

資料

江津市桜江町産桑の実由来有用微生物の分離

渡部 忍*

1. 目的

桑の葉は、1-deoxynojirimycin (DNJ) やファゴミンといった機能性成分を含み、健康食品素材として広く利用されている。鳥根県産業技術センターではこれまでに、桑葉に含まれる quercetin-malonyl-glucoiside (Q3MG) に注目し動脈硬化予防効果、血糖値上昇抑制効果を明らかにするなど、桑葉を原料とした製品開発を積極的に支援してきた¹⁾。一方、乳酸菌は古くから発酵食品のスターターとして利用されてきたほか、整腸作用²⁾、免疫賦活作用³⁾、血中コレステロール低下作用⁴⁾ など多様な健康機能が報告されており、健康食品市場で重要な素材となっている。

本研究では、桑のブランド価値向上を目的として江津市桜江町の桑圃場（しまね有機ファーム株式会社、江津市桜江町）で有機栽培された桑の実を分離源に有用乳酸菌の分離を試みた。その結果、プロバイオティクスとして働くとともに免疫賦活作用に有意な結果が認められる乳酸菌が分離されたため報告する。

2. 方法

2.1 桑の実からの微生物分離

採取した桑の実を Lactobacilli MRS Broth (Difco 製、以下 MRS) 液体培地で集積培養したのち、1% 沈降性炭酸カルシウム含有 MRS 寒天培地に播種し、ハローを形成したコロニーを釣菌した。グラム染色陽性、カタラーゼ陰性の桿菌および球菌を分離した。

2.2 人工消化液耐性試験

100 unit/mL Pepsin 含有 MRS 液体培地 (pH2.5) を人工消化液として分離菌株を 37℃、4 時間培養した。そののち 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), carboxyfluorescein diacetate (CFDA) を用いた活性染色法により生菌数を測定し、培養前後の菌数の比から耐性を評価した。

2.3 酸耐性試験

pH を 2.0, 2.5, 3.0 に調整した MRS 液体培地を用いて 37℃ で培養し、経時的にサンプリングしコロニーカウント法で生菌数を測定した。

2.4 腸管上皮細胞への付着性評価

ヒト大腸癌細胞由来 Caco-2 細胞は腸管上皮細胞様に分化することから腸管上皮細胞への付着性評価に用いた⁵⁾。Caco-2 細胞を 1% NAA (non-essential amino acid) (Sigma-Aldrich 製)、20% FBS (牛胎児血清, Fetal Bovine Serum) (Sigma-Aldrich 製)、100 unit/mL Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich 製) 含有 D-MEM (日水製) 培地で 14 日間培養後、抗生物質不含培地に交換した。MRS 液体培地で培養した各菌株を抗生物質不含培地に交換し 5.0×10^8 CFU/well になるように Caco-2 細胞に添加した。1 時間培養した後に培地を除去しリン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) で 30 秒間ゆっくり振とうして洗浄した。洗浄を 3 回繰り返したのち、トリプシン処理により Caco-2 細胞を回収した。細胞に付着した菌数は、MRS 寒天培地を用いたコロニーカウント法により測定し 1 ウェルあたりの生菌数で示した。

2.5 分離菌株の免疫賦活作用

分離菌株を 0.5% lactose 含有 M17 (Difco 製) 培地で 2 日間培養後、集菌し滅菌蒸留水で 1 回洗浄し培地を除いたのち、凍結乾燥した。乾燥菌体を 10 mg/mL になるように滅菌蒸留水で再度懸濁し生菌用検体とした。また、生菌用菌体を沸騰水浴中で 10 分間処理し死菌用検体とした。各検体を 10% FSB 含有 PRM1640 培地で 100 ng/mL になるよう希釈し培養プレート各ウェルに 100 μ L 播種した。マウスマクロファージ様株化細胞 (J774.1) を抗生物質不含 10% FSB 含有 RPM1640 培地で 5 日間培養した。96 ウェルプレートに 1.2×10^4 cells/well になるよう播種し 3 時間後に分離菌株を添加した (最終濃度 50 ng/mL)。さらに 24 時間培養したのち、培養液中に分泌されたインターロイキン-12 (Interleukin-12, 以下 IL-12) を ELISA 法 (IL-12 検出キット (株) シバヤギ製) により検出した。陽性コントロールには Lipopolysaccharide (以下 LPS) (wako 製) を使用した。

