

ラクトコッカス ラクティス H61 加熱死菌が子ブタの免疫系へ及ぼす影響

兼松伸枝・木元広実¹・林征幸・小林洋介・田島清

農研機構畜産研究部門 家畜代謝栄養研究領域, つくば市, 305-0901

¹農研機構畜産研究部門 畜産物研究領域, つくば市, 305-0901

要 約

畜産研究部門保有の *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 (H61) が免疫系へ与える影響を調べるため, 9 週齢の LWD 交雑種ブタへ加熱処理菌体 (体重 25kg あたり 4×10^{10} 個) を毎朝 1 回, 通常量の抗生剤を含む飼料の給餌時に与えた。投与開始前日 (Day0) と 2 週間後 (Day14) の午前 10 時に採血し, 分離した末梢血中単核球 (PBMC) から CD3, CD4, CD8, CD16, CD21, WC1 抗体に対する細胞表面抗原マーカー陽性細胞とリンパ球サブセットの比率, およびナチュラルキラー細胞障害活性 (NK 活性) をフローサイトメーターにて測定した。血漿コレステロール濃度と血漿中の免疫グロブリン (IgA と IgG) 濃度の測定を行った。

H61 投与による効果は $\gamma\delta$ T 細胞を含むサブセットである CD3+CD4-CD8- 細胞で有意な増加が認められ, CD3-CD8+ 細胞については低下する傾向が見られた。CD3+CD4-CD8- 細胞では H61 投与区のみ Day0 より Day14 の値が増加した。免疫グロブリン濃度に効果は認められなかった。また, 14 日間の増体量, 飼料摂取量および飼料効率にも有意差は認められなかった。

H61 死菌体の 2 週間投与はブタの血中免疫細胞に対し影響を与える可能性が示唆された。

キーワード: 乳酸菌 H61, ブタ, $\gamma\delta$ T 細胞, リンパ球サブセット

緒 言

養豚現場においては, 子豚の損耗防止のため各種抗菌剤の添加が長く行われてきた。しかし食の安全・安心や製品の高付加価値化の観点から, 抗菌剤の使用量抑制や免疫増強を目的に, 乳酸菌製剤や発酵リキッド飼料の実用化が進んでいる。当研究部門の発酵リキッド研究もブタの健康状態に対する成果を挙げてきたが^{7,10,16)}, 乳酸菌の給与効果は, 菌種や給与量, 飼養環境等で差異があり, 作用機序には未だ不明な点が多い。一方, 多頭飼育において恒常的な生産性を維持するためには, 抗菌剤の全廃, あるいは生菌剤や天然素材のみでの飼養へ移行することは難しい。

ラクトコッカス・ラクティス H61 (以下 H61) は畜産研究部門が保有する乳酸菌でプロバイオティック機能を

もち, 死菌体においてもマウス表皮やヒト皮膚の状態の改善や免疫賦活作用等の有用性が確認されている⁴⁻⁶⁾。近年の研究では^{13,14)}, 死菌を含め乳酸菌が直接, 免疫系へ影響を与えることが明らかとなってきた。本研究は, ブタに対する免疫力増強物質の候補として, 飼料として調製が容易な死菌体において効果が期待できる H61 に着目し, 2 週間の連続投与前後について免疫学的指標の変化から評価を行った。

材料および方法

本実験は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物実験等実施規程および畜産研究部門動物実験等実施要領に従い実施した。

1. 供試動物

当研究部門で生産したLWD交雑種10頭(一腹きょうだいの雌および去勢雄)を用いた。当研究部門における慣行的な飼養に基づき、4週齢で離乳し、8週齢における実験豚舎への移動まで子豚はつらつ(全農・くみあい飼料(株))にて飼養した。移動後の半開放豚舎では他個体を認識可能な平床豚房(4.7m²)に個別飼養し、実験開始までの1週間で徐々にブタ試験用標準飼料SDS No.3(日本配合飼料(株))へ飼料を切り替えた。9週齢の実験開始時にH61投与区と対照区の2区に分け、平均体重と性別が等しくなるよう5頭ずつ配分した。平均体重は実験開始時に25kg、終了時は35kgであった。試験用飼料へは通常量のリンコミックス44(ゾエティスジャパン(株);飼料1kgあたりリンコマイシン110mg力価)およびCTC散(フジタ製薬(株);飼料1kgあたりクロルテトラサイクリン440mg力価)を加え、午前9時に定量を給餌し、飲水は自由とした。体重は実験開始前日より週に1回測定し、日本飼養標準・豚の期待増体日量に基づき、1日の給餌量は体重の5%重量から開始し、Day5から体重の6%重量、Day11からは7%重量とした。

