

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450170

研究課題名(和文) 免疫バランス改善に有効な熱量・脂肪酸組成・PFC比を考慮した次世代型日本食の確立

研究課題名(英文) Establishment of the next generation type Japanese food-style which considered calorie, fatty acid and PFC ratio, effective in immune-balance improvement

研究代表者

石川 祐子 (ISHIKAWA, Yuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門 食品健康機能研究領域・ユニット長

研究者番号：40353940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵白アルブミン特異的なT細胞を発現するトランスジェニックマウス(D011.10)を用い、高脂肪食と高シヨ糖食、及びこれらのコントロール食を離乳直後から長期投与する、あるいは成熟後に短期投与する系を作成し、脾臓細胞や腹腔マクロファージ細胞の免疫応答性を検討した。これらの投与は、抗原特異的なサイトカインあるいは抗体の産生量、脾臓細胞の増殖活性など免疫応答性に影響を与えることが確認され、特に高脂肪食は、短期の投与でも免疫応答性を変化させることが認められた。また、投与開始直後にドラスティックな変化が起きるものの、投与を継続することにより、ホメオスタシスによって常態に復する可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effects of high fat and high sucrose diet on immune response were estimated using the transgenic mouse OVA specific TCR transgenic mice (D011.10). After long term feeding on weanling, or short term feeding on adult mice, antigen-specific proliferation, cytokine and antibody production on splenocytes, and phagocytosis and LPS-stimulated TNF- α production from peritoneal macrophage cells were measured. Immuno-responses were changed by feeding both high fat and high sucrose diet. Particularly, high fat diet shows drastic alteration occurred just after the administration starting, but it was suggested that continuous administration made to bring back to ordinary state by a homeostasis effect.

研究分野：食品機能学

キーワード：免疫応答性 熱量 高脂肪食 高シヨ糖食

1. 研究開始当初の背景

近年、食物アレルギーや花粉症等、免疫系の過剰な亢進に起因するアレルギー性炎症疾患は、先進国を中心に増加している。特に、主に乳幼児期に発症する食物アレルギーは、患者の心身の発育に悪影響を及ぼすのみならず、他のアレルギー性疾患の引き金になると考えられており、予防や早期治療という抜本的な対策の確立が望まれているにもかかわらず、その対策は現状のところ第一選択である食事制限にとどまっている。

その一方で、超高齢社会となった我が国においては、肺炎が死亡原因の第3位となっており、高齢者の感染症対策としての免疫応答の強化が求められていることから、免疫系のバランス改善は年齢を問わず重要な課題である。

このようなアレルギー罹患者の増加には遺伝的な素因もさることながら、食生活などの生活環境の変化が大きく関与していると考えられるようになってきている。しかしながら、食物に含まれる個々の、多くは希少な成分の免疫修飾機能については、フラボノイド (Singh et al. Clin. Exp. allergy, 2011) や、n-3系脂肪酸の炎症抑制活性 (Hageman et al. Curr Allergy Asthma Rep. 2012) などが報告されているが、食物として他の成分とともに摂取された際の効果を明らかにした報告は少なく、また個々の機能性成分のみに着目して食生活を組み立てることは現実的にも困難である。食生活とアレルギーの罹患や症状の重篤度との関連について行われた疫学調査では、複数の肯定的な報告が存在する一方で、最新の疫学調査では食生活の影響は否定されている (Papoutsakis et al. J Acad Nutr Diet. 2013) など、評価は定まっていない。これは、食生活とアレルギー性炎症疾患のいずれにも関与する因子がきわめて多いことが原因ではないかと考えられる。

また、高齢者の免疫応答性を向上させることについても、一般に高齢者は栄養吸収能力などが低下していることもあり、タンパク質/必要総カロリーは若年者に比べ高い (WHO 2007) が、単純な高栄養食を与えればよいということにはならない。

そのため、食事と免疫バランスの関係を明らかにするには、個々の機能性成分や栄養成分の多寡ではなく、食生活という大きなくくりで、マクロニュートリエントのレベルからみていくことが必要であると考えられる。

