

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463195

研究課題名(和文) 老齢マウスを用いた発酵食品による口腔の自然免疫機構活性化効果

研究課題名(英文) Innate immune response in aged mice given fermented foods

研究代表者

田口 千恵子 (TAGUCHI, Chieko)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号：80434091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：発酵食品である納豆の摂取が口腔・全身免疫機構へ及ぼす影響や効果について、老齢マウスと若齢マウスにより評価した。納豆の胃内投与により糞便抽出液や唾液中のIgA抗体および血清中のIgG抗体の誘導を認めたが非納豆投与に比べ減少した。しかし、老齢マウスおよび若齢マウスの歯肉において抗菌性ペプチド ディフェンシンの有意な産生誘導が認められた。納豆摂取により、腸内細菌Clostridium subcluster XIVaの増加が認められ、代謝産物である酪酸も認められた。納豆の摂取は自然免疫機構の活性化につながり健康増進に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to detect any immunological responses that may be enhanced in aged or young mice by consuming fermented dietary products such as natto. When mice were administered natto, low levels of IgA and IgG were seen in both young and aged mice. However, inductions of murine α -defensin specific mRNA were detected in the gum of both young and aged mice fed natto. In addition, the intestinal flora showed an increase of Clostridium subcluster XIVa, and the presence of butyrate as a metabolic product was confirmed. These results suggest that eating natto activates oral immunological responses and contributes to a healthy increase in beneficial gut flora.

研究分野：衛生学公衆衛生学 予防歯科学

キーワード：老齢マウス 発酵食品 自然免疫機構

1. 研究開始当初の背景

本格的な高齢社会を迎えたわが国においては、高齢者の口腔機能の維持・早期回復が歯科保健医療における極めて重要な課題となっている。

口腔は、免疫グロブリンや抗菌物質等が存在する免疫器官であるが、加齢とともに口腔粘膜障害や唾液分泌量低下が生じることによって、口腔免疫能の低下がみられる。加齢に伴う免疫力の低下は、口内炎や歯周病等といった口腔疾患の発症や重症化のリスクを上げるにとどまらず、高齢者の死因の上位にある誤嚥性肺炎の発症を招くなど、全身に悪影響を与えることから、口腔免疫能の維持は、高齢期において極めて重要であると考えられる。

わが国では、古くから発酵の技術を上手に利用して、多くの発酵食品を食生活に取り入れてきている。発酵技術により、食材の栄養価を高め、消化吸收を促進する働きがあり、腸内細菌のバランス調整をすることが分かっている。近年、腸内常在菌の構成と年齢や性差には関連があることが報告されている。

また、生体が防御機構として産生する抗菌性物質である抗菌ペプチドと疾患の関連性が研究されており、腸管やアトピー性皮膚炎での皮膚疾患部では抗菌ペプチドの産生能が減少していることが報告されている。乳酸菌の抗菌作用の報告があることから発酵食品による抗菌ペプチドの産生誘導能が高いことが考えられる。現在まで発酵食品の口腔内における免疫機構に関する報告は少ない。

将来的には、近年、施策として取り上げられている「食育」にもつながるものであり、ヒトが本来持っている免疫能をわが国古来の食品摂取により促進し、感染性疾患の予防、口腔・全身の健康増進に寄与することを可能にする食生活の提案につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、発酵食品であり我が国のソルフードである納豆の摂取による腸管免疫機構を介した全身や口腔への自然免疫機構の効果（特に Cathelicidin 関連抗菌性ペプチド (CRAMP), ディフェンシン, ディフェンシン）について並びにそれらの加齢への影響について評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 発酵食品である納豆の投与による免疫応答活性化の確認

若齢 (6-8 週) および老齢 (18 か月) の雌マウスを用いた。実験には市販納豆を使用した。納豆をミキサーにて粉碎し、すり鉢にてすりつぶし、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁させた。懸濁された納豆を 1 週間 (1 日 1 回, 7 日間), ゾンデを用いて胃内投与を

行った。対照群には偽投与として PBS 溶液のみを投与した。実験開始から 8 日後, マウスの糞便, 唾液, 血液, 唾液腺 (舌下腺, 顎下腺), 歯肉, 小腸を採取した。唾液中, 糞便抽出液中の分泌型 IgA 抗体価, 血清中の IgA および IgG 抗体価を ELISA 法で測定した。顎下腺, 舌下腺, 歯肉, 舌, 小腸においては, totalRNA を抽出し, 逆転写を行い cDNA を作製した。作製した cDNA の CRAMP およびディフェンシン, ディフェンシン特異的 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。

