

氏 名(本籍) き 木 もと ひろ み 実

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 6 6 号

学位授与年月日 平 成 15 年 7 月 17 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 *Lactococcus* 属乳酸菌のプロバイオティクスとしての応用
に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 藤 本 健四郎
(副 査) 教 授 齋 藤 忠 夫
教 授 駒 井 三千夫

論文内容要旨

第一章 緒言

乳酸菌により醸成される発酵乳などが有する生理的効用（整腸作用、免疫調節作用など）については、消費者の健康志向を反映して世界的に関心が高まってきた。このような効用については、近年「プロバイオティクス」という概念が導入され、世界中でプロバイオティック機能を有する乳酸菌の探索が行われている。プロバイオティクスという言葉は、以前は「宿主の腸内微生物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生きた微生物添加物」と定義されていたが、最近では「宿主の健康維持に有益な働きをする微生物」として広い意味で用いられることが多い。プロバイオティクスとしての研究が進んでいるのは、*Lactobacillus (Lb.) acidophilus*、*Lb. casei* などの乳酸桿菌であり、*Lactococcus*、*Leuconostoc* などの乳酸球菌については、腸内常在菌ではないためにこれまでプロバイオティクスとしての評価はほとんど行われてこなかった。しかし、概して *Lactococcus* 属乳酸菌は *Lactobacillus* 属乳酸菌と比べると乳中での生育が良く、乳製品製造のスターターとして用いられ、乳業利用上重要な役割を果たしている。またプロバイオティクスとして最も重要な性質である安全性についても、*Lactococcus* 属乳酸菌は乳酸菌 20 属のなかでも *Lactobacillus* 属乳酸菌と並んで安全性が高いグループであるとされている。この *Lactococcus* 属乳酸菌のなかからプロバイオティクスとして有効な性質を有する乳酸菌が見出されれば、有用菌株を用いた新規なプロバイオティック食品の開発が期待できる。そこで本研究では、*Lactococcus* 属乳酸菌についてプロバイオティクスとしての機能を評価し、新規なプロバイオティック乳酸菌を見出すことを目的とした。

第二章 *Lactococcus* 属乳酸菌の分離、同定とその性質

分離源として牛乳、チーズ、漬物、生草、サイレージを用い、計 437 株の乳酸菌を分離した。このなかから各種同定試験により、37 株の *Lactococcus* を得た (Table 1)。

また、一般に乳酸菌を含めたグラム陽性の細菌は 1 ppm のクリスタルバイオレット (CVT) 存在下では生育できないが、*Lactococcus* のなかには CVT 耐性株が存在する。*Lactococcus* 及び CVT 菌について、グルコースのみ及びグルコースとクエン酸存在下における増殖収率 (Y_0 値) を Table 2 に示した。19435、DRC1 及び N7 株の Y_0 値は、グルコースのみの培地で増殖した場合とグルコースとクエン酸存在下で増殖した場合で、ほぼ同じか後者の場合でより低かったのに対し、

CVT 菌の Y_0 値は、クエン酸存在下の方が非存在下よりも有意に高かった。以上のことから CVT 菌は他の *Lactococcus* と異なり、グルコース存在下でクエン酸を代謝してエネルギー源にできることが示唆された。*Lactococcus* は、本来クエン酸からエネルギーを獲得する能力を持たないことから、CVT 菌は *Lactococcus* のなかでも特異的な存在である。従って CVT 菌は、他の *Lactococcus* では見られない機能性を有している可能性も考えられ、CVT 菌についてもプロバイオティック乳酸菌の探索に供した。

第三章 *Lactococcus* 属乳酸菌の腸内生残性

乳酸菌がプロバイオティクスとしての機能を十分に発揮するためには、経口摂取の後に、消化管内の特異的な環境条件（胃酸の低 pH、小腸の胆汁酸の存在など）に打ち勝ち、腸管まで生菌として到達するのが望ましいとされている。従って第二章で分離した *Lactococcus* 及び畜産草地研究所保有の *Lactococcus* を腸内生残性試験に供した。

