北海道大学·大学院農学研究院



北海道大学 大学院農学研究院 准教授 博士(農学) 園山 慶 1986 年 北海道大学農学部卒業

1988年 北海道大学大学院農学研究科

修士課程修了

1988 年 ライオン株式会社

1992年 北海道大学大学院農学研究科

博士課程中退

1992年 北海道大学助手

2003年 北海道大学助教授

周産期マウスの難消化性オリゴ糖摂取が新生仔マウスの 免疫系に及ぼす影響の解析

はじめに

腸内細菌は宿主の免疫系の健常性維持に重要な役割を果たしている。とりわけ発育初期の腸内細菌叢は発育後の免疫応答に大きく影響することから、発育初期の腸内細菌叢の修飾によるアレルギー発症予防の可能性が考えられている。筆者らはこれまでに、妊娠・授乳期の BALB/c マウスに難消化性オリゴ糖の一種であるフラクトオリゴ糖 (FOS) を混餌投与することにより離乳前の仔マウスの腸内細菌叢を修飾できることを示した 1)。このモデルを発育後にアトピー性皮膚炎様の症状を自然発症する NC/Nga マウスに適用して解析した結果、母マウスの FOS 摂取が仔マウスの皮膚炎を抑制することが示された 2)。この結果から、難消化性オリゴ糖による発育初期の腸内細菌叢の修飾が発育後のアレルギー発症を抑制するものと推察される。しかしながらそのメカニズムは明らかではない。

食物アレルギーは、原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象である。食物アレルギーの発症のためには、食物抗原が腸管粘膜バリアを通過して生体内に侵入し、経口免疫寛容による抗原特異的な不応答が解除される必要がある。言い換えれば、腸管粘膜バリアと経口免疫寛容の健常性が食物アレルギー抑制に重要な寄与をしている。そこで本研究では、難消化性オリゴ糖による発育初期の腸内細菌叢の修飾が発育後の腸管粘膜バリアおよび経口免疫寛容に及ぼす影響を、動物実験により調べた。

実験動物および飼料

BALB/c マウスを、床敷きを入れたプラスティックケージ内で、基本飼料(AIN-93G 組成

の精製飼料)および水道水を自由摂取させて飼育した。飼育室の室温は 23 ± 2 に維持し、午後 8 時から午前 8 時までを暗期とした。実験飼料は、基本飼料およびこれに FOS (メイオリゴ P、明治フードマテリア)を 5%添加した飼料とした(それぞれ FOS (-) および FOS (+))。明治フードマテリアによると、FOS は D-グルコースおよび D-スクロース (2.5%)、1-ケストース (37.3%)、ニストース (49.1%)、およびフラクトシルニストース (9.8%) より構成される。

FOS 摂取が成マウスの経口免疫寛容誘導に及ぼす影響

まず、成マウスの経口免疫寛容誘導に FOS 摂取が影響するか否かを調べた。5 週齢の雌マウスを 2 群に分け、それぞれ FOS (-) および FOS (+) を自由摂取させた。飼育開始 3 週間後に各群をさらに 2 群に分け、それぞれに卵白アルブミン (0VA、20 mg/頭) 生理食塩水溶液 (0VA(+)) および生理食塩水のみ (0VA(-)) を 4 日間連続して胃内投与した。すなわち、マウスは FOS (-) 0VA (-)、FOS (-) 0VA (+)、FOS (+) 0VA (-)、および FOS (+) 0VA (+)の 4 群に分けた。0VA 胃内投与開始の 8 日後にすべてのマウスに 0VA (100 μ g/頭) /完全フロイントアジュバントを皮下投与し、その 3 週間後に安楽死させ、採血および脾臓摘出を行った。血液から血清を分離して血清抗体価の測定を行い、脾臓からは脾細胞を調製して増殖速度の測定に供した。また盲腸内容物を採取して細菌叢の分析を行った。

盲腸内容物から分離した DNA を鋳型として細菌の 16S rRNA 遺伝子断片を PCR で増幅し、その産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)で分析した結果を**図1**に示した。DGGE の

