

11455

乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* EF-2001 加熱死菌体の
血清学的確認法

柳沢 春永 梅川 美佳子 鈴木 郁功

岩佐 敏廣 下橋 博隆

(鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療栄養学科, バイオクイーン株式会社
微生物研究部, 東京薬科大学薬学部第二生化学教室)

生体応答調節物質(BRM)である乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* の加熱死菌体(菌体成分)は好中球やマクロファージなどの免疫系細胞を活性化する¹⁾. 実験動物は TNF- α を產生し, また免疫能促進作用, 抗腫瘍作用を示した^{2,3)}. この *E. faecalis* に属する EF-2001 株の死菌体は BeRMKAIN や Bio AMB などの健康食品に使用されている.

さらに, その BRM 効果により, 近い将来 EF-2001 菌株の死菌体は種々の他食品に対する添加が予測される.

そのような場合, 本来の EF-2001 菌株の死菌体が種々の食品に実際含まれているかどうかを検査し, 証明することを必要とする. しかし, EF-2001 菌株は培養により増殖(増菌)させた後, 加熱処理により死菌体となっているので, 細菌の生理, 生化学に基づいた分類・同定技法⁴⁾を用いることは不可能である.

一方, 医学細菌学では診断を迅速にするために免疫血清を用いる血清学的分類・同定法⁵⁾が行われている. また, EF-2001 株の菌体は加熱処理により多少変形したり, 縮小したりしているけれども充分に球菌としての原形を留めている. そこで, 抗原・抗体の特異反応に基づいた血清学的方法を利用した凝集反応⁶⁾と蛍光抗体法⁷⁾により, 食品に含有されている *E. faecalis* EF-2001 株の死菌体を同定ならびに証明することを試みた.

材料と方法

動物, 飼育場所: 日本家ウサギ雄 2 匹(体重約 2.5kg)は日本 SLC(株)から購入, 3 週間以上予備飼育後, 免疫血清作製のために使用した. 予備飼育, 実験期間を通して鈴鹿

English Title for No. 11455: Serological methods for the detection of heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 cells. Takaharu Yanagisawa, Mikako Umekawa, Ikukatsu Suzuki, Toshihiro Iwasa and Hirotaka Shimohashi [Department of Clinical Nutrition, Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Department of Microbial Research, Bio-Queen, Ltd., Tokyo and Department of Second Biochemistry, Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Tokyo.] *Medicine and Biology*. 139(2): 39-44, August 10, 1999.
(著者校正)

医療科学大学の動物舎で飼育した。

菌株、免疫原：東京薬科大学薬学部第二生化学教室（山川敏郎教授）にて -80°C で冷凍保存されていた *E. faecalis* EF-2001 を培養し、生理食塩水で洗浄後、 60°C 、30分加熱処理した菌液を、波長 660nm で吸光度 OD15 (10倍希釈で 1.5) に調整し、免疫原として 1 匹のウサギに投与した。もう 1 匹のウサギに投与する免疫原としては、日本ベルム社(株)で作製した *E. faecalis* EF-2001 の加熱死菌体 (105°C , 20 分) 粉末を、生理食塩水に懸濁させたもの (OD15) であった。他の 2 株 (*E. faecalis* Fc-5 と *E. faecium* KZ) は東京薬科大学の大学院生と研究生がそれぞれ保存所持していた菌株である。

免疫法、免疫スケジュール：両免疫原とも初回はウサギの腹腔内に 0.5ml、耳静脈内に 0.1ml を注射した。1 週後から週 2 回ずつ 0.2, 0.3, 0.4, 0.5ml と 0.1ml ずつ增量させてウサギの耳静脈に注射し、1 ml を注射した後 7 日目に試血して凝集反応と沈降反応で EF-2001 株に対する抗体価を調べた。さらに、1 週間に 1 回ずつ、計 2 回の追加免疫をして 7 日後に全採血し、免疫血清を得た⁸⁾。

