

粒子制御した新規殺菌乳酸菌の開発とその機能性解析

渡邊 卓巳

目次

略語一覧	3
第1章 序論	5
第2章 乳酸菌 (<i>Enterococcus faecalis</i> KH2、 <i>Lactobacillus plantarum</i> SNK12、 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>) 経口摂取におけるマウスインフルエンザ感染防御効果	14
第1節 緒言	14
第2節 材料と方法	16
第3節 結果	21
第4節 考察	30
第3章 乳酸菌 (<i>Enterococcus faecalis</i> KH2、 <i>Lactobacillus plantarum</i> SNK12) のインフルエンザ感染防御に関わる有効成分の探索	33
第1節 緒言	33
第2節 材料と方法	34
第3節 結果	38
第4節 考察	45

第4章 加熱殺菌した乳酸菌 <i>Enterococcus faecalis</i> KH2 株の摂取が健常な日本人成人の腸内環境に及ぼす影響と安全性の検討	48
第1節 緒言	48
第2節 材料と方法	49
第3節 結果	53
第4節 考察	63
第5章 乳酸菌の水分散性向上によるインフルエンザ感染防御効果への影響	66
第1節 緒言	66
第2節 材料と方法	67
第3節 結果	72
第4節 考察	81
第6章 結論	83
参考文献	87
謝辞	103

略語一覽

APC	antigen-presenting cell
AFM	Atomic Force Microscope
BALF	Bronchoalveolar Lavage Fluid
COVID-19	coronavirus disease 2019
CLRs	C-type lectin receptors
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DC	dendritic cell
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FAE	follicle-associated epithelium
FBS	Fetal bovine serum
GALT	gut-associated lymphoid tissue
IL	interleukin
IRAK	IL-1R-activating kinase
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucin-rich repeat
M cell	Microfold cell
MDCK	Madin-Darby canine kidney cell
MEM	Minimum Essential Media
MHC	major histocompatibility complex
NLRs	Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors

PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	plaque forming unit
PRRs	pattern-recognition receptors
RLRs	Retinoic acid inducible gene-like receptors
RIG	Retinoic acid-inducible gene
SEM	Scanning electron microscope
Tfh	T follicular helper
TLRs	Toll-like receptors
TRAFs	TNF-receptor-associated factors
Treg	Regulatory T cell
T-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism

第1章 序論

食品の機能は一次機能（栄養機能）、二次機能（感覚・嗜好機能）、そして三次機能（健康の維持や向上に関与する生体調節機能）で説明される。食による健康維持・増進の観点から三次機能が最近注目されており、様々な機能性食品が開発されている。例えば、植物から抽出されるポリフェノールには抗酸化作用[1]など、藻類から抽出されるフコイダンなどの硫酸化多糖には免疫賦活作用[2]など、動物の軟骨に含まれるコンドロイチン硫酸には関節症改善作用[3]などが良く知られている。これら機能性食品の中でも乳酸菌は、整腸作用[4-6]だけでなく、生体防御作用[7, 8]、抗アレルギー作用[9, 10]など様々な機能が報告されており近年関心が寄せられている。また、乳酸菌は炭素源、窒素源、微量ミネラルがあれば試験管レベルの少量から 10t 以上のように大量に増やすことができ大きな需要に対しても供給することができる。さらに詳細は後述するが乳酸菌の作用機序に関して従来知られている腸管内での作用だけでなく、乳酸菌が体内に吸収され乳酸菌の構成成分が免疫細胞に認識され免疫が活性化することも明らかとなり、加熱殺菌された乳酸菌（殺菌乳酸菌）の研究が進み殺菌乳酸菌の利用が盛んとなった。殺菌乳酸菌の利用は発酵乳や乳飲料だけでなくサプリメントや飲料、パン、菓子類などの一般食品にも配合することができ殺菌乳酸菌の市場は拡大している。しかし、殺菌乳酸菌を製造する過程の加熱処理が原因で乳酸菌が凝集し、品質や物性への影響だけでなく有効性に対しても影響が懸念される。実際に、市場で流通している殺菌乳酸菌の中には凝集した乳酸菌も見受けられる。このような背景から殺菌乳酸菌は生きている乳酸菌（プロバイオティクス）に比べ有効性が低いと認識されている。しかし、殺菌乳酸菌は保存安定性の向上や製造ラインの汚染リスクが低減することや耐熱性の向上などプロバイオティクスより利便性が高く、殺菌菌体なので生きている微生物を摂取

するリスクがない等多くの利点がある。そこで、本研究では凝集した乳酸菌を分散させることで物性（水分散性）、有効性（免疫応答、インフルエンザウイルスを用いた感染試験）が向上すると仮定し、凝集した殺菌乳酸菌を分散化させる殺菌乳酸菌の製法の確立を目指した。そして、その技術を用い高い水分散性、有効性を有する「粒子制御した殺菌乳酸菌粉末」を開発し、殺菌乳酸菌がプロバイオティクスに代わりうる新しい素材となるよう発信、発展させていきたい。

乳酸菌は古くから世界中の伝統的な発酵食品に利用されており、17世紀後半にオランダの科学者レーウェンフックが顕微鏡を使って初めて乳酸菌を観察したと言われている。その後、1860年代にフランスのパスツールが発酵や腐敗は微生物によって起こされるということを明らかにした。20世紀初頭にはメチニコフがブルガリア地方の人々の長寿がヨーグルトの常食が要因との「不老長寿説」を提唱したのをきっかけに乳酸菌の生化学的な研究が世界中で盛んになった。その結果、腸内細菌叢の改善[4-6]、生体防御[7,8]、抗アレルギー[9,10]、抗腫瘍[11,12]、抗ウイルス効果[13-15]など乳酸菌のもつ多くの保健効果が報告されるとともに、乳酸菌を含有する発酵乳や飲料は嗜好品としてだけでなく保健効果を期待した食品として様々な国で摂取されるようになった。

さらにより乳酸菌を摂取しやすいよう食品への配合を目的として殺菌乳酸菌が開発され日本を中心に注目が集まっている。殺菌乳酸菌は生きている乳酸菌と比較して冷蔵保管の必要がなく常温で輸送でき長期保存が可能で、製造過程で100°C、数十分または超高温加熱処理（120-150°Cで数秒）が行われているので耐熱性にも優れており、加熱を有する一般食品にも配合が可能である。さらに生きている乳酸菌は代謝により酸（乳酸や酢酸など）を産生するので味等に大きな影響を与えるが、殺菌乳酸菌は死んでいる菌のため代謝すること

もなく味に大きな影響を与えず様々な食品に加えることができ使い勝手も良い。また、殺菌乳酸菌の免疫応答に対する機序も明らかとなり[16]、日本では殺菌乳酸菌を配合した製品が数多く販売され、その影響は中国、韓国、台湾などアジア各国にも広まりつつある。

一方、殺菌乳酸菌の機能性に関する研究は多く報告されているが、物性、製造等のものづくりの面における報告例は少ない。特に乳酸菌を加熱殺菌すると殺菌前は乳酸菌の粒子サイズが 0.5-5.0 μm となるのに対し、加熱殺菌後は粒子サイズが 20~100 μm と大きく変化する点は興味深い。この粒子サイズの変化は食品（特に液体）に配合した時の製品の物性変化や乳酸菌の効果に対しても影響を及ぼすことが考えられる。そこで、本研究では加熱殺菌における乳酸菌の粒子サイズの変化を国内で多く流通している乳酸菌種（*Enterococcus faecalis*）を中心に検証し、加熱殺菌による乳酸菌の凝集を分散化させる粒子制御技術を確立し、乳酸菌の凝集を抑制した水分散性、有効性の優れた「粒子制御された新しい殺菌乳酸菌」の開発を目指した。さらに、粒子制御した殺菌乳酸菌の効果をインフルエンザウイルスを用いた感染防御試験にて評価した。

はじめに乳酸菌の加熱殺菌処理によって起きる凝集の粒子サイズを粒度分布で確認し、分散化させる技術を検討した。その技術を用いて凝集を分散化させた 3 種類の殺菌乳酸菌（*Enterococcus faecalis* KH2、*Lactobacillus plantarum* SNK12、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*）を作製し、マウスを用いたインフルエンザウイルス感染試験にて評価した（第 2 章）。次に感染防御効果の有効成分の探索を *E.faecalis* KH2、*L.plantarum* SNK12 の 2 種類の殺菌乳酸菌を用いて行なった（第 3 章）。さらに乳酸菌の主たる保健効果である便秘改善効果に対し有効性の有無を、ヒトを対象としたランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験にて排便促進および腸内細菌叢を指標に検証した（第 4 章）。最後に第 5 章では、殺菌乳酸菌の流通を想定して粒子サイズを制御した殺菌乳酸菌粉末の開発を行な

い、粒子制御した殺菌乳酸菌粉末と通常方法で作製した殺菌乳酸菌粉末を水分散性、体内への吸収、感染防御効果を指標に比較検証した。

乳酸菌の機能性

乳酸菌は古くから排便促進作用[17, 18]などが報告されており、様々な菌種で有効性が示されている。その中でも日本国内では、*Lactobacillus casei* シロタ株の摂取による腸内の有用細菌（乳酸桿菌およびビフィズス菌）数の増加作用 [19, 20]、腸内有害産物（インドールおよび p- クレゾール）の産生抑制 [18]、腸内変異原物質の吸着および排出作用 [21]、便秘および下痢患者における症状改善 [22]などの整腸作用が報告され、1998 年にはシロタ株を用いた乳酸菌飲料が特定保健用食品として認可もされている [23]。シロタ株をはじめとした排便、整腸作用などを有する乳酸菌は生菌（プロバイオティクス：腸内フローラのバランスを改善することによって宿主の健康に好影響を与える生きた微生物[24]）での報告が一般的であった。しかし、乳酸菌など微生物が腸管に存在する M 細胞から生体内に取り込まれる報告[25]や微生物に対する受容体[26, 27]が明確になるにつれ、乳酸菌の保健効果は乳酸菌の増殖、代謝によるものではなく乳酸菌が抗原と認識されることが重要であると考えられるようになり、乳酸菌を構成する成分に関する研究が盛んになった。特に免疫応答に関しては微生物の細胞壁、DNA などが受容体に認識されることでサイトカイン等の免疫関連物質を産生することがわかってきた。

さらに有効性に関しては、スギ花粉症の軽減効果[28]、子宮内膜症臨床症状の軽減効果 [29]、皮膚機能改善効果[30]や抗メタボリックシンドローム効果[31]、認知機能改善[32]など腸内だけに囚われず全身に対する有効性も報告され、乳酸菌配合製品といえは整腸作用イメージするヨーグルトや乳酸菌飲料などが主であったが健康の維持、増進を期待しサブ

リメントにも利用されるようになり市場規模も年々大きくなっている。

乳酸菌と免疫

腸管は粘膜によって外界と接しており、小腸においては栄養の吸収効率を高めるため絨毛が発達し、その表面積はテニスコート 1.5 面分とも言われている。このため、小腸では病原性細菌の感染や異物抗原の侵入の危険性に曝されることから、全末梢リンパ球の 60～70%が集積する最大の免疫器官である。このような免疫細胞が集まる場所を腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue, GALT) と呼ばれている。GALT の一つである小腸パイエル板や絨毛には M 細胞と呼ばれる腸管内の抗原や微生物を取り込む上皮細胞が存在する (Fig. 1-1) [33]。腸内に存在する常在菌や経口摂取された乳酸菌はこの M 細胞 (Microfold cells) を介して生体内に取り込まれ、M 細胞下に存在する樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に貪食される [16]。そして、抗原提示細胞がサイトカインをはじめとした様々な免疫に関わる生理活性物質を産生、放出することで T 細胞や B 細胞を活性化させるだけでなく、抗原を提示しこれらの細胞に抗原特異的な免疫応答を誘導する (Fig. 1-2) [34]。経口摂取した乳酸菌は免疫応答を刺激することが報告されており、免疫賦活 (感染防御) [7] や免疫調節によるアレルギー症状の改善 [10]、大腸炎の緩和 [35] など、様々な保健効果が報告されている。

哺乳類には外来抗原、細菌、ウイルス等の感染に対する防御機構として自然免疫と獲得免疫が備わっており、自然免疫は初めに起こる免疫応答である。自然免疫の中心は抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージであり、それら細胞は細菌、ウイルス等の構成成分を認識するトル様受容体 (Toll-like receptors: TLRs) などのパターン認識受容体 (pattern-recognition receptors, PRRs) を発現している [36]。TLRs からの刺激により抗原提示細胞は

活性化し、各種サイトカインなど免疫関連物質を産生することで他の免疫細胞に影響を与える。細菌構成成分の認識は TLR2、TLR4、TLR5、TLR9 が知られており、TLR2 は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を、TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) を、TLR5 は細菌の鞭毛を構成するタンパク質 (フラジェリン) を、TLR9 は細菌の持つ非メチル化 DNA (CpG DNA) を認識することが報告されている。また、TLR3 は 2 本鎖 RNA、TLR7、TLR8 は 1 本鎖 RNA を認識する [36, 37]。その他の代表的な PRRs としては NOD 様受容体 (Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors : NLRs)、RIG 様受容体 (Retinoic acid inducible gene-like receptors : RLRs) などが知られている [36]。一方、獲得免疫は抗原に対し誘導される抗原特異的免疫応答で抗原提示細胞が認識した抗原を主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) 分子上に提示し、T 細胞の表面に発現している受容体を介して活性化する。獲得免疫は感染した細菌、ウイルス等の抗原を特異的に見分け記憶することで、同じ細菌、ウイルスに対し効果的に排除できる仕組みである。また、獲得免疫は自然免疫に比べると応答までにかかる時間は長く、数日から 1 週間程度かかる。乳酸菌は抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージに存在する受容体 (TLRs, NODs など) に認識され、Th1、Th2、Th17 や Treg など様々な免疫細胞に働きかけ免疫刺激や過剰な免疫応答に対する抑制 [7, 10, 33] など免疫応答に作用することが報告されている。

ウイルス感染症

人類と感染症の関わりは古く、エジプトのミイラからは天然痘に感染した痕が確認されており、人類は常に感染症と闘っていると言っても過言ではない。中世ヨーロッパにおいては人口の 3 分の 1 が死亡したといわれるペスト、世界中で 5 億人以上の者が感染し、

死亡者数が2,000万人とも4,000万人ともいわれる1918年からのインフルエンザ（スペイン風邪）など、感染症は多くの人類の命を奪ってきた。一方、18世紀以降、ワクチンや治療薬の開発により、感染症の予防・治療方法が進歩したが、インフルエンザは感染力の強さ、症状の重篤性、肺炎等の合併症や、スペイン風邪のような世界的な大流行など未だに世界各国で甚大な健康被害と社会活動への影響を引き起こしている。また、高齢者を中心とする慢性疾患を有する者が罹患すると肺炎を併発するなど重症化する場合が多く、高齢化が進行している日本にとってインフルエンザは大きな脅威となっている。さらに、近年、乳幼児において急性脳症も報告されている。本研究では、インフルエンザに着目しオセルタミビルに感受性であり、マウスにおいて致死感染を引き起こすA型インフルエンザウイルス（A/NWS/33、H1N1亜型）を使用することで殺菌乳酸菌のインフルエンザウイルス感染防御効果を評価した。

乳酸菌と感染防御

2019年から脅威となっている新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を受けて各国で薬剤、ワクチンの開発が進められているが、時間、コストだけでなく安全性など様々な問題も抱えており早急な対応は難しい状況である。そんな状況の中、個人の免疫力を上げることでも感染しても発症しない又は軽症で済むという感染予防処置に関心が向けられ、日常的に摂取のしやすく、免疫応答の報告が多くされている乳酸菌は注目されている素材の一つである[38, 39]。本研究では、インフルエンザウイルス感染症に対する殺菌乳酸菌の効果を主に評価したが、ここで注目したのは、単に生体内でのウイルス増殖量とインフルエンザ症状のみにとどまらず、生体防御機構（獲得免疫系）への影響である。後者は、後に同じ病原体に出会った時の発症阻止能力に直結している。すなわち、病原体に対する抗体（特に中和抗

体) 量が多いと、再感染時での発症抑制が期待できる。「ワクチン」の目的は、「抗体」を生かせることによって、感染症を“予防”することである。この点にこそ、インフルエンザウイルスと新型コロナウイルスの対策に共通点を見出すことができる。

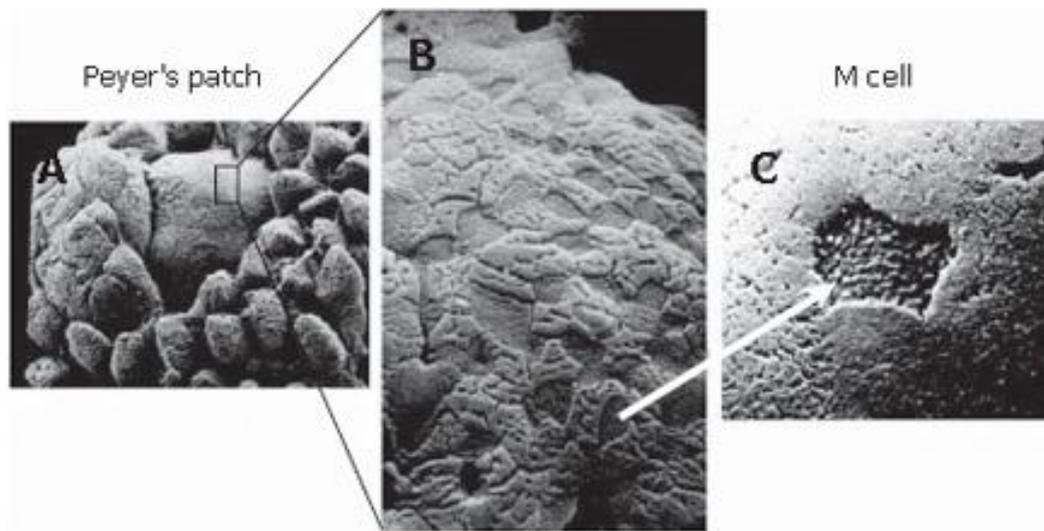


Fig. 1-1 Ultrastructure of the Peyer's patches and FAE [33].

A: At low magnification, the dome shape of the Peyer's patch protrudes between villi into the lumen of the intestine; B: At higher magnification, M cells can be seen as epithelial cells with surface microfolds rather than the microvilli that are seen on the surrounding conventional enterocytes; C: Antigen is taken up preferentially through M cells.

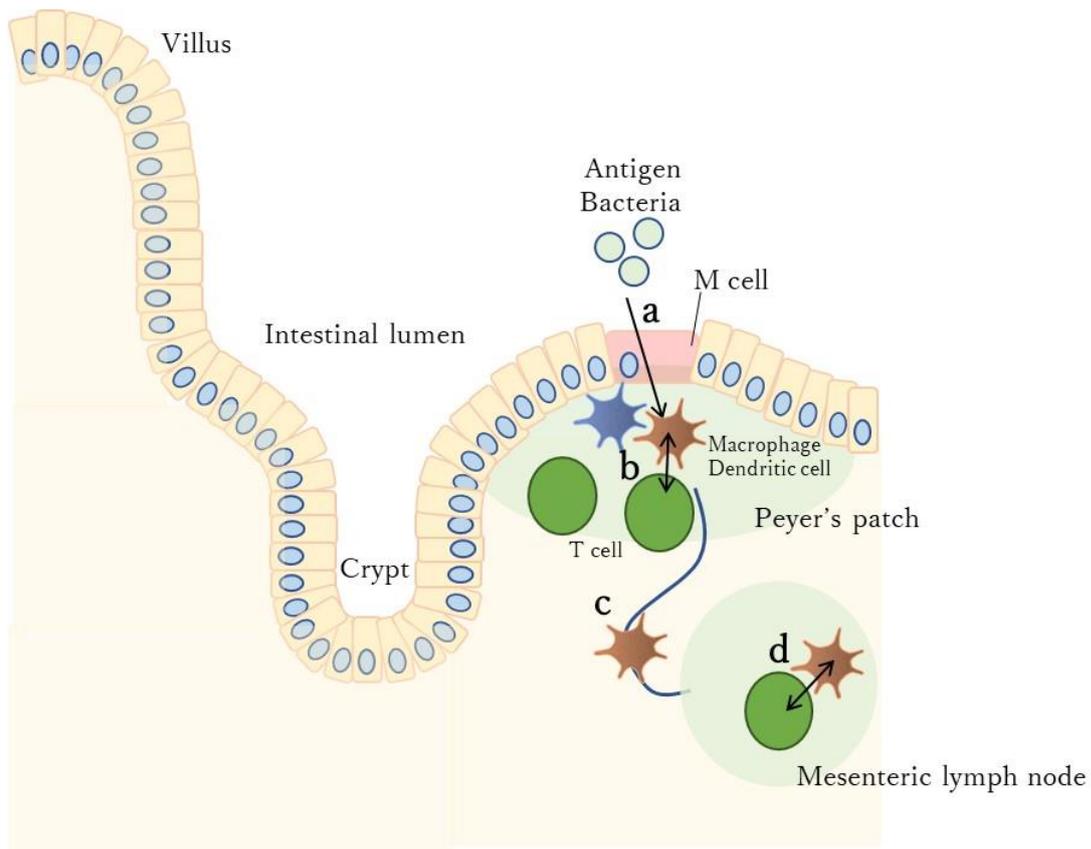


Fig. 1-2 Antigen or bacteria uptake and recognition by T cells in the intestine [Modified from Reference 34].

Antigen and bacteria may enter through the M cells in the follicle-associated epithelium (FAE) (a), and after transfer to local DCs, might then be presented directly to T cells in the Peyer's patch (b). Alternatively, antigen or antigen-loaded DCs from the Peyer's patch may gain access to draining lymph (c), with subsequent T-cell recognition in the mesenteric lymph nodes (d).

第2章

乳酸菌 (*Enterococcus faecalis* KH2、*Lactobacillus plantarum* SNK12、*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*) 経口摂取におけるマウスインフルエンザ感染防御効果

第1節 緒言

本章では、加熱殺菌処理によって凝集した乳酸菌を高圧ホモジナイザー (Fig. 2-1) を用いることで凝集を分散させることができるのか 3 種類の乳酸菌を使用して検証した。その後、分散化させた乳酸菌が有効性を有しているのかマウスインフルエンザウイルス感染試験にて確認した。乳酸菌は、*Enterococcus faecalis*、*Lactobacillus plantarum*、*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* の 3 種類を使用した。分散化の確認は、高圧ホモジナイザー処理前後の乳酸菌の粒子状態をレーザー回折式粒子径分布測定装置 (Fig. 2-2) で粒度分布および粒子径を測定し、効果の確認をマウスインフルエンザウイルス感染モデルで感染後のウイルス量と中和抗体価 (ウイルス感染、阻害機能を持つ抗体量)、ウイルス特異的な IgA 抗体 (喉や消化管の粘膜表面に分泌される抗体) で評価した。

ホモジナイザーは液体中の粒子を均一に加工することにより品質、性質を安定、向上させることができる。ホモジナイザーには超音波でキャビテーションを起こし粒子を微粒化する超音波式 (能力は高いが一度に処理する量が少ない)、高速回転で攪拌し微粒化する攪拌式 (比較的精度の必要ない加工に適している)、圧力をかけて粒子を微粒化する高圧式 (処理量が多く微細化が可能) がある。本研究では他検体の処理と微細化が可能な高圧ホモジナイザーを用いた。

我々には感染に対する防御機能として自然免疫と病原体特異的に応答する獲得免疫が備

わっている。自然免疫は体内に侵入した病原体や異常細胞を感知し排除する仕組みである。メインにはたらく好中球やマクロファージ、樹状細胞といった食細胞は多種の異物や病原体の分子に非特異的に反応することができるため迅速な応答が可能である。そのため自然免疫は生体防御の最前線の免疫機構といえる。自然免疫の主となる免疫細胞であるマクロファージや樹状細胞は細菌、ウイルス等の構成成分のパターンを認識する TLRs、NLRs、RLRs などの PRRs を発現して[36]おり、PRRs からの刺激によりマクロファージや樹状細胞が活性化し、各種サイトカインなど免疫関連物質を産生することで他の免疫細胞に対し影響を与える。一方、獲得免疫は感染した細菌、ウイルス等の抗原を特異的に見分け記憶することで特異的に排除できる。自然免疫に比べると応答までにかかる時間は長く、数日から1週間程度である。この獲得免疫で主に働く免疫担当細胞は、T細胞（細胞障害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL）、ヘルパーT細胞など）やB細胞のリンパ球である。特にヘルパーT細胞については近年多くのサブセットが発見されており、細胞性免疫に関わるTh1細胞、液性免疫に関わるTh2細胞[40]、IL-4産生に関わる濾胞性ヘルパーT細胞（T follicular helper, Tfh）[41]、免疫抑制作用の制御性T細胞（regulatory T cell, Treg）[42]、IL-17を産生し炎症反応に関連するTh17細胞[43]、IL-9産生を介しマスト細胞や好酸球の局所集積に関連するTh9細胞[44]やIL-22を産生しアトピー性皮膚炎に関連すると示唆されているTh22細胞[45]が報告されている。

また近年、感染症が社会問題となっており COVID-19 だけでなくインフルエンザウイルス感染症も毎年世界的に流行しており罹患率、死亡率が高い感染症である。特に、免疫機能が不十分な高齢者や子供に対する罹患リスクは高い。その対策としてワクチン接種、抗ウイルス薬が行われているが、ワクチンは感染予防効果が明確ではない上、インフルエンザウイルスは変異しやすく、その効果は不十分である。抗ウイルス薬に対しては薬剤耐性によるリ

スクが懸念されるため広範囲での投与は避けたい。このような背景から、生体が本来有する免疫力に依拠した感染症対策の重要性が注目され、食品成分による免疫賦活効果への期待が高まっている。ヨーグルトをはじめとした発酵食品は長年の食経験から我々の健康維持に寄与していることが知られており、プロバイオティクスの健康効果についても明らかになりつつある [46]。さらに、ヒト腸内や発酵食品から単離された乳酸菌がマウスモデルにおいて抗インフルエンザ作用を発揮するプロバイオティクスも報告されている [47, 48]。

第2節 材料と方法

乳酸菌

乳酸菌は、炭水化物（糖類など）を発酵してエネルギーを獲得し、乳酸を生成する一群の細菌の総称である。乳酸菌は通常、消費した糖類から 50%以上の割合で乳酸を生成する細菌と定義されている。細胞の形態からは球菌と桿菌に大別され、基本的な識別法であるグラム染色で陽性を示し、カタラーゼ（過酸化水素を分解する酵素）をもたず、芽胞（内生孢子）を形成せず、動性がないという共通的な特徴もある。乳酸菌は 12 属以上に分けられており、主に桿菌としては *Lactobacillus* 属、*Carnobacterium* 属、球菌としては *Streptococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Enterococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Tetragenococcus* 属、*Leuconostoc* 属などがある。本研究では免疫への応答が報告されている *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc* を使用した [49-51]。*Enterococcus* 属からは、ヒト糞便から単離された *E. faecalis* KH2（以下 KH2）（International Patent Organism Depository in Japan number, NITE P-14444）を、*Lactobacillus* 属からは、赤カブの茎および葉から作られた無塩漬物（すんき漬け）から単離された *L. plantarum* SNK12（以下 SNK）（International Patent Organism Depository in Japan number, NITE P-1445）を、*Leuconostoc* 属からは葛（*Pueraria lobata*）

