

## 乳酸菌の抗アレルギー作用と アレルギー軽減用ペットフード素材としての利用性

飛田啓輔<sup>1,2</sup>・大谷 元<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院総合工学系研究科, 長野県上伊那郡南箕輪村8304

<sup>2</sup>株式会社キティー, 東京都新宿区荒木町5 SEIビル)

A possibility of utilization of lactic acid bacteria as pet food materials with anti-allergic effects

Keisuke Tobita<sup>1, 2</sup> and Hajime Otani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Graduate School of Science and Technology, Shinshu University,

Minamiminowa-mura 8304, Kamiina-gun, Nagano 399-4598, Japan

<sup>2</sup>Kitii Co., Ltd, SEI building, 5 Araki-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0007, Japan)

### Summary

The number of pet animals having type I allergic symptoms have increased under a change of breeding environments. The type I allergic disease is mainly discussed to be associable to a skewed T helper type 1 (Th1)/T helper type 2 (Th2) cell balance. In recent years, some investigators demonstrated that numerous lactic acid bacteria and their cellular components reduce allergic symptoms via not only shifting the Th1/Th2 balance from a Th2-dominant state to a Th1-dominant state but also inducing of regulatory T cells. On the other hand, lactic acid bacteria and their cell components are found to modulate immune responses via pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptor (TLR) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD). In our studies, it was suggested that *Lactobacillus crispatus* KT-11 strain reduced allergic symptoms in NC/Nga mice by the adjustment of Th1 and Th2 balance via TLR2, NOD1 and NOD2. It is known that PRRs express on intestinal tract in dogs and cats. Thus, it is expected that lactic acid bacteria may be a pet food materials for a reduction of allergic symptoms.

### はじめに

わが国では、少子高齢化を背景として若年層の高齢者医療費の負担が懸念されるために高齢者自らによる健康維持に関する意識の向上が望まれ、国策により食の健康面における重要性が唱えられている<sup>1)</sup>。そのような背景から乳酸菌は機能性食品の代名詞と言っても過言ではない状態にあり、経口摂取した乳酸菌が宿主に多くの有益な作用を生じることが周知のところである<sup>2)</sup>。

総務省統計局が発表した「2008年10月1日現在の推計人口」によると、0～14歳齢の年少人口は1,717万6千人であり<sup>3)</sup>、ペットフード協会が公表した2008年度に日本国内でペットとして飼育されているイヌおよびネコ

の累計は約2,683万頭である<sup>4)</sup>。このことは、ペットの飼育頭数が子供の人口をはるかに凌ぐことを示している。このようなペットブームの背景には、日本人の生活に経済的なゆとりができたことやメディアの影響により小型犬の愛くるしさに注目が集まりペットに癒しを求めらるようになったことが関係しているものと思われる。しかし、最近のペットを取り巻く様々な飼育環境の変化に基づき、Fig. 1に示すように、アレルギー性皮膚炎を患うイヌが小動物診療現場において多く観察されるようになってきている<sup>5)</sup>。そこで本稿では、乳酸菌の抗アレルギー作用に着目したペットフードの開発の可能性について考察する。

### アレルギー発症のメカニズムとその制御

アレルギーは、その発症のメカニズムの違いによりI型～IV型の4つに大別される<sup>6)</sup>。その中でも、わが国に

\* 連絡者 大谷 元  
(Fax : 0265-77-1430, e-mail : otani84@shinshu-u.ac.jp)  
2010年2月22日 受理

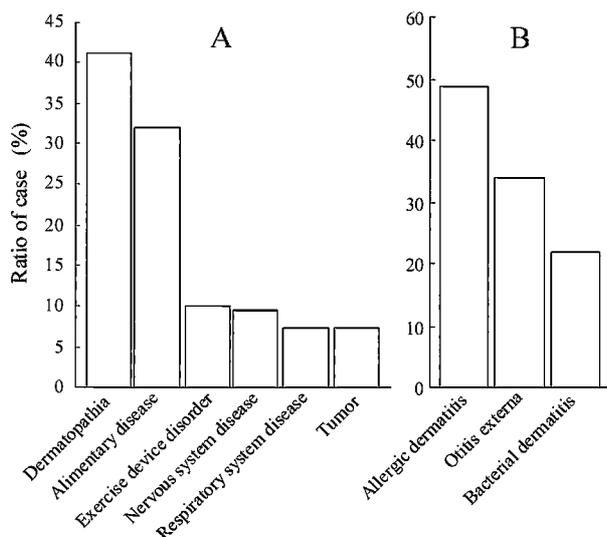


Fig. 1 The major disease (A) and type of dermatopathia (B) in pet dogs. The major disease was investigated for 543 dogs that have disease of something. The dermatopathia was investigated for 223 dogs diagnosed as dermatopathia. Data are including repetition data. The data are originated from Sonoda *et al.*<sup>5)</sup>.

