乳酸菌菌体成分および野菜抽出物のラット マクロファージ貪食能に対する効果

川村博幸*・瀬野公子*・熊谷武久*・渡辺紀之*・
八巻幸二**・津志田藤二郎**

Effects of *Lactobacillus* and Some Vegetable Homogenates on Phagocytosis of Rat Peritoneal Macrophages

Hiroyuki KAWAMURA*, Kimiko SENO*,
Takehisa KUMAGAI*, Toshiyuki WATANABE*,
Kohji YAMAKI** and Tojiro TSUSHIDA**

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

**National Food Research Institute, 2-1-2 Kannondai,
Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Macrophage phagocytosis was measured using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated zymosan in 96 well tissue culture plate. The macrophage phagocytosis reaction was reached almost plateau at 30 min, and appropriate dose of FITC-zymosan against 1×10^5 cells/well of macrophages for sensitive measurement was $30 \mu\text{g/ml}$. By this method, it was clarified that extracts from some *Lactobacillus casei* had increasing activity of the phagocytosis, whereas all twelve vegetables extracts showed depressing activity. Especially *Lactobacillus plantarum* 204, had the highest activity among all *Lactobacillus* used in the experiment. It was suggested that the active components obtained from *Lactobacillus plantarum* 204 were estimated to be some sugar-like compounds, according to the results that it was water-soluble, heat-resistant, and lower molecular weight compound less than 5000 dalton.

(Received Nov. 25, 1999 ; Accepted Feb. 21, 2000)

近年、免疫機能や生体防御機構、例えば、リンパ球の抗体産生、白血球の貪食作用等に対する食品成分や野菜抽出物の効果が盛んに調べられている¹⁾²⁾。免疫機能を高

める食品成分を検索し、それを利用した食品を創製することは機能性食品研究の最も重要な領域の一つである。これらの機能に関与する白血球の一つとして、マクロファージは異物、細菌、癌細胞、老廃物等の貪食、種々のサイトカイン産生、また生体防御に関与する他の細胞を活性化するなどの機能を持っており、免疫反応、生体防御機構において重要な位置を占めている。

マクロファージの重要な機能の一つとしての貪食能の測定方法として、ザイモサン等顆粒を異物として貪食させ顕微鏡下で計測する方法が用いられてきた³⁾⁴⁾。この単純に貪食細胞の数の測定よりも、Fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合したザイモサンをマクロファージに取り込ませ、蛍光を測定する方法、あるいはフローサイトメーターで計測する方法も用いられている⁵⁾。

本実験では食品の抽出試料のマクロファージの貪食能を調べるために、腹腔浸出性ラットマクロファージを96穴プレートで培養し、FITC標識ザイモサンを貪食させ、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて測定することでマクロファージの貪食能を定量し、試料として種々の野菜類および乳酸菌の菌体成分を用いた。乳酸菌は抗原感作マウスの脾臓細胞の免疫グロブリンE産生を抑制する報告⁶⁾があり、抗アレルギー食品としても注目すべきである。またヨーグルト食によって、マウスの細胞性免疫の上昇の報告⁷⁾もある。さらに乳酸菌は乳を原料とした発酵食品に関与する微生物として有名であるが、植物由来成分の発酵にも数多く介在しており、前者を動物性乳酸菌、後者を植物性乳酸菌と分類して⁸⁾、これらのマクロファージの貪食能に対する効果を検討した。

1. 実験方法

(1) 試料

野菜として、にら、タマネギ、タケノコ、いんげん、ホウレンソウ、ブロッコリー、大根、ピーマン、トマト、ナス、カボチャ、シイタケを用いた。これらは3~4月につくば市のマーケットにて購入した。供試乳酸菌は、亀田製菓(株)研究室で米および米加工品から分離した植物性乳酸菌 *Lactobacillus* 属、327, 379, 1016, 409, 508, 511, 924, 139, 204, 79の10株である。これらの乳酸菌は乳酸菌実験マニュアル¹⁰⁾によって同定した。乳酸菌の培養は、*Lactobacilli* MRS培地(Difco Lab.)を用い、37°C、24時間培養した。これら植物性乳酸菌のほかに動物性乳酸菌(*Streptococcus lactis* subsp. *Cremoris* H-61, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* 527, *Streptococcus lactis*

