

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 ヨーグルト乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* が産生する菌体外多糖の免疫賦活作用

氏名 牧野 聖也

論文内容の要旨

少子高齢化が進む中、健康長寿の実現が社会的に大きな課題となっている。近年、健康寿命の延長、医療費抑制の観点から毎日手軽に摂取できる食品の健康効果に期待が集まっており、発酵食品や発酵に使用する乳酸菌、プロバイオティクスの免疫賦活作用に関する研究が盛んに行われている。また、シイタケなどキノコ類の多糖類はがんの免疫療法剤としても活用されており、ヨーグルト乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* が産生する菌体外多糖 (exopolysaccharide: EPS) についても免疫賦活作用が報告されている。本研究では、毎日手軽に摂取可能な免疫賦活ヨーグルトの開発を目的として、免疫賦活作用を発揮する EPS を活用したヨーグルトの感染防御作用の検証とその作用機構の解析を行った。

L. bulgaricus OLL1073R-1 (OLL1073R-1 株) が産生する EPS は *in vitro* における B 細胞マイトジェン活性等の免疫賦活作用が報告されている。本研究では、感染防御作用と関係が深いインターフェロン(IFN)- γ 産生誘導活性について評価を行った。その結果、本 EPS は *in vitro* において IFN- γ 産生誘導活性を発揮した。そこで、初期の感染防御に重要な役割を果たしているナチュラルキラー (NK) 細胞を活性化させるか否かを検討した。EPS、本 EPS を含有するヨーグルト (OLL1073R-1 株ヨーグルト) をマウスに 3~4 週間経口投与し、脾臓細胞の NK 活性を評価した。その結果、EPS、OLL1073R-1 株ヨーグルトともに蒸留水に比べて NK 活性を有意に上昇させた (Makino *et al.* 2006. *J. Dairy Sci.*)。

OLL1073R-1 株が産生する EPS、OLL1073R-1 株ヨーグルトの感染防御作用を明らかにすることを目的にマウスインフルエンザ感染モデルを用いた実験を行った。マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させる 3 週間前から、感染後 6 日目まで、EPS、OLL1073R-1 株ヨーグルトを毎日経口投与した。その結果、EPS、OLL1073R-1 株ヨーグルトともに、インフルエンザ感染後のマウスの生存日数を有意に延長した。

また、同様の実験を再度行い、感染 4 日後に各種評価を行ったところ、EPS、OLL1073R-1 株ヨーグルトの投与により、脾臓細胞では NK 活性の上昇、肺洗液ではインフルエンザウイルス特異的 IgA、IgG1 抗体の増加、感染性ウイルス価の減少が認められた。これらの結果から、OLL1073R-1 株ヨーグルトは抗インフルエンザ作用を発揮し、この効果には EPS の NK 活性増強作用、特異的な抗体価を上昇させる作用が寄与していることが示唆された (Nagai *et al.* 2011. *Int. Immunopharmacol.*)。

OLL1073R-1 株ヨーグルトがヒトの免疫機能に与える影響、呼吸器感染症に対する感染防御作用を評価することを目的に、健常高齢者を対象とした長期摂取試験を実施した。試験は 2 回実施し、1 回目は山形県舟形町で、2 回目は佐賀県有田町で実施した。舟形町では、57 名を 2 つのグループに分け、一方には OLL1073R-1 株ヨーグルトを 1 日 90 g、もう一方は牛乳を 100 mL 毎日摂取させた。摂取期間は 8 週間とし、摂取前後の NK 活性、摂取期間中の風邪症候群への罹患状況を調査した。有田町の試験では、85 名の被験者を対象に、舟形町とほぼ同様の試験を行った。ただし、摂取期間については、12 週間とした。その結果、両試験ともに、OLL1073R-1 株ヨーグルトを摂取したグループでは、摂取開始時に NK 活性が低かった被験者で、摂取期間終了後の NK 活性が有意に上昇した。また、OLL1073R-1 株ヨーグルトを摂取したグループの摂取期間中の風邪症候群への罹患リスクは、両試験の結果を統合して解析を行った結果、牛乳を摂取したグループに比べて有意に低かった ($P=0.019$)。これらの結果から、OLL1073R-1 株ヨーグルトは加齢で低下した高齢者の NK 活性を高め、風邪症候群に対する罹患リスクを低減することが明らかとなった (Makino *et al.* 2010. *Br. J. Nutr.*)。

