

博士論文

プロバイオティクスおよび各種免疫賦活物質の  
効果に関する研究

—サルモネラ感染モデルラット  
の白血球動態を指標にした感染防御機構の検討—

鈴木 武人

2005

博士論文

プロバイオティクスおよび  
各種免疫賦活物質の効果に関する研究  
-サルモネラ感染モデルラットの  
白血球動態を指標にした感染防御機構の検討-

2005

麻布大学大学院 獣医学研究科

動物応用科学専攻

DA0206

鈴木 武人

# 目 次

## 緒 論

### 1. 本研究の背景

1-1. 腸内フローラと機能性食品 ..... 5

1-2. プロバイオティクス、プレバイオティクス、  
バイオジェニクスとその効能 ..... 7

### 2. 本研究の目的

2-1. プロバイオティクスと感染防御 ..... 9

2-2. 細菌感染と生体防御の概略  
(自然免疫、Th1、Th2 反応に着目して) ..... 10

2-3. 本研究の目的 ..... 13

2-4. 本研究で用いた乳酸菌と免疫賦活物質について ..... 15

## 第 1 章 *Lactobacillus* 属細菌による *S. Enteritidis* 感染防御効果の検討

### 第 1 節 フローサイトメーターによるヘルパーT 細胞細胞内サイトカイン

#### 測定系の確立

1. 目 的 ..... 20

2. 材料および方法 ..... 22

3. 結果および考察 ..... 24

### 第 2 節 *Lactobacillus* 属細菌による *S. Enteritidis* 感染防御効果の検討

1. 目 的 ..... 28

2. 材料および方法 ..... 29

3. 結果および考察 ..... 32

4. 要 約 ..... 40

## 第2章 免疫賦活物質による *S. Enteritidis* 感染防御効果の検討

1. 目的	44
2. 材料および方法	45
3. 結果および考察	46
4. 要約	53

## 第3章 *Lactobacillus reuteri* およびカシスポリサッカライド併用による

### *S. Enteritidis* 感染防御効果の検討

1. 目的	56
2. 材料および方法	57
3. 結果および考察	57
4. 要約	62

総括	64
----	----

謝辞	70
----	----

参考文献	72
------	----

# 緒 論

## 1. 本研究の背景

### 1-1. 腸内フローラと機能性食品

ヒトの糞便 1g 中に  $10^{11}$ CFU もの細菌が存在し、腸管内には *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Enterococcus*、*Streptococcus* など安全性も高い有用菌、*Bacteroides*、*Peptococcus*、*Eubacterium*、*Clostridium* などの嫌気性菌群や *E. coli*、*Staphylococcus* などの好気性菌群といった有害菌が生息している。健康時には一定のバランスを保って腸内フローラを形成し、増殖しては腸管下部へ送られて、糞便として排泄されている。腸内フローラが生体に及ぼす有益な働きとしては、ビタミン、タンパク質の合成があり、これが宿主に利用される。また、腸内フローラを形成する常在細菌は、外来病原菌の侵入時にバリアーとなって腸管感染を阻止し、有用菌による有害菌の増殖抑制作用により腸内環境浄化に働いている。さらに、有用菌の菌体成分は宿主の免疫能を刺激することも知られている。その一方で腸内常在菌には病原性を有する細菌もあり、宿主の老化と関係し、抗生物質、免疫抑制剤、制がん剤、副腎皮質ホルモンなどの投与、放射線治療、ストレスなどによる宿主の抵抗力低下時に病原性を発揮する。そのため、有害菌の中には日和見感染的に、敗血症、心内膜炎、脳・肝臓・肺の膿腫、膀胱炎、膣炎などの原因となり得るものがある。感染症の発症以外にも、有害菌により産生される腐敗産物（アンモニア、硫化水素、アミン、フェノール、インドールなど）、細菌毒素、発がん物質（ニトロソ化合物、エポキシド体など）、二次胆汁酸などは有害物質として腸管の細胞に直接的な障害を与える。さらに、それらの一部は吸収されて長期的には各種臓器に障害を与え、発がん、動脈硬化、高血圧、肝障害、自己免疫性疾患、免疫能の低下など生活習慣病の原因となる可能性が知られている[1]。

我が国の平均寿命や健康寿命は、世界でも最高の水準にある。しかし、人口の急速な高齢化が進む中で、疾病構造が急性伝染病をはじめとする感染性疾患

から、がん、心臓病、脳卒中などの生活習慣病の増加へと変化している。生活習慣病は、痛みなどの自覚症状が現れないうちに体内で進行し、最終的に重篤な症状を呈する。その際には、健全な生活に支障をきたしたり、生命に関わる状態に陥るために深刻な問題である。「生活習慣病」の定義は、「食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒などの生活習慣が、その発症や進行に関与する疾患群」と規定され、インスリン非依存性糖尿病（成人型糖尿病）、肥満、高脂血症、高尿酸血症、後天性循環器疾患、大腸癌、高血圧症、肺扁平上皮癌、慢性気管支炎、肺気腫、アルコール性肝障害、歯周病などが含まれる。従来、成人病と言われてきた高血圧、がん、糖尿病などは必ずしも成人になってから起こるものではなく、幼少期からの不健全な生活習慣の積み重ねや、個人の持つ遺伝的素因、さらに環境要因が重なり合って起こる疾患である。それゆえ、生活習慣病予防には幼少期から健康を保つための生活習慣を身につけることが必要である。積極的に健康を増進し、疾病の一次予防に重点を置いた対策の推進が急務であるとのことから、医療制度改革の一環として平成15年5月1日から、「健康増進法」が施行された。健康増進法の基本方針は、医療機関、保健所などによる、国民への生活習慣に関する正しい知識の普及と指導、およびその一環として、公共施設などでの受動喫煙防止に努めることである。

生活習慣病は、いったん罹患すると薬剤治療では治癒が困難であるが、これまでの疫学調査によりその危険因子が解明されてきた。そして、日常生活における食事、運動、休息による一次予防の重要性が広く認識され、その中でも特に食生活改善による予防効果が確認されている。日本人の食生活が、第二次世界大戦以降の約50年間に、高塩分・高炭水化物・低動物性タンパク質という旧来の食事パターンから、動物性タンパク質や脂質の増加にみられる大きな変化は、感染症や脳出血などを減少させることに貢献している[1]。しかし、その一方で生活習慣病の増加が深刻な問題となっており、これらの発症に栄養・

食生活の関連がみられるものも多い。したがって、栄養対策も従来の栄養欠乏から過剰栄養に焦点をあてたものへと転換を図ることが求められている。

食品の身体に対する働きは次の三つの機能に大別される。すなわち、一次機能は、糖質、脂質、たんぱく質および無機質など、生命維持に必要不可欠なエネルギー源や生体構成成分の補給に必要な栄養素としての機能である。二次機能は、食品自体あるいは食品成分が生体の感覚器に影響を及ぼす感覚機能である。そして、三次機能は生体防御、体内リズムの調節、老化制御、疾患の防止、疾病の回復調節など生体調節機能であり、その生体調節因子として、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質などが認められている。食品の持つ三次機能に対して消費者に適切な情報提供を行う目的で、厚生労働省（旧厚生省）は、平成3年7月11日「栄養改善法施行規則の一部を改正する省令」により、保健・健康増進効果が科学的に証明された食品について、特定保健用食品の表示許可制度を設けた。2004年12月現在、特定保健用食品として認定されている食品は457品目に及び、おなかの調子を整えたい方に適する食品、カルシウム不足の方に適する食品、コレステロールが気になる方に適する食品、血圧が高めの方に適する食品、貧血が気になる方に適する食品、虫歯が気になる方に適する食品、血糖値が気になる方に適する食品といった7つのカテゴリーに分類されている。この中でも「おなかの調子を整えたい方に適する食品」は乳酸菌そのものや、オリゴ糖など腸内有用菌に選択的に代謝される食品成分を配合したものが多く、長期的には生活習慣病の温床となる腸内フローラバランスの改善を促す効果が認められている。

## 1.2. プロバイオティクス、プレバイオティクス、バイオジェニクスとその効能

特定保健用食品では「おなかの調子を整えたい方に適する食品」として整腸



作用を持つ食品をまとめているが、これらはその成分と作用により、プロバイオティクス、プレバイオティクスおよびバイोजェニクスに分類されている。プロバイオティクスは、腸内フローラバランスの改善などの有効性を示す乳酸菌などの生きた微生物そのものであり、これを含む食品には発酵乳、ヨーグルト、納豆などが挙げられる。

腸内フローラの重要な機能の一つとして、物理的バリアーと病原菌の定着阻害による感染の防御がある。腸内フローラに存在するさまざまな細菌種は基質の代謝、付着場所などにおいて、互いに相乗効果もしくは拮抗効果をもたらしながら存在する。しかし、宿主の抵抗力が低下すると腸内の生体調節システムのバランスが変化し、病原菌や有害物質に対するバリアー性が低下する。しかし、ある種の経口摂取された微生物が、常在菌叢の平衡と効果的なバリアーを維持するというのが、プロバイオティクスの概念である。1989年に Fuller[2]がプロバイオティクスを「口から摂取される生きた微生物で、宿主の腸内微生物叢のバランスを改善することにより宿主に良い影響を与えるもの」と定義した。プロバイオティクス効果をもつ菌株において、安全で病原性がないことは必須条件で、さらに小腸もしくは結腸に生きたまま到達し、腸管上皮細胞に付着する能力が高く、ヒトの腸内フローラの自然な構成細菌であるという条件を満たすことが期待される。同じ菌属、同じ菌種であっても、有益なプロバイオティクス効果は菌株レベルで異なる。現在まで、科学的に証明されたプロバイオティクス効果を持つ微生物を含んでいることを表示できる製品は限られており、上記条件を満たした上で、より特徴的なプロバイオティクス効果をもつ菌株の選別に力点が置かれている。

一方、プレバイオティクスとは、腸内での有用菌に選択的に代謝され、増殖を促進する物質であり、ビフィズス因子としてのオリゴ糖が該当する。オリゴ糖は胃で分解されにくく、主に大腸に定着している *Bifidobacterium* に利用され

る。*Bifidobacterium* は胃酸に弱く、経口的に摂取したからといって、必ずしもその全量が生菌として大腸に到達するわけではない。したがって、大腸内の *Bifidobacterium* を効率よく増殖させることが重要であり、オリゴ糖がプロバイオティクスとして利用される。バイオジェニックスは、腸内細菌フローラを介することなく、直接、血圧降下作用、免疫賦活作用、コレステロール低下作用、整腸作用、抗腫瘍作用などの生体調節・生体防御・疾病予防・老化制御などに働く食品成分とされており、生理活性ペプチド、植物性ポリフェノール、カロチノイド、DHA、ビタミンなどの食品成分がこれに該当する。

## 2. 本研究の目的

### 2-1. プロバイオティクスと感染防御

プロバイオティクスには前述のように腸管感染症に対する感染防御効果が期待されるが、近年、病原菌の発育抑制、腸管上皮細胞への付着競合阻害といった特異的メカニズムにより、以下に示すような、病原菌に対する感染防御に特化した乳酸菌も報告されている。

*Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21) は、胃潰瘍や胃がん発症への関与が示唆されている *Helicobacter pylori* 抑制効果が報告されている。抑制メカニズムとしては、乳酸による殺菌作用および胃内での栄養的、空間的競合といった乳酸菌一般に考えられる作用機序の他、*H. pylori* のIV型分泌による胃上皮細胞での IL-8 産生誘導を抑制し、好中球浸潤による炎症を抑制する可能性が考えられている [3]。

また、*Lactobacillus johnsonii* LC1 においても、培養上清に *H. pylori* の運動性を瞬時に停止させて細胞粘着性を阻止する強い抗 *H. pylori* 活性成分が含まれること、数種の腸管病原細菌 (*E. coli*、*Salmonella* や *Yersinia*) のヒト腸管培養細胞への付着を *in vitro* で阻害したという報告がある [4-7]。さらに、*L. johnsonii* LC1 によるグ

ラム陰性病原菌の細胞付着および侵入阻害が示され、*E. coli* を含む様々な病原菌や非病原菌の成長阻害効果を有することも明らかになった。*L. johnsonii* LC1 は、*in vitro* および *in vivo* で活性のある非バクテリオシン抗菌物質を分泌することも明らかになっている。その他にも、ヒト結腸由来培養細胞（Caco-2 細胞）に対して、*E. coli* O157:H7 と *L. johnsonii* LC1 を同菌数暴露させた場合、*L. johnsonii* LC1 は *E. coli* O157:H7 の付着を有意に阻害する事が報告されている[4-6]。他の研究では、*E. coli* O157:H7 を *L. johnsonii* LC1 の培養上清とともに培養すると *E. coli* O157:H7 の生存率が低下することも報告されている[7,8]。

## 2-2. 細菌感染と生体防御の概略（自然免疫、Th1、Th2 反応に着目して）

図1は細胞性因子を中心にした感染防御機構の概略図である。細菌などの病原微生物の侵入に対する感染防御機構は、感染後数時間以内に働く生来備わった自然免疫 (innate immunity) と、感染数日後から働く適応免疫 (adaptive immunity) に分類される。

自然免疫を担う液性因子にはリゾチーム、ラクトフェリン、補体、IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  などがあり、細胞因子には上皮系細胞や組織マクロファージなどがある。上皮細胞は病原体侵入の物理的バリアーとしての働き以外に、IL-8 や LARC (liver and activation-regulated chemokine) を産生して好中球、マクロファージ、エフェクターリンパ球の血管外遊出、集合、活性化に関与する[9]、 $\beta$  デフェンシンを産生して樹状細胞の集合を誘導する[10]、IL-7 や IL-15 も産生して上皮間 T リンパ球 (IEL) の増殖、活性化因子として働いている。組織マクロファージは Toll-like receptor (TLR) をはじめとする多数の表面レセプターによって病原体を認識し、迅速に貪食や排除を行うとともに炎症性サイトカインを産生する。

自然免疫において感染後数時間で誘導される早期誘導反応は、食細胞による自然免疫と T リンパ球と B リンパ球を介する適応免疫との橋渡しの役割を担い、

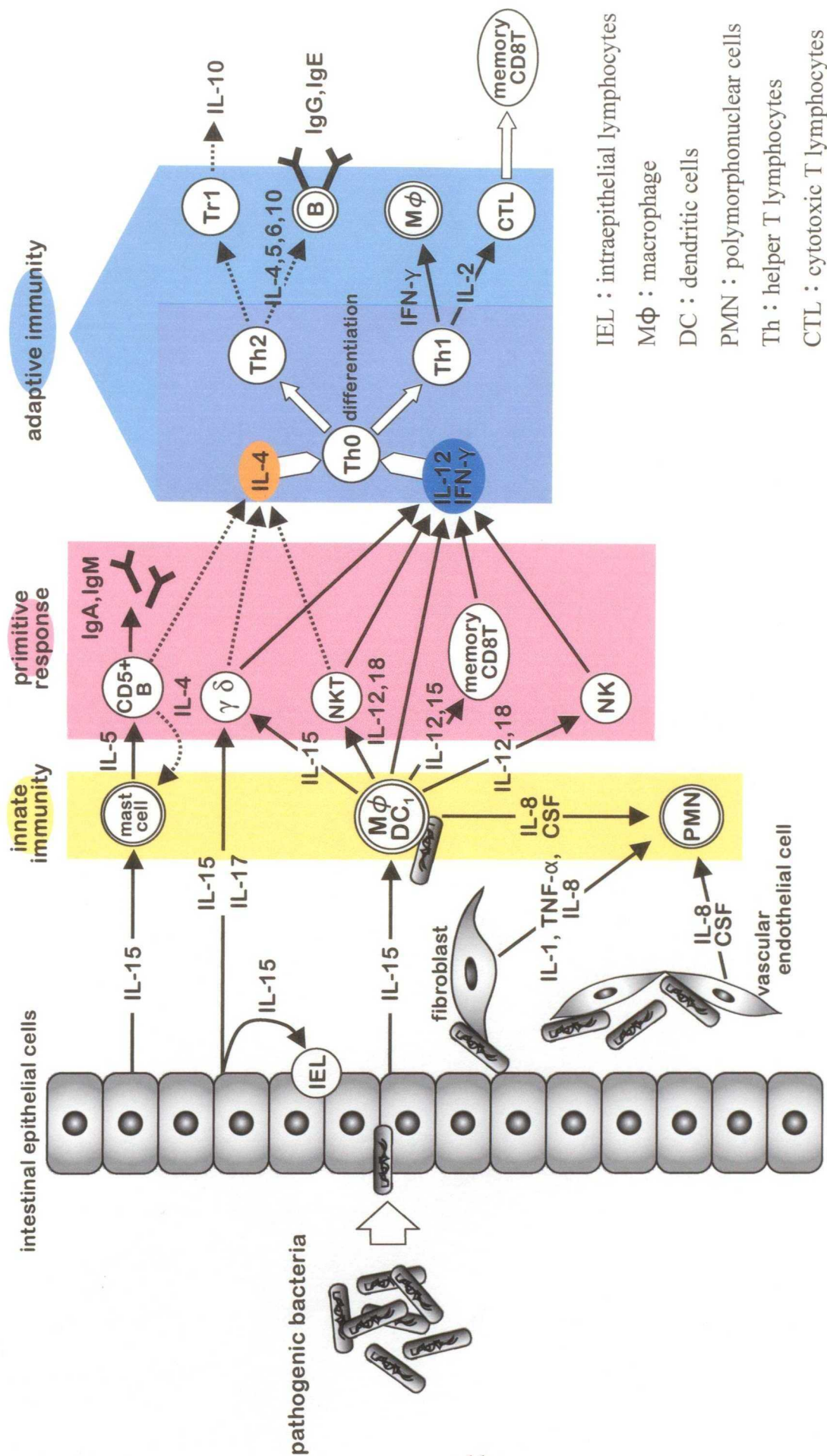


図1 細胞性因子を中心にした感染防御機構の概略図 (吉開の図を改変[11])

適応免疫のタイプを決定する重要な役割も併せもっている。これには炎症性サイトカインにより血管外遊走を誘導された好中球、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、 $\gamma\delta$ 型（T細胞レセプター）T細胞、NK陽性T（NKT）細胞、上皮間T細胞、CD5陽性B細胞などが関与する。これらの細胞から産生されるサイトカインの種類、抗原エピトープの種類と量、抗原提示細胞のアクセサリー分子などによって、適応免疫の中心的役割を担うヘルパーT細胞の前駆細胞であるTh0細胞からTh1、Th2細胞のどちらに分化するのかが決定される。このTh1、Th2の起源は骨髄中の造血幹細胞であり、そこから分化した未熟T細胞は胸腺へ運ばれ、胸腺内で自己反応性の細胞が除去され、CD4かCD8のいずれかを発現してMHC拘束性を獲得したT細胞へと分化・増殖後、末梢の免疫組織に移行する。CD8陽性T細胞は細胞障害性T細胞（CTL）として抗原特異的な細胞性免疫反応を司る。一方、抗原刺激を受ける前段階のCD4陽性T細胞はナイーブT細胞あるいはTh0細胞と呼ばれ、外来抗原の刺激を受けることにより、Th1細胞あるいはTh2細胞へと分化する。ヘルパーT細胞の分化には、IL-12、IFN- $\gamma$ あるいはIL-4という特定のサイトカインが決定因子として不可欠であり、IL-12やIFN- $\gamma$ はTh2細胞への、IL-4はTh1細胞への分化をそれぞれ抑制することで、目的の細胞への分化を誘導している[12]。また、IL-12やIFN- $\gamma$ は主にマクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞から産生されるが、抗原提示細胞におけるIL-12遺伝子の発現やナイーブT細胞のIL-12に対する応答は、インターフェロン制御因子（IRF-1）により制御されていることも報告されている[13]。

