焦げ肉摂取により誘導される尿および便中変異原の 植物性乳酸菌による抑制[†]

熊谷武久 §, 川村博幸, 渡辺紀之, 岡田早苗*

Suppression Effect of Plant Origin Lactic Acid Bacteria on Urinary and Fecal Mutagenicity Arising from Eating Burned Beef (Antimutagenicity of Plant Origin Lactic Acid Bacteria Part III)

Takehisa Kumagai §, Hiroyuki Kawamura, Toshiyuki Watanabe and Sanae Okada*

Kameda Seika Co., Ltd. 1-3-5 Motomachi, Kameda-machi, Nakakanbara-gun, Niigata 950-0192

*NRIC Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture,

1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

The effect of plant origin lactic acid bacteria on antimutagenicity for humans was tested. Mutagenicity of urine during 24 hours and of feces during 10 days for 4 healthy adults (men non-smoking) were measured when burned beef administration. Then fermented milk prepared with *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 which was isolated from rice, burned beef and milk were administered to 8 healthy adults (men non-smoking) and mutagenicity was measured. Mutagen in urine and feces was extracted using blue rayon method. Mutagenicity was analysed with the Ames test, using *Salmonella typhimurium* TA98 (with S9 mix). Six hours after eating burned beef, mutagenicity extracted from urine increased, then returned to the original level. Fecal mutagenicity increased after 1 day, then returned to the original level after about 4 days. When eating burned beef and fermented milk, urinary and fecal mutagenicity were almost the same as the original level and the mutagenicity significantly lowered compared to when burned beef was administered. When eating burned beef and drinking milk, urinary and fecal mutagenicity increased as it did when burned beef was administered alone. The number of *Lactobacillus* strain bacteria in feces significantly increased when fermented milk was administered. These results suggest that administering *L. casei* subsp. *casei* 327 suppresses urinary and fecal mutagenicity arising from eating burned beef.

(Received Feb. 21, 2002 ; Accepted Apr. 3, 2002)

変異原物質及び発癌物質はDNAや染色体に突然変異を誘発し、この過程はイニシエーションと呼ばれる。続いてプロモーションと呼ばれる細胞の異常増殖、さらに増殖した細胞が悪性化するプログレッションの過程を経てがん細胞へと変化する¹⁾とされている。

発癌の要因は様々であるが、そのうち食物が30%以

上を占めており¹⁾²⁾、肉や魚などを調理する際、そのタンパク質から変異原性を有する3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indol (Trp-P1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido(4,3-b)indol (Trp-P2)等のヘテロサイクリックアミン類が生成される。このヘテロサイクリックアミンだけではなく、様々な変異原物質に対する抗変異原性を有

[†] 植物性乳酸菌の抗変異原性 (第3報) (前報, 文献9)

亀田製菓株式会社研究室 (〒950-0192 新潟県中蒲原郡亀田町元町 1-3-5)

* 東京農業大学菌株保存室 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

§ 連絡先 (Corresponding author)

する物質の検索が行われ、発酵乳³⁾⁴⁾や乳酸菌⁵⁾などにも効果があることが報告されているが、ヒトに対しての臨床試験例は少ない⁶⁾。この理由の一つとして尿や便を変異原性試験の試料として直接使うことの難しさが挙げられる。早津ら⁷⁾によりブルーレーヨン法を用い尿や便の変異原性の検討がなされた。この方法を用いることでテロサイクリックアミン類の吸着・回収ができ、アミノ酸を含む試料や変異原濃度が希薄で、かつ大量の試料を用いる際の変異原性試験が可能となった。

日本の伝統食品に多く用いられている乳酸菌、いわゆる植物性乳酸菌について、著者らは日本人の主食である米及び米加工品から乳酸菌を分離し、4-nitroquinoline-1-oxide, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Trp-P1, Trp-P2, 2-aminoanthracene に対する抗変異原性を検討し報告した⁸⁾⁹⁾。さらに、人工胃液や人工腸液に対して耐性を有することを確認し、プロバイオティクスとしての可能性を報告した¹⁰⁾。

