

静岡県の自然界より分離された乳酸菌の健康機能性評価

食品科 褐田雅俊 三宅健司

Health functional evaluation of lactic acid bacteria isolated from natural environment in Shizuoka prefecture

Masatoshi HAKAMATA, and Kenji MIYAKE

In order to extend healthy life expectancies, it is important to prevent dementia and lifestyle-related diseases such as cardiovascular diseases, obesity, and diabetes. Lactic acid bacteria (LAB) are widely recognized as probiotics that are effective in intestinal regulation, immune function improvement, anti-allergic effect, antitumor activity, reduction of cholesterol level, prevention of metabolic syndrome, etc. Therefore, LAB are expected to contribute to increases in healthy life-spans. We have isolated LAB from the natural environment in Shizuoka prefecture for the development of fermented foods. With regard to certain LAB, four health-related effects were tested using cells killed with heat.

First, in the suppression test of advanced glycation end products, an evaluation by binding inhibition of human serum albumin and glucose showed that *Lactobacillus* genus strains had a greater inhibitive effect than the other genus. Second, in the inhibition test of amyloid-beta aggregation involved in dementia, an inhibitory effect was observed in four LAB strains. Third, in the evaluation of nitric oxide (NO) production in macrophage RAW264.7 cells, which are involved in anti-inflammatory, the suppression rate of NO production changed in a LAB dose dependent manner. Finally, in the suppression of fat accumulation, which is involved in obesity, most of the tested strains inhibited the adipogenesis in mouse fibroblast 3T3-L1 cells. Further work is required to elucidate components and the mechanism of action that bring about those inhibitory effects.

Keywords : lactic acid bacteria (LAB), advanced glycation end products (AGEs), amyloid-beta, anti-inflammatory, adipogenesis
キーワード：乳酸菌、終末糖化産物、アミロイド β 、抗炎症、脂肪蓄積抑制

1 はじめに

少子高齢化が進む中、健康寿命を延ばすことも重要な課題となっている。平成29年の日本人の死因上位は、がん、心疾患、脳血管疾患となっており¹⁾生活習慣病が上位を占めていることから、健康を維持するためには生活習慣病の発症及び重症化を予防する必要がある。

生活習慣病は食生活の乱れや運動不足により引き起こされ、高血圧、脂質異常症、糖尿病、肥満は死の四重奏とも言われ、認知症リスクを高めることも報告されている^{1,2)}。

認知症の発症率は高齢になるほど増加するため、健康寿命を延ばすうえでも予防は重要となる。高齢者が増える中で認知症高齢者の数も増加しており、2025年には65歳以上の5人に1人（約700万人）が認知症になると試算されている²⁾。

メチニコフがヨーグルトによる不老長寿説を唱えて以来、乳酸菌の機能性研究が盛んになり、整腸作用、免疫調整、ビロリ菌への効果等さまざまな機能が報告されている³⁾。

今回の研究では自然界から単離した新たな乳酸菌が健康寿命の延伸に役立つことを期待して *in vitro* 試

* 1 厚生労働省：平成29（2017）人口動態統計月報年計（概数）の概況 結果の概要. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai17/index.html> (2019.04.25アクセス)

* 2 内閣府：平成29年版高齢社会白書（概要版） 高齢者の健康・福祉

https://www8.cao.go.jp/kourei/shitepaper/w-2017/html/gaiyou/s1_2_3.html (2019.04.25アクセス)