Th1細胞はT細胞の増殖を制御するIL-2や炎症反応を制御するIFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$ などのサイトカインを産生し、CTLの増殖やマクロファージの武装化を促進し、細胞性免疫による細胞内寄生性微生物（ウイルス、リステリア、リーシュマニア、抗酸菌、チフス菌など）に対する感染防御に関与する。Th2細胞は抗

体産生を行う B 細胞の増殖や免疫グロブリンのクラススイッチを制御する IL-4, 5, 6, 9, 10, 13 など産生し、体液性免疫反応により細胞外寄生性微生物（大腸菌、肺炎球菌、原虫、寄生虫など）に対する感染防御に関与する。Th1 細胞、Th2 細胞は互いが産生するサイトカインによって相互に分化が抑制され、バランスの取れた免疫反応を維持している。この相互調節機能が破綻すると、一方向性の過剰な反応が起こり、それが持続することによって各種疾患が引き起こされると考えられている[14]。

このように、ヘルパー T 細胞は産生するサイトカインの違いから、Th1 と Th2 という二つの異なる細胞集団に分類され、Th1 細胞と Th2 細胞によって多くの免疫反応がコントロールされ、疾病の発症に関与していることが数多く報告されている[15, 16]。

### 2-3. 本研究の目的

近年、*Lactobacillus* 属のプロバイオティクス効果については、「2-1. プロバイオティクスと感染防御」で述べた各種病原細菌に対する感染防御に加え、花粉症などに対する抗アレルギー作用を含めた様々な研究が展開されている[17, 18]。近年急増している様々なアレルゲンに対するアレルギーの原因として「衛生仮説」というものがある。戦前から戦時中にかけての 1930～1940 年代において、死因の上位 3 位を占めてきた肺炎・気管支炎、全結核、胃腸炎などの感染性疾患は、戦後の公衆衛生学の発達により次第に後退し、そのほかの感染症も年を追う毎に減少傾向となっている。そのなかでも特に細菌感染症の減少が、Th1 反応の未発達を引き起こし、Th1/Th2 バランスが Th2 優位となることで、アレルギー体質の人が増えているという説である。アレルギー疾患は、免疫系が Th2 細胞偏向となり、B 細胞を刺激して免疫グロブリン E (IgE) が過度に産生されることにより発症する。新生児の免疫系は Th2 型であり、無菌マウスでは成長後

も Th2 型で、IgE に対する経口免疫寛容の成立には腸内細菌が必須であることが証明されている[19]。また、離乳後に抗生剤で一過性に腸内細菌を除去すると、成長後も Th2 偏向の免疫状態が続くことも報告されている[20]。このように乳幼児期における細菌刺激の低下は、免疫系のホメオスタシスを維持する能力を低下させ、アレルギー発症に関わっていると考えられている。一方、現代人は各種ストレスにより Th2 優位の状態に陥りやすいが、ストレス抵抗性と腸内フローラにも関連性が認められている。生体が有害なストレス刺激に暴露されると、視床下部-下垂体-副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis) や交感神経-副腎髄質系を活性化し、糖質コルチコイドやカテコールアミンが分泌され、ストレス抵抗性を示す。無菌マウスでは拘束ストレスによる血中 ACTH、コルチコステロン上昇反応が増強し、HPA axis 反応性が亢進すること、無菌マウスに健常マウスの腸内細菌叢を摂取することにより反応性が減弱することから、腸内フローラはストレス反応の発達を制御している可能性が報告されている[21]。糖質コルチコイドはヒスタミンの遊離抑制による抗アレルギー効果、線維芽細胞抑制、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 抑制によるロイコトリエン類、プロスタグランジン類といった炎症発現介在物質の生成減少による抗炎症効果を示すが、その一方で、細菌感染時の発熱やリンパ節の腫脹などの兆候を消失させるという危険もある。このように腸内細菌、特に善玉菌と言われる乳酸菌、ビフィズス菌による Th1 反応の増強、すなわち Th1/Th2 バランスの改善は、アレルギーやストレスに対する抵抗性を高める有効な予防手段であると同時に、細菌感染に対しても予防的な働きが期待できる。

そこで、本研究では、細胞内寄生性細菌感染症のモデルとして *Salmonella* Enteritidis 感染モデルラット[22, 23]を用い、Th1 反応を誘導するとされている乳酸菌[24]および新規の各種免疫賦活物質が、自然免疫や適応免疫の各ステージに与える影響を試験した。供試菌株、および各物質の免疫学的特徴を捉えると

ともに、作用点の異なる免疫賦活物質を組合せることでの感染防御効果増強の可能性についても検討した。

*Salmonella* はヒトや動物の腸管内に生息し、食物や水を介して、またヒトからヒトに感染する代表的な菌群であり、病原細菌の中でも古くから知られている。本菌感染症としては飲食物を摂取し胃腸炎を起こす食中毒が最も多い。*Salmonella* には多数の血清型が存在するが、原因食品として卵および卵加工品が代表的な *Salmonella* Enteritidis 食中毒が、細菌性食中毒の起因菌として、近年、最も年間患者数が多く[25]、厚生労働省も特別研究班を組織し、予防対策を検討している病原菌でもある。

### 3. 本研究で用いた乳酸菌と免疫賦活物質について

本研究では供試細菌として、以下の4菌株を用いた。

*Lactobacillus reuteri* JCM1112<sup>T</sup>

*Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103

*Lactobacillus johnsonii* LC1

*Lactobacillus plantarum* MCR1164

これまでに何らかのプロバイオティクス効果が示されている菌種として、*Lactobacillus reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103、*Lactobacillus johnsonii* LC1 を選択した。この3菌株はいずれもヒト糞便中から分離された動物性乳酸菌である。

*L. reuteri* は、近年、プロバイオティクス乳酸菌として研究が蓄積されてきている[26-28]。本菌は胃酸や胆汁酸に耐性があり、生きたまま腸管に到達して有害細菌を抑制しながら有用細菌と共生し、腸内フローラを改善する。また、本菌は生体内のグリセロールを利用して抗菌物質の一種であるロイテリン (3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド) を産生する。乳酸菌が産生する抗菌物質、バ



クテリオシンは、一般に近縁のグラム陽性細菌に対してのみ抗菌作用を示すが、ロイテリンはグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、酵母、真菌類および原虫に対しても抗菌性を示すという広い抗菌スペクトルを有している。ロイテリンは、水溶性で幅広い pH 域で有効、さらにタンパク・脂質分解酵素で分解されない特徴を持っている。最近の研究では *L. reuteri* は *Streptococcus mutans* の口腔内保菌数を有意に減少させることが報告されている[29]。本研究では *L. reuteri* の中でもすでにゲノム解析が終了している菌株として、標準株でもある JCM1112<sup>T</sup> 株を供試することとした。

*L. rhamnosus* ATCC53103 は、1985 年、Gorbach と Goldin によりヒト腸管内から機能性の高い乳酸菌として分離され、二人の頭文字を取って GG 菌とも呼ばれる。本菌の持つ腸管への優れた定着性、耐酸性や耐胆汁性などが評価され、プロバイオティクス乳酸菌として盛んに研究されている。また、ビフィズス菌増殖作用、便秘改善作用があり、下痢の予防や回復に貢献し、アレルギー予防効果も報告されている[30-34]。

*L. johnsonii* は、従来の *L. acidophilus* から独立した菌種である。同様に旧来の分類での *L. acidophilus* から独立した乳酸菌は他に 5 種あり、*L. acidophilus* グループと称される。これらの多くはヒトもしくは動物の腸内に常在する。主に *L. acidophilus*、*L. gasseri*、*L. johnsonii* の 3 菌種については、プロバイオティクス効果（整腸作用、血清脂質の改善、抗変異原性、免疫賦活、アレルギー抑制など [35-37]）が報告され、発酵乳や乳酸菌飲料の製造にも利用されている。*L. johnsonii* LC1 は、胃酸、胆汁酸抵抗性、ヒト腸上皮細胞に対する付着能に優れ[4-6, 38, 39]、腸管病原菌感染に対する防御機能と免疫応答に対する効果が特許化されている菌株である。

乳酸菌は動物の腸管内に限らず、作物を含む植物およびその加工品である漬物等にも多数の乳酸菌が存在し、製品の熟成に関与している。そのような植

物由来の乳酸菌の中から、ヒト糞便中のムチンに対する付着能が前述の動物性乳酸菌に遜色ない菌株として *Lactobacillus plantarum* MCR1164 を選択した。この菌株は酸耐性、胆汁酸耐性とも優れていることが証明されており、プロバイオティクス効果が期待される。

一方、免疫賦活物質としてはカシス果汁中から精製されたポリサッカライド（カシスポリサッカライド＝CAPS）と *Rhizopus* U-1 菌の菌体抽出生理活性物質 R&U を用いた。

CAPS が含まれるカシスはユキノシタ科スグリ属に属する植物で、別名ブラックアントとも呼ばれる。欧州からアジアにかけての寒冷地に生息し、広く栽培され、日常的に食用に供されている果実である。そのため安全性も経験上、確認されている。これまで特定保健用食品として利用されている食物繊維には、果実由来の食物繊維は含まれておらず、果実由来であれば消費者に対するイメージはより明るく手軽であることから、新たな飲食品用素材としてカシスが探索され、新規の免疫賦活物質として試験するに至った。

R&U の主要成分をなす *Rhizopus*（和名：くものすかび）属菌は、中国では醤油、味噌の発酵菌、酒の製造に古くから利用され、日本国内でも甘藷を原料としたアルコール製造に利用されており、ヒトに対する病原性等の問題はないとされている。R&U は菌が増殖した培養床を滅菌後、水により抽出して得られた物質を粉末化したものであり、製品として生菌は含まず、抗生物質様の抗菌作用もない。急性および慢性毒性試験でも生体に対する悪影響は認められていない。これまでに報告されている R&U の効能としては、性腺刺激ホルモン放出促進（ウサギ、マウス）、成長促進（ヒメマス）、SOD 活性維持（ラット）、過酸化脂質生成抑制（ラット）、白血球貪食能の向上および低下防止（ウシ）、B 細胞のマイトジェニック効果（マウス）、細胞増殖効果（HeLa 細胞、Vero 細胞）、Alopecia X（性ホルモン性脱毛症の総称）に対する改善効果（イヌ）な

どが挙げられる。R&Uは上記効能の中でも生殖巣に対する作用を基に製品化され、その効果が実証されてきた物質であるが、白血球の機能向上を示す報告もあることから、本研究で免疫賦活物質としての効果を検証した。

Key words - ヘルパーT細胞、マクロファージ、自然免疫、適応免疫、*Salmonella* 感染、感染防御、乳酸菌

## 第1章

*Lactobacillus* 属細菌による

*Salmonella* Enteritidis 感染防御効果の検討

## 第1節 フローサイトメーターによるヘルパーT細胞細胞内サイトカイン測定系の確立

### 1. 目的

本研究では、*Salmonella Enteritidis* 感染モデルラットを用いて、免疫賦活物質と考えられる乳酸菌、真菌発酵産物や植物成分などが免疫応答に与える影響を、自然免疫と適応免疫の両面で評価することを目的としている。

指標の一つとして、脾臓1型ヘルパーT (Th1) 細胞と2型ヘルパーT (Th2) 細胞の動態に着目した。細胞内寄生性細菌である *S. Enteritidis* の感染を防御するためにはTh1 反応の増強が必要で、IL-2 や IFN- $\gamma$  といったサイトカインの産生による細胞性免疫の活性化が求められる。これら免疫系の誘導には、緒論の図1で示したように、各種サイトカインが重要な役割を果たす。各種サイトカインは、血流に乗って遠隔標的組織を刺激するホルモン類と異なり、産生された局所において標的細胞を刺激するという機能が生理的に重要である。したがって、血中やリンパ球培養液中のサイトカインを定量するのではなく、個々の細胞から分泌されるサイトカインの種類や量を測定し、細胞数を直接、計測する方法が、より生体の状況を反映した結果を得る上で有益となる。一般に用いられる Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を利用したサイトカイン濃度測定では、細胞から培養上清中に分泌されたサイトカインの濃度を測定しており、培養されている細胞集団全体のサイトカイン産生を観察することになる。そのため、大多数の細胞が産生するサイトカインのみが反映されるので、高濃度のサイトカインを産生する細胞が少数でも存在すれば、それがその細胞集団のサイトカイン産生パターン全体を反映するようになってしまうという欠点がある。この欠点を補うために、複数種のサイトカイン分泌細胞を同時に分別定量する方法が考えられ、具体的には岡本らの Enzyme-linked Immunospot

(ELISPOT) 法[40]を応用した Dual Color ELISPOT 法[41]などがある。

本研究では Th1 と Th2 両細胞を分別するために、フローサイトメーター (FCM) による細胞数の測定を行った。その理由は、細胞個々のサイトカイン産生を明確にでき、少数の細胞や高濃度のサイトカインを産生する細胞も画像および数値として包括的に測定できること、CD4 および IFN- $\gamma$ 、IL-4 の三重染色に最適な組合せの蛍光色素標識抗体が存在すること、そのため二次標識などサンプル調製が煩雑化せず、簡便に測定が行えること、という利点があるからである。フローサイトメーターは、細胞などの懸濁液を極細の水流として粒子を 1 個ずつ順番に流し、そこに照射したレーザー光の散乱光から大きさと形態、あるいは蛍光抗体による染色などの情報を 1 秒間に数千個以上の速度で取得し、それらの相関をヒストグラムとして解析する装置である。

本節では、本研究で使用するラット (Slc: Wistar) について、ヘルパーT 細胞サブクラスの比率が計測可能なこと、健常時と *S. Enteritidis* 感染時における測定値に理論的な差異を有することを確認する目的で試験を行った。これは、感染モデル系にラットを用いるためには不可欠なバックグラウンド情報となる。また、FCM を用いた白血球の複数種サイトカイン同時定量法は、ヒトおよびマウスでの報告[42-44]、および渋谷[45]の著書を参考にした。

本研究で行った動物実験は、麻布大学動物実験ガイドラインに従い、麻布大学付置生物科学総合研究所で実施した。麻布大学動物実験ガイドラインは OPRR (Office for Protection from Research Risks) の承認を受けたものである。

## 1) 実験動物の飼育

実験に使用したラットは、麻布大学動物実験ガイドラインに従って飼育された。ラットは、飼育環境を 25°C ± 2°C に維持し、12時間交代する暗周期に飼育された。ラットは、飼育環境を 25°C ± 2°C に維持し、12時間交代する暗周期に飼育された。ラットは、飼育環境を 25°C ± 2°C に維持し、12時間交代する暗周期に飼育された。ラットは、飼育環境を 25°C ± 2°C に維持し、12時間交代する暗周期に飼育された。

## 2. 材料および方法

### 1) 実験動物

SPF (specific pathogen free) グレード 8 週齢雄-Wistar ラット (日本 SLC 株式会社) の体重約 180~200 g のものを使用し、1 実験群を 5 匹とした。実験室搬入日より 7 日間の馴致期間を設け、実験を開始した。飼育環境は、温度  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 5\%$ 、照明時間 12 時間 (8 時~20 時) に設定し、ラットは 1 匹/ゲージとし、滅菌蒸留水を給水瓶にて、またラット用放射線滅菌固形試料 (CE-2、日本クレア) を給餌器にて、それぞれ自由摂取とした。用いた飼育器具はすべて高圧蒸気滅菌器により滅菌したものを使用した。

### 2) *Salmonella* Enteritidis 感染モデル動物の作出

Islam ら[22]および Havelaar ら[23]の方法に準じて各種条件を設定した。

*Salmonella* Enteritidis は、ヒトの食中毒患者から分離された S381 株を供試した。普通培地に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ で一晩培養したものをプレ培養液とし、新たな普通培地に 1%量のプレ培養液を添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で 18 時間培養したものを投与菌液とした。ラットは投与前日から 12 時間の絶食を行い、*S. Enteritidis* 投与は日本クレア株式会社フレキシブルラット用経口ゾンデ (RZ-1) を用い、菌体培養液  $500\mu\text{l}$  ( $1\sim 2\times 10^9\text{CFU}$ ) をシリンジに吸引した後、直ちに 6%重炭酸ナトリウム溶液を重層するように静かに吸引し、即座にラット胃内へ投与した。6%重炭酸ナトリウム溶液投与は胃酸中和による感染率向上を目的として行った。*S. Enteritidis* の投与後、直ちに絶食を解除し、5 日間通常飼育した後、剖検を行った。

### 3) 供試動物の剖検

実験終了後、飼育施設併設の実験室でラットを安楽死させ、放血した後に腹腔内より脾臓を摘出した。ラットから摘出した脾臓は、あらかじめカナマイシンを  $100\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加した Invitrogen 社の RPMI1640 培地 (RPMI1640-Km 培地) 2ml を分注した 15ml ポリプロピレンチューブに入れ、細胞培養施設に運

搬した。

#### 4) FCM によるヘルパーT細胞の測定

##### ①ラット脾臓からのリンパ球の分離

RPMI1640-Km 培地に浸漬した脾臓を 90mm デイッシュに移した後に、RPMI1640-Km 培地 3ml を添加して小尖刀で脾臓を十分細切し、細胞懸濁液を臓器片を除くために 200 番ナイロンメッシュを通して新しい 15ml チューブに移した。再度、デイッシュに 5ml の RPMI1640-Km 培地を添加し、残った脾臓を同様に処理して細胞を同じ 15ml チューブに移した。

脾細胞懸濁液にはリンパ球以外に赤血球、顆粒球など多種の細胞が含まれるため、Percoll (Amersham Bioscience Corp.) を用いた密度勾配分離法によりリンパ球のみ分離した。比重は市販のラット用リンパ球分離液リンフォライト-M (大日本製薬) を参考に 1.0940 とした。

##### ②リンパ球の活性化

分離したリンパ球を 10ml の RPMI1640-Km 培地に懸濁し、25cm<sup>2</sup> 培養フラスコに移した後、37°C、5%炭酸ガス下で培養した。10 時間後にリンパ球刺激物質として 9mg/ml Phytohaemagglutinin (PHA) 溶液 (Murex Biotech Ltd.) を 100 $\mu$ l 添加し、8 時間インキュベートした。

##### ③抗体による染色

抗体による細胞表面抗原染色、細胞膜透過処理および細胞内サイトカイン染色については、渋谷[45]の著書を参考にした。以下にその方法を具体的に示す。

1. PHA を添加してインキュベーション後、6 時間経過時に、最終濃度 10 $\mu$ g/ml になるようブレフェルدين A 溶液 (Sigma-Aldrich Inc.) を添加した。

2. フラスコを氷上に置き、反応を止めた後、細胞を 15ml チューブに移して冷 PBS で 2 回洗浄した。

3. 10<sup>6</sup>cell / 50 $\mu$ l になるように PBS で懸濁し、Cy5 標識抗ラット CD4 抗体



(554839 : BD Bioscience) を  $10\mu\text{l}$  添加し、室温、遮光下で 30 分間静置した。

4.  $1\text{ml}$  の PBS で 2 回洗浄した後、PBS  $250\mu\text{l}$  で懸濁、等量の固定液 (4%ホルムアルデヒド溶液) を加えてよく混合し、室温、遮光下で 20 分間静置した。

5. 冷 PBS で 2 回洗浄して、遠心後、上清を除去した後に、細胞膜透過用バッファー (0.5%サポニン、0.5%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS 溶液) を  $150\mu\text{l}$  加え、細胞をピペッティングし、室温で 10 分間静置した。

