

# 有用微生物の探索と利用に関する研究

加島隆洋、森本智美\*、秦 健敏\*、横山慎一郎

Screening of Useful Microorganisms and Their Food Application

Takahiro KASHIMA, Tomomi MORIMOTO\*, Taketoshi HATA\* and Shinichiro YOKOYAMA

免疫賦活作用の高い蜂産品由来の有用乳酸菌を探索した。菌体収量の高さ、および糖質化の多様性を指標に、蜂産品から2株の微生物を選抜した。2株共に乳酸菌であると同定され、各々KB-11株およびKB-23株と命名した。これら乳酸菌を加熱殺菌処理後、乾燥粉末化し(乳酸菌末)、免疫賦活作用の評価を行った。その結果、KB-11株乳酸菌末とKB-23株乳酸菌末のいずれもマウス脾臓細胞のIFN- $\gamma$  産生誘導活性を示し、KB-11株乳酸菌末がKB-23株乳酸菌末に比して高値を示した。また、KB-11株乳酸菌末は菌体用量依存的にマウスマクロファージ様細胞株J774.1細胞のIL-12産生誘導刺激を増加させた。

## 1. はじめに

現代人においては、生活習慣の乱れや運動不足、環境の悪化に伴う免疫力の低下が問題視されており、また、グローバル化が進んだ結果、COVID-19といった新興感染症の脅威にも常に晒されるようになった。このような背景により、日常から生体防御能を高めるべく、免疫賦活作用を有する食品由来の成分探査が精力的に行われている。

近年の研究により、乳酸菌の菌体に免疫賦活効果があることが明らかにされ<sup>1-3)</sup>、免疫調整機能を目的とした乳酸菌関連機能性食品素材の開発が活発化し、免疫市場をリードしている。また、上述した背景から、同分野における食品開発は今後も発展することが予想される。

一方で、岐阜県では養蜂関連産業が盛んであるが、ハチミツや花粉荷(ビーポーレン)、ビーブレッド(蜂パン)などの蜂産品には多様な微生物叢が形成されており、有用微生物の分離源として有望であると考えられる。本研究では、蜂産品から今回新たに分離、選抜した乳酸菌2株について、自然免疫において重要な役割を果たすインターフェロン(IFN)- $\gamma$  およびナチュラルキラー細胞の活性化に関与するインターロイキン(IL)-12の産生誘導活性を指標に、*in vitro* における当該菌体の免疫賦活作用の評価を行ったので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 被験菌

ビーブレッド(アピ株式会社、川島養蜂場)より分離した62株より、菌体増殖量および糖質の質化性を指標に2株を選抜した。これらについて、16S rRNA遺伝子および生化学的諸性質解析を行ったところ、共に乳酸菌であると同定され、各々乳酸菌KB-11株およびKB-23株と命名した。以降の実験には本乳酸菌2株を用いることとした。

### 2.2 菌体試料の調製

被験菌をMRS Broth(Becton Dickinson)にて、30°C、48時間、静置培養した。培養液を85°Cの温浴中で20分間加熱して殺菌した後、菌体を回収した。これを滅菌超純水で洗浄後、凍結乾燥して乳酸菌末とした。得られた乳酸菌末より、その収率(mg/mL-培養液)を求め、以下の実験に供するまで-20°Cで保存した。

### 2.3 IFN- $\gamma$ 産生誘導活性の測定

KB-11株およびKB-23株の乳酸菌末を供試した。動物実験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第88号、平成18年4月28日)に準拠し、アピ株式会社長良川リサーチセンター動物実験委員会の承認(登録番号:49-001)を得て実施した。BALB/c CrSlcマウス(オス、8週齢;日本SLC)を多量のCO<sub>2</sub>吸入下で安楽死させ、脾臓を摘出した。RPMI-1640培地(Gibco)中で細胞浮遊液を調製し、300 $\times$ gにて5分間遠心分離した。回収した細胞をlysis buffer(9.0 g/L NH<sub>4</sub>Cl、1.0 g/L KHCO<sub>3</sub>、36.9 mg/L EDTA $\cdot$ 4Na;pH 7.4)にて処理後、RPMI-1640培地で2回洗浄し、10% FBS加RPMI-1640培地に懸濁して使用した。終濃度が1.2  $\mu$ g/mL、6.0  $\mu$ g/mLまたは30  $\mu$ g/mLとなるように48 wellマイクロプレートに乳酸菌末懸濁液を分注し、2.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/wellとなるよう上記細胞懸濁液を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下にて48時間培養後、培養上清を回収し、測定まで-80°Cで保存した。脾臓細胞から産生されたIFN- $\gamma$ 量は、ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IFN- $\gamma$ (BioLegend)を用いて、キット付属のプロトコルに準じて測定した。

### 2.4 IL-12産生誘導活性の測定

KB-11株乳酸菌末を供試した。マウスマクロファージ様細胞株であるJ774.1細胞(JCRB細胞バンク)を10% FBS加RPMI-1640培地(富士フイルム和光純薬)に懸濁し、24 wellマイクロプレートに3.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/wellとなるよう播種した。37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下にて6時間培養後、10  $\mu$ g/mLま

\*アピ株式会社

たは100 µg/mLのKB-11株乳酸菌末を含む培地に交換し、引き続き24時間培養した。培養上清を回収し、測定まで-80°Cで保存した。J774.1細胞から産生されたIL-12量は、ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IL-12p40(BioLegend)を用いて、キット付属のプロトコルに準じて測定した。

