

離乳後マウスの小腸における IgA 産生に及ぼすビタミン C の影響

泉 谷 紗也佳, 杉 本 実 紀, 池 田 俊 太 郎, 久 米 新 一

(京都大学大学院 農学研究科*)

Effects of Vitamin C on Mucosal IgA Induction in the Intestine of Weanling Mice

Sayaka IZUTANI, Miki SUGIMOTO, Shuntaro IKEDA and Shinichi KUME

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

Summary

The present study was conducted to clarify the effects of vitamin C on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of weanling mice. Weanling mice were fed rodent feed or 500 ppm L-ascorbic acid supplemented rodent feed for 7, 14 or 21 days. Supplemental L-ascorbic acid increased the numbers of IgA antibody-secreting cells (ASC) in the jejunum and ileum of weanling mice after 14 days of treatment, but IgA ASC in the jejunum and ileum after 7 and 21 days of treatment were not affected by the treatment. Supplemental L-ascorbic acid had no effects on IgA concentrations in the jejunum, ileum, feces and serum of weanling mice. These results indicate that supplementation of L-ascorbic acid is slightly effective to enhance the numbers of IgA ASC in the jejunum and ileum of weanling mice.

出生直後の新生児は栄養状態や健康状態を適切に維持するために、栄養成分や免疫成分を豊富に含んでいる初乳を十分に摂取することが欠かせない。新生児の健康維持に最も重要な免疫成分は免疫グロブリン G (IgG) であるが、免疫グロブリン A (IgA) は腸管内腔の抗原の捕捉や腸管壁からの抗原の侵入防止など、腸管免疫の主要な機能を担っている¹⁻³⁾。しかし、初乳由来の免疫グロブリンによる疾病予防効果は限定的なことから、新生児では骨髄や腸管で免疫グロブリンの産生を促進し、能動免疫を早期に高めることが必要である。特に、腸管に分泌される IgA は小腸の IgA 産生細胞で生産されるが、腸管への IgA 分泌量を増やすためには腸管で抗原感作された IgA 前駆細胞の IgA 産生細胞への分化および増殖と体内を循環して小腸へ移動すること (ホーミング) が必須である^{1,4)}。

食品に含まれているビタミンには動物の免疫機能を改善する効果があり、なかでもビタミン A と β -カロテンによる IgA 産生効果は数多く報告されている⁵⁻⁷⁾。筆者らの研究室では食品中のカロテノイドに着目し、 β -カロテンを離乳後のマウスに給与すると空腸のレチノイン酸受容体を介してケモカインリガンド CCL25 の mRNA 発現量が増加し、空腸の IgA 産生細胞数と IgA 濃度が増加した⁸⁾ ことと、アスタキサンチンを離乳後のマウスに給与すると空腸および回腸の IgA 産生細胞数と空腸の IgA 濃度が増加した⁹⁾ ことを報告した。

水溶性ビタミンのビタミン C は抗酸化作用による免疫改善効果が注目されている^{10,11)} が、ビタミン C による腸管の IgA 産生効果に関してはほとんど調べられていない。しかし、アスタキサンチンは抗酸化作用によって腸管の IgA 産生を改善した⁹⁾ ことから、離乳後マウスへのビタミン C 給与も腸管における IgA 産生効果が期待できる。そこで本研究では、離乳後の雄マウスに L-アスコルビン酸を給与して、マウスの空腸と回腸における IgA 産生に及ぼすビタミン C の影響を調べた。

実験方法

1. マウスの給与試験

ICR 系 3 週齢雄マウス計 24 匹を日本クレア (東京) から購入し、マウスは室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ で一定の光周期 (明: 暗サイクル = 14:10 時間) に維持された動物飼育室で、個体毎にプラスチックケージに収容して飼育した。これらの動物は、京都大学における動物実験の実施に関する規程 (京都大学動物実験委員会, 2007 年) に従って管理し、水と飼料は自由摂取させた。

雄マウスは対照区およびビタミン C 区に割り当てて、マウス用標準飼料 (オリエンタル酵母工業, 東京) あるいはマウス用標準飼料に L-アスコルビン酸 (特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を 500 ppm 添加した飼料で、7

