

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月9日現在

機関番号：11301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22658080
 研究課題名（和文） 遺伝的高免疫能選抜系マウスと免疫活性化物質による高抗病性免疫システムの解明
 研究課題名（英文） Clarification of immunity system of high disease resistance with the use of genetically selected mice for high immunity and immunoactive agent
 研究代表者
 鈴木 啓一（SUZUKI KEIICHI）
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：10344706

研究成果の概要（和文）：末梢血免疫能を遺伝的に高方向に選抜した3系統と無選抜の対照系の4系統のマウスに、菓草の甘草を飼料添加給与し、各種免疫能を測定して組み合わせ効果を比較した。4系統のマウスに甘草を飼料添加給与し、免疫能を比較した結果、甘草添加区において食細胞活性の過剰な免疫応答の抑制とIgM量の早い応答と速やかな平常化が示唆されたこと、IL-2発現量がN系統の甘草添加区のみで抑えられたことから、系統に応じた甘草の免疫調節機能が存在することが確認された。

研究成果の概要（英文）：Feed to which the licorice was added is give to the 3 lines of mice selected for high peripheral blood immunity and non-selected control line of mice, and the combination effect of genetic line of mice and licorice addition was compared measuring various immunities. Addition of the licorice to feed suggested the control of an excessive immune response of phagocyte activity, and an early response and prompt returning to the normal situation of IgM. In addition, when the licorice was given, the IL-2 expression was suppressed only in the mice of N line. This result suggested that the immune-modulatory function of licorice exists corresponding to the line of mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

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：マウス、免疫能、選抜、甘草

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物の各種疾病に対する抵抗性（抗病性）は、(a)動物自身の遺伝的抵抗能力（免疫、内分泌、神経などの総合的作用）と、(b)動物が摂取し、消化吸収した成分により腸管粘膜免疫などを経由した免疫能の活性化あるいは、成分そのものが消化吸収され全身の免疫能を高めることにより付与される。

(2) 動物自身の遺伝的抵抗能力を高める方法として、統計育種学的方法により選抜育種することが最も確実で効果的な手法と言える。抗病性育種としてBiozziら(1968,1971,1984)は、マウスについて、数種類の抗原に対する抗体産生能の高い系統を選抜により確立し、各種病原菌に対する抵抗性を報告している。われわれは、末梢血食細胞活性、羊

赤血球 (SRBC) に対する抗体産生能および食細胞活性と抗体産生能の両免疫能に優れた 3 系統のマウスを 20 世代以上にわたり選抜して作成した。特に、両免疫能選抜系統は毒素や LPS 接種に対して高い抵抗性を示唆する結果を得ている。

(3) 薬草の甘草には主成分である抗炎症性作用のあるグリチルリチンの他、未解明の物質が多数含まれ、抗炎症作用、免疫応答の改善作用や肝機能活性効果が指摘されている。われわれは、豚への甘草の飼料添加給与が唾液中 IgA を高め、末梢血中の CD8⁺ 細胞を抑制する効果や、炎症性サイトカインである TNF α 発現量を抑制する効果を確認している (Katayama ら 2011)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、動物自身の持っている遺伝的免疫能力を高方向に選抜した 3 系統マウス (末梢血食細胞活性の高い N 系、羊赤血球に対する抗体産生量の高い A 系、及び、両方の免疫能の高い NA 系) と無選抜対照系マウス (C 系) に、甘草添加飼料と無添加飼料を給与した場合、異物として羊赤血球 (SRBC) やワクチンなどを接種した際の、免疫応答、内分泌ホルモン、各種サイトカインの遺伝子レベルでの発現状況を比較検討する。

(2) それらの結果から、①異物に対する免疫システム機構の解明、②免疫能選抜の抗病性育種に関する有効性、③甘草の免疫能調整機能を検討し、いずれの免疫形質を改良したマウスが甘草添加飼料給与との組み合わせで高い抗病性機能を持つかを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 定常状態での 3 選抜系 (自然免疫: N 系、獲得免疫: A 系、自然・獲得免疫: AN 系) 及び無選抜対照系マウス (C 系) の 4 系統のマウスの免疫機構を比較した。8~12 週齢の 4 系統のマウスを 5~6 匹ずつ用い、血中総白血球数、食細胞活性を測定し、フローサイトメトリー法により免疫担当細胞割合を解析した。また、骨髄、脾臓における細胞割合の解析も行った。

