

# Lactobacillus bulgaricus産生多糖体の免疫機能調節作用

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者名	牧野,聖也 池上,秀二 狩野,宏 指原,紀宏 齋藤,忠夫 小田,宗宏
発行元	日本酪農科学会
巻/号	53巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 161-164
発行年月	2004年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 平成16年度日本酪農科学会シンポジウム講演内容

*Lactobacillus bulgaricus* 産生多糖体の免疫機能調節作用牧野聖也<sup>1</sup>, 池上秀二<sup>1</sup>, 狩野 宏<sup>1</sup>, 指原紀宏<sup>1</sup>, 齋藤忠夫<sup>2</sup>, 小田宗宏<sup>1</sup><sup>1</sup>明治乳業株式会社食機能科学研究所<sup>2</sup>東北大学大学院農学研究科・動物資源化学)Immunomodulatory effects of polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Seiya Makino, Shuji Ikegami, Hiroshi Kano, Toshihiro Sashihara, Tadao Saito and Munehiro Oda

<sup>1</sup>Food Science Institute, Meiji Dairies Co., Naruda 540, Odawara, Kanagawa 250-0862, Japan<sup>2</sup>Laboratory of Animal Products Chemistry, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Tsutsumidori Amamiyamachi 1-1, Aobaku, Sendai 981-8555, Japan)

## 1. はじめに

乳酸菌が菌体外に産生する多糖体 (EPS) は、発酵乳の離水防止に寄与したり、良好なテクスチャーを付与するなど、優れた物理的効果を発揮している<sup>1)</sup>。また、乳酸菌の免疫機能調節作用が近年注目を集める中、乳酸菌が産生する多糖体についての免疫賦活作用の報告がなされている<sup>2,3)</sup>。このような機能性をもった多糖体を産生する乳酸菌としては *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* が挙げられ、北欧にみられる粘性ヨーグルト：Villie などの製造に利用されている<sup>3)</sup>。一般的なヨーグルトのスターター菌である *Lactobacillus* (*L.*) *bulgaricus* の EPS については、その知見は少ないが、新しい機能性を見出すことができればその利用価値は非常に高い。そこで当社が保有する *Lactobacillus* 属乳酸菌より多糖体高産生菌を選択し、産生された EPS の免疫機能調節作用について IFN- $\gamma$  産生誘導活性および NK 活性増強作用を中心に評価を行った。また、活性を有す EPS を産生する乳酸菌については *S. thermophilus* と組み合わせて発酵乳を作製し、免疫機能調節作用を有する機能性食品としての可能性について検討を行った。

## 2. 多糖体高産生菌と精製多糖体

多糖体高産生菌として *L. helveticus* 806 株, *L. bulgaricus* T2038-5 株, *L. bulgaricus* OLL1073R-1 株の 3 菌株を供試した。それぞれ乳清のプロテアーゼ分解物を主体とする培地を用いて 37°C, 24 時間培養し、EPS の精製を行った。遠心分離により菌体を除去した後、冷エタノールにより EPS を沈殿物として回収した。これら EPS は DEAE-Sepharose カラムを使用することで、中

性多糖体 (NPS: neutral polysaccharide) を非吸着画分として、吸着した酸性多糖体 (APS: acidic polysaccharide) を NaCl グラジエント溶出画分として回収し、それぞれ Sephacryl S-400HR を用いてゲル濾過を行った。

精製の結果、それぞれの菌株より 1 種類ずつの NPS を得た。さらに *L. bulgaricus* OLL1073R-1 (以下 1073R-1 株) については APS が精製された。それぞれ TLC, HPLC を用いた構成糖分析の結果、NPS はグルコースとガラクトースを主体とする多糖体であった。一方、1073R-1 株 APS はゲルろ過により 2 種類に分離され、分子量 100 万以上の多糖体の構成糖はグルコース、ガラクトース、分子量のより小さな多糖体の構成糖はマンノースであった (Fig. 1)。こうして最終的に NPS3 種類, APS2 種類を凍結乾燥品として得た (Table 1)。

