

於:第18回バイオ治療法研究会学術集会(香川) 2014.12.13

ダニ感作NC/Ngaアトピーマウスに対する 小麦発酵抽出物(LPS)の経口投与の効果 ～第1報～

○若命浩二¹、小松健一¹、上野哲史¹、青木りさ¹
大川博²、西澤孝志³、稲川裕之⁴

1. 北海道薬科大学 薬学部生命科学分野
2. 株式会社スケアクロウ
3. 自然免疫応用技研株式会社
4. 香川大学医学部統合免疫システム学講座



Hokkaido Pharmaceutical University
School of Pharmacy

NC/Ngaマウスの特徴



系統化:

1957年名古屋大学のグループによって純系化されて、当初から脱毛、紅斑などの皮膚病変などの炎症病態が確認されていた。

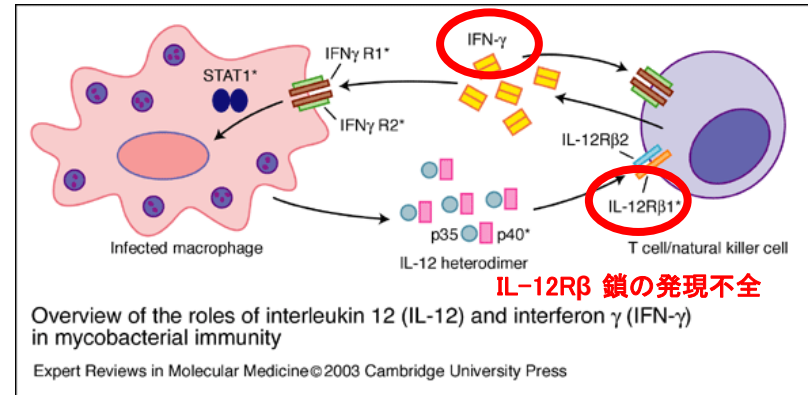
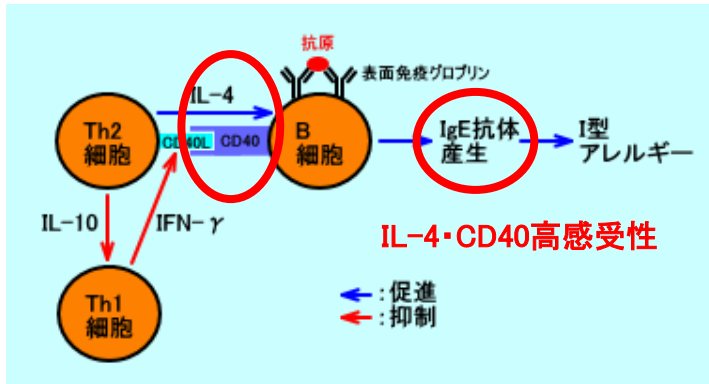
炎症のメカニズムなど:

- ✓ 症状の発現時期にほぼ一致して、血液中のIgE濃度が上昇することから、病態発現およびその増悪化におけるIgEの関与が予想される。
- ✓ B細胞のIL-4・CD40リガンド高感受性およびT細胞のIL-12Rβ 鎖の発現不全に起因するIFN-γ 低産生と低感受性がNC/Ngaマウスの高IgE血症の主たる原因であることが明らかとなった。
- ✓ Vβ 8⁺NKT細胞が欠如している為、IFN-γ 産生が低下する。また、NCマウスのリンパ球はIFN-γ 産生誘導因子であるIL-18の、マクロファージからの産生が低下している為、LPSによるIFN-γ 産生が低下する。
- ✓ 皮膚病変部位ではケラチノサイトが主な神経成長因子産生細胞であることから、マスト細胞の増加や知覚神経線維の伸張を促し、知覚過敏状態となり結果的に引っ掻き(痒み)行動を誘起し、病状を増悪化させるものと推察される。

