



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

乳酸菌Lactobacillus brevis

KB290の抗感染作用とその作用機序に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-06-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岡本, 尚子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81634

乳酸菌 *Lactobacillus brevis* KB290 の抗感染作用と
その作用機序に関する研究

2020 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

岡本 尚子

乳酸菌 *Lactobacillus brevis* KB290 の抗感染作用と
その作用機序に関する研究

岡本 尚子

目次

序論	1
第1章 インフルエンザウイルス感染マウスに対する <i>Lactobacillus brevis</i> KB290 の感染 防御作用およびその作用機序	5
第1節 小序	5
第2節 材料と方法	6
第3節 結果	11
第4節 考察	13
第2章 小学生におけるインフルエンザ罹患率に対する <i>Lactobacillus brevis</i> KB290 摂 取の影響～非盲検平行群間試験での評価～	21
第1節 小序	21
第2節 研究対象者, 材料および方法	22
第3節 結果	25
第4節 考察	27
第3章 <i>Citrobacter rodentium</i> 感染マウスに対する <i>Lactobacillus brevis</i> KB290 の感 染防御作用	35
第1節 小序	35
第2節 材料と方法	38
第3節 結果	43
第4節 考察	46
第4章 総合考察	64
第5章 総括	67
謝辞	70
参考文献	71

略語リスト

BALF: bronchoalveolar lavage fluid	気管支肺胞洗浄液
BLI: bioluminescent imaging	生物発光イメージング
EHEC: enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	腸管出血性大腸菌
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
EPEC: enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	腸管病原性大腸菌
EPS: exopolysaccharide	菌体外多糖
GHS: general health score	健康状態スコア
HA 試験: hemagglutination 試験	赤血球凝集試験
IFV: influenza virus	インフルエンザウイルス
IFN- α : interferon-alpha	インターフェロン- α
IFN- γ : interferon-gamma	インターフェロン- γ
IFN- λ : interferon-lambda	インターフェロン- λ
IgA: immunoglobulin A	免疫グロブリン A
IgG: immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL-1 β : interleukin-1 beta	インターロイキン-1
IL-6: interleukin-6	インターロイキン-6
IL-12: interleukin-12	インターロイキン-12
MDCK 細胞: Madin-Darby canine kidney 細胞	
MLD ₅₀ : 50% mouse lethal dose	マウス 50%致死量
NK 細胞: natural killer 細胞	ナチュラル・キラー細胞
PBS: phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
ROI: region of interest	関心領域
TCID ₅₀ : median tissue culture infectious dose	50%組織培養感染量
TNF- α : tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子
ZO-1: zona occludens protein	

序論

乳酸菌は、炭水化物を消費し、最終代謝産物として乳酸を生成する微生物の総称であり、グラム陽性、非孢子形成、カタラーゼ陰性、通性嫌気性菌という性質を持つ。乳酸菌は、発酵による保存期間の延長や香りの付与、風味改善など、人間の食生活に古くから利用されてきた。さらに乳酸菌の中には「プロバイオティクス」としての効果が知られているものもある。

国連食糧農業機関／国際保健機関 (FAO/WHO) のワーキンググループが発表した食品中のプロバイオティクスの評価に関するガイドラインでは、「プロバイオティクスは適量を摂取したときに宿主に対して健康上の有益な作用を授与する生きた微生物 (Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host)」と定義されている(35)。プロバイオティクスが宿主にもたらす有益な作用として、抗感染作用、抗肥満作用、抗炎症作用、抗がん作用、抗アレルギー作用などが報告されており(31)、近年、その研究は目覚ましい勢いで進展している。本研究では、植物性食品由来乳酸菌の一つであり、プロバイオティクスとしての作用を持つ *Lactobacillus brevis* KB290 (KB290) に着目した。

KB290 は、京都の三大漬物の一つである「すぐき (Fig. 1)」より分離された植物性食品由来の乳酸菌である。本菌株は、桿菌という形態学的特徴や、どのような糖を栄養源として利用できるかという、いわゆる糖の資化性、および DNA 配列解析などにより、菌種が *Lactobacillus brevis* と同定されている。さらに全ゲノム(全遺伝子情報)解析により、病原性遺伝子を保有しないことに合わせ、ストレス耐性遺伝子など、プロバイオティクスとしての有用性に関わる遺伝子を保有することが明らかとなっている(25)。なお KB290 は、JCM17312 (GenBank accession number AB289046) として、バイオリソースセンター微

生物材料開発室に寄託されており、安全性については、前述の遺伝子情報に加え、ラットにおいて急性・亜急性毒性や催奇形性を示さないこと(108, 109)、またヒトにおいて過剰量を摂取した場合でも重篤な健康被害が認められないことが(74)、それぞれ報告されている。

本菌株の機能性については、第一に整腸作用が知られている。KB290 は菌体外に多糖 (Exopolysaccharide: EPS) を産生することが明らかになっており、EPS で菌体を覆うことにより胆汁酸などの消化液に対して高い耐性を持つことが *in vitro* 試験により示唆されている(97)。さらにヒトにおいても、KB290 を含む飲料を摂取したヒトの便から生きた KB290 が検出されており(74)、KB290 が生菌の状態です腸まで到達し、プロバイオティクス効果を発揮することが期待されている。これまでに、KB290 を摂取することによる腸内菌叢改善作用(2, 72, 74)や便秘改善作用(2, 74)、過敏性腸症候群(72)に対する改善作用が、ヒトでの試験で明らかになっている。

第二の機能性として、KB290 が免疫賦活作用を示すことも複数の研究により示されている。1993年に、KB290 を2週間または4週間継続して摂取したヒトにおいて、末梢血における interferon (IFN) - α 産生能や、末梢血単核細胞の細胞傷害活性が有意に上昇することが初めて報告され(51, 52)、その免疫賦活作用のメカニズムについてさらに研究が行われた。KB290 は分泌型の EPS と細胞表層結合型の EPS (EPS-b) の2種類の EPS を産生することが明らかになっており、これら EPS が免疫賦活作用に関与することが示唆されている(97)。Sasakiら(86)は、KB290 の免疫賦活作用に寄与する菌体成分を特定するため、KB290 の生菌体、殺菌体、EPS-b の産生が極めて少ない KB290 の変異株 (KB392)、および KB290 より粗抽出した EPS-b による細胞傷害活性上昇作用を評価した。マウスに被験物質を含む飼料をそれぞれ1日間自由摂取させた後、脾細胞の細胞傷害活性を対照群と比較した結果、KB290 の生菌体および殺菌体の投与群は、対照群と比較

して、細胞傷害活性が有意に上昇していた。一方、EPS-b の産生能の低い KB392 生菌体投与群の細胞傷害活性は上昇していなかった。このことから、EPS-b が細胞傷害活性に関与する成分の一つであることが示唆されている(86)。

さらに、免疫賦活作用が発揮される際の宿主側のメカニズムも明らかになりつつある。

Fukui ら(26, 27)は、KB290 を摂取させたマウスの脾細胞の細胞傷害活性を測定するとともに、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、KB290 の細胞傷害活性上昇作用を担うエフェクター細胞として、natural killer (NK)細胞や細胞傷害性 T 細胞が関与している可能性を見出している。

上記のように KB290 は、免疫賦活作用を持つことやそのメカニズムが明らかになりつつある。しかしながら、その免疫賦活作用を介して発揮されることが期待される保健効果として、KB290 が抗感染作用を発揮できるかどうかについては明らかにされていない。そこで、本研究ではこの点について検証した。第 1 章では、マウスを用いて、呼吸器感染ウイルスであるインフルエンザウイルスに対する KB290 の抗感染効果やそのメカニズムを検証した。さらに第 2 章では、ヒトにおいても KB290 の抗感染作用を確認できるか否かを検証することを目的に、小学生を対象としてインフルエンザ罹患率に対する KB290 の効果を非盲検平行群間試験にて評価した。さらに第 3 章では、呼吸器感染症以外の主要な感染症である消化管感染症への KB290 の効果を検証するため、消化管感染細菌として *Citrobacter rodentium* を使用し、KB290 の腸管感染細菌に対する抗感染作用についてマウスを用いて評価した。



Figure 1. Suguki

KB290 were isolated from a Japanese traditional pickle made from a turnip, Suguki, which is cultivated in the Kyoto area.

第1章 インフルエンザウイルス感染マウスに対する *Lactobacillus brevis* KB290 の感染 防御作用およびその作用機序

第1節 小序

インフルエンザは、インフルエンザウイルス (influenza virus; IFV) 感染による呼吸器感染症であり、高熱や寒気、のどの痛み、頭痛などを特徴とする(4)。これらの症状は乳幼児や高齢者でしばしば重篤化し、中には死に至る場合もある(29, 30)。インフルエンザ対策としてワクチン接種が普及している。しかし、IFV は抗原変異を起こしやすいため、必ずしもワクチン接種による予防効果は十分とは言えない(21, 78)。したがって、インフルエンザを予防するためには、日々の生活から免疫力を高め、IFV に対する耐性を高めておくことが重要である。

IFV の主な感染部位は気道や肺胞等、呼吸器の上皮細胞である。IFV がこれらの細胞に感染すると、最初に自然免疫応答が誘導される。すなわち、IFV 感染細胞から IFN- α などの I 型インターフェロンや、近年新たに見つかった IFN- λ とよばれる III 型インターフェロンが産生され(14, 15)、細胞膜上にある IFN 受容体に結合することで、細胞内への IFV の侵入や細胞内での IFV の増殖が抑制される(22, 49, 68)。加えて、NK 細胞や単球、好中球、樹状細胞などの貪食細胞が感染部位に遊走し、IFV に感染した細胞を貪食し排除する(15, 44)。さらにこれらの貪食細胞の一部が貪食したウイルス断片をヘルパー T 細胞に提示することで、獲得免疫応答が誘導される。すなわち、ヘルパー T 細胞が B 細胞を活性化させ、B 細胞は形質細胞へと分化し、結果的に形質細胞から immunoglobulin (Ig) A や IgG などの IFV 特異的抗体が産生され、IFV を中和する。

KB290 の摂取は、ヒトにおいて IFN- α 産生能を亢進すること(51)、ヒトやマウスにおいて NK 細胞などによる細胞傷害活性を上昇させること(26, 52)が報告されている。上述の

通り, IFN- α や NK 細胞はウイルス感染に対する自然免疫応答において重要な役割を担うことから, KB290 は IFV 感染に対して防御作用を示す可能性がある。そこで本研究では, KB290 を摂取させたマウスに IFV を感染させることにより, KB290 が IFV に対して防御効果を示すか否かを検証した。

第 2 節 材料と方法

2-1. 使用動物

本試験を共同で実施した研究機関である AgResearch において IFV 感染試験の実績や知見が豊富であった, BALB/c マウスのメスを使用動物として選択した。具体的には, 7-8 週齢のメスの BALB/c マウス (AgResearch Ruakura Small Animal Facility, Palmerston North, New Zealand) を用い, 飼育期間中は, 固形飼料 (Prolab® RMH 1800; LabDiet, Richmond, IN, USA) と水を自由摂取で与え, 12 時間の明暗サイクル, 温度 21°C, 湿度 50.1 \pm 1.4% の環境で飼育した。なお本試験は AgResearch Ltd., Hopkirk Research Institute (Palmerston North, New Zealand) にて実施し, その計画は Agresearch Grasslands Animal Ethics Committee (Palmerston North, New Zealand) で承認を受けた。

2-2. 試験試料

試験試料として, KB290 を 1 \times 10¹¹ cfu/g 含有する馬鈴薯デンプン (サンエイ糖化株式会社, 愛知) を用いた。また, プラセボとして KB290 を含まない馬鈴薯デンプン (日澱化学株式会社, 大阪) を用いた。それぞれの試料はマウスへの投与直前にリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) に懸濁した。

2-3. 感染用 IFV の調製

感染用の IFV には, A/PR/8/34 (H1N1)型マウス順化株 (University of Otago, Dunedin, New Zealand) を使用した。10 日齢の孵化鶏卵の尿膜腔に IFV を接種して 3 日間培養し, IFV を増殖させた。尿膜腔液を回収し, ストックとして -80°C にて保管した。ストックの 50%組織培養感染量 (median tissue culture infectious dose; TCID_{50}) は, イヌ腎臓尿細管上皮由来 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞を用いた赤血球凝集 (Hemagglutination, HA) 試験 (18) により測定した。すなわち, 一晚培養した MDCK 細胞に IFV を感染させ, 3 日後に HA 試験を実施した。その結果, TCID_{50} は $10^{6.75}/\text{mL}$ であり, 経鼻投与 14 日後までのマウス 50%致死量 (50% mouse lethal dose, MLD_{50}) は $2 \times \text{TCID}_{50}$ であった。

2-4. IFV 感染実験

試験スケジュールを Fig. 2 に示した。60 匹のマウスを 5 匹/ケージにて 12 ケージで飼育した。マウスを非感染群, 対照群, KB290 投与群の 3 群に分け (4 ケージ/群), 非感染群および対照群には馬鈴薯デンプンを, KB290 投与群には KB290 含有馬鈴薯デンプンを, $10 \text{ mg}/100 \mu\text{L}$ で PBS に懸濁したものを 14 日間 (Day $-14 \sim -1$) 無麻酔にて強制経口投与した (KB290 投与群の KB290 摂取量: $1 \times 10^9 \text{ cfu}/\text{マウス}/\text{日}$)。15 日目 (Day 0) に, 非感染群を別の飼育室に隔離した後, 対照群および KB290 投与群にはケタミン/キシラジン ($0.1 \text{ mg}/\text{g body weight}$) を腹腔内投与し, PBS で希釈した IFV 溶液を麻酔下にて経鼻投与した ($2 \times \text{MLD}_{50}/20 \mu\text{L}/\text{マウス}$)。感染 3 日後 (Day 3) に各群 10 匹ずつを CO_2 ガスにて安楽死させ, 血液および肺を採取した。血液からは遠心 ($1,200$

× g, 15 分間)にて血清を分離し, -20°Cにて保存した。肺は-80°Cにて保存した。残った各群 10 匹のマウスは, 感染日 (Day 0)から感染 7 日後 (Day 7)まで毎日体重を測定し, 同時に全身観察により健康状態スコア (general health score; GHS)を算出した。GHS は以下のように 5 段階にスコア化した(48)。

5 = 健康 (臨床症状なし, 動作が機敏, 毛艶が良い, 周囲の環境に興味を示す)

4 = 軽度 (毛がわずかに逆立つ)

3 = 中度 (毛が中程度に逆立つ, 動作が不活発)

2 = 重度 (毛が凝集する, 痩せる)

1 = 非常に重度 (刺激に反応しない)

感染 7 日後 (Day 7)にマウスを CO₂ ガスにて安楽死させ, 血液および脾臓を採取した。血液からは血清を分離し-20°Cにて保存した。脾臓は細胞傷害活性の測定に供した(2-8, 3-5 の項参照)。また, 切開にて露出させた気管の内腔にカニューレを挿入し, 縫合して固定した。次にカニューレにシリンジを接続して 1 mL の PBS を気管に注入し, 3 回程度 PBS を出し入れすることにより, 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF)を採取した。BALF は遠心分離 (150 × g, 15 分間)後に上清を回収し, -80°Cにて保存した。

2-5. 肺における IFV 力価の測定

-80°Cにて保管した肺を融解させ, 2.0 mM のグルタミン (Invitrogen, California, USA), 100 U/mL のペニシリン (Invitrogen), および 100 µg/mL のストレプトマイシン (Invitrogen)を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Invitrogen)を加えてホモジナイズし, 10% (w/v)の肺組織懸濁液を作製した。この懸濁液から遠心 (7,000 × g, 20 分間)

により上清を回収し、上清中の IFV 力価を、MDCK 細胞を用いた HA 試験により測定した。

2-6. 血清中における IFN- α 量の測定

血清中の IFN- α 量は、Mouse IFN-alpha Platinum ELISA (eBioscience, Bender MedSystems Gmbh, Vienna, Austria) を用い、添付のプロトコールに従い測定した。なお、測定には 4 倍希釈した血清を使用し、それぞれ duplicate で測定した。検出限界は 7.48 pg/mL であった。

2-7. BALF 中における IFV 特異的 IgA 量の測定

BALF 中における IFV 特異的 IgA 量は ELISA 法にて測定した。すなわち、2-3 の項にて調製した IFV から密度勾配超遠心法により精製した A/PR/8/34 ウイルス抗原を、0.05 M の炭酸水素塩バッファー (pH 9.6, Sigma, St. Louis, MO, USA) に 5 μ g/mL の濃度で溶解し、96 well プレートに 50 μ L/well ずつ加え 4°C で一晩放置した。0.5 (v/v) Tween20 を含む PBS でプレートを洗浄し、1% (v/v) の牛血清アルブミン、0.5% (v/v) の Tween 20 を含む PBS を 100 μ L/well 加え、室温で 60 分間放置した。再び 0.5 (v/v) Tween20 を含む PBS でプレートを洗浄し、BALF を 50 μ L/well 加え、室温で 60 分間放置した。その後、同様にプレートを洗浄し、5000 倍に希釈した Goat-anti-Mouse-IgA-HRP (Bethyl, Montgomery, TX, USA) を 50 μ L/well 加え、室温で 60 分間放置した。さらに、プレートを洗浄後、0.15 M のクエン酸リン酸バッファー (pH 5.0, Sigma) に 0.5 mg/mL の濃度で溶解した o-フェニレンジアミン (Sigma) を 50 μ L/well 加えた。最後に、1 M の H₂SO₄ を 50 μ L/well 加えることで反応を停止させ、プレート

リーダー (VERSAmax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) にて 490 nm および対照波長 650 nm の吸光度を測定した。なお、対照波長は非特異的な吸光に起因するバックグラウンドを測定するためのもので、対照波長で得られた吸光値を目的波長で得られた吸光値より引くことで、非特異的な吸光を除外するために用いた。

2-8. 脾細胞の細胞傷害活性測定

40 μ m セルストレーナー (Product Number 431750, Corning, NY, USA) に脾臓をのせ、ハサミで細断した後、10%のウシ胎児血清 (Invitrogen) を含む RPMI 1640 培地を加えながらフィルターを通すことで脾細胞懸濁液を得た。この懸濁液を 120 \times *g* で 5 分間遠心した後、溶血液 (17 mM Tris-HCl, 140 mM NH₄Cl) を加え混和し、室温で約 3 分間静置させることで赤血球を溶解させた。再度 120 \times *g* で 5 分間遠心した後、20% (v/v) ジメチルスルホキシド (Sigma) を含むウシ胎児血清 (Invitrogen) に脾細胞を懸濁し、 -80°C にて保存した。細胞傷害活性は、既報に従い、脾細胞をエフェクター細胞、YAC-1 細胞 (マウスリンパ腫由来) を標的細胞とした、放射性クロム (⁵¹Cr) 放出法にて測定した (111)。この方法は、脾細胞と、あらかじめ ⁵¹Cr で標識した YAC-1 細胞とを共培養し、脾細胞が傷害した YAC-1 細胞の割合 (= 細胞傷害活性) を、共培養後の培養上清中に溶出した ⁵¹Cr 量を測定することで評価する方法である。例えば、全ての YAC-1 細胞が傷害された場合は細胞傷害活性が 100% となり、いずれの YAC-1 細胞も傷害されなかった場合には 0% となる。なお本試験では、共培養時のエフェクター細胞とターゲット細胞との比は 20:1 または 40:1 とした。

2-9. 統計解析

値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。群中に検出限界以下の個体が存在した場合には、その個体を除いた平均値 ± 標準誤差を算出した。体重変化量は線形混合効果モデルを用いて比較し、false discovery rate (FDR) 法にて多重性を調整した上で *P* 値を算出した(6)。GHS は Kruskal–Wallis test を用いて解析した。血清中の IFN- α 量、BALF 中の IFV 特異的 IgA 量、脾細胞の細胞傷害活性は一元配置分散分析を用いて解析した。*P* 値が 0.05 未満の時に統計学的に有意差があると判断した。なお、体重変化量の解析に使用した線形混合効果モデルとは、主に複数のサンプルに対して繰り返し測定された経時データに対して使用される解析方法である。t 検定や分散分析などと異なり、個体差や時間的影響など、データとして取得できない要因の影響(変量効果)を考慮した上で、目的の効果(固定効果、本試験では KB290 の介入を指す)を評価することができる解析方法である(28)。

第 3 節 結果

3-1. IFV 感染後の体重および GHS の変化

IFV 感染後の体重変化(A)および GHS(B)を Fig. 3 に示した。非感染群(Normal 群)では顕著な体重の変化は認められなかったのに対し、IFV を感染させた対照群(Control 群)および KB290 投与群では、IFV 感染後に顕著な体重減少が認められた。しかしながら、KB290 投与群では対照群と比べ、感染 3 日後以降で体重減少率が有意に低値を示した。GHS についても同様に、対照群および KB290 投与群では IFV 感染後に徐々に低値を示した。しかし、その値は、感染 4 日後以降において、対照群と比べ KB290 投与群の方が有意に高い値を示した。

