

博士論文

機能性植物乳酸菌の探索分離とその
生物活性物質に関する研究

2023年3月

広島大学大学院 医系科学研究科

2020年度入学

D201606 井上 裕介

【目次】

序章	1
第一章 植物素材からの乳酸菌の分離・同定	2
第一節 緒言	
第二節 乳酸菌の分離培養・同定	
第三節 総括	
第二章 植物乳酸菌のパイナップル果汁発酵によるオルニチン及びシトルリンの 高産生	5
第一節 緒言	
第二節 植物乳酸菌のオルニチン及びシトルリン産生能のスクリーニング	
第三節 オルニチン及びシトルリン産生に関する酵素活性の測定	
第四節 オルニチン及びシトルリンの高産生条件の検討	
第五節 発酵パイナップル果汁液の安全性評価と菌株の特性解析	
第六節 総括	
第三章 植物乳酸菌による発酵枇杷葉エキスの抗酸化機能	30
第一節 緒言	
第二節 植物乳酸菌を用いた発酵生薬エキスの抗酸化機能のスクリーニング	
第三節 発酵枇杷葉エキスによる酸化ストレスからの細胞保護効果	
第四節 発酵枇杷葉エキスからの活性成分の分離・精製	
第五節 発酵枇杷葉エキスによる肥満モデルマウスの肥満改善効果	
第六節 総括	
終章	48
実験の部	49
I. 実験操作	
II. 第一章の実験	
III. 第二章の実験	
IV. 第三章の実験	
参考文献	74
略語一覧	80

学位論文の基礎となる原著 80

謝辞 81

【序章】

乳酸菌は、糖を資化して多量の乳酸を産生する細菌の総称で、ヨーグルトやチーズ、バターなどの乳製品をはじめ、漬物や醸造酢に至るまで多くの発酵食品の製造に利用されている。この微生物は乳酸による pH の低下を利用して雑菌の繁殖を防ぐバイオプリザベーションとしても使用されている。また、乳酸菌は安全に使用されてきた長い歴史があり、適切な量を摂取した場合、安全と認められる米国食品医薬品局（FDA）の食品添加物に与えられる安全基準合格証（GRAS）の認証を与えられている菌株もあり、食品、医薬品、サプリメントなどの製造に幅広く利用されている [1, 2]。

乳酸菌は、さまざまな環境に適応して生育しており、その生育環境に応じて大きく異なった機能性を示すことから、その多様性が着目され、ヒトの健康に寄与する機能性素材として利用されている菌株も多い。乳酸菌に関連した保健機能性を端的に表現する言葉として広く認知されている「プロバイオティクス」と「プレバイオティクス」というキーワードは、それぞれ、「適切な量を摂取すると、宿主の健康に有益な働きをする生きた微生物」と「宿主微生物が選択的に利用して、健康上の利益をもたらす基質」と定義されている。また、乳酸菌はそれ自身のもつ特性にのみならず、腸内細菌叢の変化を介することによって生理機能を発揮することがわかってきた。更に、近年、「ポストバイオティクス」という考え方が新たに提唱された。この言葉は、「宿主に健康上の利益をもたらす、不活化された微生物及び/またはそれらの成分の調製物」と定義され、代謝産生物質の有無にかかわらず不活化された死菌体や菌体の構成成分を含む素材を指す [3]。このポストバイオティクスは、プロバイオティクスとは異なって不活化された微生物を用いるため、工業プロセスや保存性に優れている。プロバイオティクスは生菌数を維持するために、酸素濃度や保存温度の管理に課題が多い。またプロバイオティクスは、生菌数の減少や保存中の風味の変化などの品質が変化する懸念があり、加工だけでなく保存状態にも注意する必要がある。そのような課題や懸念事項がポストバイオティクスでは緩和されることから、最近、死菌体や菌体の構成成分を含む素材の研究が注目されている。実際にポストバイオティクスと、腸内細菌叢や腎臓病などとの関係性についての議論が始まっている [4-6]。筆者が所属する未病・予防医学共同研究講座でも以前から果汁や生薬を培地とした植物由来乳酸菌の発酵により、菌体やその菌のつくる二次代謝産物の生理機能効果に注目した研究を行っている。

本研究は、機能性食品や医薬品の開発を見据えて、果汁、野菜汁および生薬といった植物素材を培地とし、それを植物由来乳酸菌で発酵させて得られる生物活性物質の獲得を目的とした。本研究内容は三章に分け、第一章では植物素材からの乳酸菌の分離、第二章では植物由来乳酸菌の果汁発酵におけるオルニチン及びシトルリンの高産生、第三章では植物由来乳酸菌の発酵生薬エキスの抗酸化機能について論じた。

【第一章】

植物素材からの乳酸菌の分離・同定

第一節 緒言

乳酸菌では、グラム染色、細胞形態、カタラーゼ反応、運動性、種々の糖の発酵パターン、グルコースの代謝からの最終産生物、生育温度などの多くの項目が、分類の基準として用いられてきた。1990年代になると、16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析が行われるようになり、乳酸菌の分類基準は上記のような様々な特徴に基づくものから、遺伝子をベースにしたものへとシフトしてきた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列による解析の導入により、乳酸菌の分類・同定にかかる時間や手間が大幅に軽減されたことから、2000年代以降は多くの乳酸菌が新種として提唱されるなど、分類学的にも乳酸菌の研究が進んだ。その乳酸菌の同定・分類による特徴付けは、研究対象を選択するためだけでなく、乳酸菌を食品等の原料として使用する際は予め菌株の特徴を把握することが必要なため、非常に重要な作業である。

乳酸菌は菌種ごとの特徴により分類学的にその種が定義されるが、それとは別に分離源が異なる菌株が持つ特徴がそれぞれ異なることも注目されており、個々の特徴を対象とした研究が盛んである。分離源に関しては、動物由来と植物由来に大別され論じられることが多い。動物由来の乳酸菌は歴史的には主にヨーグルトやチーズなどの製造に用いられており、乳や腸管にいるため、その生育環境は比較的栄養に富み、温度や pH が安定している環境に生育している。すなわち、動物由来乳酸菌は、ビタミンや、プロテアーゼによって分解されたタンパク質に由来するアミノ酸など、生育に必要な栄養を十分に獲得しやすいといえる。

一方、植物由来乳酸菌は植物表面で生息している。植物表面は常に酸素や乾燥といった要因に曝されていることから、乳とは異なって栄養が乏しいだけでなく、温度や pH が本来適した状況ではない厳しい環境である。その過酷な環境に適応するために、植物由来乳酸菌は好気性微生物との生存競争力、抗菌性化合物に対する防御、そして限られた栄養源から必要な栄養素を作り出す力などの能力を備えていることから、動物由来のものとは異なった特徴を持つと考えられる。したがって、植物の生育環境が異なれば、そこから分離される植物由来乳酸菌はその分離源に応じて保有している機能が異なることが期待される。実際に、さまざまな環境に生育する植物から乳酸菌分離が試みられた結果として、得られた分離株のその特徴を活かすかたちで産業的に利用されている。例えば、寒冷地のチベット高原で分離された乳酸菌では、低温下でのサイレージの発酵能が優れているとの研究が報告されている [7]。

本章では、物活性機能を有する植物由来乳酸菌を得るために、生育地域の平均気温が異なる「サトウキビ」と「甜菜(てんさい)」から、乳酸菌の探索分離および菌学的同定を行った。

第二節 乳酸菌の分離培養・同定

特徴の異なる乳酸菌を分離するために、平均気温が異なる地域で採取できる植物素材として、亜熱帯の植物である鹿児島県喜界島産のサトウキビと、亜寒帯の植物である北海道産の甜菜を用いて乳酸菌の分離を試みた。乳酸菌を培養する際は、一般的な実験用培地である MRS を利用した。乳酸菌の培養温度は、一般的に乳酸菌の生育に適している 37℃と、その温度とは生育中の代謝が異なると考えられる 28℃で行った。

植物サンプルを MRS 液体培地に入れて培養後、増殖が確認されたものを対象に、MRS 寒天培地で菌体のシングルコロニー化を行った。その後、グラム染色によりグラム陽性細菌と判断し、かつ KOH/H₂O₂ テストを行った結果から乳酸菌候補株であると判定された株について、ゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA の 16S rDNA の塩基配列の相同性検索結果から、菌種の分類学的同定を行った。得られた菌株についてその数を種名ごとに Table 1 に示した。

Table 1. 分離菌種一覧

菌種	分離源	分離温度 (°C)	分離菌株数計
<i>Lactobacillus plantarum</i>	サトウキビ、甜菜	28、37	22
<i>Lactobacillus brevis</i>	サトウキビ、甜菜	28、37	7
<i>Lactobacillus senioris</i>	サトウキビ	28、37	5
<i>Lactococcus lactis</i>	サトウキビ	28、37	7
<i>Lactococcus garvieae</i>	サトウキビ	28	4
<i>Enterococcus avium</i>	サトウキビ	28、37	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	サトウキビ	37	1
<i>Enterococcus faecium</i>	サトウキビ	28、37	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	サトウキビ、甜菜	28、37	7
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	サトウキビ	37	1

第三節 総括

サトウキビ及び甜菜から乳酸菌の分離・同定を試みた結果、合計 61 株を分離することができた。分離された乳酸菌は *Lactobacillus* 属の菌株が最も多く、本属に含まれる菌種は漬物などの発酵食品に利用されるほか、動物の腸管や植物表面などに幅広く生息している。また、保健機能性の面でも有益な働きをもつことが確認されているものも多く、乳酸菌を用いて製造される発酵食品や宿主の健康への寄与を研究する上で非常に重要な細菌群である。次いで多く分離された *Lactococcus* 属は、ヨーグルトやチーズなどの発酵食品の製造だけでなく、プロバイオティクスとして幅広く利用されている細菌群である。その中で最も利用されてい

る菌種が *Lactococcus (Lc.) lactis* であり、3 種の亜種 (*Lc. lactis* subsp. *lactis* 及び *Lc. lactis* subsp. *cremoris*、*Lc. lactis* subsp. *hordniae*) が存在し、チーズ (カマンベール、ゴータ、チェダーなど) やサワークリーム、バターなどの乳製品を製造する過程で、最初に原料乳であるスターターとして昔から利用されている。その他には、プロバイオティクスとして用いられる一方、感染症の原因としても知られ細菌が含まれる *Enterococcus* 属や、ショ糖から粘質多糖のデキストリンを産生する *Leuconostoc* 属が分離された。

これらの分離株のうち、昔から現在に至るまで、発酵食品や乳酸菌製品に広く使用され、食経験が豊富なことから、安全安心な *Lactobacillus* 属及び *Lactococcus* 属を研究材料として取り上げた。

【第二章】

植物乳酸菌のパイナップル果汁発酵による

オルニチン及びシトルリンの高産生

第一節 緒言

ヒトの身体を構築するタンパク質の構成アミノ酸としては 20 種類が知られており、最近の研究では栄養素としての役割の他に、機能性アミノ酸としての側面も有することがわかってきた。例えば、グリシンには抗不安・抗うつ作用があり [8, 9]、睡眠改善サプリメントとして上市されている。また、グルタミン酸のナトリウム塩は、食品のうま味成分として知られている。

これら 20 種類以外にも自然界にはアミノ酸が存在しており、その数は約 500 種類にもものぼる。それらの中にも機能性成分としての役割を果たすものがあり、総称して機能性アミノ酸と呼ばれる。これらの機能性アミノ酸は、細胞の発達、免疫の改善、主要な代謝経路の調節に関連していると考えられてきた [10]。例えば、尿素サイクル (Fig. 1) で生成されるオルニチン (Orn) は、肝保護剤のひとつとして重要な役割を果たしており、過剰なアンモニアを尿素に変換し、トリカルボン酸 (TCA) サイクルの代謝活性化と糖新生を促進する。

また、Orn は成長ホルモンの分泌を促進し、最終的に抗疲労効果につながり、睡眠と覚醒、肌の質、筋肉と骨の発達を改善することが実証されている [12, 13]。シトルリン (Cit) は、上述した尿素サイクルにオルニチンと同じく関与しており、Cit の同化により体内で一酸化窒素 (NO) が生成され、血管が拡張して血流が促進される [14]。また Cit には、動脈硬化の緩和や疲労回復などの効果が報告されている [15–17]。これらのアミノ酸の生合成経路はアルギナーゼ経路を介して調節されるが、細菌におけるアルギニン (Arg) の代謝は、アルギナーゼまたはアルギニンデイミナーゼ (ADI) 経路のいずれかによって調節される (Fig. 2) [19]。ADI 経路は、ATP と

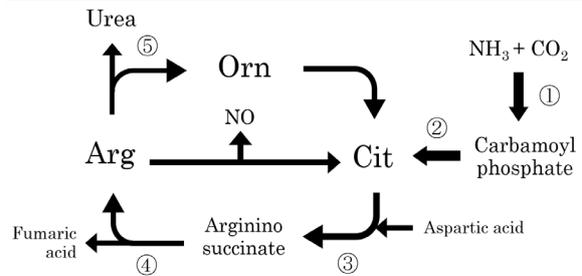


Fig. 1. 尿素サイクル [11]

- ① Carbamoyl phosphate synthase
- ② Ornithine transcarbamylase
- ③ Argininosuccinate synthase
- ④ Argininosuccinate lyase
- ⑤ Arginase

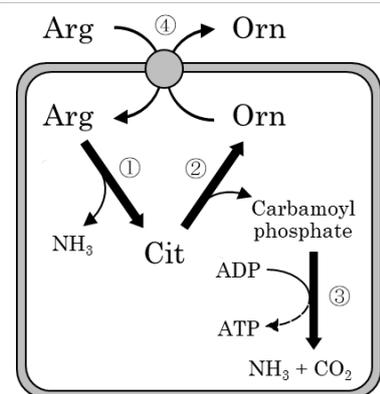


Fig. 2. ADI 経路 [18]

- ① Arginine deiminase
- ② Ornithine carbamoyltransferase
- ③ Carbamate kinase
- ④ Arginine / Ornithine antipoter

アンモニアの生成を通じて、酸性条件あるいは飢餓状態から細菌を保護する上で重要な役割を果たしている [20–22]。一般に、細菌の ADI 経路は、Arg を Cit に変換するアルギニンデイミナーゼ (ArcA)、Cit を Orn とリン酸カルバモイルに変換するオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (ArcB)、リン酸カルバモイルを二酸化炭素とアンモニアに分解して ATP を生成するカルバメートキナーゼ (ArcC)、アルギニンの細胞内取り込みとオルニチンの細胞外放出を生成する電位差非形成アルギニン/オルニチン交換体 (ArcD) で構成されている [23–26]。

乳酸菌による Orn と Cit の生産に関する研究報告は、現在までのところ限られている。当研究室では以前、エビスグサ由来の *Weissella (W.) confusa* K-28 が、Arg を添加した MRS 培地で 18 ± 1 及び 10 ± 2 g/L の Orn と Cit をそれぞれ生成することを報告した [27]。K-28 株のゲノム解析結果から、本株は ADI 経路を構成する遺伝子クラスター *wkaABDCR* を保有していることが確認された。別の報告によると、キムチ由来の *W. koreensis* DB1 では、3.0 (w/v) % Arg を添加した MRS 培地での培養で、15.05 g/L の Orn と 6.2 g/L の Cit が生成されている [28]。

Yeong らの報告にあるように、これらの菌株は化学培地での培養で Arg を変換し、大量の Orn と Cit を生成する [28]。しかしながら、乳酸菌の培養用に最適化され汎用されている化学培地では、増殖を促すための界面活性剤や種々の金属イオンが添加されており、発酵液をそのまま食用とすることには適さない。また、一般的な乳製品のように乳を発酵素材として用いると、乳糖不耐症やコレステロール高値の消費者にとっては摂取への懸念材料となる。そのため、乳を用いず、かつ発酵液をそのまま食品として利用するためには、果汁等の食品素材を培地とした発酵法がこの課題を解決するひとつの手段として期待されるのではないかと考えた。実際、上記菌株の果汁発酵を介した機能性アミノ酸生成に関しては未知である。その場合、乳酸菌の発酵によって培養液中に産生された有用な生理活性物質も、そのまま摂取が可能という利点もある。そこで本研究では、サトウキビから分離された乳酸菌株である MSC-3G 株を果汁培地で発酵させた場合の、Orn と Cit を高収率で生合成するための最適条件を調査することとした。

第二節 植物乳酸菌のオルニチン及びシトルリン産生能のスクリーニング

ADI 経路では、Arg から Cit を経て Orn が産生されることから、Arg を基質とした場合の Orn の産生量に注目してスクリーニングを行った。1 (w/v) % Arg 塩酸塩を添加した MRS 液体培地で Table 1 に記す乳酸菌株を培養後、培養液上清中の L-Orn 含有量を HPLC にて確認した。その際、ポジティブコントロールとして、既に当研究室で Orn 産生を確認している *W. confusa* K-28 を用いた。その結果、*Lc. garvieae* MSC-J2、*Lactobacillus (Lb.) brevis* MSC-4A、同 MSB-D1、そして *Lc. lactis* MSC-3G の 4 株に、Arg から Orn を産生する能力があった (Table 1)。一方で、*Lb. plantarum* 及び *Enterococcus (Ent.) avium* の各菌株では、Orn の産生は認められなかった。実用化も視野に入れた果汁培養を検討するにあたり、比較的食経験のある菌種の *Lc. lactis* MSC-3G と *Lb. brevis* MSC-4A を以降の実験に用いることとし

た。

次に、1 (w/v) % Arg を添加した各種果汁培地で *Lc. lactis* MSC-3G と *Lb. brevis* MSC-4A を培養後、Orn 含有量を HPLC にて確認した。その結果、パイナップル果汁を培地として *Lc. lactis* MSC-3G を培養した際に、最も Orn が産生されることがわかった (Table 2)。よって、この果汁と菌株の組み合わせにより、Orn 及び Cit の高産生条件を検討することとした。

Table 1. MRS 液体培地を用いた培養における Orn 産生量 (Mean ± S.D. (n=3))

菌種	菌株番号	分離源	Orn 濃度 (mM)
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-B2	サトウキビ	0.0
<i>Lc. garvieae</i>	MSC-J2	サトウキビ	10.8 ± 0.8
<i>Ent. avium</i>	MSC-N3	サトウキビ	0.0
<i>Lc. lactis</i>	MSC-3G	サトウキビ	12.8 ± 2.4
<i>Lb. brevis</i>	MSC-4A	サトウキビ	24.5 ± 3.0
<i>Lb. senioris</i>	MSC-4J	サトウキビ	6.0 ± 1.4
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-5T	サトウキビ	0.0
<i>Ent. avium</i>	MSC-O2	サトウキビ	0.0
<i>Lb. plantarum</i>	MSB-C2	甜菜	0.0
<i>Lb. brevis</i>	MSB-D1	甜菜	25.1 ± 2.4
<i>Lb. plantarum</i>	MSB-F1	甜菜	0.0
<i>W. confusa</i>	K-28	エビスグサ	26.4 ± 2.5

Table 2. 各種果汁培地を用いた培養における Orn 産生量 (mM) (Mean ± S.D. (n=3))

果汁	菌株	
	<i>Lc. lactis</i> MSC-3G	<i>Lb. brevis</i> MSC-4A
パイナップル	54.5 ± 2.5	27.1 ± 3.1
オレンジ	28.2 ± 1.2	13.7 ± 2.3
マンゴー	6.3 ± 2.1	8.5 ± 1.4
マスカット	3.1 ± 1.5	1.6 ± 0.2
梨	2.8 ± 0.5	1.4 ± 0.1
グレープ	3.5 ± 0.7	2.9 ± 0.2
ストロベリー	27.4 ± 3.2	20.3 ± 2.2
にんじん	37.8 ± 2.6	23.5 ± 2.7

各種果汁に 1.0 (w/v) % Arg を添加し、MSC-3G 株で培養した結果、細胞増殖および Orn と Cit の生産に関して、各果汁で顕著に異なる特性を示した (Fig. 3)。これらのうち、グレープ、レモン、ゆず果汁で培養した場合には、細胞の増殖と Arg 代謝のいずれも他の果汁に比べて低かった。他の果汁では細胞数 (log (CFU/mL)) が 8.3–9.7 のレベルにもかかわらず、

Arg 代謝が有意に異なっていた。その中で Orn が最も多く産生された果汁はパイナップル (56.0 ± 0.7 mM) で、ライムでは Cit が最も多く産生 (34.53 ± 0.02 mM) されたが、細胞の増殖はパイナップルに比べて低かった。各果汁の糖、ビタミン、有機酸及びその他の微量栄養素について、これらの栄養素の比較に関する文献データは少ない。果汁に含まれる糖に関する別の研究では、グレープ果汁のフルクトース (Fru) に対するグルコース (Glc) の比率が高いことが示されたが、オレンジとみかん果汁ではその比率が 1 未満であった [29]。加えて、果汁は様々なビタミンの供給源であり、オレンジやグレープフルーツ、パイナップル果汁には大量のビタミン B 複合体が含まれていることが示されており、また、オレンジやレモン、ライム、マンゴー果汁には大量のビタミン C が含まれている [30, 31]。これらの化合物と他の微量栄養素は、Arg 代謝に対して直接的または間接的に効果を示す可能性がある。日本の食品成分データベースによると、マンガン含有量はパイナップル果汁 (果汁 100 g あたり 1.16 mg) では他の果汁よりも有意に高い。いくつかの研究では、マンガンイオンが酸化ストレス耐性に関与するマンガンカタラーゼの重要な因子であることが報告されている [32–34]。更に、ある研究グループは、マンガンイオンを発酵に加えると乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性が増強され、その結果、乳酸菌の発酵にとって有益な効果をもたらされることを示した [35]。一方、マンゴー果汁の発酵における最終的な細胞増殖の増加 ($9.5 \log$ (CFU/mL)) は、Orn および Cit の生産量 (それぞれ 6.7 ± 0.7 および 5.8 ± 0.5 mM) と逆相関していた。Noens らの報告によると、*Lc. lactis* MG1363 では、L-Arg/L-Orn オルニチン交換体 ArcD1 と ArcD2 の基質特異性が有意に異なることが実証された [36]。その両タンパク質が L-Arg と L-Orn でより高い輸送活性を示したにもかかわらず、ArcD1 はカチオン性アミノ酸である L-Orn 及び L-リジン、L-ヒスチジンに対してより低い親和性を示した。それとは対照的に、ArcD2 は中性アミノ酸の L-アラニン (Ala) に対してより高い親和性を示した。ArcD2 では L-Ala を効率的に移動させたが、ArcD1 ではそのような親和性は示さなかった。従って、マンゴー果汁の発酵において細胞の増殖と Orn 及び Cit 産生が逆相関した結果は、果汁のアミノ酸組成の違いによる可能性がある。なぜならば、マンゴー果汁の栄養組成は、L-Ala 含有量が果汁 100 g あたり 82 mg であり、これはパイナップル果汁よりも非常に高いためである。

各種果汁の発酵において、糖、有機酸、イオンの代謝が Orn 及び Cit の産生と関係しているかどうかを確認するために、Arg を添加した各種果汁の未発酵液及び発酵液中の糖、有機酸、イオンを分析した。その結果、発酵することで変化がみられた成分は、Glc 及び Fru、乳酸、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} であった (Table 3–6)。それらの成分において、各種果汁の中で Orn が最も多く産生されたパイナップル果汁では、ADI 経路で消費される PO_4^{3-} の消費量が多く、Glc と Fru の消費量、及び乳酸と NH_4^+ の生産量については、どの果汁よりも多かった。一方で、Orn よりも Cit が多く産生されたライム果汁では、 NH_4^+ の生産量及び PO_4^{3-} の消費量が比較的多かったが、Glc 及び Fru の消費量と乳酸の生産量は特に多いというわけではなかった。

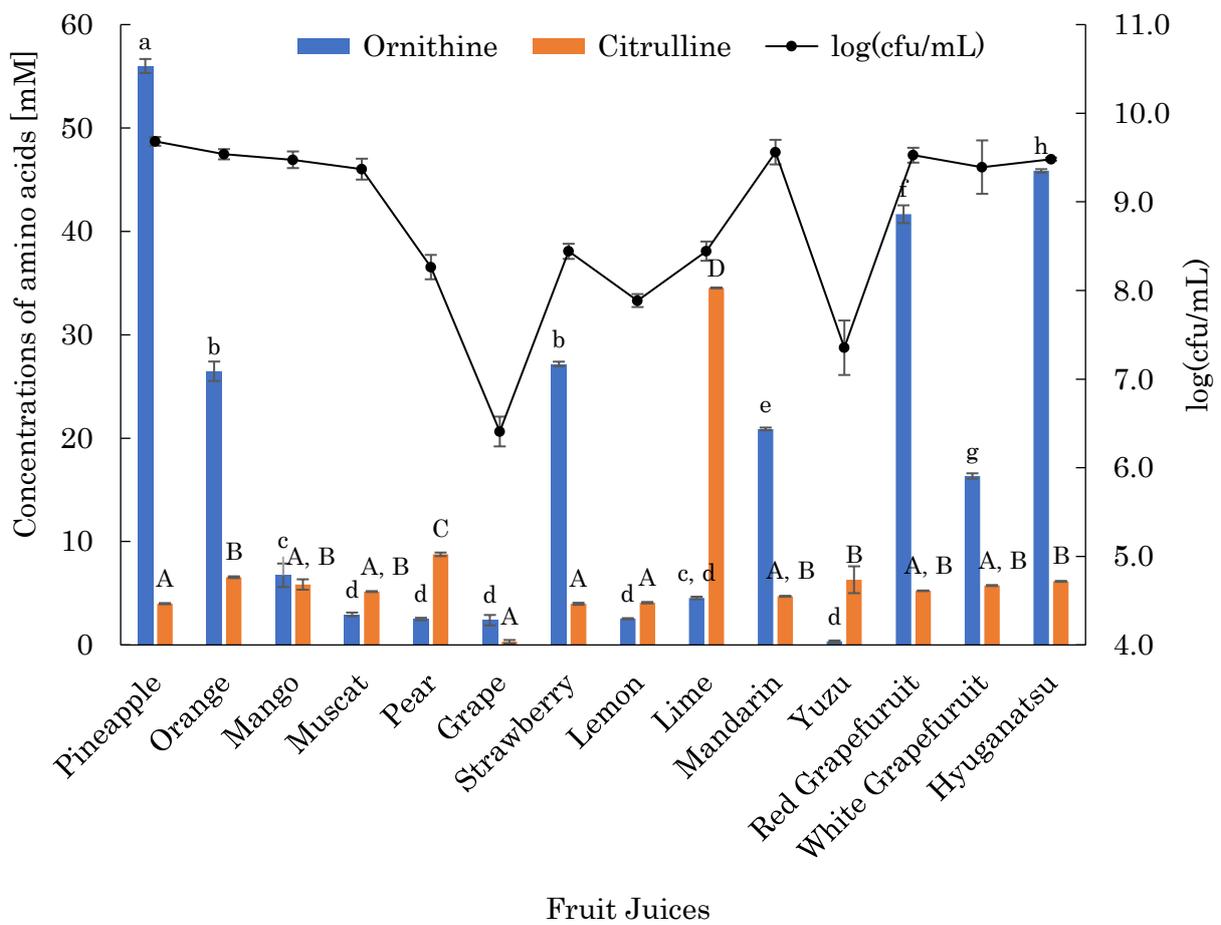


Fig. 3. 1 (w/v) % Arg を添加した各種果汁での培養における MSC-3G 株の Orn 及び Cit の産生 (培地初発 pH6.5、培養温度 28°C、ストレート果汁濃度) 異なるアルファベット間で有意差があることを示す (大文字: Orn、小文字: Cit、Tukey HSD $p < 0.01$)、Mean \pm S.D. (n=3)。

Table 3. 各種果汁培地での MSC-3G 株の発酵による糖組成の変化 (Mean \pm S.D. (n=3))

