

植物性乳酸菌による生理活性作用

長谷川 武夫^{1),2)}, 西本 裕喜¹⁾, 林部 昌弘¹⁾, 本田 俊孝¹⁾,
渡邊 恵介¹⁾, 村林 甲介²⁾, 福山 篤司²⁾, 渡邊 剛士¹⁾

¹⁾鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 放射線技術科学科

²⁾鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療画像情報学専攻

1. はじめに

乳酸菌とは糖類を発酵してエネルギーを獲得し、多量の乳酸を生成する細菌の総称で、形態的には球菌 (Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc) と桿菌 (Lactobacillus, Bifidobacterium) に分けられる^{1),2),3)}。

いずれも酸素の少ない環境に好んで生育し、各種の糖から乳酸を生成する。酸度に耐性 (pH 3~4 程度) を示すことが多く、栄養要求性はかなり複雑で、糖類に他の多くのアミノ酸やビタミン類を要求し、菌種・菌株によっては微量栄養素を加えなければ生育できないことも知られている^{2),4),5),6)}。

乳酸菌の発酵形式は、ホモ乳酸発酵 (homofermentative) とヘテロ乳酸発酵 (heterofermentative) に分けられる。ホモ乳酸菌発酵は糖類から乳酸のみを生成する発酵で、これを行う乳酸菌をホモ乳酸菌と呼ぶ^{1),5)}。ヘテロ乳酸発酵は、糖類から乳酸とそれ以外の物質 (炭酸ガス, アルコール, 酢酸など) を生成する発酵で、これを行う乳酸菌をヘテロ乳酸菌と呼ぶ^{1),5)}。乳酸菌は、農産物や食品からヒトや動物の腸内まで自然界に広く分布している。

Lactococcus はホモ乳酸する球菌で、これまでは

Streptococcus に属していたが、Streptococcus 属が Lactococcus (乳製品発酵に関与), Enterococcus (腸球菌), Streptococcus (その他) と新しい属として再分類された^{3),5)}。Lactococcus は発酵乳, チーズなどの乳製品のスターターとして食品加工で利用されている菌種が多い^{8),9)}。Pediococcus はホモ発酵する4連球菌で、味噌, 醤油, 漬物などの発酵に関した菌である¹⁾。Leuconostoc はヘテロ発酵する連鎖球菌で、ほとんど発酵に関した菌である。Lactobacillus は桿菌で、ホモ発酵とヘテロ発酵をする2群に分けられる。乳酸菌の代表的なもので、各種発酵食品への利用から口腔内, 腸管, 膣の常在フローラとしても知られている^{2),5),6),7)}。Bifidobacterium は偏性嫌気性のヘテロ発酵する桿菌で、グルコースから酢酸および乳酸を生成する。ヒトにおいて乳児および成人の腸内フローラを構成する主要な腸内菌として知られている^{5),6),7)}。

乳酸菌の中には他の有害菌の生育を抑制するものがあり、スターターとして良質な発酵食品の製造に利用される乳酸菌が多いが、Lactobacillus の中には食品の腐敗, 変敗に関与するものもあり、ある種のチーズの熟成後期にガス膨張の原因となることがある^{1),8),9)}。適切な冷蔵管理下では乳酸菌の発酵をある程度抑制でき

るが、温度管理が不十分の場合には乳製品中の乳糖を発酵して乳酸を生成し、品質を劣化させる^{1),2),8),10)}。

2. 目的

乳酸菌には動物性乳酸菌と植物性乳酸菌があり、動物性乳酸菌には牛乳などの動物の乳を餌に増殖し、植物性乳酸菌は米、麦、果物などの植物を餌に増殖する。また、動物性乳酸菌は乾燥、熱、酸に弱く、胃酸で死滅するが、植物性乳酸菌は酸に強く、生きたまま腸に届くため現在注目を浴びている。

植物性乳酸菌の効果として、免疫活性作用³⁾、発癌物質の排出・分解³⁾、便秘・下痢の解消^{3),11)}、病原菌感染の予防³⁾などが挙げられる。そこで本実験では、植物性乳酸菌における免疫活性作用の有無、程度について実験、検討した。

