

1 いちご果実由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AMAOU を用いた食品素材の開発 2 と機能性評価

3
4 九州大学 農学研究院 機能性多糖分析学講座 宮崎義之、
5 株式会社ヴェントゥーノ 中溝公次、株式会社アミー製薬 柴崎哲哉

7 はじめに

8 乳酸菌は、ヨーグルト、漬物、味噌や醤油などの発酵調味料、果実酒などの様々な発
9 酵食品の製造に古くから用いられてきた。ラクトバチルス属乳酸桿菌である *Lactobacillus*
10 *plantarum* もまた、すぐきやキムチのような漬物、石鎚黒茶や阿波番茶のような発酵茶と
11 いった伝統的な発酵食品を作る際に欠かすことの出来ない有用微生物である¹⁾。また、植
12 物由来の乳酸菌は、腸内環境を整える効果的な健康食品素材としてこれまで多く利用さ
13 れている。さらに、腸管保護作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用および免疫増強作用な
14 ど、植物性乳酸菌が健康維持に役立つ生理活性を有することが数多く報告されている。
15 特に、ラクトバチルス属の乳酸菌株について、細胞培養試験や動物試験を通して免疫増
16 強効果を有することが示され、さらに、臨床試験において有効性が確認された報告例も
17 あることなどから、バイオジェニック食品素材として大いに期待できる。

18 乳酸菌は、発酵物に限らず柿果実など広範囲の植物から単離することが可能である²⁾。
19 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AMAOU 株は、いちご品種「あまおう」の果実から単離さ
20 れた新しい乳酸菌株である。「とよのか」の流れをくむ「あまおう」は、2001年に福岡県
21 農業総合試験場で開発（2005年に「福岡 S6号」として品種登録）され、現在では栃木県
22 産の「とちおとめ」と共に、「あまおう」は日本で生産されるいちごの2大ブランド品種
23 の一つとなっている。この福岡県特産いちご品種である「あまおう」に着目し、(株)ヴ
24 ェントゥーノならびに(株)アミー製薬は、福岡県工業技術センター生物食品研究所および
25 大石化成(株)と共同であまおう果実由来乳酸菌の製品化を試み、福岡県工業技術センター
26 生物食品研究所により乳酸菌単離、大石化成(株)により本乳酸菌の加熱死菌体乾燥粉末を
27 用いた食品・健康食品素材の原料販売、(株)ヴェントゥーノより乳酸菌配合商品発売に至
28 っている（図1）。本稿では、本乳酸菌株を用いて開発された食品素材の機能性に関する
29 知見を紹介する。

31 1. あまおう果実由来乳酸菌株の遺伝子系統解析

32 機能性評価に先立ち、福岡県工業技術センター生物食品研究所において単離された分
33 離菌株の菌種を明確するため、16S rRNA 遺伝子および *recA* (recombinant A protein) 遺伝

34 子の塩基配列解析を実施した。

35 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析の結果から、*Lactobacillus plantarum* ATCC14917 に対
36 して 99.8%の高い相同性を有することが確認された。しかし、*Lactobacillus plantarum* 系
37 統群には、*Lactobacillus pentosus* や *Lactobacillus paraplantarum* など極めて類似した遺伝子
38 を有する菌種が存在し、16S rRNA 遺伝子の相同性に基づいて菌種同定を行うことは極め
39 て困難であるとされている³⁾。そこで、より正確な系統帰属を行うため、*recA* 遺伝子の
40 塩基配列解析（於：株式会社テクノスルガ・ラボ）を行った。その結果、*Lactobacillus*
41 *plantarum* グループに属する菌株由来の *recA* 遺伝子塩基配列に対して高い相同性を有す
42 ることが再度確認された。更に、得られた塩基配列情報に基づいて分子系統解析を行っ
43 た結果、*Lactobacillus plantarum* AMAOU は、図 2 に示される様に亜種レベルにおいて免
44 疫調節作用に関する報告のある乳酸菌株も含まれる *Lactobacillus plantarum* subsp.
45 *plantarum* クラスタに属することが明らかとなった。

46

47 2. 乳酸菌食品素材の機能性解析

48 乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* AMAOU には健康維持に資する生理機能が期待される
49 ことから⁵⁾、その加熱死菌体乾燥粉末を用いた食品素材を開発し、これまでに下記の機能
50 性評価を実施した。

51 (1) 腸内環境改善作用：腸内細菌の増殖に対する効果

52 先に述べたように、植物由来の乳酸菌は腸内細菌叢の改善に働く健康食品素材として
53 の利用が期待される。それらの腸内環境を整える健康食品素材の効果として、大腸菌な
54 どの日和見菌の増殖を抑える善玉菌の増殖を促す一方で、加齢とともに増加し栄養素を
55 腐敗させて様々な有害物質をつくる悪玉菌を減少させることが挙げられる。そこで、CFU
56 法による生菌数測定（於：株式会社テクノスルガ・ラボ）を行い、善玉菌として知られる
57 ビフィズス菌ならびに悪玉菌として知られるウェルシュ菌の増殖に及ぼす影響を検討し
58 た（図 3）。

