総 説

乳酸菌と大腸癌の予防

Lactic Acid Bacteria and Colon Cancer Prevention

平山和宏^{*1,†}・Joseph RAFTER^{*2}

(^{*1}東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学教室,

^{*2}Department of Medical Nutrition, Karolinska Institutet)

Kazuhiro HIRAYAMA^{*1,†} and Joseph RAFTER^{*2}

(^{*1}Department of Veterinary Medical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo; [†]Corresponding author)

(^{*2}Department of Medical Nutrition, Karolinska Institutet)

はじめに

乳酸菌には健康に有益なさまざまな効果があるといわれているが、その中でも最も興味を集めているながら確かなことがわかっていないのが抗腫瘍作用であろう。ヒトを用いた研究では乳酸菌の摂取により癌が抑制されるという直接の実験的知見は得られていないが、間接的な証拠はこれまでに数多く報告されている。乳酸菌の抗腫瘍作用に関する文献的な知見はおおよそ、次のように分類することができる。In vitro における研究、実験動物を用いた in vivo の研究、癌に関する疫学研究およびヒトのボランティアを用いた食事内容に関する介入試験である。本総説ではそれらを概説する。また、乳酸菌が大腸癌を抑制するメカニズムについても考察する。

In vitro における研究

加熱調理した食事には数多くの変異原物質が含まれている。これらの物質は in vitro において乳酸菌や腸内細菌と混合することにより菌体に吸着され、その変異原性が減少する^{46, 66)}。Orrhaga ら⁴⁴⁾ は 8 株の乳酸菌や腸内細菌を用い、食餌中に含まれる変異原物質であるヘテロサイクリックアミン類がこれらの菌に吸着されることを報告している。用いた菌株間に吸着能の差はあまり認められなかったが、物質により大きく吸着の効率が異なっていた。吸着の効率には pH が重要な要因であった。吸着の効率と各物質の変異原性の減少はよく相関した。

また、乳酸菌や乳酸菌によって産生される可溶性の物質は腫瘍由来の培養細胞に直接影響を与え、その発育を阻害する^{51, 52)}。例えば、ヒト結腸癌由来培養細胞である

HT-29 細胞の発育と活性を有意に阻害し、さらに細胞の分化が誘導されたことを示唆する結果が報告されている⁴⁾。

実験動物を用いた in vivo の研究

乳酸菌の経口投与は化学発癌物質によって誘発される胃や結腸粘膜の DNA 傷害を効率良く軽減することが報告されている。Pool-Zobel ら⁴⁷⁾ はコメットアッセイを用い、*Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve* および *B. longum* が N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロログアニジン (MNNG) に対して抗遺伝子毒性作用をもつことを示した。これらの菌は 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) の遺伝子毒性も抑制した。*L. acidophilus* の生菌体とそのアセトン抽出物は MNNG 誘発 DNA 傷害を抑制したが、加熱死菌体は効果を示さなかった。*L. acidophilus* 菌体のさまざまな分画の中では凍結乾燥菌体全体とペプチドグリカン分画に抗遺伝子毒性効果が認められた。

乳酸菌の菌株の中には発癌物質によって誘発された腫瘍や前癌病変を予防する効果が報告されているものもある。Goldin ら¹⁸⁾ は GG と呼ばれる特定の *L. rhamnosus* の菌株が DMH で誘導された大腸癌をイニシエーションあるいは初期のプロモーションの段階で抑制することができ、その効果は高脂肪食を給与した実験で最も顕著に観察できることを報告した。*L. acidophilus* もまた一晩培養した培養液がアゾキシメタン (AOM) により誘導された異常陰窩巣 (ACF) の形成を抑制することができた²⁾。ACF は大腸癌の初期病変と考えられている。この報告では *B. adolescentis* の培養液やその上清は抑制効果を示さなかったが、*Bifidobacterium* の投与は AOM^{10, 32)} や DMH^{1, 14)} で誘発される ACF の形成を抑

