

# 脱脂粉乳中のIgGの抗体機能の解明と新規免疫調節機能の探索

信州大学大学院農学研究科

食料機能開発学講座 教授 大谷 元

大学院生 大貫 秀 隆

## 要 約

妊娠中に*Salmonella enteritidis* を免疫したウシが分娩後に分泌した成熟乳から調製した脱脂粉乳中のIgGの*S. enteritidis*およびプロテインGとの結合機能に及ぼす脱脂粉乳の各種処理の影響を調べた。その結果、脱脂乳溶液を低温保持殺菌やpH 4~10, 37℃で24時間の保持を行っても85%以上の両結合機能が維持されること、並びに脱脂粉乳を室温で1年間貯蔵しても両結合機能はほとんど低下しないことが示された。これらの結果は、脱脂粉乳中でIgGの抗原結合機能やエフェクター機能は比較的安定であることを示している。

脱脂粉乳を脱塩水に溶解してマウスの胃内に直接投与し、消化管および糞便中の*S. enteritidis*およびプロテインGとの結合機能を調べた結果、投与後48時間までの糞便に、投与したIgGの半分以上の抗原結合機能と、およそ15%のプロテインG結合機能が見られた。本結果は、脱脂粉乳を摂取した場合に、IgGの感染予防機能が腸管で発現できることを示唆している。

一方、牛乳IgGを添加した飼料で飼育したマウスの免疫系を、IgG無添加飼料で飼育したそれとの比較で調べた。その結果、IgG添加飼料での飼育によりマクロファージや樹状細胞の割合およびナチュラルキラー細胞の割合が有意に増加するとともに、それらの殺菌能やヒト白血病株化細胞に対する傷害能が増強することが示された。また、IgG添加飼料での飼育によりパイエル板と脾臓のヘルパーI型(Th1)およびII型T細胞(Th2)割合が減少し、腸管IgAおよび血清IgGレベルが有意に低下することが示された。これらの結果は、脱脂粉乳を摂取することにより、その中のIgGが自然細胞性免疫系を活性化させ、獲得液性免疫系を抑制することを示唆している。

牛乳IgG1, IgG2およびそれらのFabとFcフラグメントを調製し、それらの免疫グロブリンの産生に及ぼす影響を細胞培養系で調べた結果、両IgG、特にIgG1およびそのFcフラグメントはマウス脾臓細胞による免疫グロブリンの産生、特にIgA産生を顕著に促進するという経口摂取の結果とは全く逆の結果が得られた。このように、経口摂取と細胞培養系で結果が異なる要因として、IgGが結合する免疫担当細胞のレセプターの違いが考えられる。すなわち、脾臓細胞へのIgGの結合は抗原と結合していない遊離型IgGがFc $\gamma$ R Iを介して結合するのに対して、腸管パイエル板細胞へのIgGの結合はIgG抗原複合体がFc $\gamma$ R II bを介して結合することを示唆しており、今後、この点を明らかにすることが望まれる。

以上のように本研究では、脱脂粉乳の摂取は、その中に含まれるIgGが認識している病原菌による

感染を防御するとともに、獲得液性免疫応答を抑制し、自然細胞性免疫を促進することが示された。

## キーワード

脱脂粉乳, IgG, 抗原結合機能, プロテインG結合機能, マウス経口摂取, 細胞性自然免疫促進, 液性獲得免疫抑制, アレルギー軽減, IgG1のFcフラグメント, IgA産生促進

## 緒言

牛乳はヒトにとって安全な栄養源であることから、牛乳IgGを健康維持のための受動抗体として用いようとする試みは古くからなされてきた (Ehrlich 1892)。事実、最近ではヒトの腸管由来病原菌26種類を免疫したウシが分泌する乳汁から調製した脱脂粉乳を原料にした健康食品がわが国も含めて世界各国で販売されており、その食品を摂取したヒトにおいて腸管感染症予防効果があるという報告が数多くなされている (Facon et al. 1993)。

一方、最近、このような腸内細菌を免疫した乳牛が分泌する乳汁から調製した脱脂粉乳を経口摂取すると、非免疫牛の脱脂乳を摂取した場合よりも、膠原病の一種であるエリトマトーデスに対して緩和効果があることが報告されている (Murosaki et al. 1991)。しかし、腸内細菌を免疫した乳牛が分泌する乳汁中のIgGの抗原結合機能や従来から知られているエフェクター機能によりエリトマトーデスのような膠原病の緩和が生じるとは考えがたく、その緩和メカニズムについては明らかではないところである。

膠原病等の自己免疫疾患の患者数は、日本においておよそ300~500万人に達するといわれている (Inaba 1996)。膠原病等の自己免疫疾患の治療には、一般にステロイド剤が第一選択薬として用いられている。しかし、ステロイド剤は優れた抗炎症作用や免疫抑制作用を示す一方で、感染症にかかり易くすること、副腎機能を低下させること、骨粗しょう症を引き起こすことなどの様々な副作用を生じることが知られている。そのために、脱脂粉乳中のIgGの新規免疫調節機能とその機構を明らかにすることは、安全な食品による自己免疫疾患やアレルギー等の軽減につながるものと思われる。そこで本研究は、脱脂粉乳中のIgGを新規免疫調節機能食品開発のための原料とすることを目的として行ったものである。すなわち、実験1では、脱脂粉乳中のIgGの生物機能を食品として摂取後も残存させる処理方法を明らかにすることを目的として、脱脂粉乳の加熱、各種pH処理および貯蔵過程におけるIgGのFabおよびFc領域の生物機能の安定性を調べた。また、実験2では、IgGをマウスに経口投与し、各消化管および糞便におけるFabおよびFc領域の生物機能の変動を調べた。次いで、実験3では、IgGを経口摂取させたマウスの免疫系について細胞レベルで検討した。一方、実験4では、実験3の経口摂取で認められた現象を脾臓細胞培養系で確認することを目的として、IgG1, IgG2およびそれらのフラグメントの免疫グロブリン産生およびサイトカインmRNA発現に及ぼす影響を調べた。

## 実験1 各種処理を行った脱脂粉乳中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能

牛乳IgGの免疫機能を感染症の予防や治療のために用いるためには、殺菌や乾燥などの製造工程、貯蔵過程および経口摂取後の消化管において、Fab領域の抗原結合機能やFc領域の細胞結合機能が維持されていることが必要である。

Li-Chan et al. (1995) は、高温短時間殺菌処理や噴霧乾燥処理を行った牛乳にIgGの抗原結合機能が十分に残存していることを報告している。また、Stephan et al. (1990) は、初乳から調製した免疫グロブリン粉末を密閉容器で5℃または37℃で4週間貯蔵しても細菌との結合機能はほとんど低下しないことを報告している。さらに、Brussow et al. (1987) およびHilpert et al. (1987) は、牛乳免疫グロブリン濃縮物を投与した新生児の糞便に、顕著な抗ウイルス活性を検出している。これらの報告は、牛乳IgGはその加工や貯蔵過程においても抗原結合機能を維持していることを示している。しかし、各種処理におけるFc領域の機能の安定性に関する研究報告は、筆者らの知る限りでは全くなされていない。

IgGはそのFc領域を介して細胞のFc受容体 (Fc $\gamma$ Rn) や細菌表面膜上のプロテインGと結合することが知られており、DeLano et al. (2000) およびShields et al. (2001) は、IgGの両者への結合様式はほとんど同じであることを報告している。そこで、実験1では、脱脂乳の加熱処理やpH処理および脱脂粉乳の貯蔵過程におけるFabおよびFc領域の機能の安定性を、それぞれ抗原結合機能およびプロテインG結合機能を指標として調べた。

### 1-1. 材料および方法

#### 1-1-1. 材料

ウシ血清アルブミンはSigma Chemicals (St Louis, MO, USA) より得た。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ウシIgG (H + L) はRockland (Gilbertsville, PA, USA) より購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウシIgG1重鎖および抗ウシIgG2重鎖はBethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) より購入した。イムノブロットリング検出試薬はAmersham Biosciences (Buckinghamshire, TX, USA) より購入した。日本鶉のオポインヒビターはOtani et al. (1995) の方法に従って調製した。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

#### 1-1-2. 脱脂粉乳

*S. enteritidis* を含む26種類の病原菌を免疫した乳牛が分泌した乳汁から調製した脱脂粉乳は兼松ウェルネス株式会社から譲与された。その脱脂粉乳中のIgGおよびそのサブクラスを後述するイムノブロットリングにより定量したところ、脱脂粉乳1gあたり4.9 mgのIgG (IgG1 : IgG2 = 85.4 : 14.6, w/w) を含んでいた。

#### 1-1-3. 加熱処理

脱脂粉乳を100 mg/mlの濃度になるように蒸留水に溶解し (pH 6.7), その1 mlを2 ml容の薄いガラスバイアルに分注して、密封した。40, 50, 63, 72, 80および90℃のウォーターバスにそのバイ

アルを5, 10, 15, 30および60分間浸した後、氷水中で急冷し、その溶液のpHを7.2に調整したものを加熱処理脱脂乳として分析に供した。

#### 1-1-4. pH処理

脱脂粉乳を脱塩水に溶解して、そのpHを1, 2, 4, 6, 8または10に調整した（脱脂粉乳100 mg/ml）。各1 mlを2 ml容の薄いガラスバイアルに分注して密封し、37℃のウォーターバスにバイアルを0.5, 1, 3, 5, 10および24時間浸した。次いで、バイアルを取り出しその溶液のpHを7.2に調整し、pH処理脱脂乳として分析に供した。

#### 1-1-5. 貯蔵処理

脱脂粉乳を遮光し、-30℃, -18℃, 4℃または室温で0~360日間保存したものを貯蔵処理脱脂粉乳として分析に供した。

#### 1-1-6. 酵素免疫測定法 (ELISA)

酵素免疫測定法 (ELISA) は、Otani et al. (2003) の方法に準じて行った。すなわち、マイクロタイタープレート (Nunc, Roskilde, Denmark) の各ウエルに0.25% グルタルアルデヒド溶液を300  $\mu$ lずつ加え、25℃で60分間放置した。ウエルを蒸留水で3回洗浄後、各ウエルに0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に懸濁した*S. enteritidis* (100  $\mu$ g/ml) を200  $\mu$ lずつ加え、4℃で一晩放置した。次いで、ウエルを0.125% Tween 20および0.15 M 塩化ナトリウムを含む0.01 M リン酸緩衝液 (PBS-Tween, pH 7.2) で3回洗浄後、各ウエルに0.2% ウシ血清アルブミンを含む0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を300  $\mu$ lずつ加え、25℃で120分間放置した。放置後、ウエルをPBS-Tweenで3回洗浄し、予備実験により決定した最適希釈倍率に希釈した試料を各ウエルに100  $\mu$ lずつ加え、25℃で120分間放置した。さらに、ウエルをPBS-Tweenで3回洗浄後、2% ポリビニルピロリドンを含むPBS-Tweenで2万倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ウシIgG (H+L) を各ウエルに100  $\mu$ lずつ加えて25℃で60分間放置した。最後にウエルをPBS-Tweenで3回洗浄し、ペルオキシダーゼの基質溶液 (0.03% 過酸化水素および4 mg/ml o-フェニレンジアミンを含む0.1 M クエン酸-0.2 M リン酸緩衝液, pH 5.0) を各ウエルに100  $\mu$ lずつ加え、25℃で反応させた。反応15分後、2 M 硫酸溶液を各ウエルに25  $\mu$ lずつ加え、その490 nmにおける吸光度をBio-Radマイクロプレートリーダー モデル550 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。得られた吸光度を以下の公式に代入し、残存抗原結合機能とした。