また、アレルギー性炎症疾患においては、抗原の体内への取り込みから炎症惹起までのいずれかの段階で介入すれば、予防や最終的な症状の低減が可能である。そのため、抗アレルギー食品の研究のターゲットとしては、抗原摂取量の低減 (低アレルゲン性食品開発、抗原侵入阻止)、免疫応答 (経口免疫寛容、T細胞の免疫応答バランス調節など) の抑制、炎症に関わるケミカルメディエータの産生や放出の抑制、機能の阻害などが考え

られるが、いずれの場合も、その効果は最終的に症状の強弱により見極める必要があるため、ヒトで試験することは倫理的にも難しく、動物モデルが必要である。しかし、ヒトとの相同性などの観点から、現存する食物アレルギー動物モデルから得た結果をヒトに外挿することは難しい。それに対し、応募者らは、卵白アルブミン (OVA) に特異的なT細胞を発現するトランスジェニックマウス (D011.10) を用い、ヒトと同じく免疫強化剤 (アジュバント) を用いずに経粘膜抗原感作によるアレルギーを誘導する方法を確立、食物アレルギーのモデル系を構築した。さらに、本モデル系を用いアレルギー反応の強さを高感度迅速皮膚反応測定法 (特許第4119981号) および重症度のインデックス化法 (特許第4834819号) により、血管透過性亢進に伴う血漿漏出量として数値化する技術を開発し、症状のわずかな差を検出することを可能にした。本手法では、抗原感作済みの同一のマウス皮膚に異なる濃度の抗原を接種することが可能であることから、アレルギー症状の重篤度を評価する手法として有効である。また、同じように抗原感作を行った場合でも、1) 摂取カロリーの多寡によって表現系として現れる皮膚アナフィラキシー反応の強度や抗原応答性が異なること、2) マウスの週齢によっても皮膚アナフィラキシー反応の強度が異なり、特に20週齢を超えると抗原に対する応答性が低下することが確認されており、食餌内容の違いによるアレルギー性炎症疾患への影響を皮膚アナフィラキシー反応という表現系で評価するには有効なモデルと考えられる。さらに、本モデルでは遺伝子組換え動物を用いることから、感作前の動物から調製した免疫担当細胞を抗原で処理することにより、免疫応答性を評価することも可能であるため、免疫応答性の強化が可能な食餌を検討することが可能であると考えている。

また、アレルギー性炎症疾患の発症においては、魚油の発症抑制効果 (van den Elsen LW et al. Clin Exp Allergy. 2013) など、n-3, n-6脂肪酸のバランスがアレルギー発症に密接に関連することが知られている。また、西洋型の食事が喘息の発症を増加させるという報告 (Tromp II et al. Eur Respir J. 2012) もある。しかし、いわゆる日本型食事と西洋型の比較や、脂質等の植物・動物などの由来による違い、PFC摂取比率との関連などは報告が少ない。また、高齢者の免疫力低下に対し、良質なタンパク質の摂取が有効であると言われるが、その由来、あるいは脂質等との組み合わせについてはほとんど情報がない。また、獲得免疫系のみならず、自然免疫系に対する食事の影響についてもほとんど評価は行われていない。

2. 研究の目的

我が国では免疫系の過剰な亢進によるア

アレルギー性炎症疾患の患者数が増加するとともに、高齢者、すなわち免疫応答性が低下した感染症のハイリスク者の数が増加している。このような社会状況の中、日々の食生活の改善によって免疫機能を調節する方法への国民的関心が極めて高くなってきているにも関わらず、そのような食生活を提言するために必要な科学的知見はほとんど蓄積されていないのが現状である。そこで、本研究においては、免疫機能の調節を考慮した次世代型日本食の提案に必要な、栄養摂取におけるタンパク質・脂質・炭水化物のバランス（PFC比）カロリーベースでの摂取エネルギー量や摂取源、ならびに植物・動物など食品素材の違いなどが免疫応答に与える影響とそれら機序についての科学的知見を得ること、これらの免疫系失調を改善しうる次世代型日本食としての食事指針の提案を目的とする。

3. 研究の方法

具体的に本研究では、

1. 西洋型食事のモデルとされる、高脂肪(高糖)食の免疫応答性への影響

2. カロリーベースでのエネルギー摂取量やその起源とアレルギー症状との関係

を明らかにするために以下の方法を用いる。

(1) 高脂肪食摂取が抗原刺激に対する免疫応答に与える影響

幼若期からの高脂肪食の長期摂取が、免疫応答性に与える影響

卵白アルブミン(OVA)に特異的な T 細胞を発現するトランスジェニックマウス(D011.10)を用い、脂質由来の高カロリー食として、高脂肪食 60kcal%ラードを含む餌(D12492:リサーチダイエツ社)およびそのコントロール食(D1450B:同)を投与する。