本報告では、焦げ肉摂取による尿及び便中の変異原性の上昇を確認し、発酵乳摂取による抑制効果を検討した。

実験方法

1. 発酵乳の調製

供試乳酸菌は米より分離した植物性乳酸菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 を用いた⁸⁾。

発酵乳は次のように調製した。牛乳（市販の全乳）に植物性乳酸菌を良好に生育させるため2%米粉と1.5%脱脂粉乳を加えα-アミラーゼ（アマノ）で液化（80℃、10分）後、95℃で10分間殺菌し発酵乳原料とした。この発酵乳原料に対し *L. casei* subsp. *casei* 327 の前培養液を2%（V/V）接種し、37℃で24時間発酵した。乳酸

菌数の測定は BCP 加プレートカウントアガール（日水製薬）を用いた。

2. 変異原物質としての焦げ肉の調製

牛挽肉は大量に購入して均一に混ぜた後、200gずつ冷凍庫に保存し、試験の度に解凍して使用した。牛挽肉200gを170℃、15分間ホットプレート（今西金属工業、イマーグリドル IG-1000）で炒め十分に焦げた肉を調製した。収量は80gであった。

3. 試験スケジュール及び方法

被験者は、喫煙習慣がないもの、毎朝排便が1回あるもの、生活のリズムが一定であるもの、健康であるものを8人選抜した。本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、また社内倫理規定に従い、実験計画を社内倫理審査会に承認を得た上、事前に被験者に研究の趣旨及び試験内容を十分に説明し、自由意志により試験参加の同意を得た。

試験スケジュールを図1に示した。試験期間は全6週間とし、観察期2週間、発酵乳非摂取期1週間、発酵乳摂取期1週間、休止期1週間、牛乳摂取期1週間とした。

焦げ肉40gは発酵乳非摂取期、発酵乳摂取期、牛乳摂取期に各1回、午前10時に摂取させ、その際水100mlを飲用させた。発酵乳摂取期中は発酵乳100gを焦げ肉摂取の前日から5日間、毎日午前10時に摂取させた。焦げ肉摂取の場合は、焦げ肉摂取後に発酵乳を摂取させた。発酵乳の対照食として、主成分が同じであることより牛乳100gを用い、発酵乳と同じ摂取方法で行った。便、尿とも全量採取させ、尿は回収時に強制排泄させた。検体はできる限り涼しいところで保存させ、回収後は速やかに変異原物質の抽出を行った。

試験期間中は、他の発酵乳、納豆などの生菌食品、食物繊維及びオリゴ糖強化食品の摂取、下剤、生菌剤及び

図1 試験スケジュール

焦げ肉40g、発酵乳及び牛乳100g摂取

▲, 摂取日; △, 採尿日

発酵乳非摂取期初日の採尿は定常時の値測定のため

抗生物質の服用, 焦げたタンパク質を含む食品の摂取を控えること以外は, 食事制限を行わなかったが暴飲暴食を慎んでもらい食生活を含む生活のリズムを一定にしてもらった。発酵乳は調製直後のものを 5 日間分まとめて配布した。

4. 変異原性試験

変異原性試験はブレインキューベーション法¹¹⁾で行った。指標菌は *Salmonella typhimurium* TA98 を用いた。

試料溶液 0.05ml に S-9 ミックス (オリエンタル酵母) 0.5ml 及び, 指標菌液 0.1ml を添加し, 37°C で 20 分間振とう下で接触後, 軟寒天液 2ml を加え攪拌後, 最少グルコース寒天培地に均一に重層し, 37°C で培養した。3 日後のコロニー数を計測し, 5 日後にもコロニー数の計測を行った。試料の代わりに Dimethyl Sulfoxide (DMSO) を用い自然復帰コロニー数を計算した。試料添加時のコロニー数から自然復帰コロニー数を減じたものを復帰変異コロニー数とした。測定は 2 連で行った。なお Trp-P1 による変異コロニー数は 0.1 µg/plate の時, 2451 cfu/plate であった。