第一節 インビトロ試験

Lactococcus の胆汁酸耐性試験は 3 種類の培地（MRS、M17、GM17 培地）を用いて行った（Table 3）。一部の菌株（DRC1、712 株）が、M17 培地や M17 にグルコースを添加した GM17 培地では胆汁酸耐性を示さなかったのに対し、MRS 培地では胆汁酸に対し耐性を示した。MRS 培地に含まれる Tween-80 の量を変化させ、24 時間後の菌の増殖を調べたところ、Tween 80 非存在下ではほとんどの菌株で増殖が見られないのに対し、Tween 80 が 0.5% 以上になると胆汁酸存在下でもこれらの株は胆汁酸無添加の場合とほぼ同じ増殖を示した（Table 4）。一晚培養した菌体を 4 種類のリン酸緩衝液にけん濁し、一定時間保温した後、細胞内物質の流出を測定した（Table 5）。供試したすべての菌株で、リン酸緩衝液のみ及び Tween 80 のみ添加の溶液では細胞内物質の流出は少なかった。これに対して、胆汁酸を含む溶液では著しい細胞内物質の流出が認められ、これは Tween 80 の添加により抑えられた。すなわち、Tween 80 は胆汁酸により引き起こされる細胞内物質の流出を抑制することにより、*Lactococcus* の胆汁酸耐性に寄与すると考えられた。従って、Tween 80 を含む MRS 培地では Tween 80 を含まない培地に比べ、胆汁酸耐性を有する菌株が高頻度に見出されると考えられ、*Lactococcus* の胆汁酸耐性を調べる際には培地の選択に注意を払う必要がある。

Lactococcus のなかで N7 株が、用いた 3 種類の培地のいずれにおいても優れ

た胆汁酸耐性を示したことから (Table 3)、N7 株についてリゾチーム及び低 pH 耐性を検討した。N7 株はリゾチーム存在下で生菌数が徐々に減少したが、60 分間保温の後も優れた生残率 (8.9 log cfu/ml) を示した (Table 6)。また N7 株は pH 2.0 で 2 時間保温の条件下で中程度の生残率 (5.4 log cfu/ml) を示し、pH 3.0 で 2 時間保温の条件下では優れた生残率を示した (7.8 log cfu/ml) (Table 7)。以上のことから、N7 株は消化管の特異的な環境条件に打ち勝ち、生菌のまま腸管まで到達する可能性が高いと考えられた。

N7 株はヒト結腸由来上皮細胞株 Caco-2 細胞に付着性を示さなかったが、*Lactococcus* 供試 8 株中 6 株で Caco-2 細胞への付着が認められた (Table 8)。特に 527 株が陽性対照株である *Lb. johnsonii* LA1 と同程度の高い付着性を示した。走査型電子顕微鏡写真により Caco-2 細胞に 527 株が付着している様子を示した (Fig. 1)。

第二節 インビゴ試験

N7 株の抗生物質耐性株 1×10^9 cfu をマウスに経口投与し、腸内生残性を検討した。その結果、N7 株は投与前の糞便から検出されず、投与 12 時間後の糞便から 10^6 レベル、24 時間後は 10^3 レベル、48 時間後は 10^2 レベルで検出されたが、72 時間後には検出されなくなった (Fig. 2)。このことから、N7 株は投与後 48 時間はマウス腸内で生存するが、定着しないことが示唆された。

第四章 *Lactococcus* 属乳酸菌の生理機能

第三章で腸内生残性が優れていると考えられた菌株を中心に *Lactococcus* の機能性について検討した。

第一節 コレステロール除去作用

血清コレステロール低下作用は、乳酸菌が増殖培地からコレステロールを除去する能力と関係しているとされている。*Lactococcus* のコレステロール除去作用を検討した結果、菌株間で差はあるが、供試株すべてが増殖培地からコレステロールを除去する能力を有していた (Table 9)。なかでも N7 株は供試菌株中、最もコレステロール除去能が高く、また使用培地により差はあるものの、豚において血清コレステロール低下に効果があったと報告されている *Lb. acidophilus* ATCC 43121 と同程度のコレステロール除去作用を示した (Table 10)。培地中から除去されたコレステロールは、菌体画分から回収されたことから、コレステロールは *Lactococcus* によって分解をうけないと考えられた。

N7株のコレステロール除去作用は死菌体や静止菌体 (resting cells) でも認められた (Fig. 3)。このことから、N7株のコレステロール除去作用の機構として菌体への付着が考えられた。また、増殖と共にコレステロールを培地から除去する (growing cells) 方が、死菌体や静止菌体よりもコレステロール除去作用が大きかった (Fig. 3)。つまり、単にコレステロールと乳酸菌を混ぜてコレステロールを除くよりも、菌が増殖しながら取り除く方が、効果が大きいことが明らかとなった。しかし、死菌体は扱い易く、凍結乾燥粉末としてコレステロールを含む食品に混合するなど、N7株を発酵乳の形態で摂食する以外の利用も考えられ、N7株死菌体のコレステロール除去作用は産業利用上有用な性質であると考えられる。

第二節 抗菌作用

N7株が腸内細菌の増殖に及ぼす影響を調べた。培地に腸内細菌を 10^3 cfu で、N7株を 10^7 cfu で接種し混合培養した結果、N7株は大腸菌、クレブシエラ、黄色ブドウ球菌の増殖を抑制した (Table 11)。特に、黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制効果が他の細菌に比べて大きかった。黄色ブドウ球菌とN7株を、接種比率を変えて混合培養すると、いずれの場合も黄色ブドウ球菌の増殖が抑制された (Fig. 4)。N7株の培養上清には黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は認められず、またN7株の接種割合が高いほど増殖抑制効果が大きかったことから、阻害型式は拮抗阻害であると考えられた。

