

牡蠣肉エキス添加により認められた乳酸菌 ATCC 8014 株の増殖促進効果

根 來 宗 孝^{1)†}, 湯 浅 正 洋²⁾, 森 本 雅 子¹⁾, 渡 邊 敏 明¹⁾, 石 田 達 也³⁾,
松 井 博 之³⁾, 松 田 芳 和³⁾

(¹⁾大阪青山大学健康科学部健康栄養学科*, (²⁾神戸大学大学院人間発達環境学研究科,

³⁾日本クリニック株式会社中央研究所***)

(受付 2024 年 9 月 2 日, 受理 2024 年 10 月 9 日)

The proliferative effect of the oyster powder extract on the *Lactobacillus plantarum* strain ATCC8014

Munetaka NEGORO^{1)†}, Masahiro YUASA²⁾, Masako MORIMOTO¹⁾, Toshiaki WATANABE¹⁾, Tatsuya ISHIDA³⁾,
Hiroyuki MATSUI³⁾, Yoshikazu MATSUDA³⁾

¹⁾Department of Health and Nutrition, Faculty of Health Science, Osaka Aoyama University

²⁾Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

³⁾Central Research Institute, Japan Clinic Co, Ltd.

Summary

Oyster (*Crassostrea gigas*) extract, which is obtained by extracting nutritional and functional components from raw oysters, contains zinc, glycogen, taurine, and so on. The extract is useful as a raw material for health foods. Oyster extracts harvested from oysters in different production areas by adjusting methods devised by each producer have a protective effect on the immune regulation and intestinal microflora. In particular, the effects of orally administered oyster extract on the composition ratio of intestinal lactic acid bacteria were up regulated in the cecal and fecal microflora. Furthermore, it has also been reported that oral administration of *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 strain in rats may have a certain protective effect on the intestine by increasing the intestinal barrier function and preventing acrylamide from entering the tissues. Therefore, in this study, we used the lactic acid bacteria *L. plantarum* ATCC 8014 strain to examine the effect on lactic acid bacteria by directly adding oyster extract (OE) extracted from raw oysters to a nutrient medium.

When OE was added to the media, no significant difference was observed in either the 1.0% or 0.5% OE addition group, compared to the control group after 1.5 hours of culture. Rather, it showed a tendency of suppression. However, after three hours of culture, the growth-promoting effect abruptly appeared, and after six hours of culture, the growth-promoting effect of 1.0% and 0.5% OE containing groups were 114% and 113%, respectively, compared to the control group. In particular, in the 0.5% OE containing group, after culturing for nine hours and 12 hours, significant growth-promoting effects of 110% and 107% ($p < 0.05$), respectively, were observed compared to the control group. By the time 24 hours had passed, the changes compared to the control group had become 100% and 103% in the 1.0% and 0.5% OE added groups, respectively and the proliferation promoting effect had diminished. It was suggested that such a transient lactic acid bacteria growth-promoting effect caused by the consumption and depletion of the growth-promoting factor contained in the OE after six hours of culture.

はじめに

牡蠣 (*Crassostrea gigas*) から栄養成分を抽出した牡蠣

肉エキスは亜鉛, グリコーゲンおよびタウリンなどを豊富に含むため, 健康食品の原料として有用である。異なる産地の牡蠣から生産者毎に工夫された調製方法で得られた牡

*所在地: 大阪府箕面市新稲2-11-1 (〒562-8580)

**所在地: 神戸市灘区鶴甲3-11 (〒657-8501)

***所在地: 京都市北区大將軍西町1 (〒603-8331)

†連絡先: E-mail: m-negoro@osaka-aoyama.ac.jp (根來)