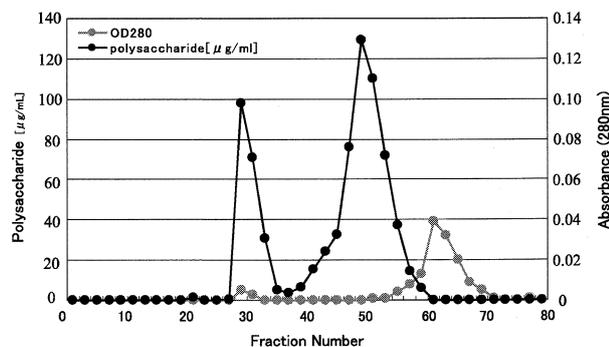


Fig. 1 Elution profile of *L. bulgaricus* OLL1073R-1 APS by gelfiltration chromatography with Sephacryl S-400HR. The eluate was monitored for protein at 280 nm and for sugar at 490 nm by phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method.

Table 1 Chemical composition of EPS from *Lactobacillus* strain used in this study.

Polysaccharide		Molar ratio			
		Glc	Gal	Man	Xyl
<i>L. helveticus</i> 806	NPS	1.93	1.00	—	—
<i>L. bulgaricus</i> T2038-5	NPS	1.00	1.27	0.12	0.07
<i>L. bulgaricus</i> OLL1073R-1	NPS	1.00	1.31	0.01	0.21
	APS1	1.00	1.25	—	—
	APS2	—	—	1.00	—

Glc: Glucose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Xyl: Xylose

### 3. 多糖体のマウス脾臓細胞に対する IFN- $\gamma$ 産生誘導活性

著者らは、各多糖体について免疫賦活、感染防御の指標として用いられる代表的な Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生誘導活性について、*in vitro* で評価を行った。

マウス C3H/HeJ (雄性, 8 週齢) より脾臓細胞を調製し、各多糖体を 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で溶解した RPMI1640 培地 (10% FCS 含有) を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 72 hr 培養を行った。そして、これら培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法を用いて測定した。その結果、1073R-1 株が産生する APS のうち分子量 100 万以上のグルコースとガラクトースを構成糖とする多糖体に顕著な IFN- $\gamma$  産生誘導活性が確認された (Fig. 2)。そこで、以降の実験ではこの多糖体に注目し、さらに検討を進めることにした。

### 4. 1073R-1 株 APS のマウスへの経口投与による NK 活性増強作用およびサイトカイン産生に与える影響

*in vitro* において脾臓細胞に対する IFN- $\gamma$  産生誘導活性を示した 1073R-1 株 APS について、マウスへの経口投与による免疫賦活作用の検討を行った。マウス BALB/c (雄性, 8 週齢) に対して APS を 5 mg/kg/day, 30 mg/kg/day の投与量で 3 週間強制経口投与を行った。投与期間終了後、それぞれのマウスより脾臓細胞を調製し NK 活性を測定した。NK 活性は、IFN- $\gamma$  などのサイトカインによって増強されウイルス感染防御や抗腫瘍活性の発現に重要であることが知られている<sup>4,5)</sup>。測定方法はエフェクター細胞である脾臓細胞とターゲット細胞である Yac-1 を 40 : 1 の比率で 37°C, 4 hr 反応させた後、死滅した Yac-1 をフローサイトメトリーを用いて検出した<sup>6)</sup>。その結果、多糖体の投与量に依存して NK 活性は上昇し、30 mg/kg/day の投与量ではコント

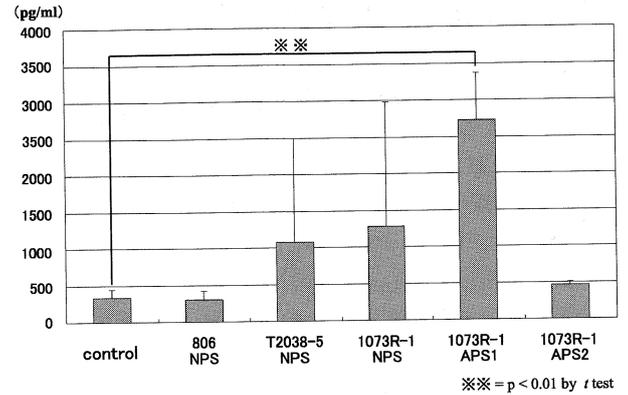


Fig. 2 Effect of EPS on IFN- $\gamma$  production by spleen cells.

