

福井県特産農産加工品来乳酸菌の抗変異原性の検討

村岡道夫*¹

Antimutagenicity of Lactic Acid Bacteria Obtained from Agricultural Products Made in Fukui Prefecture

Michio MUROKA*¹

1. はじめに

化学物質の変異原性を検出する簡易試験法である umu 試験法等を利用した、食品等の抗変異原性試験については、過去にいくつかの試みが報告されている^{1,2,3,4)}。これらは、試験菌株である *Salmonella* Typhimurium TA1535/pSK1002 (*S. Typhimurium*) を事前に培養調整する際、若干の熟練と、手間が必要である。今回、umu 試験に、事前の試験菌株調整を簡易化した市販のキットを用い、福井県の特産であるラッキョウおよびその他の農産物から採取された乳酸菌について抗変異原性の試験を試みた。

2. 実験方法

2. 1 乳酸菌試料液の調整

乳酸菌は福井県食品加工研究所から分与されたラッキョウ等由来の乳酸菌 10 株を使用した。保存培地から白金針の先で乳酸菌をとり、GYP 液体培地に摂取して、30℃で 24 時間培養した。生菌を含む培養液を試料として用いた場合、*S. Typhimurium* との相互作用が複雑に関係すると考えられるので、乳酸菌が増殖に伴って菌体外に放出する物質の影響をみることとし、以下のように処理した。培養液を 3000rpm 15 分遠心し、その上澄をフィルター孔径 0.22 μm のシリンジフィルター (日本ミリポア社) でろ過した。このろ液を原液 (1 倍希釈液) とし、2 倍希釈を繰り返して、試料液の希釈系列を調製した。原液の遠心分離前の生菌数は、10⁹ 個/ml であった。

umu 試験には、市販のキット (ウムラック AT (株) 会社 J I M U R O)) を用い、変異原化学物質として、

フリルフラマイド (AF-2) と 2-アミノアントラセン (2-AA) を使用した。試験操作は、キット添付の操作方法に従った。即ち、凍結乾燥した *Salmonella* Typhimurium TA1535/pSK1002 (*S. Typhimurium*) を培養液で調整した後、化学物質の変異原性に対応した SOS 修復反応と β ガラクトシダーゼの発色反応を 96 穴マイクロプレートで行う。各ウェルに調整試験菌液を 100 μl 分注し、変異原性化学物質 (0.3 μg/ml) 10 μl および試料希釈液 10 μl を添加し、2 時間培養した。なお、変異原化学物質に 2-AA を用いる場合には、調整試験菌液に肝マイクロゾーム抽出物の s9mix を分注直前に添加した。

2. 3. *S. Typhimurium* の増殖試験

調整培養後の試験菌液に 5 株の試料液を滅菌生理食塩水に添加しておく。で 1、2、4、8 倍にした希釈試料液を 10 μl ずつ加え、さらにそれぞれの希釈段階で、変異原化学物質 (AF-2、2-AA とともに濃度 0.3 μg/ml を使用) 10 μl を添加したものと添加しないものを、それぞれ 3 ウェルずつ作成した。2 時間培養の前後に 620nm で吸光度 (OD₆₂₀) を測定し、その差により *S. Typhimurium* の増殖を検討した。

2. 4 変異原性抑制試験

10 株の乳酸菌を GYP 液体培地で希釈して、1、2、4、8、16 倍希釈系列を調製し、変異原化学物質を添加した系と、対照として変異原化学物質を添加しない系 (nc) と、変異原化学物質のみを添加した系 (pc) をそれぞれ 2 ウェルずつ作成した。変異原化学物質の変異原性を抑制したとみられる効率 (変異原抑制率) を、発色後に測定した 650nm での吸光度 (OD₆₅₀) から次式で求めた。

$$\frac{OD_{650S}}{OD_{650pc}} \quad (1)$$

: 変異原性抑制率

OD_{650S}: 試料希釈系列と変異原化学物質を添加

*1) 元福井県衛生環境研究センター

しウェルの OD₆₅₀

650pc : 変異原化学物質のみを添加したウェルの OD₆₅₀ の平均値

抗変異原性は、平井ら¹⁾と同様、抑制率の希釈係数に対する濃度依存性の有無で判定した。

2. 5 統計処理

結果は、OD 値または変異原性抑制率を乳酸菌試料液または GYP 液体培地の希釈係数でクラス分けして、その平均値の二元配置分散分析を行い、さらに Bonferroni の多重比較を行った。

