

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500810

研究課題名（和文） 豆乳の乳酸菌発酵生産物が含有する生理活性物質の解析

研究課題名（英文） Analysis of the bioactive substances contained in the lactic acid bacteria-metabolic products from soybean milk

研究代表者

榑原 隆三（SAKAKIBARA RYUZO）

長崎国際大学薬学部生化学研究室・教授

研究者番号：30127229

研究成果の概要（和文）：本研究では、豆乳の乳酸菌発酵物 PS-B1 が示すガン細胞増殖抑制作用および肝保全作用について、その特性を検討した。PS-B1 を作用させたヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 では、細胞内活性酸素の増大を介したアポトーシスが誘導され、細胞増殖が抑制されることが示唆された。また、ラット肝細胞および肝星細胞を用いて構築したアルコール性肝障害モデルに対する PS-B1 投与実験の結果、PS-B1 が肝細胞の変性・壊死を阻止し、肝星細胞のコラーゲン産生能を抑制することが判明した。さらに、ウイルス感染や薬剤服用を原因とする肝障害モデルに対しても、活性酸素種量レベルの制御を介した有意な肝保全作用が実証された。

研究成果の概要（英文）：PS-B1 is fermented products cultivated from soybean milk using lactic acid bacteria. We found that PS-B1 inhibited significantly the growth of human leukemia HL-60 cells by the induction of apoptosis and the increase of the intracellular reactive oxygen species was important for apoptosis. In the experiments using the alcoholic injury liver model constructed by using rat hepatocytes and hepatic stellate cells, PS-B1 inhibited the necrosis of hepatocytes and suppressed the production of the collagen in hepatic stellate cells. PS-B1 also indicated the liver preservation action against the viral and drug-induced injury liver model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：バイオジェニックス・乳酸菌・生理活性・ガン・発酵・肝炎・食品

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌発酵製品の摂取による保健効果の検証やより機能的な製品の開発が古くから脚光を浴び、今日までに世界中で多大な成果が蓄積されてきた。メタボリックシンドロームや生活習慣病への対処法が社会的問題と

して急激に求められるようになった昨今では、乳酸菌発酵製品を取り巻く環境も様変わりしてきている。すなわち、予防医学やバイオジェニックスの観点から、学識や市場の関心は、集合体としての乳酸菌発酵製品から、それを構成する一つ一つの機能性分子（乳酸

菌代謝生産物質)へと徐々にシフトしてきている。

しかしながら、血圧降下作用をはじめとする一部の機能性成分を除き、乳酸菌代謝生産物質が含有する機能性成分を明確に同定し、作用機序の解明を図る生化学的・薬理学的研究は未だ十分に掘り下げられていないのが現状である。乳酸菌代謝生産物質は、学術的には言わば「未知物質の宝庫」のままである。

我々の研究グループにおいても、「食を介した健康増進・疾病予防への貢献」を命題として研究を推進する中で、乳酸菌代謝生産物質の有用性に早くから着目していた。ヒト常在乳酸菌 (*Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属) を中心とした3段階の複合培養から調製した豆乳の新規乳酸菌発酵物 PS-B1 が示す有用作用を解析し、その“バイオジェニックス”としての可能性を明らかにする「乳酸菌生産物質プロジェクト」に取り組んでいる。本プロジェクト研究は「予防医学」の観点から発案しており、PS-B1 の摂取や投与によってもたらされる保健効果の理解はもとより、その作用機序を解明し、PS-B1 のバイオジェニックスとしての可能性を検討するものである。

## 2. 研究の目的

PS-B1 が示す生理作用として、ガン細胞増殖抑制作用および肝保全作用(肝細胞保護作用および肝星細胞コラーゲン産出抑制作用)を見出した。本研究では、この PS-B1 が有する稀有な生理活性の特性を把握し、その作用機序を分子レベルで解明することを第一の目的とする。第二に、PS-B1 中より生理活性の本質となる生理活性物質を新たに精製・同定し、構造を決定する。

