

ペディオコッカス 5051 株を使用した植物性乳酸菌サプリメントと消化管内フローラ、腸間膜リンパ節との相互作用の可能性

Possible interactions between a plant-derived lactic acid bacteria supplement using *Pediococcus* strain 5051, intestinal flora bacteria, and the mesenteric lymph node cells

J. J. Lin¹⁾ 伊藤 裕行²⁾ 野内 正太³⁾ 石田 卓夫⁴⁾

1) フットカレッジ生物学科 (USA) 客員教授

2) 刈谷動物病院グループ 市川総合病院 (千葉県)

3) タクタリ動物病院 東京医療センター (東京都)

4) 赤坂動物病院 (東京都), 一般社団法人 日本臨床獣医学フォーラム 会長

プログラム提供
有限会社 ヘルスビジョン

HealthVision

要約

Pediococcus acidilactici には、他のプロバイオティクス同様、様々な株が存在し、株による安全性・効能の相違も認められている。*Pediococcus acidilactici* 5051 株 (正式名称: *Pediococcus acidilactici* NRRL B-50517 株) は、*Pediococcus* 属の中でも最も耐熱性と耐酸性に優れたプロバイオティクス株であり、それを用いて、酸素、高温、胃酸に対する抵抗性を有した植物性乳酸菌プロバイオティクスが作られた。5051 株はカナダ保健省において食品原料としての使用が認められており、ラット、犬、人への投与試験においても安全性が確認されている。5051 株由来プロバイオティクスを犬や猫に与えることで、入院に関連したストレス関連性の消化器障害を予防できることが示されており、さらに食物の消化・吸収が促進され、有害物質を減少させること、サイトカインバランスの調節などの可能性が示唆されている。

キーワード ペディオコッカス プロバイオティクス
5051 株 腸内フローラ 免疫調節

プロバイオティクスは、人や動物の消化管に常在する有益な細菌であり、世界保健機構 (WHO) が「一定量以上与えることで宿主の健康に効果を発揮する細菌」と定義している¹⁾。Bifidobacterium (ビフィドバクテリウム) 属と Lactobacillus (ラクトバシラス) 属は、市販のプロバイオティクス製品に最もよく利用されているが、これらは偏性嫌気性の腸内細菌であり、高温や酸素に対する抵抗性がないこと²⁾、また胃酸に対する抵抗性がないことも報告されている³⁾。経口投与の場合、消化管まで生きてきたまま到達しない可能性が示唆されており、生菌製剤としての有益性には疑問が生じている。したがって、安定的に再現性のある健康効果をもたらすことは必ずしも容易ではないかもしれない。また、Bacillus 属は孢子を形成することで高温下でも生存することができるが、芽胞菌はアルコール消毒、高温蒸気、低濃度の次亜塩素酸ナトリウムに抵抗性を示すため製造ラインなどにおける除菌が困難で、製造管理、品質管理には時間もコストがかかる。そのため、多くの国において製造業者は積極的な使用を躊躇する傾向がある。さらに、Bacillus 属には、炭疽の病原

菌 *Bacillus anthracis* (バシラス・アントラシス/炭疽菌)⁴⁾ や食中毒の原因菌である *Bacillus cereus* (バシラス・セレウス)⁵⁾ など強い病原性を持つ菌が存在することから、高病原性の *B.anthraxis* や *B.cereus* からプロバイオティクスである *B.subtilis* への病原性遺伝子伝播の危険性もある。

Pediococcus acidilactici (*P.acidilactici*) は、食品への長い使用歴から安全性が確認できるとして、GRAS グレードに認められている。*P.acidilactici* は、人や動物の消化管の常在菌であり⁶⁾、人や動物に対して有害であるという報告はない。また *Pediococcus* 属には、たとえば *Bacillus* 属の *B.anthraxis* や *B.cereus* のような、同属内の病原性細菌は存在しない。*Pediococcus acidilactici* 5051 株 (正式名称: *Pediococcus acidilactici* NRRL B-50517 株) は、*Pediococcus* 属の中でも最も耐熱性と耐酸性に優れたプロバイオティクス株であり、酸素、高温、胃酸に対する抵抗性を有した植物性、非芽胞形成性プロバイオティクスで⁷⁾、ラット、犬、人への投与試験においても安全性が確認されている。また日本においても人、犬、猫、うさぎ、鳥、馬などに 10 年以上使用されてきた歴史があり、これまで病原性の可能性を示す臨床報告例はない。5051 株は、近年カナダ保健省から食品原料として承認を得ている。

