

乳酸菌高抗酸化活性株の選抜

植村 亮太*¹上野 義栄*²

【要 旨】

高抗酸化活性を有する食品・化粧品等の開発に有用と期待される乳酸菌の選抜とその選抜方法の検討を目的として、乳酸菌破碎液、乳酸菌人工消化液処理試料、乳酸菌培養液上清の ORAC 法および細胞内活性酸素発生率試験による抗酸化活性の評価を行った。乳酸菌破碎液では ORAC 法で抗酸化活性を示す菌株は確認されたものの細胞内活性酸素発生率試験においては抗酸化活性を示す菌株は確認されなかった。乳酸菌人工消化液処理試料および乳酸菌培養液上清では ORAC 法で抗酸化活性を示す菌株は確認され、少数ではあるが細胞内活性酸素発生率試験においても抗酸化活性を示す菌株が確認された。

1 はじめに

我が国における高齢化は急速に進展しており 2015 年の高齢化率（65 歳以上人口）は 26.7%と過去最高となっている。将来においても 2060 年までは一貫して高齢化率は上昇していくことが見込まれており、2060 年時点では約 2.5 人に一人が 65 歳以上の高齢者となる見込みである。平均寿命が延びる一方で平均寿命と健康寿命の差（不健康な期間）は 2001 年から 2013 年にかけて男性で約 9 年、女性で約 12 年と縮まっていない。日常生活に制限のある「不健康な期間」の拡大は個人や家族の生活の質の低下を招くとともに、医療費や介護給付費等の社会保障費の増大につながるため健康寿命を延ばし「不健康な期間」を短縮することが重要である¹⁾。

そのような状況の中、健康の維持及び増進に役立つ保健機能食品が望まれている。その開発を行い、機能性の科学的根拠を得るためには動物・ヒト臨床 (*in vivo*) 試験が求められるが、莫大なコストを要するため、その前段階として機能性

成分を探索するための生化学・培養細胞 (*in vitro*) によるスクリーニング試験を行うことが必要となる²⁾。

そこで本研究では高抗酸化活性を有する食品・化粧品等の開発に有用と期待される乳酸菌の選抜とその選抜方法の検討を目的として、当センターで保有する乳酸菌 89 株の菌体破碎液を作製し、一次スクリーニング試験の位置付けとして ORAC 法を実施し、二次スクリーニング試験の位置付けとして正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を用いた細胞内活性酸素発生率による抗酸化活性の評価を行った。さらに菌体破碎液で ORAC 値の高かった 10 菌株について、その人工消化液処理試料および培養液上清を作製し、同様のスクリーニング試験を行った。

2 実験方法

2. 1 乳酸菌の培養及び破碎液の作製

2. 1. 1 乳酸菌の培養

当センターが保有する乳酸菌 89 菌株 (表 1) の凍結保存液をそれぞれ MRS 培地 (Becton, Dickinson and Company 製 Difco™ Lactobacilli MRS Broth) に接種し、常法に従い各乳酸菌株の

* 1 応用技術課 主任

* 2 応用技術課 主任研究員

培養液を得た。

表 1 乳酸菌株の分類

菌種同定株 31 株
<i>Lactobacillus brevis</i> (8)
<i>Lactobacillus plantarum</i> (6)
<i>Streptococcus thermophilus</i> (5)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> (2)
<i>Lactobacillus hilgardii</i> (2)
<i>Lactobacillus bucheri</i> (1)
<i>Lactobacillus kefir</i> (1)
<i>Lactobacillus hammesii</i> (1)
<i>Lactobacillus casei</i> (1)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (1)
<i>Lactobacillus collonoides</i> (1)
<i>Lactobacillus paracasei</i> (1)
<i>Enterococcus faecalis</i> (1)
菌種未同定株 58 株
漬物分離株(29), 味噌分離株(11), その他(18)

