

|||||
総 説
|||||ヒト常在乳酸菌群が生産する代謝物質 PS-B1 の
有効生理活性に関する研究

榎 原 隆 三

(長崎国際大学 薬学部 薬学科 特任教授)

Study on the effective physiological activity of the metabolite
PS-B1 produced by the human indigenous lactic acid
bacteria group

Ryuzo SAKAKIBARA

(Specially Appointed Professor, Dept. of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagasaki International University)**Abstract**

PS-B1 is a culture filtrate obtained by co-cultivating 21 kinds of human lactic acid bacteria in a soybean meal medium as a nutrient source, and is classified as so-called biogenics, which contains various metabolites produced by the lactic acid bacteria group. We have studied the effective physiological activity of PS-B1 from various aspects and accumulated evidence to evaluate the potential of PS-B1 as a biogenic food for health preservation and disease prevention. In this paper, I describe PS-B1's effects on cancer cell line growth inhibition, liver preservation, and obesity suppression and lipid metabolism improvement, as the results of analysis of the effective physiological activity of PS-B1.

Key words

PS-B1, Lactic Acid Bacteria, Biogenics, Cancer Cell Apoptosis, Liver Preservation, Obesity Suppression

要 旨

PS-B1 は、ヒト常在乳酸菌21種を大豆粉培地を主栄養源とし共棲培養して得られた培養ろ液で、乳酸菌群が生産した種々の代謝物質を含む、いわゆる、バイオジェニックスに位置づけられるものである。我々は、PS-B1 の有効生理活性について多方面から研究し、PS-B1 の健康保全・疾病予防を指向したバイオジェニックスフードとしての可能性を評価するためにエビデンスを蓄積してきた。本稿では、PS-B1 の有効生理活性の解析結果として、PS-B1 のがん細胞株増殖抑制作用、肝保全作用、および肥満抑制と脂質代謝改善作用について述べる。

キーワード

PS-B1、乳酸菌生産物質、バイオジェニックス、がん細胞アポトーシス、肝保全、肥満予防

はじめに

高度経済成長期以降の生活水準の向上に伴い、我が国の食生活は大きな変貌を遂げ、戦後長ら

く続いた食糧問題を克服し、食生活の多様化・大量消費化等のいわゆる「飽食」の時代に突入して久しい。1990年代も後半になると、恵まれ過

きた食生活に起因する疾病増加に強い警鐘が鳴らされ始め、次第に食生活・生活習慣の改善が謳われ始め、その中で栄養過多や運動不足を原因とする生活習慣病やメタボリック症候群といった新たな疾病概念が登場し、我々の食生活および食品に対する考え方に大きな変化が訪れた。ここに高齢社会の到来が重なり、厚生労働省の施政方針や各種メディアの積極的な介入を受け、現在のわが国では官民ともに健康維持・増進への機運が高まっている。しかしながら、生活習慣病やメタボリック症候群に対する決め手となる有効な予防法は生活習慣の改善以外に有効な打開策がまだまだ存在しない状況である。“健康寿命の延伸¹⁾”や“人生100年時代²⁾”などのスローガンには事欠かないが、このいわば、“国民総健康化事業”に対する切り札はない。我々は、この切り札を探るべく伝統的に治療薬の創製に主眼を置いてきた薬学において、予防薬、サプリメント、予防食品開発にも貢献すべきであると考えている。

ヒトの腸内常在細菌叢の活用とそれらの菌が生産する代謝物質の利用による健康増進ひいては疾病予防の考え方が近年注目されている。これは、粘膜面や皮膚に局在する健全な常在細菌叢が我々動物にとって、健康維持に欠かせない役割を演じていることについて、この数十年の基礎研究および臨床研究により疑う余地のないこととして広く受け入れられてきたからである。ヒトの腸内細菌叢（マイクロバイオータ）には数100種類、数にして100兆個以上と推定される腸内細菌が存在する。大腸に局在する腸内細菌は嫌気性菌が大部分を占め、それらの菌の培養の難しさから機能・性質の解明が遅れたが、光岡知足らをはじめとする国内外の研究者による新たな嫌気培養法の開発により多くの腸内細菌が単離同定され菌の機能・性質が明らかにされてきた。一方では、いまだ培養できない未知の有用菌が多く残っていると考えられており、新規のこれまでにない有用性のある菌の発見も期待される場所である。

