

一般演題 6

Lactobacillus gasseri および *Propionibacterium freudenreichii* の
発酵代謝産物による自然免疫賦活化作用Activation of Innate Immunity by Fermented Metabolites from
Lactobacillus gasseri and *Propionibacterium freudenreichii*○加藤(森) ゆうこ¹, 折橋毅典¹, 世良健司¹, 萩原克郎²¹明治飼糧(株) 研究開発部, ²酪農学園大学獣医学部

【目的】 *Lactobacillus gasseri* 発酵代謝物 (LG) とプロピオン酸菌乳清発酵物 (Profec) の2種類の発酵代謝産物混合剤 (Prebiotic Supplement; PS) の投与により, マウスにおいてリステリア菌排菌能が亢進されること, また, その排菌能に関与するマクロファージの機能が賦活化されることを報告した (第13回腸内細菌学会). 本研究では, これら2種類の発酵代謝産物の効果を比較するために, LGおよびPS各々をマウスに投与しリステリア菌排菌能および免疫機能の検討を行った.

【方法】 5週齢のC57BL/6マウスに対し, Profecを含有しないLG単独, PS (LGとProfecの混合物), ならびにそれらの基材であるデキストリン (対照群) を4週間経口投与した. 投与各群の免疫機能は, 末梢血の白血球動態をフローサイトメトリーにより, また脾細胞におけるサイトカイン, Toll-like receptors (TLRs) ならびに転写因子の遺伝子発現をRT real-time PCR法により解析した. リステリア菌排菌能は, 4週間投与後の各群のマウスに対し腹腔内感染を実施し, 感染3日後の排菌効果を臓器内菌数により比較した. また, 腹腔内マクロファージのNO産生量の測定も行った.

【結果・考察】 PSを4週間投与したマウスでは, リステリア菌感染3日後の脾臓内菌数が有意に減少し, その排菌能はLG投与群よりも高かった. 末梢血の白血球動態の比較においては, LGおよびPS投与による白血球数の増加, およびCD4とCD8陽性細胞数の増加がみられた. 脾細胞におけるTLR9の発現は, LG, PS投与両群が対照群より高値を示した. TLR9のシグナルを受けるmyd88の発現は, 投与群間で同程度であったが, 転写因子NF- κ Bの発現は, PS投与群が高い傾向を示した. IFN- γ の発現はLG, PS投与両群の方が対照群よりも高かった. また, 血漿中IL-12濃度および腹腔内マクロファージのNO産生能は他群と比較してPS投与群が高値を示していた.

本研究において, リステリア菌排菌能に対してはPS投与が最も高い効果を示した. これはTLR9等を介した刺激によりNF- κ Bが活性化され, IFN- γ の産生に伴うマクロファージの活性化ならびにNO産生量上昇に伴う貪食・殺菌を亢進したものと示唆された. また, これらの効果はProfecの添加により促進されたことから, ProfecがLGに対して補助的もしくは相乗的に作用することが示唆された.

一般演題 7

腸内共生菌のうち *Bacteroides* には腸管免疫系のIgA産生を強く誘導する特徴をもつ*Bacteroides* Derived from Murine Commensal Bacteria Promote Gut IgA Production Effectively

