

# ストレス誘導アレルギー性腸炎モデルにおける 発酵乳酸菌の抑制効果

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻：戸塚 護

## 要 約

ストレス負荷は自律神経系や内分泌系の変化のみならず、免疫系にも影響を与える。炎症性腸疾患や過敏性腸症候群、アレルギー疾患の発症・増悪にストレスが関与する可能性も知られている。一方、乳酸菌の経口摂取はストレスホルモンの分泌を抑制し、ストレスによる腸内細菌叢の変動を抑制する。ストレスが腸管免疫機能を低下させること、乳酸菌がストレス緩和作用や腸管免疫機能の向上を示すことは周知である。しかしストレスが引き起こす腸管免疫系の変化に対する乳酸菌の影響についての報告はほとんどない。本研究ではストレスが誘導する腸管免疫機能の低下モデルを確立し、このモデルを用いてプロバイオティクスとしての乳酸菌の効果を検討することを目的とした。

ストレス誘導性のアレルギー性腸炎モデルの確立を目指し、以下の検討を行った。D011.10 マウスに代表的な精神的ストレス負荷である拘束ストレスを1週間負荷した後、ストレスの負荷とともに20%卵白アルブミン (OVA) 含有水を与えて、体重推移、糞中 IgA 量、血清中 IgE 量を検討した。その結果、ストレス負荷と OVA の摂取が同時に行われると、一時的に有意な体重減少が確認された。しかし、糞中 IgA 量、血清中 IgE 量に関してはストレスの有無で差はみられず、再現性の高い有効なストレス誘導性のアレルギー性腸炎モデルの確立には至らなかった。

次にストレス誘導性の腸管免疫機能の低下として、BALB/c マウスに拘束ストレスを負荷すると腸管 IgA 量が減少することが報告されている。本研究では同様の変化がみられること、有意に体重が減少することを確認し、結腸において IgA 分泌細胞の分化に必要な IL-6 の mRNA 発現量が減少する傾向を見出した。本実験系は、ストレス誘導性の腸管免疫機能低下の実験モデルとして有効であると考えられる。

ストレスによる腸管 IgA 産生量の低下を緩和する作用を示すプロバイオティクス乳酸菌の候補として、*Lactococcus lactis* C59 (C59) について検討した。腸間膜リンパ節 (MLN) 細胞およびパイエル板 (PP) 細胞と共培養し、上清中の TGF- $\beta$ 量を測定した。その結果、MLN 細胞と培養時に、乳酸菌の濃度依存的に TGF- $\beta$ 産生の促進が観察された。次に実際に C59 の経口投与がストレス誘導性の腸管免疫機能の低下を抑制するかについて検討した。すなわち、BALB/c マウスに C59 を1週間投与した後、C59 の投与とともに拘束ストレスを負荷し、体重推移、糞中 IgA 量、結腸における mRNA 発現量を検討した。その結果、C59 の摂取によって、ストレス負荷による体重減少が抑制されることが明らかとなり、糞中 IgA 量の減少が緩和する傾向が示された。以上のことから、乳酸菌 C59 は TGF- $\beta$ 産生を促進し、ストレス誘導性の腸管免疫機能の低下を緩和する可能性が示された。

## 1. 背景および目的

### ストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルの構築

卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである D011.10 マウスに 20%OVA 含有水を与え、免疫応答の変化を観察する実験系の検討時に、これをある飼育条件下で行うと極度の体重減少を伴うアレルギー性の腸炎症状を示すという現象が確認された。この症状は通常誘起されないことがわかっており、常時振動や騒音が起きていたという飼育環境の悪化が原因と考えられた。すなわち飼育環境の悪化がストレスとなって、腸管免疫機能が低下し、食物アレルギー性の腸炎症が誘導された可能性が示唆されている。

臨床的に、食物アレルギーを起こす人でもアレルゲンが体内に侵入すると常にアレルギー反応を起こすわけではなく、そのときの体調によって起こしたり起こさなかったりする。これはアレルゲンの量的な暴露以外にもアレルギー症状を起こす要因となるものがある可能性を示唆しており、この要因の一つとしてストレスが挙げられる。食物アレルギーだけでなく、潰瘍性大腸炎や過敏性腸症候群などの腸疾患の発症や増悪にストレスが関与する可能性は広く知られている。

ストレスは免疫機能を低下させることが知られており、アレルギーの発症に重要な役割を担っている。これまでアレルギーとストレスに関する研究では、IL-4 産生の増強を経て IgE 産生の亢進が働きやすい状況をストレスが誘導すること、粘膜上皮や血管の透過性が変化することが報告されている。

D011.10 マウスにおいて偶然観察された上記の現象を再現性のあるモデルとして構築することによって、ストレスが誘導する腸管免疫機能の低下の指標を把握し、さらにその指標を改善する食品成分の探索が可能となる。また BALB/c マウスにおいては拘束ストレスの負荷によって腸管洗浄液中 IgA 量が減少するというストレスが誘導する腸管免疫機能の低下に関する報告がある。BALB/c マウスにおいても上記のストレス誘導性の腸管免疫機能低下時の免疫系の指標の把握を行うことによって、ストレスが腸管免疫系に与える影響のさらなる解析が可能となる。そこで、ストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルを確立することを目的とした。

### 乳酸菌 *Lactococcus lactis* C59 の免疫修飾機能と、ストレス誘導性の腸管免疫機能低下に対する改善作用

これまでにある種の乳酸菌 *Lactobacillus* が副腎や腎臓を支配する交感神経を抑制し、胃を支配する副交感神経を興奮させること、反対に別の *Lactobacillus* は交感神経を興奮し、副交感神経を抑制することが報告されており、乳酸菌の摂取が神経系に影響を与えていることが知られている (Lyte, M., Trends Microbiol, 2004. 12(1): p. 14-20, Freestone, P.P., et al., Shock, 2002. 18(5): p. 465-70, Vlisidou, I., et al., Infect Immun, 2004. 72(9): p. 5446-51)。

一方、ある種の乳酸菌やビフィズス菌が腸管での IgA 分泌を高めることが見出されている。このことから、プロバイオティクスの機能の一つとして IgA 分泌亢進効果が着目され、その作用メカニズムの解析が進められた。プロバイオティクスによる IgA 分泌亢進の主な機構として、M 細胞から PP 内に取り込まれた菌体が樹状細胞などの抗原提示細胞に認識されることで、PP における B 細胞の IgA へのクラススイッチが促進されることが考えられている。

上記のように乳酸菌が示すプロバイオティクスとしての効果に、ストレス緩和作用、腸管免疫

機能の向上が挙げられる。プロバイオティクスの研究はヒトの腸由来の *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* が主であった。一方チーズ製造や発酵乳由来の *Lactococcus* に関しても近年研究が進み、マクロファージの、細菌に対する細胞傷害機能の増強や、培地中のコレステロールを軽減する作用などが明らかにされている。本研究では、*Lactococcus lactis* C59 (C59) に着目した。C59 はチーズから単離されたプロバイオティクス乳酸菌であり、OVA で免疫した BALB/c マウスに経口投与すると OVA 特異的 IgE 抗体の産生を抑制すること (Yoshida, A., et al., FEMS Immunol Med Microbiol)、脾臓細胞において TGF- $\beta$  産生を誘導することが報告されている。TGF- $\beta$  は IgA 形質細胞への分化を促進する機能をもつことから、C59 が IgA 産生の低下を抑制する効果をもつことが期待される。そこで、C59 の免疫調節機能を解析するとともに、ストレス誘導性の腸管免疫機能の低下モデルにおいて改善作用を示すかどうかについて検討を行った。

## 2. 材料および方法

### 実験動物

D011.10 マウスはニワトリ卵白アルブミン (OVA) の主要な T 細胞抗原決定基である 323 残基から 339 残基領域を I-A<sup>d</sup> 拘束的に認識するマウス CD4<sup>+</sup>T 細胞クローン D011.10 由来の T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子が導入されたマウスで、このトランスジェニックマウスの遺伝背景は BALB/c マウスと同じである。このマウスは D. Y. Loh 博士らによって樹立され (Murphy et al., 1990)、その子孫を慶應大学医学部微生物学教室の石川博道教授より供与された。D011.10 マウスに導入した TCR を特異的に認識するクロナイプモノクローナル抗体 KJ1.26 を用い、フローサイトメーターを用いて末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞における D011.10 TCR 陽性細胞の割合を測定することにより、D011.10 TCR 遺伝子陽性の判定を行った。繁殖と選定は星野試験動物飼育所に委託した。BALB/c マウスは購入した。マウスは、24 時間サイクルの自動照明のもとで飼育した。餌はガンマ線照射 CE-2 食を自由摂取させ、水は滅菌した水道水を自由に摂取させ、通常動物飼育施設にて維持した。

### 拘束ストレス負荷方法 (図 A)

#### i) 拘束ストレスの負荷①

空気穴をあけた直径 28 mL の 50 mL ファルコンチューブにマウスを 4 時間あるいは 6 時間保定した。マウスはチューブ内で前後に移動することは可能だが体の向きを変えることはできない。コントロール群は拘束ストレス負荷の間、絶食絶水とした。

#### ii) 拘束ストレスの負荷②

マウスを 20 cm 四方の白い布でくるんだ後、50 mL シリンジに 4 時間保定した。マウスはチューブ内で前後に移動することは可能だが体の向きを変えることはできない。

コントロール群は拘束ストレス負荷の間も、自由に摂食摂水させた。

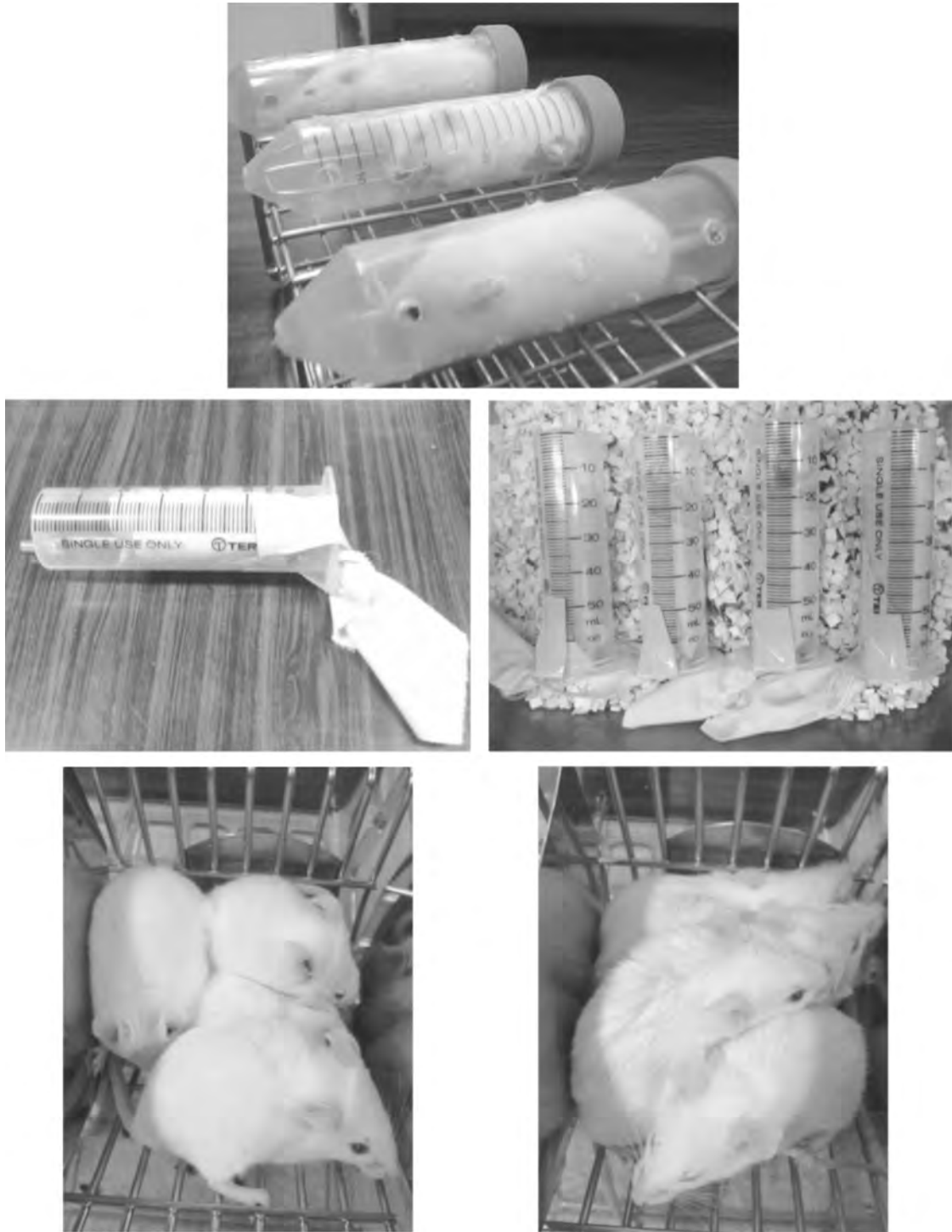


図 A

拘束ストレス

(上) 拘束ストレスの負荷方法①

(中) 拘束ストレスの負荷方法②

(下左) コントロール群

(下右) 拘束ストレスの負荷②時のストレス群

## OVA 投与方法

すり鉢上で卵白アルブミンを滅菌水でこねて溶解することにより 20%OVA 含有水を調製した。これを 24 時間おきに交換し、自由摂取させた。

## 血清の調製

マウス尾静脈より血液を回収し、1 時間程室温で保持した。その後 4°C で 3 分間遠心分離 (1000 ×g) をして、上清を回収し血清を得た。血清は酵素免疫測定法 (ELISA) に用いるまで -80°C で保存した。

