

長寿免疫と乳酸菌： Th1 細胞を誘導するナノ型乳酸菌の働き

Key Words: 乳酸菌 ■ 粒子径 ■ サイトカイン産生能 ■ 生体利用率

長谷川 秀夫*1 菅 辰彦*2

要 約

乳酸菌は、メチニコフのヨーグルト長寿説に代表されるように、腸内環境を介した健康増進、とくに抗原としての免疫賦活に大きく貢献している。一般的に、口から摂取された抗原はパイエル板でM細胞の貪食によって取り込まれるが、パイエル板を通過して生体に利用されるのは粒子の大きさ（粒子径）が10～20ミクロン（ μm ）までであることが知られている。また、免疫Th1/Th2応答においては、Th2誘導によって抗原特異抗体が産生される率が最も高くなる粒子径はIgGの場合4ミクロン、IgAの場合は7ミクロンであることが報告されている。そこで、本報では、乳酸菌によるTh1誘導における粒子径の影響を明らかにするために、食品由来の様々な乳酸菌を用いてTh1誘導の指標となるサイトカイン、IL-12（インターロイキン-12）とIFN- α （インターフェロン α ）を指標として解析した。その結果、乳酸菌の粒子径が1ミクロン程度にまで小さくなると、IL-12とIFN- α のいずれのサイトカインも著しく産生能が亢進することが明らかとなった。粒子径が小さいほど取込数が多くなる一方、粒子径が7ミクロン程度のとき最も取込重量が多くなることから、Th1誘導は抗原の取込数に、Th2誘導は抗原の取込重量にそれぞれ依存することが推察された。ところで、最近乳酸菌の死菌体を濃縮した乾燥粉末を市場で見受けられるようになった。その場合考慮すべき課題として、乳酸菌本来の粒子径が1ミクロン以下であったとしても、濃縮した菌体を乾燥しただけの粉末であっても、水に入れてもお互いの粒子が吸着したままのかたまり（塊）となってしまう、それに胃酸、膵液処理を施しても、選択的にサイトカインを誘導し得る2ミクロン以下の粒子は10%に過ぎないという結果を得た。本報の結果は、乳酸菌乾燥粉末を製造する際、水に分散しやすい粒度にすることが生体内で選択的にサイトカインを誘導するうえで重要な技術となることを示唆するものである。

1. 長寿と乳酸菌

長寿と乳酸菌との関係は、20世紀初頭のエリー・メチニコフ（1845-1916）の時代にまで遡ることができる。メチニコフは、長寿における乳酸菌の重要性について、「腸内のフローラこそ老衰の重要な原因であり」、「有害な細菌

のかたわらに、別の有益な細菌も存在している事実を数えなければならない」と指摘した¹⁾。さらに、「腸内腐敗に対するたたかいは、乳酸菌こそは疑うことのできない重大な役目を果たすことができると確信する。もしもこの説、すなわち、毒によってわれわれの組織を害することによって起こる早老と不幸な老衰に貢献するところのこの説が正しいとしたならば、腸内

*1 HASEGAWA Hideo *2 KAN Tatsuhiko (NPO 法人日本サプリメント臨床研究会)

の腐敗を避ける方法はとりもなおさず老衰を遅らせ、老体質を改善することに役立つべきこと明らかである」と述べている¹⁾。このメチニコフの不老長寿論に対して、「発酵乳を摂取したマウスが牛乳を与えたマウスよりも長生きする」ことを明らかにした日本人による興味深い研究が挙げられる²⁾。そしてこれまでの研究から、乳酸菌には、腸内環境の改善、免疫調節、下痢の改善と予防、感染防御、炎症性腸疾患の改善、発癌抑制、コレステロール低下等の作用が、生菌、死菌を問わず証明されている。現在、「宿主の健康とその健康維持と増進に有益な効果をもたらす微生物細胞調製物質または微生物細胞の構成物」は、プロバイオティクス (probiotics) として定義されている。

