

# 乳酸菌の生菌および加熱死菌の経口投与が魚類の 生体防御活性に及ぼす影響

角田 出<sup>1</sup>・舘野 僚<sup>2</sup>・高瀬 清美<sup>3</sup>

## Effect of Orally Administered Live and Heat-killed Lactic Acid Bacteria on the Biodefense Activity of Fish

Izuru KAKUTA<sup>1</sup>, Ryo TATENO<sup>2</sup> and Kiyomi TAKASE<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki 986-8580, Japan.

<sup>3</sup>Research Center for Creative Partnerships, Ishinomaki Senshu University, Miyagi 986-8580, Japan.

### Abstract

At aquaculture facilities, antibiotics are sometimes used to suppress the frequent occurrence of fish infections associated with high-density aquaculture. In this study, from the viewpoint of ensuring food and environmental safety, we investigated the effect of administration of diets containing live and heat-killed lactic acid bacteria on the biodefense activity of fish.

Live bacteria of *Lactobacillus casei* (400 mg wet weight/kg body weight/day) and the heat-killed *L. casei* (about 100 mg dry weight/kg body weight/day; equivalent to live bacteria with a wet weight of 400 mg), and heat-killed *Enterococcus faecalis* FK-23 strain (120 mg dry weight/kg body weight/day) were administered orally to goldfish *Carassius auratus*, for 5 weeks to investigate effects on the biological defense activity of the fish such as granulocyte and lymphocyte counts, phagocytic activity of granulocytes, potential killing (PK) activity, bacteriolytic activity of body surface mucus.

Administration of live *L. casei* bacteria to goldfish increased the number of granulocyte, the phagocytic activity of granulocytes and the bacteriolytic activity of body surface mucus. It also increased the average and maximum PK activity, while no statistically significant difference was shown. Similar results were obtained with the administration of heat-killed *L. casei* and *F. faecalis* FK-23. From the above, it was found that the oral administration of these supplements enhances the non-specific biodefense activity of fish.

Key words : *Lactobacillus casei*, live bacteria, heat-killed bacteria, goldfish, biodefense activity

### 1. はじめに

養殖施設では、高密度養殖に伴う魚類感染症の頻発と拡大の懸念から、病気の予防や治療を目的として、抗生物質を含む各種薬剤が使用されることも多い。しかし、薬剤が魚肉中に残留したり、環境中に薬剤耐性菌が出現したりする等の問題も提起されている。

そこで、食や環境の安全性確保の観点から、乳酸菌の生菌および死菌添加飼料の投与が魚類の生体防御活性に及ぼす効果を調べることにした。乳酸菌は、これまでも健康状態改善の目的から食品に添加されたり、環境改善に用いられたりして

きた経緯があり、その効果とともに、安全性に関連した研究・情報も多いためである<sup>1-4)</sup>。

乳酸菌摂取は、腸内環境の改善とともに、免疫機能の向上、脂質の代謝改善等の効果を有することが報告<sup>5)</sup>されている。しかしながら、給餌のタイミングに合わせて生きた乳酸菌を準備したり、それを魚に摂取させたりすることは、コスト的にも労力的にも大変である。近年、乳酸菌を生菌体として利用するのではなく、死菌体として利用する試みが進んできた<sup>6-8)</sup>。乳酸菌の死菌体での利用が可能となれば、少なくとも養殖現場での餌管理や給餌に伴う労力は減ることになる。

<sup>1</sup>石巻専修大学理工学部生物科学科

<sup>2</sup>石巻専修大学理工学部生物科学科卒業生 (BI25)

<sup>3</sup>石巻専修大学共創研究センター特別研究員

そこで本報では、免疫賦活作用のあることが報告されている乳酸菌の生菌体および同死菌体の投与が魚類の生体防御活性に及ぼす効果を調べた。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試魚

供試魚として、体重約 13 g のキンギョ (*Carassius auratus auratus*) を用いた。供試魚は業者から購入後、キンギョ用市販飼料 (エンゼル: 日本ペットフード株式会社製) を食べ残しが出ない程度に与え、約 20°C で 1 週間の馴致飼育を行った後に飼育試験に用いた。

### 2.2 試験群の設定および飼育方法

循環ろ過式の容量 2,000 L の恒温水槽内に設置した 60 L の水槽内に魚を收容し、脱塩素した水道水を各水槽に注ぎ込みながら飼育した。1 群当たり 8 尾で飼育を開始した。飼育試験中の水温は、予備飼育期間同様、 $20 \pm 0.4$  °C であった。