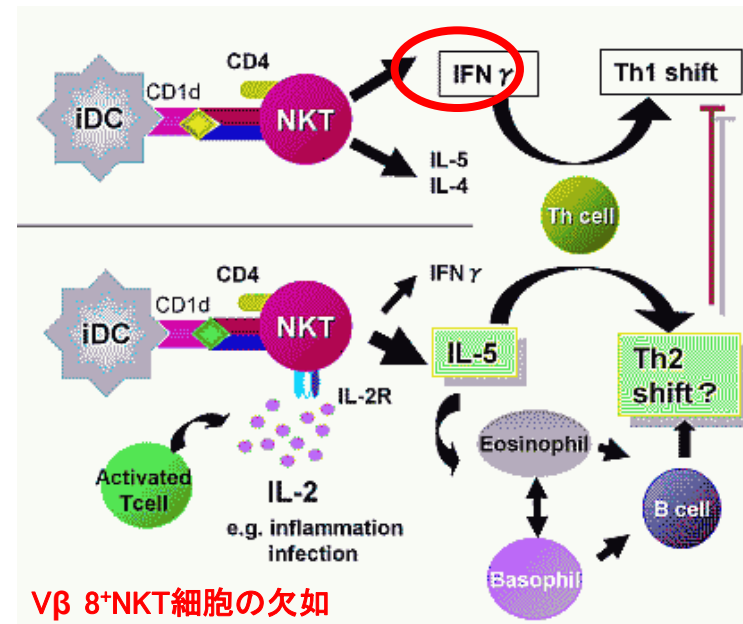
※参考: 日本エスエルシー技術資料

Koide N, Morikawa A, Naiki Y, Tumurkhuu G, Yoshida T, Ikeda H, Yokochi T. Low susceptibility of NC/Nga mice to tumor necrosis factor- α -mediated lethality and hepatocellular damage with D-galactosamine sensitization. *Clin Immunol*. 2009;130:225-32.

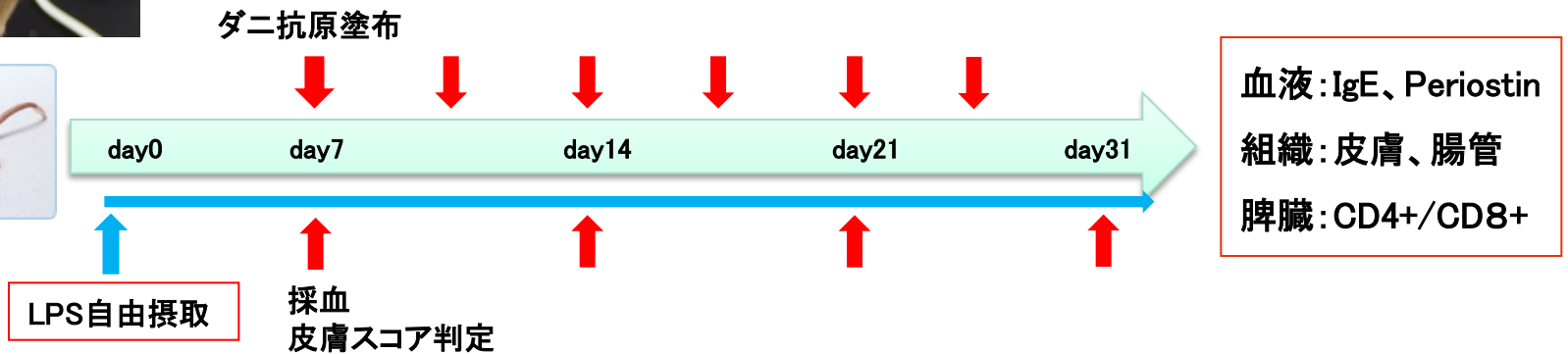
NC/Ngaマウスの免疫不全のメカニズム



株式会社ビオスタ資料より



実験計画



※LPS=小麦発酵抽出物中に(6.8mg/g含有)

5ml/25gBW摂取したとして

LPS:L=134 μ g/kg/day

LPS:H=1340 μ g/kg/day

(小麦発酵抽出物: 自然免疫応用技研株式会社より供与)

1. コントロール(n=8)
2. コントロール+ダニ抗原(n=8)
3. LPS(L: 100 μ g/ml)+ダニ抗原(n=8)
4. LPS(H: 1000 μ g/ml) +ダニ抗原(n=8)

