

<平成23年度助成>

選択的免疫賦活能を示す乳酸菌の構成成分の 同定とその高機能性食品への応用

吉 開 泰 信

(九州大学生体防御医学研究所)

目 的

選択的免疫賦活活性を有する高機能性食品の開発は免疫機能の低下した患者や高齢者の健康維持に有用となるのみならず、細胞性免疫能が低下したために発症する難治感染症や癌、さらにアレルギー疾患の予防と治療に有用である^{1,2)}。元来、乳酸菌などの菌体成分に有効な免疫賦活作用があることが知られていたが、その有効成分は不明な点が多く、また同一菌株のロット間でもその活性化がことなり、安定したサンプル供給は困難である³⁾。*Lactobacillus plantarum* L-137株は強力なインターロイキン(IL)-12産生誘導活性を示す乳酸桿菌であり⁴⁾、これまでに我々は、本菌株の加熱死菌体の抗アレルギー作用、抗がん作用、感染防御作用を報告してきた^{4,5)}。また、健常者のTh1に関連した免疫機能を上昇させ、QOLを向上させることも既に報告している⁶⁾。さらに*Lactobacillus plantarum* L-137株の加熱死菌体がインフルエンザウイルス感染マウスのI型インターフェロン(IFN)誘導を促進し、感染初期のウイルス増殖を抑制することを報告した⁷⁾。

本研究では*Lactobacillus plantarum*由来のペプチドグルカン、糖脂質、蛋白質の構成の成分とそのToll様レセプター(TLR)の関係より、最も強い活性を示す有効成分の同定を試みた。さらにヒトのインフルエンザウイルス感染予防に対する作用を調べる目的で、*Lactobacillus plantarum* L-137株の加熱死菌体の摂取が、インフルエンザワクチンを接種した健常者および豚の免疫機能に与える

影響について検討した。

方 法

I. 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の活性成分の構造とそのレセプターの同定

本研究において、L-137株に特徴的なIL-12産生誘導因子を探索する目的で、*L. plantarum*の基準株であるJCM1149株との比較解析を行った。予備検討から、両菌株では細胞壁画分のアミノ酸含有比が異なることが明らかとなったので、細胞壁成分に着目した検討を行った。*Lactobacillus plantarum*菌株の細胞壁分画、細胞膜、細胞質分画、培養上清を、TLRを発現する腸管上皮細胞株、マクロファージ株と培養して、1型IFN、IL-12p40、IL-13、IL-10、IFN- γ 、IL-4、IL-23、IL-17、ケモカイン遺伝子の発現を、RT-PCR法で、上清中の蛋白産生レベルをELISA法によって測定した。TLRとレポータープラズミドを導入したCOS7細胞株を用いて菌株の細胞壁分画を抽出して、ルシフェラーゼ活性を測定することによって、NF- κ Bの転写活性の程度を調べた^{8,9)}。L-137株およびJCM1149株の加熱死菌体、破碎細胞壁およびペプチドグリカン画分を調製し、マウス脾臓細胞と共培養して培養上清に分泌されたIL-12p40濃度を測定した。両菌株の加熱死菌体を調製し、市販の抗リポテイコ酸抗体に対する反応性をフローサイトメトリーによって評価した。遺伝子複製阻害剤処理によって、L-137株が有する複数のプラスミドを一部脱落させた変異株を調製した。それら変異株の抗リポテイコ酸抗体に対する

反応性とIL-12産生誘導活性を評価した¹⁰⁾。

II. 人と豚への免疫活性の効果

- (1) 16名の被験者(女性、平均年齢45.4歳)を、10 mg の *Lactobacillus plantarum* L-137株を含有するタブレットあるいは *Lactobacillus plantarum* L-137株不含タブレットを摂取する2群に無作為に割り付け、1日1粒8週間摂取させた。インフルエンザワクチン(HAワクチン「北研」)は摂取4週目、6週目にそれぞれ接種した。被験食品摂取0週目、4週目、6週目、8週目に採血を行い、血清のインフルエンザウィルス抗体価(A型:H1N1, H3N2, B型)、IFN- γ 濃度、IL-4濃度ならびにIFN- β 濃度を測定した(Table I)。
- (2) 上気道感染症状および免疫機能に対する *Lactobacillus plantarum* L-137株摂取の効果を知るため、精神的ストレスを強く感じている健常者を対象に、二重盲検無作為化比較試験を実施した。職業性ストレス簡易調査票の精神的ストレスに関する18項目の合計

