***Enterococcus faecalis* (FK-23 株) 加熱死菌体の Biological
Response Modifier 活性**

大橋一智,^{*,a} 上田浩史,^a 山崎正利,^b 木村貞夫,^c
安部 茂,^a 山口英世^c

ニチニチ食品 (株),^a 帝京大学薬学部,^b 帝京大学医学部^c

**Activity of *Enterococcus faecalis* (FK-23) Preparation as a
Biological Response Modifier**

Kazutomo OHASI,^{*,a} Hiroshi UEDA,^a Masatoshi YAMAZAKI,^b
Sadao KIMURA,^c Shigeru ABE,^c and Hideyo YAMAGUCHI^c

Research Institute, Nichinichi Food Co.,^{a)} 239-1 Tominaga, Ohyamada-
mura, Ayama-gun, Mie 518-14, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Teikyo University,^b Sagamiko-cho, Kanagawa 199-01,
Japan and Faculty of Medicine, Teikyo University,^c
2-1-11 Kaga, Itabashi, Tokyo 173, Japan

(Received May 28, 1992)

The biological activity of a preparation of heat killed cells of *Enterococcus faecalis*, FK-23 which was isolated from the feces of a healthy human, was investigated in C3H/He mice. Intraperitoneal injection of the preparation caused an accumulation of neutrophils and macrophages in the peritoneal cavity of the mice 6 h later. As a parameter of the activation of macrophages, the effect of the FK-23 preparation on the production of tumor necrosis factor (TNF) was examined. The mice were given two consecutive intravenous injections of the preparation at a dose of 10 μ g/mouse and, 3 h later, of 300 μ g/mouse. The TNF level in the sera reached 99 U/ml in mice 2 h after the second injection. This preparation also stimulated peritoneal macrophages to produce TNF *in vitro* and increased the capacity of neutrophils to adhere to plastic plates and to release active oxygens, but did not induce blastogenic transformation of lymphocytes. These results suggest that the FK-23 preparation is a biological response modifier (BRM) with various activities on phagocytes similar to a streptococcal antitumor agent, OK432.

Keywords—biological response modifier (BRM); tumor necrosis factor (TNF); *Enterococcus faecalis*; macrophage; neutrophil

緒 言

近年常在腸内細菌の宿主生体の様々な生理学的機能に及ぼす影響が検討されつつあり、なかでも宿主生体防御機構に対する作用が注目されている。実際、ヒト腸管内に常在する *Lactobacillus* の菌体標品が、抗高脂血症作用、¹⁾ 血圧降下作用、²⁾ 免疫賦活作用³⁻⁷⁾を示すことが報告されている。一方、同じく乳酸産生能を持つ腸内常在菌である *Enterococcus* 由来の菌体標品については、高脂血症予防効果⁸⁾が示唆されているにもかかわらず、その免疫賦活作用についての報告例は極めて少ない。⁹⁾最近我々は、ヒト糞便から分離された *E. faecalis* FK-23 株加熱死菌体標品 (FK-23 標品) が、自然発症高血圧ラットの血圧上昇を防止することを示した。¹⁰⁾ 本報では、この FK-23 標品がどのよ

うな免疫修飾作用を持つのかをいくつかの *in vivo* 及び *in vitro* 実験系を用いて解析した。すでに本邦において制癌剤として広く用いられている OK432 が *Streptococcus pyogenes* の菌体標品であり、この菌に *E. faecalis* が近縁であることに注目し、OK432 で報告されているマクロファージ及び好中球の活性化能を中心に生体防御機構に関わる作用について検討を行った。

実 験 の 部

実験材料並びに方法

FK-23 標品の調製 *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%，リン酸水素二カリウム 4%）に植菌し、37°C、24 時間の静置培養で得た前培養 10 ml を同組成の培地 1 l に添加し、37°C、24 時間静置培養を行った。培養液を遠心分離（13000×*g*、15 分間）により集菌し、滅菌蒸留水で 3 回洗浄後、蒸留水 200 ml に懸濁、105°C で 10 分間加熱殺菌した。これを凍結乾燥し、粉末状の FK-23 標品を得た。本標品 1 µg の中に混入した内毒素量が 0.8 pg 以下であることをリムラス法（エンドスペースー生化学工業）により確認した後、実験に供した。

