(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公開特許公報(A)　　(11)公開番号
特開2024-91204
(P2024-91204A)
(43)公開日　令和6年7月4日(2024.7.4)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/742 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/742	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*47/18 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/683 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/683	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*25/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	

審査請求　有　請求項の数　7　ＯＬ　（全37頁）　最終頁に続く

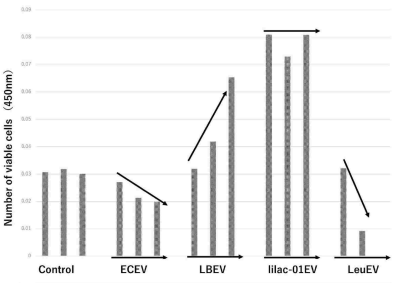
(21)出願番号　特願2023-21735(P2023-21735)
(22)出願日　令和5年2月15日(2023.2.15)
(62)分割の表示　特願2022-206613(P2022-206613)の分割
原出願日　令和4年12月23日(2022.12.23)
(11)特許番号　特許第7398846号(P7398846)
(45)特許公報発行日　令和5年12月15日(2023.12.15)

(71)出願人　714001331
アテリオ・バイオ株式会社
北海道上川郡鷹栖町八線西二号２番地
(74)代理人　110000729
弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(72)発明者　三輪　一典
北海道上川郡鷹栖町８線西２号２番地
アテリオ・バイオ株式会社内
(72)発明者　南田　公子
北海道上川郡鷹栖町８線西２号２番地
アテリオ・バイオ株式会社内
(72)発明者　平　敏夫
北海道小樽市銭函３丁目５１３番２　コスモ・バイオ株式会社札幌事業所内

Ｆターム（参考）　4C076　AA01 AA06 AA11 AA29
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　免疫機能の維持又は改善用組成物

(57)【要約】　（修正有）
【課題】マクロファージ、その他の免疫細胞の細胞死の形態により、炎症と抗炎症の二つの表現型を制御することによって身体の恒常性維持を図ることが本発明の目的である。
【解決手段】カルジオリピン、及び／又は、ホスファチジルグリセロールが、膜を構成するグリセロリン脂質全体に対して、４０質量%以上である細胞外小胞を有効量含有する、免疫機能の維持又は改善用組成物を提供する。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
カルジオリピン、及び／又は、ホスファチジルグリセロールが、膜を構成するグリセロリン脂質全体に対して、４０質量％以上である細胞外小胞を有効量含有する、免疫機能の維持又は改善用組成物。
【請求項２】
カルジオリピン、及び／又は、ホスファチジルグリセロールが、膜を構成するグリセロリン脂質全体に対して、４０質量％以上である細胞外小胞を有効量含有する、抗老化、抗アレルギー、消化管改善、又は、恒常性維持用組成物。
【請求項３】
前記細胞外小胞の１日摂取量が、10^9個以上である、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項４】
前記カルジオリピン（ＣＬ）、及び／又は、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）のうち、５０％以上が奇数鎖飽和脂肪酸アシル基を側鎖に有することを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項５】
前記細胞外小胞が、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）中で－１５ｍＶ以下のゼータ電位を有することを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項６】
アルギニンもしくはアルギニンリッチなペプチドもしくはタンパク質を含む乾燥物または塩基性ゲル懸濁物を更に含有することを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項７】
前記免疫機能の障害が、慢性炎症性疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患、自己炎症性疾患、又は、２型炎症疾患であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項８】
前記細胞外小胞が、バチルス・コアグランス Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｏａｇｕｌａｎｓ（ウェイズマンニア・コアグランス Ｗｅｉｚｍａｎｎｉａ ｃｏａｇｕｌａｎｓ）ｌｉｌａｃ－０１株（受託番号：ＮＩＴＥ Ｐ－０１１０２）が産生する細胞外小胞であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、免疫機能の維持又は改善用組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
マクロファージは白血球に分類される免疫細胞のひとつで、侵入した病原体を最初に貪食して分解・消化することにより、生体防御を担う自然免疫系の細胞である。病原微生物に感染した宿主細胞では感染の進展に伴って、炎症型マクロファージ（Ｍ１マクロファージ）から抗炎症型マクロファージ（Ｍ２マクロファージ）が誘導されてくるとされている。
【０００３】
Ｍ１マクロファージはＴＮＦ－α、ＩＬ－１βなどの炎症性サイトカインを産生し、L-アルギニンを基質とする一酸化窒素産生酵素（ＮＯＳ）によるＮＯなどの炎症性メディエータを放出して炎症を促進する。一方、Ｍ２マクロファージは抗炎症性サイトカインであるＩＬ－１０を産生し、アルギニンを基質とする酵素アルギナーゼ－１が発現して、オルニチンを産生し、組織を修復することが特徴とされる（非特許文献１）。
【０００４】
細胞に対して保護的に作用する表現型を実現するために、脳内のマクロファージであるミクログリアの表現型をＭ１型からＭ２型に誘導する方法（特許文献１）が開示されてい

る。また間葉系幹細胞が放出するエクソソームの存在下でマクロファージを培養して、Ｍ２マクロファージを誘導する方法（特許文献２）が開示されている。

【０００５】

しかしＭ１型とＭ２型マクロファージのＬ-アルギニン代謝の差異や、産生するサイトカインは混在することが多く、一概にＭ１／Ｍ２の型で炎症と再生の過程を区分することは困難であった。この概念ではマクロファージの持つ二面性（細胞障害性と組織修復性）を十分に説明することはできず、Ｍ１型とＭ２型への分化を明確に誘導することはできなかった（非特許文献２）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】国際公開２０１８／０５５１５３

【特許文献２】国際公開２０２０／１８４４２５

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Kasmi KC. et al. Nat. Immunol. 2008; 9:1399-1406

【非特許文献２】Nahrendorf M. et al. Circ. Res. 2016;119:414-417

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

マクロファージに代表される免疫細胞の表現型は炎症型と抗炎症型があり、その二つのサブタイプを制御する手法は確立されていない。マクロファージの表現型は、炎症や疾患の発症のみならず、組織の恒常性にも重要な役割を果たしている。マクロファージ、その他の免疫細胞の細胞死の形態により、炎症と抗炎症の二つの表現型を制御することによって身体の恒常性維持を図ることが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

マクロファージをはじめとする免疫細胞では、炎症反応を伴ったパイロトーシス（Ｐｙｒｏｐｔｏｓｉｓ）というプログラム細胞死が近年多数報告され、その詳細な反応過程が明らかにされている。パイロトーシスは赤痢菌などに感染したマクロファージの細胞死として発見され、細胞内成分を放出することによって炎症応答を誘導することが報告されている。

【００１０】

本発明者らは、所定の特徴を有する細胞外小胞が、マクロファージ等の免疫細胞等のパイロトーシスを抑制して、抗炎症型の表現型を持続することを見出し、本発明を完成するに至った。

【００１１】

すなわち、本発明は、下記に掲げる組成物を提供する。

【００１２】

［１］

カルジオリピン、及び／又は、ホスファチジルグリセロールが、膜を構成するグリセロリン脂質全体に対して、４０質量％以上である細胞外小胞を有効量含有する、免疫機能の維持又は改善用組成物。

【００１３】

［２］

カルジオリピン、及び／又は、ホスファチジルグリセロールが、膜を構成するグリセロリン脂質全体に対して、４０質量％以上である細胞外小胞を有効量含有する、抗老化、抗アレルギー、消化管改善、又は、恒常性維持用組成物。

【００１４】

［３］

前記細胞外小胞の１日摂取量が、10^9個以上である、［１］又は［２］に記載の組成物。

【００１５】

［４］

前記カルジオリピン（ＣＬ）、及び／又は、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）のうち、５０％以上が奇数鎖飽和脂肪酸アシル基を側鎖に有することを特徴とする、［１］又は［２］に記載の組成物。

【００１６】

［５］

前記細胞外小胞が、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、以下ＰＢＳとも表記する）中で－１５ｍＶ以下のゼータ電位を有することを特徴とする、［１］又は［２］に記載の組成物。

【００１７】

［６］

アルギニンもしくはアルギニンリッチなペプチドもしくはタンパク質を含む乾燥物または塩基性ゲル懸濁物を更に含有することを特徴とする、［１］又は［２］に記載の組成物。

【００１８】

［７］

前記免疫機能の障害が、慢性炎症性疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患、自己炎症性疾患、又は、２型炎症疾患であることを特徴とする、［１］又は［２］に記載の組成物。

【００１９】

［８］

前記細胞外小胞が、バチルス・コアグランス Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｏａｇｕｌａｎｓ（ウェイズマンニア・コアグランス Ｗｅｉｚｍａｎｎｉａ ｃｏａｇｕｌａｎｓ）ｌｉｌａｃ－０１株（受託番号：ＮＩＴＥ Ｐ－０１１０２）が産生する細胞外小胞（以下、「ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」とも表記する）であることを特徴とする、［１］又は［２］に記載の組成物。

【発明の効果】

【００２０】

細胞外小胞（以下、ＥＶともいう）を構成する膜組成のうち、カルジオリピン（以下、ＣＬともいう）、及び／又は、ホスファチジルグリセロール（以下、ＰＧともいう）が強い細胞保護効果を示し、パイロトーシスを起こす炎症型ミクログリアを抗炎症型ミクログリアに変化させることが明らかになった。

【００２１】

本発明を用いることにより、細胞保護効果を示し、パイロトーシスを起こす炎症型ミクログリアを抗炎症型ミクログリアに変化させることで、免疫機能の維持又は改善用組成物を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】図１は、実施例１試験例１－１におけるミクログリア生存細胞数の比較結果を示したグラフである。

【図２】図２は、実施例１試験例１－２におけるＥＶを添加した時のミクログリアの顕微鏡写真を示した写真像図である。

【図３】図３は、実施例１試験例１－２におけるミクログリア生存細胞数とアミロイドβを取り込んだ細胞数の比較結果を示したグラフである。

【図４】図４は、実施例１試験例１－３におけるＥＶを添加した時のミクログリアの顕微鏡写真を示した写真像図である。

【図５】図５は、実施例１試験例１－４におけるＥＶ添加後の培養上清中の「ガスダーミンＤ」と「ガスダーミンＤ　Ｎ末端」の検出結果を示した写真像図である。

【図６】図６は、実施例２試験例２－１におけるナノサイト粒度分布（１）とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの電子顕微鏡写真（２：２０万倍）とｌｉｌａｃ－０１ＥＶを生成しているｌｉｌａｃ－０１株の電子顕微鏡写真（３：２万倍）である。
【図７】図７は、実施例２試験例２－２における培養液とアルギニン添加によるｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果の違いを示したグラフである。
【図８】図８は、実施例２試験例２－３における各種ＥＶの生存細胞数とゼータ電位の関係を示したグラフである。
【図９】図９は、実施例３試験例３－１におけるｌｉｌａｃ－０１ＥＶ乾燥後のミクログリアの生存細胞数の結果を示したグラフである。
【図１０】図１０は、実施例３試験例３－３におけるｌｉｌａｃ－０１ＥＶによる、猫における歯肉口内炎への影響を示した写真である。
【図１１】図１１は、実施例４におけるｌｉｌａｃ－０１ＥＶによる老化線維芽細胞のミトコンドリア活性の上昇を示したグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００２３】
免疫は外来微生物に対する生体の防御システムであるが、衛生環境の整った現在では感染症に対する脅威に増して、免疫反応が過剰に働く免疫異常が大きな課題となっている。免疫は病原体などの外部要因ＰＡＭＰ（病原体関連分子パターン）を感知するシステムとして生物が進化的に獲得してきた機能であり、パターン認識受容体ＰＲＲで認識することによって開始される。ただし免疫は外部要因ＰＡＭＰだけでなく、活性酸素などの内部要因ＤＡＭＰ（ダメージ関連分子パターン）によっても誘導される。
【００２４】
免疫細胞の活性化によって生じる炎症によって、病原体や異常な細胞を死に追いやる一方で、ダメージを受けた宿主細胞が自らの死によって病原体への攻撃を仕掛ける炎症も重要な役割を演じている。一方で、損傷した細胞からはＤＡＭＰが放出され続けて、非感染性の炎症反応が継続することが慢性炎症の原因となる。
【００２５】
偶発的な事故的細胞死である壊死（ネクローシス）は早くから知られていたが、１９７２年、Ｋｅｒｒらはプログラムされた細胞死を発見してアポトーシス（ａｐｏｐｔｏｓｉｓ）と命名した。ネクローシス（ｎｅｃｒｏｓｉｓ）は細胞内容物が細胞外に放出されて、炎症反応が引き起こされるが、アポトーシスでは細胞は非炎症的に断片化されてマクロファージに貪食されて消失する。パイロトーシス（ｐｙｒｏｐｔｏｓｉｓ）はアポトーシスには見られない特徴を持った炎症性のプログラム細胞死として１９９２年に初めて報告された。
【００２６】
過去の報告では、マクロファージのデフォルトのモードは創傷治癒機能を有するＭ２型であり、Ｍ１マクロファージの防御的機能は進化的に遅れて獲得しているとされている。
【００２７】
発明者らは、脳内のマクロファージであるミクログリアの初代細胞を用いた検討から、細胞破壊を伴う細胞死に至る過程で炎症が惹起され、炎症型（いわゆるＭ１型）ミクログリアの分化がおこることや、平常時の正常なミクログリアは非炎症性の貪食作用を示し、抗炎症型（いわゆるＭ２型）の状態であることを見出した。すなわちマクロファージの炎症性は細胞の死に至る過程でもたらされ、マクロファージの本来の形態は非炎症型であることがわかった。
【００２８】
［細胞外小胞］
一つの実施形態において、本発明の組成物は、カルジオリピン、及び／又は、ホスファチジルグリセロールを、細胞外小胞のリン脂質膜を構成するグリセロリン脂質全体に対して４０質量％以上の割合を占める細胞外小胞を有効量含有する。
【００２９】

細胞外小胞はあらゆる細胞が放出する直径２０～５００ｎｍ程度の小胞であり、細胞膜と同じリン脂質二重膜で囲われている。本発明の効果を奏する限り、細胞外小胞を放出する細胞の種類は制限されないが、例えば、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、真菌、植物細胞、動物細胞、古細菌等が挙げられ、乳酸菌、土壌菌、真菌、及び、植物細胞からなる群より選択される少なくとも１種が好ましく、有胞子性乳酸菌、及び、クロストリジウム属細菌からなる群より選択される少なくとも１種がより好ましい。

【００３０】

有胞子性乳酸菌の例としては、例えば、バチルス・コアグランス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｏａｇｕｌａｎｓ）、スポロラクトバチルス・イヌリナス（Ｓｐｏｒｏｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｉｎｕｌｉｎｕｓ）等を挙げることができる。バチルス・コアグランスはラクリス（登録商標）－Ｓなどの名称で市販されている。本発明ではバチルス・コアグランス種の利用が好ましく、特にバチルス・コアグランス（ウェイズマンニア・コアグランス Ｗｅｉｚｍａｎｎｉａ ｃｏａｇｕｌａｎｓ）ｌｉｌａｃ－０１株の利用が好ましい。ｌｉｌａｃ－０１株は、特許第５００６９８６号公報に記載され、また独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに受託番号：ＮＩＴＥ Ｐ－１１０２として寄託されている。

