

学 位 論 文 題 名

REDUCING EFFECT OF DIETARY  $\alpha$ -LINKED  
GALACTO-OLIGOSACCHARIDE ON  
INFLAMMATORY CELL MIGRATION  
IN ALLERGIC PERITONITIS OF MICE

(マウスのアレルギー性腹膜炎における炎症細胞遊走に対する  
 $\alpha$  結合ガラクトオリゴ糖の抑制作用に関する研究)

学位論文内容の要旨

The concept and use of prebiotics, such as indigestible oligosaccharides, are growing worldwide, mainly because they beneficially affect host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of intestinal bacteria, particularly lactic acid bacteria. Increasing evidence has shown health effects of indigestible oligosaccharide consumption on preventing and treating allergic diseases. We previously showed that dietary  $\alpha$ -linked galacto-oligosaccharide ( $\alpha$ -GOS) reduced the airway infiltration of leukocytes in allergic asthma model of Brown Norway rats. In the present study, we have placed attention on leukocyte recruitment because it is a central feature in several allergic diseases. Chemokines play major roles in guiding different inflammatory cells to allergic loci and also activating the effector cells in allergic reaction. The present study therefore aimed to investigate the effects of  $\alpha$ -GOS on leukocyte migration in ovalbumin (OVA)-induced allergic peritonitis model of BALB/c mice as well as on chemokine expression and production. To this end, we conducted three studies as follows:

***Study I. Dietary  $\alpha$ -GOS suppresses OVA-induced allergic peritonitis in BALB/c mice.***

This study was performed to determine the effects of  $\alpha$ -GOS on leukocyte migration *in vivo* and *ex vivo*. All the mice were s.c. immunized with OVA on days 0 and 7. Thereafter, the mice were i.p. injected with OVA to induce allergic peritonitis on day 14. The mice were given a 14-d feeding of the synthetic diet as a control diet (CON), the diet supplemented with  $\alpha$ -GOS (GOS), or a 1-d feeding of the GOS diet. On day 15, all the mice

were euthanized, and the number of peritoneal exudate cells (PECs) recovered from peritoneal lavage fluid (PLF) was counted, and *ex vivo* migration of PECs and peripheral blood leucocytes (PBLs) isolated from blood of the untreated mice toward PLF was performed. We found that total number of PECs was significantly lower in the mice fed the GOS diet than those fed the CON diet and those fed the GOS diet for 1 d. PLF from mice fed the GOS diet not only had less potency to attract PECs and PBLs *ex vivo*, but also had lower concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and eotaxin. Preincubation of the cells with  $\alpha$ -GOS did not affect cell migration toward PLF. Here we propose that dietary  $\alpha$ -GOS reduces cell infiltration in allergic peritonitis by reducing antigen-induced elicitation of MCP-1 and eotaxin in mice.

***Study II. Role of MCP-1 in reduction of OVA-induced allergic peritonitis by dietary  $\alpha$ -GOS in BALB/c mice.***

In this study, we determined the effects of  $\alpha$ -GOS on leukocyte migration in mouse model of thioglycolate (TGC)-induced peritonitis, a well-studied model of acute inflammation, in juxtaposition with OVA-induced allergic peritonitis. The mice were left untreated or twice immunized with OVA on days 0 and 7. The mice from both groups were fed the CON or the GOS diets for 14 d. On day 14, the untreated mice were i.p. injected with TGC, whereas the immunized mice were i.p. injected with OVA. On day 15, PECs were counted, and chemokine gene expression in PECs was quantified by real-time PCR. Dietary  $\alpha$ -GOS reduced leukocyte recruitment in OVA-challenged mice, but not TGC-injected mice. Moreover, dietary  $\alpha$ -GOS reduced MCP-1 mRNA levels in OVA-challenged mice. Thus, the anti-allergic effects of  $\alpha$ -GOS on leukocyte migration are associated with the reduced MCP-1 gene expression.

***Study III. Dietary  $\alpha$ -GOS alters composition of intestinal microbiota in BALB/c mice.***

In this study, intestinal bacterial population in mice were profiled by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the PCR-amplified bacterial 16S rRNA. The cluster analysis of DGGE band profiles showed that the band profiles of fecal and cecal bacteria were divided into two large clusters of the mice fed the GOS diet and those fed the CON diet. Therefore,  $\alpha$ -GOS influences the intestinal microbiota composition.

In conclusion, we provide evidence that dietary  $\alpha$ -GOS has anti-allergic effects by reducing leukocyte infiltration. The effects of  $\alpha$ -GOS are associated with the reduced MCP-1

expression and release. Further studies will be needed to clarify the link between reduction of leukocyte infiltration and changes in intestinal microbiota by dietary  $\alpha$ -GOS.

