

# 乳業用乳酸菌DNAの腸管M細胞を介する免疫活性化機構の解明と 同機構を応用した“生体防御食品”の開発研究

東北大学大学院農学研究科 教授 齋藤 忠 夫  
東北大学大学院農学研究科 助教授 北澤 春 樹

## 【要 約】

本研究は乳酸菌由来DNAによる腸管免疫賦活化機構を解明し、機能性DNAモチーフを有する乳酸菌を用いた“生体防御食品”の開発の基礎を築くことを目的とした。その結果、以下に示す知見が得られた。

1. 乳業用乳酸菌19菌株より染色体DNAを調製し、マウスパイエル板細胞に対するリンパ球幼若化活性を解析したところ、乳酸菌19菌株中6菌株のDNAにおいてその活性が認められ、活性DNAはリンパ球にCD69の発現を誘導した。
2. マウスおよびブタ腸管組織培養による乳酸菌菌体およびDNAの通過をフローサイトメトリーおよびレーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、乳酸菌および乳酸菌由来DNAは腸管上皮に付着した後、M細胞を介してパイエル板に浸潤し、免疫担当細胞と接触することが明らかとなった。
3. *L. bulgaricus* NIAI B6由来のDNAモチーフはパイエル板細胞からのIL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ の産生を増強したことから、活性DNAによる腸管系サイトカインネットワークの制御が考えられた。本研究により、乳酸菌DNAモチーフが腸管においてTh1およびTh2系の免疫応答を誘導する事が明らかとなった。また、乳酸菌および活性DNAはM細胞を介してパイエル板に取り込まれ、免疫担当細胞と接触する事により腸管免疫を賦活化することが明らかとなった。本研究で得られた知見は、腸管系サイトカインネットワークを制御するDNAモチーフを持つ乳酸菌を用い、感染症の予防効果を発揮する“生体防御食品”の開発の基礎を築くものと期待できる。

キーワード：乳業用乳酸菌，DNA，リンパ球幼若化，サイトカイン，パイエル板，M細胞，樹状細胞

## 【1】 研究の背景および目的

我が国で厚生省認可の下生まれた「特定保健用食品」は、「食生活において特定の保健目的で摂取をするものに対し、その摂取により当該保健の目的が期待できる旨の表示をする食品」と定義されており、2002年5月27日現在、296品目に対して認可されている(1)。その機能性は整腸作用、コレステロール低減、血圧降下、Ca・Feの吸収促進などがあり、食品の種類としては発酵乳・乳酸菌飲料をベースとするものが多い。また、2000年3月に明治乳業(株)から発売されたプロビオヨーグルトLG21は

特定保健用食品ではないが、慢性胃炎や胃潰瘍、十二指腸潰瘍さらには胃ガンの原因菌とされる *Helicobacter pylori* の除菌および感染防御に寄与し (2)、生体防御機能を有する食品開発の先駆けとして期待されている。しかしながら宿主の免疫応答を賦活化し、生体防御機能を向上させる特定保健用食品の開発は未だ実現していない。

発酵乳および乳酸菌は古くから健康食品として世界的に消費されてきた事もあって、その生体調節機能が詳細に解析されつつある。現在までに発酵乳・乳酸菌の生理活性として1) 乳酸発酵による乳成分の栄養的価値の向上 (3)、2) 整腸作用 (4-6)、3) 血圧降下作用 (7-9)、4) 抗腫瘍作用 (10)、5) 抗変異原作用 (10-12)、6) 免疫賦活化作用 (10,13,14) 等が明らかとなっており、今後さらなる研究の進展が期待されている。中でも、乳酸菌の発揮する免疫賦活化作用に関する報告は *in vivo*, *in vitro* を通じて多く、マクロファージ (10,15-17)、細胞障害性T細胞 (18)、NK細胞の活性化 (19) やIFN- $\gamma$  を始めとする各種サイトカインの産生誘導 (20-25) および抗腫瘍作用 (10) や抗アレルギー作用 (26) などが知られている。

以上の研究成果を基礎とし、最近になって乳酸菌を用いた疾病予防の考えが、より一層注目されるようになった。乳酸菌は安全性に優れているため食品として経口的に摂取することが可能であり、胃酸耐性、胆汁酸耐性にも優れているため、効果的に腸管まで到達し、腸管免疫の活性化を発揮できると期待されている (27)。経口投与した乳酸菌が発揮する免疫賦活化作用としてはマクロファージの活性化 (28-30) や *L. acidophilus* および *L. casei* の消化管関連リンパ組織 (GALT) を介するIgA産生増強作用などが報告されている (31)。また、*L. casei* がT細胞の機能を亢進することにより抗腫瘍作用を示すことも報告されている (32)。これら乳酸菌による感染防御、抗腫瘍作用が直接的な病原細菌や腫瘍細胞に対する傷害作用ではなく、宿主の免疫力を増強することにより発揮されることは、腸内菌叢や免疫系に対する副作用が問題となる抗生物質や抗ガン剤などに比較し、より好ましい予防法につながるものと期待できる。さらに、サルモネラ菌や病原性大腸菌を始めとする食中毒菌は腸管粘膜を介して感染するが、非経口的抗原投与によっては全身性免疫から腸管における独立した粘膜免疫システムを十分に賦活することが出来ないのに対し、経口投与した乳酸菌は腸管免疫を直接賦活化することにより、非経口投与に比べ効果的に感染防御作用を発揮できるという利点がある (33,34)。

乳業用乳酸菌を免疫賦活化作用を有する食品として積極的に利用しようとする場合、その活性化因子の同定は必要不可欠である。乳酸菌由来免疫賦活化因子に関する研究は、菌体細胞壁成分 (35,36) や菌体外多糖成分 (37-41) がその活性因子として報告されている。我々のこれまでの研究により、乳業用乳酸菌のDNAにおいて脾臓Bリンパ球を幼若化するDNAモチーフが同定された (42,43)。DNAの免疫賦活化能については1995年、大腸菌由来DNA中の特異的配列 (CpGモチーフ) が、直接B細胞を活性化すると報告され、DNAの生理活性がクローズアップされた (44)。CpGモチーフは、Bリンパ球の増殖誘導 (44,45)、抗原特異的抗体の産生 (46-48) およびサイトカイン分泌誘導 (49-52)、NK細胞の溶菌活性の増大 (53) や各種疾病に対する補助薬 (アジュバント) 的役割 (51,54) 等、種々の免疫賦活化作用を持つことが報告されている。しかしながらCpGモチーフの腸管免疫に対する

