



Title	乳酸菌Lactobacillus plantarum L-137株の免疫調節作用に関する研究
Author(s)	廣瀬, 義隆
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57944">https://hdl.handle.net/11094/57944</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

近年、ビタミン、ミネラル、脂肪酸、アミノ酸、核酸、オリゴ糖、発酵乳などの食品あるいは食品成分が免疫調節作用を示すことが明らかになってきている。その中でも、プロバイオティクスと呼ばれる乳酸菌やビフィズス菌類の免疫調節作用に関しては多くの研究がなされており、T細胞応答調節作用、炎症性・抗炎症性サイトカインの産生調節作用、抗体産生調節作用、NK活性増強作用などが報告されている。東南アジアの発酵食品より単離した乳酸菌*Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) L-137株は、15種類のプラスミドを保持し、デンプン分解能を有する特徴を持つ。筆者らはこの乳酸菌の加熱処理菌体 (Heat-Killed *L. plantarum*; HK L-137) が、強いIL-12産生誘導能を有し、マウスに腹腔内投与した場合、抗アレルギー効果ならびに抗腫瘍効果を示すことを既に明らかにしているが、日常的に摂取される食品として応用するためには、経口摂取時の有効性を確認する必要がある。一方で、HK L-137はプロバイオティクスとして応用されている属の乳酸菌や同属同種の乳酸菌に比較し、強いIL-12産生誘導能を有する。各種乳酸菌とのIL-12産生誘導能の違いに関与する因子を明確にすることは、他菌株との差別化を可能とし、さらには、高IL-12産生誘導能を有する新規乳酸菌の探索にも有用といえる。そこで本研究では、マウスならびに健常者を対象とした経口摂取試験を実施し、HK L-137の有効性を評価した。さらには、同属同種の標準株とのIL-12産生誘導能の差に着目して、関与成分の同定を目指した。

HK L-137の摂取はマウス脾臓細胞のIL-12産生やIFN- $\gamma$ 産生を増強し、I型アレルギーモデルマウスのIgE抗体産生を抑制し、さらには同系腫瘍を移植したマウスの生存期間を延長させた。HK L-137は、腸管の樹状細胞などの免疫細胞に作用して、IL-12産生を促進しTh1/Th2バランスを改善し、アレルギー症状を改善するものと考えられた。また、IL-12産生増強作用を有する乳酸菌は、NK活性を増強し抗腫瘍作用を示すことも報告されており、HK L-137の抗腫瘍作用発現メカニズムの一つとしてNK細胞の活性化が考えられた。さらに、HK L-137の摂取は、インフルエンザ感染初期の肺組織におけるウイルス増殖を抑制し、インフルエンザウイルス感染マウスの生存期間を延長させた。乳酸菌によるインフルエンザウイルス感染予防作用については、NK活性の増強作用を介した感染予防作用やウイルス特異的IgG抗体産生の増強作用などが報告されている。本研究では、HK L-137のIFN- $\beta$ 産生促進作用が見出され、乳酸菌によるI型インターフェロン誘導を介した抗ウイルス作用の可能性を示した。

次に40歳以上の健常者を対象とした臨床試験を実施し、ヒトにおける有効性を評価した。HK L-137を1日当たり10 mg摂取することにより、Con A刺激芽球化反応とTh1/Th2比が有意に上昇し、その上昇はHK L-137摂取後4週目から試験終了まで維持された。Con A刺激芽球化反応すなわちT細胞増殖反応が上昇したことやTh1/Th2比が上昇したことは、HK L-137の摂取によりIL-12産生が誘導され、細胞性免疫が増強されたことを示唆するものであり、ヒトにおいても抗腫瘍作用や抗アレルギー作用が期待できる可能性を示した。また、QOLは免疫機能と密接に関連しているといわれており、慢性疲労症候群の患者ではT細胞増殖反応とQOLが相関することや、健常高齢者のT細胞増殖反応の上昇とQOLの向上が相関することなどが報告されている。HK L-137摂取後4週目からT細胞増殖反応やTh1/Th2比の上昇がみられ、8週目からQOLの向上が認められた結果から、HK L-137の摂取が細胞性免疫を増強し、T細胞増殖反応を上昇させることによって、QOLの向上に寄与した可能性が示唆された。さらには、インフルエンザワクチンを接種した健常者を対象とした臨床試験を実施し、HK L-137の摂取が、ワクチン接種の有無関わらず、血清IFN- $\beta$ 濃度を上昇させることを見出した。HK L-137の摂取がヒトのIFN- $\beta$ 産生誘導に強く関与することが示唆され、インフルエンザウイルス感染に対しても予防的に働く可能性が示唆された。

同属同種の標準株とのIL-12産生誘導能の差に着目して、関与成分の同定を目指した。本研究では、L-137株とJCM1149株の細胞壁成分のひとつであるLTAの違いに着目し、L-137株は抗LTA抗体に対して強く反応すること、L-137株はJCM1149株に比較し長鎖でAla置換度の高いLTAを有すること、さらには抗LTA抗体の添加によって、L-137株のIL-12産生誘導能のみが低下することを見出した。乳酸菌の保有するLTA量はIL-12産生誘導能と反比例するとの報告や、Ala置換の欠損によりサイトカイン産生誘導能が低下するといった報告などから、L-137株とJCM1149株の抗LTA抗体に対する反応性やIL-12産生誘導能の相違は、LTAの絶対量ではなく、LTAの鎖長やAla置換度が重要であると推察された。L-137株は15種類のプラスミドを保有することから、IL-12産生誘導能やLTA構造に及ぼすプラスミドの影響を調べた。その結果、L-137株の保有プラスミドpLTK11が、抗LTA抗体に対する

