

プロバイオティクスとプレバイオティクス

～プレバイオティクスとしての発酵代謝産物の利用～

加藤(森)ゆうこ¹、安井 勝巳²、後藤 正光³、萩原 克郎¹

1 酪農学園大学 獣医学群 〒069-8501 江別市文京台緑町582

2 滝川どうぶつクリニック 〒073-0023 滝川市緑町7丁目7-31

3 菊水小さな動物病院 〒003-0802 札幌市白石区菊水2条2丁目3-30

はじめに

動物の生体防御機構は、自然免疫と獲得免疫の大きく二つに分類される。免疫に関わる器官は、胸腺・骨髄・脾臓・リンパ節・腸管であり、その中で最大の器官は腸管である。腸管の長さはヒトの場合約7m、イヌでは体長の約5～7倍と言われている。腸管内における免疫担当器官は、パイエル板、粘膜固有層、腸管上皮細胞、などから構成され、これらは、腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue ; GALT) と称されている。全身に存在するリンパ球の約60%が腸管に分布しており、体内で産生されているIgA抗体の約60%が腸管由来である。このように私たちの身体における免疫は腸管がその主たる役割を担っていると言えよう。その腸管の常在細菌叢は500～1000種類の菌種により構成され、糞便1g当たりの菌数は 10^{12} 個におよび、多様な腸内細菌が腸管免疫系の発達と応答に深く関与することが明らかになっている¹⁾。

これら種々の腸内細菌が免疫機能に作用するメカニズムとして、まず外来から取り込まれる菌の腸管内定着や増殖による競合阻害があげられる。これは単純な常在菌による数的競合のみならず、腸内常在細菌が産生するバクテリオシンにより外来菌の増殖を阻害することによっても競合する。また、腸内

細菌が発酵代謝することにより生じる有機酸は腸内を弱酸性化し、外来菌(病原性菌)の増殖を抑制することも知られている。さらに腸内細菌は、腸管粘膜のムチン産生や腸管上皮のIgA・抗菌性ペプチドの産生を促進し、粘膜バリア機能の維持に関与している^{2,3)}。腸内細菌が除去された無菌マウスでは、パイエル板が未発達であり、IgA産生量も低下していることが示された^{4,5)}。こうした無菌マウスの免疫系の応答未熟は、正常な腸内細菌の一部の投与により回復することがわかり、腸内細菌叢が免疫系の発達に不可欠であることが明らかにされた^{6,7)}。さらに、免疫応答に重要な微生物認識機構であるToll-like receptors (TLRs) は腸管上皮の恒常性を保つことが知られている⁸⁾。腸内細菌に対してTLRsを介した過剰反応は観察されないが、腸内細菌由来DNAはTLRsを介したTh1、Th17ⁱ細胞の増強により生体防御機能の維持に関与していることが示されている⁹⁾。

以上のように、腸管免疫を活性化することにより個体の免疫力向上が期待されるが、本稿では腸管免疫の活性化に効果が示唆される、プロバイオティクス・プレバイオティクスの話題提供と、実験動物および小動物において効果検討したプレバイオティクスの事例を紹介したい。

i バクテリオシン；細菌が産生する抗菌性タンパク質。同種あるいは近縁の細菌の増殖を抑制する。

ii Th17；インターロイキン(IL)-17を産生するヘルパーT細胞。自己免疫疾患、アレルギー応答、細菌感染防御などで中心的な役割をすることが近年明らかにされつつある。

プロバイオティクスとプレバイオティクス

整腸作用を期待したサプリメントとして、生菌を直接投与して腸内環境を改善する方法がよく知られており、これらはプロバイオティクスと呼ばれている。一般的には、ヨーグルトや生菌製剤の摂取がこれに相当する。‘プロバイオティクス’とは、腸内フローラバランスを改善することにより動物に有益な効果をもたらす生菌添加物と定義されている¹⁰⁾。これに対して、腸内の有用細菌の増殖を促進するような物質を摂取させ、腸内環境改善を介して動物に有益な効果をもたらすものが、‘プレバイオティクス’である¹¹⁾。例えば、食物繊維やオリゴ糖などの糖質や1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA)、茶カテキンなどがこれに該当する。さらに、私たちは乳酸菌等の有用菌による発酵代謝産物も同様の作用を持つことを見出し、広義の意味において、発酵代謝産物もプレバイオティクスに該当するものと考えられている。プロバイオティクスの免疫機能に対する作用機序は、上述の項で述べた腸内細菌叢の免疫系に対する作用と同様であるが、プレバイオティクスの作用機序は、腸内細菌叢改善効果を介した免疫機能制御に加え、プレバイオティクス成分による直接的な免疫賦活化作用が確認されている¹²⁾。

