

博士論文

プラズマサイトイド樹状細胞を活性化する
乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805
の免疫賦活効果および老化抑制効果に関する研究

杉村 哲

目次

第1章 序論	1
1. はじめに	2
2. 免疫システムと樹状細胞について	3
3. 乳酸菌の免疫賦活効果と <i>L. lactis</i> JCM 5805 について	8
4. 本研究の目的と構成について.....	10
第2章 <i>L. lactis</i> JCM 5805 によるヒト由来 pDC 活性化作用の検証	11
1. 要約	12
2. はじめに	13
3. <i>in vitro</i> におけるヒト由来 pDC に対する効果.....	14
4. <i>L. lactis</i> JCM 5805 摂取による効果（夏期・小規模）	25
5. 考察	36
第3章 <i>L. lactis</i> JCM 5805 摂取によるインフルエンザウイルスに対する効果の検証 .	39
1. 要約	40
2. はじめに	41
3. <i>L. lactis</i> JCM 5805 摂取による効果（冬期・大規模）	42
4. 考察	54
第4章 高温ストレスが pDC 活性に及ぼす影響と <i>L. lactis</i> JCM 5805 摂取による効果 の検証	56
1. 要約	57
2. はじめに	58
3. 高温ストレスが pDC 活性に及ぼす影響	59
4. 高温ストレスにより低下した pDC 活性に対する <i>L. lactis</i> JCM 5805 摂取の効果	65
5. 考察	71
第5章 <i>L. lactis</i> JCM 5805 の長期摂取による老化抑制効果の検証	73
1. 要約	74

2. はじめに	75
3. <i>L. lactis</i> JCM 5805 の長期摂取による老化抑制効果	77
4. 考察	93
第6章 総合討論	96
参考文献.....	102
謝辞	116
発表論文・業績	117

第 1 章

序論

第1章 序論

1. はじめに

免疫システムは、非自己の病原体を認識し排除することによって、日常的な風邪症候群や季節性インフルエンザから新興感染症まで、生体を感染症から保護する極めて重要な機構である。また、がん細胞等の異常細胞や炎症・老化といった自己生体機能とも密接に関与していることが知られている。医学の進歩によって、これらの病気に対する免疫学的な治療法は劇的な発展を遂げているが、一方で、人々の生活の質（Quality of life）を高めるためには、日常的な食生活で予防し、未病を改善できることがより好ましい。

乳酸菌は、ヨーグルトに限らず飲料やタブレットとして日常的に摂取可能な安全な食品素材として広く受け入れられており、その生体に及ぼす機能性、特に免疫賦活能に関する研究は多数報告されている。その多くが、マクロファージやミエロイド樹状細胞（myeloid dendritic cell; mDC）を介した免疫活性化能を示しているが、一方、近年ウイルス感染防御の中核を担う免疫サブセットとしてプラズマサイトイド樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell; pDC）が発見され大きな注目を集めている。樹状細胞は自然免疫系だけではなく獲得免疫系にも寄与することが知られ、免疫システム全般に影響を与え、感染防御の他に炎症抑制や老化抑制の効果も期待される。

本章では、免疫システムにおいて樹状細胞が担う役割と、pDCを直接活性化できる稀有な乳酸菌として見出された *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 (*L. lactis* JCM 5805) に関する知見と、本研究の目的および本論文の構成について述べる。

2. 免疫システムと樹状細胞について

免疫システムは大きく自然免疫と獲得免疫に分類することができる。自然免疫とは、体内に侵入した病原体を認識し、即座に排除するための仕組みである。好中球、マクロファージ、樹状細胞等は病原体を貪食し、Toll 様受容体 (TLR) 等のパターン認識受容体を用いて病原体由来の分子や構造を認識する。病原体を認識すると細胞内でシグナル伝達が誘導され、サイトカイン等の産生が促されるほか、マクロファージや樹状細胞は抗原提示細胞としてはたらき、他の免疫細胞の活性化や獲得免疫系への情報伝達が起こる。また、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) は、ウイルス感染細胞やがん細胞を直接的に排除する役割を担う。一方で、獲得免疫とは、抗原受容体から伝達された病原体の情報を記憶し、再度同じ病原体の侵入があった際に、その病原体特異的に反応することで感染や発症を抑制する仕組みである。その代表的な免疫細胞には T 細胞と B 細胞がある。T 細胞には、抗原情報を基に感染細胞を排除する細胞傷害性 T 細胞 (CD8⁺ T 細胞)、サイトカイン産生によって他の T 細胞の活性化や B 細胞の分化成熟や抗体産生を誘導するヘルパー T 細胞 (Th 細胞あるいは CD4⁺ T 細胞)、また過剰な免疫反応を抑制する役割を担う制御性 T 細胞 (Treg 細胞) 等がある。B 細胞は、抗体産生による液性免疫を担う免疫細胞であり、成熟して形質細胞となる。B 細胞が産生する抗体には IgG、IgM、IgA、IgD、IgE の 5 種のアイソタイプが存在し、例えば IgA は主に腸管や呼吸器等の粘膜組織において病原体や毒素の排除に作用し感染防御において重要な機能を果たしている。このように、免疫システムは自然免疫と獲得免疫に大別されるものの、両者間では綿密な相互作用が生じており、その重要な役割を果たす免疫細胞のひとつが、病原体を認識して排除しつつ、抗原提示により獲得免疫の誘導も担う樹状細胞である。

樹状細胞には、古典的樹状細胞 (conventional DC; cDC) と pDC がある。cDC はさらにいくつかのサブセットに分類され、代表的な cDC である mDC (CD11c⁺ CD11b⁺ CD8⁻) の他、CD8 やケモカイン受容体 XCR1 を発現する CD8⁺ DC (CD11c⁺ CD11b⁻ CD8⁺) 等が知られている。pDC (マウス : CD11c⁺ CD11b⁻ mPDCA-1⁺、ヒト : CD123⁺ BDCA4⁺) も cDC と共通の骨髄由来の前駆細胞から分化すると考えられているが、その機能や役割には違いがある。Fig. 1-1 に示すように、mDC は細菌を貪食・感知することで活性化して IL-12 を産生し、CD4⁺ T 細胞を活性化させ、その結果 NK 細胞による感染細胞の殺傷を引き起こす。一方で、pDC はウイルスを貪食・感知することで活性化してインターフェロン (IFN) を産生し、IFN 誘導因子による様々なウイルス増殖・拡散の抑制機構が働く。

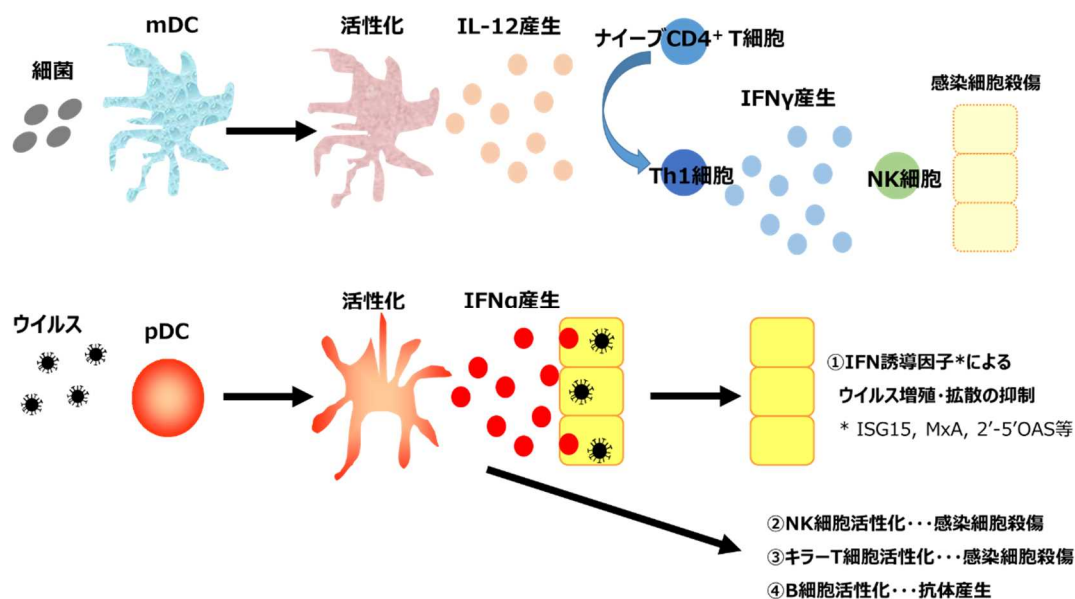


Fig. 1-1 mDC および pDC の感染防御作用機序

pDCはIFN産生細胞として抗ウイルス免疫反応において重要な役割を果たすことが知られている[1, 2]。pDCは異なる2種のTLR、TLR7とTLR9を発現している[3]。TLR7はインフルエンザウイルスのようなssRNAウイルスを感知し、イミキモドやR-848のような合成物質もまた認識することができる[4-6]。一方、TLR9はDNAウイルスのssDNAのCpGモチーフを感知し、合成したオリゴデオキシヌクレオチドも同様に認識することができる[7-9]。TLR7あるいはTLR9がリガンドである核酸を感知すると、MyD88経路を介して、インターフェロン制御因子7 (IRF7)を活性化し、リン酸化されたIRF7は核内に移行してI型IFNの転写を引き起こす[10, 11] (Fig. 1-2)。pDCは、構成的にIRF7を高発現しており[12]、エンドソームでTLR9リガンドDNAを長期間保持するユニークな能力を有することでIRF7の活性化を維持することができ、それによって他細胞と比較して迅速で豊富なI型IFNの産生が可能となっている[13]。

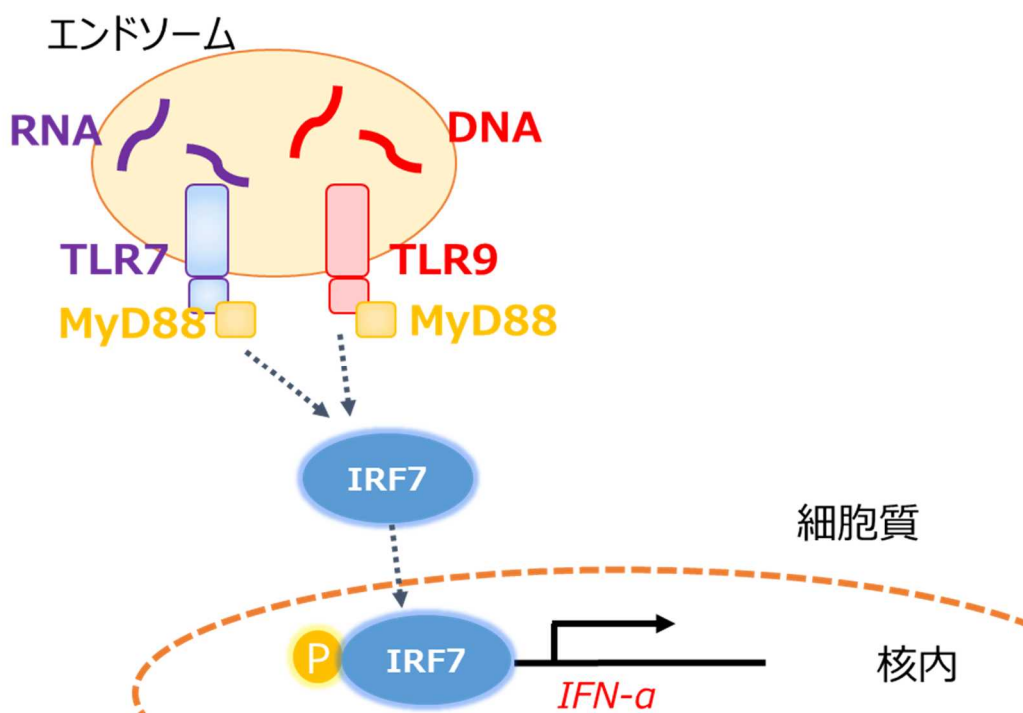


Fig. 1-2 pDC における核酸リガンド受容から *IFN* 遺伝子発現までのシグナル伝達図

pDC によって産生される I 型 IFN はウイルスの増殖と拡散を制限することで細胞性の抗ウイルス反応を誘導する[14]。I 型 IFN が IFN α レセプター (IFNAR) で受容されると IFN 刺激遺伝子因子 3 (ISGF3) の発現が誘導され、核内移動し、IFN 誘導因子の転写を活性化する[15] (Fig. 1-3)。I 型 IFN によって誘導されるインターフェロン刺激遺伝子 (ISG) の代表格である ISG15 は、タンパク質修飾に関与するユビキチン様タンパク質であり、ウイルスタンパク質に結合してウイルスの複製と拡散を阻害する[16-19]。また、ISG15 は宿主由来のタンパク質を修飾することが知られ、その中には I 型 IFN シグナル伝達経路で不可欠な IRF 類も含まれている[20]。さらに、サイトカインのように分泌された ISG15 は IFN- γ の産生も促すことが知られている[21]。他の IFN によって誘導される抗ウイルス反応として、GTPase 活性を有する Mx タンパク質 (MxA 等) がウイルス分子を捕捉して分解することや、2'-5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2'-5'-OAS) がウイルスの RNA と結合し、RNA 分解酵素 L を活性化することでウイルス RNA を分解することが知られている[15]。また、I 型 IFN によって誘導されるプロテインキナーゼ R はウイルスタンパク質を分解する機能が知られているが[15]、興味深いことに先述の ISG15 の修飾によりプロテインキナーゼ R も活性化されることが報告されている[22]。

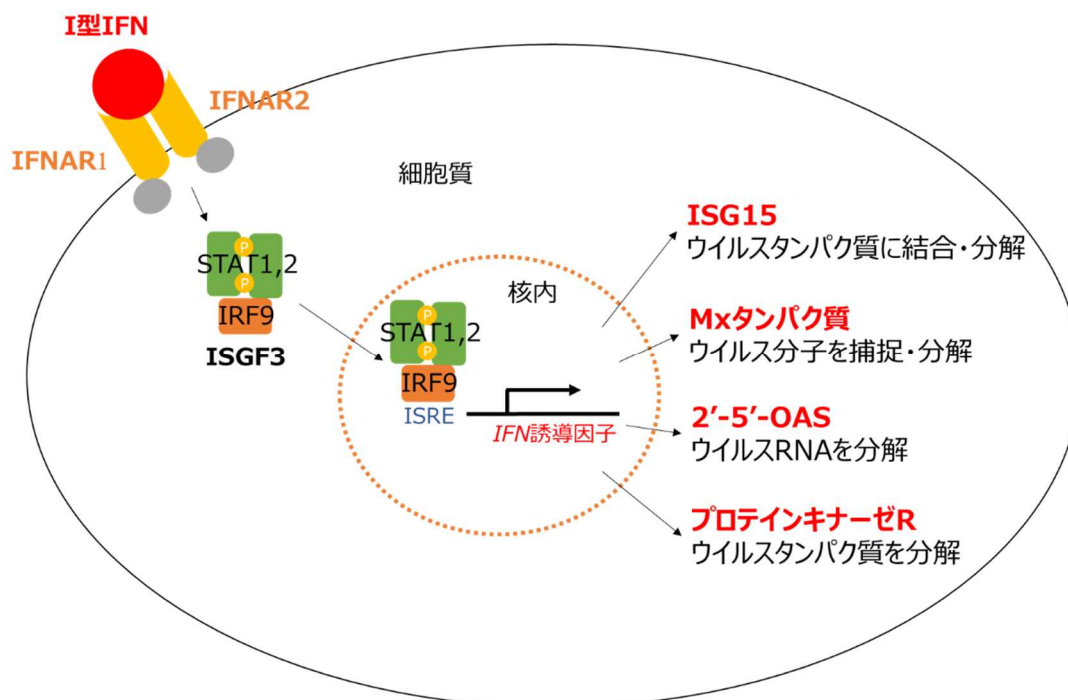


Fig. 1-3 IFN 誘導因子の発現と主な役割

樹状細胞は、抗原提示細胞としての機能や抗ウイルス反応の誘導の他に、他の免疫細胞の活性化や分化等にも寄与する。例えば、pDCによって産生されるI型IFNは、Th1細胞を介した免疫反応やCD8⁺T細胞に対する抗原提示を誘導する樹状細胞の分化と成熟に寄与することや[23-25]、CD8⁺T細胞機能の促進とCD4⁺T細胞のTh1細胞への分極化等への寄与が知られている[26-28]。高木らは、Siglec-HノックアウトマウスおよびpDCを消失させたマウスを用い、CD4⁺T細胞の免疫応答の誘導抑制やCD8⁺T細胞の免疫応答開始といったpDCの重要な機能を示している[29]。また、IFN産生細胞としての働き以外に、pDCはケモカインを産生し、CD4⁺T細胞やCD8⁺T細胞を感染部位にリクルートする役割も知られている[30, 31]。さらに、I型IFNはNK細胞の活性化[32]やB細胞から形質細胞への分化にも寄与する[33, 34]。抗体産生の面においては、pDCが粘膜のT細胞に依存しないIgA産生においても重要な役割を果たすことが知られ[35]。また、mDCもIL-6産生を介してB細胞からのIgA産生を促すことが報告されている[36]。これらのことから、pDCやmDCは自然免疫と獲得免疫の両面において重要であることがわかる。

pDCやmDCといった樹状細胞は、骨髄由来の共通前駆細胞から分化し、それぞれ骨髄から血中を移動して二次リンパ組織（リンパ節、脾臓、粘膜組織等）に局在する。そこで、病原体等の外来異物を貪食することで活性化し、病原体を認識して抗原提示やサイトカイ

ン産生を行うようになる。活性化し成熟した樹状細胞では MHC class II 分子（ヒトでは HLA-DR 等）や補助シグナル分子 CD86、CD80、CD40 の発現レベルが高くなる。これらは、樹状細胞活性化の指標となっている。細菌やウイルスの感染があった場合は、感染したあらゆる組織において病原体の貪食と樹状細胞の活性化が起こると考えられるが、本研究のように経口摂取した食品がリガンドとなる場合は、小腸のパイエル板 M 細胞によって取り込まれ、腸管付近の局所のリンパ節（腸間膜リンパ節（MLN）等）において樹状細胞の活性化が起こると想定される。一方で、局所だけではなく全身での免疫細胞活性化を誘導するためには、脾臓（SPN）のような全身性のリンパ節における樹状細胞にも影響を及ぼすことが必要と考えられる。SPN の樹状細胞活性という観点では、高温ストレスによって SPN の CD11c⁺ 細胞活性が低下し、ウイルス感染リスクが高まることが報告されている[37]。また、このような免疫機能の低下は、高温ストレスの他に老化によっても生じることが多数報告されている。樹状細胞関連では、高齢マウスにおける mDC の抗原提示能が減少することや[38]、高齢マウスにおける pDC の I 型 IFN 産生能が低下していることが知られている[39]。気温のような外的因子や老化のような内的因子が、生体内の樹状細胞にどのような影響を与えているのか興味深い（Fig. 1-4）。

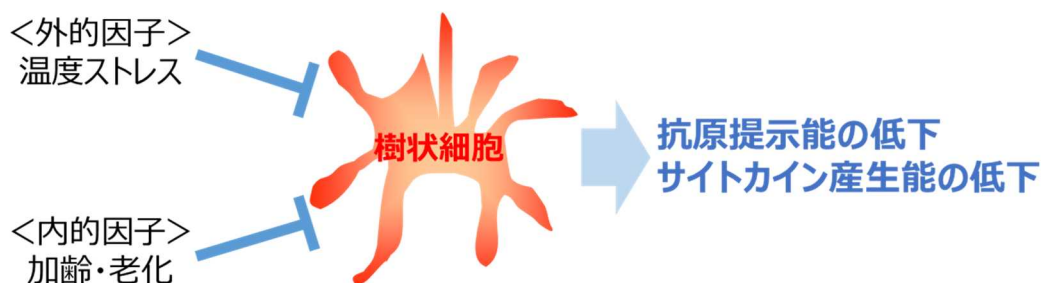


Fig. 1-4 外的因子や内的因子が樹状細胞に及ぼす影響

3. 乳酸菌の免疫賦活効果と *L. lactis* JCM 5805 について

乳酸菌は伝統的にヨーグルト、チーズ、漬物等の発酵食品に用いられており、人類の食文化において欠かすことのできない有用微生物である。いくつかの菌株はプロバイオティクスとして腸内フローラのバランスを改善することが研究され、整腸作用や免疫賦活効果を有することが報告されている。免疫賦活効果の一例として、アレルギー症状の改善効果が多数報告されている[40-42]。また、近年はウイルス感染に対する乳酸菌の機能が多くの注目を集めている。動物試験の例では、*Lactobacillus gasseri* TMC0356 の経口投与は腸および呼吸器の免疫応答を強化すること[43]、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 で発酵させたヨーグルトの多糖類は、免疫応答を高めることでインフルエンザウイルス感染に対する防御機能効果をもたらすこと[44]、*Lactobacillus pentosus* S-PT84 の経鼻投与は防御免疫応答を活性化することが報告されている[45]。また、ヒトに乳酸菌を摂取させた際の効果に関する研究では、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 で発酵させたヨーグルトは、高齢者における風邪感染リスクを下げること[46]、*Bifidobacterium longum* BB536 摂取によって高齢者のインフルエンザ発症と発熱が抑制されることが報告されている[47]。また、Gleeson らは、*Lactobacillus casei* Shirota の摂取により、アスリートの上気道感染の頻度が減少することを報告している[48]。これらの報告は、主に NK 細胞の活性や IgA 分泌などの自然免疫応答の活性化に基づいて報告されている。

我々の研究グループでは、31 種 125 株の乳酸菌を対象にマウス骨髄細胞から誘導した pDC/mDC 混合培養細胞を用い、pDC が産生する IFN- α を指標としてスクリーニングを行った。pDC はウイルス由来の核酸を認識するため通常の乳酸菌では pDC を直接活性化できないことが報告されていたが[49]、125 株中 13 株において 50 pg/mL 以上、中でも 3 株においては 100 pg/mL 以上の IFN- α 産生が認められた[50]。これら 3 株は全て球菌の *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* であり、その後の解析から、最も安定的に pDC を活性化できる株として *L. lactis* JCM 5805 が選抜された[50]。*L. lactis* JCM 5805 は IFN- α だけではなく、同じ I 型 IFN である IFN- β や、III 型 IFN である IFN- λ の産生を誘導することが確認されている[50]。蛍光標識した *L. lactis* JCM 5805 が pDC に取り込まれる様子を蛍光顕微鏡下で確認できた一方で、対照とした桿菌が pDC には取り込まれなかったことから、球菌であることやサイズが取り込みには影響していると考えられている[50]。また、死菌体だけでなく、生菌体であっても pDC 活性化能および IFN- α 産生誘導

能を有することも確認されている[50]。さらに、ノックアウトマウスを用いた解析から、*L. lactis* JCM 5805 は TLR9/MyD88 シグナル経路を介して IFN- α 産生誘導していることが示唆されている[50]。TLR9 のリガンドは CpG DNA であることが知られていることから、*L. lactis* JCM 5805 から抽出した DNA を用いて評価が行われ、強い IFN- α 産生誘導能が確認された。活性本体が DNA であることから死菌体であっても生菌であっても高い効果が期待できると考えられている[50]。*L. lactis* JCM 5805 加熱死菌体をマウスに2週間混餌投与したところ、腸間膜リンパ節 (MLN) の pDC 活性化が認められ、*in vivo* においても効果があることが示唆されている[50]。さらに、マウスを対象とした感染実験によって、*L. lactis* JCM 5805 の摂取がパラインフルエンザウイルスやロタウイルスに対して感染防御効果を発揮することも確認されている[51, 52]。

4. 本研究の目的と構成について

本研究では、マウスにおいて pDC を直接活性化できウイルス感染防御効果が実証された乳酸菌 *L. lactis* JCM 5805 に関して、ヒトにおける pDC 活性化効果の確認、およびウイルス感染防御効果以外の機能性、特に老化抑制に対する効果を明らかにすることを目的としている。本研究では、pDC の働きや作用メカニズムに着目し、ヒトにおける効果の検証を実施した。さらに、自然免疫系と獲得免疫系の両方に寄与し免疫系全般のメディエーターとなり得る pDC や mDC の特性に着目し、慢性炎症や老化といった生命維持において重要な現象に対する効果の検証を行っている。この研究の発展により、感染予防や免疫機能の維持に寄与し得る日常的に摂取可能な乳酸菌食品を提供でき、社会への貢献ができるものと考えられる。

第1章では、pDC や mDC の働きと *L. lactis* JCM 5805 の研究経緯について述べた。続く第2章では、*L. lactis* JCM 5805 がヒト由来 pDC を *in vitro* および *in vivo* で活性化できることを示す。第3章では、大規模なヒト試験において *L. lactis* JCM 5805 摂取がインフルエンザ様疾患の発症を抑制すること、そしてヒトインフルエンザウイルス刺激に対する応答性が高まることを示す。第4章では、マウスを用いた試験によって環境ストレス、具体的には高温ストレスが pDC 活性を低下させること、さらに低下した pDC 活性を *L. lactis* JCM 5805 摂取によって改善できる可能性を示す。そして第5章では、老化促進モデルマウスを用いて、生涯にわたって *L. lactis* JCM 5805 を長期摂取することで、老化抑制および寿命延長効果が期待できることを示す。最後に、第6章では本論文の総合討論を示す。

第 2 章

L. lactis JCM 5805 による

ヒト由来 pDC 活性化作用の検証

第2章 *L. lactis* JCM 5805 によるヒト由来 pDC 活性化作用の検証

1. 要約

マウス由来 pDC を活性化できる乳酸菌として見出された *L. lactis* JCM 5805 について、ヒト由来 pDC に対しても同様の作用があるのか検証を行った。ヒト由来末梢血単核細胞より pDC を単離し、*in vitro* において *L. lactis* JCM 5805 を添加培養したところ、pDC による *L. lactis* JCM 5805 の貪食が認められ、pDC 活性が上昇することを確認した。また、*IFN* 遺伝子群および *IRF* 遺伝子群の転写解析を行ったところ、これらの遺伝子の転写レベルが上昇していた。マウスと異なり、タンパク質レベルでの *IFN* 類の産生誘導は確認されなかったことから、ヒト由来 pDC に対してはマイルドな刺激であると考えられるものの、ウイルス感染時の応答性を高めている可能性が示唆された。

続いて、*L. lactis* JCM 5805 摂取時の生体内 pDC の活性を検証するために、38 名の健康成人男女を対象に 4 週間摂取の二重盲検群間比較試験を実施した。その結果、プラセボグループの pDC 活性が摂取期間前後で有意に低下するのに対し、*L. lactis* JCM 5805 グループ (*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取グループ) では pDC 活性の低下がなく、摂取期間後の pDC 活性の比較において、*L. lactis* JCM 5805 グループが有意に高いという結果であった。また、摂取期間前の pDC 活性を基に高 pDC 活性層と低 pDC 活性層に分けて層別解析を行ったところ、低 pDC 活性層において効果が顕著であった。加えて、低 pDC 活性層においては、摂取期間前後の *IFN- α* 遺伝子の転写量や、TLR9 リガンドである CpG 刺激に対する *IFN- α* 産生量が、*L. lactis* JCM 5805 グループにおいてのみ有意に上昇することも確認された。これらの結果から、ヒトにおける *L. lactis* JCM 5805 摂取による免疫賦活効果は、特に pDC 活性が低い際に有効的であると考えられた。さらに、摂取期間中の風邪様症状の主観的評価の解析により、摂取期間の最終週 (第 4 週) において *L. lactis* JCM 5805 グループの累積発症日数が有意に低くなり、感染防御効果がある可能性が示唆された。

2. はじめに

ウイルス感染はしばしば我々の生活の脅威となり深刻な問題の引き金となる。pDC は IFN 産生細胞として抗ウイルス免疫反応において重要な役割を果たすことが知られている[1, 2]。pDC は異なる 2 種の Toll 様受容体、TLR7 と TLR9 を発現している[3]。TLR7 はインフルエンザウイルスのような ssRNA ウイルスを感知するとされ、イミキモドや R-848 のような合成物質も認識することができる[4-6]。一方、TLR9 は DNA ウイルスの ssDNA の CpG モチーフを感知するとされ、合成したオリゴデオキシヌクレオチドも同様に認識することができる[7-9]。リガンドである核酸を感知すると、MyD88 経路を介して、IRF7 が活性化、リン酸化され、核内に移行して I 型 IFN の転写を引き起こす[10, 11]。pDC においては構成的に IRF7 を高発現しており[12]、エンドソームで TLR9 リガンド DNA を長期間保持するユニークな能力を有することで IRF7 の活性化を維持することができ、それによって他細胞と比較して迅速で豊富な I 型 IFN の産生が可能となっている[13]。

私達の研究チームでは、これまでに *L. lactis* JCM 5805 がマウス由来 pDC を活性化し、I 型および III 型 IFN 産生を促すことを明らかにしてきた[50]。このような作用は、*Staphylococcus aureus* のような病原性細菌では報告があるものの[51]、他の乳酸菌では報告されていない稀有なものである。乳酸菌は伝統的にヨーグルト、チーズ、漬物等の発酵食品に用いられており、また、整腸や免疫機能に効果を有するためサプリメントとしても摂取されている。顕著な効果の一例としてアレルギー症状の改善効果が報告されている[40-42]。近年、多くの研究者が乳酸菌摂取による感染防御機能に着目しており、動物感染モデル試験や[43-45]、ヒトを対象とした臨床試験が報告されている[46-48]。

