

九州地方の植物の花や実から分離した乳酸菌の免疫活性化能評価

戴 風 鳳^{1§}, 満生 萌水^{1§}, 原口ななみ², 平野美佳子¹, 張 乃 睿¹,
田中 綾乃², 中野 弘基³, 中野 雄揮³, 中野 敏朗³, 北垣 浩志^{2*}
(佐賀大学大学院先進健康科学研究科¹, 生物資源科学科・食資源情報学分野², 株式会社インパクト³)
2021年6月25日 受理

Immunopotentiating Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Flowers and Fruits in Kyushu District.

Huanghuang DAI^{1§}, Moemi MANSHO^{1§}, Nanami HARAGUCHI², Mikako HIRANO¹,
Nairui ZHANG¹, Ayano TANAKA², Hiroki NAKANO³, Yuuki NAKANO³,
Toshiaki NAKANO³ and Hiroshi KITAGAKI^{2*}

(Graduate School of Advanced Health Sciences of Saga University¹,
Department of Biological Resource Science, Food Resource and Information Laboratory², Impact Co. Ltd. ³)
Accepted June 25, 2021

Summary

Lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis* were isolated from the flowers of plum (*Prunus mume* 'Nanko'), cherry blossom (*Cerasus yedoensis* 'Someiyoshino') and the fruit of kabosu (*Citrus sphaerocarpa* 'Oita No. 1') in Kyushu island, respectively. The immunopotentiating activities of the bacteria were measured using murine macrophage RAW264.7. It turned out that none of these bacteria showed cell toxicities. *E. faecalis* showed increased nitric oxide and Tumor necrosis factor (TNF)- α productivities as relative to its type strain. *L. mesenteroides* and *L. lactis* showed increased nitric oxide productivities as relative to their type strains. These results indicate that these lactic acid bacteria have immunopotentiating activities without cell toxicities, thus these can be utilized as functional foods and/or cosmetics which increase immunity.

Key Words: Lactic acid bacteria, flower, fruit, immunopotentiating activity, macrophage

緒 言

微生物やウイルスに感染しても、感染して初期であればあるいは感染した微生物やウイルスの量が少なければ、体にもともと備わっている免疫によりヒトはそれらを撃退することができる。これは、微生物やウイルスが人体に侵入するとマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞がこれらを貪食したのち、ヘルパーT細胞に抗原の情報を受け渡し、B細胞に抗原の情報

[§]These authors equally contributed to this work.

*To whom correspondence should be addressed.

をさらに受け渡して形質細胞に抗体を産生させたりキラーT細胞を活性化し感染細胞を排除したりするためである。このことにより、抗体が微生物やウイルスに結合して抗原抗体複合体が形成されてさまざまな免疫反応が惹起され、微生物やウイルスが体内から排除される¹⁾。さらに微生物やウイルスだけでなく、ウイルス感染細胞やがん細胞も細胞傷害性Tリンパ球抗原4やProgrammed death receptor-1を介して排除される²⁾ので、免疫の活性化は微生物やウイルスなどの感染症に限らずガンなど多くの病気に対処できると言える。

このことから、普段の生活から適度にマクロファージを活性化することが健康維持の鍵である。マクロファージを活性化する物質にはlipopolysaccharide (LPS) や β グルカン、二重鎖RNA、リポタンパク質、リポ多糖、フラジェリン、ペプチドグリカン、リボテイコ酸、非メチル化CpG DNAなど³⁾が知られており、マクロファージにInterleukin-1 β 、Interleukin-6、Interleukin-12、Tumor necrosis factor (TNF)- α などのサイトカインや一酸化窒素(NO)⁴⁾を産生させる。乳酸菌はこれらの成分を含み大腸がんなどの発生を防ぐ⁵⁾ので、マクロファージを活性化するよい素材であると言える。

乳酸菌は消費したブドウ糖から50%以上の乳酸を生成する通性嫌気性の細菌で、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus*)、ラクトコッカス属(*Lactococcus*)、ペディオコッカス属(*Pediococcus*)、ロイコノストック属(*Leuconostoc*)、ストレプトコッカス属(レンサ球菌属)(*Streptococcus*)、ビフィドバクテリウム属(*Bifidobacterium*)⁶⁾などを含み、マクロファージ活性化能を有することが示されている⁷⁻⁹⁾。マクロファージへの乳酸菌の作用部位はさまざまであることから、免疫活性化能がある多様性の高い乳酸菌が求められていた。

