福島県立医科大学 学術機関リポジトリ

FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY

Title	Effect of the Lactococcus Lactis 11/19-B1 Strain on Atopic Dermatitis in a Clinical Test and Mouse Model(本文)
Author(s)	鈴木, 崇斗
Citation	
Issue Date	2022-09-30
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/1920
Rights	Fulltext: Publisher's version is "Nutrients. 2020 Mar 14;12(3):763. doi: 10.3390/nu12030763. © 2020 by the authors", used under CC-BY 4.0
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2024-04-29T13:12:32Z

Fukushima Medical University

学 位 論 文

Effect of the *Lactococcus Lactis* 11/19-B1 Strain on Atopic Dermatitis in a Clinical Test and Mouse Model

（*Lactococcus lactis* 11/19-B1 株のアトピー性皮膚炎に対する抑制効果 ）

福島県立医科大学大学院医学研究科

感染症学分野　微生物学講座

鈴木　崇斗

―目次―

Ⅰ．緒言

Ⅱ．実験材料および方法

－1　対象および試験方法

－2　検査項目

－3　試験材料

－4　実験動物および飼料

－5　アトピー性皮膚炎モデルの作製

－6　耳介の肥厚

－7　皮膚病巣スコア

－8　血漿中の総 IgE 量の測定

－9　抗体

－10　FACS 解析

－11　病理学的検討

－12　マウス骨髄細胞の培養および乳酸菌播種後の IFN-α産生能の測定

－13　統計学的解析

Ⅲ．結果

－1　アトピー性皮膚炎患者での L. lactis 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食効果

－2　マウスモデルを用いたアトピー性皮膚炎抑制効果を持つ菌株の同定

－3　乳酸菌摂食による T 細胞サブセットへの影響

－4　乳酸菌摂食による AD 病態の組織学的検討

－5　プラズマサイトイド樹状細胞による乳酸菌共培養下での IFN-α産生

Ⅳ. 考察

Ⅴ. 結語

Ⅵ. 参考文献

Ⅶ. 謝辞

I.　緒言

アトピー性皮膚炎（AD）は，掻痒のある湿疹を主病変とする疾患で増悪・寛解を繰り返す。患者の多くはアトピー性素因を有しており，痒みを伴う頻繁な皮膚の損傷は患者の生活の質の低下をもたらす［1］。

AD の病因には，皮膚バリア機能の低下と免疫学的異常が含まれており，これらの要因が互いに影響し合い，AD 病態の進行に大きく影響を及ぼしている。AD の免疫学的異常には，Th1 細胞や Th2 細胞，Th17 細胞などの T 細胞サブセットの組成やそれら細胞固有のサイトカイン産生の変化が関与している。過去の研究において，Th2 細胞は AD 病態における急性期の免疫応答，Th1 細胞は慢性期の免疫応答を誘発することが報告されている［2，3］。また Th17 細胞も AD 患者の末梢血や病変部位で増加していることが報告されており［4］，AD における T 細胞機能の制御が病態の緩和に寄与する可能性が推測される。

乳酸菌はヨーグルトや乳酸菌飲料など発酵食品の生産やプロバイオティクスとして活用されており，ヒトにとって非常に身近な微生物である。近年，乳酸菌の摂食に伴う NK 細胞の活性化や抗体産生の増強，およびサイトカイン産生の制御といった免疫調節機能が注目されている［5，6］。*Lactobacillus rhamnosus* GG 株［7，8］や *Lactobacillus paracasei* KW3110 株［9，10］などの一部の乳酸菌株は，Th1 / Th2 バランスの調節と抗炎症作用により AD 病態の改善に寄与す

ることが報告されている。しかしながら，株間での作用および効果の違いについては充分には検討されていない。

Lactococcus lactis 11/19-B1 株（*L. lactis* 11/19-B1）は，キウイフルーツから分離された乳酸菌である。これまでの研究では，*L. lactis* 11/19-B1 株含有飼料または含有ヨーグルトを摂食させたカイコにおいて，他の乳酸菌株と比較して高い自然免疫活性化作用および緑膿菌に対する抵抗力の向上が報告されている［11, 12］。さらに私たちの研究室では，*L. lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルトを摂取すると，ヒトの血中 LDL 値の低下と細胞性免疫の活性化をもたらすことを明らかにした［13］。これらのデータは，*L. lactis* 11/19-B1 株が宿主の免疫応答を刺激し，免疫系の異常によって生じる種々の病態を改善させ得る可能性を示唆しており，AD の予防及び改善にも寄与することが期待される。

そこで本研究では、ヒトおよび AD モデルマウスを用いて *L. lactis* 11/19-B1 株の抗アレルギー作用とその機序について検討した。

II. 実験材料および方法

II-1　対象および試験方法

本試験は福島県立医科大学倫理審査委員会の承認を得たうえで実施した（受付番号：2061）。対象となる被験者（Table 1）は，共同研究機関である いそめこどもクリニック ，いちかわクリニック ，大原綜合病院小児科 ，公立藤田総合病院小児科に通院中の AD 小児患者の中から，親からのインフォームドコンセントが得られた 18 名（男：12 人，女： 6 人）である（年齢：2~15 歳）。試験の実施に際しては，ヘルシンキ宣言に基づく主旨を遵守し，研究の目的，方法，内容などを十分に説明し，書面による同意を得た。試験スケジュールを Fig.1A に示す。試験は，前観察期間 4 週間，ヨーグルト摂食期間 8 週間の合計 12 週間行った。この期間中，AD に対する治療法には制限を加えなかったが，*L. lactis* 11/19-B1 含有ヨーグルトを毎日 1 個（80g）摂食することと，他の乳酸菌を用いた食品の摂食はしないことを条件とした。

II-2　検査項目

ヨーグルト摂食前（4 週前，数日前），摂食後（4 週間後，8 週間後）に採血およびアトピースコア（Severity Scoring of Atopic Dermatitis；SCORAD）による AD の重症度評価を行った［14］。SCORAD による評価は，0~103 点の範囲で行い，軽度 (0~25 点)，中等度 (26~50 点)，重度 (50 点以上)に分類した。血液検

査では，血球計数検査一般と血液生化学検査として AST，ALT，LDH，ALP，総ビリルビン（T-Bil），クレアチニン（Cre），IgG 量，IgM 量，IgE 量，TARC，CRP を測定した。

II-3　試験材料

試験に使用した *L. lactis* 11/19-B1 含有ヨーグルト（80g）は，東北協同乳業株式会社（Fukushima，Japan）から提供されたもので，毎週製造し，4℃の保存下で被験者に提供した。

II-4　実験動物および飼料

本動物実験は福島県立医科大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：動 2019057）。BALB/c 雌マウス 8 週齢は日本チャールス・リバー（Kanagawa, Japan）より購入した。マウスは実験期間を通して SPF 環境下で飼育し，水および研究に用いた菌株のいずれか一種を 0.05% 加えた AIN-93G（Clea，Tokyo, Japan）を自由摂食させた。乳酸菌摂食による影響を比較するため，コントロールマウスには，乳酸菌が含有されていない AIN-93G を自由摂食させた。

乳酸菌株は, 東北協同乳業株式会社から提供されたヨーグルトに含有されている *Lactococcus lactis* 11/19-B1 株（*L. lactis* 11/19-B1），*Lactobacillus bulgaricus* LB-12 株（*L. bulgaricus*），*Lactobacillus acidophilus* La-5 株（*L. acidophilus*），*Bifidobacterium lactis* Bb-12 株（*B. lactis*）および *Streptococcus thermophiles* ST-20

株（*S. thermophiles*）をそれぞれ分離し使用した。*Lactococcus lactis* JCM20101 株（*L. lactis* JCM20101）は Japan Collection of Microorganisms（RIKEN BRC, Tsukuba, Japan）より入手した。*L. lactis* 11/19-B1，*L. lactis* JCM20101，*L. bulgaricus*，*L. acidophilus*，*B. lactis* 菌の培養には，MRS broth（BD Difco，Sparks，MD，USA）を，*S. thermophiles* 菌の培養にはブルセラ培地（BD Difco，Sparks，MD，USA）を使用し，37 ℃，24~48 時間培養した。

マウスの餌の作製は以下のとおり行った。培養した菌株を生理食塩水で 2 回，滅菌蒸留水で 1 回洗浄し，100 ℃，30 分の熱処理後，凍結乾燥させた。この乾燥させた菌の粉末と粉砕した AIN-93G を均一に混和した後，再度ペレットに成形して餌を作製し，γ線照射によって殺菌した。

