

平成 22 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580307

研究課題名（和文） 乳汁免疫グロブリン G の能動免疫調節機能の解明と利用技術の開発

研究課題名（英文） Elucidation of active immunomodulatory function of milk IgG and development of its utility

研究代表者

大谷 元（OTANI HAJIME）

信州大学・農学研究科・教授

研究者番号：30109201

研究成果の概要（和文）：牛乳から分離したIgGのパパイン消化物から精製したFc，および大腸菌とそれと結合できる牛乳IgGの混合物をマウスに35日間経口投与すると、前者の場合は抗体産生を抑制しないが、後者の場合は抗体産生に関係する多くの因子に対して抗体産生を抑制方向に導くこと、並びにパイエル板細胞の遺伝子のDNAマイクロアレイによる網羅的解析により、牛乳IgGと大腸菌の混合物の投与は抗原提示細胞やB細胞の分化の抑制、ヘルパーT細胞のTh1やTh3への分化の促進、Fc レセプターの発現抑制などを生じることを示唆した。これらの結果は、牛乳IgGとそれが認識する抗原の同時摂取はI型アレルギーを軽減する可能性を示している。一方、パン酵母に対するヤギ乳IgG分画を2頭のシバヤギを用いて3.6g調製した。そのパン酵母に対するヤギ乳IgG分画と免疫に用いたパン酵母の混合物をI型アレルギー自然発症モデルマウスであるNC/Ngaマウスの飼料に添加して与え、ダニ抗原でアレルギーを誘導し、アレルギー症状やアレルギー関連パラメーターの分析を行った。その結果、パン酵母とそのIgGの混合物を含まない飼料（コントロール飼料）群と比べて添加飼料群のダニ抗原で誘導される耳介部分の腫れは弱く、脱毛や出血等のアレルギー症状も弱いことが確認された。また、それら投与群はコントロール群と比べて脾臓のTh1型細胞数や腸管の免疫グロブリンレベルが低いことが確認された。以上の結果は、パン酵母とそのヤギ乳IgGの混合物の経口摂取は遺伝的なI型アレルギー症状を軽減することを示している。また、コントロール飼料群とパン酵母とそのヤギ乳IgG混合物添加飼料群のパイエル板や脾臓の免疫細胞の特性付けを行ったところ、前者の飼料群と比べて、後者の飼料群のTh2細胞数が有意に減少していることが確認され、パン酵母とそのヤギ乳IgGの先天的（遺伝的）I型アレルギー軽減作用はTh1/Th2細胞バランスの改善によることが示唆された。他方、パン酵母に対するヤギ乳IgGと免疫に用いたパン酵母を添加した飼料で、卵白アルブミンでI型アレルギーを誘導したBALB/c系マウスを飼育すると、無添加飼料での飼育の場合よりもくしゃみの回数は明らかに減少し、脾臓のTh2細胞数、抗原提示細胞数、IgE産生細胞数および肥満細胞数はコントロール群に比べて有意に少なく、逆にIL-10⁺CD4⁺ (Tr1)細胞数は有意に多いことが示された。これらの結果は、パン酵母とそのヤギ乳IgG混合物は後天的に誘導したI型アレルギーマウスにおいてTh1/Th2バランスの改善だけではなく、IgE産生能の低下、制御性T細胞の誘導、肥満細胞数の減少などを介して軽減することを示唆している。

研究成果の概要（英文）： Five-week-old mice were given a diet consisting of ovalbumin alone (OVA, control diet) or a mixture of OVA, *Escherichia coli*, and its specific bovine milk IgG (IgG/*E.coli*-added diet) as a protein source for 5 weeks, and mRNAs extracted from Peyer's patch cells of the mice were analyzed by means of DNA microarray. The gene expression of

proteins relating to immunoglobulin production and development of immune diseases was reduced in mice given the IgG/*E.coli*-added diet compared with those given the control diet. In contrast, the gene expression of marker proteins on Th1, Th3, and negatively regulatory T cells was noticeably increased. On the other hand, Peyer's patch cells from mice that had not been given any *E. coli* or milk IgG were cultured with milk IgG, *E. coli*, or a mixture of *E. coli* and its specific milk IgG, and were subjected to a cell function analyzer. The numbers of CD19⁺ cells and interleukin-4⁺CD4⁺ cells increased significantly when the cells were cultured with either milk IgG or *E. coli*, while the mixture of *E. coli* and its specific milk IgG hardly influenced the numbers of these cells. These results indicate that the result obtained by DNA microarray analysis is not due to free milk IgG or *E. coli* alone, but is attributable to a mixture of *E. coli* and its specific IgG, suggesting that a mixture of *E. coli* and its specific IgG in intestinal tracts would reduce the development of allergic symptoms and autoimmune diseases.

