

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07164

研究課題名(和文)腸内細菌叢に影響する薬剤の服用による食物抗原の吸収とアレルギー発症への影響解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of drugs affecting the community composition in the intestinal microflora on the absorption of food allergens and the development of allergy

研究代表者

横大路 智治 (Yokooji, Tomoharu)

広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授

研究者番号：70389120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我が国における食物アレルギーの罹患率は増加傾向にある。近年、腸内細菌叢を形成する常在細菌種の構成比率の変化が、アレルギー疾患の発症に関連する可能性が疫学研究で明らかになりつつある。本研究では、抗菌薬による腸内細菌種の構成比率の変動が、食物アレルギーの発症に関与しているのかをラットモデルで解析した。飲水中にバンコマイシンまたは抗菌薬カクテル(バンコマイシン/アンピシリン/カナマイシン)を混合して投与した場合、一部腸内細菌叢の変動が確認された。一方、抗菌薬の投与は、ラットモデルにおける卵白アルブミンの感作を低下させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果では、抗菌薬の服用による腸内細菌叢の変化とアレルギー疾患の増加との関連性を明確に示すことができなかった。一方で、抗菌薬の服用によりOVAの感作は減少傾向を示したことから、ラットモデルにおいて抗菌薬の服用により変動した細菌種を網羅的に解析することで、アレルギー疾患の予防に有用な知見が得られる可能性がある。抗菌薬の使用とアレルギー疾患の発症との関連性を明らかにすることで、食物アレルギーの予防や新規治療法の開発に手がかりが得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of food allergy has increased in Japan. Some epidemiological studies have showed that changes in community composition in the intestinal microflora might cause the development of allergic diseases. In this study, we examined the effect of antibiotics including vancomycin, ampicillin and kanamycin on the community composition in the intestinal microflora and the sensitization to egg white allergen, ovalbumin. As the results, oral administration of vancomycin, ampicillin and kanamycin altered the community composition in the intestinal microflora partly and decreased the sensitization of ovalbumin in the rat model.

研究分野：医療薬学

キーワード：食物アレルギー 抗菌薬 腸内細菌 感作

1. 研究開始当初の背景

我が国における食物アレルギーの罹患率は増加傾向にある。食物アレルギーの罹患率の増加に関する研究では、遺伝的な要因や「衛生仮説」など環境要因に関する疫学的な報告が多くなされている¹⁾。しかしながら、食物アレルギーの発症要因となる決定的な遺伝子は同定されておらず、実験動物を用いた基礎的研究も少ないことから、食物アレルギー疾患の増加を裏付ける決定的な要因は明らかにされていない。

近年、腸内細菌叢を形成する常在細菌種の構成比率の変化が、炎症性腸疾患や過敏性腸症候群、糖尿病、肥満、自己免疫疾患および精神疾患などの発症に関連していることが明らかにされている。また、腸内細菌叢における常在細菌種の構成比率の変化は、アレルギー疾患の発症にも関連することが報告されている²⁾。例えば、Björkstén らは 2 歳までにアレルギー疾患を発症した児では健常児と比較して *Enterococcus* や *Bifidobacterium* などの腸内細菌の検出率が低く、*Clostridium* や *Staphylococcus aureus* の検出率が高いことを報告している²⁾。また、Sonnenburg らは、長期にわたる腸内細菌叢の変動は次世代においても引き継がれることを報告している³⁾。これらの報告は、腸内細菌叢を形成する常在細菌種の構成比率の変化が抗原の感作を助長し、数世代にわたる食物アレルギーの発症に関与する可能性を示唆している。