3. 実験材料・方法

3-1 免疫活性作用

植物性乳酸菌を投与することにより免疫活性作用の有無、程度を見るために、経時的にマウスの尾静脈より、微量採血 (10 μ l) を行い、血球数を日本光電製の自動血球測定装置 (Celltac α MEK-6318) を用いて測定した。

3-2 植物性乳酸菌

本実験では 12 種類の植物性乳酸菌 (日本トリム) を用いた。各植物性乳酸菌の抗酸化、pH、粘調度の違いによって免疫活性作用の有無・程度にどのような差があるかを調べるために抗酸化、pH、粘調度を測定し、表 1 に示した。図 1 に pH と抗酸化の関係、図 2 に pH と粘調度の関係、図 3 に粘調度と抗酸化の関係を示す。また、これらの乳酸菌の抗酸化はルミノール法により吸光光度計 (Aloka/BLR-201) を用いて測定した。

植物性乳酸菌は C 57 BL/6 CrSlc マウス♂ 6 週齢に 0.3 cc を 5 日間、シリンジとゾンデを用いて経口投与した。

表 1 使用した乳酸菌

| | 抗酸化 | pH | 粘調度 |
|--------|-------|------|-----|
| 乳酸菌 1 | 0.004 | 3.94 | 494 |
| 乳酸菌 2 | 0.003 | 3.98 | 370 |
| 乳酸菌 3 | 0.004 | 3.80 | 416 |
| 乳酸菌 4 | 0.003 | 3.92 | 480 |
| 乳酸菌 5 | 0.003 | 3.97 | 400 |
| 乳酸菌 6 | 0.002 | 3.97 | 423 |
| 乳酸菌 7 | 0.003 | 4.09 | 400 |
| 乳酸菌 8 | 0.003 | 3.94 | 397 |
| 乳酸菌 9 | 0.003 | 3.95 | 370 |
| 乳酸菌 10 | 0.002 | 3.95 | 464 |
| 乳酸菌 11 | 0.003 | 3.97 | 407 |
| 乳酸菌 12 | 0.003 | 3.92 | 379 |

