

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658216

研究課題名（和文） 発酵食品副産物の高度活用戦略：健康と環境を守る「イムノエコフィード」の基盤創成

研究課題名（英文） Advanced utilization of fermented food by-products: Development of Eco-immuno feeds” supporting health and environment

## 研究代表者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10204885

研究成果の概要（和文）：本研究は、未活用資源としての乳酸菌発酵液の高度有効利用法について、特にイムノバイオティクスやイムノジェニクスに着目し、健康危害リスクの軽減に貢献する家畜飼料抗菌剤代替のための新たな「イムノエコフィード」としての活用基盤を構築した。具体的には、乳酸菌発酵液の安全性とブタ腸管細胞における免疫調節機能性を検討し、それらの研究成果を基礎として、インビボ実証試験と免疫調節機構の解明を推進した。

研究成果の概要（英文）：In this study, for beneficial use of lactic acid bacterial fermentation liquid as underutilized resources, we focused on immunobiotics and immunogenics in the liquid and relating products, and examined fundamental analysis to develop as a novel “Immuno-Eco Feeds” contributing to the reduction of health hazards risk as livestock antimicrobial alternatives. Specifically, a safety of the liquid and immunoregulatory effects in porcine intestinal cells were evaluated, and in vivo confirmation study and in vitro detailed study of its mechanisms were also conducted.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：畜産物利用、発酵食品、未活用資源、ブタ、イムノバイオティクス、イムノジェニクス、エコフィード

## 1. 研究開始当初の背景

食品資源リサイクルの観点から、発酵食品産業副産物である乳酸菌発酵液の有効活用が切望されている。一部、家畜飼料としての利用性が検討されているが、その普及拡大には至っていない。我々はこれまで、乳酸菌を代表とするイムノバイオティクスから新規免疫調節因子「イムノジェニクス」を発見し、ブタにおけるパターン認識受容体を介する

腸管免疫調節機構の解明から、新たな家畜対応型の分子免疫評価系構築に成功した。本評価系を応用することにより、乳酸菌発酵液の家畜における的確な免疫機能性が評価でき、飼料抗菌剤代替等の付加価値の高い「イムノエコフィード」としての基盤が創成され、健康と環境を守る活用戦略として飛躍的發展が大いに期待できる。

## 2. 研究の目的

発酵食品（チーズ、漬物）産業副産物としての乳酸菌発酵液は、その多くが大量廃棄されており、有効活用が強く求められている。近年、我々の研究成果を含め、乳酸菌を代表とするイムノバイオティクス（腸管免疫調節作用を介して宿主に有益な生理作用をもたらすプロバイオティクス）やその活性成分（イムノジェニクス）の研究が飛躍的に進んでいる。そこで本研究では、未活用資源としての乳酸菌発酵液の高度有効利用法について、特にイムノバイオティクスに着目し、健康危害リスクの軽減に貢献する家畜飼料抗菌剤代替のための新たな「イムノエコフィード」としての活用基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

乳酸菌発酵液の免疫機能性について、既に構築したブタ対応型分子免疫評価系を用いて検討し、野外における下痢予防を指標とした実証試験を行った。さらに、パターン認識受容体を介する免疫機能性因子の同定とその機能発現機構について詳細説明を行うことにより、機能・成分・機構が解明された新たな「イムノエコフィード」としての位置づけを確実にする。具体的な研究は、以下の内容で遂行した。

### （1）乳酸菌発酵液の調製と安全性試験

- ①漬け物乳酸菌発酵液中の乳酸菌の分離・同定：MRS 寒天培地により乳酸桿菌を分離した。分離乳酸菌について、16SrDNAによるホモロジー解析等により、菌種を同定した。
- ②発酵液中の菌体以外の成分分析：一般成分分析を行った。多糖成分の存在が確認されているため、多糖成分を分画した。
- ③安全性試験：発酵液の急性経口毒性についてマウスによるLD50 値を測定し評価した。

