

日本薬学会 第119年会

乳酸菌製剤 (BeRMKAIN) 抽出免疫活性画分の部分精製とその性状

鈴鹿医療大・保衛・医栄 ○梅川美佳子、林征雄、渡辺隆司、鈴木郁功；名市大薬 山本肇；日本ベルム (株) 柳沢昊永、岩佐敏廣；バイオクィーン (株) 下橋博隆

【目的】乳酸菌の免疫系に及ぼす効果については多岐に亘り研究されてきており、中でも抗腫瘍作用、免疫賦活作用、インターフェロン増強作用、血圧降下作用、白血病ウイルス増殖抑制作用等がすでに報告されている。乳酸菌製剤 (BeRMKAIN) から得られた水溶性画分の抗腫瘍効果と鎮痛作用については先の日本薬学会第118年会総会 (1998) で報告した。今回、この水溶性画分をゲル濾過、液体クロマトグラフィーで部分精製し、リンパ球/多形核白血球比増加作用 (L/P 活性) を調べたので報告する。

【方法】BeRMKAIN の水溶性画分を Sephadex G-50 でゲル濾過し、糖の定量はフェノール硫酸法、蛋白の定量は Lowry 法で行った。L/P 活性は Hand らの方法に準じ、免疫が未熟な Swiss-Webstar 系マウスの同腹仔 (生後 6~12 時間) を 2 群に分け、一方に検体の生理食塩水溶液を、他方には対照として生理食塩水を腹腔内に注射した。注射前、注射後 6, 10, 14 日に尾静脈から採血して薄層血液塗末標本を作成し、ギムザ染色法で染色した。リンパ球と多形核白血球を総計 100 個数えて L/P 比とした。効力の判定は t-検定により 5%以下の危険率で有意になった場合を有効とした。

【結果・考察】乳酸菌製剤 (BeRMKAIN) の水抽出物を Sephadex G-50 でゲル濾過し、ゲル濾過画分 G-1 および G-2 を得た。BeRMKAIN の水溶性画分は 200 μ g/mouse 投与後 6, 10, 14 日目に有意であった。ゲル濾過画分 G-1 は 50 μ g/mouse 投与後、6, 10 日目に有意であった。L/P 活性のみで即免疫能促進作用があるとは断定しにくく本作用については、今後、抗体産生細胞誘導、増加作用 (PFC 活性) 等の検討を進める予定である。



**The partial refinement that it is medicine (BeRMKAIN)
extract immuoactivity made by the lactic ferments and the
nature water solubility**

○ Mikako Umemiya, Ikuo Hayashi, Takashi Watanabe, Ikukatsu Suzuki, Hajimu Yamamoto, Takaharu YANAGISAWA, Toshihiro Iwasa

Department of Nutrition Medicine, Suzuka University of Medical Science, 1001-1 Kishiokacho, Suzuka City, Mie 510-0293, Japan

As for effect to exert on the immunity of the lactic ferments, It has been studied in multiple. Anti-tumor effect, re-immunity effect, interferon reinforcement effect, blood pressure descent effect, leukemia virus multiplication repression effect, and so on have already been reported even of that.

As for the effect on an anti-tumor that it the water solubility which it could get from the medicine (BeRMKAIN) manufactured by the lactic ferments, and pain effect, it was reported in a Japanese pharmacy meeting the 118th-year meeting general meeting (1998) of the point. This time, report it because the advantage that it this water solubility was refined with gel filtration, liquid chromatography in the part and lymph node ball/multiple shape nuclear leukocyte ratio increases effect (L/P activity) was examined. It was filtered the advantage that it the water solubility of BeRMKAIN with SephadexG-50, and the fixed quantity of phenol sulfuric acid law, the albumen went to the fixed quantity of the sugar with the law. As for L/P activity, immunity divided stomach Swiss-Webstar mouse which it is the same as into 2 groups according to Hands' method. A physiology solution of salt was injected into one side, as a contrast in the other side in stomach to the physiology solution of salt solution of sample. After it was injected before the injection, it drew blood from the tail vein in 6, 10, 14 days, and a pale layer blood specimen was made, and giemas solution was dyed in the way of dyeing. A lymph node ball and multiple shape nuclear leukocytes were counted 100 totals, and it was made a L/P ratio. The decision of the effect made the case that it became some thought at 5% and under of the danger rates by the t-test official approval