表1 評価に用いた乳酸菌株の詳細

TIG株					
No.	菌種	由来	No.	菌種	由来
TIG-0009	<i>Pediococcus sp</i>	カキ果実	TIG-0446	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実
TIG-0051	<i>Enterococcus faecalis</i>	カキ果実	TIG-0451	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実
TIG-0052	<i>Enterococcus faecalis</i>	カキ果実	TIG-0456	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0053	<i>Enterococcus faecalis</i>	カキ果実	TIG-0457	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0062	<i>Lactobacillus plantarum</i>	カキ果実	TIG-0460	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	カキ果実
TIG-0156	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実	TIG-0461	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	カキ果実
TIG-0161	<i>Enterococcus faecalis</i>	カキ果実	TIG-0462	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0227	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実	TIG-0463	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0239	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実	TIG-0469	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0284	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0481	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実
TIG-0295	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0496	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実
TIG-0296	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0546	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0297	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0554	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0323	<i>Lactobacillus plantarum</i>	カキ果実	TIG-0555	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0325	<i>Lactobacillus plantarum</i>	カキ果実	TIG-0556	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0348	<i>Lactobacillus plantarum</i>	カキ果実	TIG-0571	<i>Lactobacillus brevis</i>	トマト果実
TIG-0349	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0576	<i>Lactobacillus brevis</i>	トマト果実
TIG-0355	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0596	<i>Lactobacillus brevis</i>	トマト果実
TIG-0356	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0597	<i>Lactobacillus brevis</i>	トマト果実
TIG-0357	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0622	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実
TIG-0358	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0625	<i>Lactobacillus paracasei</i>	カキ果実
TIG-0359	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カキ果実	TIG-0664	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0361	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0692	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0370	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0693	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0371	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0702	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0372	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0708	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0373	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0710	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0374	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0713	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0383	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0734	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実
TIG-0391	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実	TIG-0832	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0416	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0833	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0429	<i>Lactobacillus casei</i>	カキ果実	TIG-0866	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0431	<i>Lactobacillus brevis</i>	カキ果実	TIG-0868	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	カキ果実
TIG-0445	<i>Lactobacillus pentosus</i>	カキ果実	TIG-0871	<i>Enterococcus faecalis</i>	カキ果実
SUG株					
No.	菌種	由来	No.	菌種	由来
SUG-0070	<i>Lactococcus lactis</i>	アオミシマ腸管	KOG-0142	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
SUG-0081	<i>Lactococcus lactis</i>	サギフエ腸管	KOG-0152	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
SUG-0137	<i>Lactococcus lactis</i>	ヒメ腸管	KOG-0157	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
SUG-0144	<i>Lactococcus lactis</i>	サンゴイワシ腸管	KOG-0161	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
SUG-0215	<i>Lactobacillus fermentum</i>	カツオ内臓	KOG-0175	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
SUG-0222	<i>Lactobacillus fermentum</i>	駿河湾深層水	KOG-0183	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
SUG-0230	<i>Lactobacillus fermentum</i>	ヘラツノザメ腸管	KOG-0190	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
SUG-0236	<i>Lactobacillus fermentum</i>	ナマコ腸管	KOG-0203	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	醤油諸味
KOG株					
No.	菌種	由来	No.	菌種	由来

験にて機能性評価を行った。

2 方法

2.1 使用乳酸菌について

実験に使用した菌株について表1に示す。これは平成27年度から29年度にかけて県内各地から収集し構築した「しづおか有用微生物ライブラリー」の一部である。

2.2 乳酸菌液の調製

TIG株とSUG株については、M.R.S.ブイヨン培地(OXOID社製) 10 mLに接種し、30 °Cで2日間培養した。KOG株はMRS培地では増殖しないため、トリプトンソーヤブイヨンU.S.P.培地(OXOID社製) 10 mLに接種し、30 °Cで7日間培養した。培養菌株は、3,500 rpmで10分間遠心分離を行い、上清を除去した。5 mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で菌体を懸濁後、同様の条件で遠心分離、上清除去を2回繰り返して乳酸菌体を洗浄した。この菌体を2 mLのPBSで再懸濁し、600 nmの吸光度から菌液濃度を推定した。その後、乳酸菌懸濁液を沸騰水中に5分間浸漬して殺菌し、PBSを加えて、およそ 1×10^{10} 個/mLに調製した。

調製した乳酸菌液は使用するまで−80 °Cに保存した。

2.3 蛍光性終末糖化産物(AGEs)生成抑制試験

本試験は堀らの報告⁴⁾をもとに、ヒト血清アルブミンとグルコースの結合阻害を利用して評価した。96wellプレートに、表2に示す容量で各試薬を混合した(a)。(a)に対するブランクとしてグルコースを水に置き換えたもの(b)、(a)に対するネガティブコントロール(c)、(c)に対するブランク(d)を調製した。60 °C、40時間静置した後、励起波長370 nm、測定波長440 nmで蛍光強度を測定した。溶液a、b、c、dそれぞれの蛍光強度をA、B、C、Dとし、以下の計算式により蛍光性AGEs生成抑制率を評価した。