59 *Lactobacillus plantarum* AMAOU 株の加熱死菌体乾燥粉末を 100 および 1000 µg/mL 添
60 加した培養液を調製し、代表的なビフィズス菌株 *Bifidobacterium bifidum* NBRC 100015 を
61 播種して 37°Cにて 72 時間の嫌気培養した後、ビフィズス菌の生菌数を測定した。その結
62 果、*Lactobacillus plantarum* AMAOU 加熱死菌体乾燥粉末を添加することで、
63 *Bifidobacterium bifidum* NBRC 100015 株の増殖が有意に促進されることが明らかとなった。
64 一方、悪玉菌であるウェルシュ菌株 *Clostridium perfringens* JCM 1290 について 24 時間の
65 試験培養後の生菌数を測定した結果、*Lactobacillus plantarum* AMAOU 加熱死菌体乾燥粉
66 末を添加することで増殖が抑えられる傾向にあることが示された。これらの結果から、

67 *Lactobacillus plantarum* AMAOU 加熱死菌体乾燥粉末は、悪玉菌を増やすこと無く、善玉
68 菌の増殖を積極的にサポートする作用を有することが示され、腸内細菌叢の改善につな
69 がる食品への応用が大いに期待される。

70

71 (2) 免疫賦活効果：マクロファージに対する活性化作用

72 *Lactobacillus plantarum* 株に関する幾つかの研究において、菌体成分であるリポテイコ
73 酸や菌体外多糖が免疫賦活作用を有することが報告されていることから^{5,6)}、*Lactobacillus*
74 *plantarum* AMAOU もまた同様の効果を発揮することが期待される。そこで、病原体の排
75 除や創傷治癒に働く免疫細胞であるマクロファージの活性化に及ぼす *Lactobacillus*
76 *plantarum* AMAOU 加熱死菌体乾燥粉末の効果を検証した (図 4)。試験には、マウスマク
77 ロファージ様細胞株 RAW264.7 および J774.1 を用い、*Lactobacillus plantarum* AMAOU 株
78 の加熱死菌体乾燥粉末を添加した培地で培養し、それぞれ、一酸化窒素 (NO ; nitric oxide)
79 およびインターロイキン-12 (IL-12 ; interleukin-12) の産生量を指標としてマクロファージ
80 機能に及ぼす影響を評価した。また、免疫増強効果を有することが既に報告されてい
81 る小麦常在性のグラム陰性細菌 *Pantoea agglomerans* 由来のリポ多糖 (LPS) を、既知の
82 作用比較成分であるポジティブコントロールとして用いた。

83 検討の結果、*Lactobacillus plantarum* AMAOU 株の加熱死菌体乾燥粉末は、10 µg/mL 以
84 上の濃度で RAW264.7 細胞の NO 産生を有意に増強することが示された。NO はマクロフ
85 アージが細胞内で産生する病原体殺傷に関わる実行分子であり、*Lactobacillus plantarum*
86 AMAOU 株の加熱死菌体乾燥粉末がマクロファージの活性化に寄与することが明らかと
87 なった。本効果は、LPS と比較するとやや作用強度が弱かったが、過剰な NO 産生は炎
88 症の誘導にもつながる諸刃の剣であり、比較的穏和な NO 産生増強効果を有する機能性
89 成分は副作用が少なく有用であると推察された。

90 また、J774.1 細胞による IL-12 産生においては、*Lactobacillus plantarum* AMAOU 加熱死
91 菌体乾燥粉末が、高い生理活性を有することで知られる LPS よりも強い増強作用を示す
92 ことが明らかとなった。IL-12 は、ウイルス感染細胞やがん細胞などの殺傷に関わる細胞
93 性免疫細胞の分化・成熟を促す細胞間連絡分子として知られており、従って、*Lactobacillus*
94 *plantarum* AMAOU 加熱死菌体乾燥粉末は、ウイルス感染症やがんの予防に資する極めて
95 有用な食品素材であると推察された。また、他の *Lactobacillus plantarum* 株において、IL-
96 12 産生を増強することでアレルギー反応の誘導に働く IgE 抗体の産生が抑制されること
97 が報告されており、更なる検証を必要とはするものの、*Lactobacillus plantarum* AMAOU
98 加熱死菌体乾燥粉末についてもアレルギー予防効果を有することが期待される。

