

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 新 良一

本論文で研究がなされた豆乳発酵産物 (SFP: Soybean milk-Fermented Product) は、多菌種の乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*、*L. casei*、*Lactococcus lactis* など) と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 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。SFP は、含有成分とその機能性からバイオジェニクスに分類される。バイオジェニクスとは直接、あるいは腸内フローラを介して免疫賦活、コレステロール低下作用など宿主の健康に役立つ物質で、生理活性ペプチドや免疫賦活物質 (生体反応修飾物質)、植物フラボノイドなどがこれに含まれる。しかし、バイオジェニクスとしての豆乳発酵物に関する詳細な研究はこれまで少なかった。そこで本研究では、SFP 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) 大腸がん抑制作用が検討された。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が検討された。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・腎機能障害の改善、6) 関節炎抑制作用が検討され、以下の成績を得た。

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。また粘膜免疫の増強を示唆する唾液中分泌型 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。次に抗腫

瘍作用機序を Meth-A 腫瘍移植マウスで検討した。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活性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 や豆乳 (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 することにより腫瘍の増殖を抑制したと考えられた。

4) SFP および SFP-s (SFP の可溶性画分) 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** の関節炎抑制作用に関する検討

ウシⅡ型コラーゲン (**bCⅡ**) 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** ともに有意に低下した。**bCⅡ** 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 **bCⅡ** に対する免疫反応を **SFP-s** が修飾した為と考えられた。

これらの成績から、**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。

以上のように、本論文は豆乳乳酸菌発酵物がヒトの健康に有用であることを示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（応用生命科学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。