## 酵素免疫測定法 (ELISA) による血清中の総 IgE 抗体濃度の測定

一次抗体 (1:500) を 50 mM NaHCO<sub>3</sub> 水溶液で希釈し、96 ウェルポリエチレン製マイクロタイタープレートに各ウェル 50 μL ずつ添加して 4°C で一晩吸着させた。0.05% Tween20 含有リン酸緩衝生理食塩水で 3 回洗浄した後、3%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) を加え PBST で作製したブロッキング溶液を各ウェル 100 μL ずつ添加して 2 時間室温で放置した。PBST で 3 回洗浄した後、1%BSA を含む PBST で適宜希釈した血清および標準濃度溶液を各ウェル 50 μL ずつ添加して、4°C で一晩インキュベートした。PBST で 7 回洗浄した後、1%BSA を含む PBST で希釈したビオチン標識抗体 (1:2000) を各ウェル 50 μL ずつ添加して、遮光状態で室温で 1 時間放置した。その後 PBST で 5 回洗浄した後、1%BSA を含む PBST で希釈したストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ (1:1000) を各ウェル 50 μL ずつ添加して、遮光状態で室温で 1 時間放置した。PBST で 7 回洗浄した後、4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として、1 mg/mL になるようにジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH 9.8) に溶解したものを 50 μL ずつ加えて発色させた。マイクロプレートリーダー Model 550 により 405 nm と 490 nm の吸光値を測定し、総 IgE 抗体濃度は標準濃度溶液を用いた検量線から算出した。

一次抗体は Purified anti mouse IgE (R35-72)、標準濃度溶液は Purified Mouse IgE k Isotype Control、ビオチン標識抗体は Anti-IgE(ε), Mouse, Rat-Mono(L0-ME-2), Biotin、ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼは AKP Streptavidin を用いた。

## 酵素免疫測定法 (ELISA) による血清中の OVA 特異的 IgE 抗体価の測定

一次抗体 (1:500) を 50 mM NaHCO<sub>3</sub> 水溶液で希釈し、96 ウェルポリエチレン製マイクロタイタープレートに各ウェル 50 μL ずつ添加して 4°C で一晩吸着させた。PBST で 3 回洗浄した後、3%BSA を加え PBST で作製したブロッキング溶液を各ウェル 100 μL ずつ添加して 2 時間室温で放置した。PBST で 3 回洗浄した後、1%BSA を含む PBST で適宜希釈した血清および標準濃度血清を各ウェル 50 μL ずつ添加して、4°C で一晩インキュベートした。PBST で 7 回洗浄した後、1%BSA を含む PBST で希釈したビオチン標識抗体 (1:2000) を各ウェル 50 μL ずつ添加して、遮光状態で室温で 1 時間放置した。その後 PBST で 5 回洗浄した後、1%BSA を含む PBST で希釈したストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ (1:1000) を各ウェル 50 μL ずつ添加して、遮光状態で室温で 1 時間放置した。PBST で 7 回洗浄した後、4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として、1

mg/mL になるようにジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH 9.8) に溶解したものを 50  $\mu$ L ずつ加えて発色させた。マイクロプレートリーダー Model 550 により 405 nm と 490 nm の吸光値を測定し、OVA 特異的 IgE 抗体価は標準濃度血清を用いた検量線から算出した。

一次抗体は Purified anti mouse IgE (R35-72) を用い、標準濃度血清は Imject Alum に結合させた OVA (OVA/Alum) を BALB/c マウスに 1 週間間隔で 4 回腹腔免疫することにより得た。この標準血清の抗体価は 1000 units/mL とした。ビオチン標識抗体は OVA を Biotinamido hexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester によりビオチン標識して得た。ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼは AKP Streptavidin を用いた。

### 糞中総 IgA 量の測定

#### i) 糞抽出液の調製

1 匹あたり 3~4 粒の糞を採取し、0.05% アジ化ナトリウムと 5% ウシ胎仔血清 (FCS) を含む PBS を糞重 0.1 g あたり 1 mL 加えた。1 時間 4°C で抽出し、チップの先端でつぶした後、4°C で 10 分間、13000 rpm で遠心分離した。上清を回収し、糞抽出液を得た。糞抽出液は測定に用いるまで -80°C で保存した。

#### ii) 総 IgA 量の測定

ELISA 法を用いて次のように行った。

96 ウェルマイクロタイタープレートに 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液 (pH 9.0) で希釈した一次抗体を各ウェル 50  $\mu$ L ずつ添加し、4°C で一晩静置した。PBS-Tween で 3 回洗浄後、1% BSA 含有 PBS-Tween を 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 2 時間静置することでブロッキングを行った。PBS-Tween で 3 回洗浄後、PBS-Tween で適宜希釈した培養上清および標準濃度溶液を 50  $\mu$ L ずつ添加し、4°C で一晩静置した。PBS-Tween で 5 回洗浄後、PBS-Tween で希釈したビオチン標識二次抗体液を 50  $\mu$ L ずつ添加し、遮光状態、室温で 1 時間静置した。PBS-Tween で 5 回洗浄後、PBS-Tween で希釈したストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼを 50  $\mu$ L ずつ添加し、遮光状態、室温で 1 時間静置した。PBS-Tween で 7 回洗浄後、4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを 1 mg/mL になるよう 1 M ジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH 9.8) に溶解させた基質溶液を 50  $\mu$ L ずつ添加した。遮光状態、室温で反応させ、マイクロプレートリーダー Model 550 を用いて 405 nm の吸光値を測定した。

一次抗体には Goat Anti-Mouse IgA、二次抗体には Biotin anti-mouse IgA を用いた。

### 結腸組織中の mRNA 発現量の測定

#### i) 結腸組織の採取

マウスを正中線に沿って開腹し、腸管を摘出した。肛門部より 1~4 cm の部位を結腸組織として摘出し、ISOGEN をおよそ 3 mL 添加した滅菌済 5.0 mL エッペンチューブに入れた。試料は cDNA 合成に用いるまで -80°C で保存した。

#### ii) RNA 抽出

凍結保存しておいた試料を氷上で融解し、ホモゲナイザーによって細分破碎し、再び -80°C で凍

結し、30 分後に融解することで抽出の効率上昇を試みた。溶解液にクロロホルムを 200  $\mu\text{L}$  加えてボルテックスし、室温で 2~3 分間静置後、4°C、15000 rpm で 15 分間遠心、水層（最上層）を回収した。そこに 2-プロパノールを同量混合し 10 分静置した後、4°C、15000 rpm で 10 分間遠心して RNA の沈殿を得た。すぐに上清を除き、75% エタノールを 1 mL 加えた後、4°C、15000 rpm で 5 分間遠心し、すぐに上清を除いた。エッペンチューブを逆さにしてエタノールを蒸発させてから DEPC 水 20  $\mu\text{L}$  に沈殿を溶解し総 RNA 溶液を得た。

#### iii) 逆転写反応 (cDNA 合成)

cDNA 合成には PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) を使用した。滅菌済 1.5 mL エッペンチューブに 1  $\mu\text{g}$  の総 RNA (RNA 量は分光光度計 SmartSpec Plus で O. D. (A260) を測定して算出)、PrimeScript™ RT Master Mix を 4  $\mu\text{L}$  を入れ、RNase free Water で 20  $\mu\text{L}$  にした。これを 37°C で 15 分間インキュベートし、さらに 85°C で 5 秒間加熱後、氷上に置くことで cDNA を得た。これをテンプレートとして PCR 反応を行った。試料は PCR 反応に用いるまで -20°C で保存した。

#### iv) Real-time RT-PCR による mRNA 発現量の測定

real time PCR System LightCycler を用いて real-time RT-PCR を行った。

キャピラリーに DEPC 水 3  $\mu\text{L}$ 、2×QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  forward primer 0.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  reverse primer 0.5  $\mu\text{L}$ 、テンプレート DNA 1.0  $\mu\text{L}$  を入れ、キャップで密栓した。

PCR 反応は、熱変性 95°C で 10 秒の後、アニーリング反応を 30 秒、エクステンション反応を 72°C で 30 秒を 40 サイクル行った。データ解析は以下の手法で行った。全サンプルの蛍光強度が log 関数的に増加している時点での蛍光強度を一点決定し、その点に対応したコピー数をそれぞれのサンプルについて得た。各細胞における mRNA 発現の補正は、各サンプルの目的遺伝子 cDNA コピー数をハウスキーピング遺伝子である cDNA コピー数で割ることで行った。

プライマーは、日本遺伝子研究所にデザイン、作成を委託し、実験に用いた (表 2)。実際にアニーリング反応をおこなった温度 ( $T_m$ ) も示した。

各細胞における mRNA 発現の補正は、各サンプルの目的遺伝子 cDNA コピー数をハウスキーピング遺伝子である GAPDH の cDNA コピー数で割ることで行った。

表 2. 使用したプライマー配列一覧

遺伝子名	プライマー	塩基配列
IL-4	センス	5'-CGAAGAACACCACAGAGAGTGAGCT-3'
	アンチセンス	5'-GACTCATTCATGGTGCAGCTTATCG-3'
IL-6	センス	5'-TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3'
	アンチセンス	5'-TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC-3'
IL-10	センス	5'-CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG-3'
	アンチセンス	5'-CATGTATGCTTCTATGCAGTTG-3'
IL-18	センス	5'-CAAACCTTCCAAATCACTTCCT-3'
	アンチセンス	5'-TCCTTGAAGTTGACGCAAGA -3'
IFN- $\gamma$	センス	5'-AACGGCTGACTGAACTCAGAT-3'
	アンチセンス	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATA -3'
TGF- $\beta$ 1	センス	5'-GTGGAGCAACATGTGGAAC-3'
	アンチセンス	5'-AAAGCCCTGTATTCCGTCTC-3'
GAPDH	センス	5'-TGAACGGGAACCTCACTGG -3'

#### 乳酸菌 *Lactococcus lactis* C59 の調製

乳酸菌 *Lactococcus lactis* C59 (C59) は (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 鈴木チセ博士より供与された。

