

令和元年6月16日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18189

研究課題名(和文) 共生微生物を介した食物アレルギー発症メカニズムの究明

研究課題名(英文) Research in the pathogenesis of food allergy associated with symbiotic-microorganisms

研究代表者

川原井 晋平 (Kawarai, Shinpei)

麻布大学・大学病院・講師

研究者番号：20533079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食性およびアレルギー性皮膚炎の因果関係を明らかにするために、犬のアトピー性皮膚炎の皮膚および糞便細菌叢の網羅的16s細菌叢解析を行った。アトピー性皮膚炎のトイプードルでは健康な犬よりも、皮膚細菌叢におけるStaphylococcaceaeの割合が増加し、種多様性および種数が減少した。糞便細菌叢も変化する傾向がみられたが、アトピー症例と健康な犬間に有意差はなかった。高タンパク質加熱鹿肉食を与えたアトピー症例の数頭が痒みの悪化あるいは消化器症状を示した。これらの犬の細菌叢は上述した類似の変化を示した。アレルギー性皮膚炎の犬における細菌叢の破綻は食物アレルギーの曝露後に生じている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性皮膚炎(AD)のイヌにおける皮膚と糞便の菌叢変化を調査して、イヌもヒトと同様にブドウ球菌が皮膚で増加していることが明らかとなった。さらに、糞便においても細菌叢の変化が生じていると考えられた。皮膚および糞便における菌叢変化は、アレルギー曝露の結果である可能性が導き出された。これは、イヌのAD治療ではブドウ球菌に対する抗生剤の投与だけでなく、アレルギーの回避およびアレルギー炎症の抑制といった根本治療が重要であることを示唆する。本研究によって明らかとなった細菌叢データは、今後、現在イヌやネコで問題となっているアレルギー発生の発端が解明することに有用である。

研究成果の概要(英文)：To make pathogenesis of feeding habits and atopic dermatitis clear, a 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing of skin and feces microbiome from allergic dermatitis in dogs was performed. An increase of the percentage of Staphylococcaceae and a decrease of the diversity and number of bacterial species of the skin microbiome in atopic dogs were observed in comparison with healthy population of toy poodles. Tendency of changes in the fecal microbiome was observed, but significant difference was not shown between the atopic and healthy dogs. After atopic dogs fed heat high-protein venison diet, some dogs worsened pruritus and/or showed digestive symptoms. The microbiomes of these dogs showed similar changes to the allergic toy poodles described above. These results could indicate that the dysbiosis of microbiome in allergic dermatitis was occurred after exposure of food allergen in dogs.

研究分野：動物皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 食物アレルギー 犬 細菌叢 網羅的16s解析 皮膚 糞便 鹿肉

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは現代社会の抱える大きな課題の一つである。自然界においても食物アレルギーはヒト以外にイヌやネコにも発症する。動物病院に来院する40%程度のイヌが皮膚炎を主症状とし、そのほとんどにアレルギーが関与する。我々は多くの治療経験を通して、重症化する動物の食物アレルギーの起源がヒトの農耕化と動物の家畜化にあると考えた。イヌは、オオカミから家畜化する過程で生じた食性変化によって雑食性を獲得した。しかし、炭水化物食による腸内細菌叢は、イヌ本来の肉食性機能からは大きく異なり、現在イヌやネコで問題となっているアレルギー発生の発端の一つとなっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、食物アレルギーの獲得メカニズムの解明を主眼とし、以下の3点を明らかとするために実施された。食物アレルギー発症時と良化時のアレルギー関連皮膚・腸内細菌叢を解明する。本来の高蛋白肉食と従来の炭水化物食摂取時における食性関連皮膚・腸内細菌叢を同定する。変化の大きい菌種をマウスに接種して免疫賦活化能を解明する。

