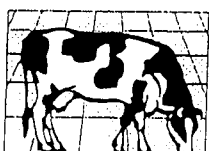


加熱処理乳酸球菌「EF-2001」の 生理効果と食品への応用

食品工業 Vol.44 No.6 別刷

乳酸菌、腸内フローラと健康 II

加熱処理乳酸球菌「EF-2001」の 生理効果と食品への応用



はじめに

近年、プロバイオティクスという言葉がよく用いられるようになったが、これは腸内フローラのバランスを改善することにより宿主に有益な影響をもたらす生菌およびそれらの増殖促進物質と定義されている。腸に生きたまま到達することのできる乳酸菌やビフィズス菌はこれを摂取することによって腸内菌叢のバランスが改善され、しかも腸内腐敗産物の低減や糞便性状の改善といった整腸作用がみられる^{1, 2)}。その結果、乳酸菌を利用した食品は特定保健用食品にも認定され、まさにプロバイオティクスの代表選手といえる。

一方、発酵乳や乳酸菌飲料中には生菌の数以上の乳酸菌やビフィズス菌の死菌体が含まれていることは周知の事実であり、これら死菌体が免疫賦活作用を有することは20年以上前から報告されている。例えば荒井ら³⁾は殺菌発酵乳混合飼料で飼育したマウスは牛乳混合飼料の対照群と比較し約8%寿命が延びることを明らかにし、さらにこの現象を詳細に検討した結果、この延命効果は発酵乳中の乳酸菌体を多く摂取することによるもので、菌の生死よりも菌体の摂取量が重要であるとされている。

また最近の研究では室崎ら⁴⁾が、*L. plantarum* の加熱処理菌体 (L-137) の経口投与によりTh1優

位に免疫機能を増強することを報告している。また、保井⁵⁾は加熱処理したビフィズス菌体の経口投与で菌体が腸管のパイエル板から取り込まれ、IgA⁺細胞数およびIgA産生細胞数を増加させることを明らかにしている。

われわれは当社の製造販売している乳酸球菌 *Enterococcus faecalis* 2001の加熱処理菌体「EF-2001」に関し、経口投与による免疫賦活効果を検討し、第13回バイオセラピー学会において発表した⁶⁾。以下にその発表内容と食品に利用する場合の加工特性について紹介したい。

1. 加熱処理乳酸球菌EF-2001の特徴

EF-2001は*Enterococcus faecalis* 2001株の培養後の洗浄菌体を加熱処理した後乾燥した菌末である。当社では既存の乳酸菌培養法の3倍以上の乳酸菌体を収穫できる大量培養法を開発し、さらに菌の持つ高い免疫賦活能を維持した製造法を確立している。製品については製造ロットごとに腫瘍壊死因子 (TNF- α 以下TNF) 活性およびインターロイキン12 (IL-12) の誘導能を測定し、それぞれの規格値を満たしたものを合格品としている。TNFの測定は山本の方法⁷⁾に準じて行い、同様にして測定した抗癌剤 (OK-432) との比活性値として表している。IL-12に関してはTNFの測定に準じて測定している。