実験動物 近交系 C3H/He N マウス（6 週齢雄性）を静岡実験動物（浜松）より購入し、SPF 管理下で飼育し実験に供した。

好中球及びマクロファージの集積反応 森川らが報告した方法¹¹⁾に従い、マウス腹腔内に検体を投与、6 時間後に腹腔細胞を採取し Türk 染色にて総有核細胞数を、算定し、一部を遠心法にてその塗抹標本作製した。これを Diff-Quik 染色液（ミドリ十字）にて染色した後無作為に選出した 4 ケ所の細胞 200 個中の好中球、マクロファージ及びリンパ球の割合を測定した。総有核細胞数と割合よりマウスあたりの各細胞数を算出した。

Tumor Necrosis Factor (TNF) 活性の測定 TNF 活性は actinomycin D 存在下での L-929 細胞の障害活性に基づいて定量した。¹²⁾ 新生仔ウシ血清 (CS) 5% を含む Eagle's MEM 培地に浮遊した L-929 細胞を 8×10^4 cells/100 µl/well の細胞濃度に調製し、96 穴平底プレートにて、37°C、5% CO₂ 下で培養した。4 時間後、系列希釈（4—1024 倍）した検体及び actinomycin D 溶液（4 µg/ml）をそれぞれ 50 µl 加え、37°C、5% CO₂ 下で 18 時間培養した。培養後上清を捨て、生理食塩水にて洗浄後、0.1% クリスタル紫にて染色し、細胞障害効果を指標として TNF の濃度を求めた。なお、活性は 50% 障害活性を与える希釈より求め、内部標準とした組替え型ヒト TNF 2.0×10^7 単位/mg（旭化成株式会社より供与）との比較により、その活性単位を示した。

試料血清調製 OK432 0.3 KE（1 KE=0.1 mg 乾燥菌体量）をマウス尾静脈内に投与した。その 3 時間後に FK-23 標品 1—1000 µg 又は OK-432 3 KE を静注し、2 時間後に採血してトリガリング活性測定用の試料血清を得た。また、FK-23 標品 0.1—1000 µg 又は OK-432 0.3 KE を静注した 3 時間後に OK 432 3 KE を再び静注し、その 2 時間後に採血してプライミング活性測定用の試料血清を得た。試料血清は -80°C に保存したものを実験直前に解凍して 4 倍より公比 4 で、5 段階希釈し、TNF 活性の測定に用いた。

マクロファージによる TNF 産生の測定 奥富らの方法¹³⁾により、単層培養のマクロファージを得た。ウシ胎仔血清 (FCS) を 5% 含んだ RPMI-1640 培地にてマウス腹腔細胞浮遊液を 5×10^5 cells/0.1 ml に調製した。それを、0.1 ml ずつ 96 穴平底プレートにまぎ、37°C、5% CO₂ 下で 2 時間培養した後、非付着細胞を取り除いた。このマクロファージ単層培養に検体 100 µl を加え、37°C、5% CO₂ 下に一定時間培養した後、培養上清の TNF 活性を前述の方法を用いて測定した。

好中球の粘着活性の測定 好中球活性化能を、プラスチックへの粘着能の増加を指標とする仙道らの方法¹⁴⁾により測定した。ヘパリン加ヒト末梢血よりフィコールハイパックにより分離精製し

た好中球を FCS を 5% 含んだ RPMI-1640 培地に浮遊し, 2.5×10^4 cells/well になるように 96 穴平底プレートにまいた. これに検体 $50 \mu\text{l}$ を添加し, 37°C , 5% CO_2 下で 1 時間培養した後, 好中球の粘着量をクリスタル紫染色による染色量に基づいて測定した.

活性酸素産生の測定 活性酸素産生は, 常法に従い化学発光にて測定した.¹⁵⁾ C3H/He マウスに, 20% カゼインを 3 ml 腹腔内投与し, 6 時間後の腹腔細胞よりフィコールハイパック遠心法を用いて好中球を分画した. プラスチックバイアルに 10 mM HEPES (pH 7.4) 加生理食塩水で調製した上記好中球浮遊液 (3×10^6 cells/ml) を $200 \mu\text{l}$ 分注し, さらにルミノール溶液 (2×10^{-4} M) を $200 \mu\text{l}$ 加えた. 37°C で加温後, 検体を $50 \mu\text{l}$ 添加し Lumicounter (日音社製) を用いて化学発光を 10 分間測定し, 発光回数の平均を cpm で示した.

リンパ球幼若化反応の測定 常法に従って測定した. マウスの脾臓より採取してリンパ球を 1×10^6 cells/ $100 \mu\text{l}$ /well の細胞濃度で 96 穴平底プレートにまき, 検体 $100 \mu\text{l}$ を添加した後, 37°C , 5% CO_2 下で 3 日間培養した. 各 well に ^3H -thymidine $1 \mu\text{Ci}$ を添加し, さらに 18 時間培養を続けた. 培養終了後, 細胞を cell harvester にて glass fiber filter 上に回収し, 液体シンチレーションカウンターで計測した. 計測はすべて triplicate で行い, その平均値を用いて算出した対照群に対する比を, stimulation index (S.I.) として表示した.

