

# コレステロール吸着性乳酸菌に関する研究

信州大学農学部 教授 細野明義  
外岡俊樹

## 序 文

食品のもつ機能性の追求は食品の「質」の評価の上で大きな意義を有している。今日、我が国を含めて多くの先進国において病因の上を占める心臓疾患は生体内での過剰なコレステロールの蓄積による場合が多い<sup>1,2)</sup>。また、コレステロールの摂取によって腸管内で発ガン物質が生成し、長期にわたるコレステロールの摂取は直腸ガン等のガン発症の原因にもなっている<sup>3)</sup>。

一方、乳酸菌が人体に対して多くの優れた働きをしていることは既に明かなところであり、特に乳酸菌のもつ整腸作用、抗ガン作用、免疫増強作用について世界的に研究がなされている。筆者らは乳酸菌の抗変異原性についてこれまでに種々検討してきたが、その過程で発酵乳から分離した一部の乳酸菌の菌体（生菌と死菌の両者）がアミノ酸加熱分解物である 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P1) や 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P2) などを強く結合 (>97.37%) させる性質をもっていることを明かにしてきた<sup>4-6)</sup>。この事実から、乳酸菌の菌体がコレステロールをも結合させる性質を同時的に有しているのではないかとの推測が可能となった。コレステロールは、細胞膜の構成成分として、またステロイドホルモンの前駆物質として生体にとって必須の要素である。しかし、それと同時に、コレステロールの過剰摂取が動脈硬化に関与することはつとに知られている。この動脈硬化は正しくは、粥状（アテローム性）動脈硬化と言われるものであり、動脈の内膜へのコレステロールの沈着、内膜の繊維性肥厚および動脈を包む平滑筋細胞の内膜への侵入、増殖を主病変とするものである。動脈硬化を原因とする疾患のうち、代表的なものは虚血性心疾患および脳血管障害である。これまで、虚血性心疾患の発症率と血中コレステロール値との間には、正の相関が認められている。この相関の危険因子とされるコレステロールは、低比重リポ蛋白質 (LDL) に含有されてるものであり、逆に高比重リポ蛋白質 (HDL) は動脈硬化症の発症に抑制的に作用すると考えられている。そこで、血管壁への沈着から、動脈硬化の一因となる LDL は“悪玉コレステロール”と呼ばれ、逆に組織への蓄積を除去する HDL は“善玉コレステロール”と呼ばれている。また、人の結腸癌による死亡率と食餌性高脂肪、低繊維、高コレステロール摂取との間には、高い相関関係が認められている。特に、コレステロール摂取が結腸癌の病因となっていることが示唆されている。コレステロールは食品の加工・調理に対して比較的安定な化合物である。しかしながら、処理条件次第ではコレステロールから様々な酸化生成物、例えば 5,6 $\alpha$ -エポキシ-5 $\alpha$ -コレスタン-3 $\beta$ -オールや 5,6 $\beta$ -エポキシ-5 $\beta$ -コレスタン-3 $\beta$ -オールなどが誘導される。コレステロール自体よりも、これら分解産物が強い発癌関連物質となっていることは言うまでもない。

そこで、本実験では世界各地の発酵乳から分離した乳酸菌の中から *in vitro* でのコレステロールと

の結合性がより高い菌株を選定することを目的として行った。本研究の意義は乳酸菌を多量に摂取した場合、菌体がたとえ死菌状態であっても消化管内でコレステロールを菌体に結合させ、菌体が自ら担体としての役割を果たしつつ、体外にコレステロールを排出させる可能性を *in vitro* での実験から推測することにある。

## 実験材料および方法

### 1. 供試菌株

本実験で用いた乳酸菌は下記の23株である。すべて筆者らの所属する研究室での保存菌株であり、世界の各地でつくられている発酵乳から分離したものである。各菌株を MRS 培地（ペプトン1.0%、肉エキス1.0%、酵母エキス0.5%、D-グルコース2.0%、ツイーン80 0.1%、リン酸-水素カリウム0.2%、酢酸ナトリウム0.5%、クエン酸アンモニウム0.2%、硫酸マグネシウム0.02%、硫酸マンガン0.005%）<sup>6)</sup>を用い、それぞれの増殖至適培養温度で36時間培養した。培養後、3000gで集菌し、1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.98) で洗浄した後、凍結乾燥を行い実験に供した。

