

報文

マウスに対する酵母 *Rhodotorula glutinis* および *Hansenula anomala* の免疫賦活活性

赤桐里美^{1,2}、日高久美^{1,3}、眞岡孝至^{1,3,*}、大高洽堂¹、谷本文男^{1,3}、森山達哉^{4,5}、小川 正^{4,6}

¹ ㈱サン・バイオレックス (606-0805 京都市左京区下鴨森本町 15)

² 現所属 京都府立医科大学大学院生体機能制御学 (602-8566 京都市上京区河原町広小路)

³ 現所属 生産開発科学研究所 (606-0805 京都市左京区下鴨森本町 15)

⁴ 京都大学大学院農学研究科 (611-0011 宇治市五ヶ庄)

⁵ 現所属 近畿大学農学部応用生命化学科 (631-8505 奈良市中町 3327-204)

⁶ 現所属 関西福祉科学大学健康福祉学部 (582-0026 柏原市旭ヶ丘 3-11-1)

*著者連絡先 E-mail : maoka@mbox.kyoto-inet.or.jp

(受取日 : 2005 年 12 月 26 日、受理日 : 2006 年 2 月 5 日)

要旨 : 経口投与した酵母 *Rhodotorula glutinis* と *Hansenula anomala* の免疫賦活効果についてマウスを用いて検討した。*R. glutinis*、*H. anomala* および 2 種の酵母混合物を食餌に与えた群では、いずれも酵母無添加群に比べてマウスマクロファージの食食能、カテプシン活性、一酸化窒素 (NO) 産生能が 1.5 から 2.7 倍と有意に上昇した。なお、それらの活性は、ポジティブコントロールとして lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与したマウスのマクロファージの活性と同等もしくはそれ以上であった。これらの事から *R. glutinis* や *H. anomala* は経口投与によって免疫賦活効果を与えることができることが明らかになった。

キーワード : *Rhodotorula glutinis*、*Hansenula anomala*、免疫賦活効果、マウス、マクロファージ

1. はじめに

Saccharomyces cerevisiae をはじめとする酵母は良質なタンパク質を含み、ビタミンなどの生理活性物質を含有するため食品、医薬品はもとより水畜産の分野でも飼料や飼料添加物として広く用いられている [1-3]。著者らはミカン搾汁滓の有効利用に関する研究の過程でミカン搾汁滓を効率良く資化する酵母としてスクリーニングされた *Rhodotorula glutinis* や *Hansenula anomala* について、これらの酵母の飼料添加物としての有効性について検討を行った [4-7]。その研究の中で *R. glutinis* や *H.*

anomala をアユに試料として与えたところ、酵母を与えた群は与えない群に比べ冷水病の発症率が減少する事を見出した [7]。さらにマダイに対するビブリオ菌 (*Vibrio anguillarum*) の攻撃試験においても、これらの酵母を投与した群の生存率は無投与群に比べ有意に上昇することを明らかにした [8]。酵母はこれらの細菌に対する抗菌活性を持たないことから、摂取した酵母がこれら魚類の免疫活性を向上させた結果、感染に対する抵抗性を向上させたものと推察された [4]。ビール酵母 (*S. cerevisiae*)

やそれに含まれるグルカンについてはすでに多くの免疫賦活効果に関する報告があり[1-3]免疫賦活剤として実用化されている。しかしながら *Saccharomyces* 属以外の *R. glutinis* や *H. anomala* の酵母の経口投与による免疫賦活効果に関する報告は無い。そこで本研究では、*R. glutinis* と *H. anomala* の免疫賦活効果とその機構を明らかにするためこれらの酵母をマウスに食餌と共に与え、マクロファージの貪食能、カテプシン活性、一酸化窒素 (NO) 産生能に与える影響について検討した。

2. 実験方法

2.1. 酵母の培養と投与試料の調製

酵母 *R. glutinis* は IF0 0389 株を、*H. anomala* は京都市の土壌より分離した株 (SB1020) [4] をそれぞれ用いた。これらの酵母の培養は定法に従った[4]。それぞれの酵母は培養後、遠心分離して集菌した後に凍結乾燥して実験に供した。*R. glutinis* と *H. anomala* の混合物はそれぞれの酵母を培養した後、同重量の酵母を混合し、複合酵素剤 XP-415 (株ナガセケムテックス) を添加し 48 時間インキュベートして細胞壁を消化したものを凍結乾燥して投与試料(以後混合試料と略す)とした。