残存抗原結合機能 (%) = 各種処理した試料のELISA値 (A<sub>490 nm</sub>) / 未処理試料のELISA値 (A<sub>490 nm</sub>) × 100

#### 1-1-7. プロテインGカラムクロマトグラフィー

0.02 Mリン酸緩衝液で平衡化したUltralink Immobilized Protein G Plusカラム ( $\phi$ 3×100 mm Pierce Chemical, Rockford, USA) に各処理試料 100  $\mu$ lを添加し、平衡化緩衝液10 mlで洗浄した。次いで、0.1 Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.7) を1 ml/minの流速で流すことによりプロテインGに結合したIgGを溶出させた。IgG量は、既知濃度の牛乳IgGを用いて作成した標準曲線を用いて、

その220 nmにおける吸光度から算出した。また、残存プロテインG結合機能は次の公式で算出した。

残存プロテインG結合機能 (%) = 各種処理した試料中のプロテインG結合IgG量 / 未処理試料中のプロテインG結合IgG量 × 100

#### 1-1-8. イムノブロットィング

ドデシル硫酸ナトリウム存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は12.5%濃度のポリアクリルアミドゲルを用いて、Laemmli (1970) の方法に従って行った。次いで、そのゲルに50 mAの電流を1時間流すことによりたんぱく質をClear Blot Membrane-P (ATTO, Tokyo, Japan) に転写した。転写した膜は、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウシIgG1重鎖、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウシIgG2重鎖または西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ウシIgG (H + L) 溶液に1時間浸した後、ペルオキシダーゼ活性 (化学発光) をECLウェイスタンブロットィング分析システム (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) を用いて測定した。蛍光強度はPrintograph FX AE-6911XFDおよびSoftware Library Lane Analyzer AE-6920WLA version 3.04b (ATTO) を用いて解析した。

### 1-2. 結果

#### 1-2-1. 加熱処理した脱脂乳中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能

加熱処理した脱脂乳中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能の測定結果をFig. 1に示した。Fig. 1から双方の結合機能は63°C以下の加熱処理においては60分間の加熱処理においてもほとんど低下せ

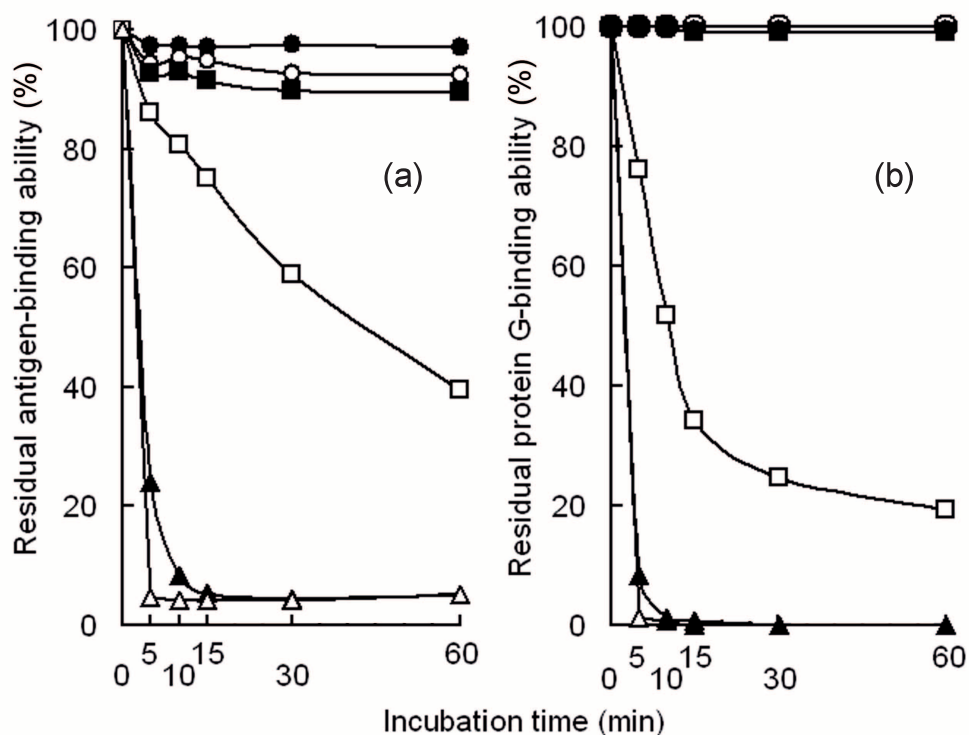


Fig. 1 Residual antigen-binding (a) and protein G-binding (b) abilities of IgG in skim milk heated at 40°C (●), 50°C (○), 63°C (■), 72°C (□), 80°C (▲) or 90°C (△).

ず、加熱温度が72℃以上になると顕著に低下することがわかる。すなわち、72℃、30分間の加熱で抗原およびプロテインG結合機能はそれぞれ未加熱の場合のおよそ60%および25%に低下し、80℃、15分間の加熱では双方ともにほとんど完全に消失する。

### 1-2-2. 各種pH処理した脱脂乳中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能

各種pHで37℃、24時間処理した脱脂乳中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能を測定した結果をFig. 2に示した。Fig. 2から、双方の結合機能はアルカリ領域では殆ど低下しないが、pHが酸性になるにともない双方の結合機能の低下割合は高いことがわかる。すなわち、pH 4.0、2.0および1.0で脱脂乳を1時間処理した脱脂乳の抗原結合機能は未処理の場合のそれぞれ約90、40および20%であり、プロテインG結合機能はそれぞれ約85、50および20%である。

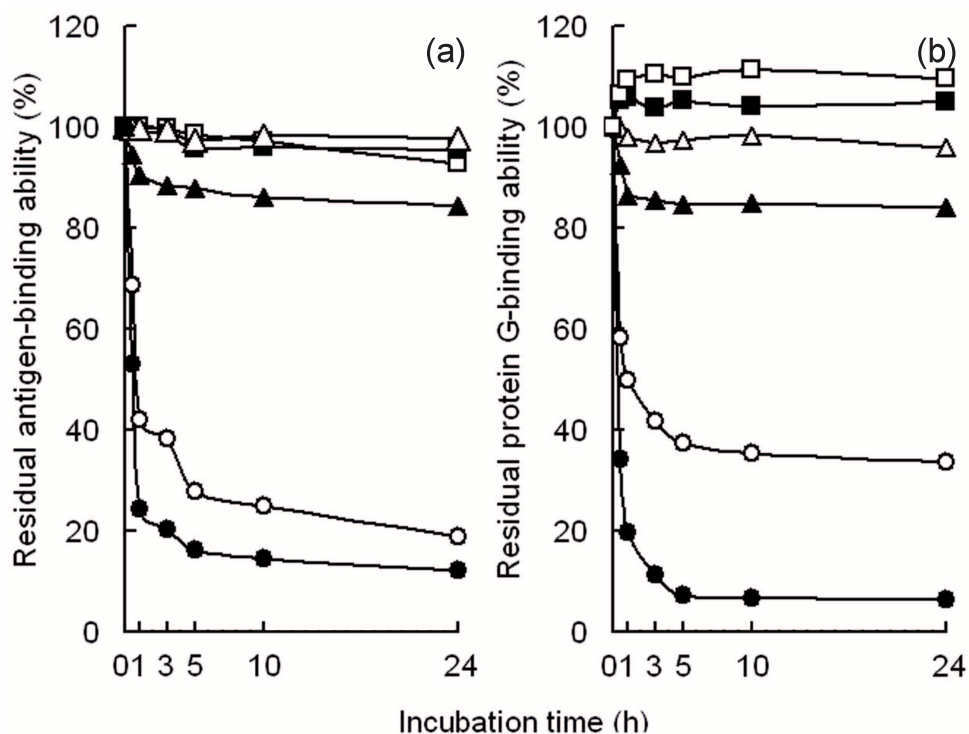


Fig. 2 Residual antigen-binding (a) and protein G-binding (b) abilities of IgG in skim milk kept at pH 1.0 (●), 2.0 (○), 4.0 (▲), 6.0 (△), 8.0 (■) or 10.0 (□).

### 1-2-3. 貯蔵脱脂粉乳中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能

各種条件で貯蔵した脱脂粉乳中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能を測定した結果をTable 1に示した。Table 1から、すべての貯蔵条件下において抗原結合機能はほとんど低下しないことがわかる。すなわち、室温で360日間貯蔵した場合においても約97%の抗原結合機能が残存している。なお、表には示していないが、プロテインG結合機能も同様にこれらの貯蔵条件ではほとんど低下しないことが確認された。

Table 1 Residual antigen-binding ability of IgG in stored skim milk

Temperature	Storage day					
	30	60	90	120	180	360
-30°C	99.09	99.52	99.23	98.96	99.59	99.63
-18°C	99.60	99.19	99.09	98.86	99.38	99.32
4°C	99.20	99.64	98.84	98.70	99.52	99.46
Room temperature	99.00	98.50	99.00	98.60	97.30	96.60

### 1-3. 考 察

牛乳IgGの感染防御機能を目的とした食品の開発においては、製造（殺菌を含む）や貯蔵時において十分な抗原結合機能やエフェクター機能を保持している必要がある。これまでに、加熱に対する牛乳IgGの抗原結合機能の変化に関する論文は数多く報告されてきたが、Fc領域の機能の安定性については筆者らの知る限りでは全く報告されていない。そこで、実験1では、脱脂粉乳に各種処理を施し、プロテインG結合機能をFc領域の機能の指標として、その安定性をFab領域の機能である抗原結合機能の安定性ととも調べた。

63°Cで60分間の加熱処理を行っても、プロテインG結合機能はほとんど低下せず、また、抗原結合機能も10%程度しか低下しないことが示された (Fig.1)。抗原結合機能については、Goldsmith et al. (1983) およびUstunol & Sypien (1997) が、62.5°Cで30分の加熱では殆ど低下しないことを報告しているが、筆者らの結果は彼らの報告を支持するものであるとともに、Fc領域の機能も抗原結合機能と同様の安定性を有することを初めて明らかにしたものである。また、本結果から、牛乳IgGのFabおよびFc領域の機能を維持する殺菌法としては低温保持殺菌が有効であることが明らかである。

一方、IgGの抗原およびプロテインG結合機能は、酸性になるに従い低下することが明らかになった (Fig. 2)。しかし、pH 4.0では24時間保持した場合も双方の結合能は80%以上が維持されていた (Fig. 2)。一般に、空腹時の成人の胃内pHは1~2であるのに対して、新生児の胃内pHは胃酸分泌が未熟であることと乳汁の経口摂取により形成されるカードの中和能によりpH 4以上に維持されているといわれている (Agunod et al. 1969)。従って、IgGのFab領域の抗原結合機能およびFc領域の生物機能の大部分は、維持されたまま新生児の腸管へ到達すると考えられる。しかし、成人がIgGの免疫機能を目的として脱脂粉乳を食べるときには、他のどのような食品と一緒に食べるかということが重要と思われる。