点数が42点以上の健常者78名(男性33名、女性45名、平均年齢50.6歳)は、無作為に2群に振り分けられ、10 mg の *Lactobacillus plantarum* L-137株Hを含有する錠剤あるいはプラセボ錠剤を12週間摂取した。上気道感染症状は、適合性が検証された自己記入方式の調査票(日本語版 Wisconsin 上気道症状調査票: WURSS-21)で毎日調査した。免疫機能の指標である単核球コンカナバリンA(以下 Con A) 刺激芽球化反応、ヘルパーT細胞の細胞内IFN- γ /IL-4陽性細胞比(以下 Th1/Th2比)、血清IFN- β レベルは、被験食品摂取前、摂取4週後、8週後および12週後に測定した。

- (3) 供試豚は三元交雑種(LWD・WLD)子豚で、1区4頭(去勢2頭・雌2頭)の4反復で実施した。試験区分は抗菌性飼料添加物を含まない豚産肉能力検定用飼料(無薬飼料)を給与する無薬区と、無薬飼料に *Lactobacillus plantarum* L-137株の加熱死菌体を0.2%添加

Table I Effect of oral administration of HK L-137 on the Ab response to the trivalent influenza vaccine derived from A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Uruguay/716/2007 (H3N2), and B/Brisbane/60/2008 A

	H1N1				H3N2				B-1			
	0 wk	4 wk	6 wk	8 wk	0 wk	4 wk	6 wk	8 wk	0 wk	4 wk	6 wk	8 wk
Seroconversion rate ¹⁾ (%)												
Control	-	0	62.5	62.5	-	0	62.5	62.5	-	0	12.5	25
(95% CI)		(0-36.9)	(24.5-91.5)	(24-91.5)		(0-36.9)	(24.5-91.5)	(24.5-91.5)		(0-36.9)	(0.3-52.7)	(3.2-65.1)
HK L-137	-	0	25	12.5	-	0	75	75	-	0	12.5	12.5
(95% CI)		(0-36.9)	(3.2-65.1)	(0.3-52.7)		(0-36.9)	(34.9-96.8)	(34.9-96.8)		(0-36.9)	(0.3-52.7)	(0.3-52.7)
		(P=1.00)	(P=0.16)	(P=0.06)		(P=1.00)	(P=0.50)	(P=0.50)		(P=1.00)	(P=0.77)	(P=0.50)
Seroprotection rate ¹⁾ (%)												
Control	12.5	12.5	75	62.5	12.5	12.5	75	100	37.5	37.5	62.5	50
(95% CI)	(0.3-52.7)	(0.3-52.7)	(34.9-96.8)	(24.5-91.5)	(0.3-52.7)	(0.3-52.7)	(34.9-96.8)	(63.1-100)	(8.5-75.5)	(8.5-75.5)	(24.5-91.5)	(15.7-84.3)
HK L-137	62.5	50	100	87.5	12.5	12.5	50	62.5	25	12.5	37.5	50
(95% CI)	(24.5-91.5)	(15.7-84.3)	(63.1-100)	(47.3-99.7)	(0.3-52.7)	(0.3-52.7)	(15.7-84.3)	(24.5-91.5)	(3.2-65.1)	(0.3-52.7)	(8.5-75.5)	(15.7-84.3)
	(P=0.06)	(P=0.14)	(P=0.23)	(P=0.28)	(P=0.77)	(P=0.77)	(P=0.30)	(P=0.10)	(P=0.50)	(P=0.28)	(P=0.31)	(P=0.69)
Geometric mean titer ²⁾												
Control	11.9	11.9	43.6	62.5	9.2	8.4	47.6	61.7	16.8	14.1	28.3	23.8
(95% CI)	(5.0-28.2)	(5.0-28.2)	(17.7-107.3)	(24.5-91.5)	(4.5-18.9)	(3.6-19.9)	(22.6-100.0)	(36.3-104.9)	(6.7-42.0)	(5.3-37.7)	(10.1-79.0)	(9.5-59.5)
HK L-137	40.0	36.7	80.0	67.3	9.2	10.0	47.6	61.7	13.0	10.0	18.3	15.4
(95% CI)	(13.7-117.0)	(12.3-109.4)	(40.0-159.9)	(26.9-168.2)	(4.5-18.9)	(4.2-52.7)	(10.2-222.1)	(11.0-345.5)	(5.1-32.7)	(4.2-24.0)	(6.4-52.3)	(5.5-43.0)
	(P=0.05)	(P=0.07)	(P=0.35)	(P=0.67)	(P=1.00)	(P=0.65)	(P=0.91)	(P=0.91)	(P=0.62)	(P=0.52)	(P=0.42)	(P=0.51)