(2) 飼料に甘草を添加給与した際の免疫応答を比較するため、4 系統のマウスを 20 匹ずつ合計 80 匹用い、甘草添加と甘草無添加の区にそれぞれ半数ずつ配置して飼料に 0.15% の甘草を添加した固形飼料を給与した。甘草添加飼料を給与 1 週間、2 週間後にブタ *M. hyopneumoniae* ワクチンを PBS で 12.5 倍希釈したものを腹腔内に接種した。ワクチン接種時、その 2 日後と、1 週間後に採血を行い、さらに、2 日後と 1 週間後に半数ずつのマウ

スをと殺して免疫担当臓器重量を測定した。採血した血液を使い、ケミルミネッセンス法により食細胞活性を、ELISA 法により抗体産生能 (IgG、IgM、IgA) を測定した。

(3) 飼料に甘草を添加給与し、(2) と異なる抗原として羊赤血球 (SRBC) を接種した際の免疫応答を比較するため、4 系統のマウスを 20 匹ずつ合計 80 匹用い、甘草添加と甘草無添加の区にそれぞれ半数ずつ配置して飼料に 0.15% の甘草を添加した固形飼料を給与した。甘草添加飼料を給与 1 週間、2 週間後に SRBC を腹腔内に接種した。給餌開始から 0、14、21、22、23、28 日後に採血を行い、23 日目に半数をと殺、28 日目に残りをと殺して臓器 (肝臓、脾臓、副腎、胸腺) を採取した。血液サンプルから全自動血球計算機を用いて総白血球数、ケミルミネッセンス法により食細胞活性、ELISA 法により SRBC 特異的抗体産生量 (IgG、IgM) を測定した。また、臓器重量、real-time PCR 法により脾臓中のサイトカイン (IL-2、IL-4、IL-12) 発現量を測定した。系統、飼料、採血日を母数効果、個体を変数効果とした混合モデル、または系統、甘草および系統と甘草の交互作用を要因とした分散分析を行い、有意な要因については多重比較検定を行った。

4. 研究成果

(1) ① 血中における T 細胞 (CD3⁺)、B 細胞 (CD19⁺) 及び Myeloid 細胞 (Gr-1/Mac-1⁺) の割合を測定した結果、Myeloid 細胞割合が N 系、NA 系において C 系より有意に高いことが明らかとなった (図 1)。

② 食細胞活性を高方向に選抜した N 系、NA 系は、Myeloid 細胞数のみではなく 1 細胞当りの活性も高いことが示唆された (図 2)。しかし、造血器官である骨髄、また脾臓における上記細胞の構成比に大きな系統間の差が認められなかった。また、B 細胞、T 細胞割合の差は認められなかった。このことから、食細胞活性による選抜 (N 系、NA 系) は、定常状態における末梢 Myeloid 細胞の質・量の両方に影響していると考えられた。