II-5　アトピー性皮膚炎モデルの作製

乳酸菌株を混餌投与したマウスに，不完全抗原（ハプテン）である 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene （DNFB）を塗布し（Sigma-Aldrich，Tokyo，Japan），AD の誘導を行った（Fig.2A）[15]。8 週齢の BALB/c マウスに餌投与を開始して 14 日目，背部を剃毛し，15，19 日目にアセトン（Wako，Tokyo，Japan）3 容とオリーブオイル（Wako，Tokyo，Japan）1 容に溶解した 0.15% DNFB 溶液 100 μl を塗布して感作を行った。投与開始 23，25 日目には 0.2% DNFB 溶液を背部に 100 μl，両耳に 25 μl ずつ反復塗布した。27 日目に，背部と両耳に DNFB 塗布を行い，その 6 時間後に 2%イソフルラン（intervet，Tokyo，Japan）麻酔下にて全

採血（ヘパリン加），背部の皮膚，耳介，パイエル板，頸部リンパ節の採取を行った。血液は 2500 rpm，10 分遠心して血漿を分離し，-80℃に保存した。なお，対照群では感作および反復塗布を溶媒のみで行った。

II-6　耳介の肥厚

耳介の厚さの測定は，マイクロメーター（Mitutoyo，Kanagawa，Japan）で行った。DNFB の反復塗布による経時的な耳介の肥厚を観察するため，DNFB 塗布前（0h），塗布後 1，6h に左右の耳介を測定した（day 23，25，27）。耳介の肥厚は，塗布前と塗布後に測定した値の差により求めた。DNFB の反復塗布による耳介の肥厚は，それぞれ即時型（1h），後期型（6h）として定義した［14］。

II-7　皮膚病巣スコア

皮膚病巣スコアは，25 日目の DNFB 反復塗布 24 時間後に発赤・出血，痂疲形成・乾燥，浮腫，擦傷・組織欠損の 4 項目を無症状，軽度，中程度，重度の 4 段階に分類し，それぞれの項目を 0~3 点でスコアリングして行った。その合計点を皮膚炎指数（ADI）とした［15］。

II-8　血漿中の総 IgE 量の測定

保存した血漿を用い，血中 IgE 量を Mouse IgE ELISA kit（Bethyl Laboratories，Montgomery，Texas，USA）で測定した。

II-9　抗体

FACS には蛍光色素標識マウスモノクローナル抗体を用いた。PE /Cy7 標識抗 CD3e 抗体（RM4-5），Pacific blue 標識抗 CD4 抗体（RM4-5）は BioLegend（San Diego，CA，USA）社製のものを，PerCP-Cy5.5 標識抗 IFN-γ 抗体（XMG1.2），PE 標識抗 IL-4 抗体（11B11），APC 標識抗 IL-17A 抗体（eBio17B7），APC 標識抗 FoxP3 抗体（FJK-16s）は Thermo Fisher Scientific（San Jose，CA，USA）社製のものを用いた。

II-10　FACS 解析

採取したパイエル板 (PPs)および頸部リンパ節 (CLNs)をセルストレーナ上ですりつぶし，細胞を分離後，抗 CD3 抗体および抗 CD4 抗体で表面抗原を染色した。IFN-γ，IL-4，IL-17 産生細胞の解析のために， Cell Stimulation Cocktail（Thermo Fisher Scientific，San Jose，CA，USA）を添加した RPMI 1640 培地中にて 37℃, 16 時間細胞を培養し，リンパ球を活性化させた。その後, Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer (eBioscience, CA,USA)を用いて添付のプロトコールに従ってリンパ球の固定および透過処理を行った。処理後のリンパ球は，抗 IFN-γ 抗体，抗 IL-4 抗体，抗 IL-17 抗体で染色した（37℃, 1 時間）。また転写因子である FoxP3 発現細胞の解析には，Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, CA, USA)を使用し，抗 FoxP3 抗体にて染色した（37℃, 1 時間）。解析には，FACS Cant II（Becton Dickinson，Franklin Lakes，NJ，USA）

および解析ソフト Flowjo software（Tree Star，Ashland，OR，USA）を使用した。

II-11　病理学的検討

採取した背部の皮膚および耳介は 10%中性緩衝ホルマリン（Wako，Tokyo，Japan）で 24 時間固定後，パラフィンで包埋し，切片を作製した（3 μm）。組織切片はヘマトキシリン・エオジン（HE）染色または Eosinophil–Mast cell stain kit (Scy Tek Laboratories, UT, USA)を用いて組織中の好酸球を染色した。HE 染色した切片は，炎症細胞浸潤と表皮びらんの 2 項目を症状なし，軽度，中等度，重度の 4 段階に分類し，それぞれの項目を 0~3 点でスコアリングした。スコアリングはブラインド法で行い，個々のスコアの合計を各グループ間で比較した。好酸球を染色した切片は，スライドごとに 5 つの高倍率視野（HPF）で好酸球数をカウントし，それらの平均を各グループ間で比較した[16]。

II-12　マウス骨髄細胞の培養および乳酸菌播種後の IFN-α 産生能の測定

C57BL/6J 雌マウス 9 週齢は日本チャールス・リバー（Kanagawa，Japan）より購入した。マウスから得られた骨髄細胞は RBC Lysis Buffer （BioLegend，San Diego，CA，USA）による赤血球除去後，1×10^{6} cells/ml の濃度で 200ul ずつ 96well プレートに分注し，4 日ごとに半量ずつ培地交換を行った。実験開始 8 日目の培地交換後，100℃，30 分で熱処理した各種乳酸菌（死菌）10^{10} cfu/ml を 10 μl ずつ各 well に播種した。乳酸菌播種後，48 時間後に上清を採取し-80℃に

保存した。すべての実験は，10% FBS，100 ng/ml の hFlt-3L（R＆D systems，MN，USA）およびペニシリン-ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地を用いて，37℃，5% CO_2 条件下で培養を行った。また保存した上清中の IFN-α量を IFN alpha Mouse ELISA Kit（Thermo Fisher Scientific，San Jose，CA，USA）で測定した。

II-13　統計学的解析

すべての実験は，平均値±標準偏差で算出した。統計解析には，SPSS ver.24 を使用し，正規性の検定には Kolmogorov–Smirnov test を用いた。2 群間の比較においては Mann–Whitney U test を用いた。多重比較には，Friedman test 後，Steel–Dwass test でポストホック検定を行った。統計学的有意差は, $p<0.05$ とした。

Ⅲ. 結果

III-1　アトピー性皮膚炎患者での *L. lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食効果

AD 患者の協力を得て，*L. lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食による病状改善効果の検討を行った。研究開始時の患者背景を Table 1 に示す。AD 患者の SCORAD スコアは，ヨーグルト摂食前の期間と比較して，ヨーグルト摂取開始後 4 週間で変化は認められなかったが，ヨーグルト摂食開始後 8 週間で有意な改善が認められた（Fig.1B，C）。また 4 群間の多重比較において，MCV および MCH に有意差が認められたが，これら測定値の変動は正常値の範囲内の，しかもヨーグルト摂食を始める前の変動であることから，ヨーグルト摂食によるものとは判断しなかった。一方で，AD の病勢を反映する血中バイオマーカーとして一般的に用いられている IgE，TARC，LDH 値および末梢血好酸球数は，ヨーグルト摂食前後で有意な差は認められなかった。同様に，そのほかの血液生化学検査においても，有意な差は認められなかった（Table 2）。

III-2　マウスモデルを用いたアトピー性皮膚炎抑制効果を持つ菌株の同定

ヒトの AD に対し *L. lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルトに改善効果が認められたため，このヨーグルトに含まれる 5 菌種のどの菌に効果があるのかをマウスの DNFB 反復塗布における AD モデルで検討した（Fig.2A）。

皮膚病巣スコアの検討において（Table 3），DNFB による AD の誘導のみを行

った Atopic 群（乳酸菌非摂食）は，溶媒のみを塗布した Vehicle 群と比較し，有意な病巣スコアの上昇が観察され，重度な皮膚炎を発症した（Fig.2B）。乳酸菌摂食による皮膚炎の抑制効果は *L. lactis* 11/19-B1 群，*L. lactis* JCM20101 群においてのみ観察された。