本章では、ヒト pDC に対する *L. lactis* JCM 5805 の効果の検証を目的とした *in vitro* 試験とヒト試験の結果および考察を述べる。

3. *in vitro* におけるヒト由来 pDC に対する効果

3.1. 実験方法

1) 乳酸菌の調製

L. lactis JCM 5805 は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN-BRC) 微生物材料開発室、Japan Collection of Microorganisms (JCM) から購入した。*in vitro* 試験に用いた *L. lactis* JCM 5805 は 30°C、48 時間、定法に従い M17 培地 (OXOID) を用いて培養し、滅菌蒸留水を用いて 2 回洗浄後、100°C で熱殺菌し、凍結乾燥を行って、PBS に懸濁した。

2) ヒト由来 pDC および mDC の単離

Lonza 社より健康でウイルスフリー (HIV、HBV、HCV、HTLV) のヒト由来末梢血単核細胞 (PBMC) を購入した。pDC は以下の方法で PBMC より分離した。

① CD14 MicroBead kit (Miltenyi Biotec) を用いて、単球、マクロファージ、mDC を除去した。

② CD304 (BDCA4/Neuropilin-1) MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) を用いて pDC 画分を濃縮した。

③ FACS Aria (BD Biosciences) を用いて CD123⁺BDCA4⁺細胞 (pDC) を単離し、最終的な pDC の純度は 95% 以上となるようにした。

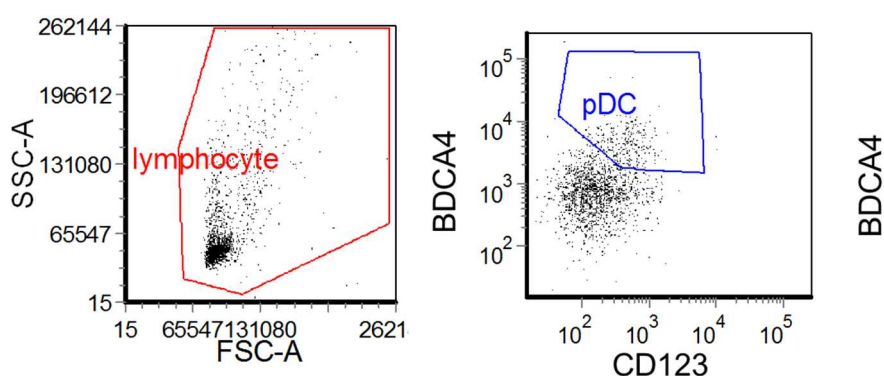
mDC については、上記①で除去した細胞群から、CD1c (BDCA-1) + Dendritic Cell Isolation kit (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。

3) ヒト由来 pDC および mDC の培養

10 ng/ml の IL-3 (R&D systems) を加えた RPMI 培地を用い、96 穴プレートで密度 1×10^5 cells/ml となるように pDC を播種し、10 g/ml の *L. lactis* JCM 5805、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103、およびポジティブコントロールとして 1 μ M CpG2216 (Invitrogen) を添加し、37°C で 24 時間培養した。試験は 3 連で実施した。また、mDC との混合培養試験においては、pDC と mDC がそれぞれ 1×10^5 cells/ml となるように培養した。

4) pDC および mDC の活性評価

細胞は以下の蛍光標識抗体を用いて染色した；CD123-FITC (AC145)、BDCA4-APC (AD-17F6) (Miltenyi Biotec.)、CD86-PE (IT2.2) (eBioscience)、HLA-DR-PerCP (L243) (BD Pharmingen)。染色後、FACS buffer (0.5% BSA in PBS buffer)を用いて2回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドを用いて再懸濁し、FACS 分析に供試した。FACS Cant II (BD Biosciences)を用いてデータを取得し、FCS Express software (De Novo Software)を用いて分析を行った。CD123+BDCA4+細胞を pDC と定義し (参考図 A)、CD86 および HLA-DR の発現強度を活性化の指標とした。



参考図 A FACS プロファイル

5) IFN α の定量

The ELISA kit for human IFN α (pan specific) (MABTECH 社) を用いて分析した。

6) 遺伝子発現解析

Total RNA を RNeasy Kit (Qiagen)を用いて抽出し、iScript cDNA synthesis kit (BioRad)を用いて cDNA 合成を行った。qRT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)および LightCycler 480 (Roche)を用いて実施した。IFN α -1、IFN α -2、IFN- β 、IFN- λ 1、IFN- λ 2/3、および TLR9 のプライマーは既報の手法に従った[54, 55]。リファレンス遺伝子には GAPDH 遺伝子を用いた。IRF3、IRF5、IRF7、IRF8 のプライマーは以下の通り設計した。

IRF3 F (GTGCTGAGCTGCCTGGGTGG), IRF3 R (CCATGCCCGCTGTTGGGGAG)

IRF7 F (GTGGAATTCCGGGCACGGCA), IRF7 R (CGGCACAGCCAGGGTTCCAG)

IRF5 F (CTGAAGCCCTGGCTGGTGGC), IRF5 R (CTCCGTCCTGGCTGGGACCA)

IRF8 F (CCGGAGGCCTGTCCGAGTCA), *IRF8* R (TGCTGAATGGTGCGCGTCGT)

7) 食食能評価

pDC による乳酸菌の食食能を検証した。FITC isomer 1 (Sigma) を 0.1 M NaHCO₃ pH9.0 に 0.1 mg/ml となるように溶解させた FITC 溶液に、乾燥乳酸菌体を 1 mg/ml となるように懸濁し、25°C で 60 分インキュベートさせ、PBS で 3 回洗浄し、FITC ラベルした乳酸菌サンプルを調整した。FACS Aria を用いて PBMC から単離した pDC をカバーグラス (Matsunami Glass Industries, Ltd.) にセットし、FITC ラベルした乳酸菌を 10 µg/ml 添加して 37°C で 24 時間インキュベートした。PBS でカバーグラスを洗浄した後、蛍光染色抗体 Anti-Human HLA-DR Purified (eBioscience) および Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (H+L) (Life Technologies) を用いて 1 時間 pDC の染色を行った。OLYMPUS BX60 を用いて蛍光顕微鏡下で観察を行った。

8) 統計解析

多重比較において、一元配置分散分析を行い有意差があることを確認した上で、ダネットの検定を用いて解析を行った。

3.2. 実験結果

1) ヒト由来 pDC 活性化作用の検証

本研究ではまず、*L. lactis* JCM 5805 が、異なる4人（サンプルA-D）のPBMCから単離したpDCを活性化させるかどうかの検証を行った。pDC活性は、pDCの表面マーカーであるHLA-DRおよびCD86の発現強度によって評価した。試験区は、無添加コントロール（medium）、CpG2216添加（ポジティブコントロール）、*L. lactis* JCM 5805 添加、および*Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 添加（対照乳酸菌）とし、培養後にFACS解析を行った。その結果、サンプルAにおいて、*L. lactis* JCM 5805 添加区のpDC表面マーカーHLA-DRおよびCD86の発現は、無添加コントロール区よりも有意に高かった（Fig. 2-1）。サンプルBにおいては、*L. lactis* JCM 5805 区のHLA-DRの発現が無添加コントロール区よりも有意に高かった（Fig. 2-1）。サンプルCおよびDにおいては、*L. lactis* JCM 5805 区のHLA-DRおよびCD86の発現は無添加コントロール区と比較して有意な差異は見られなかった。これらの結果は、*L. lactis* JCM 5805 がヒト由来pDCを活性化できる可能性を示唆している。

また、マウス由来のpDCを用いた試験ではpDCとmDCを混合させることによって一層pDCの活性化が確認されたことから[50]、本研究においても、別の異なる4人のPBMCから単離したpDCおよびmDCを用いた試験を実施した。試験区は、無添加コントロール（medium）、CpG2216添加（ポジティブコントロール）、*L. lactis* JCM 5805 添加、および*L. rhamnosus* ATCC53103 添加（対照乳酸菌）とし、培養後にFACS解析を行った。その結果、サンプルAおよびCにおいて、*L. lactis* JCM 5805 添加区のHLA-DRの発現が無添加コントロール区よりも有意に高かった（Fig. 2-2）。

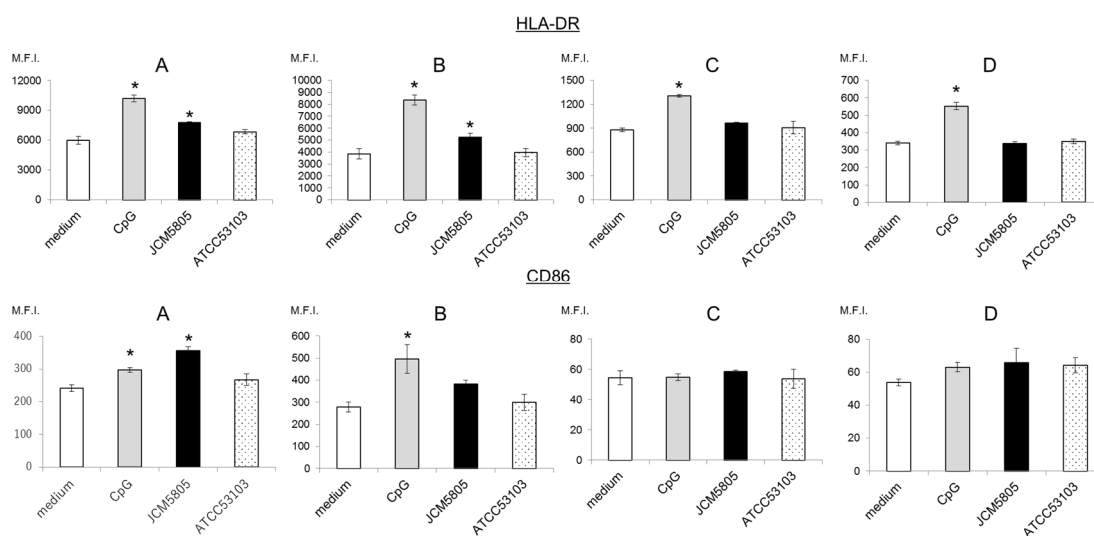


Fig. 2-1 *L. lactis* JCM 5805 刺激したヒト pDC 活性

健康なドナー4名（サンプル A-D）の PBMC から精製した pDC を 10 $\mu\text{g/ml}$ の *L. lactis* JCM 5805 または 1 μM の CpG2216 とともに 37°C で 24 時間培養した (n=3)。pDC 上の細胞表面マーカー（HLA-DR および CD86）の発現レベルをフローサイトメトリーで評価した。数字は蛍光強度の中央値（median fluorescence intensity, MFI）を示す。値は 3 反復の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。ダネットの検定を用いて統計解析を行った。*は medium との比較で $P < 0.05$ であることを示す。

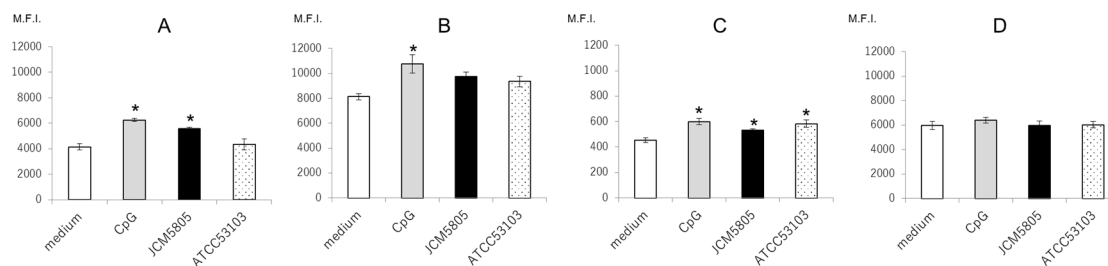


Fig. 2-2 mDC 混合培養時に *L. lactis* JCM 5805 刺激したヒト pDC 活性

健康なドナー4名（サンプルA-D）のPBMCから精製したpDCおよびmDCを10 μg/mlの*L. lactis* JCM 5805または1 μMのCpG2216とともに37°Cで24時間培養した(n=3)。pDC上の細胞表面マーカーHLA-DRの発現レベルをフローサイトメトリーで評価した。数字は蛍光強度の中央値（median fluorescence intensity, MFI）を示す。値は3反復の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。ダネットの検定を用いて統計解析を行った。*はmediumとの比較でP<0.05であることを示す。

2) IFN 産生誘導能の検証

L. lactis JCM 5805 添加による pDC の IFN 産生誘導能の評価を行った。ELISA 法による pDC の IFN- α 産生量の評価においては、CpG2216 添加区では顕著な産生が確認できたものの、*L. lactis* JCM 5805 添加区では顕著な産生は見られなかった (Fig. 2-3)。そこで、*L. lactis* JCM 5805 添加が pDC の IFN 類遺伝子の発現に影響しているか検証するために、qRT-PCR 法による遺伝子転写解析を行った。その結果、Fig. 2-4A に示す通り、*L. lactis* JCM 5805 添加区の IFN- $\alpha 1$ 遺伝子および IFN- $\alpha 2$ 遺伝子の転写量が、無添加コントロール区と比較してそれぞれ 3.2 倍および 7.4 倍高くなった。また、IFN- β 遺伝子、IFN- $\lambda 1$ 遺伝子および IFN- $\lambda 2/3$ 遺伝子の転写量に関しても、それぞれ 5.4 倍、7.7 倍および 4.6 倍高くなった (Fig. 2-4A)。CpG 添加区では IFN 類遺伝子の著しく高い転写量が確認されたが、これに対して *L. lactis* JCM 5805 はヒト pDC に対してマイルドな刺激を与えると考えられる。そこで、IFN 産生に関与するシグナル経路の因子である TLR9 や IFN 調節因子である IRF3、IRF5、IRF7 および IRF8 の遺伝子についても転写解析を行った。その結果、興味深いことに、IFN 類遺伝子とは異なり、TLR9 遺伝子や IRF 類遺伝子の転写量は *L. lactis* JCM 5805 添加区と CpG 添加区で同等に高くなった (Fig. 2-4B)。

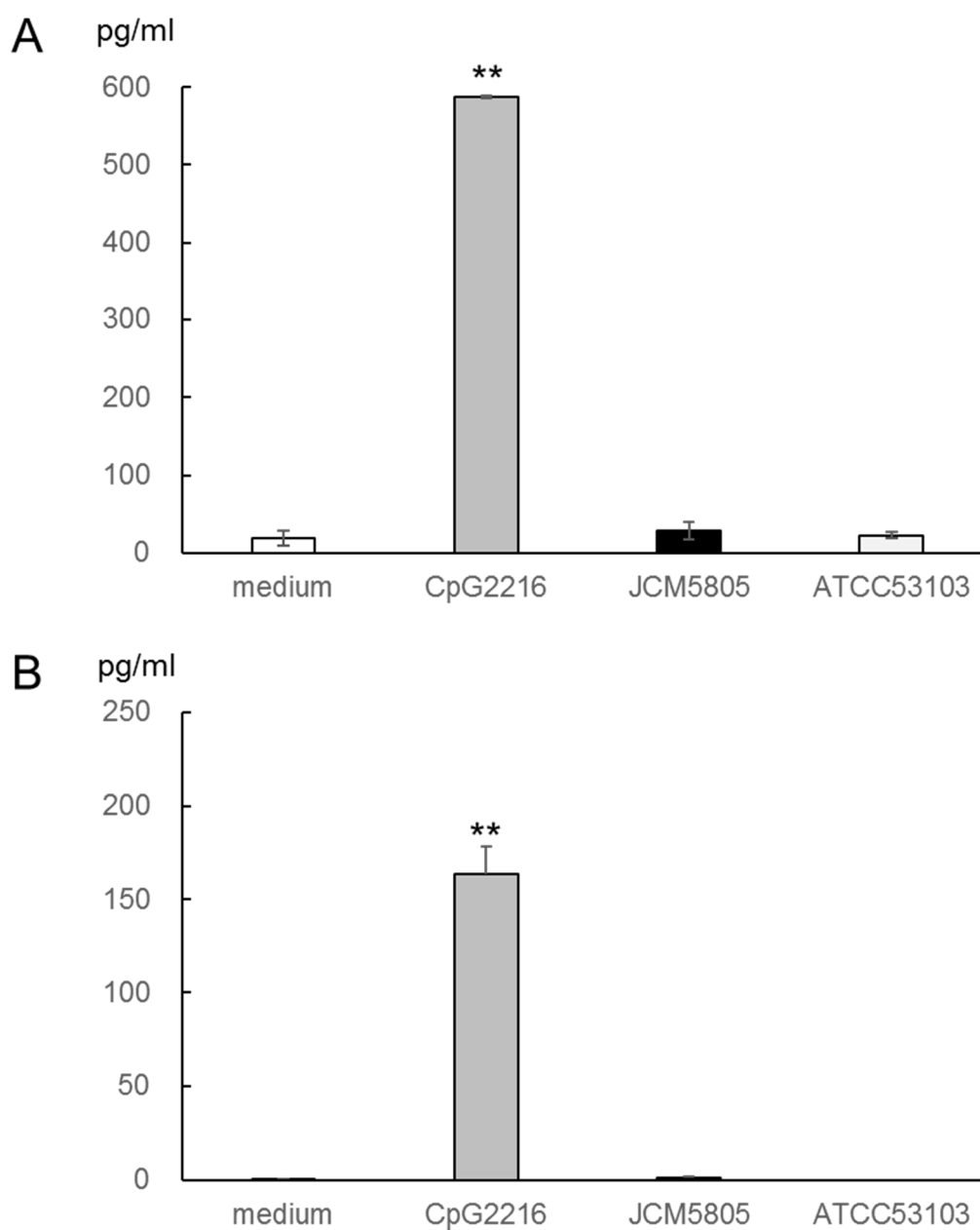


Fig. 2-3 *L. lactis* JCM 5805 刺激したヒト pDC の IFN α 産生量の評価

健康なドナー2名の PBMC から精製した pDC を 10 μ g/ml の *L. lactis* JCM 5805 または 1 μ M の CpG2216 とともに 37°C で 24 時間培養した (n=3)。培養上清中の IFN α を ELISA 法で測定した。値は 3 反復の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。**は:培地 (ネガティブコントロール) との比較で P<0.01 を示す。A、B は異なるドナーの PBMC から調製した pDC サンプルの結果を表す。

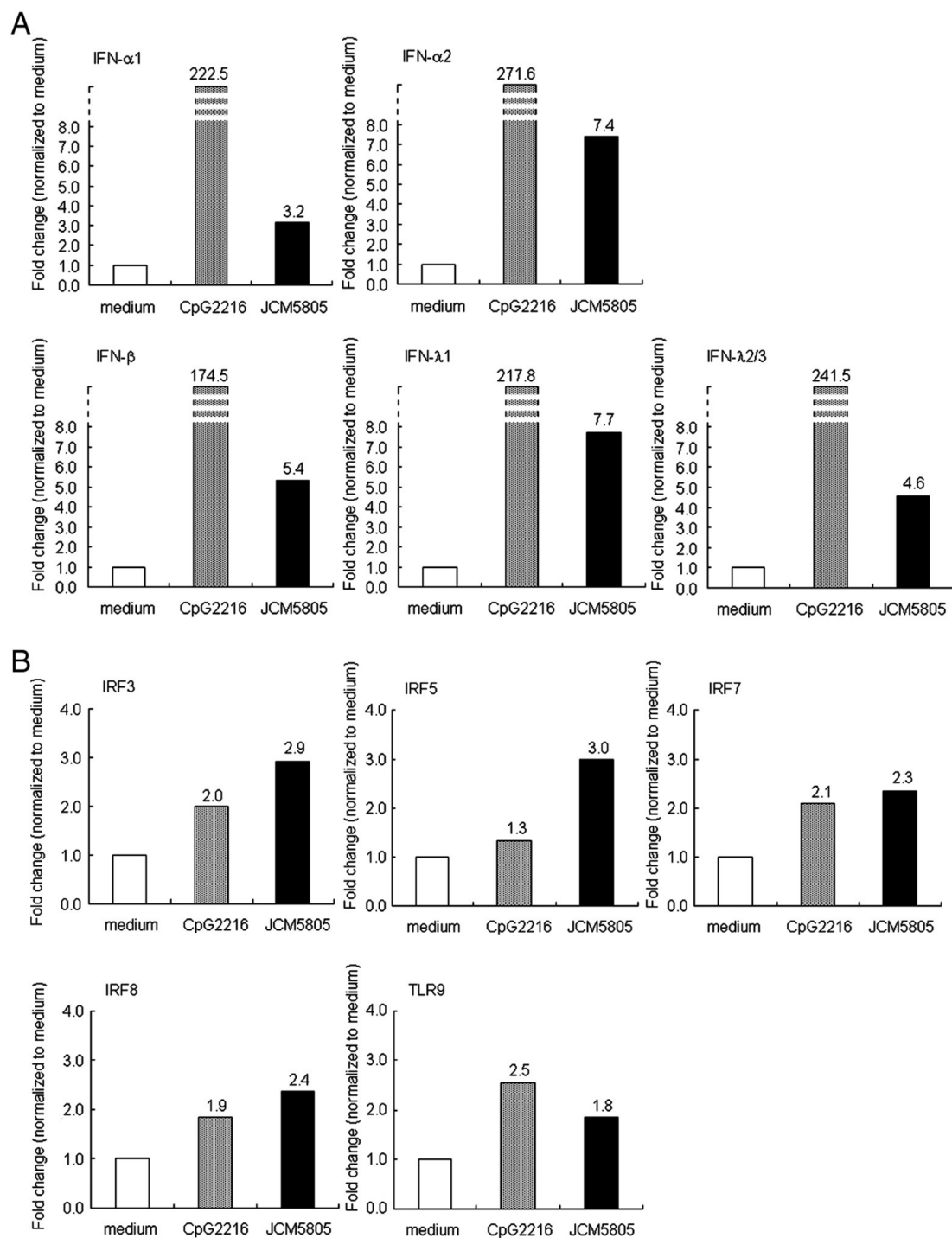


Fig. 2-4 *L. lactis* JCM 5805 刺激したヒト pDC の遺伝子転写解析

qRT-PCR は PBMC から精製したヒト pDC (n=1) を用いて行った。(A) IFN 群遺伝子、(B) IRF ファミリー遺伝子および TLR9 遺伝子。リファレンス遺伝子には GAPDH 遺伝子を用いた。いずれも無添加培地のコントロールで正規化した相対値を示す。

3) 貪食能の検証

ヒト由来 pDC の乳酸菌貪食能を検証するために、蛍光染色ラベルした *L. lactis* JCM 5805 をヒト pDC に添加し、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、*L. lactis* JCM 5805 は 24 時間以内にヒト pDC に取り込まれた (Fig. 2-5)。この結果は、ヒト pDC が *L. lactis* JCM 5805 を貪食できることを示唆している。

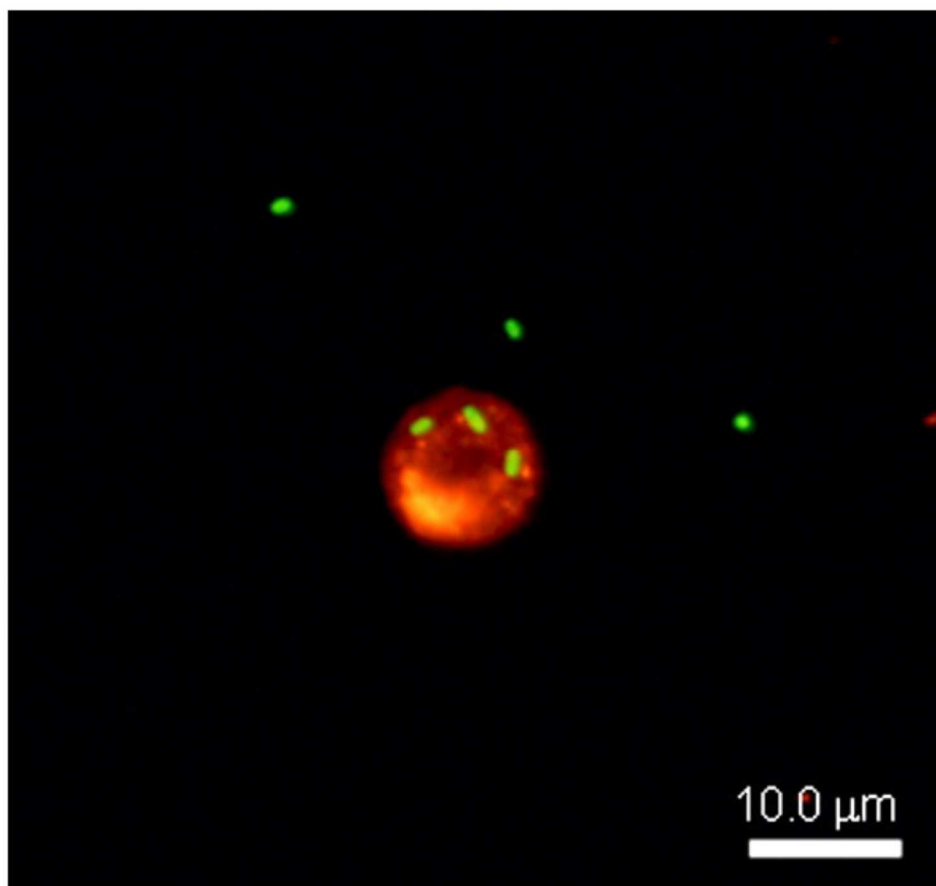


Fig. 2-5 *L. lactis* JCM 5805 刺激したヒト pDC の蛍光顕微鏡観察

FITC で染色した *L. lactis* JCM5805 を PBMC から精製したヒト pDC に添加し、その後 24 時間インキュベートした。pDC は Alexa Fluor 546 標識した HLA-DR 抗体で染色し、蛍光顕微鏡観察下で画像化した。*L. lactis* JCM 5805 : 緑色、pDC : 赤色

4. *L. lactis* JCM 5805 摂取による効果の検証（夏期・小規模）

4.1. 試験方法

1) 被験者

被験者は事前血液検査および背景調査を元に、重篤な持病、免疫疾患、乳アレルギーを有さず（既往歴を含む）、日中勤務の健康な日本人成人男女を 38 名選抜した。被験者は、年齢、性別、一般生体マーカー、および背景調査をもとに、*L. lactis* JCM 5805 グループとプラセボグループで有意差がないよう 19 名ずつ 2 グループに分けた。各グループの平均年齢はそれぞれ 39.1 歳、39.6 歳となった。

本試験はキリンホールディングス株式会社のヒト試験倫理委員会の承認のもと実行した。また、ヘルシンキ宣言に則り、すべての被験者に対して試験の説明を実施し、インフォームドコンセントを得ている。

2) 試験サンプル

L. lactis JCM 5805 を用いて発酵したヨーグルト飲料およびプラセボ飲料は小岩井乳業株式会社で作製した。100 mL の *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料中には 1×10^{11} cfu の *L. lactis* JCM 5805 が含有されている。プラセボ飲料は発酵をしておらず、*L. lactis* JCM 5805 および発酵に由来する成分は含まない。下記の組成物は *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料とプラセボ飲料で同量であり、香味及び形状も同等のものである。

組成物：牛乳、脱脂粉乳、牛乳ペプチド、グラニュー糖、ペクチン、乳酸、香料、水

3) 試験デザイン

本試験はランダム化プラセボ対照二重盲検試験で実施された。グループ分けした後に、各グループの被験者は 100 mL の *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料および 100 mL のプラセボ飲料を 4 週間毎日摂取した（2011 年 8 月 1 日～2011 年 8 月 28 日）。摂取期間中、被験者は毎日の風邪様症状を記録した。血液サンプルは摂取期間の前後に採取した。試験終了後、試験責任医師による問診を実施し、本試験の試験食品に起因する有害事象の有無を確認した。また、摂取期間中、乳酸菌を含有する食品およびサプリメント等の摂取を禁止した。

4) 日誌および風邪様症状の記録

全ての被験者は、試験サンプルの摂取状況、乳酸菌を含有する食品およびサプリメント等の摂取の有無、および医薬品を摂取状況に関して日誌に記録した。毎日の試験サンプル摂取や乳酸菌を含有する食品およびサプリメント等の摂取の禁止に反した被験者、および免疫機能に影響があると考えられる医薬品（特にステロイド系の抗炎症剤）を摂取した被験者は解析対象から除外することとした。

また、被験者は以下の風邪様症状を発症した日を記録した。①鼻水、②鼻づまり、③くしゃみ、④喉の痛み、⑤咳、⑥頭痛、⑦熱っぽさ、いずれかの症状を一つでも発症した日を風邪様症状発症日とし、週ごとに累積発症日を算出し、グループ間で比較解析を行った。

5) 一般血液検査および PBMC 採取

被験者の血液を用いた一般血液検査および PBMC の採取は株式会社ファルコバイオシステムズ（京都）に委託して実施した。一般血液検査の結果は試験責任医師によって、有害事象の有無の確認を行った。

6) FACS 解析、*ex vivo* 解析

pDC 活性測定のための FACS 解析は 3.1.3) と同様にして行った。*ex vivo* 解析については、TLR9 リガンドである CpG に対する応答性を次の方法で実施した。PBMC を RPMI 培地に 5×10^5 cells/ml となるよう 24 穴プレートに播種し、CpG2216 (Invitrogen) を無添加および $0.5 \mu\text{M}$ となるように添加し、 37°C で 24 時間培養した。培地上清中の IFN- α 濃度は ELISA 法で測定した。CpG2216 は type A CpG に属し、TLR9 のリガンドであり、PBMC 中では pDC を選択的に活性化して IFN α 産生を誘導することができる。