Fruit juices	Cultivation time (hrs)	Saccharides (g/100 mL)		
		Suc	Glu	Fru
Pineapple	0	4.54 \pm 0.03	2.75 \pm 0.02	2.37 \pm 0.03
	48	4.503 \pm 0.005	1.399 \pm 0.002	1.880 \pm 0.007
Orange	0	3.99 \pm 0.01	2.15 \pm 0.02	2.61 \pm 0.02
	48	3.993 \pm 0.004	1.146 \pm 0.009	2.52 \pm 0.01
Mango	0	3.20 \pm 0.05	2.95 \pm 0.02	5.06 \pm 0.04
	48	3.17 \pm 0.04	2.43 \pm 0.02	4.86 \pm 0.04
Muscat	0	0.1372 \pm 0.007	5.284 \pm 0.007	5.38 \pm 0.03
	48	0.068 \pm 0.002	4.933 \pm 0.005	5.225 \pm 0.003
Pear	0	0.87 \pm 0.02	1.51 \pm 0.02	6.04 \pm 0.05
	48	0.886 \pm 0.005	1.307 \pm 0.003	6.00 \pm 0.01
Grape	0	0.087 \pm 0.004	4.82 \pm 0.03	5.35 \pm 0.02
	48	0.1010 \pm 0.0007	4.782 \pm 0.007	5.334 \pm 0.009
Strawberry	0	0.44 \pm 0.02	2.46 \pm 0.02	3.005 \pm 0.008
	48	0.414 \pm 0.002	2.073 \pm 0.006	2.49 \pm 0.01
Remon	0	0.007 \pm 0.003	1.30 \pm 0.05	1.24 \pm 0.02
	48	0.00	1.229 \pm 0.002	1.182 \pm 0.07
Lime	0	0.017 \pm 0.003	1.37 \pm 0.02	1.37 \pm 0.03
	48	0.0007 \pm 0.0004	0.909 \pm 0.007	1.099 \pm 0.006
Mandarin	0	3.97 \pm 0.03	1.43 \pm 0.01	1.848 \pm 0.009
	48	3.953 \pm 0.001	0.6598 \pm 0.0004	1.722 \pm 0.002
Yuzu	0	0.60 \pm 0.02	1.18 \pm 0.04	0.86 \pm 0.03
	48	0.609 \pm 0.004	1.06 \pm 0.02	0.8438 \pm 0.0007
RGF	0	3.01 \pm 0.02	2.18 \pm 0.01	2.44 \pm 0.02
	48	2.996 \pm 0.002	1.29 \pm 0.01	2.240 \pm 0.002
WGF	0	1.24 \pm 0.02	2.51 \pm 0.01	4.17 \pm 0.02
	48	1.2293 \pm 0.0003	1.811 \pm 0.005	4.012 \pm 0.004
Hyuganatsu	0	3.02 \pm 0.02	2.02 \pm 0.02	2.33 \pm 0.02
	48	2.968 \pm 0.002	0.80 \pm 0.01	2.034 \pm 0.002
Carott	0	4.62 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01	0.454 \pm 0.007
	48	4.577 \pm 0.008	0.053 \pm 0.003	0.193 \pm 0.006

Table 4. 各種果汁培地での MSC-3G 株の発酵による有機酸組成の変化 (Mean \pm S.D. (n=3))

Fruit juices	Cultivation time (hrs)	Organic acid (g/100 mL)		
		Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid
Pineapple	0	0.0026 \pm 0.0004	0.0077 \pm 0.0006	0.014 \pm 0.002
	48	0.0026 \pm 0.0004	1.796 \pm 0.004	0.0106 \pm 0.0005
Orange	0	0.051 \pm 0.009	0.0022 \pm 0.0006	0.0052 \pm 0.0006
	48	0.0505 \pm 0.0007	1.184 \pm 0.005	0.0166 \pm 0.0002
Mango	0	4.22 \pm 0.07	0.033 \pm 0.006	0.0
	48	4.023 \pm 0.005	0.809 \pm 0.009	0.0
Muscat	0	0.0	0.0	0.0
	48	0.0	0.455 \pm 0.003	0.0093 \pm 0.0001
Pear	0	0.84 \pm 0.01	0.0038 \pm 0.0002	0.0015 \pm 0.0003
	48	0.87 \pm 0.02	0.43 \pm 0.01	0.0142 \pm 0.0005
Grape	0	0.075 \pm 0.002	0.019 \pm 0.003	0.0
	48	0.0746 \pm 0.0005	0.026 \pm 0.003	0.0
Strawberry	0	0.0	0.029 \pm 0.006	0.0
	48	0.0540 \pm 0.0006	0.94 \pm 0.02	0.0
Lemon	0	0.0	0.0	0
	48	0.0	0.118 \pm 0.001	0.0076 \pm 0.0001
Lime	0	0.0036 \pm 0.0008	0.0	0.0
	48	0.0059 \pm 0.0002	0.866 \pm 0.005	0.0148 \pm 0.0001
Mandarin	0	0.26 \pm 0.02	0.0	0.0
	48	0.2147 \pm 0.0004	0.852 \pm 0.002	0.0092 \pm 0.0002
Yuzu	0	0.129 \pm 0.006	0.0	0.0
	48	0.1279 \pm 0.0002	0.10 \pm 0.02	0.0

Table 4. Continued

RGF	0	0.0030 ± 0.0006	0.0	0.0
	48	0.0094 ± 0.0001	0.99 ± 0.01	0.0147 ± 0.0004
WGF	0	0.031 ± 0.006	0.0	0.0
	48	0.0186 ± 0.0002	0.780 ± 0.003	0.0110 ± 0.0003
Hyuganatsu	0	0.45 ± 0.03	0.0	0.0
	48	0.4083 ± 0.0006	1.46 ± 0.01	0.0191 ± 0.0002
Carott	0	0.074 ± 0.005	0.051 ± 0.006	0.029 ± 0.006
	48	0.02 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.0421 ± 0.0005

Table 5. 各種果汁培地での MSC-3G 株の発酵による陽イオン組成の変化 (Mean ± S.D. (n=3))

Fruit juices	Cultivation time (hrs)	Cation (g/L)				
		Na ⁺	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺
Pineapple	0	1.95 ± 0.04	0.060 ± 0.001	0.116 ± 0.002	0.105 ± 0.002	1.132 ± 0.006
	48	1.99 ± 0.03	2.97 ± 0.05	0.111 ± 0.001	0.113 ± 0.007	1.19 ± 0.02
Orange	0	2.73 ± 0.02	0.0092 ± 0.0004	0.113 ± 0.003	0.147 ± 0.002	2.083 ± 0.005
	48	2.70 ± 0.02	1.55 ± 0.03	0.117 ± 0.001	0.145 ± 0.006	2.103 ± 0.008
Mango	0	2.221 ± 0.003	0.050 ± 0.001	0.108 ± 0.001	0.146 ± 0.001	1.290 ± 0.006
	48	2.16 ± 0.01	1.107 ± 0.004	0.106 ± 0.001	0.172 ± 0.005	1.264 ± 0.007
Muscat	0	2.25 ± 0.04	0.010 ± 0.001	0.0098 ± 0.0002	0.029 ± 0.001	0.061 ± 0.001
	48	2.240 ± 0.003	0.215 ± 0.002	0.0094 ± 0.0004	0.028 ± 0.001	0.08 ± 0.02
Pear	0	1.303 ± 0.003	0.013 ± 0.002	0.0607 ± 0.0003	0.083 ± 0.001	1.031 ± 0.001
	48	1.292 ± 0.005	0.45 ± 0.01	0.0613 ± 0.0005	0.086 ± 0.001	1.052 ± 0.009
Grape	0	1.904 ± 0.002	0.142 ± 0.002	0.064 ± 0.001	0.103 ± 0.001	0.23 ± 0.1
	48	1.902 ± 0.003	0.143 ± 0.004	0.0634 ± 0.0003	0.095 ± 0.002	0.233 ± 0.003

Table 5. Continued

Strawberry	0	2.54 ± 0.01	0.069 ± 0.001	0.149 ± 0.005	0.254 ± 0.002	1.568 ± 0.002
	48	2.533 ± 0.003	1.75 ± 0.02	0.146 ± 0.001	0.258 ± 0.005	1.561 ± 0.008
Lemon	0	21.024 ± 0.002	0.0113 ± 0.0004	0.0904 ± 0.0003	0.194 ± 0.001	2.116 ± 0.003
	48	20.78 ± 0.09	0.117 ± 0.004	0.089 ± 0.001	0.18 ± 0.01	2.11 ± 0.01
Lime	0	18.459 ± 0.002	0.149 ± 0.001	0.0704 ± 0.0003	0.124 ± 0.002	0.941 ± 0.005
	48	18.32 ± 0.05	1.66 ± 0.04	0.0704 ± 0.0002	0.126 ± 0.002	0.959 ± 0.005
Mandarin	0	1.897 ± 0.004	0.018 ± 0.001	0.076 ± 0.003	0.085 ± 0.003	0.979 ± 0.003
	48	1.84 ± 0.02	1.20 ± 0.02	0.075 ± 0.001	0.102 ± 0.007	1.03 ± 0.01
Yuzu	0	17.01 ± 0.06	0.136 ± 0.003	0.082 ± 0.001	0.127 ± 0.003	1.52 ± 0.01
	48	16.99 ± 0.09	0.34 ± 0.05	0.082 ± 0.001	0.139 ± 0.007	1.491 ± 0.007
RGF	0	2.94 ± 0.02	0.0494 ± 0.0003	0.0704 ± 0.0003	0.107 ± 0.002	1.150 ± 0.002
	48	2.95 ± 0.02	2.18 ± 0.05	0.0698 ± 0.002	0.105 ± 0.002	1.13 ± 0.02
WGF	0	3.69 ± 0.01	0.0193 ± 0.0003	0.050 ± 0.001	0.063 ± 0.003	0.522 ± 0.004
	48	3.67 ± 0.03	1.04 ± 0.02	0.0498 ± 0.0004	0.063 ± 0.003	0.56 ± 0.03
Hyuganatsu	0	5.65 ± 0.01	0.113 ± 0.004	0.0734 ± 0.0003	0.080 ± 0.001	1.423 ± 0.003
	48	5.67 ± 0.02	2.572 ± 0.007	0.0740 ± 0.0005	0.085 ± 0.001	1.49 ± 0.02
Carott	0	0.898 ± 0.002	0.098 ± 0.003	0.104 ± 0.004	0.084 ± 0.001	1.91 ± 0.04
	48	0.91 ± 0.01	2.68 ± 0.04	0.111 ± 0.001	0.094 ± 0.006	1.91 ± 0.01

Table 6. 各種果汁培地における MSC-3G 株の発酵による陰イオン組成の変化 (Mean \pm S.D. (n=3))

Fruit juices	Cultivation time (hrs)	Anion (g/L)			
		Cl ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
Pineapple	0	1.828 \pm 0.002	0.0	1.179 \pm 0.005	0.032 \pm 0.002
	48	1.8321 \pm 0.0004	0.0	0.0486 \pm 0.0009	0.038 \pm 0.001
Orange	0	1.623 \pm 0.008	0.0	1.57 \pm 0.03	0.059 \pm 0.002
	48	1.618 \pm 0.002	0.0	0.263 \pm 0.003	0.0586 \pm 0.0006
Mango	0	1.6381 \pm 0.0006	0.0	0.523 \pm 0.002	0.0750 \pm 0.0006
	48	1.638 \pm 0.001	0.0	0.079 \pm 0.002	0.0712 \pm 0.0005
Muscat	0	1.56 \pm 0.02	0.0	0.6807 \pm 0.0009	0.0978 \pm 0.0008
	48	1.590 \pm 0.003	0.0	0.486 \pm 0.004	0.101 \pm 0.003
Pear	0	1.597 \pm 0.004	0.0	1.411 \pm 0.005	0.0471 \pm 0.0005
	48	1.589 \pm 0.003	0.0	0.266 \pm 0.008	0.0482 \pm 0.0007
Grape	0	2.116 \pm 0.003	0.0	1.696 \pm 0.004	0.0405 \pm 0.0005
	48	2.115 \pm 0.002	0.0	1.695 \pm 0.007	0.042 \pm 0.001
Strawberry	0	2.043 \pm 0.007	0.0	1.398 \pm 0.006	0.034 \pm 0.002
	48	2.036 \pm 0.006	0.0	0.276 \pm 0.001	0.0390 \pm 0.0009
Lemon	0	1.625 \pm 0.007	0.0	1.278 \pm 0.005	0.0
	48	1.623 \pm 0.008	0.0	0.965 \pm 0.009	0.0
Lime	0	1.613 \pm 0.003	0.0	1.871 \pm 0.001	0.0228 \pm 0.0002
	48	1.615 \pm 0.001	0.0	1.045 \pm 0.004	0.029 \pm 0.001
Mandarin	0	1.590 \pm 0.004	0.0	0.446 \pm 0.003	0.061 \pm 0.001
	48	1.585 \pm 0.002	0.0	0.0869 \pm 0.0009	0.063 \pm 0.002
Yuzu	0	1.535 \pm 0.004	0.0	2.24 \pm 0.03	0.0
	48	1.539 \pm 0.008	0.0	2.07 \pm 0.06	0.0
RGF	0	1.543 \pm 0.006	0.0	0.469 \pm 0.001	0.0413 \pm 0.0009
	48	1.548 \pm 0.002	0.0	0.157 \pm 0.005	0.045 \pm 0.001

Table 6. Continued

WGF	0	1.59 ± 0.01	0.0	0.269 ± 0.001	0.0423 ± 0.0007
	48	1.64 ± 0.04	0.0	0.082 ± 0.004	0.043 ± 0.001
Hyuganatsu	0	1.621 ± 0.005	0.0	0.871 ± 0.002	0.0499 ± 0.001
	48	1.630 ± 0.004	0.0	0.064 ± 0.003	0.053 ± 0.002
Carott	0	2.598 ± 0.004	0.0	1.662 ± 0.006	0.161 ± 0.001
	48	2.614 ± 0.006	0.0	0.545 ± 0.005	0.156 ± 0.002

第三節 オルニチン及びシトルリン産生に関する酵素活性の測定

細菌の ADI 経路には、アルギニンデアミナーゼ (EC 3.5.3.6)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (EC 2.1.3.3)、およびカルバメートキナーゼ (EC 2.7.2.2) の 3 つの触媒酵素が関与する。そして、Arg の枯渇、変換効率、および最終生成物である Orn と Cit の比率は、これらの酵素の活性と細胞外への輸送活性に大きく依存する。そこで、Orn を最も多く産生したパイナップル果汁と、発酵の際に菌数がパイナップル果汁と同じ桁数にもかかわらず Orn の産生量が少なく、且つパイナップル果汁と糖組成 (Glc、Fru、Suc) が比較的近い値を示したマンゴー果汁において、発酵後の乳酸菌中の総タンパク質濃度と ADI 経路に関する酵素の活性を確認することで、Orn 産生量の違いがそれらの酵素活性によるものであることを確認することにした。Arg 添加有無の両条件で、パイナップルとマンゴー果汁で培養された MSC-3G 株の酵素活性を測定し、またアルギニンデアミナーゼおよびカルバモイルトランスフェラーゼの活性については、それぞれ Arg および Orn の変換率を用いて評価した。

アルギニンデアミナーゼ活性については、Arg 添加無しでパイナップル果汁を発酵させると 39.5% の Arg が変換されたが、Arg を追加すると、変換率は約 2 倍 (79%) にまで増加した (Table 7)。マンゴー果汁の場合、Arg を含まない最高の変換率は 16.8% であったが、Arg を添加した場合でも変換率はわずか 25.8% に留まった。さらに、細胞内の MSC-3G 株の総タンパク質濃度は、パイナップル果汁では Arg 添加無しの 0.43 mg/mL から Arg を添加した場合には 0.64 mg/mL に変化し、これはマンゴー果汁の場合での約 3 倍に相当する。この条件下で MSC-3G 株のカルバモイルトランスフェラーゼ活性を測定した結果、Arg を含まないパイナップル果汁の発酵では、Orn から Cit への変換率は 46.3% であったが、Arg の添加により 59.0% に増加した。一方、Arg を添加したマンゴー果汁の Orn 変換率は 30.2% であった。パイナップル果汁での発酵は、マンゴー果汁より、アルギニンデアミナーゼ及びカルバモイルトランスフェラーゼの活性がいずれも高いことがわかった。一方、MSC-3G 株によるパイナップル果汁発酵では、Arg を培地に添加すると、アルギニンデアミナーゼ活性が増強されたが、カルバモイルトランスフェラーゼ活性はあまり増加しなかった。他の研究グループの報告では、*Lb. plantarum* Lp60 は、アルギニンデアミナーゼの高い活性とオルニチンカル

バモイルトランスフェラーゼの低い活性によって、培地中に Cit が蓄積されることが示されている [37]。したがって、MSC-3G 株のアルギニンデアミナーゼ活性は、マンゴー果汁よりもパイナップル果汁の方が有意に高く、この酵素活性に依存するかたちで最終生成物である両アミノ酸の産生量が上昇したことが示唆された。そして、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼの活性も確認されたことから、Orn だけではなく、Cit も蓄積していく反応であることがわかった。

Table 7. Arg を含む果汁培養時の総タンパク質量及び ADI 経路の酵素活性 (Mean \pm S.D. (n=3))

Juice	Arg	Fermentation	Protein concentrations (mg/mL)	Conversion Rates of Arg (%)	Conversion Rates of Ornithine (%)
Pineapple	-	-	0.04 \pm 0.02	-	-
		+	0.43 \pm 0.04	39.5 \pm 5.8	46.3 \pm 1.5
	+	-	0.00 \pm 0.00	-	-
		+	0.64 \pm 0.05	79.0 \pm 2.7	59.0 \pm 2.4
Mango	-	-	0.03 \pm 0.02	-	-
		+	0.16 \pm 0.02	16.8 \pm 3.2	18.1 \pm 0.3
	+	-	0.01 \pm 0.01	-	-
		+	0.23 \pm 0.07	25.8 \pm 2.4	30.2 \pm 1.5

第四節 オルニチン及びシトルリンの高産生条件の検討

第二節の実験において、MSC-3G 株を用いてパイナップル果汁で発酵した場合に Orn の産生量が多かったことから、さらに培養条件を変えることで Orn と Cit を高産生できるかどうかを検討することにした。本節で検討した条件は、培地の初発 pH、培養温度、酸素供給、培地中の初発 Arg 添加量、及び培地の果汁濃度（濃縮果汁の希釈倍率）である。

まず、1 (w/v) % Arg を添加したパイナップル果汁培地の初期 pH の影響を調査した。菌数及び pH、アミノ酸量の経時変化を確認した結果、初発 pH 4.0 では培養終了時の菌数が他の pH よりも 1 桁少ない値となった (Fig. 4)。Arg の変換も pH 4.0 のみ遅く、培養開始 48 時間後でも Arg の残存が見られた。培地の初発 pH 4.5–8.0 では、いずれのパラメーターにおいても大差はなく、Orn の産生は 24 時間後には上限値に達していた。一方、初発 pH 8.5 では、24 時間後の Orn 産生量が少なく、48 時間後に上限値に達しており、Arg の変換が遅かった。よって Arg の変換においては、培地の初発 pH は 4.5–8.0 が好ましいと判断し、その中でも細胞の増殖にとって好ましい中性域の 6.5 が最も良いと決定した。ADI 経路は、エネルギー源の獲得だけでなく、酸ストレス条件下での細胞増殖への応答においても機能することがわかっている [38]。Rimaux らは *Lb. sakei* CTC494 の ADI 経路を介した Arg 変換が培地 pH の影響を受けることを報告している [39, 40]。その報告では、初発 pH が 5.0 と 6.5

の間の中程度の pH 範囲では、Arg が完全に枯渇した後、Cit が Orn に変換されている様子が認められた。また、乳酸を生成しない、つまり培地の pH を 6.20 未満に下げない LDH 欠損変異体を用いた場合、培地から Arg を除くと、静止期に有意な細胞増殖の減少を示したとの報告がある [41]。しかしその欠損株では、Arg を培地に添加すると、Arg の分解により 48 時間培養の最終 pH が 8.35 に達し、細胞生存率が增加する様子が確認されている。これらの報告と本試験の結果を合わせて考えると、培地の pH と Arg の存在が、Arg から Cit 及び Orn への変換に影響することがわかった。

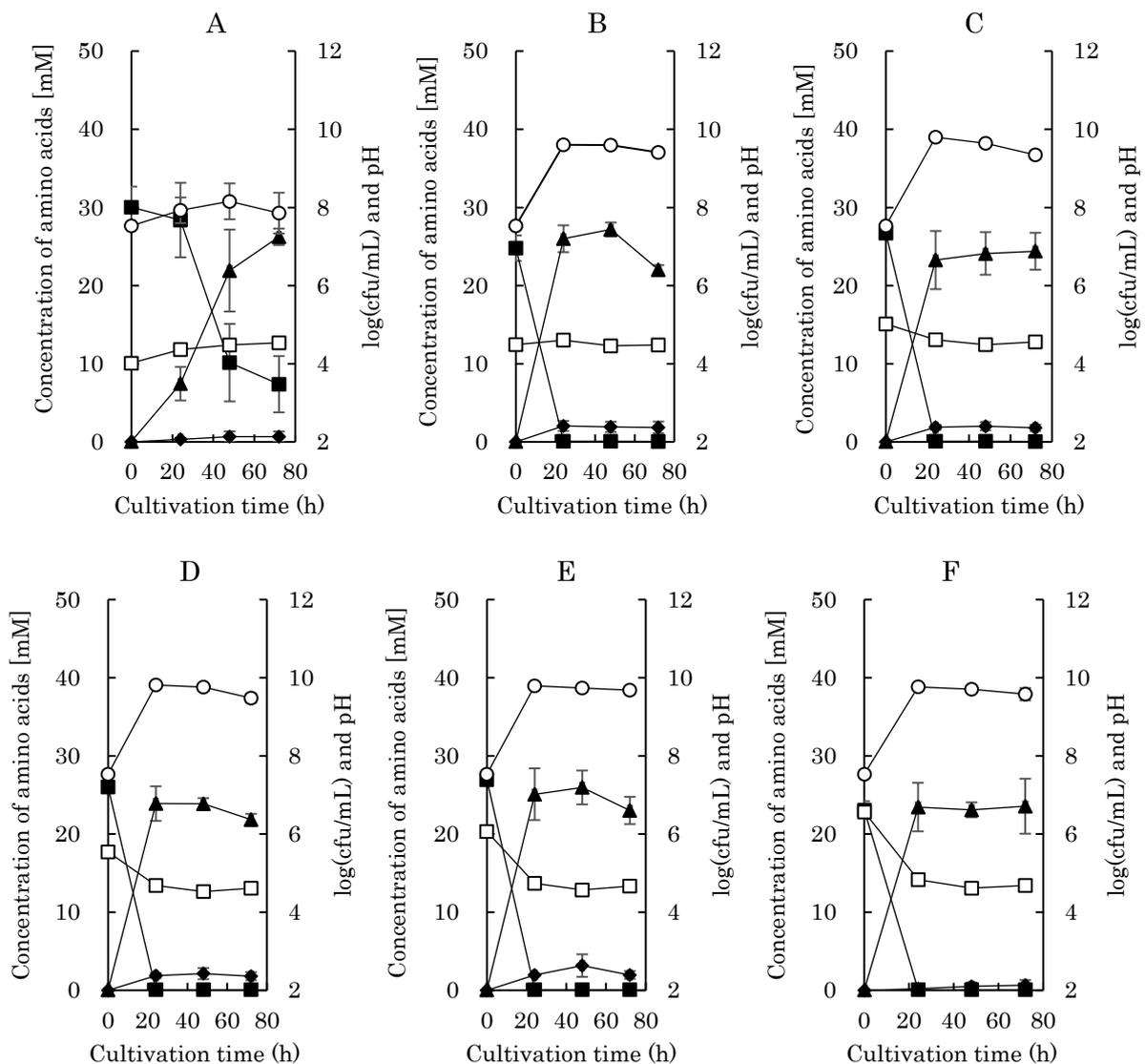


Fig. 4. パイナップル果汁培地の初発 pH による Orn 及び Cit 産生への影響 (培養温度 28°C、1 (w/v) % Arg 添加、嫌気培養、5 倍希釈果汁)
 培地の初発 : A = pH 4.0, B = pH 4.5, C = pH 5.0, D = pH 5.5, E = pH 6.0, F = pH 6.5, G = pH 7.5, H = pH 8.0, I = pH 8.5、○ : 細胞生存数、□ : 培地 pH、■ : Arg 濃度、▲ : Orn 濃度、◆ : Cit 濃度、Mean ± S.D. (n=3)。

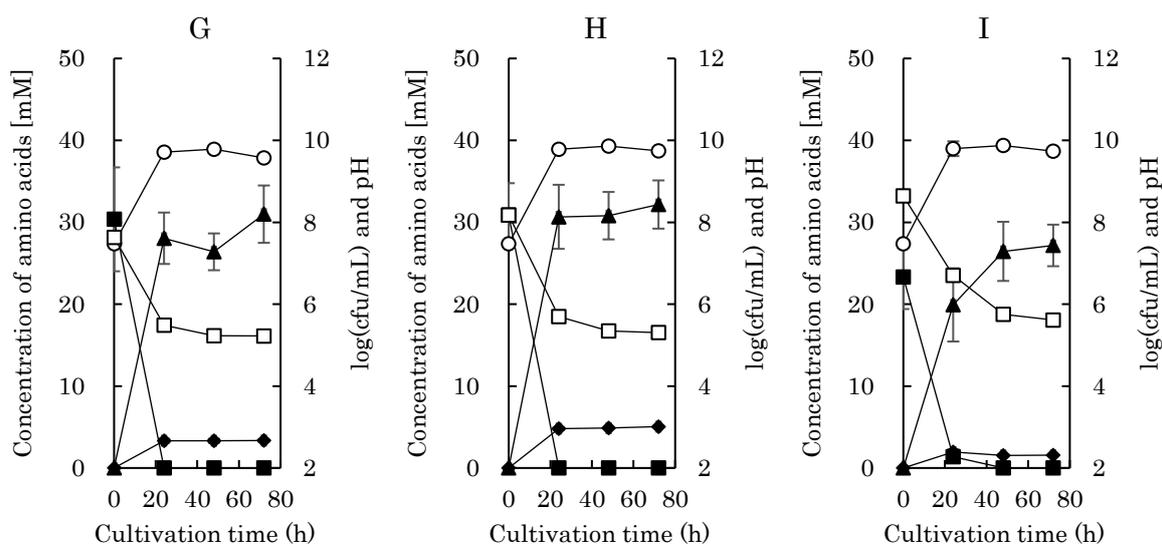


Fig. 4. Continued

次に、1 (w/v) % Arg を添加したパイナップル果汁培地での培養温度の影響を調査した。菌数及び pH、アミノ酸量の経時変化を確認した結果、Arg は 30°C 以下の温度で培養すると 24 時間後にほぼ完全に Orn に変換され、Cit の生成は 37°C で 2.8 ± 0.7 mM に達した (Fig. 5)。Orn の生産性は、以前の当研究室の *W. confusa* K-28 を用いた研究と一致しており、Arg を Orn に変換するための最適温度は 30°C 以下であった [27]。また、サワードウ由来の *Lb. fermentum* IMDO130101 において、pH や温度が ADI 経路に影響を与えることが実証されており、その報告では Orn と Cit の比率と形成パターンは温度によって変化し、Orn から Cit への変換が温度の上昇とともに増加することが確認されている [42]。従って、培養温度は 25–30°C が適していると判断し、その中でも MSC-3G 株の分離時の温度である 28°C が良いと判断した。

続いて、1 (w/v) % Arg を添加したパイナップル果汁培地での培養時の嫌気性、微好気性、及び好気性培養条件下における比較を行った。菌数及び pH、アミノ酸量の経時変化を確認した結果、細胞増殖は各条件で類似していた (Fig. 6)。しかし、MSC-3G 株の Cit 生産は発酵時間とともに増加し、Cit の濃度は嫌気性発酵の 2.2 ± 0.5 mM から、好気性発酵では 4.7 ± 0.6 mM に増加した。当研究室の以前の研究では、*W. confusa* K-28 の ADI 経路における各遺伝子の発現は、好気性条件下よりも嫌気性条件下で高いことが示されている [27]。このことは、複数の原核細胞系統が嫌気条件下でエネルギー源として ADI 経路を使用するという説と一致している。逆に、有酸素条件下での Arg 代謝の増加が議論されている報告は、*Pseudomonas* 属を除くと非常に少ない。例えば、*Pseudomonas aeruginosa* のアルギニン調節タンパク質 ArgR は、カルバモイルリン酸シンテターゼ及び同化オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼを抑制するが、好気条件下での主要な Arg 代謝経路であるアルギニンアミノトランスフェラーゼ経路 (ATA) をコードする *aruCFGDBE* オペロンの誘導を仲介する [43]。しかし、乳酸菌では好气的条件下での Cit 産生の増加は報告されていない。以上のことから、ADI 経路の酵素活性は嫌気条件下で最も働くと推察できるため、嫌気培養が好ま