6. 遠心後、上清を除去し、冷 PBS  $50\mu\text{l}$  で懸濁後、FITC 標識抗ラット IFN- $\gamma$  抗体 (559498 : BD Bioscience)  $20\mu\text{l}$ 、PE 標識抗ラット IL4 抗体 (555082 : BD Bioscience)  $10\mu\text{l}$  をそれぞれ加え、室温で 30 分間インキュベートした。

7. 0.5%BSA 含有 PBS 溶液で細胞を洗浄後、再度 0.5%BSA 含有 PBS 溶液  $1\text{ml}$  に懸濁し、FCM 解析を行った。

#### ④FCM による解析

解析には BECKMAN COULTER EPICS XL デジタルフローサイトメーターを用い、細胞 5,000 個当たりの各ヘルパー T 細胞の数を求めた。

### 3. 結果および考察

本研究では Th1 と Th2 両細胞の分別に、①前方散乱光 (FS) による粒子表面積、②側方散乱光 (SS) による内部構造、③特異抗体の蛍光という各パラメータを用いてクラスター解析を行った。

ヒト白血球に対して、FS による細胞の大きさと、SS による細胞内顆粒の量という 2 つのデータをプロットしたサイトグラム (図 2) [46] を求めると、リンパ球、単球、顆粒球がそれぞれの特徴的な細胞形態

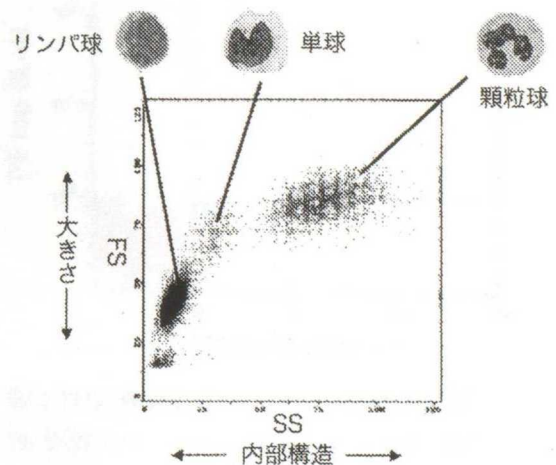


図 2. ヒト白血球の FS/SS サイトグラム

により分画される。ラット白血球ではヒトのような典型像は見られず、図3に示したように各細胞集団が内部構造のパラメータでそれぞれ独立せずに連続したプロットを描いていた。この画像の細胞サイズが小で顆粒の少ない細胞集団を、リンパ球としてゲーティングし

(図3青丸印：リージョンA)、さらにヘルパーT細胞表面抗原CD4をPhycoerythrin-cyanine dye (PE-Cy5) 標識抗ラットCD4抗体により標識した。このPE-Cy5陽性細胞を再度ゲーティングして得られたヘルパーT細胞(図4リージョンH)に対して、細胞内のIFN- $\gamma$ を

Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ラットIFN- $\gamma$ 抗体で、IL-4をPhycoerythrin (PE) 標識抗ラットIL-4抗体でそれぞれ染色し、IFN- $\gamma$ 陽性細胞をTh1細胞、IL-4陽性細胞をTh2細胞、両者陽性細胞をTh0細胞としてクラスター解析を行った(図5)。

以上の手順で解析を進め、*S. Enteritidis* 非感染コントロール群と

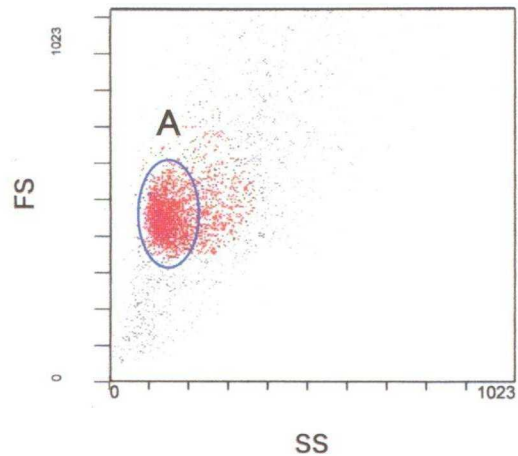


図3. ラット白血球のFS/SSサイトグラム

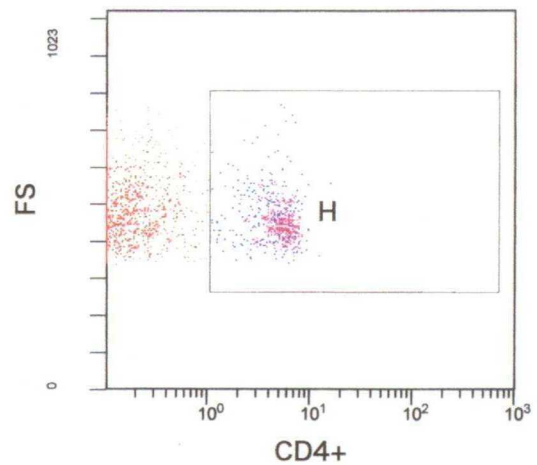


図4. Cy5 標識抗ラットCD4抗体によるヘルパーT細胞の識別

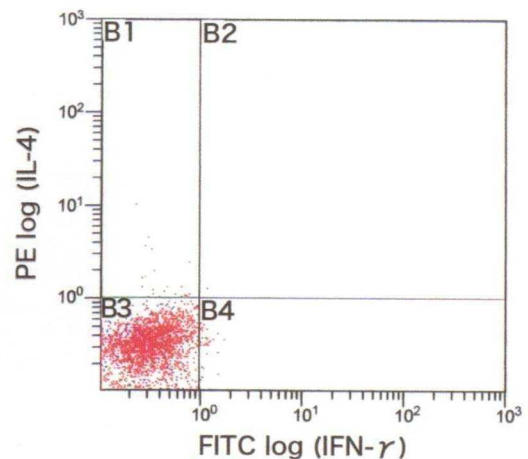


図5. FITC 標識抗ラットIFN- $\gamma$ 抗体およびPE 標識抗ラットIL-4抗体によるTh1、Th2細胞の識別 (B1:Th2、B2:Th0、B4:Th1)

*S. Enteritidis* 感染群を比較した結果を図 6 に示した。

*S. Enteritidis* は細胞内感染性のため、Th1 反応が誘導されることにより感染に抵抗すると言われているが、本感染モデルラットでは、感染 5 日後の Th2 細胞数は増加傾向にあったが、Th1 細胞数はコントロール群に対して有意に減少していた。本研究で用いた感染モデルラットでは、ヒトとは異なり、水様性下痢、血便などの症状は呈さず、投与した *S. Enteritidis* が生体内に侵入し、ラット体内をリンパ行性に移動して各臓器で増殖する過程に重点を置いている[22, 23]。臨床症状を示さなくても、病原菌の侵襲を受け、体内の至る臓器で細菌が検出されることで感染成立は明白であり、*S. Enteritidis* 感染に対して、ラットの免疫系は完全な防御が不可能であったといえる。*S. Enteritidis* 感染の生体反応としては、細胞性免疫を活性化して感染抵抗性を高める Th1 細胞の増加は必須かつ主要な免疫反応系であるが、感染を防御できなかった本感染モデルラットでは、生体侵襲に対する反応として Th2 細胞が増加したものと推察された。つまり、*S. Enteritidis* 感染成立は、一方でラットを有害なストレス刺激に暴露させたとも考えられる。ストレス刺激は、HPA axis や交感神経-副腎髄質系を活性化し、糖質コルチコイドやカテコールアミンの分泌促進を誘起するものと予測される。

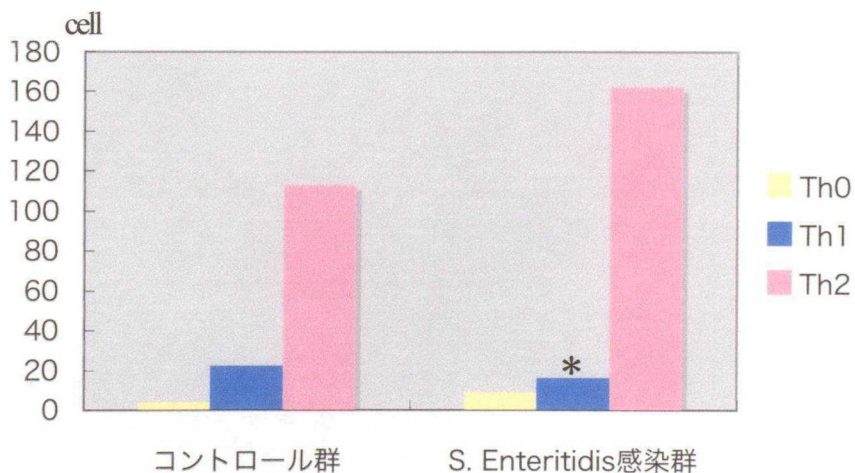


図 6. コントロール群と *S. Enteritidis* 感染群のヘルパーT 細胞の割合

\* : コントロール群に対して有意差あり (P<0.05, n=5)

糖質コルチコイドはリンパ球にアポトーシスを誘導し[47]、マクロファージの活性を低下させる。交感神経緊張により放出されるノルアドレナリンは、アドレナリン受容体を持つ顆粒球の増加を引き起こし[48]、樹状細胞やマクロファージの IL-12 産生を抑制して Th1 誘導性の樹状細胞への成熟を抑制するとともに、Th2 誘導性の樹状細胞への成熟を促進する[49]。つまり、ストレスは、リンパ球の減少と顆粒球増加を招き、免疫バランスを崩壊させ、Th2 反応の優位状態を生み出すと考えられる。

したがって、本研究での *S. Enteritidis* 感染モデルラットにおける Th1 細胞の減少と Th2 細胞の増加に矛盾点はなく、*S. Enteritidis* 感染条件、FCM によるヘルパー T 細胞の測定条件ともに適切であったといえる。第 2 節からは、このヘルパー T 細胞測定系を、*Lactobacillus* 属細菌および各種免疫賦活物質がどのように Th1 反応を誘導し、感染防御に効果的に作用するかを評価するひとつの方法として使用する。

## 第2節 *Lactobacillus* 属細菌による *S. Enteritidis* 感染防御効果の検討

### 1. 目的

本節では、第1節で確立された *S. Enteritidis* 感染モデルラットにおける Th1/Th2 細胞測定系に加え、マクロファージなど貪食細胞の貪食活性、白血球系の細胞数など免疫細胞の動体解析、および *S. Enteritidis* 感染状態の指標であるラット生体内への侵入菌数など6項目を測定することにより、*Lactobacillus* 属細菌投与の感染防御効果を網羅的に解析することを目的とした。各項目の測定意義は以下のとおりである。

#### ① 末梢血単球および腹腔マクロファージ貪食活性の測定

食細胞の貪食による病原微生物の排除は、感染初期の免疫として重要な位置を占める。特にマクロファージは取り込んだ抗原をプロセッシングによりペプチド断片とし、主要組織適合複合体 (MHC) クラス II 分子に結合させ、抗原提示を行う細胞として、あるいは炎症性サイトカインを産生する細胞として、適応免疫への移行にも重要な働きを示す。したがって、食細胞の指標として単球および腹腔マクロファージの貪食活性を測定することにより、自然免疫の活性度を推し量る指標の一つとなる。

#### ② 血球計算および白血球分類

好中球、単球といった食細胞の増加による免疫能向上性、リンパ球の増加による適応免疫の誘導、といった変化を観察する目的で測定を行った。好中球については桿状核と分葉核を区別することで新生促進の指標とした。

#### ③ Th1/Th2 バランスの測定

生体が細胞内寄生性細菌である *S. Enteritidis* の感染を防御するには、Th1 細胞から分泌される IL-2 や IFN- $\gamma$  といったサイトカインが細胞免疫の活性化に重要

な役割を果たす。その Th1 反応促進の指標としてヘルパーT 細胞の分類と細胞数の測定を行った。なお、Th1 と Th2 細胞数は測定するが、Th0 細胞数も求める。すなわち、Th0 細胞数の変化が、Th1 もしくは Th2 細胞増加への布石としてヘルパーT 細胞の新生を推測する一助となるからである。

④ 肝臓、脾臓および腸間膜リンパ節 (MLN) における臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数の測定

*Lactobacillus* 属細菌投与により、*S. Enteritidis* の体内侵入を抑制できたかを評価する目的で測定を行った。

⑤ 体重測定および一般症状の観察

*Lactobacillus* 属細菌のプロバイオティクス効果のひとつに体重増加が知られており[50]、本研究の被検菌にも同様の効果がみられるかを確認するために体重測定を行った。また、*S. Enteritidis* 感染による体重低下と、感染防御による体重低下抑制の確認も行った。

## 2. 材料および方法

### 1) 実験動物

*Lactobacillus* 属細菌の投与期間を考慮し、*S. Enteritidis* 感染を第 1 節で示した週齢に合わせるため、入荷週齢を 7 週齢に変更した。入荷週齢以外は第 1 節と同様の動物を使用した。

### 2) *Lactobacillus* 属細菌の調製およびその投与

被験菌として用意した、*Lactobacillus reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103、*Lactobacillus johnsonii* LC1、*Lactobacillus plantarum* MCRI164 は、MRS 液体培地 (Oxoid) に接種して 37°C で一晩培養したものをプレ培養液とし、新たな MRS 液体培地に 1% 量のプレ培養液を添加し、37°C で 18 時間培養したものを投与菌液とした。被験菌は、感染前 9 日間 (1 日 1 回、午前 10 時) および感

染後 2 時間の合計 10 回、ラット用経口ゾンデを用いて強制経口投与した。投与菌液は用時調製し、投与菌量はラット 1 匹当たり  $10^9$  CFU とした。また、コントロール群 (*S. Enteritidis* 非感染または感染群) には同容量の PBS を投与した。

### 3) *Salmonella Enteritidis* 感染モデル動物

各 *Lactobacillus* 属細菌を 9 日間投与したラットに対し、第 1 節と同条件の *S. Enteritidis* 投与を行った。その後、5 日間の通常飼育を施し、剖検と採材を行った。

### 4) 体重測定および一般症状の観察

体重は *S. Enteritidis* 投与日を day 0 とし、被検菌投与開始日 day-9 から剖検日 day5 まで毎日、体重計にて測定した。体重に群間のばらつきが生じた場合には、day-9 および day 0 を基準とした体重増減で示した。

一般症状は day 0 より day 5 まで毎日観察した。症状は個体別に記録し、顕著な変化がみられた症状項目を発現個体数で表した。

### 5) 供試動物の剖検、採材および採血

実験終了後、ラットをエーテル麻酔し、心臓より採血した。ついで、腹腔内を Hanks 液にて洗浄し、遊離マクロファージを回収した。最後に肝臓、脾臓および腸間膜リンパ節 (MLN) を摘出した。

### 6) 肝臓、脾臓および MLN における臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数の測定

*S. Enteritidis* の生体内への侵入を評価するために、肝臓、脾臓および MLN における臓器重量 1 g 当たりの菌数を算出した。摘出した各臓器は全量をホモジナイズし、生理食塩水を用いて段階希釈した後に普通寒天培地に塗抹した。

1 平板当たり 30~300 コロニーが得られた希釈段階平板を選択し、その希釈段階の平板 3 枚の平均値をその臓器における *S. Enteritidis* の生菌数とした。

### 7) 白血球数測定

採血したラット 3 匹をエーテル麻酔し、心臓より採血した。

## 7) 末梢血単球および腹腔マクロファージ貪食活性の測定

### ①末梢血単球の分離

採血後直ちに 4.5%デキストラン溶液を添加し、30 分静置後、白血球層を分取した。RPMI1640-Km 培地で 2 回洗浄してデキストランを除去した後、 $10^5$  cell/ml に調整し、96 穴マイクロプレートに  $100\mu\text{l}$  ずつ添加した。37°C、5%炭酸ガス下で 2 時間培養し、ウェル底面に付着した細胞を単球として貪食活性の測定を行った。

### ②腹腔マクロファージの分離

腹腔洗浄液を遠心分離し、得られた細胞を RPMI1640-km 培地で 2 回洗浄した後に  $10^5$  cell/ml に調整し、96 穴マイクロプレートに  $100\mu\text{l}$  ずつ添加した。37°C、5%炭酸ガス下で 2 時間培養し、ウェル底面に付着した細胞を腹腔マクロファージとして貪食活性の測定を行った。

### ③蛍光ビーズの貪食

マイクロプレートに付着した単球あるいはマクロファージを PBS で洗浄後、2.5%蛍光ラテックス微小粒子液 (POLYSCIENCE Inc. : 直径  $1\mu\text{m}$ ) を 0.5%含む RPMI1640-km 培地を添加し、37°C、5%炭酸ガス下で 1 時間、ビーズを貪食させた。

### ④貪食活性の測定

反応後のマイクロプレートを PBS で 2 回洗浄し、Fluoromark Microplate Fluorometer (Bio-Rad) をで各ウェルの蛍光強度を測定した。測定時のゲイン設定は 35 とした。

## 8) Th1/Th2 バランスの測定

第 1 節と同じ方法で測定した。

## 9) 白血球数測定

心採血した血液 2ml をエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 採血管に移して凝



固阻止した後、各白血球数は自動血球計算計を用いて測定した。白血球は、桿状核好中球、分葉核好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球に細分した。

### 10) 統計処理

T検定を行い、統計的有意差は  $p < 0.05$  の場合を有意であるとした。体重および体重増減は群毎の平均値および標準誤差を算出した。

## 3. 結果および考察

### 1) 体重変化

#### i) day-9~-1

図7に、被検菌として各 *Lactobacillus* 属細菌を9日間投与した際の効果を示した。すべての試験区ともコントロール群と比較して有意差は得られず、被験菌単独での腸内フローラ改善による増体量の向上などは確認されなかった。しかし、植物由来の

*Lactobacillus plantarum* MCRI164 よりも動物の糞便由来乳酸菌である他3菌株において増体量が向上する

傾向がみられた。その中でも特に *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> において増体量が向上しており、その要因として *L. reuteri* がヒト以外にも、ラット、マウス、ニワトリ、ブタ、ウシなど多種の家畜からも分離されている広宿主域の細菌であることから[51]、ヒト由来の菌株であってもラット腸管内での生残性が高く、良好な結果が得られたものと考えられた。

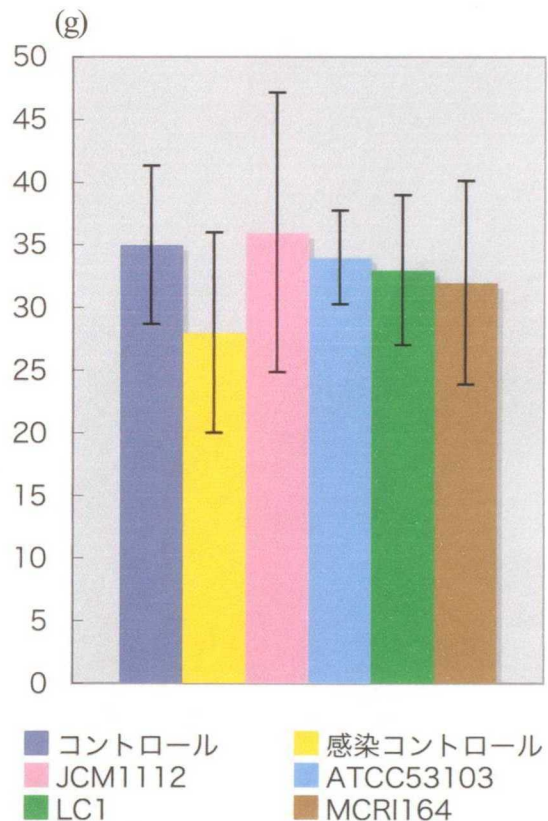


図7. day-9~-1 における増体量

また、コントロール群と感染コントロール群は、*S. Enteritidis* 投与日までの飼育状態、投与物質 (PBS) は基本的に同等であり、両群に有意差は認められず、ばらつきは個体差によるものと考えられた。

ii) day0~5

被検菌投与 10 日目の *S. Enteritidis* ( $10^9$ /rat) 投与を 0 日として、剖検までの 5 日間の増体量を図 8 に示した。両コントロール群に対して、

