

# 乳酸菌による「免疫調節作用」と「大腸炎予防作用」

タカナシ乳業株式会社

《設立》1950年4月



## はじめに

タカナシ乳業株式会社（以下、タカナシ乳業）のCIマークは、バラをモチーフにしています。バラの育成には手間がかかりますが、その手間を惜しまなければ非常に美しい花を咲かせてくれます。牛乳や乳製品も、素材にこだわり、基礎研究から製造まで手間を惜しまず取組み、高品質な製品を提供したいという想いが、このCIマークに込められているのだそうです。

タカナシ乳業が主に研究している乳酸菌は *Lactobacillus rhamnosus* GG株（以下、LGG®乳酸菌）です。この乳酸菌は1985年にアメリカ・タフツ大学のゴルバッハ博士とゴルディン博士によって健康な人の腸内から発見されたもので、フィンランドのバリオ社がライセンスを獲得し、世界中

で研究されています。タカナシ乳業はバリオ社との間でライセンス契約を締結し、以来、整腸作用や免疫調節作用などに関する様々な研究を行ってきました。日本人を対象に行った整腸作用に関する研究では、腸内環境及び便性の改善作用が確認され、1996年、LGG®乳酸菌を含むドリンクタイプの発酵乳が、乳酸菌を関与成分とする特定保健用食品として初めて許可されました。

今回は、横浜本社内にある商品研究所を訪れ、LGG®乳酸菌の免疫調節作用に関連するものとして「アトピー性皮膚炎予防」「花粉症の症状軽減」「インフルエンザウイルス感染予防」の研究と、「大腸炎抑制」に関する研究について、お話を伺いました。

## 1. アトピー性皮膚炎予防

アトピー性皮膚炎の家族歴のある妊婦を対象に行ったフィンランドでの研究では、出産1カ月前から出産6カ月後までLGG®乳酸菌を摂取していたグループは、子どものアトピー性皮膚炎の発症率が非摂取グループに比べ半減し、その効果は出生後7年経過しても有効であることがわかりました。

この研究を受け、LGG®乳酸菌によるアトピー性皮膚炎発症抑制のメカニズムを探るために、東京農工大学と共同でNC/NGaマウス（アトピー性皮膚炎を自然発症するマウス。以下、NCマウス）を使った試験を行いました。

NCマウスの妊娠確認後にマウスを2群に分け、LGG®乳酸菌を含む餌または含まない通常の餌を、仔マウスが離乳する4週齢まで与え、離乳後は仔マウスにも12週齢まで同様の餌を与えました。

12週齢の仔マウスの皮膚状態を調べたところ、LGG®乳酸菌摂取群の毛並みはきれいであるのに

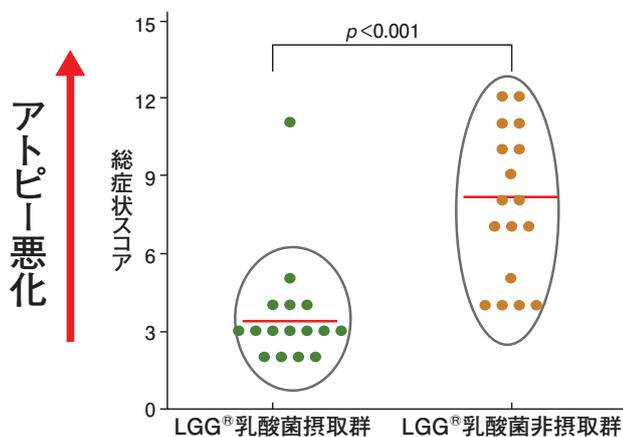


図1 LGG®乳酸菌を長期摂取した12週齢NCマウスのアトピー性皮膚炎の臨床スコア

対し、LGG®乳酸菌非摂取群は皮膚炎の症状が現れていました。また、皮膚炎の総症状スコアにおいても、LGG®乳酸菌非摂取群は有意に悪化していました(図1)。

さらに、*in vitro*試験において、LGG®乳酸菌は抗原提示細胞を介して、菌株特異的に制御性T細胞を活性化することが明らかとなり、過剰になった免疫応答全体を正常化させ恒常性を維持する可能性が考えられました。[以上、文献1より]