2.6 菌株の同定

分離菌株の同定は、研究用検査キット API (Analytical Profile Index) シリーズ (以下 API 同定キット) (オメリュー・ジャパン株式会社製) を用いて行った。マニュアルに従い API データベース (以下 ApiDB) との相同性および ApiDB 内で最も典型的なパターンを示す菌株との相関性 (T-index) から判定した。

* 生物応用科

3. 結果

3.1 桑の実からの微生物分離

採取した桑の実から乳酸菌と示唆された菌株を150株得た。

3.2 人工消化液耐性評価

乳酸菌がプロバイオティクスとして整腸作用を発揮する条件として、生きて腸まで届き、腸内である程度滞留すること⁶⁾とされることから、人工消化液耐性試験、酸耐性試験および腸管上皮細胞への付着性を評価した。

得られた150菌株について1次スクリーニングとして人工消化液耐性評価を実施し菌数比10%以上の耐性を示したA37, B30, C19の3株を得た(図1)。

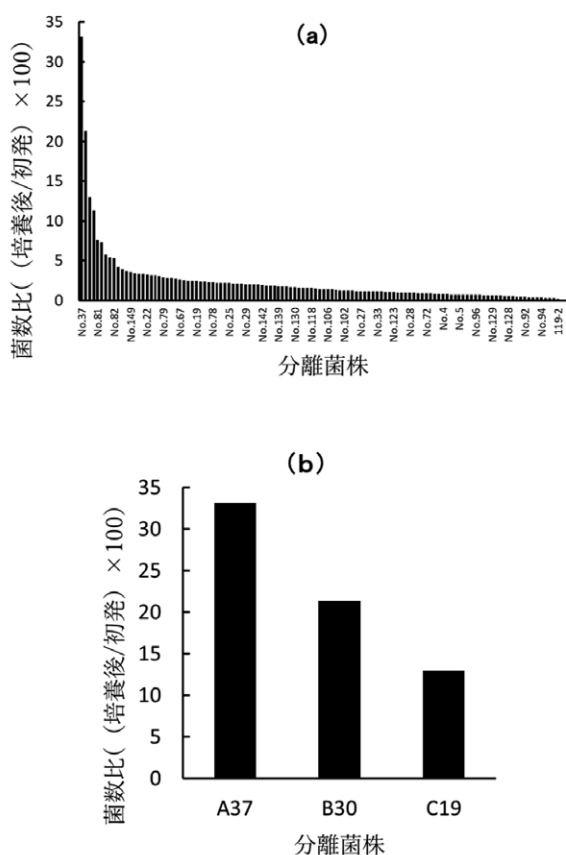


図1 人工消化液耐性試験結果

(a) : スクリーニング結果,
(b) : (a) のうち菌数比率10%以上の菌株を抜粋

3.3 分離菌株の酸耐性評価

人工消化液に耐性を示した3株について、さらに詳細に酸耐性試験を実施した結果を図2に示す。酸耐性が知られている *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103 株(以下 GG 株)を比較として使用した。A37, B30 は GG 株と同様に4時間培養後でもコロニー形成がみられたが、C19 は培地の pH に関わらず2時間後に $1.5\text{--}2.8 \times 10^4$ CFU/mL, 4時間後に $1\text{--}0.4 \times 10^2$ CFU/mL に減少した(図2)。