1) Seroconversion rate (≥ 4 -fold increase) and seroprotection rate (HI titer $\geq 1:40$) between 2 groups were assessed by the Fisher's exact probability test.

2) Geometric mean titer between 2 groups were assessed by Mann-Whitney's U test.

した乳酸菌区および無薬飼料に抗菌性飼料添加物(クエン酸モランテル 30 ppm、ノシヘプタイド 5 ppm)を添加した有薬区の3区分とした。試験期間は子豚期用飼料給与期間である供試豚の平均体重 30kg から 70kg までとし、試験飼料は自由摂取させた。

結 果

I. JCM1149株と比較して、L-137株から調製した加熱死菌体および破碎細胞壁は、顕著に高い IL-12 産生誘導活性を示した。一方、両菌株から調製したペプチドグリカンの IL-12 産生誘導活性は極めて低値であり、菌株間に差はなかった。このことから、細胞壁に存在するテイコ酸が活性に寄与している可能性が示唆された。L-137株加熱死菌体に対する抗リポテイコ酸抗体の反応性は JCM1149株と比較して極めて高かった。一方で、菌体を SDS 処理して得られた抽出物をウェスタンブロット法で調べたところ、リポテイコ酸は両菌株から同程度に検出された。(抗リポテイコ酸抗体に対する反応性が低い L-137変異株は、親株と比較して IL-12 産生誘導活性が低かった。また、活性が低い変異株は共通したプラスミドを欠損していた。)

II. (1) *Lactobacillus plantarum* L-137 株摂取群では、試験開始 4 週目から血清 IFN- β 濃度の上昇が認められ、ワクチン接種後も維持された。対照群は試験期間中を通じて血清 IFN- β 濃度の上昇は認められなかった。その他の測定項目は、両群間で差はなかった (Figure I)。

(2) *Lactobacillus plantarum* L-137 株摂取群の上気道感染症の新規発症件数は、対照群と比較して有意に低かった。また、上気道感染の新規発症件数、罹患期間、重症度および医薬品の服用件数は、*Lactobacillus plantarum* L-137 の摂取期間と負に相関した。さらには、*Lactobacillus plantarum* L-137 株摂取群の単核球 Con A 刺激芽球化反応は、対照群と比較して有意に上昇した。

(3) 試験期間中、臨床的に試験区間に差はなかった。血液の一般検査と生化学検査、好中球・リンパ球比および IgG 検査では試験区間に有意差はなかった (Table II, III)。日増体量は *Lactobacillus plantarum* L-137 株摂取区が、無薬区に比べ有意に高かったが有薬区間に有意差はなかった (Table IV)。IFN- β mRNA レベルは 40 日目に *Lactobacillus plantarum* L-137 株摂取区で有意に高かった (Figure II, $P < 0.05$)。