## 2. 花粉症の症状軽減

タカナシ乳業が保有する*Lactobacillus gasseri* TMC0356株(以下、TMC0356菌)は、様々な試験により、免疫調節作用があることが認められています。そこで、LGG®乳酸菌とTMC0356菌で発酵した発酵乳を用い、花粉症への影響を検討しました。いくつかのアレルギー研究用モデルマウスを使って試験を実施したところ、鼻の症状に対して有益な作用が認められたことから、ヒトを対象に次のような試験を行いました。

2006年のスギ花粉シーズンに、花粉症患者29名を2群に分け、LGG®乳酸菌とTMC0356菌の調整発酵乳(発酵乳群)および乳酸菌が含まれない飲料(プラセボ群)を10週間摂取してもらいました。

結果をみると、スギ花粉飛散量がピークとなる試験開始6週目に、鼻アレルギー症状もピークが観察されましたが、その後、発酵乳群では、臨床的判定と自覚症状の両方で、鼻閉症状に有意な改善

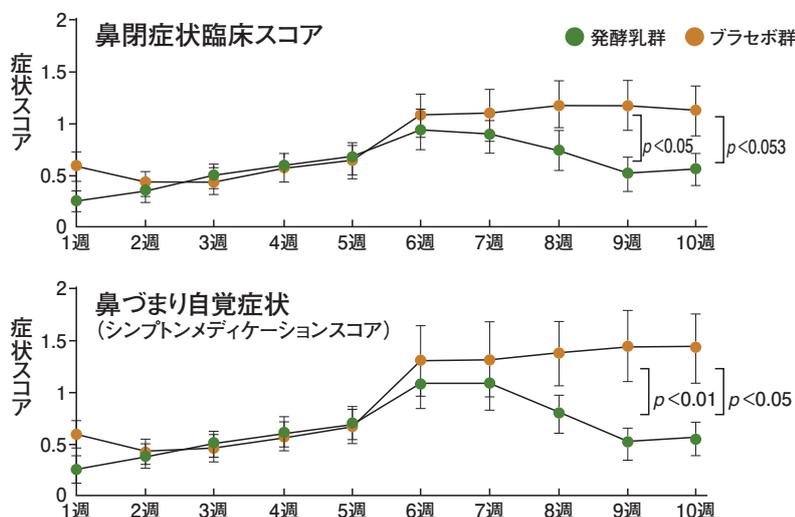


図2 花粉症患者の鼻閉に対する発酵乳摂取の効果

が認められました(図2)。[以上、文献2より]

次に、この鼻閉症状抑制のメカニズムを解明するために、発酵乳およびプラセボ摂取前後の腸内細菌叢を網羅的に解析しました。すると、花粉飛散季節において、プラセボ群の53%で腸内細菌叢が大きく変化していたのに対し、発酵乳群は21%でした。この結果から、発酵乳摂取による腸内菌叢の安定化が、スギ花粉症の発症抑制に関係していることが示唆されます。[以上、文献3より]

## 3. インフルエンザウイルス感染予防

フィンランドのヘルシンキ市内18カ所の保育施設で行われた、LGG®乳酸菌の長期飲用試験では、LGG®乳酸菌の摂取は子どもの呼吸器感染症の発症を有意に抑え、症状を軽減することが報告されています。そこで、LGG®乳酸菌とTMC0356菌の免疫調節作用によるインフルエンザウイルス感染予防の可能性について動物実験を行い、検証を試みました。

### ■試験1：乳酸菌の経鼻投与によるインフルエンザ発症率・生存率への影響

信州大学との共同試験を行い、マウスの鼻腔内にLGG®乳酸菌を3日間投与した後、自然免疫の活性の指標となる、肺のナチュラルキラー細胞(NK細胞)を測定しました。その結果、LGG®乳酸菌群は緩衝液投与群(コントロール群)と比較し