effective. And it got G-2 so long as gel filtered the water extract of the medicine (BeRMKAIN) manufactured by the lactic ferments with SephadexG-50 and gel filtration distribution. So long as the water solubility of BeRMKAIN, it was some thought after the $200 \mu\text{g}/\text{mouse}$ medication in 6, 10, the 14th day. So long as gel filtration, it was some thought after the $50 \mu\text{g}/\text{mouse}$ medication in 6, the 10th day.

As for this effect, it will be only L/P activity, and it won't be concluded easily that there is immunity Noh play promotion effect as soon as possible, and antibody will advance an examination such as live cell guidance, increase effect (PFC activity) from now on.

【目的】

乳酸菌は食品の発酵素材として広く利用されてきたが、ある種の乳酸菌はヒトの腸管内に生息し、整腸作用、非常在性の病原性細菌増殖の抑制、全身性免疫の賦活作用等、生体に有用な効果を及ぼし、腸内細菌としての乳酸菌の存在は重要である。

乳酸菌 *Enterococcus faecalis* 2001株 (EF-2001) を含む乳酸菌製剤 Bio AMB を用いて菌体成分を含む水溶性画分の凍結乾燥物 (BRM) のリンパ球対多形核白血球比増加作用 (L/P 活性)、抗腫瘍作用及び鎮痛作用について日本薬学会第118年会 (1998) で報告した。今回、BRM をゲル濾過し、得られた各画分の構成糖を調べるとともに L/P 活性について調べた。