第三節 免疫調節作用

免疫刺激の指標として免疫担当細胞のひとつであるマクロファージ株を用い、*Lactococcus* がマクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。細胞性免疫の賦活化に有用なインターロイキン (IL) -12や消化管免疫賦活に重要な IL-6の産生を誘導する *Lactococcus* が見出された (Fig. 5)。そのなかで特にG50株のマクロファージのサイトカイン誘導能が優れていた。

G50株のマウスへの経口投与試験を行った結果、G50株の7日間投与で対照群 (G50株非投与群) よりも脾臓細胞の IL-12やインターフェロン γ の産生が高まり、G50株は、生体内で細胞性免疫賦活に有効であることが示唆された (Fig. 6)。さらに食物アレルゲンのひとつである卵白オボムコイドで免疫したマウスにG50株または *Lb. acidophilus* JCM 1132を経口投与した結果、G50株投与群で対照群よりも血清中の総免疫グロブリンE (IgE) 抗体量が有意に低下した (Fig. 7)。JCM 1132株投与群では、IgE抗体産生が対照群よりも減少する傾向が認められ

たが、有意差は得られなかった。オボムコイド特異的 IgE 値も G50 株投与群で対照群よりも低くなる傾向が認められた。すなわち G50 株は、アレルゲンにより誘導される IgE 抗体産生を抑制することが明らかとなった。このことは、G50 株の経口投与がアレルギー疾患を抑制するひとつの方法となる可能性を示している。

第五章 総括

本研究では、様々な発酵食品またはその原材料から *Lactococcus* 属乳酸菌を分離し、*Lactococcus* についてプロバイオティクスとしての機能を評価した。はじめに腸内生残性の指標のひとつである胆汁酸耐性について、*Lactococcus* のなかには増殖培地によって胆汁酸耐性が異なる菌株が存在することを明らかにした。これは培地中に含まれる Tween 80 が胆汁酸によって引き起こされる細胞内物質の流出を抑制するためと考えられた。N7 株は供試した *Lactococcus* のなかで特に胆汁酸耐性に優れ、またリゾチーム及び低 pH 耐性を有していた。N7 株はマウスへの経口投与後、糞便から生菌として検出され、N7 株は生菌のまま腸まで到達することを明らかにした。次にプロバイオティック機能としてコレステロール除去作用、抗菌作用、免疫調節作用を検討した。インビトロ試験により、N7 株がコレステロール除去作用及び抗菌作用を有することを見出した。N7 株は我が国で長年乳製品製造に広く用いられてきた株であり、安全性に問題はないと考えられる。免疫調節作用については、マウスへの経口投与試験により、G50 株が細胞性免疫賦活に有用であり、また I 型アレルギーを引き起こす IgE 抗体産生を抑制することを見出した。また、クリスタルバイオレット (CVT) 耐性株が、他の *Lactococcus* と異なり、グルコース存在下でクエン酸からエネルギーを獲得できることを見出した。CVT 菌のプロバイオティック機能について検討した結果、コレステロール除去作用、マクロファージのサイトカイン誘導活性が認められたが、他の *Lactococcus* と比べて特に優れた機能性を有する菌株は見出されなかった。

以上のことから *Lactococcus* のなかにはプロバイオティクスとしての応用に有望な菌株が存在することが明らかとなった。一般に *Lactococcus* は乳中での生育がよく、乳製品製造に適しているため、本研究のなかで見出されたプロバイオティック機能を有する菌株を用いた新規な乳製品の開発が期待できる。

Table 1 Lactococci isolated from dairy and non-dairy materials in this study

Strain No.	Strain	Isolated from
G46	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G47	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G48	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G50	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G51	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G53	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G55	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G56	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G60	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G61	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G62	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
G65	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Napiergrass
H45	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H46	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H47	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H48	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H49	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H50	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H51	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H52	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H53	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H54	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H55	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H56	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H57	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H58	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
H60	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kimchi sea cucumber
CH1-1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH1-2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Cheese 1
CH1-3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH1-4	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH1-5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH1-6	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH1-7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH1-8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH1-9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	Cheese 1
CH2-1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Cheese 2

Table 2 Effect of citrate on molar growth yield Y_G from glucose of *Lactococcus lactis* strains

Strain	Y_G^a	
	Glucose	Glucose plus citrate
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC19435	19.7 (1.04)	13.7 (0.23) ^b
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. diacetylactis DRC1	22.9 (1.68)	19.9 (2.12)
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. diacetylactis N7	16.1 (0.79)	16.7 (0.36)
CVT strains		
8W	18.6 (0.45)	22.9 (0.24) ^b
CVT3	20.2 (0.65)	22.5 (0.24) ^b
B75-1	12.8 (0.18)	16.2 (0.59) ^b
B75-2	12.1 (1.45)	25.7 (0.49) ^b
B75-3	13.8 (0.64)	23.6 (0.88) ^b
B75-4	14.6 (0.74)	17.1 (1.17) ^c

^a g dry weight per mole of glucose consumed. Values are means (standard deviation); n=4.