【００３１】

クロストリジウム属細菌の例としては、例えば、クロストリジウム ブチリカム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｕｔｙｒｉｃｕｍ）等を挙げることができる。

【００３２】

本発明の効果を奏する限り、細胞外小胞の平均粒子径は制限されないが、例えば、平均粒子径として２０～５００ｎｍが好ましく、２０～４００ｎｍがより好ましく、２０～３００ｎｍが更に好ましく、２０～２００ｎｍが特に好ましい。

【００３３】

生体のリン脂質は主にグリセロリン脂質で構成され、正味の負電荷を持つ酸性リン脂質（カルジオリピンCL、ホスファチジルグリセロールＰＧやホスファチジン酸ＰＡ、ホスファチジルセリンＰＳ、ホスファチジルイノシトールＰＩ）および中性リン脂質（ホスファチジルコリンＰＣ、ホスファチジルエタノールアミンＰＥ）で構成さてれおり、ＥＶも原則的にこの構造を踏襲している。

【００３４】

下記実施例に示される通り、細胞外小胞を構成する膜組成のうち、限定はされないが、特に、カルジオリピン（ＣＬ）、及び／又は、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）が強い細胞保護効果を示すことが見出された。また、本発明の他の実施態様おいて、ＣＬ、及び／又は、ＰＧに加えて、ホスファチジルセリン（ＰＳ）、及び／又は、ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組み合わせによっても同様の保護効果を示すことが示された。

【００３５】

本発明の一つの実施態様おいて、細胞外小胞の膜を構成するグリセロリン脂質のうち、カルジオリピン（ＣＬ）、及び／又は、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）は、グリセロリン脂質全体に対して４０質量％以上の割合を占め、５０質量％以上が好ましく、６０質量％以上がより好ましく、７０質量％以上が更に好ましく、８０質量％以上がより更に好ましく、９０質量％以上が特に好ましく、９５質量％以上が最も好ましい。

【００３６】

また、本発明の他の実施態様おいて、細胞外小胞の膜を構成するグリセロリン脂質のうち、カルジオリピン（ＣＬ）、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）、ホスファチジルセリン（ＰＳ）、及び、ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）からなる群より選択される少なくとも１種は、グリセロリン脂質全体に対して、４０質量％以上が好ましく、５０質量％以上がより好ましく、６０質量％以上が更に好ましく、７０質量％以上がより更に好ましく、８０質量％以上がより更に好ましく、９０質量％以上が特に好ましく、９５質量％以上が最も好ましい。

【００３７】

カルジオリピン（ＣＬ）、及び／又は、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）は細胞におけるパイロトーシスを抑制する観点から、５０％以上、好ましくは６０％以上、より好ましくは７０％以上、更に好ましくは８０％以上、更により好ましくは９０％以上が奇数鎖飽和脂肪酸アシル基を側鎖に有することが好ましい。奇数鎖飽和脂肪酸としては、限定はされないが、ペンタデカン酸（Ｃ１５：０）、ヘプタデカン酸（Ｃ１７：０）、ウンデカン酸（Ｃ１１：０）、トリデカン酸（Ｃ１３：０）、ノナデカン酸（Ｃ１９：０）、ヘンエイコサン酸（Ｃ２１：０）、トリコサン酸（Ｃ２３：０）、ペンタコサン酸（Ｃ２５：０）からなる群より選択される少なくとも１種等が挙げられる。

【００３８】

別の実施態様において、カルジオリピン（ＣＬ）、及び／又は、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）は、例えば、５％以上、好ましくは１０％以上、より好ましくは１５％以上、更に好ましくは２０％以上、更により好ましくは２５％以上、更により好ましくは３０％以上が不飽和脂肪酸アシル基を側鎖に有していてもよい。

【００３９】

細胞外小胞は、顕著な細胞保護効果を示す観点から、ゼータ電位がより強い負電位を有することが好ましく、例えば、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）中において－１５ｍV以下のゼータ電位を有することがより好ましく、－１６ｍV以下が更に好ましく、－１７ｍV以下がより更に好ましく、－１８ｍV以下がより更に好ましく、－１９ｍV以下が特に好ましく、－２０ｍV以下が最も好ましい。

【００４０】

細胞外小胞は、ゼータ電位がより強い負電位を有する観点から、例えば、カチオン性アミノ酸と共存することが好ましい。限定はされないが、一つの実施形態において、本発明の組成物は、アルギニン、アルギニンリッチなペプチド若しくはタンパク質を含む乾燥物、又は塩基性ゲル懸濁物を更に含有することが好ましい。アルギニンリッチなペプチドは、限定はされないが、アミノ酸数が５個以下であることが好ましく、２～５個であることがより好ましく、３～５個、３～４個であってもよい。限定はされないが、例えば、ポリ－Ｌ－アルギニン（Ｓｈｉｇｍａ社製）、オリゴアルギニン（ペプチド研究所製）等の市販品を用いることも可能である。

【００４１】

上記の細胞外小胞を有効量含有する組成物は、飲食品、医薬品、医薬部外品、化粧品、又は、飼料及び動物用医薬品として広く用いることができる。

【００４２】

飲食品としては、上記の細胞外小胞を含有する限り特に制限されず、例えば、清涼飲料水、炭酸飲料、果汁入り飲料、野菜汁入り飲料、果汁および野菜汁入り飲料、牛乳等の畜乳、豆乳、乳飲料、ドリンクタイプのヨーグルト、ドリンクタイプやスティックタイプのゼリー、コーヒー、ココア、茶飲料、栄養ドリンク、エナジー飲料、スポーツドリンク、育児用ミルク、ミネラルウォーター、ニア・ウォーター、アルコール度数１％以下のノンアルコールのビールテイスト飲料等の非アルコール飲料；飯類、麺類、パン類およびパスタ類等炭水化物含有飲食品；チーズ類、ハードタイプまたはソフトタイプのヨーグルト、畜乳その他の油脂原料による生クリーム、アイスクリーム等の乳製品；クッキー、ケーキ、チョコレート等の洋菓子類、饅頭や羊羹等の和菓子類、ラムネ等のタブレット菓子（清涼菓子）、キャンディー類、ガム類、グミ類、ゼリーやプリン等の冷菓や氷菓、スナック菓子等の各種菓子類；卵を用いた加工食品、魚介類や畜肉（レバー等の臓物を含む）の加工食品（珍味を含む）、味噌汁等のスープ類等の加工食品；みそ、しょうゆ、ふりかけ、その他シーズニング調味料等の調味料；濃厚流動食、経腸栄養食等の流動食等が例示される。また、飲食品等は、サプリメントであってもよく、例えばタブレット状のサプリメントであってもよい。

【００４３】

本発明において、製剤化する場合の剤形は特に制限されず、具体的には、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、

貼付剤、点眼剤、及び点鼻剤等を例示できる。また、製剤化にあたっては、製剤担体として通常使用される賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、又は注射剤用溶剤等の添加剤を使用することができる。

【００４４】

本発明の有効成分の摂取量は、摂取対象者の性別、年齢および体重、症状、摂取時間、剤形、摂取経路等に依存して決定でき、特に制限されない。本発明の有効成分の成人１日当たりの摂取量は、例えば、細胞外小胞数により特定することができ、その下限値は１×１０^{7}個、１×１０^{8}個、１×１０^{9}個とすることができ、その上限値は１×１０^{11}個、１×１０^{12}個、１×１０^{13}個とすることができる。これらの上限値および下限値はそれぞれ任意に組み合わせることができ、上記摂取量の範囲は、例えば、１×１０^{7}～１×１０^{13}個、１×１０^{8}～１×１０^{12}個、１×１０^{9}～１×１０^{11}個等とすることができる。細胞外小胞数は、例えば、動的光散乱法、フローサイトメトリー等により測定することができる。

【００４５】

［用途］

一つの実施形態において、本発明の組成物は、免疫機能の維持又は改善用に用いることができる。

【００４６】

上記の免疫機能の改善は、例えば、免疫機能の障害を改善することが挙げられ、免疫機能の障害には、例えば、慢性炎症性疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患、自己炎症性疾患、2型炎症疾患が挙げられる。

慢性炎症性疾患としては、例えば、細胞の老化、動脈硬化症、上皮異形成等が挙げられる。

神経変性疾患としては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病等が挙げられる。

自己免疫疾患としては、例えば、潰瘍性大腸炎、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、シェーグレン症候群等が挙げられる。

自己炎症性疾患としては、例えば、痛風、クローン病、２型糖尿病等が挙げられる。

2型炎症疾患としては、例えば、喘息、アトピー性皮膚炎、慢性副鼻腔炎、好酸球性炎症症候群、食物アレルギー、花粉症等が挙げられる。

【００４７】

別の実施形態において、本発明の組成物は、抗老化用、抗アレルギー用、消化管改善用、又は、恒常性維持用に用いることができる。

【００４８】

抗老化用としては、例えば、認知機能の維持、視覚・嗅覚・聴覚機能の維持、運動機能の維持、皮膚のシミ及びシワの低減、肌老化の低減、脱毛及び白髪の低減、並びに、白斑及び老化斑の低減からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。

【００４９】

抗アレルギー用としては、例えば、目鼻喉の不快感の緩和、関節の痛みの緩和、食物過敏の緩和、軟骨成分の維持、ドライアイ、及び、ドライマウスの改善からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。

【００５０】

消化管改善用としては、例えば、便秘や下痢の改善、便性や便形状を整える、食後のもたれ・胸やけの緩和、むかつき及び悪心の軽減、並びに、膨満感の軽減からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。

【００５１】

恒常性の維持用としては、例えば、肝機能の改善、疲労感及び倦怠感の緩和、動悸、息切れ及び息苦しさの緩和、血糖値の上昇の緩和、睡眠の質の向上、肌の張りの維持、手足や体の冷えの改善、むくみの改善、内臓脂肪及び中性脂肪の低減、基礎代謝の向上、血管の健康維持、メンタルヘルスの維持、ストレスによる体調不良の緩和、手足の震え及び痒

みの改善、排尿機能の維持、呼吸機能の維持、嚥下機能の維持、並びに、鼻詰まりの軽減からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。

【００５２】

本発明の組成物には、限定はされないが、上記の用途を表示することができ、上記以外であっても、本発明の効果によって二次的に生じる効果を表す文言であれば、表示して使用できる。

【００５３】

前記「表示」とは、需要者に対して上記用途を知らしめるための全ての行為を意味し、上記用途を想起・類推させうるような表示であれば、表示の目的、表示の内容、表示する対象物及び媒体等の如何に拘わらず、すべて本発明の「表示」に該当する。しかしながら、需要者が上記用途を直接的に認識できるような表現により表示することが好ましい。具体的には、本発明の飲食品等に係る商品又は商品の包装に上記用途を記載する行為、商品又は商品の包装に上記用途を記載したものを譲渡し、引渡し、譲渡若しくは引渡しのために展示し、輸出若しくは輸入する行為、商品に関する広告、価格表若しくは取引書類に上記用途を記載して展示し、若しくは頒布し、又はこれらを内容とする情報に上記用途を記載して電磁気的（インターネット等）方法により提供する行為等が例示でき、特に包装、容器、カタログ、パンフレット、ＰＯＰ等の販売現場における宣伝材、その他の書類等への表示が好ましい。

【００５４】

例えば、健康食品、機能性食品、経腸栄養食品、特別用途食品、栄養機能食品、医薬用部外品等としての表示を例示することができ、その他厚生労働省や消費者庁によって認可される表示、例えば、特定保健用食品、機能性表示食品、これに類似する制度にて認可される表示を例示できる。後者の例としては、特定保健用食品としての表示、条件付き特定保健用食品としての表示、身体の構造や機能に影響を与える旨の表示、疾病リスク低減表示等を例示することができる。さらに詳細には、健康増進法施行規則（平成１５年４月３０日日本国厚生労働省令第８６号）に定められた特定保健用食品としての表示（特に保健の用途の表示）、及びこれに類する表示等を例示することができる。

【００５５】

飼料としては、ペットフード、家畜飼料、及び養魚飼料等が例示される。そのような飼料は、一般的な飼料、例えば、穀類、粕類、糠類、魚粉、骨粉、油脂類、脱脂粉乳、ホエー、鉱物質飼料、又は酵母類等に本発明の組成物を混合することにより製造することができる。製造された飼料は、一般的な哺乳動物、家畜類、養魚類、及び愛玩動物等に経口的に投与することが可能である。また動物用医薬品は哺乳動物、家畜類、養魚類、及び愛玩動物等に経皮、点眼、経口、塗布、吸引等により投与することが可能である。

【００５６】

本発明を飼料等として用いる場合、対象生物は特に限定されないが、好ましくはヒトを除く哺乳動物であり、例えば、カモノハシ、ハリモグラ、オポッサム、フクロネコ、カンガルー、ツチブタ、イワダヌキ、ゾウ、アルマジロ、ナマケモノ、アリクイ、ツパイ、ヒヨケザル、チンパンジー、ウサギ、ネズミ、ハリネズミ、ラクダ、イノシシ、キリン、シカ、ウシ、ヤギ、カバ、クジラ、イルカ、ウマ、サイ、バク、コウモリ、トラ、オオカミ、イタチ、クマ、アザラシ、犬、猫等が挙げられ、より好ましくは犬又は猫である。

【００５７】

本発明を飼料やペットフード等として用いる場合、主食に添加する等により１日に数回に分けて与えてもよいし、おやつとして随時与えてもよい。

【００５８】

本発明を飼料やペットフード等として用いる場合、本発明の有効成分の１日あたりの経口による摂取量又は投与量は、例えば、細胞外小胞数により特定することができ、1×10^{5}～1×10^{12}個／ｋｇ体重、1×10^{6}～1×10^{11}個／ｋｇ体重、1×10^{7}～1×10^{10}個／ｋｇ体重等とすることができる。本発明の有効成分の含有量は、上記の摂取量又は投与量となる量とすることができる。

