牛乳中に含まれる自然抗体の腸内細菌叢に及ぼす影響

岩附 聡, 木島佳子, 塩野谷博*

アサマ化成株式会社

Effect of Natural Milk Antibodies on Intestinal Flora

Satoshi Iwatsuki, Yoshiko Kijima and Hiroshi Shionoya*

Asama Chemical Co., Ltd., 20-3, Nihonbashi Kodenma-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0001

The intake of antibodies in the diet is expected to improve intestinal flora and to have an effect against human pathogens, but reports in this field are scarce. We administered whey protein concentrate (WPC) that was rich in natural milk antibodies against human pathogens to healthy elderly volunteers and analyzed fecal flora by T-RFLP and FISH. T-RFLP data for the intestinal flora showed the presence of 29 bacterial operational taxonomic units (OTUs). The administration of milk antibodies for 3 weeks resulted in the reduction of OTU 369 (*Clostridium* cluster IV), OTU 469 (*Bacteroides*), and OTU 853 (*Bacteroides*), and the increase in OTU 366 (*Bacteroides*), OTU 443 (unidentified bacteria) and OTU 995 (*Clostridium* subcluster XIVa). *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* were not influenced by the administration of milk antibodies. For FISH, fecal samples obtained for 8 weeks of WPC treatment were analyzed for bacterial counts by 16S rRNA hybridization. No effect was observed on number of total bacteria and *Bifidobacteria* were observed. However, numbers of *E. coli*, *Clostridium difficile* and *C. perfringens* decreased. In contrast, *Lactobacilli*, *Bacteroides* spp., *Prevotella*, and *Bacteroides fragilis* increased. Measurement of milk IgG in feces following administration of 320 mg of bovine immunoglobulin showed that 800 µg (0.24%) was recovered. The influence of administration of milk antibodies on intestinal bacterial flora was discussed from the aspects of endotoxin translocation and improvement of rheumatoid arthritis.

(Received Sep. 28, 2010 ; Accepted Feb. 17, 2011)

Keywords : natural milk antibodies, whey protein concentrate, intestinal microflora, bacterial toxin, translocation

キーワード : ミルク抗体, 乳清タンパク濃縮物, 腸内細菌, エンドトキシン, トランスロケーション

ヒト腸内には1000種以上, 総細菌数で 1×10^{14} 個に及ぶ腸内細菌が常在し, その構成は個人差が大きいが個々人で安定した状態を保っていると考えられ, 腸内細菌叢といわれる^{1)~3)}. 正常な腸内細菌叢は健康維持に不可欠の要因であり, そのバランスの崩壊は多くの健康障害の原因となることが知られている^{4)~6)}. 腸内細菌叢は健康維持増進に作用するとされる細菌種(ビフィズス菌, 乳酸菌など), ホストの免疫低下時に病原菌としても作用する日和見細菌(大腸菌, プロテウス菌など)と有害菌(病原性大腸菌など)の3つに分類され, 一定のバランスを取りつつホストと共存している. 腸内細菌叢に影響する要因としては薬剤⁵⁾, 食事⁵⁾⁶⁾, ストレス⁵⁾, 遺伝形質(白血球型, HLA)⁷⁾⁸⁾, 年齢⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾, 抗体^{11)~14)}などがある.

腸内細菌叢の異常としては下痢がその代表例であるが, それに対して, ウシ初乳中に含まれる抗体, 特に消化管病原微生物のワクチン接種をしたウシ由来の初乳, またはそ

れから得られた免疫グロブリン画分が有効であることが知られている¹¹⁾. しかし, 従来のミルク抗体の腸内細菌に対する効果は, 特定の病原微生物に対する効果や, エイズ患者における下痢症など, 特定の疾病を対象にしたものが主であり¹¹⁾, 健康人において, 腸内細菌叢全般を対象にした研究は, 我々が知る限り見当たらない.

生乳中の免疫グロブリンはIgGが主体で, その濃度は0.03~0.7 mg/mlである¹⁵⁾. チーズ製造に際して, チーズとなる固形物採取で残る水溶液が乳清で, 抗体は乳清に残存する. 乳清より乳糖と水分を除去した乳清蛋白中に抗体は濃縮される. 我々はミルク抗体の資源として, 乳清蛋白濃縮物(以下WPCと略称する)に注目し, 様々なWPC中の抗体含量を調べると, 検出限界以下から5%台まで分布し, その含量の差異は抗体蛋白の熱変性が関係していると思われた. 抗体の特異性をヒト由来の33株の各種病原菌に対して調べると, それらの全ての病原細菌に対する抗体があり, さらにエンドトキシン, ブドウ球菌エンテロトキシンなどの細菌毒素に対する抗体も含まれていた¹⁶⁾. 今日

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 20-3

* 連絡先 (Corresponding author), h.shionoya@asama-chemical.co.jp

まで、我々は、特別なワクチン接種を受けないウシ由来のミルク抗体の関節リウマチへの効果を検討し、ミルク抗体が関節リウマチの改善に有用であることを見いだした^{17)~19)}。本試験ではミルク抗体の有用性をさらに明らかにするため、WPCを健康な中高年のボランティアに投与し、腸内細菌叢に及ぼす効果を調べた。

実験方法

1. 自然抗体含有乳清蛋白

ヒト病原細菌に対し、高い抗体価を含有する乳清蛋白製品（アサマ化成）、WPC6を用いた。その免疫グロブリン含有量は3.2%、ヒト由来病原菌33種に対する平均抗体含有量はWPC6の1g中525.2μgの製品である¹⁶⁾。

