

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 88362

(P 2 0 0 3 - 8 8 3 6 2 A)

(43)公開日 平成15年3月25日(2003.3.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C12N 1/20		C12N 1/20	A 4B065 E 4C087
A61K 35/74		A61K 35/74	A
A61P 37/04		A61P 37/04	
//(C12N 1/20		C12R 1:01	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 280954(P 2001 - 280954)

(22)出願日 平成13年 9月17日(2001.9.17)

特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成13年 3月20日
社団法人日本畜産学会発行の「2001年度(平成13年)日
本畜産学会第98回大会講演要旨」に発表

(71)出願人 501203344

独立行政法人 農業技術研究機構
茨城県つくば市観音台 3 - 1 - 1

(72)発明者 木元 広実

茨城県稲敷郡茎崎町池の台 2 独立行政法
人農業技術研究機構 畜産草地研究所内

(72)発明者 水町 功子

茨城県稲敷郡茎崎町池の台 2 独立行政法
人農業技術研究機構 畜産草地研究所内

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫賦活に有用なラクトコッカス属乳酸菌

(57)【要約】

【課題】 乳酸菌の中でも安全性が高く、しかも乳製品
製造に適しているラクトコッカス属乳酸菌の中から、免
疫賦活に有用な菌株を単離し、プロバイオティクスとし
て応用すること。

【解決手段】 免疫賦活作用を有するラクトコッカス・
ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G 5 0 株
(F E R M P - 1 8 4 1 5)。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 免疫賦活作用を有するラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G50 株 (FERM P - 18415)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫賦活に有用なラクトコッカス属乳酸菌に関し、詳しくは免疫賦活作用を有するラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G50 株 (FERM P - 18415) に関する。

【0002】

【従来の技術】乳酸菌は、チーズや漬物等の製造において重要な役割を果たしている以外に、発酵乳等の形で体内に摂取されることにより、整腸作用や血清コレステロール低下作用等、乳酸菌の機能性に基づく様々な生理的効用を發揮することが知られている。

【0003】このような乳酸菌の効用については、近年「プロバイオティクス」(宿主の健康維持に有益に働く生きた微生物)という概念が導入され、消費者の健康志向を反映して広く関心を集めており、多くの研究が行われている。この「プロバイオティクス」という言葉は当初、「腸内フローラのバランスを改善することによって宿主動物に有益に働く微生物添加物」(Fuller, R. 1989: J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378)と定義されてきたが、現在は上記のように、広義の意味で用いられることが多い。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】現在、プロバイオティクスとして世界的に広く利用されている微生物は、ヒト由来のラクトバチルス属乳酸菌やビフィズス菌に限られている。一方、ラクトコッカス属の乳酸菌については、これまで消化管を生きたまま通過できないとされていた (Teuber, M., Geis, A. and Neve, H.: 1992, The genus Lactococcus. In: Balows, A., Truber, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (eds.) The Prokaryotes, Vol II, 2nd edn. Springer Verlag, New York, pp.1482-1501)。このため、プロバイオティクスとしての研究が、上記ラクトバチルス属乳酸菌やビフィズス菌等の微生物に比べて少ないのが実情である。

【0005】しかし、最近では、ラクトコッカス属乳酸菌の中にも生菌として消化管を通過できるものが存在することが明らかになってきており (Grahm, E., Holm, S. E., Lilja, H. and Sellgren K.: 1994, Scandinavian Journal of Nutrition 38, 2-4.)、ラクトコッカス属乳酸菌のプロバイオティクスへの応用が考えられるようになってきた。ラクトコッカス属の乳酸菌は、乳中での生育が良いために、乳製品製造のスターターとして用いられており、乳業利用上重要な役割を果たしている。従って、ラクトコッカス属乳酸菌の中からプロバイオティ