On the other hand, we investigated the effects of *Saccharomyces cerevisiae* and its specific IgG-rich fraction (anti-yeast IgG) prepared from goat's milk on the mouse immune system. Real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis of mRNA extracted from C3H/HeN mouse Peyer's patch cells revealed that the expression of *Rnf128* on regulatory T cells was higher in the cells cultured with anti-yeast IgG alone or with a mixture of *S. cerevisiae* and anti-yeast IgG than in the cells cultured with *S. cerevisiae* alone. In contrast, the expression of *Stat6* related to polarize type 2 helper T (Th2) cells was lower in the cells cultured with the mixture than *S. cerevisiae* alone, although that was higher than IgG alone. Hence, 5-week-old C3H/HeN mice were orally administered with either saline solution (control) group or a mixture of *S. cerevisiae* and anti-yeast IgG in saline (test) group once a day for 5 weeks. We found total serum IgG levels to be significantly lower in mice administered the test solution than those that were given the control solution. Microarray analysis of mRNA extracted from the mouse Peyer's patch cells revealed that the expression profile of genes related to proliferation and differentiation of B cells, T cell activation and differentiation of Th2 cells was lower in the test mice than in the control group. In contrast, the genes related to regulatory T cells were more highly expressed in mice administered with the test solution. Moreover, oral administration of the test solution was found to reduce allergic symptoms in NC/Nga mice induced with a mite antigen. The number of spleen interleukin-4⁺CD4⁺ cells was reduced in test mice when compared to the control group. These findings indicate that oral administration of the mixture of *S. cerevisiae* and its specific goat milk IgG-rich fraction may suppress the development of type I allergic symptoms in mice.

Moreover, we investigated effects of *S. cerevisiae* and a mixture of the yeast and its

specific goat milk IgG-rich fraction (anti-yeast IgG) prepared from goat's milk on the immune system of the OVA-induced type I allergic model mice. The sneezing behaviors of the mice given *S. cerevisiae* and anti-yeast IgG-added diet noticeably tend to reduce compared with the control group. The number of interleukin (IL)-4⁺CD4⁺ cells decreased in mice given *S. cerevisiae*-added diet or the mixture of *S. cerevisiae* and anti-yeast IgG-added diet when compared to the control diet group. The number of interferon- γ (IFN- γ)⁺CD4⁺ decreased in mice given the mixture of *S. cerevisiae* and anti-yeast IgG-added diet when compared to the control diet group while rose in *S. cerevisiae*-added. In addition, the mice given the mixture of *S. cerevisiae* and anti-yeast IgG-added diet significantly showed lower numbers of IgE⁺B220⁺ and Fc ϵ RI α ⁺CD117⁺cells when compared to mice given the control diet. However *S. cerevisiae*-added diet caused no significant decrease of the number of IgE⁺B220⁺ and Fc ϵ RI α ⁺CD117⁺cells compared with the control group. These results indicate that the mixture of *S. cerevisiae* and anti-yeast IgG lead to the reduction of OVA-induced type I allergic symptoms via not only modulation of Th1/Th2 balance, but also decrease of IgE-producing and Fc ϵ RI-positive mast cell numbers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，畜産学・草地学

キーワード：乳汁 IgG，抗原・IgG 複合物，マウス経口投与，遺伝子の網羅的解析，獲得液性免疫抑制，抗アレルギー作用，花粉症軽減

1. 研究開始当初の背景

Fab領域で抗原と特異的に結合し，Fc領域のエフェクター機能により補体や食細胞を活性化させ抗原を効率的に無毒化することが教科書に書かれている免疫グロブリンG (IgG) の生物学的機能である。ところが，ヒトの腸内細菌を免疫したウシの乳汁から調製したIgGを経口摂取したヒトにおいて，自己免疫疾患が軽減したという臨床的報告が複数なされている。このような軽減効果は，IgGに由来から知られている抗原結合機能と