一方、九州地方は日本の本州からもユーラシア大陸からも物理的に海洋で隔絶されており、年間降水量も日本全体の平均値1700mm前後と比べて2200-2800mmの県が分布しており湿潤であり、年間平均気温も日本全体の平均値15℃前後と比べて17-18℃と温暖である。乳酸菌は植物の糖などの栄養が多い部分や酸素のやや少ない場所に多く棲んでおり¹⁰⁾、15-30℃では温度が高いほど増殖も速い¹¹⁾ことから、九州地方の花や実には多くの乳酸菌が見つかる可能性がある。

そこで九州地方の植物の花や実から免疫を活性化する可能性のある乳酸菌を分離して選抜し、その株化マクロファージ活性化能を測定し、免疫活性化能を評価することにした。

材料及び方法

1 実験材料

乳酸菌の分離源としては九州地方の梅(南高)の花と桜(ソメイヨシノ)の花、カボス(大分1号)の実を用いた。標準品としての*Leuconostoc mesenteroides* (NBRC100496)と*Lactococcus lactis* (NBRC100933)は製品評価技術基盤機構から入手した。

細菌同定にはBacterial 16S rDNA PCR Kit(タカラバイオ株式会社)とNucleospin[®] Gel and PCR Clean-up (MACHERY-NAGEL)を用いた。

細胞試験にはダルベッコ変法イーグル培地(DMEM培地)、生細胞数測定試薬SF(ナカライテスク株式会社)、LPS(*Escherichia coli* 0111:B4由来(富士フィルム和光純薬(株))、スルファニルアミド、N-1-ナフチルエチレンジアミン・二塩酸塩(富士フィルム和光純薬(株))、penicillin-streptomycin mixed solution(ナカライテスク)、Fetal Bovine Serum(HyClone Laboratories Inc.)、Mouse TNF- α ELISA Ready-SET-Go[®](Affymetrix ebioscience)を用いた。マ

ウス・マクロファージ株化細胞 RAW264.7は The European Collection of Authenticated Cell Cultures から入手した. PBS/PBS-T, GriessI と GriessII には以下の組成のものを用いた.

	Volume or amount
NaCl	1.6 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.58 g
KCl	0.04 g
KH ₂ PO ₄	0.04 g
(PBS-T の場合) Tween20	0.45 mL
Total volume	970 mL

<GriessI>

	Volume or amount
H ₃ PO ₄	4.4 g
Sulfanilamide	0.5 g
dH ₂ O	90.1 mL

<GriessII>

	Volume or amount
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine	0.15 g
dH ₂ O	50 mL

2 乳酸菌の分離と同定

2-1 菌の培養

植物の花もしくは実を一部採取して0.85% NaCl 溶液に浸漬し, そこから100 μ L を MRS 寒天培地に播種し, 培地上に現れた単コロニーを別の MRS 寒天培地に単離し, 30°C の好気条件下で1~5日間培養した.

2-2 簡易同定

カタラーゼ試験と顕微鏡観察により乳酸菌の簡易同定を行った. カタラーゼ試験では, 乳酸菌候補の株を培養 (30°C, 1日) し, 遠心して上清を取り除いた細胞菌体に3%過酸化水素水を添加し, 泡の有無によりカタラーゼ陰性菌であるかどうかを調べた. また, 菌体の写真は花市電子顕微鏡技術研究所に委託して10⁷cells の細胞を2%グルタルアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液で固定・脱水, 蒸着し, 走査型電子顕微鏡により撮影した.