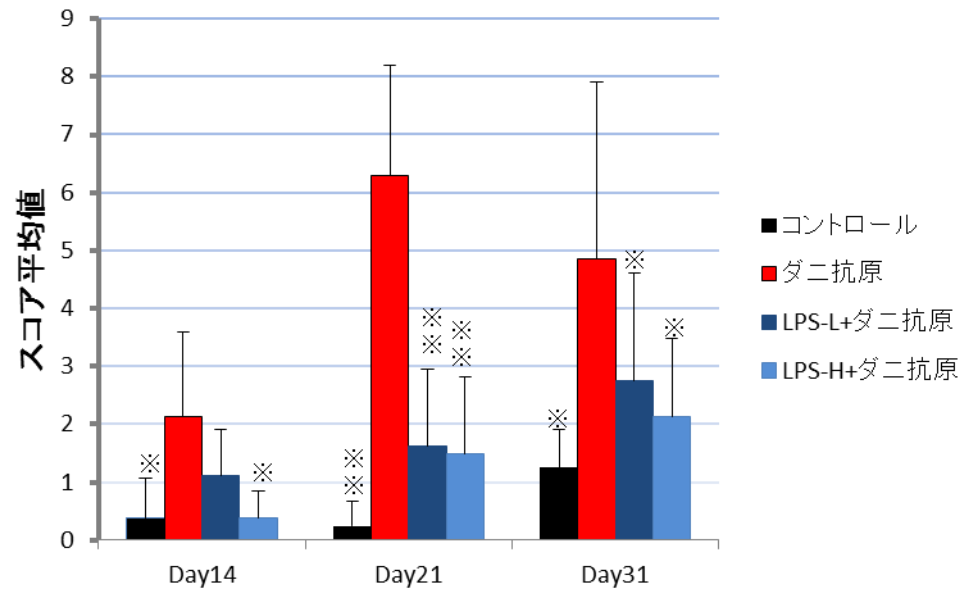
結果及び考察

皮膚スコア判定結果

アトピー所見スコア表

- ① 発赤・出血
- ② 痂皮形成・乾燥
- ③ 浮腫
- ④ 擦傷・組織欠損

※各項目を0～3段階で評価し、合計スコアを算出



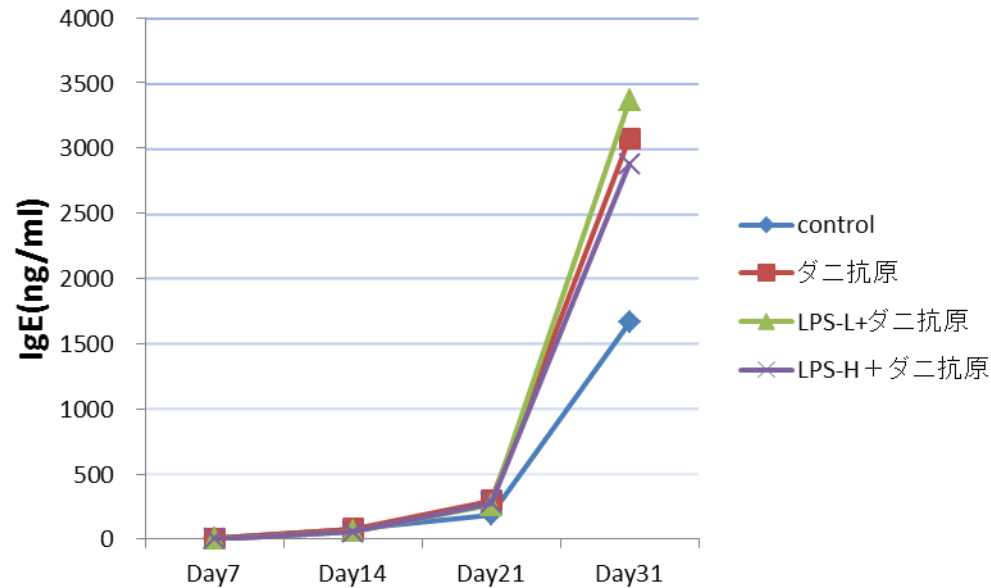
コントロール

ダニ抗原

LPS-L+ダニ抗原

LPS-H+ダニ抗原

血清中IgE定量 結果



血清中IgE値 (ng/mL)