【26】

氏名	ひろ せ よし なか	廣 瀬 義 隆
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)	
学位記番号	第 2 3 4 6 2 号	
学位授与年月日	平成22年2月23日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位論文名	乳酸菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> L-137株の免疫調節作用に関する研究	
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘	
	(副査) 教授 中川 晋作 教授 那須 正夫 教授 平田 收正	

反応性やIL-12産生誘導能を遺伝子レベルで制御している可能性が示された。pLTK11にはグリセロールリン酸の生合成に関わる酵素と相同性の高い領域が含まれたが、その機能については、pLTK11を含まない変異株やJCM1149株への導入を含めて精査が必要であると考えられた。またpLTK11には同酵素以外にも、細胞壁の糖鎖構造に影響を与える可能性のあるglucansucraseなどの酵素と相同性の高いorfも見つかっており、さらなる解析が望まれた。

機能性食品の開発において最も重要視されることは有効性よりもむしろ、安全性である。当該乳酸菌は、ザウークラウト、ピクルスなどの食品やヒト口中、消化管にも存在する日常的な菌であり、また、毒性試験や臨床試験による評価にて、安全性に全く問題ないことが確認された。したがって、安全性の高い食品素材であることが示され、ヒトへの応用は十分可能であると考えられた。

免疫機能の低下あるいはバランス異常を引き起こす代表的な要因として、加齢やストレス、衛生環境の改善などが上げられるが、現代の先進諸国は少子高齢化社会でありストレス社会である。そのような状況の中で、本研究の成果や*L. plantarum* L-137株が健康維持増進に少しでも貢献できることを期待したい。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、乳酸菌*Lactobacillus plantarum* L-137株の加熱処理菌体(Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137株; HK L-137)の機能を病態モデルマウスおよびヒトにおいて評価し、免疫調節作用を有する機能性食品素材として有用であること、さらには当該乳酸菌の免疫調節作用に関わる因子の一つとしてリポテイコ酸を同定し、その制御に保有プラスミドが関与する可能性を見出したものである。

HK L-137はマウス脾臓細胞に対して強いIL-12産生誘導能を有し、腹腔内投与によって抗アレルギー作用や抗腫瘍作用を示す。マウスに対する経口摂取試験でIL-12やIFN- $\gamma$ 産生を上昇させることを明らかにした。細胞性免疫の増強作用が期待されたため、病態モデルマウスを用いて有効性を評価したところ、HK L-137の摂取はI型アレルギーモデルマウスのIgE抗体産生を抑制し、同系腫瘍を移植したマウスの生存期間を延長させた。また、インフルエンザウイルス感染マウスの感染初期のウイルス増殖を抑制して生存期間を延長させることを明らかにし、その作用メカニズムにIFN- $\beta$ 産生促進作用が関与する可能性を示した。

健常者を対象とした臨床試験で、ヒトでの有用性を評価した。HK L-137を1日当たり10mg摂取することにより、Con A刺激芽球化反応とTh1/Th2比が摂取後4週目から、QOLが摂取後8週目から有意に上昇し、その上昇は試験終了まで維持された。さらには、摂取後4週目から、血清IFN- $\beta$ 濃度の上昇が認められ、HK L-137はヒトに対してもIFN- $\beta$ 産生を促進し、インフルエンザウイルス感染に対して予防的に働く可能性が示唆された。また、臨床試験や毒性試験において安全性に問題がないことを確認しており、当該乳酸菌が、安全でかつ免疫調節作用を有する食品素材として応用可能であることが示された。

一方で、同属同種の標準株であるJCM1149株とのIL-12産生誘導能の差に着目して、L-137株の免疫調節作用に関わる因子を探索した。その結果、L-137株とJCM1149株では、細胞壁成分の一つであるリポテイコ酸(LTA)に違いがあることを見出し、L-137株は抗LTA抗体に対して強く反応すること、L-137株はJCM1149株に比較し長鎖でアラニン高含有のLTAを有すること、抗LTA抗体の添加によってL-137株のIL-12産生誘導能のみが低下することを明らかにした。さらには、L-137株の保有プラスミドpLTK11が、抗LTA抗体に対する反応性やIL-12産生誘導能を遺伝子レベルで制御している可能性を示した。これらの成果は、乳酸菌によるIL-12産生誘導能の種差、株差を解明できる可能性を示唆しており、また、高IL-12産生誘導能を有する新規乳酸菌の探索あるいは作製に応用可能であると考えられた。

以上、乳酸菌加熱処理菌体HK L-137が免疫調節作用を有する食品素材として応用可能であることを明らかにし、その作用に関わる因子を一部特定した本研究は、大阪大学博士学位(薬学)に値するものと判断した。