Student's *t*-test was carried out for each culture with and without citrate.

^b Significance: $P < 0.01$.

^c Significance: $P < 0.05$.

Table 3 Growth characteristics of lactococci in various medium plus oxgall

Strains	Medium					
	MRS		GM17		M17	
	Control	Oxgall	Control	Oxgall	Control	Oxgall
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>						
ATCC19435	1.10	-	1.78	-	1.10	-
712	1.30	0.12	2.21	-	1.80	-
527	1.58	0.47	2.25	0.32	1.21	0.32
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>						
ML	0.70	-	0.66	-	1.00	-
HP	0.72	-	1.77	-	0.58	-
H61	0.68	-	0.46	-	0.78	-
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>						
DRC1	1.55	0.78	1.81	-	1.08	-
DRC2	1.21	0.65	1.58	0.14	1.10	0.17
N7	1.48	0.90	1.75	1.22	1.42	1.33
CVT B75-1 W	1.52	0.28	2.12	0.09	0.91	0.17
CVT B75-2 Y	1.49	0.31	2.12	0.04	1.38	0.11

Each MRS, GM17 (M17 supplemented with 0.5% glucose) and M17 broth contained 0.3% oxgall (Oxgall; dehydrated bile) or not (Control). Values were determined by absorbance at 620 nm after 24-h incubation; all values are the means of two trials. -, Non-growth

Table 4 Effect of Tween 80 on bile tolerance of lactococci.

Strains		Concentration of Tween 80 in MRS broth (%)				
		0	0.05	0.1	0.5	1.0
<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>						
527	Control	1.07	1.18	1.19	1.33	1.35
	Oxgall	0.06	0.08	0.19	0.76	1.07
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>						
DRC1	Control	1.40	1.40	1.30	1.34	1.06
	Oxgall	-	-	-	0.74	1.06
N7	Control	1.38	1.42	1.36	1.38	1.43
	Oxgall	0.28	0.46	0.78	1.45	1.36
CVT B75-1 W	Control	1.33	1.58	1.40	1.49	1.40
	Oxgall	-	-	0.16	0.98	1.18
CVT B75-2 Y	Control	1.06	1.28	1.36	1.38	1.34
	Oxgall	-	-	0.06	1.00	1.08

Values were measured by absorbance at 620 nm after 24-h incubation; all values are the means of two trials. Oxgall concentration was 0.3%. -, Non-growth

Table 5 Effect of bile and Tween 80 on leakage of intracellular materials from lactococci

Suspension buffer	Absorbance at 260 nm		
	DRC1	N7	712
B1	0.061	0.068	0.090
B2	0.033	0.045	0.138
B3	0.536	0.621	0.864
B4	0.253	0.285	0.229

Each value is the mean of two trials in triplicate. Cells were suspended in B1, B2, B3, or B4 buffer and the cellular leakage was determined after 30-min incubation at 37°C. Buffer: B1, 0.05 M sodium phosphate buffer; B2, plus 1% Tween 80; B3, plus 0.3% oxgall; B4, plus 0.3% oxgall and 1% Tween 80.

Table 6 Survival of *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* N7 in the presence of lysozyme

Time (min)	Viable bacteria (\log_{10} cfu/ml)	
	Control	Lysozyme
0	9.22±0.14	9.27±0.02
15	9.20±0.16	9.14±0.09
30	9.22±0.07	9.10±0.09
45	9.36±0.08	9.03±0.09
60	9.20±0.09	8.86±0.08

Cells suspended in 0.06 M phosphate buffer (pH 6. 2) supplemented with 1% NaCl containing 100 µg/ml lysozyme (Lysozyme) or not (Control). Values are the means with standard deviation of three trials.

Table 7 Survival of *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* N7 at various pH values

Time (h)	Viable bacteria (\log_{10} cfu/ml)			
	pH 1	pH 2	pH 3	pH 4
0	9.18±0.08	9.31±0.08	9.30±0.11	9.31±0.08
0.5	-	5.44±0.19	9.22±0.05	9.27±0.08
1	-	5.75±0.41	9.26±0.09	9.31±0.04
2	-	5.38±0.04	7.82±0.05	9.35±0.11
3	-	5.10±0.58	7.53±0.30	9.17±0.21

Values are the means with standard deviation of three trials.

-, Not detected.