*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、*L. rhamnosus*

ATCC53103 投与群では体重の増加はみられたものの、有意差は認められず、*L. johnsonii* LC1、*L. plantarum*

MCRI164 投与群では有意に体重が増加しており、各被検菌とも、

*S. Enteritidis* 感染後にもかかわらず、体重の増加傾向が観察され、

*Lactobacillus* 属細菌によるプロバイオティクス効果によるものと考えられた。

iii) day-9~5: 体重推移

この期間の増体量の推移を図 9 に示した。感染コントロール群に

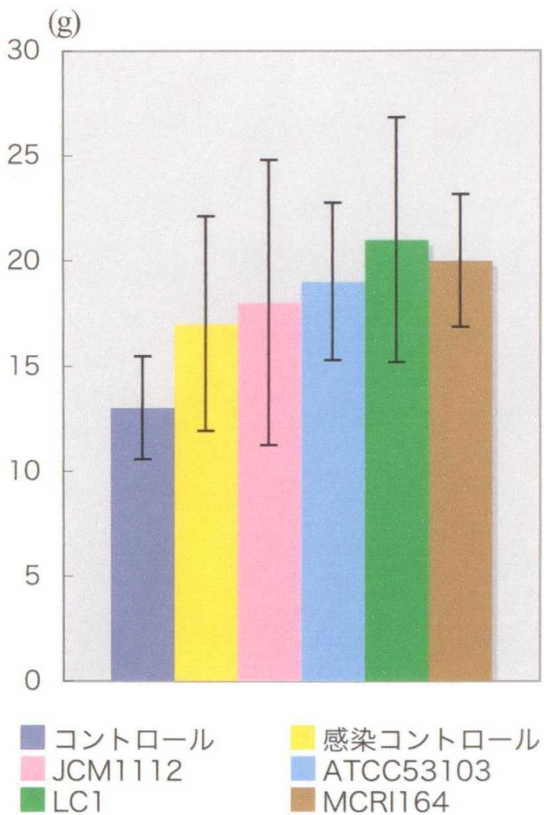


図 8. day0~5 における増体量

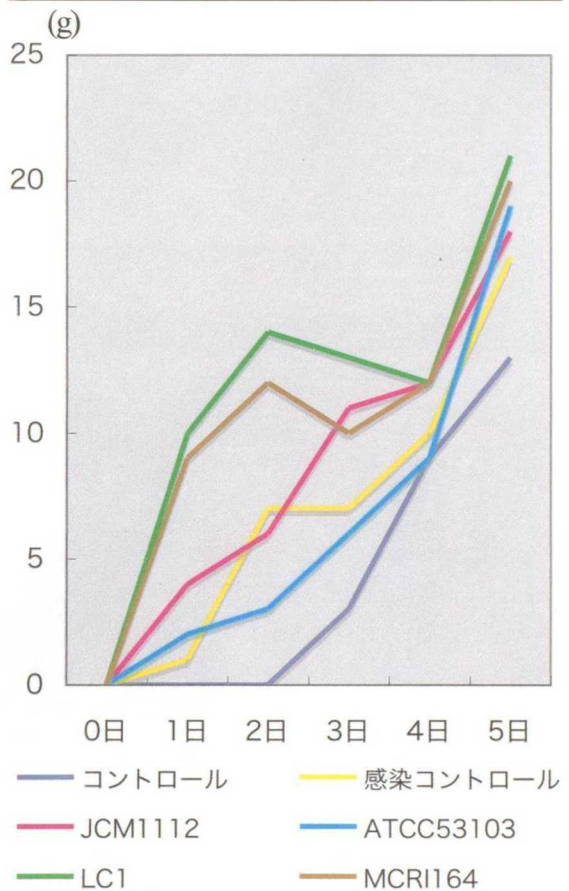


図 9. day-9~5 における増体量の推移

おける 0~2 日目にかけての増体量の低下は、物理的、化学的バリアとしての腸管上皮を *S. Enteritidis* が突破し、ラット生体内へ侵入する時期と考えられ、腸管から体内へ侵入した *S. Enteritidis* はリンパ行性に腸間膜リンパ節、さらにリンパ管を走行して、あるいは血行性に各種臓器へ移行し、3~4 日目には各臓器で *S. Enteritidis* が増殖、それが2度目の増体量低下に影響したと予測された。*L. johnsonii* LC1 および *L. plantarum* MCRI164 群ではこの体重増加パターンを周到しており、体重の有意な増加はあっても、*S. Enteritidis* 感染の影響を排除してはいない。*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> および *L. rhamnosus* ATCC53103 では、急激な体重増加はないものの、前述の 3~4 日目付近にみられる一時的な増体量の落ち込みや大きな変化がなく、滑らかに体重が増加している。この 2 菌株では、増体量に関して明らかに *S. Enteritidis* 感染パターンとは異なっており、感染の影響に差があることが伺える。

## 2) 肝臓、脾臓および MLN における臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数の測定

図 10 に各臓器から検出された *S. Enteritidis* 生菌数を示した。

MLN では各試験群とも減少傾向ではあったが、 $10^5$  レベルと *S. Enteritidis* 生菌数に大きな差は認められなかった。本 *S. Enteritidis* 感染モデルは、明確な感染を目的としたモデル系であるため、ラットへの *S. Enteritidis* 投与菌数が  $10^9$  CFU と

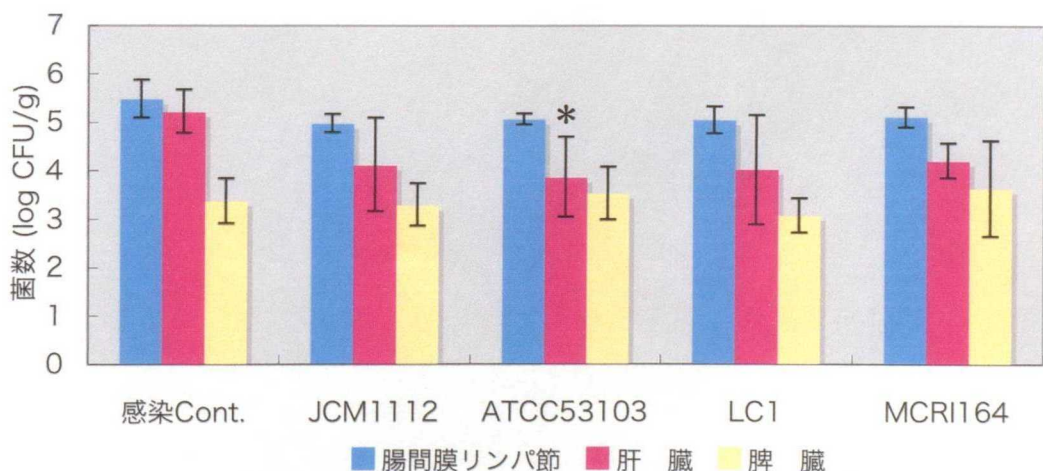


図 10. 各被験菌投与群における各臓器中の *S. Enteritidis* 生菌数

\* : コントロール群に対して有意差あり (P<0.05, n=5)

ヒトでの一般的な感染成立菌数よりもはるかに多い。よって、腸管上皮やパイエル板に侵入する *S. Enteritidis* が、好中球や組織マクロファージ、単球由来マクロファージといった貪食細胞の動員で防御可能な菌数を上回っており、感染局所である腸管から最も近傍のリンパ節である MLN へ大量の *S. Enteritidis* が侵入したことが要因ではないかと考えられる。

脾臓に関しては *L. johnsonii* LC1 でやや減少傾向がみられたが、他の被験菌も含め、感染コントロール群との有意差はなかった。一方、肝臓ではいずれの試験群においても感染コントロール群に対して 1/10 程度の  $10^4$  CFU にまで *S. Enteritidis* 菌数が減少しており、特に ATCC53103 では  $10^{3.86}$  CFU と有意に減少していた。これら被検菌による感染防御の差異は、貪食細胞の活性化誘導能およびそれ以降の適応免疫の強度に現れ、結果として肝臓、脾臓の侵入菌数に影響を及ぼすものと推測される。

### 3) 末梢血単球および腹腔マクロファージの貪食能

腸管感染に対して、単球およびマクロファージは以下に示すメカニズムによって活性化される。腸管上皮への抗原（本研究では *S. Enteritidis*、あるいは *Lactobacillus* 属細菌）の付着刺激で上皮細胞から産生される IL-8 や LARC によって局所に遊走する単球や、パイエル板の M 細胞に取り込まれた後にマクロファージや樹状細胞によって、TLR2 など各種レセプターを介した抗原の貪食、MHC クラス II への結合と提示が行われると[52]同時に IL-12 が産生される。また、血中の単球は樹状細胞（DC1）にも分化し、上皮細胞により産生された  $\beta$  デイフェンシンにより集合した未熟樹状細胞[53]も加わり、マクロファージと同様に抗原提示、IL-12 の産生を行う[54-56]。自ら産生する IL-12 に反応したマクロファージや樹状細胞は IFN- $\gamma$  を産生し、IFN- $\gamma$  はさらにマクロファージや樹状細胞を活性化して IL-12 産生を増強するといったオートクリン活性化機構が存在する。IFN- $\gamma$  によって活性化されたマクロファージは貪食能が高まるとともに

一酸化窒素などを産生することによって強力な殺菌作用を示す。

図 11. A に、各試験群における末梢血単球、B に腹腔マクロファージの貪食能測定結果を示した。末梢血単球ではすべての被験菌で貪食能の向上が認められたものの、いずれも感染コントロール群に対して有意差は得られなかった。腹腔マクロファージでは、*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、*L. johnsonii* LC1、*L. plantarum* MCRI164 は感染コントロール群と有意差はなかったが、*L. rhamnosus* ATCC53103 投与群において感染コントロールに対して 2.5 倍と有意に高値を示し、他の被験菌と比較しても極めて向上していた。

ヒトのサルモネラ感染症患者では、血清中の IFN- $\gamma$  が胃腸炎型よりも全身型で高値になることが報告されており[57]、本感染モデルでも感染局所で産生された IL-12 と IFN- $\gamma$  が血流に乗り、その拡散とともに末梢血単球の活性化が誘

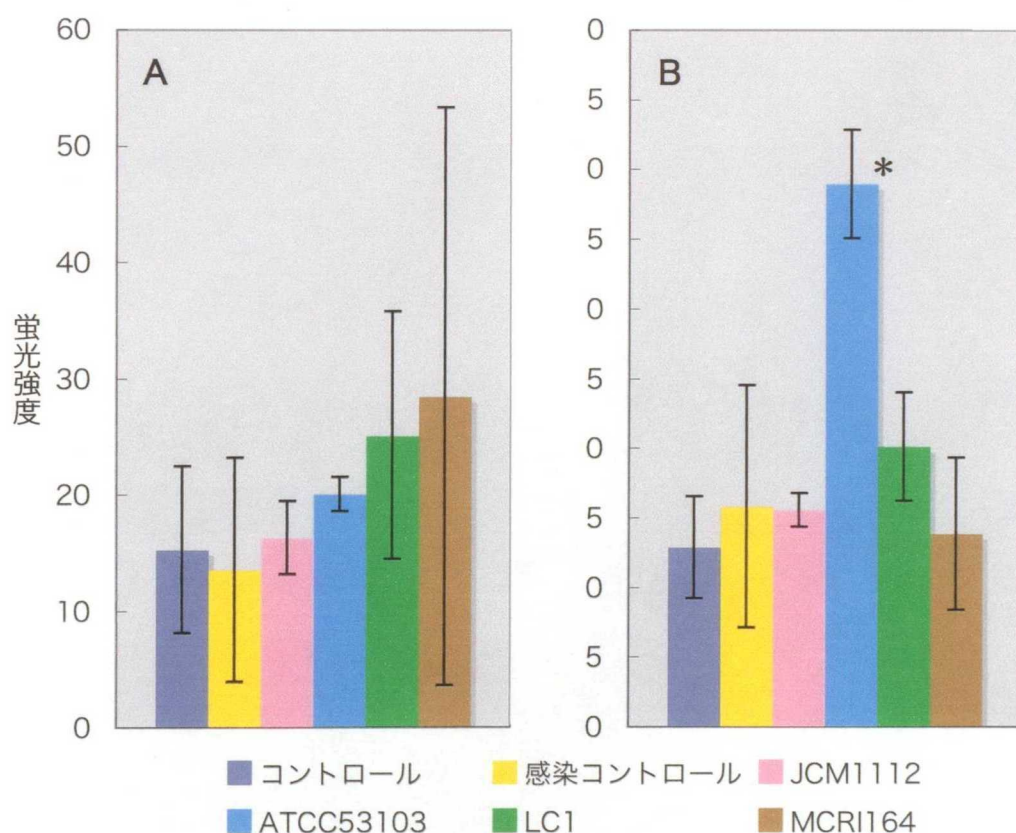


図 11. 末梢血単球(A)、腹腔マクロファージ(B)の貪食能における *Lactobacillus* 属細菌の影響

\* : コントロール群に対して有意差あり (P < 0.05, n = 5)

導されて組織マクロファージの一種である腹腔マクロファージの活性化に至るものと考えられている。

*L. rhamnosus* ATCC53103 ではこの理論どおりに、腹腔マクロファージまで十分に活性化されていることが確認できた。*L. johnsonii* LC1 では単球の活性化が認められ、腹腔マクロファージに関しても測定値が増加していることから、活性化誘導能が弱い、もしくは刺激が持続しないため、より長期の投与(抗原刺激)、あるいは*S. Enteritidis*感染後の投与の持続がなければ十分な活性化は得られないのではないかと推測される。*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup>では単球、腹腔マクロファージともに活性化は認められなかった。*L. plantarum* MCRI164 の単球貪食能は、個体差が大きく、コントロール群と同程度の個体と3倍近い値を示す個体とに二分され、平均値を求めると4被検菌中で最も高値を示していた。一方、腹腔マクロファージは活性化が認められず、貪食細胞を活性化する抗原刺激としては不安定であるといえる。

また、蛍光強度の測定と同時に、ビーズ貪食後の末梢血単球を顕微鏡にて観察した結果、非常に興味深い結果が確認された(図12)。*L. rhamnosus* ATCC53103 投与群では、単球が大型で真円形に近い細胞形態を示し、細胞当たりの貪食ビ

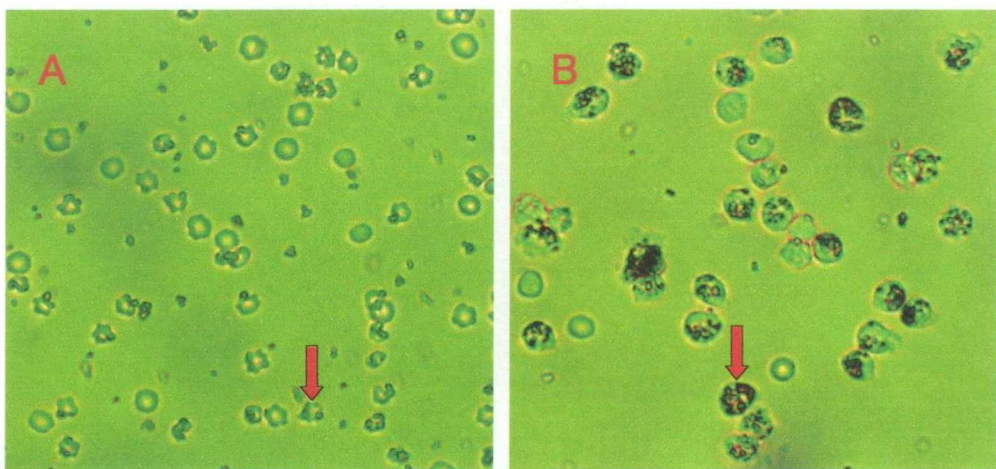


図12. 蛍光ビーズ貪食後の末梢血単球  
A:感染コントロール群、B: ATCC53103 投与群  
矢印で単球を示した

ーズ数（細胞内の黒色粒子）も多い。一方、*S. Enteritidis* のみを投与した感染コントロール群では細胞が萎縮し、貪食した蛍光ビーズも少数であった。この実験系では細胞を採取してから、分取、蛍光ビーズ貪食処理を経て観察に至るまでに4時間ほど経過している。この間に細胞が変化しているのか、すでにラット体内で変化が起こっていたのか定かではないが、*L. rhamnosus* ATCC53103 菌体により単球が活性化されているだけでなく、細胞の生残性にも影響を及ぼしていることが推察され、生体内での高い活性維持に貢献しているものと考えられる。他の被験菌においては、*L. rhamnosus* ATCC53103 投与群のような典型的貪食像ではなく、細胞形態もややいびつで細胞当たりの貪食ビーズ数も少ない傾向にあった。

#### 4) Th1/Th2 バランス

ウイルス、リステリア菌、抗酸菌、サルモネラ菌などの細胞内寄生菌による感染症では、その感染防御に CTL や武装化マクロファージが関与している。そのため、CTL 増殖、マクロファージ武装化を司る IL-2 や IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞が重要な働きをもつ。本研究の *S. Enteritidis* 感染症では Th1 優位の免疫状態へとシフトする必要があるが、Th1 反応の持続あるいは過剰すぎることは自己免疫性疾患の要因とも考えられていることから、必要十分な Th1 反応を誘導し、かつ治癒と同時に速やかに健常状態の Th1/Th2 バランスに復帰することが求められる。つまり、結果として、各被検菌投与により、コントロール群の総細胞数および細胞種比率に近づいたかという点が重要となる。

図 13 に、*S. Enteritidis* 感染5日後の各試験群におけるヘルパーT細胞数を、表 1 にその結果に対する統計評価を示した。*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、*L. rhamnosus* ATCC53103、*L. plantarum* MCR1164 の3菌株において、有意な Th1 細胞増加と Th2 細胞減少による Th1/Th2 バランスの改善が認められた。特に *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、*L. rhamnosus* ATCC53103 はコントロール群と比較しても Th1 優位状態を示し、