Peng らを含む多くの研究者により、一部の腸内細菌が消化管のタイトジャンクション (TJ) の形態維持に関与していることが報告されている⁴⁾。我々はこれまでに、運動負荷や非ステロイド性抗炎症薬の服用などの食物抗原の吸収量を増加させる因子が、抗原の感作を助長する可能性があることを明らかにしてきた。これらの知見から、抗菌薬などの腸内細菌叢を形成する常在細菌種の構成比率を変化させる薬剤の服用が TJ の形態維持に傷害を与え、食物抗原の吸収や感作を助長させると予想される。しかしながら、抗菌薬による腸内細菌種の構成比率の変動が、抗原吸収の増加や食物アレルギーの発症に関与していることを動物実験で示した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌叢を形成する常在細菌種の構成比率に変動をもたらすと考えられる薬剤の服用が抗原の吸収と感作におよぼす影響を分子・細胞レベルで明らかにすることを目的として、抗菌スペクトルの異なるバンコマイシン (VCM)、アンピシリン (ABPC) 及びカナマイシン (KM) の服用が卵白アルブミン (OVA) の感作におよぼす影響について、ラットモデルを用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) OVA の腹腔内感作におよぼす抗菌薬の影響解析

感作実験は、図 1 に示すプロトコールに従って実施した。生理食塩水に OVA を 4 mg/mL の濃度になるように溶解した。この溶液を Imject® Alum [10 mg/mL Al(OH)₃, 10 mg/mL Mg(OH)₂, Thermo Scientific] とともに週 1 回の頻度で 3 回、雌性 Brown Norway 系ラット (4 週齢) の腹腔内に 0.5 mL 投与した。OVA の感作におよぼす抗菌薬の影響を解析するため、感作開始 2 日前より、コントロール群は通常の飲水、VCM 投与群は VCM (500 mg/L) を含む飲水、抗菌薬カクテル投与群は VCM (500 mg/L)、ABPC (1 g/L) 及び KM (1 g/L) を含む飲水で実験終了 (56 Day) まで飼育した。OVA の感作を開始後 (0 Day)、56 Day まで 14 日間隔で頸静脈から採血を行い、採取した血液を遠心分離することで血漿を得た。感作の成立は、血漿中の OVA 特異的 IgE 及び IgG₁ 抗体価を測定することで評価した。また、腸内細菌叢を形成する常在細菌種の変化を確認するため、抗菌薬の投与開始前 (-2 Day) と実験最終日 (56 Day) の糞便を採取した。

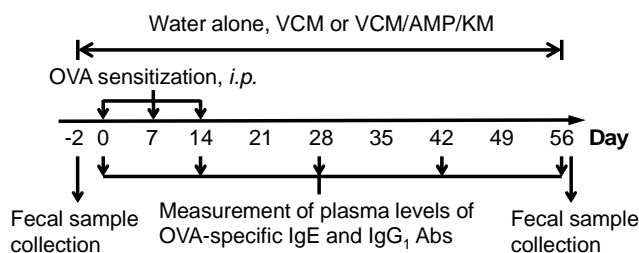


図 1 OVA の感作と抗菌薬の影響解析プロトコール

(2) リアルタイム PCR による糞便中細菌の検出

QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて、凍結した糞便から全 DNA を抽出した。抽出した DNA 中に含まれる全 16S rDNA 量及び *Bacteroides*、*Clostridium coccoides*、*Enterococcus spp.*、*Escherichia coli* 及び *Lactobacillus spp.* の 16S rDNA 量をリアルタイム PCR 法で定量した。各 16S rDNA 量の変化は、実験最終日の糞便試料から得られた Ct 値から抗菌薬投与開始前の糞便試料から得られた Ct 値を減じた値を Ct とし、各処置における 2^{-Ct} 値を比較した。

(3) 血漿中 OVA 特異的 IgE 及び IgG₁ 抗体価の測定 (ELISA 法)

OVA 特異的 IgE 及び IgG₁ 抗体価は、ELISA 法で測定した。IgE の測定については、1 µg/mL の抗ラット IgE 抗体 (MARE-1, GeneTex) で固相化したプレートに 200 倍に希釈したラット血漿を添加し、ビオチン標識 OVA (2 µg/mL) および 5000 倍希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (Proteintech) と 1 時間ずつ反応させた。IgG₁ の測定については、1 µg/mL の OVA 溶液で固相化したプレートに 30,000 倍に希釈したラット血漿を添加した後、100,000 倍希釈した HRP 標識抗ラット IgG₁ 抗体 (Bethyl Laboratories) と反応させた。反応の検出は、基質に 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 溶液を用いて 450 nm の波長で測定した。