飼育試験に先立ちキンギョを 4 群に分け、3 日間静置後、それぞれに以下の飼料を投与し、5 週間の飼育試験を行った。4 群とは、市販飼料を一旦粉末化した後に再成形したものを投与して育てる対照群、市販のヨーグルトからトマトジュース寒天培地<sup>9)</sup>を用いて嫌気条件下で培養した後、常法<sup>10)</sup>に従って分離・同定したラクトバチルス・カゼイ *Lactobacillus casei* の生菌を 400 mg 湿重量/kg 体重/日の割合になるように市販飼料の再成形時に含有させた餌を投与する群 (*L. casei* 群)、同 400 mg 湿重量の生菌を加熱して死菌としたものを市販の飼料粉末に混合して投与する群 (*L. casei* 死菌群)、および、ニチニチ製薬株式会社より購入したエンテロコッカス・フェカリス・FK-23 株 (*Enterococcus faecalis* strain FK-23) の加熱死菌を 120 mg 乾燥重量/kg 体重/日の割合で投与し得るように市販飼料粉末に含有させた餌を投与する群 (FK-23 死菌群) である。

天然あるいは養殖魚の腸内から、今回使用した *L. casei* や *E. faecalis* の検出例は見当たらない。しかし、前者は経口摂取時に生きて腸管内に到達し、腸内環境を整えることで整腸作用を示したり、宿主免疫系に作用することでナチュラルキラー細胞の活性を高めたりすることが報告されてい

る<sup>11)</sup>菌種である。また、後者はヒトや動物の腸内に存在する常在菌の一種で、宿主の免疫力が低下している状態では、種々の感染症を引き起こす場合のあることが報告されている<sup>12)</sup>が、適切な投与が免疫力の向上に有効であることや、加熱殺菌処理を行うことで、同効果が高まることが報告されているもの<sup>13)</sup>である。

なお、*L. casei* 生菌群には、継代培養中の *L. casei* を新たな培地に植え継いだ後に 3~4 日間培養したものを、餌作製の度に回収し、市販飼料粉末と同菌体を混合して作製した餌を投与した。また、同菌の加熱死菌体作製に際しては、*L. casei* 生菌を計量後、70°C に加熱した恒温装置内に 24 時間以上置き、水分の減少による重量の低下が起こらなくなったもの (含水率約 76%) を回収し、生菌体として 400 mg 相当量を体重 1 kg の魚が 1 日当たり摂取するように市販飼料粉末に混合して作製した餌を投与した。したがって、本死菌の魚への投与量はほぼ 100 mg 乾燥重量/kg 体重/日に相当する。また、本乾燥菌体は再培養により、菌の生育不可を確認済みである。

これら飼料の日間給餌量を魚体重の 2% としたことから、*L. casei* 生菌群、*L. casei* 死菌群、および、FK-23 死菌群の餌内含有率はそれぞれ 2%、0.5%、0.6% となる。また、同飼育期間中の給餌は週に 6 日間とし、糞や食べ残しはチューブを用いて適宜取り除いた。

### 2.3 生体防御指標の測定

#### 2.3.1 採血・粘液の採取

ヘパリンナトリウムでコーティングした注射器を用いて、尾部血管から採血を行った。採血の後、マイクロピチュラーで片面当たりの体表粘液をかきとった。当該粘液は、溶菌活性の測定まで、-80°C で冷凍保存した。

#### 2.3.2 赤血球数 (RBC) の計測

赤血球数は、採取した血液 (以下、全血) に 10 倍量の淡水魚用生理食塩水 (0.75% NaCl) を加え、攪拌・希釈した後、血球計算盤を用いて求めた。

#### 2.3.3 血球組成の算出

血液をスライドガラスに滴下し、スメアした後、

メイグリュンワルド染色（和光純薬工業株式会社製）を施し、検鏡し、赤血球あたりの顆粒球やリンパ球の比率を求めた後、赤血球数から、各血球の実数を算出した。

### 2.3.4 貪食活性の測定

ザイモザン A (SIGMA 社製) を 0.6 mg/mL の割合で生理食塩水に懸濁した液と全血とを等量混合し、5 分毎に攪拌しつつ、30 分間反応させた後、スライドガラスに塗沫し、メイグリュンワルド染色して検鏡し、全顆粒球当たりのザイモザンを取り込んだ顆粒球の比率を求めた。

