

原著論文

Bifidobacterium longum BB536の鼻腔内投与が マウスの気道の粘膜免疫とインフルエンザウイルスの感染に及ぼす影響

岩淵紀介^{1*}・蛭田直幸²・清水金忠¹・八重島智子¹・岩附慧二¹・保井久子²

¹森永乳業株式会社食品基盤研究所, 神奈川県座間市東原 5-1-83 228-8583

²信州大学大学院農学研究科, 長野県上伊那郡南箕輪村8304 399-4598

Effects of intranasal administration of *Bifidobacterium longum* BB536
on mucosal immune system in respiratory tract and influenza virus infection in mice

Noriyuki Iwabuchi,¹ Naoyuki Hiruta,² Kanetada Shimizu,¹ Tomoko Yaeshima,¹ Keiji Iwatsuki,¹ and Hisako Yasui²

¹Food Science and Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Zama, Kanagawa, 228-8583

²Graduate School of Agricultural Science, Shinshu University, Minamiminowa-mura, Nagano 399-4598

Abstract

We investigated effects of intranasal administration of *Bifidobacterium longum* BB536 on mucosal immune system in respiratory tract and influenza virus infection in mice. Mice were intranasally administered BB536 (BB536 group) or phosphate-buffered saline (control group) for 3 consecutive days and were intranasally inoculated with influenza virus (PR8). Three days after inoculation, phosphate-buffered saline was administered intranasally. After that, the mice were observed for 14 days to assess cumulative incidence and survival rate. The cumulative incidence and the survival rate of the BB536 group were significantly improved as compared with those of the control group. After intranasal administration of BB536 or phosphate-buffered saline for 3 consecutive days, cells from mediastinal lymph nodes and nasal-associated lymphoid tissue were prepared. The cells were cultured in the presence of concanavaline A for 3 days and the concentration of cytokines in the culture supernatants was determined. The production of interleukin-12p40 by the cells from mediastinal lymph nodes and the production of γ -interferon by the cells from nasal-associated lymphoid tissue were increased in the BB536 group. These results suggest that intranasal administration of BB536 enhances cellular immunity of mediastinal lymph nodes and nasal-associated lymphoid tissue and protects against influenza virus infection.

緒言

発酵乳は人の健康維持や疾病予防が期待できる食品として数多くの保健効果が報告されており、整腸作用をはじめ、免疫調節作用や血清コレステロール低下作用など、多彩な生理機能が報告されている。発酵乳には乳由来の乳構成成分の他に、乳酸菌菌体とその代謝産物が含まれ、これらの成分が複合的に作用して、これらの保健効果をもたらしていると考えられている。一部の乳酸菌・ビフィズス菌の菌体では、細胞性免疫を賦活するなどして抗腫瘍作用を示すことや、腸管や呼吸器などの粘

膜からのIgAの分泌を亢進させ、様々な感染症に対する防御作用を示すものがあることが報告されている¹⁾。インフルエンザウイルスの感染防御作用については、マウスに対する乳酸菌*Lactobacillus casei*の経口投与または鼻腔内投与が、気道の細胞性免疫を賦活し、インフルエンザウイルスの感染を防御することが報告されている^{2,3)}。

インフルエンザはインフルエンザウイルスが気道粘膜の上皮細胞に感染することによって発症する急性の呼吸器感染症である。ウイルスが気道粘膜上皮細胞に感染すると、気道粘膜とその関連リンパ組織で免疫応答が誘導され、感染早期には特異性の低い自然免疫が、感染後期には特異性の高い獲得免疫が誘導される。感染初期の免疫応答では、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)がウイルス感染細胞を溶解することで感染の拡大を阻止している^{4,5)}。感染後期の免疫応答では、感染ウイルスを特

* 連絡者 (fax: 046-252-3055, e-mail: n-iwabuchi@morinaga milk.co.jp)

2009年7月23日受付

2009年10月28日受理

異的に認識する細胞傷害性 T 細胞が誘導され⁶⁾, IgA や IgG などのウイルス特異的な抗体が産生されることで感染の拡大を阻止する⁷⁾。このように, 抗体による液性免疫と並んで, NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞による細胞性免疫は, インフルエンザ感染防御において重要な役割を果たしている。