	Day7	Day14	Day21	Day31
control	6.2±3.2	76.9±25.7	187.2±70.8**	1663.9±305.6*
ダニ抗原	7.2±3.2	77.2±12.0	297.9±9.4	3073.3±502.6
LPS-L+ダニ抗原	3.3±0.3	60.7±5.5**	261.3±26.2*	3366.9±201.5
LPS-H+ダニ抗原	2.9±1.1*	57.0±8.0*	277.1±34.0	2877.5±682.8*

※P<0.05 ※※P<0.01: vsダニ抗原

脾臓リンパ球CD4+/CD8+比 結果

	CD4+/CD8+
コントロール	1.28 ± 0.23 ※
ダニ抗原	1.89 ± 0.38
LPS-H + ダニ抗原	2.54 ± 0.42 ※

※P<0.05: vsダニ抗原

Bak et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012, **12**:108
<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/108>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

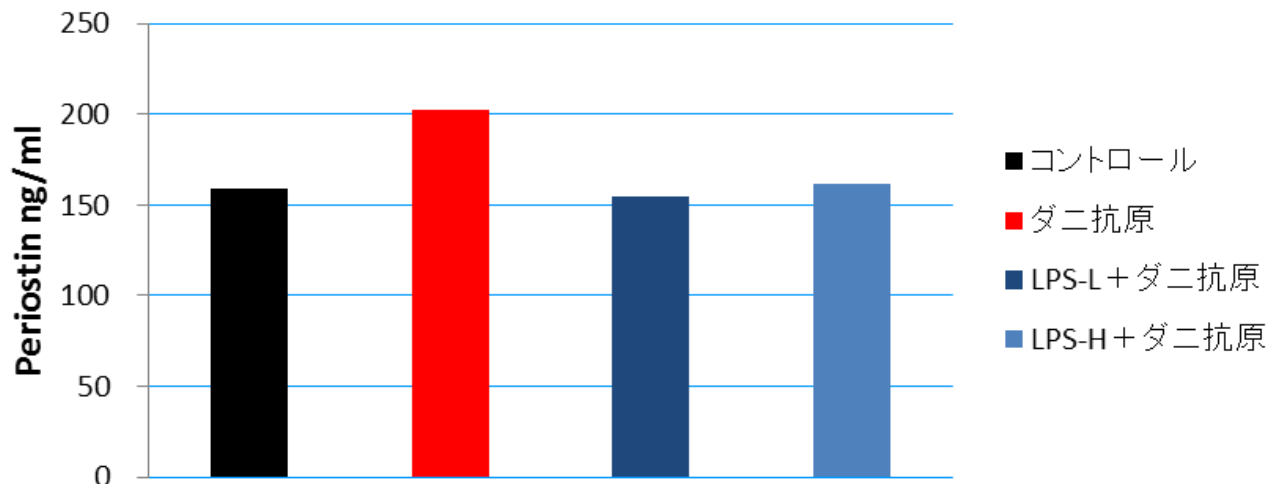
Application of concentrated deep sea water inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice

Jong-Phil Bak^{1†}, Yong-Min Kim^{1,2†}, Jeonghyun Son¹, Chang-Ju Kim² and Ee-Hwa Kim^{1*}