クスとして有効な性質を有する菌株が見出されれば、それを用いた乳製品製造へ応用できる可能性が高い。

【0006】乳酸菌による免疫賦活作用は、プロバイオティク機能の一つとして注目されており、がんを始めとした各種疾病に大きく貢献するとされている。これまでも、乳酸菌体や菌体成分について、免疫賦活作用が報告されている (Tejada-Simon, M.V. and Pestka, J.J. (1999), J. Food Prot., 12, 1435-1444, Perdigon, G. et al. (1999), J. Dairy Sci., 82, 1108-1114)。これらの報告においては、免疫賦活の指標として、T細胞の増殖能の上昇、免疫グロブリン A (以下、IgA と略記することがある。)の産生量の増加、細胞が生産する様々な働きを持つペプチドであるサイトカイン量の増加等が用いられている。しかし、これらの多くはラクトバチルス属乳酸菌やビフィズス菌についての報告である。

【0007】また、ある種の生理的効用を有する物質を体内に供給する方法としては、食品という形で摂取する方法と医薬品という形で投与方法がある。このうち、食品の形で摂取する方法は、医薬品を用いるよりも身体に良い印象があり、さらに疾病予防として毎日摂取することについても、食品としてならば抵抗が少ないと考えられる。従って、食品として摂取される乳製品の製造において重要な役割を果たし、かつ乳酸菌の中でもラクトバチルス属と並んで安全性の高いラクトコッカス属乳酸菌の中から、免疫賦活に有用な菌株を見出すことが望まれていた。

【0008】本発明の目的は、乳酸菌の中でも安全性が高く、しかも乳製品製造に適しているラクトコッカス属乳酸菌について探索し、該乳酸菌の中から免疫賦活に有用な菌株を選抜し、プロバイオティクスとして応用することである。そこで本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、乳製品製造に適しているラクトコッカス属乳酸菌の中から、免疫賦活に有用な菌株を選抜することに成功した。すなわち、ラクトコッカス属乳酸菌の中に、免疫担当細胞の一つであるマクロファージからある種のサイトカイン産生を誘導する菌株があることを見出し、本発明に到達した。

【0009】

【課題を解決するための手段】請求項 1 に記載の本発明は、免疫賦活作用を有するラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G50 株 (FERM P - 18415) である。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明の免疫賦活作用を有する新規なラクトコッカス属乳酸菌であるラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G50 株 (FERM P - 18415) は、以下の方法によってラクトコッカス属乳酸菌の中から選抜することができる。すなわち、本発明の免疫賦活機能を有するラクトコッカス属乳酸菌は、供試乳酸菌と免疫担当細胞の一つであるマ

クロファージ（大食細胞）株とを共培養したときのマクロファージ株のサイトカイン産生量を指標として選抜することができる。本発明に用いるマクロファージ株としては、BALB/c系マウス由来のJ774.1(ATCC TIB-67)株などがある。

【0011】乳酸菌と共培養するマクロファージ株としては、BALB/c系マウス由来のJ774.1株やRAW264.7などが挙げられるが、特にBALB/c系マウス由来のJ774.1株が好ましい。このマクロファージ株を、24ウェルプレートに、 $4.6 \times 10^5 \sim 5.1 \times 10^5$ cells / ウェル、好ましくは 5.0×10^5 cells / ウェルとなるように播種する。詳しくは、1mlあたり 5.0×10^5 cells となるように調製したマクロファージを1ウェルに播種する。マクロファージを播種したプレートは、5%CO₂存在下、37度で2~3日間、好ましくは2日間培養する。マクロファージを播種する培地としては、血清を添加したRPMI培地（ローズウエル・パーク・メモリアル・インスティテュート培地）やDMEM培地（ダルベッコ・モディファイド・イーグル培地、シグマ社製）を用いることができる。

【0012】培養終了後、プレートから培地をピペットで吸引する等の方法によって取り除き、新たに血清成分を添加したRPMI培地を加える。このとき培地に添加する血清成分としては、ウシ胎児血清（以下、FCSと略記することもある。）等が挙げられるが、特にFCSが好ましい。血清成分としてFCSを用いる場合の添加濃度は、10%が適当である。なお、RPMI培地の他にDMEM培地なども用いられる。

