

博士論文

活性酸素関連疾患の  
乳酸菌による予防効果に関する研究

伊藤 雅彦

## 目次

略号一覧	2
緒言	4
第一章 大腸粘膜の酸化傷害を抑制する乳酸菌のスクリーニング	8
第二章 大腸炎モデルマウスにおける抗酸化乳酸菌の投与効果	27
第三章 食餌性高脂血症モデルにおける大動脈壁脂質沈着病変の 乳酸菌による抑制	39
第四章 <i>S. thermophilus</i> YIT 2001 の LDL 酸化抑制活性に係る 活性本体の同定	53
第五章 <i>S. thermophilus</i> YIT 2001 発酵乳がヒトの血中酸化 LDL および血圧にもたらす影響	64
総合討論	75
要旨	78
引用文献	82
公表論文一覧	92
謝辞	94

## 略号一覧

- ADA : *N*-(2-acetamido)-iminodiacetic acid, *N*-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸
- ANCOVA : analysis of covariance, 共分散分析
- ANOVA : analysis of variance, 分散分析
- cfu : colony-forming units, コロニー・フォーミング・ユニット
- DBP : diastolic blood pressure, 拡張期血圧
- DSS : dextran sulfate sodium, デキストラン硫酸ナトリウム
- EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, イライザ法
- GSH : reduced glutathione, 還元型グルタチオン
- GSSG : oxidised glutathione, 酸化型グルタチオン
- HDL : high-density lipoprotein, 高比重リポタンパク質
- HPLC-ESI-MS : 高速液体クロマトグラフィー - エレクトロスプレーイオン化質量分析
- IC<sub>50</sub> : 50% inhibitory concentration, 50%阻害濃度
- IL : interleukin, インターロイキン
- LDL : low-density lipoprotein, 低比重リポタンパク質
- LcS : *Lactobacillus casei* strain Shirota, L.カゼイ・シロタ株
- M2VP: 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulphonate, 1-メチル-2-ビニルピリジニウムトリフルオロメタンスルホネート
- MDA : malondialdehyde, マロンジアルデヒド
- MDA-LDL : malondialdehyde-modified LDL, マロンジアルデヒド修飾 LDL (酸化 LDL の一種)
- MPO : myeloperoxidase, ミエロペルオキシダーゼ
- NAD(P)H : nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate), ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (リン酸)
- PBS : phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水
- SAA : serum amyloid A, 血清アミロイド A
- SBP : systolic blood pressure, 収縮期血圧
- SD : standard deviation, 標準偏差
- SE : standard error, 標準誤差
- SOD : superoxide dismutase スーパーオキシドディスムターゼ
- St2001 : *Streptococcus thermophilus* YIT 2001, ストレプトコッカス・サーモフィルス・YIT 2001 株

St2084 : *Streptococcus thermophilus* YIT 2084, ストレプトコッカス・サーモフィルス・YIT 2084 株

TBARS : thiobarbituric acid reactive substance, チオバルビツール酸反応性物質

## 緒言

人は生存に必要なエネルギーを酸素呼吸によって獲得しているが、生体内の酸素の一部は非常に反応性が高い活性酸素となる。分子状酸素は4電子還元されると化学的に安定な水となるが、必ずしも4つの電子が渡されるとは限らない。不完全な形で還元された酸素分子が、スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $HO^{\cdot}$ ) などの活性酸素である(1,2)。活性酸素は、生体内の酸化反応に関わる短寿命で高反応性の酸素種と定義され、広義には、ペルオキシラジカル、次亜塩素酸、過酸化脂質なども含む。生体は適正な量の活性酸素を好中球による感染菌の殺菌や細胞内のシグナル伝達・転写制御因子にも利用しているが、過剰な活性酸素は、脂質、タンパク質、核酸などの生体分子を酸化変性し、生理機能に障害をもたらす。活性酸素の中でもヒドロキシラジカルは最も反応性が高く、最も有害である。ヒドロキシラジカルの生体内の産生経路は以下のように考えられている。生理的条件下においても NAD(P)H オキシゲナーゼ、キサンチンオキシゲナーゼなどの反応によりスーパーオキシドアニオンラジカルが産生される。また、 $Fe^{2+}$ や  $Cu^+$ などの遷移金属イオンの存在下で分子状酸素が一電子還元され、非酵素的にもスーパーオキシドアニオンラジカルが生成する。スーパーオキシドアニオンラジカルは、酵素的・非酵素的に不均化され、過酸化水素へと変換される。この過酸化水素が遷移金属イオンの存在下で、ヒドロキシラジカルに変換され、脂質、タンパク質、核酸などの生体分子を過酸化する。

ヒドロキシラジカルが脂質と反応すると脂質ラジカル ( $L^{\cdot}$ ) が生じ、 $L^{\cdot}$  が酸素 ( $O_2$ ) と反応すると脂質ペルオキシラジカル ( $LOO^{\cdot}$ ) となる(2)。 $LOO^{\cdot}$  が別の脂質分子と反応すると過酸化脂質 ( $LOOH$ ) と  $L^{\cdot}$  が生じ、 $L^{\cdot}$  が酸素と反応して $\cdots$ という脂質過酸化の連鎖反応が続くと考えられている (Figure Preface-1)。連鎖反応はラジカル同士の反応やビタミン E などの抗酸化物質との反応により、安定生成物となることにより終結する。細胞膜で過酸化脂質が産生されると脂肪酸鎖の疎水的結合が弱くなり、膜のコンホメーションが変化する(1)。また、過酸化脂質が代謝されて、アルデヒドが生じ、これがタンパク質を変性させると考えられている(3)。

酸素を利用して生きている以上、生体内で活性酸素が生じるのを完全に防ぐことはできない。そのため、生体はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素、ビタミン C および E、グルタチオン、尿酸などの低分子抗酸化物質、鉄結合蛋

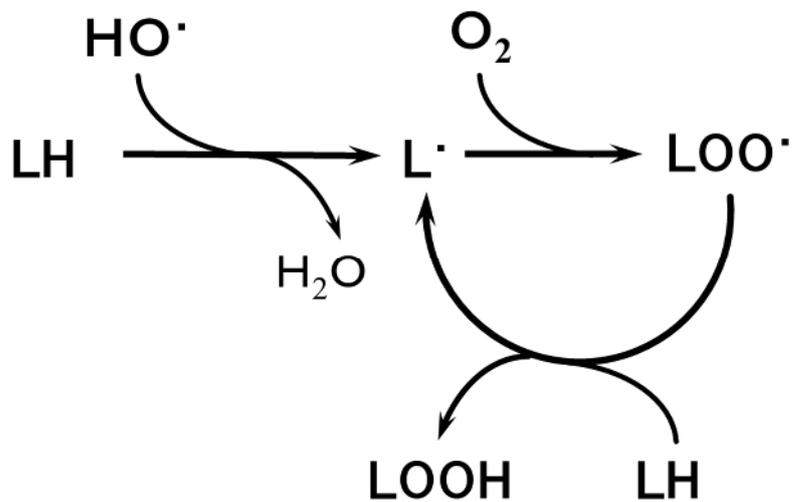


Figure Preface-1. Chain reaction of lipid peroxidation.

LH , unsaturated lipid

L· , lipid radical

LOO· , lipid peroxy radical

HO· , hydroxyl radical

LOOH , lipid peroxide

O<sub>2</sub> , molecular oxygen

H<sub>2</sub>O , water

白質など、活性酸素の害を防止するための種々の防御システムを備えており、活性酸素の産生はこれらのシステムにより抑えられ、発生した場合も消去される(4)。しかし、活性酸素産生の亢進または防御力の低下などが生じ、このバランスが崩れると生体成分が酸化変性される。このバランスの崩れを酸化ストレスと言う。

酸化ストレスは、老化を促進し、がん、炎症、動脈硬化、高血圧などの種々の疾病のリスクを高めると考えられている(5~9)。炎症においては、好中球による殺菌やマクロファージなどの食細胞による貪食の際に多量の活性酸素が産生される。生じた活性酸素は感染菌の殺菌や異物排除に用いられるが、過剰な活性酸素は組織に非特異的な酸化傷害をもたらす、炎症症状を悪化させる。粥状動脈硬化においては、酸化ストレス下で生じる低比重リポタンパク質(LDL)の酸化変性が病変形成に大きくかかわっていると理解されている。また、酸化ストレスは血管内皮細胞の機能低下をもたらす、高血圧のリスクを高めると考えられている。糖尿病患者、高血圧患者などでは酸化ストレスが高い状態にあることが報告されており、糖尿病や高血圧は動脈硬化性疾患の明確なリスク因子である。このように酸化ストレスが高いことが種々の疾病の発症リスクを高め、疾病によって酸化ストレスが高まるといった悪循環も生じている。これらの疾病は自覚症状がないまま進行してしまうことが多いことから、健康な時からの予防が重要であり、食生活や運動を含めた生活習慣への介入が効果的であると考えられている。

筆者らは、発酵乳などの形で長期の連日摂取の実績があり、通常の食生活の中に取り入れやすいと考えられる乳酸菌に着目し、活性酸素関連疾患のリスク低減に利用できる食品素材を見出すことを目的に研究を行った。

脂質の酸化されやすさおよび脂質酸化に対する抗酸化剤の効果は、脂質の存在状態(脂質の均質系、ミセル系、脂質二重膜系)によって異なることが知られている(4,10)。たとえば、ビタミンEはリノール酸メチルの均質系やリポソーム膜(脂質二重膜系)の酸化に対してはプロブコールに比べて圧倒的に高い抗酸化活性を示すが、LDL(ミセル・エマルジョン系)に対しては関係が逆転することが報告されている。そこで、抗酸化活性を持つ乳酸菌をスクリーニングする際には、生体内での脂質の存在状態を鑑み、細胞膜のモデルであるリン脂質リポソーム(第一章)およびヒト血清LDL(第三章)を基質に用いて脂質過酸化抑制活性を調べた。

乳酸菌やビフィズス菌は、発酵乳、チーズ、ヨーグルトなどの発酵食品のスターターに用いられ、長い食経験を有する安全な食品素材であると同時に、人の健康に密接にかかわっている有益な機能性素材であると考えられている。これまで、整腸作用、免疫調節作用などに関する報告は数多くなされている

が、抗酸化作用に関しては、*in vitro*の研究はいくつか認められるものの(11～16)、*in vivo*の効果に関する報告は不十分である。本研究では、乳酸菌の中から抗酸化活性の高い菌株をスクリーニングし、その菌株の経口摂取によって、結腸粘膜（第一章、第二章）および LDL（第三章～第五章）の酸化が抑制されることを明らかにした。第一章においては、日常的に起こりうる酸化ストレスのモデルとして鉄を過剰摂取した際に結腸粘膜で起こる脂質過酸化反応に対する乳酸菌の抑制効果を調べた。スクリーニングされた乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* YIT 2001 (St2001) は、鉄過剰投与の動物モデルにおいて、結腸粘膜の酸化ストレスを軽減した。第二章では、炎症モデルとしてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導マウス大腸炎モデルを用い、St2001 の経口投与により、結腸粘膜の酸化ストレスが軽減され、大腸炎の症状が改善することを示した。第三章では、動脈硬化予防の観点から LDL 酸化抑制に注目して、乳酸菌を再度スクリーニングした。St2001 は LDL 酸化に対しても高い抗酸化活性を示した。さらに、高脂血症の動物モデルにおいて、St2001 の投与により LDL の酸化が抑制されること、動脈硬化の初期病変である大動脈壁への脂質沈着が抑制されることを示した。第四章では St2001 の LDL 酸化抑制にかかわる主要な活性物質が菌体内の還元型グルタチオン (GSH) であることを明らかにした。第五章では、ヒトにおいても St2001 発酵乳の摂取によって LDL の酸化変性が抑制されることをランダム化二重盲検プラセボ対照試験により検証した。

以上、本研究においては、生体内で起こる反応を模した *in vitro* スクリーニング系を用いて乳酸菌をスクリーニングし、選抜した乳酸菌 St2001 が *in vivo* においても酸化ストレスを低減して大腸炎の症状や動脈硬化のリスクを低減することを示した。これらの研究成果は、食品成分の機能研究に新たな知見を加え、活性酸素関連疾病予防に新たな可能性を提示すると同時に、プロバイオティクスの研究対象領域を広げるものと期待している。

## 第一章 結腸粘膜の酸化傷害を抑制する乳酸菌のスクリーニング

### 序

鉄は、幼児期および成人女性においてしばしば欠乏症状が認められる栄養素の一つである。日本人の17歳から閉経期までの女性の5~17%が鉄欠乏性貧血の症状を呈し、35~62%が潜在性鉄欠乏と報告されている(17)。さらに閉経後の女性の約20%、成人男性の約5%にも鉄欠乏が認められる。妊婦における鉄欠乏は低体重児・未熟児の出産および周産期の死亡率増加の原因となる。乳児および小児では精神活動や認識動作への障害、成人では作業能力の低下などが鉄欠乏によって起こるとされている。ゆえに、鉄欠乏の人々にとっては積極的な鉄補給が必要であり、この意味から鉄イオンを補填した各種食品や医薬品が数多く市販されている。

一方で、過剰の鉄、特に2価の鉄イオンは生体組織に酸化障害を引き起こすリスクを有している(1,2)。2価鉄イオンは、Haber-Weiss反応(Fenton反応)と言われるヒドロキシラジカル産生反応を触媒し、脂質過酸化反応の開始および連鎖を促進する。それゆえ、生体内では鉄イオンの反応性はフェリチンやトランスフェリンなどの鉄結合タンパク質によって厳格に制御されている。一方、経口摂取された鉄は一部分(通常50%以下)しか吸収されないため、その多くが結腸管腔内に到達し、そこでは鉄結合タンパク質に結合していない遊離の鉄イオンが存在することとなる。結腸粘膜表面には血流を介して分子状酸素が供給されるため、分子状酸素と2価鉄イオンが共存するというヒドロキシラジカルが発生しやすい状況が生じる(Figure 1-1)。分子状酸素は2価鉄の存在下でスーパーオキシドラジカルに変換され、スーパーオキシドラジカルから酵素的・非酵素的な不均化反応により過酸化水素が発生する。過酸化水素は2価鉄の存在下でヒドロキシラジカルに変換されるが、ヒドロキシラジカルは反応性が極めて高く、脂質、タンパク質、核酸など種々の生体分子を酸化変性し、多くの組織障害に関与する。すなわち、過剰量の鉄の経口摂取により、結腸粘膜の脂質過酸化が促進されると考えられる(18~20)。

複数の疫学研究や動物試験により、鉄の過剰摂取が結腸粘膜に酸化ストレスをもたらし、大腸がんや潰瘍性大腸炎のリスクを上昇させることが示唆されている(21~24)。マウスの結腸粘膜の過酸化脂質レベルが飼料中の鉄含量に依存して増加すること、大腸がん化学誘発ラットにおいて飼料中の鉄含量の増加が発がんリスクを増加させることが報告されている。Babbsは食事由来の非吸収性の過剰な鉄が消化管内で酸化ストレスを惹起し、それが潰瘍性

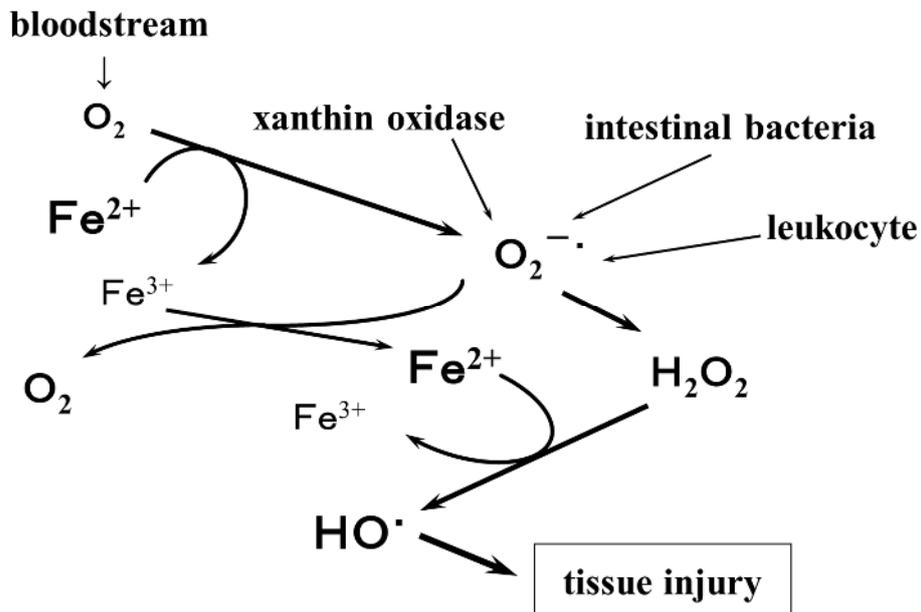


Figure 1-1. Assumed pathway of hydroxyl radical production in colonic mucosa.

$O_2$  , molecular oxygen

$O_2^{\cdot -}$  , superoxide anion radical

$H_2O_2$  , hydrogen peroxide

$HO^{\cdot}$  , hydroxyl radical

$Fe^{2+}$  , ferrous ion

$Fe^{3+}$  , ferric ion

大腸炎における粘膜傷害の悪化や結腸がんの発症率の増加をもたらしているという仮説を提唱した(25,26)。大腸における酸化ストレスが低減できれば、これらの疾病の予防に役立つ可能性が考えられる。

食事由来のフィチン酸が、鉄の過剰経口投与で生じる結腸粘膜脂質過酸化および大腸がんリスクの増加効果をキャンセルすることが報告されている(22,27)。フィチン酸は Haber-Weiss 反応を触媒できない形に鉄をキレートするが、同時に消化管からの鉄吸収を阻害する。成長期にある小児や貧血などで鉄補給が必要な人々にとっては、鉄吸収が低下することは望ましくない。したがって、フィチン酸によるキレートとは別の機構で結腸粘膜の酸化ストレスを低減する食品素材が必要と考えられる。

乳酸菌は、発酵乳やチーズなどの酪農製品の製造にも利用されている通性嫌気性菌である。近年では、整腸作用、免疫調節作用など、人の健康に役立つ種々の作用が報告され、注目を集めている。抗酸化作用に関しては *in vitro* 試験の報告は複数認められるものの(11~16)、*in vivo* での効果の報告はビタミン E 欠乏ラットにおける報告など限定的である(11)。経口摂取した乳酸菌は結腸管腔内に到達し、結腸粘膜に近接すると考えられることから、結腸粘膜の酸化ストレスを低減するために有効な素材となりうる可能性がある。

以上のような背景から、本章では鉄の過剰摂取により生じる結腸粘膜の酸化ストレスを低減するために利用できる食品用微生物を見出すことを目的として、乳酸菌をスクリーニングし、選抜した菌が鉄過剰摂取マウスにおいて結腸粘膜の過酸化脂質レベルを低下させることを検証した。また、整腸作用・免疫調整作用などの報告(28)がある代表的なプロバイオティクス菌株の一つである *Lactobacillus casei* シロタ株 (LcS) の鉄過剰摂取マウスにおける抗酸化効果についても併せて検討した。

## 材料および方法

### 微生物および培養条件

(株)ヤクルト本社 中央研究所で系統保存されている *Enterococcus*(4株)、*Lactobacillus*(34株)、*Lactococcus*(2株)、*Leuconostoc*(2株)、*Streptococcus*(7株) を試験に用いた。各菌株は 2%グルコースを含む変法 GAM 培地(日水製薬(株))を用いて 37°Cで 18 時間培養し、生理食塩水による洗浄の後、8500×g で 15 分間遠心分離して菌体を回収した。動物実験の際には *Streptococcus thermophilus* YIT 2001 (St2001) および *Lactobacillus casei* シロタ株 (LcS) を凍結乾燥(保護剤として脱脂乳を使用)した後、飼料に混合した。

### リポソームにおける脂質過酸化反応の阻害活性の評価

細胞膜の脂質過酸化に対する各菌株の阻害活性を評価するため、脂質過酸化反応の基質にリン脂質リポソームを用いた。L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (Sigma Chemical Co. 製、type XV-E、卵黄由来) 0.1 g を 10 mL のジエチルエーテルに溶解し、0.6 mL の蒸留水を加えた後、ultrasonic disrupter CA-44882 (Kaijyo Co.製) で超音波処理しながら水がなくなるまで 0°C で減圧乾固した。この乾固物に 0.1 M *N*-(2-acetamido)-iminodiacetic acid (ADA) ナトリウム緩衝液 (pH6.7) を 30 mL 加え 0°C で 15 分間超音波処理した後、1500×g で 10 分間遠心分離して非沈殿画分を回収し、リポソーム懸濁液とした。リポソーム懸濁液に各濃度の被験菌 (ADA ナトリウム緩衝液に懸濁) を加えた混液に、塩化鉄(II)およびアスコルビン酸ナトリウムをそれぞれ終濃度 48  $\mu$ M および 1 mM となるように添加し、37°C で 2 時間反応させた。反応液中の過酸化脂質レベルを既報(20)に従ってチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) 量で評価した。褐色試験管に被験試料 (反応液) 0.1 mL を採取し、8.1% ドデシル硫酸ナトリウム 0.2 mL、20% 酢酸 (NaOH で pH3.5 に調整) 1.5 mL、0.8% ブチル化ヒドロキシトルエン酢酸溶液 0.05 mL、0.8% チオバルビツール酸 1.0 mL、5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 0.7 mL、蒸留水 0.5 mL をこの順序で混合した後、5°C で 60 分間保持した。さらに、100°C で 60 分間加熱した後、TBARS を 5 mL の *n*-ブタノール・ピリジン混液 (15:1 v/v) で抽出し、蛍光検出法 (Ex: 515 nm、Em: 553 nm) によりマロンジアルデヒド (MDA) 相当量として定量した。

脂質過酸化反応の阻害率を次式に従って算出した。

$$\text{脂質過酸化反応阻害率 (\%)} = (C - T) / (C - B) \times 100$$

C：被験菌株なしで反応させたりポソーム懸濁液の TBARS

T：被験菌株共存条件で反応させたりポソーム懸濁液の TBARS

B：蒸留水を被験試料とした場合の TBARS

被験菌株毎にそれぞれ 4~5 点の菌濃度で脂質過酸化反応の阻害率を求めた。菌濃度は変法 GAM 培地を用いた培養法（37℃、2 日間培養）により、反応開始前の 1 mL あたりの生菌数（colony-forming units；cfu）を算出した。対数変換した菌濃度（log<sub>10</sub> cfu/mL）と脂質過酸化反応阻害率（%）の関係をシグモイドカーブに適合させ、脂質過酸化反応を 50%阻害する時の菌濃度（50%阻害濃度；IC<sub>50</sub>）を求めて阻害活性の指標とした。

#### 動物および飼料

動物試験のプロトコールは、(株)ヤクルト本社 中央研究所の動物実験委員会により承認された。

混餌する菌株（動物試験 1-1；St2001、動物試験 1-2；LcS）以外は同一のプロトコールで二つの動物試験を実施した。6 週齢の BALB/cA マウス（♂）を日本クレア(株)から購入し、1 週間の馴化飼育の後、ランダムに 12 匹ずつ 5 群に分けた。各群の飼料組成を Table 1-1 に示した（通常食群；AIN-76A(29)、対照群；鉄負荷飼料、0.1%群；凍結乾燥菌末 0.1%含有鉄負荷飼料、0.4%群；凍結乾燥菌末 0.4%含有鉄負荷飼料、2.0%群；凍結乾燥菌末 2.0%含有鉄負荷飼料）。飼料および飲水は自由摂取、室温 25℃、湿度 55%、明暗 12 時間周期の環境で飼育した。被験飼料で 2 週間飼育した後、ネンブタール麻酔下で、腹部大静脈から採血し、血液をヘパリンと混合した。結腸および盲腸を内容物ごと採取した後、麻酔下で安楽死させた。

#### 血漿、結腸粘膜、盲腸内容物の処理

ヘパリン血から遠心分離により血漿を調製した。血漿中の鉄濃度は市販のキット（Fe-C テストワコー；和光純薬工業(株)製）を用いて測定した。

結腸は、切開して生理食塩水で洗浄し、スライドガラスで粘膜を掻き取った。粘膜を 1.15% KCl 中で均質化した後、*in vitro* 試験と同様の既報(20)の方法で TBARS を測定した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit(Pierce Co.製)で測定した。

盲腸から内容物を回収し、10 倍量の生理食塩水で懸濁した後、13000×g で 15 分間遠心分離して上清を回収し、Fe-C テストワコーを用いて可溶性鉄（総鉄イオンおよび 2 価鉄イオン）濃度を測定した。なお、同キット付属の

Table 1-1. Composition (%) of diets

Group	Normal diet group	Control group	0.1% group	0.4% group	2.0% group
Casein	20.0	18.9	18.9	18.8	18.5
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
$\alpha$ -Corn starch	15.0	15.0	15.0	15.0	14.7
Sucrose	50.0	48.9	48.8	48.6	47.6
Cellulose fiber	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9
Corn oil	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9
AIN-76 mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4
AIN-76 vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Lactic acid bacteria	0	0	0.1	0.4	2.0
Skim milk	0	2.0	2.0	2.0	2.0
Ferrous fumarate	0	0.2	0.2	0.2	0.2

Iron concentration in diets was 0.07%, except in the normal diet (0.0035%).