【実施例】
【００５９】
［１］評価手法および評価内容
以下に、パイロトーシスの評価手法や評価内容について説明する。
【００６０】
［１－１］初代ミクログリアのパイロトーシスを用いた細胞保護効果評価手法の確立
ミクログリアは無菌的に大量にサンプリングできるため評価に供しやすく、その初代細胞は不死化細胞とは異なって、パイロトーシスが適度に発生するためにパイロトーシスの観察に適している。後述の実施例では、培養容器への接着性などの違いを利用してミクログリアを分離し、ミクログリアの初代細胞を調製して寿命評価試験を行った。
【００６１】
ミクログリアの初代細胞は、試験容器への接触刺激等によって時間の経過とともパイロトーシスによる細胞死を引き起こすが、発明者らは細菌が産生する細胞外小胞（ＥＶ）を添加することによって、初代ミクログリアの寿命が変化することを見出した。寿命延長効果は添加したＥＶによるパイロトーシスからの保護効果であり、一定時間経過後の生残細胞数がそのＥＶの生物活性すなわち細胞保護効果を表している（実施例１）。
【００６２】
［１－２］ミクログリア細胞保護効果の測定
発明者らはラットの脳から採取した初代ミクログリアとアミロイドβを９６穴プレートに播種したところ、アミロイドβの有無によるミクログリアの細胞死への短期的な影響はなく、時間の経過とともにパイロトーシスが進行することを確認した（実施例１）。
【００６３】
初代ミクログリアに大腸菌由来ＥＶ（ＥＣＥＶ）、乳酸菌由来ＥＶ（ＬＢＥＶ）、及びｌｉｌａｃ－０１ＥＶを添加したところ、初代ミクログリア（ラット）のパイロトーシスの進行速度に大きな差異が認められた（実施例１）。
【００６４】
評価結果は、ミクログリア細胞保護効果の大きな順に、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ＞乳酸菌由来ＥＶ（ＬＢＥＶ）＞コントロール（ＰＢＳ）＞大腸菌由来ＥＶ（ＥＣＥＶ）であった。
【００６５】
このような検討から、ミクログリアはＥＶによって強く保護されることが分かった。特にｌｉｌａｃ－０１ＥＶの保護効果が高かった。アミロイドβと炎症反応は短期的には影響がなかった（実施例１）。
【００６６】
大腸菌の細胞膜にはリポ多糖（ＬＰＳ）が存在し、大腸菌由来ＥＶにもＬＰＳが発現している。ＬＰＳは宿主細胞のＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）を刺激して炎症を惹起することが知られている。
【００６７】
ｌｉｌａｃ－０１ＥＶで事前に処理した初代ミクログリアに大腸菌由来ＥＶを添加すると、無処理の細胞以上の寿命を示した（実施例１）。この実験例はｌｉｌａｃ－０１ＥＶの保護効果が記憶されて、大腸菌由来ＥＶの毒性から保護したことを示している。
またｌｉｌａｃ－０１ＥＶと大腸菌ＥＶを添加したミクログリア細胞の培養上清を用いて、ガスダーミンＤ　Ｎ末端の検出を行ったところ、大腸菌由来ＥＶを添加した上清だけガスダーミンＤ　Ｎ末端が検出された。これからｌｉｌａｃ－０１ＥＶではパイロトーシスが起こっていないことが確認された。
さらに、乾燥後のｌｉｌａｃ－０１ＥＶの細胞保護効果も保たれることが確認された（実施例３）
【００６８】
［１－３］細胞保護効果とゼータ電位の関係
発明者らは、ラットの初代ミクログリアの保護効果を評価する中で、試験に供するサン

プルのミクログリアに対する保護効果とゼータ電位に強い相関があることを見出した（R^2＝０．９５、実施例２）。

【００６９】

ミクログリアの細胞膜は負に帯電しており、評価サンプルのゼータ電位が大きな負電位をもつほど強い保護効果を持つことが示された。またＥＶを含む溶液（培養液）にアルギニンなどのカチオン性アミノ酸を添加すると負のゼータ電位がさらに低下し、保護効果が大きくなることも見出した（実施例２）。

【００７０】

一般にグラム陽性菌が生成するＥＶ（膜小胞）は抗炎症性で、グラム陰性菌が生成するＥＶ（外膜小胞）は炎症性であると報告されてきたが、初代ミクログリアの寿命延長効果を評価すると、必ずしもグラム陽性、陰性によってこのような傾向を示さず、ゼータ電位と強い相関を示すことがわかった。このようなことから発明者らは、強い負のゼータ電位を持つＥＶほど強い細胞保護効果を持つことを見出した。

【００７１】

上述のように、ＥＶはすべての細胞が放出する直径１００ｎｍ程度の小胞で、細胞膜と同じリン脂質二重膜で囲われている。生体のリン脂質は正味の負電荷を持つ酸性リン脂質（ホスファチジルグリセロールＰＧやホスファチジン酸ＰＡなど）および中性リン脂質（ホスファチジルコリンＰＣ、ホスファチジルエタノールアミンＰＥ）で構成さてれおり、ＥＶも原則的にこの構造を踏襲している。

【００７２】

摂取した食物中や腸内細菌が放出するＥＶは、マクロピノサイトーシス（飲作用）などによって腸管上皮細胞に取り込まれるとされているが、その詳細については不明である。人工のリン脂質小胞であるリポソームでは、負電荷を持つ酸性リン脂質を用いると細胞表面に侵入することができないため、カチオニック・リポソームを用いる傾向があるが、一般に正電荷のリポソームは細胞毒性があり、侵入された細胞は短時間に細胞死を迎えることがわかっている。

【００７３】

［１－４］細胞膜組成とゼータ電位の関係

発明者らはＥＶを構成する膜組成によってゼータ電位に差異が生じることを確認した。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの膜組成を測定したところ、４０質量％から９５質量％がＣＬまたはＰＧであった。

【００７４】

酸性リン脂質であるＣＬとＰＧは強い負電荷を持ち、ミクログリアにＣＬとＰＧを膜組成に持つＥＶを送達することによって、ミクログリアの細胞膜に負の膜電位を与え、それがゼータ電位に反映していると考えられた。

【００７５】

［１－５］対イオン凝縮層の形成による細胞内移行性の向上

ミクログリアに対する保護効果（生物活性）およびゼータ電位（負）はＥＶ媒質中のアルギニン濃度が高いほど強化されることが示された（実施例２）。

【００７６】

ＥＶの生物活性はゼータ電位が低電位（負）であるほど向上することから、ＥＶの負電位に強く引き付けられた正電荷のアルギニンがＥＶの周囲に対イオン凝縮層を形成してミクログリアの細胞膜に接近することにより、効率よく細胞内への取込が行われると考えられる。

【００７７】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは負電位を持つＣＬもしくはＰＧを主体に構成されており、正電位を持つアルギニンリッチな正イオンの対イオン凝縮層を形成することができる。また正イオン濃度を高めることにより、安定な対イオン凝縮層を形成することができる。正イオン層はNa^+などの金属イオンなどでも対イオン凝縮層は形成可能だが、金属イオンが細胞に取り込まれると細胞障害をおこすことが多い。アルギニンは正イオンでありながら、

細胞に取り込まれるとアルギナーゼ－１等により消費されるので、細胞障害が起こらない。

【００７８】

［１－６］ｌｉｌａｃ－０１ＥＶによるミトコンドリア活性の強化

老化させた線維芽細胞にｌｉｌａｃ－０１ＥＶを２１日間添加し、２２日目にミトコンドリア膜電位を測定したところ、ミトコンドリア活性が強化されることを確認した（実施例４）。また老化線維芽細胞の形態が若返ることを確認した。

【００７９】

［１－７］奇数鎖飽和脂肪酸による抗炎症作用

奇数鎖飽和脂肪酸（ＯＣＦＡ）であるペンタデカン酸（Ｃ１５：０）やヘプタデカン酸（Ｃ１７：０）は、ヒトの血漿リン脂質中に総脂質のそれぞれ０．２％、０．４％程度含まれており、食事中のＯＣＦＡは、肥満、慢性炎症、心血管疾患、メタボリック シンドローム、２型糖尿病、非アルコール性脂肪性肝炎、慢性閉塞性肺疾患、膵臓がん、およびその他の疾病リスクの低下と関連することが多数報告されている。

【００８０】

通常、脂肪酸は炭素原子２個を単位に鎖長が延長されるので偶数になるが、反芻動物内の細菌や原生動物がＯＣＦＡを生産している。ヒトは乳製品や発酵食品等を通してＯＣＦＡを摂取しているとされている。

【００８１】

ＯＣＦＡは偶数鎖脂肪酸と比較して融点が低いために細胞膜の流動性が高く、膜密度や細胞の剛性が高いなどの利点が報告されている。

【００８２】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの細胞膜はほとんどがＯＣＦＡを側鎖に持つリン脂質で構成されている。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは吸収されたのち、ミトコンドリアに到達することができ、リモデリングによってリノール酸などの不飽和脂肪酸に置換されてＯＣＦＡは放出されるものと考えられるため、ＯＣＦＡを食品として摂取するよりも効率よくミトコンドリアに送達することが可能である。

【００８３】

［１－８］ＣＬ、ＰＧ以外のリン脂質の効果

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの細胞膜組成は、ほぼＣＬまたはＰＧで構成されるが、バチルス・コアグランス（ウェイズマンニア・コアグランス）ｌｉｌａｃ－０１の培養条件を変えることで、他のリン脂質をｌｉｌａｃ－０１ＥＶに導入することが可能である。

【００８４】

細菌が持つジアシルグリセロールキナーゼの作用を受けて、ＰＧからホスファチジン酸（ＰＡ）が生成される。ＰＡはすべてのグリセロリン脂質の出発材料で、ＰＡからはジアシルグリセロール（ＤＡＧ）を経由して、ホスファチジルセリン（ＰＳ）やホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）などにリモデリングすることができる。

【００８５】

一般に細菌ではＰＥが主要なリン脂質で、ＰＥは原核生物や真核生物の細胞膜中に普遍的に存在する。エタノールアミンを含有する培養液でバチルス・コアグランス（ウェイズマンニア・コアグランス）ｌｉｌａｃ－０１の培養を行うことによって、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）をｌｉｌａｃ－０１ＥＶに導入することができる。

【００８６】

同様にセリン、または／およびコリン、または／およびイノシトールを含有する培養液では、ホスファチジルセリン（ＰＳ）、または／およびホスファチジルコリン（ＰＣ）、または／およびホスファチジルイノシトール（ＰＩ）をｌｉｌａｃ－０１ＥＶに導入することができる。

【００８７】

ＰＳとＰＩは、ＣＬおよびＰＧと同様に負電荷を持つリン脂質で、通常、細胞膜やミト

コンドリア外膜を構成する脂質二重膜の内側に存在し、ＣＬと同様に脂肪酸側鎖が酸化されやすく、ガスダーミンの攻撃を受けて細胞膜に穿孔が形成されて、パイロトーシスが誘導される。

【００８８】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶにＰＳやＰＩが導入された場合には、不飽和脂肪酸を持たないためにガスダーミンの攻撃を受けないと考えられる。しかしリモデリングされると不飽和脂肪酸を持つようになるため、ミトコンドリア外膜に穿孔が形成されて、シトクロムｃが放出されることによってアポトーシスが誘導されることが予想される。

【００８９】

細胞膜のスクランブルがおこって脂質二重膜の外側にＰＳが露出することによって、マクロファージに非炎症的に貪食される（ｅａｔ　ｍｅサイン）。

【００９０】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶにＰＳやＰＩを導入することによって、パイロトーシスを抑制し、ＰＳを導入するとアポトーシスを促進することが期待できる。またＰＩは酵素的にリン酸化を受けることによって、細胞間の情報伝達に重要な役割を果たしており、特に神経樹状突起の成長や軸索伸長、シナプス形成などに関与していることがわかっている。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶにＰＩを導入することによって、認知症の改善等の効果が期待できる。

【００９１】

ＰＣとＰＥは電荷的に中性で、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶに導入してもアポトーシスやパイロトーシスを抑制する効果はない。ＰＣは主に細胞膜の外側に位置し、コリンの重要な供給源となる。またＰＣは血液脳関門を超えて脳内に取り込まれ、神経細胞の構築に使用されることがわかっている。酵素コリンアセチルトランスフェラーゼの作用によりアセチルコリンが合成され、アセチルコリンは運動神経の神経終末、交感神経と副交感神経の神経節、副交感神経の神経終末、交感神経の神経終末における伝達物質として機能する。アセチルコリン受容体が存在するこれらの部位に対して、ＰＣを含むＥＶが選択的に送達されることが期待できる。具体的には脳の各部位、心臓、平滑筋、眼などで、認知機能の向上や消化管活動の亢進、心拍調整作用、眼圧低下作用などが期待できる。

【００９２】

またＰＥはＣＬとともにミトコンドリア内膜の安定性を高める効果がある。また動物細胞における細胞内小器官を構成するために重要であり、小胞輸送やエンドサイトーシス（飲食作用）の制御に欠かせない成分である。

【００９３】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは、様々なリン脂質を導入することが可能であり、ＣＬ、及び／又は、ＰＧの構成比がグリセロリン脂質全体に対して４０質量％以上、好ましくは５０質量％以上、最も好ましくは６０質量％以上であれば、本発明の効果が有効となる。また、負電荷を持つリン脂質であるＰＩまたは／およびＰＳや、中性リン脂質であるＰＣまたは／およびＰＥをさらに導入することによって、細胞内およびミトコンドリアにそれぞれの成分を送達することが可能になる。

【００９４】

［２］本発明の推測される作用機序

限定はされないが、次に本発明の推測されるメカニズムを説明する。

【００９５】

［２－１］生体膜電位を下げることにより細胞寿命が延長される理由

生体の脂質二重膜は単に細胞構造の維持や物質の出入りを管理するだけでなく、様々な形で細胞間の情報伝達にかかわっていることがわかってきた。

【００９６】

ＣＬはＰＧ２分子が会合した構造で、動物細胞ではミトコンドリアに特異的に存在する負電荷を持つリン脂質である。ミトコンドリアは外膜と内膜の二組の脂質二重膜からなり、特にミトコンドリア内膜にはＣＬの８０－９０質量％が存在しているため強い負電位を示す。この負電位にH^+イオンが引き付けられてミトコンドリア膜電位が形成されており

、さらにミトコンドリア内膜に存在するプロトンポンプによって水素イオンが汲み出されて、膜電位は最大－１８０ｍＶに達する。

【００９７】

ミトコンドリアはH^+イオン濃度勾配によって生命活動の源であるＡＴＰの生産を行っており、膜電位の消失（脱分極）はミトコンドリアの機能低下や細胞死の原因になる。

【００９８】

細菌も同様に酸性リン脂質の負電位を足場に、H^+イオン濃度勾配にもとづく細胞膜電位によってＡＴＰを合成するが、細菌の場合は細胞が大型化するほど表面積の割合が低下するために効率が悪化する。

【００９９】

真核生物は細菌を起源とするミトコンドリアを内部共生とすることで、進化への道を歩み出したとされている。ミトコンドリアの特徴は内膜の表面積と負の膜電位である。このような負の膜電位の持つことがミトコンドリアの機能維持に重要であることは従来あまり重要視されてこなかったが、発明者らが行った実験によって、生体膜電位の喪失が細胞死の要因になることが明らかになった。

【０１００】

［２－２］ＣＬ／ＰＧの働き

ＣＬは４つの脂肪酸アシル基と正電荷を捕捉できる負電荷のヘッドを持つ円錐形をしている。このユニークな構造がミトコンドリアの基本的な機能を左右する。ミトコンドリアは細胞内に存在する細胞内小器官で、一つ一つの細胞に数百から数千個のミトコンドリアが含まれ、分裂と融合を繰り返す非常にダイナミックな小器官である。ＣＬはこのミトコンドリアダイナミクスに必須のリン脂質であり、膜電位の消失（脱分極）などによって機能低下したミトコンドリアと、活性の高いミトコンドリアとが融合し、さらに分裂することでダメージを分散し、ミトコンドリア活性の維持が図られている。

【０１０１】

ミトコンドリアは内膜が特有の構造（クリステ）をとることによって表面積を増大させ、ＡＴＰ生産効率を最大化することができる。このクリステ構造やミトコンドリア機能の維持にはＣＬが必須であることがわかっており、特に曲率の高い曲面を構成するために円錐形状をしたＣＬが必要と考えられている。

