

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500709

研究課題名(和文) 食生活が腸管の健康とアレルギー発症におよぼす影響についての研究

研究課題名(英文) Influence of dietary habits on gut health and occurrence of allergic diseases

研究代表者

片岡 佳子 (KATAOKA KEIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：40189303

研究成果の概要(和文)：

徳島大学病院皮膚科外来にて軽度のアトピー性皮膚炎と診断された患者の自然排泄便の菌叢を Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism 法と培養法により解析した。食物摂取頻度調査票を用いて調べた被験患者の食生活には特に偏りはなかったが、菌叢のパターンは健常人とも潰瘍性大腸炎患者とも異なっていた。また、糞便中の総菌数、好気性菌の生菌数は健常人と同程度であり、潰瘍性大腸炎のような菌叢の多様性の減少は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：

Fecal microbiota in atopic dermatitis patients, who were diagnosed in Tokushima University hospital, was analysed by Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) method and culture method. Dietary habits in the subjects were balanced. However, T-RF patterns in their fecal microbiota were different from those in healthy control and ulcerative colitis patients, and the number of T-RFs was not decreased. Total number of bacteria and viable cell number of aerobic bacteria was the same level as healthy control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

## 1. 研究開始当初の背景

近年、アレルギー性疾患や過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎などの慢性腸疾患が増加しているが、食生活の乱れによる腸内環境の悪化がその要因のひとつと考えられる。腸管は外界から栄養を獲得するための器官であるが、生

体内への病原菌や異物の侵入を防ぐため腸管上皮細胞間を強固に結びつけて物理的なバリアーを作り、さらに分泌型 IgA や抗菌ペプチドを含む粘液を分泌している。腸管内に常在する多種多様の腸内菌は腸管組織や腸管免疫系の発達を刺激し、有害病原菌の定着や侵入

の阻害に寄与している。また、ヒトに必要なビタミンや大腸粘膜の栄養源となる短鎖脂肪酸を合成している。一方、常在菌自身に対しては過剰な免疫応答が起こらないように宿主粘膜細胞にシグナルを送り、絶妙なバランスを保ってヒトと共生している。このような腸内菌との共生関係が健全に保たれることはヒトの健康保持の上で重要である。しかしながら、ヒトの腸内菌叢は、食事、加齢、運動、ストレス、感染症などの要因により影響を受ける。腸内菌の変化によって腸管細胞に対して毒性を示す代謝産物が増加すると腸内環境は悪化する。食生活の乱れにより腸内菌のバランスが崩れやすくなったヒトではこの絶妙な共生関係が保たれにくく、ストレスの増加などが重なると容易にアレルギー疾患や腸疾患などの発症、増悪がおこる可能性が考えられる。そこで、本研究では20~30歳代の若年者について、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を持つ人と持たない人の間に腸内菌叢の相違があるのかどうか、相違がある場合には食生活に食物繊維の不足やショ糖の過剰摂取などの偏りがあるのかどうか、また便通異常などはないか等を指標として、食生活と腸内菌を含めた腸内環境の関連を検討することにした。

## 2. 研究の目的

健康成人（おもに20~30歳代）の食生活と腸内環境およびアトピー性皮膚炎等アレルギー症状の有無や重症度との関連を明らかにする。被験者の糞便中腸内菌の種類と量および糞便中に産生される腸内菌由来の代謝産物を測定し健康人との相違があるのかどうか調べる。食生活の内容と便秘や腹部膨満感などの便通異常やアレルギー症状の起こりやすさは、関連があるのかどうか、腸内菌の構成や腸内環境の異常との関連があるのかどうかを解析する。便秘やアレルギー症状を起こしやすい腸内環境というものがあるのかどうか、それとも特定の腸内菌の存在がそれらに関係するのかどうか、食生活（特にショ糖の過剰摂取、食物繊維の不足）との関連も含めて明らかにする。

## 3. 研究の方法

「食生活が腸管の健康とアレルギー発症に及ぼす影響についての臨床研究」を計画し、徳島大学附属病院倫理審査委員会により承認された（承認番号721、2008年9月22日）。計画に従って以下の(1)~(4)を実施した。(1)徳島大学病院皮膚科外来にてアトピー性皮