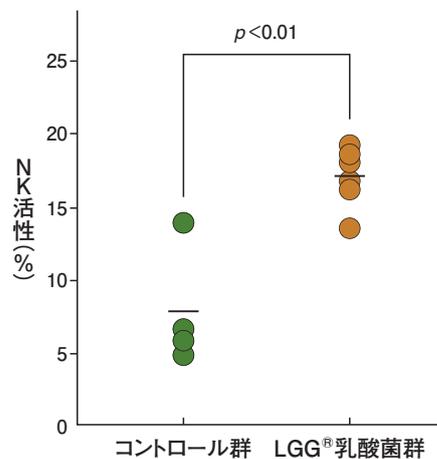
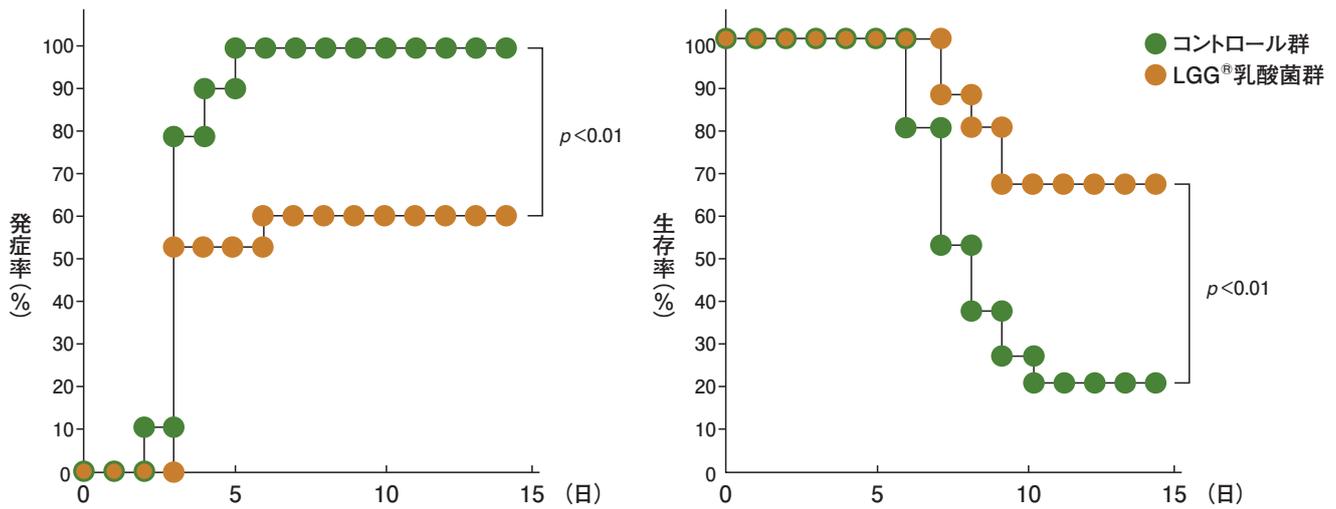


図3 LGG®乳酸菌の鼻腔内投与によるNK活性の変化



**図4 LGG®乳酸菌の鼻腔内投与がインフルエンザ発症率及び生存率に及ぼす影響**

て有意にNK活性が上昇していました (図3)。

次に、インフルエンザウイルス感染に対する影響を調べるために、マウスにLGG®乳酸菌を鼻腔内投与し、翌日インフルエンザウイルスを上気道に感染させ、発症率と生存率を観察しました。

その結果、LGG®乳酸菌群はインフルエンザウイルス感染症の発症率が有意に低下し、マウス生存率も有意に上昇しました (図4)。[以上、文献4より]