表 1 より、植物性乳酸菌の pH と抗酸化の間に、抗酸化の値が大きくなると pH の値が小さくなるということがわかる。

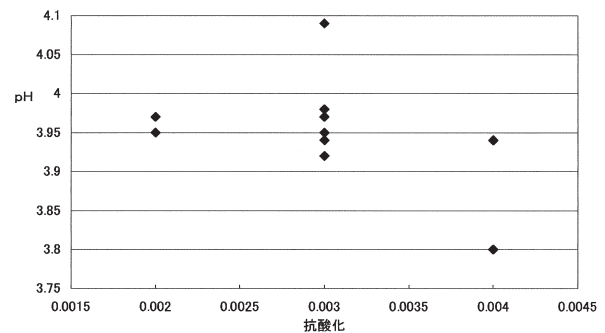


図 1 pH と抗酸化の関係

図 1 は、pH を縦軸に、ルミノール法により吸光光度計 (Aloka/BLR-201) を用いて測定した抗酸化の値を横軸にとったものである。

この図からもわかるように、植物性乳酸菌の pH と抗酸化の間に、抗酸化の値が大きくなると pH の値が小さくなるということがわかる。

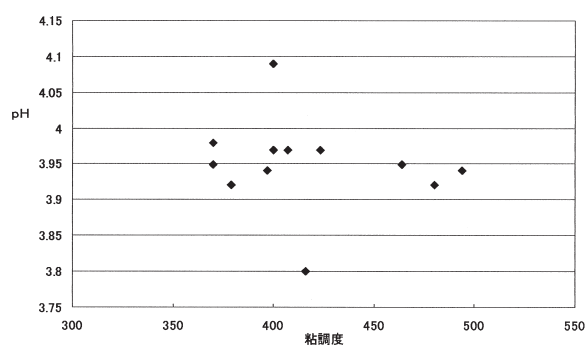


図2 pHと抗酸化の関係

図2は、pHを縦軸に、粘調度の値を横軸にとったものである。

この図からもわかるように、植物性乳酸菌のpHと粘調度の間に、特に相関関係はない。

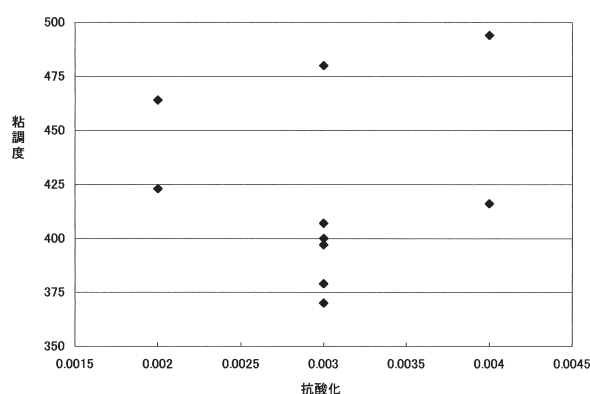


図3 粘調度と抗酸化の関係

図3は、粘調度を縦軸に、抗酸化の値を横軸にとったものである。

この図からもわかるように、植物性乳酸菌の粘調度と抗酸化の間に、特に相関関係はない。

3-3 マウス

マウスはSlc社から購入したC57BL/6CrSlcマウスを一週間の予備飼育後に使用した。体重24~26gの雄6週齢を温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間遮光、12時間照光サイクルを環境条件とし、動物舎にて飼育した。飼料は日本クレア株式会社の固形飼料CE-2を水はフィルターろ過された水道水を自由摂取させた。

3-4 血球測定

C57/BL6CrSlcマウス♂6週齢の尾静脈をメス又は注射針を用いて傷つけ、ガラス細管ピペットにより $10\mu\text{l}$ 採血した。日本光電製の自動血球測定装置(Celltac α MEK-6318)を用いて採血中の血液を希釈後、血球数を測定した。

3-5 実験方法

実験方法を図4に示す。

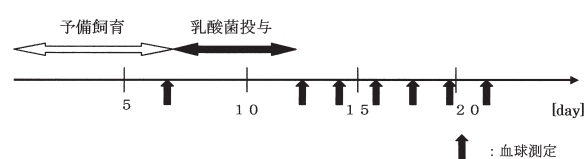


図4 実験方法

Slc社から購入したC57BL/6CrSlcマウス♂6週齢を一週間の予備飼育後、1群3匹としてコントロール群、植物性乳酸菌投与群(12群)とに無作為に分けた。植物性乳酸菌投与前に各群のマウスの尾静脈より微量採血($10\mu\text{l}$)を行い、日本光電製の自動血球測定装置(Celltac α MEK-6318)を用いて血球数を測定した。その後5日間、植物性乳酸菌をシリンジとゾンデを用いて0.3cc経口投与し、植物性乳酸菌投与5日目の翌日から2日おきに自動血球測定装置を用いて血球数を測定した。

3-6 検定方法

測定値に関する偏差平方和を、いくつかの意味のある独立な偏差平方和として表し、各分散に有意の差異があるか否かを検する方法を、一般に分散分析法(ANOVA: analysis of variance)という¹²⁾。