腸内細菌叢の活用を基盤として考案された機能性食品はその作用機序の概念から3種類に分類される。第1に Fuller³⁾により「腸内微生物のバランスを改善することにより宿主に有益に働く生菌添加物」と定義されたプロバイオティクス、第2に Gibson と Roberfroid⁴⁾により「結腸内の有用菌を増殖させるか有害菌の増殖を抑制することで宿主の健康に有益な作用をもたらす難消化性食品成分」と定義されたプレバイオティクス、そして第3は光岡⁵⁾により「直接あるいは腸内フローラを介して生体調節機能をもつ食品成分」と定義されたバイオジェニクスである（図1）。20世紀初頭、Metchnikoffにより提起された「不老長寿説」以来、発酵乳の効用は生きた乳酸菌が腸内で腐敗を抑えることによるプロバイオティクスの概念で主として捉えられてきたが、1970年代の研究で殺菌発酵乳をマウスに投与することで寿命が延長することが認められ、発酵産物の有効性の可能性が提起された。発酵代謝産物としてのバイオジェニクスには、ペプチド、フラボノイド、バクテリオシン、脂肪酸、アミノ酸、ビタミン、オリゴ糖など多種多様な有用物質が含まれる。

我々の研究グループではバイオジェニクスの生活習慣病に対する予防効果を中心に生化学的レベルで明らかにすべく研究を進めてきた。腸内環境においては、多種多様の菌が互いの代謝物を共有し合い、さらには宿主との相互作用により一種の生態系を形成していると考えられている。ここにバイオジェニクスを投与し共存させることにより宿主の生理・病態に更なる好影響が期待できるのではないかと考えられる。そこで、健康人の腸内細菌叢を模倣し、大豆を栄養源として用い、有用な乳酸菌群を体外で共棲培養させ生成させた代謝物質の有効性を解析する“乳酸菌生産物質プロジェクト”を立ち上げた。すなわち、厳選された計21種の乳酸菌・ビフィズス菌を、国産有機大豆をまるごと使用した「大豆粉培地」で共棲培養する製法で製造した乳酸菌生産物質（バイオジェニクス）を

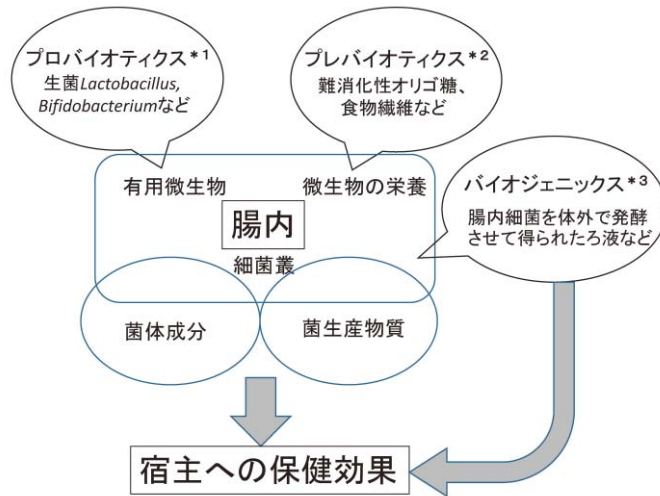


図1 腸内細菌叢の活用から見たプロバイオティクス、プレバイオティクス、バイオジェニックスの関係

- * 1 : 腸内微生物のバランスを改善することにより宿主に有益に働く生菌添加物
- * 2 : 主として腸内有用菌を増殖させる難消化性食品成分
- * 3 : 直接あるいは腸内細菌叢を介して生体調節機能を持つ食品成分

