

修士論文

大腸炎抑制作用に資する ポストバイオティクスの探索

令和5年3月

三重大学大学院 生物資源学研究科

生物圏生命科学専攻 海洋生命分子化学講座

水圏材料分子化学教育研究分野

宮 藺 大輝

目次

序論	1
第1章 Caco2細胞-RAW264.7細胞共培養LPS刺激大腸炎モデルを用いた 抗炎症誘導乳酸菌株の探索	
1. 1. 緒論	7
1. 2. 実験材料と実験方法	7
1. 3. 結果	16
1. 4. 考察	21
第2章 DSS誘発性大腸炎マウスにおけるMLおよびRBLの影響	
2. 1. 緒論	24
2. 2. 実験材料と実験方法	24
2. 3. 結果	32
2. 4. 考察	48
第3章 DSS誘発性大腸炎マウスにおけるMLの餌含有率変化の影響	
3. 1. 緒論	51
3. 2. 実験材料と実験方法	51
3. 3. 結果	53
3. 4. 考察	70

総括	71
参考文献	73
謝辞	80

序 論

ヒトの腸管には、およそ 1,000 種、100 兆個を超える腸内細菌叢を形成している¹⁾。健康人の腸内に生息する腸内細菌叢は、*Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門、*Proteobacteria* 門および *Actinobacteria* 門によってその 90%以上が構成されている²⁾。このうち、*Firmicutes* 門が最も優勢で 60%を占めており、*Bacteroidetes* 門が 20%でこれに次ぐ³⁾。これらの腸内細菌が叢を形成し、密集している姿が花畑に見えることから腸内フローラと呼ばれる。腸内フローラには、消化できない食べ物を体に良い働きに作り変える役割と、腸内免疫細胞を活性化し、病原微生物から体を守る役割がある⁴⁾。腸内フローラを構成する腸内細菌は悪玉菌の侵入や増殖を抑制したり、腸内環境を整える役割を持つ善玉菌と、腸内の優勢な善玉菌または悪玉菌に味方する日和見菌と、脂質やタンパク質を好み、腸内で有害物質を産生する悪玉菌の 3 種類に大別され、それぞれがバランスを保ちながら増殖を続け複雑な微生物生態系を構築している⁴⁾。この腸内細菌叢は宿主の免疫機能と複雑な相互関係にあり³⁾、腸内細菌叢のバランスは様々な環境で日々変化し、その一因として食生活の変容や人工甘味料などによる影響がある⁴⁾。第二次世界大戦以前の野菜や穀物類中心だった日本人の食生活も、戦後、食の欧米化と呼ばれる食生活の変容が起き、アメリカからの食援助をきっかけに徐々に乳製品や肉類の摂取量が上昇し、野菜、穀物の摂取量が減少している^{5,6)} (Fig. 0-1)。その結果、野菜、穀物を多く摂取した状態の腸内環境を好む *Tetragenococcus* などの善玉菌が中心の腸内環境から⁷⁾、脂質や動物性タンパク質といった肉類を多く摂取した状態の腸内環境を好む *Clostridium perfringens* などの悪玉菌へと腸内細菌叢の変化が起きている^{7,8)}。また、人工甘味料の一種であるスクラロース、アスパルテーム、サッカリンなどの低カロリーの甘味料は、砂糖の代替品となり、デザートやガム、朝食用食品、ダイエット飲料など幅広い食品に使用されている⁹⁾。一方で、スクラロースを含む甘味料を様々な濃度 (100 ~ 1000 mg/kg) で 12 週間経口投与したラットでは、腸内細菌叢の構成菌種の変容や異常増殖・減少が見られること¹⁰⁾や、一般的に有益な嫌気性菌 (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* など) が大きく減少すること¹⁰⁾など、個人差はあるが人工甘味料には腸内細菌叢のバランスと多様性を乱すことがあると示されている¹²⁾。このような食生活の変容や人工甘味料による腸内細菌叢の構成菌種の変容や異常増殖・減少を、ディスバイオシス (dysbiosis) と呼び¹²⁾、このディスバイオシスによって腸管免疫の恒常性は破綻し、慢性的な炎症が惹起され、免疫代謝機構の異常な乱れが生じる¹²⁾。この免疫代謝機構の異常な乱れは、炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease, 以下 IBD) と関連があり、腸内細菌叢の構成細菌のバランスが大いに注目を集めている¹³⁾。ディス

バイオシスの状態では、これらの構成菌種のバランスや多様性が失われた状態となっており、IBD では Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の細菌が減少し、Proteobacteria 門および Actinobacteria 門の細菌が増加していることが分かっている¹⁴⁾。IBD は、細菌や薬剤などが原因で起こる特異的炎症性腸疾患と、原因不明の非特異的炎症性腸疾患に分けられる³⁾。一般的に炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎¹⁵⁾ (Fig. 0-2A) とクローン病¹⁶⁾ (Fig. 0-2B) に代表される難治性で非特異的な慢性炎症性疾患の総称を意味することが多い^{15, 16)}。我が国では、欧米に比べ患者数は5分の1~10分の1と少ないが、近年になり、その患者数は年々増加し続け¹⁷⁾、特に20歳から30歳の若い世代での罹患が多く¹⁸⁾、世界的な問題となっている。潰瘍性大腸炎は原則として大腸のみに起きる連続性・表層性の炎症であり、健常者の大腸 (Fig. 0-2C) と比較して、潰瘍、易出血などの症状に加え、便が軟らかくなり、さらには便に血液が混じるようになる症状がみられる (Fig. 0-2A)¹⁵⁾。一方で、クローン病では、消化管に非連続性・全層性の炎症が起き、ただれや潰瘍が見られる (Fig. 0-2B)¹⁶⁾。その結果、腸が変形して狭くなり、瘻孔、膿瘍などの症状を誘発し、腹痛や下痢を起こし、体重が減少する。両疾患ともに、慢性的な炎症を繰り返し発症するという特徴を持っており¹⁷⁾、軽症例で5-アミノサリチル酸製剤 (5-Aminosalicylic Acid formulation, 以下 5-ASA 製剤) の処方では炎症が改善しない場合や、中等症例に対しては、5-ASA 製剤に加えてステロイド (経口) を併用することがあり、長期間を必要とする IBD の治療では、薬剤の副作用が懸念される¹⁸⁾。そこで近年、腸内細菌叢の改善を健康増進や疾患治療に応用する新たな試みが活発に行われており、IBD の治療法として、プレバイオティクス、プロバイオティクス、ポストバイオティクスの3つが注目されている³⁾。プレバイオティクスは、腸内常在菌の生育や活性に影響を与えることにより、健康効果を示す難消化性の食料成分をいう³⁾。代表的なものにオリゴ糖 (フラクトオリゴ糖やガラクトオリゴ糖など) や食物繊維が挙げられ、これらはプロバイオティクスの増殖を亢進する³⁾。プロバイオティクスでは投与した細菌がうまく定着しないことがしばしば問題になり、継続投与が必要なことが多いが、プレバイオティクスではもともと腸管に定着している菌種にアプローチできるという利点がある³⁾。マウスの病原性大腸炎感染モデルでは、食事中的多糖類 (食物繊維) の含有量を制限すると通常では病原性大腸炎と競合しない Bacteroides が病原性大腸菌と競合し、排除することが示されている¹⁹⁾。プロバイオティクスとは「適切な量を摂取することにより宿主に有用な作用を発揮する生きた微生物」と定義されており²⁰⁾、生体に寄与する作用も、花粉症軽減、アトピー性皮膚炎改善、血中コレステロールの低下など様々である²¹⁾。しかし、プロバイオティクスは、食品または健康補助食品と見なされているため、治療薬とは異なり、厳格な臨床試験を受けて

おらず、高齢の免疫不全患者の全身性真菌血症²²⁾など、プロバイオティクスの使用による問題が報告されている²³⁾。そこで、摂取に伴うリスクを最小限に抑えながら、プロバイオティクスと同様のメカニズムを通じて、有益な健康効果を示すポストバイオティクスが注目を集めている²⁴⁾。ポストバイオティクスとは、生物叢の有益な効果が、様々な代謝産物の分泌によって媒介されるという観点に基づき、微生物の代謝活動によって放出または生成され、直接的または間接的に宿主に有益な効果を及ぼす様々な物質といわれている^{23, 24)}。しかし、その正確な定義はまだ議論中であり、決定されていない²⁴⁾。ポストバイオティクスには生きた乳酸菌は含まれないため、プロバイオティクスとは明確に区別され、食物繊維などのプレバイオティクスを代謝したものがポストバイオティクスにあたる (Fig. 0-3)。本研究では、前述したポストバイオティクスに着目し、抗炎症作用を示す乳酸菌株を海洋や漬物など様々な環境からの探索し、その機能検討を細胞および動物実験系にて行い、それらを活用した乳酸菌製品の開発を目指した。

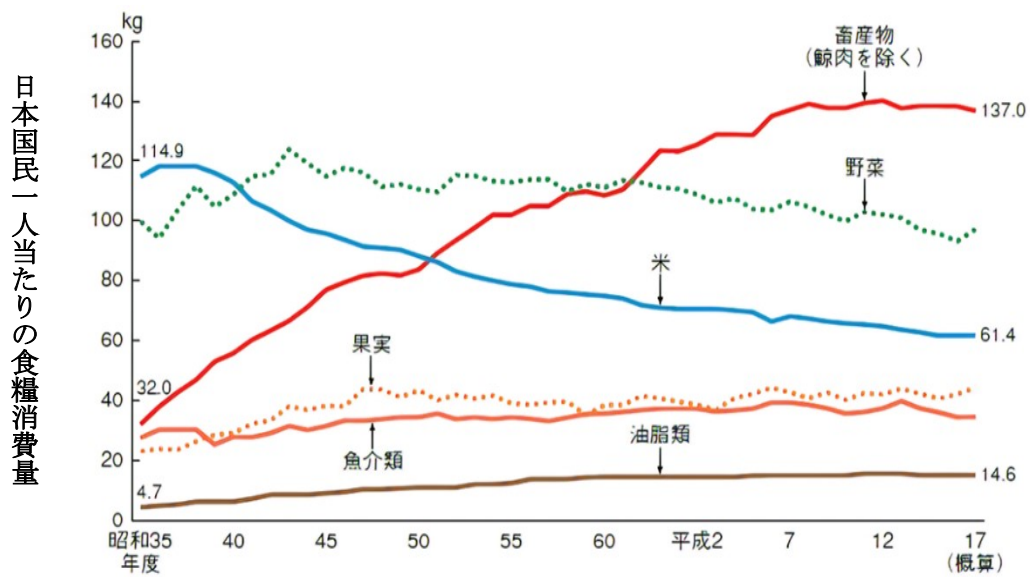
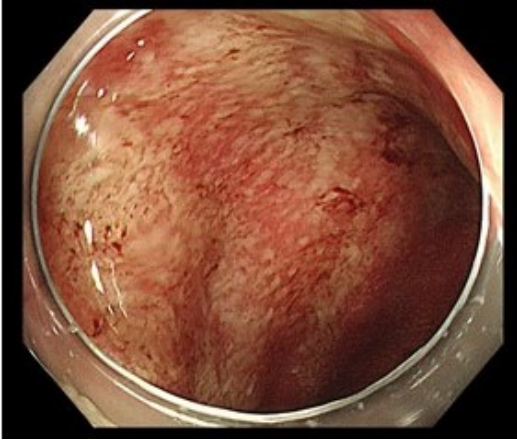
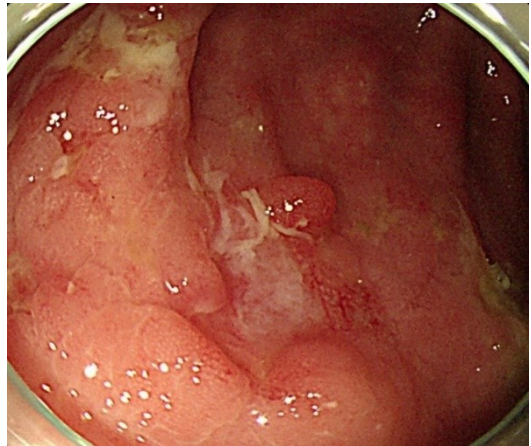


Figure 0-1. The changing Japanese diet⁵⁾. After the end of world war II, Japan's dietary habits have become more westernized, along with an increase in the consumptions of meat and dairy products. Meanwhile, consumption of rice, Japan's traditional staple food, has declined.

(A)



(B)



(C)

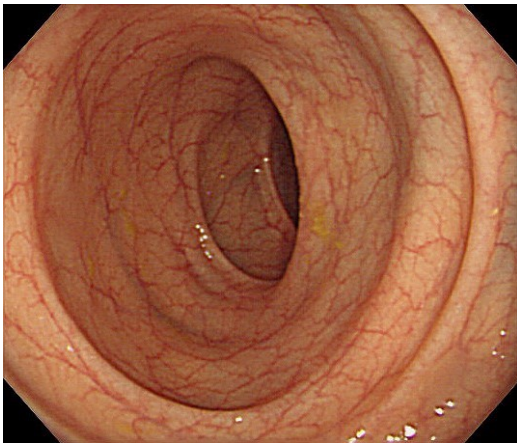


Figure 0-2. Endoscopic picture of the large intestine. (A) intestine of an ulcerative colitis patient; (B) intestine of a Crohn's disease patient; (C) intestine of a healthy subject

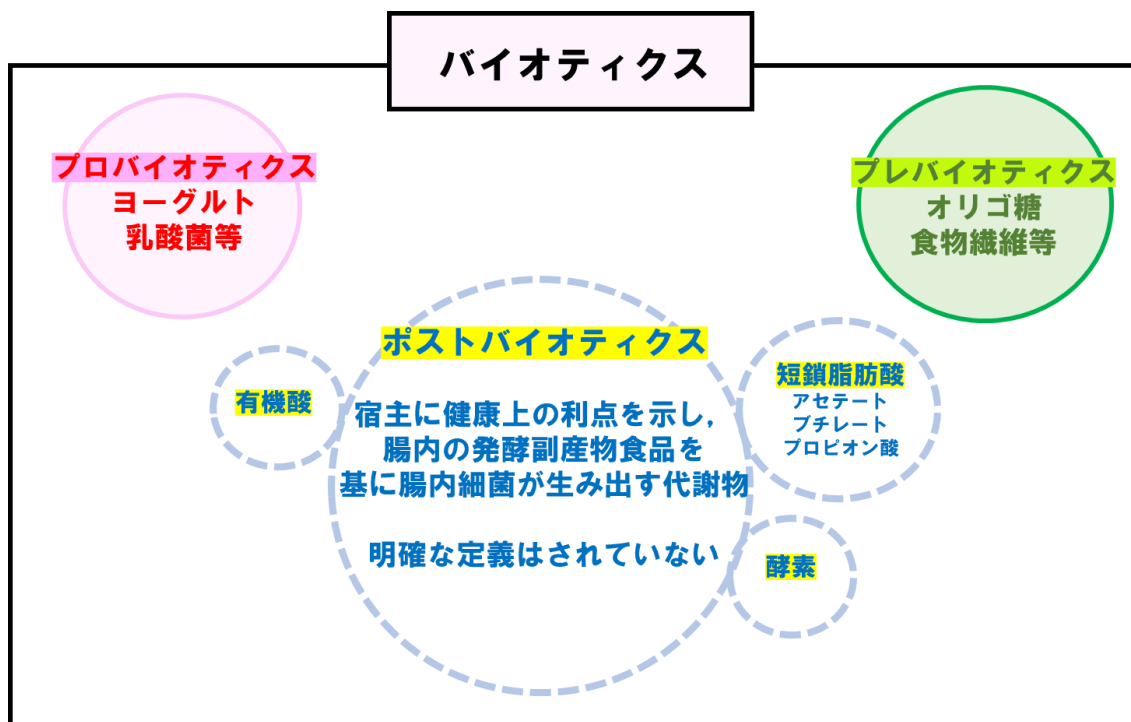


Figure 0-3. The concept of probiotics, prebiotics and postbiotics.

第1章 Caco2細胞-RAW264.7細胞共培養LPS刺激大腸炎モデルを用いた抗炎症誘導乳酸菌株の探索

1. 1. 緒論

腸内フローラのバランスは様々な要因で日々変化するが、その一因として食事内容がある³⁾。腸内フローラを改善するには、野菜や穀物中心の食生活へ変えることや、善玉菌を増やす食品を摂るようにすることが重要であり、腸内環境が我々の健康状態に影響を及ぼす重要な要素の一つであると改めて認識されるようになり、微生物が代謝、産生した代謝物の生理機能に焦点を当てた研究が進んできている。食事由来の成分を基質として、腸内細菌が作り出す宿主に有益な影響を与える代謝物は「ポストバイオティクス」と呼ばれ、このポストバイオティクスの摂取は、腸内環境を改善することから²⁵⁾、食品や医学的応用への期待が高まっている。本研究では、海洋や漬物など様々な環境から抗炎症作用を示す乳酸菌株を探索し、それらを活用した乳酸菌製品の開発を目指した。

1. 2. 材料と方法

1. 2. 1. 供試乳酸菌死菌体について

抗炎症作用を評価した乳酸菌株死菌体の一覧を Table1-1 に示した。乳酸菌の採取場所は、主に果物や漬物など身近な天然環境から単離した（特許の都合により詳細については不記載）。死菌体の調製は、培養菌体液を加圧滅菌装置（HIGH-PRESSUER STEAM STERILIZER BS-325, 株式会社トミー精工, 東京都）にて 121℃, 20 分滅菌処理を行い、凍結乾燥にて粉末化した。また、細胞試験に供するまで-80℃にて保管し、使用時は滅菌水にて溶解した。

1. 2. 2. 細胞培養

マウスマクロファージ RAW264.7 細胞およびヒト小腸上皮細胞株 Caco2 細胞は、共に理化学研究所（茨城県, つくば市）より入手した。RAW264.7 細胞および Caco2 細胞は、10%ウシ胎児血清, 50 U/mL ペニシリンおよび 50 μg/mL スプレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) / HIGH GLUCOSE (GE Healthcare UK Ltd., Amersham Place, England) を用いて 37℃, 95% 空気-5% CO₂ 環境下で培養した。

1. 2. 3. 共培養システムの作製

Caco2 細胞を 2.0×10^5 cells/mL になるように Trans-well インサートプレート

(孔径 0.4 μm , Greiner Bio-One, Kremsmünster, Upper Austria, Austria) に、細胞が完全に単層分化するまで 3 日に 1 度細胞培養培地 (DMEM) を交換した。Caco2 細胞単層の膜の形成は Trans-epithelial electrical resistance (TER 値) を Epithelial electrical resistance meter 装置 (関東化学株式会社, 東京都) を使用して測定し, TER 値 $> 200 \Omega$ となるまで培養を続けた。Caco2 細胞を播種した Trans-well インサートプレートが単層化したことを確認した後, 別に RAW264.7 細胞 (2.0×10^5 cells/mL) を 12 ウェル組織培養プレート (Greiner Bio-One) に 1 mL 播種し, 一晚保管してプレートに完全に接着させた。単層培養した Caco2 細胞の Trans-well インサートプレートを, RAW264.7 細胞を培養した 12 ウェルプレートの各ウェルに移し, Fig. 1-1 に示した共培養システムを構築した。

1. 2. 4. 乳酸菌死菌体処理

1. 1. 1. 項で示した乳酸菌株死菌体による抗炎症評価を, 1. 2. 3. 項にて構築した Caco2 細胞—RAW264.7 細胞共培養モデルにて評価した。頂端膜側 (Caco2 単層側) に PBS (-) で懸濁した各死菌体を 5 μL (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加し, 24 時間前に培養し, 24 時間処理後, 大腸菌由来のリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS, Sigma Aldrich, MO, USA) 1 μL (終濃度 200 ng/mL) 基底膜側に添加し, 24 時間炎症を惹起させた²⁶⁾。LPS 処理後, 基底膜外側, 頂端膜側のそれぞれから培養上清を回収した。

1. 2. 5. 培養培地中に分泌された TNF- α および IL-8 の測定 (ELISA 法)

LPS 刺激により RAW264.7 細胞から培養培地中に分泌された TNF- α の測定は, レビス® Mouse TNF- α ELISA Kit (富士フィルムワコーシバヤギ株式会社, 群馬県, 渋川市) の手順書に従い, 次の手順で行った;

- ①標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液 50 μL , 検体測定ウェルに緩衝液 25 μL , 検体 25 μL をそれぞれ分注し, マイクロプレート振とう機にて攪拌し, プレートシールを貼り, 室温 (20°C~25°C) で 2 時間静置した。
- ②反応終了後, 反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄した。
- ③各ウェルにビオチン結合抗 TNF- α 抗体を 50 μL ずつ分注し, マイクロプレート振とう機にて攪拌し, プレートシールを貼り, 室温で 1 時間静置した。
- ④反応終了後, 反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄した。
- ⑤各ウェルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 50 μL ずつ分注し, マイクロプレート振とう機にて攪拌し, プレートシールを貼り, 室温で 30 分間静置した。
- ⑥反応終了後, 反応液を捨て洗浄液を各ウェルを 4 回洗浄し, ペーパータオルの上でプレートを逆さにし, 軽く叩きつけ, ウェルに残った溶液を取り

除いた。

- ⑦各ウェルに発色液を 50 μ L ずつ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温で 20 分間静置した。
- ⑧各ウェルに反応停止液を 50 μ L ずつ分注し、発色反応を停止した。
- ⑨攪拌後、Varioskan LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientifics Inc., MA, USA) で 450 nm (副波長 620 nm) で吸光度を測定した。

Interleukin-8 (IL-8) 分泌量は Colorimetric Sandwich ELISA Kit Instruction Manual (proteintech Group Inc., IL, USA) の手順書に従い、次のように行った；

- ①マイクロプレートの各ウェルに標準溶液を 100 μ L ずつ分注し、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 2 時間保管した。
- ②反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ③100 μ L の抗体検出溶液を各ウェルに加え、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 1 時間保管した。
- ④反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ⑤100 μ L の HRP 標識抗体を各ウェルに加え、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 40 分間保管した。
- ⑥反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ⑦100 μ L の基質溶液を各ウェルに加え、37°Cで 20 分間保管した。
- ⑧各ウェルに 100 μ L の反応停止液を加え、プレートの側面を軽くたたき混ぜ、450 nm の波長で吸光度を測定した。

1. 2. 6. 定量的リアルタイム PCR

1. 2. 6. 1. 全 RNA の抽出

炎症反応後、頂端膜側の Caco2 細胞、基底膜側の RAW264.7 細胞に、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を 1 mL 加え、セルスクレーパーで細胞をそれぞれ回収した。その後、クロロホルムを 200 μ L 加え、遠心分離 (8,100 \times g, 15 分, 4°C) を行った。上清を別のチューブに移し 2-プロパノールを 500 μ L 加え、10 分間室温で放置して遠心分離 (8,100 \times g, 15 分, 4°C) を行った。遠心後、沈殿物に 75% エタノールを 500 μ L 加え、遠心分離 (5,000 \times g, 5 分, 4°C) を行った。沈殿物を 30 分間室温で乾燥させ、DEPC water を 180 μ L 加え、沈殿物を溶

解させた。溶解後、10×Buffer を 20 μL と DNase を 2 μL 加え、37°Cで1時間保管した。1時間後、酢酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪府、大阪市）を 40 μL とフェノール-クロロホルムを 150 μL 加え遠心分離（8,100 $\times g$, 15分, 4°C）を行った。上清にエタノール 800 μL を加え遠心分離（13,500 $\times g$, 30分, 4°C）を行った。遠心後、沈殿物に 75%エタノールを 500 μL 加え洗浄し、遠心分離（13,500 $\times g$, 15分, 4°C）を行った。その後、沈殿物を1時間室温で乾燥させ、DNase-RNase free water を 20 μL 加え、全 RNA 溶液試料を作製した。全 RNA 溶液試料の RNA 濃度を NanoDrop Lite 分光光度計（Thermo Fisher Scientific）により測定し、RNA 濃度が 250 ng/ μL になるように DNase-RNase free water で試料を調整した。