## 3. 研究の方法

PS-B1 が正常細胞に対して有意な悪影響を及ぼさずに、幅広いガン細胞増殖抑制スペクトルを示すことを明らかにした。そこで、PS-B1 を作用させたヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を対象とした分光学的解析から、アポトーシスの誘導に焦点を絞ってその作用機序の解明を図った。すなわち、カスパーゼ阻害剤存在下における PS-B1 のガン細胞増殖抑制作用を測定するとともに、細胞内活性酸素種および還元型・酸化型グルタチオンの定量、アポトーシス誘導ミトコンドリアおよびゲノム DNA の断片化を検出した。

また、ヒトを対象に PS-B1 の服用試験(50 ml/日、4週間)を実施し、臨床検査値の変化を検討した。ラット肝より調製した初代培養肝細胞および肝星細胞を用いてアルコール性肝障害モデルを構築し、PS-B1 添加実験を行った。エタノール感作による肝細胞の壊死および免疫染色法による肝星細胞のコラー

ゲン産生量を指標に、PS-B1 の肝保全作用を評価した。同様に構築したウイルス性肝障害および薬剤性肝障害のモデルに対しても、PS-B1 の影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ガン細胞増殖抑制作用

HL-60 細胞を PS-B1 存在下で4時間培養した場合、PS-B1 は濃度依存的に HL-60 細胞の増殖を抑制した(図1)。一方、培養液中へのカスパーゼ阻害剤の添加により、PS-B1 が示すガン細胞増殖抑制作用が有意に解除された(図2)ことから、PS-B1 が HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導していることが示唆された。そこで、PS-B1 によってもたらされる HL-60 細胞の細胞内変化を理解するため、PS-B1 を作用させた HL-60 細胞を用いて分光学的解析を中心とした以下の実験を行った。その結果、①HL-60 細胞内の活性酸素種 ( $H_2O_2$ ) を DCFH 法に従って定量したところ、HL-60 細胞内に取り込まれた PS-B1 中の成分の影響により細胞内活性酸素種量が異常に増大していたこと(図3)、②網羅的メタボローム解析から、おそらく増大した細胞内活性酸素種の影響を受けて還元型グルタチオンレベルが顕著に低下していたこと(図4)、③蛍光色素 JC-1 の細胞質への局在に起因する蛍光強度の解析から、還元型グルタチオンの消去能を越えた過剰の細胞内活性酸素種が、シトクロム c 等の放出を伴うミトコンドリアの不活化(膜電位の低下)を引き起こしたこと(図5)、④アポトーシスの初期段階で機能するイニシエーター型カスパーゼ (-2、-8、-9) が活性化されており、それらに続いて機能するエフェクター型カスパーゼ (-3) の活性も顕著に増大していたこと(図6)、⑤抽出したゲノム DNA をアガロース電気泳動に供したところ、DNA の断片化が起こっていたこと(図7)、が判明した。これらのことが要因となり、HL-60 細胞がアポトーシスに至ったと推察された。

