高血圧自然発症ラットにおける *Enterococcus faecalis* FK-23 株の 加熱死菌体投与による血圧上昇抑制作用

嶋田 貴志*, 岩谷 綱一*, 柳沢 昊永*
河合 康雄*, 安部 茂**, 山口 英世**

* ニチニチ食品研究所

** 帝京大学医学部細菌学教室

Antihypertensive Activity of *Enterococcus faecalis* FK-23 Preparation in Spontaneously Hypertensive Rats

Takashi SHIMADA,* Kouichi IWATANI,* Takaharu YANAGISAWA,*
Yasuo KAWAI,* Shigeru ABE** and Hideyo YAMAGUCHI**

* Research Institute, Nichinichi Food Company, Ayama-gun, Mie 518-14

** Teikyo University School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.) 45, 519~522 (1992)

The activity of heat-treated cells of *Enterococcus faecalis* FK-23 (FK-23 preparation) isolated from the intestine of a healthy human on systolic blood pressure (SBP) was investigated in spontaneously hypertensive rats (SHR). A significant reduction of high SBP was observed after oral administration of the FK-23 preparation for 7 days at 60 or 120 mg/day · rat. SBP remained below 200-210 mmHg, which was significantly lower than that of the control group (220-230 mmHg), over 21 consecutive days of oral administration ($p < 0.05$). This antihypertensive activity was dose-dependent, and the SBP rose again to the control level 14 days after cessation of FK-23 administration. Twenty-eight days of FK-23 administration at 120 mg/day · rat followed by 270 days at 240 mg/day · rat resulted in an uninterrupted reduction of high SBP. At autopsy, the control group had myocardial hypertrophy whereas the FK-23 preparation-treated group did not. These data indicate that oral administration of this FK-23 preparation may reduce SBP dose-dependently over a long period and may prevent the accompanying myocardial hypertrophy.

Key Words blood pressure, *Enterococcus faecalis*, oral administration, SHR, repression of cardiac hypertrophy.

(Received April 28, 1992)

乳酸桿菌菌体が、免疫賦活作用^{1)~9)}、抗高脂血症作用¹⁰⁾、抗高血圧作用¹¹⁾等生理活性を示すことは知られている。しかしながら、乳酸球菌については、その免疫賦活活性¹²⁾¹³⁾抗高脂血症作用¹⁴⁾について若干の検討が加えられているにすぎない。ヒト腸内細菌叢との関連から考えると、腸内細菌数の最も多い小腸下部から直腸に至るまで *Lactobacillus* 群より *Enterococcus* 群の菌数が多いことより、球菌の生理活性の解明が重要である。著者らは、ヒト糞便より分離された腸球菌 *Enterococcus faecalis* FK-23 株の熱水処理菌体の諸活性を検討してきた。

本研究では、ヒト本態性高血圧症に近いモデルとされている高血圧自然発症ラット (SHR) において、*E. faecalis* FK-23 株の熱水処理菌体を経口投与することによって、血圧上昇を用量依存的に抑制することを認めた。さらに、長期投与後の血液生化学的検査では影響はみられず、臓器において心臓の重量に差がみられたので、その成績について述べる。

実験方法

1. 試料の調製

E. faecalis FK-23 株を液体培地 (グルコース 2%, 酵母エキス 2%, 肉エキス 2%, リン酸水素 2 カリウム

* 〒518-14 三重県阿山郡大山田村富永 239-1

** 〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1

4%) に植菌し、37°C で 24 時間静置培養した。得られた前培養液を同組成の培地 1 l に添加し、同条件で培養を行った。培養液より菌体を遠心分離 (13,000×g, 15 分間) にて集め、滅菌蒸留水で 3 回洗浄後、蒸留水 200 ml に懸濁し、105°C で 10 分間加熱滅菌した。これを凍結乾燥し、投与試料粉末 (以降 FK-23 標品とする) を得た。

2. 実験動物および飼育条件

6 週齢の SHR および WKY ラット、雄性 (日本チャールス・リバー) を 4 週間の予備飼育後、1 群 7 匹ずつとし、実験に供した (体重 270~290 g)。飼育は SPF 条件下にて、室温 25.0±1.0°C、湿度 55.0±5.0%、12 時間ごとに明暗切り替えで行い、固形飼料 (CE-2、日本クレア)、およびフィルター (PF フィルター、オルガノ) 濾過した水道水を自由に摂取させた。