PS-B1 と命名し、以来実施してきた PS-B1 の有用性についての基礎研究および臨床研究から、がん細胞株増殖抑制作用、肝保全作用、肥満抑制と脂質代謝改善作用、アレルギー抑制作用、便性改善作用、および薄毛症状改善作用等についてエビデンスを蓄積してきた。本稿では、ヒト常在乳酸菌群が生産する代謝物質の有効生理活性の解析結果として、PS-B1 のがん細胞株増殖抑制作用、肝保全作用、および肥満抑制と脂質代謝改善作用について公表したエビデンスについて述べる。

1. 乳酸菌生産物質 PS-B1 の調製

乳酸菌生産物質 PS-B1 とは、大豆粉培地およびヒト由来の乳酸菌群をはじめとする21種の菌を用いて次のように調製したものである。

金沢産の無農薬有機栽培大豆を乾燥粉末化したものに水を加ペースト状にしたものを大豆粉培地とし、ホモジナイズ後グルコース、酵母エキス、脱脂粉乳、消泡剤を規定の量を添加し調製した。発酵は、*Lactobacillus* 属 (*acidophilus*, *casei*, *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *paracasei* subsp. *paracasei*, *delbrueckii*, *gasseri*, *brevis*,

helveticus, *plantarum*, *salivarius*, *rhamnosus*), *Bifidobacterium* 属 (*longum*, *bifidum*, *adolescentis*, *breve*, *longum* subsp. *infantis*), *Lactococcus* 属 (*lactis* subsp. *lactis*, *garvieae*), *Enterococcus* 属 (*faecalis*, *durans*, *faecium*) の21種の菌を個別に培養後、一定の菌数・組み合わせ・温度条件で3段階の複合(共棲)培養^{6,7)}により行い、得られた発酵ろ液を PS-B1 として調製した。本研究では、(株)バイオジェノミクス(長崎県大村市)において製造された PS-B1 の凍結乾燥標品を使用した。PS-B1 100mL から回収された凍結乾燥標品は 4.35g であった。なお、乳酸菌生産物質を含む発酵ろ液 PS-B1 は、安全性を確認の上すでに市販されている。また、本研究で使用した PS-B1 の前身であるビフィズス菌以外の乳酸菌 16種の菌を用い共棲培養により製造した PS-B1 製造法については、特許⁸⁾を取得している。

大豆の乳酸菌発酵物である PS-B1 には、大豆に含まれる成分およびこれらの成分が乳酸菌による代謝を受けて新たに産生された物質が含まれており、PS-B1 のメタボローム解析の結果では、500種類を超える化合物が認められている(図2)。

