

令和元年6月24日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00835

研究課題名(和文) 植物性食品及び発酵食品の接触過敏症抑制作用と腸内菌叢に与える効果の解明

研究課題名(英文) Effects of dietary plant and fermented foods on anti-contact hypersensitivity and gut microbiota

研究代表者

長野 隆男 (NAGANO, Takao)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：20304660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：接触過敏症(CHS)は、アレルギー性接触皮膚炎(ACD)のモデル動物実験系としてよく用いられる。本研究では、1)食生活で摂取可能な量での大豆イソフラボンのCHS抑制効果を示し、その効果に腸内細菌叢が影響していることを示した。2)大豆サポニンのCHS抑制効果を示し、その効果は抗生物質により消失し、制御性T細胞も低下することを示した。3)大豆食品として豆乳を選び、豆乳にはCHS抑制効果があること、CHSによる腸内細菌叢の変化を抑制することを示した。以上、大豆食品のACD予防効果への利用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アレルギー性接触皮膚炎(ACD)のモデル動物実験系である接触過敏症(CHS)を用いて、大豆のCHS抑制効果と腸内細菌叢の影響を明らかにした。研究から、食生活で摂取可能な量での大豆イソフラボン、大豆サポニン、豆乳のCHS抑制効果、及びその効果に腸内細菌叢が影響していることを示した。これらの結果は、大豆食品を日常の食生活に取り入れることで、腸内細菌叢の調整作用とACD予防効果が期待できることを示している。

研究成果の概要(英文)：Murine contact hypersensitivity (CHS) is one of the most frequently used animal models of human allergic contact dermatitis (ACD). In this study, we investigated the effects of diets supplemented with soy isoflavone (SI), soyasaponin (SS), and soy milk (SM) on CHS. The results indicated that dietary SI, SS, and SM alleviate CHS symptoms, suggesting that dietary supplementation with soybean foods may provide beneficial effects on ACD at physiologically relevant doses to humans.

研究分野：食生活学

キーワード：植物性食品 大豆 接触過敏症 アレルギー性接触皮膚炎 アレルギー 腸内細菌叢

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)我が国におけるアレルギーの罹患率はこの数十年で増加しており、2人にひとりが何らかのアレルギーを持っていると言われている。そのため、アレルギーの予防やその症状の緩和に有効な食品成分とその利用についての研究は重要と考えられる。

(2)アレルギー性接触皮膚炎(ACD)は低分子の化合物がハプテンとなり、繰り返し皮膚に触れることにより炎症を惹起する遅延型のアレルギー疾患である。ハプテンとなる身近な化合物は2800種類以上あると言われ、主なものとして化粧品やヘアカラーに含まれる化合物や装飾品の金属などが挙げられる。接触過敏症(CHS)は、ACDのモデル動物実験系として最もよく用いられる。

(3)大豆は、アジアで数千年間食べられてきた主要な作物一つであり、イソフラボン(SI)、サポニン(SS)などのフィトケミカルを多く含んでいる。最新の臨床研究から大豆食品またはSIやSSには、乳がんや子宮がんなどのがん、心筋梗塞、骨粗鬆症、更年期障害の軽減に対する効果等が報告されている。しかしながら、アレルギーなどの免疫疾患に対する効果についての報告は少ない。

(4)これまでに私たちは、大豆及び大豆イソフラボン(SI)のCHS抑制効果を明らかにした。MF(オリエンタル酵母)は、齧歯動物用飼料として広く使われており、たんぱく質源として大豆タンパク質が配合されることからSIを多く含む。そこで、MF飼料と市販のSIを用いて大豆とSIのCHS抑制効果の検討を行った結果、大豆とSIのCHS抑制効果が明らかとなった。

2. 研究の目的

(1)SSのCHS抑制効果と腸内細菌叢に与える影響：これまでに私たちは、大豆のCHS抑制効果を明らかにした。大豆には、SI以外にSSが多く含まれている。そこで、CHS動物実験系を用いてSSのCHS抑制効果を明らかにすることを目的とした。

(2)SSの腸内細菌叢を介したCHS抑制効果：SS摂取は適量でCHS抑制効果を示すこと、CHS抑制効果は腸内細菌叢と関係していることが示唆された。この結果を受けて、抗生剤を用いてSSのCHS抑制効果に及ぼす腸内細菌叢の作用について検討した。

(3)SI摂取と腸内細菌叢のCHS抑制効果：私たちは、CHS動物実験系を用いてSI摂取によるCHS抑制効果を明らかにした。しかしながら、マウスのSI摂取量は200mg/体重1kg/日と推定され、食品としての摂取量としては多いと考えられる。そこで、国が定めたSIの1日摂取量上限値に相当する量でCHS抑制効果を検討した。

