

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	後藤 弥生
学位授与の日付	2021年8月31日	
論文名	菌体外多糖生産乳酸菌 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FC に関する研究	
論文審査委員	主査	阪本 龍司
	副査	片岡 道彦
	副査	山地 亮一

## 論文要旨

### 緒論

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC (以下 *L. cremoris* FC) はフジッコ株式会社で製造販売されている「フジッコ カスピ海ヨーグルト®」の製造に用いられる乳酸菌である。このヨーグルトは一般のヨーグルトと比べ強い粘りがあることが特徴であり、これは *L. cremoris* FC が産生する菌体外多糖 (exopolysaccharide、EPS) に由来する。乳酸菌の保健機能効果として整腸作用が広く知られているが、「カスピ海ヨーグルト」ではこれに加えて免疫についての体感も多く寄せられている。

経口摂取した乳酸菌のうち腸内に定着するものはプロバイオティクスとして腸内細菌叢の改善に寄与し、整腸作用をもたらす。また、経口摂取した乳酸菌は腸管免疫系や全身免疫系に影響を与える場合がある。腸管にはパイエル板、孤立リンパ小節などの腸管関連リンパ組織 (GALT) が存在することから、腸管に存在する抗原の取り込みやリンパ球への提示が集中的に行われている。腸管へ到達、定着した乳酸菌も GALT によって認識され、免疫応答を誘発する。乳酸菌が生体に作用する上で重要な鍵を握るのが、その構成成分や代謝物である。細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンやテイコ酸、他にも代謝生成物である EPS の免疫賦活作用が報告されている。これらの成分が種や株ごとに異なることから、乳酸菌を認識した細胞に誘導されるシグナル伝達パターンも異なり、乳酸菌が菌株により異なる効果をもたらすと考えられる。

本研究では、消費者の体感として得られていた *L. cremoris* FC の整腸作用と免疫調節作用について検証した。免疫調節作用についてはまず、*L. cremoris* FC で作製したヨーグルトの効果を検証した。次に、発酵乳中に産生される EPS も作用成分のひとつであると考え、

EPS の構造を明らかにするとともに EPS 単体の免疫調節作用を確認した。また、ヨーグルト中での EPS の安定生産を目的として、EPS 生合成遺伝子に関する研究を行った。最後に EPS のもう一つの機能である粘性付与に注目してヨーグルトの物性研究とその応用として嚥下困難者用食品としての評価を行った。

## 第 1 章 *L. cremoris* FC 含有食品の摂取による整腸作用の検証

健常者を対象に *L. cremoris* FC 含有サプリメントの継続的な摂取による整腸効果を検証するため臨床試験を行った。*L. cremoris* FC の有効量を明らかにするため、用量漸増試験を行った。27 名の被験者を対象として 2 週間の観察期間の後に、プラセボ、2 つの用量レベルの *L. cremoris* FC (用量レベル 1 :  $1 \times 10^7$  cfu、用量レベル 2 :  $2 \times 10^7$  cfu) のカプセルについて各 2 週間の摂取期間を設け、1 日 1 回摂取させた。プラセボ摂取期間に比し、排便回数 (回数/週) は用量レベル 2 で有意に増加し、便量 (単位/週) は用量レベル 1 で有意に増加した。よって、 $1 \times 10^7$  cfu の *L. cremoris* FC 摂取により排便が改善されることが示された。本研究を基に実施されたプラセボ対照クロスオーバー試験により、*L. cremoris* FC の摂取により排便状況と便性が改善したのに加え、糞便中の *Lactobacillus* 属が有意に増加することが報告されており、*L. cremoris* FC 含有食品の継続的な摂取が腸内菌叢に変化をもたらし、排便状況や便性状を改善することが明らかになった。

わが国では消費者の健康志向の高まりから特定保健用食品や機能性表示食品の制度が制定されている。本研究結果を活用して機能性表示食品の届出を行い、*L. cremoris* FC 配合商品に「お通じを改善する」表示が可能となった。健康情報の提示により、消費者の健康づくりに寄与できるものと考えられる。

## 第 2 章 インフルエンザウイルス感染マウスに対する *L. cremoris* FC ヨーグルトの経口投与試験

乳酸菌摂取による健康効果のうち免疫調節作用は特に注目されており、特定の乳酸菌やその代謝物である EPS 等が免疫調節作用を持ち、経口投与後に免疫系を調節できることが報告されている。本章では、EPS を産生する *L. cremoris* FC で発酵させたヨーグルトの投与が、マウスのインフルエンザウイルス (IFV) 感染に対して予防効果があるか評価した。