4. 研究成果

(1) 糞便中の 16S rDNA 量におよぼす抗菌薬の影響解析

飲水中に VCM のみまたは 3 種の抗菌薬カクテル (VCM/ABPC/KM) を混合して投与した場合、感作開始後 56 日目で抗菌薬を混合していない飲水を投与した群 (コントロール群) との全 16S rDNA 量の有意な差は認められなかった (図 2)。一方、VCM のみを投与した群では、*Escherichia coli* の顕著な増加と *Clostridium coccoides* の減少が認められた。VCM は *Clostridium* 及び *Enterococcus* の一部に対する抗菌作用を示す薬剤である。したがって、*Clostridium coccoides* の減少は、VCM の服用による直接的な抗菌作用に由来すると考えられる。一方、抗菌薬カクテル投与群においては、*Bacteroides* と *Escherichia coli* の顕著な増加と *Clostridium coccoides* の減少が認められた。ABPC は *Enterococcus* に対して、KM は *Enterococcus* 及び *Escherichia coli* に対して、それぞれ抗菌作用を示す薬剤である。本研究の結果からは、*Bacteroides* や *Escherichia coli* の 16S rDNA の量が増加した要因を明らかにすることはできていない。本研究で用いた抗菌薬の対象となる腸内細菌種が減少した結果、共生菌により生育が抑制されていた *Bacteroides* の数が二次的に増加した可能性が考えられる。したがって、抗菌薬の投与による腸内細菌種の変化と使用した抗菌薬の抗菌スペクトルは必ずしも一致しないと考えられる。

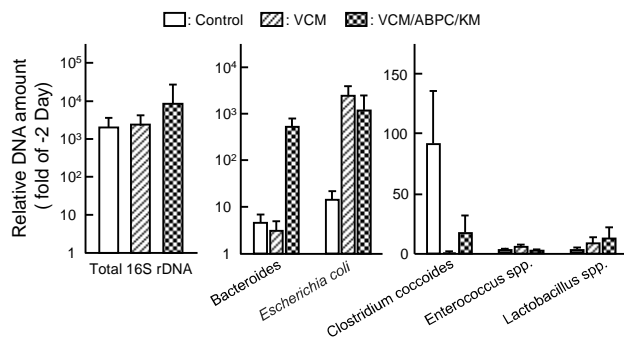


図 2 ラット糞便中の各細菌 16S rDNA 量におよぼす各種抗菌薬の影響 (感作 56 日目) Mean ± SE (n=10-11).

(2) OVA の感作に及ぼす抗菌薬の影響解析

OVA を腹腔内に 3 回投与した場合、投与開始 14 日目より血漿中 OVA 特異的 IgE 抗体価は増加し、28 日目には一定値を示した (図 3A)。VCM 単独投与群や抗菌薬カクテル投与群においても投与 14 日目より血漿中 OVA 特異的 IgE 抗体価は増加し、28 日目ではほぼ定常値を示した。このとき、VCM 単独投与群や抗菌薬カクテル投与群の OVA 特異的 IgE 抗体価は、いずれもコントロール群の抗体価よりも低い傾向を示した。一方、両群の OVA 特異的 IgG₁ 抗体価はコントロール群との差は認められなかった (図 3B)。Russell らは、マウスに VCM のみを飲水投与した場合、腹腔内感作後の血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価が増加したことを報告している⁵⁾。また、疫学調査においても、乳幼児期の抗菌薬曝露がアレルギー疾患の発症リスクを上昇させやすいことが報告されている²⁾。本研究の結果は、これらの研究報告と反する結果であった。この