イヌにおけるプロバイオティクス・プレバイオティクスの利用効果

イヌへのプロバイオティクス応用例として、腸内細菌叢の改善¹³⁻²⁰⁾だけでなく、過敏性腸症候群 (IBS) の症状緩和や生活の質 (quality of life ; QOL) の改善も報告されている¹⁷⁾²¹⁾²²⁾。また、免疫機能に作用する効果としては、*Lactobacillus acidophilus*の投与による、血清IgG濃度上昇やリンパ球の増加、血清一酸化窒素 (NO) 濃度の低下¹³⁾、アトピー性皮膚炎罹患犬におけるサイトカイン産生抑制²³⁾が報告されている。投与生菌素材にイヌ由来の乳酸菌株を利用した試みもあるが^{20,24-26)}、たとえイヌ由来の生菌であっても、それら投与菌は腸管内に定着しないことが報告されている²⁴⁾。これはヒトにおいても同様で、プロバイオティクス投与により

腸内環境改善がみられても、外来の腸内細菌は宿主への定着は限定されることが報告されており¹¹⁾、それゆえ生菌投与は継続摂取することが効果につながるものと理解されている。

また、プレバイオティクス的一种である、フルクトオリゴ糖 (FOS) やマンナンオリゴ糖、食物繊維をイヌに投与した場合、腸内細菌叢の改善や糞中腐敗産物の減少がみられること^{27,28)}、さらにFOSと*L.acidophilus*の混合投与 (いわゆる‘シンバイオティクス’) による腸内細菌叢改善効果²⁹⁾や、マンナンオリゴ糖投与による病原性大腸菌感染に対する早期回復効果³⁰⁾も報告されている。その一方、腸内環境改善やIgA産生にプレバイオティクス投与効果が認められなかったという報告もある^{31,32)}。プレバイオティクスの場合、宿主常在菌の状態が効果の多少に影響を及ぼすことも考えられるため、今後も詳細な検討が求められる。

プレバイオティクスのマウスでの効果検討

今回検討したプレバイオティクスは、*Lactobacillus gasseri* と *Propionibacterium freudenreichii* の発酵代謝産物を中心素材としたものであり、生菌を含まないものである。*L. gasseri* 株は、ヘリコバクターピロリの除去を促進し、特定保険用食品としてヨーグルトに利用されている乳酸菌株である^{33,34)}。また、*L. gasseri* は、Toll-like receptor (TLR)-9を介して核内転写因子であるnuclear factor κ B (NF- κ B) を活性化する免疫修飾作用を持つことも知られている³⁵⁾。一方、*P. freudenreichii* は、DHNAを含み、ビフィズス菌を特異的に増加させ、腸疾患の症状低減などに効果を示すものとして知られている菌株である^{36,37)}。

これら2種類の菌の混合発酵代謝産物 (LP-FM) を、C57BL/6マウスに投与して免疫機能の変化を検討したところ、末梢血T細胞数の増加 (CD4⁺、CD8⁺T細胞)、脾臓でのIFN- γ 遺伝子発現亢進、マクロファージの活性酸素 (ROS) 生成能上昇等が示された (図1~3)¹²⁾。これらの結果はLP-FM投与個体における自然免疫の増強効果を示すものであると考えられた¹²⁾。さらにLP-FMを投与したマウスに実験的にリステリア菌を感染させたところ、リステリア