耳介の肥厚は，27 日目の DNFB 反復塗布 1 時間後，　6 時間後に評価した。Atopic 群は，Vehicle 群と比較し，いずれの測定時間においても有意な耳介の肥厚が観察された。乳酸菌摂食による抑制効果は *L. lactis* 11/19-B1 群，*L. lactis* JCM20101 群において観察され，両群ともにいずれの測定時間においても耳介の肥厚が抑制されていた（Fig.2C）。また *B. lactis* 群および *S. thermophilus* 群でも，DNFB 塗布 6 時間後に有意な肥厚の抑制効果が観察された。

血中総 IgE 抗体量は，Vehicle 群と比較し，Atopic 群で有意に上昇した。乳酸菌摂食による抑制効果は *L. acidophilus* 群でのみ観察された。一方，皮膚病巣スコアと耳介の肥厚の検討で抑制効果が認められた *L. lactis* の 2 株においては，IgE 抗体量の抑制に効果はなかった（Fig.2D）。

以上の結果から，皮膚病巣スコアや耳介の肥厚の検討で最も抑制効果が強かった *L. lactis* 11/19-B1 群について，抑制効果が認められなかった *L. bulgaricus* 群をコントロールにさらに詳細な検討を行った。

III-3　乳酸菌摂食による T 細胞サブセットへの影響

乳酸菌摂食による T 細胞サブセットへの影響をパイエル板および頸部リンパ

節から回収したリンパ球で検討した。

両検討において，Atopic 群は，Vehicle 群と比較し，IFN-γ産生細胞（Th1 細胞），IL-4 産生細胞（Th2 細胞）および IL-17A 産生細胞（Th17 細胞）の分画が有意に増加していた（Fig.3）。*L. lactis* 11/19-B1 群は，Atopic 群と比較し，パイエル板で Th1 および Th17 細胞分画の有意な減少を認め, 頸部リンパ節では Th1, Th2，Th17 細胞分画の有意な減少を認めた。一方，*L. bulgaricus* 群は，Atopic 群と比較し，頸部リンパ節で Th1 細胞分画の有意な減少のみ観察された。また，制御性 T 細胞（Treg）のマスター転写因子である FoxP3 の発現量は，いずれの群においても変化はなかった。

III-4　乳酸菌摂食による AD 病態の組織学的検討

背中および耳の組織学的評価において, 炎症細胞浸潤と表皮びらんの 2 項目を症状なし（0 点），軽度（1 点），中等度（2 点），重度（3 点）の 4 段階でスコアリングし、その合計点を比較した。Atopic 群は，Vehicle 群と比較し，背中および耳の炎症スコアが有意に増加し，重度の炎症所見を示した。*L. lactis* 11/19-B1 群は，Atopic 群と比較して，背中および耳の炎症スコアが有意に抑制され，軽度から中等度の炎症所見を示した（Fig.4）。

背中および耳への好酸球浸潤は，Vehicle 群と比較し，Atopic 群で有意に増加した。*L. lactis* 11/19-B1 群は，Atopic 群と比較して，背中および耳への好酸球浸潤が有意に抑制された（Fig.5）。一方，*L. bulgaricus* 群にこれらの効果は認めら

れなかった。

III-5　プラズマサイトイド樹状細胞による乳酸菌共培養下での IFN-α産生

C57BL/6J マウスより骨髄細胞を採取し, hFlt-3L 存在下で分化させたプラズマサイトイド樹状細胞（pDC）を使用し, 各種乳酸菌の IFN-α産生能を測定した。その結果，陽性コントロールとして使用した *L. lactis* JCM20101 株のみに IFN-αの産生能が認められ，その他の乳酸菌に IFN-α産生能は認められなかった（Fig.6）

Ⅳ. 考察

Mechnikov のヨーグルトによる不老長寿説の提唱以降，乳酸菌の摂食は *Helicobacter pylori* 感染［17，18］やウイルス感染［19，20］に対する感染防御作用，抗アレルギー作用［21］，炎症性腸疾患の改善［22］や発がん抑制作用［23］など，多くの健康効果をもたらすことが報告されている。特に，乳酸菌の摂食に伴う免疫調節機能が注目されており，これまでに NK 細胞の活性化や抗体およびサイトカイン産生能の向上に寄与することが報告されている［5，6］。しかしながら，乳酸菌の生体内作用は菌種はもちろんのこと，同じ菌種であっても株によって異なることが知られている。AD 病態には多くの免疫細胞やサイトカイン応答が関与しているため，乳酸菌の摂食が宿主の免疫応答を調節し，病態の緩和に寄与する可能性がある。そこで本研究では，*L. lactis* 11/19-B1 株摂食による AD の予防および改善効果について，ヒトおよび AD モデルマウスを用いて検討を行った。

本研究では，2~15 歳の小児 AD 患者での *L. lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルトの摂食が，AD 病態の緩和に寄与するかどうか検討した。その結果，AD 患者では *L. lactis* 11/19-B1 含有ヨーグルトの摂食 8 週間後に，有意にアトピースコアが改善した（Fig.1B）。なお，AD 患者は試験期間中に薬物治療を継続して行っていたが，新たに追加の治療を開始する患者はいなかった。それゆえ，本研究における AD の臨床症状の緩和はヨーグルトの摂食に依存した効果であること

が考えられた。これまでの研究で，*Lactobacillus rhamnosus* GG 株［7，8］や *Lactobacillus paracasei* KW3110 株［9，10］などの一部の乳酸菌株の摂食は，Th1/Th2 バランスの改善や抗炎症応答に通して AD 病態の改善に寄与することが報告されている。しかしながら，本研究ではヨーグルト摂食前後で，AD の病勢を反映する IgE，TARC，LDH 値および末梢血好酸数などの血中バイオマーカーに有意な差は認められず，AD の臨床症状改善におけるメカニズムを明らかにすることができなかった（Table 2）。

DNFB の単回塗布は，Th1 優位な遅延型過敏症反応を誘導する一方で［24］，その反復塗布は Th1 優位な免疫応答を Th2 優位または両方の免疫応答が関与する状態へシフトし，IgE の増加や好酸球の浸潤，病変部位での Th2 細胞の増加など AD の一部の病態を反映することが報告されている［25-29］。本モデルでの各種乳酸菌摂食効果の検討を行った結果，*L. lactis* 11/19B-1 含有ヨーグルトに含まれる乳酸菌のうち，*L. lactis* 11/19-B1 株のみに AD 病態の緩和作用が認められた（Fig.2）。

これまでの報告では，pDC から産生される IFN-α が Th1 細胞の誘導および IgE 産生の阻害効果を有するため，AD 病態の緩和に寄与する可能性が示唆されている［30，31］。*L. lactis* JCM20101 株および *L. lactis* JCM5805 株は，in vitro で pDC を活性化し，IFN-α の産生を誘導する乳酸菌として報告されていることから，乳酸菌摂食に伴う IFN-α の産生が AD 病態の緩和に寄与する可能性がある［32］。そこで，本研究においても C57BL/6J マウスより骨髄細胞を採取し，hFlt-

3L 存在下で分化させた pDC を使用し，各種乳酸菌（死菌）の IFN-α産生能を測定した。その結果，陽性コントロールとして使用した *L. lactis* JCM20101 株のみに IFN-α の産生能が認められ，その他の乳酸菌に IFN-α産生能は認められなかった（Fig.6）。この結果から，*L. lactis* 11/19-B1 は，同じ種である *L. lactis* JCM20101 の様に IFN-α の産生誘導能を持たないことがわかり，IFN-α産生とは異なる機構で AD 病態の緩和に寄与する可能性が示唆された。

乳酸菌の摂食は，腸管免疫系を介して，全身の免疫調節機能に影響を及ぼすことが知られている。腸管関連リンパ組織（GALTs）の一つであるパイエル板（PPs）は，M 細胞を介して乳酸菌を取り込み，パイエル板内に存在する抗原提示細胞に乳酸菌を認識させることによって，一般的な免疫応答を誘導する。パイエル板のリンパ球は腸管から体循環に移行することが報告されているので［33，34］，乳酸菌の摂食は，全身の免疫システムにも影響する可能性がある。そこで，乳酸菌を摂食させた AD モデルマウスのパイエル板および病変部位の所属リンパ節である頸部リンパ節から回収したリンパ球を用いて，T 細胞サブセットの変動を観察した。その結果，*L. lactis* 11/19-B1 株の摂食は，パイエル板で Th1 および Th17 細胞分画の有意な減少を認め，頸部リンパ節では Th1, Th2, Th17 細胞分画の有意な減少を認めた（Fig.3）。さらに，*L. lactis* 11/19-B1 株の摂食は AD モデルマウスの背中および耳介の炎症所見を有意に抑制した（Fig.4, 5）。過去の研究は，T 細胞サブセットの変動が AD 病態に関与することを報告している［2-4］。実際に，*Lactobacillus* casei Shirota 株や *Enterococcus* faecalis EF-

