

# 培養温度の変化が乳酸菌およびその免疫賦活作用に及ぼす影響

井田 正幸\*・出雲 貴幸

我々ヒトをはじめとする生物に備わった免疫系は、「非自己」を認識し、病原体の体内への侵入を防いでいる。しかしながら、環境汚染や社会背景に起因したストレス、食の欧米化による食生活の変化などにより免疫機能が大きく低下することが知られている。また、加齢も免疫異常を引き起こす大きな原因になると考えられ、加齢による免疫機能の低下に伴い、感染症やガンのリスクが高まるとの報告がある。筆者らは低下した免疫機能を高める方法の一つとして、食による免疫機能の調節があると考えた。

乳酸菌は広く自然界に分布している微生物であり、一般的にはヨーグルトやチーズ、バターなどに含まれることが知られている。日本人になじみの深いものであればみそ、しょうゆ、漬物など、乳製品以外にもいろいろな食品に含まれており、非常に身近な食品素材である。乳酸菌の保健効果は、20世紀初頭にパスツール研究所のMetchnikoffによって提唱された。以降100年にわたって世界中で乳酸菌研究が進められ、さまざまな効果が明らかにされてきた。近年では、腸内細菌叢の正常化、便性改善、栄養素の消化吸収の改善、脂質代謝改善など実に多岐にわたる保健効果が確認されている。最近特に注目されている効果が免疫調節作用であり、動物あるいはヒトにおいて、自然免疫や粘膜免疫の活性化作用、あるいはアレルギー抑制作用を示すことが報告されている<sup>1-4)</sup>。筆者らは日本人にとって身近な食品素材であり、かつ広く保健効果が認められている乳酸菌が、食による免疫機能調節を実現する有力なツールとなると考え、免疫調節作用に優れた乳酸菌の探索を行った。その結果見いだしたのが京都の伝統漬物“しば漬け”より分離された *Lactobacillus pentosus* S-PT84 株である。

## 乳酸菌 *Lactobacillus pentosus* S-PT84 株とは

*L. pentosus* S-PT84 株 (S-PT84 株) は、約 1000 株の乳酸菌から、Th1 サイトカインの 1 種であるインターロイキン (IL)-12 誘導作用を指標にして選抜された植物由来の乳酸菌である。本乳酸菌のマウスへの経口投与により、脾細胞からの IL-4 産生抑制を介した Th1/Th2 バランスの Th1 偏向化作用、natural killer (NK) 活性の増強

作用、ウイルス刺激に対するインターフェロン (IFN)- $\alpha$  産生増強作用が確認されている<sup>5,6)</sup>。また、本乳酸菌の経鼻投与による、インフルエンザ感染防御作用も確認されている<sup>7)</sup>。これらの作用には、S-PT84 株によるサイトカイン産生の誘導が関与していると考えられる。そこで、S-PT84 株のサイトカイン産生誘導作用の活性成分を同定するため、S-PT84 株を 1) 構造を維持した細胞壁 (intact cell wall, ICW)、2) 多糖-ペプチドグリカン複合体 (polysaccharide-peptidoglycan, PS-PG)、3) プロトプラスト (protoplast, PP) の 3 つに分画し、S-PT84 株そのものとの IL-12 誘導作用を比較検討した。その結果、構造の維持された細胞壁が、S-PT84 株そのものと同程度の活性を示したことから、S-PT84 株のサイトカイン誘導作用には構造の維持された細胞壁が関与していることが示唆された (図 1)。

## 培養温度の変化が乳酸菌に与える影響

S-PT84 株の Th1 サイトカイン誘導作用の検証を進めるうちに、培養温度の変化により Th1 サイトカイン誘導活性が変化することを見いだした。図 1 の結果は 30°C 培養菌体での結果であるが、30°C よりも高温で培養した S-PT84 株は IL-12 誘導活性が有意に増加することが明らかとなった (図 2)。図 1 に示したように、S-PT84 株の IL-12 誘導作用に細胞壁が重要な働きをしていることから、培養温度の変化により細胞壁に何らかの変化が

