

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780092
 研究課題名（和文） 経口免疫寛容誘導を介した食物アレルギー抑制機能を有する食品開発のための基盤解析
 研究課題名（英文） Design of immune tolerance inducing peptides and analysis of their allergy-suppressive effects
 研究代表者
 渡辺 純（WATANABE JUN）
 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品機能研究領域 主任研究員
 研究者番号：10374729

研究成果の概要：免疫寛容誘導物質の作製においては、低アレルゲン化小麦粉水溶性画分が免疫寛容誘導活性をもつことを明らかとし、活性本体のペプチドの単離を試みた。腸内細菌とアレルギー発症との関わりを調べ、*Candida albicans* の定着や幼少期の抗生物質投与による菌叢変化がアレルギーの増悪に関わること、難消化性オリゴ糖の摂取は菌叢変化を介してアレルギー発症に抑制的に作用することを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	270,000	3,970,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食物アレルギー、経口免疫寛容、腸内細菌、プレバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギー患者が急増し、その対策が社会的急務とされている。一般に、経口摂取された抗原に対する免疫応答は抑制される（経口免疫寛容）が、食物アレルギーの一因は経口免疫寛容の破綻にあると考えられている。経口免疫寛容を積極的に誘導して免疫疾患を抑制する試みが行われているが、食物アレルギー患者にアレルゲンを経口投与して寛容を誘導することは不可能であるため、アレルゲン由来の部分合成ペプチドによる寛容の誘導が試みられている。しかしながら、合成ペプチドは安全上問題があるばかりでなく、食物ア

レルゲンは多岐にわたるため現実的でない。申請者らの開発した低アレルゲン化小麦粉は、小麦アレルゲンを食品添加物用酵素により網羅的に分解したもので、アレルゲン由来ペプチドが多量に含まれている。低アレルゲン化小麦粉は臨床試験によりアレルギー症状を惹起しないこと、さらに動物モデルを用いた解析から、積極的にアレルギー抑制効果を示すことが明らかとなり、その作用機序は経口免疫寛容の誘導によることが示唆された。

多くの抗原と接する腸管は独自の免疫系を発達させており、生体に有害な病原性細菌などを排除する一方、食物などに対して

は経口免疫寛容を誘導して免疫応答を抑制している。近年このように食物アレルギー発症にも密接に関わっている腸管免疫系の発達に腸内細菌が必須であることが明らかとなりつつある。しかしながら、腸内細菌叢を改善することにより経口免疫寛容誘導能を増強し、食物アレルギーを制御する試みはこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、経口免疫寛容の誘導を介した食物アレルギー抑制機能を有する食品開発のための技術基盤を確立することを目的とした。具体的には、

- (1) 食物アレルギー患者にも摂取可能な安全な免疫寛容誘導物質（寛容原）を食物アレルギーの食品添加物用酵素による網羅的分解により作製すること
- (2) 腸内細菌の経口免疫寛容誘導への関わりを明らかにするとともに、免疫寛容を促進するプロバイオティクスと寛容原を併せ持つ食物アレルギー抑制機能を有する食品を創製することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 寛容原の作製

雌性 BALB/c マウスに低アレルギー化小麦粉水溶性画分を 5 日間経口投与し、最終投与の 5 日後に薄力粉を完全フロイントアジュバントとともに皮下投与して免疫した。免疫 14 日後に屠殺し、血清小麦特異的抗体価を ELISA により、脾細胞の小麦特異的な増殖応答を BrdU の取り込みを指標に評価した。

BALB/c および C57BL/6 マウスの皮下に薄力粉と完全フロイントアジュバントを混合して投与して免疫した。免疫した動物の脾細胞に低アレルギー化小麦粉水溶性画分から逆相 HPLC により分離・精製した画分を添加し、増殖応答を BrdU の取り込みを指標として評価した。