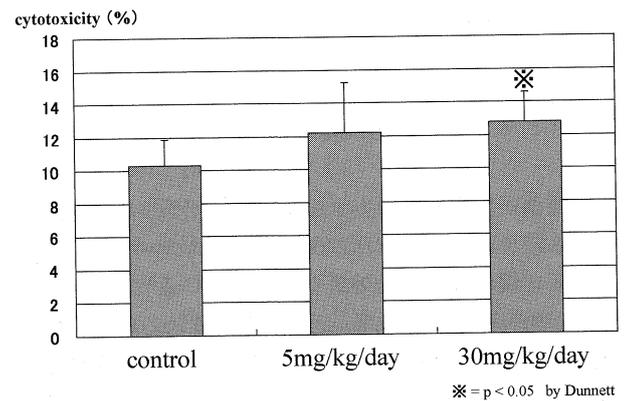


Fig. 3 Effect of oral administration of *L. bulgaricus* OLL1073R-1 APS on NK cell activity in spleen cells.

ロールである蒸留水投与に比べ、有意に高い値を示した (Fig. 3)。

また、同脾臓細胞の IFN- $\gamma$  の産生量についても検討を行った。脾臓細胞は、コンカナバリン A を 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度で含む RPMI1640 培地 (10% FCS 含有) を用いて 37°C, 72 hr 培養を行い、培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法で測定した。その結果、1073R-1 株 APS の投与により脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  産生量には若干の増加が見られた (Fig. 4)。さらに、このとき Th2 型サイトカインである IL-4 産生量については抑制されていることが確認された (Fig. 4)。つまり、APS の投与によって Th1 型 T 細胞の比率が増加し、Th2 型 T 細胞の比率が減少したと考えられる。

### 5. 1073R-1 株 APS のマウスへの経口投与が粘膜免疫に与える影響

腸管内に分泌される IgA は病原性微生物の腸管上皮細胞への付着・定着の阻止、毒素やウイルスの中和など

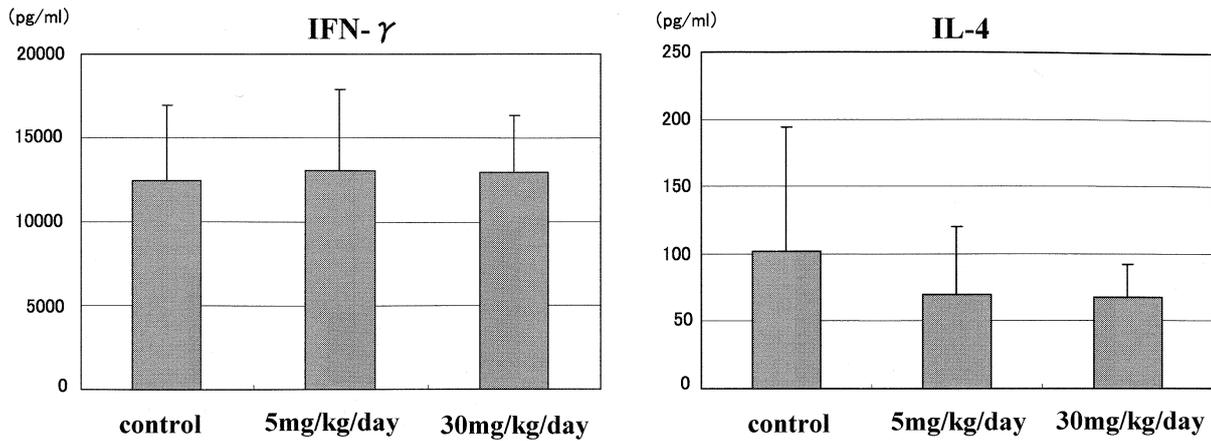


Fig. 4 Effect of oral administration of *L. bulgaricus* OLL1073R-1 APS on production of IFN- $\gamma$  and IL-4 by spleen cells.