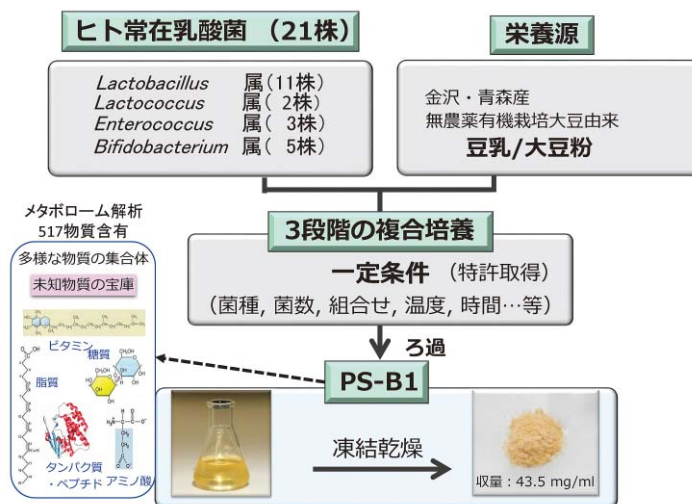


図2 豆乳/大豆粉の乳酸菌発酵物 PS-B1 の調製法概略

2. がん細胞増殖抑制作用

2.1 PS-B1 のがん細胞増殖抑制作用の特性

“乳酸菌生産物質プロジェクト”を開始した時点で、プロバイオティクスやプロバイオティクスによって生産される可溶性の物質に腫瘍由来の培養細胞に直接影響を与え、その発育を阻害する作用があることを示唆する報告がすでに公表されていた。すなわち、Baricault ら⁹⁾ は、発酵乳がヒト結腸がん由来培養細胞 HT-29 細胞の増殖を有意に阻害し、細胞の分化が誘導されたことを示唆する結果を報告した。また、Biffi ら¹⁰⁾ により、乳がん由来 MCF7 細胞の増殖阻害効果は菌体の存在の有無とは無関係であることが報告されていた。そこで、PS-B1 に含まれる多種多様な代謝物質の有用生理活性を調べる先駆け研究として、細胞の増殖に対する影響を調べた。PS-B1 は正常細胞（ヒト正常リンパ球）には特に有意な影響を及ぼさなかったが、6 種類のヒト由来浮遊系培養がん細胞株（前骨髄性白血病細胞 HL-60、組織性リンパ腫細胞 U-937、急性ミエロイド白血病細胞 KG-1、B 細胞白血病細胞 Ball-1、T リンパ性白血病細胞 Jurkat および MOLT-4）および固形がんであるヒト肝がん由来細胞株 HepG2 の増殖を濃度依存的に有意に抑制した。この結果は、PS-B1 が

正常細胞には悪影響を与えず、幅広くがん細胞に対してのみその増殖を抑制できる可能性を示唆し¹¹⁾、PS-B1 を抗がん食品として実用化していくうえで有用なエビデンスであると考えられた。

2.2 PS-B1 のがん細胞増殖抑制作用機構¹²⁾

がん細胞増殖抑制作用については、がん細胞のアポトーシスの誘導、細胞周期の異常（停止）の誘導、またがん細胞の持つ特有の解糖系酵素系の阻害などが考えられる。これらの点を考慮して PS-B1 のがん細胞増殖抑制作用を理解するために HL-60 細胞をモデルとしていくつかの実験を実施した。その中で、PS-B1 存在および非存在下培養した HL-60 細胞からそれぞれ抽出した DNA をアガロースゲル電気泳動により泳動パターンを比較した結果、PS-B1 を作用させた HL-60 細胞では、DNA の断片化（DNA ラダー）が顕著に検出された。DNA ラダーはアポトーシスの指標となることから、PS-B1 にがん細胞のアポトーシスを誘導する作用があることが強く示唆された。そこで、アポトーシス誘導のメカニズムを知るために、PS-B1 を作用させた HL-60 細胞における活性酸素種量の変化、ミトコンドリア膜電位の変化、およびカス

パーゼ活性の変化について調べた。

細胞内活性酸素種の増加がアポトーシス誘導の一つの要因であることが言われている。正常細胞および HL-60 細胞にそれぞれ PS-B1 を作用させ DCFH (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein) 法にて細胞内活性酸素種量を測定した結果、正常細胞においては PS-B1 の添加量に依存して細胞内活性酸素種産生量が減少したが、がん化した細胞である HL-60 細胞内の活性酸素種産生量は顕著に増加した。正常細胞とがん細胞で真逆の減少を示した本研究結果は、茶カテキン等のポリフェノール類の作用においても確認されている現象であるが、PS-B1 ががん細胞にのみ作用する根拠の一つになる知見となり得ることから、この点については今後の研究でさらに明らかにしたい。

次に、アポトーシス誘導の重要な要素の一つであるミトコンドリアの機能低下について調べた。ミトコンドリアの膜電位の状況を反映して異なる色の蛍光を発するプローブ色素 JC-1 は、ミトコンドリアが正常な状態ではミトコンドリアに侵入し赤色蛍光を発する。これに対して、アポトーシス条件下のミトコンドリアでは、膜電位の喪失が起これば JC-1 がミトコンドリアに侵入できず細胞質で凝集体を形成し緑色蛍光を発する。HL-60 細胞に PS-B1 を作用させた結果、正常細胞のミトコンドリアを反映する蛍光強度が濃度依存的に低下し、対して、膜電位の低下したアポトーシス状態のミトコンドリアを反映する蛍光強度が増大した。

