

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460183

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

研究課題名(英文) Analysis of activation of cellular immunity through intestinal immunity to develop versatile oral adjuvants for treatment of viral infection.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 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、細胞性免疫を賦活化できる経口抗原を検討し、その免疫賦活化作用を明らかにすることを目的とした。本研究では、主な宿主免疫防御機構が遅延型過敏反応である単純ヘルペスウイルス(HSV)経皮感染マウス用いて、乳酸菌06CC2株やモリンガ葉水エキス(AqMOL)が、これまで報告したプロポリスAF-08と同様に、腸管免疫を介したTh1免疫誘導によりHSV感染マウスの感染病態を軽症化することを明らかにした。したがって、これら3種のサプリメントが、腸管免疫を介して細胞性免疫を賦活化できる汎用的経口アジュバントとして利用できる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)： Our aim in this project is to search oral antigens that are able to activate cellular immunity through intestinal immunity and clarify the mode of the activation. It is known that a major immune defense system in intradermally herpes simplex virus-infected mice is a delayed type hypersensitivity reaction through Th1 immunity. Using this model, we demonstrated that Lactobacillus plantarum strain 06CC2 and aqueous extract of Moringa oleifera Lam. leaves (AqMOL) as well as propolis AF-08 that we found previously were significantly effective in alleviating herpetic symptoms by the activation of Th1 immunity through intestinal immunity. Thus, the three daily supplements, 06CC2, AqMOL, and AF-08 were suggested to be useful as a versatile oral adjuvant for treatment of viral infection.

研究分野：ウイルス学、免疫学、生化学

キーワード：細胞性免疫 腸管免疫 経口アジュバント プロポリス モリンガ葉 乳酸菌

## 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ウイルスワクチンはほとんどない。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ァクター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。

したがって、腸管免疫を介して獲得免疫の中でも特に細胞性免疫を誘導・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。

## 2. 研究の目的

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。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。これまで、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。

## 3. 研究の方法

腸管免疫を介した Th1 免疫反応の種々のウイルス感染症の軽症化に対する有効性の検討

加熱処理した乳酸菌(06CC2株)をインフルエンザウイルスの感染 2 日前から経口投与し続けたマウスで、インフルエンザ症状の軽症化を確認している。そこで、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 経皮感染マウスモデルを用いて、この乳酸菌や和漢薬などの植物エキスなどの健康食品やサプリメントの HSV-1 感染症状に対する有効性と HSV-1 経皮感染系の主な宿主免疫防御反応である遅延型過敏反応に対する影響を検討した。

このため、HSV-1 のマウスへの経皮接種 2

日前からサプリメント等の経口投与(2回/日)を行う。投与後の毎日の体重変化、皮膚病変の進展度(水疱、びらん、帯状疱疹の形成、潰瘍化)、皮膚や脳でのウイルス量を非投与群と比較して、HSV-1 感染病態の軽症化に対するサプリメント等の影響を検討した。また、感染 2、4 日目に自然免疫への影響を検討するため、NK 活性を測定した。HSV-1 感染後 4 日目には、脳と皮膚におけるウイルス量も測定した。一方、主な宿主防御免疫を検討するために、マウスのフットパットに不活化した HSV-1 抗原を接種して、24、36、48 時間後のフットパットの腫れを測定することにより、サプリメント等の投与による遅延型過敏反応の賦活化の有無を検討した。さらに、感染 4 日目に脾細胞を調整して 96 ウエルプレートで培養し、不活化 HSV-1 の存在化で脾細胞からのインターフェロン(IFN)- $\gamma$  の産生能を ELISA 法で検討することにより、脾細胞レベルでの細胞性免疫が賦活されているか否かを検討した。腸管免疫の関与の可能性を明らかにするため、感染 4 日目のマウスの小腸から局所免疫組織であるパイエル板を摘出して、パイエル板細胞における免疫関連遺伝子発現を real-time RT-PCR 法を用いて検討した。以上の結果から、経口投与したサプリメント等が、HSV-1 感染症の軽症化に有効であるか否かを評価した。