蛍光色素のラベル：免疫血清から 33% 飽和硫酸で沈殿させ、 γ -グロブリンを分画した。透析により硫酸を除いた γ -グロブリン画分に蛍光色素フルオレセイン・イソチオシアネイト (FITC, Sigma 製) を結合させた。そして、Sephadex G-25 (Pharmacia 製) カラムを通して遊離の色素 FITC を分離した。次に、FITC 結合 γ -グロブリンを 0.005M リン酸緩衝液、pH 8.42 で平衡化した DEAE-cellulose (生化学工業製) を充填したカラムに吸着させた。そして、0.01M と 0.1M リン酸緩衝液、pH 6.40 で溶出してくる部分を適切な蛍光抗体液とした^{7,9)}。

凝集反応、沈降反応：リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 倍ずつ段階希釈した免疫血清 0.5ml に、*E. faecalis* EF-2001 の適当な濃度の菌懸濁液 0.5ml を加えて保温 (37°C , 2 時間) 後、冷蔵庫に 1 夜放置した。菌液が凝集する最大希釈値をその免疫血清の凝集素価とした。また、PBS で 200 倍希釈した免疫血清を 1 滴スライドグラス上に滴下し、それに EF-2001 死菌体の懸濁液をのせて混和すると 5 分以内に菌体が凝集するスライドガラス凝集法⁶⁾も行った。なお、他の 2 菌株については培養した菌体を 2 回 PBS で洗浄した後、凝集反応に使用した。

沈降素価は重層法によるリングテスト⁸⁾で測定した。すなわち、PBS で 2 倍希釈した抗体液を毛細試験管の底に入れ、その上に可溶性抗原を重層する。その境目に白い沈降線を形成した抗血清の最大希釈数を沈降素価とした。可溶性抗原は、EF-2001 加熱死菌体を PBS に懸濁した時の可溶性部分を抗原とした。

蛍光顕微鏡による観察：蛍光顕微鏡用試料の作成方法として BeRMKAIN や Bio AMB の場合は、それらをまず生理食塩水に懸濁させる。そして遠心により生理食塩水で洗浄した乳酸菌菌体の濃度をかえて無蛍光のスライドグラスに塗抹し、火炎もしくはエタノールで固定した。

EF-2001 加熱死菌体入り豆腐の場合は、スライドグラス上に豆腐の細片をのせ、もう 1 枚のスライドグラスを被せて押しつける。重なった 2 枚のスライドグラスは横にずらしてはがし、固定した。

試料を固定したスライドグラスに蛍光抗体液を滴下し、乾燥させないようにして室温で 30 分間反応させ、十分に PBS で洗浄した。無蛍光のグリセロール (Merk 製) と PBS (9 : 1) を滴下しカバーグラスをのせて、紫外線励起蛍光顕微鏡 (ニコン製) で特異的抗原抗体反応による蛍光色の菌体を観察した⁷⁾。

結果と考察

1. *E. faecalis* EF-2001 菌株に対する抗血清

E. faecalis EF-2001 の加熱死菌体 (105°C , 20 分) でウサギを免疫して作製した抗血清 A, B の EF-2001 加熱死菌体 (不溶性部分) に対する凝集素価と、その加熱死菌体の可溶性部分に対する沈降素価を比較した。

表 1 抗血清 A, B の *E. faecalis* EF-2001 菌体に対する凝集価

抗血清	血清希釈							
	×20	×40	×80	×160	×320	×640	×1280	×2560
A	+	+	+	+	+	+	+	-
B	+	+	+	+	+	+	+	-