表2 抗糖化試験条件

試薬	容量	a	b	c	d
① 0.1 mol/L リン酸緩衝液	118 mL	○	○	○	○
② 40 mg/mL ヒト血清アルブミン水溶液	40 mL	○	○	○	○
③ 2 mol/L グルコース水溶液	20 mL	○	×	○	×
④ 滅菌水	20 mL	○	○	○	○
⑤ 乳酸菌	2 mL	○	○	×	×
	合計	200 mL			

$$= \{1 - (A-B)/(C-D)\} \times 100$$

2.4 アミロイド β 凝集阻害試験

アミロイド β 凝集阻害試験は、「Thioflavin T Beta-Amyloid (1-42) Aggregation Kit」(ANASPEC社製)を用い、凝集したアミロイド β とThioflavin Tが結合して生じる蛍光強度により評価した。

96wellプレートに2 mmol/LのThioflavin T (ThT) 溶液10 μL、乳酸菌液5 μL、0.25 mg/mL アミロイド β (1-42) タンパク質溶液85 μLを混合し、37 °Cに保ちながら5分おきに180分間、励起波長440 nm、測定波長484 nmで蛍光強度を測定した。

2.5 抗炎症試驗

本試験はマウス単球由来マクロファージRAW264.7細胞をリポポリサッカライド（LPS）で刺激した際に放出される一酸化窒素（NO）量により評価した。培地は非効化FBS10 %を含むRPMI培地を用いた。

RAW264.7細胞を 4×10^5 cells/mLに調製し、96-wellプレートに $200 \mu\text{L}$ 播種した。2時間後に各濃度の評価サンプル $2 \mu\text{L}$ を添加し、さらに2時間後に $10 \text{ ng}/\text{mL}$ のLPSを添加した。24時間培養後、培養上清 $100 \mu\text{L}$ とGriess試薬 $100 \mu\text{L}$ を混合し、 540 nm の吸光度から上清中のNO量を測定した。

Griess試薬は精製水に2.5 %のリン酸、0.5 %のスルファニルアミド、0.05 %のN-1-ナフチルエチレンジアミンを溶解して調製した。またNO量は亜硝酸ナトリウム水溶液を用いて検量線を作成した。

2.6 脂肪蓄積抑制試驗

本試験は三上らの方法⁵⁾をもとに、マウス胎児由来纖維芽細胞3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化誘導し、蓄積された脂肪量で評価した。細胞の分化誘導及び染色に使用する試薬はEnzo社製Adipogenesis assay kitを用いた。細胞の継代培地には10 %FBS含有DMEM培地を用いた。

3T3-L1細胞を 1×10^5 cells/mLに調製し、48wellプレートに $250 \mu\text{L}$ 播種した。3日間培養後、上清を除去し、分化誘導培地（継代培地にinsulin、dexamethasone、3-isobutyl-1-methylxanthineを添加したもの） $250 \mu\text{L}$ を入れた。2日間培養後、 $250 \mu\text{L}$ の分化培地（継代培地にinsulinを添加したもの）に替えた。2日間培養後、同量の継代培地に替え3日間培養し、さらに新しい継代培地に替えて2日間培養した。なお分化誘導培地、分化培地、継代培地には評価サンプルを $2.5 \mu\text{L}$ （1%）混合した。培養終了後、培

養上清を除去し、3.7 %ホルムアルデヒド溶液100 μ Lで30分間処理し、Oil Red O染色液100 μ Lで30分間処理して脂質を染色した。蒸留水で3回洗浄後、イソプロパノール100 μ Lで30分間処理することで細胞から染色液を溶解させ、490 nmで吸光度を測定した。