*所在地: 京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

日、14日および21日間飼養した。なお、マウス用標準飼料にはビタミンC (4 mg/100 g)、ビタミンA (1283 IU/100 g)、ビタミンE (9.1 mg/100 g) などのビタミンが添加されていたが、本研究のL-アスコルビン酸添加量は標準飼料の12.5倍に相当した。雄マウスの体重、飼料摂取量および飲水量を毎日10:00に測定した。飼育後7日目、14日目および21日目に血液、空腸、回腸および直腸糞を前報⁸⁾に従って採取し、糞は-20℃で、また空腸および回腸は-80℃で保存した。血液は遠心分離後、得られた血清を-20℃で保存した。

2. 分析方法

母マウスの血清、空腸、回腸および糞のIgA濃度は、各サンプルを前報¹²⁾と同様な方法で前処理後、Mouse IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)を用い、測定手順に従ってマイクロプレートリーダー (Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で定量した。空腸および回腸のIgA産生細胞数は、各組織を前報¹²⁾と同様な方法で蛍光免疫染色後、蛍光顕微鏡 (BX50; Olympus, 東京)で画像を撮影し、画像解析ソフトImage Jで絨毛の粘膜固有層に存在するIgA産生細胞数を計数し、単位面積当たりで示した。

3. 統計処理

雄マウスの体重、飼料摂取量および飲水量は、処理と日数を変数にしたモデル式⁸⁾を用いてSAS¹³⁾のGLMプロシジャーで解析した。採取したサンプルのIgA濃度およびIgA産生細胞数は、処理あるいは採取日を変数にしてSAS¹³⁾のGLMプロシジャーで解析した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果と考察

雄マウスの体重、飼料摂取量および飲水量には、対照区とビタミンC区間に有意差は認められなかった (Fig. 1)。雄マウスの空腸および回腸のIgA濃度は飼育後7日目から21日目にかけて急激に増加した ($P < 0.001$)⁸⁾が、雄マウスの血清、空腸、回腸および直腸糞のIgA濃度には対照区とビタミンC区間に有意差は認められなかった (Fig. 2)。雄マウスの空腸および回腸のIgA産生細胞数は、飼育後7日目から21日目にかけて急激に増加した ($P < 0.001$) (Fig. 3)。ビタミンC区の飼育後14日目の空腸と回腸のIgA産生細胞数は対照区よりも増加した ($P < 0.05$)⁸⁾が、飼育後7日目および21日目の空腸と回腸のIgA産生細胞数には処理による影響は認められなかった。

動物の腸管免疫ではIgAが重要な役割を果たしているが、小腸のパイエル板や腸間膜リンパ組織は捕捉した抗原をIgA前駆細胞に提示する役割があるのに対して、小腸の粘膜固有層はIgA前駆細胞からIgA産生細胞への分化

および増殖と腸管腔へのIgA分泌などに関わっている¹⁾。新生仔マウスはIgAを乳由来のIgAに依存しているため、出生直後から離乳まで小腸の粘膜固有層にIgA産生細胞がほとんど検出されない¹²⁾が、離乳後には飼料摂取によって腸管粘膜が多数の抗原に曝されるため、腸管からのIgA分泌量が急増する¹⁴⁾。本研究の雄マウスの空腸と回腸におけるIgA産生細胞数とIgA濃度の離乳後の急激な増加はこれらの結果とほぼ一致し、飼料摂取に伴う抗原提示の増加によって空腸と回腸におけるIgA産生細胞の分化および増殖と腸からのIgA分泌が促進されたことが推察される。

