

一般演題 A-7

Lactobacillus GG 発酵乳の炎症性腸疾患に対する作用の検討Potent Effects of Fermented Milk Containing *Lactobacillus* GG on Inflammatory Bowel Disease○依田一豊¹, 何方¹, 宮澤賢司¹, 川瀬学¹, 久保田晃¹, 平松優¹, Fang Yan²¹タカナシ乳業株式会社・商品研究所, ²Vanderbilt大・医

【目的】近年、日本でも炎症性腸疾患（IBD）と総称される潰瘍性大腸炎やクローン病が増加している。この疾患では、炎症性サイトカインの産生増加、上皮細胞のアポトーシス、免疫細胞の浸潤によって、腸管上皮細胞の完全性が損なわれる。*Lactobacillus* GG (LGG菌)は、その培養上清中に腸管上皮の損傷やアポトーシスを抑制する機能性タンパク質を分泌することが報告されている。そこで、食品の摂取によるIBDの予防や症状軽減効果の可能性を模索するために、LGG菌を含む発酵乳（LGG菌発酵乳）を用いた試験を実施した。

【方法】雌C57BL/6マウスにLGG菌発酵乳を10日間経口投与した。投与6日目より飲水中にDSSを加え大腸炎を誘導した。試験期間終了後にマウスから大腸を取り出し、炎症の度合い（炎症スコア）および長さを観察した。一方、培養細胞を用いた試験ではLGG菌発酵乳の遠心上清を用いた。マウス結腸上皮細胞に遠心上清を添加しTNF- α およびシクロヘキサミドでアポトーシスを誘導し、フローサイトメトリーおよびTUNEL染色を行った。また、遠心上清を添加したマウスおよびヒト結腸上皮細胞に、過酸化水素を加えタイトジャンクションの破壊を誘導したのち、抗ZO-1抗体を用いた免疫染色法にて細胞のZO-1の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。さらに遠心上清を添加したマウス結腸上皮細胞の細胞溶解液を、抗リン酸化Akt抗体もしくは抗リン酸化EGF受容体-Tyr1069抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

【結果】LGG菌発酵乳を投与したDSS誘導大腸炎マウスでは、非投与群のマウスと比較して腸管上皮のダメージが軽減され、炎症スコアが有意に低下した。また、結腸の長さも正常マウスと違いが見られなかった。LGG菌発酵乳を添加した結腸上皮細胞では、アポトーシスおよびタイトジャンクションの破壊が抑制され、さらにEGF受容体が用量依存的に活性化された。

【考察】LGG菌発酵乳の経口投与が、マウスのDSS誘導大腸炎に予防効果を示した。また、その予防効果は、LGG菌発酵乳がEGF受容体に間接的に作用し、宿主の腸管上皮細胞をダメージやアポトーシスから保護することによるものだと考えられた。

一般演題 A-8

Lactobacillus gasseri SBT2055による腸管でのIgA産生誘導とその機構解明Mechanisms for the Augmentation of IgA Production
in the Mouse Intestine by *Lactobacillus gasseri* SBT2055

○浮辺 健¹, 細谷知広^{1,2}, 小川哲弘¹, 大町愛子¹, 門岡幸男¹,
塩崎拓也², 中山洋祐², 酒井史彦^{1,2}, 宮崎忠昭²

¹雪印メグミルク株式会社, ²北海道大学遺伝子病制御研究所

【目的】 プロバイオティクス乳酸菌である*Lactobacillus gasseri* SBT2055 (ガセリ菌SP株) の経口投与は, ウイルス感染に対し予防効果を有することから生体防御機能を高めることが示唆されている. これら生体防御機構の最前線である粘膜組織では, IgA抗体が病原体排除に重要な役割を担っている. そこで, 本研究ではガセリ菌SP株による腸管でのIgA産生誘導作用とその機構について解析した.

【方法】 (1) 7週齢Balb/c雄マウスに, ガセリ菌SP株を0.35% (w/w) 含む餌 (SP群), または無添加餌 (対照群) を5週間毎日摂取させ, 小腸組織中のIgA量, IgA陽性細胞の割合, および各種遺伝子発現量を測定した. (2) Balb/c雄マウスのパイエル板由来CD11c陽性細胞と脾細胞由来IgM陽性細胞との共培養系にガセリ菌SP株を添加し, 培養上清中のIgA量を測定した.

