HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	発酵食品由来乳酸菌による感染予防効果
Author(s)	前川, 敏宏
Citation	北海道大学. 博士(農学) 乙第7019号
Issue Date	2017-03-23
DOI	10.14943/doctoral.r7019
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/65637
Type	theses (doctoral)
File Information	Toshihiro_Maekawa.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 題 名

発酵食品由来乳酸菌による感染予防効果

前川　敏宏

学位論文題名：発酵食品由来乳酸菌による感染予防効果

目次 … p. 1

略語一覧 … p. 2

緒言 … p. 4

第１章　*Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 株摂取による免疫調節作用 … p. 9

　第１項　S-PT84 株の死菌体及び生菌体における免疫調節作用の比較検討 … p. 10

　第２項　S-PT84 株含有食品の長期摂取によるヒト免疫調節作用 … p. 20

　第３項　S-PT84 株の交感神経系を介した免疫調節作用 … p. 49

第２章　*Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 株摂取によるインフルエンザワクチン
アジュバント効果 … p. 56

第３章　*Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 株摂取によるカンジダ感染予防効果
… p. 68

結語 … p. 88

引用文献 … p. 90

論文目録 … p. 99

謝辞 … p. 102

略語一覧

S-PT84；*Lactobacillus pentosus* strain S-PT84

LcS；*Lactobacillus casei* strain Shirota

Th1；T-helper 1

Th2；T-helper 2

IL-12；interleukin-12

IFN-γ；gamma-interferon

IFN-α；alpha-interferon

TNF-α；tumor necrosis factor-alpha

IL-4；interleukin-4

IgA；Immunoglobulin A

IgG；Immunoglobulin G

TLR；Toll-like receptor

ICW；intact cell wall

ConA；Concanavalin A

DIO；3, 3’-dioctadecyloxacarbocyamine perchlorate

PI；propidium iodide

E : T；effector to target

NK；natural killer

PBMC；peripheral blood mononuclear cells

WBC；white blood cells

RBC；red blood cells

Hb；hemoglobin

Ht；hematocrit

Plt；platelet

AST；aspartate aminotransferase

ALT；alanine aminotransferase

γ-GTP；γ-glutamyl transpeptidase

ALP；alkaline phosphatase

T-Bil；total bilirubin

T-CHO；total cholesterol

TG；triglycerides

BUN；blood urea nitrogen

CRE；creatinine

CPK；creatine phosphokinase

UA；uric acid

TP；total protein

Alb；albumin

SNA；sympathetic nerve activity

OVA；ovalbumin

CFU；colony forming unit

緒　言

現代社会はストレス社会と言われ、環境汚染などによる身体ストレス、急変を繰り返す社会背景に起因した精神ストレスなど、常にストレスを受ける環境にあるといってよい。また食の欧米化、ファーストフードの台頭、コンビニエンスストアの普及などにより、食生活が大きく変化していると思われる。ストレス過多、栄養バランスの変化は免疫機能に大きく影響し、加齢とともに免疫異常を引き起こす大きな原因になると考えられる。

平成 28 年 2 月 3 日に厚生労働省　健康局　がん・疾病対策課の出している報告によれば [1)]、わが国の 2 人に 1 人が何らかのアレルギー症状を持っており、平成 14 年以降、アレルギー人口が増加している傾向にある。抗生物質の開発により、多くの感染症が制御可能となったが、逆に病原菌に触れる機会、そして自らの免疫力で病原菌を駆逐する機会が減ったことが、逆にアレルギー増加の一因になっているのではないかという考え方が提唱されている（衛生仮説）[2)]。すなわち“適度な不衛生”が、健康あるいは免疫機能維持のためには必要ではないかという考え方である。しかしながら、“適度な不衛生”を実践するのは現実的には困難であり、やはり別の方法が必要となる。その方法の一つとして、食を通じた免疫機能の調節があると考えた。

乳酸菌は広く自然界に分布している微生物であり、一般的にはヨーグルトやチーズ、バターなどに含まれることが知られている。日本人になじみの深い食品であれば、みそ、しょうゆ、漬物など、乳製品以外でもいろいろな食品に含まれており、非常に身近な食品素材である。乳酸菌の保健効果は、20 世紀初頭にパスツール研究所の Metchnikoff によって提唱された。以降、100 年にわたって世界中で乳酸菌研究が進められ、さまざまな効果が明らかにされてきた。近年では、腸内細菌叢の正常化、便性改善、栄養素の消化吸収の改善、免疫調節作用、脂質代謝改善作用などの保健効果が確認されている [3)]。乳酸菌の有する免疫調節作用については、動物あるいはヒトにおいて、自然免疫や粘膜免疫の活性化作用、あるいはアレルギー抑制作用を示すことが報告されている [4-7)]。日本人にとって身近な食品素材であり、かつ広く保健効果が認められている乳酸菌は、食による免疫機能調節を実現する有力なツールとなると考えられる。そこで、我々は京都の伝統的漬物の中から、免疫調節作用に優れた乳酸菌の探索を行い、その結果、“しば漬け”より分離された *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 株（S-PT84 株）に強い免疫調節作用があることを見出した。

S-PT84 株は、T-helper1 (Th1)サイトカインの１つである interleukin-12 (IL-12)誘導作用を指標にして選抜された植物由来の乳酸菌である [8)]。野中らは、S-PT84 株をマウスに経口摂取させることで、脾細胞の natural killer (NK)活性が増加することや、Th1/Th2 バランスを Th1 優位に偏向させることを示している [8)]。また、S-PT84 株は、樹状細胞やマクロファージなどの単球に発現する Toll-like receptor (TLR)-2 や TLR-4 を介して IL-12 産生を誘導することや、IL-12 の産生を誘導することで gamma-interferon（IFN-γ）の産生を高

めることが報告されている[9]。

S-PT84 株の免疫賦活作用に関わる菌体成分については、S-PT84 株をさまざまな構成成分に分画しIL-12誘導作用を比較した実験において、構造が保たれた細胞壁(intact cell wall; ICW)が活性成分であることが確認されている[10]。前述の S-PT84 株を用いた様々な検討結果は全て加熱死菌体を用いた試験結果であるが、S-PT84 株の免疫賦活作用に関わる菌体活性成分は ICW であることから、加熱死菌体よりもインタクトな状態の細胞壁構造を保っている生菌体は加熱死菌体よりも強い免疫賦活作用を示す可能性がある。しかしながら、これまで S-PT84 株生菌体による免疫賦活作用は検討されておらず、免疫機能に及ぼす影響は不明である。そこで、マウスを用いた動物実験を行い S-PT84 株の加熱死菌体と生菌体による免疫賦活作用を比較し、生菌体としての有用性を検討することにした。(第 1 章 第 1 項)

ヒトを対象とした乳酸菌摂取による免疫機能に対する影響については種々の報告がある。*Lactobacillus casei* strain Shirota (LcS)株のヒト末梢血中 NK 活性増強作用を検討した臨床試験では、健常人のうち NK 活性が 45%以下の被験者に対し LcS を継続摂取させることで NK 活性が増強することを確認している[11]。そこで我々も、同様の健常な被験者を対象として S-PT84 株のヒト末梢血中 NK 活性増強作用を検討するために、5 億、15 億個、45 億個の S-PT84 株を 4 週間継続摂取させたところ、1 日当たり 15 億個の S-PT84 株を継続摂取することにより NK 活性が高まることを確認した[10]。しかしこの検討結果は、ヒトへの投与量を決める用量反応性試験であったことや、被験者の選択基準に試験開始前の NK 活性値が含まれている限定的な集団を対象とした試験であったこと、また、募集した被験者の症例数が限られていたことから、S-PT84 株のヒト免疫機能に対する影響を検討する臨床試験としては、探索的な試験として位置付けられる。そこで本研究では、1 日当たり 15 億個の S-PT84 株を 4 週間摂取した際のヒト末梢血中 NK 活性増強作用を再検討するとともに、S-PT84株を長期間継続摂取した際のヒト末梢血中NK活性に対する影響を検討した。我々の調べる限りにおいて、*Lactobacillus pentosus* や、その近縁種である *Lactobacillus plantarum* の菌株では、長期間継続摂取した際のヒト末梢血中 NK 活性に対する影響を報告した論文はなく、今回の検討で初めて明らかにした。なお、長期摂取試験では、対象とする被験者を事前の NK 活性の値で制限することなく、より一般的な集団を対象とした臨床試験とした。(第 1 章 第 2 項)。

S-PT84 株は、樹状細胞やマクロファージなどの単球に発現する TLR-2 や TLR-4 を介して IL-12 産生を誘導し、NK 活性を増強させることが報告されている[9]ことから、S-PT84 株の免疫賦活作用に関わるメカニズムの一つには、TLRを介したIL-12産生誘導が関わっていると考えられる。一方、NK活性増強作用には、交感神経活動(sympathetic nerve activity; SNA)を介した作用が知られており、SNA が亢進すると NK 活性が低下し、逆に、β-アドレナリンの受容体アンタゴニスト(nadolol)の処置により NK 活性が回復することが報告されている[12]。乳酸菌の SNA への作用については、*Lactobacillus paracasei* strain ST11 (NCC2461)株

が副腎の SNA に働きかけ血圧を調節すること [13]、また、白色脂肪組織や褐色脂肪組織を支配しているSNAを高め、抗肥満作用を示すことが報告されている[14]。これらの報告から、種々の乳酸菌はSNAに作用し、生理活性を示すと考えられる。従って、S-PT84 株も同様に SNA への作用が期待されるが、その作用については明らかにしていない。そこで、S-PT84 株の NK 活性上昇作用に関わる TLR への作用以外のメカニズムとして SNA を介した作用が存在する可能性が想定されたため、マウスを用いた動物実験にてS-PT84 株の SNA への作用を検討するとともに、SNA を介した NK 活性増強作用を確認することとした（第1 章 第 3 項）。

S-PT84 株を用いた健康効能は、Th1/Th2 バランス調節作用を介した抗アレルギー作用以外にも、インフルエンザウィルス感染予防作用[15]や、サルモネラ感染予防作用[16]などが報告されている。出雲らの報告によれば、S-PT84 株の経鼻投与により肺の NK 活性が高まることや、肺胞液中の alpha-interferon（IFN-α）産生量が増加することにより、H1N1 型のインフルエンザウィルス（PR8）に対する感染予防効果を示すことが報告されている[15]。また、IFN-α産生増強作用については、センダイウィルスを用いた実験においても確認されており、S-PT84 株を経口摂取させることで微量のウィルス抗原に対する応答性が高まり、IFN-α産生が増強されることが示されている[17]。これらの報告より、S-PT84 株は免疫細胞を活性化させ、細胞性の免疫応答を高めること、また、少量の抗原に対する応答性を高めることが考えられる。これまでの検討では、直接ウィルスに感染させる、もしくは、ウィルスを生体の組織に直接作用させたときの細胞性免疫に関わる免疫応答を主に検討してきた。一方、ウィルス感染による感染症状の重篤化を予防するには、感染初期における液性免疫も重要な役割を果たしているが、S-PT84 株の摂取がウィルス感染後の液性免疫応答に及ぼす影響については検討していない。ワクチンの接種は、液性免疫を利用した感染の重篤化を防ぐ有用な手段であるが、高齢者になると、ワクチンに対する応答性が低下すると言われており[18]、抗原に対する反応性を高め獲得免疫応答を活性化させることは極めて重要である。そこで、動物実験にて、S-PT84 株摂取による H1N1 型インフルエンザウィルスに対する抗体産生増強作用を検討することとした。インフルエンザウィルス抗原にはインフルエンザワクチンを用い、S-PT84 株の摂取によりインフルエンザワクチンに対する抗体産生が増強（アジュバント効果）するか確認することにした（第 2 章）。

最後に、S-PT84 株の経口摂取によりサルモネラ感染後の症状が緩和されることや、便中のサルモネラ特異的 Immunoglobulin A（IgA）産生が増強されることが報告されており[16]、ウィルス感染予防効果だけでなく、細菌感染予防効果についても確認されている。そこで、日和見病原体の一つでありヒトの細菌叢を構成する真菌の一つであるカンジダ菌に対する感染予防効果を検討することとした。S-PT84 株のカンジダ菌に対する作用については、口腔内カンジダ感染モデルマウスを用いた検討を行い、S-PT84 株が口腔内感染による重症度スコアを改善し、カンジダ生菌数を減少させることが報告されている[19]。しかしながら、消

化管におけるカンジダ感染に対する作用は検討していないため、今回は、新たに消化管におけるカンジダ感染モデルマウスを用いた検討を行い、カンジダ胃内感染における胃障害スコアの改善作用及び、胃内における炎症状態改善作用を検討した（第 3 章）。

第 1 章

Lactobacillus pentosus strain S-PT84 株摂取による免疫調節作用

第 1 項　S-PT84 株の死菌体及び生菌体における免疫調節作用の比較検討

■緒言

これまでの S-PT84 株加熱死菌体を用いた研究では、マウスを用いた実験において、免疫機能を増強させる作用[8,9]や血中 ovalbumin（OVA）特異的 IgE 産生増加を抑制させることによる抗アレルギー作用[8]、ウィルス[15]もしくは病原性微生物[16]の感染に予防的に働く効果など、種々の効能を確認している。S-PT84 株の免疫調節作用に関わる活性成分については、構造の保たれた細胞壁（intact cell wall; ICW）である可能性が示されているが[10]、死菌体よりもインタクトな状態を保った細胞壁構造を有していると考えられる生菌体は、加熱死菌体よりも強い免疫賦活作用を示すと期待される。

一方、S-PT84 株は培養温度を変えることで、免疫賦活作用が増強されることが報告されている[10]。具体的には、30℃で培養した加熱死菌体と 37℃で培養した加熱死菌体を、マウスの腹腔内より採取したマクロファージに対し 24 時間反応させた後の培養上清中に含まれる IL-12 産生量を測定したところ、37℃で培養した加熱死菌体の方が強く IL-12 産生を誘導した。また、37℃培養加熱死菌体の方が 30℃培養加熱死菌体よりも厚い細胞壁を有していることが電子顕微鏡で撮影した画像から確認されており、細胞壁の厚みと IL-12 産生誘導との間に相関が認められている。

そこで今回は、S-PT84 株の加熱死菌体と生菌体を用いて、よりインタクトな状態の ICW を有している生菌体が加熱死菌体と比較して強い免疫賦活作用を示すか検討した。また同時に、異なる培養温度で培養した S-PT84 株の加熱死菌体と生菌体を用いて、培養温度を高めることによる免疫賦活作用の亢進が、死菌体と同様に生菌体でも起こりうるか検討した。

■研究目的

異なる培養温度で培養した加熱死菌体と生菌体の免疫賦活作用の比較を、マウスより単離した脾細胞を用いた *in vitro* 評価系にて行う。また、マウスを用いた *in vivo* 評価系にて、加熱死菌体及び生菌体摂取後の免疫賦活作用を比較する。

■実験方法

1. 実験動物

実験には、日本 SLC より入手した BALB/c マウス、雌性、7～8 週齢を用いた。飼育期間中は、水道水を自由飲水させ、AIN-93M（オリエンタル酵母株式会社より購入）を自由摂取させた。飼育は、一定の温度、湿度管理の下、明期 12 時間、暗期 12 時間のサイクルで飼育した。馴化期間は、試験開始までに 1 週間設

けた。

2. S-PT84 株加熱死菌体の調製

S-PT84 株は、MRS 培地(Difco Laboratories)を用いて培養した。50%グリセロール溶液にストックしたS-PT84 株を 10 ml の MRS 培地に 1%の用量で接種し、30℃にて 24 時間、前培養した。その後、MRS 培地に同様に接種し、30℃もしくは 37℃にて 24 時間、本培養した。加熱死菌体の調製は、24 時間後に、得られた培養液を 9190 ×*g*、10 分間の条件で遠心し、得られたペレットを滅菌済みの生理食塩水で 2 回、蒸留水で 1 回洗浄した。洗浄後、95℃にて 5 分間加熱し、加熱死菌体を作製した。なお、加熱処理前に、1 ml 当たりの菌数を算出した。生菌体の調製は、24 時間後の培養液を同条件にて遠心し、得られたペレットを滅菌済みの生理食塩水で 2 回、蒸留水で 1 回洗浄した。菌数の測定は、顕微鏡下にて行った。

3. S-PT84 株刺激による単離脾細胞からのサイトカイン産生量の測定

馴化期間終了後、マウスをジエチルエーテルにて麻酔し、開腹後、腹部から放血させ屠殺した。無菌的条件下にて脾臓を採取し、10% FBS(Cambrex)、1% 抗生物質-抗真菌剤混合溶液(Penicillin 10000 units/ml, Streptomycin 10000 μg/ml, Amphotericin B 250 μg/ml, ナカライテスク社製)を混合した RPMI 1640 培地(ナカライテスク社製)を用いて脾細胞を調整した。脾細胞の調製は、セルストレーナー(70 μm, BD Bioscience 社製)をセットした 6 wells plate に RPMI 培地を 5 ml 添加し、セルストレーナー上にて脾臓をすりつぶし、得られた細胞浮遊液を遠心(1500 rpm, 4℃, 5 分)することで、単離した脾細胞のペレットを作成した。得られたペレットを溶血処理後、48 穴プレートに 2.5×10^6 cells/well/0.5 ml となるよう播種した。脾細胞は、S-PT84 株の加熱死菌体もしくは生菌体(0.38, 1.13, 3.8 もしくは 11.3×10^6 cells/well/0.5 ml)の共存下にて 24 時間、37℃、5% CO_2 条件下にて培養した。培養後、上清を回収し、IL-12、TNF-α、IFN-γ、IL-4 産生量の測定を行った。

4. S-PT84 株のマウス経口投与による脾細胞からのサイトカイン産生量の測定

馴化期間終了後、体重に基づき、通常食群(Control)、加熱死菌体 S-PT84 株投与群(Heat-killed S-PT84)、生菌体 S-PT84 株投与群(Live S-PT84)の 3 群(各群 8 匹)に群分けを行った。37℃で培養したS-PT84 株の加熱死菌体及び生菌体は、滅菌済みの生理食塩水に 1×10^9 cells/300 μl となるよう分散し、S-PT84 株分散溶液を作成した。通常食群には滅菌済みの生理食塩水 300 μl を、加熱死菌体 S-PT84 株投与群及び生菌体 S-PT84 株投与群には、各々の分散溶液 300 μl を、7 日間連続経口投与した。投与期間終了後、ジエチルエーテル麻酔下にて開腹し、腹部から放血し屠殺した。無菌的条件下にて脾臓を採取し、

前述と同様の方法にて脾細胞を調製した。調製した脾細胞は、96 穴プレートに 1.0×10^6 cells/well/0.2 ml となるよう播種し、2.5 μg/ml の concanavalin A（ConA, Sigma, St Louis, MO, U.S.A.）刺激を加えた後に、24 時間、37℃、5% CO_2 条件下にて培養した。培養後、上清を回収し、IFN-γ及び IL-4 産生量の測定を行った。培養上清中のサイトカイン濃度の測定は、L-12(p70)、IFN-γ、TNF-α(Mono/Poly)を BD OptEIA™ Mouse ELISA Set を用いて、IL-4 を BD Bioscience Mouse ELISA Set を用いて行った。測定方法は、キットに記載の推奨プロトコルに従った。

5. S-PT84 株のマウス経口投与による脾臓 NK 活性の測定（PINK 法）

実験設備の関係上、脾臓NK 活性の測定に ^{51}Cr 遊離法を用いることが出来なかったため、野中らの報告[8]に従って行った。標的細胞（Target 細胞）には Yac-1 細胞を使用した。PBS に 1×10^6 cells/ml となるよう懸濁させ、3, 3'-dioctadecyloxacarbocyamine perchlorate (DIO：Sigma)を 40 μg/ml 添加した後に、37℃にて 10 分間染色した。DIO にて染色した Yac-1 細胞を PBS にて洗浄し、10% FBS 及び抗生物質－抗真菌剤混合溶液を 1%添加した RPMI 培地にて 5×10^4 cells/ml となるように懸濁した。懸濁液には 25 μg/ml の propidium iodide (PI：Molecular Probes)を添加し、標的細胞となる Yac-1 細胞を作成した。96 穴プレートに、Yac-1 細胞を 100 μl と 2×10^7、1×10^7 もしくは 5×10^6 cells/ml に調整した脾細胞（Effector 細胞）100 μl を混合し、プレートを遠心（1500 rpm、4℃、5 分）した後、37℃、5% CO_2 条件下にて 2 時間培養した。Yac-1 細胞の自然死の割合は、脾細胞を添加しないウェルを設定することで測定した。培養後、Dio^+PI^+細胞数の割合をフローサイトメトリー（Epics XL: Beckman Coulter）を用いて測定した。NK 活性は、以下に示す計算式にて算出した。

＜NK 活性計算式＞

NK 活性（%） = （（脾細胞との反応により細胞死を起こした標的細胞数（Dio^+PI^+））/（総標的細胞数（Dio^+PI^- + Dio^+PI^+）） − （自然死を起こした標的細胞数（Dio^+PI^+））/（総標的細胞数（Dio^+PI^- + Dio^+PI^+））） × 100

6. 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics version 23 を用いて行った。データは、平均値±標準誤差で示した。

マウスより単離した脾細胞を用いたサイトカイン産生量の比較には、Student's *t*-test を各々のグループ間比較に用いた。

マウスを用いた動物実験における各群間の体重及びサイトカイン産生量の比較は、Tukey HSD を用いて行った。また、各群間の NK 活性の比較は、Two-way ANOVA を用いて行った。

全ての有意差検定において、*P* 値が 5%未満の場合、統計学的に有意であると判断した。

■結果

＜S-PT84 株刺激による単離脾細胞からのサイトカイン産生量の検討＞

S-PT84 株の死菌体と生菌体の免疫調節作用を比較するために、*in vitro* にて単離した脾細胞に対し S-PT84 株刺激を行い脾細胞からのサイトカイン産生量の比較を行った。サイトカインは、NK 細胞活性化因子として IL-12 を測定し、Th1/Th2 バランスの算出に用いるための Th1 サイトカインとして IFN-γを、Th2 サイトカインとして IL-4 を測定した。また、抗腫瘍活性を示すことが知られている TNF-αを評価対象に加えた。

37℃で培養した菌体刺激による脾細胞からの IL-12 産生量は、死菌体及び生菌体共に S-PT84 株の菌数依存的に増加した。また、生菌体と比較して死菌体の方が強い IL-12 産生誘導が認められた。IFN-γ及び TNF-α産生についても、IL-12 と同様の結果となった。一方、S-PT84 株刺激による単離脾細胞からの IL-4 産生誘導は、極めて弱い結果となった（Fig. 1-1-1 A-D）。

次に、30℃で培養した菌体刺激による脾細胞からの IL-12 産生量は、死菌体及び生菌体共に S-PT84 株の菌数依存的に増加した。また、生菌体と比較して死菌体の方が強い IL-12 サイトカイン産生誘導が認められた。IFN-γ及び TNF-α産生についても、IL-12 と同様の結果となった。一方、S-PT84 株刺激による単離脾細胞からの IL-4 産生誘導は、極めて弱い結果となった（Fig. 1-1-1 E-H）。

上記を踏まえると、37℃培養菌体の結果と 30℃培養菌体の結果を比較すると、同様の傾向を示しているが、IL-12、IFN-γ、TNF-α産生量については、37℃で培養した菌体での刺激によるサイトカイン産生が強く誘導される結果となった。

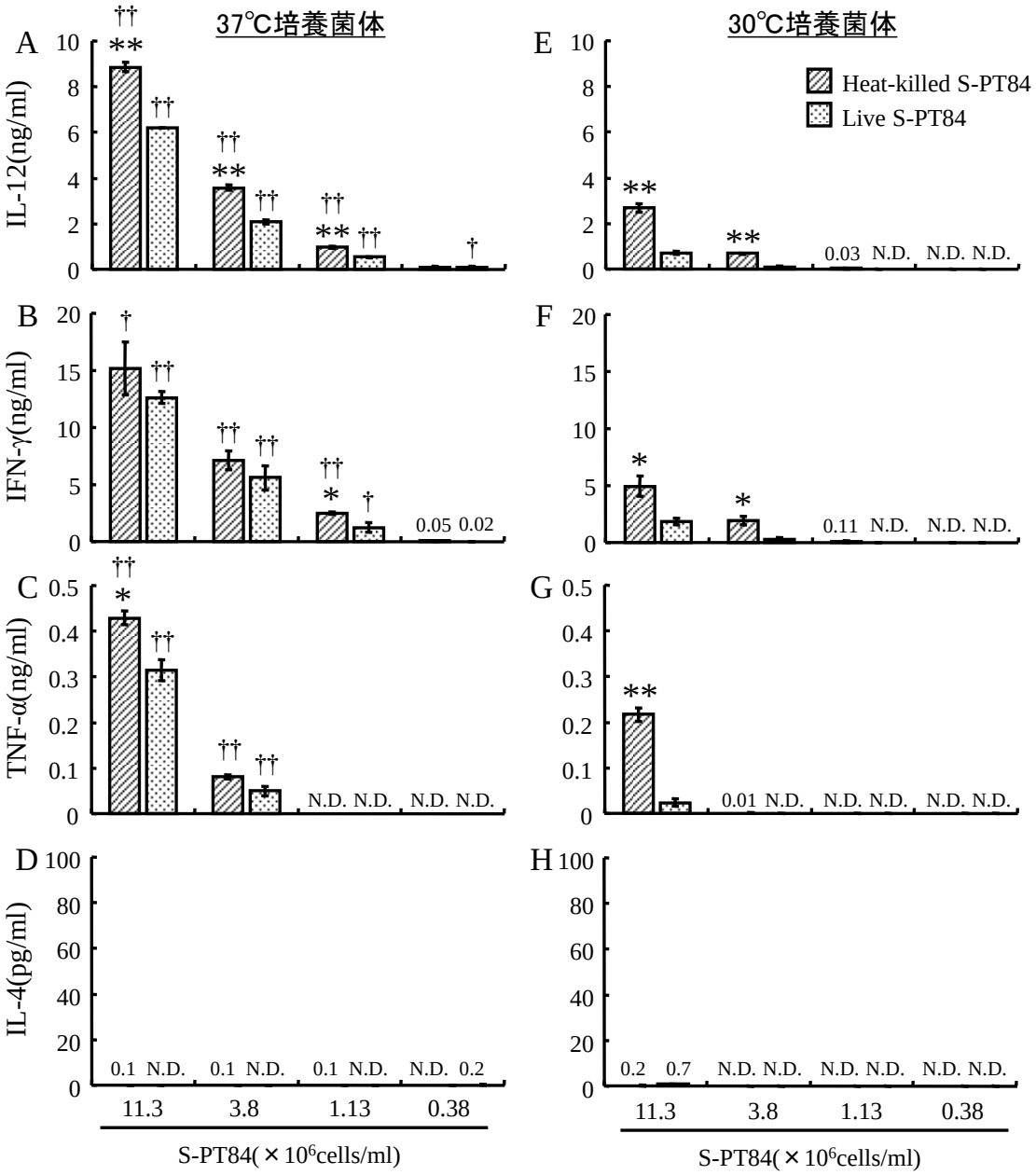


Fig. 1-1-1 IL-12, IFN-γ, TNF-α or IL-4 production from splenocytes *in vitro*.