[†] 連絡先

^{*1} ☎113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

^{*2} NOVUM, S-141 86 Huddinge, Sweden

制することが報告されている。また、ラットへの *B. longum* あるいはイヌリンの投与は AOM によって誘導された小規模な ACF の形成を減少させ、さらに両者を同時に投与することにより大規模な ACF の形成も減少させた⁵⁴⁾。また、遺伝子毒性物質を産生し、高い β -グルクロニダーゼ活性をもつ菌株群をラットに定着させると DMH により誘発される ACF 形成を促進するが、これに *B. breve* を加えて定着させると病変の悪性度の指標となると考えられている 4 つ以上の異常陰窩からなる ACF や陰窩の分裂を減少させることが報告されている⁴³⁾。

Reddy と Rivenson⁵⁰⁾ は *B. longum* 培養液の凍結乾燥物を餌に混ぜてラットに与えることにより、食餌性変異原物質である IQ による肝臓、結腸および乳腺の腫瘍の発生を抑制した。食餌とともに投与した凍結乾燥 *B. longum* 培養液は AOM によってラットに誘発した結腸腫瘍の発生率、腫瘍数および腫瘍サイズも有意に抑制した⁵⁸⁾。 *B. longum* の投与はまた、AOM によって誘導された結腸粘膜細胞の分裂、結腸粘膜および腫瘍細胞のオルニチンデカルボキシラーゼ活性および ras-p21 蛋白質の発現も有意に抑制した⁴⁹⁾。また、Kohwi ら³¹⁾ は *Bifidobacterium* の 2 菌種、すなわち *B. infantis* と *B. adolescentis* には皮下あるいは腹腔内接種により BALB/c マウスに 3-メチルコラントレンで誘導した腫瘍を抑制する能力があることを報告している。Goldin と Gorbach¹⁵⁾ はラットの食餌に *L. acidophilus* を添加することにより DMH 誘発大腸癌の発生率を減少させるとともに生存期間を延長することができた。発酵乳の給与も化学物質により結腸に腫瘍を誘発したラットの生存率を上昇させた⁵⁹⁾。

乳酸菌の抗腫瘍効果は腫瘍細胞移植モデルを用いた研究によっても示されている。発酵乳あるいは乳酸菌培養液の給与はマウスに移植された腫瘍細胞の発育を阻害することが報告されている^{13, 29)}。 *Bifidobacterium* の生菌または死菌体を腹腔内に繰り返し投与すると BALB/c マウスの皮下に移植した Meth-A 腫瘍細胞の増殖は抑制される³¹⁾。Sekine ら⁵⁷⁾ は *B. infantis* ATCC15697 から抽出した全ペプチドグリカンを用い、皮下への単回投与でマウスに移植した腫瘍の増殖を有意に抑制し、腫瘍に直接 5 回投与すると腫瘍を 70% 縮小できることを報告している。

さらに近年、ヒトと実験動物の腸内菌叢はその構成、代謝活性ともに大きく異なっていること²⁴⁾ を考慮し、ヒトの腸内菌叢を定着させたヒトフローラ定着 (HFA) マウスを用いた研究も行われた。実際、HFA マウスに変異原物質を経口投与した研究で、発癌リスクの指標となる DNA アダクト形成においてヒトとマウスの腸内菌叢は異なる影響をもつことが報告されている²³⁾。乳酸菌を含む混合生菌剤を HFA マウスに与えたところ、食餌性変異原物質の一つである 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]-

indole (2-アミノ- α -カルボリン; AAC) の経口投与によって形成される結腸上皮の DNA アダクトが抑制された²⁵⁾。AAC の細胞への暴露の減少および DNA アダクトを修復する機能の活性化の 2 つの可能性がこの効果のメカニズムとして考えられる。

癌に関する疫学研究

発酵乳製品の摂取と大腸癌の発生に関する疫学研究はこれまでのところあまり多くなされてはいないが、ヨーグルトのような乳製品や *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* を含む発酵乳の多量の摂取は結腸癌の低い発生率と関連があるかもしれないと考えられている⁶⁰⁾。フィンランドにおける疫学調査では、脂肪の摂取量が多いにもかかわらず他の国に比べてフィンランドの結腸癌の発生が少ないのは牛乳やヨーグルトなどの乳製品を多く摂取しているからであることが示唆されている^{38, 39)}。また、ケースコントロール研究において、他の要因による影響の可能性を補正しても、ヨーグルト⁴⁵⁾ や発酵乳⁶⁵⁾ の摂取量と結腸癌には負の相関が認められた。ちなみにヨーグルトや発酵乳の摂取頻度との負の相関は乳癌においても認められている^{34, 62)}。一方、アメリカで行われた 1980~1988 年と 1986~1990 年の後追調査では乳製品と結腸癌リスク減少の間の相関関係を示す証拠は認められなかった²⁶⁾。オランダで老人を対象に行われたコホート研究では、発酵乳製品の摂取と結直腸癌のリスクの間には有意な相関関係は認められなかったものの、若干の結腸癌の減少傾向が見られた²⁷⁾。