還元剤を使用せずに測定することで、2価鉄イオン濃度を求めた。

#### 統計解析

統計ソフトは SAS system for Windows (release 6.12) を用いた。乳酸菌によるリポソームの脂質過酸化の抑制活性 ( $IC_{50}$ ) の比較には **Dunnnett** の多重比較を用いた。動物試験データは、一元配置分散分析 (ANOVA) で解析し、有意差が認められた場合は **Tukey** の多重比較を行った。有意水準は 5%とした。動物試験のデータは、平均値±標準誤差 (SE) で表した。

## 結果

### リポソームの脂質過酸化の抑制活性

リポソーム中の脂質の過酸化反応に対する乳酸菌の阻害活性を調べた。本試験系において、過酸化脂質 (TBARS) レベルは反応開始 120 分後にはほぼ一定となった (Figure 1-2)。TBARS は、試験に供した全ての乳酸菌で菌濃度依存的に減少した。典型的な例として、脂質過酸化反応の抑制率と St2001 の菌濃度の関係を Figure 1-3 に示した。試験に供した 49 株の IC<sub>50</sub> は、 $7.9 \times 10^7$  ( $\log_{10} 7.9$ ) ~  $1.0 \times 10^{10}$  ( $\log_{10} 10.0$ ) cfu/mL の範囲に分布し、最も活性が高かったのは St2001 であった (Table 1-3)。また、*Streptococcus thermophilus* という同一種の中でも、活性には菌株ごとに大きな差異があり、*Streptococcus thermophilus* YIT 2084 (St2084) の活性は St2001 の 50 分の 1 (IC<sub>50</sub> が 50 倍) であった。

### 結腸粘膜の脂質過酸化の抑制効果

鉄過剰投与 (鉄負荷) マウスを用いて、結腸粘膜の脂質過酸化に対する St2001 混餌投与の効果調べた (Figure 1-4)。鉄負荷マウスの結腸粘膜の TBARS は通常飼料を摂取したマウスに比べ有意に増加した。St2001 (0.1% ~ 2.0%) を含有する鉄負荷飼料を摂取したマウスでは飼料中の菌濃度依存的に結腸粘膜の TBARS が減少し、0.4%混餌 (S 0.4%) および 2.0%混餌 (S 2.0%) 群で対照群に比べて有意差が認められた。S 0.4%群のマウスの St2001 の摂取量は  $2 \times 10^8$  cfu/mouse/day であった。LcS は 2.0%混餌 (Lb 2.0%) 群において、鉄負荷マウスの結腸粘膜の TBARS を有意に低下させたが、0.4%混餌 (Lb 0.4% :  $3 \times 10^8$  cfu/mouse/day) 群には対照群との間に有意差は認められなかった (Figure 1-5)。

### 血漿および盲腸内容物の鉄濃度

動物実験 1-1 において、対照群と St2001 混餌投与 (S 0.1%、S 0.4%、S 2.0%) の各群の血漿および盲腸内容物の可溶性鉄濃度に有意差は認められなかった (Table 1-3)。

動物実験 1-2 において、LcS の投与は盲腸内容物中の総鉄イオン濃度に影響を与えなかった (Table 1-4)。Lb 0.1%群および Lb 0.4%群の盲腸内容物中の 2 価鉄イオン濃度ならびに Lb 0.4%群の血漿鉄濃度に対照群との間に有意差が認められたが、飼料中の菌濃度依存的なものではなかった。

いずれの動物試験においても、鉄負荷マウスの盲腸内容物の鉄イオン濃度 (総鉄イオンまたは 2 価鉄イオン) と結腸粘膜の TBARS に有意な相関は認

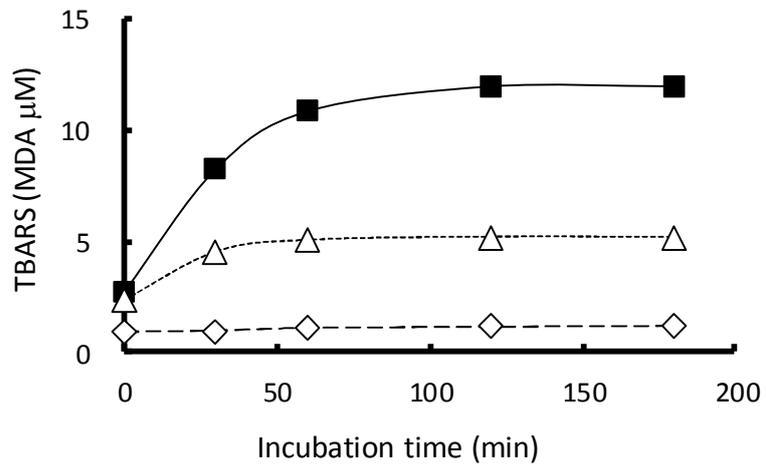


Figure 1-2. Time course of lipid peroxidation (levels of TBARS) in liposomes. ■, liposomes incubated at 37°C with 48 μM ferrous chloride; ◇, liposomes incubated at 37°C without ferrous chloride; △, liposomes incubated at 37°C with 48 μM ferrous chloride and St2001 ( $3 \times 10^8$  cfu/mL).

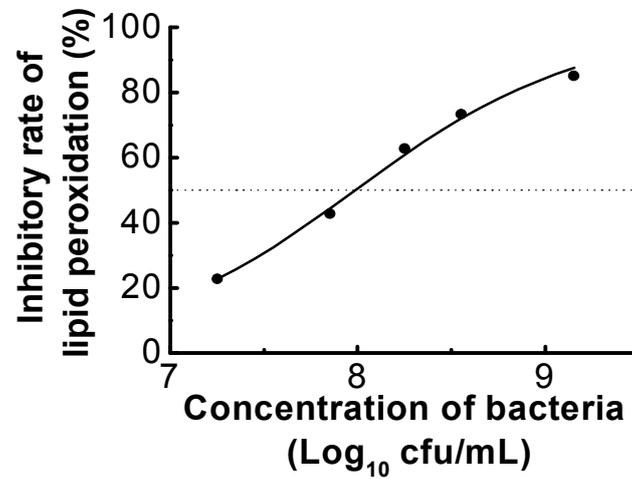


Figure 1-3. The relationship between inhibition rate of lipid peroxidation in liposomes and concentration of St2001. The liposomes were incubated for 2 h at 37°C. The inhibition curve was calculated from sigmoidal curve fitting.

Table 1-2. Fifty percent inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of lactic acid bacteria for lipid peroxidation in liposomes

Strain	IC <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> cfu/mL)	
<i>St. thermophilus</i> YIT 2001 (St2001)	7.9 ± 0.2	
<i>Lb. acidophilus</i> YIT 0070	8.1 ± 0.1	
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YIT 0447	8.2 ± 0.4	
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YIT 0098	8.2 ± 0.2	
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YIT 0206	8.3 ± 0.4	
<i>Lb. bif fermentans</i> YIT 0260	8.3 ± 0.3	
<i>Lb. salivarius</i> ssp. <i>salicinium</i> YIT 0089	8.4 ± 0.2	
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YIT 0162	8.4 ± 0.2	
<i>Lb. paraplantarum</i> YIT 0445	8.4 ± 0.3	
<i>St. thermophilus</i> YIT 2042	8.4 ± 0.2	
<i>Lb. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> YIT 0104	8.4 ± 0.3	
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YIT 0181	8.4 ± 0.3	
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YIT 0182	8.5 ± 0.3	
<i>St. thermophilus</i> YIT 2045	8.6 ± 0.3	*
<i>Lb. casei</i> strain Shirota (LcS)	8.7 ± 0.2	*
<i>Lb. delbrueckii</i> ss. <i>bulgaricus</i> YIT 0044	8.7 ± 0.2	*
<i>Lb. crispatus</i> YIT 0212	8.9 ± 0.3	**
<i>Lb. helveticus</i> YIT 0083	8.9 ± 0.2	**
<i>Ec. faecalis</i> YIT 2031	8.9 ± 0.1	**
<i>Lb. fermentum</i> YIT 0453	9.0 ± 0.2	**
<i>Leuc. lactis</i> YIT 3001	9.0 ± 0.2	**
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> YIT 0067	9.0 ± 0.3	**
<i>Ec. faecalis</i> YIT 2113	9.0 ± 0.3	**
<i>St. thermophilus</i> YIT 2046	9.0 ± 0.2	**
<i>Lb. gasseri</i> YIT 0192	9.0 ± 0.2	**
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> YIT 2008	9.0 ± 0.4	**
<i>Lc. lactis</i> YIT 2027	9.1 ± 0.3	**
<i>Lb. gasseri</i> YIT 0168	9.1 ± 0.3	**
<i>Leuc. pseudomesenteroides</i> YIT 2077	9.1 ± 0.1	**
<i>St. thermophilus</i> YIT 2021	9.1 ± 0.2	**
<i>Ec. faecium</i> YIT 2032	9.1 ± 0.5	**
<i>Lb. plantarum</i> YIT 0102	9.2 ± 0.1	**

<i>Lb. zeae</i> YIT 0078	9.3 ± 0.4	**
<i>St. thermophilus</i> YIT 2086	9.3 ± 0.5	**
<i>Lb. vaginalis</i> YIT 0276	9.3 ± 0.4	**
<i>Lb. reuteri</i> YIT 0197	9.3 ± 0.3	**
<i>Lb. rhamnosus</i> YIT 0105	9.4 ± 0.2	**
<i>Lb. sake</i> YIT 0247	9.4 ± 0.3	**
<i>Lb. fermentum</i> YIT 0081	9.4 ± 0.2	**
<i>Lb. buchneri</i> YIT 0077	9.5 ± 0.4	**
<i>Lb. salivarius</i> YIT 0452	9.6 ± 0.2	**
<i>Lb. casei</i> YIT 0180	9.6 ± 0.3	**
<i>St. thermophilus</i> YIT 2084 (St2084)	9.6 ± 0.1	**
<i>Lb. brevis</i> YIT 0076	9.7 ± 0.1	**
<i>Lb. aviarius</i> ssp. <i>araffinosus</i> YIT 0257	9.8 ± 0.3	**
<i>Lb. suebicus</i> YIT 0275	9.8 ± 0.3	**
<i>Lb. casei</i> ss. <i>paracasei</i> YIT 0209	9.8 ± 0.3	**
<i>Lb. curvatus</i> YIT 0234	9.8 ± 0.1	**
<i>Ec. faecium</i> YIT 2112	10.0 ± 0.2	**

*St.*, *Streptococcus*; *Lb.*, *Lactobacillus*; *Lc.*, *Lactococcus*; *Ec.*, *Enterococcus*; *Leuc.*, *Leuconostoc*.

IC<sub>50</sub> values are expressed as the logarithm of bacterial count per milliliter. Values are mean ± SD (n=3).

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Dunnet's multiple comparison test; compared with St2001)

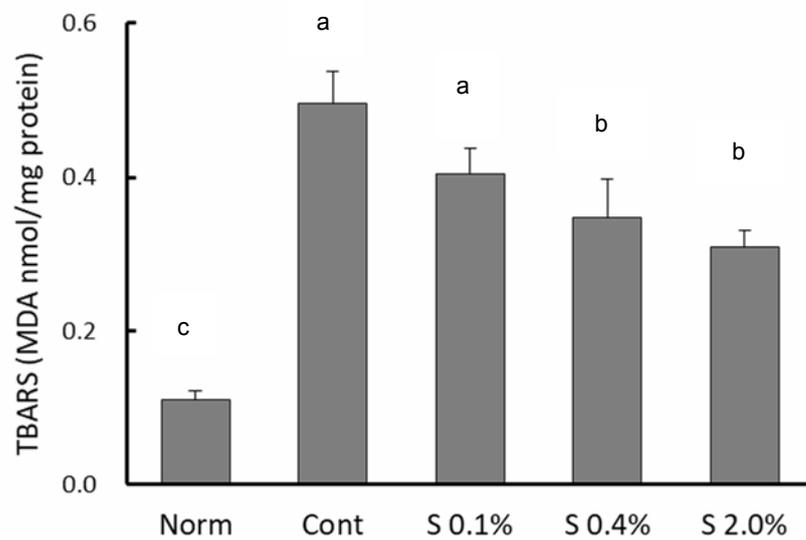


Figure 1-4. Effects of St2001 on levels of lipid peroxide (TBARS) in the colonic mucosa of mice (Animal experiment 1-1)

Norm, mice fed with the AIN-76 diet; Cont, mice fed with the iron-enriched (control) diet; S 0.1%, mice fed with the 0.1% St2001 containing iron-enriched diet; S 0.4%, mice fed with the 0.4% St2001 containing iron-enriched diet; S 2.0%, mice fed with the 2.0% St2001 containing iron-enriched diet; and MDA, malondialdehyde. Different superscript letters showed a significant difference ( $P < 0.05$ ,  $n=12$ ).

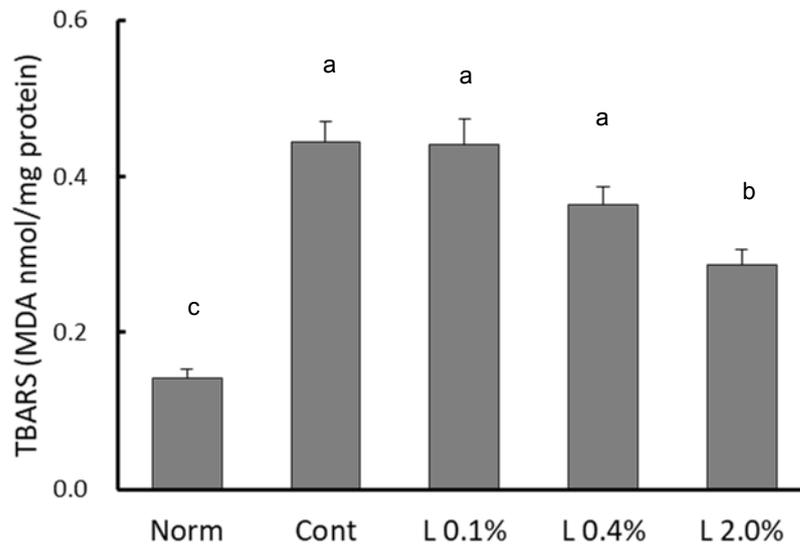


Figure 1-5. Effects of LcS on levels of lipid peroxide (TBARS) in the colonic mucosa of mice (Animal experiment 1-2)

Norm, mice fed with the AIN-76 diet; Cont, mice fed with the iron-enriched (control) diet; Lb 0.1%, mice fed with the 0.1% LcS containing iron-enriched diet; Lb 0.4%, mice fed with the 0.4% LcS containing iron-enriched diet; Lb 2.0%, mice fed with the 2.0% LcS containing iron-enriched diet; and MDA, malondialdehyde. Different superscript letters showed a significant difference ( $P < 0.05$ ,  $n=12$ ).

Table 1-3. Effects of St2001 on the iron concentrations in cecal contents and plasma (Animal experiment 1-1)

	Norm	Cont	S 0.1%	S 0.4%	S 2.0%
Soluble iron concentrations in the cecal contents (mg / dL)					
Total iron	0.53±0.03 <sup>b</sup>	5.19±0.89 <sup>a</sup>	3.61±1.13 <sup>ab</sup>	4.43±0.40 <sup>a</sup>	3.05±0.49 <sup>ab</sup>
Ferrous iron	0.19±0.01 <sup>c</sup>	0.91±0.10 <sup>ab</sup>	0.70±0.14 <sup>b</sup>	1.14±0.09 <sup>a</sup>	0.84±0.10 <sup>ab</sup>
Iron concentrations in the plasma (mg / dl)					
Total iron	0.30±0.01 <sup>a</sup>	0.30±0.03 <sup>a</sup>	0.35±0.02 <sup>a</sup>	0.37±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>

The values were means ± SE. Mean values within a row not sharing a common superscript letters were significantly different ( $P < 0.05$ , n=12).

Norm, mice fed with the AIN-76 diet; Cont, mice fed with the iron-enriched (control) diet; S 0.1%, mice fed with the 0.1% St2001 containing iron-enriched diet; S 0.4%, mice fed with the 0.4% St2001 containing iron-enriched diet; S 2.0%, mice fed with the 2.0% St2001 containing iron-enriched diet.

Table 1-4. Effects of LcS on iron concentrations in cecal contents and plasma (Animal experiment 1-2)

	Normal	Control	Lb 0.1%	Lb 0.4%	Lb 2.0%
Soluble iron concentration in the cecal contents (mg / dL)					
Total iron	0.80 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.81 ± 0.28 <sup>ab</sup>	4.43 ± 0.58 <sup>a</sup>	2.79 ± 0.50 <sup>ab</sup>	4.20 ± 0.68 <sup>a</sup>
Ferrous iron	0.31 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.15 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.85 ± 0.10 <sup>bc</sup>	1.29 ± 0.12 <sup>a</sup>
Iron concentration in plasma (mg / dL)					
Total iron	0.45 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>ac</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>ac</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.01 <sup>a</sup>

Values are mean ± SE. Mean values within a row not sharing a common superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ , n=12).

Mice were fed an AIN-76 diet (Normal), iron-enriched diet (Control), 0.1% LcS-containing iron-enriched diet (Lb 0.1%), 0.4% LcS-containing iron-enriched diet (Lb 0.4%) or 2.0% LcS-containing iron-enriched diet (Lb 2.0%).