ところで、身体機能は20歳前後をピークとして衰えるが、免疫機能もその例外ではない。形態的に加齢とともに最も退縮(萎縮)する器官に胸腺が挙げられる。胸腺は、心臓の上あたりに位置し、骨髄でつくられたT細胞が自己・非自己を認識できるように訓練する器官である。胸腺は組織学的には乳児期にもっとも充実し、その後加齢とともに退縮する。それとともに感染症への罹患リスクが高くなり、高齢者における死因の第1位を占めるようになる。現在日本人の平均寿命は男女ともに世界のトップクラスにあり、百歳以上の長寿者も年々増えているが、20世紀初頭にはわずか30歳台に過ぎなかった。したがって、長寿には感染防御が欠かせない要因となっている。

2. 微生物の大きさと免疫応答との関係

感染防御に対する身体機能を免疫というが、免疫応答に及ぼす微生物の大きさの影響に関して、故斎藤章博士は「生物学的二進法」という興味深い概念を提唱した^{3,4)}。生物学的二進法

とは、微生物の大きさによって働く白血球が異なる、すなわち、細菌のように大型のものは顆粒球の誘導がほとんどで、その貪食機能によって殺菌処理される(自然免疫)、一方、ウイルスのように小型になるとリンパ球が誘導され、抗体によって殺菌処理される(獲得免疫)というものである。これは、免疫応答における抗原粒子の大きさ(粒子径)に関する最初概念といえる。

ところで最近の研究では、ナイーブT細胞(以下、Th0と略す)は、機能的にI型T細胞(以下、Th1と略す)とII型T細胞(以下、Th2と略す)に分化することが知られている。Th1細胞による免疫応答は、細胞性免疫を誘導し、マクロファージやリンパ球など単核細胞中心の食菌処理が起こる。一方、Th2細胞による免疫応答は、液性免疫を誘導し、抗体による殺菌処理が起こる。Th1型サイトカインはTh2を抑制し、逆にTh2型サイトカインはTh1を抑制し、この2つは免疫全体のバランスを保つために互いに関係し合っている。

近年、免疫研究が進むにつれて、Th1とTh2のバランスが病気の発症や進展に重要な働きを持つと推測されている。現代は、生活環境からTh2の亢進する傾向が強くなり、例えば、癌、免疫不全、喘息、皮膚炎、アレルギー疾患、腎炎、感染症等が、そのTh2の機能亢進が関与し発症すると考えられるようになった^{5,6)}。

先に、高齢者においては感染症への罹患リスクが高くなることを述べたが、肺炎の原因となるクリプトコッカスのような細胞内寄生菌に対しては、液性免疫(抗体)による殺菌処理では難しい。また、Th1細胞よりもTh2細胞が優位に働いている状態では、IgE抗体産生が亢進し、アレルギー体質に陥りやすくなる。したがって、長寿を目指すには、免疫応答は若干Th1に傾いていることが好ましいといえる。

3. 免疫 Th1 誘導に及ぼす乳酸菌の大きさの影響

IL-12 は、樹状細胞およびマクロファージのような抗原提示細胞から分泌されるサイトカインで、ガン細胞を直接攻撃するナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) や、ラック細胞 (LAK 細胞), キラー T 細胞 (CTL 細胞) を活性化したり, IFN- γ の産生を増強したりする非常に強力な免疫活性物質として知られている。一方, IFN- α は、ウイルスや、結核菌, サルモネラ菌, リステリア菌, らい菌といった細胞内寄生性細菌, クリプトコッカスのような細胞内寄生性真菌による感染時に、樹状細胞 (抗原提示細胞) から分泌されるサイトカインである。ともに Th1 細胞を誘導するサイトカインであるが、抗原提示細胞に発現している受容体 (TRL: Toll-like receptor) の違い (IL-12 の場合: TLR1, TLR3, TLR5, TLR9; IFN- α の場合: TLR7, TLR9) が見られる。

これまで乳酸菌の大きさと免疫応答という視点での研究はほとんどなされてこなかったように思う。そこで、乳酸菌による Th1 誘導における粒子径の影響を明らかにするために、食品由来の様々な乳酸菌を用いて Th1 誘導の指標となるサイトカイン, IL-12 と IFN- α の産生能を指標として解析した。試験には、表 1 に示すように、長寿と関係のある乳酸菌を、京都の酸茎漬, 長野のすんき漬, グルジア地方のマリアーミとマッツォーニライク, モンゴルの馬乳酒, あるいは各種発酵乳製品より分離し、サイトカイン産生試験に供した。