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

** 農林水産省食品総合研究所 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-2)

subsp. *Diacetyllactis* N-7, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* L-14, *Lactobacillus acidophilus* L-54, *Lactobacillus helveticus* B-1 の計 6 株 ; (財)日本乳業技術協会) も実験に供した。

(2) 野菜抽出物の調製

各種野菜に 1 ml/g の割合で蒸留水を加え、これをクッキングカッター (FV-F2 ; HITACHI, Japan) を用いてペースト状にした後に、2 800 g、室温で 30 分間遠心し、上清を濾過した後、凍結乾燥してこれを試料とした。

(3) 乳酸菌菌体抽出物の調製

前述した乳酸菌を 4℃ 冷却下で生理食塩水を用い遠心洗浄 (1 000 g, 10 分間) を 4 回繰り返した。さらに、洗浄菌体を沸騰温浴中で 5 分間加熱することで死菌体とした後に凍結乾燥した。この凍結乾燥物 100 mg を 10 ml の蒸留水に懸濁し、これを超音波破碎機 (BRANSON ; SONIFIER 250) によって 15 分間破碎した。次に 100℃ で 20 分間加熱し、放冷した後、1 000 g で 10 分間室温で遠心した上清を凍結乾燥して試料とした。

(4) 腹腔マクロファージの採取⁹⁾

雄性 Sprague Dawley ラット (6~9 週令, 体重 300~500 g, Specific pathogen free, Charles River Japan Inc.) に対して 5% 可溶性でんぷん (和光純薬) と 5% Bacto Peptone (Difco Lab.) を 5 ml/100 g ラット体重で腹腔内注射し、4 日後にエーテル麻酔下で頸動脈の切断により脱血死させ、腹腔内に浸潤したマクロファージを集めた。得られたマクロファージは 10% Fetal Calf Serum を含んだ RPMI1640 培地に懸濁し、 1.0×10^5 cells/well で 96 穴培養プレート (FALCON 3072) に加え、37℃, 95% 空気・5% 二酸化炭素, 湿度 100% の条件下で 2 時間培養し、マクロファージを付着させた後に、培地を交換することでリンパ球などの浮遊細胞を除去し、さらに 24 時間培養した後、貪食活性の測定に供した。

(5) 貪食活性検定

24 時間培養したマクロファージに、農産物抽出試料及び乳酸菌抽出物を含んだ RPMI1640 の培地を添加し、1 時間インキュベートした。次に、蛍光標識ザイモサン A (*S. Cerevisiae* BioParticles[®], fluorescein conjugate, Molecular Probes, Inc.) 懸濁液を添加し、30 分間インキュベートした。その後、これをハンクス緩衝液 (ハンクス粉末, 日水製薬(株)) を用いて洗浄し、10% Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (和光純薬) 溶液を添加しマクロファージを溶解させ、貪食されたザイモ

ンを励起波長 485 nm, 蛍光波長 530 nm での蛍光強度で測定、無添加のコントロールに対する蛍光強度の相対値によって貪食作用の活性を評価した。

(6) 菌体由来有効成分の分画

植物性乳酸菌 *L. plantarum* 204 より調製した試料を限外濾過フィルターを用いて、分子量ごとに分画した。限外濾過フィルターは Ultrafree-CL PBGC BIOMAX-100, 10, 5 (MILLIPORE) の 3 種を用い、順番に 450 g で 20 分間遠心することで分子量約 10 万以上、10 万~1 万、1 万~5 千、5 千以下の 4 画分を得た。さらに、植物性乳酸菌 *L. plantarum* 204 より調製した試料を SEP-PAK[®] cartridge C₁₈ (ウォーターズ社製) を用いて試料中の成分を極性によって分離した。すなわち、0.1 mg/ml に溶解した *L. plantarum* 204 試料 10 ml をカートリッジに通し、素通りしたものを水画分、水によってカートリッ