BALB/c マウスに IFV A/New Caledonia/20/99 株 (H1N1) を経鼻感染させた後、14 日間経過を観察した。*L. cremoris* FC で発酵させたヨーグルトの経口投与はインフルエンザ感染前に感染日を含め 8 日間実施し、感染後 4 日目まで継続した。対照として PBS、および未発酵の牛乳を投与した。ヨーグルト投与群では、IFV 感染後の生存率および体重減少量が PBS 群に比べて有意に改善された。牛乳群では PBS 群に比べて生存率の改善は認められなかったが、体重減少はわずかに改善した。また、ヨーグルト群では感染 3 日後の肺中ウイルス力価が PBS 群に比べて有意に減少していた。

以上の結果から、*L. cremoris* FC で発酵したヨーグルトは IFV 感染に対する防御効果を持ち、消費者の健康へ寄与することが期待された。さらに、未発酵の牛乳よりも *L. cremoris* FC で発酵したヨーグルトの方が高い IFV 感染防御効果を示したことから、この効果は *L. cremoris* FC の菌体成分や EPS 等の代謝物に由来すると考えられた。

### 第3章 *L. cremoris* FC が産生する EPS の接触性皮膚炎モデルマウスに対する効果の検証

第2章にて *L. cremoris* FC で発酵したヨーグルトに免疫賦活効果があり、*L. cremoris* FC の菌体成分や EPS 等の代謝生成物に起因する事が示唆された。菌体成分に関してはマウスから調製した免疫細胞から IFN- $\gamma$  産生を誘導することが報告されているが、EPS に関する知見は得られていない。本章では、EPS の経口投与が接触性皮膚炎モデルマウスに与える影響を検証し、EPS の腸管免疫に対する作用をパイエル板細胞を用いて調べた。

*L. cremoris* FC で作製したヨーグルトから EPS を回収して試験に用いた。EPS は、ラムノース、ガラクトース、グルコースを 1:1:3 のモル比で含むリン酸多糖類であり、重量平均分子量 ( $M_w$ ) は 712,000 であった。BALB/c マウスの耳介に 2,4,6-トリニトロクロロベンゼン (TNCB) を塗布することで感作し、4日目以降1日おきに18日目まで TNCB を塗布して皮膚炎を誘発した。感作4日前より感作日までは1日1回、感作日以降は1日おきに、EPS を投与した。PBS を投与した対照群と比べ、EPS 投与群では皮膚の肥厚化や皮膚病変部への肥満細胞の浸潤が有意に抑制された。また、EPS は TNCB 曝露による IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の過剰発現を抑制した。次に腸管免疫に対する作用を検証した。C3H/HeJ マウスより摘出したパイエル板細胞に EPS を添加し、5日後に培養上清を回収した。これを同マウスより得た骨髄細胞に添加して6日間培養後の細胞増殖数を調べた。その結果、パイエル板培養上清の添加により骨髄細胞の増殖促進効果が認められ、EPS は腸管でパイエル板を介した免疫調節効果があることが示唆された。

以上より、*L. cremoris* FC が産生する EPS は腸管免疫を通じて全身の免疫系を調節し、慢性皮膚炎症性疾患の予防に有効であると示唆された。

### 第4章 EPS の安定生産に関する研究と EPS 生合成遺伝子の同定

*L. cremoris* FC が産生する EPS はヨーグルトに特徴的な粘性を付与するだけでなく、免疫調節作用も持つことが明らかとなった。本章では、ヨーグルト中での EPS の安定生産を目的とし、EPS 産生能を消失する原因を調べ、全ゲノム解析により EPS 生合成遺伝子を同定した。

*L. cremoris* FC を至適培養温度よりも高い 37°C で 72 時間培養し、非粘性発酵乳を作る変異株を取得し、C4 株と名付けた。C4 株では牛乳での EPS 産生能が失われていた。FC 株と C4 株で作製したヨーグルトの物性を比較したところ、EPS 産生能の消失により硬さ、粘着性、凝集性が有意に低下することが明らかになった。さらに、これらの菌株の全ゲノムを解析し、相違点を確認した。FC 株は 2.4-Mb の染色体と 11 個のプラスミドを保有しており、非粘性 C4 株では *eps* 遺伝子クラスター (*epsRXABCDEFGHIJKL*) がコードされているプラスミドのみが欠落していた。

