

深化する プロバイオティクス研究



(公財)日本乳業技術協会 業務執行理事
(信州大学名誉教授)
細野 明義

はじめに

1980年代に入り、食品に対して栄養素、風味、健康的な体調を維持または増進させる機能についての総合的な判断基準を設けることの必要性が叫ばれるようになり、文部省(当時)の特定研究「食品機能の系統的解析と展開」(藤巻正生・お茶の水女子大学学長)とその後の文部省重点領域研究「食品の生体調節機能の解析」(千葉英雄・京都大学教授)の成果により、食品に対して従来認識されていた栄養機能(一次機能)と感覚機能(二次機能)の他に、生体調節機能(三次機能)について、しっかりとした概念がつけられ、「機能性食品」が世界に先駆けて提唱された。このことは主にヨーロッパの国々に対して大きな影響を及ぼし、プロバイオティクス(probiotics)の概念の構築にも貢献を果たした。

プロバイオティクスの接頭語である「プロ」はマイルドな作用で有用菌が有害菌を抑えることをイメージして名づけられたものである。乳酸菌とビフィズス菌はプロバイオティクスの代表的な菌種であり、これらの菌種を中心に様々な機能が多く報告され今日に至っている(表-1)。しかし、表-1の総てについてその研究動向を記すことは到底不可能なので、本稿ではプロバイオティクスの概念の今日的コンセンサスについて説明した上で、世界の研究者の多くが強い関心を寄せているプロバイオティクスの宿主腸管での作用機序について概略的に解説したい。

表1. プロバイオティクスの健康効果

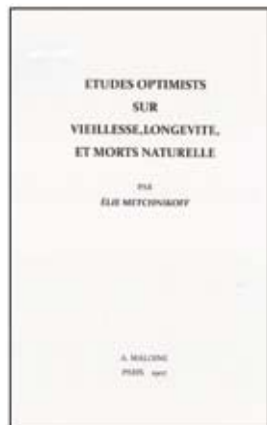
腸内環境改善、下痢の改善と予防、感染予防、抗炎症効果、抗癌性効果、抗変異原性効果、抗アレルギー効果、免疫賦活、抗ウイルス性効果、高脂血症予防、高血圧予防、自閉症治療効果、抗肥満効果、生活習慣病予防、抗齲蝕症効果、歯周病、胃内*Helicobacter pylori*菌の抑制作用など

なお、プロバイオティクス性の微生物として酵母、グラム陰性細菌の中の一部菌種が知られているが、ここではグラム陽性の*Bifidobacterium*と乳酸菌である*Lactobacilli*に限定して説明する。

1. プロバイオティクス 基礎概念の誕生

ヒトの長寿学を研究していた英国の微生物生態学者Fullerがそれまで定義されてきたプロバイオティクスの概念を整理し、1989年に「腸内フローラバランスの改善を通して宿主に有益に働く生菌添加物」と再定義したのが今日におけるプロバイオティクスの概念の基礎をなしている。その概念をもとに1996年Salminenは「宿主の健康や栄養に優位に働く生菌剤または培養乳製品」との定義を示し、腸管に限定せず宿主の身体全体に健康効果を示す生菌の総称にまで定義の幅を広げた。

図1. Elie Metchnikoff(1845–1916)と著書“Etudes Optimistes sur Vieillesse, Longevite, et Morts Naturelle”(表紙)



その後2000年になって、FAO/WHOが食品に介入するプロバイオティクスのガイドライン(“Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food”)を刊行し、プロバイオティクスを「宿主に適量与えたとき健康効果を発揮する生きた微生物」とし、プロバイオティクスに対するSalminenの定義を一層簡略化させた。

さて、プロバイオティクスの概念の確立に対しウクライナ生まれの科学者、Elie Metchnikoff(1845–1916、図-1)の慧眼がその底辺にあったことはよく知られた事実である。Metchnikoffはヨーグルトを摂取すると腸内の腐敗菌が抑えられて長寿が全うできることを彼の著書“Etudes Optimistes sur Vieillesse, Longevite, et Morts Naturelle”(Paris, A. Maloine, 1907、図-1)に実験と疫学調査に基づいて詳細に説明している。Metchnikoffはヒトデの幼虫にカルミン赤色素を注入すると、ヒトデ体内にいたアメーバ様の細胞が集まってきて色素を食べてしまうことを顕微鏡下で観察し、食細胞が病原微生物の侵入に対して生体防御の主役を演じているのではないかとの推測をし、細胞免疫学の基礎を築いた。この功績により、1908年ノーベル賞を受賞している。

