

두유의 유산균발효산물이 장내세균 및 대장암 발암에 미치는 영향

新 良一^{1*}、伊藤 幸恵¹、片岡 元行¹、原 宏佳²、大橋 雄二³
三浦 詩織¹、三浦 竜介¹、水谷 武夫¹、藤澤 倫彦³

株式会社 エイ・エル・エイ中央研究所、
日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科食品バイオテクノロジー教室、
日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科食品食品衛生学教室

Effect of Soybean Milk-Fermented Product on Intestinal Microbiota and Colon Carcinogenesis

Ryoichi SHIN^{1*}, Yukie ITOH¹, Motoyuki KATAOKA¹, Hiroyoshi HARA², Yuji OHASHI³,
Shiori MIURA¹, Ryosuke MIURA¹, Takeo MIZUTANI¹, and Tomohiko FUJISAWA³

^{1*}Central Institute For Health Science, A.L.A. Corporation,

²Laboratory of Food Biotechnology, School of Food Science and Technology,
Nippon Veterinary and Life Science University,

³Laboratory of Food Hygiene, School of Food Science and Technology, Nippon Veterinary and Life Science University

요약 두유의 발효산물이 숙주에게 미치는 영향을 검토한 보고서는 적지 않다. 이번에, 우리들은 두유의 유산균발효산물(SFP : Soybean milk-Fermented Product)가 사람의 장내세균총에 미치는 영향을 검토하고, 추가로 대장의 발암 예방과 그 작용기저에 대해서도 함께 검토했다. SFP 는 두유를 복수의 유산균과 효모로 혼합배양 후 살균, 동결건조해서 제조했다. 일반적인 일본식을 먹고 있는 지원자에게 SFP 를 섭취하게 하고(450mg/head/day for 14days), 장내세균총의 변화를 비교한 결과, SFP 군은 플라세보군보다 *Bifidobacterium* 의 점유율이 25%이상 증가한 사람 수가 많았다 ($P<0.05$). 게다가, 점심만을 일반적인 일본식에서 육식중심 서구식(육류 섭취량 300g, 900kcal)으로 3 일간 바꾸자, *Clostridium* 의 점유율은 증가했지만 ($P<0.05$), SFP 를 섭취(900mg/head/day) 하자 감소했다($P<0.05$). 또한, SFP 의 섭취로 *Bifidobacterium* 의 점유율이 증가했다.($P<0.05$). 이 지원자의 분변 속 β -glucuronidase 활성은, 점심을 육식중심의 서구식으로 하자 일반적인 일본식 섭취시보다 5 배이상 증가했지만($P<0.01$), SFP 섭취로 일반적인 일본식 때의 레벨까지 감소했다 ($P<0.05$). 이상의 결과는 SFP 가 대다수의 프리바이오틱스에서 나타나고 있는 대장암의 발암위험을 경감시킬 가능성을 시사하고 있다고 생각하며, 이하의 검토를 시도했다. 즉, SFP 가 대장암의 발암에 미치는 영향은 대장암 유도제 1,2-dimethylhydrazine(DMH)을 CF#1 마우스에 투여한 화학발암모델을 사용해서 검토했다. SFP 는 DMH 투여개시시부터 사료 안에 3%(W/W)혼합하여 제공했으며, 대장에 발암한 종루수를 검토한 결과, 유의미한 억제가 인정되었다($P<0.05$). 한편 SFP 의 항종양작용 기저는 Meth-A 종양이식모델로 검토했다. SFP(10mg/0.2ml/day/head)는 화학발암모델과 마찬가지로 Meth-A 종양이식전부터 실험기간중 투여하였고, 항종양효과가 나타난 비장세포를 사용한 Winn assay 로 그 작용기저를 검토했다. 그 결과, SFP 만은 이식 6 일째 이후에 Meth-A 단독이식군에 비해 유의미한 종양증식억제가 인정되었으며($P<0.05$), 종양마우스의 비장세포속에 항종양작용을 나타내는 면역세포군이 유도되었을 가능성을 생각할 수 있다. *Bifidobacterium* 을 정착시킨 노토바이오틱(무균)마우스는 무균마우스 보다 비장세포수가 증가했지만, 무균마우스에 SFP 나 두유(10mg/0.2ml/day/head)를 4 주간연속경구투여해도, 비장세포수는 생리식염액을 투여한 무균마우스와 차이가 인정되지 않았다. 이러한 것들로부터 SFP 의 항종양효과에는 장내세균이 숙주면역에 관여할 가능성을 시사하고 있지만, 그 상세한 기저에 대해서는 앞으로 검토가 필요하다.

Abstract A few studies have investigated the effect of fermented product of soybean milk on human health. This study evaluated the effects of soybean milk-fermented product(SFP) on the intestinal flora of humans, and colorectal carcinogenesis in animals. SFP was prepared by culturing soybean milk with lactic acid bacteria and yeast. The effect SFP(450mg/day) on human fecal flora was determined by comparing the changes in intestinal flora between human volunteers consuming SFP and those taking a placebo. The occupation rate of *Bifidobacterium* of

2013年6月24日受付 2013年10月30日受理

* 〒246-0002 神奈川県横浜市瀬谷区北町40-14
40-14 Kitamachi, Seya-ku, Yokohama, Kanagawa 246-0002,
Japan

more than 25% was greater in the SFP group (n=11) than in the placebo group (n=10, $P<0.05$). The occupation rate of *Clostridium* in fecal flora of the volunteers(n=5) increased after shifting from a traditional Japanese diet(TJD) to a Western diet (WD), in which a total daily amount of 300g of meat (900 kcal) was eaten once at lunch for 3 days ($P<0.05$). The occupation rate of *Clostridium* in the WD group was reduced by SFP ingestion (900 mg/day) to a level similar to that in the TJD group. Meanwhile, the occupation rate of *Bifidobacterium* was higher in the SFP ingestion group than in the WD group. β -Glucuronidase activity in the feces was up to 5 times higher when lunch was changed from TJD to WD, but this was recovered by SFP inclusion in the WD diet ($P<0.05$). The above findings suggest the possibility that SFP inhibits colon cancer carcinogenesis. To investigate this notion further, a colon cancer-inducing substance, 1,2-dimethylhydrazine (DMH), was given to CF#1 mice. SFP administration significantly decreased the incidence of colon cancer, compared to controls. We also examined the mechanism of SFP tumor suppression. A Winn assay was performed using spleen cells. SFP given for more than 6 days inhibited tumor growth compared to tumor cells inoculated with Meth-A alone ($P<0.05$). This result indicates the possible induction of anti-tumor immune cells in SFP-treated spleen cells. Furthermore, the number of spleen cells increased more in gnotobiotic BALB/c mice in association with *Bifidobacterium* than in saline-treated germ-free mice. The number of spleen cells in germ-free mice given SFP or soybean milk (10 mg/day and 0.2 ml/day, respectively) for 4 weeks was not significantly different compared to the saline-treated germ-free animals. Our results suggest that the suppressive effect of SFP on tumorigenesis was mediated by the involvement of the host immune response induced by intestinal bacteria. Further studies are required to clarify the mechanism of this phenomenon.