(4)SIとSS摂取と腸内細菌叢のCHS抑制効果：私たちは、CHS動物実験系を用いてSIとSSの摂取によるCHS抑制効果を明らかにした。ここでは、SIとSSの同時摂取がCHS抑制効果と腸内細菌叢に及ぼす影響について検討を行った。

(5)豆乳摂取がCHS抑制効果と腸内細菌叢に与える影響：私たちは、CHS動物実験系を用いてSIとSSの摂取によるCHS抑制効果を明らかにした。ここでは、大豆食品として豆乳を選び、豆乳摂取がCHS抑制効果と腸内細菌叢に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1)CHS動物実験系：実験0日目と1日目に、毛を剃った腹部に0.5%DNFBで感作をおこなった。実験5日目と12日目に0.15%DNFBを耳介にチャレンジした。チャレンジする前と24時間後の耳介の厚みをマイクロメーターで測定し、その差を耳介の腫れとして評価した。なお、本動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会、及び川崎医科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(2)耳介組織の組織化学的観察方法：マウス耳介を採取し、IHC Zinc Fixative (BD Bioscience)で24時間固定をおこなった後にパラフィン包埋切片を作製した。組織切片の染色は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色と免疫組織化学(IHC)染色をおこなった。IHC染色は、ベンタナXTシステムディスカバリー(ロシュ・ダイアグノスティックス)を使用して行った。一次抗体として anti-mouse Ly-6G (Gr-1) 抗体(eBioscience)を用い、二次抗体として biotin mouse anti-rat IgG2b (BD Bioscience)を使用した。また、ヘマトキシリンで核の染色をおこなった。IHC染色した組織切片は、40倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で観察し、210 μ m四方中の染色された細胞を数え、1切片につき5箇所(5視野)の細胞数の平均を求めた。

(3)サイトカインの発現解析方法：マウスの耳介組織を試料とし、抗体アレイ(R&D Systems)を用いてサイトカイン及びケモカインの発現解析を行った。サイトカインの定量はELISAを用いて行った。

(4)腸内細菌叢解析：腸内細菌叢の解析は、実験終了日に採取した糞を試料として次世代シーケンサー(NGS)を使用して行った。

(5)統計解析：結果は、平均値と標準誤差で示した。統計解析には、Origin 2017(OriginLab)を使用した。各群の比較には一次元配置分散分析を行い、その後、Tukey 検定でポストホックテストをおこなった。

4. 研究成果

(1)SS の CHS 抑制効果：CHS 群と比較して低 SS 摂取群で、耳介の腫れと耳介組織への炎症細胞の浸潤の抑制が観察された。しかしながら、高 SS 摂取群ではそれらの抑制効果は低下した。次に、サイトカインの解析をおこなった結果、低 SS 摂取群で CXCL2 と TREM-1 が抑制されていた。さらに、腸内細菌叢の NGS データについてクラスター解析をおこなったところ、非 CHS 群と CHS 群は異なるグループに分かれ、低 SS 摂取群は非 CHS 群と同じグループに分類された。一方、高 SS 摂取群は非 CHS 群と CHS 群の両方のグループに分類された。以上の結果から、SS 摂取は適量で CHS 抑制効果を示すこと、CHS 抑制効果は腸内細菌叢と関係していることが示唆された。

(2)SS の腸内細菌叢を介した CHS 抑制効果：実験は、CHS マウス/水摂取(対照群)、CHS マウス/抗生剤溶液摂取(抗生剤摂取群)、CHS マウス/SS 溶液摂取(SS 摂取群)、CHS マウス/SS と抗生剤溶液摂取(SS と抗生剤摂取群)の 4 群で行った。耳介の腫れを測定したところ、対照群と比較して SS 摂取群で有意な腫れの抑制が見られたが、SS と抗生剤摂取群では SS の抑制効果は低下して有意差は観察されなくなった。耳介組織への炎症細胞の浸潤を調べたところ、対照群と比較して SS 摂取群で有意な炎症細胞の浸潤抑制が見られたが、SS と抗生剤摂取群では SS の抑制効果は低下し、有意差は認められなくなった。脾臓と耳介リンパ節における T_{reg} を調べたところ、対照群と比較して SS 摂取群で有意な増加が見られたが、SS と抗生剤摂取群では有意差は認められなかった。腸内細菌叢の組成について主成分分析を行なった結果、対照群と SS 摂取群で違いは見られず、抗生剤を摂取した群と摂取していない群で違いが観察された。抗生剤を摂取していない群では様々な腸内細菌(科レベル)が検出されたが、抗生剤摂取群ではそれらの多くが消失し *Lactobacillaceae* と *Enterobacteriaceae* が増加していた。以上の結果から、SS の CHS 抑制効果は SS が腸内細菌叢に作用して T_{reg} が増加することによると考えられた。