しいと判断した。

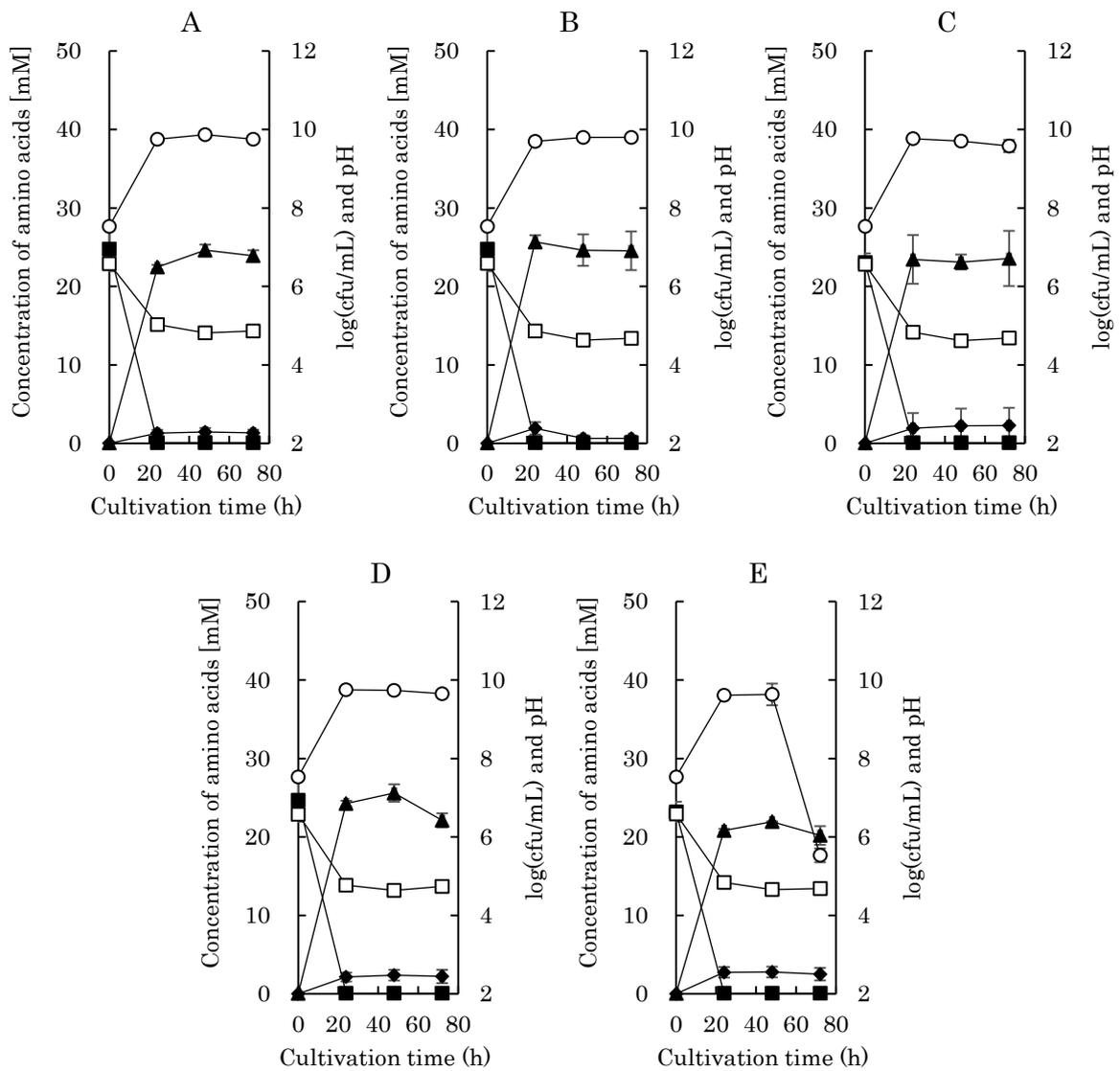


Fig. 5. パイナップル果汁発酵時の培養温度による Orn 及び Cit 産生への影響 (培地初発 pH6.5、1 (w/v) % Arg 添加、嫌気培養、5 倍希釈果汁)

培養温度 : A = 20°C, B = 25°C, C = 28°C, D = 30°C, E = 37°C、○ : 細胞生存数、□ : 培地 pH、■ : Arg 濃度、▲ : Orn 濃度、◆ : Cit 濃度、Mean ± S.D. (n=3)。

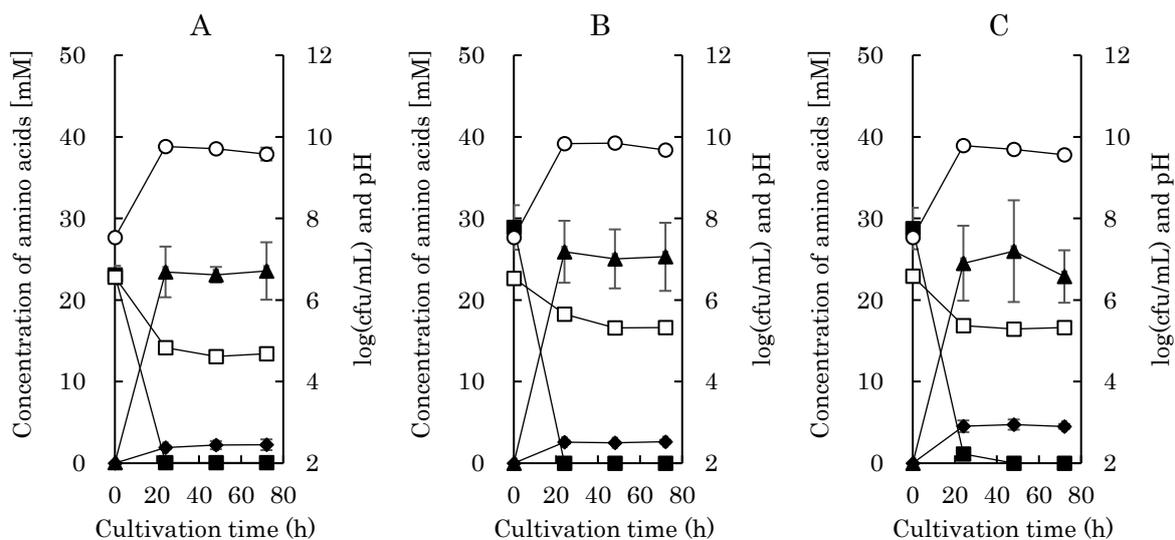


Fig. 6. パイナップル果汁発酵時の嫌気性、微好気性、好気性条件による Orn 及び Cit 産生への影響 (培地初発 pH6.5、培養温度 28°C、1 (w/v) % Arg 添加、5 倍希釈果汁)
 条件 : A = 嫌気性, B = 微好気性, C = 好気性、○ : 細胞生存数、□ : 培地 pH、■ : Arg 濃度、▲ : Orn 濃度、◆ : Cit 濃度、Mean ± S.D. (n=3)。

MSC-3G 株における Orn 産生に対する Arg 添加量の影響を評価するために、1、2、3、5、7.5、10、および 30 (w/v) % Arg をパイナップル果汁に予め添加して培養する実験を行った。菌数及び pH、アミノ酸量の経時変化を確認した結果、細胞の増殖または Orn と Cit の生産のいずれかが、Arg 濃度によって影響を受けることが確認された。7.5 (w/v) % の Arg を添加すると、細胞の生存率は他の濃度と同様であるが、48 時間の培養において最も多い Orn 産生 (98.9 ± 2.2 mM) が観察された (Fig. 7)。MSC-3G 株の Arg の消費量と細胞増殖は、Arg 濃度が低い培養でより高く、Arg の添加量が多くなるにつれて徐々に減少した。特に、増殖の定常期後の培地中に残存する Arg は、培地に 10 (w/v) % 以上の Arg を添加した場合に有意に高かった。これは Arg の代謝には低 pH が適しているが、サワードウで発酵させた *Lb. sanfranciscensis* CB1 では、Arg を 6 mM 添加して培養した場合では完全に変換することができるものの、より高濃度の Arg 存在下では、菌株の乳酸による pH の影響がなく高い pH が維持されるため、Arg の変換に適さないという報告があったことからいえる [44]。MSC-3G 株の発酵による Cit の生産は、10 (w/v) % の Arg を添加した際に、72 時間培養で 211.1 ± 35.7 mM の最大値に達した。ただし、細胞増殖は 8.4 ± 0.1 (log(CFU/mL)) にまで著しく減少した。これは、*Lb. plantarum* Lp60 でも同じことが観察され、Arg 濃度が 0.4 g/L から 2 g/L に増加すると細胞増殖が減少したと報告がある [45]。さらに、Hwang らは、キムチ由来の *Lc. lactis* の分離株を、Arg を添加した MRS 培地で培養した場合、他の菌種と比較して、Cit 産生の増加を示さず、Orn 含有量が低いことを報告した [46]。よって、Arg の添加量が多くなると効率的に Orn 及び Cit の蓄積が期待できないことから、7.5 (w/v) % が適していると判断した。

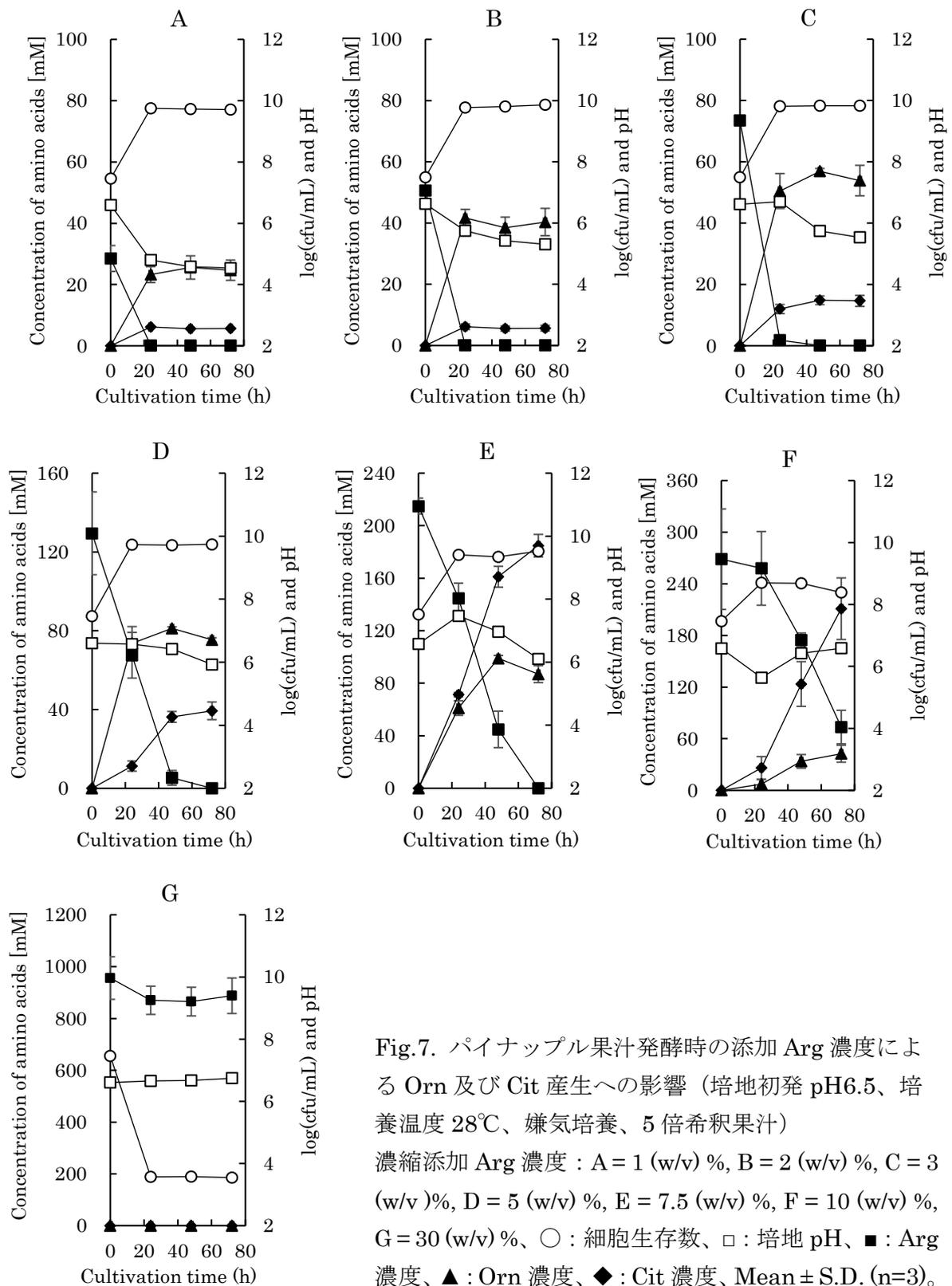


Fig.7. パイナップル果汁発酵時の添加 Arg 濃度による Orn 及び Cit 産生への影響 (培地初発 pH6.5、培養温度 28℃、嫌気培養、5 倍希釈果汁)
濃縮添加 Arg 濃度 : A = 1 (w/v) %, B = 2 (w/v) %, C = 3 (w/v) %, D = 5 (w/v) %, E = 7.5 (w/v) %, F = 10 (w/v) %, G = 30 (w/v) %、○ : 細胞生存数、□ : 培地 pH、■ : Arg 濃度、▲ : Orn 濃度、◆ : Cit 濃度、Mean ± S.D. (n=3)。

最後に、パイナップル果汁の濃度による、Arg から Orn 及び Cit 産生への影響を調査した。使用する果汁は品質を保ち、且つ効率的な保管及び輸送を行うために、絞った果汁を 5 倍濃縮された状態である。使用する際は、それを適切な濃度に希釈して用いるが、微生物にとって培地の水分量や栄養成分量は細胞の生育や代謝に影響を与える。本実験では、濃縮果汁を純水で 5, 4, 3, 2 倍で希釈し、その希釈液に 1 (w/v) % Arg を添加した条件で菌株の培養を行った。菌数及び pH、アミノ酸量の経時変化を確認した結果、5 倍希釈の果汁が最も Orn の生産量が多く、4-3 倍希釈では希釈倍率が小さいほど Cit の量が多くなった (Fig. 8)。2 倍希釈では Arg の変換が非常に遅くなり、48 時間後まで Arg がほぼ未反応のまま培地中に残存していた。また、希釈倍率 2 の場合は、増殖が遅く、72 時間培養後によく 1×10^9 cfu/mL に到達した。よって、使用するパイナップル果汁は、濃縮果汁を 5 倍希釈した果汁を用いることが適しているとわかった。

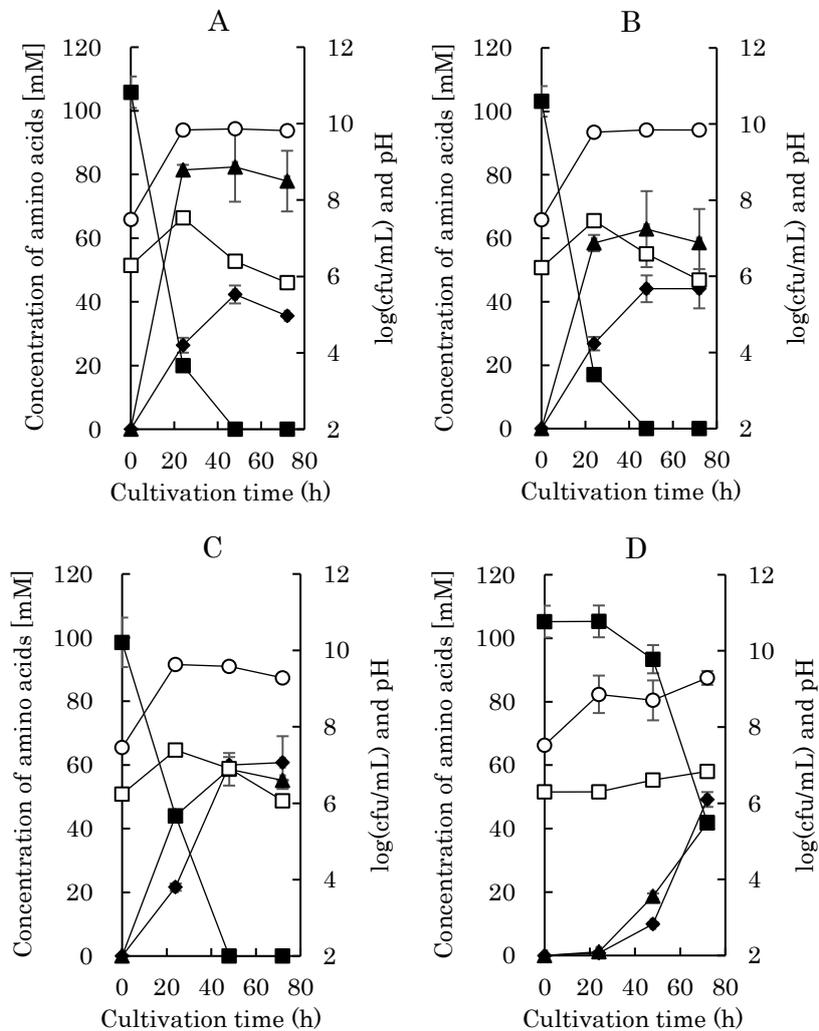


Fig. 8. 発酵時のパイナップル果汁濃度による Orn 及び Cit 産生への影響 (培地初発 pH6.5、培養温度 28°C、5 (w/v) % Arg 添加、嫌気培養)
濃縮果汁の希釈倍率: A = 5 倍, B = 4 倍, C = 3 倍, D = 2 倍、○: 細胞生存数、□: 培地 pH、■: Arg 濃度、▲: Orn 濃度、◆: Cit 濃度、Mean ± S.D. (n=3)。

以上の検討結果より、Arg から Orn と Cit を高産生する最適な条件は、パイナップル濃縮果汁を純水で 5 倍希釈し、7.5 (w/v) % Arg を添加後 pH6.5 に調整した果汁培地で、*Lc. lactis* MSC-3G を用いて 28°C、48 時間、嫌気培養にて発酵することと決定づけた。

第五節 発酵パイナップル果汁液の安全性評価と菌株の特性解析

第一項 Orn 及び Cit 含有発酵パイナップル果汁液の安全性評価

前節までの実験で、Orn 及び Cit を高産生する条件を決定することができた。そこで、MSC-3G 株を Arg 7.5 (w/v) % を添加したパイナップル果汁で、28°C、初発 pH 6.5、48 時間静置培養して得られた発酵液を 4 倍濃縮し、安全性評価を行う試験の被験液として用いた。

上記被験液を単回経口投与した時の毒性評価を、ラットを用いて行った。雌雄各 5 匹のラットに毒性試験ガイドラインの限度試験の投与量に準じた 2,000 mg/kg の用量で単回強制経口投与し、その後 14 日間、生死、一般状態、体重測定を行い、観察期間終了時に剖検を行った（対照群は媒体である注射用水を使用）。その結果、いずれの群にも死亡がみられず、また一般状態、体重測定及び剖検においても被験液投与に起因する変化はみられなかった。よって、本被験液をラットに単回経口投与した時の最小致死量及び無毒性量は雌雄ともに 2,000 mg/kg を上回ると推定された。

次に、同様の被験液を用いて、復帰突然変異試験を行った。ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合としない場合の各条件下で、プレインキュベーション法により実施した。被験液処理の用量設定得試験により決定した 5,000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 313、625、1,250、2,500、5,000 µg/plate で試験を行った。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。よって、被験液は細菌に対する遺伝子突然変異誘発を有さない（陰性）と判定した。

続いて同様の被験液について、ヒトリンパ芽球細胞（TK6）を用いた *in vitro* 小核試験を行い、染色体異常誘発能の有無を確認した。被験液処理の用量設定得試験により決定した 5,000 µg/mL を最高用量として以下公比 2 で除し 1,250、2,500、5,000 µg/mL で試験を行った。その結果、いずれの処理法においても小核を有する細胞の出現頻度は陰性対照群と比較統計学的に優位な増加を示さず、その出現率は陰性対照群背景データの 95% 管理範囲内であった。よって、被験液においては染色体異常を誘発しない（陰性）と判定した。

以上の安全性試験により、被験液には経口毒性及び遺伝毒性はないことが確認できた。

第二項 *Lc. lactis* MSC-3G の特性解析

発酵に使用する *Lc. lactis* MSC-3G の特性を解析した。走査型電子顕微鏡（SEM）にて菌体を観察したところ、双球性のある形状を有していた（Fig. 9）。また、DL-乳酸の産生や

炭水化物の資化性、塩や胃酸、胆汁酸耐性、プロバイオティクスに使用される場合に重要な指標となる細胞付着性については Table 8 の通りであった。API 50 CHL テストを使用して評価された炭水化物利用能については、MSG-3G 株によって代謝される単糖類には、D-キシロース、L-アラビノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、D-グルコース、D-マンノース、*N*-アセチルグルコサミンがあることが確認された。MSG-3G 株による二糖類と多糖類の利用は、MSG-3G 株がさまざまな糖の切断に関与する加水分解酵素（トレハロース、スクロース、マルトースの場合は α -グルコシダーゼ、セロビオースとゲンチオビオースの場合は β -グルコシダーゼ）を生成し、そして糖アルコール（アミグダリン、サリシン及びマンニトール）を利用することを示している可能性があった。セロビオース、ゲンチオビオース、アミグダリンなどの炭素源は植物由来の炭水化物であり、熟した果実に自然に存在することで知られている [47]。さらに、MSC-3G 株は、塩ストレス（5 (w/v) % NaCl）や酸ストレス（pH 2.5）に耐性があり、胆汁酸（0.1 (w/v) %）に対してわずかに耐性があることがわかった。

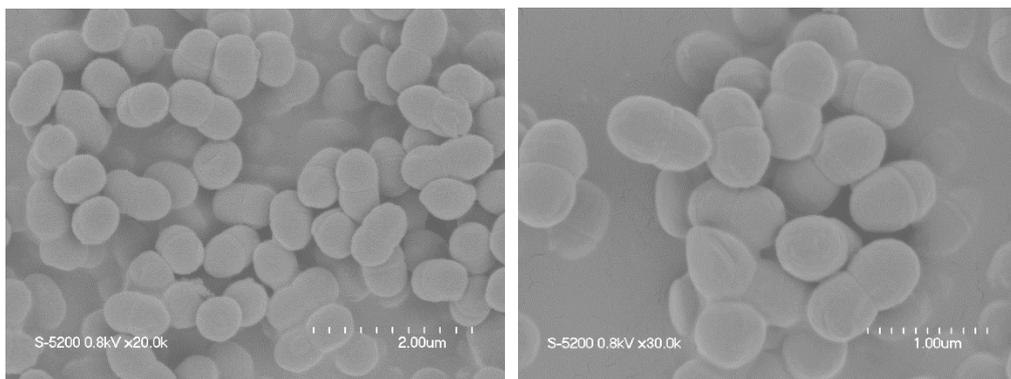


Fig. 9. SEM で観察した *Lc. lactis* MSC-3G

Table 8. *Lc. lactis* MSC-3G の特性

Characteristic	Results	Characteristic	Results
Gram strain	+	Growth in the presence of NaCl	
Cell shape	Spherical	1 (w/v) % NaCl	+
Fermentative type	Homo	2 (w/v) % NaCl	+
Catalase	-	3 (w/v) % NaCl	+
L-Lactic acid production	+	4 (w/v) % NaCl	+
D-Lactic acid production	+	5 (w/v) % NaCl	+
Tolerance to gastric acid (pH2.5)	+	7.5 (w/v) % NaCl	-
Tolerance to bile acid		10 (w/v) % NaCl	-
0.10 (w/v) %	+	Cell adhesion	1.6 ± 0.3 %
0.20 (w/v) %	-		
0.30 (w/v) %	-		
Carbon source fermentability			
Glycerol	-	Esculin ferric citrate	-
Erythritol	-	Saslicin	+
D-Arabinose	-	D-Cellobiose	+
L-Arabinose	+	D-Maltose	+
D-Ribose	+	D-Lactose	+
D-Xylose	+	D-Melibiose	-
L-Xylose	-	D-Sucrose	+
D-Adonitol	-	D-trehalose	+
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	Inulin	-
D-Galactose	+	D-Melezitose	-
D-Glucose	+	D-Rafinose	-
D-Fructose	+	Starch	+
D-Mannose	+	Glycogen	-
L-Sorbose	-	Xylitol	-
L-Rhamnose	-	Gentiobiose	+
Dulcitol	-	D-turanose	-
Inositol	-	D-Lyxose	-
D-Mannitol	+	D-Tagarose	-
D-Sorbitol	-	D-Fucose	-
Mrthyl-α-D-mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Mrthyl-α-D-glucopyranoside	-	Gluconate	+
N-Acethyl glucosamine	+	2-Ketogluconate	-
Amyggdalin	+	5-Ketogluconate	-
Arbutin	+		

次に、MSC-3G 株の薬剤感受性を E-test キット及び微量液体希釈法により確認した。E-test キットの MIC 測定結果により、その結果に近い抗生物質濃度にて微量液体希釈法により MIC の測定を行った結果、微量液体希釈法の方が全ての抗生物質において MIC が大きい傾向を示した (Table 9)。また、微量液体希釈法においては、AM 以外は LSM 培地で測定した方の MIC が大きい結果が確認された。栄養要求性が高い乳酸菌においては、MH 培地から LSM 培地に栄養が強化された場合、抗生物質の抗菌活性が弱くなってしまった可能性が考えられた。欧州食品安全気候 (EFSA) の cut-off 値と比較すると、SM のみ、全ての評価法において MIC が cut-off 値よりも高い結果であった。ISO/IDF の乳・乳製品中の微生物の抗生物質耐性を評価する培地は、LSM 培地と決められている。また、EFSA のガイドラインでは、食品製造に使用される乳酸菌の抗生物質耐性能の評価には、寒天培地を用いた拡散法ではなく、微量液体培地を用いた評価法が推奨されている [48]。日本では基準は特に設けられていないが、以上のことから、MSC-3G 株には SM への耐性能があると判断した。MSC-3G 株には SM への耐性があるため、SM 等のアミノグリコシド系抗生物質の耐性に関わっていると推測されている抗生物質修飾酵素 Aminoglycoside M(6)-acetyltransferase 及び Aminoglycoside 3'-phosphotransferase をコードする遺伝子が、MSC-3G 株のゲノム DNA 上に存在していることが考えられた [49, 50]。

Table 9. 各評価法により MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$] 測定結果

抗生物質名	E-test	微量液体希釈法		EFSA cut-off 値
		LSM	MH	
テトラサイクリン (TC)	0.19	4	1	4
エリスロマイシン (EM)	0.25	0.5	0.125	1
クロラムフェニコール (CL)	3	8	4	8
アンピシリン (AM)	0.38	0.5	1	2
バンコマイシン (VA)	0.38	0.5	0.5	4
ゲンタマイシン (GM)	4	32	8	32
クリンダマイシン (CM)	0.5	1	0.5	1
カナマイシン (KM)	16	64	16	64
ストレプトマイシン (SM)	48	128	128	32

MSC-3G 株で Arg から Orn 及び Cit を産生したことから、ADI 経路をコードする遺伝子クラスターが実際に存在しているのか、また MSC-3G 株には SM への耐性があるため、SM 等のアミノグリコシド系抗生物質の耐性に関与している遺伝子が染色体上に存在しているのか、そして伝播性の可能性を高いプラスミドの保持があるのかを確認するために MSC-3G 株の全ゲノム解析を行った。

全ゲノム解析により、MSC-3G 株のゲノムサイズは 2,481,272 bp であり、プラスミドを含まないことがわかった (Fig. 10)。MSG-3G 株の ADI 経路をコードする遺伝子はクラスター化され、アルギニンデイミナーゼ (*arcA*)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (*arcB*)、カルバメートキナーゼ (*arcC*)、アルギニ/オルニチンアンチポーター (*arcD*)、

アミノトランスフェラーゼ (*arcT*)、アルギニン tRNA リガーゼ (*argS*) およびアルギニンリプレッサー (*argR*) をコードする各遺伝子はそのクラスターを形成していた (Table 10)。これは、以前の研究の結果、特に牛乳から分離されたよく知られている国際的なプロトタイプ *Lc. lactis* MG1363 の ADI 経路クラスターの遺伝子構造と一致していた。MG1363 株の ADI 遺伝子クラスターには、*argR*、*argS*、*arcA*、*arcB*、*arcD1*、*arcC1*、*arcC2*、*arcT* および *arcD2* の順で各遺伝子が配置されており、*argR* を除いて、すべての遺伝子が同じ方向で転写されるが、Arg 依存性の転写調節因子であると予測される *argR* は、*argS* の上流に位置し、別のプロモーターで逆方向に転写される [51, 52]。また、SM 等のアミノグリコシド系抗生物質の耐性に関わっていると推測されている抗生物質修飾酵素 Aminoglycoside *N*(6)-acetyltransferase 及び Aminoglycoside 3'-phosphotransferase をコードする遺伝子をゲノム解析で得た塩基配列から検索したところ、Aminoglycoside 3'-phosphotransferase をコードする遺伝子 *ymdC* 及び *ywiA* 遺伝子が確認できた。その配列をデータベース (Database of genes from NCBI RefSeq denomes - UniProt : <https://www.uniprot.org/>) にて確認したところ、同種である *Lc. lactis subsp. lactis* IL1403 も同様に *ymdC* 及び *ywiA* 遺伝子の配列を保有していることが分かった。IL1403 株は乳酸菌の中で初めてゲノムが解読された菌株であり、研究材料としてやチーズ製造のスターターとして使用されている [53]。汎用されている同菌株と同じ既知の遺伝子が存在していることから、経験則として耐性化が拡散するような脅威はないと考えられた。

以上の結果より、MSC-3G 株はプラスミドを保有しておらず、SM 耐性に関与していると考えられる耐性遺伝子は染色体上にあることが確認できた。そのため、MSC-3G 株には耐性遺伝子の伝播性がある可能性は低いと判断した。