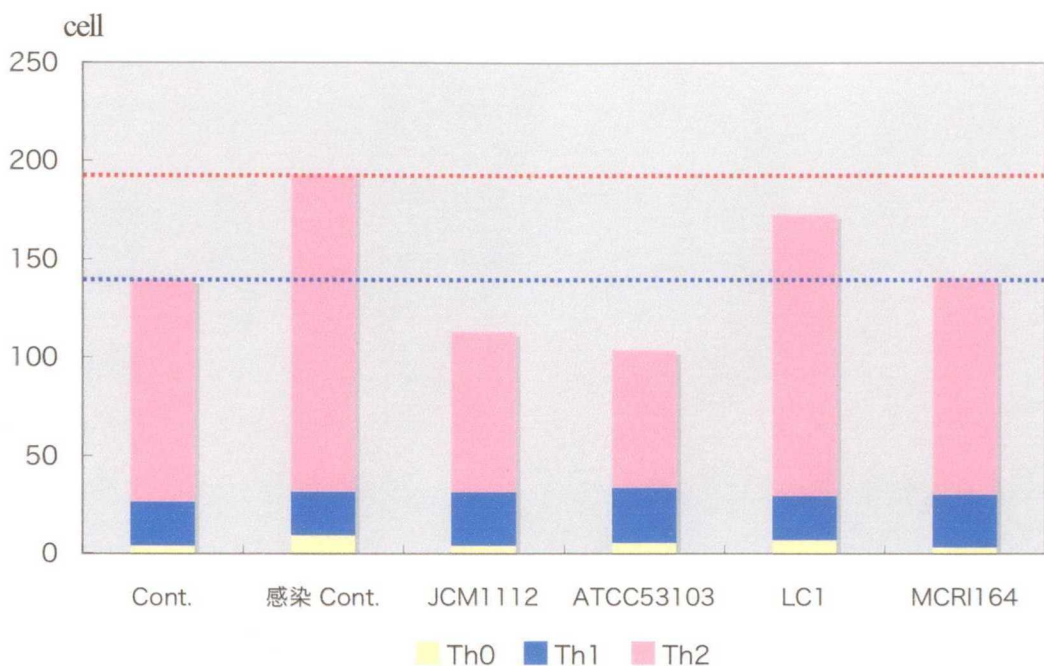


図 13. ヘルパーT 細胞数における各被験菌の影響

(コントロール群および感染コントロール群の値を青色破線、赤色破線でそれぞれ示した)

表 1. ヘルパーT 細胞数における各被験菌の影響に対する統計的評価

試験群	Th1	Th2	Th0	Total Th
JCM1112 <sup>T</sup>	↑	↓	→	↓
ATCC53103	↑	↓	→	↓
LC1	→	→	→	→
MCRI164	↑	↓	→	↓

↑ : 細胞数増加 (有意差あり、 $p < 0.05$ )、↓ : 細胞数減少 (有意差あり、 $p < 0.05$ )  
 → : 有意差なし

*S. Enteritidis* 感染 5 日目にして、Th1 細胞による CTL およびマクロファージの活性化による細胞性免疫が速やかに誘導され、感染防御に貢献していることを示している。*L. johnsonii* LC1 は被験菌中唯一、Th1/Th2 バランスの改善が認められなかったが、測定値としては感染コントロール群に対して Th2 細胞の減少が認められる。これは、貪食細胞活性化能の項でも考察したように、他菌と比較して抗原としての即時刺激能に劣ることが要因ではないかと推察される。

## 5) 白血球数

表 2 に各試験群における *S. Enteritidis* 感染 5 日後の白血球数を示した。コント



表 2. 白血球数における各被験菌の影響

試験群	総白血球	好中球	桿状核	分葉核	リンパ球	単球	好酸球
コントロール	7867	3474	157	3317	3871	340	182
感染 Cont.	10367	7000	349	6651	2864	404	69
JCM1112 <sup>T</sup>	10833	7263	292	6971	2995	433	76
ATCC53103	11200	7236	396	6840	3317	521	125
LC1	11633	7997	449	7548	3206	430	67
MCRI164	9800	6233	392	5841	2976	522	59

(個/ $\mu$ l)

ロール群と比較して、*S. Enteritidis* を投与した他 5 群では、感染反応性に好中球および単球の増加が認められた。*Lactobacillus* 属細菌投与群では感染コントロール群に対しても好中球と単球の増加が認められ、桿状核好中球増加による好中球新生も示唆されることから、これら細胞による自然免疫の発動がなされていることを示している。特に *L. rhamnosus* ATCC53103 では、貪食細胞活性化、Th1/Th2 バランスの改善に相関する結果となっており、白血球数を測定したことで、前 2 項目の結果を裏付けることとなった。一方、*L. johnsonii* LC1 投与群では、貪食細胞活性化と Th1/Th2 バランスの成績とは異なり、最も高い好中球数を示しているが、実際これは理にかなった結果である。病原細菌感染時に最も早く局所に遊走し、感染防御能を発揮するのは好中球であり、それに引き続いて抗原提示、適応免疫の誘導と反応していく。*L. johnsonii* LC1 投与群では単核食細胞系の活性化が途中段階であること、Th1/Th2 バランス改善が兆候のみであることから、*L. johnsonii* LC1 投与群 *S. Enteritidis* 感染 5 日目では自然免疫から適応免疫への移行過程にあることが示唆される。

#### 4. 要約

本章では *Lactobacillus* 属細菌の *S. Enteritidis* 感染防御能について、免疫系のカスケードからピックアップした測定項目を用いて、その能力を検討した。

*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> 投与群では、*S. Enteritidis* 接種後の体重増加率も良く、

*S. Enteritidis* 臓器侵入菌数も全項目で低下していたが、好中球数増加、単核食細胞活性化に対しての作用が弱く、有意差は得られなかった。*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> の Th1/Th2 バランス改善能は 4 被検菌中、*L. rhamnosus* ATCC53103 に次いで好成績であり、Th1 優位への Th1/Th2 バランス改善に特化した特徴を示した。

*L. rhamnosus* ATCC53103 投与群では、*S. Enteritidis* 臓器侵入菌数の有意な低下、単核食細胞の活性化や生残性向上、Th1/Th2 バランスを 4 被検菌中最も Th1 優位に改善するなど、自然免疫から適応免疫に渡って幅広く、また、バランスよく宿主の免疫能向上に貢献した。

*L. johnsonii* LC1 投与群では、好中球数増加と末梢血単球活性化が顕著で、自然免疫の活性化は推測されるが、Th1/Th2 バランス改善効果は低い結果となった。*L. johnsonii* LC1 は *L. rhamnosus* ATCC53103 と比較してヒト糞便中のムチンに対する付着性が高いので、付着競合阻害作用によって特定の病原菌に対する感染防御を発揮するものと考えられる。しかしながら、この場合では、腸管上皮に付着性が高いので宿主の免疫反応も高くなるとはいえず、付着性だけでこのことを言及するのは困難であると結論された。また、パイエル板などに存在する抗原提示細胞のマクロファージに異物が貪食された後の消化性、すなわち難消化性のために免疫能の亢進が維持されるという報告がある[58]。*Lactobacillus casei* シロタ株は、一般的なグラム陽性菌溶菌酵素であるリゾチームなどで細胞壁が消化され難く、マクロファージが貪食した後でも他菌と比較して速やかに消化されずに菌体成分が残存する。そのためにマクロファージを持続的に刺激し、結果として高い免疫能向上作用を示すと考えられている。この現象は細胞壁組成の菌種による差異に起因し、他の *Lactobacillus* 属細菌にも当てはまる可能性は大きい。*L. johnsonii* LC1 は、マクロファージ内において易消化性で、抗原としての刺激が持続しないことから、適応免疫の誘導能が低かったのではないかと推察される。それとは対照的に、*L. rhamnosus* ATCC53103 では腹腔マクロフ

マクロファージ活性化や Th1 反応の誘導について好成績であったが、同菌種の *L. rhamnosus* ma27/6b においてリゾチームに対する抵抗性が報告されており[59]、シロタ株同様、難消化性である可能性が示唆される。したがって、単球および腹腔マクロファージの活性化は、投与菌の食細胞内での動態の差によるものと考えられる。

*L. plantarum* MCRI164 は、上記3被験菌の中間的性質を持っており、特徴的な作用は見受けられなかった。

上記 *Lactobacillus* 属細菌の *S. Enteritidis* 感染モデルラットへの投与は、好中球、単球、マクロファージなどによる自然免疫の活性化から、Th1/Th2 バランスの改善まで広範囲にわたって *S. Enteritidis* 感染を防御する傾向が見られた。しかしながらその作用は、菌株による効果の差が大きいが、薬剤などにみられる局所的な効果ではなく、病的状態を正常値範囲内に復帰させる、つまり、ホメオスタシスの維持的に働くということが推察される。したがって、上記効果の認められたプロバイオティクスを長期に渡って摂取することで、日常的に受ける軽微なストレスによる Th2 偏向や病原菌の侵入を事前に防御し、生体の健康を増進するものと考えられる。

本研究で試験した *Lactobacillus* 属細菌は、主に Th1 優位の免疫誘導能を示したが、*Lactobacillus paracasei* では菌株の違いにより、1型ではなく2型のヘルパーT細胞を活性化する場合もあるという[60]。つまり、プロバイオティクスの免疫誘導能は、菌種によって一概に特徴づけられるものではなく、菌株レベルで特性を判断し、製品化する必要があると考えられる。

## 第2章

免疫賦活物質による

*Salmonella* Enteritidis 感染防御効果の検討

## 1. 目的

本章では、第1章で確立された *S. Enteritidis* 感染モデルラットの免疫細胞動態解析法を用いて、カシス果汁由来の新規の免疫賦活物質であるカシスポリサッカライド (CAPS) 類、リゾープス麩抽出生理活性物質である R&U の *S. Enteritidis* 感染防御効果を網羅的に解析することを目的とした。

CAPS は、カシス果汁の 70%エタノール沈殿分画を陽・陰イオン交換樹脂処理によりイオン性化合物を除去後、さらに C-18 カートリッジ (ウオータース社) 処理によりポリフェノール化合物を除去し、透析、凍結乾燥を行い、粉末化した物質である。CAPS には平均分子量が 60 万と 8 万の 2 種類のポリサッカライドが存在しており、前者は CAPS-high molecular (CAPS-h.m.)、後者は CAPS-low molecular (CAPS-l.m.) と称される。CAPS-l.m. は、上記方法により製造された CAPS を適量の PBS に懸濁後、終濃度 45% (v/v) となるようエタノールを添加し、その遠心上清を透析後、凍結乾燥したものである。本研究では、カシス果実圧搾物であるカシスジュース (CJ)、CAPS、CAPS-l.m. の 3 種を被検物質として用いた。ポリサッカライド含量としては原料となる CJ が最も少なく、CAPS、CAPS-l.m. と高濃度になるが、その 3 種を試験することで、有効成分の効果の濃度依存性、有効成分以外のカシス果汁成分との相互作用について検討を行った。また、CAPS-l.m. については、通常 *S. Enteritidis* 感染 5 日後に各種試験を行うところを、2 日後にも同様な試験を行い、時間経過に伴う免疫ステージの変遷も視野に入れて試験した。

R&U は物質として直接的な細菌抑制効果は認められていないが、前述の白血球に対する効果から、免疫系活性化によるサルモネラ菌感染防御効果が得られるのではないかと推測し、検討を行った。また、ヘルパー T 細胞の分化にどのように作用し、Th1 反応と Th2 反応のどちらを優位に導くのかを明らかにすることにより、Alopecia X など生体内のホメオスタシスが乱れている疾病の改善

効果解明の一助に成り得るのではないかと考えられる。

## 2. 材料および方法

### 1) 実験動物

第1章2節と同様の動物を使用した。

### 2) 被検物質の調製およびその投与

被検物質として、メルシャン(株)酒類研究所から提供頂いたカシスジュース (CJ)、CAPS 溶液 (ポリサッカライド濃度 6mg/ml)、CAPS-l.m.溶液 (ポリサッカライド濃度 13mg/ml)、および牛越生理学研究所(株)から提供頂いたリゾープス麴抽出生理活性物質 R&U を用いた。

CJ および各 CAPS 溶液は冷暗所 (4°C) に保存し、感染前 9 日間 (1 日 1 回、午前 10 時) および感染後 2 時間の合計 10 回、ラット用経口ゾンデを用いて強制経口投与した。投与容量はラットの体重 200 g 当り 1.5 ml とした。

R&U は粉末を 2mg/ml となるように PBS に懸濁し、投与量が体重 1kg あたり 10mg となるよう同様に投与した。

また、コントロール群 (*S. Enteritidis* 非感染または感染群) には同用量の PBS を投与した。

### 3) *Salmonella* Enteritidis 感染モデル動物

体重測定および一般症状の観察

供試動物の剖検、採材および採血

肝臓、脾臓および MLN における臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数の測定

末梢血単球および腹腔マクロファージ貪食活性の測定

Th1/Th2 バランスの測定

白血球数測定

統計処理

以上の各項目は、第1章2節と同様の方法で行った。

### 3. 結果および考察

#### 1) 体重変化

##### i) day-9~-1

図14に、被検物質を9日間投与した際の効果を示した。すべての試験区ともコントロール群と比較して有意差は得られず、被検物質単独での栄養的効果による増体量の向上などは確認されなかった。逆に体重低下などの弊害も認められなかったため、体重変化からは生体に対する悪影響はないものと推察できる。

また、コントロール群と感染コントロール群は、*S. Enteritidis* 投与日までの飼育状態、投与物質 (PBS) は基本的に同等であり、両群に有意差は認められず、ばらつきは個体差によるものと考えられた。

##### ii) day0~5

被検物質投与10日目の *S. Enteritidis* ( $10^9$ /rat) 投与を0日として、剖検までの5日間の増体量を図15に示した。

CJおよびCAPS類は両コントロール群に対して有意差が認められなかったが、*S. Enteritidis* 非投与のCAPS-Lm.投与群では体重増加傾向がみられた。ポリサッカライドには腸管の蠕動運動を亢進し、便秘などを解消するという整腸作用があ

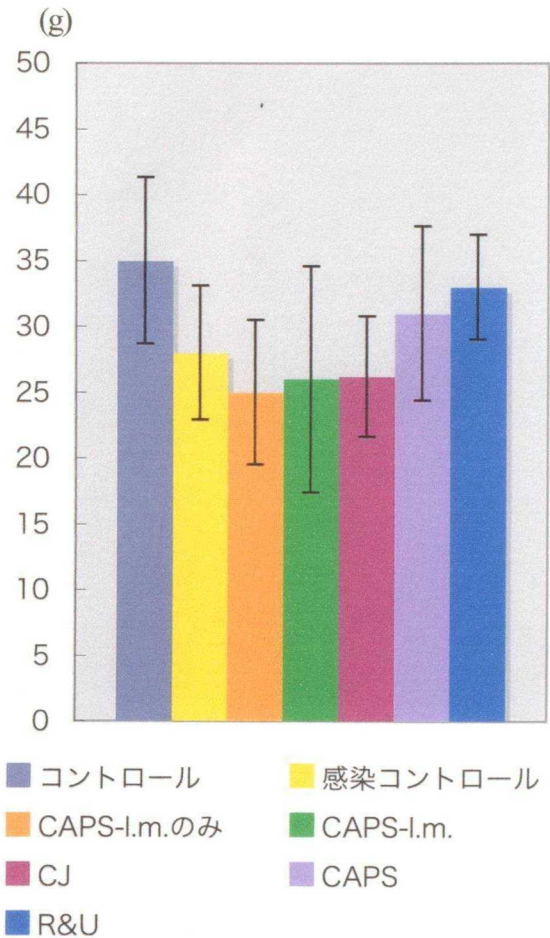


図14. day-9~-1における増体量

り [61-63]、CAPS でも他の多糖体同様、この整腸作用が影響して健全状態では体重の増加に至ったものと考えられる。これを裏付けるように、CAPS および CAPS-l.m. 投与群では排泄される糞便の堅さが減じて、下痢や軟便といった病的な状態ではない柔らかな糞便を排泄する個体が数匹ずつ見受けられた

R&U では両コントロール群に対して有意に体重が増加していた。これは、ヒメマスの成長促進効果、HeLa 細胞や Vero 細胞の細胞増殖効果といった、これまでに報告のある R&U の作用と類似しており、ラットでも成長促進効果が発揮されたものと考えられる。

## 2) 肝臓、脾臓および MLN における臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数の測定

図 16 に各臓器から検出された *S. Enteritidis* 生菌数を示した。

MLN では各試験群とも *Lactobacillus* 属細菌同様、減少傾向が認められ、CAPS-l.m.、CJ 投与群では有意に減少していた。CJ、CAPS 投与群は肝臓、脾臓も含めると感染コントロール群との差はそれほど大きくないのに対し、CAPS-l.m. 投与群では *S. Enteritidis* 菌数低減効果が高く、肝臓内菌数が 0.005 倍と大幅に低下している。感染 5 日後は時間的に適応免疫が誘導される時期と考えられ、依然として腸管内に存在する *S. Enteritidis* に対し、免疫的関門となるリンパ節で *S. Enteritidis* のさらなる生体内への侵入が阻止されたものと推察される。第 1 章で考察した

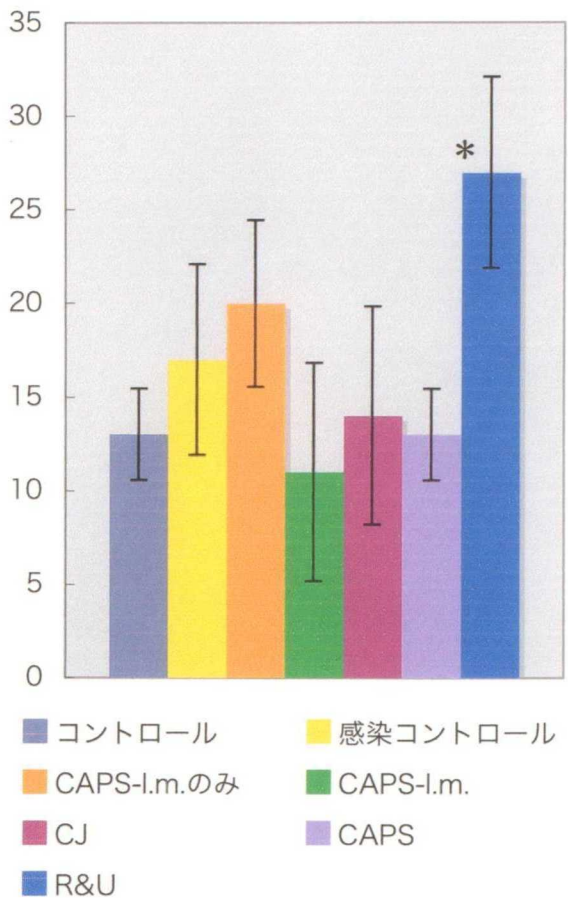


図 15. day0~5 における増体量  
\* : 感染コントロール群に対して  
有意差あり (P<0.05, n=5)



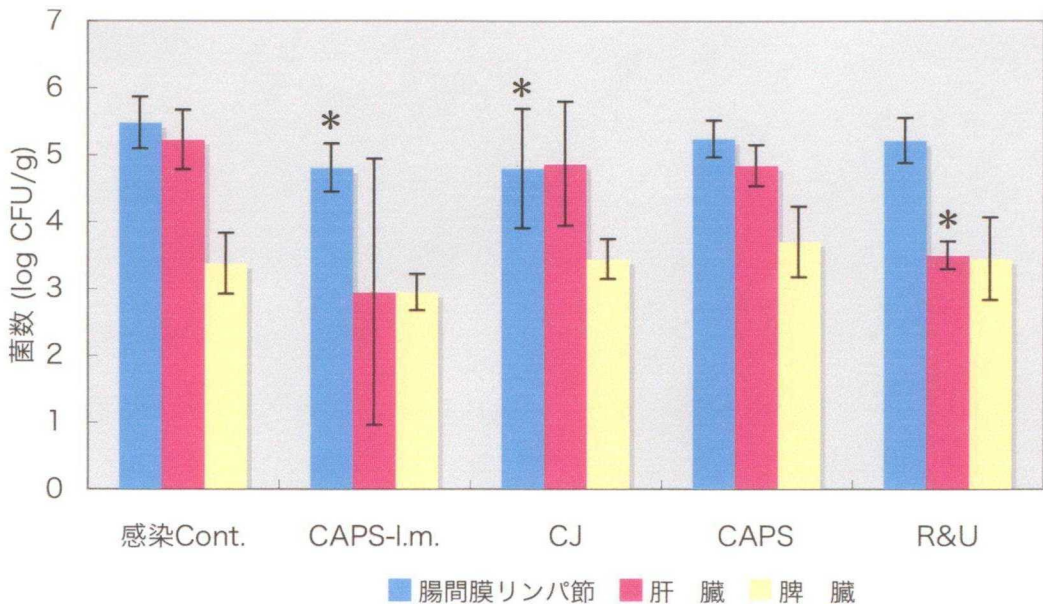


図 16. 各被験物質投与群における各臓器中の *S. Enteritidis* 生菌数  
\* : コントロール群に対して有意差あり (P<0.05, n=5)