められなかった。動物試験 1-1 および 1-2 における総鉄イオンと TBARS の相関係数 ( $r$ ) は、それぞれ 0.131 および -0.151、2 価鉄イオンと TBARS の相関係数 ( $r$ ) は、それぞれ -0.091 および -0.059 であった。

#### マウスの体重

どちらの動物試験においても、各群のマウスの体重に有意差は認められなかった。

## 考察

本章では、鉄の過剰摂取で生じる結腸粘膜の酸化ストレスを低減するために利用できる食品用微生物を見出すため、リポソームに 2 価の鉄イオンを添加して脂質過酸化反応を誘導する *in vitro* 系を用いて乳酸菌をスクリーニングし、選択した乳酸菌が実際に鉄過剰投与マウスの結腸粘膜の過酸化脂質レベルを低減したことを報告した。

脂質の酸化安定性あるいは特定の抗酸化剤の効果の強弱は、脂質がバルク（脂質均質）系、ミセル系、リポソーム系のいずれの存在形態をとるのかにより異なることが報告されている(4,10)。そこで我々は、結腸粘膜を想定した脂質過酸化の抑制活性を評価する際の基質として、細胞膜のモデルであるリン脂質リポソームを用いた。また、腸管粘膜表面で起こり得ると考えられた 2 価の鉄イオン存在下での Haber-Weiss 反応（Fenton 反応）によるヒドロキシラジカル産生系を *in vitro* スクリーニングに利用した。スクリーニングで最も高活性を示した St2001 と共に、免疫調整作用などの報告がある LcS についても、動物試験の対象とした。動物試験において St2001 は LcS より低い摂取菌数で結腸粘膜の過酸化脂質レベルを低下させたが、これは St2001 が *in vitro* 試験系で LcS の約 6 倍 ( $\log_{10} 0.8$ ) の抗酸化活性を示したことの反映であると考えられた。

いくつかの *in vitro* 試験系で乳酸菌の抗酸化活性が報告されている(11~16)。また、Kaizu らは、乳酸菌の菌体抽出物を投与することによってビタミン E 欠乏ラットの溶血が抑制されることを報告している(11)。彼らは、投与物質として菌体抽出物を用いており、小腸から吸収され、血中や組織で働くことを想定している。一方、非吸収性の抗酸化物質が結腸の酸化ストレス低減に有効であるとの仮説が提唱されている(30)。乳酸菌は、結腸に到達し、粘膜表面で非吸収性の抗酸化物質として働く可能性が考えられる。

脂質過酸化は 2 価の鉄イオンの存在により促進される。フィチン酸は 2 価の鉄イオンを Haber-Weiss 反応を触媒できない形にキレートする。また、ある種の腸内細菌は、鉄イオンを菌体内に取り込む活性を有することが知られている(31)。それゆえ、鉄イオンで誘導される過酸化反応を阻害する機作として、Haber-Weiss 反応を触媒できない形態のキレートまたは菌体内への鉄の取り込みなどが起こっている可能性も考えられる。しかし、結腸粘膜の過酸化脂質レベルは盲腸内容物の可溶性鉄（総鉄イオン、2 価鉄イオン）濃度と相関しなかった。また、菌の投与による血清鉄濃度の減少も認められなかった。これらのことから、St2001 は反応系からの 2 価鉄イオンの除去（キレート、菌体内への取り込み、酸化など）に基づいて抗酸化活性を示すのでは

なく、フィチン酸(32,33)とは異なって鉄吸収を阻害せずに結腸粘膜を酸化ストレスから防御していることが示唆された。

Sawaらは *N-nitroso-N-methylurea* で誘導したラット結腸がんの発生率が高脂肪・高ヘム鉄飼料により誘発される酸化ストレスで増加することを報告している(34)。また、Nelsonら(22)および Siegerら(23)は *dimethylhydrazine* でマウスに誘導した結腸がんの発生率が鉄(フマル酸鉄あるいは硫酸鉄)負荷飼料の摂取により増加することを報告している。結腸の酸化ストレスと結腸がんや潰瘍性大腸炎の病因との関連が想定されている(30,35,36)。本研究は、鉄の過剰投与で生じる結腸粘膜の酸化傷害が乳酸菌の経口摂取により軽減されることを示した最初の報告である。結腸粘膜の酸化ストレス低減作用を有する St2001 は、これらの病気の予防に利用できる可能性が考えられる。

## 第二章 大腸炎モデルマウスにおける抗酸化乳酸菌の投与効果

### 序

潰瘍性大腸炎は、結腸および直腸への好中球、単球、リンパ球の浸潤を特徴とする疾病で、その主症状は下痢、下血、腹痛、体重減少、貧血である。本疾患の成立には、活性酸素が重要な役割を担っていると考えられている(37)。患者の炎症部位の結腸粘膜には活性化した好中球、単球、リンパ球が多数存在し、それらは活性酸素を過剰産生する。活性酸素の産生が腸管の抗酸化防御システムの許容量を超えると患者の腸管に酸化傷害が生じる(26,38,39)。デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)をマウスやラットに飲水投与すると組織学的特徴および主要症状がヒトの潰瘍性大腸炎に類似した病態が誘導される(40,41)。また、いくつかの抗酸化剤やフリーラジカルスカベンジャーがDSS誘導大腸炎に有用な効果を示すことが報告されている(37,42)。

第一章において、細胞膜のモデルであるリポソームの脂質過酸化を抑制する乳酸菌として St2001 をスクリーニングし、本菌が鉄負荷飼料摂取マウスの結腸粘膜の過酸化脂質レベルを低減することを報告した。第二章では、DSS誘導急性大腸炎マウスにおいて、抗酸化活性を有する乳酸菌 St2001 が予防効果を示すか否かについて、*in vitro* 系における活性が 50 分の 1 である St2084 を対照に検討した。

## 材料および方法

### 微生物および培養条件

St2001 および St2084 は、(株)ヤクルト本社 中央研究所が所有している系統保存株を用いた。両菌株は 2%乳糖を含む変法 GAM 培地(日水製薬(株))を用いて 37°C で 18 時間培養し、生理食塩水による洗浄の後、8500×g で 15 分間遠心分離して菌体を回収した。脱脂乳を保護剤に用いて菌体を凍結乾燥し、飼料に混合した。

### St2001 菌体の DSS 吸着

St2001 菌体を ADA ナトリウム緩衝液 (pH6.7) で洗浄し、同緩衝液で濁度 (660 nm) が 2 となるように調整後、2.5%DSS 水溶液と等量混合して 37°C または 0°C で 2 時間保持した。2400×g で 10 分間遠心分離して、上清に回収される硫酸化多糖を Jiao と Liu の方法(43)により比色定量した。

### 動物および飼料

動物試験のプロトコールは、(株)ヤクルト本社 中央研究所の動物実験委員会により承認された。

7 週齢の BALB/cA マウス (♂) を日本クレア(株)から購入し、全期間を通じて、飼料および飲水は自由摂取、室温 25°C、湿度 55%、明暗 12 時間周期の環境で飼育した。1 週間の馴化飼育の後 (day1)、ランダムに 4 群 (実験 2-1) または 3 群 (実験 2-2) に分けた (n = 11~12)。AIN-76A(28)に菌の凍結乾燥保護剤として用いた脱脂粉乳を加えた組成を基本飼料とし、これに凍結乾燥菌体を加えた飼料 (Table 2-1) で 2 週間 (day1~day14) 飼育した。マウスに急性大腸炎を誘導するため、day8 から day14 まで 2.5%DSS 水溶液を飲水として投与 (自由摂取) した。マウスは Day14 に、ネンブタール麻酔下で腹部大静脈から採血し、血液をヘパリンと混合した。結腸を採取した後、麻酔下で安楽死させた。

### Disease activity index

Cooper らの方法(44)に従って、マウスの体重変化、便潜血・血便、下痢・軟便の程度をスコア化し、Disease activity index を評価した。便潜血は市販キット (便潜血スライド 5 シオノギ II ; 塩野義製薬(株)製) で判定した。

### 生化学分析

血液のヘモグロビン濃度はヘモグロビン B-テストワコー (和光純薬工業

Table 2-1. Composition (%) of the Diets

	Experiment 2-1				Experiment 2-2		
	Control	0.1%	0.4%	2.0%	Control	St2001	St2084
	group	group	group	group	group	group	group
Casein	19.0	19.0	18.9	18.7	19.0	18.9	18.9
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
$\alpha$ -Corn starch	15.0	15.0	15.0	14.7	15.0	15.0	15.0
Sucrose	49.0	48.9	48.7	47.9	49.0	48.7	48.7
Cellulose fiber	5.0	5.0	5.0	4.9	5.0	5.0	5.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0	4.9	5.0	5.0	5.0
Mineral mix *	3.5	3.5	3.5	3.4	3.5	3.5	3.5
Mvitamin mix *	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
St2001	0	0.1	0.4	2.0	0	0.4	0
St2084	0	0	0	0	0	0	0.4
Skimmed milk	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

\* The mineral and vitamin mixtures were those of AIN-76 described in "Report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* committee on standards for nutritional studies."

(株)製)で測定した。ヘマトクリットはマイクロヘマトクリット法(硝子毛細管を用いた遠心法)で測定した。血清アミロイドA(SAA)濃度は市販のELISAキット(Mouse SAA immunoassay kit ; BioSource International, Inc.製)を用いて測定した。

結腸を切開し、生理食塩水で洗浄後、スライドガラスで粘膜を掻き取った。粘膜を1.15% KCl中で均質化した後、TBARSおよびミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性を測定した。粘膜のTBARSは第1章に記載の方法で測定した。MPO活性はKrawiszらの方法(45)で測定した。タンパク質濃度はBCA protein assay kit (Pierce Co.製)で測定した。

#### 統計解析

統計ソフトはSAS system for Windows (release 6.12)を用いた。Disease activity indexの群間差の比較には、Kruskal-Wallis検定およびノンパラメトリックDunnnett多重比較を用いた。その他の項目の比較には1元配置分散分析(ANOVA)およびパラメトリックDunnnett多重比較を用いた。有意水準は5%とした。動物試験のデータは、平均値±標準誤差(SE)で表した。

## 結果

### St2001 菌体による DSS の吸着

DSS 水溶液中に St2001 菌体を共存させた場合(37℃および 0℃、2 時間)、菌体への吸着はほとんど認められなかった (Table 2-2)。

### 大腸炎抑制効果の St2001 混餌濃度依存性 (実験 2-1)

DSS 誘導大腸炎マウスの Disease activity index は、St2001 の混餌濃度依存的に減少した (Table 2-3)。結腸粘膜の酸化傷害レベルの指標である TBARS は、大腸炎を誘導しないマウス (MDA 当量  $0.12 \pm 0.01$  nmol/mg タンパク質) に比べて対照群 (大腸炎誘導、St2001 非投与) で約 1.5 倍に上昇した。DSS 誘導大腸炎マウスの結腸粘膜 TBARS は、St2001 の混餌濃度依存的に減少し、0.4%混餌群および 2.0%混餌群で対照群に対する有意差が認められた。Disease activity index と結腸粘膜 TBARS の間には有意な正の相関が認められた ( $r=0.43$ 、 $P<0.01$ )。

### 抗酸化活性が異なる菌株の大腸炎抑制効果の比較 (実験 2-2)

St2001 と St2084 の大腸炎抑制効果を比較した。St2001 投与群の Disease activity index および TBARS は、対照群に比べて有意に減少したが、St2084 投与群にはこれらの効果は認められなかった (Figure 2-1)。

粘膜 MPO 活性および SAA 濃度に関しては、St2001 投与群および St2084 投与群のいずれにおいても、対照群との間に有意差は認められなかった (Table 2-4)。

大腸炎による出血の結果生じる貧血の程度を評価したところ、St2001 投与群の血中ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値は対照群に比べて有意な改善を示したが、St2084 投与群には改善効果は認められなかった (Figure 2-2)。

Table 2-2. Adsorption of DSS to *S. thermophilus* YIT 2001

Temperature (°C)	St2001	DSS	DSS concentrations of supernatant (%)	Relative rate
37	-	+	1.29	100.0
	+	+	1.26	97.7
0	-	+	1.26	100.0
	+	+	1.29	102.4

The concentrations of DSS were estimated by the method of Jiao and Liu.

Table 2-3. Relationship between the Concentration of *S. thermophilus* YIT 2001 in the Diet and the Protective Effect on Colitis (Experiment 2-1)

	Control group	0.1% group	0.4% group	2.0% group
Disease activity index	9.1 ± 0.2	9.0 ± 0.2	7.5 ± 0.6	6.8 ± 0.8 *
Level of lipid peroxide (TBARS) in colonic mucosa (MDA nmol/mg of protein)	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.01 *	0.14 ± 0.01 *
Colon length (mm)	67.7 ± 2.8	65.9 ± 2.1	69.1 ± 2.6	62.6 ± 3.1
Weight gain for period of DSS administration (day 8 to day 14) (g)	-2.9 ± 0.9	-3.2 ± 1.1	-2.2 ± 1.0	-3.1 ± 1.0

\* P < 0.05: Dunnett's multiple-comparison test (n=11-12). The values were means ± SE.

The disease activity index was estimated by scoring changes in the weight, hemocult positivity or gross bleeding and stool consistency according to the method of Cooper *et al.*

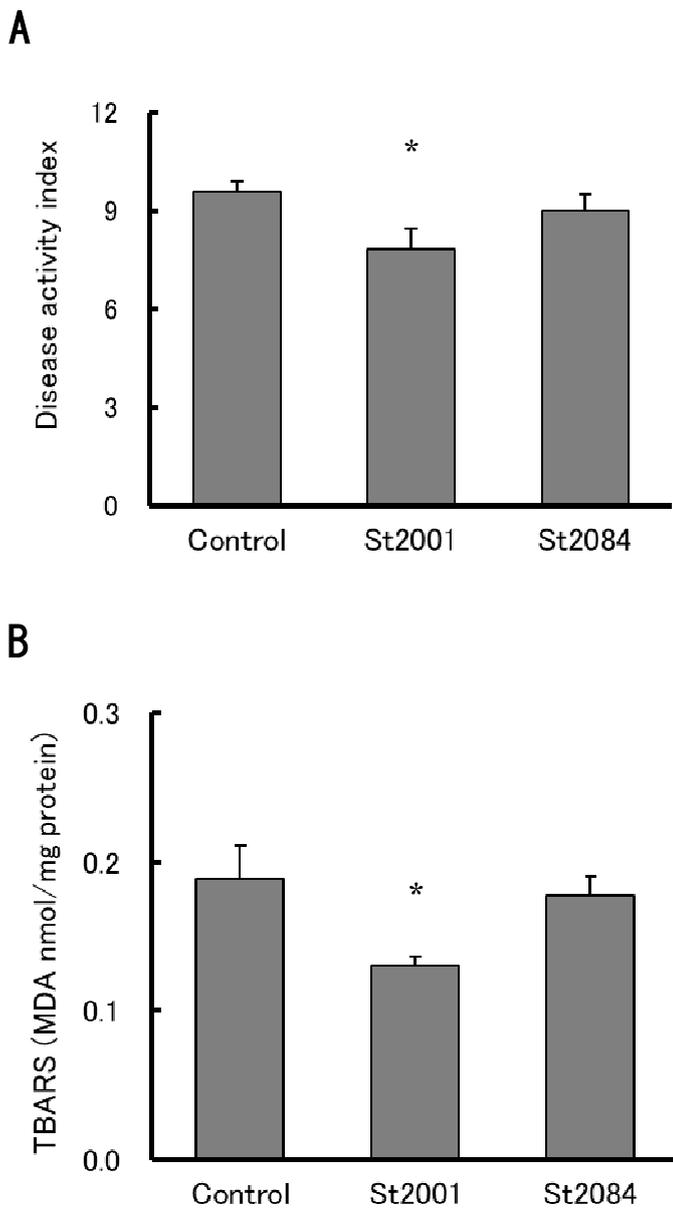


Figure 2-1. Disease Activity Index and Colonic Mucosal TBARS Value of Colitis Mice Fed on a Diet Containing St2001 or St2084 (Experiment 2-2).

Mice were fed on a control diet (Control), a diet containing 0.4% St2001 (St2001), or a diet containing 0.4% St 2084 (St2084). A, Disease activity index of DSS-induced colitis mice. The disease activity index was estimated by scoring changes in the weight, hemocult positivity or gross bleeding and stool consistency according to the method of Cooper *et al*. An asterisk indicates a significant difference in comparison to the control group ( $P < 0.05$ : non-parametric Dunnett's multiple-comparison test). B, Level of lipid peroxide (TBARS) in the colonic mucosa of DSS-induced colitis mice. An asterisk indicates a significant difference in comparison to the control group ( $P < 0.05$ : Dunnett's multiple-comparison test,  $n=11-12$ ).

Table 2-4. Mucosal MPO Activity, SAA, Colon Length and Weight Gain of Colitis Mice (Experiment 2-2)

	Control group	St2001 group	St2084 group
MPO activity (unit/g of protein)	25.7 ± 5.2	19.3 ± 2.7	30.7 ± 9.4
Serum amyloid A (mg/ml)	4.5 ± 1.6	2.8 ± 1.2	6.4 ± 1.9
Colon length (mm)	63.5 ± 2.4	72.6 ± 2.5 *	65.2 ± 2.4
Weight gain for period of DSS administration (day 8 to day 14) (g)	-1.7 ± 0.5	-0.7 ± 0.5	-1.6 ± 0.5

\*  $P < 0.05$ : Dunnett's multiple-comparison test (n=11-12). The values were means ± SE.

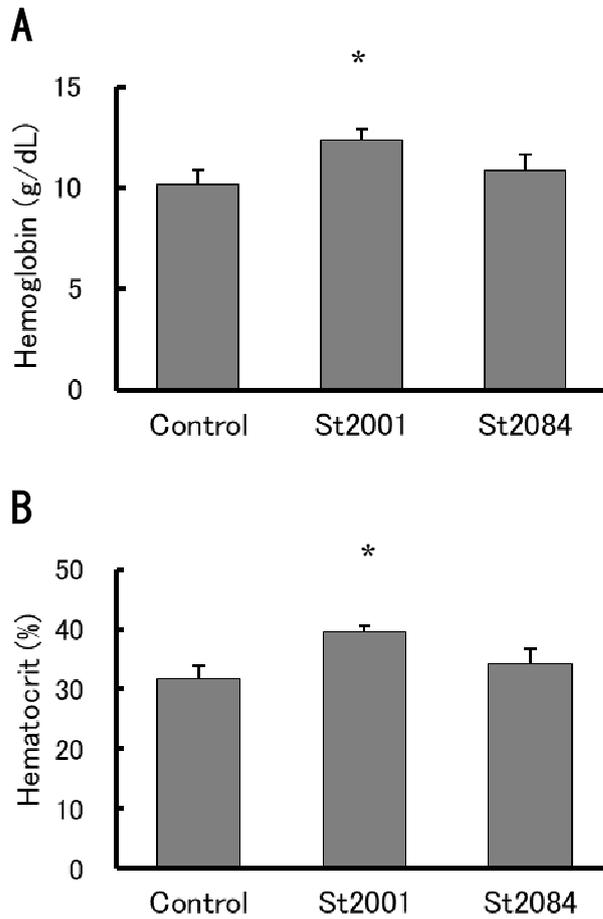


Figure 2-2. Effects of St2001 and St2084 on Anemia Resulting from DSS-Induced Colitis (Experiment 2).

A, Hemoglobin concentration in the blood of colitis mice. B, Hematocrit in the blood of colitis mice. Mice were fed on a control diet (Control), a diet containing 0.4% St2001 (St2001), or a diet containing 0.4% St2084 (St2084). An asterisk indicates a significant difference in comparison to the control group ( $P < 0.05$ ; Dunnett's multiple-comparison test,  $n=11-12$ ).

## 考察

活性酸素は潰瘍性大腸炎の悪化因子の一つであり、患者あるいは動物モデルの結腸粘膜において酸化傷害が認められることが報告されている(26,37~40)。本章では第 1 章において結腸粘膜の酸化傷害を抑制する乳酸菌として選択した St2001 の投与が、潰瘍性大腸炎の動物モデルの一つである DSS 誘導大腸炎にどのような効果を示すのかを調べた。St2001 は結腸粘膜の過酸化脂質レベル (TBARS) を低下させ、DSS 誘導大腸炎の症状 (Disease activity index) を改善した。一方、*in vitro* における抗酸化活性が St2001 の 50 分の 1 である St2084 は、これらの効果を示さなかった。したがって、St2001 の大腸炎改善効果は、抗酸化活性の反映であることが示唆された。

抗酸化酵素の一種である SOD を組み換え発現させた乳酸菌を投与すると実験的大腸炎の症状が軽減されることが報告されている(46,47)。St2001 を嫌気条件下で加熱処理 (100°C、15 分間) しても *in vitro* 抗酸化活性は消失しなかった (Data not shown) ことから、本菌の活性本体は SOD のような酵素である可能性は低いと考えられる。

炎症を生じている患者およびモデル動物の結腸粘膜においては、MPO を含有する活性化好中球が多量に浸潤している。また、SAA は炎症状態においてインターロイキン-1 (IL-1)、IL-6 などへの応答として肝臓で産生される急性期タンパク質である。St2001 は大腸炎の症状を軽減したが、粘膜 MPO 活性や SAA 濃度に有意な変化は認められなかった。このことは、DSS による大腸炎の誘導自体には大きな影響を与えないが、大腸炎による組織傷害の結果である出血 (症状悪化) を抑制したことを示唆している。Iwai および Iwashita(48)は、フリーラジカル産生阻害剤 rebamipide は DSS でラットに誘導される粘膜傷害を抑制したが、粘膜への好中球浸潤を抑制しなかったことを報告している。Gonzalez ら(49)は 2,4-trinitrobenzenesulfonic acid で誘導したラット大腸炎において、ビタミン E の経口投与は、下痢を改善したが、MPO 活性には変化がなかったと報告している。大腸炎モデルにおいて MPO 活性を低減することが報告されている抗酸化剤も存在するが、いくつかの抗酸化剤においては、St2001 と同様に、好中球の浸潤や炎症性サイトカインの産生を抑制する作用ではなく、好中球が産生した活性酸素を消去する、すなわち活性酸素傷害の抑制作用によって大腸炎を改善している可能性が考えられる(37,42)。

St2001 は、DSS 誘導大腸炎の結果として生じる貧血を改善した。活動期の大腸炎で見られる粘膜からの出血は、しばしば鉄欠乏性貧血を引き起こすが、鉄の経口補給は大腸炎ラットの酸化ストレスならびに Disease activity

index を増加させることが報告されている(50)。第 1 章で示したように、St2001 は鉄イオンに触媒される結腸粘膜の酸化傷害を抑制する。鉄補給と St2001 を組み合わせることにより、予防だけではなく、大腸炎に伴う貧血の治療にも有用な方法（鉄の経口補給と St2001 の組合せ）を提供できる可能性が考えられる。

### 第三章 食餌性高脂血症モデルにおける大動脈壁脂質沈着病変の乳酸菌による抑制

#### 序

高脂血症（高コレステロール血症および高トリグリセライド血症）は、動脈硬化の主要なリスク因子であり、低比重リポタンパク質（LDL）の酸化変性は動脈硬化の発生と進展に大きく関わっていると考えられている(7,8)。酸化LDLは、単球の走化性の増加、スカベンジャー受容体による取り込みを介したマクロファージの泡沫細胞への変換促進、細胞毒性などの機作により、血管の機能不全を引き起こす。一方、未変性のLDLにはこのような作用は認められない。動脈硬化の酸化説に基づき、食事由来の抗酸化物質が動脈硬化予防物質として注目されており、構造的に異なる複数の抗酸化物質が動物モデルで動脈硬化病変の形成を阻害することが報告されている(51~55)。

LDL酸化抵抗性（LDLの酸化されやすさ・されにくさ）は、LDL酸化リスクの *ex vivo* 評価系として広く用いられている指標である。LDLを含む反応系に酸化開始剤を加えた後のLDL中の不飽和脂肪酸の過酸化を共役ジエンの形成に伴う紫外部吸光度の変化としてモニターし、共役ジエン形成に先立つ誘導期（ラグフェイズ）の時間の長さ（酸化ラグタイム）を評価する。酸化ラグタイムが長いことは、LDLが酸化されにくいことを表す。酸化ラグタイムは冠動脈および頸動脈の動脈硬化の病態と密接に関連していることが報告されている(56~58)。

