

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05875

研究課題名（和文）食品中乳化剤による腸炎誘発機序の解明 -炎症性腸疾患の治療へ向けて-

研究課題名（英文）Analysis of mechanism for dietary emulsifying agents caused intestinal inflammatory

研究代表者

栗原 千枝 (Kurihara, Chie)

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・助教

研究者番号：90532515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小腸の粘膜障害に対する乳化剤の影響を、健常マウスおよび小腸炎モデルマウスを用いて解析した。乳化剤polysorbate 80 (P80) による腸内細菌叢の変化は大腸よりも小腸で大きく、小腸では硫化水素産生菌*P. mirabilis*が増加することを見出した。P80は健常なマウスに対して消化管炎症を惹起しないが、小腸炎モデルマウスでは小腸炎が増悪することを明らかにし、小腸炎の増悪には*P. mirabilis*だけでなく複数菌種の相互作用が関与することを示唆する結果を得た。またP80以外の乳化剤も腸内細菌叢の多様性に影響すること、乳化剤の種類により腸管粘膜バリア損傷の程度が異な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

近年の炎症性腸疾患患者数増加の一因として、乳化剤摂取量の増加が指摘されている。本研究において、乳化剤摂取による腸内細菌叢の攪乱 (dysbiosis) が小腸炎を起こしやすい環境を作っていること、また腸管粘膜バリア損傷の程度は乳化剤の種類によって異なることを明らかにした。これらの成果は、今後の炎症性腸疾患の発症予防や食事指導による治療につながることを期待でき、社会に貢献ができると考えている。

研究成果の概要（英文）：The effect of dietary emulsifiers on small-intestinal microbiota, which is important for gut immunity, has not been studied. We investigated the effect of a dietary emulsifier, polysorbate-80 (P80), on the small intestine in normal mice and Indomethacin-induced inflammation model mice. P80 reduced the microbiota diversity, especially in the small intestine rather than in the colon, in normal mice. And P80 increased the number of sulfide-producing Enterobacteriaceae in small-intestinal mucosa, which was identified as *P. mirabilis*. P80 alone did not cause small-intestinal injury of normal mice, but exacerbated indomethacin-induced intestinal lesions. We showed that P80 induced dysbiosis in the small intestine, leading to enhanced vulnerability of the small intestine to indomethacin-induced injury. Also, we showed that another kind of emulsifier ingestion changed diversity of the gut microbiota. However, degree of risk for gut damage varied by type of emulsifiers.

研究分野：消化器免疫

キーワード：乳化剤 腸内細菌 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

日本における炎症性腸疾患患者数は 1970 年台から急増し始め、この 25 年で約 10 倍に増加した。炎症性腸疾患発症の機序は明らかになっていないが、一因として食事や腸内細菌などの環境的要因による消化管免疫調節機構の異常が考えられる。炎症性腸疾患の症状は食事療法や食事制限により改善することが多いことから、食生活の変化が炎症性腸疾患患者数の増加に関与していると推測できる。

近年、乳化剤の一つである polysorbate-80 (P80) が、IL10 遺伝子欠損マウスの腸内細菌叢に変化をもたらす大腸炎を誘発することが報告された (Chassaing B et al. Nature 2015)。乳化剤は親水基と親油基を持つ界面活性剤で、材料同士の乳化を容易にする添加物として多くの加工食品に使用されており、我が国でも脂肪の摂取量増加に伴い乳化剤摂取量も増加している。食品用乳化剤は安全性が確認され正式に認可されたものであるが、疫学的なデータから本邦における乳化剤の消費量とクローン病の罹患率が正の相関関係にあることが示されている (Roberts CL et al. J Crohns Colitis. 2013)。しかしこれらの直接的な因果関係を示すデータは報告されていない。また、乳化剤が大腸炎を誘発すると報告されたが、小腸に対する乳化剤の影響については分かっていない。

一方、脂肪食により胆汁の組成が変化することで腸管内の硫化水素産生菌が増加すること (Devkota S et al. Nature 2012)、硫化水素産生菌は自身が産生する硫化水素で腸粘液のジスルフィド結合を分解し、薄くなった粘液層を通り抜け腸粘膜上皮に近づくこと (Ijssennagger N et al. Trends Mol Med 2016) が報告されている。また炎症性腸疾患患者の腸管内で硫化水素濃度が増加していることも明らかになっているが、その原因は解明されていない。

2. 研究の目的

加工食品用添加物の一つである乳化剤が、IL10 遺伝子欠損マウスにおいて腸内細菌叢を変化させ大腸炎を引き起こすことが報告され、原因不明の難治性疾患である炎症性腸疾患の患者数増加の一因であることが示唆された。食生活の西欧化で現代人が日常的に口にする乳化剤が、どのような機序で腸炎を誘発するのか解明し、加えて、より安全な乳化剤を探索することにより、炎症性腸疾患の予防や治療に結びつけることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 乳化剤による腸内細菌叢の変化

C57BL/6J マウスに乳化剤 polysorbate 80 (以下 P80) を 8 週間自由飲水で経口投与後、大腸あるいは小腸内容物を採取し、次世代シーケンサーを用いて 16S rDNA 配列解析をおこない、それぞれコントロール群と P80 投与群の多様性の比較、および P80 により増加した菌の同定をおこなった。