よって今回の実験では、コントロール群、植物性乳酸菌投与群と13群となり、3つ以上の条件間の差を検定したため、アノバ検定を行った。

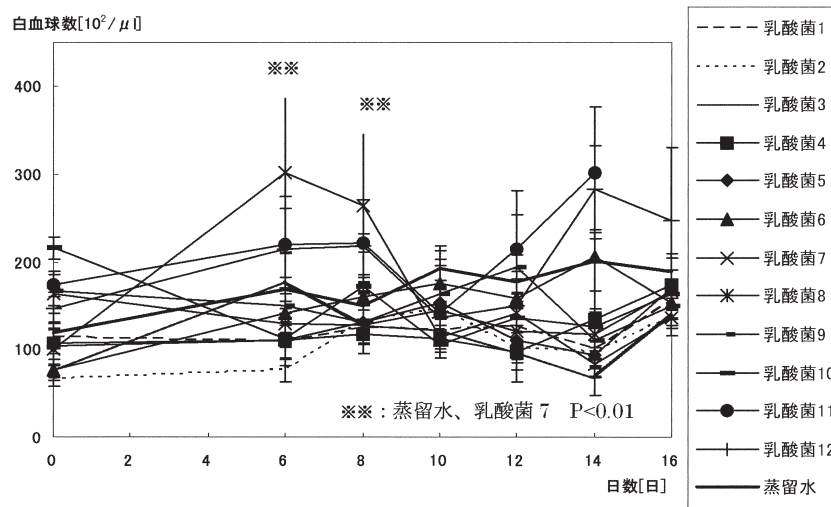


図5 白血球数の変化

図は、植物性乳酸菌投与前に尾静脈より微量採血を行い、その後5日間、植物性乳酸菌を0.3 cc 経口投与し、乳酸菌投与5日目の翌日から2日おきに白血球数を測定したものである。縦軸に白血球数、横軸に日数をとった。

4. 結果

4-1 白血球数の変化

白血球は、主に生体防御に関与する細胞である。健康な成人の白血球の数は、血液1 mm³中に5,000~8,000個である¹³⁾。新生児では15,000~25,000個と多く、12歳頃までは成人より多いのが普通である¹³⁾。また、マウスの白血球の数は4,400~6,800である¹⁴⁾。

白血球は、その形態や機能から顆粒白血球、単球およびリンパ球に分けることができる。顆粒球はさらに細胞内の顆粒の性質から好中球、好酸球、好塩基球に区別される¹⁵⁾。白血球数の変化を図5に示す。

アノバ検定により、蒸留水投与群と植物性乳酸菌7投与群に投与後6日から8日目にかけて有意な差が認められた。それ以外の植物性乳酸菌投与群には有意な差は認められなかった。

4-2 リンパ球数の変化

リンパ球は直径6~16 μmの球形の細胞で、球形の核を持っている。リボソームを多量に持つため、細胞

質が塩基性色素で青染する。リンパ球は、体液性免疫に関係したB細胞(Bリンパ球)と、細胞性免疫およびB細胞の機能調節に関与したT細胞(Tリンパ球)の2種類に大別されることが知られているが、両者の違いを形態的に区別することは難しい¹⁶⁾。

Bリンパ球は、細胞表面に免疫グロブリンを持っており、抗原と反応すると抗体産生細胞に分化して、さかんに抗体を産生する^{17),18)}。

Tリンパ球は、造血系の骨髄にある幹細胞に由来し、胸腺中で分化して成熟し、末梢血リンパ球の70~80%をしめている¹⁸⁾。

Tリンパ球にはさまざまな機能があり、それぞれ性格の異なったTリンパ球によって分担されている。ウイルス感染を受けた細胞や腫瘍細胞などに作用してそれを破壊するのはキラーT細胞、B細胞の抗体産生細胞への分化を助ける細胞はヘルパーT細胞、逆にB細胞の分化を抑える細胞はサプレッサーT細胞、リンホカインを産生してマクロファージの殺菌能を高めるような細胞はエフェクターT細胞という。こうしたT細胞の区別はさまざまな膜抗原の有無を調べることで知ることができる^{15),19),20)}。リンパ球数の変化を図6に示す。