Table 8 Results of *in vitro* adhesion tests conducted on *Lactococcus* strains on the human Caco-2 cell line

Tested strain	Result
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
ATCC 19435	-
712	+
527	++
1061	+
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	
ATCC 13675	+
DRC1	+
DRC2	-
N7	-
CVT8W	+
<i>Lb. johnsonii</i> Nestec La1	++
<i>Lb. acidophilus</i> JCM 1132	-

-, No adhesion (*Lb. acidophilus* JCM 1132 as a reference strain); +, low adhesion; ++, high adhesion (*Lb. johnsonii* Nestec La1 as a reference strain).

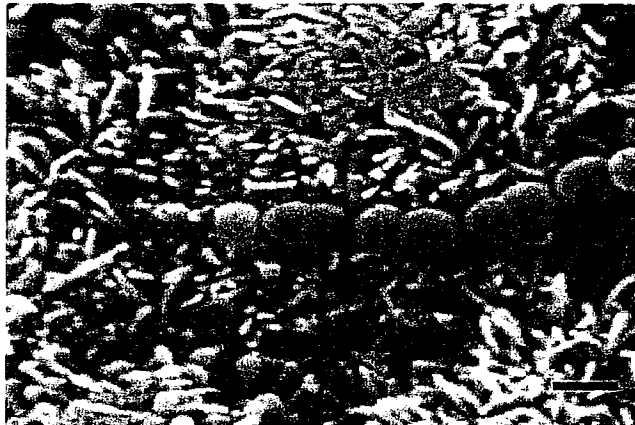


Fig.1. Scanning electron micrograph of differentiated Caco-2 monolayer to which *Lc. lactis* subsp. *lactis* 527 bound (magnification, x 10,000). Bar represents 1 µm.

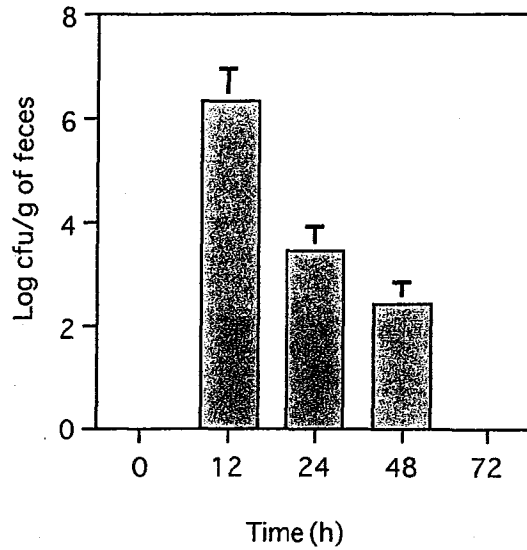


Fig.2. Mean concentration of the three populations of rifampicin-resistant *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* N7 in faecal samples of three mice.

Table 9 Cholesterol removed from media by lactococci^a

Culture	Cholesterol		Growth (A620nm)
	removed (µg/ml)	removal (%)	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			
527	37.7	53.9	1.08
G50	62.0	88.6	1.53
H48	60.7	86.7	1.74
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>			
N7	68.1	97.3	1.56
ATCC 13675	21.7	31.0	0.47
DRC1-F	41.0	58.6	1.42
8W	55.0	78.6	0.31

^a Cells were inoculated for 24 h at 37°C in GM17-THIO broth supplemented with 0.2% sodium taurocholate and cholesterol (final concentration in broth=70 µg/ml). The growth of each strain was measured as absorbance at 620 nm (A620nm); all values are the means of two trials with duplicate.

Table 10 Cholesterol removal by and growth of lactic acid bacteria in MRS-THIO and GAM broths

Media	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> N7			<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 43121		
	Cholesterol		Growth (A620)	Cholesterol		Growth (A620)
	removed ^a (µg/ml)	removal (%)		removed ^a (µg/ml)	removal (%)	
MRS-THIO	20.6	29.4	1.70	37.0	52.9	1.34
GAM	56.9	81.3	1.14	50.7	72.4	1.40

^a Cholesterol removed by the culture during a 24-h incubation at 37°C. All values are the means of two trials with duplicate.