ハムスターは、血漿リポタンパク質代謝のモデル動物として利用されており、高脂肪・高コレステロール食摂取により、トリグリセライド（中性脂肪）およびコレステロールの血中濃度が高値を示す(59,60)。この食餌性高脂血症のモデルでは、動脈弓に動脈硬化の初期病変である泡沫細胞豊富な脂質沈着病変が形成されることが報告されている(60~63)。一方、汎用される実験動物であるマウスやラットにおいてはリポタンパク質の構成比がヒトとは異なり（LDLよりも高比重リポタンパク質HDLが多い）、ヒトの脂質代謝のモデルには向いていないと考えられる。そこで、食餌性高脂血症のモデルとして高脂肪・高コレステロール食摂取ハムスターを用いることとした。

第一章では、細胞膜のモデルであるリポソームの脂質過酸化を抑制する乳酸菌として St2001 をスクリーニングし、鉄負荷食摂取マウスにおいて本菌の摂取により結腸粘膜の過酸化脂質レベルが低減されることを示した。第二章では、本菌が大腸炎モデルマウスの結腸粘膜の酸化ストレスを軽減し、病態を改善することを報告した。しかし、各種抗酸化物質による脂質過酸化反

応の抑制の強弱は、基質となる脂質がリポソームや細胞膜のような脂質二重膜として存在する場合と LDL のようなミセル状態で存在する場合で異なることが報告されている(4,10)。本章では、LDL 酸化抑制能を指標に乳酸菌・ビフィズス菌の再スクリーニングを行い、食餌性高脂血症モデルを用いて選択した菌の投与効果を調べた。

## 材料および方法

### 微生物および培養条件

(株)ヤクルト本社 中央研究所で保存されている *Bifidobacterium* 11 株、*Lactobacillus* 28 株、*Lactococcus* 3 株、*Leuconostoc* 1 株、*Streptococcus thermophilus* 36 株を試験に用いた。各菌株は 2%乳糖を含む変法 GAM 培地 (日水製薬(株)) を用いて 37°C で 18 時間培養し、生理食塩水による洗浄の後、3000×g で 15 分間遠心分離して菌体を回収した。動物実験の際には St2001 および St2084 を凍結乾燥 (保護剤として脱脂粉乳およびグルコースを使用、細胞の乾燥重量比グルコース : 脱脂粉乳 = 40:25:20) した後、飼料に混合した。

### *In vitro* における LDL 酸化抑制活性

各乳酸菌の菌体内容物を 80%エタノールで抽出し、N<sub>2</sub> ガス下で乾固した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解した。LDL 画分 (d = 1.006~1.182 g/mL) はヒト血清 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. 製) から Kano らの方法(64)に従い、超遠心法で調製し、PBS で透析 (4°C、嫌気条件下) した。LDL の酸化ラグタイムの測定は、Hirano らの方法(65)に従った。すなわち、LDL 画分 (終濃度 : 0.1 mg タンパク質/mL) を含む反応液に酸化開始剤 2,2'-azobis(4-methoxy)-2,4-dimethylvaleronitrile (V-70, 0.25 mM) を加え、37°C で保温した。12-position automatic sample changer を備えた DU650 spectrophotometer (Beckman Coulter 株製) を用いて、共役ジエンの形成を 234 nm の吸光度でモニターした。酸化ラグタイムは、酸化開始剤の開始から共役ジエンの増加が始まるまでの間の時間と定義した。酸化ラグタイム延長率は、以下の式により求めた。St2001 の酸化ラグタイム延長率の変動係数 (CV) は 10.9%であった。

$$\text{酸化ラグタイム延長率 (\%)} = \frac{T}{C} \times 100 - 100$$

T : 乳酸菌抽出物を添加した反応液の酸化ラグタイム

C : 乳酸菌抽出物の代わりに PBS を添加した反応液の酸化ラグタイム

### 菌体の細胞質画分・細胞膜画分・細胞壁画分の調製

St2001 の洗浄菌体を PBS に懸濁し、French pressure cell (SLM Instruments 製) を用いて 1500 psi で二回処理して菌体を破碎した。菌体破碎液を 8000×g で 15 分間、遠心分離することにより細胞壁画分 (沈殿) を

回収した。遠心上清を  $116,000\times g$ 、16 時間の超遠心分離処理により、細胞膜画分（沈殿）と細胞質画分（上清）に分画した。細胞壁画分と細胞膜画分は PBS に懸濁し、細胞質画分と同液量に調整した。細胞質画分の一部は、公称分画分子量 10 kDa の限外ろ過膜（BIOMAX-10、Millipore Corp.製）でろ過した。酸化ラグタイムの測定は、菌体抽出物を添加しないこと以外は前項に従った。

#### 動物と飼料

全ての動物試験は(株)ヤクルト本社 中央研究所の動物実験委員会により承認された。

7 週齢の Golden Syrian ハムスターを日本クレア(株)から購入し、試験期間を通じて、飼料および飲水は自由摂取、室温  $25^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55%、明暗 12 時間周期の環境で飼育した。基本飼料組成（改変 AIN-76A）は  $\alpha$ -コーンスターチ 49.5%、カゼイン 20%、ショ糖 10%、ヤシ油 10%、ろ紙粉末 5%、AIN-76 ミネラル混合 3.5%(28)、AIN-76 ビタミン混合 1%(28)、コレステロール 0.5%、DL-メチオニン 0.3%、重酒石酸コリン 0.2%である。基本飼料にグルコース（0.25%）、脱脂粉乳（0.2%）および凍結乾燥菌体（0.05%または 0.4%、対照には無添加）を混合して被験飼料とした。被験飼料中の乳酸菌の生菌数は、0.4%混餌の場合、 $3\times 10^8$  cfu/g であった。市販飼料（MF 飼料；オリエンタル酵母(株)製）で 1 週間、馴化飼育した後、ランダムに 3 群に分け（ $n = 7\sim 8$ ）、動物実験 1 では 4 週間、動物実験 2 では 10 週間、被験飼料で飼育した。毎週、体重を測定した。

被験飼料の投与期間終了後、18 時間絶食させ、ネンブタール麻酔下で、腹部大静脈から採血し、血液に EDTA-2K（1.2 mg/mL）を溶解し、遠心分離で血漿を調製した。血漿は測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。動物はネンブタール麻酔下で安楽死させた。

#### 生化学分析

各個体の血漿から超遠心法で LDL 画分（ $d = 1.006\sim 1.182$  g/mL）を調製し、菌体抽出物を添加しないこと以外は *in vitro* 試験と同様の方法で LDL 酸化ラグタイムを測定した。LDL 画分のタンパク質濃度は BCA protein assay kit（Pierce Co.製）を用いて測定した。血漿の総コレステロール濃度およびトリグリセライド濃度の測定には、それぞれデタミナー TC555（協和メディックス(株)製）およびトリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業(株)製）を用いた。

#### 脂質沈着面積の測定

動脈壁脂質沈着病変の測定は、Asami らの方法(66)に従った。すなわち、大動脈弓を麻酔下で切除して切開し、生理食塩水で洗浄後、oil red O で染色した。WinROOF Professional ver. 3.53 (Mitani Corporation 製) を用いた画像解析により、大動脈内表面における染色面積の割合を求め、病変形成の評価指標とした。

#### 統計解析

統計ソフトは SAS system for Windows (release 6.12) を用いた。検定には 1 元配置分散分析 (ANOVA) およびパラメトリック Dunnett 多重比較を用いた。有意水準は 5%とした。動物試験のデータは、平均値±標準誤差 (SE) で表した。

## 結果

### *In vitro*における LDL 酸化抑制活性

LDL 酸化ラグタイム延長率を指標に、79 株の乳酸菌およびビフィズス菌の菌体抽出物の抗酸化活性を比較した (Figure 3-1)。被験菌株の中で、St2001 が最も高い活性を示し、St2084 の活性は St2001 の約半分であった。

### 活性成分の菌体内局在性

St2001 の抗酸化活性成分の菌体内局在性を調べるために、菌体を French pressure cell で破碎し、遠心分離により分画した。LDL 酸化抑制活性は、主として細胞質画分に局在した (Figure 3-2)。細胞質画分の限外ろ過膜 (公称分画分子量 10 kDa) 通過画分は、ろ過前とほぼ同等の活性を示した。

### 高脂血症モデル動物の血清脂質濃度および LDL 酸化抵抗性 (動物実験 1)

高脂肪・高コレステロール食を摂取したハムスターの血漿中の総コレステロール濃度 ( $261 \pm 55$  mg/dL) およびトリグリセライド濃度 ( $498 \pm 181$  mg/dL) を、別実験で得た通常飼料 (AIN-76A) を摂取した場合の血中脂質濃度 (総コレステロール  $125 \pm 8$  mg/dL、トリグリセライド  $230 \pm 44$  mg/dL) と比較すると、それぞれ約 2 倍に上昇し、高脂血症の様相を呈していた。St2001 および St2084 の混餌投与は、高脂血症ハムスターの血漿中の総コレステロール濃度およびトリグリセライド濃度および体重に有意な変化をもたらさなかった (Table 3-1)。LDL 酸化ラグタイムは、St2001 の投与により対照群に比べて有意に延長したが、St2084 の投与では有意な変化は認められなかった。

### 高脂血症モデル動物の動脈壁脂質沈着病変への効果 (動物実験 2)

高脂血症ハムスターで、St2001 の投与量依存性を検討した。血漿の総コレステロール濃度およびトリグリセライド濃度あるいはハムスターの体重に関して、対照 (菌非投与) 群、0.05%混餌群、0.4%混餌群の間に有意差は認められなかった (Table 3-2)。一方、St2001 の混餌濃度依存的に、LDL 酸化ラグタイムが延長し、大動脈弓における脂質沈着病変面積率が低下した (Figure 3-3)。Figure 3-4 に高脂血症ハムスターの大動脈弓の内側表面における Oil red O 染色の典型的な顕微鏡画像を示す。なお、通常飼料 (AIN-76A) で飼育したハムスターには大動脈弓血管壁内側に Oil red O で染色される脂質沈着病変はほとんど認められなかった。

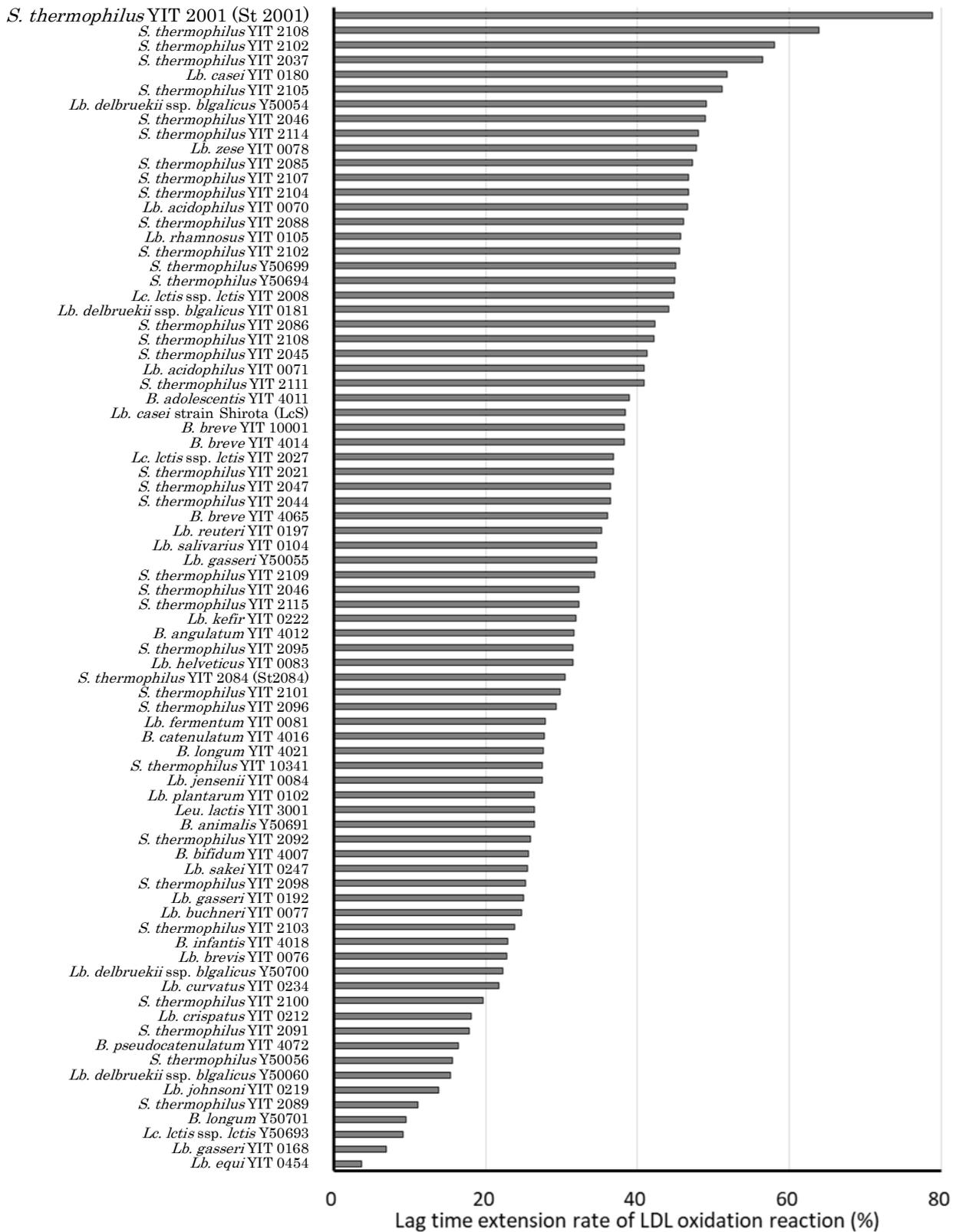


Figure 3-1. *In vitro* antioxidative activity on the basis of lag time extension rates in LDL oxidation reaction. S, *Streptococcus*; Lc, *Lactococcus*; Leu, *Leuconostoc*; Lb, *Lactobacillus*; B, *Bifidobacterium*.

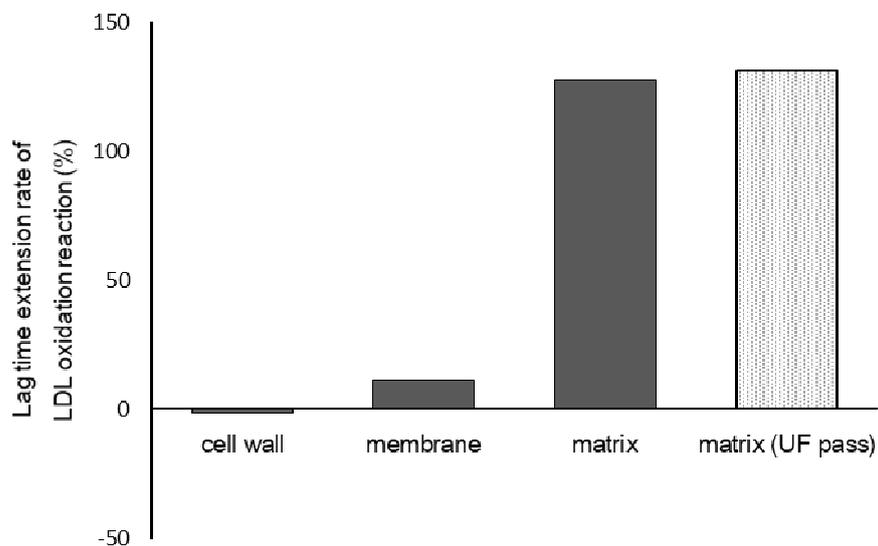


Figure 3-2. Subcellular localization of active ingredients of St2001. The cells of St2001 were disrupted by a French pressure cell and fractionated by centrifugation. The cell wall fraction and cell membrane fraction were suspended in PBS and the volumes of these fractions were matched to that of the cytoplasmic matrix fraction.

UF pass fraction had passed through an ultrafiltration membrane with a nominal molecular weight limit of 10 kDa.

Table 3-1. Effect of St2001 or St2084 on total cholesterol and triglyceride in plasma, lag time of LDL oxidation, and body weight of hamsters.

	Control group	St2001 group	St2084 group
Total cholesterol (mg/dL)	261 ± 19	259 ± 15	255 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	498 ± 64	432 ± 55	448 ± 38
Lag time of LDL oxidation (min)	46.9 ± 2.0	56.7 ± 3.6 *	49.1 ± 2.2
Body weight at the start of test (g)	129 ± 2	129 ± 2	128 ± 2
Body weight at the end of test (g)	147 ± 4	152 ± 4	151 ± 3

Hamsters were fed either a control diet (Control group), a diet containing 0.4% St2001 (St2001 group), or a diet containing 0.4% St2084 (St2084 group). All diets contained 10% coconut oil and 0.5% cholesterol. The values were means ± SE.

\*Significant difference from the control group ( $P < 0.05$ : Dunnett's multiple comparison test, n=7-8).

Table 3-2. Effect of St2001 on the total cholesterol and triglyceride in plasma, lag time of LDL oxidation, and body weight of hamsters.

	Control group	0.05% group	0.4% group
Total cholesterol (mg/dL)	257 ± 7	267 ± 9	283 ± 22
Triglyceride (mg/dL)	341 ± 30	352 ± 37	407 ± 41
Lag time of LDL oxidation (min)	51.5 ± 2.5	54.2 ± 2.1	63.9 ± 4.1 *
Body weight at the start of test (g)	126 ± 2	126 ± 3	126 ± 2
Body weight at the end of test (g)	159 ± 5	160 ± 5	159 ± 7

Hamsters were fed either a control diet (Control group), a diet containing 0.05% St2001 (0.05% group), or a diet containing 0.4% St2001 (0.4% group). All diets contained 10% coconut oil and 0.5% cholesterol. The values were means ± SE.

\*Significant difference from the control group ( $P < 0.05$ ; Dunnett's multiple comparison test, n=7-8).

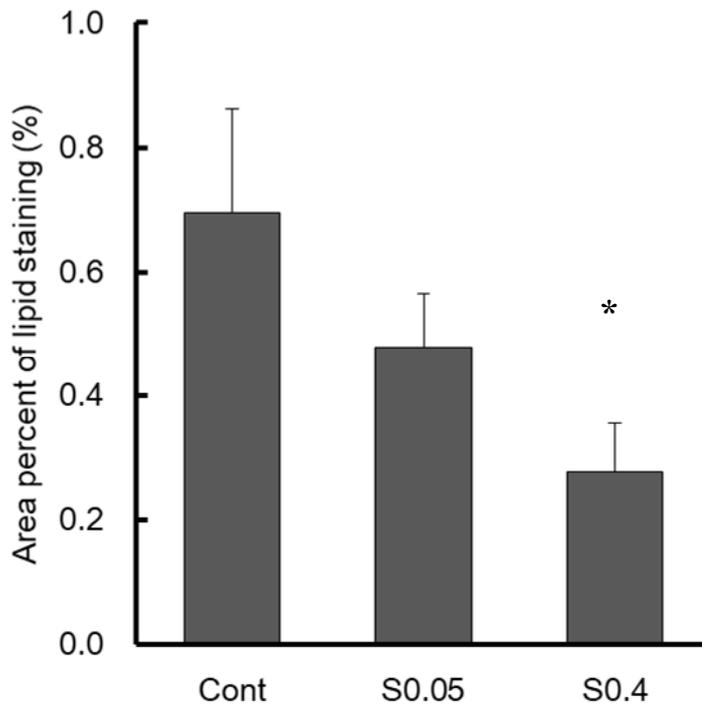


Figure 3-3. Effect of St2001 on the formation of aortic fatty lesions in hyperlipidemic hamsters. Hamsters were fed either a control diet (Cont), a diet containing 0.05% St2001 (S0.05), or a diet containing 0.4% St2001 (S0.4). All diets contained 10% coconut oil and 0.5% cholesterol. \*Significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ; Dunnett's multiple comparison test,  $n=7-8$ ).

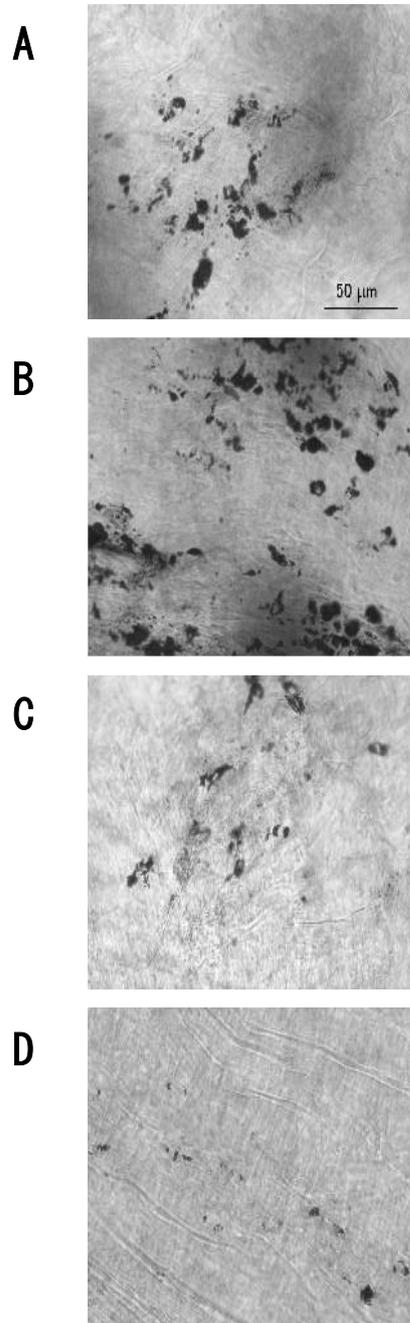


Figure 3-4. Representative photomicrographs of lipid accumulation on the surface of aortic arch stained with oil red O in hyperlipidemic hamster fed a control diet (A and B) or a diet containing 0.4% St2001 (C and D). Dark color spots indicate oil red O-stained lipid droplets.

