

氏名 (本 (国) 籍)	岡 本 尚 子 (栃木県)		
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 海 野 年 弘		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博乙第172号		
学位授与年月日	令和3年3月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	乳酸菌 <i>Lactobacillus brevis</i> KB290 の抗感染作用と その作用機序に関する研究		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	村上 賢 二
	副査	帯広畜産大学 教授	小川 晴 子
	副査	岩手大学 教授	佐藤 洋
	副査	東京農工大学 教授	竹原 一 明
	副査	岐阜大学 教授	伊藤 直 人

### 学位論文の内容の要旨

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示す。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。

*Lactobacillus brevis* KB290 (KB290) は、京都の三大漬物の一つである「すぐき」より分離された植物性食品由来の乳酸菌であり、これまでに整腸作用および免疫賦活作用が認められている。整腸作用については、その機序について比較的研究が進んでおり、腸内細菌叢の改善作用がヒトで明らかにされている。しかし、免疫賦活作用については、その発現機序や、KB290 が実際に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。本研究では、KB290 の抗感染作用およびその作用機序について明らかにする目的で、実験動物ならびにヒトを対象に KB290 の抗感染作用およびその作用機序について検討した。

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 の感染防御効果を、マウスを対象に評価した。インフルエンザウイルス (influenza virus; IFV) 感染前に KB290 を 14 日間経口投与した結果、KB290 非投与群と比較して、IFV 感染 3 日後以降では体重減少が有意に抑制され、4 日後以降では健康状態スコアの低下が有意に抑えられた。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 日と 7 日後における血清中 interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 量や

脾細胞の細胞傷害活性、および感染 7 日後における気管支肺胞洗浄液中の IFV 特異的 immunoglobulin A (IgA) 量は、KB290 の前投与により有意に上昇したことから、KB290 によるインフルエンザ症状の緩和作用には、IFN- $\alpha$  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、および 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、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、小学生を対象とした非盲検並行群間試験で評価した。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は、非摂取群と比較して有意に低値を示した。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。

第 3 章では、発展途上国で特に問題となっている、腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌の感染モデルとして *Citrobacter (C.) rodentium* 感染マウスを用い、KB290 の腸管病原性細菌に対する防御作用とその機序について評価、検討した。マウスに対して KB290 を毎日強制経口投与する条件下で、投与 7 日後に、*C. rodentium* 株の発光変異体である *C. rodentium lux* を感染させた後、マウス体内における *C. rodentium* の増殖の程度を、生物発光イメージング (BLI) 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、*C. rodentium* の主な感性部位である結腸における tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) および interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の遺伝子発現が顕著に上昇していることも見出した。TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  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。

以上の結果より、KB290 は IFV や腸管病原性細菌の感染に対して防御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、そのメカニズムには、これまでに明らかになっていた IFN- $\alpha$  産生促進や細胞傷害活性上昇作用に加え、TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  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明らかとなった。これらの知見は、ウイルスや細菌に対する乳酸菌の感染防御機構の理解に有益な情報を提供するものと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

京都の漬物「すぐき」より分離された植物性食品由来の乳酸菌である *Lactobacillus brevis* KB290 (KB290) には、免疫賦活作用が認められている。しかし、その作用発現機序や、KB290 が実際に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。本研究では、これらの点を明らかにする目的で、実験動物ならびにヒトを対象に KB290 の抗感染作用およびその作用機序について検討した。

第 1 章では、インフルエンザの病態に対する KB290 の効果を、マウスを対象に評価した。インフルエンザウイルス (influenza virus; IFV) 感染前に KB290 を 14 日間経口投与した結果、非投与群と比較して、IFV 感染による体重減少および健康状態スコアの低下が有意に抑制されるとともに、血清中 interferon- $\alpha$  量、細胞傷害活性、および IFV 特異的

immunoglobulin A (IgA) 量が有意に上昇することを見出した。

第2章では、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。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は、非摂取群と比較して有意に低値を示し、インフルエンザの流行期間におけるKB290の継続的な摂取が罹患リスクを低減させることを示した。

