

奨励研究

安全な持続的家畜生産のためのイムノバイオティック革命

北澤春樹^{1)*} 須田義人²⁾ 麻生 久³⁾

1) 東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 動物資源化学分野

2) 宮城大学食産業学部 ファームビジネス学科 動物遺伝育種学研究室

3) 東北大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 機能形態学分野

* 連絡担当者：北澤春樹

東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 動物資源化学分野

(〒 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

TEL 022-717-8713

FAX 022-717-8715

haruki@bios.tohoku.ac.jp

【はじめに】

乳酸菌が発見されたのは、今から 150 年以上も前のことである。1908 年、「食細胞説」でノーベル医学生理学賞を受賞したメチニコフ博士が、乳酸菌の健康に関わる「不老長寿説」を唱えたのも 100 年以上も前のことである。その後、乳酸菌の生理機能性に関する研究が進み(図 1)、80 年経ってから、Fuller 博士によるプロバイオティクスの確固たる提案 [2] を期に、世界各国における数多くの関連研究が報告されるようになった。以来、乳酸菌と健康に関する意識と興味関心が高いレベルで保たれ続けている。その背景には、我が国の長年の機能性乳酸菌等に関する取り組みの成果があり、1991 年に発足した特定保健用食品制度 (Food for Specified Health Use; FOSHU) は、我が国発祥のユニークな発想として、FOSHU の名で世界的に紹介されると同時に、様々な生理機能性を有するプロバイオティック製品が誕生するなど、飛躍的発展の一躍を担ってきたことを忘れてはならない [2]。プロバイオティクスは、2001 年の FAO / WHO 合同専門家会議にお

いて「十分量を摂取することにより宿主の健康に有益な作用をもたらす生きた微生物 (live microorganisms, which when consumed in adequate amounts, confer a health benefit on the host)」と再定義され [9]、ヒトをはじめ産業動物において発展的利用が展開されている。また、プロバイオティクスとプレバイオティクスをあわせたシンバイオティクスの利用性も出てきた。近年、プロバイオティクスから生まれたイムノバイオティクス [1] とそれ由来の免疫調節因子 (イムノジェニクス) [10] は、腸管免疫を介して生体に有益な機能を発揮するものとして、食品や飼料と免疫の新たな境界領域

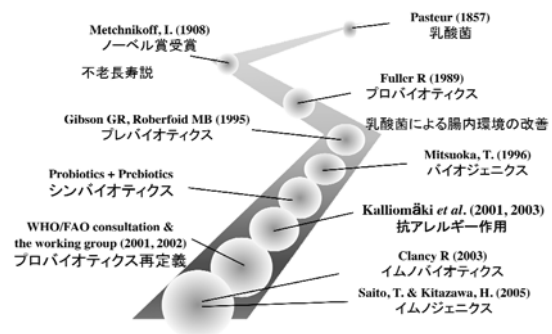


図 1. 生理機能性乳酸菌の歴史

の発展に貢献するものと期待される。

家畜生産現場では、子豚や子牛の感染性下痢症による発育遅延が問題となり、薬剤投与による治療費の増加とともに、経済的損失は極めて大きい。最近になって、薬剤耐性菌の問題が再浮上し、ヒトへの健康危害リスク増加の懸念から、解決すべき急務の課題とされている。EU諸国では、既に、家畜おける成長促進のための抗菌剤使用を全面禁止しており、抗菌剤代替の開発が進められている。我が国においても、今後、抗菌剤軽減からその代替に関する要望が急増することが予想され、その対策について本腰を入れて考える時期に来ている。我々は、イムノバイオティクスの免疫機能性を抗菌剤代替として発展的に利用することを目指し、その選抜・評価系の構築から実証研究を推進している。ここでは、我々の取り組みを紹介しながら、安全な持続的家畜生産を目指したイムノバイオティクス利用の近未来について考え、いわゆる「イムノバイオティク革命」につながれば幸いである。