1. 2. 6. 2. RNA から cDNA への逆転写反応

High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Thermo Fisher Scientific）に構成される 2 \times RT Buffer（10 μL ）と 20 \times RT Enzyme Kit（1 μL ）を混合させた RT master mix に、RNA 濃度が 250 ng/ μL になるように RNA 試料を DNase-RNase free water にて調整し、全量を 20 μL とした。次に、Verti 96 well Thermal Cycler（Thermo Fisher Scientific）を用いて、RNA から cDNA への、逆転写反応を 37°Cで 60分（逆転写反応）、95°Cで 5分（逆転写酵素の熱失活）、4°Cで（保温）で行った。使用したプライマーの塩基配列を Table 1-2 に示した。

1. 2. 6. 3. リアルタイム PCR

リアルタイム PCR 反応液は、Power SYBR Green PCR master mix（Thermo Fisher Scientific）を 10 μL 、DNase-RNase free water 6.4 μL 、cDNA 試料溶液を 2 μL 、DNase-RNase free water で 5倍希釈した 10 μM の各プライマー（タカラバイオ株式会社、滋賀県、草津市）を 0.8 μL 加え、作成した。Fast Optical 48-well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific）に 20 μL /well 入れ、プレートを 48-well Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific）を用いて、PCR 反応を行い、mRNA 量を測定した。PCR 条件は、Holding Stage; 95°Cで 10分、Cycle Stage; 95°Cで 15秒、60°Cで 1分を 45 サイクル行い、Melt Curve Stage; 95°Cで 15秒、60°Cで 1分とした。

1. 2. 7. 統計処理

測定値は、平均 \pm 標準誤差で示した。2 処理群間の比較は Student's-t 検定（* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ v.s. Non-treatment）により行った。多処理群間の比較は、Tukey-Kramer 法（ $p < 0.05$ ）により検定を行った。

Table 1-1. Lactic acid bacteria strains used in screening test and source

No.	Sample name	Bacterial species	Source
1	TN-A1	<i>Lactobacillus brevis</i>	高菜漬け
2	120127C4-2	<i>Lactobacillus brevis</i>	子株漬け
3	161013NA-3	<i>Lactobacillus brevis</i>	ぬか漬け
4	SB-A4	<i>Lactobacillus brevis</i>	しば漬け
5	120127A1-3	<i>Lactobacillus brevis</i>	ぬか漬け
6	GA1-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	たくあん
7	160906KN1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	切込ニシン
8	160906KN4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	切込ニシン
9	160906KO2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	切込大羽
10	120127C6-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	千枚漬け
11	C7-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	つぼ漬けたくあん
12	120127A2-2	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	高菜漬け
13	160906KN3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	切込ニシン
14	120127S1-2	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	つがる漬け
15	120127SB-1	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	野沢菜
16	GB3-1	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	酒粕
17	SB-A2	<i>Lactobacillus pentosus</i>	しば漬け
18	KR-A1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	きゅうり漬け
19	161013NB-3	<i>Lactobacillus pentosus</i>	ぬか漬け
20	160906KH4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	切込ホッケ
21	CN-N1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	きゅうりの糠漬け
22	GB6-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	奈良漬
23	GA9-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	酢漬け
24	MG-A1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	みょうが漬け
25	120127C1-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	つがる漬け
26	120127C5-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	すぐき漬け
27	161013NA-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ぬか漬け
28	161013NB-8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ぬか漬け
29	CB02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	キュウリ
30	120127C4-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	子株漬け
31	161013NA-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ぬか漬け
32	TN-A4	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	高菜漬け
33	160906KN2	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	切込ニシン
34	161013NA-6	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	ぬか漬け
35	16030903EA	<i>Leuconostoc lactis</i>	エノキ
36	16031117AP	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	アスパラ
37	OPLB00426	<i>Lactobacillus sakei</i>	イカジャン
38	OPLB00593	<i>Lactobacillus sakei</i>	ヘチマ 辛子醤油漬
39	OPLB00594	<i>Lactobacillus sakei</i>	発酵食品
40	OPLB00600	<i>Lactobacillus sakei</i>	ニガウリ キムチ漬け
41	OPLB00381	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ウミウチワ属
42	OPLB00409	<i>Lactobacillus plantarum</i>	サンゴ砂
43	OPLB00410	<i>Lactobacillus plantarum</i>	サンゴ砂
44	OPLB00590	<i>Lactobacillus sp.</i>	ラッパモク
45	OPLB00173	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	キュウリ古漬
46	OPLB00179	<i>Lactobacillus brevis</i>	イカわさび
47	OPLB00203	<i>Lactobacillus brevis</i>	パパイヤ 辛子醤油漬け
48	OPLB00241	<i>Lactobacillus brevis</i>	大根漬物
49	OPLB00325	<i>Lactobacillus brevis</i>	キウイフルーツ
50	OPLB00394	<i>Lactobacillus brevis</i>	マイタケ塩漬け

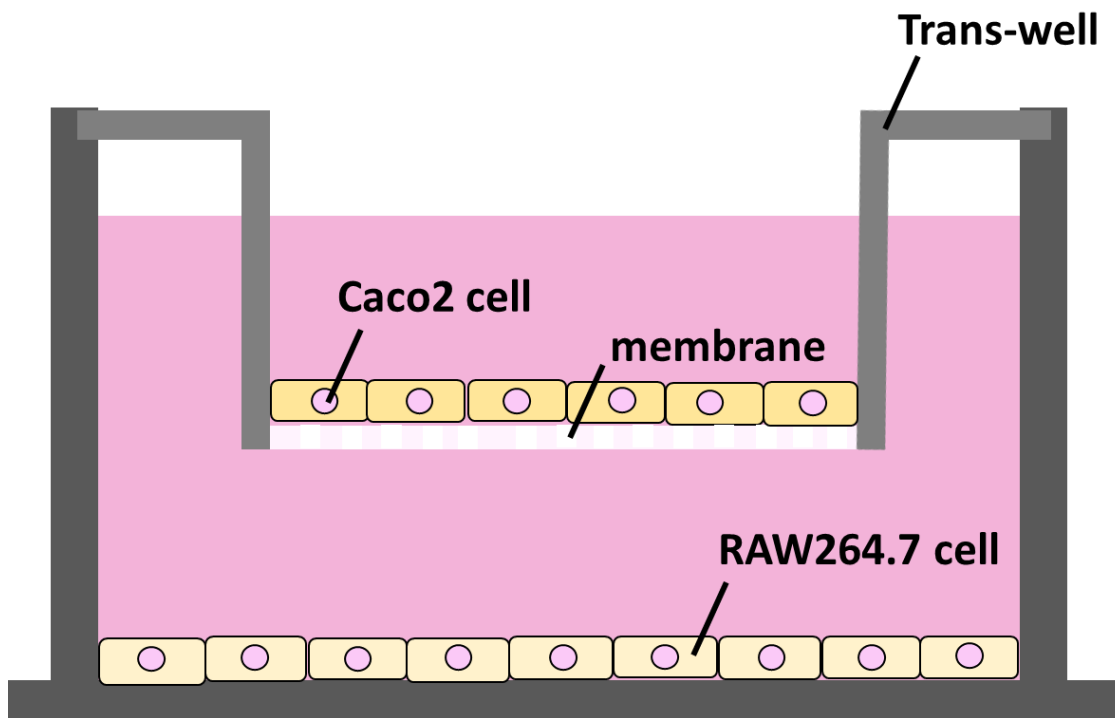


Figure 1-1. Caco2 cell-RAW264.7 cell co-culture system. With the trans-well membrane as the boundary, the upper side is the apical membrane side, the lower side is the basement membrane side. Seed RAW264.7 cells on the basolateral side and Caco2 cells on the apical side.

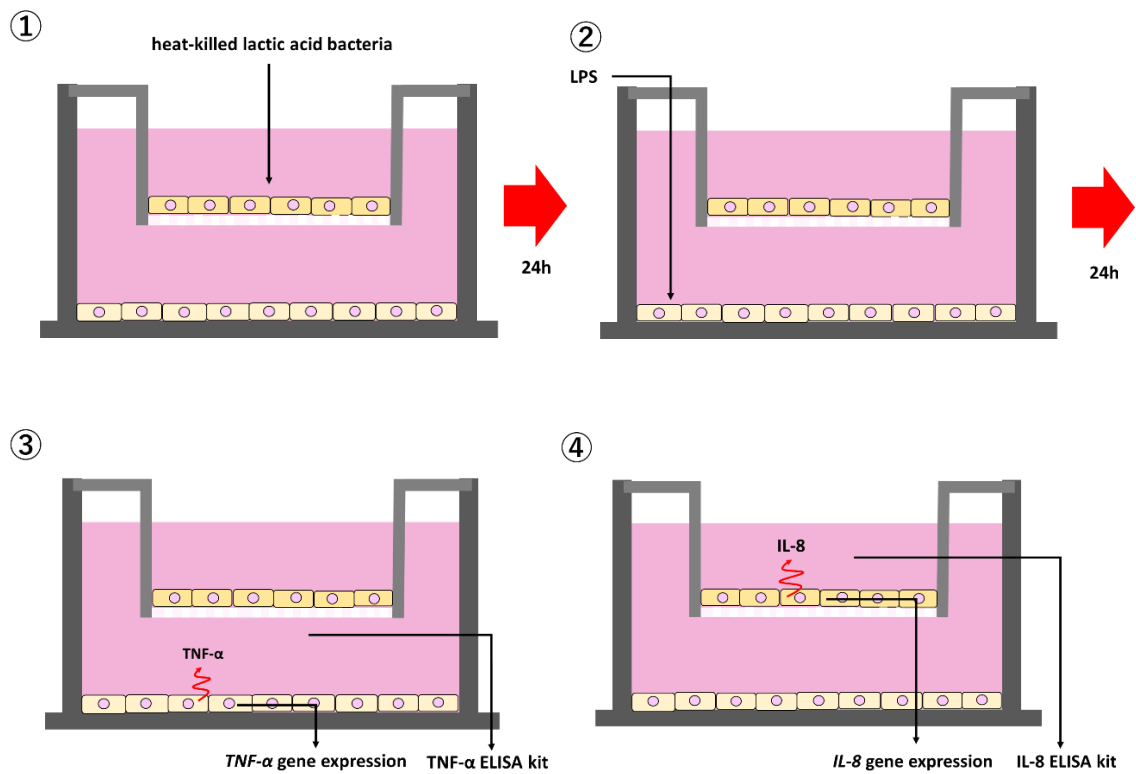


Figure 1-1-2. *In vitro* model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco2 and RAW264.7 cells. ① In an experiment to evaluate the anti-inflammatory effect of heat-killed lactic acid bacteria (hk-Lab), 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of hk-Lab was applied the apical side for 24 h. ② After the treatment of 24 h, LPS was added to the basolateral side in this co-culture cell model. ③ Culture supernatants from the basolateral side and apical side were collected for TNF- α and IL-8 respective measurement, ④ Each cultured-cell was harvested for analysis of TNF- α or IL-8 gene expression.

Table 1-2. Primer sequences used for real-time PCR

Primer sequences		
Gene	Forward	Reverse
<i>TNF-α</i>	5'-AAGCCTGTAGCCACGTCG-3'	5'-GGCACCCTAGTTGGTTGT-3'
<i>IL-8</i>	5'-CAAACCTTCAGAGACAGCAGAGC-3'	5'-GGCCAGCTTGGAAGTCATGTTTA-3'

1. 3. 結果

1. 3. 1. IL-8 分泌量抑制能を示す乳酸菌株死菌体 50 種のスクリーニング

Caco2 細胞-RAW264.7 細胞を用いた Trans-well 共培養システムにて確立した腸管モデルにて、基底膜側に LPS を添加することで大腸炎を誘導させ、Caco2 細胞（頂端膜側）からの IL-8 分泌を抑制する乳酸菌株のスクリーニングを行った。LPS のみを添加することで大腸炎を惹起した LPS (+)処理の IL-8 分泌量と比較すると、死菌体 50 種の乳酸菌株の中で、No. 31（糠漬けから単離された乳酸菌）と No. 43（沖縄県勝連半島の礁地（Fig. 1-3）にて単離された海洋性乳酸菌）がそれぞれ 58%、61%抑制した（Fig. 1-2）。また、これら乳酸菌株死菌体は、16SrRNA 系統分析（v3-v4 領域のシーケンシング解析）により、No. 31 は、*Lactobacillus plantarum*（Rice bran *Lactobacillus plantarum* 以下 RbL と省略）と、No.43 は、*Lactobacillus plantarum*（Marine *Lactobacillus plantarum*、以下 ML と省略）であることが判明し、これら RbL と ML による抗炎症作用の機構について詳細を検討することとした。

1. 3. 2. RbL および ML 死菌体処理による LPS 刺激 RAW264.7 細胞からの TNF- α 分泌の影響および TNF- α の mRNA 発現量の変化

選定した乳酸菌 RbL、ML 死菌体の抗炎症作用の機構を検討するために、LPS にて刺激した RAW264.7 細胞にて生合成される TNF- α の培養液中への分泌量を ELISA 法にて測定し、LPS にて刺激 RAW264.7 細胞における TNF- α の mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、乳酸菌 RbL、ML 死菌体でそれぞれ処理を行った RAW264.7 細胞では、LPS のみ処理を行った細胞と比較して、TNF- α の分泌量に有意差はなかった（Fig. 1-4 (A)）。同様に、LPS 刺激 RAW264.7 細胞内における TNF- α の mRNA の発現量も各群間で有意差はなかった（Fig. 1-4 (B)）。

1. 3. 3. RbL および ML 死菌体処理による Caco2 細胞における IL-8 の mRNA 発現量の変化

乳酸菌 RbL または ML 死菌体による Caco2 細胞からの IL-8 分泌量抑制機構を明らかにするため、Caco2 細胞における IL-8 の mRNA 発現量の変化を検討した。乳酸菌 RbL および ML 死菌体処理は、Caco2 細胞内における IL-8 の mRNA 発現量 LPS のみを加えた試料 LPS (+)と比較して、有意な差はなかった。（Fig. 1-5）。

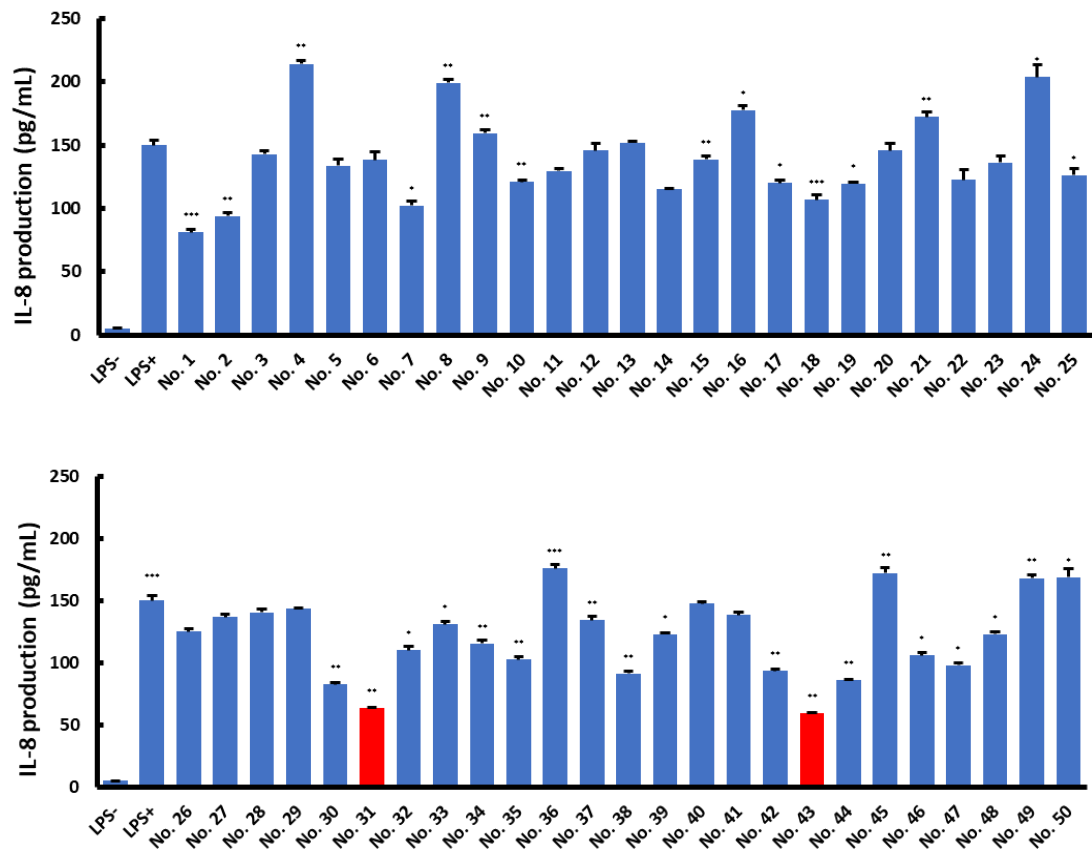
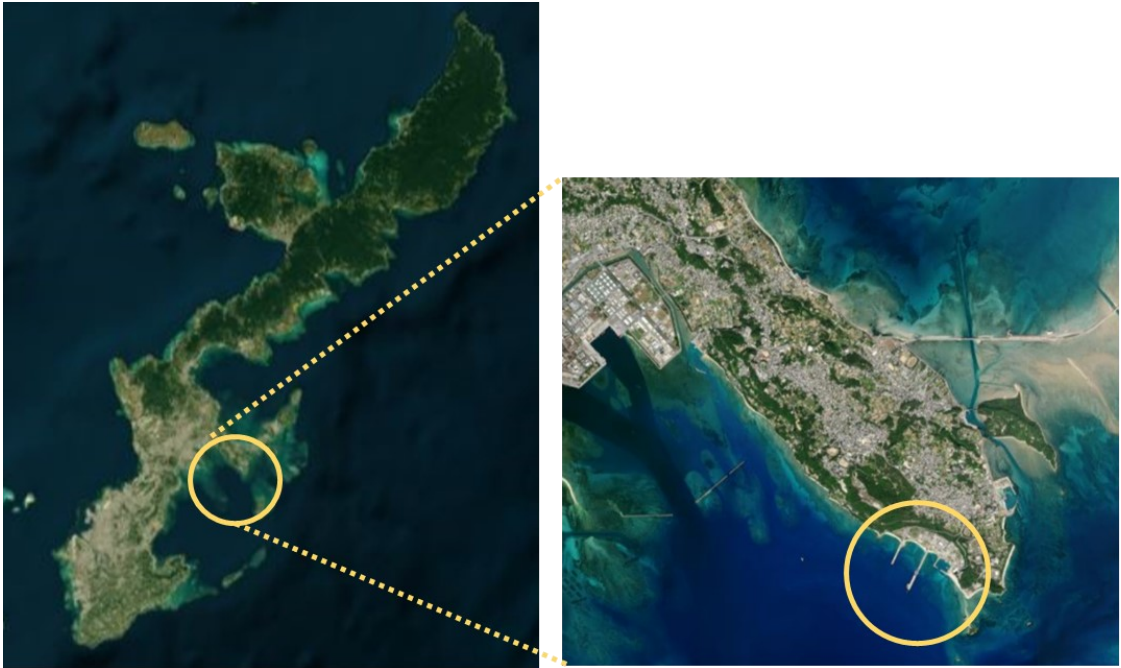


Figure 1-2. The level of IL-8 secretion from Caco2 cells treated with heat-killed lactic acid bacteria. All data are shown as mean \pm standard error. (n = 3) Student's t-test was performed for comparison between the LPS-treated sample and each sample treated with heat-treated killed lactic acid bacteria (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Non-treatment) .



Bing マップから引用

Figure 1-3. Katsuren peninsula in Okinawa prefecture .

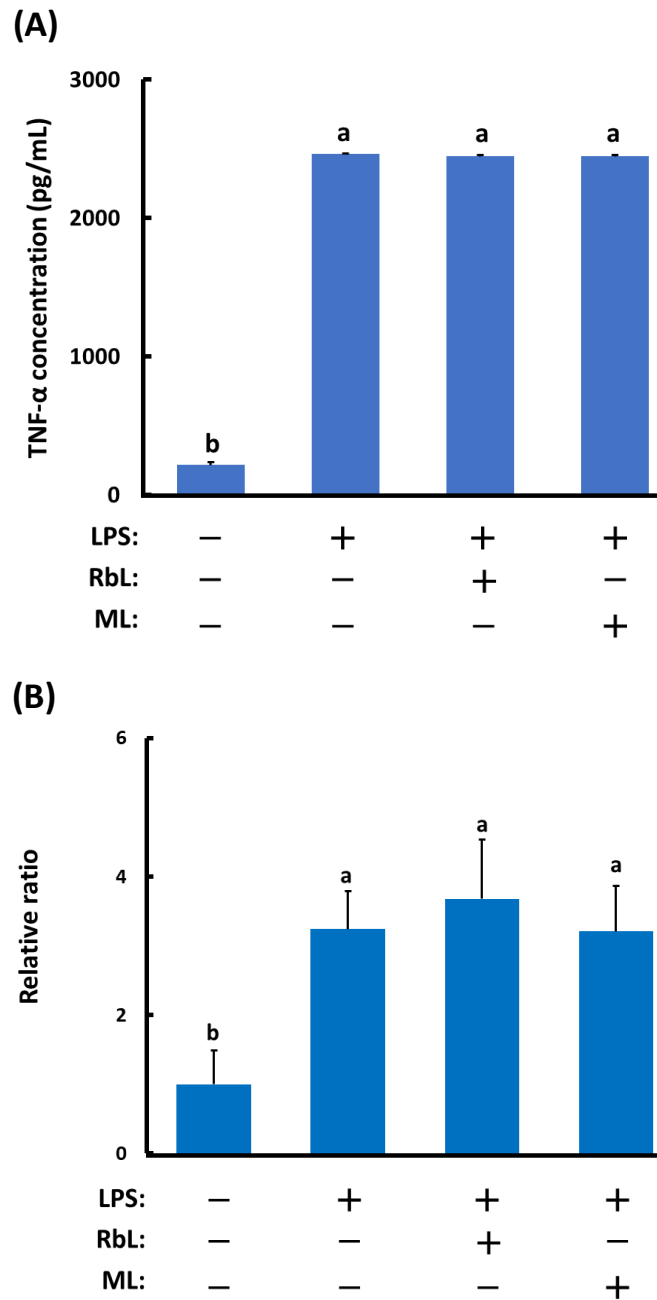


Figure 1-4. Changes in secreted protein and mRNA expression of TNF- α in Caco2/RAW264.7 cells co-culture model. (A) The levels of TNF- α production in medium; (B) The levels of mRNA expression of TNF- α -in LPS-stimulated RAW264.7 cells. All data are shown as mean \pm standard error (n = 3). Multi-group comparisons were tested by the Tukey-Kramer test (p < 0.05).

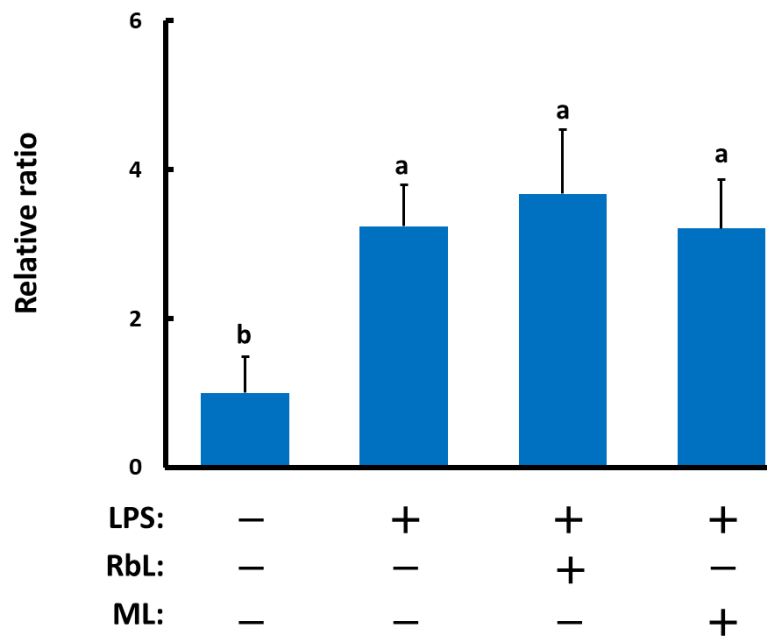


Figure 1-5. Changes in mRNA expression of *IL-8* in Caco2 cells by treatment with heat-killed RbL or ML. All data are shown as Mean \pm standard error (n = 4). Tukey-Kramer test was performed for comparison between multiple groups ($p < 0.05$).