ヒトのボランティアを用いた研究

健康成人を用いた研究で、*Lactobacillus* を摂取すると加熱調理食品の摂食に伴う尿中および便中の変異原性が減少することが報告されている。焼いた肉を食べると尿や便中の変異原性が上昇することが知られているが、*L. acidophilus* を与えると *L. acidophilus* を含まない普通の発酵乳のみを与えたときに比べて変異原性が明らかに減少した³⁶⁾。ほとんどの場合、変異原性の減少は便中の *Lactobacillus* の菌数の増加と相関が見られた。Hayatsu と Hayatsu²²⁾ もまた焼いたひき肉の摂食によって上昇した尿中の変異原性が *L. casei* の経口摂取によって抑制されることを報告している。先に述べた *in vitro* での知見を考えると、これらの *Lactobacillus* 効果は単に腸管内で変異原物質を菌体に吸着して排泄を促すというだけかもしれない。しかし、*L. acidophilus* や *B. bifidum* の培養液の投与は結腸腫瘍患者において上部結腸の陰窩の分裂を有意に抑制する⁶⁾ という報告もあり、乳酸菌が宿主に与えている影響も考慮する必要があるだろう。

乳酸菌が大腸癌を抑制するメカニズム

乳酸菌が大腸癌を抑制するメカニズムはまだ正確には

図1. 乳酸菌が大腸癌を抑制するメカニズム

解明されていない。しかし、宿主の免疫機能の増強、発癌物質や変異原物質の吸着と変性、腸内菌叢の量的・質的な変化による発癌物質やプロモータの産生の抑制、結腸内における抗腫瘍および抗変異原物質の産生、腸内菌叢の代謝活性の変化、結腸の生理化学的状态の変化、宿主の生理に及ぼす影響、などが重要な要因であると考えられる（図1）。

宿主の免疫機能の増強

乳酸菌が腫瘍を抑制するメカニズムの一つとして宿主の免疫反応を介するものが考えられる。Sekine ら⁵⁷⁾ は *B. infantis* が宿主の免疫機能を刺激することによって腫瘍の増殖抑制や縮小をもたらすことを示唆した。また、乳酸菌が宿主に対し、抗腫瘍効果を担う特異的および非特異的免疫防御機構の増強において重要な役割を果たしていることを示唆する報告も多くなされている^{11, 30, 55)}。 *L. casei* Shirota (LcS) は動物実験において可移植性腫瘍に対して抗腫瘍効果と抗転移効果を持ち、化学発癌に対しても抑制する効果をもつことが示されているが、LcS はまた、腫瘍を移植されたマウスに対し IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α といったサイトカインの産生を誘導することが報告されている⁴⁰⁾。これは、LcS が宿主の免疫機能、特に細胞性免疫を修飾することによって抗腫瘍効果をもたらしていることを示唆している。さらに、腫瘍を移植されたマウスに *L. casei* YIT 9018 の生菌を経口投与すると、T 細胞の機能を修飾する免疫反応が活性化されることが報告されている²⁸⁾。さらに、*B. longum* と *B. animalis* もマウスの腹腔細胞の炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α) 産生を促すことが報告されている⁵⁶⁾。

発癌物質や変異原物質の吸着と変性

菌体やある種の植物細胞壁は結腸内における遊離した（すなわち生体に影響を及ぼす）毒素の割合を決める重要な要素であると考えられている。蛋白質が豊富な食事に特に多く含まれているといわれる変異原物質は *in vitro* で腸内細菌や乳酸菌に吸着され、変異原物質をこれらの菌と混合した後の変異原性の減少は菌体への吸着の効率と高い相関が認められる^{33, 44, 46, 66)}。吸着は主に物