C59 菌体は以下のように培養し、処理したものを使用した。15 mL チューブに分注した GM17 培地 10 mL に、-80°C にストックしておいた C59 菌体懸濁液を 60  $\mu$ L 加えて、30°C で 18 時間培養した。このときチューブを 2 本用意し、1 本はストック作製用とした。培養後 4°C に置き、6 時間後に、15 mL チューブに分注した GM17 培地 10 mL によく混和した菌体懸濁液を 0.1 mL 加え、上記と同じ条件で 18 時間培養した。ストック作製用のチューブはそのまま 4°C に保存した。18 時間培養後、GM17 培地を 200 mL 分注した 300 mL 耐熱瓶で本培養を行った。菌体懸濁液を 2 mL 添加し同様の条件下で培養した。18 時間後の菌体培養液を 50 mL チューブに分注し、4°C、4000 rpm で 15 分間遠心分離することで菌体を沈殿させた。上清を除去し、滅菌処理した 0.85% 生理食塩水で 2 回培地の洗浄を行い、沈殿した菌体を 1 本に集め、10 mL 生理食塩水でフィルアップした。菌体は生理食塩水で懸濁し、分光光度計 SmartSpec Plus で 620 nm での O.D. が 0.85 を示すように調製した。この値は菌体乾燥重量 0.35  $\mu$ g/mL に当たり、 $0.5 \times 10^6$  CFU に相当する。

また 4°C に置いた当日中に、ストックの作製を行った。4°C、4000 rpm で 15 分間遠心分離して菌体を沈殿させた。上清を除去し、滅菌処理した 0.85% 生理食塩水で 1 回培地の洗浄を行った後、GM 培地を 10 mL 添加した菌体懸濁液を作製した。滅菌して 4°C に保存しておいた 80% グリセロールを滅菌チューブに 100  $\mu$ L ずつ添加しておき、このチューブに菌体懸濁液を 500  $\mu$ L ずつ添加してボルテックスし、ストックとした。ストックは使用まで -80°C で保存した。

GM17 培地は Difco™ M17 Broth 18.625 g、グルコース 2.5 g、滅菌水 500 mL をオートクレー



ブ滅菌して調製した。

### 乳酸菌 *Lactococcus lactis* C59 の経口投与

ディスポ・フィーディング・ニードルを用いて胃ゾンデにて投与した。

### 動物細胞培養用培地

細胞の培養には、RPMI1640 培地に 100 U/mL のペニシリン、100 µg/mL のストレプトマイシン、50 mM の 2-メルカプトメタノール、0.2%炭酸水素ナトリウム、0.03% L-グルタミンおよび 10%非働化ウシ胎仔血清となるように添加したものを RPMI 培地として使用した。

### 脾臓細胞の調製

BALB/c マウスから脾臓を摘出し、4°Cの RPMI1640 (+)の入った 6 cm ディッシュに入れ、10 mL シリンジのピストン部分を用いてすり潰した。得られた細胞懸濁液をナイロンメッシュで濾過し、RPMI (+)で 5 mL にフィルアップした後、4°C、1300 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、1 mL の RPMI (+)で懸濁した。

### 腸間膜リンパ節細胞の調製

BALB/c マウスから腸間膜リンパ節 (MLN) を摘出し、4°Cの RPMI (+)の入った 6 cm ディッシュに入れ、10 mL シリンジのピストン部分を用いてすり潰した。得られた細胞懸濁液をナイロンメッシュで濾過し、RPMI (+)で 5 mL にフィルアップした後、4°C、1300 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、1 mL の RPMI (+)で懸濁した。

### パイエル板細胞の調製

BALB/c マウスから腸管およびパイエル板 (PP) を傷つけないように小腸を摘出した。HBSS (-)で小腸内の内容物を洗浄した後、PP を丁寧に切除し、HBSS (-)内で軽く洗浄した。3 mL の PBS を入れた 15 mL 容ラウンドチューブを 3 本用意し、PP を移し入れ、滅菌スポイトで攪拌することで洗浄を 3 回行った。洗浄後、2 mL のコラゲナーゼ溶液と 5mm 長径の攪拌子を入れた 15 mL 容ラウンドチューブに PP を移し、37°Cの温水を入れたビーカー内で 30 分攪拌した。溶液をメッシュ付きチューブで濾過し、RPMI (+)で 10 mL にフィルアップした後に 4°C、1300rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去後、EDTA 溶液を 2 mL 添加し、5 分室温で静置した。RPMI (+)で 5 mL にフィルアップした後に 4°C、1300rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去することを 2 回行って洗浄し、1 mL の RPMI (+)で懸濁した。

コラゲナーゼ溶液はコラゲナーゼ 10mg/mL 1 mL、DNase 10mg/mL 15 µL、FCS 500 µL、RPMI (-) 8.5mL を調製した。EDTA 溶液は 0.5 M EDTA 500 µL、FCS 500 µL、PBS (-) 9.4mL を調製した。

### TGF-β<sup>+</sup>産生試験

i) 培地および培養条件

BALB/c マウスから調製した脾臓細胞、MLN 細胞あるいは PP 細胞を任意の細胞数で 96 ウェル平

底プレートに播種した。培地は RPMI (+) を使用した。培養条件は 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C に設定した。

#### ii) TGF- $\beta$ 量の測定

培養後、上清を回収し、ELISA 法を用いて次のように行った。96 ウェルマイクロタイタープレートに 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液 (pH9.0) で希釈した一次抗体を各ウェル 50  $\mu$ L ずつ添加し、4°C で一晩静置した。PBS-Tween で 3 回洗浄後、3% BSA 含有 PBS-Tween を 100 $\mu$ L ずつ添加し、室温で 2 時間静置することでブロッキングを行った。PBS-Tween で 3 回洗浄後、3% BSA 含有 PBS-Tween で適宜希釈した培養上清および標準濃度溶液を 50  $\mu$ L ずつ添加し、4°C で一晩静置した。PBS-Tween で 3 回洗浄後、3% BSA 含有 PBS-Tween で希釈したビオチン標識二次抗体液を 50  $\mu$ L ずつ添加し、遮光状態、室温で 1 時間静置した。PBS-Tween で 5 回洗浄後、3% BSA 含有 PBS-Tween で希釈したアビジン標識西洋ワサビ過酸化酵素を 50  $\mu$ L ずつ添加し、遮光状態、室温で 1 時間静置した。PBS-Tween で 7 回洗浄後、50  $\mu$ L ずつ添加した。遮光状態、室温で TMB Substrate Reagent と反応させ、2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 30  $\mu$ L ずつ添加して酵素反応を停止し、マイクロプレートリーダー Model 550 を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

一次抗体には Purified Rat Anti-Mouse, Human, Pig, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>、二次抗体には Biotin Rat Anti-Mouse, Human, Pig TGF- $\beta$ <sub>1</sub>、アビジン標識西洋ワサビ過酸化酵素は Streptavidin HRP、TMB Substrate Reagent は BD OptEIA TMB Substrate Reagent Set を用いた。

ブロッキングを行っている間、培養上清 70  $\mu$ L に対して 5  $\mu$ L の 1N HCl を添加し、4°C にて 1 時間静置した。添加した HCl と同量の 1N NaOH を加えて中和したものを試料とした。

### 統計解析

2 群間における血清中抗体量の比較は、Student の *t* 検定を用いた。群間における体重推移の比較には、Tukey 検定を用いた。群間における糞便スコアの比較には、Dunn's multiple comparison test を用いた。いずれの検定法においても、危険率 5% で有意差ありと判断した。

## 3. 結果

### D011.10 マウスにおけるストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルの探索

図 1 に示したスケジュールにしたがって、D011.10 マウス 3 匹に拘束ストレスを 1 日 4 時間 7 日間負荷した後、引き続きストレスの負荷とともに 20%OVA 含有水を 1 週間投与した。飼育期間中はストレス負荷前に毎日体重を測定した。最終日である 15 日目に採糞および採血を行い、糞中総 IgA 量および血清中の総 IgE 量と OVA 特異的 IgE 量を測定した。

OVA を投与したコントロール+OVA 群、ストレス+OVA 群において OVA 投与直後に体重減少がみられ、特にストレスを負荷されている群で一時的に顕著な体重減少が確認された (図 2)。また OVA の投与により糞中総 IgA 量が減少すること、血清中総 IgE 量が増加することが明らかとなったが、ストレスの有無による差はみられなかった (図 3)。このとき OVA 特異的 IgE 量は検出することができなかった。

さらにストレスの負荷を強める方法として拘束ストレスの時間を 1 日 6 時間に延ばし、検討した。図 4 に示したスケジュールにしたがって、D011.10 マウス 4 匹に拘束ストレスを 1 日 6 時間 7 日間負荷した後、引き続きストレスの負荷とともに 20%OVA 含有水を 1 週間投与した。飼育期間

中はストレス負荷前に毎日体重を測定した。体重減少直後の13日目に採糞および採血を行い、糞中総IgA量および血清中の総IgE量とOVA特異的IgE量を測定した。

拘束ストレスを1日4時間負荷したときと同様に、OVAを投与したコントロール+OVA群、ストレス+OVA群においてOVA投与直後に体重減少がみられ、特にストレスを負荷されている群で一時的に有意な体重減少が確認された(図5)。またこの方法においてもOVAの投与により糞中総IgA量が減少すること、血清中総IgE量が増加することが明らかとなったが、ストレスの有無による差はみられず、OVA特異的IgE量を検出することはできなかった(図6)。

D011.10 マウスにおけるストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルは確立には至らなかったが、拘束ストレスの負荷とOVAの摂取が同時に起こると体重が極度に減少していることから腸管免疫機能が低下する可能性が示された。

### **BALB/c マウスにおけるストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルの構築**

図7に示したスケジュールにしたがって、BALB/c マウス5匹に拘束ストレスを4時間4日間負荷した。本実験系では拘束の方法を変更し、さらにストレス強度が高いと考えられる、布でマウスをくるんでから50 mL シリンジに入れて拘束する方法で拘束ストレスの負荷を行った。飼育期間中はストレス負荷前に毎日体重を測定した。ストレス負荷の最終日11日目に採糞および結腸組織の採取を行い、糞中総IgA量と結腸組織中のIL-6遺伝子発現量を測定した。

ストレス群に有意な体重減少がみられ(図8)、糞中総IgA量も減少した(図9A)。またIgA分泌細胞の分化に必要なIL-6のmRNA発現量が減少する傾向も見出した(図9B)。

BALB/c マウスにおけるストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルとして強度の拘束ストレス負荷が有用であり、腸管免疫機能低下の指標として体重減少、糞中総IgA量低下、IL-6のmRNA発現量低下が示された。

### **C59 投与による脾臓細胞のTGF- $\beta$ の産生増加**

図10に示した方法にしたがって、BALB/c マウスに1週間、C59を胃内強制投与し、OVAをアラムアジュバントと共に、2回、腹腔免疫した時の、脾臓細胞からのTGF- $\beta$ 産生量を測定した。その結果、これまでの報告通り、OVAの刺激の有無にかかわらず、C59の投与により、脾臓細胞からのTGF- $\beta$ 産生は有意に増加したことが示された(図11)。

### **C59 が直接相互作用したときのMLN細胞およびPP細胞のTGF- $\beta$ 産生**

図12に示した方法にしたがって、BALB/c マウスから調製したMLN細胞あるいはPP細胞とC59を共培養した。48時間後に培養上清を回収し、TGF- $\beta$ 量を測定した。PP細胞に関しては明確な効果を見出すことはできなかったが、MLN細胞と培養時にC59の濃度依存的にTGF- $\beta$ 産生の促進が認められた(図13)。

### **ストレス誘導性の腸管免疫機能低下に対するC59の効果**

図14に示したスケジュールにしたがって、BALB/c マウスにC59を7日間経口投与した後、引き続きC59の投与とともに拘束ストレスを1日4時間4日間負荷した。飼育期間中はストレス負

荷前に毎日体重を測定した。ストレス負荷の最終日 11 日目に採糞および結腸組織の採取を行い、糞中 IgA 量と結腸組織中の IL-6 遺伝子、TGF- $\beta$  遺伝子発現量を測定した。

