

高齢者の介護における 感染症予防を目的とした自然免疫の意義

The significance of innate immunity
for protection infectious diseases in elderly care.

上 延 麻 耶¹⁾ ・ 湯 浅 明 彦²⁾ ・ 杣 源 一 郎³⁾⁴⁾
Maya UENOBE ・ Akihiko YUASA ・ Gen-Ichiro SOMA

1) 松本短期大学 介護福祉学科 2) 徳島県立農林水産総合技術センター 水産研究所

3) 徳島文理大学 健康科学研究所 4) 香川大学 医学部

要旨

自然免疫は全ての多細胞動物に存在している生体調節系であり、食細胞（マクロファージ）はその中枢的役割を担う細胞である。本研究では、マクロファージ活性化物質である小麦共生細菌由来糖脂質の経口・経皮投与によるアユの感染症に対する耐病性を調べ、本物質に対する魚類の免疫器官の応答性を、その効果発現機構に関連する分子である腫瘍壊死因子（TNF）遺伝子発現で調べた。結果、小麦共生細菌由来の糖脂質が、アユの感染症を含む疾患に対して改善をもたらすことを明らかにした。TNF 遺伝子発現解析では、糖脂質の投与によってアユの TNF が誘導される事を確認した。このことから、哺乳類においても糖脂質の経口・経皮投与でマクロファージを活性化制御することができれば、高齢者の介護の分野においても、加齢による生理機能の低下とそれに伴う基礎疾患や感染症などの発症を予防・改善する一つの方法になると予想される。

キーワード：自然免疫、感染症予防、高齢者介護

1. はじめに

加齢に伴って生理機能の低下や体組織の減少などの老化現象、病気やけが、廃用症候群などが原因となり生活機能が低下することはよく知られている。また、複数の臓器や組織に基礎疾患を有している者も多く、これらの病態は老年症候群と総称され、その病態は複雑である。さらに、高齢者の疾病は加齢による生理機能の低下とともに起こることからも、慢性の経過をたどりやすいことが特徴である¹⁾。このような高齢者特有の病態の背景に免疫機能の低下が共通する。免疫機能の低下に伴い感染に対する抵抗性も減退し、基礎疾患のみならず各種感染症を発症しやすくなる²⁾³⁾。これらのことが、日常生活動作（activities of daily living：ADL）、そして、生活の質（quality of life：QOL）の低下を進行させる要因となり、その結果要介護状態となることが考えられる。そこで、高齢者が健康を維持・改善し、自立した生活を送るためには、免疫機能の低下を予防、また免疫機能を向上していくことが重要であると考えられる。

免疫系は大きく自然免疫と獲得免疫の2種類に分けられる。両者は共同して生体防御を担っているが、獲得免疫が脊椎動物の出現以降に発達した免疫系に対し、自然免疫は全ての多細胞動物に備わっている基本的な生体防御系である⁴⁾。自然免疫系では、機能は異物貪食機能を持つ食細胞（マクロファージ）が中枢的な役割を果たしている。マクロファージは全身に分布し、侵入異物を認識

し、これを貪食する。これに伴い活性化し、活性酸素や一酸化窒素などを産生し、病原体を排除する。また、活性化マクロファージは細胞間情報伝達物質（サイトカイン）を産生し、他の免疫系細胞を活性化するネットワークを形成する。このことから生体防御の維持に必須の機構を形成していると考えられる⁵⁾。

活性化マクロファージの産生するサイトカインの中でも腫瘍壊死因子（TNF）は上記ネットワークの構築を誘起し、制御する分子として注目されている⁶⁾。NakamotoらはTNFの発現誘導を指標にすることで、手術ストレスによる感染症の増悪化や、がん転移の促進などの免疫低下により引き起こされる副作用を回避できることを報告している⁷⁾。この論文は免疫機能が低下した高齢者において問題となる感染症予防のあり方として、TNFの機能に着目する利点を強く示唆していると考えられる。