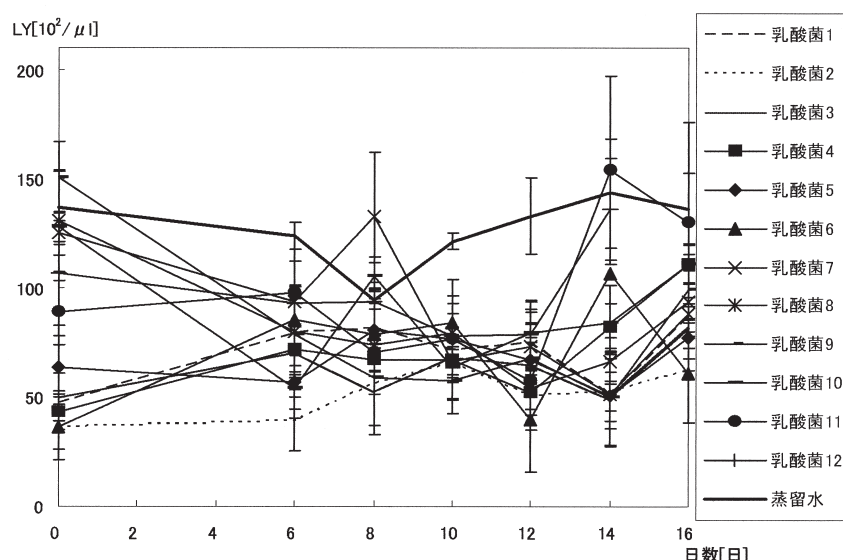


図6 リンパ球数の変化

図は、植物性乳酸菌投与前に尾静脈より微量採血を行い、その後5日間、植物性乳酸菌を0.3 cc 経口投与し、乳酸菌投与5日目の翌日から2日おきにリンパ球数を測定したものである。縦軸に白血球数、横軸に日数をとった。

アノーバ検定により、蒸留水投与群と植物性乳酸菌投与群に有意な差は認められなかった。

4-3 顆粒球数の変化

顆粒球は細胞内の顆粒の性質から好中球、好酸球、好塩基球に区別される。また、好中球数は炎症があるときには血中濃度が増加し、好酸球数はアレルギー性疾患や寄生虫感染症の際に、その数が増加する。そのため、免疫活性作用の有無を調べる上で顆粒球数の変化は重要である。図7に顆粒球数の変化を示す。

アノーバ検定により、蒸留水投与群と植物性乳酸菌7, 11投与群の間に投与6日後より有意な差が認められた。

4-3-1 好中球

塗抹標本でピンク色に染まるごく小さな顆粒（特殊顆粒）をたくさん持っている細胞を好中球という。白血球の中で最も数が多く、約70%を占めている。生体内では直径7~9 μm （塗抹標本で10~15 μm ）、核は桿状のものから、いくつかにくびれたものまでさまざまである^{21),22)}。くびれた核を分葉核といい、そのくびれの

状態により二分葉核、三分葉核などと表現する。

好中球の特殊顆粒には、アルカリホスファターゼと殺菌物質（ファゴシチン）が含まれている。好中球には、この特殊顆粒とは別の顆粒（アズール顆粒）も少数ながら存在する。これにはライソゾーム酵素が含まれている。

好中球は活発な運動能と貪食能があり、生体防御に重要な役割を果たしている。細菌がある局所に侵入すると、好中球は毛細血管や細静脈の壁をすりぬけて、炎症の局所に遊走していく。そこで細菌を細胞内に取り込んで（ファゴサイト）、アズール顆粒や特殊顆粒に含まれる物質によって細菌を破壊（殺菌消化）する²³⁾。

このように細菌の侵入部位に好中球がびっしりと集まってきた状態を化膿という。こうした場所のできる膿は、細菌とたたかう好中球とその死骸に満ちた滲出液なのである¹⁵⁾。

化膿性炎症があるときには、これに反応して循環血中の好中球数も増加する。逆に、血中にこの細菌の増殖を見たときは、体のどこかに化膿性の炎症がないかをまず疑うべきである¹⁵⁾。

