

プロジェクト名：QOL 向上を目指した発酵食品の *in vivo* 評価と新規機能性成分の探索

木下 英樹、永井 竜児、小野 政輝
(農学部バイオサイエンス学科)

緒言

食生活の変化や高齢化等により糖尿病や高脂血症などの生活習慣病が増加している。そのため国民医療費は年々上昇している。健康長寿を達成し、高い QOL を維持しながら充実した生活を送るためには、病気はかかってから治療するのではなく、かかる前に予防する「予防医学」の概念が重要である。本概念から考えると、莫大な医療費が必要な長期の投薬に頼るより、日常的に摂取する食品で予防していくことが望ましい。近年、健康と病気の間すなわち「未病」状態を検知する方法として終末糖化産物 (Advanced Glycation End products: AGEs) が注目されている。AGEs は老化や疾病に伴い体内で徐々に蓄積しくため、AGEs を検出することで、未病状態をいち早く発見できる未病マーカーとして使える可能性がある。そこで本研究の第一の目的として、今回は疾病モデル動物として線虫を用いて未病状態を検知するための有用な AGEs マーカーの探索を行った。

また、現在、機能性乳酸菌や発酵食品の投与やそれに伴う腸内細菌叢の改善が健康に深く関与していることが次々と明らかにされている。これまでの研究において様々な穀物、青果物、畜産物を用いて乳酸菌による発酵試験を行い、機能性評価を行ってきた。その中で豆乳を乳酸菌で発酵した発酵豆乳（豆乳ヨーグルト）において、抗酸化能や抗炎症能の向上が期待される機能性乳酸菌を選抜した。しかしながら、本試験は *in vitro* での試験であるため、*in vivo* でしっかりとその機能性を確かめる必要があった。そこで第二の目的として、マウスを用いて豆乳ヨーグルトおよび菌体の機能性評価を免疫調節作用に着目して行った。

病気は罹ってから治す時代から罹らないように予防する時代に！
糖尿病等、罹ってからでは遅い病気がある。

⇒未病状態を把握するマーカーが必要
⇒発酵食品の機能性に着目

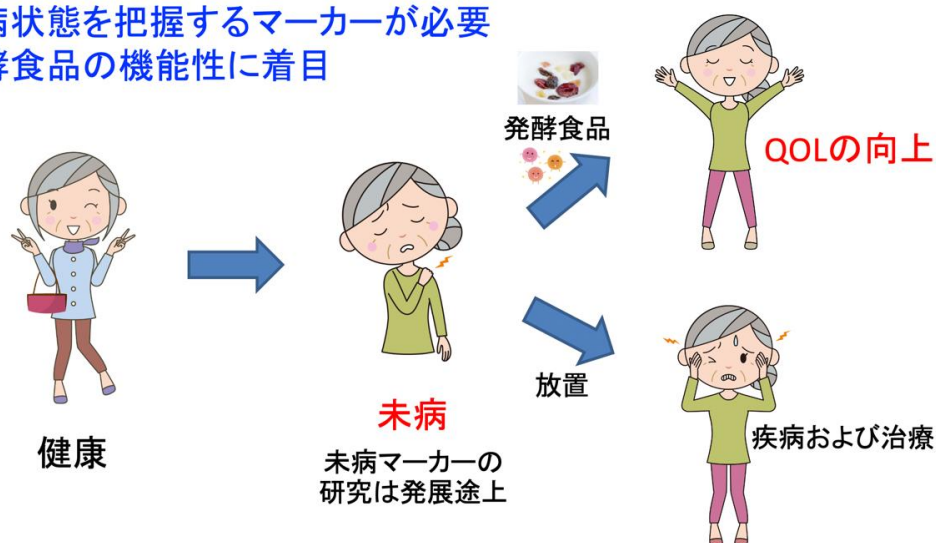


図 1. 本プロジェクトの目的

1. *Caenorhabditis elegans* (線虫) を用いた AGEs マーカーの探索

タンパク質はカルボニル基を有するグルコース等の糖質と反応し、Advanced Glycation End products (AGEs) を形成する。AGEs は加齢に伴って生体に蓄積することから、AGEs 蓄積を抑制する食品由来の成分を見出せば老化の予防および進行遅延に繋がることが期待される。しかしながら、老化の研究には多大な時間を要するため、加齢に伴って AGEs が蓄積することは報告されているものの、その詳細なメカニズムについては明らかになっていない。そこで、寿命が一か月と短命であり培養が容易な *C. elegans* を用いて、加齢に伴う AGEs 蓄積の評価とその蓄積メカニズム解明を目的とし研究を行った。その結果、*C. elegans* の日齢に伴って AGEs の 1 種である *N*^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL) が蓄積した (図 1)。

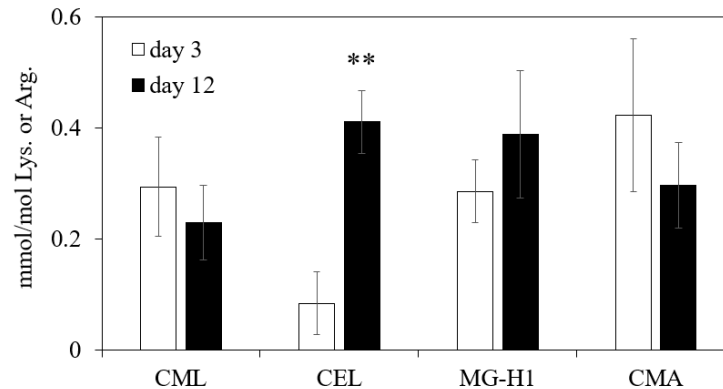


図 2. 日齢に伴う *C. elegans* 中 AGEs 蓄積量の比較

また、*C. elegans* 中の CEL 前駆体量 (メチルグリオキサールとケトン体) を測定した結果、加齢に伴いケトン体量のみが有意に増加し、CEL 蓄積と正の相関を認めた (図 2)。