5. 試料の調製

検体からの変異原物質の抽出はブルーレーヨン法⁷⁾に準じて行った。焦げ肉 40g は水 60ml で抽出したものを前試料とし, 便は 1.5 倍重の水でもみほぐした後, 10 分間攪拌し, 遠心分離 (9000 rpm, 30 分) した上清を前試料とした。

これらの前試料及び尿にブルーレーヨン (フナコシ) 0.2g を添加し 30 分, 振とう下で接触後, 別のブルーレーヨン 0.2g で再処理を 2 回した。合わせたブルーレーヨンは, 水で洗浄し, 乾燥後, メタノール-飽和アンモニア水 (50:1) 150ml で溶出し, 蒸発乾固後, 供試試料とした。試料は冷凍保存し, 測定時に DMSO に溶解して変異原性の測定を行った。

6. 便中乳酸桿菌数の測定

乳酸桿菌数は LBS 寒天培地 (BBL) を用いて, 嫌氣的に 48 時間培養した。菌数は糞便 1g あたりに換算した。

7. 統計処理

試験結果は平均値±標準偏差を算出し, 対応のある t-検定により解析した。危険率 5% 以下を有意差有りとした。

実 験 結 果

1. 焦げ肉の変異原性

牛挽肉の加熱前及び 170°C で加熱後の変異原性を表 1 に示した。復帰変異コロニー数は生肉として 100g 及び

表 1 牛挽肉の加熱処理による変異原性の変化

処理条件	復帰変異コロニー数*
非加熱 (生肉)	240±85
加熱処理 7 分	660±140
13 分	1960±35
15 分	1950±71
17 分	1930±14

* 生肉 100g の加熱前及び 170°C で加熱後の値
平均値±標準偏差

図 2 焦げ肉摂取による尿中変異原性の変化

●, 被験者 A; ▲, 被験者 B; ○, 被験者 C; △, 被験者 D

6 時間尿を採取後焦げ肉を摂取, 以後 6 時間毎に採尿

それを加熱処理した肉相当である。生肉にも変異原性は認められ, 加熱することで, 変異原性の上昇が確認された。加熱時間 13~17 分の間では, 復帰変異コロニー数は約 1900 cfu とほとんど変化がなかったため, 発酵乳投与試験には 15 分加熱処理した焦げ肉を用いた。

2. 焦げ肉摂取による尿及び便中の変異原性

定常時の尿及び便中の変異原性と焦げ肉摂取による変異原性の上昇, そして定常に戻るまでの時間を知るために予備試験を行った。試験スケジュール及び方法は実験方法の第 3 項に準じて行い, 被験者は 4 名で, 観察期

図 3 焦げ肉摂取による便中変異原性の変化
シンボルは図 2 と同じ
採便後焦げ肉を摂取、以後毎朝採便

図 5 発酵乳摂取による便中変異原性の抑制
●, 発酵乳非摂取期; ▲, 発酵乳摂取期; ■, 牛乳摂取期
平均値±標準偏差; *, $p < 0.01$
発酵乳非摂取期と発酵乳摂取期との同一日間の有意差

図 4 発酵乳摂取による尿中変異原性の抑制
平均値±標準偏差, *: $p < 0.01$
定常時と焦げ肉摂取後の 6 時間尿の値

は 2 日間で行った。採尿は焦げ肉摂取前の 6 時間の尿及び焦げ肉摂取から 24 時間までの 6 時間毎に行い、採便は焦げ肉摂取前日を含め 10 日間行った。復帰変異コロニー数は尿及び便全量に対する値で示した。

図 2 に尿中の変異原性の経時変化を示した。被験者 4 名とも 6 時間で変異原性の上昇が見られ、12 時間以後では焦げ肉摂取前の値とほぼ同一であった。焦げ肉由来の変異原物質は 6 時間以内で尿から排泄されると推察し、発酵乳投与試験では焦げ肉摂取後 6 時間の尿を用いて比較することとした。

図 3 に便中の変異原性の経時変化を示した。焦げ肉摂取 1 日後に変異原性の上昇が見られ、その後低下することが確認された。3 日後までに大部分の変異原物質が排泄されること、4 日後には定常時に戻ることが観察されたので、発酵乳投与試験では焦げ肉摂取前 1 日、摂取後 4 日の計 5 日間の便で比較することにし、焦げ肉の摂取は 1 週間の間隔で行うこととした。