*Enterococcus faecalis* subsp. *liquefacience* R-56, *Ec. faecalis* IFO 1290, *Ec. faecalis* ATCC 10100, *Streptococcus thermophilus* 3535, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* S-52, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* S-115, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* R-14, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* R-41, *Lc. lactis* subsp. *lactis* 12007, *Lc. lactis* subsp. *lactis* 12546, *Lc. lactis* subsp. *diacetyllactis* R-22, *Lc. lactis* subsp. *diacetyllactis* R-43, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* IFO 3426, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* S-54, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* S-112, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* K-27, *Lactobacillus plantarum* 04, *Lc. plantarum* 27, *Lc. plantarum* 39, *Lc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO 3533, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* S-4, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* S-98, *Lb. casei* subsp. *casei* S-3。

### 2. コレステロールの定量法

Rudel と Moris の方法<sup>8)</sup>によりコレステロールを定量した。すなわち、試料100 $\mu$ l をネジ式フタ付き試験管に入れ、99.5%エタノール 3 ml と 33%水酸化カリウム300 $\mu$ l を加え、攪拌した。攪拌後、60 $^{\circ}$ Cで15分間静置した。室温で冷却した後、蒸留水 3 ml とヘキサン 5 ml を加え正確に1分間攪拌した。

次いで、ヘキサン層から 1 ml 採り、エアーコンプレッサーを用いて揮発させた。析出物に0.05% -フタルアルデヒド-酢酸溶液を 2 ml 加え攪拌した。さらに、濃硫酸を 1 ml 加え、攪拌し、550nm の吸光度で測定した。コレステロールの量は予め作成しておいた検量線により算出した。

### 3. コレステロール結合試験

各凍結乾燥菌体10mg を 1 ml のコレステロール溶液 (100mg のコレステロールを60%エタノール 1 ml に溶解) に懸濁させ、37 $^{\circ}$ Cで1時間放置後、4000gで10分間、遠心分離を行った。得られた上澄液中のコレステロールを上記の Rudel と Moris の方法<sup>8)</sup>により定量し、下記の式によりコレステロールの菌体に対する結合率 (%) を算出した。

$$\text{結合率 (\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{菌体に結合したコレステロール量 (mg)}}{\text{上澄液中のコレステロール量 (mg)}} \times 100 \right\}$$

## 結 果

各種乳酸菌23株菌体によるコレステロール結合率を Tab.-1 に示した。Tab.-1 より供試菌体の総てがコレステロールと結合する性質を有していることが認められたが、とりわけ、*Lc. lactis* subsp. *lactis* 12007, *Lc. lactis* subsp. *lactis* 12465, *Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetyllactis* R-22, *Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetyllactis* R-43, *Ec. faecalis* subsp. *liquefaciens* R-56および<sup>8</sup>*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* K-27が高い結合率を示した。中でも *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* R-22、*Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* R-43、*Lc. lactis* subsp. *lactis* 12465、*Ec. faecalis* subsp. *liquefaciens* R-56がそれぞれ29.73±0.8、33.91±2.45、30.32±2.38、30.95±2.83%ともっとも高い結合率を示した。また、乳酸球菌のほうが桿菌に比べ、高い結合性を示した。

Table 1: In vitro binding of cholesterol to lactic acid bacteria. <sup>1</sup>	
Strain	Binding (%) of cholesterol <sup>2</sup>
<i>Ec. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> R-56	30.95
<i>Ec. faecalis</i> IFO12970	18.90
<i>Ec. faecalis</i> ATCC10100	27.79
<i>St. thermophilus</i> 3535	16.76
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> S-52	20.92
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> S-115	14.17
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> R-14	18.72
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> R-41	14.86
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 12007	25.14
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 12546	30.32
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetyllactis</i> R-22	29.73
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetyllactis</i> R-43	33.91
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> IFO3426	10.68
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> S-54	11.36
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> S-112	14.91
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> K-27	27.38
<i>Lb. plantarum</i> 04	15.58
<i>Lb. plantarum</i> 27	14.05
<i>Lb. plantarum</i> 39	18.54
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> IFO3533	12.48
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> S-4	18.35
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> S-98	11.42
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> S-3	14.65