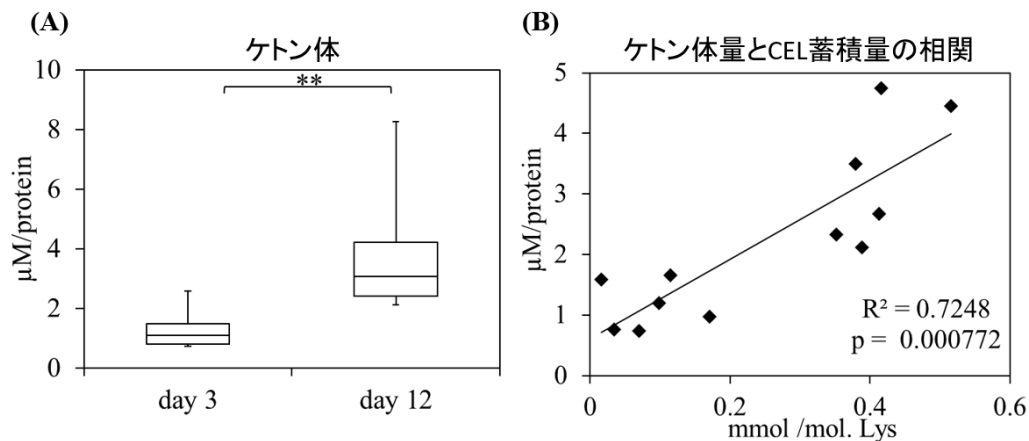


図 3. 日齢に伴う *C. elegans* 中ケトン体量の比較(A)と CEL 蓄積とケトン体量の相関(B)

ケトン体は脂質代謝の副産物として産生されることから、加齢による CEL 蓄積には脂質代謝が関与していることが示された。本結果から、*C. elegans* は、加齢と AGEs 蓄積の相関関係解明の手立てになることが期待される。

2. 豆乳ヨーグルトの *in vivo* 試験

乳酸菌やそれらを用いて作製した豆乳ヨーグルトの免疫応答についてマウスを用いて解析した。

6 週齢 ddy マウス (♂) に水、豆乳、豆乳ヨーグルト、乳酸菌 (1×10^9 cell/ 150μ L) を 150μ L/日で3週間経口投与した。

乳酸菌は、*Lactiplantibacillus plantarum* TOKAI 17 (TK 17) および *Pediococcus pentosaceus* Tokai 759m (TK 759m)を用い。また、豆乳ヨーグルトは、これらの乳酸菌で 37°C 、24 時間発酵させたものを用いた。マウスは各群6匹ずつ用いた。餌と水は自由摂取とし、体重、摂食量および給水量を記録した。

