にはウェルチの t 検定を用いた。統計学的有意水準は 5% 未満とした。ラット試験の AST、ALT の数値については、分布が歪んでいたため、データを対数変換により正規化しさらなる解析に用いた。ただし結果の欄には変換前の数値を示した。

5-3 成績

5-3-1 DCA 誘発による肝・腎機能障害に対する改善

Fig. 5-1A に示すように、DCA を負荷した対照群においては血清 AST 活性が 2 週目で 786 ± 475 IU/l まで急激に上昇し、4 週目で 2469 ± 2182 IU/l とピークに達し、その後 6 週目で 722 ± 502 IU/l に減少した。しかしながら SFP-s 群では急激な上昇は明らかに抑制され、2、4、6 週目にそれぞれ 195 ± 105 IU/l、 788 ± 744 IU/l、 147 ± 67 IU/l と、2、6 週目においては有意 ($P < 0.05$) に抑制された。ALT 活性においても同様に対照群で ALT の上昇がみられたのに対して、SFP-s 群では 2 週目において DCA 対照群と比較して有意 ($P < 0.05$) に抑制された (**Fig. 5-1B**)。また **Table 5-1** に示すように、SFP-s 群では 4、6 週目において血清 BUN 値が対照群に対して有意 ($P < 0.05$) に低かった。UA、T-CHL 値には SFP-s 投与による影響は認められなかった。TP、ALP、 γ -GTP、LAP、GLU、LPO、 β -LP に群間の

差は認められなかった (**Table 5-2**)。SFP-s 群の血清 T-BA 濃度 ($46 \pm 34 \text{ nmol/ml}$) は対照群 ($81 \pm 36 \text{ nmol/ml}$) に比較してやや低い傾向が見られた。尿の排泄量は対照群に比較して SFP-s 群で多かったが、尿中電解質 (Na、K、Cl) 排泄量に有意な差は認められなかった。

5-3-2 GMN 誘発による肝障害に対する改善

Fig. 5-2 に示すように、GMN 投与後、対照群では AST 値は 1 日目 $3172 \pm 2379 \text{ IU/l}$ 、2 日目 $2811 \pm 2210 \text{ IU/l}$ と急激に上昇し、3 日目には $372 \pm 323 \text{ IU/l}$ まで急激に減少した。SFP-s 群では AST は対照群に比べて有意 ($P < 0.05$) に上昇が抑制され、1 日目 $1423 \pm 1857 \text{ IU/l}$ 、2 日目 $1009 \pm 1395 \text{ IU/l}$ 、3 日目 $142 \pm 161 \text{ IU/l}$ と対照群の約 45% のレベルであった。

5-3-3 細胞障害の改善作用

Fig. 5-3 に示すように、肝細胞を 1 mM の重クロム酸塩で処理した場合に細胞は障害を受け、対照の細胞では総 LDH の 18% が漏出した。しかしながら、重クロム酸塩と SFP-s を同時に作用させた場合には LDH の漏出は未処理の対照細胞に対して 7% の漏出と、有意 ($P < 0.05$) に障害が抑制された。このことは SFP-s 処理は重クロム酸塩処理による障害から細胞を保護する効果があることを示している。試験した濃度範囲において SFP-s 処理により同様の効果が観察された。**Fig. 5-4** に腎細胞を用いて SFP-s を $2.5 \mu\text{l/ml}$ 以上の濃度で 16 時間作用させた結果を示した。SFP-s を添加することにより、重クロム酸塩で誘発された細胞毒性が抑制される傾向 ($P < 0.07$) が見られた。

5-3-4 脂質過酸化

Fig. 5-5 に示すように、肝細胞を 1 mM の重クロム酸塩単独で 8 時間処理する

と、対照細胞においてタンパク質 1mg あたり 0.3 nmol の MDA が生成されるのに対して 1.7 nmol の MDA が生成され、有意 ($P<0.05$) に上昇した。これに対して細胞を SFP-s の 5 あるいは 10 μ l/ml 濃度で重クロム酸塩と作用させた場合には、有意 ($P<0.05$) に MDA 生成が抑制 (50%あるいはそれ以上) された。このことは重クロム酸塩により引き起こされる細胞毒性に対する SFP-s 処理の保護効果を示している。試験した SFP-s の 1.3-10 μ l/ml の濃度範囲内において MDA 生成の上昇は全く見られなかった。このように SFP-s によって脂質過酸化が抑制された。

5-4 考察

2 次胆汁酸は肝細胞の細胞質にあるタンパク質の結合能を超えた場合にミトコンドリアを傷害してアポトーシスやネクローシスを誘導し、またミトコンドリアの呼吸や分極化の修復に関わる細胞膜の流動性を変化させる (155)。特に DCA は毒性が強く、実験動物においてコレステロール性の肝障害を引き起こす (38)。この研究においては、肝細胞内における DCA 濃度の抑制が肝細胞障害抑制のメカニズムの一つと考えられた。SFP-s を投与した群においては血清中総胆汁酸濃度が対照群よりも低い傾向を示している。このことから肝細胞中の胆汁酸濃度が SFP-s によって抑制されたことが予想され、その要因としてアミノ酸と胆汁酸の抱合阻害あるいは胆汁酸の能動輸送の低下による腸管粘膜からの DCA 吸収量の減少が推測されるが、詳細については更なる研究が必要である。

一方、ヒトのウイルス性肝障害のモデルにおいて、GMN は肝細胞におけるタンパク合成ならびに核酸合成を抑制する (156, 157)。いろいろな種類のアミノ酸、たとえば L-セリン、L-アスパラギン、L-ヒスチジン、L-リシン、L-チロシン、L-グリシン、L-グルタミンなどは GMN 誘発の障害に対して効果的である

(158)。さらに、オリゴ糖や食物繊維なども GMN 誘発の肝障害を抑制することが知られている (159)。よって、SM に由来する SFP-s のアミノ酸やオリゴ糖などの成分が GMN 誘発の肝障害に対する保護作用の一部を担っているものと考えられた。

肝細胞や腎細胞内において六価のクロムは安定な三価のクロムに還元される (150)。これらの細胞内で活性酸素（ヒドロキシラジカル・OH）が生成し、脂質過酸化の過程で細胞膜や DNA に障害が引き起こされ、細胞内の LDH の漏出につながる。SM の成分であるサポニンやイソフラボン配糖体のアグリコンは乳酸菌の β グルコシダーゼによって遊離されることが報告されている (12, 13)。よって SFP-s 中のサポニン、およびイソフラボンアグリコンの抗酸化力が六価のクロムによる脂質の過酸化抑制の一要因と考えられた。また SFP-s の抗酸化力は、カテキンやクロロゲン酸、ビタミン E、メラトニン (149, 150, 153) といった多くの抗酸化物質と同様の効力を有しているものとみられた。抗酸化力を有することで知られるハーブやフルーツなどの健康効果については数多くの報告がある (160-162)。したがって、SFP-s のような発酵した大豆の抽出物を抗酸化物質として毎日摂ることは、ヒトの健康に貢献するところが大きいと考えられる。

腸内フローラの正常化は *Clostridium* 等の減少をもたらし、1 次胆汁酸のコール酸から DCA への変換が減少することによって腸管内の DCA 濃度が低下し、肝障害の改善やがん抑制につながると考えられている (143)。本試験においては *Clostridium* の菌数変化について測定を行わなかったが、第 1 章で示したように、肉食摂食時の *Clostridium* の上昇を SFP が抑制することから、SFP-s も同様なフローラ改善作用が期待されるが、詳細については今後検討する必要があると考えられた。

結論として、本研究において SFP-s は肝および腎障害を改善し、ヒトの健康の維持に有用であることが考えられた。

5-5 小括

SFP-s の肝・腎機能改善作用を DCA 負荷ラットによる胆汁うっ滞性肝障害モデルならびにガラクトサミン負荷ラットによるウイルス性肝炎モデルを用いて検討した。いずれのモデルにおいても SFP-s は肝障害の指標である AST、ALT 値の上昇を有意 ($P < 0.05$) に抑制した。さらに DCA 負荷ラットでは腎機能の指標である BUN の低下がみられ、腎機能改善が示唆された。一方、SFP-s はラット肝および腎の初代培養細胞のクロム酸酸化による障害を抑制した。これは SFP-s の持つ抗酸化作用が、細胞膜脂質の過酸化を抑制した為と考えられた。

Table 5-1. Biochemical analysis of the serum from SFP-s-administered rats

Analytical items	Groups	Administration period (weeks)			
		0	2	4	6
BUN (mg/dl)	Control	27.8±2.3	28.0±7.9	27.1±3.0	25.0±2.5
	SFP-s	26.2±1.2	25.6±4.8	21.9±2.2*	19.8±1.1*
UA (mg/dl)	Control	2.2±0.6	2.4±0.4	2.0±0.5	2.3±0.6
	SFP-s	2.2±0.5	2.4±0.7	1.7±0.5	2.2±0.5
T-CHL (mg/dl)	Control	69±11	121±28	162±65	118±12
	SFP-s	78±11	122±17	129±12	127±16

BUN: Blood urea nitrogen, UA: Uric acid, T-CHL: Total cholesterol.

* $P<0.05$ compared to the corresponding value of the control.

Table 5-2. Biochemical analysis of the serum from SFP-s-administered rats

Analytical items		Groups	
		Control	SFP-s
Serum	TP (g/dl)	7.0 ± 0.3	7.4 ± 0.3
	ALP (IU/l)	694 ± 143	635 ± 127
	γ-GTP (IU/l)	5.0 ± 1.7	5.2 ± 1.8
	LAP(U)	397 ± 199	363 ± 156
	GLU (mg/dl)	156 ± 55	172 ± 25
	LPO (nmol/ml)	2.3 ± 2.4	1.7 ± 1.4
	β-LP (mg/dl)	47 ± 32	53 ± 34
	T-BA (nmol/ml)	81 ± 36	46 ± 34
Urine	Urine excretion (ml/day)	21 ± 14	30 ± 10
	Urine /water intake (%)	56 ± 7	69 ± 18
	Urinary electrolyte (mEq/day): Na	1.4 ± 0.7	2.1 ± 1.1
	:K	2.9 ± 1.3	4.6 ± 2.2
	:Cl	1.7 ± 0.8	2.7 ± 1.7

TP: Total protein, ALP: Alkaline phosphatase, γ-GTP: γ-Glutamyl transpeptidase, LAP: Leucine aminopeptidase, GLU: Glucose, LPO: Lipid peroxide, β-LP: β-Lipoprotein, T-BA: Total bile acids.

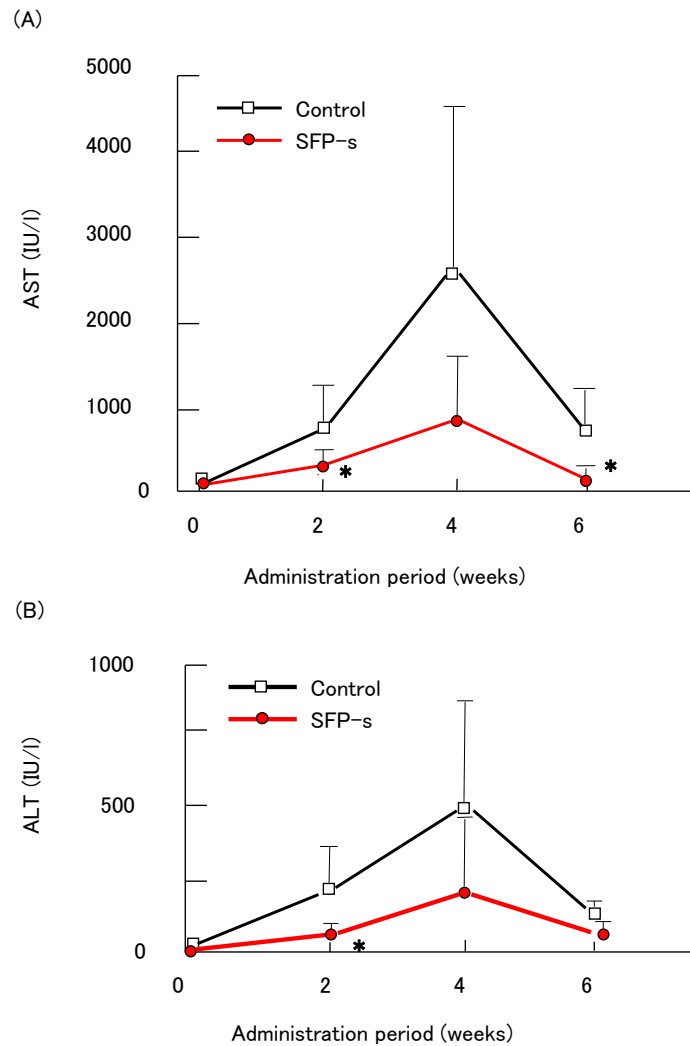


Figure 5-1. Effects of oral SFP-s administration on serum AST (A) and ALT (B) activities in rats with hepatic disorders induced by DCA loading. The control group (□) was given MF powdery feed containing 0.5% DCA only while the SFP-s group (●) was given MF powdery feed containing both 0.5% DCA and 5% SFP-s. Values indicate mean \pm S. D. (n=6). * $P < 0.05$ against the respective control values. AST, L-aspartate aminotransferase; ALT, L-alanine aminotransferase; DCA, deoxycholic acid (hepatopathy inducer).