○ 鈴木あみ¹, 細野 朗¹, 大山堯人¹, 柳橋 努¹, 八村敏志², 高橋宜聖³,
百瀬愛佳⁴, 伊藤喜久治⁴, 高橋恭子¹, 上野川修一¹

¹日本大学生物資源科学部食品生命学科, ²東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター,

³国立感染症研究所免疫部, ⁴東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

【目的】 腸管免疫系における代表的な感染防御反応に、免疫グロブリン (Ig) Aの産生があり、この反応には腸内共生菌が強く関与していることが知られている。すなわち、腸管では非常に多くの腸内細菌が腸管免疫系の発達に関与している一方で、自身は宿主の免疫系によって完全な排除を受けずに共生している。しかし、多種多様な腸内共生菌のうち、どのような菌種が、どのような作用機序でIgA産生の活性化に関与しているかは明らかになっていない。そこで、本研究では、マウス腸内共生菌の分離株を用い、マウス腸管免疫系のIgA産生に対する特定の腸内細菌の作用を細胞分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【方法】 マウス腸内共生菌の分離株であるグラム陰性菌の*Bacteroides* 8菌株, *E. coli* 2菌株, グラム陽性菌の*Lactobacillus* 3菌株, *Enterococcus* 1菌株のそれぞれ加熱処理菌体, およびグラム陰性菌の菌体成分であるLPS (*E. coli*由来)を用い、マウスパイエル板細胞との共培養を行った。未成熟なIgM⁺B細胞から、IgA⁺形質細胞への分化の割合、IgA産生の誘導に関与するサイトカインであるIL-5の測定により、菌種間の比較を行った。

【結果】 一般に、グラム陰性菌群はグラム陽性菌群に比べて総IgA産生量、IgA形質細胞への分化の割合が高い傾向が見られ、特に*Bacteroides*については、*B. acidifaciens*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*のいずれも他の菌に比べてIgA産生応答が高い傾向が見られた。一方、グラム陰性菌の菌体成分であるLPSは、10-50 μg/mlの添加濃度において最も高くIgA産生が誘導できたが、この条件で同濃度のグラム陰性菌と比較すると、総IgA産生量、IgA形質細胞発現の割合は低い傾向が見られた。

【考察】 腸内共生菌のうち、特に*Bacteroides*には腸管免疫系においてIgMからIgAへのクラススイッチを促進し、IgA産生を強く誘導する特徴があることが示唆された。この応答はグラム陰性菌に含まれるLPSによるB細胞マイトジェンの作用が考えられるが、さらにLPS以外の菌体成分の関与も含めて、*Bacteroides*によるIgA産生活活性化機構の検討を進めている。

一般演題 8

Bifidobacterium longum JBL05が産生する多糖のアレルギーモデルマウスへの経口投与効果Effect of Orally Administered Exopolysaccharide Produced by *Bifidobacterium longum* JBL05 on Allergy-Model Mouse○河野麻実子^{1,2}, 庄條愛子², 小崎敏雄¹, 浅田雅宣¹, 大野 徹¹, 北村進一²¹森下仁丹株式会社 研究開発本部, ²大阪府立大学 生命環境科学研究科

【目的】 ヒト腸管より分離された*Bifidobacterium longum* JBL05は、菌体外多糖を産生するビフィズス菌であり、その多糖については一次構造が明らかになっている (1)。マウスパリエル板細胞を用いた細胞試験においては、本多糖がパリエル板免疫調節作用を有することも認められている (2)。本研究では、*B. longum* JBL05が産生する多糖の経口投与による効果を、アレルギーモデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】 7週齢雄性BALB/cマウスを馴化飼育後、右耳介に2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) を塗布することで感作し、4日目以降1日おきにTNCBを塗布することでアレルギー様皮膚炎を誘発した。感作4日前より、*B. longum* JBL05菌体、*B. longum* JBL05産生多糖を1日1回、約3週間経口投与した。対照群には、リン酸緩衝液、陽性対照群には、プレドニゾロンを同様に経口投与した。感作日および感作4日後から、1日おきにTNCB塗布前の耳介厚測定を行い、アレルギー抑制効果として評価した。また、マウス血漿IgE量、糞便菌叢解析および糞便中IgA量の測定も行った。

【結果】 *B. longum* JBL05菌体投与群 (10⁸ cfu/日) および、*B. longum* JBL05産生多糖投与群 (20 mg/kg/日) において、対照群と比べて、誘発2回目から、耳介肥厚化の有意な抑制が認められた。その抑制効果は、いずれも陽性対照群であるプレドニゾロン投与群 (3 mg/kg/日) と同等であった。血漿IgE量は、いずれの群においても、対照群に比べて減少傾向がみられた。糞便中ビフィズス菌数およびIgA量は、対照群および陽性対照群に比べ、*B. longum* JBL05菌体投与群および*B. longum* JBL05産生多糖投与群で増加の傾向が認められた。