図 1 蛍光標識ザイモサンの用量と反応時間の検討

a) 用量の検討と, b) 反応時間の検討

96 穴培養プレートにラットマクロファージを培養した後、蛍光標識ザイモサンを添加し、一定時間培養し貪食させた後、洗浄後、マクロファージに残った蛍光を測定した。表示は平均と標準誤差を示した。

ジを洗浄した後にエタノール 10 ml を通し溶出させ、これをエタノール画分とした。

以上の操作によって得られた各画分がマクロファージの貪食能に与える影響を検討した。

2. 実験結果および考察

(1) 乳酸菌の同定

植物性乳酸菌 10 株を同定した結果、327, 379, 409, 508, 511 と 924 の 6 株が *L. casei* subsp. *casei* で、79, 139, 204 の 3 株が *L. plantarum* で、1016 が *L. fermentum*

であった。

(2) 貪食作用活性検定の条件検討

実験条件を決定するため、マクロファージの培養液に添加する蛍光標識ザイモサン量を検討した。マクロファージを培養したウェルに蛍光標識ザイモサンを添加して 1 時間後に洗浄し、10% Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether を加えて細胞を溶解した後、蛍光強度を測定した (図 1 a)。蛍光強度に著しい差がみられた 30 $\mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ (最終濃度) 以上の添加濃度であれば、マク

図 2 各種野菜と乳酸菌のマクロファージ貪食作用に対する効果

a) 各種野菜 (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と b) 乳酸菌抽出物 (1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

表示は平均と標準誤差を示す。

ロファージの食作用の程度を測定することができると判断し、以後の実験に用いた。

次にマクロファージのザイモサンの食食時間を検討した (図 1 b)。蛍光強度に差が認められた $30 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ (最終濃度) のザイモサンを用い、インキュベーションの検討を行った。マクロファージによるザイモサンの食食作用活性を調べるためには、取り込み量が直線的に上昇する範囲で測定することが適当である。そこでこの結果よりインキュベーション時間は 30 分とし以後の実験に用いた。

(3) 食食作用活性に対する農産物および乳酸菌の効果

マクロファージの食食作用活性に対する各種農産物試料および植物性および動物性乳酸菌の効果を図 2 に示した。

農産物については、典型的な野菜を科ごとに選んで抽出物を作成し、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で比較した。その結果、いね科のタネノコ、あかざ科のホウレンソウ、なす科のナス、うり科のカボチャなどに強い抑制が認められたが、科による特徴は認められなかった。また用いた全ての野菜は食食活性を上昇させる作用がなかった。

乳酸菌全体では、相対食食活性が $0.8 \sim 1.2$ を示し、菌種及び菌株によって食食活性を上昇させるもの、低下さ

せるものがあつた。特に植物性乳酸菌である *L. plantarum* 79, 139, 204 の 3 株はすべて上昇させる菌体であつた。それぞれの菌体では植物性乳酸菌は、動物性乳酸菌より比較的高い活性を示す傾向が認められた。その中でも植物性乳酸菌である *L. plantarum* 204 だけが顕著な食食活性 $1.77 (1.0 \mu\text{g}/\text{ml})$ を示した。この値はスミルノフの棄却検定で有意に他の植物性群と離れているため、特殊な菌体と考えられる。動物性乳酸菌、植物性乳酸菌での t 検定による有意な活性の差は認められないが、動物性乳酸菌より植物性乳酸菌に食食活性の上昇傾向が認められ、興味深い知見であると思われる。

実験に用いた試料は洗浄菌体を用いたものであるので乳酸菌の代謝産物ではなく、活性成分は菌体自体であると考えられる。これまでの研究を見ると生菌を含むヨーグルトがヒトリンパ球のインターフェロンの産生を増強し、加熱したヨーグルトや非加熱ヨーグルトの上清には、その活性がなかったとする報告が有る⁶⁾。

