

学 位 論 文 題 名

Studies on an immunopotential of peptidoglycan
derived from *Bifidobacterium thermophilum*

(ビフィドバクテリウム サーモフィラム由来ペプチドグリカンの免疫賦活に関する研究)

学位論文内容の要旨

ヒトおよび哺乳動物の胎子期の免疫応答は種々の因子によって抑制され、さらに母体側でもサプレッサーT細胞の活性が高まる。このように周産期には胎子および母体双方が生理的に免疫抑制状態となっており、これにより互いが異物と認識し免疫的拒否による流産が起こるのを防ぎ、在胎期間を十分に保とうとする。すなわち、母子間に拒絶反応が起こらないよう、むしろ負の免疫応答が正常に働いており、生後も一定期間その傾向は持続される。

このような周産期における負の免疫応答能は分娩後ある時期になると正のそれに転換するが、この転換因子として、胎子期における無菌の状態から生下時以降急激に多くの抗原に刺激されることが考えられ、特に生後確立する腸内フローラが強く影響をおよぼすものと思われる。このことは実験動物を用いた試験により証明されてきた。すなわち、各種の無菌動物の脾臓や腸間膜リンパ節は正常な動物のそれらに比較すると形態および重量が貧弱でリンパ濾胞の発達も悪いが、これに数種類の腸内フローラを定着させると短期間に正常な大きさに達し、血中免疫グロブリン量も正常な値になる。

腸内フローラ構成菌の中には免疫応答能に強く働きかけるものがあり、中でも *Lactobacillus* および *Bifidus* の菌体および菌体成分が持つ多彩な生物活性は抗腫瘍作用との関連で注目され、様々な報告が見られる。特に *Bifidobacterium thermophilum* (以下 *B. thermophilum*) が非特異的血中抗体を上昇させることは動物種の違いはあるもののニワトリのヒナやモルモットを用いた実験から明らかにされている。

本研究は腸内フローラで優位を示し、安定している *Bifidus* 菌のうちブタ由来 *B. thermophilum* の細胞壁構成成分ペプチドグリカン (以下PG) が、免疫応答を賦活するか否かを検討した。すなわち、ブタ由来 *B. thermophilum* のPGの経口投与が子豚の加齢に伴って起こる免疫応答能の変化にどのように作用するかを腸管局所の免疫

グロブリン（以下Ig）産生細胞の推移で調べ、あわせて子豚離乳期の腸管感染症の防圧に効果が期待されるかを検討した。また全身性の感染に対する防御効果ならびに細胞性免疫の賦活効果を検討するため、種々の免疫学的解析をマウスを用いて実施し、以下の結果を得た。

(1) *B. thermophilum*のPGを生下時から5日齢まで、および3週齢の子豚にそれぞれ経口投与し、それらの小腸各部粘膜固有層におけるIg保有細胞数および小腸内大腸菌数を調べ、PG非投与群におけるそれらの成績と比較した。PG投与後の5および6週齢時における小腸中部および回腸粘膜固有層のIg保有細胞数は非投与群と比較して有意($P<0.01$)に多かった。また、PG投与および非投与群におけるIgAおよびIgM保有細胞数の比率でみると、前者ではIgA保有細胞数がIgMのそれを上回った反面、後者ではその比率が逆転していた。つまり、PGの投与はIgのクラススイッチを早め、未熟な免疫細胞を早期に成熟させることが明らかとなった。さらに、小腸各部位における大腸菌数が減少し、臨床的に下痢症が減少することが確認された。以上の成績から、哺乳子豚におけるPG投与により、子豚の消化管局所の免疫応答能が増強されることが示唆された。

(2) PG経口投与による感染防御能の増強を検討するため、34日齢のSPF-ICRマウスに各濃度のPGを1回経口投与し、24時間後に子豚肺由来大腸菌を尾静脈に接種し、その後7日間観察し、生残率を求めた。適正濃度のPG経口投与群は非投与群と比較して、有意に高い生残率が得られたが、適正濃度以上のPGを投与すると逆に生残率が減少した。PG経口投与マウスにおける大腸菌感染防御能の持続時間を検討したところ、PG経口投与群は1日後から7日後に大腸菌を接種してもその生残率は非投与群に比べ有意に高い結果が得られた。大腸菌接種24時間後のマウス末梢血、肝臓および脾臓の大腸菌数はPG経口投与群では非投与群と比較して、末梢血および肝臓中の大腸菌数が有意に少なかった。また、PG経口投与群の脾臓由来単核細胞の幼若化反応は非投与群のそれよりも高まることが明らかとなった。これらのことからPG経口投与によって血中や脾臓、肝臓での大腸菌殺菌能が亢進し、結果的にマウス生残率が上昇することが示唆された。

(3) PGをSPF-BALB/Cマウスに経口投与したところ、脾臓由来好中球や腹腔および肺胞マクロファージなどの食食能が活性化され、異物処理能が増強した結果が得られた。また、食食能効果発現のPG至適濃度が確認され、それ以上の高濃度PGの投与は食食能を抑制することも認められた。