3. 結果と考察

3. 1. *S. Typhimurium* の増殖試験

試験菌液に乳酸菌希釈試料液の系列と変異原化学物質

を添加した場合、AF-2、2-AA ともに、希釈係数 1 の場合（無希釈）の OD 値の差の平均値は、2 倍以上の希釈の場合に比べて有意に小さかった(図 1, 2)。また、AF-2 は、2-AA より、希釈 1 倍と 2 倍以上の希釈との場合の平均値の差が大きい傾向があった。一方、試験菌液に乳酸菌試料希釈液の代わりに GYP 液体培地の希釈系列を添加した場合、s9mix が添加されていない時に、1 倍希釈は 2 倍希釈以上に比べて有意に OD 値の差が大きかった (図 3)。ただし、s9mix が添加されている時は、何れの間にも差が見られなかった (図 4)。以上の結果から、GYP 液体培地には試験菌液の *S. Typhimurium* の増殖を促進する成分が含まれていると推察される。一方、乳酸菌が放出する物質が含まれていると考えられる試料液では、*S. Typhimurium* 増殖が抑制される傾向があり、他の細菌の増殖を抑制する効果が示唆される。

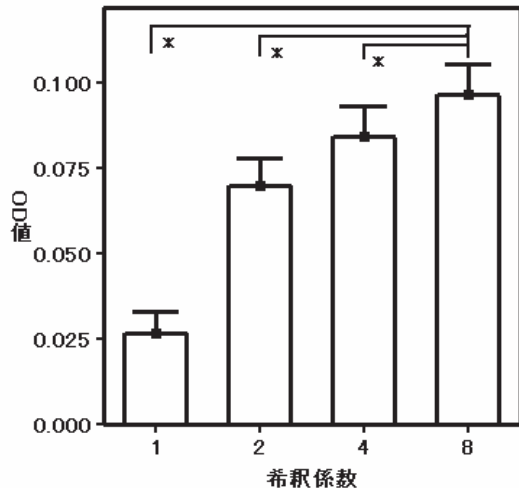


図1 試験菌液に乳酸菌原液 (5株) の1倍から8倍の倍希釈とAF-2を添加して2時間培養し、前後のOD値の差の平均値を比較した。ヒゲは95%信頼区間を示す。*:P<0.05

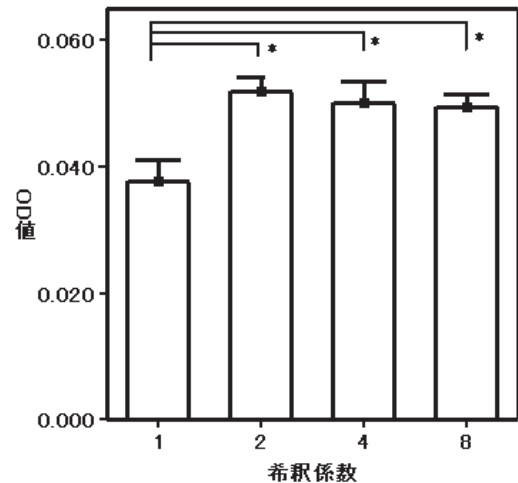


図2 試験菌液 (s9mix添加) に乳酸菌原液 (5株) の1倍から8倍の倍希釈と2-AAを添加して2時間培養し、前後のOD値の差の平均を比較した。ヒゲは95%信頼区間を示す。*:P<0.05