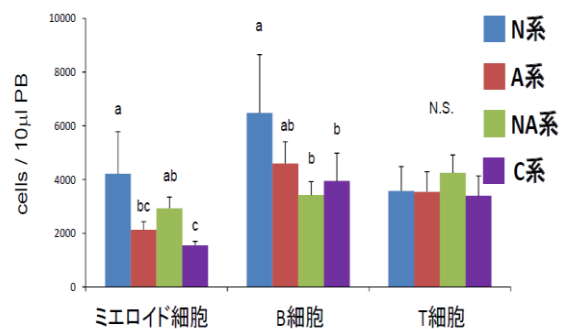


図 1. 4 系統の末梢血中細胞数の比較

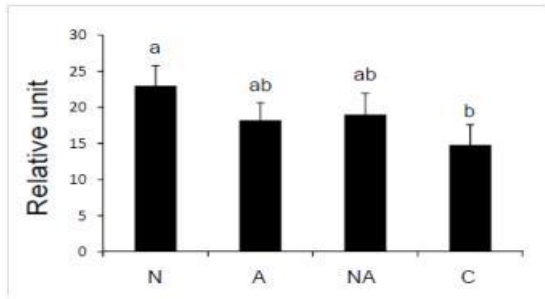


図2. ミエロイド細胞数当の食細胞活性

(2) ① マウス系統と甘草添加の有無を要因とした分散分析の結果、食細胞活性については系統と甘草添加の交互作用の効果が有意 ($P < 0.05$) であり、系統により効果が違うことが示唆された。これは、食細胞活性に対して選抜された N 系は、試験開始 21 日目で対照区の食細胞活性は他の系統と比べても有意に高いが、甘草を給与することで他の系統と同程度まで食細胞活性が抑制されることが示された (図 3)。

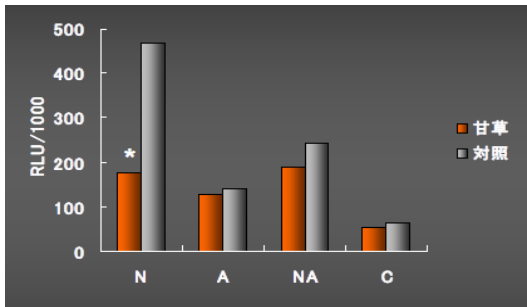


図3. 食細胞活性に対する甘草の抑制効果

② 抗原特異的 IgM 量について、試験開始 21 日目で全ての系統で甘草無添加と比べ甘草添加区が有意に高い値を示し、液性免疫が活性化されることが示された (図 4)。

③ 甘草添加区では、肝臓重量 (21 日目) と副腎重量 (17 日目) 割合がそれぞれ無添加区と比べ有意に増加した (図 5)。

以上の結果から、甘草の飼料添加給与が食細胞活性を選抜により高めた N 系では、食細胞活性の過剰な免疫応答を抑制する免疫調節効果が、抗原特異的 IgM 量については全ての系統で甘草添加区が増加したことから抗体産生促進作用の効果が認められた。



図4. 甘草添加給与の IgM への影響

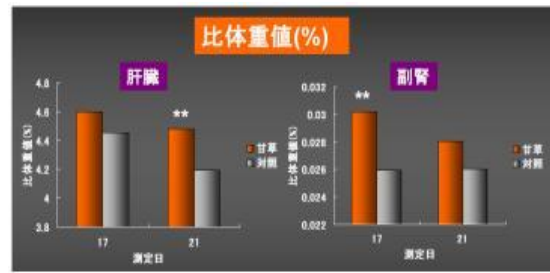


図5. 甘草添加給与の臓器重量への影響

(3) ① 4 系統のマウスに甘草を添加給与し、SRBC 接種前後の免疫応答を比較検討した結果、末梢血食細胞活性については、選抜形質が食細胞活性だった N 系が他の系統に比べて有意に高かった (図 6)。

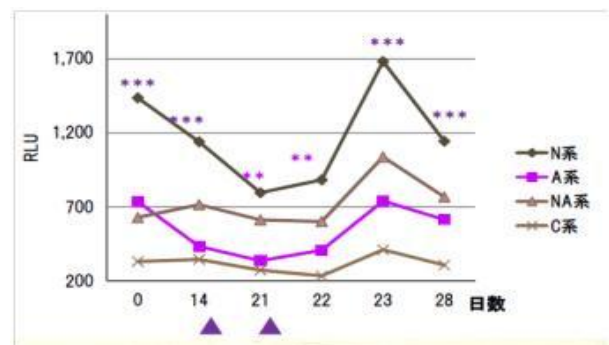


図6. 食細胞活性の系統間比較

② 分散分析の結果、系統と甘草との交互作用が認められ、N 系統では給餌後 14 日では甘草添加区が無添加区より有意に高まり、SRBC の 2 度目の接種二日後の 23 日には甘草添加区が有意に抑えられた (図 7)。しかし、他の系統では、両区間に有意差は認められなかった。