2.2. 実験動物、実験群および実験食組成

動物実験は実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号)を遵守し実施した。

実験 1 実験には、清水実験動物より購入した 7 週齢の ddY 系雌性マウスを使用した。マウスは 5 群に分け、各群 3 匹をステンレスケージに収容した。動物飼育室は明暗周期 12 時間(8:00~20:00 点灯)、室温 24±2°C、湿度 50±10%で管理した。また各実験食は 13 日間自由摂取させた。

実験群として以下の 5 群を設けた。すなわち、

20%カゼイン食(コントロール食)を与えた群をコントロール群 1 (Con-1)、コントロール食中のコーンスターチ 10%を *R. glutinis* に置き換えた食事を与えた群を *R. glutinis* 群 (Rho)、同じくコントロール食中のコーンスターチ 10%を *H. anomala* に置き換えた食餌を与えた群を *H. anomala* 群 (Han)、コントロール食中の 10%を *R. glutinis* と *H. anomala* の混合試料に置き換えた食餌を与えた群を混合酵母群 1 (Mix-1) とした。さらにコントロール食を与えていた群に実験開始 14 日目に lipopolysaccharide (LPS) (Difco Laboratories) を腹腔内注射 (0.4 mg/kg 体重) し、マクロファージを活性化させこれをポジティブコントロール群 (Posi.) とした。

実験開始 15 日目にすべての群のマウスをエーテル麻酔下頸椎脱臼により屠殺し、定法に従って無菌的に採取した腹腔マクロファージを用いて、貪食能とカテプシン活性、および NO 産生能を測定した。

実験 2 7 週齢の ddY 系雌性マウスを 3 群に分け、各群 4 匹をステンレスケージに収容した。動物飼育室は明暗周期 12 時間 (8:00~20:00 点灯)、室温 24±2°C、湿度 50±10%で管理した。

実験 1 で用いたコントロール食を与えた群をコントロール群-2 (Con-2)、コントロール食中のコーンスターチ 2%をクレチールに置き換えた食事をクレチール投与食 (Kre)、コントロール食中のコーンスターチ 10%を *R. glutinis* と *H. anomala* の酵母混合物に置き換えた食事を与えた群を酵母混合群-2 (Mix-2) とした。各実験食は 13 日間自由摂取させた。これら実験食の組成を Table 1 に示した。

実験開始から 11 日目に滅菌 10%プロテオースペプトン (Difco Laboratories) 水溶液 (1.5 ml/mouse) を腹腔内注射した。

15 日目に屠殺したあと、無菌的に腹腔マクロファージを採取し貪食能を蛍光ビーズ (Molecular Probes 社) を用いて測定した。

Table 1. 飼料組成 (重量%)

	コントロール食	クレチール食	酵母食
ミルクカゼイン	24.5	24.5	24.5
コーンスターチ	45.5	43.5	35.5
グラニュー糖	10.0	10.0	10.0
コーンオイル	6.0	6.0	6.0
アゼビル(結晶セルロース)	3.0	3.0	3.0
KCフロック(セルロースパウダー)	2.0	2.0	2.0
オカノール(α 化デンプン)	1.0	1.0	1.0
ビタミンMix(クレア精製飼料用)	1.0	1.0	1.0
ミネラルMix(クレア精製飼料用)	7.0	7.0	7.0
クレチール(カワラタケ由来細胞壁多糖類)	0.0	2.0	0.0
酵母	0.0	0.0	10.0
合計	100.0	100.0	100.0

