

豆乳の乳酸菌発酵産物による 腸内環境改善と大腸がんの発がん抑制

Inhibition of colon carcinogenesis and improvement of
intestinal environment after oral administration of soybean milk-fermented product

新 良一¹⁾・片岡 元行¹⁾・三浦 竜介¹⁾・水谷 武夫¹⁾・藤澤 倫彦²⁾

1) 株式会社エイ・エル・エイ中央研究所

2) 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

BIO Clinica

2014 年 29 卷 4 号 (通巻 379 号) 4 月号 p.84 ~ p.88

北 隆 館

豆乳の乳酸菌発酵産物による腸内環境改善と大腸がんの発がん抑制

■ しん りょういち¹⁾ かたおか もとゆき¹⁾
新 良 一¹⁾・片岡 元行¹⁾
みうら りょうすけ¹⁾ みずたに たけお¹⁾
三浦 竜介¹⁾・水谷 武夫¹⁾
ふじさわ ともしこ²⁾
藤澤 倫彦²⁾

- 1) 株式会社エイ・エル・エイ中央研究所
2) 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

Abstract

わが国の大腸がんは食事の欧米化に伴って増加し、ガンによる死因では肺がん胃がんに次いで第3位を占める。大腸がんの発症には食事や運動などの環境要因が重要である。一方、プロバイオティクスやプレバイオティクスは腸内環境を改善し大腸がん抑制作用を示す事が報告されている。今回、豆乳の乳酸菌発酵産物 (SFP) が大腸がん発症に及ぼす影響を明らかにする事を目的に、欧米食に加えて SFP を摂取した際の腸内環境を調べ、さらに SFP が大腸がん発症に及ぼす影響を化学発がんモデルで検討し、その抗腫瘍作用機序についても解析した。

はじめに

わが国の大腸がんの発症は欧米食によるタンパク、脂肪過剰摂取に代表される高エネルギー摂取、運動および喫煙など環境要因が遺伝要因よりも重要と考えられている。一方、10³ 種以上の菌種で 10¹⁴ 個以上の細菌から構成される腸内細菌叢は様々な酵素などを駆使して腸内容物を代謝し、宿主の健康に重要な役

Key words : 乳酸菌発酵産物, 腸内細菌叢,
 β -glucuronidase, 大腸がん, 免疫賦活

割を担う事が明らかにされている。プロバイオティクスやプレバイオティクスは腸内細菌叢を *Bifidobacterium* 優位にして腸内環境 (腸内の細菌叢や健康に関与する物質を含む総称) を改善し、健康に資する事も明らかにされている。例えば、豆乳をケフィア菌で発酵させた Fermented soybean milk は、*Bifidobacterium* を増やし *Clostridium* を減少させ、糞便中硫化物を抑制して腸内環境改善作用を示す¹⁾。このような腸内環境改善作用は大腸がん抑制に重要と考えられている。さらに、豆乳を *B. breve* の発酵で産生されたイソフラボンは乳がん細胞のエストロジェンレセプター (ER) に作用して増殖抑制作用²⁾、*L. helveticus* と *E. faecium* の発酵産物は免疫を活性化して ER 陰性マウス乳がん細胞の増殖抑制効果を示した報告があるものの³⁾、大腸がんに及ぼす影響は検討されていない。

今回、肝臓と腎臓の機能改善作用を示す豆乳の乳酸菌発酵産物 Soybean milk-Fermented Product (SFP)⁴⁾ が腸内環境に及ぼす影響を調べ、さらに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。

Inhibition of colon carcinogenesis and improvement of intestinal environment after oral administration of soybean milk-fermented product :

Ryoichi Shin¹⁾, Motoyuki Kataoka¹⁾, Ryosuke Miura¹⁾, Takeo Mizutani¹⁾, Tomohiko Fujisawa²⁾

1) ALA Co., Ltd.

2) Laboratory of Food Hygiene, School of Food Science and Technology, Nippon Veterinary and Life Science University