【イムノバイオティクスとイムノジェニクス】

免疫機能性のプロバイオティクスをイムノバイオティクスと考えると、これまでに実験動物を中心に、*in vivo* および *in vitro* の両面からイムノバイオティクスの免疫機能性が数多く報告されていることになる。イムノバイオティクスは、腸管免疫系を介して、腸管粘膜 IgA、抗菌性ペプチドや抗炎症性サイトカインの産生、あるいは抗原特異的 IgE 産生の抑制などの様々な免疫応答を誘導し、ウイルスおよび細菌性下痢症をはじめ、アレルギー性疾患、炎症性腸炎、さらには、細菌感染など、消化管疾病から各種炎症疾患の予防・改善に寄与すると考えられている。

これらの免疫調節機能において、イムノバイオティクスの腸管上皮細胞との相互作用や生体

への取り込み機構は、生体防御の第一線において極めて重要な鍵となる。このような腸管上皮細胞との相互作用とともに、パイエル板の M 細胞介在性の取り込み経路や樹状細胞による直接的なサンプリング等により、イムノバイオティクスが生体内に移行することにより、イムノジェニクスの効果が発揮され、ヘルパー T 細胞のバランス改善や制御性 T 細胞の活性化を誘導し、最終的に炎症性サイトカインを含めたサイトカインネットワークの改善や分泌型 IgA 抗体産生誘導に関わると考えられる。ごく最近、プロバイオティクスの腸管におけるパターン認識受容体を介する免疫応答と生体防御機構に関する総説がまとめられ [6,7]、また、M 細胞における線毛を有するグラム陰性細菌に対する受容体介在性の取り込み機構が明らかにされるなど [3]、イムノバイオティクスに関する興味関心がさらに高まった。我々も、イムノバイオティクスやイムノジェニクスとパターン認識受容体を介する腸管認識および取り込みを含めた腸管免疫調節機構に注目し、研究を進めている [4,12]。イムノバイオティクスやイムノジェニクスの腸管局所における免疫応答は、誘導組織を起点とした免疫クロストークにより全身免疫系を含めた密接な連携システムを構築している。従って、イムノバイオティクスの免疫調節機能は、腸管局所は勿論のこと、全身における恒常性破綻の改善に寄与し、生体防御機能を発揮するものと考えられる。

【パターン認識受容体】

感染初期において重要な自然免疫応答は、多様な細菌成分を特異的に認識するレセプター分子群であるパターン認識受容体により免疫応答が開始され、受容体下流の転写および後転写レベルでの調節機構を介して、生体防御応答を引き起こすシグナル分子や抗菌性因子の産生を誘導する。これらの受容体は leucine-rich

repeats(LRRs)ドメイン構造によりリガンド特異性があり、Toll 様受容体 (TLR) やヌクレオチド結合性多量体化ドメイン (NOD) が存在し、細菌由来成分の認識は、細胞内外で効率的に行われている。

TLR は、細胞外に LRRs を、細胞内にインターロイキン 1 受容体と相同性のある領域 (TIR ドメイン) を持ち、現在までにはほ乳類では 11 種類程の TLR の存在が報告され、そのリガンド分子の解明も進んでいる (図 2)。本分子は、細菌やウイルスに含まれる特異的な分子パターン (MAMPs) を認識する (図 2)。例えば、TLR2 はペプチドグリカンや細胞性リポプロテイン、リポアラビノマンナン、リポテコ酸および酵母由来サイモサンなどの微生物の細胞壁構成成分を認識し、TLR3 はロタウイルスなどの二本鎖 RNA、TLR4 および MD-2 複合体は大腸菌などのグラム陰性菌由来リポポリサッカライド (LPS)、TLR5 は細菌鞭毛タンパク質であるフラジェリン、TLR7 および 8 はウイルス由来の一本鎖 RNA、TLR11 は今のところマウスのみであるが、尿路感染性細菌の認識に関与することが報告されている。また、TLR1 と TLR6 は TLR2 と会合することでマイコプラズマのリポタンパク質リピドの微細構造を認識し、TLR9 は細菌に特異的な CpG モチーフを持つ非メチル化 DNA の他、我々の研究により、AT-ODN を認識することが明らかとなった [11]。さらに、RP105 は MD-1 と複合体を形成し、TLR4 同様、LPS の認識に関与する他、イムノジェニクスとしてのリン酸