2001 株の摂食は，T 細胞サブセットの変動を調節し，AD 病態を改善することが報告されている［35，36］。これらの報告は，本研究で得られた結果と一致しており，*L. lactis* 11/19-B1 株の摂食に伴う免疫調節作用が AD 病態の改善に寄与していることを裏付けている。

一方で，DNFB 反復塗布に伴う IgE 抗体の上昇は，*L. lactis* 11/19-B1 株の摂食で抑制されなかった（Fig.2D）。AD 患者において，総 IgE 量はしばしば上昇しており，疾患の重症度と関連することが知られている［37］。これまで IgE 産生は Th2 細胞によって制御されていると考えられてきた。しかしながら，近年の研究において胚中心に局在し，B 細胞の増殖，選択および成熟に重要な役割を担う濾胞性 T（Tfh）細胞が IgE 産生おいて中心的な役割を担っていることが報告された［38-42］。それゆえ， *L. lactis* 11/19-B1 株の摂食が IgE 産生に寄与しないことは，Tfh 細胞に作用しないことを示唆している。また Th2 細胞によって制御される好酸球浸潤が *L. lactis* 11/19-B1 株の摂食で有意に抑制されることは（Fig.5），この研究で観察された IL-4 産生細胞分画の減少の主体が Th2 細胞の抑制を表していることを示唆している。

これまでの報告で，乳酸菌は生菌，死菌を問わず，宿主への免疫調節作用を示すことが報告されている［9，10］。本研究においても，生菌を摂食した AD 患者，死菌を摂食した AD モデルマウスの両検討で，*L. lactis* 11/19-B1 株の AD 病態緩和作用が認められた。また，菌体のどの成分が効果を示すのか，生菌を摂食した場合に死菌摂食を上回る効果が期待できるのかなど，残された課題が

あり，11/19-B1 株の更なる研究を進めている。

Ⅴ．結語

本研究において，*L. lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルトの摂食は，小児 AD 患者の SCORAD スコアを有意に改善することを示した。 さらに、死菌での *L. lactis* 11/19-B1 株の摂食は，宿主の過剰な免疫応答と AD 病変部位への好酸球浸潤の抑制を通じて AD マウスモデルの病態を有意に改善した。これらの結果は，*L. lactis* 11/19-B1 株がアトピー性皮膚炎を緩和する機能性食品として有用であることを示唆している。

図（Figures）：

Table 1

	Atopic Group
N	18
Age	8.4±3.6
Sex (% of male)	66.7
SCORAD index	38.2±16.4
IgE (mg/dl)	1757.4±1724.3
TARC (pg/ml)	1246.0±1206.0
Treatment (%)	
Tropical steroid	100
Heparinoid	83.3
Antihistamines	55.6
Tacrolims	16.7

Table 1　患者背景

試験開始時における被験者の患者背景を示す。

Fig.1

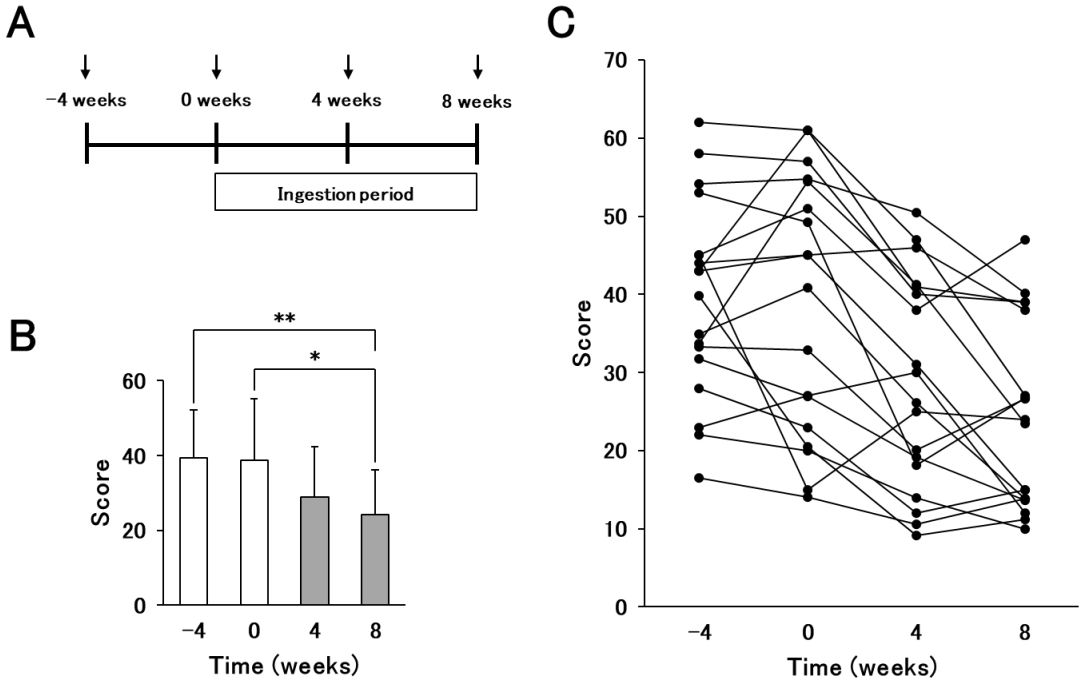

Fig.1　*L.lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食前後の SCORAD 評価

（A）　実験スケジュールを示す。ヨーグルト摂食前（-4weeks）に AD 患者の SCORAD の評価および採血を行い，1 カ月後（0weeks）より 11/19-B1 含有ヨーグルトの摂食を行った。矢印は，SCORAD の評価および採血時期を示す。

（B）　*L.lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食による SCORAD の変化を平均値±標準偏差で示す。各測定時期の有意差を*$p<0.05$，**$p<0.01$ とした（n=18）。

（C）　*L.lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食による SCORAD の被験者ごとの変化を示す。

Table 2

	Time (weeks)				
	−4	0	4	8	p value
WBC (μl)	8447.8±2624.7	8032.2±1880.5	7784.4±1338.4	8366.7±2735.6	0.737
RBC (10^4/μl)	471.2±46.3	471.9±39.7	470.8±43.9	479.8±50.0	0.126
Hb (g/dl)	13.0±1.01	13.1±0.91	13.1±1.03	13.3±1.09	0.09
Ht (%)	39.1±2.84	39.9±2.40	39.7±3.01	40.3±2.95	0.215
MCV (fl)	83.4±5.61	84.7±5.00	84.6±5.07	84.4±4.76	0.004
MCH (pg)	27.6±1.88	27.9±1.94	28.0±1.77	27.8±1.85	0.009
MCHC (%)	33.2±0.10	32.9±1.01	33.1±1.00	33.0±1.21	0.41
PLT (10^4/μl)	32.6±5.54	32.6±4.32	31.5±4.30	32.7±5.42	0.435
Neut (%)	47.0±9.05	48.1±9.12	46.9±8.36	49.7±8.22	0.224
Mono (%)	5.47±1.97	5.15±1.37	5.97±0.79	5.67±1.53	0.102
Eos (%)	6.77±4.20	7.01±3.62	7.66±4.39	7.20±3.41	0.072
Baso (%)	0.48±0.43	0.63±0.36	0.63±0.34	0.59±0.42	0.274
Lymp (%)	39.7±8.73	39.1±8.52	38.9±8.17	36.8±9.49	0.06
AST (IU)	25.7±7.87	26.4±9.10	24.7±5.09	27.9±11.1	0.991
ALT (IU)	14.7±8.25	15.7±9.64	15.3±4.50	22.6±27.3	0.076
LDH (IU)	262.1±44.0	263.3±70.4	258.6±38.7	256.6±48.4	0.892
ALP (IU)	748.0±259.6	719.6±226.4	749.3±269.3	733.7±250.5	0.287
T-Bil (mg/dl)	0.44±0.22	0.46±0.29	0.49±0.29	0.41±0.23	0.129
Cre (mg/dl)	0.42±0.10	0.42±0.13	0.43±0.13	0.43±0.13	0.722
IgG (mg/dl)	1110.3±244.2	1109.4±247.8	1105.0±270.4	1117.4±264.3	0.978
IgM (mg/dl)	83.1±41.6	81.5±32.5	80.4±36.6	82.8±34.9	0.823
IgE (mg/dl)	1897.8±1972.6	1757.4±1724.3	1704.6±1407.3	1813.3±1804.1	0.956
TARC (pg/ml)	1175.2±1066.6	1245.5±1206.0	1198.6±747.7	1132.0±771.2	0.692
CRP (mg/dl)	0.04±0.07	0.06±0.10	0.05±0.07	0.05±0.06	0.603