この論文でもNC/NgaマウスのCD4+/CD8+の上昇が確認されている。

血清中Periostin定量 (Day21) 結果



Periostinは喘息や癌に関連して過剰に発現することが以前から知られていた。

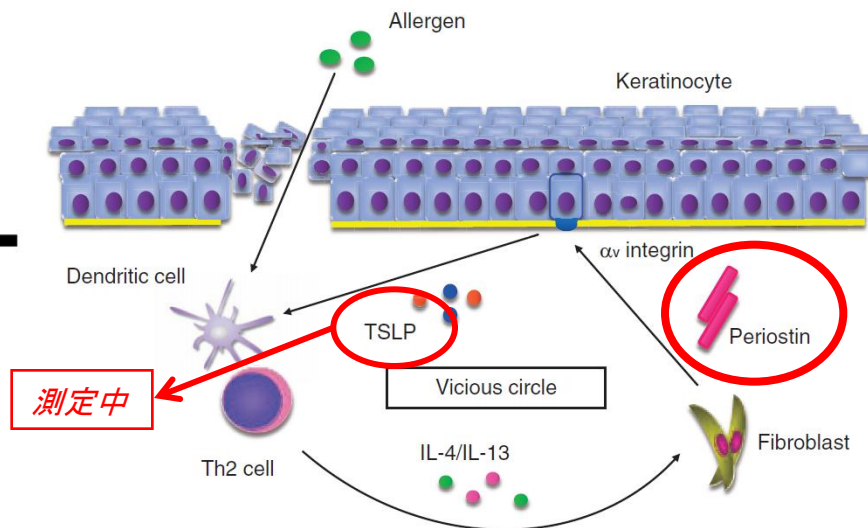
Allergy International. 2014;63:143-151
DOI: 10.2332/allergint.13-RAI-0663

REVIEW ARTICLE

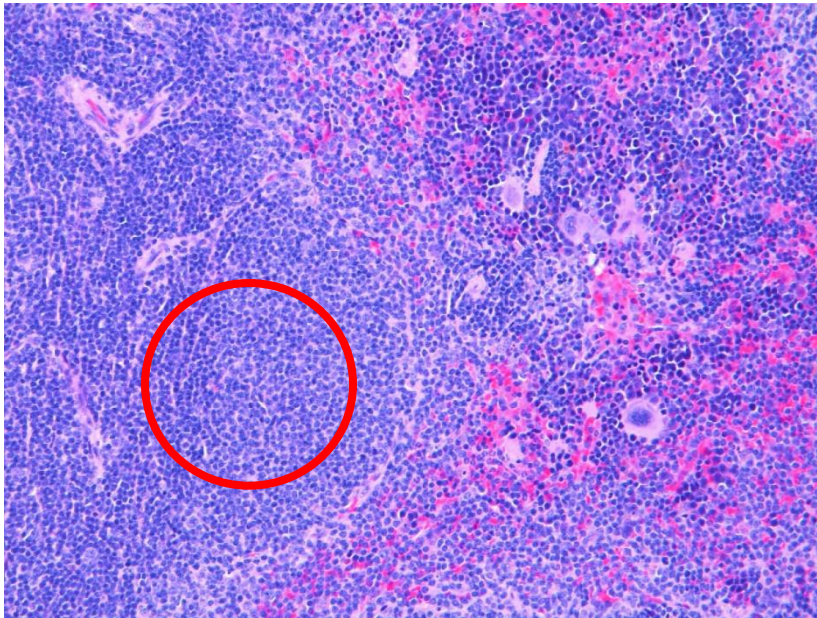
Review Series: Periostin: From Pathogenesis to Clinical Application in Allergic Diseases

Periostin in Allergic Inflammation

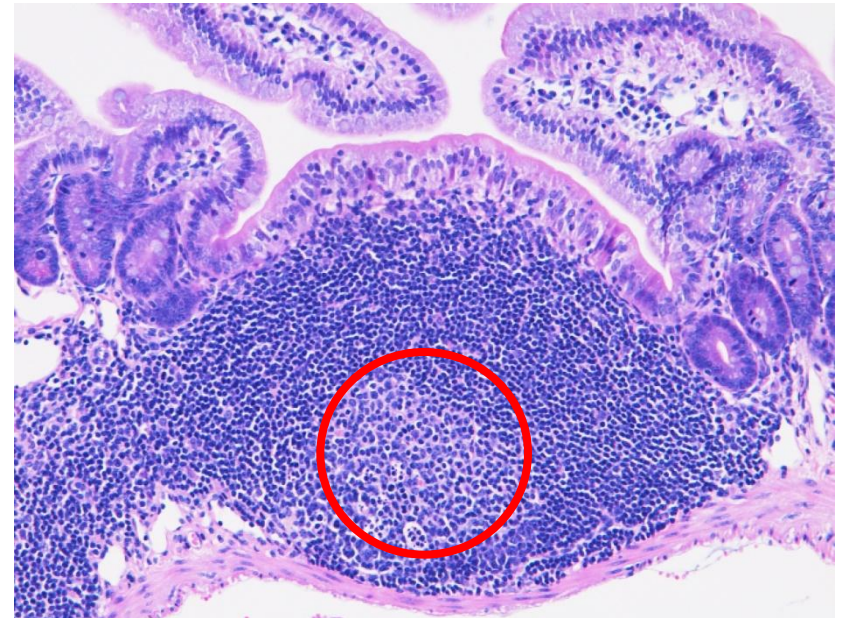
Kenji Izuhara¹, Kazuhiko Arima¹, Shoichiro Ohta², Shoichi Suzuki¹,
Masako Inamitsu¹ and Ken-ichi Yamamoto¹



