

論文の内容の要旨

論文題目 ビフィズス菌の整腸作用を介した免疫調節作用に関する研究
氏名 小田巻俊孝

日本におけるアレルギー性疾患の有病率はおよそ 38%であり、最も頻度の高い生活習慣関連病と認識されている。特にスギ花粉症は IgE が関与する I 型アレルギーで、日本人の約 20% が罹患する深刻な国民病となりつつある。様々な要因が複合的にアレルギー発症を引き起こすと考えられるが、その増加原因のひとつとして、1989 年にイギリスの Strachan 博士によって提唱された衛生仮説が挙げられる。これは過度の衛生状態で育った子どもたちは、微生物による刺激を十分に受けていないため、免疫系が正常に発達せずにアレルギーを発症する、という説である。最近では、抗生物質の使用や食生活の変化に伴い腸内細菌叢が攪乱され、正常な免疫寛容が行われなくなるという「腸内細菌叢仮説」も提唱され、腸内細菌叢とアレルギー疾患との関連性が示唆されている。これらの仮説に基づき、世界各国でプロバイオティクス投与によるアレルギーの予防および治療が試みられている。被験者、投与時期、投与菌株等の違いにより、結果に差があるものの、総じてプロバイオティクスの摂取はアレルギーを予防もしくは症状を緩和する作用があると考えられている。

我々は、プロバイオティクスとして多くの生理調節機能を有することが解明されている *Bifidobacterium longum* BB536 株 (以下 BB536) に注目し、花粉飛散の少なかった 2004 年と、大量に飛散した 2005 年春のスギ花粉飛散シーズンに二重盲検並行 2 群比較試験を実施し、BB536 摂取による花粉症改善効果について検討した。2004 年はスギ花粉症患者 40 名を 2 群に分け、BB536 配合もしくは非配合ヨーグルトを 1 日 200 グラムずつ摂取してもらい、自覚症状および血中マーカーの変動を調べた。その結果、BB536 配合摂取群は、非配合群に比べて、目、鼻の自覚症

状が有意に改善され、血中の INF(interferon)- γ の減少および好酸球比率の上昇が抑制された。2005 年にはスギ花粉症患者 44 名を対象に BB536 菌体粉末またはプラセボ粉末を摂取する試験を実施した。症状の悪化により試験を早期離脱した被験者は、プラセボ粉末摂取群では 22 名中 9 名だったのに対し、BB536 摂取群では 22 名中 2 名と有意に少なかった。また、BB536 摂取群はプラセボ群と比較して、水性鼻汁、鼻閉などの自覚症状が有意に改善され、鼻、目、のどの 6 つの症状を含む総スコアも有意に改善された。花粉飛散に伴って、血中 Th1 マーカーである IFN- γ は著しく減少し、Th2 マーカーである TARC (Thymus- and activation-regulated chemokines) は顕著に上昇していたが、BB536 摂取群では、IFN- γ の減少緩和と、TARC の上昇抑制が認められ、血中好酸球比やスギ花粉特異的 IgE (Immunoglobulin-E) の上昇も抑制される傾向を示した。これらの結果は、BB536 が花粉飛散に伴って生じる体内免疫バランスの歪みを抑制することで、花粉症の自覚症状が改善されることを示唆している。

摂取されたプロバイオティクスは、腸管上のパイエル板に存在する M 細胞などから取り込まれ、免疫担当細胞と接触し、腸管免疫から全身免疫へと働きかけることにより、抗アレルギー作用を発揮することが作用機序のひとつであると推測されている。さらに本試験に用いた BB536 は、優れた整腸作用を有していることから、腸内細菌叢のバランスを改善することで宿主免疫に影響を与えているのではないかと仮説を立て、臨床試験参加者の腸内細菌叢を解析することで、間接的な免疫調節作用について検証を行った。

まずは 2004 年の臨床試験参加者のなかから、腸内細菌叢解析に同意して頂いた花粉症患者 23 名の腸内細菌叢の全体像を T-RFLP(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)法により解析した。健常成人の腸内細菌叢は安定したものと考えられているが、花粉症患者の腸内細菌叢は花粉の飛散に伴い季節的な変動を起こすことが明らかとなった。中でも *Bacteroides (Ba.) fragilis* グループは花粉の飛散に伴い増加しており、プラセボ群においては *Bifidobacterium* が減少していた。BB536 配合ヨーグルトを摂取した群はプラセボ群と比較し、*Ba. fragilis* グループ / *Bifidobacterium* 比が試験期間を通じて有意に低い値を示した。