1. 4. 考 察

腸は食事による栄養素を吸収したり，食べ物の最終消化などの機能の他に，粘膜免疫系としての機能を有し，細菌や化学的刺激および酸化ストレスに反応するサイトカインおよびケモカインを分泌する²⁷⁻²⁹⁾。しかし，免疫の働きに異常が起きると炎症性サイトカインは過剰に分泌されることがあり，これらのサイトカインの調節不全はクローン病や潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) の病因となる³⁰⁻³¹⁾。したがって，炎症誘発性サイトカインの分泌を制御することは，正常な腸の定常状態を維持するために重要である^{31, 32)}。IBD は，異常亢進したマクロファージが，過剰な TNF- α などの炎症性サイトカインを分泌し，腸管上皮細胞層に傷害を引き起こすことが腸管免疫系の破綻に起因すると報告されている³³⁾。腸管上皮細胞から分泌される炎症性サイトカインである IL-8 は，単球やマクロファージ，線維芽細胞，内皮細胞，ケラチノサイトなど様々な細胞から分泌される炎症性サイトカインの一種であり³⁴⁾，酸化ストレスや TNF- α などの炎症性サイトカインの炎症刺激によって分泌され，分泌された IL-8 は好中球を腸管上皮細胞層下に誘因・活性化し，腸炎症状をさらに悪化させる。そこで本章では，腸内環境を改善させるポストバイオティクス作用を持つ乳酸菌株に着目し，ヒト腸管上皮細胞 (Caco2 細胞) を TNF- α で刺激した際の IL-8 の分泌を抑制する乳酸菌株を探索した²⁴⁾。その結果，糠漬けから単離した乳酸菌株死菌体である RbL と沖縄県勝連半島の礁地にて単離した乳酸菌株死菌体である ML が IL-8 の分泌を有意に抑制した (Fig. 1-2)。LPS 刺激により，RAW264.7 細胞から培養培地へ分泌された TNF- α は，Caco2 細胞の細胞膜表面に存在する tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR-1) に結合し IL-8 を分泌する³³⁾。したがって，Caco2 細胞から分泌される IL-8 の量は，その合成に関わる TNF- α の濃度に依存することから，乳酸菌死菌体処理が，LPS 刺激された RAW264.7 細胞からの TNF- α 分泌量に影響を与えていないか ELISA 法にて確認した。しかし，乳酸菌 RbL および ML 死菌体処理により LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの TNF- α の分泌量に変化はなく，TNF- α の生合成や分泌に影響を与えないことが示唆された。LPS のみを加えた LPS (+)-RAW264.7 細胞と乳酸菌 RbL または ML 死菌体にて処理を行った RAW264.7 細胞からは同等量の TNF- α が分泌され，Caco2 細胞が刺激されているにもかかわらず，Caco2 細胞からの IL-8 の分泌量が乳酸菌 RbL または ML 死菌体処理を行った場合に抑制されていたことから (Fig.1-3 および 1-4)，乳酸菌 RbL および ML 死菌体処理は，RAW264.7 細胞から分泌された TNF- α を Caco2 細胞膜表面に存在する TNFR-1 が受容した後，Caco2 細胞から IL-8 が分泌されるまでの機構に影響を与えているものと推察された。そこで，次に乳酸菌 RbL および ML 死

菌体処理が Caco2 細胞内における *IL-8* 遺伝子の発現に影響を与えることで、*IL-8* の合成が抑えられ、分泌量が減少したのではないかと作業仮説を立て、Caco2 細胞内における *IL-8* の mRNA の発現量と LPS 刺激 RAW264.7 細胞内の *TNF- α* 遺伝子の発現量をそれぞれ解析した。その結果、Caco2 細胞内の *IL-8* 遺伝子の発現量や、RAW264.7 細胞内における *TNF- α* 遺伝子の発現量は、LPS のみを加えた試料 LPS (+)と比較して、その発現量に差がなかった。

細胞接着分子は、隣接する腸上皮細胞の隙間を塞ぎ、抗原や微生物などの物質を内腔に留めていることや³⁵⁾、DSS 誘発性大腸炎において、Claudin, Zo-1, Occludin などの細胞接着分子のタンパク質の発現が増進した際に、*TNF- α* の分泌量が抑制される報告もある³⁶⁾。以上の結果から、この RbL および ML 死菌体処理による Caco2 細胞からの *IL-8* の分泌阻害は、Occludin, Claudin や Zo-1 といった細胞接着分子の発現を上方制御したことによるものではないかと推察された。また、乳酸菌の表層は Fig. 1-6 のような構造を形成しており、多様な成分が存在する。細胞膜の外側に、糖とアミノ酸が網目状に結合した厚いペプチドグリカン層 (PG) をもち、これに菌体外多糖、リポテイコ酸や表層タンパク質などが結合または挿入された状態で保持されている³⁷⁾。本章では、RbL および ML 乳酸菌死菌体を Caco2 細胞を播種した頂端膜側に処理したことから、これら死菌体の菌体外多糖類が Caco2 細胞の細胞膜表面に提示している Toll 様受容体を介して *IL-8* の遺伝子およびタンパク質の発現または分泌に変化を与えていることも考えられたが、本章 Fig.1-5 より RbL および ML 死菌体処理した Caco2 細胞内において、*IL-8* 遺伝子の発現量には、有意差がなかったことから、RbL および ML 死菌体処理は *IL-8* の遺伝子発現には影響を与えていないと推察できる。よって RbL および ML 死菌体処理は前述したとおり、Caco2 細胞からの *IL-8* の分泌阻害は、Occludin, Claudin や Zo-1 といった細胞接着分子の発現誘導によるもの、もしくは *IL-8* の翻訳阻害であると推察された。

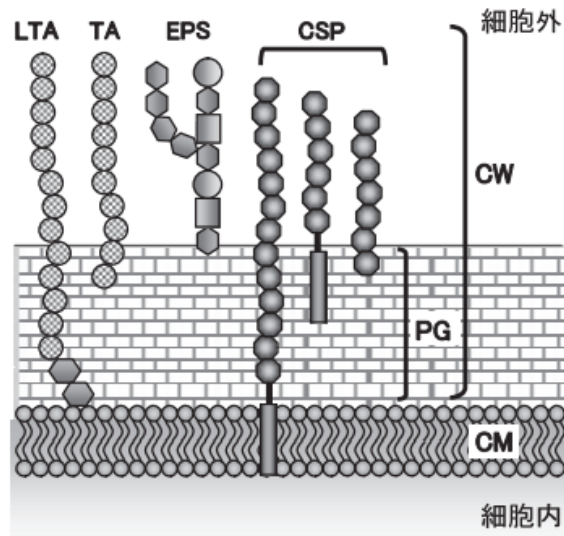


Figure 1-6. Surface layer component of lactic acid bacteria³⁷⁾ LTA : lipoteichoic acid, TA : teichoic acid, EPS : exopolysaccharide, CSP : Surface protein, PG : peptidoglycan, CW : cell walls, CM : cell membrane

第 2 章 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける ML および RbL の影響

2. 1. 緒 論

第 1 章では、天然環境に存在する 50 種の乳酸菌株の死菌体を Caco2-Raw264.7 細胞共培養大腸炎モデル細胞評価系を用いて、抗炎症効果の高い乳酸菌株の死菌体のスクリーニング試験を行い、海洋環境から単離した乳酸菌 (ML) および糠漬けから単離した乳酸菌 (RbL) の 2 種類に絞り込んだ。本章では、デキストラン硫酸ナトリウム (Dextran Sodium Sulfate ; 以下 DSS) により炎症を惹起した大腸炎誘発マウスを用いた動物実験において、この 2 種類の乳酸菌株の死菌体の大腸炎抑制作用の評価を試みた。

2. 2. 実験材料および実験方法

2. 2. 1. 実験動物

C57BL/6J cl マウス (雄性, 7 週齢, 体重 21~23 g, 日本クレア株式会社, 東京都) を使用し, それぞれ 4 匹/ケージ, 6 処理群に平均体重が各処理群で均一になるように群分けした。(1 ケージ, Control マウス; 2 ケージ, Control-DSS 投与マウス; 3 ケージ, ML 投与マウス; 4 ケージ, RbL 投与マウス; 5 ケージ, ML+DSS 投与マウス; 6 ケージ, RbL+DSS 投与マウス)。それぞれのマウスは, 温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\pm 5\%$, 7 時~19 時の 12 時間の明暗サイクルで SPF (Specific-Pathogen Free) 環境下にて飼育した。馴化のための予備飼育期間は 1 週間行った。予備飼育期間 (全群) および Control 処理群には, CE-2 (日本クレア株式会社) および蒸留水を自由摂食させた。試験スケジュールは, 予備飼育期間の 1 週間後, 0-1 週は各種乳酸菌死菌体を 1% 含有した試験食を給餌し, 1-2 週は試験食を引き続き継続給餌するとともに, 炎症誘導剤である DSS を蒸留水に溶解した 1% DSS 水をマウスに与え, 3-4 週には, 飲料水を再び蒸留水に切り替えた。

2. 2. 2. 血液試料と結腸組織の回収

2. 2. 2. 1. 血液試料の回収

試験期間終了日に, 麻酔箱にペーパータオルを敷き, イソフルラン (富士フィルム和光純薬株式会社) の過剰麻酔にて屠殺した。マウスの呼吸が浅く速い呼吸から深く遅い呼吸に移行したことを確認した後に, マウスの血液を全量, 1mL テルモシリンジ (TERUMO 株式会社, 東京) にて採取した。その後, 血液試料を, 遠心分離 ($15,000 \times g$, 30 分, 4°C) し, 上清を回収し, -30°C で冷凍保

存した。

2. 2. 2. 2. 結腸組織の回収

マウスの屠殺後、結腸の回収を行い、結腸の長さの測定を行った。回収した結腸の一部（1.0 cm）を 10 %中性緩衝ホルマリン液（富士フィルム和光純薬株式会社）にて、パラフィン処理した。その後、マイクロトームスライド（4 μm 厚）にて観察切片を作製後、回収した。その後、Hematoxyrin & Eosin（H&E）染色を行い、組織切片の顕微鏡解析に用いた（BZ-X800, キーエンス, 大阪府, 大阪市）。また、残りの結腸試料は RNA protect® Tissue Reagent（QIAGEN N.V., Venlo, Netherland）にて固定保存した。

2. 2. 3. Disease Activity Index（DAI）スコアの算出

大腸炎の重症度は、体重減少、便の硬さ、便血の三つの観点に基いた DAI スコアを毎日観察して評価した。各観点のスコア付けの基準は、Table 2-1 に示した。

2. 2. 4. Histological Activity Index（HAI）スコアの算出

結腸組織における大腸炎の重症度は、マウスの結腸組織断片をヘマトキシリンおよびエオシン染色を行った後に、顕微鏡観察にて、杯細胞の喪失、炎症性細胞の浸潤、上皮細胞の喪失の三つの観点に基いた HAI スコアを算出し、評価した。各観点のスコア付けの基準は、Table 2-2 に示した。

2. 2. 5. 血中サイトカイン量の測定

血中 TNF-α 量の測定は、レビス® Mouse TNF-α ELISA Kit（富士フィルムワコーシバヤギ株式会社, 群馬県, 渋川市）の手順書に従い、次の手順で行った；

- ①標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液 50 μL, 検体測定ウェルに緩衝液 25 μL, 検体 25 μL をそれぞれ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温（20°C~25°C）で 2 時間静置した。
- ②反応終了後、反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄した。
- ③各ウェルにビオチン結合抗 TNF-α 抗体を 50 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温で 1 時間静置した。
- ④反応終了後、反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄した。
- ⑤各ウェルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 50 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温で 30 分間静置した。
- ⑥反応終了後、反応液を捨て洗浄液で各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオル

ルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。

- ⑦各ウェルに発色液を 50 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温で 20 分間静置した。
- ⑧各ウェルに反応停止液を 50 μL ずつ分注し、発色反応を停止した。
- ⑨攪拌後、Varioskan LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientifics, MA, USA) で 450 nm (副波長 620 nm) で吸光度を測定した。

血中 Interleukin-8 (IL-8) 量は Colorimetric Sandwich ELISA Kit Instruction Manual (Proteintech, IL, USA) の手順書に従い、次のように行った；

- ①マイクロプレートの各ウェルに標準溶液を 100 μL ずつ分注し、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 2 時間保管した。
- ②反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ③100 μL の抗体検出溶液を各ウェルに加え、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 1 時間保管した。
- ④反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ⑤100 μL の HRP 標識抗体を各ウェルに加え、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 40 分間保管した。
- ⑥反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ⑦100 μL の基質溶液を各ウェルに加え、37°Cで 20 分間保管した。
- ⑧各ウェルに 100 μL の反応停止液を加え、プレートの側面を軽くたたき混ぜ、450 nm の波長で吸光度を測定した。

血中 IFN- β 量の測定は、Quantikine[®] ELISA Mouse INF- β (R&D SYSTEMS abiatechne brand, MN, USA) の手順書に従い、次の手順で行った；

- ① 各ウェルに Assay Diluent RD1W を 50 μL 、標準溶液または検体 25 μL をそれぞれ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温 (20°C~25°C) で 2 時間静置した。
- ② 反応終了後、反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄した。
- ③ 各ウェルに Mouse IFN- β Conjuate を 100 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温で 2 時間静置した。
- ④ 反応終了後、反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄した。

- ⑤ 各ウェルに Substrate Solution を 100 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう機械にて攪拌し、プレートシールを貼り、光を避けた状態で室温で 30 分間静置した。
- ⑥ 各ウェルに反応停止液を 50 μL ずつ分注し、発色反応を停止した。
- ⑦ 各ウェルに Stop Solution を 100 μL ずつ分注し、発色反応を停止した。
- ⑧ 攪拌後、450 nm (副波長 540 nm) で吸光度を測定した。

血中 Interleukin-6 (IL-6) および血中 Interleukin-10 (IL-10) 量は Colorimetric Sandwich ELISA Kit Instruction Manual (Proteintech, IL, USA) の手順書に従い、次のように行った；

- ①マイクロプレートの各ウェルに標準溶液を 100 μL ずつ分注し、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 2 時間保管した。
- ②反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ③100 μL の抗体検出溶液を各ウェルに加え、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 1 時間保管した。
- ④反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ⑤100 μL の HRP 標識抗体を各ウェルに加え、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 40 分間保管した。
- ⑥反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを 4 回洗浄し、ペーパータオルの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけ、ウェルに残った溶液を取り除いた。
- ⑦100 μL の基質溶液を各ウェルに加え、37°Cで 20 分間保管した。
- ⑧各ウェルに 100 μL の反応停止液を加え、プレートの側面を軽くたたき混ぜ、450 nm の波長で吸光度を測定した。

2. 2. 6. マウス結腸組織からの全 RNA 抽出

全 RNA 抽出は、RNeasy Plus Micro Kit (50) (QIAGEN) の手順書に従い、次の手順で行った。2. 2. 2. 2. 項に示した RNA protect® Tissue Reagent にて保管した結腸組織を、2 mm 大の鉄球ビーズが入った滅菌チューブに適量加え、TAITEC BEAD CRUSHER MT-01 にて 4,000 rpm/分で 2 分間破砕した。溶解液を遠心分離 (12,000 \times g, 30 秒, 4°C) した後に、上清を取り除き、1.5 mL の溶解液をコレクションチューブに接続された gDNA 除去剤スピンカラムへ移した。その後、遠心分離 (12,000 \times g, 30 秒, 4°C) し、カラムを通過した回収液に 600 μL の 70 % エタノールを加え、ピペットにて攪拌した。次に、700 μL の試料を 1.5 mL のコレクションチューブに加え、RNeasy スピンカラムへ移し、遠心分離 (12,000 \times

g, 15 秒, 4°C) した後に, 溶出した液体を破棄した。700 μ L の Buffer RW1 を 1.5 mL のコレクションチューブ内にある RNeasy mini spin カラムに加え, 遠心分離 (12,000 \times g, 15 秒, 4°C) し, 溶出した液体を破棄した。500 μ L の Buffer RPE を RNeasy spin カラムに加え, 遠心分離 (12,000 \times g, 15 秒, 4°C) した後に, 溶出した液体を破棄した。次に, 500 μ L の Buffer RPE を RNeasy spin カラムに加え, 遠心分離 (12,000 \times g, 2 分, 4°C) し, 溶出した液体を破棄した。その後, RNeasy spin カラムを新しい 1.5 mL コレクションチューブに加え, 30 μ L の RNase-free water を spin カラムメンブレンへ加え, 遠心分離 (12,000 \times g, 1 分, 4°C) し, RNA を溶出した。最後に, 全 RNA 溶液試料の RNA 濃度を Nano Drop Lite 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) により測定し, RNA 濃度が 125 ng/ μ L になるように DNase-RNase free water で試料を調整した。

2. 2. 7. 逆転写反応

High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) に構成される 2 \times RT Buffer (10 μ L) と 20 \times RT Enzyme Kit (1 μ L) を混合させた RT master mix に, 2. 2. 6. 項にて調製した各 RNA 試料を加え, 全量を 20 μ L とした。次に, Verti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) を用いて, RNA から cDNA への, 逆転写反応を 37°C で 60 分 (逆転写反応), 95°C で 5 分 (逆転写酵素の熱失活), 4°C で (保温) で行った。使用したプライマーの塩基配列を Table 2-3 に示した。

2. 2. 8. リアルタイム PCR

Power SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) を 10 μ L, DNase-RNase free water 6.4 μ L, cDNA 試料溶液を 2 μ L, Forward と Reverse の各プライマー (10 μ M) (タカラバイオ株式会社, 滋賀県, 草津市) を 0.8 μ L 加え, 全体で 20 μ L のリアルタイム PCR 反応液を作成した。Fast Optical 48-well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) に 20 μ L/well 入れ, プレートに 48-well Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific) を用いて, PCR 反応を行い, mRNA 量を測定した。PCR 条件は, Holding Stage; 95°C で 10 分, Cycle Stage; 95°C で 15 秒, 60°C で 1 分を 45 サイクル行い, Melt Curve Stage; 95°C で 15 秒, 60°C で 1 分とした。

2. 2. 9. 血中 Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

MPO 測定は, MPO Fluorometric Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, CO., St. Louis, MO, USA) の手順書に従い, 次のように行った;

キット内の Master reaction Mix を作製し, 50 μ L の Master reaction Mix を各ウ

エルに加え、よくピペットにて攪拌させた後、カバーシールで覆い、光を避け、室温で2分間静置した。2分後、Varioskan LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientifics, MA, USA) で 525 nm で吸光度を測定した。(T initial) 再び室温で静置し続け、5分ごとに 525 nm で吸光度を測定した。

2. 2. 10. 糞中 IgA の測定

2. 2. 10. 1. 糞便試料の調製

採取した糞便試料は 15 mL チューブに取り、小型凍結乾燥機 FDS-1000 (東京理化学工業株式会社、東京都) にて、凍結乾燥した。その後、滅菌スクリーキャップマイクロチューブに 2 mm 大の鉄球ビーズと糞試料を適量加え、TAITEC BEAD CRUSHER MT-01 (タイテック株式会社、埼玉県、越谷市) にて 4,000 rpm /分で 2 分間破碎し、粉末状にした。その後、粉末糞便 500 mg に対して PBS(-)を 2.5 mL 加え、溶解した後、適度にボルテックスを行い、遠心分離 (15,000 × g, 4°C, 10 分) した。その後、上清を取り、-30°Cで冷凍保存した。

2. 2. 10. 2. 分泌型免疫グロブリン (immunoglobulin A, IgA) 量の測定

分泌 IgA 量は、Mouse IgA ELISA Kit (Bethyl Laboratories Inc., TX, USA) の手順書に従い、次のように行った；

- ① 各ウェルに 2.2.10.1. 項で示した方法により調製した糞便試料 100 μL をそれぞれ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温 (20°C~25°C) で 1 時間静置した。
- ② 反応終了後、反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを洗浄した (4 回)。
- ③ 各ウェルに IgA 検出抗体を 100 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、37°Cの湿度の高い環境下で 1 時間保管した。
- ④ 反応終了後、反応液を捨て洗浄液にて各ウェルを洗浄した (4 回)。
- ⑤ 各ウェルに HRP 標識抗体を 100 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう機にて攪拌し、プレートシールを貼り、室温で 1 時間静置した。
- ⑥ 各ウェルに TMB 溶液を 100 μL ずつ分注し、光を避け、常温で 30 分間静置した。
- ⑦ 反応終了後、各ウェルに反応停止液を 100 μL ずつ分注し、発色反応を停止した。
- ⑧ 攪拌後、450 nm (副波長 540 nm) で吸光度を測定した。

2. 2. 11. 統計処理

測定値は、平均±標準誤差で示した。他群間の処理は Duncan 法 ($p < 0.05$) により、それぞれ有意差の測定を行った。

Table 2-1 DAI score points and criterion

Score	Weight loss rate	Flight status	Stool consistency
0	None	Normal	Normal
1	Minimal (less than 5%)	blood on the surface	loose stool
2	Mild (5%~10%)	total bleeding	diarrhea
3	Moderate (10%~15%)		
4	Marked (more than 15%)		

Table 2-2. HAI score points and criterion

Score	Loss of goblet cells	Infiltration of inflammatory cells	Loss of epithelial cells
0	None	None	None
1	Minimal (less than 10%)	Minimal (less than 2.5%)	Minimal (less than 5%)
2	Mild (10%~20%)	Mild (2.5%~5%)	Mild (5%~10%)
3	Marked (more than 20%)	Marked (more than 5%)	Marked (more than 10%)

Table 2-3. Primer sequences for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>TNF-α</i>	5'-AAGCCTGTAGCCCACGTCG-3'	5'-GGCACCCTAGTTGGTTGT-3'
<i>IL-8</i>	5'-CAAACCTTCAGAGACAGCAGAGC-3'	5'-GGCCAGCTTGGAAAGTCATGTTTA-3'
<i>IFN-β</i>	5'-AAGCAGCTCCAGCTCCAAGAA-3'	5'-TTGAAGTCCGCCCTGTAGGTG-3'
<i>IL-6</i>	5'-CAACGATGCACTTGACAGA-3'	5'-CTCCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3'
<i>IL-10</i>	5'-GCCAGAGCCACATGCTCCTA-3'	5'-GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA-3'
<i>CLDN</i>	5'-TCTATGCACATGCCTTCAAC-3'	5'-AGGCCATGCACAGCTGGAT-3'
<i>OCLN</i>	5'-AAGGTCCTGGTGTGAGCTGT-3'	5'-AGGGCTGCTGCAAGATTGATTAG-3'
<i>ZO-1</i>	5'-GTTGGAGCCAACCTGTGTTTC-3'	5'-GTTCAATCCACGTTTACATTGCTTA-3'

2. 3. 結果

2. 3. 1. ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける体重, 摂餌量, 摂水量および DAI スコア変化

体重は, Control-DSS 処理群において, Control 処理群と比較して, 19 日目に体重が 12%減少した (Fig. 2-1 (A))。試験終了時の摂餌量, 摂水量は各々 2.5 g, 2.8 g それぞれ減少した。(Fig. 2-1 (B)-(C))。炎症の程度を点数付けした試験終了時の DAI スコアは, Control-DSS 処理群で 6.75 点, DSS-ML 処理群で 4.75 点, DSS-RbL 処理群で 6.25 点であった。結腸の長さは, Control-DSS 処理群では, Control 処理群と比較して, 0.74 倍に短縮化した。一方, ML-DSS 処理群では, Control-DSS 処理群と比較して, 0.88 倍に短縮化し, RbL-DSS 処理群では, 0.84 倍に短縮化した (Fig. 2-1 (E))。ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発大腸炎マウスにおける結腸組織切片の顕微鏡観察を行ったところ, Control-DSS 処理群, ML-DSS 処理群, RbL 処理群において, 広範囲で杯細胞の喪失, 炎症性細胞の浸潤, 上皮細胞の喪失が確認された (Fig. 2-2 (A)-(C))。また, これら組織学的変化をスコア化した HAI スコアは, Control-DSS 処理群で 4 点, ML-DSS 処理群で 6 点, RbL-DSS 処理群で 5.75 点であり, DSS-ML 処理群と DSS-RbL 処理群は, Control-DSS 処理群と比較して, 各炎症の点数に変化がなかった (Fig. 2-2 (D))。

2. 3. 2. ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発大腸炎マウスにおける結腸組織のサイトカイン遺伝子の発現変化