さらに、PS-B1 を作用させた HL-60 細胞について、アポトーシスに関するシグナル伝達の上流で機能するイニシエーター・カスパーゼ-2、-8、-9 および下流で機能するエフェクター・カスパーゼ-3 の活性を測定した結果、いずれのカスパーゼ活性も増加することが明らかになった。

以上の結果から、PS-B1 を作用させた HL-60 細胞においては、細胞内活性酸素種が増加し、ミトコンドリアがそれに影響を受け膜電位の低下に基づき機能低下となり、さらに不活化した

ミトコンドリアからおそらくチトクロム c などのタンパク質が放出され、これが刺激となってカスパーゼ-3 が活性化され、結果として DNA の断片化を経て細胞死に至ると推察した。

2.3 がん細胞増殖抑制物質の部分精製

PS-B1 は、大豆発酵ろ液であることから、大豆成分の代謝物が数多く含まれている。予備実験からがん細胞増殖抑制物質は低分子物質であることを確認した¹³⁾。大豆成分中の低分子物質には、すでにごん細胞増殖抑制活性を有するものとしてイソフラボン類（ゲニステインやダイゼイン）が報告されていた¹⁴⁾。本研究では、がん細胞増殖抑制物質の精製を行うにあたって、まずポリフェノール代謝物に焦点を絞り精製を試みた。凍結乾燥した PS-B1 から常法に従い、メタノール抽出、続いてクロロホルム抽出した。このクロロホルム画分に PS-B1 が示す HL-60 細胞増殖抑制活性のほとんどが回収された。HL-60 細胞増殖抑制に対する IC₅₀ 値と比較すると、PS-B1 で 268 μg/ml であったのに対してクロロホルム画分では 0.64 μg/ml となりかなり高純度の標品を得ることができた。クロロホルム画分の HPLC 分析では、ゲニステイン、ダイゼインのリテンションタイムに相当するピークを含め複数のピークが見られた。今後、各ピークの活性および質量分析等詳細な分析を行い新規のがん細胞増殖抑制活性物質同定に至ることを期待している。

3. 肝保全作用

3.1 PS-B1 服用臨床試験

BMI (Body Mass Index) 25.0以上の「やや肥満」以上と判定された健康成人男性を対象として、PS-B1 服用臨床試験を実施した。毎日就寝30分前に 50ml の PS-B1 を 4 週間服用させた結果、AST、ALT、およびγ-GTP など肝機能状態を反映する臨床検査値が改善されることが判明し、PS-B1 の継続的服用が肝機能保全および改善に有効であることが示唆された¹⁵⁾。そこ

で、臨床試験の結果から示唆された点に言及するエビデンスを得るため以下の動物実験を行った。

3.2 肝炎モデル動物に対する PS-B1 の効果

ガラクトサミン肝炎モデルラットに対する PS-B1 投与の影響を血液中の肝逸脱酵素 (AST、ALT、LDH) 活性を指標に評価した。その結果、各酵素活性はガラクトサミン処理によって引き起こされる肝障害に伴って増大したが、PS-B1 を投与したラットにおいては酵素活性の増大が顕著に抑制された¹⁶⁾。

3.3 アルコール性肝障害に対する PS-B1 の効果

アルコール性肝障害モデルとして、分離調製したラット肝細胞および肝星細胞のそれぞれ一次培養細胞にエタノールを作用させた細胞培養系を構築した。これらに対する PS-B1 の添加実験を行った結果、PS-B1 には肝障害への第 1 段階となる肝細胞の変性・壊死を阻止する作用があることが判明した。さらに、肝障害への第 2 段階である肝星細胞によるコラーゲン産生 (線維化) 能を顕著に抑制することも判明した¹⁶⁾。なお、ラット肝臓におけるコラーゲン産生の抑制効果は、12 週間 PS-B1 摂取ラットと非摂取ラットの肝組織切片のコラーゲン染色像の比較から明らかであることを確認している。