ノーベル賞の受賞をきっかけにMetchnikoffはLouis Pasteur(1822–1895)に招聘されてパスツール研究所に移り、そこで始めた研究の課題が“細胞はなぜ老化するのか”であった。Metchnikoff

は爬虫類や鳥類それに魚類は比較的長命であるのに対し、哺乳類が短命なのは哺乳類が発達した大腸を持っているからであると考えた。つまり、大腸に糞便が滞留することにより腐敗菌が有害物質を産出することを許し、そのことが細胞の老化を速める原因になっていると推論した。その推論の正しさを証明するためにMetchnikoffはヨーグルトの摂取に注目した。つまり、ヨーグルトを毎日摂取すれば腐敗菌の増殖が抑制されて乳酸菌が優勢となり、結果として整腸作用が働いて老化、老衰の速度が遅くなり、長寿を全うできると唱えるに至った。Metchnikoffのヨーグルト飲用によるこの不老長寿説はたちまち世界中に知られるようになり、彼の死後多くの研究者がこの不老長寿説に科学的なメスを入れ、やがてプロバイオティクスの概念が生まれるきっかけをつくった。Metchnikoffがプロバイオティクス学の生みの親と呼ばれる所以である。

1980年以降になってプロバイオティクスに関する研究は一層盛んになり、今日ではプロバイオティクスの健康効果について膨大な数の論文や成書が発表されており、多様な健康効果が報告されている。我国においては平成3年に「特定保健用食品」を制度化させたことを契機に、プロバイオティクスの研究が盛んになり、企業により多くの「特定保健用食品」の認定を受けたプロバイオティクス関連の製品が生み出され、今日に至っている。

2. バイोजェニックス、 イムノバイオティクス、 イムノジェニックスの提唱

東京大学名誉教授の光岡知足博士は微生物の発酵により生成された菌体成分や有効物質が、宿主に対してプラスの健康機能をもたらすことを「バイोजェニックス」(biogenics)と呼ぶことを提唱し、プロバイオティクスの定義内では説明できない乳酸菌やビフィズス菌の保健機能をこの言葉で説明した。つまり、バイोजェニックスで

図2. 2011年免疫学分野の研究でノーベル生理・医学賞を受賞した3人の博士

(提供：北澤春樹 東北大学准教授)



Dr. Ralph M. Steinman

Dr. Bruce A. Beutler

Dr. Jules A. Hoffmann

は、腸内フローラを介することなく生体へ直接作用することにより、様々な生体調節作用、具体的には血圧降下、免疫賦活、アレルギー改善、血中コレステロール低下、整腸、抗変異原性、抗腫瘍作用を始め、感染予防、老化防止など示すことを指している。この学説のもっとも注目すべき点はバイオジェニック効果を期待する菌種は必ずしも生菌である必要はなく、死菌体にもそれらの作用のあることの可能性を示唆していることである。この場合、プロバイオティクスを含めた有用細菌などの細胞壁を構成するペプチドグリカン、テイコ酸、リポテイコ酸および菌体外多糖などが対象になるが、これらについて検討を行った*in vitro*での多くの研究論文から上記の効果が死菌体にも見出されることが証明されている。