2. H61 給与および試料採取

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* H61はMRS培地(Becton, Dickinson and Company)にて30℃で約24時間培養した。培養終了後の菌体は0.85%食塩水で1回洗浄し、1mLあたり 4×10^{10} 個となるよう蒸留水に懸濁した状態で121℃、15分間の加熱処理を行い、-20℃にて保存した。H61投与区にのみ実験開始日から14日間、体重25kgあたり 4×10^{10} 個の割合で加熱処理死菌体懸濁液を飼料へ混ぜて与え、完食を確認した。

採血は投与開始前日(Day0)と2週間後(Day14)の朝10時に鼻保定にて頸静脈から行った。EDTA-2Na含有の真空採血管(テルモ(株))に2本採取した。

3. 血液の分析と統計解析

単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)は常温でリンホプレップ(Axis-Shield PoC AS)により密度勾配遠心分離し、CD3, CD4, CD8, CD16, CD21, WC1に対する蛍光標識抗体(表1)にて細胞表面抗原マーカーの多重染色を行った。ナチュラルキラー細胞障害活性(NK活性)は, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Enzo Life Sciences, Inc.)で染色したK562細胞を、分離した単核球と共培養にて4時間反応させた後、7-Aminoactinomycin D (7-AAD; Beckman Coulter)を用いて測定した⁹⁾。マーカー陽性細胞比率およびNK活性の測定にはフローサイトメーター(Gallios, Beckman Coulter)を用い、測定データとサブセットの解析にはFlowJo (FlowJo, LLC)を使用した。

血漿は4℃、2200Gで遠心分離して得て、その後、測定まで-30℃にて保存した。血漿中コルチゾール濃度は化学発光を用いたEIA法で測定した。血漿中免疫グロブリン(IgAおよびIgG)濃度はブタ用のELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories)を用いて測定した。

体重と増体についての統計処理は、両区間で対応のないt検定を行った。また、免疫指標についてはSAS Add-In for Microsoft Office 6.1の混合モデルを使用した。すなわち採血日と実験区を固定効果、個体を変量効果として個体差を考慮に入れた分散分析を行い、固定効果とその交互作用について検討した。多重比較は

表1. 使用した蛍光抗体

Specificity	Clone	Fluor	Source
CD3e	BB23-8E6-8C8	Alexa Fluor 647	BD Biosciences
CD4a	MIL17	FITC	AbD serotec
CD8a	76-2-11	PE	Beckman Coulter
CD16	FCRIII	FITC	AbD serotec
CD21	BB6-11C9.6	PE	Beckman Coulter
WC1	CC101	FITC	AbD serotec

The specificity and clone of antibodies used for flowcytometric phenotyping of lymphocyte subpopulations.

PE: phycoerythrin, FITC: fluorescein isothiocyanate

Tukey-Kramer 法により行い、 $P < 0.05$ を有意差があるとし、 $P < 0.1$ を傾向があるとした。

結 果

14 日間の H61 給与試験期間中、両区とも下痢や食滞などの発生は認められず順調に経過した。その間の増体成績と飼料効率について両区間に差は認められなかった (表 2)。

測定した免疫指標のうち、実験区、採血日、および両者の交互作用において有意差が出た項目について表 3 に示した。採血日 (Day) の有意差は実験区分け (Group) と関係なく Day0 と Day14 の値に差があることを示し、Group における有意差は単に 2 つの区間で値が異なることを示し Day と無関係である。Day × Group で示す