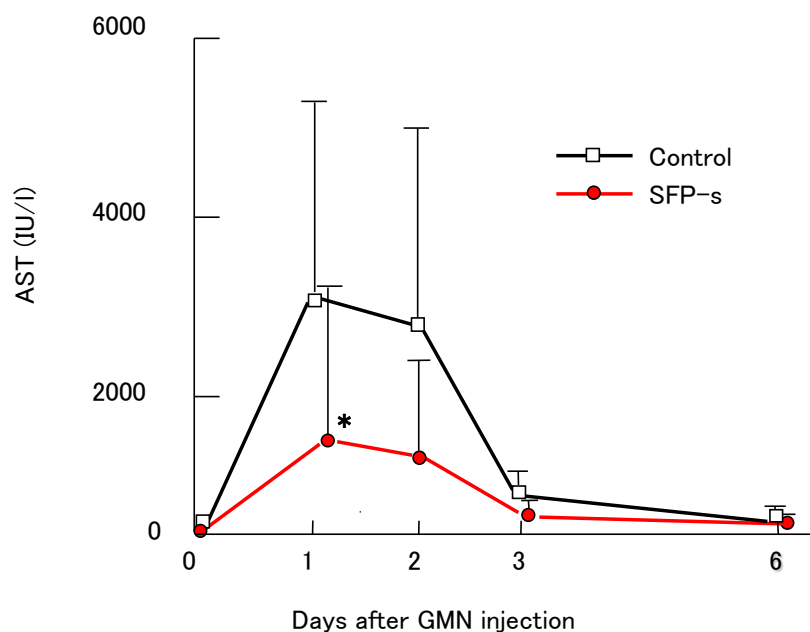


Figure 5-2. Effects of oral SFP-s administration on serum AST activity in rats with D-galactosamine (GMN)-induced hepatic disorders. The control group (□) was given MF powdery feed only for 3 weeks, while the SFP-s group (●) was given MF powdery feed containing 5% SFP-s. On the first day of the 4th week of feeding period, the rats of both groups were injected intraperitoneally with GMN solution (500mg/kg body weight). Serum AST was measured on days 1, 2, 3 and 6 after GMN injection. Values indicate mean \pm S. D. (n=7). * $P<0.05$ against the respective control values.

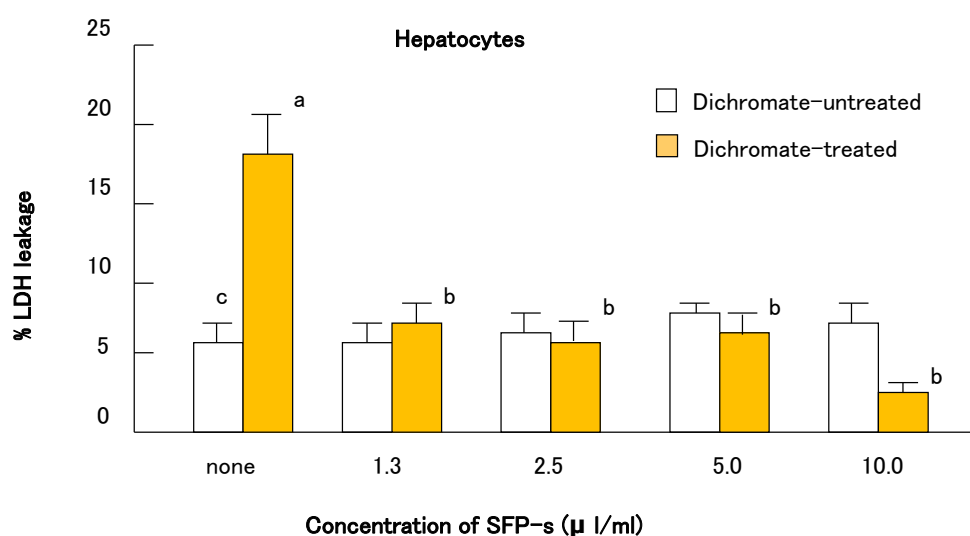


Figure 5-3. Effects of SFP-s treatment on dichromate-induced cytotoxicity in primary cultures of rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with SFP-s alone (□) or with a combination of SFP-s and dichromate (1mM) (■) for 8 h at 37°C in salt-glucose medium. The effect of SFP-s was evaluated as a percent of decreased LDH leakage against the total LDH from control hepatocytes without any treatment. Bars indicate mean \pm S. D. (n=4). ^a $P < 0.05$ compared to values with superscript b and c. LDH, lactate dehydrogenase.

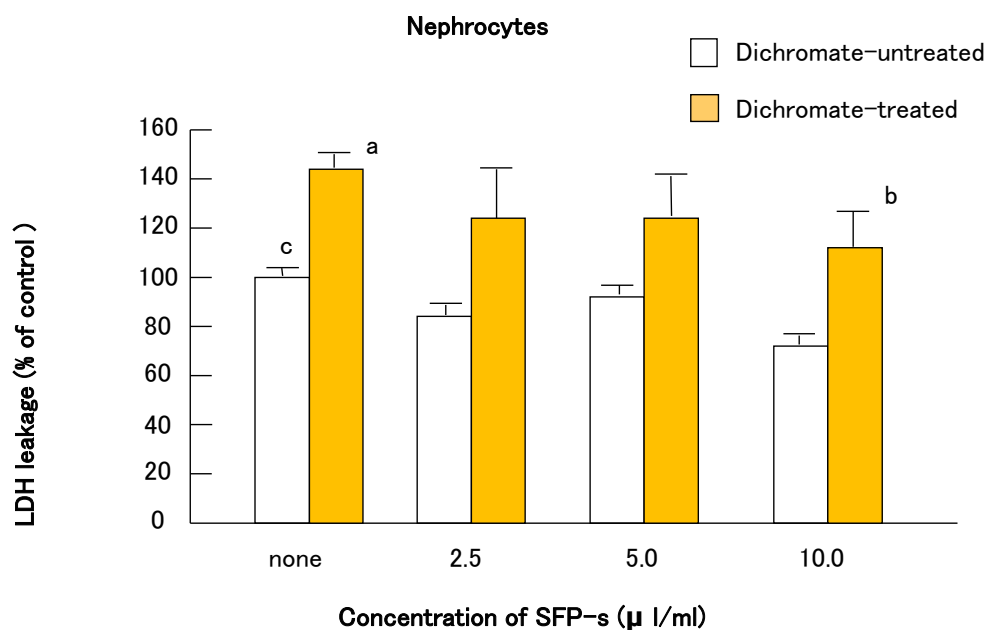


Figure 5-4. Effects of SFP-s treatment on dichromate-induced cytotoxicity in primary cultures of rat nephrocytes. Nephrocytes were treated with SFP-s alone (□) or with a combination of SFP-s and dichromate (1mM) (■) for 8 h at 37°C in salt-glucose medium. The effect of SFP-s was evaluated by the % decrease of LDH leakage in the nephrocytes treated by SFP-s and dichromate. Bars indicate mean \pm S. D. (n=4). ^a $P < 0.05$ compared to the value of superscript c. ^b $P < 0.07$ compared to the value of superscript a.

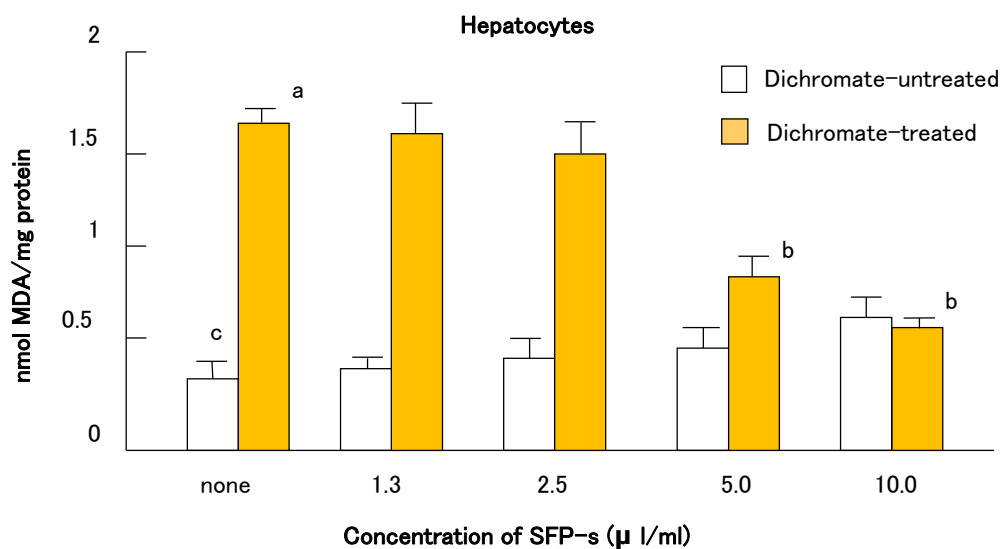


Figure 5-5. Effects of SFP-s treatment on dichromate-induced lipid peroxidation. Hepatocytes were treated with SFP-s alone (□) or with dichromate (1mM) and SFP-s (■) for 8 h at 37°C in salt-glucose medium. The effect of SFP-s treatment was estimated by monitoring decreased malondialdehyde (MDA) formation through lipid peroxidation. Values indicate mean \pm S. D. (n=4). ^a P <0.05 compared to the value of superscript c. ^b P <0.05 compared to the value of superscript a.

第 6 章 SFP-s の関節炎抑制作用

6-1 序論

リュウマチ性関節炎 (RA: Rheumatoid Arthritis) は病因不明の慢性炎症で様々な段階の軟骨破壊や関節の変形を引き起こし、あるタイプの RA は自己免疫疾患であることが分かっている。Trentham ら (163-165) は天然型のタイプ II コラーゲンを Freund の complete あるいは incomplete アジュバントとともにラットの皮下に注射することによってコラーゲン誘発性関節炎 (CIA: Collagen-Induced Arthritis) が惹起されることを示した。近年、グルコサミン (GM: D-glucosamine hydrochloride) がヒトの関節炎の治療に広く用いられている。Meiniger ら (166) は、GM が一酸化窒素 (NO: Nitric oxide) 合成蛋白の発現を阻害することによって NO 合成を阻害することから GM を関節炎のような慢性炎症の治療に用いることができるとしているが、ヒトでの十分な効果は得られていない。

一方、ペプチドグリカンをもつ細菌の細胞壁や大豆ペプチドが免疫システムに影響を与えることはよく知られている (167, 168)。また、プロバイオティクスあるいはヨーグルトの摂取が CIA を改善するという報告がわずかにあるが (169, 170)、SFP のような乳酸菌の死菌を含んだバイオジェニックスを関節炎の改善に用いた報告は無い。そこで、DBA/1 マウスの CIA に対する SFP-s の治療効果を GM と比較した。

6-2 材料と方法

6-2-1 SFP-s の調製

第 4 章 4-2-2 SFP-s の調製 と同様に行った。

6-2-2 動物

6 週齢の DBA/1 系雄マウス（チャールスリバー社、神奈川県横浜市）を温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 12 時間の飼育室内で、MF 飼料（オリエンタル酵母工業、東京都板橋区）を与え 1 週間予備飼育した。動物実験の実施にあたっては ALA 中央研究所動物実験倫理委員会の承認（承認番号 19）のもと行った。

6-2-3 関節炎の誘発

CIA は 7 週齢の DBA/1 系統、雄マウスにウシ II 型コラーゲン (bCII: Bovine Type II Collagen、コスモバイオ、東京) で免疫感作することによって誘導した。bCII を 0.05M の酢酸に 2mg/ml 濃度で溶解し、同量の Freund の complete アジュバント (MP バイオメディカル、USA) で乳化し、乳化液を尾根部に 0.5ml 皮内注射した。最初の注射から 5 週間後に、同様の乳剤を用いて同じ位置に注射し免疫増幅をおこなった。

6-2-4 関節炎の評価

CIA の臨床経過は 1 週間単位で足の甲（フットパッド）の厚みを測定し、Holmdahl ら (171, 172) の方法による 0~3 段階の関節炎スコアリングシステム（スコア 0；腫脹・紅班を認めない、スコア 1；1 本の指の腫脹あるいは僅かに紅班を認める、スコア 2；2 本の指の腫脹と 1 関節以上の紅班、スコア 3；足全体の重篤な腫脹と紅班および硬直）を用いて評価した。CIA の程度を示す 0~3 のスコアを **Fig. 6-1** に示す。臨床スコアはすべての足の合計、最大で 12 で表した。少なくとも 1 つの関節に腫脹と紅班を認める動物は関節炎とみなした。関節炎の発症率は次式で計算した。