5051 株は、常温保管で 2 年間の生存が確認できた (図 1)。85℃ の高温曝露試験では、2 分間の処理で 97%、また 10 分間では 90% の生存が確認されている。多くのプロバイオティクス株は胃酸を通過することが難しいとされているが、5051 株は pH1.2 の酸性環境でも生存することができるため、生きたまま胃を通過できると考えられる (図 2)。実際に、5051 株を与えたラットや犬の糞便中から 5051 株の生菌は検出可能である⁸⁾。5051 株は、遺伝子組換えなどの技術による遺伝子操作やカプセル技術などによるエンジニアリングを施していない天然のプロバイオティクス株であり、非芽胞形成性のプロバイオティクスとして、耐熱性そして耐酸性に優れたものとしてはきわめて稀である。

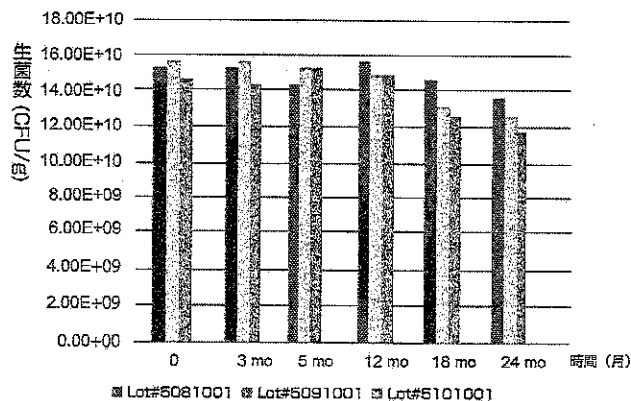


図1: *P.acidilactici* 5051 株の温度に対する耐性
異なるロットの5051株の粉末を常温で2年間保管し、生菌数を測定した結果

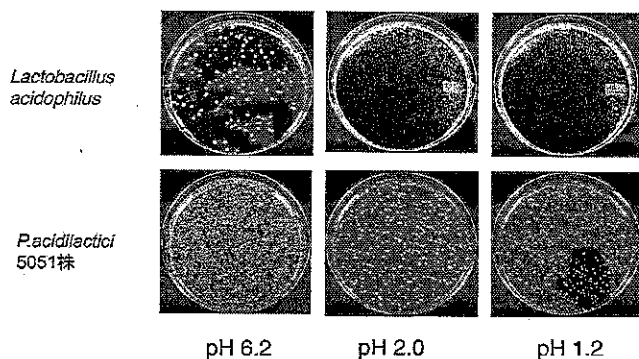
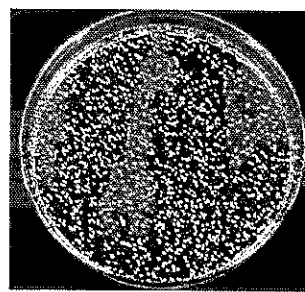


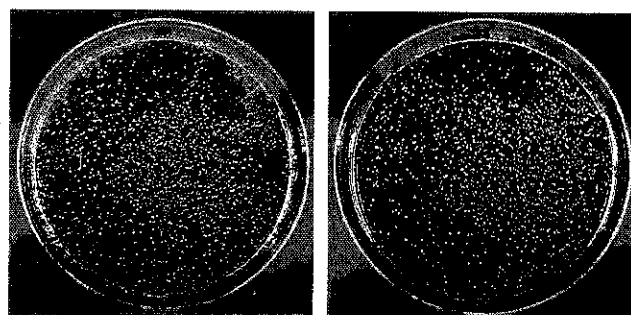
図2: 酸性環境下での *P.acidilactici* 5051 株と *L.acidophilus* の増殖性

pH6.2, pH2.0, pH1.2に調整したMRS培養液中で37℃, 4時間培養。その後pH6.2の培養液で37℃, 一晚培養した結果。

下痢や嘔吐などの消化器疾患に対してプロバイオティクスを投与する場合、抗生物質との併用がよくあるが、グラム陽性菌であるほとんどのプロバイオティクスは、抗生物質により死滅してしまい、プロバイオティクスとしての作用効果を発揮できなくなってしまう。5051株は、抗生物質に対してある程度の抵抗性を有しており、抗生物質と併用して使用することができる。5051株およびそのプロバイオティクス製剤に含まれる *Saccaromyces boulardii* (*S.boulardii*) の生菌(200mg)に、異なる濃度のクラロムフェニコールまたはテトラサイクリンを添加し培養したところ、どちらも十分な生菌数が確認できた(図3)



