

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19380070
研究課題名（和文） 食品による消化管微生物環境の制御を介した免疫疾患予防の基盤解析
研究課題名（英文） Studies on food prevention of immune diseases through modulation of gut microbiota
研究代表者 園山 慶（SONOYAMA KEI） 北海道大学・大学院農学研究院・准教授 研究者番号：90241364

## 研究成果の概要：

腸内細菌は免疫系に影響するので、難消化性糖類などの食品によって腸内細菌叢を修飾することにより、アレルギーなどの免疫疾患を予防・治療できるかもしれない。このことを動物実験によって調べた結果、授乳期の仔マウスの腸内細菌叢を修飾することによって発育後のアレルギー性皮膚炎を改善できること、米品種が腸内細菌叢を修飾するとともに食物アレルギーにも影響を及ぼすこと、消化管内のカンジダ菌がアレルギーの危険因子となりうることを示すことができた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

## 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：プレバイオティクス、難消化性オリゴ糖、米品種、腸内細菌、アレルギー、*Candida albicans*

## 1. 研究開始当初の背景

腸内の常在細菌叢は免疫系の発達ならびに恒常性維持に重要な役割を果たしている。一方、菌体成分が免疫疾患の発症・増悪に関与することも示唆されている。このような背景から、腸内細菌叢を修飾することによって免疫疾患を予防・治療するという戦略が導かれ、アレルギー疾患の予防を意図したプロバイオティク乳酸菌の投与などが試みられてきた。同様に、難消化性糖類などのプレバイオティクスの可能性も示唆されているが、プ

ロバイオティクスに比較してはるかに安全かつ経済的であるにもかかわらず、研究はあまり行われてこなかった。

アレルギー疾患の発症・進展における腸内細菌叢の役割についてのこれまでの知見は、とりわけ発育初期の腸内細菌叢とアレルギー発症との間に密接な関係があることを示唆している。筆者らはこれまでの検討により、妊娠期のマウスに難消化性オリゴ糖を摂取させると妊娠マウスの腸内 bifidobacteria が増加するのみならず、新生仔マウスの腸内

においても離乳前の段階で bifidobacteria が増加することを観察した。そこで本研究では、「母マウスに対する難消化性オリゴ糖の投与が新生仔マウスの腸内細菌叢を改善する結果、発育後の免疫疾患の発症・増悪を抑制する」という仮説を立てた。

また、北海道において栽培されている米品種のひとつである「ゆきひかり」を米アレルギー患者に摂取させると、アトピー性皮膚炎の改善がみられることが報告されているが、その機構はまったく明らかになっていない。そこで本研究では、「『ゆきひかり』は、腸内細菌叢の改善を介してアレルギー改善作用を発揮するプレバイオティク米である」という仮説を立てた。

健康なヒトの消化管粘膜面における常在真菌である *Candida albicans* がアレルギー疾患の発症・増悪に関与するという考えがあるが、科学的な証明はなされてこなかった。筆者らは消化管へ *C. albicans* が定着するモデルマウスを開発し、これを用いてアレルギーにおける本菌の役割を検証しようと考えた。

## 2. 研究の目的

1. で述べたような背景に基づき、以下のように研究目的を設定した。

(1) 妊娠・授乳期に難消化性オリゴ糖を投与した母マウスから出生した仔マウスの発育初期における腸内細菌叢の特性ならびにその確立経過を分子生物学的手法を用いて記載すると同時に、母マウスを介した仔マウスの腸内細菌叢の変化が腸管粘膜バリアおよび制御性免疫機能の発達ならびに発育後の実験的免疫疾患(アレルギー、炎症性腸疾患、関節炎)の発症・増悪に影響することを証明する。

(2) 異なる品種の米を主成分とする飼料を摂取させたマウスの腸内細菌叢を比較し、米品種特異的に出現する菌種を推定すると同時に、腸内細菌叢の変化が腸管粘膜バリアおよび制御性免疫機能ならびに実験的アレルギーの発症・増悪に影響することを証明する。