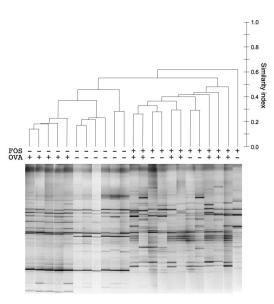


図1 16S rRNA遺伝子配列に基づくPCR-DGGE法によるBALB/cマウス の盲腸内細菌叢の解析

DGGEバンドパターンの類似性はバンドの位置と強度に基づいて算出し、無荷重平均距離法により系統樹を作成した。ゲルの各々のレーンと系統樹の各々の線は個々のマウスを示している。

バンドパターンから作成した系統樹に おいて、FOS (-) 摂取群と FOS (+) 摂取群 それぞれのクラスターが認められた。 このことは FOS 摂取が腸内細菌叢の構 成に影響を及ぼしたことを示唆してい る。またOVAによる皮下免疫から3週 間後の OVA 特異的 IgE および IgG 抗体 価に対して、免疫前の OVA の経口投与 は有意な影響を及ぼしたが、FOS の影 響は見られなかった (表1)。IgE 抗体 価は FOS(-)摂取群および FOS(+)摂取 群ともに OVA 経口投与群で有意に低値 を示した。IgG 抗体価についても、OVA 経口投与群は FOS(-) 摂取群では低い 傾向にあり、FOS(+)摂取群では有意に 低値を示した。さらに、OVA 添加培地 で培養した脾細胞の増殖速度をブロモデオキシウリジンの取り込みを指標として比較した結果、免疫前の OVA の経口投与は有意な影響を及ぼし、FOS (-) 摂取群および FOS (+) 摂取群ともに OVA 経口投与群で有意に低値を示した。これらの結果は、免疫前に OVA を経口投与することにより OVA 特異的な血清抗体価上昇および脾細胞増殖応答が抑制されたことを示しており、本研究のプロトコルにより経口免疫寛容が誘導されることを示唆している。ま

た、FOS 摂取により脾細胞の増殖は低値を示す傾向が認められたので、FOS による腸内細菌叢の修飾が経口免疫寛容による下を促進することが推察される。

表 1 BALB/c マウスにおいて食餌 FOS および OVA 胃内投与が血清抗体価および

FOS	OVA	IgE	IgG	脾細胞
		血清抗血	血清抗体力価	
-	-	7.82 ± 0.34	17.8 ± 0.7	3.82 ± 0.45
-	+	4.32 ± 0.55 *	16.2 ± 0.7	$2.48 \pm 0.31*$
+	-	7.12 ± 0.20	18.6 ± 0.7	3.25 ± 0.38
+	+	$4.32 \pm 0.49*$	$12.9 \pm 1.5*$	$1.81 \pm 0.28*$
ANOVA	<i>p</i> 値			
FOS		0.4314	0.2803	0.1120
OVA		< 0.0001	0.0041	0.0014
FOS x OVA		0.4314	0.0788	0.8918

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。アスタリスクは 0VA(-) と比較して p<0.05 で有意差有り。

母マウスの FOS 摂取が仔マウスの経口免疫寛容誘導に及ぼす影響

筆者らはこれまでに、妊娠・授乳期の母マウスに FOS を摂取させることにより離乳前の仔マウスの腸内細菌叢が修飾されることを観察しているので $^{1)}$ 、本研究でも同様の方法を採用した。すなわち、BALB/c マウスを FOS(-)あるいは FOS(+)により飼育して交配し、外観観察により妊娠を確認した雌マウスは個別飼育し、毎日観察して出産を確認した日を新生仔マウスの 0 日齢とした。仔マウスは 21 日齢から母マウスと別のケージで飼育することで強制離乳させ、すべての個体に FOS(-)を自由摂取させた。6 週齢の仔マウスを 2 群に分け、それぞれ OVA(20 mg/頭)生理食塩水溶液(OVA(+))および生理食塩水のみ(OVA(-))を 5 日間連続して胃内投与した。 すなわち、仔マウスは FOS(-)OVA(-)、FOS(-)OVA(+)、FOS(+)OVA(-)、および FOS(+)OVA(+)の 4 群に分けた。OVA 胃内投与開始の 10 日後にすべてのマウスに OVA(100 μ g/頭)/完全フロイントアジュバントを皮下投与し、その 4 週間後