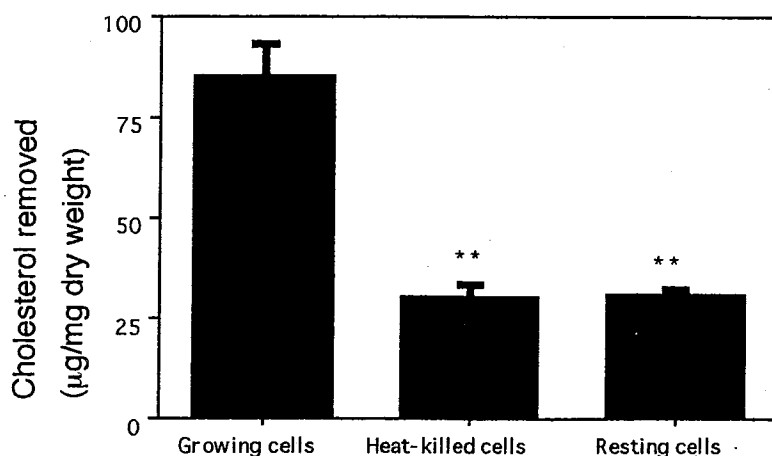


Fig. 3. Cholesterol removal by growing, heat-killed, and resting cells of *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* N7. Cell mass was determined from a standard curve relating optical density to dry weight to calculate relative amounts of cholesterol removed ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight). Cells that removed cholesterol from the media during growth for 24 h at 37°C were designated as growing cells. The heat-killed cells of strain N7 were prepared by autoclaving for 15 min at 121°C and were suspended in GM17-THIO broth containing sodium taurocholate plus cholesterol. Resting cells were suspended in 0.05 M phosphate solution. These cell suspensions were incubated at 37°C for 24 h. Values are means \pm SD of two independent experiments performed in duplicate. ** Significantly different from growing cells, $P < 0.01$.

Table 11 Inhibition of several intestinal bacteria by *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* N7 in associative cultures

Test culture	Sample	CFU of Pathogens/ml ^a	Inhibition ^b (%)
<i>E. coli</i> MAFF 911145	Control	4.46×10^8	
	strain N7	7.33×10^7	83.6
<i>E. coli</i> TISTR 527	Control	7.49×10^8	
	strain N7	1.97×10^8	73.7
<i>K. pneumoniae</i> NGRI G-1	Control	3.36×10^9	
	strain N7	2.90×10^8	91.4
<i>Sta. aureus</i> IFO 15055	Control	1.15×10^9	
	strain N7	3.50×10^6	99.7
<i>Sta. aureus</i> TISTR 029	Control	1.52×10^8	
	strain N7	6.00×10^5	99.6

^aDetermined after 24-h incubation of associative cultures at 37°C .

^bInhibition (%) = $\frac{100 (\text{CFU}/\text{ml in control}) - (\text{CFU}/\text{ml in associative culture})}{(\text{CFU}/\text{ml in control})}$

The population ratio in the inocula of strain N7 and pathogen was $10^4 : 1$.

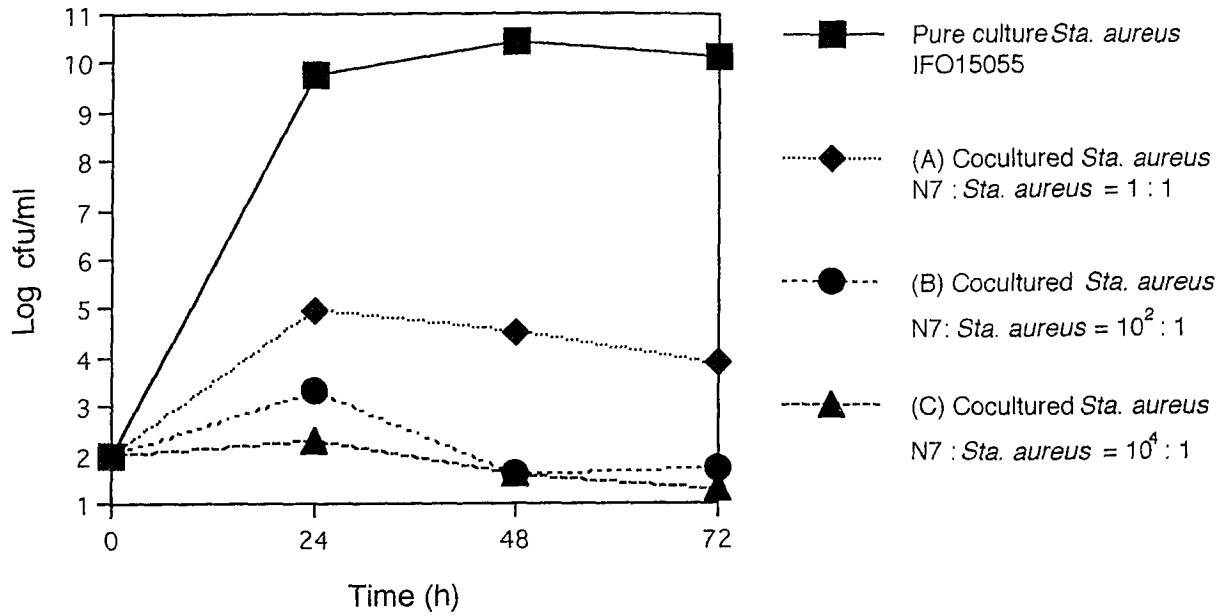


Fig.4. Inhibition of *Sta. aureus* IFO15055 by *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* N7 at varying inoculating ratios after coincubation. Co-cultures were prepared by simultaneously inoculating strain N7 and *Sta. aureus* IFO15055 at varying inoculating ratios, then the viable counts of *Sta. aureus* were determined after 24, 48 and 72-h incubation period at 37°C. To eliminate the effect of decrease in pH resulting from acid produced and nutrient consumption, at 8-10 h intervals all media were refreshed as follows. Strain N7 was inoculated simultaneously with *Sta. aureus* into GAM+MRS mix culture. Cultures were centrifuged and pellets were resuspended in fresh medium. Each population in the inocula of strain N7 and *Sta. aureus* IFO15055 was 1 : 1 (A), 10² : 1 (B) and 10⁴ : 1 (C), respectively.