ストレスを負荷した生理食塩水/ストレス群、C59/ストレス群においてストレス負荷直後より体重減少が認められた。生理食塩水/ストレス群と比べ C59/ストレス群でこの体重減少の程度は有意に小さく、C59 の経口投与がストレス負荷による体重減少を緩和したと考えられる (図 1 5)。また結腸における IL-6 の mRNA 発現量は C59 摂取の有無による差は認められなかったが (図 1 6 B)、糞中 IgA 量 (図 1 6 A)、TGF- $\beta$  の mRNA 発現量がストレス負荷で減少し、この減少が C59 投与によって緩和する傾向が見出された (図 1 6 C)。

上記の結果より、C59 が TGF- $\beta$  の産生を促進する免疫修飾機能を有すること、拘束ストレスによる体重の減少を緩和し、糞中 IgA 量についても減少を緩和する傾向を示すことが明らかとなった。

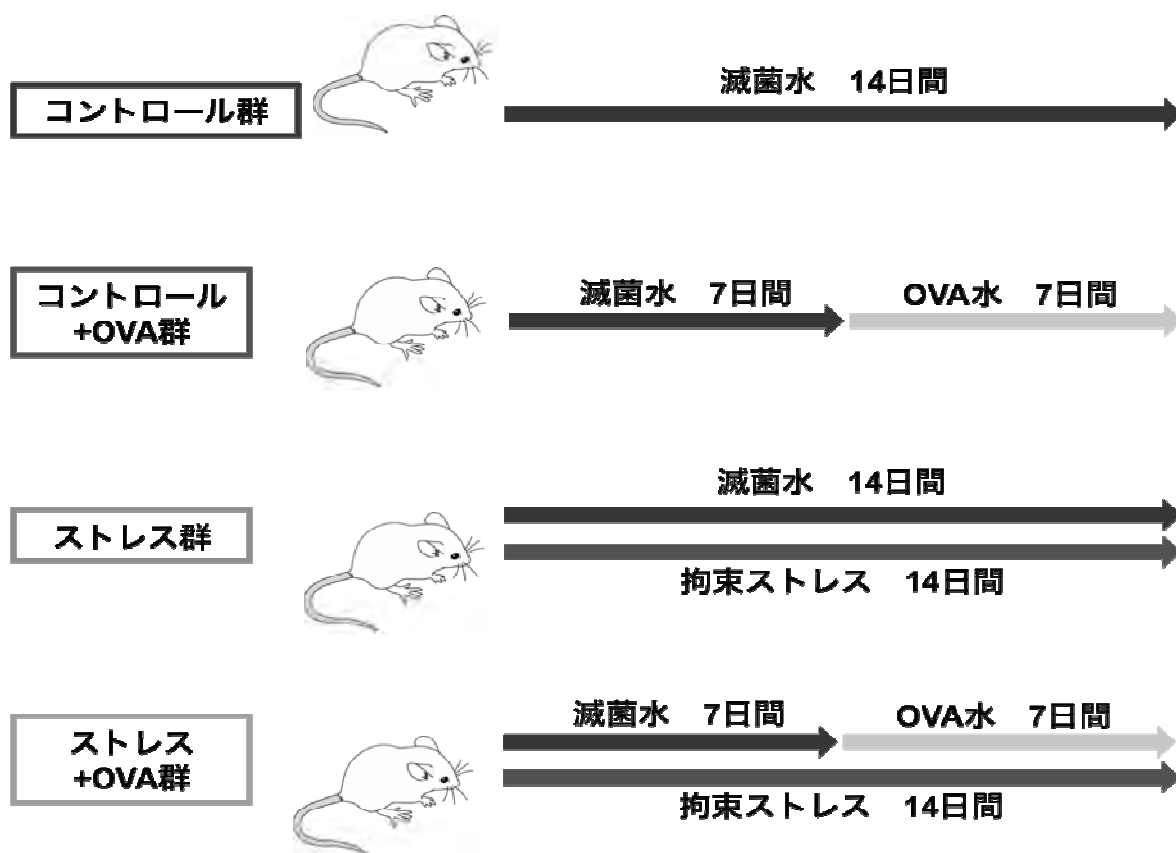


図 1 ストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルを確立するための D011.10 マウス飼育スケジュール (1)

拘束ストレス方法①に従って、7日間、1日4時間の拘束ストレスを負荷した。その後、ストレス負荷とともに 20%OVA 含有水を7日間自由摂取した。対照群としてコントロール群、コントロール+OVA群、ストレス群を用意した。各群 n = 3。実験終了時に、体重推移、血液および糞便を採取した。

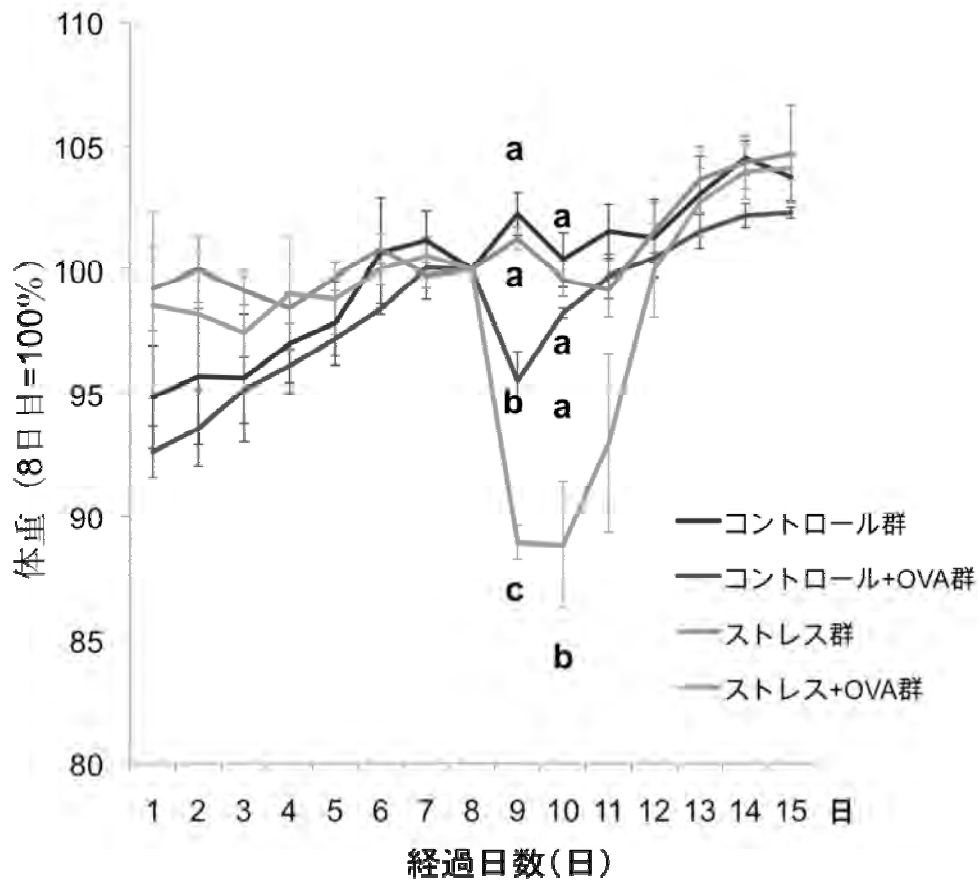


図2 拘束ストレス1日4時間負荷およびOVA水摂取時のD011.10 マウスにおける体重推移

図1の実験スケジュールに従ってD011.10 マウスを飼育し、毎日ストレス負荷前に体重を計測した。20%OVA含有水の投与を開始した8日目の体重を100%とした。各群n=3で行い、値は平均値(±SEM)で示した。有意差検定にはTukeyの方法を用いた。危険率5%で異符号間に有意差あり。

横軸は実験開始日を1とした。

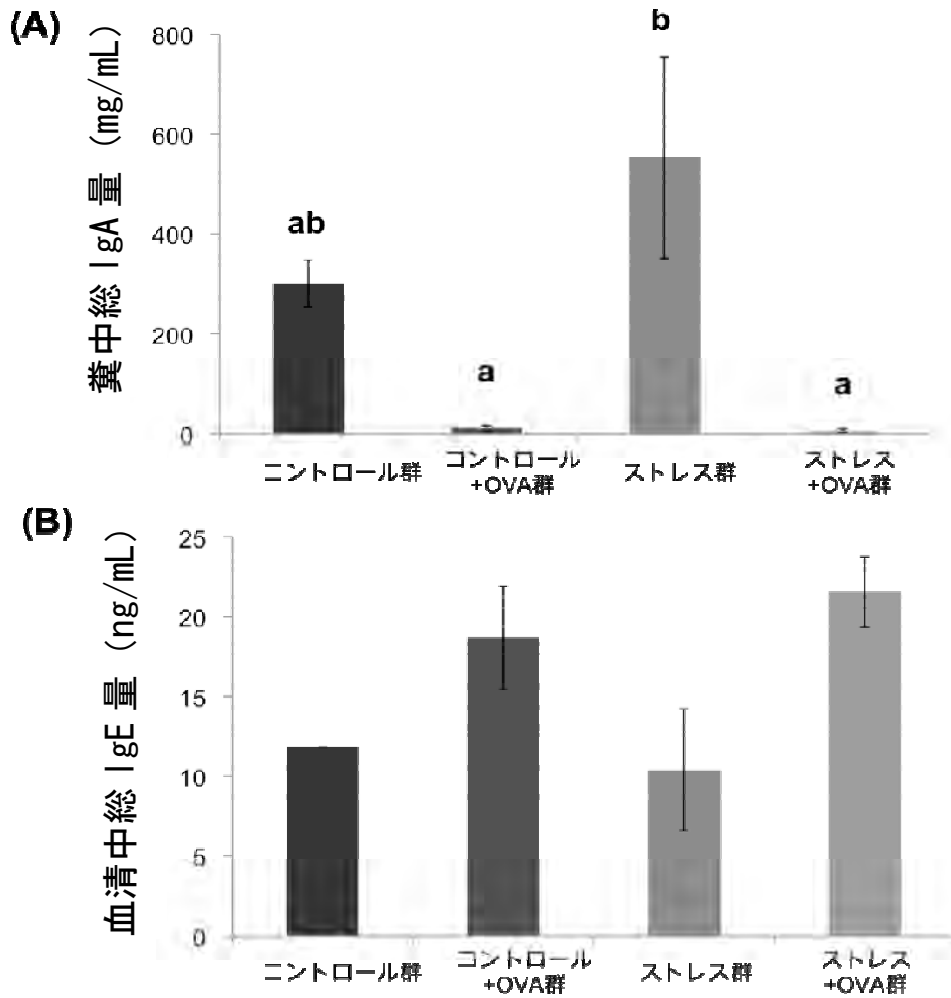


図3 拘束ストレス1日4時間負荷時およびOVA摂取時のD011.10マウスの糞中総IgA量(A)と血清中総IgE量(B)

図1の実験スケジュールに従って飼育したD011.10マウスから15日目に採糞および採血を行い、ELISA法により糞中総IgA量(A)、血清中総IgE量を測定した(B)。各群n=3で行い、値は平均値(±SEM)で示した。有意差検定にはTukeyの方法を用いた。危険率5%で異符号間に有意差あり。