【考察】 これらの結果より、*B. longum* JBL05および*B. longum* JBL05産生多糖の経口投与が、マウス耳介に誘発させたアレルギー様皮膚炎を抑制することがわかり、ビフィズス菌のみならずビフィズス菌が産生する代謝物にもアレルギー抑制作用が期待される。これまでにも報告のあるプレドニゾロンなど副腎皮質ホルモン摂取による副作用が、ビフィズス菌やその代謝物の摂取により認められなかった点においても、有用な素材となる可能性が考えられた。

<参考文献>

- (1) Kohno M, Suzuki S, Kanaya T, Yoshino T, Matsuura Y, Asada M, Kitamura S. 2009. Carbohydrate Polymers 77 : 351-357.
- (2) 河野麻実子, 小崎敏雄, 浅田雅宣, 北村進一. 2008. 日本応用糖質科学会平成20年度大会 (第58回), 39.

一般演題 9

ブドウ球菌腸毒素B産生黄色ブドウ球菌の腸内定着と
乳児期アトピー性皮膚炎発症との関連An Association of Intestinal Staphylococcal Enterotoxin B Producing
Staphylococcus aureus with the Development of Eczema in Infancy○鈴木修一¹, 下条直樹², 木村勝紀³, 利光孝之³, 河野陽一²¹独立行政法人 国立病院機構 下志津病院 小児科・アレルギー科, ²千葉大学大学院医学研究院小児病態学,
³明治乳業食機能科学研究所

【目的】ブドウ球菌腸毒素 (SE) Bは, 黄色ブドウ球菌により産生される外毒素の一つである. マウスモデルでは, SEBの皮膚塗布によりTh2関連の炎症が誘導され, 経口投与により食物抗原に対するアレルギー反応が誘導される. SEB産生黄色ブドウ球菌の皮膚への定着とアトピー性皮膚炎との関連は臨床的に確立されているが, この細菌の腸管への定着がアトピー性皮膚炎の病態において果たす役割についての報告は少ないことから, われわれは乳児期のアトピー性皮膚炎発症と新生児期の腸内毒素産生黄色ブドウ球菌の定着について解析を行った.

【方法】出生コホートにおいて, 生後4日, 1ヶ月の便について, 菌種特異的プライマーによるReal-time PCRにより黄色ブドウ球菌を定量解析した. 黄色ブドウ球菌が検出された検体について, SEA, SEB, SEC, SED, SEEおよび毒素性ショック症候群毒素-1を, 各特異的プライマーを用いて検出した. 腸内優勢菌である*Bifidobacterium*および*Bacteroides*についても, 菌属特異的プライマーによるReal-time PCRを行った. アトピー性皮膚炎の発症の判定は, 出生1ヶ月, 4ヶ月, 7ヶ月における質問票の回答に基づいて行った.

【結果】141名の乳児のうち, 26名 (18.4%) がアトピー性皮膚炎を発症し (AD群), 115名は湿疹のエピソードを認めなかった (非AD群). AD群, 非AD群間において, 黄色ブドウ球菌の検出率は生後4日では有意な差異を認めなかったが, 生後1ヶ月においてはAD群が非AD群よりも有意に高率であった (65.3% vs. 40.9%, $p=0.023$). 検出された菌量については, 両群間で有意な差異を認めなかった. 毒素産生黄色ブドウ球菌の検出頻度は低く, 生後1か月におけるSEB産生黄色ブドウ球菌 (9.3%) を除き, 全て5%未満であった. 生後1か月におけるSEB産生黄色ブドウ球菌の検出率は, 統計学的に明らかな有意差には至らないものの, AD群において非AD群よりも高率である傾向が認められた (19.2% vs. 7.0%, $p=0.065$). *Bifidobacterium*および*Bacteroides*の検出率および菌量は生後4日, 1ヶ月において, 両群間で有意な差異は認めなかった.

【考察】この結果は, 新生児期におけるSEB産生黄色ブドウ球菌の腸内への定着が, 乳児期のアトピー性皮膚炎発症において, 重要な役割を果たす可能性を示している. 新生児期における腸内黄色ブドウ球菌, 特にSEB産生黄色ブドウ球菌の定着抑制が乳児期アトピー性皮膚炎発症予防に有効であるかについては, さらなる研究が必要である.