(3)SI 摂取の CHS 抑制効果：SI としてソヤフラボン HG(HG, 不二製油)を使用した。実験は、非 CHS マウス/水摂取群(NC 群)、CHS マウス/水摂取群(CC 群)、CHS マウス/0.004% HG 摂取群(LD 群)、CHS マウス/0.1% HG 摂取群(HD 群)の 4 群で行った。耳介の腫れは、NC 群で $0.043 \pm 0.023 \mu\text{m}$ 、CC 群で $0.167 \pm 0.033 \mu\text{m}$ 、LD 群で $0.120 \pm 0.051 \mu\text{m}$ 、HD 群で $0.117 \pm 0.053 \mu\text{m}$ であった。一方、耳介組織に浸潤した Gr-1 陽性炎症細胞の数は、CC 群で $406 \pm 27 \text{個}/\text{mm}^2$ 、LD 群で $262 \pm 15 \text{個}/\text{mm}^2$ 、HD 群で $183 \pm 14 \text{個}/\text{mm}^2$ であった。CC 群と比較して LD 群と HD 群で耳介の腫れと耳介組織への炎症細胞の浸潤に有意な抑制が観察された。さらに、耳介組織への炎症細胞の浸潤において HD 群は LD 群と比較して有意な抑制が観察された。サイトカインの解析をおこなった結果、CC 群と比較して HD 群で耳介組織における CXCL1, IL-1 β , M-CSF の抑制が示された。

(4)SI と SS 摂取と腸内細菌叢の CHS 抑制効果：SI としてソヤフラボン HG(HG, 不二製油)、SS としてソイヘルス SA(SA, 不二製油)を使用し、どちらも 0.004%濃度で飲料水としてマウスに給水瓶で実験開始 3 週間前から自由摂取させた。実験は、非 CHS マウス/水摂取群(NC 群)、非 CHS マウス/HG+SA 摂取群(NT 群)、CHS マウス/水摂取群(CC 群)、CHS マウス/HG+SA 摂取群(CT)の 4 群で行った。耳介の腫れは、NC 群で $0.009 \pm 0.004 \mu\text{m}$ 、NT 群で $0.003 \pm 0.005 \mu\text{m}$ 、CC 群で $0.182 \pm 0.021 \mu\text{m}$ 、CT 群で $0.117 \pm 0.065 \mu\text{m}$ であった。一方、耳介組織に浸潤した Gr-1 陽性炎症細胞の数は、CC 群で $941 \pm 88 \text{個}/\text{mm}^2$ 、CT 群で $477 \pm 49 \text{個}/\text{mm}^2$ であった。これらの実験結果から、CC 群と比較して CT 群で耳介の腫れと耳介組織への炎症細胞の浸潤に有意な抑制が観察され、SI と SS の CHS 抑制効果が示された。次に、サイトカインの解析をおこなった結果、CC 群と比較して CT 群で耳介組織における好中球の誘導に関与する CXCL2 と炎症に関与する TREM-1 の抑制が示された。

(5)豆乳摂取が CHS 抑制効果と腸内細菌叢に与える影響：豆乳は、無調整豆乳を水で 10 倍に希釈し、マウスに給水瓶で実験開始 3 週間前から自由摂取させた。実験は、非 CHS マウス/水摂取群(NC 群)、非 CHS マウス/豆乳摂取群(SN 群)、CHS マウス/水摂取群(CC 群)、CHS マウス/豆乳摂取群(SC)の 4 群で行った。耳介の腫れは、CC 群で $0.182 \pm 0.021 \text{mm}$ 、SC 群で $0.115 \pm 0.006 \text{mm}$ 、耳介組織に浸潤した Gr-1 陽性炎症細胞の数は、CC 群で $941 \pm 88 \text{個}/\text{mm}^2$ 、SC 群で $470 \pm 49 \text{個}/\text{mm}^2$ であった。これらの結果から、豆乳摂取による CHS 抑制効果が示された。次に、サイトカインの解析をおこなった結果、CC 群と比較して SC 群で耳介組織における好中球の誘導に関与する CXCL2 と炎症に関与する TREM-1 の抑制が示された。さらに、腸内細菌叢の構成を主成分解析で解析したところ、NC 群と CC 群は異なること、SC 群は NC 群に近づくことが示された。これらの結果から、CHS により腸内細菌叢の組成は変化すること、その変化は豆乳摂取により抑制されることが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① [Takao Nagano](#), Mitsuru Katase, Kazunobu Tsumura, Mineki Saito, Tsukasa Matsuda, Inhibitory effects of dietary soyasaponin on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice.