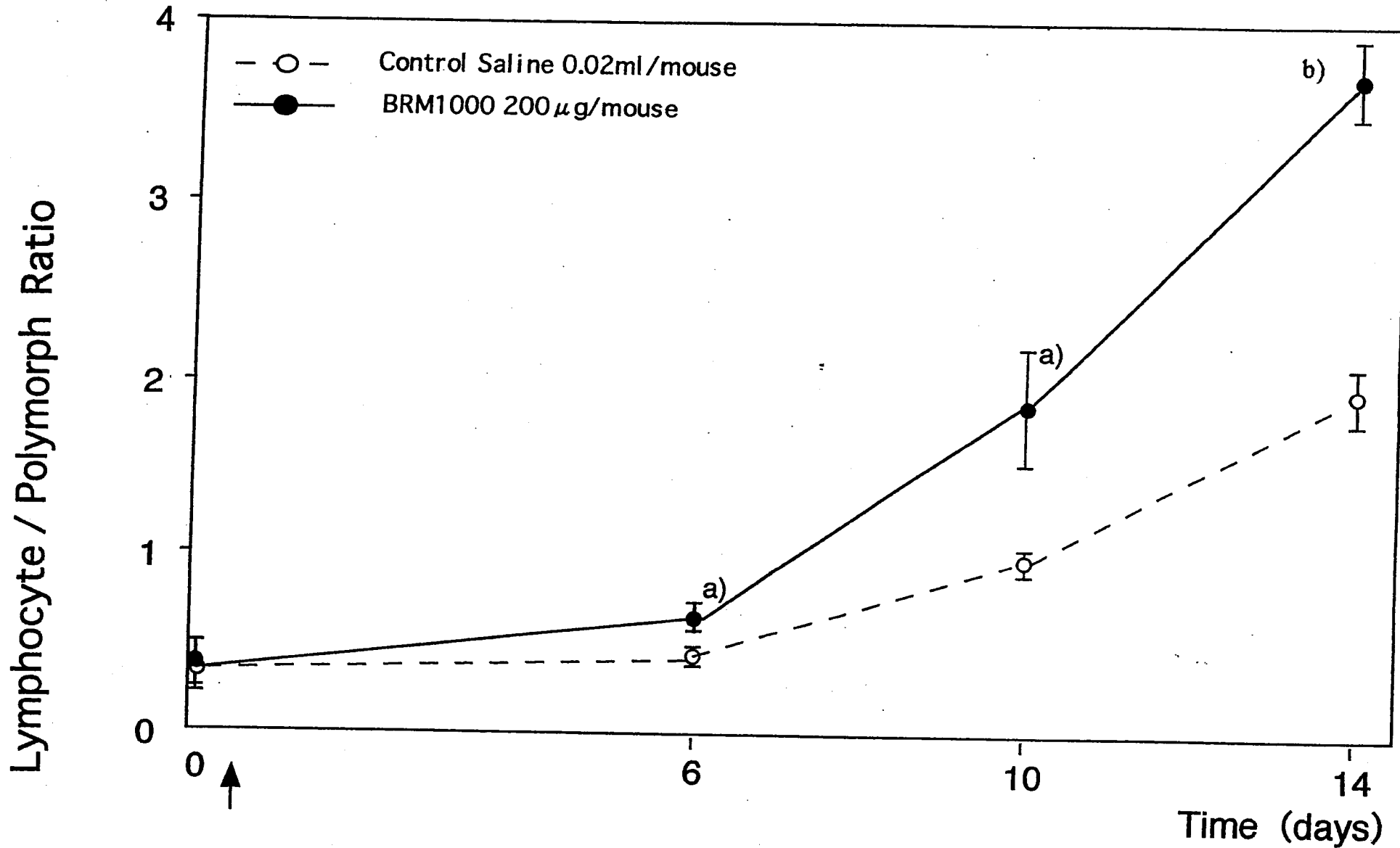
【方法】

1. 構成糖の分析

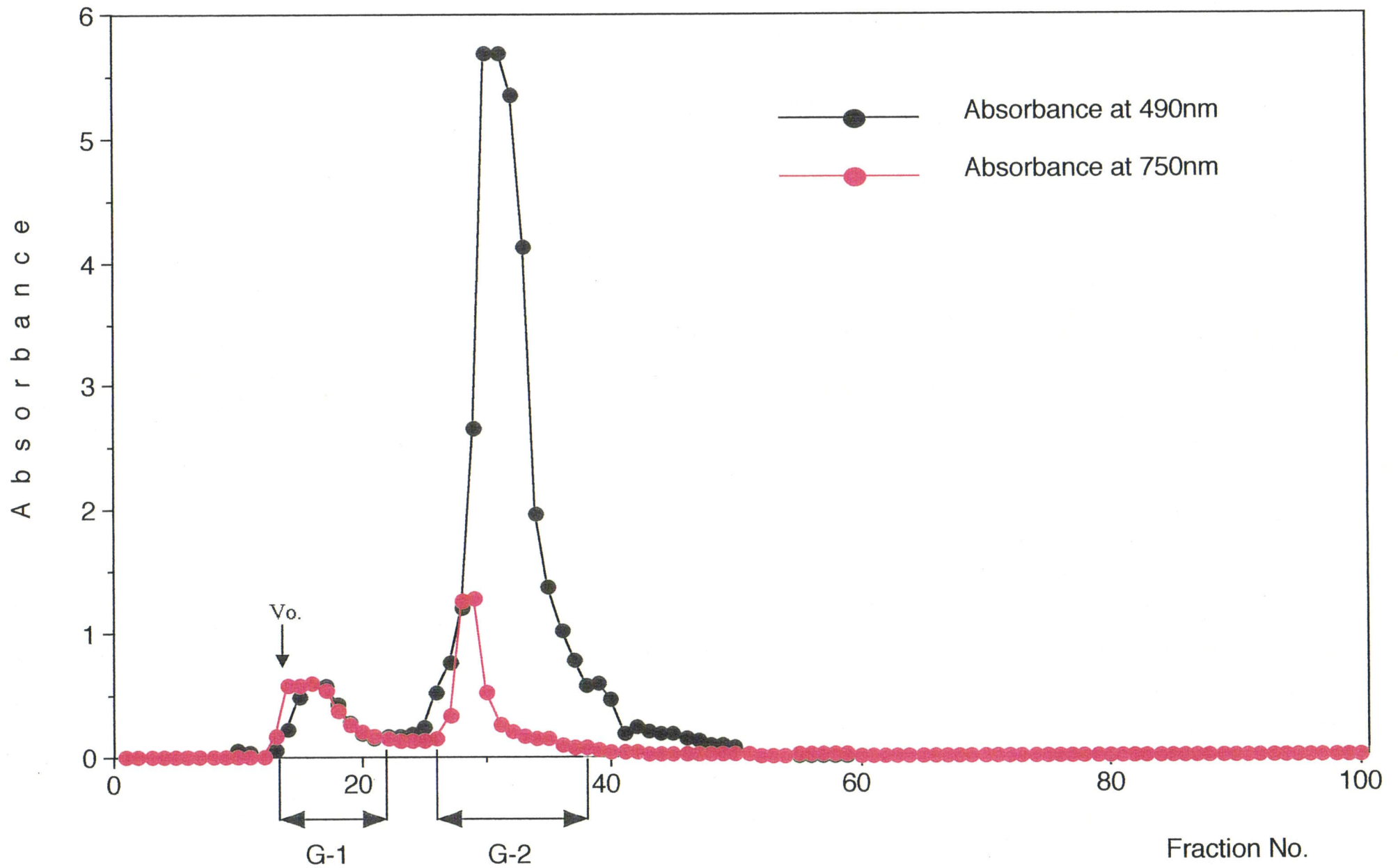
ゲル濾過画分G-1, G-2各々 5 mg を2Mの塩酸1mlで溶解し、窒素気流中で封管後、100℃で12時間加熱分解した。その後エバポレーターで蒸発乾固させ、得た加水分解物をTLC及びHPLCで分析した。

2. リンパ球対多形核白血球比増加作用 (L/P 活性)

Handらの方法に準拠した。Swiss Webster系マウスの生後6~12時間以内の免疫が未熟な同腹の新生仔を二群に分け、一方に検体の生理食塩水溶液を腹腔内注射し、他方には対照として生理食塩水を注射した。注射前、注射後6日、10日、14日に尾静脈より採血し、薄層血液塗抹標本を作成して、ギムザ染色法により、多形核白血球数とリンパ球を総計100個数えてL/P比とした。効力の判定はt-検定法により5%以下の危険率で有意になった場合を有効とした。



