

## 論文の内容の要旨

論文題目 ビフィズス菌・乳酸菌によるサイトカイン・ケモカインの産生制御と  
その免疫調節作用に関する研究

氏 名 岩淵紀介

近年、腸管の免疫機構と常に接触する腸内細菌は宿主の免疫系に多大な影響を及ぼすことが明らかになってきたことから、ビフィズス菌や乳酸菌といったプロバイオティクスによるアレルギー予防作用や感染防御作用といった様々な免疫調節作用も一般的に受け入れられつつある。しかし、これらのプロバイオティクスによる効果は、臨床試験において常に観察されるものではないことから、動物実験などより単純な試験系でその効果を検証するとともに、その作用機序を明らかにしていくことで、科学的根拠を確立することが求められている。また作用機序に関する研究は、そのプロバイオティクス株の免疫調節作用の特徴を明らかにするとともに、新規プロバイオティクスの開発に繋がる有用な知見をもたらし得る。

本研究では、ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* BB536 (*B. longum* BB536) の免疫調節作用の科学的根拠を確立することを目的として、臨床試験で示された免疫調節作用を動物試験等で検証しその作用機序を検討した。第 1 章では *B. longum* BB536 菌体が抗原特異的に誘導される Th2 サイトカインや IgE の産生に及ぼす影響を、第 2 章では *B. longum* BB536 菌体がアレルギー症状の重篤化に関与する Th2 細胞誘因性ケモカイン (Th2 ケモカイン) の産生に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。第 3 章では、*B. longum* BB536 加熱死菌体による免疫賦活作用と、生菌体によるインフルエンザ感染防御作用を動物試験で評価した。第 4 章では、ヒトでの免疫調節作用を様々な観点から検証するために、高齢者に *B. longum* BB536 を投与し自然免疫機能や獲得免疫機能に及ぼす影響を評価した。第 5 章では、*B. longum*

BB536 の免疫調節作用に関する検証結果から得られた知見をもとに、新しいプロバイオティクスの利用形態として乳酸菌の死菌体に着目し、新たに選抜した乳酸菌株の死菌体による感染防御作用を検討した。

## 第1章 In vitro における *B. longum* BB536 による Th1 サイトカインに依存しない Th2 サイトカイン・IgE 産生抑制作用

スギ花粉症患者を対象とした臨床試験において *B. longum* BB536 の摂取は Th1/Th2 バランスを調節したことから、*B. longum* BB536 菌体が抗原特異的な Th1/Th2 反応に及ぼす影響を検討した。マウス脾細胞を用いて *Lactobacillus* などの乳酸菌 17 株とビフィズス菌 15 株の IL-12 誘導能を調べたところ、*B. longum* BB536 を含むビフィズス菌株は乳酸菌より IL-12 誘導能が低かった。オボアルブミン (OVA) で抗原感作したマウス脾細胞を用いた in vitro 試験では、*B. longum* BB536 菌体は抗原の再刺激によって細胞から誘導される IgE と Th2 サイトカインである IL-4 を抑制し、抗 Th1 サイトカイン抗体を添加した中和実験でも *B. longum* BB536 は IgE と IL-4 の産生を抑制した。また、OVA 存在下で BB536 と共に培養したマウス骨髄由来樹状細胞を、OVA 感作マウスの T 細胞と共培養したところ、T 細胞から産生される IL-4 は抑制された。これらの結果から、ビフィズス菌は炎症誘発性サイトカインである IL-12 の誘導能が乳酸菌と比べて低いこと、また *B. longum* BB536 は樹状細胞などの抗原提示細胞を介して Th1 サイトカイン非依存的に IgE 産生および Th2 免疫反応を抑制することが示唆された。

## 第2章 *B. longum* BB536 による T 細胞-抗原提示細胞の相互作用で誘導される Th2 ケモカイン抑制作用

花粉症の臨床試験において *B. longum* BB536 の摂取はスギ花粉の暴露に伴う Th2 ケモカインである thymus- and activation-regulated chemokine (TARC) の血中での増加を抑制したことから、TARC や macrophage-derived chemokine (MDC) といった Th2 ケモカインの産生機序とともに、*B. longum* BB536 による TARC・MDC の産生抑制作用を、マウス脾細胞で検討した。その結果、*B. longum* BB536 菌体は抗原提示細胞が T 細胞との相互作用で産生する Th2 ケモカインを抑制することが確認された。アレルギー性疾患の炎症部位では種々のリンパ球の浸潤・集積がみられ、これらの集積した細胞同士の相互作用によって症状が進行すると考えられる。このことから、*B. longum* BB536 は免疫担当細胞同士の相互作用で産生される Th2 ケモカインを抑制することで、炎症部位での Th2 細胞の浸潤・集積を緩和し Th2 反応を抑制していることが推察された。これらの結果はプロバイオティクスによる遅発相におけるアレルギー症状軽減作用を示唆する知見である。