3-2. 肺組織中の IFV 力価

非感染群ではすべてのマウスで肺組織中の IFV 力価が検出限界以下だった。一方、感染 3 日後における対照群および KB290 投与群の平均値はそれぞれ、 $10^{4.80 \pm 0.62}$ TCID₅₀/mL, $10^{4.65 \pm 0.57}$ TCID₅₀/mL であり、両群の間に有意差は認められなかった。

3-3. 血清中の IFN- α 量

IFV 感染 3 日後および 7 日後の血清中 IFN- α 量を Fig. 4 に示した。3 日後では、非感染群および対照群のすべてのマウスで検出限界以下であったのに対し、KB290 投与群においてはすべてのマウスで検出された。7 日後では、非感染群においては 3 日後と同様すべてのマウスで検出限界であり、対照群においては 10 匹中 3 匹のマウスで検出された。一方、KB290 投与群では 3 日後と同様すべてのマウスで検出され、その平均値は対照群と比較して有意に高かった。

3-4. BALF 中の IFV 特異的 IgA 量

IFV 感染 7 日後の BALF 中の IFV 特異的 IgA 量を Fig. 5 に示した。KB290 投与群の BALF 中 IFV 特異的 IgA 量は対照群と比べて有意に高かった。非感染群では、すべてのマウスで検出限界以下だった。

3-5. 脾細胞の細胞傷害活性

IFV 感染 3 日後および 7 日後における、エフェクター細胞:ターゲット細胞=20:1 の条件下での脾細胞の細胞傷害活性を Fig. 6 に示した。いずれの測定日においても、非感染群に対し対照群および KB290 投与群で有意に高く、さらに、KB290 投与群の値

は、対照群に対し有意に高かった。また、エフェクター細胞:ターゲット細胞=40:1 の条件下でも同様に、いずれの測定日においても対照群と比較し KB290 投与群の値が有意に高値を示した(3 日後:対照群 $7.8 \pm 0.15\%$ vs KB290 投与群 $13.3 \pm 0.25\%$, 7 日後:対照群 $8.4 \pm 0.17\%$ vs KB290 投与群 $16.3 \pm 0.32\%$, いずれも $p < 0.05$)。

第 4 節 考察

本研究では、IFV 感染前に KB290 を 14 日間経口投与した結果、IFV 感染 3 日後以降で体重減少が、4 日後以降で GHS の低下が、対照群と比較して有意に抑制された。体重減少の程度は、IFV 感染による症状の重篤度の指標とみなされている(64)。また、GHS のように全身観察により健康状態をスコア化したものも、重篤度の指標として数多く報告されている(61, 95, 106)。したがって本研究から、IFV 感染前に KB290 を摂取することによりインフルエンザ症状を緩和できることが明らかとなった。

IFN- α をはじめとする I 型インターフェロンは、正常な生体内ではほとんど産生されず、ウイルスや細菌感染などの外的刺激により産生される(8)。実際に本試験でも、IFV を感染させていない非感染群ではいずれのマウスにおいても IFN- α が検出されなかった。さらに、IFV を感染させた対照群についても感染 3 日後では IFN- α が検出されなかったのに対し、KB290 投与群ではすべてのマウスにおいて検出された。加えて 7 日後においては、対照群においては 10 匹中 3 匹のマウスでのみ検出されたのに対し、KB290 投与群ではすべてのマウスで検出され、その平均値は対照群と比較して有意に高かった。乳酸菌の投与によって IFV 感染後の IFN- α 産生が亢進することはこれまでも報告されていたが(59, 99), これらの報告はすべて、IFV 感染後も乳酸菌投与を継続していた。一方、本試験では、強制経口投与の処置により IFV 感染後のマウスにさらにダメージを与えることを避ける

ため、IFV 感染後は KB290 投与を行わなかった。それにも関わらず、感染 3 日後および 7 日後に KB290 投与群において IFN- α 産生の亢進が認められた。したがって、KB290 を IFV 感染前に摂取しておくことにより、IFV 感染による IFN- α 産生がすばやく誘導されること、さらにその効果は摂取を停止した後も継続することが示唆された。I 型インターフェロンは、IFV 感染細胞に作用し細胞内のウイルス複製を抑制することに加え (68, 91)、感染初期の抗体産生反応や細胞傷害活性を増強することが報告されている (7, 55)。したがって、本試験では、感染 7 日後において BALF 中の IFV 特異的 IgA 量が、感染 3 日後および 7 日後において脾細胞の細胞傷害活性が、対照群と比較し KB290 投与群で高値を示したが、これらは IFN- α の産生亢進を介して誘導されたものである可能性がある。IFV 特異的 IgA は、IFV 感染初期に IFV に特異的に結合して感染性を失わせるという重要な役割を果たしている (13, 19, 43)。また、NK 細胞はウイルス感染初期の自然免疫応答において重要な役割を果たしている (44)。以上より、IFV 感染前に KB290 を摂取させることにより IFV 感染による IFN- α の産生が亢進し、それにより、IFV 特異的 IgA 産生や NK 細胞による細胞傷害活性の増強が誘導され、結果的にこれらが IFV 感染による体重減少や GHS 悪化を抑制したものと考えられる。

一方、本試験では、感染 3 日後における肺組織中の IFV 力価には対照群と KB290 投与群との間に差は認められなかった。IFV を経鼻感染した後の肺のウイルス力価は感染 3 日後にピークを迎えその後減衰していくとの報告があることから (59)、本試験では IFV 力価を感染 3 日後に評価した。一方で、乳酸菌摂取による肺組織中の IFV 力価低減作用は、臨床症状の抑制と同じタイミングで認められている既報が数多く存在する (34, 39, 48)。本試験では IFV 感染後の GHS は、感染 4 日後以降において対照群と KB290 投与群との間に差が認められたことから、感染 3 日後での IFV 力価の評価は KB290 の作用を確

認するには早過ぎた可能性があり、GHS 改善作用が認められた感染後期であれば、対照群と KB290 投与群との間で IFV 力価に差が認められたかもしれない。KB290 の IFV に対する防御効果の信頼性を高める上で、感染後期における IFV 力価評価は今後の課題である。

また本試験では、IFV として H1N1 型という一種類のウイルス型しか評価していないことも課題として挙げられる。IFV に対する KB290 の抗感染作用の信頼性をより強固なものにするためには、H3N2 亜型など複数のウイルス株に対する KB290 の抗感染作用の検証も求められる。

以上の結果より、KB290 はインフルエンザ症状緩和作用を持つこと、さらに本作用には、IFN- α 産生亢進や IFV 特異的 IgA 産生亢進、細胞傷害活性上昇作用など、KB290 による様々な免疫賦活作用が関与していることが示唆された。今後は、感染後期の IFV 力価の評価や、異なるウイルス型の IFV に対する有効性の検証などが期待される。

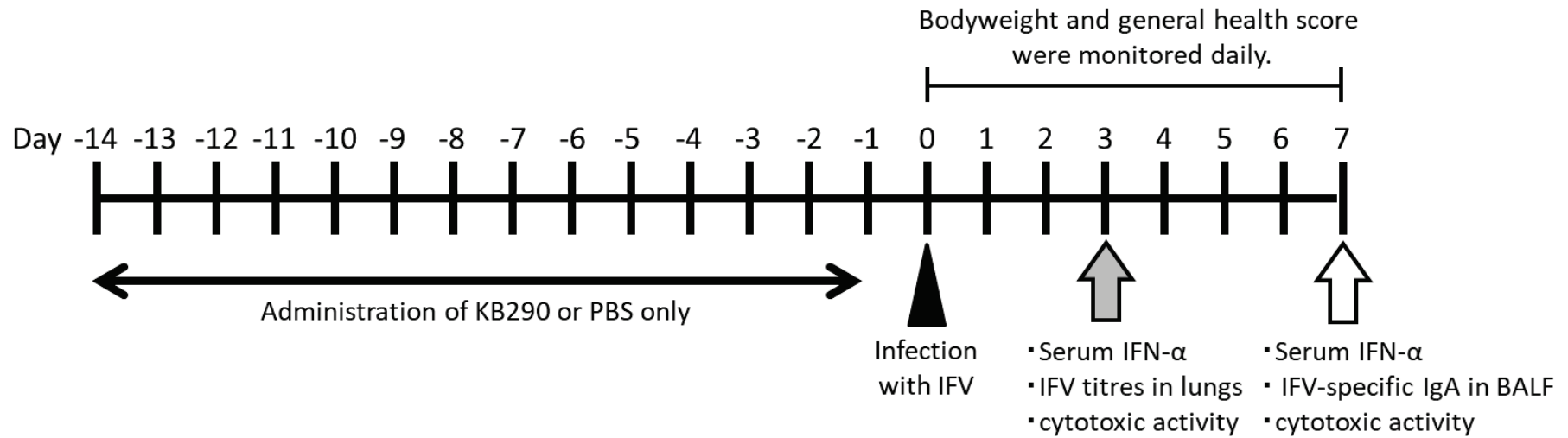


Figure 2. Schedule for animal experiments. Mice were assigned to three groups, Normal, Control, and KB290. Mice in the Normal and Control groups were orally administered potato starch daily from day -14 to day -1, while mice in the KB290 group were orally administered KB290 daily at the same period (solid lines). Control and KB290 group mice were intranasally infected with IFV on day 0, while mice in the Normal groups were not infected. Ten mice in each group were evaluated for IFN- α level in serum, IFV titres in the lungs, and cell-mediated cytotoxic activity of splenocytes on day 3. The remaining 10 mice in each group were weighed daily and their general health status was scored from Day 0 to 7. Levels of IFN- α in serum, cell-mediated cytotoxic activity of splenocytes, and IFV-specific IgA in BALF were evaluated on Day 7 in those mice.

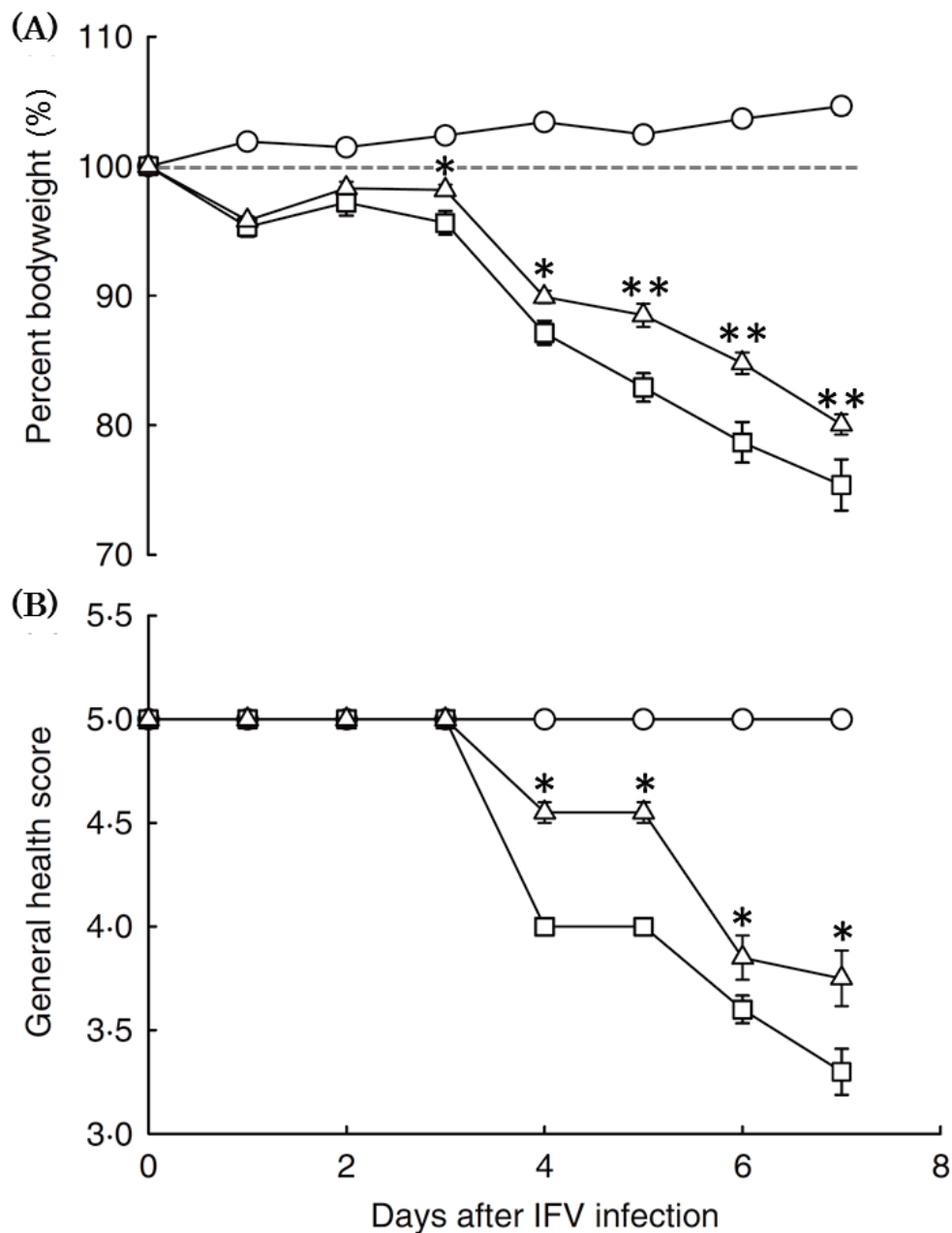


Figure 3. Body weight (A) and general health score (B) of mice in the Normal (○, n = 10), Control (□, n = 10), and KB290 (△, n = 10) groups. The comparative body weight loss between mice in the KB290 group and the Control group was analysed using a mixed effects model, and P-values for pairwise comparison were adjusted by ‘FDR’ method (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). The comparative general health scores between mice in the KB290 group and the Control group were analysed using the Kruskal-Wallis test (* $P < 0.05$).

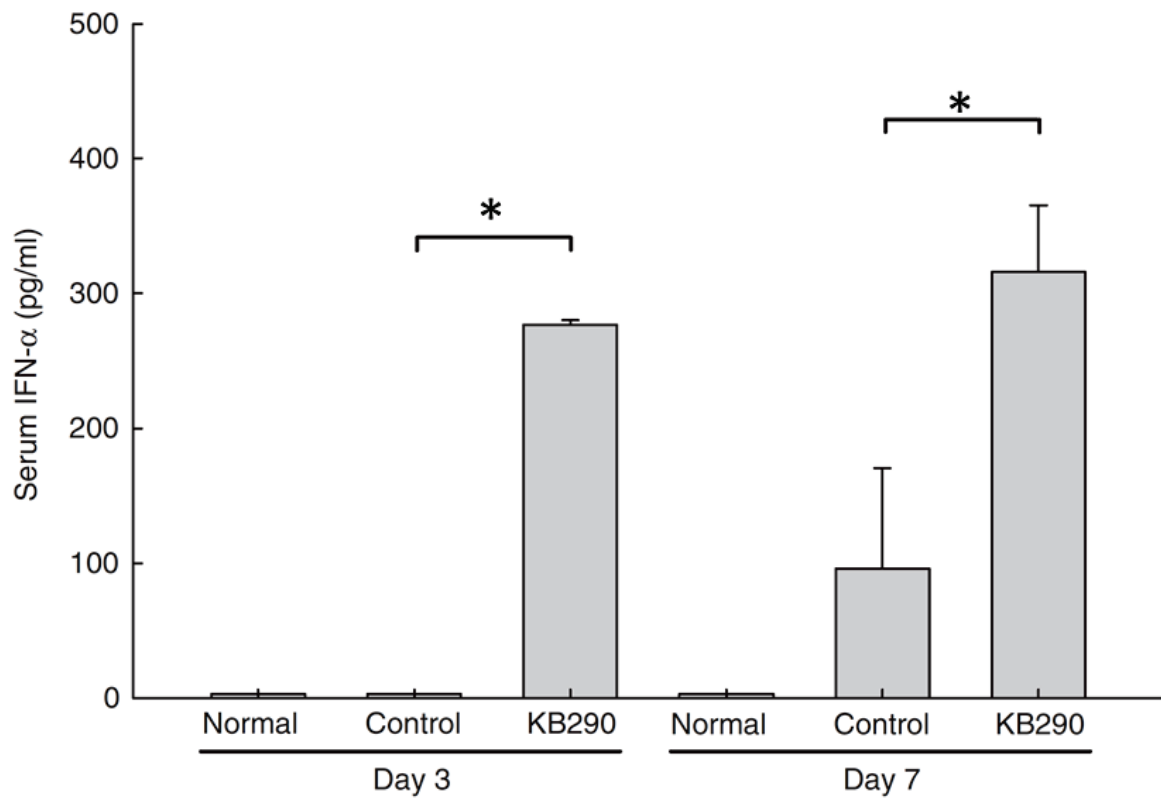


Figure 4. Levels of IFN- α in sera collected on both days 3 and 7 from mice in Normal, Control, and KB290 groups (n = 10 in each group on days 3 and 7). Data were analysed using one-way ANOVA (* $P < 0.05$).

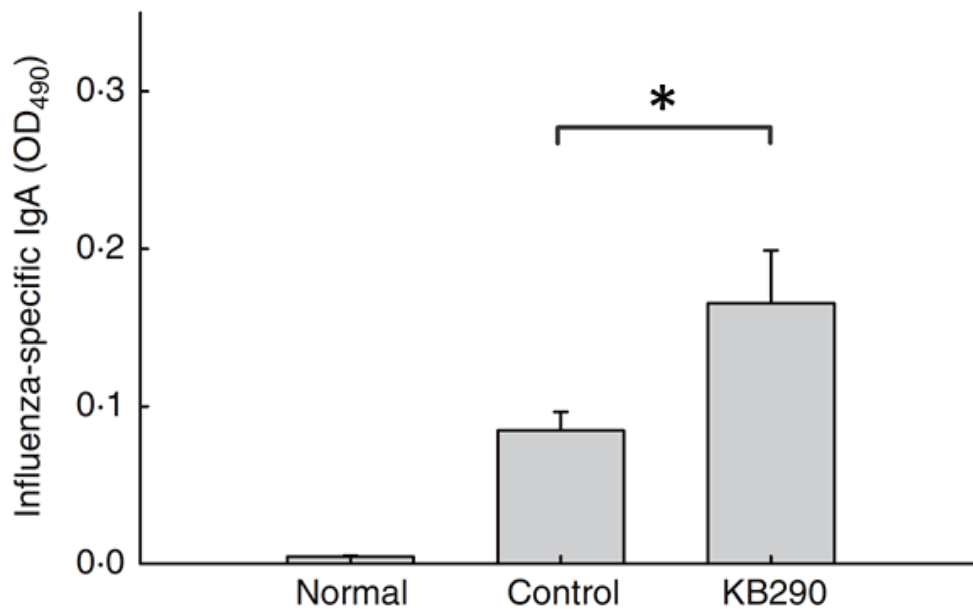


Figure 5. IFV-specific IgA levels in BALF collected from mice in Normal, Control, and KB290 groups (n = 10 in each group) on day 7 after IFV infection. OD₄₉₀ readings were log₁₀ transformed and analysed using one-way ANOVA (**P* < 0.05).

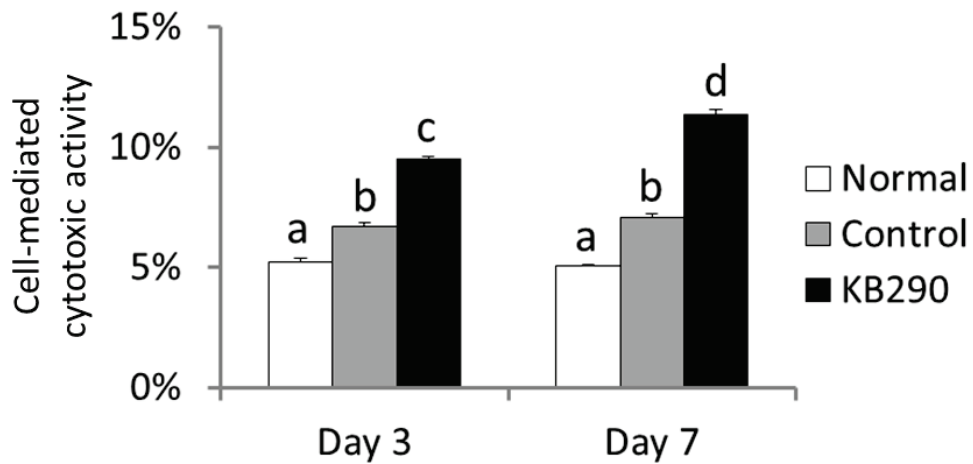


Figure 6. The cell-mediated cytotoxic activity of splenocytes using ^{51}Cr release assay. Splenocytes were collected from mice on days 3 and 7 after IFV infection (mice in the Normal group were not challenged with IFV). The splenic NK cell cytotoxicity was assayed at effector (splenocytes) : target (^{51}Cr -labelled YAC-1) cell ratios as 20:1. Means of the specific lysis were pairwise compared using one-way ANOVA. Means that do not share a letter are significantly different ($P < 0.05$).