その結果、乳酸菌の大きさ (粒子径) が 1 ミクロン程度にまで小さくなった方が、IL-12 と IFN- α のいずれのサイトカインも著しく産生能が増強されることが明らかとなった (表 1 と図 1)。ただ、図 2 に示すように、IL-12 と IFN- α との産生能には負の相関を示す菌株が認められ、たとえば EF, KH1, KH3 といった菌株は IL-12 産生能が高く IFN- α 産生能が低

表 1 乳酸菌の起源、粒子径及びサイトカイン産生能

菌株名	起源	粒子径 (μm)	IL-12 (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
(乳酸菌: 10 $\mu\text{g/ml}$)				
KH3	果実	1.15	6266	15.8
LL12	馬乳酒 (モンゴル)	1.22	1350	41.6
EF	ヒト腸管	1.22	6266	16.0
SNK	すんき漬 (長野)	1.51	3468	28.8
KH1	果実	1.51	5294	10.4
DL1	マリアーミ (グルジア)	1.69	2223	20.8
CF4	ヨーグルト (カスピ海)	1.69	2741	17.3
ML4	マッツォーニライク (グルジア)	1.89	757.3	29.3
ST100	乳製品	2.11	3735	14.0
LC12	乳製品	2.35	3863	14.8
LGG	乳製品	2.93	2323	12.7
DL2	マリアーミ (グルジア)	4.55	2185	14.8
LBR	酸茎 (すぐき) 漬 (京都)	8.80	1583	16.8
(陽性対照)				
OK-432 (5 $\mu\text{g/ml}$)			4137	3.4
H1N1 インフルエンザ (70 $\mu\text{g/ml}$)				22.6

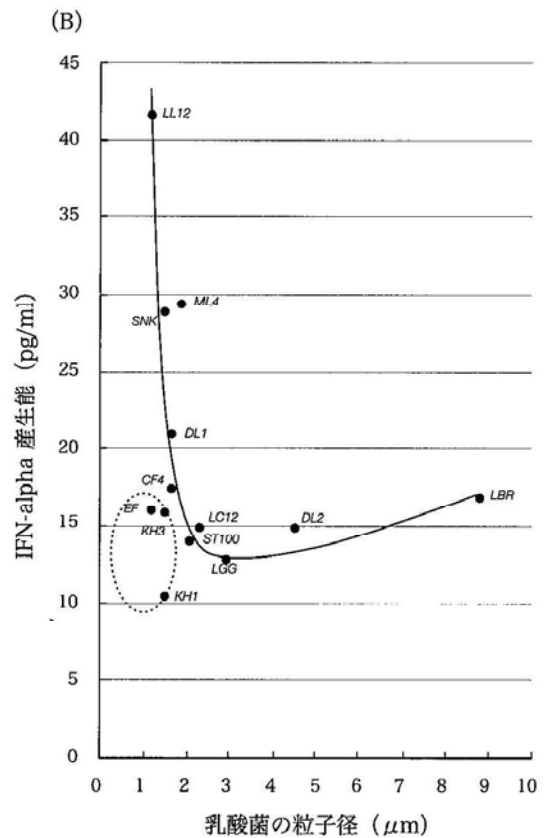
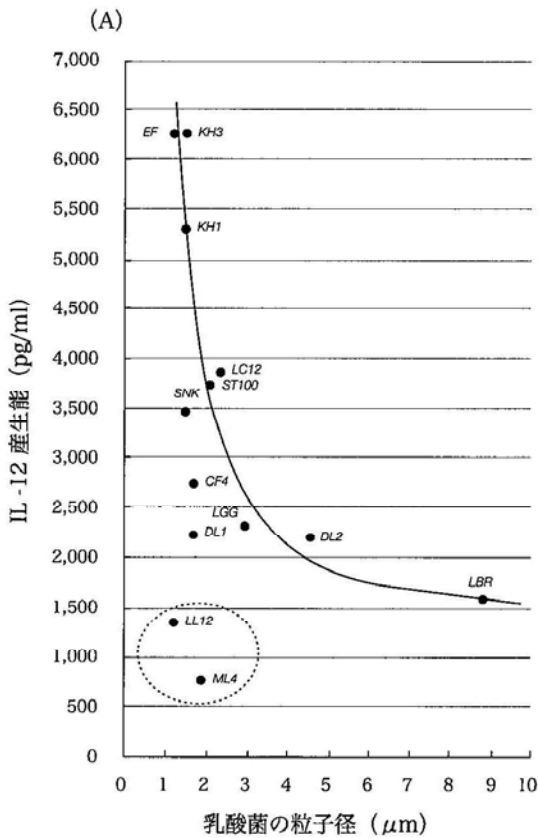


