

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05901

研究課題名(和文) 豆乳の乳酸菌発酵ろ液が示す非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)改善作用の解析

研究課題名(英文) Improving effect of a filtrate of soymilk fermented by lactic acid bacteria on non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

研究代表者

野嶽 勇一(NODAKE, Yuichi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：30332282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：16種の乳酸菌を用いて調製した豆乳の乳酸菌発酵ろ液(本ろ液)が複数の有用作用を示すことを明らかにしてきた。本研究では5週齢の非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルマウスに、本ろ液の凍結乾燥粉末を混合した高脂肪飼料を4週間与えた。その結果、対照群よりも肝重量と血漿TG値が低下し、NAFLD activity scoreの減少や脂質の沈着の抑制、炎症性細胞の浸潤の減少が見出され、本ろ液に脂質代謝やNASH病態に対する改善作用があることが示唆された。この作用機序を検討する中で、本ろ液が肝臓の脂質合成系遺伝子の発現量を部分的に変動させたことと、プレバイオティクス作用を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肝疾患と腸内細菌叢との深い関連性が注目されているが、乳酸菌を用いた発酵食品(特にバイオジェニクスに分類される食品)が腸内環境の改善を介してNASHの抑制に関与していることを示唆する報告は未だ十分ではない。本研究で研究対象とした豆乳の乳酸菌発酵ろ液は、調製の最終工程(ろ過)で乳酸菌そのものを除去していることから、腸管との観点からはバイオジェニクスに分類される。したがって、本発酵ろ液が脂質代謝やNASH病態に対する改善作用を有することを強く示唆する今回のデータは、今後の医・食両分野の研究にとって大変意義のあるものであると評価している。

研究成果の概要(英文)：A filtrate of soymilk fermented by 16 lactic acid bacteria has been demonstrated to indicate several biological activities. In this study, five-week-old non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice were fed ad libitum with a high-fat diet supplemented with a freeze-dried powder of the fermented filtrate for 4 weeks. As a result, liver weight, plasma TG level, and NAFLD activity score in the experimental group were lower than that in the control group. Since the suppression of lipid accumulation and infiltration of inflammatory cells were also observed in the experimental group, it was suggested that the fermented filtrate indicated an improving effect on lipid metabolism and NASH symptoms. In addition, it was found that the fermented filtrate partially suppressed some expression level of lipid synthesis genes in hepatocytes and that could be used as a prebiotic to improve gut microbiota.

研究分野：生化学、食品科学、スキンケア

キーワード：豆乳の乳酸菌発酵ろ液 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)

1. 研究開始当初の背景

食品に関する研究分野のうち、今後の発展が特に期待されているものの一つに「バイオジェニックス」がある。バイオジェニックスは「微生物の代謝を介して産生された物質」と定義され、生体や腸内細菌叢に直接作用する利点がある。プロバイオティクスやプレバイオティクスとは異なる観点から「食を介した健康増進」を目指すことができることから、乳酸菌発酵食品に関する研究に取り組んできた本研究代表者においても、そのバイオジェニックスとしての可能性に早くから着目してきた。すなわち、*Lactobacillus* 属を中心とする 16 種のヒト常在乳酸菌から構成する独自の複合培養法を開発し、この手法によって豆乳から新規の乳酸菌発酵ろ液（以下、本ろ液）の調製に成功している（図 1）¹⁾。

本ろ液の調製では、最終工程（ろ過）で乳酸菌そのものを除去しているため、本ろ液はバイオジェニックスに分類される。本ろ液には乳酸菌の生命活動から産生された豆乳の代謝物質以外に、未知の物質が含まれている可能性も考えられており、まさに「魅力の宝庫」と位置付けられる。本ろ液に関するこれまでの研究から、本ろ液ががん細胞増殖抑制作用、脂質代謝改善作用、アレルギー抑制作用等を有することを明らかにしており、各生理作用の特性や、含有成分によってもたらされる作用機序に関連するエビデンスを蓄積してきた²⁾。



