

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17624

研究課題名（和文）食物アレルギーの発症における腸内細菌叢の役割の解明

研究課題名（英文）The role of intestinal microbiota in the development of food allergy

研究代表者

鈴木 寿人 (Suzuki, Hisato)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：80783042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：乳幼児の食物アレルギーを発症する要因の1つとして腸内細菌叢に着目し、研究を開始した。食物アレルギーと診断された乳幼児29名と非食物アレルギーの乳幼児21名に対して、1歳6か月の時点での便検体を収集し、腸内細菌のバランス、量の比較を行った。その結果、食物アレルギー群ではBacteroides属の低下とEscherichia属の増加が確認された。授乳方法や分娩方法、食習慣による影響は確認されなかった。過去に牛乳アレルギーやアトピー性皮膚炎の乳児に行われた海外の研究でも類似した結果が示されており、これらの菌がアレルギー疾患の発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、食物アレルギー児と非食物アレルギー児の間で腸内細菌叢の分布が異なっていることが確認された。低下していたBacteroides属と増加していたEscherichia属が腸内でどのような役割を担っていたかは不明であり、これらの機能解析は今後の課題である。役割が明らかになることで、これらの菌の分布を整える内服薬あるいは乱れを予防する方法の開発が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：This study was initiated with a focus on the intestinal microbiota as one of the factors contributing to the development of food allergy in infants. Stool samples were collected from 29 infants diagnosed with food allergy and 21 infants with non-food allergy at the age of 1 year and 6 months. Metagenomic analysis was performed using DNA extracted from stools. The results showed a decrease in Bacteroides spp. and an increase in Escherichia spp. in the food allergy group. No influence by feeding method, delivery method, or eating habits was observed. Similar results were observed in previous studies conducted on infants with cow's milk allergy and atopic dermatitis, suggesting that these bacteria are involved in the development of allergic diseases.

研究分野：小児アレルギー

キーワード：食物アレルギー 腸内細菌叢 メタゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の技術革新により腸内細菌群を含めたメタゲノム解析が可能となり、肥満、2型糖尿病など有病率の高い疾患と腸内細菌叢の関連が報告された(Kamada et al. Nat Rev Immunol 2013)。腸内細菌叢はパイエル板などのリンパ組織の発達や免疫グロブリンの産生や17型ヘルパーT細胞など免疫組織・細胞の分化誘導に寄与しており、ヒトの最大の免疫器官を担っている。

海外の研究ではアレルギー性疾患患者では腸内細菌叢の多様性が損なわれ、Bacteroides 属の減少が患者において観察されたことがすでに報告されている(Chen CC et al, Pediatr Allergy Immunol 2016)。しかし、腸内細菌叢は環境要因による変化が大きく、人種差、食習慣、生活習慣により変化するため、海外の報告をそのまま利用することはできず、日本人コホートを使用した報告はいまだ発表されていない。

2. 研究の目的

乳幼児の食物アレルギーの有病率は5%と近年上昇しており、食物除去は食事の質の低下だけではなく、誤食事故報道から教育現場での対応方法も問題となり、その予防や治療は急務である。近年、喘息や肥満など多因子性疾患の要因として腸内細菌叢が注目されている。腸内細菌叢は最大の免疫組織であり、欧米から食物抗原の感作群で腸内細菌の多様性が低下していると報告されている。本研究では、食物アレルギー群と非食物アレルギー群を比較し、食物アレルギーの発症あるいは予防に關与する細菌叢の同定を目指す。

3. 研究の方法

食物アレルギー群は、生後1歳までに食物経口負荷試験陽性者および、アレルギー専門医が臨床症状から勘案し明らかな既往があり、かつ抗原特異的IgEが陽性の者をケース群とした。非食物アレルギー群は1歳6か月健診を受診した幼児に対し、食物アレルギーの既往のない受診者をコントロール群とした。腸内細菌叢は3歳頃までに年齢依存性によって動的に変化することが知られているため、1歳6か月時点での便検体を専用容器で採取、保存し、DNAの抽出を実施した。抽出されたDNAは、16S-rRNA解析およびショットガン法による次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を実施した。