2. 1. 2 乳酸菌破砕液の作製

各乳酸菌株の培養液から遠心分離(3,500rpm, 10分間)により上清を除去した。この沈殿に蒸留水を加えて懸濁し、あらかじめ重量を測定した遠沈管に移し、遠心分離(14,000rpm, 5分間)により上清を除去した後、沈殿の残った遠沈管の重量を測定して菌体湿重量を算出した。その沈殿に蒸留水 0.2mL を加えて懸濁させた後、凍結保存した。これを常温で溶解後、破砕用チューブ(エーエムアール(株)製 MORA-EXTRACT)に全量移し、さらに蒸留水 0.1mL で凍結保存チューブの内側をすすぎ破砕用チューブに移した。破砕用チューブをボルテックスミキサーに2分間かけて菌体を破砕した後、蒸留水 0.5mL を加えて、さらに1分間ボルテックスミキサーにかけて菌体を破砕した。その後、遠心分離(14,000rpm, 5分

間)により上清を回収し、乳酸菌破砕液として凍結保存した。

2. 2 ORAC 法

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) は米国国立老化研究所の Cao らによって確立された抗酸化能評価法であり、広く食品の抗酸化能評価に使用されている。本研究では、乳酸菌破砕液を試料として渡辺らによる H-ORAC 分析法標準作業手順書に準じて実験を行った³⁾。

乳酸菌破砕液は乳酸菌湿重量換算で 1mg/mL および 0.5mg/mL に希釈して ORAC 用の試験液とし、乳酸菌湿重量あたりの ORAC 値($\mu\text{molTE/g}$)を算出した。

2. 3 細胞内活性酸素発生率試験

本研究では、乳酸菌破砕液を試料として添加した正常ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)にラジカル発生剤(ピオシアニン)を用いて活性酸素を発生させ、活性酸素検出蛍光試薬(CM-H₂DCFDA)を導入し、蛍光強度を測定することで細胞内活性酸素発生率を算出した^{4), 5)}。

試験操作は次のとおりである。2.5×10⁵cells/mL の NHDF 懸濁液を 96 ウェルプレートに 100 μL /well ずつ播種後一晩培養した。上清除去後、新たな培地 50 μL /well ずつ分注し、乳酸菌破砕液 50 μL を添加し(n=2)、37°C で 4 時間培養した。乳酸菌破砕液の代わりに培地 50 μL を加えたものを未処置対照、100 $\mu\text{mol/L}$ カフェ酸を加えたものを陽性対照として同様に試験を行った。培養後、HBSS(GlutaMAX 含有)で洗浄し、5 $\mu\text{mol/L}$ CM-H₂DCFDA を 50 μL 加え、37°C で 10 分間反応させた。200 $\mu\text{mol/L}$ ピオシアニン 50 μL を添加し、37°C で 1 時間反応させた。蛍光マイクロプレートリーダーを用い、CM-H₂DCFDA とピオシアニンの作用で細胞内に発生した活性酸素の反

応により生じた蛍光物質の蛍光強度を測定した(励起波長: 493nm, 蛍光波長: 523nm)。未処置対照の蛍光強度に対する各試験液の蛍光強度から、次式により細胞内活性酸素発生率を算出した。

細胞内活性酸素発生率(%)

$$= \text{蛍光強度(試験液)} / \text{蛍光強度(未処置対照)} \times 100$$

2. 4 乳酸菌人工消化液処理試料および培養液上清の作製

菌体破砕液のORAC値の高かった10菌株(表2)の培養液から遠心分離(3,500rpm, 10分間)により上清を回収し、培養液上清として試験に供した。この沈殿に蒸留水を加えて懸濁し、あらかじめ重量を測定した遠沈管に移し、遠心分離(14,000rpm, 5分間)により上清を除去した後、沈殿の残った遠沈管の重量を測定して菌体湿重量を算出した。その沈殿に人工消化液(0.2gのペプシンを100mLの0.02N塩酸に溶かしたもの)0.2mLを加えて再度懸濁させた後、破砕用チューブに全量移し、さらに人工消化液0.1mLで内側をすすぎ破砕用チューブに移した。破砕用チューブをボルテックスミキサーに2分間かけて菌体を破砕した後、人工消化液0.5mLを加えて37°Cで2時間反応させた。遠心分離(14,000rpm, 5分間)し、上清0.6mLを回収し、エッペンチューブに移して0.02N水酸化ナトリウム0.6mLで中和し、乳酸菌人工消化液処理試料として試験に供した。