2. 対象

健康な47名のボランティアを対象者とした。対象者にはヘルシンキ宣言の精神に則り、あらかじめ文書にて詳細な試験内容の説明を行い、試験参加への同意を文書にて得た。対象者には降圧剤など腸内細菌叢に特に影響しないとされる医薬品を常用している者や、納豆、ヨーグルトなど生菌を含む食品を習慣的に用いている者も含まれるが、乳酸菌製剤を常用する者は除外した。対象者は10gのWPC6を、水またはぬるま湯に懸濁し、1日1回摂取した。摂取時刻は指定せず、食前、食間、食後、空腹時（起床時）など、各自が決めた一定の時間に摂取してもらった。摂取期間はT-RFLP法試験（後述）では21日間、FISH法試験（後述）では2週間の摂取後、2週間休止を2回繰り返し、8週間とした。糞便はT-RFLP法試験では試験開始日と終了日に採取し、FISH法では2週おきに5回採取した。糞便は糞便採取用プラスチック容器K1012（アズワン）に採取し、冷蔵保存で1両日中に送付され、分析までの期間、冷凍状態で保存した。

T-RFLP法による分析の対象者は18名で、年齢は20～65歳、男性11名、女性7名で、平均年齢49.4±15.8歳（SD）であった。FISH法による試験に際しては、高齢化に伴いウェルシュ菌の増加が知られているので⁴⁾、60代が中心になるように対象者を選び、対象者は年齢範囲36～82歳の29名、男性17名、女性12名で、平均年齢61.7±12.3歳であった。試験計画の概要を図1に示した。

3. 腸内細菌叢の変動の解析

腸内細菌叢の分析はT-RFLP解析とFISH法を用いた。

(1) T-RFLP解析による細菌叢の分析

細菌の16SrDNA遺伝子は菌種により異なる約1600の塩基配列の遺伝子で、細菌の分類同定と菌数または菌量の測定に、培養法に代わって用いられている。T-RFLP（Terminal restriction fragment length polymorphism）解析とは、この16SrDNA遺伝子を、蛍光標識プライマーを用いてPCRで増幅後、制限酵素Bsl Iで切断し、菌種ごとに異なる長さの標識断片を、電気泳動により分析するものである。糞便検体分析は株式会社テクノスルガ（現株式会社テクノスルガ・ラボ、沼津市、静岡県）にて、Nagashimaらの方法²⁰⁾によって実施した。制限酵素による切断で生ずるDNA断片の長さはOTU（Operational Taxonomic Unit（操作的分類単位））により示した。OTUは菌種を、そのOTUにおける電気泳動DNA断片の蛍光密度（ピーク面積）はある程度菌数を反映する。OTUは16SrDNAの制限酵素断片であるので、別属の細菌が同一の長さの断片となる場合、または電気泳動で重なる場合があり、必ずしも単一の菌分類を示すものではない。そこで、結果の表現にはOTU番号とそのOTU番号が示す菌の分類群を記載した。DNA切片的解析はABI PRISM 310 DNA Sequencer（Applied Biosystems, CA, USA）およびGene Scan（Applied Biosystems, CA, USA）を用いて行い、電気泳動のピーク面積の合計を100とし、それに対する各OTUのピーク面積の割り合いを占有率として表した。

(2) FISH法による細菌叢の分析

FISH（Fluorescence in situ hybridization）法はそれぞれの細菌の16SrRNAに相補性を持つ蛍光標識プローブを用いて、細菌のリボソームRNAを直接染色し、染色された菌数を顕微鏡下でカウントするもので、Ribo Technologies社（City, Netherlands）のキットを用い、キット添付の方法により染色された菌数を計測した。凍結糞便を解凍し、約0.5gを正確に秤取した。これをキットに添付された緩衝液4.5mlと径3mmのガラスビーズを加え懸濁し、沈殿物を除去した。上清中に含まれる菌をホルムアルデヒド固定し、洗浄した。次いで、プローブを加え、菌体のリボソームRNAとハイブリダイズし、顕微鏡（オリンパス

図1 ミルク抗体摂取試験計画の概要

BX41, 接眼レンズ WH15x, 対物レンズ UPlanFI100x, 蛍光ミラーユニット NIBA および WIG) で染色された菌数を計測した。菌数は、顕鏡視野に 20 細胞以上の場合には 10 視野につき、20 細胞未満の場合は 20 視野につき細胞数を計測し、1 視野中の平均細胞数を算出した。1 視野中の平均細胞数が 1 未満の場合は 1 視野に 1 細胞が存在したとして対数計算を行った。今回の測定における検出限度は、ビフィズス菌、乳酸桿菌は 4×10^7 , ウェルシュ菌は 2.6×10^6 , ディフィシル菌は 2×10^6 であった。

FISH 法と T-RFLP 解析を比べると、T-RFLP 解析では、腸内細菌叢のうち、0.1% 以上を占める細菌の動態を全体的に、手軽に解析できる特徴があるが、ウェルシュ菌など、全体から見て 0.1% 以下の細菌の動態を知ることは難しい。また、16SrDNA の PCR 増幅産物の制限酵素断片が、菌種が異なっても重なって電気泳動分離される場合があり、その場合の変動の解析が困難である。これに対し、FISH 法では、手間はかかるが、大腸菌、ウェルシュ菌など、全体的には少数であっても選択した特定の細菌の動態を知ることができる利点がある。