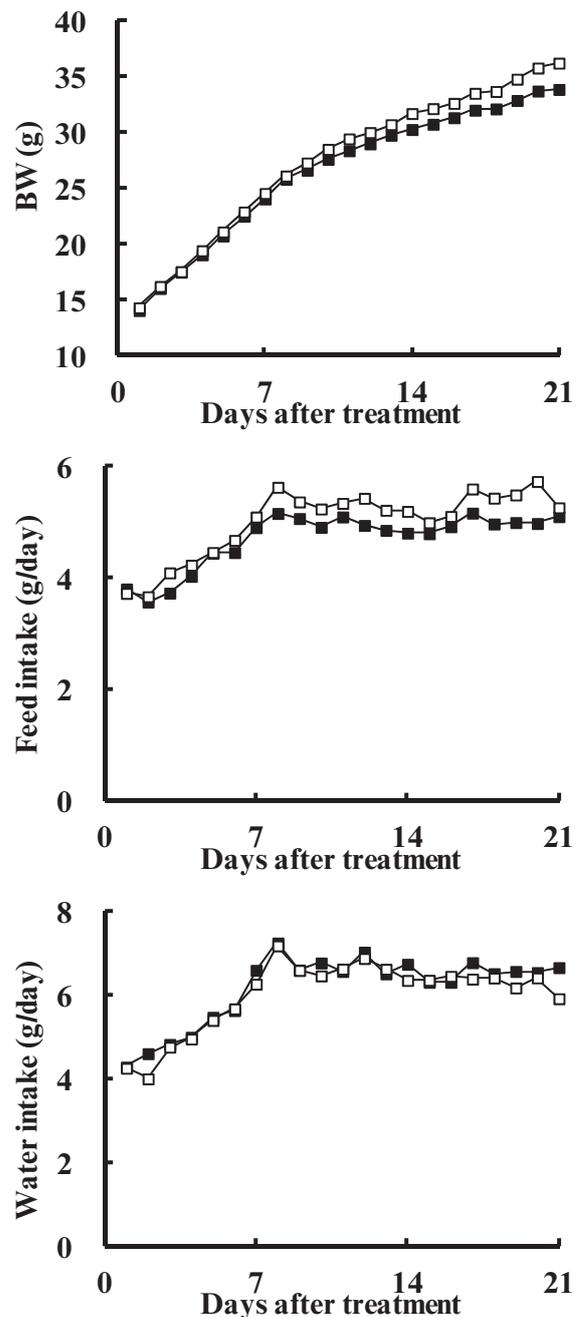


Fig. 1 Body weight (BW), feed intake and water intake of the control (■) and vitamin C (□) groups during 21 days of treatment.