3. 研究の方法

アレルギー関連皮膚・腸内細菌叢を解明するためにアレルギー性皮膚炎と健常のトイプードルから皮膚スワブと糞便を採取した。食性関連皮膚・腸内細菌叢を同定するために、高蛋白肉食を、現在食べているフード量を減らし、加熱鹿肉を追加して、蛋白質と炭水化物の比率が3:1となるように調整した。症状の安定したアレルギー性皮膚炎のイヌに、高蛋白肉食を給餌前(試験開始日) 給餌中(開始3~4週間後) 給餌後(元に戻して2週間以上経過後)に、痒みスコアと消化器症状を聴取したうえで、皮膚スワブ、糞便細菌叢、血漿を継続的に採取した。

採取した皮膚スワブおよび糞便から細菌ゲノムを既報(Morita H. *et al.*, *Microbes Environ.* 2007)を改変した酵素法を用いて抽出した。16S rRNA領域特異的プライマー(V3-V4)を用いてライブラリーを作成後、次世代シーケンサー(MiSeq、イルミナ社)による網羅的16S細菌叢解析を行った。解析データは16S Metagenomics(イルミナ社)を用いて主成分分析、Shannon-Wienerによる種多様性指数、菌種数を解析した。

採取した血漿を用いて、CE-TOFMSによるメタボローム解析を行い、高蛋白肉食による代謝変化を解析した。同定された菌叢の免疫賦活化能を解明するために、その菌株あるいは菌体成分をマウスに投与し、CD8陽性細胞割合をフローサイトメトリー法により解析することを計画した。

4. 研究成果

アレルギー関連皮膚・腸内細菌叢

皮膚細菌叢は *Staphylococcaceae* などが多く、糞便中の細菌叢は *Lachnospiraceae*、*Clostridiaceae*、*Enterobacteriaceae* などが多く存在した。トイプードルの症例8頭と健常5頭の皮膚細菌叢では、主成分分析において異なるクラスターから構成された(図1)。Shannon-Wienerによる種の多様性指数は症例において低値となる傾向にあり、種数は有意に減少していた。トイプードルの症例8頭と健常5頭の糞便細菌叢では、主成分分析において症例犬は広く分布するのに対して健常なイヌのクラスターは中心部に多く存在した(図2)。Shannon-Wienerによる種の多様性指数と種数は、症例および健常のイヌにおいて有意な差は認められなかった。

図1

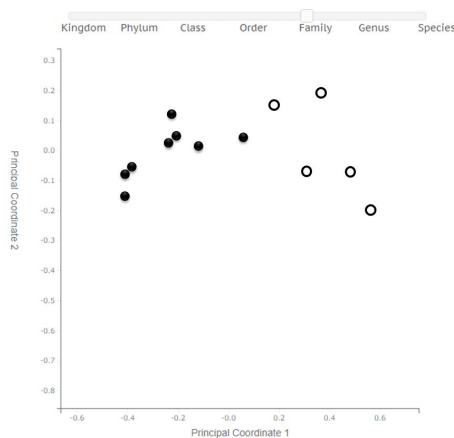
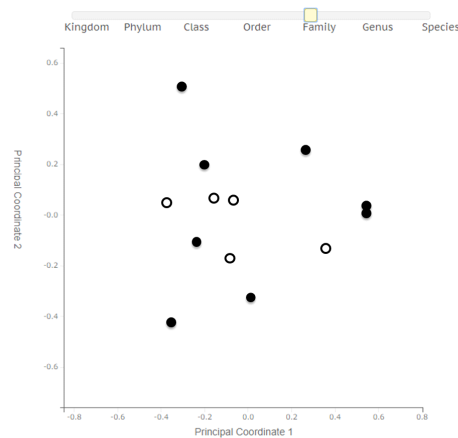


図2



アレルギー性皮膚炎のトイプードルにおける皮膚細菌叢(図1)および糞便細菌叢(図2)の主成分分析 アレルギー症例、 健常なイヌ

食性関連皮膚・腸内細菌叢

犬種の異なるアレルギー性皮膚炎の症例に高蛋白肉食を与えた結果、痒みスコアが改善あるいは変化のない4頭と、痒みスコアが悪化あるいは消化器症状を発症した3頭から採材できた。給餌前、給餌中と給餌後の皮膚および糞便細菌叢を網羅的 16S 細菌叢解析した結果、皮膚細菌叢、糞便細菌叢ともに症例毎に異なるクラスターを形成した。悪化した症例は前述したアレルギー性皮膚炎のタイプドールと類似した多様性の傾向を悪化時に示した(図 3、4)。従って高蛋白肉食を給餌した結果、既報 (Schmidt M. *et al.*, PLoS One, 2018) と類似した傾向を示す症例も存在したが、明確に有意となる細菌叢を明らかにすることはできなかった。