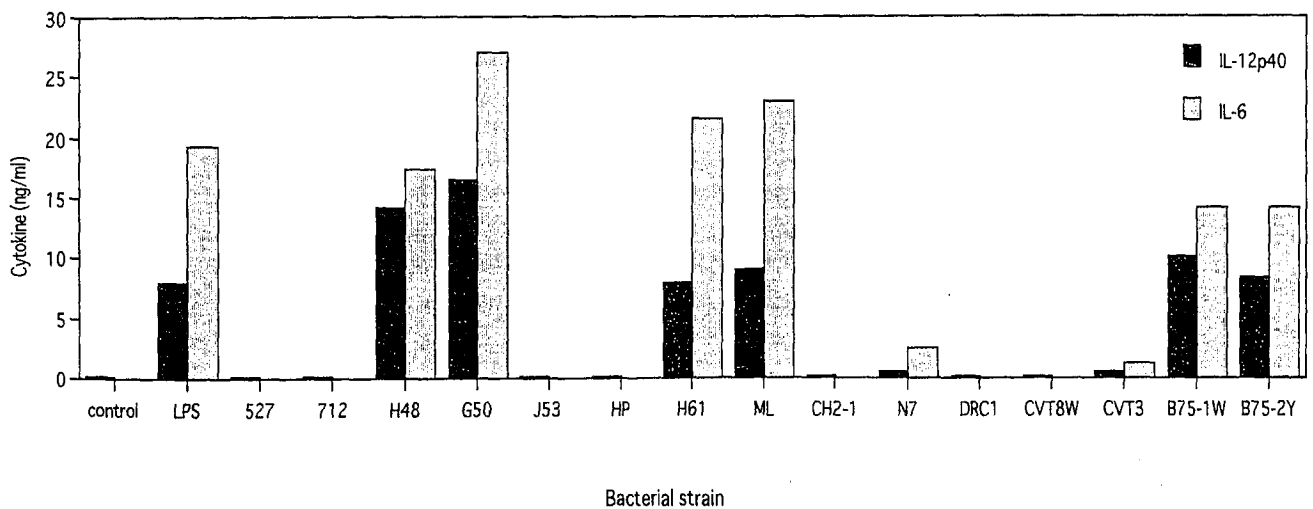


Fig. 5. Effect of lactococci on IL-12 and IL-6 production by clonal macrophage J774.1 cells.

Data are representative of two separate experiments.

527, 712, H48, G50, J53: *Lc. lactis* subsp. *lactis*

HP, H61, ML, CH2-1: *Lc. lactis* subsp. *cremoris*

N7, DRC1, CVT8W, CVT3, B75-1W, B75-2Y: *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*

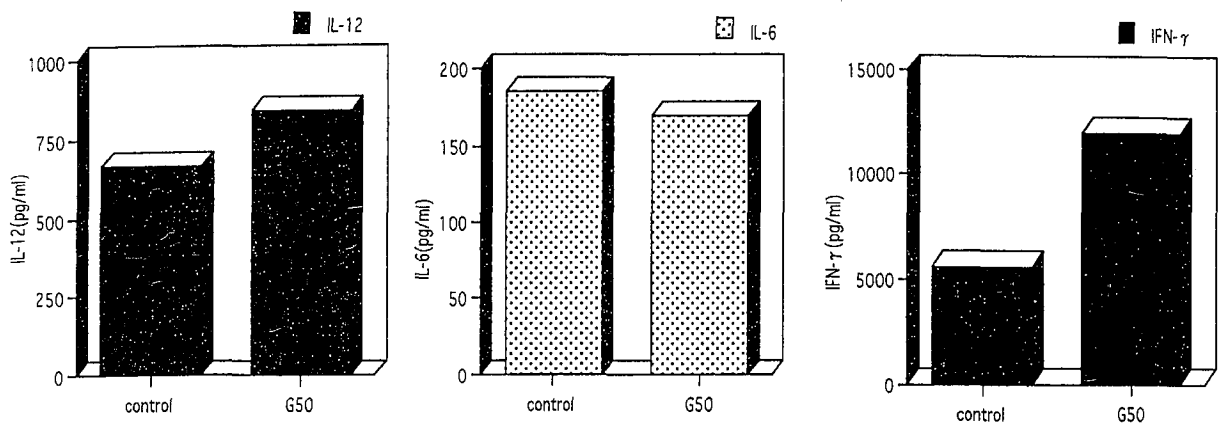


Fig. 6. Cytokine levels in spleen cells of mice after oral exposure to *Lc. lactis* subsp. *lactis* G50 (1×10^9 cfu in 10% skim milk /mouse/day) for 7 days. Control mice were fed with 10% skim milk only. Data are representative of several experiments.