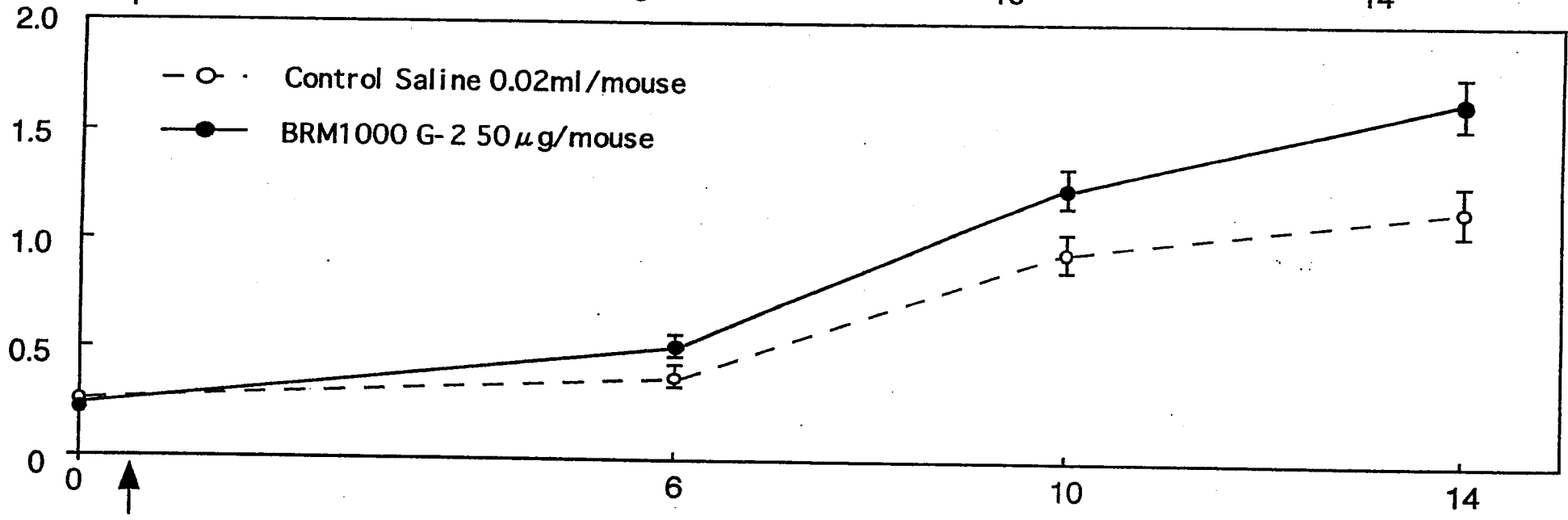
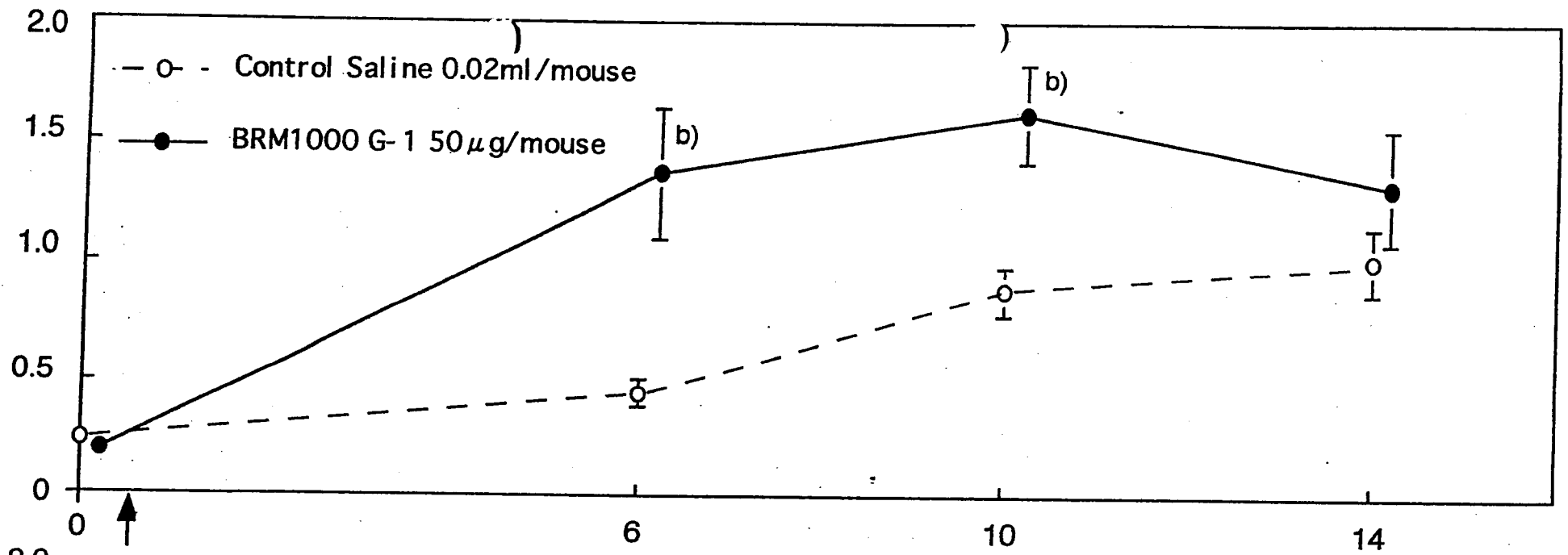
Time Course of Increase of Lymphocyte / Polymorph Activity
 a) $Pr < 0.05$ vs Control group b) $Pr < 0.01$ vs Control group