以上より、マクロファージを中心とした自然免疫の適正な保持・活性化機構を解明することが可能となれば、感染症の予防や治療を達成する上で非常に有用であると考えられる。この点では、マクロファージの機能を抽出して、固体レベルでの疾患予防効果などを検証する必要がある。しかしながら、特異免疫系が発達したことにより免疫機構が複雑化している哺乳類では、自然免疫の感染症予防における役割を明確に解析することが困難である。そこで、特異免疫機構が哺乳類に比べて単純な下等脊椎動物、特に哺乳類の免疫系の基本を有している魚類を用いることが有用であると考えている。魚類の中でもアユは一年魚であり性成熟が制御し易いこと、淡水魚であり飼育も比較的容易であること、遺伝的にも比較的均一であること、魚体も比較的大きく実験材料の採集も容易であることなど、実験動物としての観点から見て優れた特徴がある。そこで、本研究では、マクロファージ活性化物質の経口および経皮投与によるアユの感染症に対する耐病性を明らかにし、本物質に対する魚類の免疫器官の応答性をTNF遺伝子発現で調べることにした。また、高齢者の介護における感染症予防への自然免疫の意義を検討した。

2. 材料と方法

2.1 実験動物及び材料

アユは徳島県水産研究所から搬入した。本実験には、シュードモナス症病原菌（*Pseudomonas plecoglossicida*）及び冷水病病原菌（*Flavobacterium psychrophilum*）感染経歴が無いアユを用いた。

低分子糖脂質は小麦共生細菌の *Pantoea agglomerans* から同定・単離された糖脂質：以下 IP-PA1⁸⁾⁹⁾ を用いた。TNF 遺伝子の増幅に用いたプライマー配列は、AyuF1（TGGAAGAATTCGCCGCCGCTTAAGGGGGGGGGGGGG）、AyuR2（ATGGGAGCTGTGTTCCCTCAT）、アユ TNF mRNA 発現解析には SP-1（GTGCAATGGAGTAACGAGGT）、SP-2（TTTACCAGATTCATCCTGCAG）プライマーを用いた。

2.2 IP-PA1 のアユのシュードモナス感染症予防

体重 20g 程度のアユに IP-PA1（4 又は 20 μ g/kg）を含むえさを 7 日間連続で投与した。その後にシュードモナス症病原菌（ 4.1×10^2 cell/fish）を腹腔内投与し、その後、15 日間観察し生存を調べた。

2.3 IP-PA1 のアユの冷水病感染予防

冷水病に対しては、体重 20g 程度のアユに IP-PA1（4 又は 20 μ g/kg）を含むえさを 7 日間連続で投与し、その後に冷水病に感染したアユを飼育した水槽から各実験群の水槽に排水が流れ込むようにして、冷水病菌を 7 日間感染させ、感染開始より隔日で IP-PA1（4 又は 20 μ g/l）の薬液に 2 時間浸漬した。

2.4 アユ TNF mRNA 発現解析

アユに LPS ($1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$) を腹腔内投与し、0、3、6、24 時間後の頭腎（魚類の腎臓の頭部側部分の組織で、最大の免疫器官と考えられている）、脾臓、肝臓の3種類の臓器を摘出した。組織からグアニジンチオシアネートを用いて RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA 中の TNF 遺伝子量は 2.1 に示したプライマーを用いて、Competitive PCR 法により定量した。

3. 結果

3.1 アユの細菌感染に対する糖脂質の投与

著者らはこれまで小麦粉に糖脂質が存在すること、この糖脂質は世界中の小麦に見出されている共生細菌である *Pantoea agglomerans* の細胞膜に由来する糖脂質 (IP-PA1) である。人間は小麦を常食しており、長い IP-PA1 の摂取経験を持つ安全性が高い物質である¹⁰⁾。また、IP-PA1 は経口・経皮投与でマクロファージを活性化することが見出されている¹¹⁻¹³⁾。そこで、本研究では、IP-PA1 を用いて経口または経皮投与でのアユの感染症に対する効果を調べた。アユに IP-PA1 (4 または $20 \mu\text{g}/\text{kg}$) を7日間経口投与後に、シュードモナスを感染させ、IP-PA1 の感染防除効果を調べた (図 1-A)。その結果、シュードモナス症に対しては、アユに $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ の IP-PA1 を7日間投与した場合に有意な防除効果が見られた。次に、IP-PA1 の経口と経皮投与の併用によるアユの冷水病に対する防除効果を調べた。IP-PA1 をアユに $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 又は $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ を7日間投与し、その後19日間、隔日で糖脂質の薬液 (4 又は $20 \mu\text{g}/\text{l}$) に浸漬した。 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ の糖脂質を7日間経口投与後、冷水病菌に感染させ、糖脂質 $4 \mu\text{g}/\text{l}$ の薬液に浸漬した場合に有意な防除効果が見られた (図 1-B)。