のつるから単離された *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (以下 LM)

(International Patent Organism Depository in Japan number, NITE P-02751) を選定した。

培地

炭素源として 6% グルコース(富士フィルム和光純薬)、窒素源として 2% 酵母エキス(日本ベクトン・ディッキンソン)、ミネラルとして 0.2% リン酸一カリウム(富士フィルム和光純薬)、0.1% 硫酸マグネシウム(富士フィルム和光純薬)、0.4% クエン酸三ナトリウム(富士フィルム和光純薬)、0.01% 硫酸マンガン(富士フィルム和光純薬)、および 0.05% グリセリン - 脂肪酸エステル(関東化学)を加え 121°C、15 分の条件で滅菌した。

高圧ホモジナイザー (ECONIZER LABO-01、三丸工業)

高圧式ホモジナイザーは液体に高圧力をかけて均質化する。高圧力をかけた液体はホモバルブを通過し、液体中の粒子を小さく均一化することができる。ホモバルブは均質バルブともいわれており、高圧・低速で流しこんだ液体を強く圧縮している。その後、狭いすき間から放出された液体は、インパクトリングという部位に衝突して、さらに液体中の粒子が粉碎することで、より均質化した液体になる (Fig. 2-1)。

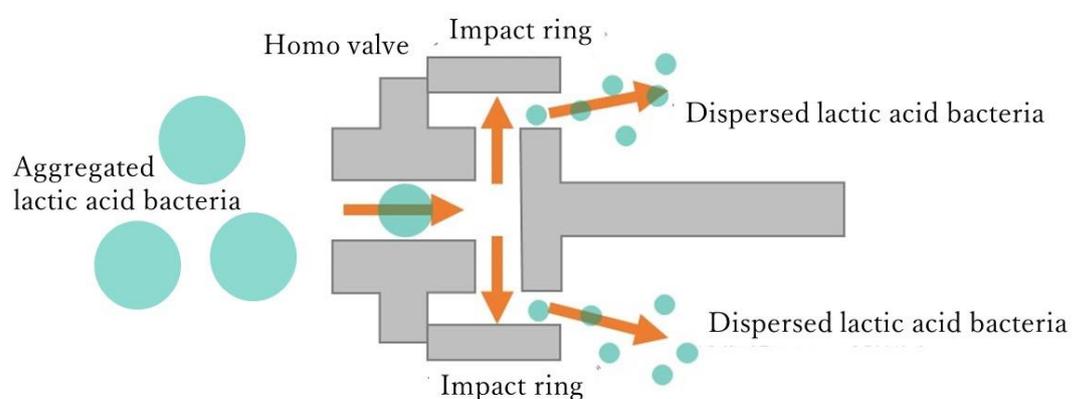


Fig. 2-1 The mechanism of the high-pressure homogenizer

レーザー回折式粒子径分布測定装 (SALD-2300、島津製作所)

粒子群にレーザー光を照射し、そこから発せられる回折・散乱光の強度分布パターンから計算によって粒度分布を求める (Fig. 2-2)。特徴としては、測定範囲が数十ナノメートルからミリメートルにおよびワンレンジで測定できる。また測定時間が短く、リアルタイムで粒度分布の変化を監視できる。

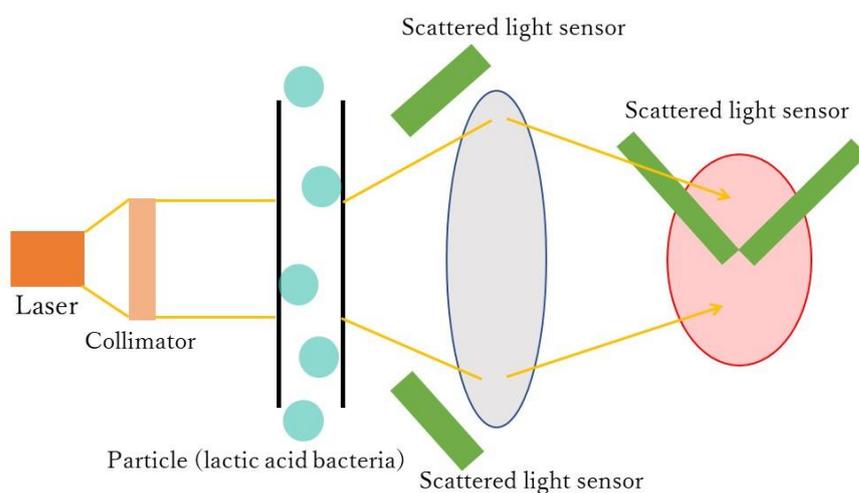


Fig. 2-2 Measuring Principle of Laser Diffraction and Scattering

殺菌乳酸菌の作製および高圧ホモジナイザー処理

各乳酸菌を培地に接種し、KH2: 37°C、SNK および LM は 30°C、20 時間の条件で培養後、100°C、30 分の条件で加熱殺菌し、蒸留水にて遠心洗浄 2 回行ない菌体を回収した。その後、高圧ホモジナイザーを用い 15MPa で分散処理を行なった。

殺菌乳酸菌の平均粒子径の測定

作製した各乳酸菌を蒸留水で 10mg/ml 濃度に調製した後、レーザー回折式粒子径分布測定装置にて粒度分布を測定し平均粒子径を算出した。

殺菌乳酸菌のマウスインフルエンザウイルス感染試験

高圧ホモジナイザー処理した各殺菌乳酸菌をマウスに経口投与しインフルエンザウイルスを経鼻感染させ感染 3 日後のウイルス量および感染 14 日後の中和抗体価、ウイルス特異的 IgA を指標に評価した。

細胞およびウイルス

各種インフルエンザウイルスに対し感受性をもつイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株 (Madin-Darby canine kidney cell, MDCK) 細胞を使用した。培養は 5% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS) を含むイーグルの最小必須培地 (Minimum Essential Media, MEM) を用いた。インフルエンザウイルスは、オセルタミビルに感受性であり、マウスにおいて致死感染を引き起こす A 型インフルエンザウイルス (A/NWS/33、H1N1 亜型) を使用した [52]。ウイルスは、MDCK を用い 37°C の 5% CO₂ インキュベータ中で増殖させ、-80°C で保存した。ウイルス特異的 IgA 量は ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) で測定したが、その際に使用したウイルスタンパクは、スクロース勾配法による遠心分離 (100,000×g、4°C で 2 時間) によって精製したウイルスから調製した。

動物感染試験

雌性の 16~18g の特定病原体非含有 BALB/c マウス (6 週齢) を日本 SLC (静岡、日本) から入手した。実験はすべて中部大学の動物実験指針に従い適正に実施された。尚、実験を通して乳酸菌投与による副作用は検出されなかった。マウスに 2×10^4 PFU/50 μ l のインフ

ルエンザウイルスを鼻腔内感染させた日を0日とし、各乳酸菌（5mg/日）およびオセルタミビルリン酸塩（以下、OSL）（0.2mg/日）を蒸留水に溶解し、ウイルス接種の7日前から接種後14日まで1日2回経口投与した。対照群のマウスには蒸留水のみを経口投与した。感染3日目に肺および気管支肺胞洗浄液（Bronchoalveolar Lavage Fluid, BALF）を、14日目に血液および糞便サンプルを採取した。肺組織は1mgに対し10 μ lのリン酸緩衝食塩水（Phosphate Buffered Saline, PBS）を添加した後、10秒間超音波処理し、1500xg、30分の条件で遠心後、上清を回収し-80 $^{\circ}$ Cに保存した。BALFに関しては気管カニューレを介し0.8mlの氷冷PBSで4回洗浄することによって回収し、1500xgで10分間遠心し上清を供試サンプルとした。血液は3,000xgで10分間遠心し、血清を回収し-20 $^{\circ}$ Cで保存した。糞便抽出物は、糞便1mgあたり10 μ LのPBSを添加後、超音波処理で懸濁して、遠心処理することによって調製した。

中和抗体価の測定

血清およびBALFのインフルエンザウイルス特異的抗体価を、50% plaque reduction assayにて測定した。約200 plaque forming unit（PFU）のウイルスを、PBSで適宜希釈したサンプルと混合し、37 $^{\circ}$ Cで1時間処理後、各混合物を35 mm dishesに単層状に培養したおいたMDCK細胞に感染させ、プラークアッセイを行なった。中和抗体力価は、血清およびBALFの代わりにPBSを含む対照のプラーク数を100%とした時に、プラーク数を50%減少させた血清またはBALFの最高希釈度とした。

インフルエンザウイルス特異的IgAの測定

ELISA法を用いて、BALFおよび糞便抽出物中のインフルエンザウイルス特異的IgAを

測定した。平底 96 ウェルプレート（日本ベクトン・ディッキンソン）に $1 \mu\text{g/ml}$ の精製ウイルスを 37°C で 1 時間コーティング後、PBS で 3 回洗浄し、10% スキムミルク含有 PBS でブロッキングした後、適宜希釈した BALF または糞抽出物をプレートに添加し、 37°C で 1 時間処理した。その後、horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgA（Santa Cruz Biotechnology）と反応させた。PBS で洗浄した後、 H_2O_2 を含有する基質溶液（ 0.4 mg/ml の *o*-フェニレンジアミン） $100 \mu\text{l}$ を添加した。室温で 20~25 分間反応後、 $50 \mu\text{l}$ の 1 M H_2SO_4 を添加して反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（iMark™、BIO-RAD）で吸光度（490 nm）を測定した。一方、IgA（Bethyl Laboratories, Inc.、Montgomery, TX、USA）を $10\sim 1000 \text{ ng/ml}$ の濃度に調製し、標準曲線を作成し、これを用いて各サンプルの IgA 量を算出した。

統計学的処理

データは平均値±標準偏差（SD）で標記した。統計学的有意性については一元配置分散分析を行ない、テューキー多重比較検定（Tukey's multiple comparison test）（Statcel4、オーエムエス出版）を用い比較した。

第 3 節 結果

高圧ホモジナイザー処理前後の殺菌乳酸菌の平均粒子径

殺菌乳酸菌の高圧ホモジナイザー処理前後の粒度分布を Fig. 2-3 に示した。A, C, E は処理前、B, D, F を処理後、x 軸に粒子径、左 y 軸に積算の相対粒子、右 y 軸に頻度の相対粒子を表している。また、平均粒子径および中央値を Table 2-1 に示した。結果、KH2 と LM

に関しては高圧ホモジナイザー処理によって粒子径は顕著に小さくなった。SNK は高圧ホモジナイザー処理前においても粒子径は小さく高圧ホモジナイザー処理による変化は大きくなかった。

マウスインフルエンザウイルス感染試験

インフルエンザウイルス量

感染 3 日目の肺および BALF 中のインフルエンザウイルス量をプラークアッセイにて評価した (Fig. 2-4, 2-5)。KH2、SNK、LM 群すべての群で Control と比較して顕著に低値を示しウイルス増殖を抑えていた。KH2 群の肺のウイルス量は Control に対し 31.3% ($p < 0.05$)、SNK 群は 30.1% ($p < 0.05$)、LM 群は 34.3%であった。BALF においても KH2 群は Control と比較して 10.6% ($p < 0.01$)、SNK 群は 9.2% ($p < 0.01$)、LM 群は 35.8%であった。

よって、高圧ホモジナイザー処理した乳酸菌の経口摂取は肺、BALF におけるインフルエンザウイルスの増殖を抑制した。

中和抗体価

感染 14 日目の血清および BALF 中の中和抗体価を評価した (Fig. 2-6, 2-7)。KH2、SNK、LM 群すべての群で Control と比較して中和抗体価の有意 ($p < 0.01$) な上昇が認められた。KH2 群の血清の中和抗体価は Control に対し 2.4 倍、SNK 群は 2.9 倍、LM 群は 1.6 倍であった。BALF においても KH2 群は 3.0 倍、SNK 群は 4.0 倍、LM 群は 2.2 倍であった。一方、OSL 群は Control 群に対し有意 ($p < 0.01$) に低値を示した。

以上の結果から、高圧ホモジナイザー処理した乳酸菌の経口摂取は血清、BALF 中の中和抗体価を上昇させた。

インフルエンザウイルス特異的 IgA

感染 14 日目の BALF および糞便中のウイルス特異的 IgA を測定した (Fig. 2-8,2-9)。KH2、SNK、LM 群すべての群で Control と比較してウイルス特異的 IgA が上昇し、その中でも KH2、LM 投与群は有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。KH2 群の BALF のウイルス特異的 IgA は Control に対し 2.2 倍、SNK 群は 2.5 倍、LM 群は 2.4 倍であった。糞便中は、KH 群で 2.4 倍、SNK 群は 1.7 倍、LM 群は 2.0 倍であった。一方、OSL 群は Control 群に対し低値であった。

以上の結果から、高圧ホモジナイザー処理した乳酸菌の経口摂取は BALF、糞便中のインフルエンザウイルス特異的 IgA を上昇させた。

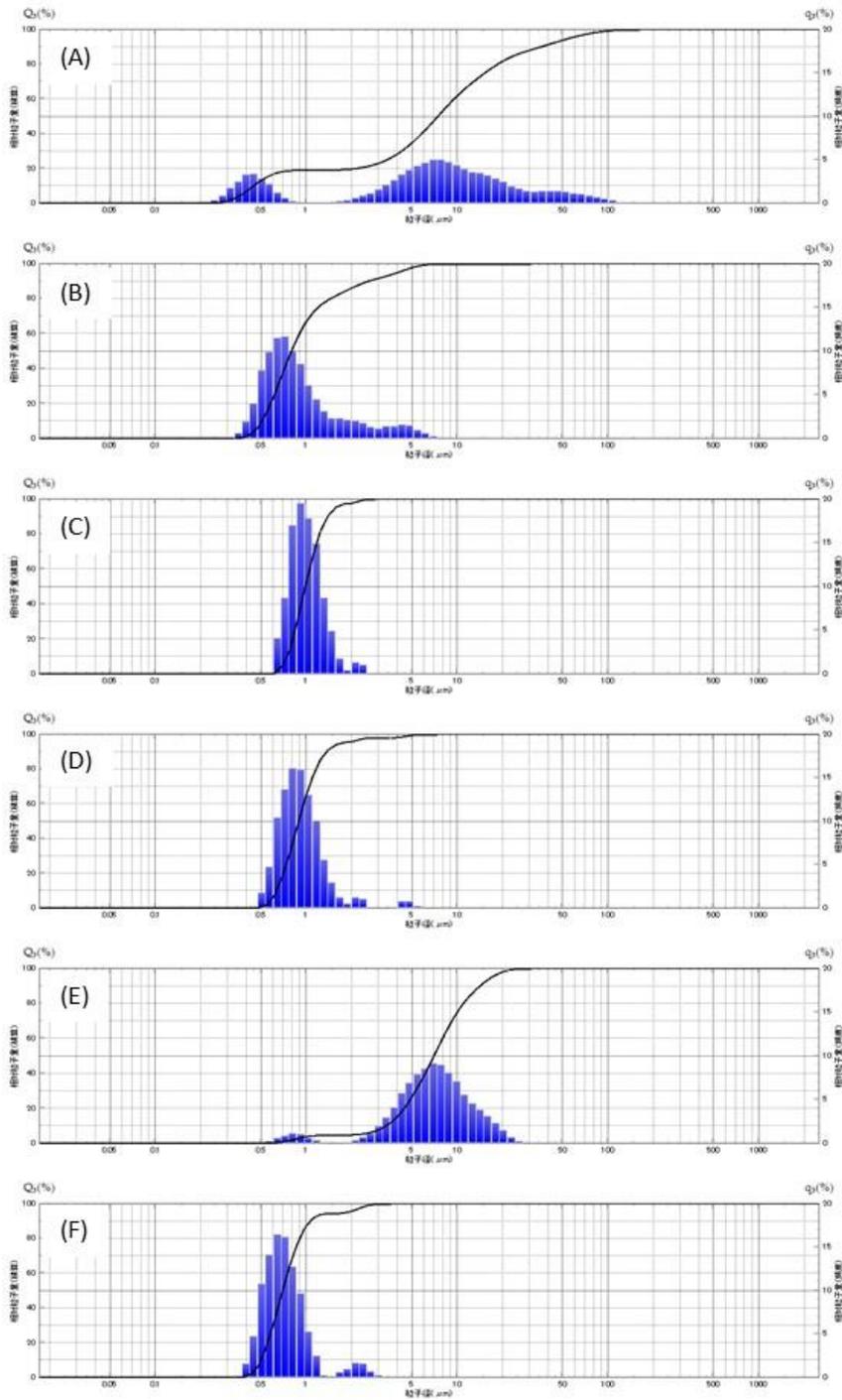


Fig.2-3 Measurement of KH2, SNK and LM using a laser diffraction particle size analyzer (SALD-2300). KH2 (A, B), SNK (C, D) and LM (E, F). A, C, D (non- homogenized) and B, C, D (homogenized) were suspended in distilled water and the relative particle mass (frequency and integration) was measured using a laser diffraction particle size analyzer.

Table.2-1 Measurement of KH2, SNK and LM using a laser diffraction particle size analyzer

		particle sizes (μm)			
	homogenize	Mean	\pm	SD	Median
KH2	×	5.80	\pm	0.65	7.37
	○	0.94	\pm	0.28	0.79
SNK	×	1.00	\pm	0.11	0.98
	○	0.93	\pm	0.16	0.88
LM	×	6.54	\pm	0.29	6.96
	○	0.73	\pm	0.16	0.69

The KH2, SNK or d-LM were suspended in distilled water and particle sizes (mean and median) were measured using a laser diffraction particle size analyzer (SALD-2300).

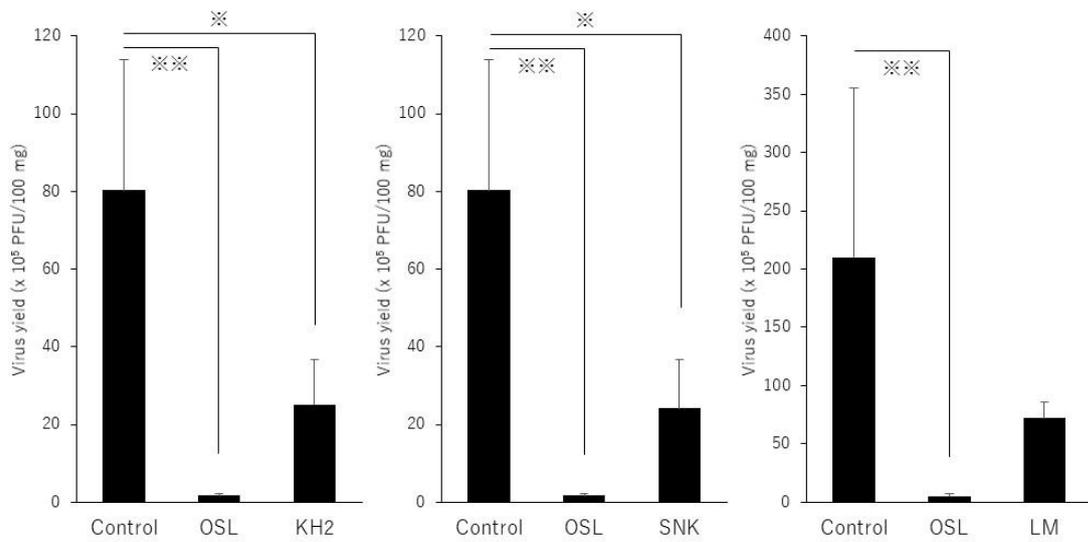


Fig.2-4 Effect of LAB administration on virus load in the murine lung.

Virus yield in samples were measured by a plaque assay on day 3 post infection. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01, *p < 0.05. KH2, *E. faecalis* KH2; LM, *Leu.mesenteroides*; OSL, oseltamivir; PFU, plaque-forming units; SNK, *L. plantarum* SNK12.

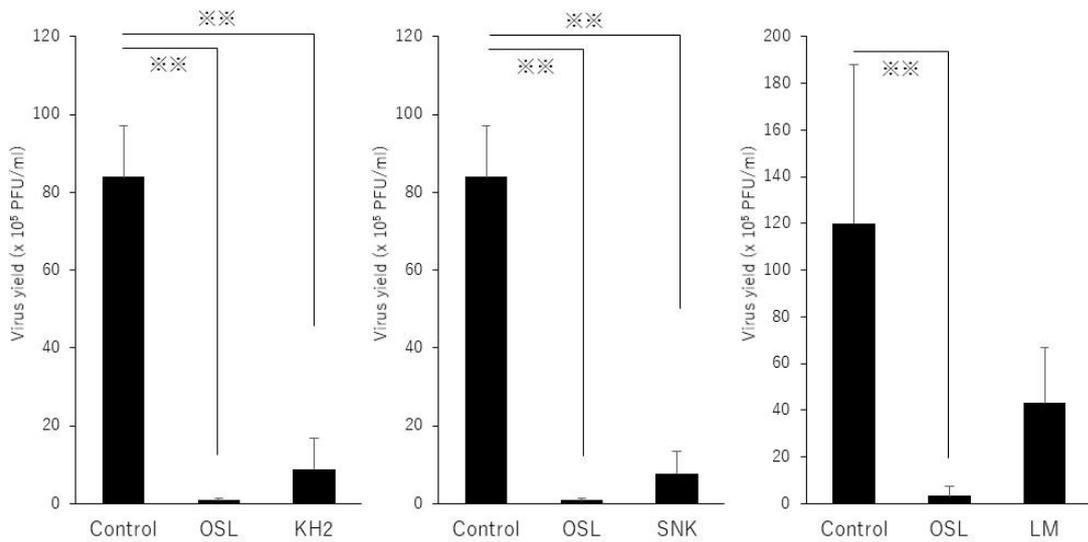


Fig.2-5 Effect of LAB administration on virus load in the murine BALFs.

Virus yield in samples were measured by a plaque assay on day 3 post infection. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01, *p < 0.05.

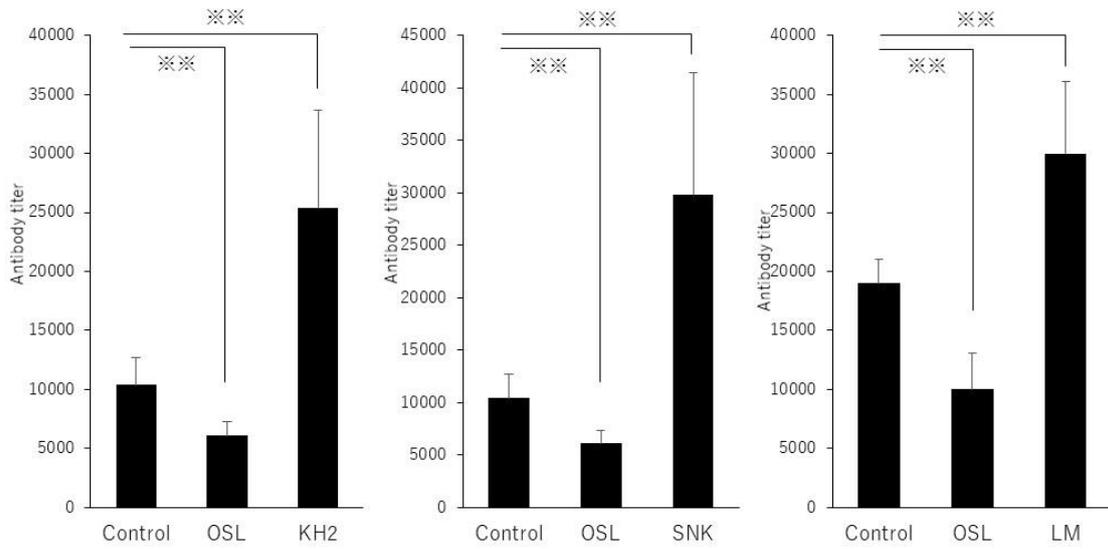


Fig.2-6 Effect of LAB administration on the neutralizing antibody titer against influenza A virus in the murine sera.

The titer of the virus-neutralizing antibody is presented as the reciprocal of the dilution of sera that reduced the plaque number to a level below 50% of that seen in the virus control.

Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01.

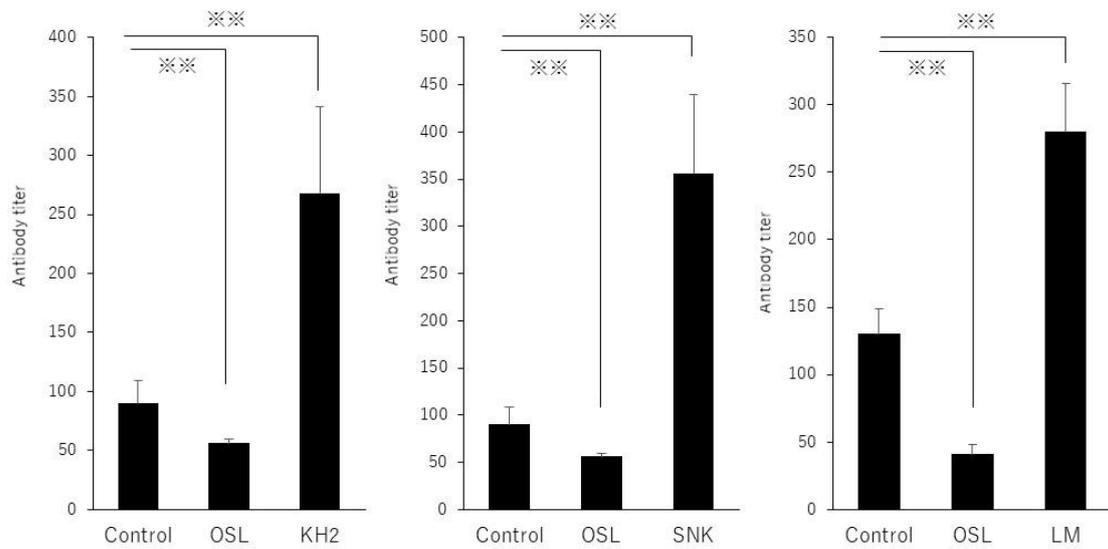


Fig.2-7 Effect of LAB administration on the neutralizing antibody titer against influenza A virus in the murine BALFs.

The titer of the virus-neutralizing antibody is presented as the reciprocal of the dilution of BALFs that reduced the plaque number to a level below 50% of that seen in the virus control.

Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01.