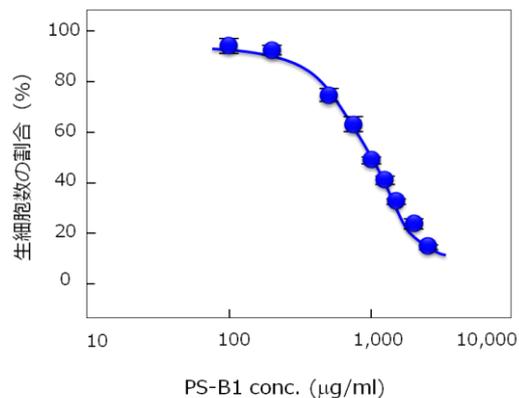


図1. HL-60細胞の増殖に対するPS-B1の濃度依存曲線

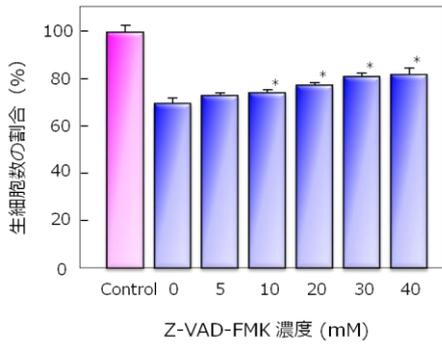


図2. カスパーゼ阻害剤で処理したHL-60細胞の増殖に対するPS-B1の影響

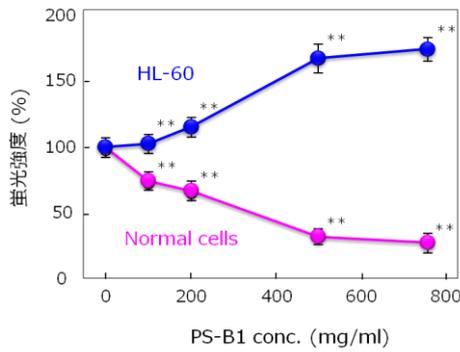


図3. HL-60細胞内活性酸素種 (ROS) レベルに対するPS-B1の影響

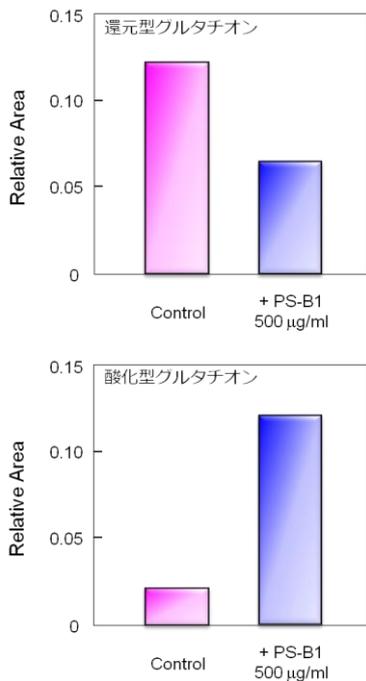


図4. PS-B1による還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン量への影響

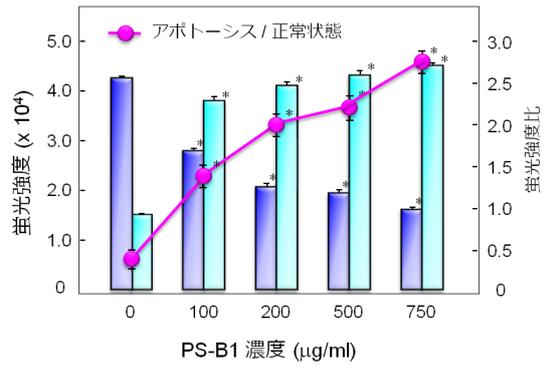


図5. HL-60細胞のミトコンドリア膜電位に対するPS-B1の影響

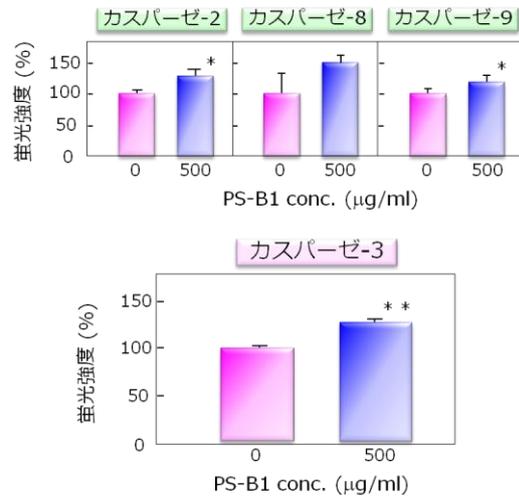


図6. HL-60細胞のカスパーゼ活性に対するPS-B1の影響

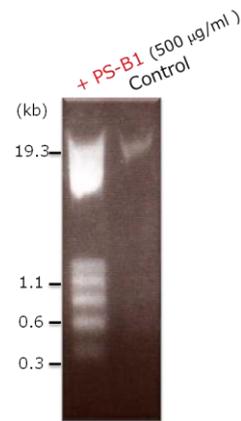


図7. PS-B1によるHL-60細胞のDNAの断片化

(2) 肝保全作用

ヒトを対象とした PS-B1 の服用試験において、肝機能の状態を示す臨床検査値の多くが改善することを明らかにした。特に AST、ALT、および  $\gamma$ -GTP の各値が顕著に減少しており (図 8)、PS-B1 が肝障害に対して肝保全的に