A : 加熱死菌体で免疫。B : 60°C , 30 分加熱菌体で免疫。

表 2 抗血清 A, B の *E. faecalis* EF-2001 菌体可溶性物質に対する沈降価

抗血清	血清希釈					
	×1	×2	×4	×8	×16	×32
A	+	+	+	+	+	-
B	+	+	+	+	+	-

A, B : 表 1 と同じ。

表 1, 2 に示すように、抗血清 A, B の凝集素価は両者とも 1 : 1280 であり、沈降素価は 1 : 16 であった。それ故、凝集素価と沈降素価で判断するかぎり、加熱処理の条件は免疫血清の作製に影響をおよぼさなかった。また *E. faecalis* は 60°C , 30 分の加熱に耐える性質を持っている⁴⁾ので、死菌体と生菌による免疫の比較ということもでき、生菌体でも死菌体でも免疫原として抗体産生系を刺激する強さに変化が見られなかった。反応抗原は加熱処理 (105°C , 20 分) 後のものを用いているので糖質が抗原の主成分を構成していると考えられる。

Enterococcus 属は 1984 年まで蓮鎖球菌 *Streptococcus* の仲間に入れられており¹⁰⁾、沈降反応による血清学的分類では *E. faecalis* は *E. faecium*, *E. durans*, *S. bovis*, *S. equinus* と共に group D に属している⁴⁾。その group 抗原は球菌の

細胞膜に分布しており、著者ら⁴⁾の経験では group D 抗血清は作成しにくかった。しかも、group D の抗血清を作成することができたとしても、その抗体価は非常に低かった (1:4)。

前川ら⁶⁾は *E. faecalis* に属する多数の菌株を、吸収操作により作成した因子血清と凝集反応により 21 型に分類した。吸収前の抗血清はかなりの菌株間に交叉反応を観察したが、ホモ反応で最も高い凝集値を示した。

2. 抗 EF-2001 血清によるスライドグラス凝集反応

BeRMKAIN と Bio AMB に混入されている加熱死菌体が、本来の EF-2001 株

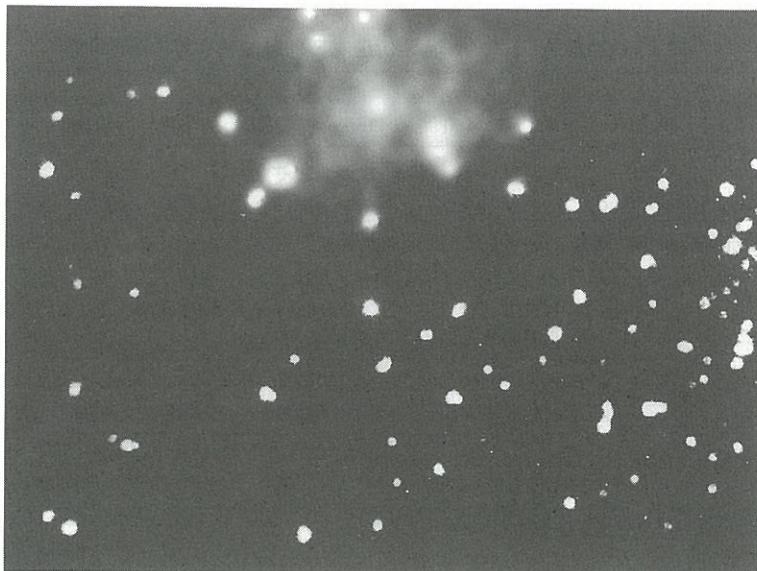


図 1 豆腐中の EF-2001 死菌体の蛍光顕微鏡写真

と同一のものか否かを調べた。まず、両検体を生理食塩水もしくは PBS に懸濁し、凝集反応に阻止的に作用すると考えられる乳糖や菌体から生じる可溶性部分を遠心により除いた。菌体などの不溶性部分は PBS で 2 回洗浄し、最終的に濃い懸濁液にした。スライドグラス上で抗 EF-2001 血清と菌体懸濁液とは素早く反応し凝集したので、BeRMKAIN と Bio AMB に入っている菌体は EF-2001 株であることが確認された。なお、新たに得た *E. faecalis* fc-5 株ならびに *E. faecium* KZ 株は凝集しなかった。