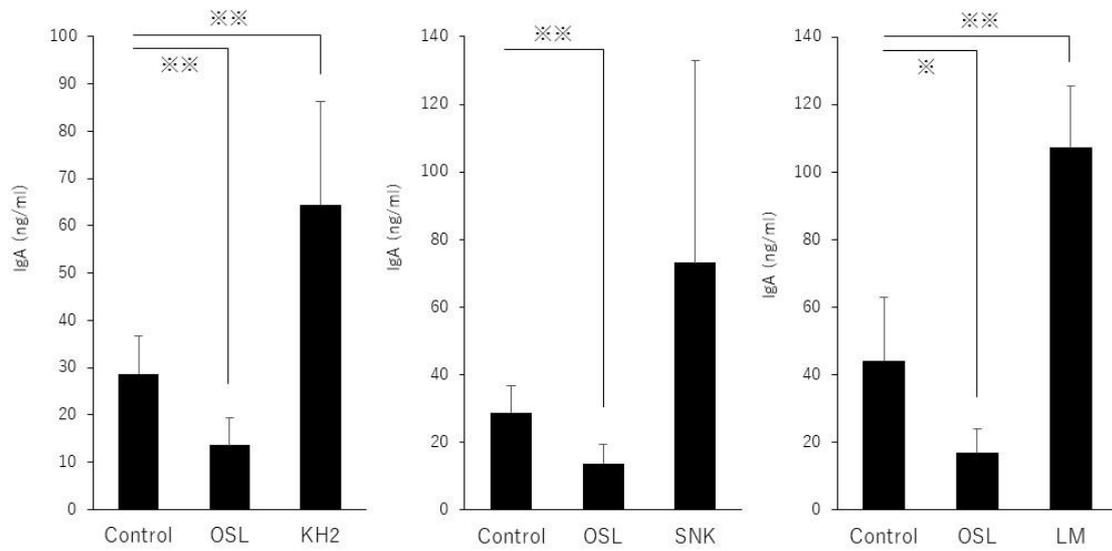


Fig.2-8 Effect of LAB administration on the production of influenza A virus specific IgA in murine BALFs.

The influenza A virus specific IgA levels in BALFs were determined by ELISA. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01; *p < 0.05.

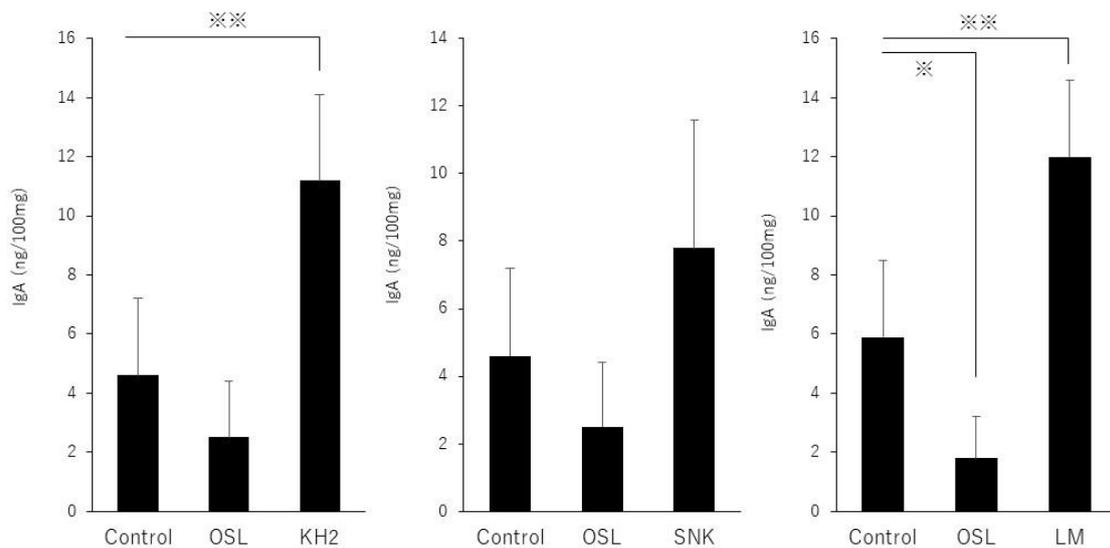


Fig.2-9 Effect of LAB administration on the production of influenza A virus specific IgA in murine feces.

The influenza A virus specific IgA levels in feces were determined by ELISA. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01; *p < 0.05.

第4節 考察

本章の研究結果から今回使用した KH2、SNK、LM すべての殺菌乳酸菌において高圧ホモジナイザー処理することで凝集が解消されたが、SNK に対しては高圧ホモジナイザー処理前においても凝集体が少なく乳酸菌種によって凝集の形成に差があることがわかった。これは、乳酸菌が産生する多糖や粒子径、pH などが複雑に関与していると考えられるので、今後は菌種間のゼータ電位や多糖量などを測定し凝集形成と関係を検証し乳酸菌開発に繋げていきたい。

また、インフルエンザウイルス感染防御作用に対してはすべての乳酸菌で有効であることがわかった。他の報告においても、*L.paracasei*、*L.gasseri*がインフルエンザに対して有効

性を示し[53, 54]、in vitro ではあるが *L.acidophilus*, *L.reuteri*, *L.salivarius* など多くの乳酸菌種で抗インフルエンザ作用[55]の報告例もあり、乳酸菌がウイルスに対して有効であることが示された。これら結果は微生物摂取による免疫刺激が全身の免疫を賦活化させ[パイエル板の論文]、結果ウイルス感染による重篤化を抑制していると推察されるが、LPS のように激しい免疫刺激の場合には過剰な炎症反応を引き起こし生体にとってマイナスに働く報告[56]もあることから、すべての微生物が有効に働くかは不明である。そのため実際にヒトが飲用する場合には in vitro (炎症性サイトカインの産生) による検証を経て、本研究で用いたウイルス感染試験による評価をするべきである。

また、本試験では試験の都合上で同時に検証ができず統計学的に比較はできなかったが、Control と比較した結果 KH2 が最も高い抗インフルエンザ作用を示していた。その要因の一つが菌数ではないかと考えられる。Park らは、経鼻投与ではあるが菌数依存的に抗インフルエンザ作用が強くなることを報告[57]しており、今回のマウスインフルエンザ感染試験では乳酸菌の重量を一定としているが、重量と菌数は異なるのでこの差によって生じた可能性も考えられる。KH2 は $0.5\mu\text{m}$ の球菌であるのに対し、SNK は長径 $1.0\text{-}1.5\mu\text{m}$ 、短径 $0.5\mu\text{m}$ の短桿菌であり、同じ重量であれば *E.faecalis* の方が菌数は 2-3 倍多いと予想されるが、実際に乳酸菌を DAPI 染色し蛍光顕微鏡で菌数を測定すると 1g あたりの菌数の差はほとんどなく、短桿菌である SNK の菌数は KH2 の 0.8-0.9 倍程度であった (data not shown)。よって、乳酸菌種による抗インフルエンザ作用の差は乳酸菌の菌数ではなく、乳酸菌体構成成分の免疫賦活作用の強弱ではないかと推測される。そこで、乳酸菌を構成する成分の何が免疫を刺激しウイルス感染防御効果を向上させているか探索した。Kawashima[65]らは菌体中の RNA をリボヌクレアーゼで分解処理すると、免疫刺激のトリガーの一つでもある IL-12 の産生量が顕著に低下することを報告している。我々は RNA と IL-12 産生の関係に着

目し、乳酸菌中の RNA をリボヌクレアーゼで分解処理しマウスインフルエンザ感染モデル
を用い検証を行なった。

第3章

乳酸菌 (*Enterococcus faecalis* KH2、*Lactobacillus plantarum* SNK12) のインフルエンザ感染防御に関わる有効成分の探索

第1節 緒言

本章では、前章で高い抗インフルエンザ作用を示した 2 種類の殺菌乳酸菌の活性本体の探索を行なった。有効成分が明確になることで殺菌乳酸菌の作製、製造を効率的に実施できるだけでなく、より有効性の高い殺菌乳酸菌の開発に繋げることが期待できる。そこで、免疫応答に影響があると報告されている乳酸菌中の RNA に着目し、乳酸菌中の RNA を酵素にて分解することで RNA のない乳酸菌を作製しマウス脾臓細胞を使った免疫刺激能とマウスインフルエンザウイルス感染試験にて RNA が活性本体であるか評価した。

経口摂取した乳酸菌は、腸管上皮細胞に認識され上皮細胞のサイトカイン産生制御や生存維持、バリア機能の強化など生体に有益な効果をもたらすことが明らかとなりつつある [58]。免疫担当細胞は、乳酸菌の構成成分である病原体関連分子パターン (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs)、リポタンパク質、リポ多糖、ペプチドグルカン、リポアラビノマンナン、リポタイコ酸、DNA などを PRRs により認識しており、その受容体は TLRs、レチノイン酸誘導性遺伝子 (retinoic acid-inducible gene, RIG) - I 様受容体、C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptors, CLR)s、NLRs、DNA センサーなどがあげられる [59-63]。その中でも TLR に関する研究は盛んに行われており、TLR1 から TLR9 については発現する細胞が特定され、リガンドやシグナル伝達経路が明確となり生体における役割が解明されつつある。TLR は細胞表面や細胞内小胞、エンドソームに局在し [64]、細

胞外にロイシンにリッチな領域 (leucine-rich repeat, LRR)、また細胞内に Toll/IL (インターロイキン) -1 receptor (TIR) ドメインと呼ばれる領域を有する。TLR ファミリー分子は LRR 配列の多様性によって各種細菌構成成分に対する柔軟な対応手段を獲得したと言える。また、TIR ドメインは様々なアダプター分子と相互作用し、細胞内へシグナルを伝達するために必須の領域である。TLR の中でも我々は TLR7, 8 のリガンドである RNA に着目した。Kawashima らや Inoue らは乳酸菌の RNA をリボヌクレアーゼで分解すると、ヒト末梢血単核球もしくはマウス脾細胞によって産生される IL-12 が顕著に減少しており、それは TLR7, 8 を介した作用であることを報告している [65, 66]。また、IL-12 は樹状細胞、マクロファージ、B 細胞などで産生される炎症性サイトカイン [67, 68] であり、抗腫瘍、抗ウイルスなどの免疫調節作用を有する。これらの報告から、乳酸菌の RNA は免疫刺激に影響を与えていることを示唆しており、免疫系を介した乳酸菌の保健効果は乳酸菌 RNA の影響を受けていると考えられる。そこで、第二章で有効な結果を示した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2 (以下 KH2)、*Lactobacillus plantarum* SNK12 (以下 SNK) を用い、リボヌクレアーゼ処理で乳酸菌中の RNA を分解することで乳酸菌中の RNA が免疫応答に影響しているか検証した。最初に in vitro (マウス脾臓細胞への添加試験) で IL-12 産生量を比較し [69, 70]、さらに KH2、SNK とリボヌクレアーゼ処理で RNA を分解した KH2 と SNK を強制経口投与し、第 2 章と同様マウスインフルエンザ感染モデルを用い感染防御効果で比較した。

第 2 節 材料と方法

殺菌乳酸菌の作製および乳酸菌中 RNA の分解

殺菌乳酸菌を作製した後、RNA のリボースとリン酸基間の結合を加水分解する酵素 (リボヌクレアーゼ) を用い乳酸菌中の RNA を分解した。

KH2 (*E. faecalis* KH2 (International Patent Organism Depository in Japan number, NITE P-14444)), SNK (*L. plantarum* SNK12 (International Patent Organism Depository in Japan number, NITE P-1445)) は、6%グルコース(富士フィルム和光純薬)、2%酵母エキス(日本ベクトン・ディッキンソン)、0.2%リン酸一カリウム(富士フィルム和光純薬)、0.1%硫酸マグネシウム(富士フィルム和光純薬)、0.4%クエン酸三ナトリウム(富士フィルム和光純薬)、0.01%硫酸マンガン(富士フィルム和光純薬)、および 0.05%グリセリン - 脂肪酸エステル(関東化学)組成の培地に接種し、KH2: 37°C、SNK: 30°Cの条件で 20 時間培養後、100°C、30 分加熱殺菌し、蒸留水にて遠心洗浄 2 回行ない菌体を回収した。また、リボヌクレアーゼ処理は、RNase A (Invitrogen) を用いて行った。加熱殺菌した KH2 と SNK を蒸留水に懸濁し RNase A を最終濃度 10 μ g/mL になるように添加した。37°Cで 120 分間インキュベートした後、蒸留水で 2 回洗浄した。リボヌクレアーゼ処理した KH2 および SNK をそれぞれ R-KH2 および R-SNK とした。

マウス脾臓細胞を用いた免疫刺激能の測定

乳酸菌のリボヌクレアーゼ処理 (RNA 分解) による免疫刺激能への影響をマウス脾臓細胞に各乳酸菌を直接添加し培養後、培養上清中の IL-12 を測定することで評価した。

終濃度 1 μ g/ml になるよう各乳酸菌を RPMI1640 培地 (Wako) で調製した後、8 週齢の雌性 BALB/c マウス (日本クレアジャパン) から採取したマウス脾臓細胞を 96 ウェル細胞培養プレートに添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間培養後、培養上清を回収し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) にて IL-12 の濃度を測定した。ELISA で使用した試薬は、一次抗体 (精製抗マウス IL-12 (p70) 抗体; BioLegend)、二次抗体 (ビオチン抗マウス IL-12/IL-23 p40 抗体、BioLegend)、ブロッキング (Block Ace Powder、

KAC)、捕捉抗体 (HRP アビジン、BioLegend)、基質 (テトラメチルベンジジン ; Sigma-Aldrich)、標品 (組換えマウス IL-12 (p70) (ELISA Std.)、BioLegend) である [71]。

マウスインフルエンザウイルス感染試験

乳酸菌のリボヌクレアーゼ処理 (RNA 分解) による効果への影響をマウスに各乳酸菌を経口投与しインフルエンザウイルスを経鼻感染させ感染 3 日目のウイルス量および感染 14 日目の中和抗体価、ウイルス特異的 IgA を指標に評価した。

雌性の 16~18g の特定病原体非含有 BALB/c マウス (6 週齢) を日本 SLC (静岡、日本) から入手した。実験はすべて中部大学の動物実験指針に従い適正に実施された。マウスに 2×10^4 PFU/50 μ l のインフルエンザウイルスを鼻腔内感染させた日を 0 日とし、各乳酸菌 (5mg/日) および陽性コントロールとしてオセルタミビルリン酸塩 (以下、OSL) (0.2mg/日) を蒸留水に溶解し、ウイルス接種の 7 日前から接種後 14 日まで 1 日 2 回経口投与した。対照群のマウスには蒸留水のみを経口投与した。感染 3 日目に肺および気管支肺胞洗浄液 (以下、BALF) を、14 日目に血液および糞便サンプルを採取した (Fig.3-1)。肺組織は 1mg に対し 10 μ l の PBS を添加した後、10 秒間超音波処理し、1500xg、30 分の条件で遠心後、上清を回収し-80°Cに保存した。BALF に関しては気管カニューレを介し 0.8ml の氷冷 PBS で 4 回洗浄することによって回収し、1500xg で 10 分間遠心し上清を供試サンプルとした。血液は 3,000xg で 10 分間遠心し、血清を回収し-20°Cで保存した。糞便抽出物は、糞便 1mg あたり 10 μ L の PBS を添加後、超音波処理で懸濁して、遠心処理することによって調製した。

感染後 3 日目に採取した肺および BALF サンプル中のウイルス量を MDCK 細胞モノレイヤー上のプラークアッセイにより定量した。感染 14 日目の血清および BALF は第 2 章に

記載した 50% plaque reduction method を用いた中和抗体価の評価、BALF および糞便抽出物は ELISA により IgA 濃度を測定した。

統計学的処理

データは平均値±標準偏差 (SD)で標記した。統計学的有意性については一元配置分散分析を行ない、チューキー多重比較検定 (Tukey's multiple comparison test) を用い比較した。

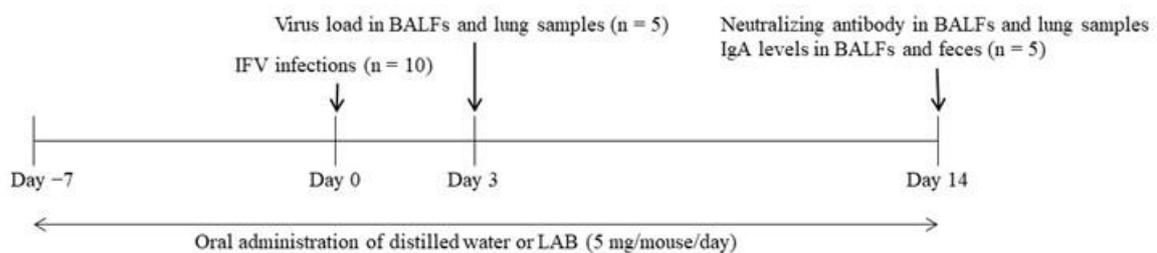


Fig.3-1 Experimental procedure of influenza virus infection.

Mice in the control or LAB groups were administered distilled water or LAB (5 mg/day in two doses per day) during the study period (day -7 to 14). Mice were intranasally infected with IFV on day 0. On day 3 post IFV infection, five mice were sacrificed from each group to quantify virus loads in BALFs and lung. The remaining five mice were sacrificed for measurement of neutralizing antibody and IgA levels on day 14. BALF, bronchoalveolar lavage fluids; IFV, influenza A virus; LAB, lactic acid bacteria.

第3節 結果

KH2 および SNK のリボヌクレアーゼ処理によるマウス脾細胞の IL-12 産生

KH2 および SNK 共にリボヌクレアーゼ処理を行なうことでマウス脾細胞から産生される IL-12 産生量は著しく低下した ($p < 0.01$) (Fig. 3-2)。また、IL-12 産生量の減少は、KH2 よりも SNK の方が顕著であった。

マウスインフルエンザ感染モデルにおける KH2、SNK リボヌクレアーゼ処理の影響

インフルエンザウイルス感染したマウスの体重変化に対するリボヌクレアーゼ処理または未処理の KH2 および SNK の影響を Fig.3-3 に示した。対照群は、インフルエンザウイルス感染後 7 日目に約 16%の体重減少を示した。KH2、R-KH2、SNK および R-SNK 群は、感染後 7 日目にそれぞれ約 14%、約 22%、約 17%および約 21%の体重減少を示した。リボヌクレアーゼ処理群と未処理群では有意差は認められなかったが、KH2 および SNK は R-KH2 および R-SNK よりも体重減少をわずかに抑制した。その後、これらの群のマウスは徐々に体重が増加し、KH2 群は感染後 14 日目には感染前の体重レベルに戻った。

感染後 3 日目のインフルエンザウイルス感染マウスの肺および BALF におけるウイルス量をそれぞれ Fig.4A および Fig.4B に示した。リボヌクレアーゼ処理または未処理の KH2 および SNK 投与は、対照群と有意な差を示さなかった R-KH2 の肺を除いて、すべての群でウイルス量を有意に減少させた ($p < 0.05$)。同様の傾向は BALF でも観察された。尚、OSL 群のウイルス量は著しく低かった。

Fig.5 は、感染後 14 日目の BALF (Fig.5A) および血清 (Fig.5B) におけるインフルエンザウイルスに対する中和抗体価のリボヌクレアーゼ処理および未処理 KH2 および SNK の影響を示した。未処理の KH2 および SNK を投与したマウスの BALF および血清の中和抗

体価は、対照群と比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。一方、BALF におけるリボヌクレアーゼ処理した R-KH2 および R-SNK 群の中和抗体価は対照群とほぼ同等であり、中和抗体価はリボヌクレアーゼ処理により有意に低下した ($p < 0.05$) (図 5A)。血清においても有意差は得られなかったがリボヌクレアーゼ処理で低下していた。また、OCL 群の中和抗体価は BALF および血清のいずれにおいても対照群に比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。

KH2 および SNK のリボヌクレアーゼ処理がマウスの局所の免疫応答への刺激を解明するために、感染後 14 日目に BALF および糞便中のインフルエンザウイルス特異的 IgA を測定した (Fig.6A, B)。KH2 群の IgA は対照群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.01$)。リボヌクレアーゼ処理した R-KH2 群の IgA は対照群と変化なく、KH2 群と比較して BALF ($p < 0.05$) および糞便 ($p < 0.01$) で有意に低値を示した。SNK 群と R-SNK 群の差は BALF では IgA に有意な差は認められなかったが、糞便においては R-SNK で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。一方、OCL 群では対照群と比較して BALF の IgA が有意に低値を示し、糞便においても低値を示した ($p < 0.01$)。

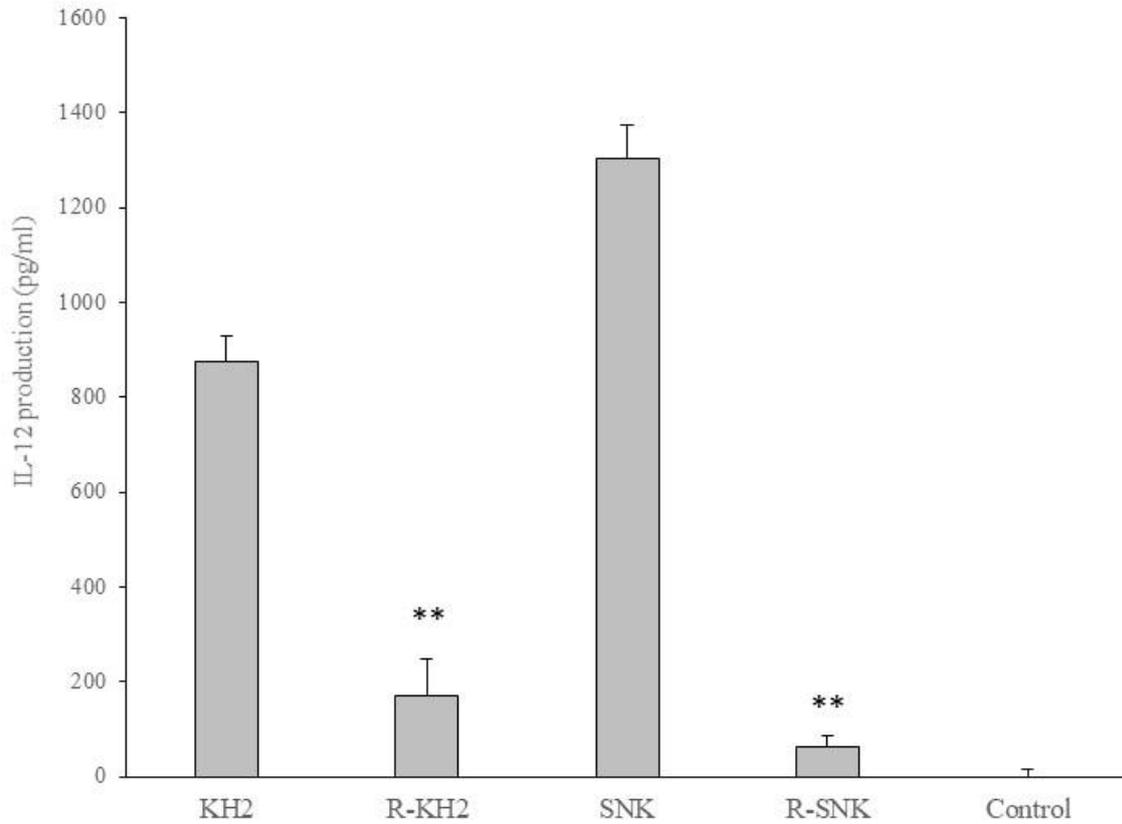


Fig.3-2 Effect of ribonuclease treatment of LAB on IL-12 production in mouse splenocytes.

Heat-killed *E. faecalis* KH2, and *L. plantarum* SNK12 were treated with or without ribonuclease and co-cultured with mouse splenocytes, for 24 hr. IL-12 protein concentration in the culture supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each value is presented as the mean \pm SD. n=6. **p < 0.01 vs untreated for each LAB. KH2, non-treated *E. faecalis* KH2; R-KH2, ribonuclease-treated *E. faecalis* KH2; LAB, lactic acid bacteria; SNK, non-treated *L. plantarum* SNK12; R-SNK, ribonuclease-treated *L. plantarum* SNK12; Control, culture medium only.

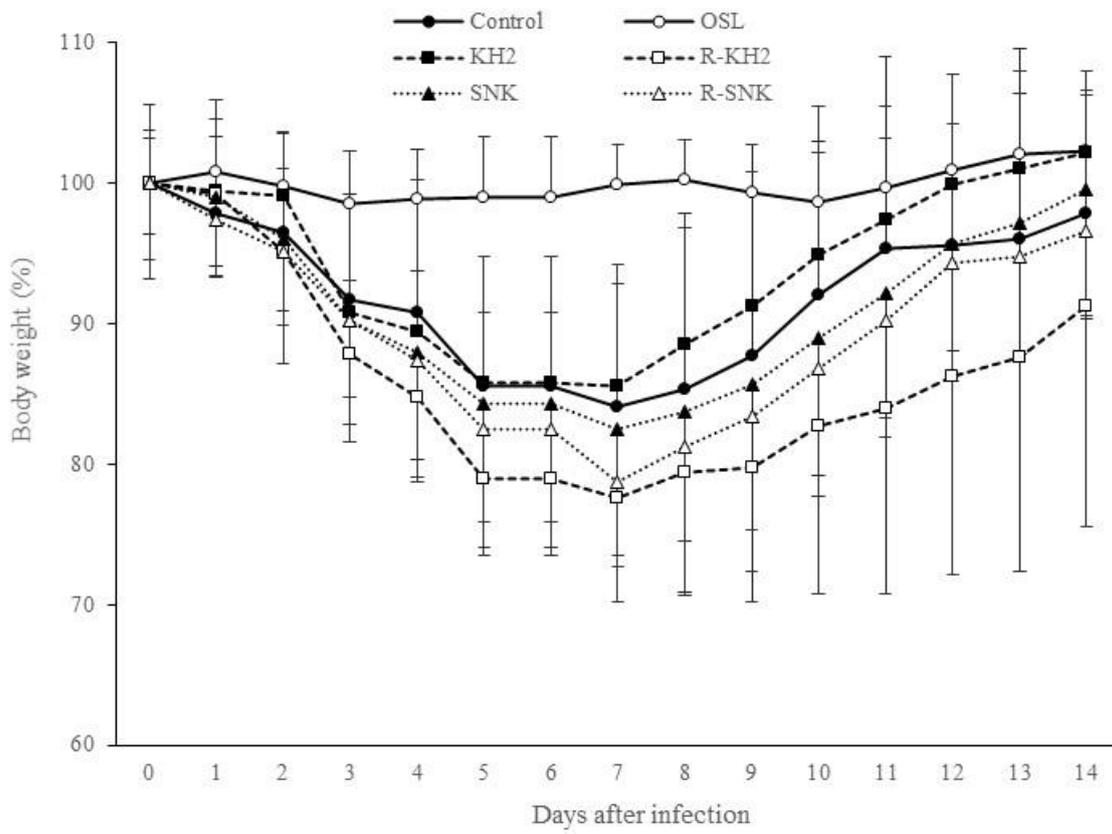


Fig.3-3 Body weight changes of mice infected with the IFV.