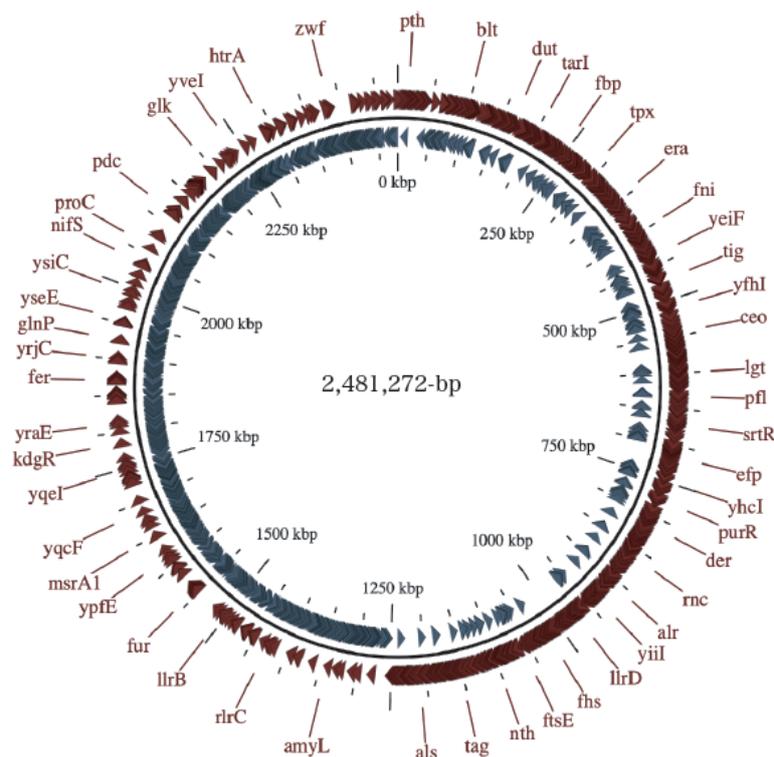


Fig. 10. *Lc. lactis* MSC-3G 染色体の環状ゲノムマップ

Table 10. *L. lactis* MSC-3G における ADI 遺伝子クラスター

Gene	aa	Best blast homology (source)	Accession No.	Identity (%)
<i>arcD2</i>	497	Arginine / Ornithine antipoter (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	Q9CE19	99.2
<i>arcT</i>	376	Aminotransferase (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	Q9CE18	98.9
<i>arcC2</i>	314	Carbamate kinase (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	Q9CE17	99.4
<i>arcC1</i>	314	Carbamate kinase (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	Q9CE16	99.0
<i>arcD1</i>	490	Arginine / Ornithine antipoter (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	Q9CE15	99.4
<i>arcB</i>	354	Ornithine carbamoyltransferase (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	P0C2U2	99.7
<i>arcA</i>	410	Arginine deiminase (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	P58013	100.0
<i>argS</i>	1,695	Arginine tRNA ligase (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	Q9CE12	99.8
<i>argR</i>	459	Arginine repressor (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403)	Q9CE11	96.1

第六節 総括

本章では、サトウキビ及び甜菜から分離した乳酸菌を用いて、Orn 及び Cit を産生するサトウキビ由来乳酸菌 *Lc. lactis* MSC-3G を見出した。本株を用いて、さまざまな果汁を培地として Orn 及び Cit の生産性を調査したところ、MSC-3G 株ではパイナップル果汁を培地とすることが適していた。これは発酵果汁中の糖及び有機酸、イオンの含有量を測定した際に、乳酸発酵や ADI 経路に関連する成分の消費量及び生産量が多かったこともこの結果を支持していた。

次に、その菌株と果汁の組み合わせで、両アミノ酸の生産性を高めるために、培地の初期 pH、培養温度、酸素供給、Arg 添加及び果汁濃度などの要因の影響を調べ、両アミノ酸を高産生する条件を決定づけた。Orn 濃度が最も高くなる条件では果汁中の Orn 濃度は 98.9 ± 2.2 mM、Cit 濃度は 161.1 ± 8.0 mM、Cit 濃度が最も高くなる条件では果汁中の Orn 濃度は 42.6 ± 9.9 mM、Cit 濃度は 211.1 ± 35.7 mM であった。

Arg を添加したパイナップル果汁培地の ADI 経路酵素である ADI 及び OCT は、マンゴー果汁よりも高い活性を示した。これらの活性は果汁中のアミノ酸などの栄養成分によって引き起こされる可能性が高いことがわかった。また、パイナップル果汁での ADI 及び OCT 活性は、Arg を添加して発酵することで ADI 活性のみが大きく増加した。このことから Arg が全て Orn に変換されていくのではなく、同時に Cit も蓄積されていくことがわかった。

Orn 濃度が最も高くなる条件で調製した発酵パイナップル果汁濃縮液を用いて、経口毒性及び遺伝毒性の双方において問題ないことを確認できた。また MSC-3G 株も薬剤耐性試験や全ゲノム解析、そして乳酸菌の一般的特徴を確認することで、使用に問題がないとした。

上記の結果より、本章にて検討した MSC-3G 株を用いた Orn 及び Cit を含む発酵パイナップル果汁は、Orn や Cit の抗疲労等の機能を有した食品原料として活用することが期待される。

【第三章】

植物乳酸菌による発酵枇杷葉エキスの抗酸化機能

第一節 緒言

生薬とは、自然界に存在する動植物、又はその一部を用いた薬効を有する産物であり、薬効成分を精製することなく用いる天然由来の医薬品の総称である。なお、日本薬局方では、「生薬は動植物の薬用とする部分、細胞内容物、分泌物、抽出物又は鉱物など」と定義されている。現在、日本で常用されている生薬は 200 種類程度であり、処方される際には漢方薬を構成する原料として、個々の症状に合った薬効を持つ生薬を組み合わせることで使用されている。生薬が含有している成分は、滋養強壮や整腸、鎮痛、抗炎症など様々な効果を持っており、糖尿病や高血圧症、癌といった特定の疾患への治療効果を発揮する場合もある。そのような成分は生薬としての活用だけでなく、単離・精製されて創薬への応用もなされている。その一方で、これらの生薬中には薬効を示さない成分がいくつも含まれており、それらが新たに生物活性を示す物質の基質となることが期待されている。

活性酸素種 (ROS) は、スーパーオキシド (superoxide : O_2^-)、過酸化水素 (hydrogen peroxide : H_2O_2)、ヒドロキシラジカル (hydroxyl radical : $\cdot OH$) などの反応性の高い酸素種の総称で、核酸やタンパク質、膜脂質など様々な生体分子に酸化損傷を与える [54]。活性酸素の生成経路は、好気性生物では主に呼吸であるが、他に紫外線や放射線、ストレス、加齢、そして肥満等により生じる。活性酸素は細胞伝達物質や免疫細胞による攻撃手段のひとつとして働く一方で、過剰な産生は細胞を傷害し、がん、心血管疾患ならびに生活習慣病などの疾患をもたらす要因となる。そのため、生体内には活性酸素による酸化ストレスに応答する内因性の防御機構として、カタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、種々のペルオキシダーゼ等の酵素が備わっており、これらの働きにより活性酸素による損傷を防いでいる。その一方で、外因性の酸化ストレスへの防御としては抗酸化物質が活躍しており、これらは食物成分として体内へ摂取されることで酸化ストレスから身体を守っている。主な抗酸化物質として、アントシアニンやイソフラボン、カテキンといったポリフェノール類や、 β -カロテンやアスタキサンチンなどのカロテノイド類、そしてビタミン C やビタミン E などがある。このような抗酸化物質は果物や野菜の摂取により補給されるが、中にはこれらの物質を乳酸菌が代謝によって産生することが報告されている。例えば、*Lb. plantarum* ではカロテノイドを産生することが報告されており [55, 56]、また当研究室でも *Lb. brevis* 174A で芍薬エキスを発酵することで抗酸化能を有するピロガロールを産生していることを発見した [57]。

上述のように、発生原因が多いため活性酸素に曝される機会が多いことから抗酸化能を持つ素材は注目されており、抗酸化機能の付与または抗酸化機能を増強する技術が保健機能性市場で期待されている。そこで、本章では、抗酸化能を有する生薬を植物乳酸菌で発酵することで抗酸化能を強化した素材について研究を行った。

第二節 植物乳酸菌を用いた発酵生薬エキスの抗酸化機能のスクリーニング

第一章にて分離・同定した一部の菌株に加え、当研究室に保存してある菌株を合わせた計 14 菌株と、漢方薬として汎用されている 41 種の生薬を選び、熱水抽出法で生薬エキスを調製した（使用菌株及び生薬は実験の部参照）。各生薬エキスにおける菌株の増殖性を確認後、生薬濃度 1, 3, 10 (w/v) %のうち増殖可能であった濃度の生薬エキスを使用し、28°C、48 時間で培養した発酵生薬エキスの培養上清液を回収した。各上清液の抗酸化機能は、HEK293 細胞培養液に上清液を添加し、細胞を H₂O₂ 処理した後の細胞生存率にて評価した。その結果、強い抗酸化機能を示した菌株と生薬の組み合わせは、サトウキビ由来 *Lb. plantarum* MSC-5T と枇杷葉及び芍薬であった (Fig. 11)。当研究室では、菌株は異なるが既に *Lb. brevis* 174A を用いた発酵芍薬エキスによる抗酸化物質産生の研究がされているため、本研究では枇杷葉を候補として選択し、*Lb. plantarum* MSC-5T を用いた発酵枇杷葉エキスについての抗酸化機能について研究することとした [57]。

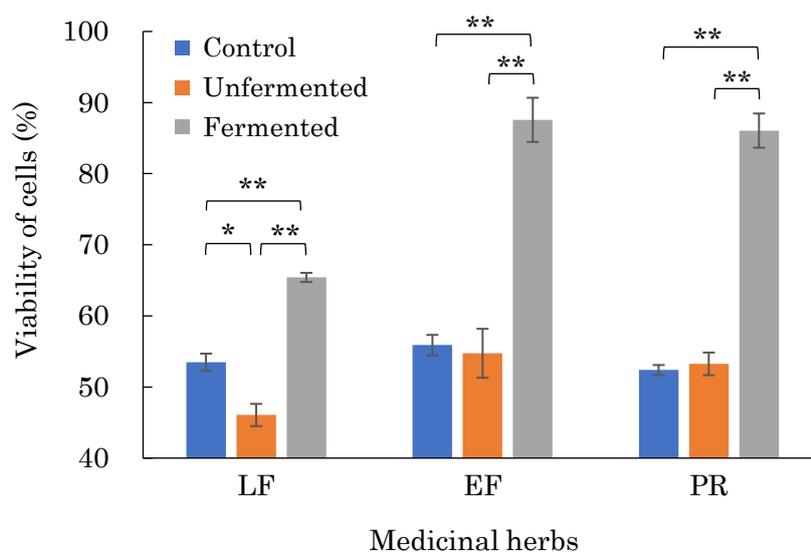


Fig. 11. 発酵生薬エキスの抗酸化機能 (LF: 金銀花、EF: 枇杷葉、PR: 芍薬)
Mean ± S.D. (n=3)、Turkey HSD test (*: p<0.05, **: p<0.01)。

第三節 発酵枇杷葉エキスによる酸化ストレスからの細胞保護効果

前節にて枇杷葉エキスをサトウキビ由来乳酸菌 *Lb. plantarum* MSC-5T を用いて発酵することで、抗酸化機能を有した発酵枇杷葉エキスを獲得した。本節ではその発酵エキスの抗酸化機能を強化できる培養条件を検討するとともに、その抗酸化機能が酸化ストレスから細胞を保護する作用を示すか否かを検証した。

熱水抽出時の枇杷葉の添加量により枇杷葉エキス濃度を調整し、MSC-5T 株を各濃度の枇杷葉エキスにて培養した。培養後の MSC-5T 株の生菌数、及び HEK293 細胞を用いた培養液上清の H₂O₂ への抗酸化機能を確認した。その結果、MSC-5T 株の生菌数は枇杷葉エキス

濃度が 10 (w/v) %よりも高くなるにつれて若干増加していたが、HEK293 細胞の生存率は枇杷葉エキス濃度が 10 (w/v) %よりも高くなってもほぼ横ばいであった (Fig. 12)。また、実際に実験を行っているとき、枇杷葉エキス調製時にエキス濃度が高くなるにつれて、使用した枇杷葉の重量に対して得られるエキス量が少なくなっていたため、極めて効率が悪かった。これらのことから、枇杷葉エキス濃度は 10 (w/v) %が適切だと判断した。

次に、10 (w/v) %枇杷葉エキスで MSC-5T 株を培養する際の時間により、抗酸化機能に違いがあるのかを確認した。その結果、48 時間培養で最も HEK293 細胞の生存率が高い結果となり、抗酸化機能を有するためには 48 時間培養が適していると判断した (Fig. 13)。

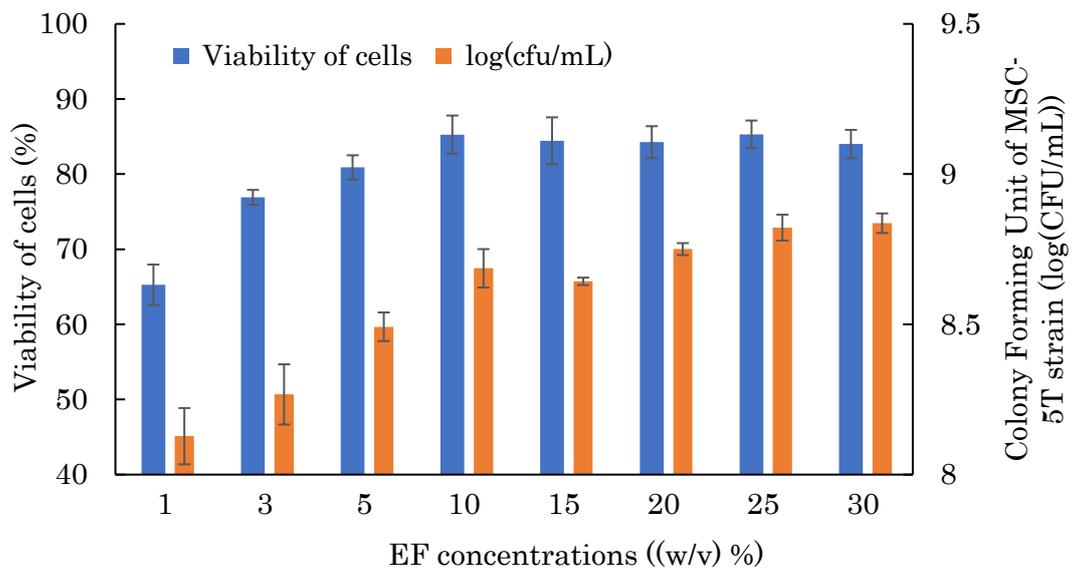


Fig. 12. 枇杷葉エキス各濃度で発酵した際の乳酸菌生菌数と抗酸化機能 (培養温度 28°C、培養時間 48 時間) Mean ± S.D. (n=3)。

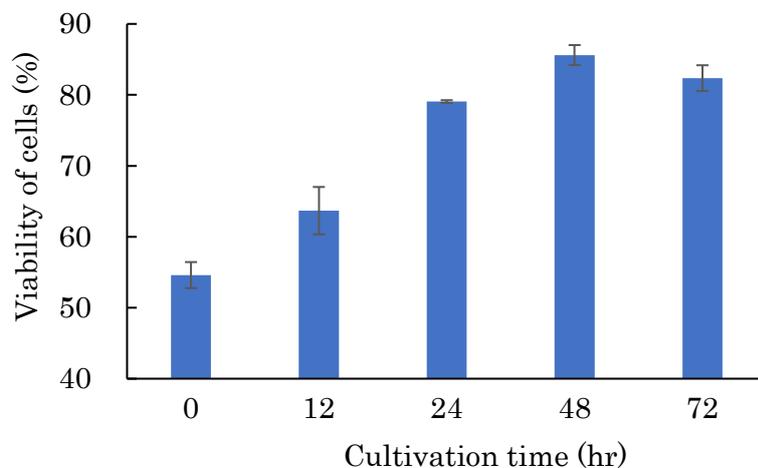


Fig. 13. 枇杷葉エキスにおける MSC-5T 株の培養時間による抗酸化機能の違い (培養温度 28°C、枇杷葉エキス濃度 10 (w/v) %) Mean ± S.D. (n=3)。

ここまでの実験で決定した枇杷葉エキス濃度と培養時間で調製した MST-5T 株による発酵枇杷葉エキス上清液が、細胞内に生じた活性酸素に対して抗酸化機能を示すか否か検証した。細胞内に活性酸素を発生させることが報告されている [68–60] カビ毒であるマイコトキシン的一种、オクラトキシン A (OTA) とシトリニン (CTN) にて HEK293 細胞を処理した後、発酵枇杷葉エキス上清液の抗酸化作用を確認した。HEK293 細胞の生存率にてその結果について評価したところ、OTA と CTN の両方に対し、発酵枇杷葉エキス上清液を添加することで、細胞生存率の低下を抑えられた (Fig. 14)。よって、発酵枇杷葉エキスが細胞内に発生する活性酸素に作用し、酸化ストレスから細胞を保護したことが推察された。

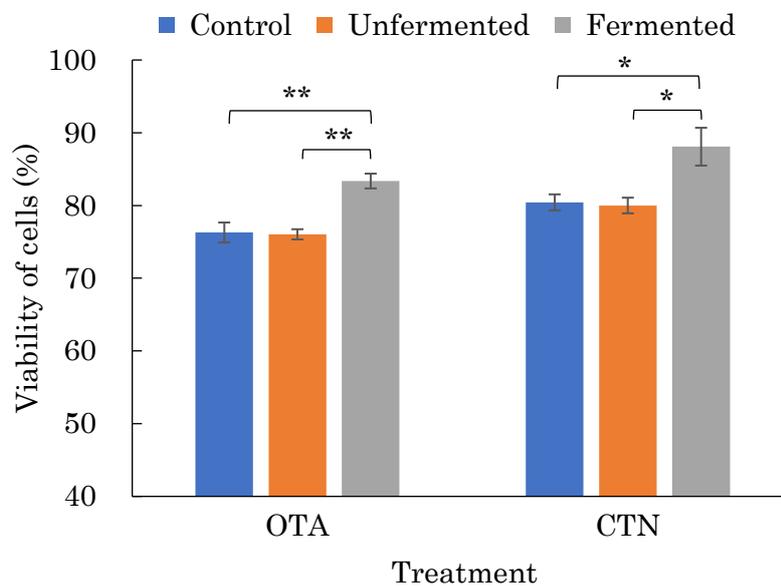


Fig. 14. カビ毒素物質に対する発酵枇杷葉エキスの細胞保護効果
Mean \pm S.D. (n=3), Turkey HSD test (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

発酵枇杷葉エキス上清液が細胞内の酸化ストレスに作用していると推察できたため、次に細胞内酸化ストレスの指標を用いることで、実際に細胞内へ作用しているかどうかを確認した。

酸化ストレスの原因である ROS の細胞内レベルが、発酵枇杷葉エキスにより影響を受けるか調査した。H₂O₂ 及び OTA、CTN で処理した HEK293 細胞を回収し、超音波処理にて得た細胞内成分液中の ROS を測定した。PBS を添加したコントロールに対して、未発酵及び発酵枇杷葉エキスを添加した場合の ROS の割合を比較した結果、いずれの処理においても発酵枇杷葉エキスを添加することで細胞内 ROS が減少していることがわかった (Fig. 15)。

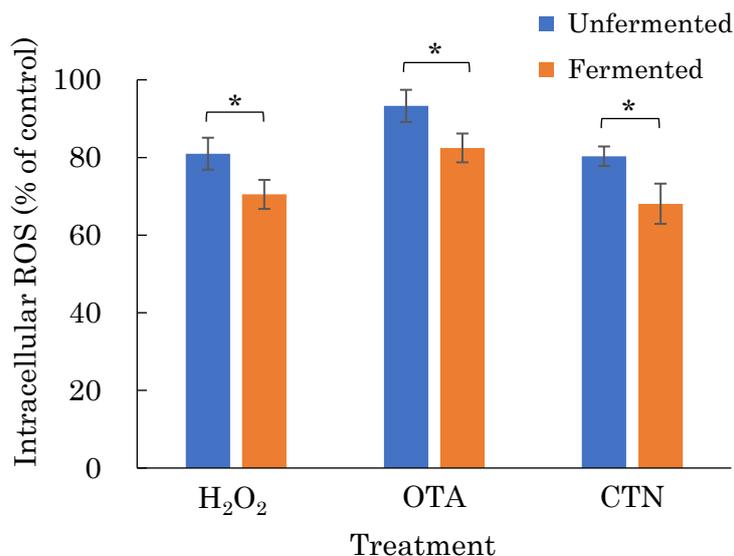


Fig. 15. 細胞内 ROS に対する発酵枇杷葉エキスの効果
Mean \pm S.D. (n=3), Turkey HSD test (* : p<0.05)。

ROS の一種であるスーパーオキシドを消去し、スーパーオキシドに由来する酸化ストレスを減少させる酵素に SOD がある。SOD は細胞内の酸化ストレス、脂質代謝、炎症などを調節することが報告されており、SOD 活性による抗酸化効果は医薬品や化粧品、食品等幅広い分野で利用が期待されている [61]。そこで、同様に H₂O₂ 及び OTA、CTN で処理した HEK293 細胞を回収し、超音波処理にて得た細胞内成分液中の SOD を測定した。PBS を添加したコントロールとして、未発酵及び発酵枇杷葉エキスを添加した場合の細胞内総タンパク質当たりの SOD 量を比較した結果、いずれの処理においても発酵枇杷葉エキスを添加することで細胞内 SOD 量が減少していることがわかった (Fig. 16)。よって、発酵枇杷葉エキスによってスーパーオキシドによる酸化ストレスレベルが低下したと考えられた。

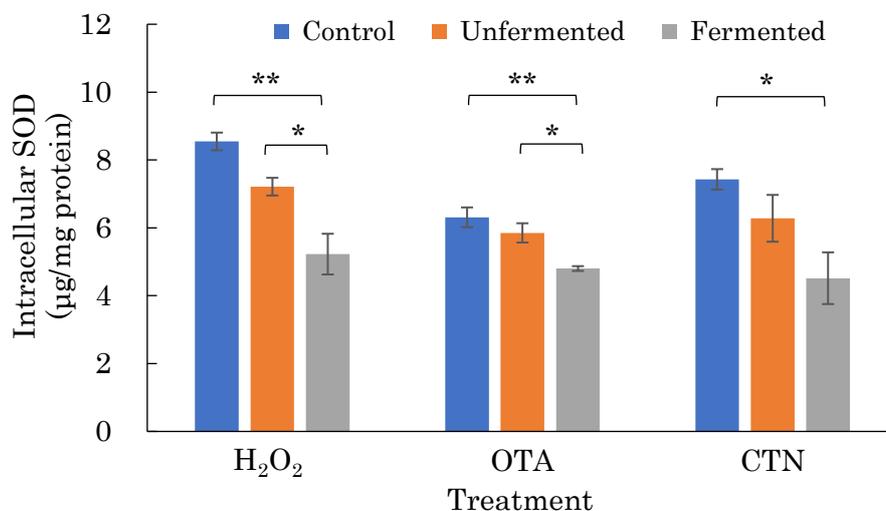


Fig. 16. 細胞内 SOD に対する発酵枇杷葉エキスの効果
Mean \pm S.D. (n=3), Turkey HSD test (* : p<0.05, ** : p<0.01)。

グルタチオンは生体内に存在するトリペプチドで、ヒトを含む多くの生物の細胞内抗酸化物質である。そして Glutathione peroxidase、Glutathione S-transferase および Thiol transferase 等の酵素基質として抗 ROS や脂質ペルオキシド、生体異物毒性物質、重金属を含む多種多様なフリーラジカルから細胞の酸化還元状態を安定化することで細胞を保護し、癌などの治療等で重要な役割をしている [62]。グルタチオンは通常、生体内で還元型 (GSH) として存在しているが、酸化ストレスなどの刺激によって還元型 (GSH) から酸化型 (GSSG) に変換されるため、GSH と GSSG の比率が酸化ストレスの指標とされている。そこで、細胞内 GSH 及び GSSG の比率を測定することで、発酵枇杷葉エキスの細胞内の酸化還元状態への影響を調査した。H₂O₂ 及び OTA、CTN で処理した HEK293 細胞を回収し、超音波処理にて得た細胞内成分液中の総グルタチオン量及び GSSG 量を測定した。測定値より、GSH と GSSG の比率を算出し SOD を測定した。PBS を添加したコントロールとして未発酵及び発酵枇杷葉エキスを添加した場合の細胞内の GSSG/GSH を比較した結果、いずれの処理においても発酵枇杷葉エキスを添加することで細胞内 GSSG/GSH を比が減少していることがわかった (Fig. 17)。よって、発酵枇杷葉エキスによって細胞内の酸化ストレス状態を緩和したと考えられた。

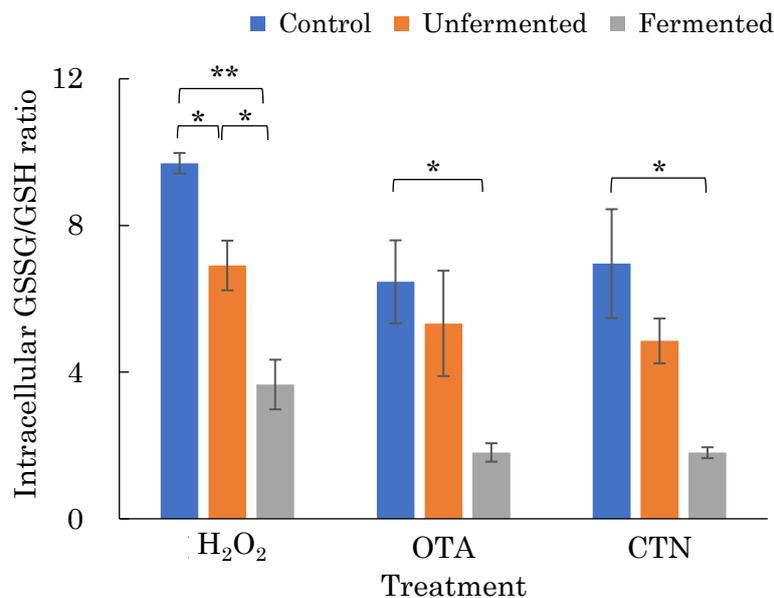


Fig. 17. 細胞内グルタチオンに対する発酵枇杷葉エキスの効果
Mean ± S.D. (n=3), Turkey HSD test (* : p<0.05, ** : p< 0.01)。

アポトーシスはプログラム細胞死の最も一般的な形態で、DNA 損傷や小胞体ストレス、ROS の増加などの内因性刺激によって起こる。実際に H₂O₂ や OTA、CTN で誘発したアポトーシスを多糖類やデフェリコプロゲンなどの抗酸化物質により抑制して、細胞の保護に寄与した研究などの報告がある [63–65]。アポトーシスの過程で不可欠な酵素がカスパーゼであり、複数あるカスパーゼのうちアポトーシス反応の重要な調節因子がカスパーゼ-3 および -8 である。カスパーゼ-8 はアポトーシスの開始に重要で、活性型カスパーゼ-8 はカスパーゼ

-3 を切断し、その結果細胞死が誘発される。そしてカスパーゼ-3 は、アポトーシスの重要なメディエーターの 1 つとして同定されている。そこで、細胞内のカスパーゼ-3 の活性を測定することで、酸化ストレス等によるアポトーシスの誘発について発酵枇杷葉エキスが与える影響を調査した。H₂O₂ 及び OTA、CTN で処理した HEK293 細胞を回収し、超音波処理にて得た細胞内成分液中のカスパーゼ-3 活性を、カスパーゼ-3 の蛍光基質を用いて蛍光強度にて評価した。PBS を添加したコントロールとして未発酵及び発酵枇杷葉エキスを添加した場合の蛍光強度を比較した結果、いずれの処理においても発酵枇杷葉エキスを添加することでカスパーゼ-3 活性が減少していることがわかった (Fig. 18)。よって、発酵枇杷葉エキスによって細胞内の酸化ストレスが緩和され、アポトーシスの誘発が抑えられたことが示唆された。

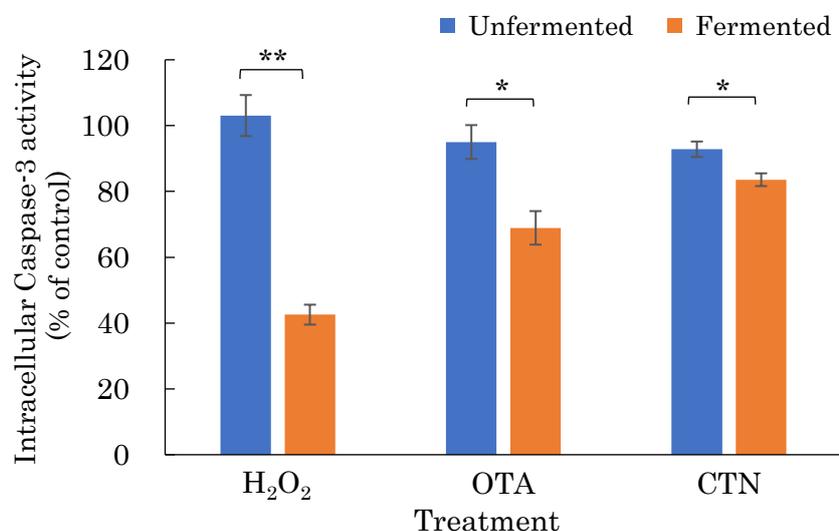


Fig. 18. 細胞内カスパーゼ-3 活性に対する発酵枇杷葉エキスの効果
Mean ± S.D. (n=3), Turkey HSD test (* : p<0.05, ** : p< 0.01)。

以上の結果より、抗酸化機能を示した MSC-5T 株による発酵枇杷葉エキスは、細胞内に生じた活性酸素に作用することで酸化ストレスから細胞を保護する効果が確認できた。

第四節 発酵枇杷葉エキスからの活性成分の分離・精製

前節にて抗酸化機能を有した MSC-5T 株による発酵枇杷葉エキスを得た。本節ではその発酵により獲得できた抗酸化機能を有する成分の分離精製を試みた。

MSC-5T 株による発酵枇杷葉エキスの上清に対し、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルの順に有機溶媒による抽出操作を行い、各画分の抗酸化活性を H₂O₂ 処理後の HEK293 細胞の生存率で評価した。その結果、酢酸エチル画分に抗酸化活性が確認できた (Fig. 19)。また、未発酵及び発酵枇杷葉エキスの酢酸エチル画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離し、*p*-メトキシベンズアルデヒドを含む検出液を噴霧して加熱した。その結果、未発酵液で見られなかったスポットが発酵液で検出された (Fig. 20)