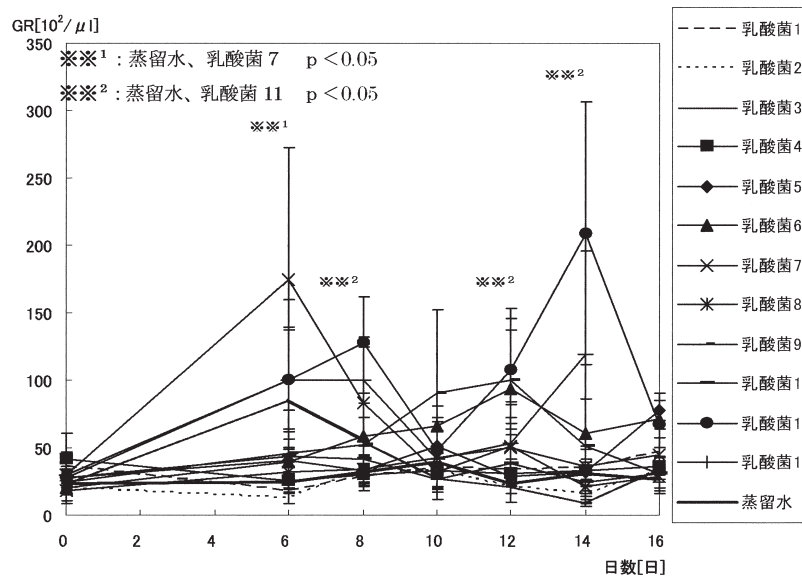


図7 顆粒球数の変化

図は、植物性乳酸菌投与前に尾静脈より微量採血を行い、その後5日間、植物性乳酸菌を0.3 cc 経口投与し、乳酸菌投与5日目の翌日から2日おきに顆粒球数を測定したものである。縦軸に顆粒球数、横軸に日数をとった。

4-3-2 好酸球

酸性色素に赤く染まる顆粒をたくさんもっている顆粒球を好酸球という。白血球のうちの2~3%を占めている。細胞の直径は好中球ほぼ同じで、核はふつう二分葉している。好酸球の顆粒は、長径約1.0 μmの卵円形をしており、中に酸性ホスファターゼ、β グルクロニダーゼなどが含まれている。好酸球は気管支喘息のようなアレルギー性疾患や寄生虫感染症の際に、その数が増加する。病変の局所にも増加するが、全身血中にも増殖するので、血液検査でアレルギー性の病気や寄生虫の存在を推測できることもある^{24),25)}。

好酸球の顆粒には寄生虫を傷害する(虫体を破壊したり運動を止めたりする)物質が見出されている。そのほか、好酸球がアレルギー性疾患や寄生虫感染に対して、生体を防御するメカニズムが解明されつつある¹⁵⁾。

4-3-3 好塩基球

塩基性色素に紫色に染まる顆粒を細胞質内にたくさんもっている顆粒球を好塩基球という。細胞の大きさ

は好中球とほぼ同じであるが、いくぶん小さい傾向にある。核は分葉せず馬蹄形をしていることが多い^{21),22)}。

好塩基球はいろいろな点で結合組織の肥満細胞と似ている。この細胞の顆粒の中にもヒスタミン、ヘパリンなどが含まれている。細胞の表面にはIgEという抗体がついており、アレルギーを起こす抗原に触れると細胞の興奮が起こって、顆粒内のヒスタミンやヘパリンが放出される¹⁵⁾。

4-4 単球数の変化

顆粒球白血球と同じか、それよりも大きい球形の細胞で、卵円形ないしU字型の核を持つ細胞を単球という。現在では、この細胞が血管から遊出してさまざまな組織に侵入し、大食細胞に転化すると考えられており、貪食能があるため、免疫系・炎症系に関与しているとされている¹⁹⁾。このような概念は単核食細胞系と呼ばれている^{15),19),20)}。単球数の変化を図8に示す。