IFV infected mice were orally given distilled water (Control (filled circle)), 0.2 mg/day of oseltamivir (OSL (white circle)), 5 mg/day of bacteria (KH2 (filled square), untreated *E. faecalis* KH2; R-KH2 (white square), ribonuclease-treated *E. faecalis* KH2; SNK (filled triangle), untreated *L. plantarum* SNK12; R-SNK (white triangle), ribonuclease-treated *L. plantarum* SNK12) from 7 days prior to virus infection to 14 days post-infection. Body weights are relative to those on the day of viral infection (day 0), set as 100%. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. IFV, influenza A virus.

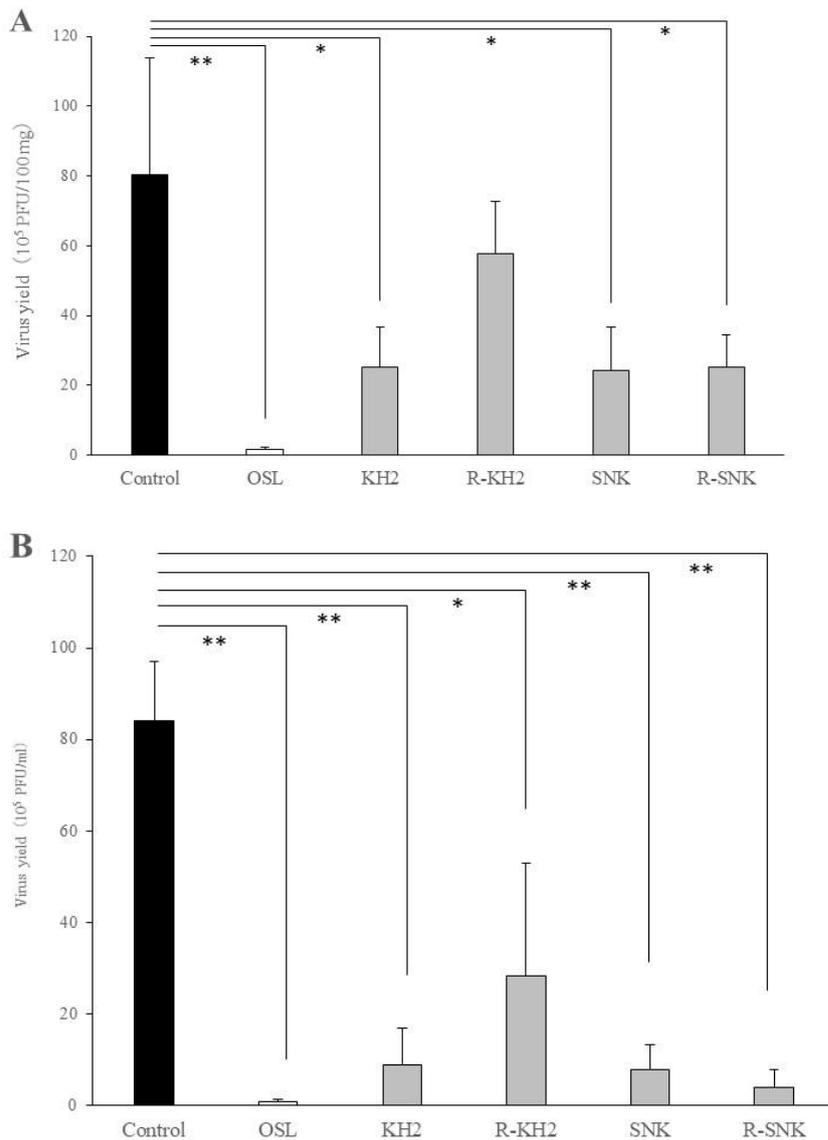


Fig.3-4A, 4B Effect of LAB administration on virus load in the mice.

Virus yield in BALFs (A) and lung samples (B) were measured by a plaque assay on day 3 post infection. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01, *p < 0.05. BALF, bronchoalveolar lavage fluids; KH2, non-treated *E. faecalis* KH2; R-KH2, ribonuclease-treated *E. faecalis* KH2; LAB, lactic acid bacteria; OSL, oseltamivir; PFU, plaque-forming units; SNK, non-treated *L. plantarum* SNK12; R-SNK, ribonuclease-treated *L. plantarum* SNK12.

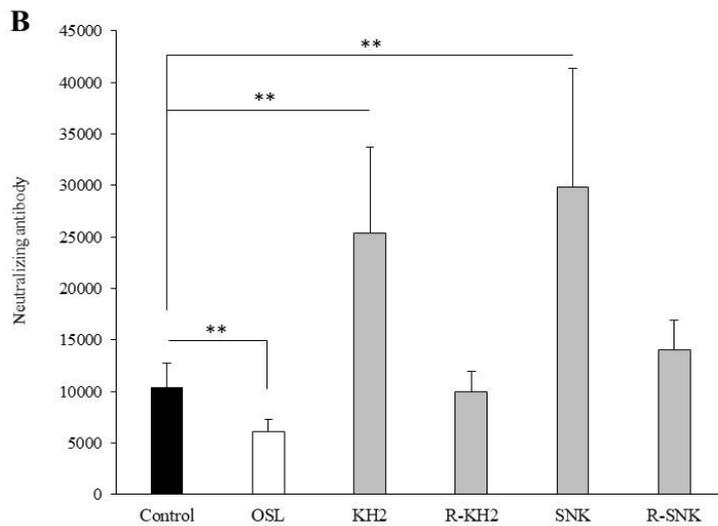
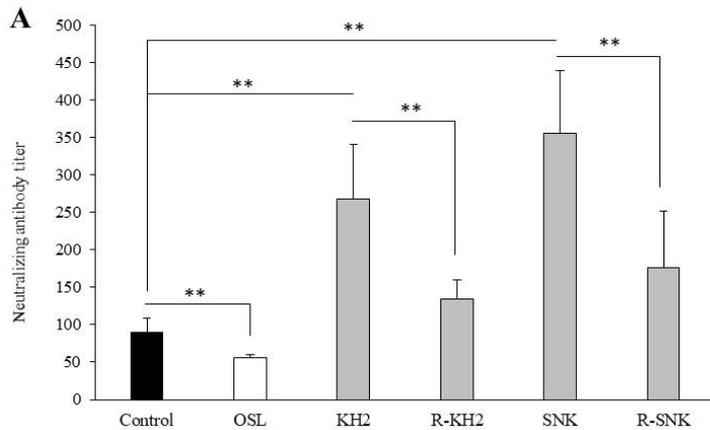


Fig. 3-5A, 5B Effect of LAB administration on the neutralizing antibody titer against IFV in the mice.

The titer of the virus-neutralizing antibody is presented as the reciprocal of the dilution of BALFs (A) and sera (B) that reduced the plaque number to a level below 50% of that seen in the virus control. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01; *p < 0.05.

BALF, bronchoalveolar lavage fluids; IFV, influenza A virus; KH2, non-treated *E. faecalis* KH2; R-KH2, ribonuclease-treated *E. faecalis* KH2; LAB, lactic acid bacteria; OSL, oseltamivir; SNK, non-treated *L. plantarum* SNK12; R-SNK, ribonuclease-treated *L. plantarum* SNK12.

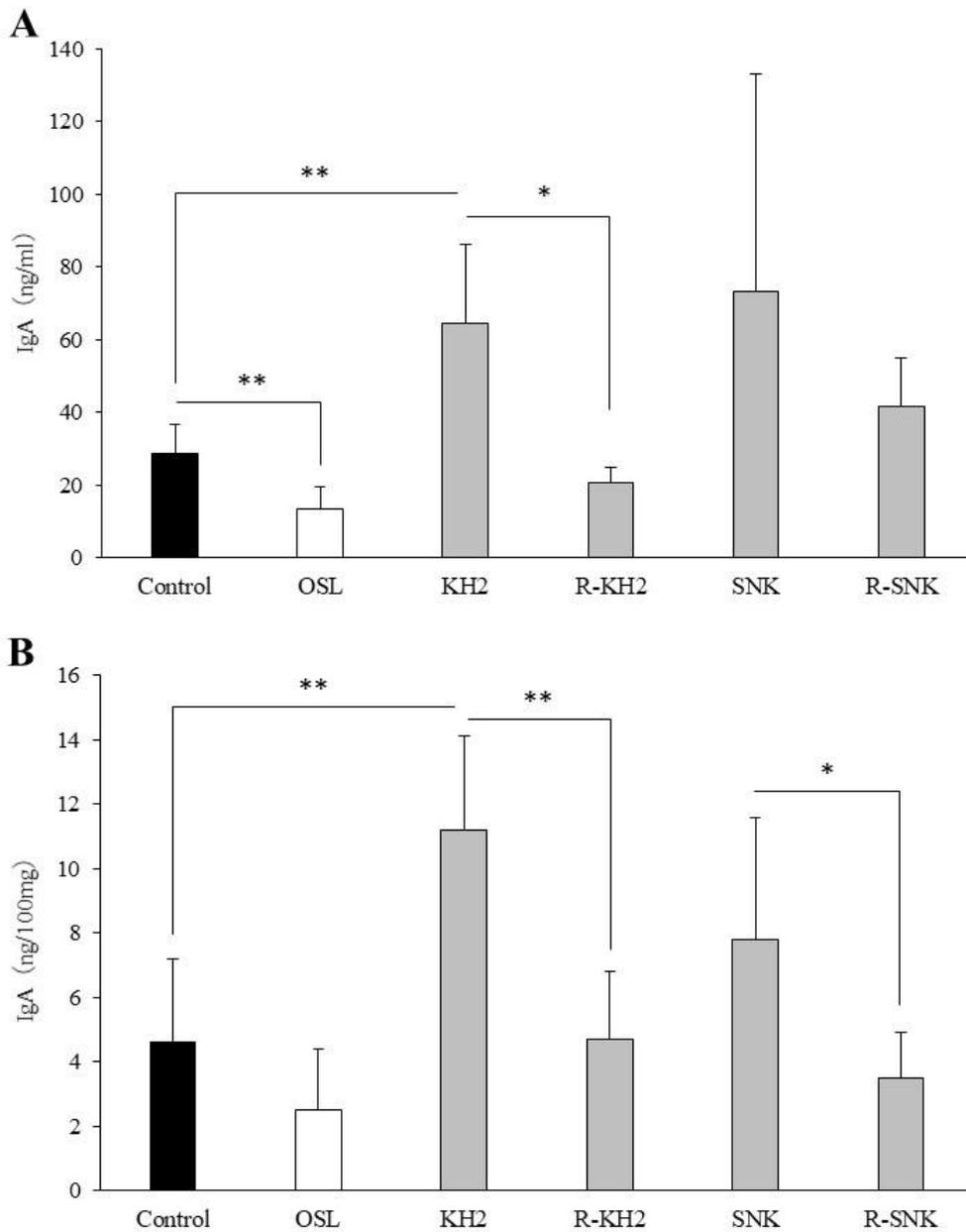


Fig. 3-6A, 6B Effect of LAB administration on the production of IFV specific IgA in mice.

The IFV-specific IgA levels in BALFs (A) and feces (B) were determined by ELISA. Each value is presented as the mean \pm SD. n=5. **p < 0.01; *p < 0.05. BALF, bronchoalveolar lavage fluids; IFV, influenza A virus; KH2, non-treated *E. faecalis* KH2; R-KH2, ribonuclease-treated *E. faecalis* KH2; LAB, lactic acid bacteria; OSL, oseltamivir; SNK, non-treated *L. plantarum* SNK12; R-SNK, ribonuclease-treated *L. plantarum* SNK12.

第4節 考察

マウス脾細胞を使った IL-12 産生とマウスインフルエンザ感染モデルを用いて、KH2 と SNK の RNA が免疫応答に影響するか検証を行なった。その結果、リボヌクレアーゼ処理により KH2 および SNK の RNA を分解した結果、脾細胞における IL-12 産生は著しく減少した。インフルエンザウイルス感染防御効果においては、酵素処理で RNA を分解していない KH2 および SNK の経口投与は感染防御効果が期待できる結果であったが、リボヌクレアーゼ処理で乳酸菌の RNA を分解した結果、感染防御効果の低下が認められた。これらの結果から、KH2 および SNK の RNA がインフルエンザウイルス感染防御効果の重要な因子であることが示された。

一方、微生物の細胞壁が IL-12 産生に重要な因子であるという報告はあるが[68, 69]、本研究結果では乳酸菌中の RNA が IL-12 産生に大きな影響を与える主要な因子である可能性があり、菌種による差なのか分析方法による差であるのか不明なため今後は同一な菌種、方法で比較をしてみたい。また、*L. plantarum* や *S. mutans* の細胞壁は、樹状細胞やマクロファージの TLR2 や TLR4 のシグナル伝達を介して IL-12 産生を強く誘導する [72, 73]が、KH2 や SNK の IL-12 産生は RNA 依存である可能性が高いため異なるシグナル伝達であると推測される。TLR3, 7, 8 を介して IL-12 を産生する報告もあることから[74, 75]、KH2 と SNK も TLR3, 7, 8 を介したシグナル伝達である可能性が考えられる。二本鎖 RNA を認識する TLR3 や一本鎖 RNA を認識する TLR7 (ヒトでは TLR8) はウイルスを認識する受容体として知られており[75, 76]、KH2 と SNK の RNA がインフルエンザウイルス感染防御効果に影響していることから、KH2 および SNK の RNA がウイルス RNA と同様の免疫応答をすることで感染防御効果が期待できるのではないかと考えられる。今後は、KH2 または SNK の全ゲノムを解析することで、インフルエンザウイルスが保有する RNA 配列と類

似する配列がないか解析すると共に DNA を保有するウイルス（ヘルペスウイルス等）に対する検証や TLR3, 7, 8 ノックアウトマウスや siRNA を用い詳細なメカニズムの解明に繋げていく予定である。

また、KH2 と SNK には先行研究[77-81]と同様、ウイルス量の減少、ウイルス特異的抗体の増加などインフルエンザウイルスの感染防御効果が認められた。乳酸菌の抗インフルエンザ効果については、プロバイオティクス株を用いた報告が多く、本研究で使用した加熱殺菌菌体は生菌と同等の効果を示したため、免疫を介材した抗ウイルス効果は生菌である必要はないことが示された。その作用機序は、腸管内の M 細胞から乳酸菌を取り込み樹状細胞やマクロファージが貪食することで全身または局所の免疫応答を誘導することであると考えられる[82, 83]。我々も KH2 が腸管内のパイエル板から取り込まれることを確認しており、同様のメカニズムであると考えている。しかし、KH2 および SNK がパイエル板から取り込まれた後の免疫反応に関しては不明なため免疫組織を中心に解析を行なうことで作用メカニズムを明らかにしていきたい。

また、興味深いことに KH2 と SNK の RNA を分解するとインフルエンザウイルス感染 14 日目の血清および BALF の中和抗体価、血清および糞便中のウイルス特異的 IgA は有意に低下したが (Fig. 3-5A, 5B, 3-6A, 6B)、感染 3 日目のインフルエンザウイルス量は RNA 分解による顕著な差は認められず、特に SNK においては RNA の分解による変化はほとんど認められなかった (Fig.3-4A, 4B)。ウイルス感染の初期は抗ウイルス I 型インターフェロンなどの炎症性サイトカインが産生され自然免疫系がウイルス制御において重要な役割を果たしている[84]。自然免疫がウイルスの認識に関与する主要な受容体は、TLRs、RLRs、CLRs、NLRs であり[59-62]、RNA 分解で変化のあった KH2 の RNA は上記受容体に対し影響を与えた可能性が考えられる。一方、SNK は RAN の分解で初期のウイルス抑制効果

にはほとんど影響を及ぼさず、KH2とは異なる免疫経路ではないかと思われる。また、感染後14日目の中和抗体価およびIgA産生量に対してはRNAの分解で顕著に低下したことから、KH2およびSNKのRNAは自然免疫ではなく獲得免疫に大きな影響を与えることが示唆された。

以上より、KH2およびSNKの経口投与はインフルエンザウイルス感染に対する防御効果が期待できインフルエンザ治療薬としての可能性を見出した。さらに、有効成分の一つがKH2とSNKのRNAであることが示され、このRNAが獲得免疫に影響を与えることが示唆された。本研究で得られた結果をもとに、今後の研究では、乳酸菌中のRNAを指標としてインフルエンザウイルス感染防御に対しより効果的な乳酸菌種を探索するだけでなく、RNAの配列解析や生菌との比較を行なうことで作用メカニズムの解明にも繋げていきたい。

第4章

加熱殺菌した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2 株の摂取が健常な日本人成人の腸内環境に及ぼす影響と安全性の検討

第1節 緒言

本章では、2章で免疫刺激能、マウスインフルエンザウイルス感染防御に有効性を示した殺菌乳酸菌 (*E.faecalis* KH2) が乳酸菌の保健効果として一般的に知られているプロバイオティクス効果の一つである便秘改善の有効性を有しているのか検証を行なった。便秘改善効果を確認することで殺菌乳酸菌は免疫に関連する作用だけでなく排便、整腸など消費者が抱く乳酸菌の一般的な保健効果に対しても訴求できるようになり殺菌乳酸菌の普及に寄与できる。

近年、腸内細菌叢の測定に分子生物学的手法が用いられるようになり、腸内に存在する腸内細菌の種類や占有率が従来の培養法での知見と大きく異なることが明らかになってきた。この手法によれば、ヒトの腸内細菌は *Firmicutes* 門と *Bacteroides* 門、*Actinobacteria* 門および *Proteobacteria* 門でほぼ 100% を占めている [85]。かつて、腸内の主要菌の一つと考えられていた *Bifidobacterium* は 2% 程度しか占有率のない *Actinobacteria* 門に属している。食品成分による腸内環境への効果を検討する際は、*Bifidobacterium* よりむしろ、60% 以上の占有率を占める *Firmicutes* 門に属する *Clostridium* や *Lactobacillus* に対する影響を考慮する必要がある。また、培養法が全盛期であった時代は生きたビフィズス菌や乳酸菌摂取による整腸作用が重要であると考えられていたが [86, 87]、摂取した乳酸菌が腸管内で増殖するという報告例はなく、現在では乳酸菌による整腸作用やその他効果は他の要因で発揮さ

れているのではないかと考えられるようになってきた。その考えを裏付けるように殺菌された乳酸菌を配合した野菜飲料摂取による排便促進[88]や抗ウイルス効果[89]など殺菌された乳酸菌摂取による効果の報告が増加している。

そこで、本研究では近年、食生活の変化、運動不足、不規則な生活や恒常的なストレスなどにより増加する便秘症状[90]を加熱処理した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2 株（以下、KH2）摂取により解決できないか、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法を用いた腸内細菌の占有率および便形スケール[91]、日本語版便秘評価尺度 (Constipation Assessment Scale, CAS) -MT[92, 93]を指標にプラセボ摂取群と比較を行った。また、身体測定、理学検査、末梢血液検査、血液学検査、血液生化学検査等を行い KH2 の経口摂取における安全性について検証した。

第2節 材料と方法

研究デザイン

ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験法にて実施した。研究計画書は医療法人社団盛心会タカラクリニック（東京都品川区）の倫理委員会にて承認を得た（承認番号：1506-1505-NN01-01-TC）。試験参加者に対しては、試験内容を十分に説明し試験参加への同意を書面にて取得する。また、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針およびヘルシンキ宣言に則り、医学倫理に十分配慮し実施した。試験に先立ち、本試験への参加を望む者に対しインフォームドコンセントを実施し、試験の方法・医学的意義および危険性について十分に理解した上で自ら試験に参加を望む者を被験者とした。被験者は、排便が週2～5回の健常な日本人成人（30～59歳）を対象とした。試験の参加にあたり、次の条件を除外基準とした。①悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞の治療の既往歴がある者、②心房細動、不整脈、

肝障害、腎障害、脳血管障害、リウマチ、糖尿病、脂質異常症、高血圧、消化器系疾患（潰瘍性大腸炎、胃潰瘍、大腸憩室症を含む）、その他の慢性疾患で治療中の者、③医薬品（漢方薬を含む）を常用している者、④整腸作用に関与すると思われるヨーグルト、オリゴ糖、乳酸菌を日頃から摂取している者、⑤アレルギー（被験品関連製品、医薬品）がある者、⑥過去3年間に、花粉症の薬を使用した者、⑦喫煙者、⑧サプリメントや栄養素強化食品を習慣的に摂取している者、⑨妊娠中、授乳中、あるいは試験期間中に妊娠する意思のある者、⑩同意書取得日以前の3か月間において他の臨床試験に参加していた者、⑪その他、試験責任医師が本試験の対象として不適切と判断した者。被検者は定められた用法・用量の通り摂取し、暴飲暴食を避け、それまでの食生活および生活習慣を変えない。検査前日は飲酒と過度の運動を行わない。採血を行う6時間前から飲食を禁止する。試験期間中は試験食以外の整腸作用に関与すると思われる牛乳・乳製品、ヨーグルト、オリゴ糖、乳酸菌等の製品をなるべく摂取しない。試験食品の摂取の有無、生活状況については日誌に毎日記録し、摂取検査前1週間および摂取期間中の便通日誌（日付、便通の有無、排便量、形状、臭い、爽快感、特記事項）を記載した。また、KH2の摂取は100mg/日とし配合とし、夕食後に水またはぬるま湯と共に摂取し、摂取期間は1週間とした。尚、プラセボはKH2の代わりとしてデキストリンを用いた。

評価項目および評価方法

主要評価項目として腸内環境を測定した。解析は、末端蛍光標識したプライマーセットで細菌DNAをPCR増幅し、制限酵素による消化後、フラグメントを解析するT-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法を用いた[94]。試験参加者の糞便をT-RFLP法で分析し、*Bifidobacterium*、Lactobacillales目、*Bacteroides*、*Prevotella*、

Clostridium cluster IV、*Clostridium* subcluster XIVa、*Clostridium* cluster IX *Clostridium* cluster XI、*Clostridium* cluster XVIII、others の占有率を評価した。糞便の採取は、採便キット（株式会社テクノスルガラボ）を用いた。

CAS-MT、便形スケールを用い排便に対する自覚症状を評価した。尚、CAS-MT による検査項目は、「お腹が張った感じ(膨れた感じ)」「排ガス量が少ない」「便の回数が少ない」「直腸に便が充満している感じ」「排便時の肛門の痛みがある」「便の量が少ない」「便が固くて出にくい」「にじみ出る水様便がある」で、数値が低いほど自覚症状が良好であることを意味する。一方の便形スケールを用いた便の形状評価は、便形状を以下 8 通りに分類し、該当するものを選択させた。分類は「水様の下痢、排出速度が速い」「かゆ状で、表面が平坦、排出速度がやや速い」「かゆ状で、表面に起伏がある」「形がくずれかけている」「筒状でなめらかな表面」「筒状で、表面に裂け目がある」「筒状で、深い裂け目がある」「破片状、または兎糞様(鹿やウサギの糞のような)」であった。

炎症マーカーとして、高感度 CRP (LA ラテックス凝集比濁法)を用い血中の CRP を測定した。

安全性の評価に関しては、身体測定、理学検査、尿検査、末梢血液検査を実施した。身体測定、理学検査、尿検査、採血は医療法人社団盛心会タカラクリニックにて行ない、末梢血液検査は株式会社 LSI メディエンスへ委託した。身体測定は、身長、体重、body mass index (BMI)、体脂肪率を評価項目とし、身長は身長計で測定し、体重と BMI、体脂肪率は ZEUS9.9 (株式会社神戸メディケア) を使用して測定した。理学検査は、収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍数を電子血圧計 ES-P730 (テルモ株式会社) を用い測定した。尿検査は、試験参加者より尿を 25ml 採取し、Aution Mini Am-4290 (アークレイ株式会社) で蛋白(正常値: -, 正常値外: ±, 1+, 2+, 3+, 4+)、ブドウ糖(正常値: -, 正常値外: ±, 1+, 2+, 3+, 4+)、

ウロビリノーゲン(正常値: 正常、正常値外: 1+, 2+, 3+, 4+)、ビリルビン (正常値: -, 正常値外: 1+, 2+, 3+, 4+)、ケトン体(正常値: -, 正常値外: ±, 1+, 2+, 3+, 4+)、pH(正常値: 5.0-7.5、正常値外: 4.5 以下、8.0 以上)、潜血(正常値: -正常値外: ±, 1+, 2+, 3+)を分析した。末梢血液検査は、試験参加者の静脈血を 13 ml 採血し、AST (GOT)、ALT (GPT)、 γ -GTP、ALP、LD (LDH)、LAP、総蛋白、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、CK、血清アミラーゼ、総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、トリグリセリド (TG: 中性脂肪)、遊離脂肪酸、グルコース、ヘモグロビン A1c (HbA1c: NGSP)、グリコアルブミン、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、血小板数、MCV (平均赤血球容積)、MCH (平均赤血球色素量)、MCHC (平均赤血球色素濃度)、白血球像を分析した。

選抜とランダム化

試験参加に同意した者は 42 名で、そのうち問診や選抜基準により 12 名を除外した。選抜基準は、スクリーニング検査における腸内フローラ検査で *Bifidobacterium* の占有率が少ない者であった。30 名を本試験に組み入れ、乳酸菌摂取群 (KH2 群) 15 名と乳酸菌をデキストリンに置き換えたプラセボ群 15 名ずつに、ランダムに割付けた。割付けは、StatLight #11 Ver. 2.10 (ユックムス株) を用いて割付けた。

統計学的処理

本研究の解析データセットは、サブグループセットとした。本研究における Full Analysis Set (FAS) の定義は、全登録症例より「割り付けられた介入の提供を受けた症例」、「対象集団の条件を満たさない症例 (確定診断により対象外疾患と判定されている症例や、明確に定

義された客観的に判定可能な重要な選択・除外基準に抵触する症例)」、「ランダム化後介入を一度も受けていない症例」、「ランダム化後のデータが全くない症例」を除外したのとしており、サブグループセットは FAS より「ベースライン時の排便日数が 6 日以上の症例」を除外したのとした。群間比較は、試験食品群とプラセボ群を比較することとし、平均値と標準偏差で示した。摂取前（ベースライン）と変化量の比較は Student の t 検定、摂取 1 週間後の測定値の比較はベースラインを共変量、群を固定因子とした共分散分析 (ANCOVA) を用いた。尿検査の pH と比重は、平均値と標準偏差で示し、Student の t 検定を用いて群間比較した。ブドウ糖、蛋白質、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、ケトン体、亜硝酸塩、白血球は、正常または偽陽性・陽性に該当する各群の n 数を示し、カイニ乗検定を用いて群間比較した。すべての統計解析は、SPSS ver.23.0 (日本アイ・ビー・エム株式会社) を使用し、有意水準 5%未満の両側検定とし、 $P < 0.05$ を有意差、0.1 を傾向差有りとした。なお、多仮説により発生する多重性は考慮しないものとした。