2.3. 腹腔マクロファージの採取および処理

前処理として、腹腔マクロファージ採取の3~4日前に滅菌した10%プロテオースペプトン水溶液(1.5 ml/mouse)をマウスに腹腔内投与した。マウスを屠殺後、無菌的に採取した腹腔マクロファージを各群ごとに回収し、RPMI-FCS (RPMI1640 培地に10% fetal calf serum (FCS)、100 μ g/ml ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したもの)で遠心洗浄(1000 rpm, 5 min, 4°C)した[9]。その後、血球算定盤で細胞数を 2×10^6 cells/mlに調整した。細胞は各種免疫活性を測定するまで氷中に保存した。

2.4. 食能の測定

96穴マイクロプレート(IWAKI)に 2×10^6 cells/mlに調整したマクロファージを200 μ l/wellずつ分注し、二酸化炭素ガス(CO₂)インキュベーター(CO₂濃度95%)を用い37°Cで1~2時間培養した。培養後、培地を除去しBODIPY ビーズ (Bio Particles BODIPY FL Particles and Opsonizing Reagent; Molecular Probe社)を100 μ l/wellずつ加え、再度CO₂インキュベーターで1~2時間培養した。BODIPY ビーズを除去したところに0.4%トリパンブルーを100 μ l/wellずつ加え、蛍光強度(励起505 nm / 蛍光513 nm)を蛍光イメージスキャナ Typhoon 8600 (アマシャムバイオサイエン

ス)で測定した。マクロファージの食能は蛍光強度を指標にして示した。

2.5. カテプシン活性の測定

リソソームのプロテアーゼであるカテプシンLおよびBの活性は、Moriyamaらの方法[10]に従った。すなわち、96穴マイクロプレートに 2×10^6 cells/mlに調整したマクロファージを200 μ l/wellずつ加え、CO₂インキュベーターで1時間培養した。その後、LPS (10 μ g/ml)を添加したRPMI-FCSに培地を交換し、さらに24時間培養した。培養後の培地はNO産生能などの測定のためにサンプルとして回収し、測定時まで-80°Cで凍結保存した。培地を回収した後、0.5% Triton X-100を300 μ l/wellずつ加え15分間振とうして細胞を破碎したものをサンプルとして回収し、測定時まで-80°Cで凍結保存した。カテプシンLおよびBの活性測定用の蛍光基質ペプチド、benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginine-7-amino-4-methylcoumarine (zFR-AMC) (10 mM、ペプチド研究所) DMSO溶液1 μ l、1M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5) 20 μ l、0.1 M dithiothreitol (DTT) 2 μ lおよび0.1 M EDTA 2 μ lを混合し水で150 μ lに調製した溶液に0.5% Triton X-100で段階的に希釈した上述のサンプルを加え総反応液量を200 μ lとした。これを37°Cで30分間インキュベートした。イ

ンキュベート終了後すぐにサンプルを氷で冷やし、停止液(0.25 g 酢酸ナトリウムに 4.375 ml の 1M 酢酸を加え蒸留水で 25 ml に調製したもの) 100 μ l を添加して良く混和した。この溶液をブラックタイタープレートに 200 μ l ずつ加え、蛍光強度 (励起 355 nm / 蛍光 460 nm) をマルチラベルカウンターWallac 1420 ARVO SX (Perkin elmer) で測定した。マクロファージのカテプシンLおよびB活性は蛍光強度から生成した 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の濃度を求め $\text{pmol}/4 \times 10^4 \text{ cells}/\text{min}$ で示した[10]。

2.6. NO 産生能の測定

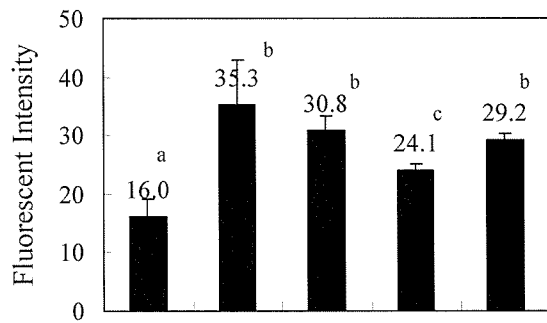
上記貪食能の測定で得た培地をサンプルとして用いた。またスタンダードとして 0.5, 10, 20, 50, 100 μ M の亜硝酸ナトリウム水溶液を用いた。サンプルおよびスタンダードを 96 穴マイクロプレートに 100 μ l/well ずつ加えた。さらに Griess 試薬を 100 μ l/well 加えて室温で 10 分間反応させ、550 nm の吸光度をマルチラベルカウンターWallac 1420 ARVO SX で測定した。NO 産生能は吸光度から求めた亜硝酸の生成量 ($\mu\text{mol}/2 \times 10^5 \text{ cells}$) で示した[11]。