発症率 (%) = 1 あるいは 1 以上のスコアを示したマウスの合計 / 1 群のマウス数

×100

フットパッドの厚みはマイクロメーターを用いて、試験開始時と終了時に横断面を測定した。1匹のフットパッド値は4本の足の平均値で表した。グループごとのフットパッド値の増加パーセントは次の式で表した。

増加率 (%) = 試験終了時の平均値/試験開始時の平均値×100

6-2-5 組織学評価法

試験終了時に臨床スコアの平均値に近い3匹を選択した。3匹のマウスの右または左の足を摘出し、10% (v/v) 中性リン酸緩衝ホルマリンで固定後5% (v/v) トリクロロ酢酸で7日間脱灰した。その後組織をアルコール脱水し、パラフィン包埋ブロックを作成した。パラフィン薄切片 (4μm) を作成し、ヘマトキシリン・エオシンで染色した。グループあたり9関節 (足根部、中足部、中足指節部の3関節を3匹のマウスから調製) について関節炎の組織学的所見を Wooley ら (173) の 0~4 のスケールシステムを用いてブラインドにてスコアリングした。すなわち score 1 ; 滑膜の表層部における単球の増加、score 2 ; 軟骨表層のダメージを伴うパンス (滑膜細胞の増殖により形成された組織) の形成、score 3 ; 軟骨下骨組織の浸食、score 4 ; 単核球の浸潤による関節の完全な破壊、にて評価した。

6-2-6 SFP-s および GM の投与

7週齢時にマウスを体重が均等になるように1群10匹ずつの4群に分けた。bCIIで免疫後、コントロール群には通常の飼料のみを、SFP-s 群には SFP-s 2%含有飼料を、GM 群には GM (Wako Chemical Co. Ltd, Osaka, Japan) 0.5%含有飼料を、SFP-s + GM 群には 2%SFP-s と 0.5%GM を混合した飼料を与えた。それぞれ12週間継続して飲水とともに自由に与えた。体重は免疫後 0、5、8、12 週目に計

測した。

6-2-7 抗 bCII 特異的 IgG 抗体の定量

試験開始時は尾静脈から、試験終了時は大静脈から採血した。抗 bCII 特異的 IgG 抗体は ELISA 法で測定した。すなわち、96 穴のマイクロプレート (Nunc, Naperville, IL, USA) を 5mM MgCl₂ を含む 0.1M NaHCO₃ buffer (pH 8.6) に溶解した 10μg/ml 濃度の bCII 溶液 100μl でコーティングし、37℃、1 時間インキュベート後 4℃でオーバーナイトした。プレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS+ ; 50mM phosphate, 0.15M NaCl, 1mM CaCl₂ , 1mM MgCl₂ ; pH 7.4) で 3 回洗浄し、残存するたんぱく結合部位は PBS+に溶解した 1%仔牛血清を添加して 25℃、1 時間、ブロッキングした。

サンプル血清は 0.05% Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Wako chemical Co. Ltd, Osaka, Japan) を含有する PBS+ (pH 7.4) で 1:20000 (v/v) に希釈し、ウェルに 2 連で添加し、2 時間室温でインキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、抗体は Peroxidase-conjugated antibody to mouse IgG (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL, USA).で検出した。Anti-bCII-specific IgG antibody の値は試験開始時と終了時の差で表した。

6-2-8 関節炎フットパット組織のサイトカインの測定

試験終了時に臨床スコアの平均値に近い各群 3 匹を選択し組織学的評価を行ったマウスについてサイトカインの分析を行った。フットパットの左右どちらか症状の重いほうを取り出した。フットパット組織をはがし、等量の 0.1M potassium phosphate buffer (pH7.8) with 0.2% TritonX100 (Wako Chemical Co. Ltd, Osaka, Japan) を加えホモジナイザーで破碎後、遠心 (10000 rpm、5 分) して上清を得た。TNF-α 濃度は DuoSet kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて、また IL-6 は Opt EIA kit (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) を用い

て測定した。値は組織 1g 当たりの量で表した。

6-2-9 統計解析

統計解析は StatMate IV software (ATMS Co., Ltd, Tokyo Japan) を用いて、関節炎の発症率は Mantel-Haenszel equation を、関節スコア、フットパッド肥厚、組織学的スコアはノンパラメトリックな Dunnett's multiple comparison test を、collagen-specific IgG と関節ホモジネートのサイトカインは Student's *t*-test を用いた。危険率 5%以下を統計学的に有意とみなした。

6-3 成績

6-3-1 CIA の発症率と臨床スコアの抑制

CIA の発症は b CII 免疫後 7 週目からすべてのグループで観察された (**Fig. 6-2**)。コントロール群の発症率は徐々に増加し、実験終了時には 90%に達した。それに対して SFP-s、GM、SFP-s + GM 群はそれぞれ 60%、70%、40%であった。SFP-s + GM 群はコントロール群に対して有意 ($P < 0.05$) に低下した。SFP-s + GM は 12 週まで発症率が抑えられていた。

関節炎スコアは免疫後徐々に上昇し、コントロール群において 11 週目には 3.6 ± 0.8 に達した (**Fig. 6-3**)。その後わずかに低下して試験終了時には 3.4 ± 0.8 となった。これに対して SFP-s 群 2.5 ± 0.4 、GM 群 2.1 ± 1.2 で、SFP-s + GM 群 (1.5 ± 0.7) ではコントロール群に対して有意に ($P < 0.05$) 低値を示した。CIA の発症はコントロール群では免疫後 7 週目であったが、GM 群を除いて他の投与群では約 1 週間遅れた。

フットパッドの肥厚率は免疫後 11 週時にコントロール群では 110.8 ± 2.7 (%) と上昇した (**Fig. 6-4**)。これに対して、SFP-s 群 105.7 ± 2.7 、GM 群 106.3 ± 2.0 で、SFP-s+GM 群 (102.8 ± 1.3) ではコントロール群に対して有意 ($P < 0.05$) な

抑制を示した。

6-3-2 体重変化

4 群の体重は同様に増加し 23 g 前後で一定に達し、試験終了時まで維持した (**Fig. 6-5**)。CIA 発症 DBA/1 マウスの体重に SFP-s あるいは GM 投与による影響はなかった。

6-3-3 抗 bCII 特異的 IgG 抗体ならびに炎症性サイトカインの産生抑制

SFP-s と GM の経口投与による抗 bCII 特異的 IgG 抗体を計測した。Table 6-1 に示すごとく、SFP-s と SFP-s+GM 投与群の血清抗体価はそれぞれ 342 ± 66 ng/ml と 358 ± 49 ng/ml で、コントロール群 456 ± 98 ng/ml と比較して有意ではないが低下した。試験終了時の CIA フットパッド組織のホモジネート上清中のサイトカインは、IL-6 は SFP-s+GM 群 (15.0 ± 1.6 ng/ml) でコントロール群 (22.0 ± 1.5 ng/ml) に対して有意 ($P < 0.05$) な低下を示し、TNF- α はすべての群間に差は見られなかった。

6-3-4 CIA による組織損傷の修復効果

Fig. 6-6A に足関節の組織学的な損傷について各群の代表例を示す。コントロール群の関節の組織所見は単球の浸潤に基づく破壊がみられ、軟骨組織の障害によるパンヌス（滑膜細胞の増殖により形成された組織）の形成、軟骨下骨組織の破壊がみられた。これに対して投与群では骨破壊や炎症性細胞数の抑制により炎症が抑えられた。投与群の障害の程度は GM 群>SFP-s 群>SFP-s+GM 群の順で強かった。組織学的な臨床スコアを代表的な 3 匹のマウスについて示すと、コントロール、GM、SFP-s、SFP-s+GM 群それぞれ 3.8、2.8、2.2、1.7 であった。**Fig. 6-6 B** に示すごとく、障害の程度はコントロール群に対して SFP-s 群 ($P < 0.05$)、SFP-s+GM 群 ($P < 0.01$) で有意に抑制された。

6-4 考察

CIA はヒトのリウマチ性関節炎のモデルとして用いられ、抗炎症や抗リュウマチ薬などの評価に用いられている (174)。Kato ら (169) はプロバイオティクス *Lactobacillus casei* Shirota 株が bCII に対する液性、細胞性免疫反応を修飾することによって CIA を抑制することができることを示している。また Baharav (170) らは *Lactobacillus* GG (LGG) の生菌を含むヨーグルトの経口投与により Lewis ラットの関節炎を改善したことを報告している。さらに Kano ら (175) は *L. delbrueckii* subsp. *bulgalicus* OLL1073R-1 が CIA マウスの症状を抑制することを示している。これらの報告はいずれもラクトバチルスが生菌を用いているが、Baharav ら (170) は LGG の抗炎症効果は微生物の生存性に関係しないことを示している。また Kano ら (175) は *L. delbrueckii* subsp. *bulgalicus* OLL1073R-1 によって産生された多糖フラクションが CIA の進展とリンパ節からの IFN- γ 産生を抑制することを示した。これは IFN- γ 産生の抑制による bC II に対する Th1 レスポンス低下が CIA の抑制の要因と推測している。このように死菌体あるいは細胞壁成分、代謝物質などが CIA の改善に有効であることが示されている。一方、ゲニスチン、ダイジンを中心とする大豆イソフラボン類は、構造が 17 β -estradiol に類似していることが知られている (176)。17 β -estradiol は免疫細胞の活性を抑制して遅延型過敏性反応 (177) や bCII 誘発関節炎を抑制することが知られており (178)、コラーゲンで免疫前にゲニステインを投与したマウスにおいて関節炎の発症と炎症の程度が軽減されることが報告されている (179, 180)。Verdrengh ら (180) は関節の組織学的評価においてゲニステイン投与マウスで滑膜の肥厚と骨/軟骨組織の崩壊の発生頻度が低く、また抗 CII 抗体のレベルも低かったと報告している。特に CII 抗体レベルと骨/軟骨組織の崩壊との間には有

意な相関を認めている。今回の研究では、SFP-s が b CII 誘発の IgG と IL-6 を抑制することによって BDA/1 マウスの CIA の発症と進展を抑制する可能性が示唆された。SFP-s には生菌は含まれておらず、発酵後は 100℃ で加熱してアルコールで抽出するため、乳酸菌と酵母の死菌体、ペプチドグリカンや DNA、RNA などの細胞壁成分が含まれる。また発酵によって微生物によって変換されたイソフラボン、サポニンなどのアグリコン型、あるいはペプチドなどが含まれる。しかし、SFP-s 中のどの成分が CIA の発症と進展の抑制に寄与しているかに関しては不明であり、詳細な検討は今後の課題である。

GM はカオリンとアジュバント関節炎ラットのモデルにおいて抗炎症作用を有することが示されている (181)。GM は NO とプロスタグランジン E2 の生成を抑え、その結果として腸上皮細胞における抗炎症作用を有する (182, 183)。Tsi ら (184) は、炎症抑制作用を有する鳥エキスと GM の混合投与は CIA ラットの関節炎の組織学的損傷が単独投与よりも抑制されることを示している。また Beren ら (185) は関節炎ラットのモデルにおいて、GM がコンドロイチン硫酸とアスコルビン酸マグネシウム塩の混合で症状改善作用を有することを報告しており、関節の免疫反応の感受性を低下して GM 単独よりも効果を得られるとしている。これらの報告と同様に、今回の研究では SFP-s と GM の同時投与は単独投与よりも関節炎の臨床スコアと組織学的評価を改善し、炎症関節組織の IL-6 の産生を抑制した。この SFP-s と GM の相加効果は SFP-s の b CII に対する免疫応答修飾能によるものと GM の炎症抑制作用によるものと考えられる。

他方、ヘルパーT細胞のサブセット Th1/Th2 によって産生されるサイト間のバランスは自己免疫疾患の進展に重要な役割を果たしていると考えられている (186)。さらに Th-17 細胞のマーカーである IL-17 はリウマチ性関節炎や CIA における炎症促進性サイトカインであり、Th17 細胞の分化抑制は CIA の抑制をもたらすことが報告されている (187-189)。今回の研究で、SFP-s 投与による

Th1/Th2 と Th17 細胞の分化との相関関係についてはあきらかではないが、SFP-s あるいは SFP-s と GM の混合物による自己免疫疾患の抑制のメカニズムを明らかにするために、今後更なる研究が必要と考えられた。

結論として、SFP-s および SFP-s と GM の混合物が CIA の発症と進展を相加的に抑制したことから、SFP-s のヒト関節炎への応用の可能性が示唆された。

