

## 豆乳の乳酸菌発酵産物が腸内細菌および大腸がん発がんに及ぼす影響

新 良一<sup>1\*</sup>, 伊藤 幸恵<sup>1</sup>, 片岡 元行<sup>1</sup>, 原 宏佳<sup>2</sup>, 大橋 雄二<sup>3</sup>,  
三浦 詩織<sup>1</sup>, 三浦 竜介<sup>1</sup>, 水谷 武夫<sup>1</sup>, 藤澤 倫彦<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup>株式会社エイ・エル・エイ中央研究所,

<sup>2</sup>日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科食品バイオテクノロジー教室,

<sup>3</sup>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

### Effect of Soybean Milk-Fermented Product on Intestinal Microbiota and Colon Carcinogenesis

Ryoichi SHIN<sup>1\*</sup>, Yukie ITOH<sup>1</sup>, Motoyuki KATAOKA<sup>1</sup>, Hiroyoshi HARA<sup>2</sup>, Yuji OHASHI<sup>3</sup>,  
Shiori MIURA<sup>1</sup>, Ryosuke MIURA<sup>1</sup>, Takeo MIZUTANI<sup>1</sup>, and Tomohiko FUJISAWA<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup>Central Institute for Health Science, A.L.A. Corporation,

<sup>2</sup>Laboratory of Food Biotechnology, School of Food Science and Technology,

Nippon Veterinary and Life Science University,

<sup>3</sup>Laboratory of Food Hygiene, School of Food Science and Technology, Nippon Veterinary and Life Science University

**要旨** 豆乳の発酵産物が宿主に及ぼす影響を検討した報告は少ない。今回、我々は豆乳の乳酸菌発酵産物（SFP: Soybean milk-Fermented Product）がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を検討し、さらに大腸の発がん予防とその作用機序についても合わせて検討した。SFPは豆乳を複数の乳酸菌と酵母で混合培養後殺菌し、凍結乾燥して調製した。一般的な日本食を食べているボランティアにSFPを摂取させ（450 mg/day/head for 14 days）、腸内細菌叢の変化を比較したところ、SFP群はプラセボ群より *Bifidobacterium* の占有率が25%以上増加した人数が多かった（ $P < 0.05$ ）。さらに、昼食のみを一般的な日本食から肉食中心の欧米食（肉摂取量約300 g, 900 kcal）に3日間変えると、*Clostridium* の占有率は増加したが（ $P < 0.05$ ），SFPを摂取（900 mg/day/head）すると減少した（ $P < 0.05$ ）。また、SFPの摂取で *Bifidobacterium* の占有率が増加した（ $P < 0.05$ ）。このボランティアの糞便中  $\beta$ -glucuronidase活性は、昼食を肉食中心の欧米食にすると一般的な日本食摂取時より5倍以上増加したが（ $P < 0.01$ ），SFP摂取で一般的な日本食時のレベルにまで減少した（ $P < 0.05$ ）。以上の結果は、SFPが多くのプロバイオティクスなどで示されている大腸がんの発がんリスクを軽減する可能性を示唆していると考え、以下の検討を試みた。即ち、SFPが大腸がんの発がんに及ぼす影響は大腸がん誘起剤1,2-dimethylhydrazine (DMH) をCF#1マウスに投与する化学発がんモデルを用いて検討した。SFPはDMH投与開始時から飼料中に3% (W/W) 混和して与え、大腸に発がんした腫瘍数を検討した結果、有意な抑制が認められた（ $P < 0.05$ ）。一方、SFPの抗腫瘍作用機序は、Meth-A腫瘍移植モデルで検討した。SFP（10 mg/0.2 ml/day/head）は化学発がんモデルと同様にMeth-A腫瘍移植前から実験期間中投与し、抗腫瘍効果が得られた脾細胞を用いた Winn assay での作用機序を検討した。その結果、SFP群のみは移植6日目以降でMeth-A単独移植群に比べ有意な腫瘍増殖抑制が認められ（ $P < 0.05$ ），担癌マウスの脾細胞中に抗腫瘍作用を示す免疫細胞群が誘導された可能性が考えられた。*Bifidobacterium*を定着させたノッ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や豆乳（10 mg/0.2 ml/day/head）を4週間連日経口投与しても、脾細胞数は生理食塩液を投与した無菌マウスと差が認められなかった。これらのことからSFPの抗腫瘍効果には腸内細菌が宿主免疫に関与した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。

