

2. 微生物を用いた機能性評価

1) 乳酸菌の上皮細胞や宿主受容体分子への付着性の評価

北里大学獣医学部 向井 孝夫

はじめに

我が国においては、消費者の健康志向が高まったことを背景に発酵乳製品をはじめとする多くのプロバイオティクス製品が市販されている。プロバイオティクスへの関心の高まりとともに、乳酸菌の菌株レベルでの宿主に対する有益な効果が次々に明らかにされている。すなわち便秘改善などを意味する整腸作用にとどまらず、コレステロール低下作用、感染予防作用、腸管免疫を介した宿主の生体調節作用など種々の保健効果に関する研究成果が報告されている。腸内での持続的な有用効果を期待するためには、腸内に定住、増殖できる性質を合わせ持つ乳酸菌株が望ましいとされている。また、経口的に摂取された乳酸菌株が消化管内で定住し増殖するためには、胃酸、胆汁酸耐性以外に腸上皮への付着性を持つことが重要である。

腸内において乳酸菌が付着する部位として、粘膜を覆っているムチン層、上皮系細胞、上皮下の基底膜などが示されている。このような部位への付着の評価法としては、剥離細胞、固定組織切片、培養細胞などを用いる方法や組織や細胞から抽出した成分への結合性を検討する方法が示されている。これらの中で、図 1 A に例示したように固定化組織切片を用いる方法は生体組織を反映している点で最も明確な結果が得られる、固定化方法を工夫することで粘液ムチンへの付着性を評価した例も見られる。しかし、ヒトを対象とした場合、試料の入手が困難であることは言うまでもなく、一般化した方法とすることはできない。これに変わる評価方法として、ヒト腸管由来の Caco-2, HT-29 および Int-407 細胞などの培養細胞系を用いる方法がよく利用されている。培養細胞を用いる場合、その性質をよく把握することが大切である。たとえば、

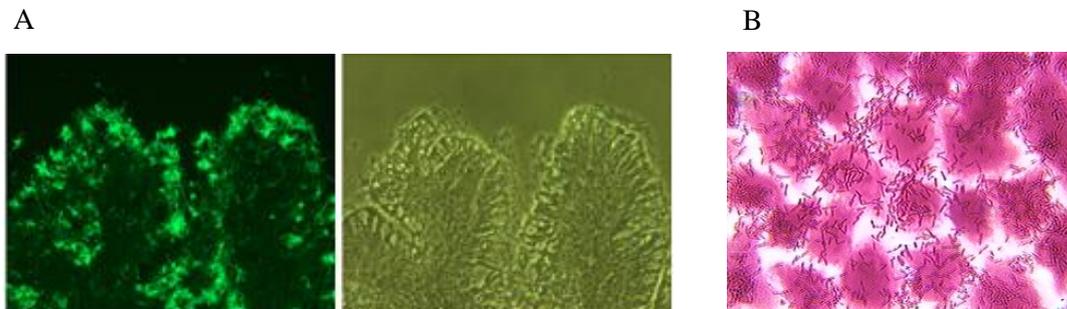


図 1 *Lactobacillus* 乳酸菌の腸上皮への付着 (A) *L. kitasatonis* 蛍光標識菌体のニワトリ小腸上皮への付着 (B) *L. reuteri* の Int-407 細胞への付着

Caco-2 細胞は長期間培養することで小腸様の構造・機能を持つようになる。また、HT-29 細胞から methotrexate 存在下で goblet 様細胞に分化し、ムチンを分泌する細胞が選択されてくる。培養細胞を用いる利点の一つは付着性を定量的に評価できることであり、細胞あたりの菌数を顕微鏡下で計数する方法、プレーティングによって生菌数を計数する方法、放射性同位元素あるいはビオチンなどでラベルした菌体を供する方法などで評価できる。一方、細胞あるいは組織抽出液や推測されるリガンド分子への結合性を検討し、評価している例も見られる。本稿では最も簡便な乳酸菌の培養細胞への付着性の評価法および受容体分子として、細胞外マトリックスタンパク質の一種であるフィブロネクチンへの付着性試験法を取り上げ、解説する。