2 つの固定効果に交互作用があるということは、H61 投与区と対照区で Day0 と Day14 の値の変動パターンが異なることを意味する。その変動の違いが投与効果であり、交互作用の有意差として表される。本実験における測定値解析の結果、交互作用は CD3+CD4-CD8- 細胞で認められ、CD3-CD8+ 細胞については傾向が得られた ($P = 0.07$)。他のサブセットや個別の抗体に対する陽性細胞、血中のコルチゾールおよび IgA 濃度の結果に有意差はなかった。

交互作用がみられた CD3+CD4-CD8- 細胞と CD3-CD8+ 細胞の P 値を表 4 に示した。CD3+CD4-CD8- 細胞では、H61 投与区のみ Day0 の値より Day14 の値が増加し両区間に有意な差が得られた。CD3-CD8+ 細胞においては H61 投与区の Day14 の平均値は減少したが両区間差は認められなかった。

表 2. 増体成績、飼料摂取量および飼料効率

	Weight gain (kg)	Daily gain (g / day)	Feed intake (g / day)	Feed efficiency
H61 group	9.8 ± 0.3	702.9 ± 19.8	1629.1 ± 49.4	0.43 ± 0.02
Control	10.3 ± 0.4	738.6 ± 25.3	1673.0 ± 50.5	0.44 ± 0.01

Growth performance in 2 weeks. Data represent mean ± standard error (n=5).

表 3. 免疫学的指標に対する H61 投与の影響

	Group			Day			P value		
	H61 (n=5)	Control (n=5)	SEM	Day 0	Day14	SEM	Group	Day	Group × Day
CD4	19.7	24.1	1.0	23.5	20.3	0.9	0.02	0.03	0.20
CD3-CD8+	9.2	9.0	1.3	9.6	8.6	1.1	0.90	0.43	0.07
CD3+CD4-CD8-	9.5	32.2	3.2	28.0	33.7	2.5	0.56	0.03	0.04
NK activity	46.3	39.2	5.4	17.2	68.3	5.1	0.38	$P < 0.01$	0.71
IgG	7.0	7.9	0.5	6.1	8.8	0.5	0.24	$P < 0.01$	0.57

Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain H61 on immunological indices.

表 4. CD3+CD4-CD8- 細胞と CD3-CD8+ 細胞に対する H61 投与の影響

	CD3+CD4-CD8-			CD3-CD8+		
	H61	Control	SEM	H61	Control	SEM
Day 0	24.1 ^a	31.9	3.5	10.9	8.2	1.5
Day 14	34.9 ^b	32.6	3.5	7.5	9.7	1.5

Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain H61 on lymphocyte subsets. Different subscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

考 察

乳酸菌 *L. lactis* subsp. *cremoris* H61 はプロバイオティック機能をもち、免疫応答への効果も期待されている。食品のみならず犬猫用健康補助食品としても既に商品化されているが、免疫系への影響や機序について詳細は不明であった。ブタは生理学的、解剖学的にヒトへの類似性が高いためヒトに近い知見を得られる実験動物として医学的研究への利用が進み、リンパ球の CD 分類や表面マーカーの同定が急速に発展している^{2,3,11,15)}。CD マーカーに対する市販抗体で各種の血中細胞を計測することが可能となり、その数値や変動は臓器移植に関する研究や薬品開発において重要な免疫学的指標として用いられている。本実験では、従来からの免疫指標測定に加えリンパ球サブセット解析を行うことにより、H61 の経口投与がブタ免疫系へ与える影響について検討した。

