

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 牧 野 聖 也

論 文 題 目

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

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	松 田 幹
委 員	名古屋大学教授	吉 村 徹
委 員	名古屋大学教授	内 田 浩 二
委 員	名古屋大学客員教授	水 野 猛

## 論文審査の結果の要旨

免疫は感染症に対する生体防御の機構で、細菌、カビ、酵母などの多様な微生物がその標的となる。本来は感染力があり病原性を持つ微生物が標的であるが、非病原性の微生物やその産物の中にも免疫系を刺激し賦活化する作用を示すものが存在する。特に、醗酵食品では、非病原性で感染力はないものの大量の菌体（生菌あるいは死菌）を含み、それらを食品とともに摂取することにより感染を伴わずに腸管の粘膜免疫系を刺激して賦活作用を示すことが考えられる。また、近年、腸内微生物の研究が進み、主に大腸や盲腸に大量に生息し宿主とは共生関係にある常在の非病原性微生物やその産物が腸管の粘膜免疫系と相互作用していることが明らかになりつつある。このように、醗酵食品に含まれる微生物やその産物が食物とともに摂取され腸管免疫系を刺激して生体にとって望ましい効果を示す可能性が想定されているが、その実験的さらには臨床的な裏付けは十分ではない。このような背景の下、本学位論文研究においては、醗酵食品の中でも微生物およびその産物の含量が高いヨーグルトに着目し、ヨーグルト乳酸菌の中から、培養細胞の実験系においてリンパ球分裂促進活性を示す菌体外多糖（exopolysaccharide: EPS）を産生する *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* を材料として、培養細胞系でのサイトカイン産生、マウス個体での免疫細胞の機能とウイルス感染耐性に対する EPS の作用に関する実験研究、さらに高齢者を対象にしたヨーグルト摂取の風邪症候群罹患への影響に関する臨床試験研究が行われた。本博士学位論文としてまとめられた研究成果の要点を以下に記す。

（1）*L. bulgaricus* OLL1073R-1 が産生する菌体外多糖のマウスにおける免疫賦活作用

先行研究においてマウス B リンパ球に対する増殖促進活性を持つことが明らかにされていた *L. bulgaricus* OLL1073R-1（OLL1073R-1 株）が産生する EPS に関して、免疫賦活能の有無をマウスの細胞および個体を用いて検証した。その結果、EPS は、培養細胞系において IFN- $\gamma$  産生を誘導し、また、EPS あるいは OLL1073R-1 株ヨーグルトの経口投与によりナチュラルキラー（NK）細胞が活性化することを明らかにした。これらの結果から、OLL1073R-1 株が産生する EPS はマウスでは経口投与によって免疫系を賦活しうることを示され、特に自然免疫への作用が示唆された。

（2）*L. bulgaricus* OLL1073R-1 ヨーグルトのマウスにおける抗インフルエンザ作用

OLL1073R-1 株ヨーグルトの経口投与によりマウスの免疫系が賦活されたことから、この免疫賦活作用を病原体感染への抵抗性の観点から再度評価した。マウスに前もって EPS あるいは OLL1073R-1 株ヨーグルトの経口投与しておくことにより、インフルエンザウイルス気道感染後の肺洗浄液中のウイルス力価が顕著に低下し、感染後の生存日数を延長した。また、NK 活性の上昇と抗ウイルス抗体価の増強も観察され、免疫系の賦活化によりウイルス感染耐性が増強されたことを示唆した。

（3）*L. bulgaricus* OLL1073R-1 ヨーグルトの摂取による健常高齢者における免疫賦活作用と風邪症候群への罹患リスクの低減作用

マウスモデル実験研究において OLL1073R-1 株ヨーグルト摂取によるウイルス感染耐性の増強が示唆されたため、ヒトでの作用を 2 回の臨床試験研究により検証した。50-100 名規模の健常高齢者を対象とし、8 週間あるいは 1 2 週間の OLL1073R-1 株ヨーグルトを長期継続摂取する介入研究を実施した。被験者をランダム化して 2 群に分け、OLL1073R-1 株ヨーグルトを 1 日 90 g、あるいは牛乳を 100 mL 毎日摂取し、被験者自身による風邪症候群の症状の記述と体温測定記録を基に医師が罹患の有無を判定するという研究デザインとして、群間での罹患リスクを統計的に比較解析した。また、介入期間の前後に採血し分離した単核球画分の NK 活性も測定し比較した。その結果、風邪症候群への罹患リスクは、個々の試験では群間に有意差は認められなかったが、2 回の試験のデータを量的に統合してメタ解析した場合にはヨーグルト摂取群において有意に低いという結果となった。また、2 回の臨床試験研究のいずれにおいても、ヨーグルト摂取群では摂取開始時に 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。これらの結果から、OLL1073R-1 株ヨーグルトの継続的摂取は高齢者の感染予防において有益な作用を示す可能性を示した。

#### (4) *L. bulgaricus* OLL1073R-1 ヨーグルトのマウスにおける免疫賦活作用の機構解析

保有する 100 株以上の *L. bulgaricus* から EPS を調製し、EPS の産生量と IFN- $\gamma$  産生誘導活性を比較解析し、OLL1073R-1 株を含め 3 菌株が大量の EPS を分泌すること、また、その中で OLL1073R-1 株が産生する EPS のみが IFN- $\gamma$  産生誘導活性を持つことを明らかにし、OLL1073R-1 株に特異的な EPS の構造が免疫賦活作用に関与することを示唆した。さらに、OLL1073R-1 株特異的 EPS が免疫系を賦活する機構を探るために、遺伝子欠損マウスを用いて EPS の免疫賦活作用への影響を解析し、EPS が IFN- $\gamma$  の産生を誘導し、その結果、NK 活性が上昇すること、免疫細胞が発現するいくつかの Toll 様受容体 (TLR) あるいは類似のシグナル伝達系を持つ受容体に対してリガンド活性を持ち、この受容体を介して IFN- $\gamma$  の産生を誘導していることを示唆した。

醗酵食品微生物およびその産物が免疫賦活作用を持つことを示す研究が近年数多く報告されているが、培養細胞系でのみの結果や、実験動物での研究においても現象論に留まるものが多い。その中で、本学位論文としてまとめられた研究では、培養細胞での探索と機能評価に続いてマウスでの個体レベルでの免疫賦活作用とウイルス感染耐性の評価が行われ、さらに統計解析ができるレベルでの健常者を対象にした介入研究まで進められている。また、マウスモデル実験により、免疫賦活作用の機構の一端も明らかにしている。これらの一連の研究には独創性と新規性が認められ、得られた研究成果は農学および関連専門分野における高度な学術的価値を持ち今後の研究に大きく貢献すると評価し、博士 (農学) に値すると判定した。