作用およびそのメカニズムについては詳細な検討がなされていない。CpGモチーフは前述のような強い免疫賦活化作用を有するが、食品成分として大腸菌由来成分を用いることは困難であり、さらに敗血症性ショックを引き起こす(55)など、副作用が指摘されている。そこで本研究ではCpGモチーフのこれまでの知見を基に、安全性が確認されている乳業用乳酸菌とそのDNAの腸管免疫に対する賦活化作用を詳細に解析することを目的とした。

本研究は乳業用乳酸菌由来のDNAの腸管免疫に対する作用を発展的に解明することにより、21世紀において疾病を予防する機能性DNAを有する乳酸菌を用いた未来食品、“生体防御食品”の創製の基礎を築くものと考えられる。

## 【2】 研究計画および方法

本研究では、疾病予防機能性のDNAを有する乳酸菌を用いた“生体防御食品”の創製の基礎を築くことを目的とし、乳業用乳酸菌由来のDNAの腸管免疫に対する作用を発展的に解明する。具体的には以下の研究を遂行した。

### 1. 腸管免疫に重要なパイエル板細胞に対する免疫賦活化能を有する乳酸菌由来DNAの選抜

*L. bulgaricus* 6菌株、*S. thermophilus* 5菌株、*L. acidophilus*グループ8菌株の計19菌株についてマウスパイエル板細胞に対する幼若化活性を検討した。

乳業用乳酸菌由来DNAによるパイエル板細胞における活性化細胞について、細胞表面に発現する活性化抗原(CD69)を指標として、解析した。

#### 1) 供試乳酸菌

実験に用いた菌株の名称および起源をTable. 1に示した。

#### 2) 乳業用乳酸菌からの染色体DNAの調製

LactobacilliはLactbacilli MRS Broth (Difco laboratories, Detroit, MI, USA)で、StreptococciはElliker brothでそれぞれ3回継代培養(37°C, 24時間)後、50mlの培地に1%接種し、37°Cで16時間培養した。菌体を集菌し、リゾチーム(生化学工業、東京)およびN-アセチルムラミダーゼSG(生化学工業)を加え溶菌後、プロテイナーゼK(TaKaRa, 京都)によりタンパクを分解した。100%エタノールで核酸を沈殿させ、生じた沈殿を滅菌したガラス棒を用いて巻き取り、70%エタノールで洗浄後、TE緩衝液に溶解した。RNAを分解後の核酸をTE緩衝液に溶解した。以上の操作でDNAが精製され、使用までの間4°C下で保存した。

#### 3) 実験動物

Specific pathogen free (SPF) BALB/cマウス(Japan SLC, Shizuoka, Japan)を用いた。マウスは5週齢の雄を購入し、MRブリーダー(日本農産工業)および水を自由摂取させ、実験には6-10週齢のマウスを用いた。

Table1 List of the Lactic acid bacteria strains tested

Speacies	Strains	Origins
Dairy lactic acid bacteria		
<i>L.bulgaricus</i>	JCM 1002 <sup>T</sup>	Bulgarian yoghurt
	NCFB 1979	
	NCFB 2490	
	NCFB 2074	
	NIAI yB62	
<i>S.thermophilus</i>	NIAI B6	acidic milk
	NIAI 510	
	OLS 3002	yoghurt
	OLS 3059	yoghurt
	OLS 3060	yoghurt
	OLS 3073	yoghurt
Intestinal lactic acid bacteria		
<i>L.johnsonii</i>	PN-Ri-2-4	Feces, pig
<i>L. acidophilus</i>	JCM 1132 <sup>T</sup>	Faces, human
	LA 67	Feces, human
<i>L.crispatus</i>	JCM 1185 <sup>T</sup>	Eye
<i>L.amylovorus</i>	JCM 1126 <sup>T</sup>	
	JCM 2125	Intestine, human (adult)
<i>L.gallinarum</i>	JCM 2011 <sup>T</sup>	Intestine, human
<i>L.gasseri</i>	JCM 1131 <sup>T</sup>	Intestine, human

#### 4) マウスパイエル板細胞の調製

BALB/cマウスの腸管を摘出し、パイエル板を切り出した。パイエル板をガーゼ中で良くほぐし、パイエル板細胞をPBS中に漏出させ、細胞浮遊液を調製した。細胞は洗浄後、最終的に10%牛胎児血清 (FCS: Biocell Lab., Inc., CA, USA) を含むRPMI-1640培地に懸濁し、これをパイエル板細胞懸濁液とした。

#### 5) マウスパイエル板細胞に対する幼若化活性

96穴マイクロプレート (SUMITOMO BAKELITE CO.,LTD. Tokyo, Japan) の各穴に細胞懸濁液を $1 \times 10^5$  cells/wellになるように分注し、調製したDNAを $10 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、RPMI-1640 (10%FCS) で5%CO<sub>2</sub>, 37°C, 48時間培養した。陽性対照試料としてLipopolysaccharide (LPS:B-cell mitogen, *E.coli* 0111:B4, SIGMA) またはConcanavalin A (ConA:T-cell mitogen,SIGMA) を用い、それぞれ最終濃度が $20 \mu\text{g/ml}$ および $2 \mu\text{g/ml}$ になるように添加した。また、大腸菌DNAにおいて同定されたマイトジェン活性を有するオリゴヌクレオチド CpG ODN 1826 (5' TCCATGACGTTCCCTGACGTT 3') および当研究室でL

*bulgaricus* NIAI B6 DNAにおいて同定したマイトジェン活性オリゴヌクレオチドOLLB7 (5' CGGCACGCTCACGATTCTTG 3') も同時に試験した。培養終了16時間前に、[5,6-<sup>3</sup>H] Uridine (Amersham pharmacia) を9.25kBq/well添加し、パルスラベルした。培養終了後、セルハーベスター (LABO MASH LM 101-655, LABO SCIENCE CO, LTD) を用いて細胞をガラスフィルター (LABO MASH LM 101-655, LABO SCIENCE CO, LTD) 上に回収し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。リンパ球幼若化活性は、以下の式を用いてStimulation Index (S.I.) を算出して相互評価した。

$$S.I. = \frac{[(\text{counts per minute in treated}) - (\text{counts per minute in background})]}{[(\text{counts per minute in control}) - (\text{counts per minute in background})]}$$

## 6) 乳酸菌由来DNAによるマウスパイエル板における活性化細胞の解析

方法4) に従いパイエル板細胞を調製した。幼若化活性試験において高い活性が認められた菌株のDNAについて、パイエル板細胞におけるCD69発現誘導能を解析した。すなわち24穴マイクロプレート (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD. Tokyo, Japan) にパイエル板細胞懸濁液を  $4 \times 10^6$  cells/well になるように分注し、Chromosomal DNAを  $10 \mu\text{g/ml}$  になるように添加し、全量  $500 \mu\text{l}$  の系で、5%CO<sub>2</sub>, 37°C, 24時間培養した。活性化された細胞の同定は抗CD69抗体を用いた抗体染色法により行った。