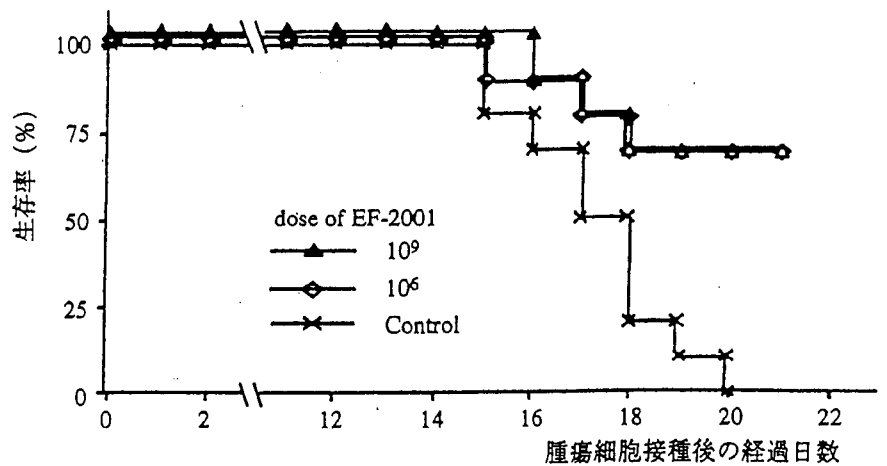
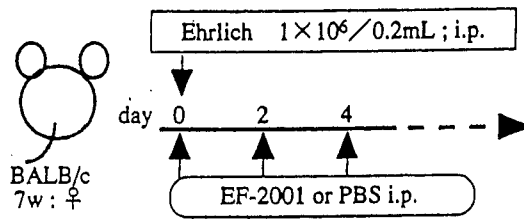


図1 EF-2001腹腔内投与マウスの腫瘍細胞接種後の生存率



2. EF-2001の経口投与による生理効果の検証

EF-2001の免疫賦活作用を経口投与で検証するために(社)北里研究所との共同研究を行った。使用したEF-2001はTNF比活性値:0.8、IL-12比活性値:1.0のものを用いた。

まずEF-2001の腫瘍細胞抑制効果の可能性を探るため、BALB/c 7週齢のマウス(1群10匹)にエールリッヒ腹水癌細胞を腹腔内接種した後、EF-2001を腹腔内投与した。図1⁶⁾に腫瘍細胞接種後

のマウス生存率を示した。対照群に比較し明らかな延命効果が認められた。生存したマウスは実験終了時まで腹水増加による腹部の膨張もなく活発な動きを示していた。

次に、エールリッヒ腹水癌細胞を腹腔内接種した後EF-2001を経口投与したときの延命効果を調べた。その結果を図2⁶⁾に示した。対照群が17日で全例死亡したのに対しEF-2001 10⁷投与群で19日、10⁸投与群で21日とEF-2001投与量の多いほど延命効果が高まった。なお10⁶投与群に関しては対照群と変わりなかった。