(2) 乳化剤が消化管免疫および小腸炎におよぼす影響

C57BL/6J マウスに乳化剤 P80 を 8 週間自由飲水で経口投与した。小腸炎モデルは、P80 投与後にインドメタシン (IND) を連続 2 日間腹腔内投与した。小腸組織をヘマトキシリン・エオジン染色し、絨毛、陰窩の高さを測定し、小腸絨毛の萎縮を評価した。また、小腸組織から RNA を抽出し、炎症関連因子の発現をリアルタイム PCR 法にて調べた。IL1 については ELISA 法にて評価した。腸管粘膜バリア障害の検出については、FITC 標識デキストラン 4 kDa を経口投与した後に血中へ移行した FITC 濃度を測定し腸管透過性を評価した。

(3) 乳化剤による小腸炎増悪と腸内細菌叢変化の関与

C57BL/6J マウスに乳化剤 P80 を自由飲水させ、6 週間後にグラム陰性菌を減少させる目的で抗菌薬 (ネオマイシン) を追加し、P80 を計 8 週間、抗菌薬を 2 週間自由飲水させた。

乳化剤 P80 を 8 週間自由飲水投与した C57BL/6J マウスの便を用いて糞便微生物移植 (FMT) をおこない、腸内細菌叢の変化が小腸炎の増悪に影響するか検討した。FMT は 7 日間連続でおこない、FMT の 6 日目と 7 日目に IND を腹腔内投与した。

乳化剤 P80 を 8 週間自由飲水させたマウスの小腸粘膜から培養増殖した *P. mirabilis* を C57BL/6J マウスに 1 日 1 回 7 日間連続で経口投与し、6 日目と 7 日目に IND を腹腔内投与した。

組織学的所見を組織学的スコアで評価し、小腸組織の炎症関連因子の発現をリアルタイム PCR 法にて調べた。IL1 については ELISA 法にて評価した。

(4) 乳化剤による自然リンパ球 (ILC) の変化

C57BL/6J マウスに乳化剤 P80 を自由飲水で 8 週間経口投与した後 IND を腹腔内投与した。小腸粘膜及び腸間膜リンパ節の ILC サブセットをフローサイトメトリーにて解析した。

(5) 親水性親油性バランス (HLB) が異なる各乳化剤が腸管免疫におよぼす影響

親水性親油性バランス (HLB) の異なる 4 種類の乳化剤 (P20, P65, P80, DATEM) を使用した。C57BL/6J マウスに各乳化剤を 8 週間投与し、体重を 2 週間ごとに計測した。各乳化剤を 8 週間投与した後、腸内細菌叢の変化を調べるために、腸管内容物を採取し 16S rDNA 配列を解析した。また腸管粘膜バリアの障害を検出するため、各乳化剤投与マウスに対し FITC 標識デキストラン 4 kDa を経口投与した後血中へ移行した FITC 濃度を測定し腸管透過性を評価した。

4. 研究成果

(1) 乳化剤による腸内細菌叢の変化

腸内細菌叢の変化は大腸よりも小腸で大きく、小腸では大腸に比べ個体内の多様性が低下し、個体間でのばらつきが大きくなっていった。また、小腸で硫化水素産生菌の *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) の増加が見られた。さらに、P80 を含んだ半固形培地で *P. mirabilis* の運動性の亢進が確認された。乳化剤存在下では、*P. mirabilis* がより増殖しやすい環境に移動できることが増加の一因であり、腸内細菌叢の攪乱 (dysbiosis) につながったと考えられた。

(2) 乳化剤が消化管免疫および小腸炎におよぼす影響

乳化剤 P80 単独投与マウスで小腸絨毛萎縮の傾向が見られたが、炎症性サイトカイン産生の増加や腸管透過性の亢進は認められなかった。一方、小腸炎モデルマウスに P80 を投与すると、腸管透過性の亢進は認められなかったが、組織学的スコアの増悪、炎症性サイトカイン IL1 の増加が確認された。乳化剤は小腸炎に対する脆弱性を増悪させることが示唆された。

(3) 乳化剤による小腸炎増悪と腸内細菌叢変化の関与

抗菌薬投与下では、乳化剤 P80 の有無による小腸の組織学的スコアおよび IL1 産生量の差は見られず、P80 による小腸炎の増悪は再現されなかったことから、腸内細菌が小腸炎の増悪に関与していると考えられた。

また、P80 投与で腸内細菌叢が変化したマウスの便を別のマウスに移植 (FMT) したところ、小腸の組織学的スコアおよび炎症性サイトカイン mRNA の発現は、健常マウスの便を FMT した群と比べ有意な差を認めなかった。

P. mirabilis の経口投与においては、*P. mirabilis* 投与群と非投与群で、小腸の組織学的スコアに有意差を認めなかったが、小腸粘膜における炎症性サイトカインの mRNA 発現は、*P. mirabilis* の経口投与群で IL1 mRNA 発現に若干の増加傾向を認めた