## 2. マウス腸管パイエル板およびブタ腸管における菌体およびDNAの通過と免疫細胞結合性の解析

経口投与により腸管に到達した乳酸菌およびそのDNAがパイエル板において免疫担当細胞と接触し、免疫賦活化作用を発揮できる事を証明する目的で、マウスパイエル板細胞および腸管組織培養により解析した。さらに、免疫賦活性乳酸菌、DNAおよびモチーフの腸管における通過解析をヒトモデル系として期待されるブタの腸管組織培養により検討した。

### 1) 供試菌体

*L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> (LG) および *L. bulgaricus* NIAI B6 (LB) の凍結乾燥粉末を調製し、実験に使用した。

### 2) 供試DNA

LB由来DNA clone (LBb-40) を含むプラスミドpLBb-40よりLBb-40の増幅をPCR (polymerase chain reaction) 法により行った。増幅DNAはフェノール抽出、エタノール沈殿を行い、最終的に  $1\text{mg/ml}$  になるようミリQ水に懸濁し、使用までの間-20°Cで保存した。

### 3) FITCを用いた乳酸菌の蛍光標識

凍結乾燥したLGまたはLBを  $100\text{mg}/10\text{ml}$  の濃度でPBSに再懸濁した。菌体懸濁液に  $1\text{mg}$  の還元型FITCを加え、4°C, 1時間インキュベートした。未反応のFITCを除去し、最終的に菌液をRPMI-1640培地に懸濁し、使用までの間-20°Cで保存した。菌体のFITCラベルは、フローサイトメトリーにより確認した。

### 4) DNA cloneのFITC蛍光標識

Label IT Fluorescein labelling Kit (TaKaRa, kyoto, japan) を用いて行った。FITC-LBb-40は、精製後

3%アガロースゲル電気泳動に供し、Molecular imager FX (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) によりFITC標識を確認した。

### 5) 実験動物

Specific pathogen free (SPF) BALB/cマウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan) は5週齢の雄を購入し、MRブリーダー (日本農産工業) および水を自由摂取させ、実験には6-10週齢のマウスを用いた。LWD種ブタ (Landrace (L), Large yorkshire (W) のF1にDuroc (D) を交配させた3元交雑種) の初生仔ブタ (Day0) は (株) ヒルズ (宮城県) より購入した。

### 6) FITC標識オリゴヌクレオチドの合成

FITCまたはBiotin標識CpG ODN 1826, OLLB7, AT5ACL (42) (5' TATAATTTTTTACCAACTAGC 3' : 当研究室で*L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup>において同定した幼若化活性を有するDNAモチーフ) の合成はSawady Technology Co. Ltd. (Tokyo) に依頼した。FITC標識オリゴヌクレオチドは付属のデータシートに従い、ミリQ水に1 mg/mlの濃度で溶解した。

### 7) マウス脾臓およびパイエル板細胞における活性オリゴヌクレオチドの結合特性

1.5mlマイクロチューブにマウス細胞懸濁液 ( $5 \times 10^6$  cells/500  $\mu$ l) を分注した。100mg/ $\mu$ lになるようにそれぞれFITC標識CpG ODN 1826, OLLB7, AT5ACLおよびH<sub>2</sub>Oを加え、37°C、4時間回転させながらインキュベートした。細胞は洗浄後、各種抗体処理し、オリゴヌクレオチドの結合および取り込みをフローサイトメトリーにより解析した。

### 8) ブタ腸管組織培養におけるFITC標識高分子の取り込みの解析

初生仔ブタの腸管を摘出し、管腔内を良く洗浄後、腸管を6 cm程度に切り、一端を滅菌した鳳糸で結んだ。FITC-LG, FITC-LB, FITC-LBb-40およびRPMI-1640を管腔内に入れ残りの一端を結んだ。予め37°Cに加温しておいたRPMI-1640中でサンプルを入れた腸管断片を37°C、0.5-6時間培養した。培養終了後、内側をPBSで良く洗浄し、腸管組織をPLP溶液で固定した。組織はTissue-Tek O.C.T.Compound (SAKURA Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に凍結包埋した。クリオスタットにより作成した厚さ5  $\mu$ mの凍結切片をPoly-L-Lysine処理したスライドガラスにのせ、サポニン処理後、anti-human cytokeratin-18 antibody (SIGMA) を4°C、14時間反応させた。次いでAlexa conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を室温で1時間反応させた。Propidium iodide (PI, 500ng/ml-PBS) で10分間核染色後、Perma Fluor<sup>TM</sup> (Shadon/Lipshaw Co., Pittsburgh, PA, USA) で封入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1024正立タイプ; BioRad Laboratories, CA, USA) を用いて行った。

## 3. 活性DNAおよびDNAモチーフによる腸管系サイトカインネットワークの制御

活性DNA, DNAモチーフおよび菌体が腸管において誘導するサイトカインをパイエル板細胞培養および腸管組織培養を行い、RT-PCR法により解析し、腸管における感染防御系サイトカインネットワークの制御を考察した。

### 1) DNA

実験には*L. bulgaricus* NIAI B6 chromosomal DNA (LB-DNA) およびOLLB7を用いた。対照として

CpG1826を用いた。

## 2) パイエル板細胞におけるサイトカイン誘導

マウスのパイエル板細胞懸濁液を24穴マイクロプレートに  $4 \times 10^5$  cells/well になるように分注した。サンプルとしてLB-DNAまたはOLLB7をそれぞれ  $10 \mu\text{g/ml}$  または  $100 \mu\text{g/ml}$  になるよう添加し、全量  $500 \mu\text{l}$  の系で、5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 12時間培養した。ネガティブコントロールにはミリQ水、ポジティブコントロールにはCpG ODN1826 ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) をそれぞれ添加し、培地にはRPMI1640 (10%FCS含) を用いた。

## 3) 培養細胞からのTotal RNAの調製

浮遊細胞は1.5mlマイクロチューブに回収し、付着細胞はプレートの各ウェルにTRIzol reagent (GIBCO BRL, Grand island, NY, USA) を注ぎ回収した。同溶液を浮遊細胞のペレットに加え、完全に細胞を溶解させた。室温で5分間放置した後、クロロホルムを加え激しく攪拌し、遠心分離 ( $15,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15分間) 後、水層を新しいマイクロチューブに回収した。使用したTRIzol Reagentの半分量のイソプロピルアルコールを加えよく攪拌し、室温で10分間放置後、遠心分離 ( $15,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15分間) し、上清を除去した。冷75%エタノール (RNase free) 洗浄後風乾 (室温, 10分間) し、最終的に  $6 \mu\text{l}$  のDEPC- $\text{H}_2\text{O}$  に溶解しRNAサンプルとした。