Table 2　*L.lactis* 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食前後の AD 患者の検査値

L.lactis 11/19-B1 株含有ヨーグルト摂食による血液学的検査(13 項目)　生化学検査(11 項目)への影響を平均値±標準偏差で示す。各測定時期の有意差を $p<0.05$ とした（n=18)。

Fig.2

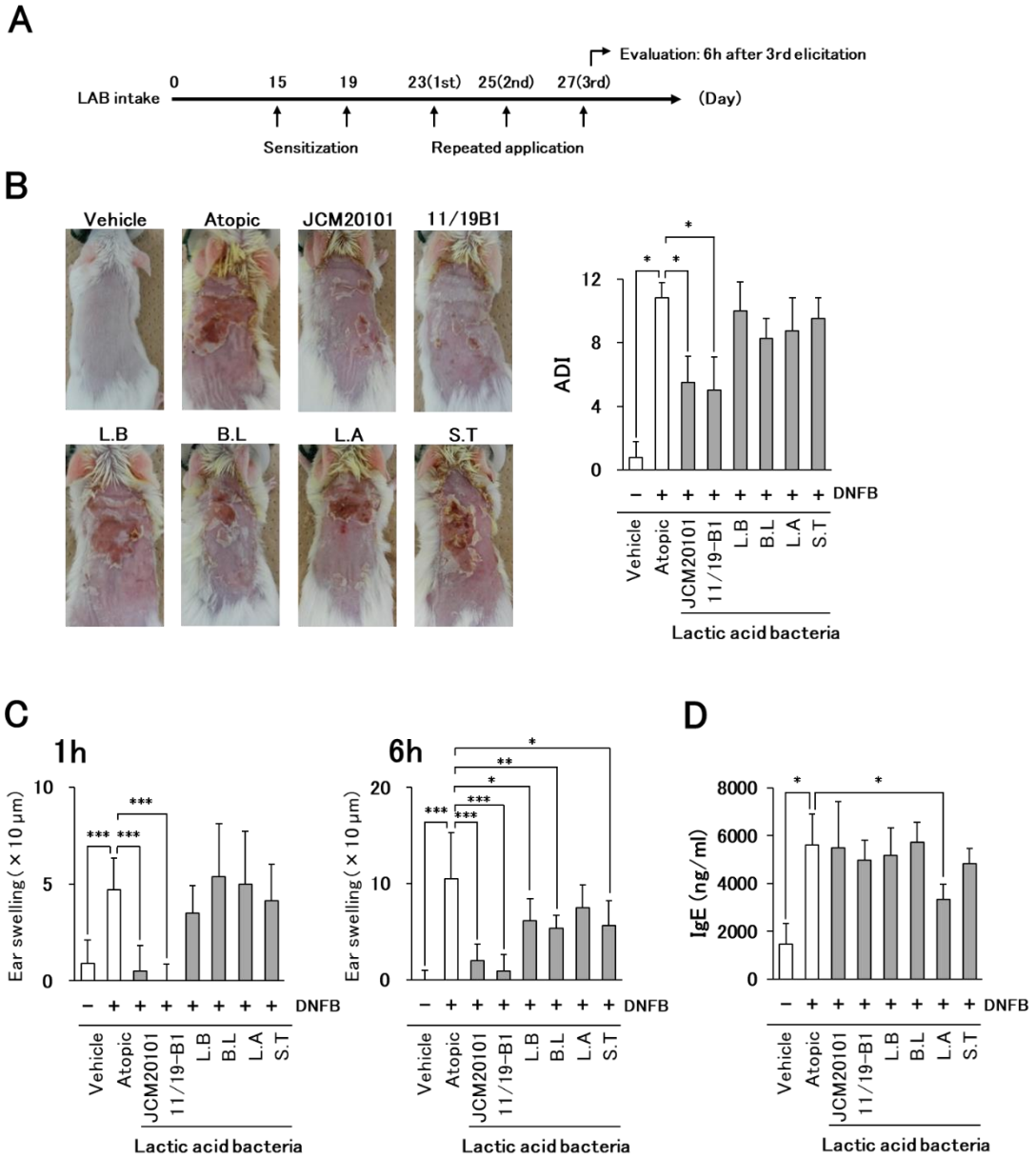
A
Evaluation: 6h after 3rd elicitation
LAB intake
0
15
19
23(1st)
25(2nd)
27(3rd)
(Day)
Sensitization
Repeated application
B
Vehicle
Atopic
JCM20101
11/19B1
L.B
B.L
L.A
S.T
ADI
DNFB
Lactic acid bacteria
C
1h
6h
Ear swelling (×10 μm)
D
IgE (ng/ml)

Fig.2　AD マウスモデルにおける *L.lactis* 11/19-B1 株の摂食効果

(A)　実験スケジュールを示す。マウスへの乳酸菌株の摂食開始後，14 日目にマウスの背部を剃毛し，0.2% DNFB 塗布による感作を行った（day15,　19）。投与開始後，23，25，27 日目にマウス背部および耳介に 0.15%DNFB を反復塗布した。組織および血液は 27 日目の DNFB 塗布後，6 時間目に採取した。なお，Vehicle 群における感作および反復塗布は，溶媒のみで行った。

（B）2 回目の DNFB 反復塗布 24 時間後の肉眼的所見および皮膚病巣スコアを示す。

（C）3 回目の DNFB 反復塗布 1，6 時間後の耳介厚を示す。グラフは平均値±標準偏差を示す。耳介の肥厚は，布前と塗布後に測定した値の差により求められた。

(D)　3 回目の DNFB 反復塗布 6 時間後に採取した血液を用いた血中総 IgE 抗体量の測定結果を示す。測定は ELISA 法を用いた。グラフは平均値±標準偏差を示す。対照群に対する有意差を*$p<0.05$，**$p<0.01$，***$p<0.001$ とした（各群 n=4）。

Table 3

①発赤・出血
0：無症状　　;背中に発赤および出血症状が認められない状態
1：軽度　　;背中に発赤が局所的に認められ，連続的な擦傷に伴う出血が認められない状態
2：中等度　　;背中に発赤が散在的に認められるか，連続的な擦傷に伴う出血が認められない状態
3：重度　　;背中に発赤が全体的に認められるか，連続的な擦傷に伴う出血が認められる状態

②痂疲形成・乾燥
0：無症状　　;背中に痂皮形成および乾燥症状なし
1：軽度　　;背中に局所的に認められ，皮膚がわずかに白色化し，角質の剥離がわずかに 認められる状態
2：中等度　　;背中に散在的に認められるか，明らかに角質の剥離が認められる状態
3：重度　　;背中に痂皮が全体的に認められるか，明らかに角質の剥離が認められる状態

③浮腫
0：無症状　　;左右の耳介に厚みが認められない状態
1：軽度　　;左右のどちらか 1 方にわずかに厚みが認められる状態
2：中等度　　;いずれの耳介にも明らかな厚み，張りが認められる状態
3：重度　　;いずれの耳介にも明らかな厚み，張りおよび反りが認められ，指で触れた時に硬さが感じられる状態

④擦傷・組織欠損
0：無症状　　;背中に擦傷および組織欠損症状が認められない状態
1：軽度　　;背中に連続的でない擦傷が認められ，組織欠損は認められない状態
2：中等度　　;背中に小規模に連続的な擦傷が認められ，組織欠損は認められない状態
3：重度　　;背中に連続的な擦傷が認められ，組織欠損が認められる状態