おいてとりわけ患者数の多い花粉症やアトピー性皮膚炎はI型(即時性)アレルギーに分類される<sup>6)</sup>。通常、免疫系はそれに関与する物質により細胞性免疫機構と液性免疫機構に大別され、それらはヘルパーT細胞のサブセットであるI型ヘルパーT(Th1)細胞とII型ヘルパーT(Th2)細胞により調節されている<sup>7)</sup>。I型アレルギーの発症は、体外から侵入した抗原が抗原提示細胞によって捕食され、その抗原断片の提示を受けたヘルパーT細胞が優先的にTh2細胞に分化することから始まる。Th2細胞はインターロイキン(IL)-4, IL-5などのサイトカインを分泌し、それらのサイトカインの刺激を受けてB細胞は抗原に特異的な免疫グロブリン(Ig)Eを産生する<sup>8,9)</sup>。産生されたIgEは肥満細胞のFcε受容体に結合し、抗原が再び侵入してそのIgEに結合すると、それが引き金となり化学伝達物質であるヒスタミンやロイコトリエンが肥満細胞から大量に放出されてアレルギー症状を呈する<sup>10)</sup>。従来、寄生虫の排除機構として働いていたIgEが環境衛生面の向上により寄生虫の感染が減少することにより花粉やダニなど生活環境に存在する物質に過敏に反応するようになりアレルギー患者が増加したと考えられている<sup>11,12)</sup>。

1989年、StrachanはヘルパーT細胞のTh1細胞やTh2細胞への選択的な分化、すなわちTh1/Th2バランスがアレルギー患者ではTh2優位となることについて「衛生仮説」を提唱した<sup>13,14)</sup>。すなわち、胎児および新生児期の免疫応答はTh2優位になっているが<sup>15)</sup>、生後

の発達に伴い様々なウイルスや細菌の刺激により抗原提示細胞から産生されるIL-12がTh1細胞にインターフェロン(IFN)-γの産生を促し、そのIFN-γがTh2細胞から産生されるIL-4やIL-5を抑制することによりTh1/Th2バランスの是正が生じる<sup>16,17)</sup>。しかし、近年では抗生物質やワクチンの接種により、結核に代表されるTh1細胞分化を誘導する細菌の暴露やウイルス感染による機会が減少した。そのために、出生後の初期の時期に十分なTh1細胞への分化の刺激が得られず、Th2優位の状態が継続されることによりアレルギーを発症するというのである。

一方、最近では免疫応答を制御する調節性T細胞もアレルギーの発症に深く関係することが示されている。調節性T細胞はトランスフォーミング増殖因子(TGF)-βの高産生を特徴とするIII型ヘルパーT細胞(Th3)<sup>18)</sup>、IL-10の高産生を特徴とするI型調節性T細胞(Tr1)<sup>19,20)</sup>、フォークヘッドボックスP3(Foxp3)の発現を特徴とするCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性T細胞(Treg)<sup>21)</sup>などに分類される。これらの調節性T細胞は、過剰になった免疫応答を制御することにより免疫寛容を導くことが明らかにされ、アレルギーの発症抑制に関与していると考えられている<sup>22)</sup>。

#### 乳酸菌の抗アレルギー作用

近年、乳酸菌がI型アレルギーの症状改善、発症の遅延または予防を行うという報告が数多くなされている<sup>23,24)</sup>。抗アレルギー作用のメカニズムは主として実験用マウスを用いた経口投与試験により調べられている。NC/Nga系マウスは先天的に高いIgE産生能を有しており、ダニ抗原やピクリルクロライド(PiCl)に対して高い感受性を持っている。そのために、ダニ抗原に感作しやすい通常の環境下での飼育、ダニ抗原の連続塗布や皮内投与、PiClの連続塗布などにより、ヒトがアトピー性皮膚炎を生じた時と同じ状態になる<sup>25-27)</sup>。また、BALB/c系マウスは卵白アルブミン(OVA)、卵白オボムコイド(OVM)、ウシβ-ラクトグロブリン(β-LG)などを腹腔内投与すると、それらのタンパク質に対してアレルギー症状を呈するようになる<sup>28-32)</sup>。そのために、両マウスを用いた評価系により、Table 1に示すように、経口投与した乳酸菌の抗アレルギー作用が確認されている。Table 1から、乳酸菌の抗アレルギー作用はTh1型サイトカイン産生の促進とTh2型サイトカイン産生の抑制を介したTh1/Th2バランスの改善、ならびに調節性T細胞機能の亢進と関連付けられていることがわかる。

一方、最近になって免疫細胞は微生物やウイルス特有の構造パターンを認識して生体防御を担う受容体

Table 1 Anti-allergic effects of orally administered lactic acid bacteria in mice.

Lactic acid bacterium	Strain	Mouse used	Total IgE	Antigen-specific IgE	Anti-allergic factor	Reference
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	L-92	BALB/c	↓	↓ (anti-OVA)	Regulatory T cells (TGF- $\beta$ increased)	33
<i>Lactobacillus brevis</i>	SBC8803	BALB/c	↓	↓ (anti-OVA)	Improvement of Th1/Th2	31
<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota	BALB/c	↓	↓ (anti-OVA)	Improvement of Th1/Th2	34
<i>Lactobacillus crispatus</i>	KT-11	NC/Nga	—	↓ (anti-Df)	Improvement of Th1/Th2 35	
<i>Lactobacillus gasserii</i>	OLL2809	BALB/c	↓	n.d.	Improvement of Th1/Th2	36
<i>Lactobacillus paracasei</i>	KW3110	BALB/c	↓	↓ (anti-OVA)	Improvement of Th1/Th2	37
<i>Lactobacillus pentosus</i>	S-PT84	BALB/c	↓	↓ (anti-OVA)	Improvement of Th1/Th2	30
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRIC0380	BALB/c	n.d.	↓ (anti- $\beta$ -LG)	Regulatory T cells (IL-10 increased)	
					Improvement of Th1/Th2	32
					Regulatory T cells (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> cells increased)	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG	NC/Nga	—	n.d.	Regulatory T cells (IL-10 increased)	38
		BALB/c	↓	↓ (anti-OVA)	Regulatory T cells (TGF- $\beta$ -secreting CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T cells and Foxp3 expressions increased)	39
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	G50	BALB/c	↓	—(anti-OVM)	Improvement of Th1/Th2	29
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Th221	BALB/c	n.d.	↓ (anti-OVA)	Improvement of Th1/Th2	40