(1) 生菌数計測による乳酸菌 (*Lactobacillus*) の培養細胞への付着試験 準備するもの

1. 実験装置・器具

- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ 通常タイプおよび CO₂ インキュベーター対応振とう機
- ・ 嫌気性菌培養装置 (アネロパックやガスパックによる嫌気ジャーでも可)
- ・ マイクロプレート
- ・ 滅菌シャーレ
- ・ その他 クリーンベンチ, 乾熱滅菌機, 高圧蒸気滅菌器, 遠心分離機, ボルテックスタイプのミキサー

2. 試薬

- ・ 細胞用培地
10% ウシ胎児血清, 1% nonessential amino acids (Gibco), 100 IU penicillin/ml 100 µg streptomycin/ml を含む DMEM (Caco-2 ; ATCC HTB37) あるいは 10% ウシ胎児血清を含む RPMI (Intestine-407 ; ATCC CCL6)
- ・ PBS (-)
- ・ MRS broth および agar

プロトコール

1. 乳酸菌菌液の調製

- 1) 12~16 時間培養したのち, 遠心分離で菌体を回収後, PBS で 3 回洗浄する。
- 2) DMEM に菌体を懸濁する。このとき培地には FBS および抗生物質を添加しない。

2. 細胞の培養

- 1) 6 穴のプレートに Caco-2 細胞あるいは Int-407 細胞を接種し, Caco-2 細胞の場合 14 日間 Int-407 細胞の場合, コンフルエント (3 日程度) になるまで培養する。

- 2) 培養後、PBS(-)あるいはDMEMを添加し攪拌しながら5分間、2回洗浄する。
3. 付着試験
 - 1) 各菌体を 5×10^7 cells/ml \sim 1×10^7 cells/mlに調整する。
 - 2) 各ウエルに4.0mlずつ菌液を添加する。
 - 3) CO₂インキュベーター内(37℃)で、振とう機を用いて緩やかに攪拌しながら1時間培養する。
 - 4) 培養後、培地を除いたのち、4.0 mlのPBS(-)を静かに添加し、振とう機で5分間攪拌し、上澄みを廃棄する。
 - 5) もう一度繰り返す。
 - 6) 最終段階で滅菌蒸留水を1.0 ml加え、よくピペッティングすることによって細胞を剥離させると同時にバーストさせる。この操作を3回繰り返す。
 - 7) 回収された3.0 ml中の菌数を求めるために、10倍ずつの段階希釈を行う。
 - 8) 100 μ lずつMRS寒天プレートに添加して、コンラージ棒で一様に塗抹する。
 - 9) 嫌気培養下で2日間培養し、生菌数を計数し、付着菌数を求める

(2) 顕微鏡観察による乳酸菌のHT-29およびCacao-2細胞への付着試験

準備するもの

- ・光学顕微鏡
- ・Lab Tek Chamber Slide (Nunc 177402)
- ・グラム染色液(サフラニンは不要)
- ・その他 項目(1)に準ずる。

プロトコール

1. 乳酸菌菌液の調製; 項目(1)に準ずる。
2. 細胞の培養
 - 1) Lab Tek Chamber SlideにCaco-2細胞を接種し、14日間、培養する。
 - 2) 培養後、PBS(-)を1ウエルあたり300 μ l添加し、緩やかに攪拌しながら5分間、1回洗浄する。
3. 付着試験
 - 1) 300 μ lの乳酸菌懸濁液を各ウエルに添加する。表面が乾かないよう素早く添加。
 - 2) CO₂インキュベーター内(37℃)で、振とう機を用いて緩やかに攪拌しながら1時間培養する。
 - 3) 300 μ lのPBS(-)を加え、非常に緩やかに5分間攪拌し、上清を廃棄する。この操作を5回繰り返す。

- 4) メタノールで 10 分間固定化する。
- 5) Chamber Slide のカバーとシリコンゴムを取り除き，光学顕微鏡で観察する。グラム染色することも可能。ただし，サフラニン液での染色は必要としない。
- 6) 1 細胞あたりに付着している菌数を計数する。

注意点など

- ・最近の報告では，付着因子が菌体表層にゆるく結合して存在している菌株も報告されており菌体の洗浄に関しては，留意する。
- ・培養細胞と乳酸菌を共培養したのちの洗浄は，細胞がはがれないよう，丁寧に行うこと。

(3) スライドガラスを用いた乳酸菌のフィブロネクチンへの付着試験法

準備するもの

1. 実験器具

- ・特殊印刷スライドガラス (8 穴 : Matsunami Glass Ind., Ltd.)
- ・モイスチャーチャンバー (水を浸した脱脂綿等を入れた密閉できるタッパーで良い)
- ・振とう機
- ・その他 前項目に準ずる