さらに、抗酸化活性成分を分離するべく、発酵液の酢酸エチル画分をシリカゲルオープンクロマトグラフィーにて、石油エーテル、酢酸エチル、アセトン、酢酸を用いた溶出システムにて溶出後、各溶出液を TLC にて検出した結果、さらに分離ができていることが確認した。*p*-メトキシベンズアルデヒドを含む検出液で見えられた活性成分と思われるスポットは、UV254 nm 照射及びよう素でも同様にスポットが検出された。このことから、アミノ基またはアミド基など二重結合や不飽和結合を有する芳香族化合物と推察したが、活性成分の構造決定は現在進行中であり、その結果が待たれる。

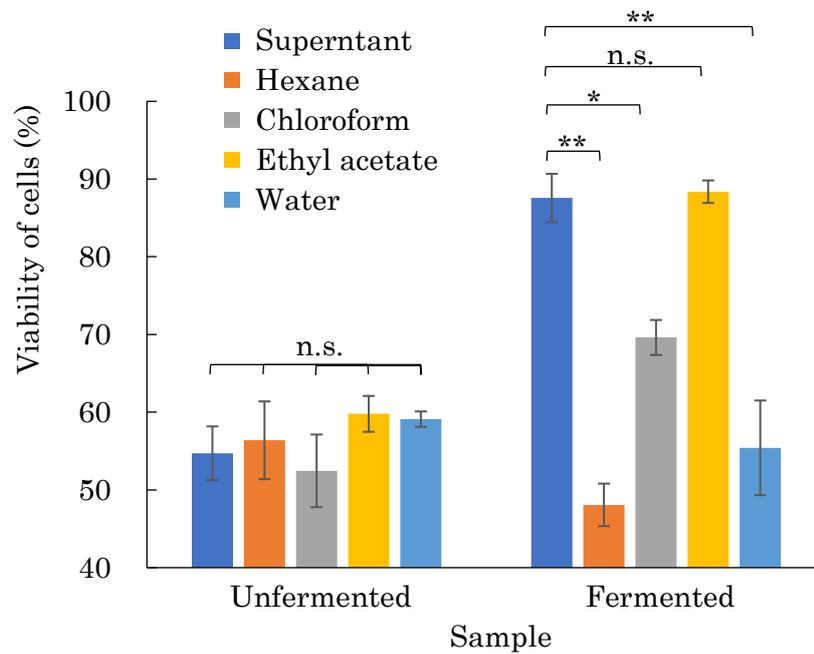


Fig. 19. 溶媒抽出の各画分による発酵枇杷葉エキスの細胞保護効果
Mean \pm S.D. (n=3), Turkey HSD test (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

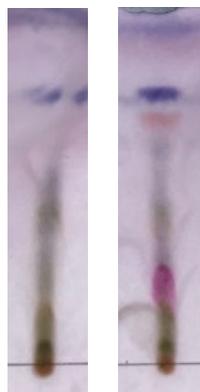


Fig. 20. 未発酵及び発酵枇杷葉エキスの酢酸エチル画分の TLC 結果
(左 : 未発酵エキス、右 : 発酵エキス)

結果、HFD-f 群の SBP 及び DBP いずれにおいても低下し、5 週間後の HFD 群と比較すると有意に減少が認められ、また NFD 群とは有意差がなかった (Fig. 23)。よって、肥満モデルマウスに発酵枇杷葉エキスを投与することで、体重及び内臓脂肪、血圧の改善効果がみられた。

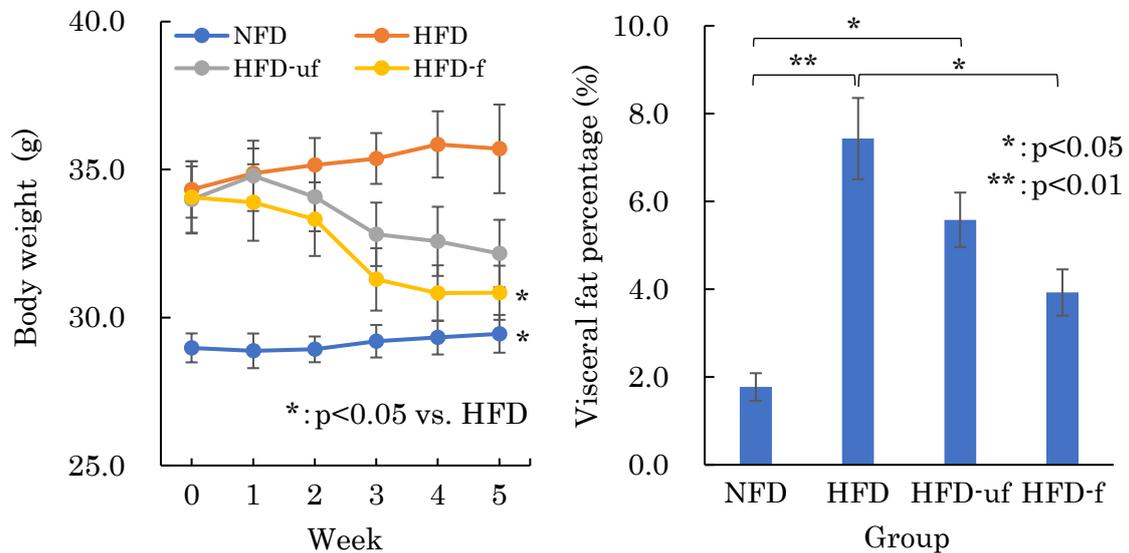


Fig. 22. マウスの (左) 体重の経時変化と (右) 内臓脂肪率
Mean \pm S.D. (n=4-8). Tukey HSD test.

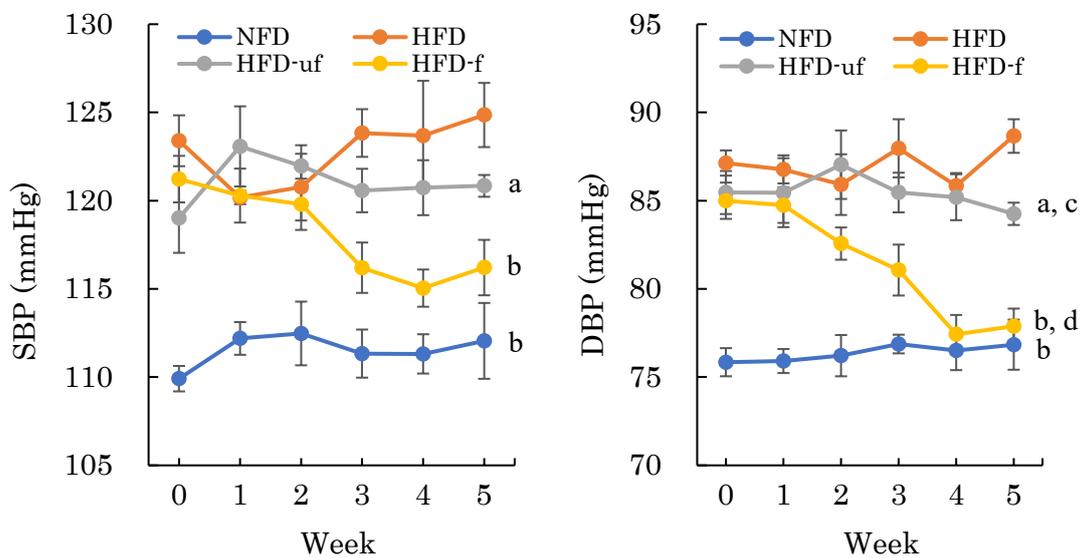


Fig. 23. マウスの血圧の経時変化 (左 : SBP、右 : DBP)
Mean \pm S.D. (n=4-8). Tukey HSD test (a : $p < 0.01$ vs. NFD, b : $p < 0.01$ vs. HFD, c : $p < 0.05$ vs. HFD, d : $p < 0.01$ vs. HFD-uf)。

次に、発酵枇杷葉エキスを投与開始して 5 週間後のマウスから血液を採取後、血清を回収し検査を行った。検査項目は、肝臓及び腎臓、心臓疾患の指標となる成分について行った (項目の詳細は実験の部参照)。その結果、マウスの各群の間で有意な差がみられる項目はなかつ

た。しかし、その中でも肝炎等により肝細胞が破壊されると血中濃度が上昇するため、肝炎の指標となっている血中の AST 及び ALT については、発酵枇杷葉エキスを投与することによりやや減少傾向がみられた (Fig. 24)。

血中の AST 及び ALT 濃度に減少傾向が見られたことから、マウスの肝臓に何らかの効果があると期待されたため、肝臓中のトリグリセライド (TG) と総コレステロール量 (T-CHO) を測定した。その結果、TG 及び T-CHO のいずれにおいても HFD 群や HFD-uf 群と比較して、HFD-f 群では有意な減少が認められた (Fig. 25)。この結果から、高脂肪の摂取により肥満になったマウスの肝臓中脂質代謝異常が、発酵枇杷葉エキスにより改善されたと考えられた。TG は高脂血症や動脈硬化の指標として知られており、肝機能の指標でもある。肝機能が低下すると肝臓で合成される内因性 TG が減少する一方、主に食物からの摂取による外因性 TG により肝臓での貯蔵量が増えすぎると脂肪肝になってしまう。コレステロールは肝臓でつくられ、全身へ運ばれるが、増えすぎると動脈硬化が進み、脳梗塞や心筋梗塞の原因となる。よって、本エキスはこれら疾患のリスク軽減に貢献することが期待できた。

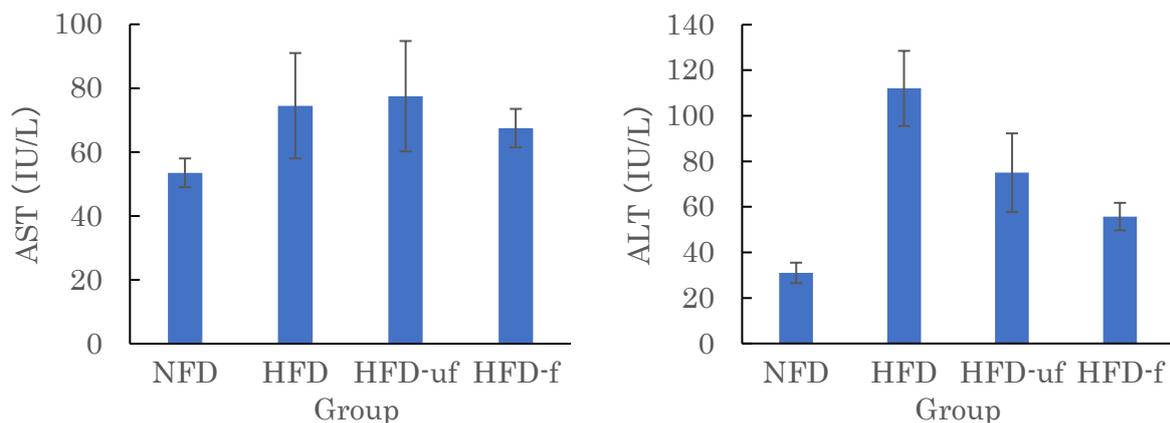


Fig. 24. マウスの血清中成分量 (左 : AST、右 : ALT)
Mean ± S.D. (n=4-8)。

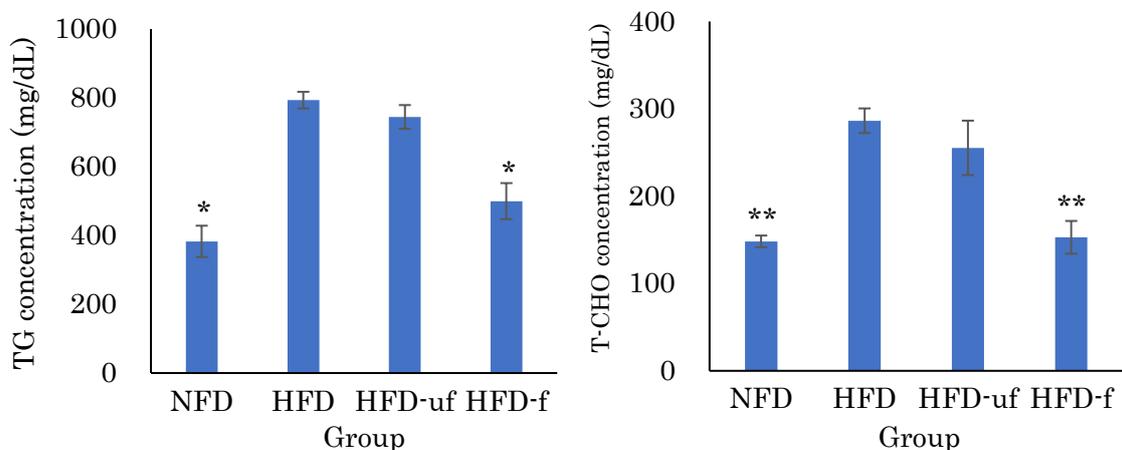


Fig. 25. マウス肝臓中のトリグリセライドと総コレステロール量
Mean ± S.D. (n=4-8). Tukey HSD test (* : p<0.05, ** : p<0.01)。

続いて、発酵枇杷葉エキスの効果が期待できそうな肝臓及び腎臓における炎症や代謝、血圧等に関連した遺伝子の発現量を、qPCR 法により解析した（遺伝子の種類の詳細は実験の部参照）。その結果、発酵枇杷葉エキスの摂取による顕著な変動がみられたのは、肝臓及び腎臓における PPAR- α 遺伝子であった（Fig. 26）。高脂肪食を摂取することで減少していた PPAR- α 遺伝子の発現量が、発酵枇杷葉エキスを投与することで有意に増加していた。PPAR- α はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α であり、PPAR- γ 及び PPAR- δ/σ とともに核内レセプタースーパーファミリーのメンバーに含まれ、炭化水素、脂質、タンパク質などの細胞内代謝と細胞の分化に密接に関与している転写因子群である [67]。PPAR- α は、主に骨格筋、心臓、肝臓、褐色脂肪組織などの高エネルギーを必要とする組織で発現し、また腎臓及び血管系に存在する細胞でも発現する。PPAR- α の活性化は、脂質代謝やグルコースの恒常性、抗炎症の働きに関与しており、HFD-f 群の肥満改善に寄与したと推察された。

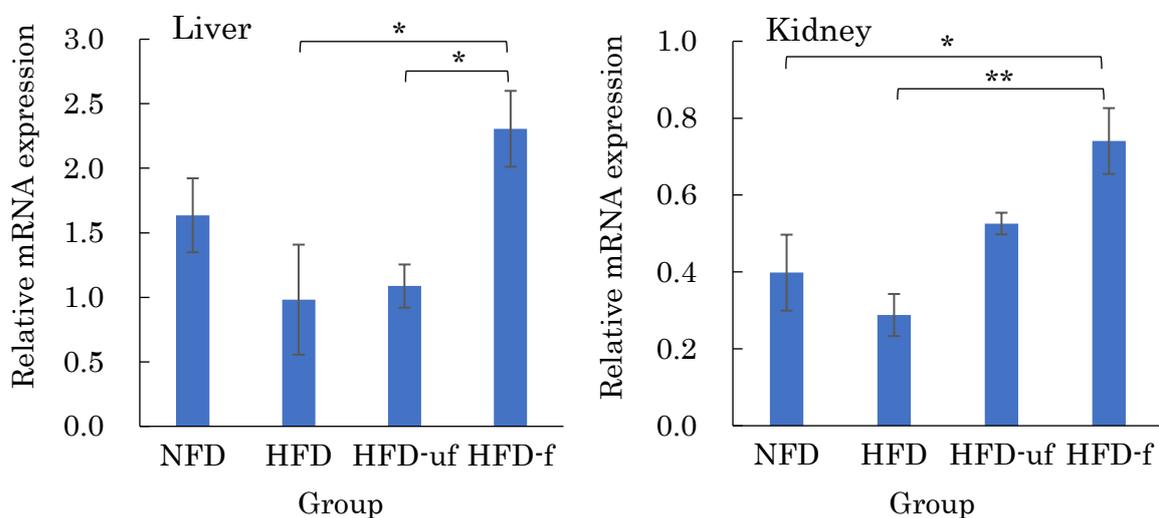


Fig. 26. マウスの肝臓及び腎臓における PPAR- α の mRNA 発現（左：肝臓、右：腎臓）
Mean \pm S.D. (n=4-8). Tukey HSD test (* : p<0.05, ** : p<0.01).

PPAR- α の他には、HFD 群で生じた発現量の変化を発酵枇杷葉エキスの摂取が特異的かつ有意に改善させるような遺伝子はみられなかった。しかし、それらの中でも興味深い変動が観察された遺伝子について以下に示す（Fig. 27）。

肝臓では、細胞内への脂肪酸の取り込みに関与している膜タンパク質である CD36 の遺伝子において、高脂肪食摂取により増加していたその発現量が、HFD-f 群では NFD 群のレベルまで下がっていた。CD36 は血中の脂肪酸を細胞内に取り込み代謝させる働きがあるため、高脂肪食の摂取等により増加した血中の脂肪酸量を調節している。高脂肪食誘導の肥満モデルマウスにおける CD36 遺伝子の欠損は、コントロールの肥満群と比較して肝臓の脂質含有量を減少させ、また肝臓と血清の炎症マーカーを減少、そしてインスリン感受性の改善がみられると報告されている [68]。従って、その発現量に有意差は認められなかったが、発酵枇杷葉エキスの摂取により CD36 遺伝子発現量の減少傾向がみられたことは、肝臓中の脂質が

減少したことと関連している可能性が考えられた。

腎臓では、IL-1 β において高脂肪食の摂取により若干増加がみられたが、HFD-f群ではNFD群よりもさらにその発現が低下していた。高脂肪食により誘発されたメタボリックシンドロームのラットではカタラーゼ活性を示し、IL-1 β レベルが増加することが報告されている [69]。従って、今回得られた結果は、発酵枇杷葉エキスの抗酸化機能が一部影響したことによる可能性が推測された。

続いて、血圧に関連した酵素であるアンジオテンシン変換酵素（ACE）及びレニンの遺伝子発現に関しては、未発酵及び発酵枇杷葉エキス間では有意な差はなかったが、いずれもHFD群の遺伝子発現よりも有意に低下していた。従って、これらの変化は発酵・未発酵に関係無く、もともと枇杷葉エキス中に含まれていた成分によるものであると推察された。

ポドシンは糸球体濾過バリアの重要な構成要素であり、その変異は劣性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を引き起こすと言われている [70]。腎臓におけるポドシンの発現は高脂肪食の摂取により低下したが、発酵枇杷葉エキスの摂取によりやや増加する様子がみられたことから、本エキスの摂取は糸球体濾過バリアへのリスクが軽減される可能性があると考えられた。

最後に、腎臓における脱共益タンパク質 UCP2 に関しては、本タンパク質はミトコンドリアの内膜に存在するプロトン勾配の分散に関与するトランスポーターであり、ROSの生成を減少させ、細胞の生存を促進するという報告がある [71]。さらにUCP2は、肥満やグルコース代謝、神経変性、炎症反応、脂肪酸酸化、アポトーシスなどにも関与している。そして、肥満との関係性も研究されており、UCP2 遺伝子発現と慢性腎臓病患者のBMIの間で負の相関がみられたと報告されている [72]。発酵枇杷葉エキスの摂取により、高脂肪食の摂取により低下したUCP2発現量がNFD群の発現量にやや近づいていたことから、酸化状態や肥満状態が緩和された可能性が考えられた。

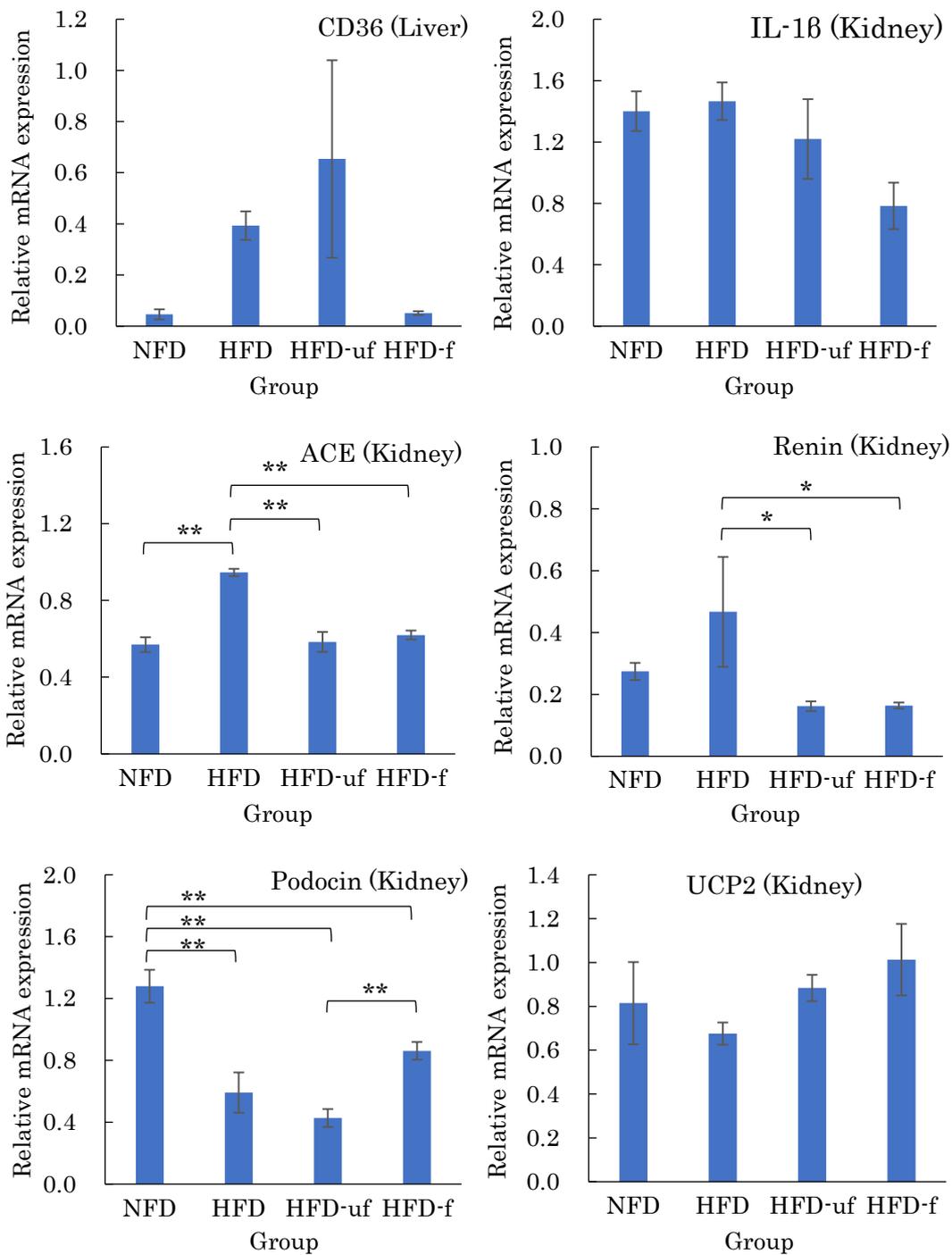


Fig. 27. マウスの肝臓及び腎臓における各種 mRNA 発現
Mean \pm S.D. (n=4-8). Tukey HSD test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

発酵枇杷葉エキスを摂取させることで観察された、肥満モデルマウスの体重や血圧などにおける改善効果に関しては、腸内細菌叢の変化も何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、その変化について確認するために、発酵枇杷葉エキスの投与開始 5 週間後のマウスの糞便を回収し、抽出したゲノム DNA をサンプルとした、16S rDNA 配列に基づいた腸内細菌叢の解析を行った。その結果、高脂肪食を摂取することで腸内細菌叢に変化が

みられ、同時に発酵枇杷葉エキスの投与によっても変化が起こっていることが確認された (Fig. 29)。まず、最も顕著な違いとしては、HFD-f 群でのみ Lactobacillaceae 科細菌群の大幅な占有比率の上昇がみられ、これは投与した *Lb. plantarum* MSC-5T によるものであると考えられた。また、高脂肪食を摂取することで減少していた *Turicibacter* 属が、発酵枇杷葉エキス投与群では有意に増加していた。*Turicibacter* 属細菌は胆汁酸代謝や酪酸産生に関与していることが動物実験によって示唆されている [73, 74]。また、高脂肪食を摂取することで減少していた Lachnospiraceae 科でもまた、発酵枇杷葉エキス投与群では増加が確認された。Lachnospiraceae 科の細菌群は、酢酸や酪酸といった短鎖脂肪酸を発酵によって生産する細菌であり、*Turicibacter* 属細菌と同様、肥満予防効果や免疫機能を整える効果のある短鎖脂肪酸のひとつである酪酸の産生が、本試験の肥満改善効果に寄与していたのではないかと推察した [75, 76]。

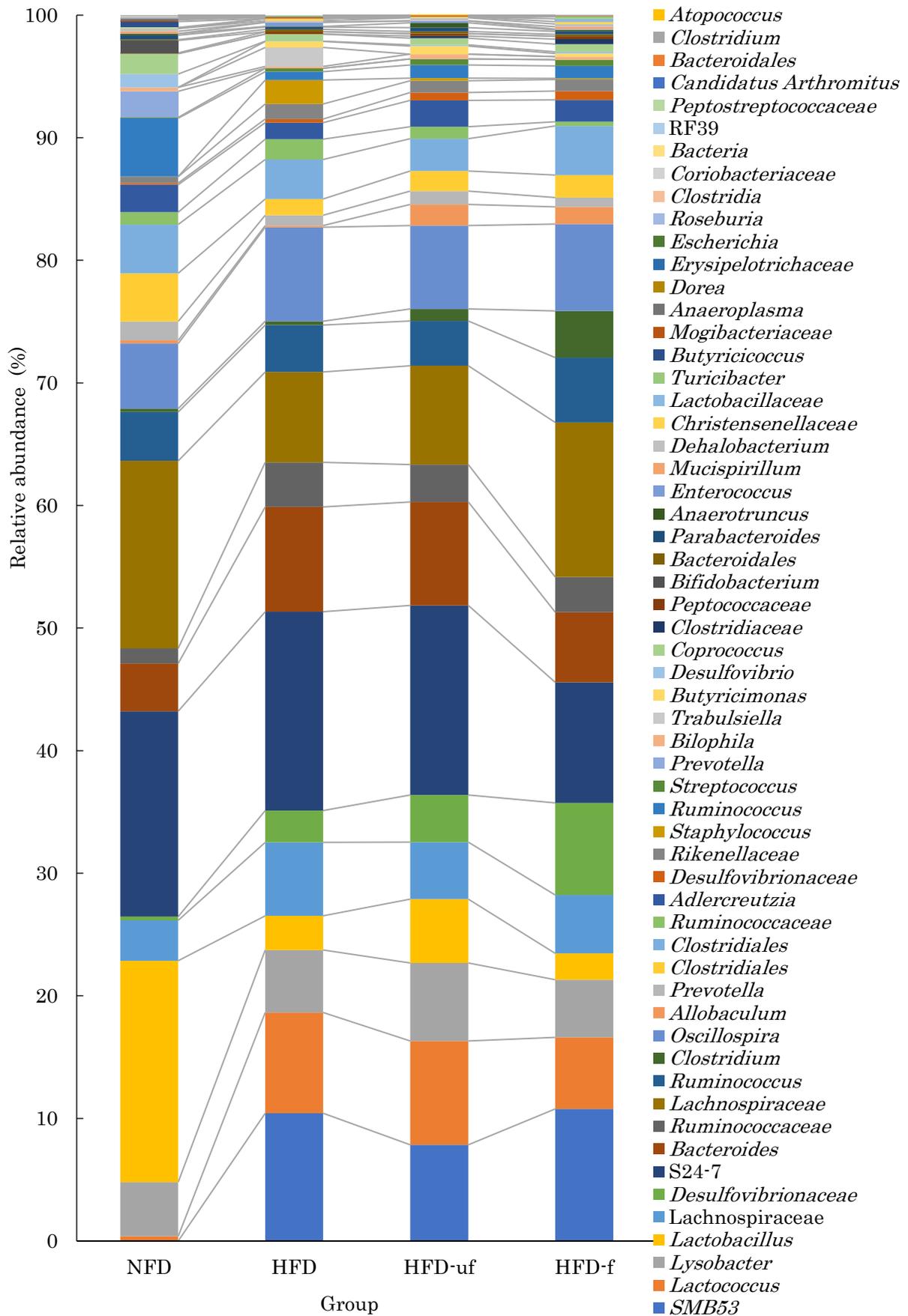


Fig. 28. マウスの腸内細菌叢の解析結果

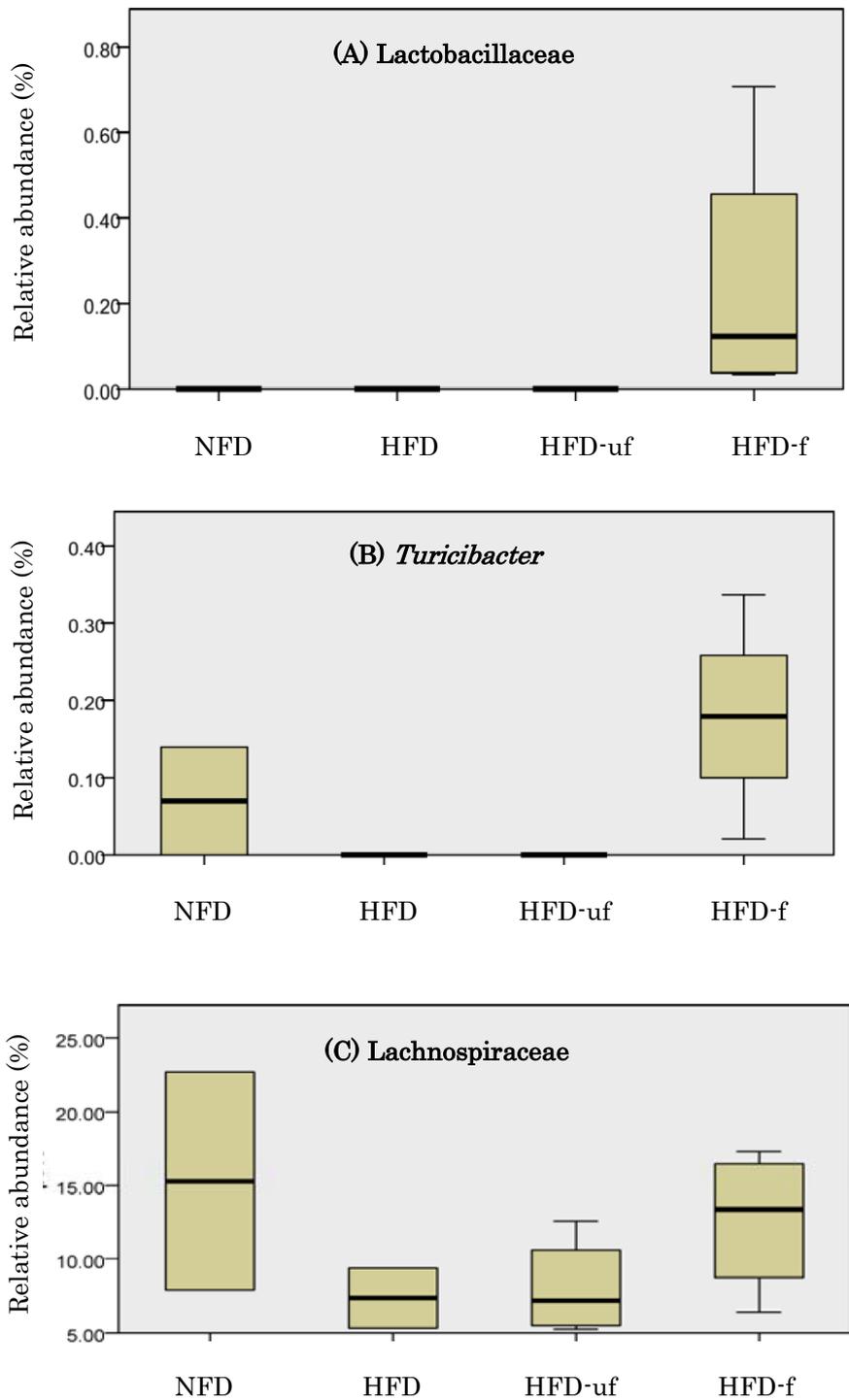


Fig. 29. マウス糞便中の腸内細菌の変化
 (A: Lactobacillaceae 科, B: *Turicibacter* 属 C: Lachnospiraceae 科)
 Mean \pm S.D. (n=2-4). Independent-samples Kruskal-Wallis test.