結腸組織における *TNF- α* および *IL-6* 遺伝子の発現量は, Control-DSS 処理群では, Control 処理群と比較して, 9.4 倍, *IL-6* は 651.8 倍上昇した。ML-DSS 処理群では, Control-DSS 処理群と比較して, *TNF- α* は 0.42 倍, *IL-6* は 0.67 倍に低下した。*IL-8*, *IFN- β* 遺伝子の発現量は Control-DSS 処理群, RbL-DSS 処理群, ML-DSS 処理の 3 群間で変化はなかった。また, 抗炎症性サイトカインである *IL-10* 遺伝子の発現量は, Control-DSS 処理では, Control 処理群と比較して, 26.7 倍上昇し, ML-DSS 処理では, 0.27 倍, RbL-DSS 処理群では, 0.67 倍に低下した (Fig. 2-3)。

2. 3. 3. ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける血中サイトカイン量変化

結腸組織における各サイトカイン遺伝子の発現量は, ML および RbL 給餌により, Control-DSS 処理群と比較して, 2. 3. 2. 項のように変化した。次に, ML および RbL によるこれらサイトカインの血中濃度について解析した。TNF- α 量

は、Control-DSS 処理群、RbL-DSS 処理群、ML-DSS 処理の 3 群間で変化はなかった。IL-6, IFN- β 量は、Control-DSS 処理により、Control 処理群と比較して、それぞれ 2.2 倍, 1.7 倍上昇したが、ML-DSS 処理では、Control-DSS 処理群と比較して、IL-6, IFN- β 量がそれぞれ 0.34 倍, 0.39 倍に低下し、RbL-DSS 処理群では、Control-DSS 処理群と比較して、IL-6, IFN- β 量がそれぞれ 0.38 倍, 0.4 倍に低下した。IL-10 量は、Control-DSS 処理群、Control 処理の 2 群間で変化はなかったが、ML-DSS 処理では、Control-DSS 処理群と比較して、0.47 倍に低下し、RbL-DSS 処理群では、0.49 倍に低下した (Fig. 2-4)。

2. 3. 4. ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスの結腸組織における細接着分子遺伝子群の発現量変化

腸の細胞接着分子によるバリアは、内腔と内部環境の間の高分子の輸送を調節し、有害な溶質、微生物、毒素、および内腔の抗原が体の防御メカニズムを損なうのを防ぐことによって宿主を保護する³⁴⁾。Fig. 2-2 に示したように、結腸組織は、DSS 処理により破壊されていたため、結腸組織における細胞間の崩壊具合を検証するため、細胞接着分子の遺伝子群の発現量を定量的リアルタイム PCR 法にて解析した。*Occludin* 遺伝子の発現量は、Control-DSS 処理により、Control 処理群と比較して、0.29 倍に低下したが、ML-DSS 処理群および RbL-DSS 処理群では、変化がなかった。*Zo-1* 遺伝子の発現量は、Control-DSS 処理により、Control 処理群と比較して、0.63 倍に低下し、ML-DSS 処理では、0.44 倍に低下し、RbL-DSS 処理では、0.1 倍に低下した。*Claudin* 遺伝子の発現量は、Control-DSS 処理では、Control 処理群と比較して、1.5 倍上昇し、ML-DSS 処理では、2 倍上昇したが、RbL-DSS 処理では、0.29 倍に低下した (Fig. 2-5)。

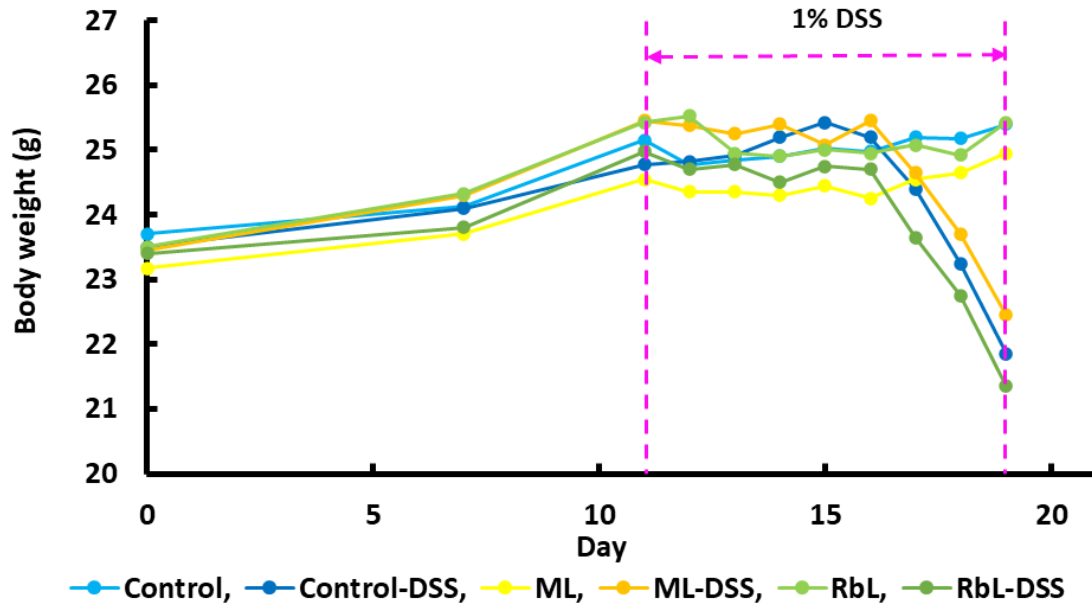
2. 3. 5. ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける血中 MPO 活性への影響

MPO は一種のヘムタンパク質であり、炎症刺激によって引き起こされる好中球の蓄積と分散によって放出され、MPO 値の増加は、炎症反応を示し、MPO 活性の減少は、炎症組織における好中球凝集の減少を表す³⁵⁾。MPO 活性は、Control-DSS 処理群では、Control 処理群と比較して、0.69 倍に低下した。また、ML 処理群および RbL 処理群では、Control 処理群と比較して、それぞれ 0.7 倍, 0.52 倍に低下した。一方、ML-DSS 処理群では、同程度の MPO 活性を示したが、RbL-DSS 処理群では、Control-DSS 処理群と比較して、1.8 倍上昇した (Fig. 2-6)。

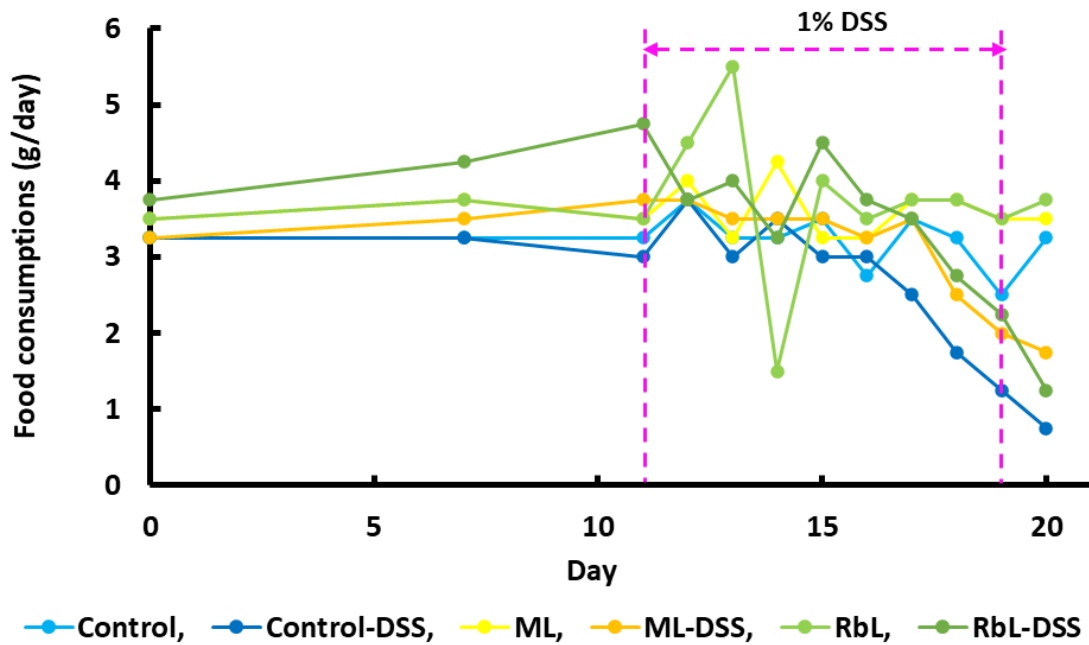
2. 3. 6. ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスの糞中分泌 IgA 量への影響

糞中における分泌 IgA 量は、B 細胞が産生する抗体の一種であり、炎症が惹起すると、主に腸管などの粘膜免疫系で産生され、粘膜上の細菌、ウイルスや毒素などが、肝臓や脾臓に移行することを抑制することが知られている³⁶⁾。Control-DSS 処理では、Control 処理群と比較して、1.9 倍に上昇した。また、ML-DSS 処理および RbL-DSS 処理群では、Control-DSS 処理群と比較して、1.6 倍に上昇した (Fig. 2-7)。

(A) Body weight

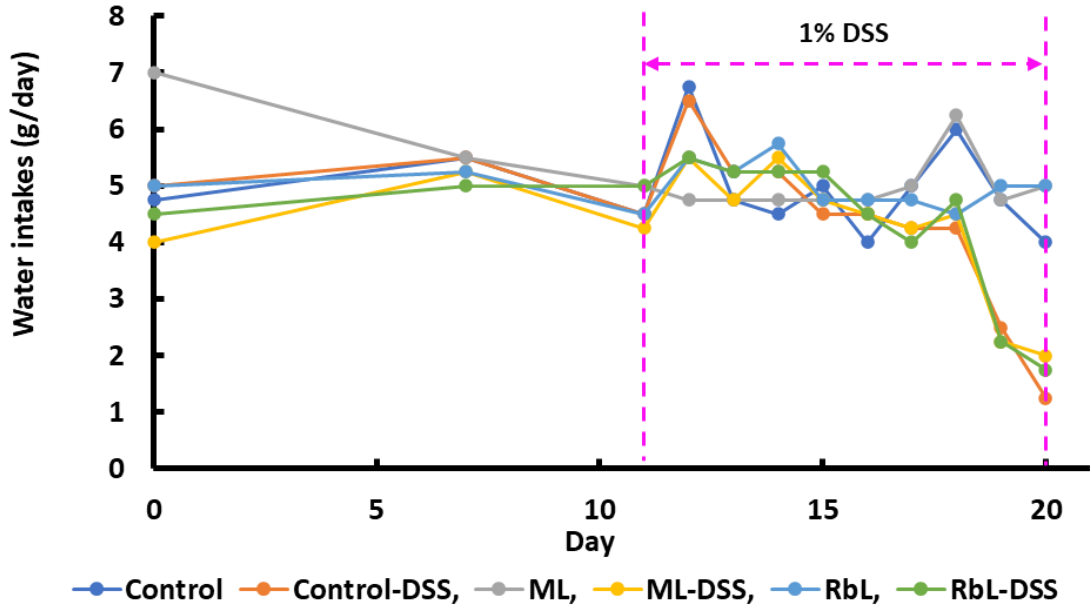


(B) Food consumptions

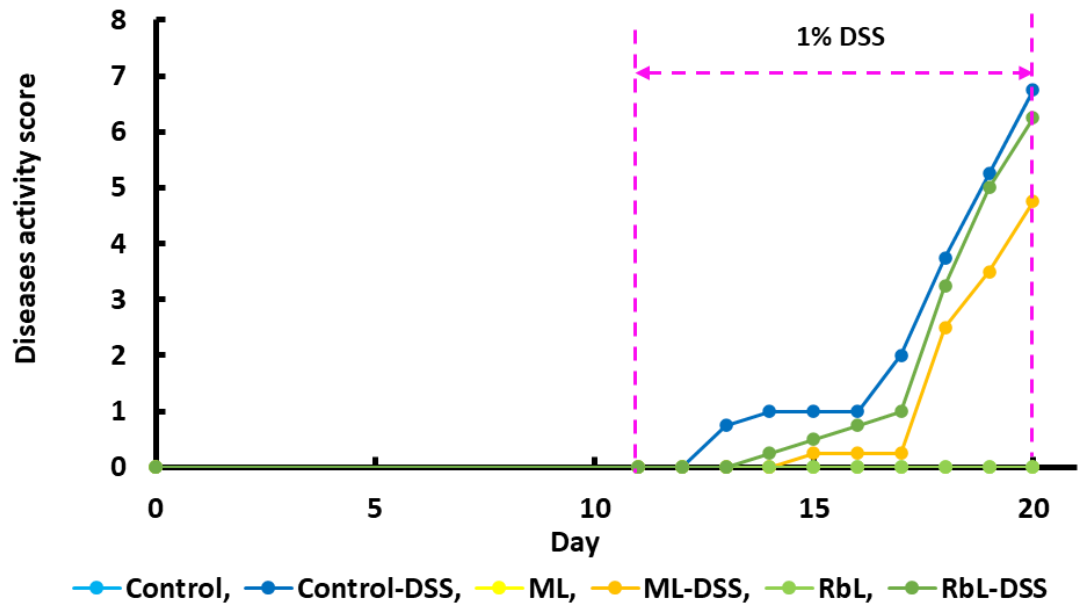


次ページへ続く

(C) Water intakes

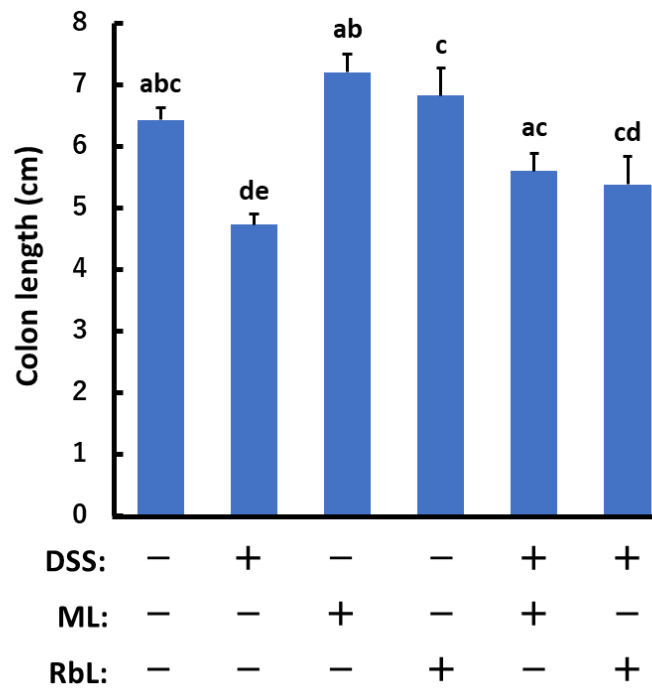


(D) DAI score



次ページへ続く

(E) Colon length



次ページへ続く

(F) Colon length

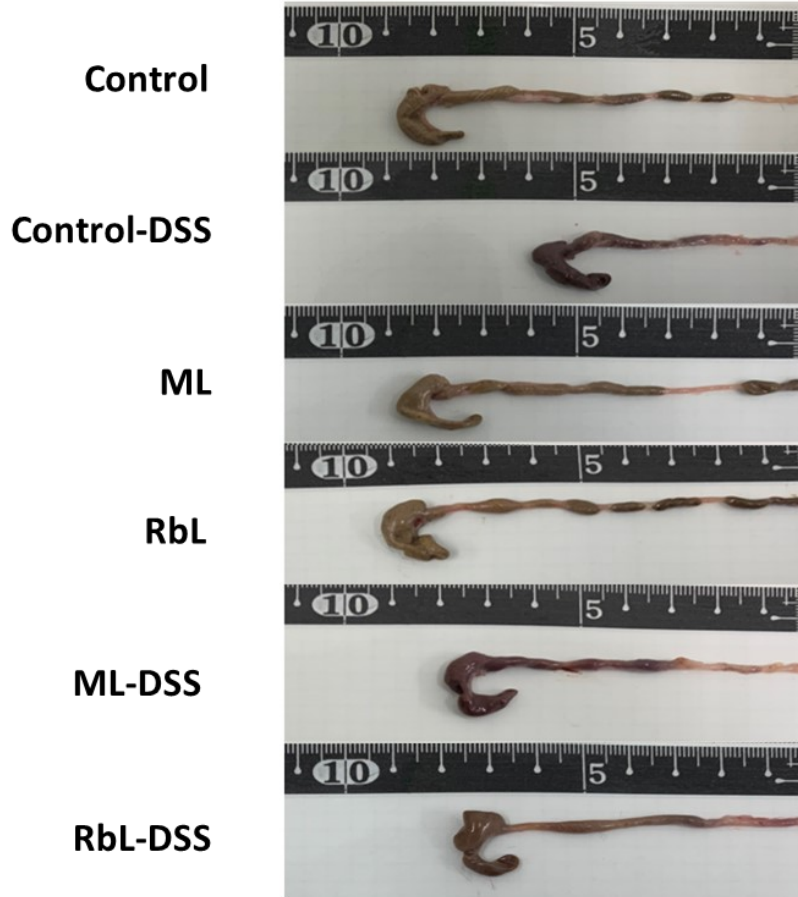
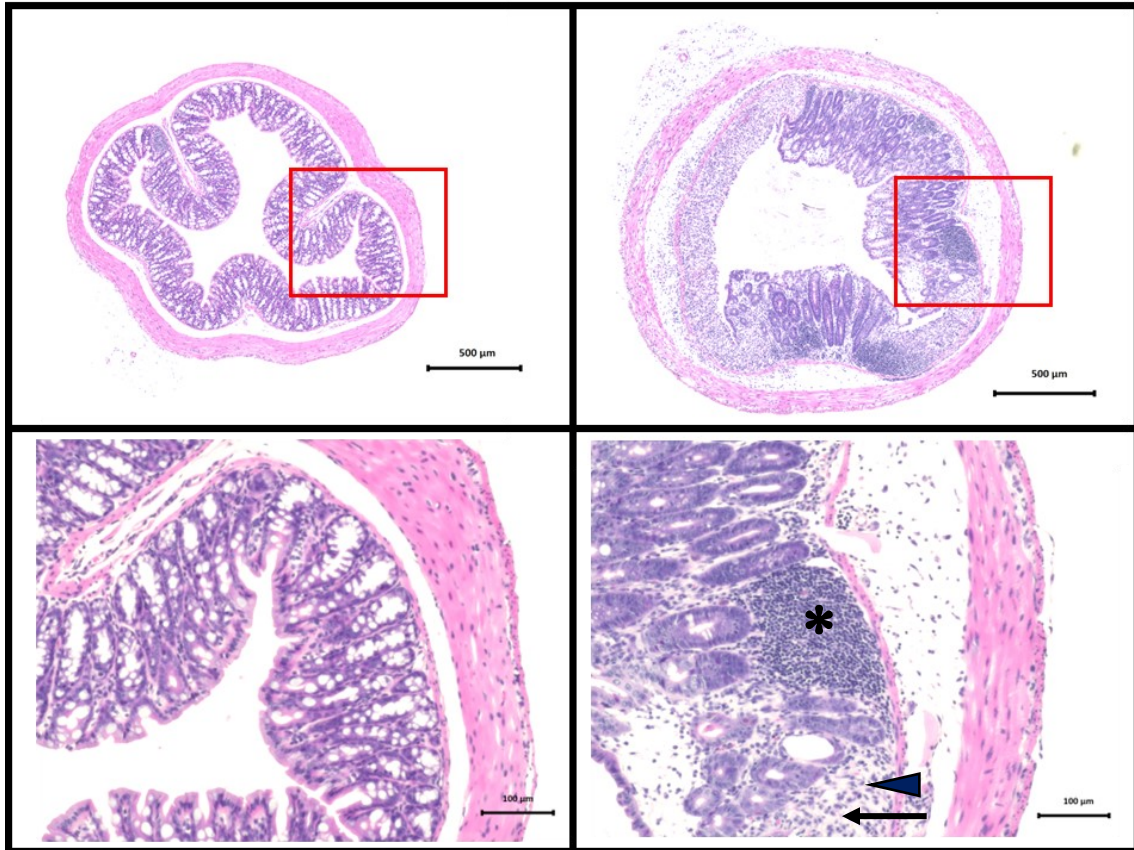


Figure 2-1. Feeding of heat-killed ML or RbL alleviates DSS-induced in colon mice. (A) body weight; (B) food consumption; (C) water consumption; (D) DAI score; (E) and (F) colon lengths. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value ($n = 4$). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test ($n = 4$, $p < 0.05$).

(A)

Control

Control-DSS



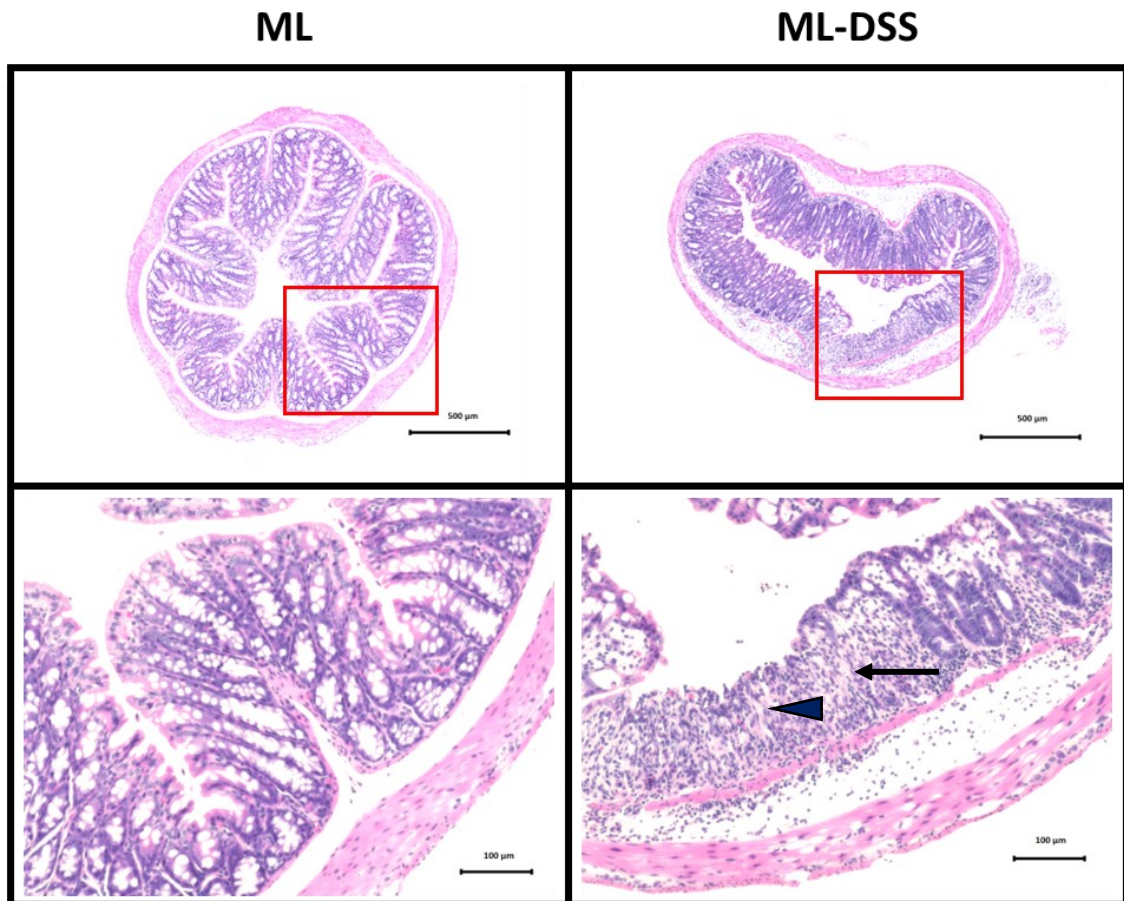
◄ goblet cell depletion

* leukocyte infiltration and centrocyte infiltration (ulceration)

← epithelial cell depletion

次ページへ続く

(B)