Key words : soybean milk ; fermented product ; lactic acid bacteria ; yeast ; colon carcinogenesis

사람의 소화기관에는 10^3 종 이상의 균종의 10^{14} 개 이상의 세균이 생식하고 있습니다(1-3). 이들 장내세균은 배양이 어려운 균이 많기 때문에, 숙주에 미치는 영향은 밝혀지지 않은 부분이 많다. Turnbaugh PJ 등은 비만마우스의 장내세균총을 이식한 무균마우스가 비만이 되었다며 장내세균총이 비만의 병태나 생리에 관여하고 있다는 것을 밝혀, 장내세균총은 숙주의 건강에 중요한 역할을 담당하고 있다는 것이 명백해지고있다(4).

최근, 이 장내세균총의 의의를 해명하기 위한 목적으로, European metagenomics of the human intestinal tract 이나 The US human microbiome project 가 조직되어, 숙주에게 미치는 장내세균총의 역할의 해명을 위한 연구가 추진되고 있다(1-3). 이미, 대다수의 프리바이오틱스나 프로바이오틱스는 장내세균총을 *Bifidobacterium* 우위로 유도한다는 것이 밝혀져있다(5-7). 한편, 두유를 케피어로 발효시킨 Fermented soybean milk(이하 FSM)은, 사람의 *Bifidobacterium* 을 증가시키고 *Clostridium* 을 감소시키며, 나아가 분변속 유화물도 감소시켜 장내환경을 개선한다고 밝혀져, 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 측면을 갖고 있다고 생각되고 있다(8).

이러한 장내환경개선을 나타내는 프리바이오틱스나 프로바이오틱스는, 면역부활, 감염방어, 염증제어

등을 유도한다는 것도 밝혀졌다(9-11). Verghese 등은 난소화성 섬유인 프리바이오틱스의 이눌린이 대장암의 위험저하(12), Bassaganya-Riera 등은 *Lactobacillus casei*, *L. Plantarum*, *Bifidobacterium infantis* 등 8 종의 프로바이오틱스가 대장암의 발병억제작용을 나타낸다고 보고하고 있다(13).

한편, 두유를 사용한 발효산물의 항종양작용은, *Bifidobacterium breve* 발효산물 속 이소플라본이 유방암세포의 에스트로젠 리셉터(ER)에 작용하여 증식억제작용(14), *Lactobacillus helveticus* 와 *Enterococcus faecium* 발효산물이 숙주면역능 활성화에 의해 ER 음성마우스 유방암 세포의 증식억제효과를 시사한 보고는 있었으나(15), 대장암에 미치는 영향을 검토한 보고는 없다.

이번에, 간과 신장의 기능개선작용을 나타내는 두유의 유산발효산물 Soybean milk-fermented product(이하 SFP)가(16) 사람의 장내환경의 개선작용에 미치는 영향을 조사하고, 그 결과 예측되는 대장암 발병에 미치는 영향과 그 작용기저를 검토한 결과, 흥미로운 결과를 얻을 수 있었기에 보고한다.

재료와 방법

1. SFP의 조제

SFP 는 Shin 들의 방법에 준하여 조제했다(16). 즉 SFP 는 가열살균한(115℃ 15 분) 두유에 *Lactobacillus plantarum* ALAL006 주, *L. casei* ALAL003 주, *L. reuteri* ALAL013 주, *Lactococcus lactis* ALAL014 주, *Saccharomyces cerevisiae* ALAY001 주를 접종하여, 37℃ 4 일간 배양 후 98℃, 30 분 가열 멸균후 동결 건조했다. 두유도 SFP 와 마찬가지로 살균 처리를 실시하고 동결 건조 했다. SFP 의 영양 성분은 단백질 51.2%, 지질 20.0%, 회분 9.3%, 당질 16.3%, 식이섬유 2.3%이며, 유기산 19.3%, 사포닌 1.7%, 이소플라본 0.2%를 함유한다.

2. 사람 시험

일반적 일본식(日本食: 일본식 보통 식사)을 섭취하고 있는 20~26 세의 지원자 11 명(남 7 명, 여 4 명)에게 SFP 450mg/head/day, 10 명(남 7 명, 여 3 명)에게 SFP 와 동량의 플라세보(덱스트린)을 14 일간 연속해서 섭취하도록 하여, 섭취전과 섭취후 마지막날에 분변속의 장내세균총을 검색했다. 장내세균총의 검색은 세균의 구성의 차이를 간편하게 조사할 수 있는 방법으로서 널리 사용되고 있는 16S rDNA 부분염기배열의 T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism)법 (테크노스르가 라보 주식회사: 시즈오카현 시미즈시静岡縣清水市)를 사용해서 점유율을 분석했다(17-19). 즉, 장내세균의 DNA 를 추출하여, PCR 로 16sDNA 를 증폭후 제한효소처리를 하여, DNA 시퀀서로 프래그먼트를 분석해서 각각의 장내세균의 점유율을 산출했다. 나아가, 장내세균의 변화는 Nagashima 의 방법(18)에 따라 개개의 지원자의 점유율의 변화량 [(섭취후의 점유율 / 섭취전의 점유율-1)x100]을 산출, 25%이상 증감한 지원자를 ‘증가’, ‘감소’, 25%이내를 ‘변화없음’의 3 단계로 나눠, 이번 지원자수로 비교했다.

다음으로, 일반적 일본식을 섭취하고 있는 20~40 대 지원자 5 명(남 3 명, 여 2 명)의 분변속의 장내세균총을 검출하여, 점심만 육식중심의 서구식(육식섭취량 약 300g, 900kcal)을 3 일간 섭취시켰다. 그 후 3 주간 일반적 일본식으로 되돌려 서구식의 영향을 배제하고, 다시 점심만 육식중심의 서구식을 섭취시켜, SFP(900mg/head/day)을 식후 30 분 이내에 섭취시켰다. 각각의 분변 속의

장내세균총은 음식의 소화관내 이동시간을 고려하여, 육식중심의 서구식 및 SFP 섭취 최종일의 다다음날에 검색했다. 또한, 분변 속 β -glucuronidase 활성은 장내세균총을 검색할 때의 분변검체를 사용했다(20). β -glucuronidase 활성은 Reddy 들(21,22)의 방법에 따라, phenolphthalein glucuronide (Sigma-Aldrich chemical company, Inc, USA Milwaukee)를 기질로 측정했다.