免疫賦活作用を有する EPS を大量に産生する *L. bulgaricus* を選抜することを目的に、保有する 139 株の *L. bulgaricus* の EPS 産生量を比較した。その結果、培養物 1kg あたり 100 mg 以上の EPS を産生した株は OLL1073R-1 株を含め 3 菌株であり、中でも OLL1073R-1 株は最も多く EPS を産生する株であることが明らかとなった。また、これら 3 菌株が産生する EPS の中で、*in vitro* での IFN- γ 産生誘導活性が認められたのは OLL1073R-1 株が産生する EPS のみであった。さらに、OLL1073R-1 株ヨーグルトと別の乳酸菌で発酵した 2 種類のヨーグルトからそれぞれ EPS を精製し、IFN- γ 産生誘導活性を評価した場合も、OLL1073R-1 株ヨーグルトから精製した EPS にのみ活性が認められた。そこで、これら 3 種類のヨーグルトをマウスに 3 週間経口投与したところ、OLL1073R-1 株ヨーグルトでのみ、脾臓細胞の NK 活性が有意に上昇し、IFN- γ 産生についても蒸留水に比べて有意な上昇が認められた。これらの結果から、*L. bulgaricus* がヨーグルト中に産生する EPS の *in vitro* における IFN- γ 産生誘導活性とヨーグルトの NK 活性増強作用との関連性が示唆された (Makino *et al.* 2016. *J. Dairy Sci.*)。

OLL1073R-1 株が産生する EPS が発揮する免疫賦活作用の機構解明を目的に、各種遺伝子破壊マウスを用いた検討を行った。OLL1073R-1 株が産生する EPS、OLL1073R-1 株ヨーグルトを IFN- γ ノックアウト (KO) マウスに 3 週間経口投与し、

NK 活性増強作用を評価したところ、EPS、OLL1073R-1 株ヨーグルトともに IFN- γ KO マウスでは NK 活性増強作用が消失した。また、Toll like receptor (TLR) のシグナル伝達に重要なアダプター分子である MyD88 の KO マウスでは、IFN- γ KO マウスと同様に EPS による NK 活性増強作用が消失することが明らかとなった。MyD88KO マウスは TLR-2、TLR-4、TLR-5、TLR-7、TLR-9 のリガンドに対して不応答であることが報告されており、EPS はこういった TLR に認識され、IFN- γ の産生誘導を介して NK 活性増強作用を発揮すると考えられる (Makino *et al.* 2016. *J. Dairy Sci.*)。

以上の結果から、ヨーグルト乳酸菌である *L. bulgaricus* が産生する EPS の量や免疫賦活作用の強さはさまざまであり、ヨーグルトの免疫賦活作用は発酵に使用する乳酸菌によって異なることが明らかとなった。OLL1073R-1 株は他の乳酸菌に比べて免疫賦活作用を発揮する EPS を大量に産生することから、本株で発酵したヨーグルトはマウスでは NK 活性増強作用、抗インフルエンザ作用、ヒトでは NK 活性増強作用と風邪症候群罹患リスク低減作用を発揮したと考えられる。ヨーグルトは健康に良い食品として広く認知されており、約 100 年前にはメチニコフが唱えた「ヨーグルト不老長寿説」で不老長寿の妙薬として紹介されたこともある。しかし、その健康効果の詳細についてはまだまだ不明な点が多い。本研究はヨーグルトが健康効果を発揮する作用機構の一端を明らかとした。

以上