Chromatogram on Sephadex G-50

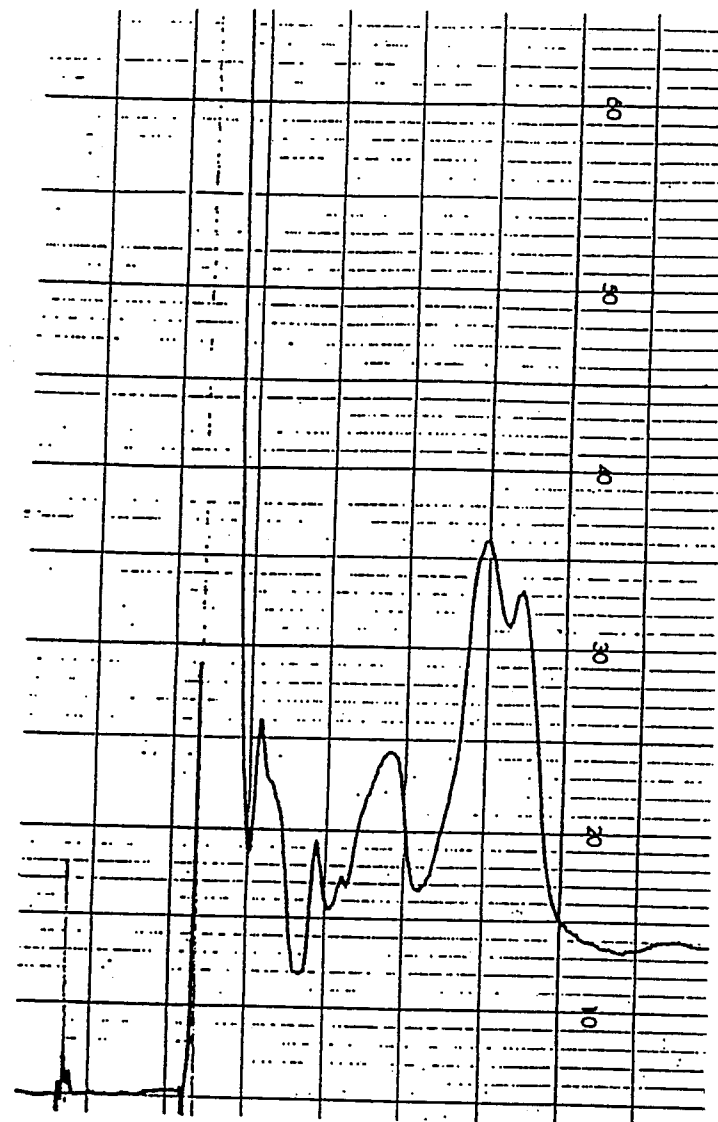
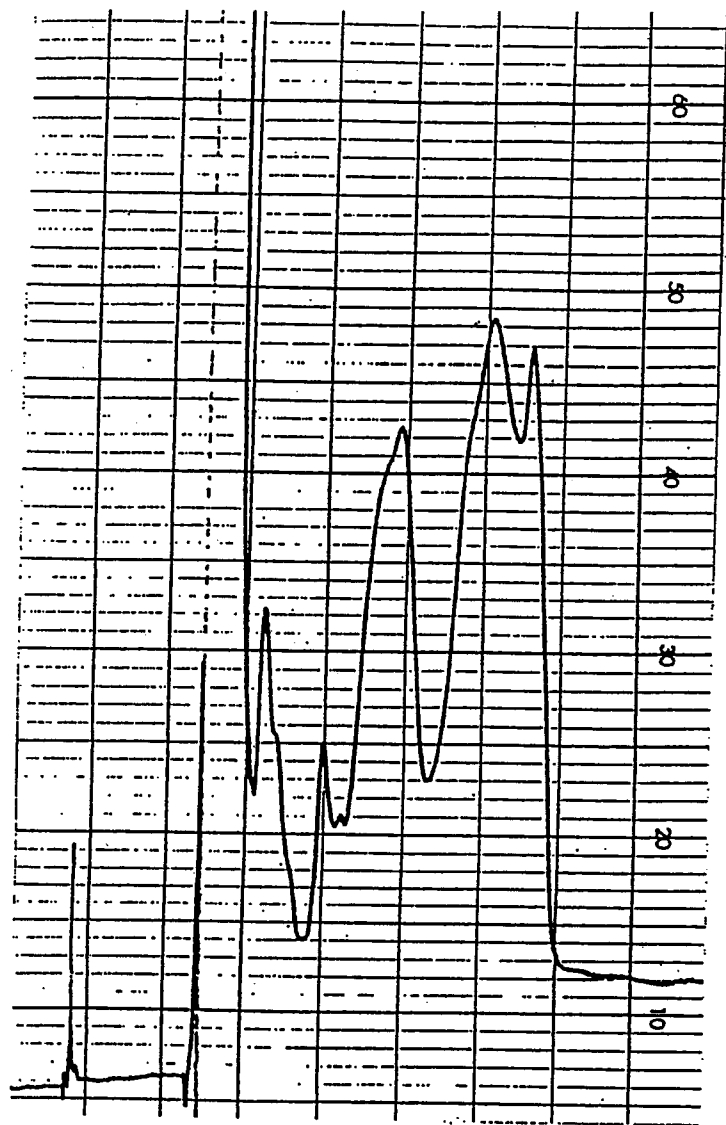
Column: 3.2cm × 72.5cm Buffer: 1/15M Phosphate Buffer (pH 6.98) Fraction: 10 ml / tube