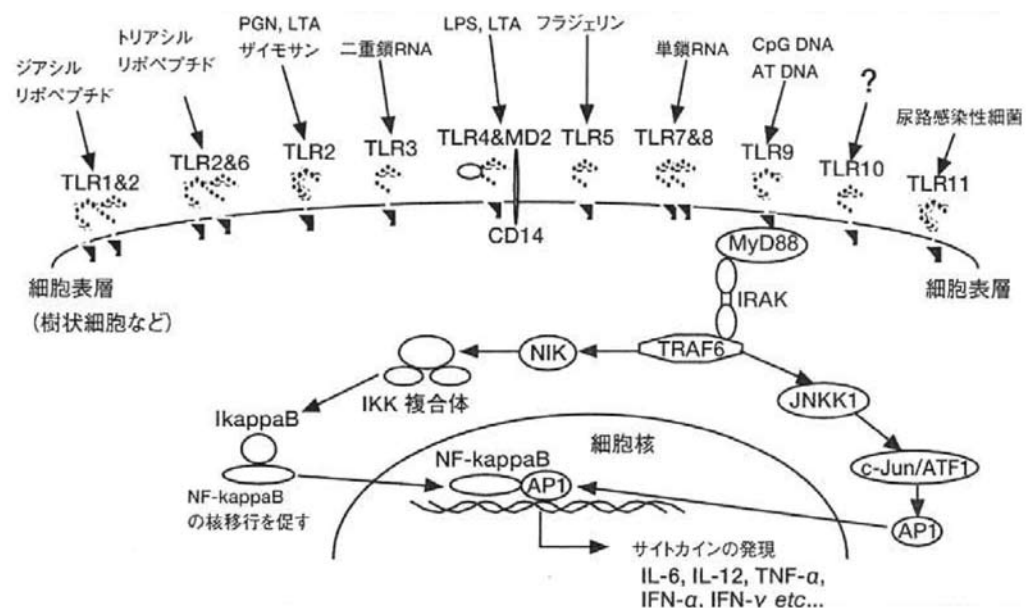
一方、アメリカの科学者Clancy博士は2003年にプロバイオティクスの中でも特に腸管免疫系に働きかけることで免疫賦活の作用に優れた菌種をイムノバイオティクス(immunobiotics)と呼ぶことを提唱した。これを更に発展させたイムノジェニクス(immunogenics)という概念が東北大学グループの齋藤・北澤によってなされて

いる。この概念は免疫賦活能を示す菌体内外の種々の免疫刺激性の機能成分とその利用を視野に入れたものである。

後述するように、今日のプロバイオティクス研究は従来のように腸管菌叢による宿主に対する健腸効果の追求だけではなく、宿主の腸管粘膜免疫系への作用解明が活発になされており、プロバイオティクス研究の最先端の一角を担っている。

我々哺乳類における生体防御機構の誘導は、侵入した病原菌を認識することから始まる。その認識メカニズムは、アメリカのBeutler博士とフランスのHoffmann博士(図-2)が病原菌認識センサー(受容体)ともいべきToll様受容体(Toll-like receptor, TLR)を発見したことにより、この分野の研究が大きな進展を遂げている。現在ヒトゲノムの遺伝子解析から14種類、またタンパク質レベル解析では11種のTLRが存在していることが判明している。TLRにはグラム陽性菌の細胞壁であるペプチドグリカンや酵母の細胞壁成分のザイモサンを認識するTLR2、ウイルスの2本鎖RNAを認識するTLR3、グラム陰性の細胞壁成分リポ多糖やリポテイコ酸を認識するTLR4、鞭毛フラジェリンを認識するTLR5、細菌の非メチル化DNAを認識するTLR9などが存在する。これら一連のTLRファミリーはそれぞれ細菌に備

図3. Toll 様受容体(TLR)ファミリーと細菌性モデュリン(下里, 2005)



わった特異的な分子パターン (pathogen associated molecular patterns; PAMPs) をもつ細菌性モデュリンを認識すると共に宿主に対するサイトカイン誘導能を示し、免疫応答の制御を行うものと考えられている (図-3)。

さらに、北澤らは腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue; GALT) において TLR9 が顕著に発現することを見出している。このことは TLR9 が病原細菌由来の DNA (モチーフ) に対しても同様の認識性を持ち、免疫の活性化に寄与している可能性を示唆している点で注目される。さらに、乳酸菌由来の免疫活性化能を持つ機能性モチーフの評価系として、ブタ TLR9 遺伝子を哺乳動物細胞で強制発現させたブタ TLR9 トランスフェクタントを用いての免疫評価系を世界に先駆けて提案している。この成果は齧歯類と霊長類の免疫反応のギャップをより霊長類に近づけた評価法として、今後の利用が多いに期待される。

3. プロバイオティクスの宿主腸管に対する作用機序

1) 腸内菌叢に対する作用

プロバイオティクスの古くから知られた最も重要な機能として整腸作用があげられる。整腸作用は乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスが生きることによって発揮される。その意味において整腸作用はプロバイオティクスの定義に叶った代表的機能と云える。

