

令和元年6月12日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08361

研究課題名(和文)腸管免疫を介する細胞性免疫賦活能の解析-汎用的経口アジュバント開発を目指して-

研究課題名(英文)Activation of cell-mediated immunity by healthy foods and supplements is examined to develop versatile adjuvant through intestinal immunity.

研究代表者

黒川 昌彦 (Kurokawa, Masahiko)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：80186527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：種々のウイルス感染症に対して有効な汎用的経口アジュバントの開発を目指して、健康食品やサプリメントの経口投与物質による腸管免疫を介した細胞性免疫賦活作用を解析した。その結果、1)プロポリスAF-08と乳酸菌(06CC2株)投与HSV-1経皮感染マウスで、腸内のLactobacillus群が細胞性免疫賦活化している可能性、2)AF-08がサイトカイン産生調節作用により関節炎を軽症化した可能性、3)モリンガ葉水抽出エキスの主要成分である-アミノ酪酸が細胞性免疫賦活すること、4)モリンガ葉水抽出エキスがアレルギー反応でTh1免疫優位にTh1/Th2バランスを改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色・独創的な点は、ウイルスとは異なる抗原を認識する腸管免疫系を介して、種々のウイルス感染に対する細胞性免疫を賦活化できる汎用性のある経口アジュバントの開発に繋げることである。この考えは、従来の体液性免疫賦活作用の強いワクチンの概念とは異なり、腸管免疫系が微生物に特有かつ共有の構造を認識し、細胞性免疫反応を強く誘導することができることに由来している。この系が立証できれば、ウイルス感染症の予防・治療に偉大な貢献が可能である。

研究成果の概要(英文)：Activation of cell-mediated immunity by healthy foods and supplements was examined to develop versatile adjuvant through intestinal immunity for virus infections. We found that 1)oral administration of Brazilian propolis (AF-08) and Lactobacillus plantarum strain 06CC2 was effective to increase the rate of Lactobacillus in intestine and activated cell-mediated immunity in mice, 2)AF-08 was effective against collagen-induced arthritis in mice and confirmed to possess cytokine-modulatory activity in vivo, 3)oral administration of -aminobutyric acid as a major compound involved in aqueous extract of Moringa oleifera Lam. leaves (AqMo1) augmented the a delayed-type hypersensitivity reaction as a major host defense in cutaneously HSV-1-infected mice, and 4) AqMo1 was suggested to alleviate allergic symptoms through suppression of mast cell activation and/or improving the Th1/Th2 balance to Th1 dominance in allergic mice.

研究分野：ウイルス学、免疫学、生化学

キーワード：腸管免疫 細胞性免疫 サプリメント 健康食品

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染予防の観点から、ウイルス感染症に対するワクチン開発は非常に重要であるが、多くのウイルス感染症に対する有効なワクチンがあるわけではない。また、本来、どのウイルスも宿主細胞内で増殖するため、細胞性免疫賦活は感染細胞の排除に非常に有効である。しかし、BCGのように明らかに細胞性免疫賦活能を有する既存ワクチンは少ない。一方、腸管では、多くの常在細菌に対しては免疫寛容の状態であるが、病原性微生物による組織侵襲に対してはエフェクターT細胞の防御応答が誘導される。このような一連の微生物に特有かつ共有の構造を認識して、獲得免疫応答を惹起するパターン認識受容体を発現している樹状細胞が腸管に存在することが知られている。このため、腸管免疫を介して細胞性免疫を誘導・賦活することができれば、ウイルス感染症の予防・治療に有効である。

21世紀は感染症の世紀であり、新型インフルエンザウイルスの大流行などウイルス感染症に対する予防や治療に関心が高まっている。これまで、ブラジル産プロポリス AF-08 の経口投与により単純ヘルペスウイルス感染マウス症状が軽症化したマウスでは、このマウスの主な宿主免疫である遅延型過敏反応に由来する細胞性免疫が増強されることを明らかにした。また、マウスのインフルエンザウイルス経鼻感染モデルを用いて、経口投与された乳酸菌 06CC2 株が腸管免疫を介して感染症状を緩和することを明らかにした。そこで、本研究では、種々のウイルス感染症に対して有効な汎用的経口アジュバントの開発を目指して、健康食品やサプリメントから腸管免疫を介した細胞性免疫賦活化に有効な経口抗原を検討するとともに、腸管免疫を介した選択的な細胞性免疫賦活化機序を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