**Abstract** A few studies have investigated the effect of fermented product of soybean milk on human health. This study evaluated the effects of soybean milk-fermented product (SFP) on the intestinal flora of humans, and colorectal carcinogenesis in animals. SFP was prepared by culturing soybean milk with lactic acid bacteria and yeast.

2013年6月24日受付 2013年10月30日受理

\*〒246-0002 神奈川県横浜市瀬谷区北町40-14

40-14 Kitamachi, Seya-ku, Yokohama, Kanagawa 246-0002,

Japan

The effect of SFP (450 mg/day) on human fecal flora was determined by comparing the changes in intestinal flora between human volunteers consuming SFP and those taking a placebo. The occupation rate of *Bifidobacterium* of more than 25% was greater in the SFP group ( $n=11$ ) than in the placebo group ( $n=10$ ,  $P<0.05$ ). The occupation rate of *Clostridium* in fecal flora of the volunteers ( $n=5$ ) increased after shifting from a traditional Japanese diet (TJD) to a Western diet (WD), in which a total daily amount of 300 g of meat (900 kcal) was eaten once at lunch for 3 days ( $P<0.05$ ). The occupation rate of *Clostridium* in the WD group was reduced by SFP ingestion (900 mg/day) to a level similar to that in the TJD group. Meanwhile, the occupation rate of *Bifidobacterium* was higher in the SFP ingestion group than in the WD group.  $\beta$ -Glucuronidase activity in the feces was up to 5 times higher when lunch was changed from TJD to WD, but this was recovered by SFP inclusion in the WD diet ( $P<0.05$ ). The above findings suggest the possibility that SFP inhibits colon cancer carcinogenesis. To investigate this notion further, a colon cancer-inducing substance, 1,2-dimethylhydrazine (DMH), was given to CF#1 mice. SFP administration significantly decreased the incidence of colon cancer, compared to controls. We also examined the mechanism of SFP tumor suppression. A Winn assay was performed using spleen cells. SFP given for more than 6 days inhibited tumor growth compared to tumor cells inoculated with Meth-A alone ( $P<0.05$ ). This result indicates the possible induction of anti-tumor immune cells in SFP-treated spleen cells. Furthermore, the number of spleen cells increased more in gnotobiotic BALB/c mice in association with *Bifidobacterium* than in saline-treated germ-free mice. The number of spleen cells in germ-free mice given SFP or soybean milk (10 mg/day and 0.2 ml/day, respectively) for 4 weeks was not significantly different compared to the saline-treated germ-free animals. Our results suggest that the suppressive effect of SFP on tumorigenesis was mediated by the involvement of the host immune response induced by intestinal bacteria. Further studies are required to clarify the mechanism of this phenomenon.

*Key words* : soybean milk ; fermented product ; lactic acid bacteria ; yeast ; colon carcinogenesis

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(1-3)。これら腸内細菌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 PJらは肥満マウスの腸内細菌叢を移植した無菌マウスが肥満になったことで腸内細菌叢が肥満の病態や生理に関与していることを明らかにし、腸内細菌叢は宿主の健康に重要な役割を担っていることが明らかにされつつある(4)。近年、この腸内細菌の意義を解明することを目的に、European metagenomics of the human intestinal tract や The US human microbiome project が組織され、宿主に及ぼす腸内細菌叢の役割解明に向けて研究が推進されている(1-3)。既に、多くのプレバイオティクスやプロバイオティクスは腸内細菌叢を *Bifidobacterium* 優位に誘導することが明らかにされている(5-7)。一方、豆乳をケフィアで発酵させた Fermented soybean milk (以下 FSM) は、ヒトで *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ことが明らかにされ、プレバイオティクスとプロバイオティクスの側面を持つと考えられている(8)。この様な腸内環境改善を示すプレバイオティクスやプロバイオティクスは、免疫賦活、感染防御、炎症制御などを誘導することも明らかにされ(9-11)、Vergheese ら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低減(12)、Bassaganya-Riera らは *Lactobacillus 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

