



# くず餅由来乳酸菌の免疫調節機能によるスクリーニングと免疫賦活作用

神山恭子<sup>1)</sup> / 跡部季子<sup>2)</sup> / 上杉泰介<sup>3)</sup> / 一般社団法人くず餅乳酸菌研究所

## はじめに

日本古来の和菓子「くず餅」は和菓子ではめずらしい発酵食品である。その製法はグルテンを取り除いた小麦でんぷんを長期間にわたって発酵・熟成する。その発酵の際に関与する乳酸菌のうち 20 種がすでに分離同定されている。

他方、発酵食品を介して摂取した乳酸菌が生体を与える様々な健康効果が報告されており、間接的に関与するプロバイオティクスとしての腸内フローラの改善だけでなく、バイोजェニクスとして直接免疫担当細胞と直接的な相互作用を介することによる免疫調節作用、抗変異原性作用などがある<sup>1)2)</sup>。くず餅にも乳酸菌が含まれるので、摂食することで上記のような免疫賦活作用が期待できれば、感染不安の高まる現代日本において日本人の健康に寄与することができると考えられる。

そこで本稿ではくず餅由来乳酸菌 20 種の内最も免疫調節作用が高い乳酸菌のスクリーニングと、その抗炎症性サイトカインの産生量の定量、免疫担当細胞への取り込み率の評価などを行い、くず餅由来乳酸菌の免疫調節作用について調査したので報告する。

## I. 免疫調節作用を有する乳酸菌のスクリーニング

くず餅の原料から分離・同定した計 20 種類の乳酸菌株のなかで最も免疫調節機能の高い乳酸菌をスクリーニングするため、免疫担当細胞としてヒト単

球細胞系 THP-1 細胞を用いて免疫調節の代表的な因子である免疫系サイトカイン インターロイキン (以後 IL) -12, 10, 6 の産生量を指標に各乳酸菌の免疫調節機能についてスクリーニングした。

乳酸菌の免疫調節作用に関しては、これまでマクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞を乳酸菌が刺激することにより炎症性サイトカインである IL-12 や IL-6 産生を促進することで Th1 細胞を活性化させて Th2 細胞を抑制し、Th1/Th2 バランスの崩れを改善する効果が多数報告されている<sup>3)4)</sup>。抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生誘導によって Th2 細胞を活性化するという報告もある<sup>5)</sup>。

そこで、腸管免疫系における免疫担当細胞であるマクロファージや樹状細胞のモデルとしてヒト由来の培養細胞である THP-1 細胞を利用した。THP-1 細胞は急性単球性白血病の患者より得られた単球細胞であり、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で処理することにより樹状細胞化し、各種抗原の貪食細胞を獲得する。また、分化した THP-1 細胞は細胞表面に Toll like receptor をはじめとした抗原認識を行う様々な受容体を発現しており、共存する乳酸菌などを認識することでインターロイキンなどの細胞間の情報伝達物質であるサイトカインを分泌する。そのため、当該試験において免疫担当細胞として採用することとした。

### 1. 試験方法

#### 1) 乳酸菌検体の調製

くず餅原料から分離された計 20 種類の乳酸菌株

1) 株式会社船橋屋 2) 株式会社ニュートネクス 3) 東京工業大学 生命理工学院

キーワード: 乳酸菌, 免疫, スクリーニング, 免疫賦活, IL-12, IL-6, IL-10, くず餅, くず餅乳酸菌

(凍結グリセロール溶液) を MRS 液体培地 (BD Bioscience, Difco Lactobacilli MRS Broth 5.5%) を用い、液体培養を実施した。液体培養は卓上型振盪恒温槽 (タイテック社製, PERSONAL-11) にて行い、培養後培養液の回収を行った。培養条件を表 1 に示す。18 時間培養後の培養液は遠心分離 (10,000 xg, 4°C, 10 min) のち培養上清を除き、10 mL の PBS (-) 溶液に懸濁した。その後再度遠心分離 (10,000 xg, 4°C, 10 min) 後、培養上清を取り除いて 10 mL の PBS (-) 溶液に再懸濁して菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液を Dry ThermoUnit (タイテック社製, DTU-1B) にて加熱処理 (100°C, 10 min) を実施し、試料を作成した。

なお、調製した各乳酸菌死菌体を含有する試料についてトーマ血球計算盤を用いて懸濁液あたりの乳酸菌総菌数 (cells/mL) を計算し、各試料の乳酸菌総菌数が  $2.5 \times 10^8$  cells/mL となるように PBS (-) 溶液を用いて希釈を行い、菌体濃度を調製した。

#### 2) 免疫担当細胞 THP-1 細胞の調製

THP-1 細胞 (JCRB 細胞バンク, JCRB0112.1 株) について 3 回以上細胞継代を実施し、 $5 \times 10^5$  cells/mL になるように THP-1 細胞培養用培地 (RPMI1640 培地 + 10% ウシ血清アルブミン, 100 units/mL ペニシリン G, 100 µg/mL ストレプトマイシン硫酸塩) に懸濁し、96 ウェルプレート (Corning 社製, 353046) に懸濁液を 100 µL ずつ添加し、さらに PMA を終濃度が 100 nM となるように添加した。37°C, 48 時間, 5% CO<sub>2</sub>, 暗所下のインキュベーターで培養を行い、THP-1 細胞を分化させた。48 時間後の分化後、さらに THP-1 細胞の表層たんぱく質等の発現誘導するために、THP-1 細胞培地用培地に IL-4 (終濃度: 20 ng/mL) を添加したものに培地交換を行い、37°C, 48 時間, 5% CO<sub>2</sub>, 暗所下のインキュベーターで培養を行った。

#### 3) THP-1 細胞への試料の添加

調製した THP-1 細胞を前培養した培地を取り除き、フィルター (孔径 0.22 µm) 滅菌した PBS1

(-) を 100 µL 添加して洗浄し、PBS (-) を取り除いた。その後、IFN-γ を最終濃度 100 ng/ml になるよう添加した培地を 100 µl ずつ加えた。

