11588

乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* EF-2001 加熱死菌体由来水溶性抽出物の抗腫瘍効果

鈴木 郁功　梅川 美佳子　高木 康之
朴 相来　具 然和　柳沢 昊永
岩佐 敏廣　下橋 博隆
（鈴鹿医療科学大学保健衛生部医療栄養学科・放射線技術学科，
日本ベルム（株），バイオクィーン研究所）

Enterococcus faecalis（*E. faecalis*）の加熱死菌体は抗腫瘍，免疫増強[1]，血圧下降[2]，および撹乱した腸内細菌叢の修復促進[3]などの効果を有することが報告されている．著者らは健康成人から分離した *E. faecalis* EF-2001 株の加熱処理死菌体（EFH-201 と略称）が，侵襲性大腸菌に対する感染防御効果を発揮したり[4]，強力な腫瘍壊死因子（TNF-α）を誘導する[5]ことを動物実験で明らかにしてきた．

本研究では，その加熱死菌体の抗腫瘍効果と活性成分の性状を明らかにする目的で EF-2001 株の加熱死菌体（EFH-201）をまず単純に水溶性画分と不溶性画分に分画し，その水溶性画分のマウスにおける移植癌に対する抗腫瘍活性に関して報告する．

方法

供試動物：ICR 系雄マウス，BALB/c 系雄マウスおよび ddY 系雄マウス（4 週齢），Swiss-Webstar 系雌雄マウス（8 週齢）を日本 SLC（株）から購入し，本大学動物舎で 1 週間以上の予備飼育後実験に使用した．Swiss-Webstar 系マウスは成熟週齢で交配させた後，分娩まで雌マウスのみを 1 匹ずつ飼育した．予備飼育ならびに実験期間を通して，温度 23±1 ℃，湿度 55±10%，照明 12 時間，換気回数 10 回/hr の環境条件下で飼育した．

E. faecalis EF-2001 加熱死菌体由来水溶性画分の抽出：日本ベルム（株）から供与された EFH-201（EF-2001 株の加熱死菌体粉末）20 g に蒸留水 200 ml の割合で加え，室温にて 2 時間撹拌した．その後遠心（5000rpm，30 分）分離した上清液を採取，濃縮，凍結

English Title for No. 11588: Antitumor effects of the water-soluble extract prepared from heat killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 Cells. **Ikukatsu Suzuki, Mikako Umekawa, Yasuyuki Takagi, Sang Rae Park, Yeun Hwa Gu, Takaharu Yanagisawa, Toshihiro Iwasa and Hirotaka Shimohashi** [Departments of Clinical Nutrition, Faculty of Health Science and Department of Radiological Technology, Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Nihon Berumu Co., LTD, Institute of Bio-Queen Co., LTD., Tokyo.] *Medicine and Biology*. 143 (3) : 113-118, September 10, 2001.
（著者校正）

乾燥させた水溶性画分をEFH-201水溶性抽出物として実験に供試した.

EFH-201水溶性抽出物によるリンパ球対多形核白血球比増加作用（L/P活性）：Handらの方法[6]に準じ，免疫が未熟なSwiss-Webstar系雌マウスの同腹の新生仔（生後6-12時間以内）マウスを2群に分け，検体群にはEFH-201水溶性抽出物200μg（生理食塩水に溶解）をそれぞれの仔Swiss-Webstar系マウス腹腔内に投与した．対照群の新生仔Swiss-Webstar系マウスには生理食塩水（0.05 ml）を同様に投与した．そして，投与前，投与後6，10，14日目にマウスの尾静脈より採血し，血液塗抹標本を作成し，ライト染色後，顕微鏡（400倍）下でその標本のリンパ球数（L）と多形核白血球数（P）を総計100個数えてL/P比を算出した[7]．