蠣肉エキスには、生体の免疫調節や腸の保護効果¹⁾、抗酸化効果²⁾、血圧降下効果³⁾、腫瘍の抑制効果⁴⁾、学習と記憶の改善効果⁵⁾、免疫力の強化⁶⁾など、多様な生物活性などが報告されている。また、マウスに牡蠣肉エキスを自由摂取させたとき、盲腸内および糞中細菌叢の変化を惹起することや^{7,8)}、牡蠣由来の多糖類を経口投与することでアルコール性肝障害を予防し、腸内の *Lactobacillus reuteri* を大幅に増加させることも報告されている⁹⁾。この様な *Lactobacillus* 属の優位性に関する報告がなされるなかで、いくつかの研究では、*Lactobacillus plantarum* の機能性が検討されている。In vitro 試験では、*Lactobacillus plantarum* は抗酸化活性を示し¹⁰⁾、動物実験では、*Lactobacillus plantarum* は腎臓および心臓の抗酸化状態を高めるだけでなく、ラット血液中の抗酸化酵素の活性を高め、個体レベルで抗酸化能を高めることが明らかされている^{11,12)}。20代女性皮膚由来の *Lactobacillus plantarum* から分泌された細胞外小胞 (LpEV) が単離されており、この LpEV が臨床試験においてシワ形成と色素沈着を抑制することも報告されている¹³⁾。さらにラットに *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 株を経口投与すると、腸のバリア機能を高め、アクリルアミドが体内に入るのを防ぐという、腸に対する一定の保護効果を有することも報告されている¹⁴⁾。

そこで本研究では乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 株を使用して、生牡蠣から抽出した牡蠣肉エキス (OE) を直接栄養培地に添加した場合に、乳酸菌の増殖にどのような効果をもたらされるのか検討を行った。

材料および方法

1. 牡蠣肉エキスの調製

生牡蠣を熱水で抽出し、残渣をろ過で除去した。得られた抽出液にエタノールを添加し、低分子画分と高分子画分に分けた。生じた低分子画分と高分子画分を、ある一定の割合で合一後、ドラム乾燥機で乾燥させた。牡蠣肉エキスの製法のフローチャートを (Fig. 1) に示す。最終的に得られた粉末を OE として乳酸菌の培養時に供試した。OE は、日本クリニック株式会社 (京都) より供与された。

2. 牡蠣肉エキス成分の分析

OE の栄養成分は、日本食品分析センター (東京, 日本) に依頼して測定した。測定項目は、水分、炭水化物、粗脂肪、粗タンパク質、粗灰分、塩化ナトリウム、グリコーゲンを含む7項目である。なお抽出前の栄養成分と OE を比較するため、日本食品標準成分表 2020 年版における生牡蠣の栄養成分量を、参考のために併記した (Table 1)。

3. 乳酸菌の培養

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 株を完全栄養培地 (MRS 培地: Fluka Analytical 社製, Darmstadt, Germany) で培養した。OE 粉末 0.15 g を生理食塩水 750 μ L に溶解後、15000 rpm \times 10 分間遠心分離し、得られた上清を 0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌し、完全栄養培地に最終濃度 0.5% または 1.0% になるように加え、乳酸菌の増殖を検討した。乳酸菌の増殖はマイクロプレートリーダーのカイネティック測定プログラム (SF6: コロナ