1 Cholesterol dissolved in 60% ethanol was used to bind with 10 mg cells in binding experiment.

2 All assays were carried out in duplicate. Values are means.

$$\text{Binding (\% of cholesterol)} = 100 - \frac{\text{cholesterol } (\mu\text{g}) \text{ in the supernatant containing the cells}}{\text{cholesterol } (\mu\text{g}) \text{ in the supernatant}} \times 100$$

供試23株の乳酸菌のうち、*Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43, *Ec. faecalis* subsp. *liquefaciens* R-56および*Lb. casei* subsp. *casei* S-3の菌体によるコレステロール結合についての dose-response を菌体量 (60%エタノール 1 ml 当たりの mg で表示) を変数として調べた。結合試験に際しての条件は37°Cで1時間とした。Fig. 1よりいずれの菌株においても、菌体に対するコレステロールの結合率が菌体量に依存して直線的に増加することが認められ、かつ菌体量50mg のとき、コレステロールとの結合率が *Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43, *Ec. faecalis* subsp. *liquefaciens* R-56および *Lb. casei* subsp. *casei* S-3 でそれぞれ約70、57、40%に達した。

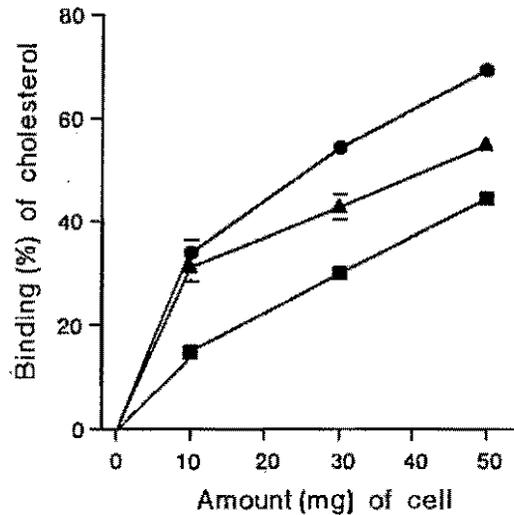


Fig. 1: Dose-response binding of cholesterol to the cells. ●, *Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43; ▲, *Ec. faecalis* subsp. *liquefaciens* R-56; ■, *Lb. casei* subsp. *casei* S-3. Cholesterol (100  $\mu$ g) was mixed with various amounts of cells in 60% ethanol (1 ml), and the reaction mixture was incubated at 37°C for 1 h. Error bars denote 95% confidence interval of the means.

供試23株の乳酸菌のうち、コレステロールとの結合性をもっとも高かった *Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43について以下に記す実験を行った。まず、R-43株菌体によるコレステロール結合に対する放置時間の影響について調べる目的から、30mgの菌体を100mgのコレステロールを37°Cで、時間を変えて結合させた。Fig. 2から明かなように、菌体とコレステロールの結合は極めて瞬間的なものであり、反応開始直後で結合率が最大値に対し、それ以降では結合率が殆ど変わらないことが明らかになった。

次に、菌体量を30mg、コレステロールを100mgとして結合時間を1時間としたときの結合率に対する温度の影響について調べた。Fig. 3から明かなように、温度10~70°Cの範囲で結合率はほぼ一定であり、結合に対し温度は殆ど影響を及ぼしていないことが判明した。