6-5 小括

bC II の免疫により誘発したマウス関節炎モデルに対して SFP-s はフットパッド肥厚を指標とする炎症を抑制した。また、SFP-s を GM と同時投与 (SFP-s +GM) することにより、各々の単独投与よりも強い炎症抑制を示した。また、後肢炎症部位の組織学的所見の炎症スコアは、SFP-s、SFP-s+ GM とともに有意に低下した。bC II に対する IgG 抗体の産生は SFP-s、SFP-s+ GM で抑制される傾向を示し、また炎症部位の IL-6 は SFP-s+ GM で有意に抑制された。これらの結果から、SFP-s は GM との併用により炎症を相加的に抑制し、これは bC II に対する免疫反応を SFP-s が修飾した為と考えられ、SFP-s のヒト関節炎への応用の可能性が示唆された。

Table 6-1. Effect of oral SFP-s administration with glucosamine hydrochloride (GM) on levels of anti-bovine type II collagen (bCII)-specific IgG antibody in serum of and cytokines IL-6 and TNF- α in homogenate of hind footpad tissues of DBA/1 mice with collagen-induced arthritis

Measurement	n	Groups			
		Control	SFP-s	GM	SFP-s + GM
Anti-bCII-specific IgG antibody ($\mu\text{g/ml}$)	10	456 \pm 98	342 \pm 66	497 \pm 55	358 \pm 49
IL-6 (ng/g)	3	22.0 \pm 1.5	22.0 \pm 3.2	18.3 \pm 2.1	15.0 \pm 1.6*
TNF- α (ng/g)	3	1.3 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1

The antibody levels were measured using an ELISA in the blood samples collected at the beginning of and the end of experiment, and expressed as the difference between 2 values from the 2 samples. The concentrations of cytokines were measured by the ELISA kits in the supernatant of footpad tissue homogenates from 3 representative mice of each group. Values are expressed mean \pm S. E. (n=10 for anti-bCII-specific IgG antibody and n=3 for IL-6 and TNF- α). * P <0.05, significantly different from control.

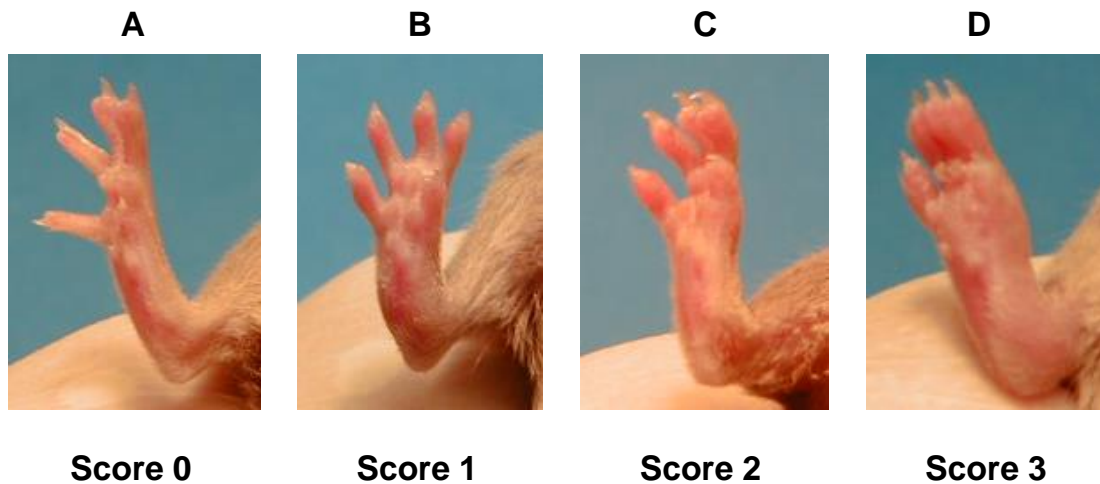


Figure 6-1. Examples of arthritic paws assessed at clinical scores from 0 to 3 in bovine type II collagen-induced arthritis (CIA) mice. CIA was induced in 7-week-old male mice by intradermal tail base injection of 0.1mg (per animal) of bovine type II collagen (bCII) emulsified in complete Freund's adjuvant. At 5 weeks after priming, mice were boosted with the same emulsion. The clinical severity of arthritis on each paw was graded on a score of 0 to 3: score 0, no change; score 1, mild swelling and/or erythema or digit inflammation; score 2, moderate swelling and erythema in the entire paw; score 3, severe swelling, erythema and joint rigidity of the entire paw and/or ankylosis.

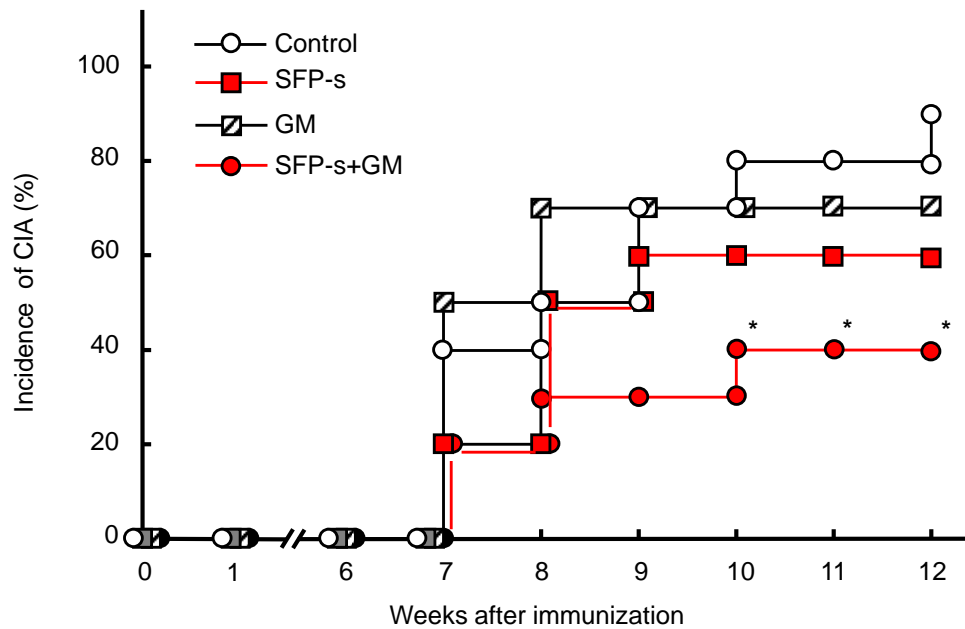


Figure 6-2. Effect of oral SFP-s administration with GM on incidence of bovine type II collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1 mice. Control group was given basic feed only. SFP-s, GM and SFP-s + GM groups were given basic feed containing 2% SFP-s, 0.5% GM and a combination of 2% SFP-s, 5% GM, respectively, during experimental period of 12 weeks after bovine type II collagen (bCII) immunization. Each group was consisted of 10 mice. * $P < 0.05$, significantly different from the control value. GM, glucosamine hydrochloride.

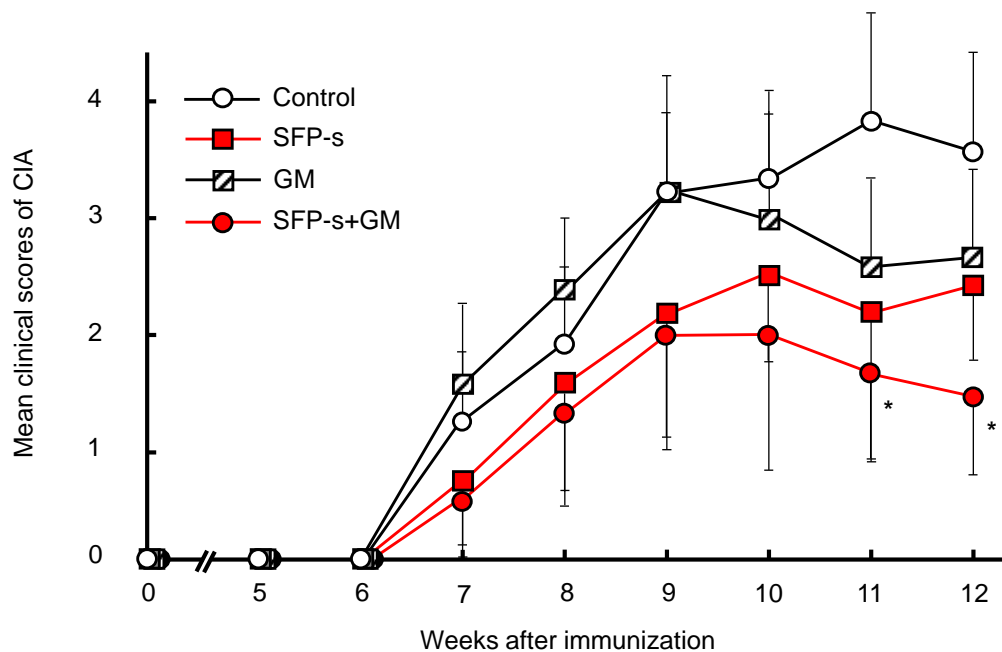


Figure 6-3. Effect of oral SFP-s administration with GM on clinical CIA severity in DBA/1 mice. Clinical severity of CIA in each paw was assessed weekly using an established clinical scoring system ranging from 0 to 3 as exemplified in Fig. 6-1. The score was expressed as a cumulative value for all paws, with a maximum possible score of 12 per mouse. Values are expressed as mean \pm S. E. (n=10). * P <0.05, significantly different from the control value. GM, glucosamine hydrochloride; CIA, bovine type II collagen-induced arthritis.

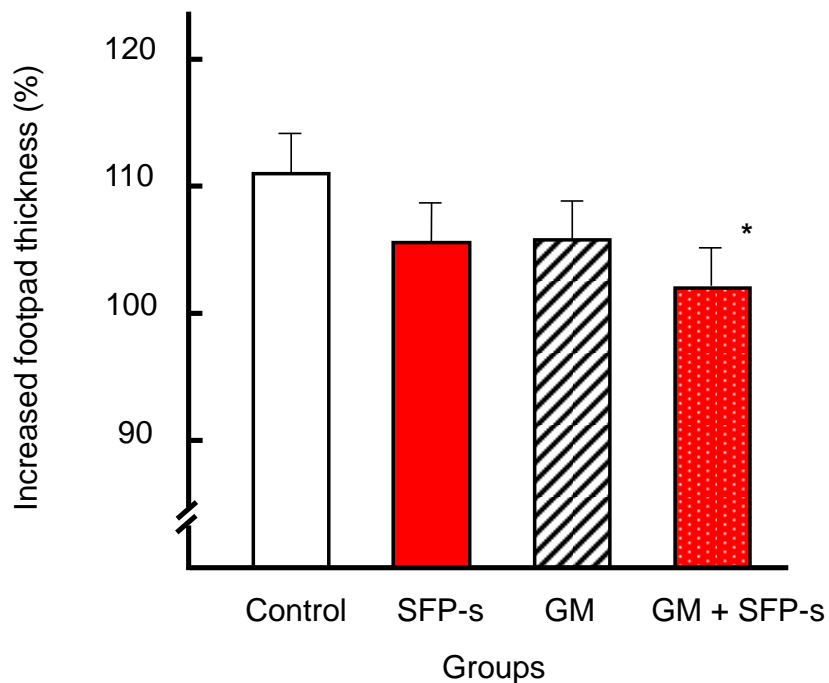


Figure 6-4. Effect of oral SFP-s administration with GM on footpad thickness of DBA/1 mice with CIA. The right and left hind footpad thicknesses were measured using a caliper micrometer at the start of and the end of experiment. Mean of right and left footpad thicknesses was used as the value for a mouse. The percentage of increased hind footpad thickness was calculated by the formula: Mean footpad thickness at the end of experiment / mean footpad thickness at the beginning of experiment $\times 100$ (%). Values are expressed as mean \pm S. E. (n=10). * $P < 0.05$, significantly different from the control value. GM, glucosamine hydrochloride; CIA bovine type II collagen-induced arthritis.