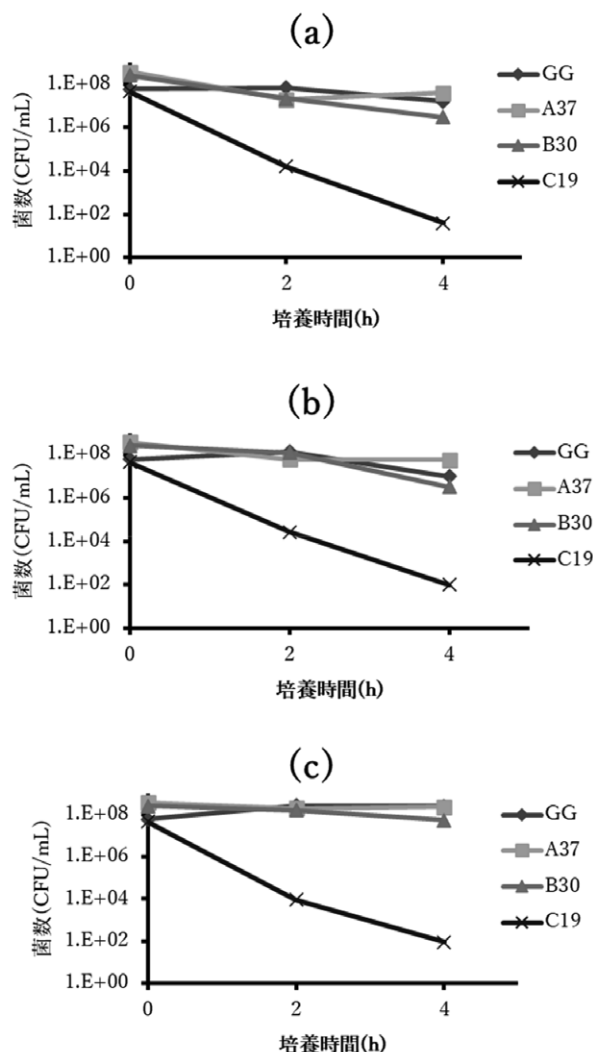


図2 分離菌株の酸耐性評価結果

(a), (b), (c) はそれぞれ pH2.0, pH2.5, pH3.0

3.4 腸管上皮細胞への付着性評価

次に酸耐性を示した A37, B30 について Caco-2 細胞への付着性の評価を行った。プロバイオティクスとして広く利用されている GG 株を比較として使用した。各ウェル菌数を測定した結果、GG 株では 3.1×10^6 CFU/well だったのに対して、A37, B30 はそれぞれ 6.3×10^4 CFU/well, 8.2×10^5 CFU/well であり、B30 は GG 株と同程度の付着性を示したのに対し、A37 は有意に少なかった(図3)。

3.5 分離菌株の免疫賦活作用

乳酸菌による免疫賦活作用として、マクロファージや樹状細胞からの様々なインターフェロン(IL-6, IL-10, IL-12 など)の発現が報告されている。特に IL-12 は CD4T 陽性

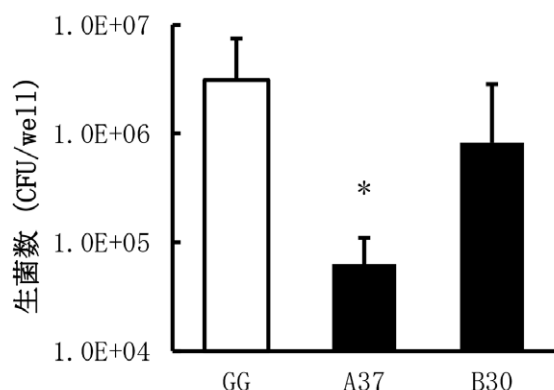


図3 Caco-2細胞への付着性

* : vs GG, p < 0.05, n=5

細胞の分化を介して、ウイルス感染細胞やがん細胞への攻撃を増強する INF γ の産生を亢進することで生体防御機能を高めることが報告されている⁷⁾。そこで、分離菌株 A37, B30 の付加価値を高めるため IL-12 誘導活性を評価した。その結果、生菌体では A37, B30 共に陽性コントロールである LPS に比べ有意に低い値であったのに対し、死菌体では LPS に比べ有意に高い値であった (図4)。

3.6 分離菌株の同定

A37, B30 について API 同定キットを用いて菌株の同定を行った。キットのマニュアルに従い ApiDB と照合した結果、両株ともに相同性が 99.8% であったことから、いずれも *Lactococcus lactis ssp. lactis* と同定した (表1)。

3.7 まとめ

本研究では、江津市桜江町の有機栽培圃場から採取した桑の実を分離源として人工消化液耐性、酸耐性、Caco-2細胞への付着性を指標に微生物のスクリーニングを行い、B30を得た。Caco-2細胞への付着性が低いA37とB30の死菌体はJ774.1細胞においてIL-12の分泌を強く誘導することが確認された。また、両菌株はともにAPI同定キットによる生物学的的手法において*Lactococcus lactis ssp. lactis*と同定された。以上の結果から生菌としてのB30はプロバイオティクス素材として、またA37, B30の死菌体は免疫賦活素材として健康食品への応用が期待される。今後は、これら菌株の安全性評価やヒトを対象とした臨床試験による有効性の検証を進めるとともに、地域資源を活用した新たなプロバイオティクス素材としての情報提供・実用化検討を行う予定である。本報の成果は、地域資源に基づく新たな素材の創出を通じて、今後の健康食品開発に寄与することが期待される。