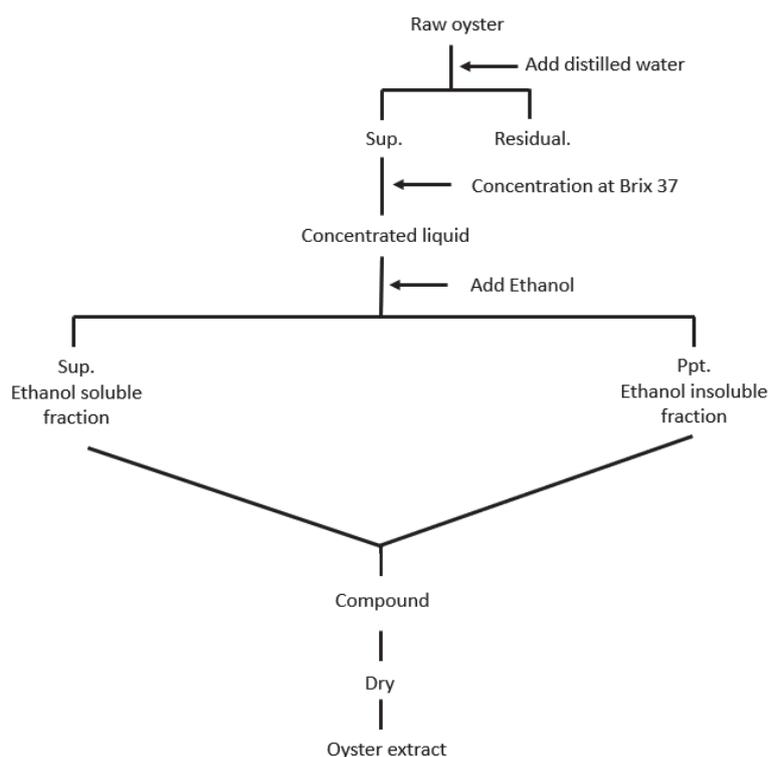


Fig. 1. The extraction flow chart of the oyster extract from the raw oyster.

Table 1. Comparison of the composition of the raw oyster and the oyster extract.

	Raw oyster*	Oyster extract
Moisture	85.0 g	3.9 g
Carbohydrate	4.9g	50.6 g
Lipid	2.2 g	2.0 g
Protein	6.9 g	28.1 g
Ash	2.1 g	15.4 g
NaCl	1.17 g	9.4 g
Glycogen	1.46 g	34.5 g

Oyster extract was extracted by Japan Clinic Co., Ltd. (Kyoto, Japan).

Composition of constituents were shown per 100 g, respectively.

*Values of raw oyster composition were referred from the standard tables of food composition in Japan - 2020.

電気株式会社, 茨城県) を用いて, 室温, OD 600 nm で吸光度を経時的に測定した。

4. 統計処理

牡蠣肉エキスを培地に添加すると, 添加量に依存して吸光度の増加が認められたため, コントロール培地を含め, 測定 0 時間の吸光度で補正を行った。これらの測定値の群間比較は, 統計アプリケーション (Statcel 4: オーエムエス出版, 東京都) を用いた一元配置分散分析と, Scheffe による多重比較検定により実施した。

結果と考察

生牡蠣 (瀬戸内産) から OE を Fig.1 の製法に従って抽出した。原料である生牡蠣および最終的な抽出物となる OE の成分組成を Table 1 に示した。生牡蠣 (栄養成分)¹⁵⁾ と比較すると OE では, 粗脂肪以外の各種栄養成分は増加した。水分は生牡蠣では 85.0 g を占めているが, OE では 3.9 g と十分に乾燥しており保存や輸送などに適する性状を兼ね備えている。また OE 中のエネルギー産生栄養素は生牡蠣と比較すると炭水化物 10.3 倍, 粗脂肪 0.9 倍, 粗タンパク質 4.1 倍となり, 粗灰分・塩化ナトリウムではそれぞれ 7.3 倍・8.0 倍に濃縮された。特に OE 中のグリコーゲンは生牡蠣の 1.46 g から 23.6 倍の 34.5 g まで高濃度に濃縮されていた。

牡蠣肉エキスには, 腸内細菌叢に対するプレバイオティクス効果に関心が寄せられるようになった。本研究に供試した OE を実験動物に投与することによる糞中の *Lactobacillus* 属の構成比率の著増する報告がなされ, 同時に糞中短鎖脂肪酸組成の変化も確認されている^{7,8)}。

一方, 牡蠣肉エキスを乳酸菌培養時に直接添加した影響についてはこれまでのところ著者らが知りうる範囲では確認できなかった。そこで *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 株を使用して OE の乳酸菌増殖能に与える影響について検討した結果を Fig.2 に示した。OE を添加した場合, 培養 1.5 時間ではコントロール群に対して, 1.0% および