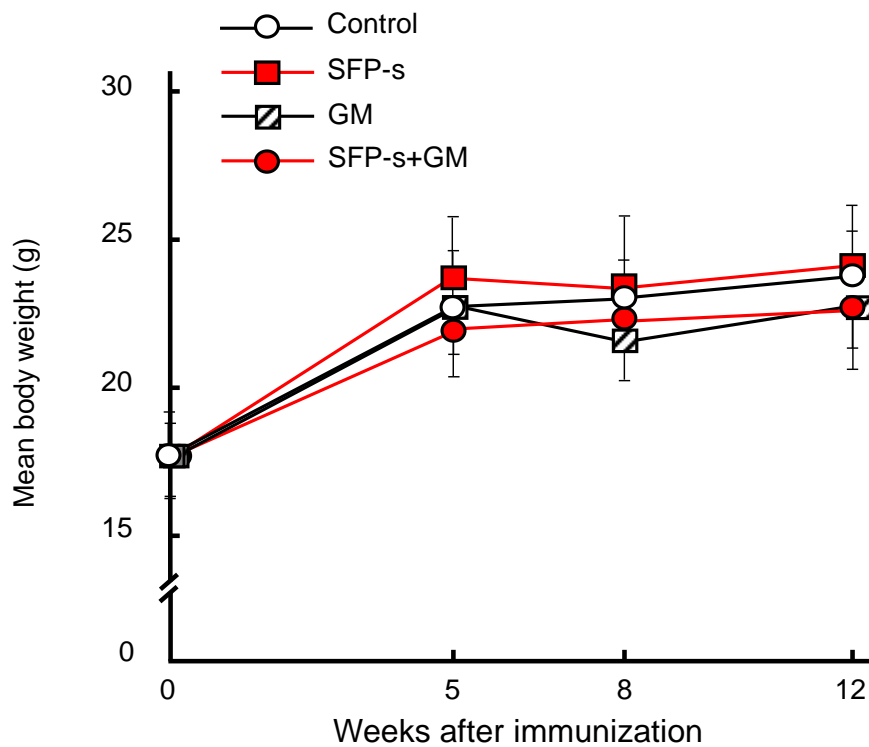


Figure 6-5. Effect of oral SFP-s administration with GM on body weight of DBA/1 mice with collagen-induced arthritis. Body weight was measured individually at 0, 5, 8 and 12 weeks during experimental period. Values are expressed as mean \pm S. E. (n=10). GM, glucosamine hydrochloride.

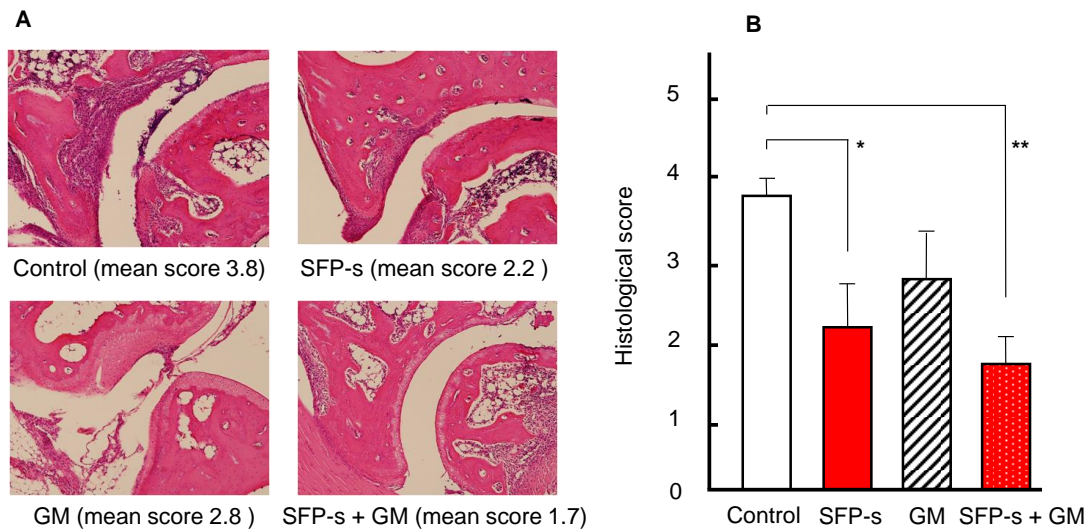


Figure 6-6. Histological analysis of the effect of oral SFP-s administration with GM on the histopathology of the hind footpad (or ankle) joints of CIA mice. **(A)** The hind footpad (or ankle) joint tissue sections (hematoxylin and eosin stain; original magnification X40) with CIA lesions which are regarded as representatives of the respective groups. In each group, 3 mice with clinical arthritic scores close to the mean one of the group were selected for histological examination at the end of experiment. The section of control group reveals the erosion with an associated monocyte infiltrate, pannus formation with superficial cartilage damage and subchondral bone erosion (mean score 3.8). The sections of treatment groups reveal less inflammatory lesions than control group. The decreasing order of their mean score numbers is 2.8>2.2>1.7 for GM, SFP-s and SFP-s + GM groups, respectively. **(B)** A total of 9 joint sections per group, i.e. 3 joints (tarsal, metatarsal and metatarsophalangeal) on a paw from each of the 3 mice, were evaluated in a blinded manner and scored on a scale of 0-4. Values are expressed as mean \pm S. E. (n=3). * P <0.05 and ** P <0.01, significantly different from the control value. GM, glucosamine hydrochloride; CIA, bovine type II collagen-induced arthritis.

総括

本研究は多菌種の乳酸菌と酵母の共生を利用した豆乳発酵産物 SFP (Soybean milk-Fermented Product) の機能性とその作用メカニズムを明らかにし、バイオジェニクスとしての有用性を検討するため、1) SFP の腸内環境改善と粘膜免疫増強作用、2) 大腸がん抑制作用を検討した。また、3) SFP 発酵菌の中からサイトカイン誘導能を指標に免疫賦活能の高い *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 株 (LP284) を選抜し、LP284 の抗腫瘍活性とその機序を検討した。さらに、SFP の可溶性画分 (SFP-s: SFP-Soluble fraction) について 4) 高血圧改善、5) 肝・腎機能障害改善、6) 関節炎抑制作用を検討した。

1) SFP のヒト腸内環境改善作用と粘膜免疫増強作用

一般的な日本食 (TJD: Traditional Japanese Diet) を摂取したボランティアに SFP (450mg/日) を 14 日間飲用させると、糞便中 *Bifidobacterium* の占有率がプラセボ群に比べ有意に増加した。また唾液中分泌型 IgA 濃度の増加率は SFP 群で有意に高値を示した。一方、肉食中心の欧米型食 (WD: Western type Diet、肉摂取量約 300g、900kcal) を昼食のみ 3 日間摂取したボランティアの糞便中 *Clostridium* の占有率は有意に増加したが、WD と同時に SFP を飲用 (900mg/日) することにより減少し、さらに *Bifidobacterium* の占有率が増加した。発がん誘因物質の排泄に関連する糞便中 β -glucuronidase 活性は、WD 摂取時は TJD 摂取時の 5 倍に増加したが、SFP 飲用時は増加しなかった。以上の結果より SFP はフローラを介して腸内環境を改善し、また粘膜免疫の増強による発がん抑制や発がん誘引物質の排泄促進により大腸がん等の発がんリスクを軽減しうる可能性が示唆された。

2) SFP の大腸がん抑制作用

1) の結果に基づき、SFP の大腸がん抑制作用を 1, 2-Dimethylhydrazine 化学発

がんモデルマウスを用いて検討したところ、SFP は腫瘍の発生を有意に抑制した。次に SFP の抗腫瘍作用機序を Meth-A 腫瘍移植モデルで検討した。SFP は化学発がんモデルと同様に Meth-A 腫瘍の増殖を抑制した。このときマウスの脾臓細胞を Meth-A 細胞と混和し、別の新たなマウスに移植する Winn assay を行ったところ、SFP 投与群は Meth-A 単独移植群に比べ有意に腫瘍の増殖を抑制した。この結果から、SFP 投与マウスの脾臓中に抗腫瘍作用を示す免疫細胞群が誘導されたことが示唆された。一方、*Bifidobacterium* 定着ノトバイオートマウスは無菌マウスより脾細胞数が増加したが、無菌マウスに SFP や SM を 4 週間連日経口投与しても脾細胞数は増加しなかった。これらの結果から SFP の抗腫瘍効果は宿主免疫の賦活化であり、腸内細菌関与の可能性が示唆された。

3) LP284 の抗腫瘍活性

乳酸菌の菌体成分は免疫賦活作用を有することが知られていることから、発酵菌 7 株の死菌体の免疫賦活活性をマウス腹腔マクロファージの TNF- α 産生を指標に比較した。その結果、LP284 の死菌体 (H-Lp) が最も強い活性を示した。パイエル板 (PP) 細胞においては LP284 の生菌体 (L-Lp) よりも H-Lp が強い TNF- α 、IFN- γ 産生性を示した。また H-Lp を Meth-A 腫瘍移植マウスに経口投与したところ、対照および L-Lp よりも腫瘍の増殖を抑制した。この結果から SFP の腫瘍抑制作用には H-Lp が大きく寄与している可能性が示唆された。次に H-Lp は Meth-A 移植マウスの PP 細胞の IFN- γ 産生を増強し、さらに脾臓細胞においても IFN- γ 産生を増強した。これは PP で活性化された免疫細胞が脾臓に集積したことを示唆しており、Winn assay でも確認された。また Meth-A 移植マウスの抹消血リンパ球中、CD3⁺細胞の割合が H-Lp により増加した。これらの結果より、H-Lp 投与により PP における免疫細胞が活性化され、脾臓における獲得免疫が確立し、細胞障害活性を持ったリンパ球が腫瘍部位に Homing することによって腫瘍の増殖を抑制したと考えられた。

4) SFP および SFP-s の高血圧改善作用

自然発症高血圧ラット (SHR) に SFP、SFP-s ならびに SM を経口単回投与し、血圧の変化をテールカフ法により非観血的に測定した。その結果 SFP、SFP-s は投与 5 時間目に対照ラットに対して有意な血圧低下を示した。一方、SM は血圧低下作用を示さないことから、発酵による血圧低下物質の産生が推測された。そこで SFP の可溶性画分である SFP-s を分子量分画した結果、糖質の発色を示す画分に血圧低下作用が認められた。この画分は血圧上昇に関連するアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の阻害活性を示したことから、ACE 阻害が降圧作用メカニズムの一つと考えられた。

5) SFP-s の肝・腎機能障害改善作用

SFP-s による肝・腎機能障害改善作用をデオキシコール酸 (DCA) 負荷ラットならびにガラクトサミン負荷ラットを用いて検討した。いずれのモデルにおいても SFP-s は肝障害の指標 L-アスパラギン酸トランスアミノトランスフェラーゼ値の上昇を有意に抑制した。さらに DCA 負荷ラットでは腎機能の指標である血中尿素窒素値の低下と利尿作用がみられ、腎機能改善が示唆された。一方、SFP-s はラット肝および腎の初代培養細胞において、クロム酸酸化による乳酸脱水素酵素を指標とした細胞障害を抑制した。また、マロンジアルデヒドを指標とした脂質過酸化も抑制した。このことから SFP-s の抗酸化作用により細胞膜脂質の過酸化が抑制され、肝・腎細胞障害が抑制されることが考えられた。

6) SFP-s の関節炎抑制作用

ウシ II 型コラーゲン (bC II) 免疫により誘発した関節炎モデルマウスに対し、SFP-s はフットパット肥厚を指標とする炎症を抑制した。また、SFP-s をグルコサミン塩酸塩 (GM) と同時投与 (SFP-s+GM) することにより、各々の単独投与よりも強い炎症抑制を示した。また、後肢炎症部位の組織学的所見の炎症スコアは、SFP-s、SFP-s+GM とともに有意に低下した。bC II に対する IgG 抗体の産

生は SFP-s、SFP-s+GM で抑制される傾向を示し、また炎症部位の IL-6 は SFP-s+GM で有意に抑制された。これらの結果から、SFP-s は GM との併用により炎症を相加的に抑制し、これは bC II に対する免疫反応を SFP-s が修飾した為と考えられた。

以上 1)～6)の結果を Fig. 7-1 にまとめた。SFP は腸内フローラの改善を介して宿主の免疫賦活ならびに発がん誘因物質の排泄促進をもたらし、大腸発がんを抑制した。SFP 発酵菌の 1 つ LP284 の加熱死菌体は、細胞障害性を有するリンパ球を活性化し腫瘍を抑制した。SFP-s は ACE 阻害作用による高血圧改善作用、抗酸化成分による肝・腎機能障害改善作用、宿主免疫の修飾作用による関節炎改善に働くことが明らかとなった。

今回、高血圧改善作用、肝・腎機能障害改善作用、関節炎改善作用については腸内フローラの検討を行わなかった。腸内フローラ構成が宿主の血圧に関連すること (190) や、腸内 *Clostridium* の増加が DCA 濃度の増加をもたらす肝機能に悪影響を及ぼすこと (143, 144) は既に報告されており、また本研究で SFP-s の関節炎改善に免疫修飾作用が示唆されたことなどから、腸内フローラとの関連性については今後詳細な検討が必要と考えられた。