### 1-4. 小 括

脱脂乳の63°Cで60分間の殺菌やpH 4~10、37°Cで24時間保持においても、IgGの抗原およびプロテ

インG結合機能は、ともに85%以上残存した。また、脱脂粉乳を室温で12ヶ月貯蔵した場合も、両機能はほとんど低下しなかった。これらの結果は、牛乳IgGのFabおよびFc領域の免疫機能を、食品としての加工や貯蔵過程において高く維持することが可能であるとともに、食品として摂取後の腸管において双方の機能を保つことが可能であることを示唆している。

## 実験2 マウスに経口投与した牛乳IgGの消化管と糞便における抗原およびプロテインG結合機能

一般に、脱脂粉乳を食品として摂取すると、その成分は消化酵素の作用を受けるために、その生物機能を多かれ少なかれ失うことが予測される。そこで、実験2では、脱脂粉乳をマウスに経口投与し、各種消化器管および糞便におけるIgGの抗原およびプロテインG結合機能を調べた。

### 2-1. 材料および方法

#### 2-1-1. 材料および粗IgG粉末

脱脂粉乳をはじめとして使用した材料は実験1のものと同じである。一方、脱脂粉乳 20 gを100 mlの蒸留水に溶解し、3 M 塩酸によりその溶液のpHを4.6に調整し、カゼインを沈殿させた。遠心分離により上澄を回収し、3 M 水酸化ナトリウム溶液によりpHを7.0に調整してホエイ試料として以下の実験に用いた。このホエイは1 mlあたりに0.98 mgのIgGを含む35.7 mgのタンパク質を含んでいる。ホエイに硫酸アンモニウムを33%飽和濃度になるように加え、得られた沈殿を少量の蒸留水に溶解し、蒸留水に対して一晚透析後、凍結乾燥したものを粗IgG粉末として以後の実験に用いた。粗IgG 1 mgあたりには0.927 mgのIgGが含まれる。

#### 2-1-2. マウスへのIgGの経口投与

脱脂粉乳 180 mgおよび粗IgG粉末 24 mgを蒸留水0.6 mlに溶解し、ゾンデを用いてマウスの胃内に直接注入した。注入後、0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24および48時間後にそれぞれ3匹のマウスを頸椎脱臼により屠殺し、胃、小腸および大腸を回収した。また、同様の試料を投与したマウス 7匹を48時間飼育し、0~6, 6~12, 12~24および24~48時間後の糞便を回収した。

#### 2-1-3. 消化管内容物および糞便抽出液の調製

PBS 3 mlを用いて胃、小腸および大腸の内容物をそれぞれ回収した。回収物のpHを7.2に調整後、小腸および大腸回収物には200 mgのウズラオポインヒビターを加えた。各回収物にPBSを加えて総容量を5 mlに調整し、0.5 gの海砂を加えて、 $2 \pm 1^\circ\text{C}$ で15分間磨砕した。磨砕物を3000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ で30分間の遠心分離を行い、得られた上澄みを胃、小腸および大腸抽出液とした。一方、糞便 1 gに0.5 gの海砂および13 mlのPBSを加えて $2 \pm 1^\circ\text{C}$ で15分間磨砕した。磨砕物を3000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ で30分間の遠心分離を行い、得られた上澄みを糞便抽出液とした。



#### 2-1-4. ELISA, プロテインGカラムクロマトグラフィーおよびイムノブロットィング

ELISA, プロテインGカラムクロマトグラフィーおよびイムノブロットィングは, 実験1の記述に準じて行った。

### 2-2. 結果

#### 2-2-1. 胃, 小腸および大腸におけるIgGの抗原およびプロテインG結合機能

IgGを経口投与したマウスから回収した消化管内容物中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能を調べた結果をFig. 3に示した。Fig. 3から投与後3時間後までの胃に, 投与したIgGの60%以上の抗原結合機能が検出されることがわかる。また, 投与0.5時間後の胃では約50%のプロテインG結合機能が見られるが, 1時間後では約10%に低下することがわかる。同様に, 投与0.5, 1および2時間後の小腸では投与したIgGの約30%の抗原結合機能が見られ, 3時間後においてもおよそ10%の抗原結合機能が検出される。また, 大腸においては投与6時間後に投与したIgGの抗原結合機能の約30%が見られ, 12時間後には約32%が見られる。しかし, プロテインG結合機能は小腸においては投与0.5時間後に約18%が, また, 大腸においては投与3時間と6時間後に約10%が見られるにすぎない。

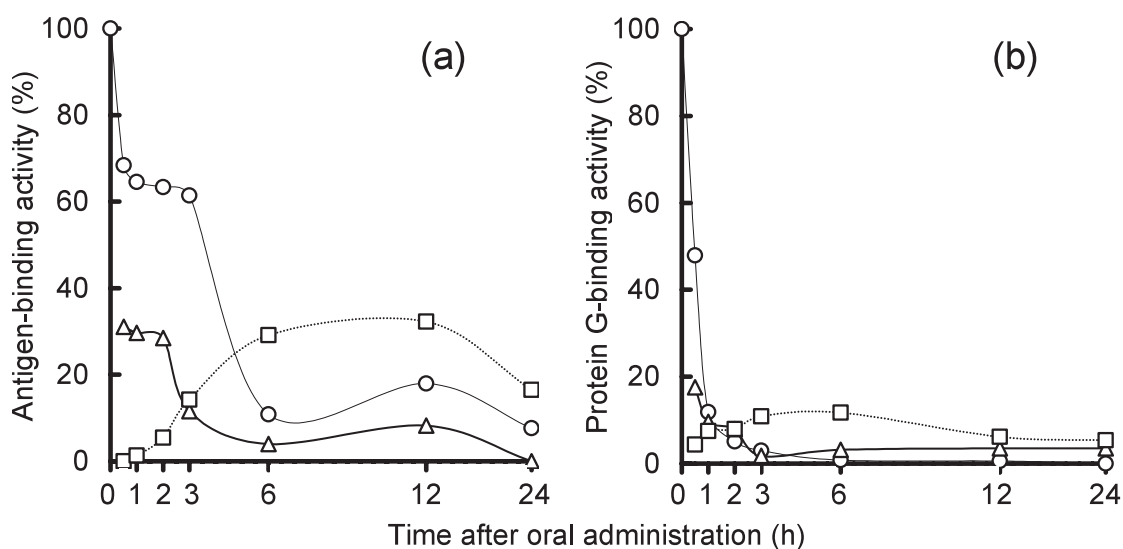


Fig. 3 Antigen- (a) and protein G-binding (b) activities of cow's milk IgG in stomach (○), small intestine (△) and large intestine (□) after the oral administration of IgG-rich skim milk.

#### 2-2-2. 糞便における抗原およびプロテインG結合機能

IgGを投与したマウス糞便中のIgGの抗原およびプロテインG結合機能を調べた結果をFig. 4に示した。Fig. 4から, 投与0~6, 6~12, 12~24および24~48時間後の糞便中には, 投与したIgGの抗原結合機能のそれぞれ5, 17, 23および15%が検出され, それらを総計すると投与48時間後までに糞便として回収された抗原結合機能は約60%であることが分かる。また, 投与0~6, 6~12, 12~24および

24～48時間の糞便中には、投与したIgGのプロテインG結合機能のそれぞれ2, 3, 5および4%が検出され、それらを総計すると投与後48時間目までに糞便中に回収されたプロテインG結合機能は14%であることがわかる。

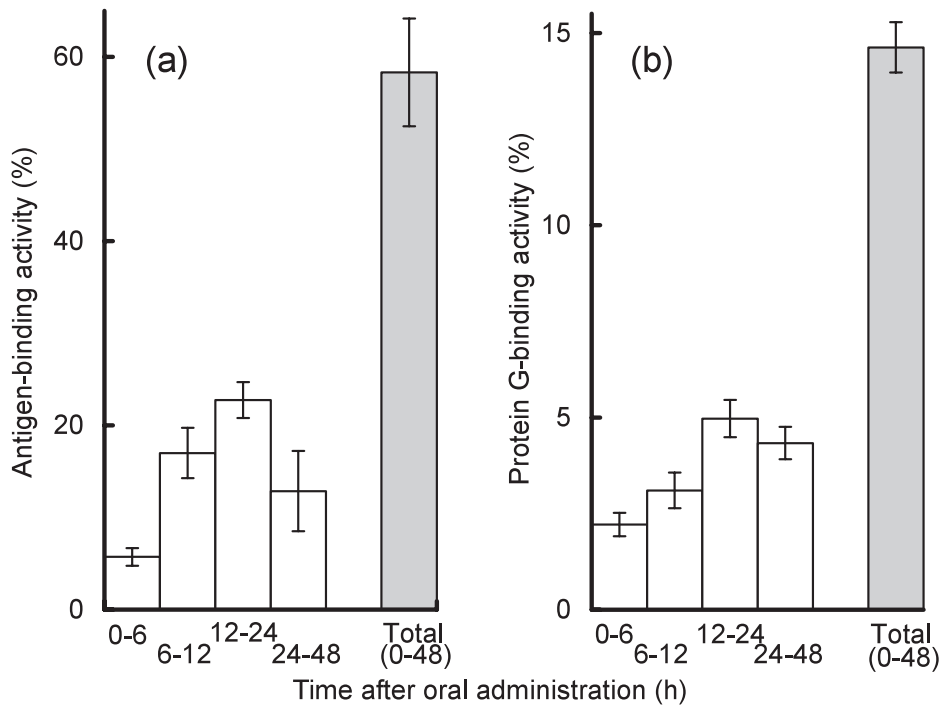


Fig. 4 Antigen- (a) and protein G-binding (b) activities of cow's milk IgG in feces after the oral administration of IgG-rich skim milk.