を示すことを報告している(13)。他方、豆乳を用いた発酵産物の抗腫瘍作用は、*Bifidobacterium 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エンレセプター (ER) に作用して増殖抑制作用(14)、*Lactobacillus 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効果を示唆した報告があるものの(15)、大腸がんに及ぼす影響を検討した報告はない。

今回、肝臓と腎臓の機能改善作用を示す豆乳の乳酸発酵産物 Soybean milk-fermented product (以下 SFP) が(16) 腸内環境の改善作用に及ぼす影響をヒトで調べ、その結果予測される大腸がん発症に及ぼす影響とその作用機序を検討したところ、興味ある結果が得られたので報告する。

## 材料と方法

### 1. SFP の調製

SFP は Shin らの方法に準じて調製した(16)。即ち、SFP は加熱殺菌した(115°C 15分)豆乳に *Lactobacillus plantarum* ALAL006 株, *L. casei* ALAL003 株, *L. reuteri* ALAL013 株, *Lactococcus lactis* ALAL014 株, *Saccharomyces cerevisiae* ALAY001 株を接種し、37°C 4日間培養後 98°C, 30 分加熱滅菌後凍結乾燥した。豆乳も SFP と同じ殺菌処理を施し凍結乾燥した。SFP の栄養成分はタンパク質 51.2%, 脂質 20.0%, 灰分 9.3%, 糖質 16.3%, 食物繊維 2.3% であり、有機酸 19.3%, サポニン 1.7%, イソフラボン 0.2% を含む。

## 2. ヒト試験

一般的日本食を摂取している 20～26 歳のボランティア 11 名（男 7 名、女 4 名）に SFP 450 mg/head/day, 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中の腸内細菌叢を検索した。腸内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（17-19）。即ち、腸内細菌の DNA を抽出し、PCR で 16sDNA を增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腸内細菌占有率を算出した。さらに、腸内細菌の変化は Nagashima の方法（18）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。

次に、一般的日本食を摂取している 20～40 歳のボランティア 5 名（男 3 名、女 2 名）の糞便中の腸内細菌叢を検索し、昼食のみ肉食中心の欧米食（肉摂取量約 300 g, 900 kcal）を 3 日間摂取させた。その後、3 週間一般的日本食に戻して欧米食の影響を排除し、再度昼食のみ肉食中心の欧米食を摂取させ、SFP (900 mg/head/day) を食後 30 分以内に摂取させた。それぞれの糞便中の腸内細菌叢は食物の消化管内移動時間を考慮し、肉食中心の欧米食および SFP 摂取最終日の翌々日に検索した。また、糞便中  $\beta$ -glucuronidase 活性は腸内細菌叢を検索した際の糞便検体を用いて行った（20）。 $\beta$ -glucuronidase 活性は Reddy ら（21, 22）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。

なお、ボランティアは発酵食品と腸内細菌叢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。

## 3. 実験動物

理化学研究所で繁殖した 5 週齢の雄性 CF # 1 マウス（理化学研究所；埼玉県和光市）、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 ± 1°C、湿度 50 ± 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」に従って実施した。

## 4. 化学発がんモデル

大腸がんは CF#1 マウスに Mizutani らの方法に準じて 1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH; Sigma-Aldrich chemical company, Inc, USA Milwaukee) 20 mg/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（23）。SFP 群、豆乳群および対照群にそれぞれ 21 匹のマウスを割り付けた。SFP 群と豆乳群には MF 飼料に SFP あるいは豆乳を 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 週目に炭酸ガスで安樂死させ、大腸を摘出し腫瘍数を計測した。

## 5. Meth-A 腫瘍移植モデル

SFP 群、豆乳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 群と豆乳群はそれぞれ 10 mg/0.2 mL/head/day を、対照群は生理食塩液 0.2 mL/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  $1 \times 10^6$  cells 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。東北大学細胞センターより供与された Meth-A 腫瘍を用いた。

