

氏名（本（国）籍）	蛇 島 武 久（熊本県）
主 指 導 教 員 名	東京農工大学 教授 田 谷 一 善
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第304号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	Studies on the Practical Use of an Immunomodifier, Immuno-Potentiator from <i>Pantoea agglomerans</i> (IP-PA1) (免疫修飾物質Immuno-Potentiator from <i>Pantoea</i> <i>agglomerans</i> (IP-PA1)の実用的利用に関する研究)
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 神 田 尚 俊 副査 帯広畜産大学 教授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教授 岡 田 幸 助 副査 東京農工大学 教授 田 谷 一 善 副査 岐 阜 大 学 教授 深 田 恒 夫

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

Immuno-potentiator from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1)は、小麦等の食用植物の共生細菌 *Pantoea agglomerans* の細胞壁構成成分の lipopolysaccharide (LPS)であり、経口投与可能で、感染症による致死率改善、幼齢動物の成長率・生存率改善など、生体に有用で免疫機能賦活能が示唆されている。またその効果は、哺乳動物や家禽にとどまらず、魚類や甲殻類にまで及ぶことが報告されている。IP-PA1 は、その由来と安全性試験・野外試験の結果から、極めて安全に投与可能な物質であると考えられており、既存の免疫賦活剤の多くが注射投与を要し、重篤な副作用を伴う場合があることから高い有用性が期待される。しかし、その作用メカニズムや適用範囲は十分に明らかにされていない。本研究では、実用的な免疫賦活剤の候補として IP-PA1 が免疫細胞に与える効果を詳細に検討するとともに、マウスと鶏を用いて、IP-PA1 の経口投与が生体に与える効果を検討した。

第1章では、緒論として、免疫機能、IP-PA1、マクロファージについて概説し、研究の目的を述べた。

第2章では、IP-PA1 の免疫賦活効果に関する研究結果を記述した。

本研究では、IP-PA1 の細胞レベルでの免疫賦活能を明らかにする目的で、LPS 特異的受容体 Toll-like receptor (TLR)-4 を細胞表面に発現するマクロファージに注目し、マウス腹腔由来マクロファージ、およびマウスマクロファージ様細胞株 RAW 264, J774.1 に対する IP-PA1 の効果を *in vitro* で検討した。その結果、IP-PA1 は、活性化マクロフ

マクロファージが産生する代表的な生理活性物質である腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor (TNF))- $\alpha$ および窒素酸化化合物(nitric oxide (NO))産生を誘導することとマクロファージの細胞増殖に影響を与えないことを明らかにした。さらに、IP-PA1 が生体に与える免疫賦活能を明らかにする目的で、マウス(Balb/c 雌 6~8 週齢)を使用し、IP-PA1 経口投与による炎症性サイトカイン産生誘導能を *in vivo* で検討した。その結果、IP-PA1 経口投与により、代表的な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、interferon (IFN)- $\gamma$ 、および interleukin (IL)-12 の産生が誘導されることを明らかにした。

第3章では、抗癌剤によるマクロファージ増殖抑制に対する IP-PA1 の防御効果について研究結果を記述した。IP-PA1 が炎症性サイトカイン産生誘導能を有することから、炎症性サイトカイン産生誘導及びアポトーシス関連タンパクの発現調整に中心的な役割を果たす細胞内転写因子 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B に注目し、RAW 264, J774.1 細胞における IP-PA1 による NF- $\kappa$ B 活性化能と抗癌剤誘導性アポトーシス抑制能を *in vitro* で検討した。その結果 IP-PA1 は、NF- $\kappa$ B を活性化し、アポトーシス抑制タンパクの発現を増強すること、及び抗癌剤誘導性アポトーシスを抑制することが明らかとなった。一方 IP-PA1 は、ヒト乳腺癌細胞株 MCF-7 とヒト肺癌細胞株 A-549 に対する抗癌剤の細胞障害性には影響を与えなかった。

第4章では、担癌マウスにおける IP-PA1 による抗癌剤治療効果の改善に関する研究結果を記述した。抗癌剤治療における補助薬としての IP-PA1 の有用性を検討する目的で、メラノーマ細胞株 B16 を腹腔内接種した担癌マウスに、抗癌剤である doxorubicin を投与することにより抗癌剤治療モデルを作製し、IP-PA1 を経口で併用投与してその効果を検討した。その結果、IP-PA1 経口併行投与が、担癌マウスの平均生存期間を延長することが明らかとなり、抗癌剤治療における IP-PA1 の補助薬としての有用性が示唆された。