Splenocytes were cultured in the presence of live or heat-killed S-PT84 (0.38, 1.13, 3.8 or 11.3 × 10^6 cells/ml, A-D: 37℃-cultivated S-PT84, E-H: 30℃-cultivated S-PT84) and culture supernatants were collected after 24 h. IL-12 (A, E), IFN-γ (B, F), TNF-α (C, G) and IL-4 (D, H) concentrations in culture supernatants were measured by ELISA. The values represent mean±S.E. (n=3). Statistically significant differences between live and heat-killed S-PT84 groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Statistically significant differences between 37℃ and 30℃ S-PT84 groups: † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, N.D., not detected.

＜S-PT84 株のマウス経口投与によるサイトカイン産生誘導への影響＞

マウスは、順化期間終了後、体重に基づき、通常食群（Control）、加熱死菌体 S-PT84 株投与群（Heat-killed S-PT84）、生菌体 S-PT84 株投与群（Live S-PT84）の 3 群に群分けを行った。Table 1-1-1 に S-PT84 株の経口投与による体重変化を示した。試験終了時における 3 群間での体重を比較した結果、有意な変動は認められなかった。また、試験開始時と比較して、全ての群において試験終了時に僅かな体重増加が認められたが有意な変動は認められず、S-PT84 株の投与による異常個体も発生しなかった。

37℃で培養した S-PT84 株の死菌体と生菌体の経口投与による Th1/Th2 バランスに対する影響を比較するために、S-PT84 株を 7 日間経口投与した後に摘出した脾臓から単離脾細胞を調製し、concanavalin A（ConA）刺激を 24 時間行った後の培養上清中に含まれる Th1 サイトカイン（IFN-γ）及び Th2 サイトカイン（IL-4）の産生量を検討した。脾細胞からの IFN-γ産生については、通常食群と比較して死菌体投与群で増加傾向が認められたが、生菌体投与群では有意な変動が認められなかった（Fig. 1-1-2A）。また、死菌体投与群と生菌体投与群の間における有意な変動も認められなかった。IL-4 産生については、全ての群間で同程度であり、統計学的に有意な変動は認められなかった（Fig. 1-1-2B）。Th1/Th2 バランスは IFN-γと IL-4 産生量の比率として算出し比較した結果、死菌体の投与により通常食群と比較して有意な上昇が確認された（Fig. 1-1-2C）。一方、通常食群と生菌体投与群、また、死菌体投与群と生菌体投与群の間には、統計学的に有意な変動は認められなかった。

Table 1-1-1 Change in average body weight in mice during the experimental period.

	試験開始時 (Day 1)			試験終了時 (Day 8)			δ value		
	AVE	±	S.E.	AVE	±	S.E.	AVE	±	S.E.
Control	17.2	±	0.3	17.4	±	0.3	0.2	±	0.3
Heat-killed S-PT84	17.2	±	0.2	17.5	±	0.3	0.3	±	0.3
Live S-PT84	17.2	±	0.2	17.4	±	0.2	0.3	±	0.3

Data are expressed as mean ± S.E. (n=8).

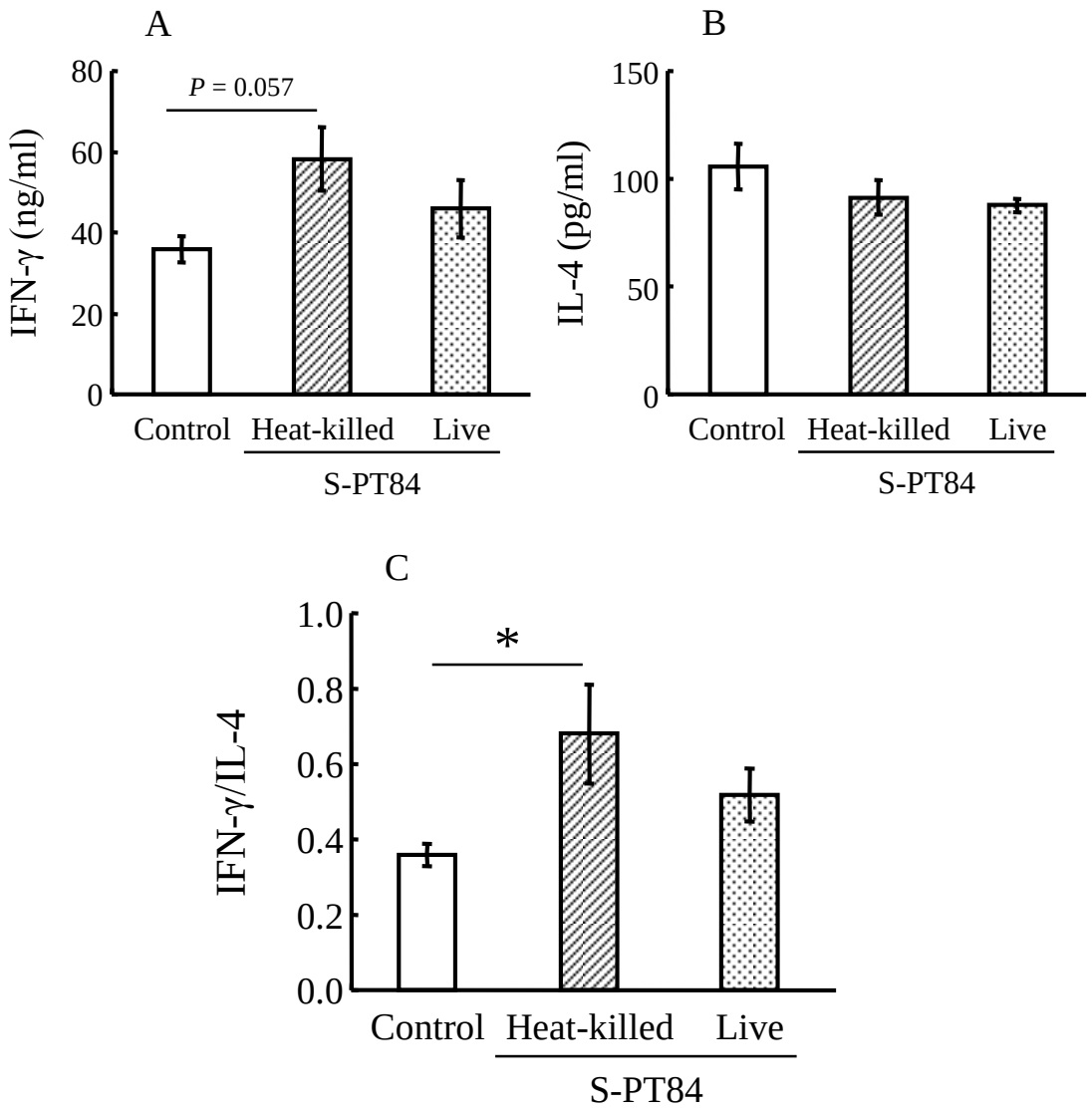


Fig. 1-1-2 IFN-γ and IL-4 production from splenocytes of control or S-PT84-treated mice.

Live or heat-killed S-PT84 was orally administered to BALB/c mice for 7 days. Splenocytes were then collected and treated with concanavalin A (ConA; 2.5 μg/ml) for 24 h. IFN-γ (A) and IL-4 (B) concentrations in culture supernatants were measured by ELISA. The ratio of IFN-γ to IL-4 was calculated as an index of Th1/Th2 balance (C). The values represent mean±S.E. of 8 mice. Statistically significant differences between control and heat-killed S-PT84 groups: * $P < 0.05$.

＜S-PT84 株の経口投与による脾臓 NK 活性への影響＞

S-PT84 株の死菌体と生菌体の経口投与による NK 活性への作用を比較するために、マウスから摘出した脾臓を調製して得られた単離脾細胞を用いて脾臓 NK 活性を測定した。

S-PT84 株の死菌体及び生菌体の経口投与により、脾臓における NK 活性は上昇し、脾細胞（Effector 細胞）数と標的細胞（Target 細胞）数の比率（E:T ratio）を変えても同様の変動が認められた。また、この上昇は、統計学的に有意な変動であった。また、死菌体と生菌体との間には有意な差は認められなかったものの、死菌体投与群の方が僅かに高い活性を示した（Fig. 1-1-3）。

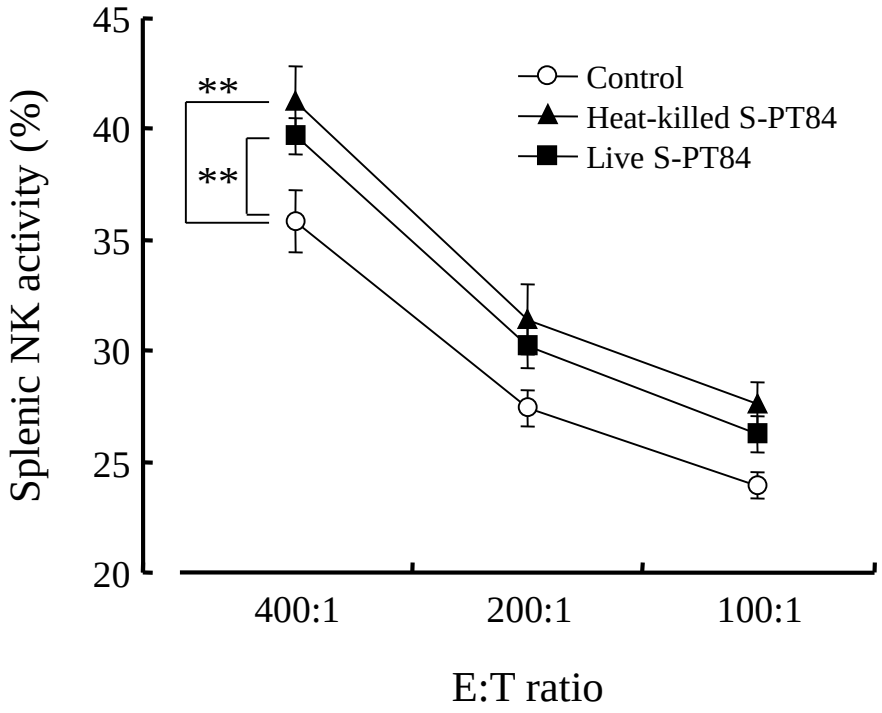


Fig. 1-1-3 NK activity of splenocytes from control or S-PT84-treated mice.

Live or heat-killed S-PT84 was orally administered to BALB/c mice for 7 days. Splenocytes were then collected and NK activity was evaluated. The ratios of effector cells to target cell (E:T ratio) were 400:1, 200:1, and 100:1 in the present experiments. The values represent mean±S.E. of 8 mice. Statistically significant differences between control and S-PT84 groups: ** $P < 0.01$.

■考察

本研究では、S-PT84 株の免疫調節作用における活性成分であるICW が、よりインタクトな構造を保っている生菌体を用いて、加熱死菌体との免疫調節作用を比較した。その結果、両菌体刺激後の単離脾細胞からのサイトカイン産生誘導においては、加熱死菌体の方が生菌体よりも強い作用が認められた。また、加熱死菌体同様、生菌体においても、30℃培養菌体よりも 37℃培養菌体の方が強く単離脾細胞からのサイトカイン産生を誘導した。一方、マウスを用いた検討においては、両菌体投与後の Th1/Th2 バランス調節作用及び脾臓 NK 活性の結果に両菌体間における差は認められなかった。これらの結果を総合的に考えると、生菌体と加熱死菌体は同程度の免疫調節作用を有していると考えられ、言い換えると、加熱死菌体でも十分な免疫調節作用を示すと考えられる。

In vitro における IL-12 と IFN-γ産生誘導の結果は、S-PT84 株加熱死菌体の方が生菌体よりも強いサイトカイン産生誘導が認められた (Fig. 1-1-1A, 1-1-1B, 1-1-1E, 1-1-1F)。また、培養温度を変えても同様の結果となった。乳酸菌の細胞壁が IL-12 産生において重要な役割を果たすことは多く報告されている[20-22]。Sashihara らの報告によれば、pH が中性付近の条件において免疫細胞と乳酸菌を共存させて培養すると、生菌体に比べ加熱死菌体の方が、IL-12 産生誘導が強いことを報告している[23]。しかしながら、低い pH 条件下で乳酸菌を培養すると、IL-12 産生誘導は生菌体も加熱死菌体も同等であることを報告している[23]。この現象は、細胞壁中のペプチドグリカン構造の変化もしくは、細胞壁構造が自己溶菌により分解されてしまうことによる結果であると考察している。今回の我々の検討では、S-PT84 株を脾細胞に作用させた条件は中性付近の pH にて行っており、Fig. 1-1-1A 及び 1-1-1E が示している死菌体と生菌体による IL-12 産生量の差は、生菌体において免疫調節作用に関わる S-PT84 株の細胞壁構造が菌株自身の持つ酵素により分解されたと推察される。また、S-PT84 株の IL-12 産生誘導は、厚い細胞壁であるほど強く誘導され、細胞壁の厚みと IL-12 の産生量は相関することが報告されている[10]。S-PT84 株は、培養温度を高めると細胞壁が厚くなる特徴を有しており、30℃で培養した菌体よりも 37℃培養菌体の方が、厚い細胞壁を有していることが分かっている。今回、30℃と 37℃で培養した菌体によるサイトカイン産生誘導を比較したが、Fig. 1-1-1 に示したように、37℃培養菌体の方が種々のサイトカイン産生誘導が強い結果となった。このことは、IL-12 産生に対する結果と同様に、細胞壁の厚さが重要な役割を果たしていると考えられる。

Fig. 1-1-2 に示した通り、IFN-γ産生誘導や Th1/Th2 バランスの指標とした IFN-γ/IL-4 産生量の比率は、対照群と比較して加熱死菌体の摂取により有意に高まった。しかしながら、加熱死菌体と生菌体との間には、有意な変動は認められなかった。*In vivo* 試験において、加熱死菌体は生菌体よりも僅かに高い Th1 サイトカイン誘導能を有していることが示されたが、NK 活性の測定結果において、加熱死菌体と生菌体の間で統計学的に有意な差が認められなかった(Fig. 1-1-3)ことから、S-PT84 株の加熱死菌体と生菌体にお

ける免疫調節作用はほぼ同等であると考えられる。言い換えれば、加熱死菌体でも十分な免疫賦活作用を示すと考えられる。

Land らは、プロバイオティクスの摂取が子供の侵襲性疾患を引き起こす原因になりうることを報告しており[24]、さらに、Boyle らは、免疫不全の病態にあるヒトや未熟児において、プロバイオティクスの摂取は敗血症をおこすリスクがあることを報告している[25]。このような人々においては、プロバイオティクスを摂取することに対して慎重にならなくてはいけないが、加熱死菌体は侵襲性疾患を引き起こすリスクは極めて低く、また、工業的にも取り扱いが容易であり安定性にも優れている。それ故、S-PT84 株の加熱死菌体は十分な免疫賦活作用を示すだけでなく、生菌体と比較して安全に取り扱うことが可能である食品素材であると考えられる。

第 2 項　S-PT84 株含有食品の長期摂取によるヒト免疫調節作用

■緒言

第 1 項の研究結果より、S-PT84 株の継続摂取はマウス脾臓における NK 活性を高めることが示された。

NK 活性は、ヒトにおいて、種々の抗原に対する感染防御反応において重要な役割を果たしている。遺伝的に NK 細胞が欠損している患者では、T 細胞や B 細胞が正常な機能を果たしていても、ヘルペスウィルスに対し頻繁に感染し、症状が重症化することが報告されている [26]。また、NK 活性が低い高齢者は、NK 活性の高いヒトと比較して、感染症による死亡率が高いことや [27]、末梢血中の NK 活性のレベルがガンの発症リスクと関連すること[28]が知られている。これらの報告から、NK 活性を正常な状態に維持することは、病原性感染に対する予防において重要なだけでなく、健康長寿の実現においても重要な役割を果たすと考えられる。

そこで本研究では、S-PT84 株の継続摂取により、ヒトの NK 活性に対する影響を検討することとし、2 つの臨床試験を計画した。これまでに、S-PT84 株を 0.5×10^9 cells（5 億個）、1.5×10^9 cells（15 億個）、4.5×10^9 cells（45 億個）の用量でヒトに摂取させた結果、1.5×10^9 cells（15 億個）の S-PT84 株継続摂取により NK 活性が高まることを確認している [10]。しかしながら、この臨床試験はヒトへの投与量を検討する用量反応性試験であったことや、被験者の選択基準に試験開始前の NK 活性値が含まれている限定的な集団を対象と試験であったこと、また、対象とした被験者数も極めて限られていた（各群、n=8-10）ことから、探索的な試験として位置付けられる。そこで、臨床試験①では、S-PT84 株 1.5×10^9 cells（15 億個）の継続摂取による NK 活性上昇作用を検討した臨床試験と同様に、NK 活性が 40%未満の健常成人男女を対象に S-PT84 株 1.5×10^9 cells（15 億個）を 4 週間摂取させることによるヒト PBMC における NK 活性上昇作用を再検討した。なお、臨床試験①は、用量反応性試験よりも被験者数を増やして実施した。臨床試験②では、特定保健用食品の臨床試験で推奨されている摂取期間 [29]を参考 に 12 週間の継続摂取とし、長期間継続摂取した際の NK 活性への影響を検証した。また、対象者の選抜においても、選択基準から試験開始時の NK 活性値をなくした健常成人男女を対象として実施した。

なお、各試験において、試験食品の摂取における安全性についても、同時に評価した。

＜臨床試験①：S-PT84 株含有食品の 4 週間継続摂取による NK 活性への影響＞

■研究目的

健常成人男女を対象に、S-PT84 株を含有する食品を 4 週間継続摂取した際の、ヒト末梢血単核球における NK 活性が上昇することを確認する。

■試験方法

1. 試験デザイン

本臨床試験は、無作為化プラセボ対照二重盲検平行群間比較試験にて行った。

2. 対象者

自由意志により試験への参加を表明し、下記の選択基準を全て満たし、除外基準に抵触しない者を本試験の対象者とした。

2-1. 選択基準

1） NK 活性が 40%未満で、同意取得時の年齢が 30 歳以上 70 歳未満の健常成人男女

2) 検査予定日に指定の施設に来院できる者

3) 本試験の目的・内容について十分に理解した上で、書面による同意を得た者

2-2. 除外基準

1） 薬物による継続的な治療を行っている者

2） 2010 年 1 月 15 日までにワクチンを接種する意思のある者

3） 消化器系疾患のある者

4） アレルギー疾患（花粉症を含む）のある者

5） 妊娠中または妊娠している可能性のある者、及び授乳中の者

6） アルコールを過度に摂取している者

7） 重篤な疾患の罹患歴がある者

8） 他の臨床試験に参加している者

9） 試験食品摂取開始前 12 週間以内に 400 mL の全血採血あるいは 4 週間以内に 200 mL の全血採血（献血等）を行った者

10） その他、試験責任医師または試験分担医師が本試験を実施するのに不適当と判断した者

3. 試験食品及び摂取方法

試験食品は、以下の 2 種類を用いた。

全て、錠剤形状の食品を用いており、外観、性状、重量、崩壊性は同一のものを用いた。

試験食品	被験食品	対照食品
原材料	・S-PT84 株加熱死菌体: 1.5×10^9 cells（15 億個）/3 tablets ・賦形剤（デキストリン）及びコーティング剤（HPMC）	・賦形剤（デキストリン）及びコーティング剤（HPMC）
形状・包装	・直径約 8 mm の白色・丸型の錠剤 ・アルミパウチ包装	・直径約 8 mm の白色・丸型の錠剤 ・アルミパウチ包装

※被験食品には、Vitamin B 群（Vitamin B1: 25 mg、Vitamin B2: 12 mg、Vitamin B6: 10 mg）を含む。

4. 試験スケジュール

事前検査時に、被験者から試験参加の同意を得たうえで試験に参加させた。事前検査終了後、割り付け因子に従い被験者を 2 群に割り付け、各群に被験食品もしくは対照食品のいずれかを摂取させた。試験食品の摂取期間を 4 週間と後観察期間を 4 週間設け、合計 8 週間の試験期間とした。試験開始時、試験開始 1 週間後、2 週間後、4 週間後、8 週間後に医師の診察、身体所見、生理学的検査、採血による特殊検査を行った。また、試験開始時、試験開始 4 週間後、8 週間後には、血液学的検査を行った。

5. 割り付け因子

割り付けは、以下の優先順位に従い行った。各群で隔たりがないよう、割り付けた。

1） NK 活性

2） 年齢

3） 性別

6. 検査項目

6-1. スクリーニング検査時

予め文書により同意を得た被験者に対し、スクリーニング検査を実施した。

1）医師の診察

健康状態の観察、問診、罹患歴確認、既往歴、一般状態、選択基準・除外基準の調査

2）身体所見

身長、体重、BMI、体脂肪率

3）生理学的検査

血圧、脈拍数

4）一般臨床検査

①生化学的検査:

AST(GOT)、ALT(GPT)、ALP、γ-GTP、総コレステロール、中性脂肪、総ビリルビン、 BUN、クレアチニン、尿酸、総蛋白、アルブミン、CPK、Na、K、Cl 、Ca

②血液学的検査:

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数

5）血液特殊検査:

NK 活性

6-2. 本試験実施時（0 週目、1 週目、2 週目、4 週目、8 週目）

以下の項目を実施した。

各検査日における検査項目は共通とした。ただし、生化学的検査及び血液学的検査は、試験開始 1 週間後及び 2 週間後には実施しなかった。

1）医師の診察

健康状態の観察、問診、一般状態

2）身体所見

体重、BMI、体脂肪率

3）生理学的検査

血圧、脈拍数

4）一般臨床検査

①生化学的検査:

AST(GOT)、ALT(GPT)、ALP、γ-GTP、総コレステロール、中性脂肪、総ビリルビン、 BUN、クレアチニン、尿酸、総蛋白、アルブミン、CPK、Na、K、Cl 、Ca

②血液学的検査:

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数

5）血液特殊検査:

NK 活性

＜NK 活性測定方法＞

末梢血におけるNK活性の測定は、株式会社BMLに委託して行った。NK活性は、ヘパリン処理した末梢血から重曹法により単離した peripheral blood mononuclear cells（PBMC）を用い、^{51}Cr 遊離法にて測定した。

単離したPBMCは、PBSにて二回洗浄した後、10%FBSを含んだRPMI培地に分散させ、2.0×10^6 cells/ml となるよう調整した。調整後の細胞分散溶液を Effector 細胞として用いた。標的細胞（Target 細胞）には、ヒト骨髄性白血病由来細胞株である K562 細胞を用い、200 μCi に調整した ^{51}Cr を 37℃にて 60 分間処理し、PBS にて洗浄することで K562 細胞に ^{51}Cr を標識させた。K562 細胞は、1.0×10^5 cells/ml となるように調整し、Target 細胞として用いた。

Target 細胞数に対し、Effector 細胞数が 20 倍（Effector 細胞数: Target 細胞数 = 20:1）となるよう加え、37℃、5% CO_2 条件下にて 4h 反応させた。反応後、Target 細胞より遊離されてくる ^{51}Cr の放射活性を測定した。NK 活性は、以下の計算式にて測定した。

＜NK 活性計算式＞

NK 活性(%) = （（（Effector 細胞と Target 細胞の反応により遊離した ^{51}Cr）−（Target 細胞から自然遊離した ^{51}Cr））/（（Target 細胞より最大遊離した ^{51}Cr）−（Target 細胞から自然遊離した ^{51}Cr））） × 100

7. 被験者日誌

被験者は、試験食品摂取開始日から後観察終了日までの期間、毎日、以下項目に関する情報を生活日誌に記載した。

1）自覚症状

2）試験食品摂取の有無

3）暴飲・暴食などの生活習慣の変化や、医薬品の摂取、健康食品の摂取

4）指導内容逸脱の有無

8. 被験者の管理

試験責任医師及び試験分担医師は、以下の内容について被験者に指導を行った。

1）試験期間中は、不規則な生活（暴飲暴食、睡眠不足、過剰な運動など）を避けることとした。

2）試験期間中は、原則として医薬品の摂取を禁止した。ただし、緊急を要する医薬品の使用は可能とし

た。その場合、服用状況を生活日誌に記載させた。

3）検査前日は禁酒とし、節食、暴飲暴食、過度の運動は避けることとした。

4）検査前日は、十分な睡眠と休養を取ることとした。また、検査当日の朝は通常通りの食事を済ませてから来院することとした。

9. 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics version 23 を用いて行った。

群間における有意差検定は、対応のない Student's *t*-test を行った。また、群内における経時的変化における有意差検定は、Bonferroni 法を用いて行った。試験食品の摂取期間における交互作用（群、摂取期間）及び摂取期間、群効果については、繰り返しのある二元配置分散分析（Two-way ANOVA）を用いて検定した。

全ての有意差検定において、*P* 値が 5%未満の場合、統計学的に有意であると判断した。

10. 倫理

本試験は、サントリーホールディングス株式会社及び医療法人弘清会四ツ橋診療所におけるヒト試験倫理委員会において、疫学研究に関する倫理指針及び倫理的、化学的妥当性の観点から審査を受け、試験実施の承認を得た。

また、本試験は、ヘルシンキ宣言の精神に則り、常に被験者の人権保護に配慮し、疫学研究に関する倫理指針に従い実施した。被験者に対しては、試験内容及び試験方法などについて十分な説明を行い、書面による同意を得た上で実施した。

■結果

＜対象＞

選択基準へ適合し、除外基準に抵触しない者のうち、試験責任医師又は試験分担医師が試験への参加に問題ないと医学的に判断した者を試験に参加させた。

本試験に参加した被験者のフローチャートを Fig. 1-2-1 に記す。結果、被験者 44 名を選抜し、被験食品群（S-PT84 株群）と対照食品群（プラセボ群）の 2 群（プラセボ群：23 名、S-PT84 株群：21 名）に割り付けた。試験期間中の被験者の脱落はなく、全ての被験者が試験を完了した。試験終了後、S-PT84 株群の被験者 1 名が、試験期間中にインフルエンザを発症していたことが判明したため、有効性の解析対象から除外した。

安全性解析対象者は、試験食品を一度でも摂取した者を対象とした。

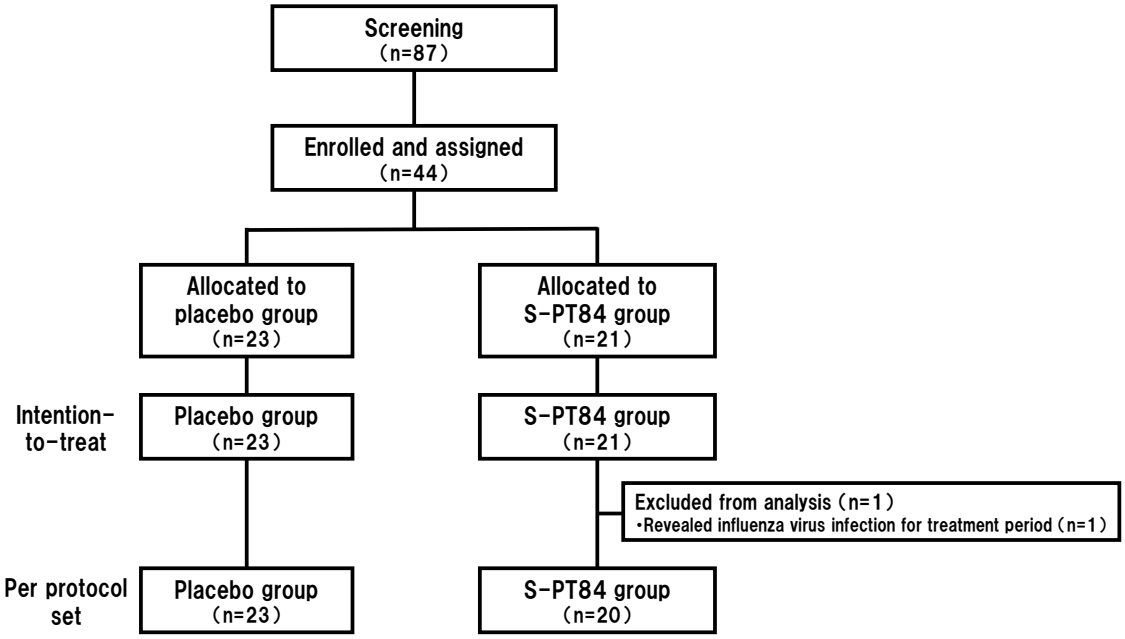


Fig. 1-2-1 Flow diagram of the study.