## 6. 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（24）。即ち、Meth-A 腫瘍移植後 8 日目の SFP 群、豆乳群および対照群それぞれ 6 匹の BALB/c マウスの脾細胞  $1 \times 10^7$  cells と Meth-A 腫瘍  $1 \times 10^6$  cells 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日的に検討した。SFP 群、豆乳群および対照群の抗腫瘍作用は Meth-A 腫瘍単独移植群の腫瘍増殖推移と比較した。

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

Bacteria	Placebo group (n=10)					SFP group (450 mg/day, n=11)					<i>P</i> value
	Occupation rate (%)		Incidence of volunteers <sup>b</sup>			Occupation rate (%)		Incidence of volunteers			
	Before	After	Inc <sup>c</sup>	Dec <sup>d</sup>	NC <sup>e</sup>	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> <sup>f</sup>	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

<sup>a</sup> The 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 (%). <sup>b</sup> Number. <sup>c</sup> Inc: 25% or more relative rate [(Occupation rate after treatment / occupation rate before treatment - 1) × 100]. <sup>d</sup> Dec: 25% or less relative rate. <sup>e</sup> NC: No Change. <sup>f</sup> The 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).

## 7. 無菌動物モデル

無菌 BALB/c マウスは SFP 群、豆乳群および陰性対照群にそれぞれ 5 匹のマウス、陽性対照群の *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM1217 (Microbe Division, RIKEN BioResource Center) を定着させるノトバイオートには 7 匹のマウスを割り付けた。SFP 群と豆乳群にはそれぞれ 10 mg/0.2 mL/head/day を、陰性対照群と陽性対照群には滅菌生理食塩液 0.2 mL/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 CO<sub>2</sub> ガスで安樂死させ、脾臓の細胞数を計測し体重比で算出した。

## 8. 統計解析

ヒト試験のプラセボと SFP の 2 群間の比較には 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。また、動物モデル試験の多群間の比較は一元配置分散分析の後、Tukey または Dunnnet 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。

## 成 績

### 1. SFP 摂取がヒト腸内細菌叢と糞便内

#### β-glucuronidase 活性に及ぼす影響

一般的日本食に SFP を摂取させた前後の腸内細菌叢とその変化を Table 1 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つたが、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多かった (*P* < 0.05)。

一般的日本食、肉食中心の欧米食さらに肉食中心の欧米食に SFP を摂取させた腸内細菌叢の変化を Table 2 に示した。一般的日本食時の *Bifidobacterium* の占有率は 3.2 ± 2.1% で、昼食に肉食中心の欧米食を摂取しても 5.4 ± 5.3% と変化が認められなかつたが、それに SFP を摂取させると 12.8 ± 10.1% と有意に増加した (*P* < 0.05)。一般的日本食摂取時の *Clostridium* 占有率は 31.8 ± 7.9% で、昼食を肉食中心の欧米食にすると 41.1 ± 8.9% に増加し (*P* < 0.05)，さらに SFP を摂取させると一般的日本食時と同等のレベルにまで減少した (*P* < 0.05)。一般的日本食摂取時の *Bacteroides* 占有率 32.3 ± 15.1% は昼食を肉食中心の欧米食にしても 28.0 ± 8.6% と差が認められなかつたが、それに SFP を摂取させると 19.8 ± 7.7% に減少した (*P* < 0.05)。

一般的日本食摂取時、昼食を肉食中心の欧米食および SFP 摂取時の糞便中の β-glucuronidase 活性の結果を Fig. 1 に示した。β-glucuronidase 活性は、昼食を肉食中心の欧米食にすると一般的日本食摂取時の 5 倍以上に増加したが (*P* < 0.01)，それに SFP を摂取させると、一般的日本食時と同レベルにまで減少した (*P* < 0.05)。

### 2. 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は Fig. 2 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、豆乳群の 4.3 ± 2.7 個 /head より有意に少なかった (*P* < 0.05)。

### 3. 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

Table 2. Effect of soybean milk-fermented product (SFP) on fecal bacterial composition in 5 volunteers fed western diet mainly meat meals<sup>a</sup>