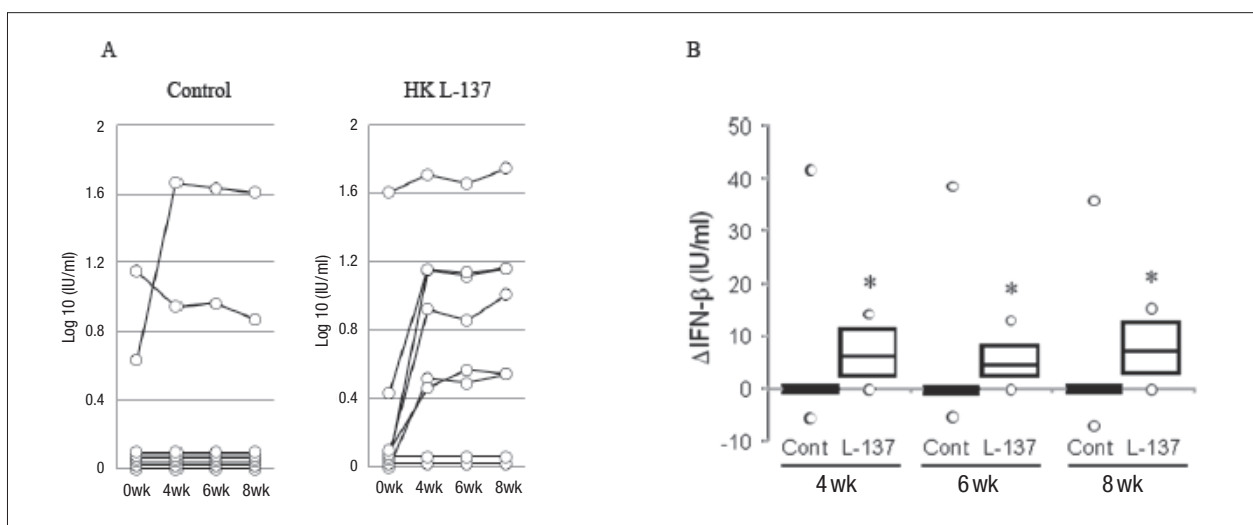


Figure I

Table II Biochemical examination of blood at day 40 and day 98 after the beginning of feeding

D40								
	TG (mg/dl)	GOT (U/l)	GGT (g/dl)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (mg/dl)	BUN (mg/dl)	TCHO (mg/dl)
Basal	22.8 ± 8.6 ^a	40.7 ± 8.8 ^a	46.7 ± 10.7 ^a	5.2 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.2 ^a	110 ± 10 ^a	12.3 ± 1.8 ^a	67.2 ± 3.0 ^a
Antibiotics	19.3 ± 4.8 ^a	39.7 ± 13.4 ^a	47.7 ± 16.3 ^a	5.6 ± 0.3 ^a	3.9 ± 0.2 ^b	106 ± 8 ^a	10.9 ± 0.4 ^a	67.7 ± 7.7 ^a
HK L-137	20.3 ± 4.8 ^a	41.7 ± 10.4 ^a	44.3 ± 11.0 ^a	5.6 ± 0.2 ^a	3.6 ± 0.2 ^{ab}	107 ± 5 ^a	11.0 ± 1.8 ^a	71.5 ± 6.3 ^a
D98								
	TG (mg/dl)	GOT (U/l)	GGT (g/dl)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (mg/dl)	BUN (mg/dl)	TCHO (mg/dl)
Basal	23.2 ± 3.9 ^a	37.8 ± 9.9 ^a	55.8 ± 15.8 ^a	7.4 ± 0.3 ^a	4.1 ± 0.3 ^a	104 ± 4 ^a	11.3 ± 1.3 ^a	87.0 ± 7.2 ^a
Antibiotics	17.5 ± 6.1 ^a	37.3 ± 9.4 ^a	53.0 ± 11.8 ^a	7.1 ± 0.3 ^a	4.4 ± 0.3 ^a	103 ± 7 ^a	11.4 ± 1.5 ^a	84.2 ± 3.5 ^a
HK L-137	21.3 ± 5.2 ^a	34.7 ± 9.4 ^a	57.0 ± 14.8 ^a	7.6 ± 0.7 ^a	4.4 ± 0.3 ^a	107 ± 9 ^a	12.3 ± 2.0 ^a	89.5 ± 13.5 ^a

Values are means ± SD. Basal group, $n=6$. HK L-137 group, $n=6$. Antibiotics group, $n=6$.