エフェクター機能では説明できないところである。また，ウシ血清ではIgGのサブクラスであるIgG1とIgG2がほぼ同量含まれているのに対して，自己の免疫系が十分に発達していない仔ウシの飲む乳汁にはIgG1がおよそ9割をも占めている。これらのことから申請者は，乳汁，特に牛乳IgGには従来から知られている抗原結合機能とエフェクター機能以外に能動免疫調節機能が存在するという仮説を立て，2004年・2005年度萌芽研究の補助により実験を行った。

その結果、細胞培養系での実験により、牛乳 IgG が遊離の状態であるか、牛乳 IgG が抗原と複合物を形成している状態であるか、牛乳 IgG が消化された状態であるかにより能動免疫系に対する作用が異なることを明らかにした。すなわち、牛乳 IgG が遊離の状態では獲得液性免疫を促進し、抗原との複合物は獲得液性免疫を抑制し、IgG の消化物は自然細胞性免疫を促進することを見出した。

2. 研究の目的

上述の研究背景に基づき、次の4点が本申請研究の目的である。

(1) マウスへの経口投与と試験により、遊離の牛乳 IgG と抗原と結合している牛乳 IgG は宿主の獲得液性免疫系に対する作用が異なることの証明

(2) ヤギに食経験のあるパン酵母を免疫し、パン酵母に特異的なヤギ乳 IgG の調製

(3) パン酵母とそれに特異的なヤギ乳 IgG を先天的(遺伝的) I 型アレルギー発症マウスと後天的 I 型アレルギー発症マウスに経口的に投与し、アレルギー症状が軽減されることの確認

(4) パン酵母とそのヤギ乳 IgG の I 型アレルギー軽減メカニズムの探索

3. 研究の方法

(1) 遊離型 IgG と IgG・抗原複合物のマウスへの経口投与試験 (2007年度)

ウシ初乳から IgG を精製し、研究室の大腸菌保存菌株から、精製した牛乳 IgG と最も反応性が高い菌株を選択し、培養菌体を調製した。

精製した IgG と大腸菌の複合物の調製と、精製した IgG をパイン処理し、そこから Fc 領域を精製した。なお、Fc 領域は遊離の IgG の作用を見るためのものである。すなわち、牛乳 IgG をそのままの状態のマウスに経口投与すると腸管で抗原抗体複合物が出来て意図する結果が得られない可能性がある。申請者は、遊離に IgG の能動免疫調節作用は Fc 領域に由来することを既に実験的に証明していることから、遊離の牛乳 IgG の代わりに IgG の Fc 領域を用いた。

牛乳 IgG も牛乳 IgG・大腸菌複合物も含まない飼料、大腸菌と牛乳 IgG 複合物を含む飼料、並びに Fc 領域を含む飼料を調製し、それらの飼料で健常マウスを5週間飼育し、腸管および血清の免疫グロブリンレベル、飼料中の蛋白質源であるオボアルブミンに特異的な免疫グロブリンレベルを測定した。また、パイエル板や脾臓のヘルパー T 細胞、B 細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞などの割合や機能をパーソナルセルファンクションアナライザーや PCR で調べた。さらに、パイ

エル板細胞から抽出した RNA を DNA マイクロアレイに供することにより、免疫系遺伝子の網羅的解析を行った。

(2) パン酵母に特異的なヤギ乳 IgG の調製 (2007年度)

腸管内で安定な乳汁 IgG・抗原複合物を作るために、妊娠中のヤギにパン酵母を免疫し、そのヤギ乳より IgG 分画を調製した。なお、この IgG 分画は 2008 年度と 2009 年度の研究で用いたものである。なお、実際はウシにパン酵母を免疫して、パン酵母に特異的な牛乳 IgG を調製するのが望ましいが、乳牛は信州大学では飼育していないことから、ヤギ乳 IgG を調製した。なお、ヤギ乳 IgG も牛乳 IgG と同様の作用を有することを申請者は細胞培養系では確認している。また、パン酵母を抗原とするのは、パン酵母はヒトにおいて食経験が豊富なこと、パン酵母は消化管で分解を受けにくいことからである。さらに、乳酸菌を抗原としなかったのは、乳酸菌に対するヤギ乳 IgG が腸内の乳酸菌と反応して腸内菌叢を乱すことを考えたからである。

(3) パン酵母とそのヤギ乳 IgG の先天的(遺伝的) I 型アレルギーに及ぼす影響 (2008年度)

生後5週齢の NC/Nga マウスをヤギ乳 IgG とパン酵母混合物を含む飼料、並びにそれらを含まない飼料(コントロール飼料)で飼育した。飼育期間中は見かけのアレルギー症状、飼料摂取量、水摂取量、増体重を定期的に調べた。