7) 遺伝子発現解析

Total RNA を RNeasy Kit (Qiagen) を用いて抽出し、iScript cDNA synthesis kit (BioRad) を用いて cDNA 合成を行った。qRT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) および LightCycler 480 (Roche) を用いて実施した。IFN α -1 のプライマーは既報の手法に従った[54]。リファレンス遺伝子には *GAPDH* 遺伝子を用いた。

8) 統計解析

生体マーカーの統計解析において、F 検定により等分散性を確認した上で、グループ間

比較においてはスチューデントの t 検定を用い、同一グループの摂取期間前後の比較においては対応のある t 検定を用いた。等分散ではない際にはウェルチの t 検定を用いることとしたが、該当する結果はなかった。

また、風邪様症状発症の解析においては、週ごとに χ^2 検定を用いた。

4.2. 試験結果

1) *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト摂取による生体内 pDC 活性化作用

L. lactis JCM 5805 が *in vitro* においてヒトの pDC を活性化することが示されたため、続いてランダム化プラセボ対照二重盲検試験においてヒト生体内の pDC を活性化できるか検証を行った。被験者は4週間の摂取期間中に毎日 100 mL の *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルトあるいはプラセボ飲料を摂取し、摂取期間の前後に血液サンプルの採取を行った。

pDC 活性、すなわち pDC 表面マーカーである HLA-DR および CD86 の発現強度を、被験者より採取した PBMC を用いて分析した。摂取期間前においては、HLA-DR および CD86 の発現強度は、*L. lactis* JCM 5805 グループとプラセボグループの間で有意な差は見られなかった。摂取期間後のプラセボ飲料グループの HLA-DR の発現強度は、摂取期間前と比較して有意に低下したが ($P < 0.01$)、*L. lactis* JCM 5805 グループでは有意な変化は見られなかった。その結果、摂取期間後の *L. lactis* JCM 5805 グループの HLA-DR の発現強度は、プラセボグループと比較して有意に高くなった ($P < 0.05$) (Fig. 2-5A)。CD86 に関しては、両グループにおいて発現低下が見られたが、プラセボグループの発現低下が一層顕著であり ($P < 0.01$)、その結果、摂取期間後の *L. lactis* JCM 5805 グループの CD86 の発現強度は、プラセボグループと比較して有意に高くなった ($P < 0.05$) (Fig. 2-6A)。

摂取期間前の pDC 活性を 100% とした際に摂取期間後の pDC 活性比率をグループ間で比較すると、HLA-DR および CD86 いずれにおいても、*L. lactis* JCM 5805 グループが有意に高い結果であった ($P < 0.05$) (Fig. 2-6B)。これらの結果は、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取がヒト生体内 pDC を刺激したことによって、摂取期間中の pDC 活性の低下を抑制したことを示唆している。

より詳細な解析を行うため、摂取期間前の HLA-DR 発現強度の平均値 (5043.6 M.F.I.) を基準にして、被験者を高 pDC 活性層と低 pDC 活性層に分けて層別解析を行った。なお、HLA-DR は CD86 よりも pDC 活性の指標としてより適していることが報告されている[56]。興味深いことに、HLA-DR の発現強度の変化率をグループ間で比較すると、高 pDC 活性層では有意な差はない一方で、低 pDC 活性層では *L. lactis* JCM 5805 グループがプラセボグループに対して有意に高かった ($P = 0.013$) (Fig. 2-6C)。このことから、*L. lactis* JCM 5805 グループとプラセボグループの pDC 活性化度の違い

は、低 pDC 活性層の被験者における *L. lactis* JCM 5805 による刺激の感受性の違いが重要であることが示唆された。

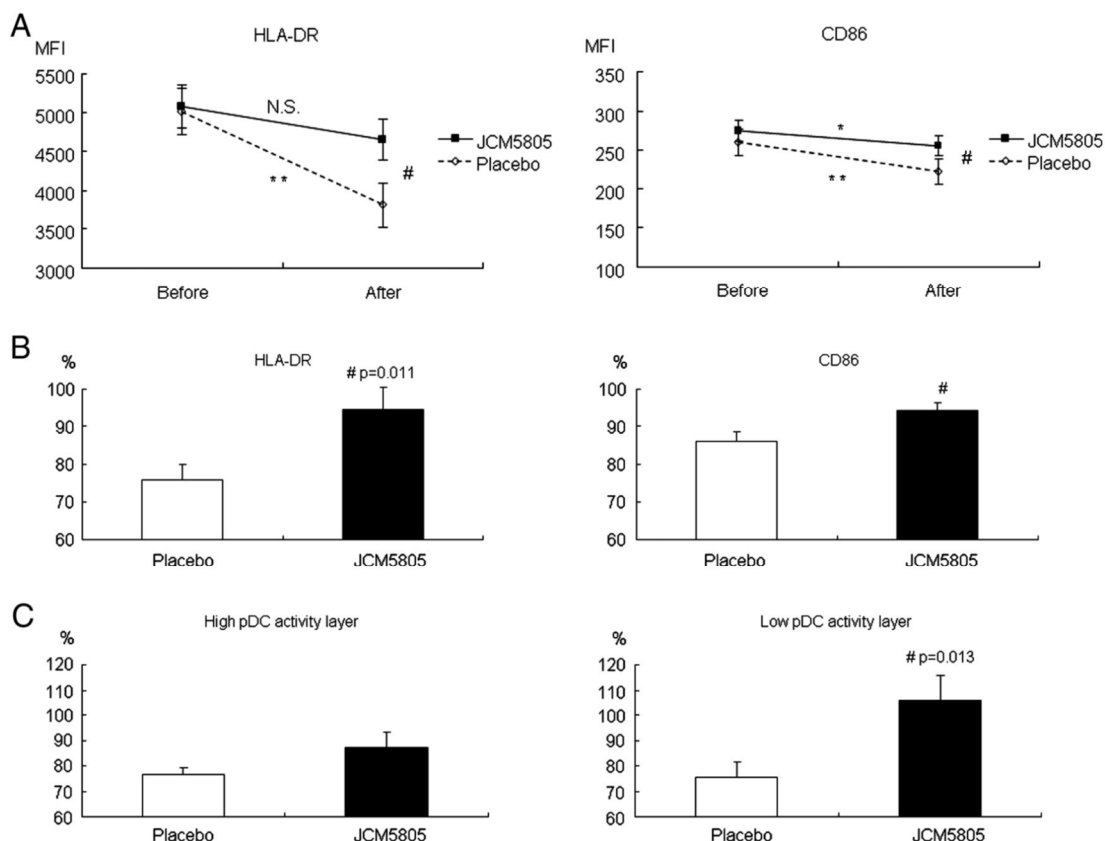


Fig. 2-6 *L.lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取が pDC 活性に及ぼす影響

(A) *L. lactis* JCM 5805 グループとプラセボグループの摂取期間前後における pDC 上の HLA-DR および CD86 レベルの比較。摂取期間前の HLA-DR 発現量が異常値（平均±2SD）であった 2 名の被験者のデータは解析から除外した。*L. lactis* JCM 5805 グループ：n=18、プラセボグループ：n=18。(B) 摂取期間前後での pDC 活性の変化率（摂取期間前のデータを 100%とした）。*L. lactis* JCM 5805 グループ：n=18、プラセボグループ：n=18。(C) pDC 活性の高い層と低い層における pDC 上の HLA-DR の変化率。摂取期間前の HLA-DR 発現量が 36 サンプルの平均値（5043.6M.F.I.）以上であるか否かで、被験者を高 pDC 活性層と低 pDC 活性層に層別した。*L. lactis* JCM 5805 グループの高 pDC 活性層：n=11、*L. lactis* JCM 5805 グループの低 pDC 活性層：n=7、プラセボグループの高 pDC 活性層：n=6、プラセボグループの低活性 pDC 層：n=12。データは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。グループ間比較においてはスチューデントの t 検定を用い、同一グループの摂取期間前後の比較においては対応のある t 検定を用いた。#:2 群間の比較において P<0.05。*および**：摂取期間前後の比較において P<0.05 および P<0.01。N.S.：有意な変化なし。

2) 低 pDC 活性層における IFN 産生能の上昇効果

IFN- α 1 遺伝子の転写レベルは、両グループにおいて摂取期間前後で有意な差は見られなかった (Fig. 2-7)。そこで、*IFN- α 1* 遺伝子の転写レベルに関して、前述の摂取期間前の pDC 活性の層別で解析を行った。その結果、高 pDC 活性層の *IFN- α 1* 遺伝子転写レベルは両グループにおいて摂取期間前後で有意な差は見られなかったが、*L. lactis* JCM 5805 グループの低 pDC 活性層においては、摂取期間前と比べて摂取期間後の *IFN- α 1* 遺伝子転写レベルが有意に上昇していた ($P < 0.05$) (Fig. 2-7)。この結果は、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取が、低 pDC 活性層において *IFN- α 1* 遺伝子の転写を促進させることを示唆している。

また、ウイルスを想定した核酸リガンドに対する IFN- α 産生能を検証するために、被験者の PBMC を CpG ODN で刺激培養して IFN- α 産生量を評価した。なお、CpG ODN 無添加では IFN- α の顕著な産生はないことを確認している (data not shown)。Fig. 2-8 に示す通り、全被験者を対象とすると、IFN- α の産生能は両グループにおいて摂取期間前から上昇していることが示唆された。層別にみると、高 pDC 活性層においてはプラセボグループで IFN- α 産生能が有意に上昇するのに対し、低 pDC 活性層においては *L. lactis* JCM 5805 グループで IFN- α 産生能が有意に上昇するという結果であった。

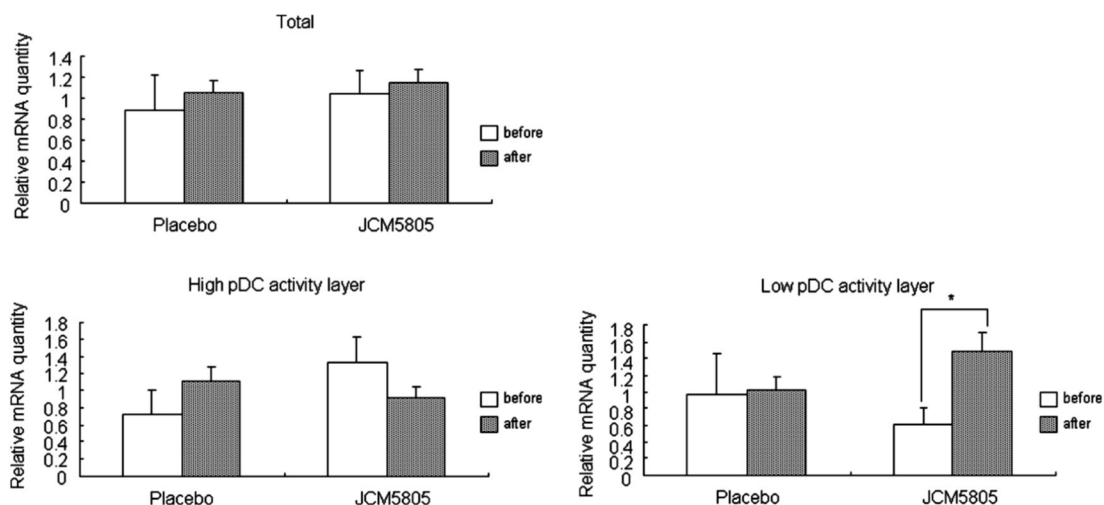


Fig. 2-7 *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取前後における *IFN-α1* 転写量の変化

L. lactis JCM 5805 グループ : n=18、プラセボグループ : n=18. *L. lactis* JCM 5805 グループの高 pDC 活性層 : n=11、*L. lactis* JCM 5805 グループの低 pDC 活性層 : n=7、プラセボグループの高 pDC 活性層 : n=6、プラセボグループの低活性 pDC 層 : n=12。リファレンス遺伝子には *GAPDH* 遺伝子を用いた。データは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。同一グループの摂取期間前後の比較においては対応のある t 検定を用いた。
*は摂取期間前後の比較において $P < 0.05$ であることを示す。

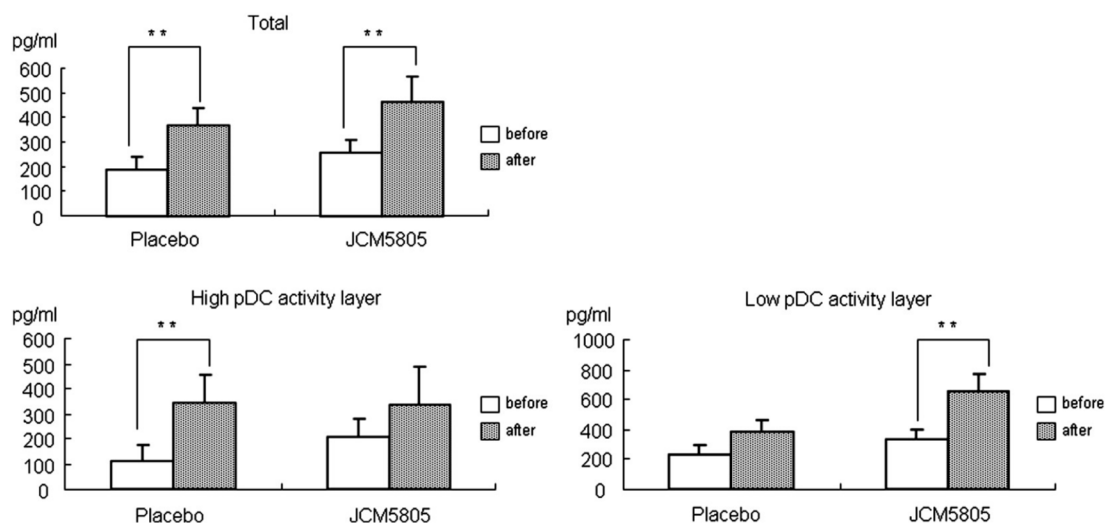


Fig. 2-8 *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取前後における CpG ODN 刺激に対する IFN- α 産生能の比較

被験者の PBMC を CpG2216 の存在下で培養し、培養上清中の IFN- α の濃度を測定した。*L. lactis* JCM 5805 グループ : n=18、プラセボグループ : n=18。 *L. lactis* JCM 5805 グループの高 pDC 活性層 : n=11、 *L. lactis* JCM 5805 グループの低 pDC 活性層 : n=7、プラセボグループの高 pDC 活性層 : n=6、プラセボグループの低活性 pDC 層 : n=12。データは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。同一グループの摂取期間前後の比較においては対応のある t 検定を用いた。**は摂取期間前後の比較において P<0.01 であることを示す。

3) *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取が風邪様症状の発症に及ぼす影響

L. lactis JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取による風邪様症状の発症に対する効果は、被験者が摂取期間中に記録した日誌の風邪様症状の有無をもとに解析を行った。詳細は 4.1.4) に記載した通りであり、風邪様症状の累積発症日数を週ごとにグループ間で比較解析した。その結果、第1週から第3週まではグループ間で有意な差はなかったが、第4週において、*L. lactis* JCM 5805 グループの風邪様症状の累積発症日数がプラセボグループに対して有意に低いという結果であった。この結果は、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取が感染防御効果を有する可能性を示唆している。

Table 2-1. *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取期間中における1週間あたりの累積発症日数

		症状なし	症状あり	P 値
第1週	JCM 5805 グループ	90	43	P=0.601
	プラセボグループ	84	46	
第2週	JCM 5805 グループ	105	27	P=0.125
	プラセボグループ	95	38	
第3週	JCM 5805 グループ	93	38	P=0.220
	プラセボグループ	85	48	
第4週	JCM 5805 グループ	100	33	P=0.004
	プラセボグループ	78	55	

統計解析には χ^2 検定を用い、週ごとに解析を実施した。基本は *L. lactis* JCM 5805 グループ : n=133 (19名×7日)、プラセボグループ : n=133 (19名×7日) となるが、第1週プラセボグループ (n=130)、第2週 *L. lactis* JCM 5805 グループ (n=132)、第3週 *L. lactis* JCM 5805 グループ (n=131)、第3週プラセボグループ (n=132) は記録が空白の欠損データを除外した。

5. 考察

我々の研究チームの過去の研究において、*L. lactis* JCM 5805 がマウス骨髄由来の pDC を活性化することを明らかにしているが[50]、ヒト pDC に対する効果は不明であった。本研究において、*L. lactis* JCM 5805 がヒト pDC を直接活性化し、I 型および III 型 IFN 遺伝子の転写レベルを上昇させることを初めて示した。pDC 表面マーカーである HLA-DR や CD86 の発現強度は *L. lactis* JCM 5805 刺激と CpG ODN 刺激で同等レベルであった。一方で、CpG ODN 刺激によっては IFN- α 産生誘導できるものの、マウス由来 pDC とは異なり、*L. lactis* JCM 5805 刺激ではタンパク質レベルでの IFN- α 産生は確認できなかった。このことから、*L. lactis* JCM 5805 のヒト由来 pDC に対する刺激は、マウス由来 pDC に対する刺激と比較してマイルドであることが示唆される。興味深いことに、IFN 調節因子である IRF 類の遺伝子は、*L. lactis* JCM 5805 刺激によって CpG ODN 刺激と同等に転写誘導されるが、*L. lactis* JCM 5805 刺激によって誘導される IFN 類の遺伝子は CpG ODN 刺激と比較して顕著に低かった。本試験で評価した IRF 類は、IRF7 や IRF3 を筆頭に、I 型および III 型 IFN 類の産生誘導に非常に重要な因子であることが知られている。今回、*L. lactis* JCM 5805 刺激により *IRF7* 遺伝子の転写は誘導されたことが示唆されたが、タンパク質レベルでの発現や、その後のリン酸化や核内移行による I 型 IFN 遺伝子の転写誘導およびタンパク質発現には至っていない。pDC は、構成的に IRF7 を高発現しており[12]、エンドソームで TLR9 リガンド DNA を長期間保持するユニークな能力を有することで IRF7 の活性化を維持することができ、それによって他細胞と比較して迅速で豊富な I 型 IFN の産生が可能となっている[13]。これより、*L. lactis* JCM 5805 は *in vitro* においてヒト pDC を活性化し、*IRF* 類遺伝子の転写レベルを高め IFN 類産生の準備をさせるが、不要時に過度な IFN 類産生には至らず、ウイルス感染した際に即座に多量の IFN 類産生を可能としているのかもしれない。このことは、医薬品ではなく食品として日常的に摂取するためには適していると考えられる。

ヒトを対象とした摂取試験においては、*L. lactis* JCM 5805 グループにおける風邪様症状の累積発症日数が、摂取期間の最終週においてプラセボグループよりも有意に低くなることが示唆された。この結果は、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取が感染防御効果をもたらす可能性を示唆している。近年、同様に感染防御効果を有する乳酸菌の研究がいくつか報告されているが、それらは CD8⁺T 細胞や CD4⁺T 細胞[57]、NK 細胞[46, 47]、および IgA 産生[45]等に着目したものであり、*in vivo* における pDC 活性や IFN 産生に対

する乳酸菌摂取の効果は知られていない。そこで、本試験では生体内 pDC 活性と抗ウイルス効果に焦点を当てて試験を実施した。摂取期間後、*L. lactis* JCM 5805 グループの pDC 活性はプラセボグループと比較して有意に高かった。このことは、摂取期間中におけるプラセボグループの pDC 活性の顕著な低下が一因となっている。当該ヒト試験が実施されたのは夏期の東京であり (2011 年 8 月 1 日～8 月 28 日)、その平均日中最高温度は 31.2°C と非常に高かった。高温ストレスが免疫機能にネガティブに影響することは報告されており [59, 60]。Yi Jin らは、マウスにおいて慢性的な高温ストレスが DC 成熟とサイトカイン産生能を弱め、ウイルス感染リスクが高まることを報告している [37]。これらのことから、夏期の高温ストレスが *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料非摂取の被験者の pDC 活性を低下させ、一方で *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取によって pDC 活性の低下が抑制されたことが考えられた。夏期の過剰な暑さや室内外の寒暖差等による免疫機能の低下、および免疫機能低下に伴うウイルス感染リスクを、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取によって防ぐ効果が期待される。高温ストレスによる pDC 活性の低下、および *L. lactis* JCM 5805 摂取の効果については、本研究の第 4 章においてマウスを対象とした試験で検証している。

また、pDC による IFN 類産生は高齢者のウイルス感染リスクを軽減する効果があることが報告されている [39, 62, 63]。このことは、老化に伴う pDC 活性の低下が原因の一因と考えられる。本試験においては、60 歳以上の被験者は参加していないが、摂取期間前の pDC 表面マーカー HLA-DR の発現強度を用いて、高 pDC 活性層と低 pDC 活性層に分けた層別解析を実施した。興味深いことに、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取による pDC 活性化の効果は、低 pDC 活性層において顕著であった。I 型 IFN 遺伝子の転写レベルや、CpG ODN 刺激に対する IFN 産生能に関しても、高 pDC 活性層では効果が見られず、低 pDC 活性層に限定的であった。年齢や体質といった内的要因、あるいは環境ストレスによる外的要因によって、pDC 活性が低下した状態においてより効果があるという点も、日常的に摂取する食品として優れた効果であると考えられる。老化による pDC 活性の低下、および *L. lactis* JCM 5805 摂取の効果については、本研究の第 5 章において老化促進モデルマウスを対象とした試験で検証している。

pDC は比較的最近発見された免疫細胞であり、ヒト生体内に非常に低い割合で存在するため、その正確な役割はまだ不明な点が多く残されている。微生物が生体内の DC 類に作用する例は、ビフィドバクテリウム属の摂取により、DC 類への刺激を介して IL-10 の発

現レベルが上昇するといった報告があるが[64]、本研究はラクトコッカス属の乳酸菌がヒト由来 pDC の活性化を示した初めての報告となる。特に、当該乳酸菌で発酵させたヨーグルト飲料を継続的に摂取させることにより、生体内の pDC 活性を高く維持でき、特に低 pDC 活性層において効果が顕著であったことが興味深く、食品としての有用性が示唆される結果であった。

第 3 章

L. lactis JCM 5805 摂取による インフルエンザウイルスに対する効果 の検証

第3章 *L. lactis* JCM 5805 摂取によるインフルエンザウイルスに対する効果の検証

1. 要約

ヒト生体内における pDC 活性化および感染防御効果の可能性が見出されたことから、続いてインフルエンザ様症状の発症に対する効果、およびインフルエンザウイルスに対する応答性の検証を行うために、213 名の健常成人男女を対象に冬期 10 週間摂取の二重盲検群間比較試験を実施した。まず、インフルエンザ様症状の主観的評価の解析により、インフルエンザ様症状の代表的症状である発熱と咳の累積発症日数において、*L. lactis* JCM 5805 グループがプラセボグループに対して有意に低いという結果が得られた。

さらに、被験者の末梢血単核細胞に対して不活化したヒトインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) を添加培養し、*IFN- α* 遺伝子の転写レベルを評価した結果、摂取期間後において *L. lactis* JCM 5805 グループの *IFN- α* 遺伝子の転写レベルがプラセボグループよりも高い傾向にあった。さらに、*IFN* 類によって発現誘導されてインフルエンザウイルスの複製や増殖を抑制することが知られる *ISG15* に関しては、摂取期間後における *L. lactis* JCM 5805 グループの *ISG15* 遺伝子の転写レベルがプラセボグループよりも有意に高かった。

以上の結果から、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料を摂取することによって、インフルエンザウイルスをはじめとするウイルスの感染時における *IFN* 類や *IFN* によって発現誘導される抗ウイルス因子の発現の応答性が高まり、そのことによって咳や発熱といったインフルエンザ様疾患の症状の発症や重症化が抑制されるものと考えられた。

2. はじめに

pDC は、大量の I 型 IFN を産生することにより、ウイルス感染に対する防御の最前線として機能する免疫細胞の重要なサブセットである[1,2]。I 型 IFN は、ウイルスの複製と拡散の阻害に関与する多数のインターフェロン刺激遺伝子 (ISG) の発現を誘導することが知られている[65]。ISG15 はタンパク質修飾に関与するユビキチン様タンパク質であり、IFN によって最も高く誘導される ISG の 1 つとして抗ウイルス免疫に不可欠な役割を果たす[3]。ISG15 はウイルスタンパク質に結合してウイルスの複製と拡散を阻害する[16-19]。また、宿主由来タンパク質を調節し、他の抗ウイルスシステムを高める[65, 66]。さらに、pDC および pDC 由来の I 型 IFN は、T 細胞[23-31]、NK 細胞[32]、B 細胞[33, 34]などのさまざまな免疫因子を制御することにより、抗ウイルス因子の誘導因子および抗ウイルス免疫の「司令官」として機能する。

これまで、通常の乳酸菌は pDC を直接活性化できないことと考えられていた[49]。しかしながら、*L. lactis* JCM 5805 は *in vitro* および *in vivo* においてマウス由来 pDC を活性化できる稀有な乳酸菌として選抜されている[50]。また、マウスを用いたパラインフルエンザウイルス感染モデル実験によって、*L. lactis* JCM 5805 摂取が肺の免疫応答を高め、感染を抑制する効果を確認している[51]。さらに、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取によりヒト生体内の pDC も活性化できることを、本研究の第 2 章で示した[67]。

本研究では、ランダム化プラセボ対照二重盲検試験によって、インフルエンザ様疾患の感染防御効果とインフルエンザウイルスに対する応答性を検証する。

3. *L. lactis* JCM 5805 摂取による効果の検証（冬期・大規模）

3.1. 試験方法

1) 被験者

本試験の被験者は関東在住（東京・神奈川・千葉・埼玉）の日本人から集められた。すべての被験者は30歳から59歳の健康な男女で、重大な疾患（免疫疾患、肝障害、腎障害、心臓病、貧血、既往歴を含む）、牛乳アレルギーおよび重度の花粉症を有さない者とした。また、過去18か月以内にインフルエンザワクチン接種を受けた者、ヨーグルトまたは乳酸菌を含むサプリメントを定期的に摂取している者、妊婦、授乳中の女性、およびアルコール中毒者、その他、試験責任医師が適切ではないと判断した者も除外した。当該試験は、芝パレスクリニック（東京）で実施した。試験実施にあたりインフォームドコンセントを得ている。テストの目的、測定するパラメーター、テストサンプル、除外基準、リスクの可能性などについて十分に説明した。被験者は、事前血液検査、摂取期間の前後の計3回、試験責任医師の診察を受けた。

本試験では各グループの被験者数をおよそ100人強に設定した。これは、38人の被験者に対する前回（第2章参照）のヒト試験データにおける個々の症状のデータを用いてシミュレーションを行い、各グループ80人以上の被験者によって5%有意水準でグループ間差異を検出できることが期待されたためである。事前血液検査（白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、尿酸、尿素窒素、LDL コレステロール、クレアチニン、総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール、AST (GOT)、ALT (GPT)、 γ -GT (γ -GTP)、LD (LDH)、CK、血糖（空腹時））および背景調査を用い、297人の候補者の中から214人を選抜した。

選抜された被験者は、年齢と性別を元にコンピューターでランダムに2グループに分け、*L. lactis* JCM 5805 グループ107人、プラセボグループ107人となった（Table 3-1）。*L. lactis* JCM 5805 グループの被験者1名が、摂取期間後の医師訪問を実施しなかったため除外され、最終的に *L. lactis* JCM 5805 グループ106人が解析対象となった。なお、この試験において有害事象は一切確認されなかった。

本試験はキリンホールディングス株式会社の臨床試験倫理委員会の承認を得て行われており、ヘルシンキ宣言に則って試験説明を行い全ての参加者からインフォームドコンセントを得ている。

Table 3-1 各グループの被験者数と平均年齢

グループ	男性	女性	合計
	人数, 平均年齢 (標準誤差)	人数, 平均年齢 (標準誤差)	人数, 平均年齢 (標準誤差)
プラセボ	47, 45.8 (7.7)	60, 44.5 (7.6)	107, 45.1 (7.6)
JCM 5805	45, 46.0 (8.3)	61, 45.2 (7.1)	106, 45.5 (7.6)

2) 試験サンプル

L. lactis JCM 5805 単独で発酵させたヨーグルト飲料 (100 mL) および乳酸菌を含まないプラセボ飲料 (100 mL) は小岩井乳業株式会社によって製造された。100 mL の *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料はおよそ 1×10^{11} cfu の *L. lactis* JCM 5805 を含有する。プラセボ飲料は発酵をしておらず、*L. lactis* JCM 5805 および発酵に由来する成分は含まない。下記の組成物は *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料とプラセボ飲料で同量であり、栄養素も同量である。また、香味及び形状も同等のものである。

<組成>牛乳、脱脂粉乳、牛乳ペプチド、グラニュー糖、ペクチン、乳酸、香料、水

<栄養素>67 kcal、タンパク質 3.2 g、脂質 0.7 g、炭水化物 12 g

3) 試験デザイン

本試験はランダム化プラセボ対照二重盲検試験によって実施された。被験者は、10 週間 (2013 年 1 月～3 月) にわたって、毎日 *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料あるいはプラセボ飲料を毎日摂取した。摂取期間中、被験者は体温およびインフルエンザ様疾患に基づく症状に関して毎日日誌に記録し、また、医師によるインフルエンザまたは風邪の診断の有無も記録した。血液サンプルは摂取期間の前後に採取した。なお、摂取期間中の乳酸菌を含有する食品の摂取を制限した。本試験については UMIN-CTR (University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry) に登録しており、登録 ID は UMIN000017274 である。主要アウトカムはインフルエンザ様疾患に起因する症状の評価とし、副次アウトカムは取期間の前後に収集された PBMC を使用した免疫学的パラメーター、すなわち pDC の活性とヒトインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) に対する応答性とした。