또한, 지원자는 발효식품과 장내세균총에 영향을 미치는 의약품의 섭취를 금지했다. 사람을 이용한 시험은 주식회사 ALA ‘인간윤리위원회 규정’에 따라 실시했다.

3. 실험동물

이화학연구소(理化学研究所)에서 번식한 5 주령의 수컷 CF #1 마우스(이화학연구소: 사이타마켄 와코시埼玉県和光市), 5 주령의 암컷 BALB/c 마우스(일본 찰즈리바; 카나가와켄 요코하마시) 및 자가번식한 5 주령의 암컷 무균 BALB/c 마우스(주식회사 ALA 중앙 연구소; 카나가와켄 요코하마시)를 사용했다.

CF#1 마우스는 MF 사료(오리엔탈 효모공업 주식회사 ;도쿄도 이타바시쿠), BALB/c 마우스는 AIN93M 사료(오리엔탈 효모공업주식회사;도쿄도 이타바시쿠), 무균 BALB/c 마우스는 멸균 AIN93M 사료를 자유섭취시켰다. 음료수는 CF#1 마우스와 BALB/c 마우스에게는 수도물을, 무균 BALB/c 마우스에게는 멸균 수도물을 자유섭취시켰다. 실험동물은 온도 23±1℃, 온도 50±5%, 명암 각각 12 시간으로 사육하여, 1 주일간의 순화 사육후, 실험에 제공했다. CF#1 을 사용한 이화학연구소에서의 동물실험은 ‘동물실험실시규정’, 그 외의 동물실험은 ‘주식회사 ALA 중앙연구소 실험동물 윤리규정’에 따라 실시했다.

4. 화학발암 모델

대장암은 CF#1 마우스에 Mizutani 들의 방법에 준해서 1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH ; Sigma-Aldrich chemical company, Inc, USA Milwaukee) 20mg/kg 를 5 주령부터 7 일 간격으로 10 회 복강내 투여해서 유발했다(23). SFP 군, 두유군 및 대조군으로 각각 21 마리의 마우스를 할당했다. SFP 군과 두유군에는 MF 사료에

Table 1. Effect of soybean milk-fermented product (SFP) on fecal bacterial occupation rate and incidence of volunteers fed traditional Japanese diet in 2 groups ^a

Bacteria	Placebo group (n=10)					SFP group (450 mg/day, n=11)					P value
	Occupation rate (%)		Incidence of volunteers ^b			Occupation rate (%)		Incidence of volunteers			
	Before	After	Inc ^c	Dec ^d	NC ^e	Before	After	Inc	Dec	NC	
<i>Bifidobacterium</i>	6.5 ± 7.9	5.4 ± 7.1	1	5	4	10.9 ± 7.5	12.2 ± 9.2	7	2	2	0.041*
<i>Lactobacillales</i>	3.8 ± 5.1	6.5 ± 7.2	5	2	3	5.7 ± 6.6	4.5 ± 3.1	3	4	4	0.454
<i>Bacteroides</i>	33.0 ± 17.0	27.2 ± 16.1	2	4	4	28.1 ± 14.7	29.1 ± 15.4	4	3	4	0.627
<i>Prevotera</i>	7.7 ± 11.9	11.1 ± 14.7	2	0	8	13.1 ± 15.5	12.6 ± 16.3	1	3	7	0.626
<i>Clostridium</i> ^f	37.0 ± 10.9	39.1 ± 11.5	4	2	4	27.8 ± 12.0	27.7 ± 9.6	3	3	5	0.678
Others	12.0 ± 7.8	10.7 ± 6.2	1	2	7	14.4 ± 9.6	14.0 ± 6.9	4	3	4	0.113

^a The occupation rate of fecal bacteria was analyzed by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) method. Values are expressed as mean ± S.D. of occupation rate of fecal microflora (%). ^b Number. ^c Inc: 25% or more relative rate [(Occupation rate after treatment / occupation rate before treatment-1) × 100]. ^d Dec: 25% or less relative rate. ^e NC: No Change. ^f The total value of cluster (IV, XI, XVIII) and subcluster (XIVa). *P<0.05, placebo vs. SFP group at number of volunteers' distribution (Mann-Whitney's U test).

SFP 혹은 두유를 3%(W/W) 첨가해서 섭취시켰다. 대조군은 MF 사료만 섭취시켰다. DMH 최종 투여후 25 주째에 탄산가스로 안락사시켜, 대장을 적출해 종루수를 계측했다.

5. Meth-A 종양이식 모델

SFP 군, 두유군 및 대조군은 각각 6 마리의 BALB/c 마우스를 할당했다. SFP 군과 두유군은 각각 10mg/0.2mL/head/day 를, 대조군은 생리식염액 0.2mL/head/day 를 3 주간 연속해서 준데로 경구투여하여, 그 다음날 Meth-A 종양 1x10⁶cells 를 마우스의 경부피하에 이식했다. 그 후, 각각 투여검체는 격일로 준대를 사용해 경구투여를 계속했다. 종양증식 추이는 노기스로 종양의 가로·세로를 계측하여, 그 면적의 평방근으로 평가했다. 토호쿠대학 세포센터에서 제공한 Meth-A 종양을 사용했다.

6. 숙주면역능의 평가(Winn assay)

숙주의 항종양면역능은 Winn assay 를 이용해서 평가했다(24). 즉, Meth-A 종양이식후 8 일째의 SFP 군, 두유군 및 대조군 각각 6 마리의 BALB/c 마우스의 비장세포 1x10⁷cells 와 Meth-A 종양 1x10⁶cells 를 혼합하여(Effector to target ratio=10:1), 각각 새로운 6 마리의 BALB/c 마우스의 마우스 경부 피하에 이식해서 종양 증식 추이의 일일 변화를 검토했다. SFP 군, 두유군 및 대조군의 항종양 작용은 Meth-A 종양 단독 이식군의 종양 증식 추이와 비교했다.

7. 무균동물 모델

무균 BALB/c 마우스는 SFP 군, 두유군, 및 음성대조군으로 각각 5 마리의 마우스, 양성대조군의 *Bifidobacterium longum subsp. Longum* JCM1217(Microbe Division, RIKEN BioResource Center)을 정착시킬 노트바이오틱 마우스 (gnotobiotic)에는 7 마리의 마우스를 할당했다.