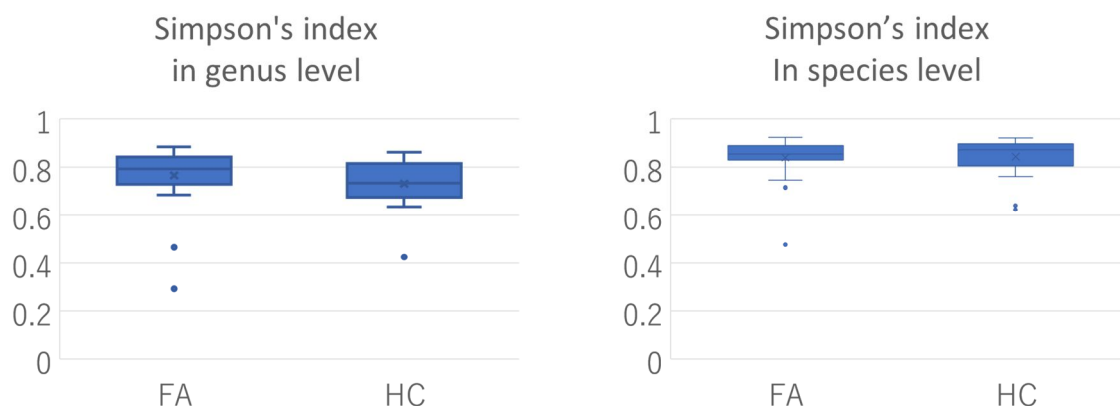
また、検体を取得する際、腸内細菌叢の変化に關連すると想定される：既往歴、家族歴、出生歴、兄弟の有無、発酵食品の摂取歴、抗菌薬の使用状況、ペット飼育の有無、原因抗原の種類についてアンケート調査を行い、統計学的解析に用いた。

4. 研究成果

1歳6か月児の食物アレルギー群29名(鶏卵13名、乳製品9名、小麦3名、鶏卵と牛乳3名、牛乳と小麦1名)、非食物アレルギー群21名を収集した。それぞれの便から抽出したDNAを用いたメタゲノム解析を実施した。

(1) 腸内細菌叢の多様性の評価

既報論文では、食物アレルギー児では、腸内細菌叢の種類が多様性が損なわれていたという報告があった。多様性を示す指標であるSimpson indexの比較を属レベル、さらに種レベルで行った(図1)。



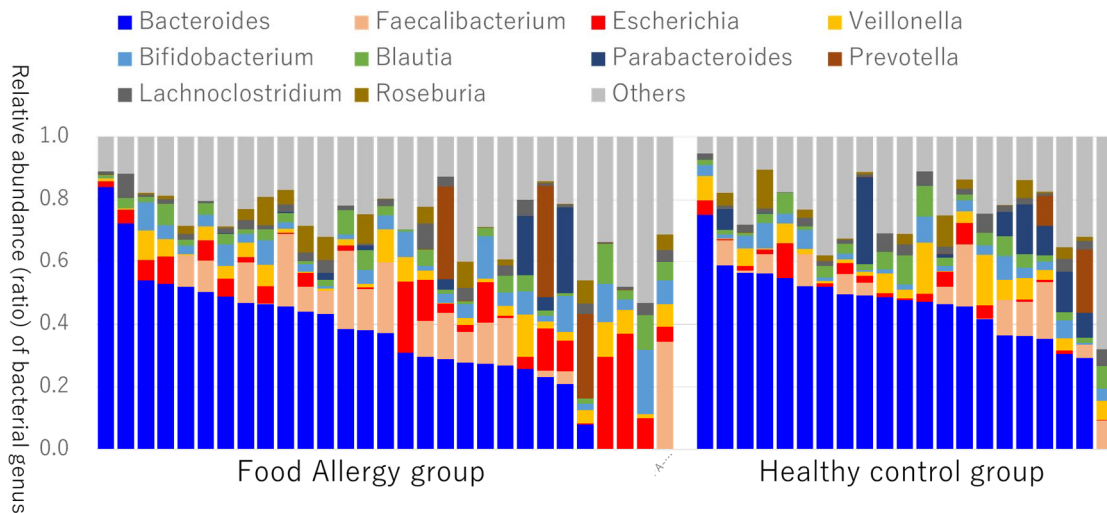
【図1：食物アレルギー群(FA)と健常コントロール群(HC)における腸内細菌叢の多様性】

その結果、本研究ではSimpson's indexについては両群間での有意差は得られなかった。また、アンケート調査による食習慣についてサブ解析を行ったが、有意差は得られなかった。

