

腸間膜リンパ液を用いた牛乳の腸管免疫機能評価

信州大学医学部 メディカル・ヘルスイノベーション講座：前島 大輔

要 旨

牛乳の投与による腸管免疫機能への影響を調査するため、ラットの腸間膜リンパ管カニューレーションを用いた腸管免疫機能評価法を確立し、採取したリンパ液を用いて腸管免疫機能を評価することを目的に実験を行った。

Wistar 系雄性ラット（体重 300～330g）を用い、実験前日夕方より絶食・絶水させた。実験当日にイソフルランによる吸入麻酔を施し、気管挿管後人工呼吸器に接続した。イソフルラン麻酔下で伏在静脈に点滴（生理食塩水 1ml/hr）を導入し、腸間膜リンパ管にカニューレを挿入した。牛乳投与の 1 時間前よりリンパ液の採取を開始し、牛乳投与後 4 時間まで 1 時間おきにリンパ液を経時的に採取した。得られたリンパ液の液量・リンパ球数の計測およびフローサイトメトリーによるリンパ球のサブセット解析（T 細胞・B 細胞比率）、およびリンパ液中の IL-22 濃度測定を行った。

その結果、牛乳の投与によりリンパ液量は増加し、リンパ液中のリンパ球数が増加する傾向が見られた。リンパ球サブセット解析では、T 細胞・B 細胞比率に大きな変動は見られなかった。リンパ液中の IL-22 は、牛乳投与後に一時的に濃度が上昇する傾向が見られた。

以上の結果から、牛乳中の何らかの成分が腸管リンパ組織やリンパ球、粘膜固有層に存在する自然リンパ球 ILC-3 の活性化を介して、腸管の恒常性維持に役割を果たす可能性があると考えられる。

緒 言

高齢化社会の急速な進行や食生活の変化、生活習慣による生活習慣病の増大が背景となり、個々人の健康増進を図る方策が国を上げて取組まれている。その 1 つに、科学的根拠を有する機能性食品をより一層普及させる目的で、機能性食品表示制度が平成 27 年 4 月に改定された。食品関連事業者が一定の条件のもとで消費者庁への届け出を経て、科学的根拠が明確化された食品については機能性表示が可能となり、その食品の持つ有効性や効果を積極的に消費者へアピールすることができるようになった。

牛乳乳製品においては、従来から健康イメージは強いものの、具体的エビデンスは限られていた。国民の健康意識への高まりを受け、牛乳乳製品についても健康への寄与を実験レベルで明確に示し、更なる機能性を研究・告知していくことも重要になると考えられる。

従来、実験動物を用いた免疫機能評価法としては、一定期間試験食を摂取させ、血液生化学検査や糞中の成分分析を行うことにより、プラセボとの比較および有効性を検証するものが多かった。腸管で消化吸収された長鎖脂肪酸はリンパ管に吸収されることと、腸管免疫を担う免疫系細胞がリンパ管を流れる機能特性を利用し、リンパ液を回収することで食品摂取後の腸管免疫機能が評価できる新たな方法になると考えた。先行研究においては、リンパ管カニューレーションを用いた乳製品の機能評価として、牛乳中のリン脂質がスフィンゴミエリンのリンパ吸収を促進

させるとの報告¹⁾があるものの、腸管免疫機能の賦活化に関する報告は見られていない。

そこで、腸間膜リンパ液を経時的に回収する動物実験系を構築し、得られたリンパ液の解析を行い、牛乳投与による腸管免疫機能への影響を検証する目的で本実験を実施した。

実験方法

1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット（体重 300～330g）を日本 SLC 株式会社より購入し、1 週間以上信州大学動物実験施設で飼育し、馴化させた動物を用いた。本実験は信州大学動物実験委員会による承認を得て行われた。