図4~6にはそれぞれ体重、摂食量、飲水量（累積）の推移を示した。いずれも群間で大きな差は見られなかった。

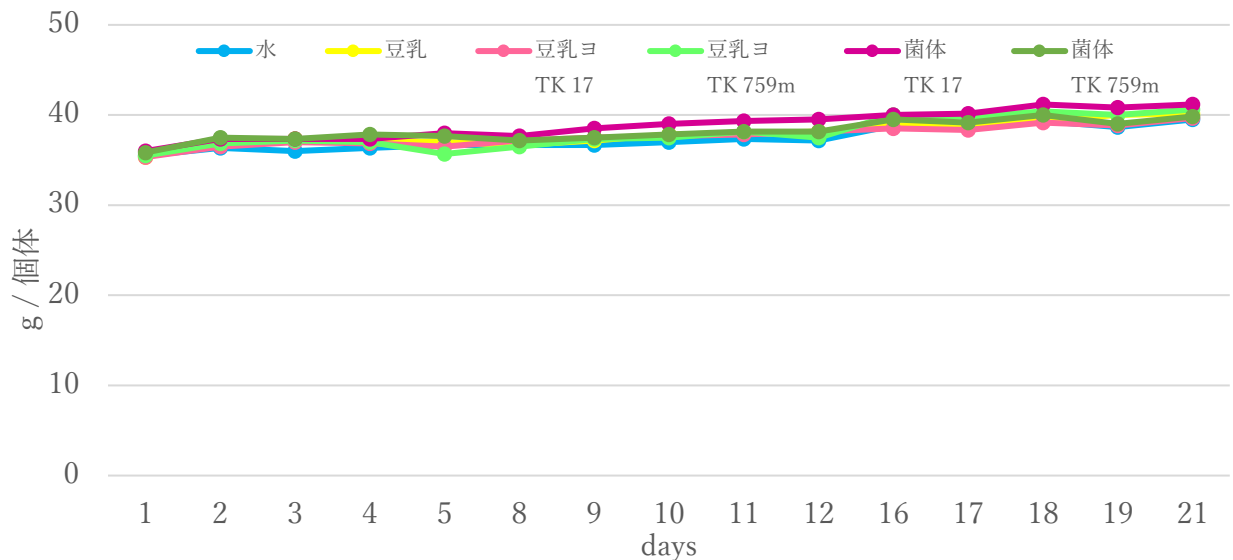


図4. 体重の推移

豆乳ヨは豆乳ヨーグルトを表しており、TK 17、および TK 759m は菌株名

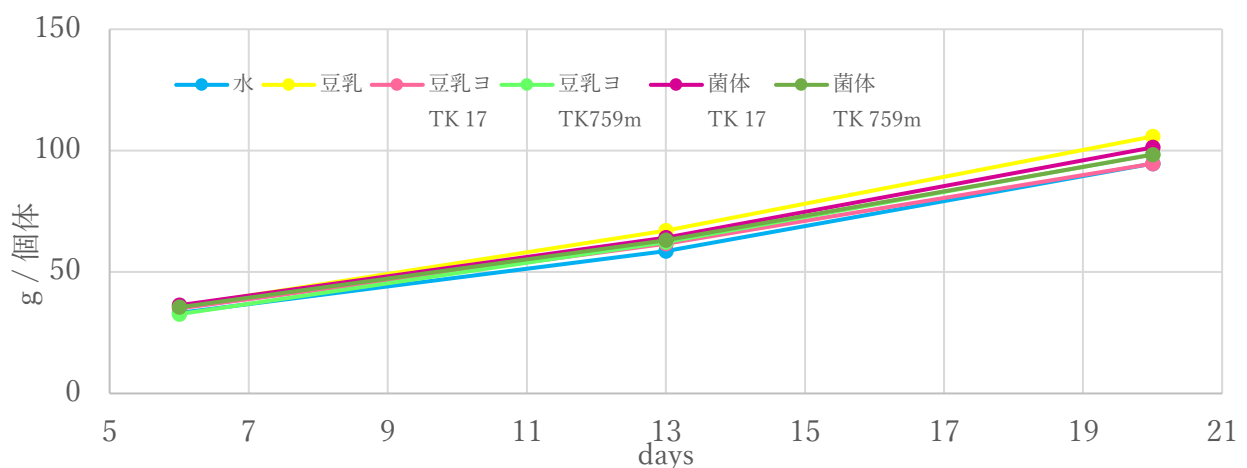


図5. 摂食量の推移

豆乳ヨは豆乳ヨーグルトを表しており、TK 17、および TK 759m は菌株名

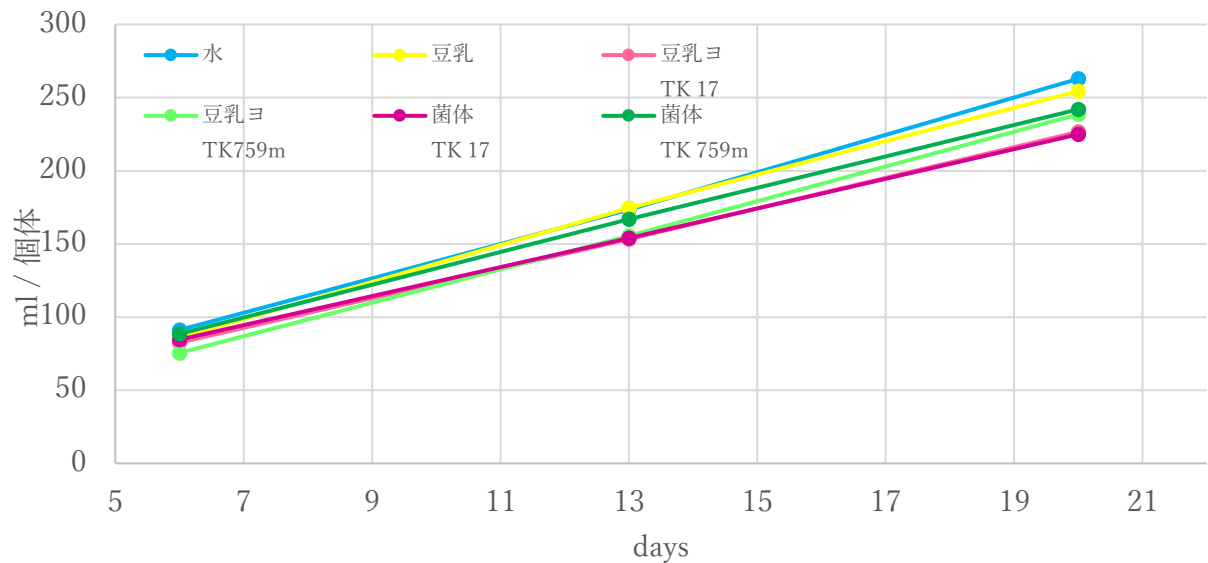


図 6. 摂水量の推移（累積）

豆乳ヨは豆乳ヨーグルトを表しており、TK 17、および TK 759m は菌株名

図 7 には、脾臓細胞の細胞障害活性試験の結果を示した。解剖後のマウスから脾臓細胞を抽出して下記の通り実施した。96 well 丸底 plate に脾臓細胞 (E: エフェクター細胞) を 5×10^6 、 2.5×10^6 、 1.25×10^6 、0 cells/well となるように 100 μ l/well ずつ播種した。そこに、 5×10^4 cells/well となるように 100 μ l/well ずつ Yac-1 細胞 (T: ターゲット細胞) を添加した。プレートを遠心分離 (150 g、1 min) した後、Yac-1 細胞のみのウェルに 2% Triton X-100 を添加した (最大溶出量)。インキュベート (37°C、5% CO₂、4 h) 後、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (同仁化学、熊本) を用いて製品プロトコルに従い、LDH 活性を測定した。結果は、E:T 別で示した。水投与群に比べ豆乳および豆乳ヨーグルト投与群で細胞障害活性は低下した。特に豆乳ヨーグルト群において顕著であった。図 8 には脾臓細胞のコンカナバリン A (ConA) で刺激し、72 h 培養した際の IFN- γ 産生量を示した。こちらも豆乳ヨーグルト投与群で顕著に IFN- γ の産生量が低かった。