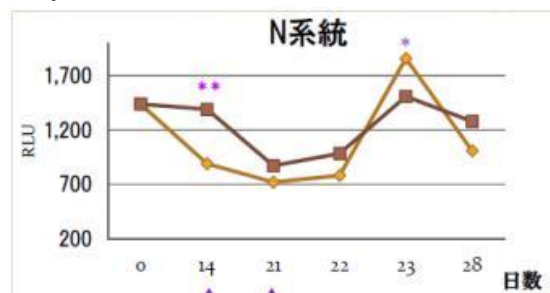


図7. 食細胞活性に及ぼす甘草効果 (N 系)

③ SRBC 特異的 IgM 産生量については、SRBC 二次接種時の 21 日目では甘草添加区の IgM が有意に高められ、その 1 週間後の 28 日目には有意に抑制された (図 8)。しかし、系統と甘草添加の交互作用が有意であり、系統毎に比較すると、C 系を除く 3 選抜系では SRBC 二次接種時あるいは翌日には甘草添加区の IgM が高くなるが、N 系と NA 系では 1 週間後

に、甘草添加区が有意に低下した。一方、A系では、1週間後も甘草添加区の値が非添加区と比べ有意に高かった。このことから、甘草添加が異物接種後の素早いIgM応答と、速やかな平常化の機能があることが示唆された。

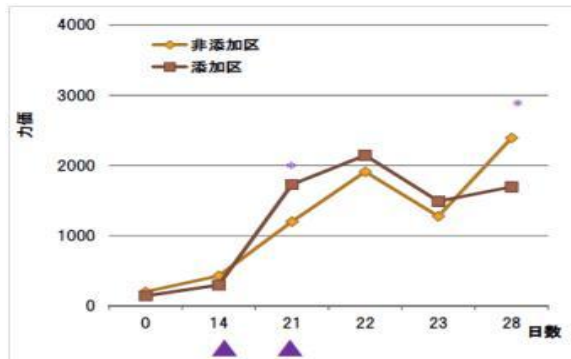


図 8. 甘草添加が IgM に及ぼす影響

さらに、サイトカインの IL-2 発現量について、N 系の甘草非添加区だけが高まり、甘草添加区では抑制されたことから、系統に応じた免疫調節機能のあることが示唆された(図 9)。

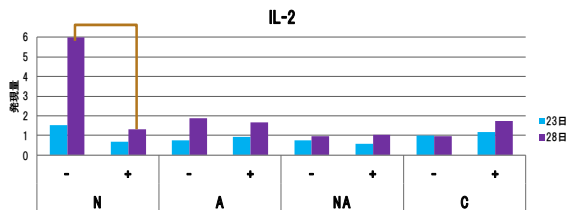


図 9. 甘草添加の IL-2 の発現量への影響
+は甘草添加を、-は無添加を示す。

以上、本研究の結果、自然免疫、獲得免疫及び両方の免疫能を 20 世代にわたり選抜した 3 系統 (それぞれ、N 系、A 系及び NA 系) のマウスは、無選抜対照系 (C 系) と比べ、定常状態及び異物接種時の免疫能が明らかに異なることを確認できた。さらに、甘草を飼料添加給与することが、自然免疫の食細胞活性の過剰な応答を抑えること、異物接種時の液性免疫能の素早い応答と速やかな定常化を促進する免疫調節効果のあることが確認された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. 島津朋之、宮崎達也、伊藤大地、宮内悠平、鈴木啓一、高免疫選抜系統マウス間の定常時における免疫機構の比較、第

112 回日本畜産学会、2012 年 3 月 29 日、名古屋大学

2. 宮内悠平、宮崎達也、伊藤大地、島津朋之、鈴木啓一、免疫能第 112 回日本畜産学会、選抜系マウスへの甘草添加飼料が及ぼす影響、2012 年 3 月 29 日、名古屋大学
3. 伊藤大地、宮崎達也、宮内悠平、島津朋之、鈴木啓一、免疫能第 112 回日本畜産学会、免疫能選抜マウスにおける単飼、群飼下での免疫能の比較、2012 年 3 月 29 日、名古屋大学
4. 宮崎達也、鈴木啓一、高免疫選抜系マウスの甘草給与下での抗原接種に対する免疫応答の比較、第 61 回東北畜産学会大会、2011 年 9 月 8 日、青森市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 啓一 (SUZUKI KEIICHI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10344706