SFP 군과 두유군에는 각각 10mg/0.2mL/head/day 를, 음성 대조군과 양성 대조군에는 멸균생리식염액 0.2ml/head/day 를 Meth-A 종양이식모델의 투여기간에 맞춰서 4 주간 연일 준데로 경구투여했다. 모든 투여액은 무균체크를 실시하였고, 음성을 확인하여 사용했다. 투여최종일, 마우스를 CO₂ 가스로 안락사시켜, 비장의 세포수를 계측하고 체중비로 산출했다.

8. 통계해석

사람 시험의 플라세보와 SFP 의 두 군 간의 비교에는 Mann-Whitney 의 U 검정을, SFP 섭취전후의 비교에는 대응이 있는 t 검정을 사용했다. 또한, 동물 모델 시험의 다군간의 비교는 일원배치분산분석 후, Tukey 또는 Dunnett 의 다중비교검정을 했다. 나아가, 통계적 유의수준은 5%미만으로 했다.

Table 2. Effect of soybean milk-fermented product (SFP) on fecal bacterial composition in 5 volunteers fed western diet mainly meat meals^a

Bacteria	TJD ^b	WD ^c	WD + SFP (900 mg/day)
<i>Bifidobacterium</i>	3.2 ± 2.1	5.4 ± 5.3	12.8 ± 10.1 ^{**e}
<i>Lactobacillales</i>	2.0 ± 1.8	2.3 ± 2.2	2.0 ± 2.2
<i>Bacteroides</i>	32.3 ± 15.1	28.0 ± 8.6	19.8 ± 7.7 ^{**e}
<i>Prevotella</i>	18.2 ± 12.9	12.1 ± 11.3	18.4 ± 15.6
<i>Clostridium</i> ^d	31.8 ± 7.1	41.1 ± 8.9 ^{**f}	29.7 ± 11.4 ^{**g}
others	12.6 ± 5.6	11.2 ± 4.4	17.4 ± 6.4

^a The composition of fecal bacteria was analyzed by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) method. Values are expressed as mean ± S.D. of composition of fecal microflora (%). ^b TJD, traditional Japanese diet. ^c WD, Western diet mainly meat meal (approximately, a total amount of meat ingestion 300 g, 900 kcal) at the only lunch for 3 days. ^d The total value of cluster (IV, XI, XVIII) and subcluster (XIVa). ^e **P*<0.05, significantly different from the value of WD (Two-sided paired *t* test). ^f **P*<0.01, significantly different from the value of TJD (Two-sided paired *t* test). ^g **P*<0.05, significantly different from the value of WD (Two-sided paired *t* test).

성적

1. SFP 섭취가 인간장내세균총과 분변내 β-glucuronidase 활성에 미치는 영향

일반적인 일본식에 SFP 를 먹인 전후의 장내세균총과 그 변화를 Table1 에 표시했다. SFP 군의 *Bifidobacterium* 점유율은 투여전후에 차이가 인정되지 않았으나, 점유율의 변화량이 25%이상 증감한 지원자의 수에서 비교해본 결과 *Bifidobacterium* 이 증가한 사람수는 SFP 군이 플라세보군 보다 많았다 (*P*<0.05).

일반적인 일본식, 육식중심의 서구식 그리고 육식중심의 서구식에 SFP 를 섭취한 식사 각각 장내세균총의 변화를 Table2 에 나타냈다.

일반적인 일본식을 할 때의 *Bifidobacterium* 의 점유율은 3.2±2.1%로, 점심을 육식중심의 서구식을 섭취해도 5.4±5.3%로 변화가 인정되지 않았지만, 이후 SFP 를 섭취시키자 12.8±10.1%로 유의미하게 증가했다(*P*<0.05).

일반적인 일본식 섭취시 *Clostridium* 점유율은 31.8±7.9%로, 점심을 육식중심의 서구식으로 하자 41.1±8.9%로 증가하였고(*P*<0.05), 이후 SFP 를 섭취시키자 일반적인 일본식과 동등한

레벨까지 감소했다 (*P*<0.05). 일반적인 일본식 섭취시의 *Bacteroides* 점유율 32.3±15.1%은 점심을 육식중심의 서구식으로 해도 28.0 ±8.6%와 차이를 인정할 수 없었지만, 이후 SFP 를 섭취시키자 19.8%±7.7%로 감소했다 (*P*<0.05).

일반적인 일본식 섭취시, 점심을 육식중심의 서구식 및 SFP 섭취시의 분변 속의 β-glucuronidase 활성 결과를 Fig.1 에 나타냈다.

β-glucuronidase 활성은, 점심을 육식중심의 서구식으로 하자 일반적인 일본식 섭취시의 5 배 이상 증가했지만(*P*<0.01).이후 SFP 를 섭취시키자 일반적인 일본식과 동등한 레벨까지 감소했다.(*P*<0.05).

2. SFP 투여가 DMH 발 대장암에 미치는 영향

대장암 발병 종루수의 결과는 Fig.2 에 나타냈다. 병리조직학적 검사 결과, 대장에 발병된 종양은 모두 선암이었다(Data not shown). SFP 군의 종루수는 2.4±1.2 개/head 로 대조군 4.3±2.3 개/head, 두유군 4.3±2.7 개/head 보다 유의미 하게 적었다(*P*<0.05).

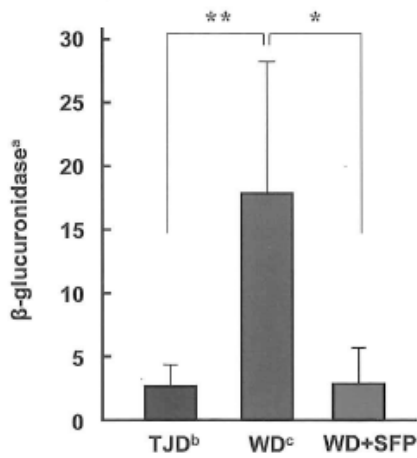


Fig. 1. Effect of soybean milk-fermented product (SFP, 900 mg/day) on the fecal β -glucuronidase in 5 volunteers fed high meat meals. ^a Phenolphthalein liberated $\mu\text{g} / \text{hr}/\text{mg}$ of feces. ^b TJD: traditional Japanese diet. ^c WD: western diet (mainly meat meal, approximately, a total amount of meat ingestion 300 g, 900 kcal) at the only lunch for 3 days. Values are expressed as mean \pm S.D. * $P < 0.05$, Significantly different from the value of WD (Two-sided paired t test). ** $P < 0.01$, Significantly different from the value of TJD (Two-sided paired t test).