3. 結果

実験 1

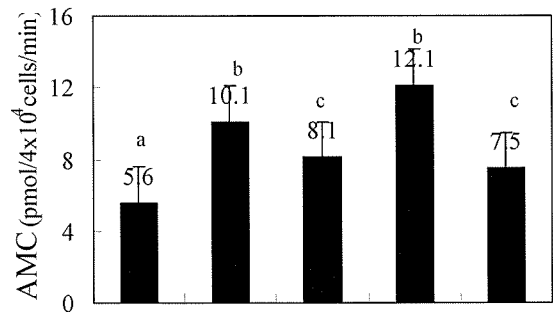
コントロール食、*R. glutinis* 食、*H. anomala* 食、*R. glutinis* と *H. anomala* の混合物食およびコントロール食を与えた群に LPS を腹腔内注射したマウスのマクロファージの貪食能、カテプシン活性および NO 産生量をそれぞれ Figure 1, 2, 3 に示した。貪食能は、*R. glutinis* 食、*H. anomala* 食、*R. glutinis* と *H. anomala* の混合物食を与えた群はともにコントロール食を与えた群と比較してそれぞれ 2.2 倍、1.9 倍、1.5 倍と有意に上昇した (Figure 1)。カテプシン活性も *R. glutinis* 食、*H. anomala* 食、混合物食でともにコントロール食群と比較してそれぞ

れ 1.8 倍、1.4 倍、2.2 倍と有意に上昇した (Figure 2)。さらに NO 産生量も、*R. glutinis* 食、*H. anomala* 食、混合物食ではともにコントロール群と比較してそれぞれ 1.7 倍、1.9 倍、2.7 倍と有意に増加した (Figure 3)。これらの酵母投与群のマクロファージの貪食能、カテプシ



Con-1 Rho Han Mix-1 Posi.

Figure 1. Effects of yeast supplementation on phagocytosis activity of macrophage. Con-1; control-1, Rho; supplementation of *Rhodotorula glutinis*, Han; supplementation of *Hansenula anomala*, Mix-1; supplementation of mixture of *Rhodotorula glutinis* and *Hansenula anomala*, Posi.; treatment with LPS. Values are means \pm SD, n = 3. Different letters, a, b, and c, indicate significant differences ($p < 0.05$).



Con-1 Rho Han Mix-1 Posi.

Figure 2. Effects of yeast supplementation on cathepsin activity of macrophage. Con-1; control-1, Rho; supplementation of *Rhodotorula glutinis*, Han; supplementation of *Hansenula anomala*, Mix-1; supplementation of mixture of *Rhodotorula glutinis* and *Hansenula anomala*, Posi.; treatment with LPS, AMC; 7-amino-4-methylcoumarin. Values are means \pm SD, n = 3. Different letters, a, b, and c, indicate significant differences ($p < 0.05$).

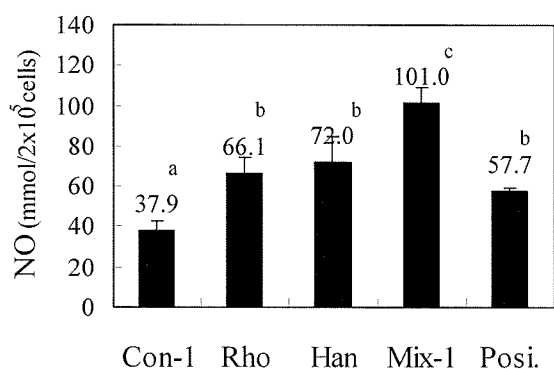


Figure 3. Effects of yeast supplementation on nitric oxide production of macrophage. Con-1; control-1, Rho; supplementation of *Rhodotorula glutinis*, Han; supplementation of *Hansenula anomala*, Mix-1; supplementation of mixture of *Rhodotorula glutinis* and *Hansenula anomala*, Posi.; treatment with LPS. Values are means \pm SD, n = 3. Different letters, a, b, and c, indicate significant differences ($p < 0.05$).