その後、1) において加熱処理した試料 10 µL ( $2.5 \times 10^6$  cells 相当) を加えた。ネガティブコントロールとして 10 µL の PBS (-), ポジティブコントロールとして試料同様に菌体濃度を調製し、加熱処理した乳酸菌 JCM1132 株を 10 µL ( $2.5 \times 10^6$  cells 相当) をそれぞれ加えた。

調製後、5% CO<sub>2</sub> 下のインキュベーター内で 37°C, 24 時間のインキュベーションを行った後、培養上清を 100 µL 回収した。

#### 4) 各種インターロイキン (IL) の定量

3) において回収した THP-1 細胞培養上清 100 µL を用いて、上清中の免疫系サイトカインである IL-12, IL-6, IL-10 の濃度を ELISA のキットを用いて定量した。定量に用いた測定キットの一覧を表 2 に示す。

## 2. 結 果

本試験ではくず餅原料から単離・同定された計 20 種類の *Lactobacillus* 乳酸菌を検体として用いた。またポジティブコントロールとして乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* JCM1132 を相対値算出用の比較対照菌株として用いた。JCM1132 株は免疫調節作用の高い<sup>6)</sup> *Lactobacillus acidophilus* の type strain であり、高い IL-12 活性を持つ菌株として知られている<sup>7,8)</sup>。

#### 1) 炎症性サイトカイン IL-12 産生量の定量

炎症性サイトカインの代表的な分子である IL-12

表 1 乳酸菌の培養条件

項 目	条 件
培養規模 (mL)	10
植 菌 量 (mL)	0.3
培養温度 (°C)	37
振 盪 度 (rpm)	120
培養時間 (hr)	18

表 2 インターロイキン測定キット一覧

測定対象	メーカー	キット名	型 番
IL-12	R&D Systems	Human IL-12/IL-23 p40 DuoSet ELISA	DY1240-05
IL-6	BioLegend	ELISA MAX <sup>TM</sup> Deluxe Set Human IL-6	430504
IL-10	BioLegend	ELISA MAX <sup>TM</sup> Deluxe Set Human IL-10	430604

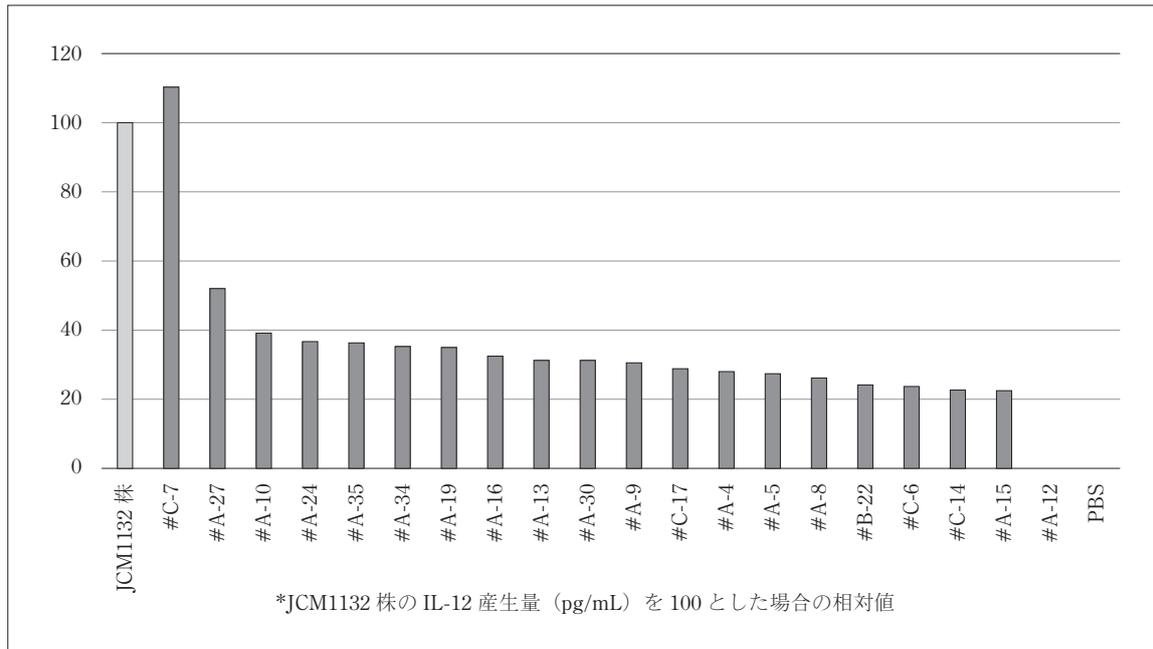


図1 各乳酸菌のIL-12産生量相対値(降順)(n=3)

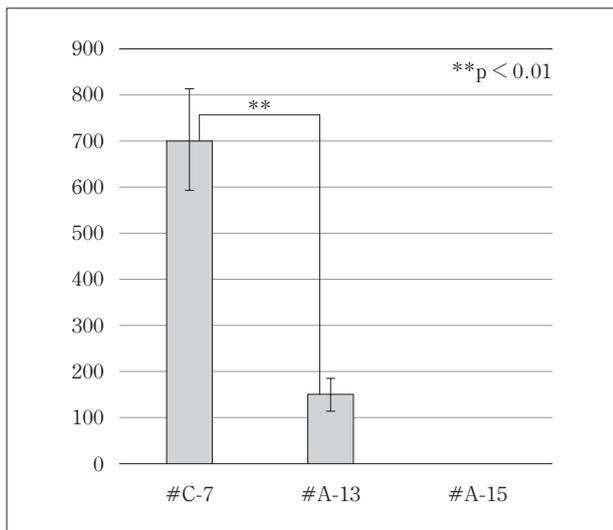


図2 乳酸菌3菌株のIL-12産生量 (pg/mL) 比較 (n=3)