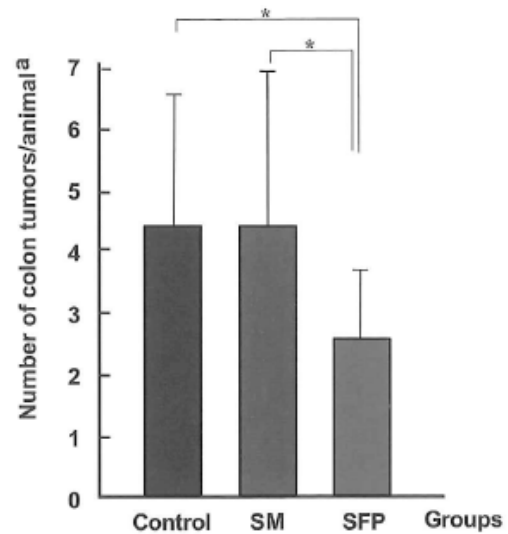


Fig. 2. Inhibitory effects of soybean milk-fermented product (SFP) on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon tumors in male CF#1 mice. Values are expressed as mean \pm S.D. (n=21). SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. ^a The number of colon tumor nodules at 25 weeks after the last DMH injection. * $P < 0.05$, Significantly different from the value of control or SM (Tukey's test).

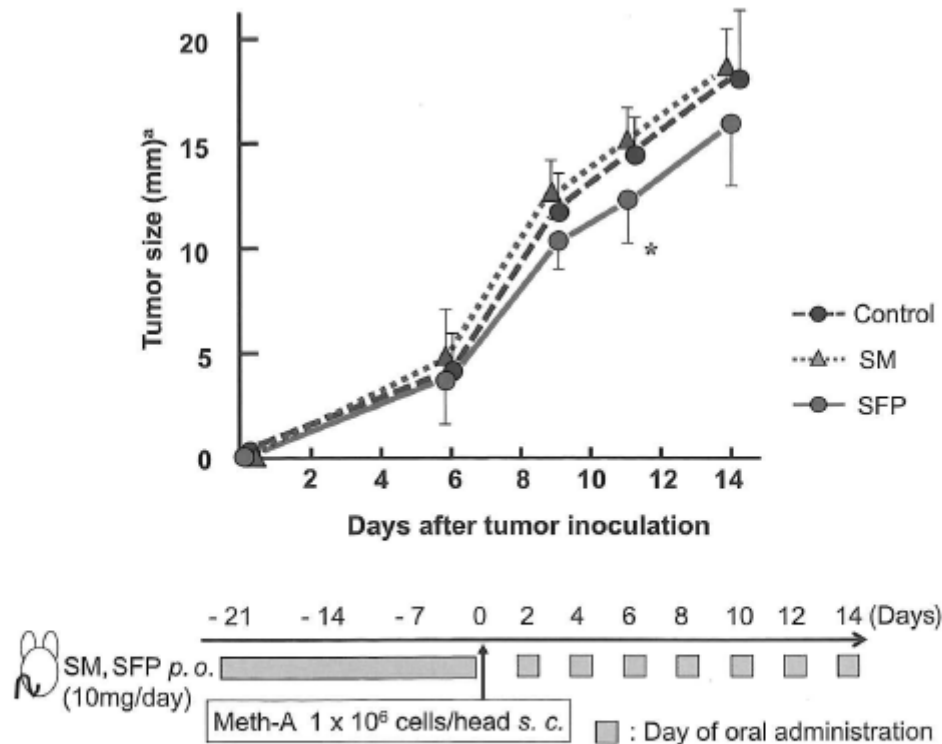


Fig. 3. Growth inhibition of Meth-A tumor by oral administration of soybean milk-fermented product (SFP) in BALB/c mice. Values are expressed as mean \pm S.D. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. ^a Tumor size was calculated by square root of the value of major axis \times minor axis (mm). * $P < 0.05$, Significantly different from the value of control (Dunnnett's test).

3. SFP 투여가 Meth-A 종양의 증식에 미치는 영향

SFP 는 화학발암 모델에 맞춰 Meth-A 종양이식전부터 시험기간중에 투여하여, 이식한 Meth-A 종양의 증식추이는 Fig.3 과 같다. SFP 군은 종양이식 11 일째에 대조군 보다 유의하게 종양증식이 억제되었다($P<0.05$). 두유군의 종양증식은 대조군과 차이가 인정되지 않았다.

4. SFP 투여에 의한 항종양작용기저(Winn assay)

SFP 군, 두유군, 대조군 및 Meth-A 종양 단독 이식군의 종양 증식 추이는 Fig.4와 같다(Winn assay)

SFP 군의 비장세포는 Meth-A 종양의 증식을 이식 6 일후 Meth-A 단독이식군 보다 유의하게 억제되었다($P<0.05$). 두유군과 대조군의 종양 증식은 Meth-A 단독이식군과 차이가 인정되지 않았다.

5. SFP 투여에 의한 무균마우스의 비장세포수

SFP 군, 두유군, 음성대조군 및 양성대조군 각각의 비장세포수를 Fig.5 와 같다. SFP 군의 비장세포수는 두유군, 음성대조군간에 차이가 인정되지 않았다. 한편, 양성대조군의 비장세포수는 SFP 군, 두유군 및 음성대조군의 그것보다 많았다 ($P<0.05$).