3 結果および考察

3.1 萍光性終末糖化產物 (AGEs) 生成抑制試驗

乳酸菌を添加した結果を図1に示す。今回使用した乳酸菌60株のうち58株で抗糖化活性が見られた。効果の強いものでは阻害率が40%程度を示した。活性が30%以上の乳酸菌は、*Lactobacillus fermentum* (TIG-358、TIG-622)、*Lactobacillus plantarum* (TIG-062)、*Lactobacillus brevis* (TIG-554) であり、活性が低いものには、*Lactococcus lactis* (SUG-070、SUG-081) や *Leuconostoc pseudomesenteroides* (TIG-713、TIG-832) といった球菌が多い傾向が見られた。

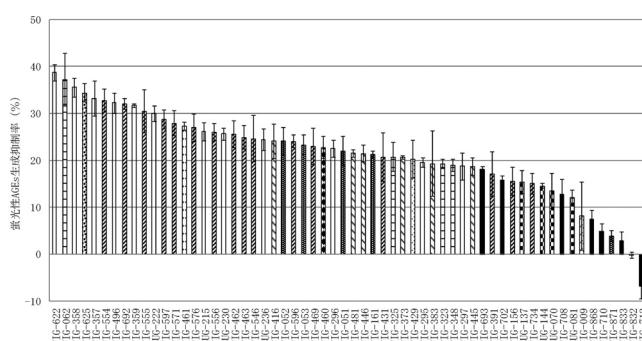


図1 乳酸菌液の蛍光性AGEs生成抑制

□: *Lactobacillus fermentum*, △: *Lactobacillus plantarum*, ■: *Lactobacillus paracasei*, ▨: *Lactobacillus brevis*, ▲: *Pediococcus pentosaceus*, ▤: *Lactobacillus pentosus*, ▨: *Enterococcus faecalis*, □: *Lactobacillus casei*, ▤: *Leuconostoc pseudomesenteroides*, ▲: *Lactococcus lactis*, ▨: *Pediococcus* sp. エラーバーは標準偏差, n=3

今回の試験では詳細な作用機序の解析には至っていないが、活性の違いの要因としては菌株を構成する成分の違いが考えられた。抗糖化の作用機序としては、アルブミンとグルコースの反応部位を物理的に阻害している可能性や、乳酸菌を構成するタンパク質がアルブミンよりも速くグルコースと反応することで、異なるAGEsが生成している可能性などが考えられた。

3.2 アミロイド β 凝集阻害試験

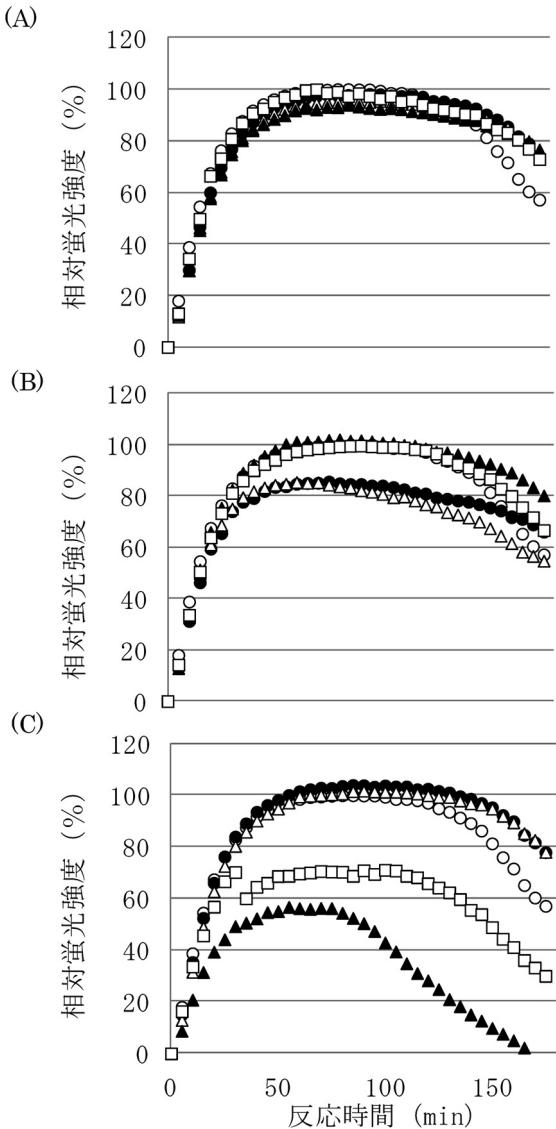
コントロールとしてPBSを入れたときの蛍光強度の最大値を100 %として12株の乳酸菌を用いた評価結果を図2に示す。TIG-297株とTIG-349株では80 %、SUG-222株では70 %、SUG-070株では60 %まで相対蛍光強度の最大値が減少した。これらの結果から、乳酸