【０１０２】

またミトコンドリアは生体内で最大の活性酸素種（ＲＯＳ）の発生源であり、ＲＯＳ消去機構が十分に機能せずにＲＯＳ産生が亢進すると、分裂したミトコンドリアは選択的なオートファジー（マイトファジー）により分解される。さらにマイトファジーが停滞して機能不全のミトコンドリアが増加すると、ミトコンドリアはその細胞自体をアポトーシスによって消去する。

【０１０３】

［２－３］細胞死のメカニズム

アポトーシスは非炎症性のプログラム細胞死で、ミトコンドリア外膜に穿孔を形成するＢＣＬ－２関連タンパク質の作用により、シトクロムｃ（電子伝達系を構成する主要なタンパク質）がこの穿孔を通って細胞質に流出することによって開始される。

【０１０４】

一方でカスパーゼ依存性のパイロトーシスもミトコンドリアにおける穿孔形成に関係している。パイロトーシスはタンパク質複合体であるインフラマソームの形成によって、活性化したカスパーゼによって切断されたガスダーミンＮ末端が、膜穿孔を形成して細胞を破裂させ、その後に続く細胞内容物の漏出によって炎症メディエータを発生することを特徴とする細胞死モードである。

【０１０５】

非炎症性のアポトーシスと炎症性のパイロトーシスは単独で発生するだけでなく、互いに影響しあう関係にある。アポトーシスとパイロトーシスを決定する要因は、細胞膜とミトコンドリア外膜への穿孔形成の違いにある。

【０１０６】
現在知られているアポトーシスとパイロトーシスの主要な経路はそれぞれ２つある。アポトーシスでは、前述のＢＣＬ－２関連タンパク質によるミトコンドリア外膜への穿孔と、ガスダーミンEによるミトコンドリア外膜と細胞膜への穿孔である。またパイロトーシスでは、ガスダーミンDによる細胞膜への穿孔と、ガスダーミンＥによる細胞膜への穿孔がある。
【０１０７】
カスパーゼによって切断されたガスダーミンファミリータンパク質のＮ末端は、正電荷を持つため、細胞膜やミトコンドリア外膜の負電荷を持つ酸性リン脂質に引き付けられて集合して穿孔を形成する。
【０１０８】
細胞膜への穿孔形成は主にガスダーミンDが関与しており、ガスダーミンDを不活性化すると、細胞はパイロトーシスからアポトーシスに切り替わることが報告されている。
【０１０９】
［２－４］細胞外小胞（ＥＶ）の機能
ほぼすべての生細胞は細胞外小胞（ＥＶ）を放出して細胞間でメッセージを送信している。ＥＶは脂質二重膜からなる小胞の総称であり、ＥＶ内にはタンパク質やｍｉＲＮＡなどの機能分子を内包し、多細胞生物の体液中には起源の異なる様々なＥＶが高密度に存在している。
【０１１０】
生体膜は負電位を持つのに対して、同じリン脂質からなるＥＶも負電荷を持っており、通常であればＥＶは生体膜に接近することはできない。人工の薬物送達システム（ＤＤＳ）であるリポソームでは正電荷を持たせたカチオニック・リポソームが多く用いられているが、細胞膜電位の喪失は細胞死をおこしやすく、従来のリポソームでは細胞毒性を完全になくすことは困難である。
【０１１１】
ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは直径２００ｎｍ以下の負電荷を持つ小胞であり、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ　ｌｉｌａｃ－０１の培養液を含む乾燥物はサプリメントとして活用されており、安全性が認められ、食経験も長い。この培養液中には10^9個／ｍｌ以上のｌｉｌａｃ－０１ＥＶの存在が確認されている。
【０１１２】
消化管内では培養液中のアルギニンやペプチドが塩基性ゲルを形成して、負電荷のＥＶの周囲に対イオン凝縮層を形成すると考えられる。塩基性ゲルにはアルギニンやアルギニンリッチなペプチドだけでなく、塩基性高分子ゲルを添加しても良い。このような塩基性ゲルは負電荷を持つＥＶのまわりに正電荷の対イオン凝縮層を形成するため、容易に負電荷の生体膜に接近することができ、消化管の広い範囲に渡ってＥＶを供給することが可能である。
【０１１３】
ＥＶは消化管上皮から食作用もしくはマクロピノサイトーシス（飲作用）によって対イオン凝縮層とともに細胞内に取り込まれる。
【０１１４】
ＥＶの膜成分は侵入先の細胞膜に融合すると考えられており、アルギニンは細胞の状態によって異なった経路で代謝される。炎症状態では免疫応答として一酸化窒素合成酵素を誘導するためＮＯ産生が亢進し、それに伴ってアルギニンが細胞外から積極的に取り込まれる。抗炎症状態ではマクロファージが発現するアルギナーゼ－１がアルギニンを代謝してオルニチンを産生する。そのため細胞内は恒常的にアルギニン欠乏状態となっている。
【０１１５】
［２－５］対イオン凝縮層の効果
ＣＬはミトコンドリア膜に必須のリン脂質である一方で、強い負電荷による弊害も存在する。抗カルジオリピン抗体はＣＬの負電荷に強い親和性を持つβ_2グリコプロテインＩ

（β２ＧＰＩ）が結合することによって形成される。抗原決定基はβ２ＧＰＩ分子上にあり、ＣＬ自体に抗原性はない。

【０１１６】

正電荷の対イオン凝縮層が存在するとＣＬの負電荷は打ち消されるため、β２ＧＰＩとの結合を抑制することができるものと考えられ、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの摂取や皮膚への塗布、鼻腔への噴霧、肺胞への吸引、点眼、注入等において、抗リン脂質抗体症候群を予防できる。

【０１１７】

また対イオン凝縮層にアルギニンを用いることによって細胞内移行性が向上することは前述のとおりである。

【０１１８】

［２－６］細胞膜でのＣＬ／ＰＧの効果

細胞内で生成されるガスダーミンタンパク質はインフラマソームによって活性化したカスパーゼによって分離され、そのうちのガスダーミンN末端が重合体を形成してガスダーミンポアを構成し、細胞膜に穿孔を形成する。

【０１１９】

ガスダーミンＤはカスパーゼ１，４，５によって切断され、炎症性細胞死であるパイロトーシスをおこす。またガスダーミンEはカスパーゼ３によって切断され、ミトコンドリア外膜または細胞膜に穿孔を形成し、アポトーシス又はパイロトーシスをおこす。いずれの場合もガスダーミンは酸性リン脂質中の過酸化した不飽和脂肪酸を攻撃してポアを形成する。カスパーゼ４及び５はＬＰＳによって活性化され、非標準インフラマソーム経路と呼ばれる。

【０１２０】

細胞膜にはＣＬは少なく、酸性リン脂質としてはホスファチジルセリン（ＰＳ）やホスファチジルイノシトール（ＰＩ）、ホスファチジン酸（ＰＡ）が存在する。細胞膜を構成するリン脂質が過酸化されると脂肪酸が開裂し、酸化リン脂質を生成して親水性が増す。ガスダーミンタンパク質N末端などの活性化した膜穿孔形成タンパク質は、このような酸化したリン脂質をターゲットにして集合する。

【０１２１】

切断されたガスダーミンＤ　Ｎ末端は細胞膜にポアを形成してパイロトーシスを惹起する。一方、ＥＳＣＲＴ（エンドソーム選別複合体）等の膜修復機構が知られている。正電荷のガスダーミンＤ　Ｎ末端に負電荷の遊離ＣＬ等が結合してパイロトーシスを抑制することが報告されている。

【０１２２】

経口摂取したｌｉｌａｃ－０１ＥＶのＣＬ／ＰＧは細胞膜に到達して、ＥＳＣＲＴ機構等によって損傷したリン脂質膜を修復するものと考えられる。

【０１２３】

細胞膜へのＣＬ／ＰＧの導入は細胞膜の安定性を大幅に向上させることが報告されており、さらにｌｉｌａｃ－０１ＥＶは８０％以上が飽和脂肪酸のため、リン脂質の過酸化は生じにくく、そのためガスダーミンポアの形成が阻害されると考えられる。

【０１２４】

［２－７］ミトコンドリア内でのＣＬ／ＰＧの機能

ＣＬはミトコンドリアをはじめとする様々な小器官のタンパク質と結合して活性の維持に貢献することが知られており、ＣＬの添加によってミトコンドリアの電子伝達系の活性が回復することが報告されている。このことは細胞膜に融合したＣＬが細胞質内のミトコンドリアに取り込まれる機構が存在することを意味している。実際、本発明でもミトコンドリア膜電位の増強が確認されている（実施例４）。

【０１２５】

ＣＬはミトコンドリア内膜に主に存在しているが、外膜にも１０～２０％存在している。内膜と外膜のＣＬ分布は膜結合酵素であるリン脂質輸送タンパク質（ＰＬＳ）によって

双方向に制御されている。
【０１２６】
発明者らがｌｉｌａｃ－０１ＥＶのリン脂質を分析したところ、ＰＧとＣＬの合計が４０質量％以上で、ＣＬのアシル基の脂肪酸は主にＣ１５：０、Ｃ１７：０の奇数鎖飽和脂肪酸であった。
【０１２７】
ＥＶによって細胞内に輸送されたＣＬはミトコンドリア外膜から内膜に移行し、アシル基転移酵素によってＣＬのリゾ体が形成され、さらに不飽和脂肪酸にリモデリングされる。
【０１２８】
ＣＬの４本のアシル基は、心臓ではリノール酸（Ｃ１８：２）、脳ではアラキドン酸（Ｃ２０：４）やドコサペンタエン酸（Ｃ２２：５）、ドコサヘキサエン酸（Ｃ２２：６）など、主に高度不飽和脂肪酸で構成されている。ミトコンドリア内膜でリモデリングされたＣＬは不飽和脂肪酸を持ち、ガスダーミンDやガスダーミンEの標的となる。
【０１２９】
ＣＬはＰＧ２分子が会合したもので、ＰＧはＣＬの直接の原料となるので、ＣＬだけでなくＰＧを摂取することは、ミトコンドリアの機能維持に有効である。
【０１３０】
細胞の寿命を決定する要素は、ミトコンドリアの恒常性維持である。ミトコンドリアの細胞死決定機構は、（１）活性酸素種（ＲＯＳ）やＤＮＡ損傷、膜電位の喪失などの細胞ストレス、（２）パターン認識受容体ＰＲＲなどからの外的ストレス、（３）変異タンパク質の蓄積による小胞体ストレスがある。
【０１３１】
ミトコンドリア中ではＡＴＰを生産する際に活性酸素種（ＲＯＳ）が発生するため、ミトコンドリアの分裂や融合によってストレスを平均化したり、衰弱したミトコンドリアをオートファジー（マイトファジー）させて活性を維持するが、ミトコンドリア全体にストレスが蓄積するとアポトーシスを起こす。
【０１３２】
［２－８］ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの作用
ミクログリアを用いた実験では、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶはミクログリア細胞に吸収されて細胞保護効果を示しており、培養液やアルギニンを含むものはさらに細胞保護効果が高かった。これは細胞質に取り込まれたＣＬがパイロトーシスの原因となる細胞膜の欠陥を修復する能力があることを示している。またミトコンドリア電位を高める効果が確認されており（実施例４）、細胞膜に取り込まれた後さらにミトコンドリア内膜まで到達してミトコンドリアの活性向上に寄与することが確認された。以上の効果により、マクロファージのパイロトーシスを抑制することによって、ヒトや動物の炎症状態を改善することが期待できる。
【０１３３】
［３］対象とする疾患の発生機序とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの作用
次に対象とする疾患の発症機序とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの作用について具体的に説明する。
【０１３４】
［３－１］ミクログリアのアミロイドβ取込量増加による認知機能改善効果
本発明者らは、ミクログリアのパイロトーシス回避によって、アミロイドβがミクログリアに取り込まれることを確認した（実施例1）。アミロイドβが脳から取り除かれる経路は複数確認されているが、不溶性となって沈着したアミロイドβの除去にはミクログリアが関与することがわかっており、アミロイドβを酵素的に分解することが知られている。
【０１３５】
加齢に伴って、脳では炎症型ミクログリアが増加し、中枢神経で炎症性サイトカインが

慢性的に増加する。一方、パイロトーシスによりミクログリアの貪食作用は低下する。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを摂取することにより、ミクログリアは抗炎症型になってアミロイドβを貪食し、長寿命で活性が高く、貪食能を長期間保つことができるため、アミロイドβの処理能力が高まり、高い認知機能改善効果が期待できる。

【０１３６】

［３－２］加齢に伴う慢性炎症とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果

老化とは身体の生理機能が衰退することであり、老化細胞が蓄積することによって進行する。加齢による身体の変化は個体ごとに一様ではなく、生活習慣や環境に強く影響を受ける。炎症反応増加の最大の原因は、活性酸素種（ＲＯＳ）の蓄積と考えられており、最大のＲＯＳ発信源はミトコンドリアである。

【０１３７】

ミトコンドリアには核ＤＮＡ（ｎＤＮＡ）とは独立したミトコンドリアＤＮＡ（ｍｔＤＮＡ）があり、ＲＯＳの発生源に近いためにｎＤＮＡに比べて変異が非常に早く、加齢によってｍｔＤＮＡ変異が蓄積する。一つの細胞に数百個以上存在するミトコンドリアは、融合と分裂を繰り返しており、ｍｔＤＮＡに蓄積した変異は周囲のｍｔＤＮＡに広がっていく。細胞内に異なるｍｔＤＮＡが存在する状態はヘテロプラスミーといわれ、ＡＴＰ生産能力の低下とＲＯＳ発生増加の原因となる。

【０１３８】

ｍｔＤＮＡ変異の蓄積は、エネルギーを多く消費する臓器である脳、心臓、骨格筋、腎臓、および内分泌系に影響を与えるが、すべての組織の老化に影響している。特に、視覚機能の低下や難聴、運動障害、認知症、心血管疾患、動脈硬化症、筋力低下、腎機能障害、および糖尿病を含む内分泌障害や肺胞における炎症等に関与すると考えられている。

【０１３９】

老化細胞は加齢や病気の際に蓄積するが、老化細胞の死によって個体全体としては一定の回復が得られる。老化細胞は非炎症性のアポトーシスによって消去されるが、慢性炎症状態ではマクロファージのパイロトーシスによって継続的に炎症物質が放出され、老化が加速される。

【０１４０】

マクロファージの表現型を決定しているのはミトコンドリアであり、ミトコンドリアは不活発な自身の細胞を死に導くとともに、細胞や個体全体の老化と死をコントロールする司令塔でもある。老化細胞は炎症型マクロファージによる慢性的な炎症状態にあり、産生するサイトカインなどの炎症性メディエータが加速度的に蓄積する特徴がある。細胞分裂しない神経細胞や心筋細胞などにおいては、その影響は顕著なものとなる。

【０１４１】

虚血再灌流（Ｉ／Ｒ）傷害は、血液供給が制限された後に組織への血液供給（再灌流）が再開されることによって引き起こされ、細胞死や臓器機能不全につながる病理学的プロセスである。Ｉ／Ｒ傷害は、脳、心臓、腎臓など、多くの重要な器官で発生する可能性がある。Ｉ／Ｒはミトコンドリアの負荷を増大させ、活性酸素種ＲＯＳを大量発生し、その結果パイロトーシスが恒常的に発生することになり、組織の炎症と臓器の機能不全をもたらす可能性がある。特にＡＴＰ需要の高い臓器で発生するリスクが高い。実際、パイロトーシス経路を遮断することでＩ／Ｒ傷害が軽減することが、神経細胞、腎臓、肝臓、肺胞、網膜など多数の臓器で確認されている。

