

氏名(本籍)	鈴木 武人(静岡県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第23号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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 —サルモネラ感染症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—
論文審査委員	(主査) 坂田 亮一 (副査) 山田 隆紹 福安 嗣昭 福岡 秀雄 森田 英利

論文内容の要旨

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)、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^T 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参与していた。

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、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-I.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-I.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、多くの項目では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^T投与群では、侵入した *S. Enteritidis* 菌数が3臓器すべてにおいて10³CFU/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^T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、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^Tの同時投与の試験から、免疫担当細胞に対する作用点が異なる

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。

論文審査の結果の要旨

本研究では、プロバイオティクスおよび各種物質の免疫賦活効果を評価するために、典型的な細胞内寄生性細菌感染症を示す *Salmonella Enteritidis* 感染モデルラットの白血球動態を指標とし、その防御機構を検討した。適応免疫の中でも主に細胞性免疫に関与する白血球中の1型ヘルパーT (Th1) 細胞反応を誘導するとされている乳酸菌 (*Lactobacillus* 属細菌)、および免疫賦活物質と期待されるカシス果汁由来のポリサッカライドとリゾプス麴抽出生理活性物質が、自然免疫や適応免疫の各ステージに与える影響を調べた。また、供試菌株および各物質の免疫学的特徴を捉えると共に、本試験の結果、作用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、感染防御に対する相乗効果を生み出す可能性についても試験を行った。各章での得られた結果は、以下のようにまとめられる。

1. *Lactobacillus* 属細菌による *Salmonella Enteritidis* 感染防御効果の検討

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被検菌中で最も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、バランスよく宿主免疫能の向上に関与していた。

L. reuteri JCM1112^T 投与群では、好中球数増加、*S. Enteritidis* 接種後の体重増加もみられ、*S. Enteritidis* 臓器侵入菌数は全項目で低下した。しかし、単核食細胞活性化に対しての作用が弱いという結果が得られた。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. 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であった。*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思われる。*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している。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反応が好成績であったのは、同菌種の *L. rhamnosus* MA27/6B、および *Lactobacillus casei* Shirota 株が、溶菌酵素であるリゾチームに対して抵抗性があるという報告から、おそらくマクロファージ内で難消化性であるためと推察された。

L. plantarum MCRI164 は、上記3被験菌と比較して特徴的な作用はみられなかったが、Th1 反応増強作用を認めている。

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と推察している。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わたって摂取することによって、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。

2. カシス果汁関連物質およびリゾープス麴抽出生理活性物質による *S. Enteritidis* 感染防御効果の検討

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関与しているものと推定している。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考察された。

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結果から、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持ち、幅広い免疫賦活効果をもたらす物質であるといえる。

3. *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

上記の結果に基づき、免疫賦活の作用効果が異なる乳酸菌と他の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、その感染防御効果について供試した9被験物質中で順位付けを行うと、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^T 投与群では、侵入した *S. Enteritidis* 菌数が3臓器すべてにおいて 10^3 CFU/g レベルと、本実験では最も強力な感染防御作用を示した。感染コントロール群の各臓器侵入 *S. Enteritidis* 菌数は、MLN: $10^{5.5}$ CFU/g、肝臓: $10^{5.2}$ CFU/g、脾臓: $10^{3.4}$ CFU/g であった。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^T の同時投与により、そ

それぞれの単独投与と比べ優れた相乗効果を示す結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ーは、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* 感染から回復しつつあると推察された。

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、リゾース麴抽出生理活性物質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 は最も高い感染防御効果を示した。

またカシスポリサッカライドでは、低分子量画分である 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。また、リゾース麴抽出生理活性物質では特に、高い単球活性と肝臓内 *S. Enteritidis* 菌数の有意な低下を示し、Th1/Th2 バランスの改善作用も併せ持ち、幅広い免疫賦活効果をもたらすことが認められた。本研究は *in vivo* で本物質の感染防御効果を示した初めての報告である。

さらに新しい知見として、CAPS と *L. reuteri* JCM1112T の同時投与の試験から、免疫賦活作用の異なる組合せによって感染防御作用が増強し、それぞれ単独よりも高い効果を発揮することを示した。

本研究では、免疫学的手法により既存の食品およびその原材料の免疫賦活効果を評価した。その免疫賦活の作用を詳細に把握し適切な物質の組合せを検討することで、高い免疫賦活効果を生み出し、新規なプロバイオティクス製品の効果を明確にすることが可能になると考えられる。本研究の成果は、プロバイオティクス製品開発の基礎研究、ならびにヒトの健康維持への食品の果たすメカニズム解明の面から、動物応用科学上の意義も大きく、博士（学術）の学位を授与するにふさわしい業績と判定する。