### 2.3.5 ポテンシャル・キリング (PK) 活性

ニトロブルーテトラゾリウム (以下、NBT) を 2 mg/mL の割合で生理食塩水に加えたもの (以下、NBT 溶液) と、これにザイモザンを 5 mg/mL 加えたもの (以下、ザイモザン NBT 溶液) の 2 種類を作製した。

全血 50  $\mu$ L を毛細管に移し、ヘマトクリット遠心機 (株式会社コクサン社製 H-1200C) を用いて、800 g、5 分間の遠心操作を行った。毛細管にできた赤血球と白血球の層から白血球層を含む血漿部分を取り出し、そこに 50  $\mu$ L の生理食塩水を加え、よく混合した。同混合液 15  $\mu$ L に、等量の NBT 溶液あるいはザイモザン NBT 溶液を加え、それぞれ 1 時間室温で放置した。この後、ジメチルホルムアミドを 400  $\mu$ L 加え、良く混和してから、1,500 g で 15 分間遠心分離し、上清を試料とした。この上清試料 250  $\mu$ L を石英マイクロセルにとり、540 nm の分光光度計で吸光度を測定し、以下の式により、PK 活性を求めた。

PK 活性 ( $\Delta$  Optical Density:  $\Delta$  OD) = Zymosan 加 NBT 溶液の OD - NBT 溶液の OD

### 2.3.6 体表粘液の溶菌 (リゾチーム) 活性

躯幹部体側の体表から掻き採った粘液に 7.5 mmol の pH 7.0 のリン酸緩衝液 2 mL を加え、乳鉢と乳棒を用いて均一化した。これをサンプルカップに分注し、4  $^{\circ}$ C、3,500 g で 20 分間遠心分離にかけ、上清を採取した (以下、粘液試料とする)。粘液試料中のタンパク質量は Lowry 法で測定した。

*Micrococcus luteus* (SIGMA 社製) を 3 mg/mL の割合で前述のリン酸緩衝液に加え約半日振とう処理したものを菌液として用いた。96 穴プレートに粘液試料を 50  $\mu$ L、1/3 mol の pH6.9 のリン酸緩衝液を 150  $\mu$ L、*M. luteus* 菌液を 100  $\mu$ L 加え、直ちに、620 nm で測定した。その後、室温 (20 $^{\circ}$ C) で放置しながら 15 分おきに 7 時間にわたり、吸光度の変化を測定し、吸光度の最大変化量を試料のタンパク質量で除して、粘液中溶菌活性とした。

## 2.5 統計

文中の数字は特記しない限り、平均値  $\pm$  標準偏差 (個体数 5 尾) で表した。測定結果については、Dunnett 検定<sup>14)</sup>により統計処理をし、 $p < 0.05$  を有意の限界として表示した。

## 3. 結果

### 3.1 飼育魚の生残・外観等

キンギョの外観や行動に変化は見られず、飼育期間中に死亡する個体は見られなかった。なお、生体防御指標を調べるために取り上げる個体数は、各群 5 個体とした。

### 3.2 血球数および生体防御指標

*L. casei* 生菌と加熱死菌、および、*E. faecalis* FK-23 加熱死菌の経口投与がキンギョの各血球数に及ぼす影響を Table 1 に、生体防御活性に及ぼす影響を Fig. 1 に示す。*L. casei* 生菌群では、赤血球数には変化は認められなかったが、顆粒球数、顆粒球の貪食活性、および、体表粘液の溶菌活性が上昇した。*L. casei* 死菌群では顆粒球の貪食活性のみが上昇し、FK-23 死菌群では、顆粒球の貪食活性と粘液の溶菌活性が高まった。ただし、ポテンシャル・キリング (PK) 活性については、各試験群ともに、平均値や最高値は著しく上昇したものの、統計的に有意な変化は認められなかった。

## 4. 考察

乳酸菌は、発酵乳製品、漬物を含む植物発酵物等の食品、サイレージは言うまでもなく、近年では海洋等の多様な環境中にも分布していること<sup>15,16)</sup>が判明している。また、魚類の腸内容物が

乳酸菌の生菌および加熱死菌の経口投与が魚類の生体防御活性に及ぼす影響

Table 1 Changes in the number of red blood cells, granulocytes and lymphocytes from the goldfish, *Carassius auratus*, administered orally live *Lactobacillus casei*, heat-killed *L. casei*, and heat-killed *Enterococcus faecalis* FK-23