(3) 各種のアレルギーモデルを用いて、消化管における *C. albicans* 定着がそれらの発症・増悪を促進することを証明し、これに寄与する菌体成分を探索する。難消化性オリゴ糖を摂取させたマウスの腸内細菌叢において *C. albicans* の酵母増殖および菌糸形成の阻害に寄与する菌種あるいは有機酸を培養実験によって推定する。

## 3. 研究の方法

(1) 妊娠・授乳期にフラクトオリゴ糖(FOS)を摂取させた母マウスから出生した仔マウスの発育初期における腸内細菌叢について、盲腸内容物より細菌 DNA を抽出して 16S rDNA

断片を PCR により増幅し、DGGE により細菌叢のパターンを比較するとともに、クローンライブラリの作成およびリアルタイム PCR により細菌叢の特性を記載する。また、仔マウスの発育後の腸管粘膜バリアを *ex vivo* におけるタンパク透過性ならびに組織化学的観察により評価し、発育後の経口免疫寛容の誘導について、卵白アルブミン(OVA)をモデル抗原として、脾細胞の増殖、血清抗体価および遅延型過敏症を比較する。更に、OVA を抗原としたアレルギー性下痢症、2,4-ジニトロフルオロベンゼン(DNFB)をハプテンとした接触過敏症、トリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎およびコラーゲン誘発関節炎の各免疫疾患モデルを作成し、疾患スコアを比較するとともに、免疫組織化学により局所の炎症性細胞および免疫担当細胞の浸潤を観察する。

(2) 異なる品種の米を主成分とする精製飼料をマウスに摂取させ、(1)と同様の方法を用いて腸内細菌叢を比較するとともに、腸管粘膜バリア、経口免疫寛容の誘導および免疫疾患に及ぼす影響を比較する。

(3) 筆者らが開発した方法(Yamaguchi *et al* 2005 *J Nutr* 135:109)にしたがって *C. albicans* の消化管定着マウスを作成した後、(1)と同様の方法により実験的免疫疾患を誘導し、*C. albicans* 定着の影響を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 妊娠・授乳期に FOS を摂取させた母マウスから出生した仔マウスの盲腸内容物 DNA を用いて 16S rDNA の PCR-DGGE により細菌叢を比較した結果、母マウスの FOS 摂取は腸内細菌叢の垂直伝播を介して仔マウスの腸内細菌叢の形成に影響することが示された。

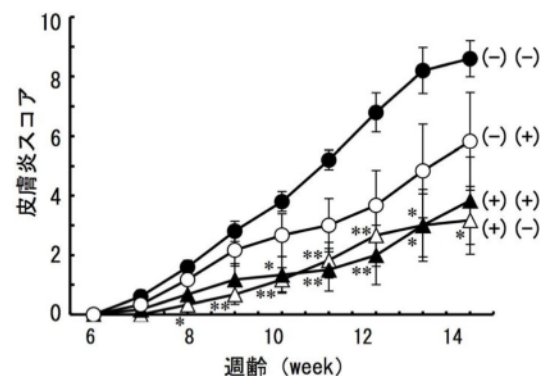


図1 NC/Nga マウスの自然発症皮膚炎モデルにおける皮膚炎スコアの推移 ((-)(-):母マウスを対照飼料で飼育し、仔マウスを離乳後に対照飼料で飼育。(-)(+):母マウスを対照飼料で飼育し、仔マウスを離乳後に FOS 添加飼料で飼育。(+)(-):母マウスを FOS 添加飼料で飼育し、仔マウスを離乳後に対照飼料で飼育。(+)(+):母マウスを FOS 添加飼料で飼育)

育し、仔マウスを離乳後に FOS 添加飼料で飼育。データは 6 頭の平均値 ± 標準誤差で示し、\*は(-)(-)に対して  $p < 0.05$  で有意差あり。)

このことを NC/Nga マウスの自然発症アトピー性皮膚炎モデルに適用したところ、発育後に発症した皮膚炎スコア (図 1) および引っ掻き回数ならびに炎症性サイトカインおよびケモカイン遺伝子発現は、離乳後の FOS 摂取の有無にかかわらず、母マウスが FOS を摂取した仔マウスにおいて低値を示した。この結果は発育初期の腸内細菌叢が発育後のアレルギー発症に影響を及ぼすことを示唆する。一方、DNFB により誘導される接触過敏症モデルにおいては、発育初期の腸内細菌叢よりもむしろ発症時の菌叢の影響が大きいこと、とりわけ *Bifidobacterium pseudolongum* が FOS による接触過敏症抑制に関与することが示唆された。また、母マウスの FOS 摂取は仔マウスの経口免疫寛容の誘導に影響を及ぼさず、むしろ仔マウス自身の FOS 摂取が影響することが示され、経口免疫寛容の誘導には発育初期の菌叢よりもむしろ誘導時の菌叢の影響が大きいと推察された。