3.4 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に対する PS-B1 の効果

肝障害としては、近年特に非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: nonalcoholic steatohepatitis) 患者の増加が注目されている。そこで、一定の高脂肪食摂取により NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) を発症し、NASH となる動物モデルである STAMTM マウス¹⁷⁾ における PS-B1 の効果の評価する実験を行った。雄性 STAMTM マウスに対して、高脂肪食のみを与えたものを NAFLD 対照群とし、PS-B1

を 3% または 5% 添加した高脂肪食を 4 週間摂取させた。その結果、PS-B1 高用量 (5%) 投与群では、対照群と比較して、肝臓重量、血漿中トリグリセリド値が低下する傾向にあることが判明し、肝臓の HE 染色による組織病理学的分析では、PS-B1 高用量群では、対照群と比較して、肝臓での脂肪滴の沈着が軽度であることが観察された。以上の結果から、PS-B1 摂取が対照群と比較して NAFLD activity score (NAS) の減少傾向を引き起こし、肝臓重量と肝臓/血漿トリグリセリドレベルの低下を伴い、PS-B1 の潜在的な抗脂肪症効果が示唆された¹⁸⁾。

4. 肥満抑制と脂質代謝改善作用

4.1 PS-B1 服用臨床試験

3.1 項の PS-B1 服用臨床試験において、PS-B1 の継続的服用が脂質代謝に関するパラメーターの改善に寄与し、特に中性脂肪、LDL-コレステロール、および HDL-コレステロールの数値を改善することを見出した¹⁵⁾。

4.2 PS-B1 による高脂肪食摂取マウスの肥満およびインスリン抵抗性の改善¹⁹⁾

3.4 項で述べた高脂肪食 (HF 食) 摂取 STAMTM マウスの実験から、PS-B1 が *in vivo* で抗脂肪症効果を示し非アルコール性脂肪性肝炎を予防することが示唆された。そこで、食生活の乱れ (過剰脂肪摂取) のモデルとして、高脂肪食を摂取させた野生型マウス (C57BL/6J) に対する PS-B1 の影響について精査した。10 週間にわたって、通常の食餌 (コントロール食)、高脂肪食 (HF 食)、または 4% PS-B1 を添加した高脂肪食 (HF-P 食) で飼育した。10 週間後、体重増加量、腸管および精巣上体の脂肪蓄積量、血清と肝臓の生化学的パラメーター、および肝臓における遺伝子発現量の変化を測定した。

HF 食摂取で顕著に誘導された体重増加と腸管および精巣上体脂肪蓄積の増加は HF-P 食を与えられたマウスで有意に抑制された。すなわ

ち、PS-B1 が HF-P マウスの HF 食によって誘導される肥満を予防したことが判明した。肝臓脂質（非エステル化脂肪酸、総コレステロール）、血清総コレステロールおよび血清グルコースは、コントロールマウスよりも HF マウスで有意に増加し、また、肝臓トリグリセリドおよび血清インスリンレベルは、コントロールマウスよりも HF マウスで増加する傾向が見られた。HF-P マウスの血清総コレステロールおよび血清グルコースレベルは、HF マウスと比較して変化は認められなかったが、一方、HF-P マウスにおける肝臓の脂質と血清インスリンのレベルは、HF マウスと比較して顕著に低下し、PS-B1 がこれらのパラメーターを HF-P マウスにおいて増加を抑制させたことが示唆された。言い換えると、PS-B1 には HF マウスで増加する肝臓の脂質と血清インスリンのレベルを抑制する作用があることを示唆する結果が得られた。