### 2-3. 考 察

抗原結合機能は、投与0.5～2時間後の小腸および投与6～12時間後の大腸で約30%が検出された (Fig. 3)。また、プロテインG結合機能は、投与0.5時間後の小腸で約18%が、投与3時間後の小腸で約2%が、また、投与3～6時間後の大腸で約10%が検出された (Fig. 3)。さらに、48時間後までの糞便において、抗原結合機能は投与量の約60%が、プロテインG結合機能は約14%が回収された (Fig. 4)。これらの結果は、IgGのプロテインG結合部位は抗原結合部位よりも消化されやすいことを示唆している。しかし、糞便に牛乳IgGの抗原結合機能とプロテインG結合機能が確認されたことから、脱脂粉乳を食べることにより腸管内で牛乳IgGの免疫機能が発現するものと思われる。

### 2-4. 小 括

IgGをマウスの胃内に直接投与すると、小腸および大腸において抗原結合機能とプロテインG結合機能が見出されるとともに、投与48時間目までの糞便中に、抗原結合機能の約60%が、また、プロテインG結合機能の約14%が排出された。これらのことから、脱脂粉乳の経口摂取により、IgGの生物機能が腸管で発現できるものと思われる。

### 実験3 牛乳IgG添加飼料で飼育したマウスの免疫系

腸管には腸管関連リンパ組織の1つであるパイエル板が存在する。パイエル板はM細胞を介して腸管内の食物タンパク質や腸内細菌を取り込み、それらを樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に受け渡すことが知られている (Beier & Gebert 1998)。また、それらの細胞にはIgG受容体が存在するとともに (Daeron 1997), それらの細胞は腸管関連リンパ組織から脾臓を含めた二次リンパ組織へ移動することが知られている (Mayrhofer et al. 1983; Lee et al. 1985; Imhof & Aurrant-Lions 2004)。これらのことから、経口摂取した牛乳IgGはパイエル板内の免疫担当細胞に作用し、腸管をはじめとした局所免疫系だけでなく、全身免疫系にも影響を及ぼすことが考えられる。そこで実験3では、牛乳IgG添加飼料で飼育したマウスの免疫系について調べた。

#### 3-1. 材料および方法

##### 3-1-1. 材料

無たんぱく質飼料 (PM15765) はPurina Mills (St. Louis, MO, USA) より購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ウシIgG (H + L) はRockland (Gilbertsville, PA, USA) より購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウシIgG1重鎖, 抗ウシIgG2重鎖, ヒツジ抗マウスIgGおよびヒツジ抗マウスIgAはBethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) より購入した。フィコエリスリン (PE) 標識抗マウスIL-4モノクローナル抗体 (mAb, clone 11B11), PE標識抗マウスインターロイキン (IL) -12 p40/p7 mAb (clone C15.6), PE標識抗インターフェロン (IFN)- $\gamma$  mAb (clone XMG1.2), PE標識抗マウスCD49b mAb (clone DX5), ビオチン標識抗マウスCD11b mAb (clone M1/70), ビオチン標識抗マウスCD4 mAb (clone RM4-5), ビオチン標識抗マウスCD19 mAb (clone MB19-1) およびフィコエリスリン/シアニン5 (PE/Cy5) 標識ストレプトアビジンはBioLegend (San Diego, CA) より得た。3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин (TMBZ) は同仁化学研究所 (熊本, 日本) より購入した。ブレフェルジン A, イオノマイシンおよびフォルボール 12-ミリステート 13-アセテート は和光純薬工業 (大阪, 日本) より得た。ヒト白血病株化細胞 K562 (TKG 0210) は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより得た。ウシ胎仔血清 (FBS) はHyClone (Road Logan, UT, USA) より購入した。RPMI-1640およびチオグリール培地は日水製薬 (東京, 日本) より購入した。Guava ViaCount試薬はGuava Technologies (Hayward, CA, USA) より購入した。2-メチル-6-p-メトキシフェニルエチニルイミダゾピラジノンはATTO (東京, 日本) より購入した。その他の試薬等は前章で述べたものである。また、その他の試薬は市販特級試薬を使用した。

##### 3-1-2. IgG

IgGは、人為的に細菌を免疫していないホルスタイン種牛の新鮮初乳から調製した脱脂乳の33%飽和硫酸アンモニウム沈殿分画をイオン交換クロマトグラフィーに供することにより調製した。調製

したIgGはイムノブロット法によりIgG1を95.9%, IgG2を4.1%含むものである。

### 3-1-3. マウスの飼育

C3H/HeN系3週齢雄マウスを日本SLC社（浜松，日本）から購入した。マウスは市販マウス用固形飼料（MF，オリエンタル酵母，東京，日本）で1週間予備飼育後，Table 2に示した市販無たんぱく質飼料PM15765（Purina Mills, St. Louis, MO）に，たんぱく質源としてオボアルブミン（OVA，キューピー株式会社，東京，日本）とIgGを各種混合割合で加えた試験飼料で4または5週間飼育した。飼料および水は自由摂取とし，飼育は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で12時間/12時間明暗サイクルで行った。

Table 2 Composition of diets

	Control diet	IgG - added diet	
		0.005%	0.05%
		%	
IgG1	0.000	0.005	0.050
Ovalbumin	25.000	24.995	24.950
Dextrin	32.738	32.738	32.738
Sucrose	27.112	27.112	27.112
RP mineral mix #10 <sup>†</sup>	3.750	3.750	3.750
Corn oil	3.750	3.750	3.750
Lard	3.750	3.750	3.750
Powdered cellulose	2.250	2.250	2.250
RP vitamin mix <sup>‡</sup>	1.500	1.500	1.500
Choline chloride	0.150	0.150	0.150
Total	100.000	100.000	100.000

<sup>†</sup>RP mineral mix #10: calcium, 0.60%; phosphorus, 0.40%; potassium, 0.40%; magnesium, 0.07%; sodium, 0.21%; chlorine, 0.24%; fluorine, 5.0 ppm; iron, 60 ppm; zinc, 21 ppm; manganese, 65 ppm; copper, 15.0 ppm; cobalt, 3.2 ppm; iodine, 0.57 ppm; chromium, 3.0 ppm; molybdenum, 0.82 ppm; selenium, 0.23 ppm. <sup>‡</sup>RP vitamin mix: vitamin K, 10.4 ppm; thiamin hydrochloride, 20.6 ppm; riboflavin, 20.0 ppm; niacin, 90 ppm; pantothenic acid, 55 ppm; choline chloride, 1400 ppm; folic acid, 4.0 ppm; pyridoxine, 16.5 ppm; biotin, 0.4 ppm; vitamin B12, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; vitamin A, 22.1 IU/g; vitamin D3, 2.2 IU/g; vitamin E, 50 IU/kg

### 3-1-4. 細胞懸濁液

マウスをエーテルの過麻酔で屠殺後，直ちに脾臓およびパイエル板を摘出した。脾臓を，100 U/mlペニシリン，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンおよび5% FBSを含むRPMI-1640培地中で丁寧に解し，同培地で3回洗浄した後，生細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ になるように調整した。パイエル板を100 Uペニシリン/ml，100  $\mu\text{g}$ ストレプトマイシン/mlおよび5% FBSを含むRPMI-1640培地中で丁寧に解し， $37^\circ\text{C}$ で30分間デイスパーゼII（1.5 mg/ml，Boehringer Mannheim，Mannheim，Germany）を作用後，同培地で3回洗浄し，生細胞数が $1 \times 10^6/\text{ml}$ になるように調整した。一方，4.05%チオグリコール培地をマウスの腹腔内に注射して4日後，腹腔内細胞を回収した。回収した細胞をプラスチックシ

ヤーレに入れ、細胞数が $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ になるよう調整して $37^\circ\text{C}$ で1時間放置後、付着細胞を回収して100 Uペニシリン/ml, 100  $\mu\text{g}$ ストレプトマイシン/mlおよび5% FBSを含むRPMI-1640培地に懸濁させた。次いで、同培地で3回遠心洗浄後、HEPES-saline緩衝液 (17 mM 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸, 120 mM 塩化ナトリウム, 5 mM 塩化カリウム, 5 mM グルコース, 1 mM 硫酸マグネシウム, 0.5 mM 塩化カルシウム, pH 7.4) に懸濁させ、分析に供した。なお、本懸濁液中のマクロファージの割合は95%であることをエステラーゼおよびギムザ染色により確認した。

### 3-1-5. 細胞の機能解析

脾臓およびパイエル板細胞の細胞表面抗原の検出はGuava Personal Cell Function Analyzer (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) により行った。すなわち、脾臓およびパイエル板細胞を、CD4 (clone RM4-5), CD11b (clone M1/70), CD19 (clone MB19-1) またはCD49b (clone DX5) に対するビオチン標識抗マウスモノクローナル抗体 (mAb) と $4^\circ\text{C}$ で15分間反応 (なお、抗マウスCD19 mAbを反応させる場合は、あらかじめマウスFcブロックと $4^\circ\text{C}$ で15分間反応させた) 後、細胞をPBSで3回遠心洗浄した。次いで、その細胞にPE/Cy5標識ストレプトアビジンを加えて $4^\circ\text{C}$ で15分間反応後、Guava Personal Cell Function Analyzerに供した。

細胞内サイトカインの測定に際しては、細胞懸濁液にプレフェルジンA 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , イオノマイシン 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ およびフォルボール12-ミリステート13-アセテート 40 ng/ml を加えて、 $37^\circ\text{C}$ で4時間反応後、IntraPrep試薬1 100  $\mu\text{l}$ を加えて15分間放置した。次いで、その細胞にIntraPrep試薬2を100  $\mu\text{l}$ を加えて室温で15分間放置後、IL-4 (clone 11B11), IL-12 p40/p70 (clone C15.6) またはIFN- $\gamma$  (XMG1.2) に対するPE標識抗マウスmAbを加えて $4^\circ\text{C}$ で15分間反応させることにより細胞内サイトカインを染色した。なお、IntraPrep試薬1での処理は細胞固定のためであり、IntraPrep試薬2での処理は抗体透過のためである。

### 3-1-6. スーパーオキシドの測定

腹腔マクロファージを5% $\text{CO}_2$ 存在下、 $37^\circ\text{C}$ で30分間培養後、2-メチル-6-p-メトキシフェニルエチニルイミダゾピラジノンを最終濃度が300  $\mu\text{M}$ になるように、また、スーパーオキシドジスムターゼ (Biomedicals, Eschwege, Germany) を最終濃度が30,000 U/mlになるように加えたものをネガティブコントロールとした。一方、スーパーオキシドジスムターゼ無添加のものを試験試料とした。各試料をルミネッセンサー PSN AB-2200 (ATTO) に供し、得られた値をスーパーオキシド値とした。

### 3-1-7. 貪食能

Otani and Futakami (1996) の報告に準じて、ラテックスビーズの取り込みを指標にしてマクロファージの貪食能を測定した。すなわち、腹腔マクロファージ ( $5 \times 10^5$  細胞) をラテックスビーズ (0.79  $\mu\text{m}$ , Polyscience, Warrington, PA, USA) とともに5% $\text{CO}_2$ 存在下、 $37^\circ\text{C}$ で1時間培養後、遊離のラテックスビーズをハンクス液で3回遠心洗浄して除去し、細胞内に取り込まれたラテックス

ビーズを光学顕微鏡視野で数えた。

### 3-1-8. 細胞傷害能

脾臓細胞懸濁液 ( $1 \times 10^6$  細胞/ml) 1 mlとヒト白血病細胞株K562懸濁液 1 mlを、脾臓細胞/K562の比が1, 20, 100, 200および1000となるようにマイクロプレートに注入し、5%CO<sub>2</sub> 存在下、37℃で24時間培養した。培養後、その培養液10  $\mu$ lに対して190  $\mu$ lのGuava ViaCount Regentを加えてK562の生存率をGuava Cell Function Analyzerで測定した。

### 3-1-9. 血清および腸管抽出液の調製

試験飼料で4週間飼育したマウスから血液を採取し、血清を調製した。また、同飼料で5週間飼育したマウスから腸管（十二指腸から直腸までの組織および内容物）を採取し、パイエル板を除去後、腸管1 gに対して海砂 1.5 gおよびPBS2.5 mlを加えて氷上で20分間磨砕した。磨砕物を4℃、3000 rpmで30分間遠心分離し、得られた上清を腸管抽出液とした。