2. 実験方法

実験スケジュールを図 1 に示す。実験前日 18:00 よりラットを絶食・絶水させ、翌日 9:00 過ぎにイソフルランによる吸入麻酔をかけ、38℃に設定した加温マット上で仰臥位に固定した。頸部を切開し気管挿管後に人工呼吸器（Hallowell EMC 社製 Workstation、換気回数 60 回/分、1 回換気量 5～6ml、イソフルラン濃度 1.4%、酸素流量 0.3L/分）に接続した。その後は全て麻酔条件下で実験を行った。まず初めに伏在静脈に点滴ルートを確認し、生理食塩水を 1ml/hr の速度で導入した。続いて腹部壁を正中線に沿って切開した後、腸間膜リンパ管にカニューレチューブを挿入し、腸間膜リンパ液を回収できる状態とした。リンパ液を 1 時間分採取した所で、38℃に温めた牛乳（1ml）あるいは蒸留水（1ml）をゾンデで経口投与した。経口投与後 1 時間おきに 4 時間までリンパ液の採取を行った。

採取したリンパ液は、液量およびリンパ球数を計測し、得られたリンパ球に CD3 および CD45R 抗体を染色後、フローサイトメトリーにて T 細胞および B 細胞の比率を解析した。また、リンパ液中の IL-22 濃度を ELISA 法にて測定した。

結果

（1）牛乳投与によるリンパ液量の変化

典型例を図 3 に示す。牛乳の投与によって、リンパ液量は増加し、投与後 4 時間まで増加傾向が見られた。蒸留水投与では投与後 1 時間以内に液量が一時的に増加したものの、その後は投与前のレベルに戻る傾向が見られた。

（2）牛乳投与によるリンパ球数の変化

牛乳投与によってリンパ液中に含まれるリンパ球数（濃度）の増加が見られ、投与後も増加傾向が続いた（図 4）。蒸留水投与ではリンパ球数の大きな増加は見られなかった。

（3）フローサイトメトリーによるリンパ球解析

牛乳投与および蒸留水投与前後で、T 細胞および B 細胞の比率に大きな変動は見られなかった（図 5-1 および 5-2）。

(4) リンパ液中の IL-22 濃度の測定

牛乳の投与で、投与後 1 時間に IL-22 濃度の上昇傾向が見られた。一方、蒸留水投与では大きな変動がなく、一定のレベルで推移する結果を示した (図 6)。

血中との濃度比較を検討したところ、IL-22 濃度はリンパ液中に比べ非常に低い値であり、血液中とリンパ液中とで濃度差が大きいことが明らかとなった。

考 察

今回の実験で牛乳の投与によりリンパ液量が増加した。これは腸管で消化吸収が起こり、リンパ液中に牛乳由来の脂質成分や水分が吸収されたことにより、リンパ液量が増加したためと考えられる。過去の研究で、ラットに水を投与し無麻酔下で胸管リンパ量を測定した結果では、投与後 30 分以内にリンパ流量が激増するデータが報告されており²⁾ 蒸留水投与の結果はそれと一致するものだった。牛乳投与においては、投与後 4 時間近くまで液量が増加していた。牛乳中には脂質が含まれることから、脂質の消化吸収が 4 時間程度は継続しているものと考えられた。また本実験は麻酔下で実施していることから、麻酔が消化吸収速度や消化時間に影響を与えている可能性も考えられる。

また、リンパ球数については、牛乳投与で増加する結果となった。Miura らは、オリーブオイルの投与により、リンパ液中のリンパ球が倍増する結果を報告している³⁾。このことから、牛乳に含まれる脂質の吸収により、腸管内のリンパ組織に何らかの刺激を与え、リンパ球の流出を促進している可能性が考えられた。

リンパ球サブセットの解析結果からは、牛乳投与による T 細胞、B 細胞の比率に大きな変化は認められなかったため、牛乳の単回投与においては免疫担当細胞の動員比率に対する影響は少ないものと考えられる。

リンパ球中の IL-22 濃度測定の結果から、牛乳投与で IL-22 濃度の上昇が見られ、蒸留水投与では濃度上昇が見られなかった。近年発見された自然リンパ球 (ILC-3) が腸管粘膜固有層に多く存在し、ILC-3 が産生する IL-22 が腸管内のバリア機能に関わることが明らかにされている⁴⁾。牛乳の摂取は ILC-3 を活性化させ、IL-22 の産生を促すことによって、腸管上皮細胞における抗菌ペプチドを誘導し、腸管の恒常性維持に役割を果たす可能性があること示唆された。