## 4) RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 法によるサイトカイン誘導の解析

RT-PCRはReady-TO-GO (RT-PCR Beads, AMERSHM PHARMACIA BIOTECH) を用いて行った。すなわちマウスパイエル板細胞より調製したTotal RNAをテンプレートとし、Oligo dT primer (pd (T)

Table2 List of cytokine primers

m $\beta$ -actin	forward: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3' reverse: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'
mIL-7	forward: 5'-GTCACATCATCTGAGTGCCACA-3' reverse: 5'-GTAGTCTCTTTAGGAAACATGCATC-3'
mIL-10	forward: 5'-GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAAG-3' reverse: 5'-CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT-3'
mIL-12p40	forward: 5'-CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG-3' reverse: 5'-CTTCATCTGCAAGTTCTTGGGC-3'
mIL-18	forward: 5'-ATGGTACAACCGCAGTAATACGG-3' reverse: 5'-AGTGAACATTACAGATTTATCCC-3'
mIFN- $\gamma$	forward: 5'-TACTGCCACGGCACAGTCATTGAA-3' reverse: 5'-GCAGCGACTCCTTTTCCGCTTCCT-3'
mTNF- $\alpha$	forward: 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3' reverse: 5'-TACAGGCTTGCTACTCGAATT-3'

12-18) および  $\beta$ -actin, mL-7, mL-10, mL-12p40, mL-18, mIFN- $\gamma$ , mTNF- $\alpha$  primerを用いて RT-PCRを行った。用いたサイトカインプライマーの配列はTable. 2 に示した。PCR反応液は3%アガロースゲル電気泳動に供し、Scion image ver.1.62cにより各レーンのバンドのデンシトグラムを得た。得られた数値を  $\beta$ -actinを用いて補正した後、Stimulation index (S. I.) を算出した。

$$S. I. = (\text{test cytokine/test } \beta\text{-actin}) / (\text{control cytokine/control } \beta\text{-actin})$$

### 【3】研究成果

#### 1. 腸管免疫に重要なパイエル板細胞に対する免疫賦活化能を有する乳酸菌由来DNA

本研究では乳酸菌由来DNAについて、腸管免疫に重要なパイエル板細胞に対する免疫賦活化能を比較検討した。

##### 1) 乳業用乳酸菌DNAのパイエル板細胞に対する幼若化活性

幼若化活性試験に供試した各種乳酸菌由来DNAは電気泳動によりRNAの混入がないことを確認し、またその純度はO.D.260/O.D.280=1.6-1.8の間であった。パイエル板細胞に対する幼若化活性試験を行ったところ、供試した乳酸菌19菌株の内6菌株、*L. bulgaricus* NCFB 1979, NIAI yB62, NIAI B6, NCFB 2074, *S. thermophilus* OLS 3073, *L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup>のDNAにおいて有意な幼若化活性が認められた (S.I.=1.7-2.2)。

##### 2) 乳業用乳酸菌DNAのパイエル板細胞におけるCD69発現の増強

CD69はリンパ球の初期活性化マーカーとして報告された細胞表面抗原である。そこで、CD69発現の誘導を指標として、乳業用乳酸菌由来DNAによるマウスパイエル板細胞における活性化細胞を解析した。

幼若化活性が認められた6菌株、*L. bulgaricus* NCFB 1979, NCFB 2074, NIAI yB62, NIAI B6, *S. thermophilus* OLS 3073, *L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup>のDNAについてパイエル板細胞におけるCD69の誘導能を解析したところ、CD4/8およびTCR  $\alpha/\beta$  陰性 (R2) の細胞集団において全ての菌株のDNAが強いCD69の発現誘導を示した。また、CD4/8陽性およびTCR  $\alpha/\beta$  陰性 (R3) の細胞集団においても、全ての菌株のDNAによりCD69の発現誘導がされた。*L. bulgaricus* NIAI B6, NIAI yB62, NCFB 1979, *L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup>, *S. thermophilus* OLS 3073はCD4/8強陽性およびTCR  $\alpha/\beta$  陽性 (R4) の細胞集団に対してCD69の発現を誘導した。CD4/8弱陽性およびTCR  $\alpha/\beta$  陽性 (R5) の細胞集団では*L. bulgaricus* NIAI yB62, NCFB 1979のDNAにおいてCD69の発現誘導が認められた。OLLB7およびCpG ODN 1826は全ての細胞集団に対してCD69の発現を誘導したが、特にCD4/8およびTCR  $\alpha/\beta$  陰性 (R2), CD4/8陽性およびTCR  $\alpha/\beta$  陰性 (R3) の細胞集団に対して強くCD69の発現を誘導した。各細胞集団におけるCD69の誘導活性をTable. 3 にまとめた。



Table3 Induction of CD69 molecule on peyer's patch cells stimulated with immunoactive DNA

Immunoactive DNA	Gated cell populations shown in Fig.			
	R2	R3	R4	R5
<i>L.bulgaricus</i> NIAI B6 DNA	+	+	+	-
NIAI yB62 DNA	+	+	+	+
NCFB 1979 DNA	+	+	+	+
NCFB 2074 DNA	+	+	-	-
<i>L. gasseri</i> JCM 1131 <sup>T</sup> DNA	+	+	+	-
<i>S.thermophilus</i> OLS 3060 DNA	+	+	+	-
OLLB7	+	+	+	+
CpG ODN 1826	+	+	+	+
ConA	+	+	+	+

+ : induction  
- : no induction

## 2. 腸管細胞による菌体およびDNAの通過と免疫細胞結合性

経口投与により腸管に到達した乳酸菌およびそのDNAがパイエル板において免疫担当細胞と接触し、免疫賦活化作用を発揮できる事を腸管組織培養により証明した。

### 1) マウス脾臓の各種細胞集団におけるオリゴヌクレオチドの結合性

3種類のオリゴヌクレオチド (CpG ODN 1826, OLLB7, AT5ACL) の、マウス脾臓各種細胞集団 (Mac-1, CD45R, Thy1.2による解析) に対する結合性を解析した。全てのオリゴヌクレオチドがMac-1強陽性 (R4) および陰性 (R2) の細胞集団に対して強く結合した。特に、AT5ACLはMac-1陰性の細胞集団 (R2) において特に強く結合している (MFI $>10^2$ ) 細胞集団が認められた (Fig. 1)。CD45Rによる解析ではOLLB7, CpG ODN1826が弱陽性および強陽性細胞集団 (R3) において強く結合し、AT5ACLは陰性および弱陽性細胞集団 (R2, R3) に対して結合性を示した (Fig. 2)。Thy1.2による解析では全ての細胞集団に結合性が認められ、中でも陽性細胞集団 (R3) に対してやや高い結合性が認められた。その結合性はAT5ACLで強い傾向であった (Fig. 3)。