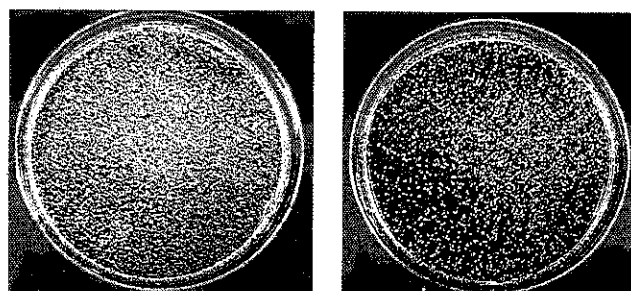
コントロール



4mg/mL

102mg/mL

クラロムフェニコールを34mg/mL, または102mg/mL添加したMRS培地4mLに5051株と *Saccaromyces boulardii* の生菌(200mg)を加えて37℃で2晩培養した。その後、培養液100μLをMRS培地に接種し、37℃で一晚培養して得られた集落。



25mg/mL

100mg/mL

テトラサイクリンを25mg/mL, または100mg/mL添加したMRS培地4mLに5051株と *Saccaromyces boulardii* の生菌(200mg)を加えて、37℃で2晩培養した。その後、培養液100μLをMRS培地に接種し、37℃で一晚培養して得られた集落。

図3: *P.acidilactici* 5051 株と *S.boulardii* の抗生物質に対する抵抗性

これまでの研究によって、5051株が自然免疫応答と適応免疫応答を高めることが知られており、コクシジウムに感染したニワトリにおいて、アイメリアに対する抗体産生の増強効果が確認されている⁹⁾。

5051株のラットとウマへの投与試験においては、マイトジェンによるT細胞とB細胞の増殖反応の増強が見られた

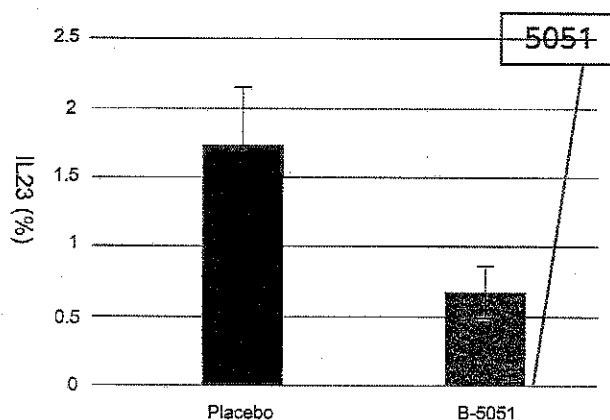
(表 1). このことは、ラットとウマにおいて、液性免疫反応と細胞性免疫反応を高める可能性を示唆している^{10, 11)}. リンパ球の活性化の理由については、マクロファージの活性化がかなりまずもって考えられる. マクロファージの活性化には 2 通りあり、炎症を促進する古典的活性化 (インターフェロニンによる活性化) と代替経路活性化 (IL-4 や IL-13 による活性化) があり、マクロファージは、抗寄生虫作用、抗炎症作用、組織修復作用を発現すると考えられている¹²⁾. ラットにおける実験では、5051 株がマクロファージの活性化を用量依存性に促すことが分かっている (Lin JJ, 未発表).