ン活性および NO 産生量は LPS を腹腔内注射して活性化されたポジティブコントロール群のマクロファージのそれらと同等もしくはそれを上回る結果を与えた。

実験 2

R. glutinis と *H. anomala* の混合物の免疫賦活活性を市販の免疫賦活剤であるクレチールと比較した。Figure 4 に示すように混合酵母を与えたマウスのマクロファージはクレチールを与えたものと同様の食食能を示した。

4. 考察

本研究では経口投与した酵母 *R. glutinis*、*H. amonala* とその混合物の免疫賦活効果を検討するため、マウスを用いてマクロファージの初期防御機能の指標として食食能、細胞内消化の指標としてカテプシン活性、殺菌活性の指標として NO 産生量を測定した。その結果、*R. glutinis*、*H. amonala* とこれらの混合物を添加した食餌を与えたマウスではマクロファージの食食能、カテプシン活性、NO 産生量はコン

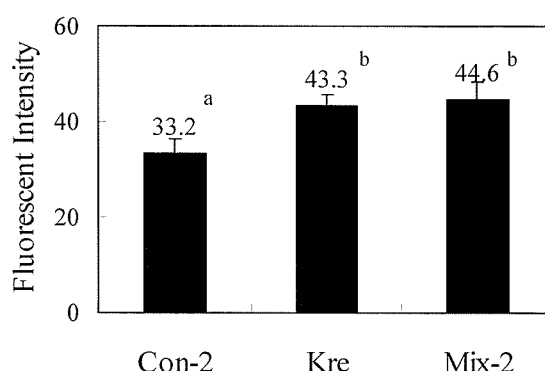


Figure 4. Effects of yeast supplementation on phagocytosis activity of macrophage. Con-2; control-2, Kre; administration of Krezyl, Mix-2; supplementation of mixture of *Rhodotorula glutinis* and *Hansenula anomala*. Values are means \pm SD, n = 4. Different letters, a and b, indicate significant differences ($p < 0.05$).

トロール群のそれらよりも 1.5 倍から 2.7 倍と有意に高値を示した。これらの酵母投与群のマクロファージは LPS を腹腔に投与して活性化したマクロファージと比較しても、同等もしくはそれ以上の活性を示した。また、*R. glutinis* と *H. amonala* の混合物は免疫賦活剤であるクレチールと比較しても遜色のない食食能を示した。Koh ら [2] は *S. cerevisiae* の熱水抽出物、米糠発酵物の熱水抽出物および LPS をマウスに与えマクロファージや小腸の免疫活性に与える影響を検討している。その結果コントロール区に比べこれらの投与区では免疫活性が 1.8 倍から 2 倍に上昇した事を報告している。今回の結果から *R. glutinis* や *H. amonala* も *S. cerevisiae* や米糠発酵物とほぼ同等の免疫活性を持つ事が認められた。これらの結果、酵母を経口的に投与することで、マクロファージの食食機能が活性化され、さらに殺菌活性も増強する事が示された。

アユやマダイなどの魚類においても同様にこれらの酵母を摂取することにより食食細胞の活性が向上し、冷水病菌やビブリオ菌の感染に対する抵抗性が向上するものと考えられる。

現在魚類の免疫活性に対する効果を検討している。

酵母の細胞壁の主要構成成分である β -1,3-グルカン免疫担当細胞の中でも特にマクロファージを刺激し、活性化することにより免疫機能を向上させる事が知られている [1-3]。著者らは *H. anomala* の細胞壁多糖について検討し β -1,6-グルコース分岐鎖を持つ β -1,3-グルカンが含まれる事をすでに報告している [3]。これらが免疫賦活効果に寄与すると考えられ活性成分の分離・同定を試みている。

