泌乳マウスの乳腺における免疫グロブリン A 産生に及ぼすガラクトオリゴ糖の影響

酒井豪太¹・前田佳祐¹・杉本実紀¹・池田俊太郎¹・木村一雅²・久米新一¹

¹ 京都大学大学院農学研究科, 京都市左京区 606-8502

² ヤクルト本社中央研究所, 国立市 186-8650

(2015. 2. 5 受付, 2015. 4. 17 受理)

要 約 ICR 系妊娠マウス 15 匹を対照区およびガラクトオリゴ糖区に割り当てて、ガラクトオリゴ糖区では交配後 6.5 日目から分娩 14 日後までガラクトオリゴ糖を 2.825% 添加した飼料を給与し、泌乳マウスの小腸と乳腺における免疫グロブリン A (IgA) 産生に及ぼすガラクトオリゴ糖の影響を調べた。ガラクトオリゴ糖給与で泌乳マウスの乳腺における IgA 産生細胞数および IgA 含量が増加したが、空腸と回腸における IgA 産生細胞数および IgA 含量には処理による影響は認められなかった。泌乳マウスの血清および糞並びに仔マウスの血清、胃内容物および糞の IgA 含量には処理による影響は認められなかった。ガラクトオリゴ糖給与で泌乳マウスの乳腺における CCL28 の mRNA 発現量が増加した。以上の結果から、ガラクトオリゴ糖給与は泌乳マウスの乳腺における IgA 産生の改善に効果的なことが認められた。

日本畜産学会報 86 (3), 319-324, 2015

動物の初乳中には免疫グロブリン、ラクトフェリンなど、免疫と関連するタンパク質が多量に含まれ、新生児の健康維持と疾病予防に重要な役割をはたしている。ヒトでは妊娠中に免疫グロブリン G (IgG) が胎盤を介して胎児に移行するため、初乳中には免疫グロブリン A (IgA) が豊富に含まれているが、ウシでは妊娠中に IgG が胎盤を介して移行しないため、初乳中には IgG が多量に含まれ、IgA は非常に少ない特徴がある (Stelwagen ら 2009)。乳中の IgA は乳腺の IgA 産生細胞で生産され、乳中へは二量体で分泌されるが、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 (Fagarasan と Honjo 2003 ; Harris ら 2006)。したがって、出生直後の新生児では下痢などの予防のために、初乳由来の IgA を十分に摂取することが必要といえる。

乳中への IgA 分泌量を増やすためには、母体の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乳腺への移動 (ホーミング) が必須である (Fagarasan と Honjo 2003 ; Mora と von Andrian 2009)。また、IgA 産生細胞の乳腺へのホーミングにはケモカインリガンド CCL28 とそのレセプターである CCR10、血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) とインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ などの活性化が重要であり、CCL28 と VCAM-1 は乳腺で発現し、CCR10 と $\alpha 4 \beta 7$ は IgA 産生細胞で発現する (Low ら 2010)。我々は泌乳マウスに β -カロテンを給与すると回腸と乳腺の IgA 産生細胞数が増加し、乳中への IgA 分泌量が増加する (Nishiyama ら 2011a, b) こ

とと、植物エストロゲンの一つであるクメステロールを泌乳マウスに投与すると乳腺における VCAM-1 の mRNA 発現量が増加し、乳腺の IgA 産生細胞数が増加する (Wang ら 2013) ことを報告した。さらに、 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 CCL25 の mRNA 発現量が増加し、空腸の IgA 産生細胞数と IgA 産生量を増やした (Nishida ら 2014) ことから、飼料由来の機能性成分は腸管や乳腺における IgA 産生を高める効果が期待された。

ガラクトオリゴ糖は乳糖にガラクトースが結合した galactosyl-lactose を主要構成成分とするオリゴ糖であり、感染防御、ミネラル代謝改善、免疫賦活化などの機能を有し (Gopal と Gill 2000)、ガラクトオリゴ糖を給与した乳牛と子牛では窒素利用効率、エネルギー代謝などが改善されている (久米ら 2006 ; Santoso ら 2003)。また、雌マウスにガラクトオリゴ糖を給与すると糞中 IgA 含量が増加し (佐藤ら 2008)、新生仔マウスにフラクトオリゴ糖を給与すると空腸、回腸および結腸における IgA 産生が増加した (Nakamura ら 2004) が、乳腺の IgA 産生に及ぼすガラクトオリゴ糖の効果は今までほとんど報告されていない。