【報告】

菌の何らかの成分がアミロイド β の凝集を抑制する可能性があることが分かった。ただし、入手できたアミロイド β が少量で試験数に制限があったため、反復試験、再試験、乳酸菌の濃度を変えた検討等を行うことができないことから、今後、詳細な検証が必要だと考えられる。

3.3 抗炎症試験

結果を図3に示す。RAW264.7細胞にLPSを接種す

図2 乳酸菌液のアミロイド β 凝集阻害効果

- (A) ○ : PBS、● : TIG-009、△ : TIG-052、
▲ : TIG-062、□ : TIG-156
- (B) ○ : PBS、● : TIG-297、△ : TIG-349、
▲ : TIG-429、□ : TIG-832
- (C) ○ : PBS、● : KOG-161、△ : KOG-203、
▲ : SUG-070、□ : SUG-222

ることで培養上清中のNO量が増加した。LPS投与前に調製した乳酸菌液の10倍希釀液を接種すると、TIG-

445株のようにNO産生量を10%程度抑制する株が見られた。その一方でTIG-596株のようにNO産生を促進するものも存在した。

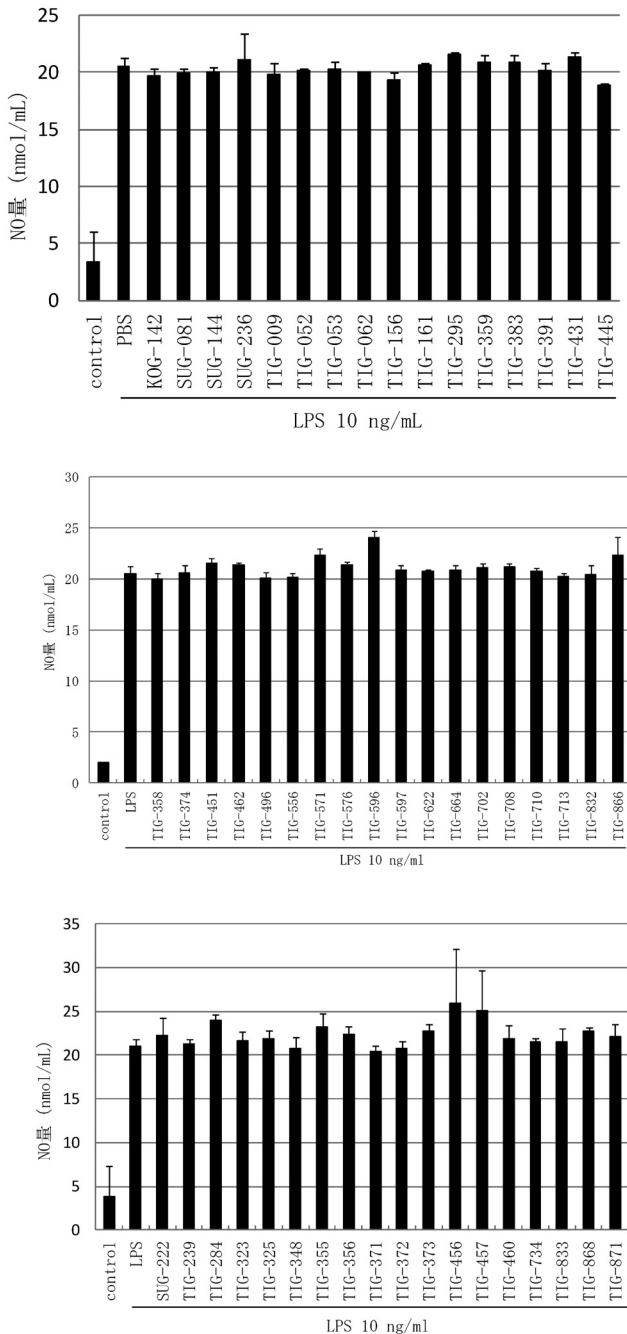


図3 乳酸菌液のNO産生抑制効果

エラーバーは標準偏差 n=3

この結果から、乳酸菌液の状態や濃度によってRAW264.7細胞のNO産生へ与える影響が異なるのではないかと考え、乳酸菌体懸濁液とその懸濁液を遠心分離して得られた上清について、原液、10、100、1000倍希釀の条件で試験を行った。

その結果を図4に示す。乳酸菌懸濁液では、乳酸

