

ビフィズス菌の腸管免疫活性化作用
に関する研究

保井 久子

ビフィズス菌の腸管免疫活性化作用 に関する研究

保井久子

目次

1 章	序 論	5
1. 1	健康と腸管のかかわりあい	5
1. 2	腸内菌叢におけるビフィズス菌	6
1. 3	生体調節機能をもつ食品としてのビフィズス菌	9
1. 4	腸管における免疫機構	10
1. 5	腸管における分泌型IgA	16
1. 6	ビフィズス菌の腸管粘膜免疫活性化作用の解析へのアプローチ	19
2 章	ビフィズス菌のバイエル板細胞活性化作用	21
2. 1	材料と方法	22
2. 1. 1	動物	22
2. 1. 2	ビフィズス菌(Bifidobacterium)	22
2. 1. 3	抗原	22
2. 1. 4	試薬	22
2. 1. 5	バイエル板細胞の培養	22
2. 1. 6	B細胞の調製	24
2. 1. 7	マクロファージ様細胞の分画と除去	24
2. 1. 8	酵素抗体法	25
2. 1. 9	統計処理	25
2. 2	結果	26
2. 2. 1	抗体産生増強作用	26
2. 2. 2	細胞増殖促進作用(マイトーゲン活性)	26

2.2.3	細胞増殖促進作用のメカニズム	27
2.3.	考察	38
2.4	小括	40
3章	ビフィズス菌のIgA産生増強作用	41
3.1	材料と方法	42
3.1.1	動物	42
3.1.2	ビフィズス菌(Bifidobacterium)	42
3.1.3	抗原	42
3.1.4	スクリーニング試験	42
3.1.5	サイトカインの測定	43
3.1.5.1	Interleukin 1 (IL-1)の測定	43
3.1.5.2	Interleukin 2 (IL-2)測定	43
3.1.5.3	Interleukin 4 (IL-4)測定	43
3.1.5.4	Interleukin 5 (IL-5)測定	44
3.1.5.4	Interleukin 6 (IL-6)測定	44
3.1.6	細胞表面抗原の検出	44
3.1.7	抗体産生細胞数の測定	45
3.1.8	ビフィズス菌の経口投与	45
3.1.8.1	胃ゾンデによる経口投与	45
3.1.8.2	ビフィズス菌添加飼料を自由摂取させることによる経口投与	45
3.1.9	抗体測定	46
3.1.10	細胞増殖性	47
3.1.11	有意差検定	47

3.2	結果	48
3.2.1	抗原非特異的IgA産生増強作用	48
3.2.1.1	Bifidobacteriumの培養時間と添加量	48
3.2.1.2	IgA誘導活性の高いBifidobacterium菌株のスクリーニング試験	48
3.2.2	B.breve YIT4064のIgA産生増強作用の作用機作	49
3.2.2.1	B.breve YIT4064のサイトカイン誘導作用	49
3.2.2.2	B.breve YIT4064の細胞構成に及ぼす影響	50
3.2.2.3	B.breve YIT4064によるIgA産生細胞数の増加	50
3.2.3	経口投与による抗原特異的IgA産生増強作用	50
3.2.3.1	in vitroのIgA誘導活性とin vivoの腸管におけるIgA産生増強作用との関係	50
3.2.3.2	経口投与による腸管免疫系の活性化	51
3.3	考察	67
3.4	小括	73
4章	ビフィズス菌の腸管における抗原性	75
4.1	材料と方法	76
4.1.1	動物	76
4.1.2	Bacteria	76
4.1.3	Bacteriaの経口投与	76
4.1.4	抗体測定	76
4.1.5	バイエル板細胞の調製	77
4.1.6	In vitro の免疫反応	77
4.1.7	有意差検定	77

4.2	結果	79
4.2.1	血中抗体価	79
4.2.2	パリエル板細胞を用いた <i>in vitro</i> の免疫反応	79
4.2.3	B.breveの経口投与によるパリエル板細胞の抗体産生能 の変動	80
4.3	考察	86
4.4	小括	97
5章	総括	98
6章	謝辞	101
7章	引用文献	102
8章	論文の内容の要旨	108
9章	論文目録	114

1 章 序 論

1.1 健康と腸管のかかわりあい

私達は、毎日食物を摂取することにより、自分自身の体をつくり、行動のためのエネルギーを獲得し、健康を維持している。このため食物を消化吸収する腸管の健康は、体の健康維持に必須であるといえる。腸管は、多細胞生物に早くから分化し、広い動物界に共通している栄養補給系である消化管の一部である。

高等動物の消化管は、口腔、食道、胃、腸、その他付属外分泌腺と複雑に分化しているが、ナマコのような動物では、消化管全体が腸と呼ばれる単純な管構造より成っている。消化管上皮は、後に主として口腔に分化する頭側端および肛門管に分化する尾側管を除けばすべて内胚葉に由来する。また、消化管の上皮以外の部分、筋組織、結合組織およびリンパ組織は中胚葉由来である。

ヒトでは、胎生第5週までに内胚葉の一部から前腸、中腸、後腸からなる原始腸管が形成されてくる。腸壁を構成する粘膜上皮は複合的な機能を持っている。大別すると、消化（膜消化、細胞内消化）、吸収（膜輸送、細胞間副路を通る溶媒牽引）、分泌（涙液、ムチン、ホルモン）、防壁ならびに免疫機能等である。

ヒトはしばしば病気になり、最悪の場合は死に至る。遺伝的欠陥によるものは別にして、ヒトと環境との相互反応の結果としてもたらされる。Dubosも著書の中で健康と環境因子とのかかわりあいに関し、病気とはヒトが環境因子にうまく適応できなかった場合におこるものであると述べている(1)。腸管は食物の消化吸収を主要な機能

としているが、一方では多種多様の微生物が存在し腸内菌叢が形成されており、経口摂取された栄養成分も存在し、たえず異物に曝されている。そこで、腸管の健康維持のためにこれらの環境因子に適応する事が必要であり、特別の機能が存在している。その担い手になっているのが腸管隣接リンパ組織(gut-associated lymphoid tissues)である。以上のことから、健康を考える上で腸管の環境因子に対する適応機構(特に免疫機構)を解明する事は重要であると思われる。腸管内の環境因子を大きく分けると微生物因子と食餌性因子にわけられる。そこで、ヒトの腸管に最優勢に棲息し、発酵乳に含まれているビフィズス菌を微生物因子と食餌性因子の両面からとらえてビフィズス菌の腸管免疫機構に及ぼす影響を解明する事を試みた。

1.2 腸内菌叢におけるビフィズス菌

腸管内の微生物の主要な構成員は腸内細菌であり、Bacteroides, Bifidobacterium(ビフィズス菌)などの偏性嫌気性菌がEscherichia coli(E. coli), Lactobacillus(乳酸杆菌), Streptococcus(乳酸球菌)などの通性嫌気性菌の1000倍もいる(2)。これらの腸内細菌は消化管の口側から肛門側にかけて特徴的な分布をしている(3)。さらに、生後から離乳にかけての遷移も観察され(4)、腸内細菌は環境因子としては複雑な因子である。

通常の場合、ヒトはこのような微生物が腸管にすんでいても健康を保っている。しかし、食事やストレスや加齢などの原因で通常、腸管内にいる病原性の弱い微生物が異常に増殖したり、ヒトの上皮

細胞に入り込むような病原性をもった微生物がたまたま腸管内に侵入し増殖すると病気をおこす。前者は日和見感染、後者は病原微生物感染である。病原微生物を含めて腸管内に大量にいる微生物によって構成される環境因子は動物の健康にもおおきな影響を与えていると推測される。通常、腸内に棲息している細菌の機能と宿主に対する影響を図1に示した。これらの細菌はヒトに対して種々の機能を示すが、中でも最優勢菌叢であり、ヒトの健康維持に役立つとされているビフィズス菌は興味をもたれ注目されている(5,93)。

ビフィズス菌は、Tissier(6)により母乳栄養児から発見されて研究が進むにつれて種々の機能が報告され、乳児から成人までの健康に最も密接な関係をもつ細菌である事がわかってきた。ビタミンB群やほかのビタミンを合成する作用があり、皮膚ビタミンであるビタミンB₂やB₆および貧血を防ぐビタミンB₁₂を合成し、出血した時に凝固作用をもつビタミンK(7)も合成する。さらにまた、乳糖を乳酸に分解し乳糖不耐症のヒトの消化吸収を助ける働きもある。また日和見感染や病原微生物感染に対する抵抗性を強化する(94,95,96)事も示されている。母乳栄養児に比べ、人口栄養児や成人はアンモニア、インデイカンなどの有害物質を産生するBacteroides, Clostridium, E.coliなどが多いが、ビフィズス菌を経口投与すると、これらの菌数が減少し、病気にかかる率が低下するといわれている(8-12)。このように、ビフィズス菌は腸内菌叢をコントロールして腸内の腐敗産物の生成量を抑制し、健康にとって都合のいい効果をもたらすと考えられる。また、抗生物質投与により菌叢が変動し、難治性下痢症になるケースがあるがこれらの患者にビフィズス菌を投与すると

腸内細菌

菌数

(大便秘1g当たり)

菌種

(有用性)

腸内細菌の機能

ヒトに対する作用

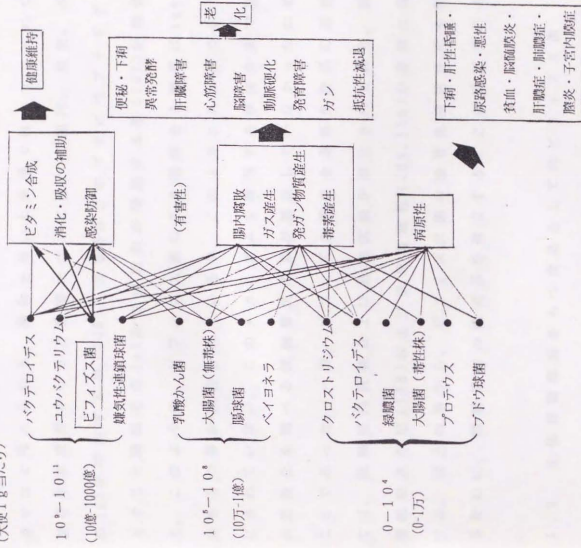


図1. ヒトと腸内細菌との関係

完治する事が報告されている(13-15)。このメカニズムは、ビフィズス菌投与により糞便中のIgAの増加が認められた事から、ビフィズス菌が病原菌に対する腸管内のIgAを増加させ、この菌を排除し、完治させたと考えられる。動物を用いた実験では、マウスにビフィズス菌を単独定着させると無菌マウスに比べて胆汁、血清、小腸内容物のIgAが増加する事(106)、生後5日目のブタにペプチドグリカンを投与すると腸絨毛のIgA産生細胞数が増加する事(107)が報告されている。このように、ビフィズス菌のある菌種ある菌株はIgA産生増強作用をもつ事が報告されているが、このメカニズムについては明らかにされていない。このメカニズムを解明する事は今まで腸管免疫系の活性化を調べる試験管内の系が確立していなかったために困難なことであった。一方、ビフィズス菌の全身性免疫系の活性化については、試験管内試験および動物試験が確立されており、脾臓細胞の増殖促進作用(108)および抗腫瘍活性(109,110)が詳細に報告されている。以上の事から、ビフィズス菌の腸管免疫活性化を明らかにするために、試験管内の測定系を確立することが重要である。

1.3 生体調節機能をもつ食品としてのビフィズス菌

食品には、発育、健康、生命を維持し、生命活動を行うための栄養素としての機能、そして味覚、臭覚、温度覚、触圧覚、視覚などの外感覚、および満腹感などの内感覚を誘起するための嗜好品としての機能がある。そして、近年、免疫系、内分泌系、神経系、循環器系などの調節に関与する生体調節機能が見いだされ注目されるようになってきた。

乳酸菌は世界で古くから遊牧民の間でヨーグルトを作るために用いられ、保存性がよく風味があるだけでなく、健康にいいという事が経験的にわかっていたが、科学的実証はなかった。そして、19世紀以降になって乳酸菌の科学的探究がされはじめ、現在になって生体調節機能をもつ食品として考えられるようになった。乳酸菌は、代謝産物として乳酸を産生する菌であり、*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* (ビフィズス菌) などの総称である。この中のビフィズス菌は腸内における最優勢菌(93)であるにもかかわらず、酸素を嫌う偏性嫌気性菌であったため発見研究が遅れてしまったが、培養技術の発展に伴い研究が進み、この菌の性質が明らかになるにつれて有益な菌である事がわかってきた。そこで、ビフィズス菌を使ってヨーグルトを作る事を考え試みられた。しかし、この菌は酸素を嫌い、代謝産物として乳酸と酢酸を産生するのでこの酸で菌自身も死滅してしまう性質をもつため大変困難な事であったが、酸素や酸に強い菌株を選抜する方法を用い、製品化を可能にした。そして、ビフィズス菌は生体調節機能をもつ食品として、期待できるものとなった。

1.4 腸管における免疫機構

腸管は、腸内菌叢を形成している多種多様の微生物や経口摂取された栄養成分などの異物につねに曝されている。このような異物から生体を防衛するために腸管には非特異的作用をもつリゾチームやムチンが存在しており、異物の排除に役だっているが、これらのバリアーをこえた異物に対しては特異的にそして効果的に防御する機

構が働く。このような生体を防御する機能は腸管粘膜に確立しており、そうした感染防御能や抗原物質の吸収制御能に主要な役割を果たしているのが腸管粘膜表面を覆っている粘液中の分泌型IgA(sIgA)とその産生分泌を司っている腸管隣接リンパ組織(GALT)である(16-19)。GALTは、パイエル板、腸間膜リンパ節、虫垂などのリンパ組織のほか、消化管粘膜固有層や粘膜上皮細胞間にくまなく分布しているリンパ球、形質細胞、単球-マクロファージ系などの免疫担当細胞の総称である。近年、腸管粘膜を被覆する絨毛上皮細胞や粘膜固有層にはり巡らされている血管の内皮細胞にも免疫機能が証明されていて、GALTの構成細胞として腸管粘膜の免疫機能の一翼を担っている(20,21)。

こうしたGALTは、ほ乳動物では生下時その構造はほとんど認められず(22-25)、腸内細菌を欠く無菌動物では成獣になってもその形成はきわめて悪い(17,18,26,27)。それは腸内菌叢の定着と食物摂取習慣の確立といった環境因子のおおきな影響を受けて成熟完成するとされている。また、これらは外からの抗原刺激の量や種類により形態や構成細胞がさまざまに変化し、あるいは出現、消失したりすることが特徴的であって、その多くは外来抗原に対しIgAで応答するところの局所免疫機構(local immune system, mucosal immune system)の主要な担い手である(16,18,28)。

一方、外来抗原が最初に遭遇するGALT中の組織はパイエル板であり、その構造を図2に示した。パイエル板は組織解剖学的ならびに機能的にドーム、リンパ様濾胞、胸腺依存性領域の3つに分けられる。ドーム領域は上皮細胞とパイエル板の特徴の一つであるM細胞により

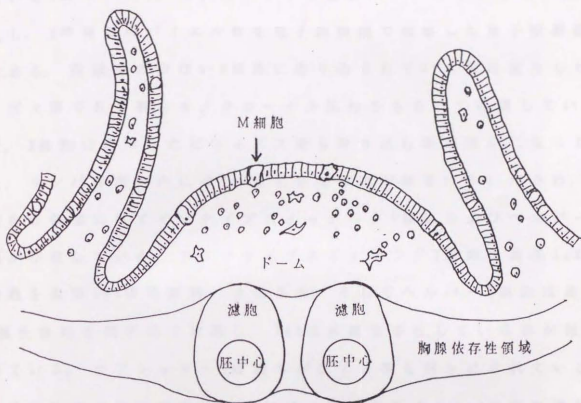


図2 マウスパイエル板の模式図

おおわれている。このM細胞は飲食作用を有す事が報告されており、高橋らはこのM細胞は投与されたビフィズス菌を取り込む事を確認している(図3)(29)。これはウサギの腸管ループにビフィズス菌を注入し、5時間後にパイエル板を電子顕微鏡で観察した電子顕微鏡写真である。微絨毛の少ないM細胞に取り込まれている菌は投与したビフィズス菌である事をモノクローナル抗体をもちいて確認しているの、M細胞は投与したビフィズス菌も取り込む事が明かになった。また、リンパ球濾胞内にはIgA産生前駆細胞が顕著にみいだされ、胸腺依存性領域にはアイソタイプスイッチングT細胞およびヘルパーT細胞が存在している。アイソタイプスイッチングT細胞は表面IgM陽性細胞を表面IgA陽性細胞へ分化させ、そしてヘルパーT細胞は表面IgA陽性細胞を選択的に認識し、IgA抗体産生を促している事が報告されている。サブレッサーT細胞も存在する事も明かにされている。

感染防御や抗原物質の吸収制御に直接作用するIgAの産生過程は図4に示した。腸管内抗原はM細胞の強力な飲食作用によりとりこまれ、IgA前駆細胞を含むリンパ球を刺激する。刺激もしくは活性化されたパイエル板のリンパ球は腸間膜リンパ節を通過し、胸管を介して体内循環に入り、涙腺、唾液腺、乳腺、腸管あるいは上気道の粘膜固有層などの局所粘膜に選択的に到達し、IgA形質細胞になる(30-34)。このIgA形質細胞で産生されるIgAは上皮細胞で産生される secretory component(SC)とIgA-SC複合体をつくり、endocytosisにより上皮細胞内に取り込まれ、細胞の反対極(管腔面)へ移動し、管腔内に分泌される(35)。