## 考察

動脈硬化の病因は複雑で多元的であるが、酸化 LDL が重要な役割を担っていることを示す証拠が多数存在している(7,8)。LDL 酸化抵抗性は、糖尿病、喫煙、高血圧、動脈硬化のような確立した冠動脈疾患のリスク因子と密接に関連している(67~70)。Regnström らは LDL 酸化抵抗性と冠動脈硬化の病態の関連を報告している(58)。LDL 酸化抵抗性は頸動脈硬化の状態を予測できる指標として報告されている(56,57)。食事由来の抗酸化物質は LDL 酸化や動脈硬化の予防薬として関心が集まっており、発酵乳の製造に使用されている *S. thermophilus* の *in vitro* 抗酸化活性に関する報告は、第一章の研究をはじめ複数存在する(11,14,71)。第一章では、リポソームにおける脂質過酸化を最も効率良く抑制する乳酸菌として TBARS を指標に St2001 を選択したが、本章では、LDL 酸化ラグタイム法という異なる基質を用いた異なる解析法においても、St2001 が最も高い抗酸化活性を示すことを明らかにした。

St2001 は、高脂血症モデル動物の LDL 酸化抵抗性（酸化ラグタイム）を改善したが、*in vitro* の抗酸化活性が低い St2084 は *in vivo* で効果を示さなかった。これら 2 菌株の動物モデルにおける投与効果の違いは、*in vitro* の抗酸化活性と矛盾しない。さらに、高脂血症モデル動物の動脈壁における脂質沈着病変は St2001 の投与により、菌の投与量依存的に抑制されたが、血漿脂質レベルには変化は認められなかった。これらの結果から、脂質沈着病変の St2001 による抑制作用が菌の抗酸化活性と密接に関連していること、および当該ハムスターモデルにおける動脈硬化の初期病変の形成に LDL の酸化が関与していることが示唆される。

St2001 の 80%エタノール抽出物に LDL 酸化抑制活性が認められたことは、細胞内に存在する抗酸化物質はタンパク質のような高分子化合物ではないことを示唆する。St2001 の LDL 酸化抑制活性は主として菌体の細胞質に局在し、活性成分の分子量は 10kDa 以下であることが示唆された。*S. thermophilus* の便からの生菌回収率は他のプロバイオティクスに比べて低いこと(72)が報告されており、菌体が十二指腸で胆汁酸により溶かされる可能性がある(73)。すなわち、菌体内に存在する低分子の抗酸化物質が菌体溶解により放出され、小腸から吸収されて血流に入り LDL の酸化を抑制するという仮説を考えることができる。本仮説はこれまでのプロバイオティクスの考え方にはないユニークなものであり、*in vivo* での抗酸化作用の機作を明らかにするためにはさらに検討が必要である。

本章では、高脂血症の動物モデルにおいて、St2001 の摂取により、LDL 酸化抵抗性が改善され、動脈壁の脂質沈着病変の形成が抑制されることを示し

た。本菌は発酵乳にも使用されている嗜好性の高い菌であり、St2001の日常的な摂取により副作用の心配が無い動脈硬化の一次予防手段を提供できる可能性が期待できる。

#### 第四章 *S. thermophilus* YIT 2001 の LDL 酸化抑制活性に係る 活性本体の同定

##### 序

第三章で述べたように、St2001 は *in vitro* および *ex vivo* で LDL の酸化に対する保護効果を示し、高脂血症の動物モデルにおいて動脈壁の脂質沈着病変形成を抑制した。本菌の主たる活性物質は、細胞質画分に局在する低分子物質であることが示唆されたが、その同定には至っていない。また、乳酸菌の抗酸化活性に関する報告は *in vitro* を中心に複数存在するが、ほとんどの場合、その活性本体は同定されていない。そこで、本章では、St2001 の LDL 酸化抑制活性に係る活性成分を逆相カラムで用いて分画した後に、高速液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化質量分析 (HPLC-ESI-MS) 装置による分析を行い、主たる活性成分を同定した。

## 材料および方法

### 微生物および培養条件

(株)ヤクルト本社 中央研究所で系統保存されている 5 菌株の *Streptococcus thermophilus* を試験に用いた。各菌株は 1%乳糖を含む変法 GAM 培地 (日水製薬(株)) を用いて 37°C で 16 時間前培養した後、1%ポリペプトン (日本製薬(株))、0.5%酵母エキス (アサヒグループ食品(株))、0.3%リン酸二水素カリウム、0.4%リン酸水素二カリウム、0.06%硫酸マグネシウム、2%乳糖から成る培地 (pH 7.2 に調整後、115°C 15 分間滅菌) で、18 時間 (37°C) 培養した。菌体は、生理食塩水による洗浄の後、4000×g、15 分間の遠心分離により回収した。

### 菌体抽出物の調製

菌体を濁度 (660 nm) 20 となるように PBS に懸濁し、4 倍量のエタノールを加えて、室温で 2 時間振盪抽出した。4°C、4000×g、15 分間の遠心分離後、上清を回収して減圧乾固した。

### 逆相カラムによる分画

減圧乾固した菌体抽出物を 10%アセトニトリル水溶液に溶解し、Sep-Pak TC18 カートリッジ (400 mg; Millipore 製) でろ過した。ろ液 400 μL を Waters Model 600E pump、U6K manual injector (以上、日本ウォーターズ(株)製)、Develosil RP-Aqueous reversed-phase column (C-30 column, 150×4.6 mm, i.d., 5 μm; 野村化学(株)製) から構成される HPLC システムに注入し、溶媒 A; 0.1%ギ酸、溶媒 B; アセトニトリルのグラジエント溶離により分画した。流速は 1.0 mL/min で、溶媒 A 100% (溶媒 B 0%) 10 分間の後、70 分間の直線勾配で溶媒 B 濃度を 70%まで上昇させた。溶離液 40 滴 (約 2 mL) 毎に 1 画分として、合計 64 画分を回収した。各画分を減圧乾固した後、PBS に溶解して、LDL 酸化抑制活性およびチオール濃度を測定した。LDL 酸化抑制活性の測定は、第三章の「*in vitro*における LDL 酸化抑制活性」に記載された方法で行った。チオール濃度の測定は Ellman の方法(74)に従った。

### HPLC-ESI-MS 分析

HPLC-ESI-MS 分析を実施するため、活性画分のチオール化合物を 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulphonate (M2VP) で誘導体化した。誘導体化処理したサンプル 10 μL を Waters ZQ4000 mass detector (日本ウォーターズ(株)製) および Scherzo SM-C18 column (150×3 mm,

i.d., 3  $\mu\text{m}$ ; インタクト(株)製) を備えた Waters 2695 Alliance system (日本ウォーターズ(株)製) に注入し、10 mM ギ酸アンモニウム (pH 5.8) : アセトニトリル (93 : 7) で溶離した (流速 0.4 mL/min、カラム温度 40°C)。検出器は以下の設定とした; positive ion mode、capillary voltage 1.0 kV、desolvation temperature 400°C、capillary temperature 140°C。

#### 菌体内 GSH の定量

PBS に溶解した菌体抽出物を 500  $\mu\text{M}$  M2VP 存在下で、室温、15 分間の誘導体化処理した。その 10  $\mu\text{L}$  を Waters 996 Photodiode Array Detector (日本ウォーターズ(株)製) および Scherzo SM-C18 column (100 $\times$ 2 mm, i.d., 3  $\mu\text{m}$ ; インタクト(株)製) を備えた Waters Alliance 2695 system (日本ウォーターズ(株)製) に注入し、溶媒 A; 3 mM ギ酸アンモニウム、溶媒 B; 25 mM ギ酸アンモニウム : アセトニトリル (80 : 20) のグラジエント溶離 (40 分間で溶媒 B 濃度を 0% から 70% まで直線的に上昇) により分画した。カラム温度 37°C、流速 0.4 mL/min、モニター波長 266 nm とした。

## 結果

### 菌体抽出物の逆相カラムによる分画

St2001 菌体抽出物の HPLC (C-30 カラム) 分画の結果、画分 12 および 13 に他の画分に比べて大きな LDL 酸化抑制活性が認められた (Figure 4-1A)。画分 12 および 13 にはチオール化合物の存在が認められた (Figure 4-1B)。

### HPLC-ESI-MS 分析

画分 12 および 13 を M2VP で誘導体化して、HPLC-ESI-MS 分析に供した。Figure 4-2 にクロマトグラムおよびマススペクトルを示す。画分 12 および 13 には、未反応の M2VP のピーク (保持時間 11.7 分、 $m/z = 119.77$ ) の他に、未同定誘導体のイオンピーク (保持時間 4.3 分、 $m/z = 427.12$ ) が認められた。生体内の代表的な低分子チオール化合物である還元型グルタチオン (GSH、分子量 307.32) およびシステイン (分子量 121.16) を同条件で誘導体化および HPLC-ESI-MS 分析に供したところ、GSH 誘導体およびシステイン誘導体の保持時間はそれぞれ 4.3 分および 6.7 分であり、GSH 誘導体は  $m/z = 427.12$  のイオンピークを有していた。以上より、画分 12 および 13 の未同定チオール化合物を GSH と同定した。

### GSH および類縁化合物の LDL 酸化抑制活性

Figure 4-3 に GSH および類縁化合物の *in vitro* における LDL 酸化抑制活性を示す。GSH は 0~20  $\mu\text{M}$  の範囲で、LDL 酸化抑制活性に対する直線的な濃度依存性を示した。一方、酸化型グルタチオン (GSSG) には、当該活性が認められなかった。GSH の LDL 酸化抑制活性は、M2VP による誘導体化により消失した。

### *S. thermophilus* 菌株間の LDL 酸化抑制活性と菌体内 GSH 含量の比較

5 株の *S. thermophilus* の *in vitro* LDL 酸化抑制活性、菌体内チオール含量および菌体内 GSH 含量を比較した (Figure 4-4)。これら 5 菌株の中で St2001 は最も高い LDL 酸化抑制活性を示すと同時に、チオール含量および GSH 含量も最も高かった。St2001 の菌体内チオール化合物に占める GSH の割合は約 80%であった。第 3 章で活性の低い株として動物試験の対照に用いた St2084 は GSH をほとんど含有しなかった。YIT 2037 のチオール含量および GSH 含量は、St2001 と GSH をほとんど含有しない 3 菌株の中間で、LDL 酸化抑制活性も中間であった。M2VP で誘導体化を行うことによりチオ

ール基を不活化すると St2001 の LDL 酸化抑制活性はほぼ半減し、チオール不活化後の活性は 5 菌株間で大差がなかった。

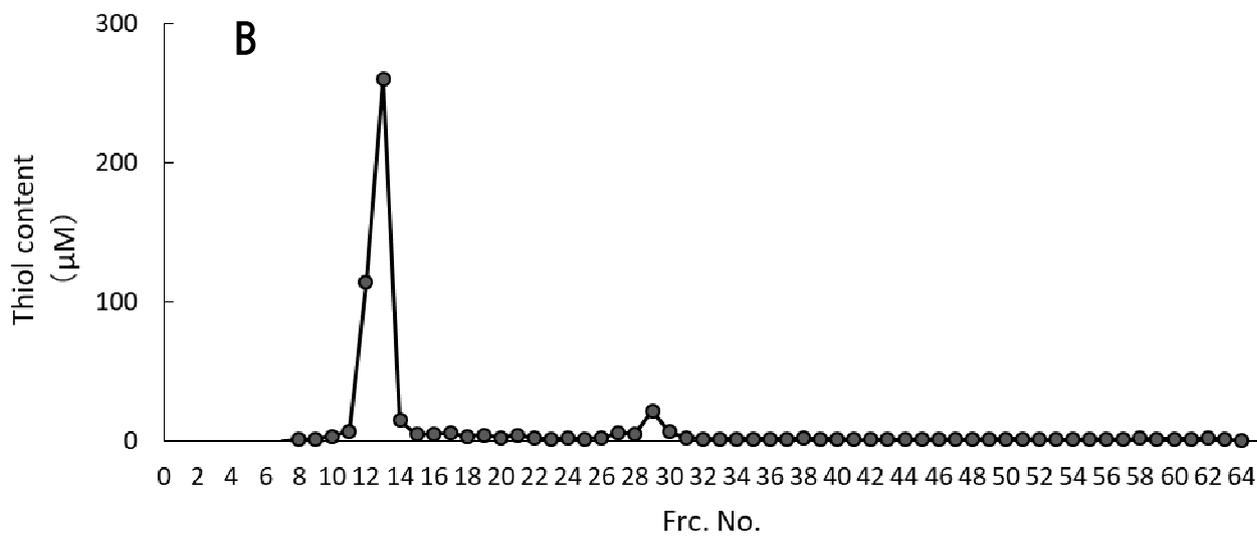
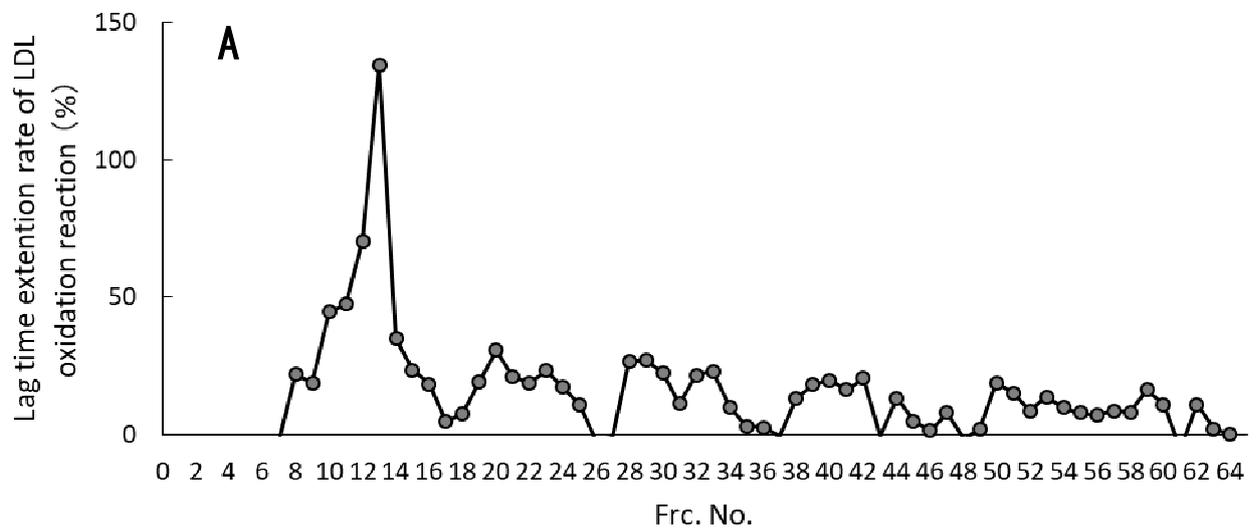


Figure 4-1. Fractionation of bacterial cell extracts of St2001 by HPLC with a C-30 column.

A, Anti-oxidative activity against LDL oxidation. B, Thiol content.

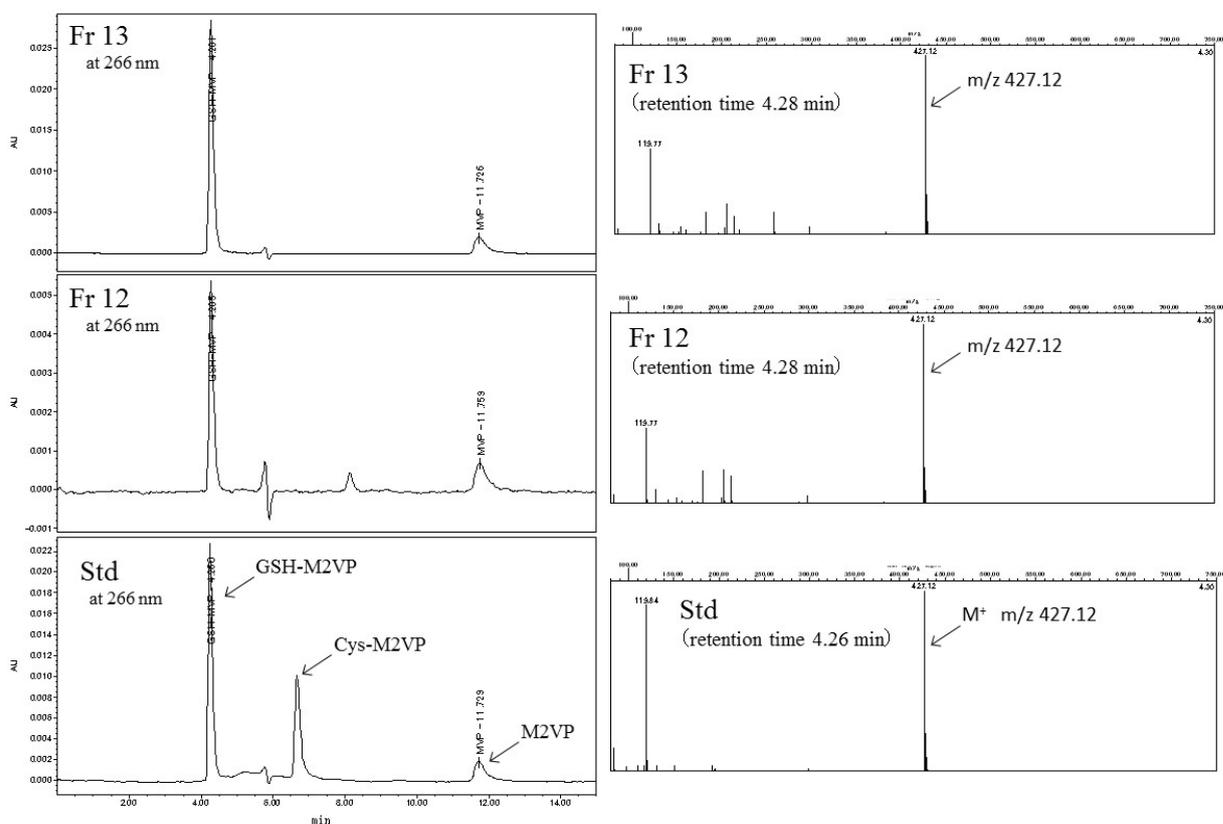


Figure 4-2. HPLC-ESI-MS analysis of the components in fraction 12 (Fr 12) and 13 (Fr 13) having higher anti-oxidative activity against LDL oxidation.

Prior to analysis, the thiol group in the components was derivatised with M2VP. Left, HPLC chromatogram. Right, MS spectra. Std, a mixture of authentic cysteine (Cys) and glutathione (GSH).

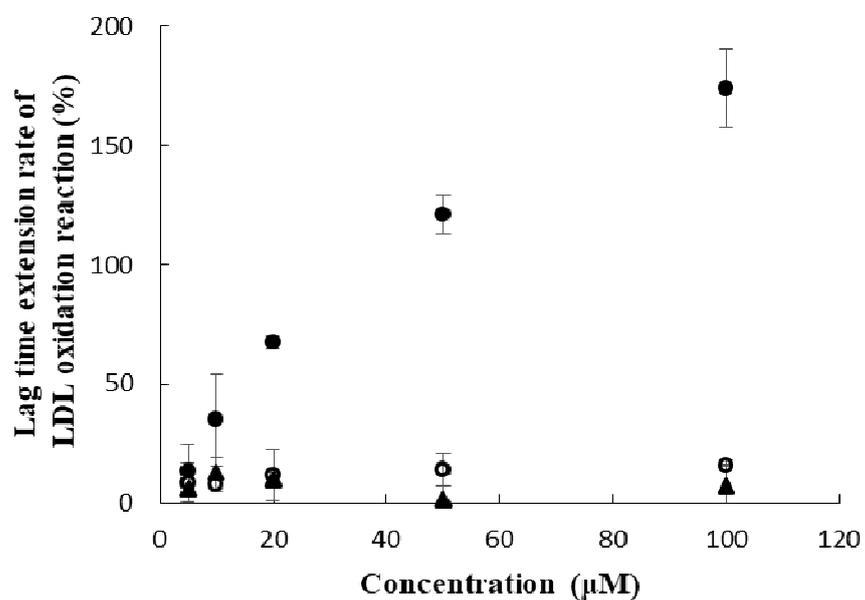


Figure 4-3. Anti-oxidative activity of GSH (closed circles), GSSG (open circles) and GSH with M2VP-derivatised thiol group (closed triangles).

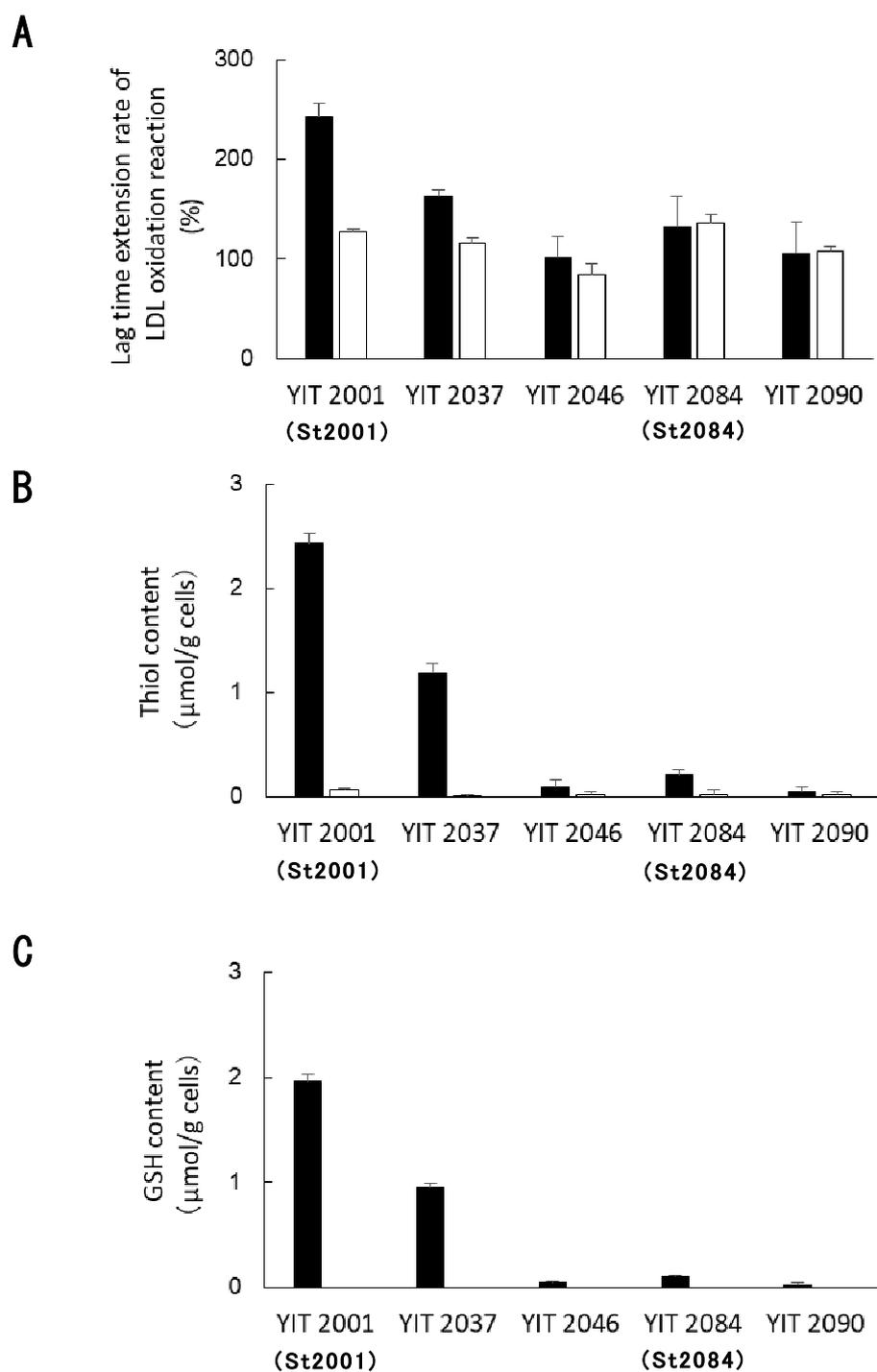


Figure 4-4. Comparison of anti-oxidative activity against LDL oxidation (A), contents of intracellular thior components (B) and GSH (C) among 5 strains of *S. thermophilus*.