第六節 総括

第三章では、本研究で分離した菌株及び当研究室の菌株を合わせた計 14 株を用いて、41 種類の発酵生薬エキス培養上清液を調製し、その抗酸化機能についてスクリーニングを実施した。各培養上清液について、 H_2O_2 処理した HEK293 細胞の生存率を指標として評価したところ、サトウキビ由来 *Lb. plantarum* MSC-5T で発酵した発酵枇杷葉エキス培養上清液に、強い抗酸化機能が認められた。さらに、その発酵枇杷葉エキスは、細胞内に活性酸素を生じさせるカビ毒オクラトキシン的一种である OTA 及び CTN で処理した際に低下する HEK293 細胞の生存率も抑制した。 H_2O_2 、OTA、CTN による細胞内酸化ストレスが緩和されていることを検証するため、細胞内 ROS、SOD 量、GSH/GSSG 比、カスパーゼ 3 活性を測定したところ、発酵枇杷葉エキスによっていずれの項目についても細胞内酸化ストレスが緩和された。これらの結果から、発酵枇杷葉エキスは細胞内に発生した活性酸素に作用し、細胞内酸化ストレスの緩和に寄与することが明らかとなった。

発酵枇杷葉エキス中の抗酸化活性成分の精製を試みた結果として、シリカゲルオープンクロマトグラフィー及び TLC による分離実験により、本化合物はアミノ基またはアミド基などの二重結合や不飽和結合を有する芳香族化合物ではないかと推察された。現在、活性成分の化学構造の決定について引き続き継続中であり、その結果が待たれる。

肥満条件下では脂肪組織において活性酸素の発生が増加し、体内に悪影響を及ぼしていることから、発酵枇杷葉エキスの抗酸化機能によって肥満におけるそれらの症状を改善できるか否か、マウスを用いた動物実験にて検証した。高脂肪食を 10 週間摂取させて作製した肥満モデルマウスに、MSC-5T 株の生菌を含む発酵枇杷葉エキスを 5 週間強制経口投与した。その結果、発酵枇杷葉エキスの投与により、体重及び内臓脂肪率、血圧 (SBP、DBP) の低下、そして肝臓中の TG 及び T-CHO 量の減少が生じることを確認できた。続いてその要因を調査するため、血液生化学検査や、肝臓及び腎臓中の mRNA 発現量、そして糞便をサンプルとした腸内細菌叢の解析を行った。血液検査では有意な差はみられなかったものの、発酵枇杷葉エキス摂取により肝炎の指標となる血中 ALT 及び AST の減少傾向がみられた。また mRNA 発現量を qPCR 法により解析した結果、高脂肪食の摂取により低下していた脂質代謝に関連する PPAR- α の発現量が、発酵枇杷葉エキス摂取により増加した。またマウスの腸内細菌叢の解析より、肥満改善効果が *Turicibacter* 属や *Lachnospiraceae* 科の細菌群による酪酸産生能と関係していることが示唆された。これらの結果より、発酵枇杷葉エキスは脂質代謝に関わる遺伝子の発現や腸内細菌叢の改善を通じて、肥満により悪化したこれらの因子を複合的に改善することで、体重の低下や肥満による高血圧の改善に寄与したと結論付けた。実際に肥満は、高血圧や脂質異常症の危険因子であり、脂質と血管に関連する動脈硬化などの原因として肥満及び高血圧、脂質異常症が密接な関係にある。

上記の結果より、サトウキビ由来乳酸菌 *Lb. plantarum* MSC-5T を用いた発酵枇杷葉エキスは、脂質代謝改善による肥満改善効果を含む、抗酸化機能を有した素材として期待される。ただし、それら改善効果の関与物質を明らかにするためにも、生菌体を除いた発酵枇杷葉エキスや、MSC-5T 株菌体そのものの肥満モデルマウスへの投与による確認試験を行う必要がある、今後の課題といえる。

【終章】

近年、健康長寿社会を実現するため、食品や医薬品に求められる機能や効果が、高度で、かつ複雑なものになってきている。また、人生 100 年時代とされ、今まで以上に病気にならないための未病・予防医学分野における機能性素材開発が求められている。そしてそれに併せて、世界情勢や環境問題等により食事やその素材についての要求も変化しており、植物由来の素材のみで構成される食物であるプラントベースフードや、動物由来の素材を摂取しないヴィーガン向け素材の需要が徐々に増えてきている。また、工業プロセスの簡素化やフードロスといった面もより注目が集められていることから、植物由来乳酸菌による植物素材を培地とした発酵代謝産物の生理活性物質の効果は、これらの課題に対応可能なものとして非常に適しているといえよう。

本研究では、サトウキビ及び甜菜から乳酸菌を分離し、果汁発酵による機能性アミノ酸の高産生や生薬発酵による抗酸化機能について検証を行い、食品や医薬品などの素材として期待できる結果が得られた。本研究成果が現代社会で求められている機能性素材の探索研究における一助となることを期待したい。

【実験の部】

I. 実験操作

1. 乳酸菌培養用培地

(1) MRS 培地

乳酸菌の培養培地として de Man、Rogosa、Sharpe (MRS) 培地 (Becton・Dickinson & Company) を純水に規定濃度にて溶解し、121℃、15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。寒天培地を使用する場合は、寒天を 1.5 (w/v) % になるように添加して同様に滅菌処理した。

(2) BHI 培地

Brain Heart Infusion 培地 (Becton・Dickinson & Company) を規定の濃度になるように純水で溶解し、121℃、15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

(3) MH 培地

Mueller Hinton 培地 (Becton・Dickinson & Company) を規定の濃度になるように純水で溶解し、121℃、15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

(4) (LSM) 培地

Iso-Sensitest 培地 (関東化学) に MRS 培地を 10 (w/v) % になるように添加後、純水で溶解し、121℃、15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。寒天培地を使用する場合は、寒天を 1.5 (w/v) % になるように添加して同様に滅菌処理した。

(5) BCP 加プレートカウントアガール寒天培地

乳酸菌測定用 BCP 加プレートカウントアガール「ニッスイ」(日水製薬) を規定の濃度 (w/v) % になるように純水で懸濁し、121℃、15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

2. 乳酸菌の菌懸濁液の作製

MRS 培地に乳酸菌を植菌し、28℃または 37℃で一晩静置培養した。その後遠心分離 (8,000×g、5 分間、4℃) して、菌体を回収した。培養液と等量の PBS にて菌体を懸濁させた。その懸濁液を本培養に用いた。

3. 乳酸菌の培養上清液の作製

各種培地に乳酸菌を植菌し、28℃または 37℃で一晩静置培養した。その後遠心分離 (8,000×g、5 分間、4℃) して、培養上清液を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター (Membrane solutions) で除菌した。その培養上清液を分析に使用した。

4. 乳酸菌の生菌数測定

菌体を含む被験液を 0.85 (w/v) % 塩化ナトリウム水溶液を用いて適当な倍率で希釈を行い、シャーレに 1 mL 加えた。BCP 加プレートカウントアガール寒天培地を注ぎ、寒天が固まるまで室温で静置した。寒天培地を密閉容器アネロパック[®]用角型ジャー(三

菱ガス化学) に入れ、酸素吸収・炭酸ガス発生剤 アネロパック[®]・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて嫌気条件下で 37°C、48–72 時間培養した。培養後コロニー数をカウントし、生菌数を算出した。

5. アガロースゲル電気泳動

1×TAE バッファーに最終濃度が 0.7 (w/v) % になるようにアガロース (Agarose L03、タカラバイオ) を加え、電子レンジで加熱溶解し、固まらない程度に室温にて冷やした後、GelGreen[™] Nucleic Acid Stain (10,000×) (Biotium) をアガロース溶液の 1/10,000 量添加した。ゲル作成用プレートにアガロース溶液を流し込み、コームをセットし、ゲルが固化するまで室温にて静置した。アガロースゲルを電気泳動システム Mupid[®]-2X (ADVANCE) にセットした。DNA サンプル 5 μ L と 6×Loading Dye (BPB, Orange G) (東洋紡) 1 μ L とを混合し、混合液 5 μ L をアガロースゲルのウェルにアプライした。100 V で約 15 分間電気泳動後、LED トランスイルミネーター ゲルみえーる (富士フィルム和光純薬) にてアガロースゲル中の DNA のバンドを検出した。

6. 細胞培養

細胞の培養は 10 (v/v) % FBS 及び 100 IU/mL ペニシリン・100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む D-MEM 培地中で、5% CO₂ の 95% 空気の気相下、37°C で行った。細胞を 100 mm ディッシュに播種した後、2–3 日間培養し、細胞が 80–90% コンフルエントになったところで、0.05% トリプシン-0.53 mmol/L EDTA・4Na 溶液 (富士フィルム和光純薬) で剥離することにより継代を行った。継代時に一部の細胞を実験に供した。

II. 第一章の実験

1. 使用植物素材

植物素材として、サトウキビ (鹿児島県喜界島産) 及び甜菜 (北海道産) を使用した。DM 三井製糖株式会社より供試していただいた。

2. 植物素材からの乳酸菌の分離

各植物素材を 70 (v/v) % エタノール及びガスバーナーによる加熱にて殺菌した包丁及びハサミで細かく切り、その切片を加熱殺菌したピンセットで 7 mL の MRS 液体培地に入れ懸濁した。28°C または 37°C で菌が生育するまで 2–3 日間静置培養した。その後、培養液を MRS 寒天培地に塗抹して、密閉容器アネロパック[®]用角型ジャー (三菱ガス化学) に転倒して入れ、酸素吸収・炭酸ガス発生剤 アネロパック[®]・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて嫌気条件下、28°C または 37°C でコロニーが形成するまで 2–3 日間培養した。形成されたコロニーをピックアップし、同様の方法で MRS 液体培地及び寒天培地で再度培養することで単一コロニーを得た。単一コロニーを用いて KOH 及び H₂O₂ テストを行い、KOH (-)、H₂O₂ (-) と判定されたコロニーを MRS 液体培地で静置培養してストックを作製した。

3. グリセロールストック作製

MRS 液体培地で培養した菌体培養液 4 mL を 3,000×g、4°C、10 分間で遠心分離し、上清を除去した。PBS を 2 mL 添加して懸濁後、3,000×g、4°C、10 分間で遠心分離し、上清を除去して菌体を洗浄した。MRS 培地 600 μL 及び 50 (v/v) %グリセロール 300 μL を入れ、ピペッティングして懸濁した。懸濁液を、冷凍保存用チューブに移し、-80°C で保存した。

4. 乳酸菌特性解析

(1) グラム染色

菌株のグラム染色にはグラム染色用バーミーM 染色キット（武藤化学）を用いた。MRS 培地で培養した菌体培養液を 10,000×g、1 分間の遠心分離にて菌体を回収した。菌体に培養液と等量の滅菌水を加えて懸濁した。懸濁液を再度、10,000×g、1 分間の遠心分離を行い、上清を廃棄して菌体を洗浄した。そこに 400 μL の滅菌水を加えて再懸濁した液をサンプルとした。20 μL の滅菌水と 10 μL のサンプル液をスライドガラスに滴下し、ピペッティングした後、ガスバーナーの近くで乾燥させ、最後にガスバーナーでスライドガラスの裏面をあぶって固定した。菌体にバーミーM1 液（クリスタルバイオレット水溶液）を約 1 mL 滴下し、約 30 秒間静置した。静かに菌体を水洗後、バーミーM2 液（よう素・水酸化ナトリウム溶液）を約 1 mL 滴下し、30 秒間静置した。静かに菌体を水洗後、バーミーM3 液（アセトン・エチルアルコール混合液）を約 1 mL 滴下し、速やかに且つ静かに菌体を水洗した。菌体にバーミーM4 液（0.1%フクシン水溶液）を約 1 mL 滴下し、速やかに且つ静かに菌体を水洗した。スライドガラス上の菌体が乾燥後、顕微鏡にて観察した。紫色の菌体をグラム陽性細菌、赤色の菌体をグラム陰性細菌とした。

(2) KOH テスト

約 10 μL の 3 (w/v) KOH 溶液をシャーレに滴下し、寒天培地で形成したコロニーを滅菌した爪楊枝でかきとった後にその滴下した溶液と混ぜた際の様子を観察した。ゲノムDNAの溶出により粘性が現れたものを (+)、変化しないものを (-) とした。

(3) H₂O₂ テスト

約 10 μL の 10 (v/v) H₂O₂ 溶液をシャーレに滴下し、寒天培地で形成したコロニーを滅菌した爪楊枝でかきとった後にその滴下した溶液と混ぜた際の様子を観察した。泡が発生したものを (+)、変化しないものを (-) とした。

5. DNA シークエンス解析による乳酸菌株の同定

(1) DNA 抽出

DNA の抽出には DNA 精製キット GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) を用いた。MRS 培地で培養した菌体培養液 2 mL を遠心分離 (6,000×g、4°C、10 分間) し、上清を除去し 500 µL PBS を添加して懸濁した。再度遠心分離 (6,000×g、4°C、10 分間) し、上清を除去し、500 µL PBS を添加して懸濁した。遠心分離 (6,000×g、4°C、10 分間) し、上清を除去し、菌体ペレットを回収した。菌体ペレットの入ったマイクロチューブに、40 mg/mL のリゾチーム溶液を 200 µL 加え、菌体ペレットを懸濁後、振とう機付インキュベーターで 37°C、30 分間保温した。マイクロチューブに 20 µL RNase A を加え、室温にて 2 分間静置した後に、マイクロチューブに Proteinase K 溶液を 20 µL、Lysis Solution C を 200 µL 加え、ボルテックスで十分混合させ、振とう機付インキュベーターで 55°C、10 分間保温した。Collection tube にセットした Column に、Column Preparation Solution を 500 µL 加え、遠心操作 (12,000×g、4°C、1 分間) を行った。遠心操作後の Collection tube 内の Column Preparation Solution を廃棄し、マイクロチューブにエタノールを 200 µL 加え、ボルテックスで混合し、Column に移して遠心 (6,500×g、4°C、1 分間) した。Column を新しい Collection tube にセットし、Column に Wash Solution 1 を 500 µL 加え、遠心 (6,500×g、4°C、1 分間) し、Collection tube 内の Wash Solution 1 を廃棄した。Column に調製した Wash Solution Concentrate を 500 µL 加え、遠心 (12,000×g、4°C、3 分間) した。Column を新しい Collection tube にセットし、Column に Elution Solution を 50 µL 加え、室温で 1 分間静置した後、遠心分離 (6,500×g、4°C、1 分間) した。さらに Column に Elution Solution を 50 µL 加え、室温で 1 分間置いた後、遠心分離 (6,500×g、4°C、1 分間) した。得られた精製 DNA サンプルは使用時まで -20°C で保管した。

(2) PCR

反応液を 100 µL 容 8 連チューブに調製し、サーマルサイクラー iCycler (Bio-Rad) にて下記の組成、Primer の塩基配列及び条件で反応を行った。

[反応組成]

	使用量	最終濃度
ゲノム DNA 溶液 (100–200 ng)	< 200 ng	
2× PrimeSTAR® Max Premix (タカラバイオ)	25.0 µL	1×
27f primer (20 µM)	10-15 pmol	0.2-0.3 µM
1525r primer (20 µM)	10-15 pmol	0.2-0.3 µM
Nuclease-Free Water (invitrogen)	Up to 50µL	

[Primer]

Primer 名称*	配列 (5'→3')
27f primer	AGAGTTTGATCCTGGCTAG
1525r primer	AAAGGAGGTGATCCAGCC

※ f: forward primer、r: reverse primer

[反応条件]

1 cycle	35 cycles	1 cycle
95°C 2 min	→ 98°C 10 sec	→ 72°C 5 min
	55°C 15 sec	
	72°C 5 sec	

(3) PCR 産物精製

PCR 産物の精製には、PCR clean-up Gel extraction (MACHEREY-NAGEL) を用いた。マイクロチューブに入っている PCR サンプルに、そのサンプルの 2 倍量の Binding Buffer NTI を加え、5 秒間ボルテックスし混合した。Collection Tube にセットした Column に混合液を入れ、11,000×g、4°C、30 秒間で遠心した。Collection Tube 内の透過液を捨て、再度 Column をセットし、Wash Buffer NT3 を 700 μL 入れ、11,000×g、4°C、30 秒間で遠心した。Collection Tube 内の透過液を捨て、再度 Column をセットし、11,000×g、4°C、30 秒間で遠心した。Column を 1.5 mL マイクロチューブにセットし、Elution Buffer NE を 30 μL 加えた。インキュベーターにて、70°C、5 分間インキュベートした。インキュベート後、11,000×g、4°C、1 分間で遠心し、精製した PCR 産物を回収した。

(4) DNA シークエンス解析

精製した PCR 産物を用いて、反応液を 100 μL 容 8 連チューブに下記の組成及び Primer にて調製した。株式会社ファスマックにてサンガーシークエンス解析を行い、16S rDNA 領域の塩基配列を決定した。

[反応組成]

	使用量
ゲノム DNA 溶液 (100-200 ng)	4 μL
R2Lf primer (10 μM)	0.64 μL
Nuclease-Free Water (invitrogen)	Up to 14 μL

[Primer]

Primer 名称*	配列 (5'→3')
r2L primer	CATCGTTTACGGCGTGGAC

※ f: forward primer

得られた塩基配列データを DNA 解析ソフト (ATGC シーケンスアセンブリソフトウェア) にて、シーケンス解析の精度を確認した後、NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) によって、シーケンスデータベース上にある菌株の 16s rRNA 塩基配列との相同性を確認し、菌株を同定した。

III. 第二章の実験

1. 使用菌株

使用菌株は Table 11 の通り。

Table 11. 使用菌株

菌種	菌株番号	分離源
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-B2	サトウキビ
<i>Lc. garvieae</i>	MSC-J2	サトウキビ
<i>Ent. avium</i>	MSC-N3	サトウキビ
<i>Lc. lactis</i>	MSC-3G	サトウキビ
<i>Lb. brevis</i>	MSC-4A	サトウキビ
<i>Lb. senioris</i>	MSC-4J	サトウキビ
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-5T	サトウキビ
<i>Ent. avium</i>	MSC-O2	サトウキビ
<i>Lb. plantarum</i>	MSB-C2	甜菜
<i>Lb. brevis</i>	MSB-D1	甜菜
<i>Lb. plantarum</i>	MSB-F1	甜菜
<i>W. confusa</i>	K-28	エビスグサ

2. 使用細胞

ヒト結腸癌由来細胞株 (Caco-2) は、JCRB Cell Bank より購入した。

3. 使用果汁

パイナップル、オレンジ、マンゴー、マスカット、梨、グレープ、ストロベリー、レモン、ライム、みかん、ゆず、レッドグレープフルーツ (RGF)、ホワイトグレープフルーツ (WGF)、日向夏、及びにんじんを使用した。果汁は、物産フードマテリアル株式会社より供試していただいた。

4. 果汁培地の調製

各濃縮果汁を、純水を用いて Table 12 の通りの濃縮倍率にて希釈した (パイナップル果汁のみ 4, 3, 2 希釈も使用した)。希釈した果汁に規定量 ((w/v) %) のアルギン塩酸塩を加え、溶解した。その後、炭酸水素ナトリウム粉末を用いて規定の pH に調整した。105°C、8 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

Table 12 使用果汁

果汁	性状	濃縮倍率 (倍)	果汁	性状	濃縮倍率 (倍)
パイナップル	混濁	5	ライム	透明	5
オレンジ	混濁	5.7	みかん	混濁	6
マンゴー	透明	4.9	ゆず	混濁	1
なし	透明	6	RGF	混濁	6
マスカット	透明	5	WGF	混濁	6
グレープ	混濁	6	日向夏	混濁	3
ストロベリー	混濁	8	にんじん	混濁	6
レモン	透明	7			

5. 実験

(1) 発酵果汁液の作製

調製した果汁に乳酸菌懸濁液を 1 (v/v) % で添加し、培養液を 28°C で 24–48 時間培養した。培養上清液を用いる場合は、培養液を遠心分離 (8,000×g、5 分間、4°C) して、上清を孔径 0.45 μm のシリンジフィルター (Membrane Solutions) で菌体を除去して得られたろ液をその後の実験に使用した。培養液を遠心分離 (8,000×g、5 分間、4°C) して、上清を同様に 0.45 μm シリンジフィルター (Membrane Solutions) で菌体を除去して得られたろ液をその後の実験に使用した。

(2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による発酵果汁液中成分の分析

① アミノ酸分析

必要に応じて希釈した培養液上清 10 μL をマイクロチューブに入れ、デシケーター内で減圧乾燥させた。マイクロチューブにエタノール：純水：トリエチルアミン=2：2：1 の混合液 20 μL を加え、ボルテックスで混合した。スピンドウン後、デシケーター内で減圧により乾燥させた。マイクロチューブにエタノール：純水：トリエチルアミン：イソチオシアン酸フェニル=7：1：1：1 の混合液 20 μL を加え、ボルテックスで混合した。スピンドウン後、室温にて 20 分間静置して PTC 誘導体化した。その後、デシケーター内で減圧により乾燥させた。マイクロチューブに PTC-アミノ酸溶離液 A (富士フィルム和光純薬) を 1 mL 加え、ボルテックスで混合後、スピンドウンした。孔径 0.45 μm のディスパーザブルメンブレンフィルターユニット 03CP045AS (アドバンテック東洋) を用いて、新しいマイクロチューブにろ過した。調製したサンプル中の Arg、Orn、Cit 濃度を測定するために、Table 13 の条件にて HPLC を行った。標準液として、Arg 及び L-オルニチン塩酸塩、L-シトルリン塩酸塩を、それぞれ 500 mM になるように純水で溶解後、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過した。純水にて、必要な濃度に希釈して使用した。

Table 13. アミノ酸分析 HPLC 測定条件

項目	内容
カラム	Wakopak® Wakosil-PTC 4.0*250 mm (W) (富士フィルム和光純薬)
流量	1.0 mL/min
注入量	20 μ L
移動相	A : PTC-アミノ酸溶離液 A (富士フィルム和光純薬) B : PTC-アミノ酸溶離液 B (富士フィルム和光純薬)
グラジエント条件	溶離液 B 容積比 0%-70% (20 分間)
カラムオープン温度	40 $^{\circ}$ C
検出器	UV 254 nm
測定時間	30 分

② 糖分析

培養液を孔径 0.22 μ m のシリンジフィルターでろ過した培養上清液をバイアルに入れた。HPLC (Agilent、1100Series) にて培養上清中のグルコース (Glc)、フルクトース (Fru)、スクロース (Suc) の定量を行った。標準混合液として、Glc、Fru 及び Suc をそれぞれ 3 g/100mL になるように純水で溶解した。その混合液を純水で 2 倍及び 300 倍希釈液を調製し、3 種濃度の標準混合液を使用した。標準混合液は培養液同様、孔径 0.22 μ m のシリンジフィルターでろ過した。HPLC の測定条件は Table 14 の通りで行った。測定した菌体未接種果汁及び培養液中の糖濃度より、各種糖の生産量及び消費量を算出した。

Table 14. 糖分析 HPLC 測定条件

項目	内容
カラム	SUGAR KS-G 6B 内径 6.0×長さ 50 mm (Shodex、ガードカラム) SUGAR KS-801 内径 8.0×長さ 300 mm (Shodex) SUGAR KS-802 内径 8.0×長さ 300 mm (Shodex)
流量	1.0 mL/min
注入量	30 μ L
移動相	水
グラジエント条件	—
カラムオープン温度	60 $^{\circ}$ C
検出器	RI
測定時間	30 min

③ 有機酸分析

培養液を孔径 0.22 μm のシリンジフィルターでろ過し、培養上清液をバイアルに入れた。HPLC (Agilent、1100Series) にて培養上清中の乳酸、酢酸、コハク酸の定量を行った。HPLC の測定条件は Table 15 の通りで行った。標準液として、乳酸 (富士フィルム和光純薬) を 1.0、0.5、0.01 (w/v) % に、酢酸 (富士フィルム和光純薬) を 0.50、0.25、0.025 (w/v) % に、コハク酸 (富士フィルム和光純薬) を 2.50、1.25、0.125 (w/v) % になるようにそれぞれ純水で溶解及び希釈し、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過して調製した。測定した菌体未接種果汁及び培養液中の有機酸濃度より、各種有機酸の生産量及び消費量を算出した。

Table 15. 有機酸分析 HPLC 測定条件

項目	内容
カラム	アミネックス HPX-87H 内径 7.8×長さ 300 mm (Bio-Rad)
流量	0.6 mL/min
注入量	20 μL
移動相	0.008 N 硫酸
グラジエント条件	—
カラムオープン温度	60 $^{\circ}\text{C}$
検出器	UV 215 nm
測定時間	30 min

④ イオン分析

陽イオン分析用サンプルは、培養液を孔径 0.22 μm のシリンジフィルターでろ過した培養上清液を Sep-Pak Accell Plus QMA (Waters) でろ過後、再度孔径 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過した。陰イオン分析用サンプルは、培養液を同様に孔径 0.22 μm のシリンジフィルターでろ過した培養上清液を Sep-Pak Accell Plus CM (Waters) でろ過後、再度孔径 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過した。Thermo Fisher Scientific、Integrion AS-AP システムにて培養上清中のイオン濃度を測定した IC の測定条件は Table 16 の通りで行った。測定した菌体未接種果汁及び培養液中のイオン濃度より、各種イオンの生産量及び消費量を算出した。標準液として、サンプル中の陽イオンを分析する際は陽イオン混合標準液Ⅲ (富士フィルム和光純薬工業社) を、陰イオンを測定する際は陰イオン混合標準液Ⅳ (関東化学社) を適当な濃度に純水で希釈して用いた。