図1 豆乳の乳酸菌発酵ろ液の調製法の概略

2. 研究の目的

アルコール、ウイルス、薬物等の肝障害因子は肝実質細胞と肝星細胞内の活性酸素種レベルを高め、両細胞の形態学的変化を亢進する。すなわち、肝細胞の壊死と肝星細胞によるコラーゲン産生が促進される。最近になって、本研究代表者は初代培養した両細胞に本ろ液を作用させた場合に、両細胞内の活性酸素種レベルが低下することを見出している。この現象には、本ろ液に含まれている抗酸化物質が影響しており、肝障害因子によって誘導される活性酸素種の異常な生成を抑制したことを意味している。このような背景から、本ろ液に肝機能を改善する作用があることが示唆されたため、本研究では、近年注目されている非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に対する本ろ液の影響を検討することとした。

過食を原因とする NASH では、肝臓で慢性的な炎症が起きており、線維化を介した肝硬変や肝臓がんへ高い確率で進展する。わが国の NASH 患者数は 200 万人以上と推定されており、その予備軍は実に 1,000 万人に達するとも言われているが、その発生機序は十分に解明されていない。一部の生薬抽出物においては NASH に対する改善作用の報告があるものの、乳酸菌（及びその代謝物）やバイオジェニックスの摂取が NASH の症状を改善したという報告は十分ではない。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルマウスに対する摂取実験

体重を基準として、5 週齢の雄性 NASH モデルマウスを「非摂取群（対照群）」と「本ろ液（5%）摂取群」に分け（n=6）、各群に決められた食餌を 4 週間与えて飼育した。飼育期間中は行動や排泄物の異常の有無を確認するとともに、体重と食餌量を毎日記録し、飼育終了時に全マウスを対象として採血・解剖を行った。

なお、本研究では、NASH のモデルマウスとして、ヒトと類似した病態進行（脂肪肝から NASH、肝がん）を示し、2 週間で脂肪肝から結節性病変を示す STAM マウスを用いた。また、NASH モデルマウスへの NASH 病態の誘導のために、食餌には高脂肪飼料を使用した。

(2) 回収試料の解析

回収した血液から調製した血漿を生化学的検査（血糖値、AST、ALT、総コレステロール、トリアシルグリセロール等）に供し、得られたデータから、本ろ液の摂取が NASH の症状に及ぼした影響を検討した。また、回収した肝臓については重量を測定した後、組織切片を作製し、病理組織学的検査に供した。NAFLD activity score (NAS) による評価法に基づいて、脂肪化、肝実質の炎症、肝実質細胞障害の各検査結果を数値化した。また、肝臓の一部から全 RNA を抽出し、これを用いた DNA アレイ解析を行った。

(3) プレバイオティクス作用の評価

腸内細菌叢を構成する多数の細菌の中から、代表的な有用菌（ビフィズス菌、乳酸菌）と有害

菌(ウェルシュ菌)を選抜し、これらの細菌の増殖に及ぼす本ろ液の影響を分光学的に検討した。GAM 培地あるいは MRS 培地を用いて細菌懸濁液を調製し、これを 96 穴マイクロプレート中で本ろ液と混合した。この混合液の 24 時間経過後の濁度 (660 nm) を測定した。

4. 研究成果

(1) 本ろ液の NASH 改善作用の特性

摂食実験に供した NASH モデルマウスに、食餌量、行動、排泄物上の異常は見出されなかった。また、解剖時にも内臓の損傷や出血に関する所見も得られなかった。

本ろ液が NASH の症状に及ぼす影響を明らかにするために、全マウスから回収した血液と肝臓を対象として、各々生化学的検査と病理組織学的検査を行った。その結果、対照群では脂質代謝や肝機能に関する測定値が悪化した^{3,4)}。これらの変化は高脂肪飼料の摂取によって NASH モデルマウスに肥満が誘導されたことを反映しており、肝臓切片の解析からも、6 週目に肝臓への脂肪の蓄積、8 週目に脂肪肝が観察された。さらに、9 週目には肝炎や肝線維化が観察され (図 2)、これらの状態変化に伴って NAS も大きく上昇した。