これまで、我々はプロバイオテイクスとしての乳酸菌 (06CC2 株) の経口投与によりインフルエンザ症状が軽症化したマウスでは、パイエル板細胞で選択的に Th1 系サイトカイン遺伝子発現が亢進し、インフルエンザウイルスが増殖する肺局所で NK 細胞活性が増強されることを明らかにした。この結果から、06CC2 株が抗原として認識される腸管免疫系を介して、肺でのウイルス感染細胞の排除が促進されたと考えられた。さらに、単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 経皮感染マウスモデルを用いて、06CC2 株経口投与によりパイエル板細胞における Th1 サイトカイン誘導が亢進され、腸管免疫を介した Th1 免疫誘導により HSV-1 感染皮膚病態が軽症化することを明らかにした。同様に、遅延型過敏反応 (細胞性免疫) がウイルスに対する有効な宿主免疫防御反応である HSV-1 経皮感染マウスへのモリンガ (*Moringa oleifera* Lam.) 葉水抽出エキスの経口投与によっても、腸管免疫を介した Th1 免疫誘導が起こることを明らかにした。したがって、異なる乳酸菌 06CC2 株、プロポリス AF-08、モリンガ葉水抽出エキスの経口投与により、HSV-1 経皮感染マウスで細胞性免疫が賦活化されることが明らかとなった。そこで、経口投与物質による細胞性免疫賦活作用を解析する一環として、(1)腸管免疫に重要な役割を果たす腸内細菌叢に及ぼすプロポリス AF-08 と乳酸菌 (06CC2 株) の影響、また、(2)プロポリス AF-08 の経口投与によるサイトカイン調節作用にもとづく関節炎の軽症化を検討した。さらに、(3)モリンガ葉水抽出エキスの主要成分である γ -アミノ酪酸の細胞性免疫賦活作用を、単純ヘルペスウイルス 1 型感染マウスを用いて検討した。(4) マウスの 3 種の 1 型アレルギー実験系を用いて、Th1 免疫活性を賦活化できるモリンガ葉水抽出エキスがアレルギー反応における Th1/Th2 バランスを変えてアレルギー症状を緩和するか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1)腸内細菌叢に及ぼすプロポリス AF-08 と乳酸菌 (06CC2 株) の影響

HSV-1 を経皮感染したマウスに、AF-08 (10mg/kg、1 日/3 回)、また、熱処理した 06CC2 株 (1g/kg、1 日/2 回) を感染前 2 日間、感染日とその後 4 日間経口投与し (各群 5 匹) RT-PCR 法を用いて感染 4 日目の糞便中の細菌量や分布 (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum* 群) とパイエル板中のサイトカイン関連遺伝子 (IFN- γ , IL-12, IL-12 レセプター 2, IL-10, IL-4) の発現量を比較、検討した。また、非感染マウスの AF-08 と 06CC2 株投与だけによる影響も検討した。

(2)プロポリス AF-08 の 1 型コラーゲン誘発関節炎マウスモデルにおける関節炎発症に及ぼす影響

DBA/1JMsSlc マウス (7 週齢, 雌) にウシの 1 型コラーゲン (2 mg/ml, 0.1M 酢酸) と Freund's complete adjuvant を 1 対 1 で混合したエマルジョンを尾根部に皮内接種して免疫した。3 週間後に同様に追加免疫して関節炎を発症させた。蒸留水あるいは蒸留水に懸濁した AF-08 (30, 100 mg/kg) を免疫開始時から 1 日 1 回経口投与した。免疫開始時から 2-3 日おきに体重を計測し、追加免疫後毎日四肢の病変スコアを観察した (0, 正常; 1, 1 あるいは 2 足指の腫脹もしくは足首の軽度な腫脹; 2, 足首の腫脹を伴った 1 あるいは 2 足指の腫脹; 3, 足全体の顕著な腫脹)。免疫開始後 28, 32 日目に採取した血清中サイトカイン濃度を測定した。また、足の関節部の病理標本を作製して HA 染色した。

(3)モリンガ葉水抽出エキスの主要成分である γ -アミノ酪酸 (GABA) の細胞性免疫賦活作用
宮崎県産モリンガ葉水エキスの成分を HPLC、アミノ酸分析装置などで解析した。Vero 細胞を用いたプラーク減少法と MTT 法で GABA の抗 HSV-1 活性と細胞毒性効果を検討した。HSV-1 7401H 株を皮内感染したマウスに、DABA (0, 10, 100 mg/kg) を経口投与 (1 日/3 回/6 日間) し、皮膚病変の進展度、延命効果を検討した。一方、感染 4 日目に、GABA 投与マウスの footpad に UV 不活化 HSV-1 抗原を接種し、経時的に足の腫脹を計測して遅延型過敏反応を検討した。DABA 投与あるいは非投与感染 4 日目のマウスから調製した脾細胞を用いて HSV-1 抗原刺激による IFN- γ 産生を検討した。脾細胞中の T 細胞サブタイプをフローサイトメーターで解析した。