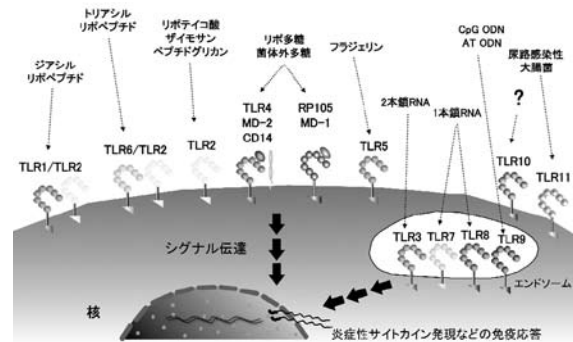


図 2. Toll 様受容体ファミリーとそのリガンド分子

化多糖も認識することがわかった [14]。

NOD は、ヒトにおいて 20 種類以上同定されており、その多くが N 末端側にエフェクター領域である caspase-recruitment domain (CARD) および C 末端側に LRRs ドメインを有する。NOD ファミリーはリガンド未同定であるものが多いが、NOD1 および NOD2 はペプチドグリカンやその合成中間物、可溶性ペプチドグリカン断片の γ -D-グルタミル-メソ-ジアミノピメリン酸 (iE-DAP) やムラミルジペプチド (MDP) を認識する。

【イムノバイオティック評価系】

我々は、ブタにおいて、イムノバイオティクスやイムノジェニクスについてパターン認識受容体介在性の免疫調節作用を追究し、それを基礎としたイムノバイオティック評価系の構築に取り組んできた。これまでに、TLR や NOD ファミリーの腸管免疫系や M 細胞における強発現とその機能性を明らかにし [15]、各種パターン認識受容体トランスフェクタントやパターン認識受容体を全発現するブタ腸管上皮細胞 (PIE) 株 [8] を用いたイムノバイオティック評価システムの構築からイムノバイオティクスやイムノジェニクスの選抜・同定が可能となった。現在、*in vivo* 試験により、本評価系の有効性が実証されつつあるので、PIE 細胞を用いたイムノバイオティック評価系を利用することにより、ブタにおける一連の評価が可能となり、こ

れまで課題とされてきた *in vitro* と *in vivo* 間の溝が埋まるものと期待される [5]。さらに、*in vivo* を反映した的確なモデル評価系の構築から、動物実験の軽減にもつながり大変有意義である。

【おわりに】

これまでの我々の研究により、家畜の腸管免疫を基礎とした、イムノバイオティク評価系が構築でき、*in vitro* から *in vivo* に至る一連の選抜・評価が可能となった。イムノバイオティクスは、ヒトや動物の健康と密接に関係する食品や飼料と免疫との境界領域が飛躍的に発展する上で、重要な存在となるかもしれない。

医食同源あるいは薬食同源に基づく「食品免疫」や「飼料免疫」の学問領域は、イムノバイオティクスの出現によって、ヒトや動物の健康維持・増進を通じて、健全な生活基盤の再構築に大きく貢献するものと信じている。

【謝辞】

関連する研究は、当時大学院生であった、上羽悟史 氏（現 東京大学助教）、下里剛士 氏（現 信州大学助教）、遠野雅徳 氏（現 畜草研研究員）、島津朋之 氏（現 米国オクラホマ医学振興財団ポスドク）および藤江 瞳 氏（現 城西大学助手）をはじめ、著者が所属する研究室教職員（齋藤忠夫 教授、川井 泰 助教、西村順子 技術専門職員）や多くの院生学生諸氏の他、企業ならびに畜草研や動衛研との共同研究のサポートにより遂行することができた。また日本学術振興会科学研究費補助金をはじめ企業からの奨学寄付金ならびに「民間活力による家畜衛生等技術研究開発促進事業」により充実した研究を維持することができた。関係の方々心より感謝の意を表す。さらに、総説執筆の機会を与えて頂いた日本家畜臨床感染症研究会に深く感謝申し上げる。