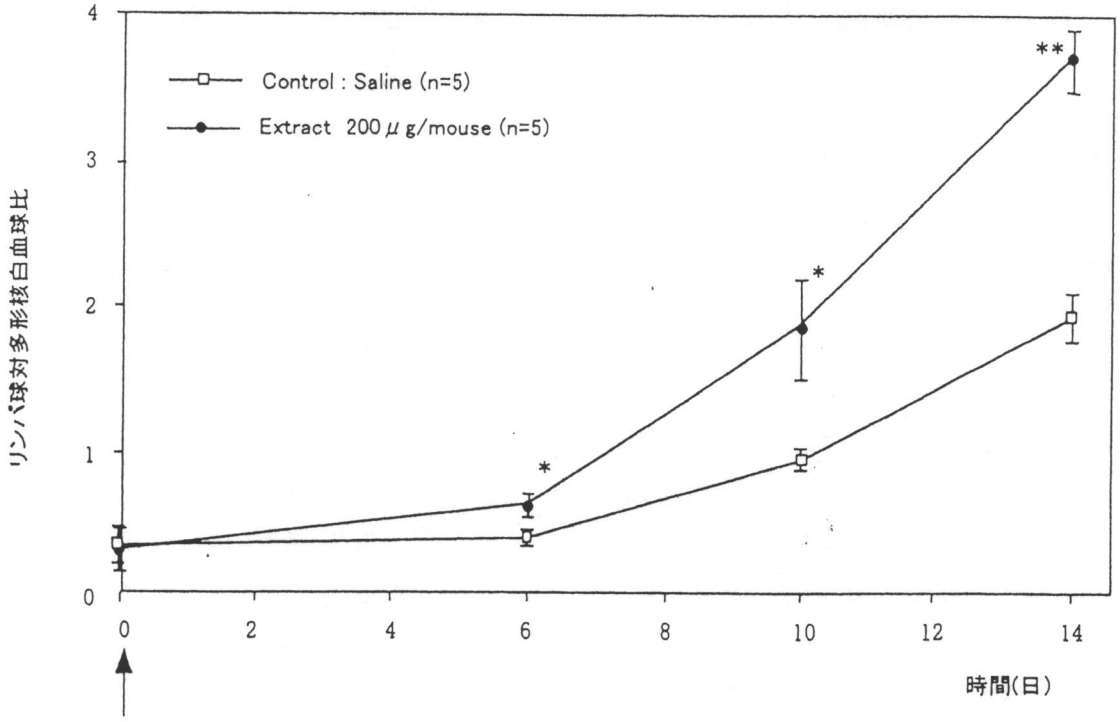

図1 EFH-201水溶性抽出物によるSwiss-Webstar系マウス末梢血中のリンパ球対多形核白血球比増加作用
*$p<0.05$, **$p<0.01$

EFH-201水溶性抽出物の抗腫瘍活性：ICR系雄マウス（5週齢）の右側下腹部皮下にSarcoma-180（1.7×10^6個/マウス）を移植した．また，6週齢のBALB/c系雄マウスの右側ならびに左側下腹部皮下にMeth-A fibrosarcoma細胞をそれぞれ1×10^6個ならびに2×10^5個移植した（Double-grafted tumor system法）[8]．両種腫瘍細胞移植後3，4および5日目に生理食塩水に溶解したEFH-201水溶性抽出物（もしくはザイモザン）1 mg/0.1 mlを右側下腹部腫瘍内に3回投与した．対照群には生理食塩水を同様に投与した．肥大，成形した腫瘍の大きさは長径と短径の積（面積mm^2）で示し，移植後3日目から隔日に25日目まで測定した．そして，25または26日に腫瘍を摘出しその重量を計測した．なお，1群につき8-10匹のマウスを使用した．

統計学的処理：各動物実験群で得られたデータは平均±標準誤差で示し，対照群と被験物質投与群との間の統計学的検定はStudent *t*-テスト法で処理し，$p<0.05$（危険率：5％以下）を有意差があるとみなした．

結果

1．EFH-201水溶性抽出物によるSwiss-Webstarマウス血液中のL/Pの増加推移

新生仔Swiss-Webstar系マウス腹腔内投与群（EFH-201水溶性抽出物）では，投与後6，10，14日目と時間の経過とともに，血液中の多形核白血球に比較してリンパ球の増加が著しかった．従ってリンパ球対多形核白血球（L/P）比も対照