4) インフルエンザ様疾患症状の解析

被験者は、咳や発熱などのインフルエンザ様疾患の症状の重症度と、のどの痛み、鼻水、鼻詰まり、くしゃみ、頭痛などの一般的な風邪の症状を記録した。重症度は①発症なし、②少しだけある、③多少はある、④かなりある、⑤ひどい、の 5 段階とした。なお、インフルエンザ様疾患は、WHO Global Epidemiological surveillance standards (2014 年) より、「38°C 以上の発熱と咳を伴い発症した急性呼吸器感染症」と定義されている。発熱の重症度は自覚症状によるものとした。

解析にあたっては累積発症日数で評価した。累積発症日数は、一度の罹患で数日間に渡って症状が発症することや、一人の被験者が複数回発症することを包括的に評価するのに有効な指標である。症状なしを含む5段階の重症度における累積発症日数について、カテゴリに順序のあるデータとしてウィルコクソンの順位和検定を行い、2グループ間の有意差検定を行った。また、重症度を「①発症なし、②少しだけある、③多少はある」および「④かなりある、⑤ひどい」に分け、 χ^2 検定を用いてグループ間で累積発症日数を比較し、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取が重篤な症状の発現期間に影響を与えるか検証した。

5) FACS

被験者から採取した PBMC は以下の蛍光染色抗体で標識した。用いた抗体は以下に示す通り：CD123-FITC (AC145)、BDCA4-APC (AD-17F6) (Miltenyi Biotec)、CD86-PE (IT2.2) (eBioscience)、HLA-DR-PerCP (L243) (BD Pharmingen)。抗体標識した細胞は FACS buffer (0.5% BSA in PBS buffer) で2回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドに懸濁して FACS に供試した。データは FACS Cant II (BD Biosciences) を用いて取得し、FCS Express software (De Novo Software) により解析した。pDC は CD123⁺ BDCA4⁺ の細胞と定義し、pDC 表面マーカーである HLA-DR および CD86 の発現強度を pDC 活性の指標とした。分析エラーの影響を排除するために、データが外れ値 (平均値 \pm 2SD) である被験者は解析から除外した。

6) ヒトインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) に対する免疫反応性

ヒトインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) は国立感染症研究所において増殖され不活化 (56°C、60分) されたものを用いた。ウイルス感作に対する免疫応答は以下のようにして評価した。被験者より採取した PBMC を 1×10^6 cells/ml となるように RPMI 培地に懸濁し 48 穴プレートに播種し、20 ng/ml となるように不活化ウイルスを添加して、37°C で 24 時間培養する。培養後、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、iScript cDNA synthesis kit (BioRad) を用いて定法に従って cDNA を作成する。qRT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) および LightCycler 480 (Roche) を用いて実施し、 β -ACTIN 遺伝子をレファレンス遺伝子とした。第2章で実施したヒト試験において、保管期間の長いサンプルの遺伝子発現量が一律に低い値であったことをふまえて、

サンプルの保管期間の影響をなくしてグループ間の転写レベルを比較するために、摂取期間前後のそれぞれにおいてプラセボグループの転写レベルの平均値を用いて基準化した。用いたプライマーの配列を以下に示す。

β-ACTIN F (5'-gagcgggaaatcgtgcgtgacatt-3')

β-ACTIN R (5'-tgcccaggaaggaaggctggaaga-3')

IFN-α F (5'-ctcccctgatgaatgctgactcca-3')

IFN-α R (5'-tgctctgacaacctcccaggcaca-3')

ISG15 F (5'-gcgggcaacgaattccaggtgt-3')

ISG15 R (5'-tcgcatttgtccaccaccagca-3')

7) 統計解析

試験中にインフルエンザまたは風邪感染と診断された被験者の累積人数は χ^2 検定を用いた。各症状の累積発症日数は、先述の通りウィルコクソンの順位和検定と χ^2 検定を用いて評価した。

生体マーカーの統計解析において、F 検定により等分散性を確認した上で、グループ間比較においてはスチューデントの t 検定を用い、同一グループの摂取期間前後の比較においては対応のある t 検定を用いた。

3.2. 試験結果

1) *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取がインフルエンザおよびインフルエンザ様疾患の発症に及ぼす影響

10 週間の摂取期間終了後、医師によってインフルエンザまたは風邪と診断された被験者の累積人数を評価した。プラセボグループで 14 人、*L. lactis* JCM 5805 グループで 7 人がであった (Table 3-2)。医師がインフルエンザと診断した被験者の数は、各グループに 1 人であった。インフルエンザまたは風邪と診断された累積人数は、*L. lactis* JCM 5805 グループで低かったが、2 つのグループ間に統計的な有意差はなかった。

次に、インフルエンザ様疾患および風邪の症状発症に対する効果の評価を行った。3.1.4) に示した通り、被験者は各症状について 5 段階で毎日記録をしており、そのデータを用いて各症状の累積発症日数を重症度の違いを加味し、Wilcoxon rank sum test を用いてグループ間で比較した。その結果、WHO によってインフルエンザ様疾患の症状として定義されている咳と発熱の項目について、*L. lactis* JCM 5805 グループの累積発症日数がプラセボグループに対して有意に低いことが示された (Table 3-3、Fig. 3-1)。さらに、重症度を基準に 2 つに分けた解析において、重症度の高い「④かなりある」と「⑤ひどい」の累積発症日数は、咳と発熱に加え、喉の痛みでも *L. lactis* JCM 5805 グループで有意に低いことが示唆された。一方で、頭痛に関してはグループ間で有意な違いはなかった。なお、鼻水、鼻づまり、およびくしゃみに関しても同様に解析を行ったが、61%の被験者が試験期間中に花粉症を発症していることを申告したため、当該データは無効とした。以上の結果から、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取は、インフルエンザ様疾患の自覚症状に改善効果をもたらすことが示唆された。

Table 3-2. インフルエンザおよび風邪の累積発症者数

グループ	発症あり	発症なし	P 値
プラセボ	14	7476	P=0.127
JCM 5805	7	7413	

試験期間中に医師からインフルエンザや風邪と診断された被験者の累積数の比較。*L. lactis* JCM 5805 グループ : n=7420 (106 名×70 日間)、プラセボグループ : n=7490 (107 名×70 日間)。累積数は、 χ^2 検定を用いて評価した。

Table 3-3. 症状別および重症度別の累積発症日数

症状	グループ	発症なし	少しだけある	多少はある	かなりある	ひどい	P 値
咳	Placebo	6440	866	141	24	19	P<0.001
	JCM 5805	6708	624	65	19	4	
喉の痛み	Placebo	6438	848	126	49	29	P=0.226
	JCM 5805	6426	814	137	36	7	
熱っぽさ	Placebo	7124	286	51	21	8	P<0.001
	JCM 5805	7194	191	23	10	2	
頭痛	Placebo	6795	520	115	42	18	P=0.958
	JCM 5805	6731	502	123	29	35	

L. lactis JCM 5805 グループ : n=7420 (106 名×70 日間)、プラセボグループ : n=7490 (107 名×70 日間)。症状なしを含む 5 段階の重症度における累積発症日数について、カテゴリに順序のあるデータとしてウィルコクソンの順位和検定を行い、2 グループ間の有意差検定を行った。

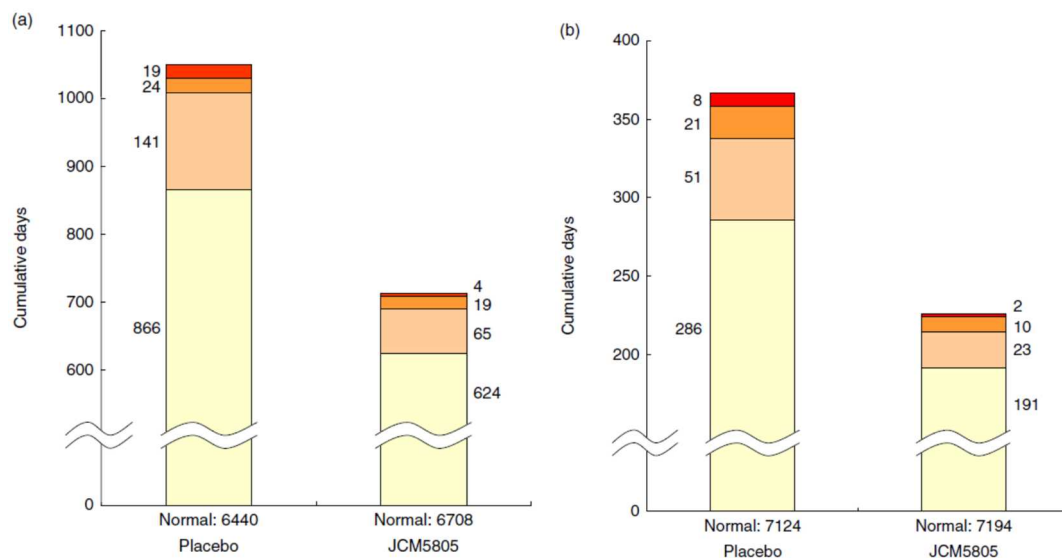


Fig. 3-1 インフルエンザ様疾患および風邪の症状の累積発生日数の比較

(a) 咳 (b) 熱っぽさ。重症度は5段階で評価し、図中では、グラフ下部：発症なし、黄色：少しだけある、薄いオレンジ：多少はある、濃いオレンジ：かなりある、赤：ひどい、で表している。*L. lactis* JCM 5805 グループ：n=7420 (106名×70日間)、プラセボグループ：n=7490 (107名×70日間)。

2) *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取が pDC 活性に及ぼす影響

第2章で述べたヒト試験において、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取によりヒト生体内 pDC を活性化することを確認している。本試験においても、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取期間前後で pDC 活性の測定を実施した。その結果、pDC 細胞表面マーカー HLA-DR の発現強度は両グループで低下していた。一方で、*L. lactis* JCM 5805 グループの pDC 表面マーカー CD86 の発現強度が、摂取期間前と比較して摂取期間後で高い傾向にあったが、有意差はなく、グループ間でも有意差は認められなかった (Fig. 3-2)。

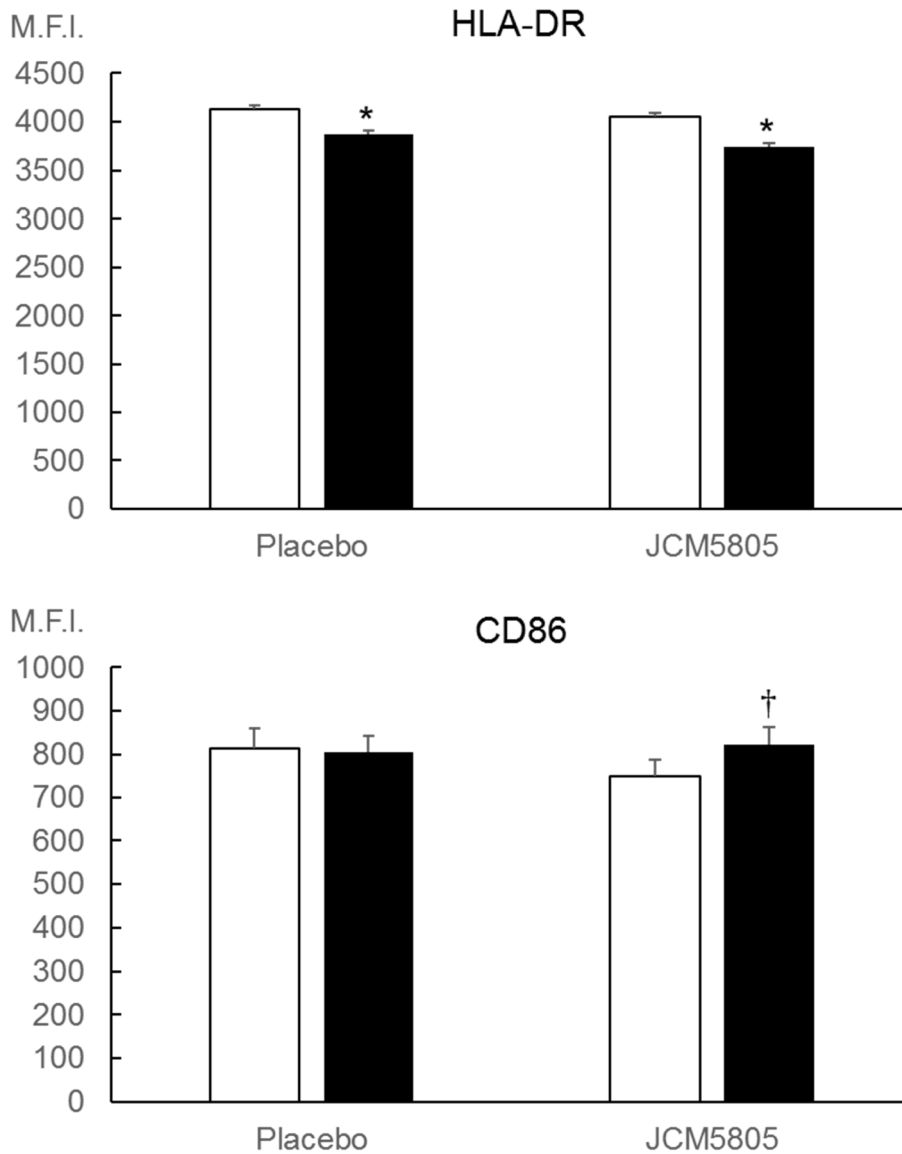


Fig. 3-2 各グループにおける pDC 活性の *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取前後での比較

ヒト生体内 pDC の表面マーカー CD86 の発現強度を指標とした。□：摂取期間前、■：摂取期間後。分析誤差の影響を排除するため、データが異常値 (平均±2SD) となった被験者は解析から除外した。その結果、*L. lactis* JCM 5805 グループは 98 名、プラセボグループは 96 名となった。グラフは蛍光強度の中央値 (M.F.I.) の平均値とその標準誤差を示す。データは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。摂取期間前後の比較においては対応のある t 検定を用いた。* : P<0.05 † : P=0.13

3) *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取がヒトインフルエンザウイルスに対する免疫応答性に及ぼす影響

L. lactis JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取がインフルエンザ様症状の発症抑制に効果をもたらすメカニズムを検証するために、ヒトインフルエンザウイルスに対する免疫応答に関して検証を行った。被験者から採取した PBMC に不活化したヒトインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) を添加して培養した後、*IFN- α* 遺伝子および *ISG15* 遺伝子の転写レベルを qRT-PCR で評価した。その結果、摂取期間後における *L. lactis* JCM 5805 グループの *IFN- α* 遺伝子の転写レベルが、プラセボグループと比べて高い傾向にあったが統計的な有意差はなかった ($P=0.140$) (Fig. 3-3A)。また、*ISG15* 遺伝子の転写レベルに関して、摂取期間前は *L. lactis* JCM 5805 グループの方が低かったにも関わらず、摂取期間後はプラセボ飲料グループより有意に高くなった ($P=0.019$) (Fig. 3-3B)。

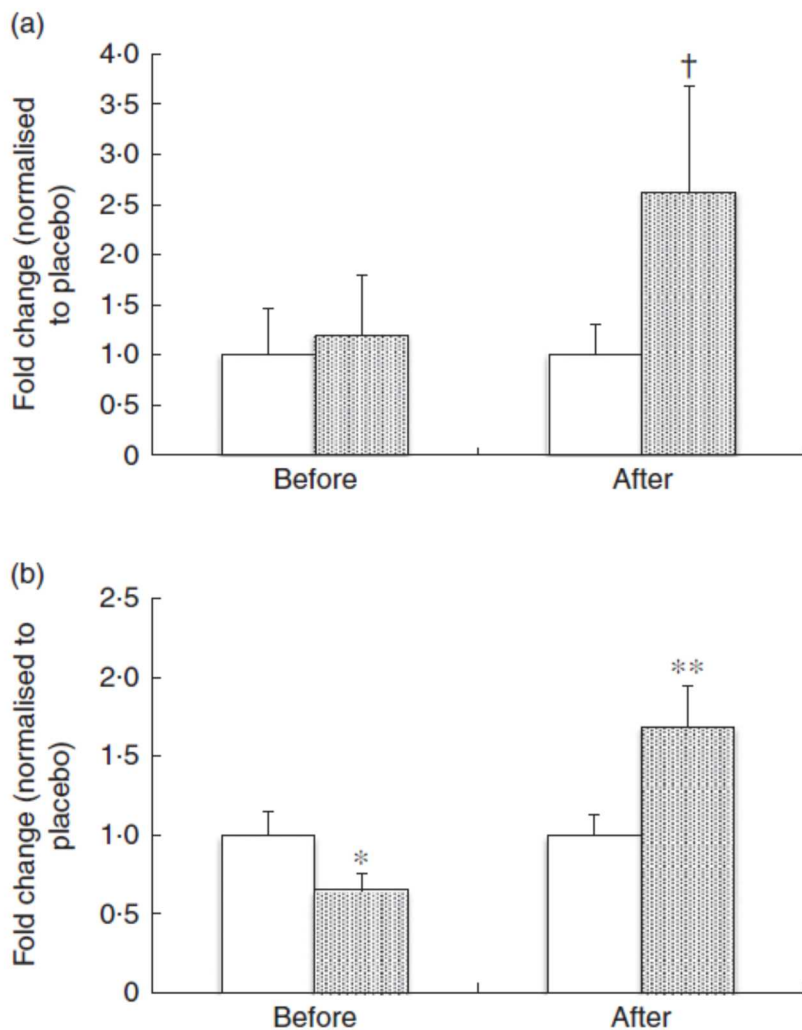


Fig. 3-3 *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取期間前後における *IFN-α* および *ISG15* 遺伝子の転写量のグループ間比較

被験者の PBMC を不活化したインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) で刺激した際の *IFN-α* 遺伝子および *ISG15* 遺伝子の転写量を解析した。□ : *L. lactis* JCM 5805 グループ、■ : プラセボグループ。(a) *IFN-α* 遺伝子、(b) *ISG15* 遺伝子。それぞれ *β-ACTIN* 遺伝子をリファレンス遺伝子とした。データは平均値を基に、プラセボグループを 1.0 として正規化した。エラーバーは標準誤差を示す。RNA 抽出ができなかったサンプルは解析対象から除外し、*L. lactis* JCM 5805 グループ : n=102、プラセボグループ : n=105 とした。スチューデントの t 検定を用いた。* : P=0.05、** : P<0.05、† : P=0.14 を示す。

3. 考察

第2章で述べた1回目のヒト試験では、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取により、生体内の pDC が活性化されることを報告した。今回の冬期に実施したヒト試験においては、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の摂取がインフルエンザ様疾患の症状を抑制する可能性が新たに示唆された。また、そのことは、*IFN- α* 遺伝子や *IFN* 誘導性の抗ウイルス因子である *ISG15* 遺伝子の発現レベルを上昇させることに起因する可能性も示された。

5段階に分けた重症度を用い、各症状（咳、のどの痛み、発熱、頭痛）の累積発症日数を分析し、重症度と発症頻度を評価した結果、*L. lactis* JCM 5805 グループにおける「咳」や「発熱」などのインフルエンザ様疾患に関連する症状が、プラセボグループと比較して有意に抑制されていた。医師によってインフルエンザ、インフルエンザ様疾患、または風邪を患っていると診断された被験者の累積人数は、プラセボグループと比較して *L. lactis* JCM 5805 グループで減少する傾向があったが、グループ間に有意な統計的差異はなかった。その要因として、中年層の感染率が低いことが考えられる。一般に、子供、若者、高齢者は感染しやすいことが知られており、それらを被験者に含めることで違いがより明確になるかもしれない。とは言え、今回の結果は、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取がインフルエンザを含む呼吸器ウイルス感染疾患に対して防御効果をもたらす可能性を示唆している。

ヒトインフルエンザウイルスに対する免疫応答を調べる試験では、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取によって *IFN- α* 遺伝子の転写レベルが高まる可能性が示唆されている。pDC は TLR7 と TLR9 を発現しており [3]、インフルエンザウイルスの ssRNA は TLR7 が受容し [4-6]、一方、*L. lactis* JCM 5805 由来の DNA によって受容されることが示唆されている [50]。異なる 2 つの受容体による核酸リガンドの需要ではあるが、その後の MyD88 経路を介して、IRF 類を活性化し、リン酸化された IRF 類が核内移行して *IFN* の転写を引き起こす経路は同じである。第2章で述べた通り、ヒト由来 pDC を用いた *in vitro* 試験において、*L. lactis* JCM 5805 は I 型 *IFN* 類である *IFN- α* 遺伝子や *IFN- β* 遺伝子、III 型 *IFN* である *IFN- γ* 遺伝子、および IRF 類の *IRF3* 遺伝子、*IRF5* 遺伝子、*IRF7* 遺伝子、および *IRF8* 遺伝子の転写レベルを上昇させることを確認している。*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取によって IRF 等の因子が活性化していたために、*ex vivo* におけるヒトインフルエンザウイルス添加に対する応答性が高まったと考えられる。また、*ISG15*

遺伝子の発現レベルが上昇していた点も大変興味深い。pDCによって産生されるI型IFN類は多数の抗ウイルス因子の発現を誘導することが知られており[65]、その中でもISG15はインフルエンザAウイルスの抑制において最も重要な因子の一つであることが報告されている。ISG15はインフルエンザAウイルスのNS1タンパク質に結合して複製を阻害する[16-19]。さらに、ISG15は宿主由来のタンパク質を修飾することが知られ、その中にはIRF類も含まれている[20]。例えば、I型IFN類の産生において重要な役割を果たすIRF3は、ISG15修飾されたHerc5によって安定性が増す[68]。また、ウイルスタンパク質の翻訳を阻害するプロテインキナーゼRは、ISG15修飾により活性化される[22]。さらに、サイトカインのように分泌されたISG15はIFN- γ の産生も促す[21]。これらのことから、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取によるISG15の発現誘導は、ウイルス感染防御において非常に有効的であると言える。

本試験では、*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料の経口摂取により、「咳」や「発熱」などのインフルエンザ様疾患の症状を大幅に軽減できることが示された。さらに、インフルエンザAウイルスへの応答性を示すIFN- α 遺伝子やISG15遺伝子の転写レベルも上昇する可能性が見出された。しかしながら、第2章で示したような生体内pDCの活性化は認められなかった点は疑問として残る。前回のヒト試験では、プラセボグループではpDC活性が有意に低下していくのに対し、*L. lactis* JCM 5805 グループではpDC活性の低下が起らず、結果として摂取期間終了後に両グループ間で有意な差が生じるという結果であった。このことをふまえると、夏期の暑さという外的要因がpDC活性の低下を招き、それによって*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取によるpDC活性への影響が顕著になった可能性が考えられる。そこで、今後の研究では、まず高温ストレスによってpDC活性が低下するかどうか、そして*L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取によってpDC活性低下を抑制できるかどうかを、動物試験で実証することとした(第4章)。また、他にpDC活性を低下させる要因の一つとして「老化」が考えられ、pDC活性と老化の関連性を紐解くべく、老化促進マウスを対象とした*L. lactis* JCM 5805 長期摂取試験を実施することとした(第5章)。

第 4 章

高温ストレスが pDC 活性に及ぼす影響と

L. lactis JCM 5805 摂取による効果

の検証

第4章 高温ストレスが pDC 活性に及ぼす影響と *L. lactis* JCM 5805 摂取による効果の検証

1. 要約

従来のインフルエンザや一般的な風邪は冷涼な季節に流行するリスクが高い一方で、新型インフルエンザやデング熱といった新興ウイルスは季節を選ばず、むしろ熱帯・亜熱帯地域といった高温環境下において猛威をふるう。また、日本国内の夏季においても、室内外の急激な温度変化等が一因となって体調を落とすこともあり、温度ストレスと免疫機能の関連性は非常に興味深い。本章では、マウスを対象に高温ストレスを負荷した際の pDC 活性への影響とともに、*L. lactis* JCM 5805 摂取による効果の検証を行った。

まず、マウスを 37°C の高温環境下で飼育したところ、24 時間の高温ストレス負荷によって脾臓および腸間膜リンパ節の pDC 活性が有意に低下した。一方で、mDC 活性に変化はなかった。そこで、続いて 2 週間の *L. lactis* JCM 5805 混餌投与後に同様に 24 時間の高温ストレス負荷をかけた結果、*L. lactis* JCM 5805 群の脾臓の pDC 活性はコントロール群の pDC 活性よりも有意に高くなった。さらに、TLR9 リガンドである CpG で脾臓由来細胞を刺激した際の IFN- α 産生量も、*L. lactis* JCM 5805 群が有意に高いという結果であった。これらの結果より、高温ストレスは pDC 活性の低下をもたらすが、*L. lactis* JCM 5805 を摂取することによって pDC 活性の低下を防ぐことができ、さらにウイルス感染時の応答性が高まることで感染防御効果がもたらされる可能性も示唆された。また、第2章で実施したヒトを対象とした *L. lactis* JCM 5805 摂取試験では、プラセボグループで pDC 活性が低下したのに対して *L. lactis* JCM 5805 グループでは pDC 活性の低下が抑制されていたが、これは当該試験を夏期に実施したことによる高温ストレスの影響であると考えられた。外的なストレス因子が免疫機能に影響を及ぼし、それに対する *L. lactis* JCM 5805 摂取の効果を明確に示すことができたと言える。

2. はじめに

pDC は I 型 IFN 産生細胞であり、抗ウイルス免疫機構において非常に重要な役割を果たすことが知られている[1,2]。pDC と pDC によって産生される I 型 IFN は、獲得免疫系と自然免疫系の両方において、T 細胞、B 細胞、NK 細胞といった様々な免疫因子を制御するレギュレーターとして働く[26-34]。これまでの研究において、マウスの pDC を *in vitro* および *in vivo* において活性化する稀有な乳酸菌、*L. lactis* JCM 5805 を見出している[50]。*L. lactis* JCM 5805 をマウスに摂取させることによって、パラインフルエンザウイルスやロタウイルスの感染から防ぐことができる[51, 52]。また、*L. lactis* JCM 5805 はヒトに対しても有効であり、*in vitro* および *in vivo* において pDC を活性化することができる[67]。さらに *L. lactis* JCM 5805 摂取のヒト試験において、インフルエンザ様症状の緩和やインフルエンザウイルスに対する応答性の上昇を確認した[69]。

季節性インフルエンザウイルスや一般的な風邪のリスクは寒冷なシーズンに高まる一方で、近年の新興ウイルスである新型インフルエンザウイルスやデング熱ウイルス、MERS コロナウイルス等は、温暖な季節や地域で流行する。過度な高温や急激な温度変化といった熱ストレスは、ウイルス感染のリスクを高める一つの要因となり得る。Jin らは、長期的な熱ストレスが樹状細胞の成熟を抑制し、マウスにおける高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 の毒性を高めることを報告しているが[37]、熱ストレスが pDC に及ぼす影響は明らかとなっていない。また、DC 活性の低下を抑制するような食品に関する報告はない。本章では、熱ストレスが pDC 活性に及ぼす影響と、*L. lactis* JCM 5805 摂取による効果について検証を行った結果および考察を述べる。

3. 高温ストレスが pDC 活性に及ぼす影響

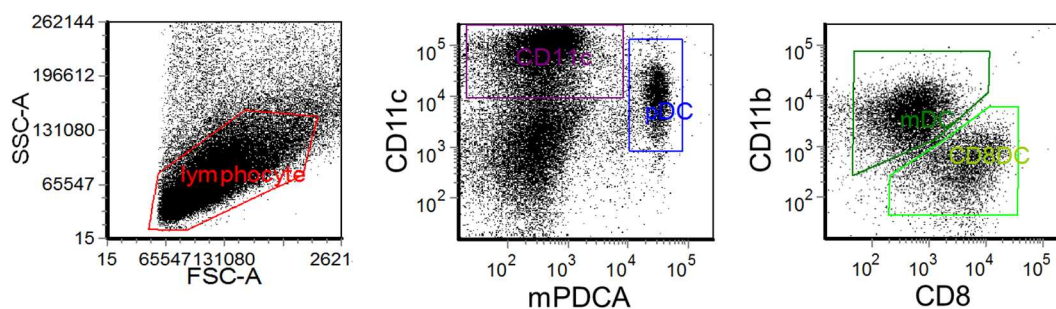
3.1. 実験方法

1) 試験計画

9週齢の雌の C57BL/6J をチャールズリバー・ジャパン社より購入した。8匹のマウスを、自由摂水・摂食 (AIN93G (オリエンタル酵母)) で1週間飼育し馴化させ、その後、平均体重を基準に4匹ずつ2群に分けた。飼育温度は、コントロール群を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、高温ストレス群を $37 \pm 2^\circ\text{C}$ に設定した。照明は12時間ごとの明暗サイクルに設定し、マウスは1匹ずつ個別のケージで飼育した。24時間後に解剖を行い、脾臓 (SPN) と腸間膜リンパ節 (MLN) を採取した。動物試験は、キリンホールディングス株式会社基盤技術研究所の実験動物管理委員会の承認のもと、2012年に実施した。(承認 ID YO12-00019)