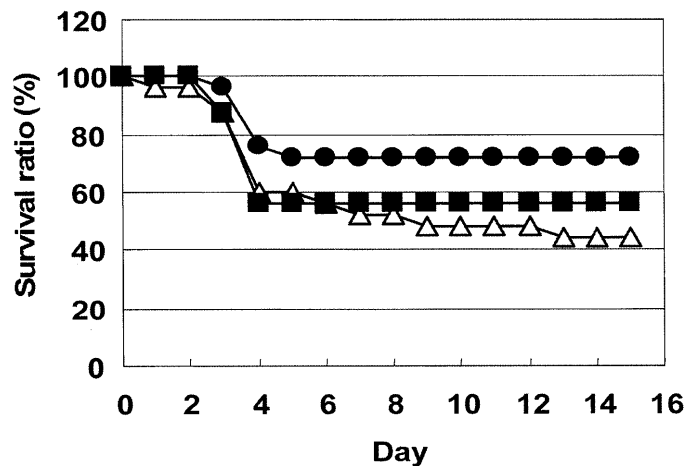


図 1-A 低分子糖脂質経口投与によるアユのシュードモナス症予防効果

体重 20g 程度のアユ (25 匹 / 群) に IP-PA1 (4 又は $20 \mu\text{g}/\text{kg}$) を含むえさを7日間連続で投与した後にシュードモナス症病原菌を $4.1 \times 10^2\text{cfu}$ 腹腔内投与した。その後、14 日間観察し生存率を調べた。 Δ は $0 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day、 \bullet は $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day、 \blacksquare は $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day を示す。P は有意差。有意差検定は Kaplan-Meier 法、logrank test により行なった。

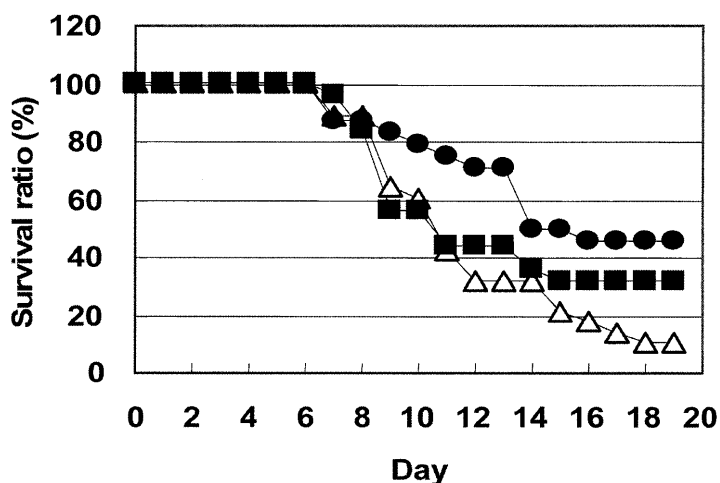


図1-B 低分子糖脂質浸漬投与によるアユの冷水病予防効果

体重 20g 程度のアユ (24-28 匹 / 群) に低分子 LPS (4 又は 20 $\mu\text{g} / \text{kg}$) を含むえさを 10 日間連続で投与した。その後に冷水病に感染したアユを飼育した水槽から、各実験群の水槽に排水が流れ込むようにして、冷水病菌を 7 日間感染させた。感染開始より隔日で 19 日間 LPS 4 $\mu\text{g} / \text{l}$ 、20 $\mu\text{g} / \text{l}$ の薬液に 2 時間浸漬した。△は 0 $\mu\text{g} / \text{kg} \text{ bw/day}$ 、●は 4 $\mu\text{g} / \text{kg} \text{ bw/day}$ 、■は 20 $\mu\text{g} / \text{kg} \text{ bw/day}$ を示す。P は有意差。有意差検定は Kaplan-Meier 法、logrank test により行なった。