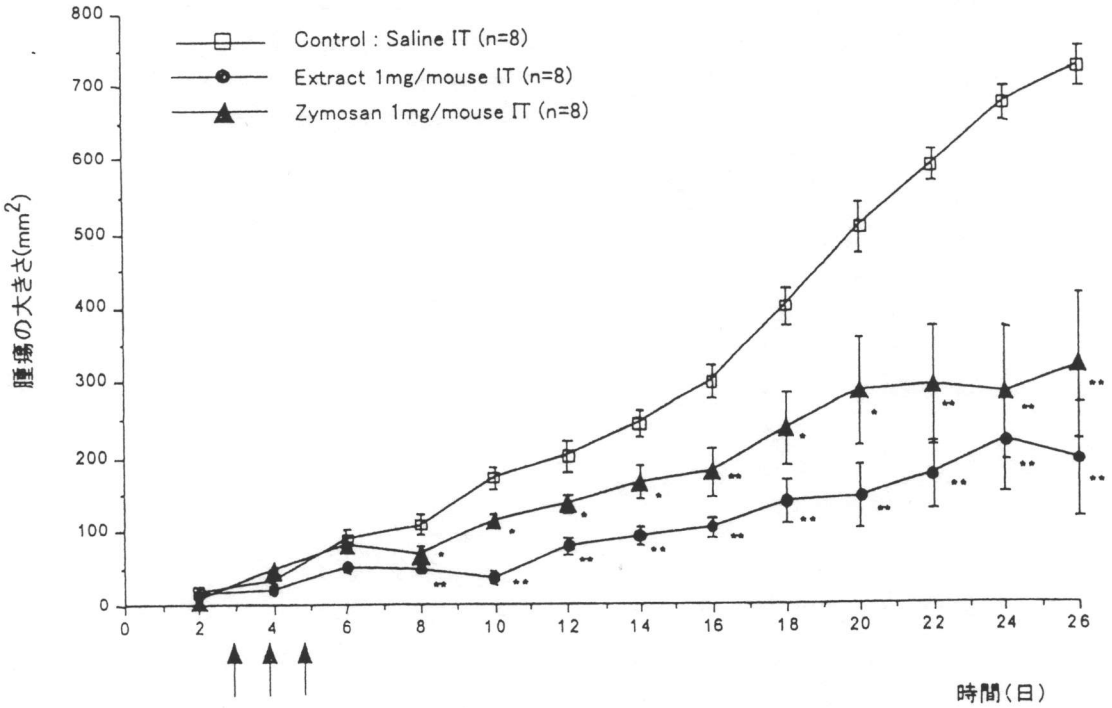

図2　ICR系マウスに移植したSarcoma-180固形癌に対するEFH-201水溶性抽出物の抗腫瘍作用
*$p<0.05$，**$p<0.01$

群では緩やかな増加を示したのに対して，水溶性抽出物投与群では急激な増加を示して，対照群と比較していずれの時点でもL/Pは有意（$p<0.05$）に高く，特に14日目における実験群の有意差は顕著であった（$p<0.01$）．

2．EFH-201水溶性抽出物の抗腫瘍活性

ICR系マウス腹部皮下に移植したSarcoma-180細胞の増殖抑制に及ぼすEFH-201水溶性抽出物の効果を調べたところ，図2に示したように，対照群に比べてEFH-201抽出物群では腫瘍の大きさ（mm^2）は投与2回目（腫瘍移植後4日目）から測定期間を通して明らかに縮小しており，腫瘍の著しい増殖抑制効果が見られた．他方，ザイモザンも腫瘍移植後8日目頃から顕著に腫瘍増殖を抑制

したものの，その程度はEFH-201抽出物投与群に比べて，低い値であった．

26日目の腫瘍サイズ測定後，腫瘍を摘出し，その重量の測定値を表1に示した．対照群に比べてEFH-201抽出物投与群の腫瘍重量は明らかに小さく，腫瘍増殖阻止率は70.6%であった．また，ザイモザン群の腫瘍重量も小さく，その増殖阻止率は52.2%であった．

次に，BALB/c系マウスの腹部右側と左側の皮下に移植したMeth-A fibrosarcoma細胞の増殖阻止（Double-grafted tumor system法）に及ぼすEFH-201水溶性抽出物の効果を調べたのが図3である．腹部右側の腫瘍（A）は移植後13日目頃から対照群に比較して抽出物投与群で抑制傾向がみられ，15日目から腫瘍のサイズは明らかに小さかった．一方，左側腫瘍（B）の大きさには抽出物投与群と対照群との間に統計学的な有意差は見られなかったが，抽出物投与群の腫瘍の増殖は抑制される傾向にあった．

表1 ICR系マウスにおけるSarcoma-180固形癌に対するEFH-201水抽出物の抗腫瘍作用

Sample (n=8)	Dose (mg/head)	Tumor weight (mean(g)±SE)	Inhibitory ratio (%)
Control	Saline (×3 days)	7.48±0.53	——
EFH-201 extract	1 (×3 days)	2.20±0.85**	70.6
Zymosan	1 (×3 days)	3.58±1.16**	52.2