佐藤ら (2008) はガラクトオリゴ糖製品を 5% 添加 (ガラクトオリゴ糖として 3.565% 添加) して雌マウスの糞中 IgA 含量が増加したことから、本研究では妊娠期から泌乳期のマウスにガラクトオリゴ糖製品を 5% 添加 (ガラクトオリゴ糖として 2.825% 添加) した飼料を給与し、泌乳マ

連絡者 : 久米新一 (fax : 075-753-6345, e-mail : kume@kais.kyoto-u.ac.jp)

ウスの小腸と乳腺における IgA 産生に及ぼすガラクトオリゴ糖の影響を調べた。

材料および方法

交配後 6.5 日の ICR 系雌マウス 15 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。なお、本実験計画は承認番号第 24-64 号、第 25-64 号および第 26-64 号として京都大学大学院農学研究科動物実験委員会で承認されたものである。

マウスは対照区 ($n = 8$) およびガラクトオリゴ糖区 ($n = 7$) に割り当て、ガラクトオリゴ糖区では交配後 6.5 日目から分娩 14 日後までマウス用標準飼料（オリエンタル酵母工業、東京）にガラクトオリゴ糖を含有した製品（オリゴメイト 55NP；ヤクルト薬品工業、東京）を 5% 添加して給与した。使用した製品にはガラクトオリゴ糖が 56.5%，単糖類および乳糖が 43.5% 含まれていたことから、飼料中に添加したガラクトオリゴ糖は 2.825% に相当した。母マウスの体重、飼料摂取量および飲水量は毎日 10：00 に測定した。仔マウスは分娩 2 日後に雌雄各 5 匹ずつにした後に、体重を毎日 10：00 に測定した。

分娩 14 日後に母マウスから血液、乳腺、空腸、回腸および糞を、また仔マウスからは血液、胃内容物および糞を前報（Nishiyama ら 2011a）に従って採取し、胃内容物および糞は -20°C で、また乳腺、空腸および回腸は -80°C で保存した。採取した血液は遠心分離後、得られた血清を -20°C で保存した。なお、泌乳マウスでは乳中 IgA を測定することが困難なため、前報（Nishiyama ら 2011a, b）と同様に新生仔マウスの胃内容物中の IgA を乳由来の IgA とみなした。

母マウスの血清、乳腺、空腸、回腸および糞と仔マウスの血清、胃内容物および糞の IgA 含量は、各サンプルを前報（Nishiyama ら 2011a）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。乳腺、空腸および回腸の IgA 産生細胞数は、各組織を前報（Nishiyama ら 2011a）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 で各組織の単位面積当たりの IgA 産生細胞数を計数した。

乳腺の IgA、CCL28 および VCAM-1 の mRNA 発現量は、前報（Nishiyama ら 2011a）と同様な方法で計測し、GAPDH mRNA 発現量で標準化した。すなわち、RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Maryland, CA, USA）を用いて凍結保存した乳腺組織から総 RNA を抽出後、SuperScript III First Strand Synthesis System（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）の oligo(dT)₂₀ プライマーを用いた方法で合成した cDNA を鋳型として、サーマルサイクラー（2720 Thermal Cycler；Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）で PCR を行った。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色したゲルを InGenius3（Synoptics, Cambridge, UK）で可視化し、画像解析ソフト Image J で定量化した。PCR に使用したプライマーおよび反応条件は、表 1 の通りである。

分娩前と分娩後の母マウスの体重、飼料摂取量および飲水量と仔マウスの体重は、処理と日数を変数にしたモデル式（Nishiyama ら 2011a）を用いて SAS（1997）の GLM プロシジャーで解析した。母マウスおよび仔マウスの分析項目は、処理を変数にして SAS（1997）の GLM プロシジャーで解析した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

Table 1 PCR primer sequences, thermal conditions, and product size used for RT-PCR.