## 4. 研究成果

(1) モリンガ葉の水抽出画分の経口投与による、単純ヘルペスウイルス感染マウスでの細胞性免疫賦活作用

モリンガ (*Moringa oleifera* Lam.) はワサビの木と言われ、広く熱帯地方で栽培されている。モリンガは、野菜として食されるだけでなく、スパイスや伝統医薬品としても用いられている。宮崎県でも最近モリンガが栽培されて、モリンガ葉の水抽出液 (AqMOL) がドリンクとして一般に日本茶のように販売されている。以前、モリンガのエタノール抽出液が、単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 感染マウスのヘルペス皮膚病変の進展を抑制することを明らかにしているため、今回はモリンガ葉の水抽出液についても、同様に、HSV-1 経皮感染マウスでの皮膚病変に及ぼす影響とその作用機序を新たに解析した。

その結果、AqMOL は、HSV-1 感染マウスの皮膚病変を遅延することが明らかとなった。また、AqMOL 経口投与マウスの皮膚でのウイルス量は非投与群と変わらなかったが、脳におけるウイルス量は AqMOL 投与により有意に減少していた。AqMOL には感染細胞内で直接ウイルス増殖を抑制する抗ウイルス作用はないため、脳でのウイルス量の減少は、免疫系によるウイルス拡散の抑制効果によると考えられた。そこで、HSV-1 経皮感染マウスの主要な生体防御免疫が、細胞性免疫の活性化を介した遅延型過敏 (DTH) 反応であるた

め、AqMOL 投与感染マウスにおける DTH 反応の強さを非投与感染マウスと比較した。その結果、明らかに AqMOL 投与により DTH 反応が亢進されていることが明らかとなった。また、AqMOL 投与感染マウスの脾細胞からは、細胞性免疫を賦活化するサイトカインであるインターフェロン (IFN- $\gamma$ ) の産生が有意に高くなっていた。さらに、フローサイトメータによる脾細胞膜表面の細胞マーカーを測定して、脾細胞中に細胞性免疫のエフェクター細胞と考えられるマクロファージや NK 細胞の割合が有意に増加していた。

したがって、AqMOL の経口投与は、HSV-1 感染マウスで細胞性免疫を亢進してヘルペスウイルスの体内への拡散を抑制し、皮膚病変の進展を遅延させたと考えられた。この結果より、モリンガ葉には、経口的に体内での細胞性免疫を活性化する免疫アジュバントとして利用できる可能性が考えられた。

## (2) モンゴル乳酸菌 06CC2 株の経口投与による、単純ヘルペスウイルス感染マウスでの細胞性免疫賦活作用

我々はこれまでにモンゴル伝統的乳製品よりプロバイオティクス乳酸菌を分離し、それらの中より体内で細胞性免疫賦活作用を有する 06CC2 株を見出した。そこで、細胞性免疫を高める汎用的経口アジュバントの開発を目指して、Th1 免疫反応を介した遅延型過敏反応が主な宿主免疫である HSV-1 経皮感染モデルを用いて、06CC2 株の HSV-1 感染免疫に対する影響を検討した。その結果、06CC2 株投与群において感染後 2 日から 4 日にかけて皮膚病変の進展が有意に抑制され、感染 4 日目の脳内ウイルス量が有意に減少した。06CC2 株の投与により感染マウス足の腫脹が対照群と比較して有意に増強した。また、感染 2 日目の 06CC2 株投与群において、脾臓細胞における NK 活性が有意に増強し、感染 4 日目の脾細胞からの IFN- $\gamma$  産生も有意に増強された。さらに、06CC2 株投与によりパイエル板細胞の Th1 免疫反応関連遺伝子である IFN- $\gamma$  や IL-12 receptor 2 遺伝子発現が有意に上昇した。したがって、投与した 06CC2 株が腸管経由の免疫調整作用によって NK 細胞活性や細胞性免疫を亢進し、感染による皮膚病変の進展抑制や脳内ウイルス量の減少に繋がったと考えられ、06CC2 株が細胞性免疫賦活経口アジュバントとして利用できる可能性が示唆された。