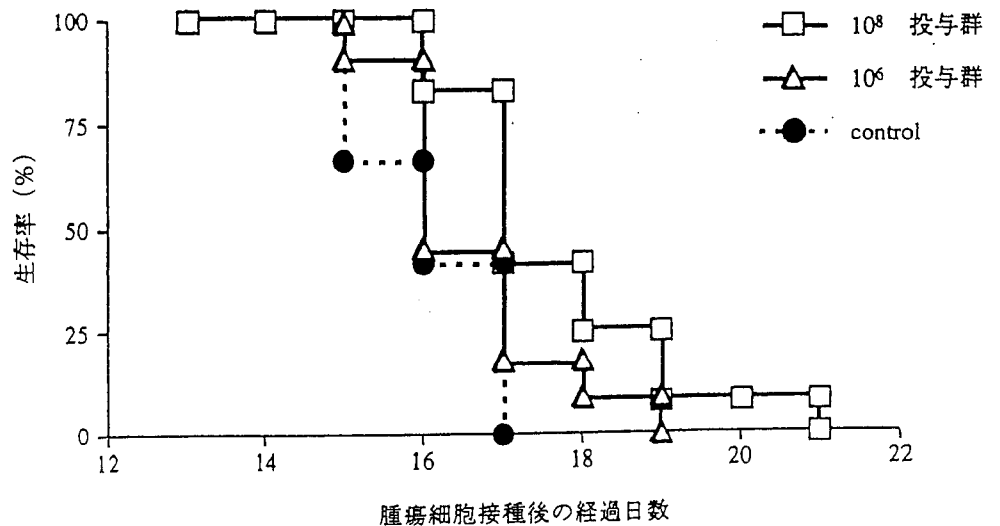


図2 EF-2001経口投与マウスの腫瘍細胞接種後の生存率

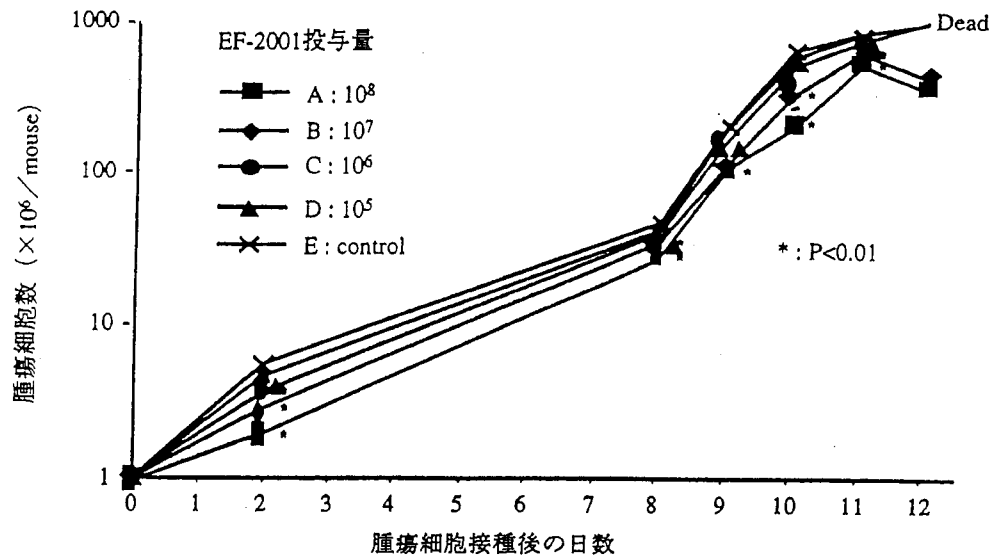


図3 EF-2001の Maus腹水癌細胞の増殖に及ぼす影響

EF-2001の延命効果について、腫瘍細胞に対する影響を検討するため 腹腔内腫瘍細胞数の推移に関し調べた。EF-2001経口投与群のうち 10^7 およ