乳酸菌やビフィズス菌は自らの生命維持に必要なエネルギーとなるアデノシントリホスフェート (ATP) を産生する場合、グルコースを嫌氣的に資化してピルビン酸を産生することがまず出発点となる。その過程で主としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) もしくはニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NAD^+) などの補酵素を還元させてそれぞれ FADH、NADH とするが、これら還元型の補酵素を再び酸化型、つまり FAD もしくは NAD^+ のかたちに戻す必要があ

る。さもないと代謝は停止し、死滅してしまうからである。そのため乳酸菌やビフィズス菌は FADH や NADH を酸化型に戻すためにピルビン酸から乳酸をつくる経路を確保し、FAD や NAD^+ を再生させ生命維持に欠かせないエネルギー源としての ATP を生み出している。グルコースからピルビン酸に至る経路は菌種で異なっており、ホモ発酵型乳酸菌では解糖系、ヘテロ発酵型乳酸菌では主としてペントースリン酸経路、ビフィズス菌ではビフィズム経路によってグルコースからピルビン酸が生成される。ヒト腸管において乳酸菌やビフィズス菌が乳酸を産生することは FADH や NADH を FAD や NAD^+ に戻すためということになるが、宿主側からすると、産生された乳酸は整腸の上で極めて大きな意義を持っている。つまり、乳酸菌やビフィズス菌により腸管内で作られられた多量の乳酸は大腸の上行結腸や横行結腸で他の細菌による資化が盛んに進み、酢酸やプロピオン酸、酪酸に誘導され、特にプロピオン酸や酪酸などの短鎖脂肪酸の濃度が 100mmol/L 以上になるため、pH も 5~6 前後と低くなって有害細菌の生育が抑制されるからである。ブタの小腸を用いて実験を行った塚原ら (京都府大) のグループは小腸の絨毛萎縮の回復促進や大腸粘膜上皮の生育に対しプロピオン酸や酪酸といった短鎖脂肪酸がヒストン脱アセチル化酵素に対する阻害効果を示すことを明らかにしている。このことはプロバイオティクスがもたらす整腸作用の新しい側面として注目される。

さらに、プロバイオティクスの lactobacilli が抗菌性のペプチドであるバクテリオシンを生産することはよく知られた事実であり、*Lactobacillus reuteri* の産生するロイテリンや *Lactobacillus gasseri* LA39 の産生するガセリシンなどはその作用機序まで深く研究された例である。これらバクテリオシンは腸管内で腐敗菌の増殖を抑え、また前述したように乳酸の示す抗菌性は酢酸のそれよりも強いので、いずれも腸管における pH を局所的に低下させることにより病原性微生物の生育性

表2. 乳酸菌により産生されるバクテリオシン

クラス (サブクラス)	主な特徴	代表的な バクテリオシン
クラス I	異常アミノ酸を含む 低分子ペプチド 酸・熱に安定	ナイシンA, Z, Q ラクテシン481 ラクテシン3147
クラス II	異常アミノ酸を含まない 低分子ペプチド 酸・熱に安定	
(II a)	抗リステリア活性 N末端にYGNGV配列あり	ペデイオシンPA-1 ロイコシンA
(II b)	2分子の相乗作用により 抗菌活性を発揮	ラクトコッシンG
(II c)	N末端とC末端がペプチドで結 合した環状構造	エンテロシンAS-48 カゼリシンA
(II d)	その他の クラスIIバクテリオシン	ラクテシンA プランタリシンA

(川井ら、2010)

が抑制され、結果として腸内菌叢の改善に寄与することにつながっている。なお、表-2にクラス I バクテリオシンおよびクラス II バクテリオシン (別名ランチビオテイク) と呼ばれる低分子ペプチドを示した。ランチビオテイクの最大の特徴はその構造中に翻訳後修飾された異常アミノ酸が存在していることであり、もっとも有名なのがナイシンである。

一方、筆者らは発酵乳の製造に用いられる乳酸菌やビフィズス菌の抗変異原性について研究を行ってきたが、食品由来のヘテロサイクリックアミン類が示す変異原性を著しく減弱させることを多くの菌種に見出してきた。さらに、プロバイオティクスの細胞壁がヘテロサイクリックアミン類を吸着させ、排出に導く作用のあることも実験的に確認している。この吸着メカニズムは今のところ十分に説明されていないが、死菌体においても同じ現象が認められ、かつプロバイオティクスと云