2. 試薬

- ・フィブロネクチン (Collaborative Research, Inc.3540008)
- ・フェチュイン (Sigma, F3004)
- ・BSA (Sigma, A9647)
- ・PBS
- ・メチレンブルー

3. 試料溶液の調製

ストック溶液を 1 mg / ml になるよう調製し，分注し-80℃で保存する。ワーキング溶液は 14.5 μg / ml になるよう調製する。この濃度に合わせることで，スライドガラスに 2.5 pmol のコラーゲンが固定化される。同様にフェツインと BSA は 25μg / ml になるよう調製する。なお，ワーキング溶液は 4℃で保存し，1 週間内に使用する。

プロトコール

1 日目

- 1) 各濃度に調製したタンパク質溶液を各ウエルに 40 μl ずつ加える。

2) 乾燥しないようモイスチャーチャンバー内で一晚、室温 (25 °C) で静置する。

2 日目

1) ライドガラスを 0.1%BSA/PBS で 5 分間 3 回洗浄する。洗浄の際、染色用の洗浄層を用いる。また、緩やかに攪拌しながら洗浄。

2) 2% BSA/PBS でブロッキングする。

3) ウエルの周りをキムワイプできれいに、丁寧にふく。

4) ウエルを乾燥させる。

5) 40 μ l ずつ菌液を加える。隣のウエルに菌液が入らないよう注意する。

6) 2 時間モイスチャーチャンバー内で静置する。

7) スライドガラスを 0.1%BSA/PBS で 5 分間 3 回洗浄する。

8) 乾燥させる。

9) メチレンブルーで染色する。

3 日目

顕微鏡で観察 (菌数計数) するとともに写真撮影を行い、一定面積あたりの菌数を計測する。

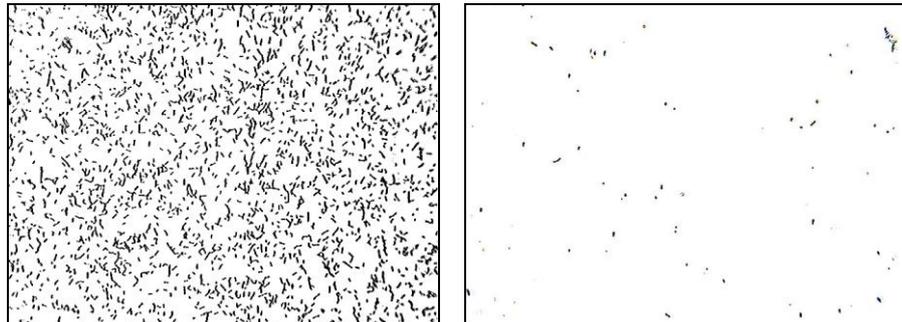


図2 *Lactobacillus* 乳酸菌のフィブロネクチンへの付着

写真左はフィブロネクチンを固定化したスライドへの付着，写真右はフェチユインを固定化したスライドへの付着性を示している。

注意点など

ネガティブコントロールとしてフェチユインに対する付着性も試験する。菌懸濁液をウエルに添加する際、隣のウエルの液を混ざらないようにするため、ウエルの周りを丁寧にふき取ることが必要である。

参考文献

- 1) Dahiya, R., Lesuffleur, T., Kwak, K.S., Byrd, J.C., Barbat, A., Zweibaum, A. and Kim, Y.S., Expression and characterization of mucins associated with the resistance to

methotrexate of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Res.*, **52**, 4655–4662 (1992).

- 2) Takahashi, N., Saito, T., Ohwada, S., Ota, H., Hashiba, H. and Ito, T., A new screening method for the selection of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria with high adhesion to human colonic mucosa. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1434-1438 (1996).
- 3) Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B., Björkman, Y., Sillanpää, J., Vartio, T., Kalkkinen, N. and Korhonen, T.K., A collagen-binding S-Layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2467-2471 (1995).
- 4) Mukai, T., Toba, T. and Ohori, H., Collagen binding of *Bifidobacterium adolescentis*. *Curr. Microbiol.*, **34**, 326-331 (1997).
- 5) Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M. and Ohori, H., Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *Int. J. Food Microbiol.*, **90**, 357-362 (2004).