理的な現象であり、菌体壁に含まれるペプチドグリカンと多糖類が吸着に重要な役割を果たしていると考えられている⁶⁷⁾。菌体に吸着された変異原物質がヒトの腸管内でどのような運命をたどるかは解明されていないが、Zhang と Ohta⁶⁸⁾ は乳酸菌や腸内細菌あるいは酵母の凍結乾燥菌体はラットにおいて 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) の小腸からの吸収を阻害し、血中濃度を低下させることを示した。しかしながら菌体に吸着された変異原物質がヒトの消化管内でも吸着されたままであるかどうかはまだよくわかっておらず、菌体への吸着のヒト体内での重要性は不明である。また、*Lactobacillus* はニトロソアミンを変性することが知られている⁵³⁾。

腸内菌叢の量的・質的な変化による発癌物質やプロモータの産生の抑制

L. acidophilus を含む発酵乳の摂取は大腸菌などのいわゆる腸内腐敗菌の菌数を抑え、*Lactobacillus* の菌数を増加させることが知られている^{3, 60)}。したがって *L. acidophilus* の投与は腸内腐敗菌によって産生される発癌プロモータや発癌物質を抑制し、腸内の環境を好ましい状態に保つ効果があると考えられる。

結腸内における抗腫瘍および抗変異原物質の産生

B. infantis, *B. bifidum*, *B. animalis*, *L. acidophilus* および *L. paracasei* を含む発酵乳は乳癌由来 MCF7 細胞の発育を阻害し、その効果は菌体の存在とは無関係であった⁷⁾。Arimochi ら²⁾ は *L. acidophilus* が AOM を投与したラット結腸における ACF 形成抑制効果と結腸粘膜 DNA からの O⁶-メチルグアニンの除去能の増強効果をもつことを報告し、これらの効果が菌体細胞ではなく培養上清中に存在することを明らかにした。

腸内菌叢の代謝活性の変化

多くの外来物質が肝臓においてグルクロン酸抱合された後胆汁を介して腸管に排泄されることによって解毒されている。腸内細菌のもつ β -グルクロニダーゼは幅広いグルクロン酸抱合体を水解する能力を有し、解毒された発癌物質を再び腸管内で解離させることができる。これ以外にも腸管内で発癌物質を発現させる効果のある腸内細菌由来の酵素がいくつか知られている。乳酸菌は動物実験においてこういった好ましくない酵素の活性を抑える効果があり、それが発癌の抑制につながるであろうという可能性は古くから考えられていた^{1, 17, 32, 54)}。乳酸菌はまた、ヒトのボランティアを用いた研究でも糞便中の特定の酵素活性を抑える効果が認められている^{3, 19, 37, 61)}。Goldin と Gorbach¹⁶⁾ は健康成人を用いて *L. acidophilus* NCFM および N-2 の給与が β -グルクロニダーゼ、ニトリリダクターゼおよびアゾリダクターゼの活性に及ぼす影響を検討し、どちらの株にも 10 日間の給与でこれらの酵素活性を低下させる効果があることを明らかにした。しかし、*Lactobacillus* 株の給与を中止するとこれらの酵素活性は 10~30 日後には元に戻り、

効果の持続には継続して乳酸菌を摂取することが大切であることも示された。彼らはこの酵素活性の低下が *L. acidophilus* の生菌をラットに投与したときに見られる大腸癌抑制効果¹⁵⁾と関連があると示唆している。これまでに発表されている報告のすべてで発癌関連酵素活性の低下が認められているわけではないが、少なくとも β -グルクロニダーゼとニトリリダクターゼについては比較的成绩は安定しているようである。しかし、これらの酵素がどれほどヒトの発癌に関与しているかは不明な点が多く、そもそもヒトにおいて癌の原因となる物質がどのようにして生成されているかはまだわかっていない点が多い。

結腸の生理化学的状態の変化

Modler ら⁴¹⁾は腸管内の pH の低下が腸内腐敗菌の増殖を抑制し、大腸癌の発生と密接に関連していると示唆している。*B. longum* とイヌリンあるいはイヌリンのみを与えられたラットでは盲腸重量と β -グルコシダーゼの活性が増加し、盲腸内 pH が低下したことが報告されている⁵⁴⁾が、腸管内 pH の低下は必ずしもすべての論文で観察されているわけではない^{1, 5)}。