2-3 16S rRNA 解析

コロニーを滅菌蒸留水 (DW) 50 μ L に懸濁し, 100 mM NaOH を50 μ L 添加し, 混合後, 95°C で15min 熱処理した. 1M Tris-HCl (pH 8.0) を11 μ L 添加して混合し, 遠心して沈殿を回収した. 94°C 1 min (94°C 30 s→55°C 30 s→72°C 1 min)×30, 72°C 3 min の条件で PCR を行い16S rDNA 領域を増幅させ, 電気泳動でバンドの確認を行った (DNA 精製液 3 μ L にローディングバッファー 1 μ L を混合し, アガロースゲル電気泳動した. 60min, 50V の電気泳動後エチジウムブロマイド液に30min 浸し, UV でバンドを確認した). Qiagen DNA 精製キットを用いて, DNA 精製を行い, 再度電気泳動でバンドの確認を行った後に, 生成増幅産物 (2.0

μL) を Sequencing Primer F1, F2, R1, R2 ($2.5 \mu\text{L}$) と dH_2O ($8.0 \mu\text{L}$) と Premix Ex Taq (2X) $12.5 \mu\text{L}$ と 8 ウェルチューブで混ぜ合わせ、株式会社タカラバイオに解析を委託した。

3 免疫活性化試験

3-1 試料の調整

16S rRNA 解析で同定された乳酸菌を MRS 培地で 30°C で 1 日間培養した後に、遠心 ($77,477 \times g$, 5 min) し上清を捨てた。残った菌体を PBS で 3 回洗浄した後、再度遠心し、上清 (PBS) を除去した。その後、DMEM 培地を 2 mL 加え、混釈平板希釈法により適宜調整した乳酸菌サンプルを作製した。細胞試験では試料を LPS 無添加区においては $200 \mu\text{L}$ ($n=4$)、また LPS 添加区においては $180 \mu\text{L}$ ($n=4$) 使用するため、1 サンプルあたり 3 mL の試料を作製した。培養した菌を遠心し ($1,118 \times g$, 3 min)、上清を除去し DW 1 mL で 3 回洗浄し、DW 1 mL に溶かし、 600nm で OD を測定し、必要な細胞数密度に調製して、熱不活化処理した (65°C , 30min)。

3-2 細胞培養

細胞はマウス由来マクロファージ株化細胞 RAW264.7 を用い、培地は 10% FBS (56°C , 30 min) の加熱により非働化したものを使用) 及び 1% penicillin (10^4units/mL) / streptomycin (10mg/mL) を含む DMEM 培地を使用した。細胞を 96 ウェルプレートに $4 \times 10^5 \text{cpm}$ に調整した RAW264.7 細胞を $8.0 \times 10^4 \text{cells/well}$ の細胞密度で 96 ウェルプレートに $200 \mu\text{L}$ ずつ播種し、5% CO_2 存在下で 19hr 培養した。

3-3 一酸化窒素 (NO) 産生量試験

NO 産生量は Griess 法¹²⁾により、培養上清に蓄積した亜硝酸イオンの濃度を求めた。細胞を $4 \times 10^5 \text{cells/mL}$ の細胞密度になるように DMEM 培地で希釈し、細胞培養用 96 ウェルプレートに $200 \mu\text{L}$ ずつ分注して 5% CO_2 存在下、19hr 前培養し、RAW264.7 細胞をプレートに接着させた。培養後、培養上清を除去し、PBS $200 \mu\text{L}$ で洗浄後、3-1 で作製した乳酸菌試料を LPS 無添加区には $200 \mu\text{L}$ 、また LPS 添加区には $180 \mu\text{L}$ ずつ添加し、5% CO_2 存在下 30min 培養した。その後、LPS 添加区には DMEM 培地に溶解させた LPS (1000ng/mL) を $20 \mu\text{L}$ 添加し、総量を $200 \mu\text{L}$ として 5% CO_2 存在下 24hr 培養した ($n=4$)。その後、細胞上清を $90 \mu\text{L}$ 採取し、Griess 試薬 (GriessI : GriessII = 2 : 1) を $90 \mu\text{L}$ 加え、室温で 10min 反応させた。その後すぐにマイクロプレートリーダーで吸光度 ($550/630\text{nm}$) を測り、NO 産生量を算出した。また、培地に NO_2^- を濃度段階的 ($50 \mu\text{g/mL}$, $25 \mu\text{g/mL}$, $12.5 \mu\text{g/mL}$, $6.25 \mu\text{g/mL}$, $3.13 \mu\text{g/mL}$, $0 \mu\text{g/mL}$) に溶解させたものを標準液として培地中の NO_2^- 濃度を測定して NO 産生量を算出した。