＜被験者背景＞

有効性解析対象者の被験者背景をTable 1-2-1に記す。試験開始時における両群間の割付因子に、統計学的に有意な差は認められなかった。

＜試験食品の摂取状況＞

試験食品摂取率は、両群ともに 99%以上であり、群間における試験食品摂取率に有意な差は認められなかった。

＜NK 活性＞

試験期間における両群の NK 活性推移を Table 1-2-2 に記す。

S-PT84 株摂取群において、被験食品摂取開始2週目におけるNK活性の変化量が、プラセボ群と比較して統計学的に有意な増加を示した。また、試験食品摂取開始 4 週目まで、S-PT84 株摂取群における NK 活性の変化量はプラセボ群と比較して高い値を示した。摂取開始4週目におけるNK 活性の変化量は、群間に有意な差は認められなかった。

後観察期間後におけるNK 活性は、両群とも、試験開始時と同程度の値となった。

Table 1-2-1 Baseline characteristics of the subjects.

	Placebo (n=23)	S-PT84 (n=20)
Age (years)	47.7 ± 9.0	48.7 ± 12.2
Sex (male/female)	6 / 17	5 / 15
NK activity (%)	29.0 ± 10.9	29.2 ± 13.5

All values are expressed as mean ± S.D. (placebo group (n=23), S-PT84 group (n=20)). There was no significant difference between the groups (Placebo; placebo group, S-PT84; S-PT84 group) in baseline data. Natural killer (NK) cell activity was measured against K562 target cells in single point for each individual with an effector-to-target (E/T) ratio of 20 using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Table 1-2-2 Change in NK activity during the study period.

	Placebo (n=23)	S-PT84 (n=20)
NK activity (%)		
Baseline	28.3 ± 2.4	27.1 ± 2.9
1 week	29.3 ± 2.5	29.6 ± 3.5
2 weeks	28.4 ± 2.7	31.5 ± 3.5
4 weeks	30.3 ± 2.8	30.5 ± 3.6
Follow-up period	24.2 ± 2.2	24.5 ± 3.2
ΔNK activity (%)		
1 week	1.1 ± 1.6	2.5 ± 1.7
2 weeks	0.1 ± 1.4	4.4 ± 1.7 #
4 weeks	2.0 ± 1.8	3.4 ± 1.4
Follow-up period	-4.1 ± 2.3	-2.6 ± 1.7

NK activity was measured 5 times against K562 target cells with an effector-to-target (E/T) ratio of 20 using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). ΔNK activity indicates the changes in values from baseline (before supplementation). Data are shown as mean ± S.E. (placebo group (n=23), S-PT84 group (n=20)). *P* value estimated by using Two-way ANOVA and Student's *t*-test. Two-way ANOVA were (NK activity) $P = 0.364$ for Time × Group, $P = 0.752$ for Time, $P = 0.775$ for Group, (ΔNK activity) $P = 0.364$ for Time × Group, $P = 0.752$ for Time, $P = 0.199$ for Group. $^{\#}p < 0.05$ compared to placebo group using Student's *t*-test.

＜血液検査＞

生化学的検査及び血液学的検査の結果を Table 1-2-3 に記す。

試験期間中において、いずれの項目においても異常変動は認められず、生理的変動又は被験者固有変動の範囲内と判断された。

＜有害事象＞

試験期間中において、S-PT84 株群で 6 例 6 件（インフルエンザ症状：1 件、感冒症状：3 件、軟便：1 件、腹痛：1 件）、プラセボ群で 12 例 12 件（感冒症状：7 件、咳嗽：1 件、軟便：1 件、頭痛：1 件、便秘 1 件、腹部膨満感 1 件）発生した。そのうち、S-PT84 株群における軟便及び頭痛、プラセボ群における便秘及び腹部膨満感は、試験食品との関連性が疑われたが、その程度は、生理的変動の範囲内であった。

＜安全性評価＞

血液検査及び有害事象の結果から、S-PT84 株を含有する食品を 4 週間摂取させても臨床上問題ないことが確認された。

以上より、S-PT84 株を含有する食品の 4 週間継続摂取による安全性に問題ないことが確認された。

Table 1-2-3 Blood hematological and blood biochemical parameters during the study period.

	Baseline			4 weeks			Follow-up period		
Blood hematological parameters									
WBC (/μL)									
Placebo	5021.3	±	1560.2	4927.0	±	1430.7	5290.0	±	1444.8
S-PT84	5214.3	±	1722.9	4937.6	±	1303.5	5048.6	±	1484.7
RBC ($\times 10^4$/μL)									
Placebo	452.5	±	37.2	447.0	±	37.1	456.4	±	36.1
S-PT84	448.5	±	34.1	439.6	±	34.8	446.2	±	38.2
Hb (g/dL)									
Placebo	13.6	±	1.5	13.4	±	1.5	13.6	±	1.6
S-PT84	13.5	±	1.2	13.3	±	1.1	13.4	±	1.3
Ht (%)									
Placebo	42.9	±	4.0	42.4	±	4.0	42.9	±	4.1
S-PT84	42.6	±	3.1	41.6	±	3.1	41.7	±	3.8
Plt ($\times 10^4$/μL)									
Placebo	24.7	±	5.1	24.5	±	5.0	25.3	±	5.6
S-PT84	25.0	±	5.0	25.1	±	5.6	25.1	±	4.8
Blood biochemical parameters									
AST (U/L)									
Placebo	21.4	±	5.1	20.0	±	4.2	22.1	±	6.2
S-PT84	21.6	±	6.5	22.9	±	6.0 $^{\$}$	23.9	±	11.4
ALT (U/L)									
Placebo	19.0	±	8.4	17.1	±	7.0	18.7	±	8.0
S-PT84	19.8	±	11.8	21.1	±	12.1	20.5	±	10.5
γ-GTP (U/L)									
Placebo	28.3	±	17.9	25.0	±	13.9	27.7	±	18.1
S-PT84	23.3	±	13.8	21.4	±	13.9	23.3	±	13.6
ALP (U/L)									
Placebo	206.3	±	67.3	202.2	±	59.4	214.7	±	71.4
S-PT84	200.7	±	57.0	198.7	±	52.3	204.8	±	54.7
T-Bil (mg/dL)									
Placebo	0.63	±	0.15	0.67	±	0.20	0.60	±	0.21
S-PT84	0.62	±	0.25	0.68	±	0.25	0.60	±	0.20
T-CHO (mg/dL)									
Placebo	228.2	±	28.5	230.8	±	31.9	235.0	±	32.1
S-PT84	213.9	±	37.7	208.0	±	39.0 $^{\#}$	221.4	±	43.9
TG (mg/dL)									
Placebo	132.9	±	83.2	127.7	±	67.1	139.7	±	84.3
S-PT84	87.3	±	56.8 $^{\#}$	78.6	±	45.7 $^{\#\#}$	90.2	±	47.0 $^{\#}$
BUN (mg/dL)									
Placebo	13.7	±	3.7	13.7	±	3.4	13.6	±	3.4
S-PT84	14.1	±	3.5	14.0	±	3.7	14.1	±	3.5
CRE (mg/dL)									
Placebo	0.66	±	0.12	0.65	±	0.12	0.65	±	0.10
S-PT84	0.64	±	0.10	0.61	±	0.09	0.61	±	0.11
CPK (U/L)									
Placebo	114.8	±	41.0	102.7	±	27.6	108.0	±	373.0
S-PT84	112.0	±	76.9	127.0	±	95.9	160.0	±	274.2

UA (mg/dL)			
Placebo	4.9 ± 1.3	4.8 ± 1.0	4.9 ± 1.1
S-PT84	4.9 ± 0.9	4.8 ± 1.0	4.7 ± 1.2
TP (g/dL)			
Placebo	7.2 ± 0.3	7.1 ± 0.4	7.2 ± 0.4
S-PT84	7.3 ± 0.4	7.1 ± 0.4	7.3 ± 0.4
Alb (g/dL)			
Placebo	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3
S-PT84	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.3
Na (mEq/L)			
Placebo	141.3 ± 1.6	141.9 ± 2.1	142.0 ± 1.7
S-PT84	141.1 ± 1.2	141.3 ± 1.3	141.5 ± 1.6
K (mEq/L)			
Placebo	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.3
S-PT84	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.3
Cl (mEq/L)			
Placebo	102.0 ± 1.6	102.3 ± 2.2	102.5 ± 1.9
S-PT84	102.1 ± 1.6	102.4 ± 2.1	102.9 ± 1.9
Ca (mg/dL)			
Placebo	9.3 ± 0.3	9.3 ± 0.3	9.4 ± 0.3
S-PT84	9.4 ± 0.4	9.1 ± 0.3	9.3 ± 0.3

Data are shown as mean ± S.D. (placebo group (n=23), S-PT84 group (n=21)). $^{\$}P < 0.1$, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ as compared with placebo group by Student's *t*-test.

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; Plt, platelet; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; T-Bil, total bilirubin; T-CHO, total cholesterol; TG, triglycerides; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; CPK, creatine phosphokinase; UA, uric acid; TP, total protein; Alb, albumin.

＜臨床試験②：S-PT84 株含有食品の長週間（12 週間）摂取による NK 活性への影響＞

■研究目的

健常成人男女を対象に、S-PT84 株を含有する食品を 12 週間継続摂取させ、ヒト末梢血単核球における NK 活性が上昇することを確認する。

■試験方法

1. 試験デザイン

本臨床試験は、無作為化プラセボ対照二重盲検平行群間比較試験にて行った。

2. 対象者

自由意志により試験への参加を表明し、下記の選択基準を全て満たし、除外基準に抵触しない者を本試験の対象者とした。

2-1. 選択基準

1) 同意取得時の年齢が 40 歳以上 70 歳未満の健康な男女

2) 検査予定日に指定の施設に来院できる者

3) 本試験の目的・内容について十分に理解した上で、書面による同意を得た者

2-2. 除外基準

1) 過去 2 年間の秋冬に一度も上気道感染症の自覚症状がない者

2) 乳酸菌や免疫賦活に関係する医薬品、医薬部外品、サプリメントを継続的に摂取している者

3) 慢性基礎疾患（糖尿病、呼吸器系疾患、循環器系疾患、心疾患、肝疾患、腎疾患、免疫不全などの重篤な疾患）を有しているあるいは既往のある者

4) 事前検査で顕著な臨床医学上の異常が認められた者

5) 本試験期間中に実施する各種検査の手順を規定どおりに実施できない者（唾液の採取など）

6) 夜勤や昼夜交代制勤務など、生活が不規則な者

7) 本試験期間中に妊娠、授乳の予定がある者

8) 本試験食品に対してアレルギー症状が出現する恐れのある者

9) 収縮期血圧が 90 mmHg 未満の者

10) 同意日の前 4 週間以内に成分献血あるいは 200 mL の全血採血（献血等）を行った者

11) 同意日の前 16 週間以内に 400 mL の全血採血（献血等）を行った者

12) 同意日の前 12 ヶ月以内に採血量 800 mL を超える全血採血（献血等）を行った者

13) 同意日に他の医薬品または健康食品の臨床試験に参加中、試験終了 4 週間以内の者、あるいは本試験の参加同意後に他の臨床試験に参加する予定のある者

14) その他、試験責任医師が被験者として不適当と判断した者

3. 試験食品及び摂取方法

試験食品は、以下の 2 種類を用いた。

全て、錠剤形状の食品を用いており、外観、性状、重量、崩壊性は同一のものを用いた。

試験食品	被験食品	対照食品
原材料	・S-PT84 株加熱死菌体：1.5×10^9 cells（15 億個）/3 tablets ・賦形剤（デキストリン）及びコーティング剤（HPMC）	・賦形剤（デキストリン）及びコーティング剤（HPMC）
形状・包装	・直径約 8 mm の白色・丸型の錠剤 ・アルミパウチ包装	・直径約 8 mm の白色・丸型の錠剤 ・アルミパウチ包装

※被験食品には、Vitamin B 群（Vitamin B1: 25 mg、Vitamin B2: 12 mg、Vitamin B6: 10 mg）を含む。

4. 試験スケジュール

事前検査時に、被験者から試験参加の同意を得たうえで試験に参加させた。事前検査終了後、割り付け因子に従い被験者を 2 群に割り付け、各群に被験食品もしくは対照食品のいずれかを摂取させた。試験食品の摂取期間を 12 週間設け、試験開始時、試験開始 12 週間後に医師の診察、身体所見、生理学的検査、採血による検査を行った。

5. 割り付け因子

割り付けは、以下の優先順位に従い行った。各群で隔たりがないよう、割り付けた。

1） NK 活性

2） 年齢

3） 性別

6. 検査項目

6-1. スクリーニング検査時

予め文書により同意を得た被験者に対し、スクリーニング検査を実施した。

1)医師の診察

健康状態の観察、問診、罹患歴確認、既往歴、一般状態、選択基準・除外基準の調査

2)身体所見

身長、体重

3)生理学的検査

血圧(収縮期血圧、拡張期血圧)、脈拍数

4)一般臨床検査

①生化学的検査:

AST(GOT)、ALT(GPT)、ALP、γ-GTP、総コレステロール、中性脂肪、総ビリルビン、 BUN、クレアチニン、尿酸、総蛋白、アルブミン、CPK、Na、K、Cl

②血液学的検査:

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数

5)尿検査

潜血反応定性、糖定性、蛋白定性

6)血液特殊検査:

NK 活性

6-2. 本試験実施時(12 週目)

1)医師の診察

健康状態の観察、問診、一般状態

2)身体所見

体重

3)生理学的検査

血圧(収縮期血圧、拡張期血圧)、脈拍数

4)一般臨床検査

①生化学的検査:

AST(GOT)、ALT(GPT)、ALP、γ-GTP、総コレステロール、中性脂肪、総ビリルビン、 BUN、クレアチニン、

尿酸、総蛋白、アルブミン、CPK、Na、K、Cl

②血液学的検査:

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数

5)尿検査:

潜血反応定性、糖定性、蛋白定性

6)血液特殊検査:

NK 活性

＜NK 活性測定方法＞

末梢血における NK 活性の測定は、三菱化学メディエンス株式会社(現:株式会社 LSI メディエンス)に委託して行った。NK 活性は、ヘパリン処理した末梢血から重曹法により単離した PBMC を用い、^{51}Cr 遊離法にて測定した。

単離した PBMC は、PBS にて二回洗浄した後、10%FBS を含んだ RPMI 培地に分散させ、2.0×10^6 cells/ml となるよう調整した。調整後の細胞分散溶液を Effector 細胞として用いた。標的細胞(Target 細胞)には、ヒト骨髄性白血病由来細胞株である K562 細胞を用い、200 μCi に調整した ^{51}Cr を 37℃にて 60 分間処理し、PBS にて洗浄することで K562 細胞に ^{51}Cr を標識させた。K562 細胞は、1.0×10^5 cells/ml となるように調整し、Target 細胞として用いた。

Target 細胞に対し、Effector 細胞が 20 倍(Effector 細胞数:Target 細胞数 = 20:1)となるよう加え、37℃、5% CO_2 条件下にて 4h 反応させた。反応後、Target 細胞より遊離されてくる ^{51}Cr の放射活性を測定した。NK 活性は、以下の計算式にて測定した。

＜NK 活性計算式＞

NK 活性(%) = (((Effector 細胞と Target 細胞の反応により遊離した ^{51}Cr)−(Target 細胞から自然遊離した ^{51}Cr))/((Target 細胞より最大遊離した ^{51}Cr)−(Target 細胞から自然遊離した ^{51}Cr))) × 100

7. 被験者日誌

被験者は、試験食品摂取開始日から後観察終了日までの期間、毎日、以下項目に関する情報を生活日誌に記載した。

1)自覚症状

2)試験食品摂取の有無

3)暴飲・暴食などの生活習慣の変化や、医薬品及び健康食品の摂取

4）指導内容逸脱の有無

8. 被験者の管理

試験責任医師及び試験分担医師は、以下の内容について被験者に指導を行った。

1）試験期間中は、食事、飲酒、喫煙、運動、睡眠などの生活習慣を極力変えず、規則的な生活を送ることとした。

2）試験期間中は、原則として医薬品の摂取を禁止した。ただし、緊急を要する医薬品の使用は可能とした。その場合、服用状況を生活日誌に記載させた。

3）検査前日は禁酒とし、節食、暴飲暴食、過度の運動は避けることとした。

4）検査前日は、22 頃までに飲食を終え、十分な睡眠と休養を取ることとした。また、検査当日の朝は通常通りの食事を済ませてから来院することとした。

9. 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics version 23 を用いて行った。

試験食品摂取前後及び群間における有意差検定は、対応のない Student's *t*-test を行った。試験食品摂取前の NK 活性と試験食品摂取による NK 活性の変化量との相関解析は、ピアソンの相関係数を算出し、有意差検定を行った。回帰係数の差は、傾きの差の t 値を検定することにより確認した。

全ての有意差検定において、*P* 値が 5%未満の場合、統計学的に有意であると判断した。

10. 倫理

本試験は、サントリーホールディングス株式会社及び公益財団愛世会　愛誠病院上野クリニックにおけるヒト試験倫理委員会において、疫学研究に関する倫理指針及び倫理的、化学的妥当性の観点から審査を受け、試験実施の承認を得た。

また、本試験は、ヘルシンキ宣言の精神に則り、常に被験者の人権保護に配慮し、疫学研究に関する倫理指針に従い実施した。被験者に対しては試験内容及び試験方法などについて十分な説明を行い、書面による同意を得た上で試験を実施した。

■結果

＜対象＞

選択基準へ適合し、除外基準に抵触しない者のうち、試験責任医師が試験への参加に問題ないと医学的に判断した者を試験に参加させた。

本試験に参加した被験者のフローチャートを Fig. 1-2-2 に記す。結果、被験者 417 名を選抜し、被験食品群（S-PT84 株群）と対照食品群（プラセボ群）の 2 群（プラセボ群：210 名、S-PT84 株群：207 名）に割り付けた。試験期間中、自己都合による同意撤回（プラセボ群：1 名、S-PT84 株群：3 名）、転倒事故により入院（頭部打撲及び腰部打撲と頚椎捻挫）をし、試験責任医師が本試験の評価に影響を与えると判断したため試験を中止した者 1 名（プラセボ群）が試験から脱落した。また、試験終了後、試験実施計画書違反などにより評価結果に影響を及ぼすことが明らかとなった者（プラセボ群：12 名、S-PT84 株群：8 名）及び、12 週目の来院時に上気道感染を発現しており、評価項目に影響を及ぼすと判断された者（S-PT84 株群：2 名）は、有効性の解析対象から除外した。

安全性解析対象者は、試験食品を一度でも摂取した者を対象とした。

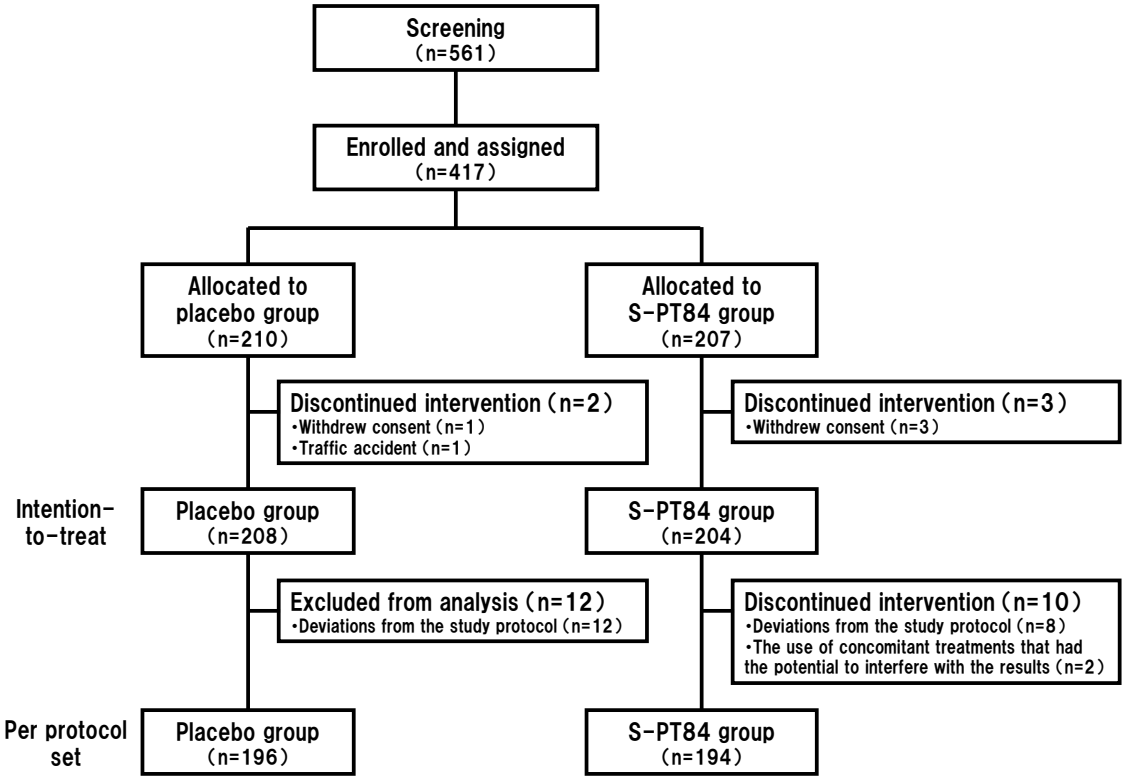


Fig. 1-2-2 Flow diagram of the study.

＜被験者背景＞

有効性解析対象者の被験者背景をTable 1-2-4に記す。試験開始時における両群間の割付因子に、統計学的に有意な差は認められなかった。

＜試験食品の摂取状況＞

試験食品摂取率は、両群ともに 90%以上であり、群間における試験食品摂取率に有意な差は認められなかった。

＜NK 活性＞

試験期間における両群の NK 活性推移を Table 1-2-5 に記す。

試験食品摂取開始12週目において、S-PT84株群及びプラセボ群において、試験食品摂取開始前と比較して NK 活性の有意な増加が認められた。また、試験食品摂取開始前からの NK 活性変化量においては、プラセボ群と比較して S-PT84 株群で統計学的に有意な増加を示した。

次に、試験食品摂取開始前の NK 活性の値と、試験食品摂取による NK 活性の変化量との関係を Fig. 1-2-3 に記す。試験食品摂取開始前の NK 活性の値を x 軸に、試験食品摂取による NK 活性の変化量を y 軸に設定した。プラセボ群における回帰直線は $y = -0.1381x + 8.7407$（Fig. 1-2-3A； $r = -0.193$, $P < 0.01$）、S-PT84 株群における回帰直線は $y = -0.3505x + 15.711$（Fig. 1-2-3B； $r = -0.352$, $P < 0.01$）となり、S-PT84 株群とプラセボ群における回帰係数の差の検定を行ったところ、S-PT84 株群の回帰直線の傾きがプラセボ群と比較して統計学的に有意に小さい値を示した（$t = 2.14$, $P = 0.03$）。

本試験に参加した全被験者の試験食品摂取開始前の NK 活性の中央値を算出すると、21.2%であった。そこで、試験食品摂取開始前の NK 活性の値が中央値よりも高い人と低い人に層別を行い、試験食品摂取による NK 活性の増加量を比較解析した。結果、摂取開始前の NK 活性が中央値よりも低い集団において、S-PT84 株群の NK 活性増加量がプラセボ群と比較して統計学的に有意な増加を示した（Fig. 1-2-4A）。一方、摂取開始前の NK 活性が中央値よりも高い集団においては、試験食品摂取による NK 活性の増加量に両群間の差は認められなかった（Fig. 1-2-4B）。また、S-PT84 株摂取群において同様の解析を行った結果、試験食品摂取開始前の NK 活性が中央値よりも高い集団と比較して低い集団の方が、S-PT84 株摂取による NK 活性の増加が有意に高い結果となった（Fig. 1-2-5）。

Table 1-2-4 Baseline characteristics of the subjects.

	Placebo (n=196)	S-PT84 (n=194)
Age (years)	48.6 ± 6.4	49.3 ± 6.7
Sex (male/female)	81 / 115	76 / 118
NK activity (%)	24.1 ± 1.0	23.1 ± 0.9

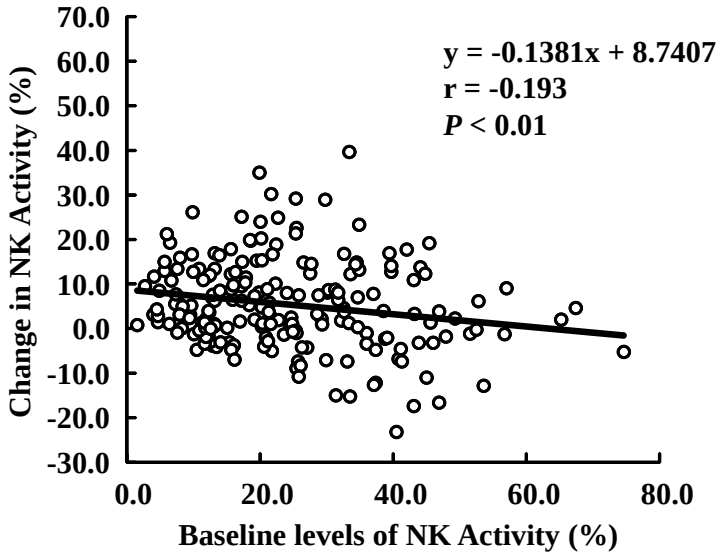
All values are expressed as mean ± S.D. (placebo group (n=196), S-PT84 group (n=194)). There was no significant difference between the groups in baseline data. NK activity was measured against K562 target cells in single point for each individual with an effector-to-target (E/T) ratio of 20 using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Table 1-2-5 Change in NK activity during the study period

	Placebo (n=196)	S-PT84 (n=194)
NK activity (%)		
Baseline	24.1 ± 1.0	23.1 ± 0.9
12 weeks	29.5 ± 1.1 ***	30.7 ± 1.0***
ΔNK activity (%)		
12 weeks	5.4 ± 0.7	7.7 ± 0.9 #

NK activity was measured 2 times against K562 target cells with an effector-to-target (E/T) ratio of 20 using peripheral blood mononuclear cells (PBMC). ΔNK activity indicates the change values from baseline (before supplementation). Data are shown as mean ± S.E. (placebo group (n=196), S-PT84 group (n=194)). ***$P < 0.001$ compared to the baseline (before supplementation) using paired Student's *t*-test. #$P < 0.05$ compared to placebo group using Student's *t*-test.