図1 乳酸菌の大きさ(粒子径)がサイトカイン産生能(A: IL-12, B: IFN- α)に及ぼす影響

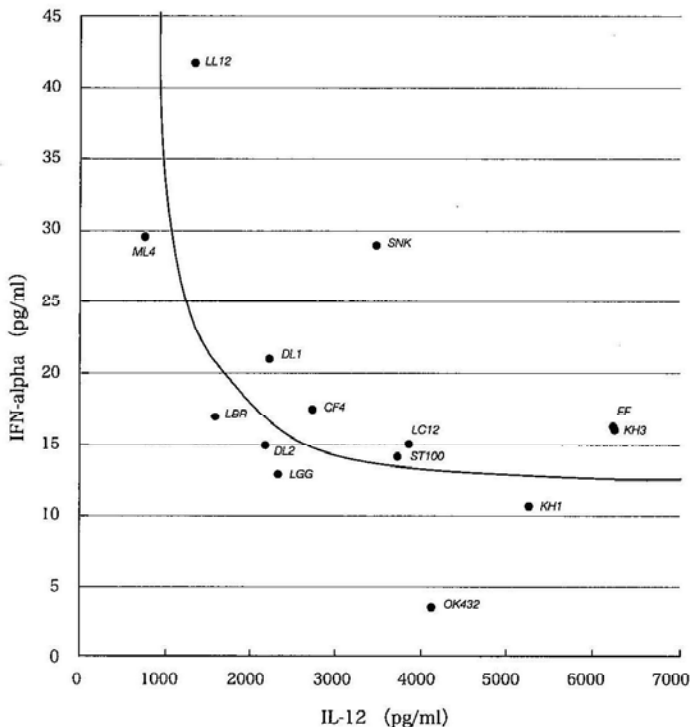


図2 乳酸菌によるIL-12産生能とIFN- α 産生能の相関(参考までに、陽性対照として用いたOK432もプロットした)

い、逆にLL12, ML4といった菌株はIL-12産生能が低くIFN- α 産生能が高い、一方でSNKはIL-12とIFN- α の産生能が相対的にともに高いといった特徴が認められた。これはおそらく、抗原提示細胞に発現する受容体の乳酸菌に対する認識の違いによると推察される。いずれにせよ、これまで長寿地域で摂取されてきた乳酸菌の中で、とくに大きさが1ミクロン程度の乳酸菌(以降、ナノ型乳酸菌と呼ぶ)が、IL-12, IFN- α といったサイトカインの産生を増強し、長寿免疫に望まれるTh1細胞の誘導に大きく寄与している可能性が示唆された。なお、陽性対照として用いたOK432とH1N1インフルエンザワクチンはともに医薬品

である。高々 10 $\mu\text{g/ml}$ 程度の濃度で陽性対照よりも強いサイトカイン産生能を有する乳酸菌株が伝統食品から分離されたということは、それらの乳酸菌が長年にわたって長寿免疫に大きく寄与してきたことを窺い知ることができる。さらに摂取菌数からいえば、グルジア地方では習慣的に毎日一人あたり 0.5 ~ 1L のヨーグルトが摂取されている。これを乳酸菌数に換算すると約 1 兆 ~ 2 兆個となる。この程度が 1 日の摂取目安量として好ましい上限と考えられる。