食餌中の脂肪の量は、大腸癌の危険因子と考えられており、これはおそらく胆汁酸、特に細菌の 7α -デヒドロゲナーゼの作用によって 1 次胆汁酸から作られる 2 次胆汁酸が結腸中に増加するためであろうと考えられている⁶⁴⁾。胆汁酸が大腸発癌に関与しているメカニズムの一つとして考えられているのが、便中の水相に存在する胆汁酸すなわち可溶性の胆汁酸が結腸上皮細胞に対して細胞毒性を示し、それに伴って腸管上皮細胞の分裂が促進されるというものである⁸⁾。大腸癌患者に 6 週間 *L. acidophilus* を含有する発酵乳を与えると便中の可溶性胆汁酸の濃度が低下することが報告されている³⁵⁾。この報告ではおそらく検体数が少なかったために統計的に有意な結果は得られていないが、大腸癌の患者で明らかな可溶性胆汁酸の減少傾向が観察されたことは興味深い。また、結腸に良性腫瘍をもつ患者に 3 カ月にわたって *L. acidophilus* と *B. bifidum* を投与した研究においては、投与期間中に糞便 pH が有意に低下するとともに発癌低リスク者に比べて高かった上部結腸陰窩の分裂活性が乳酸菌投与により抑制された⁶⁾。先に述べた研究³⁵⁾と併せて考えると、分裂活性の低下は可溶性胆汁酸の減少と関連があることが推測される。

宿主の生理に及ぼす影響

Lactobacillus は小腸の優勢菌種であり、おそらく消化管上部の代謝活性に影響を与えている。小腸⁶³⁾や結腸¹²⁾の粘膜は消化管腔内に存在する変異原物質を吸収する能力があり、吸収された物質はそのままの形あるいは代謝産物として血流に乗って運ばれる。乳酸菌はラットを用いた研究で発癌物質の代謝にかかわるとされる結腸の NADPH-チトクローム P-450 リダクターゼ⁴⁷⁾およびグルタチオン S-トランスフェラーゼの活性を上

昇させ¹⁰⁾、肝臓のウリジンジホスホグルクロニルトランスフェラーゼの活性を低下させること¹⁾が報告されている。

いくつかのプロバイオティクスに用いられる菌株によって産生される酪酸はさまざまな結腸腫瘍由来細胞株で分化とアポトーシスを誘導する^{9, 20)}。アポトーシスは細胞数を制御するための重要な機構であり、結腸においても機能していない細胞や有害な細胞、異常な細胞を除去するのに役立っている^{21, 48)}。したがって、酪酸によって誘導されるアポトーシスは結腸上皮に形成された DNA アダクトの除去にも関与していると考えられる。Arimochi ら²⁾は腸管に生息する細菌がラットの結腸において AOM で誘発された ACF や DNA アダクトの形成に与える影響を検討し、*L. acidophilus* の培養上清が ACF 形成を抑制し、その抑制効果は結腸粘膜からの O⁶-メチルグアニンの除去を促進させるからであることを示した。彼らは *L. acidophilus* 培養上清中に含まれる代謝産物が O⁶-メチルグアニン修復酵素であるメチルグアニンメチルトランスフェラーゼの活性を促進していると示唆している。つまり、乳酸菌の代謝産物は食餌に含まれる変異原物質に暴露された後の DNA 修復酵素を誘導する可能性があるのである。

結 語

以上のように、多くの研究が *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* の単独あるいは非消化性の炭水化物すなわちプレバイオティクスとの同時投与が腸内菌叢に影響を与え、初期の前癌病変の発達を抑制することを明らかにしてきた。ただし、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* の投与による腸内菌叢や宿主に対する影響を確認できなかった研究^{5, 42)}もあり、また現在のところ疫学研究の結果は必ずしも実験によって示された *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* の大腸癌予防効果を支持するものではない。この結果の不一致の原因ははっきりとはわかっていないが、発酵乳製品に用いられる菌株は一般に実験に用いられる菌株に比べて消化管内における生残性に劣るといったような菌株間の違いもその一因かもしれない。動物実験や *in vitro* の研究で得られた情報をヒトに外挿する際には十分な注意が必要なことはいままでもない。実験動物は通常特別に維持された系統の動物であり、さらに実験動物とヒトの腸内菌叢は構成、代謝活性ともに大きく異なっていることにも配慮する必要がある。無菌動物にヒトの腸内菌叢を定着させた HFA 動物の応用はその一つの解決法となるかもしれない。動物実験でしばしば用いられる、乳酸菌を静脈内や腹腔内あるいは腫瘍に直接投与する手法はヒトにおける経口摂取と同様に扱うことはできない。また、乳酸菌のもつ抗腫瘍効果は宿主の免疫機能の増強によることを示唆する報告も多いが、効果のメカニズムについてはさらに研究が必要である。抗腫瘍効果をもつ菌株の特定と効果にかかわるその菌株の性