— : not significantly changed, ↓ : significantly changed, n.d. : not determined

Table 2 PRRs and their ligands.

Location of receptors	PRRs	Ligands	Species	
Cell surface	TLR1/2	Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	
		Peptidoglycan	Gram-positive bacteria	
	TLR2	Hemagglutinin	Viruses	
		Lipoarabinomannan	Mycobacteria	
		TLR2/6	Diacyl lipopeptides	Mycoplasma
		Lipoteichoic acid	Bacteria	
	TLR4	Lipopolysaccharide	Gram-negative bacteria	
		Envelope proteins	Viruses	
	Endosome	TLR5	Flagellin	Bacteria
		TLR3	Single-stranded RNA	Viruses
Double-stranded RNA			Viruses	
TLR7		Single-stranded RNA	Viruses	
TLR8		Single-stranded RNA	Viruses	
TLR9		CpG oligodeoxynucleotides	Bacteria and viruses	
Cytosol		NOD1	iE-DAP	Bacteria
		NOD2	MDP	Bacteria

(PRR) を有することが明らかにされた<sup>41,42)</sup>。Table 2 に示すように細胞膜上に発現する Toll 様受容体 (TLR) 1, 2, 4, 5 および 6 は主に菌体成分を, 細胞内エンドソームに発現する TLR3, 7, 8 および 9 は主に微生物やウイルスに特徴的な核酸の配列を認識する<sup>43)</sup>。また, 細胞内に存在するヌクレオチド多量体化ドメイン (NOD) ファミリーは, 微生物の細胞壁に含まれるペプチドグリカンの構成成分の一部である  $\gamma$ -D-グルタミル-メソ-ジ アミノピペリン酸 (iE-DAP) やムラミルジペプチド (MDP) を認識する<sup>44)</sup>。これら PRR に微生物やウイルスの特定成分が結合すると, 細胞内シグナル伝達経路を

介して核内転写因子である核内因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) やインターフェロン制御因子 (IRF) が活性化され, 前者では IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 および腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$  が, 後者では IFN- $\alpha/\beta$  の産生が誘導されることにより感染防御機構が成立すると考えられている<sup>45)</sup>。

Matsuguchi *et al.*<sup>46)</sup> は, *Lactobacillus casei* YIT9029 株 (YIT9029) および *Lactobacillus fermentum* YIT0159 株 (YIT0159) から精製したリポペプチド酸が, マウスマクロファージ様株化細胞である RAW264.7 細胞による TNF- $\alpha$  の産生を促すことを見出した。しかし, その活性は C57BL/6, C3H/HeN および C3H/HeJ 系マウ

脾臓細胞培養系では観察されるがTLR2欠損C57BL/6系マウスの脾臓細胞培養系では観察できなかった<sup>46)</sup>。そこで、彼らはCD14およびTLR2遺伝子導入細胞にYIT9029およびYIT0159を添加するとNF- $\kappa$ Bの活性化が観察されることを示すことにより、YIT9029およびYIT0159はTLR2を介してTNF- $\alpha$ 産生を促進すると結論づけた<sup>46)</sup>。Tohno *et al.*<sup>47)</sup>は、ブタPRR遺伝子導入細胞を用いて、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*が生産する菌体外多糖(EPS)がTLRファミリーであるRadioprotective 105 (RP105)/MD-1に認識されることに基づき、EPSをブタRP105/MD-1遺伝子導入細胞に添加するとIFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ およびIL-5遺伝子の発現は促されるが、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-13およびIL-18遺伝子の発現には影響を及ぼさないことから、EPSはRP105/MD-1を介してTh1およびTh2免疫応答を促進すると考察した<sup>47)</sup>。Shimosato *et al.*<sup>48)</sup>は、TLR9遺伝子導入細胞を用いて、乳酸菌の染色体ゲノムDNAのアデニン(A)とチミン(T)の並んだ特定の塩基配列がTLR9に結合してTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$ やIL-12の遺伝子およびタンパク質レベルでの発現を誘導することを示した。

以上のように、乳酸菌の構成成分やその産生物質が細胞分子レベルで免疫機能に影響を及ぼすことが明らかにされたことは、乳酸菌の抗アレルギー作用に関する知見の信頼性を高めるだけでなく、抗アレルギー作用を有する食品やペットフードを開発する上でも極めて意義深いものと考えられる。