### 3. 結果と考察

乳酸菌末の収率は、KB-11株で2.3 mg/mL、KB-23株で1.2 mg/mLであった。今回調製した乳酸菌末は、培養液を加熱殺菌後水洗した沈殿画分であり、主に細胞壁成分から構成されるものと考えられるが、KB-11株はその収率が高い株であることが明らかになった。

次にマウス脾臓細胞からのIFN-γ産生量の測定結果を図1に示した。KB-11株乳酸菌末では、中用量(6 µg/mL)での産生量が29.9±1.3 ng/mLと最も高くなる釣鐘型のIFN-γ産生特性を示した。KB-23株乳酸菌末では、添加用量依存的なIFN-γ産生量の増加が認められた。

*ex vivo*における乳酸菌のIFN-γ産生誘導活性は、*Lactobacillus paracasei* K71株でも同様の報告がされている<sup>1)</sup>。IFN-γは、ナチュラルキラー細胞の活性化を介した免疫賦活作用だけではなく、1型ヘルパーT細胞(Th1)に作用してTh1/Th2のバランスを調整することでアレルギー症状を緩和する作用を有することも知られている。K71株乳酸菌末は、臨床試験においては、経口摂取によりアトピー性皮膚炎の諸症状を緩和したと報告されている<sup>2)</sup>。これらのことから、KB-11株乳酸菌末およびKB-23株乳酸菌末においても、免疫賦活作用だけでなく、抗アレルギー作用も期待される。

次にKB-11株乳酸菌末によるJ774.1細胞からのIL-12産生量の測定結果を図2に示した。KB-11株乳酸菌末には、添加用量依存的なIL-12産生量増加効果があることが認められた。乳酸菌のIL-12産生誘導作用に関しては、*Lactobacillus pentosus* S-PT84株由来の細胞成分で詳細な検討が行われており、原形の維持された細胞壁(Intact Cell Wall ; ICW)、プロトプラスト、多糖-ペプチドグリカン複合体のうち、ICWが当該作用の本体であることが報告されている<sup>3)</sup>。また、S-PT84株の検討では、IL-12産生量は細胞壁成分であるジアミノピメリン酸量に比例して増加すること、培養温度を高温にシフト(30°C→37°C)すると、細胞壁が肥厚し、IL-12産生量も増加することが報告されている<sup>3)</sup>。本実験に供試したKB-11株乳酸菌末も主成分は細胞壁成分であると考えられ、S-PT84株と同様のIL-12産生誘導作用が働くものと考えられる。

菌体収量、IFN-γおよびIL-12産生誘導活性に優れたKB-11株に関しては、今後、機能性食品素材への応用を目的に、免疫賦活作用をさらに高めるための培地組成や培養温度の検討を行うと共に、その量的、質的性質についても注視しながら開発研究を進めていきたい。

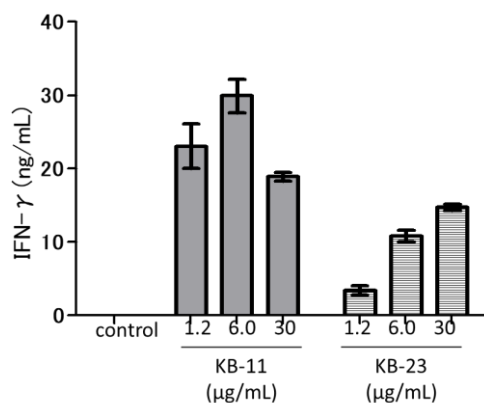


図1 KB-11株およびKB-23株乳酸菌末によるIFN-γ産生(平均値±SD, n=3)

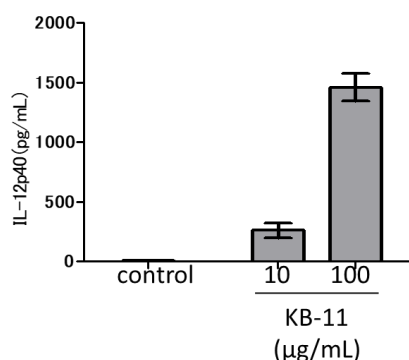


図2 KB-11株乳酸菌末によるIL-12p40産生(平均値±SD, n=3)

### 4. まとめ

免疫賦活作用の高い蜂産品由来の有用乳酸菌を探索したところ、以下の知見が得られた。

- 菌体収量の高さ、および糖資化性の多様性を指標に蜂産品から2株の微生物を選抜した。
- 2株共に乳酸菌であると同定され、各々KB-11株、KB-23株と命名した。
- KB-11株乳酸菌末およびKB-23株乳酸菌末は、いずれもマウス脾臓細胞のIFN-γ産生誘導活性を有した。
- KB-11株乳酸菌末はKB-23株乳酸菌末に比して、菌体収量およびIFN-γ産生誘導活性共に高値を示した。
- KB-11株乳酸菌末は用量依存的にJ774.1細胞のIL-12産生量を増加させた。

### 【参考文献】

- 1) T. Kumagai *et al.*, Food Science and Technology Research, 19 (1), pp.127-132, 2013
- 2) M. Moroi *et al.*, Journal of Dermatology, 38 (2), pp.131-139, 2011
- 3) 出雲 貴 幸ら, Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 7, pp.151-162, 2013