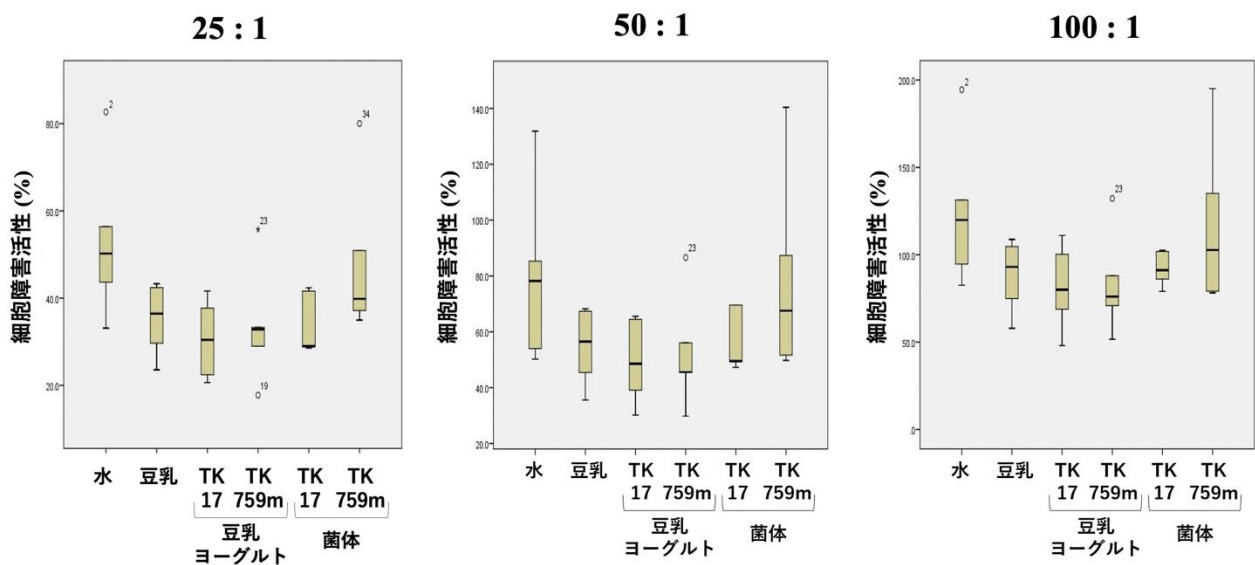


図 7. 脾臓細胞の細胞障害活性

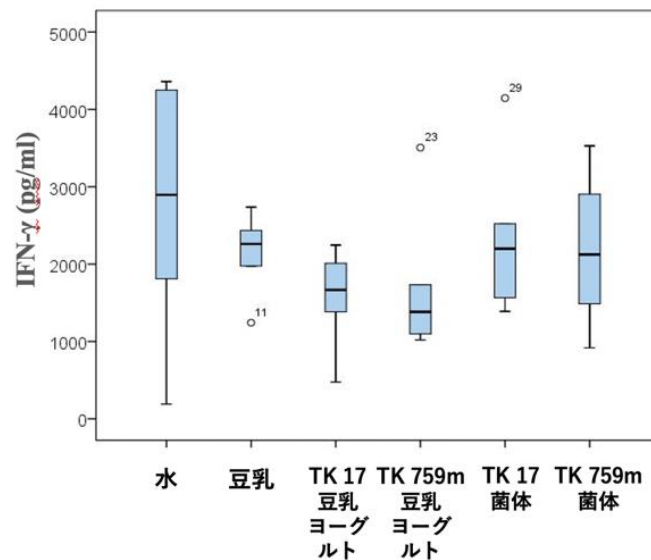
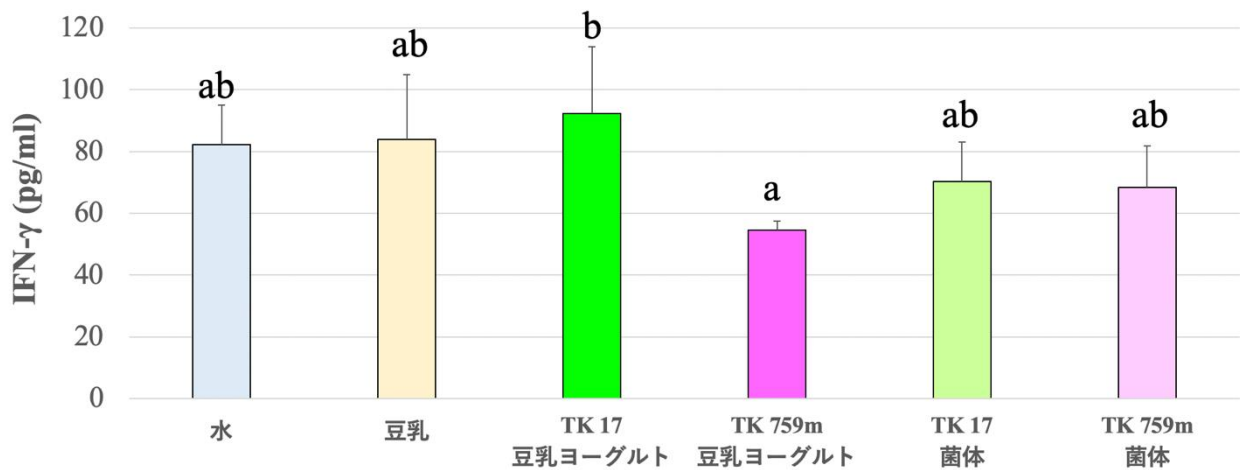