菌濃度が高いとNO産生量が増える傾向が見られた。また乳酸菌液上清のほうがNOを抑制する効果が高い傾向が見られた。LPSはグラム陰性細菌の細胞壁に存在する成分であるが、乳酸菌を含むグラム陽性菌の細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンもマクロファージを活性化する成分として知られている。したがって、乳酸菌懸濁液でNO産生量が増えた現象もペプチドグリカンによるものであると考えられた。

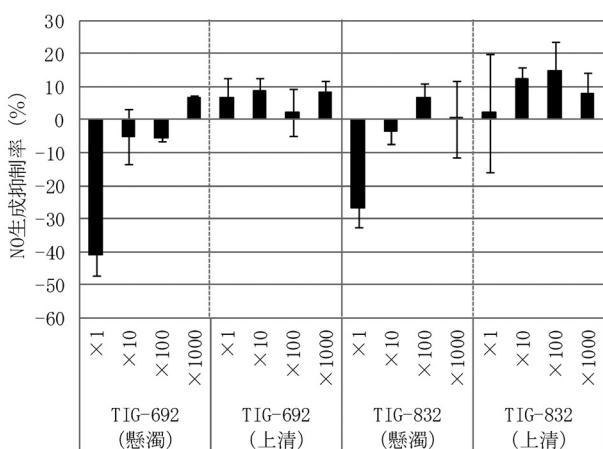
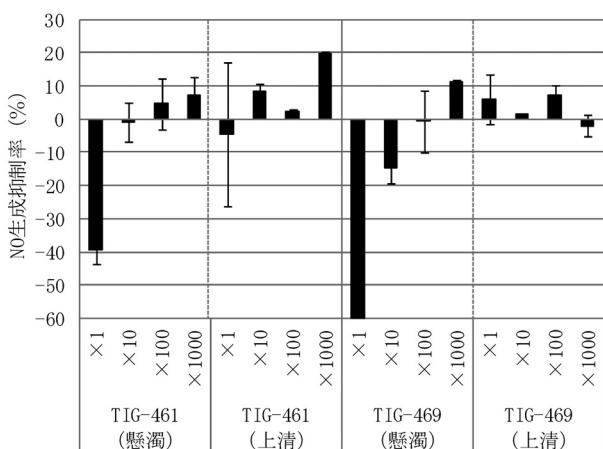


図4 各濃度乳酸菌液のNO産生抑制効果

エラーバーは標準偏差 n=3

またTIG-461株やTIG-832株の上清を使用した結果、乳酸菌の不溶性成分を取り除くことで、NO産生量が20%程度抑制できることから、細胞質成分が抗炎症効果に有効となるかもしれない。

3.4 脂肪蓄積抑制試験

乳酸菌懸濁液を接種することで多くの菌株に脂肪蓄積抑制効果がみられた(図5)。一部の菌株ではばらつきが大きく出たが、60株を試験に供し、15株で脂肪蓄積抑制率が80%以上であった。菌種で見ると、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus pentosus*、

Lactobacillus brevis、*Enterococcus faecalis*では効果が高く、*Leuconostoc pseudomesenteroides*、*Lactococcus lactis*、*Tetragenococcus halophilus*では効果が低い結果となった。報告ではキムチ由来の乳酸菌*Lactobacillus plantarum* KY1032株の細胞質成分でも同様に3T3-L1細胞の脂肪蓄積効果が報告されており、脂肪細胞へ分化する段階のシグナル伝達に影響を与えていたことから、今回の乳酸菌についても細胞質成分が3T3-L1細胞の分化の段階から関与していると予想している。