以上の結果から、37°C で培養した *L. cremoris* FC は *eps* プラスミドの脱落により EPS 生合成能を失う事が示された。至適培養温度である 25~30°C でも *L. cremoris* FC を何代にもわたって継代培養すると非粘性コロニーが発生する。これらの非粘性コロニーでも多くの場合は *eps* プラスミドが脱落しており、ヨーグルト中での EPS 生産を安定化して物性や保健効果の担保を行うためには、*eps* プラスミドの脱落を防ぐ事が重要であると考えられた。また、*eps* プラスミドは他のプラスミドより脱落しやすい可能性が示唆された。EPS の安定生産のためにはプラスミドの脱落機構を解明することが今後の課題であり、本研究で得

られた全ゲノム情報がそのプラットフォームとなる可能性がある。

## 第5章 *L. cremoris* FC で作製したヨーグルトの物性と嚥下障害患者に対する適性

第5章では、*L. cremoris* FC で作製したヨーグルトの粘性に着目し、*L. cremoris* FC とヨーグルトの製造に一般的に使用される乳酸菌で作製した発酵乳の物性の差異を明らかにし、さらに嚥下障害患者における適性を比較することを目的に検討を行った。*L. cremoris* FC で作製した発酵乳は *S. thermophilus* 510 や *L. bulgaricus* B-5b の発酵乳と比較して多量の EPS を含んでいた。それらの発酵乳の物性を測定したところ、*L. cremoris* FC では他の乳酸菌の発酵乳と比べて貯蔵弾性率 ( $G'$ ) が低く、凝集性が高かった。また、嚥下障害患者を対象として摂食時の喉頭侵入と誤嚥の有無を嚥下内視鏡により確認した。その結果、*L. cremoris* FC で製造されたヨーグルトの方が一般的な市販ヨーグルトよりも喉頭侵入や誤嚥事例が少なかった。よって、*L. cremoris* FC で製造されたヨーグルトは従来の一般的なヨーグルトよりも軟らかく食塊形成に優れ、嚥下困難者にとってより安全に摂食できると考えられた。

## 総括

以上の結果から、*L. cremoris* FC の保健効果として整腸作用、及び免疫調節作用があることが明らかとなった。免疫調節作用についてはその作用の一部を EPS が担うことが示された。EPS は粘性を付与する作用も持つことから、粘性と免疫活性の双方から *L. cremoris* FC のヨーグルトを特徴づけるユニークな成分である。今後、その特徴を活かした保健機能訴求や、高齢者での嚥下対応食品としての応用が期待される。

## 審査結果の要旨

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC (以下 *L. cremoris* FC) はフジッコ株式会社で製造販売されている「カスピ海ヨーグルト」の製造に用いられる乳酸菌である。このヨーグルトは一般のヨーグルトと比べ強い粘りがあることが特徴であり、これは *L. cremoris* FC が産生する菌体外多糖 (exopolysaccharide、EPS) に由来する。乳酸菌の中には保健効果を持つものがあり、経口摂取して腸内に定着するものはプロバイオティクスとして腸内細菌叢の改善に寄与し、整腸作用をもたらす。また、乳酸菌は腸管免疫系や全身免疫系に影響を与える場合があり、乳酸菌体のみならず代謝生成物である EPS についても免疫賦活作用が報告されている。本研究では、*L. cremoris* FC の保健効果の解明を目的とし、整腸作用と免疫調節作用の検証が実施された。また、ヨーグルト中での EPS の安定生産を目的として、EPS 生合成遺伝子に関する研究が行われた。最後に EPS のもう一つの機能である粘性付与に注目してヨーグルトの物性研究とその応用として嚥下困難者用食品としての評価が実施された。

第1章では *L. cremoris* FC の整腸作用を検証するための臨床試験を実施した。本試験では *L. cremoris* FC の有効量を明らかにするため用量漸増試験を実施した。便秘傾向者 27 名を対象とし、2 週間の前観察期間の後に、プラセボ、2 つの用量レベルの *L. cremoris* FC (用

量レベル 1 :  $1 \times 10^7$  cfu、用量レベル 2 :  $2 \times 10^7$  cfu) カプセルを各 2 週間摂取させた。その結果、プラセボ摂取期間に比べ便量 (単位/週) が用量レベル 1 で有意に増加したことから、 $1 \times 10^7$  cfu の *L. cremoris* FC 摂取により排便が改善されることが示された。本研究を基に実施されたプラセボ対照クロスオーバー試験により、*L. cremoris* FC の摂取により排便状況と便性が改善したのに加え、糞便中の *Lactobacillus* 属が有意に増加することが報告されており、*L. cremoris* FC 含有食品の継続的な摂取が腸内菌叢に変化をもたらし、排便状況や便性状を改善することが明らかになった。