試料投与は、FK-23 標品を生理食塩水で適宜懸濁し、胃ゾンデを用い、1 匹当たり 1 ml ずつ連日経口投与した。また、対照として生理食塩水 1 ml を同様に投与した。

3. 血圧測定

ブレチスモ式尾動脈圧測定装置 (KN-208、夏目製作所) を用い、保温箱にて 45°C で 8 分間保温したラットの尾動脈圧の収縮期血圧 (SBP) を無麻酔下で非観血的に週 1 回測定した。

4. 臓器重量の測定

FK-23 標品投与終了後、24 時間絶食し、ペントバルビタール酸ナトリウム (ネブタール、東京化成) 腹腔内投与麻酔下で開腹、採血後放血致死させ、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、重量の測定を行い、体重比重量の算出を行った。

5. 血液生化学的検査

採取した血液を 30 分間放置後、遠心分離 (1,670×g, 10 分間) により、血清成分を分取し、オートアナライザー (TBA-480、東芝メディカル) を用い、総コレステロール、トリグリセリド、尿素窒素、尿酸、クレアチニン、カルシウム、マグネシウム、ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオンの測定を行った。

6. 統計処理

平均と標準誤差で表された測定値については、分散の検定を行った後、Student の *t*-検定を行った。

結 果

1. SBP 上昇抑制作用に対する FK-23 標品の用量依存性

SHR に対し、FK-23 標品を 15, 30, 60, および 120 mg/日 で 28 日間投与し、体重変化、および SBP 変化を調べた。体重変化では投与 28 日目で対照群は 316.8±8.3, FK-23 標品 15 mg 投与群は 319.3±13.7、以

下 313.5±10.2, 315.6±8.9, 319.4±11.5 と各投与群に有意な差はみられなかった。10 週齢の SHR の SBP は、投与開始時に約 180 mmHg であった。対照群は、21 日目の時点において 220 mmHg となるまではほぼ直線的な上昇を示し、FK-23 標品 15 mg 投与群は対照群と同様の变化を示したが、FK-23 標品 30 mg 投与群では、投与 7 日目に降上昇は緩やかとなった。さらに 60 mg および 120 mg 投与群は、投与・14 日目に降 200~210 mmHg に留まった。この成績から、FK-23 標品は投与量 30 mg で若干の作用を示し、60 mg 以上で明確な SBP 上昇抑制作用を示すことが認められた (Fig.1)。

2. WKY ラットへの FK-23 標品投与による SBP への影響

正常血圧を示す WKY ラットに FK-23 標品 120 mg/日を 28 日間連日経口投与し、SBP 変化を調べた。FK-23 標品投与群、および対照群ともに投与開始後より同程度に緩やかな上昇を示し、21 日目に降で約 150 mmHg となり、両群に有意な差はみられなかった (Fig.2)。

3. FK-23 標品投与中止後の SBP 変化

FK-23 標品 120 mg/日を 28 日間にわたり投与した SHR において、FK-23 標品投与中止後の 28 日間にわたる SBP の変化を調べた。FK-23 標品投与群の SBP は、投与終了時に 205 mmHg であり、それらは投与中止後 2 週間までそのレベルが維持されたが、以降次第に

Fig.1. Effect of perorally administrated FK-23 preparation on the SBP of SHR.

Values indicated the mean±SEM (*n*=7). SHR were given saline (○) or FK-23 preparation at the doses of 15 (□), 30 (▲), 60 (△) and 120 (●) mg/day. Significant difference from control; * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001.

Fig. 2. Changes in SBP of WKY rats during administration of FK-23 preparation.

Values indicated the mean $\pm$ SEM ($n=7$). WKY rats were given saline (○) or FK-23 preparation of 120 mg/day (●).

Fig. 3. Changes in the SBP of SHR after termination of FK-23 administration.

SHR were given saline (○) or FK-23 preparation of 120 mg/day (●). Significant difference from control; see Legend to Fig. 1.