脾臓・腸管(パイエル板)組織検査(HE染色) 結果



胚中心の肥大、ヘモジデリン沈着の増加、髄外造血



胚中心の肥大

皮膚組織検査(HE染色) 結果

Photo.1

群: 第1群(-)
動物番号: 1-3

臓器: 背部皮膚
所見: 表皮の肥厚(±)
真皮の肥厚(-)
炎症細胞浸潤(-)

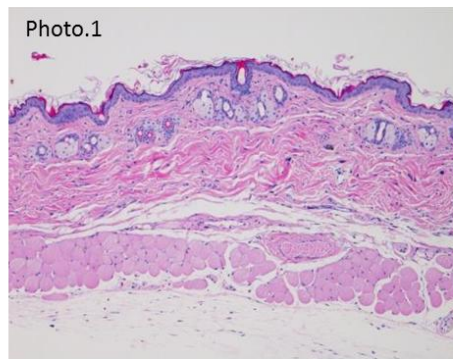


Photo.3

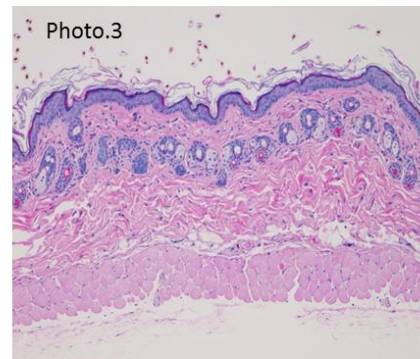


Photo.2

群: 第2群(ダニ抗原)
動物番号: 2-5

臓器: 背部皮膚
所見: 表皮の肥厚(++)
真皮の肥厚(+)
炎症細胞浸潤(+)

表皮

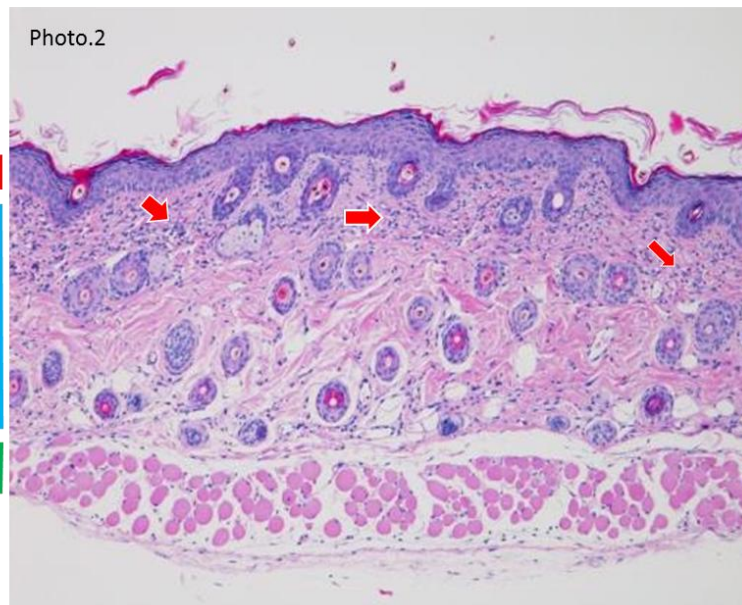
真皮

皮下組織



炎症性細胞

Photo.2



Periostin
免疫染色実施中

まとめ

小麦発酵抽出物(LPS)は、低濃度(134 μ g/kg/day)、高濃度(1340 μ g/kg/day)いずれにおいても、アトピーモデルのいくつかの指標に対して有意な抑制活性を示した。