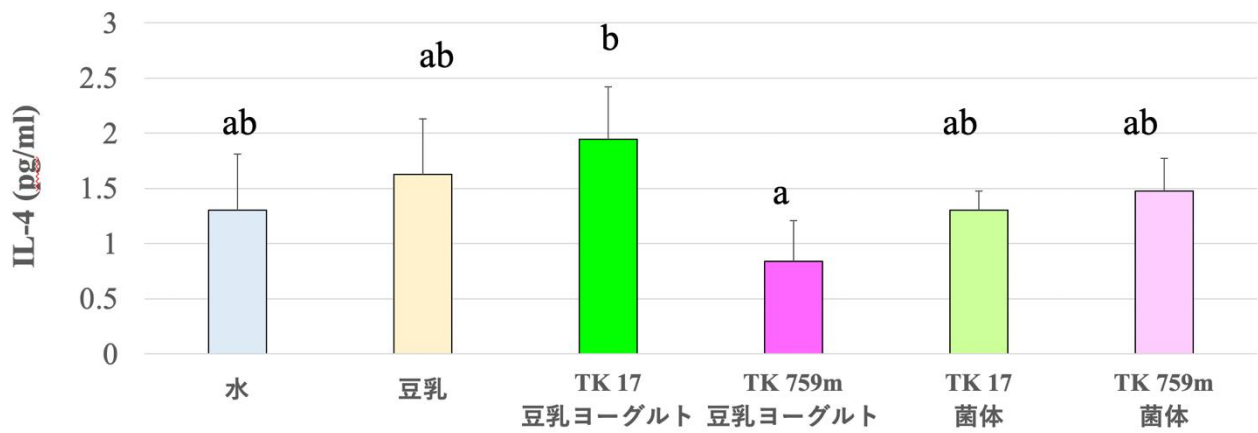
図 8. ConA 刺激脾臓細胞の IFN- γ 産生量の比較

次に血清中の各種サイトカイン量を ELISA 法にて測定した (図 9~15)。全体的に TK 759m で作製した豆乳ヨーグルト投与群でサイトカイン量が少ない傾向が見られ、特に MCP-1 は水投与群と比較して統計学的に有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。これらの結果は脾臓細胞での結果とも一致し、豆乳ヨーグルト摂取により抗炎症効果が期待できる可能性が示唆された。今後は、菌叢解析や機能性成分の探索を進めて行くことで、豆乳ヨーグルトの抗炎症メカニズムの解明を行っていく予定である。



異符号間で有意差あり ($P < 0.05$)

図 9. 血清中の IFN- γ 量 (pg/ml)



異符号間で有意差あり (P < 0.05)

図 10. 血清中の IL-4 量 (pg/ml)

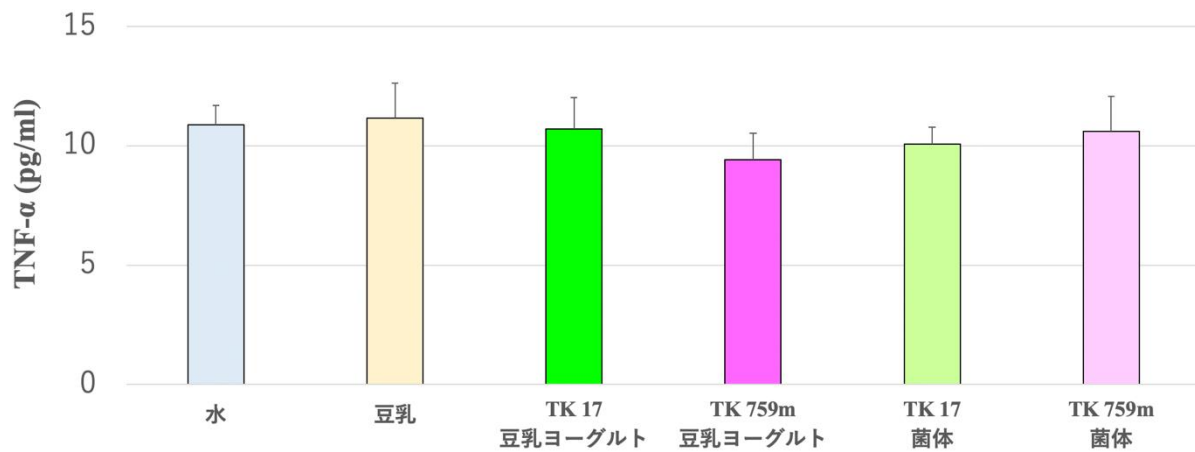


図 11. 血清中の TNF-α 量 (pg/ml)