Bifidobacterium longum BB536 (以下 BB536 と記す) は乳児から単離され, 発酵乳や育児用粉ミルクに応用されているビフィズス菌で, 整腸作用や花粉症の症状緩和効果など多くの生理効果が確認されている⁸⁾。65歳以上の高齢者27名を対象とした臨床試験では, BB536の継続摂取がNK活性や好中球活性を高め, インフルエンザ発症者数や38°C以上の発熱者数をBB536を摂取していない群に比べ有意に減少させた(難波ら, 未発表データ)。そこで本研究では, インフルエンザウイルス感染に対するBB536の作用を明らかにするため, BB536の鼻腔内投与によるマウスの気道の粘膜免疫とインフルエンザウイルスの感染に対する影響を調べた。

材料および方法

1. 動物

8週齢のBALB/c雄性マウス(日本SLC)を使用した。水と飼料(MM-3; 船橋ファーム)は自由摂取させ, 7日間の予備飼育後, 実験に供した。実験は信州大学動物実験倫理委員会の定める動物実験における倫理規定に遵って行った。

2. 菌体の調製

使用菌株は, *Bifidobacterium longum* BB536株(森永乳業株式会社)を用いた。BB536を0.05% L-システインを含むMRS培地(Difco)に接種し, 37°Cで16時間, 静置培養した。集菌後, リン酸緩衝生理食塩水で2回, 蒸留水で2回洗浄し, 凍結乾燥を行った。凍結乾燥菌体をリン酸緩衝生理食塩水で10 mg/mLに懸濁し, 100°Cで30分間の加熱処理をしたものを使用した。

3. インフルエンザウイルス

A型インフルエンザウイルスA/Puerto rico/8/34 (PR8株: H1N1)を使用し, 本ウイルスは田村慎一博士(元国立感染症研究所)より分与を受けた。PR8株を発育鶏卵(11日卵)尿膜腔内に接種し, 34°Cで2日間培養し, 4°Cに一晚置き, 尿膜腔液を採取した。この尿膜腔液のウイルス価は, MDCK細胞(イヌ腎由来細胞; 田村慎一博士より分与)が50%感染するウイルス希釈濃度の逆数値で表記し, $10^{7.4}$ TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose)/mLであった。この尿膜腔液をウイルス液として使用した。

4. BB536菌体の投与とインフルエンザウイルスの感染
BB536投与群(n=7)のマウスには, 10 mg/mLの

BB536菌体懸濁液を, 片鼻10 μLずつ計20 μLを鼻腔内に3日間投与した。コントロール群(n=8)のマウスには, リン酸緩衝生理食塩水を投与した。BB536菌体懸濁液またはリン酸緩衝生理食塩水を3日間投与した翌日に, インフルエンザウイルスPR8株($10^{5.4}$ TCID/ml)を片鼻1 μLずつ計2 μL接種し上気道感染させた。このインフルエンザウイルス接種の3日後に, リン酸緩衝生理食塩水を片鼻10 μLずつ計20 μL投与し, インフルエンザウイルスを下気道へと押し流した。これらのBB536菌体やインフルエンザウイルスの鼻腔への投与は, ペントバルビタール(65 mg/kg)による麻酔下で行った。押し流しの次の日から14日間, マウスの発症と生存を観察した。発症の判定はマウスの体重減少と毛の逆立ちから判断し, 発症に至ったマウスの数の割合から累積発症率を算出した。

5. 細胞調製と細胞培養

BB536菌体懸濁液またはリン酸緩衝生理食塩水を3日間投与した翌日に, 肺縦隔リンパ節と鼻腔関連リンパ組織を採取し, 3匹または4匹の組織をプールして細胞を調製した。鼻腔関連リンパ組織の採取は, Asanuma⁹⁾らの方法に従った。細胞は10%牛胎児血清, 100 U/mL ペニシリン, 100 μg/mL ストレプトマイシンを含むRPMI1640培地にて, 2.5×10^6 cells/mLの濃度に調製した。調製した細胞は, 2.5 μg/mL コンカナバリンA (Sigma)存在下で, 37°C, 5%CO₂培養器にて3日間培養し, 培養上清を回収しサイトカイン濃度を測定した。