図 3

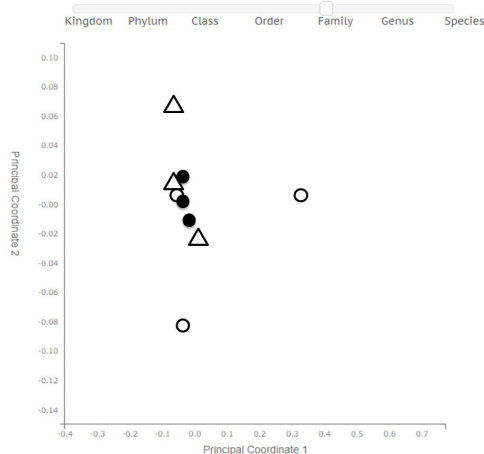
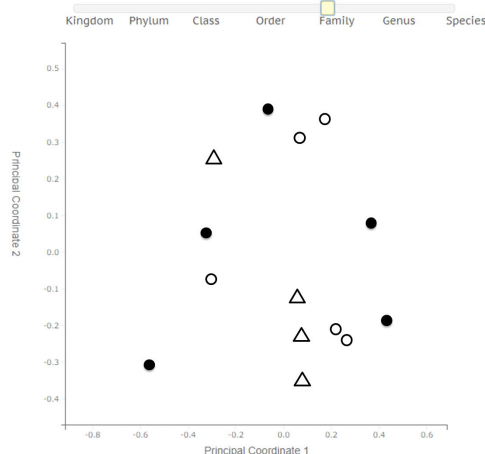


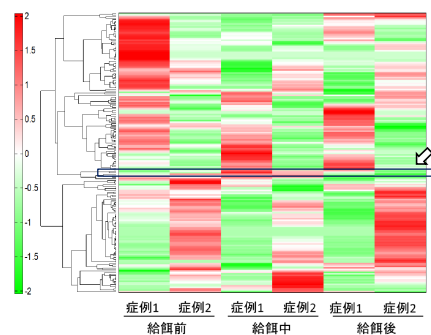
図 4



高蛋白肉食により悪化したイヌにおける給餌前、給餌中と給餌後の皮膚細菌叢(図 3)および糞便細菌叢(図 4)の主成分分析 給餌前、給餌中、給餌後

アレルギー性皮膚炎の症例 2 頭について高蛋白肉食を給餌前、給餌中と給餌後の血漿中代謝物を網羅的にメタボローム解析した結果、高蛋白肉食を給餌中に上昇する成分が存在し、加熱鹿肉に豊富な成分であると推定できた(図 5)。

図 5 高蛋白肉食を給餌前、給餌中と給餌後の CE-TOFMS による血漿メタボローム解析



矢印で示す に囲まれた代謝物が上昇している。

以上のことから、イヌにおけるアレルギー性皮膚炎の症例ではヒトの報告 (Kong H.H. *et al.* Genome Res. 2012) と同様に *Staphylococcaceae* が皮膚細菌叢で有意となり、その増加は、鹿肉に対する食物過敏反応を誘発した際にみられることが明らかとなった。さらに、糞便においても細菌叢の変化が生じていることが示唆された。皮膚および糞便における菌叢変化は、アレルギー暴露の結果生じているのかもしれない。高蛋白肉食により変化する血漿中代謝産物が得られ、今後、療法食を食べている食物アレルギーのイヌに有益な管理指標となるかもしれない。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)*責任著者