99

100 **おわりに**

101 本稿で述べてきた通り、新たな食品素材の開発を目的として単離されたあまおう果実
102 由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AMAOU の加熱死菌体粉末を用いた市販の食品素材に
103 ついて、腸内細菌および免疫細胞を用いた培養試験を実施した結果、腸内細菌叢の改善
104 (善玉菌の増殖促進) や免疫機能の増強に寄与する生理機能を発揮し得ることが確認さ
105 れた。腸内環境および免疫機能の改善に資する食品成分は、私たちが健康を維持してい
106 く上で極めて有用である。以上のことから、*Lactobacillus plantarum* AMAOU を用いた機
107 能性素材は、健康食品をはじめとする様々な領域への応用展開が今後大いに期待される。

108

109

110

111 <参考文献>

- 112 1) 岡田 早苗. (2002) 植物性乳酸菌世界とその秘める可能性. 日本乳酸菌学会誌 13:23-
113 36.
- 114 2) 上田 京子, 樋口 智子, 平野 吉男, 塚谷 忠之, 末永 光, 齋藤 浩之, 横溝 雅和.
115 (2016) 柿果実由来乳酸菌を用いた柿シロップ乳酸発酵飲料の開発. 日本食品科学工
116 学会誌 63:78-85.
- 117 3) 平山 洋佑, 遠藤 明仁. (2016) 乳酸菌分類の現在とビフィズス菌・乳酸菌分類小委員
118 会が提言した新規乳酸菌種提唱のための最少基準. 腸内細菌学雑誌 30:17-28.
- 119 4) 光岡 知足. (2011) プロバイオティクスの歴史と進化. 日本乳酸菌学会誌 22:26-37.
- 120 5) Hatano S, Hirose Y, Yamamoto Y, Murosaki S, Yoshikai Y. (2015) Scavenger receptor for
121 lipoteichoic acid is involved in the potent ability of *Lactobacillus plantarum* strain L-137 to
122 stimulate production of interleukin-12p40. *Int Immunopharmacol.* 25:321-331.
- 123 6) Tang Y, Dong W, Wan K, Zhang L, Li C, Zhang L, Liu N. (2015) Exopolysaccharide Produced
124 by *Lactobacillus Plantarum* Induces Maturation of Dendritic Cells in BALB/c Mice. *PLoS One.*
125 10:e0143743.

126

127

128

129

130

131

132

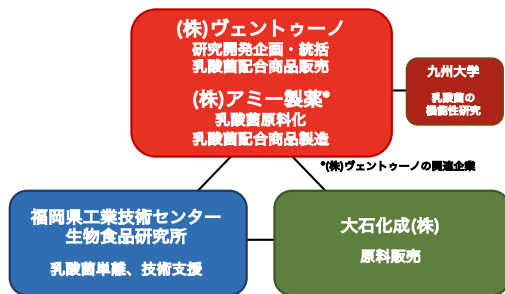
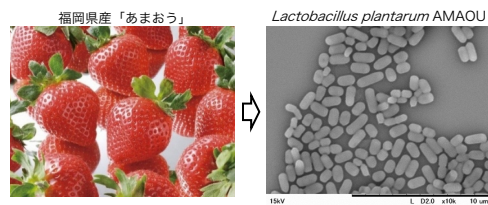