A) Placebo group



B) S-PT84 group

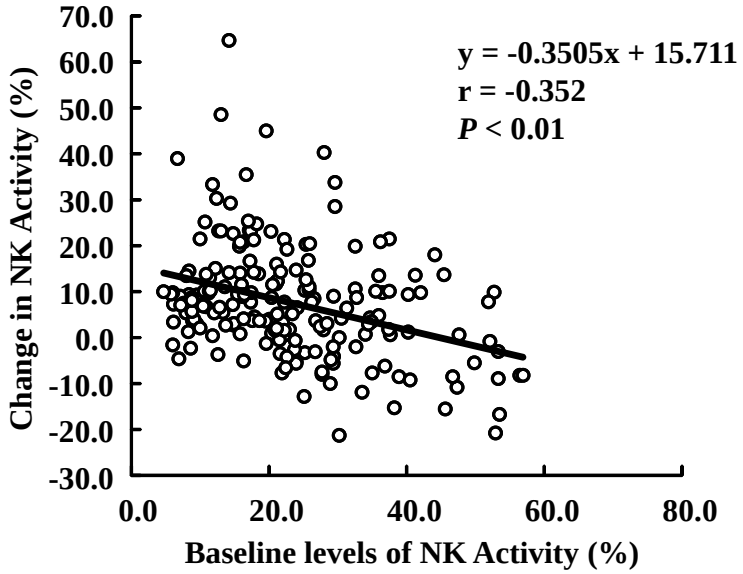
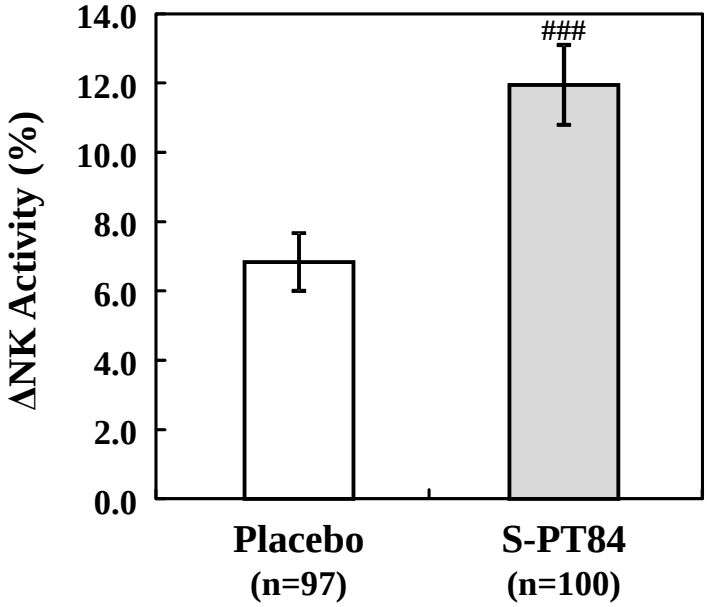


Fig. 1-2-3 Relationship between the change in NK activity over 12 weeks of supplementation and baseline levels of NK activity.

(A) and (B) show the result of placebo group and S-PT84 group, respectively. The change of NK activity indicates the change in values from baseline (before supplementation) to 12 weeks (at the end of supplementation). The correlation was determined by Pearson's method. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

A) The subjects with baseline NK activity below 21.2%



B) The subjects with baseline NK activity above 21.2%

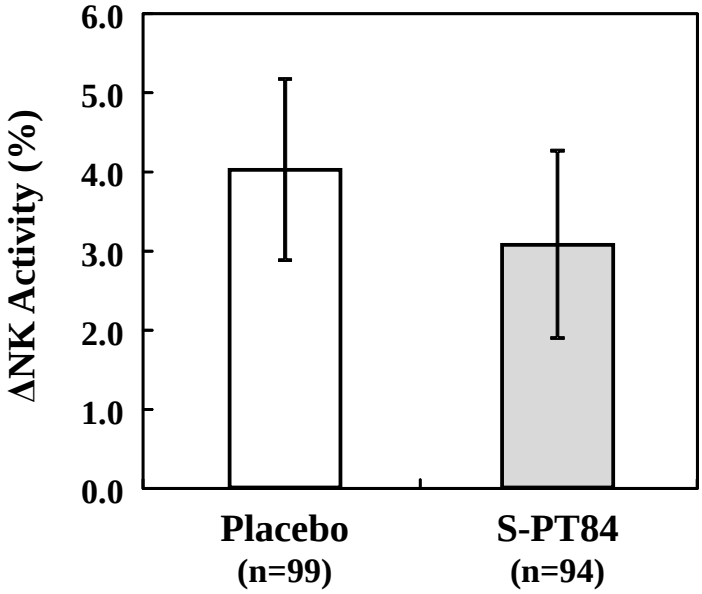


Fig. 1-2-4 The increase of NK activity classified based on baseline NK activity.

(A) and (B) show the result of the subject with baseline NK activity below 21.2% and above 21.2%, respectively. The change of NK activity indicates the change in values from baseline (before supplementation) to 12 weeks (at the end of supplementation). Data are shown as mean ± S.E. ((A) placebo group (n=97), S-PT84 group (n=100), (B) placebo group (n=99), S-PT84 group (n=94)). ### $P < 0.001$ compared to placebo group using Student's *t*-test.

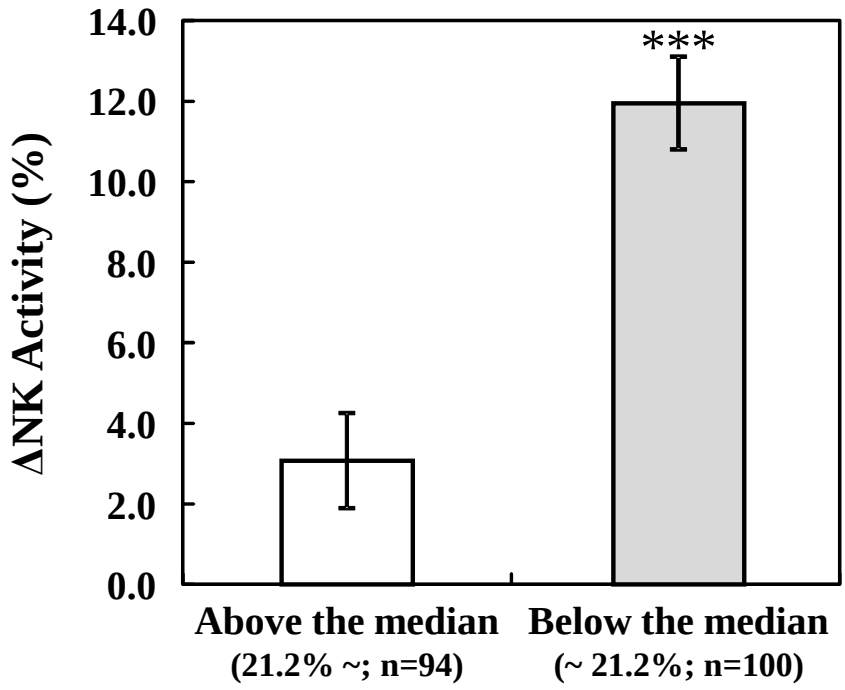


Fig. 1-2-5 The increase of NK activity classified based on baseline NK activity in S-PT84 group.

White and gray bar indicate the change of NK activity from baseline (before supplementation) to 12 weeks (at the end of supplementation) among individuals with the baseline NK activity level above the median and below the median, respectively. Data are shown as mean ±S.E. (above the median group (n=94), below the median group (n=100)). *** $P < 0.001$ compared to above medium population using Student's *t*-test.

＜血液検査＞

生化学的検査及び血液学的検査の結果を Table 1-2-6 に記す。

試験期間中において、いずれの項目においても異常変動は認められず、いずれも軽微な変化であることから、臨床上問題となるものではないと判断された。

＜有害事象＞

試験期間中において、S-PT84 株群で 105 例 116 件、プラセボ群で 85 例 89 件の有害事象が発生した。いずれの事象においても試験食品との因果関係はないと判断され、試験食品と関連のある副作用は認められなかった。

＜安全性評価＞

血液検査及び有害事象の結果から、S-PT84 株を長期間摂取させても臨床上問題ないと判断された。

以上より、S-PT84 株を含有する食品の長期間摂取による安全性に問題ないことが確認された。

Table 1-2-6 Blood hematological and blood biochemical parameters during the study period.

	Baseline			12 weeks		
Blood hematological parameters						
WBC (/μL)						
Placebo	5653.8	±	1384.0	5553.4	±	1530.8
S-PT84	5627.0	±	1292.7	5396.6	±	1355.1 **
RBC (× 10^4/μL)						
Placebo	453.9	±	39.1	455.9	±	37.4
S-PT84	453.5	±	41.2	454.6	±	41.1
Hb (g/dL)						
Placebo	13.49	±	1.46	13.49	±	1.59
S-PT84	13.56	±	1.49	13.61	±	1.55
Ht (%)						
Placebo	43.15	±	3.92	42.56	±	4.08 **
S-PT84	43.29	±	4.00	42.68	±	4.11 **
Plt (× 10^4/μL)						
Placebo	25.58	±	5.19	26.44	±	5.38 **
S-PT84	24.68	±	5.39	25.67	±	6.09 **
Blood biochemical parameters						
AST (U/L)						
Placebo	20.2	±	6.8	20.5	±	6.0
S-PT84	21.0	±	6.2	23.8	±	6.3 **,##
ALT (U/L)						
Placebo	20.0	±	14.5	20.0	±	12.6
S-PT84	20.3	±	10.6	23.0	±	11.4 **,#
γ-GTP (U/L)						
Placebo	27.8	±	25.3	27.1	±	26.1
S-PT84	27.1	±	19.0	26.6	±	20.2
ALP (U/L)						
Placebo	208.6	±	60.8	206.6	±	58.8
S-PT84	203.8	±	61.6	201.2	±	61.5
T-Bil (mg/dL)						
Placebo	0.71	±	0.28	0.68	±	0.29 *
S-PT84	0.72	±	0.27	0.68	±	0.25 **
T-CHO (mg/dL)						
Placebo	214.9	±	35.1	215.3	±	32.6
S-PT84	214.6	±	35.9	212.3	±	34.9
TG (mg/dL)						
Placebo	120.9	±	84.0	117.5	±	76.3
S-PT84	123.7	±	73.7	116.8	±	65.9
BUN (mg/dL)						
Placebo	12.54	±	3.05	12.73	±	3.07
S-PT84	13.08	±	3.14	13.17	±	2.90
CRE (mg/dL)						
Placebo	0.73	±	0.14	0.72	±	0.15
S-PT84	0.75	±	0.15	0.75	±	0.15 #
CPK (U/L)						
Placebo	102.9	±	68.0	112.2	±	74.3 *
S-PT84	113.3	±	95.5	111.6	±	58.9
UA (mg/dL)						
Placebo	4.95	±	1.32	4.95	±	1.31
S-PT84	5.00	±	1.59	4.98	±	1.42

TP (g/dL)						
Placebo	7.33	±	0.43	7.19	±	0.38 **
S-PT84	7.34	±	0.41	7.19	±	0.37 **
Alb (g/dL)						
Placebo	4.46	±	0.25	4.33	±	0.22 **
S-PT84	4.49	±	0.27	4.34	±	0.25 **
Na (mEq/L)						
Placebo	140.7	±	1.7	141.5	±	1.7 **
S-PT84	140.5	±	1.9	141.5	±	1.7 **
K (mEq/L)						
Placebo	4.26	±	0.33	4.22	±	0.33
S-PT84	4.20	±	0.27	4.20	±	0.28
Cl (mEq/L)						
Placebo	104.4	±	1.9	104.4	±	1.8
S-PT84	104.2	±	2.1	104.3	±	1.7

Data are shown as mean ± S.D. (placebo group (n=208), S-PT84-VBM group (n=204)). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ as compared with baseline (before supplementation) by paired Student's *t*-test. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ as compared with placebo group by Student's *t*-test.

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; Plt, platelet; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; T-Bil, total bilirubin; T-CHO, total cholesterol; TG, triglycerides; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; CPK, creatine phosphokinase; UA, uric acid; TP, total protein; Alb, albumin.

■考察

今回の臨床試験の検討結果から、S-PT84 株の死菌体を配合したサプリメントの継続摂取により NK 活性が高まること、また、その作用は長期間（12 週間）維持されることが示された、

臨床試験①の結果から、試験開始前の NK 活性が 40%未満の健常人に対し S-PT84 株を継続摂取させることで、末梢血中の NK 活性が高まることが確認された。また、S-PT84 株の摂取を中止すると、NK 活性が摂取前のレベルまで戻ることを確認した（Table 1-2-2）。Gill らは、高齢者に *L. rhamnosus* HN001 株もしくは *Bifidobacterium lactis* HN019 株を 3 週間継続摂取させることで末梢血中の NK 活性が高まること、また、試験食品の摂取を中止すると NK 活性は元のレベルまで戻ることを報告している [30]。Gill らの報告は、我々の検討結果を支持するものであり、NK 活性を高め、その状態を維持するためには、S-PT84 株の継続摂取が必要であると考えられる。

広瀬らは、我々の用いている *L. pentosus* strain S-PT84 株の近縁種にあたる *L. plantarum* strain L-137 株を用いた臨床試験を行なっており、健常成人に対し 12 週間 L-137 株を継続摂取させた後、ヒト末梢血を用いて評価を行なった結果、Th1/Th2 バランスを Th1 優位に偏向させることを報告している [31]。また、*L. plantarum* CECT 7315 株及び *L. plantarum* CECT 7316 株を高齢者に対し 12 週間継続摂取させることで、制御性 T 細胞（$CD8^+CD25^+$）数や NK 細胞（$CD56^+CD16^+$）数が増加することが報告されている [32]。しかしながら、12 週間の長期摂取により NK 活性が高まるということは示されておらず、我々の知る限りにおいては、*L. plantarum* もしくは *L. pentosus* の乳酸菌株の長期摂取による NK 活性そのものへの影響については、未だ調べられていない。そこで、臨床試験②を計画し、より長期間に摂取させた際の NK 活性への影響を検討した。

臨床試験②では、被験者の選択基準に試験開始前の NK 活性の制限を設けず、より一般的な集団に近いヒトを対象とした試験を行った。更に、摂取期間を 4 週間から 12 週間に変更し、S-PT84 株を長期間継続摂取させたときの NK 活性への影響を検討した。結果、試験食品摂取前後の NK 活性の変化量において、プラセボ群と比較して S-PT84 株の摂取により有意な NK 活性の上昇が認められたことから（Table 1-2-5）、S-PT84 株の長期間摂取により NK 活性が高まることを確認した。今回の検討では、プラセボ群においても摂取前と摂取後で NK 活性の有意な増加が認められているが、これは季節変動によるものであり、本試験を秋から冬にかけて実施したことが影響していると考えられる [33]。以上より、S-PT84 株の死菌体を配合したサプリメントの継続摂取は、NK 活性を高め、その状態を維持するのに有用であると考えられる。

NK 活性が比較的低い中高年者に対し、*L. casei* strain Shirota（LcS）株を摂取させることで、末梢血中の NK 活性が増強されることが報告されており、また、試験食品摂取前後の NK 活性の増加量と摂取開始前の NK 活性の値が逆相関することが示されている [11]。今回の検討においても、試験食品摂取前の NK 活性

の値（1.6%～74.6%）と試験食品摂取前後の NK 活性の増加量が逆相関することが示された（Fig. 1-2-3）。また、プラセボ群と S-PT84 株群の回帰係数の傾きの差の検定を行ったところ、S-PT84 株群の回帰直線の傾きがプラセボ群と比較して統計学的に有意に小さい値を示した（$t = 2.14$, $P = 0.03$）。さらに、S-PT84 株摂取群において、試験に参加した全被験者の試験食品摂取開始前の NK 活性の中央値（21.2%）よりも低いヒトと、中央値よりも高いヒトにおける試験食品摂取前後の NK 活性の増加量を比較したところ、中央値よりも低いヒトの NK 活性増加量は 12.0 ± 1.1%、中央値よりも高いヒトの NK 活性増加量は 3.1 ± 1.2%であり、両群の NK 活性増加量に統計学的に有意な差が認められた（Fig. 1-2-5; $P < 0.001$）。また、同様に、NK 活性の中央値よりも低いヒトの NK 活性の変化量をプラセボ群と S-PT84 株群で比較したところ、プラセボ群における NK 活性増加量は 6.8 ± 0.8%であり、S-PT84 株群の 12.0 ± 1.1%と比較すると、両群の NK 活性増加量に統計学的に有意な差が認められた（Fig. 1-2-4A; $P < 0.001$）。竹田ら[11]と同様に Dong らも、LcS 摂取による NK 活性増強作用は、元々NK 活性の低い被験者の方がより効果的であることを示しているが[34]、今回の我々の結果もこれらの研究報告を支持する結果となった。対照的に、全被験者の試験食品摂取開始前の NK 活性の中央値よりも高いヒトの NK 活性の変化量をプラセボ群と S-PT84 株群で比較したところ、それぞれ、4.0 ± 1.1%、3.1 ± 1.2%であり、両群間の NK 活性増加量に統計学的な有意差は認められなかった（Fig. 1-2-4B）。Fig. 1-2-3 及びこれらの結果をまとめると、S-PT84 株は元々NK 活性が低値のヒトに対して NK 活性を高める作用を示し、正常な NK 活性を維持している健常成人の免疫機能には影響を与えないと考えられ、免疫機能を正常な状態に戻す必要がある場合に作用すると推察される。

NK 活性は、IL-12 により活性化されるが、IL-12 は、マクロファージや樹状細胞のような抗原提示細胞から産生されるサイトカインであることが知られている[35-37]。マクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞は、腸管に存在し粘膜免疫を調節する働きを担っている[38]。小泉らは、S-PT84 株は、樹状細胞に発現している受容体である TLR2 及び TLR4 に認識され IFN-γ及び IL-12 の産生を誘導し、NK 活性を高めることを報告している[9]。また野中らは、腹腔内より単離したマクロファージに S-PT84 株を作用させると IL-12 産生が誘導されることや、マウスを用いた動物実験において S-PT84 株の摂取により NK 活性が高まることを確認している[8]。それゆえ、S-PT84 株の NK 活性増強作用には、生体内に取り込まれた時に最初に作用する組織である腸管に存在する樹状細胞やマクロファージなどの単球からの IL-12 産生の増加が関わっていると推察している。しかしながら、NK 活性増強作用に関わる詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていないため、検討課題としたい。

NK 活性を正常な状態に保つことは健康的な生活を実現するうえで欠かせない要因であるが、現代社会において、我々は、日々の生活の中で NK 活性の低下に影響を与える多くのストレス要因に曝されている。Boscolo らは、職業上のストレスや、安全面が確保されていない状況において血中の NK 活性が弱まること

を報告している[39]。さらに、精神ストレスや喫煙、長時間労働などもNK活性に影響を与える因子であることが知られている[40,41]。これらの状況を鑑みると、NK活性を正常な状態に維持できるよう、生活スタイルを見直すことや、食生活の改善、例えば、サプリメントを用いた対策を取ることが健康的な生活を実現し、ひいては、健康長寿の実現に繋がると考えられる。

S-PT84株を配合したサプリメントの継続摂取は、健常成人においてNK活性を高め、その作用を長期間維持させることが示された。また、その作用は元々NK活性の低いヒトに対して示され、正常なNK活性を維持している健常成人の免疫機能には影響を与えないことが示された。以上より、S-PT84株を配合したサプリメントは健康的な生活を維持するうえで有用な食品であると考えられる。

第 3 項　S-PT84 株の交感神経系を介した免疫調節作用

■緒言

免疫系と神経系は密接に関わっていることが知られている[42]。木村らは、ラットの両手足を 30 分間刺激することにより脾臓の交感神経活動（sympathetic nerve activity; SNA）が亢進し、脾臓 natural killer (NK)活性が低下することを報告している[43]。また、片淵らは交感神経刺激により低下した脾臓 NK 活性が、β-アドレナリン受容体のアンタゴニスト（nadolol）の処置により回復することを示している[12]。食品素材を用いた研究においては、アミノ酸もしくはペプチドの摂取により SNA が抑制され、腫瘍サイズの増加が抑えられることが報告されている[44, 45]。これらの研究報告より、SNA と NK 活性は密接に関わっていること、また、SNA の変化は NK 活性に影響を及ぼすと考えられる。

S-PT84 株の免疫賦活作用には、TLR-2 及び TLR-4 を介したメカニズムが存在することが報告されている[9, 10]ものの、TLR シグナル以外のメカニズムについては未だ明らかにされていない。近年、S-PT84 株の培養上清が褐色脂肪組織の SNA や胃の迷走神経に影響を与えることが報告されており[46]、S-PT84 株そのものも SNA に対して作用を示すことが期待される。

そこで、S-PT84 株の免疫賦活作用に関わる新たなメカニズムを明らかにする目的で、S-PT84 株が SNA に影響を与えるかどうか、更には、S-PT84 株が SNA に作用し生体内の NK 活性に影響を与えるかについて検討を行うことにした。S-PT84 株は、野中らの先行研究[8]及び、本学位論文の第 1 章　第 1 項に記載の通り、経口摂取により脾臓の NK 活性を高めることが知られている。そこで、S-PT84 株の摂取による脾臓交感神経活動に対する作用及び交感神経活動を介した脾臓 NK 活性への影響を評価することにした。

■研究目的

S-PT84 株摂取による脾臓交感神経活動への影響を評価する。また、S-PT84 株摂取による交感神経活動への作用が NK 活性上昇作用に関わっていることを明らかにする。

■実験方法

1. 実験動物

実験には、日本 SLC より入手した BALB/c マウス、雌性マウス、8 週齢を用いた。動物は、水道水を自由飲水させ、AIN-93M（オリエンタル酵母株式会社より購入）を自由摂取させた。飼育は、一定の温度（25℃±1℃）、湿度管理（60±5%）の下、明期 12 時間、暗期 12 時間のサイクルで飼育した。馴化期間は、試験開始までに 1 週間以上設けた。

2. S-PT84 株加熱死菌体の調製

S-PT84 株は、MRS 培地(Difco Laboratories)を用いて培養した。50%グリセロール溶液にストックしたS-PT84株ストック溶液を10 mlのMRS培地に1%の用量で添加し、30℃にて24時間、前培養した。その後、MRS 培地に同様に添加し、37℃にて 24 時間、本培養した。24 時間後に得られた培養液は、9190 ×*g*、10 分間の条件で遠心し、得られたペレットを滅菌済みの生理食塩水で 2 回、蒸留水で 1 回洗浄した。洗浄後、95℃にて 5 分間加熱し、加熱死菌体を作製した。なお、加熱処理前に、1 ml 当たりの菌数を算出した。菌数の測定は、顕微鏡下にて行った。

3. 脾臓交感神経活動の測定

解剖当日は、脾臓交感神経活動を測定するための外科的処置を施す 3 時間前に給餌器より餌を抜いた。マウスに 1 g/kg のウレタンを腹腔内投与することで、麻酔の処置を行った。麻酔下にて開腹後、十二指腸にカテーテルを留置した。その後、神経活動を測定するために、脾臓の交感神経の遠心枝を銀電極で吊り上げた。S-PT84 株は、生理食塩水に 3×10^8 cells/ml となるよう分散させた。被験物質は、十二指腸に留置したカテーテルから生理食塩水(Control)もしくはS-PT84株分散溶液(S-PT84)を100 μl 投与した。ヒスタミン H_3 受容体の拮抗薬であるチオペラミドマレイン酸塩(Sigma-Aldrich Corp.)は、生理食塩水を用いて 2 mg/ml に調製し、被験物質投与 10 分前に皮下投与(5 ml/kg)した。脾臓交感神経活動の測定は、被験物質投与後から 90 分間行った。交感神経活動の測定は、脾臓交感神経からの電気信号を増幅させ、オシロスコープを用いてモニタリングした。神経活動のデータは、Power-Lab analog-to-digital converter (Power-Lab model 4sp, AD Instruments)を用いて5分間毎の平均値を算出した。投与前の交感神経活動量を 100%とした百分率で算出した。

4. 脾臓NK 活性の測定

マウスに100 μlの生理食塩水(Control)もしくは、S-PT84株を分散させた溶液(3×10^8 cells /ml; S-PT84)を投与し、投与 90 分後の脾臓 NK 活性を測定した。チオペラミドマレイン酸塩は、2 mg/ml に調製し、被験物質投与の 10 分前に、腹腔内に 5 ml/kg の用量にて投与した。被験物質投与 90 分後に、ジエチルエーテル麻酔下にて放血死させ無菌条件下にて脾臓を摘出し、10% FBS(Cambrex)、1% 抗生物質-抗真菌剤混合溶液(Penicillin 10000 units/ml, Streptomycin 10000 μg/ml, Amphotericin B 250 μg/ml, ナカライテスク社製)を混合した RPMI 1640 培地(ナカライテスク社製)を用いて脾細胞を調製した。脾細胞の調製は、セルストレーナー(70 μm, BD Bioscience 社製)をセットした 6 wells plate に RPMI 培地を 5 ml 添加し、セルストレーナー上にて脾臓をすりつぶし、得られた細胞浮遊液を遠心(1500 rpm, 4℃, 5 分)することで、単離した脾細

胞のペレットを作成した。得られたペレットを溶血処理し、NK 活性測定に必要な細胞数となるよう調製した。

脾臓 NK 活性は、実験設備の関係上 ^{51}Cr 遊離法を用いることが出来なかったため、野中らの報告[8]に従って行った。標的細胞(Target 細胞)には Yac-1 細胞を使用した。PBS に 1×10^6 cells/ml となるよう懸濁させ、3, 3'-dioctadecyloxacarbocyamine perchlorate (DIO : Sigma)を 40 μg/ml 添加し、37℃にて 10 分間染色した。DIO にて染色した Yac-1 細胞を PBS にて洗浄し、10% FBS 及び抗生物質ー抗真菌剤混合溶液を 1%添加した RPMI 培地にて 5×10^4 cells/ml となるように懸濁した。懸濁液には 25 μg/ml の propidium iodide (PI: Molecular Probes)を添加し、標的細胞となる Yac-1 細胞を作成した。96 穴プレートに、Yac-1 細胞を 100 μl と 1×10^7、5×10^6 及び 1×10^6 cells/ml に調整した脾細胞(Effector 細胞)100 μl を混合し、プレートを遠心(1500 rpm、4℃、5 分)した後、37℃、5% CO_2 条件下にて 2 時間培養した。Yac-1 細胞の自然死の割合は、脾細胞を添加しないウェルを設定することで測定した。培養後、Dio^+PI^+細胞数の割合をフローサイトメトリー(Epics XL: Beckman Coulter)を用いて測定した。NK 活性は、以下に示す計算式にて算出した。