一方、菌体が生菌であるか、死菌であるかによってコレステロールの結合率がどのように違ってく

るかについて調べた。実験に際しては30mgもしくは50mgの菌体を121℃で15分のオートクレーブ処理を行い、それぞれをコレステロールのエタノール溶液(100mg/60%エタノール溶液1ml)1mlに加え、37℃で1時間放置した。対照には未加熱の菌体を用い、同様の条件で結合させた。Fig.4から明かなように、生菌、死菌30mgでは、それぞれ $54.20 \pm 0.83$ 、 $47.93 \pm 0.95$ 、50mgでは $69.16 \pm 0.37$ 、 $55.74 \pm 1.76$ であり、菌体に対するコレステロールの結合性は生菌であろうと、死菌であろうと大差がなく、わずかに生菌体の方がコレステロールとの結合力が強いことが認められた。

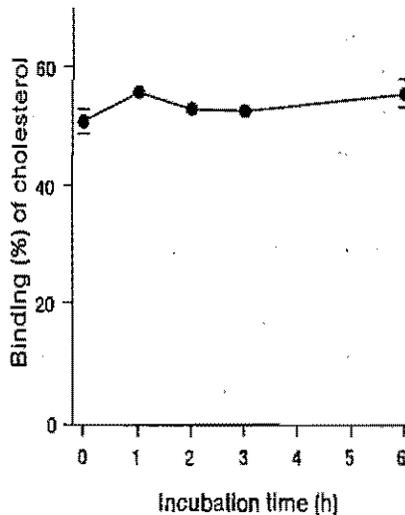


Fig. 2: Effect of incubation time on the binding of cholesterol to the cells of *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* R-43. Cholesterol (100  $\mu$ g) was mixed with 30 mg of the cells in 60% ethanol (1 ml), and the reaction mixture was incubated at 37°C. Error bars denote 95% confidence interval of the means.

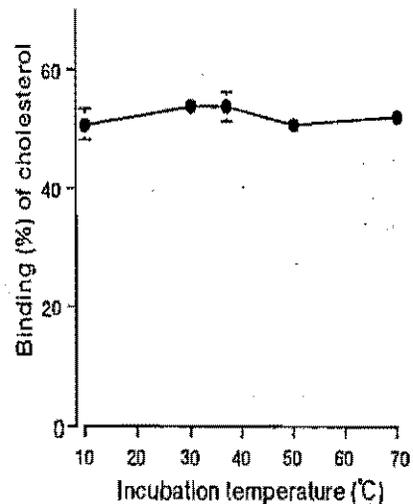


Fig. 3: Effect of incubation temperature on the binding of cholesterol to *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* R-43. Cholesterol (100  $\mu$ g) was mixed with 30 mg of the cells in 60% ethanol (1 ml), and the reaction mixture was incubated for 1 h. Error bars denote 95% confidence interval of the means.

さらに、R-43株菌体によるコレステロール結合に対する種々の陽イオンの影響について調べた。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ をそれぞれ5mM、50mMになるようにコレステロール溶液(100mg/60%エタノール1ml)に加え、それらに菌体を10mg添加し、37℃で1時間放置した。Fig.5から明らかなように、供試した総ての陽イオンが菌体に対するコレステロールの結合を阻害した。とりわけ、 $\text{Ca}^{2+}$ や $\text{Mg}^{2+}$ などの2価陽イオンが5mM程度の濃度で高い阻害性を示した。なお、実験データは示していないが、*Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43の生菌および死菌体(30mg)によるコレステロール結合に対するカルシウム濃度の影響について調べたところ、生菌、死菌のカルシウムによる結合阻害作用は同程度であった。ちなみに、カルシウム濃度50mgでの結合率はそれぞれ $41.47 \pm 3.82$ 、 $38.56 \pm 2.92$ であった。

また、*Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43によるコレステロール結合に対するpHの影響

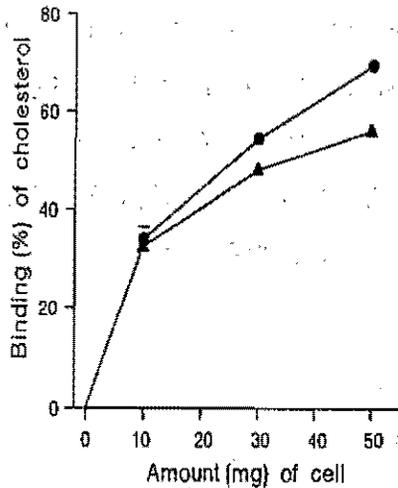


Fig. 4: Binding of cholesterol by *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* R-43 cells. ●, Viable cells ▲, Autoclaved cells. Cholesterol (100  $\mu$ g) was mixed with various amounts of the cells in 60% ethanol (1 ml), and the reaction mixture was incubated at 37°C for 1 h. Error bars denote 95% confidence interval of the means.