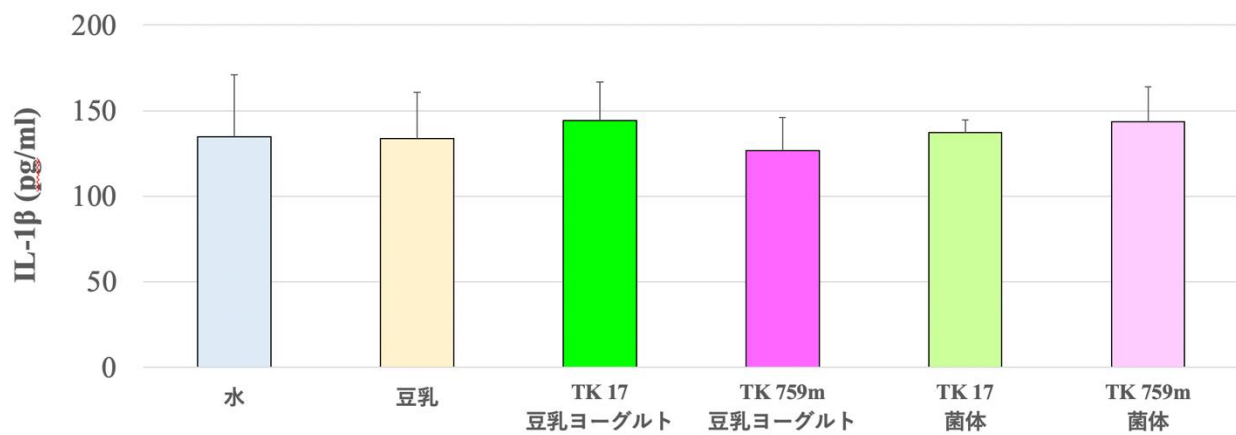
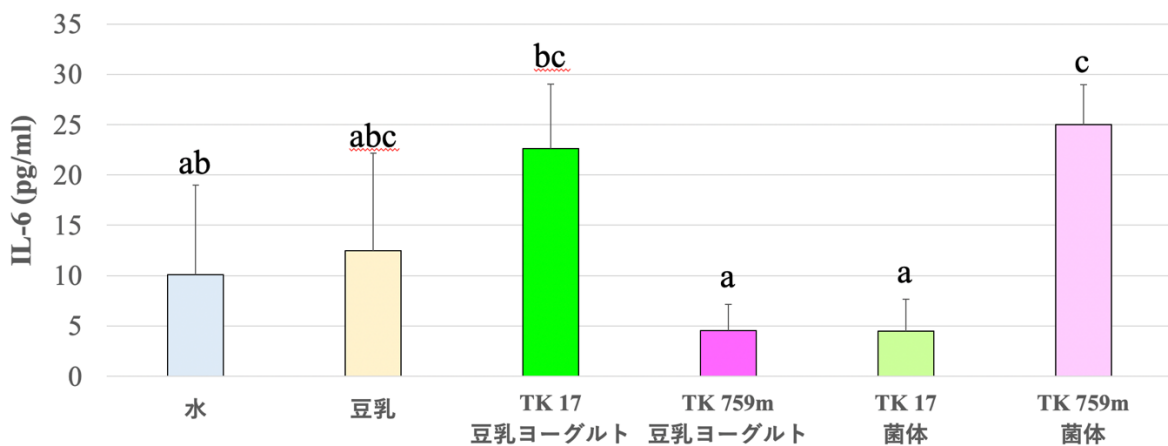
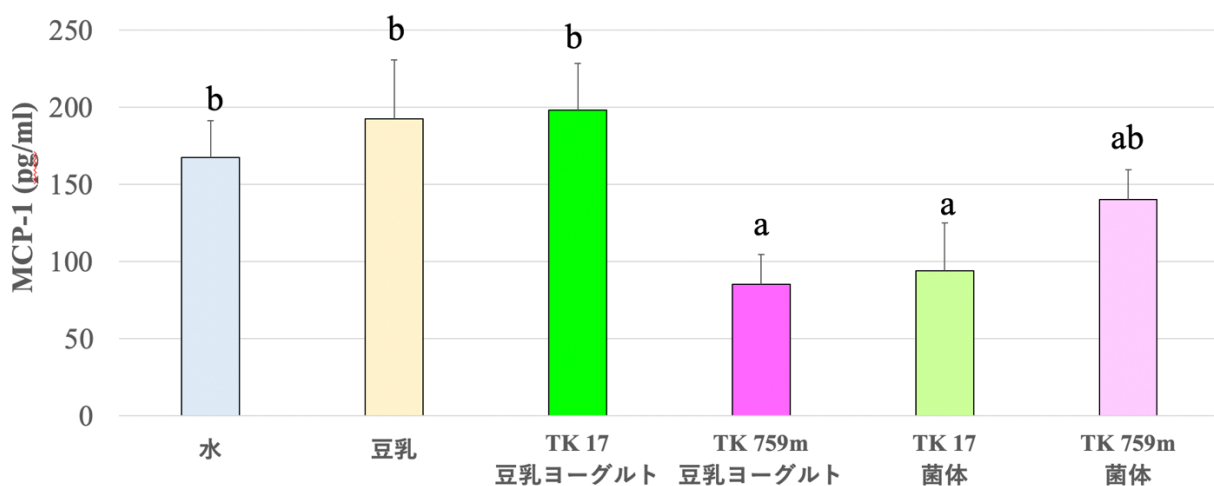