### 3-1-10. 抗体量の測定

抗体量はOtani and Wakatsuki (2004) の方法に準じてELISAにより測定をした。すなわち、マイクロタイタープレート (Nunc) の各ウエルに0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解したOVA溶液 (100  $\mu$ g/ml) を200  $\mu$ lずつ加え、4℃で一晩放置した。次いで、そのウエルをPBS-Tweenで3回洗浄後、各ウエルに0.2%BSAを含む0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を300  $\mu$ lずつ加え、25℃で120分間放置した。放置後、ウエルをPBS-Tweenで3回洗浄し、予備実験により決定した最適希釈倍率に希釈した血清または腸管抽出液を各ウエルに100  $\mu$ lずつ加え、25℃で120分間放置した。ウエルをPBS-Tweenで3回洗浄後、2% ポリビニルピロリドンを含むPBS-Tweenで希釈した0.1  $\mu$ g/mlの西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGまたはIgAを各ウエルに100  $\mu$ lずつ加え、25℃で60分間放置した。放置したウエルをPBS-Tweenで5回洗浄後、基質溶液 (0.03% 過酸化水素および0.4% o-フェニレンジアミンを含む0.1 M クエン酸-0.2 M リン酸緩衝液, pH 5.0) を100  $\mu$ lを各ウエルに加え、25℃で15分反応させた。反応後、2 M硫酸を各ウエルに25  $\mu$ lずつ加え、直ちに490 nmにおける各ウエルの吸光度をBio-Radマイクロプレートリーダー モデル550 (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。得られた吸光度を以下の公式に代入して抗体レベルを算出した。

抗体レベル = IgG添加飼料群のELISA値 (A490 nm) /コントロール飼料群のELISA値 (A490 nm)

### 3-1-11. 統計処理

結果はすべて平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。また、コントロール飼料群とIgG添加飼料群間の統計的有意差をスチューデントt検定により求めた。

## 3-2. 結果

### 3-2-1. パイエル板および脾臓中のCD11b<sup>+</sup>およびIL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞割合

IgG無添加 (コントロール) および添加飼料で4週間飼育したマウスのパイエル板および脾臓細胞

中のCD11b<sup>+</sup>およびIL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞の割合を調べた結果をFig. 5に示した。Fig. 5から、脾臓細胞中のCD11b<sup>+</sup>およびIL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞の割合はともにコントロール飼料群と比べて、IgG添加飼料群で有意に高いことがわかる。特に、0.05% IgG添加飼料で飼育したマウス脾臓のCD11<sup>+</sup>細胞割合は、コントロール飼料群のそれと比べて7倍以上も高い。一方、パイエル板ではCD11<sup>+</sup>細胞の割合は、IgG添加飼料群の方がコントロール飼料群よりも顕著に低く、IL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞の割合もIgG添加飼料群での飼育により低くなる傾向にある。

### 3-2-2. 腹腔マクロファージによるスーパーオキシドの産生とラテックスビーズの取り込み

腹腔マクロファージの生産したスーパーオキシド量と細胞内に取り込まれたラテックスビーズ数を調べた結果をFig. 6に示した。Fig. 6から、IgG添加飼料で飼育したマウスの腹腔マクロファージ

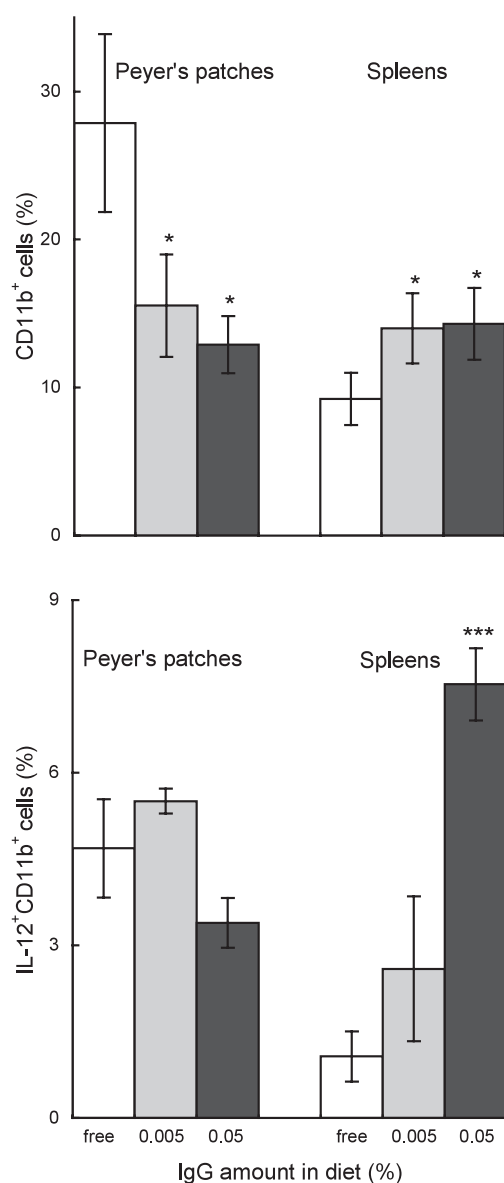
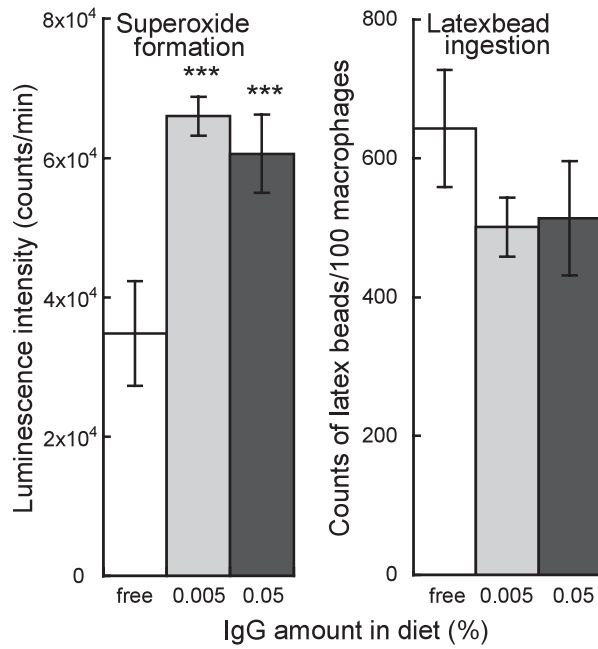
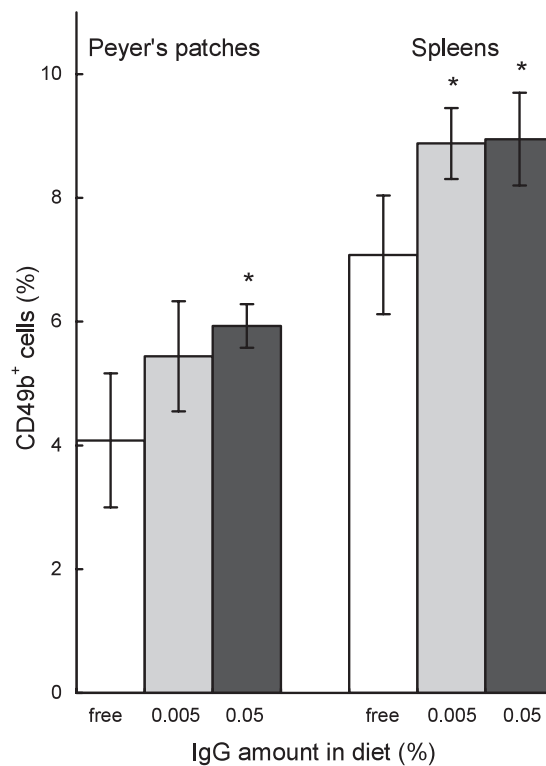


Fig. 5 Percentages of CD11b<sup>+</sup> cells (upper) and IL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells (bottom) in Peyer's patches and spleens from mice given IgG-free (control) and 0.005% or 0.05% IgG-added diets for four weeks. Values are significantly different from those of the control diet at \*P<0.05 or \*\*\*P<0.001.

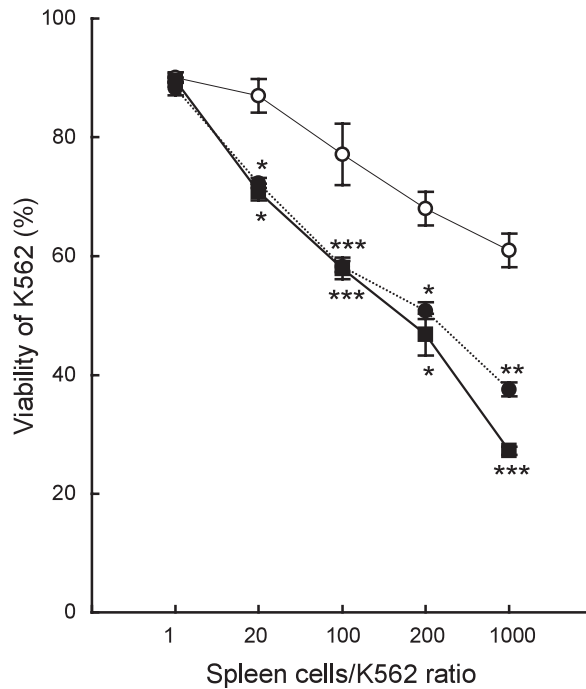


**Fig. 6** Formation of superoxides and ingestion of latex beads by peritoneal macrophages from mice given the control and 0.005% or 0.05% IgG-added diets for four weeks. Values are significantly different from those of the control diet at \*\*\*P<0.001.



**Fig. 7** Percentages CD49b<sup>+</sup> cells in Peyer's patches and spleens from mice given the control and 0.005% or 0.05% IgG-added diets for four weeks. Values are significantly different from those of the control diet at \*P<0.05.





**Fig. 8** Viability of a erythroleukemia cell line K562 in the presence of spleen cells from mice given the control (○) and 0.005% (●) or 0.05% (■) IgG-added diets for four weeks. Values are significantly different from those of the control diet at \*P<0.05, \*\*P<0.01 or \*\*\*P<0.001.

によるスーパーオキシダの生産は、コントロール飼料群のそれよりも顕著に高いことがわかる。しかし、IgG添加飼料で飼育したマウス腹腔マクロファージによるラテックスビーズの取り込み数は、コントロール飼料で飼育したマウスの方が高い。

### 3-2-3. パイエル板および脾臓中のCD49 b<sup>+</sup>細胞の割合

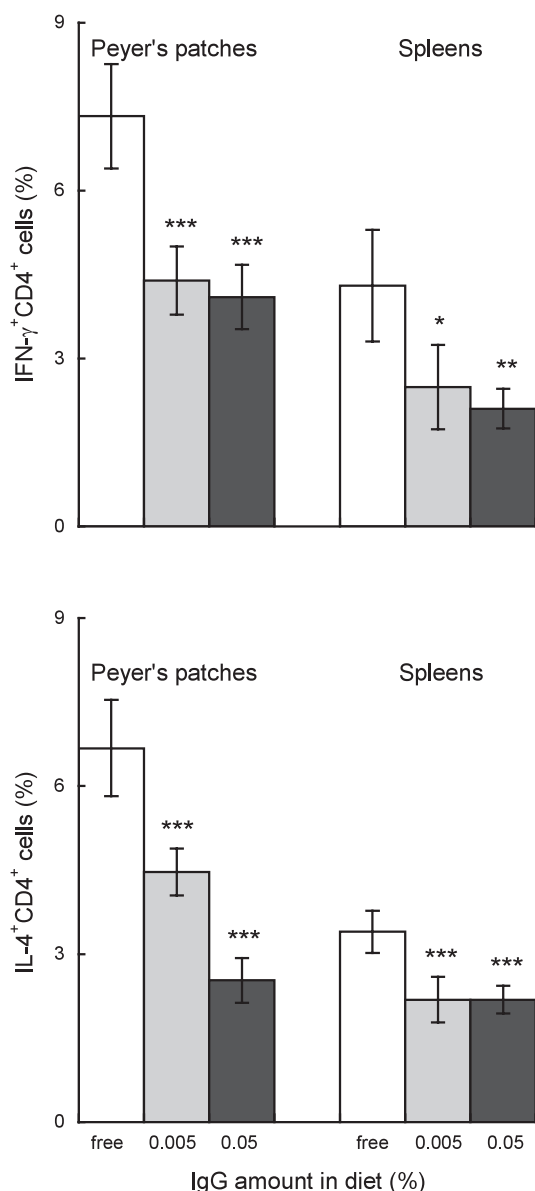
コントロールおよびIgG添加飼料で4週間飼育したマウスのパイエル板および脾臓細胞中のCD49 b<sup>+</sup>細胞割合を求めた結果をFig. 7に示した。Fig. 7からIgG添加飼料で飼育したマウスのパイエル板および脾臓中のCD49 b<sup>+</sup>細胞の割合は、コントロール飼料群のそれよりも顕著に高いことがわかる。