表 乳酸菌発酵産物 (SFP) が腸内細菌叢^{a)} に及ぼす影響

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

a) ボランティア 5 名の腸内細菌叢は T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法にて分析した。占有率の値 (%) は平均±標準偏差。

b) TJD, 日本食。

c) WD, 肉食中心の欧米食を昼食時 3 日間摂取 (肉摂取量約 300g, 900kcal)。

d) クラスタ (IV, XI, XVIII) とサブクラスタ (XIVa) の合計値。

e) $*P<0.05$, WD 値に対して有意な差 (Two-sided paired *t* test)。

f) $*P<0.01$, TJD 値に対して有意な差 (Two-sided paired *t* test)。

g) $*P<0.05$, WD 値に対して有意な差 (Two-sided paired *t* test)。

1. 乳酸菌発酵産物 (SFP) について

SFP は豆乳に *L. plantarum* ALAL006 株, *L. casei* ALAL003 株, *L. reuteri* ALAL013 株, *Lactococcus lactis* ALAL014 株, *Saccharomyces cerevisiae* ALAY001 株を接種し, 37℃ 4 日間培養後 98℃, 30 分加熱滅菌後凍結乾燥して調製した。SFP 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% で構成され, 有機酸 19.3%, サポニン 1.7%, イソフラボン 0.2% を含む。SFP の上清はデオキシコール酸および D- ガラクトサミン誘発肝障害モデルラットの肝機能障害改善を示し, 重クロム酸塩による肝腎の初代培養細胞の障害抑制から肝・腎の機能改善作用を示す事を明らかにしている⁴⁾。

2. SFP がヒト腸内環境に及ぼす影響

肉食中心の欧米食は日本食より大腸がんのリスクが高く, *Clostridium* が多く *Bifidobacterium* が少ない腸内細菌叢を形成し

ている⁵⁾。そこでボランティア 5 名に, 昼食のみ肉食中心の欧米食 (肉摂取量約 300g, 900kcal) を 3 日間摂取させ, 3 週間のウォッシュアウトの後, 再度昼食のみ肉食中心の欧米食に SFP (900mg/head/day) を食後 30 分以内に摂取させて腸内細菌叢を 16S rDNA 部分塩基配列の T-RFLP 法で検索した。

Bifidobacterium は欧米食を摂取しても変わらなかったが, SFP 摂取で増加した。*Clostridium* は欧米食で増加し, SFP を摂取させると日本食時と同等のレベルにまで減少した。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³⁾, 豆乳群は Inoguchi らと同様に有意な増加が認められなかった¹⁾。この機序は今後の検討課題である。また, 有害菌と考えられる *Clostridium* は日本食より欧米食で多い事が知られているが, 我々の結果も欧米食で増加し, SFP の摂取で日本食のレベルにまで減少した。以上の腸内細菌叢の変化は Inoguchi らや他のプロバイオティクスやプレバイオティクスの結果と同じ傾向であった¹⁾ (表)。

臨床において、糞便中の β -glucuronidase 活性は大腸がん患者が健常者より高く、バイオマーカーの一つと考えられている⁶⁾。我々の結果は、 β -glucuronidase 活性が欧米食で 6.7 倍に上昇し ($17.5 \pm 10.8 \mu\text{g/hr/mg}$)、それに SFP を摂取させると日本食を摂取させたレベルにまで減少した ($2.6 \pm 2.5 \mu\text{g/hr/mg}$)。この推移は β -glucuronidase 活性を有する菌種である *Clostridium* の変化と一致した⁷⁾。大腸がん患者で *Clostridium* が多い事を考え併せると *Clostridium* の消長に相関する β -glucuronidase 活性が大腸がん発症に重要な役割を担っていると考えられた⁸⁾。また、SFP 摂取時に増加した *Bifidobacterium* は *Clostridium* 抑制に関与し、ひいては β -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、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 (*B. lactis*, *L. rhamnosus*, とオリゴフラクトースを含む) を投与すると、*Bifidobacterium* 優位 *Clostridium* 抑制、二次胆汁酸などの大腸がんリスクを抑えて大腸がんを抑制した報告と一致しており⁹⁾、SFP は大腸がんの発症を抑制する可能性を示唆している。

3. SFP が DMH 誘発大腸がんに及ぼす影響

SFP が大腸がん発症に及ぼす影響は、7 日おきに 10 回 DMH 20mg/kg をマウス腹腔内に投与して誘発する化学発がんモデルを用いて検討した。SFP と豆乳は MF 飼料にそれぞれ 3% (W/W) 添加し試験期間中摂取させた。DMH 最終投与後 25 週目に安楽死させ、大腸の腫瘍数を計測した。腫瘍はすべて腺がんであった。SFP 群の腫瘍数は対照群と豆乳群よ