3. 発酵乳投与試験

用いた発酵乳の乳酸菌数は 1.0×10^9 cfu/g であり、保存後 2 週間までほとんど変化しないことを確認した。製造直後の pH は 4.3 であった。また、被験者には試験期間中に下痢などの消化器症状は見られず、毎日排便が行われた。

図 4 に定常時と焦げ肉摂取後 6 時間の尿中変異原性を示した。定常時のコロニー数は 320 ± 60 (平均値±標準偏差) であったが、焦げ肉を摂取することで 780 ± 200 と有意に上昇した。発酵乳摂取期では 390 ± 80 と定常時より約 20% の上昇で有意差は認められず、発酵乳非摂取期より有意な低下が認められた。牛乳摂取期では 850 ± 150 と焦げ肉摂取の場合と同程度の値であり、定常時に

図 6 発酵乳摂取による乳酸桿菌数の変化

シンボルの違いは被験者が異なることを示す
発酵乳非摂取期の 10^2 cfu の被験者 2 名は検出限界以下

比べ有意に上昇した。

図 5 に便中変異原性の経時変化を示した。定常時のコロニー数は 330 ± 60 であったが、焦げ肉を摂取することで 630 ± 170 と上昇し、その後徐々に減少して摂取 4 日後に定常時の値の戻った。発酵乳摂取期では摂取後 4 日間を通して定常時とほぼ同じ値であり、変異原性の上昇はほとんど認められなかった。発酵乳非摂取期と発酵乳摂取期の同一日の値を検定したところ、摂取前では有意差はなく、摂取 1 日後及び 2 日後で危険率 1% の有意差が認められた。牛乳摂取期では摂取 1 日後の上昇度合いが、非摂取期より低かったものの、変異原性の上昇曲線は非摂取期と同様な形を示した。

図 6 に試験期間を通じての便中乳酸桿菌の変化を示した。検体は焦げ肉を摂取 1 日後の便を用いた。即ち、発酵乳摂取期は発酵乳摂取後 3 日の便であり、牛乳摂取期は発酵乳摂取終了後から 12 日の便である。

発酵乳非摂取期は 6.5 ± 1.8 cfu/g (対数値の平均 $\pm$ 標準偏差) 発酵乳摂取期は 8.1 ± 0.8 cfu/g であり有意な増加 (危険率 1%) を示した。牛乳摂取期は 5.6 ± 1.9 cfu/g であり非摂取期と比べ有意差が認められなかった。

被験者 8 人の内、便中に乳酸桿菌が検出されないヒト (10^2 未満) は 2 人と 10^8 検出された比較的高い乳酸桿菌が多いヒト 1 名が存在した。いずれの被験者も、発酵乳を摂取することで乳酸桿菌が 10^7 以上に増加することが認められた。検出されなかった 2 人では 10^7 に上昇し、当該乳酸菌が腸内に到達したことが示唆される。発酵乳摂取前に乳酸桿菌数が多く検出されたヒトほど、発酵乳摂取により乳酸桿菌数がより多く検出される傾向であった。発酵乳摂取終了 13 日で便中の乳酸桿菌数は発酵乳摂取前とほとんど同じ値に戻り、牛乳摂取期の試験に、当該乳酸菌の影響がなかったことが示唆される。

考 察

経口摂取された変異原物質等は、一部はそのまま便として排泄されるが、一部は消化管から吸収され、門脈を通り肝臓へ行く。肝臓から血管を経て腎臓で処理された後、尿中に排泄されるもの、又は肝臓から胆汁成分として消化管に分泌され便として排泄されるものや、さらに腸肝循環を繰り返されるものがある¹²⁾

肝臓に送られた、変異原物質は活性化や解毒作用を受け、活性体はそれぞれに特有な代謝系で不活性化されたり、グルクロン酸等で包合することで誘導体に変えられ尿や便中に排泄される。包合された変異原物質は腸内細菌によっても活性化される。これら活性化された変異原物質が不活性化されるまでの間、被曝を受ける細胞や臓器は突然変異のリスクを受けることになり、消化管内で速やかに不活性化することが重要と思われる。