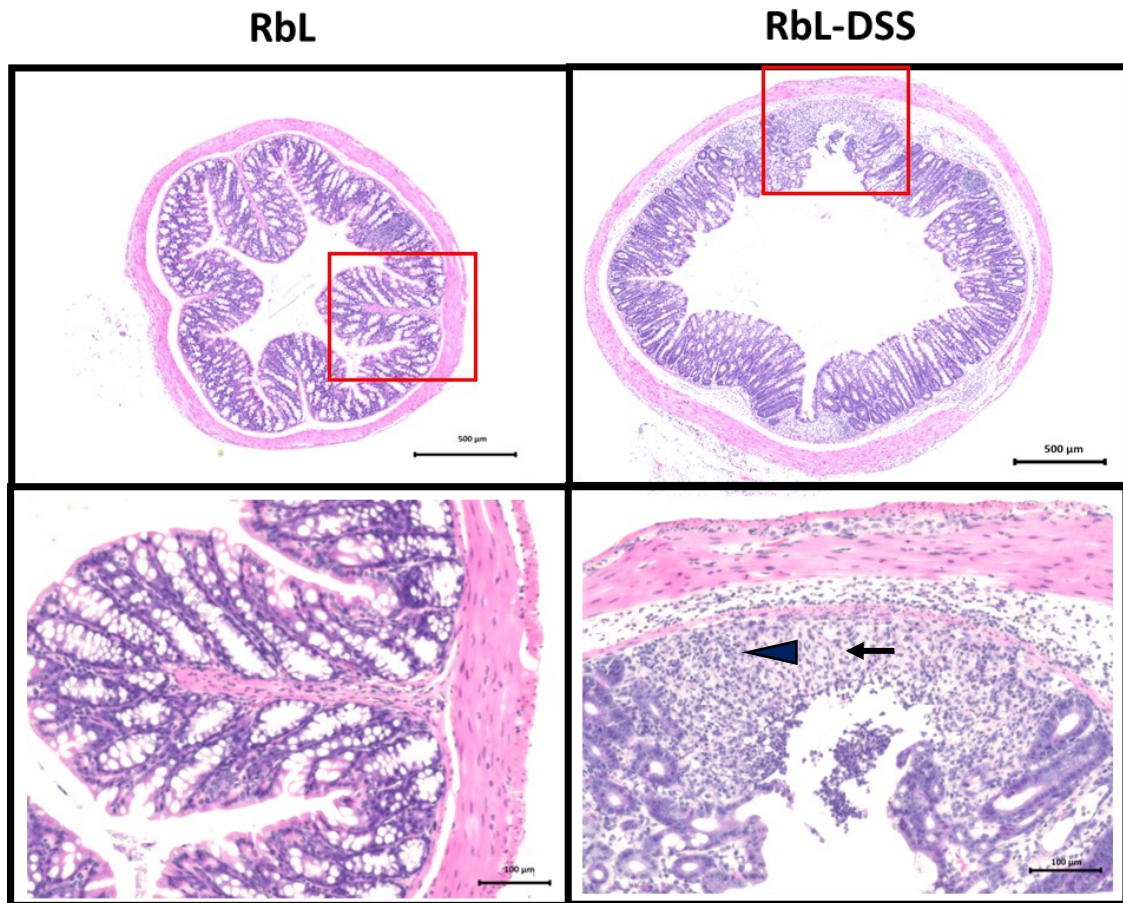
◄ goblet cell depletion

* leukocyte infiltration and centrocyte infiltration (ulceration)

← epithelial cell depletion

次ページへ続く

(C)



◄ goblet cell depletion

* leukocyte infiltration and centrocyte infiltration (ulceration)

← epithelial cell depletion

次ページへ続く

(D) HAI score

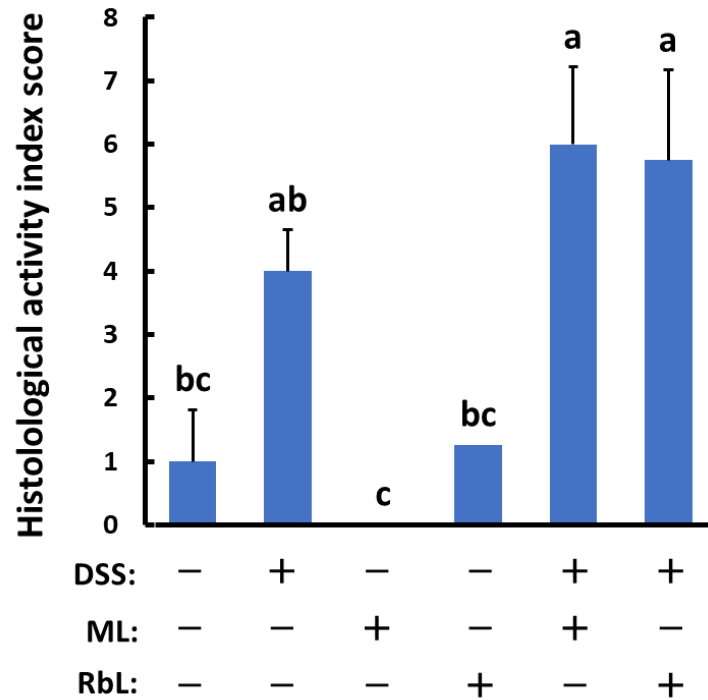


Figure 2-2. Morphological observation of colons in heat-killed ML- or RbL-fed DSS-induced colitis mice. (A) Control group; (B) ML group; (C) RbL group; (D) HAI score was recorded. The bar is 500 μm for the whole image and 100 μm for the enlarged image. Image were selected to represent each group (n = 4).

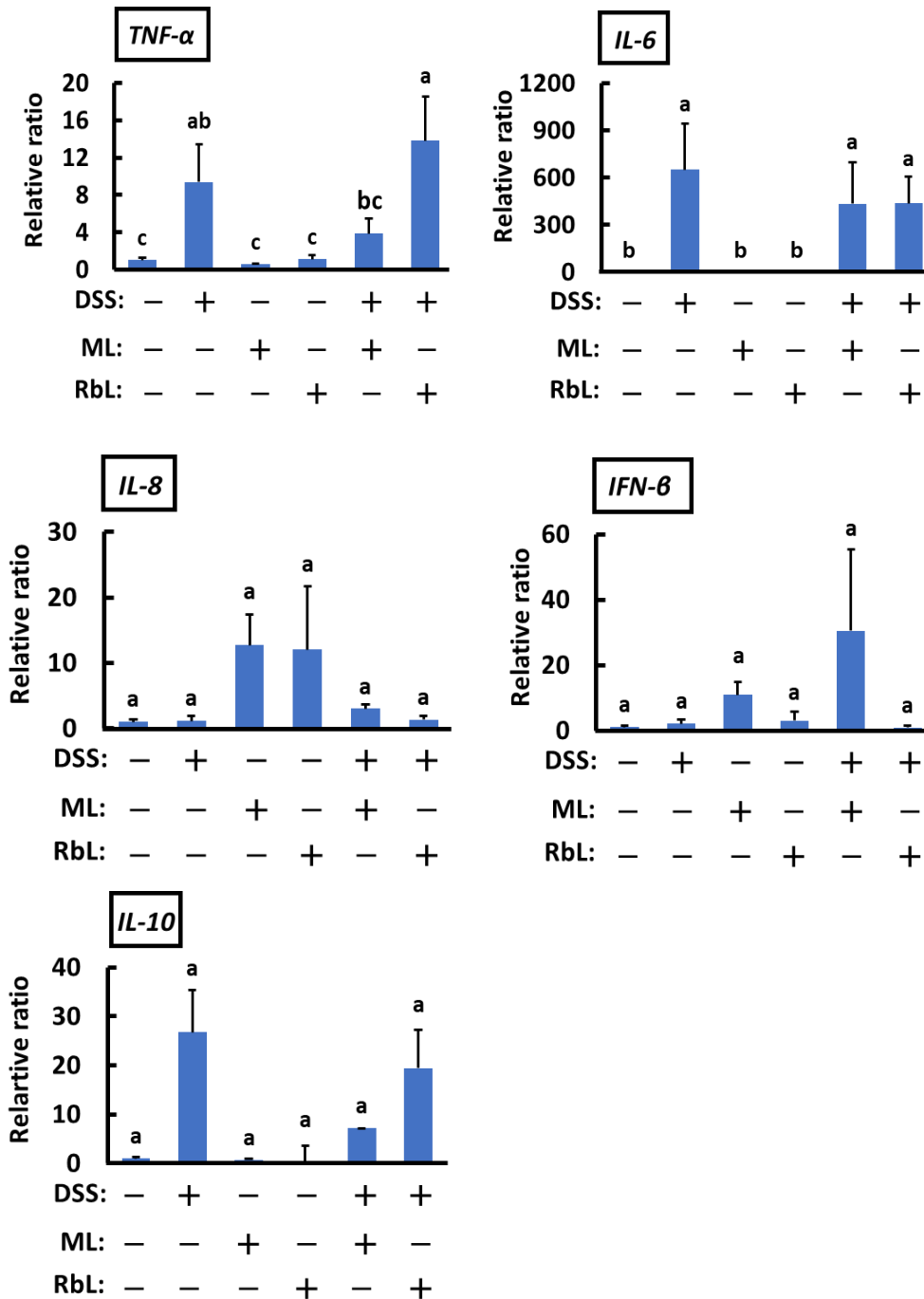


Figure 2-3. Effects of heat-killed ML or RbL on gene expression of *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *IFN- β* and *IL-10* in the colon of mice with DSS-induced colitis. Expression of genes associated with proinflammatory cytokines was measured by real-time PCR. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 4). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 4, p < 0.05).

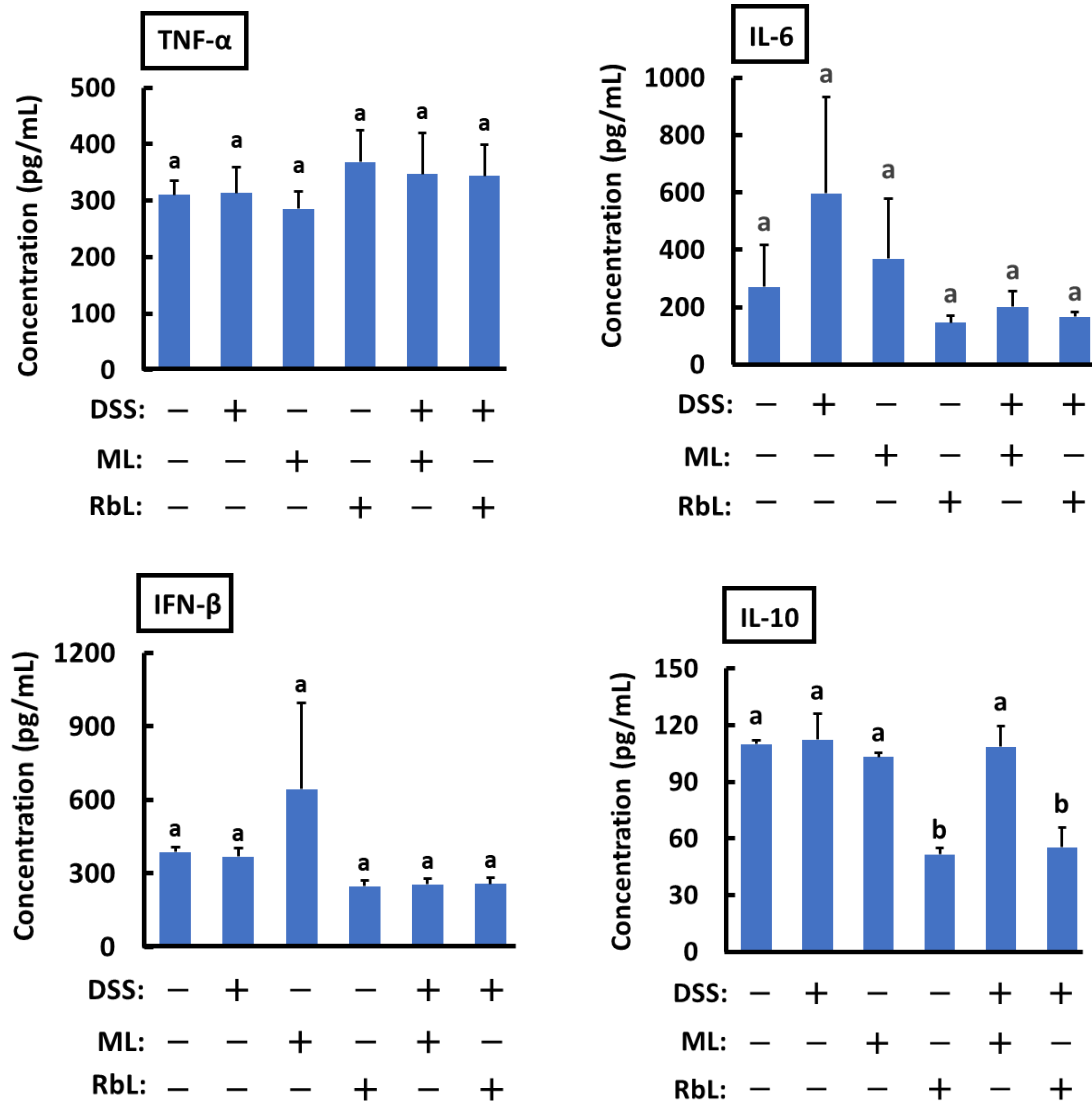


Figure 2-4. Effect of heat-killed ML or RbL on the level of TNF- α , IL-6, IFN- β and IL-10 in blood of mice with DSS-induced colitis mice. Expression of protein in blood was measured by ELISA. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 4). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 4, p < 0.05).

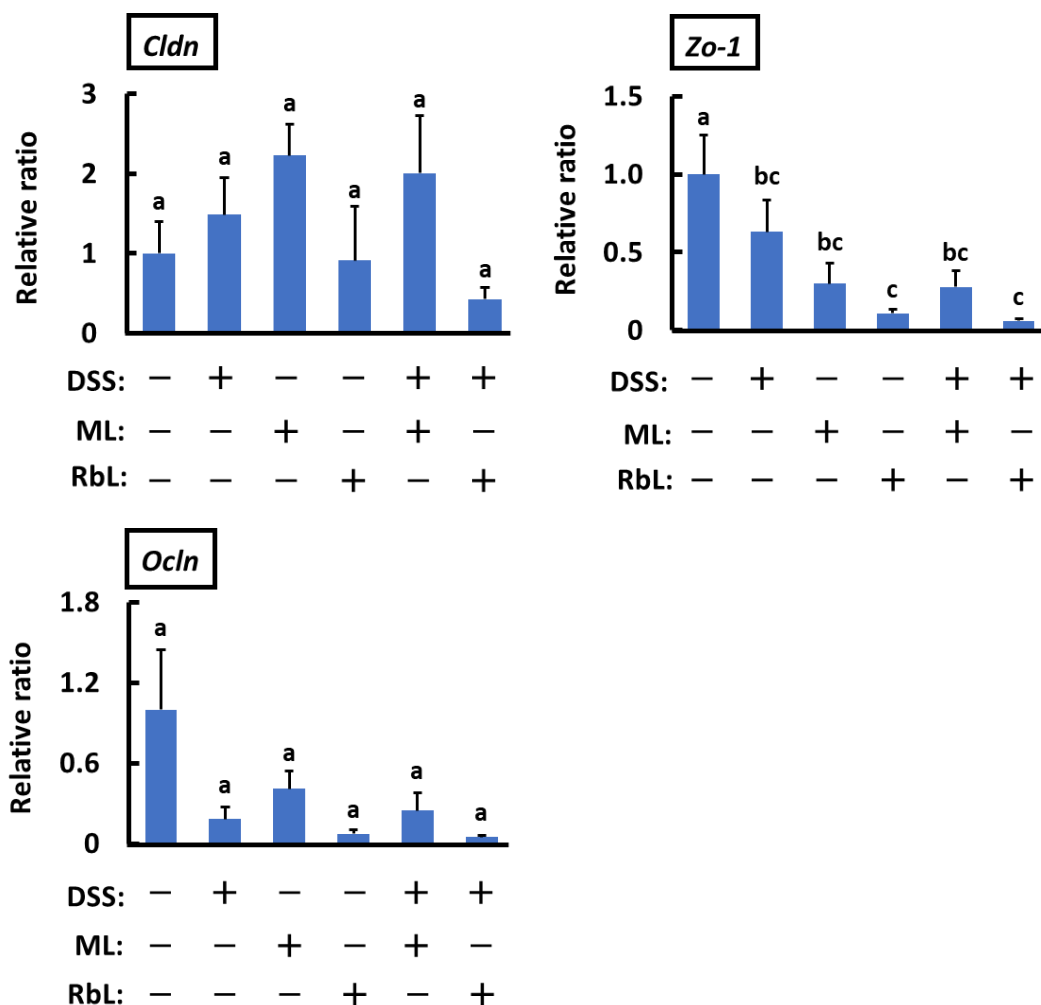


Figure 2-5. Effect of heat-killed ML or RbL on gene expression of *Claudin*, *Zonula occludens-1* and *Occludin* in the colon of mice with DSS-induced colitis. Expression of genes associated with cell adhesion molecule were measured by real-time PCR. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 4). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 4, p < 0.05).

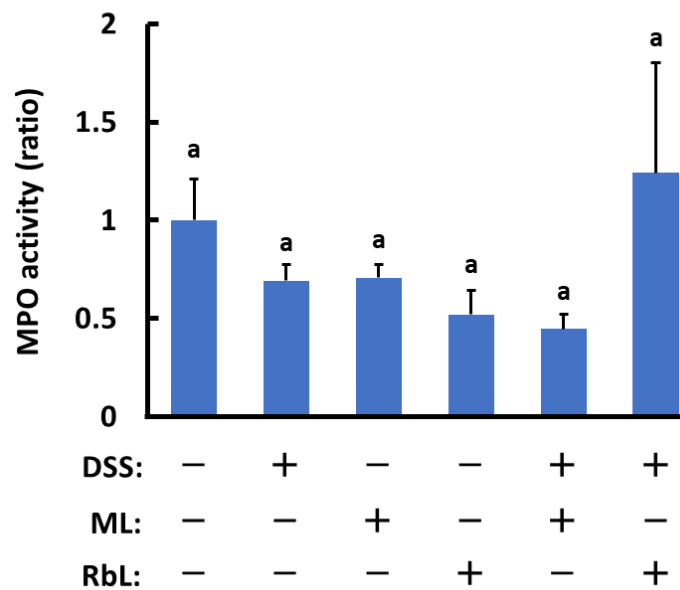


Figure 2-6. Effect of heat-killed ML or RbL on blood MPO activities in mice with DSS-induced colitis. MPO in blood was measured by MPO Fluorometric Activity Assay Kit. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 4). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 4, p < 0.05).

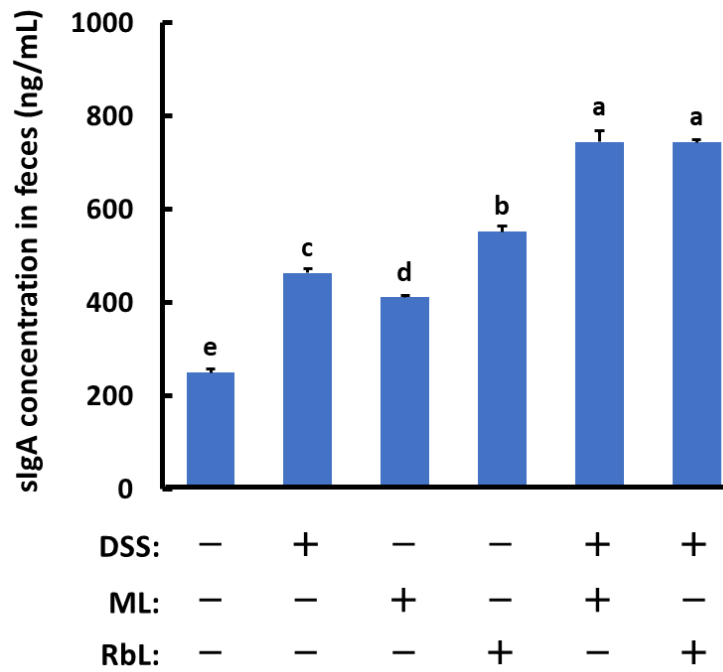


Figure 2-7. Effect of heat-killed ML or RbL on secreted-IgA (sIgA) in feces of mice with DSS-induced colitis. Secreted IgA in feces was measured by ELISA. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 4). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 4, p < 0.05).

2. 4. 考 察

潰瘍性大腸炎には乳酸菌を用いたポストバイオティクスによる治療が有効である可能性が示されている^{41, 42)}。本研究では、DSS 誘発性大腸炎マウスを使用して、海洋性環境から単離した乳酸菌株である ML と、糠漬けから単離した乳酸菌である RbL の大腸炎予防効果を検証した。DSS は、投与したマウスにおいて、表在性潰瘍、粘膜損傷、下痢、直腸出血、および体重減少を誘発する。このモデルは再現性があり、その臨床症状は潰瘍性大腸炎に類似している^{43, 44)}。本研究においても、DSS をマウスへ投与することにより、腸炎が生じ、体重減少、DAI スコア、結腸の短縮化、HAI スコアの上昇などの症状が確認された (Fig. 2-1 および Fig. 2-2)。しかし、乳酸菌死菌体を含む試験食を投与したマウス処理群である ML-DSS 処理群および RbL-DSS 処理群では、体重減少、DAI スコアの低下、結腸の短縮化など大腸炎の症状を抑制したが、結腸組織の炎症の程度を示す HAI スコアは DSS-Control 処理群と変化なかった。特に RbL-DSS 処理群では、杯細胞の喪失、炎症性細胞の浸潤、上皮細胞の喪失からスコア付けされたように、DSS による結腸組織の損傷がひどく、乳酸菌投与による組織の回復は期待できなかった (Fig. 2-2)。

DSS 誘発性大腸炎は、腸上皮細胞に対する直接的な毒性に関連している可能性があり、粘膜バリアの完全性に影響を与え、上皮細胞の増殖阻害や、腸バリア膜の破壊が、腸内細菌叢の不均衡を引き起こす⁴²⁾。腸内細菌叢は、腸疾患や炎症における粘膜免疫応答に重要な役割を果たしていることが示されており⁴²⁾、腸内細菌叢の不均衡化は、*dysbiosis* に代表されるように、免疫代謝機構の異常な乱れを生じ、腸管免疫における恒常性を破綻し、慢性的な炎症を惹起する¹²⁾。炎症において、*TNF- α* 、*IFN- β* 、*IL-6*、*IL-8* などの炎症誘発性サイトカインおよび *IL-10* などの抗炎症性サイトカインは、炎症の調節において重要な役割を果たし^{45, 46)}、これらを産生することにより、自然免疫応答を媒介するが^{47, 48)}、結腸粘膜における過剰なサイトカインの発現は、腸管粘膜の炎症性損傷および潰瘍の主な原因となる⁴⁹⁾。大腸炎の治療に用いられる一般的な薬剤であるサリチルアゾスルファピリジンは、炎症性サイトカインである *TNF- α* および *IL-6* 遺伝子の発現量を抑制し、抗炎症性サイトカインである *IL-10* 遺伝子の発現量を上昇させる⁴⁹⁾ことや、*Mo3Se4* というナノゼイムが DSS 誘発大腸炎において、*TLR4/NF- κ B* 経路の不活性化を介し、*TNF- α* 、*IL-6*、および *IFN- β* 遺伝子の発現を低下することで、DSS 誘発性大腸炎を抑制することが報告されている⁵⁰⁾。このように、炎症性サイトカインの応答は、DSS 誘発性大腸炎において、重要な生理学的因子であるといえる。本章の結腸組織におけるサイトカイン類 mRNA 測定では、Control-DSS 処理群と比較して、ML-DSS 処理群では、炎症性サイト

カインである *TNF- α* , *IL-6* 遺伝子の発現量と抗炎症性サイトカインである *IL-10* 遺伝子の発現量が抑制され, *IFN- β* 遺伝子の発現量が上昇した。一方, RbL-DSS 処理群では, *IL-6*, *IL-10* 遺伝子の発現量が低下したが, *TNF- α* 遺伝子の発現量は上昇し, *IL-8*, *INF- β* 遺伝子の発現量は変化がなかった。*IL-10* は, 毒素やその他の刺激による上皮バリアの破壊により誘発された大腸炎を制御する因子であり⁵¹⁾, *IL-10* 欠損マウスは DSS 誘発性大腸炎モデルで大腸炎を悪化させることが分かっている⁵²⁻⁵⁶⁾。さらに, *IL-10* を DSS 誘発性大腸炎マウスに投与すると, 腸の炎症が抑制され, 炎症性サイトカインの産生が抑制されることにより, マウスの大腸炎が改善されることが報告されている⁵¹⁾。本章では, ML および RbL 処理により *IL-10* 遺伝子の発現量は共に低下したが, これは, ML および RbL 処理が腸の炎症を緩和させたため, *IL-10* 遺伝子の高い発現量を必要としなかったためだと推察された。(Fig. 2-3)。