われる菌種が他の菌種、例えば*E.coli*などの細胞壁に比べて遥かに吸着能が高いことも興味深い現象である。

腸管フローラは、代謝産物や栄養素の競合といったフローラの内的要因にはじまり、腸管整理、食餌、薬物、生活環境、外来微生物さらには宿主の年齢、遺伝、消化管部位などの外的要因によって変動する。本稿では乳酸菌やビフィズス菌による乳酸、短鎖脂肪酸さらには抗菌物質の産生の観点から整腸作用や抗変異原性について説明してきたが、これらの他にプロバイオティクスの示す乳糖分解性による乳糖不耐症の予防、タンパク分解酵素に基づく抗菌ペプチドの生成、コレステロールの脱抱合活性などについても詳細な報告がなされている。

2) 宿主の免疫系に対する作用

(i) プロバイオティクス認識機構

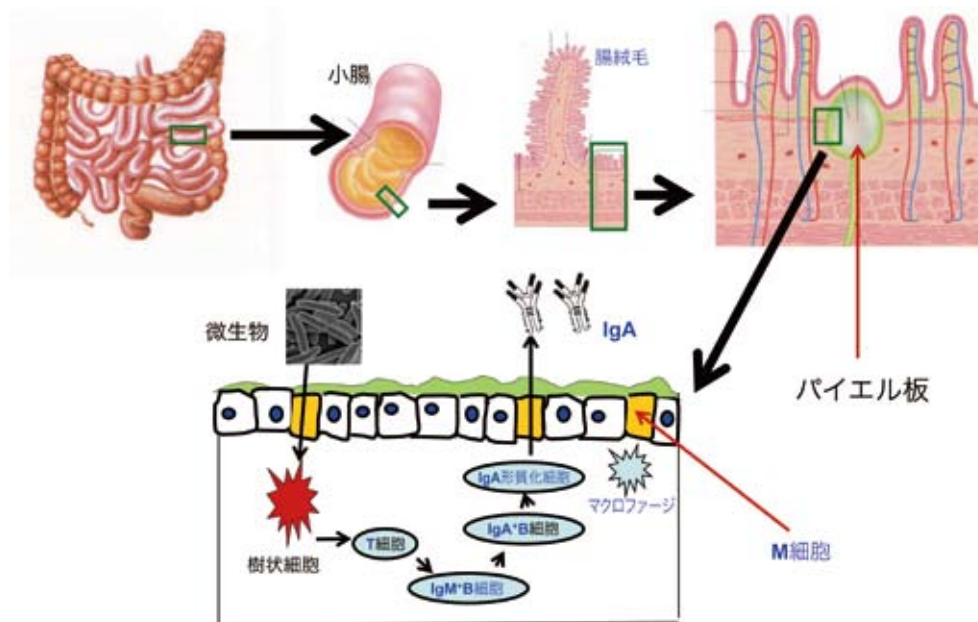
生体の免疫システムには、先天的な自然免疫と後天的に生じる獲得免疫の2種類がある。後者の獲得免疫はヒトなどの高等動物にしか存在しないのに対し、前者の自然免疫は昆虫からヒトまで広く保有されている。自然免疫を担当する細胞は外界から細菌などが侵入すると、これをすばやく攻撃し、獲得免疫を活性化させるといった働きをする。前述のTLRファミリーがその認識メカニズムの主役を果たしている。外来性微生物の存在をいち早く探知することは、生体防御において極めて重要である。それら外来微生物の菌体構成成分としてのリポポリサッカライド、ペプチドグリカン、リポタンパク、マンナン、リポタイコ酸、非メチル化CpGモチーフを有するDNA (CpGDNA;菌体由来の核酸) は前述の細菌性モデュリンの構成単位であり、哺乳動物の免疫系、とくにマクロファージや樹状細胞はこれらの外来性微生物の菌体構成成分をいち早く認識する。

