

平成 28 年 3 月 31 日

共同研究実施報告書

カーボンミネラルエキスの腸管免疫に及ぼす影響

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 太田富久
株式会社鶴商、有限会社炭素光房

- 目的：カーボンミネラルエキス(以下エキス)の腸管における T 細胞免疫賦活活性を評価する目的で、腸管免疫リンパ組織であるパイエル板構成細胞を採取し、この細胞が産生する免疫応答サイトカイン、抗体産生を測定する。
- 実験の概要：正常マウスに各用量のエキスを 4 日間経口投与し、小腸からパイエル板を摘出する。この組織を構成するリンパ球を採取し、T 細胞を非特異的に活性化させる因子の Concanavalin A の刺激、あるいは未刺激の条件で産生される Th 1 関連サイトカイン、IL-2 と IFN- γ を、また B 細胞の免疫グロブリン産生を生物の細胞に作用すると、多彩な生物活性を発現する Lipopolusaccharide の刺激、未刺激の条件下で培養し、培養上清液 ELISA 法で測定し、免疫反応の制御反応を試験する。
- ・Th1 サイトカインは生体防御反応において、悪性腫瘍、ウイルス、菌感染防御に役立つ生体内因子であり、免疫グロブリン IgA は腸管などの粘膜に多くあり細菌やウイルス感染の予防、IgG も同様に細菌やウイルスなどと結合し、それらの病原体の動きを止める抗体を産生する。
- 被検体：①エキス 100mg/kg の投与群…グラフ名 100
②エキス 200mg/kg の投与群…グラフ名 200
- 使用動物：C57BL/6N (5 週令 ♂ 日本チャールズリバー)
- 飼育条件：マウスを飼育用の木材チップを敷いたプラスチックケージに 2 匹ずつ分け、 $25\pm 2\sim 3^{\circ}\text{C}$ の室温で飼育。
- 使用匹数：一群 2 匹
- マウス飼料：オリエンタル酵母、実験動物用 (CRF-1) ガンマ線照射飼料
- 検体投与：各検体を上記の用量に精製水で調製し、4 日間連続投与した。
また、投与時間は午前 10 時に被検体を投与し、マウス 10 g あたり 0.1mL の用量になるように経口用マウスゾンデを用いて経口投与した。
検体は作り置きせずに、用時作製をした。
- 実験期間：7 日間馴化を含め 3 週間
- 実験方法：実験終了後にマウスをエーテル麻酔下に断頭遮血し、幽門から虫垂までの小腸を切り取り、パイエル板を採取した。

採取したパイエル板をコラゲナーゼ(750 U/mL)処理で細胞を分離し、細胞を集めた。最終細胞数を 1.5×10^6 cells /mL に調製し、24 well プレートに播き、T 細胞を活性化するための Concanavalin A(Con A, $5 \mu\text{g/mL}$)を加えた。これとは別に Con A 未刺激の培養条件で設定した上で、 37°C 5% CO_2 インキュベーターにて 72 時間培養した。培養終了後に培養液を遠心して上清を回収しサイトカイン測定まで -80°C に保存した。

これとは別に B 細胞を活性化するための Lipopolysaccharide(LPS $1 \mu\text{g/mL}$)を加え同様に培養し、144 時間培養した。同様に回収し、 -80°C に保存した。

計測方法: eBioscience 社製の ELISA Kit を使用し、プロトコールに従ってサイトカイン量を測定した。

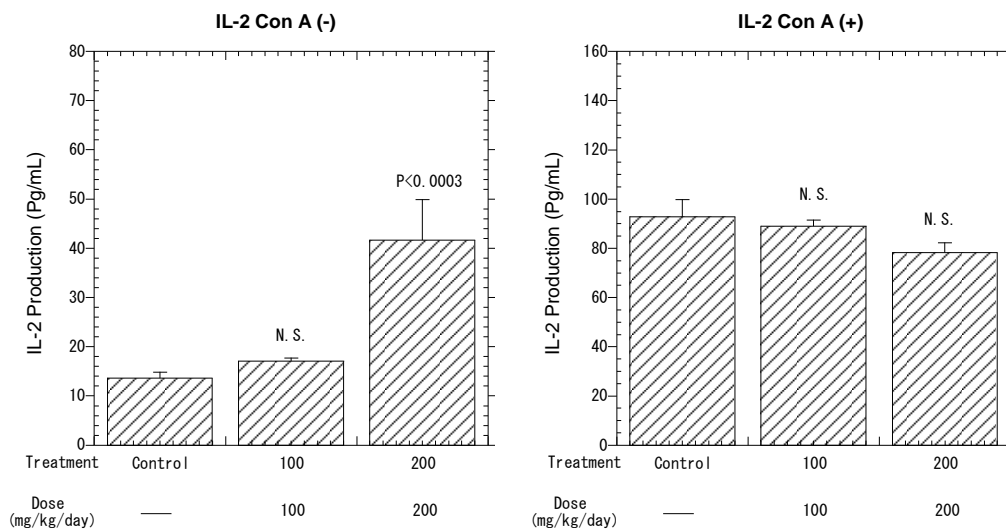
抗体産生はコスモバイオ社製の ELISA Kit を使用し、プロトコールに従って抗体産生量を測定した。