	Control	live <i>L. casei</i>	killed <i>L. casei</i>	killed FK-23
Red blood cell ( $\times 10^4$ cells/ $\mu$ L)	102 $\pm$ 12	99 $\pm$ 10	100 $\pm$ 32	96 $\pm$ 21
Granulocyte ( $\times 10^4$ cells/ $\mu$ L)	0.99 $\pm$ 0.30	1.43 $\pm$ 0.33 *	1.04 $\pm$ 0.48	1.02 $\pm$ 0.56
Lymphocyte ( $\times 10^4$ cells/ $\mu$ L)	1.14 $\pm$ 0.35	0.94 $\pm$ 0.39	1.08 $\pm$ 0.41	0.75 $\pm$ 0.47

live *L. casei* : 400 mg wet weight / kg body weight / day  
 heat-killed *L. casei* : (about) 100 mg dry weight / kg body weight / day  
 heat-killed FK-23 : 120 mg dry weight / kg body weight / day  
 Data are given as mean  $\pm$  S.D, n = 5.

\* : Significant difference to the control group ( $p < 0.05$ )

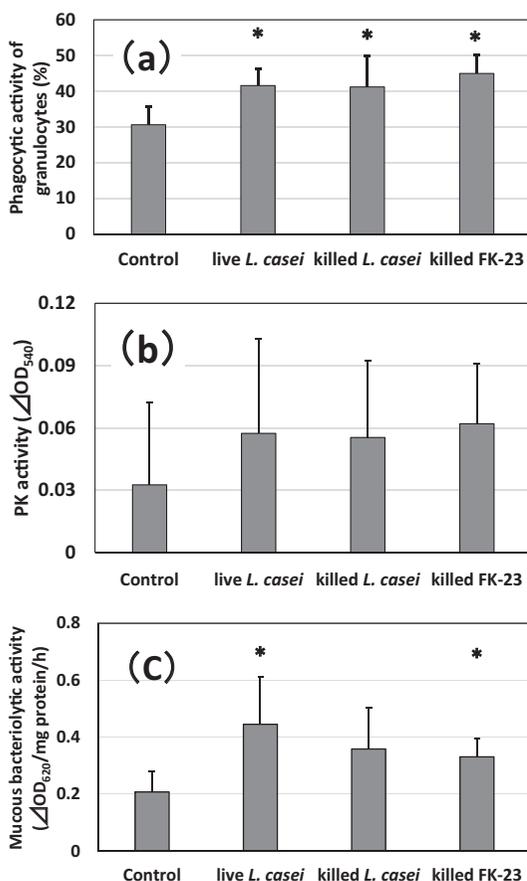


Fig. 1 Changes in the non-specific biodefense factors from the goldfish, *Carassius auratus*, administered orally live *Lactobacillus casei*, heat-killed *L. casei*, and heat-killed *Enterococcus faecalis* FK-23

- (a) phagocytic activity of granulocytes
- (b) potential killing (PK) activity
- (c) bacteriolytic activity of body surface mucus

live *L. casei* : 400 mg wet weight / kg body weight / day  
 heat-killed *L. casei* : (about) 100 mg dry weight / kg body weight / day

heat-killed FK-23 : 120 mg dry weight / kg body weight / day  
 Data are given as mean  $\pm$  S.D, n = 5.

\* : Significant difference to the control group ( $p < 0.05$ )

らも *L. lactis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Vagococcus fluvialis* 等の乳酸菌が単離されるようになり、それらの腸内定着性や作用に関する研究も進んできた<sup>17,18)</sup>。

本試験は、*L. casei* 生菌と同死菌、および、*E. faecalis* FK-23 死菌を、単一の投与量で5週間経口投与した後のキンギョを対象に、その生体防御活性をみたものである。そのため、これらの菌素材の経口投与が養殖対象魚の生体防御活性に及ぼす影響に関しては一面的な結果の把握に留まったことは否めない。また、前述の如く天然あるいは養殖魚の腸内から今回使用した *L. casei* や *E. faecalis* の検出例は見当たらない。