4. 糞便中のウシ IgG の測定

糞便約 0.5 g を正確に秤量し、径 3 mm のガラスビーズとキットに添付された緩衝液 4.5 ml を加えて懸濁後、10000 回転で 10 分間遠心した。その上清を無菌ろ過し、1/10 量のウサギ血清を加え凍結保存し、ウシ IgG の測定に供した。抗ウシ IgG ウサギ抗体 (シバヤギ) を 0.1 M 炭酸緩衝液 pH 9.5 に 25 µg/ml となるように希釈し、その 50 µl を 96 穴の ELISA プレート (Nunc) のウェルに加え、37°C で 1 時間コートした。ウェルを洗浄後、10% ウサギ血清含有リン酸緩衝液 100 µl を加え、37°C 1 時間処理してブロックした。検体はすべて緩衝化ウサギ血清で 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍に希釈し、その 50 µl を各ウェルに加え、37°C で 1 時間反応した。次いで、HRP 標識抗ウシ IgG ウサギ抗体 (Bethyl) を 10% ウサギ血清含有リン酸緩衝液にて 5000 倍希釈し、その 50 µl を加え、37°C で 1 時間反応した。ELISA プレートは OPD (Sigma) を用い発色させ、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Model 550) で 490 nm における吸光度測定し、精製抗大腸菌 O111 LPS 抗体¹⁶⁾ を標準品とする検量線とソフト Bio-Rad, Microplate Manager III により糞便ミルク抗体濃度を算出した。

5. 統計解析

T-RFLP 解析結果はそれぞれの OTU の占有率を% で示し、各測定値と平均値 ± SD で示した。ミルク抗体摂取開始日と 21 日の 18 例の糞便中のそれぞれの占有率の変化を t 検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

FISH 法による分析については、各プローブで得られた絶対菌数を対数変換し、個々の値とそれぞれの平均値 ± SD で示した。糞便菌数の変化は ANOVA の Bonferroni correction 比較により摂取開始日に対して 2, 4, 6, 8 週後

の菌数値を検定した。ミルク抗体のウェルシュ菌に対する効果を、各種解析のカテゴリーにより比較した検定は t 検定によった。

実 験 結 果

1. T-RFLP 解析による細菌叢分析結果

PCR により増幅した腸内細菌の 16S リボソーム遺伝子の制限酵素 *Bst* I による切断フラグメントを電気泳動分析により、糞便中の細菌は、OTU106 から OTU990 の 29 の OTU 値を持つ細菌群に分類された。

これらの OTU について、18 名の対象者の占有率をミルク抗体の 3 週間摂取前後で比較した。その結果を表 1 に示した。

ミルク抗体の摂取は OTU124 (ビフィズス菌), OTU332; OTU517; OTU657 (乳酸桿菌) および OTU144; OTU317 (プレボテラ) の占有率に対して影響は認められなかった。また、占有率が有意に減少した OTU が 3 グループ、増加した OTU も 3 グループ見出された。即ち、摂取前の占有率の割合を 100% として OTU369 (クロストリジウムクラスター IV) が 74% ($p=0.0015$), OTU469 (バクテロイデス) が 69% ($p=0.0039$), OTU853 (バクテロイデス) が 46% ($p=0.031$) と減少した。一方、OTU955 (クロストリジウムサブクラスター XIVa) が 119% ($p=0.028$), OTU366 (バクテロイデス) が 208% ($p=0.039$), 菌名が未定の OTU443 が 203% ($p=0.013$) に増加した。即ち、クロストリジウム、バクテロイデスともに、ミルク抗体の摂取により減少した OTU と増加した OTU があった。

バクテロイデス全体 (OTU366+OTU469+OTU853) としての増減は 7.7% から 5.2% への有意な ($p=0.0045$) 減少であった。

2. FISH 法による細菌叢分析結果

T-RFLP 法による分析において、OTU469 (バクテロイデス) は腸内細菌全体の数% を占める主要な細菌であり、この OTU が高い有意差をもって減少したことから、ミルク抗体が腸内細菌叢に変化を及ぼすことは確実と考えられた。しかし、占有率の低い細菌種については、有意な変化であってもその確度に疑念が生ずる余地があった。また、大腸菌の如く、腸内細菌全体の 1% 以下の細菌数の変化は T-RFLP 法による分析では、困難であると判断された。そこで、菌数の変化を絶対数で追える FISH 法による分析を行った。

解析に用いたプローブは全細菌、ビフィズス菌、バクテロイデスとプレボテラ、フラジリス菌、乳酸桿菌、大腸菌、ウェルシュ菌、ディフィシル菌の 8 種の標識プローブを用いて行った。