【0013】マクロファージ株と共培養する乳酸菌は、本発明者らが選抜したG50株の他に、独立行政法人農業技術研究機構 畜産草地研究所（茨城県稲敷郡莖崎町）に保存されているもの及び理化学研究所（埼玉県和光市）から入手したものも使用することができる。乳酸菌は、予め常法に従い一昼夜培養しておく。次に、上記培養乳酸菌株を0.85%食塩水で1~2回、好ましくは2回洗浄し、血清を添加したRPMI培地に懸濁した後、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ cells / ウェル、好ましくは 1×10^9 cells / ウェルになるようにプレートに接種し、マクロファージ株と共培養する。共培養の条件は、5%CO₂存在下、37、8~48時間、好ましくは24時間が適当である。

【0014】共培養終了後、培養上清を遠心分離等の常法によって分離し、上清中に含まれるサイトカイン量をELISA（固相酵素免疫測定法、エライザ）によって測定する。ELISAはインターロイキン-12（以下、IL-12と略記することがある。）の場合は、optEIAマウスIL-12測定キット（ファージン社製）を、TNF-の場合、optEIAマウスTNF-測定キット（ファージン社製）を用い、これらキットのプ

ロトコールに従って行う。また、インターロイキン-6（以下、IL-6と略記することがある。）の場合は、抗マウスIL-6（ファージン社製）とビオチン標識抗マウスIL-6（ファージン社製）の組み合わせを使用するとよい。

【0015】上記の共培養によって産生されるサイトカインとしては、がん予防に寄与するとされる細胞性免疫の賦活化を誘導するIL-12、消化管におけるIgA産生等の液性免疫賦活に関わるIL-6又は腫瘍細胞に対して障害活性を有する因子であるTNF-等が挙げられる。

【0016】後述する実施例に示すとおり、乳酸菌とマクロファージ株とを共培養することにより、サイトカインの産生が促進されることが認められた。すなわち、乳酸菌供試株16株中6株について、マクロファージ株のサイトカイン産生を促進することが見出された。この6株のうち、IL-12、IL-6及びTNF-すべてのサイトカイン産生を最も促進した菌株は1株のみであった。この乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) G50株である。本菌は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、その受託番号はFERM P-18415である。

【0017】このラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティスG50株を、マウスに経口投与した場合には、本菌株を投与しなかった非投与群よりもサイトカインの産生が促進される。なお、経口投与する際は、マウス体重1kgあたり10g程度を目安とすればよい。また、該菌株はラクトコッカス属の特長を有し、牛乳中でもよく生育するため、スターター等として乳製品製造へ応用することができる。さらに、本菌株は加熱処理等を行った死菌体であっても、マクロファージ株のサイトカイン産生を促進する作用を有している。

【0018】

【実施例】以下において、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

本実施例においては前記畜産草地研究所保有株や理化学研究所から入手した乳酸菌16株について、BALB/c系マウス由来マクロファージJ774.1株との共培養を行い、サイトカイン産生促進能を有する乳酸菌を選抜した。なお、対照として、乳酸菌を接種しないコントロールとポジティブコントロールとしてリポポリサッカライド（以下、LPSと略記することがある。）を用いたものについても同様に培養を行った。LPSは、マクロファージ活性化物質であり、本実験では、大腸菌由来LPS（シグマ社製）を $1 \mu\text{g}$ / ウェルになるように添加した。

【0019】まず、マクロファージJ774.1株を、

24 ウェルプレート (ファルコン社製) に 5×10^5 cells / ウェルとなるように播種し、5% CO₂ 存在下、37 °C で2日間培養した。マクロファージを播種する培地としては、FCS を10% 添加したRPMI 培地を用いた。培養終了後、プレートから培地をピペットを用いて吸引することによって取り除き、新たに血清成分として10% FCS (シグマ社製) を添加したRPMI 培地 (シグマ社製) 0.9 ml を加えた。