一方、本ろ液を摂取させたマウスでは、肝重量と血漿 TG 値が低下傾向を示した^{3,4)}。また、風船様肝細胞の形成や脂質の沈着が軽度抑制され、リンパ球および好中球を含む炎症性細胞の浸潤にも減少が見出された。また、NAS においても 5.3 から 4.8 へと増加が留められ、肝炎や肝線維化が抑制されたことから、本ろ液には脂質代謝や NASH の症状に対する改善作用があることが示唆された。

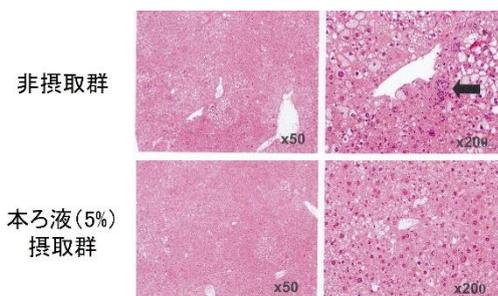


図2 NASHモデルマウスの肝臓切片の顕微鏡写真

(矢印は典型的な炎症部位を示す)

(2) NASH の症状の改善における直接的・間接的な作用機序

本ろ液が示したこの有用作用の作用点の一つとして、肝実質細胞の遺伝子発現への影響を「直接的な NASH 改善作用」と位置付けた。そこで、DNA アレイ解析によって肝実質細胞内の遺伝子発現の状態を網羅的に解析し、本ろ液によって発現量が変動した遺伝子の特定を試みた。その結果、対照群においては脂質合成に関与する遺伝子群に亢進の傾向が示され、脂肪肝を経て NASH の誘導に至った過程が明らかにされた。一方、本ろ液摂取群では、脂質合成系遺伝子のいくつかに発現の抑制が見出されたことから、本ろ液が複数の作用点を介して脂質代謝や NASH の症状を改善したことが示唆された。

次いで、腸内細菌叢のバランスに及ぼす本ろ液の影響を「間接的な NASH 改善作用」と位置付け、もう一つの作用点としての可能性を *in vitro* レベルで検討した。*Enterococcus faecalis* の細菌懸濁液に本ろ液を添加した結果、未添加時と比較して *E. faecalis* の増殖が顕著に促進された (図 3)。この作用実験を腸内細菌叢を構成する代表的な有用菌 (ビフィズス菌と乳酸菌、合わせて 21 種) に対して実施した結果、*Bifidobacterium longum*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus helveticus* 等、大部分の有用菌の増殖が促進された (図 4)。一方、本ろ液が *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) の増殖に対しては抑制的に作用したことから、本ろ液がプレバイオティクス作用を示す可能性が推察された。実際に、本ろ液の摂取によってマウスの糞便中の有害物質 (アンモニア) 濃度が有意に低下していたことから (図 5)、本ろ液が腸内細菌叢のバランスに影響を及ぼし、腸内環境が改善されたことが示唆された。マウスの糞便を対象とした腸内細菌叢解析は今後の継続課題となるが、本ろ液のプレバイオティクス作用を支持するデータが得られることを期待している。