今回の実験では、牛乳の単回投与における急性的な腸管免疫機能への影響についてのみに留まっている。結果については統計検定を行ったが、いずれも投与前の数値に比べて有意差が見られず、単回投与実験の例数を増やし、牛乳摂取による腸管免疫機能への有効性について再確認する必要がある。牛乳投与により IL-22 濃度が上昇する結果が得られたため、今後は IL-22 により誘導される腸管内の抗菌ペプチド量の増減やその他の生理活性物質の濃度変動への影響についても検討を行いたい。

文 献

- 1) Morifuji M, Higashi S, Oba C, Ichikawa S, Kawahata K, Yamaji T, Itoh H, Manabe Y, Sugawara T. Milk phospholipids enhance lymphatic absorption of dietary sphingomyelin in lymph-cannulated rats. *Lipids*. 2015; 50(10):987-996.
- 2) Simmonds WJ. The effect of fluid, electrolyte and food intake on thoracic duct lymph flow in unanaesthetized rats. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1954; 32(3):285-299
- 3) Miura S, Sekizuka E, Nagata H, Oshio C, Minamitani H, Suematsu M, Suzuki M, Hamada Y, Kobayashi K, Asakura H, et al. Increased lymphocyte transport by lipid absorption in rat mesenteric lymphatics. *Am J Physiol*. 1987; 253(5 Pt 1):G596-600.
- 4) Goto Y, Obata T, Kunisawa J, Sato S, et al. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science*. 2014; 345(6202):1254009.

図 表

図 1 実験スケジュール

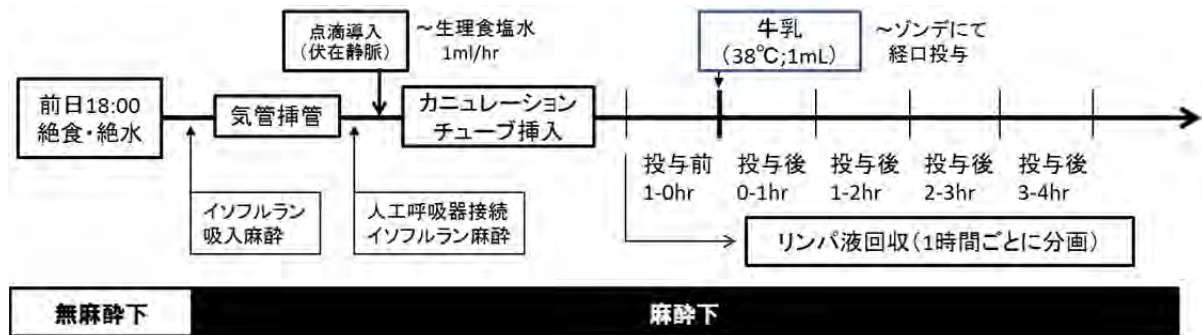


図 2 ラットの腸間膜リンパ液採取方法 (実験写真)