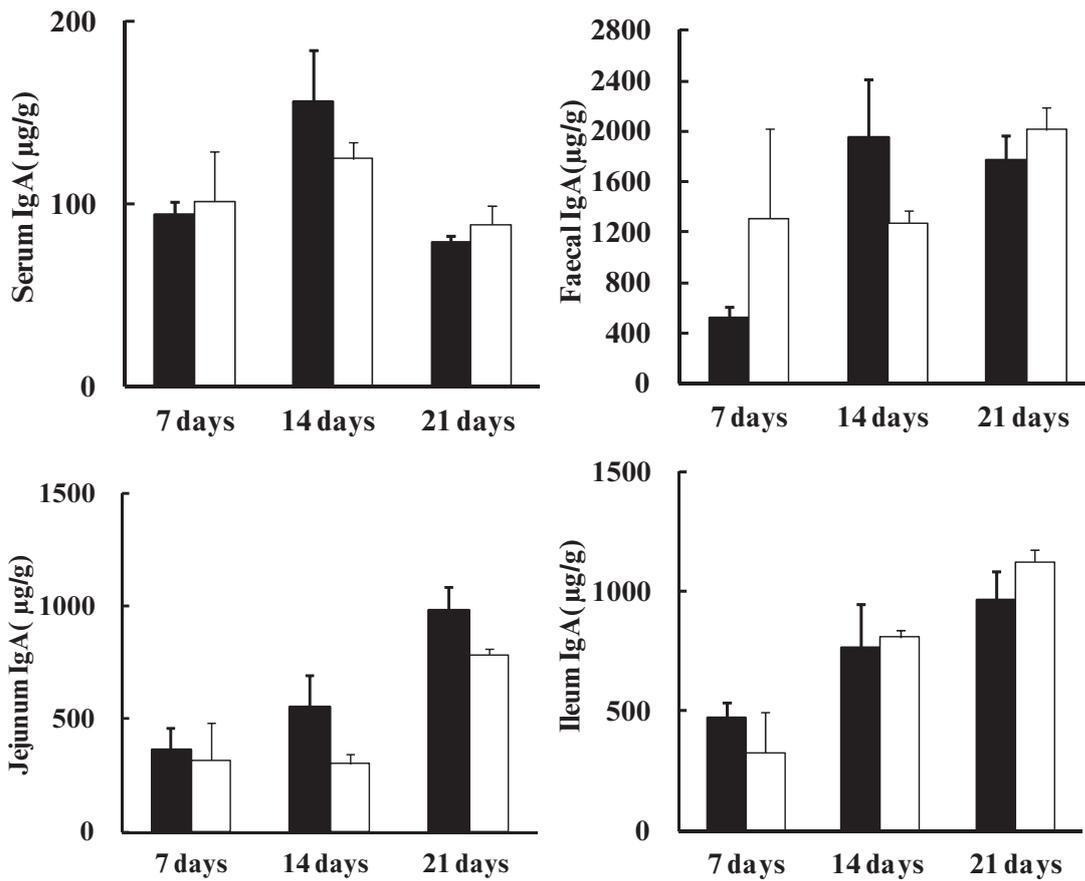
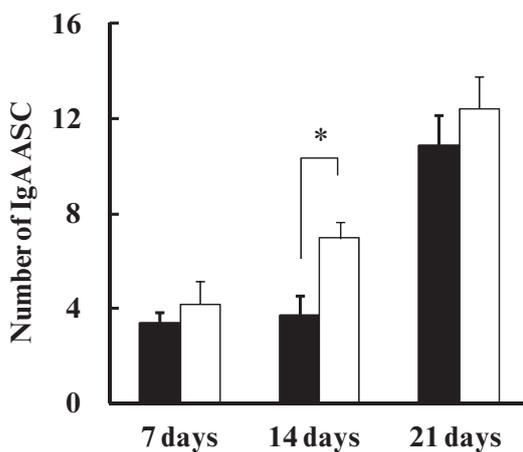


Fig. 2 IgA concentrations in serum, feces, jejunum and ileum of the the control (■) and vitamin C (□) groups after 7, 14 and 21 days of treatment (Mean ± SE).

a) Jejunum



b) Ileum

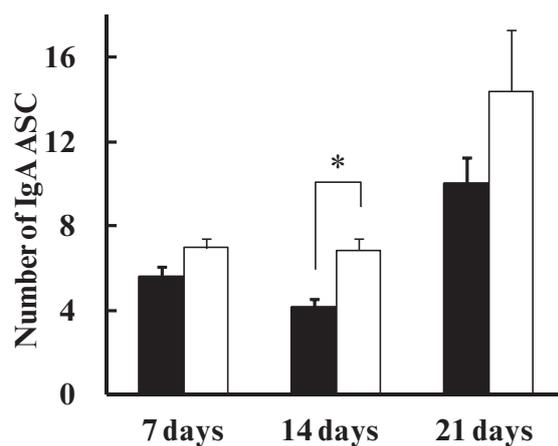


Fig. 3 Numbers of IgA antibody-secreting cells (ASC) in the jejunum and ileum of the control (■) and vitamin C (□) groups after 7, 14 and 21 days of treatment (Mean ± SE). The numbers of IgA ASC in the jejunum and ileum were counted in the lamina propria of villi in eight randomized villi from each mouse. * $P < 0.05$.

飼料中の機能性成分によって IgA 産生の改善効果は異なり、 β -カロテンはレチノイン酸受容体を介した効果^{8,12,15}が注目され、アスタキサンチンは抗酸化作用による効果⁹が報告されている。特に、 β -カロテンを給与した離乳後

マウスでは IgA 産生効果が大きく、飼育後 14 および 21 日目の空腸では IgA 産生細胞数、IgA 濃度と IgA, CCL25 および RAR γ の mRNA 発現量が増加し、飼育後 14 および 21 日目には回腸の IgA 産生細胞数も増加した⁸。また、