### 2) マウス脾臓細胞またはパイエル板細胞におけるOLLB7の結合特性

FITC標識OLLB7を脾臓細胞またはパイエル板細胞に対して37°C、4時間反応させ、CD11cおよびNK1.1により細胞集団を解析したところ、CD11c陽性細胞およびNK1.1陽性細胞において強い蛍光強度を有する細胞 (MFI $>10^2$ ) が認められた。パイエル板細胞に対してFITC標識OLLB7を37°C、4時間反応させ、CD45R, CD11c, NK1.1, CD4,およびCD8により細胞集団を解析したところ、CD45R弱陽性、CD11c陽性、NK1.1陽性細胞集団において強い結合性が認められた (Fig. 4)。

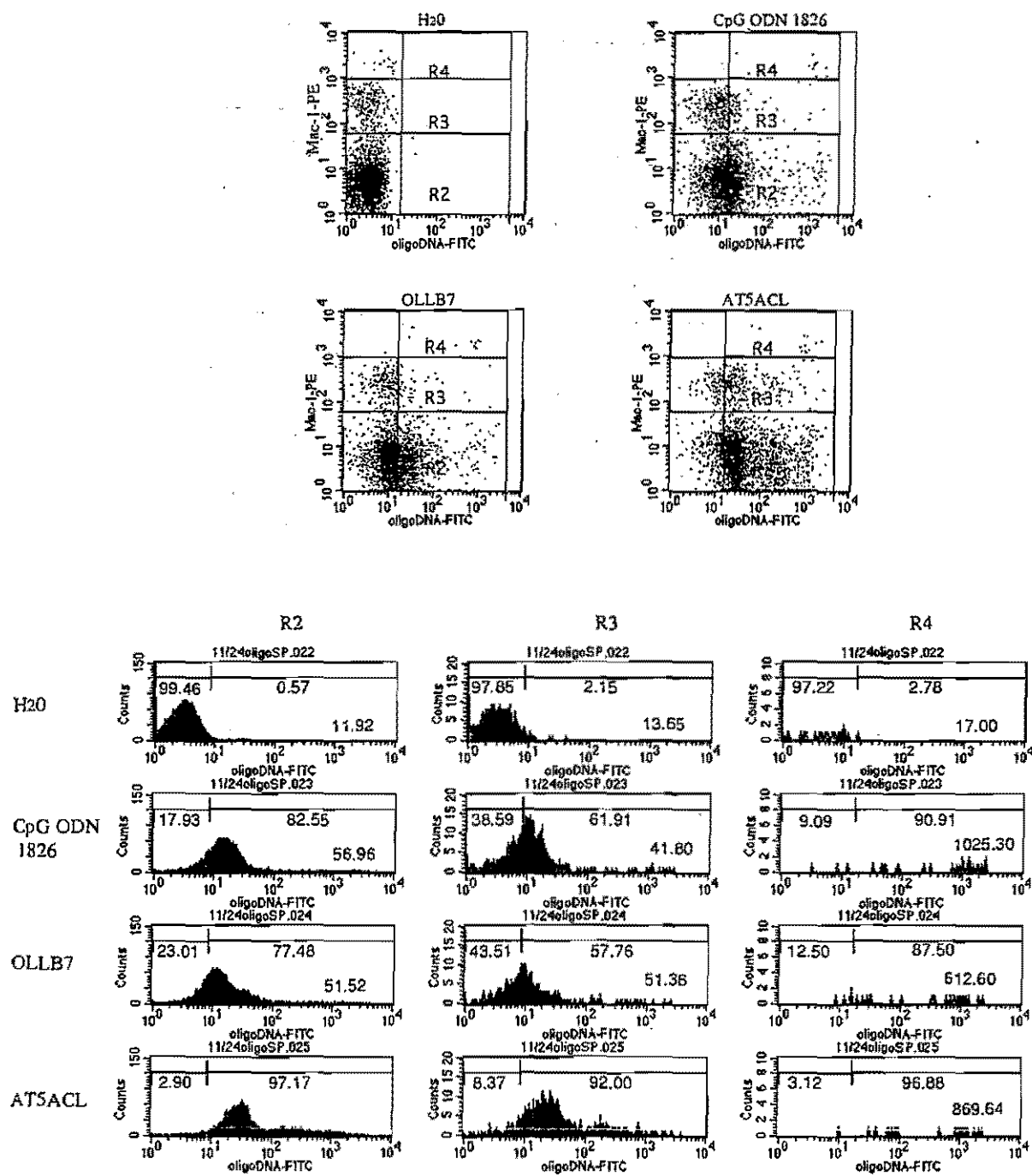


Fig1 Binding of FITC labeled oligo-nucleotide to murine splenocytes.