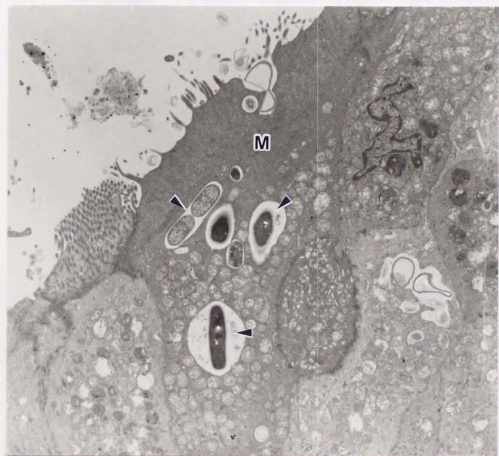


図 3 M細胞に取り込まれたビフィズス菌

矢印：ビフィズス菌

M：M細胞

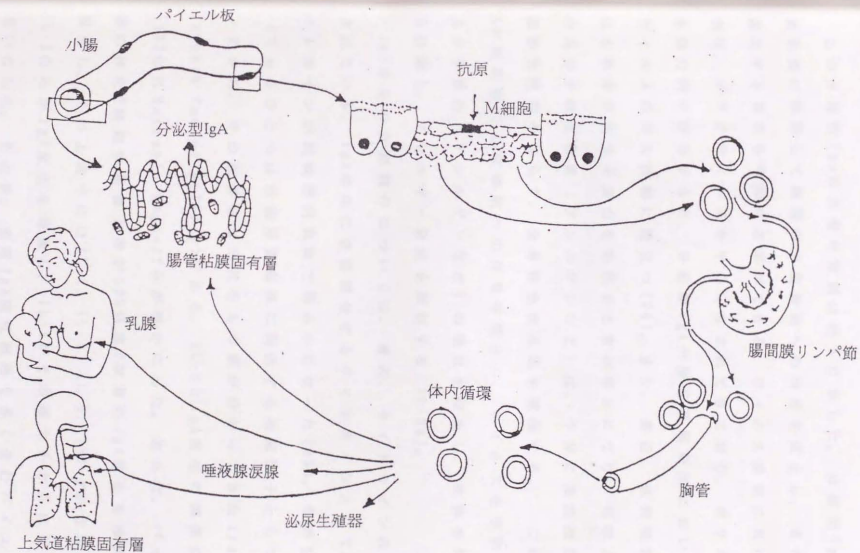


図4 分泌型IgAの産生機構

1.5 腸管における分泌型IgA

この分泌型IgAの主要な役割は図5に示した。分泌型IgAは直接細菌表面に作用して細菌の上皮細胞への付着を阻止し、また、細菌が産生する毒素を中和する事ができる。ウイルス感染におけるIgAの役割は、ポリオウイルスを中心になされてきており、ポリオウイルスを経口的に投与すると、分泌型IgAが腸管粘膜局所において産生され、ウイルスの侵入防御に役立つ(25)。また、最近、成熟哺乳類の腸管は未消化の大分子蛋白を吸収する事が明かになり、吸収された微量の高分子抗原物質(アレルゲンなど)は、十分に免疫原性を有し、局所免疫のみならず、全身性免疫反応を惹起する。この分泌型IgAが病原菌の上皮細胞への付着を阻止し、ウイルスを中和し、さらに大分子蛋白(アレルゲンなど)の吸収を阻止し、生体を外来抗原から防御し、アレルギー発症を抑制する(36-38)。

IgA産生の作用機作については、最近、サイトカインの面から研究されている。IgA産生に直接関与するサイトカインとして、2つのサイトカインが試験管内実験で明らかになった(39)。そのひとつはIL-5でもうひとつは当初形質転換に関係する増殖因子としてクローニングされ、その後多彩な活性をもつ事が分かってきたtransforming growth factor- β (TGF- β)である。IL-5とIgA産生の関係については、1987年にMurray, Kagnoffらが明かにした。彼らは、パイエル板由来の株化T細胞の培養上清がLPS刺激B細胞のIgA産生を増強する事を報告し、その上清中にはIL-2, IL-4, IL-5, INF- γ が含まれていたが、IL-5のみがIgA産生を増強し、IL-4がその産生をさらに促進する事を見いだした。その後、表面IgA陽性細胞を多く含むパイエル板を用い

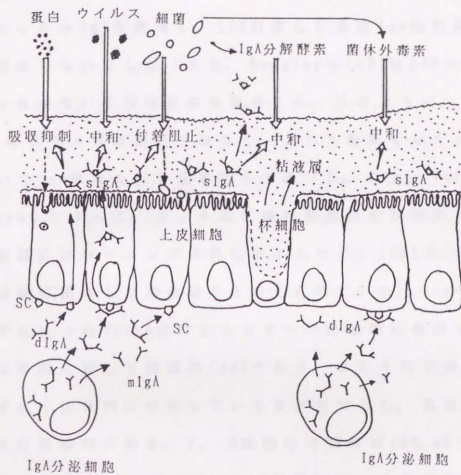


図5 腸管における分泌型IgAの役割

た実験でも IL-5 は LPS 刺激した バイエル 板 B 細胞 に作用して IgA 産生を 増強する事がわかった。その反応する B 細胞群については、Harrimanら(40)および Schoenbeckら(41)は、IL-5 は LPS 刺激した表面 IgA 陽性細胞からのみ IgA を誘導し、LPS 刺激した表面 IgA 陰性細胞から IgA 産生を誘導しないとした。また、Beagleyら(42)は LPS の刺激なしで バイエル 板を用いて同様の事を報告した。このように、IL-5 は IgM から IgA へのクラス転換因子ではなく、クラス転換をおえた IgA 陽性細胞に働いて IgA 産生を促す成熟因子であった。また、TGF- β については、Spornらによって、ラット正常線維芽細胞を軟寒天で増殖させる活性を指標にコロニー化されたサイトカイン(43)で、当初は細胞の形質転換に関連した増殖因子と考えられていた。しかしその後研究がすすむにつれ TGF- β はほとんどすべての細胞に作用し、その作用の多くは増殖に対して抑制的(44)であり、またその分布も腫瘍組織に限らず広く生体内に分布している事が判明した。免疫系細胞に対しても主に抑制的に働き、T、B 細胞の増殖抑制(45,46)、IL-2 レセプターの up-regulation 障害(47)、B 細胞における抗体産生の抑制(48)、LAK 活性の阻害、NK 細胞の活性阻害(49)などが報告されている。またマクロファージに対しても、 H_2O_2 産生を抑制する deactivation factor として作用する(50)。TGF- β は生体内のほとんどすべての細胞で産生されている。血小板は TGF- β をもっとも多く含む細胞であるが、免疫系細胞に限っても活性化した T、B 細胞(45,47)およびマクロファージ(51)は TGF- β を産生する。このように TGF- β はほとんどの免疫反応において負の調節作用をもっているが、ある条件で IL-5 が誘導する IgM や IgG₁ の産生を抑制する一方、IL-5 の IgA の産生をさらに

促進することを見いだした(52)。そこでIL-5とTGF- β の二つのサイトカインを比較して、IgA産生に及ぼす影響を詳細に検討した。その結果TGF- β をIL-5に先行して添加した時にIgA産生がもっとも強く誘導されることがわかった。すなわち、TGF- β とIL-5では反応するB細胞の状態もしくは亜集団が異なり、TGF- β は表面IgA陰性細胞に反応して表面IgA陽性細胞に分化させ、IL-5は表面IgA陽性細胞に反応し、IgA産生を促すことがわかった。このようにTGF- β はIgAへのクラス変換因子の一つと考えられている。最近、この事を裏付ける重要な報告がなされた。それは遺伝子レベルでの証明で、TGF- β の添加により μ から α 、および γ から α へのスイッチを示す環状DNAが検出された(53-55)。これはTGF- β がIgAへのクラス変換を誘導することを明らかにした。一方、IL-5はIgAへのクラス変換を示す環状DNAを誘導しなかった。

1.6 ビフィズス菌の腸管粘膜免疫活性化作用の解析へのアプローチ

ビフィズス菌は腸管で種々の機能をもち健康維持に役立っているとされているが、そのメカニズムはまだ明かでない点が多い。著者は、腸管の免疫学的側面からビフィズス菌の有用性を解明し、発酵乳やビフィズス菌を摂取する事の免疫学的な裏付けを明確にする事を試みた。特に、腸管免疫で重要な役割を担うIgAの産生増強を解析するために、IgA産生にとって最も重要であるパイエル板に注目し、まず、パイエル板細胞の試験管内培養系を確立する事とした。そしてこの系を用いてIgA産生増強作用をもつ菌株を多数のビフィズス菌

株からスクリーニングし、そのIgA産生増強作用のメカニズムをサイトカインを測定する事を中心に明らかにする事を試みた。さらにこの菌株をマウスに経口投与し、糞便中およびパイエル板におけるIgA産生増強を確認する事を試みた。ビフィズス菌はヒトから分離したものをを用い、動物は近交系が確立されており免疫学的解析が進んでいるマウスを用いた。

研究を進めるにあたって以下のように整理して解析を試みた。

- 1 ビフィズス菌はパイエル板細胞を活性化するか？（2）
- 2 ビフィズス菌はパイエル板細胞のIgA産生を増強するか？（3）
- 3 ビフィズス菌のIgA産生増強作用のメカニズムは如何なるものか？（3）
- 4 ビフィズス菌は経口投与によりIgA産生を増強するか？（3）
- 5 ビフィズス菌の抗原性は如何なるものか？（4）

ビフィズス菌の腸管における免疫増強作用を理解することができれば、ビフィズス菌を経口投与することにより、宿主の免疫反応を修飾し、宿主の健康を維持させる事が可能である。そして、ビフィズス菌をこのような生理活性をもつ食品として位置付けることができる。

2 章 ビフィズス菌のバイエル板細胞活性化作用

ビフィズス菌はヒトの腸管に最優勢に棲息している細菌である。そして、この細菌はビタミンを合成(7)し、消化吸収を助ける作用をもつ以外に、腸内菌叢をコントロールしたり生体に備わっている防御機構を強化する事により、病原菌から生体を守る事が報告されている(8-15)。それゆえに、ビフィズス菌を用いたヨーグルトや菌液が食品として広く飲食されてきた。そして、近年、食品に存在する生体調節機能が注目されるようになり、ビフィズス菌も興味を持たれるようになってきた。しかし、ビフィズス菌の感染防御効果の作用機作はまだ明かでない点が多い。そこで、著者はビフィズス菌の生体防御作用を免疫的な側面から詳細に解析する事を試みた。

腸管には腸管隣接リンパ組織(GALT)が存在し、外来抗原から生体を防御している。このGALTの一つであるバイエル板は管腔内の外来抗原が最初に遭遇するリンパ組織であり、抗原の貪食及び免疫反応が最初におこる重要な場である(28)。バイエル板には管腔内の分泌型IgAを産生するIgA形質細胞の前駆細胞が存在している。そして、このIgA前駆細胞が分化して産生した分泌型IgAは、病原菌の腸管粘膜上皮への吸着及びアレルゲンの体内への吸収を阻止する作用をもっている(56,57)。

このような事から、外来抗原が最初に遭遇し抗原処理を行う重要な組織であるバイエル板細胞を用いてビフィズス菌の腸管免疫活性化作用を解析することとした(58)。

2.1 材料と方法

2.1.1 動物

静岡実験動物共同組合から購入した7-12週令のBALB/c及びnude(nu/nu)マウスの雄を使用した。

2.1.2 ビフィズス菌 (Bifidobacterium)

健康幼児の糞便から分離したBifidobacterium breve YIT4010 (B. breve YIT4010)を用いた。0.5%lactoseを含む嫌気性VL培地(59)にB. breve YIT4010を接種し、37°Cで18時間培養後生理食塩水で3回洗浄した。その後0.3%ホルマリンを加え、37°Cで一晩処理した。B. breve YIT4010の細胞壁はArakiら(60)の方法により調製した。

2.1.3 抗原

コージンバイオから購入した羊赤血球(SRBC)を冷リン酸緩衝液(PBS)にて3回洗浄して用いた。

2.1.4 試薬

マイトゲンとしてE. coli lipopolysaccharide (LPS) (055:B5, Difco Laboratories, Detroit MI)及びConcanavalin A (Con.A)(Type IV, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を用いた。

2.1.5 バイエル板細胞の培養

Frangakisらの方法(61)によりバイエル板細胞を調製した。マウスから小腸を取り出しハサミにてバイエル板を切りとりデイスパーゼ

(1.5mg/ml: Grade II, ベーリンガー・マンハイム製)を含む Joklik-modified minimal essential mediumを加えて 37°C、30-40分間攪拌後単離された細胞を含む上清を回収した。残った組織にさらに20mlのデイスパーゼ液を加え、再び30-40分間攪拌した。この操作を4-5回繰り返し、回収した上清を遠心洗浄し細胞を調製した。この細胞を Mishellら(62)の改変法を用いて培養した(63)。5%牛胎児血清(FBS)を含む Eagle's minimum essential medium (MEM)(日水製)を用い、 5×10^5 バイエル板細胞(0.2ml)を96穴プレートの各穴に蒔き込み、 1×10^7 B.breue 菌体または10 μ g B.breue 細胞壁及び 1×10^8 SRBCを添加し、毎日 nutrient mixture(0.02ml)を加えて37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、4日目にCunningham法(64)により抗SRBC plaque forming cells(PFC)を測定した。また、同様にバイエル板細胞にB.breue菌体を添加しNutrient mixtureを加えて7日間培養した後、ELISA法(65)により、培養上清中の抗LPS抗体を測定した。細胞増殖性は、リンパ球への [³H]-TdRの取り込みを観察することにより測定した。5% FBSを含むRPMI1640(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)を用い、96穴プレートの各穴に 5×10^5 バイエル板細胞及び 1×10^7 B.breueまたは10 μ g B.breue細胞壁を分注し、90時間培養し、培養終了18時間前に [³H]-TdRを添加してリンパ球への取り込みを測定した。Eagle's MEMは、2mM glutamine, 1mM sodium pyruvate, MEM non-essential amino acid (x1)そして5%牛胎児血清を含んでいた。Nutrient mixtureの組成は次に示した。

Nutrient mixture

Essential amino acid (50倍濃度)

5 ml

Non essential amino acid (100倍濃度) 2.5ml

Glutamine 200mM 2.5ml

Dextrose 500 mg

Eagle's MEM (NaHCO₃ 不含) 35 ml

1N NaClで pH7.2に調整後

7.5% NaHCO₃ 7.5ml

を添加した。

2.1.6 B細胞の調製

抗マウスIg(IgA+IgG+IgM)(Cappel Laboratories Cochranville, PA)でコートしたプラスチックプレートを用いたパンニング法(66)によりパイエル板細胞中のB細胞富画分を分画した。また、パイエル板細胞からB細胞富画分を除去した画分をT細胞富画分とした。さらに、B細胞富画分からプラスチック付着細胞(PAC)を除去した画分をB細胞画分とした。このB細胞画分は93%以上のIg陽性細胞、1%以下のThy-1.2陽性細胞及び1%以下のPACで構成されていた。

2.1.7 マクロファージ様細胞の分画と除去

パイエル板細胞をプラスチックシャーレ上で37°C, 2時間培養する事によりPACを分画した。Sephadex G10(G10)付着細胞及びカーボニル鉄(CI)貪食細胞の除去はそれぞれLyら(67)及びSjobergら(68)の方法に準拠した。G10カラム通過細胞を回収し、その後CIを添加し37°C, 1時間培養し、非貪食CI及びCI貪食細胞をマグネットに吸着させ、マクロファージ様細胞を除去した。

2.1.8 酵素抗体法

Elsonら(69)のELISA法を改変し抗LPS抗体を測定した。96穴ELISAプレートにE.coli LPS(1 μ g/穴)をPBS(0.05M pH7.5)にて付着させ、培養上清サンプルを加え、37°C, 1.5時間反応させた。各サンプルの測定に4穴用いた。その後パーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIg(HRP-rabbit anti-mouse Ig)(IgM+IgG+IgA)(1:1000, Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA)を加えた。それぞれの反応間に各穴をよく洗浄した。次に0.02%過酸化水素を含む0-フェニレンジアミン溶液(0.4mg/mlクエン酸緩衝液 pH5.0)を加え、37°C, 10分間反応させ、2.5M H₂SO₄で反応を停止させ、タイターテックマルチスキャン(Flow Laboratories, Inc., MacLean, VA)を用い492nmの吸光度を測定した。抗体価は吸光度値で表した。

2.1.9 統計処理

Student's testにより、実験群とコントロール群の間の有意差を検定した。

2.2 結果

2.2.1 抗体産生増強作用

バイエル板は管腔内に存在しているグラム陰性菌の表層抗原であるLPSにより常に刺激されている。このようなバイエル板細胞に*B. breve*を添加し培養すると、*B. breve*無添加に比べて培養上清中に多量の抗LPS抗体が出現した(図6)。一方、通常管腔内に存在していないSRBCをバイエル板細胞に添加し培養すると4日目に抗SRBC PFCが出現するが、同時に*B. breve*または*B. breve*細胞壁を加え培養すると、抗SRBC PFC数は増加した(図7A, B)。以上のようにビフィズス菌は抗体産生を増強する作用があり、この作用は細胞壁部分にあった。

2.2.2 細胞増殖促進作用(マイトーゲン活性)

*B. breve*及びその細胞壁の細胞増殖促進作用をバイエル板細胞を用いて調べた(図8A, B)。バイエル板細胞に*B. breve*及びその細胞壁を添加し培養すると、無添加に比べ多量の ^3H -TdRの取り込みが認められた。この細胞増殖促進作用が*B. breve*溶液中に共雑しているLPSによるものか否かをLPS阻害剤であるpolymyxin B(1または5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を用いて明かにした(図9)。LPS(1.5, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の細胞増殖促進作用はpolymyxin Bの添加により阻害されたが、*B. breve*(5 $\times 10^7/\text{ml}$)の細胞増殖促進作用は阻害されなかった。このことから、*B. breve*の細胞増殖促進作用は*B. breve*溶液中に共雑しているLPSによるものでない事が明かになった。このことからビフィズス菌には細胞増殖作用がある事がわかった。またこの活性も細胞壁部分にある事がわかった。

2.2.3 細胞増殖促進作用のメカニズム

B.breuveにより増殖する細胞のタイプを明かにするためにパイエル板細胞を分離し増殖性を調べた。B.breuve添加による増殖促進は未分画細胞（増加率(SI) 5.9）及びB細胞富画分（SI 11.8）に認められたが、T細胞富画分（SI 1.5）において認められなかった（表1）。T細胞欠損マウスであるヌードマウスのパイエル板細胞の増殖促進は、LPS添加により認められCon A添加により認められないが、B.breuveによっても認められた（表2）。このように、B.breuveはBALB/cマウスのパイエル板のB細胞富画分及びヌードマウスのパイエル板細胞の増殖を促進させたが、BALB/cのT細胞富画分の増殖を促進させなかった。

次にB.breuveによるB細胞富画分の増殖促進にPACが関与するかどうかを調べた。B.breuve添加による増殖促進は未分画細胞（SI 6.8）とB細胞富画分（SI 6.9）において認められたが、B細胞富画分からPACを除去したB細胞画分（SI 1.3）では認められなかった（表3）。さらに、未分画細胞からG10付着細胞とCI食細胞を除去すると、B.breuveによる増殖促進は認められなくなった（表4）。以上のことから、B.breuveによるパイエル板細胞の増殖促進にマクロファージ様細胞が関与している事がわかった。

さらに、B.breuveによるB細胞富画分の増殖促進のメカニズムを明かにするためにB細胞とマクロファージ様細胞の関係を解明する事を試みた。PACまたはプラスチック非付着細胞にB.breuveを無添加または添加し、種々の期間培養し培養上清を回収した。そして、B細胞にこれらの培養上清を添加しB細胞の増殖性を調べると、B.breuveを添加して3日間培養したPACの培養上清がB細胞を増殖させた（図10）。このことから、B.breuveはPACに作用してB細胞の増殖を促進させる液性