上昇し 28 日目には、およそ 220 mmHg となり対照群との間に有意な差はみられなくなった (Fig. 3)。

4. FK-23 標品長期投与による SBP への影響

SHR に FK-23 標品 120 mg/日を 28 日間、240 mg/日を 270 日目まで投与し、SBP 変化を調べた。予備飼育終了時の SBP はおよそ 185 mmHg であったが、対照群では投与 28 日目までほぼ直線的に上昇がみられ、220~230 mmHg のレベルで一定となった。一方、FK-23 標品投与群では、投与開始直後から上昇が緩慢となり、21 日目以降 190~210 mmHg のレベルで一定となり、対照群と有意な差がみられた (Fig. 4)。なお、各群の体重は、270 日目に対照群が 413.0 ± 5.0 g、FK-23 標品投与群が 411.6 ± 9.7 g であり、FK-23 標品投与による有意な差はみられなかった。

5. 臓器の相対重量および血液生化学的検査

270 日間の FK-23 標品投与後の SHR において、絶食を行った後の体重、心臓、肝臓、腎臓、および脾臓の

Fig. 4. Effect of long-term administration of FK-23 on the SBP of SHR.

Values indicate the mean $\pm$ SEM ($n=7$).

FK-23 or saline was daily administered orally to SHR. They were 70 days-old at day 0. Control SHR were given saline (○). SHR were administered FK-23 preparation (△) at the doses of 120 mg/day from day 0 to day 28 and 240 mg/day from day 29.

Table 1. Various organs weight of SHR after long-term administration of FK-23 preparation.

	Relative organ weight (%)	
	-FK-23	+FK-23
Heart	0.43 ± 0.01	$0.39 \pm 0.001^{**}$
Liver	2.95 ± 0.08	3.10 ± 0.04
Kidney	0.70 ± 0.02	0.70 ± 0.01
Spleen	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.004

The ratio (%) of various organs to body weight (mean $\pm$ SEM, $n=7$ -FK-23, 413.0 ± 5.0 g, +FK-23, 411.6 ± 9.7 g) of the rats at the end of long-term administration FK-23 preparation, see "Methods." ** indicate significant difference ($p < 0.01$) from the control SHR group.

相対重量を Table 1 に示した。心臓以外の臓器に各群間に有意な差はみられなかった。心臓の相対重量は、対照群が $0.43 \pm 0.01\%$ 、FK-23 標品投与群が $0.39 \pm 0.001\%$ となり、FK-23 標品投与により有意な低下がみられた。

血液生化学的検査の結果、試験した各項目とも FK-23 標品投与による影響はみられなかった (データ省略)。

考 察

本実験の成績から、SHR に対して血圧上昇途中にある 10 週齢より FK-23 標品を、連日 30 mg/日以上投与することにより、血圧上昇が抑制されることが示された。さらにこの作用は 270 日間の長期投与を行った場合

にも持続し、心臓の相対重量を有意に低下させた。また投与中止後も3~4週間は効果が残ることが認められた。一方、FK-23 標品経口投与は正常血圧を示す WKY ラットに対して、まったくその作用は示されなかった。

イワシ、カゼインのタンパク加水分解ペプチドを静脈内投与によりアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を示し、血圧上昇を抑制する報告は数多くある^{14)~17)}。これに比べ、経口投与により同様の作用をもつことが知られている標品は少なく、クロレラ¹⁸⁾、緑茶抽出物¹⁹⁾の経口投与による作用においても投与量が餌料の50%や体重1kg当り2gと、本研究のFK-23 標品とは、投与量において異なる。一方、Furushiro ら¹¹⁾は、乳酸桿菌の *L. casei* の自己融解抽出物、および多糖類分画物 10 mg/kg を SHR に経口投与し、作用を有することを報告している。FK-23 標品も乳酸菌菌体であること、長期投与での SBP 変化や WKY ラットへの投与による SBP 変化等で類似した結果であることから、その活性成分が類似した物質の可能性も考えられた。現在、その成分を明らかにするため、菌体成分の分画 (熱水抽出上清、残渣) を進め検討を行う計画である。

また、FK-23 標品がもつ抗高血圧症作用の発現メカニズムについては、本標品を含め、血圧低下作用が報告されている天然物の多くには、免疫賦活作用が共通に認められることより、両作用になんらかの関連性があるものと推測され、事実、サイトカインが血圧に対し影響を与え得ることも報告されている²⁰⁾。FK-23 標品をマウスに経口投与した場合に、食細胞機能を高め、TNF (Tumor necrosis factor) 等のサイトカインの産生を増強することをわれわれはすでに見いだしており (未発表)、今後 FK-23 標品の両作用の関連について明らかにしていきたい。