表 1: *P.acidilactici* 5051 株と *S.bouardii* のプロバイオティクス投与ラットにおける T 細胞と B 細胞の増殖反応

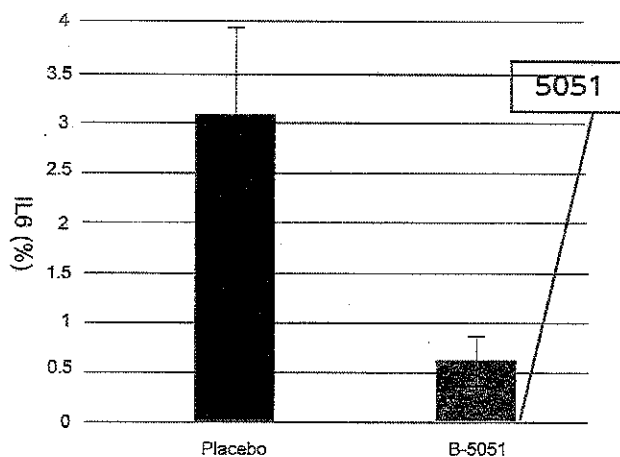
<i>P.acidilactici</i> 5051 株と <i>S.bouardii</i> 投与生菌数	T 細胞反応 (ConA) *	B 細胞反応 (LPS) *
対照群	23.34 ± 6.53	10.0 ± 1.33
1x10 ⁹	34.27 ± 3.08	42.51 ± 8.23
1x10 ¹⁰	91.14 ± 31.65	31.53 ± 5.09

* コンカナバリン A (Con A: 0.4, 0.8 or 1.6 μg/well, Sigma) および LPS (リポ多糖類: 1.25, 2.5 or 5.0 μg/well, Sigma) に対する細胞分裂反応の分析については Babu et al¹³⁾ に従い実施した.

5051 株を 3 カ月間摂取した人での二重盲検による比較試験では、炎症性サイトカインである IL6 や IL23 が、投与群では、非投与群と比べ有意に減少した (図 4). この試験は、5051 株の体脂肪減少効果を調べるために、肥満の人 30 名を対象に行われた. 肥満の人では IL6 と TNF-α が高いことが分かっており^{14, 15)}, メタボリック症候群の女性患者では、健康な女性と比べて、IL-23 が高いことが報告されている¹⁶⁾. 投与群では 5051 株の摂取により、これら炎症性サイトカインが減少し、体脂肪は、非投与群の 0.28 ± 0.19% に比較して、投与群では 0.86 ± 0.42% 減少した¹⁷⁾. 同試験において、抗炎症サイトカインの IL10 も測定したところ、非投与群に比べて増加していた. このことから、5051 株がマクロファージを活性化し、炎症性サイトカインを抑制し、抗炎症サイトカインを増加する可能性が示唆された.



*: P=0.0068, t=3.0194, placebo mean=1.714 ± 0.377 (SEM);
5051 株 mean = 0.648 ± 0.137 (SEM)



*: P=0.0295, t=2.4239, placebo mean=3.058 ± 0.867 (SEM);
5051 株 mean= 0.612 ± 0.221 (SEM)

図 4: *P.acidilactici* 5051 株摂取に伴う炎症性サイトカイン減少作用

5051 株を 3 カ月間摂取した人での二重盲検による比較試験. 試験は, Sylvania Institute と Rotary Club of Frederick (米国) によりヘルシンキ宣言に基づいて行われた. 食事の変更は行わず, 5051 株の生菌粉末を 1 日 40 億個, 12 週間摂取した. IL-6 と IL-23 は, Milliplex 社 (St. Louis, MO) において測定された.

慢性腸症と呼ばれる疾患の中には炎症性腸疾患 (IBD) と診断可能なものに加え, IBD の診断は未確定であるが慢性消化器徴候がみられるいわゆる非特異的腸疾患 (NEP) や食事反応性の腸疾患も含まれる. この炎症性腸疾患 (IBD) 例と

非特異的腸疾患 (NEP) 例において、抗炎症薬や免疫抑制剤と *P.acidilactici* プロバイオティクス製剤 (5051 株と有益な酵母菌 *S.bouardii* の生菌を含む) を同時投与すると、治療用薬剤の使用量を減量することができ、休薬できた症例も報告されている。抗炎症薬や免疫抑制剤を減量できた症例においては、症状の再発はみられなかった¹⁸⁾。このプロバイオティクス製剤に含まれる *S.bouardii* は、抗生物質による下痢や頻発する *Clostridium difficile* による腸内感染に関する臨床効果があることが知られており¹⁹⁾、マウスでの *Clostridium difficile* 毒素 A が関与する下痢に対する腸の免疫反応を高めることも報告されている²⁰⁾。