4. パイエル板に取り込まれる生体利用可能な粒子の大きさ

一般的に、口から摂取された抗原はパイエル板で M 細胞の貪食によって取り込まれる。そこで、どれくらいまでの大きさであればパイエル

板から取り込まれるのかといった関心から、粒子の大きさ（粒子径）とパイエル板への取り込みの関係についてこれまで多くの研究がなされてきた。その結果、粒子（ビーズ）の大きさが 10 ミクロンを超えると M 細胞による貪食は著しく低くなり⁷⁾、パイエル板を通過する粒子の最大径は、粒子の材質がポリラクタイドの場合には 10 ミクロン⁸⁾、ポリスチレンの場合には 15 ミクロン⁹⁾、生分解性ポリ乳酸の場合には 21 ミクロン¹⁰⁾ ということが明らかとなった。これらの結果から、パイエル板を通過できる粒子の大きさは高々 20 ミクロン程度ということになる。

5. 抗原の大きさと免疫 Th2 誘導との関係

抗原を感作させた生分解性ポリ乳酸ビーズをラットに経口投与した実験によれば、パイ

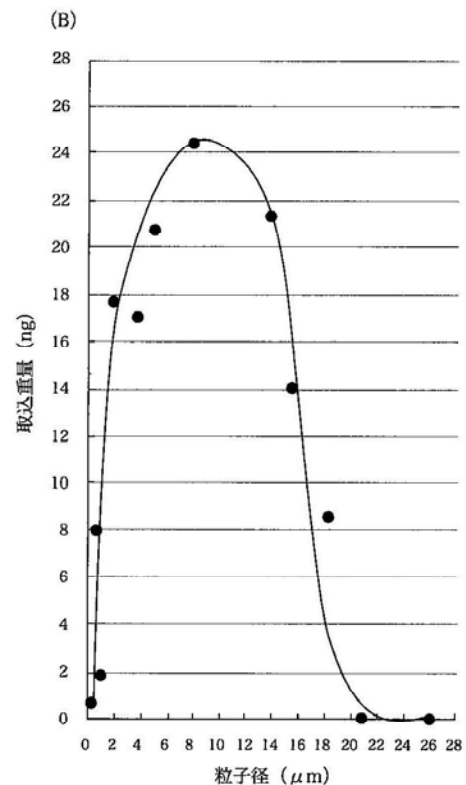
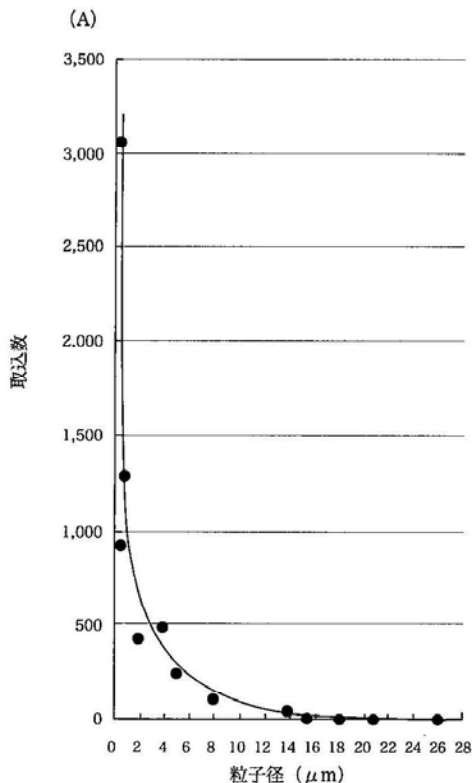