状の同定もなされなければならない。しかし、このように課題はまだ残されておりヒトを対象とした研究も不足しているが、発癌予防に乳酸菌を利用することは興味深く、将来が有望であり、さらに研究を進めていく価値のある分野である。例えば、豊富な実験データと関連させる疫学研究を注意深く計画していく必要があるだろう。

引用文献

- 1) Abdelali, H., Cassand, P., Soussotte, V., Daubeze, M., Bouley, C. and Narbonne, J. F.: Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr. Cancer*, **24**, 121-132 (1995).
- 2) Arimochi, H., Kinouchi, T., Kataoka, K., Kuwahara, T. and Ohnishi, Y.: Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238**, 753-757 (1997).
- 3) Ayebo, A.D., Angelo, I. A. and Shahani, K. M.: Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk upon fecal flora and enzyme activity in humans. *Milch Wissenschaft*, **35**, 730-733 (1980).
- 4) Baricault, L., Denariac, G., Houri, J.-J., Bouley, C., Sapin, C. and Trugnan, G.: Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis*, **16**, 245-252 (1995).
- 5) Bartram, H. P., Scheppach, W., Gerlach, S., Ruckdeschel, G., Kelber, E. and Kasper, H.: Does yogurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and fecal metabolites in healthy subjects? *Am. J. Clin. Nutr.*, **59**, 428-432 (1994).
- 6) Biasco, G., Paganelli, G. M., Brandi, G., Brilli, S., Lami, F., Callegari, C. and Gizzi, G.: Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on rectal cell kinetics and fecal pH. *Ital. J. Gastroenterol.*, **23**, 142 (1991).
- 7) Biffi, A., Coradini, D., Larsen, R., Riva, L. and Di Fronzo, G.: Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr. Cancer*, **28**, 93-99 (1997).
- 8) Bruce, W. R.: Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Res.*, **47**, 4237-4242 (1987).
- 9) Calabresse, C., Venturini, L., Ronco, G., Villa, P., Chomienne, C. and Belpomme, D.: Butyric acid and its monosaccharide ester induce apoptosis in the HT-60 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 31-38 (1993).
- 10) Challa, A., Rao, D. R., Chawan, C. B. and Shackelford, L.: *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, **18**, 517-521 (1997).
- 11) De Simone, C., Vesely, R., Bianchi Salvadori, B. and Jirillo, E.: The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals. *Int. J. Immunother.*, **9**, 23-28 (1993).
- 12) Fang, W.-F. and Strobel, H. W.: Activation of carcinogens and mutagens by rat colon mucosa. *Cancer Res.*, **38**, 2939-2944 (1978).
- 13) Friend, B. A., Farmer, R. E. and Shahani, K. M.: Effect of feeding and intraperitoneal implantation of yogurt culture cells on Ehrlich ascites tumor. *Milch Wissenschaft*, **37**, 708-710 (1982).
- 14) Gallaher, D. D., Stallings, W. H., Blessing, L. L., Busta, F. F. and Brady, L. J.: Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. *J. Nutr.*, **126**, 1362-1371 (1996).
- 15) Goldin, B. R. and Gorbach, S. L.: Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 263-265 (1980).
- 16) Goldin, B. R. and Gorbach, S. L.: The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.*, **39**, 756-761 (1984).
- 17) Goldin, B. R. and Gorbach, S. L.: Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides. *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 689-695 (1984).
- 18) Goldin, B. R., Gualtieri, L. J. and Moore, R. P.: The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr. Cancer*, **25**, 197-204 (1996).
- 19) Goldin, B. R., Swenson, L., Dwyer, J., Sexton, M. and Gorbach, S. L.: Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 255-261 (1980).
- 20) Hague, A., Elder, D. J., Hicks, D. J. and Paraskeva, C.: Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int. J. Cancer*, **60**, 400-406 (1995).
- 21) Hall, P. A., Coates, P. J., Ansari, B. and Hopwood, D.: Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell Sci.*, **107**, 3569-3577 (1994).
- 22) Hayatsu, H. and Hayatsu, T.: Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett.*, **73**, 173-179 (1993).
- 23) Hirayama, K., Baranczewski, P., Åkerland, J.-E., Midtvedt, T., Möller, L. and Rafter, J.: Effects of human intestinal flora on mutagenicity of and DNA adduct formation from food and environmental mutagens. *Carcinogenesis*, **21**, 2105-2111 (2000).
- 24) Hirayama, K., Itoh, K., Takahashi, E. and Mitsuoka, T.: Comparison of composition of faecal microbiota and metabolism of faecal bacteria among 'human-flora-associated' mice inoculated with faeces from six different human donors. *Microbial Ecol. Health Dis.*, **8**, 199-211 (1995).
- 25) Horie, H., Zeisig, M., Hirayama, K., Midtvedt, T., Möller, L. and Rafter, J.: Probiotic mixture decreases