Closed bars, absence of M2VP treatment. Open bars, after the derivatisation of the thiol group with M2VP.

## 考察

本章では、St2001の主要な活性画分にGSHが存在すること (Figure 4-2)、GSH標準品に*in vitro*で濃度依存的なLDL酸化抑制活性が認められること (Figure 4-3)、M2VPで誘導体化してチオールを不活化することによりSt2001の活性が半減すること (Figure 4-4)を示した。これらの結果から、St2001の菌体内GSHは、LDL酸化抑制活性にかかわる主たる活性物質であると考えられた。第三章では、St2001の活性物質は菌体の細胞質画分に局在する低分子物質であることに言及したが、GSH (分子量 307.32)はこの条件に合致する抗酸化物質である。

Figure 4-4の実験で用いたSt2001サンプル1 mLには、菌体22.2 mgに由来する抽出物が含まれており、菌体内GSH含量は0.043  $\mu\text{mol}$ と計算された。したがって、活性測定用のSt2001サンプル中のGSH濃度は43  $\mu\text{M}$ となる。この時のSt2001とGSHをほとんど含まないSt2084の酸化ラグタイム延長率の差は111%であった。このGSH濃度の差 (約40  $\mu\text{M}$ )と活性の差の関係はFigure 4-3で示したGSH標準品の濃度依存性とほぼ一致するものであり、St2001がSt2084より高い抗酸化活性を示す理由は、菌体内GSH含量の差で説明できるものと考えられた。

M2VPで誘導体化してSt2001のチオールを消去するとLDL酸化抑制活性は顕著に低下し、GSHを含まない活性の低い3菌株と同レベルとなったが、半分程度の活性が残存した (Figure 4-4)。また、St2001抽出物の逆相カラムによる分画において、低レベルの活性が複数の画分に認められた (Figure 4-1)。St2001を含む今回調べた5菌株には、抗酸化ペプチド、細胞内電子伝達物質、還元糖などのチオール化合物以外の抗酸化物質が存在し、*in vitro*のLDL酸化抑制活性に関与している可能性が考えられた。

体内のGSHの役割の一つは、酸化ストレスに抗して酸化還元の恒常性を維持することであると想定されている。動物の肝臓、腎臓、小腸などの各組織の細胞内GSH含量は数 $\mu\text{mol/g}$ 程度またはそれ以上と報告されているが、血清中ではその濃度は細胞内より顕著に低く数 $\mu\text{M}$  (nmol/mL)程度であり(75,76)、GSH補給の効果が細胞内より低投与量で顕在化する可能性が考えられる。

本菌は胆汁耐性が弱いことから、十二指腸で菌体が溶かされることによって菌体内に存在していたGSHが放出され、小腸から吸収されて血中に移行し、LDL酸化抑制作用を示したとの仮説を考えることができる。GSHは精製品を経口投与しても効率的な血中移行は望めないこと(77)が知られており、リポソームに内包して血中移行率を上昇させる試みなどが報告されている

(78)。St2001は、「リポソーム様作用」または「天然の腸溶性カプセル」とでもいうべき作用を示し、GSHの血中移行性を高めているのかもしれない。

## 第五章 *S. thermophilus* YIT 2001 (St2001) 発酵乳がヒトの血中酸化 LDL および血圧にもたらす影響

### 序

第三章で述べたように、LDL の酸化修飾は動脈硬化の発生と進展に大きく関わっていると理解されている。Malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) は、酸化 LDL の一種であり、市販の ELISA キットによる測定が可能で、心疾患既往歴のある糖尿病患者などで保険適用されていることから臨床検査会社での委託分析も可能である。血清 MDA-LDL は急性冠症候群、アテローム血栓性脳梗塞などで上昇することが報告されている(79,80)。また、MDA-LDL が頸動脈内膜中膜複合体厚と正の相関を示すこと(81)、MDA-LDL の上昇は不安定プラーク thin-cap atheroma と関連し、血清 MDA-LDL はプラーク破壊前に不安定プラークを持つ冠動脈疾患患者を見極めるために有用なマーカーであることが示唆されている(82,83)。一方、MDA-LDL と LDL-コレステロールの比 (MDA-LDL/LDL-コレステロール) は MDA-LDL 単独よりも優れた冠動脈疾患の予測マーカーであると報告されている(84,85)。したがって、従来から知られたリスクマーカーである血清コレステロールレベルおよび血圧のみならず、血清 MDA-LDL 濃度や MDA-LDL/LDL-コレステロールも心血管疾患の有用なリスクマーカーと考えることができる。

第三章で報告したように、St2001 は *in vitro* および *ex vivo* で LDL の酸化に対する保護効果を示し、高脂血症の動物モデルにおいて動脈壁の脂質沈着病変形成を抑制した。また、*S. thermophilus* は発酵乳に使用されている安全性の高い乳酸菌であり、嗜好性も高い。したがって、St2001 で調製した発酵乳を動脈硬化の一次予防に利用できる可能性も考えられるが、St2001 発酵乳が MDA-LDL や血圧などの心血管疾患のリスクマーカーに及ぼす影響を調べる臨床研究は行われていない。そこで、軽度の高 LDL-コレステロール血症者および健常者を対象に、二重盲検ランダム化プラセボ対照群間比較試験で St2001 発酵乳の投与効果を調べた。

## 材料および方法

### 被験者

本試験は「ヘルシンキ宣言（2008年10月修正）」および「疫学研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省告示、平成20年12月1日一部改正）」を遵守して実施された。被験者に関わる全ての実施内容は試験実施施設内の倫理審査委員会（健昌会倫理委員会）の審査を受け、承認された。全ての被験者から登録前に書面によるインフォームドコンセントを得た。

大阪市または近郊に在住する成人（年齢20～64歳）の軽度LDL-コレステロール血症者または健常者（LDL-コレステロール100 mg/dL以上）をインターネットで募集した。除外基準は以下のとおりである。1) 試験開始前4週間以内にSt2001を含む発酵乳あるいは抗酸化サプリメントを摂取した者、2) 被験食品に対するアレルギー（牛乳アレルギーなど）のリスクを有する者、3) 家族性高コレステロール血症者、4) 投薬治療など医療処置を受けている者、5) 妊娠または授乳中の者、6) 他の臨床試験に参加している者、7) 血液生化学分析・血圧・その他の理由で医師により本試験の被験者に適さないと判断された者。被験者は、試験期間を通じて、試験食品以外のSt2001を含む発酵乳、抗酸化サプリメントの摂取を制限され、通常のライフスタイルを維持するように依頼された。試験食品の摂取、食事制限の遵守、服薬、体調を被験者自身が日誌に記録した。

### 被験飲料

St2001発酵乳は、脱脂粉乳、果糖ブドウ糖液糖、ペクチン、香料、シスチンおよびSt2001を用いて調製した。シスチンを0.002%含む脱脂乳（無脂乳固形分16%）でSt2001を培養した後、液糖等を混合しSt2001発酵乳とした。St2001発酵乳1本（100 mL）あたりの栄養成分は以下のとおりである。タンパク質3.1 g、脂質0.1 g、炭水化物12.0 g、ナトリウム40 mg、エネルギー61 kcal。プラセボ飲料は、脱脂粉乳、果糖ブドウ糖液糖、ペクチン、香料、シスチンおよび乳酸を原料に調製した。プラセボ飲料の栄養成分、色調、香り、味はSt2001発酵乳とほぼ同等であった。St2001発酵乳またはプラセボ飲料を参加者の自宅に配送し、St2001発酵乳中の乳酸菌の生菌数を $1 \times 10^9$  cfu/mL以上に保つために摂取するまで0～10℃で保管した。

### 試験デザイン

二重盲検ランダム化プラセボ対照並行群間比較試験を2011年5月から10月まで、医療法人健昌会 福島健康管理センター（大阪府大阪市）で実施した。

試験デザインに従って、被験者はランダムに St2001 発酵乳摂取群 (ST 群) およびプラセボ飲用摂取群 (PC 群) に割り付けられた。割り付けは、コンピューターによる乱数発生プログラムを利用して、試験管理担当者とは別の(株) TTC のスタッフが実施した。試験群への帰属は被験者および実験担当者の双方に伏せられた。被験者の背景データを Table 5-1 に示す。被験者は 12 週間に渡って、1 日 1 本 (100 mL) の St2001 発酵乳またはプラセボ飲料を連日摂取した。試験は 4 週間の摂取前観察期間、12 週間の被検飲料摂取期間、4 週間の摂取後観察期間から成り、被験者は摂取前 (ベースラインデータ取得: 0W)、被検飲料摂取期間の 4 週目 (4W)、8 週目 (8W)、12 週目 (12W)、および摂取後観察期間の 4 週目 (+4W) に来院して検査を受けた。

#### 測定項目

本試験の主要評価項目は血清 MDA-LDL および MDA-LDL/LDL-コレステロールである。静脈血および尿は、一晩絶食後 (飲水は許可) の翌朝、採取した。血清 MDA-LDL の測定は、市販の臨床検査用 ELISA キット (酸化 LDL エライザ第一; 積水メディカル(株)製) を用いた。本キットは、抗 MDA-LDL 抗体 (ML25) および抗アポリポタンパク質 B 抗体 (AB16) を利用したサンドイッチ ELISA キットであり、Kotani らの報告(86)に基づくものである。一般的な血液生化学検査、血液学的検査、尿の定性試験、血圧測定を含む身体測定を実施した。血圧は 5 分間の安静後に座位でデジタル自動血圧計 (オムロン(株)製) により測定した。

#### 統計解析

データは平均値±標準偏差 (SD) で表記した。統計ソフトには SAS 8.02 (SAS Institute Japan(株)製) を用いた。被検飲料の摂取効果の比較解析のため、摂取前および摂取 4、8、12 週目のデータを用いて、摂取前値を共変量とする共分散分析 (ANCOVA) を実施した。ベースラインデータの群間差の検定には、Student の t-検定を用いた。男:女および喫煙者:非喫煙者の構成比の検定には、 $\chi^2$  検定を用いた。有意水準は 5% (両側検定) とした。

Table 5-1. Baseline characteristics of subjects.

	Placebo drink group	ST-fermented milk group	<i>P</i> value
Subjects (n)	30	29	-
(male : female)	(16 : 14)	(14 : 15)	(0.698 <sup>1</sup> )
Smokers (n)	3	6	0.254 <sup>1</sup>
Age (years)	47.4 ± 8.0	47.3 ± 8.5	0.966 <sup>2</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.3 ± 2.8	22.4 ± 2.8	0.243 <sup>2</sup>
Triglycerides in serum (mg/dL)	120.2 ± 74.5	108.1 ± 45.6	0.457 <sup>2</sup>
Total cholesterol in serum (mg/dL)	228.9 ± 25.7	226.9 ± 30.8	0.787 <sup>2</sup>
LDL-Cholesterol in serum (mg/dL)	143.3 ± 20.4	143.5 ± 20.9	0.968 <sup>2</sup>
HDL-Cholesterol in serum (mg/dL)	58.0 ± 12.4	55.7 ± 13.8	0.507 <sup>2</sup>
MDA-LDL in serum (U/L)	67.5 ± 21.3	70.6 ± 21.2	0.575 <sup>2</sup>
MDA-LDL/LDL-Cholesterol	0.455 ± 0.133	0.478 ± 0.140	0.520 <sup>2</sup>
Systolic blood pressure (mmHg)	118.0 ± 11.8	118.3 ± 13.5	0.934 <sup>2</sup>
Diastolic blood pressure (mmHg)	72.2 ± 8.1	68.7 ± 8.7	0.115 <sup>2</sup>
Heart rate	76.8 ± 10.9	74.7 ± 9.8	0.430 <sup>2</sup>
Plasma glucose (mg/dL)	91.2 ± 7.6	89.1 ± 7.2	0.297 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *P* values analysed by the Chi-square test.

<sup>2</sup> *P* values analysed by the unpaired t-test.

The values were means ± SD.

## 結果

### 被験者背景

募集に応じた 148 名の被験者から、試験参加に適格と判断された 20 歳以上 65 歳未満の被験者 60 名を選択し、2 群に割り付けた (Figure 5-1)。摂取を開始した被験者のうち、ST 群の女性 1 名が熱中症により体調を崩したため、脱落した。この熱中症は、試験責任医師により、高温の気候に起因するもので試験飲料の摂取とは関連がないと判断された。試験を完了し、解析対象となった被験者は ST 群 29 名、PC 群 30 名の合計 59 名であった。

被験者の背景情報を Table 5-1 に示した。両群の被験者の年齢、Body mass index (BMI)、血清脂質 (トリグリセライド、総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、MDA-LDL、MDA-LDL/LDL-コレステロール)、血糖値、血圧、心拍数に有意差は認められなかった。被検食品の平均摂取率は ST 群が 98.8%、PC 群が 99.6%で、59 名全員が摂取率 90%以上であった。

### 血清マーカーおよび血圧

Figure 5-2 に試験期間中の血清 MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP) の変化を示した。被検食品の摂取期間中、ST 群の MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、SBP、DBP は PC 群に比べて有意に低下した。血清の総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセライドに群間差は認められなかった。

ベースラインにおける酸化ストレスの高低が飲料の摂取効果に影響を与えるか否かを調べるため、摂取前の血清 MDA-LDL 濃度の中央値 (65 U/L) に基づく層別解析を実施した (Figure 5-3)。その結果、MDA-LDL が中央値より高かった被験者 (ST 群 16 名、PC 群 14 名) では、ST 群の MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、SBP、DBP が PC 群に比べて有意に低下したのに対して、MDA-LDL が中央値未満の被験者では、これらの値に ST 群と PC 群の群間差は認められなかった。

### 有害事象

被検飲料の摂取期間および摂取後観察期間において、血液の一般生化学検査および血液学的検査、尿の定性検査、身体測定の結果に、被検飲料の摂取に関連した有害事象または異常値は認められなかった。

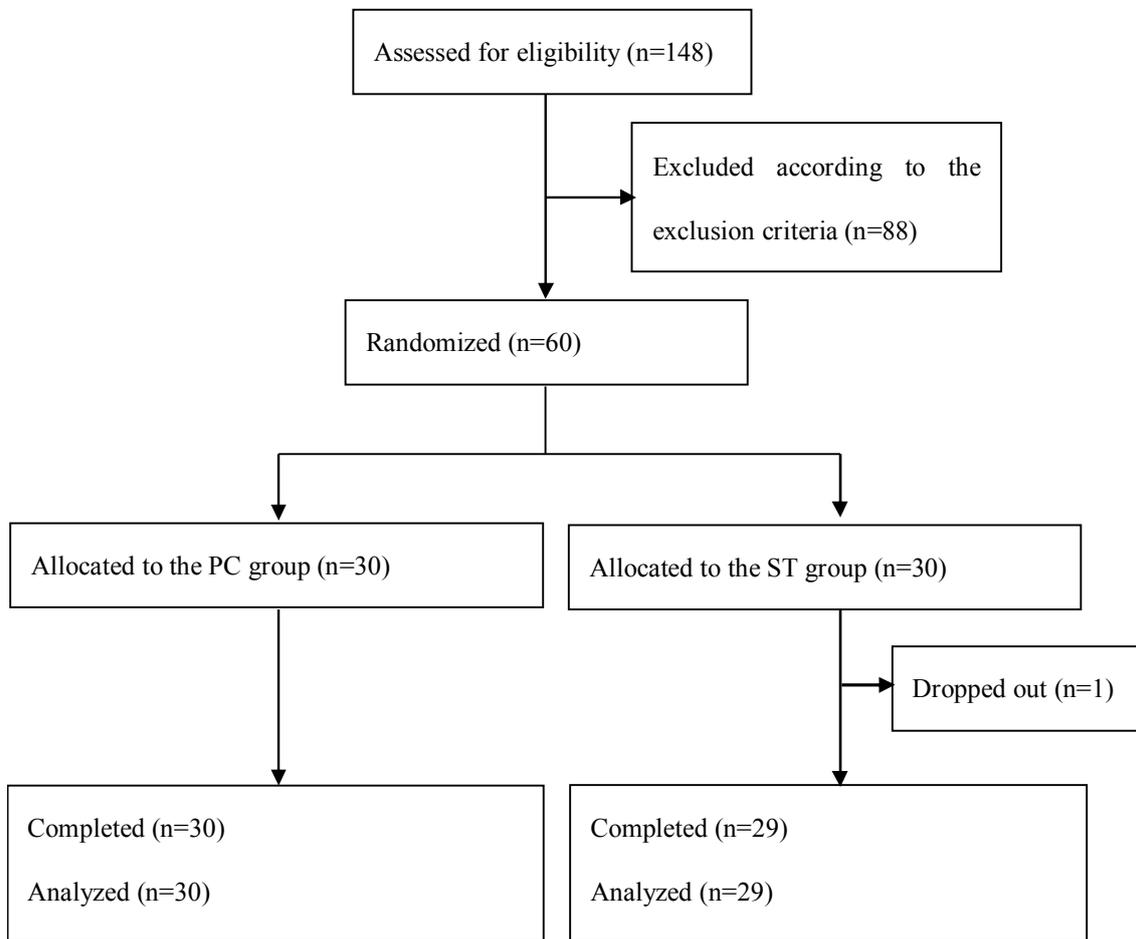
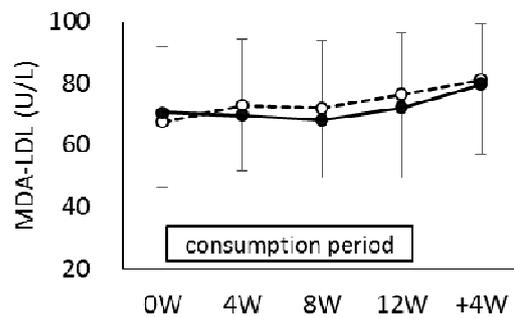
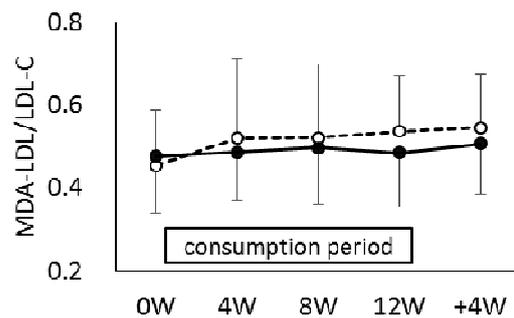


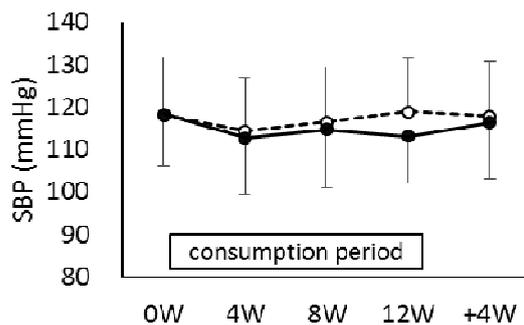
Figure 5-1. Flow chart showing the participants and the selection process.



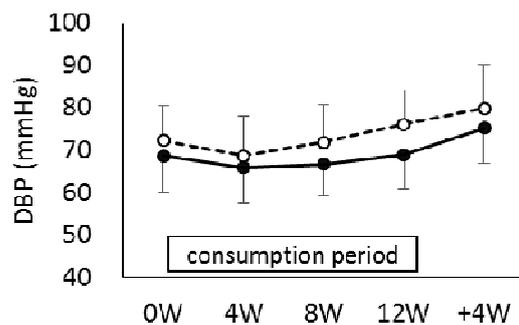
ANCOVA (MDA-LDL)  
 Treatment group:  $P = 0.02^*$   
 Time point:  $P = 0.349$   
 Interaction:  $P = 0.984$



ANCOVA (MDA-LDL/LDL-C)  
 Treatment group:  $P = 0.007^{**}$   
 Time point:  $P = 0.942$   
 Interaction:  $P = 0.823$



ANCOVA (SBP)  
 Treatment group:  $P = 0.0083^{**}$   
 Time point:  $P = 0.215$   
 Interaction:  $P = 0.290$



ANCOVA (DBP)  
 Treatment group:  $P = 0.004^{**}$   
 Time point:  $P < 0.001^{**}$   
 Interaction:  $P = 0.07$

Figure 5-2. Effects on MDA-LDL, MDA-LDL/LDL-cholesterol, SBP, and DBP. Open circles, PC (n = 30); closed circles, ST (n = 29). 4W, 8W, 12W, and +4W indicate 4, 8, and 12 weeks during the consumption period, and at 4 weeks post-consumption, respectively. Data were analysed by analysis of covariance (ANCOVA) with the baseline value as the covariate using the data at 0W, 4W, 8W, and 12W. LDL-C: LDL-cholesterol.