第 3 節 結果

解析対象者

Fig.4-1 に試験参加者の追跡フローチャートを示した。摂取期間を通じた摂取率は、全員が 100%であった。よって、解析対象者は full analysis set であり、KH2 群では 15 名 (男性 3 名、女性 12 名、 42.9 ± 6.2 歳)、プラセボ群では 15 名 (男性 5 名、女性 10 名、 42.3 ± 8.1 歳)であった。なお、本試験で定めた糞便回数 2-5 回の回数の範囲を外れた者が確認されたことから、糞便回数が定めた範囲を超えていた者 5 名を除外した追加解析も実施した。追加解析は KH2 群では 10 名 (男性 2 名、女性 8 名、 39.7 ± 6.6 歳)、プラセボ群では 15 名 (男性 3 名、女性 12 名、 42.9 ± 6.6 歳)であった。解析対象者の背景は Table 4-1 に示した。

腸内細菌叢

T-RFLP 法による腸内細菌叢についての解析の結果を表 2 に示した。群間比較において摂取前の KH2 群とプラセボ群との間に *Bacteroides* 占有率に有意差 ($P = 0.01$)、摂取後の *Clostridium* cluster IV 占有率に有意差 ($P = 0.02$) を認めた。また、摂取前と摂取 1 週間後の占有率の変化量について解析した結果、*Clostridium* cluster IV は有意 ($P = 0.003$) の増加が認められた。

自覚症状

便通日誌による排便状態の評価 (CAS) 得点、排便日数、排便回数および排便量に関する結果を表 3 に示した。CAS-MT での便秘の自覚症状評価は、KH2 群とプラセボ群ともに減少しており、2 群間の差は認められなかった。排便日数/週および排便回数/週に関しては KH2 群、プラセボ群ともに数値は増加した。しかし、排便量 (個/週) のみが KH2 摂取で有意に ($p=0.01$) 増加し、変化量においても KH2 群の排便量は有意 ($p=0.01$) に増加した。便の形状に関しては、群間に有意差は認められなかった。

炎症マーカー

KH2 群とプラセボ群の群内比較と群間比較の結果を表 4 に示した。いずれの比較でも有意差は認められなかった。

安全性評価

身体測定、理学検査を表 5、尿検査を表 6、末梢血液検査結果を表 7 に示した。身体測定、

理学検査、尿検査においてはプラセボ群、KH2 群ともに摂取前後、変化量で有意な差は認められなかった。

末梢血液検査においては、プラセボ群と KH2 群の群間比較の変化量（摂取前～摂取 1 週間後）で有意差が認められた項目は、MCHC($p=0.013$)、好塩基球率 ($p=0.03$)、単球数 ($p=0.015$)、好塩基球数 ($p=0.011$) であった。また、有意差が認められた項目の変化量平均値は、MCHC (プラセボ群：0 %、KH2 群：-0.9 %)、好塩基球率 (プラセボ群：0 %、KH2 群：0.4 %)、単球数 (プラセボ群：59.6 / μ L、KH2 群：-23.4 / μ L)、好塩基球数 (プラセボ群：3.1 / μ L、KH2 群：15.7 / μ L)であった。また、群間比較の変化量で傾向差が認められた項目は、MCH ($p=0.099$)、尿素窒素 ($p=0.057$) であった。傾向差が認められた項目の変化量平均値は、MCH (プラセボ群：0.4 pg、KH2 群：-0.5 pg)、尿素窒素 (プラセボ群：-1.1 mg/dL、KH2 群：1.5 mg/dL)であった。しかし、いずれの有意差も医学的に問題のある差ではなかった。また、KH2 摂取による医学的問題のある変化、有害事象の報告はなく試験参加者の健康状態に問題はないことを試験責任医師が判断した。

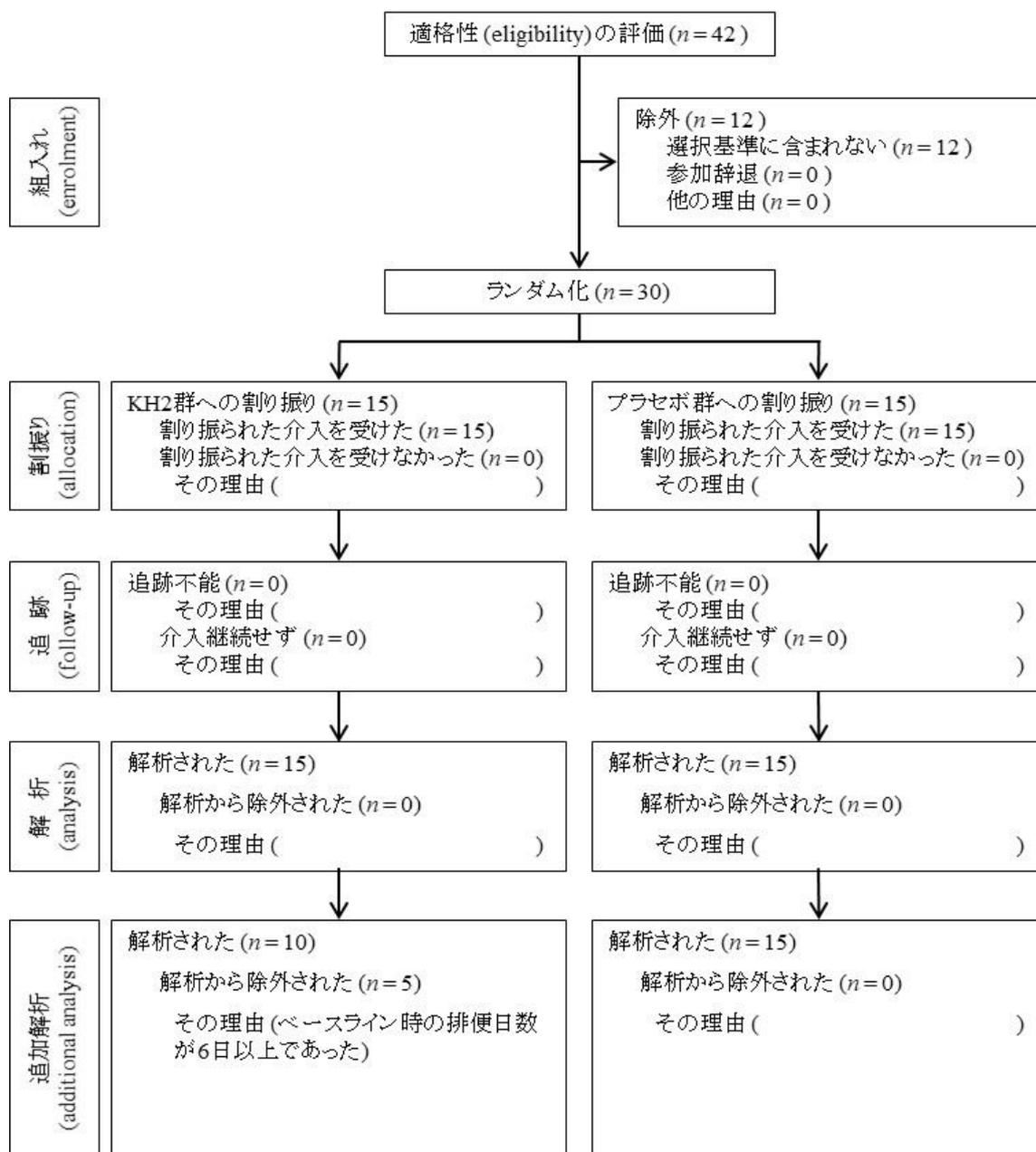


Fig.4-1 Study participant tracking flow chart

Table 4-1 Background of study participants in subgroups (fewer than 6 days of defecation),
(intergroup comparison / placebo and KH2 group)

性別	プラセボ群 (n = 15)		KH2群 (n = 10)		有意確率
	男性: 3 (20.0%)	女性: 12 (80.0%)	男性: 2 (20.0%)	女性: 8 (80.0%)	
-30代	男性: 1 (6.7%)	女性: 4 (26.7%)	男性: 1 (10.0%)	女性: 3 (30.0%)	-
-40代	男性: 2 (13.3%)	女性: 6 (40.0%)	男性: 1 (10.0%)	女性: 4 (40.0%)	-
-50代	男性: 0 (0.0%)	女性: 2 (13.3%)	男性: 0 (0.0%)	女性: 1 (10.0%)	-
年齢 (歳)	Mean ± SD: 42.9 ± 6.2		Mean ± SD: 39.7 ± 6.6		0.23
身長 (cm)	Mean ± SD: 160.5 ± 8.1		Mean ± SD: 160.3 ± 8.0		0.95

Table 4-2 Gut microbiota (comparison between groups / placebo group, KH2 group)

inspection item	unit	Before intake		After 1 week of intake		Amount of change (before intake - After 1 week of intake)		p value								
		KH2 group n=10		KH2 group n=10		KH2 group n=10										
		Mean	95%CI- 95%CI+	Mean	95%CI- 95%CI+	Mean	95%CI- 95%CI+									
<i>Bifidobacterium</i>	%	8.9	5.9 12.0	10.2	6.0 14.5	12.8	7.9 17.8	10.4	3.6 17.1	3.9	-2.4 10.2	0.1	-4.8 5.0	0.61	0.50	0.40
Lactobacillales	%	4.5	2.8 6.2	3.5	0.4 6.6	4.0	2.4 5.6	1.8	1.2 2.4	-0.5	-1.9 0.9	-1.7	-4.8 1.4	0.56	0.06	0.45
<i>Bacteroides</i>	%	33.5	28.0 39.0	44.3	39.3 49.4	37.7	31.8 43.6	43.9	38.5 49.4	4.3	-0.5 9.0	-0.4	-4.5 3.8	0.01*	0.70	0.19
<i>Prevotella</i>	%	4.6	0.5 8.7	0.7	-0.6 2.0	7.5	-0.1 15.1	2.6	-1.7 7.0	2.9	-2.8 8.5	1.9	-2.5 6.3	0.15	0.98	0.81
<i>Clostridium</i> cluster IV	%	11.6	7.2 16.1	5.8	2.5 9.1	7.3	4.2 10.5	7.4	4.5 10.3	-4.3	-6.9 -1.7	1.6	-0.1 3.3	0.08	0.02*	0.003**
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	%	22.0	18.3 25.7	22.0	18.2 25.8	17.2	14.7 19.7	20.8	17.3 24.3	-4.8	-8.6 -1.0	-1.2	-6.2 3.9	1.00	0.11	0.27
<i>Clostridium</i> cluster IX	%	2.9	1.9 3.9	1.4	0.0 2.8	4.2	2.7 5.6	4.0	0.6 7.4	1.2	-0.6 3.1	2.6	-0.4 5.6	0.09	0.79	0.43
<i>Clostridium</i> cluster XI	%	0.8	0.3 1.3	0.9	0.3 1.4	1.3	0.5 2.2	0.7	0.2 1.2	0.5	-0.2 1.1	-0.1	-1.1 0.8	0.94	0.29	0.29
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	%	1.5	0.9 2.1	2.3	1.1 3.4	1.5	0.8 2.2	2.2	1.6 3.4	0.0	-1.0 0.9	-0.7	-1.8 0.4	0.20	0.96	0.35
others	%	9.6	5.6 13.5	8.8	6.3 11.4	6.5	5.1 7.9	6.7	5.7 7.8	-3.1	-6.5 0.3	-2.1	-4.2 0.0	0.78	0.61	0.66

※ : p<0.05, ※※ : p<0.01, Mean and 95 percent confidence interval

Table 4-3 Status of bowel movements (comparison between groups / placebo group, KH2 group)

inspection item	unit	Before intake		After 1 week of intake		Amount of change (before intake - After 1 week of intake)		p value								
		KH2 group n=10		KH2 group n=10		KH2 group n=10										
		Mean	95%CI- 95%CI+	Mean	95%CI- 95%CI+	Mean	95%CI- 95%CI+									
CAS point	point	4.3	2.7 6.0	5.6	3.3 7.9	2.2	1.3 3.1	2.6	1.3 3.9	-2.1	-3.8 -0.4	-3.0	-5.1 -0.9	0.38	0.83	0.53
排便日数	day/week	3.5	2.9 4.1	3.4	2.5 4.3	5.1	4.5 5.6	4.8	3.9 5.7	1.6	0.7 2.5	1.4	0.4 2.4	0.90	0.62	0.77
排便回数	count/week	3.6	3.0 4.2	3.7	2.8 4.6	5.3	4.8 5.8	5.2	4.2 6.2	1.7	1.0 2.4	1.5	0.4 2.6	0.85	0.77	0.72
排便量	volume/day	2.8	2.2 3.4	2.4	1.8 3.1	2.8	2.3 3.3	3.6	2.8 4.3	0.0	-0.5 0.4	1.2	0.4 1.9	0.40	0.01**	0.01**

Table 4-4 Inflammatory marker (comparison between groups / placebo group, KH2

inspection item	unit	Before intake		KH2 group		After 1 week of intake		Amount of change (before intake - After 1 week of intake)		p value												
		placebo group		placebo group		KH2 group		KH2 group														
		n=15	95%CI-	n=10	95%CI+	n=15	95%CI-	n=10	95%CI+													
CRP	mg/dL	0.039	0.017	0.062	0.082	0.010	0.154	0.047	0.026	0.069	0.040	0.028	0.051	0.008	-0.013	0.028	-0.043	-0.116	0.030	0.21	0.43	0.14

Mean and 95 percent confidence interval

Table 4-5 Physical examination (comparison between groups / placebo group, KH2 group)

inspection item	unit	Before intake		KH2 group		After 1 week of intake		Amount of change (before intake - After 1 week of intake)		p value												
		placebo group		placebo group		KH2 group		KH2 group														
		n=15	95%CI-	n=10	95%CI+	n=15	95%CI-	n=10	95%CI+													
stature	cm	160.5	156.4	164.6	160.3	155.3	165.2	55.5	50.1	60.9	53.5	47.1	60.0	0.4	-0.3	1.0	0.0	-1.3	1.2	0.71	0.60	0.54
body weight	kg	55.1	50.1	60.2	53.6	47.3	59.9	22.7	21.2	22.6	20.7	18.8	22.7	-0.1	-0.5	0.4	0.0	-0.5	0.5	0.66	0.98	0.90
BMI	kg/m ²	21.3	19.9	22.7	20.8	18.8	22.7	22.3	19.7	25.0	21.7	18.8	24.6	0.2	-1.3	1.7	0.3	-1.5	0.8	0.96	0.61	0.61
body fat	%	22.1	19.9	24.4	22.0	19.1	24.9	22.3	19.7	25.0	21.7	18.8	24.6	0.2	-1.3	1.7	0.3	-1.5	0.8	0.96	0.61	0.61
systemic blood pressure	mmHg	112.1	106.2	118.0	116.2	112.7	119.7	114.1	108.8	119.5	118.4	111.5	125.2	2.0	-1.6	5.6	2.2	-3.4	7.7	0.32	0.75	0.96
diastolic blood pressure	mmHg	73.2	68.7	77.6	77.1	73.8	80.4	73.7	68.8	78.6	76.3	71.3	81.3	0.5	-2.7	3.8	-0.8	-5.3	3.7	0.22	0.84	0.64
heart rate	bpm	72.1	67.9	76.3	78.2	74.3	82.1	72.3	67.3	77.3	76.1	72.8	79.4	0.2	-3.3	3.7	-2.1	-8.7	4.5	0.06	0.80	0.51

Mean and 95 percent confidence interval

Table 4-6 Urine test (comparison between groups / placebo group, KH2 group)

検査項目	Before intake		After 1 week of intake		Amount of change (before intake - After 1 week of intake)		p value												
	placebo group n=15	KH2 group n=10	placebo group n=15	KH2 group n=10	placebo group n=15	KH2 group n=10													
	normal	False positives/ positives	normal	False positives/ positives	Mean	SD	Mean	SD											
urinary sugar	15.0	0.0	10.0	0.0	15.0	0.0	9.0	1.0	—	—	N.A.	0.40	—						
urinary proteins	12.0	3.0	7.0	3.0	13.0	2.0	7.0	3.0	—	—	—	—	0.65	0.61	—				
bilirubin	14.0	1.0	10.0	0.0	15.0	0.0	10.0	0.0	—	—	—	—	1.00	N.A.	—				
urobilinogen	15.0	0.0	10.0	0.0	14.0	1.0	10.0	0.0	—	—	—	—	N.A.	1.00	—				
occult blood	13.0	2.0	9.0	1.0	9.0	6.0	8.0	2.0	—	—	—	—	1.00	0.40	—				
ketone body	13.0	2.0	8.0	2.0	14.0	1.0	9.0	1.0	—	—	—	—	1.00	1.00	—				
nitrite	15.0	0.0	10.0	0.0	15.0	0.0	10.0	0.0	—	—	—	—	N.A.	N.A.	—				
white blood cell	12.0	3.0	7.0	3.0	12.0	3.0	9.0	1.0	—	—	—	—	0.65	0.63	—				
Mean	5.9	5.6	6.3	5.7	5.3	6.0	6.0	5.5	6.4	-0.1	-0.4	0.2	0.3	-0.2	0.8	0.31	0.72	0.19	
95%CI-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.39	0.19	0.78	
95%CI+																			

N.A. : not available, Mean and 95 percent confidence interval

Table 4-7 Blood test (comparison between groups / placebo group, KH2 group)

Inspection item	reference value	unit	Before intake										After 1 week of intake										p value
			placebo group		KH2 group		placebo group		KH2 group		placebo group		KH2 group		placebo group		KH2 group						
			n=15	Mean 95%CI- 95%CI+	n=10	Mean 95%CI- 95%CI+	n=15	Mean 95%CI- 95%CI+	n=10	Mean 95%CI- 95%CI+	n=15	Mean 95%CI- 95%CI+	n=10	Mean 95%CI- 95%CI+	n=15	Mean 95%CI- 95%CI+	n=10	Mean 95%CI- 95%CI+					
white blood cell count	3900-9000	/uL	5163.7	4557.7-5775.6	5100.0	4698.3-5601.7	5120.0	5040.5-5199.5	5000.0	4151.7-5848.3	599.3	55.6-1191.1	-100.0	-902.3-702.3	0.95	0.15	0.16						
red blood cell count	male: 430-570 female: 380-500	×10 ⁶ /uL	446.2	423.5-468.9	432.1	402.2-462.0	449.3	428.4-470.2	428.2	391.0-465.4	3.1	-10.1-16.4	-3.9	-23.7-16.9	0.46	0.47	0.55						
hemoglobin	male: 13.5-17.5 female: 11.5-16.0	g/dL	13.2	12.4-14.0	13.2	12.5-14.0	13.5	12.7-14.3	12.9	11.7-14.2	0.3	-0.1-0.7	-0.3	-1.2-0.6	0.88	0.22	0.21						
hematocrit	male: 39.7-52.4 female: 34.8-46.0	%	41.3	39.3-43.3	40.9	38.8-43.1	42.1	40.1-44.2	41.1	37.6-44.5	0.8	-0.3-2.0	0.1	-2.8-3.0	0.80	0.60	0.62						
platelet count	14.0-34.0	×10 ⁹ /uL	23.5	23.5-27.6	27.1	22.9-31.3	26.9	24.9-28.9	28.5	22.5-34.5	1.4	0.2-2.5	1.3	4.2-4.2	0.47	0.88	0.99						
MCV	85-102	fL	92.7	90.9-94.4	95.1	93.1-97.1	93.8	92.2-95.4	96.0	91.4-100.6	1.1	-0.2-2.5	0.9	-3.0-4.8	0.09	0.94	0.90						
MCH	28.0-34.0	pg	29.6	28.9-30.2	30.7	30.0-31.4	30.0	29.4-30.5	30.2	28.4-31.9	0.4	0.2-0.6	-0.5	-1.7-0.7	0.04*	0.05*	0.10*						
MCHC	30.2-36.1	%	31.9	31.4-32.4	32.3	31.7-32.9	31.9	31.3-32.5	31.4	30.6-32.1	0.0	-0.4-0.5	-0.9	-1.4-0.4	0.33	0.02*	0.01*						
neutrophil rate	40.0-75.0	%	56.6	50.1-63.1	61.3	56.6-65.9	58.4	52.7-64.1	59.7	56.0-63.4	1.8	-1.4-4.9	-1.6	-5.4-2.3	0.31	0.39	0.20						
lymphocyte rate	18.0-49.0	%	34.8	29.3-40.3	30.8	26.3-35.2	32.0	26.8-37.2	31.3	27.4-35.2	-2.8	-5.6-0.0	0.5	-2.5-3.5	0.31	0.25	0.14						
monocyte rate	2.0-10.0	%	4.5	3.7-5.2	5.7	4.8-6.6	5.1	4.4-5.9	6.5	4.7-6.3	0.7	0.0-1.4	-0.2	-0.8-0.5	0.05	0.48	0.11						
eosinophil rate	0.0-8.0	%	3.5	2.2-4.7	1.7	1.1-2.2	3.9	2.5-5.2	2.5	1.4-3.6	0.4	-0.2-1.0	0.9	-0.1-1.8	0.04*	0.57	0.38*						
basophil rate	0.0-2.0	%	0.6	0.5-0.8	0.6	0.4-0.9	0.6	0.5-0.8	1.0	0.6-1.3	0.0	-0.2-0.1	0.4	0.2-0.6	0.81	0.00**	0.00**						
lymphocyte count	-	/uL	2968.4	2425.1-3491.6	3139.2	2781.3-3527.2	3401.3	2798.3-4004.2	2995.9	2444.1-3549.7	442.9	-23.4-909.2	-142.3	-774.8-490.1	0.63	0.18	0.15						
monocyte count	-	/uL	1735.5	1458.4-2012.6	1557.9	1313.0-1800.9	1771.3	1485.6-2057.1	1564.5	1234.4-1894.6	35.8	-127.6-199.2	6.5	-178.6-191.7	0.39	0.75	0.82						
eosinophil count	-	/uL	223.9	182.8-265.0	289.3	245.0-332.7	283.5	245.3-320.6	265.9	229.3-302.5	59.6	-23.4-96.6	-23.4	-74.9-28.0	0.05*	0.14	0.01*						
basophil count	-	/uL	177.0	107.9-246.1	83.5	52.9-114.1	229.0	143.1-314.8	127.0	61.5-192.5	51.9	20.7-83.2	43.6	-14.3-101.4	0.05	0.85	0.79						

*: p<0.05, **: p<0.01, Mean and 95 percent confidence interval

Table 4-7 (continuation)

Inspection item	reference value	unit	Before intake										After 1 week of intake										Amount of change (before intake - After 1 week of intake)				p value
			placebo group		KH2 group		placebo group		KH2 group		placebo group		KH2 group		placebo group		KH2 group		Before	After	Amount of change						
			n=15	Mean	95%CI-	95%CI+	Mean	95%CI-	95%CI+	Mean	95%CI-	95%CI+	Mean	95%CI-	95%CI+	Mean	95%CI-	95%CI+									
AST (GOT)	10-40	U/L	17.9	14.7	21.2	19.0	14.7	23.3	21.1	16.6	26.6	20.8	14.3	27.3	3.1	-2.1	8.4	1.8	-3.3	6.9	0.70	0.78	0.74				
ALT (GPT)	5-45	U/L	14.3	9.1	19.5	15.1	11.4	18.8	18.3	10.3	26.4	16.9	12.3	21.5	4.1	-4.6	12.7	1.8	-3.3	6.9	0.82	0.76	0.70				
γ-GT (γ-GTP)	male: 80% female: 30% F	U/L	17.3	13.9	20.6	22.7	18.4	27.0	20.7	15.4	26.0	23.6	18.9	32.3	3.4	0.5	6.3	2.9	-1.2	7.0	0.06	0.37	0.84				
ALP	100-325	U/L	185.2	186.3	174.1	173.2	141.2	205.2	162.7	143.4	162.1	173.9	188.0	209.8	7.5	-1.1	16.1	0.7	-18.1	20.5	0.32	0.59	0.49				
LD (LDH)	120-240	U/L	172.1	157.7	186.5	173.2	160.7	185.7	179.9	164.2	195.7	171.0	181.4	190.6	7.8	-1.2	16.8	-2.2	-13.1	8.7	0.92	0.19	0.18				
LAP	male: 45-81 female: 37-61	U/L	46.3	43.9	48.8	46.3	41.4	51.2	48.5	44.7	52.3	47.2	42.1	52.3	2.1	-0.4	4.6	0.9	-1.6	3.4	0.99	0.53	0.52				
total bilirubin	0.2-1.2	mg/dL	0.9	0.7	1.1	0.8	0.6	1.1	0.8	0.7	1.0	0.8	0.5	1.0	-0.1	-0.3	0.1	0.0	-0.3	0.2	0.66	0.94	0.84				
direct bilirubin	0.0-0.2	mg/dL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.87	0.63	0.77				
indirect bilirubin	0.2-1.0	mg/dL	0.8	0.6	0.9	0.7	0.5	0.9	0.9	0.7	0.6	0.7	0.5	0.9	-0.1	-0.2	0.1	0.0	-0.2	0.2	0.61	0.88	0.86				
cholesterase (CHE)	male: 234-493 female: 200-452	U/L	282.3	246.9	317.8	289.9	249.8	392.0	291.9	260.7	323.2	295.6	240.2	381.0	9.6	-2.0	21.2	5.7	-24.0	38.4	0.79	0.81	0.79				
ZTT	2.0-12.0	U	8.0	6.8	9.1	6.1	4.7	7.4	7.7	6.6	8.8	6.8	4.5	7.2	-0.2	-0.6	0.2	-0.2	-0.9	0.4	0.04	0.56	0.39				
total protein	6.7-8.3	g/dL	7.2	7.0	7.4	7.1	6.7	7.4	7.3	7.2	7.4	7.0	6.7	7.3	0.1	0.0	0.3	-0.1	-0.4	0.3	0.65	0.07	0.56				
urea nitrogen	8.0-20.0	mg/dL	11.6	10.1	13.1	11.2	9.3	13.0	10.5	9.3	11.7	12.7	11.0	14.3	-1.1	-2.7	0.5	1.5	-0.5	3.5	0.73	0.03	0.06				
creatinine	male: 0.61-1.04 female: 0.47-0.79	mg/dL	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	0.8	0.0	0.0	0.1	0.0	-0.1	0.1	0.93	0.65	0.63				
uric acid	male: 3.8-7.0 female: 2.5-7.0	mg/dL	4.6	3.9	5.1	5.0	3.9	6.1	4.7	4.1	6.3	4.8	4.0	5.6	0.1	-0.2	0.5	-0.3	-1.2	0.6	0.42	0.60	0.36				
CK	male: 60-270 female: 40-150	U/L	128.7	61.9	205.5	107.8	66.8	148.8	147.7	20.2	276.1	88.1	56.4	119.8	19.0	-34.9	72.9	-19.7	-61.7	22.3	0.69	0.35	0.32				
sodium	137-147	mEq/L	140.7	140.0	141.5	140.7	139.5	141.9	140.1	139.3	141.0	140.8	139.7	141.9	-0.6	-1.5	0.3	0.1	-1.0	1.2	0.96	0.30	0.35				
potassium	3.5-5.0	mEq/L	4.0	3.8	4.1	3.9	3.7	4.1	3.9	3.7	4.1	4.1	3.8	4.3	-0.1	-0.2	0.1	0.2	0.0	0.3	0.61	0.14	0.11				
chloride	98-108	mEq/L	102.1	101.2	102.9	102.5	101.2	103.8	101.3	100.6	101.9	102.6	101.4	103.8	-0.8	-1.8	0.2	0.1	-1.0	1.2	0.66	0.07	0.26				
calcium	8.4-10.4	mg/dL	9.4	9.2	9.6	9.4	9.2	9.6	9.5	9.3	9.7	9.2	9.0	9.5	0.1	0.0	0.2	-0.2	-0.5	0.2	0.84	0.08	0.17				
inorganic phosphorus	2.5-4.5	mg/dL	4.0	3.7	4.3	3.6	3.1	4.1	3.9	3.6	4.3	3.8	3.4	4.2	0.0	-0.3	0.2	0.2	-0.3	0.7	0.18	0.82	0.38				
serum iron	male: 50-200 female: 40-180	μg/dL	105.9	89.1	122.7	92.9	65.2	120.6	103.4	82.8	124.0	98.4	62.7	128.1	-2.5	-27.5	22.6	2.5	-24.2	29.2	0.41	0.91	0.80				
serum amylase	40-122	U/L	71.5	62.2	80.7	72.6	51.8	93.4	74.5	64.9	84.0	70.1	59.6	80.6	3.0	-1.5	7.5	-2.5	-16.1	10.1	0.91	0.24	0.36				
total cholesterol	120-219	mg/dL	201.4	185.9	216.9	180.9	161.9	199.9	215.0	195.6	234.4	189.9	166.9	212.9	13.6	1.0	26.2	9.0	-7.6	28.6	0.12	0.57	0.67				
HDL cholesterol	male: 40-85 female: 40-95	mg/dL	69.5	61.7	77.2	65.8	57.1	74.5	69.5	59.9	79.0	69.2	60.5	77.9	0.0	-3.9	3.9	3.4	-2.1	8.9	0.95	0.33	0.32				
LDL cholesterol	65-139	mg/dL	115.8	102.1	129.5	97.8	80.0	115.6	123.0	110.0	136.0	102.4	80.7	124.1	7.2	-2.9	17.3	4.6	-8.4	17.6	0.13	0.48	0.76				
triglyceride	30-149	mg/dL	70.9	51.6	90.3	70.6	51.3	89.9	104.5	54.7	164.2	83.6	52.4	114.8	33.5	-5.4	72.5	13.0	-8.1	34.1	0.98	0.42	0.44				
fatty acid	0.10-0.30	mEq/L	0.6	0.4	0.7	0.5	0.4	0.7	0.6	0.5	0.7	0.4	0.2	0.6	0.0	-0.1	0.2	-0.1	-0.2	0.0	0.84	0.11	0.21				
glucose	70-109	mg/dL	78.5	75.6	81.3	85.0	76.1	93.9	78.9	77.3	80.4	78.6	74.8	82.4	0.4	-3.0	3.8	-6.4	-15.2	2.4	0.12	0.73	0.12				
HbA1c (NGSP)	4.6-6.2	%	5.2	5.1	5.3	5.0	4.8	5.2	5.2	5.2	5.3	5.1	4.9	5.2	0.0	0.0	0.1	0.0	-0.1	0.2	0.11	0.13	0.39				
glycoalbumin	123-165	%	14.5	13.9	15.2	14.0	13.3	14.8	14.2	13.5	14.9	13.6	13.0	14.3	-0.3	-0.5	-0.2	-0.4	-0.6	-0.2	0.32	0.63	0.62				

