

Development and Application of Probiotics

(腸内健康作用のある微生物の探索と応用)

学位論文内容の要旨

Regular consumption of foods fermented by lactic acid bacteria (LAB) is important in human health and disease. However, most potent strains of LAB have poor viability in fermented foods due to low pH. Furthermore the immunomodulatory properties of various strains of LAB and how LAB modulates gastro intestinal microbial balance has not yet been properly clarified. Therefore, there is need to conduct studies on enhancement of viability of probiotics strains in fermented foods, investigate the immuno modulatory effects of LAB and to understand the effects of LAB on the composition of gut microbiota in relation to health and disease.

1- Application of membrane-bound H^+ -ATPase defective mutants of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in prevention of yoghurt post acidification during storage

Persistent acid production by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* during refrigerated storage is a major cause of reduced viability of probiotic strains such as *Bifidobacterium breve* in yoghurt. It was established that H^+ -ATPase defective mutants of lactic acid bacteria have reduced growth and metabolism in low pH environments. Therefore, the aim of this study was to evaluate inhibition of post acidification and maintenance of *Bifidobacterium breve* viability in yoghurt fermented by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mutants with reduced membrane-bound H^+ -ATPase activity during refrigerated storage. Spontaneous neomycin mutants of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* that had a significantly ($P \leq 0.05$) reduced H^+ -ATPase activity were successfully isolated. Yoghurt fermented using *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0164 No. 55-1 (mutant) starter culture had markedly reduced post acidification and maintained viability ($\geq 10^8$ CFU/ mL) of both *Bifidobacterium breve* JCM 1192^T and *Bifidobacterium breve* JCM 7017 during storage at 10°C for 21 days. These results clearly showed that yoghurt fermented by mutants of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with reduced membrane bound H^+ -ATPase activity has reduced post acidification that prolongs viability of *B. breve* in yoghurt during refrigerated storage.

2- Potential of Lactic Acid Bacteria to Induce Th1 Immune Profile

Allergy is an immune mediated disease and has been attributed a higher T-helper (Th)-2 lymphocytes than Th1 lymphocytes. Th1 lymphocytes produce cytokines such as IFN- γ and IL-12 that suppress allergy whereas Th2 lymphocytes produce IL-4 that enhance allergy. It has been suggested that lactic acid bacteria (LAB) might switch the Th2 biased immune response in allergic patients towards a balanced Th1/Th2

immune profile leading to amelioration of allergy. To select strains of LAB that could be of potential application for foods in controlling allergy, 35 bacterial strains were screened in vitro using murine splenocytes and peritoneal exudate cells (PECs). *Streptococcus thermophilus* AHU1838, FERM AP-21009, and *Lactobacillus paracasei* subsp. *casei* AHU1839, FERM AP-21010 enhanced secretion of Th1 cytokines such as interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-12 (IL-12). These two strains also up regulated the expression of dendritic cells (DCs) surface molecules (CD40 and CD86) and activated cytotoxic T lymphocytes (CTL). Therefore these two strains could be of potential use in producing fermented food products that can enhance Th1 immune profile which is important in amelioration of allergy.

3- Development of a real-time PCR method for enumeration and detection of *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus is thermophilic lactic acid bacterium widely used as a starter culture in the manufacture of dairy products. However, culture based methods cannot accurately distinguish *S. thermophilus* from other closely related stains such as *Lactococcus lactis* due to similarity in growth and biochemical characteristics. Therefore, the objective of this study was to develop an accurate, sensitive and specific real-time PCR method for detection and enumeration of *S. thermophilus*. A highly specific real-time PCR assay for detection of a 71 bp fragment of *rimM* gene sequence encoding 16S rRNA processing protein in *Streptococcus thermophilus* was successfully developed. The designed primers and probes were found to be specific for *S. thermophilus* but not *Streptococcus equinus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus* spp. The linear range of the developed real-time PCR assay was from 2.7 to 8.6 log CFU/ml with an amplification efficiency of 96%. The detection limit of the real time PCR assay was 1.7 log CFU/ml. Therefore the developed real-time PCR assay could be of potential application in specific detection and enumeration of *S. thermophilus* AHU1838.

4- DGGE analysis of microbial diversity in gastrointestinal tract of post operative gastric and oesophageal cancer patients

The human gastrointestinal tract (GIT) is colonized by microorganisms from the oral cavity to rectum, with peak numbers in the colon ($\sim 10^{14}$ organisms/g). Although gastric and oesophageal cancer is among the causes of morbidity and mortality in Japan and other parts of the world, no systematic studies have so far not been conducted on microbial diversity in GIT of pre and post operative gastric and oesophageal cancer patients, and on the application of lactic acid bacteria (LAB) on the restoration/modulation of microbial diversity. The objective of this study was to evaluate microbial diversity in the GIT of gastric and oesophageal cancer patients before and after operation using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Our results showed that surgery of the stomach and oesophagus which are anatomically located in the upper part of the GIT affects microbial diversity in the distal part of the GIT which as been described as a very stable ecosystem. Hence there is a possibility that consumption of fermented dairy products could help in restoration of microbial balance and faster recovery rates of postoperative patients.