次にこれら腸内細菌の違いが、宿主免疫にどのような刺激を与えるかを推測するため、花粉症患者のヒト末梢血単核球(PBMC)に対する *Ba. fragilis* グループ 21 株、*Bifidobacterium* 31 株、計 52 株のサイトカイン産生能を比較した。その結果、*Bifidobacterium* は Th1 サイトカインである IFN- γ や IL12p40、*Ba. fragilis* グループは炎症性サイトカインである IL-6 を多く誘導したため、*Ba. fragilis* グループ / *Bifidobacterium* 比が高いほど花粉症症状が悪化するのではないかと推測した。

しかしこの結果で得られた花粉シーズンにおける腸内細菌叢の変動は、花粉症患者特有の現象であるかどうか、BB536 非配合ヨーグルトにも含まれる乳酸菌の影響はどの程度であるかなどが明らかではなかった。そこで 2005 年の臨床試験においては、BB536 以外の乳酸菌を含まない菌体粉末を試験食品とし、花粉症患者 44 名に加えて比較対照である非花粉症の健常者 14 名についても腸内細菌叢の解析を実施した。本解析では数百種類に及ぶ腸内細菌叢を丸ごと捉えるため、T-RFLP データに関するそれぞれのピークを比較するのではなく、主成分分析を用いた。

BB536 摂取群、プラセボ摂取群、健常者群で比較を行ったところ、スギ花粉の飛散前には大きな違いが見出せなかったが、飛散末期にはプラセボ群と健常者群との間でグルーピングに差が認められた。プラセボ群のグルーピングに寄与する T-RFLP ピークを解析したところ、3つの細菌グループに分けられ、うちひとつが前年にも観察された *Ba. fragilis* グループであった。花粉飛散末期の *Ba. fragilis* グループ占有率と、自覚症状及び血中のスギ花粉特異的IgEとの間に正の相関が認められたことは、*Ba. fragilis* グループとアレルギーとの関連を示唆する結果であった。また、BB536 の摂取により *Ba. fragilis* グループ占有率の上昇が抑制されたことから、BB536 の整腸作用を介した間接的な免疫調節作用も示唆された。

被験者における腸内細菌叢の違いが、花粉シーズン前ではなく終了時のみに確認されたことから、この違いがアレルギー発症に影響を及ぼしたのではなく、アレルギー発症の結果、健常者と異なる菌叢を有したと考えられる。しかしこれほど大きな変動を示した *Ba. fragilis* グループは、アレルギー発症ともなんらかの関与があるのではないかと推測し、花粉シーズン前後について、このグループに関する詳細な解析を実施した。

Ba. fragilis グループはヒト腸管内に生息する最優勢菌の1グループであり、近年の分子生物学的手法の発達により、毎年新種が分離・提唱されている。そのため、以前より分類されている菌種以外については、ヒト腸管内におけるこれら各菌種の動態・分布が明らかにされていなかった。そこでヒト糞便より分離・同定された 14 菌種を対象に特異的プライマーを作成し、定量PCRにて解析を実施した。*Ba. fragilis* グループに属する菌種はすべての被験者から少なくとも1種類以上、9割以上の被験者からは3~7種類が検出された。中でも *Ba. fragilis* と *Ba. intestinalis* は、花粉シーズン前から花粉症患者で有意に高い菌数を示し、試験前後における菌数が花粉症の自覚症状スコア及び花粉シーズン末期における血中スギ花粉特異的 IgE レベルと有意な正の相関を示したことから、これらの菌種と花粉症発症との関連が示唆された。花粉シーズン中に自覚症状などのストレスが引き金となって増加したと考えられる菌種のなかには、この2菌種も含まれているため、アレルギー症状を重篤化させる悪循環が生じているのではないかと考えられた。BB536 摂取によりこれら2菌種の増加が抑制されたことから、この悪循環が防止され、花粉症症状の軽減に繋がっているのではないかと推測された。

本研究により、プロバイオティクスである *Bifidobacterium longum* BB536 の継続摂取が、花粉症症状を緩和させるのに有効であることが示された。またその作用機序としては、菌体成分の免疫細胞に対する直接的な刺激だけではなく、腸内細菌叢を安定化させ、症状の悪化を防止する間接的な機序の存在が示された。今後の更なる検討は、科学的に確かなエビデンスを有するプロバイオティクス BB536 を使用した機能性食品の開発に繋がることを確信している。