機能することが示唆された。そこで、ラット肝細胞および肝星細胞を用いてPS-B1の肝保全作用を評価するためのアルコール性肝障害モデルを構築し、これらに対するPS-B1添加実験を行った。その結果、①PS-B1には肝障害への第1段階となる肝細胞の変性・壊死を阻止する作用があること(図9)、②肝障害への第2段階である肝星細胞のコラーゲン産生(線維化)能を強力に抑制すること(図10)、③予防効果を期待してエタノール感作の2時間前に肝星細胞に対してPS-B1を作用させると、コラーゲン産生抑制作用が顕著に増大すること(図11)、が判明した。一般に、肝細胞の変性・壊死や肝星細胞のコラーゲン産生を亢進させる主な原因の一つに活性酸素種量レベルの上昇が挙げられることから、PS-B1が含有するポリフェノール類がアルコール性肝障害モデルに対して効果的に作用した可能性が示唆された。一方、ウイルス感染や薬剤服用を原因とする肝障害モデルを同様に構築し、これらに対するPS-B1の影響を検討した結果、両肝障害モデルにおいても活性酸素種量レベルの制御を介した有意な肝保全作用が実証された(図12-14)。さらに、PS-B1含有飼料を摂取させた正常ラットの肝臓においては、コラーゲン合成量が低下していることも明らかになった。

### (3) 今後の展開

PS-B1がHL-60細胞に対してアポトーシスを誘導する際に鍵となる細胞内活性酸素種の増大メカニズムが不明のため、これを明らかにする。また、PS-B1が示すガン細胞増殖抑制作用の作用機序としては、今回検討したアポトーシスの誘導の他に、細胞周期の異常(停止)や解糖系の不活化等が挙げられる。そこで、PS-B1を作用させたHL-60細胞を用いて、これらの細胞内イベントが生じてい

る可能性を追求する。さらに、PS-B1が示す多様な有用作用について、その有用作用の本質となる生理活性物質の探索研究に取り組みとともに、新たに得られた知見に基づいた多面的かつ包括的な作用機序の解明を図る。