### （2）ブタ腸管免疫における機能性評価

#### （3）インビボ実証試験

- ①子ブタ下痢発生および炎症に対する予防・改善効果の検証：発酵液給与試験において、下痢発症程度を観察し、糞便中の下痢原性大腸菌の検出を行った。また、血液の各種検査（C 反応性タンパク質濃度、抹消血免疫能評価）を合わせて、抗炎症性を総合的に評価した。
- ②産肉性の検証：増体量変化と出荷時枝肉成績において、背脂肪厚や枝肉格付け等から産肉性を評価した。
- ③ブタ腸管リンパ球活性化：ブタ腸間膜リンパ節およびパイエル板から免疫担当細胞を

調製し、発酵液、分離乳酸菌、多糖成分のリンパ球幼若化活性をRI法により測定した。さらに、炎症性、抗炎症性および調節性サイトカインの発現について、Real-Time RT-PCR法により測定した。

④ブタ腸管上皮(PIE)細胞を用いた分子免疫評価：PIE 細胞を発酵液、分離乳酸菌および多糖成分で前刺激し、下痢原性大腸菌で炎症誘導後、炎症性免疫パラメータを指標とした抗炎症作用について評価した。

### （4）免疫調節機構解明

ブタ腸管免疫における炎症調節に関わる機構を基礎として、分離乳酸菌および多糖成分の上皮および免疫担当細胞におけるパターン認識受容体を介する抗炎症機能とその機構解明を行った。

## 4. 研究成果

### （1）乳酸菌発酵液の調製と安全性試験

- ①乳酸菌発酵液中の乳酸菌の分離・同定：MRS 寒天培地により乳酸桿菌を分離し、分離乳酸菌について、16SrDNA によるホモロジー解析等により菌種を同定した。
- ②発酵液中の菌体以外の成分分析：一般成分分析を行い、機能性成分としての多糖体を分画した。
- ③安全性試験：発酵液の急性経口毒性について検討し、安全性が確認された。

### （2）ブタ腸管免疫における機能性評価

- ①ブタ腸管リンパ球活性化：ブタパイエル板および腸間膜リンパ節由来の免疫担当細胞において、発酵液のリンパ球幼若化活性が認められた。
- ②ブタ腸管上皮(PIE)細胞を用いた分子免疫評価：発酵液の炎症性サイトカインの発現抑制効果が認められ、炎症調節性サイトカインの発現亢進も解析できた。以上の結果から、乳酸菌発酵液の安全性とブタにおける腸管炎症免疫調節機能性が見出された。

### （3）インビボ実証試験

- ①子ブタ下痢発症および炎症に対する予防・改善効果の検証：6 週齢時において0% 区では軟便状態が目立ち、肛門周囲の汚れも多かった。一方、5 - 20%の発酵液給与区ではその程度が低かった。しかしながら、増体に影響を与えるほどの病態はいずれの区でも呈していなかった。17 週齢時の血漿中CRP 濃度は、5%混合区が最も低い値を示した。一方、0%区は有意に高く、また20%混合区

とともに正常範囲を超えていたことから、炎症発症の可能性が示唆された。

②産肉性の検証：体重は、8週齢以降0%区に比較して5%混合区で有意に増体した。このことから、ラッキョウ発酵液は、8週齢以降の給与で増体効果が期待できるものと考えられた。枝肉成績において、枝肉重量に有意な差異は認められなかった。一方、背脂肪厚については、5%混合区で有意に低かったことから、ラッキョウ漬け発酵液5%の混合給与は赤肉量生産を低下することなく、過剰な脂肪沈着を抑制する効果があると考えられた。格付けは、5%混合区で他の給与区と比較して上物率が高く、肉質評価を向上させることが期待された。

#### (4) 免疫調節機構解明

発酵液や菌体外多糖によるブタ腸管免疫担当細胞からのサイトカイン遺伝子発現を解析した結果、IL-4 およびIFN- $\alpha$ の発現抑制が認められた。また、TGF- $\beta$ の顕著な発現増強が認められたことから、発酵液によるTGF- $\beta$ の発現増強による抗炎症性の発現が考えられた。