6. サイトカイン濃度の測定

培養上清中のγ-インターフェロン(IFN-γ), インターロイキン-12p40 (IL-12p40), IL-4濃度は, 市販のサンドイッチELISA測定キット(R&D Systems)を用いて測定した。

7. 統計解析

コントロール群とBB536投与群の間における累積発症率及び生存率の比較は, ログランク検定を用いた。またコントロール群とBB536投与群の間におけるサイトカイン濃度は, 4回以上行った実験の平均値±標準偏差で示し, 群間の比較はStudentのt検定を用いた。危険率5%未満で統計学的に有意差ありと判定した。

結果

1. BB536の鼻腔内投与によるインフルエンザ感染に対する防御効果

BB536菌体の鼻腔内投与が, インフルエンザウイルス感染による発症率と生存率に及ぼす影響をFig. 1に示した。BB536投与群はコントロール群と比べて, 累積発症率が有意に低下し, 生存率の有意な改善が認められた。

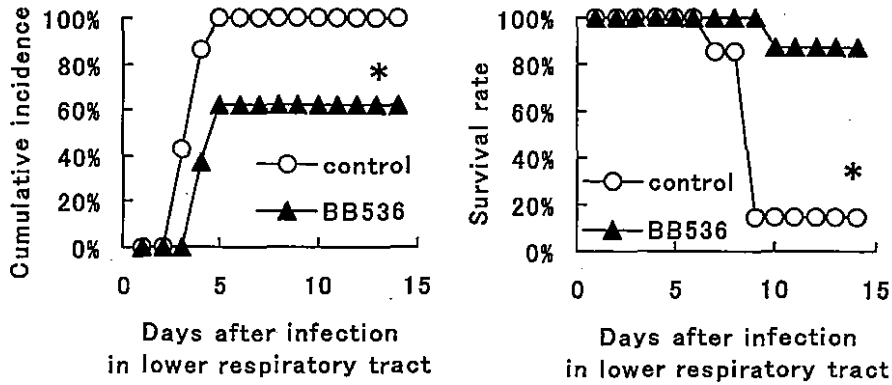


Fig. 1 Reduction of morbidity and mortality due to influenza virus infection in mice administrated *Bifidobacterium longum* BB536 intranasally. Mice were intranasally administered BB536 (BB536 group) or phosphate-buffered saline (control group) and were intranasally inoculated with influenza virus (PR8). Three days after inoculation; phosphate-buffered saline was administered intranasally. After that, the mice were observed for 14 days to assess cumulative incidence and survival rate. *, significant difference between the groups by Log Rank test at $p < 0.05$.