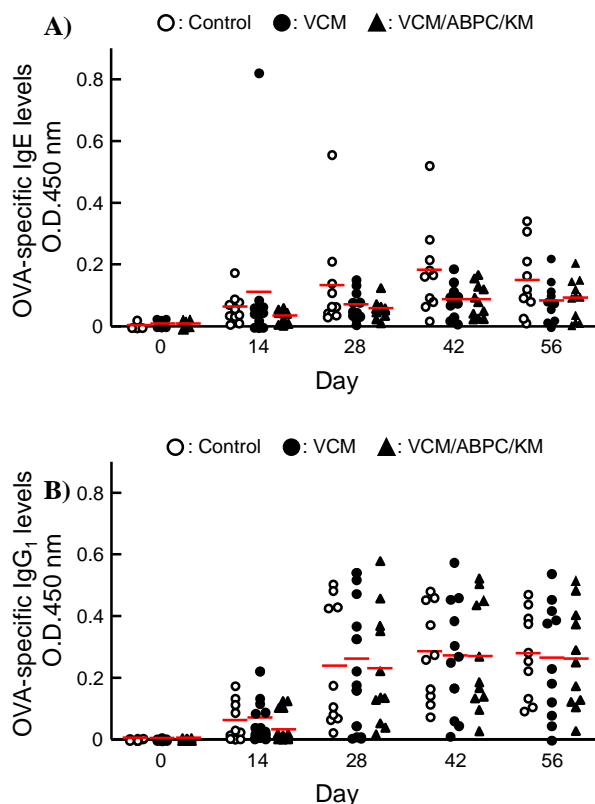


図 3 ラット血漿中の OVA 特異的 IgE (A) 及び IgG₁ (B) 抗体価におよぼす各種抗菌薬の影響 赤線は平均値を示す。(n=10-11).

原因は不明であるが、ラットとマウス、ヒトの腸内細菌叢を構成する細菌種の違いや抗菌薬の影響の違いが関与している可能性が考えられる。今後、マウスモデルでも同様の解析を行い、両者の結果の違いを明らかにする必要があると考える。

(3) まとめ

本研究の結果では、抗菌薬の服用による腸内細菌叢の変化とアレルギー疾患の増加との関連性を得ることができなかった。その要因として、抗菌薬の服用による腸内細菌叢の変動がマウスやヒトとは異なる可能性が示唆された。一方で、抗菌薬の服用により OVA の感作は減少傾向にあることから、ラットモデルにおいて抗菌薬の服用により変動した細菌種を網羅的に解析することで、アレルギー疾患の予防に有用な知見が得られる可能性がある。本研究の問題点として、腸内細菌叢を構成する一部の菌種しか解析を行っていないことや、離乳期以降のラットに対する抗菌薬曝露の影響しか検討できていないことが挙げられる。疫学調査においても、乳幼児期の抗菌薬曝露がアレルギー疾患の発症リスクを上昇させやすいことが報告されており^{6,7)}、今後、乳児期のラットに対する抗菌薬の影響を解析する必要があると考える。さらに、全菌種を対象とした網羅的解析を行うことで、本研究では検討できなかった他の腸内細菌叢と感作の影響を解明することが可能である。今後、抗菌薬の使用とアレルギー疾患の発症との関連性を明らかにし、アレルギー疾患の病態解明につなげたい。