コントロール飼料群の半数が明らかにアレルギー症状を呈したときにすべてのマウスを安楽死させた。

安楽死させたマウスの腸管および血清の免疫グロブリンレベル、並びにパイエル板や脾臓のヘルパー T 細胞、B 細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞などの割合や機能をパーソナルセルファンクションアナライザーや PCR で調べた。また、皮膚や毛などのアレルギー症状を数値化した。

以上の実験結果を解析し、パン酵母・ヤギ乳 IgG 複合物の経口摂取が遺伝的に I 型アレルギーモデルマウスに対してアレルギー軽減効果があることを確認するとともに、アレルギー軽減メカニズムを考察した。

(4) パン酵母とそのヤギ乳 IgG の後天液 I 型アレルギーに及ぼす影響 (2009年度)

健常な4週齢 BALB/c マウスをヤギ乳 IgG とパン酵母混合物を含む飼料、並びにそれらを含まない飼料(コントロール飼料)で飼育し、オボアルブミンをアジュバントとともに一定間隔で注射して I 型アレルギーマウスを作出した。

飼育期間中はの料摂取量，水摂取量，増体重を定期的に調べた。5週間飼育後，すべてのマウスを安楽死させた。

安楽死させたマウスの腸管および血清の免疫グロブリンレベル，並びにパイエル板や脾臓のヘルパーT細胞，B細胞，マクロファージ，ナチュラルキラー細胞などの割合や機能をパーソナルセルファンクションアナライザーやPCRで調べた。

以上の実験結果を解析し，パン酵母・ヤギ乳IgG複合物の経口投与が後天的に誘導したI型アレルギーを軽減することを確認するとともに，軽減メカニズムを考察した。

4. 研究成果

(1) 牛乳IgGのパパイン消化物から精製したFc，および大腸菌とそれと結合できる牛乳IgGをマウスに35日間経口投与すると，Fcは抗体産生を抑制しないが，大腸菌とその牛乳IgGの同時投与は，抗体産生やそれに関係する多くの因子を抗体産生を抑制方向に変動することを明らかにした。また，パイエル板細胞の遺伝子のDNAマイクロアレイによる網羅的解析により，牛乳IgGと大腸菌の同時投与により，抗原提示細胞やB細胞の分化の抑制，ヘルパーT細胞のTh1やTh3への分化の促進，Fcレセプターの発現抑制方向へmRNA発現が変動することを示した。これらの結果は，申請者の仮説どおり牛乳IgGとそれが認識する抗原の同時摂取はI型アレルギーを軽減する可能性を示している。

(2) 2008年度と2009年度の研究で用いるパン酵母に対するヤギ乳IgG分画を2頭のシバヤギを用いて3.6g調製した。

(3) 生後4週齢のNC/Ngaマウスを購入し，一週間の予備飼育後，パン酵母とそのヤギ乳IgG分画を含む飼料，並びにそれらを含まない飼料（コントロール飼料）で飼育したところ，飼育期間を通して，飼料摂取量，飲水量および増体重には両群間で有意な違いは見られなかった。本結果は，コントロール飼料群とパン酵母とそのヤギ乳IgG添加飼料群の間に栄養面やストレス面での有意な差はなく，本試験で得られた結果はパン酵母とそのヤギ乳IgGの生理的作用に基づくことを示唆している。一方，コントロール飼料群の半数が明らかにアレルギー症状を呈したときに両群のマウスのアレルギー症状を比較したところ，パン酵母とそのヤギ乳IgG投与群ではダニ抗原で誘導される耳介部分の腫れがコントロール群よりも弱く，脱毛や出血等のアレルギー症状も弱いことが確認された。また，それら投与群はコントロール群と比べて脾臓のTh1型

細胞数や腸管の免疫グロブリンレベルが低いことが確認された。以上の結果は，パン酵母とそのヤギ乳IgGの経口摂取は遺伝的なI型アレルギー症状を軽減することを示している。

一方，コントロール飼料群とパン酵母とそのヤギ乳IgG添加飼料群のパイエル板や脾臓の免疫細胞の特性付けを行ったところ，前者の飼料群と比べて，後者の飼料群のTh2細胞数が有意に減少していることが確認され，パン酵母とそのヤギ乳IgGの先天的（遺伝的）I型アレルギー軽減作用はTh1/Th2細胞バランスの改善によることが示唆された。