Values in the same column without a common superscript letter differ significantly ($P<0.05$) by Tukey Kramer's multiple comparison tests.

Table III Effect of oral administration of HK L-137 on blood cell counts in pigs

D40							
	RBC ($10^7/ml$)	WBC ($10^5/ml$)	Lymp ($10^5/ml$)	Neut ($10^5/ml$)	Mono ($10^5/ml$)	N/L ratio	IgG (mg/dl)
Basal	634 ± 28 ^a	179 ± 16 ^b	115 ± 16 ^a	48.6 ± 9.1 ^b	11.9 ± 2.4 ^a	0.44 ± 0.15 ^a	4.76 ± 0.70 ^a
Antibiotics	642 ± 22 ^a	154 ± 10 ^a	106 ± 8 ^a	33.9 ± 6.1 ^a	11.2 ± 2.3 ^b	0.32 ± 0.07 ^a	4.29 ± 0.63 ^a
HK L-137	643 ± 26 ^a	175 ± 13 ^b	109 ± 7 ^a	49.9 ± 11.6 ^b	12.6 ± 2.0 ^a	0.46 ± 0.11 ^a	4.37 ± 1.07 ^a
D98							
	RBC ($10^7/ml$)	WBC ($10^5/ml$)	Lymp ($10^5/ml$)	Neut ($10^5/ml$)	Mono ($10^5/ml$)	N/L ratio	IgG (mg/dl)
Basal	720 ± 55 ^a	197 ± 24 ^a	124 ± 17 ^a	53.2 ± 7.8 ^{ab}	12.6 ± 3.1 ^a	0.43 ± 0.06 ^{ab}	11.43 ± 2.13 ^a
Antibiotics	704 ± 23 ^a	177 ± 22 ^a	118 ± 16 ^a	43.8 ± 8.1 ^a	9.6 ± 1.7 ^a	0.37 ± 0.04 ^a	9.23 ± 1.79 ^a
HK L-137	712 ± 40 ^a	194 ± 11 ^a	117 ± 10 ^a	56.2 ± 4.9 ^b	13.1 ± 2.3 ^a	0.48 ± 0.07 ^b	12.19 ± 3.05 ^a

Values are means ± SD. Basal group, $n=6$. HK L-137 group, $n=6$. Antibiotics group, $n=6$.

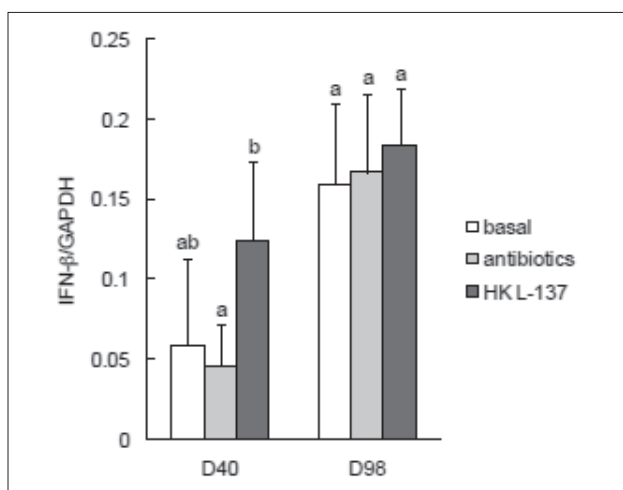
Values in the same column without a common superscript letter differ significantly ($P<0.05$) by Tukey Kramer's multiple comparison tests.