- DNA adduct formation in colonic epithelium induced by the food mutagen 2-amino-9H-pyrido(2,3-b)indole in a human-flora associated mouse model. *Eur. J. Cancer Prev.*, **12**, 101-107 (2003).
- 26) Kampman, E., Giovannucci, E., van't Veer, P., Rimm, E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Kok, F. J. and Willett, W. C.: Calcium, vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am. J. Epidemiol.*, **139**, 16-29 (1994).
 - 27) Kampman, E., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A. and van't Veer, P.: Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Res.*, **54**, 3186-3190 (1994).
 - 28) Kato, I., Endo, K. and Yokokura, T.: Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, **16**, 29-36 (1994).
 - 29) Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. and Mutai, M.: Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann*, **72**, 517-523 (1981).
 - 30) Kato, I., Yokokura, T. and Mutai, M.: Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. *Microbiol. Immunol.*, **27**, 611-618 (1983).
 - 31) Kohwi, T., Imai, K., Tamura, A. and Hashimoto, Y.: Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann*, **69**, 613-618 (1978).
 - 32) Kulkarni, N. and Reddy, B. S.: Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **207**, 278-283 (1994).
 - 33) Lankaputhra, W. E. V. and Shah, N. P.: Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat. Res.*, **397**, 169-182 (1998).
 - 34) Le, M. G., Moulton, L. H., Hill, C. and Kramer, A.: Consumption of dairy produce and alcohol in a case-control study of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 633-636 (1986).
 - 35) Lidbeck, A., Geltner-Allinger, U., Orrhage, K. M., Ottava, L., Brismar, B., Gustafsson, J.-Å. and Rafter, J. J.: Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal bile acids in colon cancer patients. *Microbial Ecol. Health Dis.*, **4**, 81-88 (1991).
 - 36) Lidbeck, A., Övervik, E., Rafter, J., Nord, C. E. and Gustafsson, J.-Å.: Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in feces and urine in humans. *Microbial Ecol. Health Dis.*, **5**, 59-67 (1992).
 - 37) Ling, W. H., Korpela, R., Mykkanen, H., Salminen, S. and Hanninen, O.: Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr.*, **124**, 18-23 (1994).
 - 38) MacLennan, R. and Jensen, O. M.: Dietary fibre, transit time, fecal bacteria, steroids, and colon cancer in two Scandinavian Populations. Report from the International Agency for Research on Cancer, Intestinal Microecology Group. *Lancet*, **2**, 207-211 (1977).
 - 39) Malhotra, S. L.: Dietary factors in a study of colon cancer from cancer registry, with special reference to the role of saliva, milk, and fermented milk products and vegetable fibre. *Med. Hypotheses*, **3**, 122-134 (1977).
 - 40) Matsuzaki, T.: Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int. J. Food Microbiol.*, **41**, 133-140 (1998).
 - 41) Modler, G. W., McKellar, R. C. and Yaguchi, M.: Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **23**, 29-41 (1990).
 - 42) Nielsen, O. H., Jorgensen, S., Pedersen, K. and Justesen, T.: Microbiological evaluation of jejunal aspirates and fecal samples after oral administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, 469-474 (1994).
 - 43) Onoue, M., Kado, S., Sakaitani, Y., Uchida, K. and Morotomi, M.: Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer Lett.*, **113**, 179-186 (1997).
 - 44) Orrhage, K., Sillerström, E., Gustafsson, J.-Å., Nord, C. E. and Rafter, J.: Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res.*, **311**, 239-248 (1994).
 - 45) Peters, R. K., Pike, M. C., Garabrant, D. and Mack, T. M.: Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes Control*, **3**, 457-473 (1992).
 - 46) Pool-Zobel, B. L., Münzner, R. and Holzapfel, W. H.: Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. typhimurium* mutagenicity assay. *Nutr. Cancer*, **20**, 261-270 (1993).
 - 47) Pool-Zobel, B. L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney, C., Moretti, M., Vilarini, I., Scasellati-Sforzolini, R. and Rowland, I.: *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer*, **26**, 365-380 (1996).
 - 48) Potten, C. S., Wilson, J. W. and Booth, C.: Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells*, **15**, 82-93 (1997).
 - 49) Reddy, B. S.: Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies. *Br. J. Nutr.*, **80**, S219-S223 (1998).
 - 50) Reddy, B. S. and Rivenson, A.: Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.*, **53**, 3914-3918 (1993).
 - 51) Reddy, G. V., Friend, B. A., Shahani, K. M. and Farmer, R. E.: Antitumor activity of yogurt components. *J. Food Protect*, **46**, 8-11 (1983).
 - 52) Reddy, G. V., Shahani, K. M. and Benerjee, M. R.: Inhibitory effect of yogurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 815-817 (1973).