3.2 アユ TNF mRNA 発現解析

IP-PA1 の感染防除効果の発現は、マクロファージが IP-PA1 の受容体を介して活性化された事によって起動されたと考えられる。これを明らかにするために糖脂質の投与によってアユの TNF が誘導される事を確認した。アユに 1.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ の糖脂質を腹腔内投与し、0、3、6、24 時間後の頭腎、脾臓、肝臓の 3 種類の臓器を摘出し、ここから抽出した RNA を用いて TNF 遺伝子発現を測定した (図 2)。その結果、いずれの臓器においても、糖脂質投与 3 時間後で最も強く TNF 遺伝子の発現誘導が 35 ~ 128 倍増強し、その後、時間の経過とともに未刺激のレベルに減少していた。

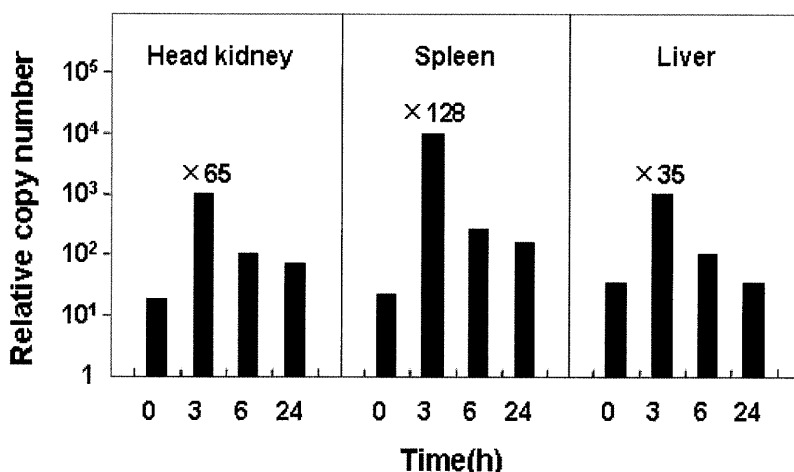


図2 LPS によるアユ TNFmRNA の誘導

アユに 1.5mg/kg の LPS を腹腔内投与し、0、3、6、24 時間後の頭腎、脾臓、肝臓の 3 種類の臓器から抽出した RNA を用いて TNF 遺伝子発現について Competitive PCR 法により測定した。

4. 考察

自然免疫は高等動物から下等動物に至るまで、全ての多細胞生物に保存されている生体調節系である。従って、系統発生的に保存された生体本来が持つ自然免疫能は生体の恒常的な維持に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、自然免疫を適切に活性化することができれば、生体恒常性を正常に保つことができると考えている。マクロファージは自然免疫の中樞をなす細胞群であり、細菌やその成分などの外来異物に対して極めて微量で識別・応答する。これを利用したマクロファージ活性化物質はグラム陰性菌由来の糖脂質である¹⁴⁾。糖脂質は経口・経皮投与では副作用無く安全に有用な感染防除効果が得られるが、経口・経皮投与した糖脂質の効果発現機構はほとんど明らかにされていなかった。魚類は、腸管からの巨大分子の吸収が哺乳類よりも明確であり、解析しやすい動物である。本論文において、小麦共生細菌由来の糖脂質が、アユの感染症を含む疾患に対して改善をもたらすことを明らかにした。また、アユ TNF の遺伝子組み換え体を作製したところ、マクロファージの貪食機能を亢進することが認められ、自然免疫活性化制御因子として TNF が魚類においても重要な役割を担っていることが推測された¹⁵⁾。我々は哺乳類のマウスにおいても静脈注射であるが、マクロファージの適切な活性化は免疫低下状態を回避し、感染や癌の転移増加を予防できることを明らかにしている⁷⁾。このことから、哺乳類においても糖脂質の経口・経皮投与でマクロファージを活性化制御することができれば、高齢者の介護の分野においても、加齢による生理機能の低下とそれに伴う基礎疾患や感染症、また、アレルギー疾患の発症を予防・改善する一つの方法になると予想される。