【結果・考察】 (1) 小腸組織中のIgA量と, 小腸のパイエル板細胞および粘膜固有層細胞におけるIgA陽性細胞の割合は, SP群では対照群よりも有意に高い値を示した. また, SP群では小腸組織のAPRILとRALDH2の遺伝子発現量が対照群よりも高いことが明らかとなった. (2) CD11c陽性細胞とIgM陽性細胞との共培養系にガセリ菌SP株を添加した結果, 培養上清中のIgA量は無添加の場合に比べ顕著に増加することが認められた. これまでに腸管に存在する樹状細胞 (CD11c陽性細胞) は, APRILやRALDH2の発現を介してIgA産生を制御することが知られている. これらのことから, ガセリ菌SP株は腸管の樹状細胞に作用し, APRILやRALDH2の発現を制御することによりIgA産生を誘導し, 生体防御機能を高めている可能性が示唆された.

一般演題 A-9

5種類の *Lactobacillus* 属乳酸菌由来ゲノムDNAの
抗炎症作用機構に関する研究Study on Anti-inflammatory Effect of Genomic DNA
from Five Different Lactobacilli○平松征洋¹, 佐藤朝光¹, 入江圭一², 椎村翔太¹, 中島幸彦¹, 見明史雄¹, 鹿志毛信広¹¹福岡大学薬学部微生物薬品化学教室, ²福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室

【目的】多くの研究者が乳酸菌の抗炎症作用について報告しているが、その有効成分に関する研究は十分に行われていない。我々は、乳酸菌に含まれる有効成分として、乳酸菌ゲノムDNAに注目した。本研究では、H₂O₂を用いてヒト腸管上皮由来Caco-2細胞に炎症を誘発させ、炎症の指標であるIL-8の遊離量を測定することで、乳酸菌ゲノムDNAが抗炎症作用を持つかどうかを調べた。さらに、小胞体やエンドリソソームに分布し、細菌のDNAを特異的に認識する受容体Toll-like receptor 9 (TLR9)と炎症性サイトカインなどの発現を誘発する転写因子NF-κBおよびIκB-αとの関連性を検討し、抗炎症作用機構の解明を試みた。

【方法】Caco-2細胞にH₂O₂と5種類の *Lactobacillus* 属乳酸菌 (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. reuteri*) および大腸菌から抽出したゲノムDNAを曝露し、培養上清中へのIL-8遊離量をELISAで測定した。さらに、作用機構を解明するために、以下の項目を行った。1) 各種乳酸菌の16s rRNA遺伝子に対するPCR法により、乳酸菌ゲノムDNAのCaco-2細胞内への侵入を確認した。2) RNAi法によりTLR9の発現を抑制したCaco-2細胞を用いて、乳酸菌ゲノムDNAのIL-8遊離抑制作用を評価した。3) H₂O₂と乳酸菌ゲノムDNAを曝露したCaco-2細胞から、時間依存的に細胞質と核を分離し、NF-κBの核内移行およびIκB-αの分解をWestern Blotで解析した。

【結果・考察】すべての乳酸菌ゲノムDNAは、Caco-2細胞においてH₂O₂により誘発されたIL-8の遊離を抑制することを明らかにした。しかし、大腸菌ゲノムDNAにこの作用は観察されなかった。また、作用機構を検討した結果、1) H₂O₂の存在下で、乳酸菌ゲノムDNAがCaco-2細胞内に侵入すること、2) TLR9の発現を抑制したCaco-2細胞では、乳酸菌ゲノムDNAのIL-8遊離抑制作用が減少すること、3) 乳酸菌ゲノムDNAは、H₂O₂を曝露したCaco-2細胞においてNF-κBの核内移行およびIκB-αの分解を抑制すること、さらに、この作用はTLR9シグナルに依存していることを明らかにした。これらの結果は、乳酸菌ゲノムDNAが細胞内へ侵入後、TLR9シグナルを介して、NF-κBの核内移行・IκB-αの分解を抑制することで、H₂O₂により誘発されるIL-8の遊離を抑制することを示している。

一般演題 A-10

Bifidobacterium bifidum G9-1 (BBG9-1) の経口投与が
マウス腸管免疫に及ぼす影響Effects of Oral Administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1)
on Mucosal Immunity in Mice

○川原知浩, 常峰 智

ビオフェルミン製薬株式会社 神戸研究所

【目的】 これまでに我々は, アレルギーモデル動物に対して *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1) の経口投与が, 血清中IgE産生量の抑制およびアレルギー症状の改善効果を示すことを報告しており, BBG9-1の経口投与が免疫系に影響を及ぼすことが推測されている.