【０１４２】

このように、ミトコンドリアの損傷がＩ／Ｒ傷害の重要な要因であることが確認されている。Ｉ／Ｒ傷害の結果、老化細胞が複数の臓器に蓄積する可能性があり、細胞老化が臓器の急性損傷を慢性損傷に変えることが報告されている。このような現象はストレス誘導細胞老化（ＳＩＰＳ）と呼ばれ、複数の臓器、特に腎臓、心臓、脳の機能不全において重要な役割を果たす。

【０１４３】

Ｉ／Ｒ傷害は、ミトコンドリアの活性酸素種の過剰な産生、ミトコンドリアのカルシウ

ム過負荷、ミトコンドリアのエネルギー代謝の障害、マイトファジー、ミトコンドリアの分裂、およびミトコンドリアの融合と密接に関連していることが報告されている。ミトコンドリアのＡＴＰ生産能力はクリステ膜の表面積に依存しており、ミトコンドリア内膜のひだ状に陥入するクリステ膜の湾曲部を形成し、ミトコンドリアの分裂／融合を起こすために、カルジオリピンＣＬが重要な役割を果たしている。

【０１４４】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶはミトコンドリアにＣＬを供給してミトコンドリアの活性を亢進するとともに、ガスダーミンポアを修復し、ミトコンドリア電位を強化することによって細胞のパイロトーシスを回避することができるため、認知機能や視覚・嗅覚・聴覚機能、運動機能等の維持のほか、排尿機能、呼吸機能、及び嚥下機能の維持や鼻詰まりの軽減等が図られる。

【０１４５】

また最近の研究では、パイロトーシスはマクロファージだけでなく、上皮細胞でも重要な役割を果たすことが明らかになってきた。皮膚老化の原因には体の老化と同じ内因性要因に加えて、紫外線暴露などによる外因性要因がある。紫外線暴露によって真皮において炎症が発生して、皮膚老化を促進する。加齢や光老化により表皮細胞の萎縮と真皮の線維芽細胞や細胞外マトリックス成分が減少し、皮膚のシミやシワ、肌老化、皮膚の菲薄化等が引き起こされる。

【０１４６】

またｌｉｌａｃ－０１ＥＶは、肺胞マクロファージのパイロトーシスを抑制することにより、喘息等の炎症反応を抑制することが期待できる。実際、肺胞サーファクタント中のＰＧ／ＣＬは炎症を抑制する効果があることが報告されている。

【０１４７】

上皮細胞にはバリア機能を保ちながら、死滅に向かう細胞を押し出す独自の機構がある。パイロトーシスは上皮細胞でも確認されており、炎症反応を引き起こして細胞膜の完全性を喪失させる。細胞内容物の放出によって制御不能な炎症を引き起こし、バリア機能は不完全となって、細胞外の異物の侵入を許すことになる。皮膚上皮細胞においては角化が正常に行われないと、乾癬などの皮膚の異常を発生するほか、アトピー性皮膚炎や食物アレルギーなどの原因にもなる。

【０１４８】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは、パイロトーシスを抑制し、皮膚線維芽細胞のミトコンドリア活性を上昇させて老化を改善する、若返り効果が確認されていることから、皮膚のシミやシワの低減、肌老化の改善や乾癬などの皮膚の異常、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの低減効果が期待できる。

【０１４９】

［３－３］肥満に伴う慢性炎症とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果

肥満は脂肪組織が過剰に蓄積した状態であり、全身のマクロファージの炎症とインスリン抵抗性に関与してる。マクロファージの分化はインスリン抵抗性の重要なターゲットと考えられている。

【０１５０】

内臓肥満は肝臓の脂肪性肝疾患に強く関与しており、パイロトーシスを起こすインフラマソームの発現があるクッパー細胞や肝星細胞、肝細胞で、直接パイロトーシスを誘発するか、間接的に肝細胞損傷を引き起こすことが知られている。

【０１５１】

インスリン抵抗性は、肥満などが原因で脂肪組織や骨格筋及び肝臓などの末梢において、インスリンに対する感受性が低下する現象で、２型糖尿病の主要な原因である。

【０１５２】

インスリンは骨格筋や脂肪細胞にあるインスリン受容体に結合することによって、グルコーストランスポーターＧＬＵＴ４などが細胞膜上に輸送され、グルコースが細胞内に取り込まれる。脂肪細胞やマクロファージが産生する炎症性サイトカインＴＮＦ－αがＧＬ

ＵＴ４の細胞膜移行を抑制することが知られている。
【０１５３】
　またミトコンドリア－小胞体接触領域（ＭＡＭ）でのシグナル伝達の障害は肥満、糖尿病、神経変性疾患など、多くの疾患に幅広い影響を及ぼすことが報告されている。具体的にはＭＡＭで生成されるホスファチジルイノシトール３キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）などの酵素やＧＬＵＴ小胞などの輸送に障害がおこると、インスリン抵抗性が生じることが報告されている。
　ＭＡＭはリン脂質の代謝を調節する酵素の活性にも関連しており、ＰＣやＰＥの構成比により細胞膜密度を調整している。またＣＬ量は心疾患や筋障害、自己免疫疾患、糖尿病などと関連していることが報告されている。
【０１５４】
　インスリン抵抗性は、非アルコール性脂肪肝疾患（ＮＡＦＬＤ）、アルコール性肝疾患、肝不全、ウイルス性肝炎、敗血症関連の肝障害等に関与しており、マクロファージなどのパイロトーシスを抑制することによって、肝機能の改善だけでなく、内臓脂肪や中性脂肪の低減、むくみの改善、疲労感・倦怠感の緩和等が期待できる。
【０１５５】
　また発明者らはインスリン製造器官である膵β細胞のパイロトーシスも確認しており、１型糖尿病と進行性の２型糖尿病の背景には膵β細胞のパイロトーシスがあると考えている。
【０１５６】
　２型糖尿病患者はアルツハイマー型認知症を発症するリスクが高く、その逆も同様であることが報告されており、アルツハイマー病は中枢神経系の代謝障害と関連があることが示唆されている。実際、インスリン抵抗性の増大によって、ニューロン内のグルコース取込量が減少し、インスリンと過剰リン酸化タウが蓄積することが報告されている。
【０１５７】
　ミクログリアのパイロトーシスによってＴＮＦ－αなどの炎症性サイトカインが産生され、線維化したアミロイドβなどの老廃物が除去されずに蓄積することが予想される。これに伴ってグルコーストランスポーターＧＬＵＴ４などの細胞膜移行が停滞したり、ＭＡＭの機能不全等が重なって、インスリン抵抗性が生じ、脳機能の障害やアルツハイマー型認知症が発生するものと考えられている。
【０１５８】
　ｌｉｌａｃ－０１ＥＶはミトコンドリア活性を高め、マクロファージのパイロトーシスを抑制するため、肥満による慢性的な炎症状態を改善することができ、血糖値の上昇の緩和、内臓脂肪や中性脂肪の低減、基礎代謝の向上、血管の健康維持などの効果が期待できるほか、２型糖尿病患者ではアルツハイマー型認知症の併発を防止することが期待できる。
【０１５９】
　［３－４］心理的ストレスに伴う慢性炎症とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果
　心理的ストレスはうつ病や不安障害の主要な危険因子だが、円形脱毛症や全身脱毛症、乾癬、アトピー性皮膚炎、白斑、にきびなどの皮膚障害や、睡眠障害などのさまざまなストレス関連の障害にも関連している。
【０１６０】
　脳の炎症は主にミクログリアによって媒介され、環境ストレッサーを最初に認識すると活性状態に入る。その後ストレッサーにさらされると持続的な炎症反応を誘発する傾向がある。このようなプライミング効果はＮＬＲＰ３インフラマソームで確認されており、活性化閾値の低下によって、ＩＬ－１βやＴＮＦ－αなどの炎症性サイトカインの産生が増幅されることが報告されている。
【０１６１】
　ｌｉｌａｃ－０１ＥＶはミクログリアのパイロトーシスを阻害し、脳の慢性炎症を回避することが可能であり、心理的ストレスに起因するうつ病や不安障害、円形脱毛症や全身

脱毛症、白髪、乾癬、アトピー性皮膚炎、白斑、にきび、など、さまざまなストレス関連疾患を改善することや、睡眠の質の向上、メンタルヘルスの維持、ストレスによる体調不良の緩和、手足の震えや痒み等を改善することができる。

【０１６２】

［３－５］自己免疫の発症機序とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果

自己免疫疾患は、生じた自己抗体に対する獲得免疫による疾患であり、代表的なものとしてはシトルリン化タンパク質に対する自己免疫疾患がある。シトルリン化とは、タンパク質を構成するアミノ酸のうち、アルギニンが酵素ペプチジルアルギニンデイミナーゼ（ＰＡＤ）によってシトルリンへ変換される反応である。アルギニンはタンパク質を構成するアミノ酸の中で最も塩基性が強く、シトルリン化反応はタンパク質の正電荷を減少させるため高次構造に著しい変化をもたらし、しばしば変異タンパク質の生成や自己免疫疾患の抗原を形成する。

【０１６３】

ＰＡＤ酵素は５つのタイプが知られているが、そのうちのＰＡＤ４は他のＰＡＤ酵素とは異なり、核内のヒストンを基質としてアルギニル残基をシトルリン化する。そのためヒストンの正電荷が減少し、ヒストン－ＤＮＡ間の静電的結合が弱くなる。

【０１６４】

そのためヒストンのシトルリン化は、クロマチンの脱凝縮とＮＥＴの形成につながる。ＮＥＴとは好中球が細菌等の外来微生物に対抗するために周囲に放散する、ＤＮＡなどのクロマチンである（詳細は後述する）。

【０１６５】

多くの自己免疫疾患は、ＰＡＤとシトルリン化の増加に関連しおり、腫瘍の発生にも重要な役割を果たしている。乾癬、関節リウマチ（ＲＡ）および多発性硬化症（ＭＳ）の病因に関与しているほか、緑内障や多くの膠原病で同様の機構が働いていることが指摘されている。

【０１６６】

シトルリン化タンパク質に対する抗体は、ＲＡに対する最も特異的な抗体であり、ＲＡを早期に検出できる有用な診断ツールとして用いられている。

【０１６７】

ＰＡＤは中枢神経系にも多く発現し、特にアストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞に存在しており、アルツハイマー病患者の脳ではシトルリン化タンパク質が多く出現していることが報告されている。アルツハイマー病以外にもプリオン病、パーキンソン病、多発性硬化症でもシトルリン化タンパク質の蓄積やＰＡＤ活性の亢進が報告されているほか、ＰＡＤはほぼ全身に分布し、腎障害などでもシトルリン化タンパク質やそれに対する自己抗体の生成が確認されている。

【０１６８】

変性したタンパク質は寿命を迎えた細胞がマクロファージに貪食されることで消去される。また変性タンパク質の蓄積は細胞へのストレス（小胞体ストレス）となり、ミトコンドリアによってアポトーシスに誘導することができ、シトルリン化したタンパク質はアルギニンに変換されて再利用することができる。

【０１６９】

自己免疫の他の例として、Ｉ型インターフェロン（ＩＦＮ－Ｉ）経路の自己免疫疾患がある。これはＩＦＮ－Ｉ依存性の特定の遺伝子パターンを持つ人に全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の有病者が多いことから判明し、現在ではシェーグレン症候群、皮膚筋炎、乾癬、および関節リウマチ患者で同様の発現パターンを示すことが明らかになっている。ＳＬＥに関しては８割の患者が女性であり、女性ホルモンの１７β‐エストラジオールとの関連も指摘されている。

【０１７０】

またＩＦＮ－Ｉで処理したヒト唾液腺上皮細胞株では、カスパーゼとガスダーミンDの発現が増加して、インフラマソーム活性時にパイロトーシスが加速されたことから、ＩＦ

Ｎ－Ｉはシェーグレン症候群（ＳＳ）を含む自己免疫疾患において病原性の中心であることが示された。

【０１７１】

ＳＳは、唾液と涙の産生低下を特徴とする慢性炎症性自己免疫疾患で、唾液腺などに浸潤するマクロファージのパイロトーシスが原因であることが報告された。ＳＳの主な症状は口腔乾燥症（ドライマウス）および角結膜炎（ドライアイ）であり、嚥下、咀嚼または会話の困難、眼内の異物、唇、鼻および喉の乾燥または灼熱感がある。また胃腸管、膣、肺、皮膚の乾燥や、慢性疲労、線維筋痛症、筋肉痛、関節痛、腎炎、末梢神経障害などの他の腺外症状との関連が指摘されている。

【０１７２】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは細胞膜のガスダーミンポアの形成を阻害し、パイロトーシスの発生を抑制することができるため炎症反応を鎮静化することができる。さらにシトルリン化した細胞をアポトーシスに導くことによって自己免疫疾患の完治が期待できる。

【０１７３】

［３－６］自己炎症の発症機序とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果

自己炎症性疾患はこれまで自己免疫疾患の一部として扱われてきたが、遺伝子異常による炎症性疾患やそれと病態が類似する自然免疫が関わる病態を含めて新たに提唱された概念である。

【０１７４】

自己炎症性疾患の多くがNOD様受容体（ＮＬＲ）に属するパターン認識受容体ＰＰＲ経路による自然免疫応答を示すが、多くの場合、他のＰＲＲ（トール様受容体ＴＬＲなど）と共存して、自然免疫応答とともに獲得免疫応答が関与することが多い。ＮＬＲは細菌の細胞壁に存在する分子を認識する大きなＰＲＲファミリーである。

【０１７５】

自己炎症性疾患はタンパク質をコードする遺伝子の変異によって引き起こされる疾患で、カスパーゼの活性化、ガスダーミンポアの形成、パイロトーシスおよびＩＬ－１等の炎症性サイトカインの放出に続く組織の損傷が共通するメカニズムである。

【０１７６】

筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）は、抗酸化酵素の遺伝子であるＳＯＤ１などの突然変異が原因であり、異常タンパク質としてＴＤＰ－４３が検出されている。ＳＯＤ１タンパク質が細胞外に放出されてミクログリアを活性化し、パイロトーシスによりＴＮＦ－αなどの炎症性サイトカインを産生することが報告されている。

【０１７７】

クローン病は自然免疫因子であるNOD様受容体（ＮＬＲ）の一種であるＮＯＤ２の変異が３０個以上確認されており、腸内細菌に対する免疫異常が原因と考えられている。

【０１７８】

痛風又は偽痛風は、ＮＬＲのサブファミリーであるＮＬＲＰ３インフラマソームが尿酸‐ナトリウム（ＭＳＵ）結晶等に応答して一連の炎症反応を開始することが原因であり、同様の粒子状物質に対する特異的炎症反応は、ミョウバン、コレステロール、アミロイドβ、アスベスト、ヒドロキシアパタイトでも報告がある。