図1. あまおう果実由来乳酸菌株の開発体制

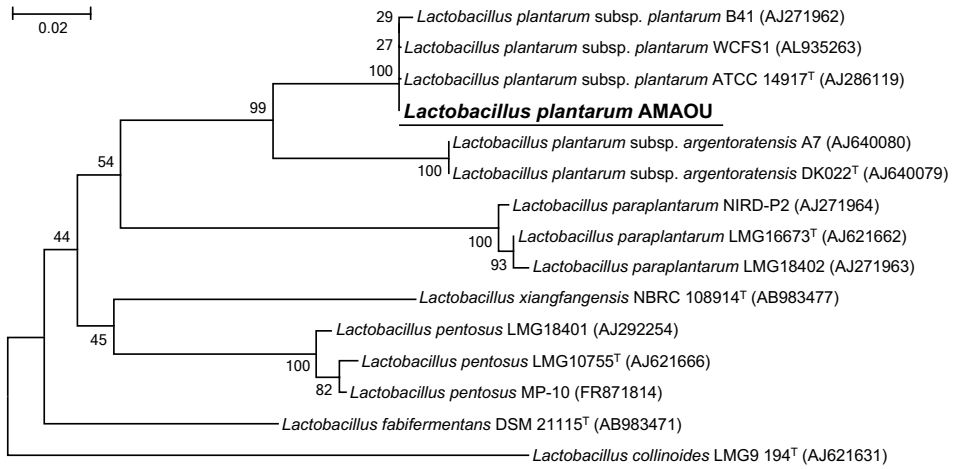


図2. *recA*遺伝子配列に基づく *Lactobacillus plantarum* AMAOUの系統樹解析

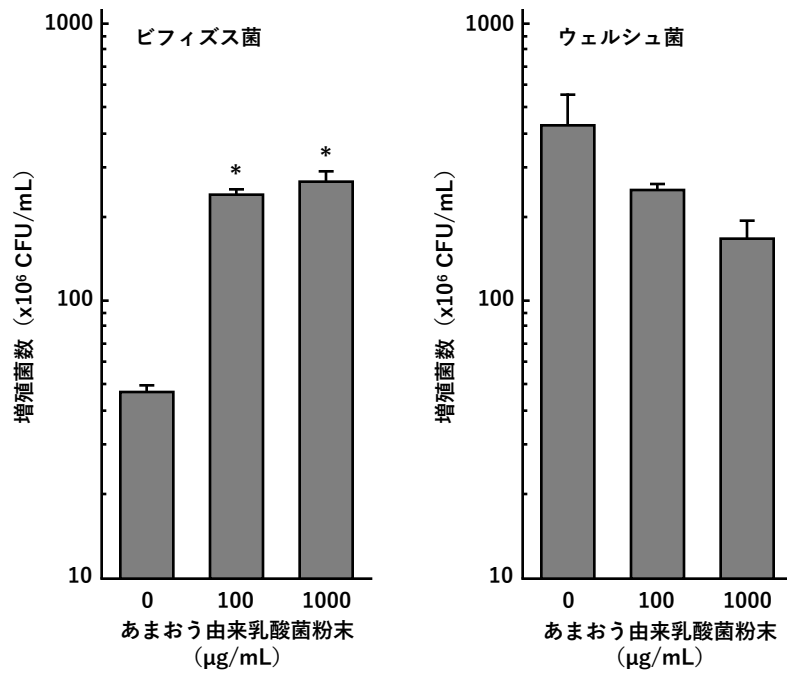


図3. 腸内細菌の増殖におよぼす *Lactobacillus plantarum* AMAOU 加熱死菌体乾燥粉末の効果 (Student's t検定, * $p < 0.01$, $n = 3$)

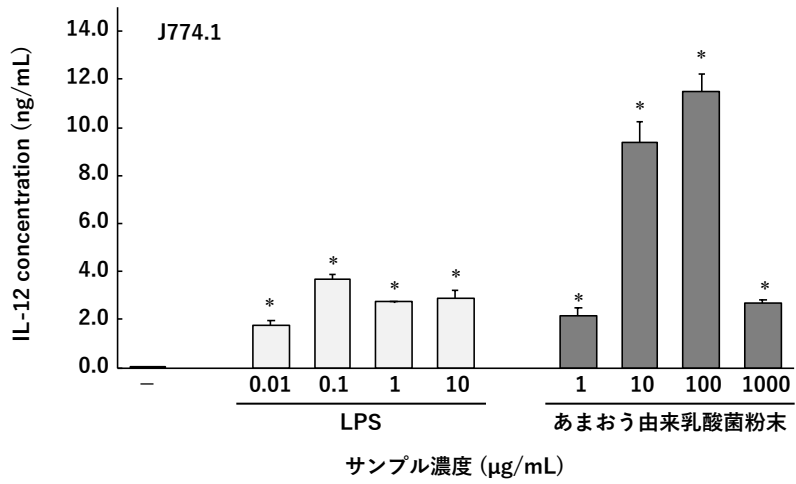
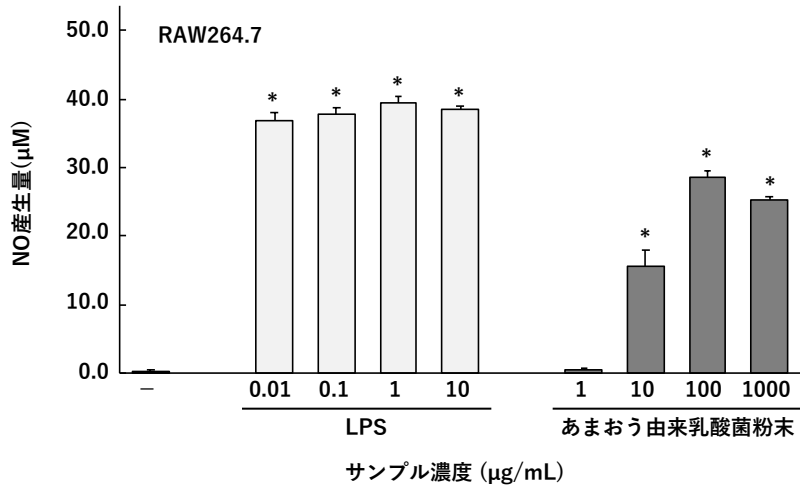


図4. マクロファージ様細胞株に対する *Lactobacillus plantarum* AMAOU 加熱死菌体乾燥粉末の活性化作用 (Student's t検定, * $p < 0.01$, $n = 3$)