ように、本感染モデルでは明確な感染を目指し、*S. Enteritidis* を  $10^9$  CFU/rat と多量に投与しているため、免疫的関門であるリンパ節まではある程度の *S. Enteritidis* の侵入を許してしまったものと考えられる。このような厳しい感染状況下においても、CAPS-Lm は *S. Enteritidis* の感染防御効果を示し、なおかつ、3臓器すべてにおいて、プロバイオティクス効果を有するとされる第1章2節の *Lactobacillus* 属細菌の効果を上回り、非常に優れた成果であるといえる。

R&U 投与群でも、肝臓において有意な *S. Enteritidis* 菌数の低下が認められた。これは次項に示す末梢血単球活性化に関連し、肝臓における貪食細胞（クッパー細胞）が活性化して *S. Enteritidis* 排除に働いたのではないかと考えられる。その効果は、肝臓内 *S. Enteritidis* 菌数では CAPS-Lm に次いで低く、高い免疫賦活能を有するものと推測される。

### 3) 末梢血単球および腹腔マクロファージの貪食能

図 17. A に、各試験群における末梢血単球、B に腹腔マクロファージの貪食能測定結果を示した。

末梢血単球、腹腔マクロファージともに、カシス関連物質の有意な貪食能

向上作用は認められなかったが、その中でも CAPS が両項目とも比較的高い値を示している。CAPS は先にも述べたように低分子量と高分子量のポリサッカライドが混在しており、CAPS-l.m.は低分子量のポリサッカライドのみを含む。このことから単核食細胞系を活性化する能力は高分子量ポリサッカライドで高く、低分子量では低いことが推察される。さらに、両ポリサッカライドを含むがその含量の低いCJで、CAPS と CAPS-l.m.の中間的な貪食能を示していることも、この推察を裏付けている。CAPS-l.m.投与群の腹腔マクロファージにおいて、感染コントロールに対し2倍強の貪食能向上がみられたが、これはCAPS-l.m.投与群に測定値が著しく高い個体とコントロールレベルの個体が混在し平均値を上昇させたことによるものであり、有意差は得られなかった。

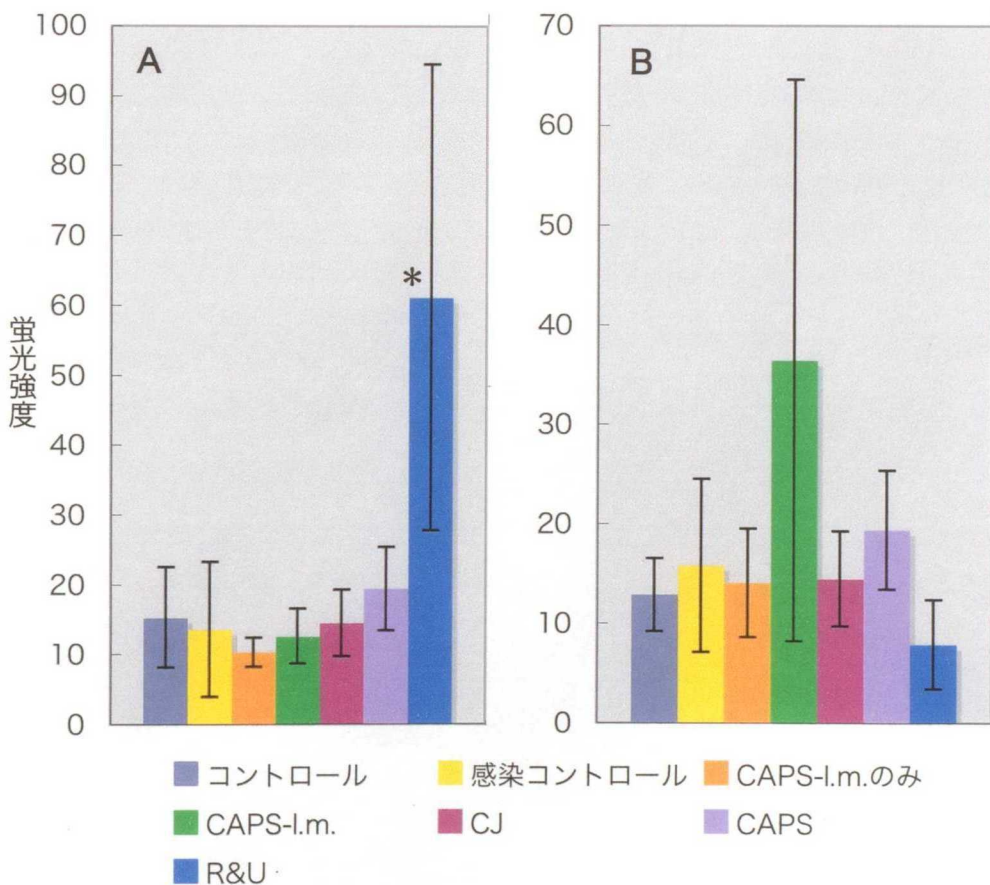


図 17. 末梢血単球(A)、腹腔マクロファージ(B)の貪食能における各種免疫賦活物質の影響

\* : コントロール群に対して有意差あり (P<0.05, n=5)

R&U 投与群では、末梢血単球において感染コントロール比 4.5 倍、最も高値を示した *Lactobacillus* 属細菌の 2 倍と著しい貪食能の向上がみられた。一方、腹腔マクロファージでの貪食能向上は認められなかったが、単球に対する高い活性化能を考えると、わずかな時間差で腹腔マクロファージの活性を捉えられなかったのではないかと考えられる。

#### 4) Th1/Th2 バランス

図 18 に、*S. Enteritidis* 感染 5 日後の各試験群におけるヘルパーT 細胞数を、表 3 にその結果に対する統計評価を示した。

カシス関連物質では、CAPS-l.m.のみ単独投与を行ったが、図 18 のとおりコントロール群とは総ヘルパーT 細胞数、Th0, 1, 2 の各細胞バランスとも近似しており、健常動物でのヘルパーT 細胞に対する作用は認められなかった。一方、*S. Enteritidis* を投与した CAPS 投与群では Th1 細胞の増加、Th2 細胞の減少に有意差が認められ、良好な Th1/Th2 バランス改善効果が観察された。*S. Enteritidis*

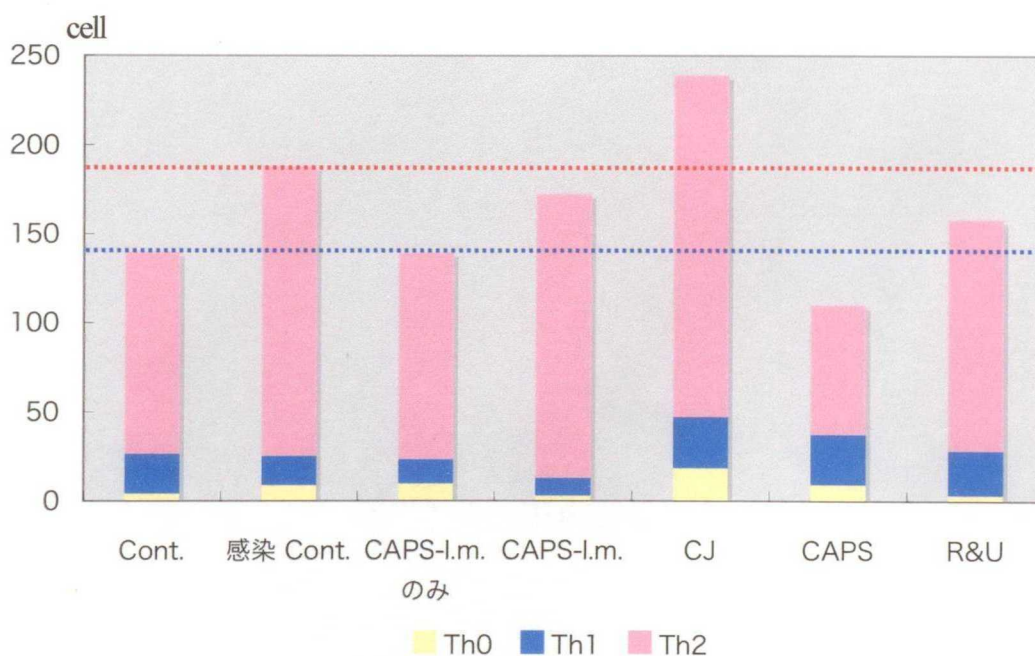


図 18. ヘルパーT 細胞数における各被験物質の影響

(コントロール群および感染コントロール群の値を青色破線、赤色破線でそれぞれ示した)

表3. ヘルパーT細胞数における各被験物質の影響に対する統計的評価

試験群	Th1	Th2	Th0	Total Th
CAPS-Lm.	↘	→	↓	→
CJ	→	↗	↑	↑
CAPS	↑	↓	→	↓
R&U	↑	↘	↘	→

↑：細胞数増加（有意差あり、 $p<0.05$ ）、↗：細胞数増加傾向（有意差なし）  
 ↓：細胞数減少（有意差あり、 $p<0.05$ ）、↘：細胞数減少傾向（有意差なし）  
 →：有意差なし

感染 CAPS-Lm.投与群にみられる Th0 細胞の減少は、Th1 細胞の需要に対して前駆細胞である Th0 細胞の新生不足により、プールされている Th0 細胞が減少したものと考えられる。さらに、各臓器中の *S. Enteritidis* 検出菌数において、CAPS-Lm.投与群が最も低下していることを考えると、他物質投与群と比較して早期に、かつ強力な Th1 反応の誘導がなされたものと推察される。したがって、この感染後期における Th1 細胞の消耗が、結果的に Th1 細胞の減少となって現れたものと考えられる。また、CJ では CAPS 類とは逆に、Th2 細胞の増加傾向とそれに伴う総ヘルパーT細胞数の有意な増加が認められた。このひとつの要因として、CJ の味覚的影響が考えられる。無加工のカシス果汁は酸味が強く、ヒトでもその嗜好性は良いものではない。ラットへの投与時も、ゾンデ先端に付着した果汁により酸味を感じるのか、CAPS 類投与群と比較して明らかにラットが抵抗する現象がみられた。つまり、ラットの好まない強い酸味がストレスとなって Th2 細胞の増加が引き起こされたのではないかと推察される。

R&U 投与群でも、Th1 細胞の有意な増加が観察され、全 Th 細胞に対する Th1 細胞の割合を感染コントロール群と比較すると、2.7 倍の増加であった。Th2 細胞の減少に有意差は得られなかったものの、Th1/Th2 バランスは CAPS に次いで改善されており、感染に対して効果的に作用しているものと考えられる。

### 5) 白血球数

図 19 に CAPS-I.m.のみを投与した群とコントロール群の白血球数を示した。

コントロール群と比較して、*S. Enteritidis* 感染のない CAPS-I.m.のみの投与群で好中球の増加が観察され、特に分葉核好中球が平常時の 1.25 倍に増加し、CAPS-I.m.に若干の好中球成熟促進作用があるのではないかと推察される。また、リンパ球数の減少に伴い、総白血球数も減少

しているため、白血球中に占める好中球の割合は相対的に増加している。これは分葉核好中球を増加させることで、感染などの外来抗原の侵入に備える反応とも解釈できる。

表 4 には、CJ および CAPS 投与群を除く、各試験群における *S. Enteritidis* 感染 5 日後の白血球数を示した。

*S. Enteritidis* を投与した CAPS-I.m.投与群では、感染反応性に CAPS-I.m.のみ投

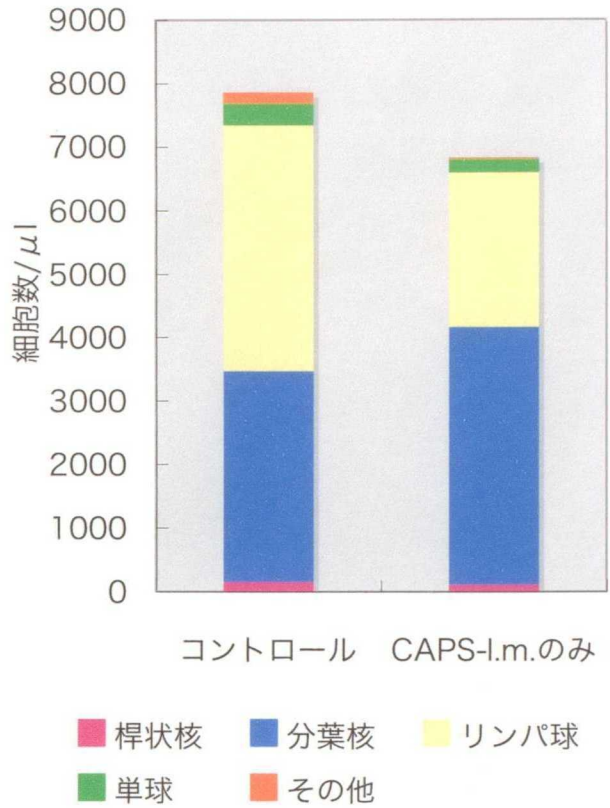


図 19. 白血球数に与える CAPS-I.m.の影響

表 4. 白血球数における各被験物質の影響

試験群	総白血球	好中球	桿状核	分葉核	リンパ球	単球	好酸球
コントロール	7867	3474	157	3317	3871	340	182
感染 Cont.	10367	7000	349	6651	2864	404	69
CAPS-I.m.のみ	6833	4174	112	4061	2429	205	24
CAPS-I.m.	13367	9127	418	8709	3553	591	39
R&U	7367	4774	231	4542	2319	239	0

(個/μl)

与群よりも好中球の増加が認められ、感染5日後という適応免疫への移行時期に合わせて、感染細胞の除去に関与するCTLや、適応免疫を調節するヘルパーT細胞の増加によりリンパ球数が増加したものと推察される。また、単球の増加もみられることから、Th1反応の促進により単球やマクロファージといった貪食細胞へのオートクリン的な活性化機構も働いているのではないかと考えられる。

R&Uでは、好中球、単球といった貪食細胞の数的な増加は認められなかった。しかし、桿状核好中球の増加、高い単球活性といった自然免疫系の機能亢進、肝臓内菌数の有意な低下といった現象がみられた。一般に桿状核好中球の増加は好中球全体の増加につながる（左方移動）のだが、総好中球数の増加は認められず、分葉の進んだ細胞と新生された細胞の置換を促進するのではないかと考えられる。これらの現象から、R&Uは貪食細胞を速やかに感染局所へ遊走させ、感染抵抗性を示すのではないかと推察される。

#### 4. 要約

本章では第1章で確立された*S. Enteritidis*感染モデルラットの免疫細胞動体解析法を用いて、カシス果汁由来の新規の免疫賦活物質であるカシスポリサッカライド（CAPS）およびその低分子量ポリサッカライド画分CAPS-l.m.、カシスジュース（CJ）、リゾース脛抽出生理活性物質であるR&Uの*S. Enteritidis*感染防御効果を網羅的に解析した。

カシス果汁関連物質では、CJを除いて、Th1/Th2バランスの改善、および各臓器に侵入した*S. Enteritidis*菌数の低減効果が認められた。特に、カシスポリサッカライドのなかでも低分子量の画分が、効果的な感染防御作用を示すことを証明した。また、CAPS-l.m.では好中球成熟促進作用が認められ、感染初期の生体防御に貢献しているものと考えられた。さらに、CAPSには比較的、末梢血単球、腹腔マクロファージ貪食能向上作用が認められ、高分子量のカシスポリ

サッカライド画分がこの作用をもつのではないかと推察された。

R&Uでは、桿状核好中球の増加、高い単球活性、肝臓内 *S. Enteritidis* 菌数の有意な低下、感染後の良好な増体といった結果から、主に自然免疫系の機能亢進に作用し、感染を防御するものと推察された。また、Th1/Th2 バランスの改善作用も併せもち、幅広い免疫賦活効果をもたらす物質であるといえる。

## 第3章

*Lactobacillus reuteri* および

カシスポリサッカライド併用による

*Salmonella* Enteritidis 感染防御効果の検討



## 1. 目的

これまで、第1章で確立された *S. Enteritidis* 感染モデルラットの免疫細胞動体解析法を用いて、*Lactobacillus* 属細菌、カシスポリサッカライド (CAPS)、リゾプス麴抽出生理活性物質 R&U の *S. Enteritidis* 感染防御効果を検討してきた。これらには効果の大小はあるものの、何らかの免疫賦活作用による感染防御効果が認められた。そのメカニズムは、貪食細胞の活性化、Th1 反応の誘導による適応免疫の活性化、あるいはその両者をバランス良く誘導するものと、プロバイオティクスや免疫賦活物質というカテゴリーでは分類できない、各被験菌、各被験物質レベルでの特徴を備えていた。本章では、これまでに試験したもののうち、免疫賦活の作用点が異なると考えられる *Lactobacillus* 属細菌と免疫賦活物質を組み合わせ、同時に投与することでの感染防御に対する相乗効果を目的とし、試験を行った。

本章で試験する *Lactobacillus* 属細菌と免疫賦活物質には、それぞれ最も感染防御効果の高かったものではなく、*Lactobacillus* 属細菌としては Th1/Th2 バランス改善に特化して良好な結果が得られた *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> と、免疫賦活物質としてはカシス関連物質のなかでも貪食細胞活性化能が比較的高かった CAPS を選択した。両者については、*S. Enteritidis* 臓器内侵入菌数は、感染コントロール群と比較して有意な減少は認められず、その感染防御効果は最も効果の高かった *L. rhamnosus* ATCC53103 や CAPS-1.m. と比較して中程度であった。効果が中程度の2者を混合することで、感染防御効果が増大し、これまでのどの試験群よりも高い効果を発揮するとすれば、プロバイオティクス製品として、組合せ次第で新たな特徴を打ち出すことが可能になると予測される。

## 2. 材料および方法

### 1) 実験動物

第1章2節と同様の動物を使用した。

### 2) 被検物質の調製およびその投与

被験菌として第1章2節で用いた *Lactobacillus reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、被験物質として第2章で用いた CAPS 溶液を用意した。

調整はそれぞれ前述の方法に従って行った。投与は *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> 投与菌液、および CAPS 溶液を同時に行い、それぞれの投与量、投与時間、投与回数 は前述の方法に従って行った。

### 3) *Salmonella* Enteritidis 感染モデル動物

体重測定および一般症状の観察

供試動物の剖検、採材および採血

肝臓、脾臓および MLN における臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数の測定

末梢血単球および腹腔マクロファージ貪食活性の測定

Th1/Th2 バランスの測定

白血球数測定

統計処理

以上の各項目は、第1章2節と同様の方法で行った。

## 3. 結果および考察

### 1) 体重変化

i) day-9~-1

図 20 に *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> と CAPS を 9 日間投与した際の効果を示した。これ以降、第1章の *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> 投与群、第2章の CAPS 投与群の結果も参考までに示すこととする。また、*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、CAPS 同時投与群を、CAPS + JCM1112<sup>T</sup> 群と略すことにする。