【０１７９】

ＮＬＲＰ３インフラマソームとカスパーゼ１を介したマクロファージのパイロトーシスは、クローン病（ＣＤ）、慢性腎疾患（ＣＫＤ）、２型糖尿病、多発性硬化症（ＭＳ）、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病（ＡＤ）、クリオピリン関連周期性症候群（ＣＡＰＳ）などで確認されている。

【０１８０】

またマクロファージが過剰炎症（パイロトーシス）を起こす現象は、マクロファージ活性化症候群（ＭＡＳ）として知られており、自己炎症性疾患における重要なリスクとなり、大規模な免疫反応はサイトカインストーム（ＣＳ）を発生することがある。

【０１８１】

ＣＳは制御不能な炎症反応で、病原体誘発性のほか、自己炎症性または単一遺伝性、治療介入誘発性に分類できる。ＣＳに至るシグナル伝達経路は、パイロトーシスと同様にＰＡＭＰまたはＤＡＭＰのパターン認識であり、炎症性サイトカイン等により組織や臓器の損傷、および死亡につながる可能性がある。一般的な免疫抑制策としてグルココルチコイド等が用いられるが、ＣＳを制御することは現在の医療では不可能である。

【０１８２】

ＣＳでは炎症性サイトカインを放出する元になる自然免疫細胞、すなわちマクロファージ、樹状細胞、ＮＫ細胞のパイロトーシスを抑制することが有効と考えられている。

【０１８３】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは細胞膜のガスダーミンポアの生成を阻害して、マクロファージ及びそれに連鎖する細胞のパイロトーシスを抑制することによって、炎症状態を解消することができる。サイトカインをターゲットした生物学製剤では免疫経路ごとに阻害剤を開発する必要があるが、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは１剤でパイロトーシスと全ての炎症性サイトカインの抑制が可能であり、自己炎症性疾患（クローン病や痛風／偽痛風、2型糖尿病、ＭＳ、アテローム性動脈硬化症、ＡＤ、ＣＡＰＳ、ＡＬＳ、ＣＫＤ、ＣＳ）の軽減を実現できる。

【０１８４】

［３－７］マクロファージ以外の細胞の死とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果

パイロトーシスはマクロファージに限定されるものではなく、顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞）のほか、膵β細胞、上皮細胞や杯細胞、神経細胞などでも報告されている。

【０１８５】

マクロファージの本来の機能は非炎症性の貪食作用で、パイロトーシスは進化的に遅れて獲得されたものと推定されている。そのためマクロファージの炎症作用は比較的温和なものである。これに対して好中球はネトーシスという強力な戦術を用いることができる。

【０１８６】

好中球は骨髄前駆細胞に由来し、寿命が１０時間程度の短命な細胞である。好中球が周囲に好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）を放出する現象はネトーシス（ＮＥＴｏｓｉｓ）と呼ばれ、主に細菌などの侵入者をトラップして殺戮する。ＮＥＴは主にＤＮＡとヒストンで構成されており、多くの殺菌タンパク質や顆粒が含まれる。

【０１８７】

ネトーシスは、ミトコンドリアへのストレスに加えて、ＰＡＤ４によるシトルリン化によって好中球のクロマチン構造が弛緩して、ガスダーミンＤによる膜穿孔とCa^{2+}の流入によって亢進することが報告されている。

【０１８８】

ＮＥＴはアテローム性動脈硬化などの慢性炎症性疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、喘息などの自己免疫疾患に関与している。また、細菌性敗血症において有害な役割を果たし、嚢胞性線維症患者の喀痰において非常に顕著である。

【０１８９】

好中球のネトーシスは外来微生物の殺戮には不十分であったようで、好酸球ではさらに強力な細胞外トラップを放出して炎症反応を起こすことができる。

【０１９０】

好酸球は主に寄生虫に対する防御を担う、好中球よりもさらに短命な自然免疫系の細胞である。好酸球は多くの慢性炎症性疾患、特に気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー反応において重要である。

【０１９１】

好中球と好酸球は死ぬために生まれてきた細胞であり、非常に短命である。炎症時には関係する細胞が相互に刺激しあうために過剰に反応しやすく、顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）の主戦場である外来細菌や寄生虫への攻撃の必要性の少ない現代生活において過剰な装備になっている。これらの炎症はＴｈ２細胞やNH細胞が関与する2型炎症と呼

ばれている。
【０１９２】
喘息は主に好酸球が原因の好酸球性喘息（２型炎症）と主に好中球が原因の好中球性喘息、その他に分類される。好酸球はアレルギーや喘息の主役であり、大部分の炎症に認められる炎症誘発性細胞である。
【０１９３】
食物アレルギー（ＦＡ）は特定の食物抗原、通常はタンパク質に対するさまざまな有害な免疫反応である。ＩｇＥを介したＦＡは、十分な臨床研究によって科学データが蓄積されている。しかし近年はＩｇＥとは別の、または混合性アレルギーが急速に増加している。
【０１９４】
好酸球性炎症症候群は、好酸球優位の炎症を伴う最近認識されたアレルギー性疾患で、２型炎症に分類される。好酸球性食道炎（ＥｏＥ）はその中の一つである。
【０１９５】
ＥｏＥは１９７７年に最初の報告があり、１９９０年代になって欧米豪で急速に増加してきた食物アレルギーである。ＥｏＥは喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性疾患、ＩｇＥ介在性食物アレルギーと強く関連しており、成人の主なアレルゲンは牛乳、小麦、卵、大豆である。アレルギー物質が体内に侵入すると、即時型反応と遅発型反応の2回のピークがあることが知られており、前者がＩｇＥとマスト細胞による即時型反応で、後者がＩｇＧと好酸球による遅発型反応である。
【０１９６】
ＩｇＥ介在性食物アレルギーは体中の多くの組織や臓器に存在するマスト細胞の活性化に起因するのに対して、ＥｏＥは消化管や気道に限定された好酸球とマスト細胞がかかわっており、マウスの研究では皮膚も感作に関係している可能性が指摘されている。
【０１９７】
好酸球性炎症症候群には、ＥｏＥのほかに好酸球性胃腸炎、同副鼻腔炎のほか、アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎（花粉症）などがあり、いずれも好酸球がかかわる２型炎症である。アトピー性皮膚炎は痒みを伴う慢性皮膚炎症で、全身性の臓器炎症の発生と関連することが報告されている。
【０１９８】
このような２型炎症に分類されるアレルギー性疾患については、種々の生物学的製剤が開発されているが、効果が一部の免疫経路に限定され、副作用もあるなど課題を抱えている。好中球のネトーシスや好酸球のエトーシスといわれる自爆的な細胞死もガスダーミンＤ依存性であり、パイロトーシスと同様の機構が働いており、マクロファージのパイロトーシスに誘発されて発生することが報告されている。
【０１９９】
マクロファージ以外の細胞も同様にパイロトーシスが原因であるため、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの摂取によって細胞膜のガスダーミンポアを修復してパイロトーシスを抑制する効果が期待できる。またパイロトーシスがおこる部位は消化管や気道に限定されるわけではなく、皮膚の上皮細胞や肺胞上皮、鼻腔上皮、角膜上皮など外界と接するあらゆる細胞で起こり得る。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの経口摂取だけでなく、皮膚への塗布や鼻腔内への噴霧、点眼などによって上皮細胞や免疫細胞のパイロトーシスを事前に安定化することは炎症の予防に有効と考えられる。
【０２００】
［３－８］消化管における炎症抑制の効果
炎症性腸疾患（ＩＢＤ）では消化管の炎症によって、活性化マクロファージから産生されるＴＮＦ－αが極めて重要な役割を果たしている。過敏性腸症候群（ＩＢＳ）においても軽微な粘膜炎症によるＴＮＦ－αの発現が高いことが報告されている。
【０２０１】
腸管粘膜におけるサイトカインは免疫担当細胞だけでなく、上皮細胞や間質細胞などの

間で相互に作用しており、粘膜の微小環境における外来微生物への防御と再生に関わっている。

【０２０２】

腸内壁をおおうすべての腸管上皮細胞は陰窩に存在する腸管上皮幹細胞から分裂して分化し、絨毛のほうへ移動して３～４日で絨毛の頂上においてアポトーシスを起こし管腔へと脱落する。腸管上皮細胞には粘液を産生する杯細胞と抗菌ペプチドを産生するパネート細胞などがあり、これらのパイロトーシスが微小環境の恒常性に影響する。

【０２０３】

腸上皮の杯細胞は粘液層を形成し、粘液タンパク質は腸内微生物のコロニー形成と浸潤を制限して、腸の恒常性を維持する上で極めて重要な役割を果たす。粘液層が消失して細菌が上皮に直接接触すると、慢性炎症を特徴とする潰瘍性大腸炎（ＵＣ）や異形成（ポリープ、憩室）が発生する。

【０２０４】

小腸の陰窩に存在するパネート細胞は抗菌ペプチドの産生および分泌に特化した細胞であり、腸内細菌の侵入に対する防御に不可欠な細胞である。

小腸におけるこれらの細胞のパイロトーシスは小腸における本来の機能を損ない、ＵＣの原因になるという報告がある。

【０２０５】

大腸においても同様に、ＴＬＲおよびＮＬＲが関与して、腸上皮細胞のパイロトーシスによる腸粘膜の損失によって、ＵＣおよびＩＢＳを生じることが報告されている。

【０２０６】

ｌｉｌａｃ０１ＥＶはパイロトーシスを抑制して、炎症を抑制することから、腸粘膜を回復し、ＵＣやＩＢＳ、異形成を回復する効果が期待できる。

【０２０７】

糖質の消化において、小腸内では消化酵素によって二糖類までの消化が行われた後、微絨毛に運ばれ最終段階の消化である膜消化が行われる。小腸粘膜の微絨毛が形成する微小空間には微生物は侵入することはできない。小腸上皮細胞の管腔に面した側の刷子縁膜に局在している膜消化酵素と二糖が接触すると単糖まで消化される。刷子縁膜にはＮａ共役型グルコーストランスポーター（ＳＧＬＴ）があり、単糖は細胞内へ能動輸送される。

【０２０８】

しかし、パイロトーシスによる炎症性サイトカインＴＮＦが作用すると、ＳＧＬＴの作用を阻害することが報告されている。その結果、膜消化で生じた単糖は管腔側へ逆拡散し、小腸内の腸内細菌による急激な発酵を受けることになり、有機酸とH_2、CO_2の発生がおこる。この現象は、感作状態にある食物が消化管を通過することによって炎症反応が惹起され、ＩＢＳにおける下痢と膨満感や、慢性偽性腸閉塞症の原因となる。

【０２０９】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは炎症を抑えることによってＴＮＦなどの炎症性サイトカインの産生を抑制することができ、その結果、グルコーストランスポーターの機能不全による吸収不良を正常化して、急激な腸内発酵を防ぐことができる。その結果、小腸における異常発酵により生じる、食後のもたれ、胸やけ、むかつき、悪心を軽減し、膨満感を解消することができる。また、杯細胞等を含む腸管上皮細胞のパイロトーシスを抑制して、粘液層を含む腸管上皮細胞を回復することができる。

【０２１０】

［３－９］老化による筋力低下と関連する疾患への効果

加齢に伴う筋力低下は、骨格筋の老化の結果と考えられてきた。しかし骨格筋は絶えずリモデリングを繰り返し、さらに運動ニューロンも喪失と再生を繰り返しており、運動脳領域の活動量の低下が、運動ニューロンの酸化ストレスを増加させ、筋線維のエネルギー代謝を損なう原因になっていることが報告されている。したがって筋力は正しい方法によって回復が可能であることが示されている。

【０２１１】

運動ニューロンが失われると、既存の筋線維は機能を戻すために神経が再生されるが、一部の神経線維は老化により再生されずに筋力の低下を招くことになる。この際の神経筋接合部（ＮＭＪ）の変性がサルコペディアの主要な要因と考えられている。加齢によりこのＮＭＪリモデリングに差異を生じ、特に高速運動ユニットの喪失が先行するという報告がある。この領域のミトコンドリアは減少しており、クリステの破壊、膨張、巨大ミトコンドリアの形成など、軸索終末におけるミトコンドリアの形態の劇的な変化について報告がある。

ミトコンドリアの数と機能の低下や頻繁に起こる形態変化の不活発化は、骨格筋を含む多くの組織で観察されている。

【０２１２】

骨格筋の再生において、マクロファージの死細胞の飲み込みは、損傷後の組織再生において重要なステップである。多くの研究は、広く使用されている毒性損傷後の筋肉再生モデルを使用している。これによると最初に炎症誘発性マクロファージ（Ｍ１型）が炎症を亢進し、損傷後２日後から３日後にかけて炎症が解消し、組織の修復、血管新生、およびマトリックスのリモデリングをし、筋形成を刺激する。また線維芽細胞の分化とコラーゲンの産生を促進するなど、骨格筋を再生するシーケンスが実施される。ここでは前段の炎症そのものが必要であるかは不明であり、炎症の解消が必須であることが示されている。

【０２１３】

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶは、マクロファージのパイロトーシスを抑制することによって、表現型を抗炎症型（Ｍ２型）にすることができる。骨格筋の再生において、炎症・修復過程を経ずに筋形成に入ることができると考えられ、骨格筋の増強に寄与することが期待できる。また実施例にあるように、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ服用により、筋肉痛を経験しなくなるというモニターが複数存在することから、筋肉痛は炎症・修復過程に伴って発生することが予想され、必ずしも再生過程に必要ではないと考えられる。

【０２１４】

［実施例］

実施例１．初代ミクログリアを用いた細胞保護効果評価手法の確立

Bacillus coagulans lilac-01株由来　ＥＶ（ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ）のパイロトーシス抑制効果を、ラット初代ミクログリアを用いて評価した。

【０２１５】

試験例１－１．ミクログリア細胞保護効果の測定１

初代ミクログリア細胞に、細菌由来のＥＶを添加し、生存細胞数を測定した。

【０２１６】

（１）初代ミクログリア細胞の準備

初代ミクログリア培養キット(ＳＤラット、コスモ・バイオ株式会社製)を使用して、ラット初代ミクログリア細胞浮遊液を調製後、ウェルに１００μＬ／ｗｅｌｌで添加し、３７℃５％CO_2インキュベータで２日間培養した。

【０２１７】

（２）細菌由来ＥＶの調製

次の細菌由来のＥＶを１０、５０、２５０倍に希釈した。コントロール（ＰＢＳ添加）、大腸菌由来ＥＶ（Escherichia coli）（ＥＣＥＶ、コスモ・バイオ社製）、乳酸菌由来ＥＶ(Lactobacillus paracasei)（ＬＢＥＶ、コスモ・バイオ社製）、有胞子性乳酸菌由来ＥＶ(Bacillus coagulans lilac-01)（ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ、コスモ・バイオ社製）、乳酸菌由来ＥＶ(Leuconostoc mesenteroides)（ＬｅｕＥＶ、コスモ・バイオ社製）

【０２１８】

（３）生細胞数の測定

ミクログリアが培養された９６ｗｅｌｌ　Ｐｌａｔｅから培養液を除去し、上記ＥＶ液を添加し、３７℃５％CO_2インキュベータで２日間培養した。その後、細胞増殖／細胞毒性アッセイキットＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　ｋｉｔ－８（ＣＣＫ－８、株式会社

同仁化学研究所製）で、生細胞数を代謝活性値から求め、さらに１０％ホルマリン固定後ギムザ染色し、オールインワン蛍光顕微鏡（ＢＺＸ－７１０、キーエンス社製）で測定した。