幼少時からの高カロリー食の摂取を想定し、通常飼育の母親マウスより得られた仔マウスを、出生後3ないし4週齢で離乳させ、離乳直後から上記飼料を投与し、9週間以上の長期間飼育を行った後、脾臓細胞を調製し、未感作状態における免疫担当細胞の抗原特異的免疫応答性(脾臓細胞の増殖活性、サイトカイン、抗体産生量)をELISA法などにより検討する。また、同時に腹腔内マクロファージを回収し、食食活性およびLPS刺激によるサイトカイン産生を測定する。

また、アレルギー症状に対する食餌の効果を検討するため、高脂肪食で飼育した後、OVAを経口抗原投与(2%OVA水(3日間)-水(4日間)いずれも自由摂取、2クール)し、抗原感作を行なう。抗原投与開始時、11日目に採血を行い、14日目に皮膚アナフィラキシー反応を惹起し、アレルギー症状の重篤度を測定する。

成熟後期からの高脂肪食の摂取が、免疫応答性に与える影響

D011.10マウスにおいては、20週齢を過ぎると皮膚アナフィラキシー反応等の免疫応答性が低下することが担当者らのこれまで

の研究により認められている。そこで、一般的には老齢マウスの範疇には入らないとされるが、免疫応答性の低下が予測される週齢のマウスを成熟後期とし、成人以降に高カロリー食を摂取することを想定し、20週齢以降のD011.10マウスに前項同様に高脂肪食およびそのコントロール食を投与し、脾臓細胞を調製し、未感作状態における免疫担当細胞の抗原特異的免疫応答性を評価する。

(2) 高シヨ糖食摂取が抗原刺激に対する免疫応答に与える影響

幼若期からの高シヨ糖食の長期摂取が、免疫応答性に与える影響

前項と同じくD011.10マウスを用い、糖質を多く含む食餌として、高シヨ糖食70kcal%スクロースを含む餌(D07042201:リサーチダイエツ社)およびそのコントロール食(7kcal% sugar D12450J:同、あるいはシヨ糖不含食、0kcal% sugar D12450K)を投与し、免疫応答性を検討する。

また、(1)と同様にアレルギー症状への食餌の効果を検討する。

成熟後期からの高シヨ糖食の摂取が、免疫応答性に与える影響

(1)と同様に成熟後期のマウスを対象に、高シヨ糖食投与の免疫応答性に対する影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食摂取が抗原刺激に対する免疫応答に与える影響

幼若期からの高脂肪食の長期摂取が、免疫応答性に与える影響

離乳直後からコントロール食あるいは高脂肪食を投与したマウスでは、摂餌量はほとんど差が認められなかった。しかし、投与開始後約2週間で体重に群間の差が生じ、その差は解剖時(9週間以上)までほぼ同様に推移したが、顕著な肥満を示すことはなかった。

未感作状態の脾臓細胞を抗原刺激した際のサイトカイン産生では、高脂肪食群において、IL-12p40やIFN- γ がコントロール群より有意に高く、有意ではないもののIL-5が低くなる傾向が認められた(図1)。

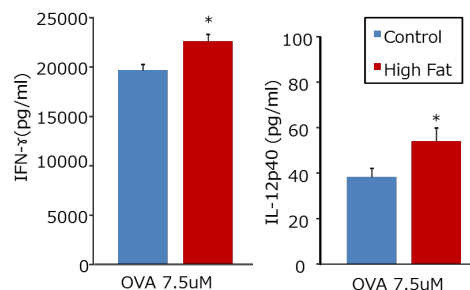


図1 高脂肪食投与が未感作脾臓細胞のサイトカイン産生に与える影響

抗原特異的な抗体産生においても高脂肪食群はIgG1等の産生量がコントロール群より有意に低くなった。これらのことから、幼若

期より高脂肪食を摂取することにより、一部の Th2 型の免疫応答性が低下する可能性が考えられた。

実際に、マウスに高脂肪食投与後に経口抗原感作を行った場合、高脂肪食投与群の脾臓細胞の応答性では IL-2 や IFN- γ が有意に高く (図 2)、IL-4, 5 が低い傾向にあり、Th1