第2章 小学生におけるインフルエンザ罹患率に対する *Lactobacillus brevis* KB290 摂取の影響～非盲検平行群間試験での評価～

第1節 小序

第1章では、KB290 がインフルエンザ症状の緩和作用を持つこと、さらに本作用には IFN- α 産生亢進や IFV 特異的 IgA 産生亢進、細胞傷害活性上昇作用など、KB290 による様々な免疫賦活作用が関与していることが示唆された。そこで本章では、動物試験にて認められた KB290 のインフルエンザに対する防御作用がヒトにおいても発揮されるか否かを検証することを目的とした。

これまでに、乳酸菌の摂取が発熱や鼻漏、発咳などの呼吸器症状を緩和することや、呼吸器感染症および消化管感染症の罹患期間を短縮させることなどが報告されている(60, 69)。しかしながら、インフルエンザに関しては、その罹患率に対する食品成分の効果を評価した例はほとんどない。これは、インフルエンザの罹患率に対する効果を評価するには多数の研究対象者が必要なことや、インフルエンザに罹患したと判断するのに医師の診断が必要になることなどが原因だと考えられる。実際、呼吸器感染症に対するプロバイオティクスの効果について記述した総説でも、呼吸器感染症の症状の緩和や罹患期間の短縮に対してプロバイオティクスは有用であるものの、罹患率の低減に効果があるとはいえない、と結論付けている(105)。

一般的に、食品成分の機能性についてヒトを対象に評価する方法としては、無作為化二重盲検プラセボ対照比較試験が用いられる。無作為化とは乱数表などを用いてランダムに被験者を割り付ける方法で、いずれかの試験群に特定の特性を持った被験者が偏ることを避けることが目的である。また二重盲検プラセボ対照比較とは、被験物質を摂取する群(被験群)と、香味や外観などで被験物質と区別できないプラセボ物質を摂取する群(プラセボ

群)を設定し、研究者および被験者の両者が、どの群に割り付けられているかを知らずに試験を実施する方法であり、プラセボ効果を除外できるため結果の客観性を保つことができるというメリットがある。一方で本試験デザインは、プラセボの設計やランダム化の可否など様々な検討要件があり、試験設計や実施に多額のコストがかかる。また、効果が無いプラセボを摂取する必要があるため、研究対象者にも負荷がかかる。そこで本試験では、インフルエンザの罹患率に対する KB290 の効果をより簡便に評価するため、無作為化割付を行わず、さらにプラセボ群ではなく非摂取群を対照とした、非無作為化非盲検並行群間試験を実施し、KB290 のインフルエンザに対する防御作用について検討した。

第 2 節 研究対象者, 材料および方法

2-1. 試験デザイン

試験デザインは非無作為化非盲検並行群間試験とした。試験は 2 期間に分けて行い、前半期間は 2013 年 10 月 21 日～12 月 13 日、後半期間は 2014 年 1 月 14 日～3 月 7 日とした。本試験の試験計画は、2013 年 9 月 12 日に受付番号 2013-R04 としてカゴメ株式会社研究倫理審査委員会の承認を得た。

2-2. 試験食品

試験食品には、カゴメ株式会社にて製造・販売されている乳酸菌飲料を用いた。飲用期間中、各小学校に必要な本数を毎日冷蔵にて配送した。配送後の試験食品は被験者に配布するまで各学校の冷蔵庫で保存した。試験食品の概要を以下に示す。

- 原材料名: りんご果汁, 乳製品, 大豆飲料, にんじんエキス, ライム果汁,
大豆ペプチド, 茶エキス, 安定剤(ペクチン), 香料

・関与成分:KB290 6.0×10^9 cfu/本以上 (製造時)

・栄養成分(1本当り):エネルギー(35 kcal), たんぱく質(0.6 g), 脂質(0~0.3 g),
糖質(7.6 g), 食物繊維(0~0.5 g), ナトリウム(8 mg), ショ糖(1.0 g),
カルシウム(14 mg), カリウム(65 mg), リン(14 mg)

2-3. 研究対象者

栃木県那須塩原市内の小学校 25 校のうち, 各学校の代表教諭(学校長)から試験参加の許可を得た 15 校を参加校とした。15 校を地域と人数に偏りがないように 2 つの群に分け, 一方を前半飲用校, もう一方を後半飲用校とした。参加校の全児童およびその保護者には, 書面にて試験の趣旨および内容を説明し, 試験参加を希望する児童の保護者から, インフォームドコンセントを書面により得た。保護者のインフォームドコンセントが得られ, 以下の①~⑤の除外基準に該当しない児童を研究対象者として選定した。

- ① 過去に重度の疾病歴がある, または現在治療中の持病があり, 試験参加に問題があると判断された児童
- ② 試験に関連してアレルギー発症の恐れがある児童(特に大豆, 乳, リンゴ)
- ③ 消化管の切除を伴う手術を受けたことのある児童(虫垂切除を除く)
- ④ 同居する家族に, カゴメ株式会社の従業員が含まれる児童
- ⑤ その他, 試験責任医師が不相当と判断した児童

2-4. 試験スケジュール

試験スケジュールを Fig. 7A に示した。前半飲用校(Group A)および後半飲用校(Group B)の研究対象者(以下, それぞれ, 前半飲用群, 後半飲用群とする)は, それぞ

れ、前半期間または後半期間の登校日(5日/週)に、試験食品を1本、1日のうち任意の時間に飲用した。なお、研究対象者が小学生であることを考慮し、飲用期間であっても、体調が悪い日などは試験食品を必ずしも飲用しなくてもよい旨を事前に伝えた。また、飲用期間以外の試験食品の飲用も制限しなかった。

2-5. データの取得

2-5-1. 保護者または研究対象者へのアンケート

各期間終了時に、各期間中の試験食品の飲用頻度、インフルエンザの予防接種の有無および接種日、医師にインフルエンザと診断されたか否か、医師に風邪または消化管感染症と診断されたか否かを、保護者もしくは保護者の監督下で研究対象者(児童)に、調査書の記入を依頼した。なお、研究対象者のプライバシーを守るため、年齢や性別、身長、体重などの、個人の特定につながる項目は収集しなかった。

2-5-2. 各学校への調査

研究対象者以外の児童も含め、試験に参加した学校に所属する全児童中の、各試験期間中におけるインフルエンザ罹患人数について、各期間終了後に調査票への記入を依頼した。

2-6. 統計解析

結果はすべて χ^2 検定を用いて解析し、解析には EZR ソフトウェア (Version 1.35) を用いた。P 値が 0.05 未満の時に統計学的に有意差があると判断した。なお EZR とは、統計解析ソフトウェアである R を、スクリプトを入力することなく使用できるよう自治医科大

学により開発されたソフトである(46)。

第3節 結果

3-1. 被験者および解析対象者の選定

解析対象者の選定の流れを Fig. 8 に示した。15 校の参加校の児童は全部で 3356 名であった。全児童に試験協力を依頼した結果、保護者からインフォームドコンセントが得られなかった 421 名の児童および除外基準に合致した 9 名の児童を除外した結果、最終的な研究対象者は 2926 名であった。研究対象者のうち、以下のすべてに当てはまる 1783 名の児童を解析対象者とした。

- ・飲用期間に試験食品を 5 日/週飲用したと回答
- ・非飲用期間に被験食品を全く飲用しなかったと回答
- ・全てのアンケート項目に回答

解析対象者のうち、前半飲用群に該当する者は 694 名、後半飲用群に該当する者は 1089 名であった。また、解析対象者から除外された 1143 名のうち、301 名はアンケートに記入漏れがあった者であり、842 名は規定通りに試験食品を摂取しなかった者であった。

3-2. 栃木県内のインフルエンザの流行度

栃木県感染症情報センターにより公開されている、試験期間中における栃木県内の定点あたりのインフルエンザ報告数(100)を Fig. 7B に示した。2013～2014 年冬のインフルエンザ流行のピークは 2014 年 1 月下旬から 2 月にかけてであり、前半期間が該当する 2013 年においてはインフルエンザの流行の程度は低かった。

3-3. 解析対象者におけるインフルエンザ罹患率

前半期間または後半期間において、KB290 摂取群と非摂取群との間でインフルエンザ罹患率を比較した (Table 1)。前半期間においてインフルエンザと診断された者は、摂取群では 0 名、非摂取群では 2 名のみであり、2 群間に統計学的な差は認められなかった。3-2 に記載の通り、栃木県においては、前半期間はインフルエンザの流行前であり、本期間は試験食品摂取の効果を評価するには不適であると考えられた。一方、インフルエンザが流行した後半期間においては、摂取群のインフルエンザ罹患率が 15.7%、非摂取群では 23.9%であり、摂取群の罹患率が非摂取群と比較して有意に低値を示した (Table 1, $p < 0.001$)。

なお、学校間でインフルエンザの流行の程度に差が無かったことを確かめるため、試験に参加した 15 校に所属する全児童 (本試験に参加していない児童も含む) における後半期間のインフルエンザ罹患率を比較した結果、前半飲用校 (Group A) において 19.8% (325/1645 名)、後半飲用校 (Group B) において 17.9% (306/1711 名) であり、群間に統計学的な有意差は認められなかった (相対危険率 = 1.105, 95%信頼区間 = 0.960 – 1.272, $p = 0.165$)。

次に、摂取群と非摂取群との間で認められたインフルエンザ罹患率の差がインフルエンザの予防接種の有無に起因するものではないことを確かめるため、予防接種を受けた者と未接種の者とで層別し、それぞれにおいて摂取群と非摂取群との間で罹患率を比較した (Table 1)。その結果、予防接種を受けた者においては、罹患率は群間に統計学的な差は認められなかった。一方未接種者においては、KB290 摂取群のインフルエンザ罹患率が 16.3%、非摂取群では 28.7%であり、摂取群における罹患率の低減がより顕著に

認められた (Table 1, $p < 0.001$)。

3-4. 解析対象者における風邪罹患率および胃腸炎罹患率

解析対象者における前半期間および後半期間の風邪および胃腸炎罹患率を Table 2 に示した。前半期間においては、摂取群の風邪罹患率が非摂取群に比べ有意に高値を示した。後半期間においては、両群の風邪罹患率の間に統計学的な差は認められなかった。胃腸炎の罹患率は両期間ともに比較的lowく、群間に差は認められなかった。

3-5. 有害事象

試験期間中、試験責任医師に対して、1名の被験者から腹痛、もう1名の被験者から風邪症状の悪化の申し出が寄せられた。しかし、どちらのケースも、医師の治療が必要なほど重篤ではなく一過性であったことから、試験責任医師は本試験において有害事象は発生しなかったと判断した。

第4節 考察

本試験では、2013年10～12月および2014年1～3月の2期間で並行群間試験を行ったが、前半期間はインフルエンザがほとんど流行せず、試験食品であるKB290の効果を評価できなかった。したがって、インフルエンザのような発生に季節性のある疾患や症状に対する効果を評価する場合には、試験期間の選定が重要であると考えられた。

インフルエンザが流行した後半期間において、KB290を継続的に摂取した群のインフルエンザ罹患率は非摂取群と比較して有意に低かった。この結果は、インフルエンザの流行期間にKB290を継続的に摂取することがインフルエンザ罹患リスクを低減できる可能性を

示唆している。一方、本試験に参加した小学校における全児童のインフルエンザ罹患率は、前半飲用校(Group A)と後半飲用校(Group B)との間に差はなかった。このことは、前半飲用校と後半飲用校との間で、後半期間のインフルエンザの流行の程度には差が無かったことを示唆しており、上記で得られた結果が KB290 摂取に起因することを支持するものである。

さらに本試験では、予防接種を受けた児童よりも受けなかった児童において、KB290 摂取群と非摂取群との間の罹患率の差が顕著に認められた。したがって、KB290 摂取によるインフルエンザ罹患リスクの低減作用は、予防接種を受けていないような罹患リスクの高いヒトにおいてより顕著に認められる可能性がある。

乳酸菌をはじめとするプロバイオティクス摂取の効果として、インフルエンザ予防接種の免疫原性を高めること(アジュバント効果)が報告されている(110)。しかしながら本研究では、予防接種を受診した者においては非摂取群と摂取群とでは差は認められず、KB290 摂取による予防接種の効果の増強作用は認められなかった。インフルエンザの予防接種は 12 月までに受診することが一般的であるため、本試験の被験者全員が予防接種時に KB290 を摂取していたとは限らない。特に後半飲用群については KB290 摂取前に予防接種を受診した者が多いと考えられる。したがって、本試験の設計はアジュバント効果を評価するには適切ではなかったと考えられる。加えて、その他の原因として、本試験では予防接種が十分に効果を発揮したことが挙げられる。本試験の後半期間においては、非摂取群のうち、予防接種を受けた児童のインフルエンザの罹患率が受けなかった児童の罹患率よりも有意に低値を示した(相対危険率:0.686, 95%信頼区間:0.524-0.898, $p < 0.01$)。また、2010 年度から 2015 年度の 6 シーズンにおいて、小学生約 5,000 人を対象にインフルエンザ予防接種の有効率を評価した研究(70)では、有効率の 6 シーズンの平均値は 17.3%(最高

38%, 最低-6%)と報告されているのに対し、本試験における予防接種の有効率((1-相対危険率)×100)は31%であり、既報と比較しても有効率は十分高かった。したがって、本試験では予防接種がインフルエンザ罹患率の低減に十分に寄与し、そのため、KB290による予防接種への効果が認められなかった可能性がある。実際、小学校におけるインフルエンザ予防接種の受診率と、学級閉鎖発生率や欠席率との間には負の相関があるなど、小学生におけるインフルエンザ予防に予防接種が効果的であることを示す報告が複数存在する(47, 101)。

プロバイオティクス摂取によるインフルエンザ罹患率の低減作用に関する既報として、Nambaら(73)が、ビフィズス菌の一種である *Bifidobacterium longum* BB536 の摂取により高齢者のインフルエンザ罹患率が低下したと報告している。しかし、この研究では研究対象者が27名と非常に少ない。また、638名の小児を対象にした研究においては、乳酸菌の一種である *Lactobacillus casei* DN-114 001 の摂取により呼吸器感染症や消化器感染症の罹患率が低減したと報告されているが、インフルエンザに限定した罹患率は評価されていない(69)。一方、プロバイオティクス以外の食品成分においては、複数の既報においてインフルエンザ罹患率への効果が示されている。例えば、334名の小学生を対象にした研究ではビタミンDの摂取がA型インフルエンザの罹患率を低減させたことや、197名の成人を対象にした研究では緑茶カテキンの摂取がインフルエンザと診断された者の割合を低減したことなどが報告されている(65, 102)。これらの研究と照らし合わせても、本研究における研究対象者の規模はインフルエンザ罹患率に対する効果を確認するのに十分だと考えられる。しかしながら、これらインフルエンザに対する効果を評価した2つの研究はいずれも無作為化二重盲検プラセボ対照比較試験であり、本研究の試験デザインである非盲検試験と比較して精度の高いものである。ヒトにおけるKB290摂取のインフルエンザ罹患

率低減作用を結論付けるには、本試験よりも精度の高い試験デザインでの評価が必要であり、今後の課題である。

本研究では、インフルエンザ以外の感染症として風邪および胃腸炎症状に対する KB290 の効果を予備的に評価した。しかし、いずれに対しても KB290 の効果を確認することはできなかった。KB290 は細胞傷害活性を上昇させることが示されているが、同様に、細胞傷害活性上昇作用が示されている乳酸菌である *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 を含むヨーグルト摂取が風邪のリスクを低減させることが報告されている(60)。したがって、KB290 も風邪に対して予防効果を示すことが期待されたものの、本試験では確認できなかった。その原因として、風邪の流行の程度が群間で異なっていた、風邪をひいても病院に行かない者が存在した、風邪の診断基準が医師により異なっていた、などの可能性が考えられる。KB290 の風邪に対する効果を判断するためには、これらを明確に把握・規定した試験が必要である。

以上より、インフルエンザ流行期に KB290 を継続的に摂取することは、小児のインフルエンザ罹患リスクを低減できることが示唆された。本試験のような 1000 人を超える研究対象者においてプロバイオティクスのインフルエンザ罹患リスク低減作用を示した報告は初めてである。しかしながら、KB290 の効果をより明確に示すためには無作為化二重盲検プラセボ対照比較試験などの、より精度の高い試験デザインでの評価が必要であり、今後の課題である。

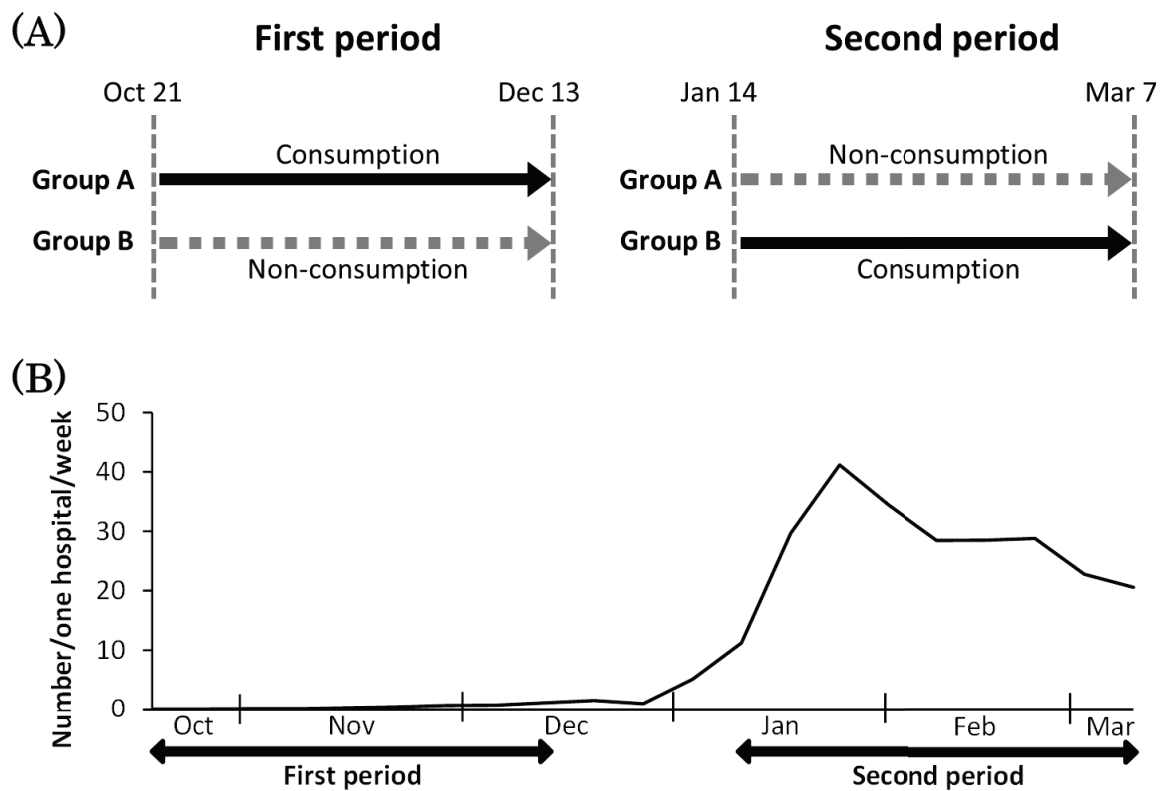


Figure 7. Clinical trial schedule (A) and number of people diagnosed with influenza in Tochigi prefecture (B). For subjects in Group A, test drink containing KB290 was provided 5 d per week for 2 months in the first period (consumption period; solid arrow) and no treatment in the second period (non-consumption period; dotted arrow), while those in Group B were defined vice versa (A). Data of number of people diagnosed with influenza in Tochigi prefecture were derived from the Tochigi Prefectural Infectious Disease Surveillance Centre (B).