Genes	Sequence of primers (5'-3')	PCR conditions*	Product size (bp)	Cycles
		(A)		(B)
IgA C-region	TGCACAGTTACCCATCCTGA GCACCAGCACTTCTTTAGGG	95°C/1 min→53°C/1 min→72°C/1 min	178	27
VCAM-1	ATTTTCTGGGGCAGGAAGTT ACGTCAGAACAAACCGAATCC	95°C/1 min→53°C/1 min→72°C/1 min	238	34
CCL28	TGGCAAAAGCCACATTCATA CATGCCAGAGTCGAACAGAA	95°C/1 min→53°C/1 min→72°C/1 min	194	37
GAPDH	GGGTGGAGCCAAACGGGTC GGAGTTGCTGTTGAAGTCGC	95°C/1 min→59°C/1 min→72°C/1 min	532	27

* All PCR procedure were performed as follows : 94°C/5 min→(A) × (B) cycles→72°C/7 min→4°C/∞

結 果

母マウスの体重、飼料摂取量および飲水量と仔マウスの

体重は、処理による影響は認められなかった (図 1). ガラクトオリゴ糖区の泌乳マウスの乳腺の IgA 含量は対照区よりも多かった ($P < 0.05$) が、泌乳マウスの血清、

Figure 1 Feed intake (A), water intake (B) and Bodyweight (BW, C) of maternal mice and BW (D) of neonatal mice in the control (○; $n = 8$) and galacto-oligosaccharides (●; $n = 7$) groups.

Table 2 IgA concentration in serum, mammary gland, jejunum, ileum and feces of maternal mice and serum, stomach contents and feces of neonatal mice in the control ($n = 8$) and galacto-oligosaccharides (GOS; $n = 7$) groups after 14 days postpartum (Mean $\pm$ SE)

	Control	GOS	<i>P</i>
Mother			
Serum, $\mu\text{g/mL}$	925 $\pm$ 260	1386 $\pm$ 233	NS
Mammary gland, $\mu\text{g/g}$	520 $\pm$ 75	741 $\pm$ 62	*
Jejunum, $\mu\text{g/g}$	1919 $\pm$ 291	2052 $\pm$ 254	NS
Ileum, $\mu\text{g/g}$	1283 $\pm$ 200	1262 $\pm$ 140	NS
Feces, $\mu\text{g/g}$	520 $\pm$ 207	418 $\pm$ 182	NS
Neonate			
Serum, $\mu\text{g/mL}$	3.2 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.5	NS
Stomach contents, $\mu\text{g/g}$	152 $\pm$ 29	189 $\pm$ 40	NS
Feces, $\mu\text{g/g}$	3513 $\pm$ 944	4867 $\pm$ 942	NS

* $P < 0.05$

Table 3 IgA antibody-secreting cells (ASC) in the mammary gland, jejunum and ileum of the control ($n = 8$) and galacto-oligosaccharides (GOS ; $n = 7$) groups after 14 days postpartum (Mean $\pm$ SE)

	Control	GOS	<i>P</i>
Mammary gland	12.5 $\pm$ 0.4	15.7 $\pm$ 0.5	***
Jejunum	9.3 $\pm$ 0.2	9.7 $\pm$ 0.2	NS
Ileum	6.9 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.3	NS

* $P < 0.001$

Numbers of IgA ASC in mammary gland were counted in eight randomised fields from each mouse, and those in jejunum and ileum were counted in lamina propria of villi in five to six randomised villi from each mouse.

Table 4 The ratios of IgA C-region, CCL28 and VCAM-1 mRNA to GAPDH mRNA in the mammary gland of the control ($n = 8$) and galacto-oligosaccharides (GOS ; $n = 7$) groups after 14 days postpartum (Mean $\pm$ SE)

	Control	GOS	<i>P</i>
IgA	1.35 $\pm$ 0.20	1.23 $\pm$ 0.23	NS
CCL28	0.94 $\pm$ 0.07	1.27 $\pm$ 0.08	*
VCAM-1	0.79 $\pm$ 0.10	0.90 $\pm$ 0.12	NS

* $P < 0.05$.

CCL28, chemokine ligand 28 ; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

空腸、回腸および糞並びに仔マウスの血清、胃内容物および糞の IgA 含量は処理による影響は認められなかった (表 2)。泌乳マウスの血清および糞中の IgA 含量と比較すると、仔マウスの血清 IgA 含量は非常に低かったが、糞中 IgA 含量は高い値を示した。

ガラクトオリゴ糖区の乳腺の IgA 産生細胞数は対照区よりも多かった ($P < 0.001$) が、空腸および回腸の IgA 産生細胞数には処理による影響は認められなかった (表 3)。ガラクトオリゴ糖区の乳腺の CCL28 の mRNA 発現量は対照区より増加した ($P < 0.05$) が、乳腺の IgA および VCAM-1 の mRNA 発現量は処理による影響は認められなかった (表 4)。