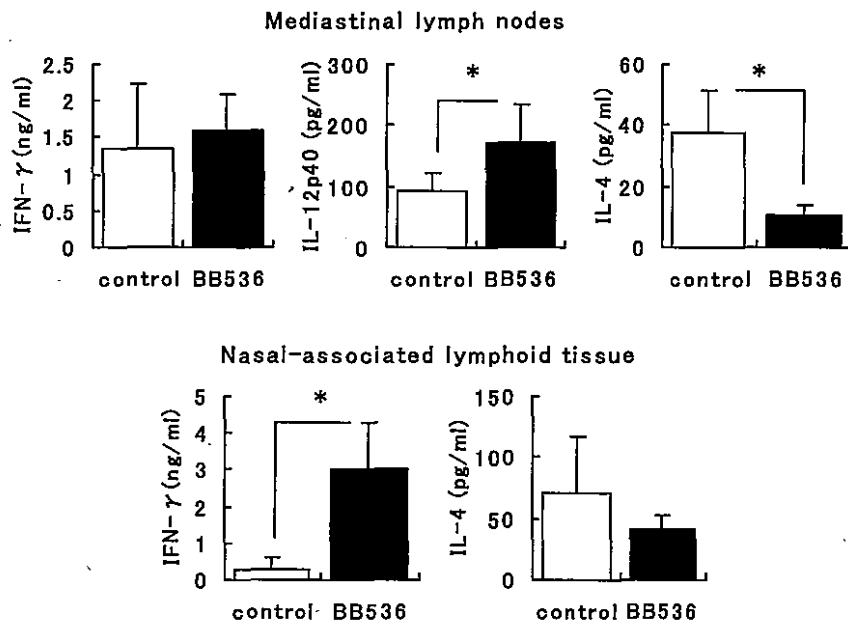


Fig. 2 Effects of intranasal administration of *Bifidobacterium longum* BB536 on cytokine production by cells of mediastinal lymph nodes and nasal-associated lymphoid tissue. Mice were intranasally administered BB536 or phosphate-buffered saline. Cells from mediastinal lymph nodes and nasal-associated lymphoid tissue were cultured in the presence of concanavaline A for 3 days. Supernatants were collected, and the concentration of various cytokines was determined. Data are shown as the mean \pm s.d. of more than four independent experiments. *, significant difference by Student's t-test at $p < 0.05$.

2. BB536の鼻腔内投与による肺縦隔リンパ節と鼻関連リンパ組織に及ぼす影響

BB536菌体の鼻腔内投与による気道の粘膜免疫に及ぼす影響を調べるために、菌体鼻腔内投与後の肺縦隔リンパ節と鼻関連リンパ組織のリンパ球からのサイトカイン産生を調べた (Fig. 2)。肺縦隔リンパ節の細胞からのサイトカイン産生では、IFN- γ の産生に両群で差はなかったが、BB536投与群でIL-12p40の産生が有意に高く、IL-4の産生が抑制された。一方、鼻関連リンパ組織の細胞からのサイトカイン産生は、IFN- γ の産生が

BB536投与群で有意に高かった。

考 察

BB536の鼻腔内投与によって、インフルエンザウイルスの感染による累積発症率と生存率の有意な改善が認められた。肺縦隔リンパ節や鼻関連リンパ組織といった気道粘膜に関連したリンパ組織は、インフルエンザウイルスに対する感染防御において重要な役割を果たしている。肺縦隔リンパ節ではインフルエンザウイルスの感染

によってウイルス特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導されることで、感染の拡大を阻止している¹⁰⁾。扁桃を持たないげっ歯類の鼻関連リンパ組織は、ヒトのワルダイエル扁桃輪に相当すると考えられる粘膜関連リンパ組織で¹¹⁾、細胞傷害性 T 細胞と分泌型 IgA を誘導することでウイルス排除に寄与している^{6,12)}。そこで、BB536 鼻腔内投与が肺縦隔リンパ節や鼻関連リンパ組織に与える影響を検討した。

BB536 鼻腔内投与は、肺縦隔リンパ節からの IL-12p40 と鼻関連リンパ組織からの IFN- γ の産生を亢進した。マウスにインフルエンザウイルスを感染させると肺における IL-12 の産生が見られ、産生された IL-12 が細胞傷害性 T 細胞を活性化させるなどして、感染初期の感染防御に寄与していることが示されている⁵⁾。また、鼻腔の IFN- γ を産生するリンパ球が、鼻粘膜のウイルス排除に寄与していることが示唆されている¹³⁾。これらのことから、BB536 菌体は鼻粘膜を介して、肺縦隔リンパ節や鼻関連リンパ組織の細胞性免疫を賦活し、インフルエンザウイルスの感染を防御したと考えられた。

多くの乳酸菌やビフィズス菌が、保健効果が期待できるプロバイオティクスとして、発酵乳などの乳製品で応用されている。プロバイオティクスとしての乳酸菌・ビフィズス菌の生理機能を理解するためには、乳酸菌やビフィズス菌の菌体または菌体構成成分が宿主に及ぼす影響を評価する必要がある。今回、ビフィズス菌 BB536 の菌体がインフルエンザの感染部位である気道粘膜に直接作用して、気道の細胞性免疫を賦活し得ることを示した。しかし、乳酸菌・ビフィズス菌が腸管を介してどのように腸管以外の抹消免疫に影響を及ぼしているかについては、不明な点が多い。今後、BB536 を含めた乳酸菌・ビフィズス菌が、どのように腸管を介して宿主の免疫に影響を及ぼすかについて検証を進めていきたい。