表2 乳酸菌株(人工消化液処理試料および培養液上清)

No.	菌株
5	<i>L. bulgaricus</i>
7	<i>L. kefir</i>
11	<i>L. hammesii</i>
13	<i>L. brevis</i>
14	<i>L. brevis</i>
25	<i>L. brevis</i>
31	<i>L. collonoides</i>
35	味噌分離株
65	味噌分離株
85	キムチ分離株

3 結果及び考察

3. 1 乳酸菌破砕液

3. 1. 1 ORAC

89株の乳酸菌破砕液の菌体湿重量あたりのORAC値($\mu\text{molTE/g}$)を図1に示す。最も高いORAC値を示したのは*L. brevis*(No.13)の49.8 $\mu\text{molTE/g}$ であったが、*L. brevis*のORAC値の平均値は22.1 $\mu\text{molTE/g}$ 、標準誤差は $\pm 5.8\mu\text{molTE/g}$ と同菌種でもばらつきがあった。乳酸菌の分類別にORAC値を比較すると菌種同定株では*L. brevis*のORAC値が他の菌種と比較して高い結果を示したが(図2)、*L. casei*, *L. sakei*, *L. plantarum*で高い活性を示したという報告もあり⁶⁾、菌種ごとの抗酸化活性の傾向を確認するためにはさらに多くの乳酸菌株について評価する必要があると考えられる。