び 10^8 の高濃度投与群に関しては2日目から11日目まで対照群と比較して腫瘍細胞数は有意に低い値を示し、12日目においては高濃度投与群のみが

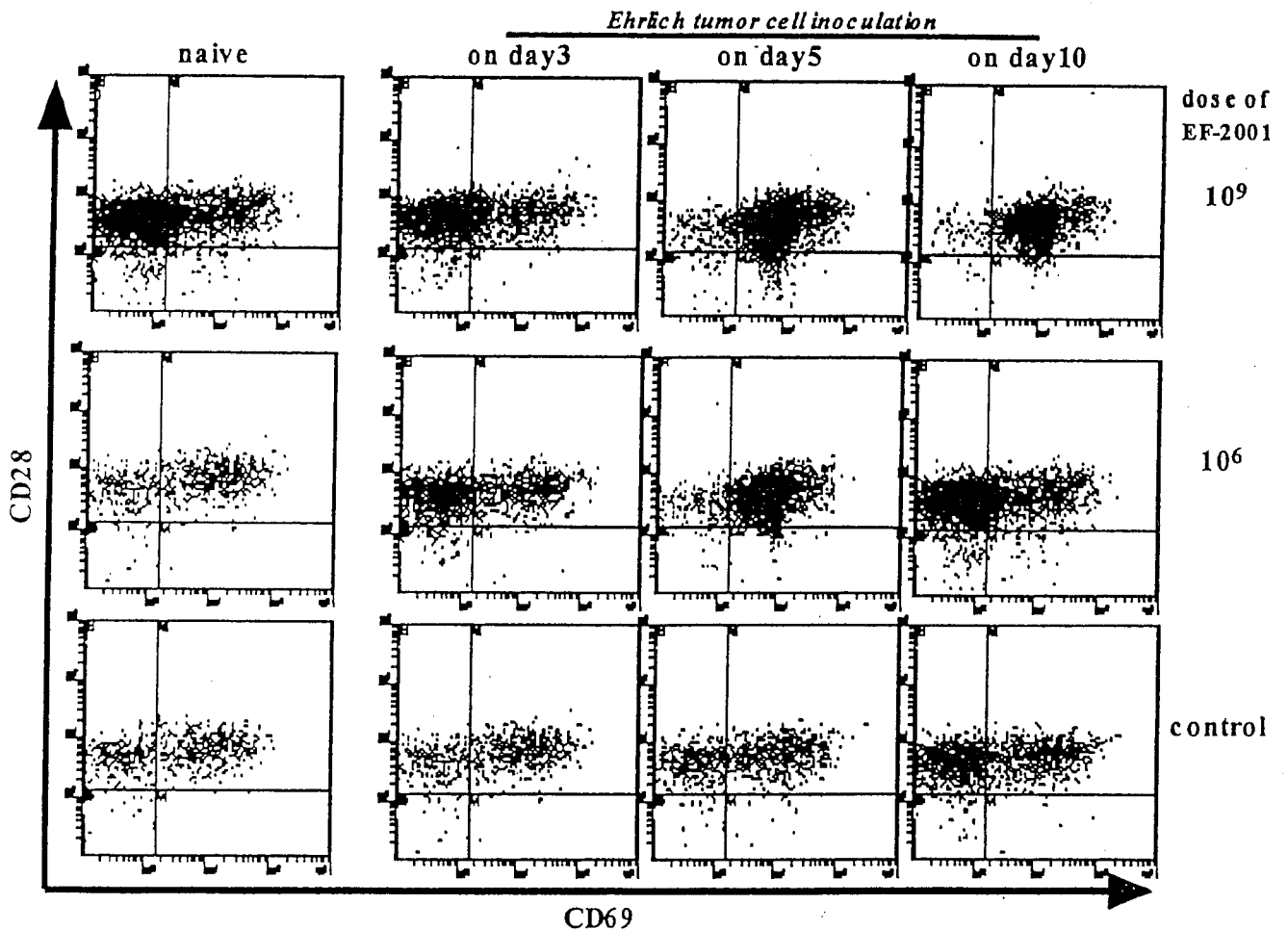


図4 EF-2001投与マウスの腫瘍細胞接種後のフローサイトメーターによるCD3陽性T細胞の活性化マーカーの発現の解析

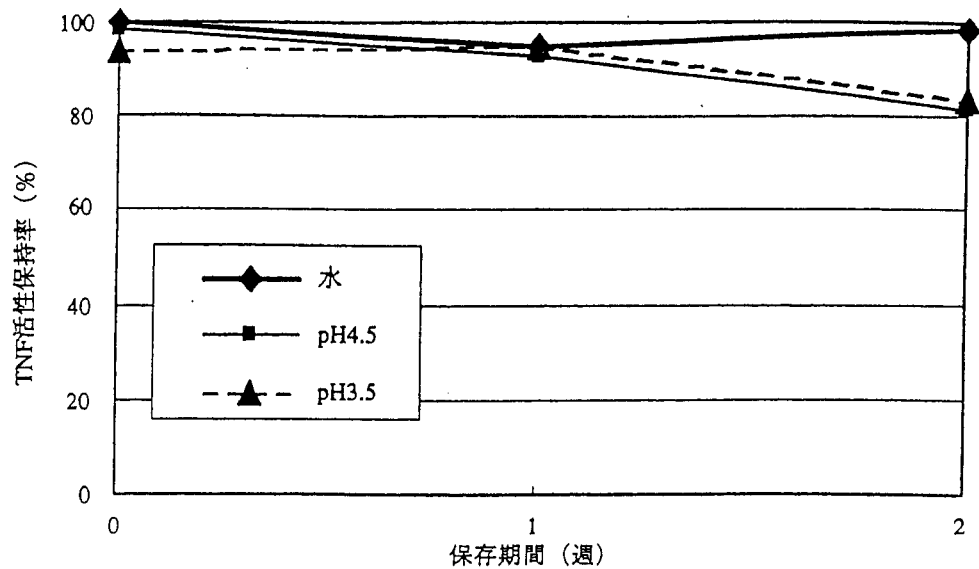


図5 EF-2001の低pH域における保存安定性 (50℃)