第 2 章ではインフルエンザウイルス (IFV) 感染マウスに対する *L. cremoris* FC ヨーグルトの経口投与試験を行った。BALB/c マウスに IFV A (H1N1) を経鼻感染させた後、14 日間経過を観察した。*L. cremoris* FC ヨーグルトの経口投与はインフルエンザ感染 8 日前から感染後 4 日目まで継続した。ヨーグルト投与群では PBS 群と比べ、IFV 感染後の生存率および体重減少量が有意に改善され、肺中ウイルス力価が有意に低かった。牛乳群では PBS 群に比べて生存率の改善は認められなかったが、体重減少はわずかに改善した。よって、*L. cremoris* FC ヨーグルトの IFV 感染に対する防御効果が明らかになり、この効果は *L. cremoris* FC の菌体成分や EPS に起因すると考えられた。菌体成分に関しては免疫細胞から IFN- $\gamma$  産生を誘導することが報告されているが、EPS に関する知見は得られていない。次章では EPS の免疫調節作用を調べた。

第 3 章では、2,4,6-トリニトロクロロベンゼン (TNCB) 誘発性接触性皮膚炎マウスに対する EPS の経口投与試験を実施した。EPS は *L. cremoris* FC ヨーグルトから回収して用い、構造解析を実施してラムノース、ガラクトース、グルコースを 1:1:3 のモル比で含むリン酸多糖類 ( $M_w$  712,000) であると明らかにした。BALB/c マウスの耳介に TNCB を 18 日間反復塗布することで皮膚炎を誘発し、感作 4 日前より EPS の経口投与を継続した。PBS 群と比べ、EPS 群では皮膚の肥厚化や皮膚病変部への肥満細胞の浸潤が有意に抑制された。さらに、C3H/HeJ マウスより調製したパイエル板細胞への EPS の添加培養試験により、EPS には腸管免疫の調節作用がある事を明らかにした。以上より、*L. cremoris* FC が産生する EPS は腸管免疫を通じて全身の免疫系を調節し、慢性皮膚炎症性疾患の予防に有効であることを明らかにした。

第 4 章では、ヨーグルト中での EPS の安定生産を目的とし、EPS 産生能を消失する原因を調べ、全ゲノム解析により EPS 生合成遺伝子を同定した。*L. cremoris* FC を至適培養温度よりも高い 37°C で 72 時間培養し、非粘性発酵乳を作る変異株を取得し、C4 株と名付けた。C4 株では牛乳での EPS 産生能が失われていた。さらに、これらの菌株の全ゲノムを解析し、相違点を確かめた。FC 株は 2.4-Mb の染色体と 11 個のプラスミドを保有しており、非粘性 C4 株では *eps* 遺伝子クラスター (*epsRXABCDEFGHIJKL*) がコードされているプラスミドのみが欠落していた。以上の結果から、37°C で培養した *L. cremoris* FC は *eps* プラスミドの脱落により EPS 生合成能を失う事を明らかにし、ヨーグルト中での EPS 生産を安定化して物性や保健効果の担保を行うためには、*eps* プラスミドの脱落を防ぐ事が重要であるとの知見を得た。

第 5 章では、*L. cremoris* FC で作製したヨーグルトの粘性に着目し、*L. cremoris* FC とヨーグルトの製造に一般的に使用される乳酸菌で作製した発酵乳の物性の差異を明らかにし、さらに嚥下障害患者における適性を比較することを目的に検討を行った。*L. cremoris* FC で作製した発酵乳は *Streptococcus thermophilus* 510 や *Lactobacillus bulgaricus* B-5b の発酵乳と比較して多量の EPS を含み、貯蔵弾性率が低く、凝集性が高かった。嚥下障害患者を対象

として摂食時の喉頭侵入と誤嚥の有無を嚥下内視鏡により確認したところ、*L. cremoris* FC ヨーグルトの方が一般的な市販ヨーグルトよりも喉頭侵入や誤嚥事例が少なかった。よって、*L. cremoris* FC で製造されたヨーグルトは従来の一般的なヨーグルトよりも軟らかく食塊形成に優れ、嚥下困難者にとってより安全に摂食できると明らかにした。

本研究は、*L. cremoris* FC の保健効果として整腸作用、及び免疫調節作用があることを明らかにした。免疫調節作用についてはその作用の一部を EPS が担うことを明らかにし、さらに EPS 生合成遺伝子の解析により粘性ヨーグルトの安定生産に関する知見を明らかにした。これらの知見は食品科学、食品機能学、応用微生物学、糖質科学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。