## (3) 今回の研究結果のまとめと展望

我々はプロバイオティ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、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(投稿中)。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ブラジル産プロポリス (AF-08) やモリンガ (*Moringa oleifera* Lam.) 葉水抽出エキス(投稿中)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。また、モリンガ葉水抽出エキス中の含有量が高い  $\gamma$ -アミノ酪酸の経口投与により、HSV-1 経皮感染マウスの皮膚感染病態が軽症化して、脾細胞やパイエル板細胞からのインターフェロン (IFN- $\gamma$ ) 誘導が亢進されることを明らかにしている(投稿準備中)。このため、種々のウイルス感染細胞の排除に有効な細胞性免疫を賦活化できる腸管免疫系で認識される共通抗原を明らかにして、その作用機序を解析することは、ウイルス感染症の予防・治療に大きく貢献できると考えられる。

## <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.  
Phytotherapy Res., 30, 2016, 797-804.  
Antiviral Res., 60, 175-180, 2003.  
Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 1372-78, 2013.  
J. Funct. Foods 9, 60-69, 2014.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計 10 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.  
Takeda, S., Hidaka, M., Yoshida, H., Takeshita, M., Kikuchi, Y.,

Tsend-Ayush, C., Bumbein, D., Kawahara, S., Muguruma, M., Watanabe, W., Kurokawa, M.: Anti-allergic activity of probiotics from Mongolian dairy products on type I allergy in mice and mode of anti-allergic action. J. Funct. Foods, 査読有, 9, 2014, 60-69.  
Kai, H., Obuchi, M., Yoshida, H., Watanabe, W., Tsutsumi, S., Park, K. Y., Matsuno, K., Yasukawa, K., and Kurokawa, M.: *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). J. Funct. Foods, 査読有, 8, 2014, 214-223.

〔学会発表〕(計56件)

黒川昌彦 他、モンゴル乳製品由来乳酸菌の経口投与による単純ヘルペスウイルス1型感染マウスへの影響、日本薬学会第136年会、2016.3.26-29、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)。  
黒川昌彦 他、単純ヘルペスウイルス感染マウスで細胞性免疫系を賦活化するサプリメントの腸内細菌叢に及ぼす影響、日本薬学会第135年会、2015.3.25-28、神戸学院大学(兵庫県神戸市)。  
黒川昌彦 他、単純ヘルペスウイルス1型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63回日本ウイルス学会学術集会、2015.11.22-24、福岡国際会議場(福岡県福岡市)。  
黒川昌彦 他、単純ヘルペスウイルス1型感染に対するモリンガ葉水抽出画分の感染防御免疫賦活作用、日本薬学会第134年会、2014.3.27-30、熊本大学薬学部(熊本県熊本市)。  
黒川昌彦 他、ブラジル産プロポリスの生物活性について(Biological activity of Brazilian propolis)、第5回食品薬学シンポジウム、2013.11.1-2、京都大学薬学部記念講堂(京都府京都市)。

〔図書〕(計5件)

Yi Sun, Ken Yasukawa, Masahiko Kurokawa et al., Bioactive compounds and synthesis of diarylheptanoids from *Alpinia officinarum*. Elsevier, Amsterdam, In: Studies of Natural Product Chemistry, Volume 49, Bioactive Natural Products, Atta-ur-Rahman (ed), in press, 2016.  
黒川昌彦 他、コンパス 分子生物学 創薬・テーラーメイド医療に向けてー, “第8章 遺伝子工学”, 編集 荒牧弘範、大戸茂弘, 南江堂, p139-164, 2014, 10. 10.

〔産業財産権〕

出願状況(計2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: 特願 2016-34419 号  
出願年月日: 2016.2.25  
国内外の別: 特願 2015-163972 号の国内優先出願

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://biochem-kuhw.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 昌彦 (KUROKAWA masahiko)  
九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・教授  
研究者番号: 80186527

(2) 研究分担者

渡辺 渡 (WATANABE wataru)  
九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・教授  
研究者番号: 50399218

吉田 裕樹 (YOSHIDA hiroki)  
九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・講師  
研究者番号: 90469411