(2) 腸内細菌叢の分布の偏り

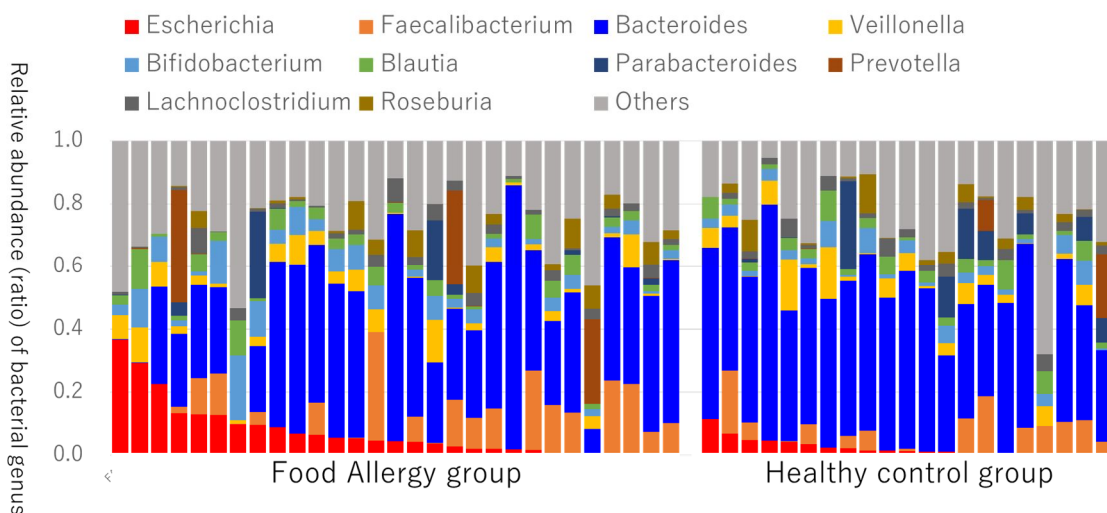
どのような細菌叢が分布しているのか、属レベルでの比較を行った。統計学的手法として、2群間に対して、Wilcoxon signed-rank test を用いた。

食物アレルギー群で低下していたものとして、*Bacteroides* 属 (図2の青色) の低下が確認された ($p=0.014$) (図2)。種レベルでの追加解析により、主に低下していたものは、*Bacteroides vulgatus* であった。



【図2：腸内細菌叢の分布：食物アレルギー群における *Bacteroides* 属の低下】

食物アレルギー群で増加していたものとして、*Escherichia* 属 (図3の赤色) の増加が確認された ($p=0.034$) (図3)。種レベルでの追加解析で、増加していたものは、*Escherichia fergusonii* であった。



【図3：腸内細菌叢の分布：食物アレルギー群における *Escherichia* 属の増加】

環境要因による腸内細菌叢の変化を考慮し、授乳方法や分娩方法、食習慣によるサブ解析を実施したが、環境要因による菌叢の違いは確認されなかった。

Bacteroides 属の低下については牛乳アレルギーの乳児やアトピー性皮膚炎の乳児で低下し、*Escherichia* の増加はアトピー性皮膚炎患者に多く見られていることが海外の既報があり、日本人でも同じ結果であることが確認できた。また、*Bacteroides* 属、*Escherichia* 属の変化は、食物アレルギー以外に炎症性腸疾患でも確認されており、腸内における免疫システムに関与していることが示唆された。

本研究成果は、JSA/WAO Joint Congress 2020 で報告し、「For the next generation 企画」の1つに選出され、第7回日本アレルギー学会関東地方会で優秀演題と評価された。

本研究を遂行するにあたって、抽出した DNA 量が十分ではなく、ショットガン法を用いたメタ

ゲノム解析でも PCR 増幅を行う必要があった。当初の研究計画では、十分量の DNA を採取し、PCR 増幅を挟まない手法による解析を目指していたが、必要量を収集するには、大量の検体の確保が必要であった。既報も PCR 増幅を挟んだメタゲノムシーケンスによる成果であり、本研究と同等であるが、PCR 増幅を含む手法、含まない手法での検討を要する。

今後の展望として、Bacteroides 属の低下と Escherichia 属の増加が、腸管免疫システムにどのように関与するのか、機能的な側面からの解析が必要である。増加した菌が腸管内でどのような化学物質を合成し、あるいは消費しているのか、さらに詳細な分類を行うことで、食物アレルギー発症のメカニズムを解明したい。

また、本研究はすでに食物アレルギーを発症した児を対象としたものである。食物アレルギーの発症時期は、離乳食を摂取するより前の乳児期あるいは新生児期が想定される。そのため、新生児期より経時的な腸内細菌叢の変遷を観察し、食物アレルギーの発症・非発症により分類する前向き研究の実施が望ましいと考えられ、本研究により確立した手法に基づく新たな研究を予定したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisato Suzuki, Wataru Morii, Daisuke Hayashi, Emiko Noguchi
2. 発表標題 Microbiome analysis for food allergy in Japanese population
3. 学会等名 Japanese Society of Allergology / World Allergy Organization Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原モナミ、鈴木寿人、林大輔、野口恵美子、高田英俊
2. 発表標題 食物アレルギー児の腸内細菌叢の多様性
3. 学会等名 第7回日本アレルギー学会関東地方会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	野口 恵美子 (Noguchi Emiko)	筑波大学・医学医療系遺伝医学・教授 (12102)	
研究協力者	林 大輔 (Hayashi Daisuke)	筑波メディカルセンター・小児科・医長	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原 モナミ (Hara Monami)	筑波大学・医学医療系小児科学・助教 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関