

令和元年5月12日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00928

研究課題名(和文) 乳酸菌が貪食細胞のアレルゲン除去に及ぼす影響評価方法

研究課題名(英文) Methods for evaluation of effects of lactobacilli on the allergen-removal by phagocytes

研究代表者

坂崎 文俊 (Sakazaki, Fumitoshi)

大阪大谷大学・薬学部・教授

研究者番号：90309378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌の摂取によりアレルギーが抑制される仕組みを研究するため、白血球の一種であるマクロファージがアレルゲンを取り込んで分解するはたらきが乳酸菌によって増強されるという仮説を立て、検証を行った。培養マクロファージに殺菌した乳酸菌を添加して培養すると、マクロファージによる異物の取り込みが促進されることが、顕微鏡下で観察できた。マクロファージが異物を取り込んだあとにTリンパ球に情報と伝えるIL-12b遺伝子の発現量が乳酸菌によって増加していることが測定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌はアレルギーを抑制する知見がある一方で、風邪ひきを軽減するとの知見もあり、その作用機構が十分に明らかでない。多くの研究者が乳酸菌による抑制性リンパ球の活性化を研究しているのに対し、本研究は、アレルギー抑制作用と感染症抑制のための免疫増強作用との両方に矛盾しない作用機構の可能性を提示した。今後さらに研究が発展することで、乳酸菌によるアレルギー抑制や感染症抑制が、医療用途として行われるように認められることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate how lactobacillus suppress allergies, I hypothesized that lactobacillus affects macrophages, a type of white blood cells, and that lactobacillus enhances macrophages to intake and to degrade allergens. I have found that Lactobacillus enhances the intake of foreign materials by cultured macrophages under microscopic examination. Lactobacillus also enhances the gene expression of IL-12b which are secreted by macrophage to inform the invasion of foreign materials to T lymphocytes.

研究分野：食品免疫学、免疫毒性学

キーワード：アレルギー 乳酸菌 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌によるアレルギー抑制作用の機構は不明な点が多い。疫学調査により、乳酸菌の摂取が多い人のアレルギー有病率が低いことや、乳酸菌の摂取の多い人のアレルギー症状が軽いことが示されている。動物実験では乳酸菌を投与した動物の制御性 T 細胞の機能が增強されることが明らかとなっている。しかし、一方ではヒトに乳酸菌を投与した疫学研究で、風邪の罹患期間が有意に減少することが報告されており、アレルギーに対する抑制作用と風邪に対する免疫増強作用との間に整合性のある理論が求められている。

乳酸菌は自然免疫応答を促進することが考えられる。自然免疫応答とは、細菌、真菌、ウイルスの表面が動物細胞と異なることを指標として白血球が異物を認識し、貪食や細胞膜の破壊を行う反応である。乳酸菌を含めたグラム陽性細菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸や、グラム陰性細菌の細胞壁成分であるリポ多糖が自然免疫応答を促進することが知られている。一方、アレルギーは自然免疫応答ではなく獲得免疫応答の一種であり、リンパ球が一度出会った経験のある異物を認識して攻撃する反応である。自然免疫応答から獲得免疫応答へ橋渡しされる過程は良く研究されているのに対して、自然免疫応答が獲得免疫応答を抑制するという知見はない。このことが、乳酸菌によるアレルギー抑制作用のメカニズムが解明されていない原因の 1 つである。

かつてアレルギーの原因は免疫機能のバランスの崩れであるという考えがなされ、一つの仮説「Th1/Th2 バランス仮説」を契機として、乳酸菌がアレルギーの予防及び治療に有効であることが発見された。しかし Th1、Th2 以外に Th17、Treg などの新規な T リンパ球の存在が提唱されるにつれて、「Th1/Th2 バランス仮説」は一時期ほど支持されなくなり、仮説に適合する現象は仮説に基づいて考察され、仮説に適合しない現象は仮説とは別に考察される是是非非の状態である。乳酸菌がアレルギーを抑制するメカニズムを解明するためには、Th1/Th2 バランス仮説を前提としない研究が必要である。