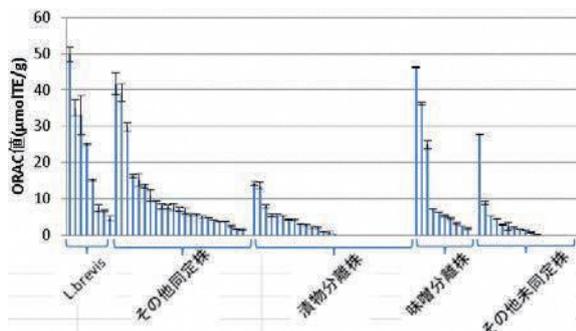


図1 ORAC 値

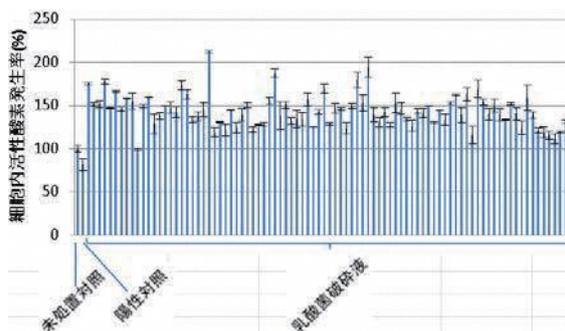


図3 細胞内活性酸素発生率

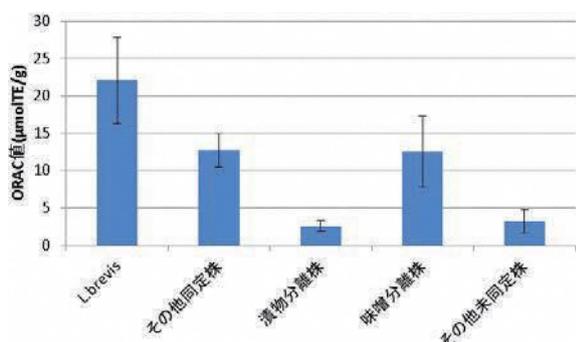


図2 分類別の平均 ORAC 値

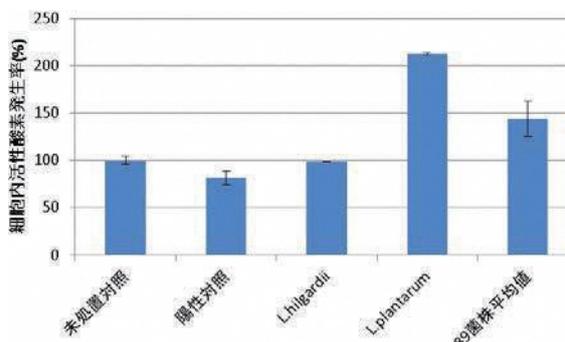


図4 細胞内活性酸素発生率 (要点)

菌種未同定株では味噌分離株が漬物分離株、その他分離株と比較して高い結果を示した (図2)。

3. 1. 2 細胞内活性酸素発生率

未処置区、陽性対照 (100 μmol/L カフェ酸) および各乳酸菌破碎液の細胞内活性酸素発生率 (%) を図3に示す。図3の左端に示した未処置区の細胞内活性酸素発生率 (100 ± 4%)、左から2番目の陽性対照 (82 ± 7%) に対してほとんどすべての乳酸菌破碎液で細胞内活性酸素発生率の上昇が確認された。唯一上昇のなかった *L. hilgardii* に属する菌株では細胞内活性酸素発生率が 99 ± 1% であり細胞内活性酸素発生率を低下させる効果は確認できなかった (図4)。

今回の乳酸菌破碎液の細胞内活性酸素発生率の結果の理由として ORAC 法において抗酸化能を示した成分が細胞内には取り込まれていないことや乳酸菌体中に細胞内で活性酸素の発生を促進する成分が含まれていることの可能性があり、細胞内で有効な抗酸化機能を追求する検体として乳酸菌破碎液は適さないことが示唆された。

3. 2 乳酸菌人工消化液処理試料

3. 2. 1 ORAC

10 株の乳酸菌株の破碎液と人工消化液の ORAC 値の比較を図5に示す。今回、実験を行ったすべての乳酸菌株において、人工消化液処理によって ORAC 値が高くなることが確認された。乳酸菌を含まない人工消化液の ORAC 値は低い値であり、ORAC 値の向上は人工消化液処理による乳酸菌体中の成分の分解により抗酸化能の高い成分が生成することが示唆された。

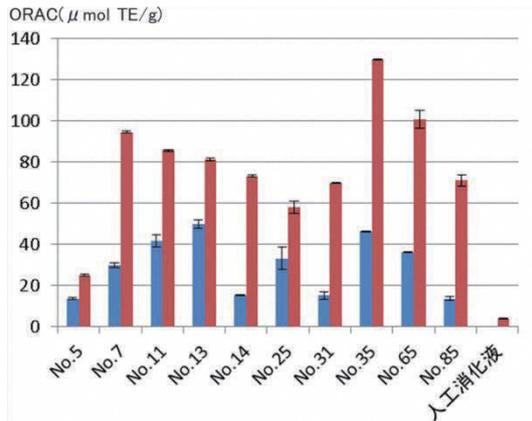


図5 乳酸菌破砕液および乳酸菌人工消化液処理試料のORAC値

■: 乳酸菌破砕液 ■: 人工消化液処理試料

3. 2. 2 細胞内活性酸素発生率

各乳酸菌株の破砕液と人工消化液の細胞内活性酸素発生率の比較を図6に示す。今回、実験を行ったすべての乳酸菌株において、人工消化液処理によって細胞内活性酸素発生率が低くなることが確認された。No. 5の *L. bulgaricus* は未処置区に対して細胞内活性酸素発生率が低下していることが確認された ($p < 0.1$)。乳酸菌を含まない人工消化液の細胞内活性酸素発生率は未処置区に対して細胞内活性酸素発生率の低下はみられないため乳酸菌人工消化液処理試料における細胞内活性酸素発生率の低下は成分の分解によるものと推定できる。つまり、人工消化液処理により乳酸菌破砕液中の細胞内で活性酸素の発生を促進する成分の分解およびタンパク質等の成分の分解により細胞に吸収される抗酸化成分が新たに生成する可能性が示唆された。