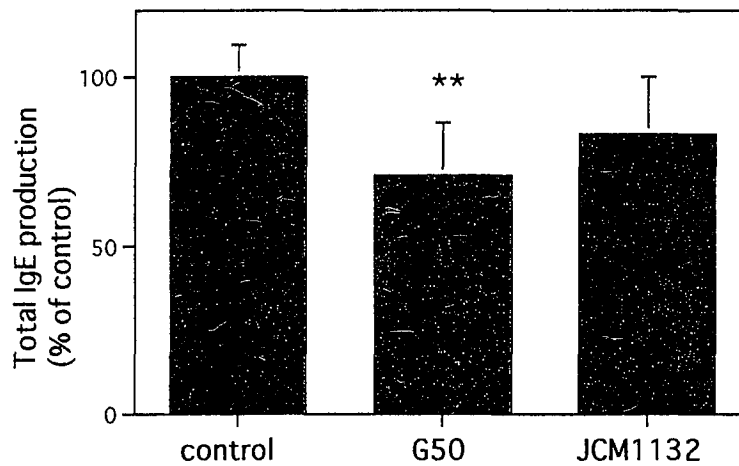


Fig.7. Effect of oral administration of lactic acid bacteria on ovomucoid-induced total IgE production in serum of mice. Strain G50 or *Lb. acidophilus* JCM 1132 was administered to mice at a level of 10^9 cfu in 10% skim milk per mouse per day for 19 days. Data are shown as means \pm SD. Asterisks indicate values significantly different from control (** $P < 0.01$).

論文審査結果要旨

腸内細菌叢がヒトの健康と密接な関係があることが認識され、「宿主の腸内微生物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生きた微生物添加物」と当初定義された“プロバイオティクス”という概念も、最近では「宿主の健康維持に有益な働きをする微生物」として広い意味で用いられることが多くなってきた。プロバイオティクスの代表は乳酸菌であり、従来はヒトの大腸の常在菌として *Lactobacillus* 属を始めとする乳酸桿菌がもっぱら研究対象とされてきた。本研究においては、腸内常在菌ではないことからほとんどプロバイオティクスとしての研究がなされなかった *Lactococcus* 属乳酸菌を取り上げた。*Lactococcus* 属の乳酸菌は、乳中での生育が *Lactobacillus* 属よりもよく、チーズやヨーグルトなどの発酵乳製品製造のスターターとして重要な菌であり、安全性も高い。

はじめに牛乳、チーズ、漬物、生草、サイレージを分離源として 437 株の乳酸菌を得、その中から 37 株の *Lactococcus* を分離した。

乳酸菌がプロバイオティクスとして機能するためには、経口摂取後、腸内環境に耐えて大腸まで生菌として到達することが望ましい。そのため、上記で分離した *Lactococcus* を使用して腸内生残性を調べた。インビトロ試験の結果、いくつかの *Lactococcus* がリゾチームや胆汁酸が存在する腸内環境を模した条件に耐え、中でも N7 株が最も耐性が高かった。

腸内生残性が優れた菌株を中心に *Lactococcus* の機能性について検討した。血清コレステロール低下作用と関係するとされる培地中のコレステロール除去能力については、すべての供試菌株に効果が認められたが、とくに N7 が顕著だった。死菌体や静止菌体より増殖菌体の作用が大きかった。免疫機能の一つとして、マクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響を検討したところ、インターロイキン-12 や -6 の産生を誘導した株があり、とくに *Lactococcus*G50 の誘導能が優れていた。一方、代表的食物アレルゲンであるオボムコイドで免疫したマウスに G650 株を経口投与した結果、対照群より IgE 量が有意に低下し、同菌の経口投与がアレルギー性疾患を抑制する可能性を示した。

以上の結果から、発酵食品や植物から分離した *Lactococcus* について、プロバイオティクスとしての機能を評価したところ、腸内常在菌ではないが腸まで生菌のまま到達する菌株を見出した。また、これらの菌にはコレステロール除去作用、免疫調節作用をはじめとするプロバイオティクスとしての機能が認められた。これらの知見は、*Lactococcus* の中にはプロバイオティクスとして有望な菌株が存在していることを示している。

一般に *Lactococcus* は乳中での生育に優れていることから、本研究の中で見出されたプロバイオティクス機能を有する菌株を用いた新規な乳製品の開発が期待でき、審査員一同は本研究者が博士（農学）の学位を授与するに値すると認定した。