Table 3　皮膚病巣スコアの評価基準

上記評価基準をもとに AD モデルマウスの皮膚病巣スコアの判定を行った。

Fig.3

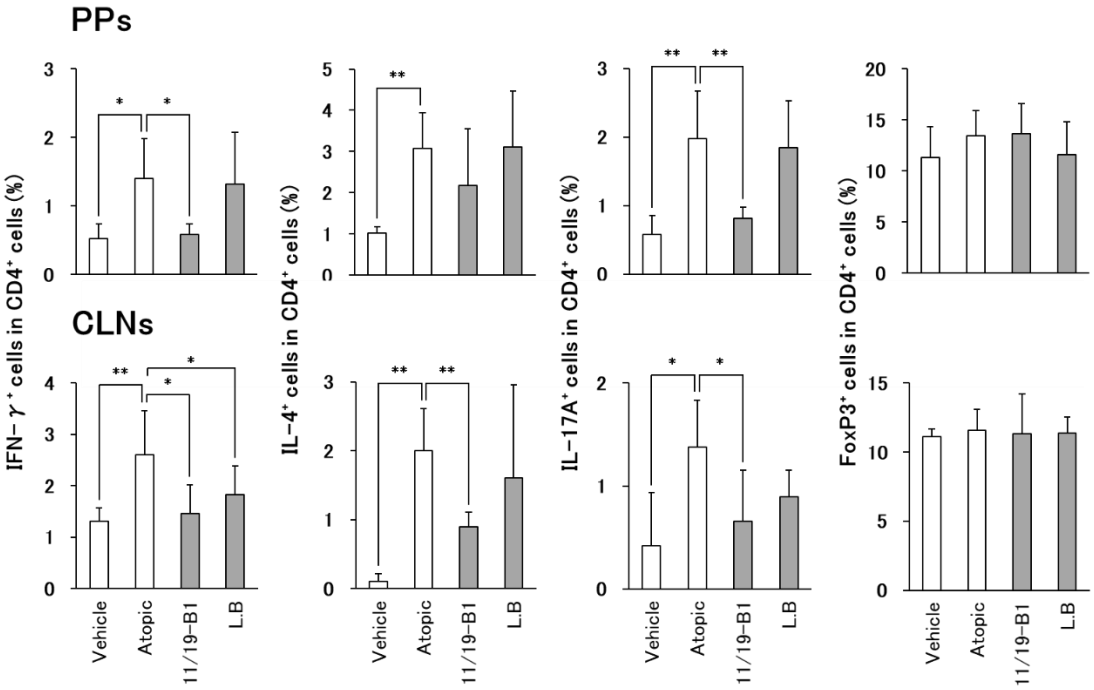

Fig.3　乳酸菌摂食に伴う各種サイトカイン陽性細胞分画の割合

最後の DNFB 反復塗布後，6 時間目に採取したパイエル板(PPs)および頸部リンパ節(CLNs)における CD4⁺T 細胞分画中のサイトカイン陽性細胞分画の割合を示す。グラフは平均値±標準偏差を示す。各群の有意差を*p<0.05, **p<0.01，***p<0.001 とした（各群 n=5)。

Fig.4

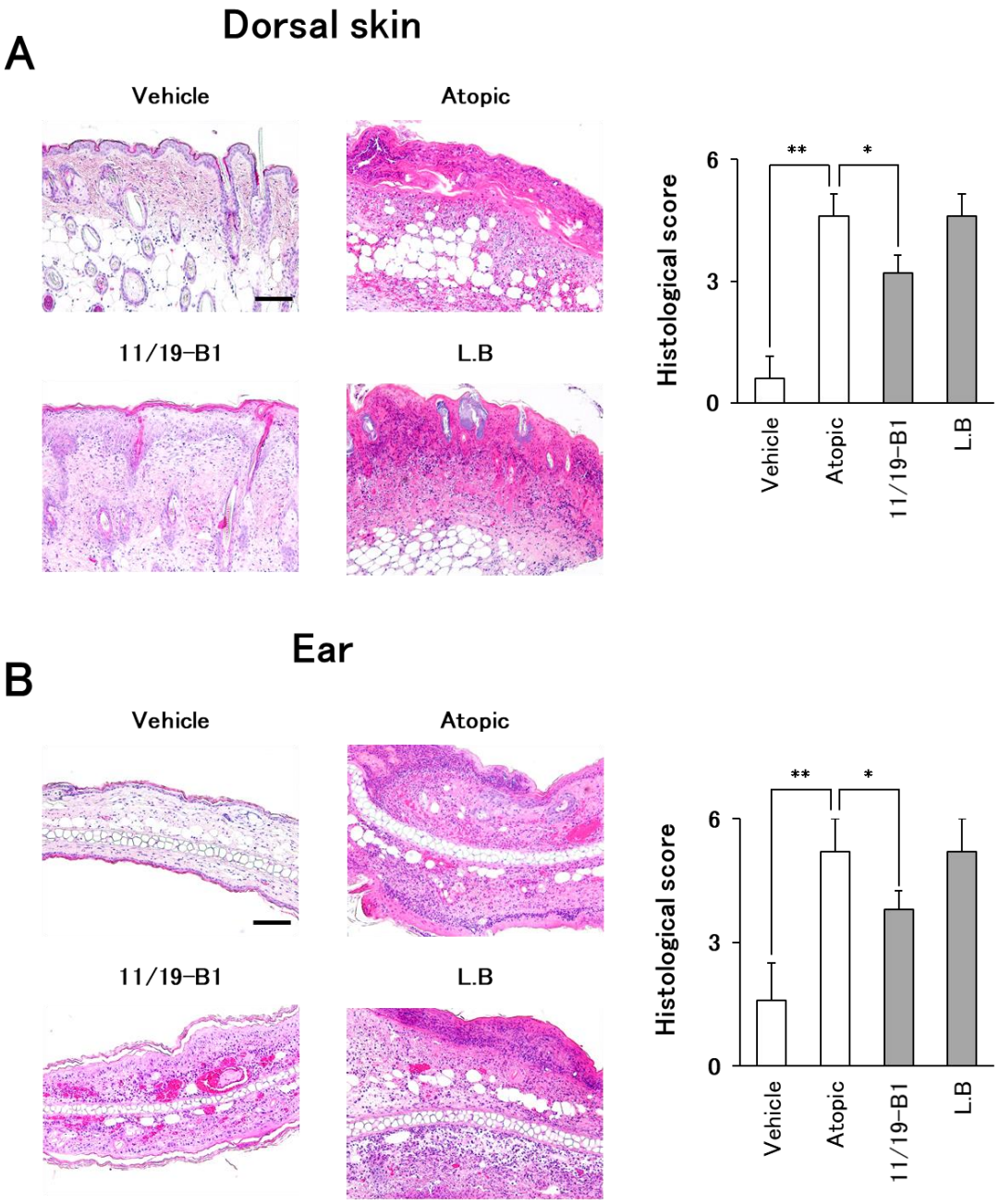
A
Dorsal skin
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B
Histological score
6
3
0
**
*
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B
B
Ear
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B
Histological score
6
3
0
**
*
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B

Fig.4　AD マウスモデルにおける組織学的重症度評価

3 回目の DNFB 反復塗布後，6 時間目に採取した背部皮膚(A)および耳介(B)の HE 染色画像を示す。HE 染色した切片は，炎症細胞浸潤と表皮びらんの 2 項目を症状なし，軽度，中等度，重度の 4 段階に分類し，それぞれの項目を 0~3 点でスコアリングした。スコアリングはブラインド法で行い，個々のスコアの合計を各グループ間で比較した。グラフは平均値±標準偏差を示す。バーは 100 μm を示す。各群の有意差を*$p<0.05$，**$p<0.01$ とした（各群 n=5)。