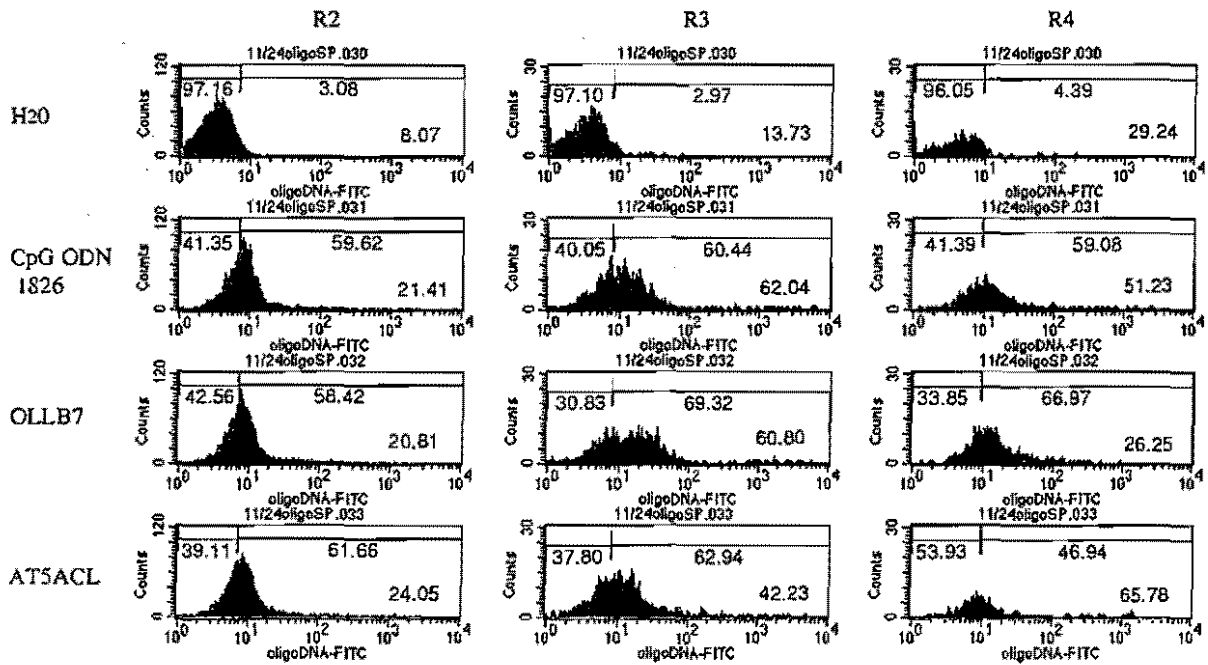
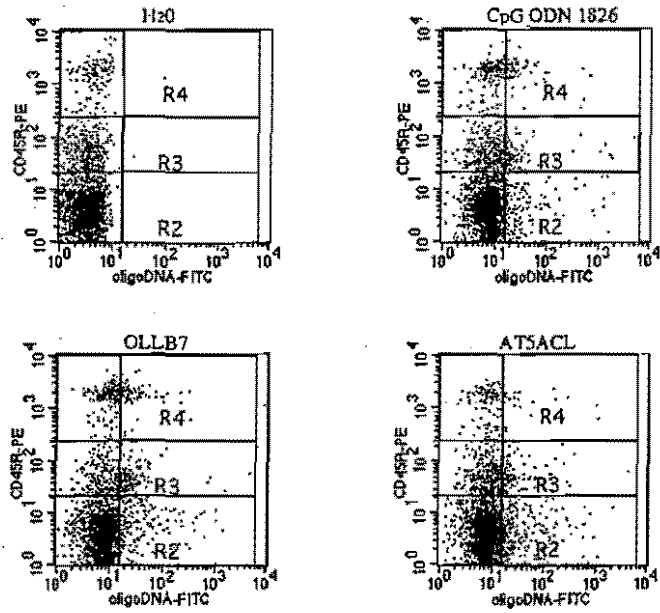


Fig2 Binding of FITC labeled oligo-nucleotide to murine splenocytes.

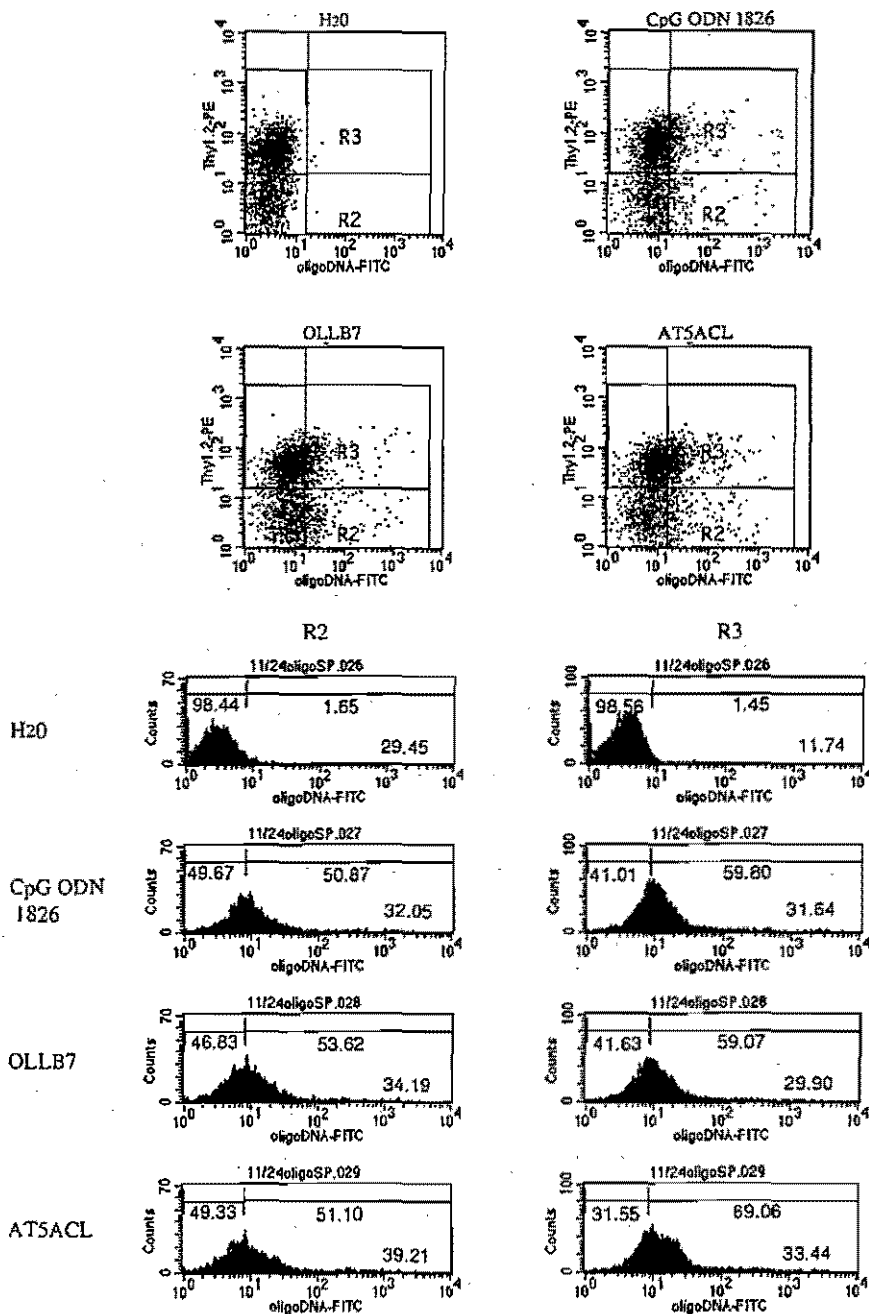


Fig3 Binding of FITC labeled oligo-nucleotide to murine splenocytes.