Bacteria	TJD <sup>b</sup>	WD <sup>c</sup>	WD + SFP (900 mg/day)
<i>Bifidobacterium</i>	3.2 ± 2.1	5.4 ± 5.3	12.8 ± 10.1 *e
<i>Lactobacillales</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> <sup>d</sup>	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

<sup>a</sup> The 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 (%). <sup>b</sup> TJD, traditional Japanese diet. <sup>c</sup> WD, Western diet mainly meat meal (approximately, a total amount of meat ingestion 300 g, 900 kcal) at the only lunch for 3 days. <sup>d</sup> The total value of cluster (IV, XI, XVIII) and subcluster (XIVa). <sup>e</sup>\*P<0.05, significantly different from the value of WD (Two-sided paired t test). <sup>f</sup>\*P<0.01, significantly different from the value of TJD (Two-sided paired t test). <sup>g</sup>\*P<0.05, significantly different from the value of WD (Two-sided paired t test).

増殖推移は Fig. 3 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 ( $P < 0.05$ )。豆乳群の腫瘍増殖は対照群と差が認められなかった。

#### 4. SFP 投与による抗腫瘍作用機序 (Winn assay)

SFP 群、豆乳群、対照群および Meth-A 腫瘍単独移植群の腫瘍増殖推移を Fig. 4 に示した (Winn assay)。SFP 群の脾細胞は Meth-A 腫瘍の増殖を移植 6 日以後 Meth-A 単独移植群より有意に抑制した ( $P < 0.05$ )。豆乳群と対照群の腫瘍増殖は Meth-A 単独移植群と差が認められなかった。

#### 5. SFP 投与による無菌マウスの脾臓細胞数

SFP 群、豆乳群、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. 5 に示した。SFP 群の脾臓細胞数は豆乳群、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、豆乳群および陰性対照群のそれより多かった ( $P < 0.05$ )。

#### 考 察

腸内細菌は宿主の健康に重要な役割を担っていることが知られている (1-4)。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ことを目的に広く用いられている (5, 6, 25)。豆乳を発酵させた 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、腸内細菌叢を *Bifidobacterium* 優位に導くことが明らかにされている (8)。今回、豆乳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、腸内細菌叢に及ぼす影響を検討した。SFP の摂取量は、FSM の腸内細菌叢に及ぼす最少有効投与量は明らかでないが (8)、その約 1/10 量を用いて検討した結果、*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ことから、SFP は多くのプレバイオティクスやプロ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 (5, 6, 8)。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。豆乳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。一方、腸内細菌叢は食事で影響を受けることが知られており、肉食中心の欧米食を摂取した際の腸内細菌叢は一般的な日本食摂取時のそれと異なり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 (9, 13, 25-28)。我々の検討結果では、肉食中心の欧米食の *Bifidobacterium* は一般的な日本食と比べ差が見られなかつたが、前試験の倍量とした SFP 摂取で増加が認められ、多くのプレバイオティクスやプロバイオティクスと同様な結果が得られた (5, 6)。SFP に含まれる大豆オリゴサッカライド、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 (8, 15)、豆乳群は Inoguchi らと豆乳群と同様に有意な増加が認められなかつた (8)。この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* は一般的な日本食より欧米食で多いことが知られているが (28, 29)、我々の検討でも肉食中心の欧米食を摂取させた際に増加し、さらに SFP を摂取させると一般的な日本食のレベルに

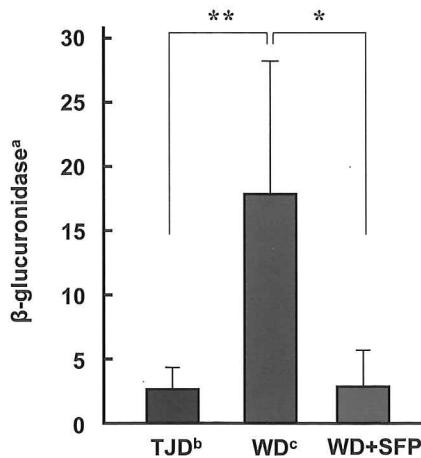


Fig. 1. Effect of soybean milk-fermented product (SFP, 900 mg/day) on the fecal  $\beta$ -glucuronidase in 5 volunteers fed high meat meals. <sup>a</sup> Phenolphthalein liberated  $\mu$ g / hr/mg of feces. <sup>b</sup> TJD: traditional Japanese diet. <sup>c</sup> WD: western diet (mainly meat meal, approximately, a total amount of meat ingestion 300 g, 900 kcal) 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).