引用文献

- 1) Strachan, DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989; 299: 1259–60.
- 2) Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year old children. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29: 342–6.
- 3) Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*. 2016; 529: 212–5.
- 4) Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*. 2009; 139: 1619–25.
- 5) Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, Gill N, Blanchet MR, Mohn WW, McNagny KM, Finlay BB. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep*. 2012; 13: 440–7.
- 6) Yamamoto-Hanada K, Yang L, Narita M, Saito H, Ohya Y. Influence of antibiotic use in early childhood on asthma and allergic diseases at age 5. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017; 119: 54–8.
- 7) Marra F, Marra CA, Richardson K, Lynd LD, Kozyrskyj A, Patrick DM, Bowie WR, Fitzgerald JM. Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma. *Pediatrics*. 2009; 123: 1003–10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Koga Y, Yokooji T, Ogino R, Taogoshi T, Takahagi S, Ishii K, Chinuki Y, Morita E, Hide M, Matsuo H	4. 巻 71
2. 論文標題 A novel detection method for cross-linking of IgE-receptors by autoantibodies in chronic spontaneous urticaria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 94 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2021.08.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akimoto S, Yokooji T, Ogino R, Chinuki Y, Taogoshi T, Adachi A, Morita E, Matsuo H	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of allergens for food-dependent exercise-induced anaphylaxis to shrimp	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84752-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogino R, Chinuki Y, Yokooji T, Takizawa D, Matsuo H, Morita E	4. 巻 70
2. 論文標題 Identification of peroxidase-1 and beta-glucosidase as cross-reactive wheat allergens in grass pollen-related wheat allergy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 215 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Furuta T, Tanaka K, Tagami K, Matsui T, Sugiura S, Kando N, Kanie Y, Naito M, Izumi H, Tanaka A, Sjoelander S, Yokooji T, Matsuo H, Ito K	4. 巻 75
2. 論文標題 Exercise induced allergic reactions on desensitization to wheat after rush oral immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 1414 ~ 1422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogino R, Yokooji T, Omoto A, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H	4. 巻 68
2. 論文標題 Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the egg allergen ovalbumin in rat plasma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 372 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Y, Yokooji T, Ninomiya N, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H	4. 巻 20
2. 論文標題 Evaluation of the allergenicity of 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima T, Yokooji T, Hirano T, Kataoka Y, Taogoshi T, Matsuo H	4. 巻 14
2. 論文標題 Aspirin enhances sensitization to the egg-white allergen ovalbumin in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0226165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0226165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 古賀 祐基, 横大路 智治, 荻野 龍平, 埜越 崇範, 高萩 俊輔, 石井 香, 千貫 祐子, 森田 栄伸, 秀 道広, 松尾 裕彰
2. 発表標題 高親和性IgE 受容体の架橋検出による自己免疫性蕁麻疹の新規検査法の有用性
3. 学会等名 第23回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國本 恭平, 山田 行徳, 猪口 紘生, 大橋 凌, 埜越 崇範, 横大路 智治, 松尾 裕彰
2. 発表標題 食物アレルギーに対する経口免疫寛容および脱感作モデルラットの作製
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小別所 貴弘, 大本 亜沙妃, 埜越 崇範, 横大路 智治, 松尾 裕彰
2. 発表標題 質量分析装置を用いた食品中小麦 -グリアジン定量法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Fukushima, Tomoharu Yokooji, Taiki Hirano, Yuta Kataoka, Takanori Taogoshi, Hiroaki Matsuo
2. 発表標題 Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on sensitization to the egg-white allergen ovalbumin in rats
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukinori Yamada, Tomoharu Yokooji, Naoki Ninomiya, Takanori Taogoshi, Eishin Morita, Hiroaki Matsuo
2. 発表標題 Evaluation of the allergenicity and induction ability for oral tolerance of 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀 祐基 , 横大路 智治, 濱田 貴行, 中山 史菜, 内藤 瑞季, 千貫 祐子, 森田 栄伸, 松尾 裕彰
2. 発表標題 抗原架橋能検出による自己免疫性慢性蕁麻疹の新規検査法の開発
3. 学会等名 日本皮膚科学会第138回山陰・第34回島根合同開催地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eishin Morita, Ryohei Ogino, Yuko Chinuki, Tomoharu Yokooji, Hiroaki Matsuo
2. 発表標題 Establishment of wheat peroxidase I-specific IgE test to identify wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis developed by sensitization to grass pollen
3. 学会等名 49th European Society for Dermatological Research (ESDR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 横大路 智治, 乾 賢一, 赤池 昭紀, 稲垣 直樹, 川合 眞一 他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 336
3. 書名 呼吸器 / 免疫・炎症・アレルギー / 骨・関節	

〔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

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