高齢者の感染に対応する防御能力は若年成人と比較し減退することが様々な臨床研究から明らかにされている。高齢者は多数の感染症に罹患しやすくなるとともに、感染を原因として重症な疾患に罹るリスクが増大し、また、その感染が持続することが知られている。特に、高齢者は呼吸器感染に罹る率が高くなると言われている¹⁶⁾。その他、ブドウ球菌感染や破傷風に罹患しやすくなることや、インフルエンザワクチンに対する反応も乏しいことが報告されている^{17) 18)}。その他、高齢者は若年成人に比べ、外傷後の感染や敗血症の発症率が高くなることも示唆されている¹⁹⁾。これらは、加齢による免疫機能の低下、特に、自然免疫機能の低下が深く関与していると考えられる。加齢に伴う自然免疫機能の低下は、マクロファージ機能の変化によっても示されている。マクロファージより産生されたサイトカインは、他の免疫細胞を活性化させ、その後の免疫応答を引き起こすが、加齢によりマクロファージからの炎症性サイトカインの産生が減少することが、ヒトやマウスを用いた研究から明らかにされている²⁾。マウスを用いた実験では、LPS 刺激した脾臓や腹腔マクロファージからの TNF や IL-6 の産生が、高齢のマウスは若いマウスよりも低いことが報告されている²⁰⁾。また、高齢のマウスではマクロファージ表面に発現する LPS 受容体である TLR (Toll-like receptor) 4 mRNA (LPS は TLR 4 と呼ばれる受容体を解して細胞内にシグナルを伝達し、炎症性サイトカインの産生といった細胞応答を引き起こし、固体レベルでの細菌やウイルスに対する抵抗性をもたらす。) 発現が低く LPS に対して低応答であること、また、LPS 刺激マクロファージからの炎症性サイトカインの低産生が、後の細胞内情報伝達機構に関与することも示唆されている²¹⁾。これらのことから、自然免疫を適正に維持・活性化することは、高齢者の感染症や諸種疾患の予防や治療を行なう上で極めて重要であると考えられる。

現在日本では、65 歳以上の高齢者人口の総人口に占める割合は約 20% で、5 人に 1 人が高齢者という現状である。これは、現役世代約 3 人で 1 人の高齢者を支えていることになる。更に今後、高齢化が進み、2.5 人に 1 人が高齢者という社会が到来すると予測されている²²⁾。このような中に

においては、病気や認知症、衰弱などで要介護状態となる期間を短縮し、健康寿命を延伸していくことが課題である。現在、要介護（要支援）認定者数は約445万人で、介護保険制度が施行された平成12年の約2倍に増加している²³⁾。このことに関して、介護保険制度改革では予防重視型システムへの転換が織り込まれ、要介護状態になることをできるだけ防ぐこと、また、要介護状態であっても状態がそれ以上悪化しないようにすることを介護予防として大きな目的としている。

本研究において、魚類のアユに対する小麦共生細菌由来糖脂質の経口投与が、アユの感染症予防に効果が得られることを明らかにした。今後、本研究成果を基盤として、高齢者の感染症予防における小麦共生細菌由来糖脂質の効果を検討していくことで、高齢社会での大きな課題である介護予防と健康寿命の延伸を達成するための糖脂質を利用した新規な技術開発につながることを期待される。

謝辞

本研究は、平成15-19年度私立大学産学連携研究推進事業（文部科学省）「自然免疫に基づく水産・畜産養殖動物の感染防御技術ならびに新規耐病性動物の開発」からの御援助の基に行なっており、深く感謝致します。