表3. プロバイオティクスの免疫調節作用

対象	菌種	主な作用
ヒト	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	アトピー性皮膚炎の炎症緩和
	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 <i>Bifidobacterium breve</i> YIT4064 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ロタウイルスに対するIgA産生量の増加
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La1	好中球や単球の貪食能の亢進
	<i>Bifidobacterium lactis</i> HN 019	末梢血細胞中のCD4 ⁺ CD25 ⁺ T細胞、NK細胞の増加、貪食活性、NK1活性の増加
マウス	<i>Bifidobacterium lactis</i>	糞便中や乳中の抗βラクトグロブリン、IgA産生量の増加
	<i>Bifidobacterium breve</i> YIT 4064	パイエル板細胞の抗インフルエンザウイルスIgA産生量の増加
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus casei</i> Shirota <i>Lactobacillus gasseri</i>	マウス脾臓B細胞の細胞増殖が亢進し、抗体産生量とIgA産生細胞数が増加 OVAで感作したマウス脾臓細胞と、加熱菌体の <i>in vitro</i> での共培養によりIFN-γ、IL-12産生を促進し、IL-4、IL-5、IgE産生を抑制
	<i>Lactobacillus plantarum</i> L-137	マウス脾臓細胞と <i>in vitro</i> での共培養でIL-12とIFN-γ産生を亢進

(柳橋・細野・上野川、2010)

図4. 樹状細胞を介してのIgA産生誘導

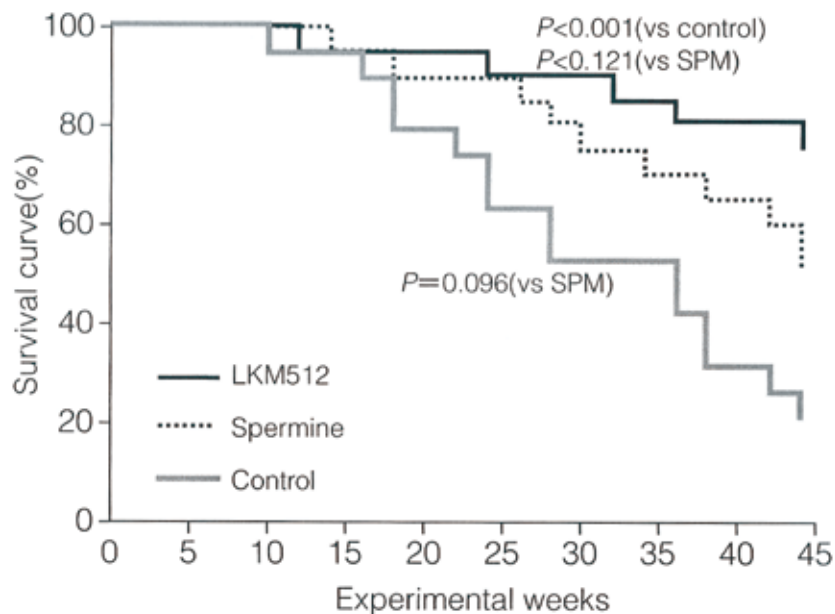


におけるプロバイオティクス研究の中核をなしている。表-3はプロバイオティクスの腸管免疫系や全身免疫系に対する免疫調節作用の報告例を示したものである。腸管に達したプロバイオティクスや他の微生物はGALTを形成するリンパ組織の一つであるパイエル板(Peyer patch)のM細胞(membranous cell)に

プロバイオティクスが腸管免疫系や全身免疫系に影響を及ぼしていることはよく知られた事実であり、この分野の研究論文は極めて多く、今日

取り込まれる(図-4)。しかし、あらゆる微生物が腸管免疫系で受入れられるのではなく、排除される微生物も存在する。その認識はM細胞の下(腸

図5. LKM512およびスペルミン経口投与がマウス寿命に与える影響(松本ら、2010)



管粘膜固有層側)に存在する樹状細胞やマクロファージによって行われる。樹状細胞はカナダのSteinman博士(図-2)により発見された細胞であり、侵入菌のPAMPsを認識するTLRを発現している。マクロファージに比べ抗原提示の強い細菌に対し強い除外作用を発揮する特性を持っている。プロバイオティクスの場合は、腸管免疫組織内に到達して、免疫系を修飾し、さらに全身免疫系にも影響を与えている。つまり、腸管免疫系に到達したプロバイオティクスは様々な免疫細胞にTLRを介して作用する。この他にもT細胞の活性化、腸管上皮細胞の増殖、IgA産生の促進、炎症の抑制といった働きを通して免疫機能を発揮する。