因子を誘導する事がわかった。



B.breve

図3 バイエル製細胞の抗リボポリサッカライド(LPS)
抗体産生に及ぼすB.breveの影響

1979.7.22

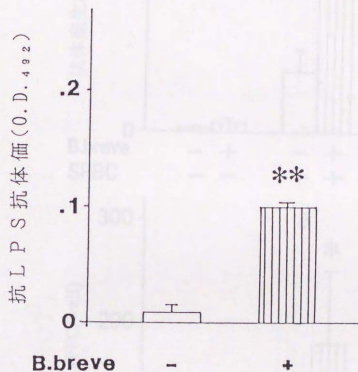


図 6 パイエル板細胞の抗リポポリサッカライド (LPS) 抗体産生に及ぼす B.breve の影響

** $P < 0.01$

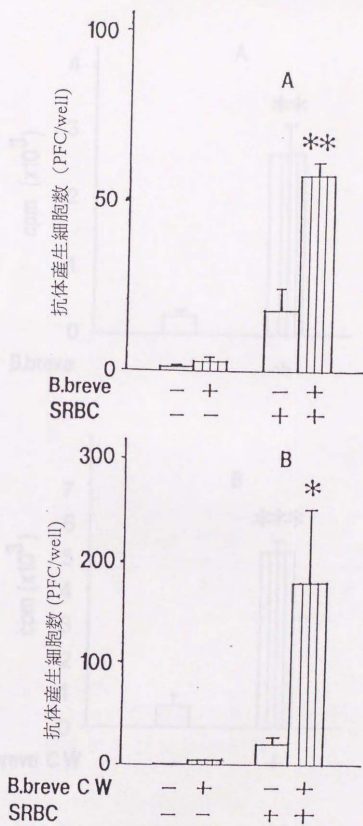


図 7 パイエル板細胞の抗 S R B C 抗体産生に及ぼす B. breve 及びその細胞壁の影響

A : B. breve, B : B. breve 細胞壁 (CW)

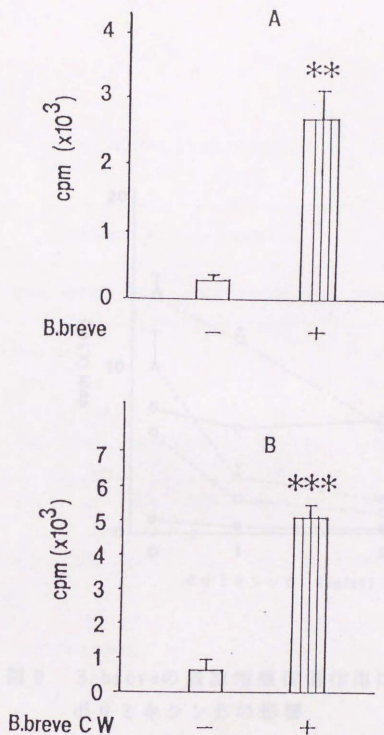


図 8 パイエル板細胞の増殖に及ぼすB. breve及びその細胞壁の影響

A : B. breve, B : B. breve 細胞壁 (CW)

*** $P < 0.01$, ** $P < 0.01$

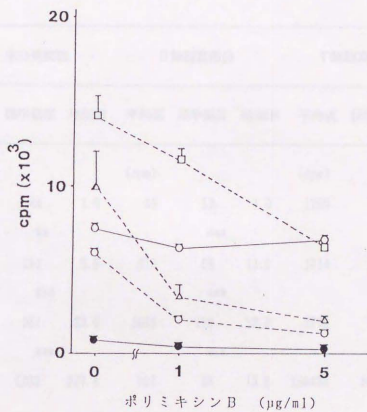


図9 B. breveの細胞増殖促進作用に及ぼす
ポリミキシンBの影響

- B. breve 5x10⁷/ml
- LPS 1μg/ml
- △---△ LPS 5μg/ml
- LPS 50μg/ml
- —

表1 B. breveにより増殖する細胞の種類

マイトゲン	未分画細胞			B細胞富画分			T細胞富画分		
	平均値	標準偏差	増加率	平均値	標準偏差	増加率	平均値	標準偏差	増加率
	(cpm)			(cpm)			(cpm)		
—	401	44	1.0	69	13	1.0	1299	195	1.0
		**			***				
B. breve	2376	261	5.9	815	69	11.8	1914	205	1.5
(5x10 ⁷ /ml)		***			***			*	
LPS	9228	381	23.0	3643	139	52.8	2272	130	1.7
(50μg/ml)		***			***			***	
Con. A	83329	6032	207.8	937	48	13.6	156423	5868	120.4
(2μg/ml)									

* P<0.02, ** P<0.01, *** P<0.001.

表2 ノードマウスのパイエル板細胞の増殖に及ぼすB. breveの影響

マイトーゲン	平均値	標準偏差	増加率
(cpm)			
—	4929	585	1.0
		**	
B. breve	9119	432	2.0
(5×10^7 /ml)		***	
LPS	19588	1096	4.3
(50µg/ml)			
Con. A	4815	925	1.0
(2µg/ml)			

** P<0.01. *** P<0.001.

表3 B. breveの細胞増殖促進作用におけるプラスチック付着細胞の関与

マイトーゲン	未分画細胞			B細胞富画分			B細胞画分			T細胞富画分		
	平均値	偏差	増加率	平均値	偏差	増加率	平均値	偏差	増加率	平均値	偏差	増加率
	(cpm)			(cpm)			(cpm)			(cpm)		
—	181	17	1.0	58	15	1.0	44	5	1.0	139	8	1.0
	**			***								
B. breve (5×10^7 /ml)	1239	145	6.8	398	77	6.9	57	8	1.3	214	55	1.5

** $P < 0.01$.

表4 B. breveの細胞増殖促進作用におけるマクロファージ様細胞の関与

マイエール板細胞	マイトーゲン	平均値	標準偏差	増加率
	(cpm)			
	—	1699	181	1.0
未分画細胞			**	
	B. breve	6379	496	3.8
	(5x10 ⁷ /ml)			
	—	35	5	1.0
G10通過・カーボニル				
鉄非貪食細胞	B. breve	49	3	1.4
	(5x10 ⁷ /ml)			

** P<0.01.

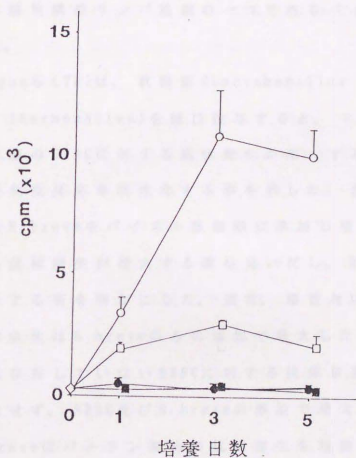


図 10 B. breveのB細胞増殖促進作用における
プラスチック付着細胞の関与

- プラスチック付着細胞にB. breveを添加した培養上清
- プラスチック付着細胞のみの培養上清
- プラスチック非付着細胞にB. breveを添加した培養上清
- プラスチック非付着細胞のみの培養上清

2.3 考察

ヒトの腸管に最優勢に棲息し、発酵乳の製造に用いられているビフィズス菌 (*B.breve*) の抗体産生増強作用及び細胞増殖促進作用をマウスの腸管隣接リンパ組織の一つであるパイエル板の細胞を用いて調べた。

Perdigonら(70)は、乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*)を経口投与すると、マクロファージが活性化され、脾臓のSRBCに対する抗体産生が増大する事を報告し、これらが全身性免疫反応を活性化する事を示した。著者らは、乳酸菌の一つである*B.breve*をパイエル板細胞に添加し培養するとLPS及びSRBCに対する抗体産生が増大する事を見だし、*B.breve*は腸管局所免疫を活性化する事を明かにした。通常、腸管内に存在しているLPSに対する抗体産生は*B.breve*のみの添加で増大した(図6)。しかし、通常腸管内に存在していないSRBCに対する抗体産生は*B.breve*のみの添加では増大せず、SRBC及び*B.breve*の添加で増大した(図7)。このことから、*B.breve*はバージン細胞の抗体産生を増強せず、抗原で刺激された細胞の抗体産生を増強する事がわかった。また、この菌体(*B.breve*)に対する抗体はこの*in vitro*の条件下では検出されなかった。また、マウスにこの菌体(*B.breve*)を経口投与(*in vivo*)してもこの菌体に対する抗体は誘導されにくく、抗原性が弱いことも確認している(63)。それゆえに、この菌体はIII型アレルギーを誘導する危険性が少ないと思われた。

グラム陰性菌のもつLPSはマウスの脾臓リンパ球の増殖を促進する事が報告されている(71,72)。*Micrococcus lysodeikticus*及び*Stap*

Staphylococcus aureus の peptidoglycan (PG) はマウスやウサギのリンパ球及びヒト末梢リンパ球の増殖を促進しない事が報告されている(73, 74)。しかし、一方では *Staphylococcus aureus* の PG はマウス脾臓細胞及びヒト末梢リンパ球の増殖を促進することも報告されている(75)。今回、*B. breve* はパイエル板細胞の増殖促進作用(図 8 A, 図 9)をもち、この作用は *B. breve* の細胞壁画分にある(図 7 B, 図 8 B)事を明らかにした。しかし、この活性は細胞壁中の PG 部分にあるのか、polysaccharide 部分にあるのかはまだ明かでない。

B. breve により増殖する細胞は B 細胞富画分中に存在し(表 1, 表 2)、T 細胞富画分中には存在していなかった(表 1)。また、B 細胞富画分からプラスチック付着細胞(表 3)または G10 付着細胞及び CI 食食細胞(表 4)を除去すると、*B. breve* による増殖促進は認められなくなった。このことから、*B. breve* の細胞増殖促進作用にマクロファージ様細胞が必須である事がわかった。*B. breve* を添加した PAC の培養上清は *B. breve* を添加したプラスチック非付着細胞上清に比べ B 細胞をより多く増殖させた(図 10)。以上のことから、*B. breve* はマクロファージ様細胞に作用して B 細胞を増殖させる液性因子を誘導する事がわかった。マクロファージから放出される因子が B 細胞に作用して増殖促進をおこす事は報告されている(76)。マクロファージは IL-1 及び IL-6 を含む種々のサイトカインを放出し、B 細胞の増殖分化を促す事も報告されている(77-83)。*B. breve* 添加によりマクロファージが放出する因子がどのようなものかはまだ明かにしていないが、このようなサイトカインが関与して B 細胞の増殖を促している事も考えられる。

発酵乳製造にもちいられているビフィズス菌 (*B. breve*) の腸管免疫活性化作用を解析するために、腸管隣接リンパ組織の一つであるパイエル板の細胞を用いてこの菌の抗体産生増強作用と細胞増殖促進作用を調べた。*B. breve*は抗体産生能(抗LPS抗体産生及び抗SRBC PFC数)及び細胞(特にB細胞)増殖を促進した。*B. breve*の増殖促進作用は、ヌードマウスのパイエル板細胞及びBALB/cマウスのB細胞とプラスチック付着細胞(マクロファージ様細胞)を含むB細胞富画分において認められた。そして、Sephadex G10付着細胞とカーボニル鉄貪食細胞(マクロファージ様細胞)を除いた画分及びB細胞富画分からプラスチック付着細胞を除いたB細胞画分では認められなかった。さらに、*B. breve*添加のプラスチック付着細胞(マクロファージ様細胞)の培養上清がB細胞の増殖を促進した。以上のことから、*B. breve*の細胞増殖促進作用のメカニズムは、*B. breve*がプラスチック付着細胞(マクロファージ様細胞)に作用し、この細胞が液性因子を分泌し、この液性因子がB細胞の増殖を促進する事であった。

3 章 ビフィズス菌のIgA産生増強作用

腸管内のIgA抗体はコレラ菌の上皮細胞への吸着を阻止(84)し、コレラ毒素(CT)及びポリオウイルスを中和(37)し、オプアルブミン(アレルギー)の吸収を減じ(38)、生体を外来抗原から防御している。このようなIgAの産生を増加させる腸内細菌はグラム陰性菌で数株(85)、そしてグラム陽性菌であるビフィズス菌(106,107)で報告されている。しかし、そのメカニズムは十分に明かにされていない。そこで、著者らは腸管内IgA産生に最も関連のある組織であるパイエル板に注目し、まずパイエル板細胞の試験管内培養系を確立する事を試みた。そしてこの系をもちいてIgA産生増強作用をもつ菌株を多数のビフィズス菌株からスクリーニングし、そのIgA産生増強作用のメカニズムをサイトカイン産生や表面マーカーを測定する事により解明することを試みた。さらに、この菌株を経口投与し、この菌株が腸管免疫系を活性化して腸管内IgAを増加させるか否かを調べた(86,87,88)。

3.1 材料と方法

3.1.1 動物

静岡実験動物共同組合から購入した 5-16 週令の BALB/c 及び C57B L/6 マウスの雌を使用した。

3.1.2 ビフィズス菌 (Bifidobacterium)

使用したヒトの糞便分離株及び標準株を表 5 に示した。各菌株を嫌気性 GAM 培地に接種し、37°C で種々の時間培養し、PBS にて 3 回洗浄した後 100°C、30 分間加熱処理した。

3.1.3 抗原

コレラ毒素 (CT, sigma 製) を用いた。

3.1.4 スクリーニング試験

Frangakis らの方法 (61) により BALB/c マウスからパイエル板細胞を調製し、Mishell らの方法 (62) を改変して細胞を培養した。Eagle's MEM (日水製) に浮遊させたパイエル板細胞を 96 穴プレートの各穴に蒔き込み ($5 \times 10^5 / 0.2 \text{ ml}$)、種々の菌株 (0.02 ml) を添加し、37°C、5% CO₂ で培養した。毎日 nutrient mixture を 0.02 ml 添加し、7 日間培養後上清を回収し、ELISA 法にて IgA 抗体価を測定した。Eagle's MEM は、2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, MEM non-essential amino acid (x1) をして 5% 牛胎児血清を含んでいた。

3.1.5 サイトカインの測定

3.1.5.1 Interleukin 1 (IL-1)の測定

C3H/HeJ の胸腺細胞を 1×10^7 /ml に調整し、96穴プレートに 0.1ml 分注し、各サンプル（バイエル板細胞培養上清）を 0.1ml 加え、72時間培養し、培養終了 6 時間前に [3 H]-TdR を加え、細胞への取り込みを測定した。培養液は、5%FBS、 5×10^{-5} M2ME および $1 \mu\text{g}$ PHA-P/ml を含む RPMI1640 を用いた。

3.1.5.2 Interleukin 2 (IL-2)の測定

CTLL-2 を 2.5×10^4 /ml に調製し、96穴プレートに 0.1ml 分注し、各サンプルを 0.1ml 加え、24時間培養し、培養終了 6 時間前に [3 H]-TdR を加え、細胞への取り込みを測定した。培養液は、10%FBS および 5×10^{-5} M2ME を含む RPMI1640 を用いた。

3.1.5.3 Interleukin 4 (IL-4)の測定

マウスに Goat anti-mouse thymocyte serum を 0.1ml 静注し、2-4 日後に脾臓を取り出し、ステンレスメッシュで細胞を分離し、Sephadex G10 カラムを用い、マクロファージを除去した。その後、Anti-thy 1.2 (clone 30-H12)、Anti-Lyt-2 (clone 53.6-72) および Anti-L3T4 (clone GK1.5) の混合液を添加し、 0°C 、30 分間反応させた。次に、Monoclonal anti-rat κ -chain を添加し、同様に反応させた後、補体を添加し、さらに反応させた。このようにして脾臓の B 細胞を分画した。この分画には 89% の表面 Ig 陽性細胞が含まれていた。この脾臓 B 細胞 (5×10^4 /穴) を 96 穴プレートを用い、Goat anti-mouse μ ch

ain (10 μ g/ml)存在下でパイエル板細胞培養上清サンプル(2倍および18倍希釈)またはコントロールとしてrIL-4またはrIL-5を添加し、37°C、5% CO₂で72時間培養した。培養終了18時間前に [³H]-TdRを加え、細胞への取り込みを測定した。培養液は5%FBSを含むRPMI1640を用いた。

3.1.5.4 Interleukin 5 (IL-5)の測定

96穴プレートを用い、上記の方法で分画した脾臓B細胞(5 $\times 10^4$ /穴)をDextran sulfate(M.W.50000, 50 μ g/ml)存在下で、パイエル板細胞培養上清サンプル(2倍希釈)またはコントロールとしてrIL-4またはrIL-5を添加し、37°C、5%CO₂で72時間培養した。培養終了18時間前に [³H]-TdRを加え、細胞への取り込みを測定した。培養液は5%FBSを含むRPMI1640を用いた。

3.1.5.5 Interleukin 6 (IL-6)の測定

PIL-6を2 $\times 10^4$ /mlに調製し、96穴プレートに0.1ml分注し、各サンプルを0.1ml加え、5日間培養し、培養終了4時間前に [³H]-TdRを加え、細胞への取り込みを測定した。培養液は、10%FBSおよび5 $\times 10^{-5}$ M2MEを含むRPMI1640を用いた。

3.1.6 細胞表面抗原の検出

一次抗体としては Rabbit anti-mouse Ig (Zymed), Rabbit anti-mouse IgA (Zymed), Monoclonal rat anti-mouse Lyt-2 (clone 53.6-72), Monoclonal rat anti-mouse L3T4 (clone GK1.5)および

Monoclonal rat anti-mouse Mac-1 (Clone M1-70)を用い、二次抗体としては PE-goat anti rabbit Ig(Tago)および FITC-goat anti rat Ig(Tago)を用いて染色し、フローサイトメトリーで測定した。

3.1.7 抗体産生細胞数の測定(ELISPOT)

Goat anti-mouse Ig (IgA+IgG+IgM)(Cappel)を96穴プレートに吸着させ、細胞浮遊液を分注し、1500rpm、5分間遠心後、CO₂ incubatorで 37°C 4時間培養し、4°C一晩置く。その後、蒸留水を各穴に分注し洗浄後、ペルオキシダーゼ(HRP)-anti-mouse IgA(Cappel)を分注し、基質にて発色させる。出現したスポットを肉眼または実体顕微鏡でカウントする。

3.1.8 ビフィズス菌の経口投与

3.1.8.1 胃ゾンデによる経口投与

B.breve YIT4064またはB.breve Ka-6の48時間培養の熱処理菌液(0.D.₅₅₀=100, 0.25ml)及びコレラ毒素(5 μ g/3%NaHCO₃液)をC57BL/6マウスに胃ゾンデにて毎週1回経口投与した。コントロールとしてD.W (3%NaHCO₃液)またはコレラ毒素(5 μ g/3%NaHCO₃)を同様に経口投与した。7回経口投与後3日目に糞便を回収しPBSにて攪拌し、遠心上清中の抗CT IgA抗体価をELISA法にて測定した。7回投与後、4日目にパイエル板細胞を取り出し、菌体を添加する事なく培養し、抗CT IgA抗体産生能及び増殖能を測定した。