学位論文審査の要旨

主査	教授	浅野	行蔵
副査	教授	原	博
副査	教授	横田	篤
副査	准教授	園山	慶

学位論文題名

Development and Application of Probiotics

(腸内健康作用のある微生物の探索と応用)

本論文は英文 149 頁、図 23、表 12、6 章からなり、参考論文 5 編が付されている。微生物とヒトとの関係は研究が長足に進んでいる。ヒトの健康と関わりの深い種類やメカニズムについても多くの知見が集積されてきた。それらの背景には、微生物分野における系統分類学の進歩やそれを活用した遺伝学的同定方法の緻密な進歩がある。一方、ヒトの免疫学もまだまだ未知の部分が残されているものの現在の知見は驚くべき発展と展開を見せている。腸内細菌の活動は、免疫細胞が最も多く存在する腸管において、免疫システムとの応答関係があることも判ってきた。免疫機構の解析も進んできており、プロビオティクスとして食品への応用の試みも始まっている。微生物をヒトの健康に役立てる種々の試みが進行している。本研究は、プロビオティクス研究業績に関するものである。ヨーグルトなど発酵食品に含まれる *Bifidobacterium* 属菌の生菌数の減少を防ぐ技術に関するもの、発酵食品に用いる乳酸菌結果をまとめたものである。

1) 乳酸菌のプロトン ATPase 活性低減株を用いて発酵させたヨーグルトの pH 保存安定性によるプロビオティック微生物の生存数の向上方法

Bifidobacterium が添加された健康保健機能のあるヨーグルトの問題点は、発酵後酸性化によって、酸に弱い *Bifidobacterium* の生菌数が、賞味期限まで高い濃度で保ちにくいことにある。そこで、発酵後酸性化を防止するために、ヨーグルト発酵に用いる *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0164 株から H⁺-ATPase 欠損変異株を誘導した。Neomycin 耐性の変異株を 2 株取得した。これらで発酵させると、pH5 以下には下がることはなかった。両株の H⁺-ATPase の活性は、低下しており、そのために菌体内のプロトンを排出する能力も下がったために乳酸産生が止まった。変異株を用いて発酵させたヨーグルトでは、発酵後酸性化が

起こりにくく、添加されている *Bifidobacterium* 属菌の生菌数は、*B. breve* JCM1192 においても JCM7017 においても 10^8 CFU/ml 以上を、賞味期限の後に至るまで保持でき、プロバイオティック・ヨーグルトを供給できるという目的を達成できた。(Int. J. Food Microbiol., 116, 358, 2007)

2) ヨーグルト発酵用乳酸菌における Th1/Th2 免疫バランス安定化機能性を持つ株の探索とその利用

アレルギー症状を持つ人口が増えてきたという統計から、免疫反応の過剰反応を抑制する目的の食品の開発も盛んになってきた。すでに複数の企業からアレルギー抑制効果を差別化要素とした商品も販売されている。本研究においては、ヨーグルトなどの発酵乳に用いる実用的な乳酸菌を集めて、新しい手法も入れて、Th1/Th2 バランスを改善する乳酸菌の探索を行った。35 株の乳酸菌を培養し、その菌体をマウスの脾臓細胞に暴露した。Interferon- γ (IFN- γ) と interleukin-12 (IL-12) は、T ヘルパーリンパ細胞-1(Th1)によって作られアレルギーを抑制方向に作用する。一方、IL-4 と IL-10 は、Th2 によって作られアレルギー反応を促進する。スクリーニングは、まず、IFN- γ の産生量が多く、かつ IL-4 の生産量の少ない乳酸菌を選択した。さらに IL-12 と IL-10 の産生を調べたが、新規の活性測定法を構築した。これらのサイトカインは、その生産量が少ないために、直接的な測定では、変化をとらえられない。そこで、マウスのムレイン脾臓細胞と腹腔滲出細胞(PEC)を組み合わせた高感度測定法を用いた。これは、チオグリコール酸を腹腔注射して4日後にPECを取り出し、乳酸菌と共培養して2日後にELISAによってIL-10およびIL-12の定量を行った。この高感度測定法は、本研究の独創的部分でもある。スクリーニングの結果、*Streptococcus thermophilus* AHU1838 と *L. paracasei* subsp. *casei* AHU1839 が、選択された。これらは、IFN- γ と IL-12 の産生を促進して、他方、IL-4 と IL-10 の産生は抑制された。樹状細胞(DCs)表層抗原として CD40 と CD86 の上昇が観察された。さらに、細胞傷害性 T リンパ球の活性化も惹起することが判明した。これらの乳酸菌でヨーグルトを作り官能検査を行ったところ、商品化可能なレベルにあることが判り、商品化が進んでいる。(Biosci. Biotechnol. & Biochem. in press.)

3) 腸内細菌の遺伝的解析法を利用した胃ガンおよび食道ガン患者の臓器除去手術後の大腸内微生物叢の変化の

消化管の上部である食道および胃の除去手術を行った場合に、しばしば消化管後部の大腸での以上があることが知られている。しかし、未だに腸内細菌叢の解析はなされていなかった。順天堂大学医学部で手術された患者の糞便を採取し、DGGE法で腸内細菌を解析した。100人を越える患者さんの糞便から術前と大きな変化を示す患者が、ある頻度で存在すること、および今後の解析が、期待されている。

以上、本研究では、プロバイオティクス微生物の活用のための発酵食品に使用する微生物の改良、免疫バランスを調節するヨーグルト用乳酸菌のスクリーニング、お

よび消化管ガン患者の術後の腸内細菌叢分析など微生物を基軸として、人の生活に役立てる研究が行われた。

よって審査員一同は、Ongol Martin Patrick 氏が、博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。