(2) 腸内細菌のアレルギー発症への影響の解析

① FISH-フローサイトメトリー法

糞便ホモジネートから遠心分離により腸内細菌を回収し、パラホルムアルデヒドで固定した。Cy5 標識した bacteria universal あるいは属・種特異的プローブで hybridize した後、フローサイトメータにより染色された細菌を計数した。ヒトにおけるラフィノースのビフィズス菌増殖効果の解析においては、4g/日のラフィノースを 4 週間摂取させ、摂取開始 1 週間前、摂取後 2 週および 4 週、摂取終了後 4 週に糞便を採取し、上記の方法により腸内細菌叢の変化を解析した。

② *Candida albicans* による食物アレルギー増悪機構の解析

粉末精製飼料で飼育した雌性 BALB/c マウスに、*Candida albicans* を単回経口投与し、定着させた。卵白アルブミンを隔日 9 週間経口投与して *C. albicans* の定着が経口感作に及ぼす影響を、卵白アルブミン経口投与後の血中濃度の推移を見ることで定着の透過性への影響を評価した。

③ 難消化性オリゴ糖摂取による菌叢変化がアレルギー反応に及ぼす影響の解析

雌性 BALB/c マウスに 5% フルクトオリゴ糖添加、非添加の粉末精製飼料を摂取させた。ジニトロフルオロベンゼンを腹部に塗布して感作した後、耳介に塗布して接触性皮膚炎を惹起し、耳介に肥厚を皮膚炎の指標として評価した。腸内細菌叢の比較は、盲腸内容物から抽出した DNA を鋳型に 16S rRNA 断片を PCR により増幅し、変成剤濃度勾配ゲル電気泳動法により、腸内ビフィズス菌数の計数は属特異的プライマーを用いた real-time PCR により行った。

④ 発育初期の腸内細菌叢の変化が発育後のアレルギー発症に及ぼす影響の解析

雌性 BALB/c マウスに 5% フルクトオリゴ糖添加、非添加の粉末精製飼料を摂取させ、交配・出産させた。母のフルクトオリゴ糖摂取の有無が仔の腸内細菌叢形成に及ぼす影響の解析は、仔の盲腸内容物から抽出した RNA から RT-PCR により 16S rRNA 断片を増幅し、変成剤濃度勾配ゲル電気泳動法により行った。

3 週齢の雌性 NC/Nga にカナマイシンを 7 日間連続経口投与した。投与終了 8 週後に皮膚炎スコアおよび 10 分間の引っ掻き回数を計数し、重症度を評価した。投与終了 1 日および 8 週後に糞便あるいは盲腸内容物を回収し、16S rRNA 断片を PCR により増幅し、変成剤濃度勾配ゲル電気泳動法により菌叢の比較を行った。

⑤ 腸内細菌叢変化を誘導する新規オリゴ糖の作製・評価

大腸菌に生産させた *Ruminococcus albus* NE-1 由来の cellobiose 2-epimerase をラクトースに作用させ、HPLC によりエピラクトースを精製した。雄性 SD ラットにエピラクトースあるいはラクトースを 5% 含有する粉末精製飼料を 2 週間摂取させ、出納試験によりカルシウム吸収を、屠殺時に採取した盲腸内容物を用いて菌叢解析を行った。菌叢解析は培養法による総嫌気性菌数の計数と、bifidobacteria 属特異的プライマーを用いた real-time PCR、および 16S rRNA 断片を増幅して得たクローンライブラリのシーケンス解析により行った。

4. 研究成果

(1) 寛容原の作製

寛容原のモデルとして低アレルギー化小

小麦粉を用いて解析した。低アレルゲン化小麦粉水溶性画分の経口投与により、小麦抗原免疫後の小麦特異的抗体価の上昇が抑制され、脾細胞の小麦抗原による増殖応答が有意に抑制されたことから、免疫寛容誘導能を有していることが明らかとなった。T細胞エピトープを有することが寛容原である必要条件であるが、低アレルゲン化小麦粉水溶性画分から複数の系統のマウスのT細胞エピトープを有するペプチドを複数単離した。