血清グルコースおよびインスリンレベルから計算されインスリン抵抗性の恒常性モデル評価として使用される HOMA-IR 値は、コントロールマウスで 2.24 ± 0.13 であったのに対して、HF マウスで 21.5 ± 4.2 と大きく上昇し、HF マウスでインスリン抵抗性が形成されたことが示唆された。これに対して HF-P マウスでの HOMA-IR 値は HF マウスの値と比較して大幅に増加が抑制され 8.2 ± 0.2 となった。この結果は、PS-B1 が継続的高脂肪食摂取に誘導されたインスリン抵抗性を改善することを強く示唆する知見であると考えられる。さらに、肝臓における脂質代謝関連酵素の発現量を定量的 RT-PCR により測定した結果、その中で、ステアロイル-CoA デサチュラーゼ-1 (*Scd1*) の発現レベルがコントロールマウスと比較して、HF マウスでは顕著に増加を示したが、PS-B1 を摂取させた HF-P マウスではその発現の増加を抑制することが判明した。言い換えると、PS-B1 には HF マウスで増加する SCD1 遺伝子の発現を抑制する作用があることが示唆された。

これらの結果から、高脂肪食摂取マウスに誘

導される肥満と脂肪蓄積増加に対する PS-B1 の改善作用の一部は、インスリン抵抗性の改善と *Scd1* の発現レベルの低下に基づくと推察された。ステアロイル-CoA デサチュラーゼ-1 がモノ不飽和脂肪酸合成の律速酵素であること、また同酵素遺伝子欠損マウスが肥満にならないことなどの報告²⁰⁾ もあることから、PS-B1 の脂質代謝改善作用点の一つとして *Scd1* 遺伝子発現レベルでの更なる解析が期待されることである。

4.3 脂肪細胞への脂肪滴蓄積に対する PS-B1 の影響

上記の動物実験で示された、HF 群における腸管および精巣上体脂肪蓄積の増加は脂肪細胞への脂肪滴蓄積を示唆する結果である。この点を細胞レベルで確認するためマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 に対する PS-B1 添加実験を行った。その結果、PS-B1 が脂肪細胞内への脂肪滴の蓄積を有意に抑制し脂肪細胞の肥大化を抑えるデータを得ている⁶⁾。

おわりに

我々の研究グループでは、バイオジェニックスとして位置付けている乳酸菌生産物質 PS-B1 のヒトの健康維持ひいては疾病予防に対する可能性について追及してきた。本稿では、生活習慣病に対する PS-B1 の有効性を細胞レベル、動物レベルおよび臨床レベルで得ることができ公表したエビデンスについて述べた。これらの有用作用のほかに、PS-B1 がマウスのアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー軽減作用⁶⁾、ヒト便性改善作用⁷⁾ およびマウス背毛発毛促進作用²¹⁾ 等に対しても一定の効果を示すことを明らかにし公表している。今後、PS-B1 に含まれる各作用に関連する活性因子の特定と特定された物質を用いた研究から PS-B1 の有用作用発現機構を詳細に解明したいと考えている。