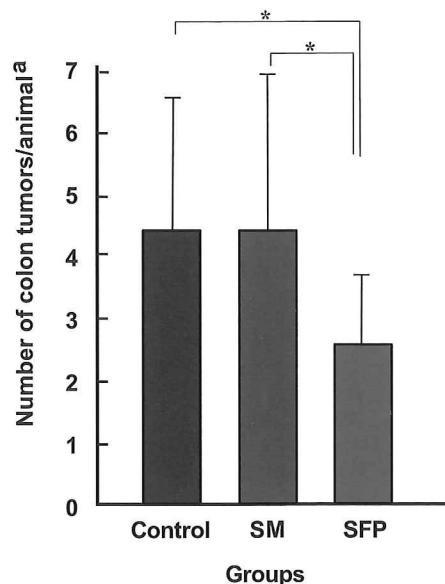


Fig. 2. Inhibitory effects of soybean milk-fermented product (SFP) on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon tumors in male CF#1 mice. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $n=21$ ). SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. <sup>a</sup> The number of colon tumor nodules at 25 weeks after the last DMH injection. \* $P$ <0.05, Significantly different from the value of control or SM (Tukey's test).

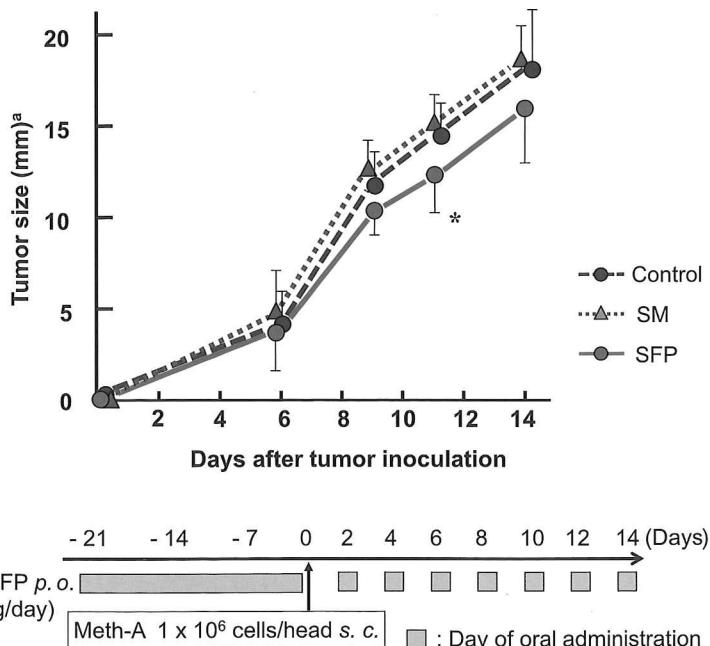


Fig. 3. Growth inhibition of Meth-A tumor by oral administration of soybean milk-fermented product (SFP) in BALB/c mice. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. <sup>a</sup> Tumor size was calculated by square root of the value of major axis  $\times$  minor axis (mm). \* $P$ <0.05, Significantly different from the value of control (Dunnett's test).

