

平成 2010 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19780198  
 研究課題名 (和文) 宿主にとって真に有用な乳酸菌の評価・選抜法の確立と利用による家畜専用乳酸菌の提案  
 研究課題名 (英文) An approach to establish a method that allows efficient screening of beneficial probiotic strains for livestock.  
 研究代表者  
 井上 亮 (INOUE RYO)  
 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師  
 研究者番号：70443926

## 研究成果の概要 (和文)：

プロバイオティクスの効果を 1.腸管上皮細胞への影響、2.宿主特異性という 2 つの観点から検証した。多くのプロバイオティック乳酸菌は健康状態の腸管上皮細胞にはほとんど影響を与えないことがわかった。また、少なくとも細胞レベルではプロバイオティック乳酸菌の宿主特異性は無いことが明らかになった。本研究の結果からは、マウスの免疫細胞を用いてブタでも効果が期待できる乳酸菌株をある程度は選抜できると考えられる。

## 研究成果の概要 (英文)：

Effect of probiotics was evaluated with consideration of “effect on intestinal epithelial cells” and “host specificity”. This study showed most probiotic lactic acid bacteria (LAB) did not affect considerably on gene expression of intestinal epithelial cells under physical condition but not inflammatory status. Additionally no host specificity was found at least in *in vitro* co-culture system of splenocyte, mesenteric lymph node tissue with LAB. Thus, probiotic strains effective on pigs could be screened by using mouse cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	660,000	3,860,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：プロバイオティクス、上皮細胞、ブタ、インターロイキン 1 2

## 1. 研究開始当初の背景

家畜に対するプロバイオティクスの使用が普及し始めているが、家畜に使用する乳酸菌株の選抜はそれほど慎重には行われていな

い。プロバイオティクスの効果には宿主特異性が存在するとの報告もあるため、家畜に真に有効なプロバイオティック乳酸菌を慎重に選抜しなければならない可能性が考えら

れる。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者の持つ技術である嫌気条件下における細菌と腸管上皮細胞の共培養系（嫌気共培養系）を利用してプロバイオティック乳酸菌の選抜に有効な指標を検討すること、家畜の腸管上皮細胞を初代培養系にて確立し、この指標を用いてプロバイオティック乳酸菌を選抜・提案することを当初の目的とした。しかし、研究を進めるうちにプロバイオティクスが上皮細胞に与える影響よりも免疫器官の細胞に与える影響の方が大きい可能性がわかったため、免疫器官の細胞に対するプロバイオティクスの効果の宿主特異性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1)有用なプロバイオティクスの指標となる因子を検討すべく、嫌気共培養系にて種々のプロバイオティック乳酸菌とヒト腸管上皮細胞株である Caco-2 を共培養し、プロバイオティクスの炎症時・通常時の影響を、炎症性サイトカインを中心にリアルタイム PCR により網羅的に解析した。

(2)マウスに殺菌乳酸菌体を 10 日間経口投与し、乳酸菌投与により空腸上皮細胞、回腸上皮細胞、空腸パイエル板、回腸パイエル板、腸間膜リンパ節 (MLN)、脾臓で発現が変化するサイトカイン・ケモカイン遺伝子をリアルタイム PCR により網羅的に解析した。対照として生理食塩水を 10 日間投与したマウスを用いた。

(3)マウスおよびブタの脾臓、MLN の細胞を採取し、マウス糞便由来の乳酸菌株 4 株、ラット糞便由来の乳酸菌株 4 株、ブタ糞便由来の乳酸菌株 4 株、市販プロバイオティック乳酸菌株 3 株と共培養した。培養 48 時間後に培養上清中のインターロイキン 12 (IL-12) 濃度を ELISA で解析した。

## 4. 研究成果

(1) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を使用して Caco-2 細胞に炎症を誘導し、9 種類のプロバイオティクスと共培養を行ったところ、どの細菌株でも他のプロバイオティック乳酸菌で報告されているような IL-8 抑制作用を確認することができた。しかし、これは乳酸の産生に伴う pH の低下に依存するものであり (図 1)、乳酸菌の菌体や分泌タンパク質等による直接的な効果ではないことを本研究では明らかにした。しかし、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現を網羅的に解析したところ、多くの乳酸菌株は pH に関係なく CXCL11 の発現を有意に抑制するこ

とがわかった (図 2、図 3)。乳酸菌が CXCL11 の発現に影響を与えることは本研究が初めて明らかにした事実である。一方で、通常状態の Caco-2 細胞に乳酸菌を作用させても大きく変化する遺伝子はほとんど見られないことがわかった。これは、腸管上皮細胞は通常、乳酸菌を受容するための Toll-like 受容体 2 などの発現が低いためであると考えられる。