図3 パイエル板への粒子取込の数量 (A) 及び重量 (B) に及ぼす粒子径の影響

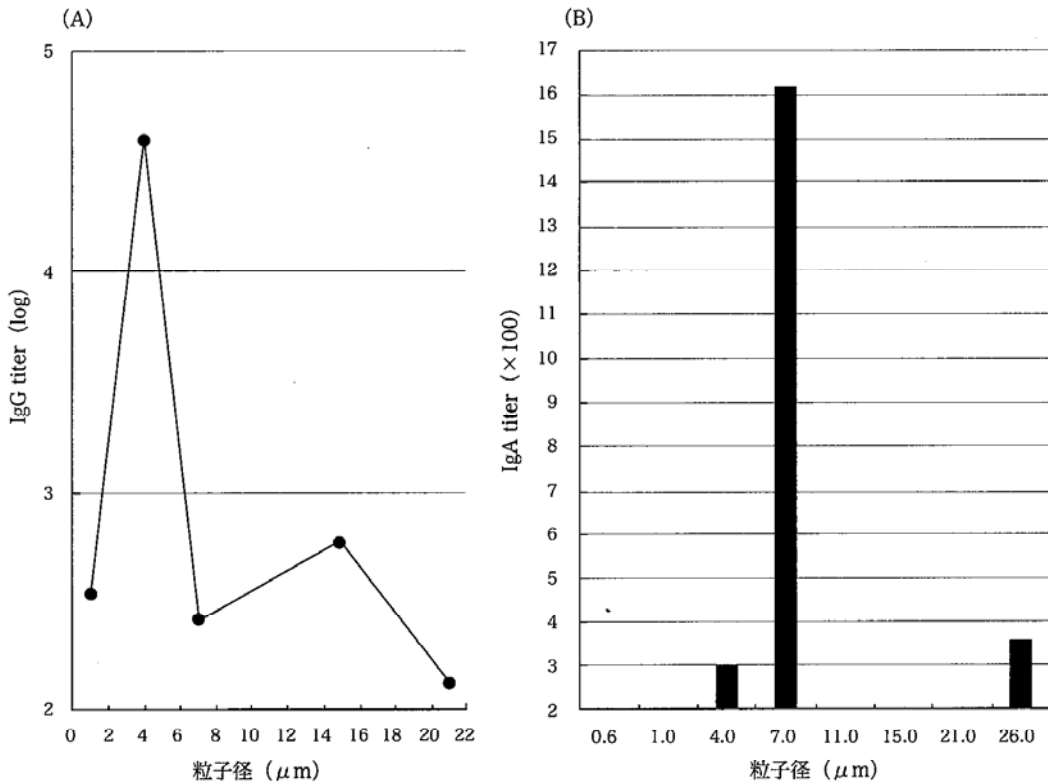


図4 抗原特異抗体産生能 (A: IgG, B: IgA) に及ぼす粒子径の影響

エル板に取り込まれる抗原粒子の数は、粒子の大きさが小さい方が多くなり、粒子径が0.6ミクロン程度の場合に最も取込数量が多くなる(図3A)。しかし、抗原重量の場合には、粒子径が7ミクロンまでは増加し、それ以上になると減少して粒子径が21ミクロン以上になると全く取り込まれなくなる(図3B)ことが明らかとなった¹⁰⁾。そして、Th2誘導によって抗原特異抗体が産生される率が最も高くなる粒子径は、IgGの場合4ミクロン(図4A)、IgAの場合は7ミクロン(図4B)であった¹⁰⁾。

実際乳酸菌を用いた試験でも、生菌体よりもその超音波破砕物の方が、すなわち、大きさが小さくなった方がパイエル板での取り込み量が多くなり¹¹⁾、IgA、IL-5、IFN- γ といった産生量が亢進されることが明らかにされている¹²⁾。

6. 粒子径と免疫 Th1/Th2 応答との関係

乳酸菌の場合、マクロファージによる乳酸菌貪食率とIL-12産生誘導能との間には、正の相関関係が存在する、すなわち、乳酸菌が多く貪食されるほどIL-12が多く産生されるようになることが報告されている¹³⁾。さらに、抗原提示細胞におけるIL-12の産生は、抗原物質の貪食が阻害されると抑制された¹⁴⁾。パイエル板に取り込まれる抗原粒子の数量は、粒子の大きさが小さくなるほど多くなった(図3A)。一方、抗原重量の場合には、粒子径が7ミクロンまでは増加し、それ以上になると減少した(図3B)。このことから、抗原の大きさと免疫Th1/Th2応答との関係においては、Th1誘導の場合には抗原の取込数量に、Th2誘導の場合には抗原の取込重量にそれぞれ依存