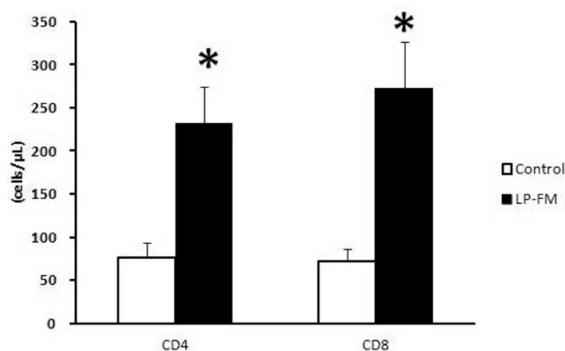


図1. プレバイオティクス4週間投与後のマウス末梢血リンパ球の変化

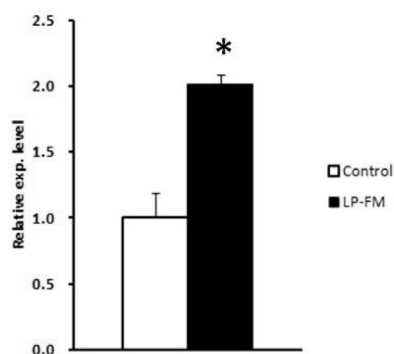


図2. プレバイオティクス4週間投与後のマウス脾臓細胞におけるIFN- γ 遺伝子発現

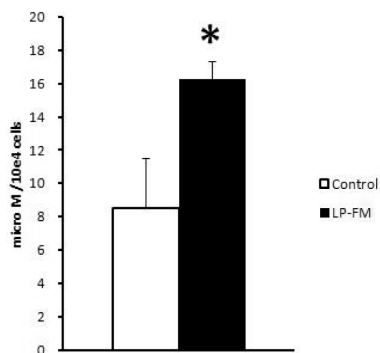


図3. プレバイオティクス4週間投与後のマウスにおけるマクロファージの活性酸素生成能

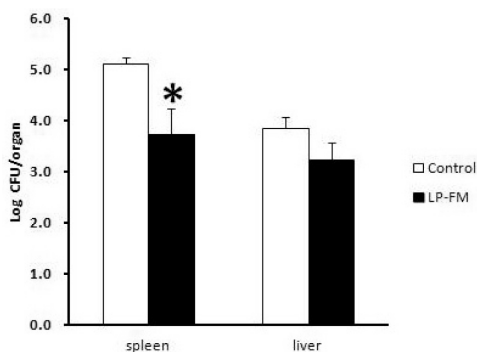


図4. プレバイオティクス投与マウスのリステリア菌排除能、感染3日後のリステリア菌数

菌の排除が亢進された(図4)¹²⁾。これらの現象はLP-FMがマクロファージの機能を活性化させた結果、病原性細菌の排除を促進した結果と考えられた。また、LP-FM投与マウスに腸内細菌叢の大きな変化がなかったことから、免疫賦活化効果はプレバイオティクスの直接効果であることが示唆された。

イヌ末梢血単核球 (PBMC) による プレバイオティクス効果の検証

上述のプレバイオティクスを投与したマウスの脾臓ではTLR-9と転写因子 (myd88, NF- κ B) の遺伝子発現上昇も確認された。TLR-9は自然免疫における病原体センサーである。病原体分子の認識により核内転写因子を活性化し、細胞のサイトカイン産生を促進することが知られている³⁸⁾。そこでTLR-9および転写因子の発現を指標に、イヌPBMCに対するプロバイオティクスの効果検討を行った。動物病院来院犬10頭のPBMCをプロバイオティクスと混合培養したところ、TLR-9および転写因子NF- κ Bの遺伝子発現が上昇した。さらに、Lipopolysaccharide (LPS) の刺激を加えるとIFN- γ 発現が亢進した。これらはマウスにおけるプレバイオティクス効果と同様の結果であり、イヌPBMCに対するプレバイオティクスの自然免疫機能活性化、および外来刺激に対する免疫応答亢進効果を示すものと考えられた。

プレバイオティクスのQOL改善効果の検討

獣医医療の発達に伴い、動物も高齢化特有の腫瘍性疾患や代謝性疾患などが増加し、QOLの低下が問題となっている。QOLの低下した個体では、主訴に対する投薬などの治療効果も得られにくくなることから、QOLを下げない管理が望まれている。ヒト医療分野でも、IBS^{39,40)}、アトピー性皮膚炎⁴¹⁾、直腸ガンの術後⁴²⁾、慢性腎疾患⁴³⁾、などの患者に対してプロバイオティクス・プレバイオティクスを投与し、QOL改善に効果を示した例がある。私たちは、腸内細菌叢改善を介したQOL改善に着目し、疾病罹患犬19頭に対するプレバイオティクス投与を試みた。

対象犬は動物病院来院した年齢11ヶ月から16才（腫瘍系3頭、消化器系8頭、泌尿器系3頭、皮膚系4頭、その他3頭）の計19頭で、従来の治療法で改善の見られなかった症例に対して実施した。治療・食事等の通常飼育管理に、プレバイオティクスを1kg体重当たり0.3g/日、追加投与する形式とした。投与4週間以上経過後に血液検査および血液生化学検査を行い、プレバイオティクス投与による臨床症状に対する有害事象の発生、および副作用と考えられる症状のないことを確認した。

プレバイオティクス投与後に行った臨床症状評価の結果、主訴に対する改善効果は消化器系8例、泌尿器系3例、皮膚系1例で認められた（12例/19例、63.2%）。また、投与前後の個体の全身状態評価および飼い主の満足度より評価したQOL改善効果は19例中17例（89.5%）であり、治療薬とプレバイオティクスの併用によりQOLが改善されることが示唆された。