【0020】また、マクロファージ株と共培養する供試乳酸菌は、予め常法に従って一昼夜培養した。次に、上記の培養した乳酸菌株を0.85% 食塩水で2回洗浄し、RPMI 培地に 1×10^{10} cells / ウェルになるように懸濁した後、1 ウェルあたり0.1 ml (乳酸菌は 1×10^9 cells) を添加し、マクロファージ株と共培養した。共培養の条件は、5% CO₂ 条件下で37 °C で24時間とした。共培養終了後、培養上清を遠心分離 (12000 rpm、10分間、4 °C) によって分離した。この上清中に含まれるサイトカイン量を、ELISA によって測定した。ELISA にはIL-12 の場合は、optEIAマウスIL-12 測定キット (ファーマンジン社製) を用い、TNF- α の場合は、optEIAマウスTNF-測定キット (ファーマンジン社製) を用いた。また、IL-6 の場合は、抗マウスIL-6 (ファーマンジン社製) とビオチン標識抗マウスIL-6 (ファーマンジン社製) の組み合わせを用いて測定を行った。測定は、それぞれのプロトコールに従って実施した。

【0021】図1は、マクロファージ株と乳酸菌の共培養によって産生したサイトカイン量をELISA法によって測定した値を示したものである。図1から明らかなように、サイトカインの産生量は、共培養に用いる供試乳酸菌の種類によって差があることが分かる。供試乳酸菌のうちIL-12、IL-6 及びTNF- α のすべてのサイトカインの産生を促進する効果が大きく、ポジティブコントロールであるLPS と比べても同程度かそれ以上である乳酸菌は1株のみであった。本菌株がG50株である。

【0022】実施例2

本実施例では、実施例1において選抜したラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティスG50株について、死菌体とした場合におけるマクロファージ株のサイトカイン産生促進能について検討した。ラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティスG50株の死菌体は、生菌体を100 °C で50分間の熱処理をすることによって調製した。共培養の条件、培養後の培養上清に含まれるサイトカインの量の測定等は実施例1と同様に行った。なお、対照として乳酸菌を接種しないものについても、同様に培養を行った。

【0023】結果を図2に示す。図は、乳酸菌として生菌体又は死菌体を共培養に用いた場合のサイトカイン産生量の相対変化を表したものである。すなわち、各々の

測定値を対照の測定値で除すことによって算出したものである。この結果、G50株は死菌体であっても、生菌体の場合と同様に、マクロファージ株のIL-12及びIL-6産生を促進することが明らかとなった。

【0024】実施例3

本実施例では、ラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティスG50株を生体に経口投与した場合における免疫系に対する影響について検討した。G50株は、予め常法に従って一昼夜培養した。次に、上記の乳酸菌株を0.85% 食塩水で2回洗浄し、200 μ l あたり 1×10^9 cells となるように10% 脱脂乳 (雪印スキムミルク、雪印乳業製) に懸濁した。

【0025】G50株生菌体の10% 脱脂乳懸濁液を、BALB/c系マウス3匹 (体重平均20g) に7日間又は14日間強制的に連続して経口投与した。なお、対照群には、10% 脱脂乳のみを同様に経口投与した。また、G50株の投与量は、マウス体重1kgあたり10gを目安とした。

【0026】投与後8日目又は15日目に、供試マウスからパイエル板細胞と脾臓細胞を採取した。採取したパイエル板細胞と脾臓細胞は、単一細胞にして24ウェルプレートに播種し、FCS を10% 添加したRPMI 培地を用いて、5% CO₂ 存在下、37 °C で72時間培養した。培養終了後、培養上清を採取し、遠心分離を行って細胞を取り除いた上清中に含まれるサイトカイン量を実施例1と同様にELISAによって測定した。結果を図3に示す。

【0027】パイエル板細胞は、消化管免疫系で重要な役割を果たしている組織である。この細胞は、局所性の免疫能を表す指標と考えられる。また、脾臓細胞は、血中に生じた抗原に対する免疫防御等の役割を果たしていることから、全身性の免疫能を表す指標と考えられる。