膚炎の診察を行い、Dermatology Life Quality Index (DLQI) と Visual analogue scale (VAS) を用いた皮膚の痒みの評価を行い、アトピー性皮膚炎の重症度を評価した。(2)食物摂取頻度調査票による食生活のアンケート調査を行い、「エクセル栄養君」を用いた解析によって食生活内容を調べた。(3)自然排泄便の菌叢をTerminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)法および培養法により解析した。腸内菌叢のパターンの比較のためにBionumericsによるクラスタリングを行った。糞便中の有機酸の定量にはガスクロマトグラフを用いた。糞便中の分泌型IgA濃度はELISAキットを用いて測定した。

(4)腸管の透過性を調べるため、被験者にマンニトール 2.0g -ラクチュロース 7.5g の混合物を服用してもらった。服用前と服用後0-5時間の尿を提供してもらい、吸収排泄された糖をtrimethylsilyl 化処理後ガスクロマトグラフにより定量した。難吸収性のラクチュロースのマンニトールに対する尿中排泄量比(L/M)を透過性の指標とした。(1)~(4)を被験者1名につき3回行った後、被験者の皮膚炎スコアとのマッチングを行った。

平成20~21年度の軽度のアトピー性皮膚炎患者で、腸内菌叢の構成が健康人とは異なるが、相違に関係する菌種の特定はできなかった。ADや食物アレルギー患者では腸管のバリア機能が低下しているとの報告がある一方、腸内菌による食物繊維の発酵代謝により生成する短鎖脂肪酸、特に酪酸は大腸上皮細胞の増殖、分化を促進し、腸管バリア機能を高める作用が報告されている。そこで腸内菌のうちどの菌種が腸内環境を良好に保つ上で重要であるのかを明らかにするため、無菌マウスにマウス腸管内から分離した主要構成菌を定着させ、腸管組織の観察と盲腸内の短鎖脂肪酸の定量を行った。ICRマウスの盲腸内容物から嫌気培養により種々の腸内菌を分離し、主要分離菌のうち7種類の菌を16S ribosomal RNA 遺伝子のシーケンスの相同性に基つき、Bacteroides 属、Porphyomonadaceae 科、Alistipes 属、Lactobacillus 属、Anaerotruncus 属、Lachnospiraceae 科と同定した。最優勢菌のうち Clostridium 属およびその近縁菌種は高度酸素感受性であるため今回はわずかしかな分離できなかった。これらの分離菌を無菌

マウスに胃内投与して3週間以上ビニルアイソレータ内で飼育後、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸をガスクロマトグラフで定量した。腸管組織の形態はホルマリン固定しHE染色により観察した。また、マウス盲腸内容物中の有機酸の定量はヒトの便検体と同様に行った。

#### 4. 研究成果

「食生活が腸管の健康とアレルギー発症に及ぼす影響についての臨床研究」について同意取得できた被験者について、①アトピー性皮膚炎の症状のスコア化、②食生活調査アンケートへの回答の分析③自然排泄便の菌叢の解析④腸管の透過性テストを3セット行った。食物摂取頻度調査の結果、今回の被験者の食生活の内容には特に偏りはなく、食物繊維の摂取量やショ糖の摂取量は一般健康成人とほぼ同じであった。今回の糞便中の総菌数、培養法によるEnterobacteriaceae(大腸菌を主とする)や好気性グラム陽性球菌の生菌数には健康人との間で有意差はなかった。Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)法により解析したアトピー患者の腸内菌叢のパターンをBionumericsによりクラスタリングすると、健康人とも潰瘍性大腸炎患者とも異なるクラスターを形成したので、菌叢は異なっていると考えられる。T-RFピーク数は、健康人よりも多く、潰瘍性大腸炎のような菌叢の多様性の減少は見られなかった。また、糞便中の短鎖脂肪酸の濃度にも有意差はなかった。腸管の透過性の指標として測定した尿中排泄されたlactulose/mannitolの比は既報中の健康人の値と同程度であった。糞便中のsIgA濃度は192.3~12721.2μg/gであった。これらの解析結果と被験者の皮膚炎スコアのマッチングを行ったが、被験者がいずれも軽症であったため、また、被験者のサンプル数が少なかったため、アトピー患者に特徴的な腸内菌あるいは腸内環境があるのかどうかを結論付けることはできなかった。ヒトの腸内菌叢は非常に個体差が大きく菌叢の違いとアレルギー発症の関連を結びつけるのは困難であったので、平成22年度は動物モデルを用いた検討を行った。まずアトピー性皮膚炎モデル(NC/JicJc1マウスにダニ抗原エキスを塗布)を用い、飼料中の食物繊維の増量による症状の抑制効果を検討したが、ダニ抗原による皮