＜NK 活性計算式＞

NK 活性(%) = ((脾細胞との反応により細胞死を起こした標的細胞数(Dio^+PI^+))/(総標的細胞数(Dio^+PI^- + Dio^+PI^+)) − (自然死を起こした標的細胞数(Dio^+PI^+))/(総標的細胞数(Dio^+PI^- + Dio^+PI^+))) × 100

5. 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics version 23 を用いて行った。

データは、平均値±標準誤差で示した。脾臓交感神経活動量測定開始前の群間における統計解析には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。また、被験物質投与後の測定結果における統計解析には、繰り返しのある二元配置分散分析を用いた。脾臓 NK 活性の測定結果における統計解析には、繰り返しのない二元配置分散分析を用いた。

全ての有意差検定において、*P* 値が 5%未満の場合、統計学的に有意であると判断した。

■結果

＜脾臓交感神経活動の測定＞

脾臓交感神経活動（sympathetic nerve activity; SNA）の変化を Fig. 1-3-1A に示した。測定開始前の脾臓交感神経活動レベルは、control 群で 235.1 ± 55.7 spikes/5s (n=3)、S-PT84 群で 200.1 ± 74.0 spikes/5s (n=3)であり、両群の SNA の値に有意な差は認められなかった。また、測定開始前の交感神経活動量を 100%とした時の活動量の変化を Fig. 1-3-1B に示した。Control 群と比較して、S-PT84 株の投与により、脾臓交感神経活動の緩やかな低下が認められ、両群間に有意な差が認められた。

次に、ヒスタミン H_3 受容体の拮抗薬であるチオペラミドマレイン酸塩（thioperamide）を用いて、S-PT84 株を単独投与した場合とチオペラミドマレイン酸塩を事前に皮下投与したのちに S-PT84 株を投与した場合の交感神経活動量の変化を評価した。測定開始前の脾臓交感神経活動レベルは、S-PT84 株群で 257.7 ± 9.0 spikes/5s (n=3)、S-PT84 株 + thioperamide 群で 245.2 ± 10.1 spikes/5s (n=3)であり、両群の SNA の値に有意な差は認められなかった（Fig. 1-3-1A）。交感神経活動量の変化については、チオペラミドマレイン酸塩の事前投与により、S-PT84 株投与による交感神経活動量低下の阻害が認められ、S-PT84 株群と S-PT84 株 + thioperamide 群の間に有意な差が認められた（Fig. 1-3-1C）。

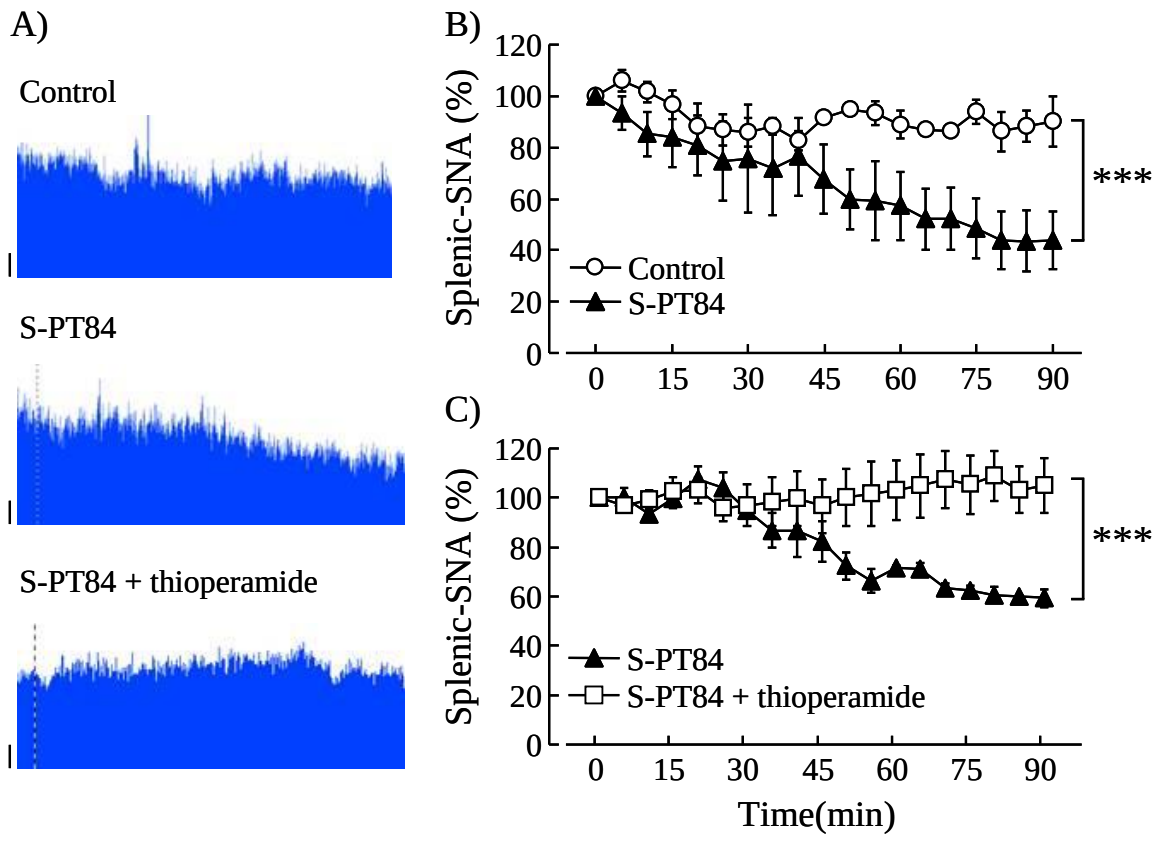


Fig. 1-3-1 Changes in splenic sympathetic nerve activity (SNA) in BALB/c mice.

A) Representative recordings of splenic SNA of mice administered water, S-PT84 or S-PT84/thioperamide. Vertical scale bars to the left of the recordings represent neural discharge rates of 100 spikes/5s. B) Effect of S-PT84 administration on splenic sympathetic nerve activity. C) Effect of thioperamide on the decrease in splenic sympathetic nerve activity by S-PT84. Data (mean±S.E.) are expressed as percentages relative to values at 0 min. Each group consists of 3 mice. Statistically significant differences between control and S-PT84 group and S-PT84 + thioperamide group : *** $P < 0.001$.

＜脾臓 NK 活性の測定＞

脾臓における NK 活性は、脾臓の交感神経活動が有意に低下することが確認された被験物質投与 90 分後に測定した。

S-PT84 株の投与により脾臓 NK 活性は上昇し、脾細胞（Effector 細胞）数と標的細胞（Target 細胞）数の比率（E:T ratio）を変えても同様の変動が認められた。また、この上昇は、統計学的に有意な変動であった。一方で、事前にチオペラミドマレイン酸塩を皮下投与することにより脾臓 NK 活性の上昇が阻害され、Control 群とほぼ同様の推移を示した（Fig. 1-3-2）。

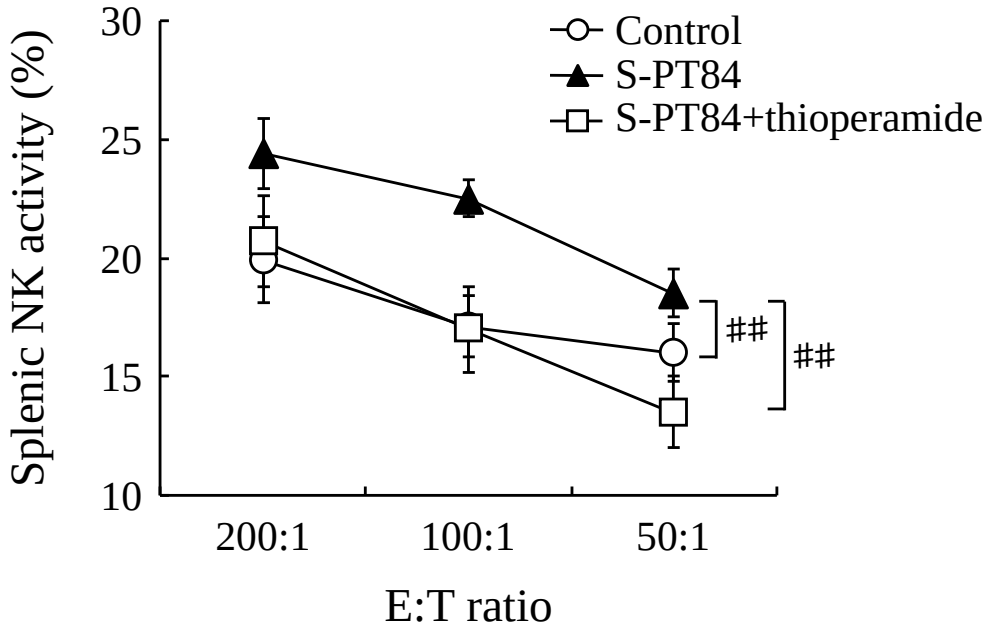


Fig. 1-3-2 Changes in splenic NK activity in BALB/c mice.

Effect of oral administration of S-PT84 and effect of thioperamide on splenic NK activity enhanced by S-PT84 administration. Each group consists of three to six mice. Data are shown as mean ± S.E. (n=6). Statistically significant differences between control and S-PT84 group: $^{\#\#}P < 0.01$, between S-PT84 group and S-PT84+thioperamide group: $^{\#\#}P < 0.01$ (two-way ANOVA).

■考察

脾臓は、神経軸索の 98%が交感神経に支配されている生体内において重要なリンパ器官である[47,48]。

今回の検討結果より、S-PT84 株の死菌体を投与することにより、脾臓の交感神経活動が有意に低下することが示された（Fig. 1-3-1A, 1-3-1B）。Logan らは、脾臓へのノルアドレナリンによる周期的な刺激が、脾臓での NK 細胞における分子時計を調節することを報告しており[49]、脾臓における NK 細胞と脾臓の交感神経活動とに関わりがあることを示している。S-PT84 株の単回投与により脾臓 NK 活性が有意に上昇することを確認したが、この結果は、脾臓における交感神経活動を抑制したことによるものと推察される。

次に、S-PT84 株の投与による脾臓交感神経活動の抑制作用及び脾臓 NK 活性の上昇は、ヒスタミン H_3 受容体の拮抗薬であるチオペラミドマレイン酸塩の処置により消失した（Fig. 1-3-1A, 1-3-1C）。谷田らは、*Lactobacillus johnsonii La 1* もしくはアンセリンの投与により、腎臓における交感神経活動及び血圧が低下すること、またこれらの作用は、チオペラミドマレイン酸塩の処置により消失することを報告している[50, 51]。また、オレキシン-A による白色脂肪組織中の交感神経活動量の減少や尿素による皮下動脈の交感神経活動が減少は、チオペラミドマレイン酸塩の処置により消失することが報告されている[52, 53]。このように、交感神経活動はヒスタミン H_3 受容体により支配されていると考えられる。従って、今回の結果とあわせて考えると、S-PT84 株による脾臓 NK 活性の上昇作用に関わるメカニズムの一つには、ヒスタミン H_3 受容体を介した交感神経活動の抑制作用が関わっていると考えられる。

近年、遠野らは、L-ムラニルジペプチドが腸管の神経活動を調節する可能性があることを報告している[54]。S-PT84 株を含むグラム陽性細菌は、細胞壁成分の一つにムラニルジペプチドを有していることから、S-PT84 株の細胞壁成分が今回示した S-PT84 株投与による脾臓交感神経活動の抑制に関わっている可能性が推察される。S-PT84 株を構成する成分のうち、交感神経活動に影響を及ぼす成分については、今後の研究課題としたい。

第 2 章

Lactobacillus pentosus strain S-PT84 株摂取による
インフルエンザワクチンアジュバント効果

■緒言

幼児や高齢者はインフルエンザウィルスに対する感染率が高く、また、感染後の死亡率が高いことが報告されている[55]。彼らはインフルエンザ感染による合併症として肺炎を引き起こすリスクが高いため、予防的処置としてワクチンを接種することが推奨されている。

WHO は、インフルエンザに感染した際の治療的処置として、タミフル（中外製薬株式会社）やリレンザ（グラクソスミスクライン株式会社）の使用を勧めている。これらの薬剤は、ウィルスの細胞膜表面に存在するノイラミニダーゼを阻害する薬剤であり、季節性のインフルエンザウィルスに対し有用であることから、世界的に広く用いられている。一方で、Shinahara 等は、これらのノイラミニダーゼ阻害剤の投薬により、インフルエンザウィルスの複製が阻害された結果、血中及び鼻腔中における抗原特異的な生体反応が低下し、インフルエンザウィルスに対する特異的 IgG 及び IgA 抗体産生の低下が起こることを報告している[56]。また、少量のウィルス抗原に対し十分な抗体産生を誘導することが出来なくなり、翌年のインフルエンザウィルスに対する再感染リスクが高まることも報告している[56]。

乳酸菌摂取によるインフルエンザ感染予防に関しては、例えば、新生児から幼児期のマウスに対し *Lactobacillus casei* strain Shirota 生菌体を経口投与させることで、IL-12 産生を誘導し、NK 活性を高めることによりインフルエンザ感染後の生存率が改善すること[57]、また、*Lactobacillus plantrum* L-137[58]及び *Lactobacillus pentosus* strain b240[59]については、血中におけるⅠ型インターフェロン（IFN-β）産生や肺胞洗浄液及び血中のインフルエンザウィルス特異的抗体（IgA 及び IgG）の産生を高めることでインフルエンザ感染後の生存率を改善することが知られている。乳酸菌摂取によるワクチン接種後の抗体産生増強作用については、ノトバイオート化した豚の新生児において *Lactobaciollus acidophilus* がロタウィルス特異的な抗体産生を高めること[60]や、ヒトにおいて、*Lactobacillus* GG を摂取することで弱毒化した H3N2 型の生インフルエンザワクチン接種後のインフルエンザウィルス特異的な抗体産生を高めることが報告されている[61]。また、*Lactobacillus casei* DN-114001 を含有する発酵乳を健康的な高齢者に摂取させることで、インフルエンザワクチンに対する特異的な抗体産生が高まることが確認されている[62]。

これまで我々は、S-PT84 株の経鼻投与により肺中のⅠ型インターフェロン（IFN-α）及び IL-12 産生が増強されること、また、肺の NK 活性を高めることでインフルエンザウィルスに対する感染を予防することを報告している[15]。さらに、S-PT84 株を継続的に経口摂取させることで、インフルエンザウィルスに対する感染予防効果を示すことを明らかにした[63]。これらの結果から、S-PT84 株の摂取により Th1 型免疫の活性化や、IFN-α産生量の増加及び NK 活性の増強作用によりインフルエンザウィルスに対して感染防御を示すと考えられるが、ウィルス感染に対する生体防御反応の一つである抗体産生に対する作用は明らかにされていない。

そこで、本研究では、S-PT84 株摂取によるインフルエンザウィルスに対する抗体産生増強作用を検討することにした。前述の通り、薬剤使用により少量のインフルエンザウィルスに対する特異的抗体の産生能が低下することが知られていることからも、初期段階のインフルエンザウィルス感染に対する防御反応を高める方策が求められている。また、薬剤の使用による影響がない状況においても、少量のインフルエンザウィルス抗原に対し、インフルエンザウィルス特異的抗体の産生を誘導させることができれば、感染初期における生体防御機能を高めることになりウィルス感染に対する予防に繋がると考えられる。今回の試験では、インフルエンザウィルス抗原として 2009 年に世界的にインフルエンザが大流行(パンデミック)した際に日本国内で用いていたインフルエンザワクチンを用いて、継続的な S-PT84 株の経口摂取がインフルエンザウィルス抗原に対する特異的抗体産生増強作用(ワクチンアジュバント効果)を示すか検討することとした。

■研究目的

S-PT84 株を継続摂取させた動物に対し、少量のインフルエンザウィルス抗原を感作させた際に誘導されるインフルエンザウィルス特異的抗体産生増強作用を明らかにする。

■実験方法

1. 実験動物

実験には、日本 SLC より入手した BALB/c マウス、雌性、試験開始時 8 週齢の動物を用いた。飼育期間中は、水道水を自由飲水させ、AIN-93M(オリエンタル酵母株式会社より購入)を自由摂取させた。飼育は、一定の温度、湿度管理の下、明期 12 時間、暗期 12 時間のサイクルで飼育した。馴化期間は、試験開始までに 1 週間設けた。

2. S-PT84 株加熱死菌体の調製

S-PT84 株は、MRS 培地(Difco Laboratories)を用いて培養した。50%グリセロール溶液にストックした S-PT84 株を 10 ml の MRS 培地に 1%の割合で接種し、30℃にて 24 時間、前培養した。その後、MRS 培地に同様に接種し、37℃にて 24 時間、本培養した。24 時間後に、得られた培養液を 9190 ×*g*、10 分間の条件で遠心し、得られたペレットを滅菌された生理食塩水で 2 回、蒸留水で 1 回洗浄した。洗浄後、95℃にて 5 分間加熱し、加熱死菌体を作製した。菌数の測定は、加熱処理前に顕微鏡下にて行い、1 ml 当たりの菌数を算出した。

3. 試験プロトコル

＜実験 1：インフルエンザ HA ワクチン接種量の検討＞

順化期間終了後、動物に AIN-93M 飼料（オリエンタル酵母株式会社）を 6 週間摂取させた。インフルエンザワクチンは、飼育開始 1 週間目に皮下に接種させ、その 3 週間後（飼育開始 28 日目）に 2 回目の皮下投与を行った。用いたインフルエンザワクチンの濃度は、2.5 ng HA、5.0 ng HA、10.0 ng HA、15.0 ng HA とし、各濃度に対し 5 匹の動物を飼育した。飼育開始 6 週後に麻酔下にて解剖を行い、血液を回収した。血液は、4℃、2500 rpm、10 分の条件にて遠心を行った後に上清を回収し、血清サンプルとした。

＜実験 2：S-PT84 株によるインフルエンザワクチンアジュバント効果の検討＞

順化期間終了後、動物に AIN-93M 飼料（オリエンタル酵母株式会社）もしくは、S-PT84 株を 0.186%（w/w）配合（マウス 1 匹、1 日当たり 3.0×10^9 cells（30 億個）摂取相当）させた AIN-93M 飼料のいずれかを 6 週間摂取させた。両群とも、15 匹ずつの動物を飼育した。インフルエンザワクチンは、飼育開始 1 週間目に皮下に接種させ、その 3 週間後（飼育開始 28 日目）に 2 回目の皮下投与を行った。用いたインフルエンザワクチンの濃度は 2.5 ng HA とした。飼育開始 6 週後に麻酔下にて解剖を行い、血液を回収した。血液は、4℃、2500 rpm、10 分の条件にて遠心を行った後に上清を回収し、血清サンプルとした。鼻腔洗浄液には、咽頭部より 1 ml の生理食塩水を注入し、鼻孔より回収した溶液を 2000 ×*g* の条件にて遠心し、細胞残屑を取り除いたものを用いた。

4. インフルエンザワクチン

インフルエンザ HA ワクチンは、A/California/7/2009（H1N1）株（0.636 μg protein/0.341 HA/mL）（デンカ生研株式会社）を使用した。

5. インフルエンザウィルス特異的抗体の測定

血中のインフルエンザ特異的抗体は、ELISA 法 [64]を用いて測定した。PBS に BSA（0.1 μg/well）及び HA ワクチンを溶解させた溶液で 96 well plate（Nunc, Naperville, IL）を一晩、4℃の条件下にてコーティングした。翌日、HA ワクチンをコーティングした 96 well plate を 0.14 M NaCl、0.05% Tween 20 を含む 50 mM Tris-HCl（pH 8.0）（TTS）に 1% BSA を混合させた溶液で、室温条件下にて 1 時間ブロッキングした。血清は、1% BSA を含む TTS 溶液にて希釈を行い、各 well に添加し、3 時間反応させた。反応後、1% BSA を含む TTS 溶液にて各 well を 6 回洗浄し、Horseradish peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA)を混合したヤギ抗マウス IgG 抗体を室温にて 2 時間反応させた。反応後、TMB substration (Bethyl Laboratories)溶液を用いて発色させ、450 nm の波長を用いて吸光度を測定した。

6. 抗体価の算出方法

回収した血清サンプルを 1% BSA を含む TTS 溶液を用いて段階的に希釈（100 倍希釈から 2 倍公比）し、各々の吸光度を 450 nm の波長（OD450）を用いて測定した。ワクチン接種を行っていない陰性対照のサンプルの吸光度と比較し、陰性対照の吸光度よりも高い吸光度を示した希釈倍率のうち最も高い希釈倍率を、その血清の抗体価（Antibody Titer）とした。

7. 統計解析

群間の有意差検定には Student *t*-test を用いた。*P* 値が 5%未満の場合、統計学的に有意であると判断した。

■結果

＜インフルエンザ HA ワクチン接種量の検討＞

S-PT84 株によるワクチンアジュバント効果を評価するにあたり、最適なインフルエンザワクチン接種量の検討を行った。検討に用いた試験プロトコルは Fig. 2-1 に示した。

血清中のインフルエンザ HA 特異的 IgG 抗体量は、ワクチン接種量に応じて用量依存的に増加した（Fig. 2-2）。また、最も低い用量である 2.5 ng の抗原量においても、弱いながらもインフルエンザ HA 特異的 IgG 抗体産生の誘導が認められた。

S-PT84 株によるワクチンアジュバント効果を検討するにあたり、HA 特異的抗体産生の誘導が僅かに認められる抗原量を用いるのが適していると考え、ワクチン接種量を 2.5 ng とすることにした。

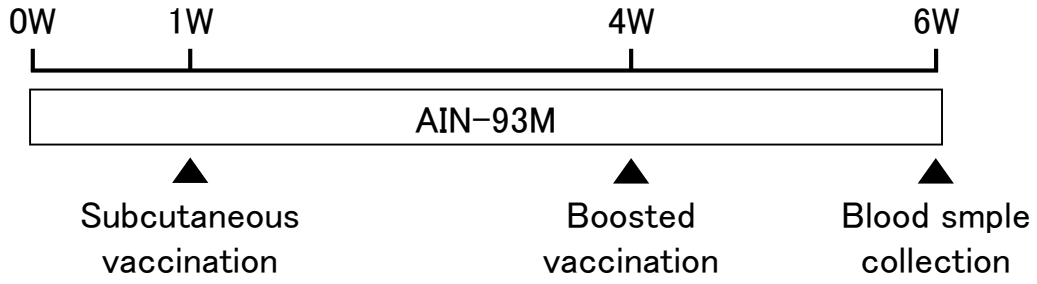


Fig. 2-1 Experimental procedure of vaccination dose of A/California/7/2009(H1N1) virus

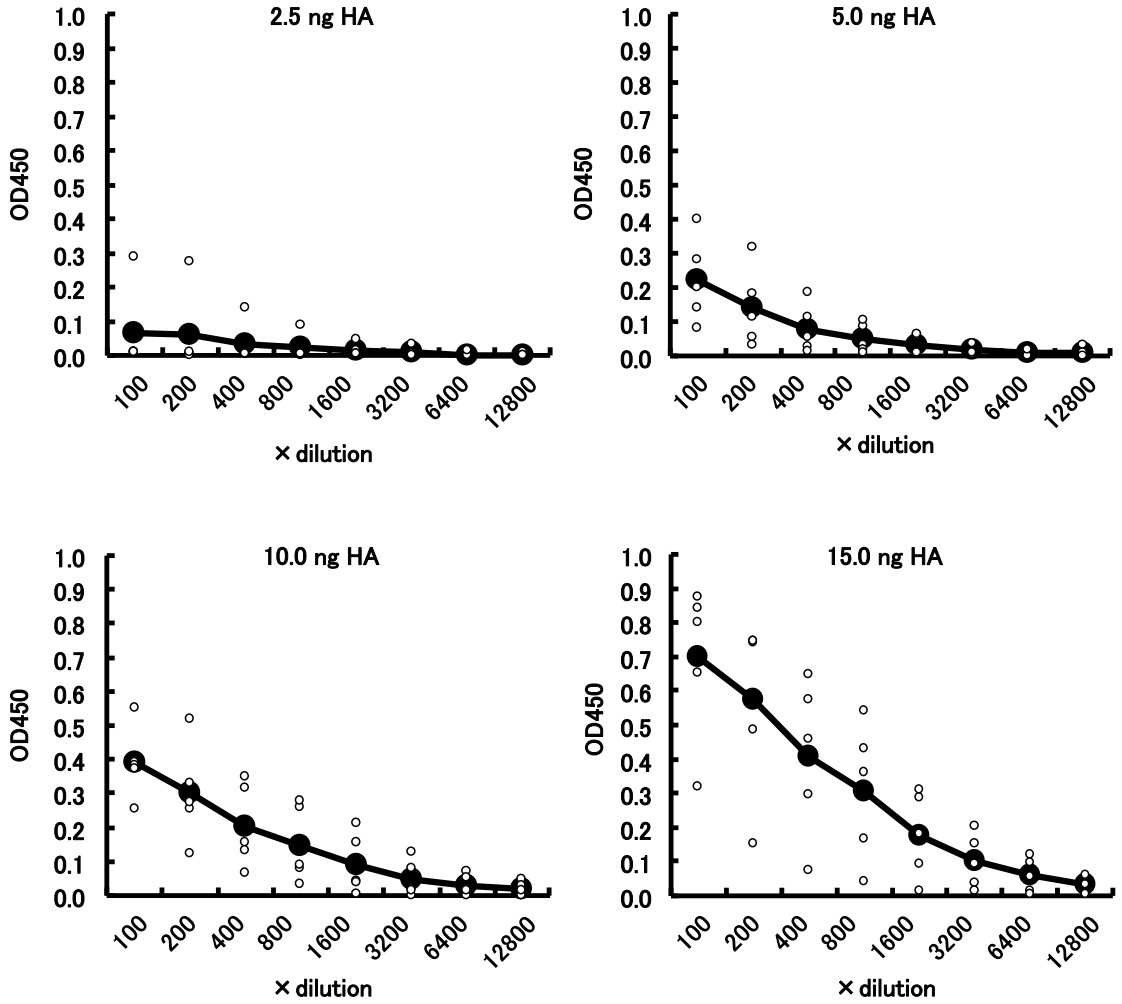


Fig. 2-2 The amount of HA-specific IgG production by vaccination.

Mice were fed an AIN-93M diet and given subcutaneous vaccination at doses between 2.5 and 15.0 ng HA and boosted on day 28 from the initial vaccination. Two weeks after the last vaccination, plasma was collected from each mouse, and the amount of HA-specific IgG antibody was measured by ELISA, as described in Materials and Methods. Values are means of 5 mice in each group. Open circles are individual data, closed circles are mean values.