各標識プローブにより計測した対象者 29 名全員の菌数とそれらの平均値 ± SD を図 2 に示した。

糞便中の菌数の平均値を見ると、全菌数 ($2.7 \times 10^{10} \sim 3.1$

表 1 ミルク抗体の腸内細菌叢に及ぼす影響 T-RFLP 法による分析

OTU	推定される菌の分類群	占有率 (平均%±SD)		<i>p</i>
		摂取前	摂取後	
106	クロストリジウムサブクラスター XIVa	0.25±0.49	0.10±0.11	ns (0.098)
110	クロストリジウムクラスター IX メガモナス	1.15±1.91	0.98±1.21	ns
124	ビフィズス菌	7.99±7.52	7.74±6.79	ns
144	プレボテラ	0.00±0.01	0.00±0.00	ns
168	クロストリジウムクラスター IV	0.85±1.17	0.42±0.64	ns (0.063)
317	プレボテラ	0.06±0.08	0.05±0.08	ns
332	乳酸桿菌	1.49±1.26	1.63±1.32	ns
338	クロストリジウムクラスター XI	0.71±1.16	0.26±0.58	ns (0.093)
366	バクテロイデス	0.09±0.11	0.19±0.18	0.039*
369	クロストリジウムクラスター IV	3.10±3.53	2.28±3.02	0.0015**
423	クロストリジウムクラスター XVIII	0.00±0.01	0.01±0.02	ns
443	菌名未定	0.12±0.16	0.25±0.21	0.013*
469	バクテロイデス	6.79±4.56	4.66±2.39	0.0039**
494	クロストリジウムサブクラスター XIVa	6.89±2.92	7.36±3.32	ns
505	クロストリジウムサブクラスター XIVa	0.63±0.02	0.60±0.50	ns
514	クロストリジウムサブクラスター XIVa	0.53±0.45	0.55±0.50	ns
517	乳酸桿菌	0.35±0.45	0.35±0.57	ns
550	菌名未定	0.03±0.08	0.06±0.11	ns
650	クロストリジウムクラスター XVIII	1.28±1.71	1.11±1.75	ns
657	乳酸桿菌	5.66±9.60	7.46±8.86	ns
749	クロストリジウムクラスター IV	10.42±5.91	10.03±7.62	ns
754	クロストリジウムサブクラスター XIVa	2.59±3.47	3.69±4.87	ns
770	菌名未定	0.28±0.34	0.47±0.60	ns (0.098)
853	バクテロイデス	0.79±1.06	0.37±0.43	0.031*
919	クロストリジウムクラスター XI クロストリジウムサブクラスター XIVa	5.75±2.69	6.02±2.23	ns
940	クロストリジウムサブクラスター XIVa エンテロバクテリウム目	10.07±3.91	10.41±7.47	ns
955	クロストリジウムサブクラスター XIVa	13.63±4.67	16.26±5.93	0.028*
968	菌名未定	1.73±1.64	1.36±1.20	ns
990	クロストリジウムサブクラスター XIVa	16.76±5.76	15.46±3.84	ns

**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$

×10¹⁰/糞便 g), ビフィズス菌 (2.0×10⁹~3.1×10⁹/g) は 8 週の検査期間を通じて一定範囲に留まり有意な変動はなかった。また, バクテロイデスとプレボテラは 8 週においてのみ開始日の 1.6 倍の有意な増加 ($p < 0.05$) が認められた。一方, フラジリス菌 (初期菌数: 4.8×10⁸/g) は摂取 4 週間後には 1.5 倍 ($p < 0.05$), さらに 8 週間後には 2.7 倍 (1.2×10⁹/g) と有意 ($p < 0.01$) に増加した。乳酸桿菌 (初期菌数: 5.4×10⁷/g) はミルク抗体の摂取により徐々に増

加し, 8 週間後には 1.5×10⁸/g へと, 開始日の 3 倍弱の増加 ($p < 0.01$) であった。

一方, 大腸菌 (初期菌数: 1.5×10⁸/g) はミルク抗体摂取終了の 6 週まで有意な変化は見られなかったが, 8 週には約半数の 8.1×10⁷/g に減少 ($p < 0.01$) した。

ディフィシル菌は抗生物質使用後の菌交代性下痢症の原因菌として知られる²¹⁾。この菌はミルク抗体摂取前では 1 例を除く 28 例 (96.6%) において検出され (初期菌数: 1.2

図 2 FISH 法による腸内細菌叢の分析

ミルク抗体摂取の腸内細菌に対する影響を全細菌用プローブを含む 8 プローブにより計測し、各プローブにおける 29 例全例の菌数と平均±SD を示した。

*は 0 週における平均菌数と 2, 4, 6, 8 週における ANOVA 検定を示す。

**: $p<0.01$, *: $p<0.05$ ミルク抗体摂取: 0~2 週, 4~6 週

$\times 10^8/g$) たが、2 週間のミルク抗体摂取により、有意に減少し、さらに 8 週後には 1/4 の $3.0 \times 10^7/g$ へと減少 ($p<0.01$) した。

ウエルシュ菌は 29 例の全例に検出され (初期菌数: $2.2 \times 10^7/g$)、ミルク抗体摂取 2 週で有意に減少 ($p<0.01$) し、その後も減少が続き、6 週、8 週にはそれぞれ $3.8 \times 10^6/g$ 、 $4.0 \times 10^6/g$ と 1/6 弱に減少した。

3. 摂取ウシ IgG の糞便への回収量

FISH 法による試験期間中の 29 名のボランティアより、0, 2, 4, 6, 8 週に採取した糞便中のウシ IgG の濃度 (平均±SD) を図 3 に示した。2 および 6 週目の糞便中のウシ IgG 濃度はそれぞれ $2.6 \pm 2.4 \mu g/g$ と $2.6 \pm 2.8 \mu g/g$ であった。糞便量を平均 300 g とすると、回収されたウシ IgG は約 800 μg であり、摂取したウシ IgG 量 320 mg の 0.24% に相当した。

ウシ抗体量の回収量をミルク抗体の食前摂取と食後摂取で比べると、食前摂取の $3.0 \pm 2.2 \mu g/g$ ($n=11$) に対し食後摂取では $2.6 \pm 2.6 \mu g$ ($n=10$) で有意な差は見られなかった。

4. ミルク抗体の効果に与える糞便中ミルク抗体濃度、年齢、摂取タイミング、性の影響

糞便中に回収されるミルク IgG 濃度の高低は、消化管におけるミルク抗体の消化分解を反映し、その結果、腸内細菌叢に及ぼす影響と関連すると推察される。そこで、ミルク抗体の影響を最も受けやすいと考えられるウエルシュ菌