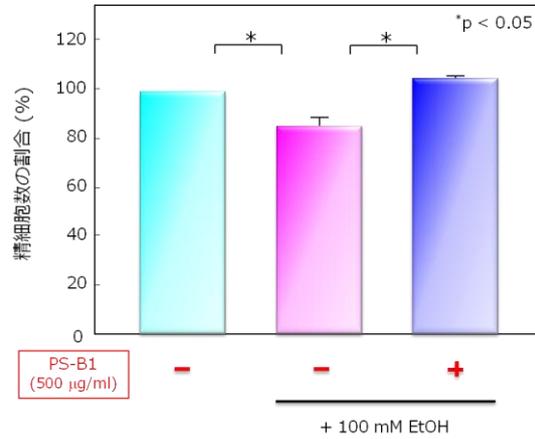


図9. EtOH処理によって肝細胞に誘導される壊死に対するPS-B1の影響

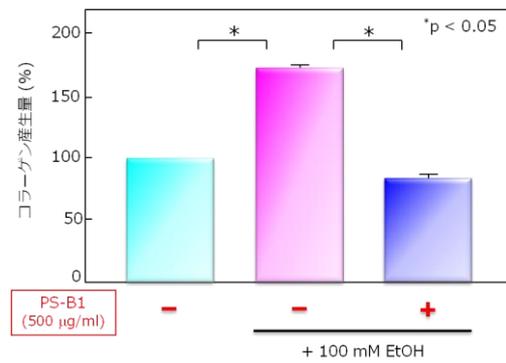


図10. EtOH処理によって誘導される肝星細胞のコラーゲン産生に対するPS-B1の影響

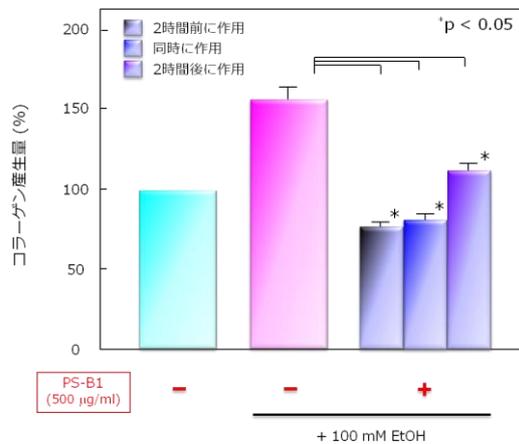


図11. EtOH処理によって誘導される肝星細胞のコラーゲン産生に対するPS-B1の作用時間の影響

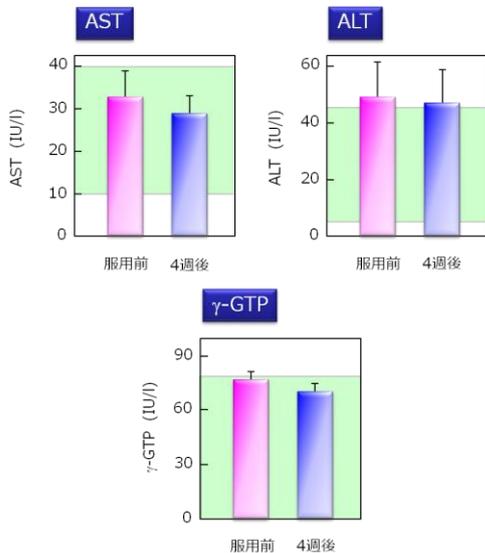


図8. PS-B1服用試験における臨床検査値の変化

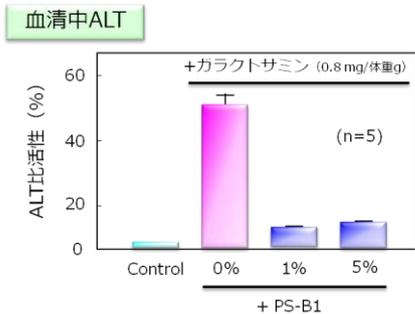
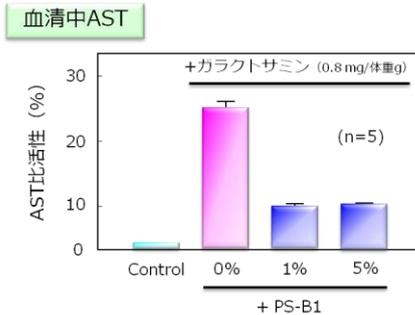


図12. PS-B1のウイルス性肝障害モデルに対する影響

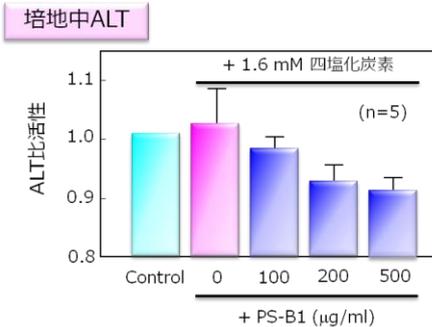
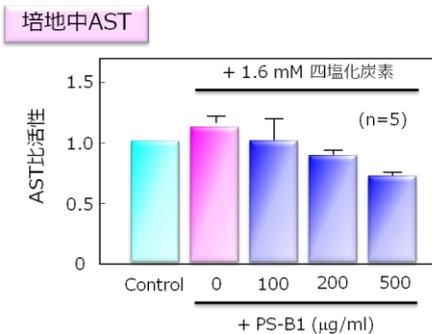


図13. PS-B1の薬剤性肝障害に対する影響

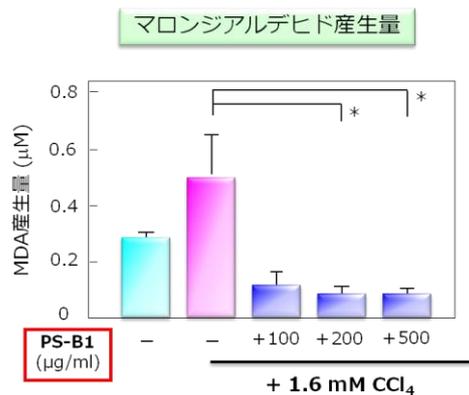
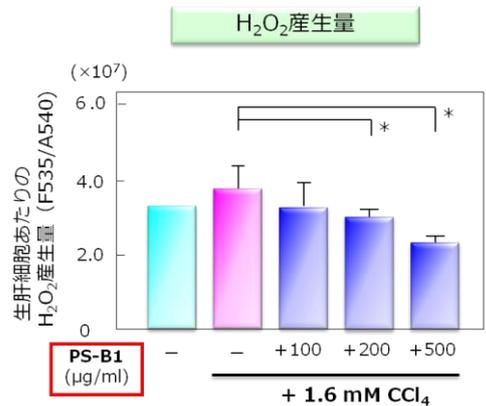