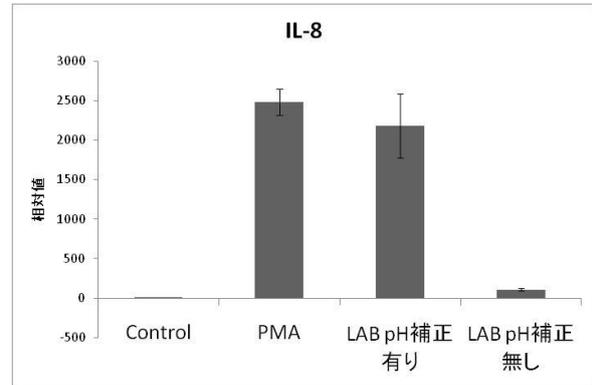


図 1. 乳酸菌が Caco-2 細胞の PMA 誘導性 IL-8 遺伝子の発現に与える影響と pH との関係

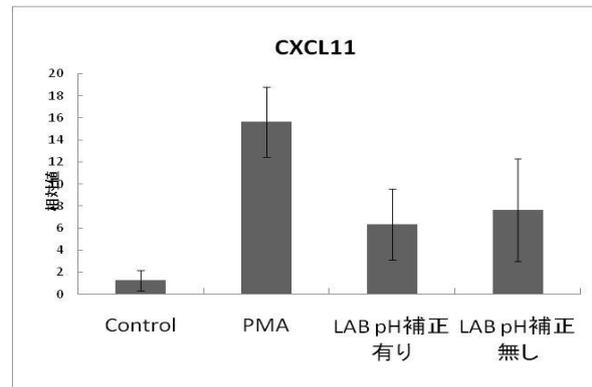


図 2. 乳酸菌が Caco-2 細胞の PMA 誘導性 CXCL11 遺伝子の発現に与える影響と pH との関係

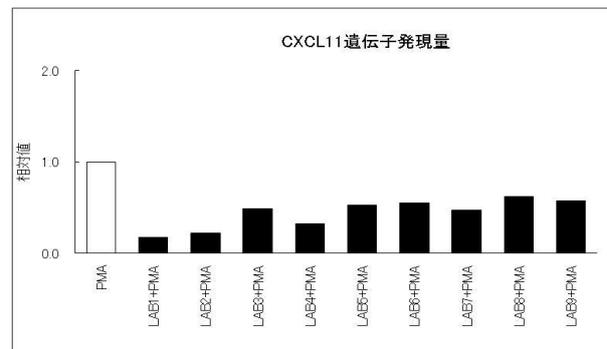


図 3. 種々の乳酸菌が Caco-2 細胞の PMA 誘導性 CXCL11 遺伝子の発現に与える影響

(2)(1)の結果を in vivo で検証すべく、殺菌乳

酸菌の腸管上皮細胞や免疫器官への影響を健全なマウスで検討したところ、免疫器官によって異なった影響が見られることがわかった(表1)。しかし、腸管上皮細胞へ影響は(1)同様ほとんどみられなかった。このことから、乳酸菌の経口投与は腸管上皮細胞よりも免疫器官の細胞に影響を与えやすいことが考えられた。これは *in vitro* の結果を支持すると共に、無害な腸内細菌に対しては免疫的寛容が成立しているという報告と一致している。つまり、乳酸菌により効率的に免疫賦活を行うためには、上皮細胞ではなく、免疫器官の免疫担当細胞を対象とするべきなのかもしれない。

表1 殺菌乳酸菌の経口投与が各種臓器のサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現に与える影響(対照を1とした相対値)

Genes	jejunal-PP		ileal-PP		MLN		spleen	
	C	LAB	C	LAB	C	LAB	C	LAB
IL-1a	1.00 ± 0.06	0.70 ± 0.10	1.00 ± 0.16	2.21 ± 0.61*	1.00 ± 0.15	2.88 ± 0.83*	1.00 ± 0.23	1.40 ± 0.10
IL-1b	1.00 ± 0.08	0.97 ± 0.14	1.00 ± 0.10	0.79 ± 0.11	1.00 ± 0.18	1.90 ± 0.46 <sup>†</sup>	1.00 ± 0.26	0.39 ± 0.09 <sup>‡</sup>
IL-4	1.00 ± 0.12	1.08 ± 0.21	1.00 ± 0.16	1.24 ± 0.22	1.00 ± 0.25	2.95 ± 0.64 <sup>†</sup>	1.00 ± 0.25	1.26 ± 0.32
IL-12 p40	1.00 ± 0.15	1.66 ± 0.18*	1.00 ± 0.15	0.98 ± 0.20	1.00 ± 0.17	1.36 ± 0.29	1.00 ± 0.24	0.96 ± 0.42
CXCL5	1.00 ± 0.20	0.92 ± 0.08	1.00 ± 0.22	0.85 ± 0.05	1.00 ± 0.18	1.33 ± 0.46	1.00 ± 0.13	1.39 ± 0.11*