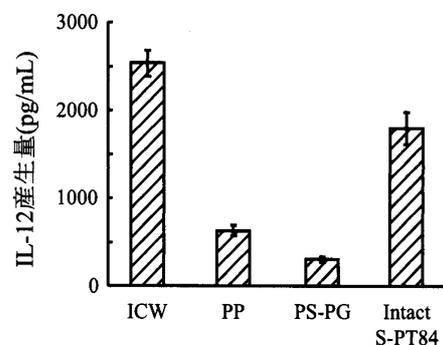


図 1. 各種 S-PT84 株分画物のサイトカイン産生に対する作用。(ICW, 構造の維持された細胞壁; PP, プロトプラスト; PS-PG, 多糖-ペプチドグリカン複合体) 構造の維持された細胞壁が、S-PT84 株そのものと同程度の活性を示した。

\*著者紹介 サントリーウエルネス (株) 健康科学研究所 (研究員) E-mail: Masayuki\_Ida@suntory.co.jp

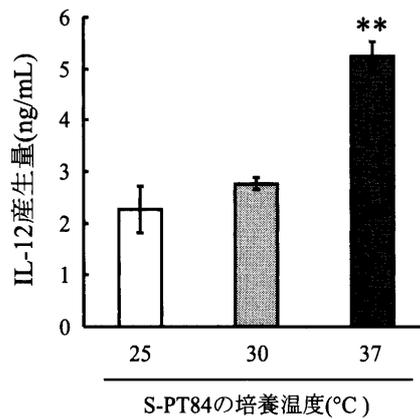


図2. S-PT84株のサイトカイン産生に及ぼす培養温度の影響. 37°Cで培養したS-PT84株はIL-12誘導活性が有意に増加した. \*\*,  $P < 0.01$  vs 30°C.

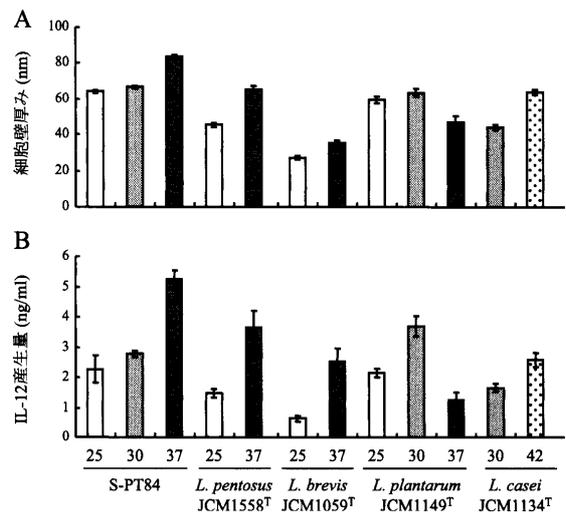


図4. 各種乳酸菌の細胞壁厚みとIL-12誘導作用. *L. plantarum*基準株を除き, 培養温度を高くすることで(A)細胞壁の厚みが増加し, (B) IL-12誘導作用が高まった.

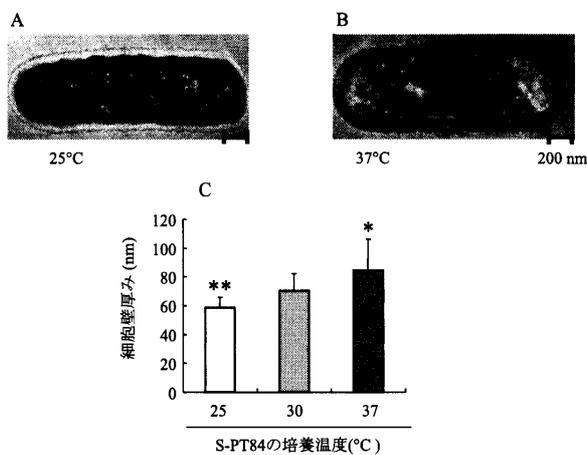


図3. S-PT84株の細胞壁厚みに及ぼす培養温度の影響. (A) 25°C培養したS-PT84株, (B) 37°C培養したS-PT84株, (C) 25°C, 30°C, 37°C培養したS-PT84株の細胞壁の厚み. 37°C培養菌体の細胞壁は, 30°C培養菌体に比べ厚くなっている. \*,  $P < 0.05$  vs 30°C; \*\*,  $P < 0.01$  vs 30°C.