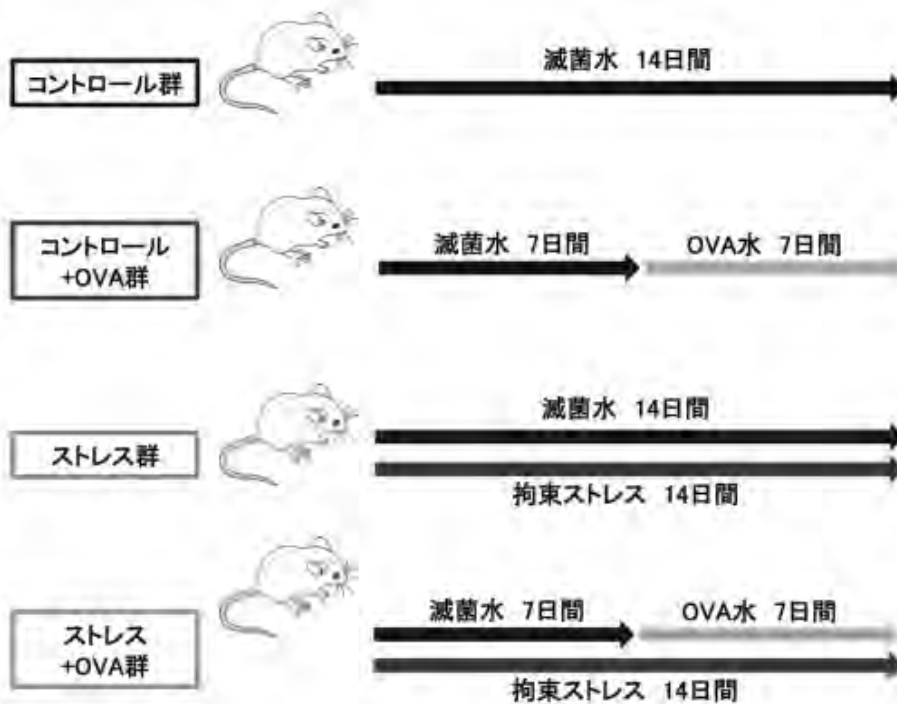


図4 ストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルを確立するための D011.10 マウス飼育スケジュール (2)

拘束ストレス方法①を1日6時間7日間投与した後、20%OVA含有水を7日間投与した。対照群としてコントロール群、コントロール+OVA群、ストレス群を用意した。各群 n=4。実験終了時に、体重推移、血液および糞便を採取した。

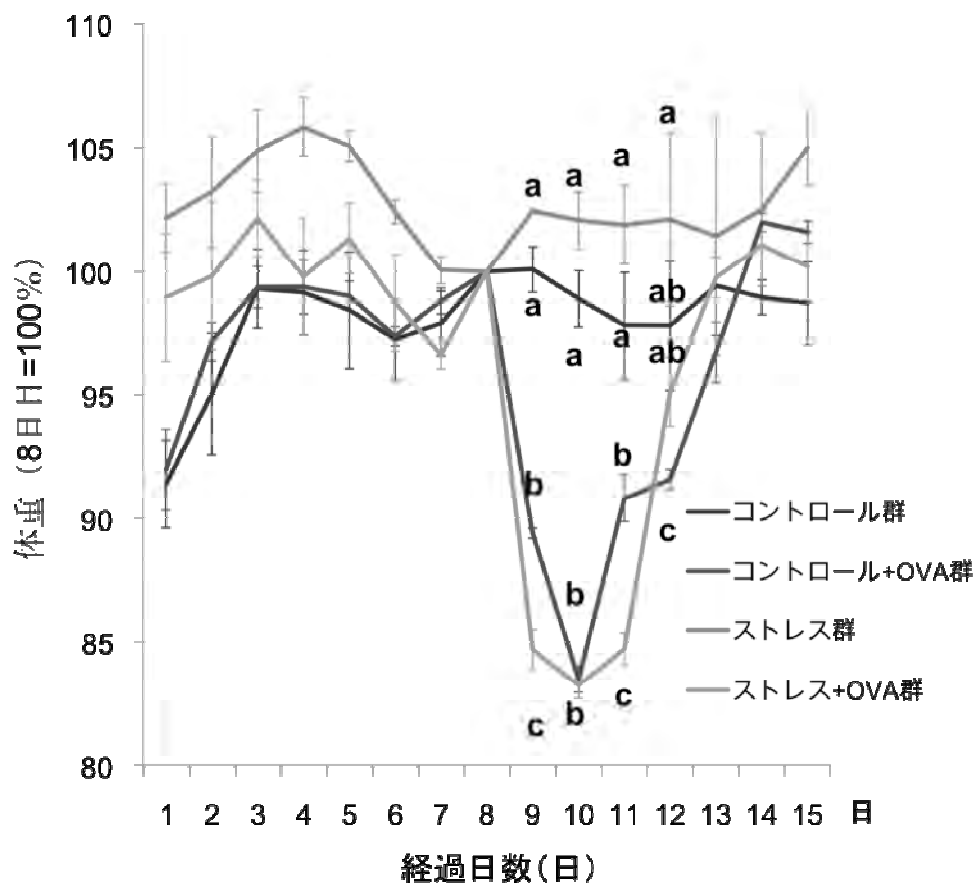


図5 拘束ストレス1日6時間負荷時およびOVA摂取時のD011.10マウスの体重推移

実験スケジュール(図4)に従ってD011.10マウスを飼育し、毎日ストレス負荷前に体重を測定した。20%OVA含有水の投与を開始した8日目の体重を100%とした。各群n=4で行い、値は平均値(±SEM)で示した。有意差検定にはTukeyの方法を用いた。危険率5%で異符号間に有意差あり。

横軸は実験開始日を1とした。



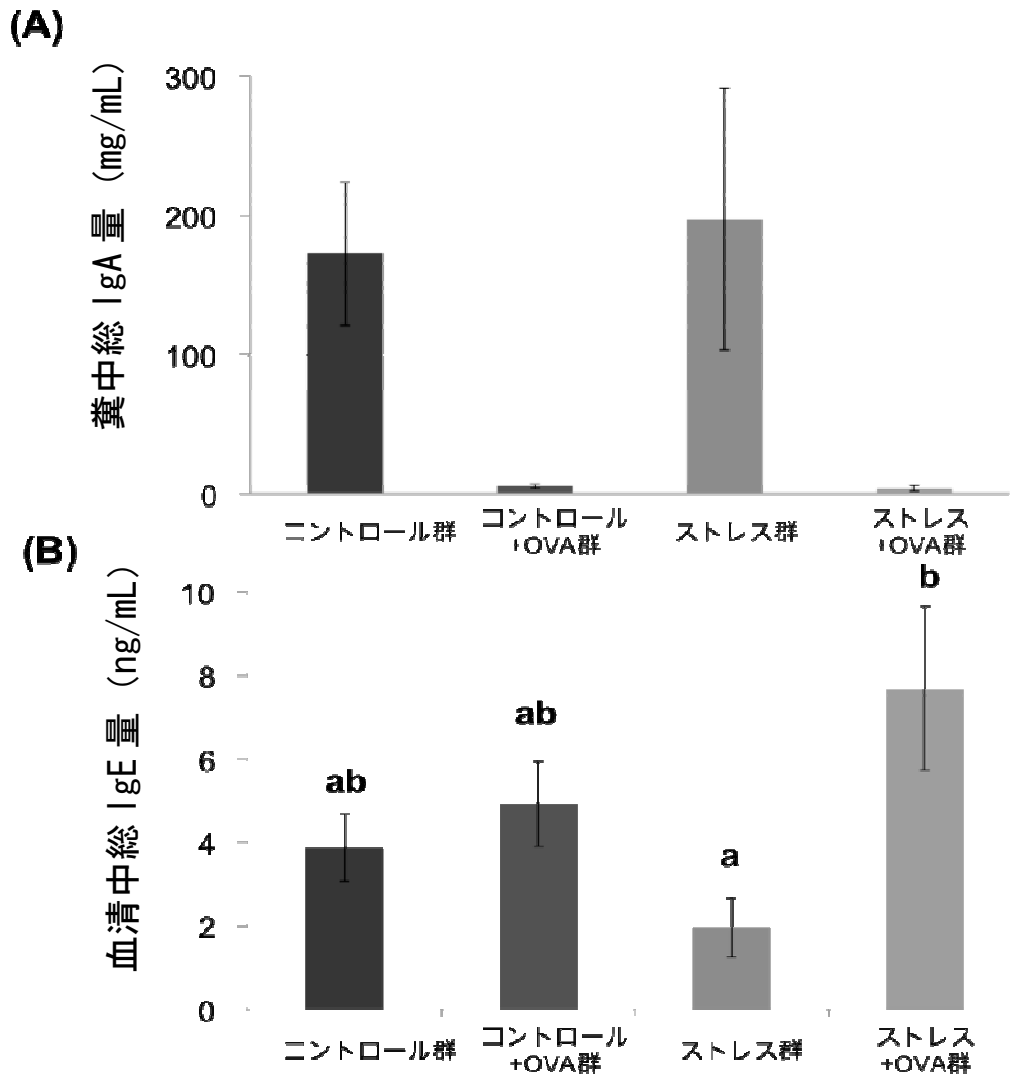


図6 拘束ストレス1日6時間負荷時およびOVA摂取時のD011.10マウスの糞中IgA量(A)と血清中IgE量(B)

図4に従って飼育したD011.10マウスより13日目に採糞、採血を行い、ELISA法により糞中IgA量(A)、血清中IgE量(B)を測定した。各群n=4で行い、値は平均値(±SEM)で示した。有意差検定にはTukeyの方法を用いた。危険率5%で異符号間に有意差あり。



図7 ストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルを確立するための BALB/c マウス飼育スケジュール

通常飼育を7日間行って順化させた後、拘束ストレス方法②に従い、1日4時間計4日間負荷した。実験開始から11日目に、採糞および結腸組織の採取を行った。対照群としてコントロール群を用意した。各群 n=5。このとき両群に生理食塩水を1日 200  $\mu$ L 投与した。

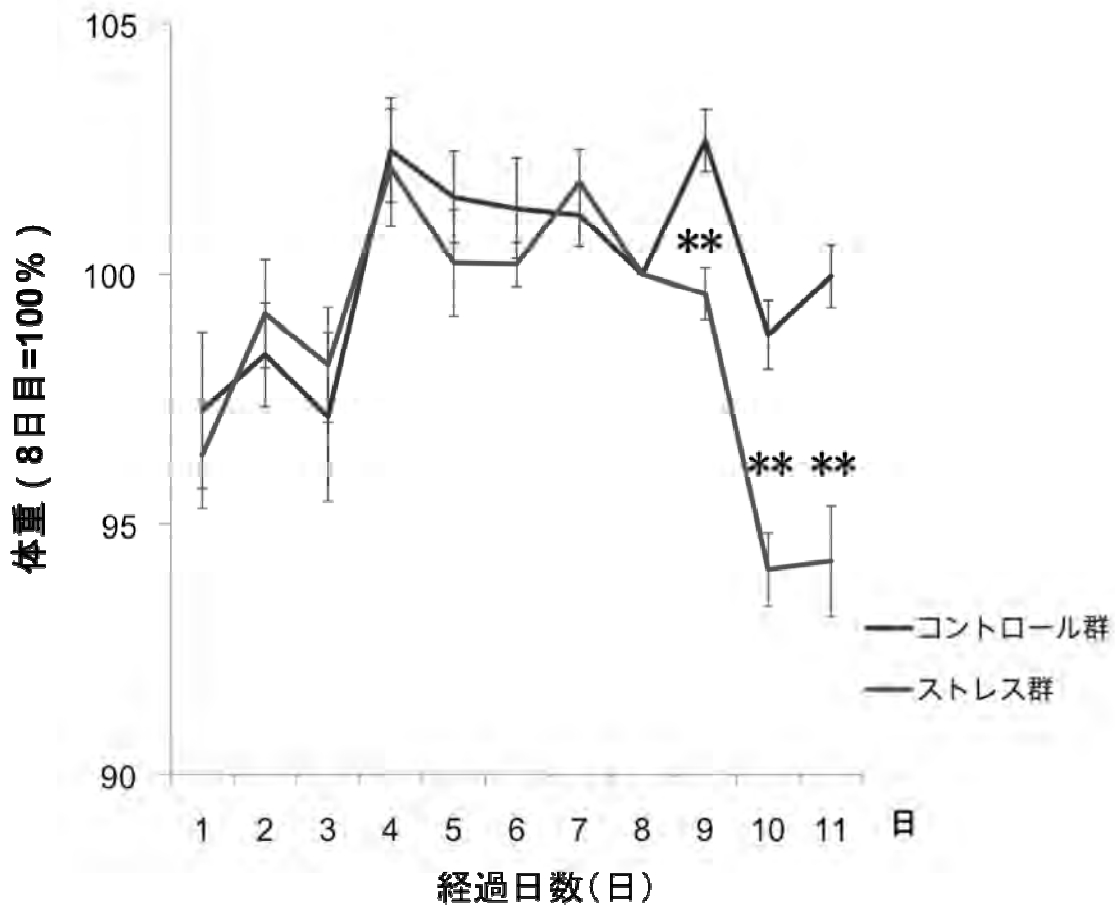


図8 拘束ストレス1日4時間負荷時のBALB/cマウスの体重推移

拘束ストレス方法②を用いた実験スケジュール(図7)に従い、BALB/cマウスを飼育し、毎日の体重を測定した。ストレス負荷期間中はストレス負荷前に体重を計測した。ストレス負荷を開始した8日目の体重を100%とした。各群n=5で行い、値は平均値(±SEM)で示した。有意差検定にはStudentのt検定を用いた。危険率1%で有意差あり(\*\*)。横軸は実験開始日を1とした。