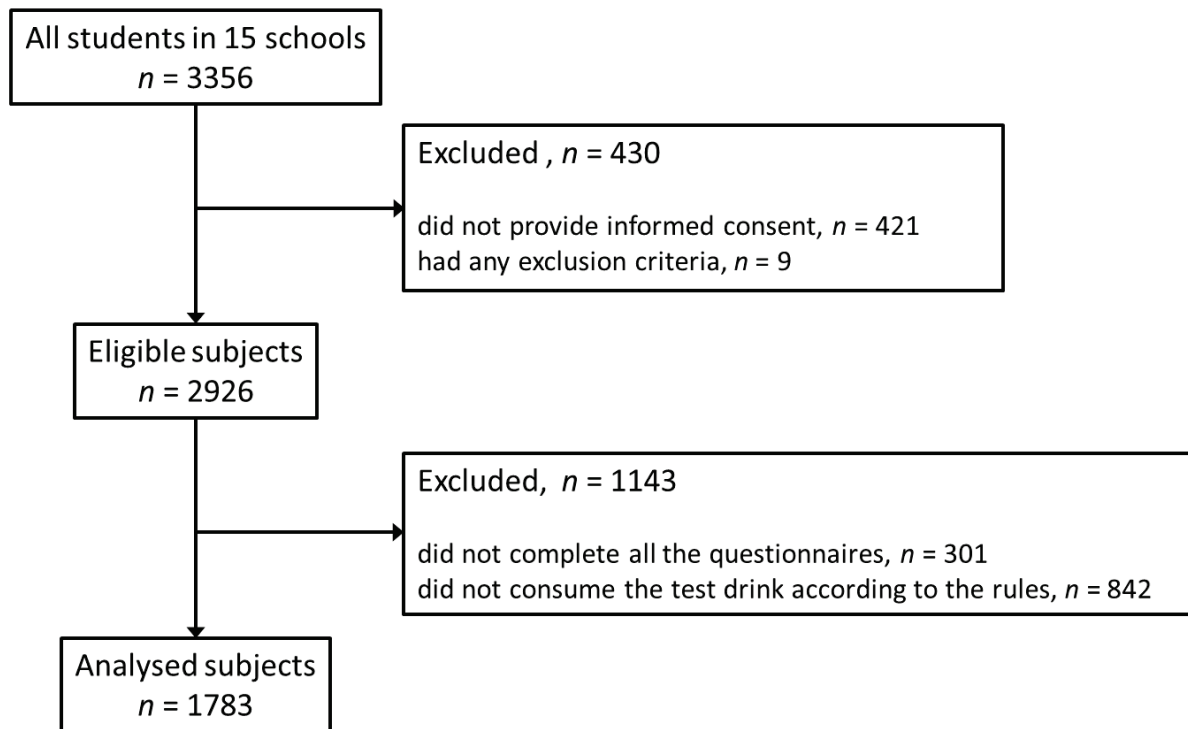


Figure 8. Flow of participants through the study.

Table 1. Incidence of influenza

	Subjects diagnosed with Influenza (n/total n (%))		RR	95% CI	P value
	Non-consumption group	Consumption group			
<i>First period</i>					
All subjects analysed	2/1089 (0.2)	0/694 (0.0)	—	—	0.259
<i>Second period</i>					
All subjects analysed	166/694 (23.9)	171/1089 (15.7)	0.656	0.542, 0.795	< 0.001
- Vaccinated subjects	70/356 (19.7)	70/466 (15.0)	0.764	0.565, 1.032	0.079
- Unvaccinated subjects	96/335 (28.7)	101/620 (16.3)	0.568	0.445, 0.727	< 0.001

RR: relative risk, CI: confidence interval, Non-consumption group: the group which did NOT consume test drink including KB290, Consumption group: the group which consumed test drink including KB290

Table 2. Incidence of common cold and gastroenteritis

	Subjects diagnosed with common cold or gastroenteritis (n/total n (%))		RR	95% CI	P value
	Non-consumption group	Consumption group			
<i>First period</i>					
Common cold	131/1089 (12.0)	108/694 (15.6)	1.294	1.021, 1.638	0.033
Gastroenteritis	19/1089 (1.7)	17/694 (2.4)	1.404	0.735, 2.682	0.302
<i>Second period</i>					
Common cold	62/694 (8.9)	117/1089 (10.7)	1.203	0.897, 1.612	0.215
Gastroenteritis	27/694 (3.9)	63/1089 (5.8)	1.487	0.957, 2.310	0.075

RR: relative risk, CI: confidence interval, Non-consumption group: the group which did NOT consume test drink including KB290, Consumption group: the group which consumed test drink including KB290

第3章 *Citrobacter rodentium* 感染マウスに対する *Lactobacillus brevis* KB290 の感 染防御作用

第1節 小序

腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*; EPEC) や腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) は、主に2歳以下の子供に下痢を起こす病原体である。特に発展途上国では、乳幼児下痢症の30~40%がこれらの病原体によるものともいわれており、この下痢症による乳児の死亡率の低減は、特に発展途上国において非常に重要とされている(17)。

EPEC や EHEC が大腸の粘膜上皮細胞に接着し増殖すると、attaching (菌の接着) /effacing (微絨毛の退縮) (A/E) lesions と呼ばれる、微絨毛の破壊と退縮、上皮細胞骨格の傷害、細胞膜の陥没および破壊、粘膜の肥厚などの特徴的な病変を誘導する(92)。そして、これらの病原体の感染モデルとして *Citrobacter (C.) rodentium* 感染動物が一般的に用いられている(71)。その理由として、*C. rodentium* はマウスの結腸に接着し A/E lesions と同様の病変を引き起こすことが知られており(5, 58, 87, 88)、この病変が EPEC や EHEC がヒトに対して誘発するものと酷似していることが挙げられる(103)。これは、*C. rodentium* が EPEC や EHEC と同様に locus for enterocyte effacement (LEE) という遺伝子座を持つため、病原性に関与するエフェクタータンパク質が類似していることに起因する(20)。そこで本研究では *C. rodentium* 感染マウスを用いることで、EPEC や

EHEC などの腸管感染細菌に対して KB290 が抗感染作用を発揮するか否か検討した。

前述の通り *C. rodentium* による病態は、*C. rodentium* が大腸上皮に接着、増殖することから始まる。そのため、大腸内での *C. rodentium* での挙動を把握することは抗感染作用の有無やそのメカニズムを評価する上で重要である。*C. rodentium* の腸内での挙動の評価指標としては糞便中または大腸組織中の *C. rodentium* 数が一般的に用いられている。糞便中の菌数は非侵襲的かつ経時的に測定できるものの、*C. rodentium* が大腸に強く接着し排泄されない場合、排便時に *C. rodentium* が死滅した場合、あるいは摂餌直後と空腹時など糞便の組成が大きく異なる場合など、必ずしも糞便中の菌数が腸内の菌数を反映しているとは限らない。一方、大腸組織中の菌数は、大腸に存在する菌数を直接的に計測することが可能であるが、測定するためにはマウスを安楽死させる必要があるため、経時的に測定する場合は各評価タイミングのための群設定が必要である。また、糞便、大腸組織のいずれの場合においても、評価サンプルを腸内細菌分離用培地にて 24 時間程度培養する必要があるため結果が出るまで時間を要する。そこで本研究では、非侵襲的かつ迅速に腸内の *C. rodentium* の挙動を把握する方法として生物発光イメージング (bioluminescent imaging; BLI) 法を用いた。

BLI 法は、生体内における遺伝子やタンパク質の発現、細菌感染の程度などを体外からリアルタイムに評価できる手法である。遺伝子やタンパク質、細菌などに発光マーカールを付けることによって、動物体内でのそれらの動向を非侵襲的に観察することができる。本手法

は現在、がん転移、薬効研究をはじめ、感染症、移植・再生医療、遺伝子治療などの *in vivo* 研究に幅広く用いられており、*C. rodentium* を含め、様々な細菌の生体内での挙動を把握する目的でも多くの研究で用いられている実績がある(82, 107)。一般的に発光細菌の作製方法として、ホタル由来のホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入する方法と、発光細菌である *Photobacterium luminescens* 由来の発光遺伝子群である *lux operon* を組み込む方法が知られている。前者はルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを外的に添加しなければならないのに対し、後者の *lux operon* を用いた方法では内在性の物質が基質に用いられるため基質の追加が必要ない。したがって、発光細菌の多くは後者の *lux operon* 導入が採用されている(40, 45, 62, 83, 94)。そこで本研究でもこの方法を採用することとし、感染させる *C. rodentium* として、*lux operon* を相同組換えにより 16S rDNA に組み込んだ *C. rodentium* ICC169::p16S*lux* (*C. rodentium lux*) を用いた)。この菌株は発光するという点以外は、野生株と比較して生育速度、マウスへの感染能力、感染部位に差異がないことが証明されている(82)。

以上より本研究では、*C. rodentium* 感染マウスに対する KB290 の効果を、発光する *C. rodentium* 株である *C. rodentium lux* を用いた BLI 法により検討した。さらにそのメカニズムを検討するため、結腸における *C. rodentium* 感染防御に関わる各遺伝子発現量を評価した。なお、*C. rodentium* 感染に用いる溶媒として一般的には 1×PBS が用いられているが(24, 41, 92)、予備検討にて溶媒に 1×PBS を用いた結果、感染が成立しない個

体が認められた(データ示さず)。これは、マウスの胃酸によって *C. rodentium* が死滅したことが原因と予想された。そこで本研究では、第一に安定して *C. rodentium* 感染を成立させるのに適した溶媒を検討し、次にその条件を用いて *C. rodentium* 感染に対する KB290 の効果及びメカニズムを評価した。

第 2 節 材料と方法

2-1. 使用動物

5 週齢のメスの C57BL/6 マウス(日本クレア株式会社, 東京)を用い, 1 週間の馴化期間の後, 各試験に使用した。なお, 共同で試験を実施した静岡県立大学の過去の検討により, 他の系統に比べて C57BL/6 マウスにおいて *C. rodentium* 感染が最も安定的に成立することが明らかになっていたこと, さらにメスではオスと比較してファイティングが起りにくいことから, 本系統のメスを選択した。

飼育期間中, 精製飼料(AIN-93, 日本クレア株式会社, 東京)と水を自由摂取で与え, 12 時間の明暗サイクル, 温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50 \pm 10\%$ の環境で飼育した。なお, 本試験は静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科微生物学研究室にて実施し, その計画は静岡県立大学動物実験委員会で承認を受けた(承認番号:135006)。

2-2. 発光 *Citrobacter rodentium* ICC169::p16Slux の調製

グリセロールストックとして保存した *C. rodentium* lux を 250 µg/mL エリスロマイシン (和光純薬工業株式会社, 大阪) 添加 LB 寒天培地に塗布し, インキュベーターにて 37°C 好気条件下で一晩培養した。得られたコロニーを 4 mL の 250 µg/mL エリスロマイシン添加 LB 液体培地に植菌し, 37°C で一晩振とう培養した。さらに, 新しい 250 µg/mL エリスロマイシン添加 LB 液体培地 50 ml に培養液を 2% (v/v) 添加し, 3 時間, 37°C で振とう培養した。培養液を 4°C, 2,500 × g, 10 分間遠心し, 上清を除去した。得られた *C. rodentium* lux のペレットを 1×PBS (0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 8.0 g NaCl を 1.0 L の蒸留水に溶解) で 2 回洗浄し, 1×PBS, 10×PBS (2.0 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, 11.5 g Na₂HPO₄, 8.0 g NaCl を 1.0 L の蒸留水に溶解), または 3% (w/v) 炭酸水素ナトリウム (NaHCO₃) (和光純薬工業株式会社) 水溶液で最終的に 2×10¹⁰ cfu/mL となるように調製した。

2-3. KB290 の調製

グリセロールストックとして保存した KB290 を MRS 寒天培地 (メルク株式会社, 東京) に塗布し, 30°C, 好気条件下で 48 時間培養した。さらに, 得られたコロニーを 50 mL の MRS 液体培地 (メルク株式会社) に植菌し, 30°C, 好気条件下で一晩培養した。培養液を 4°C, 2,500 × g, 10 分間遠心し, 1×PBS で 2 回洗浄した後, 1×10¹⁰ cfu/mL となる

ように 1×PBS で調製した。

2-4. 動物試験

2-4-1. *C. rodentium* lux 投与に用いる溶媒の検討

検討溶媒として、1×PBS, 10×PBS, ならびに腸管感染細菌である *Salmonella enterica* serovar Enteritidis や *Escherichia coli* の感染実験に使用された報告 (36) がある 3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液を使用した。マウスを 1 週間順化した後、1×PBS , 10×PBS または 3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液で 2×10^{10} cfu/mL の濃度に懸濁した *C. rodentium* lux 液を 1 匹あたり 100 μ L (2×10^9 cfu/マウス) 強制経口投与し、その直後に、イソフルラン(マイラン製薬株式会社, 東京)の吸入麻酔(導入濃度 4~5%, 維持濃度 1~3%)によりマウスを鎮静化させた。ビニールテープで手足を固定して、マウス組織を透過した微弱な *C. rodentium* lux 由来の発光を、生物発光測定装置 (IVIS Imaging System Xenogen Co., Alameda, CA, USA) で検出した。本試験では、マウス腹部の長方形で囲った部分(縦約 3 cm×横約 2 cm)を関心領域 (Region of Interest; ROI) とし (Fig. 9), ROI の 1 分間の発光強度から、Living Image Software (version 3.0, Xenogen Co.) を用いて、発光強度 (photons/s/cm²) を定量化した。

2-4-2. KB290 が *C. rodentium* 感染に与える影響の検討

動物試験の試験スケジュールを Fig. 10 に示した。試験は試験 1 と試験 2 の 2 回実施し、試験 1 では KB290 の投与期間を 10 日間とし、投与から 7 日目に *C. rodentium* 感染、10 日目(感染 3 日後)に解剖を行った。試験 2 では投与期間を 15 日間とし、投与から 7 日目に *C. rodentium* 感染、15 日目(感染 8 日後)に解剖を行った。詳細を以下に示す。

投与期間中には、非感染群および対照群には 1×PBS を、KB290 投与群には KB290 溶液を、1 匹あたり 100 μL (1×10^9 cfu/マウス) ずつ、毎日強制経口投与した。1×PBS および KB290 溶液投与開始から 7 日後に、対照群および KB290 投与群には 3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液で 2×10^{10} cfu/mL に懸濁した *C. rodentium* lux 液 100 μL (2×10^9 cfu/マウス) を強制経口投与し感染させた。非感染群には 3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液を 100 μL 投与した。感染日から解剖日まで、体重測定および生物発光測定装置による発光観察を毎日行った。試験 1 では感染 3 日後に、試験 2 では感染 8 日後に、マウスをイソフルランで麻酔後頸椎脱臼にて安楽死させ、盲腸から肛門部までを摘出し、遠位結腸(肛門部から 20~30 mm の部分)を組織用 RNA 安定化溶液(RNA later® Solution, Ambion, USA)に浸漬した。浸漬した結腸は、4°C で 24 時間放置した後遺伝子発現解析まで -80°C にて保存した。

2-5. 遺伝子発現解析

Total RNA の抽出には NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) を用い、付属のプロトコールに従って実施した。回収した RNA は使用するまで -80°C にて保存した。cDNA の調製には PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用い、付属のプロトコールに従って行った。逆転写反応は、 37°C で 15 分、逆転写酵素の熱変性を 85°C で 5 秒の条件で行った。

結腸における炎症性サイトカインおよびタイトジャンクション関連因子の mRNA 量を、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ株式会社) を用いたリアルタイム PCR にて測定した。炎症性サイトカイン遺伝子として tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 p40 (IL-12 p40), interferon-gamma (IFN- γ) を、タイトジャンクション関連因子として occludin および zona occludens protein 1 (ZO-1) を測定した。Table 3 には各遺伝子発現の測定に用いたプライマー配列を示した。内部標準には β -actin を用い、 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法 (57) にて非感染群の値に対する相対値として各群の発現量を算出した。

2-6. 統計解析

結果はすべて平均値 + 標準誤差として示し、n 数は動物の数とした。*C. rodentium* lux の発光強度の解析には Mann-Whitney U 検定を、体重の解析には Tukey 法を、

遺伝子発現量の解析には Steel-Dwass 法をそれぞれ用いた。P 値が 0.05 未満の時に統計学的に有意差があると判断した。

第 3 節 結果

3-1. *C. rodentium* lux 投与に用いる溶媒の検討

各溶媒で調製した *C. rodentium* lux を投与した直後のマウスを生物発光測定装置にて観察した画像を Fig. 11A に示した。1×PBS または 10×PBS を用いた群の中には発光が観察されない個体が存在したのに対し、3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液を用いた群ではいずれのマウスでも発光が確認された。また、発光強度を群間で比較すると、有意差は認められなかったものの、3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液群はその他の群よりも高い値を示した (Fig. 11B)。以上より、*C. rodentium* lux を懸濁する溶媒として 3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液が適していると判断し、以降の試験では 3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液を溶媒に用いた。

3-2. KB290 が *C. rodentium* 感染に与える影響の検討

3-2-1. *C. rodentium* lux 発光強度

試験 1 (感染 3 日後に解剖) における *C. rodentium* lux 感染 3 日後までの生物発光測定装置の画像を Fig. 12A に、発光強度を定量化したものを Fig. 12B に示した。

対照群および KB290 投与群のいずれにおいても感染日において全個体の腹部で発光が確認されたことから、*C. rodentium lux* を安定的に感染させることができたと考えられた。

感染日に比べ感染 1 日後に発光強度が顕著に低下し、その後徐々に上昇した理由としては、ほとんどの *C. rodentium lux* が感染直後に排泄され、排泄されずに大腸に定着した *C. rodentium lux* が徐々に増殖したためだと考えられた。しかしながら、この発光強度上昇の程度は群間に差があり、感染 2, 3 日後において KB290 投与群の発光強度が対照群に対し有意に低値を示した。

試験 2(感染 8 日後に解剖)における IVIS の画像および発光強度を、Fig. 12 と同様に Fig. 13A, B に示した。試験 1 と同様、感染初期(感染 1~3 日後)において KB290 投与群の発光強度が対照群と比較して有意に低値を示し、本結果の再現性が確認できた。さらに、感染 4 日後以降においても、有意差は認められなかったものの KB290 投与群の発光強度は対照群と比較して低い傾向を示した(Fig. 13B, $p < 0.1$ on Day 6, 8)。

3-2-2. 体重

感染後の体重変化について、試験 1 および試験 2 の結果を図 14A および 14B にそれぞれ示した。試験 1 においては、*C. rodentium lux* 感染後の体重は群間で有意

な差は認められなかった(図 14A)。一方, 試験 2 においては群間に差が認められ, 感染 3 日後においては対照群が他の 2 群に比べて有意に低値を示し, 4, 5 日後においては KB290 投与群が対照群に比べて有意に高値を示した(図 14B)。

3-2-3. 遠位結腸における炎症性サイトカイン遺伝子発現

3-2-1 で認められた KB290 の *C. rodentium* lux 増殖抑制作用の機序を検証するため, *C. rodentium* の標的臓器の一つである遠位結腸における, 炎症性サイトカイン (Fig. 15) およびタイトジャンクション関連因子 (Fig. 16) の遺伝子発現を測定した。炎症性サイトカインについては, 感染 3 日後において, KB290 投与群における TNF- α および IFN- γ 発現量が, 他の群に対し有意に高い値を示した (Fig. 15A)。一方, 感染 8 日後では, IFN- γ 発現量が KB290 投与群において他の群に対し高い傾向が認められたものの, 有意な差は認められなかった (Fig. 15B)。また, その他の 3 種のサイトカインについては, 感染 3 日後および 8 日後のいずれにおいても, 群間に有意な差は認められなかった。一方, タイトジャンクション関連因子である occludin および ZO-1 については, 感染後 3 日後, 8 日後のいずれにおいても群間に有意な差は認められなかった (Fig. 16A, B)。

第4節 考察

本試験では、まず *C. rodentium* lux をマウスに安定的に感染させることができる溶媒を検討した。その結果、*C. rodentium* 感染に用いる溶媒として一般的である 1×PBS や、リン酸の濃度を高めた 10×PBS と比較して、3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液を用いることで最も安定的に *C. rodentium* lux を感染させることができることが明らかとなった。1×PBS と比較して 3% (w/v) NaHCO₃ 水溶液が優れていた理由は明らかではないが、炭酸水素ナトリウムは胃酸に対して強い制酸作用を持ち、実際に胃潰瘍や胃炎に対する治療薬として使用されていることから、胃酸に対する緩衝能が高いのかもしれない。

次に、選抜された溶媒を使用して、*C. rodentium* 感染に対する KB290 の防御効果を評価した結果、試験 1, 2 のいずれにおいても、KB290 投与群では、感染初期におけるマウス体内での *C. rodentium* lux 増殖が抑制された。したがって、KB290 を感染前に摂取させることにより、*C. rodentium* 感染後の腸内での増殖を抑制できることが示唆された。

一方 *C. rodentium* 感染後の体重変化については、試験 1 と 2 とで異なる挙動を示した。この理由は不明であるが、*C. rodentium* を野生型の C57BL/6 マウスに感染させた場合、体重に顕著な変化が認められない例が複数報告されていることから (1, 90, 96), C57BL/6 マウスは *C. rodentium* 感染により体重に影響を受けにくく、そのため試験 1 と 2 とで異なる挙動を示したことが原因の一つとして考えられる。試験 2 においてのみではあるが、対照群において感染後に体重が減少傾向を示したのに対し、KB290 投与群では非感