＜S-PT84 株によるインフルエンザワクチンアジュバント効果の検討＞

S-PT84 株によるインフルエンザワクチンアジュバント効果の検討に関する試験プロトコルを Fig. 2-3 に示した。

S-PT84 株を配合していない飼料（AIN-93M）を摂取させた群を Control 群とし、S-PT84 株を 0.186%（w/w）配合した飼料（AIN-93M with 0.186% S-PT84；マウス 1 匹、1 日当たり 3.0×10^9 cells（30 億個）摂取相当）を摂取させた群を S-PT84 株群とした。

各群に対し、2.5 ng の抗原を皮下に摂取させ血清中の HA 特異的 IgG 抗体産生量を測定した結果、Control 群においては HA 特異的 IgG 抗体産生の誘導が僅かに認められた。一方で、S-PT84 株を摂取させることにより、Control 群と比較して血清中の HA 特異的 IgG 抗体産生量の有意な増加が認められた（Fig. 2-4A）。また、両群における血清中の IgG 産生量に対する抗体価を評価したところ、Control 群と比較して S-PT84 株群において有意な増加が確認された（Fig. 2-4B）。

一方、鼻洗浄液中の HA 特異的 IgG 抗体産生量を測定した結果、Control 群及び S-PT84 株群の両群で抗体産生の誘導は認められなかった（Fig. 2-5）。

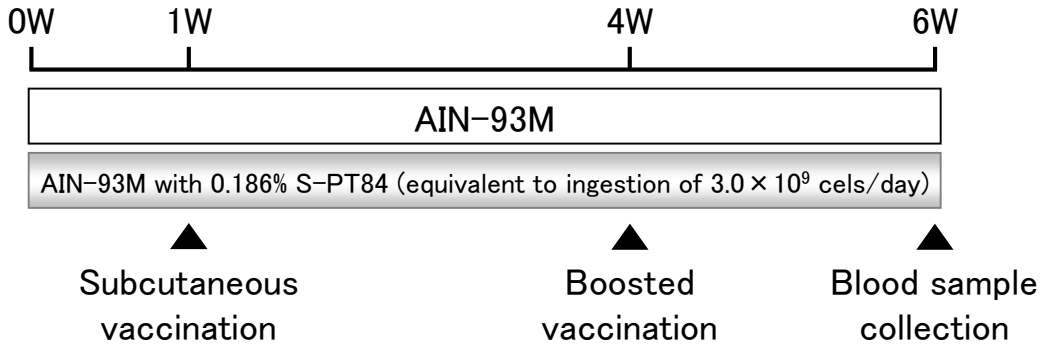
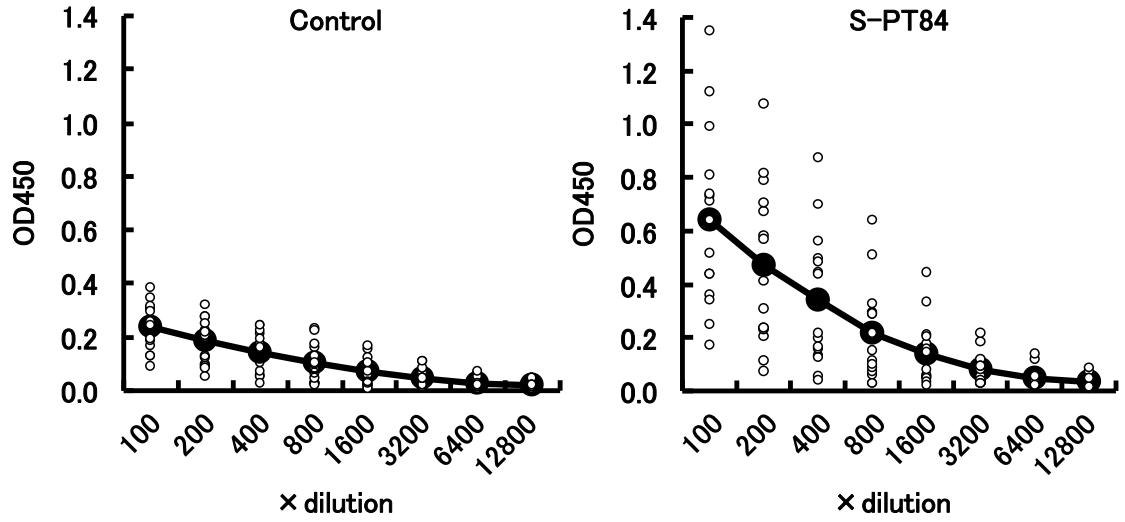


Fig. 2-3 Experimental protocol of effect of S-PT84 on the production of HA-specific IgG in plasma.

A)



B)

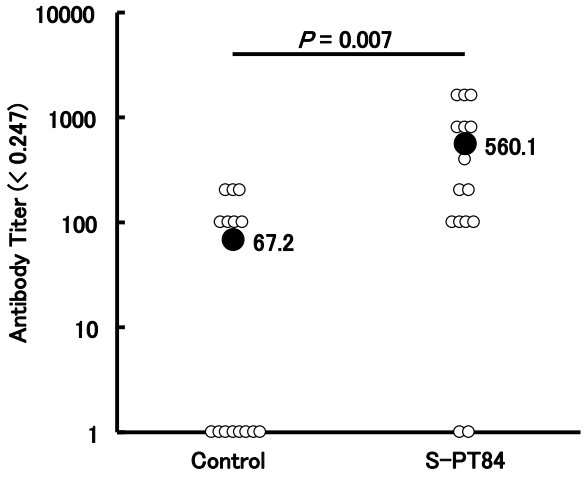


Fig. 2-4 Effect of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 on HA-specific IgG production in plasma by vaccination.

Mice were fed an AIN-93M diet with or without 0.186% S-PT84 (equivalent to ingestion of 3.0×10^9 cells/day) for 6 weeks followed by subcutaneous vaccination of 2.5 ng HA and boosted on day 28 from the initial vaccination. Two weeks after the last vaccination, plasma was collected from each mouse, and the amount of HA-specific IgG Antibody (Ab) (A) was measured by ELISA and expressed as the titer (B), as described in Materials and Methods. Values are means of 15 mice in each group. Significant differences are seen between the control group and the S-PT84 group. Open circles are individual data, closed circles are mean values.

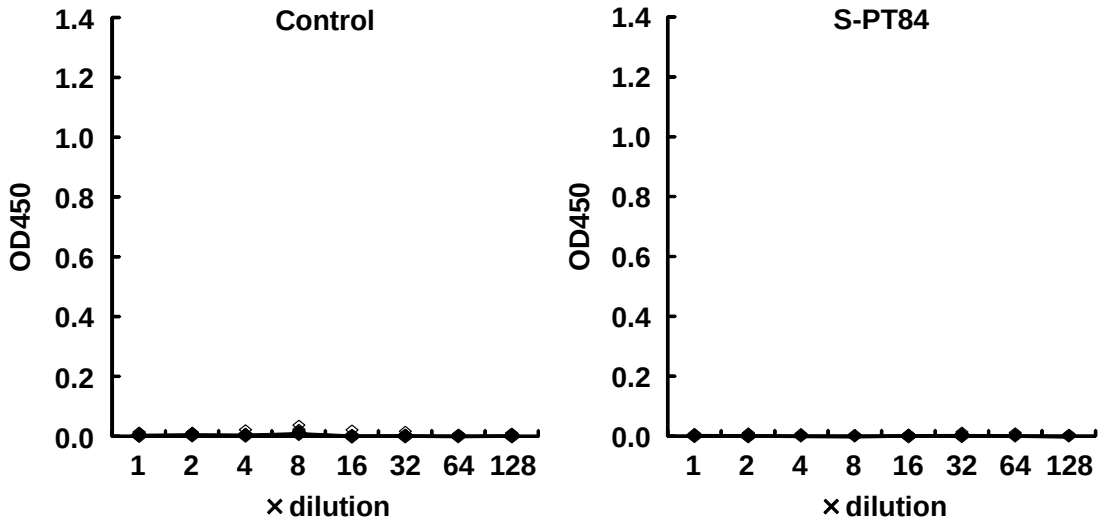


Fig. 2-5 Effect of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 on HA-specific IgG production in nasal wash by vaccination.

Mice were fed an AIN-93M diet with or without 0.186% S-PT84 (equivalent to ingestion of 3.0×10^9 cells/day) for 6 weeks followed by subcutaneous vaccination of 2.5 ng HA and boosted on day 28 from the initial vaccination. Two weeks after the last vaccination, nasal wash was collected from each mouse, and the amount of HA-specific IgG Antibody (Ab) was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Values are means of 15 mice in each group. Open squares are individual data, closed squares are mean values.

■考察

本試験結果より、S-PT84 株を経口摂取させることにより、単独では十分な抗体誘導が認められない少量のインフルエンザワクチンを皮下に接種させた後の、血清中における HA 特異的 IgG 産生を高めることが確認された。一方で、鼻腔中における HA 特異的 IgA 産生は認められなかった。これらの結果は、S-PT84 株の摂取により、低用量のインフルエンザワクチン接種による HA 特異的な血中抗体産生誘導を高めることを示している。

野中らは、S-PT84 株が腹腔内より単離したマクロファージからの IL-12 産生を高めること、また、マウスを用いた実験において脾臓での NK 活性を高めることを報告している[8]。小泉らは、S-PT84 株は TLR-2 及び TLR-4 を介して樹状細胞からの IFN-γ及び IL-12 産生を誘導し、脾臓における NK 活性を高めることを報告している[9]。また、出雲らは、S-PT84 株の摂取により、*Salmonella typhimurium* 感染マウスにおけるサルモネラ特異的 IgA 産生の誘導を高めることを報告している[16]。これらの報告から、今回の検討により示された S-PT84 株の経口摂取によるワクチンアジュバント効果に関するメカニズムの一つには、S-PT84 株が樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞を活性化させ、インフルエンザワクチン接種後の血清中 HA 特異的 IgG 抗体の産生を高めている可能性が推察される。

一方で、筋中もしくは皮下へのインフルエンザワクチン接種は、全身性の免疫機能を介して主に、血清中における IgG 抗体産生を高めることが知られているが、気道粘膜における IgA 抗体産生に対しては増強作用を示さないことが知られている[65]。この報告は、S-PT84 株の経口摂取により血中での HA 特異的 IgG 抗体産生を高めたが、鼻腔における HA 特異的 IgA 産生を誘導しなかった結果（Fig. 2-5）と一致する。

Hui-Tsu らは、今回の実験に用いたインフルエンザワクチンと同一の株(A/California/7/2009(H1N1))を用いて 10 ng のインフルエンザワクチンのみをマウスに接種させた結果、血清中の HA 特異的 IgG 抗体量が増加し、インフルエンザウィルス感染後の生存率を改善させることを報告している[66]。今回の検討結果より、S-PT84 株は少量のインフルエンザウィルス抗原に対する抗体産生量を増加させることを示したが、Hui-Tsu らの報告における血中 HA 特異的 IgG 抗体産生の増加量と今回の試験結果がほぼ一致していることから、S-PT84 株の経口摂取によるインフルエンザワクチンアジュバント作用は、インフルエンザウィルスに対する防御作用を示すのに十分な作用を示していると推察される。

今回、少量のインフルエンザウィルス抗原に対し HA 特異的 IgG 抗体産生を高めた（Fig. 2-4A）ことから、S-PT84 株を継続的に摂取することは、タミフルやリレンザといったノイラミニダーゼ阻害薬を服用した後のインフルエンザウィルスに対する再感染リスクに対しても、有用であると考えられる。今後、S-PT84 株を継続摂取させた後に低用量のインフルエンザワクチンを接種させ、その後のインフルエンザウィルスに対する感染予防効果を示すかということや、タミフルやリレンザといったノイラミニダーゼ阻害剤を摂取させた

後にインフルエンザウィルスを感染させた際、十分な HA 特異的 IgG 抗体を誘導されるかなどについて検討する必要があると考えている。

第 3 章

Lactobacillus pentosus strain S-PT84 株摂取による
カンジダ感染予防効果

■緒言

カンジダ菌は、ヒトの細菌叢を構成する細菌の一つであり、皮膚や泌尿器、胃腸などの消化管に存在し日和見病原体の一つであることが知られている[67]。また、健常成人の口腔内から単離されることが知られており[68, 69]、加齢とともに口腔内にカンジダ菌を保有するヒトが増えることが報告されている[70]。一方で、免疫抑制剤や抗生物質の仕様により、カンジダの過剰な生育が促され、カンジダ症を引き起こすことが報告されている[71]。また、臨床における症例報告として、胃潰瘍や潰瘍性結腸炎の患者からカンジダ菌が単離されること[72, 73]、消化不良（dyspeptic disease）の症状には、カンジダ菌とピロリ菌の感染が関係していることが報告されている[74]。これらの報告から、消化管におけるカンジダ感染を予防することは、健康的な生活を送るうえで重要であると考えられる。

各組織に存在するカンジダは、その組織において他の細菌と相互作用を示すことが知られている。その中でも、*Streptococcus salivarius* K12 株や *Enterococcus faecalis* strain EF2001 株は、カンジダ菌の菌糸形成を阻害することや、マウスを用いた検討において、口腔内のカンジダ生菌数を減少させ、口腔内カンジダ感染を予防することが報告されている[75, 76]。また、羽山らの先行研究により、S-PT84 株も同様にカンジダ菌の菌糸形成を阻害することや、口腔内カンジダ感染モデルマウスにおいて口腔内におけるカンジダ感染予防効果を示すことや S-PT84 株の投与量依存的にカンジダの生菌数が減少することが確認されている[19]。

近年、*N*-acetylglucosamine（GluNAc）を用いた消化管カンジダ感染モデルマウスに関する報告がされており、胃粘膜においてカンジダ菌体の塊が白苔状の塊を形成することや、カンジダ感染による白苔形成率により胃症状を評価できることが示されている[77]。また、組織学的評価においては、胃粘膜へのカンジダ菌体の浸潤や胃粘膜の肥厚が確認されている[77]。S-PT84 株は、カンジダ菌に対し菌糸形成阻害作用を示すことから、口腔内におけるカンジダ感染予防だけでなく、消化管におけるカンジダ感染に対しても効果を示す可能性が考えられる。

そこで、本モデルマウスを用いて、S-PT84 株摂取による上部消化管におけるカンジダ感染予防効果を検討することとした。

■研究目的

上部消化管での傷害及び組織の炎症が認められることが報告されている消化管カンジダ感染モデルマウスを用いて、S-PT84 株摂取による胃傷害に対する改善作用及び胃での炎症抑制作用を確認する。また、病原性を示さない酵母形のカンジダ菌と、病原性を示す菌糸形のカンジダ菌を用いて、S-PT84 株のカンジダ菌に対する作用を明らかにする。更に、S-PT84 株のカンジダ菌の菌糸形成に対する阻害作用を他の

乳酸菌基準株と比較検討し、その作用強度を確認する。

■実験方法

1. 乳酸菌の調製

S-PT84 株は、MRS 培地（Difco Laboratories）を用いて培養した。50%グリセロール溶液にストックしたS-PT84 株を解凍後、10 ml の MRS 培地に 1%の割合で接種し、30℃にて 24 時間、前培養した。前培養終了後、MRS 培地に同様に接種し、37℃にて 24 時間、本培養した。培養後、遠心分離を行い、90℃、30 分間の加熱処理を行ったものを凍結乾燥し、加熱死菌体を作製した。

対照菌株として、理化学研究所バイオリソースセンターの保有する乳酸菌基準株（JCM1558^{T}: *Lactobacillus petosus* type strain, JCM1131^{T}: *Lactobacillus gasseri* type strain, JCM1134^{T}: *Lactobacillus casei* type strain）を用いた。JCM1558^{T}は、50%グリセロール溶液にストックしていた溶液を解凍後、10 ml の MRS 培地に 1%の割合で接種し、30℃にて 24 時間、前培養した。その他の菌株については、50%グリセロールストックを解凍後、同様に MRS 培地に接種し、37℃にて 24 時間、前培養した。その後、MRS 培地に S-PT84 株と同様に接種し、37℃にて 24 時間、本培養した。本培養後、遠心分離を行い、生理食塩水にて 2 回、蒸留水にて 1 回洗菌後、95℃にて 5 分間加熱処理を行ったものを凍結乾燥し、加熱死菌体を作製した。

各菌株の菌数測定は、加熱処理前に顕微鏡下にて行い、1 ml 当たりの菌数を算出した。

2. カンジダ菌の調製

カンジダ菌株は、カンジダ症を患っている患者の血液より単離した菌株であり、帝京大学医真菌研究センターにてストックされている *Candida albicans* TIMM1768 株を用いた。-80℃の条件下にて 0.5%酵母エキス（Becton Dickinson）及び 10%（v/v）グリセロール溶液を含むサブローデキストロース培地（Becton Dickinson）にて凍結保存しているストックを融解させ、使用前にサブローデキストロース寒天培地に塗布し、37℃、18 時間培養した。培養後、スパチュラにて菌体を回収し、2.5%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地（20 mM HEPES buffer (pH7.2), 2 mM Urea, 10 mg/ml D-glucose, 60 μg/ml benzyl penicillin potassium, 60 μg/ml kanamycin sulfate を含有）を滅菌水で 3 倍希釈した培地に分散させた。

3. 実験動物

実験には、日本チャールズリバーより入手した Crl:CD1(ICR)マウス、雌性、試験開始時 6 週齢の動物を用いた。飼育期間中は、水道水を自由飲水させ、ラボ MR ストック（日本農産工業株式会社より購入）を自由摂取させた。飼育は、一定の温度、湿度管理の下、明期 12 時間、暗期 12 時間のサイクルで飼育した。馴化期

間は、試験開始までに 1 週間設けた。

4. Cristal Violet 染色法

菌糸形成発育をクリスタルバイオレット染色法にて評価した。前述の基礎培地に 5×10^3 cells/ml の濃度となるようカンジダ菌を分散させ、96 well 平底プレートに 200 μl ずつ播種した。また、各種乳酸菌を終菌数が $0.7\sim11\times10^9$ cells/ml となるよう添加し、37℃にて 20 時間培養した。培養後、培養液を除去し、70%エタノールで固定後、0.1%クリスタルバイオレット溶液で 20 分間染色した。余分な色素を洗浄後、乾燥させた各ウェルに 0.04 M HCl を含むイソプロピルアルコール 150 μl 及び 0.25% SDS 水溶液 50 μl を加えて 2 分間撹拌し、カンジダ菌体からクリスタルバイオレットを抽出した。抽出した色素量を分光光度計（620 nm）にて測定した。

5. FUN-1 染色法

S-PT84 株が直接的にカンジダ菌に作用しカンジダ菌の生存に影響するか検討するため、2 色の蛍光プローブを用いた FUN-1 染色（FUN1; F-7030; Molecular Probes, Eugene, OR, USA）による評価を行った。生存しているカンジダ菌では、細胞質内に取り込まれた FUN-1 が細胞内の代謝活性により液胞中に集められ、pH 変化により緑色から赤色に変化する。一方、生存していないカンジダ菌では拡散と吸着により緑色の FUN-1 が細胞全体に広がり赤色の蛍光は観察されないことから、カンジダの生死を FUN-1 染色により確認した。

0.1% Poly-L-lysine コーティングされたカバーガラス上に、前述の RPMI1640 基礎培地に分散したカンジダ菌を 2×10^6 cells 播種し、1 時間の前培養を行ったのちに、S-PT84 株と共に 27℃もしくは 37℃にて 3 時間、5% CO_2 インキュベータにて培養した。培養後、GH 溶液（2% Glucose、10mM HEPES buffer、pH7.2）にて洗浄し、20 μM FUN-1（F-7030; Molecular Probe 社）を含有した GH 溶液に置換させ、30 分間、室温にて培養した。培養後、蛍光顕微鏡にて観察し、細胞の生死を確認した。

6. 消化管カンジダ感染モデルマウスの作成及び乳酸菌の投与方法

Fig. 3-1 に消化管カンジダ感染モデルマウスの作成方法及び乳酸菌の投与タイミングを記した。本モデルでは、病原性を示す菌糸形のカンジダ菌へ形態変化を促すことが知られている GluNAc を用いて、消化管における重篤なカンジダ感染状態を作成した。

Candida albicans TIMM1768 株感染の 48 時間前からテトラサイクリン（4.2 mg/ml; 住化エンバイロメンタルサイエンス株式会社）と GlcNAc 50 mM を添加した飲料水で飼育を開始した。*Candida albicans* TIMM1768 株

胃内感染の 22-24 時間前には、免疫抑制剤のプレドニゾロン（100 mg/kg; 共立製薬株式会社）を皮下注射し、感染症に対するマウスの免疫力を抑えることによってカンジダ菌に対して易感染状態にした。感染当日の早朝より、絶食を開始し、絶食開始 3 時間後に、胃内へ直接、マウス用経口投与ゾンデを用いて 2×10^8 CFU/0.2 ml RPMI1640 のカンジダ菌分散溶液を注入した。90 分間、安静な状態で飼育し、その後、クロルプロマジン（14.4 mg/kg）を筋肉注射して、全身状態を鎮静化することで消化液の流れを抑え、TIMM1768 株の消化管内への定着を促した。

感染 3 時間後に、滅菌済み生理食塩水にて 30 mg/ml の濃度に調製した S-PT84 株及び *L gasseri* JCM1131^T 株加熱死菌体分散溶液を 1 匹当たり 200 μl ずつ胃内投与した。対照群には、滅菌済み生理食塩水のみを投与した。マウスをカンジダ菌接種 2 日後、頚椎脱臼によって屠殺した後に胃を採取し、内容物を滅菌済み生理的食塩水で洗浄した。その後、肉眼による白苔の程度をスコア化し、感染症状を評価した。胃を計量後、半分に切り分けた組織を 4%パラホルムアルデヒドにて固定化し、組織解析用に保存した。また、残り半分について計量後に 3 ml の滅菌済み生理食塩水にてホモジナイズし、20 倍、100 倍と段階希釈した。段階希釈後、GS 寒天培地（カンジダ菌選択培地；栄研化学株式会社）に塗布し、37℃、20 時間培養後、組織重量当たりの菌数を CFU 値（Colony Forming Unit）として求め、マウス 1 匹あたりのカンジダ生菌数を算出した。各実験群とも n=6 で行った。

（上記のマウスを対象とした動物実験に関しては帝京大学実験動物倫理委員会の定める方法に準拠して実施し、計画書に関しては委員会の審査にて許可を得た。）

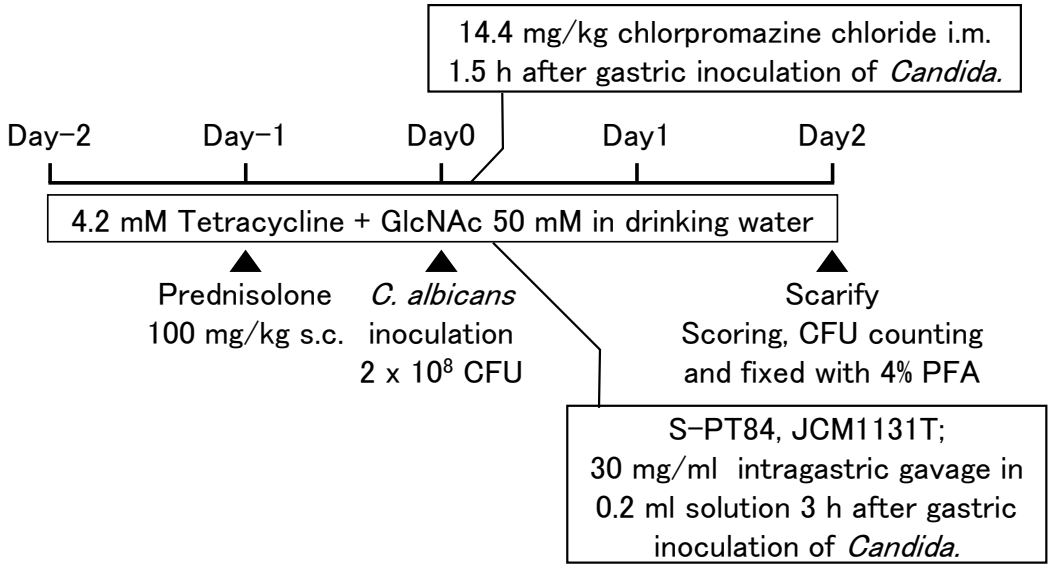


Fig. 3-1 Experimental procedure of *Candida* infection and administration of lactobacilli.