要 約

Bifidobacterium longum BB536 の鼻腔内投与によるマウスの気道の粘膜免疫とインフルエンザウイルス感染に対する影響を調べた。マウスにリン酸緩衝生理食塩水 (コントロール群) または BB536 加熱死菌体 (BB536 投与群) を 3 日間鼻腔内に投与した後に、インフルエンザウイルス (PR8 株) を鼻腔内に接種した。3 日後にリン酸緩衝生理食塩水で下気道に押し流し、累積発症率および生存率を 14 日間観察した。BB536 投与群では、累積発症率と生存率の有意な改善が認められた。また、3 日間のリン酸緩衝生理食塩水または BB536 菌体の鼻腔内投与の後に、肺縦隔リンパ節と鼻関連リンパ組織から細胞を調製した。調製した細胞をコンカナバリン A 存

在下で 3 日間培養し、培養上清中のサイトカインを測定した。BB536 投与群で肺縦隔リンパ節からの IL-12p40 産生と鼻関連リンパ組織からの IFN- γ 産生が増加した。これらの結果から、BB536 の鼻腔内投与は肺縦隔リンパ節や鼻関連リンパ組織の細胞性免疫を賦活し、インフルエンザ感染を防御したと考えられた。

引用文献

- 1) 細野明義:「発酵乳の科学」, アイ・ケイコーポレーション, 神奈川, pp. 141-147 (2002)
- 2) Hori, T., Kiyoshima, J., Shida, K., and Yasui, H.: Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9, 105-108 (2002)
- 3) Hori, T., Kiyoshima, J., Shida, K., and Yasui, H.: Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 593-597 (2001)
- 4) Stein-Streilein, J., and Guffee, J.: In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection. *J. Immunol.*, 136, 1435-1441 (1986)
- 5) Monteiro, J.M. Harvey, C., and Trinchieri, G.: Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *J. Virol.*, 72: 4825-4831 (1998)
- 6) Wiley, J.A., Hogan, R.J., Woodland, D.L., and Harmsen, A.G.: Antigen-specific CD8+ T cells persist in the upper respiratory tract following influenza virus infection. *J. Immunol.*, 167, 3293-3299 (2001)
- 7) Asahi, Y., Yoshikawa, T., Watanabe, I., Iwasaki, T., Hasegawa, H., Sato, Y., Shimada, S., Nanno, M., Matsuoka, Y., Ohwaki, M., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Aizawa, C., Sata, T., Kurata, T., and Tamura, S.: Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.*, 168, 2930-2938 (2002)
- 8) Xiao J.Z.: *Bifidobacterium longum* BB536. in *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2nd Edition. Y.K. Lee and S. Salminen ed. Jhon Wiley & Sons, Inc., Hoboken NJ, pp. 488-491 (2009)
- 9) Asanuma, H., Thompson, A. H., Iwasaki, T., Sato, Y., Inaba, Y., Aizawa, C., Kurata, T. and Tamura,

- S.: Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *J. Immunol. Methods*, **202**, 123-131 (1997)
- 10) Hamilton-Easton, A., Eichelberger, M.: Virus-specific antigen presentation by different subsets of cells from lung and mediastinal lymph node tissues of influenza virus-infected mice. *J. Virol.*, **69**, 6359-6366 (1995)
- 11) Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D.L., Lund, F.E., and Randall, T.D.: Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.*, **10**, 927-934 (2004)
- 12) Tamura, S., Iwasaki, T., Thompson, A.H., Asanuma, H., Chen, Z., Suzuki, Y., Aizawa, C., and Kurata, T.: Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J. Gen. Virol.*, **79**, 291-299 (1998)
- 13) Tamura, S., Miyata, K., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Nakajima, K., Suzuki, Y., Aizawa, C., and Kurata, T.: Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in the nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *J. Immunol.*, **156**, 3892-3900 (1996)