結 果

1. マウス腹腔内における好中球及びマクロファージの誘導作用

FK-23 標品をマウス腹腔内に投与した場合に誘導される細胞応答について検討した. OK-432 を腹腔内へ投与すると 6 時間以内に好中球数を増加させることはすでに報告した.¹¹⁾ これに準拠して, FK-23 標品についても投与 6 時間後に, 腹腔内に誘導される食細胞数を調べた. Fig. 1 に示すように, 生理食塩水を投与した対照群マウスに比較し, FK-23 標品 1 mg/マウス投与群においては腹腔内の好中球数の顕著な増加及びマクロファージ数の増加が認められた.

Fig. 1. Induction of Macrophages and Neutrophils by Intraperitoneal Administration of FK-23 Preparation

Groups of 3–5 mice were i.p. injected with vehicle saline or 1 mg of FK-23 preparation. Six hours later, their peritoneal exudate cells were collected and counted. Each column represents means of cell numbers of neutrophils (closed), macrophages (shaded) and lymphocytes (open) and bar standard deviation.

Fig. 2. Triggering Activity of FK-23 Preparation for Production of TNF in Mice

C3H/He mice were treated i.v. with OK432 (0.3 KE/mouse) and 3 h later with varying doses of FK-23 preparation (○) or 3KE of OK432 (●). Mice were exsanguinated 2 h later to prepare serum specimens.

2. TNF 誘導作用

OK-432 等の BRM の投与により TNF を血清中に誘導する場合、BRM の投与がトリガリング、プライミングとよばれる 2 回にわけてなされると、TNF が強く誘導されることはすでに報告されている。¹⁶⁾ Fig. 2 に示すように本実験においても、既報¹⁷⁾と同様に OK 432 については、プライマーとして 10 μg /マウスを、トリガーとして 300 μg /マウスを尾静脈より投与することにより、血清中に約 1000 U/ml の TNF を誘導することが確認された。この実験条件下で FK-23 標品をトリガーとして投与すると、用量依存的に TNF を誘導し、100 μg /マウス以上の用量では血清中の TNF レベルは約 1000 U/ml に達した (Fig. 2)。また、Fig. 3 に示すように、FK-23 標品をプライマーとして 1—10 μg /マウスの投与を行った場合にも、TNF 産生を誘導し、10 μg での血清中濃度は約 1000 U/ml に達した。なおこの条件下で FK-23 標品の 10 μg をプライマーとして、300 μg をトリガーとして投与すると 1000 U/ml の TNF がでることは確認してある。以上の成績から、FK-23 標品は、プライマーとしてのみならずトリガーとしても OK 432 と同程度の強い TNF 誘導活性を持つことが示された。

3. マウス腹腔内マクロファージによる *in Vitro* での TNF 産生誘導作用

FK-23 標品が、*in vitro* で直接的にマクロファージを活性化して TNF 産生を誘導するか否かを調べた。Fig. 4 で示すとおり、FK-23 標品 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を培地に添加すると、培養 4 時間以後に TNF が培地中から 1 U/ml 以上検出された 10—100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の FK-23 標品の存在下でその濃度は 100 U/ml に達し、OK 432 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 処置と同程度であった。なおこの TNF 産生は、微量 (1 ng/ml) 以上の内毒素 (リポ多糖) の存在で増強することは観察しているが、¹³⁾ FK-23 標品 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも混入する内毒素濃度は 80 pg/ml 以下であることを確認した。

4. 好中球に対する *in Vitro* での活性化能

LPS, OK 432 等の BRM の刺激は好中球を活性化し、その粘着性を増すことが知られている。¹⁴⁾ FK-23 標品にも同様の好中球活性化作用があるかを、OK 432 のそれと比較検討した。Fig. 5 に示すように、FK-23 標品は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で好中球の粘着性を増強した。この増強作用は重量

Fig. 3. Priming Activity of FK-23 Preparation to Induce for TNF Production in Mice

C3H/He mice treated i.v. with various doses of FK-23 preparation ($\circ$) or 0.3KE/mouse of OK432 ($\bullet$), and 3 h later with OK432 (3KE/mouse). Serum specimens were obtained as described in Fig. 2.