することが推察される。そして、Th1 誘導に好ましい粒子径は1ミクロン程度（2ミクロン以下）で、Th2 誘導の場合には3～7ミクロン程度といえる。これは、Th1/Th2 応答における生物学的二進法の具体的な数値といえる。これは実は、乳酸菌製剤を作る際、粒度分布を管理することが免疫 Th1/Th2 応答を制御するうえで非常に重要な要因となることを物語っている。その点を最後に論述したい。

7. 乳酸菌の製剤化における課題

これまで乳酸菌は、発酵乳あるいはヨーグルトの形態で摂取するのが常態であった。ところで、最近乳酸菌の死菌体を濃縮した乾燥粉末を市場で見受けられるようになった。少量で多数量

の乳酸菌を摂取できることを訴求している。しかし、その場合考慮すべき課題として、乳酸菌本来の粒子径が1ミクロン以下であったとしても、濃縮した菌体を乾燥しただけの粉末であっても、水に入れてもお互いの粒子が吸着したままのかたまり（塊）となってしまうということである。

試しに、乳酸菌本来の大きさが0.6ミクロン（図5A）で、選択的にサイトカインを誘導し得る2ミクロン以下の粒子の積算分布が99%（図5B）のナノ型乳酸菌を液体培養し、その培養液から菌体を濃縮して乾燥粉末とした。それを再び水に分散した場合、図5Aに示すように、粒子径が100ミクロンまでならかな粒度分布を示した。その内訳は、積算分布を図5Bに示すように、パイエル板を通過する20ミクロンまでの粒子は約50%、Th2 細