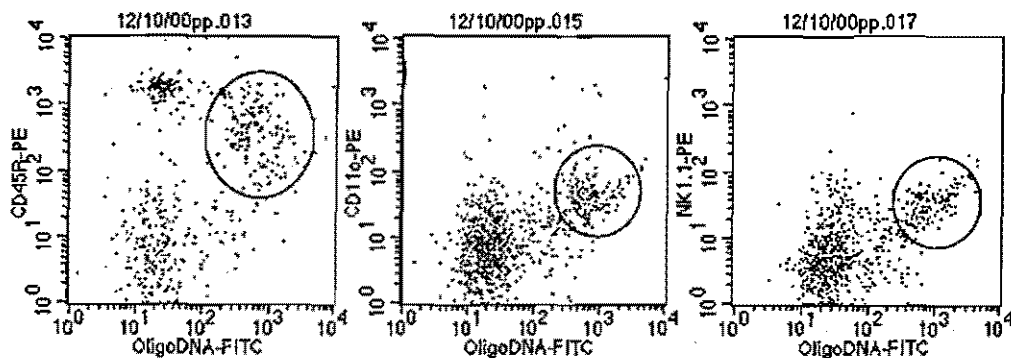


Fig4 Binding of FITC labeled OLLB 7 to murine peyer's patch cells

### 3) レーザー顕微鏡によるOLLB7のパイエル板細胞に対する結合性の解析

37°C, 4時間反応させたFITC標識OLLB7のパイエル板細胞に対する結合性をレーザー顕微鏡により解析した。FITC標識OLLB7はパイエル板細胞に対し明瞭に結合することが明らかとなり, またその結合性は細胞によって異なることが明らかとなった。

### 4) ブタ腸管組織培養におけるFITC標識高分子の取り込みの解析

FITC-LG, FITC-LB, 20倍希釈FITC-LBb-40, ラテックスビーズのブタ腸管組織培養(6時間)における通過を解析した。LG, LB, LBb-40いずれも腸管上皮を通過し, 粘膜下組織まで到達していた。ラテックスビーズは腸管上皮絨毛において局所的に取り込む細胞が存在したものの, その数はLG, LB, LBb-40と比較し, 非常に少なかった。LGは上皮への付着および上皮を通過し組織へ浸潤する数がLBと比較し明らかに多かった。LGはサイトケラチン18陽性の細胞から組織に取り込まれ, 近傍に位置する樹状細胞もしくはマクロファージに取り込まれ, 消化されることが明らかとなった。LG, LB, LBb-40の組織への浸潤は絨毛および陰窩両方において検出できたが, 特に陰窩の下方における粘膜下組織で多く検出された。これらの結果から初生仔ブタ腸管において菌体およびDNAといった高分子が組織に取り込まれることが明らかとなり, またその程度は分子によって異なることが明らかとなった。

## 3. 活性DNAおよびDNAモチーフによる腸管系サイトカインネットワークの制御

活性DNA, DNAモチーフおよび菌体が腸管において誘導するサイトカインについてパイエル板細胞培養を行い, RT-PCR法により解析した。

### 1) パイエル板細胞におけるサイトカイン誘導

パイエル板細胞を*L. bulgaricus* NIAI B6由来DNA (LBDNA) およびOLLB7により12時間刺激した。RT-PCRにより腸管系サイトカインの発現を解析したところ, LBDNA刺激によりIFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-18の発現が誘導され(それぞれS.I.=2.0, 2.0, 2.2, 1.3); OLLB7刺激によりIFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-18の発現が誘導された(それぞれS.I.=1.4, 2.2, 2.5, 1.3)。ポジティブコントロールとしたCpG ODN 1826はIFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12, IL-18を誘導した(それぞれS.I.=1.9, 2.0, 1.6, 3.0, 1.5)。

### 2) CD45Rにより分画したパイエル板細胞集団におけるサイトカイン遺伝子発現の誘導

OLLB7で12時間刺激したパイエル板細胞集団を抗CD45R抗体を用いた磁気分離法により分画した。CD45R陽性細胞集団は磁気分離法により54.6%から99.5%まで純化でき, 一方ネガティブセレクションとなったCD45R陰性細胞集団は45.4%から98.2%となった。全細胞画分, CD45R陽性画分およびCD45R陰性画分におけるサイトカイン遺伝子の発現を解析したところ, CD45R陽性画分においてIL-10, IL-12p40, IFN- $\gamma$ の発現が強く誘導された(S.I.=2.4, 2.6, 7.0)。またCD45R陰性画分においてはIL-12p40, IFN- $\gamma$ の発現が強く誘導された(S.I.=3.2, 15)。CD11c陽性細胞集団はその数が少なく, 得られたRNAの量が少なかったため, IL-12, IFN- $\gamma$ に関してのみ解析することとした。CD11c陽性細胞集団およびCD11c陰性細胞集団はいずれもOLLB7によりIL-12およびIFN-gの発現が誘導されていたが, CD11c陰性細胞集団におけるIL-12, IFN- $\gamma$ の発現誘導はそれぞれS. I.=1.9, 2.3と, 陽性細胞集団(S.

I=1.7, 1.5) より強いものであった。

#### 【4】今後の展望

乳酸菌は一般にTh 1系の免疫応答を誘導することが知られており、その活性因子が細胞壁成分である事が報告されていたが、本研究により、乳酸菌DNAモチーフがCpGモチーフと似た活性を有し、特に本研究で初めて腸管においてTh 1および2系の免疫応答を誘導する事が明らかとなった。このことは細胞壁成分と相乗的に作用することにより乳酸菌の免疫賦活作用に寄与する可能性を示唆するものである。Th 1および2系免疫応答を制御する活性DNAを有する乳酸菌を発酵乳に使用し、経口的摂取により細胞性および液性免疫が賦活化し、サルモネラや病原性大腸菌といった病原性細菌やウイルスに対して感染防御作用が発揮される食品の開発が大いに期待される。一方、乳酸菌に組み替えタンパク質を発現させることにより、経口的に摂取したタンパク質の生理活性を腸管で効果的に発揮させようという試みがなされている。Steidlerらは大腸炎の治療効果を有するIL-10を発現させた*Lactococcus lactis*を、大腸炎発症モデルマウスに経口投与することにより、炎症反応が抑えられ有意に症状が改善される事を報告した(56)。また五十君は病原性細菌の抗原を乳酸菌に発現させた経口ワクチンの可能性を示唆している(57)。本研究により、樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞を活性化させる乳酸菌由来DNAは、これら細胞の抗原提示能を亢進することにより抗体産生を増強することが考えられ、またB細胞を直接活性化する作用も有することから、B細胞の抗体産生能を増強することにより乳酸菌の経口ワクチンとしての効果を増強する有効なアジュバントとしての活性を示すものと考えられる。ごく最近になって、CpGDNAの受容体としてToll-like receptor 9 (TLR9)が発見され(58)、自然免疫から獲得免疫系の制御に関する新しい考え方が提唱され(59)、DNA ワクチンへの応用も期待されている(60)。本研究で得られた知見は、免疫賦活化作用を有するDNAを持つ乳酸菌を用い、感染防御作用を有する機能性食品、あるいは経口ワクチン・アジュバントとして感染症の予防効果を発揮する生体防御食品の開発の基礎を築くものであり、今後、さらに乳酸菌DNAモチーフの腸管におけるTLR9を介するアジュバント活性等を詳細に検討することにより21世紀の未来食品として、“生体防御食品 (Bio-Defence Foods)” が誕生するものと期待される。