【0028】図から明らかなように、パイエル板細胞においては、G50株を7日間投与群では、IL-12産生量が対照群に比べて約4倍の高値を示した。また、IL-6については、該菌株の7日間投与群で対照群よりも高い産生量を示した。一方、脾臓細胞については、該菌株の14日間投与群では、IL-12産生量が対照群よりも高値となった。しかし、IL-6に関しては、投与期間にかかわらず、該菌株を投与した群は対照群よりも産生量がやや低下していた。これらのことから、G50株は生体内において免疫担当細胞のIL-12産生を強く誘導することが明らかとなった。

【0029】

【発明の効果】本発明により、乳酸菌の中でもラクトバチルス属と並んで安全性が高く、しかも乳製品製造に適しているラクトコッカス属乳酸菌の中から選抜した、免疫賦活に有用な菌株が提供される。したがって、該菌株をスターター等として用いることにより乳製品製造に応用し、そのプロバイオティック機能を利用することができ

る。

【図面の簡単な説明】

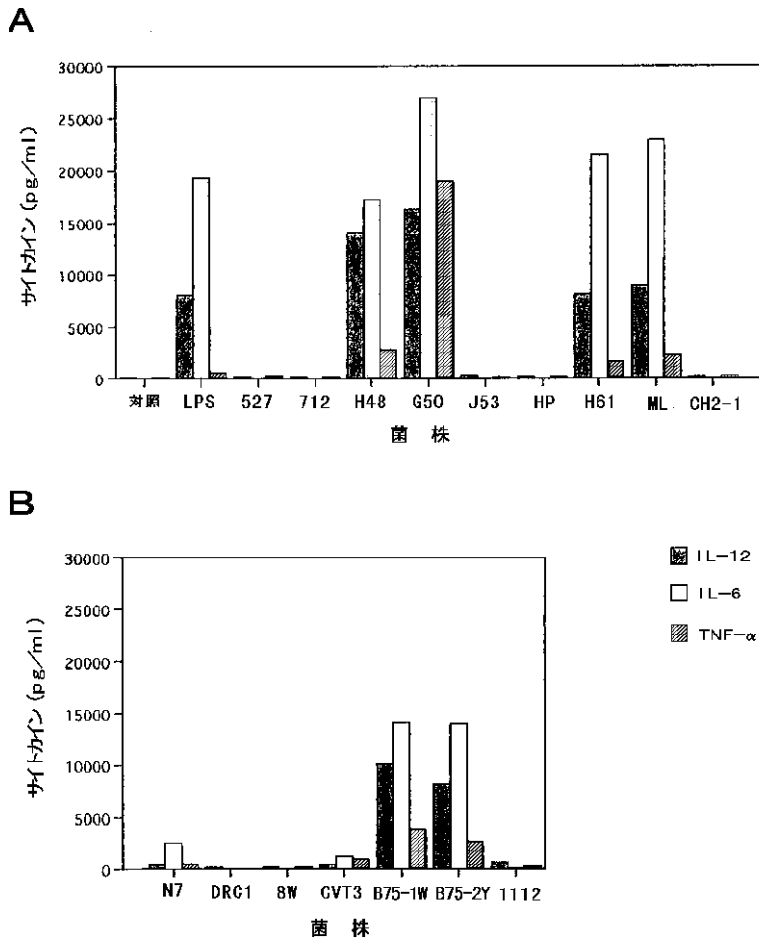
【図 1】 A と B は、実施例 1 におけるマクロファージ株と各種乳酸菌を共培養した場合におけるサイトカイン産生量を示した図である。図中、5 2 7, 7 1 2, H 4 8, G 5 0 及び J 5 3 はラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス; H P, H 6 1, M L 及び C H 2 - 1 はラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*); N 7, D R C 1, 8 W, C V T 3, B 7 5 - 1 W 及び B 7 5 - 2 Y はラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス バイオバラエティ ジアセチラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*); 1 1 1 2 はラクトバチルス