免疫介在性の慢性疾患、すなわち、慢性の消化器疾患や免疫介在性溶血性貧血 (IMHA) 持つ犬や猫では、抗炎症薬や免疫抑制剤による治療が長期化することが多い。しかしながら、薬剤の長期投与が重大な副作用の要因となる可能性があるため、減量や休薬を目標とすることが望ましい。ただし、早期の減量は再発を招く可能性があるため、常に困難を伴うことは周知の事実である。*P.acidilactici* 5051 株と *S.bouardii* の混合プロバイオティクスには、犬や猫の消化管における細菌叢を正常化させることを通じて、本来備わる抗炎症作用を回復させる効果が期待される。

利益相反状態の開示

今回の講演について、著者は本プロバイオティクス製品を発明、製造し、有限会社ヘルスビジョンに販売する米国内法人 Imagilin Inc. の創業者である。他の共著者には開示すべき利益相反状態はない。

参考文献

- 1) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001, pp1-34.
- 2) Talwalkar A, Kailasapathy K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* Spp. *Curr Issues Intest Microbiol.* 5: 1-8, 2004.
- 3) Hood SK, Zoitola EA. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J food Sci.* 53: 1514-1516, 1988.
- 4) Madigan M, Martinko J (eds). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed. Prentice Hall, 2005.
- 5) Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2: 189-198, 2000.
- 6) Kim SY, Adachi Y. Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Microbiol Immunol.* 51: 919-928, 2007.
- 7) Lin JJ, Busi SB. High temperature resistant probiotics for food and feed preparations. US patent No.9, 289, 008, 2006.
- 8) Lin JJ, 石田卓夫. *Pediococcus* および *Saccharomyces* 混合プロバイオティクス投与動物糞便の細菌学的検索. JBVP 年次大会プロシーディングス. pp3-231-233, 2009.
- 9) Lee SH, Lillehoj HS, Dalloul RA, et al. Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. *Poultry Sci.* 86: 63-66, 2007.
- 10) Lin JJ, 石田卓夫. ペディオコッカス菌を含むプロバイオティクスの消化器系およびその他の器官系への応用. 伴侶動物治療指針. 緑書房. 2011, pp156-166.
- 11) Furr M. Orally administered *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces bouardii*-based probiotics alter select equine immune functional parameters. *J Equine Vet Sci.* 34: 1156-1163, 2014.
- 12) Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3: 23-25, 2003.
- 13) Babu US, Wiesenfeld PW, Collins TFX, et al. Impact of high flaxseed diet on mitogen-induced proliferation, IL-2 production cell subsets and fatty acid composition of spleen cells. *Food Chem Tox.* 41: 905-915, 2003.
- 14) Ellulu MS, Khaza' ai H, Rahmat A, et al. Obesity can predict and promote systemic inflammation in healthy adults. *Int J Cardiol.* 215: 318-324, 2016.
- 15) Christinana UI, Casimir AE, Nicholas AA, et al. Plasma levels of inflammatory cytokines in adult Nigerians with the metabolic syndrome. *Niger Med J.* 57: 64-68, 2016.
- 16) Murphy MS, Tayade C, Smith GN. Evidence of inflammation and predisposition toward metabolic syndrome after pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 5: 354-358, 2015.
- 17) Lin JJ, O'Connell H, Sinclair S. *Pediococcus acidilactici* NRRL B-50517 as a Safe Probiotics for Regulation of Weight Related Pro-inflammatory Cytokines: A Double-blind Placebo-controlled Pilot study. *Curr Dev Nutr.* pp21-026-19, 2019.
- 18) Lin JJ, 伊藤裕行, 石原喜代司, ほか. ペディオコッカス・プロバイオティクスの疾患別応用法. JBVP プロシーディングス. pp3-288-292, 2014.

- 19) Czerucha D, Piche T, Rampal P. Review article:
Yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii*
Aliment Pharmacol Ther. 26: 767-778, 2007.
- 20) Gamar A, Aboudoia S, Warny M, et al. *Saccharomyces*
boulardii stimulates intestinal immune A immune
response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect*
Immun. 69: 2762-2765, 2001.

このプログラムは、有限会社 ヘルスビジョンの企画のもとに構成
されています。講師は企画内容に基づいて講演を依頼されています。
演者（著者）個人と企業との利益相反関係については本文中に開示
されています。