Yoshizawa M†, Kawarai S†, Torii Y, Ota K, Tasaka K, Nishimura K, Fujii C, Kanemaki* N. Eosinophilic plasmacytic conjunctivitis concurrent with gingival fistula caused by *Schizophyllum commune* in a captive cheetah (*Acinonyx jubatus*). Med Mycol Case Rep. 2017. 18:34-9. 査読有 †co-first author

川原井晋平*, 犬のアレルギー性皮膚炎と表在細菌、アレルギーの臨床、2017、37 巻、1163-1169 査読無

Maruo T, Fukuyama Y, Nagata K, Yoshioka C, Nishiyama Y, Kawarai S*, Kayanuma H, Orito K, Nakayama T. Intraoperative acridine orange photodynamic therapy and cribriform electron-beam irradiation for canine intranasal carcinomas: 14 cases. Can Vet J. 2019. 60:509-13. 査読有
横山大希、川原井晋平*、榎本力弥、菅原優子、安齋眞一、斑目広郎、茅沼秀樹、片側廉部に限局した休止期脱毛を認めた精巣腫瘍の犬の1例、獣医皮膚科臨床、2019、In press 査読有

〔学会発表〕(計10件)

高橋聡一郎、加藤なつ紀、田端伴行、斑目広郎、代田欣二、川原井晋平、食物アレルギーのネコの3例、平成29年度関東・東京合同地区獣医師大会、2017年9月
加藤なつ紀、高橋聡一郎、田端伴行、村上弘正、斑目広郎、代田欣二、川原井晋平、猫アレルギー性皮膚炎におけるFcγR1を用いた血清抗原特異的IgE検査の検討、題5回神奈川獣医師会学術大会、2018年3月
川原井晋平、蓬来温泉によるイヌのマラセチア性皮膚炎への症状緩和効果、第17回バイオ・ライフサイエンス研究展、2018年6月
福山泰広、西山優太、川原井晋平、金井詠一、安齋眞一、斑目広郎、代田欣二、圓尾拓也、多中心性皮内扁平上皮癌の犬と猫の2例、平成30年度関東・東京合同地区獣医師大会、2018年9月
久保田翔太、仁比大記、園尾美穂、加藤なつ紀、望月美佐、木内明男、川原井晋平、蓬来温泉によるイヌのマラセチア性皮膚炎への症状緩和効果、平成30年度関東・東京合同地区獣医師大会、2018年9月
前田佑亮、久保田翔太、遠藤仁美、藤川康夫、安齋眞一、川原井晋平、塚本篤士、LED照射器を用いたイヌ皮膚肥満細胞に対するナローバンドUVBの影響、第161回日本獣医学学会学術集会、2018年9月
川原井晋平、竹田志郎、平健介、竹下毅、菊水健史、南正人、鹿肉を高用量負荷した犬のアレルギー性皮膚炎2症例の腸内細菌叢の変化、第6回神奈川獣医師会学術大会、2018年11月
川原井晋平、今井昭宏、皮膚科実習、神奈川県獣医師会主催小動物臨床実習(招待講演)、2019年2月
川原井晋平、麻布大学におけるアレルギー疾患における取り組み、神奈川県獣医師会主催「第32回卒業後教育セミナー」(招待講演)、2019年3月
高橋聡一郎、加藤なつき、久保田翔太、高橋俊一、川原井晋平、合併症を伴うニキビダニ症に対してフルラナレルを用いた3例、第22回日本獣医皮膚科学会学術大会、2019年3月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：真菌を原因とする皮膚疾患に対する予防・改善剤

発明者：川原井晋平、望月美佐

権利者：同上

種類：特許

番号：2018-012483

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：動物用治療器、光治療器、および人間以外の動物の治療方法

発明者：川原井晋平、塚本篤士、久保田翔太、藤川康夫、山岸真貴子

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2018-206015

出願年：2018

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菊水 健史

ローマ字氏名：Kikusui Takefumi

研究協力者氏名：森田 英利

ローマ字氏名：Morita Hidetoshi

研究協力者氏名：平 健介

ローマ字氏名：Taira Kensuke

研究協力者氏名：南 正人

ローマ字氏名：Minami Masato

※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。