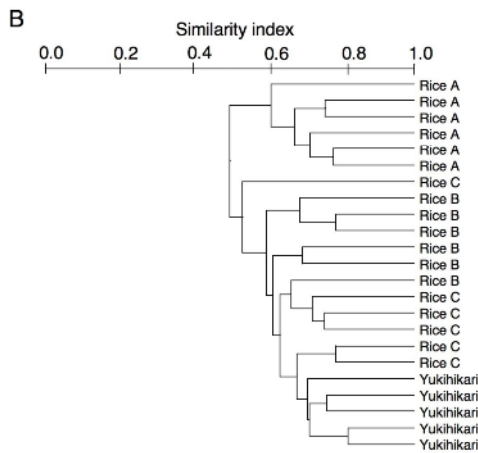
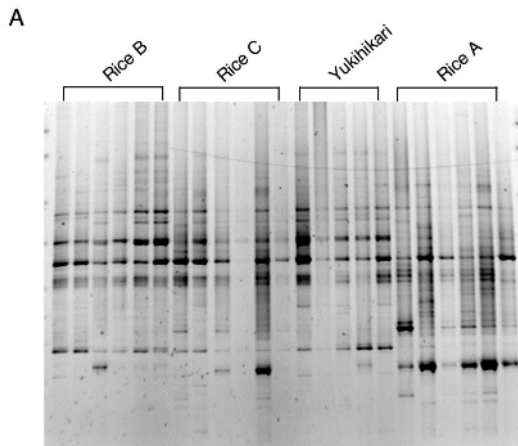


図 2 異なる品種の米を摂取したマウスの腸内細菌叢の比較 (16S rDNA 配列に基づく)

PCR-DGGE 分析(A)と、それに基づく系統樹 (B) )

(2) 異なる品種の米粉を主成分とする精製飼料をマウスに摂取させ、16S rDNA の PCR-DGGE により腸内細菌叢を比較したところ、品種に特有の腸内細菌叢が形成されることが示された (図 2)。16S rDNA のクローンライブラリを構築して解析した結果、ゆきひかり摂取マウスにおいてムチン分解菌である *Akkermansia muciniphila* が少ないことが明らかとなった。また OVA 特異的アレルギー性下痢症モデルにおいては、摂取する米品種が発症に影響することが示され (図 3)、更にゆきひかり摂取マウスでは経口投与した食物抗原に対する血清抗体価は低く推移し、*ex vivo* で測定した腸管のタンパク透過性も低かった。したがってゆきひかり摂取によるアレルギーの抑制・改善は腸管粘膜バリアと関係し、このことに腸内細菌叢の変化が寄与すると推察した。

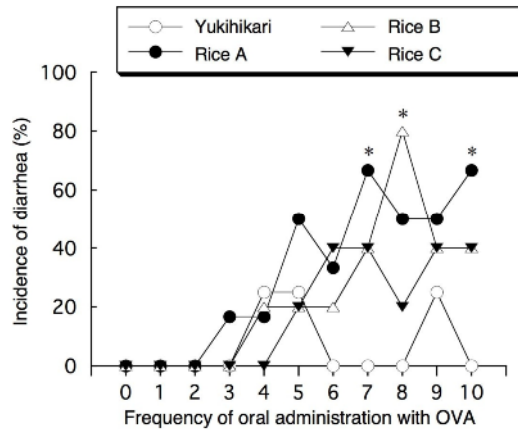


図 3 異なる品種の米を摂取したマウスの OVA 特異的アレルギー性下痢症の発症頻度の推移 (\*は Yukihiikari に対して  $p < 0.05$  で有意差あり)