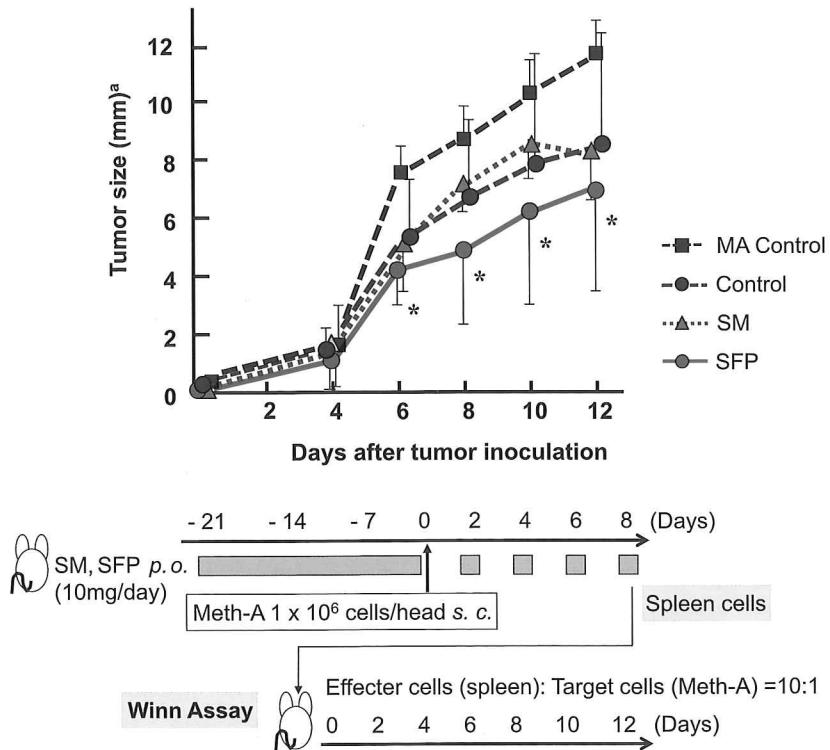


Fig. 4. Growth inhibition of Meth-A tumor by oral administration of soybean milk-fermented product (SFP) in BALB/c mice (Winn assay). Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. MA control: Meth-A tumor alone. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. <sup>a</sup> Tumor size was calculated 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).

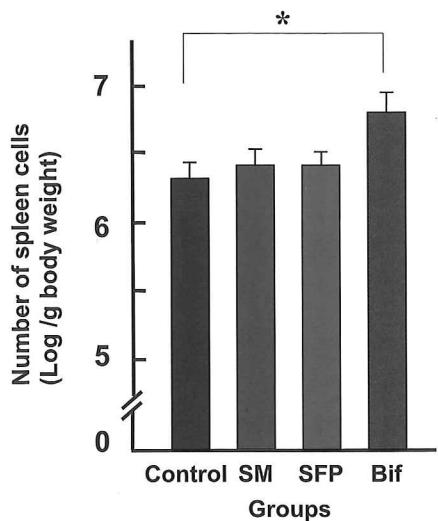


Fig. 5. Effects of soybean milk-fermented product (SFP) on number of spleen cells in BALB/c germ free mice. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. Bif: gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strain as a positive control. \*P<0.05, Significantly different from the value of control (Dunnett's test).