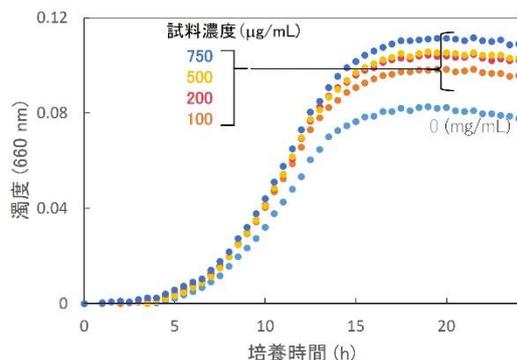


図3 *E. faecalis* の増殖に及ぼす本ろ液の影響

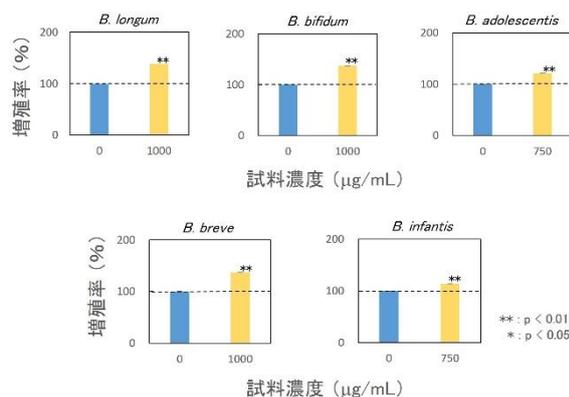


図4 ビフィズス菌の増殖に及ぼす本ろ液の影響

なお、本ろ液の製造工程において、原料の豆乳に含まれるオリゴ糖（ラフィノース、スタキオース）が代謝されている可能性が考えられたが、薄層クロマトグラフィーによる解析から、これらのオリゴ糖が本ろ液中に十分に残存しており、ビフィズス菌の増殖が促進された主要な要因であることが明らかになった。ヒトの腸内環境に及ぼすビフィズス菌の影響の大きさを考えると、極めて重要なデータである。さらに、本ろ液は 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl に対する消去能を示したことから、液中に抗酸化物質を豊富に含んでおり、腸内に持ち込まれた、あるいは、腸内で発生した活性酸素種の観点からも、腸内環境の改善に関わることが示唆された。

以上のことから、本ろ液の含有物質による直接的な NASH 改善作用とは別に、腸内細菌叢への影響やそれに伴う腸管環境の改善などの間接的な NASH 改善作用の惹起が推察された。すなわち、本ろ液によって膨大に発生する腸内細菌代謝物に好ましい変化が生じ、脂質代謝や NASH の症状が改善に至ったと考えられた。

本研究では、肝硬変や肝臓がんの要因ともなる NASH に対して、本ろ液の影響を検討した。その結果、本ろ液に NASH の症状を改善する可能性があることを反映したデータを得るに至った。NASH に対する乳酸菌やその発酵物の影響については未だ深く研究されておらず、新規性が極めて高い。今後は本ろ液中の生理活性物質の単離・同定にも取り組み、食（豆乳の乳酸菌発酵ろ液）を介した NASH 予防の実現に一石を投じることを目指す。

<引用文献>

- ① Nodake Y., Miura R., Ryoya H., Momii R., Toda S., Sakakibara R., Improvement of lipid metabolism and ovalbumin-induced type I allergy by use of soybean milk fermented by 16 indigenous lactic acid bacteria, *J. Food Nutr. Sci.*, **4**, 113-119 (2016).
- ② 野嶽勇一, ヒト常在乳酸菌生産物質の生理活性解析研究, 日本食生活学会誌, **23**, 65-69 (2012).
- ③ 野嶽勇一, 豆乳の乳酸菌発酵ろ液が示す肝保護作用, アグリバイオ, **4**, 1076-1079 (2020).
- ④ Fukasawa M., Nodake Y., Kawatsu R., Honda H., Yamaguchi K., Sakakibara R., Evaluation of fermented product obtained from soybean milk using lactic acid bacteria in a stelic animal model (STAM™) of nonalcoholic steatohepatitis - A preliminary study, *Int. J. Probiotics prebiotics*, **15**, 45-51 (2020).

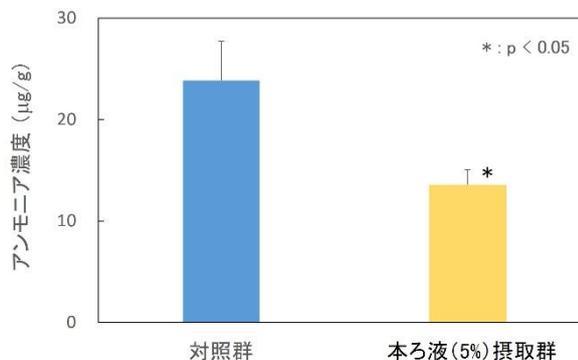


図5 マウス糞便中のアンモニア濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 野嶽勇一	4. 巻 4
2. 論文標題 豆乳の乳酸菌発酵ろ液が示す肝保護作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1076-1079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukasawa M., Nodake Y., Kawatsu R., Honda H., Yamaguchi K., Sakakibara R.	4. 巻 15
2. 論文標題 Evaluation of fermented product, PS-B1, obtained from soybean milk using lactic acid bacteria in a stelic animal model (STAM TM) of nonalcoholic steatohepatitis - A preliminary study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Probiotics prebiotics	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------