起こっている可能性が考えられた. そこで, 各培養温度で調製したS-PT84株の形態を電子顕微鏡により検証したところ, 37°C培養菌体の細胞壁が30°C培養菌体に比べ厚くなっていることが明らかとなった(図3 A, B). 細胞壁の厚みを計測したところ, IL-12誘導作用の高い37°C培養菌体は, 他の培養温度菌体に比較して約3割細胞壁が厚く, 平均値として80 nmを超えていた(図3 C). 以上の結果から, 培養温度を高めることでIL-12誘導作用に参与する細胞壁が厚くなり, IL-12誘導作用が増強される可能性が示唆された. S-PT84株で認められた細胞壁の厚みとIL-12誘導作用の関係が他の乳酸菌で認められるかをいくつかの基準株を用いて評価した. 評価には *L. pentosus* 基準株 (JCM1558<sup>T</sup>), *Lactobacillus plantarum*

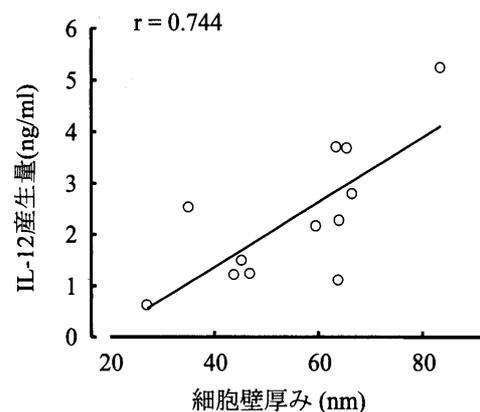


図5. 乳酸菌の細胞壁厚みとIL-12誘導作用との相関関係. 細胞壁厚みとIL-12誘導作用に正の相関が認められた.

基準株 (JCM1149<sup>T</sup>), *Lactobacillus brevis* 基準株 (JCM1059<sup>T</sup>) および *Lactobacillus casei* 基準株 (JCM1134<sup>T</sup>) を用いた. 各基準株はそれぞれ2温度以上の培養菌体を調製し, 細胞壁の厚みおよびIL-12誘導作用を評価した. 図4に示したように, *L. plantarum* 基準株を除き, 培養温度を高くすることで細胞壁の厚みが増加し, IL-12誘導作用が高まることが明らかとなった. *L. plantarum* 基準株についても細胞壁が厚ければIL-12誘導作用が高く (30°C), 薄くなればIL-12誘導作用が減弱した (37°C). 今回評価した5株, 12種類の菌体について細胞壁厚みとIL-12誘導作用の相関を確認したところ,  $r = 0.744$  ( $p < 0.006$ ) と高い正の相関が認められた(図5). 以上の結果から, 細胞壁の厚みとIL-12誘導作用は密接に関わっているこ

とが示された。乳酸菌のIL-12誘導作用には細胞壁の3次元構造あるいは消化酵素耐性が重要であることが報告されているが<sup>8)</sup>、今回の検討から、細胞壁の厚みもIL-12誘導作用に重要であることが示唆された。ただし細胞壁の厚みをどのように免疫細胞が認識しているかについてはまったく不明であり、この点については今後の検討課題と考えている。