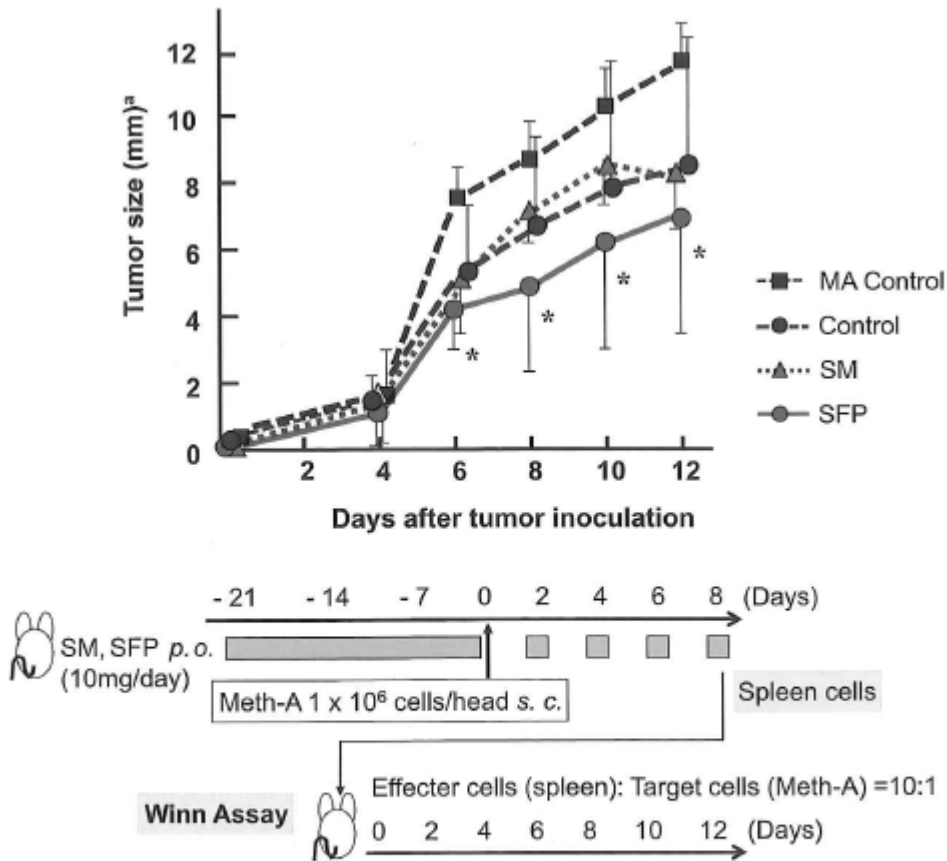


Fig. 4. Growth inhibition of Meth-A tumor by oral administration of soybean milk-fermented product (SFP) in BALB/c mice (Winn assay). Values are expressed as mean ± S.D, MA control: Meth-A tumor alone. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. ^a Tumor size was calculated by square root of the value of major axis × minor axis (mm). * $P<0.05$, Significantly different from the value of control (Dunnett's test).

고 찰

장내세균은 숙주의 건강에 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다(1-4). 또한 장내에서 *Bifidobacterium* 이 증가하면 정상작용이나 면역부활작용 등 건강에 유용한 작용을 기대할 수 있다고 생각되며, 프리바이오틱스나 프로바이오틱스는 장내 *Bifidobacterium* 우위를 점하게 하여 건강에 이바지하려는 목적으로 널리 사용되고 있다(5,6,25). 두유를 발효시킨 FSM 은 프리바이오틱스나 프로바이오틱스 양쪽의 측면을 갖고 있으며, 장내세균총을 *Bifidobacterium* 우위로 유도한다는 것이 밝혀져있다.(8).

이번에, 두유를 유산균으로 발효시킨 후, 가열처리해서 조제한 SFP 를 일반적인 일본식을 섭취하고 있는 지원자에게 2 주간 섭취하게 하여, 장내세균총에 미치는 영향을 검토했다. SFP 의 섭취량은, FSM 의 장내세균총에 미치는 최소 유효 투여량은 밝혀지지 않았으나(8), 그 약 1/10 량을 사용해서 검토한 결과, *Bifidobacterium* 의 점유율 변화량이 25%이상 증가한 인원수는 SFP 군이 플라세보군 보다 많았다는 점으로 부터, SFP 는 대다수의 프리바이오틱스나 프로바이오틱스와 마찬가지로 *Bifidobacterium* 을 증가시키는 작용이 있다고 생각된다(5,6,8).

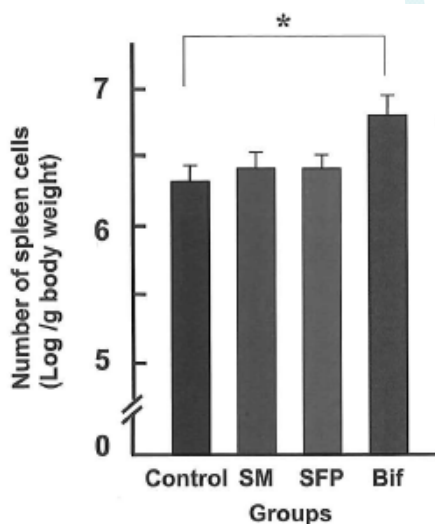


Fig. 5. Effects of soybean milk-fermented product (SFP) on number of spleen cells in BALB/c germ free mice. Values are expressed as mean \pm S.D. SM: soybean milk control. SFP: soybean milk-fermented product. Bif: gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strain as a positive control. * $P < 0.05$, Significantly different from the value of control (Dunnnett's test).

그러나, 본검토에서는, SFP 의 투여량이 적었기 때문인지 *Clostridium* 의 변화는 인정되지 않았으며, Inoguchi 들의 FSM 의 결과와 달랐다. 두유의 발효에 사용한 균종의 차이가 영향을 미쳤을 가능성도 부정할 수 없다. 한편, 장내세균총은 식사에 영향을 받는다고 알려져 있으며, 육식중심의 서구식을 섭취했을 때의 장내세균총은 일반적인 일본식을 섭취했을 때의 그것과 다르며 대장암의 위험요인이 될 가능성이 지적되고있다(9,13,25-28).

우리들의 검토결과에서는, 육식중심의 서구식의 *Bifidobacterium* 는 일반적인 일본식과 비교시 차이가 보이지 않았지만, 이전 시험에서 양을 배로 했던 SFP 섭취에서는 증가가 인정되어, 대다수의 프리바이오틱스나 프로바이오틱스와 동등한 결과를 얻을 수 있었다(5,6). SFP 에 함유되어 있는 두유올리고사카이드, 라피노스나 스타키오스 등을 자원화해서 *Bifidobacterium* 이 증식되었을 가능성을 생각할 수 있지만(8,15), 두유균은 Inoguchi 들의 두유균과 마찬가지로 유의미한 증가가 인정되지 않았다(8). 이 기저는 앞으로의 검토 과제이다.

또한 유해균이라 생각되는 *Clostridium* 은 일반적인 일본식보다 서구식에서 많다고 알려져있는데(28,29), 우리들의 검토에서도 육식중심의 서구식을 섭취했을 때 증가하였고, 이후 SFP 를 섭취시키자 일반적인 일본식 레벨까지 감소했다. 이상의 장내세균총의 변화는 FSM 을 먹인 Inoguchi 들(8), 다른 프리바이오틱스나 프로바이오틱스의 결과와 같은 경향이었다(5,6). *Bacteroides* 는 SFP 를 섭취시키자 일반적인 일본식을 섭취했을 때 보다 감소했으나, 이 의미는 명확하지 않다.