表3 乳酸菌3菌株のIL-12産生量 (n=3)

菌株	IL-12産生量 (pg/mL)				標準偏差
	1回目	2回目	3回目	平均値	
#C-7	732	821	554	703	111
#A-13	135	197	112	148	36
#A-15	-1	-62	-72	-45	31

著にIL-12産生量が高く、ポジティブコントロールであるJCM1132株を上回る活性をもつことが明らかになった。

上記の結果に関し、再現性を確認するため、IL-12産生量の高活性→中活性→低活性がみられた代表的な3株としてC-7株→A-13株→A-15株について再度THP-1細胞に添加し、IL-12産生量を定量した。結果を図2と表3に示す。

その結果、再現性試験を実施しても初回と同様に乳酸菌C-7株において顕著なIL-12産生量が認められ、中活性株であるA-13株に比べて有意に高いIL-12産生量を呈した。

#### 2) 炎症性サイトカインIL-6産生量の定量

炎症性サイトカインであるIL-6はIL-12と同様に、免疫応答や炎症反応の調節において重要な役割を果たしている主要な分子である。IL-6も乳酸菌等の刺激により免疫細胞などから産生され、制御性

は抗アレルギーや感染症予防に効果的な免疫賦活作用の高い乳酸菌のスクリーニング指標として頻繁に定量されている分子である。IL-12のサブユニットのうち、より定量性の高いp-40に関してキットを用いて定量し、JCM1132株を100とした場合の相対値として各乳酸菌のTHP-1細胞におけるIL-12産生量を比較した。結果を図1に示す。菌株の違いによりIL-12産生量が大きく異なり、IL-12産生量相対値を降順に並べると、菌株番号F1805株(本報告内では、試験菌株管理番号C-7と呼ぶ)が顕

表4 各乳酸菌のIL-6産生量 (pg/mL) (n = 3)

菌株番号	IL-6産生量 (pg/mL)				標準偏差
	1回目	2回目	3回目	平均値	
#A-10	158	121	-6	91	70
#A-13	0	0	0	0	0
#A-15	0	0	0	0	0
#C-6	0	0	0	0	0
#C-7	540	659	461	553	81
#C-14	-6	103	139	79	62
#A-19	158	84	214	152	53
#A-24	0	0	0	0	0
#A-27	30	-6	84	36	37
#A-34	0	0	0	0	0
JCM 1132 株	251	176	121	183	53
PBS (-)	0	0	0	0	0

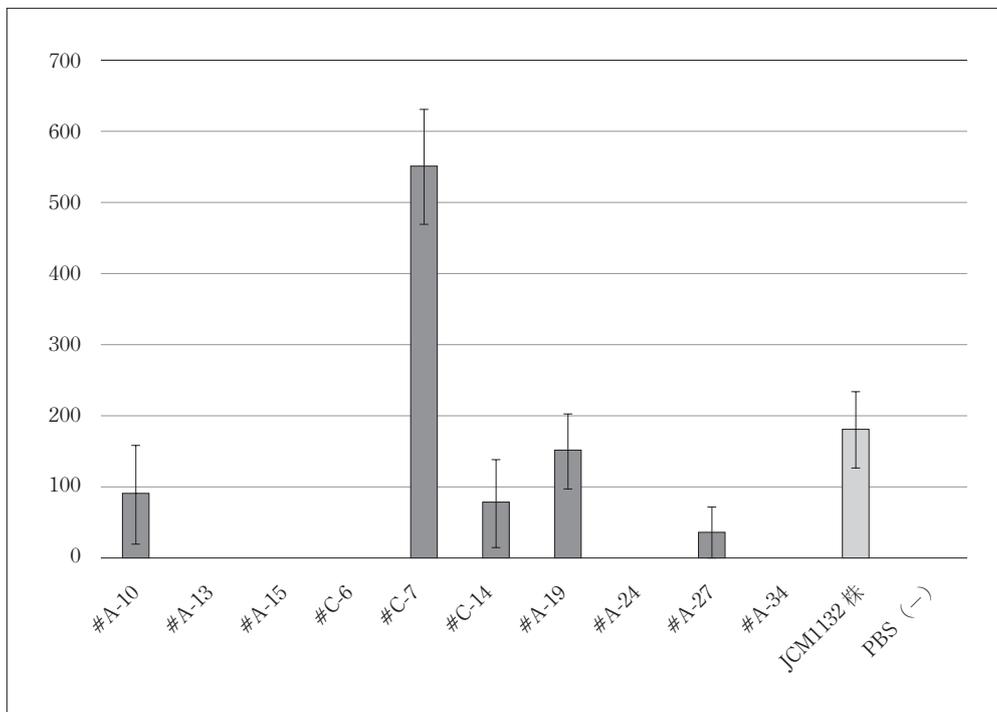


図3 乳酸菌 10 菌株の IL-6 産生量 (pg/mL) 比較 (n = 3)

T細胞の活性を抑える一方で、T細胞サブセットの一つであるTh17細胞への分化促進を行うことにより主に身体に侵入した細菌やウイルスなどの異物を排除するための役割を担う。このIL-6に対してELISAキットを用いて定量し、各乳酸菌のTHP-1細胞におけるIL-6産生量を比較した。実験工数の関係上、分析対象とする乳酸菌数をIL-12の結果をもとに半数に絞り込み試験を行った。結果を表4、図3に示す。

IL-12産生量が顕著に高かったC-7株がIL-6産生量でも顕著に高い産生量を示し、ポジティブコントロールであるJCM1132株の約3倍のIL-6産生量を示した。

### 3) 炎症性サイトカインIL-10産生量の定量

抗炎症性サイトカインであるIL-10はIL-12やIL-6などの炎症性サイトカインによって、増強された免疫反応が過剰になった場合に引き起こされる、自己を構成する正常な成分までも攻撃してしま