図 12. 血清中の IL-1β 量 (pg/ml)



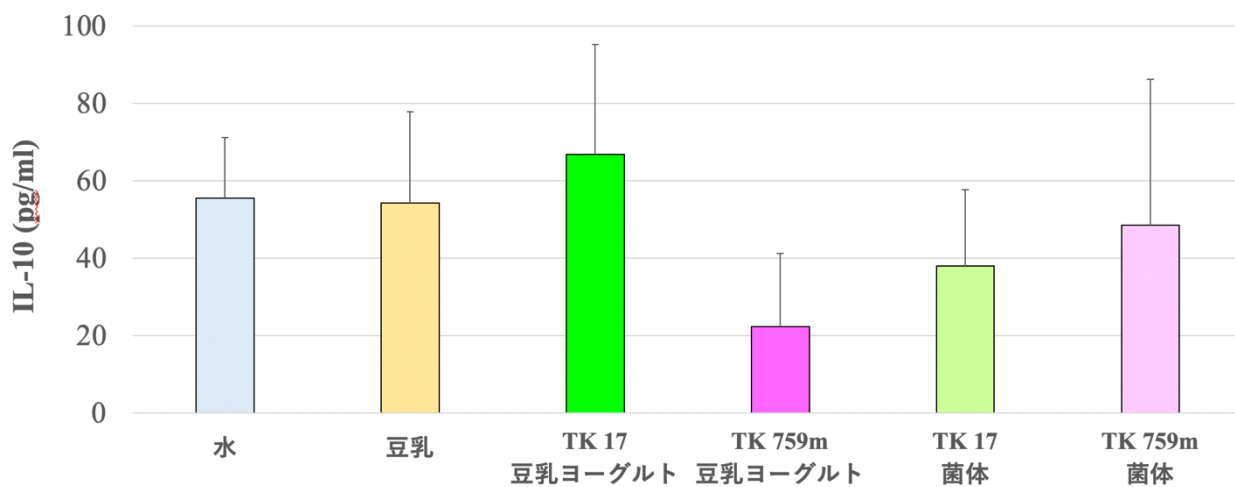
異符号間で有意差あり (P < 0.05)

図 13. 血清中の IL-6 量 (pg/ml)



異符号間で有意差あり (P < 0.05)

図 14. 血清中の MCP-1 量 (pg/ml)



異符号間で有意差あり (P < 0.05)

図 15. 血清中の IL-10 量 (pg/ml)

総括

プロジェクト初年度である本年度は線虫を用いた AGEs マーカーの探索と、豆乳ヨーグルトおよび乳酸菌投与によるマウスの免疫調節作用について検証した。

線虫を用いた AGEs マーカーの探索では、線虫は日齢に伴って AGEs の一つである CEL を有意に蓄積した。また、ケトン体も日齢に伴い増加し、CEL 蓄積と正の相関を認めた。本試験により、加齢に伴う CEL およびケトン体蓄積が見られたことから更なる研究を進めることで、AGEs やケトン体を未病マーカーとして活用すると共にそれらを抑制する食品成分の研究に繋がることが期待される。

豆乳ヨーグルトの *in vivo* 試験では、脾臓細胞における細胞障害活性および IFN- γ 産生試験において、豆乳ヨーグルト投与群で減少傾向が見られた。また、血清中のサイトカイン量は、特に TK 759m で作製した豆乳ヨーグルトで低い傾向が見られた。ケモカインである MCP-1 では有意な抑制効果が見られたことより、本菌で作製した豆乳ヨーグルトを摂取することで抗炎症効果が期待される結果となった。今後、菌叢解析を行う予定であり、腸内菌叢の変化と合わせて考察していく予定である。また、機能成分についても今後同定を試みる。

本プロジェクトは一年目であり、今後は、引き続き AGEs マーカー探索を行うほか、現在、豆乳ヨーグルトを用いて 1 型糖尿病モデルマウスにて投与試験を行っている。また、本年度からはメダカを使った新たな系について検証を行う予定である。これらの取り組みを推進していくことで、未病状態をいち早く検出し、発酵食品を用いて関連する疾病の予防・改善に繋げていきたい。

業績

研究成果

[学会誌・書籍]

木下英樹, 井越敬司(監). 乳酸菌の機能と産業利用, シーエムシー出版, 東京 (2021)

※ 監修ほか、第 1 章乳酸菌の機能と全身の健康および第 2 章植物原料を用いた乳酸発酵食品と食品開発を執筆

[学会発表]

大野礼一, 田中誠太郎, 伴郁穂, 勝田奈那, 富永悠幹, 谷口直之, 永井竜児. 糖尿病ラット水晶体におけるポリオール経路由来新規 AGEs の蓄積評価, 第 20 回日本抗加齢医学会総会, 2020 年 9 月, 東京, 口頭

山中幹宏, 勝田奈那, 永井竜児. 安定的な非侵襲 AGEs 測定の意義とその臨床応用, 第 93 回日本生化学会大会, 2020 年 9 月, オンライン, 口頭

中島勇貴, 椎山愛美, 浦部泰平, 山下秀次, 安田伸, 井越敬司, 木下英樹. RNA-seq を用いた *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* グループにおける small RNA の機能の推定, 日本乳酸菌学会 2020 年度大会, 2020 年 11 月, オンライン, 口頭