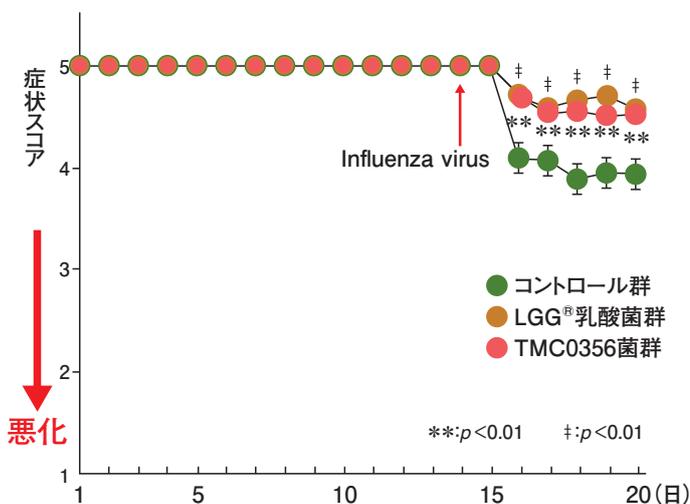
毎日経口投与し、14日目にインフルエンザウイルスを経鼻接種して感染させ、影響を調べました。

マウスの眼や毛の状態、行動、呼吸などをスコア化して観察したところ、乳酸菌投与群はコントロール群に比べて症状が軽微でした (図5)。また、肺のインフルエンザウイルス数を測定したところ、有意に減少していました (図6)。[以上、文献5より]

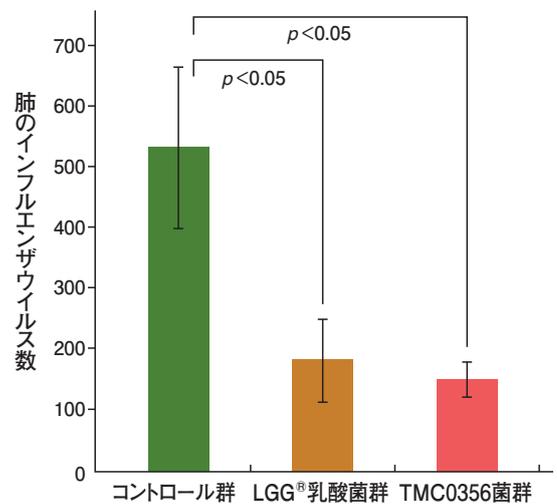
試験1及び試験2の結果から、乳酸菌が腸管内の免疫系を介し、インフルエンザウイルスに対して予防的に作用している可能性が示唆されました。