図14. PS-B1による細胞内活性酸素種産生量への影響

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- 野嶽勇一, 松本周三, 晦日房和, 玉屋圭, 深澤昌史, 河村俊哉, 榊原隆三  
長崎県内資源を活用した新規乳酸菌発酵食品開発のための高機能性植物性乳酸菌のスクリーニング  
日本食生活学会誌, **23**, 1-6 (2012).
- 石橋源次, 宮崎美絵, 本多英俊, 榊原隆三  
アルコール投与されたラットのアルコール濃度に及ぼす乳酸菌産生物質 (PS-B1) 摂取の影響  
九州共立大学総合研究所紀要, **5**, 55-58 (2012).  
<http://www.lib.kyukyo-u.ac.jp/kiyosoken5.pdf>
- 野嶽勇一, 深澤昌史, 荒川正幸, 榊原隆三  
乳酸菌代謝産物 PS-B1 における肝機能および脂質代謝改善作用について  
日本食生活学会誌, **22**, 13-19 (2011).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2740/jisdh.22.13>
- 石橋源次, 廣戸美絵, 本多英俊, 榊原隆三

乳酸菌代謝生産物質 (PS-B1) の血圧上昇抑制作用

九州共立大学総合研究所紀要, 4, 77-80 (2011).

<http://www.lib.kyukyo-u.ac.jp/kiyosoken4.pdf>

5. 石橋源次, 本多英俊, 榊原隆三  
乳酸菌代謝生産物質 (PS-B1) の非肥満 II 型糖尿病モデルラットに対する血糖上昇抑制効果

九州共立大学総合研究所紀要, 4, 71-76 (2011).

<http://www.lib.kyukyo-u.ac.jp/kiyosoken4.pdf>

6. 野嶽勇一, 深澤昌史, 榊原隆三  
環状重合乳酸のガン細胞増殖抑制効果  
長崎国際大学論叢, 10, 239-48 (2010).

<http://library.niu.ac.jp/NiuDA/RNS/PDF/RN10-025.pdf>

[学会発表] (計 5 件)

1. 野嶽勇一  
ヒト常在乳酸菌生産物質の生理活性解明研究  
日本食生活学会第 44 会大会 (東京) 2012 年 5 月
2. 岩永真理恵, 野嶽勇一, 深澤昌史, 小野原侑子, 石橋源次, 榊原隆三  
乳酸菌発酵物 PS-B1 の肝障害保護作用  
日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月
3. 野嶽勇一, 深澤昌史, 榊原隆三  
新規乳酸菌発酵物 PS-B1 のヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する細胞増殖抑制作用  
日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都) 2012 年 3 月
4. 野嶽勇一  
乳酸菌代謝生産物質及びタンパク質コンジュゲートに関する研究  
日本農芸化学会西日本支部総会 (福岡) 2011 年 1 月
5. 野嶽勇一, 富松裕美, 中尾瑞穂, 料屋紘和, 湯浅 (小島) 明子, 湯浅勲, 深澤昌史, 榊原隆三  
豆乳の乳酸菌発酵物が示す有用作用  
BMB2010 (神戸) 2010 年 12 月

[図書] (計 1 件)

1. 榊原隆三, 石橋源次, 小笠原正良, 野嶽勇一, 乳酸菌生産物質 (バイオジェニックス) の可能性, 権歌書房 (2009).

[産業財産権]

○出願準備中 (計 1 件)

名称: 新規乳酸菌とそれを用いた肝細胞保護剤 (保護成分)

発明者: 榊原隆三, 野嶽勇一, 深澤昌史, 河村俊哉, 晦日房和, 玉屋圭, 松本周三

権利者: 同上

種類: 特許

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

[http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/biochemistry/biochem\\_index.html](http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/biochemistry/biochem_index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榊原 隆三 (SAKAKIBARA RYUZO)

長崎国際大学・薬学部生化学研究室・教授

研究者番号: 30127229

### (2) 研究分担者

深澤 昌史 (FUKASAWA MASASHI)

長崎国際大学・薬学部生化学研究室・准教授

研究者番号: 20238439

野嶽 勇一 (NODAKE YUICHI)

長崎国際大学・薬学部生化学研究室・助教

研究者番号: 30332282