2 週間の H61 投与の結果、末梢血中 CD3+CD4+CD8- 細胞の比率が有意な増加を示した。このサブセットには、NK 細胞と同様に、ウイルスや細菌に対する初期感染防御を担う $\gamma\delta$ T 細胞が含まれる¹¹⁾。 $\alpha\beta$ 鎖の T 細胞受容体を持ち、CD3+CD4+ あるいは CD3+CD8+ と表される $\alpha\beta$ T 細胞に対し、 $\gamma\delta$ 鎖の受容体を持つ $\gamma\delta$ T 細胞は若齢のブタやウシに多いことが報告されている^{3,12,15)}。特にブタについては各種病原微生物に対する有効性を確認した既報も多く¹¹⁾、NK 細胞が未発達な幼弱時から成長期においては重要な自然免疫細胞である^{12,15)}。CD3+CD4+CD8- 細胞に $\gamma\delta$ T 細胞以外の細胞も含まれることは考えられるが、今回の解析で得られた血中比率は既報²⁾と同レベルであり、H61 の 2 週間投与により末梢血中における $\gamma\delta$ T 細胞の比率が増加した可能性がある。 $\gamma\delta$ T 細胞はウシにおいてはほとんどが WC1 抗原を発現する WC1+ 細胞であるのに対し、ブタでは WC1+ と WC1- の $\gamma\delta$ T 細胞に分類されている¹²⁾。WC1 抗原発現の有無による機能性の違いについてはまだ不明であるが²⁾、WC1+ 細胞の結果には差がなかったため、H61 投与により増加した可能性があるのは CD3+CD4+CD8-WC1- サブセットと推測される。

一方、H61 投与により減少傾向を示した CD3-CD8+ 細胞には NK 細胞も含まれる^{3,15)}。しかし NK 細胞に発現する CD16 が陽性である細胞や別の NK 細胞サブセットである CD3-CD16+ 細胞¹¹⁾の結果に有意差や変化はなかった。従って、本実験において減少傾向を示した CD3-CD8+ 細胞は NK 細胞ではない可能性がある。

本実験では、女性の皮膚の状態（水分量など）を対象とした研究において、肌状態を表す指数へ H61 の効

果が出た摂取量⁵⁾を基に、体重換算で 2 倍となる量の H61 を投与した。肌と免疫系の関連については、紫外線曝露マウスでの細胞性免疫抑制や¹⁾、紫外線により誘起された免疫応答の変化が皮膚がんの要因となること⁸⁾等の報告がある。本実験では、動物種の違いに加え成長が著しい時期でもあったため、免疫系への明瞭な影響や変化を及ぼすには必要十分な投与量ではなかった可能性がある。

今回の飼料は、当研究部門における通常の子豚飼育と同量の抗菌剤を加えて使用した。抗菌剤は免疫系へ大きな影響を与える殺菌作用を持ち、ワクチンやプロバイオティクスへの抑制効果もあることから、それらとの併用は臨床的に推奨されない薬品である。しかし、抗菌剤と H61 とを同時に与えた本実験においては、血中免疫細胞の割合へ対する H61 の投与効果が示唆される結果が得られた。抵抗力の弱い個体は飼養条件に関わらず存在するため、抗菌剤を用いた飼養中でも、細かい健康管理を必要とする個体や区へのみ随時投与できる補助飼料として H61 を利用できる可能性がある。ただし、臨床的な効果が得られる投与量や方法については今後の検討が必要と考えられる。

謝 辞

本研究の統計解析には農林水産研究情報総合センターのシステムを利用しました。解析についての説明方法は家畜育種繁殖研究領域の石井和雄上級研究員ならびに佐々木修ユニット長にご教授いただきました。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Araneo, B.A., Dowel, T., Moon, H.B., and Daynes, R.A. (1989). Regulation of murine lymphokine production in vivo. Ultraviolet radiation exposure depresses IL-2 and enhances IL-4 production by T cells through an IL-1 dependent mechanism, *J. Immunol.*, 146, 1737-1744.
- 2) Carr, M.M., Howard, C.J., Sopp, P., Manser, J.M., and Parsons, K.R. (1994). Expression on porcine gamma delta lymphocytes of a phylogenetically conserved surface antigen previously restricted in expression to ruminant gamma delta T lymphocytes, *Immunology*, 81, 36-40.
- 3) Gerner, W., Käser, T., and Saalmüller, A. (2009).