図3 リンパ液量の変化

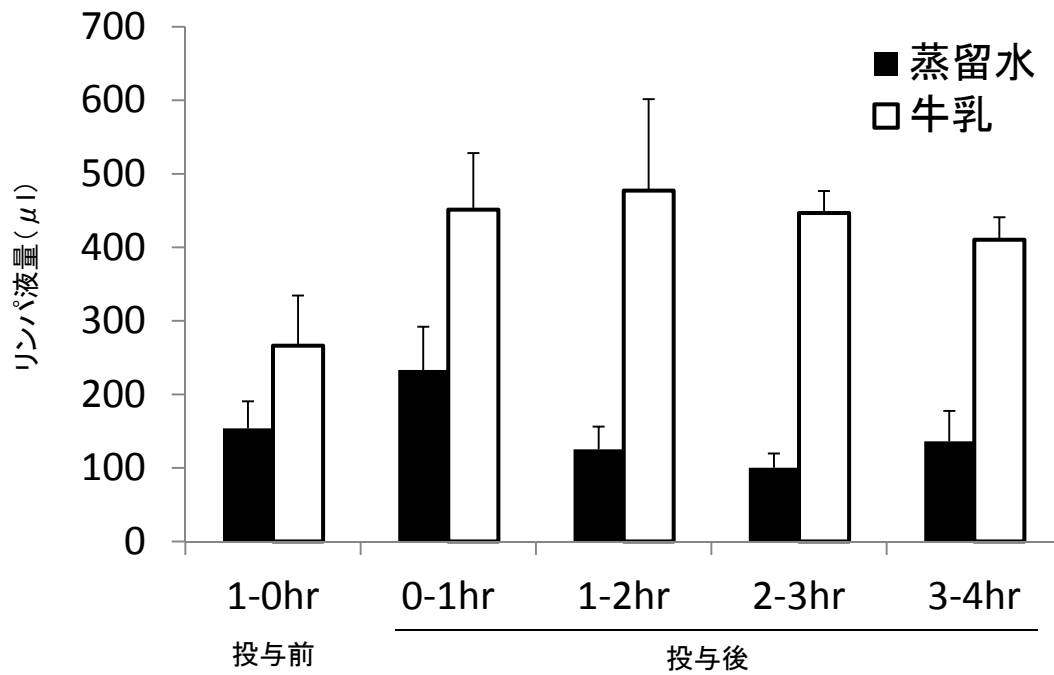


図4 リンパ球数の変化

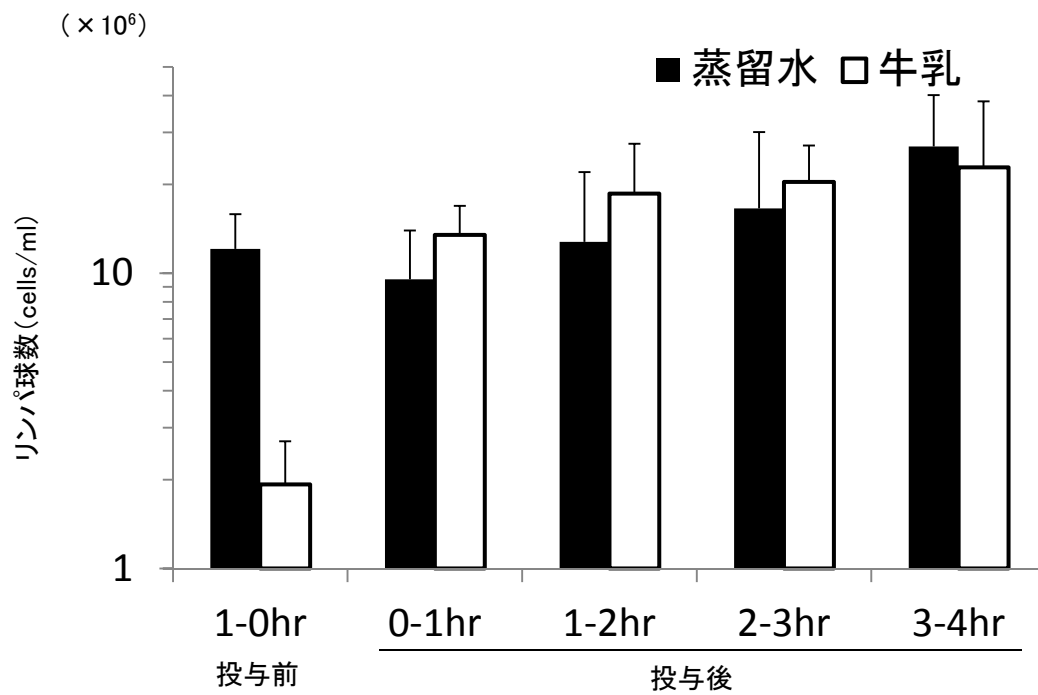


図 5-1 リンパ液中の T 細胞の比率