(3) *C. albicans* 定着マウスにおいて、OVA 特異的アレルギー性下痢症 (図 4)、DNFB 接触過敏症 (図 5) およびコラーゲン誘発関節炎 (図 6) の症状がいずれも増悪することが示された。また、免疫したマウスの脾細胞を *in vitro* で抗原刺激した際に見られる抗原特異的抗体産生が、*C. albicans* 菌体成分の添加によって促進されることを見出し、このことがマウス消化管への *C. albicans* の定着による経口免疫寛容の誘導阻害と関連することを示唆した。更に、マウスおよびラットの盲腸内容物中に *C. albicans* の菌糸形成を促進する活性があることを見出し、活性成分が腸内細菌によって産生されることを示唆した。



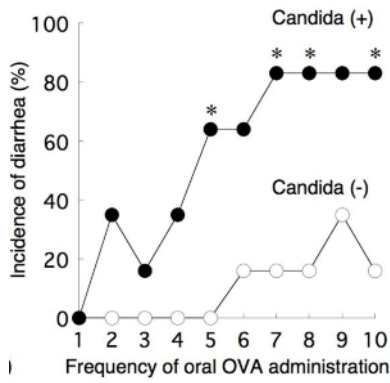


図4 *C. albicans* の消化管定着が OVA 特異的アレルギー性下痢症に及ぼす影響 (\*は  $p < 0.05$  で有意差あり)

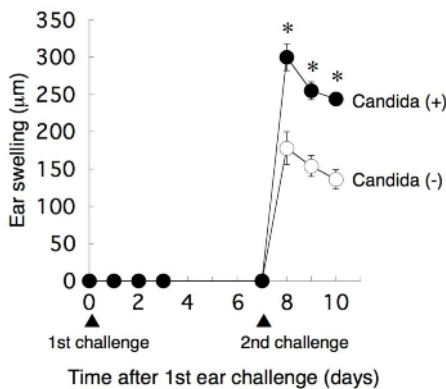


図5 *C. albicans* の消化管定着が DNFB 特異的接触過敏症 (耳介肥厚) に及ぼす影響 (データは 6 頭の平均値 ± 標準誤差で示し、\*は  $p < 0.05$  で有意差あり)

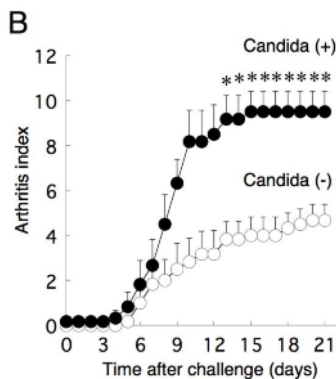
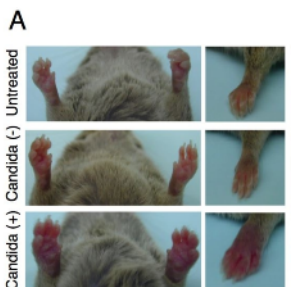


図6 *C. albicans* の消化管定着がコラーゲン

誘発関節炎に及ぼす影響 (典型的な前肢の肥厚 (A) と関節炎スコアの推移 (B))。データは 6 頭の平均値 ± 標準誤差で示し、\*は  $p < 0.05$  で有意差あり)

## 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 5 件)

園山慶 (2009) アレルギーを予防する難消化性オリゴ糖、*フードリサーチ* 645: 44-47 (査読無)

Pirapatdit, S., Kishino, E., Fujita, K., Hashimoto, H., Mori, S., Saito, S., Sato, T., Watanabe, J. and Sonoyama, K. (2008) Dietary  $\alpha$ -linked galacto-oligosaccharide suppresses ovalbumin-induced allergic peritonitis in BALB/c mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72: 1901-1907 (査読有)

Watanabe, J., Sasajima, N., Aramaki, A. and Sonoyama, K. (2008) Consumption of fructo-oligosaccharide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *British Journal of Nutrition* 100: 339-346 (査読有)

Fujiwara, R., Watanabe, J. and Sonoyama, K. (2008) Assessing changes in composition of intestinal microbiota in neonatal BALB/c mice through cluster analysis of molecular markers. *British Journal of Nutrition* 99: 1174-1177 (査読有)