一方、心臓肥大抑制作用について、この作用を示す薬剤として中枢性交感神経遮断薬である α -methyldopa や ACE 阻害剤が知られている²¹⁾。しかし、これらの薬剤は、過度の血圧低下をひきおこしたり、正常血圧も低下させる等、血行動態に及ぼす作用は本標品とは異なっているようにみえる。このことから、本標品の作用はさらに別の因子によるものと考えられ、その作用のメカニズムについて今後検討していきたい。

要 約

ヒト腸内より分離した *Enterococcus faecalis* FK-23 株熱水処理菌体 (FK-23 標品) を高血圧自然発症ラット (SHR) に経口投与し、血圧上昇に及ぼす影響を検討した。FK-23 標品を 60 および 120 mg/日投与すると、投与開始 7 日目より血圧上昇の抑制がみられ、21 日目以降

では、200~210 mmHg の血圧を維持し、対照群 SHR の血圧値 220~230 mmHg と比較して有意に低値を示した。なお、投与量の低下につれて効果は減少し、用量依存性を示した。また、投与終了後、14 日目で再び血圧は上昇を示した。長期投与による効果の持続性を検討する目的で 120 mg/日を 28 日間投与、その後 240 mg/日で通算 270 日間投与を続けた場合、その間血圧上昇は終始抑制された。剖検の結果から FK-23 標品投与 SHR では、対照群動物にみられる心臓肥大が抑制されていることが認められた。以上の成績から、FK-23 標品の経口投与は、SHR における血圧上昇を用量依存的に、かつ持続的に抑制し、心臓肥大をも防止すると結論した。

文 献

- 1) Kohwi, Y., Imai, K., Tamura, Z. and Hashimoto, Y.: *Gann*, **69**, 613 (1978)
- 2) Kohwi, Y., Hashimoto, Y. and Tamura, Z.: *Bifidobacteria Microflora*, **1**, 61 (1982)
- 3) Kato, I., Yokokawa, T. and Mutai, M.: *Microbiol. Immunol.*, **27**, 209 (1986)
- 4) Asano, M., Karasawa, E. and Takayama, T.: *Urology*, **36**, 716 (1986)
- 5) Gablila, P., Macias, M.E.N., Susana, A., Guillermo, O. and Aida, A.P.R.H.: *Infect. Immunol.*, **53**, 404 (1986)
- 6) Matsuzaki, T., Yokokura, T. and Azuma, I.: *Cancer Immunol.*, **24**, 99 (1987)
- 7) 後藤俊幸, 横田芳武, 松本清子, 仲井益代, 山形裕士: 感染症学会誌, **62**, 1105 (1988)
- 8) 松崎 健, 横倉輝男: 医学のあゆみ, **150**, 745 (1989)
- 9) 片山友子: 大阪医大誌, **49**, 23 (1990)
- 10) Kawai, Y.: *Microecol. Ther.*, **14**, 109 (1984)
- 11) Furushiro, M., Sawada, M., Hirai, K., Motoike, M., Sansawa, H., Kobayashi, S., Watanuki, M. and Yokokura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2193 (1990)
- 12) 山本克弥, 田沢賢次, 藤巻雅夫, 坂本憲市, 小西健一: *Biotherapy*, **4**, 670 (1990)
- 13) Suegara, N., Ishihara, K. and Kawai, Y.: *Microecol. Ther.*, **15**, 271 (1985)
- 14) 末綱邦男, 成島克裕: 栄食誌, **42**, 47 (1989)
- 15) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 成島克裕, 松藤寛, 成島 豊: 農化, **65**, 1223 (1991)
- 16) 村上哲男, 辻 章夫, 山本和夫, 岡本耕造: 栄食誌, **45**, 129 (1992)
- 17) 杉山圭吉, 高田康二, 江川 真, 山本郁雄, 恩塚博, 大場健吉: 農化, **65**, 35 (1991)
- 18) 村上哲男, 岡本耕造, 大垣昌弘, 飯塚義富: 栄食誌, **40**, 351 (1987)
- 19) 大垣寿美子, 伊村祈年子: 生活衛生, **33**, 171 (1989)
- 20) 新津洋司郎, 伊藤克礼, 蟹沢祐司, 坂牧純夫: 日本臨床, **50**, 353 (1992)
- 21) 柿木滋夫, 安田寿一: 日本臨床, **50**, 587 (1992)

(1992 年 4 月 28 日受理)