著者らは植物性乳酸菌 *L. casei* subsp. *casei* 327 のヒトに対する抗変異原性の効果を確認するために、同株を含む発酵乳を調製し、当該発酵乳を摂取することで、焦げ肉摂取による尿及び便中の変異原性上昇を抑制する効果を検討した。

予備試験として被験者 4 人と少数で焦げ肉摂取後の尿及び便中の変異原性の上昇を確認した (図 2, 図 3)。一般に食品を嚥下してから小腸に到着するまでに 5 分～4 時間、大腸には 4～15 時間かかると言われている¹³⁾。また腸肝循環は 1 日に約 6 サイクル¹³⁾ 行われるので、焦げ肉摂取後 6 時間の間に 1 回強程度、循環したことになる。尿中の変異原性は 6 時間でピークとなり、その後はほぼ定常値に戻ったことより、変異原物質が小腸より吸収され、1 回程度の循環を受けた後、尿として排泄され、残りは大腸に送られたことが示唆される。

排便は嚥下してから 24～72 時間で行われる¹³⁾。被験者は毎朝排便があるヒトを選んだので 1 日後に大半が排

泄されると考えられたが、便中の変異原物質が排泄されるまで約3日を要した。同様の結果が早津ら⁷⁾により報告されており、成人3人に調理牛肉を摂取させたときの便中の変異原性が1日後に上昇し、その後低下し続け摂取後3～4日で消失した。6時間後の尿中の変異原性の上昇が見られないため、大腸からの拡散による吸収の可能性も少ないと考えられ、小腸で吸収されなかった変異原物質は大腸や便中に残存し続けたことが示唆される。大腸内に変異原物質が約3日後まで検出された理由として、腸壁や内在性の腸内細菌と比較的弱い吸着などの結合したため遅延されたことが考えられる。

発酵乳はデザートとして食後に摂取することが多い食品であることから、発酵乳投与試験では焦げ肉摂取後に摂取させた。発酵乳摂取期の変異原性は尿及び便で発酵乳非摂取期より有意に低下し、牛乳摂取期では発酵乳非摂取期とほぼ同程度の値であることより、発酵乳中の *L. casei* subsp. *casei* 327 の効果により尿及び便中の変異原性が低下したことが示唆される。

L. casei subsp. *casei* 327 の Trp-P1, Trp-P2 に対する抗変異原性が生菌体と死菌体で同様の値を示すことより、酵素的な効果ではなく吸着作用と推察されることを報告した⁹⁾。Morotomi *et al.*¹⁴⁾ により *L. casei* と Trp-P2 の結合の pH 安定性が、Tanabe *et al.*¹⁵⁾ により *Lactococcus lactis* と Trp-P1 の結合の pH 安定性が報告されており、両者とも pH5～7 程度で安定とされている。

また、空腹時の胃は pH が 1～2 であるが、食物が入った場合、3 以上に上昇する¹³⁾。空腹時の十二指腸～回腸の pH は 6.0～7.5 であり¹⁶⁾、アルカリ性の膵液 (pH 8.0～8.3)、胆汁 (pH 7.0～7.4) 及び腸液 (pH 8.2～9.3) が分泌され¹³⁾、最終的には便中の pH は 6～7 になる。本試験においては pH 4.3 の発酵乳を朝食終了後 3～4 時間後に摂取させたため、胃の中の pH は中性付近であるとは考えにくい。よって *L. casei* subsp. *casei* 327 と変異原物質の結合は十二指腸以降に行われ、その結合は小腸や大腸中の pH やその環境で安定であるため、そのまま排便されたと推察される。

以上のことより植物性乳酸菌 *L. casei* subsp. *casei* 327 を含む発酵乳を摂取することで焦げ肉摂取における尿及び便中の変異原性の上昇を抑制し、プロバイオティクス効果が期待できると推察された。