(4) モリンガ葉水抽出エキスがアレルギー反応における Th1/Th2 バランスに与える影響
マウス (6 週令、BALB/c、雌) への compound 48/80 刺激モデルでは、48/80 刺激の 2 日前から 1 日 3 回の宮崎県産モリンガ葉水抽出エキス (300 mg/kg) の経口投与を行い、刺激後に引っ掻き回数を測定した。マウス (5 週令、BALB/c、雌) の passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応モデルでは、抗 dinitrophenyl (DNP) IgE 抗体接種の 2 日前から上記と同様に AqMOL を経口投与し、その抗体接種後 1 日目にエバンスブルーと albumin-DNP を尾静脈投与した後、切除した耳の色素量を測定した。また、ovalbumin(OVA)感作モデルでは、モリンガ葉水抽出エキスを 45 日間自由飲水させている OVA 感作マウスに OVA を経鼻摂取した後、経日的に鼻の引っ掻き回数や採取した血清中ヒスタミンレベル、OVA-特異的 IgE レベル、全 IgE レベルを ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌叢に及ぼすプロポリス AF-08 と乳酸菌 (06CC2 株) の影響

AF-08 投与 HSV 感染群では、糞便中の全細菌量が有意に増加したが、検討した細菌群中、Lactobacillus 群量だけが有意に増加した。06CC2 株投与 HSV 感染群では、Clostridium leptum 群の増加だけが認められなかったが、糞便中全細菌量は増加した。この時、AF-08 および 06CC2 株投与 HSV 感染群では、ともにパイエル板中の IFN- γ と IL-12 レセプター 2 発現が有意に上昇した。非感染マウスでは、AF-08 と 06CC2 株の経口投与により糞便中の全細菌量は有意に増加したが、各細菌群に顕著な変化は認められなかった。したがって、腸内の Lactobacillus 群が細胞性免疫賦活化と関連している可能性が示唆された。

(2) プロポリス AF-08 の 型コラーゲン誘発関節炎マウスモデルにおける関節炎発症に及ぼす影響

AF-08 の 100mg/kg 投与群では、蒸留水投与群と比較して顕著な体重変化は認められず、有意な四肢の腫脹の減少が認められた。関節炎の発症初期 (28, 32 日目) の血清中 IL-6 濃度が AF-08 (100mg/kg) 投与により有意に抑制された。また、28 日目では TNF- α の濃度も減少した。さらに、関節滑膜の炎症も蒸留水投与群と比較して抑制されていた。したがって、AF-08 の サイトカイン産生調節作用により関節炎が軽症化した可能性が示唆された。

(3)モリンガ葉水抽出エキスの主要成分である γ -アミノ酪酸 (GABA) の細胞性免疫賦活作用

モリンガ葉水エキスの成分解析より、タンパク質量が多く、他のアミノ酸に比べて γ -アミノ酪酸含有量 (877.3 mg/100 g MO 葉水エキス) が高いことがわかった。In vitro での GABA の抗 HSV-1 活性は認められなかった。GABA (100 mg/kg) 経口投与は、皮膚病変の進展を有意に遅延した。GABA (100 mg/kg) 投与により、HSV-1 経皮感染の主要な生体防御免疫と考えられる遅延型過敏反応が増強された。GABA (100 mg/kg) 投与群の感染マウス脾細胞では、HSV-1 抗原刺激による IFN- γ 産生が有意に増加した。GABA (100 mg/kg) 投与群感染マウス脾細胞の CD8 や CD4T 細胞の割合が非投与群より増加した。以上の結果、GABA は、主に細胞性免疫が関与する遅延型過敏反応を亢進してヘルペス病変に対して有効性を発揮したと考えられた。

(4) Compound 48/80 刺激モデルでは、モリンガ葉水抽出エキスの経口投与によりマウスの引っ掻き回数が有意に抑制された。PCA 反応モデルでは、抗 DNP 抗体接種後、マウスの耳におけるエバンスブルーの染色度がモリンガ葉水抽出エキスの経口投与により統計的に有意ではなかったが減少した。OVA 感作モデルでは、モリンガ葉水抽出エキス飲水群では引っ掻き回数や血清中 OVA-特異的 IgE レベルが有意に減少した。しかし、血清中ヒスタミン濃度や全 IgE レベルに顕著な変化が認められなかった。以上の結果、モリンガ葉水抽出エキスはマスト細胞の活性化を抑制し、あるいは、アレルギーマウスで Th1 免疫優位に Th1/Th2 バランスを改善することによりアレルギー症状を緩和したと考えられた。

< 引用文献 >

Cell, 124, 783-801, 2006.

