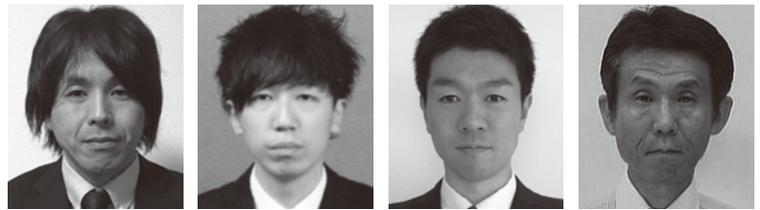


ウイルス感染防御機能を持つ  
*Lactococcus lactis* JCM5805の発見と  
事業応用



① キリン株式会社 基盤技術研究所 藤原 大 介 ①  
 ② 小岩井乳業株式会社 技術開発センター 城 内 健 太 ②  
 ③ キリン株式会社 酒類技術研究所 杉 村 哲 ③  
 ④ キリン株式会社 基盤技術研究所 藤 井 敏 雄 ④

【背景】

季節性インフルエンザなどの従来のリスクに加えて、新興感染症の拡大などウイルスに関連したリスクは飛躍的に増大しつつある。また、健康人においても高度情報化社会のもたらす多種多様なストレスにより、免疫力の低下が問題となっている。

乳酸菌に関しては古くから免疫について多くの研究が行われており、マクロファージやミエロイド樹状細胞(mDC)を介した自然免疫活性化機能が明らかとなっていた。一方、近年ウイルス感染防御機能を司る制御細胞としてプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)が見つかり、大きな注目を集めている。pDCはヒト末梢血単核球の1%にも満たないマイナーなサブセットであるが、ウイルス核酸を認識するTLR7/9を細胞内に強発現しており、大量のtype Iインターフェロン産生を介した感染初期応答を担い、さらにウイルス抗原特異的な獲得免疫の誘発による感染後期応答まで制御する、いわばウイルス感染防御の中核を担う免疫細胞である。

【pDC活性化乳酸菌の探索】

上記のようなpDCの重要性から、それを活性化するような乳酸菌が仮に見つかれば、実効性の高いウイルス感染リスク低減技術になりうると考えた(図1)。

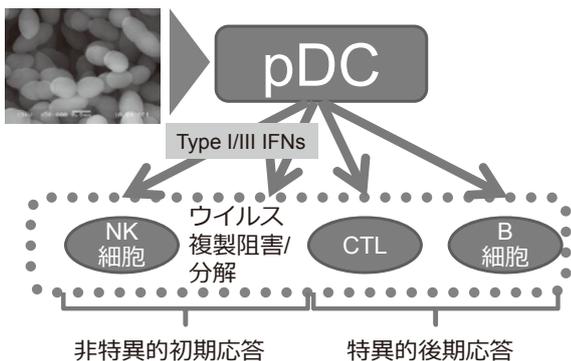


図1 pDC活性化乳酸菌の研究戦略

マウス骨髓細胞からFlt-3Lにより*in vitro*で誘導したpDC培養系を用い、公的菌株バンクから収集した31菌株からなる計125株の乳酸菌株を添加し、pDC活性化指標であるIFN- $\alpha$ の定量を行った。その結果、殆どの乳酸菌株添加でIFN- $\alpha$ は検出されなかったが、3株において100pg/mlを上回る量が検出された。極めて興味深いことにこれら3株は*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*に

分類されるものであった。このうち最も安定な反応を示す*L.lactis* JCM5805を選抜し、その後の解析を行った。

【JCM5805の作用機構の解明】

まず*in vitro* pDC培養系を用いて作用機構の解析を行った。対照乳酸菌として*Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103を用いて解析を行ったところ、JCM5805はIFN- $\alpha$ に加えてIFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ といったウイルス感染防御に関わるサイトカインを特異的に誘導することが分かった(図2)

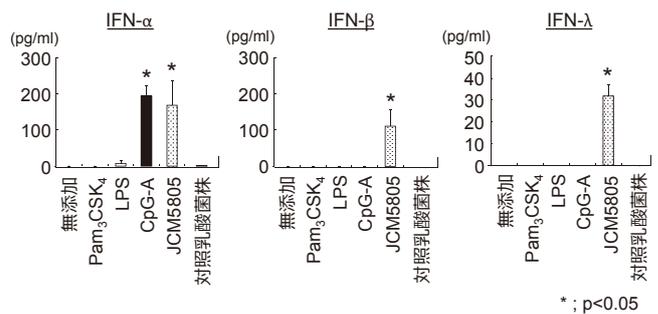


図2 乳酸菌株のpDCへの添加によるIFNs産生誘導量比較

また、この反応は生菌・死菌いずれの場合でも等しく観察された。さらに必須シグナルの探索の結果、JCM5805はTLR9/MyD88を介したpDC活性化を誘導することが示された。TLR9はエンドソームに発現する内在性レセプターであり、pDCにJCM5805が貪食され、菌体中のDNAが溶出することが必須と考えられたため、蛍光染色したJCM5805を用いた蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、図3に示すように対照乳酸菌株はpDC外部を取り囲むように分布し、細胞内部に取り込まれないのに対して、JCM5805はpDCの内部に取り込まれ、DNAがTLR9を介した活性化を起こすことが作用機構であることが示唆された。