生存していた (図3)⁶⁾。

上記のようにEF-2001を高濃度経口投与することで腫瘍細胞の増殖が抑制されたため、リンパ球の活性化に関し詳細な解析を試みた。腫瘍接種と同時にEF-2001を 10^6 および 10^9 含む飼料を摂取させたマウスの腹腔リンパ球を回収し細胞自動解析システム (FACS) による解析を行った。ここでは抗原を認識した際の活性化T細胞の指標となるCD28とCD69分子の発現を調べた。その結果対照群と比較して、 10^9 投与群でT細胞の活性化が腫瘍細胞接種後の早い時期から認められた (図4)⁶⁾。

以上のようにEF-2001の経口投与により生体の免疫細胞が活性化されることが明らかになった。

今後はさらに詳しい細胞レベルでの解析を行うことによりEF-2001の免疫系に及ぼす作用機序を明らかにしていきたい。

3. EF-2001の食品加工特性

EF-2001は淡黄色のわずかに甘味を有する微粉末で冷水に容易に分散するが溶解はしない。EF-2001を添加することによって、食品の味や物性を変化させることなく免疫賦活機能を付加することができる。そこで種々の加工条件下でのTNF活性の安定性を調べた。

(1) pH安定性

図5はEF-2001をpH3.5、4.5のクエン酸緩衝液および水に懸濁し90℃、30分間保持した後50℃、

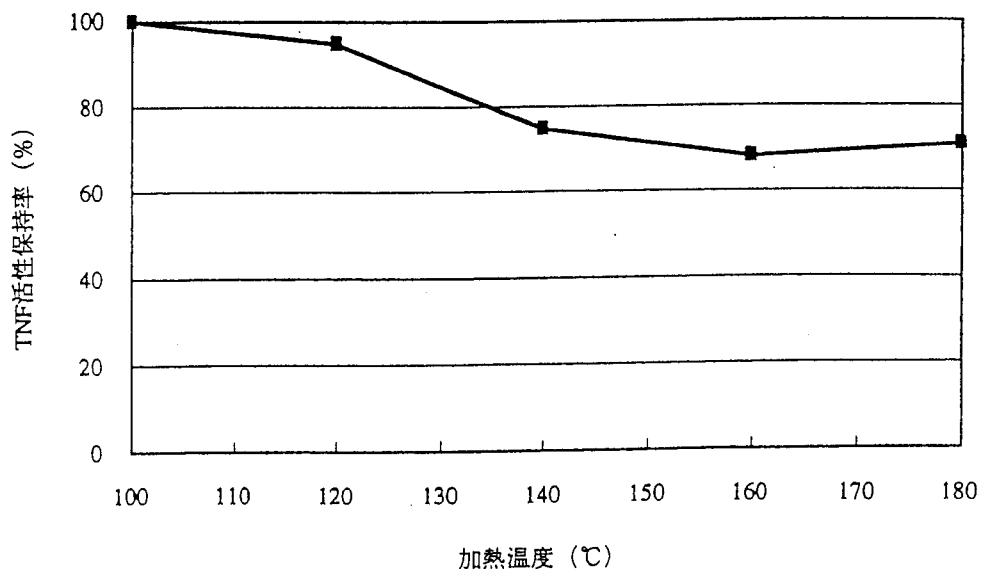


図6 EF-2001の加熱温度とTNF活性

2週間保存したときのTNF活性値の変化を見たものである。中性域では活性値の変化はほとんど見られないが、pH4.5以下になると50℃、1週間で10%、2週間で20%の活性の低下が見られた。このことからEF-2001は乳製品、麺類、豆腐あるいは豆乳等中性域の食品への添加が可能と考えられる。しかし、清涼飲料水やドリンク剤など低pH域の食品に添加する場合は保存期間や保存条件が限定されるかもしれない。