3-4 生細胞率試験

乳酸菌添加によりマクロファージ RAW264.7 細胞の生細胞率が変化するかを確認するため、細胞活性測定キット (cell counting reagent) を用いて生細胞率を試験した。3-3 と同一の試験時に、試料添加後、細胞を 24hr 培養した培地を除去し、cell counting reagent を DMEM 培地で 50 倍希釈した試薬 $100 \mu\text{L}$ ($2 \mu\text{L}$ reagent / $98 \mu\text{L}$ medium) を 96 ウェルプレートに添加し、培養した (37°C で 5% CO_2 存在下 5 hr 培養した)。その後すぐにマイクロプレートリーダーで吸光度 ($550/630\text{nm}$) を測り、以下に示した式から生細胞率を算出した。

$$\text{生細胞率}[\%] = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

A sample : 試料添加時の吸光度, A blank : 試料未添加時 (代わりに DMEM 培地を添加) の吸光度

3-5 TNF- α 産生量試験

死菌体を添加した RAW264.7 細胞の培養 24hr 後の上清を 11 μL ずつ採取し, TNF- α 量を ELISA 法により測定した. 滅菌蒸留水 : coating buffer : 1 次抗体 = 450 : 5 : 1 で調整した試薬で 50 μL ずつ 96 ウェルプレートに播種し抗体を固相化させ, 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晚反応させた. *E. faecalis* を添加した RAW264.7 細胞の培養 24hr 後の上清を 4 倍希釈させたものを 50 μL ずつ 96 ウェルプレートに播種し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晚反応させた. ウェル中の溶液を全て除去し, PBS-T で洗浄した後, ビオチン結合抗 TNF- α 抗体 : 上清希釈溶液 = 1 : 420 で調整した試薬で 50 μL 播種し, 室温で 1 hr 静置反応させた. その後 PBS-T で洗浄後, 上清希釈液で 420 倍希釈したペルオキシダーゼ・アビジン結合物溶液を 500 μL 添加し, 30min 後, 中の溶液を捨て, PBS-T で洗浄後, 発色液を 50 μL ずつ添加し, 暗所で 10min 静置反応させた. その後, 反応停止液として 1 M H_2SO_4 を 100 μL 用い, マイクロプレートリーダーで吸光度 (450/545nm) を測定した. TNF- α 産生量を求めるために, 上清希釈液に TNF- α を濃度段階的 (500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.3pg/mL, 0pg/mL) 溶解させたものを標準液として, TNF- α 検量線から上清中の TNF- α 産生量を算出した.

結 果

1 梅の花からの乳酸菌の分離と免疫活性化測定

採取した梅の花から実験方法に従い多数の菌を分離し, カタラーゼ試験を行った結果, 陰性を示した株が 2 株あったので乳酸菌候補株とした. そのうち一株を電子顕微鏡観察した結果, 球菌の形状であることが分かった (図 1 A). この乳酸菌候補株の 16s rDNA のシーケンスを解析した結果, *Enterococcus faecalis* であることが明らかになった. この菌株は NITE P-02789 として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託した¹³⁻¹⁴⁾.

次に得られた *E. faecalis* の死菌体の免疫活性化能をマクロファージ細胞 RAW264.7 を用いて調べた. その結果, LPS を添加しなくても, 乳酸菌濃度 (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cells/mL) に依存してマクロファージによる NO が標準品よりも多く増加した (図 1 B). また *E. faecalis* の TNF- α 産生量も標準品より多かった (図 1 C). また, 生細胞率試験において, *E. faecalis* では 93.8~99.8% の生細胞率を示し (図 1 D), サンプル無添加区と比較し有意差は見られなかったことから, 今回添加した菌濃度 (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cells/mL) の範囲内ではいずれの菌体も RAW264.7 細胞における細胞傷害性は無いと考えられた.