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001. Mean and 95 percent confidence interval

第4節 考察

本試験の目的は、加熱殺菌処理した乳酸菌である *E.faecalis* KH2 の継続摂取が便秘気味（排便が週 2～5 回）である 30 歳以上 59 歳以下の日本人成人の腸内細菌叢および排便におよぼす影響を評価することであり、主要評価項目は、T-RFLP 法を用いた糞便中に含まれる腸内フローラの同定とし被験者の腸内環境を評価した。その結果、摂取前の *Bacteroides*、摂取後の *Clostridium* cluster IV の占有率にプラセボ群と KH2 群との間に差 ($p < 0.05$) が認められたが、他の細菌に対しては差が認められなかった。また、*Clostridium* cluster IV の占有率の群間比較においては、プラセボ群が摂取前 11.6% に対し摂取 1 週間後が 7.3% と減少しているのに対し、KH2 群では摂取前が 5.8%、摂取 1 週間後が 7.4% で増加していた。この差に対し各細菌についても占有率の変化量を求め、両群間の変化量に有意な差があるか解析した。その結果、KH2 群の *Clostridium* cluster IV にのみ有意な差が認められた。この結果から、KH2 の摂取は、*Clostridium* cluster IV の占有率の保持、あるいは増加に働くことが示唆された。我々が実施したパイロット試験 (KH2 摂取の非盲検・単群前後比較試験) においても、KH2 の摂取で *Clostridium* cluster IV の占有率が有意に上昇し、さらに CAS-MT の解析により便秘の改善が期待される結果が得られていた。*E.faecalis* KH2 の摂取が *Clostridium* cluster IV の占有率の保持あるいは増加に働くことで排便に影響することが推定された。

便通に対する自覚症状は、KH2 群とプラセボ群における排便日数、および排便回数は 2 群とも有意に増加し群間における有意の差は認められなかった。これは、プラセボ効果が現れたと推測された。しかし、排便量に対しては KH2 群でのみ有意に増加した。この結果から、KH2 摂取は排便の頻度に影響は認められないものの、排便一回当たりの量を増加させる可能性が考えられる。CAS-MT での便秘の自覚症状評価は、KH2 群とプラセボ群ともに

減少しており 2 群間の差は認められなかったが、摂取前から摂取 1 週間後にかけての変化量は、やや KH2 群の方が大きく症例数を増加させれば CAS-MT においても有意な差を得ることができる可能性がある。便通日誌と CAS-MT を用いた排便の評価をまとめると排便回数に差はないものの、1 回あたりの排便量が増加していたことが判明した。便秘は、日本消化器病学会より、本来対外に排出すべき糞便を十分量かつ快適に排出できない状態と定義される[95]。また、米国消化器学会のコンセンサス会議では、残便感や週 3 回未満の排便、肛門直腸閉塞感などが便秘の診断基準とされた[96]。本試験の結果である排便量の増加は、残便感の低下に寄与すると考えられ便秘改善が期待でき排便量の増加は、腸内フローラの変動から *Clostridium* cluster IV の占有率の増加または保持が関与している可能性がある。近年の研究で *Clostridium* cluster IV および *Clostridium* subcluster XIVa には短鎖脂肪酸（炭素数 6 以下のもので、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸などを指す）、中でも酪酸を産生し[97]、抑制性 T 細胞(Treg)を誘導する菌[98, 99]が多数存在することが報告されている。短鎖脂肪酸は大腸の粘膜を刺激して腸管の蠕動運動を促進する[100-102]。また、産生された短鎖脂肪酸は腸上皮細胞に速やかに吸収され、腸上皮細胞の増殖を促進し[103, 104]、claudin-2, occludin など上皮細胞間隙構成蛋白の発現を通じて tight junction の復元に寄与し、組織の修復に働いていると考えられている[105, 106]。また、免疫反応の抑制に働く Treg 細胞が消化管の炎症を実際に抑制しているかどうかはまだ明らかになっていないが、過剰な免疫応答を抑制し炎症の終息に関わっている可能性は高い。KH2 の摂取が *Clostridium* cluster IV の維持・増加に働き、腸内菌叢の多様性維持に働く可能性が示されたことは大変意義深い。次世代シーケンサーを用いた近年の腸内細菌叢の研究により、菌叢を構成している主要な細菌である *Firmicutes* 門、中でも *Clostridium* 目の細菌と *Bacteroides* 門 *Bacteroides* 目の細菌が密接なネットワークを作り[105]、菌叢の恒常性を保っていることが

明らかにされている。今回の試験では摂取前のプラセボ群と KH2 群の *Bacteroides* 占有率に有意の差が認められたため、解析を断念したが、今後症例数を増やし、事前の検査により *Bacteroides* 占有率が同じになるように振り分けて、*Bacteroides* 属の細菌と *Clostridium* 属の細菌との相互作用に与える KH2 摂取の影響の解析に興味を持たれる。*Clostridium* cluster IV は、腸内の炎症の抑制や免疫調整などを司っていることが解明された腸内細菌でもある [98]。高感度 CRP の発現量は、潰瘍性大腸炎や過敏性腸症候群などの疾病に関連している [107, 108]。そこで、本試験は副次的アウトカムとして、血中の高感度 CRP を測定した。いずれの比較においても有意な差は認められなかったが、KH2 群では平均値が減少していた (表 4)。今後、KH2 摂取における炎症マーカーを主要アウトカムとした追試験を実施し、炎症の軽減作用が認められれば、*E.faecalis* KH2 の新たな訴求点となると考えている。また、安全性評価項目として、摂取前と摂取 1 週間後に身体測定・理学検査、尿検査、末梢血液検査を実施した。血液検査において一部の項目において有意な変動は認められたが、いずれも基準値内での軽微な変動であることから、KH2 に起因する変動ではないと考えられた。よって、KH2 の摂取に伴う医学的に問題のある変化は認められなかった。

加熱殺菌した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2 株を排便が週 2-5 回の日本人成人に 1 週間継続摂取させた結果、排便量が増加し排便を促進したことが認められた。加え、*Clostridium* cluster IV 占有率の増加や CRP 値から抗炎症作用つながる結果を得ることができた。また、安全性に関連する検査結果から、摂取に伴う副作用はなく、安全性に問題ないことが認められた。

第5章

乳酸菌の水分散性向上によるインフルエンザ感染防御効果への影響

第1節 緒言

本章では、インフルエンザウイルス感染防御、便秘改善を示した殺菌乳酸菌 (*E.faecalis* KH2) に対し、流通を想定した粉末の殺菌乳酸菌の開発を行なった。粉末化は衛生管理や保存安定性だけでなく輸送コスト低減などの多くの利点があり素材を普及させるためには必須である。しかし、粉末化は分散化させた乳酸菌を再凝集させてしまう。そこで、高圧ホモジナイザーで凝集を分散化させ、乾燥時に水溶性の物質を加えることで水に懸濁した際に凝集が解消される「粒子制御した殺菌乳酸菌粉末」を開発した。その粒子制御した殺菌乳酸菌粉末と未処理の殺菌乳酸菌粉末を水分散性（粒度分布、平均粒子径、観察にて評価）、マウス小腸部位における体内への吸収、マウスインフルエンザウイルス感染試験にて比較することで「粒子制御した殺菌乳酸菌粉末」の物性および機能性を評価した。

近年、乳酸菌はサプリメントだけでなく飲料、お菓子、シリアルなど一般食品にも配合されるようになり常温による殺菌乳酸菌粉末の原料として多く流通するようになってきた。乳酸菌は腸管に存在するパイエル板から体内に取り込まれ樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞によって貪食され、TLRs や NODs などの受容体によって菌体の構成成分が認識されることでサイトカイン等の免疫関連物質を産生し免疫反応が起こると考えられている。その際、乳酸菌はパイエル板上に点在する M 細胞から取り込まれるが、乳酸菌同士が凝集し細胞より大きくなると物理的に取り込みが難しくなると推測される。我々が販売されている幾つかの殺菌乳酸菌粉末原料を確認したところ乳酸菌同士が凝集し粒子サイ

ズが 20 μ m 以上の製品も幾つか確認した。そこで我々は、何も処理しない凝集が認められる殺菌乳酸菌粉末と高圧ホモジナイザーにて凝集を解消し乾燥工程で再凝集しないよう水溶性の物質（デキストリン）を加え粉末化した粒子制御した殺菌乳酸菌粉末を以下の項目で比較した。比較は、①粒度分布計による水分散性の分析と原子間力顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察、②マウスパイエル板からの取り込みを顕微鏡で観察、③マウスインフルエンザ感染モデルを用いた感染防御効果を用いた。

第2節 材料と方法

粒子制御した殺菌乳酸菌粉末の作製

加熱殺菌した乳酸菌を高圧ホモジナイザー処理し粉体化した時に再凝集しないよう水溶性かつ安価で安定性の高いデキストリンを等量加えることで粒子制御された殺菌乳酸菌粉末を作製した。

Enterococcus faecalis KH2 (*E. faecalis* KH2 (International Patent Organism Depository in Japan number, NITE P-14444)) は、6%グルコース(富士フィルム和光純薬)、2%酵母エキス(日本ベクトン・ディッキンソン)、0.2%リン酸一カリウム(富士フィルム和光純薬)、0.1%硫酸マグネシウム(富士フィルム和光純薬)、0.4%クエン酸三ナトリウム(富士フィルム和光純薬)、0.01%硫酸マンガン(富士フィルム和光純薬)、および 0.05%グリセリン - 脂肪酸エステル(関東化学)組成の培地に接種し、37°Cの条件で 20 時間培養後、100°C、30 分加熱殺菌し、蒸留水にて遠心洗浄を 2 回行ない菌体を回収した。その後、何も処理せずスプレードライヤーにて粉体化したものを“n-LAB”とし、高圧ホモジナイザー (ECONIZER LABO-01、三丸工業)にて処理後、等量のデキストリン (NSD300、サンエイ糖化) を加えスプレードライヤーにて粉体化したものを“d-LAB”とした。

平均粒子径の測定および観察

粒子制御した殺菌乳酸菌粉末の水分散性を粒度分布および平均粒子径で評価し、原子間力顕微鏡で n-Lab を観察し、走査型電子顕微鏡で n-LAB と d-LAB を観察し比較した。

原子間力顕微鏡 (AFM5100N、日立製作所)

原子間力顕微鏡 (AFM : Atomic Force Microscope) は探針と試料に作用する原子間力を検出するタイプの顕微鏡。AFM 探針は、片持ちバネ (カンチレバー) の先端に取り付けられており、この探針と試料表面を微小な力で接触させ、カンチレバーのたわみ量が一定になるように探針・試料間距離をフィードバック制御しながら水平に走査することで、表面形状を画像化する。

走査電子顕微鏡 (JSM-6510LA、日本電子)

走査電子顕微鏡 (SEM) は、二次電子を検出して画像を作り観察する。電子銃では電子源から電子線を発生させて加速する。集束レンズと対物レンズは、加速した電子線を試料上に電子スポットとして集束する。走査コイルは、電子スポットを探針 (プローブ) として試料上を移動させる。検出器は試料の電子線照射点から発生した信号電子を検出し、信号電子の量を各点の明るさとして表示したのが SEM 像で、信号電子の発生量は表面の凹凸構造で変化するため、SEM 像には試料の表面形態が映し出される。

各サンプルを蒸留水にて 10mg/ml 濃度に希釈した後、レーザー回折式粒子径分布測定装置 (SALD-2300、島津製作所) にて屈折率 1.55-0.01i の条件で粒度分布を測定し平均粒子径および中央値を算出した。また、n-LAB および d-LAB を蒸留水に 10 μ g/ml 濃度で懸濁

したものをメンブランフィルター (pore size: 0.4 μ m、東洋濾紙) 上に塗布し、原子間力顕微鏡、走査電子顕微鏡にて観察した。

マウスパイエル板上の乳酸菌の観察

n-LAB および d-LAB の体内への吸収を蛍光染色した乳酸菌を投与することでマウス小腸 (パイエル板) での吸収を蛍光顕微鏡で観察し、吸収後の動向を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

乳酸菌を 25mg/mL になるよう懸濁し、Cy3 (Amersham Cy3 Mono-Reactive Dye Pack、GE Healthcare) を添加して (終濃度 0.6mg/mL)、遮光し 2 時間インキュベートした。3000rpm、15 分遠心、PBS で洗浄後、さらに PBS を 1mL を加え菌液を準備し、Ddy マウス (6 週齢雄性) に 100 倍希釈した菌液を注入した後、ループアッセイで 1 時間インキュベートした。安楽死させたマウスの腸管を摘出し、phalloigin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin、Thermo Fisher Scientific) と DAPI (Thermo Fisher Scientific) で 1 時間染色し蛍光顕微鏡 (OPTIPHOTO、NIKON) および共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 5EXCITER、ZEISS) で観察した。

マウス脾臓細胞を用いた免疫刺激能の測定

n-LAB および d-LAB の免疫刺激の比較をマウス脾臓細胞に添加し培養後、培養上清中の IL-12 を測定することで評価した。

終濃度 1 μ g/ml になるよう各乳酸菌を RPMI1640 培地 (Wako) で調製した後、8 週齢の雌性 BALB/c マウス (日本クレアジャパン) から採取したマウス脾臓細胞を 96 ウェル細胞培養プレートに添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間培養後、培養上清を回

取し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) にて IL-12 の濃度を測定した。ELISA で使用した試薬は、一次抗体 (精製抗マウス IL-12 (p70) 抗体; BioLegend)、二次抗体 (ビオチン抗マウス IL-12/IL-23 p40 抗体、BioLegend)、ブロッキング (Block Ace Powder、KAC)、捕捉抗体 (HRP アビジン、BioLegend)、基質 (テトラメチルベンジジン; Sigma-Aldrich)、標品 (組換えマウス IL-12 (p70) (ELISA Std.)、BioLegend) である [71]。

マウスインフルエンザウイルス感染試験

n-LAB および d-LAB の効果の比較をマウス経口投与によるインフルエンザウイルス感染試験 (ウイルス感染 3 日後のウイルス量および感染 14 日後の中和抗体価、ウイルス特異的 IgA を指標) にて評価した。

雌性の 16~18g の特定病原体非含有 BALB/c マウス (6 週齢) を日本 SLC (静岡、日本) から入手した。実験はすべて中部大学の動物実験指針に従い適正に実施された。マウスに 2×10^4 PFU/50 μ l のインフルエンザウイルスを鼻腔内感染させた日を 0 日とし、各乳酸菌 (5mg/日) および陽性コントロールとしてオセルタミビルリン酸塩 (以下、OSL) (0.2mg/日) を蒸留水に溶解し、ウイルス接種の 7 日前から接種後 14 日まで 1 日 2 回経口投与した。対照群のマウスには蒸留水のみを経口投与した。感染 3 日目に肺および気管支肺胞洗浄液 (以下、BALF) を、14 日目に血液および糞便サンプルを採取した (Fig.5-1)。肺組織は 1mg に対し 10 μ l の PBS を添加した後、10 秒間超音波処理し、1500xg、30 分の条件で遠心後、上清を回収し -80°C に保存した。BALF に関しては気管カニューレを介し 0.8ml の氷冷 PBS で 4 回洗浄することによって回収し、1500xg で 10 分間遠心し上清を供試サンプルとした。血液は 3,000xg で 10 分間遠心し、血清を回収し -20°C で保存した。糞便抽出物は、糞便 1mg あたり 10 μ l の PBS を添加後、超音波処理で懸濁して、遠心処理することによ

って調製した。

感染後3日目に採取した肺およびBALFサンプル中のウイルス量をMDCK細胞モノレイヤー上のプラークアッセイにより定量した。感染14日目の血清およびBALFは第2章に記載した50% plaque reduction methodを用いた中和抗体価の評価、BALFおよび糞便抽出物はELISAによりIgA濃度を測定した。

統計学的処理

データは平均値±標準偏差(SD)で標記した。統計学的有意性については一元配置分散分析を行ない、テューキー多重比較検定(Tukey's multiple comparison test)を用い比較した。

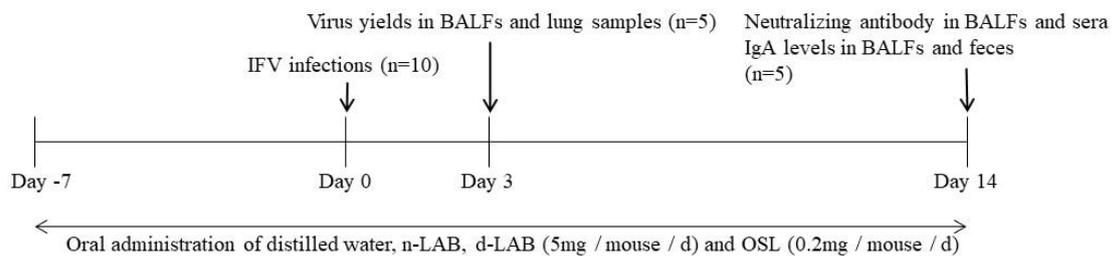


Fig.5-1 Experimental procedure of influenza virus infection. Mice in the control, LAB, d-LAB, and OSL groups were administered distilled water, LAB, and d-LAB (5 mg/d, two doses per day) and OSL (0.2 mg/d, two doses per day), respectively, during the study period (days -7 to 14). Mice were intranasally infected with IFV on day 0. On day 3 after IFV infection, five mice from each group were euthanized to quantify virus loads in BALFs and lungs. Five mice were euthanized for measuring neutralizing antibody and IgA levels on day 14. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; IFV, influenza A virus; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria; OSL, oseltamivir phosphate.

第3節 結果

n-LAB と d-LAB の粒度分布および粒子径

n-LAB および d-LAB を蒸留水に懸濁した時の粒度分布を Fig.5-2(a, b)に示し、平均粒子径および中央値を Table.5-1 に示した。n-LAB は粒子径が $55\mu\text{m}$ 付近に多く存在しているのに対し、d-LAB は粒子径が $0.7\mu\text{m}$ 付近に多く存在していた。平均粒子径においても n-LAB は $35.454\mu\text{m}$ に対し d-LAB は $0.679\mu\text{m}$ と小さく、中央値も n-LAB が $40.761\mu\text{m}$ に対し d-LAB が $0.633\mu\text{m}$ であった。原子間力顕微鏡および走査型電子顕微鏡の観察画像を Fig.5-3 に示した。原子間力顕微鏡で観察したところ菌体の周囲に莢膜または単体外多糖のようなものが確認できた (Fig.5-3 (a))。また、走査型電子顕微鏡で観察したところ n-LAB と d-LAB を比較すると n-LAB は凝集体が認められた (Fig.5-3(b))。

マウスパイエル板上の n-LAB および d-LAB の観察

n-LAB はパイエル板の上には確認できず、パイエル板周囲の粘膜の上で観察された (Fig. 5-4(a))。さらに n-LAB は凝集体として観察された。一方、d-LAB はパイエル板表面上に観察された (Fig. 5-4(b))。さらに d-LAB 投与におけるパイエル板の下層を確認するため cLSM で観察した結果、d-LAB が体内に取り込まれていることがわかった (Fig. 5-4(c))。

マウス脾細胞における n-LAB および d-LAB の IL-12 産生量

マウス脾臓細胞を使って n-LAB と d-LAB の IL-12 産生量を比較した結果、d-LAB は n-LAB よりも有意に高値を示した (Fig. 5-5)。

n-LAB および d-LAB 経口投与におけるマウスインフルエンザ感染防御効果

n-LAB および d-LAB 経口投与によるマウスの体重変化を Fig.5-6 に示した。対照群は、インフルエンザウイルス感染後 7 日目に約 15.9%の体重減少を示したのに対し、n-LAB および d-LAB 群は、14.9%、14.4%の体重減少を示し有意な差は認められなかったが、d-LAB 群は体重減少をわずかに抑制した。その後、これらの群のマウスは徐々に体重が増加し、d-LAB 群は感染後 12 日目には感染前の体重レベルに戻った。

感染後 3 日目のインフルエンザウイルス感染マウスの肺および BALF におけるウイルス量をそれぞれ Fig. 5-7(a)および Fig. 5-7(b)に示した。n-LAB および d-LAB 群は、対照群と比較し BALF ($p<0.01$)、肺 ($p<0.05$) でウイルス量を有意に減少させた。さらに d-LAB 群は n-LAB 群より BALF において有意にウイルス量が減少していた。尚、OSL 群のウイルス量は著しく低かった。

Fig. 5-8(a, b)は、感染後 14 日目の BALF および血清におけるインフルエンザウイルスに対する中和抗体価への影響を示した。BALF においては n-LAB および d-LAB 群で対照群と比較して有意に高値を示し、d-LAB 群は n-LAB 群より有意に高値を示した ($p<0.05$)。一方、血清では d-LAB 群のみが対照群と比較して有意に高値を示した ($p<0.01$)。

n-LAB および d-LAB 投与がマウスの局所の免疫応答への刺激を解明するために、感染後 14 日目に BALF および糞便中のインフルエンザウイルス特異的 IgA を測定した (Fig. 5-8(c, d))。d-LAB 群のみ対照群と比較して IgA 量が有意に高値を示した ($p<0.01$)。さらに d-LAB 群の糞便中 IgA 量は n-LAB 群と比較して有意に高かった ($p<0.05$)。

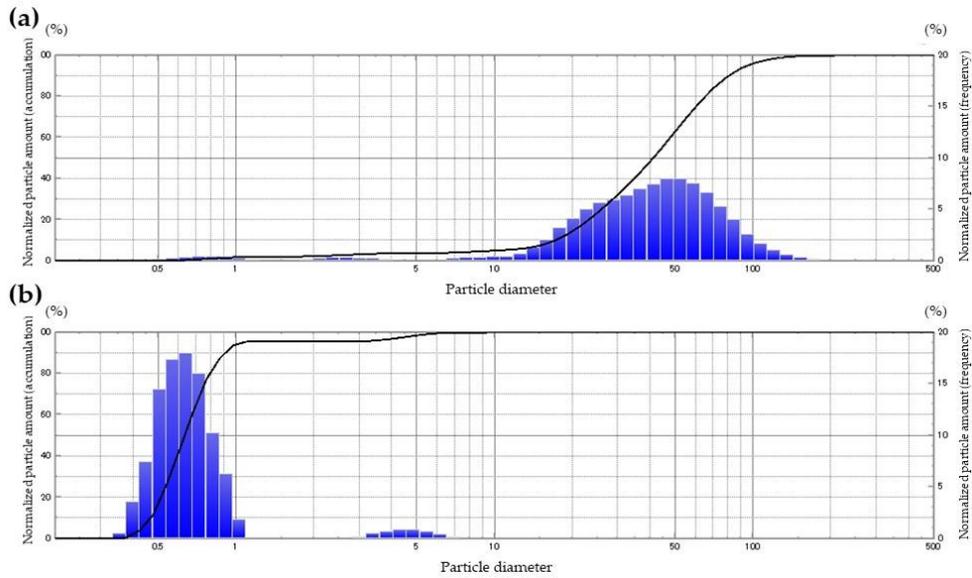


Fig.5-2 Measurement of n-LAB and d-LAB using a laser diffraction particle size analyzer (SALD-2300). n-LAB (a) and d-LAB (b) were suspended in distilled water and the relative particle mass (frequency and integration) was measured using a laser diffraction particle size analyzer. d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria; n= 3.

Table.5-1 Measurement of n-LAB and d-LAB using a laser diffraction particle size analyzer

	particle sizes (μm)			
	Mean	\pm	SD	Median
n-LAB	35.454	\pm	0.378	40.761
d-LAB	0.679 ^{**}	\pm	0.203	0.633 ^{**}

n-LAB or d-LAB were suspended in distilled water and particle sizes (mean and median) were measured using a laser diffraction particle size analyzer (SALD-2300). d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria; n = 3; ^{**}p < 0.01 vs. n-LAB.