7. 胃におけるカンジダ感染状態のスコア基準

カンジダ感染後に起こる胃傷害の重症度合いをカンジダの白苔形成率からスコア化し、写真撮影を行った。なお、スコア評価は各個体の識別がつかないよう、ブラインドにて行った。

スコア	状態
0	全体的にカンジダ感染が認められない。
1	カンジダ感染による白苔のもととなるパッチが胃の内部表面積全体の約 20%以下に見られる。
2	カンジダ感染による白苔のもととなるパッチが胃の内部表面積全体の約 21～50%以下に見られる。
3	カンジダ感染による白苔のもととなるパッチが胃の内部表面積全体の約 51～90%以下に見られる。
4	カンジダ感染による白苔のもととなるパッチが胃の内部表面積全体の約 91%以上に見られる。
5	カンジダ感染による白苔のもととなるパッチが胃の内部表面積全体の約 91%以上に見られ、それらが厚みを持った塊として観察される。

8. 組織学的解析

組織学的評価に用いた標本は、4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて組織を固定した。固定後、縦方向に厚さが 8 μm となるような組織切片を作成し、スライドガラスに貼り付けた。その後、キシレンを用いて脱パラフィン処理をし、エタノールを用いて段階的に再水和させた。カンジダ菌の存在は、PAS 染色を行い確認した。その後、HE 染色を行い、組織状態を観察した。

抗好中球抗体の染色は、以下のように行った。前述と同様に、厚さが 3-5 μm となるよう組織切片を作成しスライドガラスに貼り付け、キシレン及びエタノールを用いて脱パラフィン処理と再水和を行った。その後、脱イオン水及び Tris-buffer saline（TBS, pH7.6）を用いて洗浄し、0.1 M クエン酸緩衝液（pH 7.2）を用いてオートクレーブ（120℃, 10 分間）にて賦活化させた。賦活化後、TBS にて 3 回洗浄し、1%過酸化水素含有メタノールに浸漬した。浸漬後、TBS にて 3 回洗浄し、アビジン溶液（Biotin Blocking System, catalog no. X0590; Agilent Technologies）を 10 分間処理させ、TBS にて 3 回洗浄した。その後、ビオチン溶液を 10 分間処理し、TBS にて 3 回洗浄し、スキムミルクを用いてブロッキングを行い、一次抗体（Rabbit Anti-Neutrophil Elastase Polyclonal Antibody（1:100; catalog no. bs-6982R; Bioss Inc., Woburn, MA, USA））を 4℃にて 1 時間反応させた。

一次抗体の反応が完了後、TBS にて 3 回洗浄し、室温にて二次抗体（Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins, biotinylated; catalog no. E0432; Agilent Technologies）を反応させた。TBS にて 3 回洗浄行った後、ABC Peroxidese staining kit（Ultra-Sensitive ABC Peroxidase staining Kits; catalog no. 32050; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて ABC 試薬を 30 分間、室温にて処理した。反応後、TBS にて 3 回洗浄し、酵素基質（DAB substrat kit; catalog no. 34065; Thermo Fisher Scientific）と 3 分間反応させ、脱イオン水で反応を停止させた。最後に、マイヤーヘマトキシリン溶液で染色し、水洗後、エタノール脱水、キシレン透徹を行った。

9. Evans Blue の静脈内投与による胃部血管透過性評価

本評価は、前述の消化管カンジダ感染モデルマウスを用いて行った。血管透過性の評価は、Evans blue を尾静脈から投与することで行った。*Candida albicans* TIMM1768 株感染 48 時間後に、生理食塩水で希釈した 0.5% Evans blue（10 ml/kg）を静脈投与し、20 分後に頸椎脱臼にて屠殺した。屠殺後、胃を採取し、内容物を滅菌済み生理的食塩水で洗浄し、凍結保存させた。凍結保存した胃を Polytron（PTI200）にて粉砕し、2 ml のアセトンを添加、10 分間ボルテックスした後、3500 rpm にて 20 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清をアセトンにて 4 倍希釈し、600 nm の波長にて吸光度を測定した。

10. 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics version 23 を用いて行った。

非感染群と感染群とグループ間比較における有意差検定には、対応のない t 検定（Unpaired Student's *t*-test）を使用し、その他の群間における有意差検定には、対応のない t 検定（Unpaired Student's *t*-test）もしくは Tukey's test を用いた。Evans Blue の透過量と胃症状との相関解析には、ピアソンの相関係数を算出した。

全ての有意差検定において、*P* 値が 5%未満の場合、統計学的に有意であると判断した。

■結果

＜S-PT84 株の *Candida* 菌糸形成阻害作用に対する他菌株との比較検討（Cristal Violet 染色法）＞

Fig. 3-2 に菌糸形成阻害作用の結果を記す。

今回用いた全ての乳酸菌（S-PT84 株、*L. pentosus* JCM1558^T、*L. gasseri* JCM1131^T、*L. casei* JCM1134^T）において、用量依存的に *C. albicans* TIMM1768 株に対する菌糸形成阻害作用が認められた。

S-PT84 株は、今回比較した 4 種の乳酸菌の中で最も強い菌糸形成阻害作用を示した。一方、*L. gasseri* JCM1131^T 株は、4 種の乳酸菌の中で最も弱い菌糸形成阻害作用を示した。

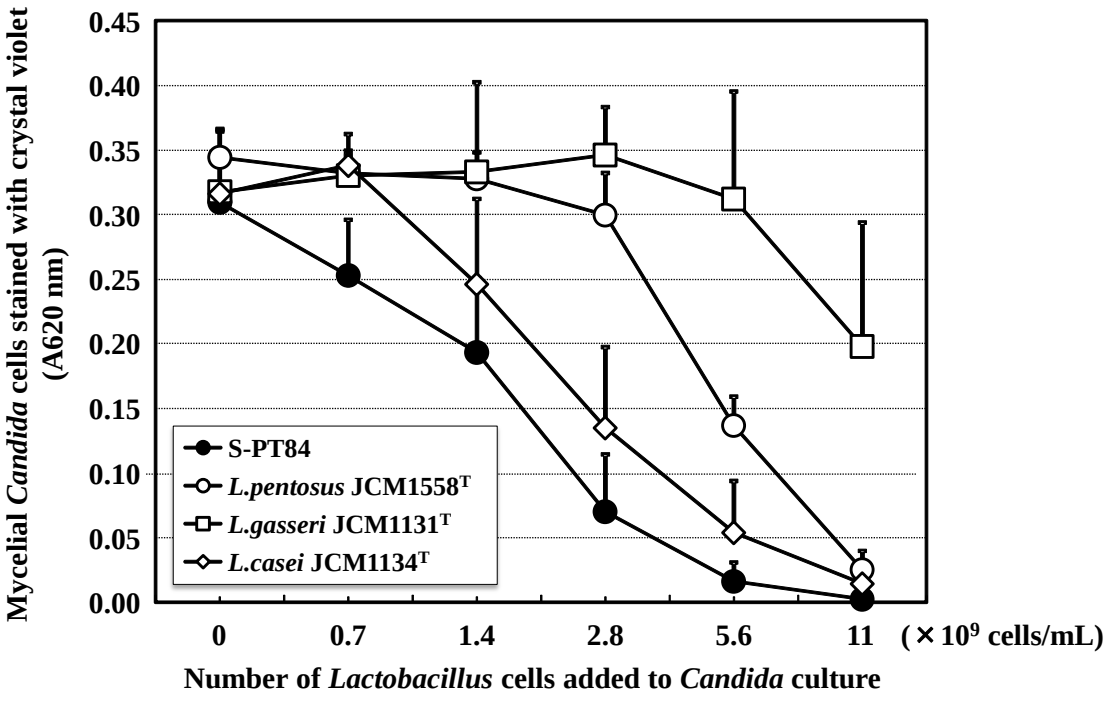


Fig. 3-2 Inhibitory effect of *lactobacilli* on mycelial growth of *C. albicans* strain TIM1768.

C. albicans was cultured with different doses of S-PT84, *L. pentosus* JCM1558^T (*Lactobacillus pentosus* type strain), *L. gasseri* JCM1131^T (*Lactobacillus gasseri* type strain) and *L. casei* JCM1134^T (*Lactobacillus casei* type strain) for 20 h at 37°C in a 5% CO_2 environment. *C. albicans* cells were stained with crystal violet. The optical absorbance at 620 nm was detected. Data are shown as means ± S.D. (n=3-8).

＜S-PT84 株による *C. albicans* TIMM1768 株の代謝活性に対する作用検討（FUN-1 染色法）＞

C. albicans TIMM1768 株の酵母形及び菌糸形に対する S-PT84 株の作用を検討するために、FUN-1 染色によるカンジダ菌の生死を判別した。

FUN-1 染色により、生細胞では細胞質内に取り込まれた FUN-1 が細胞内の代謝活性により液胞中に集められ、pH 変化により緑色から赤色に変化する。一方、死細胞では拡散と吸着により緑色の FUN-1 が細胞全体に広がり、赤色の蛍光は観察されない。

Fig. 3-3 に、37℃と 27℃で培養した結果を載せた。Fig. 3-3A, 3-3C, 3-3E は 37℃で培養した際の画像を、Fig. 3-3B, 3-3D, 3-3F は 27℃で培養した際の画像を示している。37℃培養では、カンジダ菌は病原性を示す菌糸形となり、27℃培養では病原性を示さない酵母形となることが知られている。S-PT84 株は、それぞれに対し、0, 2.8, 11 × 10^8 cells/ml の濃度となるよう添加した。

カンジダの周辺に付着している緑色の桿状をした画像が S-PT84 株である。S-PT84 株は、菌糸形及び酵母形のカンジダに対して付着している状態が観察された。菌糸形のカンジダにおいては、酵母形のカンジダと比較して赤色の蛍光が減少していることから、S-PT84 株と共培養させたことにより代謝活性を失い死滅している様子が確認された。それに対し、酵母形のカンジダでは、作用させた S-PT84 株の用量に関わらず赤色の蛍光が観察されたことから、S-PT84 株と共培養させても代謝活性を保持していることが確認された。

＜菌糸形のカンジダ菌＞　　＜酵母形のカンジダ菌＞

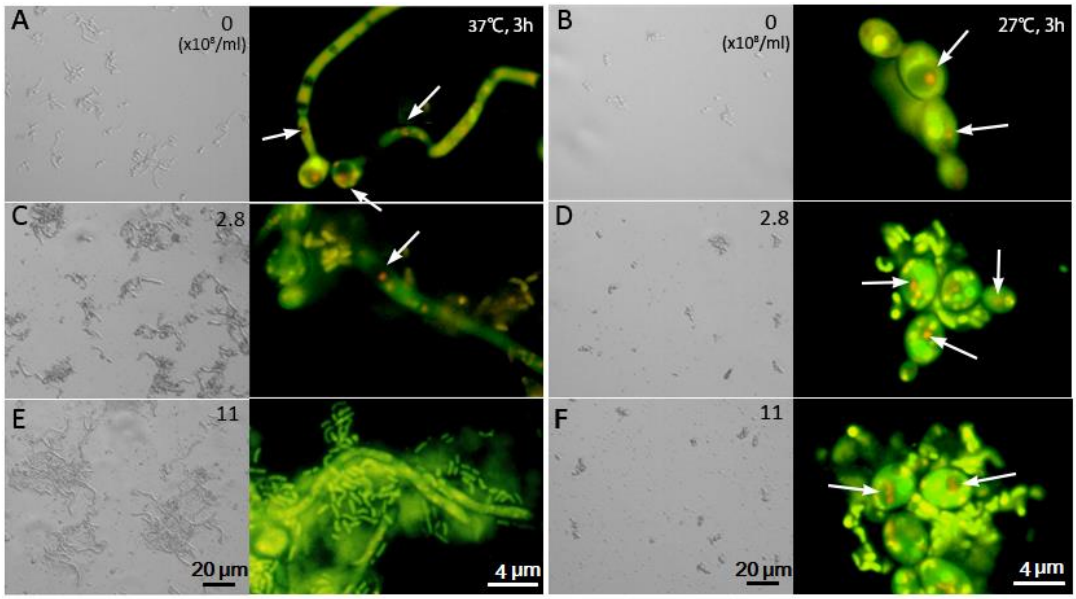


Fig. 3-3 Representative images of vital staining of *C. albicans* by FUN1.

C. albicans was cultured with or without S-PT84 at 27 °C or 37 °C for 3 h and stained with FUN1. A; Hyphal forms of *C. albicans* cultured without S-PT84. C, E; Hyphal forms of *C. albicans* cultured with S-PT84 (2.8 x 10^8 or 11 x 10^8 cells/ml). B; Yeast forms of *C. albicans* cultured without S-PT84. D, F; Yeast forms of *C. albicans* cultured with S-PT84 (2.8 x 10^8 or 11 x 10^8 cells/ml). White arrows indicate the accumulated red crystals of FUN1. Scale bars are as indicated.

＜S-PT84 株摂取による胃の重症度スコア改善作用＞

カンジダ感染後の胃傷害に対する S-PT84 株投与の効果を評価した。また、Fig. 3-2 の結果から、最も弱い菌糸形成阻害作用を示した *L. gasseri* 1131^{T}株を選択し、本菌株と S-PT84 株の胃症状の改善作用を比較した。

Fig. 3-4A に、カンジダ感染後に起こる胃の重症度をスコア化した結果を示す。乳酸菌を投与していない Control 群と比較して、S-PT84 株の投与により、カンジダ感染による胃の重症度スコアが有意に改善した。この結果は、胃の症状が改善したことを示している。また、比較対照とした *L. gasseri* 1131^{T}株についても、その投与により Control 群と比較して有意に胃の重症度スコアを改善した。次に、S-PT84 株と *L. gasseri* 1131^{T}株の胃症状改善作用を比較した結果、S-PT84 株の方が *L. gasseri* 1131^{T}株よりも強い胃症状改善作用を示した。しかしながら、解剖時における胃内のカンジダ生菌数については、各群で有意な差は認められなかった（Fig. 3-4B）。

Fig. 3-5 は、解剖時に摘出した胃の粘膜側を撮影した写真である。白い矢印は、カンジダ感染による白苔のプラーク形成を示している。Normal 群（Fig. 3-5A）と比較して、Control 群（Fig. 3-5B）では広範囲に及んで白苔のプラークが形成されていることが分かる。一方、S-PT84 株（Fig. 3-5C）及び *L. gasseri* 1131^{T}株（Fig. 3-5D）の投与により、Control 群と比較して明らかに、形成されたプラークの数が減少していることが示された。

＜S-PT84 株摂取による血管透過性改善作用＞

Fig. 3-5 の Normal 群と Control 群の写真を比較したところ、白苔プラークが形成されている周辺は粘膜が肥厚している様子が確認された。これは、カンジダ感染による浮腫が起きた結果と考えられる。そこで、エバンスブルーを尾静脈から投与し、血管からの色素透過性を評価した。

エバンスブルー静脈内投与により、Normal 群では濃い青色に染まる部分が限定的（Fig. 3-6A）であったのに対し、Control 群では胃が全体的に濃い青色に染色された（Fig. 3-6B）。また、Control 群と比較して S-PT84 株の投与群では、エバンスブルー投与後の胃の青色染色が抑えられていた（Fig. 3-6C）。

次に、エバンスブルーの透過量を測定した結果を Fig. 3-7A に記す。Normal 群と比較して、Control 群ではエバンスブルーの透過量が有意に増加していた。一方、S-PT84 株の投与により、Control 群と比較してエバンスブルーの透過量が低下していた。Fig. 3-7B は、横軸（x）に胃の重症度スコアを、縦軸（y）にエバンスブルーの透過量をプロットした図である。透過したエバンスブルーの量は、胃の重症度スコアと正の相関を示した（$y = 0.0671x + 0.0662$； $r = 0.815$, $P = 0.014$）。

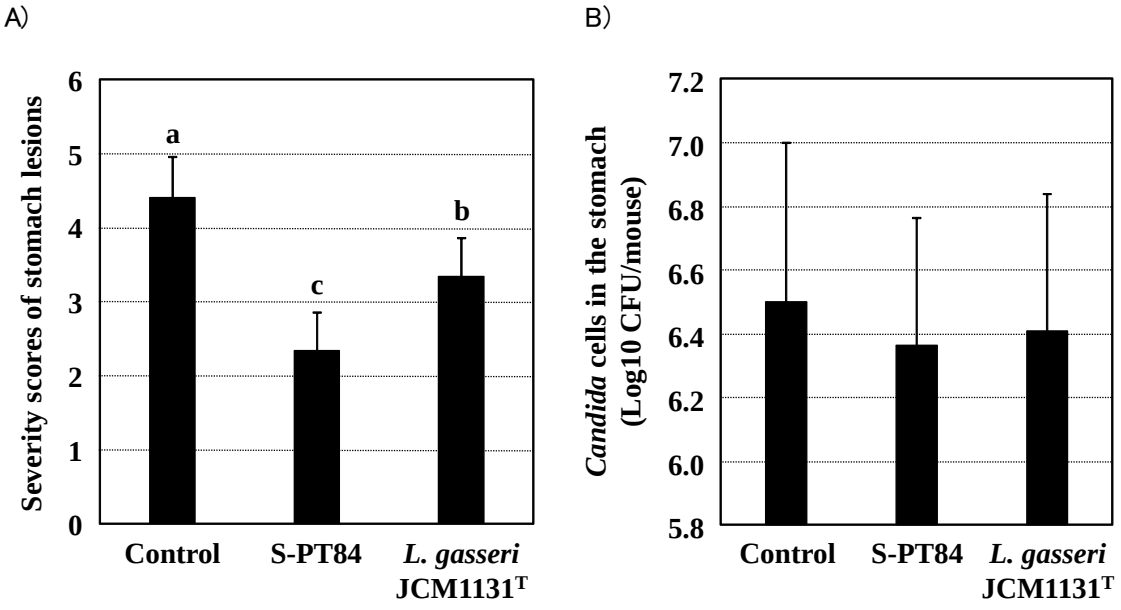


Fig. 3-4 Effect of S-PT84 and JCM1131^{T} on the severity score and the viable cell number of *C. albicans* strain TIMM1768.

Mice were allocated to three groups: control group (infected; n=5), S-PT84 group (infected+S-PT84; n=6), and *L. gasseri* JCM1131^{T} group (infected+*L. gasseri* JCM1131^{T}; n=6). S-PT84 and *L. gasseri* JCM1131^{T} were administered as described in Methods. Animals were sacrificed and their stomachs were removed at 48 h after *Candida* infection, as described in Methods. Severity scores of stomach lesions (indicative of the degree of formation of patchy whitish plaques; A) and densities of *C. albicans* viable cell in homogenized stomachs (B) were determined as described in Methods. Data are presented as mean ± S.D. (n=5 or 6). Labeled means without a common letter are significantly different by Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

Fig. 3-5 Representative inner surface images of stomachs 48 h after infection with *C. albicans* strain TIMM1768. (A) Normal group (non-infected), (B) Control group (infected), (C) S-PT84 group (infected+S-PT84), (D) *L. gasseri* JCM1131^{T} group (infected+*L. gasseri* JCM1131^{T}). Images are representative for each semi-quantitative score. White arrows indicate the presence of patchy whitish plaques.

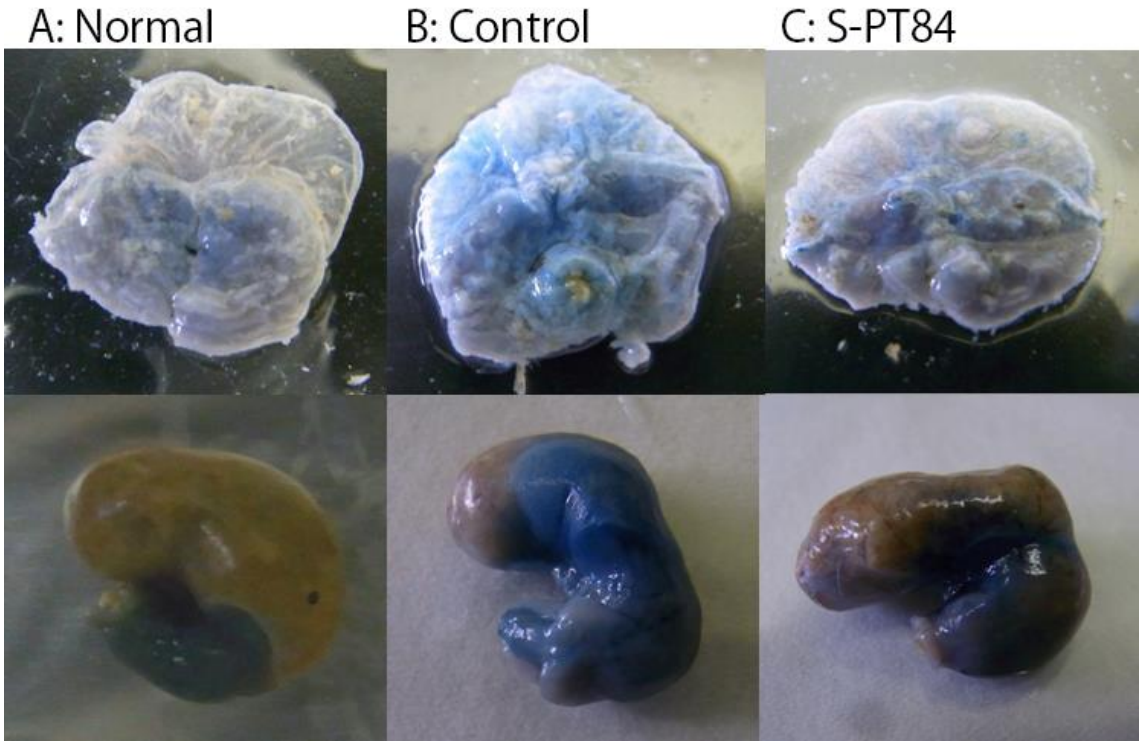
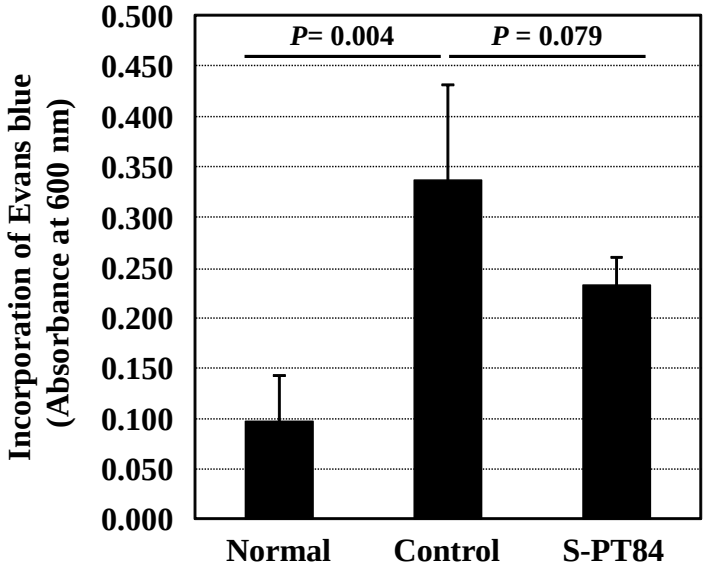


Fig. 3-6 Typical images of vascular permeability assessment by tail vein injection of Evans blue.

(A) Normal group (non-infected), (B) Control group (infected), (C) S-PT84 group (infected+S-PT84). Stomachs were recovered 20 minutes after tail vein injection of Evans blue. The stomachs were cut open along the longitudinal axis (upper figures). Lower figures indicate the whole stomachs.

A)



B)

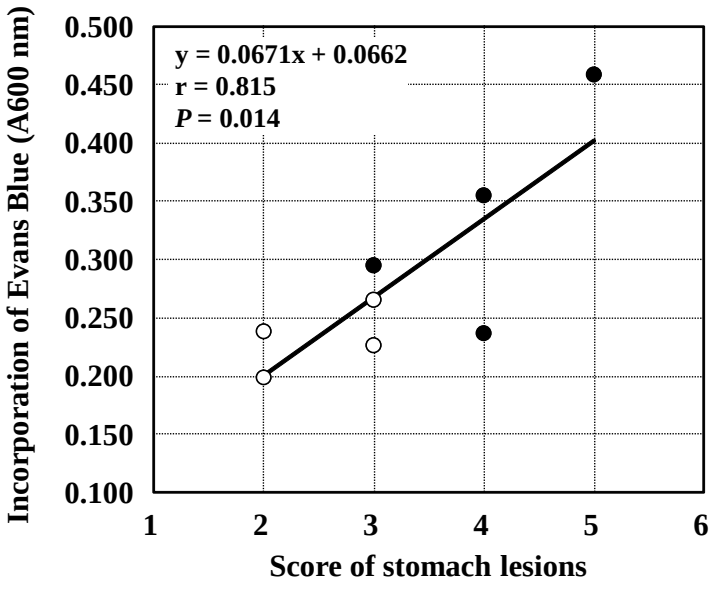


Fig. 3-7 Accumulation of Evans blue in the stomach following tail vein injection and the relationship between the incorporation of evans blue and score of stomach lesion.

(A) Pigment accumulation was assessed as described in Methods. The optical absorbance at 600 nm was detected. Data are presented as mean ± S.D. (n=4). Significant differences were determined using unpaired Student's *t*-test. (B) The correlation was determined by Pearson's correlation coefficient test. Closed circles are control group (infected), open circles are S-PT84 group (infected+S-PT84).

＜S-PT84 株摂取による炎症状態改善作用＞

Fig. 3-8 に、解剖時に摘出した胃の組織学的な評価結果を示す。白い矢印の先端は PAS 染色により染色された *C. albicans* TIMM1768 株を示しており、白い矢印は組織内に浸潤した好中球を示している。

カンジダに未感染の Normal 群では、粘膜上皮に PAS 染色されたカンジダ菌体は観察されなかった（Fig. 3-8A1, 3-8A2）。また、炎症状態や粘膜層への好中球の浸潤も確認されなかった。一方、カンジダを感染させた Control 群では、粘膜上皮に多数のカンジダ菌が存在しており（Fig. 3-8B1, 3-8B2）、粘膜の下層部分には、好中球の浸潤が確認された（Fig. 3-8B3, 3-8B4）。S-PT84 株の投与群では、Normal 群と比較して、粘膜上皮に存在するカンジダ菌数が明らかに低下していること（Fig. 3-8C1, 3-8C2）、また、粘膜層に浸潤する好中球数が減少している様子が確認された（Fig. 3-8C3, 3-8C4）。

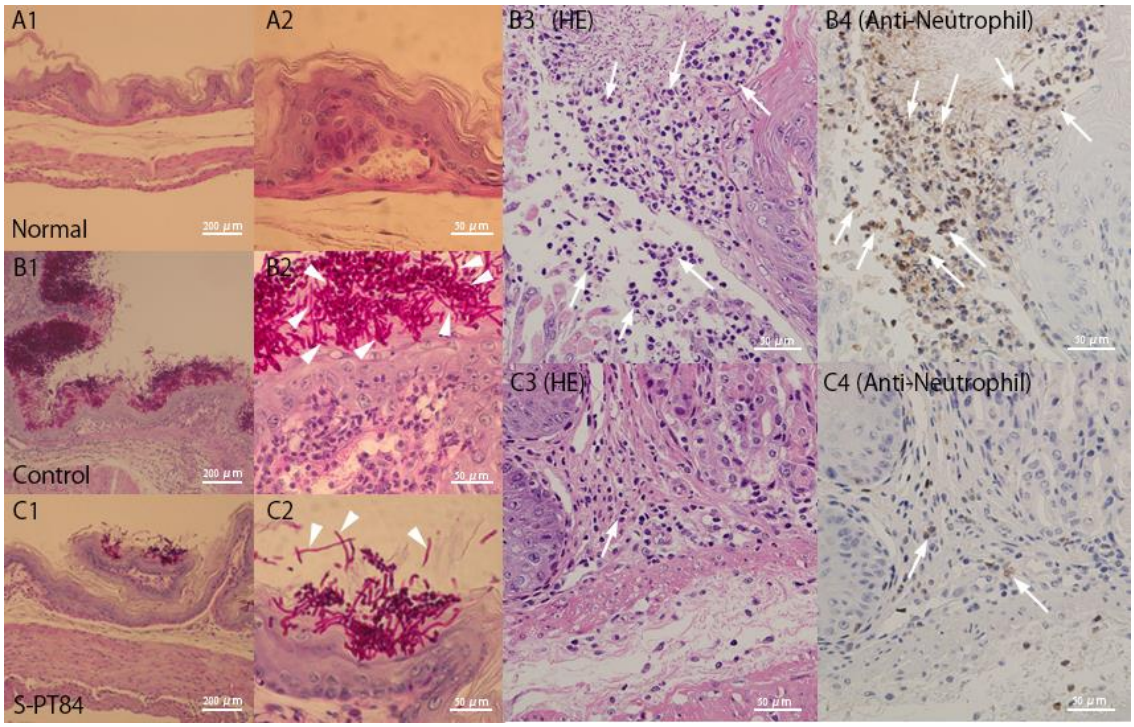


Fig. 3-8 Histology of cross-section of formalin-fixed-paraffin-embedded (FFPE) tissues of stomachs infected with *C. albicans* strain TIMM1768.

Mice were allocated to three groups: (A) Normal group (non-infected), (B) Control group (infected), (C) S-PT84 group (infected+S-PT84). To detect fungal cells, sections were stained using the Periodic Acid-Schiff (PAS) reaction and counter-stained with hematoxylin-eosin (HE). To detect neutrophil infiltration, sections were stained with anti-neutrophil antibody and counter-stained with hematoxylin. Arrowheads indicate PAS-stained *C. albicans* of mycelial form. Arrows indicate infiltrating neutrophils.