(2) 腸内細菌のアレルギー発症への影響の解析

①FISH-フローサイトメトリー法の確立

腸内細菌叢を迅速かつPCR増幅によるバイアスなしに計数するためのFISH-フローサイトメトリー法を確立した。この手法を用いると、蛍光標識プローブをかえることによって全菌数や属・種特異的に腸内細菌数を計数することが可能であった。プレバイオティクスとしてビフィズス菌増殖活性の知られているラフィノースのヒト腸内細菌叢への影響を本手法を用いて種レベルで観察した。その結果、*B.adolescentis*, *B.catenulatum* group, *B.longum*の順でヒト糞便内で優勢であり、ラフィノース摂取によりその優占順位を保ったまま菌数が増大し、摂取後は摂取前と同等の菌数まで減少することを示した。一方、*B.breve*, *B.bifidum*, *B.angulatum*の摂取前の菌数は前記の3菌種に比べて少なく、摂取14日目まで急増したが、28日目では逆に減少した。これらの結果から、ラフィノースによるビフィズス菌の増殖促進効果は菌種により異なることが明らかとなった。

②Candida albicansによる食物アレルギー増悪機構の解析

ヒト腸内常在真菌である *Candida albicans* がアトピー性皮膚炎を増悪することが報告されている。粉末精製飼料を摂取させたマウスに *C.albicans* を単回経口投与することにより、消化管に *C.albicans* を定着させるモデルをすでに確立している。このモデルを用い、*C.albicans* の消化管バリアへの影響を解析した。*C.albicans* の定着により、経口投与したアレルゲンの血中への移行が促進され、アレルゲンに対する免疫応答が増大することを示した。アレルゲンの血中移行の増大の少なくとも一部には肥満細胞が関与することを明らかにした。以上より、消化管への *C.albicans* 定着は、肥満細胞の活性化を介して消化管バリアを傷害することで食物アレルギーを増悪する可能性が示唆された。

③難消化性オリゴ糖摂取による菌叢変化がアレルギー反応に及ぼす影響の解析

腸内細菌叢の変化がアレルギー反応に及

ぼす影響を、ハプテン誘導接触性皮膚炎モデルにより解析した。食餌への難消化性オリゴ糖添加により接触性皮膚炎が抑制されることが示され(図1)、抑制には腸内ビフィズス菌、とりわけ *B.pseudolongum* の増加が寄与することが示唆された。

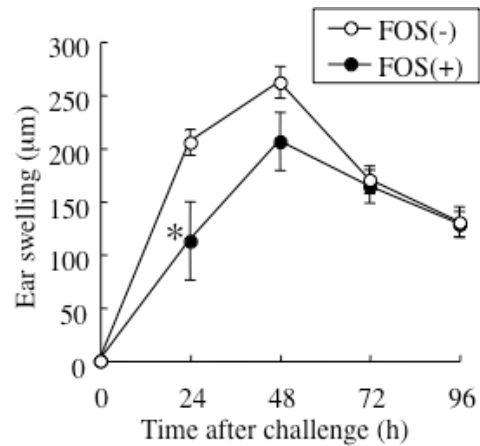


図1 フルクトオリゴ糖摂取 (FOS(+)) および非摂取 (FOS(-)) 群の耳介肥厚

④発育初期の腸内細菌叢の変化が発育後のアレルギー発症に及ぼす影響の解析

発育初期の腸内細菌叢が発育後の免疫応答に影響することが知られている。そこで、妊娠・授乳期の母マウスへの難消化性オリゴ糖摂取が、仔の腸内細菌叢形成に影響するか分子生物学的手法を用いて解析した。難消化性オリゴ糖摂取の有無により母の菌叢が大きく異なること、出生直後は仔の菌叢と母の菌叢は大きく類似し、離乳期においても母のオリゴ糖摂取の有無により仔の菌叢が異なったパターンを示すことが明らかとなった。

離乳直後のカナマイシン投与により NC/Nga マウスの皮膚炎スコアは増加傾向を示し、引っ掻き回数は有意に増加し、アトピー性皮膚炎様症状の増悪が観察された(図2)。