参考文献

- (1) 一番ヶ瀬康子、江澤郁子、田端光美 (2007) 家政学概論 ミネルヴァ書房 P130
- (2) Pawelec G. (2006) Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol.* Dec;41 (12) :1239-42.
- (3) Timothy P. Plackett, Eric D. Boehmer, Douglas E. Faunce, and Elizabeth J. Kovacs. (2004) Aging and innate immune cells. *J. Leukoc. Biol.*76: 291 - 299
- (4) Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* May 21;284 (5418) :1313-8
- (5) Kohchi C, Inagawa H, Hino M, Oda M, Nakata K, Yoshida A, Hori H, Terada H, Makino K, Takiguchi K, Soma G. (2004) Utilization of macrophages in anticancer therapy: the macrophage network theory. *Anticancer Res.* 2004 ep-Oct;24 (5C) :3311-20
- (6) Aggarwal BB, Natarajan K. (1996) Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw.* Apr-Jun;7 (2) :93-124
- (7) Nakamoto T, Yoshimura H, Honda T, Nakata K, Taniguchi Y, Yoshida A, Uenobe M, Yoshioka N, Yamaguchi T, Inagawa H, Kohchi C, Nishizawa T, Soma G. (2007) Treatments for the activating macrophages that reduces surgical stress and postoperative mortalities from bacterial infections and tumor metastases. *In Vivo.* 2007 Mar-Apr;21 (2) :357-64.
- (8) Nishizawa T, Inagawa H, Oshima H, Okutomi T, Tsukioka D, Iguchi M, Soma G, Mizuno D. (1992) Homeostasis as regulated by activated macrophage. I. Lipopolysaccharide (LPS) from wheat flour: isolation, purification and some biological activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* . 40, 479-483.
- (9) Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Yamaguchi T, Nagai S, Soma (2006) G.Applications of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory. *J Biosci Bioeng.* 102 (6) :485-96
- (10) Lindh E, Kjaeldgaard P, Frederiksen W, Ursing J. (1991) Phenotypical properties of *Enterobacter agglomerans* (*Pantoea agglomerans*) from human, animal and plant

- sources. *Apmis*. 99 (4) :347-52.
- (11) Suzuki Y, Kobayashi A, Nishizawa T, Inagawa H, Morikawa A, Soma G, Mizuno D. (1992) Homeostasis as regulated by activated macrophage. VI. Protective effect of LPSw (a lipopolysaccharide from wheat flour) against acute infection by *Toxoplasma gondii* in mice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* . 40 (5) :1266-7.
- (12) Iguchi M, Inagawa H, Nishizawa T, Okutomi T, Morikawa A, Soma GI, Mizuno D. (1992) Homeostasis as regulated by activated macrophage. V. Suppression of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by LPSw (a lipopolysaccharide from wheat flour) .*Chem Pharm Bull (Tokyo)* . 40 (4) :1004-6.
- (13) Inagawa H, Nishizawa T, Noguchi K, Minamimura M, Takagi K, Goto S, Soma G, Mizuno D. (1997) Anti-tumor effect of lipopolysaccharide by intradermal administration as a novel drug delivery system. *Anticancer Res*. 17 (3C) :2153-8.
- (14) Ulevitch, R.J., and P.S. Tobias. (1999) Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 11:19.
- (15) Uenobe M, Kohchi C, Yoshioka N, Yuasa A, Inagawa H, Morii K, Nishizawa T, Takahashi Y, Soma G. (2007) Cloning and characterization of a TNF-like protein of *Plecoglossus altivelis* (ayu fish) . *Mol Immunol.* 44, 1115-1122.
- (16) Ruiz, M., Santiago, E., Marcos, M. A., Martinez, J. A., Arancibia, F. Mensa, J., Torres, A. (1999) Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 397 - 405.
- (17) Laupland, K. B., Church, D. L., Mucenski, M., Sutherland, L. R., Davies, H. D. (2003) Population-based study on the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J. Infect. Dis.* 187, 1452 - 1459.
- (18) Potter, J. M., O' Donnell, B., Carman, W. F., Roberts, M. A., Stott, D. J. (1999) Serological response to influenza vaccination and nutritional and functional status of patients in geriatric medical long-term care. *Age Ageing* 28, 141 - 145.
- (19) Linn, B. S. (1980) Age differences in the severity and outcomes of burns. *J. Am. Geriatr. Soc.* 28, 118 - 123.
- (20) Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., Sambhara, S. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* 169, 4697 - 4701.
- (21) Boehmer, E. D., Goral, J., Faunce, D. E., Kovacs, E. J. (2004) Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokines by production and mitogen-activated protein kinase expression. *J. Leukoc. Biol.* 75, 342 - 349.
- (22) 内閣府編 平成 19 年版 高齢社会白書
- (23) 厚生労働省老健局 平成 19 年 6 月分 国民生活基礎調査 介護保険事業状況報告月報