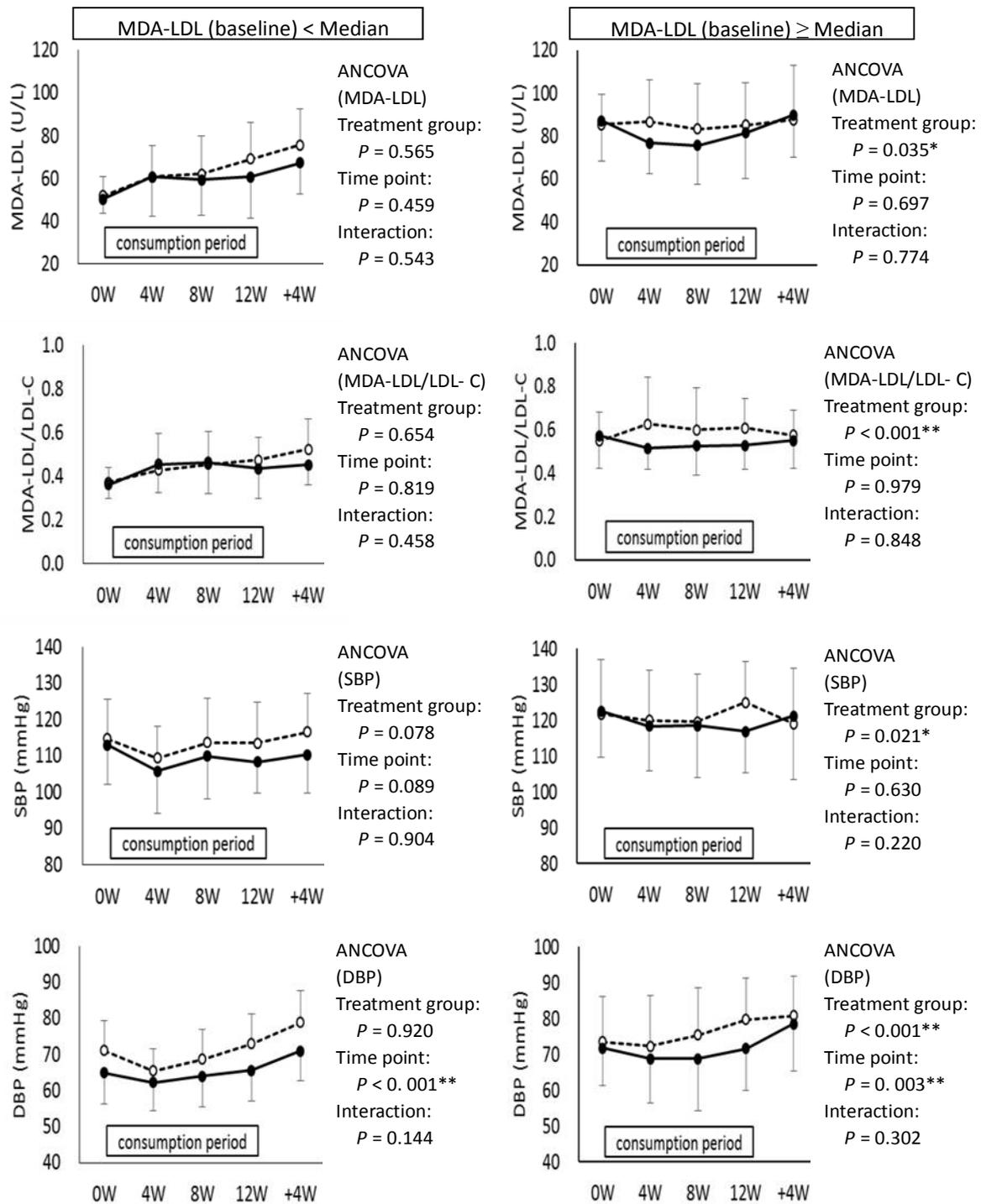


Figure 5-3. Effects on MDA-LDL, MDA-LDL/LDL-cholesterol, SBP, and DBP in stratified analysis based on MDA-LDL levels at baseline. Open circles, PC; closed circles, ST. 4W, 8W, 12W, and +4W indicate 4, 8, and 12 weeks during the consumption period, and at 4 weeks post-consumption, respectively. Data were analyzed by ANCOVA with the baseline value as the covariate using the data at 0W, 4W, 8W, and 12W. Median of MDA-LDL at baseline was 65 U/L (MDA-LDL<Median, PC n=16, ST n=13; MDA-LDL≥Median, PC n=14, ST n=16). LDL-C: LDL-cholesterol.

## 考察

本章では、抗酸化活性が高い乳酸菌 St2001 を用いて調製した発酵乳の摂取が軽度の高 LDL-血症者および健常者の健康にメリットをもたらすか否かを二重盲検ランダム化プラセボ対照並行群間比較試験で調べた。摂取前値を共変量とする共分散分析の結果、被験食品の摂取により ST 群の MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、SBP、DBP は PC 群に比べて有意に低下することが示された。

日本動脈硬化学会の動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版では、LDL-コレステロール 140 mg/dL 以上を高 LDL-コレステロール血症と位置づけている(87)。米国においては the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (NCEP-ATP III) で、LDL-コレステロールレベルは、至適 (100 mg/dL 未満)、正常高値 (100~129 mg/dL)、境界域高値 (130~159 mg/dL)、高値 (160~189 mg/dL)、超高値 (190 mg/dL 以上) に分類されている(88)。本試験では、ベースラインの LDL-コレステロール値が至適や超高値に該当する被験者はおらず、160 mg/dL および 140 mg/dL 以上の割合は、それぞれ全被験者の 25% および 61% であった。心血管病の高リスク群において MDA-LDL 濃度および MDA-LDL/LDL-コレステロールは病態の有用な予見因子であることが多くの臨床試験により示唆されている(81~85)。健常者や低リスク群においては血清 MDA-LDL と心血管疾患の潜在的な罹患率との関連に関するデータは少ないが、MDA-LDL の上昇は高リスク状態に近づくことを意味する。さらに、食品摂取を含む生活習慣への介入は心血管疾患の予防に重要であると考えられている。したがって、食事介入としての St2001 発酵乳の日常的な摂取は、MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、血圧といった心血管疾患のリスクマーカーの低下を介して、軽度の高 LDL-コレステロール血症者および健常者に健康上のメリットをもたらすことが示唆される。

MDA-LDL は血中の酸化ストレスマーカーの一つである。我々は、酸化ストレスの程度が被験食品の摂取効果に与える影響を調べるために摂取前の MDA-LDL 値による層別解析を行った。摂取前の酸化ストレスが相対的に高い (MDA-LDL が中央値以上の) 被験者では、被験食品の摂取期間において ST 群の MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、SBP、DBP は PC 群に比べて有意に低下したが、酸化ストレスが低い (MDA-LDL が中央値未満の) 被験者では、いずれの項目においても群間差は認められなかった。このことは、St2001 発酵乳は、酸化ストレスが高い状態にある場合にその状態

を改善し、酸化ストレスが低い望ましい状態にある場合はその状態を維持するということを示している。

血圧、特に SBP は心血管疾患の確立された主要なリスク因子の一つである(89,90)。本試験では、ST 群の SBP および DBP は、被験食品の摂取期間中、PC 群に比べて有意に低下した。いくつかの発酵乳で主として生理活性ペプチド（ミルクペプチド）に基づく血圧低下作用が報告されている(91)。興味深いことに、MDA-LDL が中央値以上の相対的に酸化ストレスが高い被験者において被験食品の摂取期間中に ST 群の血圧（SBP および DBP）が PC 群に比べて低値を示したが、MDA-LDL が中央値未満の酸化ストレスが低い被験者では血圧の群間差は認められなかった。それゆえ、今回の血圧低下の主たる機作は、ミルクペプチドの作用ではない可能性が考えられる。本態性高血圧患者および腎血管性高血圧患者の酸化ストレスは健常者より高く、多くの研究は酸化ストレスが高血圧の主要な要因の一つであることを示唆している(9,92,93)。生理的な血管収縮ペプチドである angiotensin II、endothelin-1、urotensin II は、NADPH oxidase の活性化を介して活性酸素産生を亢進させ、活性酸素が血管拡張因子である NO の生体利用性を低下させる。したがって、今回の層別解析の結果は、酸化ストレスによる血圧の上昇を St2001 発酵乳が抗酸化作用によって抑制したことを示唆すると考えられる。境界域高血圧者に対する St2001 発酵乳の血圧低下作用を検証するためにはさらなる研究が必要である。

今回の臨床試験で認められた血清 MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、血圧の改善効果には、St2001 の抗酸化作用が関与していると思われる。第三章において、St2001 の摂取により、高脂血症の動物モデルで LDL 酸化抵抗性が改善され、動脈壁の脂質沈着病変の形成が抑制されることを報告した。また、*in vitro* において St2001 の細胞破砕液が LDL 酸化を抑制すること、活性成分は細胞質画分に局在する低分子の抗酸化物質であることを示した。*S. thermophilus* は他のプロバイオティクスに比べてヒトの便からの生菌回収率が低いこと、胆汁によって溶解されやすいことから、経口摂取して腸管に到達した菌の大部分は消化されると考えられる。また、第四章で報告したように St2001 の LDL 酸化抑制作用には菌体内の GSH が関与していると考えられる。したがって、St2001 発酵乳を経口摂取した後、十二指腸で St2001 が胆汁により溶解され、菌体内の GSH が放出される、GSH は腸管から吸収され、血流に入って LDL の酸化を抑制し、血圧を改善するという仮説を考えることができる。一方で、St2001 が腸内フローラに影響を与え、有益な効果をもたらした可能性も残っている。

軽度の高 LDL-コレステロール血症者および健常者を対象とした今回の臨

床試験の結果、主要評価項目である血清 MDA-LDL 濃度および MDA-LDL/LDL-コレステロール比は、St2001 発酵乳の日常的な摂取により改善することが示された。これらの項目は、酸化ストレスマーカーであり、心血管疾患のほぼ確実なリスクマーカーである。さらに、St2001 発酵乳が血圧低下作用を有する可能性が示された。血圧は、心血管疾患の確立されたリスクマーカーの一つである。複数のリスクマーカーの値が改善したことは心血管疾患の予防を考える上で大きな意味を持つものと考えられる。

本研究の限定要因はサンプルサイズが小さいことである。St2001 発酵乳の摂取による血清 MDA-LDL 濃度、MDA-LDL/LDL-コレステロール、血圧の改善効果を明確にし、我々の仮説を強化するためには、より大規模な試験が必要であると考えられる。また、St2001 発酵乳が腸内フローラに与える影響についても明らかではない。これらの点について、さらなる検討が必要である。

## 総合討論

本研究では、乳酸菌の中から抗酸化活性の高い菌株をスクリーニングし、その菌株の経口摂取によって、結腸粘膜（第一章、第二章）および LDL（第三章～第五章）の脂質酸化が抑制されることを明らかにした。

脂質の酸化されやすさおよび脂質酸化に対する抗酸化剤の効果は、脂質の存在状態（脂質の均質系、ミセル系、脂質二重膜系）によって異なると報告されている。この点を考慮し、菌株のスクリーニングに際しては、抗酸化物質のスクリーニングにしばしば用いられている 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルなどの合成基質を用いるのではなく、*in vivo* の基質を想定したリン脂質リポソーム（細胞膜のモデル）およびヒト血清由来の LDL を用いた。その結果、*in vitro* で最も高い抗酸化活性を示した乳酸菌 St2001 は、*in vivo* においても St2084（第二章、第三章）あるいは LeS（第一章）より高い酸化抑制効果を示し、スクリーニング系の妥当性が支持されたと考えられた。また、St2001 は、脂質の存在状態が異なる結腸粘膜（脂質二重膜系）および LDL（ミセル・エマルジョン系）の両者において高い効果を示したことから、抗酸化食品素材として優れた適性を持っていると考えられた。

鉄は生存に必須の栄養素であり、しばしば欠乏症状がみられることから、鉄剤あるいはサプリメントなどによる鉄補給を必要とする人は多い。一方で、鉄、特に 2 価の鉄イオンは、活性酸素の産生、中でも最も反応性が高いヒドロキシラジカルの産生を触媒し、消化管粘膜に酸化傷害を引き起こすリスクを有している。選抜した乳酸菌 St2001 は、鉄過剰投与の動物モデルにおいて、鉄吸収に重要な消化管内の可溶性鉄濃度を低下させずに、結腸粘膜における酸化傷害を低減した（第一章）。このことから、経口鉄剤の副作用の一つである消化管粘膜傷害の軽減に、St2001 が利用できる可能性が考えられる。St2001 は潰瘍性大腸炎の動物モデルの一つである DSS 誘導大腸炎において、大腸炎の症状を抑制した（第二章）。潰瘍性大腸炎の患者では、腸管からの多量の出血により貧血が生じる場合がある。この場合、鉄の補給が必要となるが、経口鉄剤による鉄補給は、大腸炎の症状を悪化させるリスクを有する。大腸炎に伴う貧血の治療の際には通常の貧血以上に鉄イオンによる消化管粘膜傷害に留意する必要があるが、St2001 は大腸炎の予防および治療に有用な手段を提供できるかもしれない。

LDL の酸化変性は、粥状動脈硬化病変形成の重要なステップであると理解されている。第三章では、選択した乳酸菌 St2001 が高脂血症の動物モデルにおいて LDL の酸化ならびに動脈硬化の初期病変形成を抑制することを示

した。第五章では、健常者および軽度高 LDL-コレステロール血症者を対象とする臨床試験において、St2001を用いて調製した発酵乳の摂取が酸化 LDL (MDA-LDL) および血圧という二つの動脈硬化のリスクマーカーを改善させたことを示した。動脈硬化性疾患は、進行するまで自覚症状がほとんどないため、健康な時から予防に留意することが重要である。St2001は、長い食経験を有する安全な菌であり、調製した発酵乳の嗜好性も高いことから、医薬品とは異なり、健常者が通常の食事に取り入れて継続摂取することが可能である。すなわち、St2001発酵乳を動脈硬化性疾患の予防に利用できる可能性が考えられる。

St2001は、腸管内の可溶性鉄濃度に影響を与えずに結腸粘膜の過酸化脂質レベルを低減した。DSS誘導大腸炎モデルでは、活性化好中球の浸潤の指標である粘膜 MPO 活性に影響を与えずに、大腸炎の症状を改善した。高脂血症の動物モデルおよびヒトにおいて、血清のコレステロールやトリグリセライドの濃度に影響を与えずに、LDLの酸化を抑制した。また、St2001とSt2084あるいはLcSの各動物モデルにおける投与効果の差は、*in vitro*の抗酸化活性の違いと矛盾しなかった。これらの結果は、St2001の投与効果が主として抗酸化活性に基づくものであることを示唆している。

本研究では、St2001のLDL酸化抑制作用に、菌体内GSHが関与していることを示した(第四章)。本菌は胆汁耐性が弱いことから、経口摂取した菌の大部分は十二指腸で胆汁により溶かされると想定される。その際に菌体内に存在していたGSHが菌体外に放出され、小腸から吸収されて血中に移行し、LDL酸化抑制作用を示すという仮説を考えることができる。GSHは精製品を経口投与しても効率的な血中移行は望めないこと(77)が知られており、リポソームに内包して血中移行率を上昇させる試みなどが報告されている(78)。GSHを始めとする抗酸化物質は、酸化されるとその活性を失うが、生きた菌の細胞内では、その大部分が抗酸化活性を有する還元型に維持されている。したがって、抗酸化効果においても活性型の化合物を失活させずに作用点(血中)まで届けるという点で生きた菌を摂取するメリットが考えられる。St2001は、「リポソーム様作用」または「天然の腸溶性カプセル」とでもいべき作用を示し、GSHの血中移行性を高めているのかもしれない。生菌として摂取した菌が胆汁酸で溶解され、菌体内の低分子抗酸化物質が溶出し、血中移行して生理効果を発揮するという仮説は、これまでのプロバイオティクスの考え方にないユニークなものであり、乳酸菌の作用機作に新たな可能性を提示するものと考えられる。

近年、乳酸菌をプロバイオティクスと位置づけ、その保健効果を訴求することが多くなってきている。プロバイオティクスとは「適切な量を摂取する

ことによって宿主の健康に有益な作用をもたらす生きた微生物」(FAO/WHO、2001)と定義されている。プロバイオティクスについては、整腸作用、免疫調節作用など、多くの保健効果が報告されているが、乳酸菌の抗酸化作用を *in vivo* で検証した報告は少ない。*Streptococcus thermophilus* はヨーグルトなどの食品に古くから使用されてきた発酵乳製造特性や嗜好性に優れた乳酸菌でありながら、消化管内で生存できないと考えられてきたため、プロバイオティクスとしては評価されてこなかった。*S. thermophilus* のヒト糞便からの回収性は他のプロバイオティクスよりも低い。しかし、その一部が回収されることが明らかとなり、本研究も含めて保健効果に関する報告も複数認められるようになってきたため、*S. thermophilus* をプロバイオティクスとして評価しようとする動きもでてきた(94)。摂取した St2001 の大部分は、胆汁酸で溶かされることによって抗酸化活性成分(GSH)が小腸で吸収され、血中移行して LDL の酸化を抑制することが想定される。一方で、小腸を通過して結腸管腔内に到達した一部の菌が結腸粘膜の酸化を防いでいる可能性が考えられる。

以上、本研究においては、生体内で起こる反応を模した *in vitro* スクリーニング系を用いて乳酸菌をスクリーニングし、選抜した乳酸菌 St2001 が *in vivo* においても酸化ストレスを低減して大腸炎の症状や動脈硬化のリスクを低減することを示した。これらの研究成果は、食品成分の機能研究に新たな知見を加え、活性酸素関連疾病予防の新たな可能性を提示すると同時に、プロバイオティクスの研究領域を広げるきっかけになるものと期待している。

## 要旨

人は、酸素呼吸によって生存に必要なエネルギーを獲得しているが、生体内の酸素の一部は活性酸素となり、生体組織を過酸化し、生理機能に障害をもたらす。これが、老化を促進し、がん、炎症、動脈硬化などの種々の疾病のリスクを高めると考えられている。これらの疾病は自覚症状がなく進行してしまうことから、健康な時からの毎日の食事による予防が特に重要である。

乳酸菌は、発酵乳、チーズ、ヨーグルトなどの発酵食品のスターターに用いられ、長い食経験を有する安全な食品素材であると同時に、人の健康に密接に関わっている有益な機能性素材であると考えられている。これまでに、整腸作用、免疫調節作用などに関する報告は数多いが、抗酸化作用に関しては、*in vitro*の研究はいくつか認められるものの *in vivo* 効果に関する報告は不十分である。

本研究では、乳酸菌の中から抗酸化活性の高い菌株をスクリーニングし、その菌株の経口摂取によって、結腸粘膜（第一章、第二章）および LDL の酸化（第三章～第五章）が抑制されることを明らかにした。

脂質の酸化されやすさおよび脂質酸化に対する抗酸化剤の効果の強さは、脂質の存在状態（脂質均質系、ミセル系、脂質二重膜系）によって異なることが知られている。そこで、抗酸化活性を持つ乳酸菌をスクリーニングする際には、生体内での脂質の存在状態を鑑み、細胞膜のモデルであるリン脂質リポソーム（第一章）およびヒト血清 LDL（第三章）を基質に用いて脂質過酸化抑制活性を測定した。選抜した乳酸菌の投与効果は、鉄過剰摂取（第一章）、大腸炎（第二章）、高脂血症（第三章）の各動物モデルで調べた。本菌の LDL 酸化抑制作用には菌体内 GSH が関与していると考えられた（第四章）。さらに、ヒトにおける投与効果をランダム化二重盲検プラセボ対照試験により調べた（第五章）。

### 【第一章】大腸粘膜の酸化傷害を抑制する乳酸菌のスクリーニング

鉄はしばしば不足する栄養素であり、鉄剤等による補給も試みられるが、消化管内の過剰の鉄イオン、特に  $\text{Fe}^{2+}$  イオンは、活性酸素の中でも最も反応性が高いヒドロキシラジカルの産生反応を触媒し、結腸粘膜に酸化傷害をもたらす。 $\text{Fe}^{2+}$  が触媒するリン脂質リポソームの脂質過酸化の抑制活性を指標に乳酸菌 49 株を対象とするスクリーニングを行った結果、*Streptococcus thermophilus* YIT 2001 (St2001) が最も高い阻害活性を示した。鉄過剰摂取 ( $\text{Fe}0.07\%$  飼料) マウスに St2001 を  $0.4\%$  混餌投与 ( $2 \times 10^8$  cfu/mouse/day) して 2 週間飼育したところ、結腸粘膜の過酸化脂質 (TBARS) レベルが低下

した。この時、腸粘膜の過酸化脂質レベルが盲腸内容物の可溶性鉄濃度と相関しなかったことから、腸粘膜における St2001 の抗酸化活性は、脂質過酸化の反応系から  $\text{Fe}^{2+}$  を除去することで生じたものではないことが示唆された。また、鉄の吸収に重要な可溶性鉄の濃度を低下させずに粘膜を酸化傷害から保護できると考えられた。

### 【第二章】大腸炎モデルマウスにおける抗酸化乳酸菌の投与効果

高い抗酸化活性を有する乳酸菌 St2001 と抗酸化活性が低い *S. thermophilus* YIT 2084 (St2084) のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導マウス急性大腸炎に対する予防効果を比較検証した。St2001 投与は、disease activity index (大腸炎症状の指標) および結腸粘膜の過酸化脂質レベルを低下させた。St2001 投与マウスの血中ヘモグロビン濃度およびヘマトクリットは、対照群より高値を示し、大腸炎に伴う貧血が改善されていることが示された。一方、St2084 投与は、これらの効果をもたらさなかった。結腸粘膜ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性および血清アミロイド A (SAA) 濃度には、St2001 投与群、St2084 投与群のいずれにおいても対照群との間に有意差は認められなかった。これらの結果から、St2001 は、好中球の浸潤抑制ではなく、好中球が産生した活性酸素を消去し、組織の酸化傷害を抑制する作用によって大腸炎症状を改善することが示唆された。

### 【第三章】食餌性高脂血症モデルにおける大動脈壁脂質沈着病変の乳酸菌による抑制

高脂血症のモデルである高脂肪・高コレステロール食摂取ハムスターを用いて、LDL 酸化抵抗性 (酸化抑制能の指標) および大動脈脂質沈着病変 (動脈硬化の初期病変) 形成に対する乳酸菌 St2001 の投与効果を調べた。79 株の乳酸菌・ビフィズス菌を対象に *in vitro* で LDL 酸化抵抗性を増強する菌をスクリーニングしたところ、St2001 が最も高い活性を示し、St2084 の *in vitro* 活性はその半分ほどであった。高脂肪・高コレステロール食摂取ハムスターを用いた動物試験の結果、St2001 投与群の LDL 酸化ラグタイム (LDL 酸化抵抗性の指標) は対照群に比べて有意に延長されたが、St2084 投与群では変化がなかった。St2001 の投与量依存的に LDL 酸化ラグタイムが延長し、大動脈弓の脂質沈着病変面積が減少した。一方、血漿中のコレステロールおよびトリグリセライド濃度には菌の投与による変化は認められなかった。これらの結果から St2001 は LDL 酸化の抑制を介して、大動脈の脂質沈着病変の形成を抑制することが示唆された。