染群と同様の挙動を示したことから、KB290 による感染初期の *C. rodentium* lux 増殖抑制により、*C. rodentium* lux 感染により引き起こされる体重低下が抑制された可能性がある。しかしながら、本結果については使用するマウスの系統や *C. rodentium* の感染力価を変えた場合にどのようなようになるかさらに確認する必要がある。なお、試験 1, 2 ともに感染 1 日後に全群の体重が低下したのは、感染日における *C. rodentium* lux 投与または溶媒投与によるストレスによるものだと考えられる。

KB290 による感染初期の *C. rodentium* lux 増殖抑制作用の機序を検討するため、炎症性サイトカインおよびタイトジャンクション関連因子の遺伝子発現を評価した。その結果、タイトジャンクション関連因子である occludin および ZO-1 については、感染 3 日後、8 日後ともに群間に有意差は認められなかった。タイトジャンクションを強固にすることは *C. rodentium* 感染に対して防御的に働くことが報告されている(50, 56)。しかしながら KB290 の *C. rodentium* lux 増殖抑制作用にはタイトジャンクションの変化は関わっていないことが示唆された。

一方で、KB290 の摂取は結腸における TNF- α および IFN- γ の発現を顕著に増強させた。*C. rodentium* 感染により、TNF- α および IFN- γ をはじめとする炎症性サイトカインの産生が、結腸において誘導されることが報告されている(3, 93, 104)。そのためこれらの発現量は *C. rodentium* 感染の重篤度を反映しているとみなされることが多く、実際、一部の乳酸菌においてはこれらの発現を抑制することが報告されている(84)。一方、これらのサイ

トカインは、*C. rodentium* 感染初期に誘導される宿主の自然免疫応答において主要な役割を担うことも知られている。Gonçalves らの報告(33)では、TNF- α 受容体遺伝子である TNFRp55 をノックアウトすることで TNF- α の作用を排除したマウスに *C. rodentium* を感染させると、結腸における *C. rodentium* 増殖が亢進し、さらに感染後の特徴的な病態である結腸粘膜の肥厚が悪化することが示されている。さらに、IFN- γ 遺伝子をノックアウトしたマウスでも、*C. rodentium* 感染後の結腸における粘膜肥厚および炎症細胞浸潤の悪化や *C. rodentium* 増殖促進が認められる(93)。これらの知見は、TNF- α や IFN- γ が *C. rodentium* 感染の抑制に重要な働きをしていることを示唆するものである。したがって、本試験においても、感染初期の KB290 によるこれらのサイトカインの産生亢進が *C. rodentium* 増殖抑制に関与している可能性が考えられる。過去の研究において、KB290 を経口摂取させたマウスでは、NK 細胞などによる細胞傷害活性が上昇することが明らかになっている(26, 27)。NK 細胞は、*C. rodentium* 感染において TNF- α や IFN- γ の産生を増強させることや、*C. rodentium* 増殖抑制に必須であることが報告されている(81)。したがって、摂取された KB290 が NK 細胞の活性化を介して各サイトカイン産生を亢進させ、結果的に *C. rodentium* 感染に対して素早く応答できた可能性がある。ただし、本研究では細胞傷害活性は評価していないことから、本メカニズムを結論付けるにはさらなる研究が必要である。

様々な乳酸菌において、*C. rodentium* 感染に対する防御作用が報告されている(12,

54, 85)。しかし、感染初期における乳酸菌の効果を評価した研究はほとんどない。本研究では、感染 3 日後において、非感染群と対照群との間に、結腸の TNF- α 遺伝子発現に差が認められなかった (Fig. 15A)。このことは、*C. rodentium* 感染単独では、感染 3 日後には TNF- α 産生が未だ誘導されていないことを示唆している。しかし、*C. rodentium* 感染前に KB290 を投与することにより、感染 3 日後において TNF- α および IFN- γ 産生誘導が促進し、同時に *C. rodentium* 増殖が抑制された。したがって、KB290 による TNF- α および IFN- γ 誘導が *C. rodentium* 増殖抑制に寄与していると考えられる。一方、感染後期においては、感染群、KB290 投与群の両群ともに、TNF- α の遺伝子発現が非感染群に比べ上昇傾向を示し、同時に *C. rodentium* 増殖も認められたことから、この感染後期の TNF- α 誘導は *C. rodentium* 増殖に起因すると考えられる。著者の知る限り、*C. rodentium* 感染初期において乳酸菌が炎症性サイトカインの誘導を介して防御効果を示した報告はこれまでに無く、新たな知見が得られた。これは、BLI 法によりマウス体内の *C. rodentium* 増殖を生きたまま継時的に測定したことで、KB290 の防御効果やその作用機序を評価するのに適切なポイントを見つけられたことに起因すると考えられた。

なお、本研究では、KB290 は感染初期における *C. rodentium* 増殖を有意に抑制したものの、感染後期には対照群と同様に *C. rodentium* が増殖し、完全に *C. rodentium* 増殖を抑制することはできなかった。これは、本研究で感染させた *C. rodentium* の菌数が多いことが一因だと考えられる。本研究では、安定的にマウスに *C. rodentium* を感染させる

ため比較的高用量の *C. rodentium* lux を感染させたが (2×10^9 cfu/マウス), 過去の研究ではより少ない菌数を用いて乳酸菌の防御効果を示しているものが多い(12, 23, 42)。したがって, より少ない菌数の *C. rodentium* を感染させた場合には感染後期においても KB290 の効果が継続した可能性があり, さらなる検討が必要である。加えて, 今回の試験では *C. rodentium* 感染による病態に関する評価項目が体重のみであることから, KB290 による感染初期の *C. rodentium* 増殖抑制作用が病態の抑制にまでつながるかどうかは明らかにできていない。したがって, KB290 の感染防御作用を結論付けるには, マウスの健康状態の評価や結腸粘膜の組織学的評価など, 病態に関する評価が今後必要だと考えられる。

以上より, KB290 は結腸における TNF- α や IFN- γ 産生を促進することで, 特に感染初期において, *C. rodentium* 増殖を抑制することが明らかになった。著者の知る限り, *C. rodentium* 感染初期においてプロバイオティクスが炎症性サイトカインの誘導を介して防御効果を示した例はこれまでに無く, プロバイオティクスの腸管感染防御作用に関して新たな知見が得られた。一方で, この *C. rodentium* 増殖抑制作用が *C. rodentium* 感染による病態を抑制できるのかについては, 低用量の *C. rodentium* 感染実験や, 体重以外の病態に関わる項目の評価など, さらなる研究が必要だと考えられた。

Table 3. Sequences of primers used in real-time PCR

Primer		Sequence (5'–3')	Reference
β-Actin	Forward	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	76
	Reverse	GCTGGAAGGTGGACAGTGAG	
TNF-α	Forward	AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA	112
	Reverse	GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTTG	
IL-1β	Forward	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	75
	Reverse	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	
IL-6	Forward	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	37
	Reverse	GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC	
IL-12 p40	Forward	ACTCACATCTGCTGCTCCACAAG	67
	Reverse	CACGTGAACCGTCCGGAGTA	
IFN-γ	Forward	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	98
	Reverse	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC	
Occludin	Forward	ATCCTGGGCATCATGGTGTTT	66
	Reverse	GGGCCGTCGGGTTCACT	
ZO-1	Forward	CCAGGCATCATCCCAAATAAGAA	66
	Reverse	CCACCCGCTGTCTTTGGA	

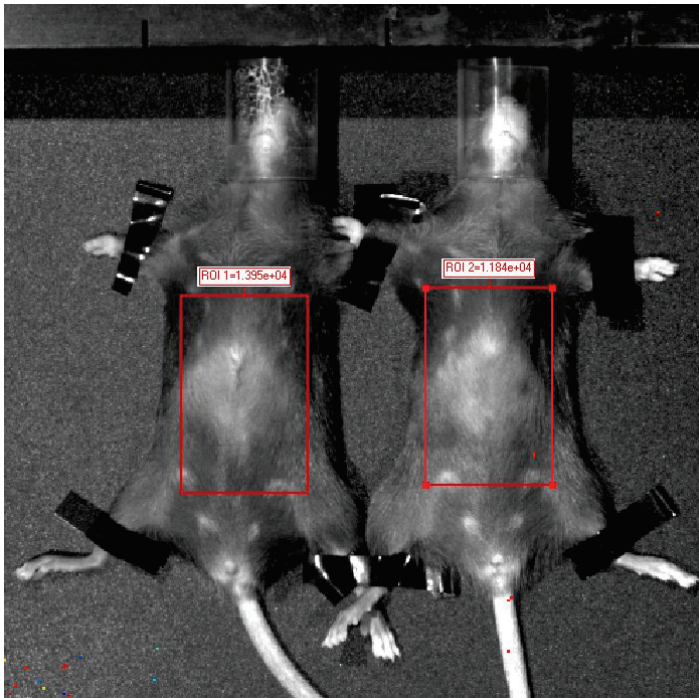


Figure 9. ROI was selected as a red rectangular window in the image.

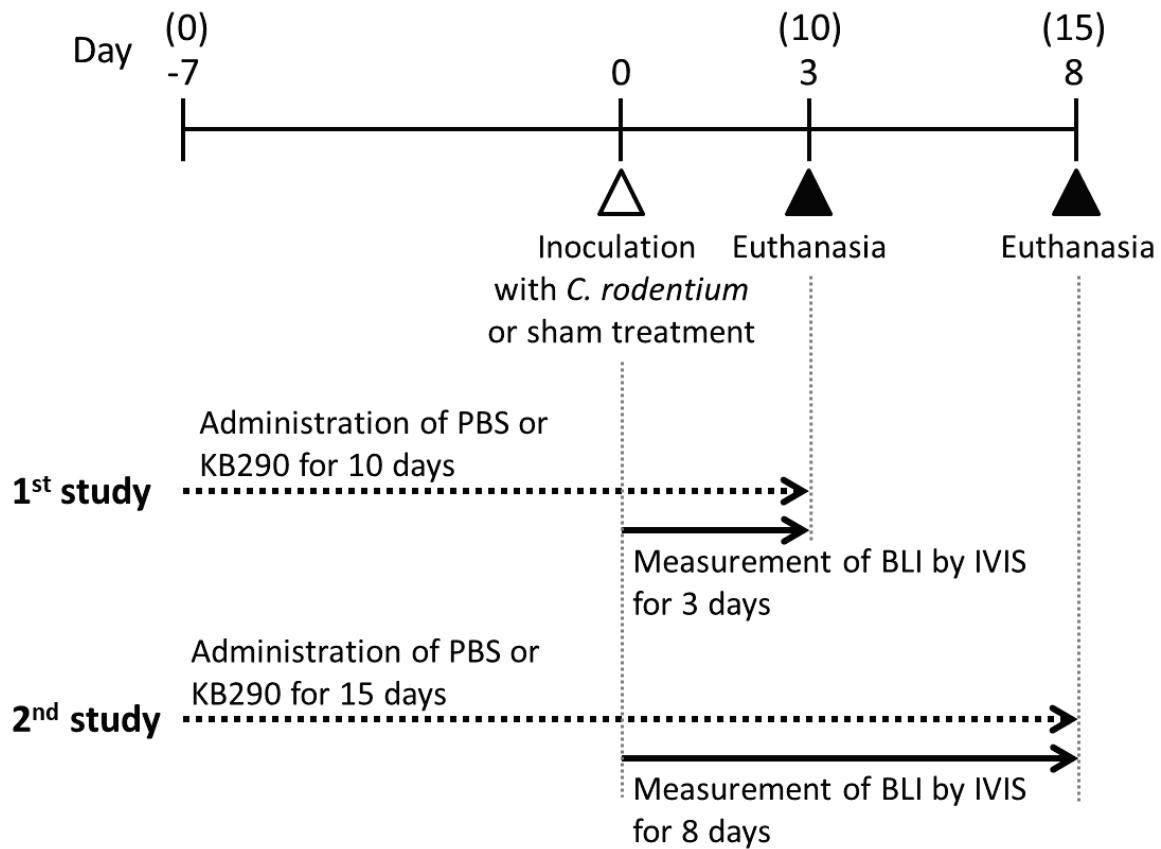
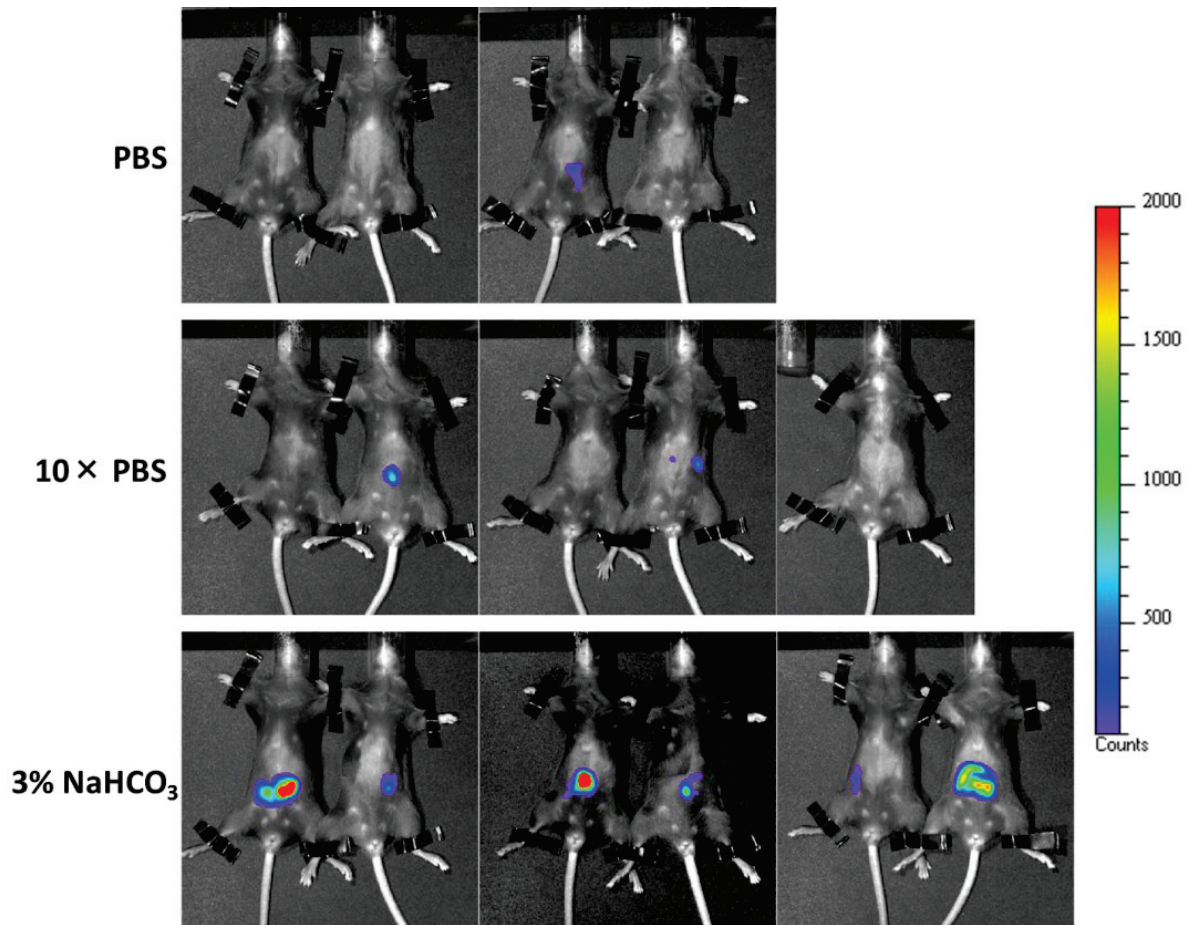


Figure 10. Experimental design. Mice in the uninfected and infected groups were orally administered with PBS by gavage daily for 10 or 15 days, while mice in the KB290 + infected group were orally given KB290 in PBS by gavage daily for the same period (dotted lines). Mice in the infected and KB290 + infected groups were inoculated orally with *C. rodentium* ICC169::p16*lux*, while mice in the uninfected group were administered 3% NaHCO₃ alone as a sham treatment (open triangle). Then, mice in the infected and KB290 + infected groups were daily analysed for the presence of bioluminescent bacteria under isoflurane anaesthesia by BLI using IVIS imaging system (solid line). On day 3 (1st study) or 8 (2nd study) after infection, mice were euthanised and the colonic tissue was collected (filled triangle).

(A)



(B)

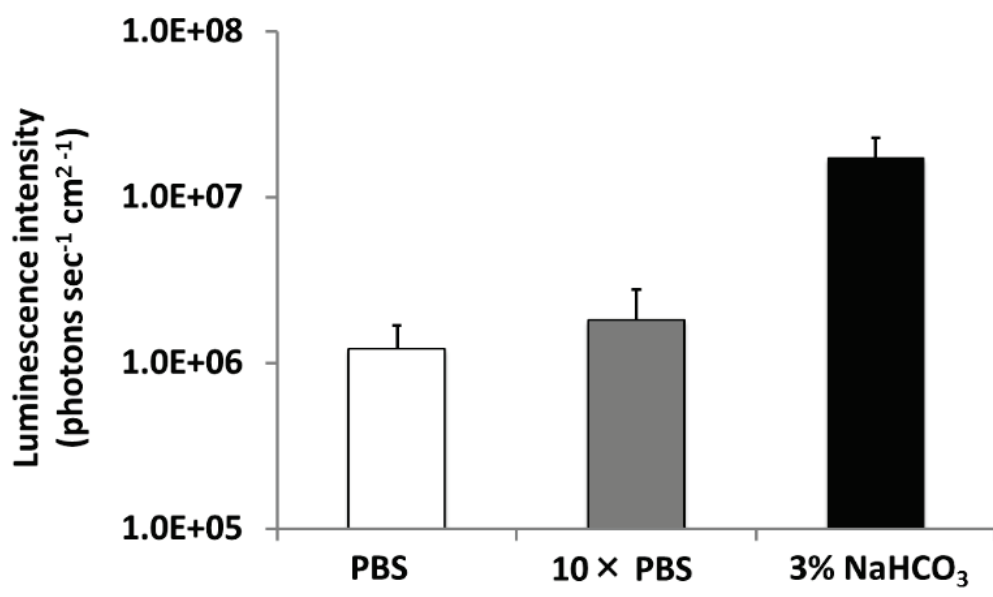
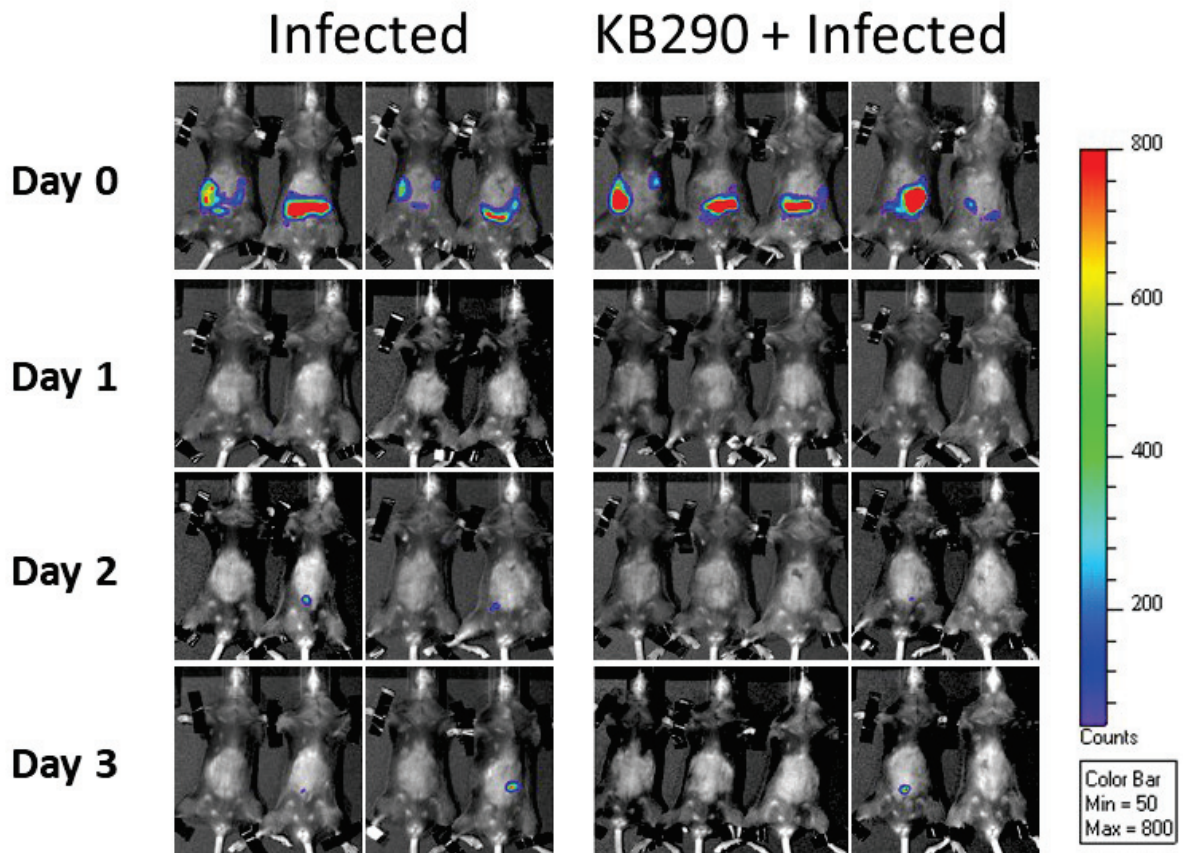


Figure 11. IVIS imaging for the evaluation of three solutions to re-suspend *C. rodentium* ICC169::p16lux for the establishment of stable infection. (A) The *in vivo* imaging of mice inoculated with *C. rodentium* ICC169::p16lux suspended in 100 μ L of PBS, 10 \times PBS or 3% NaHCO₃. The images were taken immediately after inoculation. (B) The quantitative analysis of bioluminescence emission in the region of interest of the murine abdomen. Data represent the means of luminescence intensity from the respective mouse group; n = 3 (PBS group), except for a luminescent-undetected mouse (the rightmost one of the PBS group in Figure 11A), n = 5 (10 \times PBS group) or n = 6 (3% NaHCO₃ group).