謝 辞

本研究の多くは、文部科学省科学研究費補助金(21500810、24614020、26350171)により実施されたものである。また、本研究の遂行にあたり終始ご協力いただいた榊バイオジェノミクス社長本多英俊氏、九州女子大学名誉教授石橋源次先生、長崎国際大学薬学部生化学研究室のスタッフ並びに所属学生諸君に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 厚生労働省 (2013) 「国民の健康寿命が延伸する社会」に向けた予防・健康管理に関する取組の推進
- 2) Lynda Gratton and Andrew Scott (2016) 「ライフ・シフト—100年時代の人生戦略—」東洋経済新報社
- 3) Fuller R. (1989) “Probiotics in man and animals” *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365–378.
- 4) Gibson G. K. and Roberfroid M. B. (1995) “Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics” *J. Nutr.*, 125, 1401–1412.
- 5) 光岡知足 (1998) 腸内フローラとプロバイオティックス (光岡知足編), 学会出版センター, pp. 1–16.
- 6) Nodake Y., Miura R., Ryoya H., Momii R., Toda S., and Sakakibara R., (2016) “Improvement of lipid metabolism and ovalbumin-induced type I allergy by use of soybean milk fermented by 16 indigenous lactic acid bacteria,” *J. Food Nutr. Sci.*, 4, 113–119. doi: 10.11648/j.jfns.20160404.17.
- 7) Yamaguchi K., Matsumoto S., Fuchigami T., Tsuchida M., Honda H., and Sakakibara R. (2020) “Effect of PS-B1 (a fermented product cultured from soy flour using lactic acid bacteria) on defecation and skin condition,” *J. Integr. Stud. Diet. Habits.*, 30, 111–122.
- 8) 特許第5918290号「乳酸菌生産物質の製造方法及び乳酸菌生産物質並びにアレルギー性皮膚炎抑制剤及び全身性アレルギー反応抑制」(2016)
- 9) Baricault L., Denariar G., Houry J.-J., Bouley C., Sapin C., and Trugnan G. (1995) “Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation” *Carcinogenesis* 16, 245–252.
- 10) Biffi A., Coradini d., Larsen R., Riva A., and Di Fronzo, G. (1997) “Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line” *Nutr Cancer* 28, 93–99.
- 11) Nodake Y., Ogasawara M., Honda H., Fukasawa M., and Sakakibara R. (2008) “Characterization and preliminary purification of the anti-cancer substance (s) in the fermented products cultivated from soybean milk using lactic acid bacteria,” *Saito Ho-on kai Mus. Nat. Hist., Res. Bull.*, 73, 17–21.
- 12) Nodake Y., Fukasawa M., and Sakakibara R. (2012) “Growth inhibition action of lactic acid bacteria-metabolic products on human leukemia HL-60 cells” *Soy Protein Research, Japan* 15, 96–102.
- 13) 榊原隆三・石橋源次 監修 (2009) 「乳酸菌生産物質の可能性—乳酸菌生産物質 PS-H1 及び PS-B1 の機能特性に関する研究—」pp. 85–89. 権歌書房
- 14) Yagasaki K., Takabatake M. and Miura Y. (2003) “Effects of soybean isoflavones on the proliferation and invasion of hepatoma cells” *Soy Protein Research, Japan* 6, 122–127.
- 15) Nodake Y., Fukasawa M., Arakawa M., and Sakakibara R. (2011) “Effect of the fermented product cultivated from soybean milk using lactic acid bacteria, PS-B1, on liver function and lipid metabolism,” *J. Integr. Stud. Diet. Habits.*, 22, 13–19.
- 16) Nodake Y. (2012) “Bioactivities of human indigenous lactic acid bacteria-metabolic products.” *J. Integr. Stud. Diet. Habits.*, 23, 65–69.
- 17) Fujii, M., Shibasaki, Y., Wakamatsu, K. et al. (2013) “A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma.” *Med. Mol. Morphol.* 46, 141–152.
- 18) Fukasawa M., Nodake Y., Kawatsu R., Honda H., Yamaguchi K., and Sakakibara R. (2020) “Evaluation of fermented product, PS-B1, obtained from soybean milk using lactic acid bacteria in a Stelic Animal Model (STAM™) of nonalcoholic steatohepatitis - a preliminary study” *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 15, 45–51.

- 19) Yamaguchi K., Iwanaga-Suehiro M., Fujimoto K., Fukasawa M., and Sakakibara R. (2020) "Improvement in High-fat Diet-induced Obesity and Insulin Resistance upon Uptake of PS-B1, a Fermented Product Prepared from Soy Flour Using Lactic Acid Bacteria" *J. Food Nutr. Sci.* 8(4), 81-88.
- 20) Ntambi J. M., Miyazaki M., Stoehr J. P., Lan H., Kendziorski C. M., Yandell B. S., Song Y., Cohen P., Friedman J. M., and Attie A. D. (2002) "Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 11482-11486.
- 21) Sakakibara R., Kawatsu R., Honda H., Toda S., Yamaguchi K., and Nodake Y. (2019) "Effect of PS-B1 (a fermented product cultured from soybean milk using lactic acid bacteria) on hair growth in vivo. (1st report)" *J Jpn Hair Sci Assoc.*, 51, 147-154.