結果と考察: ヘルパーT 細胞を活性化する免疫関連タンパク質 IL-2 及び IFN- γ の産生を優位に増強した。(下図参照) したがって、カーボンミネラルは細胞性免疫を増強することで細菌やがん細胞のリスクを下げると同時に、液性免疫とのバランスをとることによって、アレルギーなどの発症を予防すると考えられる。

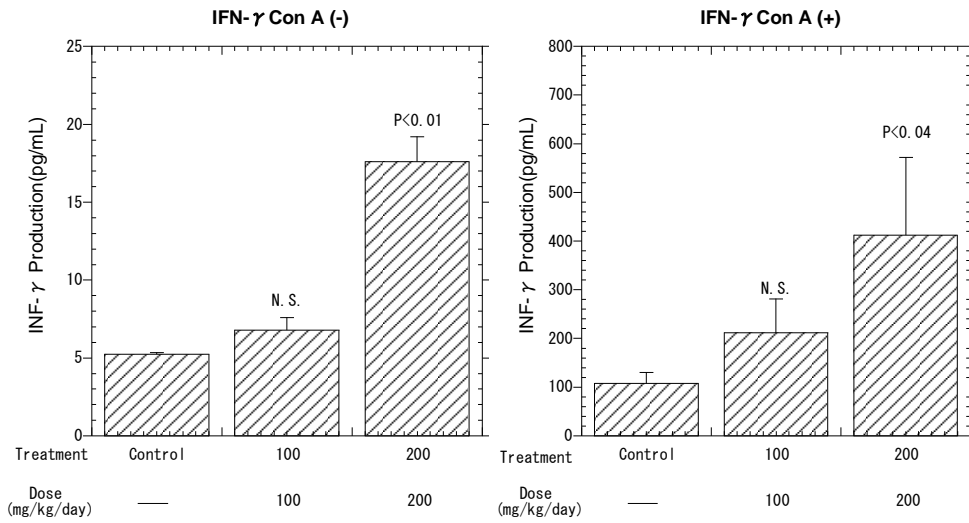
一方、免疫抗体 IgA の産生に有意な影響は認められなかったが、IgG1 の産生を強く増強した。IgG1 は細菌や真菌あるいはウイルスなどの病原体と結合することによって生体を守っている。したがって、カーボンミネラルは感染症を未然に防ぐ作用が期待できる。

実験結果図

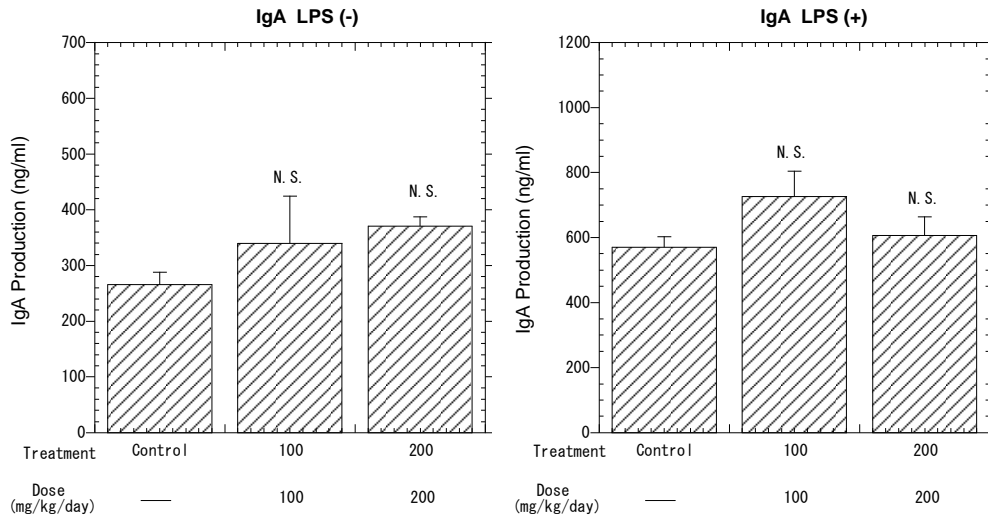
1. IL-2 (細胞性免疫に関与する免疫たんぱく質) の産生増強作用



2. IFN- γ (免疫調節たんぱく質) 産生増強作用



3. Ig-A (感染防御関連免疫グロブリン) の産生を促進する傾向が認められた。



4. Ig-G (感染防御関連免疫グロブリン) の産生の促進が認められた。