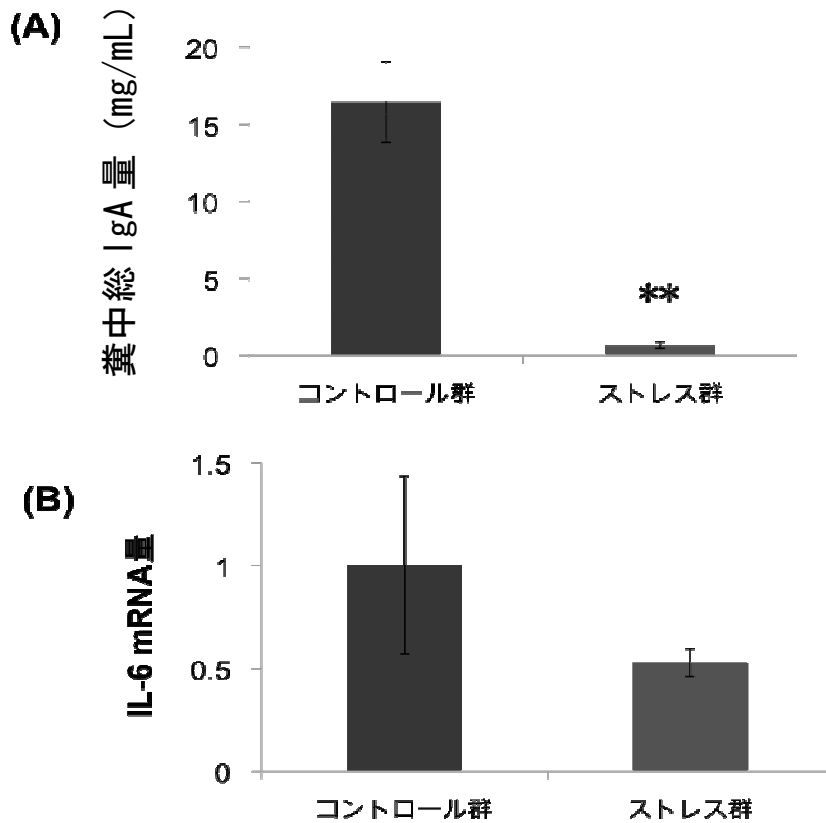


図9 拘束ストレス1日4時間4日間負荷後のBALB/cマウスの糞中総IgA量(A)と結腸組織中IL-6 mRNA発現量(B)

拘束ストレス方法②を用いた実験スケジュール(図7)に従い飼育したBALB/cマウスより11日目に採糞を行い、ELISA法により糞中総IgA量を測定した(A)。また同時に結腸組織を採取し、結腸組織中のIL-6遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCR法を用いて測定した(B)。図にはGAPDH cDNA 1コピーに対するIL-6遺伝子のcDNAのコピー数を算出し、コントロール群を1として示した。各群n=5で行い、値は平均値(±SEM)で示した。有意差検定にはStudentのt検定を用いた。危険率1%で有意差あり(\*\*)。

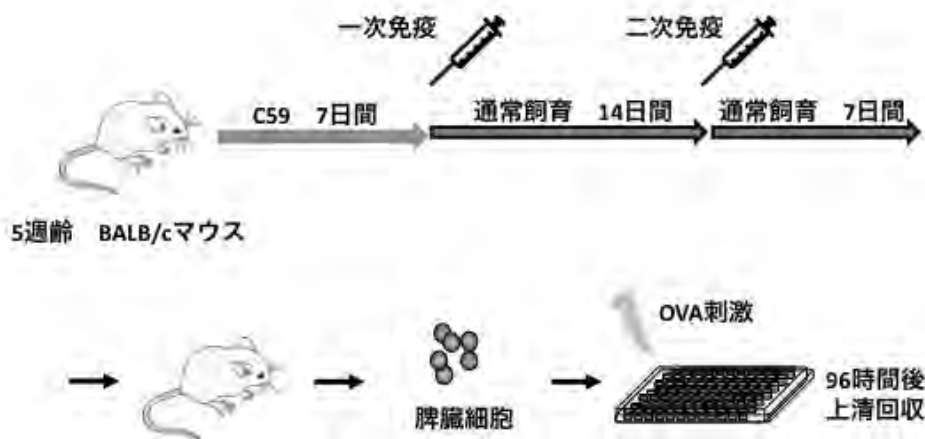


図10 C59が誘導する脾臓細胞のTGF- $\beta$ 産生を検討するための実験スケジュール

C59を1週間摂取し、以後2回の免疫を経たBALB/cマウスより、脾臓細胞を調製し、96時間後に培養上清を得た。コントロール群には生理食塩水群を用意した。各群n=8~11匹。C59は懸濁液としての吸光値(OD<sub>620</sub>値)が0.85となるように調製し、1日200 $\mu$ L投与した。脾臓細胞は $4 \times 10^6$  cells/mLに調製し、24ウェルプレート1ウェル当たり500 $\mu$ L添加し、またOVAは1ウェルあたり0、10、100 $\mu$ gとなるように調製し、1ウェル当たり100 $\mu$ L添加した。培養上清の回収は96時間後とした。

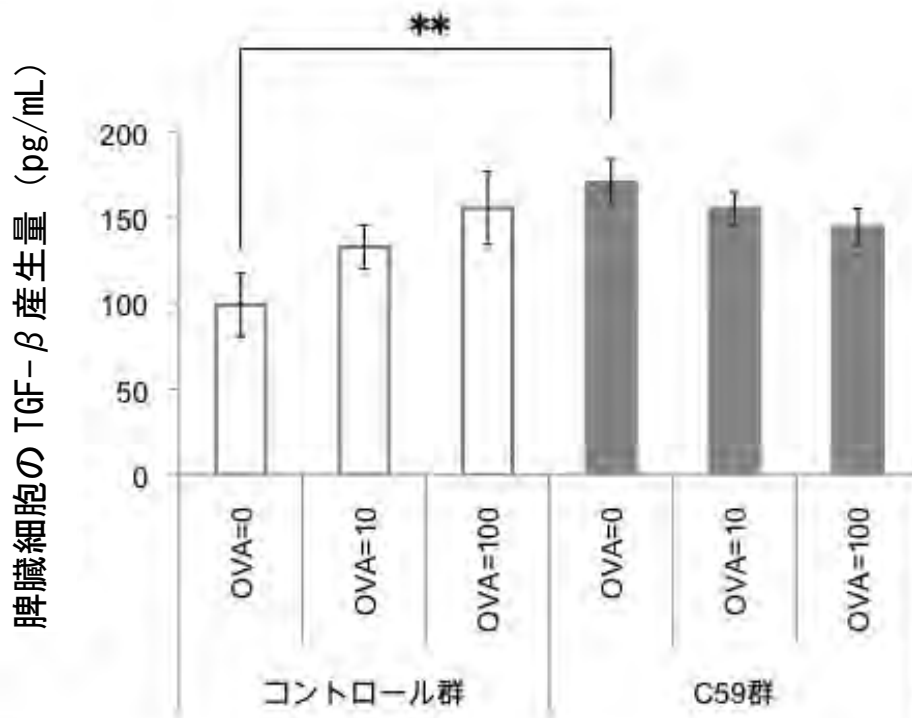


図 1 1 C59 投与による脾臓細胞の TGF-β の産生増加

図 1 0 にしたがって得た培養上清中の TGF-β 量を ELSIA 法によって計測した。各群 n=8-11 で  
 行い、値は平均値 (±SEM) で示した。有意差検定には Student の *t* 検定を用いた。危険率 1% で  
 有意差あり (\*\*).

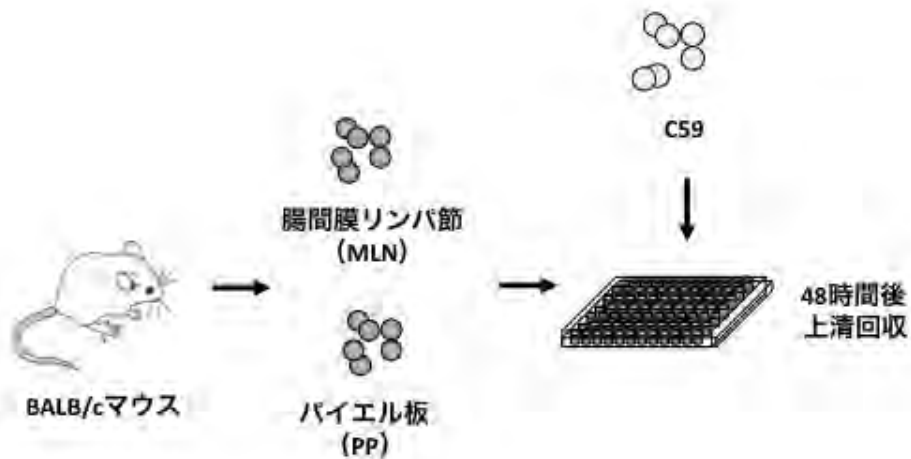


図 1 2 C59 が MLN 細胞あるいは PP 細胞と直接相互作用したときの TGF- $\beta$  産生を検討するための実験スケジュール

BALB/c マウスより MLN 細胞および PP 細胞を調製し、C59 と共培養した。

MLN 細胞および PP 細胞は  $3 \times 10^6$  cells/mL に調製し、96 ウェルプレート 1 ウェル当たり 100 $\mu$ L 添加し、また C59 は懸濁液としての吸光値 (OD<sub>620</sub> 値) が 0、0.0001、0.001、0.01 となるように調製し、1 ウェル当たり 100 $\mu$ L 添加した。培養上清の回収は 48 時間後とした。

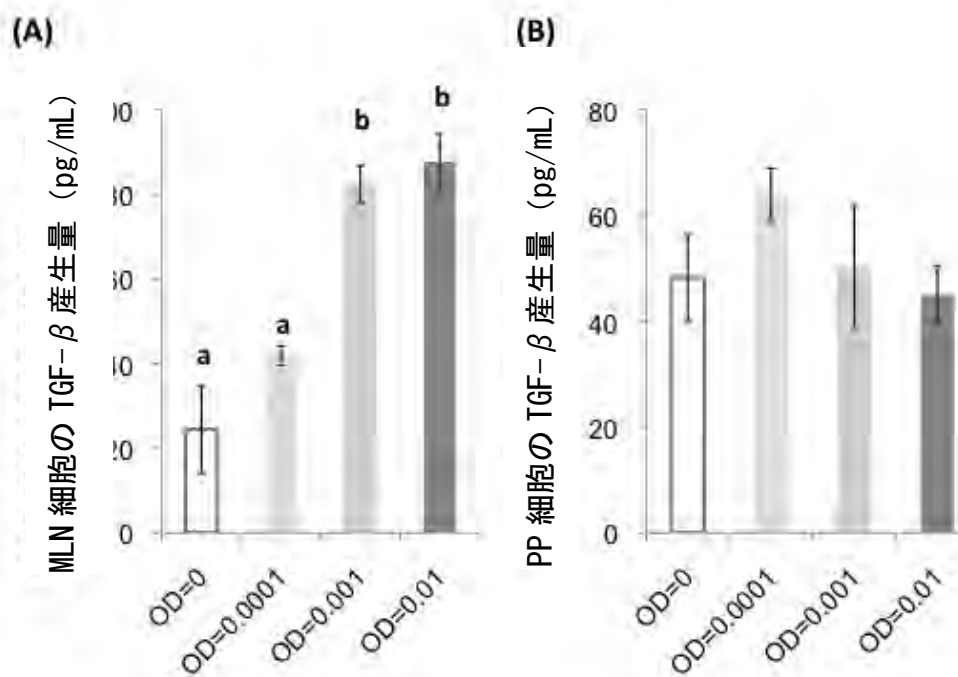


図 13 C59 が MLN 細胞あるいは PP 細胞と直接相互作用したときの TGF-β 産生

図 12 に従って得た培養上清中の TGF-β 量を ELSIA 法によって計測した。各群 n=3 で行い、値は平均値 (±SEM) で示した。有意差検定には Tukey を用いた。危険率 5% で異符号間に有意差あり。