#### 抗アレルギー作用を有したペットフード素材としての乳酸菌

イヌはヒトにとって最古の家畜であり、その起源は約3万年前に遡るが、イヌと同様にペットとして人気の高いネコは、その家畜化の歴史は浅く3500~4000年前からである<sup>49)</sup>。本来、イヌは番犬として、ネコはネズミの天敵として、私たちの生活に役立たせるために飼養が始まったと言われている<sup>49)</sup>。しかし、最近ではそれらイヌやネコは家族の一員として認識される傾向にあり、1970年代頃から欧米では食用にする産業動物と区別する目的で伴侶動物(コンパニオンアニマル)と称されるまでになった<sup>49)</sup>。

近年、わが国においては所得の上昇に伴う生活水準の向上などを背景にペットの飼育頭数は増加傾向にある。ペットフード協会の発表によると、2008年度のペットの飼育頭数はイヌでは約1,310万頭、ネコでは約1,373万頭になり、同協会による1994年度の調査報告と比較すると、イヌでは約1.4倍、ネコでは約1.8倍に増加している<sup>4)</sup>。さらに、飼い主がペットに対して同じ環境での生

活を望むようになったことからペットの飼育環境は室外から室内へと移行しつつあり、主に室外飼育とするイヌは約15%、ネコは約5%程度と言われている<sup>50)</sup>。このような背景から、最近では嗜好性や栄養価の高いペットフードの供給や生活様式の変化による運動量の減少により、ペットにおいてもヒトと同様に肥満、糖尿病、癌など様々な疾病の発生が多くなっている<sup>51)</sup>。

既に述べたように最近ではペット、特にイヌのアレルギー性皮膚炎が小動物診療現場において多く観察されるようになっている<sup>5)</sup>。また、ネコにおいても慢性的な掻痒を伴うアレルギー性皮膚炎や食物アレルギーの症例が報告されている<sup>52-54)</sup>。これらペットのアレルギー性皮膚炎の発症要因として、室内飼育、飼料の品質向上など環境衛生面の向上が考えられることから、衛生仮説に基づくアレルギーの発症であることが推察される。治療方法は、二次的な感染症であるマラセチアや濃皮症を治療した後、抗ヒスタミン剤、副腎皮質ホルモン剤などで症状の制御を行い、アレルギーの原因となっている抗原から遠ざけることが一般的である<sup>55)</sup>。しかし、一部の投薬は免疫力の低下を招くことから感染症やその慢性化を誘発するために、副作用が極めて少ない代替治療法が期待されている。最近では、ラクトフェリン、多価不飽和脂肪酸、ビタミン類、樹液エキス、カミツレ、ホヤ粉末、ハタケシメジなど食品やその構成成分が臨床データに基づき、ペットのアレルギー性皮膚炎を含む皮膚病の改善を目的としたサプリメント素材として利用されている<sup>56)</sup>。

Iwasaki *et al.*<sup>57)</sup>は、アトピー性皮膚炎罹患犬に対するIFN- $\gamma$ の投与がアトピー性皮膚炎の症状を改善することを報告している。この報告は、アトピー性皮膚炎罹患犬においてTh1免疫応答を促進させることにより、Th1/Th2バランスの改善を介してアトピー性皮膚炎の症状軽減に繋がることを示唆している。また、永田<sup>58)</sup>はペットとして飼育されているアトピー性皮膚炎罹患犬60頭を対象に各種抗原との皮内反応と血清抗原特異IgEレベルを調べ、いずれにおいてもダニ抗原に対して極めて高い陽性率を示すとともに、ダニ抗原の中でもとりわけコナヒョウヒダニ(*Dermatophagoides farinae*)に対して高い陽性率を示したことから、イヌのアトピー性皮膚炎の主要な原因物質としてコナヒョウヒダニを挙げている。

一方、ネコではヒトのアレルギー性皮膚炎罹患者と同様に、抗原特異IgEレベルの上昇および末梢血好酸球数の増加を伴うアレルギー性皮膚炎の症例が報告されている<sup>54,59)</sup>。また、Horvath<sup>60)</sup>は、アレルギー性皮膚炎に罹患したネコの大部分からネコノミ(*Ctenocephalides felis*)が分離されたことから、ネコのアレルギー性皮膚炎の主要な原因物質としてネコノミを挙げている。

Marsella<sup>61)</sup>は、*L. rhamnosus* GG 生菌を重篤なアトピー性皮膚炎を患う妊娠ビーグル種およびその出産後の仔イヌに投与したところ、投与していない仔イヌと比較してアレルギー症状では統計的に有意な軽減作用は見られなかったが、Df に対する血清 IgE レベルの低下および皮内反応を呈する仔イヌの数が減少したと報告している。すなわち、*L. rhamnosus* GG の経口投与はアトピー性皮膚炎の予防およびアレルギー症状の軽減に寄与することが示唆される。

以上のことから、乳酸菌はアレルギー罹患ペットのための抗アレルギーペットフード素材としての利用が期待できる。しかし、ペットにおいて乳酸菌の抗アレルギー作用を調べた臨床試験は、まだまだ少ないのが実情である。

#### 乳酸菌を用いた抗アレルギーペットフードの開発に向けて

既に述べたように、経口的に投与した乳酸菌の免疫調節作用を期待する場合、消化管において TLR, NOD ファミリーなどの PRR に、乳酸菌体またはその構成成分の一部が認識されることが不可欠である。イヌおよびネコでは、これら受容体分子の腸管における遺伝子発現について報告されている<sup>62-67)</sup>。