(4) 乳化剤による自然リンパ球 (ILC) の変化

ILC は主要サイトカイン産生源として腸管免疫において重要な役割を果たしている。ILC に対する乳化剤 P80 の影響を調べた。正常小腸粘膜では、3%存在していた ILC が、P80 投与により 4.4%まで増加した。また、腸管膜リンパ節では P80 投与で特に ILC 1 が有意に増加した。腸管膜リンパ節における ILC 1 の増加は P80 + ND 投与群でさらに増加し、IND 単独投与群よりも増加した。腸管粘膜から流出するリンパ液中の ILC は、P80 投与群で 2 型および 3 型 ILC が増加しており、ILC の組成変化が腸管免疫異常の一因となっている可能性が示唆された。

(5) 親水性親油性バランス (HLB) が異なる各乳化剤が腸管免疫におよぼす影響

乳化剤投与開始から 8 週間以内に、各乳化剤投与群の体重変化は乳化剤非投与のコントロール群と比較して有意差はなかった。しかし、腸管透過性解析では、各乳化剤投与群の血清 FITC デキストラン値はコントロール群と比較して増加する傾向が見られ、特に乳化剤 DATEM 投与群では高値を示した。16S rDNA 配列解析の結果、乳化剤の種類ごとにクラスターが形成された。また各種乳化剤を投与したマウスでは個体間の腸内細菌叢のばらつきがコントロール群に比べ大きかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 東山正明, 澁谷尚希, 埴芳典, 古橋廣崇, 栗原千枝, 穂苅量太	4. 巻 45(2)
2. 論文標題 リンパ球マイグレーションを変化させる管腔内因子	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 リンパ学	6. 最初と最後の頁 100-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Kazuki Horiuchi, Masaaki Higashiyama, Chie Kurihara, Kouji Matsumura, Rina Tanemoto, Suguru Ito, Akinori Mizoguchi, Shin Nishii, Akinori Wada, Kenichi Inaba, Nao Sugihara, Yoshinori Hanawa, Kengo Tomita, Ryota Hokari	4. 巻 -
2. 論文標題 Intestinal inflammations increase efflux of innate lymphoid cells from the intestinal mucosa to the mesenteric lymph nodes through lymph-collecting ducts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microcirculation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/micc.12694	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 -

1. 著者名 Furuhashi Hirotaka, Higashiyama Masaaki, Okada Yoshikiyo, Kurihara Chie, Wada Akinori, Horiuchi Kazuki, Hanawa Yoshinori, Mizoguchi Akinori, Nishii Shin, Inaba Kenichi, Sugihara Nao, Watanabe Chikako, Komoto Shunsuke, Tomita Kengo, Miura Soichiro, Hokari Ryota	4. 巻 35
2. 論文標題 Dietary emulsifier polysorbate 80 induced small intestinal vulnerability to indomethacin induced lesions via dysbiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 110 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14808	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Chie Kurihara, Masaaki Higashiyama, Yuta Yoshidome, Hiroyuki Tahara, Kana Ayaki, Hiroyuki Nishimura, Akira Tomioka, Suguru Ito, Rina Tanemoto, Yoshikiyo Okada, Kazuyuki Narimatsu, Shunsuke Komoto, Kengo Tomita, Ryota Hokari
2. 発表標題 THE IMPACT OF DIETARY EMULSIFIERS ON CHANGES OF MOUSE GUT MICROBIOTA AND INCREASED INTESTINAL PERMEABILITY DEPENDS ON HYDROPHILIC-LIPOPILIC BALANCE
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chie Kurihara, Akinori Wada, Hirotaka Furuhashi, Masaaki Higashiyama, Ryota Hokari
2. 発表標題 Analysis of dietary emulsifier leading to change diversity of the gut microbiota and increased intestinal permeability
3. 学会等名 The 8th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis (AOCC2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 穂苅量太
2. 発表標題 食品添加物として用いられる微量の乳化剤が腸粘膜バリアに与える影響について
3. 学会等名 第48回日本潰瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内和樹、東山正明、西井慎、溝口明範、因幡健一、杉原奈央、埴芳典、和田晃典、古橋廣崇、澁谷尚希、栗原千枝、岡田義清、渡辺知佳子、高本俊介、富田謙吾、穂苅量太
2. 発表標題 乳化剤が腸管自然リンパ球に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第43回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Horiuchi, Masaaki Higashiyama, Koji Matsumura, Hiroshi Ohno, Shin Nishii, Akinori Mizoguchi, Kenichi Inaba, Nao Sugihara, Yoshinori Hanawa, Akinori Wada, Hirotaka Furuhashi, Naoki Shibuya, Chie Kurihara, Yoshikiyo Okada, Hideaki Hozumi, Chikako Watanabe, Shunsuke Komoto, Kengo Tomita, Ryota Hokari
2. 発表標題 DISTINCTIVE SUBPOPULATION OF INNATE LYMPHOID CELLS EFFLUXED FROM INTESTINAL MUCOSA BY DIFFERENT INTESTINAL INFLAMMATIONS
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	穂苅 量太 (Hokari Ryota) (90255464)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科 学・教授 (82406)	

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
---------	---------