(4) パン酵母に対するヤギ乳IgGと免疫に用いたパン酵母を添加した飼料で，卵白アルブミン(OVA)でI型アレルギーを誘導したBALB/c系マウスを飼育し，そのマウスのアレルギー（後天的アレルギー）症状と免疫系をそれら無添加飼料（コントロール飼料）での飼育の場合と比較した。すなわち，パン酵母に対するヤギ乳IgG分画と免疫に用いたパン酵母をそれぞれ0.025%（w/w）量添加した市販飼料で5週齢BALB/c系雄マウスを7週間飼育し，6週齢および8週齢時に水酸化アルミニウムゲルと共にOVAを腹腔内注射した。9週齢から週に3回OVAを鼻腔内に投与し，くしゃみの回数を調べた。その結果，パン酵母とそのヤギ乳IgG分画を含む飼料群は，コントロール飼料群と比べてくしゃみの回数が明らかに減少した。また，パン酵母とそのIgG分画添加飼料群の脾臓Th2細胞数、抗原提示細胞数、IgE産生細胞数および肥満細胞数はコントロール群と比べて有意に減少し，逆にIL-10⁺CD4⁺（Tr1）細胞数は有意に増加した。これらの結果は，パン酵母とそのヤギ乳IgGのマウスへの経口投与は後天的に誘導したI型アレルギーをTh1/Th2バランスの改善だけではなく，IgE産生能の低下，制御性T細胞の誘導、肥満細胞数の低下などを介して軽減することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

The effect on mouse immune systems of cow's colostrum produced 6 to 7 days after parturition, Y. OHASHI, K. UCHIDA, M. KAWASAKI and H. OTANI, *Milchwissenschaft*, **65**, 11-15 (2010), 査読有

Preparation of goat milk anti-*Saccharomyces cerevisiae* immunoglobulin G(IgG)-rich fraction and immunological fun-

ctions of mice orally administered a mixture of the antigen and its specific IgG-rich fraction

Y. SEKIMURA, N. ONODERA, M. BANNO, I. HATA, K. HAMANO, T. SHIMOSATO and H. OTANI, *Milk Science*, **58**, 119-128 (2009), 査読有

Microarray analysis of mRNAs extracted from the Peyer's patch cells of mice given a diet including *Escherichia coli* and its specific bovine milk IgG, Y. SUEDA and H. OTANI, *Milchwissenschaft*, **64**, 354-357 (2009), 査読有

牛乳および乳製品において最近注目されている免疫調節機能とその解明技術, 大谷元, 乳業技術, **58**, 51-68 (2008), 査読無

牛乳タンパク質でアレルギーの予防とその症状を軽減する - 牛乳タンパク質の特性を利用した試み (日本農学賞受賞記念論文), 大谷元, *Biophilia*, **4**(3), 41-48 (2008), 査読無

チーズとホエイに含まれるたんぱく質の免疫科学, 大谷元, *New Food Industry*, **50**(5), 45-58 (2008), 査読無

牛乳たんぱく質の多様な機能—花粉症軽減食品への利用—, 大谷元, 北信越畜産学会新潟県分会報, No.43, 9-14 (2008), 査読無

Cow's IgG1 and its proteolytic digests stimulate immunoglobulin formation in mouse spleen cell cultures, A. MIZUTANI, H. OHNUKI, T. KAWAHARA and H. OTANI, *Milchwissenschaft*, **62**, 9-12 (2007), 査読有

A humoral immunoregulatory mechanism of bovine milk immunoglobulin G via Fcγ receptors in mice, H. OHNUKI and H. OTANI, *Milchwissenschaft*, **62**, 450-453 (2007), 査読有

新規機能性食品素材を用いた商品開発：牛乳蛋白質に秘められた多様な生体防御機能に基づき牛乳IgGを原料に用いた新規免疫調節食品開発の可能性, 大谷元, 食品工業, 2007-6.15, 53-60 (2007), 査読無

〔学会発表〕(計16件)

〔図書〕(計1件)

著書：大谷元：「現代チーズ学」(齊藤忠夫・堂迫俊一・井越敬司編), 4.5 チーズとホエイに含まれるタンパク質の免疫科学 (pp.333-345), 食品資材研究会, 2008年10月10日出版

〔その他〕

http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/otani/j_index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷元 (OTANI HAJIME)
信州大学・農学研究科・教授
研究者番号：30109201