アノーバ検定により、蒸留水投与群と植物性乳酸菌7, 11投与群の間に投与後6日目より有意な差が認められた。

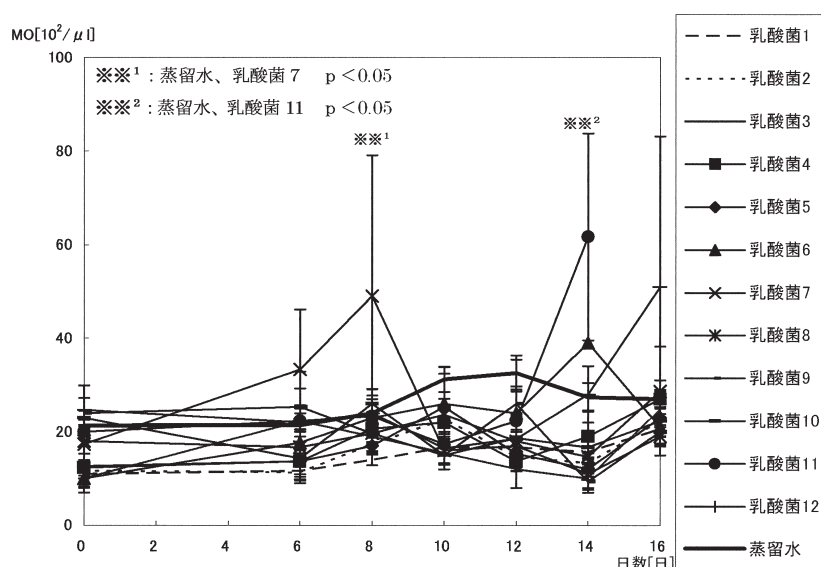


図8 単球数の変化

図は、植物性乳酸菌投与前に尾静脈より微量採血を行い、その後5日間、植物性乳酸菌を0.3 cc 経口投与し、乳酸菌投与5日目の翌日から2日おきに単球数を測定したものである。縦軸に白血球数、横軸に日数をとった。

5. 考察

白血球は、その形態や機能から顆粒白血球（好中球、好酸球、好塩基球）、単球およびリンパ球に分けることができる。

図5より、植物性乳酸菌7投与群と蒸留水投与群の間に有意な白血球数の増加が認められた。図7より、6日目の白血球の増加は図6のリンパ球数および図8の単球数に増加が見られないため、顆粒球数の増加によるものであると考えられる。

顆粒球には好中球、好塩基球、好酸球が含まれるが、好中球が70%を占めるため図7の顆粒球数の増加は好中球数の増加によるものと考えられる。

好中球は、細菌がある局所に侵入すると、毛細血管や細静脈の壁をすりぬけて、炎症の局所に遊走するため化膿性炎症があるときには、これに反応して血中の好中球数は増加する。また、単球も同様に炎症系に関与することから、炎症を生じると血中の単球数が増加する。したがって、図5で見られた白血球数の増加は、顆粒球数および単球数の増加によるものであると考え

られる。これは、植物性乳酸菌を経口投与する際に食道や胃の壁に傷をつけてしまったことで生じた炎症によるものと考えられ、植物性乳酸菌の免疫作用が少ないと考えられる。

同様に図8より、8日目の白血球数の増加は図7の顆粒球数に増加が見られなかった。図6のリンパ球数では8日目に増加が見られたが、アノーバ検定により、有意な差が認められなかった。そのため、リンパ球数の増加が白血球数の増加に作用しているとは考えにくい。これより、8日目の白血球数の増加は、単球数の増加によるものであると考えられる。また、単球は炎症系に関与することから、炎症を生じると血中の単球数が増加する。よって、図5の8日目に見られた白血球数の増加は、植物性乳酸菌による免疫作用ではなく、経口投与の際に生じた食道や胃の壁にできた炎症による変化も含まれ、白血球の実際の増加は十分確認できなかった。

6. 結語

1) 今回使用した植物性乳酸菌に免疫活性作用があっ

たものと、活性を示さないものがあった。

- 2) 今回使用した植物性乳酸菌の pH と抗酸化の間に、抗酸化の値が大きくなると pH の値が小さくなるという関係が得られた。

7. 今後の課題

- 1) コントロール群および各植物性乳酸菌投与群の個体数を増やし、再検討する。
2) 植物性乳酸菌の放射線防護効果について検討する。
3) 発癌物質の排出・分解、便秘・下痢の解消、病原菌感染の予防効果について検討する。