感染防御に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで1073R-1株APSが腸管でのIgA産生量に与える影響について検討を行った。

マウスC57/BL6(雌性, 14週齢)に対してNPS, APSをそれぞれ50 mg/kg/dayの投与量で一日一回, 2週間強制経口投与を行った。APSについてはIFN- $\gamma$ 産生誘導活性を有する高分子量の多糖体, 活性を有さない低分子量の多糖体の混合物を用いた。投与期間終了後, マウス腸管より採取したパイエル板細胞を群ごとに集め, リポポリサッカライド1  $\mu$ g/mlを含むRPMI1640培地(10%FCS含有)で一週間培養を行った。培養終了後, 上清中の全IgA量をELISA法で測定した。

その結果, APS投与ではコントロールである蒸留水投与, NPS, 投与と比べIgA産生量の増加が見られた(Fig. 5)。このことから1073R-1 APSは腸管内でのIgA産生量を増加させるとともにパイエル板を介してNK活性上昇等の全身の免疫機能に影響を与える可能性が示唆された。

### 6. 発酵乳の経口投与による免疫機能調節作用

1073R-1株を使用した発酵乳についてマウスへの経口投与による評価を行った。発酵乳は1073R-1株と*S. thermophilus* OLS3059の組み合わせにより作製し, 対照発酵乳には*L. bulgaricus* OLL1256と*S. thermophilus* OLS3295を使用した。

マウスBALB/c(雌性, 11週齢)に対して1073R-1株使用発酵乳, 対照発酵乳, 未発酵乳の凍結乾燥物をそれぞれ200 mg/body/dayの投与量で一日一回, 4週間強制経口投与を行った。投与終了後, 脾臓細胞を調製し, NK活性を測定した。また, 多糖体の場合と同様に脾臓細胞からのIFN- $\gamma$ , IL-4産生量についても測定を行った。

その結果, 1073R-1株使用発酵乳投与では, コント

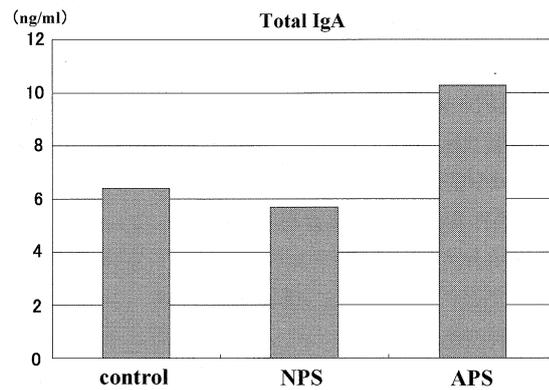


Fig. 5 Effect of oral administration of *L. bulgaricus* OLL1073R-1 NPS and APS on production of total IgA by Peyer's patch cells.

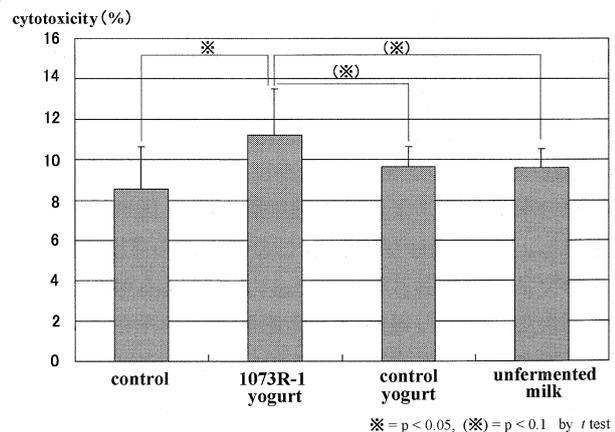


Fig. 6 Effect of oral administration of yogurt fermented by *L. bulgaricus* OLL1073R-1 and *S. thermophilus* OLS3059 on NK cell activity in spleen cells.

ロールの蒸留水投与に比べ, 有意に高いNK活性が確認された(Fig. 6)。しかしながら対照発酵乳, 未発酵乳については有意な上昇は認められなかった。さらに, 1073R-1株使用発酵乳投与では, 対照発酵乳投与に比