(A)



(B)

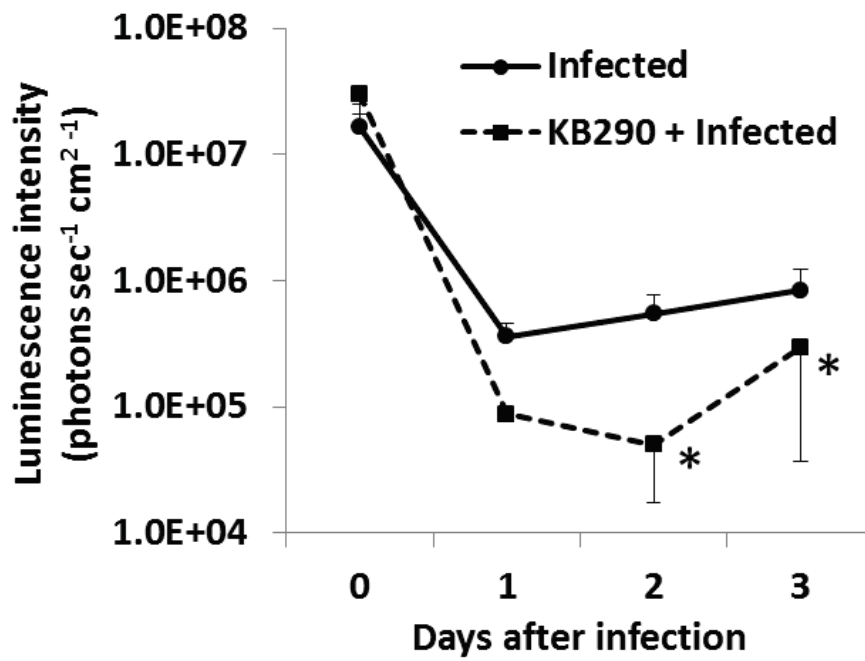
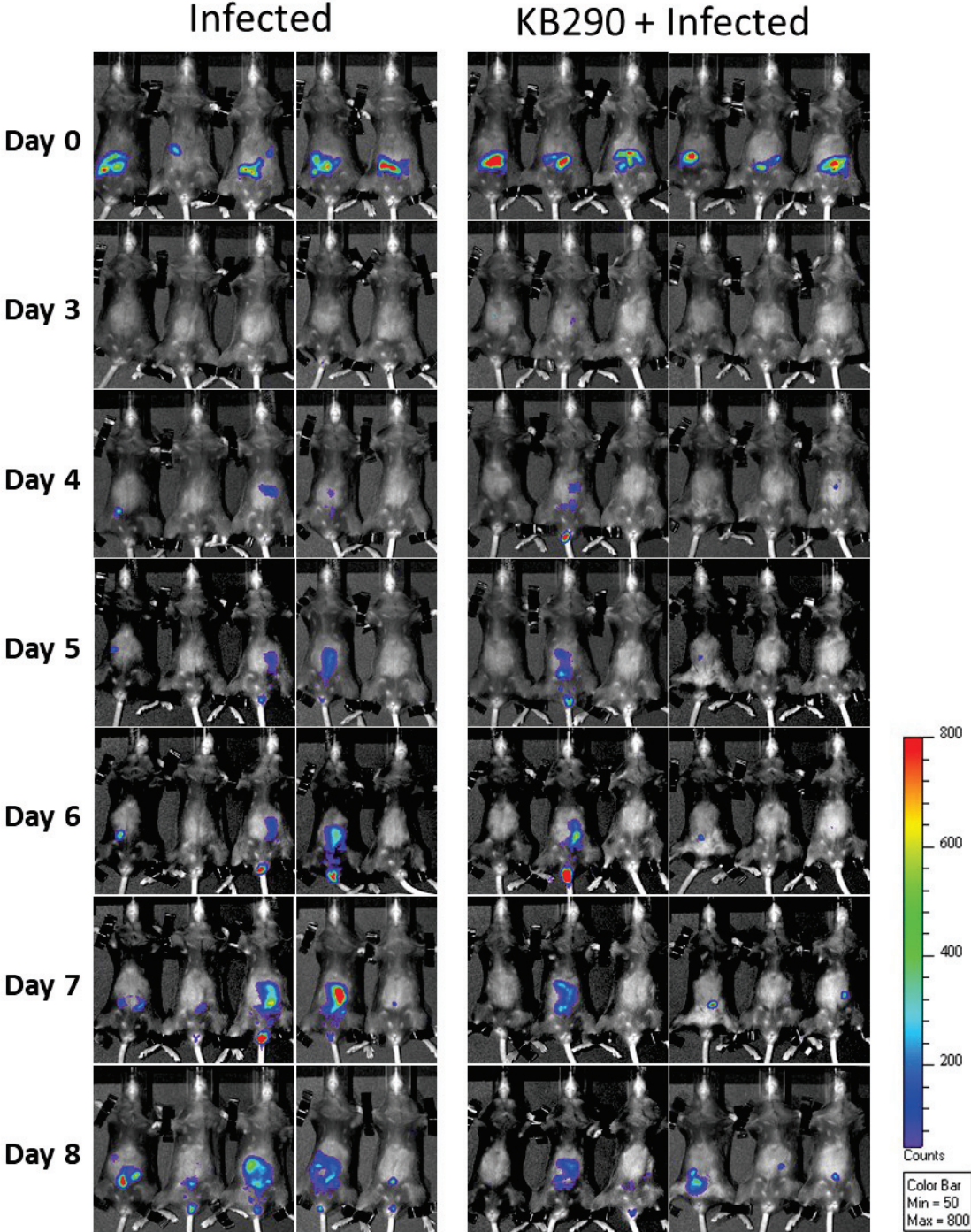


Figure 12. Colonisation dynamics of *C. rodentium* ICC169::p16*lux* in mice in the 1st study. After treatment with PBS or KB290 for 7 days, mice were inoculated orally with 2×10^9 cfu of *C. rodentium* ICC169::p16*lux*. Then, mice were analysed daily for the presence of bioluminescent bacteria under isoflurane anaesthesia by IVIS, and the bacterial emission (photon sec⁻¹ cm² ·⁻¹) was quantified in the region of interest of the murine abdomen. * $p < 0.05$, by Mann–Whitney U test; n = 4 (Infected group), n = 5 (KB290+Infected group).

(A)



(B)

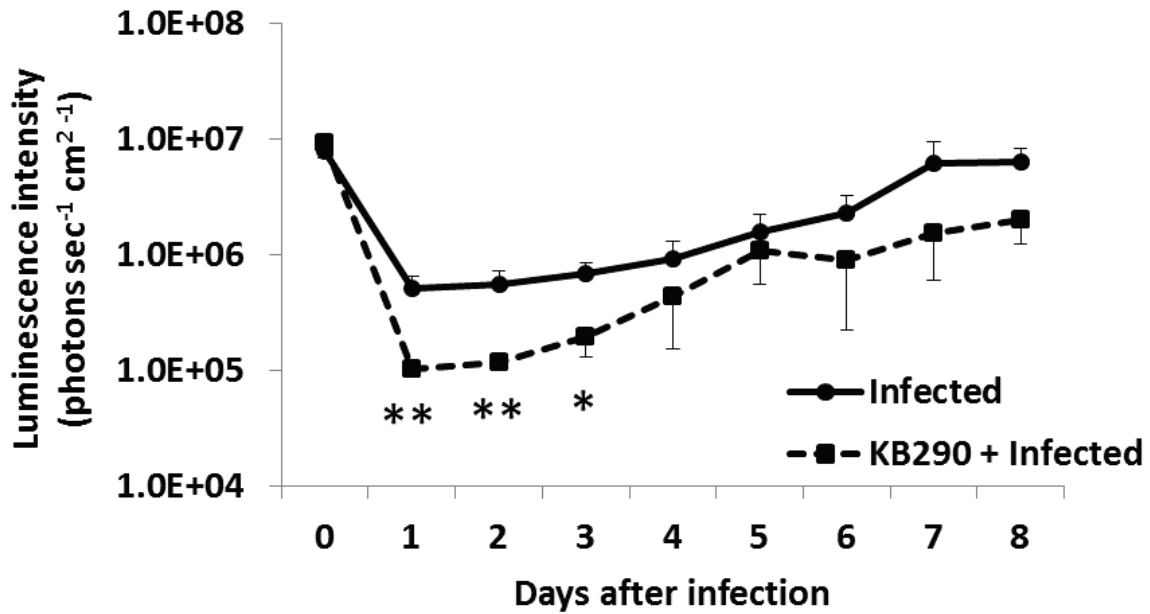
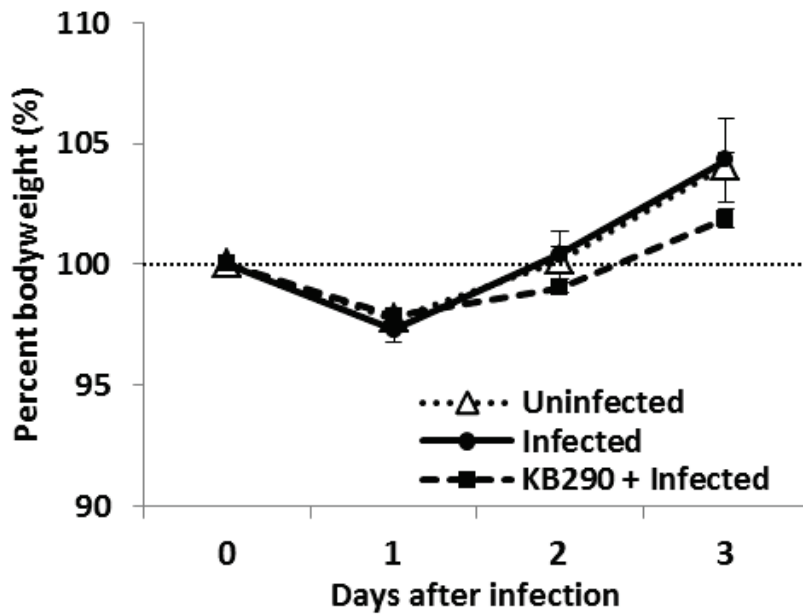


Figure 13. Colonisation dynamics of *C. rodentium* ICC169::p16lux in mice in the 2nd study. After treatment with PBS or KB290 for 7 days, mice were inoculated orally with 2×10^9 cfu of *C. rodentium* ICC169::p16lux. Then, mice were analysed daily for the presence of bioluminescent bacteria under isoflurane anaesthesia by IVIS, and the bacterial emission (photon sec⁻¹ cm²⁻¹) was quantified in the region of interest of the murine abdomen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, by Mann–Whitney U test; $n = 5$ (Infected group), $n = 6$ (KB290+Infected group).

(A)



(B)

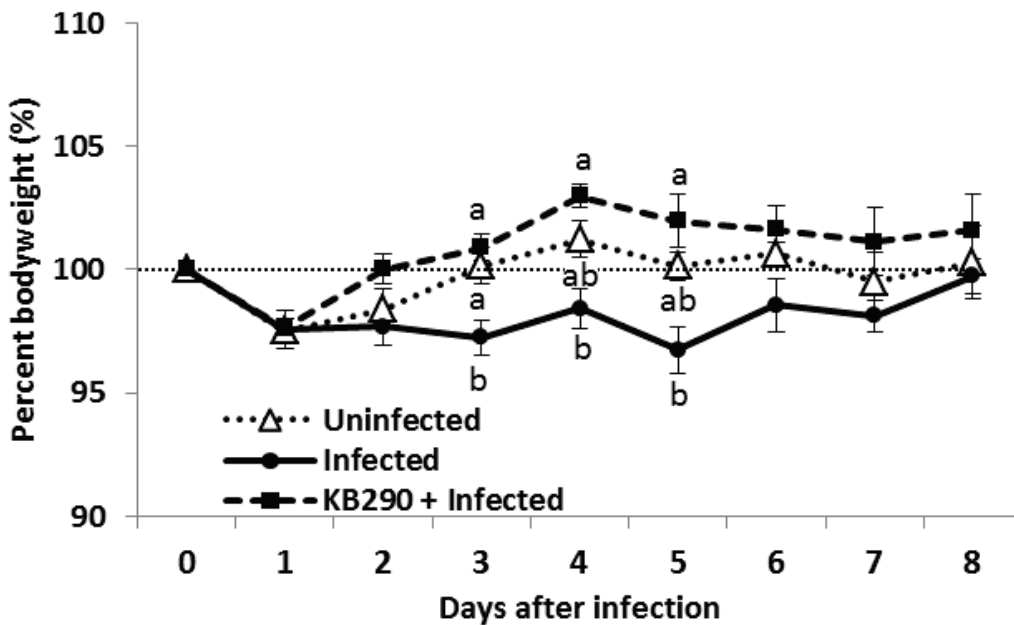
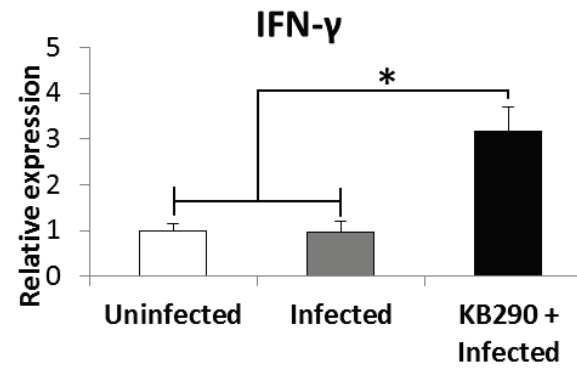
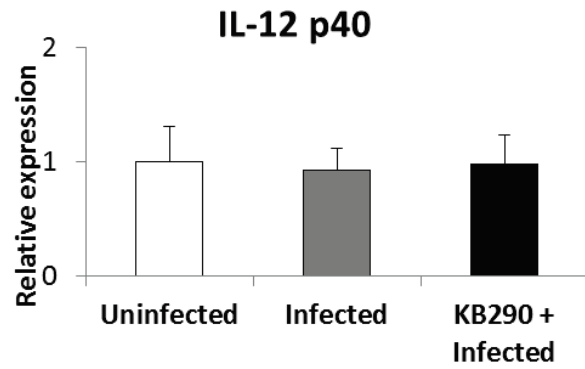
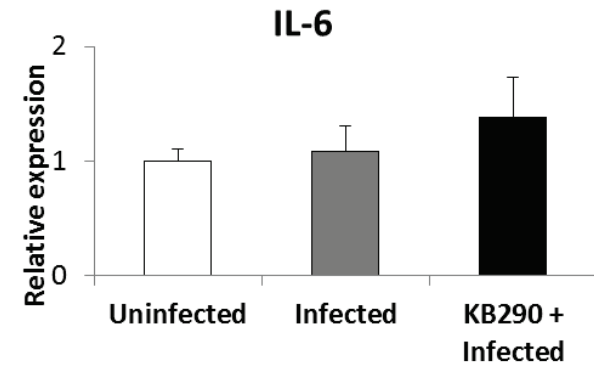
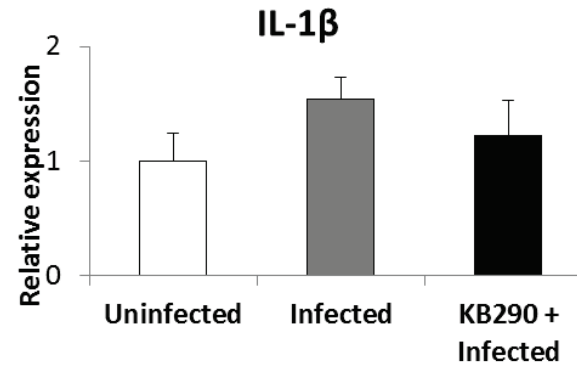
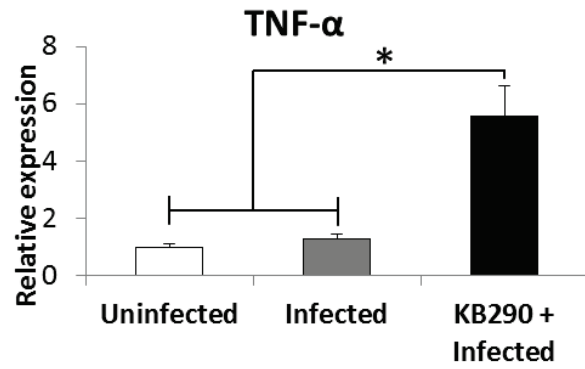


Figure 14. Body weight of mice in each groups. After treatment with PBS or KB290 for 7 days, mice were inoculated orally with *C. rodentium* ICC169::p16lux. Then, the bodyweight of mice were measured daily. Statistical differences are shown by different letter in Tukey's test. (A) n = 4 (Uninfected group), n = 4 (Infected group), n = 5 (KB290+Infected group); (B) n = 5 (Uninfected group), n = 5 (Infected group), n = 6 (KB290+Infected group).