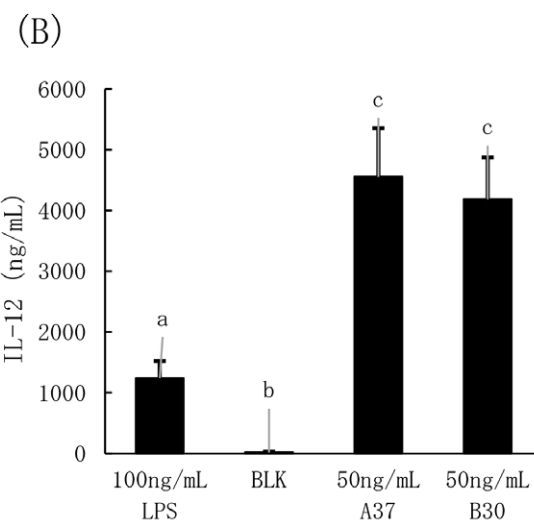
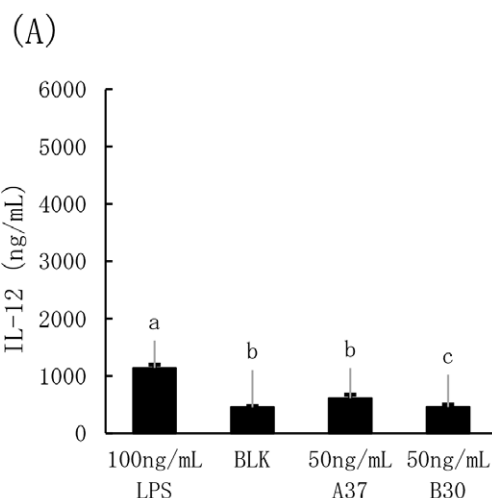


図4 分離菌株の生死による IL-12 誘導活性

(A) : 生菌, (B) : 死菌,

a, b, c: 異なる文字は有意差あり, p < 0.05, n=3

表1 API同定キットによる菌株の同定結果

No	Strain	同定確立 ApiDBとの 相性 (%)	T-index *
A37	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	99.8	0.91
B30	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	99.8	0.91

* ApiDBのうち、最も典型的なパターンを示す菌株との相関性 (最大値1)

謝 辞

本研究を実施するにあたり、桑の実の提供をいただきました、しまね有機ファーム株式会社 代表取締役社長 古野利路氏に心より感謝いたします。

文 献

- 1) 勝部拓矢, 小川哲郎, 田畑光正. 産学官連携による地域農・畜・水産物活用のための機能性食品開発研究を迫る (27) 鳥根県機能性食品産業化プロジェクトの取り組み. 食品と開発. 2013, 48, 11, p.80-82.
- 2) 脇尚子. 植物性発酵食品由来の乳酸菌 *Lactobacillus brevis* KB290 の健康効果. 日本醸造協会誌. 2020, 115 巻, 9 号, p.513-520.
- 3) 神山恭子, 跡部季子, 上杉泰介. くず餅由来乳酸菌の免疫調節機能によるスクリーニングと免疫賦活作用. 診療と新薬. 2023, 60, p.297-307.
- 4) 渡部忍. 津田かぶ由来乳酸菌 (*Lactobacillus brevis* 119-2) のコレステロール低下効果. 鳥根県産業技術センター研究報告. 2014, 第 50 号, p.1-7.
- 5) 木下秀樹, 渡辺真通, 齊藤忠夫. プロバイオティック乳酸菌の血液型抗原を介したヒト腸管付着性機構. 日本乳酸菌学会誌. 2008, Vol.19, No.2, p.78-88.
- 6) 辨野義己. プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. モダンメディア. 2011, 57 巻, 10 号, p.277 ~ 287.
- 7) 薩 秀夫, 梅谷華奈, 日浦月穂, 柴田奈那, 鈴木政彦, 辻川勇治, 坂根 巖. IL-12 発現を亢進するプロバイオティクスの探索・解析. 前橋工科大学研究紀要. 2022, 第 25 号, p.47-48.