第5章では、ストレス誘導性免疫抑制における IP-PA1 の効果について研究結果を記述した。IP-PA1 の畜産分野における有用性を検討する目的で、3 週齢の鶏（白色レグホーン）に、35 日間 dexamethasone を筋肉内投与して作製したストレス誘導性免疫抑制モデルを使用し、IP-PA1 経口投与の効果を検討した。その結果、dexamethasone 投与による体重増抑制、胸腺およびファブリキウス囊萎縮、*Salmonella* Enteritidis(SE)ワクチンおよび羊赤血球(Sheep Red Blood Cells (SRBC))に対する特異的抗体産生能低下に対し IP-PA1 経口投与が防御効果を有することが明らかとなった。

以上の結果から、IP-PA1 は、経口投与により効果を発揮する免疫賦活剤であり、癌や感染症などの免疫機能低下が病態の進行に関与する疾病の治療や予防において有効性が高いことを明らかにした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、免疫修飾物質である Immuno-potentiator from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1)が免疫細胞に与える効果を詳細に検討するとともに、マウスと鶏を用いて、IP-PA1 の経口投与が生体に与える効果を検討した。その結果、IP-PA1 は経口投与により効果を発揮し得る免疫賦活剤であり、免疫機能低下が病態の進行に関与する癌や感染症などの疾病の治療や予防における有用性を明らかにした。

### I. 免疫賦活効果

IP-PA1 の細胞レベルでの免疫賦活能を明らかにする目的で、マウス腹腔由来マクロファージ、及びマウスマクロファージ様細胞株 RAW 264, J774.1 に対する IP-PA1 の効果を検討した。その結果、IP-PA1 は、活性化マクロファージが産生する腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor (TNF))- $\alpha$

及び窒素酸化化合物(nitric oxide (NO))産生を誘導すること、及びマクロファージの細胞増殖に影響を与えないことを明らかにした。また、IP-PA1 が生体に与える免疫賦活能を明らかにする目的で、マウス(Balb/c 雌 6～8 週齢)を用いて、IP-PA1 経口投与の炎症性サイトカイン産生誘導能を検討した。その結果、TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , 及びinterleukin (IL)-12 の産生が誘導される事実を明らかにした。

## II. 抗癌剤によるマクロファージ増殖抑制に対する防御効果

RAW 264, J774.1 細胞における IP-PA1 による細胞内転写因子 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B 活性化能と抗癌剤誘導性アポトーシス抑制能を検討した。その結果、IP-PA1 は、NF- $\kappa$ B を活性化し、アポトーシス抑制タンパクの発現を増強する事実、及び抗癌剤誘導性アポトーシスを抑制する事実が明らかとなった。しかし、IP-PA1 は、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 とヒト肺癌細胞株 A-549 に対する抗癌剤の細胞障害性には影響を与えなかった。

## III. 抗癌剤治療効果の改善

抗癌剤治療における補助薬としての IP-PA1 の有用性を検討する目的で、メラノーマ細胞株 B16 を腹腔内接種した担癌マウスに、抗癌剤である doxorubicin を投与することにより作製した抗癌剤治療モデルに IP-PA1 を経口で併用投与してその効果を検討した。その結果、IP-PA1 経口併用投与が、担癌マウスの平均生存期間を延長することが明らかとなった。

## IV. ストレス誘導性免疫抑制に対する防御効果

3 週齢の鶏（白色レグホーン）に、35 日間 dexamethasone を筋肉内投与して作製したストレス誘導性免疫抑制モデルに、IP-PA1 経口投与の効果を検討した。その結果、dexamethasone 投与による体重増抑制、胸腺及びファブリキウス囊委縮、*Salmonella* Enteritidis(SE)ワクチン及び羊赤血球(Sheep Red Blood Cells (SRBC))に対する特異的抗体産生能低下に対し、IP-PA1 経口投与が防御効果を有することが明らかとなった。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

## 基礎となる学術論文

1) 題 目 : Immune recovery effects of Immunopotentiator from *Pantoea agglomerans* 1 (IP-PA1) on low antibody productions to *Salmonella* Enteritidis vaccine and sheep red blood cells in dexamethasone-treated stressed chicken models

著 者 名 : Hebishima, T., Matsumoto, Y., Soma, G., Kohchi, C., Watanabe, G., Taya, K., Hayashi, Y. and Hirota, Y.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : In Press