表5 各乳酸菌の IL-10 産生量 (pg/mL) (n = 3)

菌株番号	IL-10 産生量 (pg/mL)				標準偏差
	1回目	2回目	3回目	平均値	
#A-13	8	5	5	6	1
#A-15	3	1	4	3	1
#C-7	1	1	0	0	0
#A-34	2	10	3	5	4
JCM 1132 株	4	5	3	4	1
PBS (-)	2	10	3	5	4

表6 乳酸菌 10 菌株の IL-12, IL-6 産生量 (n = 3)

菌株番号	IL-6 産生量 (pg/mL)	IL-12 産生量 (相対値*)
#A-10	91	39
#A-13	0	31
#A-15	0	22
#C-6	0	23
#C-7	553	110
#C-14	79	22
#A-19	152	34
#A-24	0	36
#A-27	36	52
#A-34	0	35
JCM 1132 株	183	100

\*JCM1132 株の IL-12 産生量 (pg/mL) を 100 とした場合の相対値

う自己免疫疾患などを抑制する役割を果たす。このような過剰な攻撃を抑制するために、IL-10 は主に 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2 細胞) から産生され、炎症性サイトカイン IL-12 等が調節する Th1 細胞と対比して抗炎症性の主要な働きを担う。これまでいくつかの乳酸菌は免疫賦活作用として IL-12 や IL-6 等の炎症性サイトカイン産生促進だけでなく、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生誘導を示すことが報告されている<sup>9)</sup>。そこで、前項までで IL-12 や IL-6 産生量が比較的高かった C-7 株, A-13 株, A-15 株を含めた複数の乳酸菌株に関して ELISA 測定キットを用いて定量し、IL-10 産生量を比較した。

結果を表5に示す。

ポジティブコントロールである JM1132 株を含め今回検討に用いたすべての乳酸菌株について、ネガティブコントロールである PBS (-) とほとんど同値であり、極めて低い IL-10 産生量であることが明らかになった。この結果から、今回検討に用いた乳酸菌には抗炎症性サイトカインに関する調節作用はほとんど望めないことが明らかになった。

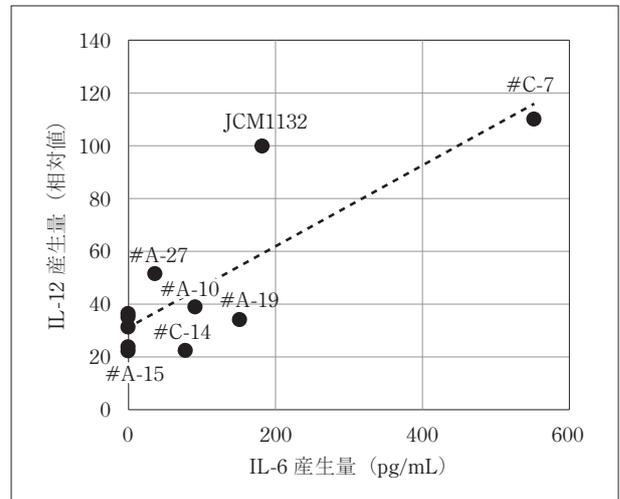


図4 乳酸菌 10 菌株の IL-12, IL-6 産生量の相関解析

### 3. まとめ

くず餅由来の乳酸菌 20 種類の免疫調節作用を解析した結果、乳酸菌株の違いにより免疫調節作用が大きく異なることが明らかとなった。中でも、*Lactobacillus* に属する C-7 株が、免疫調節作用の有無を測る指標の一つである IL-12, IL-6 の高い産生

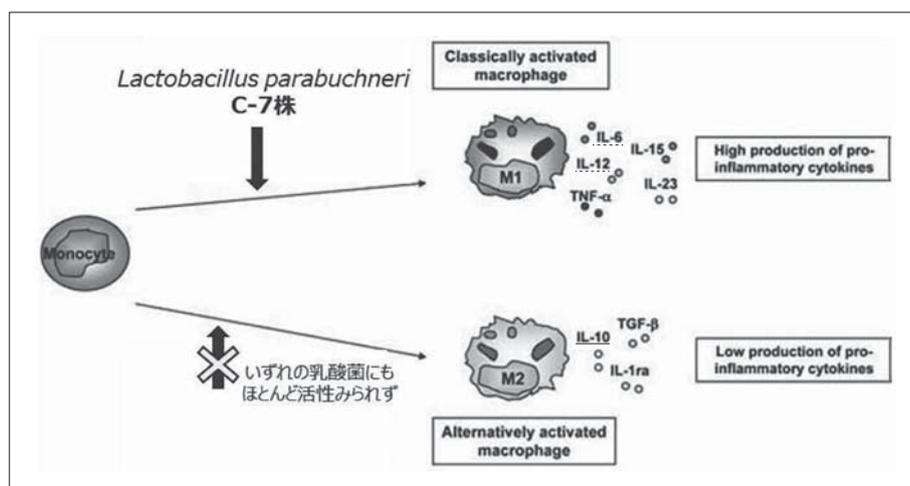


図5 C-7株の推定される免疫調節作用

量を示すことが認められた。

IL-12産生量（相対値）とIL-6産生量（絶対値）の相関を表6、図4に示す。

上記より、くず餅由来乳酸菌のうち、C-7株が特異的に高活性であり、ポジティブコントロールとして採択したJCM1132株よりIL-12、IL-6産生量が高いことが明らかになった。

これらの結果から、くず餅由来の乳酸菌C-7株が免疫担当細胞を刺激し、高いIL-12、IL-6産生量を誘導する免疫調節機能の高い乳酸菌として選抜された。また抗炎症サイトカインIL-10についてはほとんど産生されなかった。