2. 研究の目的

アレルギーの原因は皮膚あるいは粘膜の異常がアレルゲンの侵入を許すことに起因すると考える「バリア機能仮説」に基づき、私はアレルギーのカギを握っているのは体内に侵入したアレルゲンの動態であろうと私は考えた。アレルギーの分解・除去を担っている白血球の機能を評価するため、培養条件での白血球の貪食作用に注目し、蛍光標識ビーズを用いた実験方法を行った。さらに実際のアレルギーに近づけるために、蛍光標識ビーズの代わりに卵アレルギーの主要なアレルゲンである卵白アルブミンを用い、アレルゲン除去促進に注目した実験方法の確立を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マクロファージの培養 白血球の一種であるマウスマクロファージ培養細胞株 J774.1 細胞に、細菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸あるいはリポ多糖を添加し、蛍光ビーズの取り込みを蛍光顕微鏡で観察した。リポテイコ酸は黄色ブドウ球菌由来のものを購入して用い、リポ多糖も大腸菌由来のものを購入して用いた。

(2) 乳酸菌の調整 乳酸菌は嫌気性菌であるため一般的には嫌気的な条件で培養されるが、本研究では MBS broth 培地を試験管に入れて乳酸菌を播種し、静置培養を行った。1 晩培養後、高圧蒸気滅菌で殺菌し、無菌的に遠心管に移して遠心分離で乳酸菌菌体を回収し、培養細胞用培養液で洗浄した。乳酸菌の菌数は顕微鏡下で血球計算版を用いて計数し、10 倍ずつ 5 段階に希釈して用量反応関係を検討した。

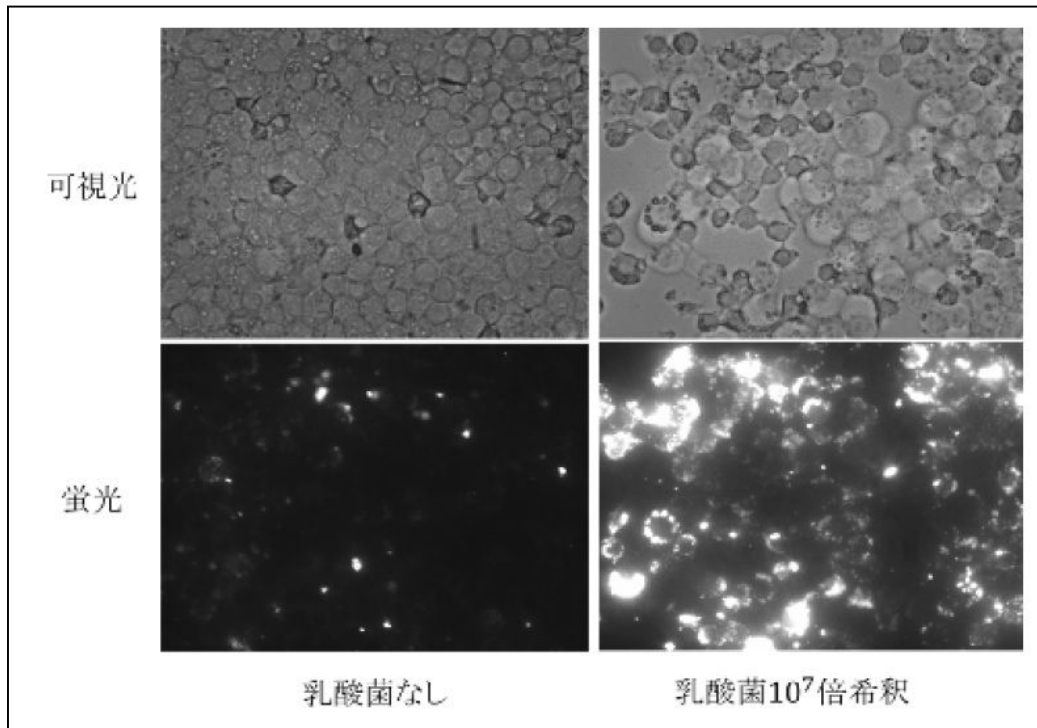
(3) マクロファージに取り込ませる蛍光物質 蛍光標識ビーズには Latex Beads-Rabbit IgG-FITC Complex を用いた。卵白アルブミンの蛍光標識には Fluorescein Labeling Kit NH2 を用い、抗卵白アルブミン抗体の蛍光標識には HiLyte Fluor 555 Labeling Kit NH2 を用いた。