Evid. Based. Complement. Alternat. Med., Volume 2011, Article ID 976196.

Int. Immunopharmacol., 11, 1976-1983, 2011.

Int. Immunopharmacol., 39, 320-327, 2016.
Phytotherapy Res. 30, 797-804, 2016.
European J. Med. Plants, 16(3), 1-10, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Kurokawa, M., Wadhvani, A., Kai, H., Hidaka, M., Yoshida, H., Sugita, C., Watanabe, W., Matsuno, K., Hagiwara, A. Activation of cellular immunity in herpes simplex virus type 1-infected mice by the oral administration of aqueous extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Phytotherapy Res.*, 査読有, 30, 2016, 797-804.
Matsusaki, T., Takeda, S., Takeshita, M., Arima, Y., Tsend-Ayush, C., Oyunsuren, T., Sugita, C., Yoshida, H., Watanabe, W., Kurokawa, M. Augmentation of T helper type 1 immune response through intestinal immunity in murine cutaneous herpes simplex virus type 1 infection by probiotic *Lactobacillus plantarum* strain 06CC2. *Int. Immunopharmacol.*, 査読有, 39, 320-327, 2016.
Hagiwara, A., Hidaka, M., Takeda, S., Yoshida, H., Kai, H., Sugita, C., Watanabe, W., Kurokawa, M. Anti-Allergic Action of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in Mice. *European J. Med. Plants*, 査読有, 16(3), 1-10, 2016.

〔学会発表〕(計43件)

末繁嘉朗 他、単純ヘルペスウイルス1型経皮感染マウスにおける -アミノ酪酸の細胞性免疫賦活作用について、第65回日本ウイルス学会学術集会、2017.10、大阪。
長谷川裕美 他、 -アミノ酪酸による単純ヘルペスウイルス1型感染マウスにおける細胞性免疫賦活作用について、第27回抗ウイルス療法学会学術集会総会、2017.5、熊本。
黒川昌彦 他、ブラジル産プロポリス AF-08 の II 型コラーゲン誘発関節炎マウスモデルにおける関節炎発症に及ぼす影響、日本薬学会第137年会、2017.3、仙台。
梅本啓史 他、モリンガ葉水エキスの抗アレルギー作用について、第33回日本薬学会九州支部大会、2016.12、鹿児島。
松崎竜也 他、単純ヘルペスウイルス1型感染マウスにおけるプロバイオティクス(モンゴル乳製品由来乳酸菌)の細胞性免疫賦活作用について、第64回日本ウイルス学会学術集会、2016.10、札幌。
松崎竜也 他、単純ヘルペスウイルス1型感染マウスへのプロバイオティクス(モンゴル乳製品由来乳酸菌)の影響、第26回抗ウイルス療法学会、2016.5、名古屋。

〔図書〕(計7件)

黒川昌彦(共著):薬学領域の病原微生物学・感染症学・化学療法学 第4版, 廣川書店, p195, p204-220, p349-352, p354-358, p383-385. 2018.3.31.
Yi Sun, Ken Yasukawa, Masahiko Kurokawa et al., Bioactive Natural Products and synthesis of diarylheptanoids from *Alpinia officinarum*. Elsevier, Amsterdam, In: Studies of Natural Product Chemistry, Volume 49, Bioactive Natural Products, Atta-ur-Rahman (ed), Volume 49, chapter(s) 4, 157-187. 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 上気道保護剤及び上気道保護用飲食品組成物
発明者: 新光一郎、若林裕之、黒川昌彦
権利者: 新光一郎、若林裕之
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/070985
出願年: 2016
国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等
<http://biochem-kuhw.org/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 渡辺 渡

ローマ字氏名：(WATANABE, wataru)

所属研究機関名：九州保健福祉大学

部局名：保健科学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50399218

研究分担者氏名：吉田 裕樹

ローマ字氏名：(YOSHIDA, hiroki)

所属研究機関名：九州保健福祉大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 90469411

研究分担者氏名：杉田 千泰

ローマ字氏名：(SUGITA, chihiro)

所属研究機関名：九州保健福祉大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 70632694

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。