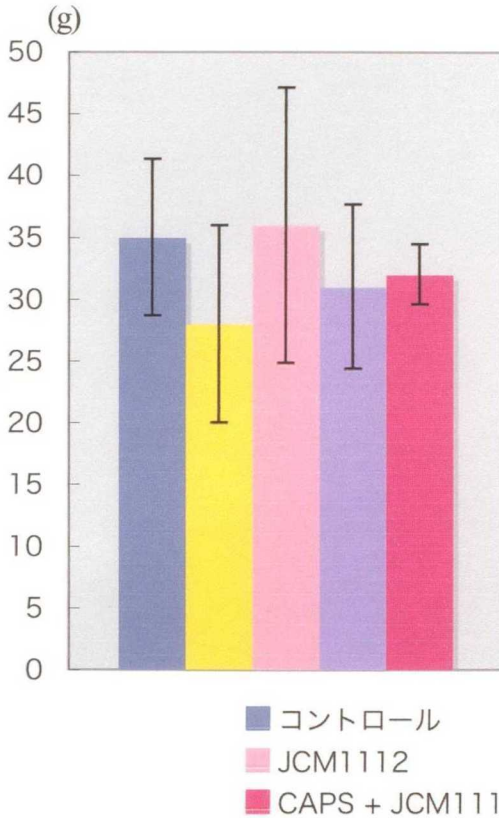


図 20. day-9~5 における増体量

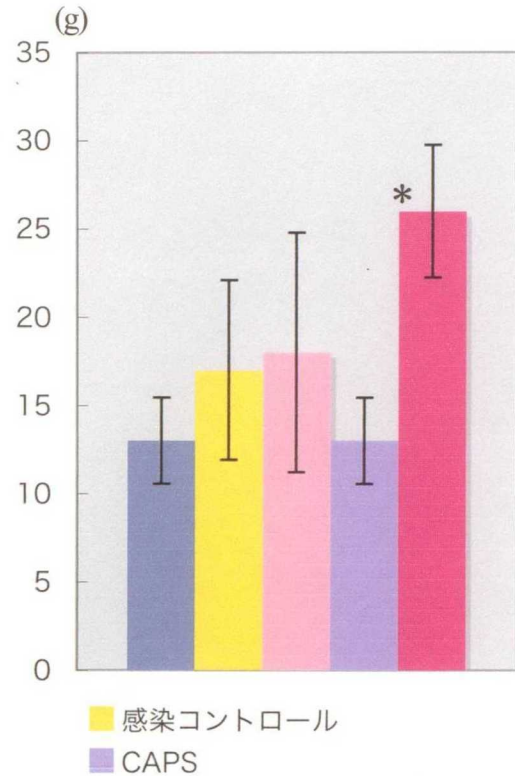


図 21. day0~5 における増体量

\* : 感染コントロール群に対して有意差あり (P<0.05, n=5)

CAPS + JCM1112<sup>T</sup>群ではコントロール群と比較して有意差は得られず、逆に体重低下などの弊害も認められなかったため、体重変化からは同時投与による生体への悪影響はないものと推察できる。

ii) day0~5

被検物質投与 10 日目の *S. Enteritidis* ( $10^9$ /rat) 投与を 0 日として、剖検までの 5 日間の増体量を図 21 に示した。

*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup>、および CAPS 投与群では、感染コントロール群に対する増体量に有意差は認められなかったが、CAPS + JCM1112<sup>T</sup>群では有意に体重が増加した。乳酸菌の産生する乳酸やポリサッカライドは、腸管の蠕動運動を亢進し、便秘などを解消するという整腸作用をもつが [61-64]、この作用により腸管内での内容物の滞留時間が短縮することで、病原微生物、有害物質の体外へ

の排除が速やかに行われる可能性も示唆される。

## 2) 肝臓、脾臓および MLN における臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数の測定

図 22 に各臓器から検出された *S. Enteritidis* 生菌数を示した。

CAPS+JCM1112<sup>T</sup>群では、MLN および肝臓内の *S. Enteritidis* 菌数が、感染コントロール群に対して有意に減少していた。本試験群は、免疫的関門となるリンパ節での 1/100 近い菌数低減、他臓器でも同レベルに抑制された菌数と、これまでにない強力な感染防御作用を示し、高い相乗効果を生み出している。これは、前章までに明らかにした両物質の免疫賦活作用と、前項でも述べた整腸作用による物理的な *S. Enteritidis* の排除が功を奏したものと考えられ、非常に優れたプロバイオティクスと免疫賦活物質の組合せであるといえる。

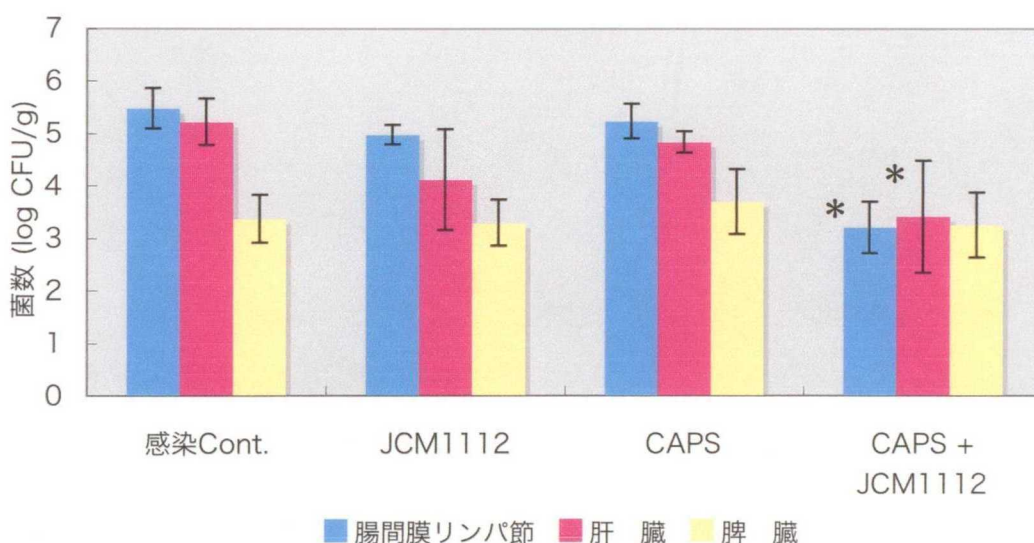


図 22. CAPS+JCM1112 群における各臓器中の *S. Enteritidis* 生菌数

\* : コントロール群に対して有意差あり (P<0.05, n=5)

## 3) 末梢血単球および腹腔マクロファージの貪食能

図 23. A に、CAPS+JCM1112<sup>T</sup>群における末梢血単球、B に腹腔マクロファージの貪食能測定結果を示した。

末梢血単球、腹腔マクロファージともに、CAPS+JCM1112<sup>T</sup>群の有意な貪食能向上作用は認められなかったが、末梢血単球で明らかな低下傾向、腹腔マ

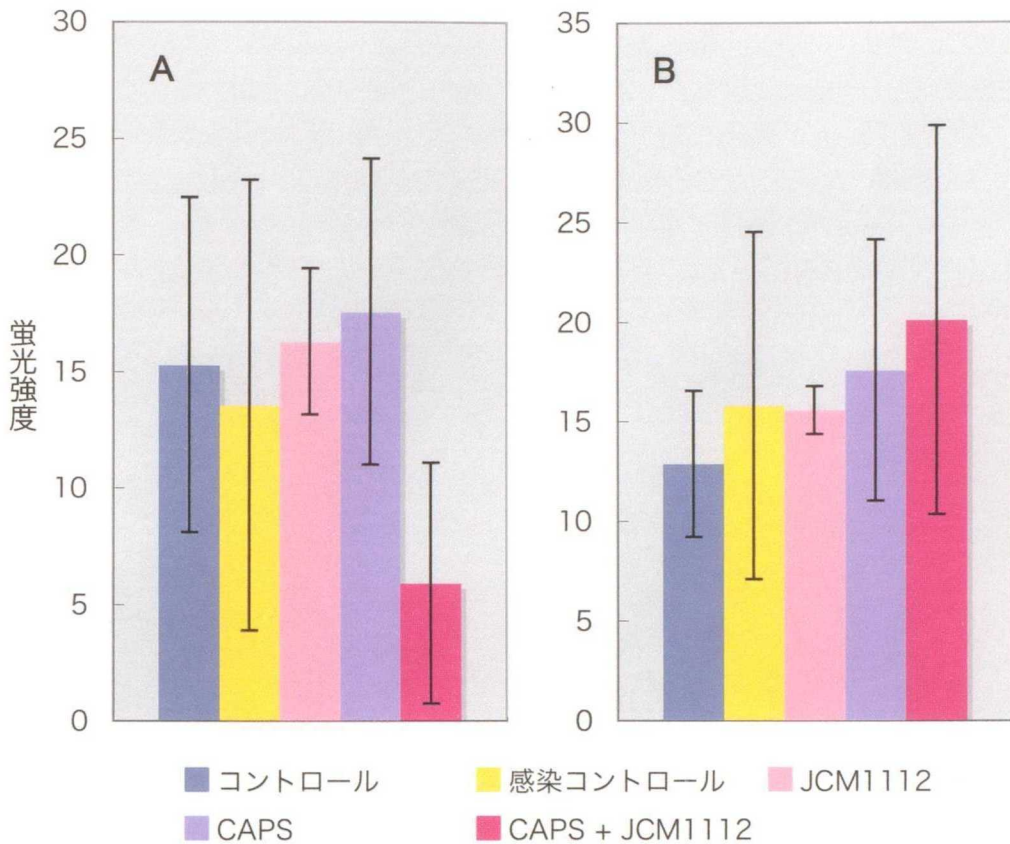


図 23. 末梢血単球(A)、腹腔マクロファージ(B)の貪食能における CAPS+JCM1112 の影響

クロファージで向上傾向がみられた。末梢血単球は感染局所に遊走することで感染初期の生体防御を担うが、本試験を行った *S. Enteritidis* 感染 5 日後は適応免疫期に当たると考えられ、この時期では逆に末梢血中から単球は減少し、新生されたばかりの活性化されていない単球が血中に出現したものと推察される。それ故、末梢血単球の貪食能は抗原刺激を受けていない低活性の状態にあり、腹腔マクロファージは感染初期からのサイトカイン刺激により活性化され、比較的高い貪食能を有していたものと考えられる。

#### 4) Th1/Th2 バランス

図 24 に、*S. Enteritidis* 感染 5 日後の各試験群におけるヘルパー T 細胞数を、表 5 にその結果に対する統計評価を示した。

CAPS+JCM1112<sup>T</sup> 群では有意な Th1、Th2 細胞の低下が認められた。Th1 細胞

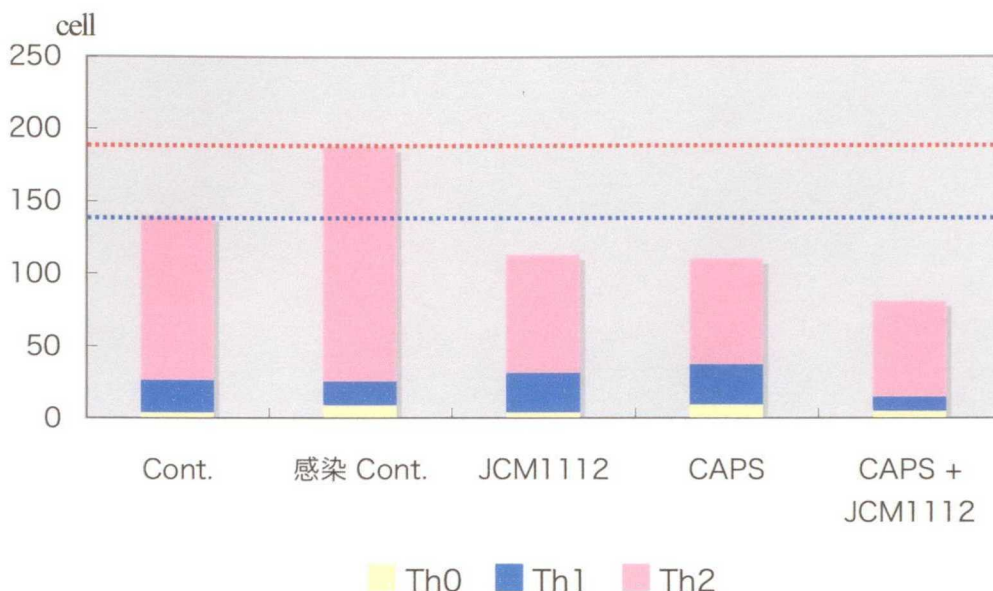


図 24. ヘルパーT 細胞数における CAPS+JCM1112<sup>T</sup>の影響

(コントロール群および感染コントロール群の値を青色破線、赤色破線でそれぞれ示した)

表 5. ヘルパーT 細胞数における CAPS+JCM1112<sup>T</sup>の影響に対する統計的評価

試験群	Th1	Th2	Th0	Total Th
<i>L. reuteri</i> JCM1112	↑	↓	→	↓
CAPS	↑	↓	→	↓
CAPS+JCM1112	↓	↓	→	↓

↑ : 細胞数増加 (有意差あり、 $p < 0.05$ )、↓ : 細胞数減少 (有意差あり、 $p < 0.05$ )  
→ : 有意差なし

は感染コントロール群よりも減少しているが、全ヘルパーT 細胞数に対する割合で比較すると、Th2 細胞の減少により Th1 細胞は 1.4 倍の増加と、コントロール群の割合にほぼ等しくなる。Th1/Th2 バランスとしては、それぞれ単独投与時と同様な傾向を示し、感染抵抗性を示していたが、臓器内 *S. Enteritidis* 菌数や貪食細胞活性化能のような相乗的効果はみられなかった。

## 5) 白血球数

表 6 に、CAPS + JCM1112<sup>T</sup>群における *S. Enteritidis* 感染 5 日後の白血球数を示した。

表 6. 白血球数における CAPS + JCM1112<sup>T</sup> の影響

試験群	総白血球	好中球	桿状核	分葉核	リンパ球	単球	好酸球
コントロール	7867	3474	157	3317	3871	340	182
感染 Cont.	10367	7000	349	6651	2864	404	69
JCM1112 <sup>T</sup>	10833	7263	292	6971	2995	433	76
CAPS-l.m.	13367	9127	418	8709	3553	591	39
CAPS+JCM1112	6700	3686	71	3616	2880	180	0

(個/ $\mu$ l)

コントロール群、感染コントロール群と比較して、CAPS + JCM1112<sup>T</sup> 群では、好中球、単球といった自然免疫を担う貪食細胞の数的な増加は認められなかった。むしろ、好中球は平常レベルに復帰しており、桿状核好中球も増加していないこと、腹腔マクロファージの高い貪食能に対して末梢血単球の貪食能および数の低下といった白血球数の変動と、MLN および肝臓内菌数のこれまでにならぬ有意な低下といった現象を総合すると、*S. Enteritidis* 感染に対する免疫反応は終息に向かいつつあると推察される。

## 6) 要約

本章では第 1 章 2 節、第 2 章に引き続き、これまでに試験したものの中で、感染防御効果が中程度で、免疫賦活の作用点が異なると考えられる *Lactobacillus* 属細菌の *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> と免疫賦活物質 CAPS を同時に投与することで、*S. Enteritidis* 感染防御に対して相乗効果を見出せないかという目的の元、試験を行った。

その結果、CAPS + JCM1112<sup>T</sup> 群では、臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数が 3 臓器全てにおいて  $10^3$  CFU/g レベルと、これまでにならぬ強力な感染防御作用を示した。また、末梢血単球および腹腔マクロファージの貪食能測定では、腹腔マクロファージでそれぞれ単独投与時よりも高い貪食能が認められた。以上の 2 点に関しては、CAPS と *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> の同時投与は、それぞれの単独投与より優れた相乗効果を得ることができた。また、Th1/Th2 バランス、白血球数の各パラ

メータは、コントロール群の値に近似しており、感染後の良好な増体といった結果からも、感染5日後ではすでに *S. Enteritidis* 感染が終息に向かいつつあると推察された。

CAPS と *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> では、その組合せにより感染防御効果が増大し、それぞれ単独よりも高い効果を発揮した。既存のプロバイオティクス製品も、本研究で示した免疫学的手法などにより、その特徴を詳細に把握して適切な組合せを検討することで、新たな特徴を打ち出すことが可能になると予測される。



# 総括

プロバイオティクスに関しては、これまでの数々の研究がなされ、腸管感染症に対する感染防御効果についても証明されてきた。近年、*in vivo* あるいは *in vitro* の実験において、病原菌の発育抑制、腸管上皮細胞への付着競合阻害といったメカニズムにより、特定の病原菌に対する感染防御に特化した乳酸菌も報告されている。

細菌などの病原微生物の侵入に対する生体の感染防御機構は、感染後数時間以内にはたらく生来備わっている自然免疫 (innate immunity) と、感染数日後からはたらく適応免疫 (adaptive immunity) に分類される。

腸内細菌のなかでも、プロバイオティクスとして利用される乳酸菌やビフィズス菌には、適応免疫のなかでも主に細胞性免疫に関与する 1 型ヘルパー T (Th1) 細胞反応の増強による Th1/Th2 バランスの改善効果が認められており、アレルギーやストレスに対する抵抗性を高めると同時に、細胞内寄生性の病原微生物感染に対しても予防的なはたらきが期待される。

本研究では、まず細胞内寄生性細菌感染症のモデルとして *Salmonella* Enteritidis 感染モデルラット [22, 23] を作出し、Th1 反応を誘導するとされている乳酸菌 (*Lactobacillus* 属細菌) [24]、および免疫賦活物質と考えられるカシス果汁由来のポリサッカライド (CAPS) とリゾープス麴抽出生理活性物質 R&U が、自然免疫や適応免疫の各ステージに与える影響を試験した。この試験によって供試菌株および各物質の免疫学的特徴を捉えることができる。これらの結果から、作用点が異なると考えられた菌株や免疫賦活物質を組合せることで、複合的な感染防御効果増強の可能性についても検討した。

*L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> 投与群では、*S. Enteritidis* 接種後の体重増加率も良く、*S. Enteritidis* 臓器侵入菌数は全項目で低下していたが、好中球数増加、単核食細胞活性化に対しての作用が弱く、有意差は得られなかった。Th1/Th2 バランス改善能は 4 被検菌中、*L. rhamnosus* ATCC53103 に次いで好成績を示した。

*L. rhamnosus* ATCC53103 投与群では、*S. Enteritidis* 臓器侵入菌数の有意な低下、単核食細胞の活性化、Th1/Th2 バランスを 4 被検菌中最も Th1 優位に改善するなど、自然免疫から適応免疫にわたって幅広く良好な結果を示し、宿主免疫能の向上に関与していた。

*L. johnsonii* LC1 投与群では、好中球数増加と末梢血単球活性化がみられたが、Th1/Th2 バランス改善効果は低い結果を示した。*L. johnsonii* LC1 は *L. rhamnosus* ATCC53103 と比較してヒト糞便中のムチンに対する付着性が高いので、付着競合阻害作用によって特定の病原菌に対する感染防御を発揮するものと考えられる。しかしながら、この場合では、腸管上皮に付着性が高いので宿主の免疫反応も高くなるとはいえ、付着性だけでこのことを言及するのは困難であると結論された。また、パイエル板などに存在する抗原提示細胞のマクロファージに異物が貪食された後の消化性、すなわち難消化性のために免疫能の亢進が維持されるという報告がある[58]。*Lactobacillus casei* Shirota 株は、一般的なグラム陽性菌溶菌酵素であるリゾチームなどで細胞壁が消化され難く、マクロファージが貪食した後でも他菌と比較して速やかに消化されずに菌体成分が残存する。そのためにマクロファージを持続的に刺激し、結果として高い免疫能の向上作用を維持すると考えられている。この現象は菌種の細胞壁組成の差異に起因し、他の *Lactobacillus* 属細菌にも当てはまる可能性は大きいと思われる。それに比べて *L. johnsonii* LC1 は、マクロファージ内において易消化性で、抗原としての刺激が持続しないことから、適応免疫の誘導能が低かったのではないかと推察された。それとは対照的に、*L. rhamnosus* ATCC53103 では腹腔マクロファージ活性化や Th1 反応の誘導について好成績を示したのは、同菌種の *L. rhamnosus* MA27/6B においてリゾチームに対する抵抗性があると報告されているので[59]、Shirota 株同様に難消化性である可能性が示唆される。