임상에 있어, 분변 속의 β -glucuronidase 활성은 대장암 환자가 건강인 보다 높다고 알려져 있으며, β -glucuronidase 활성은 대장암 발병의 바이오마커의 하나로 생각되고 있다(9,30,31). 우리들의 검토결과에서는 β -glucuronidase 활성은 육식중심의 서구식을 섭취했을 때 현저하게 상승하였고, 이 후 SFP 를 섭취하자 일반적 일본식을 섭취한 레벨까지 감소했다. 이 추이는 β -glucuronidase 활성을 갖고 있는 균종이라 생각되는 *Clostridium* 의 변화와 일치하며(9), 대장암환자에게 *Clostridium* 이

많다는 것과 함께 고려 했을 때(32) *Clostridium* 의 성쇠와 상관되는 β -glucuronidase 활성이 대장암 발암에 중요한 역할을 담당하고 있다고 생각된다. 또한 SFP 섭취시에 증가한 *Bifidobacterium* 은 *Clostridium* 억제에 관여하며(33), 나아가서 β -glucuronidase 활성 저하로 이끌 가능성을 추측할 수 있다.

이상으로 나타난 SFP 의 장내환경개선작용은, 대다수의 프리바이오틱스나 프로바이오틱스에서의 보고(25)나, 폴립 절제 환자 및 대장암 환자에게 심바이오틱스(*Bifidobacterium laticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, 와 oligofructose 함유)를 투여하자, 장내세균총은 *Bifidobacterium* 우위 *Clostridium* 억제 상태가 되어(34), 소화관내의 2 차 담즙산 등의 대장암 발암인자가 감소하여, 대장암을 억제할 가능성을 명확히 한 보고와 일치하며(25,37), SFP 는 대장암 발암 위험을 경감시킬 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

그러나, 두유의 발효산물의 항종양작용은 유방암에서 보고되고 있으나(14,15), 대장암 발병에 미치는 영향은 검토되지 않았었다. 이에, 프리바이오틱스나 프로바이오틱스에서 많이 사용되고 있는 대장의 화학발암 모델을 사용해서 SFP 가 대장암 발병에 미치는 영향을 검토했다(35,36). 그 결과 SFP 군의 암의 종루수는 대조군 보다 적다는 것이 관찰되었다.

두유군은 대조군과 차이가 인정되지 않았기 때문에, SFP 의 항종양작용에 관여한 물질은 유산균발효과정에서 생산되는 물질의 가능성을 추정할 수 있다. Ohta 들은 두유속에 함유되어 있는 이소플라본 배당체 등이 발효과정에서 이소플라본 아그리콘 등으로 변환되어, 유방암 세포의 에스트로겐 리셉터에 작용해서 항종양작용을 나타낸다고 보고하고 있다(14). 사람의 대장암의 약 50%에는 에스트로겐 리셉터가 발현되고 있기 때문에(37), 이소플라본 아그리콘이 항종양작용을 나타낼 가능성도 있다고 생각되나 명확하지 않다. 항종양작용을 나타낸 발효유래 물질에 대해서는 추가 검토가 필요하다.

한편, 프리바이오틱스나 프로바이오틱스는, 숙주 면역능을 부활시키고 항종양 작용을 유도한다고

알려져있다 (2,9,10,13,25). 또한, Kinouchi 들은 대두발효산물이 숙주 면역을 부활시켜 에스트로겐 리셉터를 갖고 있지 않은 유방암의 *in vivo* 증식을 억제한다는 것을 밝히고 있다(15). 그러나, 이 면역부활 작용은 *in vitro* 에서 사이토카인의 유도능을 나타낸 것으로, *in vivo* 의 항종양작용 기저는 검토되고 있지 않다. 그래서 SFP 의 면역부활에 의한 항종양작용에 주목해서 기저를 검토를 했다. 우리들의 Meth-A 종양이식모델을 이용한 검토결과에서는 SFP 군에서 종양증식억제 작용은 인정되었지만, 두유군에서는 그것이 확인되지 않으며, 대장암의 화학 발암 모델과 동등한 결과를 얻을 수 있었다.

다음으로, SFP 에 의한 항종양작용기저 해명을 목적으로, 항종양 작용이 인정된 시기의 비장세포를 Meth-A 종양과 혼합하여 Winn assay 를 진행했다(24). 그 결과, SFP 군에서만 Meth-A 단독이식군에 비해 종양 증식억제 작용이 인정되었으며, 두유군과 대조군 보다도 종양증식 억제 경향이 보였고, 적어도 SFP 는 종양마우스의 비장세포 속의 Meth-A 세포를 상해하는 면역세포군을 유도하는 작용이 있다고 생각된다.

인터페론 γ (INF- γ)는 면역담당세포의 항종양작용 발현에 중요한 사이토카인으로 알려져있으나(24,25), Kinouchi 들은 두유발효산물을 투여한 마우스의 비장세포는 두유나 대조군의 그것보다 많은 INF- γ 를 생산한다는 것을 확인하였고, 면역부활작용이 있다고 밝히고 있으며, Winn assay 의 결과도 SFP 투여로 비장세포가 INF- γ 를 생산하며, Meth-A 세포를 상해하는 활성화된 마크로퍼지, NK 세포 및 세포 상해성 T 세포 등을 유도할 가능성이 있다고 생각된다(24).

우리들의 Meth-A 종양이식모델의 결과는 Kinouchi 들의 보고와 일치하며(15), 다른 장소의 종양에도 숙주면역부활작용(15)에 의한 항종양작용을 나타낼 가능성을 시사하는 흥미 깊은 결과이다.

SFP 가 숙주면역능에 미치는 영향을 더 검토했다. 즉, 프리바이오틱스나 프로바이오틱스가 숙주면역에 미치는 영향은, 각각 투여개체,

장내세균총의 변화에 의존한다고 생각되며(10), SFP 섭취로 증가한 *Bifidobacterium* 은 사람의 숙주 면역을 변화시킨다고 보고되고 있으며, *Bifidobacterium* 을 정착시킨 노토바이오틱(무균) 마우스에서는, 자연면역능 뿐만 아니라 획득면역도 변화시킨다고 알려져있다(2,38).

본 검토에서도 생리식염액을 투여한 무균 마우스보다 *Bifidobacterium* 의 자극에 의해 면역세포가 증식하여, 항원 자극의 입구이자 자연면역을 지휘하는 장관막 림프절(Gut associated lymphoid tissue 에 포함된다)가 무거워지고 (Data not shown), 획득면역을 지휘하는 비장세포수(39)도 증가를 확인할 수 있었다.

그러나 SFP 군과 두유군은, 무균 BALB/c 마우스에 4 주간에 걸쳐 연일 경구투여해서 확인해본 결과, 장관막 림프절의 중량(Data not shown)과 비장세포수는 생리식염액을 투여한 무균마우스군 (음성대조군)과 차이가 인정되지 않았으며, 숙주면역에 미치는 영향은 장내세균에 비해 매우 약하다고 생각된다.