Lymphocyte / Polymorph Ratio



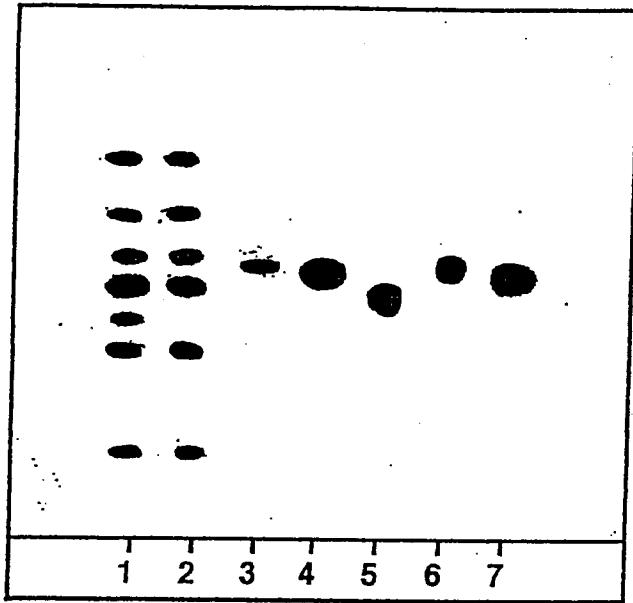
Time Course of Increase of Lymphocyte / Polymorph Activity