3.1.8.2 ビフィズス菌添加飼料を自由摂食させることによる経

口投与

48時間培養の熱処理B.breve YIT4064添加飼料(0.05%)を自由摂食させ、コレラ毒素($5\mu\text{g}/3\%\text{NaHCO}_3$ 液)を毎週1回経口投与し、投与後3-4日後に採糞し、経時的に糞便中の抗CT IgA抗体価をELISAにて測定した。CT 7回投与4日目に屠殺し、バイエル板及び脾臓の細胞の抗体(抗CT IgA、総)産生能及び増殖性、及び血中及び糞便中の抗体量(抗CT抗体、総抗体及び抗B.breve YIT4064抗体量)を測定した。

3.1.9 抗体測定

Elsonら(69)のELISA法を改変し、96穴ELISAプレートを用いて抗CT抗体量、総抗体量及び抗B.breve YIT4064抗体量を測定した。抗CT抗体量(IgA, IgM, IgG)測定のためにCT($2\mu\text{g}/\text{ml}$)を、総抗体量(IgA, IgM, IgG)測定のためにGoat anti-mouse IgA($\times 1000$, Cappel), IgM($\times 1000$, Cappel)またはIgG($\times 1000$, Cappel)を、そして抗B.breve YIT4064抗体量(IgA, IgM, IgG)測定のために熱処理B.breve YIT4064($8 \times 10^8/\text{ml}$)を炭酸緩衝液(pH 9.6)にて $0.1\text{ml}/\text{穴}$ でコートし、各種サンプルを添加後 37°C , 1.5時間反応させた。次に、HRP-anti-mouse IgA($\times 1000$, Zymed)、IgM($\times 5000$, Cappel)およびIgG($\times 1000$, Cappel)をそれぞれ反応させた。そして、基質(0.02% 過酸化水素を含む0-フェニレンジアミン液($0.4\text{mg}/\text{ml}$ クエン酸緩衝液(pH 5.0)))を添加し、 37°C , 10分間反応させ、2.5M硫酸により停止し492nmの吸光度をタイターテックマルチスキャンにて測定した。抗CT抗体量は過免疫血清($\times 4000$)の吸光度を1UとしたU値で、総抗体量はそれぞれの標準曲線から得た絶対量で、抗B.breve YIT4064抗体量は492nmの測定値で示した。また、

スクリーニング試験における各菌株添加のバイエル板細胞培養上清中のIgA値は、無添加バイエル板細胞培養上清中のIgA値に対する指数(SI)及び絶対量で示した。

3.1.1.0 細胞増殖性

5%牛胎児血清を含むRPMI1640を用い、96穴プレートの各穴に 5×10^5 のバイエル板細胞または脾臓細胞を蒔き込み、72時間培養し、培養終了6時間前に $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を添加してリンパ球への取り込みをシンチレーションカウンターにて測定した。

3.1.1.1 有意差検定

Student's testにより、実験群とコントロール群との間の有意差を検定した。

3.2 結果

3.2.1 抗原非特異的IgA産生増強作用

ヒトの腸管内に棲息しているBifidobacteriumの中に抗原非特異的IgA抗体産生を増強する菌株があるか否かをマウスパイエル板細胞培養法を用いたin vitro系で調べた。

3.2.1.1 Bifidobacteriumの培養時間と添加量

IgA誘導活性と菌体の培養時間との関係を添加量を一定にして($O.D._{550}=0.275$) 5株の分離株を用いて調べた。3菌株(B. breve YIT4064, Va-30, B. longum E3-9)においては24時間に比べて48時間培養菌がより多量のIgAを誘導した。2菌株(B. breve Ka-6, B. longum KN-25-1)においては24時間及び48時間培養菌ともIgAを誘導しなかった(図11)。B. breve YIT4064を用いてさらに詳しくIgA誘導活性と菌体の培養時間との関係を調べると、48時間培養菌のIgA誘導活性が最も高かった(図12)。次に48時間培養菌を用いてIgA誘導活性と菌体添加量との関係を調べた。3菌株(B. breve YIT4064, Va-30, B. longum E3-9)においては $O.D._{550}=0.275$ (約 1×10^8 /ml)の菌体添加量が最も高いIgA誘導活性を示した(図13)。2菌株(B. breve Ka-6, B. longum KN-25-1)においてはいかなる添加量でもIgAを誘導しなかった。以上のことから、パイエル板細胞培養でIgA誘導活性を調べるには、 5×10^8 パイエル板細胞/穴に48時間培養菌を $O.D._{550}=0.275$ の濃度で添加する事が最もよい事がわかった。

3.2.1.2 IgA誘導活性の高いBifidobacterium菌株のスクリーニ

ング試験

ヒト糞便由来の *Bifidobacterium* 分離株 (120 株、*B. breve* および *B. longum*) (表 5) の IgA 誘導活性を調べた。大部分の分離株は低い活性を示したが、数株は高い活性を示した (図 14)。これらの菌株を単一コロニー分離法によりさらに分離し、再度 IgA 誘導活性を調べると、最終的に 3 株 (*B. breve* 2 株 (YIT 4064, KN-3), *B. longum* 1 株 (04-6)) の IgA 誘導活性の高い菌株を得る事ができた (図 15)。今後、この中の 1 株 (*B. breve* YIT4064) を用いて解析する事とした。

3.2.2 *B. breve* YIT4064 の IgA 産生増強作用の作用機作

3.2.2.1 *B. breve* YIT4064 の サイトカイン誘導作用

図 16 に示すように、IL-1, IL-4, IL-5 は *B. breve* YIT4064 添加群の培養 3 日目の上清中に検出された。しかし、IgA 誘導活性の低い *B. breve* Ka-6 添加群ではコントロール (無添加群) と同様にこのような現象はみられなかった。この事から、*B. breve* YIT4064 は *B. breve* Ka-6 に比べ、これらのサイトカインを誘導する作用がある事がわかり、これらのサイトカインが IgA 誘導作用に関与していると思われた。IL-2 は *B. breve* YIT4064, *B. breve* Ka-6, 無添加とも 3 日目まで急激に上昇し、3 群間で違いが見られなかったが、その後違いがみられ、*B. breve* Ka-6 群、無添加群は急激に減少するのに比べ、*B. breve* YIT4064 添加群はゆるやかに減少した。また、IL-2 に反応する HT-2 細胞を用いても同様の傾向が認められた。IL-2 が IgA 誘導活性に関与しているかどうかは不明である。IL-6 は *B. breve* YIT4064 添加群と *B. breve* Ka-6 添加群ともに同じように産生され、2 群間で違いがみられなか

った。ここで誘導された 1L-6 は IgA 産生には関与しないと思われた。

3.2.2.2 B.breve YIT4064 の細胞構成に及ぼす影響

B.breve YIT4064 によりどのような表面抗原をもった細胞が増殖しているかを明かにするために細胞表面に対する抗体を用いて調べた。図 17 に示すように、培養 3 日目と 5 日目とは同じ傾向を示し、Ig 陽性細胞および IgA 陽性細胞は B.breve YIT4064 添加群で増加しているのが認められた。しかし、Lyt-2 陽性、L3T4 陽性細胞数は、3 群間で違いはみられなかった。Mac-1 陽性細胞数は 3 群とも非常に少なかったが、B.breve YIT4064 添加群が多い傾向を示した。

3.2.2.3 B.breve YIT4064 による IgA 産生細胞数の増加

図 18A に示すように IgA 産生細胞数は B.breve YIT4064 添加により増加し、培養 5 日目でピークを示した。B.breve Ka-6 はまったくこの数を増加させる作用はなかった。また、図 18B に示すように培養上清中の IgA 抗体産生量は B.breve YIT4064 で増加し、培養 7 日目でピークを示し、2 日間遅れるが、IgA 抗体産生細胞数の増加と連動した結果が得られた。このように IgA 産生の増加は IgA 産生細胞数の増加によることがわかった。

3.2.3 経口投与による抗原特異的 IgA 産生増強作用

3.2.3.1 in vitro の IgA 誘導活性と in vivo の腸管における IgA 産生増強作用との関係

パイエル板細胞培養法を用いた in vitro の IgA 誘導活性が腸管にお

ける *in vivo* の IgA 産生を反映するかどうかを、*in vitro* で高い活性を示した菌株 (B. breve YIT4064) と低い活性を示した菌株 (B. breve Ka-6) をそれぞれ経口投与する事により調べた。B. breve YIT4064 は、コントロール (CT 単独投与群) に比べ糞便中の抗原特異的 IgA 抗体 (抗 CT IgA) を増加させる傾向を示し、パイエル板細胞の抗 CT IgA 産生能及び増殖性を有意に増強した。しかし、B. breve Ka-6 にはこれらの活性は全く認められなかった (図 19)。以上の事から、パイエル板細胞を用いた IgA 誘導活性 (*in vitro*) と経口投与による IgA 誘導活性 (*in vivo*) との間には関連がみられ、IgA 産生増強作用をもつ食品のスクリーニングにこのパイエル板細胞培養法を用いる事は可能であると思われた。

3.2.3.2 経口投与による腸管免疫系の活性化

B. breve YIT4064 の腸管免疫活性化についてさらに詳しく調べるために、B. breve YIT4064 添加飼料 (0.05%) を自由摂食させ、抗原に CT を用いて抗体産生増強作用を調べた。CT を 7 回経口投与した後の糞便中の抗 CT IgA 抗体は、B. breve YIT4064 投与群 (B. breve YIT4064+CT 投与群) が CT 単独投与群に比べ有意に増大した (図 20)。この時のパイエル板細胞の増殖性及び抗体産生能 (抗 CT、総抗体産生能) も、B. breve YIT4064+CT 投与群が CT 単独投与群に比べ増大していた。また、B. breve YIT4064 単独投与群においてもパイエル板細胞の増殖性および抗原非特異的抗体産生能の増加は認められた。しかし、脾臓細胞の増殖促進はビフィズス菌投与によって認められなかった (図 21)。一方、血中の抗体量は B. breve YIT4064+CT 投与群と CT 単独投

与群との間で違いは認められなかった(図22)。また、糞便および血中の抗B.breve YIT4064抗体はB.breve YIT4064の経口投与で増加する事はなかった(図23)。以上のことから、B.breve YIT4064の経口投与は、全身性免疫系を活性化することなく腸管粘膜免疫系を活性化することが明かになった。さらにこの菌体の抗原性は弱い事もわかった。

表5 使用したビフィズス菌株

菌株	菌株数	分離源
分離株		
<i>Bifidobacterium</i>		
breve	19	新生児
	7	母乳栄養児
	5	人工栄養児
	4	幼児
longum	12	新生児
	4	人工栄養児
	12	幼児
	47	成人
	10	老人
標準株		
<i>Bifidobacterium</i>		
breve ATCC* 15700	1	幼児
ATCC 15698	1	幼児
ATCC 15701	1	幼児
longum ATCC 15707	1	成人
ATCC 15708	1	幼児

* ATCC : The American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.

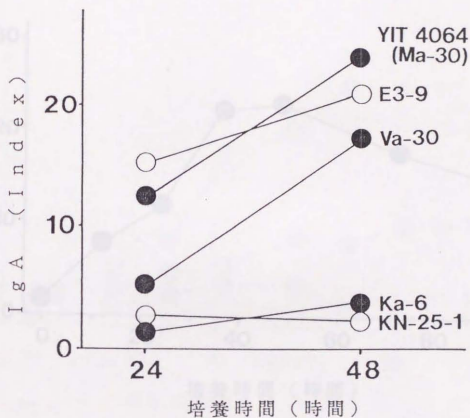


図 1 1 ビフィズス菌の培養時間と Ig A 誘導活性との関係

● *B. breve* ○ *B. longum*

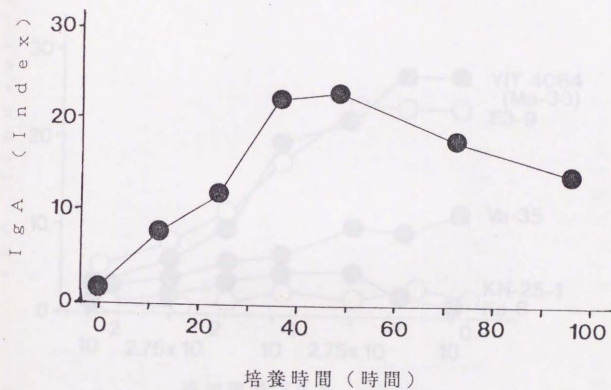


図 1 2 B. breve YIT4064 の培養時間と I g A 誘導活性との関係

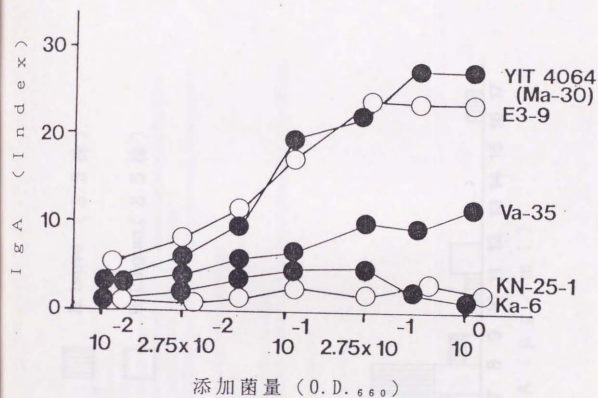


図 13 ビフィズス菌の添加量と IgA 誘導活性との関係

● *B. breve* ○ *B. longum*

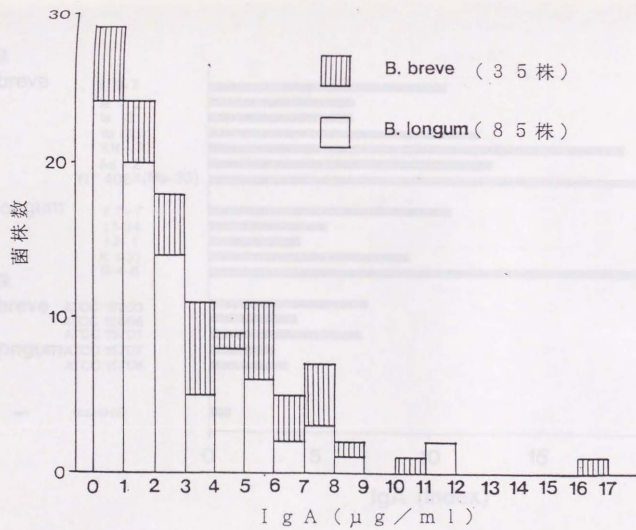


図 14 ビフィズス菌の菌株による IgA 誘導能の違い

標準株

B. breve

I 9-7

Ia - 2

Ia -21

Va -35

KN -3

Aa - 2

YIT 4064 (Ma-30)

B. longum

Y 7-7

I 1-34

I 2-1

K 1-31

O 4-6

分離株

B. breve

ATCC 15700

ATCC 15698

ATCC 15701

B. longum

ATCC 15707

ATCC 15708

- (control)

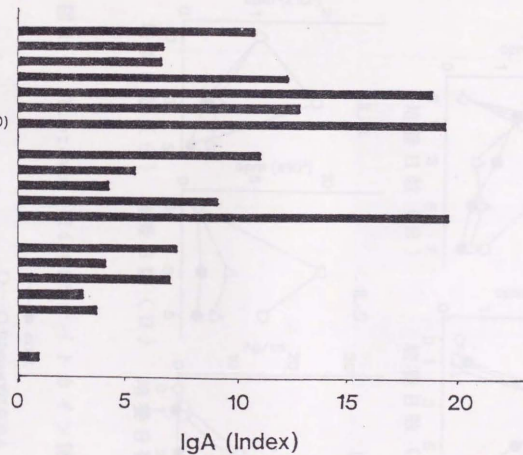


図 15 選抜されたビフィズス菌株の単一コロニー分離後の IgA 誘導活性

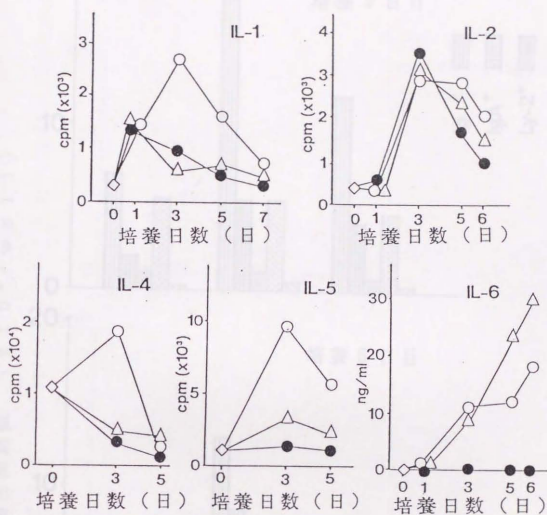


図 1 6 B.breve YIT4064のサイトカイン誘導能

●—● cont
○—○ B.breve YIT4064
△—△ B.breve Ka-6

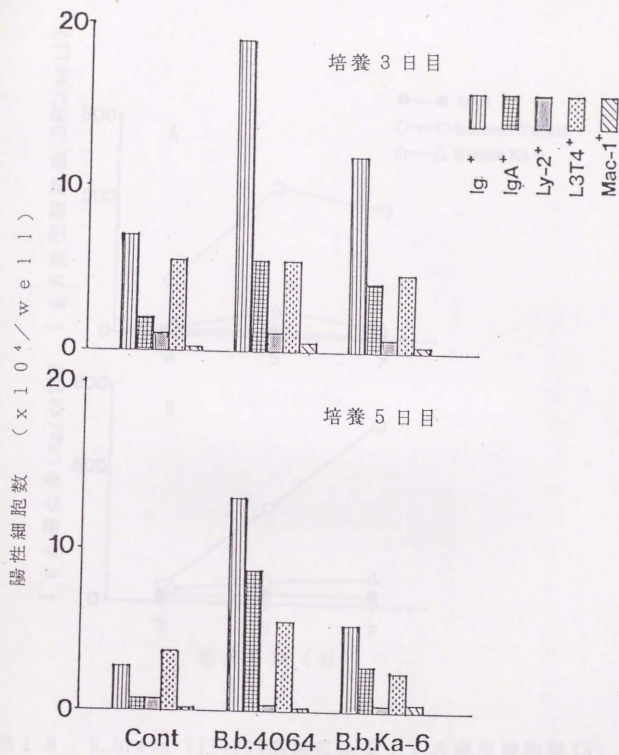


図 17 B. breve YIT4064 添加による細胞表面マーカーの変化

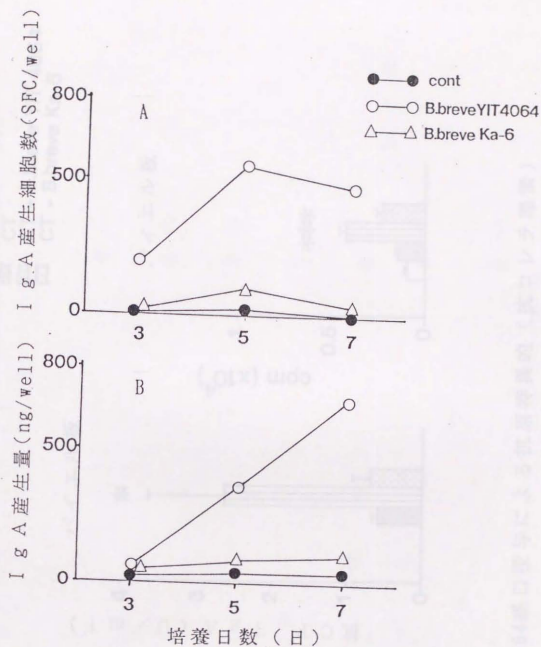


図 1 8 *B.breve* YIT4064 添加による IgA 産生細胞数 (A) 及び IgA 産生量 (B) の増加

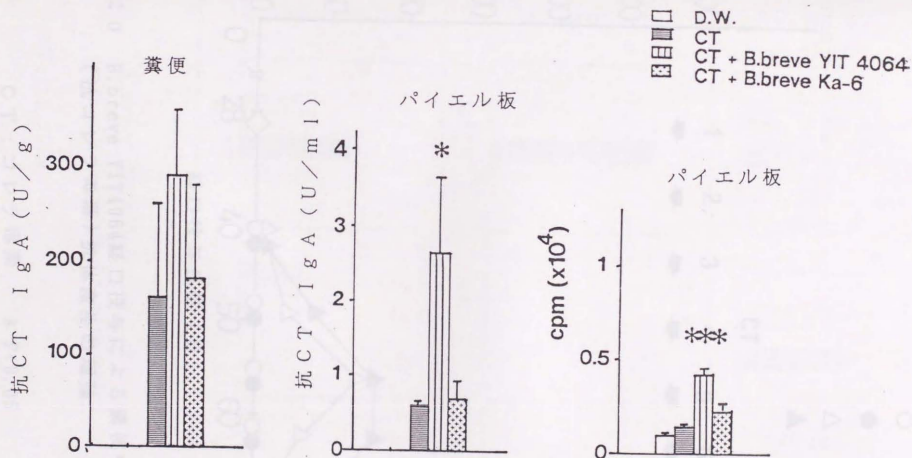


図19 B. breve YIT4064経口投与による抗原特異的(抗コレラ毒素)
抗体産生能の増強

*** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

経口投与

B.breve
YIT4064 CT

○	-	-
●	+	-
△	-	+
▲	+	+

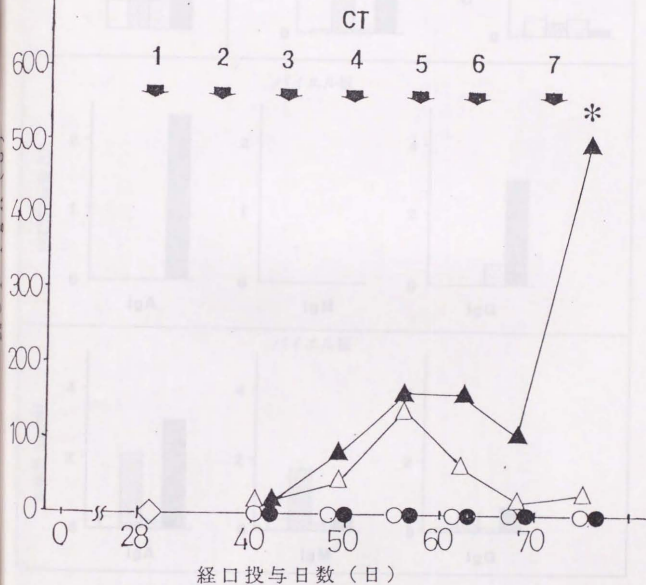


図 20 B.breve YIT4064経口投与による糞便中の抗原特異的
(抗コレラ毒素)抗体産生の増強

CT : コレラ毒素 * $P < 0.05$

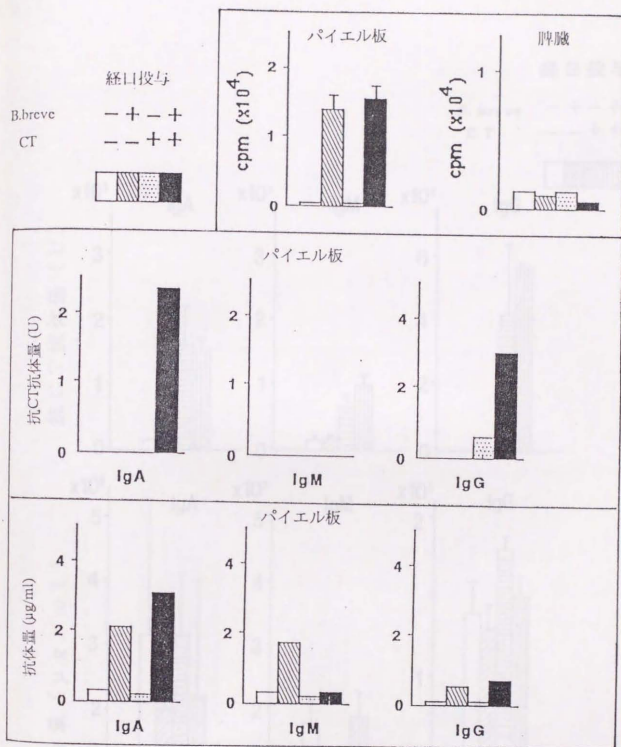


図 2.1 B.breve YIT4064経口投与後のパイエル板及び脾臓の抗体産生能及び細胞増殖性

CT: コレラ毒素

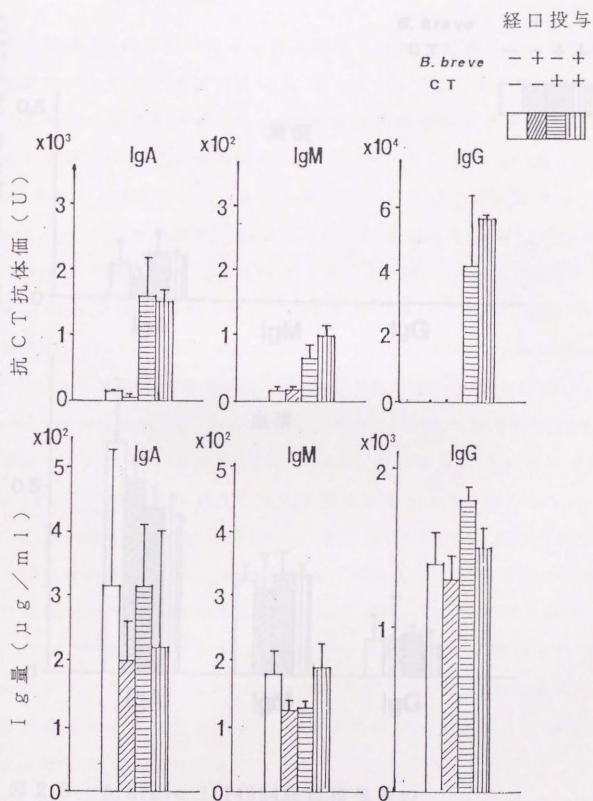


図 2 2 *B. breve* YIT4064 経口投与後の血中抗体価

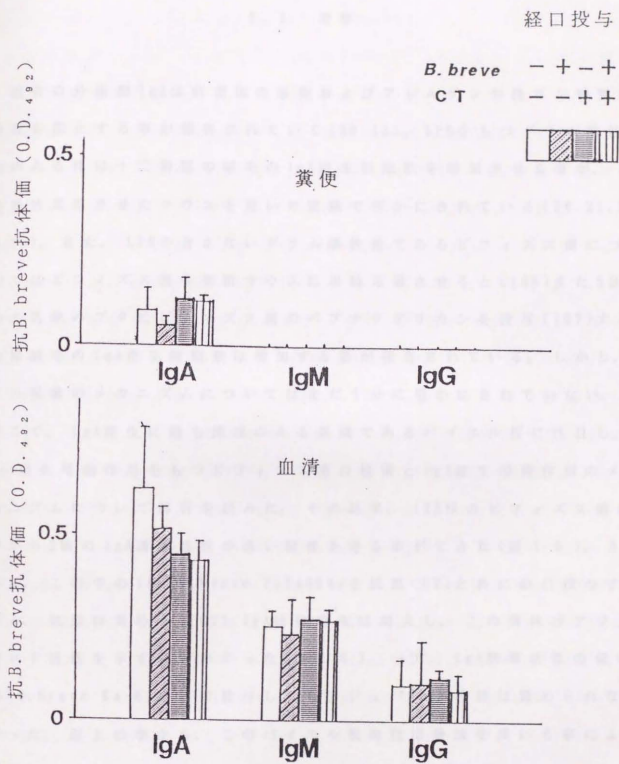


図 2 3 *B. breve* YIT4064 経口投与後の
抗 *B. breve* YIT4064 抗体価

3.3 考察

腸管の分泌型IgAは病原菌の感染およびアレルゲンや発ガン物質の吸収を阻止する事が報告されている(36-38)。LPSをもつグラム陰性菌のある株は十二指腸の絨毛のIgA産生細胞数を増加させる事が、菌を単独定着させたマウスを用いた実験で明かにされている(20,21,22,85)。また、LPSを含まないグラム陽性菌であるビフィズス菌についてはビフィズス菌を無菌マウスに単独定着させると(106)また5日令の乳飲みブタにビフィズス菌のペプチドグリカンを投与(107)すると腸絨毛のIgA産生細胞数は増加する事が報告されている。しかし、この現象のメカニズムについてはまだ十分に明かにされていない。そこで、IgA産生に最も関連のある組織であるパイエル板に注目し、IgA産生増強作用をもつビフィズス菌の検索とIgA産生増強作用のメカニズムについて解析を試みた。その結果、120株のビフィズス菌の中から3株のIgA誘導活性の高い菌株を得る事ができた(図15)。さらに、この中の1株(B.breve YIT4064)を抗原(CT)と共に経口投与すると、抗原特異的(抗CT)IgA抗体産生は増大し、この菌株はアジュバント活性を示す事がわかった(図19)。一方、IgA誘導活性の低い株(B.breve Ka-6)を経口投与してもアジュバント活性は認められなかった。以上の事から、このパイエル板細胞培養法を用いる事により腸管粘膜免疫系を活性化する(IgA産生増強作用をもつ)食品を迅速かつ容易にスクリーニングする事ができると思われた。

次に、B.breve YIT4064のIgA産生増強作用のメカニズムを解析する過程でいくつかのサイトカイン(IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6)

産生を調べた。その結果、B.breve YIT4064はIL-1, IL-4, IL-5を誘導する事がわかった(16)。IL-1については、1940年代にすでに発熱をおこす内因物質として発見されており、種々の生物活性が明かにされている。その中にはT, B, NK細胞の増殖促進作用(89-91)もある。この事からB.breve YIT4064により誘導されたIL-1もB細胞を増殖させると思われた。このIL-1は、現在では種々の細胞から分泌される事がわかってきたが、大量に分泌するのはマクロファージであるとされている。B.breve YIT4064がマクロファージに作用してIL-1を誘導したと考えている。また、前章(2章)で述べたB.breveがマクロファージに作用して誘導したB細胞増殖因子もIL-1であると思われた。これについては今後明らかにしたい。またIgA産生に直接関与するサイトカインとしては2つのサイトカインが試験管内実験で明らかになかった。そのひとつはIL-5でもうひとつは当初形質転換に関係する増殖因子としてクローニングされ、その後多彩な活性をもつ事が分かってきたtransforming growth factor- β (TGF- β)である。1987年、Murray, Kagnoffらは、パイエル板由来の株化T細胞の培養上清がLPS刺激B細胞のIgA産生を増強する事を報告した(39)。その上清中にはIL-2, IL-4, IL-5, INF- γ が含まれていたが、IL-5のみがIgA産生を増強し、IL-4がその産生をさらに促進する事を見いだした。その後、表面IgA陽性細胞を多く含むパイエル板を用いた実験でもIL-5はLPS刺激したパイエル板B細胞に作用してIgA産生を増強する事がわかった。さらに、Harrimannら(40)およびSchoenbeckら(41)は、IL-5はLPS刺激した表面IgA陽性細胞からのみIgAを誘導し、LPS刺激した表面IgA陰性細胞からはIgA産生を誘導しないと報告した。また、Beagle

γ₄(42)はLPSの刺激なしでパイエル板を用いて同様の事を報告した。これは、パイエル板は通常腸内細菌由来のLPSで刺激活性化されていて表面IgA陽性細胞が存在するからと思われる。このように、IL-5はIgMからIgAへのクラス転換因子ではなく、クラス転換をおえた表面IgA陽性細胞に働いてIgA産生を促す成熟因子であった。B.breve YIT4064により誘導されたIL-5も表面IgA陽性細胞に作用してIgA産生を促進すると思われる。IL-4はLPS刺激B細胞においてIgMからIgG₁およびIgEへのクラス変換因子である事が示されている。Kunimotoら(92)はCH12LX細胞株を用い、IL-4が表面IgM陽性細胞から表面IgA陽性細胞を誘導し、IL-5はその表面IgA陽性細胞に働いてIgA産生を促進する事を報告した。B.breve YIT4064はIL-4とIL-5を誘導したので、このIL-4も表面IgM陽性細胞を表面IgA陽性細胞に変換させ、その後、このIL-5が表面IgA陽性細胞に働いてIgA産生を促進することが推察される。IL-4とIL-5を産生する細胞はタイプ2 T_H (Th₂) 細胞である事がわかっているので、B.breve YIT4064が直接または間接にこの細胞に働いてIL-4とIL-5を誘導すると考えている。今までの知見から想定されるB.breve YIT4064の作用機作を図24に示した。B.breve YIT4064がマクロファージに作用してIL-1を誘導し、Th₂細胞に作用してIL-4とIL-5を誘導する。そして、IL-1は表面IgM陽性細胞を増加させ、IL-4がその細胞に作用して表面IgA陽性細胞に分化させ、IL-5がその細胞に作用してIgA産生を促進させる。この図24は、測定したサイトカインの範囲内でB.breve YIT4064の作用機作を単純化して想定したものである。生体ではより複雑なネットワークが存在するので他のサイトカインを測定し、より明確にしたいと思う。特に

TGF- β についてはIgA産生に深く関与するサイトカインであるのでは
非測定したい興味あるものである。一方、表面IgA陽性細胞数の増加
は抗IgA抗体を用いて、そしてIgA産生細胞数の増加もELISPOT法にて
確認している。以上のように、B.breve YIT4064は、IL-1, IL-4, IL-5を誘導し、
複雑なネットワークで表面IgA陽性細胞数を増やし、
IgA産生細胞数を増加させ、IgA産生量を増大させる事がわかった。
B.breve YIT4064は著しくIL-2を増加させる事はなかったので、IL-
2, IFN- γ を産生するTh₁細胞をあまり刺激しないと思われた。今後、
細胞を分画したり、バイエル板細胞をクローン化して作用機作をさ
らに明かにしたい。一方、抗腫瘍活性が認められている乳酸桿菌で
あるLactobacillus casei(111)はIgA誘導活性は全く認められなかつ
たが、IL-2, IFN- γ を誘導する(112)事が報告されているので、この
菌はTh₁を刺激するものと思われた。このように、乳酸を産生し、ヨ
ーグルト製造に用いられる菌の中にTh₁を刺激する菌とTh₂を刺激す
る菌がある事は興味深い事である。

バイエル板細胞でスクリーニングされたB.breve YIT4064は、経口
投与により糞便中の抗原特異的(抗CT)IgA抗体量及びバイエル板細
胞の増殖性と抗体(抗原特異的(抗CT)、抗原非特異的)産生能を
増大させ、腸管粘膜免疫系を活性化する事が明かになった(図20、
21)。この抗原特異的(抗CT IgA)抗体が抗原(CT)中和能を有する
か否かは現在実験中であるが、充分期待できると思われる。一方、
IgA産生増強作用をもつ物質についてはまだ明かでない。波岡ら(10
7)はペプチドグリカンがIgA産生細胞数を増加させることをブタを用
いて報告しているが、著者らはペプチドグリカン部分ではなく細胞

質膜部分にこの活性を確認している。今後、詳細な解析が必要である。さらに、この菌株は全身性免疫系を活性化せず(図22)、抗原性も弱く(図23)、タイプIIIのアレルギーをひきおこす危険性は低いと推測された。以上の事から、この菌株を飲食する事によりウイルス感染やアレルギー発症を予防する事ができるかもしれない。また経口ワクチンの効果を高める作用も期待できる。

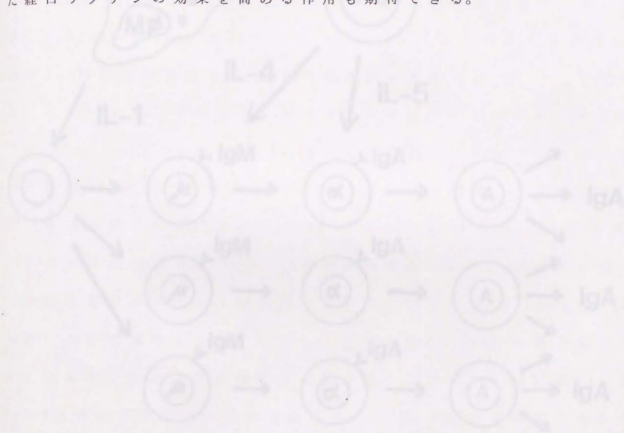


図24 B.brevis T124054のIL-4誘導作用の作用機序

B.breve YIT4064

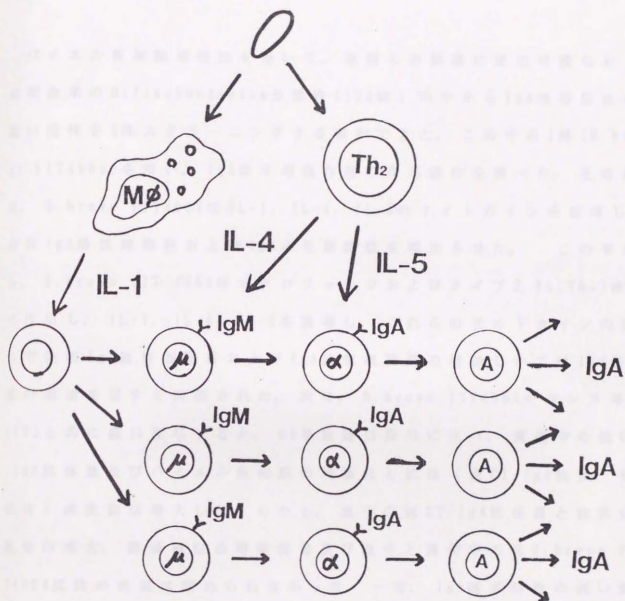


図 2 4 B.breve YIT4064の I g A 誘導活性の作用機序

バイエル板細胞培養法を用いて、発酵乳の製造に使用可能なヒト糞便由来の *Bifidobacterium* 分離株(120株)の中からIgA誘導活性の高い菌株を3株スクリーニングする事ができた。この中の1株(*B. breve* YIT4064)を用い、IgA産生増強作用の作用機作を調べた。その結果、*B. breve* YIT4064はIL-1, IL-4, IL-5のサイトカインを誘導し、表面IgA陽性細胞数およびIgA産生細胞数を増加させた。この事から、*B. breve* YIT 4064はマクロファージおよびタイプ2 T_H (T_H2)細胞に作用し、IL-1, IL-4, IL-5を誘導し、これらのサイトカインの関与で表面IgA陽性細胞数およびIgA産生細胞数の増加し、IgA産生量の増加を促すと推測された。次に、*B. breve* YIT4064をコレラ毒素(CT)と共に経口投与すると、CT単独経口投与に比べ、糞便中の抗CT IgA抗体量及びバイエル板細胞の増殖性と抗体(抗CT IgA抗体、総抗体)産生能は増大した。しかし、血中の抗CT IgA抗体量と総抗体産生の増大、脾臓細胞の増殖促進及び血中と糞便中の抗*B. breve* YIT4064抗体の出現は認められなかった。一方、IgA誘導活性の低い菌株(*B. breve* Ka-6)を経口投与しても糞便の抗体量及びバイエル板細胞の抗体産生量の変化はみられなかった。以上の事から、バイエル板細胞培養法を用いる事により、IgA誘導活性の高い食品を迅速かつ容易にスクリーニングできる事が示唆された。そして、この方法でスクリーニングされた*B. breve* YIT4064は全身性免疫系を活性化することなく、腸管粘膜免疫を活性化し、抗原性が弱い事がわかった。それゆえに、*B. breve* YIT4064においては感染防御作用及びアレルギー

の吸収阻止作用が期待できる。

4 章 ビフィズス菌の腸管における抗原性

ビフィズス菌はパイエル板細胞を活性化し、IgA産生を増強し、腸管免疫機構を強化する事が明らかになった(58,86,87,88)。それゆえにこの菌をヨーグルト製造に利用し、また菌液を培養して飲食すると、感染防御やアレルギー物質の吸収阻止効果が期待できる。しかし、食餌性抗原に対する抗体が多量誘導されると、全身性アナフィラキシーや強烈なショック反応(97)やクローン病のような症状(98,99)をおこす危険性がある。ビフィズス菌を飲食したときにその菌自身の抗体産生がおこるか否か、つまり、腸管におけるビフィズス菌の抗原性について調べておく事は必要である。

そこで、著者らはビフィズス菌(*Bifidobacterium breve* (B.breve))の腸管における抗原性を明らかにするためにこの菌をマウスに経口投与し血中抗体の出現を調べ、ビフィズス菌と同様にヒトの腸管に最優勢に棲息しており日和見感染原因菌とされている *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bact. thetaiotaomicron*) のものと比較した。さらに、管腔内抗原が最初に遭遇する腸管リンパ組織の一つであるパイエル板の細胞を用いた *in vitro* 系で、これら2菌体の抗原性の違いを比較した。また、B.breveを経口投与した後のパイエル板細胞の抗体産生能の変化を調べ、B.breveの寛容(トレランス)誘導について議論する(63)。

4.1 材料と方法

4.1.1 動物

静岡実験動物共同組合から購入した7-15週令のBALB/cマウスの雄を使用した。

4.1.2 Bacteria

健康幼児の糞便から分離したビフィズス菌 (B.breve YIT 4010) 及びヒト糞便由来である Bact.thetaiotaomicron ATCC 12290 を用いた。B.breve YIT4010 を 0.5% lactose を含む嫌気性 VL 培地 (59) に、Bact.thetaiotaomicron を 0.5% glucose を含む嫌気性 VL 培地に接種し、37°C、18 時間培養し生理食塩水にて 3 回洗浄した。その後、それぞれに 0.3% ホルマリンを加え、37°C で一晚処理した。

4.1.3 Bacteria の経口投与

2×10^{11} / ml の菌液を屠殺前日まで毎日胃ゾンデにて 0.25 ml ずつ経口投与した。コントロールとして等量の生理食塩水を経口投与した。各群 5 匹のマウスを用いた。

4.1.4 抗体測定

Elson ら (69) の ELISA 法を改変し用いた。96 穴の ELISA プレートに B.breve または Bact.thetaiotaomicron 菌体 (8×10^7 / 穴) を炭酸緩衝液 (pH 9.6) にてコートした。その後、各穴に血清サンプル (100 倍希釈) を入れ、37°C、1.5 時間反応させた。各サンプルの測定に 4 穴を用いた。総 Ig 量の測定のためにペルオキシダーゼ (HRP) 標識 rabbit anti

-mouse Ig(IgM, IgG及びIgA)(1:1000, Zymed)を各穴に加えた。IgM, IgGまたはIgA測定のためにRabbit anti-mouse IgM(1:1000, Cappel), Rabbit anti-mouse IgG(1:5000, Cappel)またはRabbit anti-mouse IgA(1:1000, Cappel)をそれぞれ各穴に加え反応後、HRP-goat anti-rabbit Ig(1:2000, Cappel)を各穴に加えた。それぞれの反応の間に各穴を洗浄した。その後、0.02%過酸化水素を含む0-フェニレンジアミン液(0.4mg/mlクエン酸緩衝液(pH 5.0))を添加して37°C、10分間反応させ、2.5M硫酸により停止し、492nmの吸光度値をタイターテックマルチスキャンにて測定した。抗体価は492nmの吸光度値または過免疫血清(10000倍希釈)の492nmの吸光度値を1UとしたU値で表した。そして、5匹のマウスの平均値±標準偏差値として表示した。

4.1.5 パイエル板細胞の調製

Frangakisらの方法(61)によりパイエル板細胞を調製した。詳細は2章に示した。

4.1.6 In vitroの免疫反応

Mishellらの方法(62)を改変しパイエル板細胞を培養した。Eagle's MEM(日水製)に浮遊させたパイエル板細胞を96穴プレートの各穴に蒔き込み($1 \times 10^6 / 0.2 \text{ ml}$)、種々の濃度の抗原(0.02ml)を添加し、37°C, 5% CO₂で培養した。毎日nutrient mixtureを0.02ml添加し5-7日間培養後上清を回収し、ELISAにて抗体価を測定した。Nutrient mixtureの組成は2章に示した。

4.1.7 有意差検定

4.2 結果

4.2.1 血中抗体価

B. breveまたはBact. thetaiotaomicronをマウスに経口投与し、血中抗体の出現を経時的に測定した。抗B. breve抗体はB. breveの21日間の経口投与後に出現し、33日間の投与後に有意に増加した。これらの抗体のクラスはIgGとIgAであった。さらに、B. breveを42日間及び49日間投与すると血中抗体価は減少した(図25)。一方、抗Bact. thetaiotaomicron抗体は7日間の経口投与後に有意に増加した。そして、7日間以上投与してもこれらの抗体は減少せず、長期間同じレベルの抗体量が維持された。これらの抗体のクラスはIgM, IgG及びIgAであった(図26)。

4.2.2 パイエル板細胞を用いた in vitro の免疫反応

腸管には腸管リンパ組織の一つであるパイエル板が存在しており、食餌性抗原などの食食や最初の免疫反応がおきている(28)。そこで、パイエル板細胞培養法を用いたin vitro系でB. breveの抗原性をBact. thetaiotaomicronのものと比較した。種々の濃度の菌体をパイエル板細胞に添加して5日間または7日間培養し、上清中の抗体量をELISA法にて測定した。B. breveは両培養期間とも 5×10^8 菌体/ml添加で最大の抗体誘導を示した(図27)。この濃度はアジュバント活性およびマイトゲン活性を示す濃度より10倍高いものであった。Bact. thetaiotaomicronは両培養期間とも 5×10^7 菌体/ml添加で最大の抗体誘導を示した(図28)。以上のように、パイエル板細胞による抗体産生を誘導するために、B. breveはBact. thetaiotaomicronに比べて

10倍量必要であった。これらの事から、B.breveの抗原性はBact.th
etaiotaomicronに比べ弱い事がわかった。

4.2.3 B.breveの経口投与によるパイエル板細胞の抗体産生能の 変動

B.breveを経口投与した後のパイエル板細胞の免疫反応の変化を調
べた。25日間または33日間B.breve菌液または生理食塩水（コントロ
ール）を経口投与した後のパイエル板細胞に最適濃度のB.breve(5×10^8 菌体/ml)を添加して7日間培養後、培養上清中の抗体量をELISA法
にて測定した。B.breveを25日間投与したマウスのパイエル板細胞の
抗体産生能はコントロールに比べ有意に増加していた。しかし、33
日間投与したマウスのパイエル板細胞の抗体産生能はコントロール
に比べて有意に減少していた(図29)。この事から、血中抗体価は
33日間投与してはじめて検出されるが、パイエル板細胞の抗体産生
能はこの時すでに減少している事がわかった。



図 29 B.breve経口投与後の血中の抗B.breve抗体価

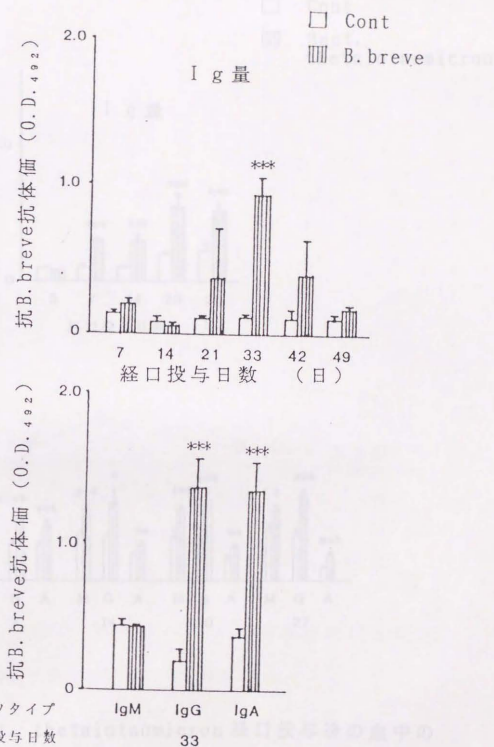


図 2 5 B. breve経口投与後の血中の抗B. breve抗体価

*** $P < 0.01$

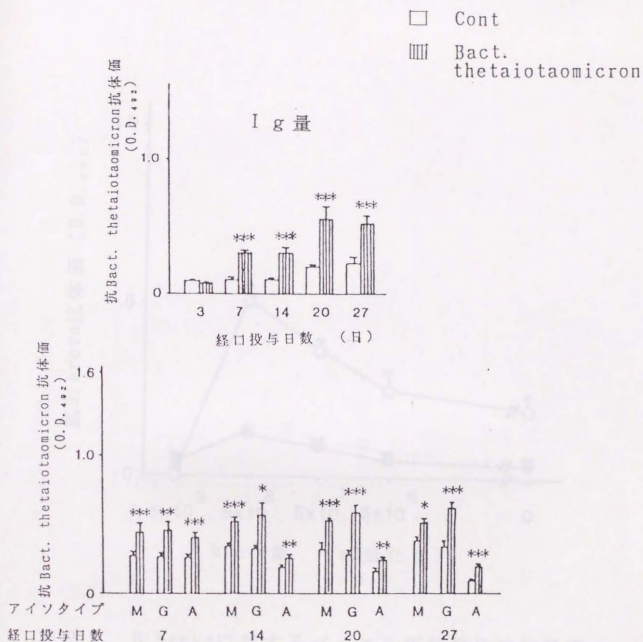


図 2 6 Bact. thetaiotaomicron 経口投与後の血中の
抗 Bact. thetaiotaomicron 抗体価

*** $P < 0.01$, ** $P < 0.02$, * $P < 0.05$

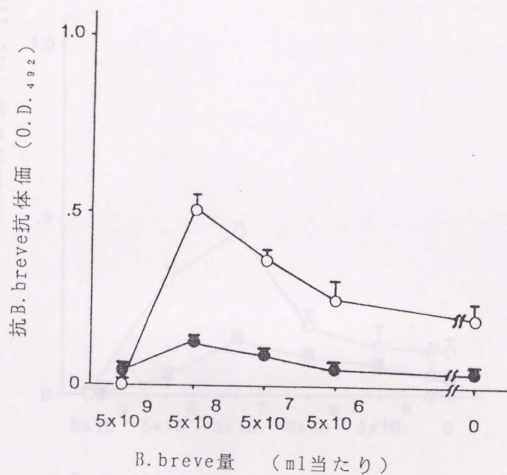


図 2 7 B. breveに対するパイエル板細胞の抗体反応

● 培養5日目 ○ 培養7日目

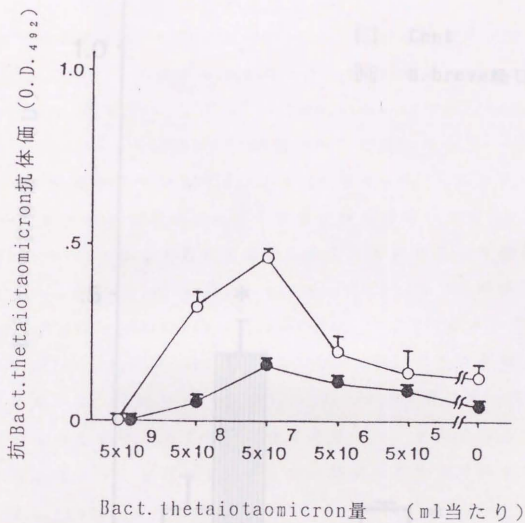


図 2 8 Bact. thetaiotaomicron に対する
パイエル板細胞の抗体反応

● 培養5日目 ○ 培養7日目

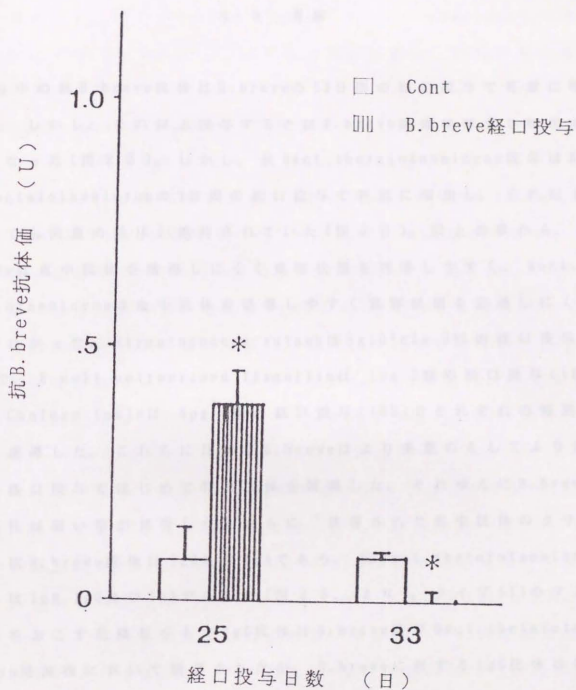


図 2 9 B. breve 経口投与によるパイエル板細胞の
B. breveに対する反応性の変化

* $P < 0.05$

4.3 考察

血中の抗 *B. breve* 抗体は *B. breve* の 33 日間の経口投与で有意に増加した。しかし、それ以上投与すると抗 *B. breve* 抗体は減少し検出されなくなった(図 25)。しかし、抗 *Bact. thetaiotaomicron* 抗体は *Bact. thetaiotaomicron* の 7 日間の経口投与で有意に増加し、それ以上投与しても同量の抗体が維持されていた(図 26)。以上のことから、*B. breve* は血中抗体を誘導しにくく寛容状態を誘導しやすく、*Bact. thetaiotaomicron* は血中抗体を誘導しやすく寛容状態を誘導しにくい事がわかった。*Streptococcus mutans* は 5×10^6 cfu 2 回の経口投与(100)で、*E. coli* polymerized flagellin は 1 ng 2 回の経口投与(101)で、*Cholera toxin* は $5 \mu\text{g}$ 4 回の経口投与(102)でそれぞれの特異抗体を誘導した。これらに比べて *B. breve* はより多量のそしてより長期間の経口投与ではじめて特異抗体を誘導した。それゆえに *B. breve* の抗原性は弱い事が判明した。さらに、誘導された血中抗体のクラスは、抗 *B. breve* 抗体は IgG 及び IgA であり、抗 *Bact. thetaiotaomicron* 抗体は IgM, IgG 及び IgA であった(図 25、26)。タイプ III のアレルギーをおこす危険性をもつ IgG 抗体は *B. breve* 及び *Bact. thetaiotaomicron* 両菌株において誘導されたが、*B. breve* に対する IgG 抗体は誘導されにくく減少しやすかった。

Kiyono らはパイエル板細胞は抗原特異的抗体を産生する事が可能である事を示した(103)。この抗体産生に必要な菌体の最適濃度は、*B. breve* は 5×10^4 菌体/ml であり、*Bact. thetaiotaomicron* は 5×10^7 菌体/ml であった(図 27、28)。以上のように、抗体を誘導するのに必要な *B. breve* 菌体の濃度は *Bact. thetaiotaomicron* の 10 倍量であった。

この事からも、*B. breve*の抗原性は*Bact. thetaiotaomicron*より弱い事がわかった。しかし、この抗原性の違いが菌属、菌種または菌株によるものか否かはまだ明かでない。

次に、*B. breve*の血中抗体の誘導の弱さは如何なるメカニズムによるものかを明かにするために、*B. breve*を経口投与した後のパイエル板の抗体産生能を調べる事により解析した。血中の抗*B. breve*抗体は*B. breve*の33日間の経口投与で出現し42日間の経口投与で減少したが、パイエル板細胞の抗*B. breve*抗体産生能は25日間の経口投与で増加し33日間の経口投与で減少していた(図29)。これらの結果は、パイエル板細胞の抗体産生能の増加及び減少に伴い数日おくれて血中抗体の増加及び減少がおこり、血中の抗*B. breve*抗体量はパイエル板の抗体産生能と連動しており、パイエル板で制御されている事を示している。