- 53) Rowland, I. R. and Grasso, P.: Degradation of *N*-nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.*, **29**, 7-12 (1975).
- 54) Rowland, I. R., Rumney, C. J., Coutts, J. T. and Lievense, L. C.: Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, **19**, 281-285 (1998).
- 55) Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J. M. and Donnet-Hughes, A.: Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **78**, 491-496 (1995).
- 56) Sekine, K., Kawashima, T. and Hashimoto, Y.: Comparison of the TNF- α levels induced by human-derived *Bifidobacterium longum* and rat-derived *Bifidobacterium animalis* in mouse peritoneal cells. *Bifidobacteria Microflora*, **13**, 79-89 (1994).
- 57) Sekine, K., Toida, T., Saito, M., Kuboyama, M., Kawashima, T. and Hashimoto, Y.: A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.*, **45**, 1300-1307 (1985).
- 58) Singh, J., Rivenon, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N. and Reddy, B. S.: *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **18**, 833-841 (1997).
- 59) Shackelford, L. A., Rao, D. R., Chawan, C. B. and Pulusani, S. R.: Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically-induced colon tumors in rats. *Nutr. Cancer*, **5**, 159-164 (1983).
- 60) Shahani, K. M. and Ayebo, A. D.: Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2448-2457 (1980).
- 61) Spanhaak, S., Havenaar, R. and Schaafsma, G.: The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **52**, 899-907 (1998).
- 62) van't Veer, P., Dekker, J. M., Lamers, J. W., Kok, F. J., Schouten, E. G., Brants, H. A., Sturmans, F. and Hermus, R. J.: Consumption of fermented milk products and breast cancer: A case-control study in the Netherlands. *Cancer Res.*, **49**, 4020-4023 (1989).
- 63) Venitt, S.: Mutagens in human faeces and cancer of the large bowel. Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer. Rowland, I. R. (ed.), pp. 399-460, Academic Press, London (1988).
- 64) Weisburger, J. H. and Wynder, E. L.: Etiology of colorectal cancer with emphasis on mechanism of action and prevention. Important Advances in Oncology. De Vita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. (eds.), pp. 197-220, JB Lippincott, Philadelphia (1987).
- 65) Young, T. B. and Wolf, D. A.: Case-control study of proximal and distal colon cancer and diet in Wisconsin. *Int. J. Cancer*, **42**, 167-175 (1988).
- 66) Zhang, X. B. and Ohta, Y.: In vitro binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. *J. Dairy Sci.*, **74**, 752-757 (1991).
- 67) Zhang, X. B. and Ohta, Y.: Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **74**, 1477-1481 (1991).
- 68) Zhang, X. B. and Ohta, Y.: Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole, *Can. J. Microbiol.*, **39**, 841-845 (1993).