- Experimental Dermatology*, 査読あり, 26(3), 2017, 249-254. DOI: org/10.1111/exd.13205
- ② Takao Nagano, Norihisa Nishida, Hideyuki Ito, Diet containing a polyphenol concentrate from pomegranate juice attenuates contact hypersensitivity in mice. *Food Science and Technology Research*, 査読あり, 24(1), 2018, 169~175. DOI: 10.3136/fstr.24.169
 - ③ Takao Nagano, Hideyuki Ito, Diet containing a polyphenol concentrate from pomegranate juice attenuates contact hypersensitivity in mice. *Journal of Functional Foods*, 査読あり, 45, 2018, 247-253. DOI: 10.1016/j.jff.2018.04.038
 - ④ Takao Nagano, Mitsuru Katase, Kazunobu Tsumura, Dietary soyasaponin attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity via gut microbiota in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 査読あり, 195, 2018, 86-95. DOI: 10.1111/cei.13212
 - ⑤ Takao Nagano, Mitsuru Katase, Kazunobu Tsumura, Inhibitory effects of dietary soy isoflavone and gut microbiota on contact hypersensitivity in mice. *Food Chemistry*, 査読あり, 272, 2019, 33-38. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.08.043
 - ⑥ Takao Nagano, Hideyuki Ito, Diets containing pomegranate polyphenols and soy isoflavones attenuate contact hypersensitivity in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読あり, 83(3), 2019, 525-530. DOI: 10.1080/09168451.2018.1543013
 - ⑦ Takao Nagano, Mitsuru Katase and Kazunobu Tsumura, Impact of soymilk consumption on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity and gut microbiota in mice, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 査読あり, 70(5), 579-584 (2018). DOI: 10.1080/09637486.2018.1547689

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 長野隆男、片瀬満、津村和伸、接触過敏症動物実験系における大豆サポニンの効果、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年。
- ② 長野隆男、津村和伸、大豆イソフラボンの接触過敏症抑制効果、日本家政学会第68回大会、2016年。
- ③ 長野隆男、大豆のアレルギー性接触皮膚炎抑制効果、おかやまバイオアクティブ研究会第49回シンポジウム(招待講演)、2016年。
- ④ 長野隆男、接触過敏症動物実験系を用いた大豆のアレルギー性接触皮膚炎抑制効果、第7回川崎医科大学学術集会(招待講演)、2016年。
- ⑤ 長野隆男、片瀬満、津村和伸、大豆イソフラボンの接触過敏症抑制効果と腸内細菌叢に及ぼす影響、日本食品科学工学会大会第63回大会、2016年
- ⑥ 長野隆男、亀崎彩紗、三宅沙知、片瀬満、津村和伸、後川潤、齊藤峰輝、矢野博己、松田幹、大豆サポニンの接触過敏症抑制効果における腸内細菌叢の作用、日本農芸化学会2017年度大会、2017年。
- ⑦ 長野隆男、片瀬満、津村和伸、大豆イソフラボンの接触過敏症抑制効果と腸内細菌叢との関係、日本家政学会第69回大会、2017年
- ⑧ Takao Nagano, Mitsuru Katase and Kazunobu, Inhibitory effect of dietary soy isoflavone on contact hypersensitivity in mice. The 19th Biennial International ARAHE Congress 2017 (国際学会) 2017年。
- ⑨ 長野隆男、片瀬満、津村和伸、大豆イソフラボンとサポニンの接触過敏症抑制効果と腸内細菌叢に及ぼす影響、日本食品科学工学会第64回大会、2017年。
- ⑩ 長野隆男、片瀬満、津村和伸、大豆サポニンの接触過敏症抑制効果に与える腸内細菌叢の作用、北陸の微生物研究、2017年
- ⑪ 長野隆男、片瀬満、津村和伸、豆乳の接触過敏症抑制効果と腸内細菌叢に及ぼす影響、日本食品科学工学会第65回大会、2018年。
- ⑫ 長野隆男・伊東秀之、ザクロポリフェノールと大豆イソフラボンによる接触過敏症抑制効果、日本農芸化学会2019年度大会、2019年。

〔図書〕(計 1件)

- ① 長野隆男、腸内細菌叢に働きかける大豆の接触過敏症抑制効果、腸内細菌叢を標的にした医薬品・保健機能食品の開発ノウハウ集、技術情報協会(東京)、2018、359-366。

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：アレルギー性接触皮膚炎抑制剤

発明者：津村和伸、片瀬満、長野隆男

権利者：不二製油株式会社

種類：特許権

番号：特開2017-141170

出願年：2017

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.ishikawa-pu.ac.jp/staff/staffname/nagano-takao/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。