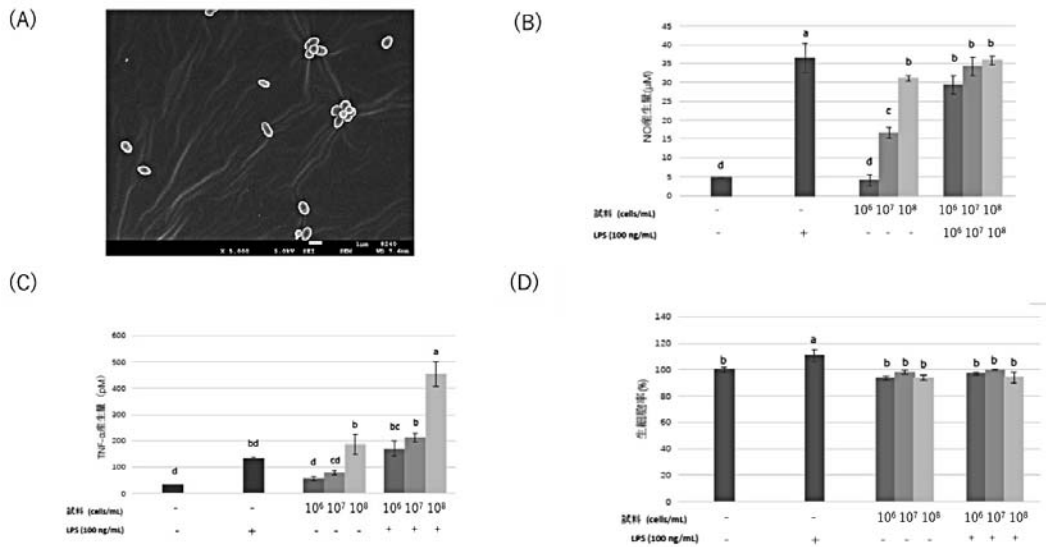


図1 梅の花より分離した *Enterococcus faecalis* を添加したマクロファージ細胞の NO 及び TNF- α 産生能

(A)梅の花より分離した細菌の電子顕微鏡写真. 白いバーは1 μ mを表す. (B)梅の花より分離した *E. faecalis* を添加したマクロファージ細胞の NO 産生能. マクロファージ RAW264.7細胞 (4×10^4 cells/well in 96 well プレート) に試料 (死菌体 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cells) 添加後, LPS を20ng (終濃度100ng/mL) 添加して細胞の活性化を誘導し, 培養上清を回収して Griess 反応による NO 産生量を測定した. 統計検定は分散分析後, Tukey HSD 法で多重比較を行った ($P < 0.05$, $n = 6$). (C)梅の花より分離した *E. faecalis* を添加したマクロファージ細胞の TNF- α 産生量. マクロファージ RAW264.7細胞 (4×10^4 cells/well) に試料 (死菌体 *E. faecalis* 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cells) 添加後, LPS を20 ng (終濃度100ng/mL) 添加して細胞の活性化を誘導し, 培養24hr 後の上清を回収して ELISA により TNF- α 産生量を測定した. 統計検定は分散分析後, Tukey HSD 法で多重比較を行った ($P < 0.05$, $n = 4$). (D)梅の花より分離した *E. faecalis* を添加したマクロファージ細胞の生細胞率. マクロファージ RAW264.7細胞 (4×10^4 cells/well) に試料 (死菌体 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cells) 添加後, LPS を20ng (終濃度100ng/mL) 添加した. そして乳酸菌無添加における生細胞率を100%として各添加量における生細胞率を測定した. 統計検定は分散分析後, Tukey HSD 法で多重比較を行った ($P < 0.05$, $n = 6$).

2 桜の花からの乳酸菌の分離と免疫活性測定

採取した桜の花から実験方法に従って菌を多数分離し, カタラーゼ陰性のものを対象に16S rDNA のシーケンス解析を行った. その結果, そのひとつを *Leuconostoc mesenteroides* として同定することができた. この菌株は NITE AP-03367として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託した. この菌を電子顕微鏡で観察したところ球菌であった (図2 A). そのマクロファージに対する免疫活性化能を一酸化窒素 (NO) により測定した.