さらに *L. plantarum* 204 について活性成分のおおよその分子量を求めるために、限外濾過によって試料を分画し、それぞれに食食作用の変化を調べ、その結果を図 3 に示した。分子量 5 千以上の画分では顕著な活性の上昇は認められなかった。 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、5 千以下の画分で 1.88 の活性が得られた。よって *L. plantarum*

図 3 植物性 204 抽出物の分子量の分画後活性

Lactobacillus plantarum 204 抽出物を限外濾過フィルターで分画し、それぞれの食食活性を測定した。表示は平均と標準誤差を示す。

204に含まれる有効成分は5千以下の分子量であることが考えられる。

さらに *L. plantarum* 204に含まれる有効成分の性質を知るためにSEP-PAK[®] C₁₈ カートリッジを用いて水画分とエタノール画分に分離し、それぞれの食作用活性を測定した。その結果、水溶性の素通り画分は0.3 µg/mlの濃度で1.26±0.16の活性を示し、SEP-PAK[®] C₁₈に吸着した疎水性画分は0.3 µg/mlの濃度で0.70±0.07の活性を示した。この水溶性画分は疎水性画分に比べ有意に高い活性を有した。このことから *L. plantarum* 204に含まれる有効成分は水溶性の極性成分であると考えられる。さらに有効成分の分子量が5千以下であることと試料の調製において加熱をしているにもかかわらず活性が残存していることから低分子の糖類である可能性が高い。マクロファージには抗体、補体、マンノースレセプターを介した食食などが認められているが¹¹⁾、その解明にはさらに研究を進める必要がある。

3. 要 約

96穴培養プレートを用い、ラット腹腔浸潤マクロファージの貪食能を蛍光標識ザイモサンを用いて測定する方法を用い、野菜、乳酸菌の抽出物の活性を測定した。その結果、野菜類は活性を上昇させるものではなく、ほとんどが抑制傾向を示した。乳酸菌の抽出物では動物性は増強、抑制の両者があったが、植物性乳酸菌の中の *Lactobacillus plantarum* は試験に供した3株全てで増強を示した。そのうちの最も増強活性の強い菌体から分離した成分は分子量画分の結果、5千以下で熱に強い成分であったことより、糖類の可能性が高いことが推測された。

文 献

- 1) KAKU, S., YAMADA, K., HASSAN, N., WATANABE, T. and SUGANO, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 558 (1997).
- 2) ZHANG, R., LI, Y. and WANG, W.: *Nutr. Cancer*, **29**, 24 (1997).
- 3) OBEN, J.A. and FOREMAN, J.C.: *J. Immunol. Methods.*, **112**, 99 (1988).
- 4) RAGSDALE, R.L. and GRASSO R.J.: *J. Immunol. Methods.*, **123**, 259 (1988).
- 5) JANSSEN, W.T.M., GOOTJES, J., ZELLE, M., MADORE, D.V., VERHOEF, J., SNIPPE, H. and VERHEUL, F.M.: *Clin. Dia. Lab. Immunol.*, **5**, 703 (1998).
- 6) SHIDA, K., MAKINO, K., MORISHITA, A., TAKAMIZAWA, K., HACHIMURA, S., AMETANI, A., SATO, T., KUMAGAI, Y., HABU, S. and KAMINOGAWA, S.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **115**, 278 (1998).
- 7) DE SIMONE, C., VESELY, R., NEGRI, R., BIANCHI SALVADORI, B., ZANZOGLU, S., CILLI, A. and LUCCI, L.: *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **9**, 87 (1987).
- 8) 岡田早苗: 微生物, **4**, 55 (1988).
- 9) WATANABE, M., TAMURA, T., OHASHI, M., HIRASAWA, N., OZEKI, T., TSURUFUJI, S., FUJIKI, H. and OHUCHI, K.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1047**, 141 (1990).
- 10) 小崎道雄: 乳酸菌実験マニュアル (朝倉書店, 東京), p.32 (1992).
- 11) ADEREM, A. and UNDERHILL D.M.: *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 593 (1999).

(平成11年11月25日受付, 平成12年2月21日受理)