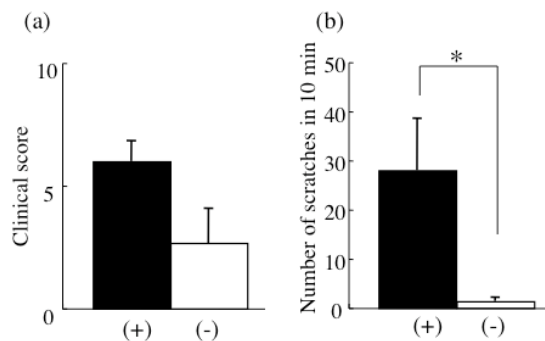


図2 カナマイシン投与(+)/非投与(-)の皮膚炎スコア(A)および引っ掻き回数(B)

腸内細菌叢はカナマイシン投与により一過

性に変化し、特に乳酸菌数は有意に減少した。以上より、幼少期の抗生物質投与は腸内細菌叢の一過性の変化、特に乳酸菌数の減少を介して、アレルギー症状を増悪する可能性が示唆された。

以上の結果は、妊娠・授乳期の難消化性オリゴ糖摂取が仔の腸内細菌叢形成に影響し、その結果仔のアレルギー発症にも影響する可能性を示唆するものであった。

⑤腸内細菌叢変化を誘導する新規オリゴ糖の作製・評価

消化管内微生物による有用物質の生産に関する検討を行った。ヒツジルーメンから *Ruminococcus albus* NE-1 を分離し、本菌株より cellobiose 2-epimerase を単離するとともに、コードする遺伝子を取得している。本酵素はセロオリゴ糖の還元末端グルコースをマンノースに異性化する活性を有していたが、同時にラクトースをエピラクトース（ガラクトシルマンノース）に変換することを明らかにした。エピラクトース添加飼料を摂取したラットにおいて、盲腸内容物重量が増加し、総嫌気性菌数が有意に増加した。菌叢変化に関しては、盲腸内ビフィズス菌数が増加するが（図 3）、clostridia の顕著な増加は見られないことを明らかにした。さらに、エピラクトース添加飼料の摂取により、カルシウム吸収が促進されること、その作用機序は大腸内発酵による pH の低下のみならず、小腸上皮細胞への直接作用にもよることが示唆された。腸内細菌叢の変化・ミネラル吸収触診効果とも、原料ラクトースには見られなかった。チーズホエイの主要な糖質であり有効には利用されていないラクトースが、機能性を有するエピラクトースに変換可能であり、乳の高付加価値化につながるものと考えられる。