Ignacio *et al.*<sup>64)</sup>は、1~1.5歳齢 SPF ネコの TLR1~9 の遺伝子発現量を調べ、小腸上皮細胞間リンパ球において TLR1, 4 および 6 を除く TLR 遺伝子の発現を、また小腸粘膜固有層リンパ球において TLR1 および 6 を除く TLR 遺伝子の発現を観察している。Asahina *et al.*<sup>62)</sup>はネコの大腸において TLR4 遺伝子の強い発現を、また小腸において弱い発現を観察した。

一方、イヌの小腸では TLR2, 4 および 7 遺伝子の発現が観察されるが TLR9 遺伝子の発現は観察されないこと、大腸では TLR2 および 7 遺伝子の発現は観察されるが TLR4 および 9 遺伝子の発現は観察されないことが報告されている<sup>62,63,65,67)</sup>。Swerdlow *et al.*<sup>68)</sup>は 6~8 週齢のイヌから分離した大腸上皮細胞において TLR2, 4 および NOD2 遺伝子の発現を観察している。また、Burgener *et al.*<sup>66)</sup>は、イヌの十二指腸および大腸で TLR9 遺伝子の発現を観察している。すなわち、イヌやネコの腸管においても多様な PRR 分子が存在することは明らかであり、経口的に投与した乳酸菌を介してアレルギーの予防や軽減が期待できる。

著者らは、Fig. 2 に示すようにマウス脾臓細胞培養系において *Lactobacillus* (*L.*) *acidophilus* および *L. crispatus* の標準菌株よりも Th1 免疫応答を強く誘導する加熱処理 *L. crispatus* KT-11 株を、コナヒョウヒダニ抽出物の連続皮内投与によりアトピー性皮膚炎症状を発症した NC/Nga 系マウスに経口投与すると、非投与マウスと

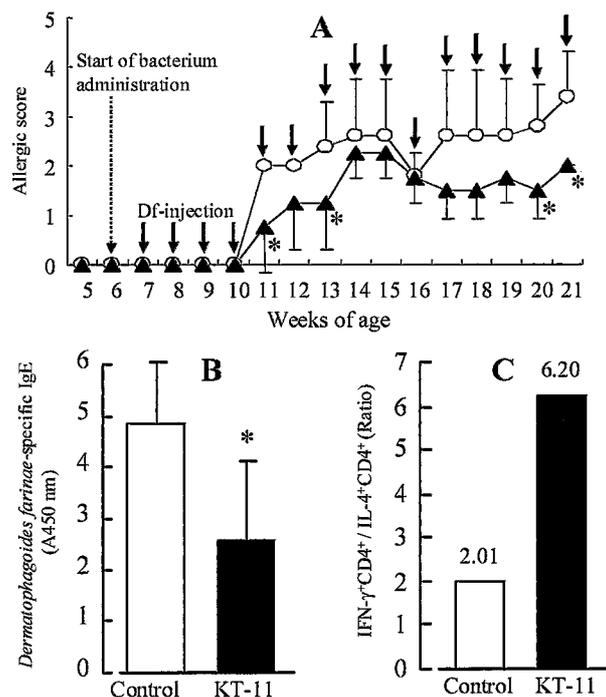


Fig. 2 Total allergic scores (A), serum levels of *Dermatophagoides farinae*-specific IgE (B) and ratio of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> spleen cells (C) of NC/Nga mice administered with *L. crispatus* KT-11. The bacterium was given every day from 6 weeks of age. ○: Control (saline 500  $\mu$ L/mouse), ▲: KT-11 (1 mg/saline 500  $\mu$ L/mouse). The degree of erythema, hemorrhaging, edema, scab/excoriation and scaling/dryness was scored from 0 points (none) to 2 points (severe). Serum levels of *Dermatophagoides farinae*-specific IgE and ratio of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> spleen cells were investigated at 21-week old mice. Df-specific IgE levels were determined by ELISA. The number of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells was determined using Guava PCA. The IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell ratio was calculated from the mean IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell number against the mean IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell number. The data is presented as mean  $\pm$  SD. \* $P$  < 0.05 (compared to control).

比較してアレルギー症状の軽減、血清抗コナヒョウヒダニ特異 IgE レベルの減少および脾臓 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 細胞比の上昇を観察した<sup>35)</sup>。また、Fig. 3 に示すように *L. crispatus* KT-11 株を添加したマウスパイエル板細胞培養系において、TLR2, NOD1 および NOD2 の遺伝子発現量が無添加の場合と比較して有意に増加することを明らかにした<sup>35)</sup>。これらの結果は、腸管のパイエル板から取り込まれた *L. crispatus* KT-11 株は、TLR2, NOD1 あるいは NOD2 を刺激することにより Th1 免疫応答を増強し、Th1/Th2 バランスの改善を介してアレルギー症状を軽減することを示唆するものであり、アレルギー性皮膚炎に苦しむペットのための抗アレルギー作用を有したペットフード素材として利用が

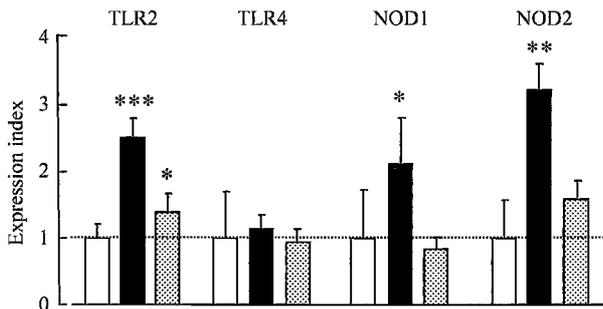


Fig. 3 Expression indexes of TLR2, TLR4, NOD1 and NOD2 mRNAs in C3H/HeN mouse Peyer's patch cells cultured with heat-treated *L. crispatus* KT-11 or JCM1185<sup>T</sup>. Peyer's patch cells were cultured without bacterium (control) or with 100  $\mu$ g/mL bacteria for 3 hr. The expression of TLR2, TLR4, NOD1 and NOD2 mRNAs was analyzed using real time RT-PCR. The data is presented as mean  $\pm$  SD. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 (compared to control).