ミルク抗体摂取 0~2 週, 4~6 週

図 3 ミルク抗体の糞便回収濃度

糞便に回収されたウシ IgG 濃度 (平均値±SD) を示した。

を例にとり、糞便中ウシ IgG 濃度が $2.6 \mu g/g$ 以上 ($n=12$) と $2.6 \mu g/g$ 未満 ($n=16$) について、ウエルシュ菌の減少効果に及ぼす影響を比べた。その結果、5 回にわたる糞便採取のいずれの時期においても菌数に有意な差は認められなかったことから、糞便中のミルク抗体濃度は腸内細菌に対する影響を必ずしも反映しないと考えられた。

ミルク抗体の作用に及ぼすその他の要因として、年齢 65 歳以上と以下、食前摂取と食後摂取、性差の有無について解析した。結果は表 2 に示した如く、ミルク抗体の効果は、

表 2 ミルク抗体の摂取によるウェルシュ菌に対する効果

解析のカテゴリ		人数	ウェルシュ菌数/糞便 (g)					
			摂取前	%	8 週経過時	%	p 摂取前 対 8 週経過時	p 各カテゴリー内 8 週経過時の 有意差の有無
全 29 例	年齢 61.7±12.3 歳	29	2.2×10^7	100	4.0×10^6	18.0	<0.0001	
糞便ウシ IgG 濃度	2.6µg/g 以上 (4.36±2.07)	12	2.1×10^7	100	3.9×10^6	18.8	<0.0001	無し
	2.6µg/g 未満 (0.27±0.32)	16	2.3×10^7	100	4.0×10^6	17.7	<0.0001	$p=0.373$
年齢	66 歳以上 71.2±3.6 才	15	3.0×10^7	100	4.2×10^6	13.8	<0.0001	無し
	65 歳以下 51.4±9.7 才	14	1.6×10^7	100	3.8×10^6	23.9	<0.0001	$p=0.224$
摂取時刻	食前	11	2.4×10^7	100	3.7×10^6	15.3	<0.0001	無し
	食後	10	2.0×10^7	100	4.2×10^6	20.7	0.0004	$p=0.226$
性	男 66.9± 8.1 才	17	2.8×10^7	100	4.2×10^6	14.9	<0.0001	無し
	女 54.3±13.6 才	12	1.6×10^7	100	3.7×10^6	23.6	<0.0001	$p=0.153$

糞便中に回収されたウシ IgG 濃度, 年齢, 摂取タイミング, 性のいずれにも影響は認められなかった。

考 察

関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン関節炎において, エンドトキシンが関節炎の発症を促進²²⁾²³⁾することから, エンドトキシンが消化管バリアーを通過して, 体内に移行することが関節リウマチの発症に拘わるという仮説²⁴⁾の元に, ミルク抗体を用いた予備的な治験を行い, 一定の効果が得られた^{17)~19)}。そこで, 本研究においては, ミルク抗体の腸内細菌叢に及ぼす影響を調べることを目的とした。その結果, T-RFLP 解析法を用いた糞便細菌の分析により, 菌の増減は, 同じバクテロイデスに属する細菌種のなかに, 増加する菌種と減少する菌種があり, 同様な現象はクロストリジウムでも認められた (表 1)。T-RFLP 分析では, 大腸菌などの腸内細菌科の細菌は OTU940 に該当し, OTU940 はクロストリジウムとも重なるために, 腸内細菌科の細菌に及ぼす影響を知ることができなかった。そこで, FISH 法により特異的なプローブを用い, 大腸菌, ディフィシル菌, ウェルシュ菌のそれぞれの増減を詳しく調べた。これらの結果から, ミルク抗体が特定の菌の減少および, 増加に影響することが知られた。

菌の増加, 減少の結果を, 1) 腸内細菌叢に対する効果, 2) 自己免疫病との関連, 3) 消化管バリアーとの関連の 3 項目に分けて, 関連する文献を含めて考察する。

1. 腸内細菌叢に対する効果

免疫機構の本質が, 生体防御に利する機構であるとする, 減少した菌種は免疫機構が有害と判断した菌種, 増加した細菌は有益と判定したという仮説が成り立つ。

ミルク抗体の摂取により増加した OTU (T-RFLP 法) および菌 (FISH 法) は, OTU995 (クロストリジウムサブクラスター XIVa), OTU366 (バクテロイデス), OTU443

(菌名未定), 乳酸桿菌, フラジリス菌であった。フラジリス菌は T-RFLP 解析では OTU469 に含まれる (テクノスルガ社からの私信による)。この OTU469 は全体としては減少している, ミルク抗体から観て, 有益なバクテロイデスがフラジリス菌以外にもあると思われる。

バクテロイデスは, 大腸菌と同じくグラム陰性菌で, エンドトキシンを有するが, 大腸菌を始めとする腸内細菌科のエンドトキシンとは化学構造が異なり, 毒性も 1/100~1/1000 である²⁵⁾。しかし, IL-6 の誘導活性については大腸菌のエンドトキシンよりも格段に活性が強いことが報告されている²⁶⁾。T-RFLP 法ではバクテロイデスは, この主要な OTU469 が減少したために, バクテロイデス全体としては減少であったが, FISH 法による分析では, バクテロイデスとプレボテラ, およびフラジリス菌は増加であった。ミルク抗体のバクテロイデス属に及ぼす影響については, 減少の可能性が高いと思われるが, 更なる検討が必要である。また, 結果に記載したが, フラジリス菌は T-RFLP 法ではミルク抗体により減少した OTU469 に属するので, この OTU にはフラジリス菌以外の, バクテロイデスに属する菌で, ミルク抗体により減少した細菌を含むと考えられる。

