

論文の内容の要旨

論文題目 : アレルギー改善効果を有する乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2809
の研究

氏 名 : 池 上 秀 二

近年、アレルギー疾患の罹患者数は、増加の一途をたどっており、特に、スギ花粉症 (Japanese cedar pollinosis) は、くしゃみや鼻水、鼻づまり、眼のかゆみ、流涙などの諸症状を引き起こし、罹患者の QOL (Quality of life) を著しく低下させる。スギ花粉症の罹患者数も年々増加しており、日本人の約 20%が罹患しているという報告がある。花粉症の治療は、抗ヒスタミン薬やステロイドを中心とした薬物療法が主流であるが、いずれも対症療法で根本的な治癒をもたらすものではなく、こうした薬剤の副作用も問題となっている。減感作療法や舌下免疫療法などの新しい治療法も開発され、臨床での応用が試みられているが、著しい治療効果は得られていないのが現状である。一方で、乳酸菌などのプロバイオティクスが、様々な保健効果を持つことが報告され、特に、アトピー性皮膚炎をはじめとしたアレルギー疾患の予防、改善に有効とする臨床試験結果が相次いで報告されている。

そのような中、アレルギー疾患が先進国で特に増加している原因を説明する説として「衛生仮説」が提唱された。これは、「衛生環境の改善による感染症リスクの低下がアレルギー疾患の増加をもたらす」というものである。通常、新生児の免疫系は Th2 側に傾いているが、出生後、様々な微生物やウイルス、腸内細菌から刺激を受けて、Th1 細胞が次第に発達し、Th1/Th2 のバランスがとれた免疫系が完成する。しかし、近年の衛生環境の改善により、微生物等への暴露が不十分となり、Th1 の発達が起こらず、アレルギー

一疾患を発症しやすい Th2 優位の状態が続くという説である。一方で、免疫システムの自然免疫を担う樹状細胞やマクロファージなどは、微生物やウイルスなどをパターン認識する受容体である Toll 様受容体 (TLR) を発現しており、この受容体を介したシグナルがサイトカインの産生を促し、Th1 細胞の分化を誘導する。さらに、乳酸菌などのグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポテイコ酸は TLR2 によって認識され、樹状細胞やマクロファージからナイーブ T 細胞を Th1 細胞へと分化誘導するサイトカインである IL-12(p70)を産生することが明らかとなった。

これらの背景を総合的に考察して、本研究では、安全性の高い腸内共生菌である乳酸菌の中から、アレルギー疾患の改善作用が高い菌株を選抜し、その活性発現に最適の培養条件を検討して、スギ花粉症に近いアレルギー動物モデルでの評価を行った。さらに、ヒトでの効果を確認するため、臨床試験を実施し、実用化に向けた評価を行った。

第二章では、まず、*in vitro* においてマウス由来脾細胞からの IL-12 (p70)産生誘導刺激活性が高く、Th1/Th2 バランス改善効果の高い株として *Lactobacillus gasseri* や *Lactobacillus plantarum* などの 4 株を選抜した。この評価において、菌体の IL-12(p70)産生誘導刺激活性の強さは、菌種依存的ではなく菌株依存的であることが明らかになった。さらに、これらの株の加熱死菌体をオボアルブミン (OVA) で免疫したアレルギーモデルマウスに経口投与したところ、*L. gasseri* OLL2809 投与群に有意な抗原特異的 IgE 抑制効果が認められた。また、*L. gasseri* OLL2809 投与群から調製した脾細胞および腸間膜リンパ節細胞を *ex vivo* で培養したところ、脾細胞における IL-12 (p70)産生量の増加、脾細胞および腸間膜リンパ節細胞における IL-4 産生量の抑制が認められた。以上の結果から、アレルギー改善効果の高いプロバイオティクス乳酸菌として、*L. gasseri* OLL2809 株を選抜した。この IL-12(p70)産生誘導刺激活性は、乳酸菌体を N-アセチルムラミダーゼで処理することによって抑制されること、菌体に含まれるペプチドグリカン(PGN)量と正の相関を示すことから、活性発現を担う一つの菌体成分として、細胞壁に含まれるペプチドグリカンの関与が明らかになった。

第三章では、*L. gasseri* OLL2809 の生育条件が IL-12(p70)産生誘導刺激活性に与える影響について検討した。*L. gasseri* OLL2809 を培養時間、培地の種類、培養 pH を変えた様々な培養条件で培養し、IL-12(p70)産生誘導刺激活性を測定した。その結果、IL-12(p70)産生誘導刺激活性は、(1) 菌の生育に従って上昇し、対数増殖期の菌体よりも定常期の菌体の方が高く、(2) 酸性 pH で生育した菌体の方が高く (3) 非加熱、中性域の pH バッファー処理で低下すること、が明らかになった。この結果は、IL-12(p70)産生誘導刺激活性が培養液 pH によって影響されることを示唆しており、加えて、様々な生育条件下における *L. gasseri* OLL2809 の IL-12(p70)産生誘導刺激活性の変化が菌体の自己融解の性状と一致していることを示している。従って、IL-12(p70)産生誘導刺激活性を発現するには完全な構造の菌体が必要と考えられ、菌固有に存在する自己融解酵素の働きを酸性 pH や加熱処理で阻害することにより、刺激活性の維持に寄与するこ