(2) 発酵食品である納豆の摂取による腸管における免疫応答の要因としての腸内細菌叢について

若齢 (7 週) および老齢 (12 か月) の雌マウスを用いた。市販の粉末納豆を一般粉末飼料に混在させ納豆飼料とした。マウスにこの納豆飼料を 1 週間自由摂取させた。摂取期間終了後, 糞便を採取し, 糞便中の腸内細菌叢を 16SrDNA 部分塩基配列の T-RFLP で解析した。また, 糞便中の有機酸を高速液体クロマトグラフィーによって測定した。

4. 研究成果

(1) 発酵食品である納豆の投与による免疫応答活性化の確認

納豆投与の若齢, 老齢マウスにおいて, 糞便抽出液中の IgA 抗体価は対照群と比較し同程度であった。また, 唾液中の IgA 抗体価は対照群と比べ低下傾向を示した。また, 血液中の IgG, IgA 抗体価はいずれも低い値を示した。これは, 納豆の胃内投与により IgA 抗体の誘導が腸管内, 唾液中で起こらなかったことを示した。血清中の IgG や IgA 抗体価も有意に低下していることから, 納豆食による IgG や IgA 抗体産生の抑制が認められた。納豆の胃内投与により小腸粘膜, 歯肉での CRAMP は, 若齢マウスにおいて, 対照群と比較し有意に発現の増加が認められたが老齢マウスにおいては, 対照群と比較し発現が抑えられた。一方, 舌では, 老齢マウスへの納豆の胃内投与により CRAMP の発現が増加した (図 1) が, 若齢マウスでは対照群と比較し低下していた。顎下腺では, 若齢, 老齢マウスともに CRAMP の発現が増加することが認められた。

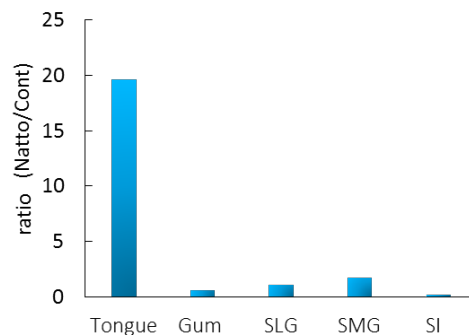


図 1 老齢マウスへの納豆の胃内投与によ

る CRAMP 特異的 mRNA の検討 (老齢マウス非納豆投与群との比)

各組織より抽出した totalRNA をリアルタイム PCR に供して CRAMP 特異的 mRNA の発現を検討した。

ディフェンシンの発現については、小腸粘膜では、若齢マウスにおいて対照群と同様であったが、老齢マウスにおいては、対照群に比較し発現が抑えられていた。歯肉、舌では、若齢マウスにおいては納豆の投与によりディフェンシンが有意に増加したものの老齢マウスにおいては、発現の程度は低かったが舌、唾液腺において、納豆投与によりディフェンシン特異的 mRNA の発現は非納豆投与群に比べて増加していた (図 2)。

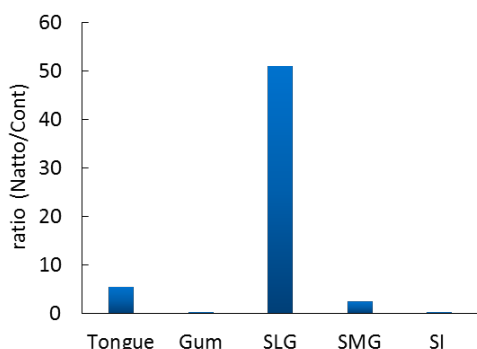


図 2 老齢マウスへの納豆の胃内投与によるディフェンシン特異的 mRNA の検討 (老齢マウス非納豆投与群との比)

他方、ディフェンシンについては、小腸粘膜において、若齢、老齢マウス共に対照群と比べわずかに低下することが認められた。若齢マウスの歯肉、舌においては、納豆の投与により有意な発現が認められた (図 3)。しかし、老齢マウスにおいては、納豆の投与により舌、歯肉での発現上昇が認められたが対照群に比較し有意性は示されなかった。