以上、マウスおよびイヌにおける検討結果から、発酵代謝産物由来のプレバイオティクス投与はTLR-9を介した転写因子の活性化・マクロファージの機能誘導に作用し、その結果個体の免疫機能を賦活化することが示唆された。イヌではプレバイオティクスによる腸内細菌叢改善に効果が認められた例もあり、プレバイオティクスの直接効果に加え、整腸作用を介したQOL向上の可能性も示唆された。

おわりに

生菌摂取のプロバイオティクスの場合、求める機能に対してどの菌種が宿主に対して効果的か、またその効果に必要な摂取量および摂取期間など様々な条件設定が適用時に明確でなければならない。しかしながら実験動物とは異なり、ヒトや小動物の場合は品種も多岐にわたり、かつ摂取飼料（食料）にも多様性があるため、各動物種における‘正常細菌叢’の把握は難しい。そのため、プロバイオティクスの適応範囲は個々に決定されることが望ましい。

また、治療に抗生物質を使用している場合、プロバイオティクスの生菌としての効果は減弱されるが、

宿主の常在菌を増加させるプレバイオティクスによりその補填が可能になるものと考えられる。逆にプレバイオティクスは、宿主常在菌の状態がその効果の多少に影響を及ぼすことが考えられる。そのため、常在菌のバランスが極端に悪化している場合は、プロバイオティクス投与による積極的な腸内菌叢バランス改善が有効だろう。それゆえ、個体（腸内細菌）の状態に合わせた、プロバイオティクスとプレバイオティクスの組合せを適用することが、これらサプリメントの効果を最大限に引き出すものと思われる。

引用文献

- 1) Chung, H., et al., *Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota*. Cell. 2012. 149(7) : p. 1578-93.
- 2) Ewaschuk, J.B. and L.A. Dieleman, *Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases*. World J Gastroenterol, 2006. 12(37) : p. 5941-50.
- 3) Fukuda, S., et al., *Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate*. Nature. 2011. 469(7331) : p. 543-7.
- 4) Rothkott, H.J. and R. Pabst, *Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs*. Immunology, 1989. 67(1) : p. 103-8.
- 5) Shroff, K.E., K. Meslin, and J.J. Cebra, *Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut*. Infect Immun, 1995. 63(10) : p. 3904-13.
- 6) Umesaki, Y., et al., *Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system*. Infect Immun, 1999. 67(7) : p. 3504-11.
- 7) Ivanov, I., et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. Cell, 2009. 139(3) : p. 485-98.
- 8) Rakoff-Nahoum, S.O., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. 118(2) : p. 229-41.
- 9) Hall, J.A., et al., *Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses*. Immunity, 2008. 29(4) : p. 637-49.
- 10) Fuller, R., *Probiotics in man and animals*. J Appl Bacteriol, 1989. 66(5) : p. 365-78.
- 11) Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid, *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. J Nutr, 1995. 125(6) : p. 1401-12.
- 12) Kato-Mori, Y., et al., *Fermentation metabolites from Lactobacillus gasseri and Propionibacterium freudenreichii exert bacteriocidal effects in mice*. J Med Food. 2010. 13(6) : p. 1460-7.
- 13) Baillon, M.L., Z.V. Marshall-Jones, and R.F. Butterwick, *Effects of probiotic Lactobacillus acidophilus strain DSM13241 in healthy adult dogs*. Am J Vet Res, 2004. 65(3) : p. 338-43.
- 14) 内野富弥, 熊, 萩野勇, 吉川忠作, 堀口隆嘉, 高谷不き, 中西章男, 山田勝彦, 田杭浩, 犬の下痢症に対する生菌剤（動物用ピオスリー）の臨床効果, in 小動物臨床. 1995. p. 17-23.
- 15) Ren, Z., et al., *Preparation of Selenium/Zinc-Enriched Probiotics and Their Effect on Blood Selenium and Zinc Concentrations, Antioxidant Capacities, and Intestinal Microflora in Canine*. Biol Trace Elem Res. 2011. 141(1-3) : p. 170-83.