S. cerevisiae については多くの免疫賦活機能に関する研究がなされ、すでに食品や水畜産分野で免疫賦活剤として応用されている [1-3]。

一方、*R. glutinus* や *H. anomala* は *S. cerevisiae* が資化することができない galacturonic acid を資化することが可能であることから、これらの酵母の培養には galacturonic acid を含む柑橘類の搾汁滓などの食品加工廃棄物 (バイオマス) を利用できる利点があり、新たな免疫活性を持つ酵母の量産が期待できる。

文献

1. 石脇尚武、酵母の多様な機能、シーエムシー pp228-238. 1997年 東京.
2. Koh, J. H., Yu, K. W., Suh, H. J., Biological activities of *Saccharomyces cerevisiae* and fermented rice as feed additives, *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 47-51 (2002).
3. Robertsen, R., Rorstad, G., Engstad, R., Raa, J., Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls, *J. Fish Diseases*, 13, 391-400 (1990).
4. Otaka, K., Hidaka, K., Nakajima, A., Maoka, T., Characterization and application of sugar components produced by autolysis of *Hansenula anomala* SB1020, *J. Biol. Macromol.* 2, 64-74 (2004).
5. 秋山真一、滝井健二、眞岡孝至、中川雅雄、北野尚男、熊井英水、酵母タンパク質に対するマダいの嗜好性と利用、*SUISANZOUHOKU*, 49, 47-52 (2001).
6. Takii, K., Akiyama, S., Maoka, T., Hidaka, K., Otaka, K., Seoka, M., Kumai, H., Evaluation of Dietary Yeast Autolysates from Red Sea Bream, *Pagrus major*, *SUISANZOUHOKU*, 52, 387-394 (2004).
7. 大高洽堂、滝井健二、伏木省三、眞岡孝至、日高久美、中島敦子、公開特許広報 2003-47411.
8. 眞岡孝至、滝井健二、石丸克也、大高洽堂、日高久美、谷本文男、佐野光彦、公開特許広報、2004-971686.
9. 篠原和毅、上野川修一、鈴木健夫、食品機能研究法、2000、光琳、東京.
10. Moriyama, T., Wada, M., Urade, R., Kito, M., Katamura, N., Ogawa, T., Simoni, R. D., 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is sterol-dependently cleaved by cathepsin L-type cysteine protease in the isolated endoplasmic reticulum, *Arch. Biochem. Biophys.*, 386, 205-212 (2001).
11. Matsuda, H., Kageura, T., Morikawa, T., Toguchida, I., Harumura, S., Yoshikawa, M., Effect of stilbene constituents from Phubarbon nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophage, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 323-327 (2000).

Effects of dietary supplementation of the yeasts, *Rhodotorula glutinis* and *Hansenula anomala*, on enhancement of immunological activity of mice

Satomi Akagiri,^{1,2} Kumi Hidaka,^{1,3} Takashi Moaka,^{1,3,*} Kodo Otaka,¹ Fumio Tanimoto,^{1,3}
Tatsuya Moriyama,^{4,5} and Tadashi Ogawa^{4,6}

¹ Sun Biorex Co. Ltd.

² Preset address: Kyoto Prefecture University of Medicine

³ Preset address: Research Institute of Production Development

⁴ Graduate School of Agriculture, Kyoto University

⁵ Preset address: Department of Agriculture, Kinki University

⁶ Preset address: Kansai University of Welfare Sciences

* Correspondence should be addressed. Tel.: +81-75-703-3810, Fax: +81-75-703-3811,

E-mail: maoka@mbox.kyoto-inet.or.jp

(Received December 26, 2005; Accepted February 5, 2006)

ABSTRACT

The effects of the dietary supplementation of yeasts, *Rhodotorula glutinis* and *Hansenula anomala* on the enhancement of immunological activity were determined by measuring macrophage phagocytosis activity using mice. In the yeast supplementation groups, macrophage activities of phagocytosis, cathepsin activity, and nitric oxide production were increased. All the activities determined were enhanced by 1.5-2.7 fold against those of the control mice, suggesting that the supplementation of yeasts, *R. glutinis* and *H. anomala* to diets may be effective as immunopotentiators.

Key words: *Rhodotorula glutinis*, *Hansenula anomala*, immunological activity, mouse, macrophage

責任編集者：織田昌幸