*L. plantarum* MCRI164 は、上記 3 被験菌と比較して特徴的な作用は見受けられ

なかったが、Th1 反応の増強作用は認められた。

上記 *Lactobacillus* 属細菌の *Salmonella* Enteritidis 感染モデルラットへの投与は、好中球、単球、マクロファージなどによる自然免疫の活性化から、Th1/Th2 バランスの改善まで広範囲にわたって *S. Enteritidis* 感染を防御する傾向がみられた。その作用は、菌株による効果の差も大きいですが、薬剤などにみられる局所的な効果ではなく、病的状態を健常範囲内に復帰させる、すなわちホメオスタシスの維持に効果的であることが推察された。したがって、上記効果の認められたプロバイオティクスを長期に渡って摂取することは、日常的に受ける軽微なストレスによる Th2 偏向や病原菌の侵入を事前に防御し、生体の健康を維持するものと考えられる。

カシス果汁関連物質では、カシスポリサッカライド (CAPS)、およびその低分子量ポリサッカライド画分 CAPS-l.m.において、Th1/Th2 バランスの改善、および各臓器に侵入した *S. Enteritidis* 菌数の低減効果が認められた。特に、CAPS-l.m.では感染防御作用が強く、好中球新生促進作用が認められ、感染初期の生体防御に貢献しているものと考えられた。一方、CAPS では比較的、末梢血単球、腹腔マクロファージ貪食能向上作用が認められ、高分子量のカシスポリサッカライド画分がこの作用を示すと推察された。

リゾープス麴抽出生理活性物質 R&U では、桿状核好中球の増加、高い単球活性、肝臓内 *S. Enteritidis* 菌数の有意な低下、感染後の良好な増体などの事象から、主に自然免疫に作用し、感染を防御するものと推察された。また、Th1/Th2 バランスの改善作用も併せもち、幅広い免疫賦活効果をもたらす物質であるといえる。

上記の結果に基づき、免疫賦活の作用点が異なる乳酸菌と物質を同時に投与することで、*S. Enteritidis* 感染防御に対する相乗効果の有無を調べた。その対象には、両者とも、*S. Enteritidis* 臓器内侵入菌数に有意な減少が認められず、その

感染防御効果を供試した9被検物質中で順位付けすると、多くの項目でほぼ中間の順位を示したものを選択した。すなわち、*Lactobacillus* 属細菌として Th1/Th2 バランス改善に良好な結果が得られた *L. reuteri* JCM1112 と、貪食細胞活性化能が比較的高かった CAPS との組合せを選んだ。

その結果、CAPS と JCM1112<sup>T</sup> 投与群では、侵入した *S. Enteritidis* 菌数が3臓器すべてにおいて 10<sup>3</sup>CFU/g レベルと、本研究では最も強力な感染防御作用を示した。また、末梢血単球および腹腔マクロファージの貪食能測定では、腹腔マクロファージでそれぞれ単独投与時よりも高い貪食能が認められた。以上の2点に関しては、CAPS と *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> の同時投与は、それぞれの単独投与と比べ優れた相乗効果を得ることができた。また、Th1/Th2 バランスと白血球数の各パラメータは、コントロール群の値に近似しており、感染後の良好な増体の結果からも、感染5日後ではすでに *S. Enteritidis* 感染が終息に向かいつつあったと推察される。

以上、本研究では、*S. Enteritidis* 感染モデルラットにおける Th1/Th2 細胞測定、マクロファージなど貪食細胞の貪食活性、白血球系の細胞数など免疫細胞の動態解析、および *S. Enteritidis* 感染状態の指標であるラット臓器への侵入菌数など6項目を指標に、*Lactobacillus* 属細菌、およびカシス果汁ポリサッカライド (CAPS)、リゾープス麴抽出生理活性物質 R&U の感染防御効果を網羅的に解析した。試験した *Lactobacillus* 属細菌は、主に Th1 優位の免疫誘導能と貪食細胞の活性化を示し、*L. rhamnosus* ATCC53103 において最も高い感染防御効果を示した。*Lactobacillus paracasei* では菌株の違いにより、2型のヘルパーT細胞を活性化する場合もあることから[60]、プロバイオティクスの免疫誘導能は、菌種によって一概に特徴づけられるものではなく、菌株レベルで特性を判断する必要があると考えられる。

カシスポリサッカライドでは、低分子量の画分である CAPS-l.m.が、好中球新生促進作用と Th1 反応の増強による感染防御作用を示すことを証明した。高分子量と低分子量の両画分を含む CAPS では、比較的、末梢血単球、腹腔マクロファージ貪食能の向上作用が認められたことから、この作用は高分子量画分によるものと推察された。

さらに、CAPS と *L. reuteri* JCM1112<sup>T</sup> の同時投与の試験から、免疫担当細胞に対する作用点異なる組合せは、感染防御効果を増大させ、それぞれ単独よりも高い効果を発揮することを示したことも新しい知見である。既存のプロバイオティクス製品も、本研究で示した免疫学的手法を駆使し、その特徴を詳細に把握して適切な物質の組合せを検討することで、高い効果を生み出し、新たな特徴を打ち出すことが可能になると考えられる。

また、R&U では、白血球貪食能の向上および低下防止など、免疫担当細胞に対する効果が *in vitro* の実験系で証明されているが、本研究では、*in vivo* の実験系において初めて、末梢血単球貪食能向上作用および Th1 反応増強作用を認めた。

## 謝 辞

本研究の実施および論文作成にあたり、坂田亮一教授と森田英利助教授より御助力と御指導を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。学位審査の副査をお引き受け頂きました基礎教育研究室生物学の福岡秀雄教授、衛生学第二研究室の福安嗣昭教授ならびに内科学第二研究室の山田隆紹教授におかれましては大変お忙しい中、有益なご指導、ご助言を頂き、深く感謝申し上げます。公衆衛生学第二研究室の加藤行男教授におかれましては、*S. Enteritidis* s381 株を分譲頂き、深く感謝申し上げます。微生物学第二研究室の池田輝雄助教授におかれましては、貪食細胞の活性測定法についてご指導頂き、深く感謝申し上げます。環境病理学研究室の岸川正剛助教授におかれましては、大変お忙しい中、血球数計測方法についてご指導頂き、深く感謝申し上げます。

また、札幌医科大学医学部病理学第一講座の鳥越俊彦助教授、佐原弘益助手、近藤雅子研究員、下澤久美子研究員、分子機能解析部門の小海康夫教授におかれましては、フローサイトメーターでのヘルパーT細胞測定について技術指導を頂き、深く感謝申し上げます。

静岡県立大学薬学部産業衛生学教室の高木邦明助教授におかれましては、ヘルパーT細胞の測定方法の選定にご助言頂き、深く感謝申し上げます。

(株)メルシャン 酒類研究所の矢内隆章氏、山本玲子女史、高田良二氏、ならびに(株)牛越生理学研究所の牛越設男先生におかれましては、実験サンプルおよび資料を提供頂き、深く感謝申し上げます。

本研究室の大学院生の多大なる御指導と四年生の御協力に心より感謝いたします。特に本学大学院を修了された山崎薫さんと堀川洋さんには、大変お忙しい中、実験をお手伝い頂き、感謝申し上げます。

最後に、実験をともに行い日々手助けを頂いた妻 久留実、研究実施なら  
びに学生生活を見守り、経済的にも支えて頂いた祖父母と両親に心より感  
謝申し上げます。



## 参 考 文 献

- [1] 光岡知足. 21世紀腸内フローラ研究の新しい動向. 学会出版センター. 東京. 2002
- [2] Fuller R., Probiotics in human medicine. *Gut*. **32**: 439-442. 1991.
- [3] Sakamoto I., Igarashi M., Kimura K., Takagi A., Miwa T., Koga Y., Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J. Antimicrob. Chemother.* **47** : 709-710. 2001.
- [4] Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R., Servin, A. L., *Lactobacillus acidophilus* La1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. **35**:483-489. 1994.
- [5] Brassart D., Neeser J.R., Michetti P., et al. Adhesion of human lactobacilli to human intestinal cell lines Caco-2 and HT-29 and their protective effect toward adherent and / or Invasive gastro-intestinal pathogens. *52eme Assemblee Annuelle de la Socit Suisse de Microbiologie*. Montreux, 1993.
- [6] Brassart D., Neeser J.R., Michetti P., et al., Adhesion of dairy lactobacilli and *bifidobacteria* to the human differentiated enterocytic cell lines HT-29 and Caco-2 and protection against gastrointestinal pathogens. *1st World Congress of Dairy Products in Human Health and Nutrition*. Madrid, 1993.
- [7] Bernet-Carnard M.F., Lievin V., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L., and Hudault S., The human *Lactobacillus acidophilus* strain La1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 2747-2753. 1997.
- [8] Fourniat J., Colomban C., Linxe C., Karam D., Heat-killed *Lactobacillus acidophilus* inhibits adhesion of *Escherichia coli* B41 to HeLa cells. *Ann.Rech.Vet.* **23** : 361-370. 1992.

- [9] **Zlotnik A., Yoshie A.**, A new classification system and their role in immunity. *Immunity*. **12** : 121-127. 2000.
- [10] **Yang D., Chertov O., Bykovskaia S.N., Chen Q., Buffo M.J., Shogan J., Anderson M., Schroder J.M., Wang J.M., Howard O.M., Oppenheim J.J.** Beta-defensins : Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. **286** : 525-528. 1999.
- [12] **O'Garra A.** Cytokine induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. **8** : 275-283. 1998.
- [13] **Taki, S., Sato, T., Ogasawara, K., Fukuda, T., Sato, M., Hida, S., Suzuki, G., Mitsuyama, M., Shin, E.-H., Kojima, S., Taniguchi, T. and Asano, Y.** Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity*, **6** : 673-679. 1997.
- [14] **Abbas A. K., Murphy K.M., Sher A.** Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. **383** : 787-793. 1996.
- [15] **Mosmann T. R.** T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **664** : 89-92. 1992.
- [16] **Salgame P. Abrams J.S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R.L., Bloom B.R.** Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. **254** : 279-282. 1991.
- [17] **Fujiwara D., Inoue S., Wakabayashi H., Fujii T.** The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **135** : 205-215. 2004.
- [18] **藤原茂**, *Lactobacillus acidophilus* L-92 株による腸内細菌叢構成の変化と抗アレルギー作用. *Med. Sci. Digest*. **29** : 34-37. 2003.

- [19] **Ishida Y., Bandou I., Kanzato H., Yamamoto N.** Decrease in ovalbumin specific IgE of mice serum after oral uptake of lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** : 951-957. 2003.
- [20] **Oyama N., Sudo N., Sogawa H., Kubo C.** Antibiotic use during infancy promotes a shift in the T(H)1/T(H)2 balance toward T(H)2-dominant immunity in mice. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **107**: 153-159. 2001.
- [21] **Sudo N., Chida Y., Aiba Y., Sonoda J., Oyama N., Yu X.N., Kubo C., Koga Y.** Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.* **558** : 263-275. 2004.
- [22] **Islam A.F., Moss N.D., Dai Y., Smith M.S., Collins A.M., Jackson G.D.** Lipopolysaccharide -induced biliary factors enhance invasion of Salmonella enteritidis in a rat model. *Infect Immun.* **68** :1-5. 2000.
- [23] **Havelaar A.H., Garssen J., Takumi K., Koedam M.A., Dufrenne J.B., van Leusden F.M., de La Fonteyne L., Bousema J.T., Vos J.G.** A rat model for dose-response relationships of Salmonella Enteritidis infection. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 442-452. 2001.
- [24] **松崎健.** 乳酸菌と Th1/Th2 バランス. *細胞* **30** : 362-366. 1998.
- [25] 厚生労働省ホームページ: 食中毒・食品監視関連情報.  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/>
- [26] **Talarico T.L., Casas I.A., Chung T.C., Dobrogosz W.J.** Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**:1854-1858. 1988.
- [27] **Toba T., Samant SK., Yoshioka E., Itoh T.** Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Lett. Apple. Microbiol.* **13** : 281-286. 1991.

- [28] Ganzle M.G., Holtzel A., Walter J., Jung G., Hammes W.P., Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4325-4333. 2000.
- [29] van Hijum S.A., van Geel-Schutten G.H., Rahaoui H., van der Maarel M.J., Dijkhuizen L. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4390-4398. 2002.
- [30] Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanaukee P., and Koivula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatrics.* **88**: 90-97. 1991.
- [31] Richard G.B., Sherwood L.G., Barry R.G., Te-Wen Chang, Barbara E.L., William B.G., John G.B., Treatment of Relapsing, *Clostridium deificile* Diarrhea with *Lactobacillus* GG. *Nur.* **31**:35s-38s. 1996.
- [32] Goldin B.R., Gorbach S.L., Saxelin M., Barakat S., Gualtieri L., Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* **37**: 121-128.1992.
- [33] 細田正孝, 何方, 平松優, 橋本英夫, 辨野義己. *Lactobacillus* GG 株のヒト糞便内菌叢および便性改善に及ぼす影響. *ビフィズス*. **8** : 21-28.1994.
- [34] Ling W.H., Korpela R., Mykkanen , H., Salminen S., Hanninen O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr.* **124**: 18-23. 1994.
- [35] 水谷潤. プロバイオティクスの機能と広がる応用範囲 *Lactobacillus acidophilus*L-92 株の機能性と製品への応用. *食品工業* **46** : 44-51. 2003.

- [36] **Hosoda M., Hashimoto H., He F., Morita H., Hosono A.** Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine. *J. Dairy Sci.* **79**:745-749. 1996.
- [37] **Kos B., Suskovic J., Vukovic S., Simpraga M., Frece J., Matosic S.** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiology.* **94** : 981-987. 2003.
- [38] **Link-Amster H., Rochat F., Saudan K.Y., Mignot O., Aeschlimann J.M.** Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Micro.* **10**:55-64. 1994.
- [39] **Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J.M., Donnet-Hughes A.** Immunomodulation of human blood cells following ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **78**:491-497. 1995.
- [40] **Czerkinsky C., Rees A.S., Bergmeier L.A., Challacombe S.J.** The detection and specificity of class specific antibodies to whole bacterial cells using a solid phase radioimmunoassay. *Clin Exp Immunol.* **53**:192-200. 1983.
- [41] **Okamoto Y., Abe T., Niwa T., Mizuhashi S., Nishida M.** Development of a dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1- and T helper type 2-cells. *Immunopharmacology.* **39**:107-116. 1998.
- [42] **東尚子, 土谷健, 二瓶宏, 安藤稔, 秋葉隆血.** 液透析患者における helperT 細胞サブセットの解析. *日本透析医学会雑誌.* **35** : 1549-1555. 2002.
- [43] **Cousins D.J., Lee T.H., Staynov D.Z.** Cytokine Coexpression During Human Th1/Th2 Cell Differentiation: Direct Evidence for Coordinated Expression of Th2 Cytokines. *J. Immunol.* **169** : 2498-2506. 2002.

- [44] **Andolph D.A., Carruthers C.J.L., Szabo S.J., Murphy K.M., Chaplin D.D.** Modulation of Airway Inflammation by Passive Transfer of Allergen-Specific Th1 and Th2 Cells in a Mouse Model of Asthma. *J. Immunol.* **62**: 2375-2383. 1999.
- [45] **渋谷和子.** フローサイトメトリー自由自在(9) 細胞内サイトカインの検出. 秀潤社. 東京. 1999.
- [46] **ベックマン・コールター(株).** 最新フローサイトメトリー入門. サイトメトリー&セルアナリシスカタログ2002/2003, 317-337.
- [47] **佐藤勝輝, 辻本京子, 多田隈卓史.** アポトーシスに関する新知見 グルココルチコイド誘導性アポトーシスの分子機構. *臨床免疫* **42**: 325-331. 2004.
- [48] **安保徹.** 白血球分画が皮膚の健康状態と関連するメカニズム. *コスメトロジー研究振興財団研究報告* **9** 2001.
- [49] **細川友秀.** Th1/Th2 バランスに影響する内外要因 ノルアドレナリン・副腎皮質ステロイドと Th1/Th2 バランス. *臨床免疫* **34**: 742-746. 2000.
- [50] **Timmerman H.M., Beynen A.C., Koning C.J.M., Mulder L., Rombouts F.M.** Monostrain, multistrain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food. Microbiol.* **96**: 219-233. 2004.
- [51] **Casas I.A., Dobrogsz W.J.** Validation of the probiotic concept : *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb. Ecol. Health. Dis.*, **12**: 247-285. 2000.
- [52] **松崎健,** プロバイオティクスの機能と作用 免疫調節 (バランス) とプロバイオティクス. *医学のあゆみ* **207**: 823-827. 2003.
- [53] **Yang D., Chertov O., Bykovskaia S.N., Chen Q., Buffo M.J., Shogan J., Anderson M., Schroder J.M., Wang J.M., Howard O.M., Oppenheim J.J.** Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. **286**:525-528. 1999.

- [54] Ohteki T., Fukao T., Suzue K., Maki C., Ito M., Nakamura M., Koyasu S. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **189**:1981-1986. 1999.
- [55] Fukao T., Matsuda S., Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol.* **164**:64-71. 2000.
- [56] Fukao T., Koyasu S. Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **30**:1453-7. 2000.
- [57] 高田英俊, 水野由美, 野村明彦, Jin S., 服部浩佳, 井原健二, 原寿郎, 青木知信, 江口克彦. サルモネラ感染症患者における IFN- $\gamma$  産生機構の解析. 血液系疾患調査研究班原発性免疫不全症候群分科会 平成11年度研究業績報告書 12-17. 2000.
- [58] 志田寛, 南野昌信. *Lactobacillus* 属乳酸菌の IL-12 誘導活性: IL-12 誘導における菌体細胞壁構造の重要性. 日本免疫学会総会学術集会記録 **34**: 63. 2004.
- [59] Bernardeau M., Vernoux J. P., Gueguen M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. *Milchwissenschaft.* **56**: 663-667. 2001.
- [60] 井上小夜, 藤井敏雄, 藤原大介, 西田聡. アレルギー効果のある乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* KW3110株の選抜. 日本農芸化学会大会講演要旨集2003. 74. 2003.
- [61] 松生恒夫, 鈴木康元, 野沢博, 井上冬彦, 西野晴夫, 渡辺豊. Medical Graph 316 便秘症の問題点とポリデキストロースの応用. 大塚薬報 **585**: 41-46. 2003.
- [62] 中尾誠, 小島康生, 小倉庸蔵, 鍋島俊隆, 佐竹昭介, 井口昭久, 高木健次. 高齢患者における経腸栄養施行中の下痢に対する可溶性食物繊維の有用性. 静脈・経腸栄養 **18**: 53-57. 2003.
- [63] 前田浩明, 朱霞, 鈴木志保, 北村進一. *Lactobacillus kefirianofaciens* が生産する細胞外多糖の構造と生理作用. 日本農芸化学会大会講演要旨集 2002. 238. 2002.

[64] **Rašić J. Lj., Kurmann J.A.** Yoghurt, Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations. 曾根敏磨監訳. 86. 実業図書. 東京. 1986.