アスタキサンチンを給与した離乳後マウスでは飼育後7、14および21日目の空腸と回腸のIgA産生細胞数だけでなく、飼育後21日目の空腸のIgA濃度が増加した⁹⁾。それに対して、本研究のL-アスコルビン酸を給与した離乳後マウスでは飼育後14日目の空腸と回腸のIgA産生細胞数が増加したものの、空腸と回腸のIgA濃度には影響が認められなかった。したがって、離乳後マウスに対するL-アスコルビン酸給与は空腸と回腸のIgA産生細胞数を増やしたものの、腸管のIgA産生の改善効果は β -カロテンとアスタキサンチンよりも小さいことが推察された。

アスタキサンチンによるIgA産生の改善効果は、体内で発生した活性酸素をアスタキサンチンによる抗酸化作用で除去し、IgA産生細胞を酸化ストレスから保護したことが一因と考えられた⁹⁾。したがって、L-アスコルビン酸給与で離乳後マウスの腸管のIgA産生細胞が増加したことは、アスタキサンチンと同様に抗酸化作用による効果が貢献したと考えられるが、L-アスコルビン酸500ppm給与では腸管からのIgA分泌量が増加しなかったことから、今後はL-アスコルビン酸によるIgA産生改善効果の作用機序を解明することが必要である。

参考文献

- 1) Fagarasan S, Honjo T (2003) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Immunol* 3: 63-72.
- 2) Harris NL, Spoerri I, Schopfer JF, Nembrini C, Merky P, Massacand J, Urban JF Jr, Lamarre A, Burki K, Odermatt B, Zinkernagel RM, Macpherson AJ (2006) Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *J Immunol* 177: 6256-6262.
- 3) Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT (2009) Immune component of bovine colostrum and milk. *J Anim Sci* 87(Suppl.1): 3-9.
- 4) Mora JR, von Andrian UH (2009) Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Semin Immunol* 21: 28-35.
- 5) Ertesvåg A, Naderi S, Blomhoff HK (2009) Regulation of B cell proliferation and differentiation by retinoic acid. *Semin Immunol* 21: 36-41.
- 6) Chew BP, Park JS (2004) Carotenoid action on the immune response. *J Nutr* 134: 257S-261S.
- 7) Rühl R (2007) Effects of dietary retinoids and carotenoids on immune development. *Proc Nutr Soc* 66: 458-469.
- 8) Nishida K, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S (2014) Effects of supplemental β -carotene on mucosal IgA induction in jejunum and ileum of mice after weaning. *Brit J Nutr* 111: 247-253.
- 9) Nagayama T, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S (2014) Effects of astaxanthin-enriched yeast on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of weanling mice. *Anim Sci J* 85: 449-453.
- 10) Webb AL, Villamor E (2007) Update: Effects of antioxidant and non-antioxidant vitamin supplementation on immune function. *Nutr Rev* 65: 181-217.
- 11) Ichiyama K, Mitsuzumi H, Zhong M, Tai A, Tsuchioka A, Kawai S, Yamamoto I, Gohda E (2009) Promotion of IL-4- and IL-5-dependent differentiation of anti- μ - primed B cells by ascorbic acid 2-glucoside. *Immunol Lett* 122 : 219-226.
- 12) Nishiyama Y, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S (2011) Supplemental β -carotene increases IgA-secreting cells in mammary gland and IgA transfer from milk to neonatal mice. *Brit J Nutr* 105: 24-30.
- 13) Statistical Analysis Systems (SAS) (1997) SAS/STAT software: Changes and Enhancement Through Release 6.12. SAS Institute Cary, NC.
- 14) 高木菜穂子, 長谷川清香, 池田俊太郎, 杉本実紀, 久米新一 (2010) 離乳後のマウスの窒素利用効率および糞中IgAに及ぼすホエータンパク質あるいは脱脂乳タンパク質給与の影響. *関西畜産学会報* 166 : 1-9.
- 15) Nishiyama Y, Yasumatsuya K, Kasai K, Sakase M, Nishino O, Akaike M, Nagase T, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S (2011) Effects of supplemental β -carotene with whey on IgA transfer from maternal milk and mucosal IgA induction in neonatal mice and calves. *Livest Sci* 137: 95-100.