## 第3章 インフルエンザウイルス感染モデルマウスにおける *B. longum* BB536 による感染防御作用

高齢者を対象とした臨床試験において *B. longum* BB536 の継続摂取はインフルエンザ発症者数や 38℃ 以上の発熱者数を減少させたことから、*B. longum* BB536 加熱死菌体の経鼻投与と *B. longum* BB536 生菌体の経口投与がインフルエンザ感染モデルマウスに及ぼす影響を検討した。*B. longum* BB536 加熱死菌体の経鼻投与は、肺縦隔リンパ節からの IL-12p40 や鼻関連リンパ組織からの IFN- $\gamma$  の産生を亢進するなど、鼻粘膜を介して気道に関連した細胞性免疫を賦活し、インフルエンザウイルス感染を防御した。しかし、*B. longum* BB536 加熱死菌体のマウスへの経口投与は、脾臓中の NK 細胞の割合などに変化を及ぼさなかった。一方、*B. longum* BB536 の生菌をインフルエンザ感染モデルマウスへ投与した試験では、投与によって感染による症状等が軽減され、肺中の IFN- $\gamma$  と IL-6 の濃度が減少傾向を示し、抗炎症的な作用が見られた。

#### 第 4 章 プロバイオティクス *B. longum* BB536 の摂取が経腸栄養管理を受ける高齢患者の免疫機能と腸内菌叢に及ぼす影響

*B. longum* BB536 の摂取が高齢者の免疫機能や腸内菌叢に及ぼす影響を調べるために、経腸栄養管理を受ける高齢患者を対象に *B. longum* BB536 の生菌体を 12 週間摂取させる介入試験を実施した。*B. longum* BB536 の摂取は、腸内のビフィズス菌を増加させ、NK 活性の維持や血中 IgA 値の増加、一部のインフルエンザワクチンの効果を高めるなど、経腸栄養患者の生体防御能を改善することが示唆された。このような *B. longum* BB536 生菌による宿主の自然免疫機能と獲得免疫機能を調節する作用が感染防御作用に寄与していると考えられた。

#### 第 5 章 高い IL-12 誘導能を有する乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MoLac-1 の選抜とそのインフルエンザウイルス感染に対する防御作用

IL-12 誘導能の低い *B. longum* BB536 加熱死菌体の経口投与は、NK 細胞の割合などに変化を及ぼさず、感染防御作用が期待できなかったことから、IL-12 誘導能の高い乳酸菌加熱死菌体の感染防御作用を検討した。マウス脾細胞を用いてビフィズス菌・乳酸菌 85 株の中から、高い IL-12 誘導能を有する乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MoLac-1 株 (*L. paracasei* MoLac-1) を新たに選抜した。*L. paracasei* MoLac-1 加熱死菌体は、*in vitro* においてマクロファージからの IL-12 産生を誘導し、IL-12 と IL-18 依存的に NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を誘導するとともに、NK 細胞を活性化した。また、*L. paracasei* MoLac-1 加熱死菌体のマウスへの経口投与は、脾臓中の NK 細胞の割合を増加させ、インフルエンザウイルス感染による症状を軽減した。微生物死菌の食品への応用は、生菌と比べて安全性に関するリスクが少なく工業的なハンドリングも良いことから、近年注目されている。本研究から感染防御作用が期待できる乳酸菌死菌体の開発において、IL-12 誘導能の評価が有用であることが示唆された。

## 総括

本研究は *B. longum* BB536 の抗アレルギー作用に寄与し得る Th2 サイトカイン・IgE 産生抑制作用と Th2 ケモカイン産生抑制作用を示した。また *B. longum* BB536 生菌体のマウスへの経口投与は抗炎症的な作用によりインフルエンザウイルス感染による症状を軽減し、高齢者への投与では自然免疫機能と獲得免疫機能を調節することにより、感染を防御することが示唆された。これらの結果から、ビフィズス菌 *B. longum* BB536 による免疫調節作用は、過剰な免疫反応や炎症反応を抑制するといった免疫抑制的な作用であることが推察された。一方で、高い IL-12 誘導能を有する *L. paracasei* MoLac-1 の加熱死菌体は、経口投与によってマウスのインフルエンザ感染を防御した。本研究はプロバイオティクスによる免疫調節作用の科学的根拠の確立に寄与するとともに、新規プロバイオティクス株の開発に繋がる知見を提供するものであり、プロバイオティクスを通じた更なる健康維持と疾病予防に貢献するものと考えられる。