이러한 것들로부터 SFP 의 항종양효과는 장내세균이 숙주 면역에 관여했을 가능성을 시사하지만, 상세한 기저에 대해서는 앞으로 검토가 필요하다.

인용 문헌

- (1) Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489 : 220-23.
- (2) Maynard C, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489 : 231-241.
- (3) Tremaroli V, Bachhed F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489 : 242-249.
- (4) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444 : 1027-103
- (5) Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125 : 1401-1412.
- (6) Howarth GS, Wang H. 2013. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 5 : 58-81.
- (7) Terada A, Bukawa W, Kan T, Mitsuoka T. 2004. Effect of the consumption of heat-killed *Enterococcus faecalis* EC-12 preparation on microbiota and metabolic activity of the faeces in healthy adults. *Microb Ecol Health Dis* 16 : 188-194.
- (8) Inoguchi S, Ohashi Y, Narai-Kanayama A, Aso K, Nakagaki T, Fujisawa T. 2012. Effects of non-fermented and fermented soybean milk intake on faecal microbiota and faecal metabolites in humans. *Int J Food Sci Nutr* 63 : 402-410.
- (9) Azcarate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Barcena JM. 2011. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301 : G401-G424.
- (10) O'Flaherty S, Saulnier DM, Pot B, Versalovic J. 2010. How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? *Gut Microbes* 5 : 293-300.
- (11) Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. 2009. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 6 : 5-11.
- (12) Verghese M, Rao DR, Chawan CB, Williams LL, Shackelford L. 2002. Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young Fisher 344 rats. *J Nutr* 132 : 2809-2813.
- (13) Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, Simone CD, Hontecillas R. 2012. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS ONE* 7 : e34676.
- (14) Ohta T, Nakatsugi S, Watanabe K, Kawamori T, Ishikawa F, Morotomi M, Sugie S, Toda T, Sugimura T, Wakabayashi K. 2000. Inhibitory effects of *Bifidobacterium*-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinogenesis* 21 : 937-941.
- (15) Kinouchi FL, Maia DCG, Ribeiro LCA, Placeres MCP, Valdez GF, Colombo LL, Rossi EA, Carlos IZ. 2012. A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. *Food Chem Toxicol* 50 : 4144-4148.
- (16) Shin R, Suzuki M, Mizutani T, Susa N. 2007. Improvement of experimentally induced hepatic and renal disorders in rats using lactic acid bacteria-fermented soybean extract (Biofermentics™)- Evid Based Complement Alternat Med 6 : 357-363.
- (17) Nagashima K, Mochizuki J, Hisada T, Suzuki S, Shimomura K. 2006. Phylogenetic analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences from human fecal

- microbiota and improved utility of terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Biosci Microflora* 25 : 99-107.
- (18) Nagashima K, Fukushi M, Motohashi C, Yasokawa D, Kanbayashi I, Kusakabe M, Hashimoto S, Takeda H. 2007. Effects of ingestion of a vegetable-extracted enzyme on intestinal bacterial flora in humans. *北海道立食品加工研究センター報告* No. 7: 27-31.
- (19) Dicksved J, Floistrup H, Bergstrom a, Rosenquist M, Pershagen G, Scheynius A, Roos S, Alm JS, Engstrand L, Braun- Fahrlander C, Mutius E, Jansson JK. 2007. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *App Environ Microbiol.* 73 : 2284-2289.
- (20) Ishikado A, Sato T, Mitsuoka T. 2007. Suppressive effects of lactose and magnesium oxide supplementa□tion of fecal putrefactive metabolites with shortening gastrointestinal transit time. *Microbiol Ecol Health Dis* 19 : 184-190.
- (21) Reddy BS, Weisburger JH, Wynder EL. 1974. Fecal bacterial beta-glucuronidase: control by diet. *Science* 183 : 416-417.
- (22) Kulkarni N, Reddy BS.1994. Inhibitory effect of *Bifodobactermm* tongum cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β-glucuronidase *Proc Soc Exp Biol Med* 207 :278-283.
- (23) Mizutani T, Mitsuoka T. 1983. Effect of konjac mannan on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in Fischer 344 rats. *Cancer Letters* 19 : 1-6.
- (24) Saito M, Nanjo M, Aonuma E, Noda T, Nakadate I, Ebina T, Ishida N. 1984. Activated macrophages are responsible for the tumor-inhibitory effect in mice receiving intravenous injection of OK-432. *Int J Cancer* 33 : 271-276.
- (25) Thomas LV, Ockhuizen. 2012. New insights into the impact of the intestinal microbiota on health and disease: a symposium report. *Bri J Nutr* 107 : S1-S13.
- (26) Mitsuoka T. 2000. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Biosci Microflora* 19 : 15-25.
- (27) Finegold SM, Sutter VL, Sugihara PT, Elder HA, Lehmann SM, PhiUps RL.1977. Fecal microbial flora in Seventh Day Adventist populations and control sub□jects. *Am J Clin Nutr* 30 : 1781-1792.
- (28) Benno Y, Suzuki K, Narisawa K, Bruce WR, Mitsuoka T. 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol Immunol* 30 : 521-532.
- (29) Mitsuoka T. 1984. The effect of nutrition on intestinal flora. *Nahrung* 28 : 619-625.
- (30) Kim DH, Jin YH. 2001. Intestinal bacterial β-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 24 : 564-567.
- (31) Nakamura J, Kubota Y, Miyaoka M, Saitoh T, Mizuno F, Benno Y. 2002. Comparison of four microbial enzymes in Clostridia and Bacteroides isolated from human feces. *Microbiol Immunol* 46 : 487-490.
- (32) Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* 7 : e39743.
- (33) Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M, Radke M, Blaut M. 2006. Effect of *Bifidobacterium lactis* Bbl2 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol* 44 : 4025-4031.
- (34) Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, Riorden G, Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Loo JV, Watzl B, Collins JK. 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Chin Nutr* 85 : 488-496.
- (35) Hsu C-K, Liao J-W, Chung Y-C, Hsieh C-P, Chan Y-C. 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *J Nutr* 134 :1523-1528.
- (36) Asha, Gayathri D. 2012. Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Exp Therapeut Med* 3 : 1049-1054.
- (37) Rudolph A, Toth C, Hoffmeister M, Roth W, Herpel E, Jansen L, Marx A, Brenner H, Chang-Claude J. 2012. Expression of oestrogen receptor p and prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 107 : 831-839.
- (38) Menard O, Butel M-J, Gaboriau-Rouriau V, Waligora-Dupriet A-J. 2008. Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobactenum* sp. strains isolated from infants. *App Environ Microbiol* 74 : 660-666.
- (39) Hrcncir T, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H. 2008. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ free mice. *BMC Immunology* 9 : 65.