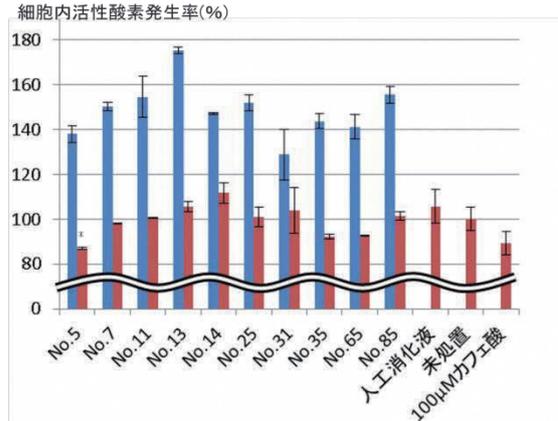


図6 乳酸菌破砕液および乳酸菌人工消化液処理試料の細胞内活性酸素発生率

■: 乳酸菌破砕液 ■: 人工消化液処理試料

3. 3 乳酸菌培養液上清

3. 3. 1 ORAC

乳酸菌培養液上清のORAC値の比較を図7に示す。今回、乳酸菌の培養に用いたMRS培地に対して、いずれの乳酸菌培養液上清も同程度のORAC値を示しており、ORACにはMRS培地に元々含まれている成分の影響が大きいことが推察される。

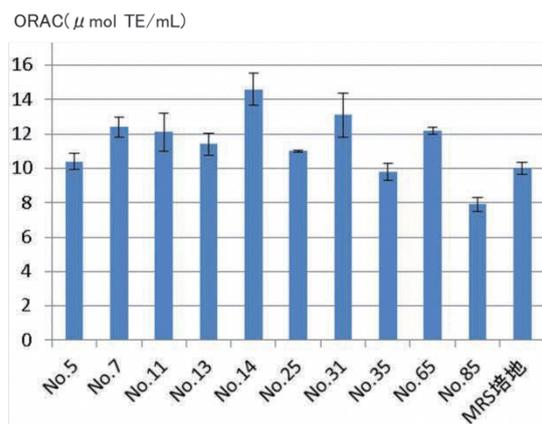


図7 乳酸菌培養液上清のORAC値

3. 3. 2 細胞内活性酸素発生率

乳酸菌培養液上清の細胞内活性酸素発生率の比較を図8に示す。今回、実験を行ったすべての乳酸菌株において、MRS培地よりも細胞内活性酸

素発生率が低くなることが確認された。No. 14 の *L. brevis* は未処置区に対して細胞内活性酸素発生率が低下していることが確認された ($p < 0.1$)。これらの結果から乳酸菌が菌体外に放出する成分の中には細胞に吸収される抗酸化成分が存在することが示唆された。