園山慶 (2008) 難消化性オリゴ糖によるアレルギーの予防・改善、*アレルギー・免疫* 15: 28-35 (査読無)

[学会発表] (計 17 件)

園山慶、難消化性糖類による腸内細菌叢の制御を介したアレルギー疾患予防の試み、日本食物繊維学会第 13 回学術集会シンポジウム、2008 年 11 月 21 日、独立行政法人 国立健康・栄養研究所 (東京)

園山慶、難消化性糖類による腸内細菌叢の制御を介したアレルギー疾患予防の試み、日本農芸化学会北海道支部第二回合同学術講演会シンポジウム、2008 年 11 月 8 日、とかちプラザ (帯広市)

小笠原達、異なる品種の米を摂取したマウスの腸管粘膜バリア及び免疫応答の比較、日本農芸化学会北海道支部第一回合同学術講演会、2008 年 8 月 9 日、北海道大学 (札幌市)

吉田知世、フラクトオリゴ糖摂取がマウスの経口免疫寛容誘導に及ぼす影響、日本農芸化学会北海道支部第一回合同学術講演会、2008年8月9日、北海道大学(札幌市)

Kei Sonoyama, Mechanism for elimination of *Candida albicans* by dietary fructo-oligosaccharide in the colon of BALB/c mice, 6th International Fructan Symposium, 2008年7月30日、ホテルモントレエーデルホフ札幌(札幌市)

Reiko Fujiwara, Dietary fructo-oligosaccharide in mouse dam influences gut microbiota and allergic dermatitis in her offspring, 6th International Fructan Symposium, 2008年7月30日、ホテルモントレエーデルホフ札幌(札幌市)

Naho Sasajima, Consumption of fructo-oligosaccharide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice, 6th International Fructan Symposium, 2008年7月30日、ホテルモントレエーデルホフ札幌(札幌市)

小笠原達、米品種はマウスの経口抗原に対する抗体産生に影響する、日本食品免疫学会2008年度大会、2008年5月13日、こまばエミナス(東京)

後藤悠、フラクトオリゴ糖がマウスのTNBS誘発大腸炎およびコラーゲン誘発関節炎に及ぼす影響、日本食品免疫学会2008年度大会、2008年5月13日、こまばエミナス(東京)

小笠原達、異なる品種の米を摂取させたマウスの腸内細菌叢の解析、2008年5月4日、女子栄養大学(坂戸市)

三木篤子、*Candida albicans*の消化管定着がマウスのコラーゲン誘発関節炎に及ぼす影響、2008年5月3日、女子栄養大学(坂戸市)

藤原麗子、フラクトオリゴ糖摂取による接触皮膚炎抑制効果の反応機構の解析、日本農芸化学会2008年度大会、2008年3月28日、名城大学(名古屋市)

三木篤子、フラクトオリゴ糖(FOS)摂取がマウス結腸粘膜への*Candida albicans*接着に及ぼす影響、日本農芸化学会2008年度大会、2008年3月27日、名城大学(名古屋市)

園山慶、食物アレルギーの増悪因子としての常在真菌 *Candida albicans* と食餌によるその制御、日本栄養・食糧学会中部支部大会シンポジウム、2007年7月14日、静岡大学(静岡市)

Naoki Takemura, Development of Peyer's patch is impaired by c-kit mutation but restored by dietary

raffinose in mice, 日本食品免疫学会2007年度大会、2007年7月11日、品川プリンスホテル(東京)

Atsuko Miki, Elimination of *Candida albicans* by dietary fructo-oligosaccharide is not mediated by short chain fatty acids in mouse colon, 日本食品免疫学会2007年度大会、2007年7月11日、品川プリンスホテル(東京)

Reiko Fujiwara, Fructo-oligosaccharide in maternal diet influences intestinal microbiota and severity of allergic dermatitis in offspring of mice, 日本食品免疫学会2007年度大会、2007年7月10日、品川プリンスホテル(東京)

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/fbc/sonoyama/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園山 慶 (SONOYAMA KEI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：90241364

### (2) 研究分担者

渡辺 純 (WATANABE JUN)

北海道大学・創成科学共同研究機構・特任准教授  
研究者番号：10374729

### (3) 連携研究者

なし