(2) 加熱安定性

図6はEF-2001を乾燥状態で加熱した時の安定性についてTNF活性値を指標に調べたものである。EF-2001を直接シャーレに取り100~180℃の間の各温度下で、25分間加熱した。TNF活性値は140℃以上になると約30%低下した。しかし、EF-2001をクッキーに添加することを想定して、小麦粉と混合して170℃、1時間加熱したときのTNF活性値の低下は約10%であったことから他の素材と混合することにより加熱によるTNF活性の低下は抑えられると考えている。以上からEF-2001はパン、ケーキ、焼菓子、スナック菓子等への添加も可能と思われる。さらに、EF-2001をレトルトパウチに添加することを想定してpH5.0のクエン酸緩衝液中で120℃ 60分間の加圧滅菌を行った。このような過酷な加熱条件においてもTNF活性は約10%の低下に抑えられた。これらの結果からEF-2001は加熱安定性の高い素材といえる。

おわりに

乳酸菌やビフィズス菌は一般に生菌でなければその機能を発揮しないと考えられている。しかし生菌を健康成人に経口投与しても、腸内で増殖しないと解釈できる報告もあり^{1, 2, 8, 9)}、整腸作用ははたして生菌由来のものかという指摘を受けるところである。さらに加熱処理菌体の投与においても腸内フローラの改善効果が報告されていることから^{3, 10)}、発酵乳中に存在する死菌体の影響は無視できない。このことから加熱処理菌体で観察された効果も生菌で認められたものと機構的には類似のものかもしれない。

従来乳酸菌やビフィズス菌は生菌での利用にこだわってきたために保証できる製品中の菌数は 10^8 個/g以下であった。またチルド流通の商品やフリーズドライ商品など限られた種類の食品にのみ使用されてきた。しかしEF-2001は製品1g当たり最大で 10^{12} 個の菌体の添加が可能である。さらに食品加工特性の項で示したようにEF-2001の持つ免疫賦活活性は加工による低減が少ないため、幅広く一般食品、飼料およびペットフードなどに応用できると考えている。今後は乳酸菌の加熱処理菌体を応用した付加価値の高い食品が数多く上市されることが期待される。

平成3年に特定保健用食品の制度が発足してから、種々の食品や食品素材の食効についての研究が充実し、機能解析が正しく評価されるようになってきた。加熱処理菌体についても生菌と同様に機能の検証を蓄積し、予防医学的食生活の改善を通じて日本の医療経済に大きく貢献していきたい。

謝 辞

本稿の執筆にあたり終始ご指導ご助言を賜りました(社)北里研究所 鈴木達夫博士、小林憲忠博士、脇田史朗氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) 田中隆一郎ほか：腸内フローラと発癌 一理研腸内フローラシンポジウム1、79~102 (1981)
- 2) 田中隆一郎、大脇 真：腸内フローラと食餌、理研腸内フローラシンポジウム12、85~142 (1991)
- 3) 荒井幸一郎ほか：腸内フローラと発癌、理研腸内フローラシンポジウム1、105~123 (1981)
- 4) 室崎伸二ほか：第54回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 59(2000)
- 5) 保井久子：食の科学、241、35~39 (1998)
- 6) 脇田史朗ほか：第13回バイオセラピー学会学術集会総会、抄録集、158(2000)
- 7) 山本哲郎：New food industry、35、1~7 (1993)
- 8) 菅 辰彦ほか：小児科臨床、30、1947~1953 (1977)
- 9) 東 幸雄ほか：日本食品科学工学会誌、48、35~43、(2001)
- 10) 和田光一ほか：腸内フローラと成人病、理研腸内フローラシンポジウム5、175~196 (1985)