2) FACS

解剖時に採取した SPN および MLN は、FACS による pDC 活性と mDC 活性の測定に用いた。各組織を Mg^{2+} および Ca^{2+} を含まないハンクの平衡塩類溶液の中で細かくし、1 mg/ml のコラゲナーゼ (Sigma) および 0.2 mg/ml の DNase I を用いて 37°C で 20 分間処理した。EDTA を最終濃度 30 mM となるように添加し、混合物を室温で 10 分間インキュベートした。細かくした組織を孔サイズ 70 μm のナイロンセルストレーナーに通し、10% FCS を含む RPMI 1640 中の 15% Histodenz (Sigma) 上に重層し、ブレーキをかけずに 450 x g で 20 分間遠心分離した。界面の低密度画分を回収、洗浄し、以下の蛍光標識抗体を用いて染色した。MHC class II-FITC (M5 / 114.15.2) (eBiosciences)、CD86-PE (GL1) (BD Pharmingen)、mPDCA-1-APC (JF05-1C2.4.1) (Miltenyi Biotec)、CD11c-PE-Cy7 (N418) (eBiosciences)、CD11b-APC-Cy7 (M1 / 70) (BD Pharmingen)、CD8-PerCP (53-6.7) (BD Biosciences)。染色後の細胞を FACS バッファー (0.5% BSA を添加した PBS バッファー) を用いて 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (Wako) に再懸濁して、FACS 分析に供試した。FACS Cant II (BD Biosciences) を用いてデータを取得し、FCS Express software (De Novo Software) を用いて分析を行った。CD11c⁺ CD11b⁻ mPDCA-1⁺ 細胞を pDC と定義し、CD11c⁺ CD11b⁺ mPDCA-1⁻ 細胞を mDC と定義して (参考図 B)、細胞表面マーカー (MHC class II および CD86) の発現レベルを測定した。



参考図 B FACS プロファイル

3) 遺伝子発現解析

SPN の pDC および mDC を含む低密度画分細胞の Total RNA を RNeasy Kit (Qiagen) を用いて抽出し、iScript cDNA synthesis kit (BioRad) を用い cDNA 合成を行った。qRT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) および LightCycler 480 (Roche) を用いて実施した。Gapdh 遺伝子はリファレンス遺伝子として用いた。プライマー配列は以下の通り設計した。

Gapdh 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3', 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'

Hsp70 5'-TGAGCAGCCCATCCTTAGTG -3', 5'-ATAGGCATCCGTCCCTTTGT-3'

4) 統計解析

スチューデントの t 検定を用いて解析を行った。

3.2. 実験結果

1) 高温ストレスが pDC 活性に及ぼす影響

高温ストレスが pDC および mDC の活性に及ぼす影響について検証するために、 23 ± 2 °C で飼育したコントロール群と、 23 ± 2 °C から 37 ± 2 °C の高温ストレス環境下に移し 24 時間飼育した高温ストレス群で比較を行った。その結果、高温ストレス群の SPN の pDC 上の表面マーカーである MHC class II および CD86 の発現強度が、コントロール群と比較して有意に低くなった ($P < 0.05$) (Fig. 4-1a)。また、MLN の pDC 上の MHC class II の発現強度も、高温ストレス群で有意に低くなった ($P < 0.01$) (Fig. 4-1b)。一方で、mDC の表面マーカーについては、両群間で有意な差異は見られなかった (Fig. 4-2)。

また、高温ストレスによって発現誘導される HSP 類は自然免疫系のアクチベーターとして働くことが知られているため [70]、SPN の pDC および mDC を含む低密度画分細胞の *Hsp70* 遺伝子の転写レベルを評価した。その結果、コントロール群の *Hsp70* 遺伝子の転写量と比較して、高温ストレス群の *Hsp70* 遺伝子の転写量は有意に低くなっていた ($P < 0.05$) (Fig. 4-3)。

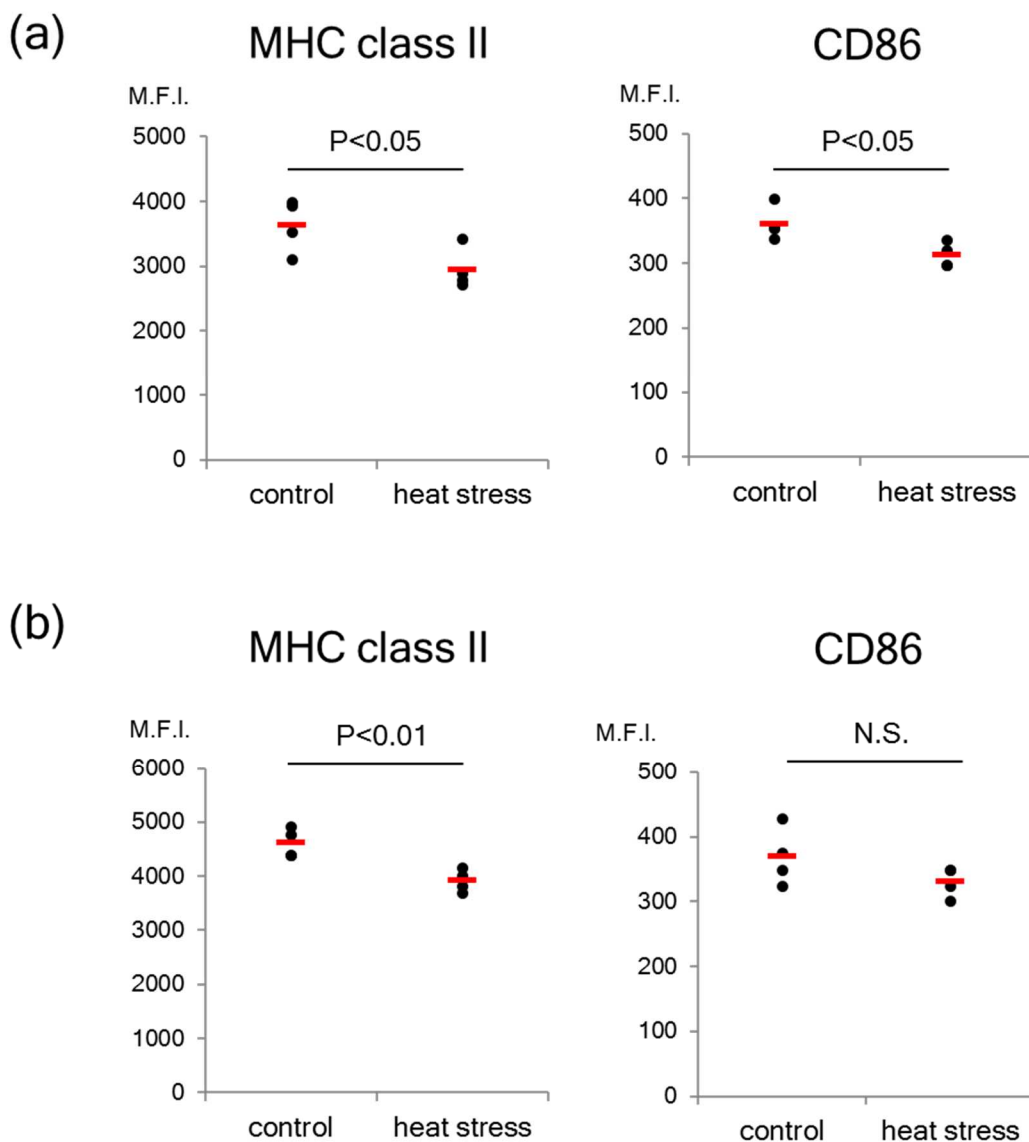


Fig. 4-1 SPN および MLN における pDC 活性の比較

(a) SPN の pDC に高温ストレスが及ぼす影響、(b) MLN の pDC に高温ストレスが及ぼす影響。コントロール群および高温ストレス群いずれも $n=4$ 。プロットは各サンプルを表し、数値は蛍光強度の中央値 (M.F.I.)を示す。赤いバーは各群の平均値を示す。スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

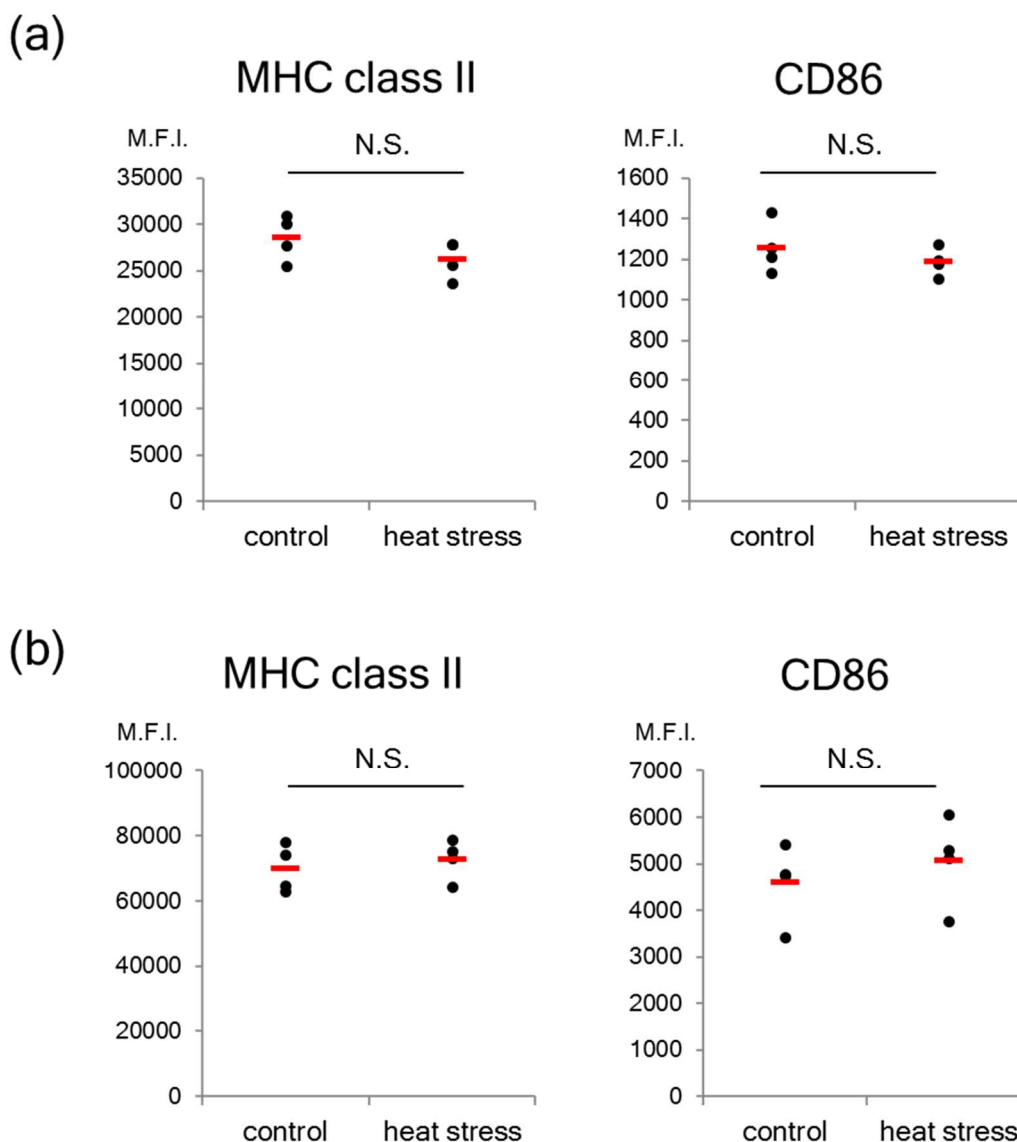


Fig. 4-2 SPN および MLN における mDC 活性の比較

(a) SPN の mDC に高温ストレスが及ぼす影響、(b) MLN の mDC に高温ストレスが及ぼす影響。コントロール群および高温ストレス群いずれも n=4。プロットは各サンプルを表し、数値は蛍光強度の中央値 (M.F.I.)を示す。赤いバーは各群の平均値を示す。スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

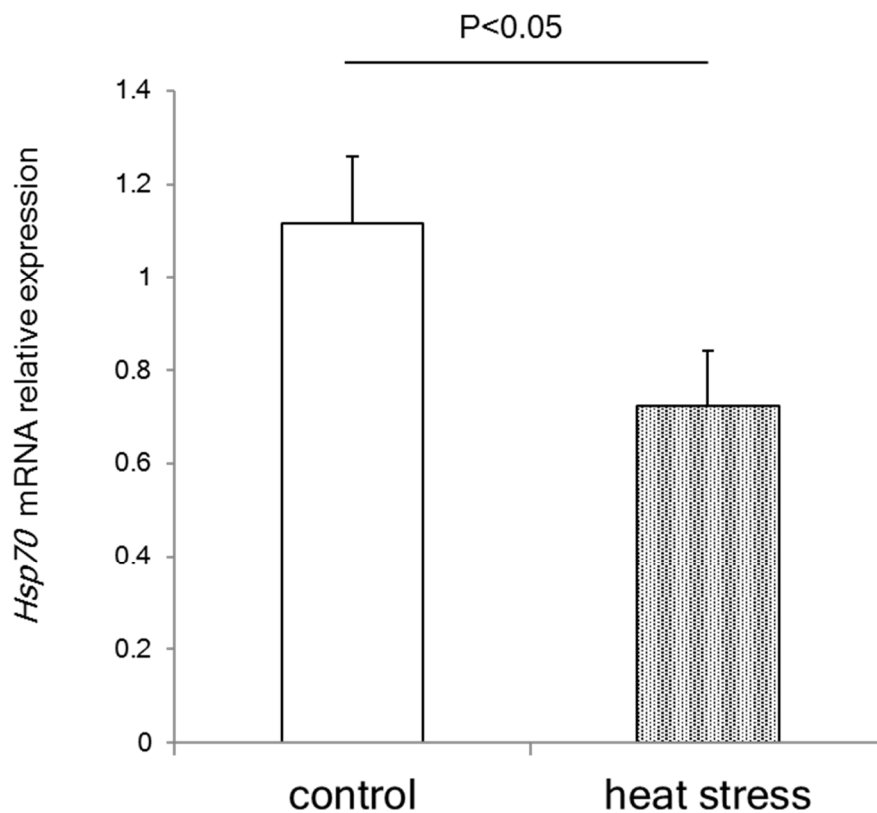


Fig. 4-3 SPN の低密度画分細胞における *Hsp70* 遺伝子の転写量の比較

SPN の pDC および mDC を含む低密度画分細胞の *Hsp70* 遺伝子の転写レベルを評価した。リファレンス遺伝子には *Gapdh* 遺伝子を用いた。コントロール群および高温ストレス群いずれも $n=4$ 。グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

4. 高温ストレスにより低下した pDC 活性に対する *L. lactis* JCM 5805 摂取の効果

4.1. 実験方法

1) 試験計画

5 週齢の雌の C57BL/6J をチャールズリバー・ジャパン社より購入した。12 匹のマウスを、自由摂水・摂食 (AIN93G (オリエンタル酵母)) で 1 週間飼育し馴化させ、その後、平均体重を基準に 6 匹ずつ 2 群に分け、一方を高温ストレス群、もう一方を高温ストレス・*L. lactis* JCM 5805 摂取群とした。高温ストレス・*L. lactis* JCM 5805 摂取群は、*L. lactis* JCM 5805 の加熱死菌体を 1 日あたり 1 mg 摂取するように混餌した AIN93G を 2 週間摂取した。飼育温度は、両群とも $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で 2 週間飼育した後に、 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ に移した。照明は 12 時間ごとの明暗サイクルに設定し、マウスは 1 匹ずつ個別のケージで飼育した。 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ に移した 24 時間後、解剖を行い、SPN と MLN を採取した。動物試験は、キリンホールディングス株式会社基盤技術研究所の実験動物管理委員会の承認のもと、2012 年に実施した。(承認 ID YO12-00060)

2) FACS

解剖時に採取した SPN および MLN は、FACS による pDC 活性と mDC 活性の測定に用いた。各組織を Mg^{2+} および Ca^{2+} を含まないハンクの平衡塩類溶液の中で細かくし、1 mg/ml のコラゲナーゼ (Sigma) および 0.2 mg/ml の DNase I を用いて 37°C で 20 分間処理した。EDTA を最終濃度 30 mM となるように添加し、混合物を室温で 10 分間インキュベートした。細かくした組織を $70 \mu\text{m}$ のナイロンセルストレーナーに通し、10% FCS を含む RPMI 1640 中の 15% Histodenz (Sigma) 上に重層し、ブレーキをかけずに 450 x g で 20 分間遠心分離した。界面の低密度画分を回収、洗浄し、以下の蛍光標識抗体を用いて染色した。MHC class II-FITC (M5 / 114.15.2) (eBiosciences)、CD86-PE (GL1) (BD Pharmingen)、mPDCA-1-APC (JF05-1C2.4.1) (Miltenyi Biotec)、CD11c-PE-Cy7 (N418) (eBiosciences)、CD11b-APC-Cy7 (M1 / 70) (BD Pharmingen)、CD40-PerCP (HM40-3) (eBiosciences) (*実験方法 3.1.2 に記載の CD8-PerCP (53-6.7) (BD Biosciences) に替えて加えた)。染色後の細胞を FACS バッファー (0.5% BSA を添加した PBS バッファー) を用いて 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (Wako) に再懸濁して、FACS 分析に供試した。FACS Cant II (BD Biosciences) を用いてデータを取得し、FCS Express software

(De Novo Software)を用いて分析を行った。CD11c⁺ CD11b⁻ mPDCA-1⁺細胞を pDC と定義し、CD11c⁺ CD11b⁺ mPDCA-1⁻細胞を mDC と定義して、細胞表面マーカー (MHC class II および CD86) の発現レベルを測定した。

3) *ex vivo* 試験

SPN 細胞を 1×10^5 cells/ml となるように RPMI 培地に懸濁し 48 穴プレートに播種し、 $1 \mu\text{M}$ の CpG-A (Invitrogen) を添加および無添加で、 37°C で 24 時間培養した。なお、高温ストレス群の 1 サンプルは細胞数が不十分であったため試験から除外した。培養上清中の IFN- α 濃度は ELISA (PBL Biomedical Laboratories) を用いて分析した。

4) 統計解析

スチューデントの t 検定を用いて解析を行った。

4.2. 試験結果

1) 高温ストレスにより低下したpDC活性に対する *L. lactis* JCM 5805 摂取の効果

高温ストレスによって低下するpDC活性に対し、*L. lactis* JCM 5805 摂取がどのように効果を発揮するか検証した。2週間 *L. lactis* JCM 5805 を混餌投与した群と、通常食のコントロール群を、それぞれ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ・24時間の高温ストレス負荷をかけた後に評価を行った。その結果、高温ストレス・*L. lactis* JCM 5805 摂取群のSPNのpDC上の表面マーカーであるCD86およびCD40の発現強度が、高温ストレス群と比較して有意に高いという結果が得られた($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$) (Fig. 4-4)。一方で、MLNのpDC、SPNおよびMLNのmDCに関しては、両群間で有意差はなかった(Fig. 4-4、Fig. 4-5)。

また、SPNでの効果が顕著であったことから、SPN細胞におけるI型IFN産生能を評価するために、SPN細胞にCpGを添加した際のIFN- α 産生量を評価する *ex vivo* 試験を実施した。その結果、高温ストレス・*L. lactis* JCM 5805 摂取群のIFN- α 産生量が、高温ストレス群と比較して有意に高いことが示された($P < 0.05$) (Fig. 4-6)。

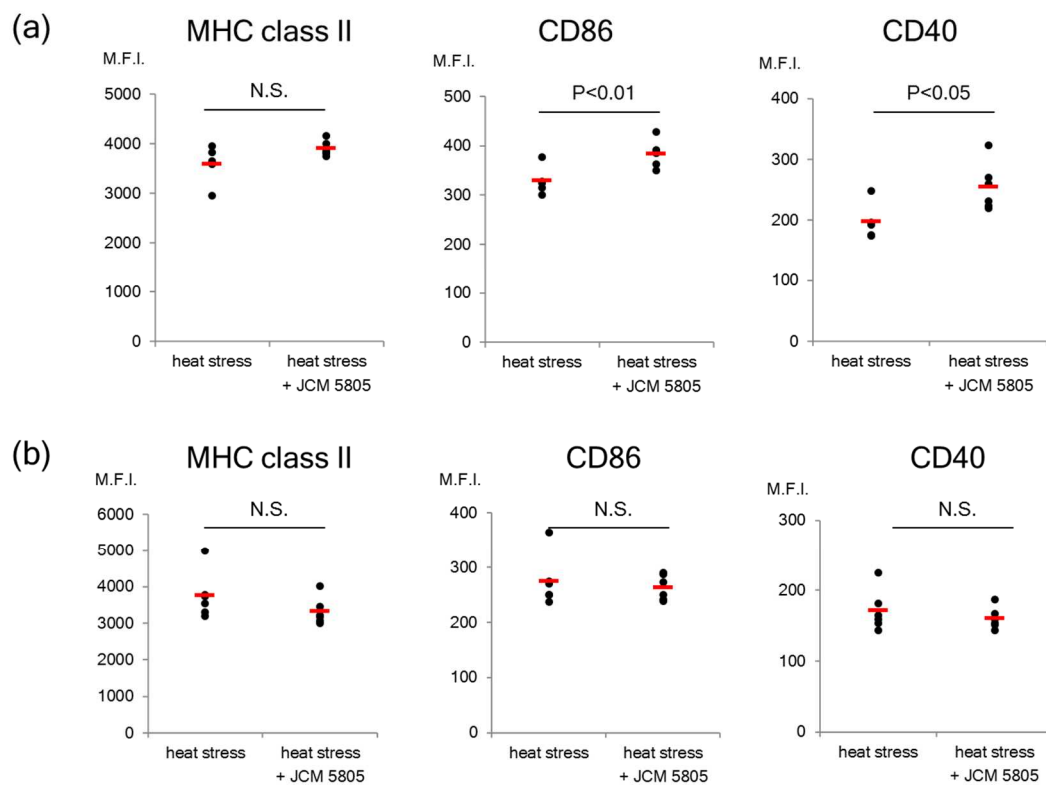


Fig. 4-4 *L. lactis* JCM 5805 摂取が高温ストレスによる pDC 活性低下に及ぼす影響

(a) SPN における pDC 活性の比較、(b) MLN における pDC 活性の比較。高温ストレス群：n=5、高温ストレス+*L. lactis* JCM 5805 摂取群：n=6。プロットは各サンプルを表し、数値は蛍光強度の中央値 (M.F.I.)を示す。赤いバーは各群の平均値を示す。スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

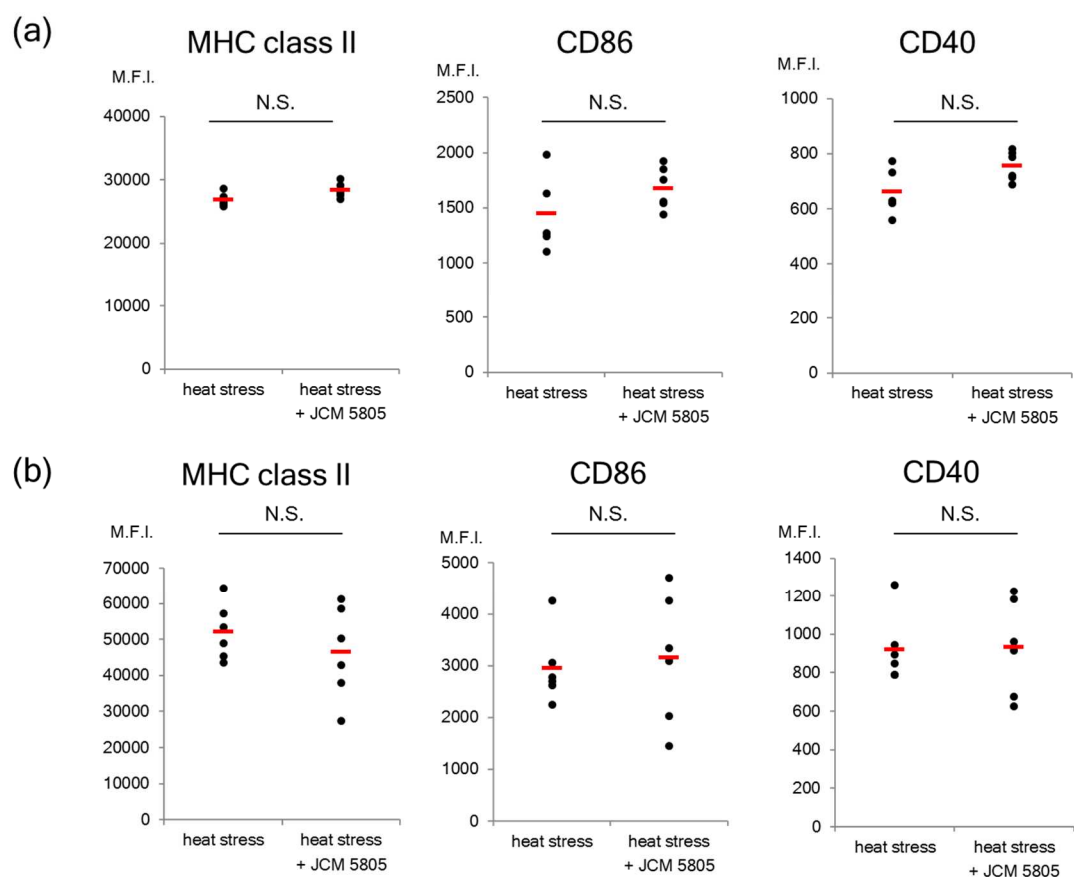


Fig. 4-5 *L. lactis* JCM 5805 摂取が高温ストレスによる mDC 活性低下に及ぼす影響

(a) SPN における mDC 活性の比較、(b) MLN における mDC 活性の比較。高温ストレス群：n=5、高温ストレス+*L. lactis* JCM 5805 摂取群：n=6。プロットは各サンプルを表し、数値は蛍光強度の中央値 (M.F.I.)を示す。赤いバーは各群の平均値を示す。スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

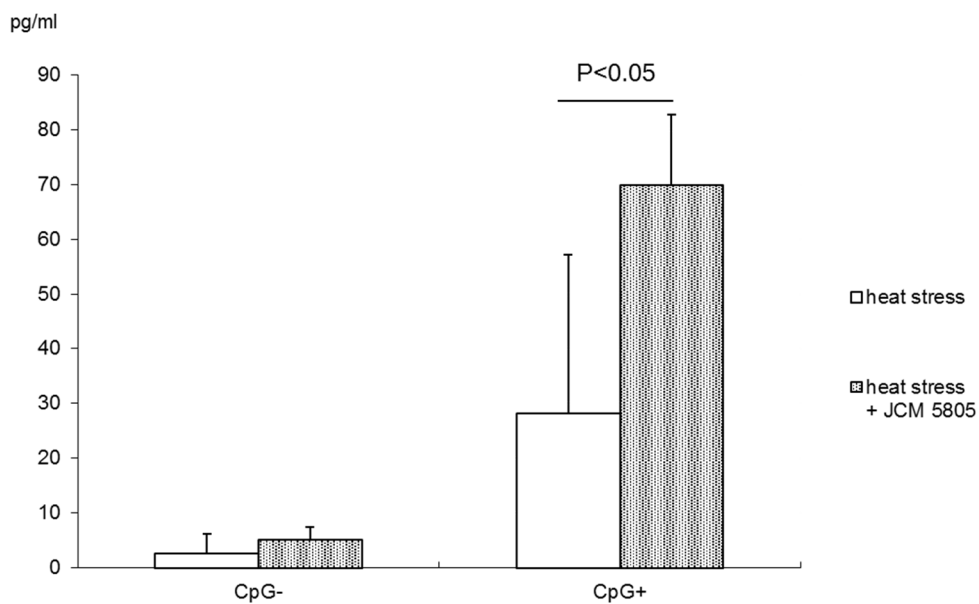


Fig. 4-6 SPN における IFN- α 産生能の評価

CpG 刺激培養によって産生される IFN- α 濃度を ELISA によって測定した。高温ストレス群：n=5、高温ストレス+*L. lactis* JCM 5805 摂取群：n=6。グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

5. 考察

今回の試験において、24 時間の高温ストレスによって pDC 活性が著しく低下することが確かめられた。一方で、mDC 活性には影響がないことが示唆された。高温ストレスによって SPN における CD11c⁺細胞の活性低下し、ウイルス感染リスクが高まることが報告されているが[37]、今回の結果から、mDC (CD11c⁺ CD11b⁺ mPDCA-1⁻)ではなく、pDC (CD11c⁺ CD11b⁻ mPDCA-1⁺) が影響を受けていたことが明らかとなった。また、高温ストレスによって発現誘導される HSP 類は自然免疫系のアクチベーターとして働くことが知られているため[70]、SPN の pDC および mDC を含む低密度画分細胞の *Hsp70* 遺伝子の転写レベルを評価したところ、高温ストレス群の *Hsp70* 遺伝子の転写レベルがコントロール群よりも有意に低いという結果であった。高温ストレスが HSP 発現を誘導しなかったことは予想に反した結果であったが、このことは解析対象を SPN の器官全体ではなく、pDC および mDC を含む低密度画分細胞に限定したことが一因と考えられる。樹状細胞で発現する HSP70 は核内ではたらくユビキチンリガーゼ PDLIM2 に結合して活性化させ、NF- κ B を分解することにより過剰な炎症を抑えることが知られている[67]。今回、高温ストレスによって DC 自体の活性が低下したことにより、*Hsp70* 遺伝子の発現も同時に抑制されたと考えられる。