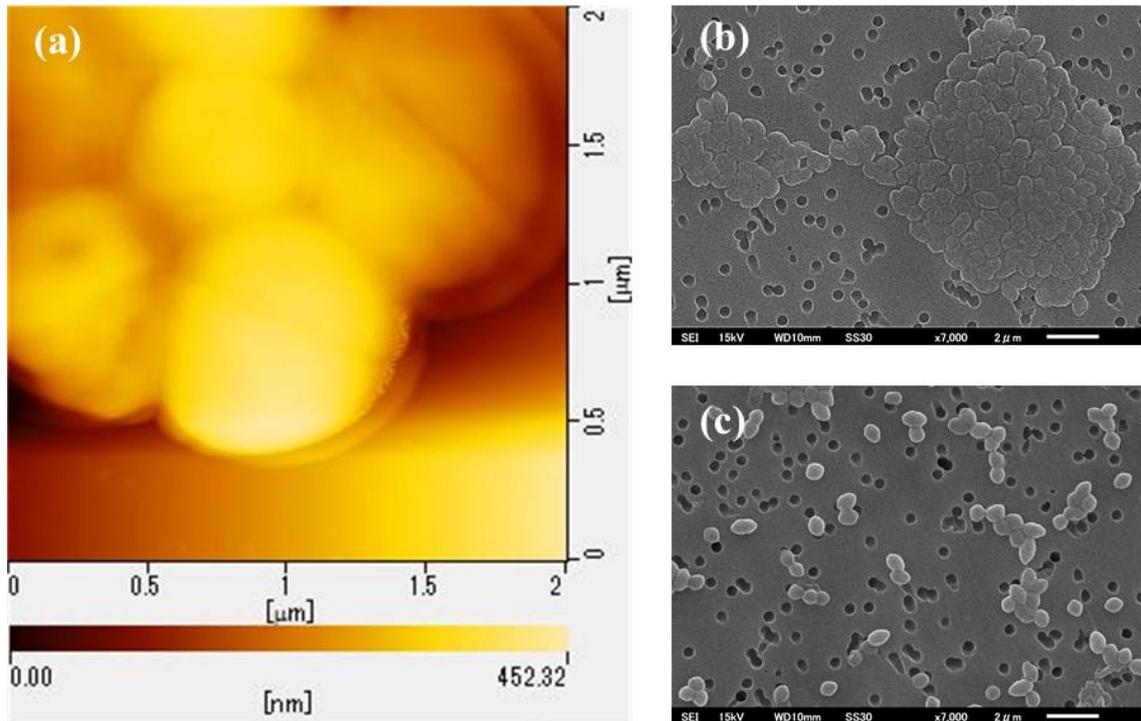


Fig.5-3 Microscopic images of n-LAB and d-LAB

n-LAB and d-LAB were suspended in distilled water ($10 \mu\text{g/ml}$) and applied to a membrane filter. Atomic force microscopy of n-LAB (a), n-LAB (b) and d-LAB (c) scanning electron microscopy images are shown. d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria.

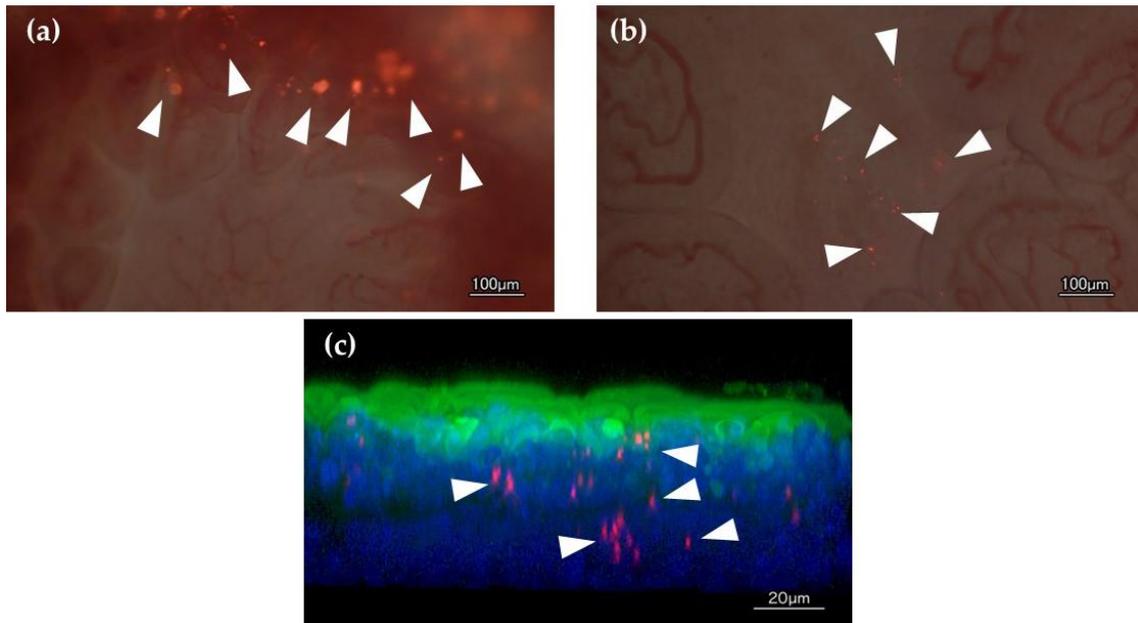


Fig. 5-4 Microscopy images of the Peyer's patch in mice after LAB and d-LAB administration and Peyer's plate images after d-LAB administration with cLSM. n-LAB (a) or d-LAB (b) stained with Cy3 and Peyer's patches were imaged with a fluorescence microscope. The uptake of d-LAB by Peyer's patches after d-LAB administration was imaged with cLSM (c). The white triangular arrow shows the bacteria. cLSM, confocal laser scanning microscopy; d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria.

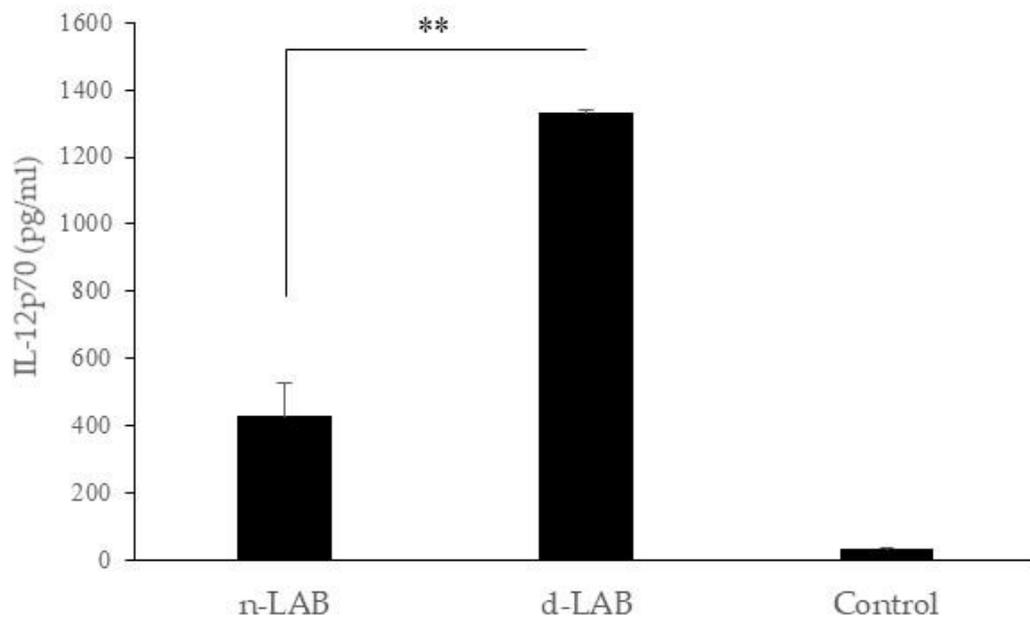


Fig. 5-5 Effect of ribonuclease treatment after n-LAB and d-LAB administration on IL-12 production in mouse splenocytes. n-LAB and d-LAB were co-cultured with mouse splenocytes for 24 h. IL-12 concentration in the culture supernatant was measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Control, culture medium only; d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria. Each value is presented as the mean \pm SD; n = 6; **p < 0.01 vs. n-LAB.

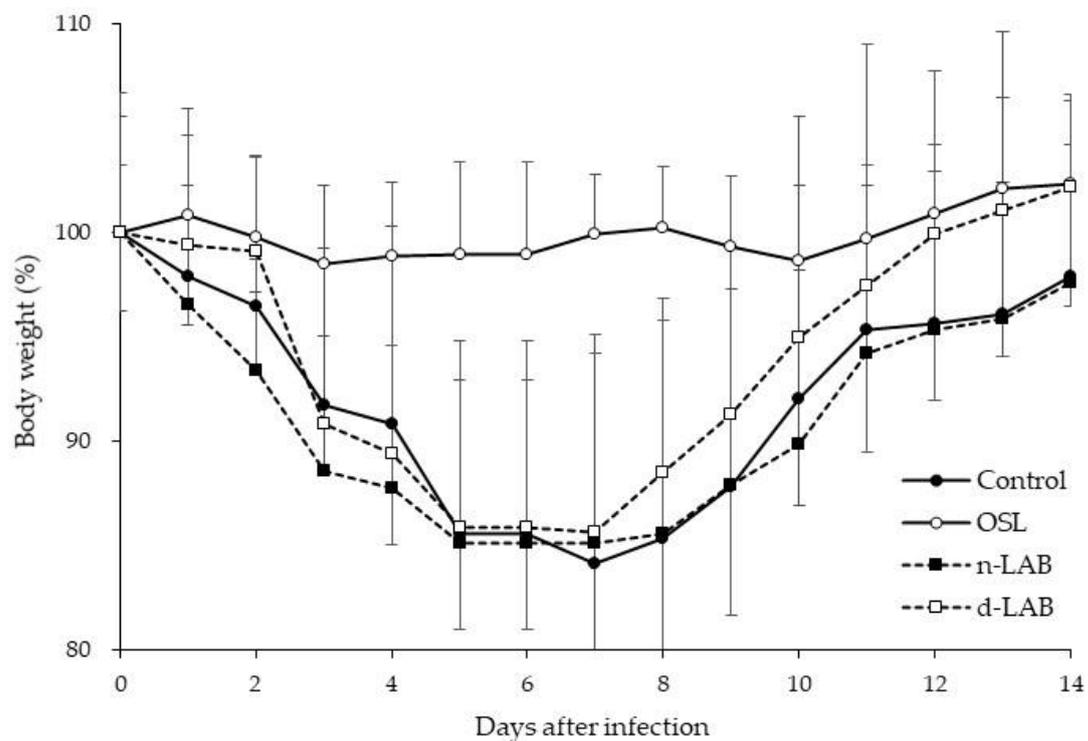


Fig. 5-6 Body weight change in mice infected with IFV. IFV-infected mice were orally administered distilled water (control, filled circle), 0.2 mg/day of oseltamivir (OSL, white circle), 5 mg/day of non-treated lactic acid bacteria (n-LAB, filled square), and 5 mg/day of dispersed lactic acid bacteria (d-LAB, white square) from day 7 pre-infection to day 14 post-infection. Body weights are relative to those on the day of viral infection (day 0), which was set as 100%. Each value is presented as the mean \pm SD; n = 5; IFV, influenza A virus.

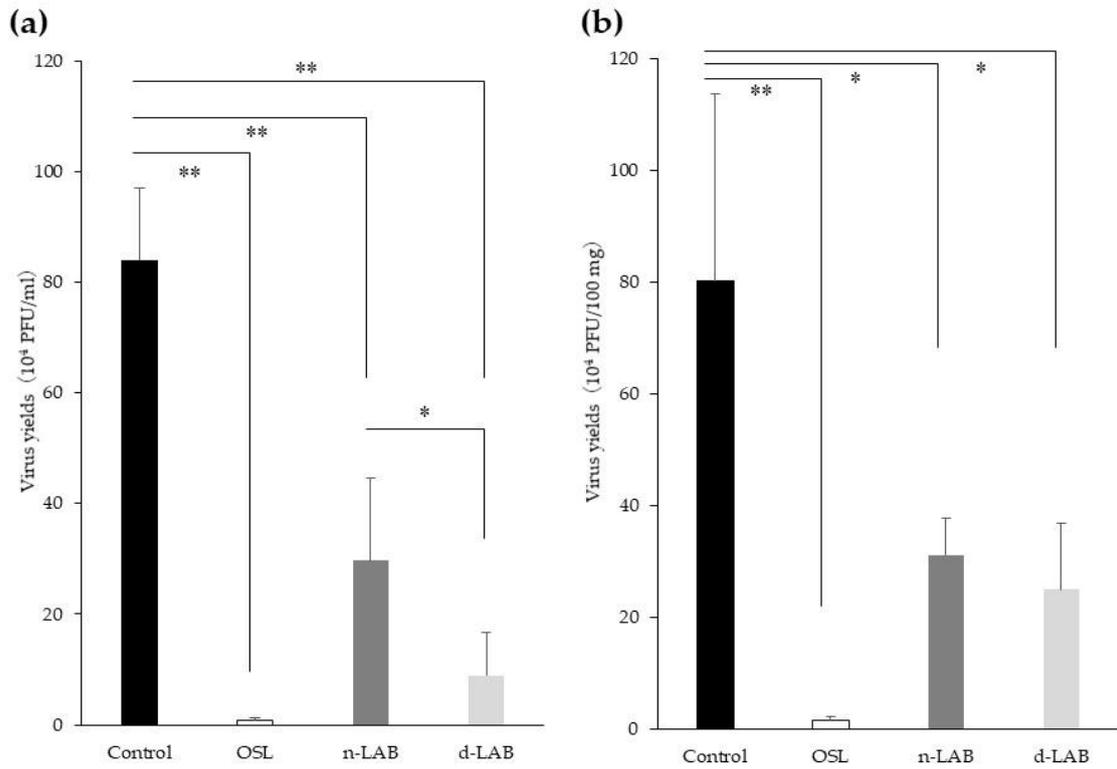


Fig. 5-7 Effect of n-LAB or d-LAB administration on viral load in mice. Virus yield in BALF (a) and lung samples (b) were measured using a plaque assay on day 3 post-infection. Each value is presented as the mean \pm SD; n = 5; **p < 0.01; *p < 0.05. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria; OSL, oseltamivir; PFU, plaque-forming unit.

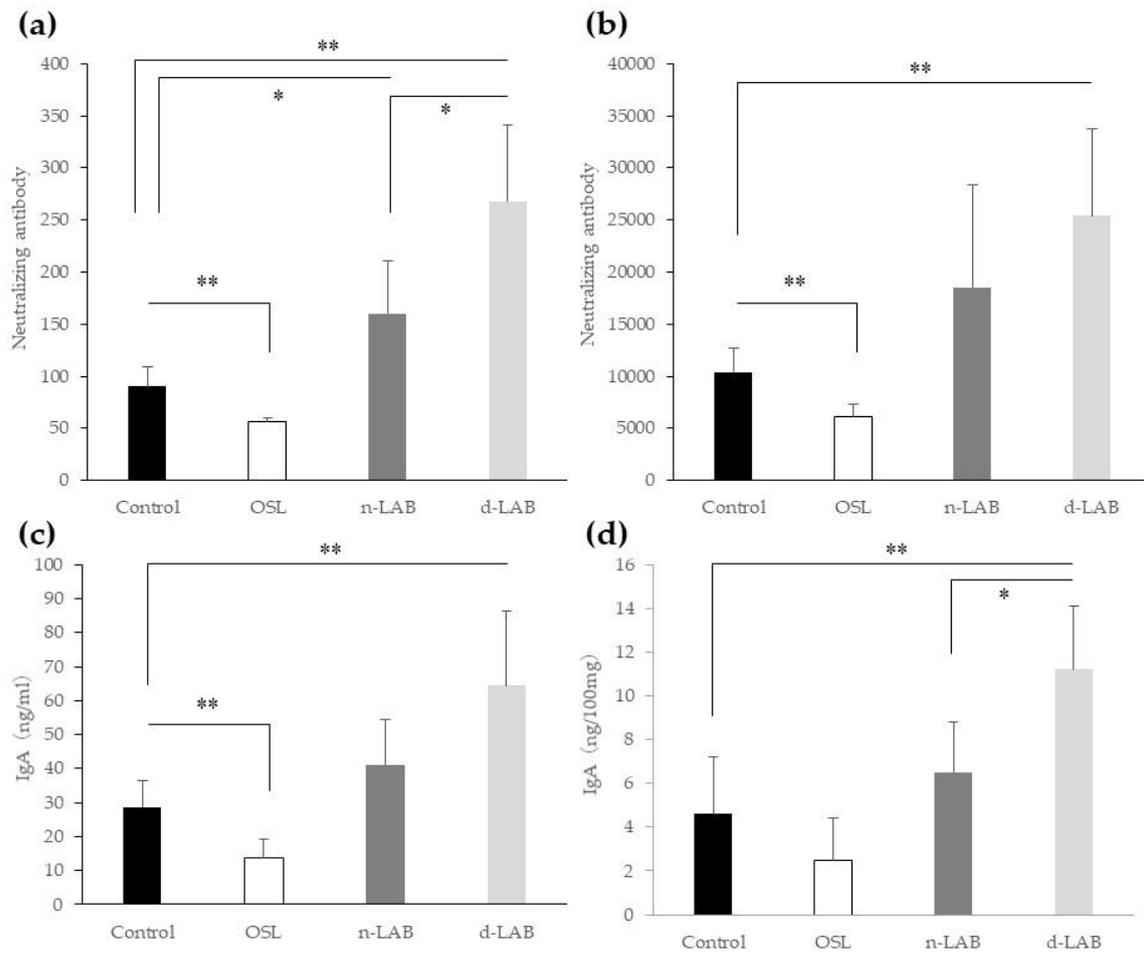


Fig. 5-8 Effects of n-LAB or d-LAB administration on the neutralizing antibody titer and IFV-specific IgA production in mice. The titer of the virus-neutralizing antibody is presented as the reciprocal of the dilution of BALF samples (a) and sera (b) that reduced the plaque number to a level below 50% of that observed in the virus control. The IFV-specific IgA levels in BALF (c) and fecal samples (d) were determined using enzyme-linked immunosorbent assay. Each value is presented as the mean \pm SD; n = 5; **p < 0.01; *p < 0.05. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; IFV, influenza A virus; d-LAB, dispersed lactic acid bacteria; n-LAB, non-treated lactic acid bacteria; OSL, oseltamivir.

第4節 考察

Table.1、Fig. 5-2、Fig. 5-3 から培養した乳酸菌を洗浄し、乾燥粉末させると菌体同士が結着し凝集体を形成することがわかった。原因の一つとして、蒸発する過程で乳酸菌が産生する多糖や菌体表面に存在する莢膜が凝集に影響することで外側に移動する粒子が少なくなり、中心に向かって収縮することで凝集がより強固になったと考えられる。さらに菌体表面に存在する細胞表層タンパク質 (surfacylayer protein: SLP) が電位の安定性に関与し、静電的な非特異的な作用が結着の要因にもなる報告がある [109]。また、乳酸菌がキチンやムチン等の多糖に付着することも報告されており [110]、乳酸菌が産生する多糖や莢膜を基に菌体同士が接着したとも考えられる。そこで、菌体の凝集を解消させるために高圧ホモジナイザーを用いることで菌体の凝集を分散させ、さらに乾燥時に菌体同士が再凝集しないようデキストリンを加えることで分散性の高い粒子制御された殺菌乳酸菌粉末 (d-LAB) を作製した。d-LAB を粒度分布計で測定した結果、平均粒子径が $0.679\ \mu\text{m}$ と、乳酸菌単体のサイズと同等で凝集体がほとんど存在していないことを示した。未処理の凝集体が存在する乳酸菌 (n-LAB) と d-LAB をマウスに投与し小腸パイエル板付近を観察した結果、n-LAB はパイエル板に到達できずパイエル板を覆う腸管粘液上に漂っているのに対し、d-LAB はパイエル板に到達していた。この差は腸管のムチンの三次元の綱目構造による物理的な障害によるものだと考えられ [111, 112]、n-LAB は $50\ \mu\text{m}$ ほどの粒子サイズの凝集体が多く存在しているのでムチンによってパイエル板への到達が阻まれ、d-LAB は $1.0\ \mu\text{m}$ 以下の粒子サイズのためムチンを通過することができパイエル板まで到達できたのではないかと考えられる。さらに乳酸菌の凝集はマクロファージや樹状細胞等の食作用による免疫応答性も低下させることがわかった (Fig. 5-5)。以上のことから乳酸菌が凝集体を形成するとパイエル板の M 細胞からの取り込みが少なくなるだけでなく細胞の食作用にも影響し、乳酸

菌が持つ免疫応答性が減弱する可能性が考えられる。次に n-LAB と d-LAB を用いマウスインフルエンザ感染モデルを用いて感染防御効果の比較を実施した。結果は、凝集体が存在する n-LAB は d-LAB に比べ感染 3 日目の BALF のインフルエンザウイルス量、感染 14 日目の BALF の中和抗体価や糞便中のインフルエンザウイルス特異的 IgA で有意に低値を示した。また、体重の推移に関しても n-LAB は control とほとんど同じ推移であったのに対し、d-LAB は感染 7 日目以降体重の回復が早く 12 日目には感染前の体重に戻っていた。これらの結果から乳酸菌の凝集は乳酸菌の有効性を低下させていることが推察される。よって、乳酸菌の凝集が認められる製品が多く存在する中、凝集を解消させた「粒子制御した殺菌乳酸菌粉末」を開発できたことは殺菌乳酸菌市場において有効性、品質の向上の側面からも大きな意味を持つと思われる。今後は、より安定かつ安価に粒子制御・分散制御できるような技術を確立し新規乳酸菌の普及・展開に繋げていきたい。

第 6 章 結論

乳酸菌は、チーズ、ヨーグルト、漬物、味噌、醤油など古くから世界中の発酵食品に利用されており、ロシアの微生物学者イリヤ・メチニコフの「ヨーグルト不老長寿説」[113]をきっかけに発酵食品や乳酸菌の保健効果に対する研究が盛んになった。乳酸菌の研究はフラーが提唱した生きている微生物「プロバイオティクス」を中心に行われ、その保健効果は整腸作用だけでなくウイルス感染症からの早期回復[114, 115]など様々な報告がされている。1997年に光岡知足博士は微生物の死菌体や産生物質においても保健効果が期待できる「バイオジェニクス (直接あるいは腸内細菌を介して免疫賦活作用, コレステロール低下作用, 血圧降下作用, 整腸作用, 抗腫瘍作用などを持つ食品成分)」という概念[116, 117]を提唱し、乳酸菌の菌体成分や菌体産生物に対し盛んに研究が行われるようになり殺菌乳酸菌の市場も拡大していった。しかし、機能、作用機序など生化学的な研究は積極的にされてきたが加熱殺菌処理による乳酸菌の粒子状態など物理的な側面からの報告例は少ない。そこで、本研究では加熱殺菌すると乳酸菌が凝集する現象を検証し、その凝集を解消する技術を確認することで粒子制御された殺菌乳酸菌粉末の開発を行なった。

第 2 章では、3 種類の乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2、*Lactobacillus plantarum* SNK12、*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* を培養、洗浄、加熱殺菌後、凝集した乳酸菌を高圧ホモジナイザーで分散させた殺菌乳酸菌を作製した。作製した 3 種類の殺菌乳酸菌の各平均粒子径は KH2 : $0.94 \pm 0.28 \mu\text{m}$ 、SNK : $0.93 \pm 0.16 \mu\text{m}$ 、LM : $0.73 \pm 0.16 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差) であった。また、各々の殺菌乳酸菌の効果を評価するためマウスに経口摂取させインフルエンザウイルス感染試験にて蒸留水のみを摂取させたマウスと感染防御効果を比較した。結果、3 種類すべての殺菌乳酸菌は蒸留水を投与したコントロールと比べ肺お

よび BALF (気管支肺胞洗浄液) 中のウイルス量の低下、インフルエンザウイルス特異的 IgA や中和抗体価の上昇が認められ、インフルエンザウイルス感染防御効果が示された。

第 3 章では、殺菌乳酸菌の有効成分の探索を目的とし、免疫応答に影響していると報告されている乳酸菌中の RNA に着目した。第 2 章で使用した 2 種類の殺菌乳酸菌 (*Enterococcus faecalis* KH2、*Lactobacillus plantarum* SNK12) を酵素にて乳酸菌中の RNA を分解することで、RNA を分解した殺菌乳酸菌と未処理の殺菌乳酸菌 (RNA が存在する殺菌乳酸菌) を作製し、マウスインフルエンザウイルス感染モデルで比較した。結果、乳酸菌中の RNA 分解はインフルエンザウイルス感染 14 日目の中和抗体価、インフルエンザウイルス特異的 IgA が有意に低下させ、乳酸菌中の RNA が抗体産生に影響を与えていることが示唆された。しかし、感染 3 日目の感染初期においては RNA の有無において大きな差はなかった。以上のことから、乳酸菌中の RNA は抗原特異的に働く獲得免疫系には影響を与え、非特異的に働く感染初期の自然免疫系に対しては大きな影響を与えない可能性があることが考えられる。また本結果から、乳酸菌中の RNA はウイルス感染防御に対し重要な因子であることがわかり、殺菌乳酸菌の作製においては低 pH (pH3 以下) における 100°C 以上の高温は RNA の分解に影響を与える可能性があるため、製造過程ではそれら工程を極力避けた方が良いと考えられる。

第 4 章では、殺菌乳酸菌が生菌であるプロバイオティクス同様に便秘改善効果を有しているのか高圧ホモジナイザーで分散処理した殺菌乳酸菌 (*Enterococcus faecalis* KH2) を用い、ヒトを対象に二重盲検比較試験で検証した。腸内細菌叢の変動を T-RFLP 解析で便秘改善評価を排便回数、便量で評価した。結果、KH2 群は細菌叢解析で *Clostridium* cluster IV の占有率でプラセボ群と比較し有意な差が認められ、摂取前後の変化量においても KH2 群で有意な差が認められた。この結果から KH2 の摂取は腸内細菌叢に影響を与えていること

が示された。一方、便通においても排便回数においてはプラセボ群、KH2 群で有意な差は認められなかったが、KH2 群は 1 回あたりの排便量が有意に増加していた。よって、殺菌された乳酸菌においてもプロバイオティクスと同様の整腸、便秘改善効果を有していることが示された。