とが推察された。

第四章では、*L. gasseri* OLL2809 の加熱死菌体をスギ花粉抗原感作マウスに経口投与することで好酸球の局所への集積が抑制されるか検証した。スギ花粉抽出抗原で BALB/c マウスを感作し、腹腔内に同抽出抗原を投与することで、腹腔内への好酸球の集積・増多を惹起した。このマウスに、加熱殺菌処理した *L. gasseri* OLL2809 を実験期間の 21 日間経口投与した。抗原惹起 24 時間後、腹腔洗浄液中の好酸球数、サイトカイン濃度、血清中の抗原特異的 IgG 濃度を測定した。その結果、*L. gasseri* OLL2809 投与群において、好酸球比率が有意に抑制されており、特に、*L. gasseri* OLL2809 2mg/day 投与群において、好酸球数が有意に抑制され、好酸球抑制率も 44% と有意であった。また、血清中の IgG2a/IgG1 比は、*L. gasseri* OLL2809 2mg 投与群で対照群と比較して有意に上昇した。さらに、*L. gasseri* OLL2809 投与群において、腹腔洗浄液中の IL-2 の増加と GM-CSF の減少が見られた。これらのことから、加熱殺菌処理した *L. gasseri* OLL2809 の経口投与により、Th1/Th2 バランスの修飾作用を介して、好酸球の集積・増多を抑制したことが推察された。

第五章では、加熱殺菌処理した *L. gasseri* OLL2809 菌末を用いて、100 名規模のプラセボ対照無作為化二重盲検試験を実施し、スギ花粉症の諸症状改善効果を検証した。被験物は加熱殺菌処理した *L. gasseri* OLL2809 の凍結乾燥菌体を 100 mg/day の量で、2 月上旬から 8 週間、スギ花粉飛散時期に摂取させた。被験者全体で解析を実施した結果、*L. gasseri* OLL2809 の摂取による明確なスギ花粉症症状改善効果は認められなかった。そこで、CAP RAST スコア（スギ花粉抗原特異的 IgE レベル）4~5 の被験者について、層別解析を行ったところ、*L. gasseri* OLL2809 群において、医師による鼻腔内所見、アレルギー日記による鼻症状・薬剤スコア、日本アレルギー性鼻炎標準 QOL 調査票 (JRQLQ) による鼻症状の改善が見られ、スギ花粉抗原特異的 IgE レベル、好酸球数、Th1/Th2 細胞比などのアレルギー関連指標も改善されていた。*L. gasseri* OLL2809 の摂取によって、免疫系の調節を介して、アレルギー素因の高い人に対して、スギ花粉症症状の改善効果をもたらすことが明らかとなった。

以上のように、アレルギー疾患の改善を目的として、効果が最も期待される乳酸菌を選抜し、高い免疫刺激活性を保持する乳酸菌の培養条件の検討、アレルギーモデル動物での評価、臨床試験での評価まで一貫した研究を実施した。結果として、Th1/Th2 パラダイムを基本とした理論に基づき、選抜した乳酸菌によって、スギ花粉症に対して一定の効果を得ることができた。しかし、最近の研究では、免疫系は Th1、Th2 だけでなく、その制御に制御性 T 細胞 (Treg) も深く関わっていることが明らかになり、*L. gasseri* OLL2809 の作用メカニズムについても、こうした免疫細胞の関与も視野に入れて研究を進める必要がある。また、こうした乳酸菌の効果をもたらす活性が培養条件によって、大きく影響されることが明らかになり、より効果の高いプロバイオティクスを提供するには、生産条件にも配慮する必要がある。スギ花粉症に対する臨床試験においては、ス

ギ花粉抗原特異的 IgE が比較的高い人に対する効果が明らかとなった。これは、動物実験においても、抗原感作されたマウスに対しては強い Th1 への誘導作用が見られるものの、非感作の正常マウスでは、この作用は全く見られないことから、Th2 に極端に傾いた状態にのみ作用することが示唆される。したがって、スギ花粉症においても、スギ花粉抗原特異的 IgE が高い十分に感作された人に効果が現れた可能性がある。免疫刺激活性の高い *L. gasseri* OLL2809 を、スギ花粉症をはじめとしたアレルギー疾患を有する人に提供することで、その症状や QOL の改善に少なからず貢献できるものと考えられる。