このメカニズムとして、LPS経口投与における免疫系への関与が考えられるが、今回の研究ではそれらを確認するには至っていない。

Periostinの抑制に関して、T細胞からのIL-4、IL-13産生を抑制している可能性がある。

引き続き、免疫系(特にTh1/Th2関連サイトカイン)の動態を検証する。

MultiplexELISA法による炎症性サイトカイン(血清、脾臓細胞)の定量を実施中。
(IL-1 α 、 β 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-13、IFN γ 、GM-CSF、MCP-1、TNF α)

教えてください！！



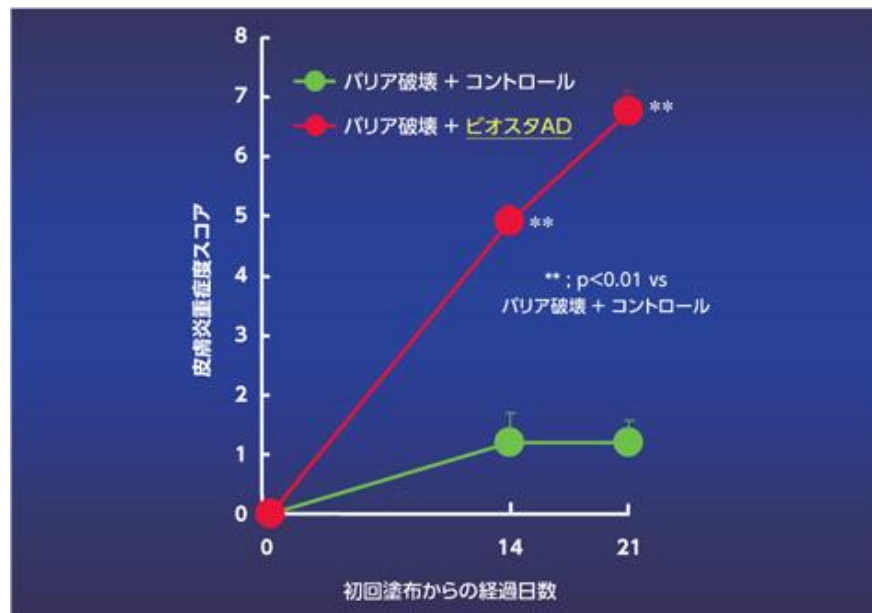
- ✓これまでの小麦発酵抽出物(LPS)の抗アレルギー作用のメカニズムは？
→経口投与では血中のIL-10が増強する。脾臓でのIgE受容体遺伝子の発現が低下する。などがみられていますが、詳細は不明です。
- ✓小麦発酵抽出物(LPS)の自然免疫調整に対する推奨量(ヒト、動物)は？
→通常であれば、 $10\mu\text{ g/kg}$ 。低応答性の場合は10倍にあげても副作用はないので、このdoseをとりあえず勧めています。
- ✓ NCマウス(NKT不全、IFN γ 低産生)で効果がみられた際のメカニズムは？
→不明です。これからの解析ですが、推定としては、最初の質問の返事参照ください。
- ✓本研究において、必要と思われる他の測定項目は？
→マスト細胞の動き(IgE受容体、抗原に対する反応性)、サイトカイン測定、遺伝子発現解析、などが考えられます。

NC/Ngaマウスのダニ抗原アトピーモデル

コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) 由来成分を含むクリームをマウスに塗布



- ✓ 皮膚炎重症度スコア悪化 (2週間以降から)
- ✓ 掻痒行動の上昇
- ✓ 血液中IgE上昇
- ✓ プロトピック軟膏、ステロイド軟膏などで症状軽減
- ✓ ある種の漢方薬、天然エキスで症状予防



株式会社ビオスタ資料より

小麦発酵抽出物(LPS)で活性が確認できるか！？