第3章では、腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌の感染モデルとして *Citrobacter (C.) rodentium* 感染マウスを用い、KB290の腸管病原性細菌に対する防御作用とその機序について評価した。その結果、KB290を毎日強制経口投与したマウスでは、非投与群と比べて腸管における tumor necrosis factor- $\alpha$  および interferon- $\gamma$  の遺伝子発現が顕著に上昇しており、また、*C. rodentium* の腸内での増殖も抑制されることを示した。

以上のように、申請者はKB290がIFVや腸管病原性細菌の感染に対して防御的な作用を持つこと、そのメカニズムには炎症性サイトカインやIgAの産生亢進など免疫賦活作用が関与することを明らかにした。これらの知見は、ウイルスや細菌に対する乳酸菌の感染防御機構の理解に有益な情報を提供するものと判断した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Oral administration of *Lactobacillus brevis* KB290 to mice alleviates clinical symptoms following influenza virus infection  
著 者 名 : Waki, N., Yajima, N., Suganuma, H., Buddle, B.M., Luo, D., Heiser, A. and Zheng, T.  
学術雑誌名 : Letters in Applied Microbiology  
巻・号・頁・発行年 : 58 (1) : 87-93, 2014
- 2) 題 目 : Effects of probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 on incidence of influenza infection among schoolchildren: an open-label pilot study  
著 者 名 : Waki, N., Matsumoto, M., Fukui, Y. and Suganuma, H.  
学術雑誌名 : Letters in Applied Microbiology  
巻・号・頁・発行年 : 59 (6) : 565-571, 2014
- 3) 題 目 : Amelioration of *Citrobacter rodentium* proliferation in early stage of infection in mice by pretreatment with *Lactobacillus brevis* KB290 and verification using *in vivo* bioluminescence imaging  
著 者 名 : Waki, N., Kuwabara, Y., Yoshikawa, Y., Suganuma, H., Koide, H., Oku, N. and Ohashi, N.  
学術雑誌名 : FEMS Microbiology Letters  
巻・号・頁・発行年 : 364 (6) : fnw254, 2017

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Roles of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine  
著 者 名 : Tanahashi, Y., Waki, N., Unno, T., Matsuyama, H., Iino, S., Kitazawa, T., Yamada, M. and Komori, S.  
学術雑誌名 : Neurogastroenterology & Motility  
巻・号・頁・発行年 : 25 (10) : e687-e697, 2013
  
- 2) 題 目 : Wide-range screening of anti-inflammatory compounds in tomato Using LC-MS and elucidating the mechanism of their functions  
著 者 名 : Mohri, S., Takahashi, H., Sakai, M., Takahashi, S., Waki, N., Aizawa, K., Suganuma, H., Ara, T., Matsumura, Y., Shibata, D., Goto, T. and Kawada, T.  
学術雑誌名 : PLoS One  
巻・号・頁・発行年 : 13 (1) : e0191203, 2018
  
- 3) 題 目 : Apo-12'-lycopenal, a lycopene metabolite, promotes adipocyte differentiation via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation  
著 者 名 : Takahashi, S., Waki, N., Mohri, S., Takahashi, H., Ara, T., Aizawa, K., Suganuma, H., Kawada, T. and Goto, T.  
学術雑誌名 : Journal of Agricultural and Food Chemistry  
巻・号・頁・発行年 : 66 (50) : 13152-13161, 2018
  
- 4) 題 目 : Association between biomarkers of cardiovascular diseases and the blood concentration of carotenoids among the general population without apparent illness  
著 者 名 : Matsumoto, M., Waki, N., Suganuma, H., Takahashi, I., Kurauchi, S., Sawada, K., Tokuda, I., Misawa, M., Ando, M., Itoh, K., Ihara, K. and Nakaji, S.  
学術雑誌名 : Nutrients  
巻・号・頁・発行年 : 12 (8) : 2310, 2020