### 3-2-4. 脾臓細胞のヒト白血病株化細胞K562に対する細胞傷害活性

コントロールおよびIgG添加飼料で4週間飼育したマウスの脾臓細胞のヒト白血病株化細胞であるK562に対する細胞傷害活性をFig. 8に示した。Fig. 8からIgG添加飼料で飼育したマウスの脾臓細胞と培養した白血病株化細胞K562の生存率は、コントロール飼料群のそれよりも有意に低いことがわかる。特に脾臓細胞数と白血病株化細胞数の割合が1000：1のIgG添加飼料群の細胞傷害活性はコントロール群のおよそ2倍である。

### 3-2-5. パイエル板および脾臓中のIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>およびIL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の割合

コントロールおよびIgG添加飼料で4週間飼育したマウスのパイエル板および脾臓中のIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>およびIL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の割合を求めた結果をFig. 9に示した。Fig. 9から、パイエル板および脾臓細胞中のIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>およびIL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の割合はともに、コントロール飼料群のそれらと比べて、IgG添加飼料群で有意に低いことがわかる。



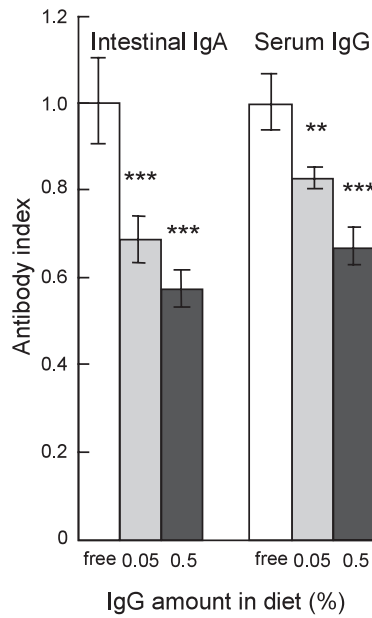
**Fig. 9** Percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (upper) and IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells (down) in Peyer's patches or spleens from mice given the control and 0.005% or 0.05% IgG-added diets for four weeks. Values are significantly different from those of the control diet at \*P<0.05, \*\*P<0.01 or \*\*\*P<0.001.

### 3-2-6. OVA特異腸管IgAおよび血清IgGレベル

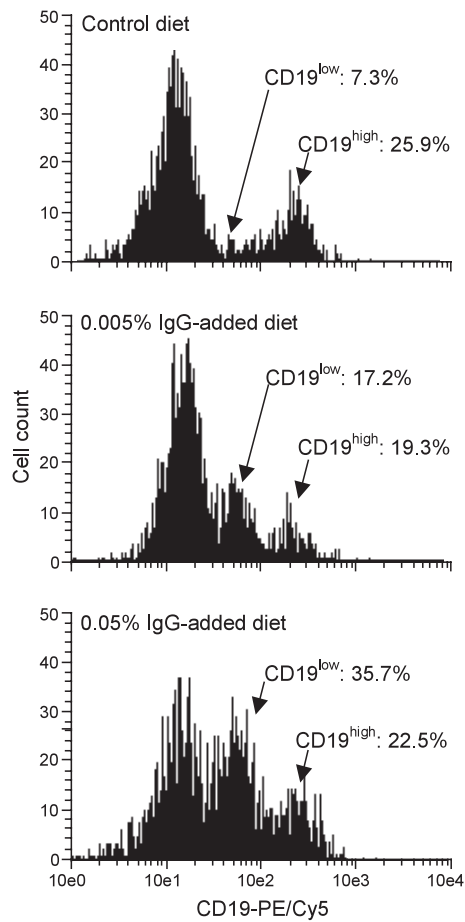
コントロールおよびIgG添加飼料で5週間飼育したマウスの飼料中の主要たんぱく質であるOVAに対する腸管IgAおよび血清IgGレベルの測定結果をFig. 10に示した。Fig. 10から、OVA特異腸管IgAおよび血清IgGはともに、コントロール飼料群のそれらと比べて、IgG添加飼料群で有意に低いことがわかる。

### 3-2-7. 脾臓中のCD19<sup>+</sup>細胞の性質

コントロールおよびIgG添加飼料で4週間飼育したマウスの脾臓中のCD19発現が低い細胞（以後、便宜上CD19<sup>low</sup>と呼ぶ）とCD19発現が高い細胞（以後、便宜上CD19<sup>high</sup>と呼ぶ）割合を調べた結



**Fig. 10** Levels of intestinal OVA-specific IgA and serum OVA-specific IgG in mice given the control and 0.05% or 0.5% IgG-added diets for five weeks. Values are significantly different from those of the control diet at \*\* $P < 0.01$  or \*\*\* $P < 0.001$ .



**Fig. 11** Cells expressing CD19 at low density (CD19<sup>low</sup> cells) and at high density (CD19<sup>high</sup> cells) in spleens from mice given the control and 0.005% or 0.05% IgG-added diets for four weeks.

果をFig. 11に示した。Fig. 11から、CD19<sup>high</sup>細胞割合はコントロール飼料群の方がIgG添加飼料群よりも高く、逆にCD19<sup>low</sup>細胞割合はIgG添加飼料群の方が高いことがわかる。

### 3-3. 考察

コントロール飼料群とIgG添加飼料群の体重増加に有意な違いは見られなかったことから、両試験群にストレスおよび餌の栄養価に差はなく、本実験で得られた結果の違いは飼料中のたんぱく質源の違い、すなわちIgGに起因するものと考えられる。

IgG添加飼料で飼育したマウスのCD11b<sup>+</sup>細胞およびIL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞の割合は、脾臓ではコントロール飼料群と比べて有意に高く、パイエル板では低かった (Fig. 5)。また、IgG添加飼料で飼育したマウスの腹腔マクロファージのスーパーオキシド生産能は、コントロール飼料群と比べて有意に高かった (Fig. 6)。CD11bは単球/マクロファージおよび樹状細胞の細胞表面抗原として知られる (Ammon et al. 2000)。IL-12は、単球/マクロファージおよび樹状細胞の生産する主要なサイトカインの1つである (Dhodapkar et al. 2005)。加えて、これらの細胞は腸管関連リンパ組織から、脾臓を含めた二次リンパ組織へ移動することが知られている (Mayrhofer et al. 1983; Lee et al. 1985; Imhof & Aurrant-Lions 2004)。これらのことから、経口摂取したIgGは腸管関連リンパ組織における単球/マクロファージの割合を増加させるとともに、それら細胞のサイトカインやスーパーオキシドなどの分泌機能の促進、並びにそれら細胞の脾臓や腹腔へのホーミングを促進することが示唆される。

マクロファージおよび樹状細胞は、Fc $\gamma$ 受容体 (Fc $\gamma$ R) I, Fc $\gamma$ R II およびFc $\gamma$ R III などのIgGのFc領域と結合する受容体を有している (Daeron 1997)。また、Fc $\gamma$ R I およびFc $\gamma$ R III にIgGが結合すると、マクロファージおよび樹状細胞の成熟やIL-12の生産が誘導される (Ravetch & Bolland 2001; Dhodapkar et al. 2005)。さらに、Fc $\gamma$ R I およびFc $\gamma$ R III を介した樹状細胞の活性化は、パイエル板から二次リンパ組織への移動を加速することが知られている (Dhodapkar et al. 2005)。本実験において、IgG添加飼料で飼育したマウスのCD11b<sup>+</sup>細胞の割合は、パイエル板ではコントロール群のそれと比べて有意に低かった (Fig. 5)。従って、牛乳IgGは、Fc $\gamma$ R I およびFc $\gamma$ R III を介してパイエル板の樹状細胞を成熟させ、パイエル板から二次リンパ組織への樹状細胞の移動を加速させたことが示唆される。Pfefferkorn & Fanger (1989) は、Fc $\gamma$ R I を介したマクロファージへのIgGの結合はスーパーオキシドの生産を促進するとともに、貪食作用を促進することを報告している。一方、Hunter et al (1998) は、IgGがFc $\gamma$ R II aを介してマクロファージに結合すると、貪食作用は阻害されることを報告している。本実験において、IgG添加飼料で飼育したマウスのマクロファージに取り込まれたラテックスビーズ数はコントロール飼料群のそれと比べて低く、腹腔マクロファージによるスーパーオキシド生産は高いことが示された (Fig. 6)。これらのことは、牛乳IgGは複数の受容体を介してマクロファージに結合したことを示唆している。

CD49b<sup>+</sup>細胞はナチュラルキラー (NK) 細胞の表面マーカーである (Arase et al. 2001)。パイエ

ル板および脾臓の双方において、コントロール飼料群と比べて、IgG添加飼料群においてNK細胞は有意に高いことが示された (Fig. 7)。NK細胞はがん細胞を傷害することはよく知られたところである (Miller 2001)。牛乳IgG添加飼料で飼育したマウスの脾臓細胞はヒトの白血病細胞株であるK562に対してコントロール飼料群のそれよりも強い細胞傷害を示した (Fig. 8)。休止期NK細胞の増殖および活性化はIL-12により誘導されることから (Biron et al. 1999)、本実験において脾臓中のIL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞割合は、コントロール飼料群よりもIgG添加飼料群において高かったことが (Fig. 5) が関係しているものと考えられる。

一方、パイエル板および脾臓細胞におけるIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>およびIL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の割合は、コントロール飼料群よりもIgG添加飼料群において顕著に少ないことが示された (Fig. 9)。IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>およびIL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞はそれらが生産するサイトカインを介して抗体応答を調節する (Pala et al. 2000)。特に、IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞はヘルパーII型T (Th2) 細胞と名づけられており、Th2細胞の生産するサイトカインは抗体の産生において不可欠である (Pala et al. 2000)。OVA特異腸管IgAおよび血清IgGレベルは、コントロール飼料群と比べて、IgG添加飼料群において顕著に低いことが示された (Fig. 10)。これらのことから、IgG添加飼料群において、抗体生産が低下した原因は、IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞割合が低下したことに基づくものと結論できる。