一方、SFP の機能性成分として、大豆オリゴ糖、乳酸菌菌体成分、ACE 阻害糖質画分、アミノ酸、イソフラボンやサポニン等が示唆されたが、これらの詳細構造や含量、機能性との相関に関してはさらなる検討が必要と考えられた。大豆タンパク水解物から得られる生理活性ペプチドとしてアミノ酸 43 個からなるルナシンが知られている (191, 192)。ルナシンは NF- κ B、サイトカイン産生を抑制し、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) レベルを減少させることによって抗炎症作用を示すほか、抗酸化作用や抗腫瘍効果を有し、コレステロール合成の制御にも影響することが知られている。SFP 中には発酵により多くの生理活性ペプチドが生成していることが推測され、SFP の多様な機能性に寄与している可

能性が高いことから、生理活性ペプチドの検索は今後の課題である。さらに単菌種での発酵に比べ多菌種での発酵により得られる発酵産物はより複雑である（193-195）と考えられることから、SFP 発酵に用いた個々の乳酸菌による発酵産物との比較を行い、多菌種による発酵の有用性についても今後検討が必要と考えられた。

以上、本研究から SFP はバイオジェニクスとして直接あるいは腸内フローラを介して作用し、腸内環境改善、免疫賦活、発がん抑制、高血圧改善、肝・腎機能障害改善、関節炎改善など様々な機能性を有することが明らかとなった。また、その効果の機序の一部が明らかにされ、宿主の健康の維持・増進に寄与する有益な発酵物であることが明確となった。

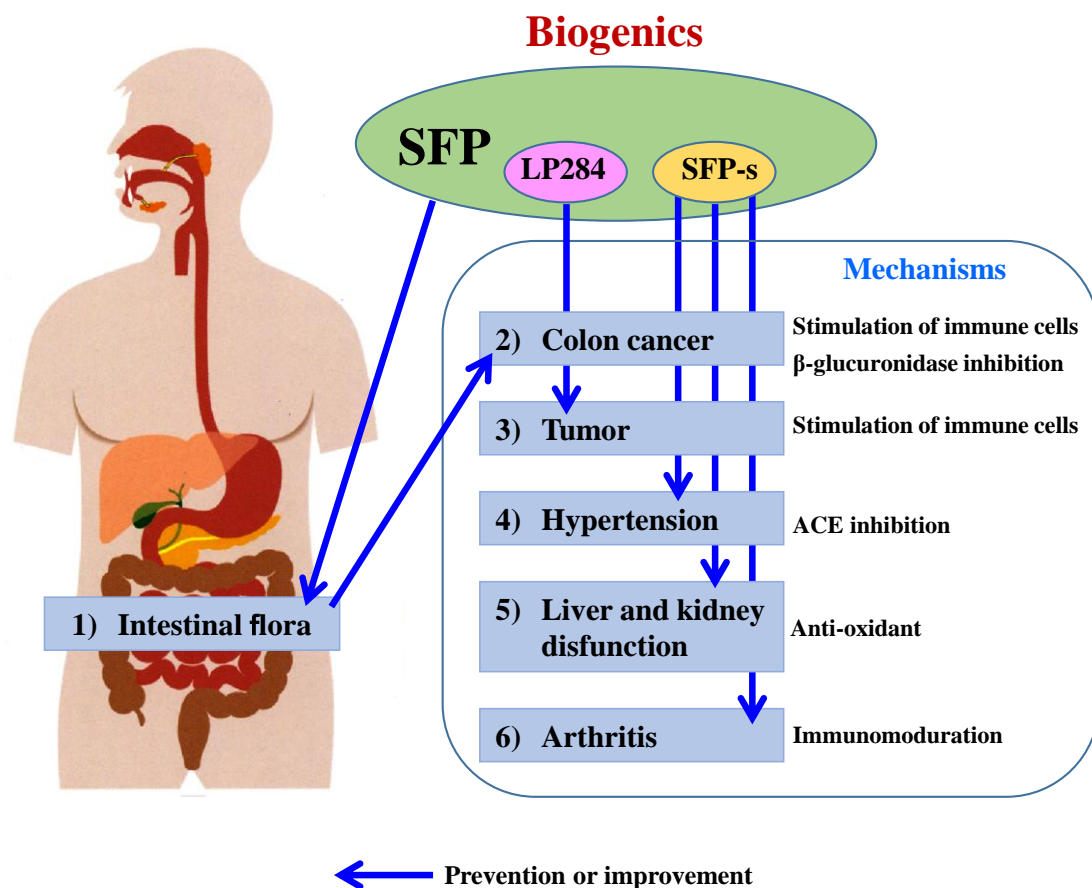


Figure 7-1. Function and mechanisms of SFP, LP-284 and SFP-s.

謝辞

本研究の遂行と論文の作成にあたり、終始懇切なるご指導とご高閲を賜りました日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科食品衛生学教室 藤澤倫彦教授ならびに株式会社エイ・エル・エイ中央研究所名誉所長 水谷武夫先生に深甚の謝意を表します。また、動物実験の遂行ならびに論文作成にあたり貴重な御助言、ご指導を賜りました株式会社エイ・エル・エイ中央研究所元所長 金内長司先生、元研究員 片岡元行先生、東京女子医科大学元教授 関口守衛先生に厚く感謝の意を表します。

本研究の機会を与えてくださり、研究を進めるにあたり多大なる御協力を賜りました株式会社エイ・エル・エイ 三浦竜介社長ならびに株式会社エイ・エル・エイ中央研究所職員の皆様に心より感謝致します。

引用文献

- (1) Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, et al. 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: Results of a follow-up national survey. JAMA. 280: 1569-1575.
- (2) Kaminogawa S, Nanno M. 2004. Modulation of immune functions by foods. Evid Based Complement Alternat Med. 1: 241-250.
- (3) Naylor CD. 1995. Gray zones of clinical practice: some limits to evidencebased medicine. Lancet. 345: 840-842.
- (4) Metchnikoff II. 1907. The prolongation of life. Optimistic Studies, Springer, New York.
- (5) Shiby Vk. Shiby VK, Mishra HN. 2013. Fermented milks and milk products as functional foods--a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 53 (5): 482-496.
- (6) Ceapa C, Wopereis H, Rezaïki L, Kleerebezem M, Knol J, Oozeer R. 2013. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 27 (1): 139-155.
- (7) Mitsuoka T. 2014. Development of functional foods. Bioscience of Microbiota, Food and Health. 33 (3): 117-128.
- (8) 光岡知足. 2008. プロバイオティクスの進化に期待する. 乳業技術 58: 89-101.
- (9) Csáky I, Fekete S. 2004. Soybean: feed quality and safety. Part 1: Biologically active components. Acta Veterinaria Hungarica. 52: 299-313.
- (10) Mukherjee R, Chakraborty R, Dutta A. 2015. Fermented soybean meal: a review. Asian-Australas J Anim Sci. Dec 1. doi: 10.5713/ajas.15.0627. [Epub ahead of print]

- (11) Nakahara T, Sano A, Yamaguchi H, Sugimoto K, Chikata H, Kinoshita E, Uchida R.J. 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *Agric Food Chem.* 58 (2): 821-827.
- (12) Matsuda S, Miyazaki T, Matsumoto Y, Ohba R, Teramoto Y, Ohta N, et al. 1992. Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* IFO 3425. *J Ferment Bioeng.* 74: 301-304
- (13) Coulon S, Chemardin P, Gueguen Y, Arnaud A, Galzy P. 1998. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. *App Biochem Biotech.* 74: 105-114.
- (14) Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, et al. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr.* 130: 1695-1699.
- (15) Kataoka S. 2005. Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (Shoyu) and its components. *J Biosci Bioeng.* 100: 227-234.
- (16) Katsuyama H, Ideguchi S, Fukunaga M, Fukunaga T, Saijoh K, Sunami S. 2004. Promotion of bone formation by fermented soybean (Natto) intake in premenopausal women. *J Nutr Sci Vitaminol.* 50: 114-120.
- (17) Nakajima N, Nozaki N, Ishihara K, Ishikawa A, Tsuji H. 2005. Analysis of isoflavone content in tempeh, a fermented soybean, and preparation of new isoflavone-enriched tempeh. *J Biosci Bioeng.* 100: 685-687.
- (18) 鈴木一郎, 岡田早苗. 1996. 乳酸菌の共生. 乳酸菌の化学と技術 (乳酸菌研究研究会編). 学会出版センター : 266-274.
- (19) 古川壮一, 片倉啓雄. 2012. 乳酸菌と酵母の共存と共生. 生物工学. 90: 188-191.

- (20) Rekha CR, Vijayalakshmi G. 2010. Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast. *J Appl Microbiol.* 109 (4): 1198-1208.
- (21) Shimakawa Y, Matsubara S, Yuki N, Ikeda M, Ishikawa F. 2003. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *Int J Food Microbiol.* 81: 131-136.
- (22) Beasley S, Tuorila H, Saris PEJ. 2003. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol.* 81: 159-162.
- (23) Howarth GS, Wang H. 2013. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients.* 5: 58-81.
- (24) 藤澤倫彦. 2014. 腸内菌検索手法と腸内構成菌. *日本細菌学雑誌.* 69 (2): 331-348.
- (25) Olsen G J, Woese C R, Overbeek R. 1994. The wind of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J Bacteriol.* 176: 1-6.
- (26) Hattori M, Taylor T D. 2009. The human intestinal microbiome: A new frontier of human biology. *DNA Reserch.* 16: 1-12.
- (27) Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 489: 220-230.
- (28) Maynard C, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 489: 231-241.
- (29) Tremaroli V, Bäckhed F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 489: 242-249.

- (30) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 444: 1027-1031.
- (31) 光岡知足. 1998. 腸内フローラとプロバイオティクス (光岡知足編). 学会出版センター : 1-13.
- (32) Mitsuoka T. 2000. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Bioscience Microflora*. 19 (1): 15-25.
- (33) Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 125: 1401-1412.
- (34) Bisht M, Bist SS, Dhasmana DC. 2010. Biological response modifiers; Current use and future prospects in cancer therapy. *Indian J Cancer*. 47: 443-451.
- (35) Nio Y, Shiraishi T, Tsuchitani T, Tobe T, Sugawara Y, Saito M, Kamiyama H. 1989. Antitumor activity of orally administered streptococcal preparation, OK-432 on murine solid tumors and its absorption from the gut. *In Vivo*. 3 (5): 307-313.
- (36) Takano T. 2002. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82: 333-340.
- (37) Yamamoto N, Akino A, Takano T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci*. 77 (4): 917-922.
- (38) Shiina T, Shin R, Ishihara K, Isoda M. 1990. Effects of heat treated cells of intestinal lactic acid bacteria in rats fed a deoxycholic acid diet. *Exp. Anim*. 39 (3): 325-335.
- (39) Ishihara K, Shin R. 1990. Effects of cellular components of intestinal lactic acid bacteria on cholesterol metabolism. *Microbiology and Therapy*. 20: 73-80.

- (40) 石原一興, 新 良一, 椎名恒子, 山本博一, 磯田政恵. 腸内細菌のコレステロール代謝に及ぼす影響. 1989. 腸内フローラと生体ホメオスタシス (光岡知足編). 学会出版センター : 121-144.
- (41) Shin R, Sugiyama Y, Shiina T, Ishihara K, Oowada T, Ozaki A, Mizutani T. 1992. Effects of heat-treated cells of intestinal lactic acid bacteria on lipid metabolism in germfree mice. J. germfree life gnotobiol. 22 (2): 71-74.
- (42) Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 489: 220-230.
- (43) Maynard C, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature. 489: 231-241.
- (44) Tremaroli V, Bäckhed F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature. 489: 242-249.
- (45) Terada A, Bukawa W, Kan T, Mitsuoka T. 2004. Effect of the consumption of heat-killed *Enterococcus faecalis* EC-12 preparation on microbiota and metabolic activity of the faeces in healthy adults. Microb Ecol Health Dis. 16: 188-194.
- (46) Inoguchi S, Ohashi Y, Narai-Kanayama A, Aso K, Nakagaki T, Fujisawa T. 2012. Effects of non-fermented and fermented soybean milk intake on faecal microbiota and faecal metabolites in humans. Int J Food Sci Nutr. 63: 402-410.
- (47) Azcárate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. 2011. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 301: G401-G424.
- (48) O'Flaherty S, Saulnier DM, Pot B, Versalovic J. 2010. How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? Gut Microbes. 5: 293-300.