潰瘍性大腸炎の病理学的特徴は, 炎症の悪化とそれに続く腸上皮の破壊と密接に関連している⁵⁷⁾。腸のバリアは, 内腔と内部環境の間の高分子の輸送を調節し, 有害な溶質, 微生物, 毒素, および内腔の抗原が体の防御メカニズムを損なうのを防ぐことによって宿主を保護する⁵⁸⁾。このバリアは, 細胞接着分子などのさまざまなバリア成分の相互作用によって形成される⁵⁹⁾。Lei Peng らの研究では, 抗炎症フラボノイドである Astragalin の投与が, 炎症性サイトカインおよび関連 mRNA (*TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* など) の発現を低下させ, マクロファージおよび好中球による大腸浸潤を抑制し, 細胞接着分子 (*Occludin*, *Zo-1* など) の mRNA 発現量を向上させることにより, DSS 誘発性大腸炎を抑制した⁵⁸⁾ ことから, 結腸組織における細胞接着分子の mRNA 発現量の発現は, DSS 誘発性大腸炎において一つの指標になる。本研究では, 3 つの主要な細胞接着分子 (*Claudin*, *Zo-1*, *Occludin*) の発現を検討したところ, Control-DSS 処理群と比較して, RbL-DSS 処理群は *Claudin*, *Zo-1*, *Occludin* 遺伝子の発現量が全て抑制された。一方で, ML-DSS 処理群では, *Zo-1* を除く *Claudin*, *Occludin* 遺伝子の発現量を上昇させ, 結腸における炎症の重症度を軽減した。また, ML 処理群では, *Claudin* 遺伝子の発現量が Control と比較して, 2 倍程度あり, 炎症が発症する前から腸のバリア機能を向上させる, プレバイオティクのような効果を持つことが期待された (Fig. 2-5)。生体内で産生される全抗体のなかで IgA 抗体の占める割合は 20%程度であるにもかかわらず, 粘膜組織のリンパ節では, その割合は 80%を占め, IgA 抗体産生は粘膜免疫応答の特徴の一つと言われている³⁾。また, IgA 産生は, 抗原を取り込んだ樹状細胞がナイーブ T 細胞に抗原提示し, エフェクター T 細胞への分化を誘導し, 活性化した T 細胞により産生される TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10 によって誘発される場合と, 抗原刺激を受けた B 細胞が, 二次応答により産生する抗体のクラススイッチを起こし, IgA を産

生する可能性がある³⁾。糞中に分泌されたIgA量は、ML-DSS処理およびRbL-DSS処理群では、Control-DSS処理群と比較して、1.6倍に上昇したが、IgA産生に関与する*IL-6*および*IL-10*遺伝子の発現量はControl-DSS処理群、ML-DSS処理群、RbL-DSS処理群の3群間でその発現量に有意差はなく、*IL-6*および*IL-10*分泌量は、Control-DSS処理群、ML-DSS処理群ではその分泌量に有意差はなく、*IL-10*分泌量はRbL-DSS処理群ではさらに低下した (Fig. 2-7)。この結果からTGF- β および*IL-4*によりIgA分泌が増進された、または、MLおよびRbL処理が、B細胞によるIgAの産生量を向上させ、免疫賦活的に作用することが考えられた。

以上の結果を統合すると、MLはRbLよりも抗炎症作用において、より優れているポストプロバイオティクスであることが考えられた。

第3章 ML 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける ML の餌含有率変化の影響

3. 1. 緒 論

一般に、乳酸菌やビフィズス菌などに代表されるプロバイオティクスは、過剰摂取しても、便として体外へ排出されるため、生体には悪影響を及ぼさないといわれている⁵⁹⁾。つまり、乳酸菌を摂取しすぎた場合も、余分な乳酸菌は排泄されてしまうので、毎日適切な量を続けて摂取することが重要である。しかし、乳酸菌を多く含む食品には、乳酸菌飲料水や甘味ヨーグルトなど、糖質や塩分などを多く含むものが多く、過剰摂取には、注意を要する。第2章にて、海洋環境から単離した新規乳酸菌株である、ML に大腸炎抑制作用が示唆されたことから、マウスに与える試験食への ML 含有率の変化が、大腸炎抑制に影響を及ぼすか検証し、ML の摂取量の適正レベルを推察した。

3. 2. 実験材料および実験方法

3. 2. 1. 実験動物

C57BL/6Jcl マウス（雄性，7週齢，体重21～23g，日本クレア，日本，東京都）を使用し，それぞれ3匹/ケージ，計8処理群に，平均体重が各処理群で均一になるように処理群分けした。(1, Control マウス; 2, Control-DSS 投与マウス; 3, 0.002% ML 投与マウス (0.2 g/10 kg CE-2 中に混餌，マウスは 1×10^9 CFU/mL/day の摂取となる) ; 4, 0.006% ML 投与マウス (0.6 g/10 kg CE-2 中に混餌，マウスは 3×10^9 CFU/mL/day の摂取となる) ; 5, 0.01% ML 投与マウス 1 g/10 kg CE-2 中に混餌， 5×10^9 CFU/mL/day) ; 6, 0.002% ML+DSS 投与マウス; 7, 0.006% ML+DSS 投与マウス; 8, 0.01% ML+DSS 投与マウス)。その他，マウスの試験環境や試験期間は第2章の2.2.2.項に準じて行った。

3. 2. 2. 結腸組織と血液試料の回収

第2章2.2.2.項に準じ，行った。

3. 2. 3. DAI スコア

第2章2.2.3.項に準じ，行った。

3. 2. 4. HAI score

第2章2.2.4.項に準じ，行った。

3. 2. 5. 各サイトカインの分泌量の測定 (ELISA 法)

第2章 2.2.5. 項に準じ, 行った。

3. 2. 6. マウス結腸組織からの全 RNA の抽出

第2章 2.2.6. 項に準じ, 行った。

3. 2. 7. 逆転写反応

第2章 2.2.7. 項に準じた。

3. 2. 8. リアルタイム PCR

第2章 2.2.8. 項に準じ, 行った。

3. 2. 9. 血中 MPO 測定

第2章 2.2.9. 項に準じ, 行った。

3. 2. 10. 糞中 IgA の測定

3. 2. 10. 1. 糞便からの試料調製

第2章 2.2.10.1. 項に準じ, 行った。

3. 2. 10. 2. IgA 活性測定 (ELISA)

第2章 2.2.10.2. 項に準じ, 行った。

3. 2. 11. 統計処理

第2章 2.2.11. 項に準じ, 行った。

3. 3. 結果

3. 3. 1. ML 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける ML 含有率による影響

試験終了時の体重は、Control-DSS 処理群において、Control 処理群と比較して、0.93 倍、ML 0.002%-DSS 処理群では 0.88 倍に減少したが、ML 0.006%-DSS 処理群および、0.01% ML-DSS 処理群では、変化がなかった (Fig. 3-1(A))。また、DAI スコアは、最終日である 20 日目には Control 処理群と比較して、Control-DSS 処理群で 5.57 点、0.002% ML-DSS 処理群で 7.33 点、0.006% ML-DSS 処理群で 6.75 点、0.01% ML-DSS 処理群で 7.33 点であった。さらに、結腸の長さは、Control-DSS 処理群では、Control 処理群と比較して、0.95 倍に短縮化し、0.002% ML-DSS 処理群では、Control-DSS 処理群と比較して、1.1 倍、0.006% ML-DSS 処理群では 1.1 倍上昇し、0.01% ML-DSS 処理群では 0.96 倍に短縮化した。Control-DSS 処理群と比較して、0.002% ML-DSS 処理群と 0.006% ML-DSS 処理群は、結腸の長さの短縮化を抑制した (Fig. 3-1 (E))。ML および RbL 死菌体給餌 DSS 誘発大腸炎マウスにおける結腸組織切片の顕微鏡観察を行ったところ、Control-DSS 処理群、0.002% ML-DSS 処理群、0.006% ML-DSS 処理群、0.01% ML-DSS 処理群において、広範囲で杯細胞の喪失、炎症性細胞の浸潤、上皮細胞の喪失が確認された (Fig. 3-2 (A)-(D))。一方で、それらを点数化した HAI スコアは、Control-DSS 処理群では 5.2 点、0.002% ML-DSS 処理群では 6.3 点、0.006% ML-DSS 処理群では 5.2 点、0.01% ML-DSS 処理群では 3 点を示し、0.01% ML-DSS 処理群のみ、Control-DSS 処理群と比較して、各炎症の点数は低下した (Fig. 3-2 (D))。

3. 3. 2. ML 含有率変化による ML 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける結腸組織のサイトカイン遺伝子群発現変化

TNF- α 遺伝子の発現量は、DSS-Control 処理群では、Control 処理群と比較して、4.1 倍に上昇したが、0.002% ML、0.006% ML および 0.01% ML 処理群では、各遺伝子の発現量に変化がなかった。Control-DSS 処理群と比較して、0.002% ML-DSS 処理では、0.48 倍、0.01% ML-DSS 処理群では、0.92 倍に低下したが、0.006% ML-DSS 処理群では、2 倍に上昇した。*IL-8* 遺伝子の発現量は、DSS-Control 処理群では、Control 処理群と比較して、変化がなかったが、Control-DSS 処理群と比較して、0.002% ML-DSS 処理では、1.3 倍、0.006% ML-DSS 処理群では、1.2 倍、0.01% ML-DSS 処理群では、1.3 倍上昇した。*IFN- β* 遺伝子の発現量は、DSS-Control 処理群では、Control 処理群と比較して、半減したが、Control-DSS 処理群と比較して、0.002% ML-DSS 処理では、1.3 倍、0.006% ML-DSS 処理群では、5.2 倍、0.01% ML-DSS 処理群では、15 倍上昇し、ML 含有率

依存的に上昇傾向を示した (Fig. 3-3)。

3. 3. 3. ML 含有率変化による ML 死菌体給餌 DSS 炎症誘発マウスにおける血中サイトカイン量の変化

血中 TNF- α 量は, DSS-Control 処理群では, Control 処理群と比較して, 0.89 倍に低下した。Control-DSS 処理群と比較して, 0.002% ML-DSS 処理では, 0.82 倍に低下したが, 0.006% ML-DSS 処理群では, 1.3 倍上昇し, 0.01% ML-DSS 処理群では, 変化なかった。血中 IL-6 量は, DSS-Control 処理群では, Control 処理群と比較して, 0.71 倍に低下し, Control-DSS 処理群と比較して, 0.002% ML-DSS 処理では, 1.1 倍, 0.006% ML-DSS 処理群では, 2 倍, 0.01% ML-DSS 処理群では, 2.2 倍上昇した。血中 IFN- β 量は, DSS-Control 処理群では, Control 処理群と比較して, 0.34 倍に低下した。Control-DSS 処理群と比較して, 0.002% ML-DSS 処理では, 0.55 倍, 0.006% ML-DSS 処理群では, 0.22 倍, 0.01% ML-DSS 処理群では, 0.24 倍に低下した。血中 IL-10 量は, DSS-Control 処理群では, Control 処理群と比較して, 0.967 倍に低下した。Control-DSS 処理群と比較して, 0.002% ML-DSS 処理では, 0.9 倍, 0.006% ML-DSS 処理群では, 0.95 倍に低下したが, 0.01% ML-DSS 処理群では, 1.2 倍に上昇した (Fig. 3-4)。

3. 3. 4. ML 含有率変化による ML 死菌体給餌 DSS 誘発性大腸炎マウスの結腸組織における細胞接着分子遺伝子群の発現量変化

Claudin 遺伝子の発現量は, DSS-Control 処理群では, Control 処理群と比較して, 0.5 倍に低下した。また, 0.002%, 0.006%および0.01%処理群では, 各遺伝子の発現量に濃度依存的に発現量が増加した。Control-DSS 処理群と比較して, 0.002% ML-DSS 処理では, 1.2 倍, 0.006% ML-DSS 処理群では, 5.8 倍, 0.01% ML-DSS 処理群では, 17.6 倍上昇し, ML 含有率依存的に上昇傾向を示した。*Zo-1* 遺伝子の発現量は, DSS-Control 処理群では, Control 処理群と比較して, 1.6 倍に上昇した。また, 0.002%, 0.006%および0.01%処理群では, 各遺伝子の発現量は ML 含有率依存的に発現量が増加した。Control-DSS 処理群と比較して, 0.002% ML-DSS 処理では, 0.37 倍に低下したが, 0.006% ML-DSS 処理群では, 1.6 倍, 0.01% ML-DSS 処理群では, 3.8 倍上昇し, ML 濃度依存的に上昇傾向を示した。*Occludin* 遺伝子発現量は, DSS-Control 処理群では, Control 処理群と比較して, 0.78 倍に低下した。また, 0.002%, 0.006%, 0.01%処理群では, 各遺伝子の発現量に ML 含有率依存的に発現量が増加した。0.002% ML-DSS 処理では, Control-DSS 処理群と比較して, 0.61 倍に低下したが, 0.006% ML-DSS 処理群では, 4.4 倍, 0.01% ML-DSS 処理群では, 8.4 倍上昇し, ML 含有率依存的に上昇傾向を示した (Fig. 3-5)。

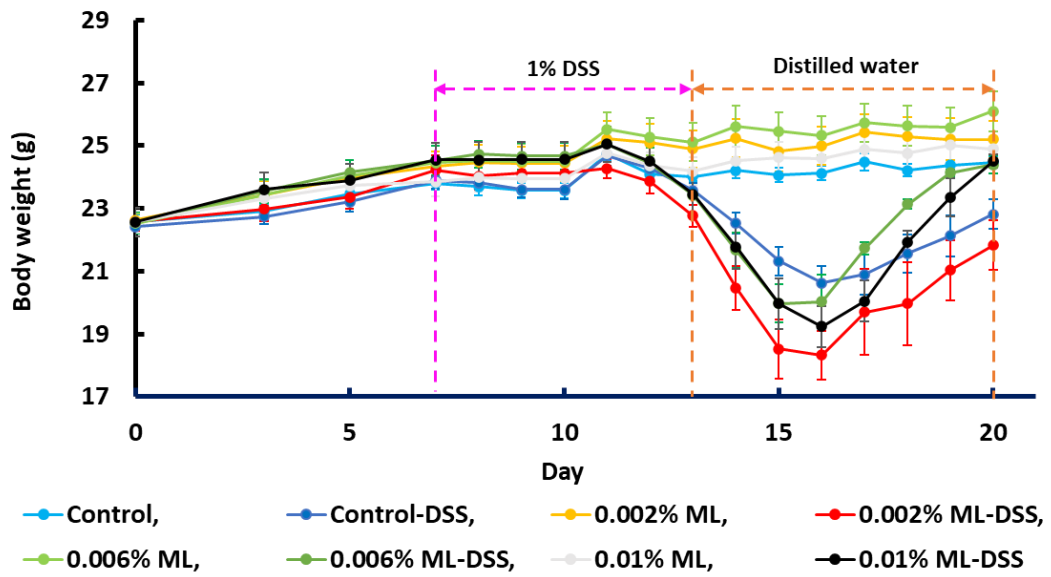
3. 3. 5. ML 死菌体給餌 DSS による炎症誘発マウスにおける ML 含有量の変化による、血中 MPO 活性への影響

MPO 活性は Control-DSS 処理群では、Control 処理群と比較して、2.9 倍に上昇した。また、0.002%、0.006%および 0.01%処理群では、ML 含有率依存的に MPO 活性が上昇した。0.002% ML-DSS 処理群では、Control-DSS 処理群と比較して、同程度であったが、0.006% ML-DSS 処理群では、2 倍に上昇し、0.01% ML-DSS 処理群では、2.5 倍に上昇し、ML 含有率依存的に MPO 活性が上昇した (Fig. 3-6)。

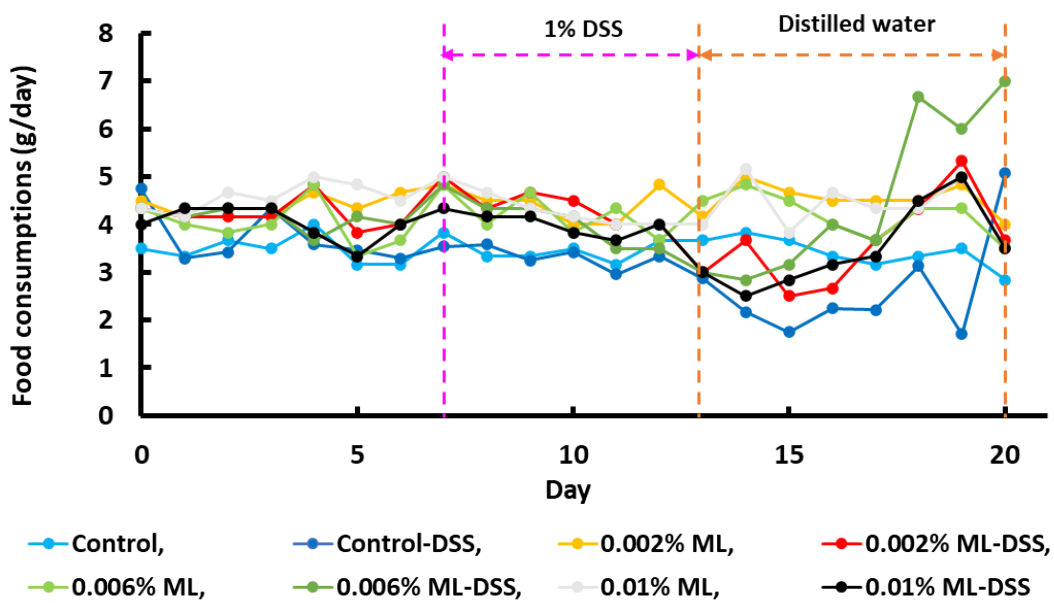
3. 3. 6. ML 死菌体給餌 DSS による炎症誘発マウスにおける ML 含有率の変化による、糞中分泌 IgA 量への影響

糞中の IgA 分泌量は、Control-DSS 処理では、Control 処理群と比較して、有意差がなく、0.002%、0.006%および 0.01%処理群でも大きな変化はなかった。0.002%-DSS 処理群では、Control-DSS 処理群と比較して、1.3 倍、0.006% ML-DSS 処理群では、1.6 倍、0.01% ML-DSS 処理群では、1.5 倍に上昇した (Fig. 3-7)。