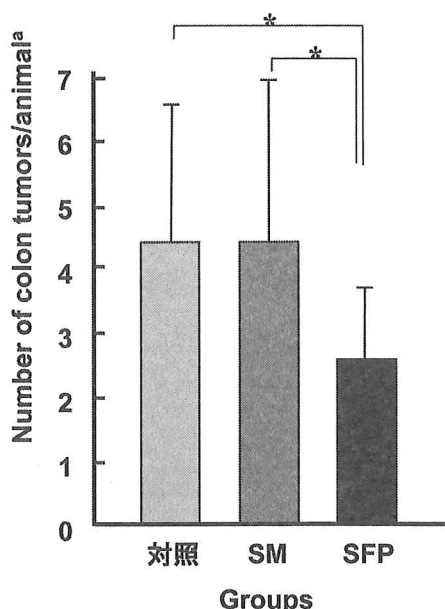


図 1 乳酸菌発酵産物 (SFP) の DMH 誘発大腸がんの発がん抑制

大腸がんは雄性 CF#1 マウスに DMH, 20mg/kg を 5 週齢から 7 日おきに 10 回腹腔内投与して誘発した。SM (豆乳) SFP (乳酸菌発酵産物) は MF 飼料に 3% (W/W) 添加し試験期間中摂取させた。各群 21 匹のマウスを割り付けた。a DMH 最終投与後 25 週後の腫瘍数。値は平均 $\pm$ 標準偏差。* $P < 0.05$, 対照群または SM 群に対して有意な差 (Tukey's test)。

り少なかった (図 1)。豆乳群は対照群と差が認められなかったので、SFP の抗腫瘍作用は発酵過程で産生された物質による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 ER に作用して抗腫瘍作用を示したと報告している²⁾。ヒト大腸がんの約 50% には ER が発現しているため、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。

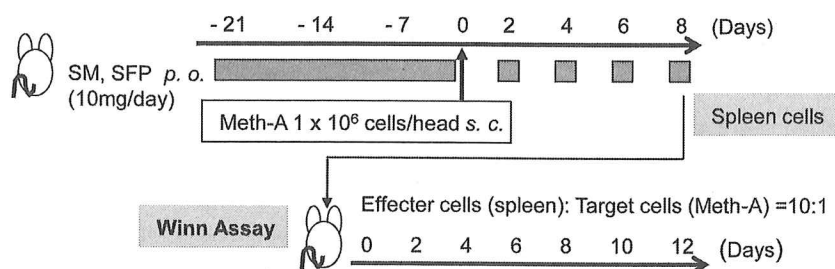
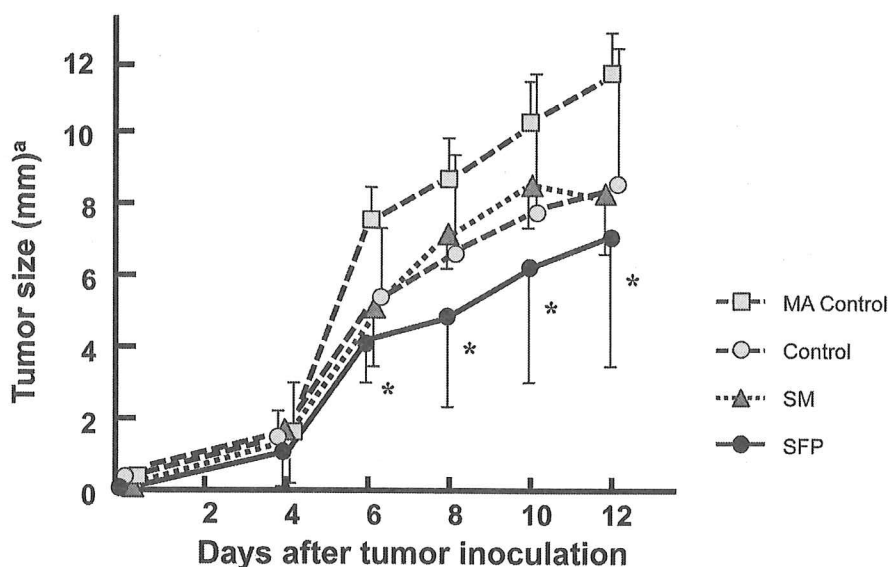


図2 Winn Assay による乳酸菌発酵産物 (SFP) の抗腫瘍作用機序

SM (豆乳) SFP (乳酸菌発酵産物) は5週齢雌性BALB/cマウスに10mg/0.2mL/head/dayを3週間連日経口投与した。その後 1×10^6 cellsのMeth-A腫瘍を鼠経部皮下に移植し、隔日に経口投与を継続した。Control群は生理食塩液を同様なスケジュールで経口投与した。腫瘍移植8日目の脾細胞 1×10^7 cellsとMeth-A腫瘍 1×10^6 cellsを混和し、新たな雌性BALB/cマウスの鼠経部に移植し経的に腫瘍サイズを測定した。各群6匹のマウスを割り付けた。MA control: Meth-A腫瘍のみ移植。a腫瘍サイズは長径と短径の積の平方根 (mm) で表した。値は平均 $\pm$ 標準偏差。* $P < 0.05$, MA control に対して有意な差 (Dunnett's test)。