に安楽死させ、前述と 同様に血清抗体価およ び脾細胞の増殖速度を 測定した。

その結果、OVA 特異的 IgE および IgG 抗体価に対して免疫前のOVA の経口投与は有意な影響を及ぼし、IgE

表 2 BALB/c マウスにおいて母親の食餌 FOS および OVA 胃内投与が血清抗体価および脾細胞増殖に及ぼす影響

FOS	O VA	IgE	IgG	Splenocytes
		ELISA	直(吸光度)	増殖刺激指数
-	-	0.435 ± 0.041	1.060 ± 0.078	7.45 ± 3.03
-	+	$0.185 \pm 0.013*$	$0.535 \pm 0.115*$	2.89 ± 1.39
+	-	0.356 ± 0.046	1.279 ± 0.111	3.66 ± 0.95
+	+	$0.167 \pm 0.016*$	$0.450 \pm 0.082*$	2.46 ± 0.72
ANO VA p	値			
FOS		0.1469	0.5002	0.2427
OVA		< 0.0001	< 0.0001	0.1140
FOS x OVA		0.3639	0.1324	0.3469

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。アスタリスクは 0VA(-)と比較して p < 0.05 で有意差有り。

および IgG 抗体価ともに OVA 経口投与群で有意に低値を示した (表 2)。しかしながら、母マウスの FOS 摂取の影響は見られなかった。さらに、免疫前の OVA の経口投与が OVA 刺激下の脾細胞増殖を低下させる傾向が認められたが、FOS の影響は見られなかった。したがって、FOS による発育初期の腸内細菌叢の修飾は発育後の経口免疫寛容の誘導に影響しないものと推察される。

母マウスの FOS 摂取が仔マウスの腸管粘膜バリアに及ぼす影響

前述と同様に BALB/c マウスを飼育し、2 群に分けてそれぞれ FOS(-)および FOS(+)を自由摂取させ、交配した。仔マウスは強制離乳時に 2 群に分け、それぞれ FOS(-)および FOS(+)を自由摂取させた。すなわち、仔マウスは FOS(-)FOS(-)、FOS(-)FOS(+)、FOS(+)FOS(+)、FOS(+)FOS(-)、および FOS(+)FOS(+)の4 群に分けた。10 週齢時に安楽死させ、長さ5 cm の末端回腸および近位結腸を切り出し、FOS(+)FOSにおけるタンパク透過性の測定に供した。また盲腸内容物を採取し、FOS(+)FOSに対象の主成分であるムチン量の指標とした。

その結果、仔マウスの末端回腸におけるタンパク透過に対して仔マウスの FOS 摂取が有意な影響を及ぼし、母マウスの FOS 摂取の有無にかかわらず、仔マウスにおける FOS(+)摂取群は FOS(-) 摂取群に比して有意な低値を示

表 3 BALB/c マウスにおいて母親の食餌 FOS が腸管タンパク透過性および盲腸 内容物中ムチン濃度に及ぼす影響

母マウス	仔マウス	タンパク透過性		盲腸ムチン
FOS	FOS	回腸	結腸	
		ng/ml		nmol
-	-	5.97 ± 1.34	1.68 ± 0.32	76 ± 15
-	+	$2.45 \pm 0.42*$	2.02 ± 0.30	108 ± 23
+	-	6.83 ± 1.26	1.93 ± 0.37	42 ± 5
+	+	$3.34 \pm 0.58*$	1.55 ± 0.103	$130 \pm 28*$
ANO VA p	値			
母マウス FOS		0.3684	0.7081	0.7569
仔マウス FOS		0.0016	0.9523	0.0069
母マウス x 仔マウス		0.9877	0.2287	0.1749

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。アスタリスクは FOS (-) と比較して p < 0.05 で有意差有り。