インビボ実証試験において、総白血球数およびリンパ球数に対する顆粒球数比が、発酵液混合区では、有意に低かった。一方、0%区は有意に高く、血漿中CRP濃度の結果を考えると、感染性炎症調節機構の一端と考えられた。

本研究成果は、これまで大量廃棄されていた乳酸菌発酵液を、「イムノエコフィード」として位置づけるための基礎となり、その先駆的実施研究として大変有意義である。さらに、発酵液は加工せずに直接流通可能であるので、発酵食品名産地に密着したブタ産業の活性化を可能とする新たな「地域活性化プロジェクト」の発展的展開が見込まれる。

#### 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3件)

(1) Takanashi, N., Y. Tomosada, J. Villena, K. Murata, T. Takahashi, E. Chiba, M. Tohno, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, S. Ikegami, H. Itoh, Y. Kawai, T. Saito, S. Alvarez, H. Kitazawa, Advanced application of bovine intestinal epithelial cell line for evaluating regulatory effect of lactobacilli against heat-killed enterotoxigenic Escherichia

coli-mediated inflammation, BMC Microbiol., 13(54), 2013, 1-16、査読有 DOI: 10.1186/1471-2180-13-54.

(2) Villena, J., R. Suzuki, H. Fujie, E. Chiba, T. Takahashi, Y. Tomosada, T. Shimazu, H. Aso, S. Ohwada, Y. Suda, S. Ikegami, H. Itoh, S. Alvarez, T. Saito, H. Kitazawa, Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* modulates toll-like receptor 4-induced inflammatory response via negative regulation in porcine antigen presenting cells, Clin. Vac. Immunol., 19(7), 2012, 1038-1053、査読有 Doi: 10.1128/CVI.00199-12.

(3) 橋口健司、長田裕子、吉田睦子、室伏陽、北澤春樹、*Lactobacillus plantarum* No. 14株が生産する菌体外多糖の化学的性状と免疫活性、日本乳酸菌学会誌、22(2)、2011、100-105、査読有 URL: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jslab/>

[学会発表] (計4件)

(1) 須田義人、下斗米陽子、細矢翔一、石田光晴、麻生久、牧野聖也、池上秀二、伊藤裕之、北澤春樹、ブタの生産性を高めるイムノバイオテック乳酸菌の抗病性効果、日本畜産学会第116回大会、2013年3月28-30日、広島

(2) Kitazawa, H., J. Villena, Role of pattern recognition receptors in the therapeutic effect of immunobiotics and immunogenics, LVII Reunion Cientifica Anual de la Sociedad Argentina de Investigacion Clinica, LX Reunion Cientifica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunologia, 2012年11月14-17日、Mar del Plata, Argentina (招待講演)

(3) 室伏陽、和知俊、細矢翔一、遠野雅徳、島津朋之、下里剛士、川井泰、齋藤忠夫、橋口健司、吉田睦子、北澤春樹、乳酸菌菌体外多糖のパターン認識受容体を介する免疫調節機能特性、平成24年度酪農科学シンポジウム、2012年8月18日、東京

(4) 室伏陽、和知俊、細矢翔一、遠野雅徳、島津朋之、下里剛士、川井泰、齋藤忠夫、橋口健司、吉田睦子、北澤春樹、乳酸菌菌体外多糖の異なるパターン認識受容体を介する免疫調節機能特性、日本畜産学会第115回大会、2012年3月28-30日、名古屋

[図書] (計1件)

(1) Villena, J., H. Aso, S. Alvarez, H. Kitazawa, Probiotics: Sources, Types and Health Benefits, Nova Science Publishers, Inc., 2012, pp53-84

[その他]

ホームページ等

<http://www.rpip.tohoku.ac.jp/seeds/profile/216>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10204885

### (2) 研究分担者

麻生 久 (ASO HISASHI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50241625

### (3) 連携研究者

須田 義人 (SUDA YOSHIHITO)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：90404847