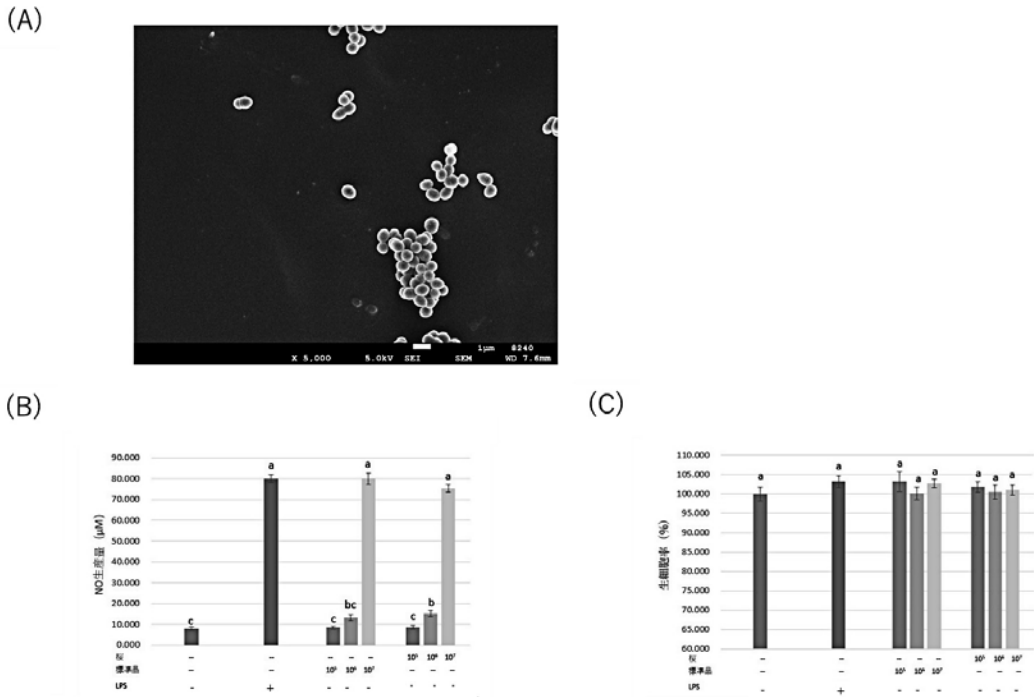


図2 桜の花より分離した *Leuconostoc mesenteroides* を添加したマクロファージ細胞の NO 産生能

(A)桜の花より分離した細菌の電子顕微鏡写真. 白いバーは1µmを表す. (B)桜の花より分離した *L. mesenteroides* を添加したマクロファージ細胞の NO 産生能. マクロファージ RAW264.7細胞 (4×10^4 cells/well) に試料 (死菌体 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cells) 添加後, LPS を20ng (終濃度100ng/mL) 添加して細胞の活性化を誘導し, 培養上清を回収して Griess 反応による NO 産生量を測定した. 標準品には NBRC100496の死菌体を用いた. 統計検定は分散分析後, Tukey HSD 法で多重比較を行った ($P < 0.05$, $n = 6$). (C)桜の花より分離した *L. mesenteroides* を添加したマクロファージ細胞の生細胞率. マクロファージ RAW264.7細胞 (4×10^4 cells/well) に試料 (死菌体 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cells) 添加後, LPS を20ng (終濃度100ng/mL) 添加した. そして乳酸菌無添加における生細胞率を100%として各添加量における生細胞率を測定した. 統計検定は分散分析後, Tukey HSD 法で多重比較を行った ($P < 0.05$, $n = 6$).

NO 産生量においては, 桜から分離した乳酸菌は標準品と同様の傾向を示した (図 2 B) ので, 桜由来乳酸菌は標準品と同様の免疫活性を持っていると考えられた. また桜から分離した乳酸菌と標準品の生細胞率はすべて95%以上を示した (図 2 C) ため, この菌には細胞障害性がないと考えられた.

3 カボスの実からの乳酸菌の分離と免疫活性測定

採取したカボスの実から実験方法に従って菌を多数分離し, カタラーゼ陰性のものを電子顕微鏡観察したところ球菌の形状であった (図 3 A). この菌の16S rDNA のシークエンス解析を行った結果, *Lactococcus lactis* をとして同定することができた. この菌株は NITE AP-03368 として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託した. この株の死菌体のマクロファージに対する免疫活性化能を NO で測定した. その結果, 添加濃度に依存して NO 産生量が増加し, 標準品と同様の免疫活性化能を有することを明らかにした (図 3 B).