- (49) Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. 2009. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl. 6: 5-11.
- (50) Nagashima K, Mochizuki J, Hisada T, Suzuki S, Shimomura K. 2006. Phylogenetic analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences from human fecal microbiota and improved utility of terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Biosci Microflora*. 25: 99-107.
- (51) Nagashima K, Fukushi M, Motohashi C, Yasokawa D, Kanbayashi I, Kusakabe M, Hashimoto S, Takeda H. 2007. Effects of ingestion of a vegetable-extracted enzyme on intestinal bacterial flora in humans. 北海道立食品加工研究センター報告 No.7: 27-31.
- (52) Dicksved J, Flöistrup H, Bergström a, Rosenquist M, Pershagen G, Scheynius A, Roos S, Alm JS, Engstrand L, Braun- Fahrländer C, Mutius E, Jansson JK. 2007. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *App. Environ. Microbiol.* 73: 2284-2289.
- (53) Yang Y, Koh D, Ng V, Lee CY, Chan G, Dong F, Goh SH Anantharaman V and Chia SE. 2002. Self perceived work related stress and the relation with salivary IgA and lysozyme among emergency department nurses. *Occup Environ Med.* 59: 836-841.
- (54) Ishikado A, Sato T, Mitsuoka T. 2007. Suppressive effects of lactose and magnesium oxide supplementation of fecal putrefactive metabolites with shortening gastrointestinal transit time. *Microbiol Ecol Health Dis.* 19: 184-190.
- (55) Reddy BS, Weisburger JH, Wynder EL. 1974. Fecal bacterial beta-glucuronidase: control by diet. *Science.* 183: 416-417.

- (56) Kulkarni N, Reddy BS.1994. Inhibitory effect of *Bifodobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase P. S. E. B.M. 207: 278-283.
- (57) Thomas LV, Ockhuizen. 2012. New insights into the impact of the intestinal microbiota on health and disease: a symposium report. Bri J Nutr. 107: S1-S13.
- (58) Fagarasan S, Honjo T. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. Nat Rev Immunol. 3 (1): 63-72.
- (59) McGhee JR, Mestecky J, Elson CO, Kiyono H. 1989. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. J Clin Immunol. 9 (3): 175-199.
- (60) Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S. 2014. Foxp3 (+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. Immunity. ; 41 (1): 152-65.
- (61) Slack E, Balmer ML, Fritz JH, Hapfelmeier S. 2012. Functional flexibility of intestinal IgA - broadening the fine line. Front Immunol. May 3; 3: 100. doi: 10.3389/fimmu. 2012. 00100.
- (62) Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, Barry NA, Stefanowski J, Hao L, Degnan PH, Hu J, Peter I, Zhang W, Ruggiero E, Cho JH, Goodman AL, Flavell RA. 2014. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. Cell. 158 (5): 1000-1010.
- (63) de LeBlanc Ade M, Castillo NA, Perdigon G. 2010. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. Int J Food Microbiol. 138 (3): 223-231.
- (64) Inoue R, Nishio A, Fukushima Y, Ushida K. 2007. Oral treatment with probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) for a specific part of the weaning period

- prevents the development of atopic dermatitis induced after maturation in model mice, NC/Nga. Br J Dermatol. 156 (3): 499-509.
- (65) Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, Simone CD, Hontecillas R. 2012. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. PLoS ONE. 7: e34676.
- (66) Finegold SM, Sutter VL, Sugihara PT, Elder HA, Lehmann SM, Philips RL. 1977. Fecal microbial flora in Seventh Day Adventist populations and control subjects. Am J Clin Nutr. 30: 1781-1792.
- (67) Benno Y, Suzuki K, Narisawa K, Bruce WR, Mitsuoka T. 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. Microbiol Immunol. 30: 521-532.
- (68) Kinouchi FL, Maia DCG, Ribeiro LCA, Placeres MCP, Valdez GF, Colombo LL, Rossi EA, Carlos IZ. 2012. A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. Food Chem Toxicol. 50: 4144-4148.
- (69) Mitsuoka T. 1984. The effect of nutrition on intestinal flora. Nahrung. 28: 619-625.
- (70) Kim DH, Jin YH. 2001. Intestinal bacterial β -glucuronidase activity of patients with colon cancer. Arch Pharm Res. 24: 564-567.
- (71) Nakamura J, Kubota Y, Miyaoka M, Saitoh T, Mizuno F, Benno Y. 2002. Comparison of four microbial enzymes in Clostridia and Bacteroides isolated from human feces. Microbiol Immunol. 46: 487-490.
- (72) Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. PLoS ONE. 7 : e39743.

- (73) Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M, Radke M, Blaut M. 2006. Effect of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. J Clin Microbiol. 44: 4025-4031.
- (74) Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, Riorden G, Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Loo JV, Watzl B, Collins JK. 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. Am J Clin Nutr. 85: 488-496.
- (75) 厚生労働省 平成 26 年（2014）人口動態統計（確定数）の概況
- (76) Azcárate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. 2011. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 301: G401-G424.
- (77) O'Flaherty S, Saulnier DM, Pot B, Versalovic J. 2010. How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? Gut Microbes. 5: 293-300.
- (78) Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. 2009. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. J Physiol Pharmacol. 60 Suppl 6: 5-11.
- (79) Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, Simone CD, Hontecillas R. 2012. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. PLoS ONE. 7: e34676.
- (80) Verghese M, Rao DR, Chawan CB, Williams LL, Shackelford L. 2002. Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young Fisher 344 rats. J Nutr. 132: 2809-2813.

- (81) Ohta T, Nakatsugi S, Watanabe K, Kawamori T, Ishikawa F, Morotomi M, Sugie S, Toda T, Sugimura T, Wakabayashi K. 2000. Inhibitory effects of *Bifidobacterium*-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinogenesis*. 21: 937-941.
- (82) Kinouchi FL, Maia DCG, Ribeiro LCA, Placeres MCP, Valdez GF, Colombo LL, Rossi EA, Carlos IZ. 2012. A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. *Food Chem Toxicol*. 50: 4144-4148.
- (83) Mizutani T, Mitsuoka T. 1983. Effect of konjac mannan on 1, 2-dimethylhydrazine -induced intestinal carcinogenesis in Fischer 344 rats. *Cancer Letters*. 19: 1-6.
- (84) Saito M, Nanjo M, Aonuma E, Noda T, Nakadate I, Ebina T, Ishida N. 1984. Activated macrophages are responsible for the tumor-inhibitory effect in mice receiving intravenous injection of OK-432. *Int J Cancer*. 33: 271-276.
- (85) Hsu C-K, Liao J-W, Chung Y-C, Hsieh C-P, Chan Y-C. 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *J Nutr*. 134: 1523-1528.
- (86) Asha, Gayathri D. 2012. Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1, 2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Exp Therapeut Med*. 3: 1049-1054.
- (87) Rudolph A, Toth C, Hoffmeister M, Roth W, Herpel E, Jansen L, Marx A, Brenner H, Chang-Claude J. 2012. Expression of oestrogen receptor β and prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 107: 831-839.

- (88) Mahmoud AM, Yang W, Bosland MC. 2014. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 140: 116-132.
- (89) Sugiyama Y, Nagata Y, Fukuta F, Takayanagi A, Masumori N, Tsukamoto T, Akasaka H, Ohnishi H, Saito S, Miura T, Moriyama K, Tsuji H, Akaza H, Mori M. 2014. Counts of *Slackia* sp. strain NATTS in intestinal flora are correlated to serum concentrations of equol both in prostate cancer cases and controls in Japanese men. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15 (6): 2693-2697.
- (90) Thomas LV, Ockhuizen. 2012. New insights into the impact of the intestinal microbiota on health and disease: a symposium report. *Bri J Nutr.* 107: S1-S13.
- (91) Menard O, Butel M-J, Gaboriau-Rouriau V, Waligora-Dupriet A-J. 2008. Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants. *App Environ Microbiol.* 74: 660-666.
- (92) Hrnčir T, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H. 2008. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ free mice. *BMC Immunology.* 9: 65.
- (93) Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, Naito S. 1995. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group. *Eur Urol.* 27 (2): 104-109.
- (94) Kumar M, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V, Kumar P, Poddar D, Aggarwal PK, Henry CJ, Jain S, Yadav H. 2010. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int J Food Sci Nutr.* 61 (5): 473-496.
- (95) Shida K, Nomoto K. 2013. Probiotics as efficient immunopotentiators: translational role in cancer prevention. *Indian J Med Res.* 138 (5): 808-814.

- (96) Adams CA. 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.* 23 (1): 37-46.
- (97) Asano M, Karasawa E, Takayama T. 1986. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* (LC 9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). *J Urol.* 136 (3): 719-721.
- (98) Ou CC, Lin SL, Tsai JJ, Lin MY. 2011. Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *J Food Sci.* 76 (5): M260-M267.
- (99) Hiramatsu Y, Hosono A, Konno T, Nakanishi Y, Muto M, Suyama A, Hachimura S, Sato R, Takahashi K, Kaminogawa S. 2011. Orally administered *Bifidobacterium* triggers immune responses following capture by CD11c (+) cells in Peyer's patches and cecal patches. *Cytotechnology.* 63 (3): 307-317.
- (100) Uccello M, Malaguarnera 8G, Basile F, D'agata V, Malaguarnera M, Bertino G, Vacante M, Drago F, Biondi A. 2012. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surg.* 12 (suppl 1): S35.
- (101) Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, Sirard JC, Pot B, Grangette C. 2007. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One.* 2 (3): e313.
- (102) Kim JY, Park MS, Ji GE. 2012. Probiotic modulation of dendritic cells co-cultured with intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 18 (12): 1308-1318.
- (103) Soltan Dallal MM, Yazdi MH, Holakuyee M, Hassan ZM, Abolhassani M, Mahdavi M. 2012. *Lactobacillus casei* ssp.*casei* induced Th1 cytokine profile and natural killer cells activity in invasive ductal carcinoma bearing mice. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 11 (2): 183-189.

- (104) Matsuzaki T, Chin J. 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol.* 78 (1): 67-73.
- (105) Matsuno K, Ueta H, Shu Z, Xue-Dong X, Sawanobori Y, Kitazawa Y, Bin Y, Yamashita M, Shi C. 2010. The microstructure of secondary lymphoid organs that support immune cell trafficking. *Arch Histol Cytol.* 73 (1): 1-21.
- (106) Miura S, Hokari R, Tsuzuki Y. 2012. Mucosal immunity in gut and lymphoid cell trafficking. *Ann Vasc Dis.* 5 (3): 275-281.
- (107) Shin R, Itoh Y, Kataoka M, Hara H, Ohashi Y, Miura S, Miura R, Mizutani T, Fujisawa T. 2014. Effect of soybean milk-fermented product on intestinal microbiota and colon carcinogenesis. *J Intest Microbiol.* 28: 15-24.
- (108) Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. 2004. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor- α production. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68: 119-125.
- (109) Hill DR, Pohl R. 1990. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by murine Peyer's patch macrophages. *Infect Immun.* 58 (10): 3202-3207.
- (110) Saito M, Yamaguchi T, Ebina T, Koi M, Aonuma E, Usami H, Ishida N. 1983. *In vitro* production of interferon (IFN γ) by murine spleen cells when different sensitizing antigens are used in vivo and in vitro. *Cell Immunol.* 78: 379-386.
- (111) McFarland DC, Zhang C, Thomas HC, T L R. 2006. Confounding effects of platelets on flow cytometric analysis and cell-sorting experiments using blood-derived cells. *Cytometry A.* 69 (2): 86-94.
- (112) Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, Joo HG, Woo HJ. 2004. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci.* 5 (1): 41-48.

- (113) Stewart-Tull D E S. 1980. The immunological activities of bacterial peptidoglycans. *Ann Rev Microbiol.* 43: 311-340.
- (114) Matsuguchi T, Takagi A, Matuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y. 2003. Lipoteicoic acid from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor α -inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diag Lab Immunol.* 10: 259-266.
- (115) Sun K, Xie C, Xu D, Yang X, Tang J, Ji X. 2013. *Lactobacillus* isolates from healthy volunteers exert immunomodulatory effects on activated peripheral blood mononuclear cells. *J Biomed Res.* 27 (2):116-126.
- (116) Tuo Y, Zhang W, Zhang L, Ai L, Zhang Y, Han X, Yi H. 2013. Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe.* 21: 22-27.
- (117) Murosaki S, Muroyama K, Yamamoto Y, Yoshikai Y. 2000. Antitumor effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother.* 49 (3): 157-164.
- (118) Fujiki T, Hirose Y, Yamamoto Y, Murosaki S. 2012. Enhanced immunomodulatory activity and stability in simulated digestive juices of *Lactobacillus plantarum* L-137 by heat treatment. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76 (5): 918-922.
- (119) Takeda S, Kawahara S, Hidaka M, Yoshida H, Watanabe W, Takeshita M, Kikuchi Y, Bumbein D, Muguruma M, Kurokawa M. 2013. Effects of oral administration of probiotics from Mongolian dairy products on the Th1 immune response in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77 (7): 1372-1378.
- (120) Yazdi MH, Soltan Dallal MM, Hassan ZM, Holakuyee M, Agha Amiri S, Abolhassani M, Mahdavi M. 2010. Oral administration of *Lactobacillus*