Fig.5

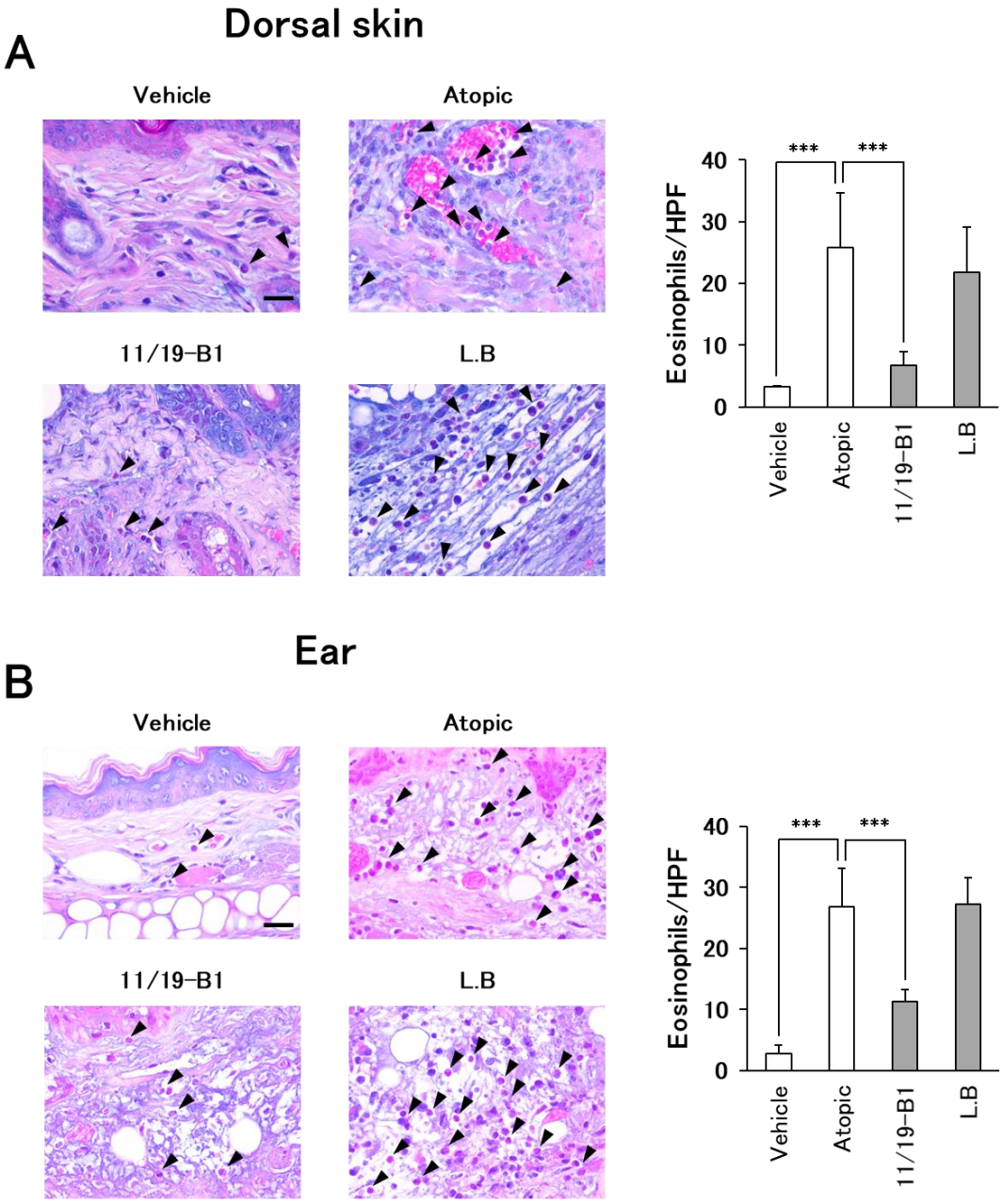
A
Dorsal skin
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B
Eosinophils/HPF
40
30
20
10
0
***
***
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B
B
Ear
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B
Eosinophils/HPF
40
30
20
10
0
***
***
Vehicle
Atopic
11/19-B1
L.B

Fig.5　AD マウスモデルにおける好酸球浸潤の評価

3 回目の DNFB 反復塗布後，6 時間目に採取した背部皮膚(A)および耳介(B)の好酸球染色画像を示す。スライドごとに 5 つの高倍率視野（HPF）で好酸球数をカウントし，それらの平均を各グループ間で比較した。矢印は好酸球を示す。グラフは平均値±標準偏差を示す。バーは 20 μm を示す。各群の有意差を**$p<0.01$，***$p<0.001$ とした（各群 n=5)。

Fig.6

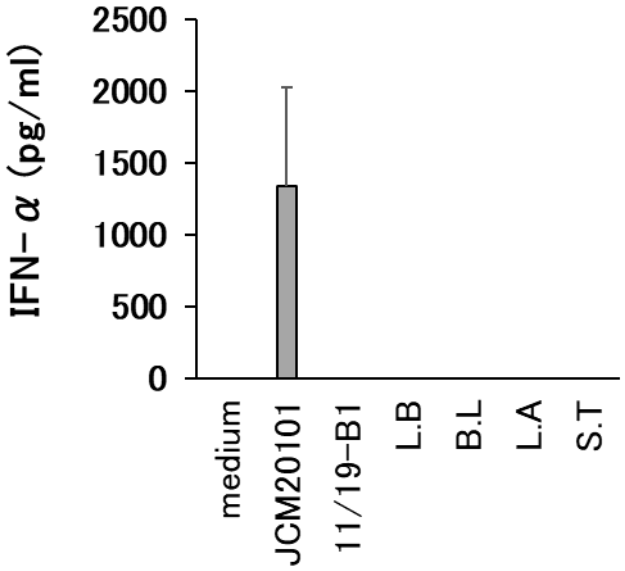

Fig.6　プラズマサイトイド樹状細胞における乳酸菌共培養下での IFN-α の産生

hFlt-3L の存在下で誘導したマウス骨髄細胞由来の pDC と乳酸菌死菌体を 48 時間共培養し，48 時間後の上清を用いて IFN-α の産生能を測定した。測定は ELISA 法を用いた。グラフは平均値±標準偏差を示す （各群 n=3)。

VI. 参考文献

1. Saeki, H.; Furue, M.; Furukawa, F.; Hide, M.; Ohtsuki, M.; Katayama, I.; Sasaki, R.; Suto, H.; Takehara, K. Guidelines for management of atopic dermatitis. J. Dermatol. 2009, 36, 563–577.
2. Bieber, T. Atopic Dermatitis. N. Engl. J. Med. 2008, 358, 1483–1494.
3. Oyoshi, M.K.; He, R.; Kumar, L.; Yoon, J.; Geha, R.S. Cellular and Molecular Mechanisms in Atopic Dermatitis. Adv. Immunol. 2009, 102, 135–226.
4. Koga, C.; Kabashima, K.; Shiraishi, N.; Kobayashi, M.; Tokura, Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. J. Investig. Dermatol. 2008, 128, 2625–2630.
5. Rizello, V.; Bonaccorsi, I.; Dongarra, M.L.; Fink, L.N.; Ferlazzo, G. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. J. Biomed. Biotechnol. 2011, 2011, 1–10.
6. Tsai, Y.-T.; Cheng, P.-C.; Pan, T.-M. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. Artic. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012, 96, 853–862.
7. Pessi, T.; Su, Y.; Tas, È.; Hurme, M.; Isolauri, E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral Lactobacillus rhamnosus GG. Clin. Exp. Allergy 2000, 30, 1804–1808.

8. Sawada, J.; Morita, H.; Tanaka, A.; Salminen, S.; He, F.; Matsuda, H. Ingestion of heat-treated Lactobacillus rhamnosus GG prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. Clin. Exp. Allergy 2007, 37, 296–303.
9. Fujiwara, D.; Inoue, S.; Wakabayashi, H.; Fujii, T. The Anti-Allergic Effects of Lactic Acid Bacteria Are Strain Dependent and Mediated by Effects on both Th1/Th2 Cytokine Expression and Balance. Int. Arch. Allergy Immunol. 2004, 135, 205–215.
10. Fujiwara, D.; Wakabayashi, H.; Watanabe, H.; Nishida, S.; Iino, H. A Double-blind Trial of Lactobacillus paracasei Strain KW3110 Administration for Immunomodulation in Patients with Pollen Allergy. Allergol. Int. 2005, 54, 143–149.
11. Nishida, S.; Ono, Y.; Sekimizu, K. Lactic acid bacteria activating innate immunity improve survival in bacterial infection model of silkworm. Drug Discov. Ther. 2016, 10, 49–56.
12. Ishii, K.; Hamamoto, H.; Kamimura, M.; Sekimizu, K. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. J. Biol. Chem. 2008, 283, 2185–2191.
13. Nishiyama, K.; Kobayashi, T.; Sato, Y.; Watanabe, Y.; Kikuchi, R.; Kanno, R.; Koshizuka, T.; Miyazaki, N.; Ishioka, K.; Suzutani, T.; et al. A Double-Blind Controlled Study to Evaluate the Effects of Yogurt Enriched with Lactococcus lactis

11/19-B1 and Bifidobacterium lactis on Serum Low-Density Lipoprotein Level and Antigen-Specific Interferon-γ Releasing Ability. Nutrients 2018, 10, 1778.