乳酸桿菌については, 今回の試験で, T-RFLP 法解析の 3 週間, および FISH 法による解析では 4 週では変化が見られなかったが, 8 週目には 3 倍弱の有意な ($p<0.01$) 増加がみられた (図 2)。

ビフィズス菌については, ミルク抗体の影響は認められなかった。一方, Kushnareva ら¹²⁾ は, 新生児における菌交代症下痢症に, ウシ初乳抗体製剤を 500 mg/kg/日の大量投与で, 糞便ビフィズス菌の増加と下痢症の改善を報告している。

ディフィシル菌は, 今回の FISH 法による検索において 29 例中 28 例の 97% に, 10^8 オーダーで検出された。この結

果は、日本人における、培養法による検出率が 15% 台、菌数が 10^4 オーダーであったのと比べて著しく高かった²¹⁾。

加齢に伴い腸内細菌叢の変化、即ち大腸菌やウエルシュ菌の増加がある⁴⁾⁹⁾が、これは、加齢による消化管免疫の低下に起因するものと推察される。ミルク抗体摂取により大腸菌やウエルシュ菌の減少が見られたことは、ミルク抗体が老化した消化管免疫能を補った結果と見ることができる。

2. 自己免疫病との関連

関節リウマチ²²⁾²³⁾、溶血性貧血²⁷⁾、自己免疫性甲状腺炎²⁸⁾、自己免疫性神経炎²⁹⁾を始めとする様々な自己免疫病において、消化管内のエンドトキシンその他の菌体成分が、病気の発症に密接に関係している可能性が報告されている。一方、自己免疫病の抑制要因として免疫抑制性 T リンパ球が挙げられる³⁰⁾。したがって、自己免疫病の治療には、消化管内の微生物環境の制御、特にエンドトキシンレベルの低下と免疫抑制性 T リンパ球の誘導、それに加えて、消化管バリアーの健全化が重要と考えられる。

大腸菌は病原性の有無を問わずエンドトキシンを産生する。Li ら³¹⁾は糞便中の大腸菌と血液中のエンドトキシンレベルは正の相関 ($r=0.228$, $p<0.05$) を示すことを報告した。大腸菌がミルク抗体により減少するという今回の結果は、エンドトキシンレベルの減少につながり、自己免疫病の発症要因を抑える効果が期待できる。抑制性 T リンパ球の誘導については、フラジリス菌の産生する多糖体 PSA の経口投与により、潰瘍性大腸炎モデル³²⁾、自己免疫性脳脊髄炎マウス³³⁾において治療効果を認めた。その機序として、PSA の経口投与が、免疫抑制性 T リンパ球の増殖を促進した結果であるとした。PSA はフラジリス菌が菌体外に産生する莢膜多糖体であり、ミルク抗体の摂取によりフラジリス菌が 2.5 倍に増加した今回の結果は、消化管内における PSA の増加を伴うと思われ、ミルク抗体による免疫抑制性 T 細胞の増勢が期待できる。一方、Vaahrovu ら³⁴⁾は関節リウマチ患者ではフラジリス菌が有意に少ない事を報告している。片山^{17)~19)}らによるミルク抗体の関節リウマチ改善にはフラジリス菌の増加が関与している可能性があり、この菌の増加と関節リウマチの病態との関連は今後の課題である。

3. 消化管バリアーとの関連

消化管は栄養の吸収臓器であるとともに、食品や腸内細菌などを含めた多くのしかも多量の外来物質の体内への移行、すなわちトランスロケーションを防ぐため、物理的並びに免疫バリアーシステムを備えた組織である。物理的バリアー機構は腸管粘膜上皮細胞同士をシート状に結合させるクローディンその他の接着タンパクにより細胞膜がお互いに連結されて成り立っている³⁵⁾。

ウエルシュ菌の産生するエンテロトキシン³⁵⁾、ディフィシル菌の産生するエンテロトキシン A およびエンテロトキシン B³⁶⁾などは消化管粘膜上皮細胞の接着タンパクに

作用してタイトジャンクションを破壊し、エンドトキシンのトランスロケーションを許す結果となる。ミルク抗体がこれらの細菌毒素を産生する細菌種を減少させることは、エンドトキシンのトランスロケーションの阻止の点からも好ましい作用であったと考えられる。

ミルク抗体の摂取により、乳酸桿菌については 2.8 倍の有意な増加であった。消化管バリアー機能の維持の観点からみると、乳酸桿菌はバリアー機能を修復する作用が報告されているので³⁷⁾³⁸⁾、その作用が期待できる。

バリアーの破壊要因としては、便秘³⁹⁾、下痢³⁵⁾³⁶⁾、外科手術⁴⁰⁾、精神的ストレス⁴¹⁾、寒冷ストレス⁴²⁾、熱ストレス⁴³⁾、薬物(痛み止め)⁴⁴⁾などがある。Khalif らは、便秘者においては、糞便の乳酸桿菌、ビフィズス菌の減少と大腸菌、ブドウ球菌の増加とともに、消化管バリアー機能の低下を示した³⁹⁾。一方、片山らは関節リウマチ患者のミルク抗体製品「母乳のチカラ」による治験で便秘または下痢の改善にともない関節リウマチの改善が見られたことを報告した^{17)~19)}。これらの報告は、便秘が消化管透過性を亢進することも伺い知れ、自己免疫疾患の病因を探るために考慮すべき要因の一つと考えられる。Bölke らは、外科手術前にウシ初乳抗体を投与することにより、手術に伴うエンドトキシンレベルの上昇を抑えると報告した⁴⁰⁾。