■考察

今回の検討結果より、S-PT84 株は病原性を示す菌糸形のカンジダ菌及び病原性を示さない酵母形のカンジダ菌の両方に結合することが示され、菌糸形のカンジダ菌選択的に不活性化させることを確認した。また、菌糸形成阻害作用については、今回、比較検討を行った乳酸菌基準株の中で最も強い作用を示した。更に、消化管カンジダ感染モデルマウスを用いた検討において、S-PT84 株の投与によりカンジダ感染による胃傷害が改善された。組織学的な評価においては、好中球の浸潤が抑えられており、炎症状態が抑制されている様子が確認された。

FUN-1 染色画像の結果から、S-PT84 株は菌糸形成したカンジダを選択的に不活性化させることが示された(Fig. 3-3)。この結果から、S-PT84 株の保有する成分が抗真菌作用を示し、*in vitro* における菌糸形成阻害作用や、*in vivo* におけるカンジダ感染抑制作用を示していると推測される。Nyanzi らの報告によれば、凍結乾燥させた *L. acidophilus* 株のメタノール抽出物から単離した新規の脂肪酸(6-*O*-(α-D-glucopyranosyl)-1, 6-di-*O*-pentadecanoyl-α-D-glucopyranose)が、抗カンジダ活性を示すことを報告している[78]。また、Li らは、*L. pentosus* の近縁種として知られている *L. plantarum* の 1 つである *L. plantarum* R315 の細胞外多糖が、カンジダなどの多くの病原菌に対して抗菌作用を有することを報告している[79]。今回の検討に用いた S-PT84 株は培養後、洗菌を行い加熱処理した死菌体であるため、菌体が生成した代謝物が作用している可能性は低いと考えられる。一方、以前の検討により、S-PT84 株は細胞外多糖を産生する菌株であることを墨汁染色にて確認しており、今回用いた培養条件においても、S-PT84 株は細胞外多糖を産生することを確認している。このことから、*L. plantarum* R315 株の報告のように、S-PT84 株の産生する細胞外多糖がカンジダ菌の生育に影響を及ぼし菌糸形成阻害作用を示した可能性が推察される。

In vivo の検討において、S-PT84 株は、*L. gasseri* 1131^{T}株と比較して、カンジダ感染による胃の傷害を軽減させる作用が強かった(Fig. 3-4A)。この検討では、S-PT84 株と *L. gasseri* 1131^{T}株は投与菌体重量を揃えて投与しており、これを菌数に換算すると、それぞれマウス 1 匹あたり 4.5×10^{9} cells 及び 9.18×10^{9} cells の乳酸菌数を投与していることになる。このことから、S-PT84 株は *L. gasseri* 1131^{T}株と比較して、少ない菌数でより強い作用を示したことになり、*in vivo* での検討結果は、*in vitro* における菌糸形成阻害作用を比較した結果と一致している。一方で、胃内のカンジダ生菌数(CFU 数)については、Control 群と比較して S-PT84 株投与群で有意な低下は認められなかった(Fig. 3-4B)。カンジダのクォーラムセンシングを誘導する物質として知られている Farnesol を用いた先行研究によれば、口腔内カンジダ感染モデルマウスにおいて Farnesol の用量依存的に、舌表面でのカンジダの菌糸形成を阻害することや、舌の重症度スコアを改善することが報告されている[80]。しかしながら、舌におけるカンジダ生菌数の評価を行った結果、Farnesol

投与によるカンジダ生菌数の減少は認められていない。Farnesol は、カンジダが酵母形から病原性を示す菌糸形に形態変換するのを阻害する物質であることから、先行研究での舌におけるカンジダ生菌数は主に酵母形のカンジダの菌数を評価した結果と考えられる。また、我々の研究結果と同様に、石島らはカンジダ感染による胃での傷害が GlcNAc を処理することにより増悪するものの、胃でのカンジダ生菌数には GlcNAc 処置群と未処置の間で差が認められないことを報告している[77]。これらの報告から、CFU 値を用いたカンジダ菌数の測定方法は、病原性を示さない酵母形のカンジダ菌数を定量するのに適した方法であると考えられる。Fig. 3-3 の結果が示すように、S-PT84 株は酵母形のカンジダには作用せず病原性を示す菌糸形のカンジダを選択的に不活性化させることから、CFU 値を用いた胃内におけるカンジダの生菌数評価では S-PT84 株の効果が確認出来なかったと考えられる。従って、病原性を示す菌糸形のカンジダ菌数を含め定量的に評価するには、別の方法を用いる必要があると考えられる。一方、組織病理学的な評価結果では、S-PT84 株を投与することにより PAS 染色されたカンジダの菌数が減少していることを確認した（Fig. 3-8B1 及び 3-8C1）ことから、恐らく、Control 群と比較して S-PT84 株投与によりカンジダの総菌数は減少していると推察される。

組織病理学的な評価結果から、カンジダ感染により菌糸形のカンジダが粘膜層から固有層にかけて広がっており、粘膜下の組織に好中球が浸潤している様子が確認された（Fig. 3-8B3 及び 3-8B4）。対照的に、S-PT84 株の投与により粘膜組織に接着しているカンジダの菌数が減少している様子（Fig. 3-8C1 及び 3-8C2）や、組織中に浸潤している好中球数が減少している様子が確認された（Fig. 3-8C3 及び 3-8C4）。これらの結果から推察するに、好中球の浸潤抑制は接着しているカンジダの菌数が減少していることによると考えられる。更に、カンジダ感染により胃での炎症状態が誘発されたことによるエバンスブルーの透過性亢進が認められたが、S-PT84 株の投与により、透過性が抑制される傾向が認められており、この結果は炎症状態が改善されていることを示唆している。（Fig. 3-7A）。これまで我々は、S-PT84 株は Th1/Th2 バランスを Th1 形に偏向させることで抗アレルギー作用を示すことを明らかにしており、この作用には制御性 T 細胞の寄与を示唆している[7]。この結果は、S-PT84 株が過剰な免疫応答を正常な状態に戻すよう免疫機能を調節することで、全身性の炎症状態を制御している可能性を示しているが、今回の我々の検討においても、S-PT84 株のカンジダに対する直接的な作用による炎症状態の改善以外に、胃や腸といった消化管における免疫機能を調節することで好中球の浸潤を抑制し、炎症状態を改善している可能性も考えられる。

カンジダ感染による炎症状態の誘発は、腸管でも起こることが報告されている。園山らは、腸管におけるカンジダ菌の定着が炎症性細胞の浸潤を増加させ、腸管透過性を亢進させることを報告している[81]。また、腸管透過性が亢進した状態を意味する“Leaky Gut”は、糖尿病[82]、非アルコール性脂肪性肝疾患[83]、過敏

性腸症候群[84]、関節リウマチ[81]などといった様々な疾患と関連があることが報告されている。これらの報告から、消化管におけるカンジダの定着は、胃腸における炎症を誘発することにつながり、このことが Leaky Gut のような状態を引き起こし、様々な疾患を増悪させると考えられる。従って、消化管でのカンジダ菌の定着を抑制することは、前述のような様々な疾患を予防することにつながると考えられる。

消化管カンジダ感染モデルマウスを用いた今回の検討では、S-PT84 株の経口投与によりカンジダ感染を予防することや、胃における炎症状態を改善することが明らかとなった。このことから、S-PT84 株はカンジダ症の予防や治療に役立つ食品素材であると考えられ、また、カンジダ感染により引き起こされる Leaky Gut に起因する様々な疾患の予防や治療にも役立つと考えられる。S-PT84 株のカンジダ感染予防効果のメカニズムについては詳細が明らかにされていないため、今後、更なる研究が必要である。

結　語

本研究では、*Latobacillus pentosus* strain S-PT84 株の感染予防効果に着目し、研究を進めた。

本学位論文では、以下の点について明らかにした。

■S-PT84 株の生菌体と死菌体の免疫賦活作用について NK 活性を指標に比較した結果、同程度の作用であることが明らかになった。つまり、死菌体でも十分な NK 活性上昇作用を発揮することが示された。

■S-PT84 株を長期間摂取することにより、ヒト末梢血における NK 活性を高めた状態を維持することを確認した。また、その作用は NK 活性が低値のヒトに対して発揮され、正常な NK 活性を維持しているヒトの免疫機能には影響を及ぼさないことが示された。本臨床試験により、S-PT84 株の長期間摂取による安全性についても、問題ないことを確認した。

■S-PT84 株摂取による脾臓における NK 活性上昇作用に関わる新たなメカニズムとして、NK 活性の制御に関わることが知られている脾臓交感神経活動を抑制させる作用があることが明らかになった。

■S-PT84 株のインフルエンザ感染予防効果に関わる新たな作用として、インフルエンザワクチンに対する特異的抗体産生量を高める作用（ワクチンアジュバント効果）があることが示された。

■S-PT84 株は、種々の乳酸菌と比較して、カンジダ菌に対する強い菌糸形成阻害作用を示した。また、S-PT84 株は、カンジダ菌に結合し、菌糸形成したカンジダ菌を選択的に死滅させることが明らかとなった。消化管カンジダ感染モデルマウスを用いた検討では、S-PT84 株の摂取によりカンジダ感染による胃傷害を改善することや、胃内における炎症状態を改善することが示された。

現代人は、生活習慣や食習慣の乱れ、また、社会生活を営む中で種々のストレスに曝されており、常に免疫機能に影響を及ぼす環境のもとで生活をしている。日常生活を営むうえで、免疫機能を高め、その状態を適切に維持・管理することは、様々の抗原に曝されている環境から身を守ることにつながり、健康的な生活を実現するうえで極めて重要である。この観点において、S-PT84 株は免疫機能を高め、適切にその状態を維持することが可能であり、健康的な生活を営むために非常に有用な食品素材の一つであると考えられる。日々、継続的に S-PT84 株を摂取することで、ひいては、健康長寿の実現につながると考えられる。

引用文献

1) 厚生労働省　健康局　がん・疾病対策課. 平成28年2月3日「アレルギー疾患の現状等」. http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10905100-Kenkoukyoku-Ganshippeitaisakuka/0000111693.pdf

2) 呉艶玲, 山崎暁子, 毛暁全, 白川太郎 (2006) アレルギーと衛生仮説. 化学と生物 44: 21-26. 公益社団法人日本農芸化学会

3) 高野俊明ほか (1996) Ⅷ 乳酸菌、発酵食品の栄養生理効果. 乳酸菌の科学と技術: 311. 学会出版センター

4) Schiffrin EJ1, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A (1997) Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. Am J Clin Nutr 66: 515S-520S.

5) Yasui H, Shida K, Matsuzaki T and Yokokura T (1999) Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 76: 383-389.

6) Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH and Paerregaard A (2003) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 111: 389-395.

7) Peng S, Lin JY and Lin MY (2007) Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model. J Agric Food Chem 55: 5092-5096.

8) Nonaka Y, Izumo T, Izumi F, Maekawa T, Shibata H, Nakano A, Kishi A, Akatani K and Kiso Y (2008) Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. Int Arch Allergy Immunol 145: 249-257.

9) Koizumi S, Wakita D, Sato T, Mitamura R, Izumo T, Shibata H, Kiso Y, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H and Nishimura T (2008) Essential role of Toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1(+) cell-dependent activation of type 1 immunity by *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84. Immunol Lett 120: 14-19.

10) 出雲貴幸、星子博之、井田正幸、前川敏宏 (2013) *Lactobacillus pentosus* S-PT84 株の免疫調節作用について. Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences 7: 151-162.

11) Takeda K and Okumura K (2007) Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. J Nutr 137: 791S-793S.

12) Katafuchi T, Take S and Hori T (1993) Roles of sympathetic nervous system in the

suppression of cytotoxicity of splenic natural killer cells in the rat. J Physiol 465: 343-357.

13) Tanida M, Fukushima Y, Yamano T, Maeda K, Horii Y, Shen J and Nagai K (2007) Effects of probiotic strain *L. paracasei* ST11 (NCC2461) on autonomic nerve activities, blood pressure and appetite in rats. Curr Top Nutraceutical Res 5: 157-164.

14) Tanida M, Shen J, Maeda K, Horii Y, Yamano T, Fukushima Y and Nagai K (2008) High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *L. paracasei* ST11 (NCC2461) in rats. Obes Res Clin Pract 2: I-II.

15) Izumo T, Maekawa T, Ida M, Noguchi A, Kitagawa Y, Shibata H, Yasui H and Kiso Y (2010) Effect of intranasal administration of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 on influenza virus infection in mice. Int Immunopharmacol 10: 1101-1106.

16) Izumo T, Izumi F, Nakagawa I, Kitagawa Y, Shibata H and Kiso Y (2011) Influence of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 ingestion on the mucosal immunity of healthy and *Salmonella* Typhimurium-infected mice. Biosci Microflora 30: 27-35.

17) Izumo T, Maekawa T, Ida M, Kishi A, Akatani K, Kitagawa Y and Kiso Y (2011) Effect of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 ingestion on IFN-α production from plasmacytoid dendritic cells by virus stimulation. Biosci Biotechnol Biochem 75: 370-372.

18) 新開敬行, 山崎清, 貞升健志, 中村敦子, 平田一郎, 関根大正, 小久保彌太郎, 諸角聖, 稲松孝思 (2000) ワクチン接種後の高齢者におけるインフルエンザ抗体価の推移 (1997-1999). 東京衛研年報 51: 14-19.

19) Hayama K, Ishijima S, Ono Y, Izumo T, Ida M, Shibata H and Abe S (2014) Protective activity of S-PT84, a heat-killed preparation of *Lactobacillus pentosus*, against oral and gastric candidiasis in an experimental murine model. Med Mycol J 55: J123-129.

20) Kawahara T and Otani H (2006) Stimulatory effect of lactic acid bacteria from commercially available Nozawana-zuke pickle on cytokine expression by mouse spleen cells. Biosci Biotechnol Biochem 70: 411-417.

21) Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Watanabe K and Nanno M (2006) Induction of interleukin-12 by Lactobacillus strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. J Dairy Sci 89: 3306-3317.

22) 出雲貴幸 (2010) 第 10 章 乳酸菌の免疫調節作用. 免疫機能性食品の基礎と応用 (Basics and applications of immunologically functional foods): 79-86. CMC 出版

23) Sashihara T, Sueki N, Furuichi K and Ikegami S (2007) Effect of growth conditions of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the immunostimulatory activity for production of interleukin-12 (p70) by murine splenocytes. Int J Food Microbiol 120: 274-281.

24) Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK (2005) *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. Pediatrics 115: 178-181.

25) Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML (2006) Probiotic use in clinical practice: what are the risks? Am J Clin Nutr 83: 1256-1264.

26) Biron CA, Byron KS and Sullivan JL (1989) Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. N Engl J Med 320: 1731-1735.

27) Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S and Dan K (2001) Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. Clin Exp Immunol 124: 392-397.

28) Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K and Nakachi K (2000) Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. Lancet 356: 1795-1799.

29) 「特定保健用食品の表示許可等について」(平成 26 年 10 月 30 日付け消食表第 259 号): 別添 2「特定保健用食品申請に係る申請書作成上の留意事項」

30) Gill HS, Rutherfurd KJ and Cross ML (2001) Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. J Clin Immunol 21: 264-271.

31) Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Yoshikai Y and Tsuru T (2006) Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults. J Nutr 136: 3069-3073.

32) Mañé J, Pedrosa E, Lorén V, Gassull MA, Espadaler J, Cuñé J, Audivert S, Bonachera MA and Cabré E (2011) A mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects. A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized pilot trial. Nutr Hosp 26: 228-235.

33) Muñoz FJ, Galván A, Lerma M and De la Fuente M (2000) Seasonal changes in peripheral blood leukocyte functions of the turtle Mauremys caspica and their relationship with corticosterone, 17-β-estradiol and testosterone serum levels. Vet Immunol Immunopathol 77:

27-42.

34) Dong H, Rowland I, Thomas LV and Yaqoob P (2013) Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers. Eur J Nutr 52: 1853-1863.

35) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B and Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J Exp Med 170: 827-845.

36) Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM and O'Garra A (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. J Immunol 154: 5071-5079.

37) Trinchieri G and Scott P (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. Res Immunol 146: 423-431.

38) Mann ER and Li X (2014) Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. World J Gastroenterol 20: 9653-9664.

39) Boscolo P, Di Gioacchino M, Reale M, Muraro R and Di Giampaolo L (2011) Work stress and innate immune response. Int J Immunopathol Pharmacol 24: 51S-54S.

40) Kusaka Y, Kondou H and Morimoto K (1992) Healthy lifestyles are associated with higher natural killer cell activity. Prev Med 21: 602-615.

41) Morimoto K, Takeshita T, Inoue-Sakurai C and Maruyama S (2001) Lifestyles and mental health status are associated with natural killer cell and lymphokine-activated killer cell activities. Sci Total Environ 270: 3-11.

42) Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP and Vizi ES (2000) The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. Pharmacol Rev 52: 595-638.

43) Kimura A, Nagai N and Sato A (1994) Somatic afferent regulation of cytotoxic activity of splenic natural killer cells in anesthetized rats. Jpn J Physiol 44: 651-664.

44) Shen J, Horii Y, Fujisaki Y and Nagai K (2009) Effects of L-arginine and L-lysine mixtures on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation. Auton Neurosci 147: 86-90.

45) Horii Y, Shen J, Fujisaki Y, Yoshida K and Nagai K (2012) Effects of L-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation. Neurosci Lett 510: 1-5.

46) Beppu Y, Komura H, Izumo T, Horii Y, Shen J, Tanida M, Nakashima T, Tsuruoka N and Nagai K (2012) Identificaton of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one isolated from *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 culture supernatants as a compound that stimulates autonomic nerve activities in rats. J Agric Food Chem 60: 11044-11049.

47) Straub RH (2004) Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen. Trends Pharmacol Sci 25: 640-646.

48) Klein RL, Wilson SP, Dzielak DJ, Yang WH and Viveros OH (1982) Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. Neuroscience 7:2255-2261.

49) Logan RW, Arjona A and Sarkar DK (2011) Role of sympathetic nervous system in the entrainment of circadian natural-killer cell function. Brain Behav Immun 25: 101-109.

50) Tanida M, Yamano T, Maeda K, Okumura N, Fukushima Y and Nagai K (2005) Effects of intraduodenal injection of *Lactobacillus johnsonii* La1 on renal sympathetic nerve activity and blood pressure in urethane-anesthetized rats. Neurosci Lett 389: 109-114.

51) Tanida M, Shen J, Kubomura D and Nagai K (2010) Effects of anserine on the renal sympathetic nerve activity and blood pressure in urethane-anesthetized rats. Physiol Res 59: 177-185.

52) Shen J, Tanida M, Yao JF, Niijima A and Nagai K (2008) Biphasic effects of orexin-A on autonomic nerve activity and lipolysis. Neurosci Lett 444: 166-171.

53) Horii Y, Tanida M, Shen J, Fujisaki Y, Fuyuki R, Hashimoto K, Niijima A, Nakashima T and Nagai K (2011) Skin application of urea-containing cream affected cutaneous arterial sympathetic nerve activity, blood flow, and water evaporation. Skin Res Technol 17: 75-81.

54) Tohno M. KAKEN database of grants-in-aid for scientific research. Research Project Number: 23780274. Available at: http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23780274.en.html. [last accessed 18 November 2016]

55) Gillim-Ross L and Subbarao K (2006) Emerging respiratory viruses: Challenges and vaccine strategies. Clin Microbiol Rev 19: 614-636.

56) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, Takasaki Y, Shindo S, Shibao K,

Yokoyama T, Nishikawa K, Mino M, Iwaya M, Yamashita Y, Suzuki S, Mizuno D and Kido H (2013) Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with Influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: A retrospective analysis. PLoS One 8: e70060

57) Yasui H, Kiyoshima J and Hori T (2004) Reduction of Influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. Clin Diagn Lab Immunol 11: 675-679.

58) Maeda N, Nakamura R, Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Kase T and Yoshikai Y (2009) Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. Int Immunopharmacol 9: 1122-1125.

59) Kobayashi N1, Saito T, Uematsu T, Kishi K, Toba M, Kohda N and Suzuki T (2011) Oral administration of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 augments protection against influenza virus infection in mice. Int Immunopharmacol 11: 199-203.

60) Zhang W, Azevedo MS, Wen K, Gonzalez A, Saif LJ, Li G, Yousef AE and Yuan L. (2008) Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. Vaccine 26: 3655-3661.

61) Davidson LE, Fiorino A-M, Snydman DR and Hibberd PL (2011) Lactobacillus GG as an immune adjuvant for live attenuated Influenza vaccine in healthy adults: A randomized double blind placebo controlled trial. Eur J Clin Nutr 65: 501-507.

62) Boge T1, Rémigy M, Vaudaine S, Tanguy J, Bourdet-Sicard R and van der Werf S (2009) A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials. Vaccine 27: 5677-5684.

63) Ida M, Izumo T, Maekawa T, Furukawa Y, Takahashi K, Kiso Y, Kitagawa Y, Shibata H (2011) Protective effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 against infectious diseases. Int Soc Nutraceuticals Funct Foods P122

64) Nishino M, Mizuno D, Kimoto T, Shinahara W, Fukuta A, Takei T, Sumida K, Kitamura S, Shiota H and Kido H (2009) Influenza vaccine with Surfacten, a modified pulmonary surfactant, induces systemic and mucosal immune responses without side effects in minipigs. Vaccine 27: 5620-5627.

65) Kimoto T, Mizuno D, Takei T, Kunimi T, Ono S, Sakai S and Kido H (2013) Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10: induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. Influenza Other Respir Viruses 7:1218-1226.

66) Lin HT, Chuang CC, Wu HL, Chu DM and Wang YC (2013) Characterization of cross protection of Swine-Origin Influenza Virus (S-OIV) H1N1 and reassortant H5N1 influenza vaccine in BALB/c mice given a single-dose vaccination. J Biomed Sci 20: 19.

67) Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienra RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa VP Jr and Levin AS (2009) *Candida* colonisation as a source for candidaemia. J Hosp Infect 72: 9-16.

68) Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D and Koc AN (2007) Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. Jpn J Infect Dis 60: 280-283.

69) Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP and Siu SC (2007) Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. J Med Microbiol 56: 1393-1398.

70) Kato T, Maruyama R and Nishioka K (1995) Isolation of *Candida albicans* from Tongues Showed no Fungus by Direct Examination. Jpn. J. Med. Mycol 36: 145-148.

71) Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E and Pietrella D (2012) New approaches in the development of a vaccine for mucosal candidiasis: progress and challenges. Front Microbiol 3: 294.

72) Sasaki K (2012) *Candida*-associated gastric ulcer relapsing in a different position with a different appearance. World J Gastroenterol 18: 4450-4453.

73) Kumamoto CA (2011) Inflammation and gastrointestinal Candida colonization. Curr Opin Microbiol 14: 386-391.

74) Massarrat S, Saniee P, Siavoshi F, Mokhtari R, Mansour-Ghanaei F and Khalili-Samani S (2016) The effect of *helicobacter pylori* infection, aging, and consumption of proton pump inhibitor on fungal colonization in the stomach of dyspeptic patients. Front Microbiol 7: 801.

75) Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y and Abe S (2012) Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the *in vitro* growth of *Candida albicans* and its protective

effect in an oral candidiasis model. Appl Environ Microbiol 78: 2190–2199.

76) Ishijima SA, Hayama K, Ninomiya K, Iwasa M, Yamazaki M and Abe S (2014) Protection of mice from oral Candidiasis by heat-killed *Enterococcus faecalis*, possibly through its direct binding to *Candida albicans*. Med Mycol J 55: E9–E19.

77) Ishijima SA and Abe S (2015) A novel murine candidiasis model with severe colonization in the stomach induced by N-acetylglucosamine-treatment and its scoring system based on local characteristic stomach symptoms. Med Mycol J 56: E31–E39.

78) Nyanzi R, Awouafack MD, Steenkamp P, Jooste PJ and Eloff JN (2014) Anticandidal activity of cell extracts from 13 probiotic *Lactobacillus* strains and characterisation of lactic acid and a novel fatty acid derivative from one strain. Food Chem 164: 470–475.

79) Li S, Huang R, Shah NP, Tao X, Xiong Y and Wei H (2014) Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. J Dairy Sci 97: 7334–7343.

80) Hisajima T, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, Nishiyama Y, Funakoshi K, Oshima H and Abe S (2008) Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. Microbiol Immunol 52: 327–333.

81) Sonoyama K, Miki A, Sugita R, Goto H, Nakata M and Yamaguchi N (2011) Gut colonization by *Candida albicans* aggravates inflammation in the gut and extra-gut tissues in mice. Med Mycol 49: 237–247.

82) Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Cartenì M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D and Fasano A (2006) Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. Diabetes 55: 1443–1449.

83) Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP and Grieco A (2009) Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 49: 1877–1887.

84) Shulman RJ, Eakin MN, Czyzewski DI, Jarrett M and Ou CN (2008) Increased gastrointestinal permeability and gut inflammation in children with functional abdominal pain and irritable bowel syndrome. J Pediatr 153: 646–650.

論文目録

以下、本学位論文に関連する文献一覧を記す。

【参考論文】

1) Maekawa T, Ida M, Furukawa Y, Kitagawa Y, Yasui K, Kowata Y, Izumo T, Shibata H. Supplementation with *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 and vitamin B mixture enhances natural killer cell activity in healthy humans. J Prob Health 4; 1000134, 2016.

2) Maekawa T, Kimoto T, Mizuno D, Furukawa Y, Ida M, Takahashi E, Izumo T, Ono Y, Shibata H, Kido H: Oral administration of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 enhances anti-influenza virus-specific IgG production in plasma after limited dose of influenza virus vaccination in mice. J Vaccine Immunotechnology. 2; 5, 2015.

3) Maekawa T, Ishijima SA, Ida M, Izumo T, Ono Y, Shibata H, Abe S: Prophylactic effect of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 on *Candida* infection and gastric inflammation in a murine gastrointestinal candidiasis model. Med Mycol J 57; E81-E92, 2016.

4) Izumo T, Maekawa T, Horii Y, Fujisaki Y, Ida M, Furukawa Y, Ono Y, Kiso Y, Kitagawa Y, Shibata H, Nagai K: The effect of the sympathetic nervous system on splenic natural killer cell activity in mice administered the *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84. Neuroreport 24; 988-991, 2013.

5) Izumo T, Ida M, Maekawa T, Furukawa Y, Kitagawa Y, Kiso Y: Comparison of the immunomodulatory effects of live and heat-killed *Lactobacillus pentosus* S-PT84. J Health Sci 57; 304-310, 2011.

【関連論文】

6) Izumo T, Maekawa T, Ida M, Kishi A, Akatani K, Kitagawa Y and Kiso Y: Effect of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 ingestion on IFN-α production from plasmacytoid dendritic cells by virus stimulation. Biosci Biotechnol Biochem 75; 370-372, 2011.

7) Izumo T, Maekawa T, Ida M, Noguchi A, Kitagawa Y, Shibata H, Yasui H, Kiso Y: Effect of intranasal administration of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 on influenza virus infection in mice. Int Immunopharmacol 10; 1101-1106, 2010.

8) Zhou Y, Inoue N, Ozawa R, Maekawa T, Izumo T, Kitagawa Y, Kiso Y, Shibata H, Ikeda I: Effects of heat-killed *Lactobacillus pentosus* S-PT84 on postprandial

hypertriacylglycerolemia in rats. Biosci Biotechnol Biochem 77; 591-594, 2013.

謝辞

本稿を執筆するにあたり、終始、御懇切な御指導を賜りました北海道大学農学部・原博教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行にあたり多方面に渡りお力添えをいただきました北海道大学産学・地域協働推進機構産学推進本部　木曽　良信博士、サントリーウエルネス株式会社健康科学研究所　柴田　浩志博士、河島　洋博士、小野　佳子博士、出雲　貴幸博士、サントリービジネスエキスパート株式会社　北川　義徳博士に深く感謝致しますとともに、本研究に御協力いただいたサントリーウエルネス株式会社健康科学研究所、井田　正幸博士、古川　祐一研究員をはじめ、サントリーウエルネス株式会社健康科学研究所の研究員各位に厚く御礼申し上げます。大阪大学・永井克也名誉教授、徳島大学・木戸博名誉教授、帝京大学・安部茂教授ならびに石島早苗様におきましては、本研究の推進にあたり多大なる御支援ならびに御指導を賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。