ただし添加濃度が高すぎると却って NO 産生量が減少してしまい、測定に至適濃度の範囲は狭いことが示唆された。一方、この菌を添加した時の生細胞率は明確な現象を示さなかったことから、この菌には細胞障害性はないと考えられた (図 3 C)。

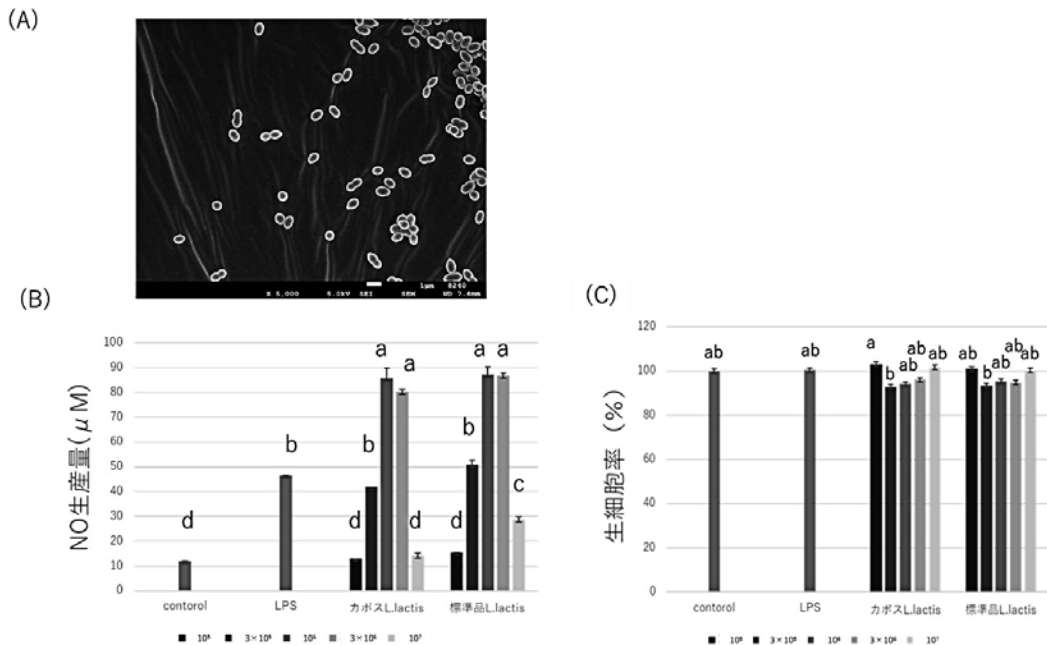


図 3 カボスの実より分離した *Lactococcus lactis* を添加したマクロファージ細胞の NO 産生能

(A)カボスの実より分離した細菌の電子顕微鏡写真。白いバーは1 μm を表す。(B)カボスの実より分離した *L. lactis* を添加したマクロファージ細胞の NO 産生能。マクロファージ RAW264.7細胞 (4×10^6 cells/well) に試料 (死菌体 1×10^5 , 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 cells) 添加後、LPS を20ng (終濃度100ng/mL) 添加して細胞の活性化を誘導し、培養上清を回収して Griess 反応による NO 産生量を測定した。標準品には NBRC100933 を用いた。統計検定は分散分析後、Tukey HSD 法で多重比較を行った ($P < 0.05$, $n = 6$)。 (C)カボスの実より分離した *L. lactis* を添加したマクロファージ細胞の生細胞率。マクロファージ RAW264.7細胞 (4×10^6 cells/well) に試料 (死菌体 1×10^5 , 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 cells) 添加後、LPS を20ng (終濃度100ng/mL) 添加した。そして乳酸菌無添加における生細胞率を100%として各添加量における生細胞率を測定した。統計検定は分散分析後、Tukey HSD 法で多重比較を行った ($P < 0.05$, $n = 6$)。

以上の結果から、九州地方の植物の花や実には免疫活性化能のある多くの乳酸菌が含まれていることが明らかになった。今後その免疫活性化能を活かして、機能性のある食品や化粧品に応用されることが期待される。

考 察

本研究により、九州地方の植物の花あるいは実から *E. faecalis*, *L. mesenteroides* 及び *L. lactis* が分離され、マクロファージ活性化能を有することが明らかになった。