(3)マウス、ラット、ブタ糞便由来および市販プロバイオティクス乳酸菌株に対するブタ・マウスの脾細胞、MLN細胞の *in vitro* での応答は非常に類似していた(図4・5)。つまり、どの動物の細胞に対しても IL-12 産生誘導能の強い乳酸菌株は共通しており、IL-12 産生誘導能が弱い株も共通していた。このことから、免疫器官に存在する細胞の各種乳酸菌株に対する反応には宿主特異性がみられず、むしろ細菌株特異性が見られることがわかった。また、それぞれの菌株がマウスの細胞またはブタの細胞から誘導する IL-12 の濃度には有意な相関が見られた。このことから、ブタで効果が期待できるプロバイオティク乳酸菌の選抜がマウスの細胞を用いてもある程度は行えると考えられる。しかし、(2)において乳酸菌を経口投与した際の免疫器官の応答は脾臓と MLN で異なることが明らかになっているため、経口投与の効果をより反映しやすい MLN の細胞を用いて選抜を行うのが望ましいと考えられる。これに加えて、免疫器官への取り込まれやすさは乳酸菌株ごとで異なっている可能性があるためこの点についても有効なスクリーニング方法を確立する必要があると考えられる。

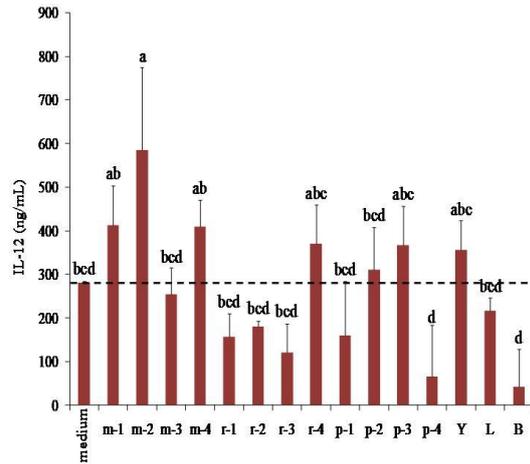


図4 各種乳酸菌株がマウスMLN細胞のIL-12産生に及ぼす影響

m1-4:マウス糞便由来、r1-3:ラット糞便由来、p1-4:ブタ糞便由来、Y, L, B:市販乳製品由来

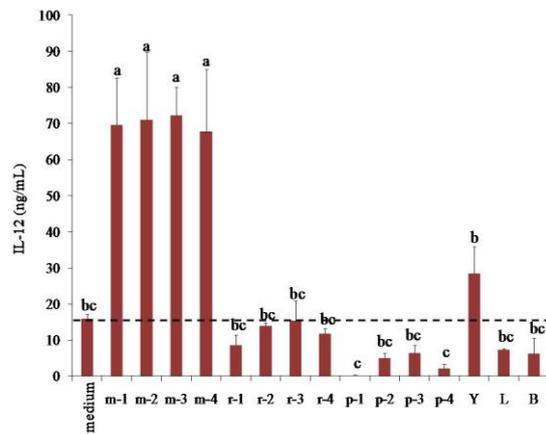


図5 各種乳酸菌株がマウスMLN細胞のIL-12産生に及ぼす影響

m1-4:マウス糞便由来、r1-3:ラット糞便由来、p1-4:ブタ糞便由来、Y, L, B:市販乳製品由来

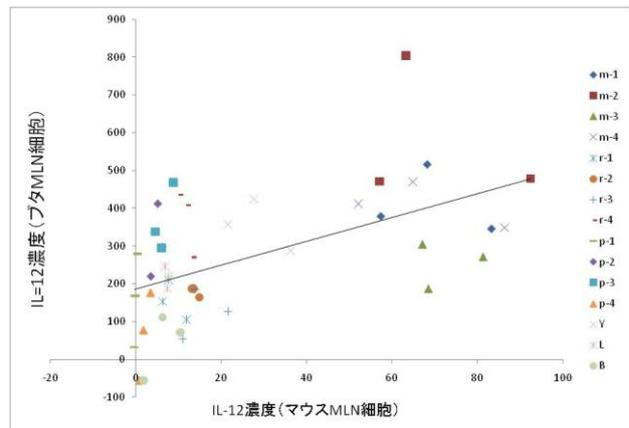


図6 それぞれの菌株に対してマウス、ブタMLN細胞から分泌されたIL-12濃度の相関  
相関係数 0.54,  $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshikawa,T. Inoue,R. Yoshida,Y. Watanabe,T. Bukawa,W. and Ushida,K. Diverse Immune Responses to Orally Administrated Heat-Killed Cell Preparation of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 in Immune Tissues in Mice. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2009, 73(6), 1439-42

[学会発表] (計 3 件)

殺菌乳酸菌体 EC-12 投与に対する各種免疫組織の応答の差異  
吉川徹  
日本食品免疫学会 2009 年度大会  
2009 年 5 月 26,27 日、東京大学

乳酸菌の IL-12 産生誘導能に関する研究  
榑野崇之  
第 15 回 Hind gut club Japan  
2009 年 12 月 5 日、専修大学

乳酸菌の IL-12 産生誘導能に関する研究  
榑野崇之  
第 64 回栄養食糧学会  
2010 年 5 月 23 日、アスティ徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 亮 (INOUE RYO)  
京都府立大学大学院生命環境科学研究科・講師  
研究者番号 : 70443926

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :