

博士論文

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AYA の
免疫賦活効果と作用機序解析

菊池洋介

目次

略語一覧	4
第 1 章 諸言	6
第 2 章 IgA 分泌を亢進する乳酸菌株の選抜と必要な用量	19
2-1 序	20
2-2 材料と方法	22
2-3 結果	29
2-3-1 IgA 分泌量を亢進する乳酸菌株の選抜	29
2-3-2 <i>L. plantarum</i> AYA が有する NK 活性亢進効果の評価 .	31
2-3-3 IgA 分泌量の測定方法の検討	31
2-3-4 <i>L. plantarum</i> AYA の用量試験	32
2-4 考察	49
第 3 章 <i>L. plantarum</i> AYA の IgA 分泌亢進効果の作用機序の解析	52
3-1 序	53
3-2 材料と方法	55
3-3 結果	63
3-3-1 IgM 陽性 B 細胞から IgA 陽性 B 細胞へのクラススイッチ に着目した検討	63
3-3-2 IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化に着目した検討	64
3-3-3 <i>L. plantarum</i> AYA を認識する受容体	66
3-4 考察	79

第 4 章	IgA 分泌亢進以外の免疫調節機能の検討	82
4-1	序	83
4-2	材料と方法	84
4-3	結果	89
4-3-1	網羅的遺伝子発現解析に供するマウスの選別	89
4-3-2	<i>L. plantarum</i> AYA の摂取で発現が変動した遺伝子の抽出	89
4-3-3	<i>L. plantarum</i> AYA の摂取で変動した機能の推定	90
4-3-4	発現変動遺伝子の上流因子の推定	91
4-4	考察	103
第 5 章	<i>L. plantarum</i> AYA のインフルエンザウイルス感染試験	106
5-1	序	107
5-2	材料と方法	109
5-3	結果	114
5-3-1	X31 株の感染量の決定	114
5-3-2	X31 株感染試験	115
5-4	考察	126
第 6 章	総合討論	129
引用文献	140
要旨	159
謝辞	166

略語一覽

ALDH:	aldehyde dehydrogenase
APRIL:	a proliferation-inducing ligand
aRNA:	amplified RNA
BAFF:	b-cell-activating factor
BALT:	bronchus-associated lymphoid tissue
CCL:	cc chemokine ligand
CCR:	cc chemokine receptor
DAVID:	Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery
DFW:	distribution-free weighted method
FACS:	fluorescence activated cell sorting
FCS:	fecal calf serum
FDR:	false discovery rate
FITC:	fluorescein is thiocyanate
GALT:	gut associated lymphoid tissue
GAPDH:	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GO:	gene ontology
IFN- α :	interferon- α
IgA:	immunoglobulin A
IgD:	immunoglobulin D
IgE:	immunoglobulin E
IgG:	immunoglobulin G

IgM:	immunoglobulin M
IL-6:	interleukin-6
IL-12:	interleukin-12
IL-17:	interleukin-17
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
IPA:	Ingenuity Pathway Analysis
LDH:	lactose dehydrogenase
LPS:	lipopolysaccharide
MACS:	magnetic-activated cell sorting
MDCK 細胞:	Madin-Darby canine kidney cell
NK:	natural killer
NO:	nitric oxide
PBS:	phosphate buffered saline
PE:	phycoerythrin
PNAd:	peripheral node addressin
TCID50:	tissue culture infectious dose 50
TGF- β :	transforming growth factor- β
TLR:	toll-like receptor
TNF:	tumor necrosis factor
VCAM:	vascular cell adhesion molecule

第 1 章

諸言

ヒトの体表面は、皮膚もしくは腸管、肺、目、鼻などの粘膜組織に覆われており、病原性微生物などの外界因子から保護されている。外界因子に対して、皮膚はおもに物理的な障壁として働き、粘膜組織はさらに化学的・生物学的な障壁としての機能も備えている [1] [2]。粘膜組織の1つである腸管は成人で 400 m²もの広さに及ぶ表面積を有しており、生命に必須な栄養素を消化、吸収する場である一方で [1] [2]、病原細菌やそれが分泌する毒素、花粉や食品由来のアレルゲン、ウイルス等を排除する免疫組織としても重要な機能を果たしている [3] [4]。

この腸管免疫の中心を司っているのが、腸管関連リンパ組織（GALT: gut associated lymphoid tissue）である [2]。GALT はパイエル板、腸間膜リンパ節、虫垂などの組織で構成されている。そこには、T 細胞、B 細胞、樹状細胞等の免疫細胞種その他、M 細胞（micro fold cell）、パネート細胞、粘膜固有層（lamina propria of the mucous membrane）に存在する腸管上皮膜リンパ球（intraepithelial lymphocytes）など、GALT 特有の細胞も存在している [2]。

GALT の中心であるパイエル板は、腸管の被膜直下に存在している [2]。その上皮に、M 細胞が存在し、腸管管腔に存在するタンパク質、細菌、ウイルスなどの抗原をパイエル板内に取り込んでいる [5] [6]。さらに、その下層には、大部分が B 細胞からなる濾胞（B 細胞領域: B cell follicle）と、大部分が T 細胞からなる濾胞間領域（interfollicular region）とが存在している。M 細胞か

ら取り込まれた抗原が免疫反応を起こす際、活発に増殖する B 細胞が濾胞内で集合する。ここには、樹状細胞や T 細胞も存在しており、この領域を胚中心 (germinal center) と呼ぶ。胚中心に集まった B 細胞は、抗原やヘルパー T 細胞と遭遇し、更に活発な増殖を始める (Fig. 1-1)。

病原体の感染に備えるために、B 細胞には重要な変化が生じる [7]。具体的には、胚中心で B 細胞が抗原に刺激されると、免疫グロブリン遺伝子の点突然変異が高頻度かつランダムに起こる。これを体細胞高頻度突然変異という。その結果、多様な抗原に結合することが可能になる。抗原との親和性が低い免疫グロブリンを産生する B 細胞はアポトーシスによって排除され、親和性の高い B 細胞が残る。このように、体細胞高頻度突然変異の結果より抗原に対して親和性が高い免疫グロブリンを産生する B 細胞が得られる現象を親和性成熟という [8]。

免疫グロブリンには、immunoglobulin M (IgM)、immunoglobulin D (IgD)、immunoglobulin G (IgG)、immunoglobulin A (IgA)、immunoglobulin E (IgE) という 5 つのアイソタイプが存在する。これらは異なる機能を有しており、IgM は補体活性化効果、IgG はオプソニン化や補体活性化効果、IgA は中和効果、IgE はマスト細胞活性化効果を示す。これらのアイソタイプは、B 細胞内で生じるクラススイッチにより決定される (Fig. 1-2)。成熟前の B 細胞の免疫グロブリン遺伝子は IgM をコードしており、V、D、J 遺伝子断片に C 遺伝子として C_μ が連結されている。しかし、胚

中心で B 細胞が抗原と作用すると DNA 配列の再編成が行われ、C_μ 遺伝子が他の C 遺伝子に置き換えられる。その際、抗原を特異的に認識する配列には影響を与えない。その結果、免疫グロブリンの抗原認識特異性は保たれたまま、アイソタイプが決定される。つまり、免疫グロブリンのアイソタイプは、クラススイッチ後に連結した C 遺伝子に依存している (Fig. 1-3)。また、どのアイソタイプへのクラススイッチが起こるかは、胚中心で活性化した樹状細胞や T 細胞が分泌するサイトカイン等の情報伝達物質の種類によって決定される [9] [10]。

クラススイッチ後に B 細胞の一部は形質細胞へ分化する。それは、抗原を認識して活性化した樹状細胞や T 細胞が分泌するサイトカイン等の情報伝達物質がきっかけになる。GALT では、B 細胞が形質細胞へ分化することが決まると、主にパイエル板から腸管上皮下の粘膜固有層に移動して形質細胞に分化し、IgA を分泌する (Fig. 1-1) [11]。

IgA は、分泌される免疫グロブリンのうち、粘膜での分泌量が最も多いアイソタイプである [12]。IgA は、分子量 16 万 Da の単量体として、リンパ節、脾臓、骨髄から血中へと分泌されて、血清中濃度は 2 ~ 3 mg/ml に達する。一方で、ヒトの形質細胞の約 80% は腸管の粘膜固有層に存在しており、ここから成人で 1 日あたり 40-60 mg/kg もの IgA が産生される [13]。腸管から分泌される IgA は、免疫グロブリンと J 鎖とのジスルフィド結合によって形成した分子量 39 万 Da の二量体 IgA である (Fig. 1-4)。体内に

存在する IgA のうち約 80%以上が二量体 IgA であり、これが粘膜免疫の最前線で機能している [6] [14] [15]。二量体 IgA は、拡散によって粘膜固有層の基底膜を通過し、粘膜上皮細胞の基底膜側に存在するポリ Ig 受容体と結合する。この受容体と IgA の複合体は細胞内を通過して管腔側に出る。そこでポリ Ig 受容体が切断され、一部が分泌片 (secretory component) として IgA と結合し、タンパク質分解酵素に対する耐性を獲得してから、粘膜に分泌される。

以下に腸管免疫の仕組みをまとめる。腸管管腔に到達したウイルス等の病原体は、粘膜上皮細胞に存在する M 細胞からパイエル板に取り込まれ、胚中心で樹状細胞に認識される。抗原提示を受けた成熟前の B 細胞は、体細胞高頻度突然変異と親和性成熟が誘導され、分泌された各種サイトカインによって IgA 陽性 B 細胞へとクラススイッチが生じる [16] [17] [18]。ここで、IgA 陽性 B 細胞はパイエル板を離れてリンパ節から血液に乗って全身を循環し、その多くが粘膜固有層に移動して形質細胞に分化する。その細胞から、IgA が分泌される。分泌された IgA は二量体を形成し、粘液糖タンパク質ムチンと結合し、腸管内に入ってきた病原体と結合し、中和する [19]。また、病原体と結合した IgA は、樹状細胞やマクロファージの FC ϵ RI レセプターに結合し、ファゴサイトーシスやスーパーオキシドの産生といった各種免疫反応や、抗炎症反応も誘導する [20]。

また、腸管以外の粘膜においても免疫機構は発達しており、その一つに気道の **bronchus-associated lymphoid tissue (BALT)** がある。BALT では、抗原を取り込み、IgA を中心とした免疫グロブリンを分泌している [21]。一方で、他臓器の粘膜免疫と密接な関係を持っており、GALT で得られた抗原の情報が気道免疫に影響を及ぼすことも知られている [22]。このように、GALT で活性化した IgA 陽性 B 細胞は、全身を循環した後に気道粘膜にも伝達され、気道粘膜の賦活にも貢献していると考えられている [21]。

近年、粘膜での免疫を亢進する食品素材として、乳酸菌が注目されている [23]。乳酸菌とは、グラム陽性の桿菌または球菌と定義されており、26 属、381 種 50 亜種に分類されている。これらは、土壌や植物からヒトや動物の体内まで自然界に広く分布している。食品加工においては、味噌、醤油、漬物、パンなど発酵食品のスターターとして利用されている [24]。

乳酸菌が有する機能の一つに、粘膜での IgA 分泌量を亢進する効果が報告されている [23]。IgA は病原菌やウイルスの中和作用を持つため、粘膜での IgA 分泌亢進は感染予防に繋がる。IgA 分泌亢進効果は多種の菌種において報告されており、具体的には、生菌で効果を確認した *Lactobacillus casei* [25] と *Bifidobacterium* 種の *B. bifidum* と *B. infantis* [26]、発酵物で確認した *Lactobacillus casei* DN-114001 [27]、死菌で確認した *Lactobacillus crispatus* KT-11 [28]、*Lactobacillus pentosus*

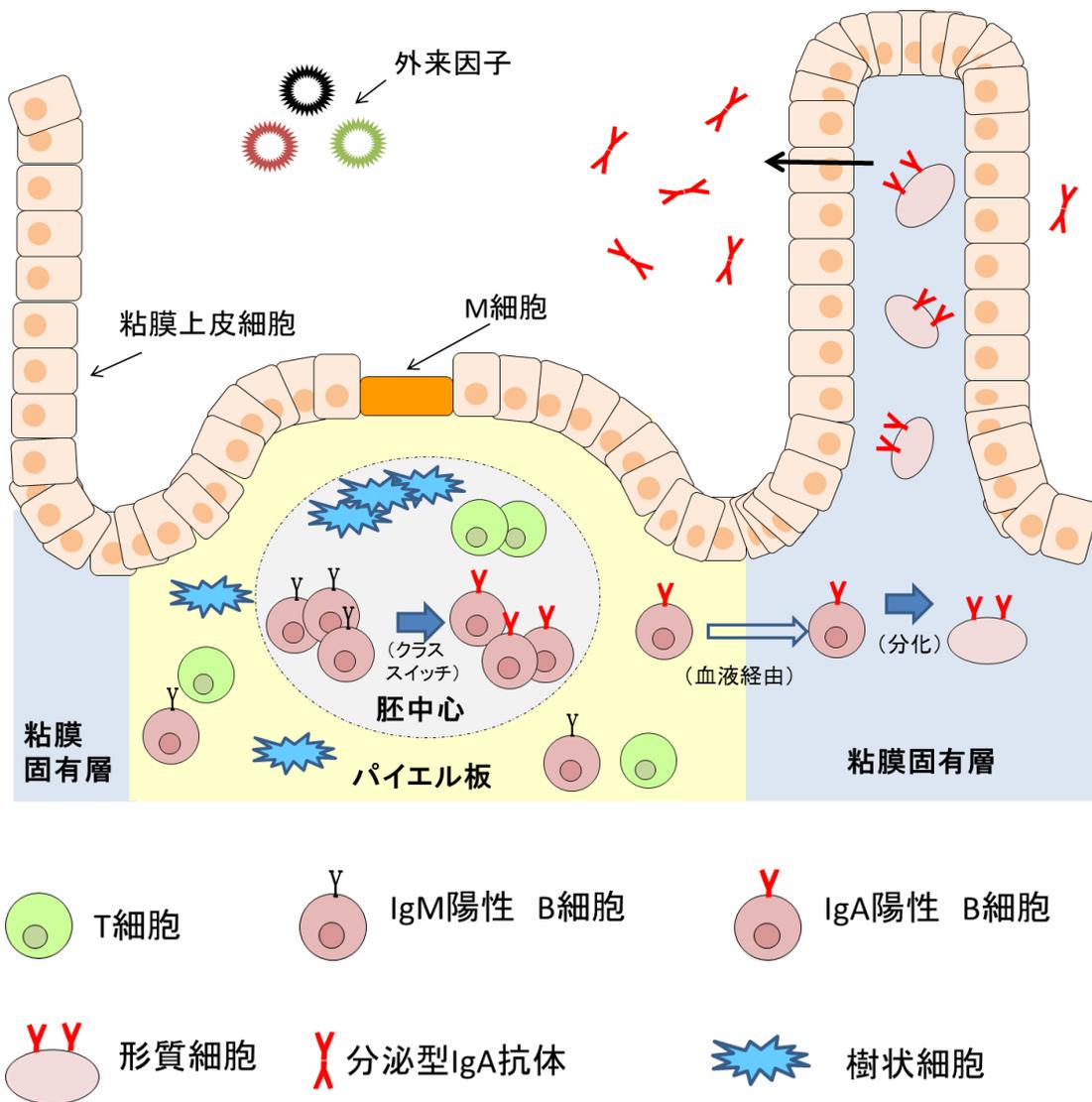
S-PT84 [29]、*Lactobacillus* GG [30] 等がある。このように、生菌、死菌、発酵物など様々な形態で効果が確認されている。

粘膜での IgA 分泌亢進が感染予防に寄与する病原の 1 つとして、インフルエンザウイルスが知られている。インフルエンザウイルスは、nucleoprotein、および matrix protein の抗原性に応じて A 型・B 型・C 型の 3 種に分類されている [31]。これまでに、インフルエンザウイルスが引き起こす感染症であるインフルエンザへの対策として、ワクチン接種による予防法や治療薬が報告・実施されている。しかし、こうした対策にもかかわらず、インフルエンザは世界各地で毎年流行している。さらに、東南アジアを中心に鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染によって、生命および健康に重篤な影響が与えられるという報道が断続的になされており [32]、2009 年にはメキシコでヒトへの感染が確認されたブタ由来の A 型インフルエンザウイルスが、世界的大流行（パンデミック）を引き起こした [33]。これらの例によって、ヒトに感染する新型インフルエンザウイルスが発生し得ること、そしてそれが感染すると甚大な被害をもたらすことも広く認識されている。このような状況に対応するため、新たなインフルエンザ対策が望まれている。対策の 1 つとして、前述のような IgA 分泌亢進作用を持つ乳酸菌株を、インフルエンザの予防や罹病した際の症状緩和に利用する研究が報告されている。具体的には、生菌で効果を確かめた *L. brevis* KB290 [34]、発酵物で確かめた *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 [35]、死菌で確かめた *L.*

pentosus ONRIC b0240 [36]と *L. plantarum* YU [37] 等についてインフルエンザに対する効果が報告されている。生菌、死菌、発酵物など様々な形態で効果が確認されている。しかし、これら乳酸菌株が発揮する効果の作用機序に関する研究は、パイエル板の初代培養試験により IgA 分泌がパイエル板で主に亢進していることを示した報告 [38] [39] [40] [41] や、パイエル板の遺伝子発現解析を行い、interleukin-6 (I/6)、interleukin-12 (I/12)、interferon- α (Ifna) 等に変動があるという報告 [38] [42] [29] があるのみである。したがって、乳酸菌がインフルエンザの予防、症状緩和作用について詳細な機序は明らかにされていなかった。抗インフルエンザ効果を持つ機能性食品として乳酸菌を利用する場合、作用機序の解明が重要であると考えた。また、企業の食品開発の観点からは、特定の乳酸菌株の作用機序を明らかにし、他の菌株と差別化することは、非常に重要と考えた。

以上のような背景から、本研究は、食を通じた健康で豊かな生活づくりへ貢献を最終目的とし、乳酸菌株を利用した機能性食品の開発を目指して開始した。その第一歩として、まずは IgA 分泌を亢進する効果と、それに伴うインフルエンザの症状を緩和する効果を有し、かつその詳細な作用機序が明らかな乳酸菌株を見出すことを目的とした。そこで、第 2 章では IgA 分泌を亢進する乳酸菌株として *Lactobacillus plantarum* AYA を選抜し、必要摂取量を決定した。第 3 章では、*L. plantarum* AYA とパイエル板初代培

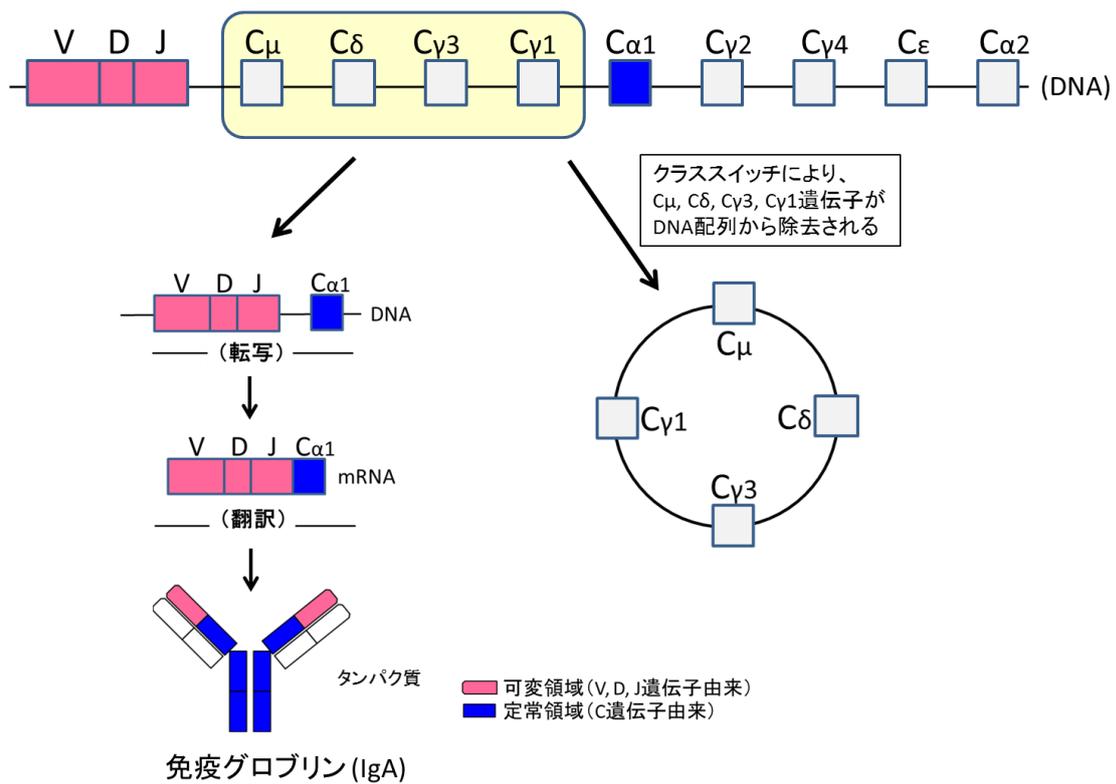
養細胞の相互作用を解析し、詳細な作用機序を明らかにした。第4章では *L. plantarum* AYA の機能を網羅的遺伝子発現解析で推定した。第5章ではインフルエンザウイルスを感染させた際の効果を評価した。その結果、*L. plantarum* AYA はパイエル板の樹状細胞に認識されて IL-6 の分泌を亢進し、それが B 細胞から形質細胞への分化を誘導し、腸管や肺等の粘膜から IgA 分泌を亢進してインフルエンザの症状を緩和することを見出した。



Kiyono *et al.* [18]を参考に作成

Fig. 1-1 パイエル板の構造と IgA の分泌

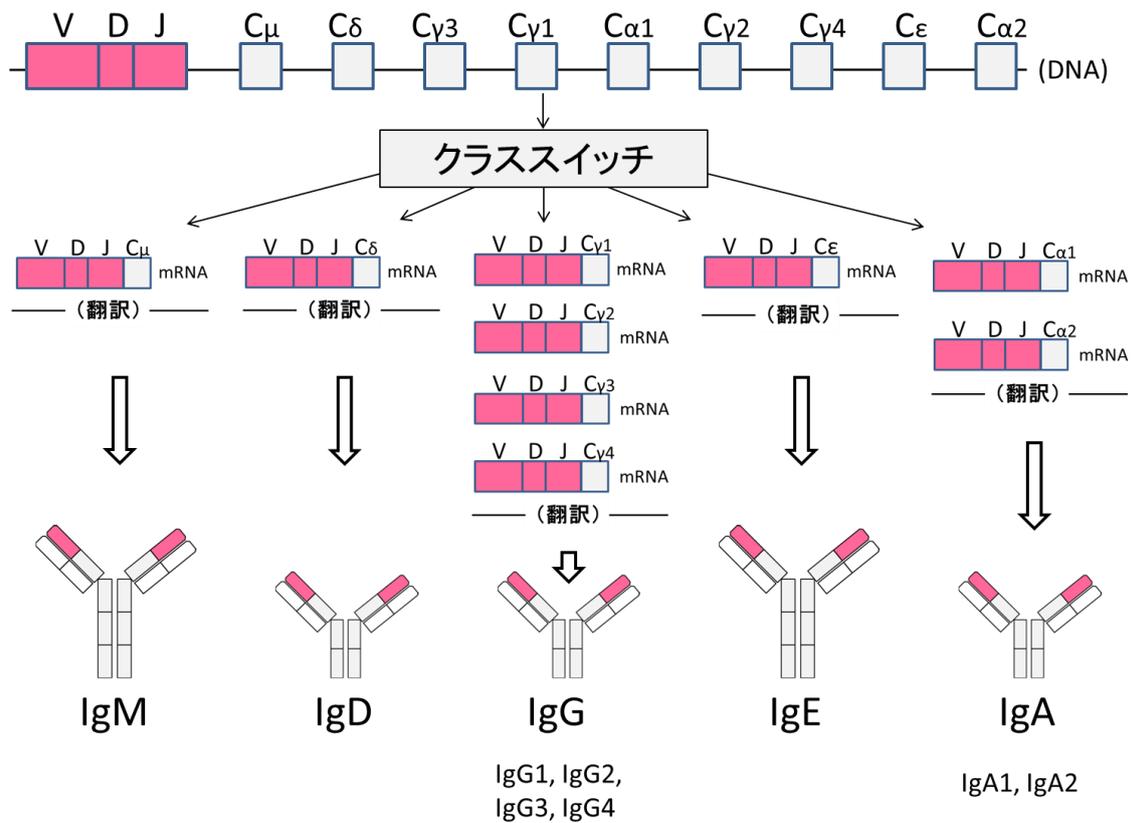
M細胞から取り込まれた抗原は腸管上皮下に存在するパイエル板に取り込まれ、B細胞、樹状細胞、およびT細胞が存在する胚中心に集まり、免疫反応が開始される。その結果、B細胞の一部が形質細胞へ分化し、血液を経由して粘膜固有層に移動し、管腔内に向けてIgAを分泌する。



AJ Macpherson *et al.* [15]と笹月 [43]を参考に作成

Fig. 1-2 クラススイッチによるヒト IgA 抗体の産生

クラススイッチ前は V、D、J 遺伝子断片と C_μ 遺伝子が転写・翻訳されて IgM 抗体が産生される。クラススイッチにより、C_μ、C_δ、C_{γ3}、C_{γ1} 遺伝子がループを形成して離脱し、V、D、J 遺伝子断片と C_{α1} 遺伝子が連結し、IgA1 抗体が産生される。同様に C_μ、C_δ、C_{γ3}、C_{γ1}、C_{α1}、C_{γ2}、C_{γ4}、C_ε 遺伝子が離脱し、V、D、J 遺伝子断片と C_{α2} 遺伝子が連結し、IgA2 抗体が産生される。様々な抗原を認識する可変領域は、V、D、J 遺伝子断片由来のポリペプチド鎖からなり、抗体のアイソタイプの違いが反映された定常領域は、C 遺伝子由来のポリペプチドで構成されている。



笹月 [43]を参考に作成

Fig. 1-3 ヒト免疫グロブリンのアイソタイプ

免疫グロブリンのアイソタイプは、クラススイッチにて可変領域（V, D, J 遺伝子断片）の近傍に配置された C 遺伝子の型で決定される。また、アイソタイプによって C 領域のドメイン数も異なる。

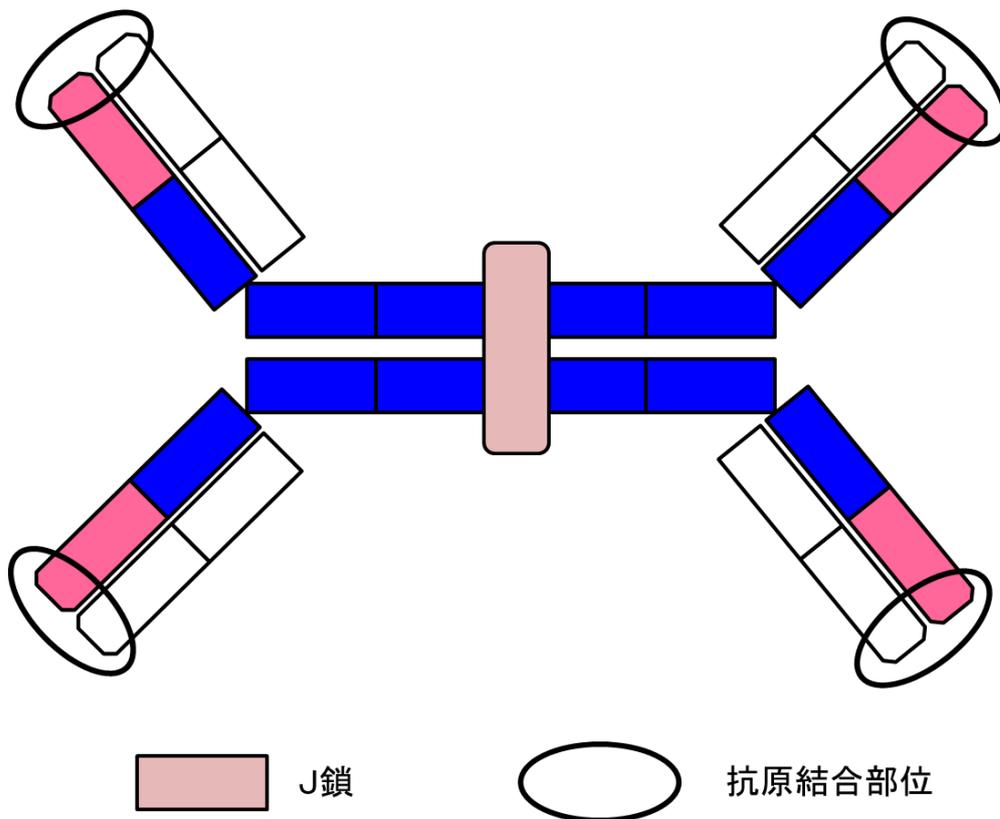


Fig. 1-4 分泌型 IgA の構造

IgA は、J 鎖とジスルフィド結合で会合し、2 量体として腸管に分泌される。

第 2 章

IgA 分泌を亢進する

乳酸菌株の選抜と必要な用量

2-1 序

Lactobacillus 属や *Bifidobacterium* 属等の乳酸菌株は腸管免疫を高めることが知られており [44] [45] [46]、有望な機能性食品素材として期待されている。これまでに、乳酸菌株 *L. crispatus* KT-11 [28]、*L. pentosus* S-PT84 [29]、*L. GG* [30] の死菌を摂取すると、腸管管腔への IgA 分泌が亢進されることが報告されている。また、乳酸菌については、IgA 分泌亢進以外の免疫機能活性化として、natural killer 細胞（NK 細胞）の活性を亢進する乳酸菌株も報告されている。NK 細胞とは細胞障害性の顆粒リンパ球の 1 種であり、生体内の腫瘍やウイルス感染を拒絶するために重要である。これまでに、*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 が分泌する多糖成分 [35]、*L. paracasei* MoLac-1 の死菌 [47]、*L. rhamnosus* GG の死菌 [48]、*L. pentosus* S-PT84 の死菌 [41]、*L. plantarum* YU の死菌 [37] などが NK 活性を高める乳酸菌株として報告されている。

これら IgA 分泌亢進作用、NK 細胞活性亢進作用を有することが報告されている乳酸菌株は、ヒトの腸管、ミルク、漬物等を由来としている。一方、乳酸菌は様々な発酵食品の製造に用いられており、これら以外に由来し、食経験のある乳酸菌の中に免疫機能活性化能を有するものが存在すると予想される。そこで、報告のない新たな乳酸菌株を機能性食品素材として見出すことを目的とし、本章ではパンの発酵種を含む発酵食品（パンの発酵種、

漬物、他)由来の乳酸菌株の計 140 菌株を対象として IgA 分泌亢進効果を評価した。

評価には死菌を用い、マウスパイエル板初代培養細胞への投与およびマウスへの経口摂取実験を行った。その中で最も効果が高い菌株の粉末をマウス由来の脾臓初代培養細胞に加え、NK 活性亢進効果を評価した。その結果、評価した中ではパンの発酵種由来の乳酸菌株が最も高い効果を有すること、そしてこの菌株をマウスに与えると、1 匹あたり 1 日平均 0.72 mg の摂取によって腸管において IgA の分泌が亢進することを見出した。一方、細胞培養試験より、当該乳酸菌株に、NK 細胞の活性を高める効果は認められなかった。

2-2 材料と方法

2-2-1 動物

日本エスエルジー社（静岡）より、7週齢の雌性 BALB/c マウスを購入し、特定病原体が不在（specific pathogen-free）かつ、明期と暗期がそれぞれ 12 時間（明期：8 時～20 時、暗期：20 時～8 時）の環境下で飼育した。馴化期間（7 日間）は、餌である MF（オリエンタル酵母工業㈱、東京、日本）、および滅菌水を自由摂取させた。なお、動物実験における倫理規程を含む「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」、または「日清製粉グループ上福岡研究所群動物実験に関する指針」に従って実験計画を作成し、「東京大学の部局動物実験委員会」または「日清製粉グループ上福岡研究所群動物実験委員会」で承認された後に、動物実験を実施した。

2-2-2 乳酸菌粉末の作製

オリエンタル酵母工業㈱が保有している 140 種類の菌株を使用した。菌の種名を Table 2-1 に示す。各菌株を、121℃、15 分でオートクレーブ処理した GYP 液体培地（1% グルコース、1% yeast extract、0.5% Bacto peptone、0.2% 酢酸ナトリウム 3 水和物、20 ppm 硫酸マグネシウム 7 水和物、1 ppm 硫酸マンガン 4 水和物、1 ppm 硫酸鉄 7 水和物、2.5 ppm Tween 80、pH 6.8）で培養した。その後、5000×g、10 分間、室温の条件で遠心して乳

酸菌を回収し、Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。
121°C、30 分間でオートクレーブ処理後に凍結乾燥した。以上の
ように、本研究では、全て死菌の乳酸菌を粉末化して使用した。

2-2-3 乳酸菌粉末添加飼料の調製

精製飼料である AIN-93M (オリエンタル酵母工業株) に、前述
の乳酸菌粉末を外添して乳酸菌粉末添加飼料とした。餌の配合を
Table 2-2 および Table 2-3 に示す。

2-2-4 パイエル板初代培養細胞の分離

Fetal calf serum (FCS) を 10%、collagenase type 1
(Sigma-Aldrich 社) を 1 mg/ml となるように溶解させた
RPMI1640 に、頸椎脱臼後にマウスから摘出したパイエル板を加
え、スターラーバーで攪拌しながら 37°C で 60-90 分間インキュベ
ートした。次に目開き 70 μm のセルストレイナー (BD Biosciences,
San Jose, CA, USA) で細胞塊を除去し、300 \times g、1 分、4°C で遠
心し、上清を廃棄した。洗浄のために PBS を加え、10 秒間の混
和後、300 \times g、1 分、4°C で遠心して上清を廃棄した。この洗浄を
3 回実施し、試験に使用した。

2-2-5 細胞培養

RPMI1640 に、FCS を 10%、L-glutamine を 2mM、penicillin を
100 units/ml、そして streptomycin を 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように溶

解させたものを培地とした。液量は 200 μ l/ウェルとし、培養条件は、加湿下で 5% CO₂、37°C とした。

2-2-6 IgA の定量

回収した検体上清中の IgA 濃度を、ELISA 法により測定した。ELISA 法は mouse IgA ELISA quantitation set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を使用し、キット付属のプロトコールに従って実施した。具体的には、96 ウェルのプレートに IgA の 1 次抗体を 50 μ l ずつ添加し、4°C で 1 晩静置した。PBS/Tween (PBS に Tween80 を 0.05% 添加) で洗浄後、超純水に対してブロックエース[®]粉末 (DS ファーマバイオメディカル(株)、大阪、日本) を 1% 加えたブロッキング液を 100 μ l ずつ添加して、室温で 1 時間静置した。洗浄後、スタンダード溶液と培養液を各ウェルに 50 μ l ずつ添加し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、0.1% のブロックエース[®]粉末を加えた PBS 溶液で 50,000 倍に希釈した 2 次抗体を各ウェルに 50 μ l ずつ添加して室温で 1 時間静置した。洗浄後、基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (MOSS Inc., Elk Grove Village, IL, USA) を各ウェルに 100 μ l ずつ添加して発色を行い、2 規定の硫酸を 100 μ l ずつ添加して発色反応を止め、450 nm の吸光値を測定した。

2-2-7 脾臓細胞の採取

頸椎脱臼後にマウスから脾臓を摘出し、FCS を 10% 添加した

RPMI1640 に加えた。これをシリンジの背面ですりつぶし、目開き 70 μm のセルストレイナー (BD Biosciences) で細胞塊を除去した。それを、300 \times g、5 分、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心して上清を廃棄し、脾臓細胞を得た。これに 10% FCS 添加の RPMI1640 に懸濁させ、試験に供した。

2-2-8 Yac-1 細胞の調製

マウスリンパ腫由来 Yac-1 細胞は、American Type Culture Collection から購入した (カタログ番号 ATCC TIB-160 ; ロット番号 #4249479)。購入後、37 $^{\circ}\text{C}$ で解凍し、RPMI1640 で洗浄後に FCS 10% 入りの RPMI1640 に懸濁させ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 の条件下で培養して試験に供した。

2-2-9 細胞障害率測定法

Yac-1 細胞と脾臓細胞を共培養後、lactose dehydrogenase (LDH) 量を測定して Yac-1 細胞の障害率を評価した。これは、Kawashima らの方法 [37] に準じ、CytoTox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay キット (プロメガ、東京、日本) を使用して添付のプロトコールに従い実施した。まずは 2 nM の IL-2 と 5 日間培養して NK 細胞を活性化した脾臓細胞を、Yac-1 細胞 (2.5×10^4 個/ml) の 10 倍量 (2.5×10^5 個/ml)、50 倍量 (1.25×10^6 個/ml)、100 倍量 (2.5×10^6 個/ml) に調製し、Yac-1 細胞とそれぞれ 100 μl ずつ同じウエルに加えた。乳酸菌粉末を添加する際は 1 ウエルあ

たり 50 µg 加え、液量を 200 µl/ウェルとした。プレートを 250×g、5 分、室温で遠心後、37°C で 4 時間のインキュベーションを行い、室温で 250×g、4 分間で遠心した。次いで、テトラゾリウム塩を含んだ Substrate Mix を Assay buffer で溶解後に各ウェルへ 50 µl ずつ加え、遮光して室温で 30 分間静置した。Stop Solution を 50 µl/ウェルずつ加え、490 nm の吸光度を測定した。こうして、Yac-1 細胞から放出された LDH 量を定量した。

脾臓細胞中の NK 活性を評価するために、「Yac-1 と脾臓細胞の共培養で放出された LDH 量」を、「Yac-1 に含まれる LDH 量」で除して細胞障害率を算出し、これを NK 活性の指標とした。Yac-1 と脾臓細胞を共培養した際の上清 LDH 量から、Yac-1 と脾臓細胞それぞれを単独で培養した際の上清 LDH 量をバックグラウンドとして差し引き、「Yac-1 と脾臓細胞の共培養で放出された LDH 量」を算出し、これを分子とした。また、Yac-1 と Lysis Solution を培養した際の上清 LDH 量から Yac-1 を単独で培養した際の上清 LDH 量をバックグラウンドとして差し引いて「Yac-1 に含まれる LDH 量」を算出し、これを分母とした。細胞障害率を算出する式は、下記である。

$$\% \text{ 細胞障害率} = \frac{(\text{Yac-1} + \text{脾臓細胞}) - (\text{Yac-1}) - (\text{脾臓細胞})}{(\text{Yac-1} + \text{Lysis}) - (\text{Yac-1})}$$

2-2-10 糞の洗浄液採取法

Maeda らの方法 [49] に準じて実施した。具体的には、解剖 24 時間前にマウスをケージに 1 匹ずつ入れ、解剖時に糞を 5 粒/匹ずつ回収した。IgA を抽出するために、50 ml の PBS に、プロテアーゼインヒビターである cOmplete, EDTA-free (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) 1 粒を加え、凍結乾燥した糞を 100 mg/ml になるように加え、ボルテックスによる混和にて IgA を抽出した。これを 9200×g、30 分、4°C で遠心し、その上清を糞の洗浄液とした。なお、試験に供した糞の乾物重量を測定し、糞 1 g あたりにふくまれる IgA 含量を算出した。

2-2-11 空腸と回腸の洗浄液採取法

Ludert JE らの方法 [50] に準じて実施した。具体的には、まずマウスの解剖時に空腸と回腸を採取した。プロテアーゼインヒビターである cOmplete, EDTA-free (Roche Diagnostics) のタブレット 1 粒を 50 ml PBS で溶解させてバッファーを調製し、各個体の空腸、回腸それぞれにバッファーを 1 ml 流しこみ、回収した。同じバッファーでの洗浄をさらに 2 回繰り返した。これを 9200×g、30 分、4°C で遠心し、その上清を空腸と回腸の洗浄液とした。

2-2-12 データ処理

結果は平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は Student's *t*-test を実施し、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。多群の比較は Bartlett 検定で分散の均一性を検定し、等分散であれば Tukey

検定を実施し、不等分散であれば **Steel-Dwass** 検定を実施した。

いずれも、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

2-3 結果

2-3-1 IgA 分泌量を亢進する乳酸菌株の選抜

発酵食品（パンの発酵種、漬物、他）由来の 140 種類の乳酸菌株（Table 2-1）について、IgA 分泌量亢進効果を評価するため、まず、*ex vivo* 細胞試験によるスクリーニングを行った。マウスのパイエル板初代培養細胞 5×10^6 cells/ml に乳酸菌粉末 250 $\mu\text{g/ml}$ となるよう添加し、7 日間の培養後に上清の IgA 濃度を測定した。検体が多く、全株を同時に評価できなかつたため、6 グループに分けて評価し、各グループで効果が高かつた 5 菌株ずつを選抜した。その際、乳酸菌粉末を添加せずにパイエル板初代培養細胞のみを培養する系をコントロールとした。その後、選抜した菌株を同時に評価し、最も効果が高い菌株を選抜した。

1 つめのグループでは、コントロールより IgA 分泌量を増加させる乳酸菌株は得られなかつた（Fig. 2-1）。2 つめのグループでは、No. 14、No. 15、No. 16、No. 17、および No. 23 を選抜した。3 つめのグループから No. 47、No. 54、No. 57、No. 63、および No. 66（Fig. 2-3）、4 つめのグループから No. 72、No. 81、No. 83、No. 84、および No. 94（Fig. 2-4）、5 つめのグループから No. 97、No. 98、No. 99、No. 107、および No. 109（Fig. 2-5）、6 つ目のグループから No. 125、No. 135、No. 136、No. 137、および No. 139 をそれぞれ選抜した（Fig. 2-6）。

次いで各グループから選抜した計 25 菌株の同時評価を実施し

た。その際、IgA 分泌量亢進効果が弱かった No. 105 をネガティブコントロールとした。その結果、No. 63 (*L. plantarum*)、No. 72 (*L. plantarum*)、No. 94 (*L. hilgardii*)、No. 107 (*L. parakefiri*)、No. 139 (*Pediococcus acidilactici*) の乳酸菌粉末について IgA 分泌亢進効果が高いことを明らかにした。また、ネガティブコントロールである No. 105 (*L. paracasei*) の IgA 分泌量が最も少なかったことから (Fig. 2-7)、この評価系の再現性が高いことも示した。IgA 分泌亢進効果が高いこれら 5 菌株のうち、No. 107 と No. 139 は乳酸菌培養時の増殖効率が非常に低く、食品素材として開発するには不適であるため候補から外し、No. 63、No. 72、および No. 94 を選抜した。

続いて、選抜した 3 つの候補菌株を用い、動物試験による効果を検証した。マウスに各乳酸菌株粉末混餌食 (Table 2-2) を 4 週間摂餌させ、パイエル板を摘出してその初代培養細胞 5×10^6 cells/ml を 7 日間培養し、IgA 分泌亢進効果を評価した (乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 試験)。乳酸菌粉末を混餌していない通常飼料で飼育した、マウス由来のパイエル板を対照とした。その結果、コントロールに対して IgA 分泌量亢進効果を有意に高める乳酸菌は No. 72 のみであった (Fig. 2-8)。No. 72 はパンの発酵種由来の乳酸菌株であった。これを *Lactobacillus plantarum* AYA 株と命名し、国立研究開発法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託した。寄託番号は FERM P-21106 である。以降、No. 72 を *L. plantarum* AYA と記載する。以上のように、乳酸菌株 140 種類

の中から、マウス経口摂取によって IgA 分泌量亢進効果を発揮する乳酸菌株として *L. plantarum* AYA を選抜した。

2-3-2 *L. plantarum* AYA が有する NK 活性亢進効果の評価

L. plantarum AYA の NK 活性を評価した。9 週齢のマウスを購入し、1 週間の馴化期間終了時に脾臓細胞を摘出した。脾臓細胞中の NK 細胞を活性化させてから *L. plantarum* AYA 粉末存在下でマウスリンパ腫由来 Yac-1 細胞と共培養し、Yac-1 細胞の細胞傷害から脾臓細胞中の NK 活性を評価した。なお、共培養時の濃度は、Yac-1 細胞が 2.5×10^4 個/ml、脾臓細胞は Yac-1 細胞の 10 倍量 (2.5×10^5 個/ml)、50 倍量 (1.25×10^6 個/ml)、および 100 倍量 (2.5×10^6 個/ml) とし、*L. plantarum* AYA 粉末添加量は 250 μ g/ml とした。その結果、*L. plantarum* AYA の添加による細胞障害率の増加は確認されなかった (Fig. 2-9)。

2-3-3 IgA 分泌量の測定方法の検討

2-3-1 では、生体での IgA 分泌量亢進効果を測定する方法として、乳酸菌粉末の 4 週間摂餌後のマウスより単離したパイエル板初代培養細胞を用い、*ex vivo* 試験 (乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 試験) を実施した (Fig. 2-8)。しかし、当該分析方法は生体内の腸管に分泌された IgA を直接測定している方法ではない。そこで、生体内において *L. plantarum* AYA 粉末の IgA 分泌活性を測定するため、腸管管腔に分泌された IgA 量を測定する方法の検討を行った。前

述の試験と同様に、通常餌を摂取した **Control** 群と、*L. plantarum* AYA を 5%混合した餌を 4 週間摂取したマウス（6 週齢）を使用した。

まずは、糞中の IgA 含量の測定を行った。糞の洗浄液を調製し、上清の IgA を腸管管腔に分泌されたものとして測定した。その結果、IgA 含量は **Control** 群に対して AYA 投与群がやや多いものの、個体ごとのバラつきが非常に大きく、群間で有意差はみられなかった。この測定法は、乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 試験よりも検出力が低いことが示唆された（**Fig. 2-10**）。

次いで、空腸と回腸を摘出し、管腔の洗浄液上清の IgA を腸管管腔に分泌されたものとみなし、これを測定した。その結果、回腸の洗浄液で IgA 含量に有意な差がみられた（**Fig. 2-11**）。回腸洗浄液では 1%水準で有意差を検出しており、乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 試験や糞中の IgA を測定する試験よりも検出感度が高いことが示唆された。よって、以降は IgA 分泌量を測定する方法として、空腸と回腸の洗浄液に含まれる IgA 含量を測定することとした。

2-3-4 *L. plantarum* AYA の用量試験

L. plantarum AYA を食品素材として開発するために、その必要摂取用量を明らかにすることは必須である。これまでに、*L. plantarum* AYA を 5%混合した餌を 4 週間摂取すると、回腸での IgA 分泌量が有意に高くなることを示した（**Fig. 2-11**）。そこで、5%よりも低用量にて同様の効果が得られるか検討するため、6 週齢

のマウスに対し、*L. plantarum* AYA を 0.3%混合した餌、または 0.03%混合した餌 (Table 2-3) をそれぞれ与えて 4 週間飼育し、空腸と回腸での IgA 分泌量を測定した。その結果、いずれの用量においてもコントロール群と比較して空腸と回腸に分泌される IgA 量が有意に増加することが明らかになった (Fig. 2-12)。

通常餌群、*L. plantarum* AYA をそれぞれ 0.03%、0.3%含有した群において、解剖時の体重 (\pm 標準偏差) は 21.4 ± 1.4 g、 21.7 ± 1.3 g、および 21.5 ± 1.6 g であり、1 日当たりの平均摂餌量は、2.38 g/日、2.41 g/日、および 2.39 g/日であった。群飼育であったため有意差検定は実施できなかったが、両群の摂餌量ほぼ同等であった。この平均摂餌量から算出すると、0.03%摂取群は *L. plantarum* AYA を 0.72 mg/日、0.3%摂取群は *L. plantarum* AYA を 7.1 mg/日摂取したことになる。なお、*L. plantarum* AYA の粉末 0.72 mg は、 8.6×10^8 colony forming units に相当する。以上より、マウスにおいて *L. plantarum* AYA を 1 日あたり 0.72 mg 摂取すれば、腸管の IgA 分泌量が有意に増加することを明らかにした。

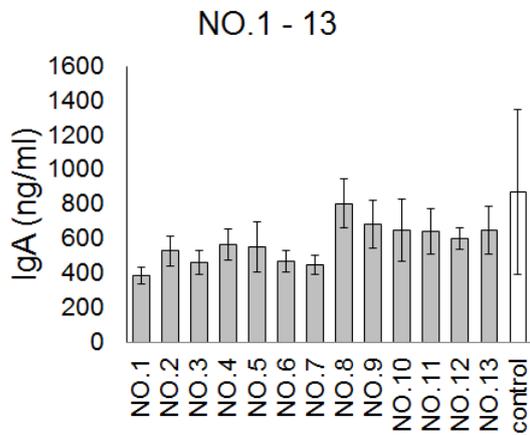


Fig. 2-1 マウスパイエル板初代培養細胞の各種乳酸菌（No. 1～13）粉末添加による IgA 分泌量の変化

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml、各種乳酸菌株の死菌粉末を 250 μ g/ml になるよう調整して 7 日間共培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

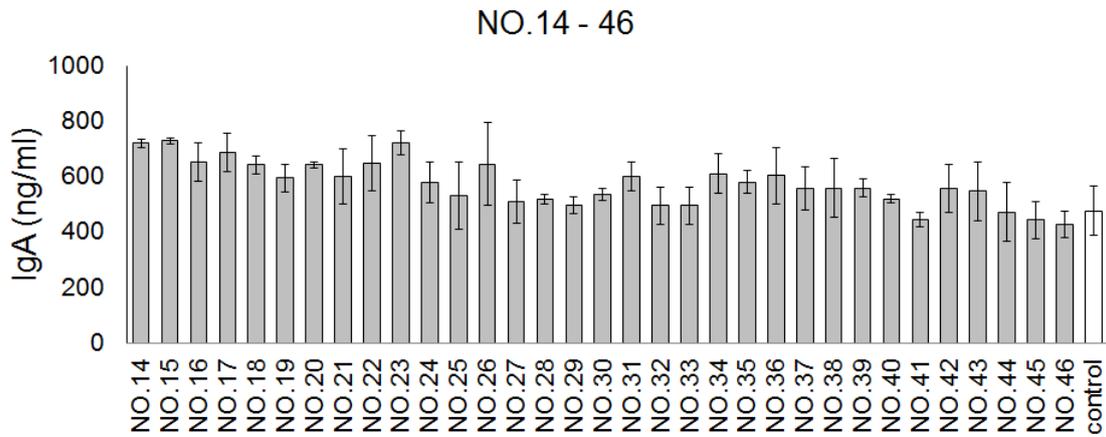


Fig. 2-2 マウスパイエル板初代培養細胞の各種乳酸菌（No. 14～46）粉末添加による IgA 分泌量の変化

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml、各種乳酸菌株の死菌粉末を 250 μ g/ml になるよう調整して 7 日間共培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

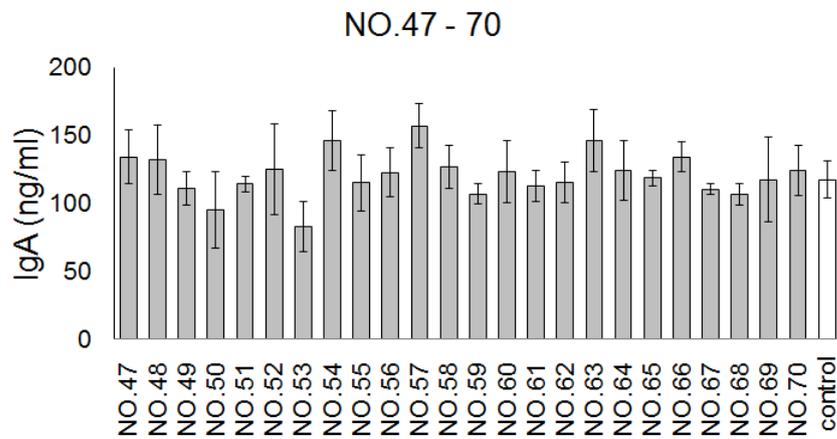


Fig. 2-3 マウスパイエル板初代培養細胞の、各種乳酸菌（No. 47～70）粉末添加による IgA 分泌量の変化

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml、各種乳酸菌株の死菌粉末を $250 \mu\text{g/ml}$ になるよう調整して 7 日間共培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

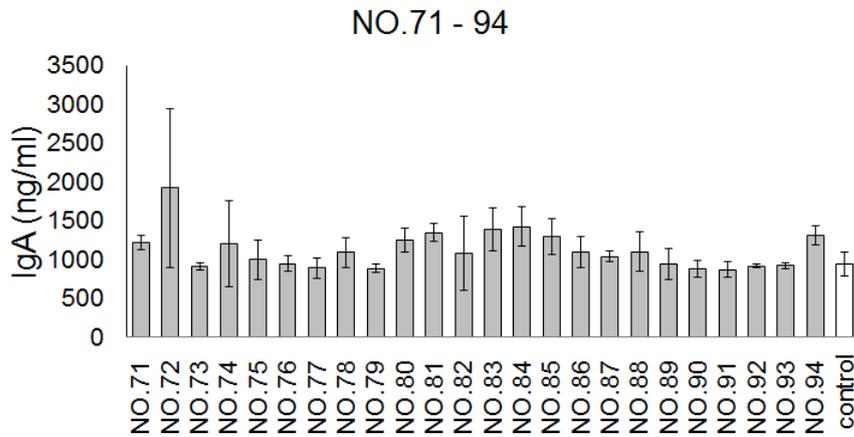


Fig. 2-4 マウスパイエル板初代培養細胞の各種乳酸菌（No. 71～94）粉末添加による IgA 分泌量の変化

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml、各種乳酸菌株の死菌粉末を 250 μ g/ml になるよう調整して 7 日間共培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

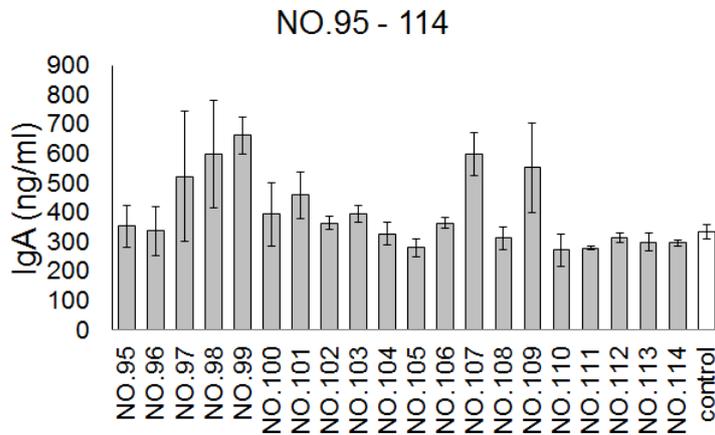


Fig. 2-5 マウスパイエル板初代培養細胞の各種乳酸菌（No. 95～114）粉末添加による IgA 分泌量の変化

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml、各種乳酸菌株の死菌粉末を 250 μ g/ml になるよう調整して 7 日間共培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

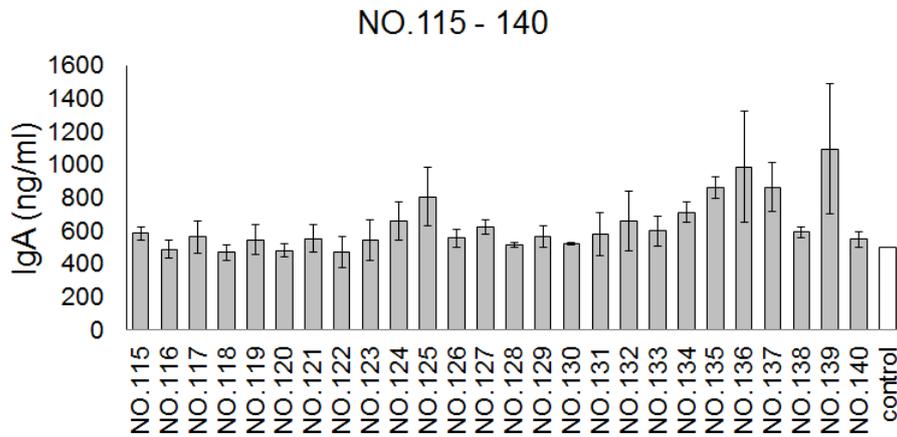


Fig. 2-6 マウスパイエル板初代培養細胞の各種乳酸菌（No. 115～140）粉末添加による IgA 分泌量の変化

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml、各種乳酸菌株の死菌粉末を 250 μ g/ml になるよう調整して 7 日間共培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

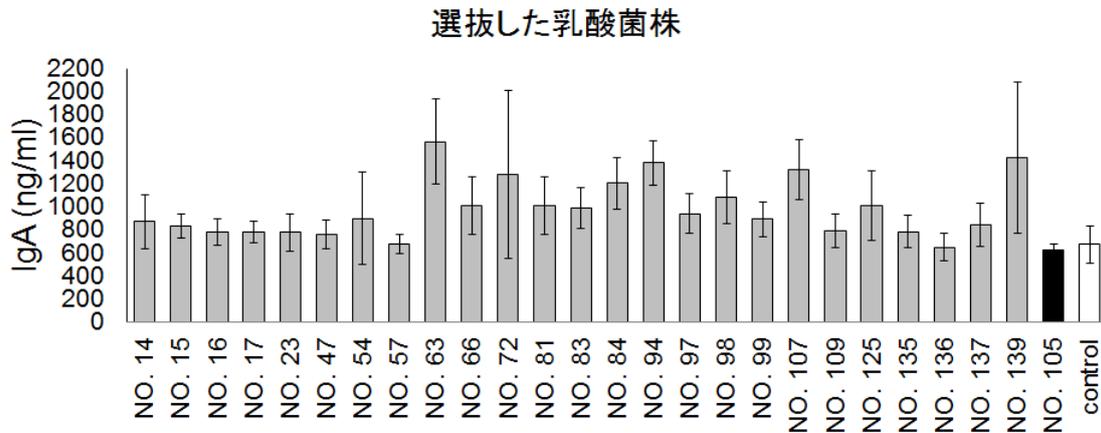


Fig. 2-7 マウスパイエル板初代培養細胞の各種乳酸菌(選抜株)

粉末添加による IgA 分泌量の変化

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml、各種乳酸菌株の死菌粉末を 250 μ g/ml になるよう調整して 7 日間共培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。

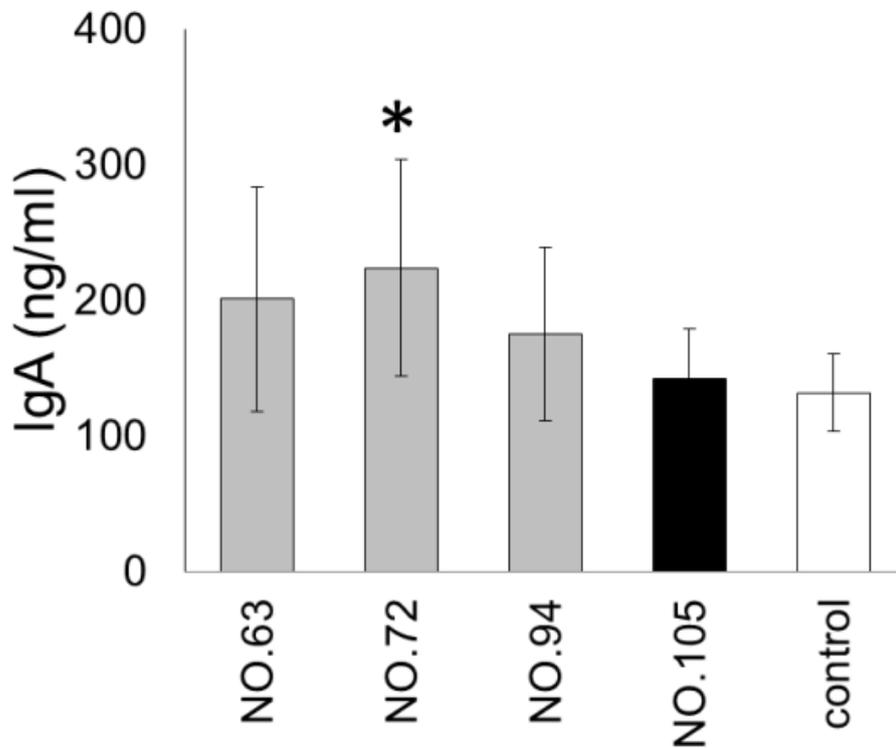


Fig. 2-8 乳酸菌の死菌粉末を摂取させたマウス由来の、パイエル板の初代培養細胞から分泌された IgA 量

通常餌 (Control) または、No. 63, No. 72, No. 94, No. 105 それぞれの死菌粉末を含む餌 (Table 2-2) を 4 週間摂取させ、パイエル板初代培養細胞を採取した。そのパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml で 7 日間培養し、上清の IgA 濃度を ELISA で測定した。n = 5 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。Tukey 検定を実施した。* $p < 0.05$ vs control

Table 2-1 乳酸菌株の種名

number	strain
No. 1 ~ 11	<i>Lactobacillus brevis</i>
No. 12 ~ 21	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
No. 22 ~ 27	<i>Lactobacillus pentosus</i>
No. 28 ~ 74	<i>Lactobacillus plantarum</i>
No. 75	<i>Lactobacillus buchneri</i>
No. 76 ~ 77	<i>Lactobacillus casei subsp.casei</i>
No. 78 ~ 79	<i>Lactobacillus casei subup pseudplantarum</i>
No. 80	<i>Lactobacillus coryniformis subsp. Coryniformis</i>
No. 81~ 87	<i>Lactobacillus curvatus</i>
No. 88~ 89	<i>Lactobacillus fermentum</i>
No. 90	<i>Lactobacillus fructosus</i>
No. 91~ 92	<i>Lactobacillus gasseri</i>
No. 93	<i>Lactobacillus helveticus</i>
No. 94~ 95	<i>Lactobacillus hilgardi</i>
No. 96	<i>Lactobacillus kefirgranum</i>
No. 97	<i>Lactobacillus kfi</i>
No. 98~ 99	<i>Lactobacillus mali</i>
No. 100 ~ 101	<i>Lactobacillus murinus</i>
No. 102	<i>Lactobacillus para paracasi</i>
No. 103	<i>Lactobacillus parabuchineri</i>
No. 104	<i>Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans</i>
No. 105 ~ 106	<i>Lactobacillus paracasei subsp.paracasei</i>
No. 107	<i>Lactobacillus parakefiri</i>
No. 108	<i>Lactobacillus viridesceus</i>
No. 109 ~ 111	<i>Leuconostoc citreum</i>
No. 112	<i>Leuconostoc lactis</i>
No. 113 ~ 115	<i>Leuconostoc mes</i>
No. 116 ~ 123	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
No. 124	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris</i>
No. 125 ~ 127	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum</i>
No. 128 ~ 129	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.mesenteroides</i>
No. 130 ~ 133	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
No. 134	<i>Leuconostoc carnosum</i>
No. 135	<i>Leuconostoc fallax</i>
No. 136	<i>Leuconostoc psudemmesenteroides</i>
No. 137	<i>Pediococcus acidilactici</i>
No. 138	<i>Pediococcus damnosus</i>
No. 139	<i>Pediococcus acidilactici</i>
No. 140	<i>Weis halotolarans</i>

Table 2-2 乳酸菌粉末摂餌 ex vivo細胞試験に使用した餌の配合

通常餌	
原料名、検体名	配合比率 (%)
カゼイン	14
L-シスチン	0.18
コーンスターチ	46.5692
α 化コーンスターチ	15.5
シュウケイロース	10
大豆油	4
セルロースパウダー	5
AIN-93Mミネラル混合	3.5
AIN-93ビタミン混合	1
重酒石酸コリン	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0008
合計	100

乳酸菌入り餌	
原料名、検体名	配合比率 (%)
カゼイン	14
L-シスチン	0.18
コーンスターチ	46.5692
α 化コーンスターチ	15.5
シュウケイロース	10
大豆油	4
セルロースパウダー	5
AIN-93Mミネラル混合	3.5
AIN-93ビタミン混合	1
重酒石酸コリン	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0008
乳酸菌粉末	5
合計	105

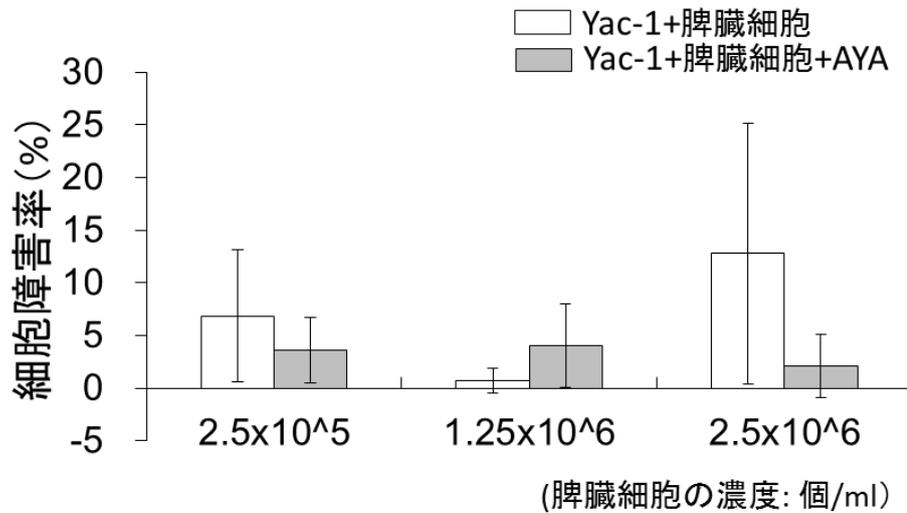


Fig. 2-9 *L. plantarum* AYA が NK 活性に与える影響

共培養時の濃度は、Yac-1 細胞が 2.5×10^4 個/ml、脾臓細胞が 2.5×10^5 個/ml、 1.25×10^6 個/ml または 2.5×10^6 個/ml とし、*L. plantarum* AYA の死菌粉末を 250 $\mu\text{g/ml}$ 添加した。4 時間の培養後、上清の LDH を測定し、細胞障害率を算出した。n = 3 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。濃度ごとに、群間の Student's *t*-test で有意差検定を実施した。

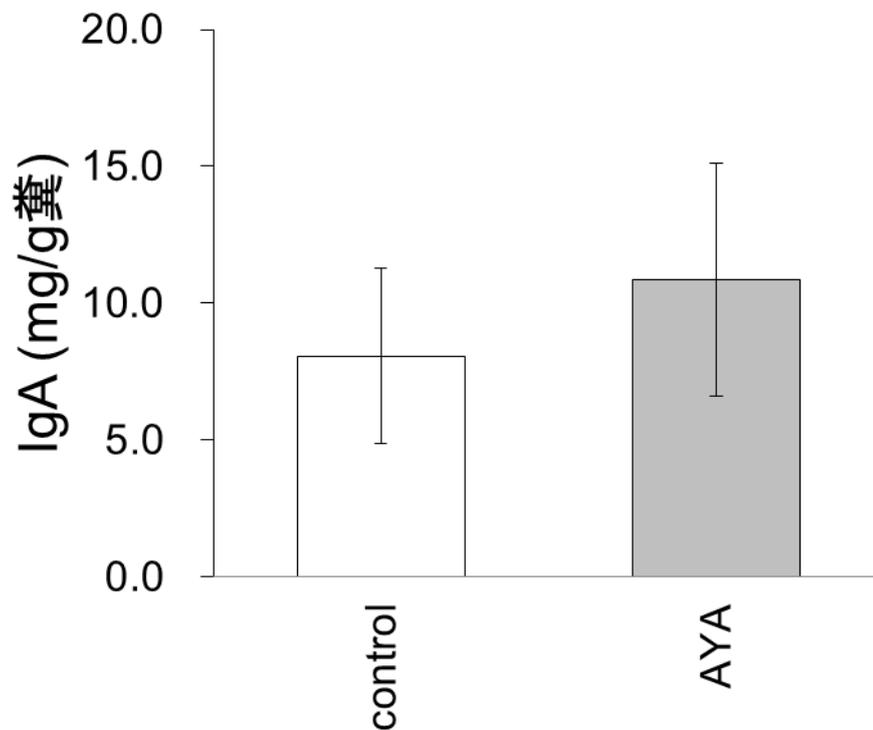
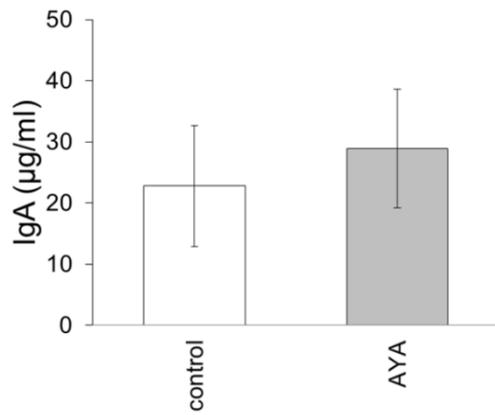


Fig. 2-10 糞中の IgA 含量

通常餌 (control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取した BALB/c マウスをケージに 1 匹ずつ入れ、24 時間後に糞を 5 粒/匹ずつ回収した。そこから IgA を抽出し、ELISA 法によって測定した。なお、試験に供した糞の乾物重量を測定し、それぞれのマウスについて糞 1 g あたりの IgA 含量を算出した。n = 5 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。群間で Student's *t*-test で有意差検定を実施した。

A



B

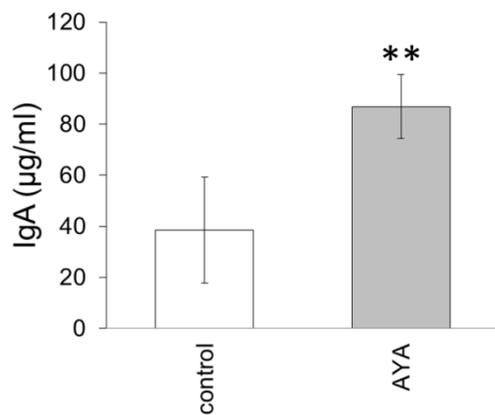
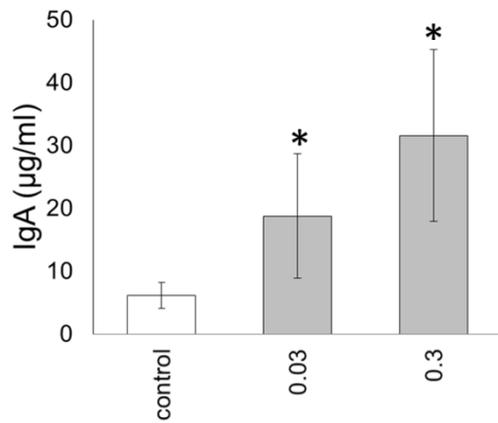


Fig. 2-11 空腸および回腸洗浄液中の IgA 量

通常餌 (control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取した BALB/c マウスから、空腸 (A) および回腸 (B) の洗浄液を採取し、ELISA 法によって IgA 含量を測定した。n = 5 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。群間で Student's *t*-test で有意差検定を実施した。 ** $p < 0.01$ vs control

A



B

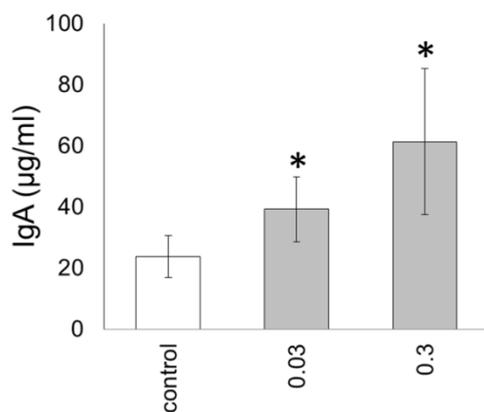


Fig. 2-12 空腸および回腸洗浄液中の IgA 量

通常餌 (control) または *L. plantarum* AYA 0.03%, 0.3% 混合餌 (0.03, 0.3, Table 2-3) を 4 週間摂取した BALB/c マウスから、空腸 (A) および回腸 (B) の洗浄液を採取し、ELISA 法によって IgA 量を測定した。n = 6 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。群間で、Steel-Dwass 検定を実施した。* $p < 0.05$ vs control

Table 2-3 *L. plantarum* AYAの用量試験に使用した餌の配合

通常餌		<i>L. plantarum</i> AYA 混合餌 (0.3%混餌)		<i>L. plantarum</i> AYA 混合餌 (0.03%混餌)	
原料名、検体名	配合比率 (%)	原料名、検体名	配合比率 (%)	原料名、検体名	配合比率 (%)
カゼイン	14	カゼイン	14	カゼイン	14
L-シスチン	0.18	L-シスチン	0.18	L-シスチン	0.18
コーンスターチ	46.5692	コーンスターチ	46.5692	コーンスターチ	46.5692
α 化コーンスターチ	15.5	α 化コーンスターチ	15.5	α 化コーンスターチ	15.5
シュウケイコース	10	シュウケイコース	10	シュウケイコース	10
大豆油	4	大豆油	4	大豆油	4
セルロースパルプダー	5	セルロースパルプダー	5	セルロースパルプダー	5
AIN-93Mミネラル混合	3.5	AIN-93Mミネラル混合	3.5	AIN-93Mミネラル混合	3.5
AIN-93ビタミン混合	1	AIN-93ビタミン混合	1	AIN-93ビタミン混合	1
重酒石酸コリン	0.25	重酒石酸コリン	0.25	重酒石酸コリン	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0008	第三ブチルヒドロキノン	0.0008	第三ブチルヒドロキノン	0.0008
合計	100	<i>L. plantarum</i> AYAの死菌粉末	0.3	<i>L. plantarum</i> AYAの死菌粉末	0.03
		合計	100.3	合計	100.03

2-4 考察

本章では、IgA 分泌亢進能を有する乳酸菌株としてパンの発酵種由来の乳酸菌株である *L. plantarum* AYA を、新たに発見した。*L. plantarum* AYA 死菌粉末をマウスが摂取すると、腸管での IgA 分泌を亢進すること、必要用量は 0.72 mg/日であることを明らかにした。そして、当該乳酸菌株が NK 活性を高める効果は確認されなかった。

これまでに、ヒトの腸管、ミルク、漬物等を由来とする乳酸菌株をターゲットとした研究が報告されており、それらが有する IgA 分泌を亢進する効果が報告されている [51] [29] [30] [52]。しかし、パンの発酵種由来の乳酸菌株では報告されていない。パンの発酵種由来の乳酸菌株は、主食として継続的に摂取されているパンの良い風味を生み出すために重要な役割を担っている [53]。そのため、パンの発酵種由来である *L. plantarum* AYA は、「おいしさ」と「健康機能」の両面において機能を発揮し、さらに主食としてより継続的に摂取しやすい乳酸菌株である可能性がある。よって、食品開発の面から *L. plantarum* AYA を対象に研究を行う価値は非常に高い。

本章では、140 種の乳酸菌について、*ex vivo* 細胞試験によるスクリーニングを実施した。腸管から IgA 分泌を亢進する菌は、腸管上皮領域の M 細胞からパイエル板に取り込まれ [6]、樹状細胞、T 細胞、B 細胞等を活性化することが知られている [54]。よって、

初代培養のマウス由来パイエル板初代培養細胞と乳酸菌を培養し、上清の IgA 含量を評価する *ex vivo* 細胞試験は、適切な実験系と考えている。ただし、菌の種類によって生死に関わらず M 細胞を通過する菌や、コレラ菌のように生菌でないと M 細胞を通過しない菌が報告されている [54] ため、*L. plantarum* AYA を経口摂取させた際の、パイエル板からの IgA 分泌量も測定する必要があった。その方法には、これまで乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 細胞試験 [55]、糞中 IgA を測定する方法 [49] および腸管洗浄液の IgA を測定する方法 [50] と複数報告されていた。本章にてこれらの分析感度を比較し、腸管洗浄液を採取する方法の感度が高いことを明らかにした。

しかし、マウスパイエル板由来初代培養細胞に対して乳酸菌粉末を投与した *ex vivo* 細胞試験（スクリーニング）と、4 週間乳酸菌粉末を摂餌したマウスからパイエル板由来初代培養細胞を調製し、IgA 分泌量を測定する *ex vivo* 細胞試験（乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 細胞試験）の結果が一致しないこともあった。乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 細胞試験では、*L. plantarum* AYA（No. 72）を試験に供した際に IgA 分泌量が最も多かったが（Fig. 2-8）、スクリーニング *ex vivo* 細胞試験では、他の菌株の方が IgA 分泌量は多かった（Fig. 2-7）。乳酸菌粉末摂餌 *ex vivo* 細胞試験の系では乳酸菌粉末は経口摂取された後、胃酸・胆汁酸・各種消化酵素等にさらされてその状態が変化する。また、菌株によっては M 細胞から取り込まれにくいこともある [54]。これらが、2 つの *ex vivo* 細胞

試験で結果が異なる原因と考えられる。スクリーニング *ex vivo* 細胞試験は多くのサンプルを一度に評価することができるためスクリーニングには適しているが、経口摂取による結果への影響が考慮されていないことに留意する必要がある。

本章では、腸管での IgA 分泌を亢進する食品素材の候補として *L. plantarum* AYA を見出した。そして、マウスがそれを 1 日平均 0.72 mg 摂取すると、空腸と回腸のでの IgA 分泌を有意に亢進するが、NK 細胞の活性を高める効果は確認できなかった。次章では、IgA 分泌を亢進する詳細な作用機序について検討を進めた。

第 3 章

L. plantarum AYA の

IgA 分泌亢進効果の作用機序の解析

3-1 序

前章において、*L. plantarum* AYA を経口摂取すると、腸管に分泌される IgA 含量が亢進されることを明らかにした。そこで本章では、その詳細な作用機序の解明をめざした。

緒言で述べた通り、パイエル板は IgA 分泌に深く関わる組織である。パイエル板の IgM 陽性 B 細胞がクラススイッチによって IgA 陽性 B 細胞になり、免疫応答の実効組織に移行して形質細胞に分化し、IgA が分泌される [13]。*L. plantarum* AYA が IgA 分泌を亢進するのは、IgA へのクラススイッチ、又は形質細胞への分化を亢進している可能性が考えられる。IgA へのクラススイッチを誘導する因子としては transforming growth factor- β (TGF- β) [56] [57] [58]、a proliferation-inducing ligand (APRIL)、及び b-cell-activating factor (BAFF) [59] [60] [61]、これらを誘導する nitric oxide (NO) [62] が報告されている。また、IgA を分泌する形質細胞への分化を誘導するサイトカイン IL-6 [63] が報告されており、IgA 分泌細胞の腸管へのホーミングを誘導し、IL-6 の効果を高めるレチノイン酸 [64] [65] も報告されている。

また、乳酸菌はその菌体成分が樹状細胞やマクロファージなどの Toll 様受容体 (toll-like receptor: TLR) で認識され、炎症性サイトカインやケモカインなど情報伝達物質の分泌を誘導し、他の免疫細胞を活性化することが報告されている。具体的な菌体成分として、ペプチドと糖からなるペプチドグリカン [66] [67]、ペプ

チドと脂質からなるリポタンパク質 [66] [67]、グリセロールリン酸と糖脂質からなるリポテイコ酸 [66] [67] [68]等が報告されており、これらは TLR-2 で認識される [69] [70]。

本章では、*L. plantarum* AYA が IgA 分泌を亢進する、詳細な作用機序の解明を目的とした。そのため、*L. plantarum* AYA 粉末摂取マウスのパイエル板細胞種の解析や、パイエル板初代培養細胞への *L. plantarum* AYA 粉末添加による解析によって、それらの相互作用や受容体の探索を実施した。その結果、*L. plantarum* AYA は、パイエル板樹状細胞から IL-6 の分泌を促進し、IL-6 が IgA 産生 B 細胞から形質細胞への分化を誘導し、IgA 分泌を亢進することを明らかにした。また、*L. plantarum* AYA が樹状細胞の TLR-2 で認識されている可能性も示した。

3-2 材料と方法

3-2-1 動物

第 2 章に記載した BALB/c マウスを使用した。なお、動物実験は、「東京大学の部局動物実験委員会」または「広島大学動物実験委員会」の承認を得た後に、「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」、または「広島大学動物実験等規則」に従い、実施した。

3-2-2 乳酸菌粉末の作製

第 2 章に記載した方法で *L. plantarum* AYA の粉末を作製した。

3-2-3 乳酸菌粉末添加飼料の調製

第 2 章に記載した方法で、*L. plantarum* AYA を添加した飼料を調製した。配合は Table 2-2 に示した。

3-2-4 パイエル板初代培養細胞の分離

第 2 章に記載した方法で BALB/c マウスからパイエル板初代培養細胞を分離した。

3-2-5 フローサイトメーター分析

パイエル板初代培養細胞を、 1×10^7 個/ml の濃度で fluorescence activated cell sorting バッファー（以下、FACS バッファー：0.5%

BSA と 2 mM EDTA を含む PBS 溶液) に懸濁した。これを 100 μ l 採取し、CD16/32 抗体 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を 10 μ l 添加し、4°C で 10 分静置した。次いで 1 ml の FACS バッファーを添加し、室温、300 \times g で 10 分遠心後に上清を廃棄することで細胞を洗浄した。計 3 回洗浄したのち、細胞に FACS バッファー 100 μ l と、fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識された抗 IgA 抗体 (Miltenyi Biotec) を 10 μ l 加え、混和後に 4°C、暗所で 10 分間静置した。その後 FACS バッファーを用いて細胞を洗浄し、細胞に FACS バッファー 100 μ l と Phycoerythrin (PE) で標識された CD45R/B220 抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) を 10 μ l 加え、混和後に 4°C、暗所で 10 分間静置した。なお、B220 は B 細胞の指標である。その後 FACS バッファーで洗浄し、FACS バッファーに懸濁し、フローサイトメーターの試験に供した。

3-2-6 IgM 陽性 B 細胞の分離

マウスの解剖時に脾臓を摘出し、FCS を 10% 添加した RPMI1640 に加えた。脾臓をシリンジの背面ですりつぶし、すぐに目開き 70 μ m のセルストレイナー (BD Biosciences) で細胞塊を除去した。その細胞懸濁液を、300 \times g、5 分、4°C で遠心して上清を廃棄した後に、10% FCS 入りの RPMI1640 に懸濁させた。3 \times 10⁸ 個の細胞を含む懸濁液を 50 ml チューブに移して 300 \times g、5 分、4°C で遠心して上清を廃棄した。沈殿の細胞塊を、5% BSA と

2 mM EDTA を含む PBS 溶液 (Magnetic-activated cell sorting バッファー: MACS バッファー) で懸濁した。これに、抗 IgM マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を 600 μ l 加え、混和後に 4°C で 20 分静置し、MACS バッファーで洗浄し、MACS バッファーに懸濁した。VarioMACS separator (Miltenyi Biotec) に LS カラムを設置し、カラムを MACS バッファーで洗浄したのちに、IgM マイクロビーズを加えた脾臓細胞をカラムにアプライした。その後、再び MACS buffer で 3 回洗浄した。そして LS カラムを VarioMACS separator から取り外し、MACS バッファーをアプライした。カラムを通過した液を回収し、抗 IgM マイクロビーズでラベルされた細胞の懸濁液を得た。これを IgM 陽性 B 細胞とした。

3-2-7 IgA 陽性 B 細胞の分離

まずは第 2 章に記載した方法でパイエル板細胞を分離した。そして 1×10^7 個のパイエル板細胞を MACS バッファー懸濁液 90 μ l に、Anti-IgA-FITC 抗体 (Miltenyi Biotec) 10 μ l を加えた。混和後、暗所、4°C で 20 分静置した。次いで 1 ml の MACS バッファーを添加し、室温、300 \times g で 10 分遠心後に上清を廃棄して細胞を洗浄した。洗浄後の細胞に 100 μ l の MACS バッファーと 10 μ l の抗 FITC マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を加え、混和後、暗所、4°C で 20 分静置した。MACS バッファーで洗浄後、再び 100 μ l の MACS バッファーに懸濁させた。VarioMACS separator (Miltenyi Biotec) に LS カラムを設置し、MACS バッファーで洗

浄した後に、パイエル板細胞懸濁液をアプライした。その後、再び LS カラムを MACS バッファーで洗浄した。この時にカラムを通過した細胞懸濁液は、後述のパイエル板樹状細胞の分離に使用した。LS カラムを VarioMACS separator から取り外し、MACS バッファーをアプライした。カラムを通過した液を回収し、これを IgA 陽性 B 細胞とした。

3-2-8 パイエル板樹状細胞の分離

前述の IgA 陽性 B 細胞を分離する際に、VarioMACS separator に設置された LS カラムを通過した細胞 (IgA 陰性パイエル板細胞) は、パイエル板細胞から IgA 陽性細胞を除去したものである。この IgA 陰性パイエル板細胞から樹状細胞の分離を実施した。IgA 陰性パイエル板細胞 1×10^7 個を含む MACS バッファー懸濁液 40 μ l に、抗 CD11c ミクロビーズ (Miltenyi Biotec) 10 μ l を加え、混和後、暗所、4°C で 20 分静置した。1 ml の MACS バッファーを添加し、室温、300 \times g で 10 分遠心後に上清を廃棄して細胞を洗浄し、50 μ l の MACS バッファーに懸濁した。VarioMACS separator に LD カラムを設置し、MACS バッファーで洗浄した後に、IgA 陰性パイエル板細胞を LD カラムにアプライした。その後、MACS バッファーで洗浄し、LD カラムを VarioMACS separator から取り外した。LD カラムに残存している CD11c 陽性細胞を、1 ml の MACS バッファーで回収した。CD11c 陽性細胞の割合をさらに高めるため、LS カラムによる分離も実施した。VarioMACS

separator に設置した LS カラムを MACS バッファーで洗浄後に、回収した CD11c 陽性細胞をアプライした。これを MACS バッファーで洗浄後、VarioMACS separator から取り外し、LS カラム中の CD11c 陽性細胞を MACS バッファーで回収した。この細胞をパイエル板の樹状細胞とした。

3-2-9 細胞培養

第 2 章に記載した方法で細胞培養を実施した。ただし、パイエル板の樹状細胞は 5×10^4 cells/ml、IgM 陽性 B 細胞は 1×10^6 cells/ml、IgA 陽性 B 細胞は 1×10^6 cells/ml に調製し、200 μ l/ウェルで実施した。

3-2-10 樹状細胞からの total RNA 分離

リアルタイム PCR を行うため、樹状細胞から total RNA を抽出した。抽出には RNAeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用し、キットのマニュアルに従って実施した。具体的には、 5×10^5 個のパイエル板樹状細胞を含む懸濁液を、300 \times g、5 分、室温で遠心し、上清を廃棄した。これに 350 μ l の Buffer RLT を加えてボルテックスし、2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder Spin Column にアプライし、最高速度で 2 分間遠心した。スルー液に 350 μ l の 70%エタノールを加えてピペットで混和後、2 ml コレクションチューブにセットした RNeasy MinElute Spin Column に、アプライした。これを 8,000 \times g で 15 秒間遠心

してスルー液を廃棄し、次いで 350 μ l の Buffer RW1 で洗浄を行った。DNase I インキュベーション溶液 (10 μ l の DNase I ストック溶液を 70 μ l の Buffer RDD : キット添付) を加えて室温で 20 分静置し、350 μ l の Buffer RW1、500 μ l の Buffer RPE、80%エタノールで洗浄した。これを RNase free 水に溶解させ、Nano Drop (Thermo Fisher Scientific K.K. USA) を用い、RNA の濃度を測定した。

3-2-11 cDNA 合成

得られた RNA 500 ng を、cDNA 合成に供した。cDNA 合成には SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、マニュアルに従って実施した。具体的には、キットに添付されている 5X VILO™ Reaction Mix を 4 μ l、10X SuperScript Enzyme Mix を 2 μ l 加え、RNA を 500 ng 含む滅菌水を 14 μ l 加えた。これを 25°C で 10 分間、42°C で 60 分間、85°C で 5 分保温した。この反応液の原液を、後述のリアルタイム PCR のテンプレートとして使用した。

3-2-12 樹状細胞のリアルタイム PCR 解析

リアルタイム PCR は、1 ウェルあたり 10 μ l の系で実施した。反応系は、SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Shiga, Japan) を 5 μ l とし、プライマーペア 1 μ M と 1 μ l の cDNA を含む滅菌水を 5 μ l とした。後述するプライマーは、Operon Biotechnologies (Tokyo,

Japan) から購入した。反応条件は、LightCycler (Roche Diagnostics) にて、95°Cで 15 分静置後に、95°Cで 15 秒、57°Cで 30 秒、72°Cで 15 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル実施し、最後に 72°Cで 15 分保温した。内部標準として、ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) を使用した。なお、本試験で使用したプライマーセットを Table 3-1 に記載する。

3-2-13 *L. plantarum* AYA の細胞壁成分分離法

細胞壁成分の分離は、Kaji らの方法に準じて実施した [71]。具体的には、*L. plantarum* AYA の粉末 0.5 g を、0.3% ドデシル硫酸ナトリウム（和光純薬工業、大阪、日本）水溶液 20 ml に懸濁させ、1400×g で 10 分遠心し、上清を廃棄した。その後、沈殿物を滅菌水で 3 回、次にアセトンで 1 回洗浄して、10 ml のプロナーゼ溶液 {1 mg/ml のプロナーゼ（和光純薬工業）を含有した 50 mM Tris-HCL buffer: pH6.8} に懸濁し、37°Cで 20 時間インキュベートした。1400×g で 10 分遠心して上清を廃棄した。沈殿物にメタノールを 10 ml 加えて懸濁後、1400×g で 10 分遠心して上清を廃棄した。その沈殿物を 20 ml のベンゾナーゼ溶液 {10 units/ml のベンゾナーゼ（Sigma-Aldrich）を含有した 50 mM Tris-HCL buffer: pH8.0} に懸濁し、37°Cで 20 時間インキュベートした。1400×g で 10 分遠心して上清を廃棄し、その沈殿物を 20 ml のプロナーゼ溶液に懸濁して 37°Cで 72 時間インキュベートした。

1400×g で 10 分遠心して上清を廃棄し、沈殿物を滅菌水で 3 回洗浄してから凍結乾燥したものを細胞壁画分とした。

3-2-14 IgA 量の定量

第 2 章に記載した方法で IgA 量の定量を実施した。

3-2-15 サイトカイン測定

細胞培養した上清中のサイトカインを ELISA 法にて測定した。ELISA 法は Quantikine Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- β Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、Quantikine Mouse BAFF/BLyS/TNFSF13B Immunoassay (R&D Systems)、mouse IL-6 ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を使用し、キット付属のプロトコールに従って実施した。具体的には、第 2 章の IgA 測定と同様に実施した。

3-2-16 データ処理

結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。2 群間の比較は、F 検定で分散の均一性を検討し、等分散であれば Student's *t* test を実施し、不等分散であれば Mann-Whitney 検定を実施した。また、多群の比較を実施する場合は Tukey 検定を実施した。いずれも、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

3-3 結果

3-3-1 IgM 陽性 B 細胞から IgA 陽性 B 細胞へのクラススイッチに着目した検討

L. plantarum AYA が IgA 分泌を亢進する原因として、パイエル板の IgM 陽性 B 細胞から IgA 陽性 B 細胞へのクラススイッチを亢進している可能性を考えた。

7 週齢のマウスに、通常餌または 5% *L. plantarum* AYA 混合餌 (Table 2-2) を 4 週間摂取させて解剖し、パイエル板の IgA 陽性 B 細胞の割合を、フローサイトメーターで測定した。その結果、*L. plantarum* AYA 摂取群で割合が有意に高くなっていた ($p < 0.05$) (Fig. 3-1)。*L. plantarum* AYA を摂取すると、パイエル板で、IgA 陽性 B 細胞へのクラススイッチ亢進される可能性を示した。

次に、パイエル板の IgM 陽性 B 細胞を単離して培養し、*L. plantarum* AYA 粉末添加による、IgA 分泌量への影響を評価した。その結果、いずれも IgA は検出限界以下であった (データ無し。検出限界：10 ng/ml)。パイエル板の樹状細胞と IgM 陽性 B 細胞を共培養しても、IgA は検出限界以下であったが、これらに *L. plantarum* AYA 粉末を添加すると、IgA が検出された (Fig. 3-2)。よって、*L. plantarum* AYA は、IgM 陽性 B 細胞には認識されず、樹状細胞に認識され、樹状細胞を介して IgA 陽性 B 細胞へのクラススイッチを亢進する可能性を示した。

L. plantarum AYA が、樹状細胞に作用し、クラススイッチを亢

進させる情報伝達物質の分泌を誘導するという仮説を検討した。これまでに IgA 陽性 B 細胞へのクラススイッチを亢進させる因子として、TGF- β [56] [57] [58]、APRIL、BAFF [59] [60] [61] の 3 種のサイトカインタンパク質、および inducible nitric oxide synthase (iNOS) 酵素によって産生・分泌される一酸化窒素 (NO) [62] [72] が報告されている。しかし、乳酸菌株の摂取とこれらの関連は報告されていない。そこで *L. plantarum* AYA を添加した際の、樹状細胞におけるこれら遺伝子の mRNA 発現量解析をリアルタイム PCR 法で行った。その結果、培養開始から 48 時間後の測定終了時までいずれのタイムポイントでも *Tgf β* と *Baff* の mRNA 発現量は *L. plantarum* AYA を添加した樹状細胞の方が高く維持されていた (Fig. 3-3)。しかし、タンパク質の分泌量を測定したところ、TGF- β と BAFF とともに *L. plantarum* AYA を添加による増加はみられず (Fig. 3-4)、仮説は立証できなかった。以上より、*L. plantarum* AYA がクラススイッチを亢進する可能性が示されたものの、その作用機序の解明には至らず、パイエル板細胞で IgA 陽性 B 細胞の比率が高くなる原因を特定することは出来なかった。

3-3-2 IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化に着目した検討

L. plantarum AYA が、パイエル板からの IgA 分泌量を亢進する作用機序として、IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を亢進する可能性が考えられた。そこで、IgA 陽性 B 細胞を培養する系に、*L. plantarum* AYA を添加し、添加の有無で分泌された IgA 量を比

較した。その結果、両者の間で IgA 分泌量に有意な差は見られなかった (Fig. 3-5)。よって、*L. plantarum* AYA は IgA 陽性 B 細胞に直接認識されていないことが示された。

次にこの培養系に、パイエル板の樹状細胞を加えた。その結果、*L. plantarum* AYA の存在下で IgA の分泌量が有意に高くなった

(Fig. 3-5)。以上より、*L. plantarum* AYA はパイエル板の樹状細胞に認識されて情報伝達物質が分泌され、その結果 IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を亢進していることが示唆された。樹状細胞から分泌される情報伝達物質として、これまでに IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を亢進し、腸管からの IgA 分泌量を増加する効果が報告されているサイトカイン IL-6 [63] [73] [74] [75] と、IL-6 の効果を高めることが報告されているレチノイン酸 [64] を候補とした。それらの合成・分泌に必要な遺伝子である、*Il6*、*aldehyde dehydrogenase 1a1 (Aldh1a1)*、および *aldehyde dehydrogenase 1a2 (Aldh1a2)* の mRNA 発現量と、それらのタンパク質の発現量の比較試験を行った。その結果、*L. plantarum* AYA を添加すると *Il6* の mRNA 発現量、並びに IL-6 タンパク分泌量が有意に高くなることを明らかにした (Fig. 3-6、Fig. 3-7)。一方、*Aldh1a1* と *Aldh1a2* には mRNA 発現量に変化がみられなかった (Fig. 3-6)。

L. plantarum AYA 刺激により樹状細胞から分泌された IL-6 が、IgA 分泌に寄与しているか検討するために、IL-6 に対するモノクローナル抗体を用い、IL-6 を中和した際の IgA 分泌量を検討した。

その結果、抗 IL-6 抗体の添加によって、*L. plantarum* AYA の IgA 分泌亢進効果がキャンセルされた (Fig. 3-8)。よって、*L. plantarum* AYA が IL-6 の分泌を亢進することは、IgA の分泌亢進効果に必須であることを明らかにした。

以上より、*L. plantarum* AYA は、パイエル板の樹状細胞に認識されて IL-6 の分泌を亢進し、IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を促し、結果として IgA の分泌を亢進していることが示唆された。

3-3-3 *L. plantarum* AYA を認識する受容体

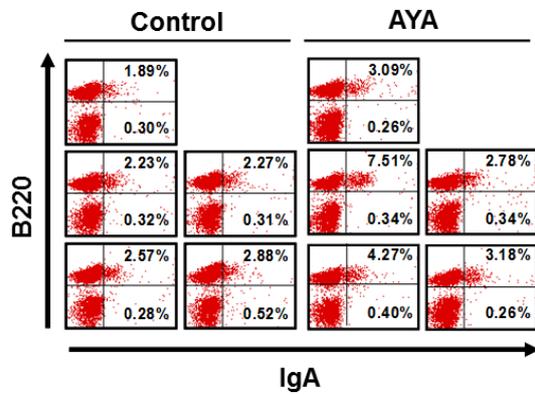
前項までに、*L. plantarum* AYA はパイエル板の樹状細胞に認識されることを明らかにした。しかし *L. plantarum* AYA を認識する受容体は明らかになっていないため、本項でその同定をめざした。

受容体を決定するために、まずは *L. plantarum* AYA のリガンドの推定を行った。*L. plantarum* AYA の効果は死菌粉末で確認されたため、その機能性関与成分は乳酸菌の代謝物ではなく構成成分であると考えられる。これまでに、各種微生物の構成成分で機能性関与成分と報告されているものには、リポテイコ酸 [66] [67] [68]、リポプロテイン [66] [67]、およびペプチドグリカン [65] [66] [67] 等がある。この中で、リポテイコ酸とペプチドグリカンは乳酸菌の細胞壁に存在していることから、まずはリガンドが細胞壁画分に含まれていると推定し、検討を開始した。9 週齢のマウスから採取したパイエル板初代培養細胞 (5×10^6 cells/ml) に

L. plantarum AYA の細胞壁画分 (500 µg/ml) となるように調整し、共培養すると、IgA 分泌が有意に亢進された ($p < 0.05$) (Fig. 3-9)。よって、*L. plantarum* AYA 認識受容体のリガンドの少なくとも 1 つは細胞壁画分に存在していることが示唆された。

リポテイコ酸とペプチドグリカンは、いずれも樹状細胞の TLR-2 に認識されることが報告されている [76]。よって、*L. plantarum* AYA がパイエル板樹状細胞の TLR-2 に認識されている可能性が考えられた。そこで、パイエル板初代培養細胞と *L. plantarum* AYA の培養系に TLR-2 抗体を加え、上清の IgA 分泌量を比較した。その結果、TLR-2 抗体を添加すると、*L. plantarum* AYA が有する IgA 分泌亢進効果が有意に抑制された (Fig. 3-10)。また、同様の処理で細胞壁画分の IgA 分泌亢進効果も有意に抑制された (Fig. 3-10)。以上より、*L. plantarum* AYA の細胞壁画分がリガンドの 1 つとして機能し、それが樹状細胞の TLR-2 に認識され、その結果としてパイエル板初代培養細胞より IgA 分泌を亢進する可能性を示した。

A



B

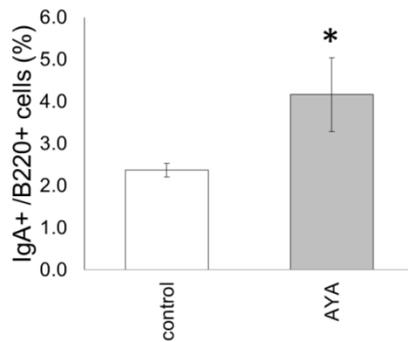


Fig. 3-1 *L. plantarum* AYA を経口摂取したマウスの、パイエル板における、IgA 陽性細胞と B220 陽性細胞の割合

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 粉末混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取した BALB/c マウス (n = 5) からパイエル板初代培養細胞を採取し、フローサイトメーターで IgA と B220 の発現量を測定した。IgA 陽性 B 細胞は右上枠にプロットされる。

(A) 各マウスのパイエル板のフローサイトメーターの図を示した。(B) パイエル板初代培養細胞全体における IgA 陽性 B 細胞の割合を、平均値 ± 標準偏差を示した。2 群間が不等分散であったため、Mann-Whitney 検定を実施した。* $p < 0.05$ vs Control

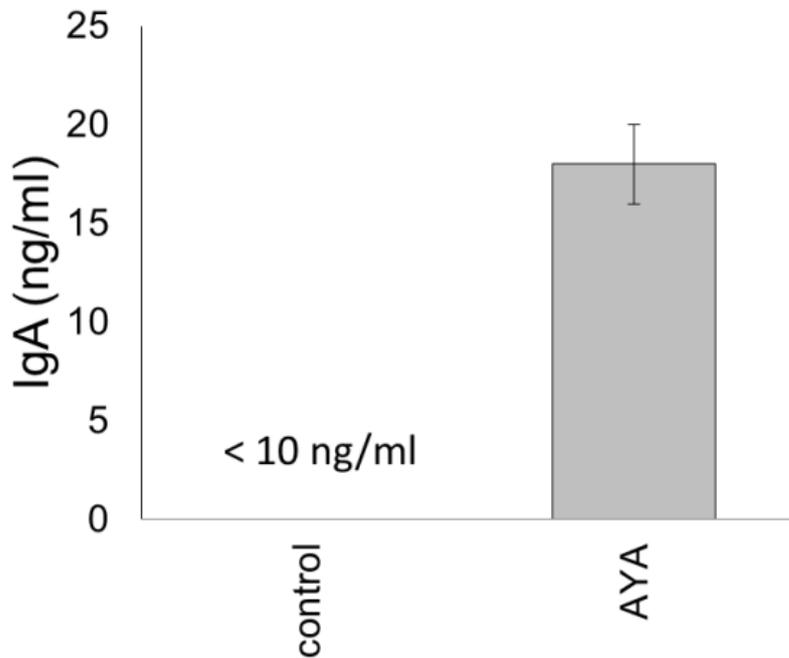


Fig. 3-2 樹状細胞と IgM 陽性 B 細胞に、*L. plantarum* AYA を添加して培養したときの IgA 分泌量

BALB/c マウスの初代培養細胞であるパイエル板樹状細胞を 5×10^4 cells/ml、IgM 陽性 B 細胞を 1×10^6 cells/ml に調製して共培養する系 (Control) と、それに *L. plantarum* AYA の死菌粉末を 250 μ g/ml になるように添加した系 (AYA) の培養試験を、200 μ l/ウエルで実施した。4 日間培養後に上清を回収し、IgA 分泌量を ELISA で測定した。n = 5 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。検出限界は 10 ng/ml である。

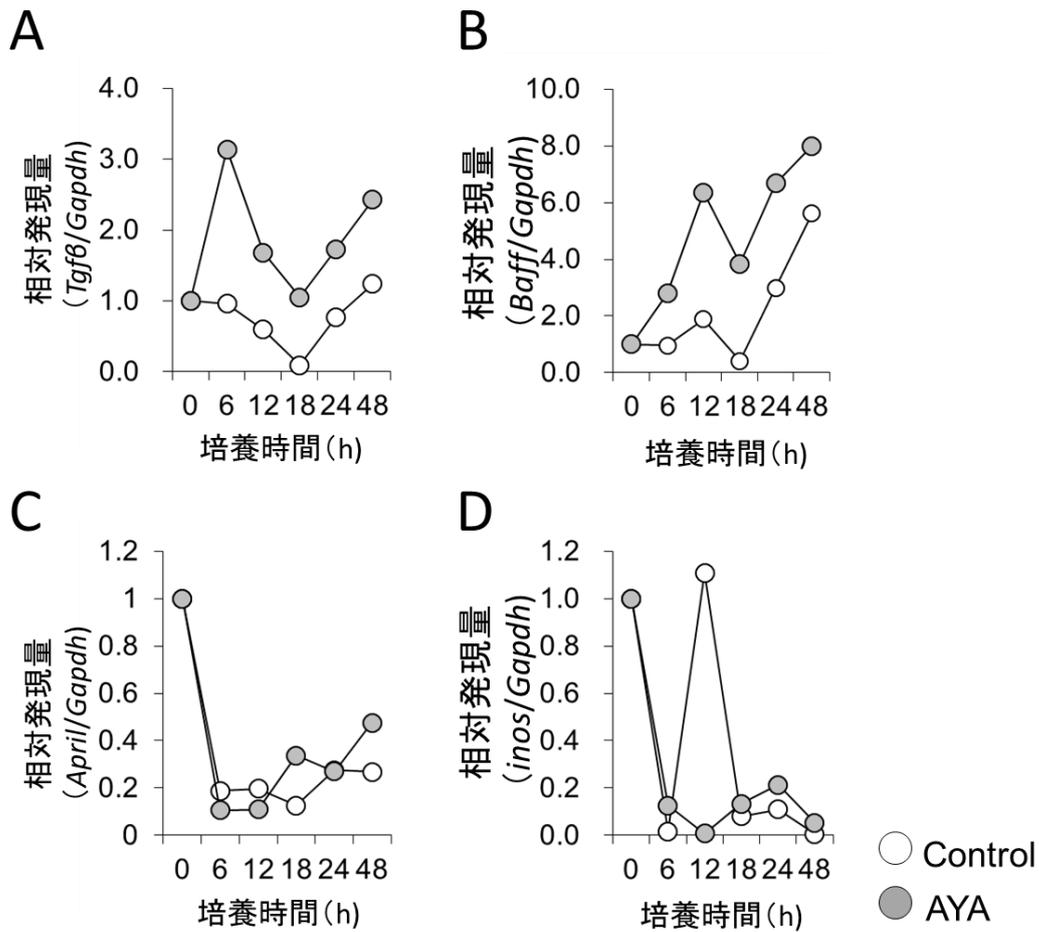


Fig. 3-3 *L. plantarum* AYAを添加して培養したパイエル板樹状細胞の遺伝子発現解析

BALB/cマウスの初代培養細胞であるパイエル板樹状細胞を 5×10^4 cells/mlに調製する系 (Control) と、それに *L. plantarum* AYAの死菌粉末を 250 μ g/mlになるよう添加した系 (AYA) について、200 μ l/ウェルで培養試験を実施した。培養開始時、6、12、18、24、48時間後に樹状細胞をサンプリングし、遺伝子発現量を測定した。*Gapdh*を内部標準とした。A: *Tgfb*、B: *Baff*、C: *April*、D: *inos*

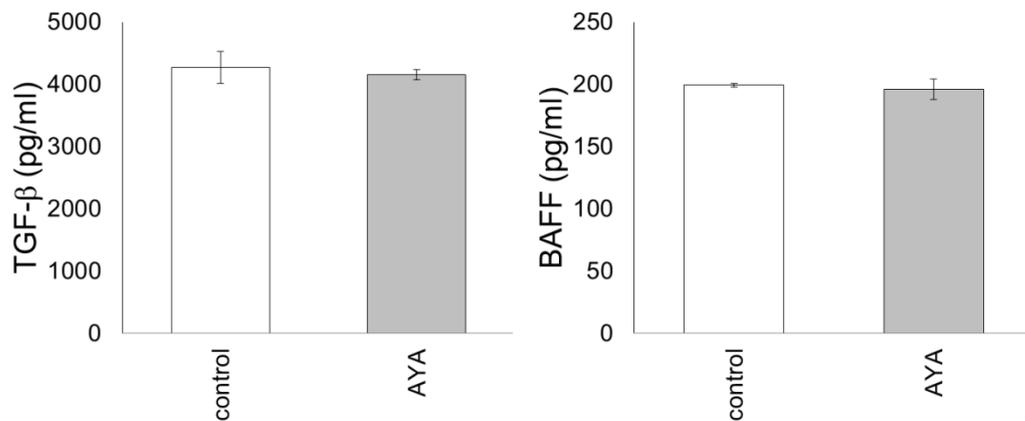


Fig. 3-4 *L. plantarum* AYAを添加して培養したパイエル板樹状細胞からのサイトカイン分泌量

BALB/cマウスの初代培養細胞である、パイエル板樹状細胞を 5×10^4 cells/mlに調製する系 (Control)、それに *L. plantarum* AYAの死菌粉末を 250 $\mu\text{g/ml}$ になるよう添加した系 (AYA) について、200 μl /ウェルで培養試験を実施した。3日間培養後に上清を回収し、サイトカイン (TGF- β とBAFF) 量を測定した。n = 3で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。Student's *t*-testで有意差検定を実施した。

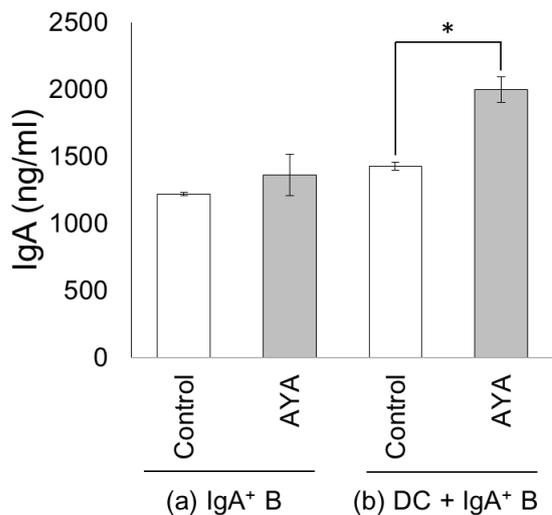


Fig. 3-5 樹状細胞と IgA 陽性 B 細胞に、*L. plantarum* AYA を添加して培養した際の IgA 分泌量

(a) BALB/c マウスの初代培養細胞である、パイエル板の IgA 陽性 B 細胞を 1×10^6 cells/ml になるよう調製した系 (Control)、それに *L. plantarum* AYA の死菌粉末を $250 \mu\text{g/ml}$ になるよう添加した系 (AYA) について、 $200 \mu\text{l}$ /ウエルで培養試験を実施した。

(b) BALB/c マウスの初代培養細胞である、パイエル板の樹状細胞を 5×10^4 cells/ml、IgA 陽性 B 細胞を 1×10^6 cells/ml になるよう調製した共培養系 (Control)、それに *L. plantarum* AYA の死菌粉末が $250 \mu\text{g/ml}$ になるよう添加した系 (AYA) について、 $200 \mu\text{l}$ /ウエルで培養試験を実施した。

いずれも 3 日間培養後に上清を回収し、上清の IgA 含量を ELISA 法にて測定した。 $n = 3$ で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。(a)、(b) それぞれ群間で、Student's *t*-test で有意差検定を実施した。

* $p < 0.05$ vs Control

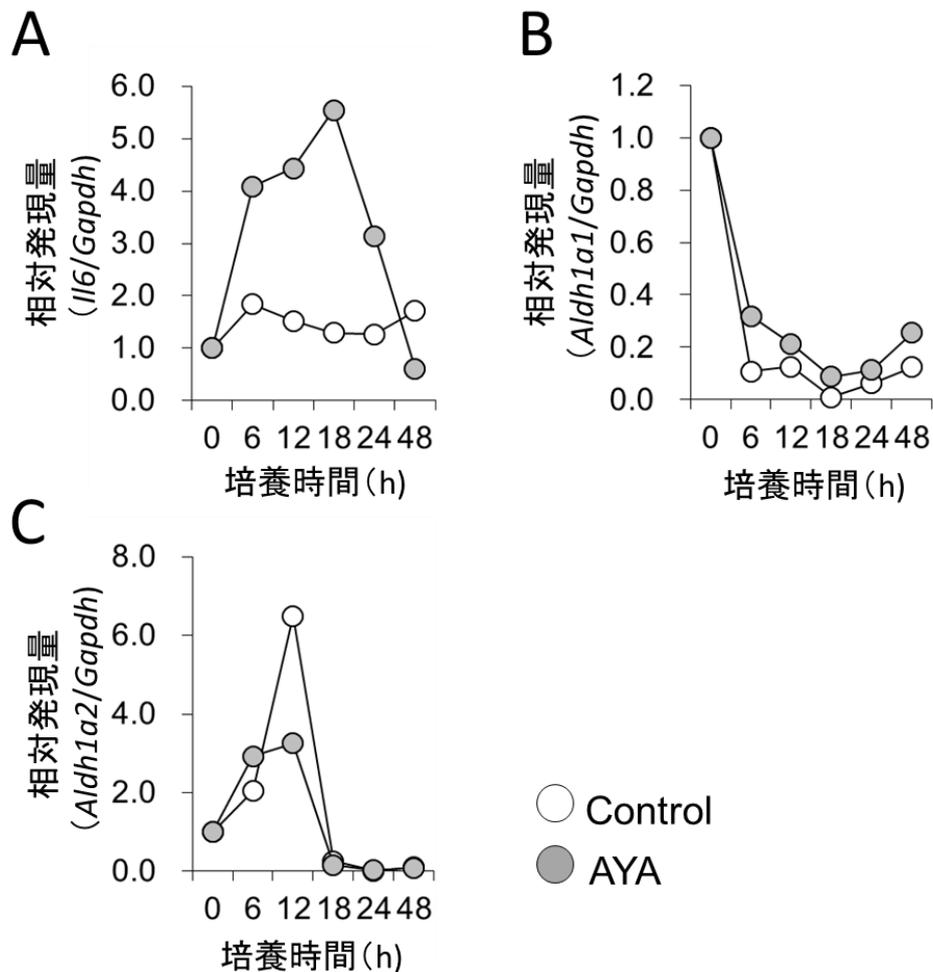


Fig. 3-6 *L. plantarum* AYA を添加して培養したパイエル板樹状細胞の遺伝子発現解析

BALB/cマウスの初代培養細胞である、パイエル板の樹状細胞を 5×10^4 cells/ml に調製した系 (Control) と、それに *L. plantarum* AYA の死菌粉末を 250 μ g/ml になるよう添加した系 (AYA) について、培養試験を実施した。培養開始時、6、12、18、24、48 時間後に樹状細胞をサンプリングし、遺伝子発現量を測定した。*Gapdh* を内部標準とした。A: *Il6*、B: *Aldh1a1*、C: *Aldh1a2*

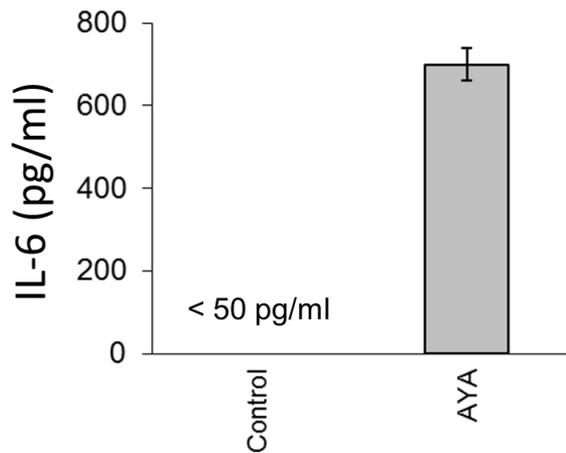


Fig. 3-7 *L. plantarum* AYAを添加して培養したパイエル板樹状細胞からのサイトカイン分泌量

BALB/cマウスの初代培養細胞である、パイエル板の樹状細胞を 5×10^4 cells/mlに調製した系（control）と、それに*L. plantarum* AYAの死菌粉末を250 μ g/mlになるよう添加した系（AYA）について、200 μ l/ウェルで培養試験を実施した。3日間培養後に上清を回収し、IL-6の分泌量をELISA法にて測定した。n = 3で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。なお、ELISAの検出限界は50 pg/mlである。

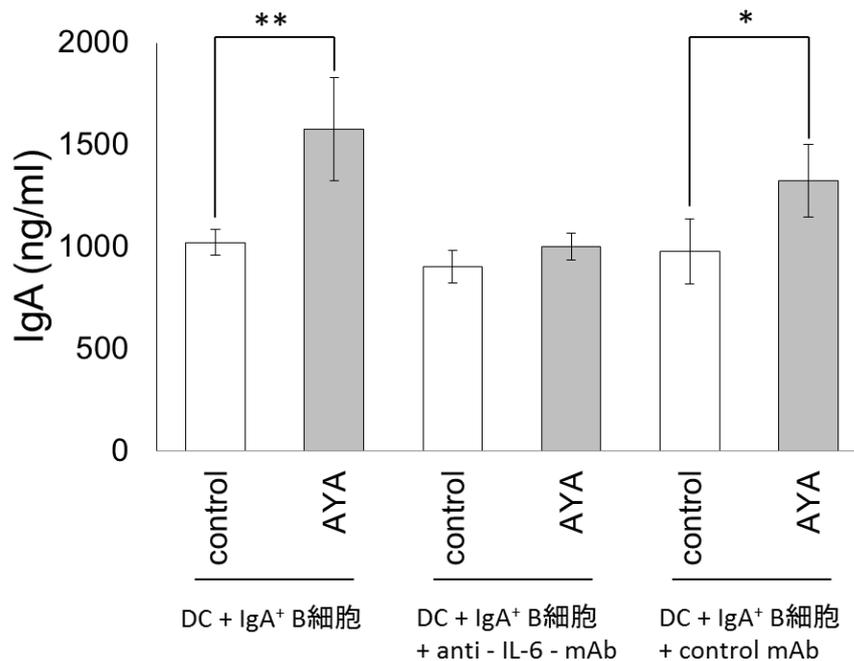


Fig. 3-8 *L. plantarum* AYAを添加して培養した、パイエル板樹状細胞およびIgA陽性B細胞の共培養系に、IL-6抗体を添加した際のIgA分泌量

BALB/cマウスの初代培養細胞である、パイエル板の樹状細胞 (DC) を 5×10^4 cells/ml、IgA陽性B細胞を 1×10^6 cells/mlになるよう調製した系 (control)、それに *L. plantarum* AYAの死菌粉末が 250 μ g/mlになるよう添加した系 (AYA) を用意した。それぞれの系に対し、何も添加しない系、抗IL-6中和抗体 (2 μ g/ml) を添加する系、抗体のネガティブコントロールとしてIL-6ではないモノクローナル抗体 (2 μ g/ml) を添加する系、200 μ l/ウエルの培養試験を実施した。3日間培養後に上清を回収し、IgA含量をELISAにて測定した。n = 4で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。それぞれ、controlとAYA間で、Student's *t*-testによる有意差検定を実施した。

***p* < 0.01 vs control、**p* < 0.05 vs control

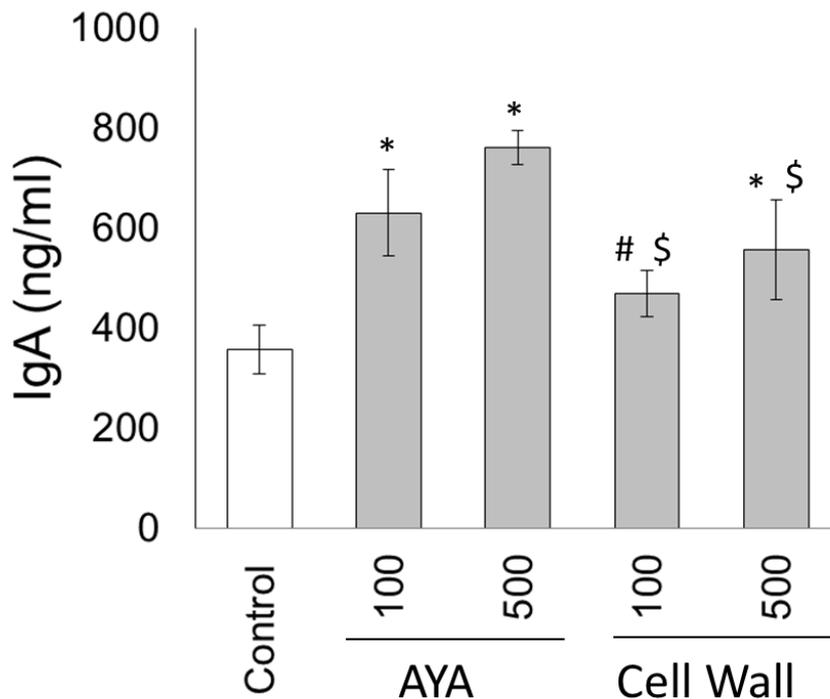


Fig. 3-9 *L. plantarum* AYA およびその細胞壁画分を添加した際に、パイエル板細胞から分泌する IgA 分泌量

BALB/c マウス由来のパイエル板から採取した樹状細胞を 5×10^4 cells/ml に調製した系 (Control) と、それに *L. plantarum* AYA の死菌粉末を 100 $\mu\text{g/ml}$ 、または 500 $\mu\text{g/ml}$ になるよう調製して添加した系 (AYA)、および細胞壁画分が 100 $\mu\text{g/ml}$ 、または 500 $\mu\text{g/ml}$ になるよう調製して添加した系 (Cell Wall) について、200 μl /ウェルの系で培養試験を実施した。3 日間培養後に上清を回収し、IgA 含量を ELISA にて測定した。n = 4 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。Tukey 法で有意差検定を実施した。*: $p < 0.05$ vs Control, #: $p < 0.05$ vs 100 $\mu\text{g/ml}$ *L. plantarum* AYA, \$: $p < 0.05$ vs 500 $\mu\text{g/ml}$ *L. plantarum* AYA

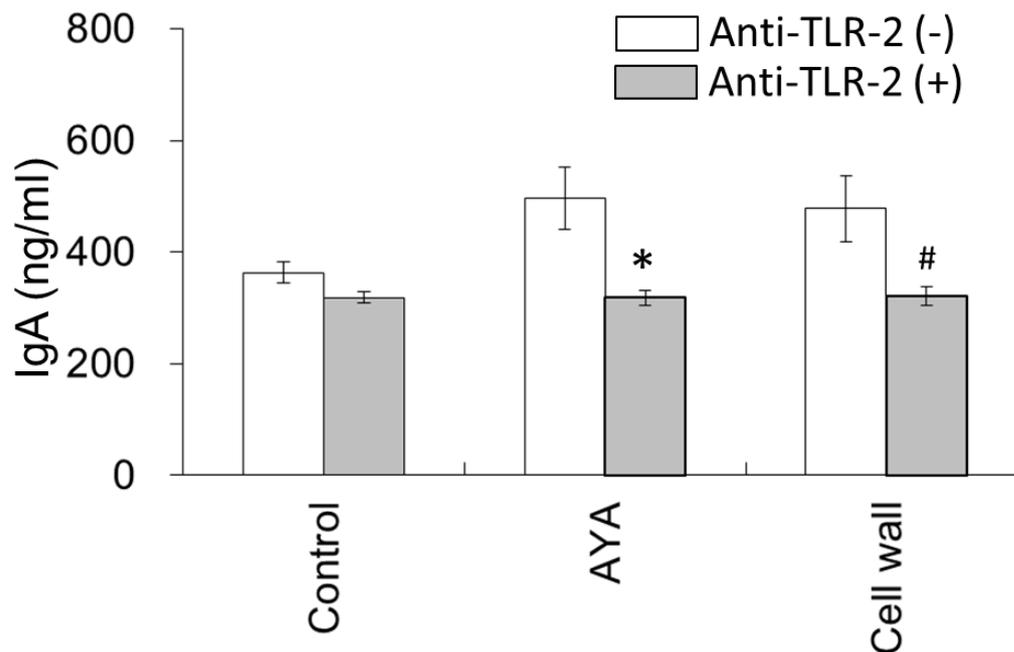


Fig. 3-10 TLR-2 中和抗体の添加による、*L. plantarum* AYA IgA 分泌亢進作用への影響

BALB/c マウス由来のパイエル板初代培養細胞を 5×10^6 cells/ml に調製した系 (Control) と、それに *L. plantarum* AYA の死菌粉末を $500 \mu\text{g/ml}$ になるように添加して培養する系 (AYA)、または細胞壁画分が $500 \mu\text{g/ml}$ になるよう添加して培養する系 (Cell Wall) を用意した。それぞれの系について、 $5 \mu\text{g/ml}$ の抗 TLR-2 中和抗体を添加の有無で、培養試験を実施した。200 μl /ウエルとした。3 日間培養後に上清を回収し、IgA 含量を ELISA にて測定した。n = 4 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。Student's *t*-test で有意差検定を実施した。* $p < 0.05$ vs *L. plantarum* AYA without anti-TLR-2; # $p < 0.05$ vs the cell wall fraction without the anti-TLR-2 antibody

Table 3-1 PCRに使用したプライマーセット

Gene name	Sequence
Transforming growth factor- β (TGF- β)	Forward 5'-ATTGAGGGCTTGTGAGATG-3' Reverse 5'-GACTGGCGAGCCTAGTTTG-3'
B-cell-activating factor (BAFF)	Forward 5'-TGCTATGGGTCATGTCATCCA-3' Reverse 5'-GGCAGTGTTTGGGCATATTC-3'
a proliferation-inducing ligand (APRIL)	Forward 5'-TCACAATGGGTCAGGTGGTATC-3' Reverse 5'-TGTAATGAAAGACACCCTGCACGTG-3'
inducible nitric oxide synthase (iNOS)	Forward 5'-CGTTGATTTGGAGCAGAAGTG-3' Reverse 5'-CATGCCAAAATCTCTCCACTGCC-3'
interleukin-6 (IL-6)	Forward 5'-TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3' Reverse 5'-TCTGACCACACAGTGAGGAATGTCAAC-3'
aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH 1a1)	Forward 5'-ATGTTTAGCAGCAGGACTCTTC-3' Reverse 5'-CCAGACATCTGAATCCACCGAA-3'
aldehyde dehydrogenase 1a2 (ALDH 1a2)	Forward 5'-GACTTGTAGCAGCTGCTTCACT-3' Reverse 5'-TCACCCATTCTCTCCATTTC-3'
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Forward 5'-TGACCGGGAAGCTCACTGG-3' Reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGGTGTGA-3'

3-4 考察

本章では、*L. plantarum* AYA が有する IgA 分泌亢進効果の、詳細な作用機序の解明を目指した。

L. plantarum AYA は、パイエル板にて IgA 陽性 B 細胞の比率を高める事、およびパイエル板樹状細胞に認識され、IL-6 の分泌を亢進し、それが IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を誘導して、パイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌量を増加させることを明らかにした。また、樹状細胞の TLR-2 が *L. plantarum* AYA を認識している可能性も示した。

L. plantarum AYA を摂取すると、パイエル板にて IgA 陽性 B 細胞の比率が高くなった。その原因として、IgM 陽性 B 細胞からのクラススイッチを亢進した可能性、IgA 陽性 B 細胞の増殖を促進した可能性、ホーミングによる他組織から流入した可能性等が考えられた。その中でクラススイッチを亢進した可能性に着目し、TGF- β , BAFF, APRIL, NO の発現解析を行ったが、発現は亢進しておらず、IgA 陽性 B 細胞の比率が高くなった原因を特定することは出来なかった。

我々が当該研究を発表した当時、*L. plantarum* AYA はもちろんその他の乳酸菌株を含め、IgA の分泌を亢進する詳細な作用機序として、パイエル板の細胞と乳酸菌株の詳細な相互作用については報告されていなかった。本章にて、パイエル板細胞と、IgA 分

泌亢進効果を有する乳酸菌株の、相互作用をはじめて明らかにした。

さらに、*L. plantarum* AYA の機能性関与成分について検討した。本章にて、*L. plantarum* AYA から分画した細胞壁画分を 100 µg/ml になるよう培養液に加えても IgA 分泌を亢進する効果はみられなかったが、添加濃度を 500 µg/ml にすると、IgA 分泌を有意に亢進することが確認された。一方、分画していない *L. plantarum* AYA の死菌粉末を培養液に加えた際は、添加濃度が 100 µg/ml においても 500 µg/ml においても、IgA 分泌を有意に亢進する効果がみられた (Fig. 3-9)。このように、分画していない *L. plantarum* AYA の死菌粉末の方が、分画した *L. plantarum* AYA の細胞壁画分よりも活性が高かった。以上より、*L. plantarum* AYA の細胞壁には機能性関与成分が含まれているが、細胞壁以外にも別の関与成分が存在していることが示唆された。しかし、細胞壁以外の機能性関与成分を明らかにすることはできていない。それを明らかにするためには、更なる検討が必要であり、今後の課題である。

また、*in vivo* で作用機序の検証ができていないことも課題である。これまでに、蛍光標識した乳酸菌株 (*L. GG* と *L. gasseri* TMC0356) をマウスに摂取させると、パイエル板へ取り込まれるという報告がある [38]。よって、この方法を用いて、*L. plantarum* AYA がパイエル板へ取り込まれる様子を確認できれば、作用機序を確定する為の重要なデータとなる。

一方で、*L. plantarum* AYA がパイエル板に取り込まれていない可能性も存在する。これまでに、腸管上皮細胞から分泌された IL-6 や APRIL が、腸管の B 細胞からの IgA 分泌を亢進することが報告されている [59] [77]。*L. plantarum* AYA が腸管上皮細胞に直接作用することで、IL-6 や APRIL を分泌を促し、IgA 分泌を亢進している可能性も考えられる。これらの点をはっきりさせるためにも、まずは摂取した *L. plantarum* AYA がパイエル板へ取り込まれるか否かを明確にすることが重要である。

第 2 章と第 3 章より、*L. plantarum* AYA の IgA 分泌亢進効果とその詳細な作用機序を明らかにした。そこで、次章では *L. plantarum* AYA が IgA 分泌亢進効果以外の効果を有するか、検証を行った。

第 4 章

IgA 分泌亢進以外の 免疫調節機能の検討

4-1 序

前章までに、*L. plantarum* AYA 死菌粉末を経口摂取すると IgA の分泌が亢進されること、および、その詳細な作用機序を明らかにした。しかし、*L. plantarum* AYA がその他の免疫賦活効果を有している可能性も考えられる。食品素材として *L. plantarum* AYA を開発していくうえで、それを明らかにすることは非常に重要である。そこで、*L. plantarum* AYA の未知機能の推定を目指した。

機能性を有する食品成分を摂取すると、各臓器はそれに応答し、遺伝子発現が変化する。このような遺伝子発現変化は表現型の発現につながる。そこで、DNA マイクロアレイを用いてこれらの遺伝子応答を網羅的に捉え、食品成分の機能を推定する解析が行われている。特に全ゲノム配列が解析され、遺伝子レパートリーが明らかになっているヒト、マウス、及びラット等などの生物種を対象にすると、効果的である。このように網羅的遺伝子発現解析を用いて食品の未知機能を推定する方法は、ニュートリゲノミクスと呼ばれ、近年報告が増加している [78] [79]。

そこで本章では、*L. plantarum* AYA がもつ未知の免疫調節機能の推定を目的とし、マウスに *L. plantarum* AYA の死菌粉末を摂取させ、そのパイエル板の網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、*L. plantarum* AYA の摂取で急性炎症の誘導や補体の活性化など自然免疫を高めること、および樹状細胞や B 細胞が活性化すること等、獲得免疫を高めることが示唆された。

4-2 材料と方法

4-2-1 動物

第 2 章に記載した BALB/c マウスを使用した。なお、実験動物は、「日清製粉グループ上福岡研究所群動物実験委員会」の承認を得た後に、「日清製粉グループ上福岡研究所群動物実験に関する指針」に従い、実施した。

4-2-2 乳酸菌粉末の作製

第 2 章に記載した方法で *L. plantarum* AYA の粉末を作製した。

4-2-3 乳酸菌粉末添加飼料の調製

第 2 章に記載した方法で、*L. plantarum* AYA を添加した飼料を調製した。配合は Table 2-2 に示した。

4-2-4 回腸の洗浄液採取法

第 2 章に記載した方法で実施した。

4-2-5 IgA の定量

第 2 章に記載した方法で実施した。

4-2-6 パイエル板初代培養細胞の分離

第 2 章に記載した方法で実施した。

4-2-7 パイエル板細胞の網羅的遺伝子発現解析

DNAマイクロアレイを用いて、網羅的遺伝子発現解析を実施した。まずはパイエル板細胞からtotal RNAを抽出した。抽出は、第2章と同様の方法で実施した。その後、RNAの精製にRNeasy® MinElute® Cleanup (QIAGEN) を使用し、マニュアルに従って実施した。具体的には、RNA 45 µgを滅菌水200 µlに溶解させ、Buffer RLT 700 µlと100%エタノール500 µlを添加して混和した。これを2 mlコレクションチューブにセットしたRNeasy MinElute Spin Columnにアプライして遠心し、スルー液を廃棄した。これを500 µlのBuffer RPE、500 µlの80%エタノールで洗浄し、遠心してスルー液を廃棄した。これにRNase free水を加えて1分間静置し、最高速度で遠心してスルー液を回収した。これをクリーンアップ後のtotal RNA溶液として使用した。RNAの質の確認をするためアガロースゲル電気泳動を実施し、28S rRNA と 18S rRNAが分解されていないことを確認した。

次に、パイエル板細胞由来のtotal RNAからcDNAの合成、amplified RNA (aRNA) の合成およびその断片化を実施した。そのため、GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用い、そのプロトコールに従って実施した。具体的には、クリーンアップ後のtotal RNA 100 ngに、 5×10^5 倍に希釈したPoly-A Control Stockを2 µl、First-Strand Buffer Mixを4 µl、First-Strand Enzyme Mixを1 µl加え、滅菌水で合計10 µlにした。

これを42°Cで2時間インキュベートして1本鎖cDNAを合成した。

この反応液に、**Second-Strand Buffer Mix**を5 µl、**Second-Strand Enzyme Mix**を2 µl加え、滅菌水を13 µl加えて16°Cで1時間インキュベートし、2本鎖cDNAを合成した。これに**IVT Biotin Label**を4 µl、**IVT Labeling Buffer**を20 µl及び**IVT Enzyme Mix**を6 µl加えて40°Cにて16時間インキュベートし、aRNAを合成した。これをクリーンアップするため、これに**RNA Binding Beads**を10 µl、**aRNA Binding Buffer Concentrate**を50 µl加え、120 µlの100%エタノールを加えて混和し、磁性スタンドを用いて非磁性のものを除去した。**aRNA Wash Solution**で2回洗浄し、50°Cの**aRNA Elution Solution**を50 µl加えて磁性スタンドに供し、磁性ビーズを除去した。最後にaRNAを15 µgと**5x Array Fragmentation Buffer**を8 µlを加えて滅菌水で40 µlにし、94°Cで35分インキュベートしてaRNAを断片化し、そのピーク長が100-200ヌクレオチドになることを確認した。

断片化したaRNAを12.5 µl、**Control Oligonucleotide B2** (3 nM)を4.3 µl、**20x Hybridization Controls**を12.5 µl、**2x Hybridization Mix**を125 µl、**DMSO**を25 µl、**Herring Sperm DNA** (10 mg/mL)を2.5 µl、**BSA** (50 mg/mL)を2.5 µl、滅菌水を65.7 µlを混和したものを**Hybridization Cocktail**とした。これを99°Cで5分、次いで45°Cで5分インキュベートし、遠心機の最高速度で5分間遠心してから**Pre-Hybridization Mix**によるプレハイブリダイゼーション(45°C、10分、60 rpm)を実施し、**GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array**

(Affymetrix) にアプライした。これを 45°C、16時間、60 rpmの条件でハイブリダイズして洗浄後、スキャンしてデータを得た。スキャンデータを GeneChip Command Console software (Affymetrix) で CEL files に変換して各遺伝子の発現量を得た。

4-2-8 データ処理

回腸の IgA 分泌量の解析

結果は平均値 ± 標準偏差で表した。Student's *t*-test で有意差検定を実施し、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

網羅的遺伝子発現解析結果のデータ処理

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析で得られた各遺伝子の発現量を、統計ソフトの R [80] と Bioconductor [81] を用いて処理した。まず各アレイのバラつきを補正するために distribution-free weighted method (DFW 法) で正規化 [82] したのち、主成分分析を実施して群間の発現プロファイルを比較した。次いで、正規化したデータを Rank Product 法 [83] を実施し、群間比較を行った。そこから発現変動が顕著な遺伝子として False Discovery Rate (FDR) が 0.05 未満であるものを抽出した。

Rank Product 法で抽出した遺伝子を生物学的機能の側面から解析するため、DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) と QuickGO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) を用いて Gene ontology (GO)

解析を実施した [84] [85]。その結果について、Benjamini-Hochberg 法 [86]で制御した FDR が、0.1 未満の機能を群間で有意に差があるものとした。次に、抽出した遺伝子の上流因子の活性を予測するために Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Inc., Redwood city, CA) を実施した。

4-3 結果

4-3-1 網羅的遺伝子発現解析に供するマウスの選別

L. plantarum AYA 死菌粉末を 5%含む餌 (Table 2-2) を、4 週間摂取させて解剖し、回腸の IgA 分泌量を測定した。その結果、AYA 摂取群は通常餌摂取群よりも IgA 分泌量が増加する傾向にあった ($p = 0.052$; Fig. 4-1)。回腸での IgA 分泌量が、各群の平均値に最も近い 3 匹ずつを選抜してパイエル板を摘出し、DNA マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。

4-3-2 *L. plantarum* AYA の摂取で発現が変動した遺伝子の抽出

網羅的遺伝子発現解析で得た各遺伝子の発現量を、DFW 法で正規化した後、主成分分析を実施した。その第一主成分と第二主成分の寄与率を合計すると 99.6%であり、全体を反映しうると判断し、群間の比較を行った。その結果、群間で発現プロファイルが 2 つに大別された (Fig. 4-2)。よって、*L. plantarum* AYA の摂取により、パイエル板での遺伝子発現が変動することが示唆された。発現が変動した遺伝子の抽出を目指し、解析を継続した。

DFW 法で正規化した遺伝子発現情報を用い、Rank Product 法で、群間比較を行った。その結果、*L. plantarum* AYA の摂取で、有意に発現が上昇する遺伝子として 124 個 (Table 4-1)、有意に発現が抑制される遺伝子として 144 個 (Table 4-2) を抽出した (FDR < 0.05)。

4-3-3 *L. plantarum* AYA の摂取で変動した機能の推定

次に発現が変動した遺伝子群に濃縮された機能の推定を行うため、Web ツール DAVID を用いて GO 解析を実施した。その際、modified Fisher's exact test 結果を Benjamini-Hochberg 法で制御した FDR [86] の基準を 0.1 に設定し、それ未満を *L. plantarum* AYA の摂取で有意に変動した機能と判断した。その結果、発現が亢進した遺伝子群に濃縮された機能として、炎症、免疫賦活がみられた (Table 4-3)。一方で、発現が減少した遺伝子群に濃縮された機能としては基準を満たすものは存在しなかった。よって、発現が亢進した免疫賦活と炎症に着目し、解析を継続した。

免疫賦活に関連する遺伝子では、B 細胞を活性化させて抗体分泌に寄与することが知られている immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)、immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)、immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b)、および immunoglobulin heavy constant region gamma 1 (G1m marker) の発現上昇がみられた (Table 4-1)。また、情報伝達物質であるケモカインの発現上昇を介し、T 細胞の活性化を誘導する遺伝子として知られている、chemokine (C-C motif) ligand 28、chemokine (C-X-C motif) ligand 11、および chemokine (C-C motif) ligand の発現も上昇していた (Table 4-1)。以上のように、*L. plantarum* AYA の摂取によってパイエル板で発現が上昇した遺伝子には、B 細胞や T 細胞の活性を高める遺伝子が含まれていた。

これらによって、免疫グロブリンを分泌する獲得免疫が高められ、結果として生体での免疫が賦活されていることが示唆された。

生体外から侵入した異物を非特異的に認識し、その排除に寄与するタンパク質として、補体が知られている。その活性化に寄与する **mannose-binding lectin (protein C) 2** の発現上昇が確認された (Table 4-1)。また、生体の組織が障害された際に、再生させるための反応として炎症が知られているが、この反応を誘導する **regenerating islet-derived 3 beta**、**regenerating islet-derived 3 gamma**、**serum amyloid A1 (Saa 1)**、**Saa 2** および **Saa 3** 遺伝子発現が上昇した (Table 4-1)。特に **SAA** タンパク質はパイエル板にて T 細胞を **Th17** 細胞への分化を誘導することが知られており [87]、**Th17** 細胞は **interleukin-17 (IL-17)** を分泌し、転写因子 **NFκβ** の誘導を介して **IL-6** などの炎症性サイトカインを誘導し、炎症反応を亢進する [88]。補体、炎症などの反応を含めた反応は、異物を非特異的に認識してその排除や再生に寄与しており、自然免疫と呼ばれている。このように、*L. plantarum* AYA の摂取で、自然免疫の賦活化も示唆された。

4-3-4 発現変動遺伝子の上流因子の推定

発現が亢進した遺伝子群 (Table 4-1) について IPA ソフトウェアによる解析を実施し、カスケード上流に存在する因子の活性化状態の推定を試みた。その結果、**IL-6**、**tumor necrosis factor-α (TNF)**、**dexamethasone**、**lipopolysaccharide (LPS)** の活性化が示

唆された (Table 4-4)。IL-6 の活性化は、第 3 章 (Fig. 3-7) の *ex vivo* 試験の結果を支持するデータであり、マウス体内においても *L. plantarum* AYA の摂取によってパイエル板樹状細胞で IL-6 の分泌が亢進されていることが示唆された。また、TNF はパイエル板の B 細胞から分泌され、濾胞樹状細胞の発達に重要な因子である [89]。パイエル板において、濾胞樹状細胞は、抗原・抗体・補体の免疫複合体を細胞表面に発現して未熟 B 細胞を活性化し、その増殖・成熟を誘導する [90] [91]。その結果として、獲得免疫に寄与している。よって、*L. plantarum* AYA の摂取によってパイエル板で TNF 分泌が亢進され、濾胞樹状細胞および B 細胞を活性化して獲得免疫の活性を高めている可能性が示された。

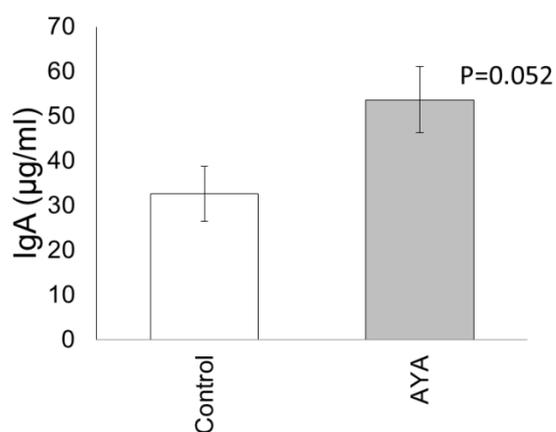


Fig. 4-1 *L. plantarum* AYA 摂取したマウスの回腸洗浄液中の IgA 含量

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取した BALB/c マウスから、回腸の洗浄液を採取し、ELISA 法によって IgA 量を測定した。n = 8 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。Student's *t*-test で有意差検定を実施した。

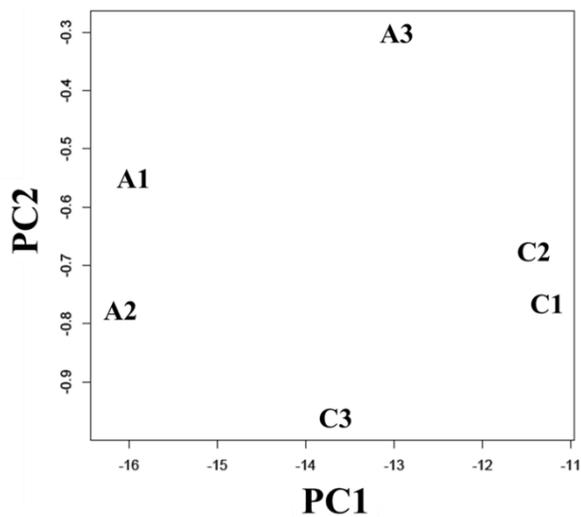


Fig. 4-2 網羅的遺伝子発現解析における遺伝子発現プロファイルの主成分分析

網羅的遺伝子発現解析で得られた各遺伝子の発現量を、DFW法で正規化した後に主成分分析を実施し、各マウスの第一主成分と第二主成分の値をプロットした。なお、第一主成分と第二主成分の寄与率は99.6%であった。C: 通常食摂取群、A: *L. plantarum* AYA混合餌摂取群。数値は個々のマウスの割付番号

Table 4-1 *L. plantarum* AYA の摂取でパイエル板における発現が
上昇した遺伝子

Probe_set_ID	Gene Title	FDR
1452535_at	Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	0.000
1450788_at	serum amyloid A 1	0.000
1422217_a_at	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	0.000
1419075_s_at	serum amyloid A 1	0.000
1418787_at	mannose-binding lectin (protein C) 2	0.000
1460423_x_at	predicted gene 5571 /// immunoglobulin kappa chain variable 1 (V1)	0.000
1420504_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	0.000
1448872_at	regenerating islet-derived 3 gamma	0.000
1427860_at	---	0.000
1424631_a_at	Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)	0.000
1434862_at	fucosyltransferase 2	0.000
1421424_a_at	alanyl (membrane) aminopeptidase	0.000
1423556_at	aldo-keto reductase family 1, member B7	0.000
1417074_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 10	0.000
1416297_s_at	regenerating islet-derived 3 beta	0.000
1426174_s_at	immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b) /// Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)	0.000
1448964_at	S100 calcium binding protein G small proline-rich protein 2A1 ///	0.000
1439016_x_at	small proline-rich protein 2A2 /// small proline-rich protein 2A3	0.000
1448573_a_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 10	0.000
1427837_at	Immunoglobulin kappa chain variable 32 (V32)	0.000
1420503_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	0.000
1428988_at	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	0.000
1417828_at	aquaporin 8	0.001
1424592_a_at	deoxyribonuclease I	0.001
1455892_x_at	---	0.001
1438910_a_at	stomatin	0.001
1449952_s_at	protease, serine, 30	0.001
1420577_at	activation-induced cytidine deaminase	0.001
1425247_a_at	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	0.001
1416380_at	Moloney leukemia virus 10	0.001
1425871_a_at	immunoglobulin kappa chain variable 28 (V28) /// immunoglobulin kappa chain variable 12-46	0.001
1419640_at	purine rich element binding protein B	0.001
1455577_at	chemokine (C-C motif) ligand 28	0.001
1456951_at	myeloblastosis oncogene-like 1	0.001
1449326_x_at	serum amyloid A 2	0.002
1425324_x_at	Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	0.002
1424266_s_at	carboxylesterase 1F	0.003
1429950_at	unc-5 homolog C (C. elegans)-like	0.004
1416746_at	H2A histone family, member X	0.004
1419097_a_at	stomatin	0.004
1416432_at	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	0.004
1419498_at	transmembrane and immunoglobulin domain containing 1	0.005
1450618_a_at	small proline-rich protein 2A1 /// small proline-rich protein 2A2	0.005

1416854_at	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	0.005
1429947_a_at	Z-DNA binding protein 1	0.005
1419697_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	0.006
1423933_a_at	RIKEN cDNA 1600029D21 gene	0.006
1428909_at	RIKEN cDNA A130040M12 gene	0.006
1435529_at	predicted gene 14446	0.006
1449018_at	profilin 1	0.007
1452463_x_at	predicted gene 10883	0.007
1428572_at	brain abundant, membrane attached signal protein 1	0.007
1449385_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	0.008
1422557_s_at	metallothionein 1	0.007
1426731_at	desmin	0.007
1434046_at	expressed sequence AA467197	0.009
1448894_at	aldo-keto reductase family 1, member B8	0.011
1449279_at	glutathione peroxidase 2	0.011
1423786_at	RIKEN cDNA 8430410A17 gene	0.011
1417300_at	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B	0.012
1436515_at	BTB and CNC homology 2	0.012
1421761_a_at	BarH-like homeobox 2	0.017
1441236_at	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	0.017
1428947_at	RIKEN cDNA 2010001M09 gene	0.018
1460681_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	0.018
1427348_at	zinc finger CCCH type containing 12A	0.019
1422029_at	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.020
1455531_at	major facilitator superfamily domain containing 4	0.021
1427512_a_at	laminin, alpha 3	0.021
1425704_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11	0.022
1419060_at	granzyme B	0.023
1417500_a_at	transglutaminase 2, C polypeptide	0.022
1446368_at	RIKEN cDNA 9130221J18 gene	0.023
1416246_a_at	coronin, actin binding protein 1A	0.024
1421818_at	B-cell leukemia/lymphoma 6	0.024
1449184_at	peptidoglycan recognition protein 1	0.025
1452081_a_at	RIKEN cDNA 9130017N09 gene	0.025
1423686_a_at	proline rich 13	0.025
1460682_s_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 /// carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 2	0.025
1419123_a_at	platelet-derived growth factor, C polypeptide	0.025
1427756_x_at	Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	0.025
1451441_at	RIKEN cDNA 2210415F13 gene predicted gene 10883 /// predicted gene 1420 /// predicted gene 7202 ///	0.025
1452417_x_at	immunoglobulin kappa chain, constant region /// immunoglobulin kappa chain, joining region, 1 /// immunoglobulin kappa chain variable 28 (V28)	0.025
1428942_at	metallothionein 2	0.025
1425606_at	solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8	0.025
1416683_at	plexin B2 RIKEN cDNA 4933402N22 gene /// predicted gene 5861 ///	0.025
1452794_x_at	predicted gene 6460 /// spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 1, pseudogene 1	0.026

1420913_at	solute carrier organic anion transporter family, member 2a1	0.027
1419386_at	mucin 13, epithelial transmembrane	0.028
1423916_s_at	myeloid leukemia factor 2	0.028
1435550_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	0.030
1460351_at	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	0.030
1451243_at	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	0.030
1417880_at	glucose-6-phosphatase, catalytic	0.031
1450494_x_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	0.030
1425675_s_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	0.031
1426025_s_at	lysosomal-associated protein transmembrane 5	0.034
1452871_at	nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)	0.034
1422123_s_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 2	0.034
1437893_at	phospholipase B1	0.034
1452532_x_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	0.034
AFFX-MURINE_b1_at	---	0.034
1434944_at	dystrophia myotonica-protein kinase	0.034
1424345_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	0.035
1418181_at	protein tyrosine phosphatase 4a3	0.035
1438941_x_at	adenosine monophosphate deaminase 2	0.037
1439965_at	solute carrier family 43, member 2	0.037
1437226_x_at	MARCKS-like 1	0.037
1450826_a_at	serum amyloid A 3	0.039
1455080_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	0.040
1456123_at	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12	0.040
1450624_at	betaine-homocysteine methyltransferase	0.042
1427711_a_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	0.042
1457253_at	tripartite motif-containing 40	0.043
1448290_at	regenerating islet-derived 3 beta	0.043
1416957_at	POU domain, class 2, associating factor 1	0.042
1448346_at	cofilin 1, non-muscle	0.043
1426511_at	sushi domain containing 2	0.043
1424689_at	protease, serine, 32	0.044
	predicted gene 10883 /// predicted gene 1420 /// predicted gene 7202 ///	
1427455_x_at	immunoglobulin kappa chain, constant region /// immunoglobulin kappa chain, joining region, 1 /// immunoglobulin kappa chain variable 28 (V28)	0.044
1427870_x_at	Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	0.047
1452767_at	ribosome binding protein 1	0.047
1433741_at	CD38 antigen	0.048
1418346_at	insulin-like 6	0.050

Table 4-2 *L. plantarum* AYA の摂取でパイエル板における発現が

抑制された遺伝子

Probe_set_ID	Gene Title	FDR
1454883_at	gasdermin C2	0.000
1430641_at	gasdermin C2 /// gasdermin C4	0.000
1436712_at	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	0.000
1448186_at	pancreatic lipase-related protein 2	0.000
1437438_x_at	pancreatic lipase-related protein 2	0.000
1423439_at	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	0.000
1438364_x_at	angiogenin, ribonuclease A family, member 4	0.000
1440832_at	angiogenin, ribonuclease A family, member 4	0.000
1427374_at	mucin 3, intestinal	0.000
1438612_a_at	colipase, pancreatic	0.000
1415805_at	colipase, pancreatic	0.000
1418979_at	aldo-keto reductase family 1, member C14	0.000
1426452_a_at	RAB30, member RAS oncogene family	0.000
1448568_a_at	solute carrier family 20, member 1	0.000
1418376_at	fibroblast growth factor 15	0.000
1419759_at	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	0.000
1422421_at	defensin, alpha, related sequence 12	0.000
1442537_at	---	0.000
1424962_at	transmembrane 4 superfamily member 4	0.001
1433581_at	RIKEN cDNA 1190002N15 gene	0.001
1419758_at	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	0.001
1418165_at	intelectin 1 (galactofuranose binding)	0.001
1429239_a_at	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4	0.002
1450276_a_at	scinderin	0.002
1424931_s_at	immunoglobulin lambda chain, constant region 1 /// immunoglobulin lambda c	0.002
1422242_at	defensin, alpha, related sequence 10	0.003
1449375_at	carboxylesterase 2A	0.003
1455454_at	aldo-keto reductase family 1, member C19	0.003
1423467_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B	0.004
1417952_at	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 6	0.004
1429240_at	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4	0.004
1419591_at	gasdermin C	0.004
1448595_a_at	brain expressed gene 1	0.004
1447774_x_at	RIKEN cDNA 5730469M10 gene	0.004
1450128_at	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	0.005
1418174_at	D site albumin promoter binding protein	0.005
1429146_at	small VCP/p97-interacting protein	0.006
1420249_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 6	0.006
1417430_at	cerebellar degeneration-related 2	0.007
1449277_at	chemokine (C-C motif) ligand 19	0.007
1453589_a_at	cadherin 11 pseudogene /// cadherin 11 pseudogene	0.007
1425952_a_at	glucagon	0.007
1417735_at	RIKEN cDNA 1810030J14 gene	0.007
1433582_at	RIKEN cDNA 1190002N15 gene	0.007
1450455_s_at	aldo-keto reductase family 1, member C12 /// aldo-keto reductase family 1, n	0.007
1434424_at	major facilitator superfamily domain containing 7B	0.008
1438211_s_at	D site albumin promoter binding protein	0.008
1452716_at	RIKEN cDNA 5730469M10 gene	0.009
1437863_at	butyrylcholinesterase	0.008
1419268_at	anterior gradient 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	0.008

1427347_s_at	tubulin, beta 2A	0.009
1420636_a_at	dual specificity phosphatase 12	0.008
1418931_at	regenerating islet-derived family, member 4	0.008
1451257_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	0.008
1421556_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3A	0.009
1452270_s_at	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	0.009
1424716_at	retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)	0.010
1423858_a_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	0.010
1429527_a_at	phospholipid scramblase 1	0.011
1460192_at	oxysterol binding protein-like 1A	0.010
1426195_a_at	cystatin C	0.010
1452016_at	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	0.010
1429040_at	cadherin 11 pseudogene	0.011
1427480_at	liver-expressed antimicrobial peptide 2	0.011
1452348_s_at	interferon activated gene 204 /// interferon activated gene 205 /// myeloid cell	0.011
1418672_at	aldo-keto reductase family 1, member C13	0.012
1416905_at	guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	0.012
1450109_s_at	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	0.012
1422934_x_at	defensin, alpha, related sequence 7	0.012
1416645_a_at	alpha fetoprotein	0.012
1438610_a_at	crystallin, zeta	0.012
1453181_x_at	phospholipid scramblase 1	0.014
1416067_at	interferon-related developmental regulator 1	0.014
1448575_at	interleukin 7 receptor	0.014
1448823_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	0.014
1452231_x_at	myeloid nuclear differentiation antigen like	0.014
1423298_at	adducin 3 (gamma)	0.015
1421041_s_at	predicted gene 3776 /// glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya) /// glutathione	0.014
1448136_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	0.014
1424715_at	retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)	0.015
1440691_at	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 6	0.015
1452942_at	transmembrane protein 65	0.016
1456174_x_at	N-myc downstream regulated gene 1	0.016
1422422_at	defensin, alpha, 4	0.016
1451310_a_at	cathepsin L	0.018
1427351_s_at	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	0.018
1424367_a_at	homer homolog 2 (Drosophila)	0.019
1418505_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	0.019
1416490_at	transmembrane emp24 protein transport domain containing 6	0.019
1415837_at	kallikrein 1	0.019
1436759_x_at	calponin 3, acidic	0.018
1455913_x_at	transthyretin	0.021
1427329_a_at	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	0.022
1417133_at	peripheral myelin protein 22	0.023
1448107_x_at	kallikrein 1	0.023
1422860_at	neurotensin	0.023
1454608_x_at	transthyretin	0.024
1440922_at	RIKEN cDNA 9130208D14 gene	0.023
1426990_at	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	0.025
1426161_at	---	0.025
1425742_a_at	TSC22 domain family, member 1	0.025
1438645_x_at	beta-site APP-cleaving enzyme 2	0.025
1455777_x_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	0.025
1436879_x_at	alpha fetoprotein	0.025
1418499_a_at	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 3	0.025

1455802_x_at	anterior gradient 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	0.026
1417214_at	RAB27b, member RAS oncogene family	0.027
1424811_at	camello-like 5	0.027
1436098_at	butyrylcholinesterase	0.027
1416194_at	cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1	0.027
1428228_at	phosphoglucomutase 3	0.028
1425682_a_at	Tp53rk binding protein	0.028
1424451_at	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B	0.028
1420598_x_at	defensin, alpha, related sequence 2	0.028
1417069_a_at	glia maturation factor, beta	0.030
1420941_at	regulator of G-protein signaling 5	0.032
1437323_a_at	islet amyloid polypeptide	0.033
1439617_s_at	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	0.034
1423452_at	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	0.033
1437327_x_at	enolase-phosphatase 1	0.034
1417419_at	cyclin D1	0.034
1416452_at	ornithine aminotransferase	0.038
1417539_at	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member 1	0.039
1416066_at	CD9 antigen	0.040
1432488_a_at	splicing factor 3a, subunit 3	0.041
1426259_at	pantothenate kinase 3	0.042
1434657_at	glutaminase	0.041
1426906_at	myeloid nuclear differentiation antigen like	0.041
1449478_at	matrix metalloproteinase 7	0.042
1419426_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 21A (serine) /// chemokine (C-C motif) ligand 2	0.042
1417329_at	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2	0.042
1419476_at	ADAM-like, decysin 1	0.042
1436836_x_at	calponin 3, acidic	0.042
1417266_at	chemokine (C-C motif) ligand 6	0.042
1424677_at	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 9	0.043
1417962_s_at	growth hormone receptor	0.046
1434866_x_at	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	0.048
1419622_at	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5	0.048
1416639_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5	0.048
1434456_at	RUN domain containing 3B	0.048
1419618_at	butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase 1 (gamma-butyrobetaine	0.048
1416368_at	glutathione S-transferase, alpha 4	0.048
1424542_at	S100 calcium binding protein A4	0.048
1430523_s_at	immunoglobulin lambda chain, variable 1	0.049

Table 4-3 *L. plantarum* AYA の摂取でパイエル板における発現
が上昇した遺伝子群に濃縮された機能

GO_ID	GO_Term	FDR-corrected <i>p</i> -value
GO:0002526	acute inflammatory response	6.41E-03
GO:0006953	acute-phase response	1.66E-02
GO:0006954	inflammatory response	1.70E-02
GO:0002250	adaptive immune response	2.59E-02
GO:0002460	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	2.59E-02
GO:0006952	defense response	2.66E-02
GO:0006955	immune response	4.84E-02
GO:0016064	immunoglobulin mediated immune response	4.79E-02
GO:0019724	B cell mediated immunity	4.81E-02
GO:0002455	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	6.87E-02
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	7.51E-02
GO:0009611	response to wounding	9.36E-02

Table 4-4 *L. plantarum* AYA の摂取で、パイエル板における発
 現が上昇した遺伝子群の、カスケード上流で発現
 が予想される因子

Upstream Regulator	p-value of overlap	Target molecules in dataset
lipopolysaccharide	1.89E-09	Abcc3, Aicda, Bcl6, Ccl20, Cd38, Ceacam1/Ceacam2, Coro1a, Cxcl11, Cyp1a1, Gzmb, Ifit1, Ighm, Igk-v28, Marcks11, Mbl2, Mt1e, Mt1h, Pfkfb3, Pglyrp1, Ppp1r16b, Reg3g, Saa1, Saa3, Slc9a3, Slco2a1, Sprr2g, Tgm2, Zc3h12a
dexamethasone	2.97E-08	Abcc3, Akr1b7, Bcl6, Bhmt, C3orf37, Ccl20, Ceacam1/Ceacam2, Cfl1, Cxcl11, Cyp1a1, G6pc, Gzmb, Ifit1, Ighm, Lama3, Laptm5, Mt1e, Mt1h, Reg3a, S100g, Saa1, Saa3, Slc9a3, Slco2a1, Stom, TGM2
IL6	1.14E-07	Abcc3, Anpep, Bcl6, Ccl20, Cyp1a1, G6pc, Gzmb, Ifit1, Ighm, Mt1e, Mt1h, Ptp4a3, Saa1, Saa3, Stom, Tgm2
TNF	3.48E-07	Abcc3, Aicda, Akr1b10, Anpep, Bcl6, Ccl20, Ccl28, Cd38, Cxcl11, Cyp1a1, Ifit1, Lama3, Marcks11, Mbl2, Mt1e, Mt1h, Plxnb2, Saa1, Saa3, Slc43a2, Slc5A8, Slc9a3, Tgm2, Zc3h12a

4-4 考察

本章では、*L. plantarum* AYA がもつ未知の免疫機能の推定を目指し、*L. plantarum* AYA を 4 週間摂取したマウスのパイエル板の網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、*L. plantarum* AYA を摂取すると、パイエル板において、炎症、補体の誘導を介した自然免疫と、抗体の分泌誘導を介した獲得免疫の活性をともに高め、その結果生体の免疫を賦活していることが示唆された。

これまでに IgA 分泌機構に関するパイエル板の遺伝子発現解析は、*Tgf β* [56] [57] [58]、*April*、*Baff* [59] [60] [61]、*inos* [62]、*Il6* [63]、*Aldh1a1*、*Aldh1a2* [64] [65] など既知の情報伝達物質をターゲットとした定量 PCR が実施されてきた。しかし、網羅的発現解析は実施されていなかった。そこで、本章ではニュートリゲノミクスの考え方を取り入れ、既知の因子以外にもターゲットを広げて網羅的な解析を実施し、機能推定することを目指した。その結果、*L. plantarum* AYA が有する免疫賦活に関連する複数の機能を推定することができた。本検討はあくまで遺伝子発現解析であるため、今後はタンパク質の発現や細胞の分化を確認する試験を行っていく必要がある。本解析によって示唆された未知機能の詳細な検討によって、IgA 分泌亢進以外の免疫機能を高める機能性食品素材として実用化を目指した開発も可能となる。

本章では、DNA マイクロアレイを用いて実施した網羅的遺伝子発現解析によって得られる遺伝子発現情報を、正規化した後に群

間比較を行い、発現量に変動した遺伝子を抽出した。なお、解析には DFW 法による正規化を実施した後に Rank Product 法による群間比較を実施した。これまでに網羅的遺伝子発現解析の生データを DFW 法と Rank Product 法で解析すると、群間で発現量が異なる遺伝子を高感度にかつ特異的に同定できることが報告されている [92]。よって、本試験で抽出した発現変動遺伝子群の信頼度は高いと考えている。

また、発現が有意に変動した遺伝子からその上流制御因子の発現予測解析を実施した結果、IL-6、TNF、dexamethasone、LPS の活性化が示唆された (Table 4-4)。これらのうち、内因性である *Ii6* と *Tnf* は、*L. plantarum* AYA を摂取しても、パイエル板の転写活性が亢進していなかった (Table 4-1)。一方、3 章で *L. plantarum* AYA とマウスパイエル板を培養すると、*Ii6* の発現が亢進することを示している (Fig. 3-6)。以上より、*L. plantarum* AYA を摂取した直後に *Ii6* の転写および IL-6 の分泌が亢進されるが、その転写亢進はすぐ元に戻る一過性の反応であると考えられる。網羅的遺伝子発現解析を実施した際は、*L. plantarum* AYA を摂取した直後に解剖しなかったため、転写活性の亢進を検知できなかったと考えられる。また、*Tnf* も同様に一時的な反応である可能性もあるが、転写活性に影響を及ぼさずにタンパク質の活性が高くなっているという可能性もあると考えている。

また、カスケード上流の推測で、乳酸菌に含まれおらずかつマウスの内因性物質ではない dexamethasone と LPS による活性化

が示唆された。**Dexamethasone** は、ステロイド系抗炎症薬である [93]。**Dexamethasone** 投与時と似たカスケード下流の反応が生じるということは、*L. plantarum* AYA 摂取によって抗炎症作用が発揮されている可能性がある。また、**LPS** はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分で、マクロファージ細胞株の活性を高める効果、イヌのアトピー性皮膚炎を改善する効果 [94]、およびサルモネラ菌 (*Salmonella enterica*) 感染に対する抵抗性を高める効果 [95] 等、免疫を賦活する機能を有することが報告されている。*L. plantarum* AYA を摂取すると、**LPS** を摂取した時と同様、マクロファージの活性化を通して免疫を賦活している可能性が考えられる。しかし、マクロファージの検討は行っていないため、今後の課題である。

本章では、*L. plantarum* AYA 摂取によって得られる効果の検討を網羅的に行った。その結果、IgA 分泌亢進効果のみでなく、炎症、補体の誘導を介した自然免疫と、抗体の分泌誘導を介した獲得免疫の活性を高めることが示唆された。そこで次章では、実際にウイルスを感染させたマウスを用い、*L. plantarum* AYA を摂取した際の抗感染効果を評価した。

第 5 章

L. plantarum AYA の

インフルエンザウイルス感染試験

5-1 序

前章までに、*L. plantarum* AYA の死菌粉末が、粘膜組織の IgA 分泌の亢進等、様々な免疫反応を賦活する可能性を示した。この結果、ウイルス等の外敵を中和する効果が期待される。そこで本章では、インフルエンザウイルスを用いてその効果を評価した。

インフルエンザウイルスは、表面上に存在する抗原性糖タンパク質である hemagglutinin が頻繁に変異 [96] [97] [98] [99] し、新しい抗原性を獲得すると、その感染が急速に拡大する。よって、感染に対する防御力を高めることが必要である。そのためには、新しい抗原を中和できるような、交叉性を有する免疫を賦活することが有効と考えられる。分泌型 IgA 抗体は粘膜表面に分泌され、管腔に存在するウイルス等との交叉性が非常に高い。そこで、IgA 分泌を亢進する *L. pentosus* ONRIC b0240 [36]、および *L. plantarum* YU [37] 等の死菌を用い、インフルエンザの感染に対する研究が行われ、粘膜組織の分泌型 IgA を増やすことが、インフルエンザの罹病予防、または罹病時の症状緩和に大きく寄与することが示された。

これらの菌株を用いて新たな機能性を有する食品を開発するには、作用機序も明らかにする必要がある。しかし、いずれの菌株においても IgA 分泌を亢進する詳細な作用機序は明らかにされていない。一方、本研究によって詳細な作用機序を示した *L. plantarum* AYA についてインフルエンザ感染に対する効果が確認

されれば、機能と作用機序の両方が明らかな乳酸菌株が得られるため、機能性を有する新しい食品を開発するという面からも、非常に価値が高い。

そこで本章では、*L. plantarum* AYA を摂取したマウスにインフルエンザウイルスを感染させ、その症状を評価した。その結果、マウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させても、通常食摂取群と比較して生存率が高まり、罹病時の症状を緩和し得ることを明らかにした。

5-2 材料と方法

5-2-1 動物

第 2 章に記載した BALB/c マウスを使用した。インフルエンザウイルスの感染量決定試験は 10 週齢、感染試験には 6 週齢のを用いた。なお、インフルエンザウイルスを感染させたマウスは国立感染症研究所のバイオセーフティーレベル 2 管理下で飼育した。なお動物実験は、「国立感染症研究所動物実験委員会」の承認を得た後に、「国立感染症研究所動物実験実施規程」に従い、実施した。

5-2-2 乳酸菌粉末の作製

第 2 章に記載した方法で *L. plantarum* AYA の粉末を作製した。

5-2-3 乳酸菌粉末添加飼料の調製

第 2 章に記載した方法で、*L. plantarum* AYA を 5% 添加した飼料を調製した。配合は Table 2-2 に示した。

5-2-4 インフルエンザウイルスの準備

感染に使用するウイルス量を決定するため、インフルエンザウイルス X-31 株（以下 X31 株）を増殖させて回収した。具体的には、鶏の有精卵を産卵後約 10 日間、37°C で育成してから殻に穴をあけ、生菌の X31 株（国立感染症研究所保有菌株）を漿尿膜に

注入した。接着剤にて殻の穴を塞いで 37°C、4 日間で育成し、漿尿液を採取した。これを、50% (W/W)、45% (W/W)、40% (W/W)、35% (W/W)、30% (W/W)、20% (W/W) の順に重層したショ糖溶液に添加し、100,000 x g、90 分、4°C で超遠心を実施した。その結果、X31 株が存在するショ糖濃度 40% (W/W) の画分を分離して上清を除去し、BSA を 0.2% 加えた MEM 培地（以下、ウイルス希釈液）に懸濁し、ウイルスの原液とした。以上のように必要量の X31 株を得て、使用するまで -80°C で保管した。

5-2-5 ウイルスタイターの測定

X31 株の感染力の指標である、ウイルスタイターを測定した。その評価には、Madin-Darby canine kidney cell（MDCK 細胞）を使用した。

FCS を 10% 混合させた MEM 培地（10% FCS-MEM 培地）に MDCK 細胞を加えてコンフルエントになるまで培養した。その後、培地を廃棄して 0.05% trypsin/PBS-EDTA 溶液を加えて 37°C で 10～15 分間処理し、MDCK 細胞を剥離した。これを FCS 無しの MEM 培地で回収して洗浄後、ウイルス希釈液で 8×10^4 cells/100 μ l に調製した。これを 96 穴のプレートに 100 μ l ずつ加え、加湿条件下のもと、37°C、0.5% の CO₂ 環境下で 1 晩培養した。

翌日に上清を廃棄し、原液に対して $10^{-5.0}$ 、 $10^{-5.5}$ 、 $10^{-6.0}$ 、 $10^{-6.5}$ 、 $10^{-7.0}$ 、 $10^{-7.5}$ 、 $10^{-8.0}$ 、 $10^{-8.5}$ 、 $10^{-9.0}$ となるようウイルス懸濁液で濃度を調製した X31 株を 100 μ l/well ずつ加え、加湿条件下のもと、

34°C、0.5%のCO₂環境下で4日間培養した。MDCK細胞は付着細胞であるが、ウイルスに感染すると細胞がはがれるため、感染の程度を目視で確認することが可能になる。コンフルエントになるよう培養したMDCK細胞が、4ウエル中2ウエルが感染する濃度である tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) を、ベーレンス・ケルバーの式を用いて算出した。なお、ベーレンス・ケルバーの式は、求める希釈濃度を10^x、試験に供する希釈液うち、最も濃いものを10^A、希釈率を10^Bとすると、下記の計算式になる。ただし、非感染であったウエルを更に希釈した濃度で感染が確認された、いわゆるジャンプして感染したウエルは非感染とした。

$$X = \log 10^A - \left(\text{希釈時の} \frac{\text{感染数}}{\text{検体数}} \text{の総和} - 0.5 \right) \times \log 10^B$$

5-2-6 X31株の感染

まず、PBSで12倍に希釈したイソフルラン（和光純薬）200 µlを、マウスの腹腔内に注射し、麻酔した。そしてX31株の原液を希釈し、20 µlあたりにTCID₅₀の4.5×10⁶倍、4.5×10⁵倍、4.5×10⁴倍、4.5×10³倍となるX31株懸濁液を準備し、これを20 µl/匹となるよう経鼻感染させた。

5-2-7 安楽死の指標（人道的エンドポイント）の設定と体重の測定

X31 株に感染したマウスの体重を測定するに先だち、動物愛護の観点から安楽死の指標を設定した。日本学術会議が 2006 年 6 月 1 日に発行した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき、安楽死の指標を感染時の体重から 20%減とした。感染日を含め、11 日間マウスの体重を測定し、指標に達した際は安楽死処分して死亡マウスとし、指標に達しなかったマウスを生存マウスとした。

5-2-8 回腸と空腸の洗浄液採取法

第 2 章に記載した方法で実施した。

5-2-9 肺洗浄液の採取

肺洗浄液は、Waki らの方法 [34] に準じて採取した。具体的には、50 ml の PBS に cOmplete, EDTA-free (Roche Diagnostics) のタブレット 1 粒を溶解させ、これをマウスの気道から 1 ml 注入して肺を満たし、3 回ピペッティングして回収した。これを 9200 ×g、30 min、4°C で遠心し、その上清を肺洗浄液とした。

5-2-10 IgA、IgG1、IgG2a の定量

ELISA 法にて測定した。ELISA 法は mouse IgA ELISA quantitation set (Bethyl Laboratories)、mouse IgG1 ELISA quantitation set (Bethyl Laboratories) および mouse IgG2a ELISA quantitation set (Bethyl Laboratories) を使用し、キット

付属のプロトコールに従って実施した。具体的には、第 2 章の IgA の定量と同様に実施した。

5-2-11 X31 株特異的な IgA 測定

X31 株特異的な IgA を ELISA 法で測定した。具体的には、不活性化した X31 株を国立感染症研究所から供与頂き、PBS に 5 µg/ml で溶解させ、これを 100 µl/ウエル添加して室温 2 時間静置にてコーティングし、1 次抗体の代わりとした。それ以外は、第 2 章の IgA の定量と同様に実施した。

5-2-12 ウイルスタイター測定

X31 株の感染 3 日後に解剖したマウスの肺洗浄液について、ウイルスタイターを測定した。本章 5-2-5 に記載したウイルスタイター測定法に準じて実施した。ただし、X31 株希釈液を肺洗浄液に置き換え、原液の $10^{-3.0}$, $10^{-4.0}$, $10^{-5.0}$, $10^{-6.0}$, $10^{-7.0}$, $10^{-8.0}$ に希釈した。その他は本章 5-2-5 と同様の方法で実施した。

5-2-13 データ処理

結果を平均値 ± 標準偏差で表した。X31 株を感染させたマウスの生存率の群間比較は Kaplan-Meier 法による生存率曲線の作成を実施し、log-rank test で有意差検定を実施した。その他の二群間比較は Student's *t*-test で有意差検定を実施した。いずれも、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

5-3 結果

5-3-1 X31 株の感染量の決定

本試験で使用する X31 株の感染力を測定した。MDCK 細胞を培養し、国立感染症研究所で保有していた X31 株の原液を希釈して加え、感染したウェル数を計測した (Table 5-1)。ベーレンス・ケルバーの式を用いて TCID₅₀ を計算した結果、X31 株の原液の感染力の強さは $10^{7.6} \times \text{TCID}_{50}/20 \mu\text{l}$ であった。

次に、通常食を摂取した全てのマウスが安楽死の指標に至る X31 株の最低濃度の決定を目指した。10 週齢のマウスを 20 匹購入して 1 週間の馴化を行い、そこから餌を通常餌 (Table 2-2) に切り替えた。マウスの平均体重が同じになるよう 5 匹/群で 4 群に分け、 $4.5 \times 10^3 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ 、 $4.5 \times 10^4 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ 、 $4.5 \times 10^5 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ 、 $4.5 \times 10^6 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ に相当する X31 株を経鼻感染させ、10 日間の体重測定を実施した。その結果、 $4.5 \times 10^5 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ 、および $4.5 \times 10^6 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ を感染させたときにすべてのマウスが安楽死の指標に達した。一方、 $4.5 \times 10^3 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ 、 $4.5 \times 10^4 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ の感染量では、5 匹中 1 匹が試験終了時に生存していた (Table 5-2)。本試験より、全てのマウスが安楽死の指標に達する X31 株の最低感染濃度が $4.5 \times 10^5 \times \text{TCID}_{50}/\text{匹}$ であることを明らかとし、これを X31 株感染試験実施時の感染濃度とした。

5-3-2 X31 株感染試験

プロトコールの全体像を Fig. 5-1 に記載する。具体的には、6 週齢のマウスを 40 匹購入して 1 週間馴化し、通常餌を摂取する群、および、5% *L. plantarum* AYA 死菌粉末混合餌を摂取する群 (Table2-2) に分け、各群 20 匹ずつ 4 週間飼育した。そこで各群 5 匹ずつ解剖し、空腸・回腸へ分泌された IgA、肺へ分泌された IgA、X31 株特異的 IgA、IgG1、および IgG2a を測定した。その結果、空腸と回腸において、*L. plantarum* AYA を摂取した群の IgA 分泌量が有意に増加した (Fig. 5-2 : 空腸 ; $p < 0.01$ 、回腸 ; $p < 0.05$)。また肺において、*L. plantarum* AYA を摂取した群の IgA 分泌量は有意に増加した (Fig. 5-3、 $p < 0.05$) が、ウイルス特異的 IgA は両群とも検出限界以下であり (データ無し)、IgG1 と IgG2a の分泌量は、群間に有意な差が認められなかった (Fig. 5-4)。

残りの 15 匹/群に対し、5-3-1 で決定した $4.5 \times 10^5 \times \text{TCID}_{50}$ /匹に調製した X31 株を感染させた。感染 3 日後に 5 匹/群を解剖して肺洗浄液を採取し、ウイルスタイターを測定した結果、通常食摂取群は $10^{6.0} \times \text{TCID}_{50}$ /匹、*L. plantarum* AYA 摂取群は $10^{5.3} \times \text{TCID}_{50}$ /匹であった (Fig. 5-5、 $p = 0.11$)。肺洗浄液のウイルスタイターに有意な差はなかったが、*L. plantarum* AYA 摂取群の方が低めであり、肺での X31 株の増殖に影響を与えている可能性がある。

残りの 10 匹/群について、感染 10 日後まで体重測定を実施した。その結果、感染 1 日後、2 日後、3 日後において *L. plantarum*

AYA 摂取群の体重減少が有意に抑制された (Fig. 5-6、感染 1 日後 : $p < 0.05$ 、感染 2 日後と感染 3 日後 : $p < 0.01$)。そして通常食摂取群は感染後 4 日後にすべてのマウスが安楽死の指標まで体重低下したのに対し、*L. plantarum* AYA 摂取群の半数は体重低下が 20% 未満に抑えられ、*L. plantarum* AYA 摂取群の生存率が有意に高かった (Fig. 5-7: $p < 0.01$)。

Table 5-1 X31 株との共培養で MDCK 細胞が感染したウエル数

X31株原液の希釈濃度	ウエル数	
	感染	非感染
$10^{-5.0}$	4	0
$10^{-5.5}$	4	0
$10^{-6.0}$	4	0
$10^{-6.5}$	4	0
$10^{-7.0}$	3	1
$10^{-7.5}$	3	1
$10^{-8.0}$	1	3
$10^{-8.5}$	0	4
$10^{-9.0}$	0	4

Table 5-2 X31 株の濃度を調整し、感染させたときのマウスの体重推移

4.5x10 ⁶ TCID ₅₀	感染時	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 (日)
A	100	100.5	88.4	81.4	75.9	-	-	-	-	-	-
B	100	101.1	89.8	83.0	77.3	-	-	-	-	-	-
C	100	102.7	90.4	82.9	75.9	-	-	-	-	-	-
D	100	101.5	86.2	80.6	73.5	-	-	-	-	-	-
E	100	101.1	89.6	84.1	78.6	-	-	-	-	-	-

4.5x10 ⁵ TCID ₅₀	感染時	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 (日)
A	100	104.9	91.8	84.8	77.7	-	-	-	-	-	-
B	100	108.0	94.3	85.2	78.4	-	-	-	-	-	-
C	100	101.0	88.3	79.6	-	-	-	-	-	-	-
D	100	104.2	92.6	84.2	77.4	-	-	-	-	-	-
E	100	103.8	93.5	84.3	77.3	-	-	-	-	-	-
F	100	106.0	91.0	84.1	75.1	-	-	-	-	-	-

4.5x10 ⁴ TCID ₅₀	感染時	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 (日)
A	100	101.0	88.6	82.9	80.3	81.9	79.8	-	-	-	-
B	100	100.5	96.2	84.9	78.5	-	-	-	-	-	-
C	100	101.1	94.6	86.5	82.7	82.7	83.8	82.2	88.1	90.3	90.3
D	100	103.2	93.0	84.9	77.4	-	-	-	-	-	-
E	100	103.6	94.9	83.2	79.1	-	-	-	-	-	-

4.5x10 ³ TCID ₅₀	感染時	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 (日)
A	100	105.0	101.0	90.5	84.4	88.4	93.5	95.0	97.5	96.5	96.5
B	100	104.1	96.4	87.1	78.9	-	-	-	-	-	-
C	100	105.8	98.9	88.4	78.8	-	-	-	-	-	-
D	100	103.9	93.9	87.2	79.3	-	-	-	-	-	-
E	100	103.3	98.4	88.0	80.4	78.8	-	-	-	-	-

(注 1) 感染時の体重を 100 とした時の、相対体重 (%)

(注 2) 相対体重が 80%を切ると、安楽死処分実施

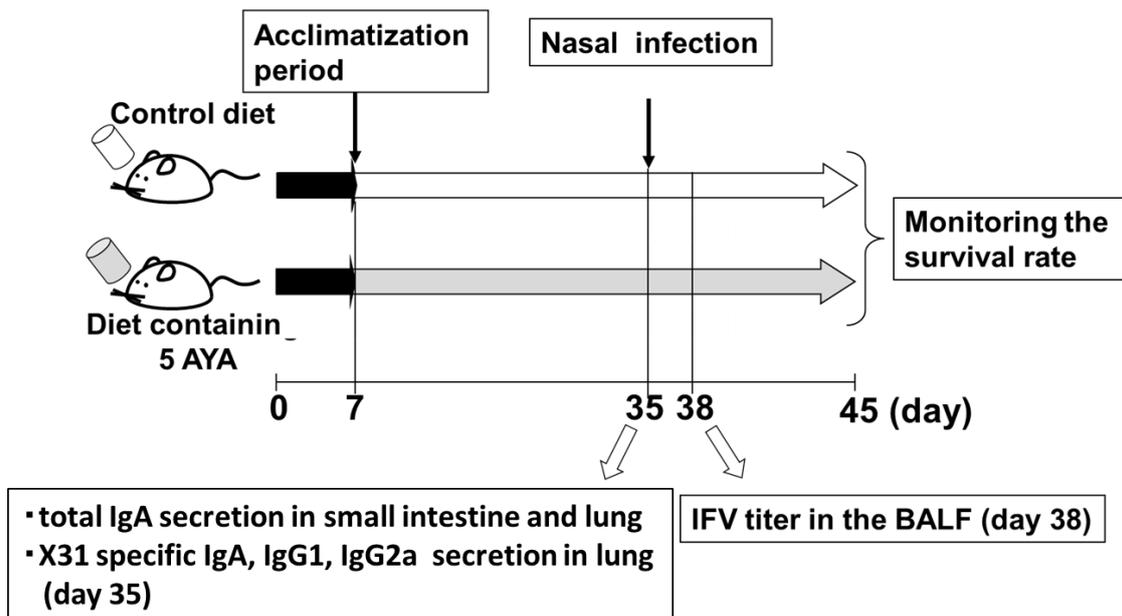


Fig. 5-1 X31 株感染試験のプロトコール

6 週 齢 の マウ ス を 40 匹 購 入 し、7 日 間 の 馴 化 後 に 通 常 餌 を 摂 取 する 群 (Control diet) と 5% *L. plantarum* AYA 混 合 餌 を 摂 取 する 群 (Diet containin_5AYA) に わ け て 20 匹 づ つ 4 週 間 飼 育 し た。飼 育 開 始 35 日 後 に 5 匹 / 群 を 解 剖 し、空 腸・回 腸 へ 分 泌 さ れ た IgA の 測 定、お よ び 肺 へ 分 泌 さ れ た IgA、X31 株 特 異 的 IgA、IgG1、お よ び IgG2a を 測 定 し た。残 り の 15 匹 / 群 に 対 し、 $4.5 \times 10^5 \times \text{TCID}_{50}$ /匹 の X31 株 を 経 鼻 感 染 し た。飼 育 開 始 38 日 後 に 5 匹 / 群 を 解 剖 し て 肺 で の ウ イ ル ス タ イ ター を 測 定 し、残 り の 10 匹 / 群 は、X31 株 感 染 後 か ら 10 日 後 ま で 体 重 を 測 定 し、そ の 推 移 を 群 間 で 比 較 し た。

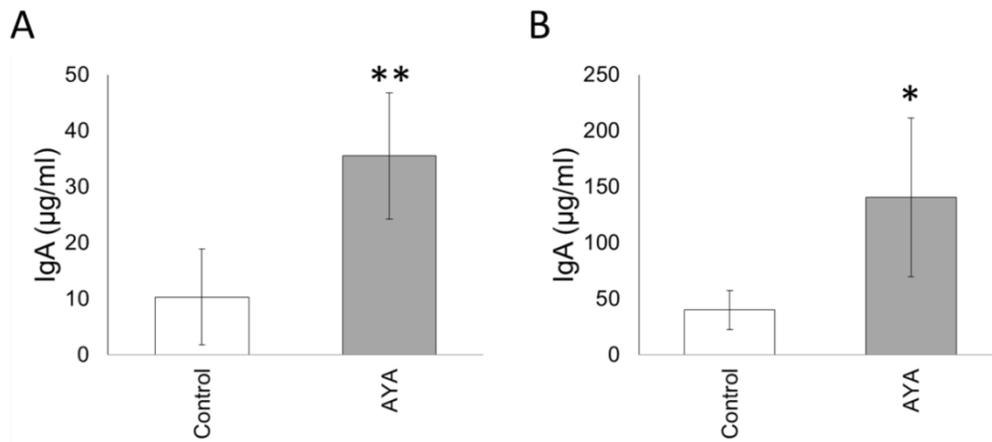


Fig. 5-2 *L. plantarum* AYA 摂取マウスにおける、空腸と回腸の洗浄液中の IgA 濃度

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取したマウスから、空腸 (A) および回腸 (B) の洗浄液を採取し、ELISA 法によって IgA の濃度を測定した。n = 5 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。Student's *t*-test で有意差検定を実施した。** $p < 0.01$ vs Control、* $p < 0.05$ vs Control

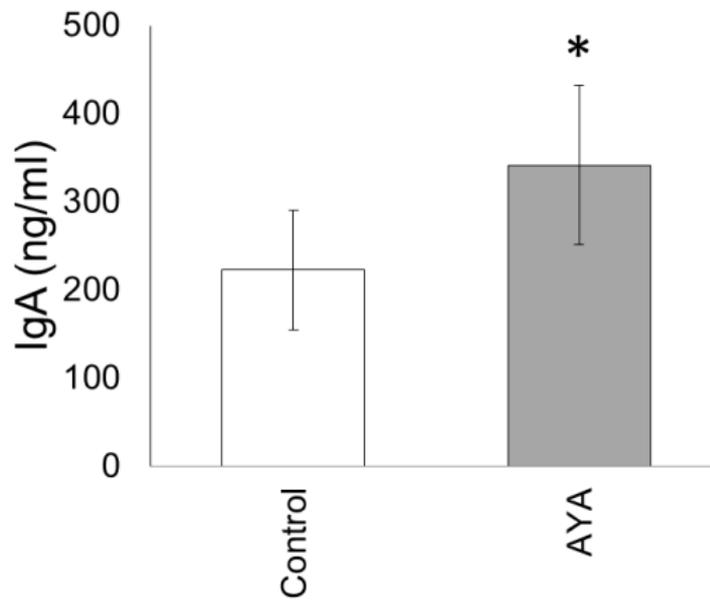


Fig. 5-3 *L. plantarum* AYA 摂取マウスにおける、肺洗浄液中の IgA 濃度

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取したマウスから、肺の洗浄液を採取し、ELISA 法によって IgA 濃度を測定した。n = 5 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。Student's *t*-test で有意差検定を実施した。* $p < 0.05$ vs Control

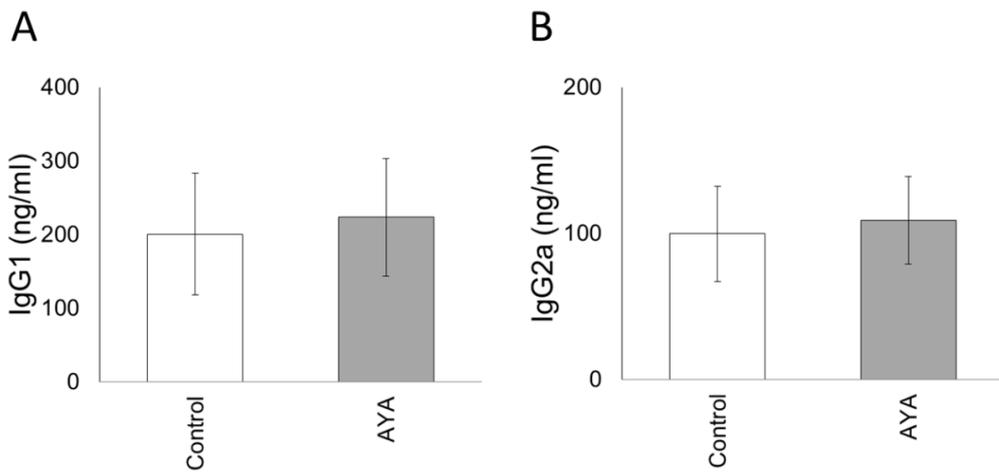


Fig. 5-4 *L. plantarum* AYA 摂取マウスにおける肺洗浄液中の IgG1 と IgG2a 濃度

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取したマウスから、肺洗浄液を採取し、ELISA 法によって IgG1 (A) と IgG2a (B) の濃度を測定した。n = 5 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。Student's *t*-test で有意差検定を実施した。

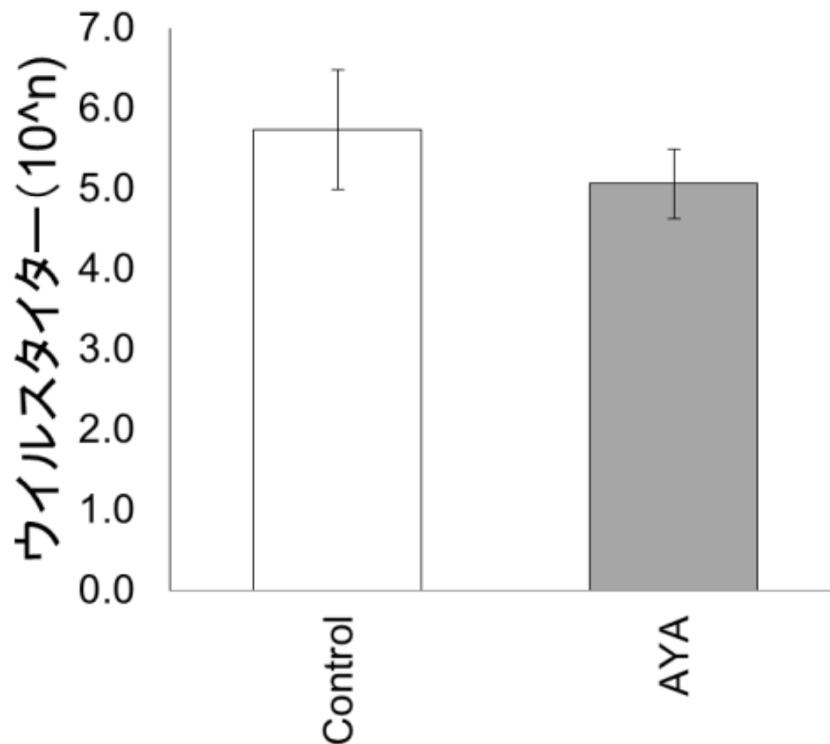


Fig. 5-5 X31 株に感染 3 させたマウスの、肺洗浄液中のウイルスタイター

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取したマウスに、X31 株を 1 匹あたり 4.5×10^5 xTCID₅₀ 感染させ、3 日後に肺洗浄液を採取し、MDCK 細胞と共培養し、その結果からケルバーの式を用いてウイルスタイターを算出した。n = 5 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。Student's *t*-test で有意差検定を実施した。

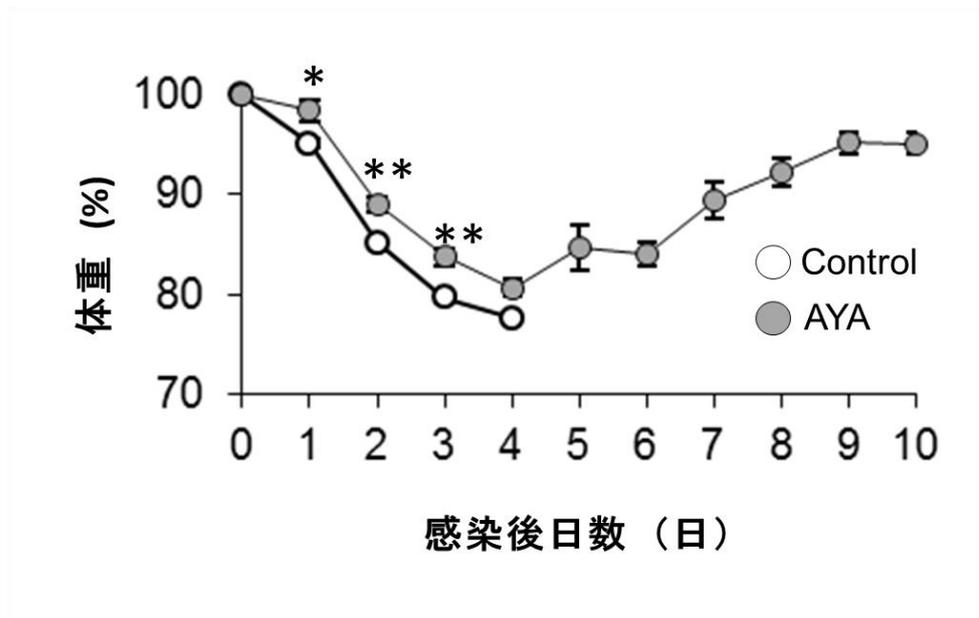


Fig. 5-6 X31 株感染後の体重の推移

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取したマウスに、1 匹あたり X31 株を $4.5 \times 10^5 \times \text{TCID}_{50}$ 感染させた。各マウスについて感染当日から 10 日後までの体重を測定し、感染当日の体重を 100 とした時の相対体重 (%) をグラフにした。なお、安楽死の指標は体重 20% 減に設定した。n = 10 で実施し、平均値 \pm 標準偏差を示した。Student's *t*-test で有意差検定を実施した。** $p < 0.01$ vs Control、* $p < 0.05$ vs Control

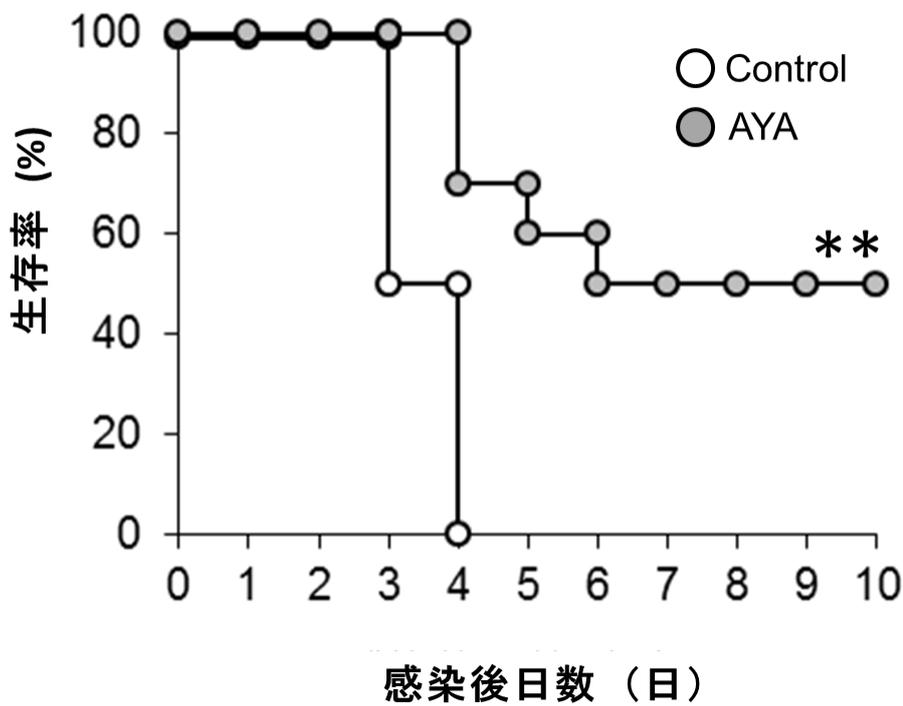


Fig. 5-7 X31 株を感染させたマウスの生存率

通常餌 (Control) または *L. plantarum* AYA 混合餌 (AYA, Table 2-2) を 4 週間摂取したマウスに、X31 株を 1 匹あたり 4.5×10^5 xTCID₅₀ 感染させ、感染日から感染 10 日後までの生存率を集計した。なお、安楽死の指標を体重 20% 減に設定した。n = 10 で実施し、平均値 ± 標準偏差を示した。Kaplan-Meier 法による生存率曲線の作成を実施し、log-rank test で有意差検定を実施した。

** $p < 0.01$ vs Control

5-4 考察

本章において、*L. plantarum* AYA を摂取したマウスが X31 株に感染したときの症状を評価した。その結果、*L. plantarum* AYA を摂取すると、X31 株を致死量感染させた際の体重減少が有意に抑えられ、生存率が有意に高くなった。*L. plantarum* AYA を 4 週間摂取させた群では X31 株経鼻感染時に空腸、回腸および肺で IgA 分泌が有意に亢進していた。以上のように、*L. plantarum* AYA を摂取すると、粘膜組織での IgA 分泌が亢進され、その結果インフルエンザに罹病した際の症状が緩和されることが示唆された。

近年、インフルエンザを予防する乳酸菌株の研究結果が報告されている。死菌として摂取すると IgA 分泌を亢進し、インフルエンザの症状を緩和する菌株として、*L. pentosus* ONRIC b0240 [36]、および *L. plantarum* YU [37] 等が報告されている。このような乳酸菌の死菌の研究では、パイエル板初代培養細胞と乳酸菌を培養する *ex vivo* 細胞試験で、IgA 分泌が亢進されることを示している [38] [39] [40] [41]。また、パイエル板の遺伝子発現解析を行い、*Ii6*、*Ii12*、*Ifna* 等に変動があるという報告もある [39] [42] [29]。しかし、乳酸菌株を認識する細胞とそのレセプター、その時に分泌されるサイトカイン等の情報伝達物質、それがパイエル板の免疫細胞に対してどう作用するかという詳細な作用機序は報告されていなかった。本研究は、それらの詳細な作用機序を明らかに

した乳酸菌株に、インフルエンザ罹病時の症状を緩和する効果があることを初めて示した。

第 4 章までに、*L. plantarum* AYA の死菌粉末を摂取すると、生体において IgA 分泌亢進を中心とした免疫反応が賦活されることを明らかにした。そこで、本章ではその具体的な効果の一つとして、インフルエンザ罹病時の症状を緩和することを明らかにした。*L. plantarum* AYA を機能性食品として開発した際には、インフルエンザウイルス等の感染を予防する効果をうたうことが可能になると考えている。

本章にて、*L. plantarum* AYA を摂取すると肺での IgA 分泌も亢進されることを示したが、その作用機序は明らかになっていない。以下にその作用機序の仮説を述べる。経口摂取した *L. plantarum* AYA は、腸管の M 細胞からパイエル板に取り込まれ [5] [6]、IgA 陽性 B 細胞の比率を高め、樹状細胞からの IL-6 分泌を、亢進する。IL-6 の存在により、IgA 陽性 B 細胞は分化しやすい状態になり、血液循環を介して免疫応答の実効組織である肺に移行し、形質細胞への分化が亢進されていると考えている。パイエル板で産生された IgA 陽性 B 細胞には、ホーミングに必要な $\alpha 4\beta 7$ 、 $\alpha 4\beta 1$ 、cc chemokine receptor 9 (CCR9)、CCR10 が発現しており、肺の近くに存在する気道粘膜には peripheral node addressin (PNAd)/vascular cell adhesion molecule (VCAM1) と cc chemokine Ligand 28 (CCL28) が発現している [100]。そして、 $\alpha 4\beta 1$ と VCAM1 が結合すること [100] [101]、および CCR10 と

CCL28 が結合することも報告されている [102]。よって、血液循環に入った IgA 陽性 B 細胞は、これらの分子の結合によって気道粘膜にホーミングし、IgA を分泌する形質細胞に分化し、IgA 分泌を亢進していると考えている。

一方で、パイエル板で分泌された IgA 陽性 B 細胞は、主に腸管にホーミングすることが知られている [100]。本研究においても、*L. plantarum* AYA を摂取したマウスの空腸と回腸の洗浄液で、IgA 分泌が亢進していることから、腸管へホーミングしているものと考えている。但し、パイエル板で IgA 陽性 B 細胞が増えることによって、肺へとホーミングされる細胞も増え、結果として、肺において IgA 分泌亢進が観察されたものと推測している。これらの機序の詳細はさらなる研究によって証明する必要があるだろう。

以上のように、本節では *L. plantarum* AYA を摂取することで気道粘膜での IgA 分泌を亢進させ、その効果によってインフルエンザに罹病してもその症状を緩和させ得る可能性があることを明らかにした。そして、その作用機序としては、*L. plantarum* AYA によってパイエル板で IgA 陽性 B 細胞の比率が高まり、樹状細胞からの IL-6 によって分化しやすい状態になった IgA 陽性 B 細胞が増え、それらの一部が気道へホーミングする可能性が考えられた。

第 6 章 総合討論

食の機能は、ヒトの細胞の構成成分やエネルギー源になる機能（栄養機能）、嗅覚と味覚に作用する機能（感覚機能）、生体を調節する機能（生体調節機能）に分類される。本研究では食の生体調節機能に着目し、研究開始当初に報告が少なかった免疫力を向上させる食品素材を開発し、健康で豊かな生活づくりへ貢献することを目的とした。その候補として、乳酸菌 *L. plantarum* AYA を見出した。まず、本研究の結果の概要を以下に述べる。

パンの発酵種由来の乳酸菌株 *L. plantarum* AYA は、その死菌粉末をマウスに経口摂取させると、腸管パイエル板において IgA 陽性 B 細胞の存在比率が有意に高くなる。さらに、当該乳酸菌株はパイエル板樹状細胞に認識され、樹状細胞からのサイトカイン IL-6 分泌を亢進し、IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を亢進する。また、*L. plantarum* AYA が樹状細胞の TLR-2 で認識されている可能性も示した。このような作用機序によりマウスの腸管の IgA 分泌を有意に亢進することを明らかにした (Fig. 6-1)。また、パイエル板の網羅的遺伝子発現解析により、炎症、補体等の各種自然免疫と、抗体の分泌誘導を介した獲得免疫を亢進していることが示唆された。ただし、IgA 分泌以外の効果については、今後さらに詳細な解析が必要である。そして、マウスが *L. plantarum* AYA を経口摂取すると、肺と腸管での IgA 分泌が亢進され、インフルエンザ罹病時の症状を緩和することをマウスで明らかにした。これらの研究成果について、新たな価値と今後の展望を述べる。

これまでに、乳酸菌株の死菌による IgA 分泌亢進は数例報告されてきた [29] [30] [52]。しかし、我々が研究を実施していた当時は、IgA の分泌を亢進するために必要な、パイエル板細胞と乳酸菌との相互作用について詳細な解析結果は報告されていなかった。本研究にて、IgA 分泌亢進効果を有する乳酸菌株の作用機序を初めて明らかにした。我々がこの成果を報告した後に、*L. pentosus* ONRIC b0240 [103]、及び *L. gasseri* SBT2055 [104] の作用機序が報告されたので、これらを比較した（表 6-1）。

L. pentosus ONRIC b0240 は、*L. plantarum* AYA 同様、パイエル板樹状細胞の TLR-2 に認識されて IL-6 の分泌を誘導し、IgA の分泌を亢進している。*L. plantarum* AYA の研究では、樹状細胞から分泌亢進された IL-6 が、IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を亢進し、IgA 分泌を誘導することを示した。しかし、*L. pentosus* ONRIC b0240 の研究では、IgA を分泌しない IgD 陽性 B 細胞を用いて検証されており、分泌亢進された IL-6 が B 細胞にどのような影響を与えて IgA の分泌を亢進するか、明確になっていない。

L. gasseri SBT2055 は、骨髄系の樹状細胞の TLR-2 に認識されて TGF- β の分泌を亢進し、BAFF、IL-6、IL-10 の分泌を高め、パイエル板中の IgA 陽性細胞を増やして IgA 分泌を亢進する。しかし、TGF- β 、BAFF、IL-6、および IL-10 で中和抗体を用いた試験を実施していない為、いずれが IgA 陽性細胞の増加に寄与しているか、または全てが関与しているのか、明確にできておらず、結果としてパイエル板細胞内で IgA 陽性細胞を増加させる作用機序

も明らかにできていない。

L. plantarum AYA を含めた 3 種類の菌株は、作用機序が酷似している。その中でも、*L. plantarum* AYA は、最も明確な作用機序を報告できたと考えている。ただし、*L. pentosus* ONRIC b0240 と異なり、活性物質が明確でないことが、*L. plantarum* AYA の課題である。

また、乳酸菌株を摂取した際のパイエル板での網羅的遺伝子発現解析を実施し、新たな機能を持つ可能性を示した。これまで、パイエル板の遺伝子解析は、機能が明らかな遺伝子群を対象を絞って解析を行うことが一般的であった [56] [59] [62] [63] [64] が、本研究によりはじめてパイエル板で網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、*L. plantarum* AYA が炎症、補体等の誘導を介した自然免疫と、抗体の分泌誘導を介した獲得免疫の活性をも高め、生体の免疫を賦活している可能性を見出した。ただし、これらの機能についてはタンパク質発現解析など別の手法を用いて、さらに詳細に検証する必要がある。

そして、IgA 分泌亢進効果、その他の免疫賦活効果、およびインフルエンザ罹病時の症状を緩和する効果が、パンの発酵種の乳酸菌株に見出された報告は初めてである。*L. plantarum* AYA は死菌で摂取しても効果を有することから、*L. plantarum* AYA を含む発酵種を用いて製造したパンを主食として日常的に摂取することで、上記の効果を得られる可能性がある。このように、長期的な摂取という観点からも、主食であるパンの発酵種に含まれる乳

酸菌に効果を見出したことは価値が高く、機能性食品の素材の候補として有望と考えている。

しかし、*L. plantarum* AYA を摂取してもインフルエンザウイルスのタイターは有意に低くならず (Fig. 5-5)、肺におけるウイルス特異的 IgA の分泌量も増加しなかった。そこで、肺粘膜において Total IgA の分泌が亢進した以外に、インフルエンザの症状を緩和した可能性を考察した。NK 活性を亢進する他の乳酸菌株が報告されているが [35]、*L. plantarum* AYA では確認できなかった (Fig. 2-9)。しかし、当該試験にはポジティブコントロールが無い試験系で実施しており、結論を出すには不十分なデータと言える。再度試験を行い、NK 活性を亢進する効果を評価すべきだと考える。

本研究の成果は、機能性食品の素材として産業面にも貢献する可能性を有している。機能性食品の研究は、日本が世界に先駆けて開始し [105] [106]、その成果として「特定保健用食品」が制度化された [107]。また、2015 年には「食品の新たな機能性表示制度」も制度化され、機能性表示食品の数も増え続けている。これらの制度を積極的に活用することは、極めて重要になると考えている。

これまでに、腸内環境の改善、血糖値上昇抑制等の効果が特定保健用食品や機能性表示食品として上市されている (消費者庁 HP <http://www.caa.go.jp/foods/index4.html>、および

http://www.caa.go.jp/foods/todoke_1-100.html)。しかし、インフルエンザ罹病時の症状を緩和する食品のヘルスクレームは、現時点で認められていない。消費者庁が、そのクレームを感染症の疾病予防と認識し、医薬品の領域と捉えていることが原因の一つと考えられる。しかし、インフルエンザウイルスは、ヒトに対する感受性が、非常に高いことが知られている [108] [109]。毎年のように、インフルエンザウイルスの変異株が発生し、インフルエンザが流行して社会的・経済的な損失を引き起こしている。本研究より、免疫を高めることで、インフルエンザ等のウイルス感染症に罹病した際の症状を緩和し得る食品素材が見出された。このような素材を含む食品を開発し、その機能を表示して上市することができたならば、産業的にも非常に価値が高いと考えられる。そのためには、健康維持・増進に繋がるヘルスクレームを考案することが、表示の認可に向けた第一歩と考えられる。

本研究では、乳酸菌 *L. plantarum* AYA が有する効果とその詳細な作用機序を明らかにした。しかし、「食を健康で豊かな生活づくりへの貢献」を達成するまでには、まだ実施すべき研究がある。

まず、*L. plantarum* AYA の活性を担保するために、機能性関与成分を決定する必要がある。本研究にて、*L. plantarum* AYA の活性成分は樹状細胞の TLR-2 に認識される可能性があること、および、活性成分の一部は細胞壁画分に含まれることを見出した。これまでに別の乳酸菌株の成分で TLR-2 を亢進する物質として、リ

ポテイコ酸 [66] [67] [68]、およびペプチドグリカン [65] [66] [67]が報告されている。これらの情報を参考にし、*L. plantarum* AYA の機能性関与成分を同定する必要がある。

次いで、*L. plantarum* AYA の IgA 分泌亢進効果をより高める製造方法の検討が必要である。これまでに、*L. paracasei* A13 株の死菌を高圧ホモゲナイザーで処理 (50 MPa) してから摂取すると、未処理の死菌と比較してマウス腸内での IgA 分泌量を増加させることが報告されている [110]。これは、高圧でホモゲナイズ処理すると細胞表面の疎水性が増加し、胃での消化に対する抵抗性が付与されることが原因と考えられている。本研究で使用している *L. plantarum* AYA は高圧処理を実施していない為、この処理を実施することで活性をより高めることができる可能性はあると考えている。

そして *L. plantarum* AYA がもつ抗インフルエンザ効果について、マウスで用量試験を実施する必要がある。本研究では、通常餌に 5% の *L. plantarum* AYA を混合させて 4 週間摂取させると、インフルエンザの症状を緩和することを明らかにした (Fig. 5-7)。しかし、より少量の摂取で効果を有するか否かは明らかになっていない。第 2 章にて、通常餌に重量比 0.03% の *L. plantarum* AYA を加えると腸管に分泌される IgA 量が有意に増加することを示した (Fig. 2-12)。これと同等かさらに低い摂取用量で、抗インフルエンザ効果を発揮することができるか、非常に興味深い。

機能性関与成分、製造方法、最適摂取量が確定した後は、ヒ

トでの臨床試験を行う必要がある。近年、特定の乳酸菌株の発酵物を摂取することで、インフルエンザ等のウイルス感染症を抑制するという報告がされている。例えば、健常で年配の方（59－84歳）を対象とした試験において、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* OLL 1073R-1 を発酵させて作製したヨーグルト 90 g/日を 8 週間又は 12 週間摂取すると、対照群（牛乳 100 g/日）よりも風邪をひいた人数が有意に低くなったという報告 [35] がある。これは NK 活性の上昇によるものと考察されている。また、健常な小学生（6-12 歳）を対象とした試験において、*Lactobacillus brevis* KB290 の生菌を使用した飲料 1 本/日（*L. brevis* KB290 が 6×10^9 cfu 相当）を 7 週間摂取すると、インフルエンザワクチンを接種していない群において、対照群（対照コントロールなし）よりもインフルエンザの罹病率が有意に減少したという報告もある [111]。このように、特定の乳酸菌株で発酵させた食品を、お年寄りと小学生が摂取した結果、インフルエンザ等、ウイルスによる感染症の罹病を有意に抑えたという報告がされている。*L. plantarum* AYA はパンの発酵種に含まれていた乳酸菌であり、死菌を摂取しても効果が得られることを明らかにしているため、必要摂取量をパンに加えた試験食の作製が可能であれば、学術的にも産業的にも差別化が可能と考えている。ただし、試験食の配合を設定する為には、最適摂取量の決定が必須である。

また、体内で IgA 分泌量の増加により、ロタウイルスの予防 [112]、アトピー性皮膚炎の症状緩和 [51]、病原性大腸菌 0157 の

感染防御 [113]、サルモネラ菌の感染防御 [41]、腸内細菌の制御等の効果が報告されている。特に、IgA による腸内細菌の制御は近年注目されており、IgA の一種（W27 抗体）が、悪玉菌と言われる大腸菌等のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼに結合して増殖を抑制し、善玉菌と言われる乳酸菌やビフィズス菌の増殖は抑制せず、善玉菌優位な腸内環境へ変化させ、腸管の恒常性維持に貢献している [114]。IgA 分泌を亢進する *L. plantarum* AYA を摂取することで、上記の効果も期待できるかもしれない。

本研究では、*L. plantarum* AYA が有する IgA 分泌を亢進する効果の詳細な作用機序を明らかにし、その結果としてウイルス疾患の一つであるインフルエンザへの罹病を抑制する効果があることをマウスで示した。そして、その他にも免疫を賦活する可能性を見出し、*L. plantarum* AYA は新しい機能性食品の素材となる候補であることを示した。本研究の成果が、「食を通じた健康で豊かな生活づくり」に貢献できる機能性食品の研究をさらに進展させ、食品産業発展への一助となることを期待したい。

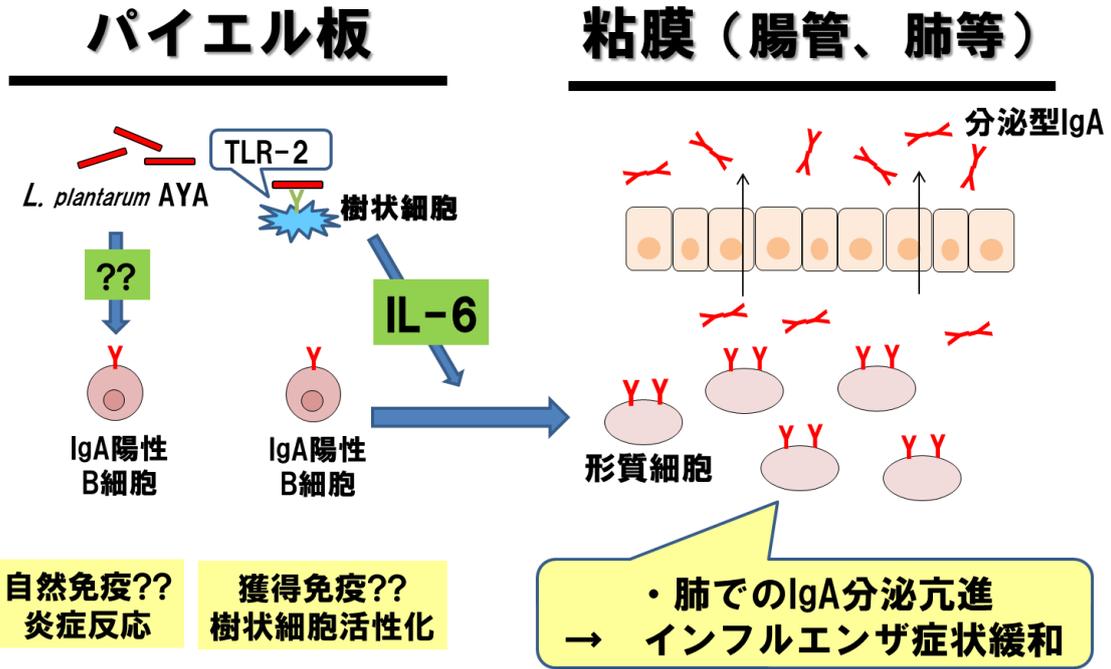


Fig. 6-1 *L. plantarum* AYA による IgA 分泌亢進機構

L. plantarum AYA の死菌粉末をマウスが摂取すると、パイエル板で IgA 陽性 B 細胞の比率が増加する。そして *L. plantarum* AYA の死菌粉末がパイエル板樹状細胞に認識されて IL-6 分泌を亢進し、IgA 陽性 B 細胞から形質細胞への分化を亢進する。なお、*L. plantarum* AYA が樹状細胞の TLR-2 に認識されている可能性も示した。それが腸管や肺などの粘膜から、IgA 分泌を亢進している。

表6-1 各乳酸菌株のIgA産生作用機序

	<i>L. plantarum</i> AYA	<i>L. pentosus</i> ONRIC b0240 [102]	<i>L. gasseri</i> SBT2055 [103]
① 活性物質	cell wallの一部	polysaccharide peptideglycan	不明確
② ①が作用するパイエル板細胞	パイエル板樹状細胞	パイエル板樹状細胞	BMDc
③ ②の受容体	TLR-2	TLR-2	TLR-2
④ ②から分泌される情報伝達物質	IL-6	IL-6	TGF, BAFF, IL-6, IL-10
⑤ ④が作用する細胞	IgA陽性B細胞	IgD陽性B細胞	解析無し
⑥ ④がIgA分泌を亢進するメカニズム	形質細胞への分化促進	不明	パイエル板にて IgA陽性細胞の増加

引用文献

1. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen FE, Nilsen EM, Yamanaka T. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? : *Immunol Today* 20: 141 – 151., 1999.
2. Wershil BK, Furuta GT. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. : *J Allergy Clin Immunol* 121: S380 – S383., 2008.
3. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. : *Nat Rev Immunol* 6: 148 – 158., 2006.
4. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. : *Nat Med* 11 (4Suppl): S45 - S53., 2005.
5. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. : *Cell* 86 (3): 345 - 348., 1996.
6. Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses.: *Immunity* 28: 740 - 750., 2008.
7. Lycke NY, Bemark M. The role of Peyer's patches in synchronizing gut IgA responses. : *Front Immunol* 3: 329., 2012.
8. Eisen HN. Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. : *Cancer Immunol Res* 2(5) : 381 - 392., 2014.
9. Matthews AJ, Zheng S, DiMenna LJ, Chaudhuri J. Regulation

- of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. : *Adv Immunol* 122: 1 - 57., 2014.
10. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity.: *Nature* 302 (5909): 575 - 581., 1983.
11. Muthuswamy RV, Sundström P, Börjesson L, Gustavsson B, Quiding-Järbrink M. Impaired migration of IgA-secreting cells to colon adenocarcinomas. : *Cancer Immunol Immunother* 62 (6): 989 - 997., 2013.
12. Van der Heijden PJ, Stok W, Bianchi AT. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. : *Immunology* 62 (4): 551 - 555., 1987.
13. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. : *Nat Rev Immunol* 3: 63 – 72., 2003.
14. Van der Waaij LA, Limburg PC, Mesander G, van der Wáaij D. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. : *Gut* 38 (3): 348 - 354., 1996.
15. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. : *Mucosal Immunol* 1: 11 - 22., 2008.
16. Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault AL, Snider DP, McDermott MR. Comparison of murine nasal-associated

- lymphoid tissue and Peyer's Patches. : *Am J Respir Crit Care Med* 156 (4 Pt 1): 1256 - 1262., 1997.
17. Shikina T, Hiroi T, Iwatani K, Jang MH, Fukuyama S, Tamura M, Kubo T, Ishikawa H, Kiyono H. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. : *J Immunol* 172 (10): 6259 - 6264., 2004.
18. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. : *Nat Rev Immunol* 4 (9): 699 - 710., 2004.
19. Tamura S, Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. : *Jpn J Infect Dis* 57 (6): 236 - 247., 2004.
20. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. : *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298 (6): G807 - 819., 2010.
21. 玉田勉、佐々木司. 気道粘膜防御機構における気道粘膜下腺の役割. : 日本呼吸器学会誌: 39 (3): 157 - 165., 2001.
22. Wilson NR, Dunkley ML, Buret A, Young B, Cripps AW. Histopathology of the lung following intratracheal challenge with live *Pseudomonas aeruginosa* in intestinally immunized rats. : *Immunol Cell Biol.* 73 (5): 440 - 445., 1995.
23. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. : *Br J Nutr* 93 Suppl 1:

- S41 - S48., 2005.
24. 辨野義美. プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. : モダンメディア 57 巻 10 号 277 - 287, 2011.
25. Galdeano CM, Perdigon G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. : *Clin Vaccine Immunol.* 13 (2): 219 - 226., 2006.
26. Qiao H, Duffy LC, Griffiths E, Dryja D, Leavens A, Rossman J, Rich G, Riepenhoff-Talty M, Locniskar M. Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with *bifidobacteria* and prebiotic supplements. : *Pediatr Res* 51 (6): 750 - 755., 2002.
27. De Moreno de LeBlanc A, Dogi CA, Galdeano CM, Carmuega E, Weill R, Perdigon G. Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity. : *BMC Immunol* 9: 27., 2008.
28. Tobita K, Yanaka H, Otani H. *Lactobacillus crispatus* KT-11 enhances intestinal immune functions in C3H/HeN mice. : *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 56 (6): 441 - 445., 2010.
29. Izumo T, Maekawa T, Ida M, Noguchi A, Kitagawa Y, Shibata H, Yasui H, Kiso Y. Effect of intranasal administration of

- Lactobacillus pentosus* S-PT84 on influenza virus infection in mice. : *Int Immunopharmacol* 10 (9): 1101 - 1106., 2010.
30. He F, Morita H, Kubota A, Ouwehand AC, Hosoda M, Hiramatsu M, Kurisaki J. Effect of orally administered non-viable *Lactobacillus* cells on murine humoral immune responses. : *Microbiol Immunol* 49 (11): 993 - 997., 2005.
31. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. : *Scand J Immunol.* 59 (1): 1 - 15., 2004.
32. Viruses AI. World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. : *Emerging Infectious Diseases* 11: 1515 – 1521., 2005.
33. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivaller P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier RA, Pappas C. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. : *Science* 325: 197 - 201., 2009.
34. Waki N, Yajima N, Suganuma H, Buddle BM, Luo D, Heiser A, Zheng T. Oral administration of *Lactobacillus brevis* KB290 to

- mice alleviates clinical symptoms following influenza virus infection. : *Lett Appl Microbiol* 58 (1): 87 - 93., 2014.
35. Nagai T, Makino S, Ikegami S, Itoh H, Yamada H. Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. : *Int Immunopharmacol* 11 (12): 2246 - 2250., 2011.
36. Kobayashi N, Saito T, Uematsu T, Kishi K, Toba M, Kohda N, Suzuki T. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 augments protection against influenza virus infection in mice. : *Int Immunopharmacol* 11 (2): 199 - 203., 2011.
37. Kawashima T, Hayashi K, Kosaka A, Kawashima M, Igarashi T, Tsutsui H, Tsuji NM, Nishimura I, Hayashi T, Obata A. *Lactobacillus plantarum* strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses. : *Int Immunopharmacol* 11 (12): 2017 - 2024., 2011.
38. Harata G, He F, Kawase M, Hosono A, Takahashi K, Kaminogawa S. Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch. : *Microbiol Immunol* 53 (8): 475 - 480., 2009.
39. Jin H, Higashikawa F, Noda M, Zhao X, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M. Establishment of an in vitro Peyer's patch cell

- culture system correlative to in vivo study using intestine and screening of lactic acid bacteria enhancing intestinal immunity. : *Biol Pharm Bull* 33 (2): 289 - 293., 2010.
40. Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Hachimura S, Takahashi Y, Itoh K, Hirayama K, Takahashi K, Kaminogawa S. Bacteroides induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. : *Biosci Biotechnol Biochem* 73 (2): 372 - 377., 2009.
41. Izumo T, Izumi F, Nakagawa I, Kitagawa Y, Shibata H, Kiso Y. Influence of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 Ingestion on the Mucosal Immunity of Healthy and Salmonella Typhimurium-Infected Mice. : *Biosci Microflora* 30 (2): 27 - 35., 2011.
42. Miyazawa K, He F, Yoda K, Hiramatsu M. Potent effects of, and mechanisms for, modification of crosstalk between macrophages and adipocytes by *lactobacilli*. : *Microbiol Immunol* 56 (12): 847 - 854., 2012.
43. 笹月 健彦. エッセンシャル免疫学. : メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2007.
44. Heczko PB, Strus M, Kochan P. Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. : *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 9: 5 - 12., 2006.

45. Blum S, Haller D, Pfeifer A, Schiffrin EJ. Probiotics and immune response. : *Clin Rev Allergy Immunol* 22 (3): 287 - 309., 2002.
46. Perdigon G, Fuller R, Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. : *Curr Issues Intest Microbiol* 2 (1): 27 - 42., 2001.
47. Iwabuchi N, Yonezawa S, Odamaki T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Xiao JZ. Immunomodulating and anti-infective effects of a novel strain of *Lactobacillus paracasei* that strongly induces interleukin-12. : *FEMS Immunol Med Microbiol* 66 (2): 230 - 239., 2012.
48. Harata G, He F, Hiruta N, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, Yausi H. Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. : *Lett Appl Microbiol* 50 (6): 597 - 602., 2010.
49. Maeda S, Ohno K, Uchida K, Nakashima K, Fukushima K, Tsukamoto A, Nakajima M, Fujino Y, Tsujimoto H. Decreased Immunoglobulin A Concentrations in Feces, Duodenum, and Peripheral Blood Mononuclear Cells of Dogs with Inflammatory Bowel Disease. : *J Vet Intern Med* 27 (1) :47 - 55., 2013.
50. Ludert JE, Krishnaney AA, Burns JW, Vo PT,. Greenberg HB. Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. : *J Gen Virol* 77 (Pt3): 391 -

- 395., 1996.
51. Inoue R, Nishio A, Fukushima Y, Ushida K. Oral treatment with probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) for a specific part of the weaning period prevents the development of atopic dermatitis induced after maturation in model mice, NC/Nga. : *Br J Dermatol* 156 (3): 499 - 509., 2007.
52. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. : *Nat Immunol* 9 (5): 503 - 510., 2008.
53. 武田泰輔、岡田早苗、小崎道雄. パン生地,生イーストおよびドライイースト中の乳酸菌の特性. : 日本食品工業学会誌 31 (10): 24 - 30., 1984.
54. 大野 博司. 特殊な腸管上皮細胞、M細胞の生物学. : 生化学 83 (1): 13-22., 2011.
55. Jia Q, Shi Y, Bennink MB, Pestka JJ. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid, but not α -Linolenic acid, suppress deoxynivalenol-induced experimental IgA nephropathy in mice. : *J Nutr* 134 (6): 1353 - 1361., 2004.
56. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, Ishii T, Sugimoto M, Araki S, Tominaga A, Yamaguchi N, Takatsu K. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. : *J Exp Med* 170 (4): 1415 - 1420., 1989.

57. Coffman RL, Lebman DA, Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. : *J Exp Med* 170 (3): 1039 – 1044., 1989.
58. Kim PH, Kagnoff MF. Transforming growth factor-beta 1 is a costimulator for IgA production. : *J Immunol* 144 (9): 3411 – 3416., 1990.
59. He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. : *Immunity* 26 (6): 812 – 826., 2007.
60. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, Ding A, Knowles DM, Santini PA, Cerutti A. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. : *Nat Immunol* 8 (3): 294 – 303., 2007.
61. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, Bram RJ, Jabara H, Geha RS. TACI and BAFFR mediate isotype switching in B cells. : *J Exp Med* 201 (1): 35 – 39., 2005.
62. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shiohara T, Akira S, Ohteki T. Regulation of IgA

- production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. : *Nature* 448 (7156): 929 – 933., 2007.
63. Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, Kiyono H, Everson MP, Koopman WJ, Hirano T, Kishimoto T, McGhee JR. Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. : *J Exp Med* 169 (6): 2133 - 2148., 1989.
64. Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, Senman B, Otipoby KL, Yokota A, Takeuchi H, Ricciardi-Castagnoli P, Rajewsky K, Adams DH, von Andrian UH. Generation of guthoming IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. : *Science* 314 (5802): 1157 – 1160. , 2006.
65. Mora JR, von Andrian UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. : *Mucosal Immunol* 1 (2): 96 - 109., 2008.
66. Mayer ML, Phillips CM, Stadnyk AW, Halperin SA, Lee SF. Synergistic BM-DC activation and immune induction by the oral vaccine vector *Streptococcus gordonii* and exogenous tumor necrosis factor. : *Mol Immunol* 46: 1883 – 1891., 2009.
67. Mayer ML, Phillips CM, Townsend RA, Halperin SA, Lee SF. Differential activation of dendritic cells by Toll-like receptor agonists isolated from the Gram positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*. : *Scand J Immunol* 69: 351 – 356., 2009.

68. Mohamadzadeh M, Pfeiler EA, Brown JB, Zadeh M, Gramarossa M, Managlia E, Bere P, Sarraj B, Khan MW, Pakanati KC, Ansari MJ, O'Flaherty S, Barrett T, Klaenhammer TR. Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. : *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 Suppl 1: 4623 - 4630., 2010.
69. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. : *Annu Rev Immunol* 21: 335 - 376., 2003.
70. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. : *J Allergy Clin Immunol* 117: 979 - 987., 2006.
71. Kaji R, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Nanno M, Shida K. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain *lactobacillus* strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. : *J Immunol* 184 (7): 3505 - 3513., 2010.
72. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. : *Nat immunol* 3 (9): 822 - 829., 2002.
73. Kunimoto DY, Nordan RP, Strober W. IL-6 is a potent cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. : *J Immunol* 143 (7): 2230 - 2235., 1989.
74. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI,

- Koehler G, Kopf M. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. : *Science* 264 (5158): 561 - 563., 1994.
75. Sato A, Hashiguchi M, Toda E, Iwasaki A, Hachimura S, Kaminogawa S. CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. : *J Immunol* 171 (7): 3684 - 3690., 2003.
76. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. : *Nat Immunol* 11: 373 - 384., 2010.
77. Harata G, He F, Kawase M, Hosono A, Takahashi K, Kaminogawa S. Differentiated implication of *Lactobacillus GG* and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch. : *Microbiol Immunol* 53(8):475-480. , 2009.
78. 松本一朗、阿部啓子. ニュートリゲノミクス. : 化学と生物 45 (4): 246 - 251., 2007.
79. 高橋陽子. ニュートリゲノミクスによる食品の機能性解析. : 脂質栄養学 21 (1): 51 - 57., 2012.
80. Team., R Development Core. "R: A Language and Environment for Statistical Computing". : R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., 2006.
81. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T,

- Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. : *J Genome Biol* 5: R80., 2004.
82. Chen Z, McGee M, Liu Q, Scheuermann RH. A distribution free summarization method for Affymetrix GeneChip arrays. : *Bioinformatics* 23: 321 - 327., 2007.
83. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. : *FEBS Lett* 573: 83 - 92., 2004.
84. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. : *Nat Protoc* 4: 44 - 57., 2009.
85. Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. : *Bioinformatics* 25: 3045 - 3046., 2009.
86. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. : *J Roy Stat Soc* 57: 289 - 300., 1995.
87. 本田 賢也. 腸内細菌による Th17 細胞分化. : 生化学 82 (11): 1060 - 1064., 2012.

88. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. : *Cytokine* 43: 402 - 407., 2008.
89. Tumanov AV, Grivennikov SI, Kruglov AA, Shebzukhov YV, Koroleva EP, Piao Y, Cui CY, Kuprash DV, Nedospasov SA. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. : *Blood* 116 (18): 3456 - 3464., 2010.
90. Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhar G, Livshits G, Skokos D, Kosco-Vilbois MH, Dustin ML, Nussenzweig MC. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. : *Nature* 446 (7131): 83 - 87., 2007.
91. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. : *Science* 315 (5811): 528 - 531., 2007.
92. Kadota K, Nakai Y, Shimizu K. Ranking differentially expressed genes from Affymetrix gene expression data: methods with reproducibility, sensitivity, and specificity. : *Algorithms Mol Biol* 4: 7., 2009.
93. Li J, Du J, Liu D, Cheng B, Fang F, Weng L, Wang C, Ling C. Ginsenoside Rh1 potentiates dexamethasone's anti-inflammatory effects for chronic inflammatory disease by reversing dexamethasone-induced resistance. : *Arthritis Res Ther* 16 (3): R106., 2014.

94. 河内知恵、西澤孝志、稲川裕之、柚源一郎. 免疫調節食品 免疫増強および自然治癒力強化を特徴とする安全安心な糖脂質素材の開発. : 食品工業 54 (2): 52 - 61., 2010.
95. Marshall JC. Lipopolysaccharide: an endotoxin or an exogenous hormone? : *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7: S470 - 480., 2005.
96. Laver WG, Air GM, Webster RG. Mechanism of antigenic drift in influenza virus. Amino acid sequence changes in an antigenically active region of Hong-Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin. : *J Mol Biol* 145: 339 - 361., 1981.
97. Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: Multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. : *J Virol* 48: 52 - 60., 1983.
98. Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. : *Annu Rev Immunol* 8: 737 - 771., 1990.
99. Cox NJ, Bender CA. The molecular epidemiology of influenza viruses. : *Semin Virol* 6: 359 - 370., 1995.
100. Johansen FE, Baekkevold ES, Carlsen HS, Farstad IN, Soler D, Brandtzaeg P. Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from

- tonsils. : *Blood* 106 (2): 593 - 600., 2005.
101. English K, Brady C, Corcoran P, Cassidy JP, Mahon BP. Inflammation of the respiratory tract is associated with CCL28 and CCR10 expression in a murine model of allergic asthma. : *Immunol Lett* 103 (2): 92 - 100., 2006.
102. Pan J, Kunkel EJ, Gossler U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, Vierra MA, Genovese MC, Butcher EC, Soler D. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. : *J Immunol* 165 (6) : 2943 - 2949., 2000.
103. Kotani Y, Kunisawa J, Suzuki Y, Sato I, Saito T, Toba M, Kohda N, Kiyono H. Role of *Lactobacillus pentosus* Strain b240 and the Toll-like receptor 2 axis in Peyer's patch dendritic cell-mediated immunoglobulin A enhancement. : *PLoS One* 9: e91857., 2014.
104. Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, Kadooka Y, Shiozaki T, Nakagawa H, Nakayama Y, Miyazaki T. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- β expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. : *PLoS One* 21; 9 (8): e105370, 2014.
105. Swinbanks D, O'Brien J. Japan explores the boundary between food and medicine. : *Nature* 364 (6434): 180., 1993.

106. Arai S. Perspective functional food science. : *J Sci Food Agric* 85:1603 - 1605., 2005.
107. Arai S, Yasuoka A, Abe K. Functional food science and food for specified health use policy in Japan: state of the art. : *Curr Opin Lipidol* 19 (1): 69 - 73., 2008.
108. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: the once and future pandemic. : *Public Health Rep* 125 Suppl 3: 16 - 26., 2010.
109. McCaughey C. Influenza: a virus of our times. : *Ulster Med J* 79 (2): 46 - 51., 2010.
110. Tabanelli G, Burns P, Patrignani F, Gardini F, Lanciotti R, Reinheimer J, Vinderola G. Effect of a non-lethal High Pressure Homogenization treatment on the in vivo response of probiotic *Lactobacilli*. : *Food Microbiol* 32 (2): 302 - 307., 2012.
111. Waki N, Matsumoto M, Fukui Y, Suganuma H. Effects of probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 on incidence of influenza infection among schoolchildren: an open-label pilot study. : *Lett Appl Microbiol* 59 (6): 565 - 571., 2014.
112. Zhang W, Azevedo MS, Wen K, Gonzalez A, Saif LJ, Li G, Yousef AE, Yuan L. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. : *Vaccine* 26 (29-30): 3655 - 3661., 2008.
113. Shu Q, Gill HS. Immune protection mediated by the probiotic

Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. : *FEMS Immunol Med Microbiol* 34 (1): 59 - 64., 2002.

114. Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. : *Nat Microbiol* 1 (9) : 16103, 2016.

論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AYA の免疫賦活効果と作用機序解析

氏名 菊池 洋介

ヒトの体表面は、腸管、肺などの粘膜や皮膚に保護されている。腸管粘膜は、ウイルス、病原細菌やそれらが分泌する毒素等の外界因子を排除する免疫組織として、重要な役割を果たしている。その免疫機能を司っているのが、腸管関連リンパ組織 (**GALT: gut associated lymphoid tissue**) の中心器官であるパイエル板である。パイエル板では、腸管内腔から腸管上皮の M 細胞を介して取り込まれた抗原が、樹状細胞等に提示される。その結果、**immunoglobulin A (IgA)** を産生する **IgA 陽性 B 細胞** が産生され、粘膜組織への移行、形質細胞への分化を経て、**IgA** が産生される。それが腸管へ分泌され、ウイルス等の抗原と結合し、中和することで免疫機能が発揮される。また、気道の免疫組織である気管支随伴リンパ組織 (**BALT: bronchus-associated lymphoid tissue**) でも、**IgA** が分泌されている。**GALT** で活性化された **IgA 陽性 B 細胞** は、体内を循環後に **BALT** へも伝達され、気道粘膜における **IgA** の分泌にも貢献していることが報告されている。

近年、粘膜免疫を亢進する食品素材として、**IgA** 分泌を亢進す

る乳酸菌が注目されている。IgA 分泌の亢進は、ウイルス等感染症の原因となる抗原の中和を促進し、症状の緩和が期待される。例えば、インフルエンザウイルスについて、複数の乳酸菌株の死菌がその罹病症状に対して緩和効果を示すことが報告されている。しかし、その症状緩和効果の詳細な作用機序は明らかにされていない。よって、インフルエンザの症状を緩和させる効果を有し、その作用機序が明らかな乳酸菌株を見出すことは、食品開発の面から非常に価値が高いといえる。本研究は、食を通じた健康で豊かな生活づくりへの貢献を最終目的とし、乳酸菌株を利用した機能性食品の開発を目指して開始した。IgA 分泌亢進作用を有する乳酸菌株を見出し、その作用機序を明らかにすること、さらには、インフルエンザ罹病症状の緩和効果を示すことを目的とした。

1. IgA 分泌を亢進する乳酸菌株の選抜と必要な用量

はじめに、パイエル板からの IgA 分泌亢進能を持つ乳酸菌株を探索するため、*ex vivo* 試験によってスクリーニングを実施した。BALB/c マウスパイエル板細胞の初代培養系に、発酵食品（パンの発酵種、漬物他）由来の 140 種類の乳酸菌株の死菌を添加し、上清の IgA 分泌濃度を測定した。その結果、IgA 分泌亢進作用を示す乳酸菌株を複数見出した。次に、IgA 分泌亢進能が高い上位 3 菌株を選抜し、マウスに各乳酸菌株粉末を 5%含む混餌食を 4 週間摂餌させ、パイエル板を摘出してその初代培養を行い、IgA

分泌亢進効果を評価した。この試験で、IgA 分泌量を有意に高めた乳酸菌株を 1 種特定し、*Lactobacillus plantarum* AYA と命名した。

IgA 分泌量亢進効果の必要用量を決定する為、*L. plantarum* AYA 粉末を重量比で 0.3%、および 0.03% 加えた餌を調製してマウスに 4 週間摂取させると、いずれの餌を摂取しても腸管での IgA 分泌量が有意に増加した。0.03% 含有餌について 1 日当たりの平均摂取量から換算した結果、*L. plantarum* AYA 粉末を 1 日あたり 0.72 mg で 4 週間経口摂取すると、マウス腸管の IgA 分泌量が有意に増加することを明らかにした。

2. *L. plantarum* AYA の IgA 分泌亢進効果の作用機序の解析

L. plantarum AYA の摂取にて IgA の分泌が亢進する作用機序の解明を目指し、各種パイエル板初代培養細胞の培養に、*L. plantarum* AYA 粉末を加え、相互作用を解析した。IgA 陽性 B 細胞に *L. plantarum* AYA 粉末を加えて培養したが、IgA 分泌量に差は見られなかった。しかし、これらに樹状細胞を加えて共培養したところ、IgA 分泌量が有意に増加した。よって、*L. plantarum* AYA と樹状細胞の作用が重要であることが示唆された。そこで、樹状細胞に *L. plantarum* AYA 粉末を添加して培養したところ、interleukin-6 の遺伝子発現 (IL6)、並びにタンパク質分泌 (IL-6) が有意に亢進された。樹状細胞と IgA 陽性 B 細胞の共培養系に、*L. plantarum* AYA 粉末とともに IL-6 抗体を加えると、IgA 分泌量

の亢進効果がキャンセルされた。よって IgA 分泌亢進には、パイエル板における IL-6 の分泌亢進が必須であることが示唆された。

続いて、*L. plantarum* AYA を認識する樹状細胞の受容体同定を目指した。パイエル板細胞に *L. plantarum* AYA 粉末を添加した培養系に、toll-like receptor 2 (TLR-2) の抗体を加えると、IgA 分泌亢進効果が有意に抑制された。よって、*L. plantarum* AYA は樹状細胞に認識され、そこからの IL-6 分泌が亢進されることで、パイエル板からの IgA 分泌を亢進していると考えられた。また、*L. plantarum* AYA が樹状細胞の TLR-2 に認識されている可能性を示した。

3. IgA 分泌亢進以外の免疫調節機能の検討

L. plantarum AYA が有する IgA 分泌亢進以外の免疫機能の推定を目的に、トランスクリプトーム解析を行った。*L. plantarum* AYA 粉末を含む精製飼料をマウスに 4 週間摂取させ、パイエル板細胞から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ試験を実施した。distribution-free weighted method (DFW 法) で正規化した遺伝子発現情報を用いて Rank Product 法による群間比較を行った結果、*L. plantarum* AYA 粉末の摂取で発現が上昇する遺伝子が 124 個、抑制される遺伝子が 144 個抽出された (FDR < 0.05)。

Gene Ontology 解析にて、発現が有意に変動した遺伝子群に濃縮された機能の推定を行った (FDR < 0.1)。その結果、発現が亢進された遺伝子群より、immunoglobulin heavy chain (gamma

polypeptide) などの抗体産生の亢進、および B 細胞の活性化が推測され、獲得免疫の活性化が示唆された。また、補体を誘導する mannose-binding lectin (protein C) 2、および炎症反応を誘導する serum amyloid A1 等の遺伝子発現も亢進されており、自然免疫の活性化も示唆された。一方、発現が抑制された遺伝子群では濃縮された機能はみられなかった。

次に、Ingenuity Pathway Analysis を実施し、発現が亢進した遺伝子群のパスウェイ上流の活性を予測した結果、IL-6、tumor necrosis factor- α (TNF) 等の発現亢進が示唆された。IL-6 の発現亢進は、*L. plantarum* AYA 粉末の添加で、パイエル板樹状細胞からの IL-6 の分泌が有意に亢進した *ex vivo* 試験のデータを支持する結果であった。また、TNF はパイエル板の B 細胞から分泌され、獲得免疫に重要な樹状細胞の発達に寄与する因子であることが知られている。

以上の結果から、*L. plantarum* AYA を摂取すると炎症、補体の誘導を介した自然免疫と、抗体の分泌誘導を介した獲得免疫の活性を高めることが示唆された。

4. *L. plantarum* AYA のインフルエンザウイルス感染試験

L. plantarum AYA 粉末の摂取が、ウイルス等の外敵を中和するか評価する為、インフルエンザウイルス (X31 株) の感染試験を実施した。マウスを通常餌を摂取する群と 5% *L. plantarum* AYA 混合餌を摂取する群の 2 つに分け、4 週間飼育し、各群 5 匹ずつ

解剖すると、空腸、回腸、および、肺で IgA の分泌が有意に亢進した。残りのマウスに、致死量のインフルエンザウイルスを経鼻感染させ、10 匹/群について感染後生存確認試験を実施した。その際、感染時の体重から 20%減を安楽死の指標（人道的エンドポイント）とした。感染 10 日後まで生存率を測定した結果、通常食摂取群はすべてのマウスが人道的エンドポイントに達した一方、*L. plantarum* AYA 摂取群は 5 匹が人道的エンドポイントに達しておらず、群間で有意な差があった。以上のように、*L. plantarum* AYA 粉末を摂取すると、腸管や肺などの粘膜で IgA の産生が亢進し、インフルエンザに罹病したときの症状を緩和する効果が示唆された。

まとめ

パンの発酵種由来の乳酸菌株である *L. plantarum* AYA 粉末を経口摂取すると、腸管および肺粘膜での IgA 分泌が亢進することが示された。その作用機序として *L. plantarum* AYA の成分が樹状細胞に認識されて IL-6 の分泌を亢進し、IgA 陽性細胞から形質細胞への分化を亢進することが重要であることを明らかにした。そして、*L. plantarum* AYA の成分が樹状細胞の TLR-2 に認識されている可能性を示した。また、それ以外にも獲得免疫、自然免疫を高めていることを示した。そして、*L. plantarum* AYA 粉末摂取はインフルエンザ罹病時の症状緩和作用を有することを示した。

以上のように、乳酸菌株の死菌の摂取が IgA 分泌を亢進し、イ

ンフルエンザの症状を緩和すること、およびその詳細な作用機序を、他の研究に先駆けて見出し、新しい機能性食品の素材となりうる候補を見出した。この素材を活かすことで、「食を通じた健康で豊かな生活づくり」に貢献できるようさらに研究が発展していくことを期待する。

(発表論文)

Kikuchi Y, Kunitoh-Asari A, Hayakawa K, Imai S, Kasuya K, Abe K, Adachi Y, Fukudome S, Takahashi Y, Hachimura S.

Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain AYA enhances IgA secretion and provides survival protection against influenza virus infection in mice. *PLoS One*. 9 (1): e86416, 2014.

Kikuchi Y, Toyoda T, Ishijima T, Abe K, Nakai Y, Fukudome S.

Oral administration of the AYA strain of *Lactobacillus plantarum* modulates expression of immunity-related genes in the murine Peyer's patch: a DNA microarray analysis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 78 (11): 1935-1938., 2014.

Kikuchi Y, Yoshida H, Ogita T, Okita K, Fukudome S, Suzuki T, Tanabe S.

In Vivo Dose Response and *In Vitro* Mechanistic Analysis of Enhanced Immunoglobulin A Production by *Lactobacillus plantarum* AYA. *Biosci Microbiota Food Health*. 34 (3): 53-58., 2015.

謝辞

株式会社日清製粉グループ本社 R&D・品質保証本部 基礎研究所にて研究に従事し、社内外の多くの方々にご指導・ご鞭撻を戴き、博士論文を作成・提出するに至りました。ここに、謝意を述べさせていただきます。

本研究を進め、かつ投稿論文の執筆に至るまで、終始温かいご指導、ご鞭撻を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科の八村敏志准教授に、深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

国立感染症研究所の高橋宜聖室長にはインフルエンザ感染試験において、試験系や結果への的確かつ貴重なアドバイス、ならびに試験方法をご教授頂きました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科の阿部啓子特任教授、中井雄治准教授（現弘前大学大学院農学生命科学研究科）、石島智子特任助教には、ニュートリゲノミクスの実施、データ処理から結果の解釈、そして論文執筆まで、的確な助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

広島大学大学院生物圏科学研究科の田辺創一教授（現日清食品ホールディングス株式会社）には、乳酸菌の分画実験を進めるにあたり、試験系の組み立て、実施から論文執筆まで多くの的確な助言、ならびに実験方法をご教授頂きました。心より感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科の岡田晋治特任准教授には、学位論文の作成において、全体の構成、論旨の展開、文言の使い方

等において、貴重なご指導ならびに的確なご助言を頂きました。深く御礼申し上げます。

株式会社日清製粉グループ本社の遠藤繁氏、および福留真一博士には、本研究テーマを与えて頂き、研究について直接ご指導いただきました。深く感謝申し上げます。また、株式会社日清製粉グループ本社の原田隆氏、横塚章治氏、福富竜太博士には、学位取得にご理解いただき、多くの支援と叱咤激励を頂きました。深く感謝申し上げます。共同研究者として数多くご協力頂いた日清製粉グループ本社の早川克志博士、浅利（国東）礼美氏、乳酸菌サンプルの準備にご尽力頂いたオリエンタル酵母工業株式会社の沖田公子氏、糟谷健二氏、阿部紀長氏に感謝申し上げます。また、研究を進めるにあたり、多大なご協力とご支援を頂きながら、お名前を記すことができなかつた、株式会社日清製粉グループ本社の皆様に感謝申し上げます。本研究は、株式会社日清製粉グループ本社の研究資金で実施されました。ここに記し、感謝申し上げます。

最後になりますが、子育ての時間を割いての学位取得を快く承諾し、協力してくれ、更に心の支えになってくれ、常に応援してくれた、妻の菊池聡子、そして娘の莉帆と麻佑に心から感謝いたします。これからは、もっともっともっと家族サービスしますので、宜しく願います。本当にありがとうございました。

平成 29 年 3 月

菊池 洋介