2 章で述べた夏期に実施したヒト試験において、プラセボグループでは pDC 活性が有意に低下するのに対し、*L. lactis* JCM 5805 グループでは低下せず、その結果 4 週間の摂取期間後に *L. lactis* JCM 5805 グループの pDC 活性が有意に高くなった[67]。そのことは、夏期の高温ストレスが pDC 活性にネガティブに影響し、*L. lactis* JCM 5805 の摂取がそのネガティブな影響を抑制した可能性を示唆していた。今回のマウスを用いた動物実験において、高温ストレスによる pDC 活性の低下が、*L. lactis* JCM 5805 摂取によって抑制されることが示され、前述のヒト試験結果を裏付ける結果となった。老化による pDC の機能低下は、食食作用やサイトカイン分泌といった自然免疫系だけではなく、T 細胞や B 細胞のプライミングや抗原提示といった獲得免疫系にも及ぶため[71, 72]、免疫系全体に深刻な影響をもたらすと言える。今回の試験において、2 週間の *L. lactis* JCM 5805 摂取による pDC 活性の上昇は SPN において確認された。以前、通常的环境下で実施した 2 週間の *L. lactis* JCM 5805 摂取試験においては、SPN ではなく MLN でのみ pDC 活性の上昇が確認されている[50]。このことから、摂取した *L. lactis* JCM 5805 は腸管上皮細胞の M 細胞によって取り込まれ、腸管に存在する pDC に受け渡され、その場で pDC を活性化

すると考えられる。一方で、高温ストレスにより SPN の pDC 活性が低下した際には、*L. lactis* JCM 5805 摂取によって SPN の pDC 活性が高く維持されていた。仮説として、活性が低下した pDC からケモカイン等のシグナル物質が産生され血中を通り、*L. lactis* JCM 5805 によって活性化した腸管の pDC が SPN に移動すると推察している。通常的环境下では、*L. lactis* JCM 5805 摂取は局所性の免疫細胞を活性化できる一方で、高温ストレス环境下では全身性の免疫細胞の急な機能低下を抑制し、免疫ホメオスタシスを維持していると考えられ非常に興味深い。第2章で示した通り、*in vitro* において *L. lactis* JCM 5805 刺激により活性化した pDC では、*IFN* 遺伝子群および *IRF* 遺伝子群の転写レベルが上昇する[67]。このことは、pDC 活性化とは、CpG のような TLR リガンドに対する応答性が高く、*IFN* 類を即座に産生できる状態である可能性を示唆している。pDC 由来の I 型 *IFN* は、細胞の抗ウイルス応答を誘導してウイルスの複製と拡散を制限することができるため[14, 15]、*L. lactis* JCM 5805 摂取により、ストレス环境下におけるウイルス応答性を維持できると考えられる。Yi Jin らの報告では、37°C の高温ストレスを一日4時間、21日間与えることで CD11c⁺細胞の活性が低下することを報告していた[37]。一方、本研究では、わずか24時間の高温ストレスが DC 活性に対してネガティブに働くことが示され、急激な温度変化が pDC 活性の低下に影響していることを示唆している。また、低温ストレスはマクロファージの活性化を促進し、マクロファージはカテコールアミンを分泌して褐色脂肪組織で発熱遺伝子発現を誘導し、適応性熱発生を維持するために白色脂肪組織で脂肪分解を誘導することが報告されている[74]。低温ストレスと DC 活性の関係性やメカニズムに関しても非常に興味深い。

今回、短時間の高温ストレスによって pDC 活性が低下すること、さらに2週間の *L. lactis* JCM 5805 摂取によってその pDC 活性低下を抑制できる可能性が示唆された。pDC はウイルス感染防御における重要な免疫細胞サブセットであり、その活性低下は、暑い季節や暑い地域で流行するウイルス感染のリスクを高める可能性がある。今回の試験結果は、*L. lactis* JCM 5805 の摂取が、そうしたウイルス感染に対する効果的なソリューションとなり得ることを示唆している。

第 5 章

L. lactis JCM 5805 の長期摂取による 老化抑制効果の検証

第5章 *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取による老化抑制効果の検証

1. 要約

老化によって引き起こされる免疫機能の低下は、感染症、腫瘍形成、慢性炎症のリスクを高め、老化を加速させると考えられる。pDCは自然免疫系と獲得免疫系の両方に作用し、免疫機能全般に大きく寄与する重要な免疫細胞である。そこで、pDCを活性化できる乳酸菌 *L. lactis* JCM 5805 を生涯にわたって長期的に摂取することにより、老化に伴う免疫機能の低下、あるいは老化の進行そのものを抑制できる可能性がある。本試験では、老化促進モデルマウス (SAM) を用いて、*L. lactis* JCM 5805 の長期経口投与試験を実施し、生存率、老化形質、およびpDC活性を含む免疫機能の評価を行った。

SAMP6系統を *L. lactis* JCM 5805 群とコントロール群の2群に分け、82週齢まで経口投与を継続した結果、*L. lactis* JCM 5805 群の生存率と老化スコアが、コントロール群と比較して顕著に改善された。解剖時の病理解析により、*L. lactis* JCM 5805 群では肝細胞病巣変化の頻度が有意に低く、肝臓および肺における他の病理学的所見の発生率も低い傾向であった。また、肺の *Il-1 β* 遺伝子の転写レベルも *L. lactis* JCM 5805 群で低い傾向にあった。さらに、加齢による皮膚の薄化と筋肉量の低下も、*L. lactis* JCM 5805 群で有意に抑制されていた。これらの表現型と一致して、pDC活性はコントロール群よりも *L. lactis* JCM 5805 群で有意に高かった。pDC活性の維持は、日常的な日和見感染の抑制、Treg細胞の誘導、創傷治癒効果等を介して、慢性的な炎症を抑制できると考えられる。*L. lactis* JCM 5805 を長期的に摂取することで、慢性炎症に起因する腫瘍形成や老化形質の発現が抑制され、老化抑制・寿命延長させられる可能性が示唆された。

本章では、*L. lactis* JCM 5805 の長期摂取による老化および免疫機能に対する効果について検証した動物試験について結果・考察を述べる。

2. はじめに

加齢に伴い免疫機能が低下し、感染症に対する感受性が高まり、発癌のリスクが高まることや[75, 76]、免疫機能の低下が慢性炎症を誘発し、老化を加速させることが知られている[77]。また、適応免疫における加齢性機能障害に関する多くの研究がなされており、例えば、胸腺 T 細胞生成の減少と恒常性 T 細胞増殖の破壊が報告されている[78, 79]。B 細胞の数は初期の前駆細胞の喪失により減少し[80]、免疫グロブリンのクラススイッチングは抑制される[81, 82]。マクロファージ、NK 細胞、DC といった自然免疫細胞における加齢性機能障害も同様に報告されている[83, 84]。DC 腫瘍抗原の提示能に関して、高齢マウスの mDC に欠陥があることや、DC-SIGN の選択的減少が観察されている[38]。

pDC は、I 型 IFN を豊富に産生する細胞として機能する抗ウイルス免疫の重要なサブセットである[1, 2]。さらに、pDC および pDC 由来の I 型 IFN は、T 細胞[17, 19-21]、B 細胞[25, 26]などのさまざまな免疫因子を制御することにより、適応免疫および自然免疫の両方でレギュレーターとして機能することが知られている[24]。pDC の機能の低下は、免疫システム全体に深刻な影響を及ぼすと考えられる。これは、pDC が貪食作用やサイトカイン分泌などの自然免疫機能だけでなく、抗原提示や T 細胞および B 細胞のプライミングといった獲得免疫機能にも大きく寄与しているためである[71, 72]。

乳酸菌は安全で毎日の食事で摂取可能な食品として広く受け入れられている。pDC を活性化できる希少な乳酸菌 *L. lactis* JCM 5805 はマウスを用いた *in vitro* および *in vivo* の試験によって見出された[50]。そこで、本章では *L. lactis* JCM 5805 を生涯にわたって毎日摂取することが老化によって引き起こされる表現型に及ぼす影響に焦点を当てている。老化促進マウス (SAM) は、老化および老化に関連する障害の動物モデルであり、人間の自然な老化機能障害に近い表現型を示すことが知られている[86, 87]。SAMP6 系統は、加齢性骨粗鬆症、続発性アミロイドーシス、大腸炎などのいくつかの老化関連の表現型を発症する一方、SAMP1 系統、SAMP2 系統および SAMP8 系統のように、免疫系の機能障害は報告されていない[88]。したがって、SAMP6 系統は免疫系の自然な老化機能障害の評価に有用であると考えられ、本研究では当該系統を老化モデル動物として選択した。

これまでに、SAM の免疫系のさまざまな表現型および機能障害を抑制するのに効果的である乳酸菌やその発酵食品がいくつか報告されている。たとえば、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 を 5 ヶ月間の高齢 SAMP6 に経口投与すると、骨密度の低下が抑制される[89]。*Lactobacillus gasseri* TMC0356 を SAMP1 に 4 週間および 8 週間投与す

ると、細胞性免疫機能が向上する[90]。また、乳酸菌発酵乳を4か月間投与すると、SAMP1/Yit マウスの炎症性腸疾患に対する予防効果があること等が報告されている[91]。しかしながら、乳酸菌の長期投与の効果や、免疫機能と加齢の関係は不明である。

本研究では、雌の SAMP6 マウスにおける *L. lactis* JCM 5805 の長期投与の抗老化効果を検証した。その結果、炎症抑制により老化関連の表現型が改善され、さらに、寿命が著しく延長されることを明らかにした。

3. *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取による老化抑制効果の検証

3.1. 試験方法

1) 乳酸菌の調製

L. lactis JCM 5805 は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN-BRC) 微生物材料開発室、Japan Collection of Microorganisms (JCM) から購入した。30℃、48時間、定法に従い M17 培地 (OXOID) を用いて培養し、滅菌蒸留水を用いて2回洗浄後、100℃で30分間熱殺菌し、凍結乾燥を行って、PBSに懸濁した。

2) 試験計画

5週齢の SAMP6 をジャパン SLC 社から購入した。これまでの *L. lactis* JCM 5805 摂取試験において pDC 活性化を確認したのは雌のマウスであったため[29]、比較検討を行うために今回の試験においても雌を用いた。マウスは1匹ずつ個別のケージで飼育した。温度は 23±2℃、湿度は 60±15%、照明は12時間ごとの明暗サイクルに設定した。動物試験は、キリンホールディングス株式会社基盤技術研究所の実験動物管理委員会の承認のもと、2012年に実施した。(承認 ID YO12-00050)

2週間の馴化後に、マウスを体重を基準に2グループに分け、7週齢から *L. lactis* JCM 5805 の摂取試験を開始した。コントロール群のマウス (n=20) は AIN93G (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を摂取し、*L. lactis* JCM 5805 群のマウス (n=20) は *L. lactis* JCM 5805 の加熱死菌体を1日あたり1mg摂取するように混餌した AIN93G を摂取した。12週齢からは、両群のベースの飼料を AIN93G から、成熟マウス用の AIN93M に変更した[89]。体重は7週齢から82週齢まで4週間ごとに計量した。また、血液サンプルを6週間ごとに採取したが、各群4匹のマウスが採血過程において死亡したため、採血は試験途中で中止し、死亡した個体は解析対象からはずすこととした。

3) 生存率の解析

生存個体の数は毎日記録した。82週齢までの生存率はログランク検定を用いて統計解析を行った。なお、試験のエンドポイントは試験開始前に定義し、どちらかの群の生存個体数が10個体以下になる時とした。

4) 老化形質の評価

SAM の老化度合いの評価は、既報のグレーディングスコアシステムを一部改変して実施した[87]。以下の3カテゴリー7項目について8週間ごとに評価を行った。なお、目に関する評価は本試験では実施しなかった。トータルは各項目のスコアを合算した。

行動カテゴリー：①反応性（マウスをケージの外に出した時に見られる探索行動）、②受動性（マウスを首の真上からそっと押さえたときの逃避行動）

毛・皮膚カテゴリー：③毛の光沢、④毛の滑らかさ、⑤脱毛、⑥皮膚の潰瘍

脊椎カテゴリー：⑦脊椎の弯曲

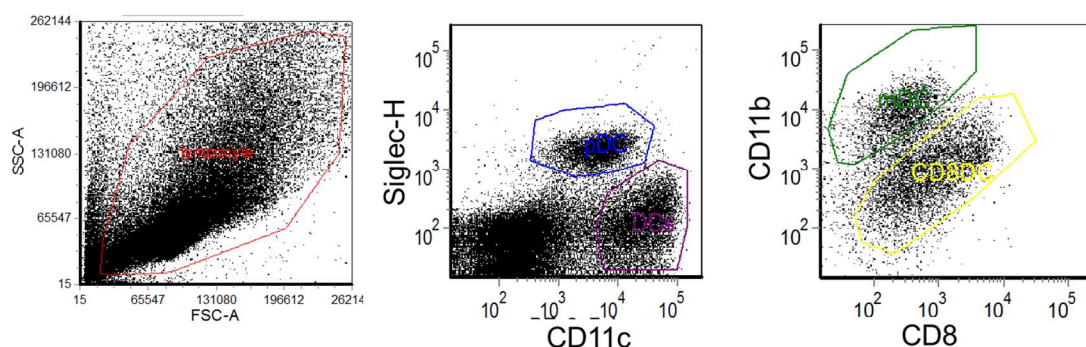
5) 病理解析

82週齢、*L. lactis* JCM 5805 摂取75週目において、コントロール群10匹、*L. lactis* JCM 5805 群15匹となり、試験開始前に定義したエンドポイントとなったため、この時点の生存マウスを解剖・解析の対象とした。脾臓（以下、SPN）、腸間膜リンパ節（以下、MLN）、肺、肝臓、腎臓、背部皮膚、脚の筋肉、血液を採取した。肺、肝臓、および腎臓は10%ホルマリンを用いて固定した。病理組織分析は、公益財団法人食品農医薬品安全性評価センター（2018年より株式会社安評センター）によって評価された。パラフィン包埋したサンプルを薄くスライスし、パラフィン除去後、切片をヘマトキシリン・エオジンマイヤー（HE）染色（Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Merck、等量混合物）した。HE染色で特定できない物質を含むサンプルは、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色、過ヨウ素酸メセナミン銀（PAM）染色、マッソントリクローム染色、およびコンゴレッド染色によって分析した。肉眼的病変も記録した。病理組織学的分析は、病理検査システム（PATHOTOX）を使用した。病理組織学的所見は、肺カテゴリーの11項目、肝臓カテゴリーの23項目、および腎臓カテゴリーの9項目について解析した。

6) FACS

SPNとMLNは、FACSによるpDC活性とmDC活性の測定に用いた。各組織をMg²⁺およびCa²⁺を含まないハンの平衡塩類溶液の中で細かくし、1 mg/mlのコラゲナーゼ（Sigma）および0.2 mg/mlのDNase Iを用い37°Cで20分間で処理した。EDTAを最終濃度30 mMとなるよう添加し、混合物を室温で10分間インキュベートした。細かくした組織を70 μmのナイロンセルストレーナーに通し、10% FCSを含むRPMI 1640中の15% Histodenz（Sigma）上に重層し、ブレイキをかけずに450 x gで20分間遠心分離

した。界面の低密度画分を回収し洗浄した。その細胞を以下の蛍光標識抗体を用いて染色した。MHC class II-FITC (M5 / 114.15.2) (eBiosciences)、CD86-PE (GL1) (BD Pharmingen)、Siglec-H-APC (551.3D3) (Miltenyi Biotec)、CD11c-PE-Cy7 (N418) (eBiosciences)、CD11b-APC-Cy7 (M1 / 70) (BD Pharmingen)、CD8-PerCP (53-6.7) (BD Biosciences)。染色後の細胞を FACS バッファー(0.5% BSA を添加した PBS バッファー)を用いて 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (Wako) に再懸濁して、FACS 分析に供試した。FACS Cant II (BD Biosciences)を用いてデータを取得し、FCS Express software (De Novo Software)を用いて分析を行った。CD11c⁺ Siglec-H⁺細胞を pDC と定義し、CD11c⁺ CD11b⁺細胞を mDC と定義して (参考図 C)、細胞表面マーカー (MHC class II および CD86) の発現レベルを測定した。なお、第4章では CD11c⁺ CD11b⁻ mPDCA-1⁺細胞を pDC と定義していたが、本章では mPDCA-1 より pDC 特異的に発現しているとされる Siglec-H をマーカーとして用いた。



参考図 C FACS プロファイル

7) 遺伝子発現解析

肺および肝臓の Total RNA を RNeasy Kit (Qiagen)を用いて抽出し、iScript cDNA synthesis kit (BioRad)を用いて定法に従って cDNA 合成を行った。qRT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)および LightCycler 480 (Roche)を用いて実施した。*Gapdh* 遺伝子はリファレンス遺伝子として用いた。プライマー配列は以下の通り設計した。

Gapdh

5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'

5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'

Il-1β

5'-TTGACGGACCCCAAABATG-3'

5'-TGGACAGCCCAGGTCAAAG-3'

Tnf α

5'-GATCGGTCCCCAAAGGGATG-3'

5'-TGAGGGTCTGGGCCATAGAA-3'

Saa1

5'-ATGAAGGAAGCTAACTGGAAAACTC-3'

5'-TCCTCCTCAAGCAGTTACTACTGCAA-3'

Saa2

5'-ATGAAGGAAGCTGGCTGGAAAGATGG-3'

5'-TCCTCCTCAAGCAGTTACTACTGCTG-3'

Saa3

5'-GCCACCATGAAGCCTTCCATTGCCATCATT-3'

5'-TCAGTATCTTTTAGGCAGGCCAGCAG-3'

8) 皮膚薄化の評価

マウスから採取した背部皮膚は、10%ホルマリンを使用して固定した。脱水後、サンプルをパラフィンで包埋し、薄く切片 (4 μm) にし、定法に従って HE 染色した。1 サンプルごと 4 枚のプレートを作製し、倍率 100 倍で撮影をした。1 つのプレートからランダムに 10 箇所を観測ポイントを選択し、40 ポイント (4 プレート \times 10 ポイント) から、サンプルの平均表皮厚を算出した。

9) 肢筋肉重量の評価

ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋、および長指伸筋を両脚から採取し、体重あたりの両脚の平均筋肉重量を計算した。

10) 統計解析

2 群間の生体マーカー等に関する統計的差異は、スチューデントの t 検定を使用した。生存率の解析にはログランク検定を用いた。老化形質の解析にはウィルコクソンの順位和検定を用いた。肺、肝臓、腎臓の病理解析には χ^2 検定を用いた。

3.2. 試験結果

1) *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取が老化形質および生存率に及ぼす影響

82 週齢において、コントロール群の生存率は 62.5% (16 個体中 10 個体生存)、*L. lactis* JCM 5805 群の生存率は 93.75% (16 個体中 15 個体生存) であった (Fig. 5-1A)。累積生存率は、対照群よりも *L. lactis* JCM 5805 群で有意に高かった ($P < 0.05$)。

老化スコアの評価は 27 週齢から 82 週齢まで 8 週ごとに実施した。その結果、*L. lactis* JCM 5805 群のトータル老化スコアはコントロール群と比較して試験中低い傾向にあった。特に、43 週齢、67 週齢、75 週齢、および 82 週齢においては有意な差異が認められた (Fig. 5-1B)。カテゴリーごとの解析においては、毛・皮膚カテゴリーにおいて、*L. lactis* JCM 5805 群のスコアが有意に低かった (Fig. 5-1B)。一方で、行動カテゴリーや脊椎カテゴリーにおいて有意な差異は認められなかった。

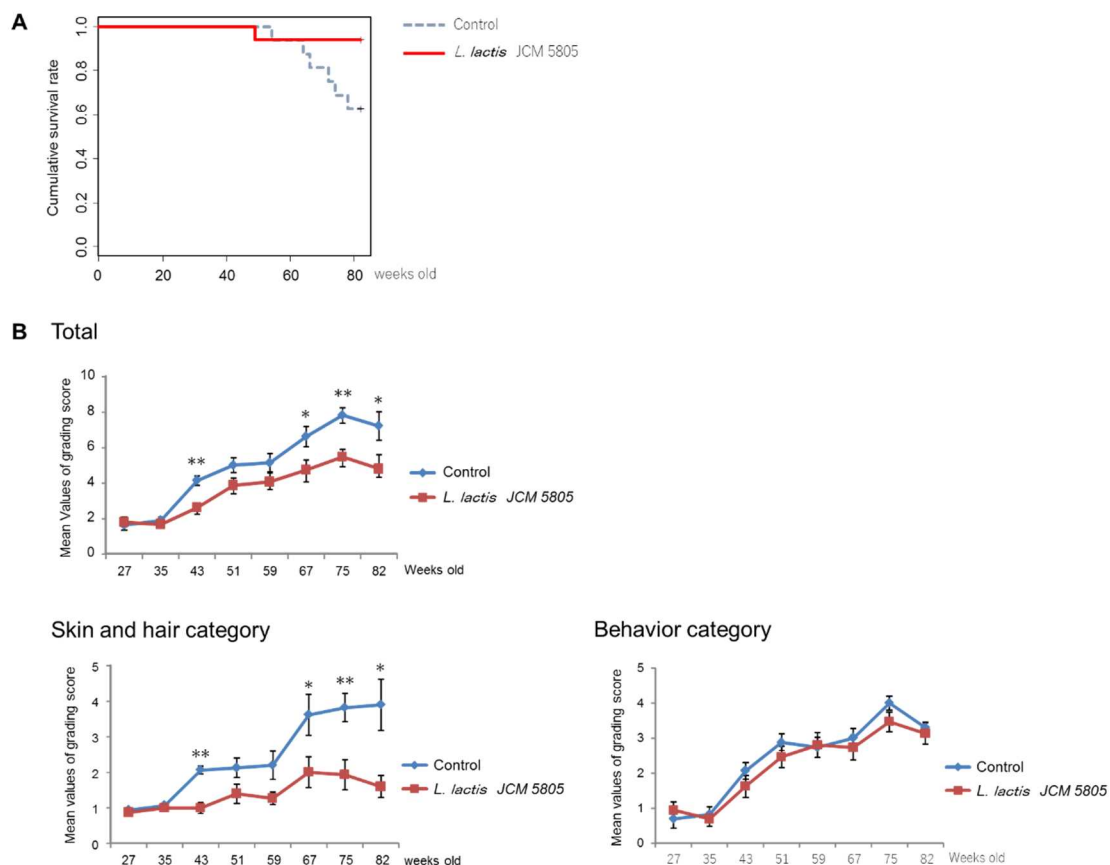


Fig. 5-1 累積生存率と老化スコアの群間比較

(A)累積生存率は82週齢で評価を行った。各群 n=16 で、コントロール群：破線（青）、*L. lactis* JCM 5805 群：実線（赤）で示した。統計解析にはログランク検定を用いた。(B)老化スコアの評価は27週齢から8週ごとに行った。各群 n=16 で、コントロール群：青線、*L. lactis* JCM 5805 群：赤線で示した。グラフは平均値と標準誤差を示す。統計解析にはウィルコクソンの順位和検定を用いた。*：P<0.05、**：P<0.01

2) *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取が老化個体の pDC 活性および mDC 活性に及ぼす影響

以前の研究において、若いマウスを対象に2週間 *L. lactis* JCM 5805 を摂取させた際には、MLN の pDC および mDC の活性化が認められたが、SPN では認められなかった[23]。今回の試験においては、生涯にわたる長期的な摂取が pDC および mDC の活性に及ぼす影響を検証した。82 週齢 (*L. lactis* JCM 5805 摂取 75 週) において評価を行った結果、*L. lactis* JCM 5805 群の SPN の pDC 上の MHC class II および CD86 の発現強度が、コントロール群と比較して有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. 5-2A)。また、SPN の mDC の MHC class II および CD86 の発現強度も、コントロール群と比較して有意に高かった ($P < 0.05$, Fig. 5-2A)。一方で、以前の短期間摂取の試験結果とは異なり、MLN の pDC および mDC の表面マーカーの発現強度においては両群間で有意な差異は見られなかった (Fig. 5-2B)。これらの結果は、*L. lactis* JCM 5805 の長期摂取が、局所的ではない全身性の pDC や mDC の活性低下を抑制できる可能性を示唆している。

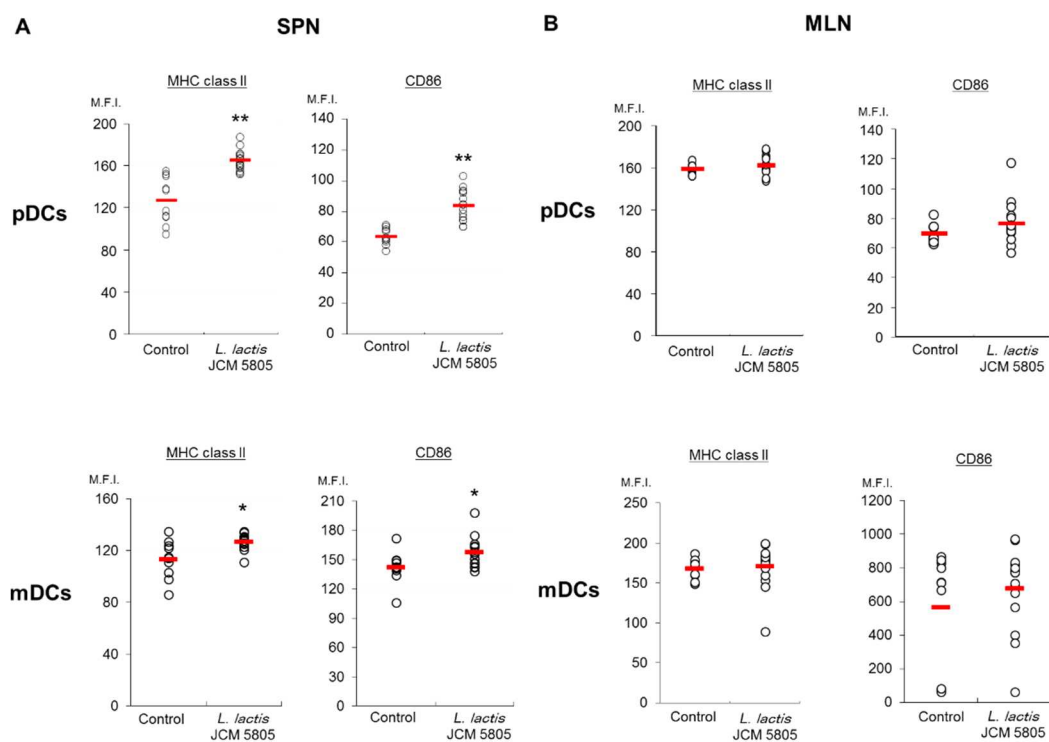


Fig. 5-2 pDC 活性および mDC 活性の群間比較

(A)SPN の pDC 活性および mDC 活性、(B)MLN の pDC 活性および mDC 活性。プロットは各サンプルを表し、数値は蛍光強度の中央値 (M.F.I.)を示す。赤いバーは各群の平均値を示す。スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。コントロール群 : n=10、*L. lactis* JCM 5805 群 : n=15 。* : P<0.05、** : P<0.01

3) *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取が病態や炎症に及ぼす影響

SAMP6 の主な死因は、肺炎、膿瘍の形成、および腎臓の収縮と報告されているため[85]、今回の試験では 82 週齢における肺、肝臓、腎臓の病理解析を実施した (Table 5-1)。その結果、肝細胞病巣変化の頻度は、コントロール群より *L. lactis* JCM 5805 群で有意に低く ($P < 0.05$)、肝臓での膿瘍および細菌感染の発症、ならびに肺における巨大核の出現およびマクロファージの凝集は *L. lactis* JCM 5805 グループで低くなる傾向があった (いずれも $P < 0.1$)。肝臓および肺の病理的観察において両群間で差異が見られたことから、炎症の中心的なメディエーターとして知られる *Il-1 β* 遺伝子の転写レベルの解析を実施した。qRT-PCR の結果、*L. lactis* JCM 5805 群の肺の *Il-1 β* 遺伝子の転写レベルは、コントロール群と比較して低い傾向にあった ($P = 0.057$, Fig. 5-3A)。その一方で、肝臓の *Il-1 β* 遺伝子の転写レベルは両群間で有意差はなかった (Fig. 5-3B)。加えて、他に老化と慢性炎症のバイオマーカーとして知られる *Saa1* 遺伝子、*Saa2* 遺伝子、*Saa3* 遺伝子、および *Tnf- α* 遺伝子についても検証したが、両群間で有意差は見られなかった (data not shown)。しかしながら、*Saa1* 遺伝子および *Saa2* 遺伝子の発現は、コントロール群の 2 個体のみで認められ、*L. lactis* JCM 5805 群での遺伝子発現は認められなかった (data not shown)。これらの結果は、*L. lactis* JCM 5805 の生涯投与が、炎症性因子の発現を抑制することによって病理発生を抑制できる可能性を示唆している。

Table 5-1 肺、肝臓、腎臓の病理学的解析

Organ	Pathological finding	Number of mice		P 値 (χ^2 検定)
		Control n=10	JCM 5805 n=15	
Lung	Hemorrhage	6	9	1.000
	Thrombus	0	1	0.405
	accumulation of foamy cells	1	0	0.211
	appearance of giant nucleus	2	0	0.071 †
	eosinophilic change	10	15	-
	metaplasia, osseous	0	1	0.405
	metaplasia, squamous cell	0	0	-
	Mineralization	1	0	0.211
	aggregation, macrophage	2	0	0.071 †
	Neutrophilia	10	15	-
	hyperplasia, lymphoid tissue	0	0	-
Liver	Peliosis	1	0	0.211
	anisonucleosis, hepatocyte	4	7	0.742
	atrophy, hepatocyte	0	0	-
	Cyst	1	1	0.763
	dilatation, sinusoid	1	0	0.211
	dilatation, bile duct	3	2	0.307
	hyaline droplet, hepatocyte	0	0	-
	hyalinosis, bile duct	1	0	0.211
	hypertrophy, sinusoidal cell	1	0	0.211
	necrosis, hepatocyte	2	4	0.702
	vacuolation, hepatocyte	1	1	0.763
	Abscess	2	0	0.071 †
	bacterial infection	2	0	0.071 †