しかしながら、当該生菌および死菌の経口投与が、少なくとも今回設定した投与量や投与期間において、魚類の自然免疫系を刺激し、生体防御活性を高めることが明らかとなった。特定の乳酸菌についての結果ではあるが、生菌のみならず死菌の投与が、ともに魚類への自然免疫系の活性を高めたことは、当該分野における乳酸菌の死菌体での利用促進、今後の乳酸菌死菌混合餌料の普及促進につながり、養殖現場での餌管理や給餌に伴う労力削減に貢献する可能性は高いと考える。

ただし、同一種の生菌と死菌を投与した際にみられた生体反応については、多少の違いもみなかった。すなわち、*L. casei* 生菌の投与が顆粒球数や顆粒球の貪食活性に加え、体表粘液中の溶菌活性を高めたのに対し、同死菌の投与は顆粒球の貪食活性を賦活化したのみであった。この差異は、顆粒球数増加や体表粘液溶菌活性上昇を誘起するには *L. casei* の易熱性成分や細胞壁の三次元構造が重要である可能性を示唆する。

一方、*E. faecalis* 死菌の経口投与は *L. casei* 死

菌とほぼ同量（乾燥重量でそれぞれ 120 と 100 mg/kg 体重/日）であったにも係わらず、その効果は *L. casei* 生菌投与時と同様に高いものであった。なお、両者の投与効果における差の原因については、現状では特定するに至っていないが、*L. casei* 死菌と *E. faecalis* FK-23 死菌のペプチドグリカンの化学構造や細胞壁の三次元構造の違いが関係している可能性が高い。

また、本菌の使用については、抗菌薬に対する顕著な獲得耐性が認められないことやバンコマイシン耐性遺伝子を保有していないこと等からプロバイオティクス乳酸菌として使用する際の安全性は高いとの報告がなされている<sup>12)</sup>ものの、その出自等から生菌使用に際して安全面での懸念がゼロとは言えないことから、現状では死菌での利用が推奨される。

今後は、養殖対象魚であり、かつ、肉食性で、有胃かつ腸管の短い魚であるサケ科やブリを含むサバ科の養殖対象魚等に対し、これらの菌素材の用量依存的な経口投与効果を調査するとともに、これらの菌体の経口投与によって引き起こされる腸管内での菌叢変化や腸管での免疫反応、体内のサイトカインの挙動等、経口投与された菌体が引き起こす各種生体反応の発動機序に関する研究を進めることが肝要であろう。

## 引用文献

- 1) T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki, Bacteriocines Produced by Lactic Acid Bacteria and the Applications, Jpn. J. Lactic Acid Bact., 10(1), 2-18 (1999)
- 2) S. Matsui, T. Matsuda, S. Shiomi, J. Matsushita, Y. Inamori and N. Sugiura, An Analytical Method of Auxin and Cytokinin Produced by *Lactobacillus fermentum* 403 — a Principle of Probiotic Environmental Agriculture, Jpn. J Water Treat Biol., 48 (3), 117-123 (2012)
- 3) R. Kaji, Intracellular Signaling Involved in Immunomodulation Induced by Lactobacilli, KASEAA, 50 (3), 182-187 (2012)
- 4) H. Kawamura, K. Seno, T. Kumagai, T. Watanabe, K. Yamaki and K. Tsushida, Effects of *Lactobacillus* and Some Vegetable Homogenates on Phagocytosis of Rat Peritoneal Macrophages, Nippon. Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 47(6), 465-469 (2000)
- 5) H. Uenishi and Y. Seto, Physiological Functions of Lactic Acid Bacteria and Their Factors, Cookeryscience, 46(2), 129-133 (2013)
- 6) C.F. Fernandes, K.M. Shahani and M.A. Amer, Therapeutic Role of Dietary Lactobacilli and Lactobacillic Fermented Dairy Products, FEMS Microbiology Reviews, 46, 343-356 (1987)
- 7) T. Shimizu, K. Nomoto, T. Yokokura and M. Mutai, Role of Colony-Stimulating Activity in Antitumor Activity of *Lactobacillus casei* in Mice, J. Leukoc. Biol., 42(3), 204-212 (1987)
- 8) M. Furushiro, H. Sawada, K. Hirai, M. Motoike, H. Sansawa, S. Kobayashi, M. Watanuki and T. Yokokura, Blood Pressure-lowering Effect of Extract from *Lactobadllus casei* in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), Argic. Biol. Chem., 54 (9), 2193-2198 (1990)
- 9) F.L. Mickle and R.S. Breed, A Gaseous Fermentation of Tomato Pulp and Related Products, NY Agricultural Experiment Station Tech. Bull., 110, 3 (1925)
- 10) Y. Ezura and U. Shimizu, 1990, "6. Saikinsou ni kansuru Chousa (Bacterial Flora Considerations), Suishitsu Biseibutsu Hen (Water Quality and Microorganisms)", The Oceanographic Society of Japan, ed., In, Engankaiyou Chousa Mannyuaru II (Manual for Coastal Survey), 9-20, Kouseisya Koseikaku Co.,Ltd., Tokyo.
- 11) K. Shida, Anti-allergic Activity of *Lactobacillus casei* YIT 9029 (Shirota strain) : Action Mechanisms and Possible Application in Clinical Practice, Jpn. J. Lactic Acid Bacteria, 21(2), 107-111 (2010)
- 12) S.A. Taylor, E.M. Bailey and M.J. Rybak, Enterococcus, an Emerging Pathogen. Ann. Pharmacother., 27, 1231-1242 (1993)
- 13) K. Ohasi, H. Ueda, M. Yamazaki, S. Kimura, S. Abe and H. Yamaguchi, Activity of *Enterococcus faecalis* (FK-23) Preparation as a Biological Response Modifier, YAKUGAKU ZASSHI, 112(12), 919-925 (1992)
- 14) C.W. Dunnett, A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Am. Stat. Assoc., 50, 1096-1121 (1955)