## 【参考文献】

- 1) URL:<http://www.mhlw.go.jp/topics/0102/tp0221-2.html>
- 2) Sakamoto, I. et al., *J. Antimicrobial Chemother.*, 47, 709-710 (2001).
- 3) 湧口浩也ら, 発酵乳類の機能, 中沢勇二・細野明義編, 食品資材研究会, 東京, p.165, (1988).
- 4) 小谷新太郎ら, 日本公衆衛生誌, 8, 871 (1961).
- 5) 岡本健治ら, 診療と新薬, 18, 1563 (1981).
- 6) Oksanen, P. J. et al., *Ann. Med.*, 22: 53 (1990).
- 7) 鈴木建夫ら, 日本農芸化学会誌, 57: 1327 (1983).
- 8) 伊藤 整ら, 医学と生物学, 115: 375 (1987).
- 9) Yamamoto, N. et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 776 (1994).
- 10) Hosono, A. et al., *Probiotics 2* (ed. R. Fuller) , pp. 89-132  
Chapman & Hall Ltd, London (1997).
- 11) Nadathur, S. R. et al., *Mutation Res.* 334: 213-224 (1995).
- 12) PoolXobel, B. L. et al., *Nutr. Cancer* 26: 365-80 (1996).
- 13) Perdigon, G. et al., *J. Dairy Res.*, 58, 485-96 (1991).
- 14) Nanno M. et al., *J. Leukocyte Biol.*, 46, 89-95 (1989).
- 15) Matsuzaki, T. et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 20,18 (1985).
- 16) 田部井敏夫ら, *Biotherapy* 4, 21 (1990).
- 17) 松崎 健ら, 医学のあゆみ, 150, 745 (1989).
- 18) Kato, I. et al, *Cancer Immunol. Immunother.*, 26: 215 (1988).
- 19) Kato, I. et al, *Microbiol. Immunol.*, 28, 209 (1984).
- 20) Suzuki, F. et al., *Nippon Saikingaku Zasshi*, 43, 821-827 (1988).
- 21) Pereyra, B. X. et al., *Eur. Cytokine Netw.*, 2, 299-303 (1991).
- 22) Kitazawa, H. et al., *Microbiol. Immunol.*, 36, 311-5 (1992).
- 23) Matsumura, K. et al., *Anim. Sci. J.*, 63, 1157-1159 (1992).
- 24) Maassen, C. B. et al., *Vaccine*, 18, 2613-23 (2000).
- 25) Meydani, S. N. et al., *Am J Clin Nutr.*, 71, 861-72 (2000).
- 26) Shida, K. et al., *Int Arch. Allergy immunol.*, 115, 278-87 (1998).
- 27) Steidler, L. et al., *Science*, 289, 1352-55 (2000).
- 28) Hashimoto, S. et al., *Infection & Immunity*, 44, 61-7 (1984).
- 29) Kato, I. et al., *J. Immunopharmacol.*, 7, 103-9 (1985).
- 30) Perdigon, G. et al., *J. Dairy Sci.*, 70, 919-26 (1987).
- 31) Perdigon, G. et al., *J. Dairy Res.*, 58, 485-96 (1991).

- 32) Perdigon, G et al., *Int. J. Immunother.*, 9, 29 (1993).
- 33) 松島綱治編 分子予防医学, pp.275-84, 医学書院, (1999).
- 34) 森地敏樹, 日本乳酸菌学会誌, 9, 69-81 (1999).
- 35) Kitazawa, H. et al., *Microbiol. Immunol.*, 36, 311-5 (1992).
- 36) Simelyte, E. et al., *Infect. Immun.*, 68, 3535-40 (2000).
- 37) Kitazawa, H. et al., *J. Dairy Sci.*, 75, 2946-2951 (1992).
- 38) Kitazawa, H. et al., *J. Dairy Sci.*, 76, 1514-1519 (1993).
- 39) Kitazawa, H. et al., *Int. J. Food Microbiol.*, 31, 99-106 (1996).
- 40) Kitazawa, H. et al., *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 169-75 (1998).
- 41) Kitazawa, H. et al., *Food Microbiol.*, 17, 109-118 (2000).
- 42) Kitazawa, H. et al., *Int. J. Food Microbiol.*, 65, 149-162 (2001).
- 43) Kitazawa, H. et al., submitted.
- 44) Krieg, A. M. et al., *Nature*, 374, 546-9 (1995).
- 45) Liang, H. et al., *J. Clin. Invest.*, 98, 1119-29 (1996).
- 46) Jakob, T. et al., *J. Immunol.*, 161, 3042-3049 (1998).
- 47) Martin-Orozco, E. et al., *Int. immunology*, 11, 1111-8 (1999).
- 48) Askew, D. et al., *J. Immunol.*, 165, 6889-95 (2000).
- 49) Jakob, T. et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 118, 457-61 (1999).
- 50) Walker, P. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6970-5 (1999).
- 51) Krieg, A. M. et al., *J. Immunol.*, 161, 2428-34 (1998).
- 52) Klinman, D. M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2879-83 (1996).
- 53) Chace, J. H. et al., *Clin. Immunol. Immunopath.*, 84, 185-93 (1997).
- 54) Elkins, K. L. et al., *J. Immunol.*, 160, 3627-30 (1998).
- 55) Sparwasser, T. et al., *J. Immunol.*, 27, 1671-9 (1997).
- 56) Steidler, L. et al., *Science*, 289, 1352-55 (2000).
- 57) 五十君静信, 日本乳酸菌学会誌, 8, 101-5 (1998).
- 58) Hemmi, H. et al., *Nature*, 408, 740-745 (2000).
- 59) Takeuchi, O. et al., *Int. Immunopharmacol.*, 1, 625-635 (2001).
- 60) Modlin, RL., *Nature*, 408, 659-660 (2000).