C-7株の想定される免疫調節作用を図5に示す。

## II. 免疫担当細胞内への取り込み率の評価

免疫調節機能の高い乳酸菌はマクロファージ等の免疫担当細胞内に取り込まれることで刺激されるメカニズムがよく知られている<sup>10)</sup>。

経口的に摂取された乳酸菌は腸管壁を覆う上皮細胞や、免疫担当細胞であるマクロファージや樹状細胞により認識される。腸管上皮細胞に認識された乳酸菌は、IL-12やIL-6などのサイトカイン産生制御による免疫調節に寄与することによって、感染防御や抗アレルギー作用生体に有益な効果をもたらす<sup>11)12)</sup>。近年の研究により、これら乳酸菌の免疫調節機能に関しマクロファージや樹状細胞による乳酸菌の認識が重要であることがわかってきている。例えば、腸管関連リンパ組織のパイエル板被覆上皮に存在するM細胞を介して、免疫調節作用がある乳

酸菌が取り込まれる機構が明らかになっており<sup>13)</sup>、乳酸菌株の食作用指数とIL-12誘導能は正の相関を示す<sup>14)</sup>。さらに取り込みにかかる因子のマスキングや取り込み阻害剤を用いることでIL-12産生能が落ちることも報告されている<sup>15)</sup>。

マクロファージや樹状細胞は上皮細胞の隙間に樹状突起を伸長させ、腸管腔内の乳酸菌菌体もしくはその一部を直接認識し、免疫担当細胞が乳酸菌を認識することでサイトカイン産生やT細胞の分化・抗体産生などが活性化すると考えられている<sup>16)</sup>。そこで、IL-12、IL-6産生量の高かったC-7株を含めた複数の乳酸株において、免疫担当細胞内への取り込み率について差があるかフローサイトメトリー法によって評価した。

### 1. 試験方法

#### 1) 乳酸菌検体の調製

スクリーニングにおいてIL-12、IL-6産生量が高活性、中活性、低活性であったC-7株、A-13株、A-15株、およびA-34株とポジティブコントロールとして*Lactobacillus acidophilus* JCM1132株の計5株において培養を行った。液体培養の培地・培養条件・洗浄法はスクリーニングと同様に行い、各乳酸菌死菌体試料を作成した。

また上記にて得た死菌体を含有する試料1mLに対し、5(6)-CFDA, SE (ANASPEC社製, AS-89000)が5mMとなるようDMSOに溶解した蛍光標識液10μLを添加し、30°C、1時間、暗所下でインキュベートした。その後、遠心分離(10,000xg, 4°C, 10min)ののち培養上清を除き、1mLのPBS(-)

表7 供試乳酸菌のIL-12, IL-6産生量 (n = 3)

菌株番号	IL-6 産生量 (pg/mL)	IL-12 産生量 (相対値 <sup>※</sup> )
#A-13	0	31
#A-15	0	22
#C-7	553	110
#A-34	0	35