参考文献

- 1) 相田 浩・高尾彰一・栃倉辰六郎 他：II章 微生物の形態と分類，新版 応用微生物学 I，朝倉書店，35～37，1989
2) 東 秀雄・荒井綜一・有本邦太郎 他：II編 消化吸収，栄養学ハンドブック，技報堂出版株式会社，432～440，1979
3) 光岡知足・新城敏晴・原澤 亮 他：5章 食品への応用，腸内細菌学，朝倉書店，439～445，1990
4) 永井史郎・吉田敏臣・菅 健一 他：1章 微生物反応における科学量論，微生物学基礎講座 7 巻 微生物培養工学，共立出版，35，1990
5) 高橋 甫・斎藤日向・手塚泰彦 他：33章 人類による微生物の利用開発，微生物学（下），培風館，323，1989
6) 市川洋一：医学領域・5部 病原微生物学各論，微生物学，医学出版社，164，1989
7) 加藤延夫・江崎孝行・木藤伸夫 他：IV章 細菌学各論，医系微生物学，朝倉書店，195～197，1996
8) 相田 浩・高尾彰一・栃倉辰六郎 他：VI章 醸造および発酵食品，新版 応用微生物学 II，朝倉書店，207，214，1988
9) 中江 利孝：II章 牛乳の基礎科学，牛乳・乳製品，養賢堂，62～63，1988
10) 上野川修一：5章 牛乳・乳製品と微生物，乳の科学，朝倉書店，68～69，1999
11) 河井啓三・大沼 敏夫：1章 知っておきたい排便のしくみ，よく分かる排便・便秘のケア，中央法規出版株式会社，10～19，1997
12) 淡中忠郎：20章 分散分析法，実務家のための新統計学，槇書店，248～265，1994
13) 今川珍彦・北村清彦：I章 植物性機能，生理学，医師薬出版，6，1987
14) 江崎孝三郎・篠田元扶・山内忠平 他：6章 比較生物学・1，新実験動物学，朝倉書店，1，190，1986
15) 牛木辰男：8章 血液と骨髄，入門組織学，株式会社南江堂，93～96，2002
16) 原 宏・平嶋邦猛・福田多禾男 他：7章 リンパ球系細胞の分化，血球の分化，丸善，334，1982
17) McKenzie, D. T., et al.: J. Immunol 139: 2661, 1987
18) 矢田純一：1章 T cell B cell の発生，T リンパ球と B リンパ球，中外医学双書，1～15，1976
19) 青柳泰司・秋庭弘道・穴井元昭 他：医用放射線辞典，共立出版，302，2002
20) M. W. エルヴス・阿部由明：1章 リンパ球の形態学と生理学，リンパ球，岩波書店，16，96，104，239，246，306，1974
21) 小笠原一夫・波田野基一・阿多実茂：I章 細菌，医科微生物学，朝倉書店，114，115，1978
22) 小山次郎・大沢利照：IV 免疫担当細胞，免疫学，南江堂，87，88，1984
23) Baggs, D. R., J. W. Athens, S. O. Roab, G. E. Cartwright and M. M. Wintrobe: Leuko-kinetic studies. III. A search for an extramedullary tissue pool of neutrophilic granulocytes. Proc Soc. Exp. Biol. Med., 115, 792～796, 1964
24) Jenkins, V. K., J. J. Trentin, R. S. Speirs and M. P. Mc Garry: Hemopoietic colony studies VI. Increased eosinophil-containing colonies obtained by antigen pre-treatment of irradiated mice recon-studied with bone marrow cells. J. Cell. Physiol., 79. 413～422, 1972
25) Bleiberg, I. and M. Aronson: Undifferentiated

spleen colonies : An attempt to induce differentiation into eosinophils. J. Reticuloendothelial Soc.,

17, 267~273, 1975

The physiological activity by the plant lactic acid bacterium

Takeo HASEGAWA^{1),2)}, Yuki NISHIMOTO¹⁾, Masahiro HAYASHIBE¹⁾, Toshitaka HONDA¹⁾,
Takeshi WATANABE¹⁾, Keisuke WATANABE¹⁾, Kousuke MURABAYASHI²⁾, Atsushi FUKUYAMA²⁾

¹⁾Department of Radiological Technology, Faculty of Health Science, Suzuka University of Medical Science

²⁾Division of Medical Imaging, Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science

Key Words: physiological activity, plant lactic acid bacterium, anti-oxidization

Abstract

There are effects of anti-onset of disease, such as an activation of immunity, discharge and decomposition of a carcinogen, the improvement of constipation and diarrhea and prevention of disease germ infection etc. We experimented about the activity of the mice immunity using plant lactic acid bacterium.

We gave 12 kinds of lactic acid bacteria to the C57BL mouse, and measured the number of blood cells. Consequently, the increase in the number of leukocytes was seen. However, this is based on the increase in granulocyte and monocyte, and inflammation was the cause. Therefore, it is considered that the plant lactic acid bacterium used this time did not have large increase the activity of immunity.

As a future subject, it is increasing the number of individuals of each group, or examining the protection effect for radiation.