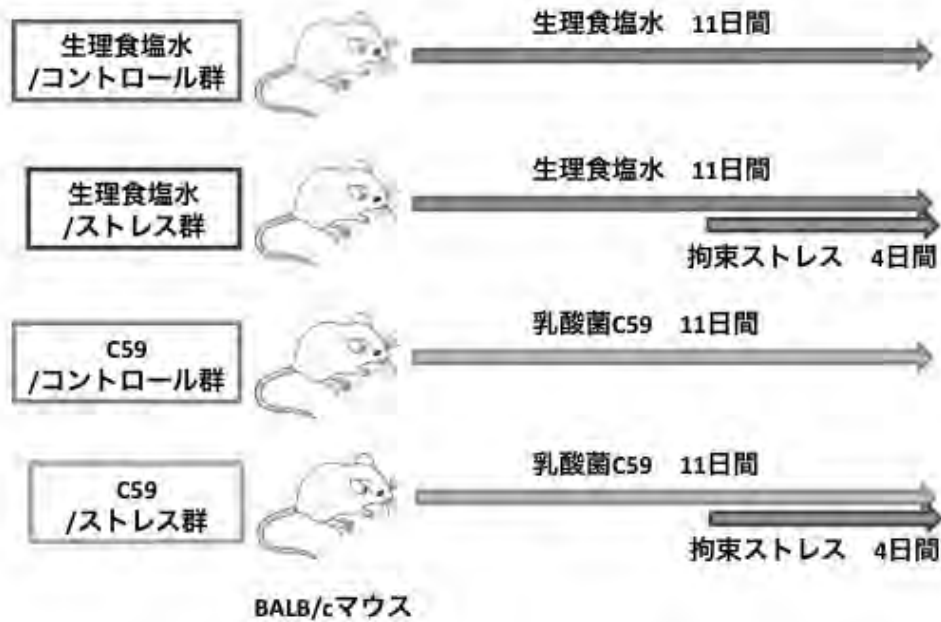


図 1 4 ストレス誘導性の腸管免疫機能低下に対する C59 の効果を検討するための BALB/c マウス飼育スケジュール

C59 の投与を 7 日間行った後、C59 の投与とともに拘束ストレス（拘束ストレス方法②）を 1 日 4 時間 4 日間の負荷した。対照群として生理食塩水/コントロール群、生理食塩水/ストレス群、C59/コントロール群を用意した。各群 n=5。生理食塩水群には 0.85%食塩水を 1 日 200 $\mu$ L 投与した。

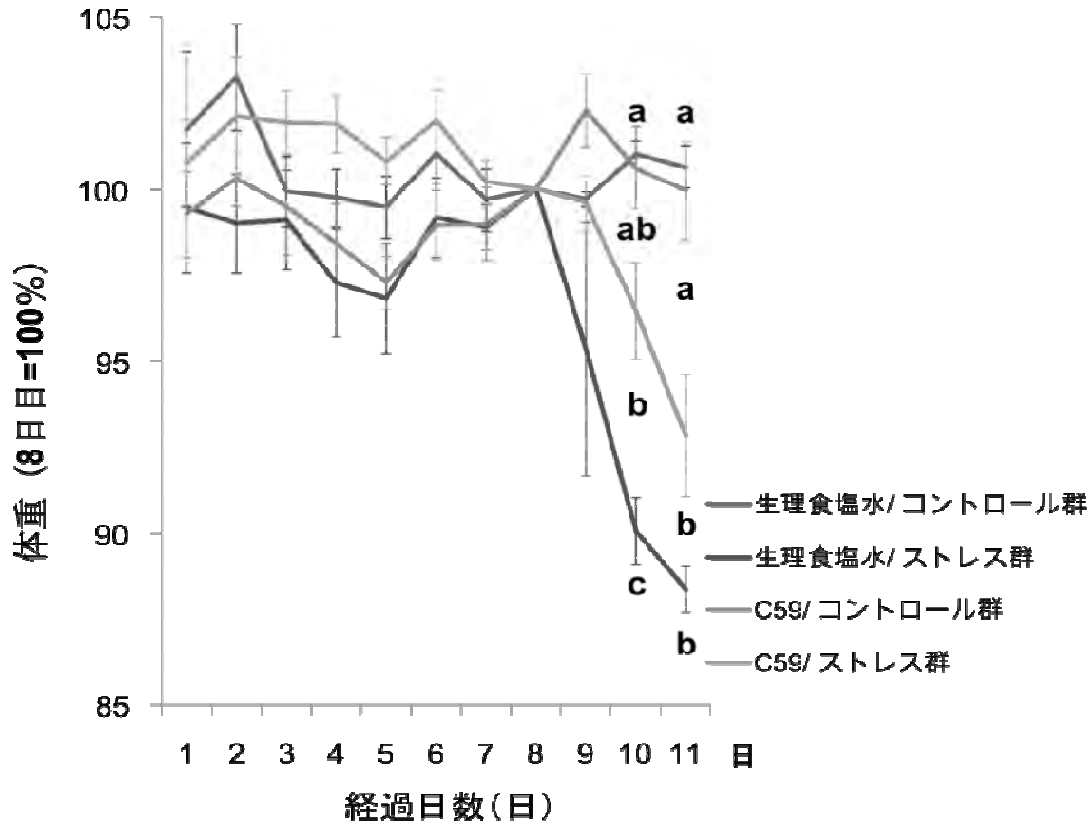


図15 C59の投与および拘束ストレス1日4時間4日間負荷時のD011.10マウスの体重推移

図14にしたがって BALB/c マウスを飼育し、毎日ストレス負荷前に体重を計測した。ストレス負荷を開始した8日目の体重を100%とした。各群 n=5 で行い、値は平均値 (±SEM) で示した。有意差検定には Tukey を用いた。危険率 5% で異符号間に有意差あり。横軸は実験開始日を 1 とした。

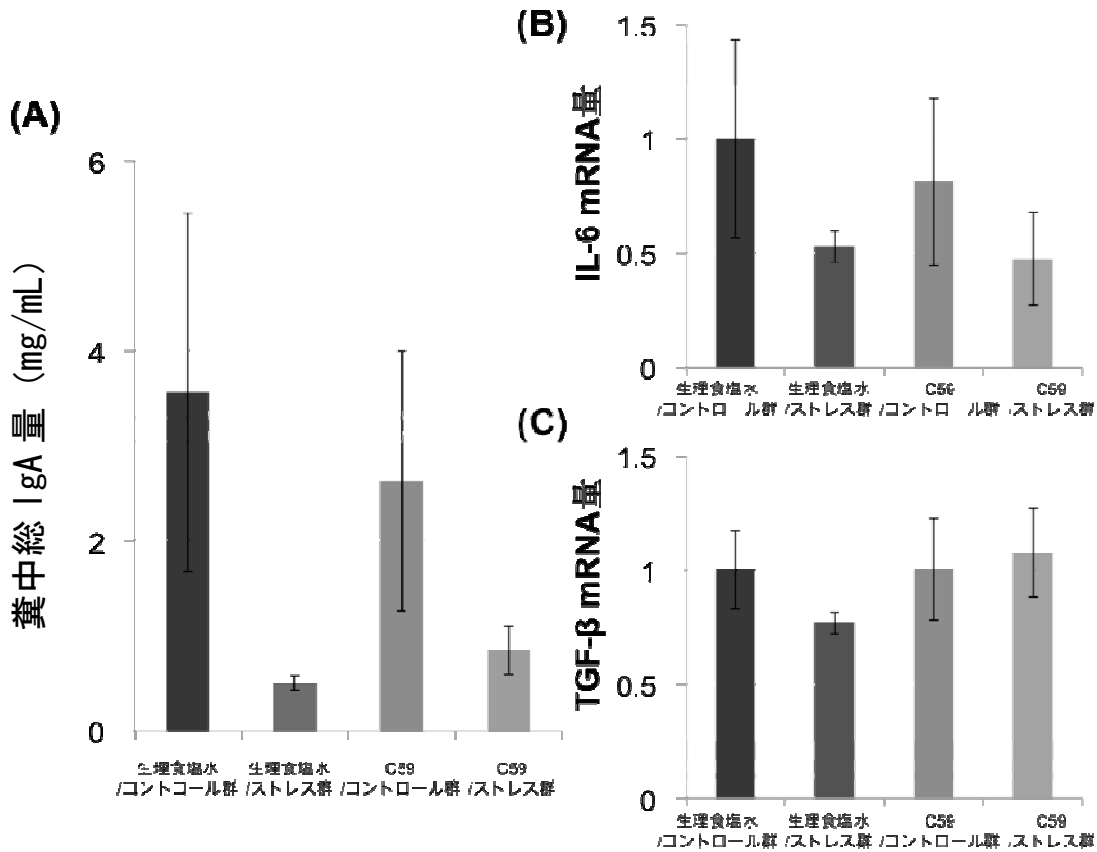


図16 C59の投与および拘束ストレス1日4時間4日間負荷後のBALB/cマウスの糞中総IgA量(A)、結腸組織中IL-6(B)、TGF-β mRNA発現量(C)

図14に従って飼育したBALB/cマウスより11日目に採糞を行い、ELISA法により糞中総IgA量を測定した(A)。また同時に結腸組織を採取し、結腸組織中のIL-6(B)、TGF-β(C)遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCR法を用いて測定した。図にはGAPDH cDNA 1コピーに対するIL-6、TGF-β遺伝子のcDNAのコピー数を算出し、コントロール群を1として示した。各群n=5で行い、値は平均値(±SEM)で示した。

#### 4. 考察

ストレスが自律神経系や内分泌系に変化をもたらし、相関する免疫系の変動も導くことが知られている。臨床的にも潰瘍性大腸炎や過敏性腸症候群などの腸疾患、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー疾患の発症・増悪にストレスが関与する可能性は広く知られている。ストレスが誘導し、免疫応答が関与するアレルギー性の腸炎症モデルを確立することはこれらの疾患の解析に有用である。特に本研究では発症・増悪を抑制、予防する食品成分の探索に用いるモデルの構築を目指した。

まず D011.10 マウスについて、ストレスの負荷と OVA の投与を同時に行い、腸管免疫系の変化を誘導することによってモデルの確立を試みた。マウスに代表的な精神的ストレス負荷である拘束ストレスと OVA の投与を同時に行うと一時的に有意な体重の減少が確認された。しかし糞中総 IgA 量、血清中総 IgE 量は OVA 投与群でそれぞれ低い傾向、高い傾向がみられたもののストレスの有無で差はみられなかった。D011.10 マウスにおけるストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルは確立には至らなかったが、拘束ストレスの負荷と OVA の摂取が同時に起こると体重が極度に減少していることから腸管免疫機能が低下する可能性が示された。

また BALB/c マウスについて拘束ストレスの負荷によって腸管洗浄液中 IgA 量が減少するという報告をもとに (Jarillo-Luna, A., *et al.*, *Psychoneuroendocrinology*, 2007. **32**(6): p. 681-92)、拘束ストレスによって腸管免疫系の変化を誘導することによってモデルの確立を試みた。本実験系では拘束の方法を変更し、さらにストレス強度が高いと考えられる拘束ストレスの負荷を行った。報告と同様に IgA 量が減少することに加え、体重の減少が認められた。また IgA 産生形質細胞の分化に必要な IL-6 の mRNA 発現量が減少する傾向が見出された。BALB/c マウスにおけるストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルとして強度の拘束ストレス負荷が有効であり、腸管免疫機能低下の指標として体重推移、糞中 IgA 量、IL-6 の mRNA 発現量が示された。