本報告では, 抗原による感作や惹起処置を施さない無処置のマウスにBBG9-1を経口投与した場合, その腸管免疫系にどのような影響を及ぼすか検討した.

【方法】 5週齢の雄性BALB/cマウスにBBG9-1を0.5または5.0 mg/animal/dayで7日間連続経口投与した. 1週間後, 各群のパイエル板細胞を調製し, BBG9-1熱処理菌体 (50 µg/ml) を添加して3-7日間培養した. 培養終了後, 培養上清を回収しパイエル板細胞からのサイトカイン産生量 (IFN-γ) および抗体産生量 (total IgA) をELISA法にて測定した.

【結果】 各群のパイエル板細胞からのサイトカインおよび抗体産生量を検討した結果, 対照群に比してBBG9-1 0.5 mgおよび5.0 mg投与群で, 投与濃度依存的にIFN-γおよびIgA産生量が増加した. さらに, 各群のパイエル板細胞をBBG9-1熱処理菌体と共に培養するとIFN-γおよびIgA産生量共に増加するが, 特にBBG9-1 5.0 mg投与群においてはIFN-γ産生が強力に誘導された.

【考察】 BBG9-1の経口投与は, パイエル板細胞の免疫機能を亢進し, サイトカインおよび抗体産生能を増強することが示された. さらに, BBG9-1投与群のパイエル板細胞をBBG9-1熱処理菌体と共に培養すると強力的にサイトカイン産生を誘導することから, BBG9-1の反復投与は腸管のBBG9-1菌体に対する反応性を向上させる可能性が示唆された. すなわち, BBG9-1の経口投与による免疫調節作用は, 単回よりも反復投与の方がより効果的であると考えられる.

一般演題 A-11

Bifidobacterium longum JBL05産生多糖の構造と
アレルギーモデルマウスへの経口投与効果Structure of Extra-cellular Polysaccharide Produced by *Bifidobacterium longum* JBL05 and Oral Administration Effect on Allergy-model Mouse○河野麻実子¹, 庄條愛子², 松本卓也², 橋本賀世子², 小崎敏雄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】 *Bifidobacterium longum* JBL05が産生する菌体外多糖 (BPS) は, ガラクトース, グルコース, ラムノースおよびピルビン酸が結合した7糖の繰り返し構造からなることが明らかとなっている¹⁾. これまでに, *B. longum* JBL05またはBPSを経口投与することにより, 耳介に誘発したアレルギー様皮膚炎を抑制することを, 本学会にて報告した²⁾. 本研究では, この多糖の構造特徴と皮膚炎抑制作用との関係を明らかにすることを目的とした.

【方法】 BALB/cマウスの右耳介に2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) を塗布することで感作し, 4日目以降1日毎にTNCBを塗布することでアレルギー様皮膚炎を誘発させた. 感作4日前から, BPS, 低分子化BPS, 脱ピルビン酸化BPSを1回/日の頻度で経口投与した. 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, 同様の頻度で経口投与した. 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. 一方, C3H/HeJマウスよりパイエル板を採取し, 各多糖を添加して5日間培養後, 培養上清中のサイトカイン量およびIgA量をELISA法で定量した.

【結果】 BPS投与群 (20 mg/kg/日, 2 mg/kg/日) において, 対照群と比べて, 耳介肥厚化の有意な抑制効果が認められた. 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. 同様に, 低分子化BPS投与群 (20 mg/kg/日) においても抑制効果がみられたが, 脱ピルビン酸化BPS投与群 (20 mg/kg/日) の抑制効果は低いことが明らかとなった. また, BPSを添加したパイエル板細胞培養上清中で, 多糖非添加培養に比べ, IL-4, IL-6, IL-10およびIgA量の有意な増加が認められた. 一方, 脱ピルビン酸化BPSを添加したパイエル板培養上清中では, それらの有意な増加は認められなかった.

【考察】 これらの結果より, BPSの経口投与によるアレルギー様皮膚炎抑制作用には, ピルビン酸を含む側鎖構造が関与していることが示唆された.

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, 庄條愛子, 小崎敏雄, 浅田雅宣, 大野徹, 北村進一, 2010. 腸内細菌学雑誌, 24(2) : 96.