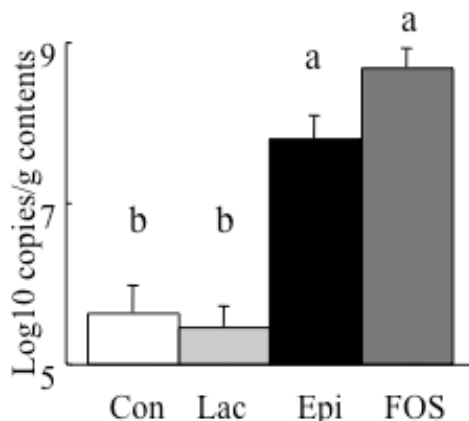


図 3 対照食(Con), ラクトース食(Lac), エピラクトース食(Epi), フルクトオリゴ糖食(FOS)摂取群の盲腸内ビフィズス菌数

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Nishimukai, M., Watanabe, J., Taguchi, H., Senoura, T., Hamada, S., Matsui, H., Yamamoto, T., Wasaki, J., Hara, H., and Ito, S.: Effects of epilactose on calcium absorption and serum lipid metabolism in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10340-10345 (2008). (査読あり)
- ② Taguchi, H., Senoura, T., Hamada, S., Matsui, H., Kobayashi, Y., Watanabe, J., Wasaki, J., and Ito, S.: Cloning and sequencing of the gene for cellobiose 2-epimerase from a ruminal strain of *Eubacterium cellulosolvens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **287**, 34-40 (2008). (査読あり)
- ③ Watanabe, J., Nishimukai, M., Taguchi, H., Senoura, T., Hamada, S., Matsui, H., Yamamoto, T., Wasaki, J., Hara, H., and Ito, S.: Prebiotic properties of epilactose. *J. Dairy Sci.*, **91**, 4518-4526 (2008). (査読あり)
- ④ Ito, S., Taguchi, H., Hamada, S., Kawauchi, S., Ito, H., Senoura, T., Watanabe, J., Nishimukai, M., Ito, S., and Matsui, H. Enzymatic properties of cellobiose 2-epimerase from *Ruminococcus albus* and the synthesis of rare oligosaccharides by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 433-441 (2008). (査読あり)
- ⑤ Watanabe, J., Sasajima, N., Aramaki, A., and Sonoyama, K.: Consumption of fructo-oligosaccharide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Br. J. Nutr.*, **100**, 339-346 (2008). (査読あり)
- ⑥ Fujiwara, R., Watanabe, J., and Sonoyama, K.: Assessing changes in composition of intestinal microbiota in neonatal BALB/c mice through cluster analysis of molecular markers. *Br. J. Nutr.*, **99**, 1174-1177 (2008). (査読あり)
- ⑦ Ito, S., Hamada, S., Yamaguchi, K., Umene, S., Ito, H., Matsui, H., Ozawa, T., Taguchi, H., Watanabe, J., Wasaki, J., and Ito, S.: Cloning and sequencing of the cellobiose 2-epimerase gene from an obligatory anaerobe, *Ruminococcus albus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 640-645 (2007). (査読あり)

- ⑧ Dinoto, A., Marques, T. M., Sakamoto, K., Fukiya, S., Watanabe, J., Ito, S., and Yokota, A.: Population dynamics of *Bifidobacterium* species in human feces during raffinose administration monitored by FISH-flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7739-7747 (2006). (査読あり)
- ⑨ Yamaguchi, N., Sugita, R., Miki, A., Takemura, N., Kawabata, J., Watanabe, J., and Sonoyama, K.: Gastrointestinal *Candida* colonisation promotes sensitization against food antigens by affecting mucosal barrier in mice. *Gut*, **55**, 954-960 (2006). (査読あり)

[学会発表] (計9件)

- ① 渡辺純ら、高発酵性オリゴ糖エピラクトースの腸内細菌改善作用、2009年度日本農芸化学会大会、2009年3月29日、福岡国際会議場
- ② 西向めぐみら、高発酵性オリゴ糖エピラクトースのミネラル吸収促進作用、2009年度日本農芸化学会大会、2009年3月29日、福岡国際会議場
- ③ 田口秀典ら、プレバイオティクス特性を有するエピラクトースの生成酵素：生産菌の分離・同定と生成酵素の特性、2009年度日本農芸化学会大会、2009年3月28日、福岡国際会議場
- ④ 渡辺純ら、エピラクトースのプレバイオティクス特性、第13回日本フードファクター学会、2008年11月17日、タワーホール船堀
- ⑤ 渡辺純ら、離乳直後のカナマイシン投与はNC/Nga マウスにおけるアトピー性皮膚炎を悪化させる、第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月20日、京都国際会議場

- ⑥ 梅田智里ら、マウス腸内細菌の動態解析サンプルとしての糞便と盲腸内容物の比較、第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月20日、京都国際会議場
- ⑦ 小笠原達ら、異なる品種の米を摂取させたマウスの腸内細菌叢とIV型アレルギー症状の比較、第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月20日、京都国際会議場
- ⑧ 杉田竜介ら、消化管カンジダ定着によりマウスの接触皮膚炎が増悪する、第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月20日、京都国際会議場
- ⑨ 藤原麗子ら、フルクトオリゴ糖摂取がNC/Nga マウスにおける接触皮膚炎に及ぼす影響、第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月20日、京都国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 純 (WATANABE JUN)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品機能研究領域 主任研究員

研究者番号：10374729

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

園山 慶 (SONOYAMA KEI)

北海道大学 農学研究科 准教授

研究者番号：90241364

伊藤 進 (ITO SUSUMU)

北海道大学 創成科学共同研究機構 特任教授

研究者番号：90400043

田口 秀典 (TAGUCHI HIDENORI)

北海道大学 創成科学共同研究機構 特任助教

研究者番号：60374732