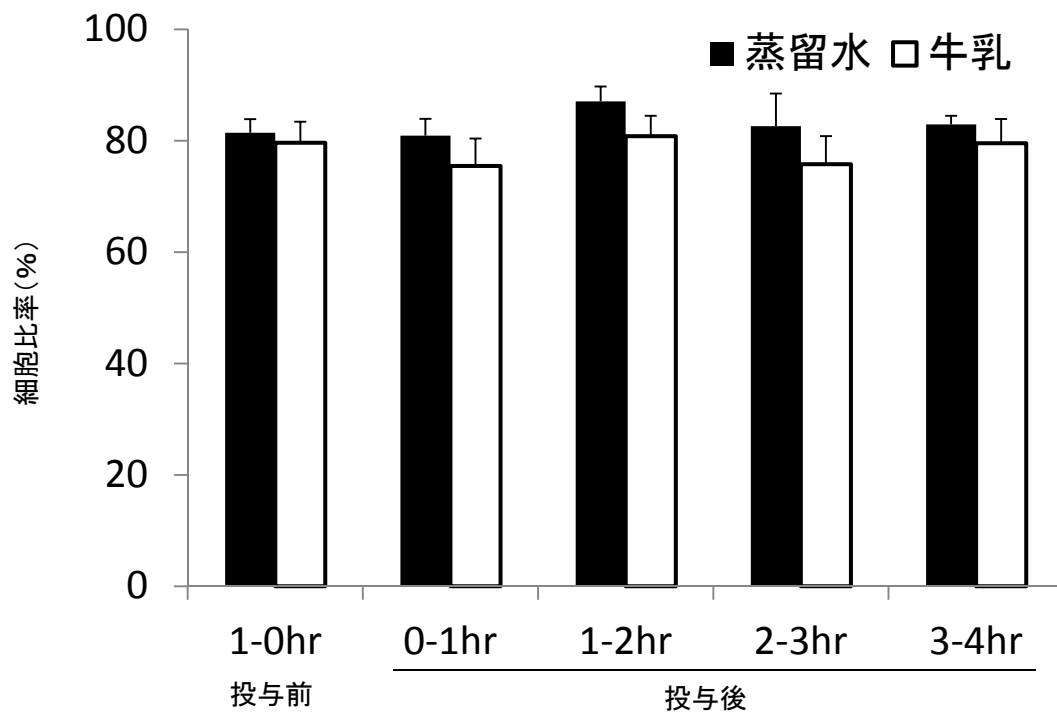


図 5-2 リンパ液中の B 細胞の比率

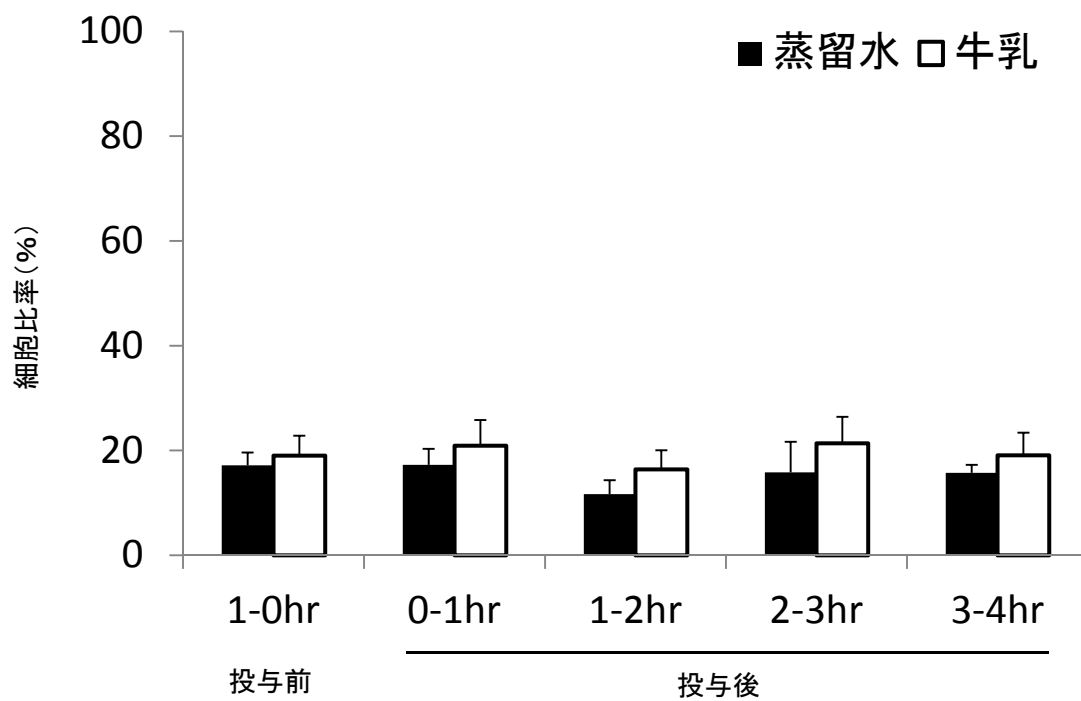


図6 リンパ液および血液中の IL-22 濃度