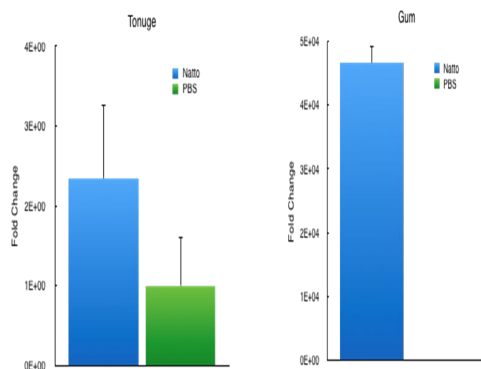


図 3 若齢マウスへの納豆の胃内投与によるディフェンシン特異的 mRNA の検討

顎下腺においては、若齢マウスにおいて、納豆投与ではディフェンシンが対照群に比較し低下していた。一方、老齢マウスにおいては、納豆投与により増加した (図 4)。

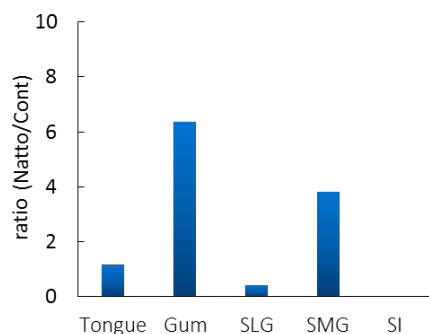


図 4 老齢マウスへの納豆の胃内投与によるディフェンシン特異的 mRNA の検討 (老齢マウス非納豆投与群との比)

以上のことより、納豆の胃内投与による若齢マウスと老齢マウスにおける各抗菌ペプチドの誘導には組織間で差が認められた。また、若齢マウスにおけるその誘導量は大きかったが、老齢マウスにおいては、産生誘導量は対照群に比較し、有意性が示されなかった。しかし、老齢マウスにおいても抗菌性ペプチド (CRAMP, ディフェンシン) 特異的 mRNA の発現上昇が認められたことから、納豆の胃内投与における口腔内への自然免疫機構の誘導が示された。

(2) 発酵食品である納豆 (粉末) の摂取による腸管における免疫応答の要因としての腸内細菌叢について

腸内細菌叢は、若齢マウスに比較し老齢マウスにおいて Lactobacillales 目の減少、Clostridium subcluster XIVa の増加がみられた。また、納豆摂取の老齢マウスは対照群に比較し、Lactobacillales 目、Clostridium subcluster XIVa の増加が認められた。Lactobacillales は、生体で有益な細菌であり、老齢マウスの腸内細菌叢の改善を示すものであると考えられた。糞便中の有機酸は、若齢、老齢マウス共に酢酸が高く、プロピオン酸、酪酸の発現が認められた。Clostridium subcluster XIVa により産生される酪酸が制御性 T 細胞 (Treg) の誘導に関与し、腸管の免疫恒常性維持に寄与していることが報告されている。これらの結果から納豆摂取による腸内免疫応答の亢進に関し、Clostridium subcluster XIVa の増加とそれに伴い産生される酪酸による腸管での免疫修飾作用の可能性が示唆された。

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 11 件)

小林良喜, 田口千恵子, 有川量崇, 内山敏一, 齊藤孝親, 落合智子, 納豆食による自然免疫誘導の検討, 日大口腔科学, 査読有, 43, 2017, 41-47.

田口千恵子, 小林良喜, 加藤志奈, 有川

量崇, 内山敏一, 那須郁夫, 歯科診療室内の浮遊微粒子群が THP-1 細胞に与える影響, 日大口腔科学, 査読有, 43, 2017, 35-40.

Takeuchi Reiri, Matsumoto Hiroko, Arikawa Kazumune, Taguchi Chieko, Nakayama Ryuji, Nasu Ikuo, Hiratsuka Koichi, Phenytoin-induced gingival overgrowth caused by death receptor pathway malfunction, Oral Diseases, 査読有, 24, 319-324, 2017.

Hiroya Gotouda, Takanori Ito, Yasuhiro Okamoto, Takashi Uchida, Chieko Taguchi, Michiharu Shimosaka, Mana Fuchigami, Akira Fukatsu, Kensuke Matsune, Yoshiharu Kono, Kiyoshi Matsushima, Masamichi Komiya, Kazutaka Kasai, Koh Shibusani, Misao Kawara, Ikuo Nasu, Correlation between Assignments for Professionalism of the Post-graduate Clinical Competency Evaluation and the Pre-graduate Objective Structured Clinical Achievement Test in Dental Education, International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 15, 2017, 40-45.

Hiroya Gotouda, Takanori Ito, Yasuhiro Okamoto, Takashi Uchida, Chieko Taguchi, Michiharu Shimosaka, Mana Fuchigami, Akira Fukatsu, Kensuke Matsune, Yoshiharu Kono, Tatsuo Sakamaki, Kiyoshi Matsushima, Masamichi Komiya, Kazutaka Kasai, Koh Shibusani, Misao Kawara, Ikuo Nasu, A Study on the Occupational Stress of Trainee Dentists in Post-graduate Dental Education, International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 15, 2017, 33-39.

Hiroya Gotouda, Takanori Ito, Yasuhiro Okamoto, Takashi Uchida, Chieko Taguchi, Michiharu Shimosaka, Mana Fuchigami, Akira Fukatsu, Kensuke Matsune, Yoshiharu Kono, Kiyoshi Matsushima, Masamichi Komiya, Kazutaka Kasai, Koh Shibusani, Misao Kawara, Ikuo Nasu, An Examination of the Post-graduate Dental Clinical Competency Evaluation at the End of Clinical Training for Professionalism in Dental Education, International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 15, 2017, 29-32.