**■試験2：乳酸菌の経口投与によるインフルエンザの症状軽減への影響**

次に、マウスにLGG®乳酸菌及びTMC0356菌を

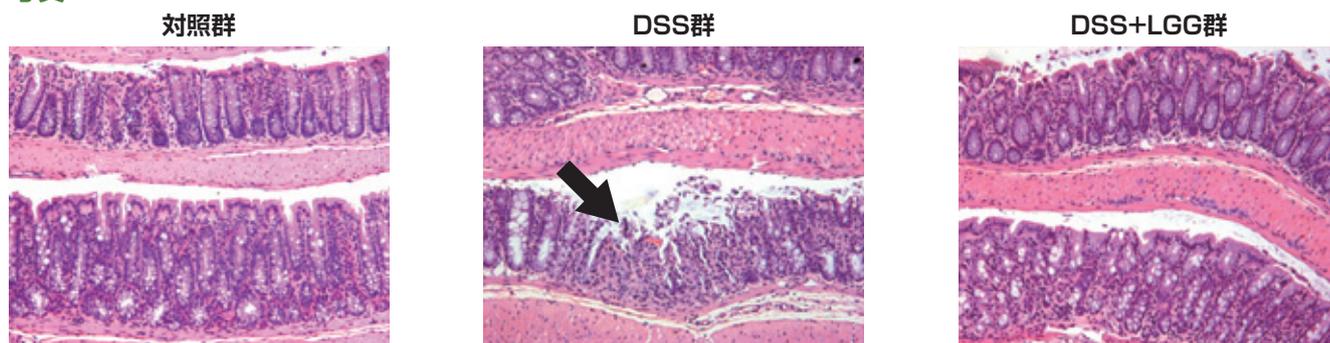


**図5 LGG®乳酸菌及びTMC0356菌経口投与がインフルエンザの症状に及ぼす影響**



**図6 LGG®乳酸菌及びTMC0356菌経口投与が肺のインフルエンザウイルス数に及ぼす影響**

## 写真1



DSS群に示した矢印は、腸管上皮の壊死、損壊部分を示す。

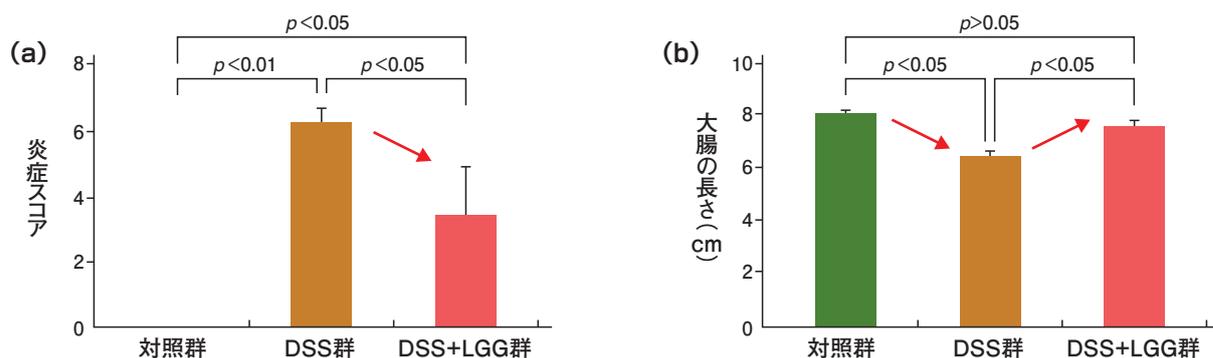


図7 DSS処理マウスの腸管炎症スコア(a)と大腸の長さ(b)に対するLGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳投与の影響

## 4. 大腸炎の抑制

近年増加している潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) は、腸管上皮細胞のアポトーシス (細胞死) と深く関与していることが知られています。アメリカのヴァンダービルト大学医学部のヤン博士は、LGG<sup>®</sup>乳酸菌の培養上清を腸管上皮細胞に添加することによって、細胞のアポトーシスが抑制されることを発見しました。さらにLGG<sup>®</sup>乳酸菌の培養液から、腸管上皮細胞のアポトーシスを抑制するタンパク質のp40、p75を発見、分離することに成功しています。そこで、LGG<sup>®</sup>乳酸菌の大腸炎抑制効果についてヤン博士と共同研究を行いました。

### ■腸管上皮の炎症抑制

LGG<sup>®</sup>乳酸菌の培養上清\*1が大腸炎に及ぼす影響について調べるために、以下の3群のマウスを用い、大腸組織を顕微鏡で観察しました。

- ①界面活性剤のDSSを4日間投与して人為的に大腸炎を発症させたマウス (DSS群)
- ②DSS投与前に6日間、LGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳を

毎日1回投与し、さらにDSS投与期間(4日間)も同様にLGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳を投与したマウス (DSS+LGG群)

- ③DSSもLGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳も投与しないマウス (対照群)

試験の結果、DSS群では腸管上皮にダメージが観察され、絨毛組織が破壊されていましたが、DSS+LGG群では組織のダメージは見られるものの、その度合いは低く対照群に近いことが認められました (写真1)。

次に、各群の炎症スコアを比較したところ、DSS群と比較しDSS+LGG群は有意に低値を示しました (図7-a)。また、炎症を起こすと大腸が萎縮し、長さが短縮します。そこで大腸の長さを比較すると、DSS群は有意に長さが短くなっており、炎症による大腸の収縮が見られましたが、DSS+LGG群と対照群の間には有意差がなく、炎症による大腸収縮は確認されませんでした (図7-b)。〔以上、文献6、7より〕