した(表3)。母マウスのFOS 摂取の影響は見られなかった。一方、結腸においては母マウスのFOS 摂取および仔マウスのFOS 摂取の影響は認められなかった。また、盲腸内容物中のムチン量に対して仔マウスのFOS 摂取が有意な影響を及ぼし、FOS(+)を摂取した母マウスの仔マウスにおいてFOS(+)摂取群はFOS(-)摂取群に比して有意な高値を示した。FOS(-)を摂取した母マウスの仔マウスにおいてもFOS(+)摂取群は高い傾向を示した。これらの結果から、FOS 摂取は末端回腸における粘膜バリアの健常性を亢進させたものと推察される。腸管における粘液バリアにムチンが中心的な役割を果たしていることを考えると、FOS 摂取によるムチンの増加がバリア機能亢進に寄与する結果、末端回腸におけるHRP 透過の低下につながったと推察することができる。また、本研究で用いた FOS と同様のイヌリン型フラクタンは、腸管におけるムチン産生を増加させるだけでなく、粘膜の肥厚(絨毛の伸長と陰窩の深化)を促すので、ムチンによる粘液バリアに加えて粘膜上皮によるバリア機能の亢進がFOS 摂取によるタンパク透過の低下に寄与しているかもしれない。しかしながら、

母マウスの FOS 摂取が仔マウスの腸管のタンパク透過性および盲腸内容物中ムチン含量に 及ぼす影響は認められなかったので、FOS による発育初期の腸内細菌叢の修飾は発育後の腸 管粘膜バリアに影響しないと考えられる。

結論

食物アレルギーを発症するためには食物抗原により感作されることが必要である。すなわち、食物抗原は腸管上皮を通過し、腸管粘膜に存在する樹状細胞によって取り込まれてMHC class II 拘束性にヘルパーT 細胞に提示され、これを活性化する必要がある。しかしながら健常状態においては、腸管粘膜バリアにより食物抗原の吸収が阻止されるのに加え、食物抗原に対して T 細胞は低応答となっている。言い換えれば、このような腸管粘膜バリアと経口免疫寛容の機構が破綻した状態が食物アレルギーである。FOS の摂取が回腸末端におけるタンパク透過性を抑え、経口免疫寛容によるリンパ球増殖応答の低下を促進する傾向にあるという本研究の結果は、FOS が食物アレルギーの予防に寄与する可能性を示唆する。筆者らは、妊娠・授乳期のNC/NgaマウスにFOS を摂取させることにより仔マウスで自然発症するアトピー性皮膚炎様の症状が抑制されることを報告した。この結果は発育初期の腸内細菌叢が免疫系の発達に何らかの影響を及ぼすことを示唆している。しかしながら本研究では、妊娠・授乳期の母マウスの FOS 摂取は仔マウスにおける経口免疫寛容の誘導および腸管粘膜バリアに影響しなかった。したがって、FOS による発育初期の腸内細菌叢の修飾が発育後の食物アレルギー発症のリスクを軽減する可能性は低いと考えられる。

謝辞

本研究を助成いただきましたサッポロ生物科学振興財団、ならびに助成候補者としてご推薦下さいました池上幸江先生に心より感謝申し上げます。

なお、本研究結果は以下の学術論文として既に発表した。

吉田知世、後藤悠、武村直紀、藤原麗子、園山慶. 母マウスのフラクトオリゴ糖摂取は仔マウスの発育後の経口免疫寛容の誘導および腸管粘膜バリアに影響を及ぼさない. 日本食物繊維学会誌 2010; 14: 23-32.

引用文献

- Fujiwara R, Watanabe J, Sonoyama K. Assessing changes in composition of intestinal microbiota in neonatal BALB/c mice through cluster analysis of molecular markers. Br J Nutr 2008; 99: 1174-1177.
- 2) Fujiwara R, Takemura N, Watanabe J, Sonoyama K. Maternal consumption of fructo-oligosaccharide diminishes the severity of skin inflammation in offspring of NC/Nga mice. *Br J Nutr* 2010; 103: 530-538.