Table 16. イオン分析 HPLC 測定条件

陽イオン	
項目	内容
カラム	Dionex IonPac CS12A (Thermo Fisher Scientific)
流量	1.0 mL/min
注入量	25 μ L
移動相	20 mM メタンスルホン酸
グラジエント条件	—
カラムオープン温度	—
検出器	電気伝導度
測定時間	17 min
陰イオン	
項目	内容
カラム	Dionex IonPac AS14A (Thermo Fisher Scientific)
流量	1.0 mL/min
注入量	25 μ L
移動相	8.0 mM Na ₂ CO ₃ /1.0 mM NaHCO ₃
グラジエント条件	—
カラムオープン温度	—
検出器	電気伝導度
測定時間	17 min

(3) アルギニンデイミナーゼ経路の酵素活性測定

① 細胞破碎液の調製

アルギニン無添加または添加の果汁培地で培養した培養液及び、それぞれ菌株未接種の果汁培地をマイクロチューブにとり、遠心分離 (8,000 \times g、5分、4 $^{\circ}$ C) し、上清を除去した。マイクロチューブに PBS を入れ、再度遠心分離 (8,000 \times g、5分、4 $^{\circ}$ C) し、上清を除去した。これを 2 回繰り返した後、ペレットを PBS 500 μ L で懸濁した。サンプル密閉式超音波破碎装置 BIORUPTOR[®] (ソニック・バイオ) で 10 分間 (On: 10 秒、Off: 5 秒)、細菌細胞を破碎し、遠心分離 (12,000 \times g、10分、4 $^{\circ}$ C) をして、上清を新しいマイクロチューブに回収し、-20 $^{\circ}$ C で保管した。

② アルギニンデイミナーゼ活性測定

マイクロチューブに細胞破碎液を 50 μ L を入れ、1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 及び 50 mM 塩化マンガン水溶液を、酵素反応液中の最終濃度がそれぞれ 1/10 になるようにマイクロチューブに加えた。酵素反応の基質となる 50 mM Arg 水溶液を、酵素反応液中の最終濃度が 1/10 になるように添加し、酵素反応を開始した。恒温槽内で 37 $^{\circ}$ C、20 分間静置させ、Arg から Cit へ酵素反応させた。酵素反応液と等量の 1 N HCl 溶液を加え、酵素反応を停止させた。酵素反応液中の Arg 量を HPLC にて測定した。未発酵液中の Arg 量に対する培養液中の Arg 量より、Arg 変換率を算出して、それを酵素活性として評価した。

③ オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ活性測定

マイクロチューブに細胞破砕液 50 μ L を入れ、1.5 M イミダゾール塩酸・100 mM リン酸塩水溶液 (pH 7.5) を、酵素反応液中の最終濃度がそれぞれ 1/10 になるようにマイクロチューブに加えた。酵素反応の基質となる 100 mM Orn 水溶液を、酵素反応液中の最終濃度が 1/10 になるように添加した。酵素反応において基質と反応する 100 mM カルバモイルリン酸ナトリウム水溶液を、酵素反応液中の最終濃度が 1/10 になるように添加し、酵素反応を開始した。恒温槽内で 37°C、20 分間静置させ、Orn から Cit へ酵素反応させた。酵素反応液と等量の 1N HCl 溶液を加え、酵素反応を停止した。酵素反応液中の Orn 量を HPLC にて測定した。未発酵液中の Orn 量に対する培養液中の Orn 量より、Orn 変換率を算出して、それを酵素活性として評価した。

(4) 安全性評価試験

① 被験物質の調製

Arg を 7.5 (w/v) % 添加で調製したパイナップル果汁に乳酸菌懸濁液を 1 (v/v) % で添加し、培養液を 28°C で 48 時間培養した。その後 90°C、30 分間、高圧蒸気滅菌処理した。殺菌した発酵パイナップル果汁液を凍結乾燥機 (EYELA FDU-540、東京理化工業) にて 4 倍濃縮し、この濃縮液を被験物質として使用した。

② 急性経口毒性試験

急性経口毒性試験は株式会社ボゾリサーチセンターにて行った。被験物質の投与前に約 18 時間絶食した 6 週齢の Sprague-Dawley ラット (CrI:CD(SD))、1 群雄雌各 5 匹に 2,000 mg/kg の用量で単回強制経口投与し、その後 14 日間、生死、一般状態、体重測定を行い、観察期間終了時には剖検を行った。また、媒体を投与する媒体対照群 (雄雌各 5 匹) を設けた。

③ 復帰突然変異試験

復帰突然変異試験は株式会社ボゾリサーチセンターにて行った。ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。陰性対照物質として注射用水、陽性対照物質として 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、Sodium azide、2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine・2HCl、2-Aminoanthracene、Benzo[a]pyrene を用いた。被験物質の本試験用量を設定するために、5,000 μ g/plate を最高用量として、以下公比 4 で被験物質を希釈した計 6 用量を設定し、用量設定試験を行った。用量設定試験で得られた最高用量として、以下公比 2 で除した 5 用量で本試験を実施した。被験物質群の復帰変異コロニー数が、陰性対照群に対して 2 倍以上となる増加を示し、

再現性が認められた場合に陽性と判定した。

④ 小核試験 (*in vitro*)

小核試験 (*in vitro*) は株式会社ボゾリサーチセンターにて行った。ヒトリンパ芽球細胞 (TK6 細胞)、PPMI Medium 1640 にピルビン酸ナトリウム (最終濃度 200 µg/mL) 及び非働化した馬血清 (最終濃度 10 (v/v) %) を添加して調製した培地を用いた。陰性対照物質として注射用水、陽性対照物質として Colchicine (富士フィルム和光純薬) 及び Cyclophosphamide monohydrate (富士フィルム和光純薬) を用いた。被験物質の本試験用量を設定するため、毒性試験ガイドライン (OECD TG 487) に基づいて 5,000 µg/mL を最高用量として、以下公比 2 で被験物質を希釈した計 8 用量を設定し、用量設定試験を行った。用量設定試験で得られた用量で本試験を行い、細胞を顕微鏡下で各群 2,000 個の単核細胞を観察し、主核の 1/3 以下の小核を有する、または微少な小核と主核の 1/3 以下の小核を有する単核細胞の合計数とその出現率を算出した。小核を有する細胞の出現頻度が陰性対照群と比べて有意な増加を示し、その出現率が陰性対照群背景データの 95% 管理外であり、有意な増加に付随して Cochran Armitage の傾向検定で有意な用量依存性が認められた場合を陽性判定とした。

(5) *Lc. lactis* MSC-3G の特性解析

① 菌体形状

菌体懸濁液を SEM にて観察し、菌体の形状を確認した。

② LD-乳酸産生量

96 ウェルプレートに表の反応混合液を 180 µL 加え、そこに MRS 培地による菌体培養上清液 10 µL を加え、ピペッティングにて混合した。LDH 液 (オリエンタル酵母工業) を純水で 6 倍希釈し、希釈液 10 µL を各反応液に添加した。プレートをアルミホイルで覆い遮光して、室温で 30 分間静置した。その後、マイクロプレートリーダー (iMark、Bio-Rad) にて 355 nm の吸光度を測定した。L-乳酸標準液により作成した検量線より、上清液中の L-乳酸量を算出した。同様の方法で D-LDH 液 (オリエンタル酵母工業) を 12 倍希釈した希釈液及び D-乳酸標準液を使用して D-乳酸量も測定した。

Table 17. 反応混合液組成 (量は一例)

試薬液	量
50 mM NAD	181.8 µL
0.6 M Glycine Buffer solution	1.6 mL
純水	6.4 mL

③ 糖資化性

菌体の MRS 液体培養液からディスポ白金耳で MRS 寒天培地に植菌し、28℃、24 時間で培養した。MRS 寒天培地よりディスポ白金耳で菌体を適量かきとり、API 50 CHL 培地（ビオメリュー・ジャパン）に植菌した。植菌した API 50 CHL 培地を 100 μ L とり、API 50 CH（ビオメリュー・ジャパン）に添加し、ミネラルオイルで重層した。API 50 CH を 37℃で培養し、24 時間後、48 時間後の炭素源の資化性を確認した。API 50 CH の液体の色が黄緑～黄色に変色した炭素源については資化したと判定した。

④ NaCl 耐性

規定濃度の NaCl が含まれる MRS 液体培地に菌体懸濁液を 1 (v/v) % 添加し、37℃、24 時間静置培養した。培養後、菌体の生菌数を測定し、NaCl を含まない MRS 液体培地で培養した際の生菌数に対する割合を算出した。

⑤ 胃酸耐性

崩壊試験第一液, pH1.2/溶出液得試験第 1 液, pH1.2（富士フィルム和光純薬）を 5N NaOH を用いて pH2.5 に調整し、121℃、20 分間、高圧蒸気滅菌処理した。調製液を室温まで冷ました後、終濃度 0.04 (w/v) % になるように 0.4 (w/v) % ペプシン溶液を加えた液を人口胃液として使用した。人口胃液に菌体懸濁液を 1 (v/v) % 添加し、37℃、5 時間で一培養した。培養後、菌体の生菌数を測定した。

⑥ 胆汁酸耐性

規定濃度 (w/v) % の胆汁（富士フィルム和光純薬）が含まれる MRS 液体培地に菌体懸濁液を 1 (v/v) % 添加し、37℃、18 時間静置培養した。培養後、マイクロプレートリーダー（Bio-Rad）で OD_{595 nm} を測定し、胆汁を含まない MRS 液体培地で培養した際の生菌数に対する OD_{595 nm} に対する割合を算出した。

⑦ 細胞付着性

Caco-2 細胞培養液を 5×10^4 cells/mL になるように 10 (v/v) % FBS 含有 D-MEM（Low Glucose）培地（富士フィルム和光純薬）で希釈した。*Lc. lactis* MSC-3G を MRS 培地で 28℃、24 時間培養した培養液を遠心分離（3,000 \times g、4℃、10 分間）し、上清を除去後、PBS で洗浄した。その後、菌数が 5×10^6 cfu/mL になるように PBS で懸濁した。細胞懸濁液と菌体懸濁液をそれぞれ 1 mL ずつ、6 ウェルプレートに添加し、5% CO₂ の 95% 空気の気相下、37℃で 3 時間培養した。培養後、上清を除去し、4℃で保管していた PBS を 500 μ L を静かに添加し、再度上清を除去した。ウェルに 1 (w/v) % TritonX-100 溶液を 1 mL 添加し、室温で 15 分間静置後、溶液を回収した。溶液中の生菌数及び使用した菌体懸濁液中の生菌数を測定し、細胞に付着した菌数の割合を算出した。

⑧ 薬剤感受性試験

1) E-test キットによる評価

菌体懸濁液をマクファーランド濁度 ≈ 1 ($OD_{600\text{nm}} \approx 0.257$) となるように BHI 液体培地で懸濁した。その懸濁液を滅菌綿棒にて LSM 寒天培地上に塗布した。この時、塗布していない箇所がないように、60 度ずつ寒天培地を回転させ計 3 回塗布した。懸濁液を塗布した寒天培地上に抗生物質を含んだ耐性測定用ストリップを、寒天培地とストリップの間に空気が入らないようにピンセットで置いた。寒天培地を 1 時間、4°C で静置した。酸素吸収・炭酸ガス発生剤「アネロパック[®]・ケンキ」及び密閉容器「アネロパック[®]用 角型ジャー」（三菱ガス化学）を用いて、嫌気条件下で発育が十分認められるまで（本試験では 1–2 日間、37°C）培養することで MIC ($\mu\text{g/mL}$) を算出した。試験はフレッシュな寒天培地を用いて 3 回行い、測定結果の最頻値を採用した。

2) 微量液体希釈法（LSM 及び MH 培地）による評価

菌体懸濁液をマクファーランド濁度 ≈ 3 ($OD_{600\text{nm}} \approx 0.582$) となるように LSM または MH 液体培地で懸濁した。その菌体懸濁液を 2,000 倍になるように、各濃度の抗生物質を含むフレッシュな LSM または MH 液体培地にて希釈した。希釈液を 96 穴の U 底プレートにそれぞれ 200 μL ずつ入れ、酸素吸収・炭酸ガス発生剤「アネロパック[®]・ケンキ」及び密閉容器「アネロパック[®]用 角型ジャー」（三菱ガス化学）を用いて、U 底プレートを嫌気条件下で培養した。培養は、抗生物質を含まない LSM または MH 培地に菌体懸濁液を接種したウェルにおいて、明らかに増殖が認められるまで（37°C、最大 72 時間）行った。U 底プレートを培養後、培養液の濁りがほとんど認められないか、もしくは直径 2 mm を超える凝集菌体が確認できないウェルにおける抗生物質濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を MIC とした。3 回行い、測定結果の最頻値を採用した。

⑨ 全ゲノムシーケンス解析

全ゲノムシーケンス解析は口腔常在微生物叢解析センターにて行った。MRS 培地で培養した培養液の菌体からゲノム DNA を回収した。シーケンサー GridION（オックスフォード・ナノポアテクノロジー）及び DNBSEQ（MGI）により塩基配列を確認した。その後、アSEMBラー Unicycler（GitHub）によるアSEMBル解析、アノテーションパイプライン DFAST（DDBJ）によりアノテーションにて解析を行った。

IV. 第三章の実験

1. 使用菌株

使用菌株は Table 18 の通り。

Table 18. 使用菌株

菌種	菌株番号	分離源
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-B2	サトウキビ
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-G2	サトウキビ
<i>Lc. garvieae</i>	MSC-J2	サトウキビ
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-11G	サトウキビ
<i>Lc. lactis</i>	MSC-3G	サトウキビ
<i>Lb. brevis</i>	MSC-4A	サトウキビ
<i>Lb. plantarum</i>	MSC-5T	サトウキビ
<i>Lb. brevis</i>	MSB-D1	甜菜
<i>Lb. plantarum</i>	MSB-F1	甜菜
<i>Lb. paracasei</i>	IJH-SONE68	無花果の葉
<i>Lb. brevis</i>	174A	伊予柑
<i>Lb. plantarum</i>	M30	ミラクルフルーツ
<i>Lb. sakei</i>	31-1	トチノキ
<i>Lb. plantarum</i>	LP28	竜眼

2. 使用細胞

ヒト胎児腎細胞 293 株 (HEK293) は、広島大学大学院医系科学研究科幹細胞応用医科学共同研究講座より提供していただいた。

3. 使用動物

マウス (BALB/cCrSlc、オス、第 8 週齢) は、日本エスエルシー株式会社より購入した。

4. 使用生薬

杏仁、荊芥、淫羊藿、金銀花、蒼朮、枇杷葉、益母草、牡丹皮、木通、何首烏、枳実、桃仁、大棗、菊花、胡麻仁、桂皮、酸棗仁、紅花、桔梗、川芎、山梔子、艾葉、芍薬、薄荷、厚朴、百合、ツボ草、蘇葉、大黄、黄芩、枸杞子、人參、黄連、防風、生姜、白朮、黄耆、木香、甘草、茯苓、陳皮の乾燥生薬を使用した。乾燥生薬は、株式会社小島漢方より購入した。

5. 細胞培養用培地

10% FBS (biosera)、100 IU/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシン (富士フィルム和光純薬) を含む D-MEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム含有) (富士フィルム和光純薬) を用いた。

6. 実験

(1) 生薬抽出発酵液の作製

規定濃度 ((w/v)%) になるように各乾燥生薬を純水に浸し、105°C、30 分間で熱水抽出した。その後、抽出液の温度を室温まで冷まして、遠心分離 (8,000×g、5 分間、25°C) して上澄みを回収した。回収した各生薬抽出液に乳酸菌懸濁液を 1 (v/v) % で添加し、培養液を 28°C で 24–72 時間培養した。培養上清液を用いる場合は、培養液を遠心分離 (8,000×g、5 分間、4°C) して、上清を孔径 0.45 µm のシリンジフィルター (Membrane Solutions) で菌体を除去して得られたろ液をその後の実験に使用した。

(2) HEK293 細胞の過酸化水素及びカビ毒処理

HEK293 細胞を 1×10^5 cells/well の密度で、24 ウェルプレートに 500 µL を播種し、5% CO₂ の 95% 空気の気相下、37°C で 24 時間培養した。その後、生薬抽出液の未発酵液及び発酵液を 1% 添加し、3 時間培養した。そして H₂O₂ (終濃度 : 0.3 mM) 及び、OTA (終濃度 : 5 µM)、STN (終濃度 : 75 µM) 溶液を添加し、24 時間培養した。コントロールには PBS を用いた。

(3) Cell Counting Kit-8 による生細胞数の計測

HEK293 細胞を含む培養液に Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所、日本) の試薬 WST-8 を添加し、5% CO₂ の 95% 空気の気相下、37°C で 3 時間反応させた。その後、培養上清液をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 450 nm の吸光度を測定した。

(4) 超音波処理により細胞内成分の回収

培養した HEK293 細胞を含む培養液をマイクロチューブに移し、遠心分離 (200×g、4 分間、4°C) 後、上清を除去した。マイクロチューブに PBS を添加し、再度遠心分離 (200×g、4 分間、4°C) 後、上清を除去した。PBS を加え、細胞を懸濁した。細胞懸濁液をサンプル密閉式超音波破碎装置 BIORUPTOR® (ソニック・バイオ) で 5 分間 (On : 10 秒間、Off : 5 秒間) 処理した。細胞内成分液を遠心分離 (12,000×g、10 分間、4°C) し、上清を回収した。

(5) 細胞内の総タンパク質濃度

2 mg/ml BSA Standard Solution (タカラバイオ) を PBS で 1, 0.75, 0.5, 0.25,

0.125, 0.025 mg/mL に調製し、検量線作成用の標準液とした調製した HEK293 細胞内成分液及び標準液を 96 ウェルプレートにそれぞれ 4 μ L を加え、そこに Bradford Dye Reagent (タカラバイオ) を 200 μ L を添加した。室温で 5 分静置後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 595 nm の吸光度を測定した。標準液の吸光度の測定値より検量線を作成し、細胞内成分液中の総タンパク質量 (mg/mL) を算出した。

(6) 細胞内活性酸素種 (ROS) 量の比較

H₂O₂ (終濃度 : 0.3 mM) 及び、OTA (終濃度 : 5 μ M)、STN (終濃度 : 75 μ M) 溶液を添加し 24 時間培養した培養液の培地を除去し、DMSO で調製した 10 mM 2', 7'-ジクロロフルオレセイン二酢酸 (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich) を終濃度 10 μ M になる PBS で希釈し、各ウェルに添加した。ウェルプレートを 37°C、30 分間培養後、多機能マイクロプレートリーダー VARIO SKANKLASH (Thermo Fisher Scientific) にて蛍光強度 (λ_{ex} 480 nm、 λ_{em} 530 nm) を測定した。コントロールに対する各サンプルの蛍光強度の割合 (%) を算出し、比較した。

(7) 細胞内スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性の比較

HEK293 細胞を超音波処理して得られた細胞内成分液中の SOD 活性を、SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用いて測定した。SOD (富士フィルム和光純薬) を 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 mg/mL となるように PBS で調製し、検量線作成用の標準液とした。細胞内成分液及び標準液、WST solution、Enzyme working solution を 96 ウェルプレートに添加、混合し、37°C、2 時間反応後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 450 nm の吸光度を測定した。標準液の吸光度より検量線を作成し、各細胞破碎液中の SOD を算出した。さらに総タンパク質当たりの SOD 量 (μ g/mL) を算出し、比較した。

(8) 細胞内グルタチオン (酸化型 : GSH、還元型 : GSSG) 量の比較

GSSG/GSH Quantification Kit (同仁化学研究所) を用いて、HEK293 細胞を超音波処理して得られた各細胞内成分液中の GSH 及び GSSG 量を定量した。GSSG 測定用標準液として 100 μ mol/L GSSG standard solution を 0.5 (w/v) % SSA 水溶液で希釈し、25.0、12.5、6.25、3.13、1.57、0.78、0 μ mol/L とした。総グルタチオン測定用標準液として 200 μ mol/L GSH standard solution を 0.5 (w/v) % SSA 水溶液で希釈し、50.0、25.0、12.5、6.25、3.13、1.57、0 μ mol/L とした。SGGS 測定用の細胞内成分液及び標準液にはその 1/50 量の Masking solution を添加してボルテックスにて混合した (総グルタチオン測定用細胞内成分液は必要なし)。GSSG 測定用及び総グルタチオン測定用の細胞内成分液及び標準液 20 μ L ずつを 96 ウェルプレートに添加した。Buffer solution 30 μ L を各ウェルに添加し、混合後、37°C、1 時間インキュベートした。Substrate working

solution 30 $\mu\text{g/L}$ 及び Enzyme/coenzyme working solution 30 μL を各ウェルに添加し、37°C、30分間インキュベートした。マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で 405 nm の吸光度を測定した。標準液の吸光度より検量線を作成し、各細胞内成分液中の GSH 及び GSSH 量を算出した。細胞内総タンパク質当たりの GSH 量 ($\mu\text{g/mL}$) 及び GSSH/GSH 比を算出し、比較した。

(9) 細胞内カスパーゼ-3 活性の比較

HEK293 細胞を超音波処理して得られた細胞内成分液を、液中の総タンパク質量が 1 mg/mL になるように PBS で調製した。カスパーゼ-3 の反応基質である Ac-DEVD-AFC (AAT Bioquest) を DMSO で 10 mM 溶液を調製した。10 mM Ac-DEVD-AFC 溶液を 50 μL 、1 M DTT を 100 μL 、100 mM EDTA を 400 μL 、20 mM Tris Buffer (pH7.4) を混合し、2×カスパーゼ基質反応溶液を調製した。調整した各細胞内成分液と 2×カスパーゼ基質反応溶液をそれぞれ 100 μL ずつ 96 ウェルプレートのセルに加えてよく混合後、28°C で 3 時間保温した。その後、多機能マイクロプレートリーダー VARIO SKANKLASH (Thermo Fisher Scientific) にて蛍光強度 (λ_{ex} 380 nm、 λ_{em} 500 nm) を測定した。コントロールに対する各サンプルの蛍光強度の割合 (%) を算出し、比較した。

(10) 枇杷葉の未発酵及び発酵抽出液からの活性成分の抽出

枇杷葉の未発酵及び発酵抽出液に、2 倍量の n-ヘキサンで 2 回抽出し、ヘキサン層と水層に分けた。次にその水層に、2 倍量のクロロホルムで 2 回抽出し、クロロホルム層と水層に分けた。さらにその水層に、2 倍量の酢酸エチルで 2 回抽出し、酢酸エチル層と水層に分けた。各画分液を減圧乾燥でドライアップし、酢酸エチルで成分を溶解した。溶解液の一部の溶媒を 10 (v/v) % DMSO に置き換え、各画分について活性の有無を確認した。なお活性成分の精製する際は、酢酸エチル画分をエバポレーターにて酢酸エチルを揮発させ、酢酸エチル画分量の 1/100 量 (培養上清液量の 1/50 量) の酢酸エチルで再溶解することで濃縮液を得た。

(11) 枇杷葉の発酵抽出液由来の活性成分の精製

① シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー

得られた活性成分を含む濃縮液にシリカゲル 60 (球状、中性) (ナカライテスク) を適量入れ、減圧乾燥にて酢酸エチルを揮発させ、成分をシリカゲルに吸着させた。内径 2 cm のクロマト管 (Climbing) にシリカゲルを高さ 17 cm まで詰めたオープンカラムを用いた。クロマト管内に活性成分を吸着させたシリカゲルを入れ、カラム容量と等量の溶媒でカラムから成分を溶出した (石油エーテル : 酢酸エチル : アセトン : 酢酸溶出システム [(80 : 20 : 1 : 1)、(80 : 30 : 5 : 1)、(80 : 50 : 10 : 1)、(80 : 100 : 30 : 1)])。その後、カラム容量と等量のメ

タノールで溶出した。溶出液を減圧乾燥でドライアップし、酢酸エチルで成分を溶解した。溶液の一部の溶媒を 10 (w/v) % DMSO に置き換え、各溶出液について活性の有無を確認した。残りの溶液は薄層クロマトグラフィーに使用した。

② 薄層クロマトグラフィー (TLC)

PLC ガラスプレート (Silica gel 60 F₂₅₄, 1mm、MERCK) を縦 5 cm 幅になるように切り、下部より 0.5 cm の位置にシリカゲルオープンクロマトグラフィーにて得た溶解液をアプライした。ドライヤーで乾燥したガラスプレートを、展開溶媒 (クロロホルム : ベンゼン : メタノール = 5 : 1 : 2) を入れた展開槽に入れ、上部から約 5 mm の位置まで溶媒を展開した。ガラスプレートをドライヤーで乾かし、酢酸 : 硫酸 (50 : 1) 混合液及び *p*-メトキシベンズアルデヒドを 50 : 0.5 で混合し、ガラス噴霧器でガラスプレートに噴霧した。噴霧したガラスプレートをプレートヒーターにて加熱し、検出したスポットを確認した。また、ドライヤーで乾燥したガラスプレートは、よう素を入れた展開槽に入れ、検出したスポットを確認した。併せて、ドライヤーで乾燥したガラスプレートは、UV254 nm 照射により検出したスポットも確認した。

(12) 動物の食餌

通常食群には通常食 : エネルギー 3.6 kcal/g、脂質 5.3% を、高脂肪食群には高脂肪食 : Rodent Diet with 60 kcal% fat、エネルギー 5.2 kcal/g、脂質 35% (Research Diets) を食餌とした。枇杷葉抽出液の未発酵及び発酵液摂取群は、それぞれ未発酵液と発酵液を 7.5 mL/kg、金属製ゾンデ (孔径 0.55 mm × 長さ 38 mm) にて経口投与した。なお、コントロール群には PBS を投与した。

(13) 動物の飼育環境及び給餌方法

マウスは 1 ケージ 4 匹までとし、室温 20–26°C、湿度 40–60% の環境で、12 時間ごとに室内の明暗を切り替えて飼育した。週に 1 回、飼育ケージを交換し、清潔な環境を保持した。飼育期間中、水と食餌は自由摂取した。

(14) 動物の飼育方法

購入したマウスを 1 週間、通常食にて飼育して環境に慣らせた。その後 10 週間、通常食群と高脂肪食群に分け、それぞれ通常食と高脂肪食を給餌した。それから、高脂肪食群をコントロール群、枇杷葉抽出液の未発酵液及び発酵液摂取群に分けた。

(15) 体重測定

高脂肪食の給餌を開始して 0–10 週、生薬抽出液の未発酵及び発酵液を投与開始して 0–5 週目に、1 回/週の頻度で全ての群のマウスについて、電子天秤で体重

を測定した。

(16) 血圧測定

生薬抽出液の未発酵及び発酵液を投与開始して、0, 1, 2, 3, 4, 5 週目のマウスについて、ラット・マウス非観血血圧測定装置 BP-98A-L (Softron) を用いて tail-cuff 法により非観血で収縮期及び拡張期の血圧を測定した。測定は 3 回行い、その平均値を算出した。

(17) 血液サンプルの調製及び分析

生薬抽出液の未発酵及び発酵液を投与開始して 5 週目のマウスを開腹し、血管から採血した。採取した血液をセパラピッドマイクロチューブ S (フチガミ器械) に入れ、遠心分離 (3,000×g、10 分間) した。得られた血清をエッペンチューブに移し、-80℃で保存した。血液検査は Table 19 の項目をオリエンタル酵母工業株式会社にて行った。

Table 19. 血中成分及び関連疾患

検査項目	関連疾患		
	肝・胆疾患	腎疾患	心・脳疾患
尿素窒素 (BUN)		○	
クレアチニン (CRE)		○	
尿酸 (UA)		○	
ナトリウム (Na)		○	○
カリウム (K)		○	○
AST (GOT)	○		○
ALT (GPT)	○		
乳酸脱水素酵素 (LDH)	○		○
クレアチンキナーゼ (CK)			○
コリンエステラーゼ (ChE)	○		
総コレステロール (T-CHO)	○	○	○
中性脂肪 (TG)	○		○
LDL-コレステロール (LDL-C)	○		
HDL-コレステロール (HDL-C)	○		
グルコース (GLU)		○	

(18) 臓器及び血液、内臓脂肪の採取

枇杷葉抽出液の未発酵及び発酵液を投与開始して 5 週目のマウスを開腹し、腎臓及び肝臓、内臓脂肪を採取した。採取した臓器は 2 mL チューブに入れ、液体

窒素により急速冷凍し、 -80°C で保存した。採取した内臓脂肪は電子天秤で重量を測定し、体重における内臓脂肪の割合(%)を算出した。

(19) マウス肝臓中コレステロール量及び中性脂肪量

マウス肝臓片 100 mg を PBS で洗浄した後、肝臓をペッスルの付いたハンディホモジナイザーで粉砕した。抽出液 (クロロホルム : メタノール = 2 : 1) 1 mL を粉砕した肝臓に加えて、室温で 2 時間振動した。抽出後孔径 $0.22\ \mu\text{m}$ のシリンジフィルター (Membrane Solutions) でろ過して回収した液に、その液量の 0.2 倍量の純水を添加した。ボルテックスにより混合後、遠心分離 ($5,000\times g$, 1 分間、 4°C) し、クロロホルム層 (下層) を回収した。減圧乾燥にてクロロホルムを揮発させ、イソプロパノールを加えて混合した。イソプロパノール溶液を適当に希釈し、コレステロール E-テスト (富士フィルム和光純薬) でコレステロール量を、トリグリセリド E-テスト (富士フィルム和光純薬) でトリグリセリド量を測定した。