### 乳酸菌S-PT84株を用いた免疫賦活食品の開発

37°C培養により高い免疫賦活作用を有するS-PT84株を用いた免疫賦活食品の開発に向け、本乳酸菌のヒトの免疫機能に対する効果を検証した。試験は、プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験として実施した。37°C培養S-PT84株5億個、あるいは15億個を2週間摂取することによる免疫機能への影響を評価した。評価項目は末梢血単核球(PBMC)のNK活性およびPBMCをウイルス刺激した際のIFN- $\alpha$ 産生を指標とした。いずれも摂取前からの変化量として評価した。NK活性についてはS-PT84株摂取量依存的、かつ15億個摂取群でプラセボ群に比較して有意な増加が認められた(図6)。また、IFN- $\alpha$ についても同様の傾向が認められた。また、S-PT84株15億個にビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>を加えた食品にも、NK活性やIFN- $\alpha$ 産生を増強する作用があることがプラセボ対照二重盲検並行群間比較試験により明らかとなっている。以上の結果から、37°C培養S-PT84株、あるいは37°C培養S-PT84株を配合した食品はヒトにおいても免疫機能を高める作用を有することが明らかとなった。

以上、*L. pentosus* S-PT84株のこれまでのデータについて紹介した。S-PT84株は厚い細胞壁を持っており、これがIL-12誘導作用に反映されていること、またS-PT84株に限らず乳酸菌の細胞壁の厚さは培養温度の調節というきわめて簡便な操作によって調節できることを示した。この知見は乳酸菌の機能を高めるのに有用であると考えている。今回、37°C培養S-PT84株を摂取するとヒトの免疫機能が高まることを示したが、免疫機能が高まった結果、ヒトの健康にどの程度寄与できるのか

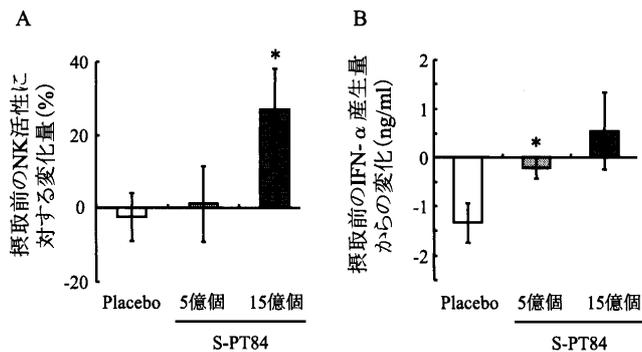


図6. ヒト免疫機能に対するS-PT84株摂取の効果。(A) 37°C培養S-PT84株15億個摂取群でプラセボ群に比較してNK活性の有意な増加が認められた。(B) 37°C培養S-PT84株5億個摂取群でプラセボ群に比べIFN- $\alpha$ 産生量の有意な増加が認められた。\*,  $P < 0.05$  vs Placebo.

について検討を続けていきたい。

我々現代人はストレス、生活習慣の乱れ、運動不足、環境変化などに伴って免疫機能に異常をきたし始めている。また、ボーダレス国際交流が進む中、SARSや新型インフルエンザなど、これまで予想しなかった新興感染症の脅威にも晒されるようになってきている。一方で、乳酸菌の免疫調節作用に関する研究は目覚ましい進歩を遂げている。これまでの食文化や先人たちの知恵を享受し、乳酸菌あるいは乳酸菌を用いた食品を毎日の食生活の中にも取り入れることは、ストレスの多い現代社会に住む我々にとって、日々の健康を維持する上で有用な手段になると期待している。

### 文 献

- 1) Schiffrin, E. J. et al.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **66**, 515S (1997).
- 2) Yasui, H. et al.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76** (1-4), 383 (1999).
- 3) Rosenfeldt, V. et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111** (2), 389 (2003).
- 4) Peng, S. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **55** (13), 5092 (2007).
- 5) Nonaka, Y. et al.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **145**, 249 (2008).
- 6) Izumo, T. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 370 (2011).
- 7) Izumo, T. et al.: *Int. Immunopharmacol.*, **10**, 1101 (2010).
- 8) Shida, K. et al.: *J. Dairy Sci.*, **89**, 3306 (2006).