(ii) プロバイオティクスのIgA産生誘導

腸管上皮細胞層においては病原性微生物を排除する仕組みの中でもっとも重要なのが分泌性の免疫グロブリン(sIgA)である。成人の場合であれば1日200mg以上のsIgAが腸管上皮から分泌されると云われている。パイエル板のM細胞に取り込まれた微生物抗原の情報は、図-4に概略を示したように樹状細胞を介してT細胞に伝えられる。T細胞が産生するインターロイキン-5(IL-5)や

TGF- β (transforming growth factor- β)などのサイトカインにより、B細胞(IgA+B細胞)へと誘導され、IgA+B細胞は、腸管粘膜固有層に移行してIgAを産生すると一般的に説明されている。しかし、個々のプロバイオティクスについては十分な解明がなされていない。

sIgAの腸管上皮からの分泌に関連して協同乳業の松本らが興味深い現象を報告している。松本らはポリアミンがsIgAの分泌促進に強く関与しているとするButsらの報告(1993)に基き高齢者に

LKM512ヨーグルトを1日当り100g、2週間摂取させたときの糞便中のポリアミンの量を調べ、LKM512ヨーグルトの投与により*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512の菌数が増え、プロレッシン、スペルミジン、スペルミン(SPM)といったポリアミンの含量が有意に増加することを明らかにしている。同時に、プロバイオティクス(LKM512)が腸管バリア機能を誘導し炎症原因物質の体内への侵入機会を減少させ、さらには腸管粘膜固有層および全身性免疫の炎症抑制の誘導、慢性炎症の軽減、抗酸化効果、抗変異原性の発揮などを示す優れたプロバイオティクスであることを明らかにした。さらに、雌性ICRマウスを10ヶ月齢飼育後、LKM512(10⁹/kg/dose)投与群(n=20)、SPM(3mg/kg/dose)投与群(n=20)および生理的リン酸バッファー投与(対照)群(n=19)に分けて、それぞれ11ヶ月間投与した(3回/週)。その結果、図-5に示すように、LKM512群で明確な寿命の伸長のあることを認めている。生存率が70%になる時点では対照群と比較して約6ヶ月の寿命の伸びで、これはマウスの平均寿命(2年)の1/4に当たり、平均寿命から割り出した人(日本人)換算年齢では約20年に相当するという驚異的な結果である。

おわりに

本稿ではプロバイオティクスに関する膨大な学術情報の中からプロバイオティクスの概念の今日的コンセンサスと宿主腸管における作用機序を中心に解説した。本誌No.477(2012年、夏季号)に上野川教授が抗アレルギー作用を含め腸管免疫の発現機構について詳述しておられるのでその部分には言及せず本稿をまとめた。葦の髄から天井を覗いただけかもしれないが、我々の健康の増進・維持の上でプロバイオティクスが果たす役割が如何に大きいかを認識して戴ければ幸いである。

現在のところプロバイオティクスは「生菌」状態であることを条件にしてその定義がなされているが、宿主腸管に対し様々な作用を発揮する場合、どこまで生菌でどこから死菌であるかの境界線が不明である。その意味でプロバイオティクスの定義そのものについても今後の研究が進むにつれ、修正がなされる時がくるかも知れない。

また、プロバイオティクスと食品マトリックスとの関連もプロバイオティクスの正しい利用の上で極めて重要であるが、現在のところ残念ながら明確な知見が十分得られていない。今後、優れた機能を発揮するプロバイオティクスの食品への利用に当たって十分な検討が必要である。国際酪農連盟(International Dairy Federation)でもこの問題に取り組む方針を示しており、その成果が待たれるところである。さらに、プロバイオティクスの安全性の評価についてもプロバイオティクス利用に際して十分に留意する必要がある。乳酸菌やビフィズス菌は一般認識としてGRAS(Generally Recognized As Safe)としての認識が確立されているが、プロバイオティクスが日和見的であることや細菌転移(bacterial translocation; BT)を行うことが報告されている。BTとは、腸内細菌が腸管外組織に移行して惹起される病態のことである。現在、BTは生菌以外にも死菌やエンドトキシンなどが腸管壁を越え移行することにも概念が

広げられている。今後プロバイオティクスのBTについての十分なデータが蓄積されることも併せ期待したい。

最後に本稿をまとめるに当たり、プロバイオティクスに関する多くの最新資料を提供して下さいました東北大学准教授 北澤春樹博士ならびに協同乳業株式会社研究所 松本光晴博士に深く謝意を表したい。