抗体は形質細胞により産生される。形質細胞は形質前駆細胞から分化し、形質前駆細胞はB細胞から分化する。CD19分子はB細胞および形質前駆細胞の細胞表面マーカーであるが、形質細胞にはCD19分子は存在していない (Edsel et al. 2001)。また、CD19分子の発現密度は、形質前駆細胞 (CD19<sup>low</sup>) よりも分化前のB細胞において高い (CD19<sup>high</sup>) ことが報告されている (Edsel et al. 2001)。本実験において、脾臓中のCD19<sup>low</sup>細胞の割合はコントロール群よりも、IgG添加飼料群で高いことが示された (Fig. 11)。このことは、牛乳IgGの経口摂取がTh2細胞機能の抑制を介して形質前駆細胞から形質細胞への分化を阻害することを示唆している。

以上のように、牛乳IgGのマウスへの経口投与は自然細胞性免疫を促進し、液性獲得免疫応答を抑制することを見出した。本実験において、マウス1匹の平均体重およびマウス1匹の1日あたりの平均飼料摂取量は、それぞれ19.5~28.4 gおよび2 gであった。従って、マウス1匹あたり経口摂取IgG量は、0.005% IgG添加飼料群において1日あたり0.1 mgである。このIgG量を60 kgのヒトが摂取したIgG量に換算すると、1日当たり0.21 gのIgGを摂取したことに相当し、このことはさらに、体重60 kgのヒトが、毎日292 mlの市販の牛乳を飲んだときに摂取するIgG量に相当する。私たちの多くは牛乳300 mlに相当する脱脂乳を毎日摂取することはさほど困難ではない。したがって、ヒトが脱脂粉乳を自然免疫系増強の目的で摂取することは決して困難ではないように思われる。

### 3-4. 小 括

牛乳IgG添加飼料でマウスを1ヶ月間飼育すると、脾臓中のIL-12<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞の割合および腹腔マクロファージのスーパーオキシド生産能がIgG無添加飼料群と比べて有意に高くなることが示され

た。また、パイエル板と脾臓中のNK細胞の割合とヒト白血病株化細胞であるK562に対する脾臓細胞の傷害活性も同様にIgG添加飼料群で高いことが示された。一方、パイエル板と脾臓中のIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>およびIL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の割合と腸管や血清のOVA特異IgAおよびIgGレベルは、IgG無添加飼料群と比べて有意に低下することが示された。また、脾臓中のCD19<sup>low</sup>細胞の割合はIgG無添加飼料群と比べてIgG添加飼料群で有意に高いことが示された。すなわち、これらの結果は、牛乳IgGの経口摂取は自然細胞性免疫系を促し、獲得液性免疫応答を抑制することを示している。

#### 実験4 マウス脾臓細胞の免疫グロブリン産生とサイトカイン遺伝子発現に及ぼす牛乳IgG1, IgG2およびそれらのフラグメントの影響

牛乳IgGの経口摂取は自然細胞性免疫系を促進し、獲得液性免疫応答を抑制することを見出すとともに、獲得液性免疫応答の抑制は、ナイーブT細胞からTh2細胞および形質前駆細胞から形質細胞への分化を阻害することによることを実験3で示唆した。そこで、実験4ではIgGのこのような免疫調節機構を解明するための手がかりを得る目的で、マウス脾臓細胞培養系における免疫グロブリンの産生とサイトカイン遺伝子の発現に及ぼす牛乳IgG1, IgG2およびそれらのフラグメントの影響を調べた。

##### 4-1. 材料および方法

###### 4-1-1. 材料

プロテインGおよびプロテインAカラムは、それぞれPierce Chemical (Rockford, USA) および昭光通商株式会社 (東京, 日本) から購入した。DEAE-Sephades A50はAmersham Bioscience (Uppsala, USA) から購入した。ウサギ抗ウシIgG1および抗ウシIgG2はNordic Immunological Laboratories (Tilburg, Netherlands) から購入した。ウサギ抗ウシIgG Fabおよびヤギ抗ウシIgG Fcは、それぞれBethyl Laboratories (Montgomery, USA) およびEY Laboratories (San Mateo, USA) から購入した。ヤギ抗マウスIgGおよび抗マウスIgMはJackson Immuno Research Laboratories (Baltimore Pike, USA) から、また、ヤギ抗マウスIgA, 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウスIgG, 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウスIgAおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウスIgMはBethyl Laboratories (Texas, USA) から購入した。

###### 4-1-2. IgG1, IgG2およびそれらのフラグメント

IgG1およびIgG2は実験3で調製したIgGを陰イオン交換クロマトグラフィー、プロテインGクロマトグラフィーおよびプロテインAカラムクロマトグラフィーに供することにより調製した。調製したタンパク質がIgG1およびIgG2であることをSDS-PAGEとウサギ抗ウシIgG1および抗ウシIgG2を用

いた免疫二重拡散により確認した。各サブクラスのFabおよびFcフラグメントはパパイン消化IgG1およびIgG2をSephadex G-100カラム (2.5×100 cm, Amer-sham Bioscience, Uppsala, Sweden) を用いてゲルろ過およびプロテインGカラムクロマトグラフィーに供することにより調製した。また、それらの同定は、SDS-PAGEとウサギ抗ウシIgG Fabおよび抗ウシIgG Fcを用いた免疫二重拡散により行った。

#### 4-1-3. 脾臓細胞の培養

6週齢のC3H/HeN系雄マウスを頸椎脱臼により屠殺し、摘出した脾臓から脾臓細胞懸濁液を、Otani et al. (2003) の報告に準じて調製した。脾臓細胞懸濁液を96ウェルマイクロタイタープレート (Falcon, Cockeysvill, USA) または培養用ペトリディッシュ (ナルジェ スンクインターナショナル, 東京, 日本) にそれぞれ100  $\mu$ lまたは3 mlずつ分注し、PBSに溶解した牛乳IgG1, IgG2またはそれらのフラグメント溶液 (最終濃度 0, 50または100  $\mu$ g/ml) 10または300  $\mu$ lを加え、5% CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで72時間培養した。培養後、遠心分離により得られた上澄み中の免疫グロブリンをELISAで定量するとともに、沈殿物として得られた細胞のサイトカイン遺伝子の発現を逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により調べた。

#### 4-1-4. ELISAおよびSDS-PAGE

ELISAおよびSDS-PAGEは実験1で記述した方法に準じて行った。

#### 4-1-5. RT-PCR

脾臓細胞からTRIzol 試薬を用いて、RNAを抽出した。次いで、そのRNA 1  $\mu$ gにオリゴ (dT) 18 500 ngを加え、70°Cで10分間加熱し、氷冷した。その後、Superscript II (Invitrogen Japan, 東京, 日本) 1  $\mu$ lを加え、ミニサイクラーPTC-1152 (MJ Research, Inc., Watertown, USA) を用いて42°Cで50分間、cDNAに逆転写反応を行った。得られたcDNA 1  $\mu$ lに各種サイトカイン遺伝子に対する特異的プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。得られたPCR反応物の全量を1.5% アガロースゲルを用いて、100 Vで15分間、電気泳動を行った。電気泳動後、アガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色し、ATTO Printgraph FX AE-6911FXFD (ATTO, 東京, 日本) を用いてバンドを可視化および撮影した。バンドの解析および数値化はATTO Densitograph Software Library Lane Analyzer AE-6920WLA ver. 3.04b を用いて行った。なお、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対する特異的プライマーを、ポジティブコントロールおよび内部標準として用いた。上流および下流側のプライマー配列は以下の通りである: IL-5, 5'-GCCACTGCCATGGAGATTCCC-3' (上流側) および5'-GGGTTCCATCTCCAGCACTTC-3' (下流側) ; IL-6, 5'-C-TGGTGACAACCACGGCCTTCCC-TA-3' (上流側) および 5'-ATGCTTAGGCATAACGCACTAGGTT-3' (下流側) ; GAPDH, 5'-CCGTAGACAAAATGGTGAAGGT-3' (上流側) および5'-GTGGTGCAGGAGGCATTGCTGA-3' (下流側)。

## 4-2. 結果

### 4-2-1. マウス脾臓細胞の免疫グロブリン産生に及ぼすIgG1およびIgG2とそれらのFabおよびFcフラグメントの影響

マウス脾臓細胞をIgG1およびIgG2, 並びにそれらのフラグメント存在下で72時間培養し, その上澄み中のIgG, IgMおよびIgAレベルをサンドウィッチELISAで調べた結果をFig. 12およびFig. 13に示した。Fig. 12から, IgG1およびIgG2はIgG, IgMおよびIgA産生すべて有意に促進することがわかる。中でも, IgG1のIgA産生促進活性が最も強く, 50  $\mu$ g/ml添加時には1.21倍, 100  $\mu$ g/ml添加時に

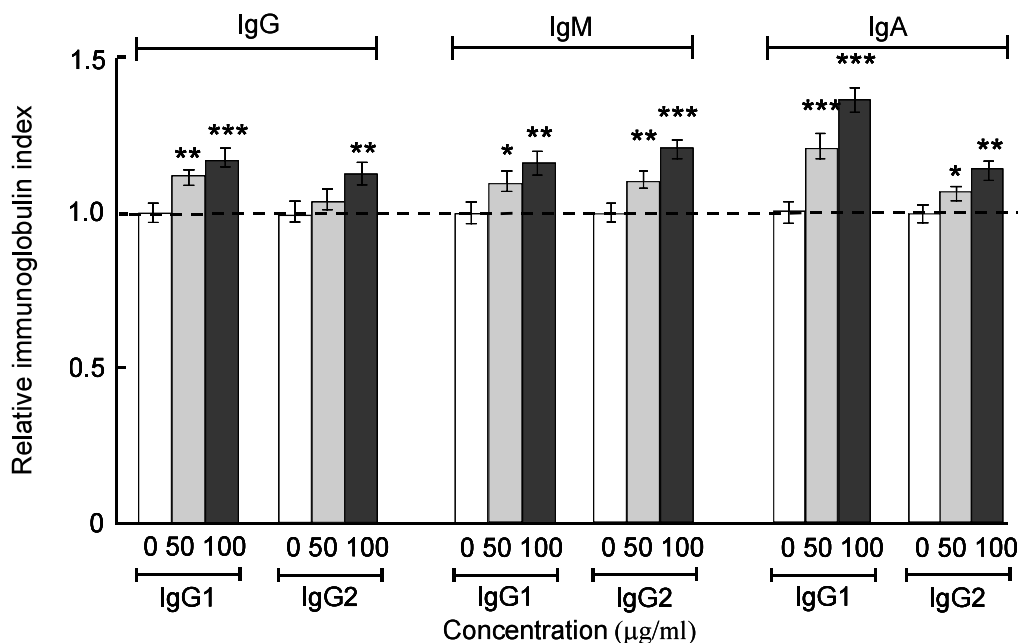


Fig. 12 Immunoglobulin levels in spleen cell cultures with or without bovine milk IgG1 and IgG2.