一般演題 A-12

インフルエンザウイルス M2e 抗原を表層発現する
遺伝子組換えビフィズス菌による抗原特異的免疫応答の誘導Recombinant *Bifidobacterium* Displaying Influenza M2e Protein Induced
the M2e Specific Immune Responses in Mouse Model甲斐宏樹¹, ○竹井咲希¹, 川端真人², 片山高嶺³, 白川利朗⁴¹神戸大学医学研究科, ²神戸大学医学研究科, ³石川県立大学, ⁴神戸大学保健学研究科

【目的】本研究は抗原タンパク質を産生する遺伝子組換えビフィズス菌による、腸管免疫を介した抗原特異的免疫応答を誘導するための技術開発を目的とした。ここでは、A型インフルエンザ抗原タンパク質である Matrix 2 extracellular domain (M2e) をターゲットとしたビフィズス菌によるインフルエンザワクチンの開発を試みた。

【方法】M2eタンパク質をコードする遺伝子を、ビフィズス菌のABCトランスポーターであるGNB/LNB基質結合膜タンパク質 (GL-BP) 遺伝子に結合させて、ビフィズス菌-大腸菌シャトルベクターを構築した。このベクターを電気穿孔法により *B. longum* に遺伝子導入し、GL-BPを分子アンカーとしたM2e抗原タンパク質を表層発現する組換えビフィズス菌を作製した。このM2e抗原発現 *B. longum* を、 1×10^9 CFU/mlのPBS希釈菌液として8-12週齢のメスのBALB/Cに1回あたり50 μ l、週3回の胃内強制経口投与を行った。投与開始後、隔週の尾静脈採血を行うと同時に、28日目にマウスから脾臓細胞を取得した。ELISA法により血清中のM2e抗原特異的IgG, IgM抗体の検出を実施した。また、マウスの脾臓細胞由来RNAを用いてリアルタイムPCR法によりIFN- γ , GATA3, IL-4の遺伝子発現を $\Delta\Delta$ Ct法により比較定量した。

【結果】図1に示すELISA法の結果から、投与を開始して14日目以降において顕著なM2e抗原特異的IgG, IgM抗体の産生を確認した。また、図2に示すリアルタイムPCR法の結果よりM2e発現 *B. longum* 投与群においてIFN- γ , GATA3, IL-4遺伝子の発現増幅が確認された。

【考察】GATA3やIL-4遺伝子は、Th2細胞を主体とした液性免疫応答を観測するための重要なマーカー遺伝子である。図2に示すリアルタイムPCRの結果から、PBS投与群に対してM2e発現 *B. longum* 投与群ではGATA3, IL-4遺伝子発現の顕著な増加を確認することができた。また、抗ウイルス因子でありマクロファージなどの食細胞を活性化させるIFN- γ も同様に顕著な発現増強が確認された。図1および図2の結果より、抗原特異的な免疫応答が腸管を介して全身性の免疫にまで及ぶという、本研究において非常に重要な事実が示唆された。

これらの結果により、抗原を菌体表層に発現させることで抗原特異的な抗体産生を促すことが可能であり、本システムがビフィズス菌による経口ワクチンとして幅広い応用性を持つことが示された。

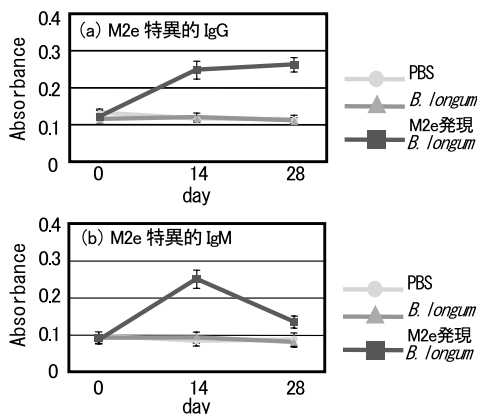


図1 ELISA法によるM2e抗原特異的抗体の検出

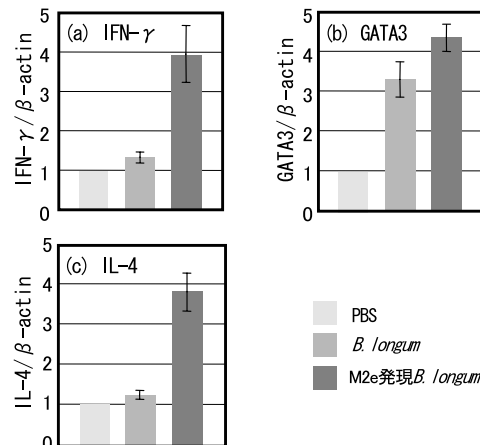


図2 リアルタイムPCR法による各種遺伝子群の比較定量