- acidophilus* induces IL-12 production in spleen cell culture of BALB/c mice bearing transplanted breast tumour. Br J Nutr. 104 (2): 227-232.
- (121) Maroof H, Hassan ZM, Mobarez AM, Mohamadabadi MA. 2012. *Lactobacillus acidophilus* could modulate the immune response against breast cancer in murine model. J Clin Immunol. 32 (6):1353-1359.
- (122) Ueta H, Shi C, Miyanari N, Xu XD, Zhou S, Yamashita M, Ezaki T, Matsuno K. 2008. Systemic transmigration of allosensitizing donor dendritic cells to host secondary lymphoid organs after rat liver transplantation. Hepatology. 47 (4):1352-1362.
- (123) Lim BK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. 2002. Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. Jpn J Cancer Res. 93 (1): 36-41.
- (124) Zamarron BF, Chen W. 2011. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. Int J Biol Sci. 7 (5): 651-658.
- (125) Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. 2003. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 42 (6): 1206-1252.
- (126) Bruce KD and Hanson MA. 2010. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. J Nutr. 140 (3): 648-652.
- (127) Daien V, Duny Y, Ribstein J, du Cailar G, Mimran A, Villain M, Daures JP, Fesler P. 2012. Treatment of hypertension with renin-angiotensin system

- inhibitors and renal dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Am J Hypertens.* 25 (1): 126-132.
- (128) Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova AF, Vallejo-Córdova B. 2016. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *J Dairy Sci.* doi: 10.3168/jds.2015-10054.
- (129) Chen Y, Li C, Xue J, Kwok LY, Yang J, Zhang H, Menghe B. 2015. Characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk produced by *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Sci.* 98 (8): 5113-5124.
- (130) Jakala P, Pere E, Lehtinen R, Turpeinen A, Korpela R, Vapaatalo H. 2009. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 60 (4): 11-20.
- (131) Takano T. 2002. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 333-340.
- (132) Yamamoto N, Akino A, Takano T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 77 (4): 917-922.
- (133) Liu TH, Chiou J, Tsai TY. 2016. Effects of *Lactobacillus plantarum* TWK10-Fermented Soymilk on Deoxycorticosterone Acetate-Salt-Induced Hypertension and Associated Dementia in Rats. *Nutrients.* 8 (5): 260; doi: 10.3390/nu8050260.
- (134) Liu YY, Zeng SY, Leu YL, Tsai TY. 2015. Antihypertensive Effect of a Combination of Uracil and Glycerol Derived from *Lactobacillus plantarum* Strain TWK10-Fermented Soy Milk. *J Agric Food Chem.* 63 (33): 7333-7342.

- (135) Yeo SK, Liong MT. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *Int J Food Sci Nutr.* 61 (2):161-181.
- (136) Hariri M, Salehi R, Feizi A, Mirlohi M, Kamali S, Ghiasvand R. 2015. The effect of probiotic soy milk and soy milk on anthropometric measures and blood pressure in patients with type II diabetes mellitus: A randomized double-blind clinical trial. *ARYA Atheroscler.* 11 (Suppl 1): 74-80.
- (137) Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57 (6): 922-925.
- (138) Washida K, Mashima I, Dansako T, Nakano T, Ishibashi T, Koyama T, Nomoto K. 2011. Angiotensin I-Converting-Enzyme (ACE) Inhibitor from Leaves of *Pueraria lobate* (Willd) Ohwi. *Nara Agri. Exp. Sta.* 42: 7-11.
- (139) Rai R, Saraswat VA, Dhiman RK. 2015. Gut microbiota: its role in hepatic encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol.* 5 (Suppl 1): S29-36.
- (140) Patel R, DuPont HL. 2015. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis.* 60 Suppl 2: S108-121.
- (141) Usami M, Miyoshi M, Yamashita H. 2015. Gut microbiota and host metabolism in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 21 (41): 11597-11608.
- (142) Sharma BC, Singh J. 2016. Probiotics in management of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* Apr 28. [Epub ahead of print]
- (143) Kitahara M, Sakata S, Sakamoto M, Benno Y. 2004. Comparison among fecal secondary bile acid levels, fecal microbiota and *Clostridium scindens* cell numbers in Japanese. *Microbiol Immunol.* ; 48 (5): 367-75.

- (144) Ridlon JM, Alves JM, Hylemon PB, Bajaj JS. 2013. Cirrhosis, bile acids and gut microbiota: unraveling a complex relationship. *Gut Microbes*. 4 (5): 382-387.
- (145) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. 2013. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 499 (7456): 97-101.
- (146) Kawano A, Ishikawa H, Kamano T, Kanoh M, Sakamoto K, Nakamura T, Otani T, Sakai T, Kono K. 2010. Significance of fecal deoxycholic acid concentration for colorectal tumor enlargement. *Asian Pac J Cancer Prev.*; 11 (6): 1541-1546.
- (147) Susa N, Ueno S, Furukawa Y. 1989. Comparative test for cytotoxicity of hexavalent and trivalent chromium in primary cultures of hepatocytes. *Kitasato Arch Exp Med*. 62: 53-57.
- (148) Susa N, Ueno S, Furukawa Y. 1994. Protective effects of thiol compounds on chromate-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Environ Health Perspect*. 102: 247-250.
- (149) Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Sugiyama M. 1996. Protective effect of vitamin E on chromium (VI)-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Toxicol*. 71:20-24.
- (150) Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Sugiyama M. 1997. Protective effect of deferoxamine on chromium (VI)-induced DNA single-strand breaks, cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Toxicol*. 71: 345-350.
- (151) Mitchell DB, Santone KS, 1980. Acosta D. Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage. *J Tissue Cult Method*. 6: 113-116.

- (152) Ueno S, Susa N, Furukawa Y, Akikawa K, Itagaki I, Komiyama T, et al. 1988. The relationship between the development of toxicity and lipid peroxidation induced by chromium compounds in rats. *Kitasato Arch Exp Med*. 61: 137-147.
- (153) Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Ueda J, Sugiyama M. 1997. Potent protective effect of melatonin on chromium (VI)-induced DNA single-strand breaks, cytotoxicity, and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol App Pharmacol*. 144: 377-384.
- (154) Buege JA, Aust S. 1987. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 52: 302-310.
- (155) Palmeria CM, Rolo AP. 2004. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicol*. 203: 1-15.
- (156) Keppler DOR, Rudigier JFM, Bischoff E, Decker KFA. 1970. The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine, and 2-deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur J Biochem*. 17: 246-253.
- (157) Decker K, Keppler D. 1974. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 71: 78-106.
- (158) Wang B, Ishihara M, Egashira Y, Ohta T, Sanada H. 1999. Effects of various kind of dietary amino acids on the hepatotoxic action of D-galactosamine in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 63: 319-322.
- (159) Daizo A, Egashira Y, Sanada H. 2005. Suppressive effect of corn bran hemicellulose on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Nutrition*. 21: 1044-1051.

- (160) Gupta V, Gupta A, Saggu S, Divekar HM, Grover SK, Kumar R. 2005. Anti-stress and adaptogenic activity of L-arginine supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2: 93-97.
- (161) Azaizeh H, Ljubuncic P, Portnaya I, Said O, Cogan U, Bomzon A. 2005. Fertilization-induced changes in growth parameters and antioxidant activity of medicinal plants used in traditional Arab medicine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2: 549-556.
- (162) Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. 2006. Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in vitro*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 3: 329-338.
- (163) Trentham DE, Townes AS, Kang AH. 1977. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med.* 146: 857-868.
- (164) Trentham DE, Roselynn A, David JR. 1978. Passive transfer by cells of Type II collagen-induced arthritis in rats. *J Clin Invest.* 61: 359-366.
- (165) Trentham DE, Townes AS, Kang AH, David JR. 1978. Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. *J Clin Invest.* 61: 89-96.
- (166) Meininger CJ, Kelly KA, Li H, Haynes TE, Wu G. 2000. Glucosamine inhibits inducible nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 279: 234-239.
- (167) Oelschlaeger TA, 2010. Mechanisms of probiotic actions- A review. *Int J Med Microbiol.* 300: 57-62.
- (168) Egusa S, Otani H. 2009. Characterization of a cellular immunostimulating peptide from a soybean protein fraction digested with peptidase R. *J Nutr Sci Vitaminol.* 55: 428-433.

- (169) Kato I, Endo-Tanaka K, Yokokura T. 1998. Suppressive effect of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. Life science. 63: 635-644.
- (170) Baharav E, Mor F, Halpern M, Weinberger A. 2004. *Lactobacillus* GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. J Nutr. 134: 1964-1964.
- (171) Holmdahl R, Jansson L, and Andersson M. 1986. Female sex hormone suppress development of collagen-induced arthritis in mice. Arthritis rheumatism. 12: 1501-1509.
- (172) Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, Larsson E. 1988. Immunogenetics of typeII collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis. Immunology. 65: 305-310.
- (173) Wooley P H, Luthra H S, Stuart J M, David C S. 1981. Type II collagen-induced arthritis in mice I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. J Exp Med. 151: 688-700.
- (174) Holmdahl R, Bockermann R, Bäcklund J, Yamada H. 2002. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice — a model for rheumatoid arthritis. Ageing Res Rev. 1: 135-147.
- (175) Kano H, Kaneko T, Kaminogawa S. 2002. Oral intake of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 prevents collagen-induced arthritis in mice. J food protection. 65: 153-160.
- (176) Sakai T, Kogiso M. 2008. Soy isoflavones and immunity. J Med Invest. 55: 167-173.
- (177) Salem ML, Matsuzaki G, Kishihara K, Madkour GA, Nomoto K. 2000. β -Estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through

- suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction. *Int Arch Allergy Immunol.* 121: 161-169.
- (178) Jansson L, Holmdahl R. 2001. Enhancement of collagen-induced arthritis in female mice by estrogen receptor blockage. *Arth Rheum.* 44: 2168-2175.
- (179) Ito A, Bebo Jr BF, Matejuk A, Zamora A, Silverman M, Fyfe-Johnson A, Offer H. 2001. Estrogen treatment down-regulates TNF- α production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol.* 167: 542-552.
- (180) Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A. 2003. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res.* 52: 341-346.
- (181) Setnikar I, Pacini M A, Revel L. 1991. Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied in animal models. *Arzneimittelforschung.* 41: 542-545.
- (182) Hua J, Suguro S, Hirano S, Sakamoto K, Nagaoka I. 2005. Preventive actions of a high dose of glucosamine on adjuvant arthritis in rats. *Inflamm Res.* 54: 127-132.
- (183) Yomogida S, Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I. 2008. Glucosamine suppresses interleukin-8 production and ICAM-1 expression by TNF- α -stimulated human colonic epithelial HT-29 cells. *Int J Mol Med.* 22: 205-211.
- (184) Tsi D, Khaw A, Iino T, Kiso Y, Ono H. 2003. Effect of Brand's glucosamine with essence of chicken on collagen-induced arthritis in rats. *Life sciences.* 73: 2953-2962.
- (185) Beren J, Hill S L, Diener-west M, Rose N R. 2001. Effect of pre-loading oral glucosamine HCL/chondroitin sulfate/manganese ascorbate combination on experimental arthritis in rats. *Exp Biol Med.* 226: 144-151.

- (186) Mauri C, Williams R O, Walmsley M, Feldmann M. 1996. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*. 26: 1511-1518.
- (187) Monari C, Bevilacqua S, Piccioni M, Pericolini E, Perito S, Calvitti M, Bistoni F, Kozel T R, Vecchiarelli A. 2009. A microbial polysaccharide reduces the severity of rheumatoid arthritis by influencing Th17 differentiation and proinflammatory cytokines production. *J immunol*. 183:191-200.
- (188) Mihara M, Ohsugi Y, Kishimoto T. 2009. Evidence for the role of Th17 cell inhibition in the prevention of autoimmune disease by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Biofactors*. 35: 47-51.
- (189) Criado G, Simelyte E, Inglis J J, Essex D, Williams R O. 2009. Indoleamine 2,3 dioxygenase-mediated tryptophan catabolism regulates accumulation of Th1/Th17 cells in the joint in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 60:1342-1351.
- (190) Mell B, Jala VR, Mathew AV, Byun J, Waghulde H, Zhang Y, Haribabu B, Vijay-Kumar M, Pennathur S, Joe B. 2015. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiol Genomics*. Jun; 47 (6): 187-97. doi: 10.1152/physiolgenomics.00136.2014.
- (191) Chakrabarti S, Jahandideh F, Wu J. 2014. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *Biomed Res Int*.; 608979. doi: 10.1155/2014/608979.
- (192) Lule VK, Garg S, Pophaly SD, Hitesh, Tomar SK. 2015. Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. *J Food Sci. Mar*; 80(3): R485-94. doi: 10.1111/1750-3841.12786.

- (193) Wang YC, Yu RC, Chou CC. 2006. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 23: 128-135.
- (194) Lin FM, Chiu CH, Pan TM. 2004. Fermentation of a milk-soymilk and *Lyceum chinense* Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 and *Bifidobacterium longum*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 31: 559-564.
- (195) Chien HL, Huang HY, Chou CC. 2006. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 23: 772-778.