第5章 *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取による老化抑制効果の検証

	aggregation, macrophage	3	4	0.856	
	Cholangitis	1	0	0.211	
	infiltration, inflammatory cell	4	9	0.327	
	extramedullary hematopoiesis	3	1	0.119	
	hypertrophy, bile duct epithelial cell	0	1	0.405	
	increase in mitosis, hepatocyte	1	2	0.802	
	altered hepatocellular foci	5	2	0.045	*
	hyperplasia, bile duct	2	1	0.315	
	(adenoma, hepatocellular)	1	2	0.802	
	Hemangiosarcoma	2	1	0.315	
	sarcoma, histiocytic	0	1	0.405	
<hr/>					
Kidney	cast, hyaline	3	7	0.405	
	Cyst	1	1	0.763	
	deposit, amyloid, glomerulus	0	1	0.405	
	eosinophilic amorphous substance,				
	glomerulus	5	7	0.87	
	glomerulopathy,				
	mesangioproliferative glomerulonephritis	4	4	0.484	
	hyaline droplet, proximal tubule	1	1	0.763	
	regeneration, tubule	7	10	0.861	
	infiltration, inflammatory cell	1	1	0.763	
	extramedullary hematopoiesis	0	1	0.405	

両群の肺、肝臓、腎臓の病理学的観察結果を示す。肺 11 項目、肝臓 23 項目、腎臓 9 項目において異常所見のある個体数を示した。統計解析には χ^2 検定を用いた。

* : P<0.05、† : P<0.1

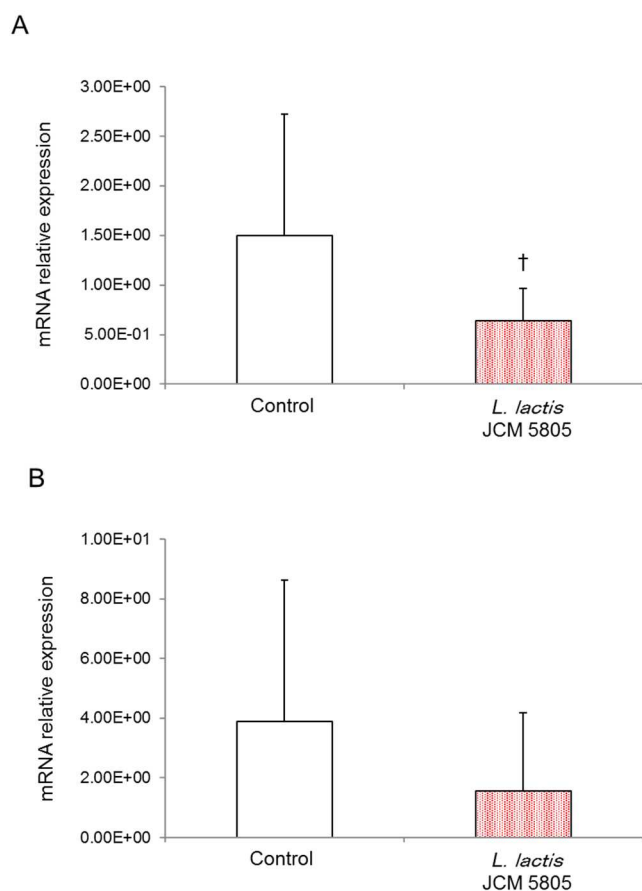


Fig. 5-3 肺および肝臓における *IL-1β* 遺伝子転写量の群間比較

(A) 肺、(B) 肝臓の *IL-1β* 遺伝子の転写量を示す。リファレンス遺伝子には *Gapdh* 遺伝子を用いた。コントロール群：n=10、*L. lactis* JCM 5805 群：n=15。グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。統計解析にはスチューデントの t 検定を用いた。†：P<0.1

4) *L. lactis* JCM 5805 の長期摂取が皮膚や筋肉の老化に及ぼす影響

先述の通り、毛・皮膚カテゴリーで顕著な老化形質発現の抑制が確認できたことから、皮膚老化の形質を詳細に解析することとした。老化過程においては、表皮が薄くなることが報告されているため[94, 95]、82 週齢時点での背部皮膚の厚さを評価した。その結果、*L. lactis* JCM 5805 群の皮膚の厚さは、コントロール群と比較して有意に厚かった ($P < 0.01$, Fig. 5-4)

また、行動カテゴリーにおいては、両群間で有意な差異はなかったものの、老化に伴い筋肉量が低下している可能性を検証するため、82 週齢における両脚のヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋、および長指伸筋の筋肉量を群間比較したところ、いずれも *L. lactis* JCM 5805 群が有意に高いという結果であった ($P < 0.05$, Fig. 5-5)。なお、82 週齢の解剖時点において、両群間の平均体重に有意差はなかった (Fig. 5-6)。

これらの結果は、*L. lactis* JCM 5805 の長期的摂取が皮膚や筋肉の老化を抑制していることを示唆している。

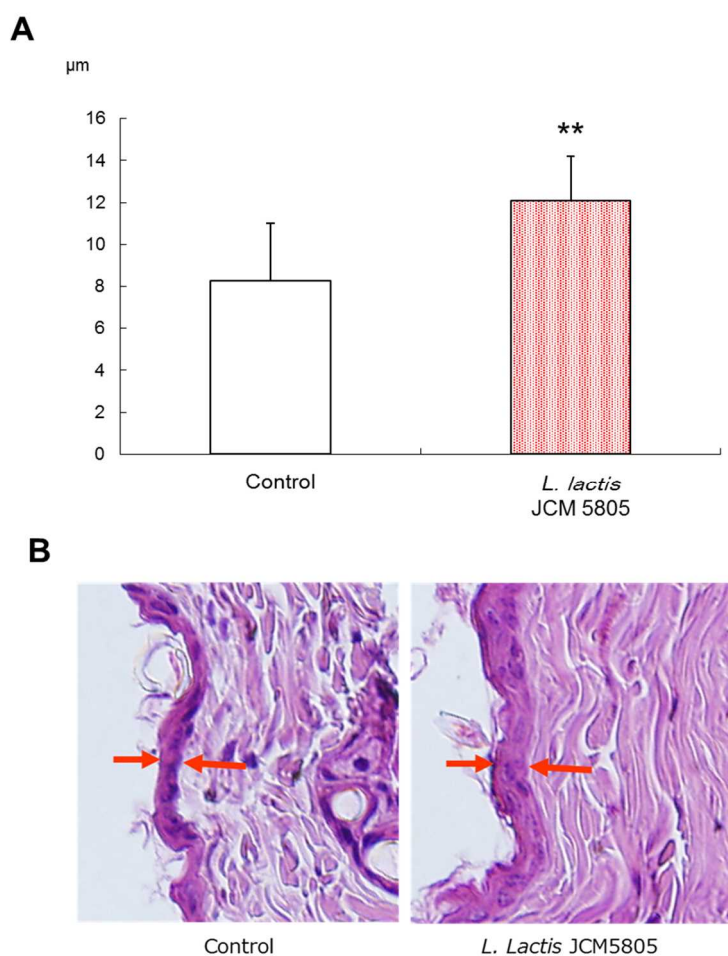


Fig. 5-4 皮膚の厚さの群間比較

(A) 皮膚は 82 週齢の時点で背部から採取した皮膚の厚さを計測した。コントロール群：n=10、*L. lactis* JCM 5805 群：n=15。グラフは皮膚厚の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。統計解析にはスチューデントの t 検定を用いた。**：P<0.01

(B) HE 染色した背部皮膚の断面観察像を示す。赤矢印で示した箇所を皮膚の厚さとして計測した。

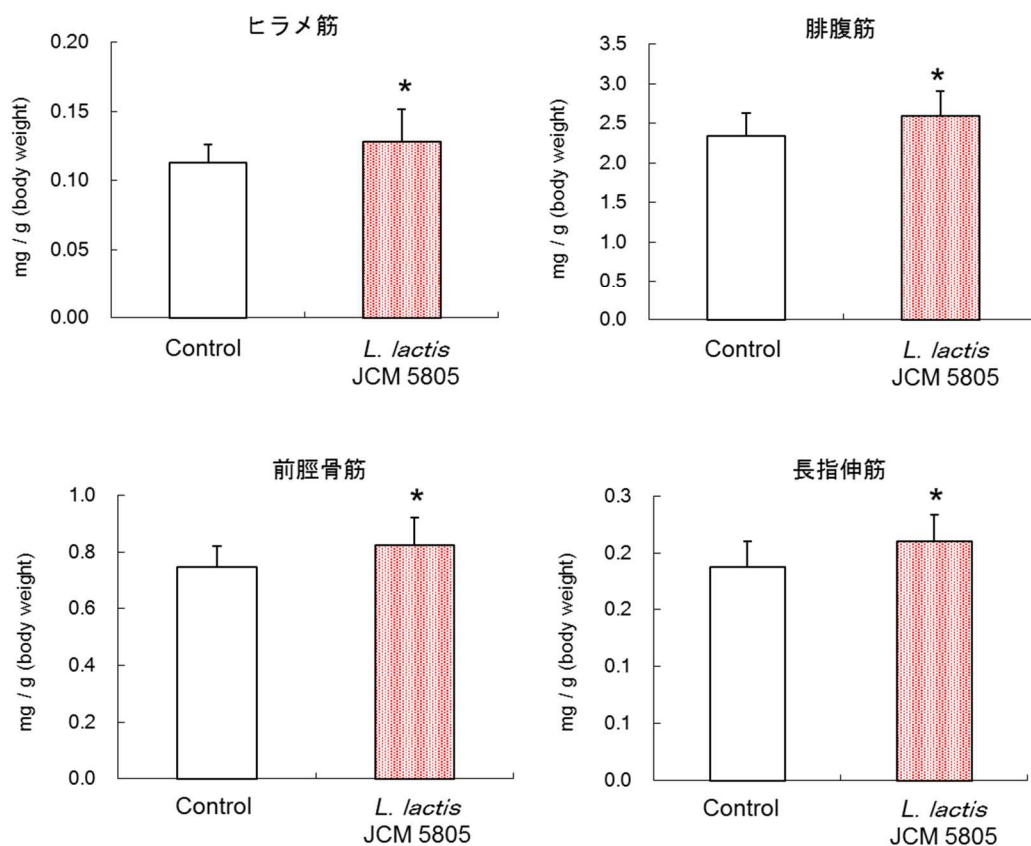


Fig. 5-5 筋肉量の群間比較

筋肉量は 82 週齢の時点で両脚のヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋、および長指伸筋の筋肉量を計量した。コントロール群 : n=10、*L. lactis* JCM 5805 群 : n=15。グラフは体重当たりの筋肉重量の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。統計解析にはスチューデントの t 検定を用いた。* : P<0.05

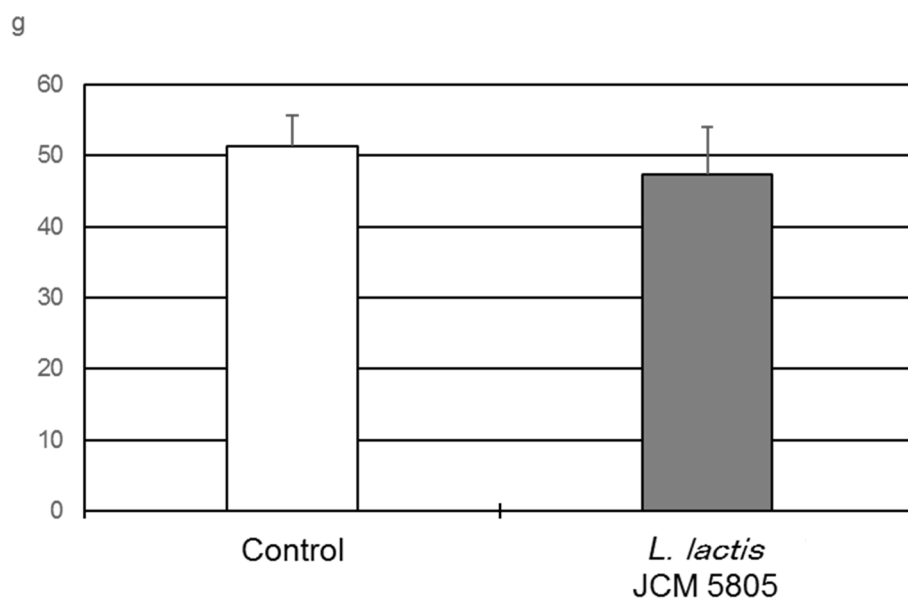


Fig. 5-6 体重の群間比較

82 週齢の時点で体重を計測した。コントロール群 : n=10、*L. lactis* JCM 5805 群 : n=15。

グラフは体重の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

3. 考察

これまでの研究において、*L. lactis* JCM 5805 摂取は pDC を活性化させ、ウイルス感染に対して防御機能を発揮することをマウスとヒトで示している[50-52, 67, 69]。本研究では、*L. lactis* JCM 5805 の摂取が老化抑制に対しても機能することを示すことができ、寿命延長に対しても顕著な効果があることがわかった。82 週齢において、*L. lactis* JCM 5805 を摂取した SAMP6 の生存率はコントロール群と比較して有意に高かった。コントロール群では 16 匹中 6 匹が死亡したのに対し、*L. lactis* JCM 5805 群では 16 匹中わずか 1 匹のみが死亡し、15 匹は生存していた。DC 活性の解析において、*L. lactis* JCM 5805 群の SPN 中の pDC および mDC は、コントロール群と比較して有意に高かったが、その一方で MLN の pDC および mDC に関しては両群間で差異がなかった点が興味深い。以前の研究において、*L. lactis* JCM 5805 をマウスに 2 週間摂取させた際には、SPN ではなく MLN の pDC および mDC が活性化することを確認している[50]。今回の結果は、*L. lactis* JCM 5805 は摂取期間によって効果が異なることを示唆している。短期間の摂取は局所免疫細胞を一時的に活性化し、ウイルス等の外的因子に対する感染防御機能に寄与する可能性がある一方で、生涯にわたる長期間の摂取は、加齢に伴う全身性免疫システムの機能低下を抑制し、老化の表現型発現の抑制と寿命の延長に寄与すると考えられる。この結果は、第4章で示した、高温ストレスによる pDC 活性の低下が SPN 特異的であったことと類似している。外的な環境ストレスや、老化のような内的なストレスがかかることで、免疫機能の中樞がネガティブな影響を受けてしまうが、*L. lactis* JCM 5805 を摂取することによって、そうした機能の低下を防ぎ免疫ホメオスタシスを維持できる可能性が示唆される。

pDC の重要な機能である I 型 IFN の産生能は高齢の C57BL/6 マウスでは低下していることが報告されている[39]。また、腫瘍抗原の提示能に関しても、高齢マウスでは mDC 機能が低下し、DC-SIGN が選択的に減少することが観察されている[38]。これらの樹状細胞の機能低下は感染リスクを高めることにもつながり得る。今回の試験において、ウイルスおよび細菌感染に対して機能する pDC および mDC の活性が、いずれも *L. lactis* JCM 5805 群で顕著に高く維持されていた。本試験は、外部からのウイルスや細菌の持ち込みがないように管理された環境で飼育・観察が行われていたが、常在細菌によるものと考えられる肝臓における日和見感染の形跡がコントロール群においてのみ観察されている (Table 5-1)。このことは、*L. lactis* JCM 5805 群では mDC 活性維持によって日和見感

染が抑制されていた可能性を示唆している。

感染の頻度が高まると、DAMPs が蓄積し、インフラマソーム依存性カスパーゼ-1 を構成する NLRP3 が活性化され、炎症性サイトカインの産生が増加することが知られている [96, 97]。本研究では、*Il-1 β* 遺伝子の転写レベルが *L. lactis* JCM 5805 群で抑制される傾向にあった他、*Saa1* 遺伝子や *Saa2* 遺伝子の転写はコントロール群の個体でのみ確認された。*IL-1 β* は炎症を誘引する代表的なメディエーターとして知られており [93]、*Saa* 遺伝子ファミリーは急性炎症および慢性炎症性疾患の発症時に高く発現することが報告されている [98]。また、病理学的解析において、肝細胞病巣の変化の頻度は、*L. lactis* JCM 5805 群で有意に改善されていた。さらに、肝臓での膿瘍の発症、肺での巨大核の出現およびマクロファージの凝集は、コントロール群の個体でのみ見られた (Table 5-1)。これらの結果は、*L. lactis* JCM 5805 の長期摂取が、日和見感染の抑制を通じて、慢性炎症の蓄積をも抑制する可能性を示唆している。これらの病理学的解析に関して、両群間に統計的な差がなかった主な理由として、エンドポイントの前にコントロール群で 16 匹のマウスのうち 6 匹が既に死亡していたため、解析対象としてのデータを収集できなかったことが考えられる。また、以前の研究の *in vitro* 試験において、*L. lactis* JCM 5805 の刺激によって pDC の ICOS-L および PD-L1 の発現が誘導され、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 細胞が誘導されることを確認している [50]。このことをふまえると、*L. lactis* JCM 5805 の摂取によって、pDC 活性化を介した炎症反応の抑制が起こっていた可能性も考えられる。なお、pDC および mDC の細胞数も評価したが、両群間で有意差はなかったため、*L. lactis* JCM 5805 の長期摂取は pDC や mDC の細胞数には影響しないものと考えられる。また、pDC によって産生される I 型 IFN が慢性炎症に影響することも考えられるため、82 週齢時点における血液サンプルを用いて ELISA を行ったが、両群において解析できるレベルの I 型 IFN は検出されず、老化や炎症との関連性は結論付けられなかった。重要なこととして、*L. lactis* JCM 5805 の長期摂取は、短絡的に I 型 IFN 産生量 (血中濃度) を高めるのではなく、pDC や mDC の加齢に伴う活性低下を抑制すること、感染防御や関連する他の免疫システム全般を調節・維持できるものと考えられる。

本研究では、加齢に関連する組織損傷に対する *L. lactis* JCM 5805 摂取の効果についても検証している。加齢による皮膚の薄化や筋肉量の低下は *L. lactis* JCM 5805 群で顕著に抑制されており、そのことによって様々な老化形質の発現が抑制されたと考えられる。近年、pDC の興味深い新しい役割として、組織の感知と皮膚の創傷治癒の促進が報告されて

おり、I型 IFN を産生する pDC の活性化は、エンドソームの TLR7 および TLR9 に依存しているようである[99]。これは、pDC が老化により損傷した組織から放出された核酸を認識し、その損傷を治癒できることを示唆している。pDC に由来する I 型 IFN は、創傷治癒のために初期の炎症因子を一時的に誘導し、慢性炎症の抑制に寄与すると考えられ、pDC 活性化による抗老化効果は、創傷治癒による慢性炎症の抑制によるものであると推察している。様々な乳酸菌が mDC やマクロファージを活性化すると報告されているが、mDC だけでなく pDC も活性化する乳酸菌は他に報告されておらず、創傷治癒などの pDC 活性化を介した効果は、*L. lactis* JCM 5805 に特異的であると考えられる。その特異的な効果を明らかにするためには、mDC やマクロファージのみを活性化する他の従来の乳酸菌株と比較する必要があるだろう。

本章では、*L. lactis* JCM 5805 の新しい効果として、その長期投与が老化を減速させ、寿命を著しく延長させることを示した。*L. lactis* JCM 5805 は、mDC だけでなく pDC も活性化できる希少な乳酸菌であり、高齢マウスにおいてその活性を維持することによって、感染予防だけでなく、Treg 細胞誘導および創傷治癒の効果により異常な炎症の抑制に寄与し、老化抑制や寿命延長につながったと考えられた。異常な炎症は加齢に伴って徐々に生じるものではなく、上流の免疫系の機能が低下するために起こると推察している。しかしながら、病理的形質と炎症抑制、あるいは皮膚や筋肉の老化抑制のような他の効果が、pDC および mDC の活性化を介した直接的なメカニズムによって引き起こされるかどうかはまだ不明である。*L. lactis* JCM 5805 摂取と加齢表現型との関係の根底にある詳細なメカニズムを探る研究がまだ必要である。

第 6 章

総合討論

第6章 総合討論

L. lactis JCM 5805 は、マウス骨髄細胞を用いたスクリーニングによって、pDC を直接活性化できる稀有な乳酸菌として見出され、マウスに摂取させることで *in vivo* においても pDC を活性化することができる[50]。本研究では、まず *L. lactis* JCM 5805 がヒト pDC に対しても同様に作用するかについての検証を行ったところ、*in vitro* でヒト pDC を活性化でき、*L. lactis* JCM 5805 で発酵させたヨーグルト飲料の摂取により生体内 pDC も活性化できることを示した（第2章）。さらに、被験者 213 名を対象とした *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料摂取のヒト試験を実施し、咳や喉の痛みといったインフルエンザ様疾患症状の発症・重症化を抑え、加えて *ex vivo* におけるヒトインフルエンザウイルス A/H1N1 (A/PR/8/34) 刺激に対する IFN 誘導性の抗ウイルス因子 ISG15 の遺伝子発現量が上昇することを確認した（第3章）。その後の研究において、インフルエンザ感染に対する検証として、岩手県雫石町の全小中学校に *L. lactis* JCM 5805 ヨーグルト飲料を冬期 25 日間・週 3 回配布したところ、隣接する町の小中学校と比較して、インフルエンザによる欠席率が低くなるという臨床試験結果が得られている[100]。これらのヒトを対象とした臨床試験は *L. lactis* JCM 5805 を用いて発酵させたヨーグルトを用いて実施されてきたが、加熱死菌体を用いても同様の効果があるかどうかについて検証が行われている。*L. lactis* JCM 5805 加熱死菌体を 1000 億個含む飲料もしくはプラセボ飲料を 8 週間摂取させたヒト試験では、血中 pDC 活性の上昇、風邪様自覚症状の発症数低下、*ex vivo* におけるヒトインフルエンザウイルス刺激に対する *ISG15* 遺伝子発現量の上昇等が確認されている [101]。また、*L. lactis* JCM 5805 加熱死菌体を 1000 億個含むカプセルを 12 週間摂取させた試験においても、やはり風邪様症状の発症数低下や、*IFN-α* 遺伝子の発現量の上昇等が確認され[102]、別途実施した 4 週間摂取の試験では、唾液中 IgA 分泌量の上昇等を確認している[103]。以上のことから、*L. lactis* JCM 5805 は、生菌ではなく死菌であっても、摂取によって pDC を活性化させられ、そこから派生する免疫賦活効果、抗ウイルス感染効果を発揮できることが示唆されている。すなわち、当該乳酸菌は、ヨーグルトのようなチルド製品（運搬・保管に冷蔵を必要とする製品）だけではなく、常温保管できる飲料やタブレットといった様々な製品形態に加工可能であり、輸送性や保存性にも優れ、食品として非常に優位な特性であると考えられる。また、*L. lactis* JCM 5805 の活性本体が DNA であることが、ノックアウトマウスを用いた解析によって *L. lactis* JCM 5805 は TLR9/MyD88 シグナル経路を介して *IFN-α* 産生誘導していること、*L. lactis* JCM 5805

から抽出した DNA によって IFN- α 産生誘導できることから示唆されている[50]。さらに研究は進み、*L. lactis* JCM 5805 のゲノム情報解析を行い、DNA 断片の GC 含量が pDC 活性化に寄与すること、低 GC 領域の CpG モチーフのコピー数が pDC 活性化能と正の相関があることが報告されている[104, 105]。*L. lactis* JCM 5805 は球菌であり、よりサイズの大きい桿菌より pDC に貪食されやすいという特性があると考えられる。加えて、同様に貪食される乳酸菌は他にも存在し得るが、pDC の TLR9 リガンドとなるために必要なゲノム配列の特性を有していると推察される。

ヒトを対象とした *L. lactis* JCM 5805 摂取試験において、試験開始前の pDC 活性が低い層や、夏期に pDC 活性が低下した際に、*L. lactis* JCM 5805 摂取による pDC 活性化能が顕著であった。これらのことから、pDC 活性は内的あるいは外的な要因によって低下し、*L. lactis* JCM 5805 摂取による pDC 活性化能は pDC 活性が低い状態において効果を発揮するものと考えられた。本研究では、まず高温ストレスによる pDC 活性への影響を検証した。その結果、24 時間の高温ストレス (37°C) によって pDC 活性が有意に低下すること、そして高温ストレス負荷前に *L. lactis* JCM 5805 摂取をしておくことで pDC 活性を維持できる可能性が示唆された (第 4 章) [106]。一般的な風邪やインフルエンザに感染するリスクは冬期に高くなると考えられるが、季節の変わり目や室内外の温度差、あるいは海外旅行等による急激な気温差によって、ウイルス感染のリスクが高まることは想像に難しくなく、pDC 活性の低下もその一因であると推察される。また、新興ウイルスであるデング熱ウイルスや新型インフルエンザウイルス、MERS コロナウイルス等は、亜熱帯地域で流行し、近年では日本国内でもこうした新興ウイルスの脅威に晒されることも稀ではなくなっている。*L. lactis* JCM 5805 のデングウイルスに対する効果も検証されており、マウス骨髄由来樹状細胞を *L. lactis* JCM 5805 刺激した際に放出される液性因子を HepG2 細胞に添加したところ、デングウイルスの増殖が抑制されることが報告されている[107]。さらに、*L. lactis* JCM 5805 を摂取させたマウスにデングウイルスを感染させたところ、コントロール群と比較して生体内デングウイルス量が有意に低いことが確かめられている[108]。他にも、様々なウイルスに対する抗ウイルス効果が確認されている。マウスのパラインフルエンザウイルスを用いた感染実験では、*L. lactis* JCM 5805 摂取により生存率が著しく高まり、肺炎症状の軽減が認められている[51]。また、ロタウイルス感染実験では、*L. lactis* JCM 5805 摂取により、体重抑制・糞便スコア・ウイルス量の改善が確認された[52]。そのメカニズムの根底にあるのは、pDC 活性化とそれに伴う I 型 IFN 産

生能の上昇にあると考えられるが、それだけでは説明のつかない効果の高さ、あるいは pDC 活性化部位と感染部位の違い等がある。pDC は I 型 IFN 産生によって抗ウイルス免疫機構において非常に重要な役割を果たすが[1, 2]、それだけではなく、pDC と pDC によって産生される I 型 IFN は、獲得免疫系と自然免疫系の両方において、T 細胞、B 細胞、NK 細胞といった様々な免疫因子を制御する免疫機構の司令塔として働くと考えられている[25-34]。 *L. lactis* JCM 5805 が他の免疫因子に及ぼす影響として、*in vitro* において *L. lactis* JCM 5805 が樹状細胞を介して NK 細胞を活性化することができ、*L. lactis* JCM 5805 摂取によって脾臓中の NK 細胞が活性化すること[109]、pDC を含む樹状細胞の活性化を介して Th1 等の抗原特異的免疫反応を促進できることが報告されている[110]。 *L. lactis* JCM 5805 が pDC を活性化させることによって、実に多岐にわたる免疫機能が活性化することがわかる。ストレスに関して、*L. lactis* JCM 5805 摂取が運動負荷による疲労ストレスの軽減に効果があることも動物実験によって示されている[111]。運動部に所属する男子学生を対象としたヒト試験では、*L. lactis* JCM 5805 加熱死菌体を 1000 億個含むカプセルの摂取により、プラセボ摂取と比較して摂取期間中の pDC 活性が有意に上昇し、さらに風邪様の自覚症状や疲労の自覚症状が低下した[112]。気温や運動といった外的ストレス因子は人体の免疫機能に大きな影響を与え、ウイルス感染や疲労等の様々な QOL の低下を招く。*L. lactis* JCM 5805 摂取は、pDC 活性化を介して、外的ストレスに起因する免疫機能の低下を防ぎ、健康な生活を送る大きな助けになるものと考えられる。

ここまでは外的なストレスについて述べてきたが、内的なストレスで免疫機能に影響を与えるものとして「老化」が考えられる。本研究では、老化促進モデルマウス SAMP6 を用いて、生涯にわたって *L. lactis* JCM 5805 を長期摂取させた際の老化に及ぼす影響について検証を行った。その結果、*L. lactis* JCM 5805 摂取群では、コントロール群と比べて顕著に生存率が高く、毛・皮膚等の老化度も有意に低くなり、その他に病態発症の低下、炎症性因子の発現量低下、皮膚薄化の抑制、脚筋肉量低下の抑制、そして pDC 活性の上昇（維持）が確認された（第 5 章）[73]。*L. lactis* JCM 5805 摂取は、高齢マウスにおいて pDC 活性を維持することによって、感染予防だけでなく、Treg 細胞誘導および創傷治癒の効果により異常な炎症の抑制に寄与し、老化抑制や寿命延長につながったと考えられた。同様に SAM 系統に *L. lactis* JCM 5805 を摂取させた試験では、SAMP1 に *L. lactis* JCM 5805 を摂取させたところ IFN- α 産生能の上昇やナイーブ T 細胞の比率上昇等の免疫老化抑制効果が確認できた他、SAMP10 では皮膚薄化の抑制やタイトジャンクション遺伝子の