以上、ヒト病原菌に対する自然抗体を含有するミルク抗体の摂取は、腸内細菌叢に影響した。この影響は先に行われた関節リウマチの治療試験^{17)~19)}における効果に関連すると思われるが、今後の更なる検討が必要である。

要 約

ヒト病原菌に対する抗体の摂取により、腸内細菌叢の改善が期待できるが、その情報は乏しい。我々は、ヒト病原菌に対するミルク由来の自然抗体を多く含む乳清蛋白を中高年健康人ボランティアに投与し、糞便細菌叢の変化を T-RFLP 法と FISH 法により解析した。T-RFLP 法では、腸内細菌は 29 の OTU (菌の分類群) に分けられ、ミルク抗体の 3 週間の摂取により減少した菌は OTU369 (クロストリジウムクラスター IV)、OTU469 (バクテロイデス)、OTU853 (バクテロイデス) であった。また、増加した菌は OTU366 (バクテロイデス)、OTU443 (菌名未定)、OTU995 (クロストリジウムサブクラスター XIVa) で、ビフィズス菌、乳酸桿菌その他には影響が見られなかった。FISH 法による解析は、ミルク抗体の影響を 8 週にわたり行った。全細菌数およびビフィズス菌には影響しなかった。大腸菌、ディフィシル菌、ウエルシュ菌は減少したのに対し、バクテロイデスとプレボテラ、フラジリス菌、乳酸桿菌は増加した。ミルク抗体の糞便中への回収を測定すると、摂取したミルク抗体 320 mg の 800 μ g (0.24%) が糞便中に回収された。ミルク抗体による腸内細菌叢への影響をエンドトキシンのトランスロケーション、関節リウマチの改

善作用との関係について考察した。

本研究を行うにあたり、WPCの自然抗体の研究にご協力いただきました女子栄養大学衛生学教室桑原祥浩教授・上田成子教授、本論文の作成にご助言いただきましたChondrex Inc. 寺戸国昭博士、また、本研究に参加していただいたボランティアの皆様に感謝申し上げます。

文 献

- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Daniel, A., Peterson, D.A. and Gordon, J.I., Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, **307**, 1915-1920 (2005).
- Tannock, G.W., Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56**, Suppl 4, S44-S49 (2002).
- Moore, W.E. and Holdeman, L.V., Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.*, **27**, 961-979 (1974).
- Mitsuoka, T., Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **1**, 3-24, (1982).
- Hawrelak, J.A. and Myers, S.P., The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern. Med. Rev.*, **9**, 180-197 (2004).
- Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártošová, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovská, D., Řeháková, Z., Šinkora, J., Hofman, J., Drastich, P. and Kokešová, A., Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.*, **93**, 97-108 (2004).
- Stewart, J.A., Chadwick, V.S. and Murray, A., Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1239-1242 (2005).
- Toivanen, P., Vaahtovuori, J. and Eerola, E., Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infect. Immun.*, **69**, 2372-2377 (2001).
- 光岡知足, 老化と腸内細菌, 老年消化器病, **13**, 85-90 (2001).
- Hopkins, M.J., Sharp, R. and Macfarlane, G.T., Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*, **48**, 198-205 (2001).
- Korhonen, H., Marnila, P. and Gill, H.S., Bovine milk antibodies for health. *Br. J. Nutr.*, **84**, Suppl 1: S135-S146 (2000).
- Kushnareva, M.V., Keshishian, E.S. and Soboleva, S.V., The efficacy of using an immune lactoglobulin preparation for correcting intestinal dysbacteriosis in newborn infants. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **2**, 101-104 (1995).
- Florén, C.H., Chinenye, S., Elfstrand, L., Hagman, C. and Ihse, I., ColoPlus, a new product based on bovine colostrums, alleviates HIV-associated diarrhoea. *Scand. J. Gastroenterol.*, **41**, 682-686 (2006).
- Rump, J.A., Arndt, R., Arnold, A., Bendick, C., Dichtelmüller, H., Franke, M., Helm, E.B., Jäger, H., Kampmann, B., Kolb, P., Kreuz, W., Lissner, R., Meigel, W., Ostendorf, P., Peter, H.H., Plettenberg, A., Schedel, I., Stellbrink, H.W. and Stephan, W., Treatment of diarrhoea in human immunodeficiency virus-infected patients with immunoglobulins from bovine colostrums. *Clin. Investig.*, **70**, 588-594 (1992).
- Chen, C.C., Tu, Y.Y. and Chang, H.M., Thermal stability of bovine milk immunoglobulin G (IgG) and the effect of added thermal protectants on the stability. *J. Food Sci.*, **65**, 188-193 (2000).
- 木島佳子, 岩附 聡, 赤松裕久, 寺戸国昭, 桑原祥浩, 上田成子, 塩野谷博, ヒト病原菌と細菌毒素に対する乳清タンパク濃縮物中の自然抗体, 食科工, **56**, 475-482 (2009).
- 片山 耕, 松野丈夫, 寺戸国昭, 塩野谷博, ミルク抗体の関節リウマチ治療効果, 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会, p. 351, 札幌 (2008).
- 片山 耕, 松野丈夫, 寺戸国昭, 割谷孝貴, 塩野谷博, ミルク抗体, 関節外科, **28**, 108-110 (2009).
- Katayama, K., Matsuno, T., Waritani, T., Terato, K. and Shionoya, H., Supplemental treatment of rheumatoid arthritis with natural milk antibodies against enteromicrobes and their toxins: results of an open-labelled pilot study. *Nutr. J.*, **10**: 2 (2011).
- Nagashima, K., Hisada, T., Sato, M. and Mochizuki, J., Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1251-1262 (2003).
- Nakamura, S., Mikawa, M., Nakashio, S., Takabatake, M., Okado, I., Yamakawa, K., Serikawa, T., Okumura, S. and Nishida, S., Isolation of *Clostridium difficile* from the feces and the antibody in sera of young and elderly adults. *Microbiol. Immunol.*, **25**, 345-351 (1981).
- Terato, K., Harper, D.S., Griffiths, M.M., Hasty, D.L., Ye, X.J., Cremer, M.A. and Seyer, J.M., Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of E. coli lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen. *Autoimmunity*, **22**, 137-147 (1995).
- Yoshino, S., Sasatomi, E., Mori, Y. and Sagai, M., Oral administration of lipopolysaccharide exacerbates collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.*, **163**, 3417-3422 (1999).
- Terato, K., Do, C.T., Comstock, B.A. and Zabrecky, J.R., A hypothesis: Two distinct factors, autoantibody to type II collagen elicited by mimic antigens and intestinal bacterial toxins, are involved independently and synergistically in the development of autoimmune arthritis. APLAR (Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress) 11th: 325-328 (2004).
- Mancuso, G., Midiri, A., Biondo, C., Beninati, C., Gambuzza, M., Macri, D., Bellantoni, A., Weintraub, A., Espevik, T. and Teti, G., *Bacteroides fragilis*-derived lipopolysaccharide produces cell activation and lethal toxicity via toll-like receptor 4. *Infect. Immun.*, **73**, 5620-5627 (2005).
- Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S., Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, **59**, 295-301 (1991).
- Murakami, M., Nakajima, K., Yamazaki, K., Muraguchi, T., Serikawa, T. and Honjo, T., Effects of breeding environments on generation and activation of autoreactive B-1 cells in anti-red blood cell autoantibody transgenic