大いに期待される。現在、本菌株の臨床的効果の検討を進めている。なお、*L. crispatus* は、*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. gasseri*, *L. gallinarum* および *L. johnsonii* と同様に、*L. acidophilus* グループに属する乳酸菌である<sup>69)</sup>。*L. acidophilus*, *L. gasseri* および *L. johnsonii* は、アレルギーモデルマウスに経口投与するとアレルギー応答を減少させることが報告されている<sup>33,36,70)</sup>。著者らの結果は、*L. crispatus* も *L. acidophilus* グループに属する他の乳酸菌と同様に、抗アレルギー作用を有することを示すものである。Ishida *et al.*<sup>71)</sup> は乳酸菌の免疫調節活性の強弱が菌種ではなく菌株に依存することを報告している。*L. crispatus* KT-11株は、マウス脾臓細胞培養において *L. acidophilus* および *L. crispatus* 標準菌株と比べて Th1 免疫応答を強く誘導したことから、*L. acidophilus* グループまたは *L. crispatus* 種としてではなく、KT-11株として強い Th1 免疫誘導活性を有するものと考えられる。

#### おわりに

2007年に米国等において有害物質であるメラミンが混入したペットフードが原因となり、多数のイヌおよびネコが死亡する事故が発生した。そのために、わが国においてもメラミン混入ペットフードの輸入販売の禁止に至ったことの報道は記憶に新しいことと思う。メラミン問題を受け、わが国では農林水産省および環境省が合同で識者による「ペットフードの安全確保に関する研究会」を設置し、2009年6月1日からはペットフードの安全性の確保を図るため、「愛玩動物用飼料の安全確保に関する法律（ペットフード安全法）」の施行に至って

いる。このような背景から、ペットフードやペットのサプリメントの規格や安全性の基準が厳しく監視されるようになっただけでなく、市場においてもペットフードやサプリメントに対して高い安全性とエビデンスの信頼性が望まれている。

乳酸菌の抗アレルギー作用に関する研究は、培養細胞やマウスを用いた実験から始まりヒトでの臨床試験にまで至っており、乳酸菌は免疫機能を調節する食品素材として確固たる地位を築いている。乳酸菌の持つアレルギー軽減メカニズムとペットの免疫系を考えると、ペットのアレルギーの軽減を目的とした乳酸菌の利用を多くに期待するところである。

#### 引用文献リスト

- 1) 内閣府：「平成21年版 食育白書」, 日経印刷, 東京, pp. 78-104 (2009).
- 2) Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., and Kim, H. Y.: Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 1171-1185 (2006).
- 3) 総務省統計局：「平成20年10月1日現在推計人口」, 総務省統計局 HP, URL: <http://www.stat.go.jp/data/jinsui/pdf/2008.pdf> (2008).
- 4) ペットフード協会：「第15回 犬猫飼育率全国調査」, ペットフード協会 HP, URL: <http://www.petfood.or.jp/data/chart2008/index.html> (2009).
- 5) 園田開・林屋早苗・林屋牧男・長谷川篤彦：一動物病院における犬のアレルギー性皮膚炎の発症状況. *獣医臨床皮膚科*, **11**, 199-204 (2005).
- 6) Riedl, M. A., and Casillas, A. M.: Adverse drug reactions: types and treatment options. *Am. Fam. Physician.*, **68**, 1781-1790 (2003).
- 7) Mosmann, T. R., and Coffman, R. L.: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**, 145-173 (1989).
- 8) Rousset, F., Robert, J., Andary, M., Bonnin, J. P., Souillet, G., Chrétien, I., Brière, F., Pène, J., and Vries, J. E.: Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **87**, 58-69 (1991).
- 9) Vercelli, D.: Regulation of IgE synthesis in humans. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **9**, 1-6 (1995).