(A) Body weight

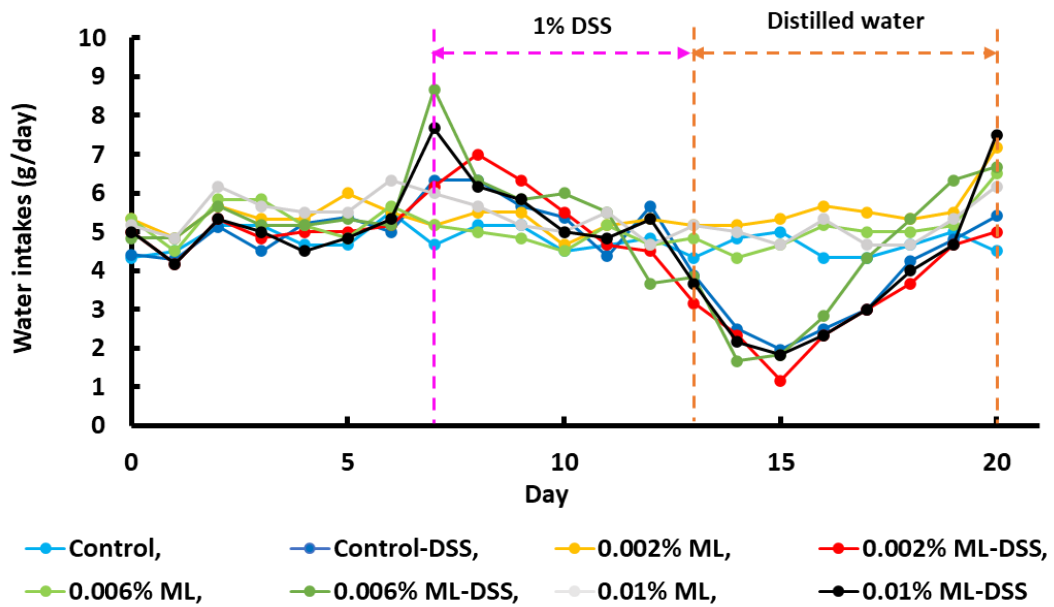


(B) Food consumptions

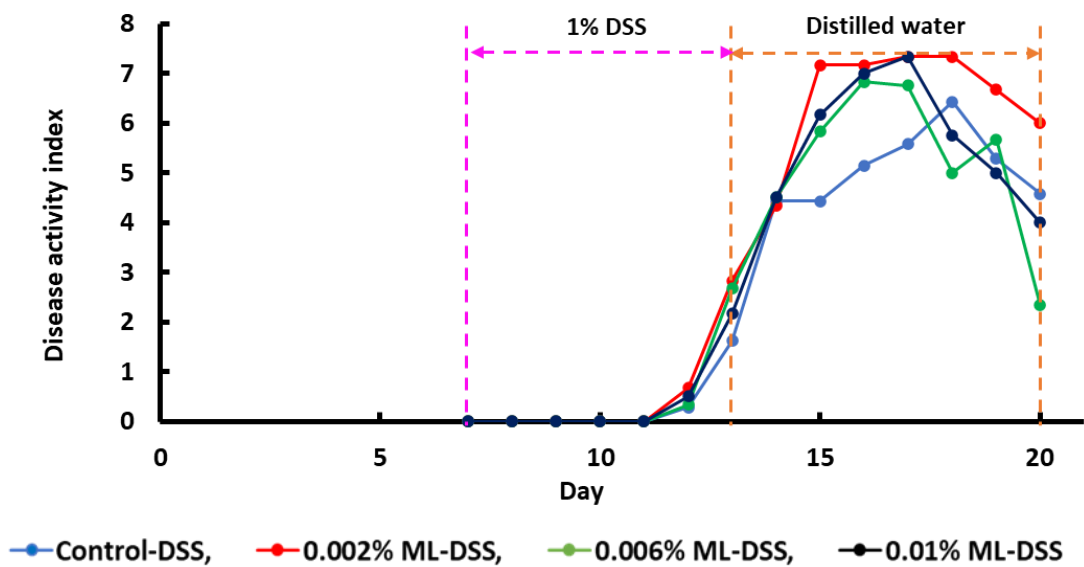


次ページへ続く

(C) Water intakes

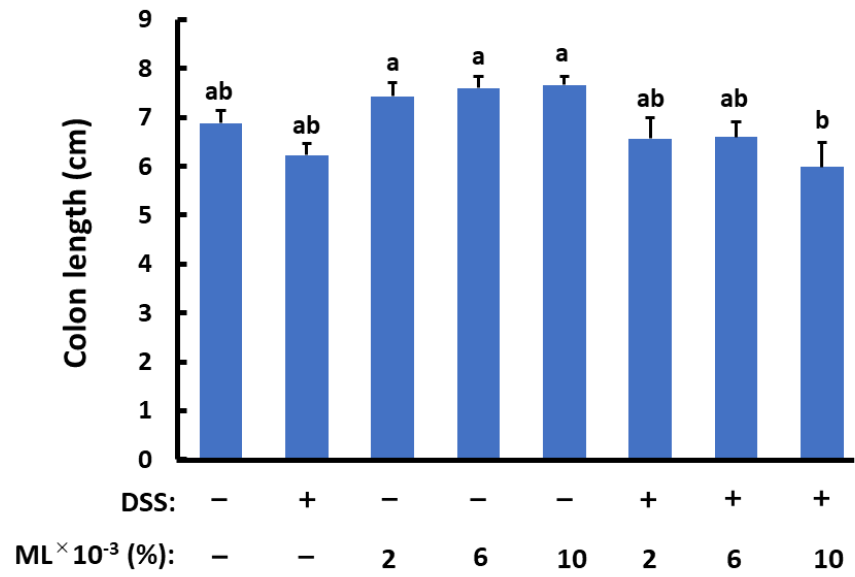


(D) DAI score



次ページへ続く

(E) Colon length



(F) Colon length

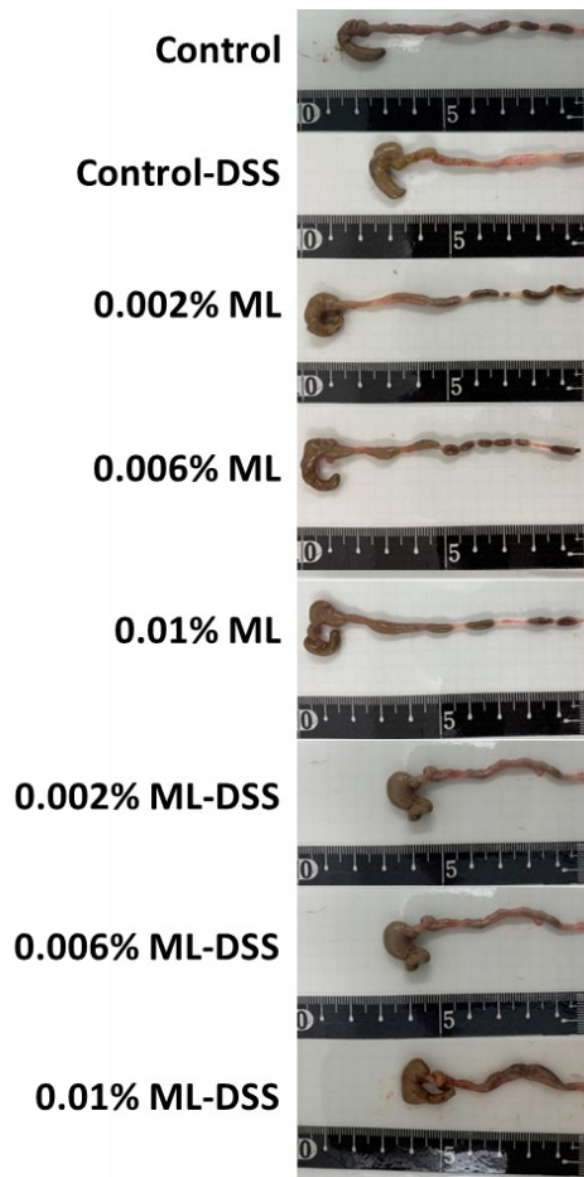
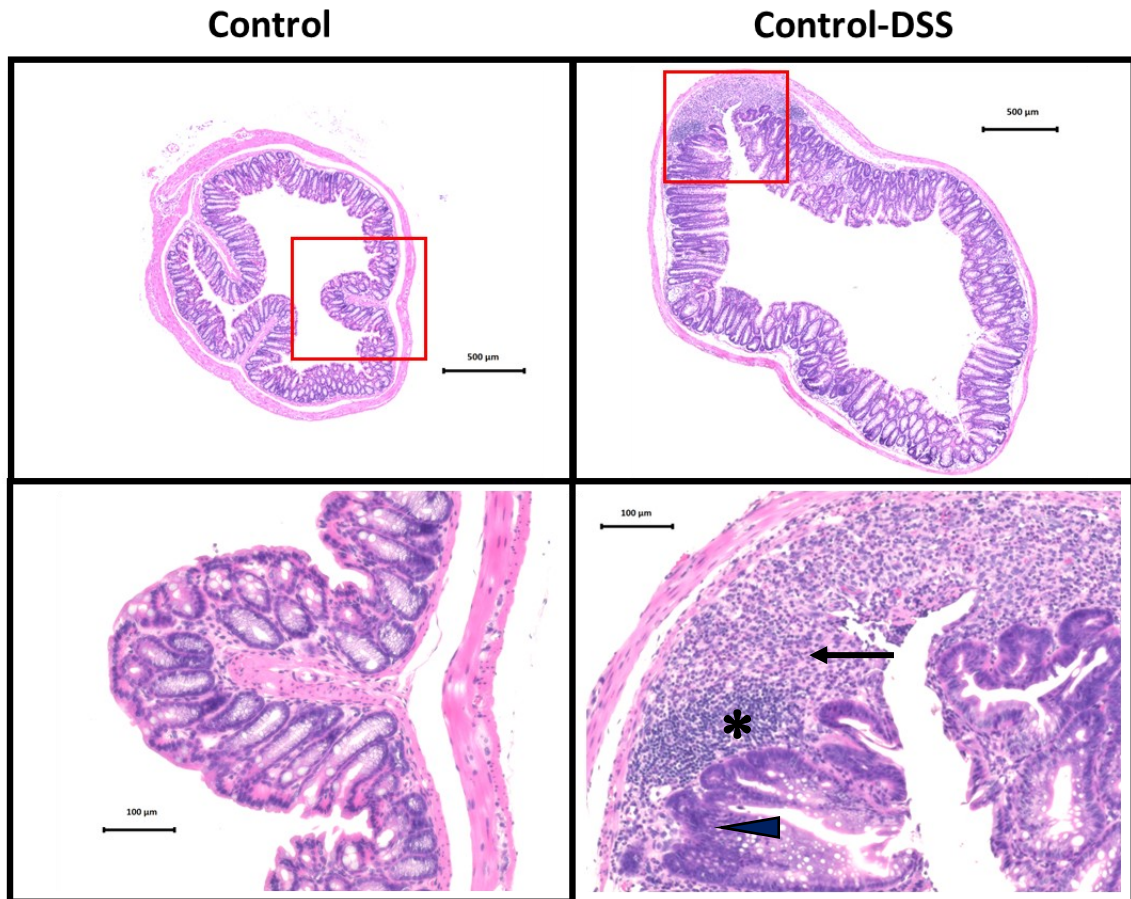


Figure 3-1. Effect of heat- killed ML feed content change on DSS-induced colitis in mice. (A) body weight; (B) food consumption; (C) water consumption; (D) DAI score; (E) and (F) colon length. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 6). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 6, $p < 0.05$).

(A)



◄ goblet cell depletion

* leukocyte infiltration and centrocyte infiltration (ulceration)

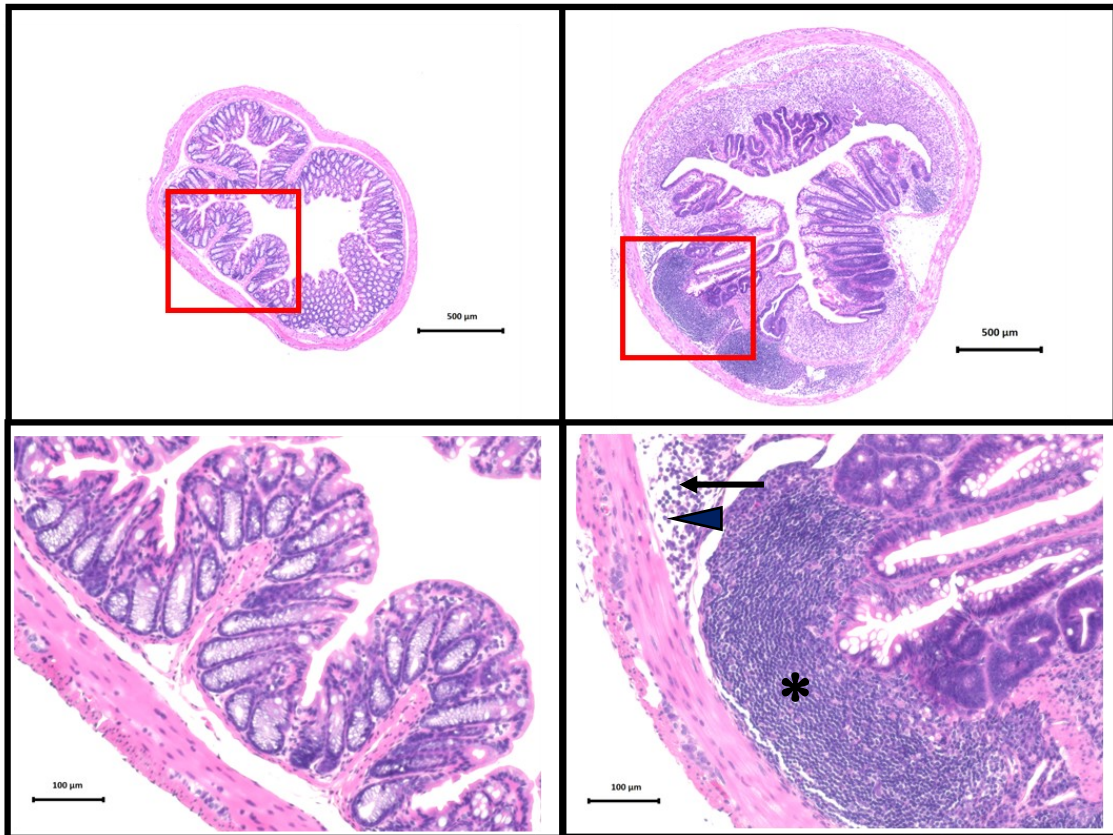
← epithelial cell depletion

次ページへ続く

(B)

0.002% ML

0.002% ML-DSS



◄ goblet cell depletion

* leukocyte infiltration and centrocyte infiltration (ulceration)

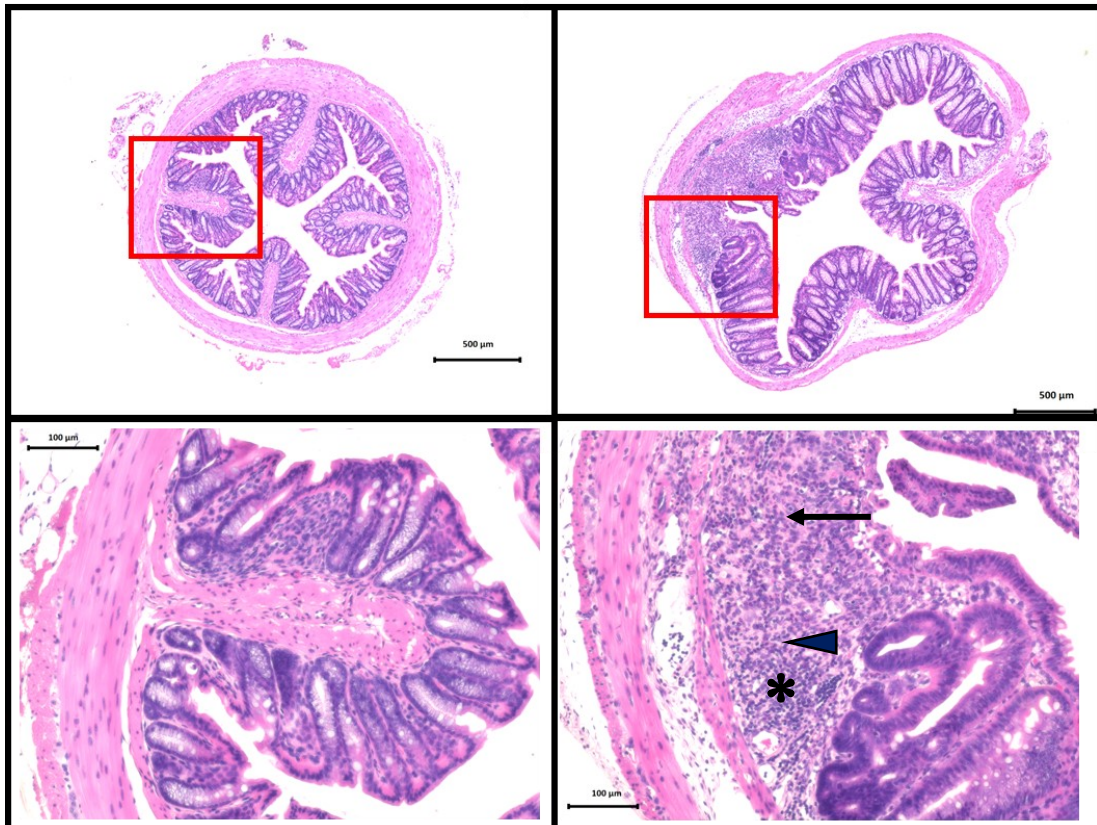
← epithelial cell depletion

次ページへ続く

(C)

0.006% ML

0.006% ML-DSS



◄ goblet cell depletion

* leukocyte infiltration and centrocyte infiltration (ulceration)

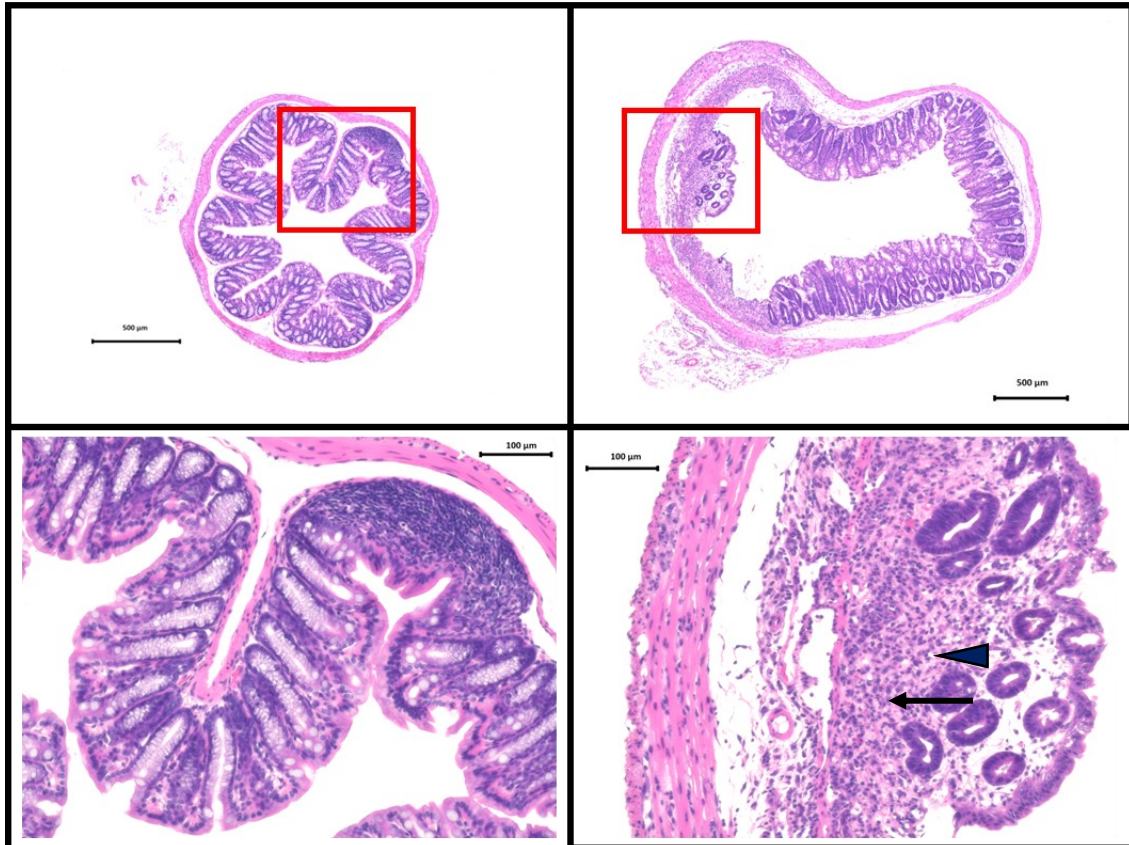
← epithelial cell depletion

次ページへ続く

(D)

0.01% ML

0.01% ML-DSS



◄ goblet cell depletion

* leukocyte infiltration and centrocyte infiltration (ulceration)

← epithelial cell depletion

次ページへ続く

(E) HAI score

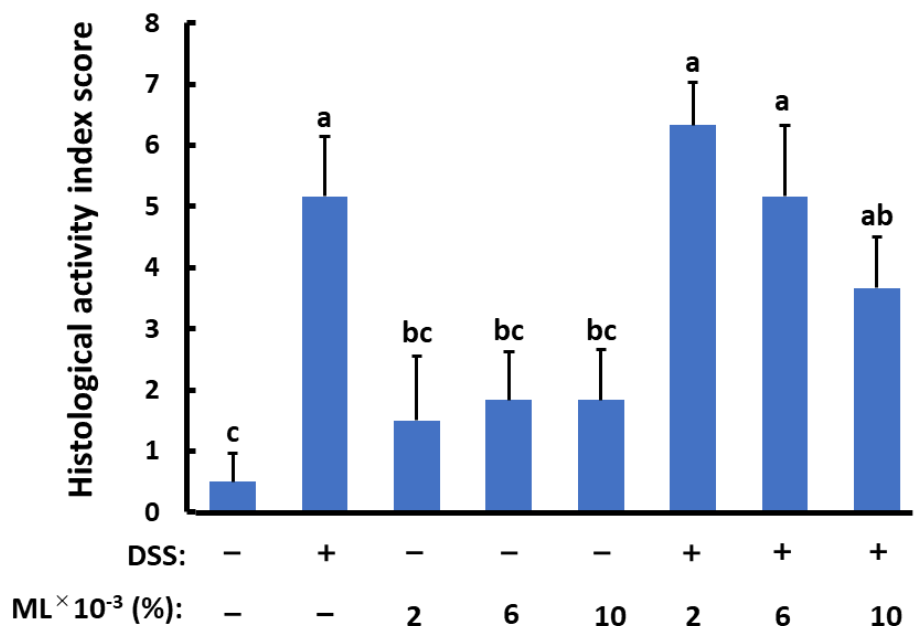


Figure 3-2. Morphological observation of colons in heat-killed ML -fed DSS-induced colitis mice. (A) Control group; (B) 0.002% ML feeding group; (C) 0.006% ML feeding group; (D) 0.01% ML feeding group; (E) HAI score was recorded. The scale is 500 μm for the whole photo and 100 μm for the enlarged photo. Photos were selected to represent each group (n = 6). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 6, p < 0.05).

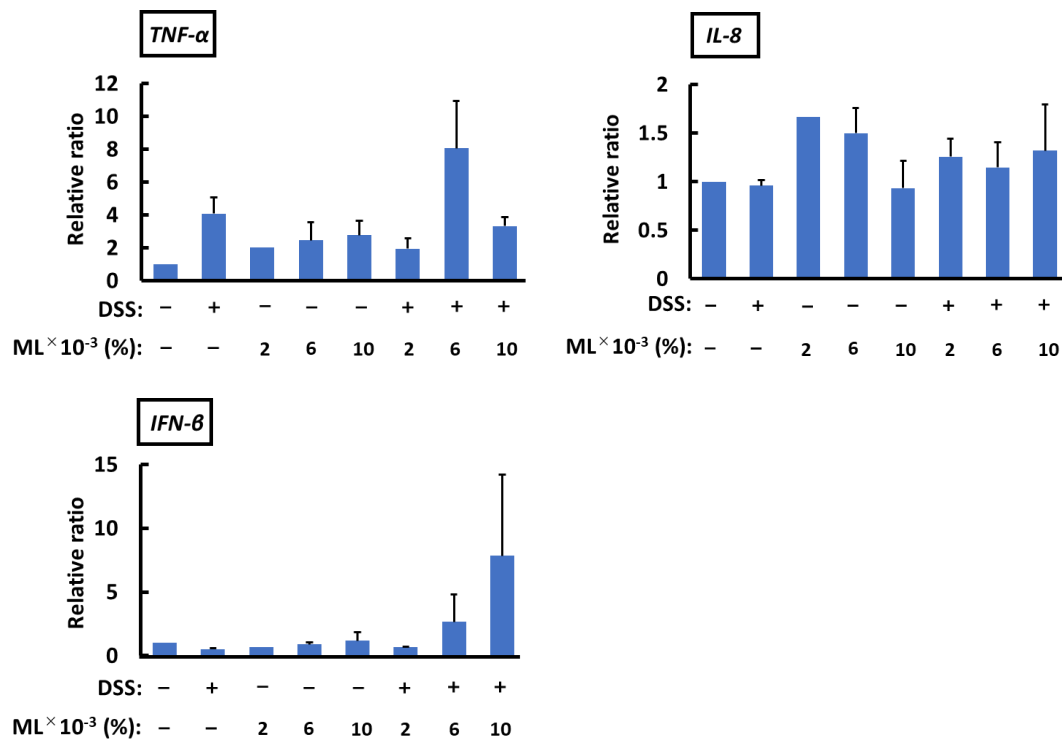


Figure 3-3. Effects of heat-killed ML feed content change on gene expression of *TNF-α*, *IL-8* and *IFN-β* in the colon of mice with DSS-induced colitis. Expression of genes associated with proinflammatory cytokines was measured by real-time PCR. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 6).

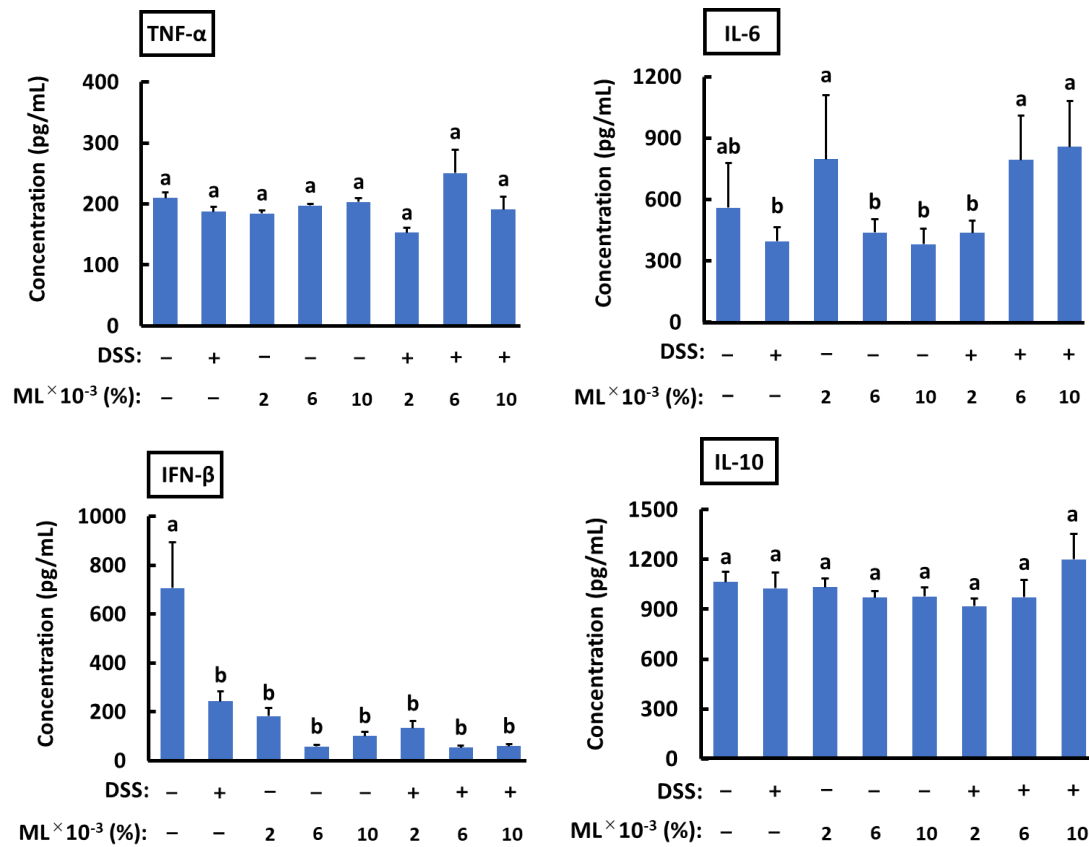


Figure 3-4. Effects of heat-killed ML feed content change on protein concentration of TNF- α , IL-6, IFN- β and IL-10 in blood of mice with DSS-induced colitis. Expression of protein in blood was measured by ELISA. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 6). Data represent the mean \pm SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 6, p < 0.05).