発現量増加が認められている[113]。さらに、老化促進モデルマウスを用いた試験で皮膚老化への影響が特に顕著に改善されたことから、皮膚機能に対するさらなる研究が行われている。マウスに *L. lactis* JCM 5805 を摂取させた後に黄色ブドウ球菌を感染させたところ黄色ブドウ球菌の増殖抑制により皮膚の炎症が改善され、*in vitro* 試験によって TLR9 経路の活性化による IL-17A 産生誘導が起因している可能性が示唆されている[1114]。老化によって免疫機能が低下し、逆に免疫機能低下によって老化が進むこともあり、老化と免疫は切っても切り離せない密接かつ複雑な関係性にある。その中で、pDC は免疫機構の中核として鍵を握る免疫サブセットであり、その pDC を直接活性化できる乳酸菌 *L. lactis* JCM 5805 は機能性食品としては当然ながら、研究材料としても非常に興味深いと言える。さらに、老化に関する研究から派生して、皮膚（肌）の免疫力を高めるという新しい効果も見出されている。近年、美容に関する関心は老若男女問わず高まっており、日常的に摂取することができる乳酸菌によって、皮膚（肌）の免疫機能を高め、健康な皮膚（肌）環境を維持することができれば、人々の QOL 向上に新しい形で貢献することが可能となる。今後のさらなる研究が期待される。

本研究によって、ヒトにおいて pDC 活性化効果が確認された *L. lactis* JCM 5805 は、今後食品として広く活用されることが期待される。当論文執筆中には新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が全世界的に猛威をふるっている。COVID-19 の感染者においては、IFN- α 産生の阻害や PBMC における HLA-DR の発現低下が報告されている[115]。免疫機能に関する関心が高まる中で、食品による免疫賦活効果には今後さらに期待が高まる可能性がある。2020 年には機能性表示食品制度において、当該乳酸菌が免疫機能に言及した表示で初めて消費者庁に届出受理されている。*L. lactis* JCM 5805 の安全性は、ヒトを対象とした長期摂取試験および過剰摂取試験によって、臨床上問題となる所見や副作用がないことが確認されている[116, 117]。過度な免疫亢進は時に自己免疫疾患等の問題を引き起こす可能性もあるが、*L. lactis* JCM 5805 による pDC 活性化作用はヒトにおいては比較的マイルドであり、I 型 IFN 産生に必要な諸因子の発現量を上昇させることでウイルス感染時の応答性を高める点、また、pDC 活性が低い方や低下した状態において効果が顕著であるという点も、日常的に摂取できる食品としての適性が高いと言える。pDC 活性が低下する条件として、本研究では高温ストレスと老化の影響について検証を行った。高温ストレスに関しては、ウイルス感染のリスクが年中いつでも高まる可能性や、新興ウイルスに対するリスクの警鐘となり得、*L. lactis* JCM 5805 摂取による免疫機能維持の効果に高い期

待が集まる。実際に、*L. lactis* JCM 5805 を含有する飲料がベトナムで上市される等、日本国外における展開も進んでいる。老化に関しては、人生 100 年時代と言われる現代において、感染予防だけではなく様々な疾病や老化現象に対する「未病の改善」を実現していくにあたって、免疫機能・免疫ホメオスタシスを長く維持することが非常に重要であると考えられる。本研究における抗老化作用は非常に顕著であり、特に皮膚（肌）や肢筋肉といった豊かな生活に欠かせない形質の老化を抑制できた点は、人々の QOL 向上、すなわち人生を長く楽しむことに大きく貢献できる可能性を示唆している。本研究は、*L. lactis* JCM 5805 のヒトにおける効果や老化抑制といった新しい側面を見出すことが達成されたが、メカニズム面ではまだまだ不明な点を残している。*L. lactis* JCM 5805 に関する研究、pDC を介した免疫機構の研究がさらなる発展を遂げ、医学や食品免疫学の進歩、ひいては豊かな社会の実現に一步でも近づくことを期待している。

参考文献

- [1] G. Trinchieri and D. Santoli, Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis, *J. Exp. Med.* 147 (1978) 1314-1333.
- [2] F.P. Siegal, The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood, *Science* 284 (1999) 1835-1837.
- [3] M. Gilliet, W. Cao, Y.J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases, *Nature Reviews Immunology* 8 (2008) 594-606.
- [4] J.M. Lund, L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N.C. Adams, N.W. Gale, A. Iwasaki, R.A. Flavell, Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 5598-5603.
- [5] S.S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa, Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA, *Science* 303 (2004) 1529-1531.
- [6] H.K. Lee, J.M. Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima, A. Iwasaki, Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells, *Science* 315 (2007) 1398-1401.
- [7] H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* 408 (2000) 740-745.
- [8] S. Bauer, C.J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, G.B. Lipford, Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 9237-9242.
- [9] E. Latz, A. Verma, A. Visintin, M. Gong, C.M. Sirois, D.C. Klein, B.G. Monks, C.J. McKnight, M.S. Lamphier, W.P. Duprex, T. Espevik, D.T. Golenbock, Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 772-779.

- [10] K. Honda, H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W.C. Yeh, T. Taniguchi, Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 15416-15421.
- [11] T. Kawai, S. Sato, K.J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, S. Akira, Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 1061-1068.
- [12] T. Ito, H. Kanzler, O. Duramad, W. Cao, Y.J. Liu, Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells, *Blood* 107 (2006) 2423-2431.
- [13] K. Honda, Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, T. Taniguchi, Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction, *Nature* 434 (2005) 1035-1040.
- [14] A.N. Theofilopoulos, R. Baccala, B. Beutler, D.H. Kono, Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 307-336.
- [15] A.J. Sadler, B.R. Williams, Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 8 (2008) 559-568.
- [16] D.J. Lenschow, C. Lai, N. Frias-Staheli, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 1371-1376.
- [17] T.Y. Hsiang, C. Zhao, R.M. Krug, Interferon-induced ISG15 conjugation inhibits influenza A virus gene expression and replication in human cells. *J. Virol.* 83 (2009) 5971-5977.
- [18] C. Zhao, T.Y. Hsiang, R.L. Kuo, et al. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 2253-2258.
- [19] Y. Tang, G. Zhong, L. Zhu, et al. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J. Immunol.* 184 (2010) 5779-5790.

- [20] C. Zhao, C. Denison, J.M. Huibregtse, et al. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 10200-10205
- [21] Bogunovic D, Boisson-Dupuis S, Casanova JL. ISG15: leading a double life as a secreted molecule. *Exp. Mol. Med.* 45 (2013), e18
- [22] Okumura F, Okumura AJ, Uematsu K, et al. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *J. Biol. Chem.* 288 (2013), 2839-2847.
- [23] T. Luft, K.C. Pang, E. Thomas, P. Hertzog, D.N. Hart, J. Trapani, J. Cebon, Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells, *J. Immunol.* 161 (1998) 1947-1953.
- [24] P. Blanco, A.K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, J. Banchereau, Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus, *Science* 294 (2001) 1540-1543.
- [25] A. Le Bon, N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow, D.F. Tough, Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 1009-1015.
- [26] P. Marrack, J. Kappler, T. Mitchell, Type I interferons keep activated T cells alive, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 521-530.
- [27] A. Le Bon, D.F. Tough, Links between innate and adaptive immunity via type I interferon, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 432-436.
- [28] M.F. Mescher, J.M. Curtsinger, P. Agarwal, K.A. Casey, M. Gerner, C.D. Hammerbeck, F. Popescu, Z. Xiao, Signals required for programming effector and memory development by CD8⁺ T cells, *Immunol. Review* 211 (2006) 81-92.
- [29] H. Takagi, T. Fukaya, K. Eizumi, Y. Sato, K. Sato, A. Shibasaki, H. Otsuka, A. Hijikata, T. Watanabe, O. Ohara, T. Kaisho, B. Malissen, K. Sato, Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity in vivo, *Immunity* 35 (2011) 958-971.
- [30] A. Krug, R. Uppaluri, F. Facchetti, B.G. Dorner, K.C. Sheehan, R.D. Schreiber, M. Cella, M. Colonna, IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of

- CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation, *J. Immunol.* 169 (2002) 6079-6083.
- [31] B. Vanbervliet, N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, B. Homey, O. de Bouteiller, F. Briere, G. Trinchieri, C. Caux, The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 823-830.
- [32] F. Gerosa, A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra, G. Trinchieri, The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions, *J. Immunol.* 174 (2005) 727-734.
- [33] G. Jego, A.K. Palucka, J.-P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, J. Banchereau, Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6, *Immunity* 19 (2003) 225-234.
- [34] H. Poeck, M. Wagner, J. Battiany, S. Rothenfusser, D. Wellisch, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann, Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help, *Blood* 103 (2004) 3058-3064.
- [35] H. Tezuka, Y. Abe, J. Asano, T. Sato, J. Liu, M. Iwata, T. Ohteki, Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction, *Immunity* 34 (2011) 247-257.
- [36] A. Sato, M. Hashiguchi, E. Toda, A. Iwasaki, S. Hachimura, S. Kaminogawa, CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol.* 171 (2003) 3684-3690.
- [37] Y. Jin, Y. Hu, D. Han, M. Wang, Chronic heat stress weakened the innate immunity and increased the virulence of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in mice, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 367846.
- [38] Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL. Impaired dendritic cell function in ageing. *Cancer Res.* 68 (2008) 6341-6349.
- [39] H.W. Stout-Delgado, X. Yang, W.E. Walker, B.M. Tesar, D.R. Goldstein, Aging impairs IFN regulatory factor 7 up-regulation in plasmacytoid dendritic cells during TLR9 activation, *J. Immunol.* 181 (2008) 6747-6756.

- [40] D. Fujiwara, S. Inoue, H. Wakabayashi, T. Fujii, The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135 (2004) 205-215.
- [41] H. Wakabayashi, C. Nariai, F. Takemura, W. Nakao, D. Fujiwara, Dietary supplementation with lactic acid bacteria attenuates the development of atopic-dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice in a strain-dependent manner, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145 (2008) 141-151.
- [42] D. Fujiwara, H. Watanabe, S. Nishida, H. Iino, A. double-blind trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in patients with pollen allergy, *Allergol. Int.* 54 (2005) 143-149.
- [43] M. Kawase, F. He, A. Kubota, K. Yoda, K. Miyazawa, M. Hiramatsu, Heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 protects mice against influenza virus infection by stimulating gut and respiratory immune responses. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64 (2012) 280-288.
- [44] T. Nagai, S. Makino, S. Ikegami, H. Itoh, H. Yamada, Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice, *Int. Immunopharmacol.* 11 (2011) 2246-2250.
- [45] T. Izumo, T. Maekawa, M. Ida, A. Noguchi, Y. Kitagawa, H. Shibata, H. Yasui, Y. Kiso, Effect of intranasal administration of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 on influenza virus infection in mice, *Int. Immunopharmacol.* 10 (2010) 1101-1106.
- [46] S. Makino, S. Ikegami, A. Kume, H. Horiuchi, H. Sasaki, N. Orii, Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1, *Br. J. Nutr.* 104 (2010) 998-1006.
- [47] K. Namba, M. Hatano, T. Yaeshima, M. Takase, K. Suzuki, Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 Administration on Influenza Infection, Influenza Vaccine Antibody Titer, and Cell-Mediated Immunity in the Elderly, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 939-945.

- [48] M. Gleeson, N.C. Bishop, M. Oliveira, P. Tauler, Daily probiotic's (*Lactobacillus casei* Shirota) reduction of infection incidence in athletes, *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 21 (2001) 55-64.
- [49] D. Piccioli, C. Sammiceli, S. Tavarini, et al. Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation. *Blood* 113 (2009) 4232-4239.
- [50] K. Jounai, K. Ikado, T. Sugimura, Y. Ano, J. Braun, D. Fujiwara, Spherical lactic acid bacteria activate plasmacytoid dendritic cells immunomodulatory function via TLR9-dependent crosstalk with myeloid dendritic cells, *PLoS One* 7 (2012) e32588.
- [51] K. Jounai, T. Sugimura, K. Ohshio, D. Fujiwara, Oral administration of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* L. JCM 5805 enhances lung immune response resulting in protection from murine parainfluenza virus infection, *PLoS One* 10 (2015) e0119055.
- [52] K. Jounai, T. Sugimura, Y. Morita, K. Ohshio, D. Fujiwara, Administration of *Lactococcus lactis* strain Plasma induces maturation of plasmacytoid dendritic cells and protection from rotavirus infection in suckling mice, *Int. Immunopharmacol.* 56 (2018) 205-211.
- [53] M. Parcina, C. Wendt, F. Goetz, R. Zawatzky, U. Zahringer, K. Heeg, I. Bekeredjian-Ding, Staphylococcus aureus-induced plasmacytoid dendritic cell activation is based on an IgG-mediated memory response, *J. Immunol.* 181 (2008) 3823-3833.
- [54] A.N. Morrow, H. Schmeisser, T. Tsuno, K.C. Zoon, A Novel Role for IFN- Stimulated Gene Factor 3II in IFN- γ Signaling and Induction of Antiviral Activity in Human Cells, *J. Immunol.* 186 (2011) 1685-1693.
- [55] A. Komatsuda, H. Wakui, K. Iwamoto, M. Ozawa, M. Togashi, R. Masai, N. Maki, T. Hatakeyama, K. Sawada, Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.* 152 (2008) 482-487.
- [56] J.A. Villadangos, L. Young, Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells, *Immunity* 29 (2008) 352-361.

- [57] M. de Verse, P. Winkler, P. Rautenberg, T. Harder, C. Noah, C. Laue, S. Ott, J. Hampe, S. Schreiber, K. Heller, J. Schrezenmeir, Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial, *Clin. Nutr.* 24 (2005) 481-491.
- [58] F. Luis, B.B. Miriam, P.D. Julio, et al. Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* 109 (2013) S35-S50.
- [59] S. Yamamoto, M. Ando, E. Suzuki, High-temperature effects on antibody response to viral antigen in mice, *Exp. Anim.* 48 (1999) 9-14.
- [60] Y. Hu, H. Jin, X. Du, C. Xiao, D. Luo, B. Wang, R. She, Effects of chronic heat stress on immune responses of the foot-and-mouth disease DNA vaccination, *DNA Cell Biol.* 26 (2007) 619-626.
- [61] Fujiwara D, Wei B, Presley LL, Brewer S, McPherson M, Lewinski MA, Borneman J, Braun J.. Systemic control of plasmacytoid dendritic cells by CD8+ T cells and commensal microbiota. *J. Immunol.* 180 (2008) 5843–5852.
- [62] D.H. Canaday, N.A. Amponsah, L. Jones, D.J. Tisch, T.R. Hornick, L. Ramachandra, Influenza-induced production of interferon-alpha is defective in geriatric individuals, *J. Clin. Immunol.* 30 (2010) 373-383.
- [63] A. Panda, F. Qian, S. Mohanty, D. van Duin, F.K. Newman, L. Zhang, S. Chen, V. Towle, R.B. Belshe, E. Fikrig, H.G. Allore, R.R. Montgomery, A.C. Shaw, Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response, *J. Immunol.* 184 (2010) 2518-2527.
- [64] P. Konieczna, D. Groeger, M. Ziegler, R. Frei, R. Ferstl, F. Shanahan, E.M. Quigley, B. Kiely, C.A. Akdis, L. O'Mahony, *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells, *Gut* 61 (2012) 354-366.
- [65] W.M. Schneider, M.D. Chevillotte, C.M. Rice, Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32 (2014) 513-545.
- [66] C. Zhao, M.N. Collins, T.Y. Hsiang, et al. Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle. *Trends in Microbiol.* 21 (2013) 181-186.

- [67] T. Sugimura, K. Jounai, K. Ohshio, et al. Immunomodulatory effect of *Lactococcus lactis* JCM5805 on human plasmacytoid dendritic cells. *Clinical Immunol.* 149, (2013) 509-518.
- [68] H.X. Shi, K. Yang, X. Liu, et al. Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 2424-2436.
- [69] Sugimura T, Takahashi H, Jounai K, Ohshio K, Kanayama M, Tazumi K, Tanihata Y, Miura Y, Fujiwara D, Yamamoto N, Effects of oral intake of pDC-stimulative lactic acid bacterial strain on pathogenesis of influenza-like illness and immunological response to influenza virus, *Br. J. Nutr.* 114 (2015) 727–733.
- [70] Wallin RP, Lundqvist A, Moré SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG, Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends in Immunol.* 23 (2002) 130-135.
- [71] Gigley JP, Khan IA, Plasmacytoid DC from aged mice down-regulate CD8 T cell responses by inhibiting cDC maturation after *Encephalitozoon cuniculi* infection, *PLoS One* 6 e20838 (2011).
- [72] Gupta S, Role of dendritic cells in innate and adaptive immune response in human aging, *Exp. Gerontol.* 54 (2014) 47–52.
- [73] Sugimura T, Jounai K, Ohshio K, Suzuki H, Kirisako T, Sugihara Y, Fujiwara D, Long-term administration of pDC-Stimulative *Lactococcus lactis* strain decelerates senescence and prolongs the lifespan of mice, *Int. Immunopharmacol.* 58 (2018) 166-172.
- [74] Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A., Brombacher F, Locksley RM, Chawla A, Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis, *Nature.* 480 (2011) 104-108.
- [75] Gavazzi G, Krause KH. Ageing and infection. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 659-666.
- [76] Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature.* 448 (2007) 767-774.
- [77] Pawelec G, Goldeck D, Derhovanessian E. Inflammation, ageing and chronic disease. *Curr. Opin. Immunol.* 29 (2014) 23-28.

- [78] Maue AC, Yager EJ, Swain SL, Woodland DL, Blackman MA, Haynes L. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol.* 30 (2009) 301-305.
- [79] Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, Qi Q, Weyand CM. Naive T cell maintenance and function in human aging. *J. Immunol.* 194 (2015) 4073-4080.
- [80] Miller JP, Allman D. The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors. *J. Immunol.* 171 (2003) 2326-2330.
- [81] Frasca D, Riley RL, Blomberg BB. Effect of age on the immunoglobulin class switch. *Crit. Rev. Immunol.* 24 (2004) 297-320.
- [82] Frasca D, Blomberg BB. Aging affects human B cell responses. *J. Clin. Immunol.* 31 (2011) 430-435.
- [83] Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fülöp T Jr, Goldstein DR, Linton PJ. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol.* 30 (2009) 319-324.
- [84] Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 22 (2010) 507-513.
- [85] Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL. Impaired dendritic cell function in ageing. *Cancer Res.* 68 (2008) 6341-6349.
- [86] Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, et al. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17 (1981) 183-94.
- [87] Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, Takeshita S, Shimizu K, Hamamoto H, et al. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.* 26 (1984) 91-102.
- [88] Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M. Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp. Gerontol.* 32 (1997) 117-127.
- [89] Kimoto-Nira H, Suzuki C, Kobayashi M, Sasaki K, Kurisaki J, Mizumachi K. Anti-ageing effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice. *Br. J. Nutr.* 98 (2007) 1178-1186.

- [90] Kawase M, He F, Miyazawa K, Kubota A, Yoda K, Hiramatsu M. Orally administered heat-killed *Lactobacillus gasser* TMC0356 can upregulate cell-mediated immunity in senescence-accelerated mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 326 (2012) 125-130.
- [91] Matsumoto S, Watanabe N, Imaoka A, Okabe Y. Preventive effects of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*-fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. *Digestion* 64 (2001) 92-99.
- [92] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123 (1993) 1939-51.
- [93] Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39 (2013) 1003-1018.
- [94] Bhattacharyya TK, Thomas JR. Histomorphologic changes in aging skin: observations in the CBA mouse model. *Arch Facial Plast Surg.* 2004; 6: 21-25.
- [95] Wulf HC, Sandby-Møller J, Kobayasi T, Gniadecki R. Skin aging and natural photoprotection. *Micron.* 35 (2004) 185-191.
- [96] Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, Bos AJ, Maggio M, Dixit VD, et al. Uric acid and inflammatory markers. *Eur. Heart J.* 27 (2006) 1174–1181.
- [97] Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 2070–2075.
- [98] Zhang, N., Ahsan, M. H., Purchio, A. F. & West, D. B. Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition. *J. Immunol.* 174 (2005) 8125-8134.
- [99] Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerma A, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J. Exp. Med.* 207 (2010) 2921-2930.

- [100] Sakata K, Sasaki Y, Jounai K, Fujii T, Fujiwara D. Preventive effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 yogurt intake on influenza infection among schoolchildren. *Health* 9 (2017) 756-762.
- [101] 鈴木 弘章、金山 雅也、藤井 敏雄、藤原 大介、杉村 春日 乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 含有飲料の摂取による抗ウイルス免疫応答および体調の維持に対する効果-プラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験- 薬理と治療 (JPT) Vol.43 No.10 (2015)
- [102] Shibata T, Kanayama M, Haida M, Fujimoto S, Oroguchi T, Sata K, Mita N, Kutsuzawa T, Ikeuchi M, Kondo M, Naito K, Tsuda M, Nishizaki Y, Ishii N. *Lactococcus lactis* JCM 5805 activates anti-viral immunity and reduces symptoms of common cold and influenza in healthy adults in a randomized controlled trial. *J. Func. Food*. 24 (2016) 492-500.
- [103] Fujii T, Jounai K, Horie A, Takahashi H, Suzuki H, Ohshio K, Fujiwara D, Yamamoto N. Effects of heat-killed *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 on mucosal and systemic immune parameters, and antiviral reactions to influenza virus in healthy adults; a randomized controlled double-blind study. *J. Func. Food*. 35 (2017) 513-521.
- [104] Fujii T, Tomita Y, Ikushima S, Horie A, Fujiwara D. Draft genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805T, a strain that induces plasmacytoid dendritic cell activation. *Genome Announc*. 3 (2015) e00113-15.
- [105] Horie A, Tomita Y, Ohshio K, Fujiwara D, Fujii T. Characterization of genomic DNA of lactic acid bacteria for activation of plasmacytoid dendritic cells. *BMC Microbiol*. 19 (2019) 88.
- [106] Sugimura T, Jounai K, Ohshio K, Fujiwara D. Plasmacytoid dendritic cell dysfunction caused by heat stress is improved by administration of *Lactococcus lactis* strain plasma in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 83 (2019) 2140-2143.
- [107] Tsuji R, Yamamoto N, Yamada S, Fujii T, Yamamoto N, Kanauchi O. Induction of anti-viral genes mediated by humoral factors upon stimulation with *Lactococcus lactis* strain Plasma results in repression of dengue virus replication in vitro. *Antiviral Res*. 160 (2018) 101-108.

- [108] Suzuki H, Tsuji R, Sugamata M, Yamamoto N, Yamamoto N, Kanauchi O. Administration of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria is effective against dengue virus infection in mice. *Int. J. Mol. Med.* 43 (2019) 426-434.
- [109] Suzuki H, Ohshio K, Fujiwara D. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 activates natural killer cells via dendritic cells. *Biosci. Biotec. Biochem.* 80 (2016) 798-800.
- [110] Suzuki H, Jounai K, Ohshio K, Fujii T, Fujiwara D. Administration of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria enhances antigen-specific immune responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503 (2018) 1315-1321.
- [111] Kokubo T, Komano Y, Tsuji R, Fujiwara D, Fujii T, Kanauchi O. The effects of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* strain Plasma, on exercise-induced fatigue and recovery via immunomodulatory action. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 5 (2019) 1-5.
- [112] Komano Y, Shimada K, Naito H, Fukao K, Ishihara Y, Fujii T, Kokubo T, Daida H. Efficacy of heat-killed *Lactococcus lactis* JCM 5805 on immunity and fatigue during consecutive high intensity exercise in male athletes: a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 15 (2018) 39.
- [113] Tsuji R, Komano Y, Ohshio K, Ishii N, Kanauchi O. Long-term administration of pDC stimulative lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* strain Plasma, prevents immune-senescence and decelerates individual senescence. *Exp. Gerontol.* 30 (2018) 10-16.
- [114] Tsuji R, Fujii T, Nakamura Y, Yazawa K, Kanauchi O. Staphylococcus aureus epicutaneous infection is suppressed by *Lactococcus lactis* strain Plasma via interleukin 17A elicitation. *J. Infect. Dis.* 24 (2019).
- [115] Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RAPM, Scott M, *et al.* Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science.* 369 (2020) 1210-1220.
- [116] 田中 健太郎、鈴木 弘章、金山 雅也、藤井 敏雄、藤原 大介、野澤 元、杉村 春日 乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 および難消化性デキストリン含有

飲料の長期摂取時および過剰摂取時における安全性の検討-プラセボ対照ランダム化二重
盲検並行群間比較試験- 薬理と治療 (JPT) Vol.43 (2015) No.12

[117] Kato Y, Kanayama M, Yanai S, Nozawa H, Kanauchi O, Suzuki S. Safety
evaluation of excessive Intake of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805: a
randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. Food Nutr Sci. 9
(2018) 403-419.

<謝辞>

本論文は筆者が麒麟株式会社 R&D 本部基盤技術研究所に在籍中の研究成果をまとめたものです。本論文をまとめるにあたり、論文の構成や内容について数多くのご助言をいただき、さらに論文審査委員主査をお引き受けいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科・食の安全研究センター・免疫制御研究室准教授 八村敏志先生に対し、深謝の意を表します。

ヒトインフルエンザウイルスに関する研究の実行にあたり、多くのご指導と有益なご助言をいただきました国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター（当時）山本典生先生、高橋仁先生に対し、心より御礼申し上げます。

本研究の実行および本論文の執筆にあたり、研究の機会を与えていただき、多大なるご理解とご支援をいただいた麒麟株式会社 基盤技術研究所（当時）水谷悟氏、吉田有人氏、藤原大介氏、及び、麒麟ホールディングス株式会社 飲料未来研究所の永嶋一史氏、片山貴仁氏、蒲生徹氏、村上敦司氏に感謝いたします。特に、藤原大介氏には、研究内容全般に対して多くのご助言とご指導を賜り、研究者として多くのことを学ばせていただき、貴重な財産となりました。

また、本研究を遂行する上で、多くのご協力をいただいた麒麟株式会社 基盤技術研究所（当時）の城内健太氏、大塩木乃実氏、井門久美子氏、阿野泰久氏、鈴木弘章氏、桐浴隆嘉氏、杉原圭彦氏、森田悠治氏、藤井敏雄氏、健康技術研究所（当時）の金山雅也氏、田墨恭子氏、谷畑葉子氏、三浦裕氏、及び、小岩井乳業株式会社の諏訪昌宏氏、田中貴章氏をはじめ、多くの関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。特に、本研究の推進にあたり、実験計画の策定、実行、考察などへの多大なるご協力をいただき、互いに切磋琢磨しながら研究者として共に成長させていただいた城内健太氏と大塩木乃実氏に深く感謝申し上げます。

最後に、本論文をまとめるにあたり、常に温かく支えてくれた家族に心から感謝します。

< 発表論文・業績 >

1. 原著論文

Immunomodulatory effect of *Lactococcus lactis* JCM5805 on human plasmacytoid dendritic cells.

Sugimura T, Jounai K, Ohshio K, Tanaka T, Suwa M, Fujiwara D.

Clin Immunol. 2013 Dec;149(3):509-18. DOI: [10.1016/j.clim.2013.10.007](https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.10.007)

(第 2 章)

Effects of oral intake of plasmacytoid dendritic cells-stimulative lactic acid bacterial strain on pathogenesis of influenza-like illness and immunological response to influenza virus.

Sugimura T, Takahashi H, Jounai K, Ohshio K, Kanayama M, Tazumi K, Tanihata Y, Miura Y, Fujiwara D, Yamamoto N.

Br J Nutr. 2015 Sep 14;114(5):727-33. DOI: [10.1017/S0007114515002408](https://doi.org/10.1017/S0007114515002408)

(第 3 章)

Plasmacytoid dendritic cell dysfunction caused by heat stress is improved by administration of *Lactococcus lactis* strain plasma in mice.

Sugimura T, Jounai K, Ohshio K, Fujiwara D.

Biosci Biotechnol Biochem. 2019 Nov;83(11):2140-2143.

DOI: [10.1080/09168451.2019.1642098](https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1642098)

(第 4 章)

Long-term administration of pDC-Stimulative *Lactococcus lactis* strain decelerates senescence and prolongs the lifespan of mice.

Sugimura T, Jounai K, Ohshio K, Suzuki H, Kirisako T, Sugihara Y, Fujiwara D.

Int Immunopharmacol. 2018 May;58:166-172. DOI: [10.1016/j.intimp.2018.03.024](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.024)

(第 5 章)

原著論文を掲載いただいた各出版社・各誌にお礼申し上げます。

2. その他関連論文

Spherical lactic acid bacteria activate plasmacytoid dendritic cells immunomodulatory function via TLR9-dependent crosstalk with myeloid dendritic cells.

Jounai K, Ikado K, Sugimura T, Ano Y, Braun J, Fujiwara D.

PLoS One. 2012;7(4):e32588.

Oral administration of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 enhances lung immune response resulting in protection from murine parainfluenza virus infection.

Jounai K, Sugimura T, Ohshio K, Fujiwara D.

PLoS One. 2015 Mar 6;10(3):e0119055.

Administration of *Lactococcus lactis* strain Plasma induces maturation of plasmacytoid dendritic cells and protection from rotavirus infection in suckling mice.

Jounai K, Sugimura T, Morita Y, Ohshio K, Fujiwara D.

Int Immunopharmacol. 2018 Mar;56:205-211.

ウイルス感染防御を統括するプラズマサイトイド樹状細胞を活性化する乳酸菌の開発
化学と生物 Vol.53 No.9 Page. 626 - 632

藤原大介、城内健太、杉村哲

3. 業績

【受賞】

平成 28 年農芸化学技術賞

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

藤原大介、城内健太、杉村哲、藤井敏雄