- 10) Metcalfe, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A.: Mast cells. *Physiol. Rev.*, **77**, 1033–1079 (1997).
- 11) Bell, R. G.: IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol. Cell Biol.*, **74**, 337–345 (1996).
- 12) Reddy, A., and Fried, B.: Atopic disorders and parasitic infections. *Adv. Parasitol.*, **66**, 149–191 (2008).
- 13) Strachan, D. P.: Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Med. J.*, **299**, 1259–1260 (1989).
- 14) Strachan, D. P.: Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*, **55**, S2–S10 (2000).
- 15) Prescott, S. L., Macaubas, C., Holt, B. J., Sinallacmbe, T. B., Loh, R., Sly, P. D., and Holt, P. G.: Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J. Immunol.*, **160**, 4730–4737 (1998).
- 16) Backman, A., Bjorksten, F., Ilmonen, S., Juntunen, K., and Suoniemi, I.: Do infections in infancy affect sensitization to airborne allergens and development of atopic disease? A retrospective study of seven-year-old children. *Allergy*, **39**, 309–315 (1984).
- 17) Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Murphy, K. M., and O’Garra, A.: Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN- $\gamma$  production is IFN- $\gamma$ -dependent. *Int. Immunol.*, **5**, 1119–1128 (1993).
- 18) Weiner, H. L.: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- $\beta$ -secreting regulatory cells. *Microbes Infect.*, **3**, 947–954 (2001).
- 19) Groux, H., O’Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G.: A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, **389**, 737–742 (1997).
- 20) Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M. K.: Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.*, **182**, 68–79 (2001).
- 21) Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y.: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, **4**, 330–336 (2003).
- 22) Akdis, C. A., and Akdis, M.: Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **123**, 735–746 (2009).
- 23) Shida, K., and Nanno, M.: Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol.*, **29**, 565–573 (2008).
- 24) Ouwehand, A. C.: Antiallergic effects of probiotics. *J. Nutr.*, **137**, 794S–797S (2007).
- 25) Sasakawa, T., Higashi, Y., Sakuma, S., Hirayama, Y., Sasakawa, Y., Ohkubo, Y., Goto, T., Matsumoto, M., and Matsuda, H.: Atopic dermatitis-like skin lesions induced by topical application of mite antigens in NC/Nga mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **126**, 239–247 (2001).
- 26) Matsuoka, H., Maki, N., Yoshida, S., Arai, M., Wang, J., Oikawa, Y., Ikeda, T., Hirota, N., Nakagawa, H., and Ishii, A.: A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy*, **58**, 139–145 (2003).
- 27) Ohmura, T., Tsunenari, I., Hayashi, T., Satoh, Y., Konomi, A., Nanri, H., Kawachi, M., Morikawa, M., Kadota, T., and Satoh, H.: Role of substance P in an NC/Nga mouse model of atopic dermatitis-like disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **133**, 389–397 (2004).
- 28) Saito, H., Howie, K., Wattie, J., Denburg, A., Ellis, R., Inman, M. D., and Denburg, J. A.: Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis. *Immunology*, **104**, 226–234 (2001).
- 29) Kimoto, H., Mizumachi, K., Okamoto, T., and Kurisaki, J.: New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol. Immunol.*, **48**, 75–82 (2004).
- 30) Nonaka, Y., Izumo, T., Izumi, F., Maekawa, T., Shibata, H., Nakano, A., Kishi, A., Akatani, K., and Kiso, Y.: Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **145**, 249–257 (2008).
- 31) Segawa, S., Nakakita, Y., Takata, Y., Wakita, Y., Kaneko, T., Kaneda, H., Watari, J., and Yasui H.: Effect of oral administration of heat-killed *Lac-*

- tobacillus brevis* SBC8803 on total and ovalbumin-specific immunoglobulin E production through the improvement of Th1/Th2 balance. *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 1–10 (2008).
- 32) Enomoto, M., Noguchi, S., Hattori, M., Sugiyama, H., Suzuki, Y., Hanaoka, A., Okada, S., and Yoshida, T.: Oral Administration of *Lactobacillus plantarum* NRIC0380 Suppresses IgE Production and Induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Cells *in Vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 457–460 (2009).
- 33) Torii, A., Torii, S., Fujiwara, S., Tanaka, H., Inagaki, N., and Nagai, H.: *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergol. Int.*, **56**, 293–301 (2007).
- 34) Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., and Yokokura, T.: The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.*, **81**, 48–53 (1998).
- 35) Tobita, K., Yanaka, H., and Otani, H.: Heat-treated *Lactobacillus crispatus* KT strains reduce allergic symptoms in mice. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5586–5590 (2009).
- 36) Sashihara, T., Sueki, N., and Ikegami, S.: An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J. Dairy Sci.*, **89**, 2846–2855 (2006).
- 37) Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T.: The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **135**, 205–215 (2004).
- 38) Sawada, J., Morita, H., Tanaka, A., Salminen, S., He, F., and Matsuda, H.: Ingestion of heat-treated *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Clin. Exp. Allergy*, **37**, 296–303 (2007).
- 39) Feleszko, W., Jaworska, J., Rha, R. D., Steinhausen, S., Avagyán, A., Jaudszus, A., Ahrens, B., Groneberg, D. A., Wahn, U., and Hamelmann, E.: Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin. Exp. Allergy*, **37**, 498–505 (2007).
- 40) Masuda, S., Yamaguchi, H., Kurokawa, T., Shirakami, T., Tsuji, R. F., and Nishimura, I.: Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 245–252 (2008).
- 41) Kawai, T., and Akira, S.: The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.*, **21**, 317–337 (2009).
- 42) Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S.: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 621–625 (2009).
- 43) Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783–801 (2006).
- 44) Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., and Girardin, S. E.: Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.*, **7**, 1250–1257 (2006).
- 45) Kawai, T., and Akira, S.: TLR signaling. *Semin. Immunol.*, **19**, 24–32 (2007).
- 46) Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., and Yoshikai, Y.: Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 259–266 (2003).
- 47) Tohno, M., Shimazu, T., Ueda, W., Anzawa, D., Aso, H., Nishimura, J., Kawai, Y., Saito, Y., Saito, T., and Kitazawa, H.: Molecular cloning of porcine RP105/MD-1 involved in recognition of extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Mol. Immunol.*, **44**, 2566–2577 (2007).
- 48) Shimosato, T., Kitazawa, H., Katoh, S., Tohno, M., Iliev, I. D., Nagasawa, C., Kimura, T., Kawai, Y., and Saito, T.: Augmentation of T(H)-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 782–787 (2005).
- 49) 鈴木立雄：イヌおよびネコという動物。ペット栄養学会誌，**2**，16–24 (1999)。
- 50) 大木富雄：「ペットフード・ペットビジネスの動向」，シーエムシー出版，東京，pp. 1–11 (2007)。
- 51) 古瀬充宏・村井篤嗣：イヌとネコの肥満。ペット栄養学会誌，**2**，78–86 (1999)。
- 52) Roosje, P., Whitaker-Menezes, D., Goldschmidt, M., Moore, P., Willemsse, T., Murphy, G.: Feline atopic dermatitis: A model for Langerhans cell par-