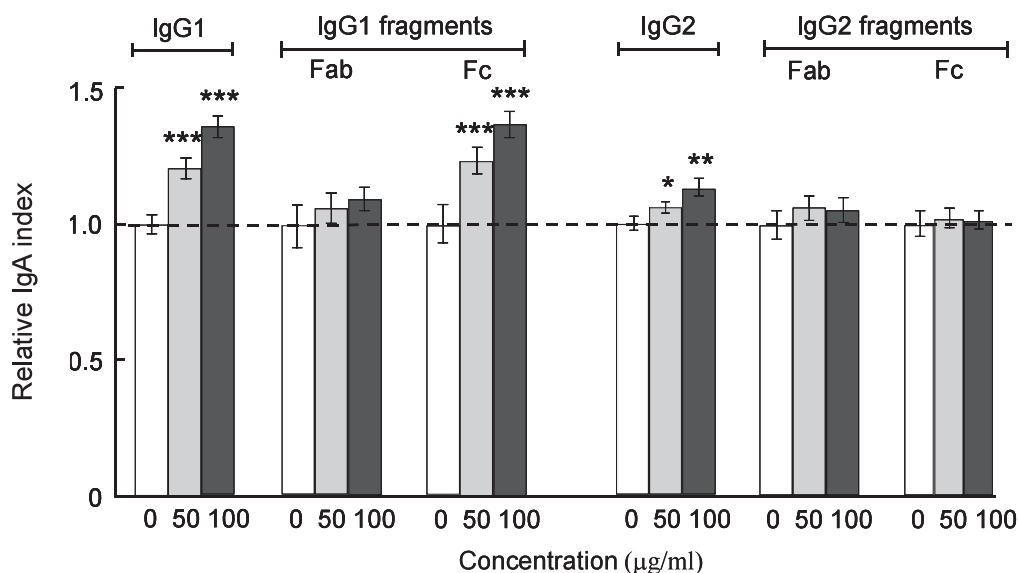


Fig. 13 IgA levels in spleen cell cultures with or without IgG1, IgG2 and their fragments.



は1.36倍産生される。また、Fig. 13から、IgG1のFcフラグメントはIgA産生を有意に促進するが、FabフラグメントやIgG2のFabおよびFcフラグメントにはIgAの有意な促進作用はないことがわかる。

#### 4-2-2. IgG1, IgG2およびそれらのFabとFcフラグメントのIL-5 とIL-6 mRNAの発現に及ぼす影響

IgG1, IgG2およびそれらのフラグメント存在下で培養した脾臓細胞のIL-5 とIL-6のmRNAの発現を調べた結果をFig. 14に示した。Fig. 14から、IL-5mRNAの発現は、IgG1を添加して培養することにより約3倍になり、IgG1のFcフラグメントの添加でも約2倍になることがわかる。しかし、IgG2やそのFabおよびFcフラグメントはIL-5mRNAの発現に殆ど影響を及ぼさない。同様に、IL-6mRNA発現も牛乳IgG1の添加により無添加の場合の約2倍になり、IgG1のFcフラグメントの添加により約2.5倍になるが、IgG2やそのFabとFcフラグメントの添加による影響は殆どない。

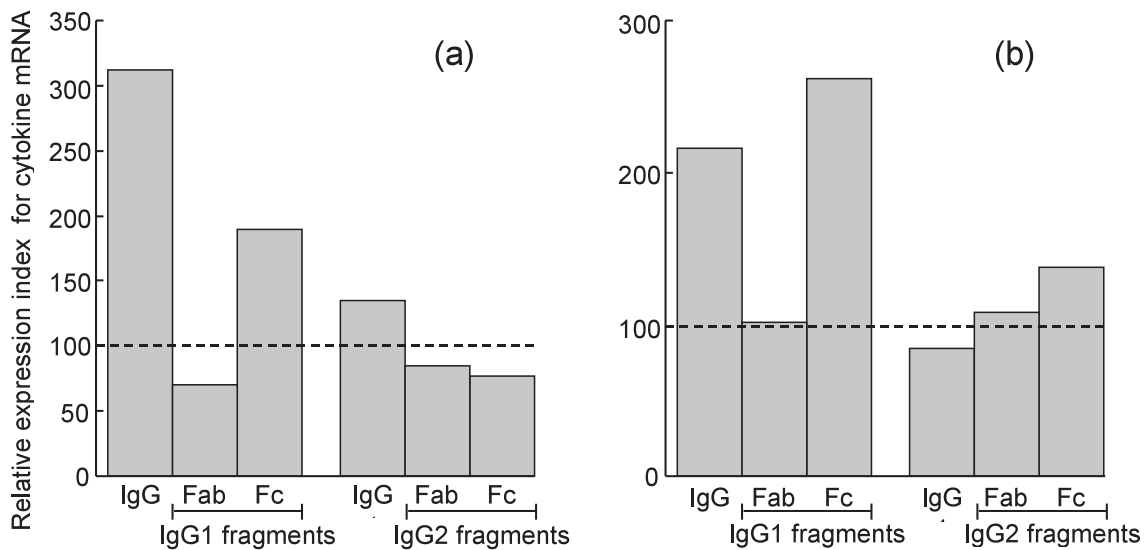


Fig. 14 Expression levels of IL-5 mRNA (a) and IL-6 mRNA (b) in spleen cells cultured with or without IgG1, IgG2 and their fragments.

### 4-3. 考 察

IgG1はIgAの産生を最も強く促進するとともに、その作用はFc領域から生じていることが示された。また、IgG2の免疫グロブリンの促進作用はIgG1と比べて弱いことが示された (Fig. 12および13)。IgA産生細胞は、B細胞からIL-5およびIL-6の作用により特異的に分化誘導されることが知られているが (Beagley et al. 1989), IgG1とそのFcフラグメントはIL-5mRNAおよびIL-6mRNAの発現を強く促進することが示された (Fig. 14)。すなわち、これらのことから、細胞培養系では牛乳IgG, 特にIgG1はFc領域を介してIL-5mRNAおよびIL-6mRNAの発現を促進することによりIgA産生を促進することが明らかになった。しかし、本結果は、牛乳IgG1を経口的にマウスに与えた場合のIgA応答の結果とは全く反対の結果である。

一般に、IgGのFc領域に対する受容体として、Fc $\gamma$ R I, Fc $\gamma$ R IIおよびFc $\gamma$ R III等が知られてい

る (Daeron 1997)。Fc $\gamma$ R I はIgG単量体に対する親和性も高いが、Fc $\gamma$ R II およびFc $\gamma$ R IIIはIgGと抗原との複合体に対する親和性が高いことが知られている (Daeron 1997)。また、IgGがFc $\gamma$ R Iを介して結合するとIL-6生産は顕著に促進され、Fc $\gamma$ R IIを介して結合するとIL-6生産のシグナルが封鎖されることが知られている (Krutman et al. 1990)。実験4での細胞培養系では添加したIgGに対する抗原は存在していない。しかし、実験3の経口投与の場合は腸管内の細菌と投与したIgGの間で複合体が形成されたことが考えられる。したがって、牛乳IgG1が結合した受容体の種類の違いにより、実験3と実験4では牛乳IgGの免疫グロブリン産生に対する結果が異なったことが示唆される。すなわち、脾臓細胞培養系では抗原と結合していない遊離型のIgGが主にFc $\gamma$ R Iを介して抗原提示細胞に結合し、経口摂取では腸管内でIgGと抗原との複合体が形成され、それはFc $\gamma$ R II bを介して免疫担当細胞に結合することが考えられる。

#### 4-4. 小 括

牛乳IgG1およびそのFcフラグメントはマウスの脾臓細胞によるIgA産生、並びにIL-5およびIL-6のmRNAの発現を有意に促進する。

#### 文 献

- Agunod M, Yamaguchi N, Lopez R, Luhby AL, Glass GB. 1969. *Am. J. Dig. Dis.* 14, 400-414.
- Ammon C, Meyer SP, Schwarzfischer L, Krause SW, Andreesen R, Kreutz M. 2000. *Immunology* 100, 364-369.
- Arase H, Saito T, Phillips JH, Lanier LL. 2001. *J. Immunol.* 167, 1141-1144.
- Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, Kiyono H, Everson MP, Koopman WJ, Hirano T, Kishimoto T, McGhee JR. 1989. *J. Exp. Med.* 169, 2133-2148.
- Beier R, Gebert A. 1998. *Am. J. Physiol.-Gastr. Liver Physiol.* 275, 130-137.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. 1999. *Ann. Rev. Immunol.* 17, 189-220
- Brussow H, Hilpert H, Walther I, Sidoti J, Mietens C, Bachmann P. 1987. *J. Clin. Microbiol.* 25, 982-986.
- Daeron M. 1997. *Ann. Rev. Immunol.* 15, 203-234.
- DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, Wells JA. 2000. *Science* 287, 1279-1283.
- Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, Banerjee DK, Bonvini E, Koenig S, Steinman RM, Ravetch JV, Dhodapkar MV. 2005. *PNAS* 102, 2910-2915.
- Edsel A, Jackson DG, Gill MA, Bennett LB, Banchereau J, Pascual V. 2001. *J. Immunol.* 167, 2361-2369.
- Ehrlich P. 1892. *Zeit. Hyg. Infect.* 12, 183-203.
- Facon M, Skura BJ, Nakai S. 1993. *Food Agric. Immunol.* 5, 85-91.

- Goldsmith SJ, Dickson JS, Barnhart HM, Toledo RT, Eitenmiller RR. 1983. *J. Food Prod.* 46, 4-7.
- Hilpert H, Brussow H, Mientens C, Sidoti J, Lerner L, Werchau H. 1987. *J. Infect. Dis.* 156, 158-166.
- Hunter S, Indik ZK, Kim M, Cauley MD, Park J, Schreiber AD. 1998. *Blood* 91, 1762-1768.
- Imhof BA, Aurrant-Lions M. 2004. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 432-444.
- Inaba Y. 1996. Recent statistical data book of intractable diseases in Japan. 1-95. Research Committee on Epidemiology of Intractable Diseases, the Ministry of Health and Welfare of Japan. Tokyo.
- Krutman J, Kirnbauer R, Kock A, Schwarz T, Schopf E, May LT, Sehgal PB, Luger TA. 1990. *J. Immunol.* 145, 1337-1342.
- Laemmlli UK. 1970. *Nature* 227, 680-685.
- Lee SH, Starkey PM, Gordon S. 1985. *J. Exper. Med.* 161, 475-489.
- Li-Chan E, Kummer A, Losso JN, Kitts DD, Nakai S. 1995. *Food. Res. Int.* 28, 9-16.
- Mayrhofer G, Pugh CW, Barclay AN. 1983. *Eur. J. Immunol.* 13, 112-122.
- Miller JS. 2001. *Exper. Hemat.* 29, 1157-1168.
- Murosaki S, Yoshikai Y, Kubo C, Ishida A, Matuzaki G, Sato T, Endo K, Nomoto K. 1991. *J. Nutr.* 121, 1860-1868.
- Otani H, Futakami M. 1996. *Food Agric. Immunol.* 8, 59-69.
- Otani H, Nakaya H, Maenishi K. 1995. *Anim. Sci. Technol.* 66, 513-522.
- Otani H, Nakano K, Kawahara T. 2003. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67, 729-735.
- Otani H, Wakatsuki S. 2004. *Anim. Sci. J.* 75, 147-153.
- Pala P, Hussell T, Openshaw PJM. 2000. *J. Immunol. Meth.* 243, 107-124.
- Pfefferkorn LC, Fanger MW. 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 14112-14120.
- Ravetch JV, Bolland S. 2001. *Ann. Rev. Immunol.* 19, 275-290.
- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. 2001. *J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604.
- Stephan W, Dichtelmuller H, Lissner R. 1990. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 19-23.
- Ustunol Z, Sypien C. 1997. *J. Food Sci.* 62, 1218-1222.
- Vernot OI, Alexander NG, Lubert S. 1982. *J. Cell Biol.* 93, 981-986.