第 5 章では、流通を想定し粉末化した殺菌乳酸菌「粒子制御した殺菌乳酸菌粉末」の開発を行なった。常法で乾燥させた殺菌乳酸菌粉末と比較することで水分散性、生体内への吸収、感染防御効果を比較検証した。粒子制御した殺菌乳酸菌粉末は、乳酸菌を培養、洗浄、加熱殺菌した後に高圧ホモジナイザーで乳酸菌の凝集を分散させ、粉末化した時に再凝集しないよう水溶性で安定性の高いデキストリンを等量加え作製した。それぞれの乳酸菌を水に懸濁させ平均粒子径を測定した結果、粒子制御した殺菌乳酸菌が $0.68 \pm 0.20 \mu\text{m}$ で、未処理の殺菌乳酸菌は $35.45 \pm 0.38 \mu\text{m}$ と粒子制御により粒子サイズが小さくなり水分散性が向上した。生体への吸収においては、未処理の殺菌乳酸菌は乳酸菌が凝集し腸管粘液を通過できず腸管上皮（パイエル板）に到達できないことがわかった。一方、粒子制御した殺菌乳酸菌はパイエル板上に到達し体内への吸収を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。続いてマウスに強制経口投与しインフルエンザウイルス感染モデルにて比較した結果、粒子制御した殺菌乳酸菌は通常処理の殺菌乳酸菌と比較して気道中のウイルス量が $1/6$ になり、気道中の中和抗体価が 1.7 倍と高くなりインフルエンザウイルス感染防御効果の向上が認められた。この結果から、乳酸菌の粒子サイズ（凝集）が有効性にも影響を与えていることがわかり、高圧ホモジナイザーで凝集を分散させ、再凝集を防ぐためデキストリンを加え作製した「粒子制御した殺菌乳酸菌粉末」は従来の殺菌乳酸菌と比較し有用であると考えられる。

本研究から、加熱殺菌処理により凝集した乳酸菌を高圧ホモジナイザーで分散させた「粒子制御した殺菌乳酸菌」は何も処理しない凝集が存在する殺菌乳酸菌に比べ物性（水分散

性)、有効性（免疫応答、インフルエンザウイルス感染防御効果）において優れていた。また、有効成分の探索から乳酸菌中の RNA が重要であることがわかり殺菌乳酸菌の製造に活かすことができ、ヒト摂取による便秘改善効果も示され殺菌乳酸菌の新しい訴求点も見いだされた。さらに、粒子制御した殺菌乳酸菌にデキストリンを加えることで乾燥による再凝集を抑制することができ、流通を想定した「粒子制御した殺菌乳酸菌粉末」を作製することができた。

また、本研究で確立した「凝集した乳酸菌を分散化させる技術」は、現在市場に流通している凝集した殺菌乳酸菌製品にも利用することができ、効果の向上や効果向上による添加量の低減から製品をコストダウンさせ、殺菌乳酸菌の利用拡大、延いては人々の健康維持・増進にも期待できる。また、本研究で使用したインフルエンザウイルスには新型コロナウイルスと、抗原変異を起こし易い点、RNA ウイルスであるという点、ワクチン接種時の抗体の寿命が短い等共通点が多い。インフルエンザウイルス感染防御効果が殺菌乳酸菌の摂取による自己免疫力の強化（中和抗体価の増加など）によってもたらされたという本研究の結果は、インフルエンザ対策のみに適応される訳ではなく、異なる抗原刺激（例えば新型コロナウイルス感染）時にも当てはまり近年脅威となっているウイルス感染症にも利用が期待される。乳酸菌の他に免疫に働きかける機能性食品素材（ビタミン、ショウガ、フコイダン、プロポリスなど）は数多く存在するが、乳酸菌は炭素源、窒素源、微量ミネラルがあれば大量に製造することができ、殺菌乳酸菌にすることで保管、輸送も容易である。さらに、本研究成果である粒子制御技術を用いることで殺菌乳酸菌の欠点である乳酸菌の凝集も解決することができ、粒子制御した殺菌乳酸菌は乳酸菌の新しい展開を開く材料として期待できる。さらに今後はより安定した粒子制御・分散制御技術の開発に取り組み新規乳酸菌の普及・展開に繋げていきたい。

参考文献

1. Nakagawa K, Ninomiya M, Okubo T, Aoi N, Juneja LR, Kim M, Yamanaka K, Miyazawa T. Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *J Agric Food Chem.* 1999 Oct;47(10):3967-73.
2. Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Exp Hematol.* 2007 Jun;35(6):989-94.
3. Bottegoni C, Muzzarelli RA, Giovannini F, Busilacchi A, Gigante A. Oral chondroprotection with nutraceuticals made of chondroitin sulphate plus glucosamine sulphate in osteoarthritis. *Carbohydr Polym.* 2014 Aug 30;109:126-38
4. Lidbeck A, Gustafsson JA, Nord CE. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scand J Infect Dis.* 1987;19(5):531-7.
5. Fujiwara S, Seto Y, Kimura A, Hashiba H. Establishment of orally - administrated *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. *J Appl Microbiol.* 2001 Mar;90(3):343-52.
6. Unno T, Choi JH, Hur HG, Sadowsky MJ, Ahn YT, Huh CS, Kim GB, Cha CJ. Changes in human gut microbiota influenced by probiotic fermented milk ingestion. *J Dairy Sci.* 2015 Jun;98(6):3568-76.
7. Reid G, Bruce AW, McGroarty JA, Cheng KJ, Costerton JW. Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections? *Clin Microbiol Rev.* 1990

Oct;3(4):335-44.

8. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 2004 Apr;72(4):2240-7.
9. Cross ML, Stevenson LM, Gill HS. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol*. 2001 May;1(5):891-901.
10. Inoue R, Nishio A, Fukushima Y, Ushida K. Oral treatment with probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) for a specific part of the weaning period prevents the development of atopic dermatitis induced after maturation in model mice, NC/Nga. *Br J Dermatol*. 2007 Mar;156(3):499-509.
11. Tsukahara T, Nakamura SI, Romero-Pérez GA, Ohwaki M, Yanagisawa T, Kan T. Stimulation of murine cell-mediated immunity by dietary administration of a cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain KH-2 and its possible activity against tumour development in mice. *Biosci Microbiota Food Health*. 2018;37(3):49-57.
12. Takagi A, Matsuzaki T, Sato M, Nomoto K, Morotomi M, Yokokura T. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis*. 2001 Apr;22(4):599-605.
13. Goto H, Sagitani A, Ashida N, Kato S, Hirota T, Shinoda T, Yamamoto N. Anti-influenza virus effects of both live and non-live *Lactobacillus acidophilus* L-92 accompanied by the activation of innate immunity. *Br J Nutr*. 2013 Nov;110(10):1810-8.
14. Kumova OK, Fike AJ, Thayer JL, Nguyen LT, Mell JC, Pascasio J. Lung transcriptional

- unresponsiveness and loss of early influenza virus control in infected neonates is prevented by intranasal *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS Pathog.* 2019 Oct 11;15(10):e1008072.
15. Bae JY, Kim JI, Park S, Yoo K, Kim IH, Joo W. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* Probiotics on Human Seasonal and Avian Influenza Viruses. *J Microbiol Biotechnol.* 2018 Jun 28;28(6):893-901.
 16. Yanagihara S, Kanaya T, Fukuda S, Nakato G, Hanazato M, Wu XR, Yamamoto N, Ohno H. Uromodulin-SlpA binding dictates *Lactobacillus acidophilus* uptake by intestinal epithelial M cells. *Int Immunol.* 2017 Aug 1;29(8):357-363.
 17. Higashikawa F, Noda M, Awaya T, Nomura K, Oku H, Sugiyama M. 2010. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. *Nutrition.* 2010 Apr;26(4):367-74.
 18. Ozaki K, Maruo T, Kosaka H, Mori M, Mori H, Yamori Y, Toda T. 2018. The effects of fermented milk containing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC on defaecation in healthy young Japanese women: a double-blind, placebo-controlled study. *Int J Food Sci Nutr.* 2018 Sep;69(6):762-769.
 19. 田中隆一郎、遠山 清、諸富正己、高山博夫、南野昌信、黒島敏方、ほか：腸内フローラと発癌（光岡知足編）。92-99、学会出版センター、1981.
 20. 田中隆一郎、大脇 真：腸内フローラと食餌（光岡知足編）。85-104、学会出版センター、1994.
 21. Hayatsu H, Hayatsu T : Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer*

- Lett. 1993 Sep 30;73(2-3):173-9.
22. 福原有光、山本矩朗、渡辺 晋、光藤幸和、下野雅通、平田忠範、ほか：高濃度乳酸菌製剤 LP-201 の用経験. 診療と新薬、10、1807-1810、1973.
 23. 消費者庁[internet], <http://www.caa.go.jp/> [accessed 2011-04-01]
 24. Fuller, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378 1989
 25. Yanagihara S, Kato S, Ashida N, Yamamoto N. *Lactobacillus acidophilus* CP23 with weak immunomodulatory activity lacks anchoring structure for surface layer protein. *J Biosci Bioeng.* 2015 May;119(5):521-5.
 26. Leo A. B. Joosten, Shahla Abdollahi-Roodsaz, Charles A. Dinarello, Luke O'Neill and Mihai G. Netea. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases:new developments. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Jun;12(6):344-57.
 27. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009 Apr;21(4):317-37.
 28. Gotoh M, Sashihara T, Ikegami S, Yamaji T, Kino K, Orii N, Taketomo N, Okubo K. Efficacy of oral administration of a heat-killed *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on patients of Japanese cedar pollinosis with high Japanese-cedar pollen-specific IgE. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009 Sep;73(9):1971-7.
 29. Itoh H, Uchida M, Sashihara T, Ji ZS, Li J, Tang Q, Ni S, Song L, Kaminogawa S. *Lactobacillus gasseri* OLL2809 is effective especially on the menstrual pain and dysmenorrhea in endometriosis patients: randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cytotechnology.* 2011 Mar;63(2):153-61.
 30. Tokudome Y. Influence of Oral Administration of Lactic Acid Bacteria Metabolites on

- Skin Barrier Function and Water Content in a Murine Model of Atopic Dermatitis. *Nutrients*. 2018 Dec 1;10(12):1858.
31. Takahashi S, Anzawa D, Takami K, Ishizuka A, Mawatari T, Kamikado K, Sugimura H, Nishijima T. Effect of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 on visceral fat accumulation in healthy Japanese adults: a randomized controlled trial. *Biosci Microbiota Food Health*. 2016;35(4):163-171.
 32. Ishikawa R, Fukushima H, Nakakita Y, Kado H, Kida S. Dietary heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 (SBL88™) improves hippocampus-dependent memory performance and adult hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2019 Jun;39(2):140-145.
 33. Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB, Chen W. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *Cell Tissue Res*. 2006 Mar;323(3):425-32.
 34. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):331-41.
 35. Yoda K, He F, Miyazawa K, Hiramatsu M, Yan F. Fermented milk containing *Lactobacillus* GG alleviated DSS-induced colitis in mice and activated epidermal growth factor receptor and Akt signaling in intestinal epithelial cells. *Microb Ecol Health Dis*. 2012 Jun 18;23.
 36. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001 Aug;2(8):675-80.
 37. Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev*

- Rheumatol. 2016 Jun;12(6):344-57.
38. Bottari B, Castellone V, Neviani E. Probiotics and Covid-19. *Int J Food Sci Nutr.* 2020 Aug 12;1-7.
 39. Sundararaman A, Ray M, Ravindra PV, Halami PM. Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Oct;104(19):8089-8104.
 40. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
 41. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000 Dec 4;192(11):1545-52.
 42. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
 43. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.
 44. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+

- Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008 Dec;9(12):1347-55. doi: 10.1038/ni.1677.
Epub 2008 Nov 9.
45. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009 Dec;119(12):3573-85.
46. Bourlioux P, Pochart P. Nutritional and health properties of yogurt. *World Rev. Nutr. Diet* 1988; 56: 217-258.
47. Yasui H, Kiyoshima J, Hori T. Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Jul;11(4):675-9.
48. Waki N, Yajima N, Suganuma H, Buddle BM, Luo D, Heiser A, Zheng T. Oral administration of *Lactobacillus brevis* KB290 to mice alleviates clinical symptoms following influenza virus infection. *Lett Appl Microbiol.* 2014 Jan;58(1):87-93.
49. Tsuruta T, Inoue R, Tsushima T, Watanabe T, Tsukahara T, Ushida K. Oral Administration of EC-12 Increases the Baseline Gene Expression of Antiviral Cytokine Genes, IFN- γ and TNF- α , in Splenocytes and Mesenteric Lymph Node Cells of Weaning Piglets. *Biosci Microbiota Food Health.* 2013;32(4):123-8.
50. Park MK, Ngo V, Kwon YM, Lee YT, Yoo S, Cho YH, Hong SM, Hwang HS, Ko EJ, Jung YJ, Moon DW, Jeong EJ, Kim MC, Lee YN, Jang JH, Oh JS, Kim CH, Kang SM. *Lactobacillus plantarum* DK119 as a probiotic confers protection against influenza virus by modulating innate immunity. *PLoS One.* 2013 Oct 4;8(10):e75368.

51. Ishii M, Nishida S, Kataoka K, Nishiyama Y, Abe S, Sekimizu K. Lactic acid bacteria of the *Leuconostoc* genus with high innate immunity-stimulating activity. *Drug Discov Ther.* 2017 Mar 22;11(1):25-29.
52. Govorkova, E.A., Fang, H.B., Tan, M., Webster, R.G. Neuraminidase inhibitor-rimantadine combinations exert additive and synergistic anti-influenza virus effects in MDCK cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Dec;48(12):4855-63.
53. Belkacem N, Serafini N, Wheeler R, Derrien M, Boucinha L, Couesnon A, Cerf-Bensussan N, Gomperts Boneca I, Di Santo JP, Taha MK, Bourdet-Sicard R. *Lactobacillus paracasei* feeding improves immune control of influenza infection in mice. *PLoS One.* 2017 Sep 20;12(9):e0184976.
54. Kawase M, He F, Kubota A, Yoda K, Miyazawa K, Hiramatsu M. Heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 protects mice against influenza virus infection by stimulating gut and respiratory immune responses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Mar;64(2):280-8.
55. Shojadoost B, Kulkarni RR, Brisbin JT, Quinteiro-Filho W, Alkie TN, Sharif S. Interactions between lactobacilli and chicken macrophages induce antiviral responses against avian influenza virus. *Res Vet Sci.* 2019 Aug;125:441-450.
56. Koch RM, Diavatopoulos DA, Ferwerda G, Pickkers P, de Jonge MI, Kox M. The endotoxin-induced pulmonary inflammatory response is enhanced during the acute phase of influenza infection. *Intensive Care Med Exp.* 2018 Jul 5;6(1):15.
57. Park MK, Ngo V, Kwon YM, Lee YT, Yoo S, Cho YH, Hong SM, Hwang HS, Ko EJ, Jung YJ, Moon DW, Jeong EJ, Kim MC, Lee YN, Jang JH, Oh JS, Kim CH, Kang SM.

- Lactobacillus Plantarum DK119 as a Probiotic Confers Protection Against Influenza Virus by Modulating Innate Immunity. PLoS One. 2013 Oct 4;8(10):e75368.
58. O'Callaghan J, Buttó LF, MacSharry J, Nally K, O'Toole PW. Influence of adhesion and bacteriocin production by Lactobacillus salivarius on the intestinal epithelial cell transcriptional response. Appl Environ Microbiol. 2012 Aug;78(15):5196-203.
 59. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod - like receptors in microbial recognition and host defense. Immunol Rev. 2009 Jan;227(1):106-28.
 60. Barber GN. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. Immunol Rev. 2011 Sep;243(1):99-108.
 61. Kato H, Takahashi K, Fujita T. RIG - I - like receptors: cytoplasmic sensors for non - self RNA. Immunol Rev. 2011 Sep;243(1):91-8.
 62. Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. Crit Rev Microbiol. 2013 Aug;39(3):229-46.
 63. Plato A, Willment JA, Brown GD. C-Type Lectin-Like Receptors of the Dectin-1 Cluster: Ligands and Signaling Pathways. Int Rev Immunol. 2013 Apr;32(2):134-56.
 64. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007 Oct 18;449(7164):819-26.
 65. Kawashima T, Ikari N, Watanabe Y, Kubota Y, Yoshio S, Kanto T, Motohashi S, Shimojo N, Tsuji NM. Double-Stranded RNA Derived from Lactic Acid Bacteria Augments Th1 Immunity via Interferon- β from Human Dendritic Cells. Front Immunol. 2018 Jan 23;9:27.
 66. Inoue R, Nagino T, Hoshino G, Ushida K. Nucleic acids of Enterococcus faecalis strain

- EC-12 are potent Toll-like receptor 7 and 9 ligands inducing interleukin-12 production from murine splenocytes and murine macrophage cell line J774.1. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Feb;61(1):94-102.
67. Abdi K, Singh NJ, Spooner E, Kessler BM, Radaev S, Lantz L, Xiao TS, Matzinger P, Sun PD, Ploegh HL. Free IL-12p40 monomer is a polyfunctional adaptor for generating novel IL-12-like heterodimers extracellularly. *J Immunol.* 2014 Jun 15;192(12):6028-36.
68. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251-76.
69. Sashihara T, Sueki N, Ikegami S. An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J Dairy Sci.* 2006 Aug;89(8):2846-55.
70. Ongol MP, Iguchi T, Tanaka M, Sone T, Ikeda H, Asano K, Nishimura T. Potential of selected strains of lactic acid bacteria to induce a Th1 immune profile. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Nov;72(11):2847-57.
71. Iwabuchi N, Yonezawa S, Odamaki T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Xiao JZ. Immunomodulating and anti-infective effects of a novel strain of *Lactobacillus Paracasei* that strongly induces interleukin-12. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Nov;66(2):230-9.
72. Ren C, Zhang Q, de Haan BJ, Zhang H, Faas MM, de Vos P. Identification of TLR2/TLR6 Signalling Lactic Acid Bacteria for Supporting Immune Regulation. *Sci Rep.* 2016 Oct 6;6:34561.
73. Li H, Wang D. *Streptococcus mutans* wall-associated protein A promotes TLR4-induced

- dendritic cell maturation. *Scand J Immunol.* 2014 Aug;80(2):121-6.
74. Nishibayashi R, Inoue R, Harada Y, Watanabe T, Makioka Y, Ushida K. RNA of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 Is a Major Component Inducing Interleukin-12 Production from Human Monocytic Cells. *PLoS One.* 2015 Jun 17;10(6):e0129806.
75. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):499-511.
76. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003 Oct 3;278(40):38105-8.
77. Kechaou N, Chain F, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bertho N, Chevalier C, Le Goffic R, Courau S, Molimard P, Chatel JM, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Identification of one novel candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strain active against influenza virus infection in mice by a large-scale screening. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Mar;79(5):1491-9.
78. Lee YN, Youn HN, Kwon JH, Lee DH, Park JK, Yuk SS, Erdene-Ochir TO, Kim KT, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. Sublingual administration of *Lactobacillus rhamnosus* affects respiratory immune responses and facilitates protection against influenza virus infection in mice. *Antiviral Res.* 2013 May;98(2):284-90.
79. Youn HN, Lee DH, Lee YN, Park JK, Yuk SS, Yang SY, Lee HJ, Woo SH, Kim HM, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. Intranasal administration of live *Lactobacillus* species facilitates protection against influenza virus infection in mice. *Antiviral Res.* 2012 Jan;93(1):138-43.
80. Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice.

- Clin Diagn Lab Immunol. 2001 May;8(3):593-7.
81. Harata G, He F, Hiruta N, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, Yausi H. Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Lett Appl Microbiol.* 2010 Jun 1;50(6):597-602.
 82. Savidge TC, Smith MW, James PS, Aldred P. Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol.* 1991 Jul;139(1):177-84.
 83. Kan T. Recent topics of the *Lactobacillus* material, Nano-type Lactic acid bacteria. *Food style* 21 22(4), 58-62, 2018
 84. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
 85. 平山 和宏 ヒトの腸内菌の分類に関する総論 腸内細菌学雑誌 2016 ; 30 : 5-15
 86. S.E. Gilliland, M.L. Speck, G.F. Nauyok Jr., F.G. Giesbrecht. Influence of Consuming Nonfermented Milk Containing *Lactobacillus acidophilus* on Fecal Flora of Healthy Males. *Journal of Dairy Science*, 1978;61,(1): 1–10
 87. Benno Y, Mitsuoka T. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. *Microbiol Immunol.* 1992;36(7):683-94.
 88. Mitamura R, Ueda A, Hasegawa K, Obata A. Effects of Mixed Vegetable and Fruit Juice Containing a Sterilized Lactic Acid Fermented Vegetable on Defecation. *The Bulletin of Studies on QOL and Well-Being* 2015;10(1): 61-66
 89. Jounai K, Sugimura T, Ohshio K, Fujiwara D. Oral administration of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 enhances lung immune response resulting in protection from

murine parainfluenza virus infection. PLoS One. 2015 Mar 6;10(3)

90. 西 基, 三宅浩次, 国本正雄:女子高校生の便秘に関与する因子 小児保健研究
2002;61(3):520-524
91. Susan C, McMillan Faye A, Williams. Validity and reliability of the constipation
Assessment Scale. Cancer Nurs 1989 ; 12 : 183-8.
92. 深井喜代子, 杉田明子, 田中美穂. 日本語版便秘評価尺度の検討. 看護研究 1995; 28 :
201-8.
93. 深井喜代子, 塚原貴子, 人見裕江. 日本語版便秘評価尺度を用いた高齢者の便秘評価.
看護研究 1995 ; 28: 209-16.
94. Davies GJ, Crowder M, Reid B, Dickerson JW. Bowel function measurements of
individuals with different eating patterns. Gut 1986 ; 27 : 164-9.
95. 便秘の定義. In : 日本消化器病学会関連研究会, 慢性便秘の診断・治療研究会. 慢性便
秘症診療ガイドライン 2017. 2 版. 南江堂 ; 2017 年. p.2.
96. 徳井教孝, 三成由美. 便秘の定義と便秘体質. 薬膳科学研究所研究紀要 2012 ; 5 : 49-
54.
97. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ.
Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. Appl
Environ Microbiol 2000 ; 66 : 1654-61.
98. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Honda K. Induction
of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species Science 2011 ; 331 : 337-
41.
99. 本田賢也他. 腸管における T 細胞応答における腸内共生菌の役割. 腸内細菌学雑誌

2011 ; 25 : 103-4.

100. Yajima, T. Effect of sodium propionate on the contractile response of the rat ileum in situ. *Jpn J Pharmacol.* 1984 Jul;35(3):265-71.
101. Grider JR, Piland BE. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jan;292(1):G429-37.
102. Yajima T. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol.* 1985 Nov;368:667-78.
103. Sakata, T and W. von Engelhard. Stimulatory effect of short chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1983 ; 74 : 459-462
104. Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke JD, Gäbel G, Martens H, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N.Y. Acad Sci* 2012 ; 1258, 52-59.
105. Lozupone C, Faust K, Raes J, Faith JJ, Frank DN, Zaneveld J, et al. Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. *Genomic Res* 2012 ; 22 : 1974-84
106. Fadlallah J, El Kafsi H, Sterlin D, Juste C, Parizot C, Dorgham K, et al. Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Sci Transl Med* 2018 ; 1217 : 1-15
107. Zilberman L, Maharshak N, Arbel Y, Rogowski O, Rozenblat M, Shapira I, et al. Correlated expression of high-sensitivity C-reactive protein in relation to disease activity in inflammatory bowel disease: lack of differences between Crohn's disease and ulcerative

- colitis. *Digestion* 2006 ; 73 : 205-9
- 108.Hod K, Dickman R, Sperber A, Melamed S, Dekel R, Ron Y, et al. Assessment of high-sensitivity CRP as a marker of micro-inflammation in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2011 ; 23 : 1105-10
- 109.Hynönen U, Palva A. Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Jun;97(12):5225-43.
- 110.Saito K, Nakamura T, Kobayashi I, Ohnishi-Kameyama M, Ichinose H, Kimura K, Funane K. Xylan-mediated aggregation of *Lactobacillus brevis* and its relationship with the surface properties and mucin-mediated aggregation of the bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014;78(12):2120-7.
- 111.Ambort D, Johansson ME, Gustafsson JK, Nilsson HE, Ermund A, Johansson BR, Koeck PJ, Hebert H, Hansson GC. Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 10;109(15):5645-50. doi: 10.1073/pnas.1120269109. Epub 2012 Mar 26.
- 112.Schütte A, Ermund A, Becker-Pauly C, Johansson ME, Rodriguez-Pineiro AM, Bäckhed F, Müller S, Lottaz D, Bond JS, Hansson GC. Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 26;111(34):12396-401.
- 113.Metchnikoff, E. *The prolongation of life ; optimistic studies*. William Heinemann, London, 1907
- 114.Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb 3;(2):CD006895.

115. Kumpu M, Lehtoranta L, Roivainen M, Rönkkö E, Ziegler T, Söderlund-Venermo M, Kautiainen H, Järvenpää S, Kekkonen R, Hatakka K, Korpela R, Pitkäranta A. The use of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. *J Med Virol*. 2013 Sep;85(9):1632-8.
116. 光岡知足：機能性食品ープロバイオティクス・プレバイオティクス・バイオジェニックス。腸内フローラとプロバイオティクス，光岡知足（編），学会出版センター，東京，pp1-16, 1998
117. Mitsuoka, T. Significance of Dietary Modulation of Intestinal Flora and Intestinal Environment. 2000 ;19(1): 15-25

謝辞

本博士論文を作成するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました中部大学大学院工学研究科電気電子工学専攻の河原敏男教授、中部大学大学院工学研究科応用化学専攻の坂本渉教授、饒村修教授、岐阜医療科学大学薬学部薬学科の伊藤哲朗教授に深く感謝いたします。河原敏男教授には電子顕微鏡、原子間力顕微鏡による乳酸菌体表面の観察や大学と会社を両立させるための調整から論文、学会発表において的確な助言を頂き厚く御礼申し上げます。また、ご指導頂きました中部大学大学院工学研究科電気電子工学専攻の後藤英雄教授、中野由崇教授に感謝致します。

インフルエンザウイルス感染試験において手技手法や結果の捉え方など研究の側面だけでなく、論文の執筆、学会発表に至るまでご指導ご鞭撻いただきました中部大学大学院工学研究科の林京子客員教授に深く感謝し厚く御礼申し上げます。

有限会社バイオ研の菅辰彦博士、菅哲郎氏、生天目由里子氏には検体の調製、粒度分布測定などご協力頂き、また学位取得に対するご理解そして支援をありがとうございました。特定非営利活動法人日本サプリメント臨床研究会の大脇眞博士、清水和美氏、武川和琴氏には乳酸菌のマウス脾細胞におけるサイトカインの分析だけでなく研究の進め方など多くの面でサポートして頂きありがとうございました。株式会社アイカムの川村智子氏、長谷川高久氏、高橋功氏には乳酸菌の投与後の動き、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を使ったマウスパイエル板上の乳酸菌の観察、そしてイメージの作成などご協力頂きありがとうございました。また、乳酸菌、免疫の分野に導いてくれた以前従事していたコンビ株式会社ライフサイエンス事業部に感謝致します。

最後になりますが学位取得に対し研究を理解し、協力し、応援してくれた家族には心から感謝致します。