4. 研究成果

(1) 乳酸菌がマクロファージの貪食機能に及ぼす影響の評価

マウスマクロファージ培養細胞株 J774.1 細胞に、リポテイコ酸あるいはリポ多糖を添加し、蛍光ビーズの取り込みを蛍光顕微鏡で観察した結果、リポテイコ酸あるいはリポ多糖を添加した細胞では、無添加細胞と比較して蛍光ビーズの取り込みが増加していた。フローサイトメトリーで細胞 1 つ 1 つの蛍光の強さを測定すると、リポテイコ酸あるいはリポ多糖の有無で蛍光の差はわずかであった。蛍光顕微鏡で観察すると、リポテイコ酸あるいはリポ多糖を添加しない細胞では蛍光ビーズが細胞表面に付着しており、リポテイコ酸あるいはリポ多糖を添加した細胞では、蛍光ビーズが細胞内に取り込まれているようすが観察された。リポテイコ酸あるいはリポ多糖の濃度を 5 段階に設定して実験したところ、添加した物質の用量依存的に蛍光ビーズの取り込みが増加した。

上記の実験で用いたのは黄色ブドウ球菌由来のリポテイコ酸であるので、次に乳酸菌由来のリポテイコ酸がマクロファージの蛍光ビーズ取り込みに及ぼす作用を検討する必要がある。乳酸菌からリポテイコ酸を抽出し抽出物を確認する技術を有していないため、乳酸菌からリポテイコ酸を抽出せずに、乳酸菌そのものを培養して殺菌し、希釈して用いた。その結果、乳酸菌懸濁液を 10^7 倍にまで希釈しても、蛍光ビーズ取り込み促進効果が認められた。