まで減少した。以上の腸内細菌叢の変化は FSM を摂取させた Inoguchi ら (8), 他のプレバイオティクスやプロバイオティクスの結果と同じ傾向であった (5, 6)。*Bacteroides* は SFP を摂取すると一般的な日本食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  $\beta$ -glucuronidase 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、 $\beta$ -glucuronidase 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 (9, 30, 31)。我々の検討結果では、 $\beta$ -glucuronidase 活性は肉食中心の欧米食を摂取させた時に著しく上昇し、それに SFP を摂取させると一般的な日本食を摂取させたレベルにまで減少した。この推移は、 $\beta$ -glucuronidase 活性を有する菌種とされている *Clostridium* の変化と一致し (9), 大腸がん患者で *Clostridium* が多いことを考え併せると (32) *Clostridium* の消長に相関する  $\beta$ -glucuronidase 活性が大腸がん発がんに重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 (33), ひいては  $\beta$ -glucuronidase 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、多くのプレバイオティクスやプロバイオティクスでの報告(25)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*, *Lactobacillus 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(34)、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と一致しており(25, 34)、SFPは大腸がん発がんリスクを軽減できる可能性を示唆している。しかし、豆乳の発酵産物の抗腫瘍作用は乳がんで報告されているが(14, 15)、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を用いてSFPが大腸がん発がんに及ぼす影響を検討した(35, 36)。その結果、SFP群の腫瘤数は対照群より少ないことが観察された。豆乳群は対照群と差が認められなかつたので、SFPの抗腫瘍作用に関与した物質は乳酸菌発酵過程で產生された物質の可能性が推察された。Ohtaらは豆乳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エンレセプターに作用して抗腫瘍作用を示すことを報告している(14)。ヒト大腸がんの約50%にはエストロジエンレセプターが発現しているため(37)、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が、明らかでない。抗腫瘍作用を示す発酵由来物質についてはさらなる検討が必要である。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ことが知られている(2, 9, 10, 13, 25)。また、Kinouchiらは大豆発酵産物が宿主免疫を賦活してエストロジエンレセプターを持たない乳がんのin vivo増殖を抑制したことを見た(15)。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の検討を行った。我々の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、豆乳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腫瘍と混和しWinn assayを行った(24)。その結果、SFP群のみにMeth-A単独移植群に比べ腫瘍の増殖抑制が認められ、豆乳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は担癌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 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )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(24, 25)、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- $\gamma$ を产生することを認め、免疫賦活作用を有することを明らかにしており、Winn assayの結果もSFP投与で脾細胞がIFN- $\gamma$ を产生し、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(24)。我々のMeth-A腫瘍移植モデルの結果はKinouchiらの報告と一致し(15)、異所性の腫瘍にも宿主免疫賦活作用(15)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。SFPが宿主免疫能に及ぼす影響をさらに検討した。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(10)。SFP摂取で増加した*Bifidobacterium*はヒト宿主免疫を修飾することが報告されており、*Bifidobacterium*を定着させたノトバイオートマウスでは、自然免疫能のみならず獲得免疫をも修飾することが知られている(2, 38)。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(Gut associated lymphoid tissueに含まれる)が重くなり(Data not shown)、獲得免疫を司る脾細胞数(39)も増加が認められた。しかし、SFP群と豆乳群は無菌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(Data not shown)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が宿主免疫に関与した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。

## 引用文献

- (1) Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489: 220-230.
- (2) Maynard C, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489: 231-241.
- (3) Tremaroli V, Bäckhed F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489: 242-249.
- (4) 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.

- (5) Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125 : 1401-1412.
- (6) Howarth GS, Wang H. 2013. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 5 : 58-81.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) O'Flaherty S, Saulnier DM, Pot B, Versalovic J. 2010. How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? *Gut Microbes* 5 : 293-300.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) Shin R, Suzuki M, Mizutani T, Susa N. 2007. Improvement of experimentally induced hepatic and renal disorders in rats using lactic acid bacteria-fermented soybean extract (Biofermentics<sup>TM</sup>). *Evid Based Complement Alternat Med* 6 : 357-363.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) Dicksved J, Flöistrup H, Bergström a, Rosenquist M, Pershagen G, Scheynius A, Roos S, Alm JS, Engstrand L, Braun- Fahrlander 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.
- (20) 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.
- (21) Reddy BS, Weisburger JH, Wynder EL. 1974. Fecal bacterial beta-glucuronidase: control by diet. *Science* 183 : 416-417.
- (22) Kulkarni N, Reddy BS. 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β-glucuronidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 207 : 278-283.
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) Mitsuoka T. 2000. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Biosci Microflora* 19 : 15-25.
- (27) 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.
- (28) 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.
- (29) Mitsuoka T. 1984. The effect of nutrition on intestinal flora. *Nahrung* 28 : 619-625.
- (30) Kim DH, Jin YH. 2001. Intestinal bacterial β-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 24 : 564-567.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) 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.
- (34) 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.
- (35) 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.
- (36) Asha, Gayathri D. 2012. Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Exp Therapeutic Med* 3 : 1049-1054.
- (37) Rudolph A, Toth C, Hoffmeister M, Roth W, Herpel E, Jansen L, Marx A, Brenner H, Chang-Claude J. 2012. Expression of oestrogen receptor  $\beta$  and prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 107 : 831-839.
- (38) 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.
- (39) Hrncir 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.