マクロファージは自然免疫の一環を成し、ウイルスや細菌、真菌を貪食してヘルパー T 細胞などに抗原情報を提示する機能を有する。従って、マクロファージ活性化能を持つこれらの乳

酸菌は食事として摂取することで、小腸でマクロファージと接触し、全身の自然免疫を活性化し、ウイルスや細菌、真菌による感染を防ぐ効果が期待できる。事実、システムティックレビューで乳酸菌を摂取することにより上気道の感染症を47%減らすことができることを示唆する研究が発表されている¹⁵⁾。また皮膚の真皮にもマクロファージが分布していることから、化粧品として使うことで、皮膚における免疫の活性化も期待できる。

今回観察された乳酸菌の免疫活性化について、どの成分がマクロファージを活性化したかについては、LPSや二重鎖RNA、リポタンパク質、リポ多糖、フラジェリン、ペプチドグリカン、リポテイコ酸、非メチル化CpG DNAなどが考えられる³⁾が、本研究では成分を特定できなかった。今後研究が進むことでこれらの成分の特定、菌ごとの違いなども明らかになると考えられる。

以上の研究から、九州地方の植物の花や実から乳酸菌が得られ、免疫活性化能を持つことが明らかになった。得られた乳酸菌は、独自性のある機能性食品や化粧品に活用可能だと考えられる。

摘 要

九州地方の梅の花から *Enterococcus faecalis* を、桜の花から *Leuconostoc mesenteroides* を、カボスの実から *Lactococcus lactis* を乳酸菌として分離した。その免疫活性化能をマウスの株化マクロファージ RAW264.7 を用いて測定したところ、いずれの菌も細胞障害性を示さなかった。一方、*E. faecalis* 添加は一酸化窒素と TNF- α の産生を増加させ、*L. mesenteroides* と *L. lactis* 添加は一酸化窒素の産生量を増加させた。これらのことから免疫活性化能のある乳酸菌が梅の花及び桜の花、カボスの実から得られ、機能性食品や化粧品などに応用可能と思われた。

引 用 文 献

- 1) Tonegawa, S. (1985) The molecules of the immune system. *Scientific American* **253**, 122-131.
- 2) Chen, D., Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. (2017) *Nature* **541**, 321-330.
- 3) Lemaitre, B., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1997) Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 14614-14619.
- 4) Duque, G. A., Descoteaux, A. (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, **5**, 491.
- 5) Hirayama, K., Rafter, J. (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* **2**, 681-686.
- 6) Douillard, F.P., de Vos, W.M. (2014) Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell Fact.* **13**, S 8.
- 7) Jeon, H. H., Lee, K. W., Kim, H. Y., Chung, D. K., Lee, H. J. (2006) *In vitro* immunopotentiating activities of cellular fractions of lactic acid bacteria isolated from kimchi and bifidobacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 661-666.
- 8) Kim, J. H., Li, J., Han, S. K., et al. (2016) Characterization of macrophage-activating lactic acid bacteria isolated from Mukeunji. *Food Sci. Biotechnol.*, **25**, 595-599.
- 9) Wang, Y., Xie, J., Wang, N., Li, Y., Sun, X., Zhang, Y. and Zhang, H. (2013) *Lactobacillus casei* Zhang modulate cytokine and Toll-like receptor expression and beneficially regulate poly I:C-induced immune responses in RAW 264.7 macrophages. *Microbiol. Immunol.* **57**, 54-62.

- 10) 乳酸菌研究集談会編 (1996) 乳酸菌の科学と技術, 12.
- 11) da Silva A. P. R., Longhi, D. A., Dalcanton, F., de Aragão, G. M. F. (2018) Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 61.
- 12) Tsikas D. (2007) Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatography B*, 851, 51-70.
- 13) 中野雄輝, 北垣浩志 (2020) 乳酸菌及び同乳酸菌を含有する食品・抗菌組成物. 特願2020-19442
- 14) 中野雄輝, 北垣浩志 (2021) 乳酸菌及び同乳酸菌を含有する食品・抗菌組成物. 特願2021-019749
- 15) Hao, Q., Dong, B. R., Wu, T. (2015) Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2, CD 006895. DOI: 10.1002/14651858.CD 006895.pub 3.