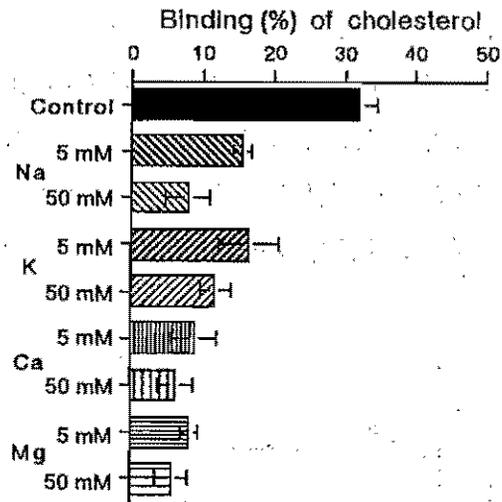


Fig. 5: Effect of metal ion on binding ability of *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* R-43. Cholesterol (100  $\mu$ g) was mixed with 10 mg of the cells in 60% ethanol (1 ml), including metal salts, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 1 h. Error bars denote 95% confidence interval of the means.

について調べたところ、pHによっても結合性に殆ど影響を受けないことが判明した（実験データは示していない）。

## 考 察

本研究では種々の発酵乳から分離した23株の乳酸菌菌体によるコレステロールの結合性について調べた。中でも、とりわけ、*Lc. lactis* subsp. *lactis* 12007, *Lc. lactis* subsp. *lactis* 12465, *Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-22, *Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43, *Ec. faecalis* subsp. *liquefaciens* R-56および *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* K-27が高い結合率を示した (Tab.1)。*Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43について行ったコレステロールとの結合速度は Fig.2に示すように、極めて速く、瞬時にコレステロールが菌体に結合することが明らかとなった。しかし、Fig.5から明らかのように、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ などの陽イオンが存在すると、菌体に対するコレステロールの結合が阻害される。この事実はコレステロールの菌体に対する結合機構が菌体の細胞壁構造と密接な関係を有していることを物語っている。筆者ら<sup>9)</sup>は先に、乳酸菌のみならず、他のグラム陽性菌をはじめ、種々のグラム陰性菌などに対する Trp-P 1、Trp-P 2 それに Glu-P 1 (2-amino-6-methyl-dipyrido [1,2-3'2'-d] imidazole) といったアミノ酸加熱分解物の結合性について調べた。その結果、グラム陽性菌とグラム陰性菌の間にはこれらアミノ酸加熱分解物に対する結合性に大きな差があり、グラム陽性菌がより強い結合性を有していた。バクテリアの細胞壁はペプチドグリカンが主要な構成成分で

あり、菌そのものの特徴を決定する上で重要な役割を果たしている。本研究で明らかになったように、乳酸菌菌体によるコレステロールの結合は乳酸菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンの化学構造と密接に関係していることは容易に想像されるが、その結合機構については今後の検討を待たなければならない。

*Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetyllactis* R-43が供試23株の乳酸菌のうち、もっとも高い結合性をコレステロールに対して示した。R-43株のコレステロールに対する結合性はpH7.0付近(実験データは示していない)で最大に達し、またFig.3にも示したように10~70℃の広い温度範囲で一様の結合能を示した。この事実から、人腸管内でのpHや体温を考慮した場合、腸管内での乳酸菌菌体によるコレステロール結合の可能性を強く示唆している。