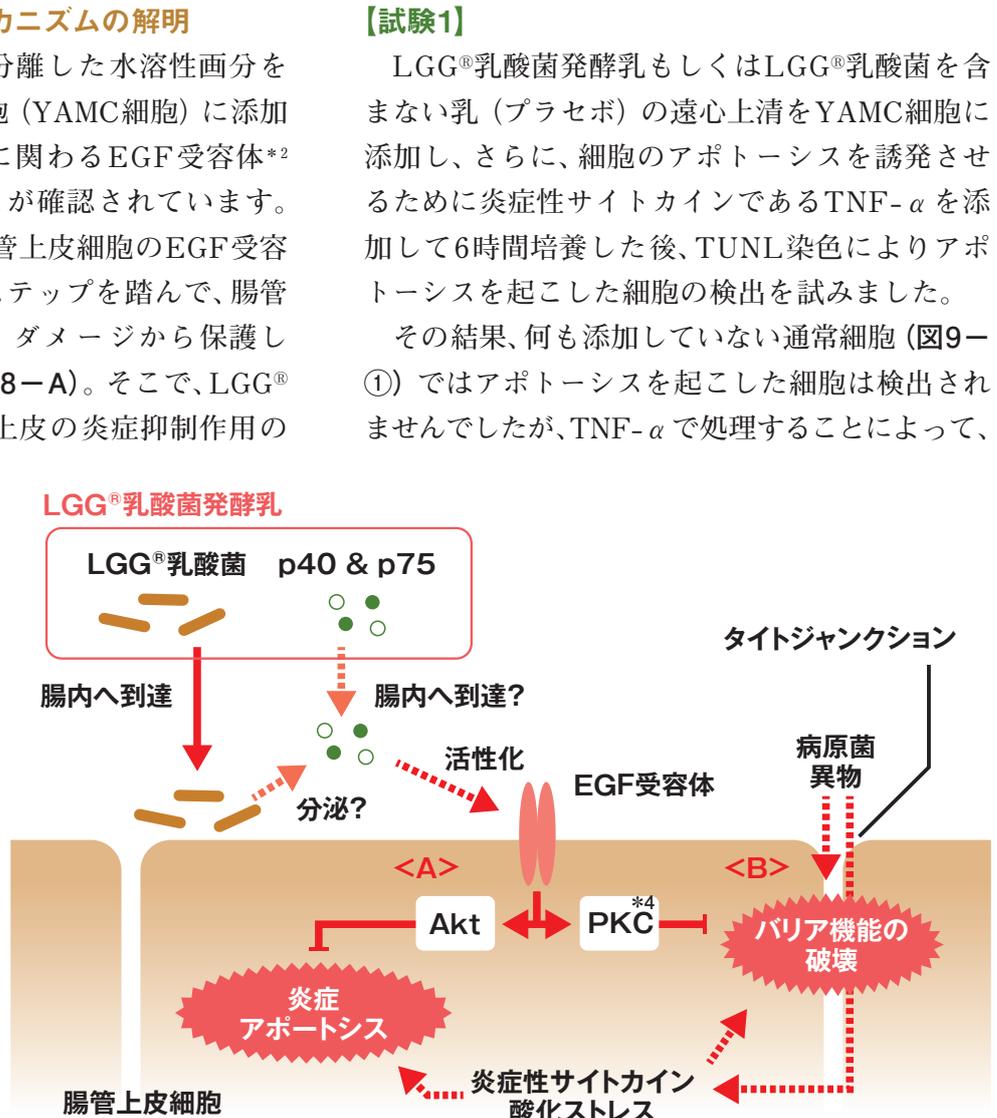
\*1 培養上清：培養液を遠心分離した際の上澄み部分。菌などの不溶性物質は遠心分離によって沈殿するため、培養上清には可溶性の物質が含まれる。