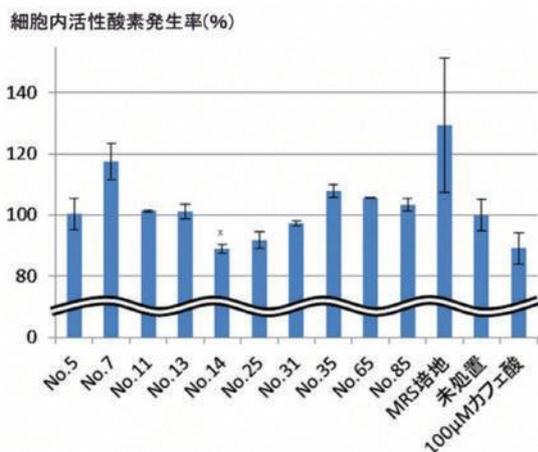


図8 乳酸菌培養液上清の細胞内活性酸素発生率

4 まとめ

高抗酸化活性を有する食品、化粧品等の開発に有用と期待される乳酸菌の選抜とその選抜方法の検討を目的として、当センターで保有する乳酸菌 89 株の菌体破碎液を作製し ORAC 法および正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を用いた細胞内活性酸素発生率による抗酸化活性の評価を行った。

ORAC 法においては抗酸化活性を示す菌株と抗酸化活性を示さない菌株が区別されたが、細胞内活性酸素発生率においては有意に細胞内活性酸素発生率を低下させる菌株は確認されず、ほとんどの菌株で細胞内活性酸素発生率が上昇する結果が得られた。

今回作製した乳酸菌破碎液について、ORAC 法で抗酸化活性を示したにも関わらず、細胞内活性酸素発生率が低下しない、あるいは上昇したこと

から ORAC 法で抗酸化活性を示した抗酸化成分が細胞内に取り込まれていない可能性や細胞内での活性酸素の発生を促進する成分が含まれている可能性があり、乳酸菌破碎液は細胞内で有効な抗酸化機能を追求する対象としては適さないことが示唆された。

一方で乳酸菌を食品・化粧品等に利用することを考えたとき、乳酸菌破碎液 (菌体内成分) が有する機能性のみではなく成分等が消化された際に生じる成分や菌体外に放出する成分に機能性があれば有用であると考えられる。そこで人工消化液処理を行った試料および培養液上清について同様の試験を行ったところ細胞内活性酸素発生率が低下する菌株が確認された。人工消化液処理による細胞内活性酸素発生率の低下から活性酸素の発生を促進する成分の分解およびタンパク質等の成分の分解により細胞に吸収される抗酸化成分が新たに生成する可能性が示唆されるが、その機構については今後の検討課題である。

乳酸菌人工消化液処理試料および乳酸菌培養液上清については、一次スクリーニング試験の ORAC 法で抗酸化活性を示す検体であっても二次スクリーニング試験の細胞内活性酸素発生率試験で抗酸化活性を示す検体は 3 割程度であった。ORAC 法で抗酸化活性を示さず、細胞内活性酸素発生率試験で抗酸化活性を示す検体が存在する確率の評価のためにはより多くの検体を用いたデータの蓄積が必要である。

培養細胞を用いた評価系は、一般的な化学分析に比べ、より生体内に近い状態での抗酸化物質の作用を評価するのに有効であるとされており⁴⁾、ORAC 法を一次スクリーニング試験とし、細胞内活性酸素発生率試験による二次スクリーニング試験を行うことは有効であると考えられる。細胞内活性酸素発生率試験で抗酸化活性を示した検体がどの程度 *in vivo* 試験で抗酸化活性を示すかにつ

いては今後の検討課題である。

(謝辞)

本研究の実施にあたり細胞内抗酸化活性測定法については一般財団法人日本食品分析センターの堀籠悟様にご助言をいただきました。心より感謝いたします。

(参考文献)

- 1) 厚生労働省：平成 28 年版厚生労働白書 (2016)
- 2) 日本食品分析センター：JFRL ニュース

vol. 3, No. 9 (2009)

- 3) 渡辺 純：H-ORAC 分析法標準作業手順書 (2013)
- 4) 津田愛子：J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn., vol. 45, No. 3, p. 207-211 (2011)
- 5) Satoru Horigome：Eur J Nutr, vol. 56, No. 3, p. 949-964 (2017)
- 6) 山本裕司：乳酸菌由来抗酸化物質の同定と高抗酸化活性株の選抜 (公益財団法人野田産業科学研究助成事業研究成果概要 (2009))