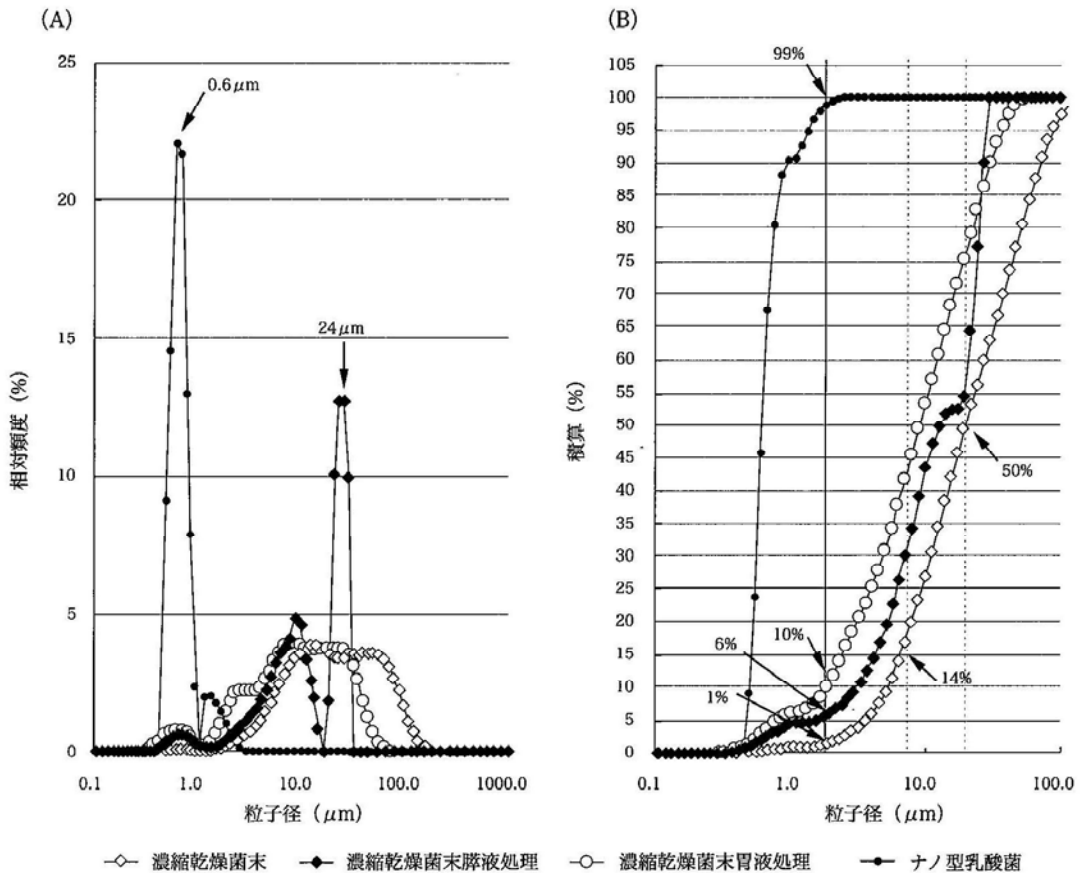


図5 乳酸菌粉末の粒径分布 (A: 頻度 %, B: 積算 %) に及ぼす消化処理の影響

胞を誘導する3~7ミクロンの粒子は約14%, さらにTh1細胞を誘導する2ミクロン以下の粒子は高々1%に過ぎなかった。これではTh1/Th2応答をとともに誘導する粒子が混在することになり, アクセルとブレーキを同時に踏んでいるようなもので, 生理的には決して好ましい状況とは言えない。さらに生体内での消化作用を想定し, これを胃酸あるいは唾液処理した場合でも, Th1細胞を誘導する2ミクロン以下の粒子の積算分布は高々10%までしか上がらなかった。これではせっかくの乳酸菌本来の機能も十分に発揮されない(高々10%程度)という結果を招くことが懸念される。したがって, 乳酸菌を濃縮して粉末にする際, 細かい粒子の状態のまま水に分散しやすくする加工処理が重要となる。

結 論

長寿免疫と乳酸菌というテーマで, 乳酸菌の大きさがTh1誘導に及ぼす影響と製剤時における課題を概観した。乳酸菌には, 球菌と桿菌が存在する。あるいは最近栄養要求性からみて, 動物性あるいは植物性といった区別がされている。しかし本報の結果から, 桿菌・球菌, 動物性・植物性といった区別よりも, 免疫応答という機能から見れば, その乳酸菌の粒子径に着眼することの方がより重要であることが明らかとなった。すなわち, 桿菌・球菌, 動物性・植物性に限らず, その粒子径が1ミクロン程度の大きさであることが長寿免疫(Th1応答)を誘導するうえで好ましいといえる。乳酸菌の大きさから免疫を論ずるこの概念は, これまでになく新鮮で, 免疫における乳酸菌の役割というテーマに新しい展開を予感させるものである。

..... 文 献

- 1) エリー・メチニコフ, 長寿の研究—楽観論者のエッセイ (平野威馬雄訳), 幸書房, 東京 (2006).
- 2) 荒井幸一郎ほか, 光岡知足編 “腸内フローラと発癌” pp. 105-123, 学会出版センター, 東京 (1981).
- 3) Saito A. *Tohoku J Exp Med* **102**: 289-312, 1970.
- 4) 齊藤章. *東北医誌* **95**: 228-246, 1982.
- 5) *Springer Seminars in Immunopathology* 21, Springer-Verlag, Berlin (1991).
- 6) 最新医学 6月増刊号自己免疫疾患の臨床 1998(II)- 疾患の概念と最新の知見, 山本一彦監修, 森本幾夫編, 最新医学社, 東京 (1998).
- 7) Tabata Y. Ikada Y. *Adv Polym Sci* **94**: 107-141, 1990.
- 8) Eldridge JH. *et al. J Controlled Rel* **11**: 205-214, 1990.
- 9) Eldridge JH. *et al. Molec Immun* **28**: 187-194, 1991.
- 10) Tabata Y. *et al. Vaccine* **14**: 1677-1685, 1996.
- 11) 平松靖浩ほか, 日本食品免疫学会 2005 年度大会要旨集 **45**, 2005.
- 12) 平松靖浩ほか, 腸内細菌学雑誌 **21**: 79, 2007.
- 13) 若林英行ほか, 日本農芸化学会 2006 年度大会要旨集 **45**, 2006.
- 14) 田野智之ほか, 癌と化学療法 **31**: 1767-1789, 2004.