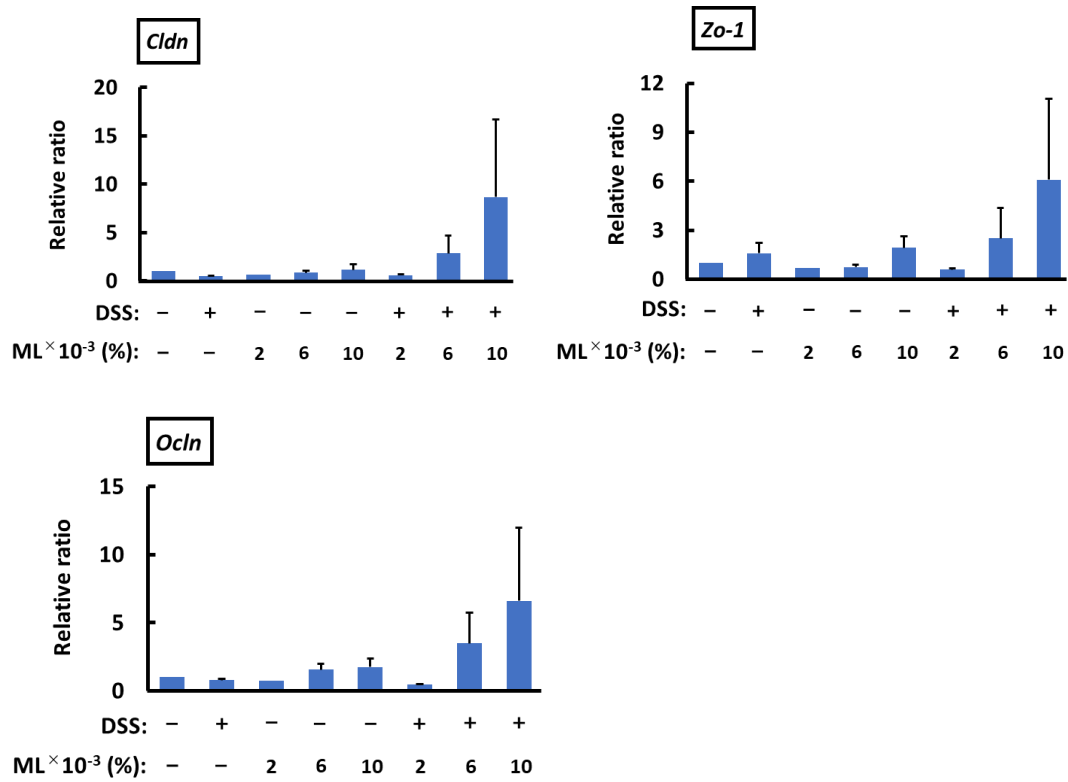


Figure 3-5. Effects of heat-killed ML feed content change on gene expression of *Claudin*, *Zonula occludens-1* and *Occludin* in the colon of mice with DSS-induced colitis. Expression of genes associated with cell adhesion molecule were measured by real-time PCR. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 6).

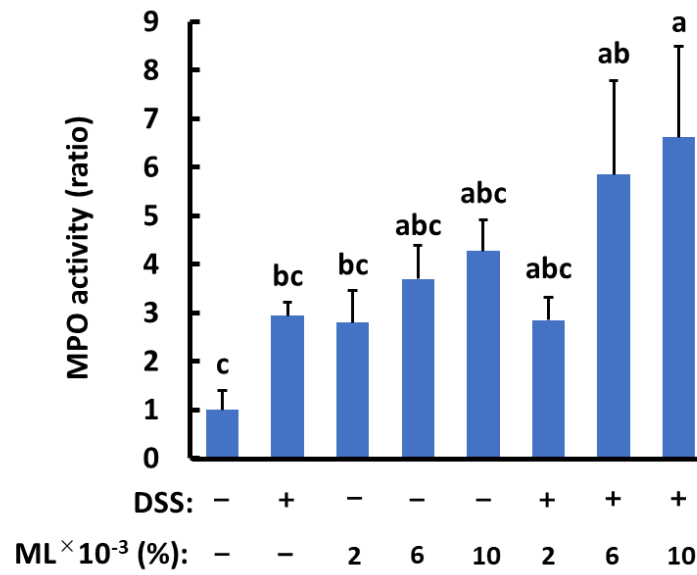


Figure 3-6. Effect of heat-killed ML feed content change on blood MPO activities in mice with DSS-induced colitis. Activity of MPO in blood was measured by MPO Fluorometric Activity Assay Kit. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 6). Data represent the mean ± SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 6, p < 0.05).

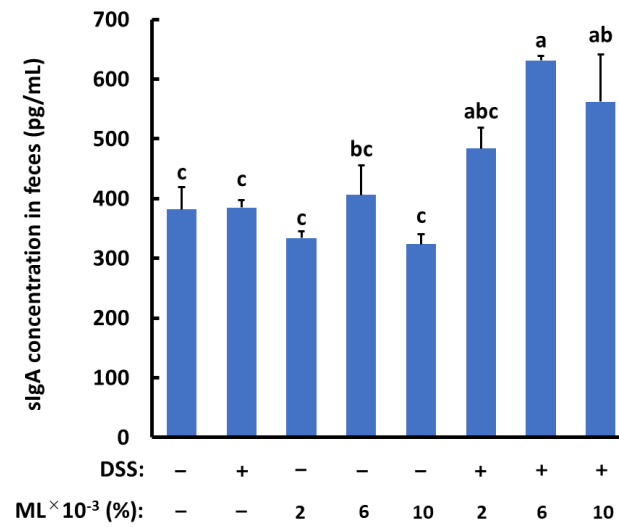


Figure 3-7. Effect of heat-killed ML feed content change on secreted-IgA (sIgA) in feces of mice with DSS-induced colitis. Secreted IgA in feces was measured by ELISA. The value for each group is the mean value for each group corrected by the control mean value (n = 6). Data represent the mean ± SE and statistical analysis was conducted by Duncan's multiple range test (n = 6, p < 0.05).

3. 4. 考 察

本章では、ML含有率の変化が、DSS誘発性大腸炎マウスにML摂取量依存的な効果を与えるか検証を行った。その結果、DSSを投与した0.002% ML-DSS、0.006% ML-DSSおよび0.01% ML DSS処理群では、Control-DSS群と比較して、炎症の程度を示すDAIスコアと結腸の短縮化は、ML含有率依存的に抑制されなかった。同様に、結腸における炎症性サイトカインである*IL-8*、*TNF- α* 遺伝子の発現量も、Control-DSS処理群と比較して各ML-DSS処理群では遺伝子の発現を抑制せず (Fig. 3-3)、血中における炎症性サイトカイン量も全処理濃度群でML無給餌群と変化がなかった (Fig. 3-4)。Control-DSS処理群での炎症の程度が低く、0.002% ML-DSS、0.006% ML-DSSおよび0.01% ML-DSS処理群は、Control-DSS処理群と比較して、炎症を抑制することは確認できなかった。しかし、結腸における細胞接着分子のmRNA発現量は、濃度依存的にその遺伝子の発現量が上昇していることが確認された (Fig. 3-5)。細胞接着タンパク質は、腸粘膜バリアの重要な構成要素として、隣接する腸上皮細胞の隙間を塞ぎ、抗原や微生物などの物質を内腔に留めており、細胞接着タンパク質は、腸の透過性や恒常性の維持に重要な役割を担っている³⁶⁾。葛の発酵エキスが、細胞接着タンパク質の発現を回復したことにより、DSSにより誘発した大腸炎を抑制させたという報告や⁶⁰⁾、キトサンが結腸組織における*TNF- α* のタンパク質発現の抑制および*Claudin*、*Zo-1*、*Occludin*といった細胞接着分子のタンパク質発現を促進し、マウスにおけるDSSにより誘発された大腸炎を抑制させたという報告も³⁶⁾があり、DSS誘発性大腸炎において、結腸上皮のバリア性を維持するための細胞接着分子の制御は極めて重要であると考えられる。このような多くの既報を基本に、第1章にて得られた、乳酸菌株死菌体MLによる細胞接着分子の発現誘導による細胞外への*IL-8*の分泌阻害であるという推察と、第2章にて、ML-DSS処理群が、*Zo-1*を除く*Claudin*、*Occludin*遺伝子の発現量を上昇することや、結腸における各炎症性サイトカインmRNA発現量を抑制したが、血中における炎症性サイトカイン分泌量に変化がないといった結果から、MLは腸管バリアを構成する細胞接着分子の発現を上方制御し、血中への炎症性サイトカインの流入を抑制することで、大腸炎抑制に貢献すると推察された。また、糞中の分泌型IgA分泌量は、ML含有率の変化により、その分泌量に有意差はなかったが、MLの摂取により、濃度が高まることが分かり、菌死体摂取がB細胞の活性化を誘導することも第2章と同様に考えられた (Fig. 3-7)。

総 括

ヒトの腸管にはおよそ 1,000 種, 100 兆個を超える腸内細菌叢を形成している。この腸内細菌叢は, 宿主の免疫機能と複雑な相互関係にある。しかし, 近年では食生活の欧米化や, 人工甘味料の過剰摂取などを原因としてディスバイオシスという腸内細菌叢の構成菌種の変容や異常増殖・減少が起きている。このディスバイオシスは現在難病指定されている IBD に関連があると考えられており, IBD の治療法の一つである, 腸内細菌叢の構成細菌の平衡に作用するポストバイオティクスが大いに注目を集めている。本研究では, 海洋や漬物など様々な環境から探索した乳酸菌株を細胞実験系にて, その機能検討を行い, マウスを用いた動物実験においても, 同様に抗炎症効果を発揮すると作業仮説を立て, 単離した乳酸菌株が DSS 誘発性大腸炎に及ぼす影響を検討した。

第 1 章 Caco2 細胞-RAW264.7 細胞共培養 LPS 刺激大腸炎モデルを用いた抗炎症誘導乳酸菌株の探索

現在, 炎症性腸疾患を完治に導く内科的治療は存在しないが, 腸の炎症を抑える有効な薬物治療は存在する。炎症性腸疾患の内科的治療には, 主にブデソニド, メサラジン, サラゾスルファピリジンなどの薬剤に依存している現状があるが, 薬物治療には, さまざまな副作用が伴うことがよくあり, 近年, 腸におけるポストバイオティクス製剤が, 副作用を引き起こさず, 大腸炎の炎症症状を効果的に緩和することから, 大腸炎の治療において大きな注目を集めている。それらはマウスマクロファージ RAW264.7 細胞株とヒト小腸上皮細胞株 Caco2 細胞株により共培養システムを用いて腸管モデルを作製し, 基底膜側にリポ多糖を添加することで, 大腸炎モデルとした。大腸炎の抑制評価は, 炎症性サイトカインである TNF- α , IL-8 の分泌量を ELISA 法にて測定することで行った。50 種の乳酸菌死菌体を選抜評価した結果, 糠漬けから採取した乳酸菌 (RbL) と沖縄県勝連半島の礁地にて採取した乳酸菌 (ML) が, Caco2 細胞からの IL-8 の分泌阻害を起し, 大腸炎抑制作用を示すことが分かった。炎症を誘導した RAW264.7 細胞の TNF- α 分泌量や mRNA 発現は 2 種の死菌体処理により変化しなかった。一方で, 炎症誘導後の死菌体処理した頂端膜側の Caco2 細胞からの IL-8 分泌量は有意に低下した。しかし, 細胞内における IL-8 mRNA の発現量は無処理群と変化しなかった。よって, Caco2 細胞からの IL-8 の分泌阻害機構は, 乳酸菌株 RbL および ML による, Claudin, ZO-1 や Occludin といった接着分子の発現誘導によるものではないかと推察された。

第2章 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける, ML および RbL の影響

動物実験は, 7週齢雄性 C57BL/6J マウスに抗炎症を示した2種の乳酸菌を配合した試験食を3週間摂餌させ, 給餌17日後に1%DSSにより炎症を惹起した。飼育期間中, 体重および便の状態から, DAI スコアを算出し, 抗炎症の状況を確認した。飼育期間終了後, 結腸および血液を採取し, 炎症に関連するサイトカイン, 細胞接着分子の mRNA 発現量をリアルタイムPCR法にて測定し, 血中に含まれる炎症に関連するタンパク質発現量と MPO 活性を ELISA 法にて測定した。その結果, ML 給餌により, DAI スコアや結腸の長さの短縮, 炎症に関連するサイトカインおよび, 細胞接着分子の mRNA 発現量, MPO 活性が Control-DSS グループ, RbL-DSS グループと比較して, いずれも回復したことを確認した。これらの結果から, ML が大腸炎抑制作用を示すことが示唆された。

第3章 DSS 誘発性大腸炎マウスにおける, ML の餌含有率変化の影響

第2章では, 海洋環境から単離した新規乳酸菌株である, ML に大腸炎抑制作用が確認された。そこで, マウスに与える試験食への ML 含有率の変化が, 大腸炎抑制に影響を及ぼすか検討を行い, ML の餌含有率の決定を行った。その結果, マウスの体重, DAI score, 炎症に関連するサイトカイン, 血中に含まれる炎症に関連するタンパク質発現量と MPO 活性では, ML 含有率依存性が確認できなかった。しかし, 結腸における *Claudin*, *Zo-1*, *Occludin* の細胞接着分子の遺伝子の発現量は, ML の濃度依存的に上昇した。本結果と, 第1章, 第2章の結果から, ML は腸管バリアを構成する接着分子の発現を上方制御し, 血中への炎症性サイトカインの流入を抑制することで, 大腸炎抑制に貢献することが推察された。本研究では, 細胞接着分子群の遺伝子の発現量およびタンパク質分泌量を, 細胞実験において検証を行っていないため, 動物実験と同様に ML 含有率依存的に細胞接着分子群の遺伝子の発現が上昇傾向を示すのかさらに検討をする必要がある。また, 糞中への IgA 分泌量は, ML 含有率に相関がなかったが, ML を摂取すると上昇することが分かった。よって, IgA を産生する B 細胞への ML の影響や IgA へのクラススイッチを誘導する TGF- β , IL-4 の遺伝子の発現およびタンパク質生成等に, ML 処理がどのように作用するか, さらに検討を行いたいと考えている。

参考文献

- 1) Ley, R. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *CelSML* **4**, 837-848 (2006).
- 2) Eckburg, P. B. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638 (2005).
- 3) 熊ノ郷 淳. 「免疫ペディア 101 のイラストで免疫学・臨床免疫学に強くなる！」 羊土社 pp.61-62, pp.234, pp. 118-127, pp137-139 (2017).
- 4) ビオフィルミン製薬. 「腸内フローラをもっと知ろう」 <https://www.biofermin.co.jp/nyusankin/chonai flora/> (2020.9.24 掲載) .
- 5) 日本人の食生活における野菜の重要性 https://vegetable.alic.go.jp/yasaijoho/joho/1208_joho01.html (2023.2.17 掲載) .
- 6) 農林水産省. https://www.maff.go.jp/j/heya/kodomo_sodan/0407/01.html (2022.11.11 掲載) .
- 7) Tatiana, T., Camila, F., Niels, C. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* **5**, 12, Doi: 10.1080/21688370.12 (2017).
- 8) 安藤 朗. 腸内細菌の種類と定着：その隠された臓器としての機能. 日本内科学会雑誌 **104**, 29-34 (2015).
- 9) Nettleton, J. E., Reimer, R. A., Shearer, J. Reshaping the gut microbiota: Impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance?. *Physiology & behavior* **164**, 488-493 (2016).
- 10) Jose, U., Ubeda, C., Artacho, A., Attur, M., Isaac, S., Reddy, S. M., Marmon, S., Neimann, A., Brusca, S., Patel, T., Manasson, J., Pamer, E. G., Littman, D. R., Abramson, S. B. Decreased Bacterial Diversity Characterizes the Altered Gut Microbiota in Patients With Psoriatic Arthritis, Resembling Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease *Arthritis Rheumatology* **67**, 128-139 (2015).

- 11) Abou-Donia, M., El-Masry, E., Abdel-Rahman, A., McLendon, R., Schiffman, S. Splenda Alters Gut Microflora and Increases Intestinal P-Glycoprotein and Cytochrome P-450 in Male Rats *Journal of Toxicology and Environmental Health* **71**, 1415-1429 (2008).
- 12) Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D., Corfe, B., Owen, L. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial ecology in health and disease* **26**, 191, Doi:10.3402/mehd.v26.26191 (2015).
- 13) Eckburg, P. B. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638 (2005).
- 14) Frank, D. N. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13780-13788 (2007).
- 15) 西村内科クリニック. 「潰瘍性大腸炎診断」 <https://nishimuranaika-cl.com/uc/> (2022.8.18 掲載) .
- 16) 晴海 3 丁目クリニック. 「症例写真」 <https://www.harumi3-cl.jp/crohn> (2022.8.18 掲載) .
- 17) 炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎・クローン病)とは?. <https://medicalnote.jp/contents/181019-005-RG> (2022.6.21 掲載) .
- 18) 薬剤師が抑えておくべき炎症性腸疾患 (IBD) 最新治療. <https://credentials.jp/2021-06/special/> (2022.11.11 掲載) .
- 19) Kamada, N., Chen, G., Núñez, G. A complex microworld in the gut: Harnessing pathogen-commensal relations *Science* **336**, 1325-1329 (2012).
- 20) Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. Expert consensus document, The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.

Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology **11**, 506-514 (2014).

- 21) 小村 智美, 西川 禎一. プロバイオティクスの免疫調節作用. 日本食品微生物学会雑誌. **30**, 1-14 (2013).
- 22) Appel-da-Silva, M. C., Narvaez, M. C., Perez, L. R. R., Drehmer, L., Lewgoy, J. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment, *Medical Mycology Case Reports* **18**, 15-17 (2017).
- 23) Kothari, D., Patel, S., Kim, S. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **111**, 537-547 (2019).
- 24) Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M. Postbiotics-a step beyond pre- and probiotics, *Nutrients* **8**2189, Doi: 10.3390/nu12082189 (2020).
- 25) Tsilingiri, K., Rescigno, M. Postbiotics: What else?, *Beneficial Microbes* **4**, 101–107 (2013).
- 26) Saiga, A., Kunisawa, J. 腸内環境を介して産生される代謝物による免疫・アレルギーの制御, 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会誌 **4**, 141–145, (2022).
- 27) Tanoue, T., Nishitani, Y., Kanazawa, K., Hashimoto, T., Mizuno, minvitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374**, 565-569 (2008).
- 28) Yamamoto, K., Kushima, R., Kisaki, O., Fujiyama, Y., Okabe, H. Combined effect of hydrogen peroxide induced oxidative stress and IL-1 β on IL-8 production in Caco-2 cells (a human colon carcinoma cell line) and normal intestinal epithelial cells. *Inflammation* **27**, 123-128 (2003).
- 29) Mack, D., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S. Hollingsworth, Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut Microbiota* **52**, 827-833 (2003).
- 30) Kim, Y., Kim, S., Jung, C., Song, S. The effects of thalidomide on the stimulation of

- NF- κ B activity and TNF- α production by lipopolysaccharide in a human colonic epithelial cell line. *Cells* **17**, 210-216 (2004).
- 31) Gerard, C., Rollins, B. Chemokines and disease. *Nature Immunology* **2**, 108-115 (2001).
- 32) Gijssbers, K., Assche, G., Joossens, S., Struyf, S., Proost, P., Rutgeerts, P., Geboes, K., Damme, J. CXCR-1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue. *European Journal of Immunology* **34**, 1992-2000 (2004).
- 33) Coëffier, M., Marion, R., Ducrotté, P., Déchelotte, P. Modulating effect of glutamine on IL-1 β -induced cytokine production by human gut. *Nature* **22**, 407-413 (2003).
- 34) 薩 秀夫. 食物分子の腸管吸収とその機能・安全性に関する分子栄養学的研究. 日本栄養・食料学会誌 **64**, 207-214 (2011).
- 35) Eckmann, L., Kangnoff, M., Fierer, J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *American Society for Microbiology Journals* **61**, 4569-4574 (1993).
- 36) Wang, J., Zhang, C., Guo, C., Li, X. Ameliorates DSS-induced ulcerative colitis mice by enhancing intestinal barrier function and improving microflora. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 5751, Doi: 10.3390/ijms20225751 (2019).
- 37) Groschwitz, K. R., Hogan, S. P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Immunology* **124**, 2-20 (2009).
- 38) 上西寛司. 乳酸菌の生理機能とその要因. 日本調理科学会誌 **46**, 129-133 (2017).
- 39) Hu, T., Wang, H., Xiang, C., Mu, J., Zhao, X. Preventive Effect of *Lactobacillus acidophilus* XY27 on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Drug Design, Development and Therapy* **22**, 5645-5657 (2020).
- 40) 清野 宏, 植松 智. 「生体バリア 粘膜や皮膚を舞台とした健康と疾患のダイナ

ミクス」 羊土社, pp. 49 (2017).

- 41) MacEwan, D. J. TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *British Journal of Pharmacology* **135**, 855-875 (2002).
- 42) Wang, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Ma, W., Ning, K., Xiang, J., Cui, J., Xiang, H. Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intestinal microbiota, IL-10, and barrier function. *Applied Microbiology and Biotechnology* **104**, 334-349 (2020).
- 43) Anjum, N., Maqsood, S., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., Momin, A. *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **9**, 1241-1251 (2014).
- 44) Alex, P., Zachos, NC., Nguyen, T. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Disease* **3**, (2009).
- 45) Young, Y. Folate Receptor-targeted diagnostics and therapeutics for inflammatory diseases. *Immune Network* **16**, 337-343 (2016).
- 46) Shin, J., Cho, E., Choi, H., Seo, J., An, H., Park, H., Cho, Y., Lee, K. Anti-inflammatory effect of a standardized triterpenoid-rich fraction isolated from *Rubus coreanus* on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-induced macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* **158**, 291-300 (2014).
- 47) Young, Y. Folate Receptor-Targeted Diagnostics and Therapeutics for Inflammatory Diseases. *Immune Network* **16**, 337-343 (2016).
- 48) Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J. Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204-7218 (2018).
- 49) Zhou, X., Liu, H., Zhang, J., Mu, J., Zalan, Z., Hegyi, F., Takács, K., Zhao, X., Du, M. Protective effect of *Lactobacillus fermentum* CQPC04 on dextran sulfatesodium induced colitis in mice is associated with modulation of the nuclear factor- κ B signaling

- pathway. *Journal of Dairy Science* **11**, 9570-9585 (2019).
- 50) Westbrook, A. M., Szakmary, A., Schiestl, R. H. Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers lessons learned from mouse models. *Mutation Research* **705**, 40-59 (2010).
- 51) Groschwitz, K. R., Hogan, S. P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Immunology* **124**, 2-20 (2009).
- 52) Li, B., Alli, R., Vogel, P., Geiger, T. L. IL-10 modulates DSS-induced colitis through a macrophage – ROS – NO axis. *Mucosal Immunology* **4**, 869-878 (2014).
- 53) Glocker, E. O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N., Grimbacher, B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1246**, 102-107 (2011).
- 54) Glocker, E. O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E. M., Schäffer, A. A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., Hätscher, N., Pfeifer, D., Sykora, K. W., Sauer, M., Kreipe, H., Lacher, M., Nustede, R., Woellner, C., Baumann, U., Salzer, U., Koletzko, S., Shah, N., Segal, A. W., Sauerbrey, A., Buderus, S., Snapper, S. B., Grimbacher, B., Klein, C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *The New England journal of medicine* **361**, 2033-2045 (2009).
- 55) Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
- 56) Spencer, S. D., Marco, F. D., Hooley, J., Meek, S. P., Bauer, M., Ryan, A. M., Sordat, B., Gibbs, V. C., Aguet, M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *The Journal of Experimental Medicine* **187**, 571-578 (1998).
- 57) Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., Bhan, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219-230 (2002).
- 58) Vancamelbeke, M., Vermeire, S. The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **11**, 821-834 (2017).

- 59) ケフラン. <https://www.kefran.coRbLog/column/post/010/> (2023/01/09 掲載) .
- 60) Peng, L., Gao, X., Nie, L., Xie, J., Dai, T., Shi, C., Tao, L., Wang, Y., Tian, Y. Astragalin attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute experimental colitis by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting NF- κ B activation in mice. *Frontiers in immunology* **11**, 2058, Doi: 10.3389/fimmu.2020.02058. eCollection 2020 (2020).
- 61) Choi, S., Woo, J., Jang, Y., Kang, J., Jang, J., Yi, T., Park, S., Kim, S., Yoon, Y., Oh, S. Fermented *Pueraria lobata* extract ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by reducing pro-inflammatory cytokines and recovering intestinal barrier function. *Laboratory Animal Research* **3**, 151-159 (2016).

謝辞

今回の研究を行うにあたり、天然環境や植物性発酵食品からの単離した乳酸菌を提供していただきました株式会社バイオバンク常務取締役 高畑 宗明様に謹んで厚く御礼申し上げます。本論文の審査をいただきました水圏生物利用学教育研究分野教授田丸 浩先生ならびに海洋微生物学教育研究分野准教授田中 礼士先生に御礼申し上げます。本研究を行うにあたり常に好意的にご協力いただいた水圏材料分子化学研究室の皆様には深く感謝の意を表します。