Table IV Effect of oral administration of HK L-137 on body weight in pigs

	intervention periods		
	D0	D40	D98
	(kg)		
Basal	10.7 ± 0.7 ^a	31.4 ± 2.3 ^a	72.3 ± 3.6 ^a
Antibiotics	10.7 ± 0.7 ^a	35.0 ± 2.8 ^b	81.5 ± 5.0 ^b
HK L-137	10.7 ± 0.5 ^a	33.0 ± 1.8 ^{ab}	78.5 ± 4.5 ^b

Values are means ± SD. Basal group, $n=6$. HK L-137 group, $n=6$. Antibiotics group, $n=6$.

Values in the same column without a common superscript letter differ significantly ($P<0.05$) by Tukey Kramer's multiple comparison tests.

**Figure II**

結 論

細胞壁表面に存在しているテイコ酸、特に、リポテイコ酸が、L-137株の強力なIL-12産生誘導活性に寄与しており、特定のプラスミドがリポテイコ酸の発現強度に関与している可能性が示された。

Lactobacillus plantarum L-137株摂取群は健常者の血清IFN-β濃度を上昇させたことから、ウイ

ルス感染、特に感染初期のウイルスの増殖抑制に有用であることが示唆された¹¹⁾。HK L-137の日常摂取は、免疫機能の増強を介し、健常者の上気道感染の発症や重症度を低下させることが示唆された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団ならびに関係各位の皆様にご心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000;130:403S-9S.
- 2) Nomoto K. Prevention of infections by probiotics. *J Biosci Bioeng* 2005;100:583-92.
- 3) Yasui H, Shida K, Matsuzaki T, Yokokura T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999;76:383-9.
- 4) Murosaki S, Yamamoto Y, Ito K, Inokuchi T, Kusaka H, Ikeda H, Yoshikai Y. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:57-64.
- 5) Murosaki S, Muroyama K, Yamamoto Y, Yoshikai Y. Anti-tumor effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:157-64.
- 6) Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Yoshikai Y, Tsuru T. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults. *J Nutr* 2006;136:3069-73.
- 7) Maeda M, Nakamura R, Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Kase T, Yoshikai Y. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int Immunopharma* 2009;9:1122-5.
- 8) Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:259-66.
- 9) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 ; 140:805-20.
- 10) Hirose Y, Murosaki S, Fujiki T, Yamamoto Y, Yoshikai Y, Yamashita M. Teichoic acids on *Lactobacillus plantarum* cell surfaces induce interleukin-12p40 production. *Microbiol Immunol* 2010; 54:143-51.
- 11) Arimoria Y, Nakamura R, Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Shidara O, Hiroshi Ichikawad H, and Yoshikai Y. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances type I interferon production in healthy humans and pigs. *Immunophar. Immunotoxi.* 2012 ; 34:937-43.

Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances type I interferon production in healthy humans and pigs

Yasunobu Yoshikai

*Division of Host Defense, Medical Institute of Bioregulation
Kyushu University*

Abstract

We have previously reported that oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 (HK L-137) stimulates innate immunity for production of type I interferon (IFN) which subsequently augments host defense against influenza A virus infection in mice. We here examined the effect of HK L-137 intake on type I IFN in humans. Sixteen subjects were randomly assigned to receive a tablet containing 10 mg of HK L-137 or a matching tablet for 8 weeks (wk) and the serum levels of type I IFN were examined before and after the first or second dose of the trivalent inactivated influenza vaccine. There were no differences in the seroresponse rate, the seroprotection rate and the geometric mean Ab titers after either the first or second dose of vaccine between the HK L-137 group and the control group. On the other hand, the levels of IFN- β were significantly higher in the HK L-137 group than in the control group before vaccination although the vaccination conferred little additional induction of IFN- β . We further examined IFN- β gene expression in the whole peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of pigs fed on a diet containing HK L-137 or control and found that the IFN- β mRNA levels were significantly higher in the HK L-137 group than in the control group. The finding that daily intake of HK L-137 enhances type I IFN production and host defense against influenza A virus infection in mice may be applied to at least two different additional species.