## ■腸管上皮の炎症抑制メカニズムの解明

LGG<sup>®</sup>乳酸菌から遠心分離した水溶性画分をマウス大腸上皮由来の細胞 (YAMC細胞) に添加すると、上皮細胞の成長に関わるEGF受容体\*2とAkt\*3が活性化することが確認されています。LGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳は、腸管上皮細胞のEGF受容体やAktの活性化というステップを踏んで、腸管上皮細胞の成長を促進し、ダメージから保護していると推測されます (図8-A)。そこで、LGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳による腸管上皮の炎症抑制作用のメカニズムを明らかにするために、YAMC細胞を用いて検討を行いました。

\*2 FGF受容体：上皮成長因子 (EGF) と結合する受容体タンパク質。EGFと結合すると活性化し、細胞の成長促進メカニズムが働き始める。

\*3 Akt：細胞の成長に関わるシグナル伝達経路に働くリン酸化酵素 (タンパク質) の一つ。



\*4 : p40とp75は、EGF受容体を介してプロテインキナーゼ (PKC) 経路などを経ることも腸管上皮バリア機能に作用する。

図8 腸管上皮細胞における恒常性調節メカニズム

## 【試験1】

LGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳もしくはLGG<sup>®</sup>乳酸菌を含まない乳 (プラセボ) の遠心上清をYAMC細胞に添加し、さらに、細胞のアポトーシスを誘発させるために炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ を添加して6時間培養した後、TUNL染色によりアポトーシスを起こした細胞の検出を試みました。