※JCM1132株のIL-12産生量 (pg/mL) を100とした場合の相対値

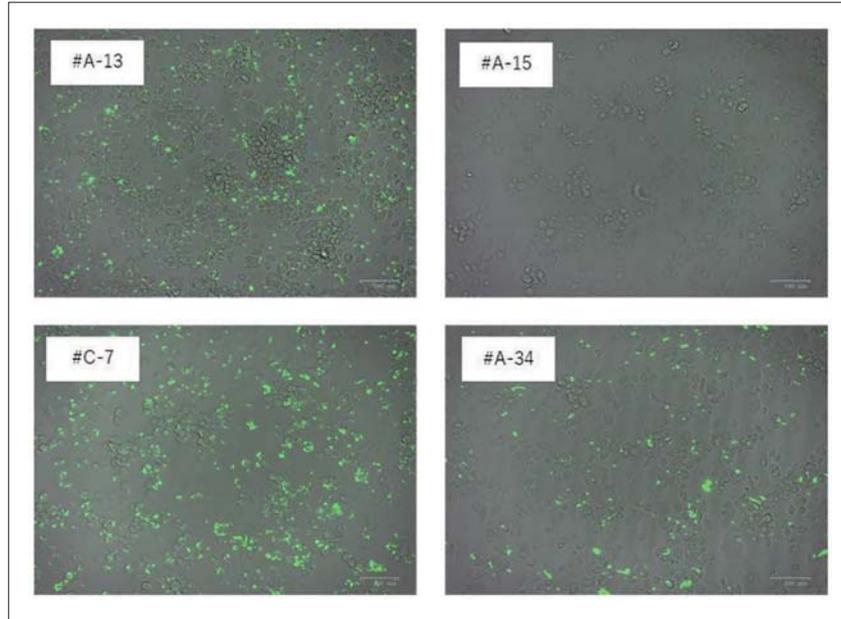


図6 THP-1細胞内に取り込まれた乳酸菌の蛍光画像

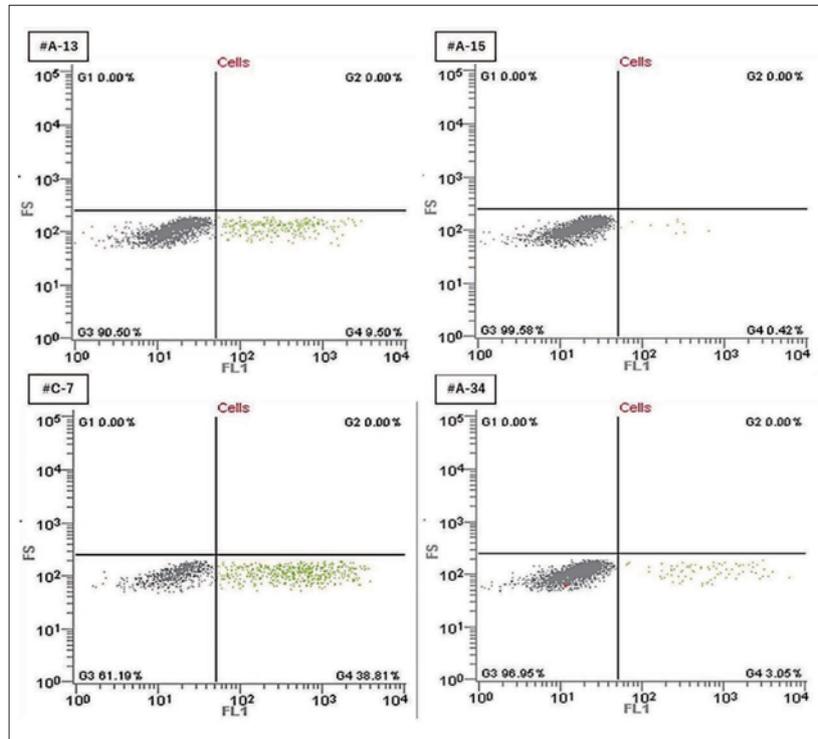


図7 フローサイトメトリー法による乳酸菌取り込み率

溶液に再懸濁し、さらに 30°C、1 時間インキュベートし、蛍光標識試料を作成した。

なお、調製した試料についてトーマ血球計算盤を用いて蛍光標識試料あたりの乳酸菌総菌数 (cells/mL) を計算し、各試料の乳酸菌総菌数が  $5.0 \times 10^7$  cells/mL となるように PBS (-) 溶液を用いて希釈を行い、菌体濃度を調製した。

#### 2) 免疫担当細胞 THP-1 細胞の調製

THP-1 細胞 (JCRB 細胞バンク, JCRB0112.1 株) についてスクリーニング時と同様に THP-1 細胞を調製した。

#### 3) THP-1 細胞への試料の添加

調製した THP-1 細胞を前培養した培地を取り除き、フィルター (孔径 0.22  $\mu\text{m}$ ) 滅菌した PBS (-) を 100  $\mu\text{L}$  添加して洗浄し、PBS (-) を取り除いた。

その後、1) において調製した蛍光標識された乳酸菌を含有する蛍光標識試料 10  $\mu\text{L}$  ( $5.0 \times 10^5$  cells 相当) を加えた。ネガティブコントロールとして 10  $\mu\text{L}$  の PBS (-) を加えた。

調製後、5% CO<sub>2</sub> 下のインキュベーター内で 37°C、2 時間のインキュベートを行った。

#### 4) セルイメージャーによる蛍光画像の取得

3) において蛍光標識された試料と THP-1 細胞を 2 時間インキュベートした後、THP-1 細胞内に取り込まれなかった乳酸菌体を含む培養上清を取り除き、100  $\mu\text{L}$  の PBS (-) で 3 回 THP-1 細胞を洗浄した。その後、蛍光セルイメージャー ZOE (BIO-RAD 社製, 1450031J1) を用いて THP-1 細胞への乳酸菌体の取り込みに関する画像を取得した。

#### 5) フローサイトメトリーによる菌体取り込み率の評価

4) において PBS (-) で 3 回洗浄した THP-1 細胞についてプレートに接着した THP-1 細胞を引きはがすために 1 mM EDTA を添加した PBS (-) を各ウェルに 150  $\mu\text{L}$  ずつ加え、マイクロプレートミキサー (アズワン製, NS-P) にて 5 分間攪拌した後に、各ウェルをマイクロピペッターでピペティングすることで細胞懸濁液を回収した。その後、各細胞懸濁液を 40  $\mu\text{m}$  のセルストレーナー (Falcon 製, 352340) によりフィルターをろ過し、細胞懸濁液 140  $\mu\text{L}$  を回収した。この細胞懸濁液 140  $\mu\text{L}$  をフローサイトメーター (SONY 製,

EC800) に取込み、蛍光標識された菌体を取り込むことにより生じる細胞の蛍光シフトを検出した (使用フィルタ: FL1, 光源:  $\lambda = 488 \text{ nm}$  レーザー)。

測定後、THP-1 細胞内への菌体の取込み率を以下の計算式により算出し、各菌体について 3 回ずつ実施した。

$$\text{取込み率 (\%)} = \frac{\text{蛍光シフトした細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

## 2. 結 果

スクリーニングにおいて IL-12 産生量が特徴的であった乳酸菌株について免疫担当細胞内への取り込み率を評価した。供試乳酸菌の一覧を表 7 に示す。

#### 1) THP-1 細胞の蛍光画像の比較

フローサイトメトリー法による取り込み評価直前の THP-1 細胞の乳酸菌取り込みの状態を視覚的に評価するため、蛍光セルイメージャーを用いた細胞の蛍光画像の取得を実施した。なお、蛍光の直前に乳酸菌を取り込ませた THP-1 細胞を 3 回 PBS (-) にて洗浄しているため、THP-1 細胞に取り込まれなかった蛍光標識された乳酸菌体に関しては培養液中から除去されている。結果を図 6 に示す。

IL-12 産生量が最も高かった C-7 株と免疫担当細胞である THP-1 細胞をインキュベートした場合に、顕著に蛍光標識された C-7 株が THP-1 細胞に取り込まれている様子が確認された。また IL-12 産生量が中活性である A-13 株、A-34 株に関しても C-7 株ほどではないものの THP-1 細胞に取り込まれている様子が確認された。一方で、IL-12 産生量が低かった A-15 株に関してはほとんど蛍光ラベルされた乳酸菌体を THP-1 細胞内に確認することはできなかった。この結果から、蛍光画像の確認において、IL-12 産生量と蛍光標識された乳酸菌の THP-1 細胞内での局在は相関する可能性が示唆された。