考 察

出生直後の新生児では、健康維持のために初乳から免疫グロブリンなどの免疫成分を十分に摂取することが欠かせない。IgA は動物の小腸粘膜を保護して病原菌や有害微生物の腸管からの侵入を防ぐため、新生児の下痢予防では乳中の IgA が重要な働きをしている (Fagarasan と Honjo 2003 ; Mora と von Andrian 2009) が、乳中への IgA 分泌量を増やすためには乳腺における IgA 産生細胞の増加が必須である (Morteau ら 2008)。本研究ではガラク

トオリゴ糖給与によって泌乳マウスの乳腺の IgA 産生細胞数と IgA 含量が増加したことから、ガラクトオリゴ糖には乳腺における IgA 産生を高める効果のあることが認められた。

乳中への IgA 分泌量を増やすためには腸管で抗原感作された IgA 前駆細胞の乳腺へのホーミングが必要であるが、ケモカインレセプター CCR10 を欠損したマウスでは乳中への IgA の分泌が阻害され、新生仔マウスの糞中 IgA 含量が減少した (Morteau ら 2008)。本研究では、ガラクトオリゴ糖給与によって CCR10 のリガンドである CCL28 の mRNA 発現量が乳腺で増加し、IgA 産生細胞数と IgA 含量も乳腺で増加したことから、ガラクトオリゴ糖による IgA 産生効果はホーミングリガンドである CCL28 の活性化を介したことが推察された。

一方、3.565%のガラクトオリゴ糖給与で雌マウスの糞中 IgA 含量が増加し、5%のフラクトオリゴ糖給与で新生仔マウスの空腸、回腸および結腸の IgA 産生が増加したことから、ガラクトオリゴ糖などの難消化性オリゴ糖は腸内細菌叢の改善によって IgA 産生を高めることが推察されている (Nakamura ら 2004 ; 佐藤ら 2008)。しかし、本研究の 2.825%のガラクトオリゴ糖給与では泌乳マウスの空腸および回腸の IgA 産生細胞数と IgA 含量は改善されなかった。腸管で抗原感作された IgA 前駆細胞は IgA 産生細胞への分化および増殖後、体内への病原菌などの侵入を防ぐために小腸、乳腺などにホーミングする (Mora と von Andrian 2009)。したがって、本研究ではガラクトオリゴ糖給与で改善された腸内細菌叢が泌乳マウスの腸管の IgA 前駆細胞を増やし、小腸よりも乳腺へ IgA 産生細胞を優先的にホーミングしたことが示唆される。

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 (Nishida ら 2014 ; Nishiyama ら 2011a, b) が注目され、クメステロールはエストロゲン受容体を介した効果 (Wang ら 2013) が報告されている。特に、 β -カロテンを給与した泌乳マウスでは IgA 産生効果が大きく、乳腺と回腸の IgA 産生細胞数、乳中への IgA 分泌量と回腸の IgA mRNA 発現量が増加したが、乳腺の IgA mRNA 発現量には影響が認められなかった (Nishiyama ら 2011a, b)。また、クメステロールを投与した泌乳マウスでは乳腺に特異的な効果を示し、乳腺の IgA 産生細胞数と乳腺における IgA および VCAM-1 の mRNA 発現量が増加したが、回腸の IgA 産生細胞数と乳中への IgA 分泌量には影響が認められなかった (Wang ら 2013)。それに対して、本研究のガラクトオリゴ糖を給与した泌乳マウスでは乳腺の IgA 産生細胞数と IgA 含量が増加したものの、空腸と回腸の IgA 産生細胞数、乳中への IgA 分泌量と乳腺の IgA および VCAM-1 の mRNA 発現量には影響が認められなかった。したがって、ガラクトオリゴ糖による乳腺の IgA 産生効果は β -カロテンよりも小さいことが推察される。

が、ガラクトオリゴ糖による腸内細菌叢の改善と乳腺の IgA 産生の関係などを詳細に調べることが必要と考えられる。

飼料中の機能性成分を活用した下痢などの疾病予防法の開発は、新生児の健康維持だけでなく、抗生物質の使用量を低減する効果が期待できる。本研究では、2.825% のガラクトオリゴ糖給与により泌乳マウスの乳腺における IgA 産生を改善したが、乳中への IgA 分泌量が増加しなかったことから、今後はガラクトオリゴ糖の給与量を高めた試験などが必要である