(A)



(B)

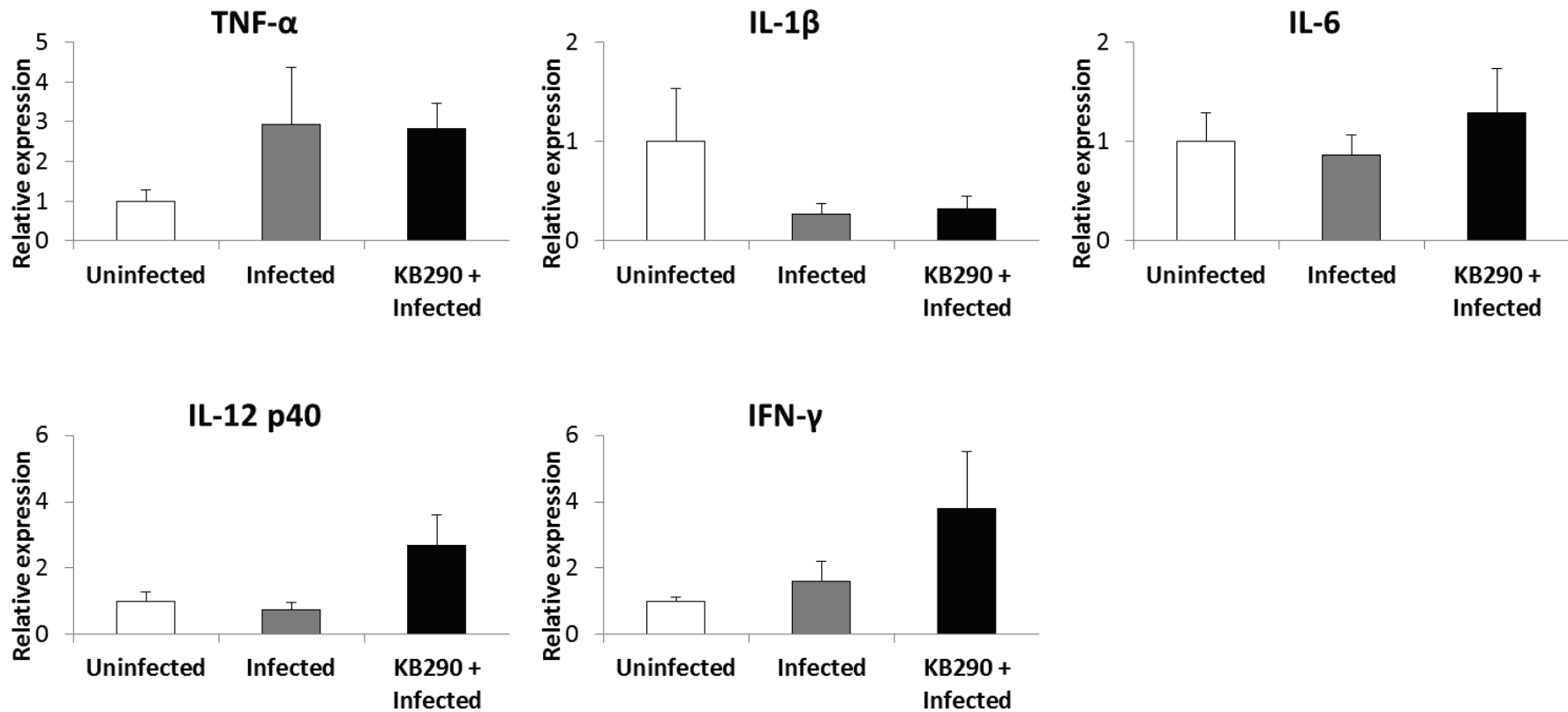
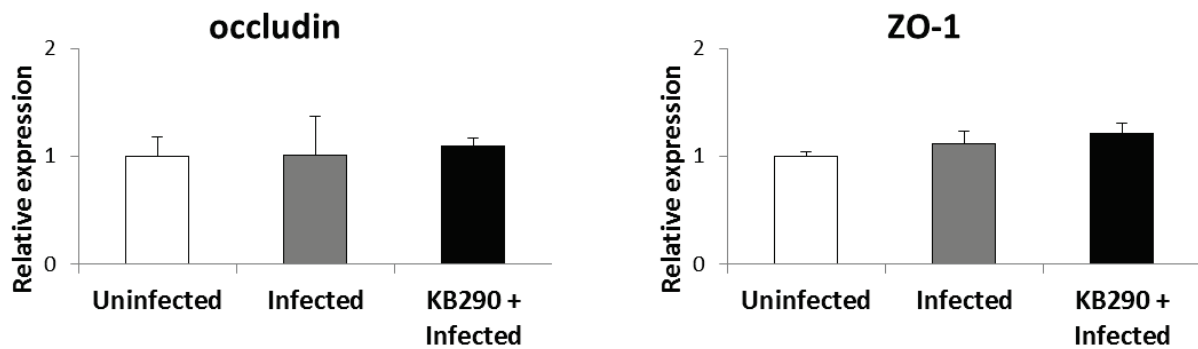


Figure 15. Cytokine mRNA levels in colonic tissue on day 3 (A) and day 8 (B) after infection. The relative expression level of cytokines was normalised against the expression of β -actin, and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method used to calculate the relative expression level of the cytokines in the Uninfected, Infected, and KB290 + Infected groups. * $p < 0.05$, by Steel–Dwass test. (A) $n = 4$ (Uninfected group), $n = 4$ (Infected group), $n = 5$ (KB290+Infected group); (B) $n = 5$ (Uninfected group), $n = 5$ (Infected group), $n = 6$ (KB290+Infected group).

(A)



(B)

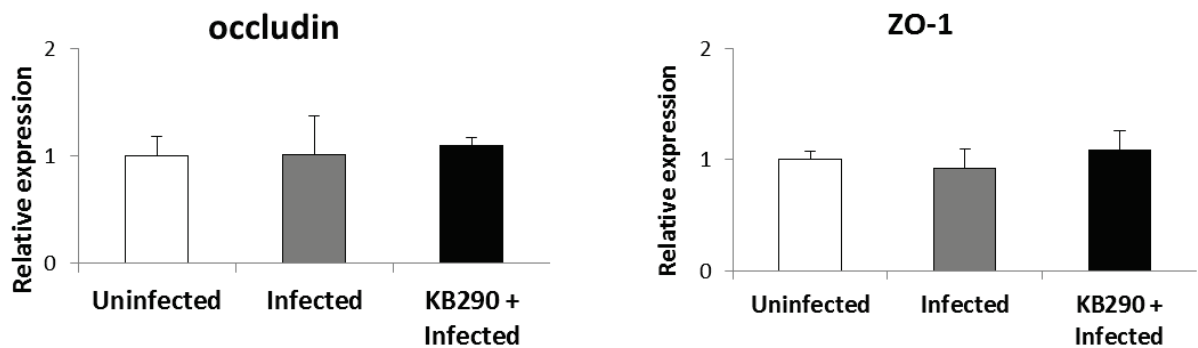


Figure 16. mRNA expression of tight junction proteins in colonic tissue on day 3 (A) and day 8 (B) after infection. The relative expression level of cytokines was normalised against the expression of β -actin, and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method used to calculate the relative expression level of the cytokines in the Uninfected, Infected, and KB290 + Infected groups.

(A) $n = 4$ (Uninfected group), $n = 4$ (Infected group), $n = 5$ (KB290+Infected group); (B) $n = 5$ (Uninfected group), $n = 5$ (Infected group), $n = 6$ (KB290+Infected group).

第4章 総合考察

KB290 は、京都の三大漬物のひとつである「すぐき」より分離された植物性食品由来の乳酸菌である。これまでに、整腸作用に加え IFN- α の産生能や細胞傷害活性を上げるといった、免疫賦活作用が明らかになっている。本研究では、これら免疫賦活作用から期待される保健効果である抗感染作用に着目し、インフルエンザウイルスまたは腸管感染細菌に対する KB290 の効果を実験動物およびヒトにおいて検討した。

第1章では、KB290 摂取によりインフルエンザ感染後の血中 IFN- α 量増加や脾細胞の細胞傷害活性上昇が認められ、過去の研究(51, 52)の再現性が確認できた。さらに本試験では、これら自然免疫系の活性化だけではなく BALF 中の IFV 特異的 IgA の産生促進も認められた。IFN- α などの I 型インターフェロンは、感染初期に IFV 感染細胞に作用し細胞内のウイルス複製を抑制することに加え(68, 91)、細胞傷害活性や抗体産生反応を増強することが報告されている(7, 55)。したがって、KB290 による IFN- α 産生亢進作用が引き金となり、自然免疫系だけではなく獲得免疫系の活性化を誘導することが示唆された。また、本試験ではこれら免疫学的指標の変化と同時に IFV 感染後の体重減少や GHS 悪化の抑制が確認された。さらに第2章では、ヒトにおいても KB290 摂取によるインフルエンザ罹患率の低下を確認できた。以上より、KB290 の免疫賦活作用が抗感染作用という保健効果につながることを確認できた。

一方、第3章では、KB290 の新たな免疫賦活作用として、炎症性サイトカインである TNF- α や IFN- γ 産生促進作用が確認された。また、これらの作用が KB290 による *C. rodentium* 増殖抑制作用に寄与していることも示唆された。この KB290 による炎症性サイトカイン産生亢進の作用機序として NK 細胞の寄与が考えられる。過去の研究により KB290 の細胞傷害活性上昇作用を担うエフェクター細胞として NK 細胞が関与している

可能性が見出されている(26, 27)。一方で, *C. rodentium* 感染により NK 細胞は速やかに感染部位である結腸やその所属リンパ節である腸間膜リンパ節に遊走し IFN- γ を産生すること, その IFN- γ が 1 型ヘルパー T 細胞反応 (Th1 反応) を誘導し, *C. rodentium* 増殖を抑制することが報告されている(63, 79)。実際 NK 細胞欠損マウスでは, *C. rodentium* 感染後の結腸における IFN- γ や Th1 サイトカインである TNF- α 産生量が少ないことや, *C. rodentium* 感染による病態が悪化することも示されている(79)。したがって *C. rodentium* 感染前の KB290 摂取により活性化していた NK 細胞が, *C. rodentium* 感染により感染部位である結腸に遊走し IFN- γ や TNF- α の産生を促すことで, 結果的に *C. rodentium* 増殖を抑制した可能性がある。実際, プロバイオティクスが NK 細胞からの IFN- γ や TNF- α の産生を促進するとの報告もある(11)。

では, 経口摂取された KB290 はどのようにして抗感染作用やその上流にある免疫賦活作用をもたらすのだろうか。そのメカニズムの一つの可能性として腸内菌叢の関わりが考えられる。本研究ではいずれの試験でも KB290 の生菌体を使用した。KB290 は消化液に対して高い耐性を持つ, すなわち生きたまま腸に届くことが, *in vitro* 試験やヒトを対象にした試験で示されている(74, 97)。さらに, 生きたまま腸に届いた KB290 が腸内菌叢を変化させることもヒトにおいて示されている(2, 72, 74)。一方, Ichinohe ら(38)は, 抗生物質であるネオマイシン投与により腸内菌叢を変化させたマウスでは通常のマウスに比べ, IFV 感染に対する免疫応答が著しく低下しており, 結果的に IFV 感染による死亡率も悪化したことを報告している。したがって, KB290 による抗感染作用や免疫賦活作用には, 腸内菌叢の変化が関わっているのかもしれない。

一方で KB290 は, 生菌体と比較してその作用は低いものの, 殺菌体でも脾細胞の細胞傷害活性を上昇させることが動物試験にて示されている(86)。また, KB290 と同様植物性

素材であるキムチから単離された乳酸菌である *Lactobacillus plantarum* nF1 をはじめ、複数の乳酸菌において殺菌体がインフルエンザなどに対して抗感染作用があることが報告されている(53, 77)。したがって、KB290 の殺菌体も生菌体と同様抗感染作用を発揮する可能性があり、今後の検証が期待される。

2016 年の世界における死亡原因のうち 3 位が下気道感染症, 9 位が下痢性疾患, 10 位が結核であり, 感染症は日本のみならず世界的にも大きな問題である(32)。一方, プロバイオティクスは, 今回 KB290 の効果を検証した感染症以外にも, *Helicobacter pylori* 感染, Human Immunodeficiency Virus (HIV) 感染, 尿路感染症など, さまざまな感染症に対する防御効果が報告されている(16, 80)。KB290 によりその産生や活性が亢進する IFN- α や NK 細胞は主に自然免疫を担うものであり, 様々な病原体に対して非特異的に作用を発揮することから(9, 10, 79, 89), KB290 も今回検証したもの以外にも様々な感染症に対して防御効果を発揮する可能性がある。

以上より, KB290 の抗感染作用に関する今後の研究の展開として, 殺菌体による抗感染作用の確認やそのメカニズムの解明, インフルエンザや腸管感染細菌以外の様々な感染症に対する効果の検証などが期待される。

第5章 総括

第1章では、国内における主要な感染症の一つであるインフルエンザに対する KB290 の効果を動物試験にて評価した。IFV 感染前に KB290 を 14 日間経口投与 (1×10^9 cfu/マウス/日)した結果、IFV 感染 3 日後以降で体重減少が、4 日後以降で健康状態スコアの低下が、KB290 非投与群と比較して有意に抑制された。体重減少の程度や健康状態スコアは IFV 感染による症状の重篤度の指標とみなされていることから、IFV 感染前に KB290 を摂取することによりインフルエンザ症状を緩和できることが示唆された。さらに、感染 3 日および 7 日後の血清中 IFN- α 量や細胞傷害活性、感染 7 日後の気管支肺胞洗浄液中の IFV 特異的 IgA 量が、KB290 の前投与により有意に上昇した。以上より、KB290 はインフルエンザ症状緩和作用を持つこと、さらに、本作用には IFN- α 産生亢進や細胞傷害活性の上昇のような自然免疫の活性化や、IFV 特異的 IgA 産生亢進のような獲得免疫の活性化が関与していることが示唆された。

第2章では、第1章で認められたインフルエンザに対する KB290 の効果をヒトで検証するため、インフルエンザ罹患率に対する KB290 摂取の効果を、小学生を対象とした非盲検並行群間試験で評価した。期間を分けて 2 回の試験を行ったが、1 回目の試験期間においてはインフルエンザがほとんど流行せず、試験食品である KB290 の効果を評価できなかった。一方、試験期間がインフルエンザ流行期と合致したもう一方の試験においては、KB290 を含む飲料を継続的に摂取した群のインフルエンザ罹患率が、非摂取群と比較して有意に低値を示した ($P < 0.001$)。したがって、インフルエンザの流行期間における KB290 の継続的な摂取がインフルエンザ罹患リスクを低減できる可能性が示された。さらに KB290 摂取群と非摂取群との罹患率の差は、インフルエンザの予防接種を受けた児童よりも受けていない児童でより顕著であった。このことから、KB290 のインフルエンザ罹患リスク

低減効果は、予防接種を受けていないような罹患リスクの高い場合において強く発揮されることが示唆された。今回の試験デザインである非盲検並行群間試験は、比較的簡便に試験が実施できるという利点がある一方、結果の信頼性が低いという欠点がある。KB290 のインフルエンザに対する効果をより明確に示すためには、ランダム化プラセボ対照試験などの、より精度の高い試験デザインでの評価が必要であり、今後の課題である。

第 3 章では、発展途上国で特に問題となっている病原体である EPEC や EHEC の感染モデルとして *C. rodentium* 感染マウスを用いて、KB290 の腸管感染細菌に対する防御作用を評価した。マウスに対して、KB290 (1×10^9 cfu/マウス/日) を毎日強制経口投与し、投与開始から 7 日後に、発光する *C. rodentium* 株である *C. rodentium lux* を感染させ (2×10^9 cfu/マウス)、感染後の *C. rodentium* の増殖の程度を、生物発光イメージング (BLI) 手法にて非侵襲的かつ経時的に観察した。その結果、*C. rodentium lux* 感染前に KB290 を経口投与した群では、非投与群と比べて感染初期 (感染 1~3 日後) における *C. rodentium* の腸内での増殖が抑制されることが明らかになった。さらに、KB290 投与群では、感染初期において、*C. rodentium* の主な感性部位である結腸における TNF- α および IFN- γ の遺伝子発現が顕著に上昇していることも確認した。TNF- α や IFN- γ は *C. rodentium* 感染に対して防御的な作用を示すことが報告されていることから、KB290 はこれら炎症性サイトカインの産生促進を介して *C. rodentium* 増殖を抑制することが示唆された。著者の知る限り、*C. rodentium* 感染初期において乳酸菌が炎症性サイトカインの誘導を介して防御効果を示した例はこれまでに無い。これは、BLI 手法を用いてマウス体内の *C. rodentium* 増殖を非侵襲的かつ経時的に測定したことで、KB290 の防御効果やその作用機序を評価するのに適切なポイントを見つけられたことに起因する。一方で、本試験で認められた KB290 による *C. rodentium* 増殖抑制作用が *C. rodentium* 感染による病態

を抑制できるのかについては、低用量の *C. rodentium* 感染実験や、体重以外の病態に関わる項目の評価など、さらなる研究が必要だと考えられた。

以上の研究結果より、KB290 はインフルエンザウイルスや腸管感染細菌の感染に対して防御的な作用を持つことが明らかになった。さらに動物試験の結果から、そのメカニズムとして、これまでに明らかになっていた IFN- α 産生促進、細胞傷害活性上昇作用に加え、TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカインの産生促進や IgA 産生亢進など、様々な免疫賦活作用が関与していることが示唆された。

謝辞

学位申請の機会を与えていただき、また、学位論文をまとめるに際し多くのご支援とご指導を賜りました、推薦教員である岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 海野年弘教授に深甚なる謝意を表します。

学位論文審査にあたり副査をお引き受けいただき、本論文作成に際し貴重なご助言やご指導を賜りました、帯広畜産大学 獣医学研究部門 小川晴子教授、岩手大学 農学部 共同獣医学科 佐藤洋教授、東京農工大学 農学部 共同獣医学科 竹原一明教授、岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 伊藤直人准教授に感謝申し上げます。

本研究の全般にわたる親身な御指導と学位申請のご支援をいただきましたカゴメ株式会社イノベーション本部の皆様、本研究環境を提供していただき、研究遂行に多大なるご尽力をいただきました AgResearch 及び静岡県立大学食品栄養科学部の共同研究者の皆様に深謝申し上げます。

参考文献

- 1) Alipour, M., Lou, Y., Zimmerman, D., Bording-Jorgensen, M. W., Sergi, C., Liu, J. J. and Wine, E. (2013) A balanced IL-1 β activity is required for host response to *Citrobacter rodentium* infection. PLoS One. 8, e80656.
- 2) 荒川千夏, 鈴木重徳, 信田幸大, 付茂賓, 鈴木聡, 砂堀諭, 菅沼大行. (2017) *Lactobacillus brevis* KB290 を含む食品の摂取が便秘傾向の健康成人における便通および腸内環境に及ぼす効果の検証～無作為化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験～. 健康・栄養食品研究誌. 16, 1-18.
- 3) Baker, J., Brown, K., Rajendiran, E., Yip, A., DeCoffe, D., Dai, C., Molcan, E., Chittick, S. A., Ghosh, S., Mahmoud, S. and Gibson, D. L. (2012) Medicinal lavender modulates the enteric microbiota to protect against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 303, G825-G836.
- 4) Barik, S. (2012) New treatments for influenza. BMC Med. 10, 104.
- 5) Barthold, S. W., Coleman, G. L., Jacoby, R. O., Livestone, E. M. and Jonas, A. M. (1978) Transmissible murine colonic hyperplasia. Vet Pathol. 15, 223-236.
- 6) Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological). 57, 289-300.
- 7) Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. and Salazar-Mather, T. P. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol. 17, 189-220.

- 8) Bogdan, C. (2000) The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol.* 12, 419-424.
- 9) Bourke, N. M., Napoletano, S., Bannan, C., Ahmed, S., Bergin, C., McKnight, Á. and Stevenson, N. J. (2018) Control of HIV infection by IFN- α : implications for latency and a cure. *Cell Mol Life Sci.* 75, 775-783.
- 10) Brandstadter, J. D. and Yang, Y. (2011) Natural killer cell responses to viral infection. *J Innate Immun.* 3, 274-279.
- 11) Bui, V. T., Tseng, H. C., Kozłowska, A., Maung, P. O., Kaur, K., Topchyan, P. and Jewett, A. (2015) Augmented IFN- γ and TNF- α induced by probiotic bacteria in NK cells mediate differentiation of stem-like tumors leading to inhibition of tumor growth and reduction in inflammatory cytokine release, regulation by IL-10. *Front Immunol.* 6, 576.
- 12) Chen, C. C., Louie, S., Shi, H. N. and Walker, W. A. (2005) Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res.* 58, 1185-1191.
- 13) Chen, K. S., Burlington, D. B. and Quinnan, G. V. (1987) Active synthesis of hemagglutinin-specific immunoglobulin A by lung cells of mice that were immunized intragastrically with inactivated influenza virus vaccine. *J Virol.* 61, 2150-2154.
- 14) Chen, S. N., Zhang, X. W., Li, L., Ruan, B. Y., Huang, B., Huang, W. S., Zou, P. F., Fu, J. P., Zhao, L. J., Li, N. and Nie, P. (2016) Evolution of IFN- λ in tetrapod vertebrates and its functional characterization in green anole lizard (*Anolis carolinensis*). *Dev Comp Immunol.* 61, 208-224.
- 15) Chen, X., Liu, S., Goraya, M. U., Maarouf, M., Huang, S. and Chen, J. L.

- (2018) Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front Immunol.* 9, 320.
- 16) Chua, K. J., Kwok, W. C., Aggarwal, N., Sun, T. and Chang, M. W. (2017) Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. *Curr Opin Chem Biol.* 40, 8-16.
- 17) Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. and Williams, P. H. (2003) Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 16, 365-378.
- 18) Cottey, R., Rowe, C. A. and Bender, B. S. (2001) Influenza virus. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 19, Unit 19.11.
- 19) Davenport, F. M., Hennessy, A. V., Brandon, F. M., Webster, R. G., Barrett, C. D. and Lease, G. O. (1964) Comparisons of serologic and febrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins. *J Lab Clin Med.* 63, 5-13.
- 20) Deng, W., Vallance, B. A., Li, Y., Puente, J. L., Finlay, B. B. (2003) *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol.* 48, 95-115.
- 21) Estrada, L. D. and Schultz-Cherry, S. (2019) Development of a Universal Influenza Vaccine. *J Immunol.* 202, 392-398.
- 22) Evans, S. S., Lee, D. B., Han, T., Tomasi, T. B. and Evans, R. L. (1990) Monoclonal antibody to the interferon-inducible protein Leu-13 triggers aggregation and inhibits proliferation of leukemic B cells. *Blood.* 76, 2583-2593.