- Porcine T lymphocytes and NK cells – An update, *Dev. Comp. Immunol.*, 33, 310–320.
- 4) Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Kobayashi, M., Sasaki, K., Kurisaki, J., and Mizumachi, K. (2007). Anti-aging effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice, *Br. J. Nutr.*, 98, 1178–1186.
 - 5) 木元広実・青木 玲二・佐々木 啓介・鈴木 チセ・水町 功子 (2012). ヒトの肌の状態に対する, H61 の摂取効果 – 年齢層別解析 –, *日本畜産学会報*, 83, 307–313.
 - 6) Kimoto-Nira, H., Nagakura, Y., Kodama, C., Shimizu, T., Okuta, M., Sasaki, K., Koikawa, N., Sakuraba, K., Suzuki, C., and Suzuki, Y. (2014). Effects of ingesting fermented milk by using *Lactococcus lactis* H61 on skin health in young women: A randomized double-blind study, *J. Dairy Sci.*, 97, 5898–5903.
 - 7) Kobashi, Y., Ohmori, H., Tajima, K., Kawashima, T., and Uchiyama, H. (2008). Reduction of chlortetracycline-resistant *Escherichia coli* in weaned piglets fed fermented liquid feed, *Anaerobe*, 14, 201–204.
 - 8) Kripke, M.L. (1981). Immunologic mechanisms in UV-radiation carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.*, 34, 69–106.
 - 9) Lecoeur, H., Fevrier, M., Garcia S, Riviere. Y., and Gougeon, M.L. (2001). A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, 253, 177–187.
 - 10) Mizumachi, K., Aoki, R., Ohmori, H., Saeki M., and Kawashima T. (2009). Effect of fermented liquid diet prepared with *Lactobacillus plantarum* LQ80 on the immune response in weaning pigs, *Animal*, 3, 670–676.
 - 11) Piriou-Guzylack, L., and Salmon, H. (2008). Membrane markers of the immune cells in swine: an update, *Vet. Res.*, 39, 54.
 - 12) Pollock, J.M. and Welsh, M.D. (2002). The WC1+ $\gamma\delta$ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 89, 105–114.
 - 13) Reuter, G. (1998). 腸内フローラとプロバイオティクス (光岡知足編), 学会出版センター, 東京, 17–39.
 - 14) Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., and Lee, Y.-K. (1999). Probiotics: How should they be defined?, *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 107–110.
 - 15) Sipos, W., Duvigneau, C.J., Hartl, R.T., and Schwendenwein, I. (2011). Exploratory reference intervals on hematology and cellular immune system of multiparous Large White sows, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 141, 307–311.
 - 16) Tajima, K., Ohmori, H., Aminov, R.I., Kobashi, Y., and Kawashima, T. (2010). Fermented liquid feed enhances bacterial diversity in piglet intestine, *Anaerobe*, 16, 6–11.

Effect of Oral Administration of *Lactococcus lactis* H61 on the Immune System of Piglets

Nobue KANEMATSU, Hiromi KIMOTO¹, Masayuki HAYASHI, Yosuke KOBAYASHI and Kiyoshi TAJIMA

Division of Animal Metabolism and Nutrition,
Institute of Livestock and Grassland Science, NARO,
Tsukuba, 305-0901 Japan

¹Division of Animal Products Research,
Institute of Livestock and Grassland Science, NARO,
Tsukuba, 305-0901 Japan

Summary

In order to investigate the immunological effect of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 that we have developed, it was administered to LWD crossbred pigs (9-week-old) with a feeding of every morning (4×10^{10} heat-killed cells per 25kg in weight). Blood samples were taken at 10:00 a.m. of the day before the administration start (Day0) and two weeks later (Day14). CD3, CD4, CD8, CD16, CD21, and WC1 antigens on isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and Natural killer cell activity (NK activity) were measured by flow cytometry. Additionally, plasma concentration of IgA, IgG and cortisol were measured.

The effect of H61 on lymphocyte subsets expressing selected differentiation antigens were shown in CD3+CD4-CD8-cell significantly, and CD3-CD8+cell showed a tendency. CD3+CD4-CD8-cell subset that includes $\gamma\delta$ T cell increased at Day14. Other indices did not show any change. Neither body weight gain nor feed intake showed the significant difference. Strain H61 has the possibility as immunoenhancement additive to pig, even in the feeding contained normal amount of antibiotic.

Key words: *Lactococcus lactis* H61, pig, $\gamma\delta$ T cell, lymphocyte subset