ガン細胞移植後26日目に固形癌を摘出し，その重量を測定
**P<0.01

25日目に腹部右側腫瘍を摘出した．腫瘍重量は対照群で1.46±0.52gであり，EFH-201抽出物投与群では0.64±0.21gと明らかに小さかった．また，EFH-201抽出物によるMeth-A腫瘍の阻止率は56.4%と計算され，10匹中1匹のマウスにおいて腫瘍は完全に退縮した．対照群においては腫瘍が完全に退縮したBALB/c系マウスは見られなかった．他方，左側腫瘍に関しては，腫瘍のサイズが抽出物群と対照群の間で有意差がみられなかったので腫瘍を摘出しなかった．

考察

乳酸菌の菌体（または菌体成分）には免疫増強効果があり，*E. faecalis*の加熱死菌体も免疫増強作用を有していることはすでに報告されている．そこで，次の段階として*E. faecalis* EF-2001株の加熱死菌体（EFH-201）より抽出した水溶性画分における免疫増強作用を調べた．

EFH-201の水溶性抽出物の新生仔Swiss-Webstar系マウスへの腹腔内投与は

経時的に血液中のL/Pを増加させた．このことは，好中球を中心とした多形核白血球よりもリンパ球の増加が顕著であったことによる現象であり，リンパ球の分裂，増殖機構を刺激する作用を有する成分が抽出物には存在すると考えられる．