3. 蛍光抗体法による EF-2001 株の確認

抗 EF-2001 血清の蛍光標識抗体は精製過程でかなり希釈されており（凝集素価 1:160～1:320），最終的に凝集素価を 1:160 にして使用した。その希釈率に比例して特異性も高くなっていると思われる。

製造過程で添加した EF-2001 の加熱死菌体が製品としての豆腐中に存在するか否かを調べた。豆腐中に EF-2001 菌体が存在すると、その菌体に特異的に反応する γ -グロブリンが強固に吸着する。その上、 γ -グロブリンには蛍光色素が共有結合しているので、蛍光顕微鏡でみると暗い視野に蛍光を発する菌形が観察でき、EF-2001 菌体の証明となった。

写真は山形市で製造された EF-2001 菌体入り豆腐の蛍光顕微鏡写真である（図 1）。明らかに蛍光を発して光り輝く球菌を観察することができた。EF-2001 加熱死菌体のみを塗抹したスライドグラスで輝いて見える数と比較して、このくらいの菌数であれば、1g 当たり 10^7 の菌数が豆腐中に含まれていると推測される。東京都下の 5 地区で購入した豆腐には、蛍光を発するものは観察されなかつた。

結語

BRM を所有する乳酸菌 *Enterococcus faecalis*。EF-2001 の死菌体は健康食品として愛用され、かつ種々の食品に添加されるようになってきた。食品中に含まれている EF-2001 死菌体を確認、証明するのに、血清学的手法を用いた。EF-2001 菌体に対する抗血清はウサギの耳静脈に菌体を頻回注射して作製した。多量の EF-2001 死菌体が含まれている食品からは、菌体（不液性部分）を分離後、スライドグラス上で抗血清との間での凝集反応により EF-2001 の存在を確認できた。少量の死菌体が含まれている食品、豆腐の場合、抗血清中の γ -グロブリンに蛍光色素を結合させた蛍光抗体液を、豆腐を塗抹したスライドグラスと反応させる蛍光抗体法での確認が有効であった。

- 1) 大橋一智、他：*Enterococcus faecalis* (FK-23 株) 加熱死菌体の biological species modifier 活性。薬学誌 112 : 919-925 1992 —2) 大橋一智、他：*Enterococcus faecalis* FK-23 株加熱死菌体のマウス同系腫瘍に対する抗腫瘍効果。薬学誌 113 : 396-399 1992 —3) 長谷川貴史、他：腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) 加熱死菌体を用いた経口 BRM 療法の基礎的研究および臨床試験。動物臨床医学 3 : 11-20 1994 —4) Watanabe, T., et al. : Studies on Streptococci. I. Distribution of fecal streptococci in man. *Microbiol Immun* 25 : 257-269 1981 —5) Wilson, E., Zimmerman, R.A., & Moody, M.D. : Value of T-agglutination typing of group A streptococci in epidemiologic investigation. *Health Lab Sci* 5 : 199-207 1968 —6) Maekawa, S., Yoshioka, M. & Kumamoto, Y. : Proposal of a new scheme for the serological typing of *Enterococcus faecalis* strains. *Microbiol Immun* 36 : 671-681 1992 —7) 川生 明：図説蛍光抗体法。（株）ソフトサイエンス社 1983 —8) Shimohashi, H. & Mutai, M. :

Group antigens of *Lactobacillus acidophilus*. *J Gen Microbiol* 103 : 337-344 1977 —9) 宮本大誠訳：免疫蛍光法、(豊島聰監訳) 抗体の実験技術 II, 廣川書店 1995 191-213 —10) Schleifer, K.H. & Kilppgr-Bältz, R.: Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus daecium* comb. nov. *Int J Syst Bact* 34 : 31-34 1984

(受付：1999年6月29日)

[通信先 鈴木都功：鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療栄養学科,
鈴鹿市岸岡町1001-1 (〒510-0293)]