その結果、何も添加していない通常細胞 (図9-①) ではアポトーシスを起こした細胞は検出されませんが、TNF- $\alpha$ で処理することによって、

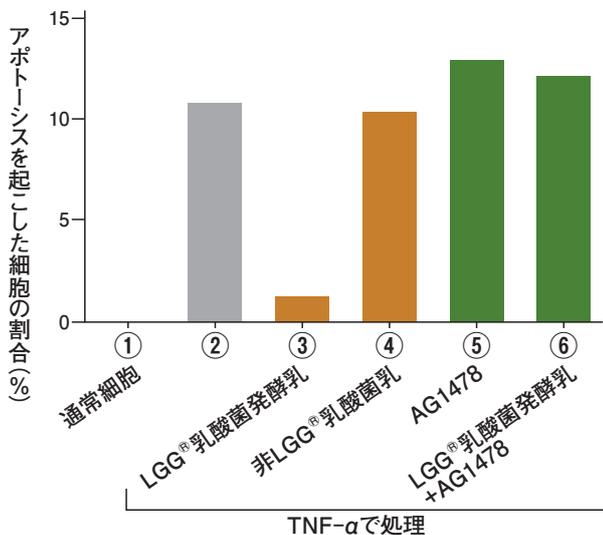


図9 LGG<sup>®</sup>乳酸菌発酵乳によるTNF- $\alpha$ 誘導性アポトーシスに対する抑制効果

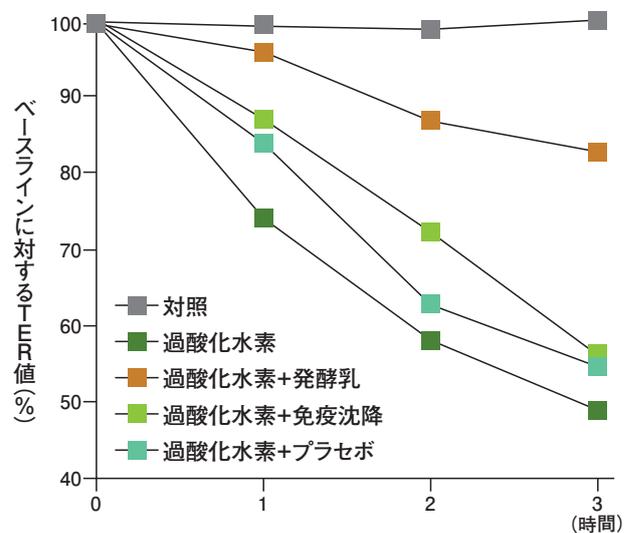


図10 腸管バリア機能破綻に対する発酵上清の保護作用

アポトーシスを起こした細胞が検出されました(②)。また、LGG®乳酸菌発酵乳の遠心上清を加えた細胞では、TNF- $\alpha$  処理によってもほとんどアポトーシスを起こした細胞が見られない(③)のに対し、プラセボではアポトーシスを起こした細胞が観察されました(④)。なお、LGG®乳酸菌のアポトーシス抑制効果は、EGF受容体の活性を阻害する試薬AG1478を添加することで失われました(⑥)。この結果により、LGG®乳酸菌はEGF受容体活性化を介して腸管上皮のダメージを抑制することが示唆されました。〔以上、文献6、7より〕

### 【試験2】

腸管上皮の細胞間が密接している部分はタイトジャンクションと呼ばれ、細胞間を通り抜けようとする物質を妨げ、腸管上皮のバリア機能を支えています(図8-B)。LGG®乳酸菌発酵乳もしくはプラセボの上清をヒト結腸由来上皮細胞に添加して1時間前処理した後、過酸化水素を加え、バリア機能への影響を調べました。バリア機能の指標として、経上皮電気抵抗(TER)値の測定\*5を行いました。

過酸化水素処理によってTER値の顕著な低下が観察されましたが、発酵乳上清を添加することによってTER値の低下が抑制されました。しかし、抗p40抗体と抗p75抗体を用いて発酵乳上清から両タンパク質を除去(免疫沈降)した細胞もしくはプラセボ上清を添加した細胞では、発酵乳上清を添加した細胞と比較して著しい低下を示しました(図10)。この結果から、発酵乳中のp40と

p75が腸管上皮バリア機能の保護に作用していることが示唆されました。〔以上、文献6、7より〕

\*5:細胞間が緊密であるほどバリア機能が高く、また高い電気抵抗値を示す。

## おわりに

線毛(pili)があることも、LGG®乳酸菌の大きな特徴です。この線毛はLGG®乳酸菌が腸表面に付着する際の重要な構造体であることがわかっており、線毛を除去すると極端に付着性が低下してしまいます。現在、フィンランドでは、LGG®乳酸菌の腸管への付着性が免疫反応に及ぼす影響について試験が行われており、タカナシ乳業も注目しているそうです。

LGG®乳酸菌は世界で最も研究されている乳酸菌であり、学術的根拠も豊富です。タカナシ乳業もその有用性をさらに追求し、消費者に伝えてきたいと、取材の最後に研究者の皆さんは話してくださいました。



▲LGG®乳酸菌 Represented with the kind permission of Antoni Hendrikxs, Matti Kankainen & Willem M. de Vos - Utrecht, Helsinki and Wageningen University

《今回の記事は、以下の文献・学会発表を参考にまとめました》

- 1) 森田裕嗣ほか. モデル動物試験系における乳酸菌*Lactobacillus* GG株の抗アレルギー効果の解析. 日本免疫学会(2005)
- 2) Kawase M, et al. Effect of fermented milk prepared with two probiotic strain on Japanese cedar pollinosis in a double-blind placebo-controlled clinical study. *International J. Food Microbiology* 128 ; 429-434 (2009)
- 3) Kubota A, et al. *Lactobacillus* strains stabilize intestinal microbiota in Japanese pollinosis patients. *Microbiol. Immunol.* 53 (4) ; 198-205 (2009)
- 4) Harata G, et al. Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Lett. Appl. Microbiol.* 50 (6) ; 597-602 (2010)
- 5) Kawase, et al. Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection. *Lett. Appl. Microbiol.* 51; 6-10 (2010)
- 6) Yoda K, et al. *Lactobacillus* GG-fermented milk prevents DSS-induced colitis and regulates intestinal homeostasis through activation of epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Nutr.* 53 (1) ; 105-115 (2014)
- 7) 依田一豊ほか. 発酵乳中の*Lactobacillus* GGタンパク質と腸管上皮の恒常性. 月刊細胞 47 (2) ; 93-96 (2015)

《取材・編集：(株)BBプロモーション 高林 昭浩》