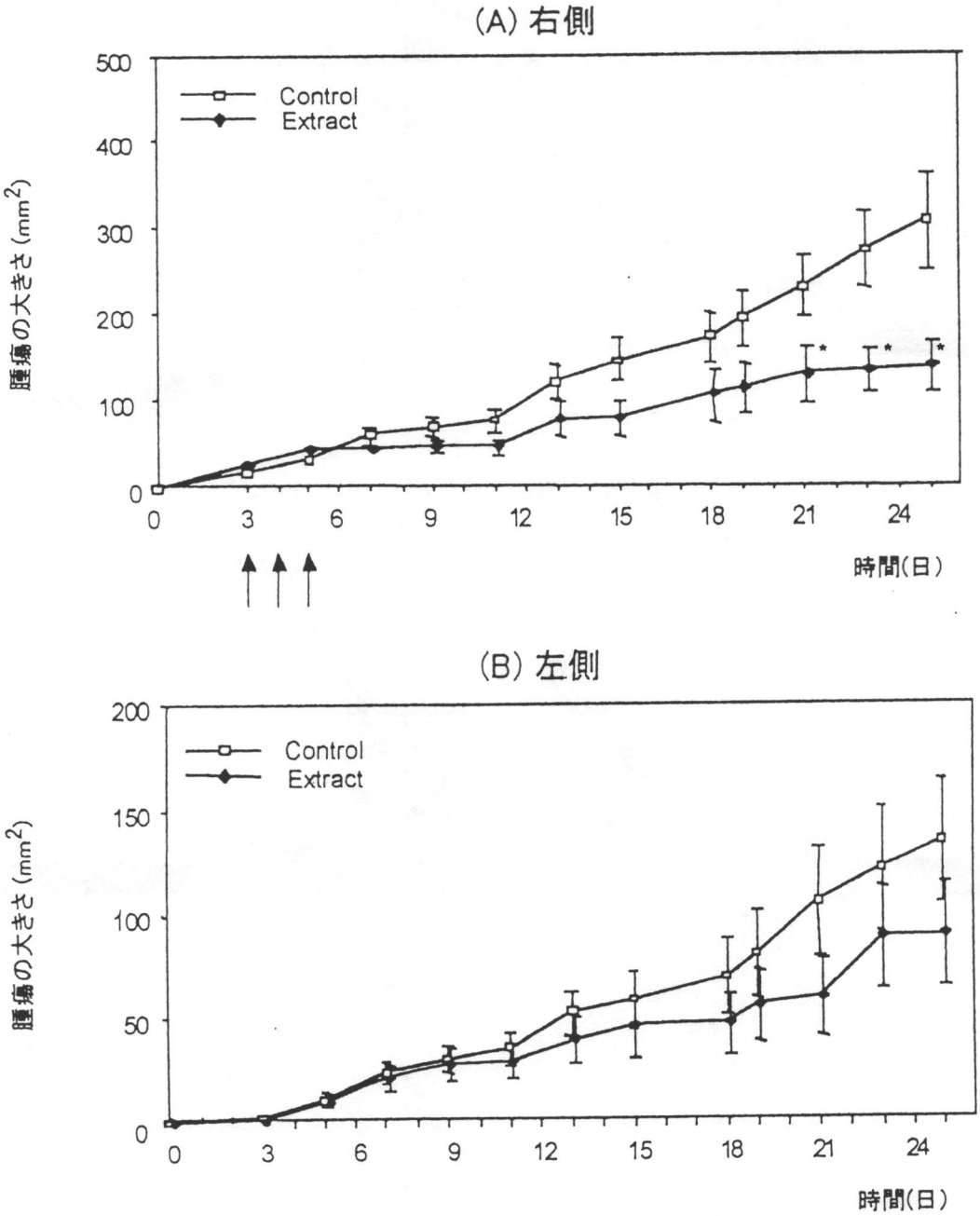

図 3　EFH-201 水溶性抽出物の BALB/c 系マウスにおける Meth-A fibrosarcoma に対する抗腫瘍作用
*$p<0.05$

好中球は異物の注射後早期に遊走するがその寿命は短い．次にマクロファージが出現してきてリンパ球の分裂を促進し各種インターロイキンを産生する．さらに，マクロファージはTNF-αやインターフェロンγなどの抗腫瘍因子を産生すると

ともに，活性化マクロファージ自身も腫瘍細胞を攻撃する．増殖したリンパ球の中にはナチュラルキラー細胞も含まれていると思われる．*Lactobacillus Bifidobacterium* の菌体成分，*E. faecalis* 加熱死菌体の抗腫瘍作用には活性化マクロファージが重要な役割を演じていると云われている[1]．

EFH-201 水溶性抽出物は腫瘍内投与により Sarcoma-180 の増殖をザイモザン以上に抑制したので，その抽出物の Meth-A 腫瘍に対する増殖抑制作用を調べるのに Double-grafted tumor 法を使用したところ，Meth-A 腫瘍に対する抽出物の直接的増殖抑制効果はみられたが，腫瘍の転移に対する抑制効果はほとんど観察されなかった．Meth-A 腫瘍増殖阻止に関与するマクロファージやリンパ系細胞群の関与の研究は，今後の興味ある課題である．

結語

Enterococcus faecalis EF-2001 菌株の加熱死菌体（EFH-201）の水溶性抽出物による生理活性を調べた．EFH-201 の水溶性抽出物（200 μg/マウス）を新生仔 Swiss-Webstar 系マウスに投与し，リンパ球/多形核白血球（L/P）比が経時的に増加した．また，ICR 系マウス腹部皮下に移植した腫瘍細胞 Sarcoma-180 に対する EFH-201 抽出物は増殖抑制効果を示した．腹部皮下に接種した Meth-A fibrosarcoma 細胞腫瘍内に投与した EFH-201 抽出物は同腫瘍細胞の増殖を明らかに抑制したが，腫瘍の転移阻止効果は認められなかった．しかし，これらの事実は EFH-201 の水溶性抽出物が腫瘍免疫系の賦活化を介する抗腫瘍性物質を含んでいることを示唆している．

1）大橋一智 他：*Enterococcus faecalis* FK-23 株加熱死菌体のマウス同系腫瘍に対する抗腫瘍効果．薬学誌 113：396-399 1992 —2）嶋田貴志 他：高血圧自然発症ラットにおける *Enterococcus faecalis* FK-23 株の加熱死菌体投与による血圧上昇抑制作用．栄食誌 45：519-522 1992 —3）宮下ゆかり，堤 敏夫，下橋博隆：*Streptococcus faecalis* 加熱死菌体の腸内細菌叢におよぼす影響（講演抄録）．日細菌誌 40：636 1985 —4）柳澤昊永，下橋博隆，山川敏郎：乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* EF-2001 加熱死菌体による外来大腸菌の排除促進作用．本誌 140：53-57 2000 —5）前田雅民 他：乳酸球菌（*Lactococcus lactis* 332）の biological response modifier 活性．薬学誌 118：150-157 1998 —6）Hand, T., Caster, P., Luckey, T. D.: Isolation of a thymus hormone, LSH. *Biochem Biophys Res Commun* 26：361 1967 —7）Suzuki, I., et al.: Lymphocyte-increasing action and hypocalcemic action of parotid gland extract. I. *Biochem* 78：697-703 1975 —8）Ebina, T., et al.: Anti-metastatic effect of biological response modifiers in the "double grafted tumor system". *Jap J Cancer Res* (*Gann*) 77：1034-1042 1986

（受付：2001 年 7 月 16 日）

[通信先 鈴木郁功：鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療栄養学科，
鈴鹿市岸岡町 1001-1（〒510-0293）]