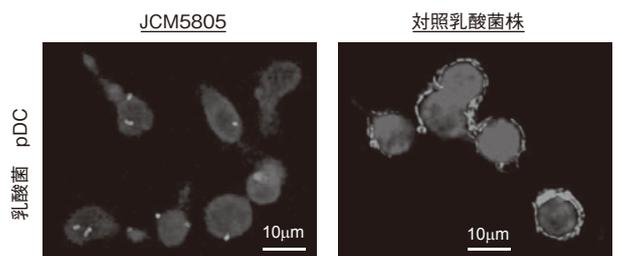


図3 乳酸菌のpDCによる取り込みの違い

【JCM5805の動物感染モデルにおける効果】

マウス経口摂取時の効果について、パラインフルエンザウイルス感染モデルを用いて検討した。マウスをJCM5805摂取・非摂取の2群に分け、試験食投与2週間後に致死量のウイルスを感染させた。その結果、感染から10日以内に非摂取群の全個体が死亡したのに対し、摂取群では約7割が生存するという著効が観察された(図4)。このとき非摂取群のマウスの肺では顕著な好中球の浸潤が認められ気道の閉塞が起っていたが、JCM5805摂取群では浸潤の大幅な低下が起っていた。さらなる解析の結果、腸管から取り込まれたJCM5805は腸管pDC活性化を介して全身の抗ウイルス機能を高めていることが示唆された。

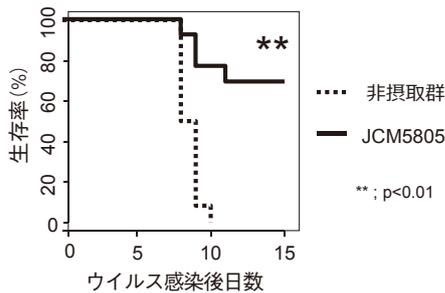


図4 マウスパラインフルエンザウイルス感染モデルにおけるJCM5805経口投与の効果

【JCM5805のヒトにおける効果】

動物モデルで著効を認めたため、JCM5805で製造したヨーグルト飲料(1000億cfu/本)を用いてヒトにおける効果の検証を行った。

2011年夏季に行った試験では被験者38名を無作為に19名ずつ2グループに分け、一日100mlの試験飲料を4週間飲用させた。試験開始時、終了時にそれぞれ採血を行い、末梢血単核球中のpDC活性化度を評価したところ、試験終了時にJCM5805群のpDC活性がプラセボ群より有意に高くなった(図5)。

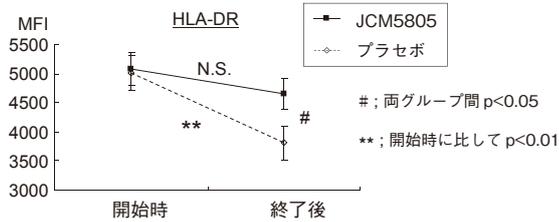


図5 JCM5805含有食品摂取のヒトpDC活性における効果

さらにヒトにおける風邪・インフルエンザ様症状に対する効果の検証のため、2013年冬季に試験を行った。被験者213名を2グループに分け、10週間ヨーグルト飲料を飲用させ、医師による診断及び自覚症状を調査した結果、風邪・インフルエンザ様症状である咳、熱っぽさの項目がプラセボ群と比してJCM5805群で有意な低下を示した(図6)。さらにPBMCを不活化ヒトインフルエンザウイルスで刺激した際の抗ウイルス因子・ISG15の発現量がJCM5805群でプラセボ群より有意に高くなった。

さらに、工業的により広範な加工が可能な死菌粉末についても同様なヒトにおける有効性評価を行い、ポジティブな結果が得られている。

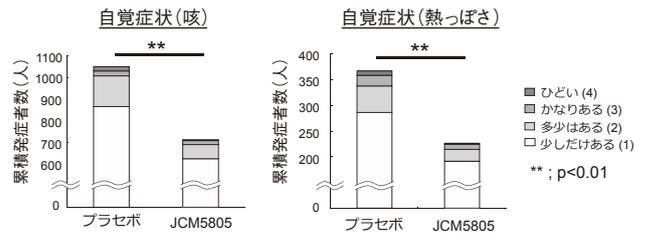


図6 風邪・インフルエンザ様自覚症状に対するJCM5805含有食品摂取の効果

【まとめ】

このように我々は加工特性や安全性・コスト面に優れ、現実的な有用性を持つ乳酸菌を題材に、ヒトの抗ウイルス免疫を司るpDCに着目し、ごく限られた株に活性化作用があることを発見した。さらにJCM5805を題材に*in vitro*実験・動物実験・ヒト試験を通して、その効果と作用機構について検証を行った。

さらにヨーグルト製品を開発し、加工特性を生かした死菌粉末の製造ラインを立ち上げ、清涼飲料製品及びサプリメントを開発した。

現在、JCM5805のpDC活性化における分子生物学的観点からのメカニズム解明や、腸管感染性ウイルスに対する効果、寿命や加齢形質に与える効果など多岐に渡る応用研究を推進している。

【謝辞】

本研究成果はキリングroup各社の多くの関係者の尽力によるものであり、研究・商品開発・マーケティング・製造・販売に関わった皆様に感謝いたします。また、研究コンセプトから開発研究までご助言・ご指導を賜りました先生方に厚く御礼申し上げます。