【０２１９】

（４）結果

ミクログリアの生存細胞数の比較を図１に示した。細菌由来ＥＶはそれぞれ右ほど濃い液（左から希釈倍率２５０倍、５０倍、１０倍）になっている。図１に示されるように、大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）、乳酸菌ＥＶ（ＬｅｕＥＶ）添加で濃い濃度ほどミクログリアの生存細胞数が減少していたが、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ添加によって生存細胞数が保持されていることが示された。

【０２２０】

試験例１－２．ミクログリア細胞保護効果の測定２

初代ミクログリア細胞に、細菌由来のＥＶを添加し、アミロイドβの取り込み量と生存細胞数を測定した。

【０２２１】

（１）初代ミクログリア細胞の準備

初代ミクログリア培養キットを使用して、ラット初代ミクログリア細胞浮遊液を調製後、ウェルに５０μＬ／ｗｅｌｌで添加し、３７℃５％CO_2インキュベータで４日間培養した。

【０２２２】

（２）細菌由来ＥＶの調製

細菌由来のＥＶ（コントロール（ＰＢＳ添加）、ＥＣＥＶ、ＬＢＥＶ、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ）を培養液で希釈した。

【０２２３】

（３）アミロイドβの添加

アミロイドβ（ＴＡＭＲＡ－Ａβ（１－４２）、コスモ・バイオ社製）を終濃度１００μＭになるように培養液で調製して、培養上清を除去後、１００μＬ／ｗｅｌｌで添加し、上記ＥＶ液も添加し、３７℃５％CO_2インキュベータで２４時間培養した。

【０２２４】

（４）核の染色

アミロイドβを含む培養液を除去し、核染色液（Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２　Ｃｅｌｌｓｔａｉｎ－Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２ｓｏｌｕｔｉｏｎ、同仁化学研究所製）を添加し、１時間インキュベーションして染色後、蛍光顕微鏡にて画像測定した。

【０２２５】

（５）細胞数計測

蛍光顕微鏡の画像解析ソフト（ハイブリットセルカウント解析）を用いて、各画像中のアミロイドβを取り込んだ細胞の数と染色された核の数を計測した。

【０２２６】

（６）結果

【０２２７】

（ｉ）ＥＶを添加後のミクログリアを蛍光顕微鏡で観察した写真を示した（図２）。ミクログリアはコントロール（ＰＢＳ添加）でも徐々に減少した(図２Ａ)。大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）を添加したミクログリアはパイロトーシスを起こし破裂して徐々に死滅していき、最終的にはほぼすべての細胞が死滅した（図２Ｂ）。一方、コントロール（図２Ａ）と乳酸菌ＥＶ（ＬＢＥＶ、図２Ｃ）、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ（図２Ｄ）を添加したミクログリアではパイロトーシスを起こし破裂した細胞はなかった。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを添加したミクログリアの生存数（図２Ｄ）は、大腸菌ＥＶ(ＥＣＥＶ)を添加したミクログリア（図２Ｂ）よりも生存数が多く、さらにコントロール（図２Ａ）と乳酸菌ＥＶ（ＬＢＥＶ、図２Ｃ）よりも生存数が多かった。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶにはミクログリア細胞保護効果があることが示された。

（ｉｉ）ミクログリア生存細胞数とアミロイドβを取り込んだ細胞数の比較を図３で示した。画像解析ソフトを用いて、ミクログリアの生存細胞数（図３Ａ）とミクログリア内に取り込まれたアミロイドβ数（図３Ｂ）を計測した結果、大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）添加で生存細胞数（図３Ａ）とアミロイドβ数（図３Ｂ）は減少しているのに反し、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ添加では顕著に生存細胞数（図３Ａ）と取り込まれたアミロイドβ数（図３Ｂ）が増加していた。また他の乳酸菌（ＬＢＥＶ）よりもｌｉｌａｃ－０１ＥＶ添加のほうが、生存細胞数（図３Ａ）も取り込まれたアミロイドβ数（図３Ｂ）も多かった。

【０２２８】

この結果からｌｉｌａｃ－０１ＥＶ添加は、他の細菌由来のＥＶと比較して、「アミロイドβの取り込み活性を保持したミクログリア」の保護効果があることが示された。

【０２２９】

試験例１－３

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの前処理よる大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）のミクログリア死滅作用を防止する効果を調査した。

【０２３０】

（１）初代ミクログリア細胞の準備

初代ミクログリア培養キットを使用して、ラット初代ミクログリア細胞浮遊液を調製後、ウェルに５０μＬ／ｗｅｌｌで添加し３７℃５％CO_2インキュベータで２日間培養した。

【０２３１】

（２）細菌由来ＥＶの調製

細菌由来のＥＶ（コントロール（ＰＢＳ添加）、ＥＣＥＶ、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ）を培養液で希釈した。

【０２３２】

（３）培養方法

ミクログリアが培養された９６ｗｅｌｌ　Ｐｌａｔｅから培養液を除去し、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ液を添加し、３７℃５％CO_2インキュベータで１日間培養する前処理を行い、その後、大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）を添加し、同様に1日間培養した。

【０２３３】

前処理を行わずに、ＰＢＳ、大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを添加後に培養した細胞と比較した。すべての細胞は、１０％ホルマリン固定後ギムザ染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

【０２３４】

（４）結果

蛍光顕微鏡でミクログリアを観察した写真を示した（図４）。大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）を添加したミクログリアはパイロトーシスを起こし破裂して死滅していた（図４Ｂ)。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを添加したミクログリアのウェル（図４Ｃ）では、大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）を添加したウェル（図４Ｂ）よりも生存しているミクログリア数が多く、コントロール（ＰＢＳ添加、図４Ａ）よりも細胞数が多かった。

【０２３５】

またｌｉｌａｃ－０１ＥＶで前処理後に大腸菌ＥＶを添加したミクログリアのウェル（図４Ｄ）では、大腸菌ＥＶ（図４Ｂ）と異なりミクログリア数は減少しておらず、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶのみの培養（図４Ｃ）と同様にミクログリア数が増加していた。

【０２３６】

以上から、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを添加する前処理は、大腸菌ＥＶのミクログリアを死滅させる作用（パイロトーシス）を防ぐ効果があることが示された。

【０２３７】

試験例１－４

各種ＥＶを添加し培養した培養上清に、パイロトーシスの原因物質であるガスダーミンＤのＮ末端（約１０ｋＤａ）が含まれているかどうかを調査した。

【０２３８】
（１）方法
試験例１－３のそれぞれの培養上清にメルカプトエタノールを添加し、ウエスタンブロッティングを行った。抗ガスダーミンD抗体（Ａｆｆｉｎｉｔｉｙ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を使用した。
【０２３９】
（２）結果
EV添加後の培養上清中の「ガスダーミンD」と「ガスダーミンDのN末端」のゲルの写真を示した（図５）。図５Ａ（約２５ｋＤａ）は細胞に穴を開けてパイロトーシスを起こさないガスダーミンDのバンドで、図５Ｂ（約１０ｋＤａ）はパイロトーシスを起こす「ガスダーミンDのN末端」のバンドである。コントロール（ＰＢＳ添加）、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ添加した上清では、パイロトーシスを起こす原因物質である「ガスダーミンDのN末端」のバンドは検出されず、大腸菌ＥＶを添加した上清のみに「ガスダーミンDのN末端」のバンドが検出された。このことから、大腸菌EVを添加したミクログリアの破裂がパイロトーシスであることが確認され、大腸菌ＥＶはパイロトーシスを起こすが、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶはパイロトーシスを起こさないことが示された。
【０２４０】
実施例２
ラット初代ミクログリアを用いたｌｉｌａｃ－０１ＥＶによるパイロトーシス抑制効果とゼータ電位の相関を評価した。
【０２４１】
試験例２－１
各種ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを作製し、ナノ粒子数と平均粒径を測定し、電子顕微鏡で撮影した。
【０２４２】
（１）各種ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの精製と測定
ｌｉｌａｃ－０１株を培地に接種し、２４時間培養後、遠心し上清をフィルターろ過した。ろ液を遠心式フィルターユニット（アミコンウルトラ－０．５、１００Ｋ）で限外ろ過し、ＰＢＳで３回洗浄・濃縮した液をＥＶ液とし、ナノ粒子の粒子径と数を測定した（ナノサイト、マルバーン、ＬＭ１０Ｖ－ＨＳ）。同様に、培地のみと、培養液にアルギニンを添加した液からもＥＶを精製した。電子顕微鏡の撮影は透過電子顕微鏡（日立株式会社製、Ｈ７６００）で行った。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを生成しているｌｉｌａｃ－０１株の撮影は走査型電子顕微鏡（日本電子株式会社製、ＪＳＭ７４００Ｆ）で行った。
【０２４３】
（２）結果
ナノサイトで測定した粒度分布の一例（図６（１））とｌｉｌａｃ－０１ＥＶの電子顕微鏡写真（図６（２）：２０万倍）とｌｉｌａｃ－０１ＥＶを生成しているｌｉｌａｃ－０１株の電子顕微鏡写真（図６（３）：２万倍）を示した。ナノサイトで測定したｌｉｌａｃ－０１ＥＶの平均粒子径は１２０~１２９ｎｍで、数は２．５~２．９×10^{11}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍLだった（図6（１））。電子顕微鏡で測定したｌｉｌａｃ－０１ＥＶの粒子径は２０~１００ｎｍだった（図６（２））。電子顕微鏡の試料作製時の処理でｌｉｌａｃ－０１ＥＶは縮小したと考えられる。図６（３）では、電子顕微鏡写真の左端には分裂途中でありＥＶを生成していない菌体（Ａ)、中央には細胞壁の亀裂に沿ってＥＶが並んでいる菌体（Ｂ）、右側には細胞壁表面に多量のＥＶを生成した菌体（Ｃ）が写っていた。このことからｌｉｌａｃ－０１株は、論文で報告されている他の菌種よりおよそ１０倍以上のＥＶを生成する能力があることが証明された。
【０２４４】
試験例２－２
試験例２－１で精製した各種ｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果を初代ミクログリアの生存細胞数を用いて評価した。

【０２４５】
（１）初代ミクログリア細胞の準備
初代ミクログリア培養キットを使用して、ラット初代ミクログリア細胞浮遊液を調製後、ウェルに１００μＬ／ｗｅｌｌで添加し、３７℃５％CO_2インキュベータで２日間培養した。
【０２４６】
（２）使用したコントロール、ポジティブコントロール、ネガティブコントロール
コントロールとしてＰＢＳ添加、ネガティブコントロールとして大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ、コスモ・バイオ社製）添加、ポジティブコントロールとしてｌｉｌａｃ－０１ＥＶ（試薬、コスモ・バイオ社製）を使用した。
【０２４７】
（３）生存細胞数の測定
ミクログリアが培養された ９６ｗｅｌｌ Ｐｌａｔｅ から培養液を除去し、上記ＥＶ液を添加し、３７℃５％CO_2インキュベータで２日間培養した。その後、細胞増殖／細胞毒性アッセイキットＣＣＫ－８で測定した。
【０２４８】
（４）結果
培養液とアルギニン添加によるｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果の違いを示した（図７）。ネガティブコントロールの大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）はコントロール（ＰＢＳ添加）よりもミクログリアの生存細胞数が減少し、ポジティブコントロールのｌｉｌａｃ－０１ＥＶ（コスモ・バイオ社製）は生存細胞数が増加した（図７点線）。
【０２４９】
「培地のみのＥＶ」は「コントロール（ＰＢＳ添加）」と同程度の生存細胞数だった。「培地のみのＥＶ」より「培養液から精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」の方がミクログリアの生存細胞数が多かったので、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶがミクログリアの生存細胞数を増加させることが確認できた（図７破線）。
【０２５０】
また、「ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ（コスモ・バイオ社製）」よりも試験例２－１で作製した「培養液から精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」を添加したほうが、生存細胞数が多かった（図７実線）。「培養液にアルギニンを添加後に精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」は、「アルギニンを添加せずに精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」より、生存細胞数が多かったこと（図７実線）から、アルギニン添加の効果も示された。
【０２５１】
試験例２－３
各種ＥＶのゼータ電位を測定し、ミクログリア生存細胞数との関係を調査した。
【０２５２】
（１）方法
試験２－１と実施例１で使用した各種ＥＶ液のナノ粒子数を同じ濃度に調整後にゼータ電位を測定した（ゼータサイザーナノＺ、マルバーン・パナリティカル社製）。ミクログリア生存細胞数は、実施例１の代謝活性値（ＣＣＫ－８、４５０ｎｍ）を使用した。
【０２５３】
（２）結果各種ＥＶ＊を添加したときのミクログリア生存細胞数とゼータ電位の関係を調べたところ、ミクログリア生存細胞数とゼータ電位の間には相関があり、ゼータ電位が低いほうがミクログリア生存細胞数が多かった（図８、R^2＝０．９５）。「培養液にアルギニンを入れたｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」のほうが、「アルギニンが入っていないｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」よりもゼータ電位が低いことから、アルギニンの効果が示された。
＊：コスモ・バイオ株式会社の大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）、乳酸菌ＥＶ（ＬｅｕＥＶ）、乳酸菌ＥＶ（ＬＢＥＶ）、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ、試験例２－１で精製した「ｌｉｌａｃ－０１培養液ＥＶ」、「ｌｉｌａｃ－０１培養液ＥＶ＋アルギニン」）
【０２５４】

実施例３

乾燥後のｌｉｌａｃ－０１ＥＶ効果を評価した。

【０２５５】

試験例３－１

（１）方法

「ｌｉｌａｃ－０１培養液を乾燥基材と混合後に精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」と「ｌｉｌａｃ－０１培養液を乾燥基材と混合後に乾燥させてから精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶ」を作製し、試験例２－２と同様に初代ミクログリアの生存細胞数を調べた。

【０２５６】

（２）結果

各種ｌｉｌａｃ－０１ＥＶと生存細胞数のグラフを示した（図９）。ネガティブコントロールの大腸菌ＥＶ（ＥＣＥＶ）はコントロール（ＰＢＳ添加）よりもミクログリアの生存細胞数が減少し、ポジティブコントロールのｌｉｌａｃ－０１ＥＶ（コスモ・バイオ社製）は生存細胞数が増加した（図９：点線）。

【０２５７】

「乾燥基材のＥＶ」は「コントロール（ＰＢＳ添加）」と同程度の生存細胞数だった。「乾燥基材のＥＶ」より「ｌｉｌａｃ－０１培養液と乾燥基材を混合してから精製したＥＶ」の方がミクログリアの生存細胞数が多かったので、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶがミクログリアの生存細胞数を増加させることが確認できた（図９：実線）。

【０２５８】

また、「ｌｉｌａｃ－０１培養液と乾燥基材を混合してから精製したＥＶ」と「ｌｉｌａｃ－０１培養液と乾燥基材を混合後に乾燥してから精製したＥＶ」の生存細胞数が同程度だったことから、乾燥後もｌｉｌａｃ－０１ＥＶの効果が保たれることが示された（図９：実線）。

【０２５９】

試験例３－２

（１）方法

培養液とその培養液の乾燥物から限外濾過法で精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶから、Ｆｏｌｃｈ法で脂質を抽出し、ＨＰＬＣ－ＥＬＳＤでリン脂質を分析した（Ｓｏｆｔａ３００Ｓ（ＴＥＬＥＤＴＮＥ　ＩＳＣＯ））。