著者らは、以前、*B. breve*と同様の粒子抗原である羊赤血球(SRBC)を経口投与すると脾臓の抗体産生能に変化が認められ、それがパイエル板細胞の変化による事を示し、パイエル板が全身性免疫を制御している事を報告した(104)。つまり、種々の濃度のSRBCまたはPBS(コントロール)を14日間経口投与し、翌日 1×10^8 SRBCを静注後、脾臓の各クラスの抗SRBC PFCを測定した。IgM抗SRBC PFCは 5×10^4 及び 5×10^4 SRBCの経口投与で有意に減少し(図30A)、IgG抗SRBC PFCは 5×10^8 SRBCの経口投与で有意に減少し(図30B)、IgA抗SRBC PFCは 5×10^8 SRBCの経口投与で約10倍増加した(図30C)。このようにSRBC抗原を経口投与すると、ある抗原量で脾臓のIgM及びIgG抗SRBC PFCは減少し、IgA抗SRBC PFCは増加する事がわかった。次に、IgA抗SRBC PFCの増加とIgG抗SRBC PFCの減少のメカニズムを明かにするた

めに移入実験を行った。 5×10^8 SRBCまたは 5×10^8 SRBCを種々の期間経口投与後、パイエル板及び脾臓を取り出しT細胞富画分を調製し受容マウス（胸腺摘出後B細胞を移入したマウス(T_xXB)）に移入した。翌日 1×10^8 SRBCを静注しさらに9日後に脾臓のIgA PFCまたはIgG PFCを測定した(図3 1、3 2)。2日間経口投与したマウスのパイエル板のT細胞富画分にIgA PFC増強活性またはIgG PFC抑制活性が認められたが、4日間経口投与すると、パイエル板中のこれらの活性は減少した。一方、2日間の経口投与の脾臓のT細胞富画分中にはIgA PFC増強活性またはIgG PFC抑制活性は認められないが、4日間の経口投与の脾臓のT細胞富画分にこれらの活性は認められるようになった。これらのことから、 5×10^8 SRBC経口投与による脾臓のIgA抗SRBC PFCの増加はIgA helper T細胞の出現によるものであり、 5×10^8 SRBC経口投与による脾臓のIgG抗SRBC PFCの減少はIgG suppressor T細胞の出現によるものであり、これらの細胞はまずパイエル板に出現し、脾臓に移行するものである事がわかった。今回のパイエル板および血中における抗B.breuve抗体の増加および減少も、クラス別に測定していないので明かでないが、helper細胞とsuppressor細胞の出現によるものと考えている。また、液性抗原であるオブアルブミンも経口投与するとパイエル板にsuppressor T細胞が出現する(105)事が報告されている。以上のことから、B.breuveは suppressor細胞を誘導しやすくhelper細胞を誘導しにくい事が推測された。

また、著者らは常在菌に対しても寛容状態になっている事をマウス常在菌であるバクテロイデスを用いて明かにしている(59)。つまり、マウスの糞便及び盲腸内容物から3種のBacteroidesを分離し、その3分離株(2-2, Y, 2-4株)に対する血中抗体を測定したが、検出

されなかった(表6)。しかし、これらを腹腔に接種すると様々な抗体誘導活性(抗体量及びクラス)を示した。2-2株は一次、二次反応ともに低い抗体誘導活性を示し2ME抵抗性抗体を誘導し(図33)、Y株は一次反応で低い抗体誘導活性を二次反応で高い抗体誘導活性を示し2ME感受性抗体を誘導し(図34)、2-4株は一次、二次反応とも高い抗体誘導活性を示し多量の2ME抵抗性抗体を誘導した(図35)。常在菌は腸管に棲息しているときは抗体を誘導しないが、これらを非経口投与すると様々な抗体誘導活性を示したことから、これらの菌は腸管で抗原性を保持しているが、腸管には免疫反応を抑制する機構(寛容機構)が存在するために抗原性を発揮しない事がわかった。

このような生体に備わっている寛容機構を破るような物質は食品として適当でないばかりかアレルギーを引き起こす危険がある。抗体(特にIgG抗体)は多量の抗原と結合した時にタイプIIIのアレルギーを引き起こす事が知られている。そこで、日常的に摂取している発酵乳に含まれる*Bifidobacterium*の安全性を検証する必要があるためその抗原性を調べた。その結果、*B. breve*は抗原性が弱く血中抗体(IgG抗体)を誘導しにくかったので、経口摂取した時にこのタイプのアレルギーをおこしにくい事が推察された。

以上のように、*B. breve*は抗原性が弱く抗体を誘導しにくく、誘導された抗体も消失しやすく、寛容状態を誘導しやすいので、食品として摂取しても安全と思われた。

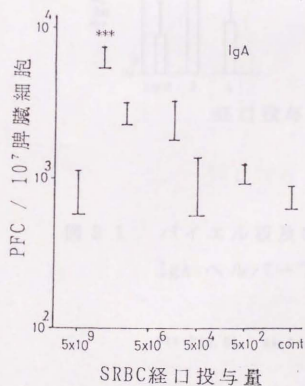
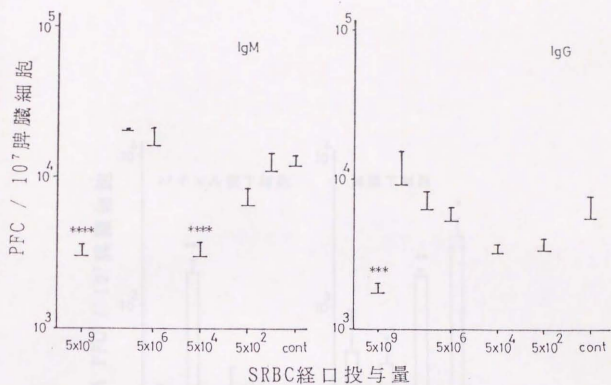


図 3 0

SRBC経口投与後の脾臓の
抗SRBC抗体産生能

**** $P < 0.001$, *** $P < 0.01$

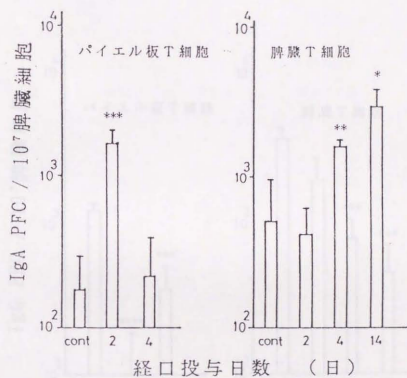


図 3 1 パイエル板及び脾臓中に出現する
IgA ヘルパー T 細胞

*** P<0.01, ** P<0.02, * P<0.05

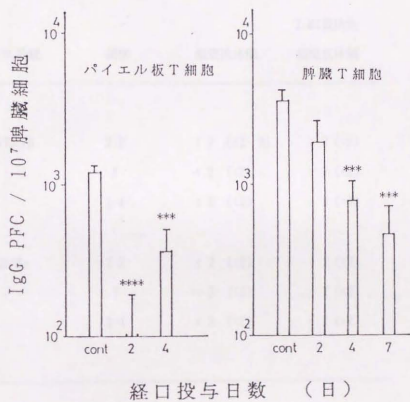


図 3 2 パイエル板及び脾臓中に出現する
IgG サプレッサー T 細胞

**** P<0.001

*** P<0.01

表6 3株のバクテロイデス分離株に対するマウス血清中の自然抗体価

マウス系統	菌株	凝集抗体価	2 ME抵抗性
			凝集抗体価
C57BL/6	2-2	< 2 (<2-2)	< 2 (<2)
	Y	< 2 (<2)	< 2 (<2)
	2-4	< 2 (<2)	< 2 (<2)
C3H/He	2-2	< 2 (<2)	< 2 (<2)
	Y	< 2 (<2)	< 2 (<2)
	2-4	< 2 (<2)	< 2 (<2)

凝集抗体価は凝集を示す血清の希釈の逆数を \log_2 として表した。

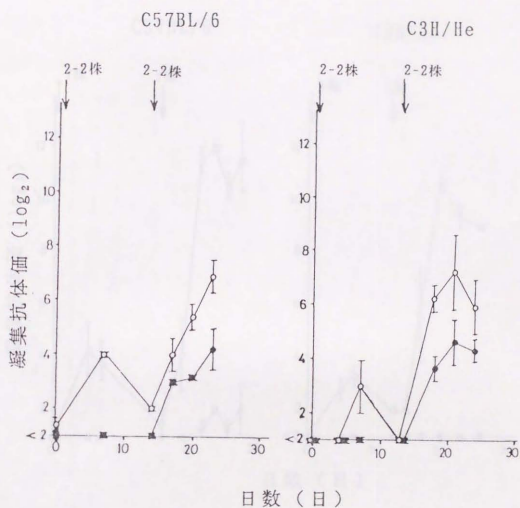


図 3 3 Bacteroides 2-2株の腹腔投与後の血中抗体価

- 凝集抗体価
●——● 2-NE抵抗性凝集抗体価

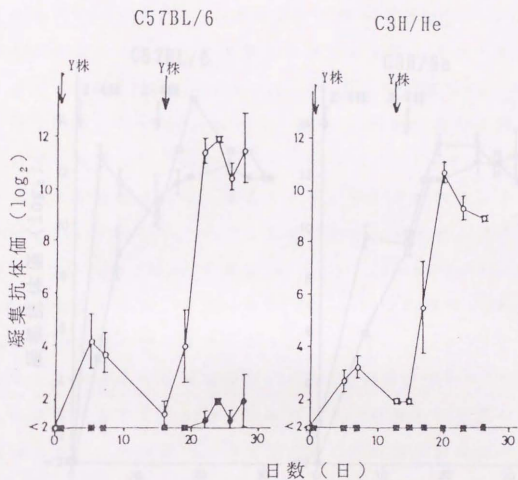


図 34 Bacteroides Y株の腹腔投与後の血中抗体価

- — ○ 凝集抗体価
- — ● 2-ME抵抗性凝集抗体価

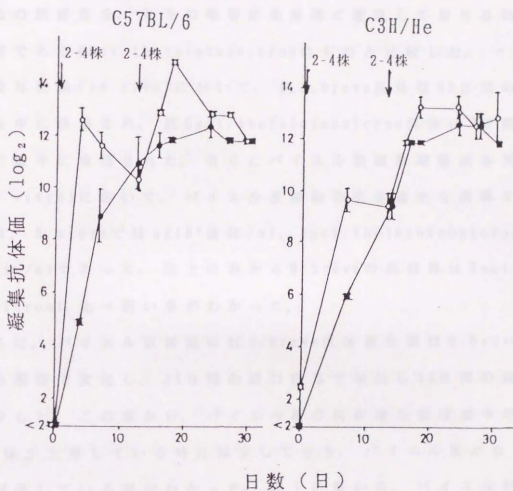


図 3 5 Bacteroides 2-4株の腹腔投与後の血中抗体価

- — ○ 凝集抗体価
● — ● 2-ME抵抗性凝集抗体価

発酵乳に含まれる *B. breve* の安全性を調べるために、*B. breve* の腸管経由の抗原性を、ヒトの腸管に最優勢に棲息しており日和見感染原因菌である *Bact. thetaiotaomicron* のものと比較した。マウスへの経口投与実験 (*in vivo*) において、抗 *B. breve* 抗体は33日間の経口投与で血中に検出され、抗 *Bact. thetaiotaomicron* 抗体は7日間の経口投与で血中に検出された。さらにパイエル板細胞培養法を用いた実験 (*in vitro*) において、パイエル板細胞の抗体産生を誘導する最適濃度は、*B. breve* では 5×10^8 菌体/ml、*Bact. thetaiotaomicron* では 5×10^7 菌体/ml であった。以上のことから *B. breve* の抗原性は *Bact. thetaiotaomicron* に比べ弱い事がわかった。

さらに、パイエル板細胞の抗 *B. breve* 抗体産生能は *B. breve* の経口投与の期間で変化し、25日間の経口投与で増加し33日間の経口投与で減少した。このことから、パイエル板の抗体産生能は血中の抗 *B. breve* 抗体が上昇している時に減少しており、パイエル板が血中抗体産生を制御している事がわかった。以上のことから、パイエル板の制御作用により *B. breve* に対する血中抗体は誘導されにくく消失されやすく、この *B. breve* がタイプIIIのアレルギーをひきおこす危険性は低い事が判明した。

本研究は、ビフィズス菌の腸管免疫活性化作用を解析する事である。ビフィズス菌はヒトの腸管に最優勢に棲息しており、発酵乳の製造に用いられている細菌であり、感染防御作用(94-96)をはじめ種々の生理活性が報告されている。しかし、そのメカニズムはまだ明かでない点が多い。そこで、腸管免疫機構におよぼすビフィズス菌の影響を、腸管免疫組織の一つであり管腔内抗原が最初に遭遇し最初の免疫反応がおきるパイエル板の細胞を用いて解析する事を試みた。さらに、ビフィズス菌を経口投与してIgA産生に及ぼす影響を解明する事を試みた。その結果、次の事が判明した。

(1) ビフィズス(*B. breve*)はマウスパイエル板細胞の抗体産生能および細胞増殖を促進した。そして、この増殖促進の作用機作は*B. breve*がプラスチック付着細胞に作用して液性因子を誘導し、その液性因子がB細胞を増殖させるものであった。

(2) 120株のビフィズス菌分離株の中にマウスパイエル板細胞のIgA産生を増強する菌株が3株あった。この中の1株(*B. breve* YIT4064)をマウスに経口投与すると糞便中の抗原特異的IgA抗体産生が増大した。しかし、パイエル板細胞系で低いIgA誘導活性を示した菌株を経口投与しても糞便中の抗体は増大しなかった。以上のことから、このパイエル板細胞培養系を用いてIgA誘導活性の高い物質(食品素材など)を迅速、安価にそして容易にスクリーニングすることができると思われた。

(3) この B.breve YIT4064 は IL-1, IL-4, IL-5 を誘導し、表面 IgA 陽性細胞数および IgA 産生細胞数を増加させた。このことから、B.breve YIT4064 はマクロファージおよび Th₂ 細胞に作用し、IL-1, IL-4, IL-5 を誘導し、これらのサイトカインの関与で表面 IgA 陽性細胞数および IgA 産生細胞数の増加、そして IgA 産生量の増加を促すと推測された。

(4) この B.breve YIT4064 をコレラ毒素 (CT) とともにマウスに経口投与すると CT 単独投与に比べ糞便中の抗 CT IgA 抗体量は増大した。このマウスのパイエル板細胞の増殖性および抗体 (抗 CT IgA 抗体、総抗体) 産生能も増大した。しかし、血中の抗体量の増大および脾臓細胞の増殖促進は認められなかった。また、抗 B.breve YIT4064 抗体は血中、糞便中で認められなかった。以上のことから、この B.breve YIT4064 は腸管免疫を活性化するが、全身性免疫系は活性化しないことがわかった。また、抗原性も弱い事があきらかになった。

(5) ビフィズス菌の安全性を検証するために、B.breve を用いて抗原性を調べた。B.breve に対する抗体産生をパイエル板細胞で誘導するには多量の B.breve 抗原が必要であった。また、B.breve を経口投与すると、血中抗体が誘導されにくく消失されやすかった。そして、これはパイエル板の制御作用によるものであった。以上のことから、B.breve は抗原性が弱く、抗体が関与するタイプ III のアレルギーをひきおこす危険性が低いと思われた。

以上のように、ビフィズス菌のある菌株はパイエル板細胞を活性化し、腸管のIgA産生を増強したことから、腸管の病原菌やアレルゲンに対するIgA産生を増強し、感染を防御したり、アレルゲンの吸収を阻止する事が期待できた。一方、IgA産生増強作用をもつビフィズス菌中の活性物質についてはまだ明らかでない。活性本体が明らかになれば、経口のみならず経鼻投与も可能になるので、上気道の粘膜免疫を活性化し、インフルエンザ感染の予防も期待できるであろう。作用物質の解析は現在進行中である。さらに、この菌の腸管感染阻止作用については、感染防御にIgAが関与する事が報告されているウイルス（ロタウイルス、A型肝炎ウイルス、ポリオウイルスなど）を用いて検証する予定である。そして、この菌の免疫賦活作用を明確にし、ビフィズス菌を免疫賦活の生体調節機能をもつ食品として位置づけたい。

6 章 謝 辞

本論文を書き終えるに当たり、本研究のテーマについてご討論ご指導いただき、ここに発表の機会をあたえて下さいました東京大学農学部農芸化学科、上野川修一教授に深謝いたします。また、畜産物利用研究室での本研究発表の際、多くの討論をして下さいました舩谷助教授はじめ皆様に感謝いたします。

本研究はヤクルト中央研究所において行われたものであり、本研究をご指導、ご支援くださいました同研究所元所長、務台方彦博士に、さらに、本研究のテーマについて始終討論をし、ご協力頂きました同研究所菅辰彦元次長、大脇真室長、三毛明人研究員に厚く感謝いたします。また、本研究は、長岡（旧姓加藤）紀子さんの卓越した技術協力、同研究所動物管理室の飼育管理なくしてはならなかったことを記し、感謝の念にかえます。そして同研究所の山下哲郎部長、綿貫雅章室長はじめおおくの方々のご協力、ご助言に厚くお礼を申しあげます。

最後に、私の研究生生活を理解し、支えてくれた夫、孝太郎、家族に感謝します。

7 章 引用文献

- 1) Dubos, R. (1965) in *Man Adapting*. Yale Univ. Press, New Haven, U.S.A.
- 2) Gustafsson, B.E. in *The Germ-free Animal in Biomedical Research*. (eds. Coates, M.e., Gustafsson, B.E.) pp. 1 Laboratory Animals. London, U.K.
- 3) Savage, D.C. (1977) *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 107
- 4) Hungate, R.E. (1976) in *Fibre in human nutrition* (eds. Spiller, G.A., Amen, R.J.) pp. 131-150. Plenum Press, New York, U.S.A.
- 5) 光岡知足 (1975) 腸内細菌とその意義 臨床と細菌 2 55
- 6) Tissier M.H. (1899) *C.R.Seances Soc. Biol. Fil.* 51 943
- 7) Liebscher S. (1961) *Z. Kinderheilked.* 85 265
- 8) 榑野義己、沢山健、光岡知足 (1983) 腸内フローラと栄養 (光岡知足編) 学会出版センター 13
- 9) Tohyama K. et al. (1982) *Bifido. Microflora.* 1 45
- 10) 田中隆一郎 et al. (1980) *小児科臨床* 33 2483
- 11) 小林洋一 et al. (1978) *日本細菌学雑誌* 33 214
- 12) Tanaka R. et al. (1983) *Bifido. Microflora.* 2 17
- 13) 老川忠雄 et al. (1985) *治療学* 14 587
- 14) 佐藤吉壮 et al. (1985) *治療学* 14 682
- 15) 高野健一郎 et al. (1986) *小児科* 27 1081
- 16) Mestecky J, McGhee J.R. (1987) in *Advance in Immunology*. 40, pp153 Academic Press, New York.