##### ストレス負荷の方法

ストレスについて明確な定義はなく、ストレス刺激は恒常性を直接乱す刺激である物理的ストレスと、乱すおそれがあると生体が判断した刺激である精神的ストレスの大きく2つに分けて考えることができる。温熱や寒冷などの物理的ストレスは血流促進による腸管の蠕動運動の活発化など直接的影響が認められ、これらは体温や血圧、脱糞数などの指標をもつ。一方で不安や緊張などの精神的ストレスは神経系や内分泌系、免疫系が複雑に連動して応答を示し、統一的な指標は認められていない。本研究は精神的ストレスによる腸管免疫系の変化の指標の把握に着目した点に新規性がある。

本研究では精神的ストレスの代表とされる拘束ストレスの負荷方法を2通り用いた。チューブ内に単に入れることで拘束する方法(拘束ストレス方法①)に加えて、布で巻いて緊縛したうえでチューブ内に拘束する方法(拘束ストレス方法②)も行った(図A)。拘束ストレス方法①を用いた、D011.10 マウスのストレス群では体重および糞中総 IgA 量が減少しないことから、比較的軽度のストレス負荷であったと推察される。実際に拘束ストレス方法①では、BALB/c マウスにおいて腸管洗浄液中 IgA 量、糞中 IgA 量が下がらないことが確認されており(データ未掲載)、拘束ストレス方法②が目指すモデルの構築に適していると言える。

## 血清中 IgE 抗体産生量

先行実験において、飼育環境の悪化時に、OVA特異的IgE量が増加したこと、体重の減少が顕著であったこと、回腸での絨毛の萎縮からアレルギー性の腸炎症状が誘導されると判断した。本研究ではIgE量をストレスが誘導する免疫機能の変化の一指標として検討を行った。

先行実験において、環境の悪化によるストレス負荷がかかったと考えられる時の IgE 量と通常飼育時の IgE 量の値は大きく異なる。ストレス負荷時の IgE 量はコントロール群においても OVA 群においても少ない。しかし、通常飼育時の IgE 量でも腸管アレルギー症状はみられなかった。ストレス負荷時には胸腺の萎縮やリンパ球の機能低下、脾臓リンパ球数の減少が報告されていることから (Fukui, Y., *et al.*, *J Neuroimmunol*, 1997. 79(2): p. 211-7, Okimura, T., Y. Satomi-Sasaki, and S. Ohkuma, *Jpn J Pharmacol*, 1986. 40(4): p. 513-25, Okimura, T. and Y. Nigo, *Jpn J Pharmacol*, 1986. 40(4): p. 505-11)、ストレスによって抗体応答が落ちており、そのなかでの IgE 量の優位がアレルギー優位な状態へ導いた可能性がある。ストレスによって抗体応答が落ちた可能性は、今回行った実験において OVA 特異的 IgE 量が検出できなかった一因とも考えられる。実際に、OVA を腹腔注射した BALB/c マウスは血清中の OVA 特異的 IgE 量が減少することが報告されている (Fukui, Y., *et al.*, *J Neuroimmunol*, 1997. 79(2): p. 211-7)。

ストレスを負荷し、続いてOVAを投与したストレス+OVA群でIgE量が増加していたが、ストレスを負荷していないコントロール+OVA群とほぼ同値を示し、糞便の状態、腸管切片において腸炎症状を確認することはできなかった (データ未掲載)。しかしながら、拘束ストレスの負荷が1日4時間の場合、コントロール群とストレス群の値にほとんど差がみられなかったことに対して、負荷が1日6時間とすると、ストレス群は低値を示す傾向がみられた。すなわちストレスの程度が強くなることで、抗体応答の低下が導かれたと考えられる。

本研究ではアレルギー性の腸炎症状を誘導するには至らなかった。しかし、ストレスの程度を強めることによって抗体応答の低下を引き起こせる可能性が示唆された。

## 糞中総 IgA 量

D011. 10 マウスについてストレスによる糞中総 IgA 量の低下は認められなかった。しかしながら前述のように BALB/c マウスで行った実験と同様に拘束ストレスの方法を強めること、体重減少時の IgA 量を測定することによって、ストレスによる IgA 量の低下が認められる可能性がある。

ストレス群では糞中 IgA 量の値の個体差が大きく、ストレスの感受性に個体差があった。また、拘束ストレスの負荷によって粘膜固有層における IgA<sup>+</sup>B 細胞数は変化しないが (Jarillo-Luna, A., *et al.*, *Psychoneuroendocrinology*, 2007. 32(6): p. 681-92)、ごく最近、パイエル板における IgA 形質細胞が減少することが報告された (Martinez-Carrillo, B.E., *et al.*, *Neuroimmunomodulation*. 18(3): p. 131-141)。

本研究では IgA 量の減少が認められた BALB/c マウスについて、IgA<sup>+</sup>B 細胞から IgA 形質細胞への分化を誘導する IL-6 の遺伝子発現量が減少する傾向がみられた。すなわち拘束ストレスの負荷は、IL-6 量の低下が IgA<sup>+</sup>B 細胞から IgA 形質細胞への分化を抑制し、IgA 量の減少を導いたものと考えられる。また拘束ストレスの程度が弱いとストレス応答を示しにくい個体が存在するものの、ストレス強度が高い拘束ストレスによってより多くの個体が IgA 量の低下というストレス応

答を示すことが示唆された。

### **結腸組織における IL-6 遺伝子発現量**

大腸はストレスによって発症や増悪が認められる炎症性腸疾患や過敏性腸症候群の主な発症部位である。クローン病患者の結腸では腸管粘膜の防御機能を担うムチンの減少が確認されている (Van Klinken, B. J., *et al.*, *Gut*, 1999. 44(3): p. 387-93、Kranefeld, A. D., *et al.*, *Eur J Pharmacol*, 2008. 585(2-3): p. 361-74)。ストレスの影響をよく反映する部位と考えられている。ここでの遺伝子発現量を検討することは、ストレス誘導性の腸管免疫系の変動を示す指標の探索に適していると考えられた。

本研究ではストレスによって変化する免疫系の指標として、ストレスとの関連が指摘されている IL-4、IL-6、IL-10、IFN- $\gamma$ 、IL-18 の遺伝子発現量についても検討した。本研究の拘束ストレスの負荷によって発現量の減少傾向が確認されたのは IL-6 のみであった。

IL-6 はマクロファージ、B 細胞、T 細胞のほか繊維芽細胞やケラチノサイトなどの生体防御の前線に位置する細胞から分泌されており、免疫応答に広く関わる。一般に IL-6 は、炎症性サイトカインとして知られている。しかしながら、同じく炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 によって産生が誘導されると同時に、TNF- $\alpha$  や IL-1 の活性化を抑制し、これらの内因性阻害物質 (sTNFR, IL-1ra) の産生を高めるため、炎症性と抗炎症性サイトカインの両作用を有する。IL-6 は前述のように IgA<sup>+</sup>B 細胞から IgA 形質細胞への分化を誘導することによって抗体産生を増強する機能をもつ (Ramsay, A. J., *et al.*, *Science*, 1994. 264(5158): p. 561-3, Beagley, K. W., *et al.*, *J Exp Med*, 1989. 169(6): p. 2133-48)。実際に IL-6 ノックアウトマウスの小腸、腸間膜リンパ節、肺の粘膜組織では IgA 形質細胞の割合が低下するという報告がされている (Ramsay, A. J., *et al.*, *Science*, 1994. 264(5158): p. 561-3)。

### **乳酸菌 *Lactococcus lactis* C59 の免疫修飾機能とストレス誘導性の腸管免疫機能低下に対する改善作用**

C59 は OVA で免疫した BALB/c マウスに経口投与すると、脾臓細胞において TGF- $\beta$  の産生を誘導する。すなわちストレス誘導性の IgA 産生低下を抑制する効果が期待された。そこでストレス誘導性の腸管免疫機能低下に対して改善効果を示すか検討した。

まず C59 の免疫修飾機能として、腸管関連リンパ組織のなかでも IgA 抗体応答の要である腸間膜リンパ節 (MLN) 細胞と直接相互作用し、TGF- $\beta$  産生を促進することを明らかにした。次に実際に、ストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルに C59 の経口投与を試みたところ、ストレスによる体重減少の緩和が認められた。このとき結腸における IL-6 の mRNA 発現量は C59 摂取の有無による差はみられなかったが、糞中 IgA 量、TGF- $\beta$  の mRNA 発現量がストレス負荷で減少し、この減少が C59 投与によって緩和する傾向が見出された。

### **C59 と MLN 細胞および PP 細胞との直接的相互作用**

先行実験でみられたように、本研究においても C59 の経口投与は、OVA で感作した BALB/c マウスの脾臓細胞における TGF- $\beta$  の産生を促進した。T 細胞、B 細胞、樹状細胞や貪食細胞などの免

疫細胞は胸腺や骨髄で作られた後、全身のリンパ節や脾臓へと配備される。さらに脾臓は血液中の抗原を集めており、脾臓での免疫応答の解析は全身の免疫応答を反映しているとも考えられる。一方、C59 は食品成分と同様、外来異物すなわち抗原としてパイエル板 (PP) を覆う濾胞被蓋上皮層の一部に存在する M 細胞により取り込まれ、PP 内に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞により T 細胞に提示される。同時に PP に存在する B 細胞が抗原を認識し、IgA<sup>+</sup> B 細胞へ分化する。また PP 以外の経路で腸管粘膜に取り込まれた抗原はリンパ管を経て MLN に流入し、そこで免疫応答や免疫寛容といった反応を示す。すなわち、経口摂取された C59 が最初に接する腸管免疫系においても TGF- $\beta$  産生を誘導する機能をもつことが期待され、その作用部位として C59 の進入部位である PP、MLN が候補に挙げられた。

実際、本研究において MLN 細胞と共培養時に、C59 の濃度依存的に TGF- $\beta$  の産生が促進された。PP 細胞との共培養時には明確な効果を見出すことはできなかった。腸内共生細菌が樹状細胞によって MLN へ運搬されて IgA が誘導することが報告されている (Macpherson, A. J. and T. Uhr, *Science*, 2004, **303**(5664): p. 1662-5)。乳酸菌が同様に MLN へ運搬され、主要な免疫応答の場を MLN とする可能性は十分に考えられる。

#### ストレス誘導性の腸管免疫機能低下に対する C59 の効果

BALB/c マウスを用いたストレス誘導性の腸管免疫機能低下モデルに C59 を経口投与したところ、ストレスによって誘導される体重および糞中総 IgA 量の減少がいくらか改善する傾向がみられた。さらに TGF- $\beta$  の mRNA 発現量がストレス負荷で減少し、この減少が C59 投与によって緩和する傾向が見出された。すなわち C59 は TGF- $\beta$  の産生を促進することで IgA 形質細胞への分化を導き、IgA 量の改善に働いたと考えられる。IL-6 の mRNA 発現量はストレスの負荷によって低下する傾向を示し、これは C59 投与の有無による差はみられなかった。このことより C59 は IgA<sup>+</sup> B 細胞から IgA 形質細胞への分化を誘導する IL-6 の遺伝子発現量を改善することで糞中 IgA 量をストレス負荷の状態から改善したわけではないことが示唆された。

本研究では精神的ストレスが誘導する腸管免疫機能低下を解析するモデルを構築し、ストレスに対する腸管免疫系の応答に乳酸菌が防御的效果をもつことを明らかにした。乳酸菌が示すプロバイオティクスとしての効果に、ストレス緩和作用、腸管免疫機能の向上が挙げられることは周知であるが、ストレスが引き起こす免疫系の変化に対する検討はほとんどない。構築されたモデルは、乳酸菌のみならずストレス誘導性の腸管免疫機能低下を緩和する性質をもつ食品成分の探索系に有用であると考えられる。