膚炎の誘導が非常に強く、食物繊維の添加による皮膚炎スコアの改善および血清中IgE濃度の抑制は見られなかった。

アトピー性皮膚炎や食物アレルギー患者では腸管のバリア機能が低下しているとの報告がある一方、腸内菌による食物繊維の発酵代謝により生成する短鎖脂肪酸、特に酪酸は大腸上皮細胞の増殖、分化を促進し、腸管バリア機能を高める作用が報告されている。そこで腸内菌のうちどの菌種が腸内環境を良好に保つ上で重要であるのかを明らかにするため、無菌マウスにマウス腸管内から分離した主要構成菌を定着させ、腸管組織の観察と盲腸内の短鎖脂肪酸の定量を行った。ICRマウスの盲腸内容物から嫌気培養により種々の腸内菌を分離し、主要分離菌のうち7種類の菌を16Sribosomal RNA遺伝子のシーケンスの相同性に基づき、Bacteroides属、Porphyomonadaceae科、Alistipes属、Lactobacillus属、Anaerotruncus属、Lachnospiraceae科と同定した。最優勢菌のうちClostridium属およびその近縁菌種は高度酸素感受性であるため今回はわずかしから分離できなかった。これらの分離菌を無菌マウスに胃内投与して3週間以上ビニルアイソレータ内で飼育後、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸を定量したところ短鎖脂肪酸は生成していたが、SPFマウス糞便を投与してもそのSPFとほぼ同じ菌叢を形成させた場合に比べて酪酸が少なかった。腸管組織の形態をHE染色により観察したところ、SPF糞便を投与した無菌マウスではSPFマウスと同様になっていたが、分離菌を投与した無菌マウスではSPFマウスとは異なっていた。以上の結果から、腸内環境が完全な状態に調えられ良好に保たれるためには、Clostridium属およびその近縁菌種の存在とそれらの菌種による酪酸など有機酸の産生活性が重要である可能性がある。今回のアトピー性皮膚炎患者では潰瘍性大腸炎の場合のような菌叢の多様性の低下は見られなかったが、今後症状の重い患者についても腸内菌叢を調べていく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ①Production of apoptosis-inducing substances from soybean protein by *Clostridium butyricum*: Characterization of their toxic

effects on human colon carcinoma cells. Arimochi H., Morita K., Nakanishi S., Kataoka K., et al. Cancer Letter 277, 190-198 (2009) 査読有り

- ② Inhibitory effects of fermented brown rice on induction of acute colitis by dextran sulfate sodium in rats. Kataoka K., Ogasa S., Kuwahara T., Bando Y., Hagiwara H., Arimochi H. et al. Digestive Diseases and Sciences 53, 1601-1608 (2008) 査読有り

[学会発表] (計2件)

- ① 潰瘍性大腸炎患者の腸内菌叢および腸内環境の解析 根本英幸、井形和枝、片岡佳子、有持秀喜、大西克成、桑原知巳 第82回日本細菌学会総会 2009年3月13日(名古屋)

- ② 酪酸菌が大豆タンパク質から産生するアポトーシス誘導物質について 有持秀喜、中西崇介、片岡佳子、桑原知巳 第82回日本細菌学会総会 2009年3月13日(名古屋)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 佳子 (KATAOKA KEIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師  
研究者番号：40189303

### (2) 研究分担者

有持 秀喜 (ARIMUCHI HIDEKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：30311822