- 17) Nagura H. Sumi Y. (1988) in Digestive Disease Pathology,
I (ed. by Watanabe S et al), pp.185 Field of Wood,
Pennsylvania.
- 18) Nagura H. Sumi Y. (1988) Toxicol. Pathol. 16, 154
- 19) 名倉 宏 (1986) 節外性リンパ組織の構造と機能 病理と臨
床 4 466
- 20) Butcher E.C. et al. (1982) in Recent Advances in Mucosa
I Immunity (ed by Strober W et al) pp.3 Raven Press,
New York.
- 21) Nagura H. Sumi Y. (1987) in Recent Advances in Mucosal
Immunology (ed by MacGhee J.R. et al) pp.279 Plenum
Press, New York
- 22) Wilders M.M. et al. (1983) Immunology 50 303
- 23) Sminia T. et al. (1983) Anat Rec 207, 309
- 24) Van Rees E.P. et al. (1988) Immunology 63, 79
- 25) Nakanura S. et al. (1988) Acta. Pathol Jpn 33, 1267
- 26) Pollard M et al. (1970) Infect. Immun. 2, 96
- 27) Crabbe P.A. et al. (1970) Lab. Invent. 22, 448
- 28) Owen R.L. (1977) Gastroenterology 72, 440
- 29) Takahasi M. et al. (1991) J. Clin. Electron. Microscopy
24 5
- 30) Crabble P.A. et al. (1969) J. Exp. Med. 130, 723
- 31) Bazin H. et al. (1970) J. Immunol. 105, 1049
- 32) Montgomery P.C. et al. (1974) Immunol. Commun. 3, 143
- 33) Mestecky J. et al. (1978) J. Clin. Invest. 61, 731

- 34) Michalek S.M. et al. (1976) Science 192, 1238
- 35) Mostov K.E., Blobel G. (1983) in "The Secretory Immune System" 409, ed. by J.R. McGhee and J. Westecky, New York Academy of Sciences, New York p.441
- 36) Ogra P.L., Karzon D.T. (1969) J. Immunol. 102, 1423
- 37) Pierce N.F. et al. (1980) Infect. Immun. 27, 632
- 38) 北山裕展 藤山佳秀 (1986) 消化器病学の進歩 '85 日本医学館 東京 p.204
- 39) Murray P.D. et al. (1987) J. Immunol. 139 2669
- 40) Harriman G.R. et al. (1988) J. Immunol. 140 3033
- 41) Schoenbeck S. et al. (1989) Eur. J. Immunol. 19 965
- 42) Beagley K.W. et al. (1988) J. Immunol 141 2035
- 43) Sporn M.B. et al. (1986) Science 233 532
- 44) Roberts A.B. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 119
- 45) Kehrl J.H. (1986) J. Exp. Med. 163 1037
- 46) Lee G. et al. (1987) J. Exp. Med. 166 1290
- 47) Kehrl J.H. et al. (1986) J. Immunol. 137 3855
- 48) Espevik T. et al. (1988) J. Immunol. 140 2312
- 49) Rook A.H. et al. (1986) J. Immunol. 136 3916
- 50) Tsunawaki S. et al. (1988) Nature 334 260
- 51) Assoian R.K. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 6020
- 52) Sonoda E. et al. (1989) J. Exp. Med. 170 1415
- 53) Schwedler U.V. et al. (1990) Nature 345 452

- 54) Matsuoka M. et al. (1990) Cell 62 135
- 55) Iwasato T. et al. (1990) Cell 62 143
- 56) Andre C.R. et al. (1974) Eur. J. Immunol. 4, 701
- 57) Stokes C.R. et al. (1975) Nature (Lond.) 255, 745
- 58) Yasui H., Ohwaki M. (1991) J. Dairy Sci. 74, 1187
- 59) Yasui H. et al. (1979) Infect. Immun. 24, 39
- 60) Araki Y. et al. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6312
- 61) Frangakis M.V. et al. (1982) J. Immunol. Methods 48, 33
- 62) Mishell R.I., Dutton R.W. (1967) J. Exp. Med. 126, 423
- 63) Yasui H., Ohwaki M. (1989) J. Dairy Sci. 72, 30
- 64) Cunningham A.J., Szenberg A. (1968) Immunology 14, 599
- 65) Viljanen M.K. et al. (1983) J. Infect. Dis. 148, 715
- 66) Mage M.G. et al. (1977) J. Immunol. Methods 15, 47
- 67) Ly, I.A., Mishell R. (1974) J. Immunol. Methods 5, 239
- 68) Sjoberg O. et al. (1972) Eur. J. Immunol. 20, 123
- 69) Elson C.O. et al. (1984) J. Immunol. Methods 67, 101
- 70) Perdigon G. et al. (1987) J. Dairy Sci. 70, 919
- 71) Janossy G., Greaves M.F. (1971) Clin. Exp. Immunol. 9, 483
- 72) Peavy D.L. et al. (1970) J. Immunol. 105, 1453
- 73) Damais C. et al. (1975) J. Immunol. 115, 268
- 74) Forsgren A. et al. (1976) Eur. J. Immunol. 6, 207
- 75) Dziarski R., Dziarski A. (1979) Infect. Immun. 23, 706
- 76) Damais C. et al. (1977) Cell. Immunol. 34, 49
- 77) Bazin R., Lemieux R. (1987) J. Immunol. 139, 780

- 78) Freedman A.S. et al. (1988) J. Immunol. 141, 3398
- 79) Hirano T. et al. (1986) Nature (Londo.) 324, 73
- 80) Jelinek D.F., Lipsky P.E. (1987) J. Immunol. 139, 2970
- 81) Nordan R.P. et al. (1987) J. Immunol. 139, 813
- 82) Tosato G. et al. (1988) Science 239, 502
- 83) Vink A. et al. (1988) Eur. J. Immunol. 18, 607
- 84) Pierce N.F. et al. (1980) Infect. Immune. 27 632-632
- 85) Moreau M.C. et al (1978) Infect. Immune. 21, 532
- 86) Yasui H. et al (1991) in "Frontiers of Mucosal Immunology" 1, 275
- 87) 保井久子 (1991) 酪農科学・食品の研究 40, A295
- 88) Yasui H. et al (1992) Microb. Ecol. Health. Dis. 5, 155
-162
- 89) Greenbaum L.A. et al. (1988) J. Immunol. 140 1555
- 90) Wakasugi H. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
84 804
- 91) Endo Y. et al. (1988) J. Immunol. 141 2342
- 92) Kunimoto D.Y. et al. (1988) J. Immunol. 141 713-720
- 93) Mituoka T., Kaneuchi C. (1977) Am. J. Clin. Nutr. 30, 1
799
- 94) Homma N. (1974) Jpn. J. Pediatr. 27, 1267
- 95) Poupard J.A. et al. (1973) Bacteriol. Rev. 37, 136
- 96) Yamazaki S.H. et al. (1982) Bifidobacteria Microflora 1,
55
- 97) Golbert T. M. et al. (1969) J. Allergy 44, 96

- 98) Pock-steen O.C. (1973) Clin. Allergy 3, 373
- 99) Shiner M.J. et al. (1975) Lancet i, 136
- 100) Morisaki I. et al. (1983) Infect. Immun. 40, 577
- 101) Kenrick K.G., Cooper G.N. (1978) J. Exp. Biol. Med. Sci. 56, 441
- 102) Svennerholm A.M. et al. (1980) Infect. Immun. 30, 337
- 103) Kiyono H. et al. (1982) Pro. Natl. Acad. Sci. 79, 596
- 104) Yasui H. et al (1983) Microbiol. Immunol. 27, 1107
- 105) Mowat A.M. (1985) Immunology 56, 253
- 106) 露木重雄 ら (1987) 第103回日本獣医学会講演要旨集 129
- 107) Namioka S. (1985) Bifidobacteria Microflora 4 3-14
- 108) 厚井芳則 ら (1977) 日本細菌学雑誌 32 220
- 109) Kohwi Y (1982) Bifidobacteria Microflora 1 61
- 110) 藤原茂 ら (1990) 日本栄養食料学会誌 43 203
- 111) Kato I. et al (1981) Gann 72 517
- 112) 林圭子 ら (1989) Biotherapy 3, 1575

8 章 論文の内容の要旨

論文題目 ビフィズス菌の腸管免疫活性化作用に関する研究

氏 名 保井 久子

ビフィズス菌はバクテロイデス、ユウバクテリウム、大腸菌、乳酸菌等と同様に腸内細菌の主要な構成員である。バクテロイデスや大腸菌は腸内腐敗や発ガン物質産生などの有害性が報告されているのに比べ、ビフィズス菌はビタミンの合成、消化吸収の補助、腸内有害菌や病原菌感染に対する抵抗性などの有用性が報告されている。このようなことから、ヒトはこの菌をヨーグルト製造に用い食品として摂取してきたが、これらの生理活性についてはまだ充分に実証されているとはいえない。一方、近年、食品には栄養素および嗜好品としての機能のほかに生体機能の調節という高次の機能が存在する事が報告され、盛んに研究が行われるようになってきた。そして、食品には神経系調節作用、細胞分化調節作用、生体防御作用、免疫賦活作用のような生理活性も見いだされてきた。そこで、ビフィズ

ス菌を免疫賦活作用をもつ食品として位置付けられるかを明らかにする事を試みた。ビフィズス菌の免疫賦活作用については非経口投与で全身性免疫活性を調べた報告が多く、腸管免疫活性化についての研究は充分でない。腸管免疫活性化作用やそのメカニズムを解析するためには、腸管免疫組織の試験管内培養系を確立する事が必須となる。このような背景から、腸管免疫組織の一つであり管腔内抗原が最初に遭遇するパイエル板の細胞の試験管内培養を確立し、ビフィズス菌がこのパイエル板細胞の抗体産生や増殖におよぼす影響を解析し、そのメカニズムを解明する事を試みた。さらに、マウスに経口投与して腸管免疫の活性化を測定し、試験管内試験と生体試験の関連性を検討し、試験管内試験の妥当性を見いだした。

I ビフィズス菌のパイエル板細胞活性化作用

腸管にはパイエル板、腸間膜リンパ節、粘膜上皮間や固有層のリンパ球からなる腸管隣接リンパ組織(GALT)が存在し、腸管における免疫応答を制御している。特にパイエル板は管腔内抗原が最初に遭遇する免疫組織であり、パイエル板の特徴の一つであるM細胞(microfold cell)、マクロファージ、IgA前駆細胞およびT細胞から構成されており、抗体(特にIgA)産生に重要な組織である。そこでパイエル板細胞の培養系を用い、ビフィズス菌を添加して腸管免疫賦活作用を明らかにする事を試みた。その結果、ビフィズス菌はパイエル板細胞の抗体産生(リボポリサッカライドおよび羊赤血球抗原に対する抗体産生)を増強し、細胞(特にB細胞)増殖を促進する事がわかった。この増殖促進のメカニズムはビフィズス菌がマクロファージ系細胞に作用し、液性因子を分泌させ、この因子がB細胞を増殖させる

ものであった。また、この菌の活性本体は細胞壁部分にあった。

II ビフィズス菌のIgA産生増強作用およびその作用機作

分泌型IgA抗体は腸管粘膜の分泌液中に多量に存在している抗体であり、病原菌やウイルスなどの体内への侵入や感染および食餌性抗原の過剰な体内への吸収を阻止する作用をもつものである。この分泌型IgAは次のように産生される。管腔内抗原はパイエル板中のM細胞に取り込まれ、IgA前駆細胞を刺激または活性化する。これらの細胞はT細胞の関与により増殖、分化しながら腸間膜リンパ節、胸管そして脾臓へと体内循環してIgA形質細胞に分化して粘膜固有層に帰巢しIgAを分泌し、上皮細胞で産生される分泌片と結合して分泌型IgAとして管腔内に分泌される。そこで、パイエル板のIgA前駆細胞が試験管培養系でIgA形質細胞に分化するか調べたところ、培養液中にIgAが認められ分化する事がわかったので、この試験管培養系を用いて、多量のIgAを誘導するビフィズス菌株をスクリーニングした。その結果、ヒトの糞便から分離された120株のビフィズス菌の中から3株のIgA誘導活性の高い菌株をスクリーニングする事ができた。そこで、この中の1株(B.breve YIT4064)を用い、IgA産生増強作用のメカニズムを解析する事を試みた。最近、種々の免疫反応に種々のサイトカインが複雑に作用しあっている事が報告されている。そこで、細胞増殖や抗体産生に関与する事が報告されているサイトカインの産生をバイオアッセイで測定したところ、IgA誘導活性の高いビフィズス菌(B.breve YIT4064)はIgA誘導活性の低いビフィズス菌(B.breve Ka-6)に比べて、IL-1、IL-4、IL-5を多量に誘導した。IL-1は主にマクロファージが分泌するサイトカインであり、細胞増殖に関与

し表面IgM陽性細胞の数を増加させる。IL-4とIL-5はタイプ2T_H(Th₂)細胞が産生するサイトカインである。IL-5はIgA産生に関与するサイトカインの一つで、表面IgA陽性細胞に作用し、IgA産生を促す成熟因子とされている。IL-4はこのIL-5の作用を促進するサイトカインであり、表面IgM陽性細胞から表面IgA陽性細胞に分化させる作用をもつクラス転換因子とされている。さらに、表面抗原とIgA抗体産生細胞数をそれぞれ蛍光抗体法とELISPOT法により測定したところ、ビフィズス菌(B.breve YIT4064)添加により表面IgA陽性細胞数とIgA産生細胞数が増加していた。このことから、このビフィズス菌(B.breve YIT4064)のIgA産生増強作用のメカニズムを次のように想定した。このビフィズス菌(B.breve YIT4064)はマクロファージに作用してIL-1を、Th₂細胞に作用してIL-4とIL-5を誘導する。IL-1は表面IgM陽性細胞を増加させ、その表面IgM陽性細胞にIL-4が作用して表面IgA陽性細胞に分化させる。そして、IL-5がその表面IgA陽性細胞に作用してIgA産生を増強する。

次にパイエル板細胞を用いた試験管内試験法によるIgA誘導活性が生体の腸管におけるIgA誘導活性を反映するかを明らかにするために、試験管内試験法で高い活性を示した菌株(B.breve YIT4064)と低い活性を示した菌株(B.breve Ka-6)をそれぞれ経口投与し抗原にコレラ毒素を用いその反応性を調べると、高い活性を示した菌株(B.breve YIT4064)は低い活性を示した菌株(B.breve Ka-6)に比べ糞便およびパイエル板の抗原特異的IgA抗体産生(抗CT IgA抗体)を増強しパイエル板細胞の増殖を促進した。以上のことから、パイエル板細胞を用いた試験管内試験法と経口投与による生体試験法との間でIgA誘導活性に関連がみられたので、このパイエル板細胞培養法を用いることに

より、迅速に、安価に、正確にIgA産生増強食品をスクリーニングで
きる事がわかった。また、この菌体は経口投与により脾臓細胞の増
殖を促進せず、血中の抗体価(抗原特異的および非特異的抗体価)を
上昇させることはなかった。以上の事から、ビフィズス菌(B.breve
YIT4064)を経口投与すると、全身性免疫系を活性化することなく、
腸管粘膜免疫系を活性化する事がわかった。

III 腸管におけるビフィズス菌の抗原性

食餌性抗原に対する抗体が多量に誘導されると、全身性アナフィ
ラキシーや強烈なショック反応やクローン病のような症状をおこす
危険性がある。そこで、ビフィズス菌の安全性を抗原性の観点から
詳細に調べた。ビフィズス菌および他の腸内細菌をマウスへ経口投
与すると、ビフィズス菌に対する血中抗体は他の腸内細菌(バクテロ
イデス、ストレプトコッカス、大腸菌)に対する抗体に比べて誘導さ
れにくく消失されやすく、またビフィズス菌は寛容(トレランス)
を誘導しやすい事がわかった。パイエル板細胞培養法を用いた実験
においても、ビフィズス菌はバクテロイデスに比べてその菌自身の
抗体産生を誘導するのに大量の菌体量を必要とした。以上の事から、
ビフィズス菌は抗原性が弱く、安全性が高いことがわかった。

以上のようにビフィズス菌のなかにはパイエル板細胞を活性化し、
腸管のIgA産生を増強する菌株がある事が明らかになった。このよう
な菌を摂取すると病原菌やアレルゲンに対するIgA抗体産生が増強さ
れ、これらの物質を排除する事が予想できるので、このビフィズス
菌に感染防御作用やアレルギー発症阻止作用が期待できる。また、

世界保健機構(WHO)の最近の指針の中に安全性の高い経口ワクチンの開発の必要性が述べられている。ワクチンは特に抗生物質で効果を示さないウイルス病に対して必要なものであるが、現在のワクチンは効果の面で非経口投与によるものが多く、副作用があとをたない。このような背景から経口ワクチンの必要性が生じてきているのである。このビフィズス菌に経口ワクチンを強化する作用(特に粘膜に感染し感染防御にIgAが関与するインフルエンザウイルス、ロタウイルス、ポリオウイルスなどの経口ワクチン強化作用)も期待できるので、このビフィズス菌は免疫賦活作用をもつ食品として位置付けられるばかりでなく経口ワクチン強化作用をもつ医薬品としても期待できよう。

9 章 論文目録

- 1 Enhancement of Immune Response in Peyer's Patch Cells
Cultured with *Bifidobacterium breve*. (パイエル板細胞を用いて
のビフィズス菌の免疫増強作用) J. Dairy Sci. 74 : 1187-1195
1991
- 2 Detection of *Bifidobacterium* Strains that Induce Large
Quantities of IgA. (IgA産生増強作用をもつビフィズス菌株の
検出) Micro. Ecol. Health Dis. 5 : 155-162 1992
- 3 ビフィズス菌の経口投与による腸管粘膜免疫系 (IgA抗体産生能)
の増強 酪農科学・食品の研究 40 : A295-A298 1991
- 4 Augmentation of Antigen-Specific and Antigen-Nonspecific
IgA Production by *Bifidobacterium breve* YIT4064. (B.breve
YIT4064の抗原特異的および抗原非特異的IgA産生増強作用)
Frontiers of Mucosal Immunology 1 : 275-276 1991
- 5 IgA Production and Intestinal Microflora : Augmentation of
IgA Production by *Bifidobacterium breve*. (IgA産生と腸内細
菌 : *Bifidobacterium breve* のIgA産生増強作用) J. Clin.
Electron Microscopy 24 : 5-6 1991
- 6 Immunogenicity of *Bifidobacterium breve* and Change in

Antibody Production in Peyer's Patches after Oral Administration. (ビフィズス菌の免疫原性と経口投与によるパイエル板の抗体産生能の変化) J. Dairy Sci. 72 : 30-35 1989

7 Dose-Dependent Induction of Immunologic Enhancement and Suppression after Oral Administration of Antigen. (経口投与の抗原量による免疫応答(増強と抑制)の違い) Microbiol. Immunol. 27 : 1107-1116 1983

8 Immunogenicity of Bacteroides Isolated from Mice: Relationship between Immunogenicity and Cell Wall Antigens. (マウスから分離されたBacteroidesの免疫原性: 免疫原性と細胞壁との関係) Infect. Immun. 24 : 39-46 1979