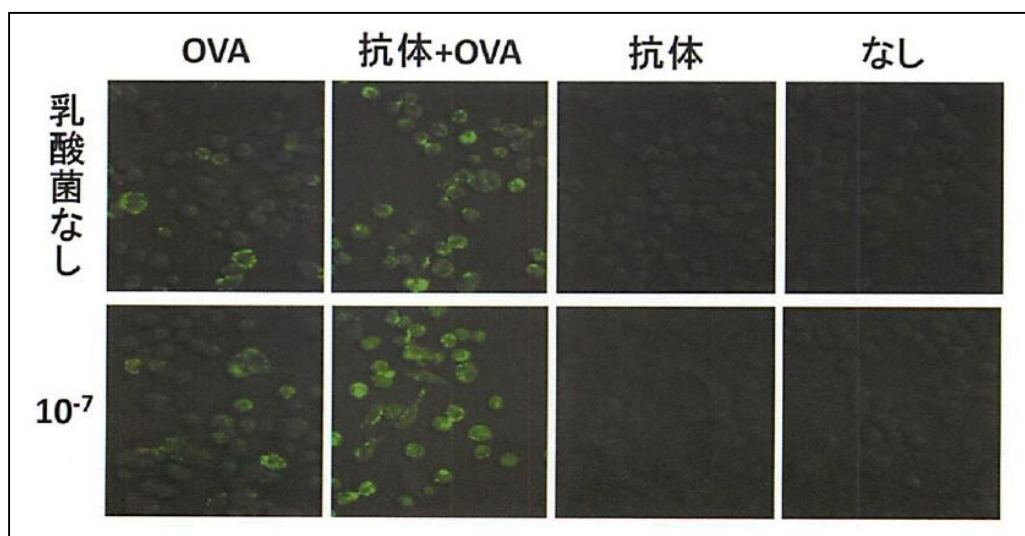


(2) 卵白アルブミンをマクロファージが貪食する作用の評価

蛍光標識ビーズで行った実験を発展させて実際のアレルギーの状況に近づけるため、卵アレルギーの主要な抗原であるオブアルブミンに対する貪食効果を検討した。タンパク質を蛍光標識する試薬を用いてオブアルブミンを蛍光標識し、マクロファージ細胞に添加した。滅菌した乳酸菌を添加して、蛍光標識オブアルブミンが細胞内に取り込まれる様子を蛍光顕微鏡で観察した。

まず、乳酸菌のみをマクロファージに添加した場合、蛍光標識卵白アルブミンは細胞内に取り込まれなかった。この実験系に卵白アルブミンに対する抗体を同時に添加して実験すると、蛍光標識卵白アルブミンはマクロファージ細胞内に取り込まれ、乳酸菌を添加するとさらに取り込み量が増加した。このことから、乳酸菌を添加してもマクロファージのあらゆる貪食作用が増強されるのではなく、Bリンパ球の分泌する抗体が結合（オプソニン化）したアレルギーに対する貪食が、乳酸菌添加によって増強されることが示唆された。乳酸菌は自然免疫のみを増強してアレルギーを抑制するのではなく、獲得免疫の介在を通じて自然免疫を増強し、アレルギーの除去を行っていると考えられる。

実験に最適な培養時間を検討し、蛍光標識オブアルブミン、抗体、および乳酸菌を細胞に添加してから3時間の時点で観察することが最も適切であることが示唆された。ただし、この方法は蛍光顕微鏡の操作中に試料が乾燥してしまう問題があった。鮮明な画像を得るために蛍光顕微鏡の中でも性能のよい共焦点レーザー顕微鏡で観察しようとしたが、測定条件を試行錯誤しているうちに試料が乾燥して作業の続行が難しくなった。またカバーガラスの押さえ方によって細胞が動いてしまったりして、定量的な画像解析を行うには正確性に欠けた。



(3) 貪食作用に伴って発現量が増大する遺伝子の評価

これまで蛍光顕微鏡を用いた観察を行ってきたが、作業中に細胞が乾燥してしまう問題があったため、蛍光顕微鏡による観察と異なる方法として、マクロファージ細胞の活動の指標となる遺伝子の発現を、mRNA 量を指標として測定した。

マクロファージは、取り込んだ異物を消化するために細胞内のペルオキシソームやリソソームを用いる。今回はペルオキシソームの指標となる PXMP2 遺伝子の mRNA 量を測定した。しかし、マクロファージにリポテイコ酸やリポ多糖を添加しても、乳酸菌を添加しても、ペルオキシソーム増殖剤であるトログリタゾンやベザフィブラートを添加しても、PXMP2 遺伝子の mRNA 量の増加は認められなかった。このことから、ペルオキシソームを指標として乳酸菌の効果を測定することは困難であると考えられた。マクロファージが取り込んだ異物を分解する様子を評価するためには、リソソームに着目する方が良いかもしれないと予想されるため、今後の研究が必要である。

一方、マクロファージが異物を取り込んだ後にその情報を T リンパ球に伝える IL-12b 遺伝子および CCL12 遺伝子の mRNA 発現量は、リポテイコ酸、リポ多糖および乳酸菌の添加によって有意に増加した。市販の発酵乳食品から培養した乳酸菌でも、IL-12b 遺伝子および CCL-12 遺伝子の mRNA の増加が認められた。CCL12 遺伝子は乳酸菌の添加が多すぎるとときに返って減少するのに対し、IL-12b 遺伝子は乳酸菌の用量が多いときでも増加した。この 2 つの遺伝子に対する乳酸菌の作用の違いが、マクロファージを通じてリンパ球へのはたらき掛け方を変えることにより、アレルギーの抑制に繋がっている仮説が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: なし

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。