要 約

焦げ肉摂取による尿及び便中変異原に対する植物性乳

酸菌の抑制効果について検討した。

(1) 発酵乳は植物性乳酸菌 *L. casei* subsp. *casei* 327 を 10^9 cfu/g を含むものを用い、変異原物質として牛挽肉を炒めたものを用いた。

(2) 焦げ肉、尿及び便中の変異原物質はブルーレーヨン法で抽出し、変異原性試験を行った。

(3) 被験者4人と少数で焦げ肉摂取により尿及び便中の変異原性の上昇を確認し、尿では6時間で、便では約3日間で排泄された。

(4) 被験者8人で焦げ肉摂取時、発酵乳と焦げ肉摂取時、牛乳と焦げ肉摂取時の尿及び便中の変異原性を測定し、発酵乳を摂取することで変異原性が有意に低下することを確認した。対照食である牛乳摂取では明確な変異原性の低下は見られなかった。

(5) 発酵乳を摂取することで腸内乳酸桿菌数の有意な増加が見られ、内2人の腸内乳酸桿菌が検出されない被験者で増加したため、当該乳酸菌が腸内到達性を有することが示唆された。

文 献

- 1) 黒田行昭, 食品中の変異原物質, 食品工業, 36, 16-27 (1993).
- 2) 黒田行昭, 抗変異原・抗発がん物質とその作用機序, 「抗変異原・抗発がん物質とその検索法」, 黒田行昭編, (講談社, 東京), pp. 1-12 (1995)
- 3) Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M. and Hosono, A., Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Dairy Sci.*, 75, 976-981 (1992).
- 4) 橋本英夫, 大根田啓二, 中村昇二, 細野明義, 高い抗変異原性を有する発酵乳用乳酸菌の選定に関する研究, *Milk Science*, 47, 101-110 (1998).
- 5) Lankaputhra, W. E. and Shah, N. P., Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic. *Mutation Research*, 397, 169-182 (1998).
- 6) 早津彦哉, 焼牛肉の摂取によって尿中に出現する変異原性に対する *Lactobacillus casei* 投与の抑制効果, 「腸内フローラと変異原」, 光岡知足編, (学会出版センター, 東京), pp. 93-110 (1997).
- 7) Hayatsu, H., Hayatsu, T., Wataya, Y. and Mower, F.H., Fecal mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Mutation Research*, 143, 207-211 (1985).
- 8) 熊谷武久, 瀬野公子, 渡辺紀之, 岡田早苗, 米及び米加工品より分離した植物性乳酸菌の抗変異原性, 食科工, 47, 551-554 (2000).

- 9) 熊谷武久, 瀬野公子, 渡辺紀之, 岡田早苗, 米及び米加工品より分離した植物性乳酸菌の抗変異原性, (第 2 報) 食科工, 48, 693-696 (2001).
- 10) 熊谷武久, 瀬野公子, 川村博幸, 渡辺紀之, 岡田早苗, 植物性乳酸菌の食品発酵性と食餌モデル培地における生育, 食科工, 48, 677-683 (2001).
- 11) 早津彦哉, 微生物を用いた検出法, 「変異原物質試験法」, 早津彦哉編, (横川書店, 東京), pp. 15-39 (1990).
- 12) 武藤泰敏, 食物摂取と体内順応, 「新版 消化・吸収」(第一出版, 東京) pp. 286-323 (1988).
- 13) 武藤泰敏, 消化・吸収の生理 (I) —管腔内消化とその調節「新版 消化・吸収」(第一出版, 東京) pp. 119-188 (1988).
- 14) Morotomi, M. and Mutai, M., In vitro binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria., *J. of National Cancer Inst.*, 77, 195-201 (1986).
- 15) Tanabe, T., Suyama, K. and Hosono, A., Effect of sodium dodecylsulphate on the binding of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T-80 cells with Trp-P1. *J. of Dairy Reserch*, 61, 311-315 (1994).
- 16) 柳田友道, 生物環境における微生物の生態「微生物科学 4 生態」, (学会出版センター, 東京) pp. 402-409 (1984).

(平成 14 年 2 月 21 日受付, 平成 14 年 4 月 3 日受理)