# 学位論文審査の要旨

|     |     |     |   |
|-----|-----|-----|---|
| 主 査 | 准教授 | 園 山 | 慶 |
| 副 査 | 教 授 | 川 端 | 潤 |
| 副 査 | 教 授 | 原   | 博 |
| 副 査 | 准教授 | 石 塚 | 敏 |

## 学 位 論 文 題 名

### REDUCING EFFECT OF DIETARY $\alpha$ -LINKED GALACTO-OLIGOSACCHARIDE ON INFLAMMATORY CELL MIGRATION IN ALLERGIC PERITONITIS OF MICE

(マウスのアレルギー性腹膜炎における炎症細胞遊走に対する  
 $\alpha$  結合ガラクトオリゴ糖の抑制作用に関する研究)

本論文は総頁数 77 の英文論文で、図 15 および表 3 を含み、4 章で構成されている。別に参考論文 1 編が添えられている。

腸内細菌叢が宿主の免疫機能の発達やアレルギー等の免疫疾患の発症に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。そのため、腸内細菌叢を修飾することにより正常な免疫機能の発達を促したり、免疫疾患を予防・改善したりすることが期待されている。難消化性オリゴ糖は宿主の消化酵素により消化されずに腸内細菌により資化され、選択的に *bifidobacteria* の増殖を促進する。したがって、「宿主の健康に有用な腸内細菌を選択的に増殖・活性化させる難消化性食品」と定義されるプレバイオティクスの代表的なものである。難消化性オリゴ糖のひとつである  $\alpha$  結合ガラクトオリゴ糖 ( $\alpha$ -GOS) には、ラットのアレルギー性気道炎症モデルにおいて炎症局所への好酸球浸潤を抑制する作用が認められ、アレルギー性炎症を予防できる食品として期待できる。本論文は、 $\alpha$ -GOS が炎症細胞の遊走を抑制する機構について、新たな動物モデルおよび *in vitro* モデルを構築して解析した結果をまとめたものである。

#### 1) BALB/c マウスの卵白アルブミン特異的アレルギー性腹膜炎モデルにおける $\alpha$ 結合ガラクトオリゴ糖の炎症細胞遊走抑制作用

BALB/c マウスを卵白アルブミン (OVA) で皮下免疫し、14 日後に OVA を腹腔

注射することにより腹腔内の炎症細胞浸潤を惹起するアレルギー性腹膜炎モデルを構築した。 $\alpha$ -GOS を 5% 添加した精製飼料を腹膜炎惹起前に 14 日間摂取させたマウスにおいて、腹腔浸潤細胞数は対照飼料を摂取させたマウスと比較して有意に低値を示した。また、腹腔浸潤細胞および末梢血白血球を分離し、ケモタキシンチャンバーにおいて腹腔洗浄液上清に対する遊走を計測したところ、 $\alpha$ -GOS 飼料摂取マウスの腹腔洗浄液上清に対する遊走細胞数は対照飼料マウスの上清に対する遊走細胞数より有意に低値を示した。更に、単球および好酸球の遊走をそれぞれ刺激するケモカインである MCP-1 およびエオタキシンの腹腔洗浄液中濃度は  $\alpha$ -GOS 飼料摂取マウスで対照飼料摂取マウスに比較して有意に低値を示した。以上の結果より、 $\alpha$ -GOS はマウスのアレルギー性腹膜炎において MCP-1 およびエオタキシンの産生を減少させることにより炎症細胞浸潤を抑制することが示唆された。

## 2) $\alpha$ 結合ガラクトオリゴ糖の炎症細胞遊走抑制作用における MCP-1 の役割

OVA 特異的アレルギー性腹膜炎モデルマウスにおいて、分離した腹腔浸潤細胞におけるケモカイン遺伝子の発現を定量リアルタイム PCR により比較した結果、MCP-1 mRNA レベルが  $\alpha$ -GOS 飼料摂取マウスで対照飼料摂取マウスに比較して有意に低値を示した。また、チオグリコール酸 (TGC) を腹腔投与することにより誘導する急性腹膜炎モデルにおける  $\alpha$ -GOS の効果を調べた結果、 $\alpha$ -GOS は OVA 特異的アレルギー性腹膜炎モデルにおける炎症細胞浸潤を抑制したにもかかわらず、TGC 誘導性腹膜炎における炎症細胞浸潤は抑制せず、またこれは浸潤細胞における MCP-1 mRNA レベルと一致していた。すなわち、OVA 特異的アレルギー性腹膜炎モデルで観察される  $\alpha$ -GOS の効果は、一次刺激 (炎症反応) に対する抑制作用ではなく、アレルギー応答に対する抑制作用であり、またその作用は MCP-1 遺伝子の発現低下と関連するものと推察される。

## 3) BALB/c マウスにおける $\alpha$ 結合ガラクトオリゴ糖摂取による腸内細菌叢の変化

マウスの糞便および盲腸内容物より分離した細菌 DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子断片を PCR により増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) により分離した。得られた DGGE バンドパターンのクラスター解析により腸内細菌叢の比較を行った結果、 $\alpha$ -GOS の摂取は腸内細菌叢を大きく変化させることが確認できた。そのような腸内細菌叢の変化が前述した炎症細胞遊走抑制に関係するか否かについては更なる解析が必要である。

以上、本研究では、 $\alpha$ -GOS がアレルギー性炎症を抑制する機構について、細胞浸潤に着目して新たに構築したマウスモデルを用いて解析し、関与するケモカインを明らかにするなど、難消化性オリゴ糖の生理機能に関する新しい知見を加えた点で学術上高く評価されるものである。

よって審査員一同は、Sooksan Pirapatdit が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。