Fig. 4. *In Vitro* TNF Production by FK-23 Preparation-Stimulated Murine Macrophages

TNF activity in culture media of macrophages were measured as described in Materials and Methods. Macrophages were cultured without ($\circ$) or with 1 μg ($\bullet$), 10 μg ($\blacksquare$) and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\blacktriangle$) of FK-23 preparation or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of OK432 ($\square$).

Fig. 5. Neutrophils Adherence Induced by FK-23 Preparation or OK432

Neutrophils were incubated with FK-23 preparation (●) or OK432 (○) and the extent of their adherence was measured photometrically after staining with crystal violet.

Fig. 6. Active Oxygen Species Production of FK-23-Stimulated Murine Neutrophils

Neutrophils were incubated with FK-23 preparation or OK432 and then their chemiluminescence was measured in the presence of luminol (final 0.9×10^{-4} M).

濃度で比較した場合 OK-432 のそれと同程度のものであった。また、FK-23 標品の好中球に対する活性酸素産生誘導能を化学発光を指標として検討した。Fig. 6 に示すように、OK 432 100 μg/ml の添加によって、化学発光が誘導され、FK-23 標品 300 μg/ml の添加では、顕著な化学発光が認められた。

5. リンパ球幼若化誘導作用について

FK-23 標品のリンパ球幼若化誘導作用を検討した。その結果、対照として用いた concanavalin A (1 μg/ml) や、*E. coli* LPS (50 μg/ml) が ³H-thymidine の取り込みを明らかに促進（それぞれの S.I. は 24.6 ± 4.6 及び 8.7 ± 0.7 ）したのに対し、FK-23 標品は 0.4—50 μg/ml の濃度範囲ではほとんど影響を及ぼさなかった (S.I. = 1.0 ± 0.2 — 1.5 ± 0.3)。なお、OK-432 も 0.4—50 μg/ml の範囲ではその S.I. はすべて 1.4 以下で、リンパ球幼若化は認められなかった。

考 察

本研究において、*E. faecalis* 由来の FK-23 標品が、*in vitro* 並びに *in vivo* でマクロファージ及び好中球の活性化を促す BRM 作用をもつことを明らかにした。すなわち FK-23 標品は、*in vitro* で直接マクロファージからの TNF 産生を誘導し、好中球に対しては粘着能を増強し、生化学的指標である化学発光をも誘発した。また FK-23 標品はマウス腹腔内に投与することにより、すみやかに大量の好中球を腹腔内に誘導することから、本標品は森川らの方法¹¹⁾によれば OK 432 と同じく好中球高応答型の BRM に分類されよう。また、本標品の 2 回の連続投与で TNF が大量に血中に放出されるという成績は、本標品が全身的な食細胞の活性化を誘導し得ることを示す。

すでに著者らは、FK-23 標品がマウスにおける固型腫瘍、腹水型腫瘍の増殖を抑制することを見いだしており（未発表）、山本らも *E. faecalis* ホルマリン処理死菌体が、マウスにおいて抗腫瘍活性を示すとともに NK 活性を高めることを報告している。⁹⁾ このように、FK-23 標品の BRM としての特性は OK 432 と基本的に一致していると考えられる。ただし OK 432 については細胞性免疫能等のリンパ球の関与する免疫学的応答を増強することが報告されており、FK-23 標品についてのこの点の検討は今後の課題として残されている。

また我々は、FK-23 標品の経口投与が免疫抑制マウスで作成された全身性緑膿菌感染症及びカンジダ感染症のモデルにおいて明らかな予防的効果を示す実験結果を得ている。これらの日和見感染症に対する生体防御機構の第一線に好中球が働くことが知られており、本研究が示した FK-23 標品の好中球活性化作用は、その感染防御のメカニズムに関与しているものと推定される。

Lactobacillus casei その他の乳酸桿菌^{3,5,7)}及び、ビフィズス菌 *Bifidobacterium infantis*⁴⁾ など腸管内に常在する乳酸産生菌に食細胞活性化能が報告されている。同じく乳酸産生能を持つ腸内フローラの主要メンバーである *E. faecalis* が類似の BRM 活性を持つことは興味深い。これとは別に、グラム陽性菌の細胞壁構成成分であるリポタイコ酸がマクロファージ活性化能を持つことが知られており、¹⁸⁾ したがってこの活性がリポタイコ酸をもつ上述のグラム陽性乳酸産生細菌菌体に共通に見られることが推察される。しかし、著者らが検索した範囲では、*L. acidophilus*, *B. breve* 等の菌体標品は *in vivo* でほとんど TNF 産生を誘導せず、菌種及び菌株によりその能力には大きな差があるものと思われる。