#### 【第四章】*S. thermophilus* YIT 2001 の LDL 酸化抑制活性に係る活性本体の同定

St2001 の LDL 酸化抑制活性にかかわる主たる抗酸化物質を同定するために、菌体抽出物を逆相カラムで分画した活性画分を HPLC-ESI-MS で分析したところ、主要な活性画分には GSH の存在が認められた。GSH 標準品は、*in vitro* で LDL 酸化抵抗性を濃度依存的に改善した。チオール基を誘導体化することにより GSH の活性は消失し、St2001 菌体抽出物を同様にチオール誘導体化処理することにより活性はほぼ半減し、GSH をほとんど含まない他の *S. thermophilus* と同等となった。菌体抽出物中のチオール化合物の約 8 割が GSH であった。以上より、St2001 の LDL 酸化抑制（LDL 酸化抵抗性改善）活性には菌体内 GSH が関与していると考えられた。

#### 【第五章】*S. thermophilus* YIT 2001 発酵乳がヒトの血中酸化 LDL および血圧にもたらす影響

LDL-コレステロール、酸化 LDL (MAD-LDL)、MDA-LDL/LDL-コレステロール、高血圧は心血管疾患の有用なリスク指標である。抗酸化活性を有する乳酸菌 St2001 で調製した発酵乳が健常者または軽度の高 LDL-コレステロール血症者に有益な作用をもたらすか否かをランダム化二重盲検プラセボ対照試験により調べた。29 名および 30 名の被験者（平均 LDL-コレステロール 140 mg/dL）は、それぞれ St2001 発酵乳およびプラセボ（未発酵乳）を 1 日 1 回 12 週間摂取した。サンプル摂取前（baseline）、摂取 4 週間目、8 週間目、12 週間目に測定した血清 MDA-LDL、総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセライド、血圧を ANCOVA（摂取前値を共変量とした共分散分析）で統計解析した。サンプル摂取期間中、St2001 発酵乳群の MDA-LDL、MDA-LDL/LDL-コレステロール、収縮期血圧はプラセボ群に比べて有意に低下した。血清の総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセライドには群間差は認められなかった。

層別解析の結果、摂取前の MDA-LDL（酸化ストレス指標）が中央値（65 U/L）以上の場合、St2001 発酵乳群の MDA-LDL、MDA-LDL/LDL-コレステロール、収縮期血圧、拡張期血圧はプラセボ群に比べて有意に低下した。一方、中央値未満の場合は、これらの低下は認められなかった。このことから、酸化ストレスが高い状態にある場合は St2001 発酵乳の飲用により状態が改善され、酸化ストレスが低い望ましい状態にある場合はその状態が維持されることが考えられる。また、血圧低下の機作にも St2001 の抗酸化作用が関与していることが示唆される。

以上の試験結果から、St2001 発酵乳の日常的な摂取が健常者および軽度高 LDL-コレステロール血症者に酸化ストレスマーカーおよび心血管疾患のリスクマーカー値の低減という有益な作用をもたらす可能性が示された。

以上、本研究で選択した乳酸菌 St2001 を食品として継続摂取することにより、活性酸素関連疾患のリスクを副作用の心配なく低減できる可能性が考えられた。*S. thermophilus* は、ヨーグルトなどの食品に古くから使用されてきた発酵乳製造特性や嗜好性に優れた乳酸菌でありながら、消化管内で生存できないと考えられてきたため、これまでプロバイオティクスとしては評価されてこなかった。本研究は、その *S. thermophilus* がヒトの健康に寄与しうることを示した点、および乳酸菌が抗酸化食品素材としても有望であることをヒトやモデル動物を用いて多角的に示した点に新規性がある。これらの研究成果は、食品成分の機能研究に新たな知見を加え、活性酸素関連疾病予防の新たな可能性を提示すると同時に、プロバイオティクスの研究領域を広げるきっかけになるものと期待している。

## 引用文献

- 1) 藤田直. 活性酸素、過酸化脂質、フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの生物学的作用. 薬学雑誌 2002; 122: 203-218.
- 2) 吉川敏一、内藤裕二、近藤元治. フリーラジカルとは. 『フリーラジカルと和漢薬 (奥田拓男、吉川敏一 編)』. 国際医書出版 1990; pp11-16.
- 3) 内田浩二. 活性酸素による脂質過酸化と蛋白質変性: 酸化ストレス産物および酸化ストレス源としての反応性アルデヒド. Jpn J Electroph 2000; 44: 265-269.
- 4) 二木鋭雄. 生体の酸化的傷害とそれに対する防御システム. 『抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御— (二木鋭雄、島崎弘幸、美濃真 編)』. 学会出版センター 1994; pp3-15.
- 5) 江口裕伸、藤原範子、大河原知水、鈴木敬一郎、谷口直之. 酸化ストレスと健康. 生体試料分析 2009; 32: 247-256.
- 6) 佐々木 徹. 自然老化動物を用いた酸化ストレスの解析と抗老化研究. 薬学雑誌 2010; 130: 29-42
- 7) Steinberg D. Low density Lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J Biol Chem 1997; 272: 20963-20966
- 8) Niki E. Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited. J Clin Biochem Nutr 2011; 48: 3-7.
- 9) González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. World Journal of Cardiology 2014; 6: 353-366.
- 10) 宮下和夫. 脂肪酸、リン脂質の水溶液中での劣化. 『脂質栄養と脂質過酸化—生体内脂質過酸化は傷害か防御か— (奥山治美、菊川清見 編)』. 学会出版センター 1998; pp85-94.
- 11) Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H, Suzuki Y. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. J Dairy Sci 1993; 76: 2493-2499.
- 12) Ahothpa M, Saxelin M, Korpela R. Antioxidative properties of Lactobacillus GG. Nutr Today Suppl 1977; 31: 51S-52S.
- 13) Lin MY, Yen CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. J Agric Food Chem 1999; 47: 1460-1466.
- 14) Lin MY, Yen CL. Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. J Dairy Sci 1999; 82:

1629-1634.

- 15) Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1617-1622.
- 16) Stecchini ML, Torre MD, Munari M. Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 2001; 64: 183-188.
- 17) 吉野芳夫、折茂英生、平井幸彦、久安早苗、佐藤久美子. 鉄. 『ミネラル・微量元素の栄養学(鈴木継美、和田攻 編)』. 第一出版 1994: pp351-376.
- 18) Younes M, Trepkau HD, Siegers CP. Enhancement by dietary iron of lipid peroxidation in mouse colon. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1990; 70: 349-354.
- 19) Porres JM, Sathl CH, Chang WH, Fu Y, Roneker KR, Pond WG, Lei XG. Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 221: 80-86.
- 20) Ito M, Sawada H, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Watanabe T, Yokokura T. Suppressive effects of bifidobacteria on lipid peroxidation in the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1583-1589.
- 21) Knekt P, Reunanen A, Takkunen H, Aromaa A, Heliovaara M, Hakulinen T. Body iron stores and risk of cancer. *Int J Cancer* 1994; 56: 379-382.
- 22) Nelson RL. Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 161-168.
- 23) Siegers CP, Bumann D, Baretton G, Younes M. Dietary iron enhances the tumor rate in dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1988; 41: 251-156.
- 24) Wurzelmann JI., Silver A, Schreinemachers DM, Sandler RS, Everson RB. Iron intake and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1996; 5: 503-507.
- 25) Babbs CF. Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 191-200.
- 26) Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 169-181.
- 27) Porres JM, Stahl CH, Cheng WH, Fu Y, Roneker KR, Pond WG, Lei XG.

- Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 221: 80-86
- 28) Miyazaki K, Matsuzaki T. Health properties of milk fermented with *Lactobacillus casei* strain Shirota (LcS). In: Farnworth ER (ed). *Handbook of fermented functional foods*. CRC Press. 2008; pp165-208.
  - 29) American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1977; 107: 1340-1348.
  - 30) Stone WL, Papas AM. Tocopherols and the etiology of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1006-1014.
  - 31) Kot E, Furmanov S, Bezkorovainy A. Accumulation of iron in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Food Sci* 1995; 60: 547-550.
  - 32) Hallberg L, Brune M, Rossander L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 140-144.
  - 33) Pallauf J, Pippig S, Most E, Rimbach G. Supplemental sodium phytate and microbial phytate influence iron availability in growing rats. *J Trace Elem Med Biol* 1999; 13: 134-140.
  - 34) Sawa T, Akaike T, Kida K, Fukushima Y, Takagi K, Maeda H. Lipid peroxy radicals from oxidized oils and heme-iron: Implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1998; 7: 1007-1012.
  - 35) McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Inves.* 1996; 98: 136-141.
  - 36) Pearson DC, Jourd'heuil D, Meddings JB. The anti-oxidant properties of 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 367-373.
  - 37) Araki Y, Sugihara H, Hattori T. The free radical scavengers edaravone and tempol suppress experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mo. Med* 2006; 17: 331-334.
  - 38) Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, Van Someren RNM, Blake DR, Rampton DS. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 186-196.
  - 39) Sedghi S, Fields JZ, Klamut M, Urban G, Durkin M, Winship D,

- Fretland D, Olyae M, Keshavarzian A. Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34: 1191-1197.
- 40) Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R., A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98, 694-702 (1990)
- 41) Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats – clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1458-1475.
- 42) Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJS. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 297-304.
- 43) Jiao Q, Liu Q. Simple spectrophotometric method for the estimation of algal polysaccharide concentrations. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 996-998.
- 44) Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69: 238-249.
- 45) Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assesment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350.
- 46) Han W, Mercenier A, Ait-Belgnaoui A, Pavan S, Lamine F, van Swan II, Kleerebezem M, Salvador-Cartier C, Hisberguers M, Bueno L, Theodorou V, Fioramonti J. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1044-1052.
- 47) Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Bárcena JM, Klaenhammer TR, Hassan HM, Threadgill DS. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G729-G738.
- 48) Iwai A, Iwashita E. Changes in colonic inflammation induced by dextran sulfate sodium (DSS) during short- and long-term

- administration of Rebamipide. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 143S-147S.
- 49) Gonzalez R, de Sanchez MF, Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Duarte J, Zarzuelo A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. *Int J Vitam Nutr Res* 2001; 71: 243-250.
  - 50) Adhdassi E, Carrier J, Cullen J, Tischler M, Allard JP. Effect of iron supplementation on oxidative stress and intestinal inflammation in rats with acute colitis. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1088-1094.
  - 51) Fruebis J, Silvestre M, Shelton D, Napoli C, Palinski W. Inhibition of VCAM-1 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce early atherosclerosis in NZW rabbits. *J Lipid Res* 1999; 40: 1958-1966.
  - 52) Miyazaki K, Makino K, Iwadate E, Deguchi Y, Ishikawa F. Anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki suppress the development of atherosclerotic lesions and both enhancements of oxidative stress and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 11485-11492.
  - 53) Ling WH, Wang LL, Ma J. Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status. *J Nutri* 2002; 132: 20-26
  - 54) Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 2001; 156: 67-72.
  - 55) Xu R, Yokoyama WH, Irving D, Rein D, Walzem RL, German JB. Effect of dietary catechin and vitamin E on aortic fatty streak accumulation in hypercholesterolemic hamsters. *Atherosclerosis* 1998; 137: 29-36.
  - 56) Aoki T, Abe T, Yamada E, Matsuto T, Okada M. Increased LDL susceptibility to oxidation accelerates future carotid artery atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 2012; 11: 4.
  - 57) Hendrickson A, McKinstry LA, Lewis JK, Lum J, Louie A, Schellenberg GD, Hatsukami TS, Chait A, Jarvik GP. Ex vivo measures of LDL oxidative susceptibility predict carotid artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 179: 147-153.
  - 58) Regnström J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein and coronary atherosclerosis

- in man. *Lancet* 1992, 339: 1183-1186
- 59) Spady DK, Dietschy JM. Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4526-4530.
  - 60) Srivastava R A, He S. Anti-hyperlipidemic and insulin sensitizing activities of fenofibrate reduces aortic lipid deposition in hyperlipidemic Golden Syrian hamster. *Mol Cell Biochem* 2010; 345: 197-206.
  - 61) Asami Y, Yamagishi I, Akiyoshi K, Tomoike H, Tsuchida K, Higuchi S. Inhibitory effect of TS-962 on the formation of early atherosclerotic lesions in high fat-fed hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis* 1999; 146: 237-242.
  - 62) Auger C, Caporiccio B, Landrault N, Teissedre PL, Laurent C, Cros G, Besancon P, Rouanet JM. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Nutr* 2002; 132: 1207-1213.
  - 63) Nistor AN, Bulla A, Filip DA, Radu A. The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1987; 68: 159-173.
  - 64) Kano M, Takayanagi T, Harada K, Makino K, Ishikawa F, 2005. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 979-988.
  - 65) Hirano R, Kondo K, Iwamoto T, Igarashi O, Itakura H. Effects of antioxidants on the oxidative susceptibility of low-density lipoprotein. *J Nutri Sci Vitaminol* 1997; 43: 435-444.
  - 66) Asami Y, Yamagishi I, Akiyoshi K, Tomoike H, Tsuchida K, Higuchi S. Inhibitory effect of TS-962 on the formation of early atherosclerotic lesions in high fat-fed hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis* 1999; 146: 237-242.
  - 67) Keidar S, Kaplan M, Shapira C, Brook JG, Aviram M. Low density lipoprotein isolated from patients with essential hypertension exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis* 1994; 107: 71-84.

- 68) Lavy A, Brook GJ, Dankner G, Ben-Amotz A, Aviram M. Enhanced in vitro oxidation of plasma lipoproteins derived from hypercholesterolemic patients. *Metabolism* 1991; 40: 794-799.
- 69) Scheffler E, Huber L, Fruhbis J, Schulz I, Ziegler R, Dresel HA. Alteration of plasma low density lipoprotein from smokers. *Atherosclerosis* 1990; 82: 261-265.
- 70) Yoshida H, Ishikawa T, Nakamura H. Vitamin E/lipid peroxide ratio and susceptibility of LDL to oxidative modification in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1438-1446.
- 71) Terahara M, Kurama S, Takemoto N. Prevention by lactic acid bacteria of the oxidation of human LDL. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 1864-1868.
- 72) Mater DDG, Bretigny L, Firmesse O, Flores MJ, Mogenet A, Bresson JL, Corthier G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 250: 185-187.
- 73) Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld, JHJ. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1031-1037.
- 74) Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.
- 75) 東胤昭. システインの貯蔵型（輸送型）としての肝臓グルタチオン. *栄養と食糧* 1980; 33(4): 203-218.
- 76) McMenamin ME, Himmelfarb J, Nolin TD. Simultaneous analysis of multiple aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2009; 877: 3274-3281.
- 77) Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH. The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43: 667-669.
- 78) Lauver DA, Kaissarian NM, Lucchesi BR. Oral pretreatment with liposomal glutathione attenuates reperfusion injury in rabbit isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013; 61: 233-239.

- 79) Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998; 98: 1487-1494.
- 80) Kametsu Y, Kitagawa Y, Sekiyama S, Takagi S. Increase in plasma malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in patients with atherothrombotic cerebral infraction. *The Tokai J Exp Clin Med* 2005; 30: 171-176.
- 81) Tanaga K, Bujo H, Inoue M, Mikami K, Kotani K, Takahashi K, Kanno T, Saito Y. Increased circulating malondialdehyde-modified LDL levels in patients with coronary artery diseases and their association with peak sizes of LDL particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 662-666.
- 82) Matsuo Y, Tubo T, Okumoto Y, Ishibashi K, Komukai K, Tanimoto T, Ino Y, Kitabata H, Hirata K, Imanishi T, Akagi H, Akasaka T. Circulating malondialdehyde-modified low-density lipoprotein levels are associated with the presence of thin-cap fibroatheromas determined by optical coherence tomography in coronary artery disease. *Euro Heart J Cardiovasc Imaging* 2013; 14: 43-50.
- 83) Tajika K, Okamatsu K, Takano M, Inami S, Yamamoto M, Murakami D, Kobayashi N, Ohba T, Hata N, Seino Y, Mizuno K. Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein is a useful marker to identify patients with vulnerable plaque. *Circulation J* 2012; 76: 2211-2217.
- 84) Fujihara K, Suzuki H, Sato A, Kodama S, Heianza Y, Saito K, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Yagyu H, Sone H, Shimano H. Circulating malondialdehyde-modified LDL-related variables and coronary artery stenosis in asymptomatic patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Res* 2015: article ID 507245.
- 85) Ono M, Takabe N, Oda T, Nakagawa R, Matsui M, Sasai T, Nagasawa K, Honma H, Kajiwara T, Taneichi H, Takahashi Y, Takahashi K, Satoh J. Association of coronary artery calcification with MDA-LDL/LDL-C and urinary 8-isoprostane in Japanese patients with type 2 diabetes. *Intern Med* 2014; 53: 391-396.
- 86) Kotani K, Maekawa M, Kanno T, Kondo A, Toda N, Manabe M. Distribution of immunoreactive malondialdehyde-modified low-

- density lipoprotein in human serum. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215: 121-125.
- 87) Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi H, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. Diagnostic criteria of dyslipidemia. Executive summary of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan – 2012 version. *J Atheroscler Thromb* 2012; 20: 655-660.
- 88) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult treatment panel III). *J Am Med Assoc* 2001; 285: 2486-2497.
- 89) Fujiyoshi A, Ohkubo T, Miura K, Murakami Y, Nagasawa S, Okamura T, Ueshima H, for the Evidence for Cardiovascular Prevention from Observational Cohorts in Japan (EPOCH-JAPAN) Research Group. Blood pressure categories and long-term risk of cardiovascular disease according to age group in Japanese men and women. *Hypertens Res* 2012; 35: 947-953.
- 90) Miura K, Nakagawa H, Ohashi Y, Harada A, Taguri M, Kushiro T, Takahashi A, Nishinaga M, Soejima H, Ueshima H for the Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study (JALS) group. Four blood pressure indexes and the risk of stroke and myocardial infarction in Japanese men and women: A meta-analysis of 16 cohort studies. *Circulation* 2009; 119: 1892-1898.
- 91) Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova AF, Vallejo-Córdova B. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *J Dairy Sci* 2016; 99: 4099-4110.
- 92) Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346: 1954-1962.
- 93) Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 247-258.

- 94) Uriot O, Denis S, Junjua M, Roussel Y, Dary-Mourot A, Blanquet-Diot S. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? *J Funct Foods* 2017; 37: 74-89.

## 公表論文一覧

本学位論文は、以下の公表論文の内容に基づくものである。

第一章 : Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Sawada H. Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4456-4460.

Reproduced with permission from *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4456-4460. DOI; 10.1021/jf0261957. Copyright 2003 American Chemical Society.

第二章 : Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Okumura T, Sato T, Yokoi W, Sawada H. Preventive effect of *Streptococcus thermophilus* YIT 2001 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Biosci Biothechnol Biochem* 2008; 72: 2543-2547.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry is available online at: [www.tandfonline.com/Article](http://www.tandfonline.com/Article) DOI; 10.1271/bbb.80240. Copyright 2008 Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry.

第三章 : Ito M, Oishi K, Yoshida Y, Okumura T, Sato T, Naito E, Yokoi W, Sawada H. Effect of lactic acid bacteria on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and aortic fatty lesion formation in hyperlipidemic hamsters. *Benef Microbes* 2015; 6: 287-293.

The original publication is available at DOI; 10.3920/BM2014.0040. Copyright 2015 Wageningen Academic Publishers.

第四章 : Kusuhara S, Ito M, Sato T, Yokoi W, Yamamoto Y, Harada K, Ikemura H, Miyazaki K. Intracellular GSH of *Streptococcus thermophilus* shows anti-oxidative activity against low-density lipoprotein oxidation in vitro and in a hyperlipidaemic hamster model. *Benef Microbes* 2018; 9: 143-151.

The original publication is available at DOI; 10.3920/BM2017.0065. Copyright 2017 Wageningen Academic Publishers.

第五章 : Ito M, Kusuhara S, Yokoi W, Sato T, Ishiki H, Miida S, Matsui A, Nakamori K, Nonaka C, Miyazaki K. *Streptococcus thermophilus* fermented milk reduces serum MDA-LDL and blood pressure in healthy

and mildly hypercholesterolaemic adults. *Benef Microbes* 2017; 8: 171-178.

The original publication is available at DOI; [10.3920/BM2016.0102](https://doi.org/10.3920/BM2016.0102).  
Copyright 2017 Wageningen Academic Publishers.

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始、ご指導、ご協力を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 食の安全研究センター 免疫制御研究室 准教授 八村敏志博士に心より感謝し、厚くお礼申し上げます。

本研究は、主に株式会社ヤクルト本社中央研究所で行われたものであり、本研究をご指導、ご支援くださいました中央研究所長 石川文保博士、副所長 南野昌信博士、ならびに元所長の澤田治司博士、田中隆一郎博士、横倉輝男博士に深謝いたします。本研究の遂行にあたりご指導、ご協力くださいました株式会社ヤクルト本社中央研究所 宮崎幸司博士に深謝いたします。

本研究は、株式会社ヤクルト本社中央研究所 池村治夫博士、原田勝寿氏、大石憲司博士、吉田康人氏、奥村剛一博士、佐藤直博士、内藤栄一郎氏、槇洸博士、楠原史朗氏、横井稚恵氏、山本悠氏および株式会社ヤクルト本社開発部 野中千秋氏、松井彰久氏、石木広志氏（現国際部）、中森一樹氏、三井田聡司氏のご協力なくしては成しえなかったものであり、深く感謝いたします。本研究は株式会社ヤクルト本社中央研究所 安全性研究所、分析試験研究所など多くの部署のご協力をいただいで進められたものであり、厚くお礼申し上げます。また、ヒト試験の被験者の皆様および被験者管理・試験実施にご協力いただきました株式会社 TTC 飯塚宗秋氏ならびに同社のスタッフの皆様へ感謝いたします。

これまでの研究生活において、多くの先輩および同僚の方々に様々なご支援をいただきました。お世話になりながらもここにお名前を挙げる事ができなかった多くの方々に、心からお礼申し上げます。

最後に、心の支えとなってくれた家族に感謝します。

2018年9月