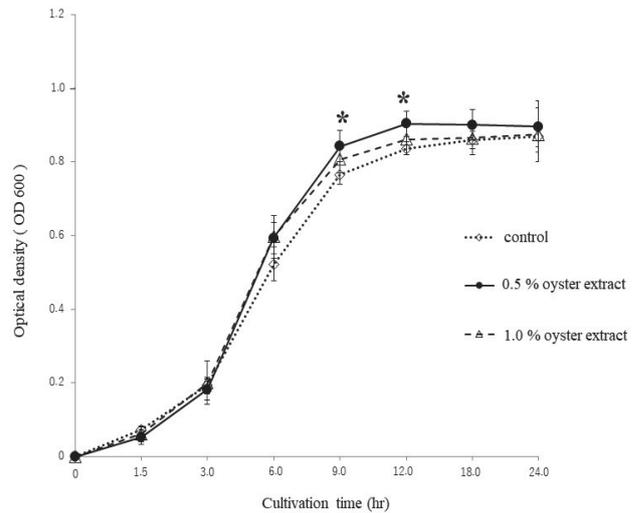


Fig. 2. Exponential growth curves for *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 strain. The cells were grown in MRS media in the absence (control: ◇) and presence of two oyster extract concentrations (0.5%: ● and 1.0%: △). Each point represents the mean of five determinations. Error bars are SD. Significances ($p < 0.05$, Scheffe's F test) are expressed as an asterisk.

0.5% OE 添加群において, 供試菌の増殖は抑制傾向を示した。しかしながら培養 3 時間以降から急激に増殖促進効果が現れ, 培養 6 時間ではコントロール群に対して, 1.0% および 0.5% OE 添加群ではそれぞれ 114% および 113% の増殖促進効果を認めた。特に 0.5% OE 添加群では培養 9 時間および培養 12 時間において, コントロール群に対して, それぞれ 110% および 107% の有意 ($p < 0.05$) な増殖促進効果を認めた。それ以降の培養 24 時間に至る頃にはコントロール群に対する変化は 1.0% および 0.5% OE 添加群ではそれぞれ 100% および 103% となり増殖促進効果は減衰した。このような一過性の乳酸菌増殖促進効果は, OE に含まれる増殖促進因子が培養 6 時間以降消費され枯渇した可能性が考えられる。これまで, フラクトオリゴ糖が *in vitro* で *Lactobacillus plantarum* ATCC14917 株に対して最大の増殖効果を有することが報告¹⁶⁾ されており, 今後 OE に含まれるオリゴ糖の種類や含有量について解析する必要がある。また, 合成したグリコーゲンをラットに給餌すると糞中乳酸菌の割合が増加することも報告されている¹⁷⁾。

今後 OE に含まれる乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 株増殖促進因子を含む有用物質を特定するためにメタボローム解析技術による内容物の一斉分析を実施するとともに, 特に本研究に使用した OE から抽出したグリコーゲンやオリゴ糖の乳酸菌増殖への関与について検討したいと考えている。