・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) に属する乳酸菌をそれぞれ表している。

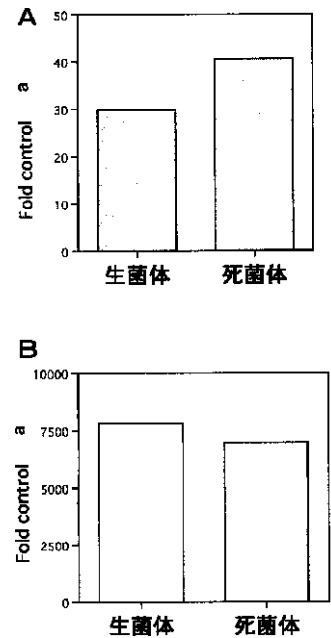
【図 2】 実施例 2 のラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G 5 0 株の生菌体及び死菌体を用いた場合のサイトカイン産生量の相対変化を示した図である。図中の A は I L - 1 2、B は I L - 6 の結果を示す。

【図 3】 実施例 3 におけるラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G 5 0 株を経口投与した場合のサイトカイン産生量を示した図である。図中、A はパイエル板細胞における I L - 1 2 の産生、B はパイエル板細胞における I L - 6 の産生、C は脾臓細胞における I L - 1 2 の産生を示す。

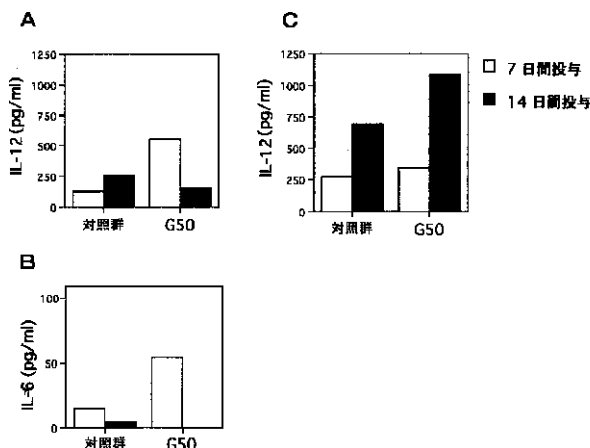
【図 1】



【図 2】



【 図 3 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 1 4 年 8 月 7 日 (2 0 0 2 . 8 . 7)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 1 7

【 補正方法 】 変更

【 補正内容 】

【 0 0 1 7 】 このラクトコッカス・ラクティス サブスピーシーズ ラクティス G 5 0 株を、マウスに経口投与した場合には、本菌株を投与しなかった非投与群よりもサイトカインの産生が促進される。なお、経口投与する際は、マウス体重 1 k g あたり 1 0 m g 程度を目安とすればよい。また、該菌株はラクトコッカス属の特長を有し、牛乳中でもよく生育するため、スターター等として乳製品製造へ応用することができる。 さらに、本菌株

は加熱処理等を行った死菌体であっても、マクロファージ株のサイトカイン産生を促進する作用を有している。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 2 5

【 補正方法 】 変更

【 補正内容 】

【 0 0 2 5 】 G 5 0 株生菌体の 1 0 % 脱脂乳懸濁液を、BALB / c 系マウス 3 匹 (体重平均 2 0 g) に 7 日間又は 1 4 日間強制的に連続して経口投与した。なお、対照群には、1 0 % 脱脂乳のみを同様に経口投与した。また、G 5 0 株の投与量は、マウス体重 1 k g あたり 1 0 m g を目安とした。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷
C 1 2 R 1 : 0 1

識別記号

F I

テ-マコ-ト' (参考)

(72) 発明者 栗 さき 純一
茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政
政法人 農業生物資源研究所内

(72) 発明者 岡本 隆史
茨城県稲敷郡茎崎町池の台 2 独立行政法
人農業技術研究機構 畜産草地研究所内
F タ-ム (参考) 4B065 AA01X AC20 BB40 CA44
4C087 AA01 AA02 BC56 CA09 NA14
ZB09 ZB26