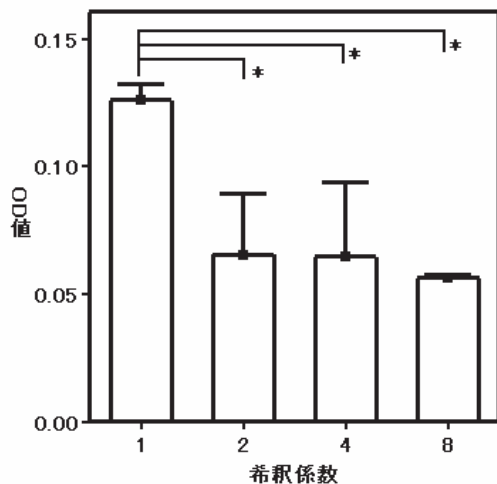


図3 試験菌液にGYP液体培地の希釈液のみを添加して2時間培養し、前後のOD値の差の平均比較した。ヒゲは95%信頼区間を示す。*:P<0.05

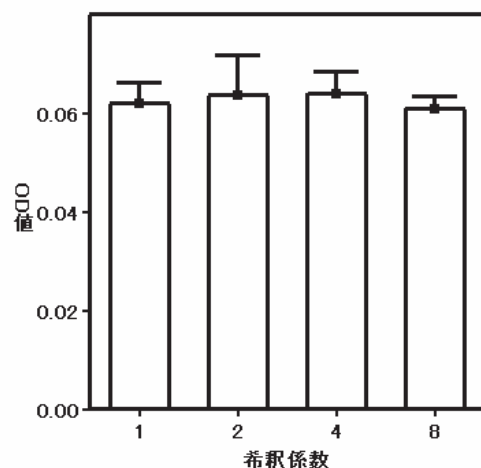


図4 試験菌液 (s9mix添加) にGYP液体培地の希釈液のみを添加して2時間培養し、前後のOD値の差の平均値を比較した。ヒゲは95%信頼区間を示す。

3. 2 変異原性抑制試験

増殖試験に見られたように、GYP 培地が *S. Typhimurium* の増殖に影響を与えられるので、乳酸菌試験液の希釈は滅菌生理食塩水ではなく、GYP 液体培地でおこなった。(1) 式で求めた値の各希釈率ごとの平均値を比較すると、AF-2 の場合には希釈係数 1 から希釈率が増加するにつれて漸減し、原液と希釈率 8 倍および 16 倍の間には、有意差が見られた (図 5)。しかし、2-AA については、ほとんど差が見られなかった (図 6)。乳酸菌の分泌物が β ガラクトシダーゼ活性に直接与える影響を相殺するため、同時に測定した AF-2 および 2-AA を添加しない乳酸菌希釈系列をブラ