#### 2) フローサイトメトリーによる菌体取り込み率の評価

1) と同一の THP-1 細胞を使用して、フローサイトメトリー法による THP-1 細胞内への蛍光ラベルされた乳酸菌体の取り込み率の定量的評価を実施した。

結果を図 7 に示す。

表8 フローサイトメトリー法による取込み率

菌株番号	THP-1細胞の乳酸菌取込み率				
	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
#A-13	9.5%	10.2%	9.0%	9.6%	0.5%
#A-15	0.4%	0.6%	0.3%	0.4%	0.1%
#C-7	35.0%	38.8%	24.2%	32.7%	6.0%
#A-34	3.1%	3.2%	2.6%	2.9%	0.3%
PBS (-) (ネガティブコントロール)	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%
JCM1132株 (ポジティブコントロール)	24.2%	—	—	24.2%	—

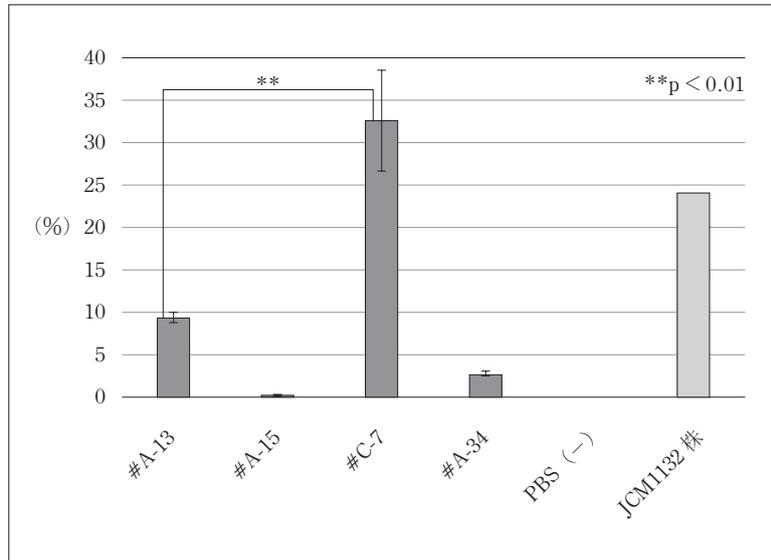


図8 フローサイトメトリー法による乳酸菌取り込み率 (n = 3)

蛍光標識された乳酸菌を含有する THP-1 細胞は、右下の画分にライトグリーンのドットとしてカウントされる一方で、蛍光標識された乳酸菌を含有していない THP-1 細胞は左下の画分にグレーのドットとしてカウントされる。

これを踏まえて、それぞれの乳酸菌を添加した場合のグレーとライトグリーンのドットの分布を見比べると、IL-12 産生量が最も多い C-7 株を THP-1 細胞に添加した場合に、多数のグレーのドットがライトグリーンのドットにシフトしていることが確認された。このことから、蛍光標識された C-7 株を添加した場合に、多数の THP-1 細胞が積極的に C-7 株を取り込んだことからこのような結果に至ったと考えられる。また C-7 株以外を比較すると、A-13 株 > A-34 株 > A-15 株の順に蛍光標識された乳酸菌を含有する THP-1 細胞の割合が多く、1) の結果と同様にフローサイトメトリー法においても IL-12 産生量と THP-1 細胞内への取り込み率は相

関する可能性が示された。そこでこのフローサイトメトリー法による取り込み率測定を計 3 回実施し、それらの結果をもとに各乳酸菌の取り込み率を算出した。結果を表 8、図 8 に示す。

取り込み率を定量した結果、C-7 株の 3 割以上が THP-1 細胞内に取り込まれている結果となり、次に取り込み率の高かった IL-12 産生量が中活性株である A-13 株と比較しても C-7 の取り込み率は有意に高く、ポジティブコントロールとして使用した JCM1132 株と比較しても取り込み率が上回る結果となった。

### 3. まとめ

本項では、IL-12 産生量が顕著に高かった F1805 株 (試験内識別名: C-7 株) を中心に、それらの乳酸菌において免疫担当細胞である THP-1 細胞内への取り込み率の評価を実施したところ、F1805 株 (C-7 株) 株の約 3 割の菌体が THP-1 細胞内に取り込まれており、顕著に取り込み率が高いことが認め

られた。また、興味深いことに IL-12 産生量と THP-1 細胞への取り込み率の相関解析を実施したところ (図 9), 両者は非常に高い正の相関関係にあり, THP-1 細胞内に取り込まれやすい乳酸菌は IL-12 産生量が高くなる可能性が強く示唆された。

### おわりに

本稿では日本古来からの発酵食物であるくず餅の製造過程で働く乳酸菌の免疫賦活作用の有無を, 炎症性サイトカインの IL-12, IL-6 産生量, 抗炎症性サイトカインの IL-10 産生量および免疫担当細胞への取り込み率で評価し, 紹介した。その結果, くず餅製造工程で単離同定された乳酸菌 20 種のうち, *Lactobacillus* 属の乳酸菌 1 種である F1805 株 (試験内識別名: C-7 株) について IL-12, IL-6 産生量, 免疫担当細胞への取り込み率などから高い免疫賦活効果が認められた。

*Lactobacillus* 属乳酸菌は腸内細菌叢でも善玉菌として作用することから, 経口摂取した際にプロバイオティクスとして腸内細菌叢のバランスを改善する効果が見込まれる<sup>17)</sup>が, 免疫賦活効果が見込まれる乳酸菌は摂取することでバイオティクスとしての働きも期待できる<sup>18)</sup>。

ヒトの免疫応答において, Th1 細胞は主に液性免疫のなかでマクロファージや樹状細胞などの貪食作用を活性化し, Th2 細胞は主に液性免疫の中で B 細胞を刺激して抗体産生を活性化させるが, 相対的に Th1 細胞より Th2 細胞が優位であればアレルギー性疾患が増大する。一方で, Th2 細胞より Th1 細胞が優位であれば, 過剰な免疫応答により自己免疫疾患につながる可能性がある。ヒトの免疫恒常性を維持するためには Th1 細胞と Th2 細胞のバランスを整えることが重要である。特に衛生環境の整った現代においては, Th1 細胞より Th2 細胞が優位となり, アレルギーやアトピー等の疾患になる報告例が増えている<sup>19)</sup>。IL-12, IL-6 の産生促進により Th1/Th2 のバランスを改善し免疫応答を整えることは現代病としてもあげられるアレルギーやアトピーの予防効果が期待でき, 実際に乳酸菌を活用したアトピー性皮膚炎の改善も報告されている<sup>20)</sup>。