## 乳酸菌の生菌および加熱死菌の経口投与が魚類の生体防御活性に及ぼす影響

- 15) M. Uchida, Studies on Lactic Acid Fermentation of Seaweed, Bull. Fish. Res. Agen., 14, 21-85 (2005)
- 16) Microbial library, Database of strain information on useful microorganisms derived from the ocean, MaOI Marine Microbial library, BISHOP, <https://bishop-i.jp>
- 17) A. Shiina, S. Itoi, S. Washio and H. Sugita, Molecular Identification of Intestinal Microflora in Takifugu nipobles, Comp. Biochem. Physiol. D, 1, 128-132 (2006)
- 18) T. Kuda, Y. Noguchi, M. Ono, H. Takahashi, B. Kimura, R. Kamita, T. Eto, M. Kato and M. Kawahara, *In vitro* Evaluation of the Fermentative Antioxidant, and Anti-inflammation Properties of *Lactobacillus lactis* BF3 and *Lactobacillus mesenteroides* subsp. *mesenteroides* BF7 Isolated from *Oncorhynchus keta* Intestines in Rausu, Japan, J. Funct. Foods, 11, 269-277 (2014)

### 和文要旨

養殖施設では、高密度養殖に伴う魚類感染症の頻発を抑制する目的で、抗生物質等が用いられることも多い。今回、食や環境の安全性確保の観点から、乳酸菌の生菌および死菌添加飼料の投与が魚類の生体防御活性に及ぼす効果を調べた。

キンギョ *Carassius auratus* にラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) の生菌 (400 mg 湿重量/kg 体重/日) と加熱死菌 (左記相当量; 約 100 mg 乾燥重量/kg 体重/日)、および、エンテロкокカス・フェカリス・FK-23 株 (*Enterococcus faecalis* strain FK-23) の加熱死菌 (120 mg 乾燥重量/kg 体重/日) を、市販飼料に添加して 5 週間飼育後に以下の生体防御活性指標を調べた: 顆粒球とリンパ球数、顆粒球の貪食活性、ポテンシャル・キリング (PK) 活性、体表粘液の溶菌活性。

キンギョへの *L. casei* 生菌の投与は、顆粒球の数と貪食活性、体表粘液の溶菌活性を上昇させた。PK 活性の平均値や最高値も高めた。*L. casei* 死菌や FK-23 死菌の投与でも、ほぼ同様の結果が得られた。以上の結果より、魚類への *L. casei* 生菌や同死菌、および FK-23 死菌の経口投与は、その非特異的生体防御活性を高めることが分かった。なお、特定の乳酸菌についての結果ではあるが、生菌のみならず死菌の投与が、ともに魚類への自然免疫系の活性を高めたことは、当該分野における乳酸菌の死菌体での利用促進、今後の乳酸菌死菌混合飼料の普及促進につながり、養殖現場での餌管理や給餌に伴う労力削減に貢献する可能性は高いと考える。

キーワード: *Lactobacillus casei*、生菌、加熱死菌体、キンギョ、生体防御活性