ンクとして、式 (2) により補正をほどこした抑制率を求めた。その結果は、AF-2、2-AA ともに希釈率による差は認められなかった (図 7、図 8)。

$$SMr = 1 - \frac{OD_{650S} - OD_{650nc}}{OD_{650pc}} \quad (2)$$

SMr : 補正された変異原抑制率

OD_{650S} : 試料希釈系列と変異原化学物質を添加したウェルの OD₆₅₀

OD_{650nc} : 試料系列のみの OD₆₅₀

OD_{650pc} : 変異原化学物質のみを添加したウェルの OD₆₅₀ の平均値

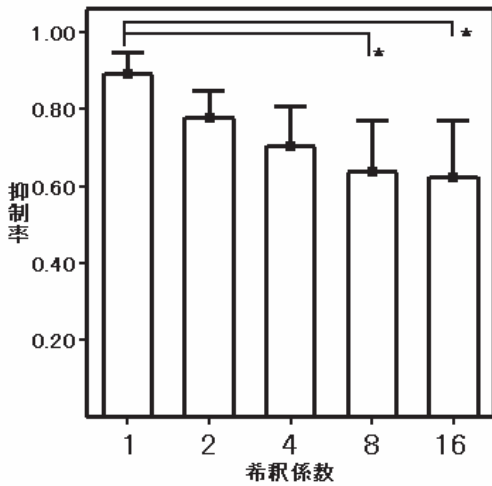


図5 乳酸菌(10株)のAF-2に対する変異原性抑制率を希釈係数毎にグループ化し、平均値を比較した。ヒゲは95%信頼区間を示す。*:P<0.05

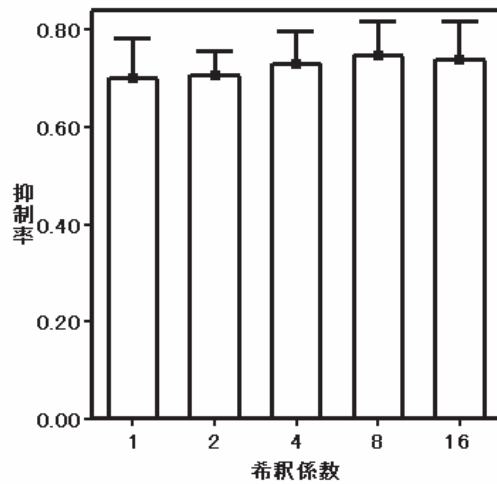


図6 乳酸菌(10株)の2-AAに対する変異原性抑制率を希釈係数毎にグループ化して、平均値の比較をした。ヒゲは95%信頼区間を示す。

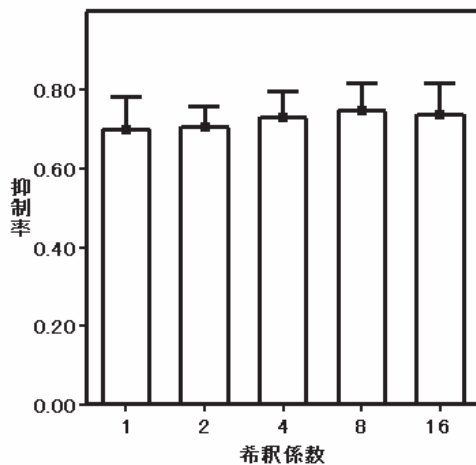


図7 乳酸菌(10株)のAF-2に対する補正した変異原性抑制率を希釈係数でグループ化して平均値を比較した。ヒゲは95%信頼区間を示す。

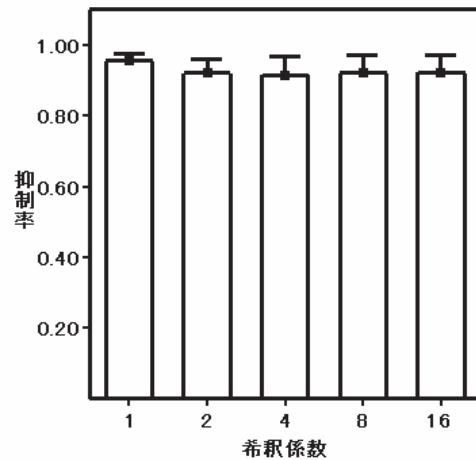


図8 乳酸菌(10株)の2-AAに対する補正した変異原性抑制率を希釈係数でグループ化し、平均値を比較した。ヒゲは95%信頼区間を示す。

4. まとめ

乳製品由来の乳酸菌には、ヒト腸内の細菌叢の改善効果を利用して、整腸剤等の医薬品として利用されているものがある。今回試験したのは、農産品に由来した乳酸菌である。株ごとに変異原性の抑制作用の有無を検討すべきであるが、統計処理による有意差の判定を行うため、今回用いた乳酸菌をほぼ同様の性質を有するものとして、一括して取り扱った。*S. Typhimurium* の増殖試験では、菌体から放出される物質により *S. Typhimurium* の増殖が抑制される可能性があり、同様の効果が期待できるかもしれない。化学物質の変異原性を抑制する効果については、AF-2 に対しては可能性があるものの、GYP 液体培地の影響を無視できないため、確実性が乏しい。今回使用した変異原化学物質の AF-2 と 2-AA は、比較的身の回りに多く存在すると考えられるものであるが、その他にも変異原を有する化学物質は多く、今回用いた乳酸菌により変異原性が抑制されるものがある可能性はある。

本研究は、「健康長寿ふくい」にかかる県内農産物の発酵食品開発の一部として行われた。

参考文献

- 1) 平井敏之他：県特産農産物（野菜等）ジュースの抗変異原性スクリーニングについて（第1報），福井県衛生研究所年報，28，59～65(1989)
- 2) 平井敏之他：県特産農産物ジュースの抗変異原性スクリーニングについて（第2報），福井県衛生研究所年報，29，74～78(1990)
- 3) 石原島栄二他：栃木県産農産物に含まれる生理活性物質に関する調査（第2報） Umu 法による「とちおとめ」の抗変異原性について，栃木県保健環境センター年報，7，85～90(2001)
- 4) Masataka HOSODA et al, Antimutagenicity of Milk Cultured with Acid Bacteria Against N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine, J Dairy Sci, 75, 976-981(1992)