本稿で乳酸菌 F1805 株 (試験内識別名: C-7 株) に高い IL-12, IL-6 産生量と免疫担当細胞への取り込み率が確認されたことからアレルギーやアトピー

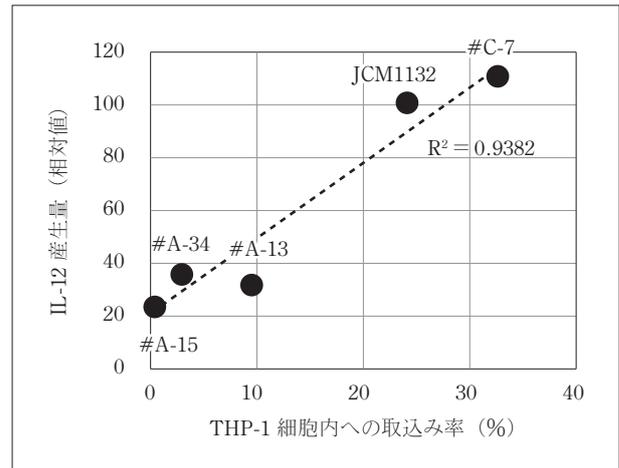


図 9 乳酸菌の IL-12 産生量および免疫担当細胞への取り込み率の相関解析

の予防効果など機能性食品への応用が期待できるが, F1805 株の特異性は他の乳酸菌と比較して, F1805 株のどのような特徴によるものなのかは今のところ不明であり, 免疫担当細胞による F1805 株株の認識されやすさ, F1805 株の細胞表面の特異性などさまざまな可能性が考えられる。今後これら作用機序の解明についてさらなる研究の可能性が考えられる。

### 参考文献

- 冠木敏秀: 健康機能を有する乳酸菌の可能性. *Milk Science* **65**: 203-209;2016.
- 加地留美: 乳酸菌の免疫調節作用に関わる細胞内シグナルとその制御. *化学と生物* **50** (3): 182-187;2012.
- 八村敏志: 乳酸菌の免疫調節機能. *Jpn J Acid Bacteria* **18** (2), 54-57;2007.
- 飛田啓輔, 大谷 元: 数種の乳酸菌およびツール様受容体 2 リガンドで刺激したマウスマクロファージ様株化細胞 J774.1 による IL-12 産生を *Lactobacillus crispatus* KT-11 株は促す. *Milk Science* **64** (1): 1-6;2015.
- Lightfoot YL, Mohamadzadeh M: Tailoring gut immune responses with lipoteichoic acid-deficient *Lactobacillus acidophilus*. *Front Immunol*: **4**: 25; 2013.
- Yanagihara S, Goto H, Hirota T, et al: *Lactobacillus acidophilus* L-92 cells activate expression of immunomodulatory genes in THP-1 cells. *Biosci Microbiota Food Health* **33**: 157-164; 2014.
- Zeuthen LH, Christensen HR, Frøkiaer H: Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol* **13** (3), 365-75; 2006.

- 8) Wang G, Yu Y, Garcia-Gutierrez E, et al: *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132 Strain and Its Mutant with Different Bacteriocin-Producing Behaviour Have Various In Situ Effects on the Gut Microbiota of Healthy Mice. *Microorganisms* **8** (1): 49;2020.
  - 9) Lightfoot YL, Mohamadzadeh M: Tailoring gut immune responses with lipoteichoic acid-deficient *Lactobacillus acidophilus*. *Front Immunol* **4**: 25; 2013.
  - 10) 八村敏志: 乳酸菌の免疫調節作用. *Jpn J Lactic Bact* **18**: 54-57;2007.
  - 11) Miyazawa K, He F, Yoda K, et al: Potent effects of, and mechanisms for, modification of crosstalk between macrophages and adipocytes by lactobacilli. *Microbiol Immunol* **56**: 847-54; 2012.
  - 12) Yanagihara S, Goto H, Hirota T, et al: *Lactobacillus acidophilus* L-92 Cells Activate Expression of Immunomodulatory Genes in THP-1 Cells. *Biosci Microbiota Food Health* **33**: 157-164; 2014.
  - 13) Yanagihara S, Kanaya T, Fukuda S, et al: Uromodulin-SlpA binding dictates *Lactobacillus acidophilus* uptake by intestinal epithelial M cells. *International Immunol* **29**: 357-363; 2017.
  - 14) Onishi K, Mochizuki J, Sato A, et al: Total RNA and genomic DNA of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 induce interleukin-12 production in the mouse macrophage cell line J774.1 via toll-like receptors 7 and 9. *BMC Microbiology* **20**: 217; 2020.
  - 15) Taverniti V, Marengo M, Fuglsang E, et al: Surface Layer of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 Promotes Endocytosis by Dendritic Cells. *Appl Environ Microbiol* **85**: e00138-19; 2019.
  - 16) 加地留美: 乳酸菌の免疫調節作用に関わる細胞内シグナルとその制御. *化学と生物* **50** (3): 182-187;2012.
  - 17) Mekkes MC, Weenen TC, Brummer RJ, et al: The development of probiotic treatment in obesity: a review. *Benef Microbes* **5**: 19-28; 2014.
  - 18) Mitsuoka T: Development of Functional Foods. *Biosci Microbiota Food Health* **33**: 117-128; 2014.
  - 19) Eyerich K, Novak N: Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy* **68**: 974-982; 2013.
  - 20) 藤村響男: アトピー性皮膚炎に対する乳酸菌の効果. *皮膚の科学* **7** (Suppl.10): A38-A44; 2008.
-