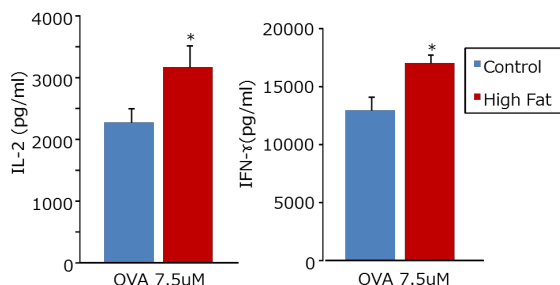


図 2 高脂肪食投与が経口抗原感作した脾臓細胞の抗原特異的サイトカイン産生に与える影響

型にシフトしている可能性が認められた。同様に、Th2 型抗体の血中抗体価も高脂肪食投与群の方が有意に低かった (図 3)。

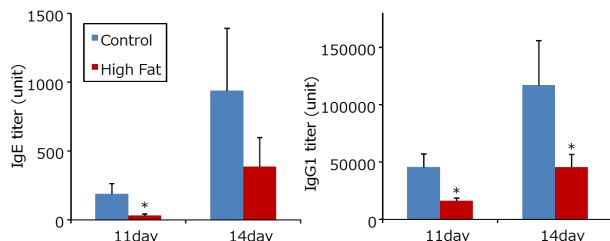


図 3 高脂肪食投与が経口抗原感作後の血清中抗体価に与える影響

しかし、皮膚アナフィラキシー反応では抗原刺激によるアレルギー症状の重篤度に差が認められず (図 4)、アレルギー症状の発症を抑制するほどの影響は無いものと思われた。

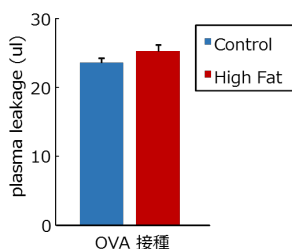


図 4 高脂肪食投与が皮膚アナフィラキシー反応に与える影響

以上の結果から、幼若期からの高脂肪食摂取は、20 週齢を超えない範囲ではアレルギーの発症には大きく関与しないと考えられた。

また、自然免疫系に関係する腹腔内マクロファージの貪食活性や LPS 刺激による TNF- α 産生能については、高脂肪食投与による有意な差は認められなかった。

また、本モデルマウスにおいて、通常の飼育でも免疫応答の低下が予測される 20 週齢を超えて、さらに長期間にわたり、高脂肪食を投与したところ、未感作脾臓細胞の抗原特異的抗体産生量が有意に減少したことから、週齢により免疫応答性に与える影響が異な

ることが示唆された。

成熟後期からの高脂肪食の摂取が、免疫応答性に与える影響

免疫応答性の低下が認められる成熟後期から高脂肪食を摂取することにより、免疫応答性に変化が起こるかについて検討したところ、1 週間で免疫応答性に変化が認められた。しかし、投与を継続することにより、コントロール食との差異は小さくなることが確認された。

(2) 高シヨ糖食摂取が抗原刺激に対する免疫応答に与える影響

幼若期からの高シヨ糖食の長期摂取が、免疫応答性に与える影響

離乳直後からコントロール食あるいは高シヨ糖食を投与したマウスでは、摂取量はほとんど差が認められなかった。高シヨ糖食においては、高脂肪食とは異なり、コントロール食と餌重量あたりのカロリー値が同じであるため、体重や肥満度についても、顕著な差は認められなかった。

離乳直後からの 9 週間以上高シヨ糖食の投与を行ったマウスの未感作脾臓細胞では、抗原特異的な IL-4, 10 等の Th2 型サイトカイン産生において有意な増加が認められた (図 5)。

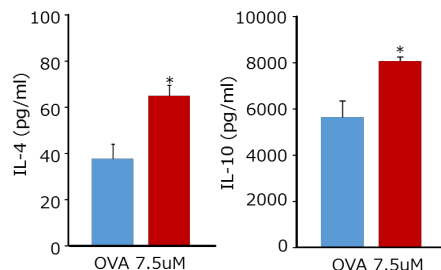


図 5 高シヨ糖食投与が未感作脾臓細胞のサイトカイン産生に与える影響

これは高脂肪食による応答性の変化とは異なっており、西洋型食餌の特徴として、高脂肪、高糖質といわれるが、摂取カロリー源が脂質であるか炭水化物 (糖質) であるかによって、免疫応答性に違いが認められることが示唆された。