(4) PGをSPF-C57BL/6CrSlcマウスに経口投与し、ナチュラルキラー（NK）細胞、腹腔内細胞障害性Tリンパ球（CTL）およびコンカナバリンA刺激リンパ球の細胞障害活性を測定し、PG非投与群と比較検討を行った。PG添加飼料を3週間連続給与

したマウスの脾臓および腸間膜リンパ節のNK細胞はPG非投与対照群のそれに比較して、細胞障害活性が有意に高まった。しかしながら、PG 1 回経口投与ではPG非投与対照群のそれと差がみられなかった。PG添加飼料を2週間連続給与したマウスの腹腔に肥満細胞腫細胞を接種して1週間感作後、腹腔内CTLの細胞障害活性を測定した。その結果、PG添加飼料を給与したマウスの腹腔内CTL活性は、PG非投与群に比較し有意に高い値を示した。また、PG添加飼料連続給与群のコンカナバリンA刺激リンパ球の細胞障害活性はPG非投与群に比較して、高い活性がみられた。これらの結果から、PGの経口投与はマウスの免疫系細胞の細胞障害活性を高めることが確認された。

以上から本研究において、*Bifidobacterium thermophilum*由来PGの経口投与が局所的および全身的に免疫賦活作用を有し、若齢動物の未熟な免疫機能を早期に成熟させることが確認された。すなわち、新生期から哺乳期後半に至る一定の生長過程の中で胎子性の免疫応答が腸内フローラによる抗原刺激を介して正常な免疫ネットワークシステムを確立していくものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	前出吉光
副査	教授	橋本晃
副査	教授	小沼操
副査	講師	田島誉士

学位論文題名

Studies on an immunopotential of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*

(ビフィドバクテリウム サーモフィラム由来ペプチドグリカンの免疫賦活に関する研究)

本研究は腸内フローラで優位を示し、安定している *Bifidus* 菌のうちブタ由来 *B. thermophilum* の細胞壁構成成分ペプチドグリカン (以下PG) が、免疫応答を賦活することを明らかにした。すなわち、

(1) *B. thermophilum* の PG を生下時から 5 日齢まで、および 3 週齢の子豚にそれぞれ経口投与し、それらの小腸各部粘膜固有層における Ig 保有細胞数および小腸内大腸菌数を調べ、PG 非投与群におけるそれらの成績と比較した。PG 投与後の子豚における小腸中部および回腸粘膜固有層の Ig 保有細胞数は非投与群に比較して有意 ($P < 0.01$) に多かった。また、PG 投与および非投与群における IgA および IgM 保有細胞数の比率でみると、前者では IgA 保有細胞数が IgM のそれを上回った反面、後者ではその比率が逆転していた。さらに、小腸各部位における大腸菌数が減少し、臨床的に下痢症が減少することが確認された。以上の成績から、哺乳子豚における PG 投与により、子豚の消化管局所の免疫応答能が増強されることが示唆された。

(2) PG 経口投与マウスにおける大腸菌感染防御能の持続時間を検討したところ、PG 経口投与群は 1 日後から 7 日後に大腸菌を接種してもその生残率は非投与群に比べ有意に高い結果が得られた。大腸菌接種後のマウス末梢血、肝臓および脾臓の大腸菌数は PG 経口投与群では非投与群に比較して、末梢血および肝臓中の大腸菌数が有意に少なかった。また、PG 経口投与群の脾臓由来単核細胞の幼若化反応は非投与群のそれよりも高まることが明らかとなった。これらのことから PG 経口投与によって血中や脾臓、肝臓での大腸菌殺菌能が亢進し、結果的にマウス生残率が上昇することが示唆された。

(3) PG を SPF-BALB/C マウスに経口投与したところ、脾臓由来好中球や腹腔および肺胞マクロファージなどの食食能が活性化され、異物処理能が増強した結果が得られた。

(4) PG を SPF-C57BL/6CrSlc マウスに経口投与し、ナチュラルキラー (NK) 細胞、腹腔内細胞障害性 T リンパ球 (CTL) およびコンカナバリン A 刺激リンパ球の細胞障害活性を測定し、PG 非投与群と比較検討を行った。PG 添加飼料を連続給与したマウスの脾臓および腸間膜リンパ節の NK 細胞は PG 非投与対照群のそれに比較して、細胞障害活性が有意に高まった。PG 添加飼料を 2 週間連続給与したマウスの腹腔に肥満細胞腫細胞を接種して 1 週間感作後、腹腔内 CTL の細胞障害活性を測定した。その結果、PG 添加飼料を

給与したマウスの腹腔内CTL活性は、PG非投与群に比較し有意に高い値を示した。また、PG添加飼料連続給与群のコンカナバリンA刺激リンパ球の細胞障害活性はPG非投与群に比較して、高い活性がみられた。これらの結果から、PGの経口投与はマウスの免疫系細胞の細胞障害活性を高めることが確認された。

以上のように申請者は、*B. thermophilum* 由来PGの経口投与が局所的および全身的に免疫賦活作用を有し、若齢動物の未熟な免疫機能を早期に成熟させることを明らかにした。これらの成果は離乳期の家畜の腸管感染症制圧に大きく貢献する。よって審査員一同は佐々木隆志氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。