14. Schallreuter, K.U. Severity scoring of atopic dermatitis: The SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. Dermatology 1993, 186, 23–31.
15. Hussain, Z.; Katas, H.; Mohd Amin, M.C.I.; Kumolosasi, E.; Sahudin, S. Downregulation of immunological mediators in 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions by hydrocortisone-loaded chitosan nanoparticles. Int. J. Nanomed. 2014, 9, 5143–5156.
16. Lee, J.H.; Lee, Y.S.; Lee, E.J.; Kim, T.Y. Capsiate Inhibits DNFB-Induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice through Mast Cell and CD4+ T-Cell Inactivation. J. Investig. Dermatol. 2015, 135, 1977–1985.
17. Tamura, A.; Kumai, H.; Nakamichi, N.; Sugiyama, T.; Deguchi, R.; Takagi, A.; Koga, Y. Suppression of Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production in vitro and within the gastric mucosa by a live Lactobacillus strain. J. Gastroenterol. Hepatol. 2006, 21, 1399–1406.
18. Kabir, A.M.; Aiba, Y.; Takagi, A.; Kamiya, S.; Miwa, T.; Koga, Y. Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. Gut 1997, 41, 49–55.
19. Jungersen, M.; Wind, A.; Johansen, E.; Christensen, J.; Stuer-Lauridsen, B.;

Eskesen, D.; Jungersen, M.; Wind, A.; Johansen, E.; Christensen, J.E.; et al. The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. Microorganisms 2014, 2, 92–110.

20. De Vrese, M.; Winkler, P.; Rautenberg, P.; Harder, T.; Noah, C.; Laue, C.; Ott, S.; Hampe, J.; Schreiber, S.; Heller, K.; et al. Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial. Vaccine 2006, 24, 6670–6674.
21. Viljanen, M.; Pohjavuori, E.; Haahtela, T.; Korpela, R.; Kuitunen, M.; Sarnesto, A.; Vaarala, O.; Savilahti, E. Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema–dermatitis syndrome. J. Allergy Clin. Immunol. 2005, 115, 1254–1259. [CrossRef]
22. Vanderpool, C.; Yan, F.; Polk, B.D. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. Inflamm. Bowel Dis. 2008, 14, 1585–1596.
23. Liong, M.-T. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and In-vivo Evidence. Int. J. Mol. Sci. 2008, 9, 854–863.
24. Takeshita, K.; Yamasaki, T.; Akira, S.; Gantner, F.; Bacon, K.B. Essential role of MHC II-independent CD4+ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. Int. Immunol. 2004, 16, 685–695.

25. Grewe, M.; Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M.; Schöpf, E.; Thepen, T.; Langeveld-Wildschut, A.G.; Ruzicka, T.; Krutmann, J. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol. Today 1998, 19, 359–361.
26. Kitagaki, H.; Ono, N.; Hayakawa, K.; Kitazawa, T.; Watanabe, K.; Shiohara, T. Repeated Elicitation of Contact Hypersensitivity Induces a Shift in Cutaneous Cytokine Milieu from a T Helper Cell Type 1 to a T Helper Cell Type 2 Profile'. J. Immunol. 1997, 159, 2484–2491.
27. Inagaki, N.; Shiraishi, N.; Igeta, K.; Nagao, M.; Kim, J.F.; Chikumoto, T.; Itoh, T.; Katoh, H.; Tanaka, H.; Nagai, H. Depletion of substance P, a mechanism for inhibition of mouse scratching behavior by tacrolimus. Eur. J. Pharmacol. 2010, 626, 283–289.
28. Man, M.-Q.; Hatano, Y.; Lee, S.H.; Man, M.; Chang, S.; Feingold, K.R.; Leung, D.Y.M.; Holleran, W.; Uchida, Y.; Elias, P.M. Characterization of a Hapten-Induced, Murine Model with Multiple Features of Atopic Dermatitis: Structural, Immunologic, and Biochemical Changes following Single Versus Multiple Oxazolone Challenges. J. Investig. Dermatol. 2008, 128, 79–86.
29. Nagai, H. Immunopharmacological Approach to Elucidating the Mechanism of Allergic Inflammation. Allergol. Int. 2005, 54, 251–261.
30. Sareneva, T.; Matikainen, S.; Kurimoto, M.; Julkunen, I. Influenza A Virus-Induced IFN-alpha/beat and IL-18 Synergistically Enhance IFN-Gene Expression in Human

T Cells 1. J. Immunol. 1998, 160, 6032–6038.

31. Pène, J.; Rousset, F.; Brière, F.; Chrétien, I.; Bonnefoy, J.Y.; Spits, H.; Yokota, T.; Arai, N.; Arai, K.; Banchereau, J. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 6880–6884.
32. Jounai, K.; Ikado, K.; Sugimura, T.; Ano, Y.; Braun, J.; Fujiwara, D. Spherical Lactic Acid Bacteria Activate Plasmacytoid Dendritic Cells Immunomodulatory Function via TLR9-Dependent Crosstalk with Myeloid Dendritic Cells. PLoS ONE 2012, 7, e32588.
33. Guy-Grand, D.; Griscelli, C.; Vassalli, P. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell: Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. J. Exp. Med. 1978, 148, 1661–1677.
34. Ruedl, C.; Albin, B.; Böck, G.; Wick, G.; Wolf, H. Oral administration of a bacterial immunomodulator enhances murine intestinal lamina propria and Peyer's patch lymphocyte traffic to the lung: Possible implications for infectious disease prophylaxis and therapy. Int. Immunol. 1993, 5, 29–36.
35. Lim, L.H.; Li, H.Y.; Huang, C.H.; Lee, B.W.; Lee, Y.K.; Chua, K.Y. The Effects of Heat-Killed Wild-Type Lactobacillus casei Shirota on Allergic Immune Responses in an Allergy Mouse Model. Int. Arch. Allergy Immunol. 2009, 148, 297–304.
36. Choi, E.-J.; Iwasa, M.; Han, K.-I.; Kim, W.-J.; Tang, Y.; Hwang, Y.; Chae, J.; Han,

W.; Shin, Y.-S.; Kim, E.-K. Heat-Killed Enterococcus faecalis EF-2001 Ameliorates Atopic Dermatitis in a Murine Model. Nutrients 2016, 8, 146.

37. Laske, N.; Niggemann, B. Does the severity of atopic dermatitis correlate with serum IgE levels? Pediatr. Allergy Immunol. 2004, 15, 86–88.

38. Schaerli, P.; Willimann, K.; Lang, A.B.; Lipp, M.; Loetscher, P.; Moser, B. Cxc Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. J. Exp. Med. 2000, 192, 1553–1562.

39. Smith, K.; Nossal, G.; Tarlinton, D.; Ueno, H. FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011, 92, 11628–11632.

40. Morita, R.; Schmitt, N.; Bentebibel, S.-E.; Ranganathan, R.; Bourdery, L.; Zurawski, G.; Foucat, E.; Dullaers, M.; Oh, S.; Sabzghabaei, N.; et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. Immunity 2011, 34, 108–121.

41. Vijayanand, P.; Seumois, G.; Simpson, L.J.; Abdul-Wajid, S.; Baumjohann, D.; Panduro, M.; Huang, X.; Interlandi, J.; Djuretic, I.M.; Brown, D.R.; et al. Interleukin-4 Production by Follicular Helper T Cells Requires the Conserved Il4 Enhancer Hypersensitivity Site V. Immunity 2012, 36, 175–187.

42. Harada, Y.; Tanaka, S.; Motomura, Y.; Harada, Y.; Ohno, S.I.; Ohno, S.; Yanagi, Y.;

Inoue, H.; Kubo, M. The 30 Enhancer CNS2 Is a Critical Regulator of Interleukin-4-Mediated Humoral Immunity in Follicular Helper T Cells. Immunity 2012, 36, 188–200.

Ⅶ. 謝辞

本研究に際し終始丁寧にご指導，ご鞭撻を賜りました福島県立医科大学医学部微生物学講座の錫谷達夫教授に深く感謝申し上げます。また，実験の際に細部にわたってご指導を頂きました西山恭子氏をはじめ微生物学講座の皆様，病理学的な解析をご指導下さいました基礎病理学講座の杉本幸太郎博士に感謝申し上げます。