4. 抗腫瘍作用機序の解明

Kinouchi らは乳がんの *in vivo* 増殖抑制を大豆発酵産物が *in vitro* で誘導したサイトカインの結果から宿主免疫賦活によるとしているが、*in vivo* の抗腫瘍作用機序は検討していない³⁾。そこで、SFPの抗腫瘍作用機序を *in vivo*

で検討した。即ち、図2下部に示すプロトコールに従ってSFP群と豆乳群を投与し、腫瘍増殖推移を比較すると、腫瘍移植9、11日目にSFP群 (10.03 ± 1.08 , 12.17 ± 2.00 mm) は対照群 (11.84 ± 1.84 , 18.34 ± 3.06 mm) より増殖抑制が認められたが、豆乳群 (12.75 ± 1.26 , 15.10 ± 1.73 mm) は対照群と差が認められず、先の化学発がんモデルと同様な結果が得られ

た。次に、腫瘍移植後8日目にSFP群、豆乳群および対照群それぞれ6匹のマウスの脾細胞 1×10^7 cells に Meth-A 腫瘍 1×10^6 cells を混和し、それぞれ新たな6匹のマウスの鼠経部皮下に移植して腫瘍増殖推移を経日的に検討した (Winn assay)。

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、豆乳群と対照群に比べ腫瘍増殖抑制傾向が見られた。少なくともSFPは脾細胞中にMeth-A細胞を傷害する免疫細胞群を誘導したと考えられた。Kinouchiらは豆乳発酵産物群の抗腫瘍作用は *in vitro* IFN- γ 産生増強で証明しており³⁾、Winn assayの結果もSFP投与で脾細胞が抗腫瘍作用発現に重要なIFN- γ を産生し、Meth-A細胞を傷害する活性化マクロファージ、NKおよびCTLなどを誘導した可能性が考えられる。

SFPの免疫賦活に腸内細菌叢が関与した可能性は無菌マウスにSFPと豆乳 (10mg/0.2mL/head) を1カ月間経口投与し、宿主免疫賦活作用を有する *B. longum* を定着させたノトバイオトマウスを陽性対照とし、分化増殖した脾細胞数の変化で評価した。

その結果、陽性対照群の脾細胞数は 6.74 ± 0.07 (log/g 体重) と増加したが、SFP群、豆乳群ともに生理食塩液を投与した陰性対照群 6.34 ± 0.08 (log/g 体重) のそれと差が無く、宿主免疫に及ぼす影響は認められなかった。この結果は、SFPの宿主免疫賦活は腸内細菌叢が重要な働きをした可能性を示唆している。

おわりに

SFPは *Bifidobacterium* 優位、*Clostridium* 抑制および β -glucuronidase 活性抑制に誘導して腸内環境を改善し、大腸がん発症を抑制する

可能性が示唆された。化学発癌モデルで検討した結果、SFPは大腸がんの発症抑制作用を有する事が認められ、その作用機序はSFPの宿主免疫賦活能が重要であり、宿主免疫賦活能は腸内環境改善作用が関与した可能性が考えられた。

文 献

- 1) Inoguchi S, Ohashi Y, Narai-Kanayama A, *et al.* Effects of non-fermented and fermented soybean milk intake on faecal microbiota and faecal metabolites in humans. *Int J Food Sci Nutr* 2012; 63: 402-410.
- 2) Ohta T, Nakatsugi S, Watanabe K, *et al.* 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* 2000; 21: 937-941.
- 3) Kinouchi FL, Maia DCG, Ribeiro LCA, *et al.* A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 4144-4148.
- 4) Shin R, Suzuki M, Mizutani T, *et al.* Improvement of experimentally induced hepatic and renal disorders in rats using lactic acid bacteria-fermented soybean extract (BiofermenticsTM). *Evid Based Complement Alternat Med* 2007; 6: 357-363.
- 5) Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, *et al.* Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS ONE* 2012; 7: e34676
- 6) Kim DH, Jin YH. Intestinal bacterial β -glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 2001; 24: 564-567.
- 7) Azcárate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G401-G424.
- 8) Chen W, Liu F, Ling Z, *et al.* Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* 2012; 7: e39743.
- 9) Rafter J, Bennett M, Caderni G, *et al.* Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 488-496.