

氏名	しん けいい 瀧 継偉
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第242号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Potentiation of intestinal immunity by micellary mushroom extracts (超微粒子化キノコエキス投与マウスにおける腸管免疫能の増強について)
論文審査委員	主査 教授 青柳 豊 副査 教授 畠山 勝義 副査 教授 安保 徹

博士論文の要旨

【背景と目的】腸管は胸腺非依存性 T 細胞 (胸腺外分化 T 細胞) が豊富に存在する臓器である。また小腸上皮間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte: IEL) は食物抗原や腸内細菌叢などの外来抗原に大量暴露されている特殊な環境下であり、その免疫機構についてまだ不明な点が多い。β-グルカンはキノコ由来の健康食品として広く知られ、従来の β-グルカンは高分子 (10~1000 μm) で経口摂取しても腸管粘膜に殆ど取り込まれずに排泄されるが、今回使用した β-グルカン (超微粒子化キノコエキス) は超微粒子化 (0.05~0.2 μm) されたものであり、腸管粘膜に吸収され易い特徴を持っている。そこで、β-グルカンをマウスに経口投与し、腸管における免疫賦活効果について検討した。

【材料と方法】8~12 週齢の C57BL/6 マウスを用いた。超微粒子化 β-グルカン溶液 (ミセラピスト、味の素 KK より供与、β-1, 3-グルカン含有量 15mg/100ml) を 5ml (β-1, 3-グルカン量 0.75mg) /日 で 2 週間自由飲水による経口投与を行い、定法にて肝臓、脾臓、および小腸上皮よりリンパ球の分離を行った。分離した単核球を抗マウスモノクローナル抗体で二重及び三重染色し、フローサイトメトリーにて細胞表面抗原の変化を解析した。また細胞傷害活性測定するために、YAC-1 及び P815 細胞を標的細胞として ⁵¹Cr 遊離試験を行った。さらに血清のサイトカイン量を CBA 法にて測定した。

【結果】超微粒子化 β-グルカン投与群は対照群と比べ、小腸 IEL のみ細胞数が 40% 程度の増加が認められた。超微粒子化 β-グルカン投与マウスの各サブセットの変化を比べるために、対照群と超微粒子化 β-グルカン投与群マウス肝、脾及び小腸単核球を、抗 CD3 及び IL-2R、CD3 及び NK1.1 の二重染色で解析を行った。肝の胸腺外分化 T 細胞は IL-2Rβ⁺CD3^{int} 細胞として同定できる。IL-2Rβ⁺CD3⁻ は NK 細胞であり、IL-2Rβ⁻CD3^{high} 細胞が胸腺由来 T 細胞である。NK 細胞及び胸腺外分化 T 細胞は肝に豊富に存在するが、脾に少ない。対照群と比べ、超微粒子化 β-グルカン投与における肝臓、脾臓の単核球のサブセット変化は認められなかった。

小腸 IEL では、 $CD3^+IL-2R\beta^+$ (主に $\alpha\beta T$ 細胞) 及び $CD3^+IL-2 R\beta^+$ (主に $\gamma\delta T$ 細胞) が存在するが、これらの細胞群も超微粒子化 β -グルカン投与により変化が認められなかった。さらに小腸 IEL にて、ほかの二重染色を行った。その結果、 β -グルカン投与により小腸 IEL の $CD8^+$ 細胞、 $TCR\alpha\beta^+$ 細胞及び $CD8\alpha\alpha^+$ 細胞の増加を認めた。

小腸 IEL の三重染色については、 $CD8\alpha\beta$ 細胞及び $CD8\alpha\alpha$ 細胞サブセット内で $TCR\alpha\beta^+$ 細胞の増加、 $TCR\gamma\delta^+$ 細胞の減少を有意に認めた。更に小腸 IEL の $CD8^+$ 、 $CD8\alpha\alpha$ 、 $CD8\alpha\beta$ 、 $TCR\alpha\beta^+$ 及び $TCR\gamma\delta^+$ 細胞の絶対数は超微粒子化 β -グルカン投与により、各サブセットの増加を認めた。

YAC-1 に対する細胞傷害活性 (NK 細胞傷害活性) について、肝、脾単核球および小腸 IEL いずれの臓器においても超微粒子化 β -グルカン投与非投与に関わらず変化を認めなかった。しかし、小腸 IEL の抗腫瘍活性については超微粒子化 β -グルカン投与において活性の増強を認めた。血清中のサイトカイン量について、超微粒子化 β -グルカン投与により、 $TNF\alpha$ 及び $IL-2$ の産生が顕著に増加した。

【結論】以上の結果より、超微粒子化 β -グルカン (超微粒子化キノコエキス) の経口投与により小腸のリンパ球数が増加すると共に、小腸 IEL $CD8\alpha\beta^+TCR\alpha\beta^+$ 細胞、小腸 IEL における抗腫瘍活性及び血中サイトカイン、特に $IL-2$ および $TNF\alpha$ の量が増大したことが明らかとなった。

従って超微粒子化 β -グルカンの経口投与により腸管免疫の賦活効果を得られることが示唆された。従来の天然 β -グルカンはその粒子が大きく腸管に取り込まれにくいいため、腸管における免疫賦活効果を得るためには多量摂取が必要である。我々は以前天然 β -グルカンを $10\sim 30\text{mg/日}$ 経口投与すると、免疫能が増強すると報告している。本研究では、超微粒子化 β -グルカンは 0.75mg/日 経口投与により、同等な免疫能増強の効果を得られることが認められた。

(論文審査の要旨)

従来の β -グルカンは高分子 ($10\sim 1000\mu\text{m}$) で経口摂取しても腸管粘膜に殆ど取り込まれずに排泄されるが、今回使用した β -グルカンは超微粒子化 ($0.05\sim 0.2\mu\text{m}$) されたものであり、腸管粘膜に吸収され易い特徴を持っている。そこで、超微粒子化 β -グルカンをマウスに経口投与し、腸管における免疫賦活効果について検討した。

超微粒子化 β -グルカン投与群は対照群と比べ、小腸 IEL のみ細胞数が 40% 程度の増加が認められた。また、分画の変化では $CD8^+$ 細胞、 $TCR\alpha\beta^+$ 細胞及び $CD8\alpha\alpha^+$ 細胞に比率の増加を認めた。小腸 IEL の三重染色については、 $CD8\alpha\beta^+$ 細胞及び $CD8\alpha\alpha^+$ 細胞サブセット内で $TCR\alpha\beta^+$ 細胞の増加を有意に認めた。更に小腸 IEL の $CD8^+$ 、 $CD8\alpha\alpha^+$ 、 $CD8\alpha\beta^+$ 、 $TCR\alpha\beta^+$ 及び $TCR\gamma\delta^+$ 細胞の絶対数は超微粒子化 β -グルカン投与により、各サブセットの増加を認めた。小腸 IEL の抗腫瘍活性については超微粒子化 β -グルカン投与において活性の増強が認められた。血清中のサイトカイン量について、超微粒子化 β -グルカン投与により、 $TNF\alpha$ 及び $IL-2$ の産生が顕著に増加した。

以上の結果より、超微粒子化 β -グルカンの経口投与により腸管免疫の賦活効果を得られることが示唆された。この点に学位論文としての価値を認めた。