E. faecalis が腸内細菌であることを考えると、本菌が腸管内に存在する状態で十分な BRM 活性を発揮するか否かは、腸管フローラの生理学的意義という観点からは重要な問題である。予備的実験から FK-23 標品を正常マウスに経口投与した場合には、食細胞機能の明かな変化は認めに至っていないが、FK-23 標品 1—10 mg/マウス/d を 7 日以上経口投与された担癌マウスにおいては、制癌効果並びに TNF 産生能の増強がみられている（未発表）。したがって、*E. faecalis* など特定の腸内菌が腸管内で BRM 作用を発揮している可能性は十分考えられる。ヒト腸管内でも特に免疫系が発達した小腸部位においては、*E. faecalis* は他の乳酸菌 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 等よりも豊富に存在し細菌叢の主要メンバーとなっているので、*E. faecalis* の免疫学的役割は相対的に大きく、正常な生体の免疫能にもかなりの影響を与えうると推察される。事実、ノトバイオートのミニブタでは、*E. faecalis* の腸内定着によって血流中の単球の貪食能が高められることが報告されている。¹⁹⁾ 本研究で明らかにされた FK-23 標品の BRM 活性が経口投与した際にどのように発揮するか、今後明らかにする必要があると考えている。

謝辞 本研究に際し、OK 432 を分与していただいた中外製薬株式会社、及びマウスの飼育管理にご協力頂いた帝京大学中央動物施設に感謝いたします。

引用文献

- 1) Y. Kawai, *Microecol. Ther.*, **14**, 109 (1984).
- 2) M. Furushiro, H. Sawada, K. Hirai, M. Motoike, H. Sansawa, S. Kobayashi, M. Watanuki, T. Yokokura, *Agr. Biol. Chem.*, **54**, 2193 (1990).
- 3) Y. Kohwi, K. Imai, Z. Tamura, Y. Hashimoto, *Gann*, **69**, 613 (1978).
- 4) Y. Kohwi, Y. Hashimoto, Z. Tamura, *Bifidobacteria Microflora.*, **1**, 61 (1982).
- 5) I. Kato, T. Yokokura, M. Mutai, *Micro. Immunol.*, **27**, 209 (1986).
- 6) G. Perdigon, M. E. Nader-de-Macias, S. A. Ivarez, G. Oliver, A. A. Pesce-de-Ruizholgado, *Infect. Immun.*, **53**, 404 (1986).
- 7) 後藤俊幸, 横田芳武, 松本清子, 中井益代, 山形裕士, *感染症学会誌*, **62**, 1105 (1988).
- 8) N. Suegara, K. Ishihara, Y. Kawai, *Microecol. Ther.*, **15**, 271 (1985).
- 9) 山本克弥, 田沢賢次, 藤巻雅夫, 坂本憲市, 小西健一, *Biotherapy.*, **4**, 670 (1990).
- 10) 嶋田貴志, 岩谷綱一, 柳沢昊永, 河合康雄, 安部 茂, 山口英世, 日本栄養食料, 印刷中.
- 11) K. Morikawa, Y. Kikuchi, S. Abe, M. Yamazaki, D. Mizuno, *Gann*, **75**, 370 (1984).
- 12) M. Sato, Y. Shimada, H. Inagawa, H. Minagawa, T. Kajikawa, H. Oshima, S. Abe,

- M. Yamazaki, D. Mizuno, *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 342 (1986).
- 13) T. Okutomi, Y. Nakajima, F. Sakakibara, H. Kawauchi, M. Yamazaki, *Cancer Res.*, **47**, 47 (1987).
- 14) N. Yakuwa, T. Inoue, T. Watanabe, K. Takahashi, F. Sendo, *Microbiol. Immunol.*, **33**, 843 (1989).
- 15) 杜 徳極, 山崎正利, 医学の歩み, **149**, 579 (1989).
- 16) H. Oshima, H. Inagawa, M. Sato, Y. Shimada, S. Abe, M. Yamazaki, D. Mizuno, "Host Defense Mechanisms Against Cancer," ed. by I. Urushizaki, T. Aoki, E. Tsubura, Excerpta Medica, Amsterdam, 1986, pp. 92—100.
- 17) 稲川裕之, 大島治之, 水野伝一, 医学の歩み, **140**, 837 (1987).
- 18) H. Usami, A. Yamamoto, Y. Sugawara, S. Hamada, T. Yamamoto, K. Kato, S. Koikeguchi, H. Takada, S. Kotani, *Br. J. Cancer.*, **56**, 797 (1987).
- 19) L. Mandel, M. Talafantova, I. Trebichavsky, J. Travnicek, *Folia Microbiol.*, **34**, 64 (1989).