小林良喜, 田口千恵子, 有川量崇, 内山敏一, 伊藤誠康, 落合智子, Porphyromonas gingivalis 口腔感染により発現する Exosome の検討, 日大口腔科学, 査読有, 42, 2016, 34-39.

Bhawal UK, Lee HJ, Arikawa K, Shimosaka M, Suzuki M, Toyama T, Sato

T, Kawamata R, Taguchi C, Hamada N, Nasu I, Arakawa H, Shibusani K. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss, Int J Oral Sci, 査読有, 7, 2015, 242~249.

Kobayashi Ryoki, Taguchi Chieko, Yonenaga Shusuke, Arikawa Kazumune, Uchiyama Toshikazu, Kono Tetsuro, Takeuchi Takashi, Nasu Ikuo, Hirano Hirohiko, Ochiai Tomoko, Circadian Rhythm Affects the Dynamics of S-IgA Mucosal Secretion, International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 14, 2015, 1-7.

Taguchi Chieko, Arikawa Kazumune, Saitou Masanori, Uchiyama Toshikazu, Watanabe Itsuki, Tobita Keisuke, Kobayashi Ryoki, Ochiai Tomoko, Nasu Ikuo, Orally ingested Lactobacillus crispatus KT-11 inhibits Porphyromonas gingivalis-infected alveolar bone resorption, Int J Oral-Med Sci, 査読有, 13, 2015, 102-109.

有川量崇, 田口千恵子, 鈴木浩司, 石井広志, 千葉和成, 長谷川勝, 内山敏一, 小林良喜, 伊藤誠康, 竹内麗理, 永岡明記, 小椋正之, 和田康志, 那須郁夫, 口腔環境といびきの関連性 市川市(千葉県)における口腔内診査とアンケート調査結果, 日本歯科医療管理学会雑誌, 査読有, 49, 2015, 200-209.

[学会発表](計 8 件)

田口千恵子, 竹内麗理, 有川量崇, 内山敏一, 那須郁夫, 平塚浩一, ラットによる口内炎モデルの開発, 第 18 回日本口腔機能水学会学術大会, 2017 年 3 月 12 日, 日本大学歯学部, 東京都(文京区) 竹内麗理, 有川量崇, 田口千恵子, 中山竜司, 平塚浩一, 那須郁夫, 口内炎モデルラットによる水素水の治療および予防効果の検討, 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 2016 年 5 月 29 日, 東京医科歯科大学(東京都文京区)

田口千恵子, 小林良喜, 有川量崇, 中山竜司, 落合智子, 那須郁夫, マウスにおける分泌型 IgA 抗体産生の概日リズム, 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 2016 年 5 月 29 日, 東京医科歯科大学(東京都文京区)

有川量崇, 小林良喜, 田口千恵子, 中山竜司, 河野哲朗, 内山敏一, 生田明敏, 落合智子, 那須郁夫, 市販発酵食品摂取による唾液中分泌 IgA 抗体の誘導効果, 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 28 日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

田口千恵子, 小林良喜, 有川量崇, 中

山竜司, 落合智子, 那須郁夫, 高脂肪食摂取による分泌型 IgA 抗体産生の概日リズム変化の検討, 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 28 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

小林良喜, 有川量崇, 田口千恵子, 那須郁夫, 落合智子, 概日リズムによる経鼻ワクチンの誘導効果, 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 28 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

後藤田宏也, 田口千恵子, 生田明敏, 桑原紀子, 松根健介, 平塚浩一, 河野善治, 那須郁夫歯垢を用いたミュータンスレンサ球菌比率と S.sobrinus の評価を基盤とするう蝕ハイリスク者選別法についての研究, 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 28 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

田口千恵子, 有川量崇, 石井広志, 中山竜司, 生田明敏, 那須郁夫, 市川市 (千葉県)における口腔診査とアンケート調査結果 口腔環境といびきの関連性, 第 73 回日本公衆衛生学会総会, 2014 年 11 月 6 日, 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 千恵子 (TAGUCHI Chieko)
日本大学・松戸歯学部・助手 (専任扱)
研究者番号 : 80434091

(2) 研究分担者

小林 良喜 (KOBAYASHI Ryoki)
日本大学・松戸歯学部・助手 (専任扱)
研究者番号 : 10609085

(3) 研究分担者

有川 量崇 (ARIKAWA Kazumune)
日本大学・松戸歯学部・准教授
研究者番号 : 50318325

(4) 連携研究者

なし

(5) 研究協力者

なし