今回はin vitroでの試験であり、食品等として機能性を追求していくためにはさらなる試験が必要となるが、それぞれの試験で効果を示す乳酸菌をみつけることができた。今回の試験は乳酸菌を殺菌して評価していることから、食品への配合も容易になると考えられる。

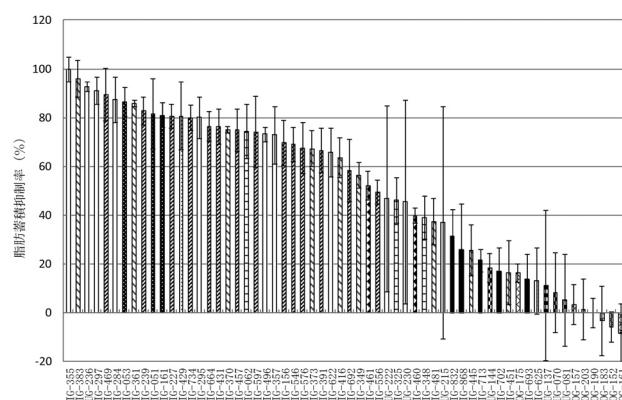


図5 乳酸菌の脂肪蓄積抑制率

□: *Lactobacillus fermentum*, ▨: *Lactobacillus plantarum*, ▲: *Lactobacillus paracasei*, △: *Lactobacillus brevis*, ▤: *Pediococcus pentosaceus*, ▶: *Lactobacillus pentosus*, ■: *Enterococcus faecalis*, ▲: *Lactobacillus casei*, △: *Leuconostoc pseudomesenteroides*, ▤: *Lactococcus lactis*, ▶: *Pediococcus sp.*

5まとめ

健康寿命の延伸にはプロバイオティクスとして広く利用されている乳酸菌が有効であると考え、その健康機能性の評価を行った。自然界等から新たに分離された乳酸菌は、老化に関与する終末糖化産物生成抑制、認知症に関与するアミロイドβ凝集阻害、炎症やがんに関与する抗炎症、及び肥満に関与する脂肪蓄積抑制に対してそれぞれ効果を示した。これら阻害効果は乳酸菌の属種の違いにより差が生じることが推察されたが、乳酸菌のどのような成分が有効であるかについてはさらなる検討が必要である。今回の試験では殺菌した乳酸菌で評価していることから、食品への配合により健康食品への応用も期待される。

謝辞

本研究は、静岡県新成長戦略研究チャレンジ研究費で実施した。

今回の研究を行うにあたり、愛知医科大学分子標的医薬寄付講座 梅澤一夫教授に抗炎症試験の方法をご指導いただいた。

参考文献

- 1) 小原知之 他：地域高齢住民における認知症の疫学，九州神経精神医学，60（2），83–91（2014）
- 2) 橋本道男：食事・運動と認知症予防，老年期認知症研究会誌，20（4），26–31（2016）
- 3) 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抗能，モダンメディア，57（10），277–287（2011）
- 4) 堀未央 他：クマイザサ (*Sasa senanensis* Rehder) の蛋白糖化最終生成物 (AGES) 生成抑制作用の研究. 同志社大学理工学研究報告, 52 (3), 223–229 (2011) .
- 5) 三上一保 他：平成21年度農林水産省補助事業 食品機能性評価マニュアル集第 I 集 (改訂 2 版) ,115–122
- 6) Sato M. et al. : Site-specific Inhibitory Mechanism for Amyloid beta42 Aggregation by Catechol-type Flavonoids Targeting the Lys Residues. The journal of Biological chemistry, 288 (32), 23212–23224
- 7) Do – Young P. et al. : The Inhibition of *Lactobacillus plantarum* KY1032 Cells Extract on the Adipogenesis of 3T3-L1 Cells. Journal of medical food, 14 (6), 670–675 (2010).