(20) qPCR 法による遺伝子発現解析

① 臓器から RNA 抽出

RNA の抽出には NucleoSpin® RNA Plus (MACHEREY-NAGEL) を用いた。回収したマウスの肝臓及び腎臓切片約 100 mg を 2 mL マイクロチューブに入れ、ペッスルを付けたハンディホモジナイザーで粉砕した。マイクロチューブに Lysis Buffer LBP を 350 μL 加え、ボルテックスで混合し、マイクロチューブを $2,000\times g$, 4°C 、15 秒間で遠心分離した。上清液を 2 mL Collection tube にセットした NucleoSpin® gDNA Removal Colum に入れ、 $11,000\times g$, 4°C 、30 秒間で遠心分離した。Collection tube 内の通過液に Binding Solution BS を 100 μL 加え、ピペッティングにて混合した。その混合液を、2 mL Collection tube にセットした NucleoSpiR® RNA Plus Colum に入れ、 $11,000\times g$, 4°C 、15 秒間で遠心分離した。RNA Plus Colum に Wash Buffer WB1 を 200 μL 加え、 $11,000\times g$, 4°C 、15 秒間で遠心分離した。RNA Plus Colum を新しい 2 mL Collection tube に移し、RNA Plus Colum に Wash Buffer WB2 を 600 μL 加え、 $11,000\times g$, 4°C 、15 秒間で遠心分離した。Collection tube 内の通過液を除去後、RNA Plus Colum に Wash Buffer WB2 を 250 μL 加え、 $11,000\times g$, 4°C 、2 分間で遠心分離した。RNA Plus Colum を 1.5 mL Collection tube にセットし、RNA Plus Colum に RNase-free H_2O を 30 μL 加え、 $11,000\times g$, 4°C 、1 分間で遠心分離した。再度、RNA Plus Colum に RNase-free H_2O を 30 μL 加え、 $11,000\times g$, 4°C 、1 分間で遠心分離し、RNA 溶液を回収した。溶液中の RNA 濃度及び純度は、次世代型超微量分光光度計 NANO DROP ONE^c (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。各溶液の RNA 濃度を Nuclease free Water (invitrogen) で 30 ng/ μL に調製した。

② 逆転写反応 (cDNA 合成)

逆転写反応には ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いた。回収した RNA 溶液 7.2 μL を 100 μL 容 8 連マイクロチューブに入れ、サーマルサイクラー iCycler (Bio-Rad) にて 65°C、5 分間で加熱した (RNA の変性)。RNA 溶液に 4×DN Master Mix を 2.4 μL 添加し、サーマルサイクラー iCycler (Bio-Rad) にて 37°C、15 分間で反応させた (gDNA 除去)。その反応液から 8 μL を新しい 100 μL 容 8 連マイクロチューブに移し、そこに 5×RT Master Mix II を 2 μL 添加し、サーマルサイクラー iCycler (Bio-Rad) にて 下記の条件で反応させた (逆転写反応)。

[反応条件]

1 cycle

37°C 15 min

50°C 5 min

60°C 30 sec

③ RT-PCR

逆転写して得られた反応液に 10 μL に Nuclease free Water (invitrogen) を 174 μL 添加し希釈した。希釈液を用いて、下記の組成、各種 Primer の塩基配列及び条件で、CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) により各種遺伝子発現量を測定した。

[反応組成]

	使用量
逆転写反応希釈	9.2 μL
KAPA SYBR Fast qPCR キット (日本ジェネティクス)	10.0 μL
F primer (10 mM)	0.4 μL
R primer (10 mM)	0.4 μL

[Primer]

Primer 名称*	配列 (5'→3')	臓器
IL-6-F	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	腎臓・肝臓
IL-6-R	CCACGATTTCCCAGAGAAC	腎臓・肝臓
renin-F	ATGAAGGGGGTGTCTGTGGGGTC	腎臓・肝臓
renin-R	ATGTCGGGGAGGGTGGGCACCTG	腎臓・肝臓
ACE-F	TGAGAAAAGCACGGAGGTATCC	腎臓・肝臓
ACE-R	AGAGTTTTGAAAGTTGCTCACATCA	腎臓・肝臓
IL-6-2F	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	腎臓・肝臓
Il-6-2R	AAGTGATCATCGTTGTTTCATACA	腎臓・肝臓
16s rRNA-pl-F	AAGGGTTTCGGCTCGTAAAA	腎臓・肝臓
16s rRNA-pl-R	TGCACTCAAGTTTCCCAGTT	腎臓・肝臓
16s rRNA-lac-F	GCTCACCAAGGCGATGATACATA	腎臓・肝臓
16s rRNA-lac-R	ACCAACGTTCTTCTCTACCAACA	腎臓・肝臓
kid-TNF- α -F	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	腎臓
kid-TNF- α -R	ACATTTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	腎臓
kid-MCP-1-F	TCAGCCAGATGCAGTTAACGC	腎臓
kid-MCP-1-R	TGATCCTCTTGTAGCTCTCCAGC	腎臓
kid-TRAF6-F	GCCGAAATGGAAGCACAG	腎臓
kid-TRAF6-R	GGGCTATGGATGACAACAGG	腎臓
kid-iNOS-F	CAGCTGGCTGTACAAACCTT	腎臓
kid-iNOS-R	CATTGGAAGTGAAGCCTTTTCG	腎臓
kid-PPAR- γ -F	CCAGAGTCTGCTGATCTGC	腎臓
kid-PPAR- γ -R	GCCACCTCTTTGCTCTGCTC	腎臓
kid-MCAD-F	TAATCGGTGAAGGAGCAGGTTT	腎臓
kid-MACD-R	GGCATACTTCGTGGCTTCGT	腎臓
kid-UCP2-F	CTACTGTCGAGGAGATAGAG	腎臓
kid-UCP2-R	GCAGCAGTTTGGGTTGTTTC	腎臓
kid-ApoE-F	GCCGTGCTGTTGGTCACA	腎臓
kid-ApoE-R	TGATCTGTCACCTCCGGCTC	腎臓
kid-PCG1 α -F	TCCTCTGACCCCAGAGTCAC	腎臓
kid-PCG1 α -R	CTTGGTTGGCTTTATGAGGAGG	腎臓
kid-EER α -F	GGTGTGGCATCCTGTGAGGC	腎臓
kid-EER α -R	AGGCACTTGGTGAAGCGGCA	腎臓
kid-PPAR- α -F	ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC	腎臓
kid-PPAR- α -R	CCGATTCTTTCAGGTCGTGT	腎臓
kid-CPT-1-F	ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC	腎臓
kid-CPT-1-R	AGCGAGTAGCGCATGGTCAT	腎臓

Primer 名称※	配列 (5'→3')	臓器
kid-SREBP1-F	GGAGCCATGGATTGCACATT	腎臓
kid-SREBP1-R	GCTTCCAGAGAGGAGGCCA	腎臓
kid-podocin-F	AAGTGCGGGTGATTGCTGCAGAAG	腎臓
kid-podocin-R	TGTGGACAGCGACTGAAGAGTGTG	腎臓
kid-IL-1b-F	CAACCAACACGTGATATTCTCCAT	腎臓
kid-IL-1B-R	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	腎臓
kid-FAS-F	AGAGATCCCGAGACGCTTCT	腎臓
kid-FAS-R	GCCTGGTAGGCATTCTGTAGT	腎臓
kid-mDGAT2-F	GGAGCCGCAAAGGATTTGTA	腎臓
kid-mDGAT2-R	AATAGGTGGGAACCAGATCAGC	腎臓
kid-CD36-F	TGGATGAGCCTACATTATGCACT	腎臓
kid-CD36-R	GCACACCACCGTTTCTTCAA	腎臓
kid-TFAM-F	TTCCAGGGGGCTAAGGATGA	腎臓
kid-TFAM-R	CACACTGCGACGGATGAGAT	腎臓
kid-NRF1-F	AGCCGTTGGAGCACTTACTG	腎臓
kid-NRF1-R	TCACGGCTTTGCTGATGGT	腎臓
kid-Sirt1-F	TCATTCTGTGAAAGTGATGACGA	腎臓
kid-Sirt1-R	CTGCCCTAGTGTTCATATCATCAA	腎臓
liv-Fasn-F	TCCACCTTTAAGTTGCC	肝臓
liv-Fasn-R	TCTGCTCTCGTCATGTCACC	肝臓
liv-Aldo1-F	CTACAAGGCTCTGAGCGACC	肝臓
liv-Aldo1-R	ACAGGAAAGTGACCCAGTG	肝臓
liv-PPAR- α -F	GTGGCTGCTATAATTTGCTGTG	肝臓
liv-PPAR- α -R	GAAGGTGTCATCTGGATGGGT	肝臓
liv-PPAR- γ -F	CAAGACTACCCTTTTAAGTGAA	肝臓
liv-PPAR- γ -R	CTACTTTGATCGCACTTTGGT	肝臓
liv-CD36-F	CACAGCTGCCTTCTGAAATGTGTGG	肝臓
liv-CD36-R	TTTCTACGTGGCCCGGTTCTAATTC	肝臓

※ F: Forward primer、R: Reverse primer

[反応条件]

1 cycle 40 cycles
95°C 30 sec → 98°C 5 sec
 60°C 30 sec

(21) 腸内細菌叢解析

① マウスの糞便からの DNA 抽出

生薬抽出液の未発酵及び発酵液を投与開始して 5 週目のマウスから回収した糞便 2-3 個を 2 mL チューブに入れ、PBS を 1 mL 加えた。プラスチック棒で糞便をすり潰した後、PBS をさらに 1 mL 加えて混合後、孔径 100 μm のフィルター (CellTrics™、Sysmex Partec GmbH) で 15 mL 遠沈管にろ過した。15 mL 遠沈管を遠心分離 (9,000 $\times g$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) し、上清を捨てた。15 mL 遠沈管に PBS を 2 mL 加え、懸濁し、遠心分離 (9,000 $\times g$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) 後、上清を捨てた。15 mL 遠沈管に TE10 バッファー (10 mM Tris-HCl/10 mM EDTA) を 2 mL 加え、懸濁し、遠心分離 (9,000 $\times g$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) 後、上清を捨てた。15 mL 遠沈管に TE10 バッファーを 800 μL 加え、懸濁後、懸濁液を 2 mL チューブに移した。2 mL チューブにリゾチーム溶液 (TE10 バッファーで 15 mg/mL に調製) を 50 μL を加え、振とうしながらインキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間) した。2 mL チューブに 100 units/ μL アクロモペプチダーゼ (富士フィルム和光純薬) を 20 μL 加え、振とうしながらインキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間) した。2 mL チューブに 10 (w/v) % SDS を 50 μL 、Proteinase K (富士フィルム和光純薬) を 10 μL 添加し、インキュベート (55 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間) した。2 mL チューブにフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを 1 mL 添加し、遠心分離 (9,000 $\times g$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) 後、上清を新しい 2 mL チューブに回収した。上清液に 3 M 酢酸ナトリウムを 100 μL 、イソプロパノールを 800 μL を添加して混合後、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間静置した。2 mL チューブを遠心分離 (12,000 $\times g$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) し、上清を捨てた。2 mL チューブに 75% エタノールを 1 mL 添加し、遠心分離 (12,000 $\times g$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) 後、上清を捨てた。2 mL チューブを室温で乾燥させた。2 mL チューブに 1 \times TE バッファーを 360 μL 加え、タッピングして DNA を溶解し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 晩静置した。2 mL チューブに RNase (ニッポンジーン) を 1 μL 添加し、インキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間) した。3 M 産駒酸ナトリウムを 40 μL 加え、エタノールを 1 mL 添加し、混合後、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間静置した。2 mL チューブを遠心分離 (12,000 $\times g$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) して、上清を捨てた。75 (v/v) % エタノールを 1.5 mL 加え、遠心分離 (12,000 $\times g$ 、5 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) して、上清を捨て、乾燥させた。1 \times TE バッファーを 50 mL 加えて DNA を溶解させ、4 $^{\circ}\text{C}$ で保管した。DNA が回収できていることをアガロース電気泳動にて確認した。DNA 溶液中の DNA 濃度及び純度は、次世代型超微量分光光度計 NANO DROP ONE^c (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。

② 腸細菌叢解析

調製した DNA 溶液を用いて、株式会社生物技研にて遺伝子解析を行った。解析によって得られたデータを統計解析ソフト SSPA (IBM) により、腸内細菌の割合を算出した。

【参考文献】

1. Sanders, M.E. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46 Suppl 2:S58–S61.
2. Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann. Biol. Res.* 2020, 1(4):218–228.
3. Salminen, S., et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol.* 2021, 18(9):649–667.
4. Vinderola, G., Sanders, M.E., Salminen, S. The Concept of Postbiotics. *Foods.* 2022, 11(8):1077
5. Favero, C., Giordano, L., Mihaila, S.M., Masereeuw, R., Ortiz, A., Sanchez-Niño, M.D. Postbiotics and Kidney Disease. *Toxins (Basel).* 2022, 14(9):623.
6. Scott, E., De Paepe, K., Van de Wiele, T. Postbiotics and Their Health Modulatory Biomolecules. *Biomolecules.* 2022, 12(11):1640.
7. Wang, S., Yuan, X., Dong, Z., Li, J., Shao, T. Isolating and evaluating lactic acid bacteria strains for effectiveness on silage quality at low temperatures on the Tibetan Plateau. *Anim. Sci. J.* 2017, 88(11):1722–1729.
8. Bannai, M., Kawai, N., Nagao, K., Nakano, S., Matsuzawa, D., Shimizu, E. Oral administration of glycine increases extracellular serotonin but not dopamine in the prefrontal cortex of rats. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2011, 65(2):142–149.
9. Heresco-Levy, U., Javitt, D.C., Ermilov, M., Mordel, C., Horowitz, A., Kelly, D. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of glycine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia. *Br. J. Psychiatry.* 1996, 169(5):610–617.
10. Tamura, T., Noda, M., Ozaki, M., Maruyama, M., Matoba, Y., Kumagai, T., Sugiyama, M. Establishment of an efficient fermentation system of Gamma-aminobutyric acid by a Lactic Acid Bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33(10):1673–1679.
11. Caldwell, R.W., Rodriguez, P.C., Toque, H.A., Narayanan, S.P., Caldwell, R.B. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2018, 98(2): 641–665.
12. Ho, Y.Y., Nakato, J., Mizushige, T., Kanamoto, R., Tanida, M., Akiduki, S., Ohinata, K. L-Ornithine stimulates growth hormone release in a manner dependent on the ghrelin system. *Food Funct.* 2017, 8(6):2110–2114.
13. Miyake, M., Kirisako, T., Kokubo, T., Miura, Y., Morishita, K., Okamura, H., Tsuda, A. Randomized controlled trial of the effects of L-ornithine on stress markers and sleep quality in healthy workers. *Nutr. J.* 2014, 13:53.
14. Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S., Cynober, L.

- Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*. 2005, 29(3):177–205.
15. Schwedhelm, E., Maas, R., Freese, R., Jung, D., Lukacs, Z., Jambrecina, A., Spickler, W., Schulze, F., Böger, R.H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: Impact on nitric oxide metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2008, 65(1):51–59.
 16. Hayashi, T., Juliet, P.A., Matsui-Hirai, H., Miyazaki, A., Fukatsu, A., Funami, J., Iguchi, A., Ignarro, L.J. L-Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, 102(38):13681–13686.
 17. Takeda, K., Machida, M., Kohara, A., Omi, N., Takemasa, T. Effects of citrulline supplementation on fatigue and exercise performance in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2011, 57(3):246–250.
 18. Rimaux, T., Vrancken, G., Pothakos, V., Maes, D., De Vuyst, L., Leroy, F. The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. *Food Microbiol.* 2011, 28(3):597–604.
 19. Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A., Stalon, V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* 1986, 50(3):314–352.
 20. Fang, F., Zhang, J., Zhou, J., Zhou, Z., Li, T., Lu, L., Zeng, W., Du, G., Chen, J. Accumulation of citrulline by microbial arginine metabolism during alcoholic fermentation of soy sauce. *J. Agric. Food Chem.* 2018, 66(9):2108–2113.
 21. Araque, I., Bordons, A., Reguant, C. Effect of ethanol and low pH on citrulline and ornithine excretion and arc gene expression by strains of *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Microbiol.* 2013, 33(1):107–113.
 22. Araque, I., Reguant, C., Rozes, N., Bordons, A. Influence of wine-like conditions on arginine utilization by lactic acid bacteria. *Int. Microbiol.* 2011, 14(4):225–233.
 23. Barcelona-Andrés, B., Marina, A., Rubio, V. Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2002, 184(22):6289–6300.
 24. Majsnerowska, M., Noens, E.E.E., Lolkema, J.S. Arginine and citrulline catabolic pathways encoded by the arc gene cluster of *Lactobacillus brevis* ATCC 367. *J. Bacteriol.* 2018, 200(4):e00182-18
 25. Fulde, M., Willenborg, J., Huber, C., Hitzmann, A., Willms, D., Seitz, M., Eisenreich, W., Weigand, P.W., Goethe, R. The arginine-ornithine antiporter ArcD contributes to biological fitness of *Streptococcus suis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014, 4:107.
 26. Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., De Vuyst, L., Leroy, F. Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 135(3):216–222.

27. Rakhimuzzaman, M., Noda, M., Danshiitsoodol, N., Sugiyama, M. Development of a system of high ornithine and citrulline production by a plant-derived lactic acid bacterium, *Weissella confusa* K-28. *Biol. Pharm. Bull.* 2019, 42(9):1581–1589.
28. Yeong, M.S., Hee, M.S., Choon, C.H. Characterization of high-ornithine-producing *Weissella koreensis* DB1 isolated from kimchi and its application in rice bran fermentation as a starter culture. *Foods.* 2020, 9(11):1545.
29. Navarro-Pascual-Ahuir, M., Lerma-García, M.J., Simo-Alfonso, E.F., Herrero-Martínez, J.M. Rapid differentiation of commercial juices and blends by using sugar profiles obtained by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63(10):2639–2646.
30. Dillon, A. Fruit juice profiles. In *Methods to Detect Adulteration of Fruit Juice Beverages*, Nagy, S., Wade, R.L., Eds., Append. II, AGscience: Auburndale, FL, USA, 1995, pp. 359–433.
31. Wills, R.B.H., Composition of Australian fresh fruits and vegetables. *Food Technol. Aust.* 1987, 39, 523–530.
32. Archibald, F. Manganese: Its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 1986, 13(1):63–109.
33. Archibald, F.S., Fridovich, I. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 1981, 145(1):442–451.
34. Watanabe, M., van der Veen, S., Nakajima, H., Abee, T. Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology.* 2012, 158(Pt 1):293–300.
35. Cheng, X., Dong, Y., Su, P., Xiao, X. Improvement of the fermentative activity of lactic acid bacteria starter culture by the addition of Mn²⁺. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 174(5):1752–1760.
36. Noens, E.E., Kaczmarek, M.B., Żygo, M., Lolkema, J.S. ArcD1 and ArcD2 arginine/ornithine exchangers encoded in the arginine deiminase pathway gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 2015, 197(22):3545–3553.
37. Spano, G., Massa, S., Arena, M.E., de Nadra, M.C.M. Arginine metabolism in wine *Lactobacillus plantarum*: *in vitro* activities of the enzymes arginine deiminase (ADI) and ornithine transcarbamylase (OTCase). *Ann. Microbiol.* 2007, 57(1):67–70.
38. Casiano-Colón, A., Marquis, R.E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54(6):1318–1324.
39. Rimaux, T., Vrancken, G., Pothakos, V., Maes, D., Vuyst, L.D., Leroy, F. The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. *Food Microbiol.* 2011, 28(3):597–604.
40. Rimaux, T., Rivière, A., Illegghems, K., Weckx, S., De Vuyst, L., Leroy, F. Expression of

- the arginine deiminase pathway genes in *Lactobacillus sakei* is strain-dependent and is affected by the environmental pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78(14):4874–4883.
41. Verges, M.C., Zúñiga, M., Morel-Deville, F., Pérez Martínez, G., Zagorec, M., Ehrlich, S.D. Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 180(2):297–304.
 42. Vrancken, G., Rimaux, T., Wouters, D., Leroy, F., Vuyst, L.D. The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt. *Food Microbiol.* 2009, 26(7):720–727.
 43. Lu, C.D., Winteler, H., Abdelal, A., Haas, D. The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1999, 181(8):2459–2464.
 44. De Angelis, M., Mariotti, L., Rossi, J., Servili, M., Fox, P.F., Rollán, G., Gobbetti, M. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: Purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(12):6193–6201.
 45. Spano, G., Massa, S., Arena, M.E., de Nadra, M.C.M. Arginine metabolism in wine *Lactobacillus plantarum*: *in vitro* activities of the enzymes arginine deiminase (ADI) and ornithine transcarbamylase (OTCase). *Ann. Microbiol.* 2007, 57(1):67–70.
 46. Hwang, H., Lee, J.H. Characterization of arginine catabolism by lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Molecules* 2018, 23(11):3049.
 47. Buckenhüskes, H.J. Fermented vegetables. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed., Doyle, P.D., Beuchat, L.R., Montville, T.J., Eds., *ASM Press: Washington, DC, USA*, 1997, pp. 595–609.
 48. European Food Safety Authority. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *The EFSA Journal.* 2012, 10(6):2740–2749.
 49. Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1999, 43(4):727–737.
 50. Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 2010, 13(6):151–171.
 51. Larsen, R., Buist, G., Kuipers, O.P., Kok, J. ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 2004, 186(4):1147–1157.
 52. Budin-Verneuil, A., Maguin, E., Auffray, Y., Ehrlich, S.D., Pichereau, V. Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363. *Can. J. Microbiol.* 2006, 52(7):617–622.
 53. Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium

- Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 2001, 11(5):731–753.
54. Imlay, J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 2008, 77:755–776.
 55. Garrido-Fernández, J., Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Hornero-Méndez, D., Ruiz-Barba, J.L. Carotenoid production in *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 140(1):34–39.
 56. Kim, M., Seo, D.H., Park, Y.S., Cha, I.T., Seo, M.J. Isolation of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* Producing C₃₀ Carotenoid 4,4'-Diaponeurosporene and the Assessment of Its Antioxidant Activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 29(12):1925–1930.
 57. Shakya, S., Danshiitsoodol, N., Sugimoto, S., Noda, M., Sugiyama, M. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Substance Generated Newly in Paeoniae Radix Alba Extract Fermented with Plant-Derived *Lactobacillus brevis* 174A. *Antioxidants (Basel)*. 2021, 10(7):1071.
 58. Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Yuan, Z. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 112:320–331.
 59. Khoi, C.S., Chen, J.H., Lin, T.Y., Chiang, C.K., Hung, K.Y. Ochratoxin A-Induced Nephrotoxicity: Up-to-Date Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 18,22(20):11237.
 60. Máté, G., Gazdag, Z., Mike, N., Papp, G., Pócsi, I., Pesti, M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicon.* 2014, 90:155–166.
 61. Islam, M.N., Rauf, A., Fahad, F.I., Emran, T.B., Mitra, S., Olatunde, A., Shariati, M.A., Rebezov, M., Rengasamy, K.R.R., Mubarak, M.S. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022, 62(26):7282–7300.
 62. Narayanankutty, A., Job, J.T., Narayanankutty, V. Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2019, 20(9):907–917.
 63. Xu, N., Lu, Y., Hou, J., Liu, C., Sun, Y. A Polysaccharide Purified from *Morchella conica* Pers. Prevents Oxidative Stress Induced by H₂O₂ in Human Embryonic Kidney (HEK) 293T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(12):4027.
 64. El Golli Bennour, E., Rodriguez-Enfedaque, A., Bouaziz, C., Ladjimi, M., Renaud, F., Bacha, H. Toxicities induced in cultured human hepatocarcinoma cells exposed to ochratoxin A: Oxidative stress and apoptosis status. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2009, 23(2):87–96.
 65. Hsu, L.C., Hsu, Y.W., Liang, Y.H., Lin, Z.H., Kuo, Y.H., Pan, T.M. Protective Effect of Deferricoprogen Isolated from *Monascus purpureus* NTU 568 on Citrinin-Induced

- Apoptosis in HEK-293 Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60(32):7880–7885.
66. Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sánchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., Morales-González, J.A. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12(5):3117–3132.
 67. Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 2015, 62(3):720–733.
 68. Wilson, C.G., Tran, J.L., Erion, D.M., Vera, N.B., Febbraio, M., Weiss, E.J. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology.* 2016, 157(2):570–585.
 69. Silva, A., Gonçalves-de-Albuquerque, C.F., Daliry, A. High-fat diet-induced kidney alterations in rats with metabolic syndrome: endothelial dysfunction and decreased antioxidant defense. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2019, 12:1773–1781.
 70. Relle, M., Cash, H., Brochhausen, C., Strand, D., Menke, J., Galle, P.R., Schwarting, A. New perspectives on the renal slit diaphragm protein podocin. *Mod. Pathol.* 2011, 24(8): 1101–1110.
 71. Dutra, M.R.H., Feliciano, R.D.S., Jacinto, K.R., Gouveia, T.L.F., Brigidio, E., Serra, A.J. Protective role of UCP2 in oxidative stress and apoptosis during the silent phase of an experimental model of epilepsy induced by pilocarpine. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018, 2018:6736721.
 72. Shawky, S.A., Gaber, O. Mostafa, E., Sarhan, W.M. Uncoupling Protein 2 Expression Modulates Obesity in Chronic Kidney Disease Patients. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2021, 10(1): 119–125.
 73. Yang, B., Huang, S., Zhao, G., Ma, Q. Dietary supplementation of porcine bile acids improves laying performance, serum lipid metabolism and cecal microbiota in late-phase laying hens. *Anim. Nutr.* 2022, 11:283–292.
 74. Zhong, Y., Nyman, M., Fåk, F. Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59(10):2066–2076.
 75. Gao, F., Lv, Y.W., Long, J., Chen, J.M., He, J.M., Ruan, X.Z., Zhu, H.B. Butyrate Improves the Metabolic Disorder and Gut Microbiome Dysbiosis in Mice Induced by a High-Fat Diet. *Front. Pharmacol.* 2019, 13,10:1040.
 76. Coppola, S., Avagliano, C., Calignano, A., Berni Canani, R. The Protective Role of Butyrate against Obesity and Obesity-Related Diseases. *Molecules.* 2021, 26(3):682.

【略語一覧】

ACE	Angiotensin-converting enzyme	LDH	Lactate dehydrogenase
ADI	Arginine deiminase	LE	<i>Lonicerae Flos</i>
Ala	Alanine	LSM	LAB susceptibility test medium
ALT	Alanine aminotransferase	Lys	Lysine
Arg	Arginine	MH	Mueller Hinton
AST	Aspartate aminotransferase	MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ATP	Adenosine triphosphate	MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
BCP	Bromocresol Purple	NAD	β -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate
BHI	Brain Heart Infusion	NBCI	the National Centre for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	NFD	Normal fat diet
Cit	Citrulline	Orn	Ornithine
CTN	Citrinin	OTA	Ochratoxin A
DNA	Deoxyribonucleic acid	OTC	Ornithine transcarbamylase
DBP	Diastolic blood pressure	PBS	Phosphate buffered saline
FDA	Food and Drug Administration	PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
EF	<i>Eriobotryae Folium</i>	PR	<i>Paeoniae Radix</i>
EFSA	European Food Safety Authority	RNA	Ribonucleic acid
Fru	Fructose	ROS	Reactive oxygen species
Glc	Glucose	SBP	Systolic blood pressure
GRAS	Generally Recognized As Safe	SEM	Scanning Electron Microscope
GSH	Glutathione	SOD	Superoxide Dismutase
GSSG	Glutathione disulfide	SSA	5-Sulfosalicylic Acid
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293	Suc	Sucrose
His	Histidine	T-CHO	Total-cholesterol
HFD	High fat diet	TG	Triglyceride
IL	Interleukin	TLC	Thin-layer chromatography

【学位論文の基礎となる原著】

Inoue Y, Danshiitsoodol N, Noda M, Hagihara K, Sugiyama M. Fermentation in pineapple juice significantly enhances ornithine and citrulline production in *Lactococcus lactis* MSC-3G isolated from sugarcane. *Microorganisms*. 2022. 10:962.

【謝辞】

本研究に対し、終始懇切なるご指導・ご鞭撻を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 未病・予防医学共同研究講座 杉山 政則 教授に、謹んで深い感謝の意を表します。

本研究に対し、多大なるご指導をいただきました広島大学大学院医系科学研究科 未病・予防医学共同研究講座 野田 正文 特任准教授ならびに Narandalai Danshiitsoodol 特任講師に、深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、副指導教官を務めて頂いた広島大学大学院医系科学研究科 薬分子機能科学研究室 小池 透 教授ならびに同研究科 生体機能分子動態学研究室 古武 弥一郎 教授に、深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験素材を提供して下さった広島大学大学院医系科学研究科 幹細胞応用医科学共同研究講座 中島 歩 教授に、深く御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、ご指導を賜りました広島大学病院薬剤部 松尾 裕彰 教授ならびに広島大学大学院医系科学研究科 薬効解析科学研究室 森岡 徳光 教授、同研究科 薬学部 附属薬用植物園 山野 幸子 准教授に、深く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、御協力くださった広島大学大学院医系科学研究科 未病・予防医学共同研究講座の方々にも深く御礼申し上げます。

最後に、絶えず精神的に支え続けてくれた家族に感謝致します。