

論文の内容の要旨

論文題目： 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

氏名： 伊藤雅彦

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）および低比重リポタンパク質（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の還元型グルタチオン（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 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。 Fe^{2+} が触媒するリン脂質リポソームの脂質過酸化反応の阻害活性を

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 (Fe0.07%飼料) マウスに St2001 を 0.4%混餌投与 (2×10^8 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 (チオバルビツール酸反応性物質) 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 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活性および血清アミロイド A 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装置 (HPLC-ESI-MS) で分析したところ、主要な活性画分に 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が、チオール基を誘導体化することにより GSH の活性は消失した。St2001 菌体抽出物を同様にチオール誘導体化処理すると活性はほぼ半減し、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 (マロンジアルデヒド修飾 LDL)、酸化 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酸化 LDL、総コレステロール、LDL-コレステロール、高比重リポタンパク質 (HDL) -コレステロール、トリグリセライド、血圧について、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 発酵乳群の酸化 LDL、酸化 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、摂取前の酸化 LDL (酸化ストレス指標) が中央値 (65 U/L) 以上の場合、St2001 発酵乳群の酸化 LDL、酸化 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。