- 16) Marcinakova, M., et al., *Oral application of Enterococcus faecium strain EE3 in healthy dogs*. Folia Microbiol (Praha), 2006. **51** (3) :p. 239-42.
- 17) Sauter, S.N., et al., *Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet*. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2006. **90**(7-8) :p. 269-77.
- 18) Strompfova, V., et al., *Application of potential probiotic Lactobacillus fermentum AD1 strain in healthy dogs*. Anaerobe, 2006. **12**(2) :p. 75-9.
- 19) Strompfova, V., A. Laukova, and S. Gancarcikova, *Effectivity of freeze-dried form of Lactobacillus fermentum AD1-CCM7421 in dogs*. Folia Microbiol (Praha). 2012. **57**(4) :p. 347-50.
- 20) Strompfova, V., A. Laukova, and D. Cilik, *Synbiotic administration of canine-derived strain Lactobacillus fermentum CCM 7421 and inulin to healthy dogs*. Can J Microbiol. **59**(5) :p. 347-52.
- 21) Herstad, H.K., et al., *Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis—a controlled clinical trial*. J Small Anim Pract. 2010. **51** (1) :p. 34-8.
- 22) Kelley, R.L., et al., *Clinical benefits of probiotic canine-derived Bifidobacterium animalis strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea*. Vet Ther, 2009. **10**(3) :p. 121-30.
- 23) Marsella, R., D. Santoro, and K. Ahrens, *Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects*. Vet Immunol Immunopathol. 2012. **146**(2) :p. 185-9.
- 24) Manninen, T.J., et al., *Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(10) :p. 6539-43.
- 25) Kim, S.Y., Y. Ogawa, and Y. Adachi, *Canine intestinal lactic acid bacteria agglutinated with concanavalin A*. J Vet Med Sci, 2006. **68**(12) :p. 1351-4.
- 26) Beasley, S.S., T.J. Manninen, and P.E. Saris, *Lactic acid bacteria isolated from canine faeces*. J Appl Microbiol, 2006. **101** (1) :p. 131-8.
- 27) Swanson, K.S., et al., *Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs*. J Nutr, 2002. **132**(5) :p. 980-9.
- 28) Jia, J., et al., *Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhoea*. FEMS Microbiol Ecol. 2010. **71** (2) :p. 304-12.
- 29) Swanson, K.S., et al., *Fructooligosaccharides and Lactobacillus acidophilus modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs*. J Nutr, 2002. **132**(12) :p. 3721-31.
- 30) Gouveia, E.M., et al., *Action of phosphorylated mannanoligosaccharides on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic Escherichia coli strains*. Braz J Microbiol. **44**(2) :p. 499-504.
- 31) Hesta, M., et al., *Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels*. Br J Nutr, 2003. **90**(6) :p. 1007-14.
- 32) Verlinden, A., et al., *The effects of inulin supplementation of diets with or without hydrolysed protein sources on digestibility, faecal characteristics, haematology and immunoglobulins in dogs*. Br J Nutr, 2006. **96**(5) :p. 936-44.
- 33) Sakamoto, I., et al., *Suppressive effect of Lactobacillus gasseri OLL 2716 (LG21) on Helicobacter pylori infection in humans*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(5) :p. 709-10.
- 34) Uchida, M., K. Shimizu, and K. Kurakazu, *Yogurt containing Lactobacillus gasseri OLL 2716 (LG21 yogurt) accelerated the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats*. Biosci Biotechnol Biochem. 2010. **74**(9) :p. 1891-4.
- 35) Shimosato, T., et al., *Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure*. Cell Microbiol, 2006. **8**(3) :p. 485-95.
- 36) Isawa, K., et al., *Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by Propionibacterium freudenreichii ET-3*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. **66**(3) :p. 679-81.
- 37) Mitsuyama, K., A. Toyonaga, and M. Sata, *Intestinal microflora as a therapeutic target in inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 2002. **37 Suppl** 14:p. 73-7.
- 38) Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol. **30**(1) :p. 16-34.
- 39) Choi, C.H., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of saccharomyces boulardii in irritable bowel syndrome: effect on quality of life*. J Clin Gastroenterol. 2011. **45**(8) :p. 679-83.
- 40) Murakami, K., et al., *The effect of Lactobacillus brevis KB290 against irritable bowel syndrome: a placebo-controlled double-blind crossover trial*. Biopsychosoc Med. **6**(1) :p. 16.
- 41) Drago, L., et al., *Effects of Lactobacillus salivarius LS01 (DSM 22775) treatment on adult atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled study*. Int J Immunopathol Pharmacol. 2011. **24**(4) :p. 1037-48.
- 42) Ohigashi, S., et al., *Functional outcome, quality of life, and efficacy of probiotics in postoperative patients with colorectal cancer*. Surg Today. 2011. **41**(9) :p. 1200-6.
- 43) Ranganathan, N., et al., *Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease*. Adv Ther. 2010. **27**(9) :p. 634-47.