- icipation in disease pathogenesis. *Am. J. Pathol.* **154**, 927-932 (1997).
- 53) Roosje, P., Dean, G., Willemse, T., Rutten, V., Thepen, T.: Interleukin 4-producing CD4<sup>+</sup>T cells in the skin of cats with allergic dermatitis. *Vet. Pathol.* **39**, 228-233 (2002).
- 54) Reinerer, C. R.: Feline immunoglobulin E: historical perspective, diagnostics and clinical relevance. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **132**, 13-20 (2009).
- 55) Scott, D. W., Miller, W. H., and Griffin, C.: Skin immune system and allergic skin disease. in *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. 6th ed, Saunders, Philadelphia, PA, pp. 543-666 (2001).
- 56) 内野富弥: 獣医療のサプリメントの現状と今後の動物サプリメントのあり方. *Food Style* **21**, **10**, 48-52 (2006).
- 57) Iwasaki, T., Park, S. J., Kagawa, N., Kanazawa, N., Mori, T., Kubo, T., Momoi, Y., and Tanikawa, H.: Effect of treatment with recombinant canine IFN- $\gamma$  on the clinical signs, histopathology and Th1/Th2-cytokine mRNA profiles in Shih Tzu dogs and a Basset hound with atopic dermatitis. *Adv. Vet. Dermatol.* **5**, 82-88 (2004).
- 58) 永田雅彦: 犬のアトピー性皮膚炎に關与する抗原. *日本獣医師会雑誌*, **52**, 658-660 (1999).
- 59) Roosje, P. J., Thepen, T., Rutten, V. P., van den Brom, W. E., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Willemse, T.: Immunophenotyping of the cutaneous cellular infiltrate after atopy patch testing in cats with atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **101**, 143-151 (2004).
- 60) Horvath, C.: 猫のノミアアレルギー性皮膚炎. *ViVed.* **3**, 321-327 (2007).
- 61) Marsella, R.: Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **70**, 735-740 (2009).
- 62) Asahina, Y., Yoshioka, N., Kano, R., Moritomo, T., and Hasegawa, A.: Full-length cDNA cloning of Toll-like receptor 4 in dogs and cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **96**, 159-167 (2003).
- 63) Hashimoto, M., Asahina, Y., Sano, J., Kano, R., Moritomo, T., and Hasegawa, A.: Cloning of canine toll-like receptor 9 and its expression in dog tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **106**, 159-163 (2005).
- 64) Ignacio, G., Nordone, S., Howard, K. E., and Dean, G. A.: Toll-like receptor expression in feline lymphoid tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **106**, 229-237 (2005).
- 65) Ishii, M., Hashimoto, M., Oguma, K., Kano, R., Moritomo, T., and Hasegawa, A.: Molecular cloning and tissue expression of canine Toll-like receptor 2 (TLR2). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **110**, 87-95 (2006).
- 66) Burgener, I. A., König, A., Allenspach, K., Sauter, S. N., Boisclair, J., Doherr, M. G., and Jungi, T. W.: Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, **22**, 553-560 (2008).
- 67) Okui, Y., Kano, R., Maruyama, H., and Hasegawa, A.: Cloning of canine Toll-like receptor 7 gene and its expression in dog tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **121**, 156-160 (2008).
- 68) Swerdlow, M. P., Kennedy, D. R., Kennedy, J. S., Washabau, R. J., Henthorn, P. S., Moore, P. F., Carding, S. R., and Felsburg, P. J.: Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **114**, 313-319 (2006).
- 69) Cato, E. P., Moore, W. E. C., and Johnson, J. L.: Synonymy of strains of "Lactobacillus acidophilus" group A2 (Johnson *et al.* 1980) with the type strain of *Lactobacillus crispatus* (Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 426-428 (1983).
- 70) Inoue, R., Nishio, A., Fukushima, Y., and Ushida, K.: Oral treatment with probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) for a specific part of the weaning period prevents the development of atopic dermatitis induced after maturation in model mice, NC/Nga. *Br. J. Dermatol.* **156**, 499-509 (2007).
- 71) Ishida, Y., Bandou, I., Kanzato, H., and Yamamoto, N.: Decrease in ovalbumin specific IgE of mice serum after oral uptake of lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 951-957 (2003).