- mice. *J. Exp. Med.*, **185**, 791-794 (1997).
- 28) Penhale, W.J. and Young, P.R., The influence of the normal microbial flora on the susceptibility of rats to experimental autoimmune thyroiditis. *Clin. Exp. Immunol.*, **72**, 288-292 (1988).
- 29) Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D.W., Ditrio, L.E., Burroughs, A.R., Foureau, D.M., Haque-Begum, S. and Kasper, L.H., Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **183**, 6041-6050 (2009).
- 30) Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, **155**, 1151-1164 (1995).
- 31) Li, L., Wu, Z., Ma, W., Yu, Y. and Chen, Y., Changes in intestinal microflora in patients with chronic severe hepatitis. *Chin. Med. J.*, **114**, 869-872 (2001).
- 32) Round, J.L. and Mazmanian, S.K., Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 12204-12209 (2010).
- 33) Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D.W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D.L. and Kasper, L.H., A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal. Immunol.*, **3**, 487-495 (2010).
- 34) Vaahtovuori, J., Munukka, E., Korkeamäki, M., Luukkainen, R. and Toivanen, P., Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, **35**, 1500-1505 (2008).
- 35) Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y. and Tsukita, S., *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.*, **147**, 195-204 (1999).
- 36) Nusrat, A., von Eichel-Streiber, C., Turner, J.R., Verkade, P., Madara, J.L. and Parkos, C.A., *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect. Immun.*, **69**, 1329-1336 (2001).
- 37) Gotteland, M., Cruchet, S. and Verbeke, S., Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **15**, 11-17 (2001).
- 38) Seth, A., Yan, F., Polk, D.B. and Rao, R.K., Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **294**, G1060-G1069 (2008).
- 39) Khalif, I.L., Quigley, E.M., Konovitch, E.A. and Maximova, I.D., Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig. Liver Dis.*, **37**, 838-849 (2005).
- 40) Bölke, E., Jehle, P.M., Hausmann, F., Däubler, A., Wiedeck, H., Steinbach, G., Storck, M. and Orth, K., Preoperative oral application of immunoglobulin-enriched colostrum milk and mediator response during abdominal surgery. *Shock*, **17**, 9-12 (2002).
- 41) Velin, A.K., Ericson, A.C., Braaf, Y., Wallon, C. and Söderholm, J.D., Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut*, **53**, 494-500 (2004).
- 42) Anderlik, P., Szeri, I., Bános, Z. and Barna, Z., Bacterial translocation after cold stress in young and old mice. *Acta. Microbiol. Hung.*, **37**, 289-294 (1990).
- 43) Selkirk, G.A., McLellan, T.M., Wright, H.E. and Rhind S. G., Mild endotoxemia, NF-kappaB translocation, and cytokine increase during exertional heat stress in trained and untrained individuals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **295**, R611-R623 (2008).
- 44) Playford, R.J., MacDonald, C.E., Calnan, D.P., Floyd, D. N., Podas, T., Johnson, W., Wicks, A.C., Bashir, O. and Marchbank, T., Co-administration of the health food supplement, bovine colostrum, reduces the acute non-steroidal anti-inflammatory drug-induced increase in intestinal permeability. *Clin. Sci. (Lond.)*, **100**, 627-633 (2001).

(平成 22 年 9 月 28 日受付, 平成 23 年 2 月 17 日受理)