【０２６０】

（２）結果

ナノサイトで測定したＥＶの数はそれぞれ１．２×10^{12}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬと２．８×10^{12}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬだった。培養液から精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶのリン脂質（ＰＧ＋ＣＬ）の割合は全グリセロリン脂質の８７％で、乾燥物から精製したｌｉｌａｃ－０１ＥＶのリン脂質（ＰＧ＋ＣＬ）の割合は全グリセロリン脂質の９２％だったので、ＥＶ数とリン脂質（ＰＧ＋ＣＬ）は乾燥の影響を受けないことが示された。

【０２６１】

試験例３－３

（１）方法

健常な男女（３０－７０代）のボランティア３０名にｌｉｌａｃ－０１ＥＶの乾燥物（１日当たり約０．５ｇ、３×10^{11}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／日）、猫（５匹）に同乾燥物（１日当たり約０．５ｇ、３×10^{10}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／日）を飲んでもらって、１か月から３か月後に感想を教えてもらった。

【０２６２】

（２）ボランティアの感想

（ｉ）抗老化：シミの色が薄くなって面積が減った。シミが１つ減った。化粧のノリがいい。膝の角質化しているところが、ぽろぽろとれた。肌がつるつるする。肌ツヤがよくなった。肌色がワントーン明るくなった。足の痛みが減った。踵が例年よりかさかさしない

。頭と体がすっきりして調子がいい。
（ｉｉ）抗アレルギー：鼻水が出なくなった。くしゃみが減った。鼻の中にできものができなくなった。突発的な水状の鼻水とクシャミが出なくなってきた。慢性的な鼻炎が改善して鼻炎の薬を飲まずに済んでいる。喘息の発作が改善した。アレルギーによる咳症状が改善した。
（ｉｉｉ）消化管改善：おなかの調子が整って下痢しなくなった。便の形が整った。便器に便が付かなくなった。ものを食べてもおなかがごろごろしなくなった。小麦や乳製品を食べてもおなかの違和感と鈍痛が減った。夏バテの下痢にならなかった。何十年の下痢が治って、いい形のうんちになった。ＩＢＳによる出血が改善した。便秘が治って毎日ウンチが出るようになった。朝のお便りもスムーズで体調良い。
（ｉｖ）恒常性維持：体がポカポカする。鼻が通るようになった。鼻血が出なくなった。目の下のクマが消えてきた。手足の冷えが改善された。尿がたくさん出るようになって浮腫みが減った。疲れからの血尿が止まった。交通事故の後遺症の手の痺れ・だるさが薄れている。寝返りできないほど痛かった腰が痛くなくなった。ストレスからくる高血圧の後頭部の頭痛さが減った。お酒を飲みすぎても二日酔いしなくなった。転んでできた青タンの消え方が早かった。眼底出血の跡と溜まっていた水が急に減っていて医者に驚かれた。疲れにくくなった気がする。体重が減っていないのにＨｂＨ１ｃが０．２も下がった。眼のピントがハッキリ焦点が合う気がした。スッキリ感がある。反射神経が上がった。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを摂取し始めてからコレステロール、甲状腺の値が上がらなくなった。貧血傾向が改善した。生理不順が改善した。足の臭いが少なくなった。なかなか治らない口内炎が最近は治癒に進んでいる。腰の痛みが少ないのには本当に助かっている、治りも早いような気がする。強い運動をしても筋肉痛が出なくなった。寝られなくて悩んでいたけど、深く熟睡できるようになった。睡眠の質が上がった。夜中一度に目が覚めて起きても、その後寝れるようになった。

【０２６３】

（３）猫の様子及び飼育者による感想

（ｉ）抗老化：数ヶ月間左目から出ていた茶色い涙が出なくなった。
（ｉｉ）消化管改善：何年も苦しんでいる慢性の下痢がとまった。授乳期の母猫に摂取させたら、子猫たちは下痢をしなくなった。ウンチがくさくなくなった。
（ｉｉｉ）恒常性維持：猫ヘモプラズマ感染症で食欲がない猫の歯肉口内炎が回復傾向。歯肉口内炎の赤みが改善した。歯肉口内炎があって歯肉種の摘出した場所の赤みがとれてきた。ひどい歯肉口内炎の猫が糸のようなヨダレを垂らさなくなった。食べる時さほど痛がらなくもなった(図１０、Ａ：飲む前、Ｂ：飲んで1か月後、矢印：糸のようなよだれ)。腎不全の猫にきいている感じがする。高齢猫のクレアチニンの数値が下がった（約１か月間の摂取により、数値が３．０から２．６へ低下した）。

【０２６４】

実施例４

ｌｉｌａｃ－０１ＥＶが細胞のミトコンドリアを活性化する効果を評価した。

【０２６５】

試験例４－１

（１）方法

老化させたヒト繊維芽細胞（Ｓ－ＨＤＦ）に、ＰＢＳ（コントロール）とｌｉｌａｃ－０１ＥＶを添加した培地に交換しながら３７℃５％CO_2インキュベータで培養し、２２日後にミトコンドリア活性を測定し（ＭＴ－１ミトコンドリア膜電位検出キット、同仁化学研究所製）、核を染めて顕微鏡で画像撮影した。

【０２６６】

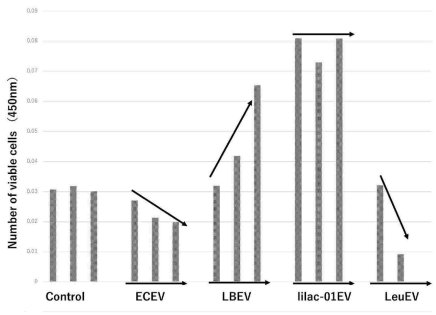
（２）結果

細胞の画像と活性のグラフを以下に示した（図１１）。ｌｉｌａｃ－０１ＥＶを添加した細胞（図１１Ｂ）では、コントロール（ＰＢＳ添加、図１１Ａ）よりも、細胞の形（図の白枠）が細長くなり（細胞が若返ったことを表す）、ウェルの中の細胞数（核：青）が

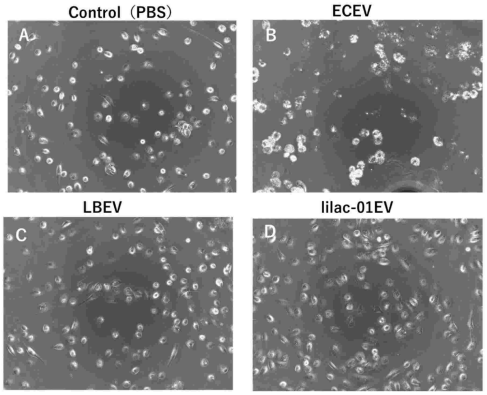
増え、ミトコンドリア（赤）の面積（図１１Ｃ）と輝度（図１１Ｄ）も増加し、ｌｉｌａｃ－０１ＥＶ添加によってミトコンドリア活性が上昇したことが確認された。

【図面】

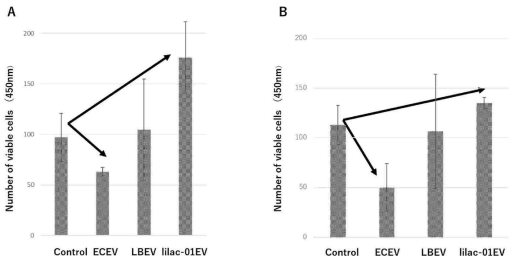
【図１】



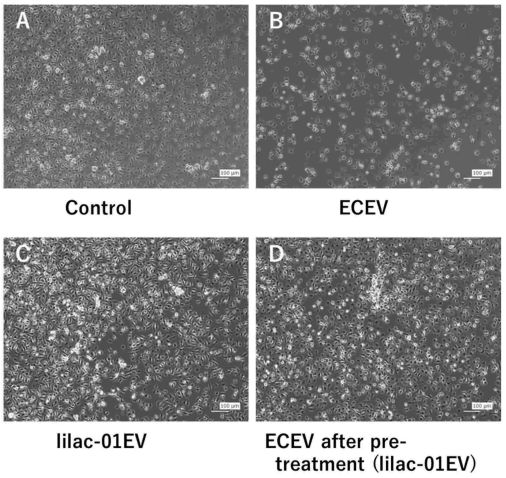
【図２】



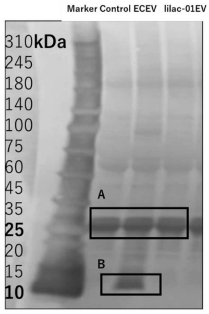
【図３】



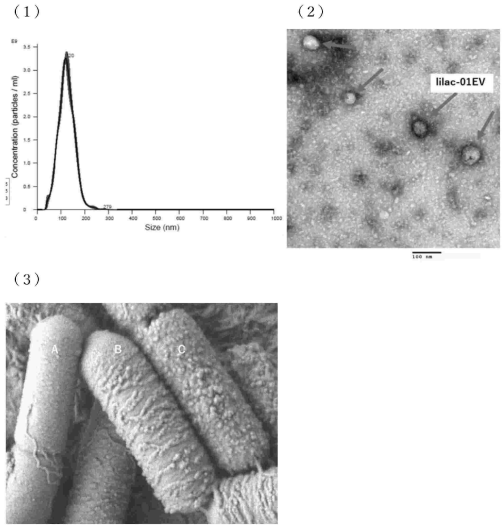
【図４】



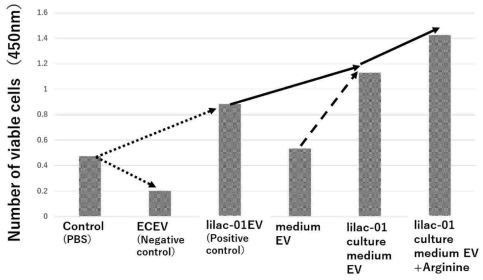
【図５】


Marker Control ECEV lilac-01EV
310kDa
245
180
140
100
75
60
45
35
25
20
15
10
A
B

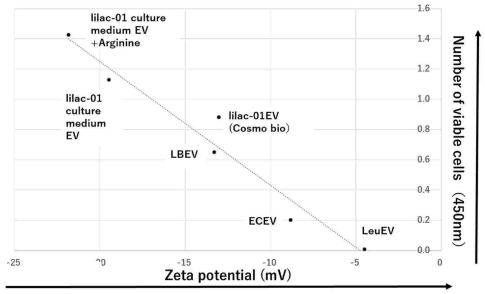
【図６】


（1）
Concentration (particles / ml)
Size (nm)
（2）
lilac-01EV
（3）
A
B
C

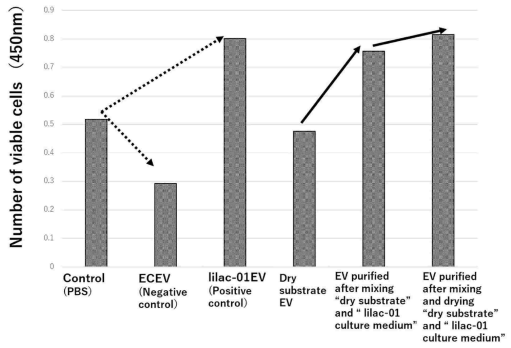
【図７】


Number of viable cells （450nm）
Control (PBS)
ECEV (Negative control)
lilac-01EV (Positive control)
medium EV
lilac-01 culture medium EV
lilac-01 culture medium EV +Arginine

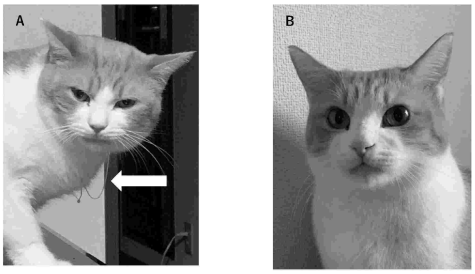
【図８】


lilac-01 culture medium EV +Arginine
lilac-01 culture medium EV
lilac-01EV (Cosmo bio)
LBEV
ECEV
LeuEV
Zeta potential (mV)
Number of viable cells （450nm）

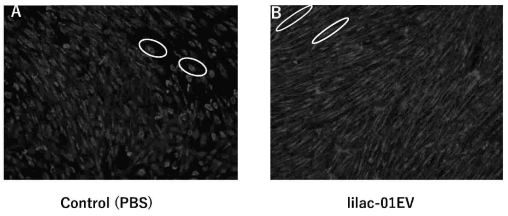
【図９】

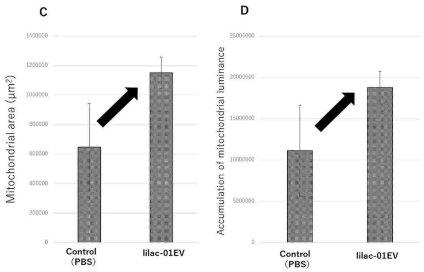

Number of viable cells（450nm）
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control (PBS)
ECEV (Negative control)
lilac-01EV (Positive control)
Dry substrate EV
EV purified after mixing "dry substrate" and " lilac-01 culture medium"
EV purified after mixing and drying "dry substrate" and " lilac-01 culture medium"

【図１０】


A
B

【図１１】


A
B
Control (PBS)
lilac-01EV


C
D
Mitochondrial area (μm²)
Accumulation of mitochondrial luminance
Control (PBS)
lilac-01EV
Control (PBS)
lilac-01EV

【手続補正書】
【提出日】令和5年8月3日(2023.8.3)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
バチルス・コアグランス　Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ（ウェイズマンニア・コアグランス　Ｗｅｉｚｍａｎｎｉａ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ）由来の細胞外小胞を有効量含有する、免疫機能の維持又は改善用組成物。
【請求項２】
バチルス・コアグランス　Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ（ウェイズマンニア・コアグランス　Ｗｅｉｚｍａｎｎｉａ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ）由来の細胞外小胞を有効量含有する、抗老化、抗アレルギー、消化管改善、又は、恒常性維持用組成物。
【請求項３】
前記細胞外小胞の１日摂取量が、10^9個以上である、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項４】
前記細胞外小胞が、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）中で－１５ｍＶ以下のゼータ電位を有することを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項５】
アルギニンもしくはアルギニンリッチなペプチドもしくはタンパク質を含む乾燥物または塩基性ゲル懸濁物を更に含有することを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項６】
前記免疫機能の改善が、慢性炎症性疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患、自己炎症性疾患、又は、２型炎症疾患の改善であることを特徴とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
前記細胞外小胞が、バチルス・コアグランス　Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ（ウェイズマンニア・コアグランス　Ｗｅｉｚｍａｎｎｉａ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ）ｌｉｌａｃ－０１株（受託番号：ＮＩＴＥ　Ｐ－０１１０２）が産生する細胞外小胞であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。

フロントページの続き

(51)国際特許分類	FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　37/06　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　37/06	

Ｆターム（参考）
AA36 AA53 BB01 BB11 BB21 BB31 CC07 CC40 DD51 DD52 FF36
4C086 AA01 AA02 DA41 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZB08 ZB11
4C087 AA01 AA02 BC64 CA19 MA05 NA14 ZA02 ZB07 ZB09 ZB11 ZB13