本研究では*in vitro*での乳酸菌菌体によるコレステロールの結合性について検討し、乳酸菌菌体がコレステロールを結合させる能力をもっていることを明らかにした。この事実より*in vivo*においても乳酸菌菌体がコレステロールを結合させるか否かの実験的証明が急がれる。同時に本研究での成果は、発酵乳の食品機能を評価する上でも重要な意味をもっている。今日、牛乳・乳製品と鶏卵の国民栄養における役割は戦前および戦後直後に比較して、極めて高くなっている。我が国の牛乳・乳製品の消費量は、牛乳換算で一人一日当たり約160gで、鶏卵消費量は一人一日当たり約40gである。鶏卵は、一個当たりのコレステロール含量が約200~300mgであり、コレステロール含量が極めて高い食品に分類されている。そこで、畜産物に多く含まれている動物性脂肪の過剰摂取が、我が国でも欧米のように心臓動脈疾患を増加させるのではないかと懸念もでてきている。バター脂肪を多量に与えると、血清コレステロール値の上昇が、人や実験動物で明らかにされている。牛乳脂肪の特徴は、まず低級脂肪酸が多い点にある。コレステロールは脂質100g中、約0.4g含まれている。血清コレステロール上昇因子であるコレステロールと飽和脂肪酸が共に存在する。虚血性心疾患と食餌との関連から、動物性食品をとりすぎないほうが良いとする考えが広く行き渡ってきている。ノルウエーやスウェーデン、フィンランドの医学団体は、全カロリー当たりの脂肪の摂取を40%から25%に減少させ、飽和脂肪酸の摂取量を減らし、多価不飽和脂肪酸の摂取量を増やすべきであると勧告している。アメリカにおいても同様の勧告がなされている。我が国でも厚生省は「動物性脂肪を植物性脂肪より少なくすべきである」と勧告している。

高齢化社会および成人病増加といった状況下で、食生活と健康との関わりは、ますます重要なものに成ってきている。とりわけ、発酵乳は消化吸収に優れ、種々の生理効果が期待できるため、有望な食品の一つとして考えられている。乳酸菌や発酵乳の保健作用には、整腸作用、免疫賦活化作用、抗変異原性および血清コレステロール濃度調節作用などがある。このうち、血清コレステロール濃度調節作用は、循環器系疾患予防の上で極めて重要であり、本研究もこの観点から意義づけられる。

## 結 語

本研究では発酵乳から分離した23株の乳酸菌菌体によるコレステロールとの結合性について検討した。その結果、供試菌体の総てがコレステロールと結合する性質を有していることを認めた。とりわけ、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* R-22、*Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* R-43、*Lc. lactis* subsp. *lactis* 12465および<sup>8</sup>*Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* R-56が高い結合率を示した。

*Lc. lactis* subsp. *lactis* bioval. *diacetylactis* R-43について行った実験からコレステロールとの結合速度は極めて速く、瞬時にコレステロールが菌体に結合し、死菌体もまた、生菌に匹敵する結合性を示した。

一方、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ などの陽イオンが存在すると、菌体に対するコレステロールの結合が阻害されることが認められた。

## 引用文献

- 1) Lichtenstein, A. H., Goldin, B. R. : *In Lactic Acid Bacteria* (Eds. S. Salminen, A. von Writh) Marcel Dekker, Inc., New York/Basel/Hong Kong 227-235(1993)/
- 2) Reddy, B.S., Mastromarini, A. and Wynder, E. : *Cancer*, 39 1815-1819(1977).
- 3) Field, F.J., Kam, N.T.P. and Mathur, S.N. : *Gastronology*, 99 539-555(1990).
- 4) Tanabe, T., Otani, H. and Hosono, A. : *Milchwissenschaft*, 61 311-315(1994).
- 5) Tanabe, T., Suyama, K. and Hosono, A. : *J. Dairy Res.*, 61 311-315(1994).
- 6) Thyagaraja, N. and Hosono, A. : *J. Food Protection*, 56 1061-1066(1993).
- 7) Man, J.C. DE, Rogosa, M. and Sharpe, M.E. : *J. Appl. Bacteriology*, 23 130-135(1960).
- 8) Rudel, L.L. and Morris, M.D. : *J. Lipid Research*, 143 64-366(1973).
- 9) Hosono, A., Wardojo, R. and Otani, H. : *Lebensmitt.-Wiss. u.-Technologie*, 23 143-153(1990).