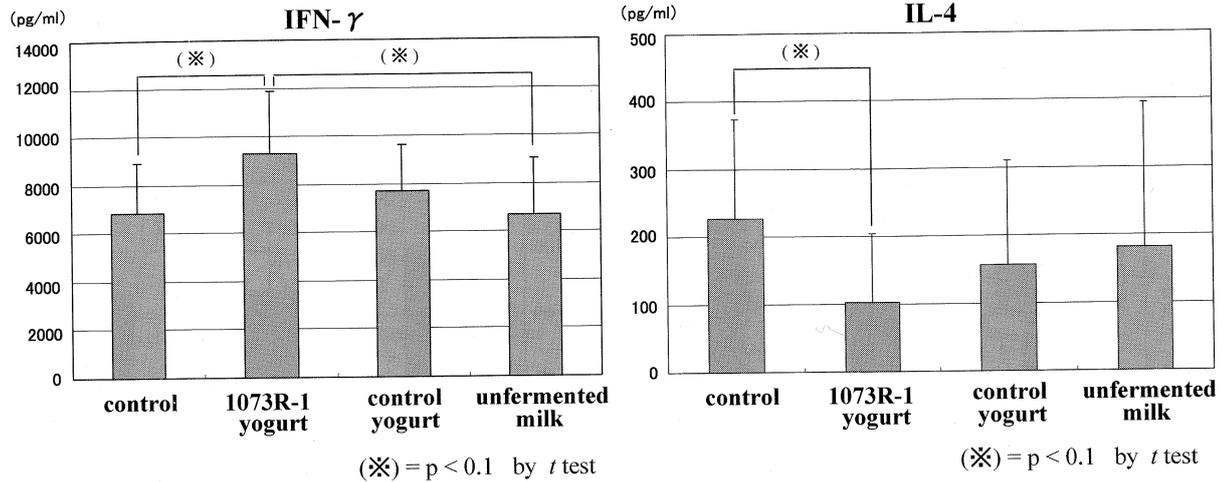


Fig. 7 Effect of oral administration of yogurt fermented by *L. bulgaricus* OLL1073R-1 and *S. thermophilus* OLS3059 on production of IFN- $\gamma$  and IL-4 by spleen cells.

べても IFN- $\gamma$  産生量の増加, IL-4 産生量の減少が顕著であった (Fig. 7)。以上の結果から, 1073R-1 使用発酵乳では 1073R-1 株が産生する多糖体そのものと同レベルの活性を有することが明らかとなった。

## 7. まとめ

*L. bulgaricus* OLL1073R-1 が産生する APS には, *in vitro* におけるマウス IFN- $\gamma$  産生誘導活性, マウスへの経口投与による脾臓細胞の NK 活性増強作用が確認された。また, 経口投与においてはマウスパリエル板細胞からの全 IgA 産生量の増加が見られたことより, 本多糖体はパリエル板を介して全身性の免疫機能に影響を及ぼしたと考えられた。さらに, 本多糖体の利用を目的として, *L. bulgaricus* OLL1073R-1 と *S. thermophilus* OLS3059 を使用した発酵乳を作製した。本発酵乳は多糖体同様, マウスへの経口投与によって脾臓細胞の NK 活性を増強した。また, 脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  産生を誘導し, IL-4 の産生を抑制したことから Th1/Th2 のバランスを調整し, Th1 側へシフトさせる可能性が示唆された。近年, 過剰な Th2 応答がアレルギー発症の原因であることが示唆されており, Th1 応答を増強させることにより Th1/Th2 のバランスを適正化し, アレルギーを抑制する試みがなされている<sup>7)</sup>。したがって本発酵乳は NK 活性増強による免疫賦活効果に加え, アレルギーの抑制という面でも効果を発揮する可能性が考

えられる。発酵乳については, 多糖体の作用に加えて成分の関与も考えられる。今後は, *L. bulgaricus* OLL1073R-1 および *S. thermophilus* OLS3059 の各菌が持つ作用についても注目し, 発酵乳全体としての機性を感染防御, アレルギー抑制の観点からさらに検討する予定である。

## 参考文献

- 1) De Vuyst L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degee B., *Int. Dairy J.*, **11**, 687-707 (2001)
- 2) Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., Kambe, M and Tsuchiya, F., *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1623-16 (1983)
- 3) Kitazawa, H., Yamaguchi, T., Miura, M., Saito, T. and Itoh, T., *J. Dairy Sci.*, **76**, 1514-1519 (1993)
- 4) Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, I Morimoto, M., Yokokura T., *Carcinogenesis*, **22**, 5-605 (2001)
- 5) Hori T., Kiyoshima J., Shida K., Yasui H., *Clin. Immunol. Lab. Immunol.* **9**, 105-108 (2002)
- 6) Johann, S., Blumel, G., Lipp M., Forster, R., *J. Immunol. Methods*, **185**, 209-216 (1995)
- 7) Cross, M. L., Stevenson, L. M., Gill, H. S., *Int. Immunopharmacol.*, **1**, 891-901 (2001)