利益相反

本論文の発表に関して, 申告すべき COI 状態にはないが, 著者に含まれる石田, 松井, 松田は牡蠣肉エキス粉末

を調製した日本クリニックに所属している。

文 献

- 1) Chen H, Zheng H, Li T, Jiang Q, Liu S, Zhou X, Ding Y, Xiang X (2022) Protective effect of oyster peptides derived from *Crassostrea gigas* on intestinal oxidative damage induced by cyclophosphamide in mice mediated through Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Front Nutr* 9: 888960, doi: 10.3389/fnut.2022.888960.
- 2) Miao J, Liao W, Kang M, Jia Y, Wang Q, Duan S, Xiao S, Cao Y, Ji H (2018) Anti-fatigue and anti-oxidant activities of oyster (*Ostrea rivularis*) hydrolysate prepared by compound protease. *Food Funct* 9: 6577–6585.
- 3) Shiozaki K, Shiozaki M, Masuda J, Yamauchi A, Ohwada S, Nakano T, Yamaguchi T, Saito T, Muramoto K, Sato M (2010) Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Fish Sci* 76: 865–872.
- 4) Umayaparvathi S, Arumugam M, Meenakshi S, Dräger G, Kirschning A, Balasubramanian T (2014) Purification and characterization of antioxidant peptides from oyster (*Saccostrea cucullata*) hydrolysate and the anticancer activity of hydrolysate on human colon cancer cell lines. *Int J Pept Res Ther* 20: 231–243.
- 5) Wang X, Yu H, Xing R, Liu S, Chen X, Li P (2018) Effect and mechanism of oyster hydrolytic peptides on spatial learning and memory in mice. *RSC Adv* 8: 6125–6135.
- 6) Xiang XW, Zheng HZ, Wang R, Chen H, Xiao JX, Zheng B, Liu SL, Ding YT (2021) Ameliorative effects of peptides derived from oyster (*Crassostrea gigas*) on immunomodulatory function and gut microbiota structure in cyclophosphamide-treated mice. *Mar Drugs* 19 (8): 456, doi: 10.3390/md19080456.
- 7) 池田祐生, 細見亮太, 松田芳和, 新井博文, 下埜敬紀, 神田靖士, 西山利正, 吉田宗弘, 福永健治 (2018) カキ肉エキスの給餌によるラットの盲腸内細菌叢の変化. 微量栄養素研究 35 : 41–46.
- 8) 中村潤平, 池田祐生, 細見亮太, 石田達也, 松井博之, 松田芳和, 下埜敬紀, 神田靖士, 西山利正, 吉田宗弘, 福永健治 (2019) カキ肉エキスの給餌がマウスの糞中細菌叢および短鎖脂肪酸組成に及ぼす影響. 微量栄養素研究 36 : 21–28.
- 9) Jiang S, Ma Y, Li Y, Liu R, Zeng M (2021) Mediation of the microbiome-gut axis by oyster (*Crassostrea gigas*) polysaccharides: A possible protective role in alcoholic liver injury. *Int J Biol Macromol* 182: 968–976.
- 10) Lin XN, Xia YJ, Wang GQ, Yang YJ, Xiong ZQ, Lv F, Zhou W, Ai LZ (2018) Lactic acid bacteria with antioxidant activities alleviating oxidized oil induced hepatic injury in mice. *Front Microbiol* 9, 2684. doi: 10.3389/fmicb.2018.02684.
- 11) Korkmaz OA, Sadi G, Kocabas A, Yildirim OG, Sumlu E, Koca HB, Nalbantoglu B, Pektas MB, Akar F (2019) *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* modulate renal antioxidant status in a rat model of fructose-induced metabolic syndrome. *Archiv Biol Sci* 71(2): 265–273.
- 12) Sefidgari-Abrasi S, Karimi P, Roshangar L, Morsheidi M, Bavafa-Valenia K, Saghafi-Asl M, Mohiti S, Rahimiyan-Heravan M (2020) *Lactobacillus plantarum* and inulin: therapeutic agents to enhance cardiac ob receptor expression and suppress cardiac apoptosis in type 2 diabetic rats. *J Diabetes Res*: 4745389, doi: 10.1155/2020/4745389.
- 13) Jo CS, Myung CH, Yoon YC, Ahn BH, Min JW, Seo WS, Lee DH, Kang HC, Heo YH, Choi H, Hong IK, Hwang JS (2022) The effect of *Lactobacillus plantarum* extracellular vesicles from Korean Women in their 20 s on skin aging. *Curr Issues Mol Biol* 44(2):526–540.
- 14) Zhao S, Zhao X, Liu Q, Jiang Y, Li Y, Feng W, Xu H, Shao M (2020) Protective effect of *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 on acrylamide-induced oxidative damage in rats. *Appl Biol Chem* 63, 43, <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00527-9>.
- 15) 文部科学省 (2020), 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂) https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html, (2022/1/7) .
- 16) Cao P, Wu L, Wu Z, Pan D, Zeng X, Guo Y, Lian L (2019) Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *J Dairy Sci* 102 (4): 2863–2872.
- 17) Furuyashiki T, Takata H, Kojima I, Kuriki T, Fukuda I, Ashida H (2011) Metabolic fate of orally administered enzymatically synthesized glycogen in rats. *Food Funct* 2(3–4): 183–189.