【引用文献】

1. Clancy, R. 2003. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 38, 9-12.
2. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Microbiol.*, 66, 365-378.
3. Hase, K., K.Kawano, T. Nochi, G.S. Pontes, S. Fukuda, M. Ebisawa, K. Kadokura, T. Tobe, Y. Fujimura, S. Kawano, A. Yabashi, S. Waguri, G. Nakato, S. Kimura, T. Murakami, M. Iimura, K. Hamura, S. Fukuoka, A.W. Lowe, K. Itoh, H. Kiyono, H. Ohno. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 462, 226-230.
4. Kitazawa, H., Tohno, M., Shimosato, T., Saito, T. 2008. Development of molecular immunoassay system for probiotics via toll-like receptor based on food immunology. *Anim. Sci. J.*, 79, 11-21.
5. Kitazawa, H., M. Tohno, T. Shimosato, Y. Suda, H. Aso. 2010. Development of Immunobiotic Evaluation System for Functional Foods and Feeds. *Proceedings of the 14th AAAP Animal Science Congress, Pingtung, Taiwan, ROC, Aug. 23-27., Vol.1 Plenary Sessions*, 524-529.
6. Lebeer, S., J. Vanderleyden, S. C. J. De Keersmaecker. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with

- commensals and pathogens. *Nature Rev. Microbiol.*, 8, 171-184.
7. MeÅLlanie G. Gareau, M. G., P. M. Sherman, W. A. Walker. 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Gastroenterol. Hepatol.*, 7, 503-514.
 8. Moue, M., M. Tohno, T. Shimazu, T. Kido, H. Aso, T. Saito, H. Kitazawa. 2008. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *BBA-General Subjects*, 1780, 134-144.
 9. Pineiro, M., Stanton, C. 2007. Probiotic bacteria: legislative framework-- requirements to evidence basis. *J. Nutr.*, 137(3 Suppl 2), 850S-853S.
 10. Saito, T., Kitazawa, H. 2005. Recent tendency of immunogenics research on lactic acid bacteria. (in Japanese with English abstract). *Bull. Jpn. Dairy Tech. Assoc.*, 55, 34-44.
 11. Shimosato, T., T. Kimura, M. Tohno, I.D. Iliev, S. Kato, Y. Ito, Y. Kawai, T. Sasaki, T. Saito, H. Kitazawa. 2006. Strong immunostimulatory activity of AToligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5' -C...G-3' stem structure. *Cell. Microbiol.*, 8, 485-495.
 12. 下里剛士、北澤春樹. 2010. イムノジェニクスとしての免疫刺激性 DNA 研究の最前線. *北信越畜産学会報*, 100, 1-9.
 13. Swinbanks, D., O' Brien, J. 1993. Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature*, 364, 180.
 14. Tohno, M., T. Shimazu, W. Ueda, D. Anzawa, H. Aso, J. Nishimura, Y. Kawai, Y. Saito, T. Saito, H. Kitazawa. 2007. Molecular cloning of porcine RP105/MD-1 involved in recognition of extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Mol. Immunol.*, 44, 2566-2577.
 15. 遠野雅徳、北澤春樹. 2009. パターン認識受容体を介するイムノバイオティクスの腸管免疫調節機構. *栄養生理研究会報*, 53, 19-33.

Immunobiotic evolution for safe and sustainable livestock production

Haruki Kitazawa ^{1)*}, Yoshihito Suda ²⁾ and Hisashi Aso ³⁾

1) Food Immunology Group, Laboratory of Animal Products Chemistry, Division of Bioscience and Biotechnology for Future Bioindustries, Graduate School of Agriculture, Tohoku University. 2) Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Department of Food, Agriculture and Environment, Miyagi University. 3) Cell Biology Laboratory, Division of Life Science, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University.

*Correspondence : Haruki Kitazawa

(1-1 Tsutsumidori Amamiyamachi, Aobaku, Sendai 981-8555)

haruki@bios.tohoku.ac.jp