謝 辞

ガラクトオリゴ糖をご提供いただいたヤクルト本社中央研究所に深謝します。

文 献

- Fagarasan S, Honjo T. 2003. Intestinal IgA synthesis : regulation of front-line body defences. *Nature Immunology* **3**, 63-72.
- Gopal PK, Gill HS. 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition* **84** (Suppl. 1), S69-S74.
- 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. *Journal of Immunology* **177**, 6256-6262.
- 久米新一, 長野京子, 木村一雅. 2006. 子牛の健康状態・ミネラル代謝におよぼすガラクトオリゴ糖給与の影響. 微量栄養素研究 **23**, 22-27.
- Low EN, Zagieboylo L, Martino B, Wilson E. 2010. IgA ASC accumulation to the lactating mammary gland is dependent on VCAM-1 and alpha4 integrins. *Molecular Immunology* **47**, 1608-1612.
- Mora JR, von Andrian UH. 2009. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Seminars in Immunology* **21**, 28-35.
- Morteau O, Gerard C, Lu B, Ghiran S, Rits M, Fujiwara Y, Law Y, Distelhorst EM, Nielsen EM, Hill ED, Kwan R, Lazarus NH, Butcher EC, Wilson E. 2008. An indispensable role for the chemokine receptor CCR10 in IgA antibody-secreting cell accumulation. *Journal of Immunology* **181**, 6309-6315.
- Nakamura Y, Nosaka S, Suzuki M, Nagafuchi S, Takahashi T, Yajima T, Takenochi-Ohkubo N. 2004. Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clinical and Experimental Immunology* **137**, 52-58.
- Nishida K, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. 2014. Effects of supplemental β -carotene on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of mice after weaning. *British Journal of Nutrition* **111**, 247-253.
- Nishiyama Y, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. 2011a. Supplemental β -carotene increases IgA-secreting cells in mammary gland and IgA transfer from milk to neonatal mice. *British Journal of Nutrition* **105**, 24-30.
- Nishiyama Y, Yasumatsuya K, Kasai K, Sakase M, Nishino O, Akaike M, Nagase T, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. 2011b. Effects of supplemental β -carotene with whey on IgA transfer from maternal milk and mucosal IgA induction in neonatal mice and calves. *Livestock Science* **137**, 95-100.
- Santoso B, Kume S, Nonaka K, Gamo Y, Kimura K, Takahashi J. 2003. Influence of β 1-4 galactooligosaccharides supplementation on nitrogen utilization, rumen fermentation, and microbial nitrogen supply in dairy cows fed silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **16**, 1137-1142.
- 佐藤岳治, 中村泰之, 小澤修. 2008. ガラクトオリゴ糖がマウスの免疫系に与える影響. 日本栄養・食糧学会誌 **61**, 79-88.
- Statistical Analysis Systems (SAS). 1997. *SAS/STAT Software : Changes and Enhancement Through Release 6. 12*. SAS Institute, Cary, NC.
- Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. 2009. Immune component of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science* **87** (Suppl. 1), 3-9.
- Wang M, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. 2013. Effects of coumestrol administration to maternal mice during pregnancy and lactation on IgA-secreting cells in mammary gland. *Animal Science Journal* **84**, 322-327.

Effects of galacto-oligosaccharides on IgA induction in mammary glands of lactating mice

Gota SAKAI¹, Keisuke MAEDA¹, Miki SUGIMOTO¹, Shuntaro IKEDA¹,
Kazumasa KIMURA² and Shinichi KUME¹

¹ Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

² Yakult Central Institute for Microbiological Research, Tokyo 186-8650, Japan

Corresponding : Shinichi KUME (fax : +81 (0) 75-753-6345, e-mail : kume@kais.kyoto-u.ac.jp)

Fifteen ICR pregnant mice were assigned to control or galacto-oligosaccharides (GOS) groups to clarify the effects of GOS on IgA induction in the mammary glands and intestines of lactating mice, and 2.825% GOS was supplemented in the GOS groups from 6.5 days post coitus to 14 days after parturition. Supplemental GOS increased the numbers of IgA-secreting cells and IgA contents in the mammary glands of lactating mice, but the numbers of IgA-secreting cells and IgA contents in the jejunum and ileum of lactating mice were not affected by the treatment. Supplemental GOS had no effect on IgA contents in serum and feces of lactating mice and serum, stomach contents and feces of neonatal mice. Supplemental GOS increased the mRNA expression of CCL25 in the mammary glands of lactating mice. These results imply that supplemental GOS in maternal mice during pregnancy and lactation is effective to increase IgA induction in the mammary glands of lactating mice.

Nihon Chikusan Gakkaiho 86 (3), 319-324, 2015

Key words : Galacto-oligosaccharide, IgA induction, Lactating mouse, Mammary gland.