覚張孝大, 角替建斗, 後藤浩文, 小島公実子, 山本恵理, 安田伸, 井越敬司, 木下英樹. 牛乳中における乳酸菌と *Penicillium camemberti* の共生に関する研究, 日本乳酸菌学会 2020 年度大会, 2020 年 11 月, オンライン, 口頭

鈴木隆介, 斎藤充, 荒川翔太郎, 白河潤一, 巻千恵, 藤原章雄, 永井竜児. 骨芽細胞内の終末糖化産物の蓄積は小胞体ストレスを介した apoptosis を誘導する, 第 30 回日本メイラード学会年会, 2020 年 11 月, オンライン, 口頭 (若手研究者奨励賞受賞)

白河潤一, 勝田奈那, 藤原章雄, 松村剛, 荒木栄一, 永井竜児. 血中 2SC の変動および生成メカニズムの解明, 第 30 回日本メイラード学会年会, 2020 年 11 月, オンライン, 口頭

勝田奈那, 白河潤一, 南里友明, 田中祐樹, 永井竜児. ラットの脳中 2SC は加齢に伴い増加する, 第 30 回日本メイラード学会年会, 2020 年 11 月, オンライン, 口頭

富永悠幹, 須川日加里, 池田剛, 星良和, 永井竜児. モウセンゴケの終末糖化産物の生成抑制作用および活性成分の同定, 第 18 回日本機能性食品医用学会総会, 2020 年 12 月, オンライン, 口頭(最優秀演題賞受賞)

[招待講演]

木下英樹. 酪農科学シンポジウム 2020, 乳酸菌のムーンライティングプロテインの多機能性について, 2020 年 9 月, 長野, オンライン (2020)

[論文]

木下英樹, 森下光貴, 村田祐太朗, 古閑史也, 安田伸, 荒木朋洋, 井越敬司. 乳酸菌のカドミウムおよび水銀耐性におけるムーンライティングプロテインの役割に関する研究. ミルクサイエンス, 69(1),11-20 (2020)

Kinoshita H, Jumonji M, Yasuda S, Igoshi K. Protection of human intestinal epithelial cells from oxidative stress caused by mercury using lactic acid bacteria. Biosci. Microbiota, Food Health, 39(3), 183-187 (2020)

Kinoshita H, Ubara M, Nakashima Y, Watanabe K, Yasuda S, Igoshi K. Lactic acid bacterial exopolysaccharides strongly bind histamine and can potentially be used to remove histamine contamination in food. Microbiol. 167(1), 1-8 (2020)

Functions of small RNAs in *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* group of lactic acid bacteria using fragment analysis, Nakashima Y, Shiiyama N, Urabe T, Yamashita H, Yasuda S, Igoshi K, Kinoshita H. FEMS Microbiol. Lett. 367(19), fnaa154 (2020)

Tsutsumi S., Tokunaga Y., Shimizu S., Kinoshita H., Ono M., Kurogi K., Sakakibara Y., Suiko M, Liu M-C., Yasuda S. Investigation of the effects of indoxyl sulfate, a uremic toxin, on the intracellular oxidation level and phagocytic activity using an HL-60-differentiated human macrophage cell model. Biosci. Biotechnol. Biochem, 84, 1023–1029 (2020)

Tsutsumi S, Tokunaga Y., Shimizu S., Kinoshita H., Ono M., Kurogi K., Sakakibara Y., Suiko M., Liu M-C, Yasuda S. Effects of indole and indoxyl on the intracellular oxidation level and phagocytic activity of differentiated HL-60 human macrophage cells. J. Toxicol. Sci. 45 (9), 569–579 (2020)

Suzuki R, Fujiwara Y, Saito M, Arakawa S, Shirakawa J, Yamanaka M, Komohara Y, Marumo K, Nagai R. Intracellular accumulation of advanced glycation end products induces osteoblast apoptosis via endoplasmic reticulum stress. J. Bone Miner. Res. 35 (10), 1992-2003 (2020)

Tominaga Y, Sugawa H, Hirabayashi K, Ikeda T, Hoshi Y, Nagai R. *Drosera tokaiensis* extract containing multiple phenolic compounds inhibits the formation of advanced glycation end-products. Arch. Biochem. Biophys. 30 (693), 108586 (2020)

Arakawa S, Suzuki R, Kurosaka D, Ikeda R, Hayashi H, Kayama T, Ohno RI, Nagai R, Marumo K, Saito M. Mass spectrometric quantitation of AGEs and enzymatic crosslinks in human cancellous bone. Sci. Rep. 10(1), 18774 (2020)

Yamaguchi H, Nagai M, Sugawa H, Yasuda H, Nagai R. Development of a conventional immunochemical detection system for determination of N δ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine in methylglyoxal-modified proteins. Glycoconj. J. 38(3), 293-301 (2021)

Ono M, Taketomi S., Kakiki Y., Yasuda S., Okawa M., Kinjo J., Miyashita H., Yoshimitsu H., Nohara T. A New Glycosidic Acid, Muricatic Acid D, and Resin Glycosides, Muricatins X and XI, from the Crude Resin Glycoside Fraction of the Seeds of *Ipomoea muricata*. Chem. Pharm. Bull., 69 (3), 291–297 (2021)

Wattananapakasem I, Penjumras P, Malaithong W, Nawong S, Poomanee W, Kinoshita H. Effect of heat moisture treatment of germinated black rice on the physicochemical properties and its utilization by lactic acid bacteria. J Food Sci Technol. in press (2021)