- 23) Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M. O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G. and van Sinderen, D. (2012) Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 2108-2113.
- 24) Foye, O. T., Huang, I. F., Chiou, C. C., Walker, W. A. and Shi, H. N. (2012) Early administration of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and/or prebiotic inulin attenuates pathogen-mediated intestinal inflammation and Smad 7 cell signaling. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65, 467-480.
- 25) Fukao, M., Oshima, K., Morita, H., Toh, H., Suda, W., Kim, S. W., Suzuki, S., Yakabe, T., Hattori, M. and Yajima, N. (2013) Genomic analysis by deep sequencing of the probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 harboring nine plasmids reveals genomic stability. *PLoS One.* 8, e60521.
- 26) Fukui, Y., Sasaki, E., Fuke, N., Nakai, Y., Ishijima, T., Abe, K. and Yajima, N. (2013) Effect of *Lactobacillus brevis* KB290 on the cell-mediated cytotoxic activity of mouse splenocytes: a DNA microarray analysis. *Br J Nutr.* 110, 1617-1629.
- 27) Fukui, Y., Sasaki, E., Fuke, N., Nakai, Y., Ishijima, T., Abe, K., Yajima, N. (2014) Sequential gene expression profiling in the mouse spleen during 14 d feeding with *Lactobacillus brevis* KB290. *Br J Nutr.* 111, 1957-1966.
- 28) 船渡川伊久子, 船渡川隆. (2015) 母集団薬物動態解析の基礎:線形混合効果モデル・非線形混合効果モデルの数理. *計量生物学.* 36, S33-S48.
- 29) Gasparini, R., Bonanni, P., Amicizia, D., Bella, A., Donatelli, I., Cristina, M.

- L., Panatto, D. and Lai, P. L. (2013) Influenza epidemiology in Italy two years after the 2009-2010 pandemic: need to improve vaccination coverage. *Hum Vaccin Immunother.* 9, 561-567.
- 30) Gavazzi, G. and Krause, K.H. (2002) Ageing and infection. *Lancet Infect Dis.* 2, 659-666.
- 31) George Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S. and Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal.* 26, 927-939.
- 32) Global Health Estimates 2016. (2018) Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization.
- 33) Gonçalves, N. S., Ghaem-Maghani, M., Monteleone, G., Frankel, G., Dougan, G., Lewis, D. J., Simmons, C. P. and MacDonald, T. T. (2001) Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of luminal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. *Infect Immun.* 69, 6651-6659.
- 34) Goto, H., Sagitani, A., Ashida, N., Kato, S., Hirota, T., Shinoda, T. and Yamamoto, N. (2013) Anti-influenza virus effects of both live and non-live *Lactobacillus acidophilus* L-92 accompanied by the activation of innate immunity. *Br J Nutr.* 110, 1810-1818.
- 35) Guidelines for the Evaluation of probiotics in food. (2002) Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- 36) Havelaar, A. H., Garssen, J., Takumi, K., Koedam, M. A., Dufrenne, J. B., van Leusden, F. M., de La Fonteyne, L., Bousema, J. T. and Vos, J. G. (2001)

- A rat model for dose-response relationships of *Salmonella Enteritidis* infection. J Appl Microbiol. 91, 442-452.
- 37) Huang, T. T., Lai, H. C., Ko, Y. F., Ojcius, D. M., Lan, Y. W., Martel, J., Young, J. D. and Chong, K. Y. (2015) *Hirsutella sinensis* mycelium attenuates bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis *in vivo*. Sci Rep. 5, 15282.
- 38) Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S. and Iwasaki, A. (2011) Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 5354-5359.
- 39) Iwabuchi, N., Xiao, J. Z., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K. (2011) Oral administration of *Bifidobacterium longum* ameliorates influenza virus infection in mice. Biol Pharm Bull. 34, 1352-1355.
- 40) Jawhara, S. and Mordon, S. (2006) Monitoring of bactericidal action of laser by *in vivo* imaging of bioluminescent *E. coli* in a cutaneous wound infection. Lasers Med Sci. 21, 153-159.
- 41) Johnson-Henry, K. C., Nadjafi, M., Avitzur, Y., Mitchell, D. J., Ngan, B. Y., Galindo-Mata, E., Jones, N. L. and Sherman, P. M. (2005) Amelioration of the effects of *Citrobacter rodentium* infection in mice by pretreatment with probiotics. J Infect Dis. 191, 2106-2117.
- 42) Jones, S. E. and Knight, K. L. (2012) *Bacillus subtilis*-mediated protection from *Citrobacter rodentium*-associated enteric disease requires espH and functional flagella. Infect Immun. 80, 710-719.
- 43) Joshi, S. R., Shaw, A. C. and Quagliarello, V. J. (2009) Pandemic influenza

- H1N1 2009, innate immunity, and the impact of immunosenescence on influenza vaccine. *Yale J Biol Med.* 82, 143-151.
- 44) Jost, S. and Altfeld, M. (2013) Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 31, 163-194.
 - 45) Kadurugamuwa, J. L., Sin, L., Albert, E., Yu, J., Francis, K., DeBoer, M., Rubin, M., Bellinger-Kawahara, C., Parr, T. R. and Contag, P. R. (2003) Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. *Infect Immun.* 71, 882-890.
 - 46) Kanda, Y. (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48, 452-458.
 - 47) Kawai, S., Nanri, S., Ban, E., Inokuchi, M., Tanaka, T., Tokumura, M., Kimura, K. and Sugaya, N. (2011) Influenza vaccination of schoolchildren and influenza outbreaks in a school. *Clin Infect Dis.* 53, 130-136.
 - 48) Kawase, M., He, F., Kubota, A., Harata, G. and Hiramatsu, M. (2010) Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection. *Lett Appl Microbiol.* 51, 6-10.
 - 49) Kelly, J. M., Gilbert, C. S., Stark, G. R. and Kerr, I. M. (1985) Differential regulation of interferon-induced mRNAs and c-myc mRNA by alpha- and gamma-interferons. *Eur J Biochem.* 153, 367-371.
 - 50) Kim, Y., Kessler, S. P., Obery, D. R., Homer, C. R., McDonald, C. and de la Motte, C. A. (2017) Hyaluronan 35kDa treatment protects mice from *Citrobacter rodentium* infection and induces epithelial tight junction protein ZO-1 in vivo. *Matrix Biol.* 62, 28-39.
 - 51) Kishi, A., Uno, K., Matsubara, Y., Okuda, C. and Kishida, T. (1996) Effect of

- the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on interferon-alpha producing capacity in humans. *J Am Coll Nutr.* 15, 408-412.
- 52) 岸田綱太郎, 宇野賀津子, 岸惇子. (1993) *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* による免疫機能の促進. *基礎と臨床.* 27, 3701-3707.
- 53) Kiso, M., Takano, R., Sakabe, S., Katsura, H., Shinya, K., Uraki, R., Watanabe, S., Saito, H., Toba, M., Kohda, N. and Kawaoka, Y. (2013) Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. *Sci Rep.* 3, 1563.
- 54) Kumar, A., Anbazhagan, A. N., Coffing, H., Chatterjee, I., Priyamvada, S., Gujral, T., Saksena, S., Gill, R. K., Alrefai, W. A., Borthakur, A. and Dudeja, P. K. (2016) *Lactobacillus acidophilus* counteracts inhibition of NHE3 and DRA expression and alleviates diarrheal phenotype in mice infected with *Citrobacter rodentium*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 311, G817-G826.
- 55) Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. and Tough, D. F. (2001) Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells *in vivo*. *Immunity.* 14, 461-470.
- 56) Li, X., Wang, Q., Xu, H., Tao, L., Lu, J., Cai, L. and Wang, C. (2014) Somatostatin regulates tight junction proteins expression in colitis mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 7, 2153-2162.
- 57) Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene

- expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25, 402-408.
- 58) Luperchio, S. A., Newman, J. V., Dangler, C. A., Schrenzel, M. D., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. and Schauer, D. B. (2000) *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *C. rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 38, 4343-4350.
- 59) Maeda, N., Nakamura, R., Hirose, Y., Murosaki, S., Yamamoto, Y., Kase, T. and Yoshikai, Y. (2009) Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int Immunopharmacol*. 9, 1122-1125.
- 60) Makino, S., Ikegami, S., Kume, A., Horiuchi, H., Sasaki, H. and Orii, N. (2010) 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, 998-1006.
- 61) Mann, J. F., Shakir, E., Carter, K. C., Mullen, A. B., Alexander, J. and Ferro, V. A. (2009) Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine*. 27, 3643-3649.
- 62) Maoz, A., Mayr, R., Bresolin, G., Neuhaus, K., Francis, K. P. and Scherer, S. (2002) Sensitive in situ monitoring of a recombinant bioluminescent *Yersinia enterocolitica* reporter mutant in real time on Camembert cheese. *Appl Environ Microbiol*. 68, 5737-5740.

- 63) Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol.* 5, 1260-1265.
- 64) Maruo, T., Gotoh, Y., Nishimura, H., Ohashi, S., Toda, T. and Takahashi, K. (2012) Oral administration of milk fermented with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC protects mice against influenza virus infection. *Lett Appl Microbiol.* 55, 135-140.
- 65) Matsumoto, K., Yamada, H., Takuma, N., Niino, H. and Sagesaka, Y. M. (2011) Effects of green tea catechins and theanine on preventing influenza infection among healthcare workers: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med.* 11, 15.
- 66) Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H. and Benno, Y. (2011) Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One.* 6, e23652.
- 67) Matsuzaki, C., Kamishima, K., Matsumoto, K., Koga, H., Katayama, T., Yamamoto, K. and Hisa, K. (2014) Immunomodulating activity of exopolysaccharide-producing *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 from green peas. *J Appl Microbiol.* 116, 980-989.
- 68) Matzinger, S. R., Carroll, T. D., Fritts, L., McChesney, M. B. and Miller, C. J. (2011) Exogenous IFN-alpha administration reduces influenza A virus replication in the lower respiratory tract of rhesus macaques. *PLoS One.* 6, e29255.

- 69) Merenstein, D., Murphy, M., Fokar, A., Hernandez, R. K., Park, H., Nsouli, H., Sanders, M. E., Davis, B. A., Niborski, V., Tondu, F. and Shara, N. M. (2010) Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study. A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Clin Nutr.* 64, 669-677.
- 70) 三井俊賢, 徳村光昭, 井ノ口美香子, 川合志緒子, 康井洋介, 内田敬子, 久根木康子, 木村奈々, 外山千鈴, 佐藤幸美子. (2017) 2010-2015 年度 6 シーズンの全例観察コホート研究による小学校におけるインフルエンザ流行状況および インフルエンザワクチン集団免疫効果の検討. *慶応保健研究.* 35, 55-58.
- 71) Mundy, R., MacDonald, T. T., Dougan, G., Frankel, G. and Wiles, S. (2005) *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell Microbiol.* 7, 1697-1706.
- 72) Murakami, K., Habukawa, C., Nobuta, Y., Moriguchi, N. and Takemura, T. (2012) The effect of *Lactobacillus brevis* KB290 against irritable bowel syndrome: a placebo-controlled double-blind crossover trial. *Biopsychosoc Med.* 6, 16.
- 73) Namba, K., Hatano, M., Yaeshima, T., Takase, M. and Suzuki, K. (2010) Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 administration on influenza infection, influenza vaccine antibody titer, and cell-mediated immunity in the elderly. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74, 939-945.
- 74) Nobuta, Y., Inoue, T., Suzuki, S., Arakawa, C., Yakabe, T., Ogawa, M. and Yajima, N. (2009) The efficacy and the safety of *Lactobacillus brevis* KB290 as a human probiotics. *Int J Probiotics Prebiotics.* 4, 263-270.

- 75) Nomura, J., Busso, N., Ives, A., Matsui, C., Tsujimoto, S., Shirakura, T., Tamura, M., Kobayashi, T., So, A. and Yamanaka, Y. (2014) Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Sci Rep.* 4, 4554.
- 76) Osawa, T., Tsuchida, R., Muramatsu, M., Yuasa, Y. and Shibuya, M. (2011) Human glioblastoma cells exposed to long-term hypoxia and nutrient starvation stimulated induction of secondary T-cell leukemia in mice. *Blood Cancer J.* 1, e6.
- 77) Park, S., Kim, J. I., Bae, J. Y., Yoo, K., Kim, H., Kim, I. H., Park, M. S. and Lee, I. (2018) Effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* against influenza viruses in mice. *J Microbiol.* 56, 145-149.
- 78) Petrova, V.N. and Russell, C.A. (2018) The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol.* 16, 47-60.
- 79) Raniga, K. and Liang, C. (2018) Interferons: Reprogramming the Metabolic Network against Viral Infection. *Viruses.* 10, 36.
- 80) Reid, G. (2017) The development of probiotics for women's health. *Can J Microbiol.* 63, 269-277.
- 81) Reid-Yu, S. A., Small, C. L. and Coombes, B. K. (2013) CD3⁻NK1.1⁺ cells aid in the early induction of a Th1 response to an attaching and effacing enteric pathogen. *Eur J Immunol.* 43, 2638-2649.
- 82) Riedel, C. U., Casey, P. G., Mulcahy, H., O'Gara, F., Gahan, C. G. and Hill, C. (2007) Construction of p16Slux, a novel vector for improved bioluminescent labeling of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 73, 7092-7095.
- 83) Rocchetta, H. L., Boylan, C. J., Foley, J. W., Iversen, P. W., LeTourneau, D.

- L., McMillian, C. L., Contag, P. R., Jenkins, D. E. and Parr, T. R. (2001) Validation of a noninvasive, real-time imaging technology using bioluminescent *Escherichia coli* in the neutropenic mouse thigh model of infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 129-137.
- 84) Rodrigues, D. M., Sousa, A. J., Johnson-Henry, K. C., Sherman, P. M. and Gareau, M. G. (2012) Probiotics are effective for the prevention and treatment of *Citrobacter rodentium*-induced colitis in mice. *J Infect Dis.* 206, 99-109.
- 85) Ryu, S. H., Park, J. H., Choi, S. Y., Jeon, H. Y., Park, J. I., Kim, J. Y., Ham, S. H. and Choi, Y. K. (2016) The Probiotic *Lactobacillus* Prevents *Citrobacter rodentium*-Induced Murine Colitis in a TLR2-Dependent Manner. *J Microbiol Biotechnol.* 26, 1333-1340.
- 86) Sasaki, E., Suzuki, S., Fukui, Y. and Yajima, N. (2015) Cell-bound exopolysaccharides of *Lactobacillus brevis* KB290 enhance cytotoxic activity of mouse splenocytes. *J Appl Microbiol.* 118, 506-514.
- 87) Schauer, D. B., Zabel, B. A., Pedraza, I. F., O'Hara, C. M., Steigerwalt, A. G. and Brenner, D. J. (1995) Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 33, 2064-2068.
- 88) Schauer, D. B. and Falkow, S. (1993) Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun.* 61, 2486-2492.
- 89) Shekhar, S. and Yang, X. (2015) Natural killer cells in host defense against veterinary pathogens. *Vet Immunol Immunopathol.* 168, 30-34.
- 90) Shiomi, H., Masuda, A., Nishiumi, S., Nishida, M., Takagawa, T., Shiomi, Y.,

- Kutsumi, H., Blumberg, R. S., Azuma, T. and Yoshida, M. (2010) Gamma interferon produced by antigen-specific CD4⁺ T cells regulates the mucosal immune responses to *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun.* 78, 2653-2666.
- 91) Silverman, R. H. (2007) Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol.* 81, 12720-12729.
- 92) Simmons, C. P., Clare, S., Ghaem-Maghami, M., Uren, T. K., Rankin, J., Huett, A., Goldin, R., Lewis, D. J., MacDonald, T. T., Strugnell, R. A., Frankel, G. and Dougan, G. (2003) Central role for B lymphocytes and CD4⁺ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 71, 5077-5086.
- 93) Simmons, C. P., Goncalves, N. S., Ghaem-Maghami, M., Bajaj-Elliott, M., Clare, S., Neves, B., Frankel, G., Dougan, G. and MacDonald, T. T. (2002) Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial pathogen, *Citrobacter rodentium*, in mice lacking IL-12 or IFN-gamma. *J Immunol.* 168, 1804-1812.
- 94) Siragusa, G. R., Nawotka, K., Spilman, S. D., Contag, P. R. and Contag, C. H. (1999) Real-time monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to beef carcass surface tissues with a bioluminescent reporter. *Appl Environ Microbiol.* 65, 1738-1745.
- 95) Stavale, E. J., Vu, H., Sampath, A., Ramstedt, U. and Warfield, K. L. (2015) *In vivo* therapeutic protection against influenza A (H1N1) oseltamivir-

- sensitive and resistant viruses by the iminosugar UV-4. PLoS One. 10, e0121662.
- 96) Su, L., Qi, Y., Zhang, M., Weng, M., Zhang, X., Su, C. and Shi, H. N. (2014) Development of fatal intestinal inflammation in MyD88 deficient mice co-infected with helminth and bacterial enteropathogens. PLoS Negl Trop Dis. 8, e2987.
- 97) Suzuki, S., Yakabe, T., Suganuma, H., Fukao, M., Saito, T. and Yajima, N. (2013) Cell-bound exopolysaccharides of *Lactobacillus brevis* KB290: protective role and monosaccharide composition. Can J Microbiol. 59, 549-555.
- 98) Tada, S., Okuno, T., Yasui, T., Nakatsuji, Y., Sugimoto, T., Kikutani, H. and Sakoda, S. (2011) Deleterious effects of lymphocytes at the early stage of neurodegeneration in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neuroinflammation. 8, 19.
- 99) Takeda, S., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Kawahara, S., Yoshida, H., Watanabe, W., Muguruma, M. and Kurokawa, M. (2011) Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity. Int Immunopharmacol. 11, 1976-1983.
- 100) Tochigi Prefectural Infectious Disease Surveillance Centre. <http://www.thec.pref.tochigi.lg.jp/tide/data/data.htm> (accessed 3 July 2014).
- 101) Uchida, M., Kaneko, M., Hidaka, Y., Yamamoto, H., Honda, T., Takeuchi, S.,

- Saito, M. and Kawa, S. (2018) High vaccination coverage is associated with low epidemic level of seasonal influenza in elementary schools: an observational study in Matsumoto City, Japan. *BMC Infect Dis.* 18, 128.
- 102) Urashima, M., Segawa, T., Okazaki, M., Kurihara, M., Wada, Y. and Ida, H. (2010) Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 91, 1255-1260.
- 103) Vallance, B. A. and Finlay, B. B. (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 8799-8806.
- 104) Vijayakumar, V., Santiago, A., Smith, R., Smith, M., Robins-Browne, R. M., Nataro, J. P. and Ruiz-Perez, F. (2014) Role of class 1 serine protease autotransporter in the pathogenesis of *Citrobacter rodentium* colitis. *Infect Immun.* 82, 2626-2636.
- 105) Vouloumanou, E. K., Makris, G. C., Karageorgopoulos, D. E. and Falagas, M. E. (2009) Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents.* 34, 197.e1-197.e10.
- 106) Warfield, K. L., Plummer, E. M., Sayce, A. C., Alonzi, D. S., Tang, W., Tyrrell, B. E., Hill, M. L., Caputo, A. T., Killingbeck, S. S., Beatty, P. R., Harris, E., Iwaki, R., Kinami, K., Ide, D., Kiappes, J. L., Kato, A., Buck, M. D., King, K., Eddy, W., Khaliq, M., Sampath, A., Treston, A. M., Dwek, R. A., Enterlein, S. G., Miller, J. L., Zitzmann, N., Ramstedt, U. and Shresta, S. (2016) Inhibition of endoplasmic reticulum glucosidases is required for in vitro and in vivo dengue antiviral activity by the iminosugar UV-4. *Antiviral Res.* 129, 93-98.
- 107) Wiles, S., Pickard, K. M., Peng, K., MacDonald, T. T. and Frankel, G. (2016)

- In vivo* bioluminescence imaging of the murine pathogen
Citrobacter rodentium. Infect Immun. 74, 5391-5396.
- 108) Yakabe, T., Moore, E. L., Yokota, S., Sui, H., Nobuta, Y., Fukao, M., Palmer, H. and Yajima, N. (2009) Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain. Food Chem Toxicol. 47, 2450-2453.
- 109) Yakabe, T., Takashima, H., Kuwagata, M., Fukao, M., Kikuchi, S. and Yajima, N. (2011) Teratogenicity and maternal effects of *Lactobacillus brevis* KB290 in rats and rabbits. Food Chem Toxicol. 49, 722-726.
- 110) Yeh, T. L., Shih, P. C., Liu, S. J., Lin, C. H., Liu, J. M., Lei, W. T. and Lin, C. Y. (2018) The influence of prebiotic or probiotic supplementation on antibody titers after influenza vaccination: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Drug Des Devel Ther. 12, 217-230.
- 111) Zeis, M., Siegel, S., Wagner, A., Schmitz, M., Marget, M., Kühl-Burmeister, R., Adamzik, I., Kabelitz, D., Dreger, P., Schmitz, N. and Heiser, A. (2003) Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. J Immunol. 170, 5391-5397.
- 112) Zhang, X., Han, S., Kang, Y., Guo, M., Hong, S., Liu, F., Fu, S., Wang, L. and Wang, Q. X. (2012) SAHA, an HDAC inhibitor, synergizes with tacrolimus to prevent murine cardiac allograft rejection. Cell Mol Immunol. 9, 390-398.