しかし、抗原特異的抗体産生には有意な差はなく、皮膚アナフィラキシー反応においても、高脂肪食投与と同様、抗原刺激によるアレルギー症状の重篤度に差は認められなかった。また、腹腔マクロファージ細胞の応答性についても特に差は認められなかった。

成熟後期からの高シヨ糖食の摂取が、免疫応答性に与える影響

成熟後期から高シヨ糖食を 2 週間投与した未感作脾臓細胞の抗原特異的サイトカインや抗体産生については、有意差は認められなかったが、腹腔マクロファージ細胞の LPS 刺激による抗体産生量は IgA, G1, M で有意ではないものの、低下する傾向が認められた (図 6)。

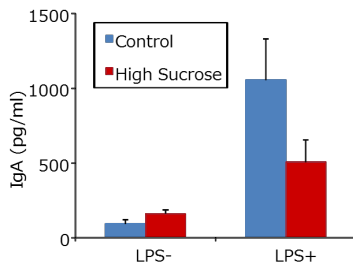


図6 高シヨ糖食投与が腹腔マクロファージ細胞の抗体産生に与える影響

本試験の結果より、高脂肪食、高シヨ糖食を摂取させることにより、抗原特異的なサイトカインあるいは抗体の産生量、脾臓細胞の増殖活性など免疫応答性に影響を与えることが確認された。また、免疫応答性に与える影響は、摂取カロリー値よりも、摂取カロリー源の方が大きいことが示唆され、また免疫応答性の変化は、外見的な肥満状態とは必ずしも関連してはいなかった。

近年、我が国におけるアレルギー性疾患罹患患者数が増加している理由として、食生活の変化、特に脂質由来、糖質由来のカロリー摂取量の増加があげられることが多い。しかし、今回のモデルマウスによる結果からは、免疫応答性の過剰な亢進は認められず、むしろアレルギーを抑制するような応答も認められた。ただし、これらの応答性の変化は抗原刺激によるアレルギー症状の発症に關与するほどの影響ではなく、症状重篤度の抑制は認められていない。

長期的な摂取の影響として認められた変化が比較的早い時期に生じ、それが継続されるものであるのか、あるいは長期摂取により変化が起きているのかを検討したところ、高脂肪食、高シヨ糖食のいずれにおいても、従来報告されているよりもはるかに短い、1週間の投与において免疫応答性が変化することが確認され、特に高脂肪食は、短期の投与で免疫応答性を大きく変化させることが認められた。今回の結果からは、投与開始直後にドラスティックな変化が起きるものの、投与を継続することにより、ホメオスタシスによって常態に復する可能性が示唆された。

<引用文献>

Singh A. et.al., Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. Clin. Exp. allergy, 41(10), 1346-59, 2011

Jeske H. et. al., The Impact of Dietary Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids on Respiratory Illness in Infants and Children. Curr Allergy Asthma Rep. 12(6), 564-573, 2012

C Papoutsakis et al., Childhood Overweight/Obesity and Asthma: Is There a Link? A Systematic Review of Recent

Epidemiologic Evidence. J Acad Nutr Diet 113 (1), 77-105. 1 2013.

van den Elsen LW et. al, n-3 Long-chain PUFA reduce allergy-related mediator release by human mast cells in vitro via inhibition of reactive oxygen species. Clin Exp Allergy. 109,1821-1831, 2013

Tromp II et. al. Dietary patterns and respiratory symptoms in pre-school children: The Generation R Study. Eur. Respir. J., doi: 10.1183/ 09031936.00119111, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕
なし(投稿準備中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 祐子 (ISHIKAWA Yuko)
農研機構・食品研究部門 食品健康機能研究領域・ユニット長
研究者番号: 40353940

(2) 研究分担者

若木 学 (WAKAGI Manabu)
農研機構・食品研究部門 食品健康機能研究領域・研究員
研究者番号: 50710878

後藤 真生 (GOTO Masao)
農研機構・食品研究部門 食品健康機能研究領域・上級研究員
研究者番号: 30302590