b) Pr < 0.01 vs Control group

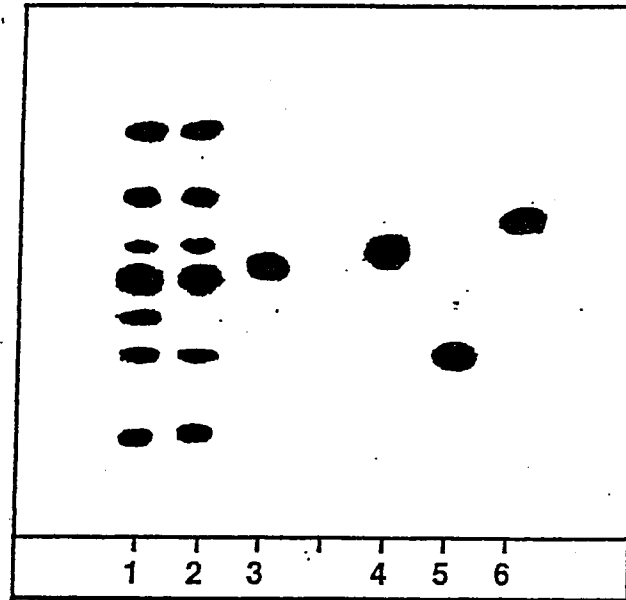


HPLC Chart of the Hydrolyzate Derived from G-1 and G-2

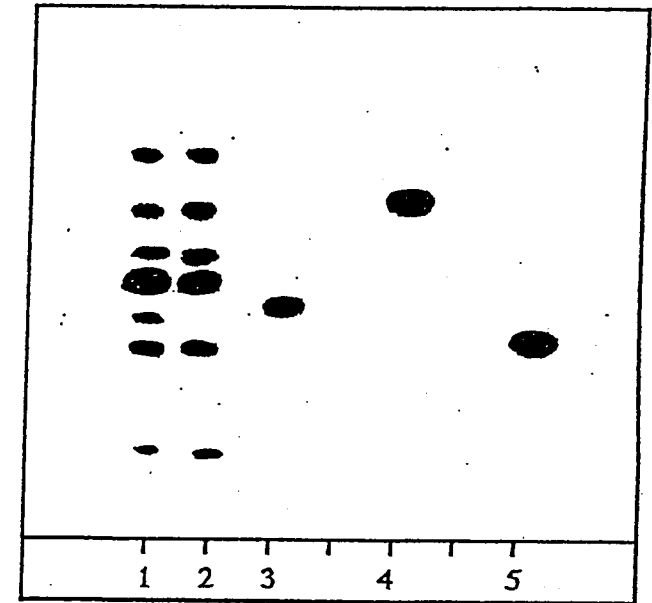
Column: TSKgel Amide 80(250×4.6mm I.D) Mobile phase: Acetone / Water = 8 / 2
 Flow rate: 1ml / min Chart speed : 6mm / min Column temp: 80°C Detection: RI



1. G-1
2. G-2
3. Sorbose
4. Glucose
5. Galactose
6. Arabinose
7. Sccharose



1. G-1
2. G-2
3. Fructose
4. Mannose
5. Raffinose
6. Xylose



1. G-1
2. G-2
3. Maltose
4. Rhamnose
5. Lactose

【結論】

BRMをSephadex G-50 で分離精製すると2つの画分G-1及びG-2が得られた。この画分G-1及びG-2の構成糖はほぼ同じであり、少なくともガラクトース、アラビノース、ラムノース、グルコサミンが含まれていることが分かった。

ゲル濾過画分G-1のL/P活性は $50 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の用量で腹腔内注射した場合、6日目、10日目に有意 ($P < 0.01$) であった。一方、ゲル濾過画分G-2の場合は同用量で活性がなかった。

画分G-1の構成糖には画分G-2に含まれていない糖が一つあり、それがL/P活性に関係しているものと思われる。

今後、さらに画分G-1を分離精製するとともに構成糖を特定し、抗体産生細胞増加作用 (PFC活性) を調べる予定である。