

学 位 論 文 題 名

Prevention of allergic disease by manipulating gut microbiota in mouse infants

(乳仔期マウスの腸内細菌叢の修飾によるアレルギー予防に関する研究)

学位論文内容の要旨

腸内細菌は、宿主の生理機能発現に様々な役割を果たしており、とりわけ発育初期の腸内細菌叢は免疫系の発達に重要な役割を果たすと考えられている。たとえば、経口免疫寛容の誘導には、発育初期に微生物に曝露されることが重要であることがマウスの実験で示されている。また疫学研究においては、乳児期の腸内細菌叢の変化がアトピー性皮膚炎 (AD) の発症に先立って観察されている。さらに、妊娠・授乳期の母親にある種の乳酸菌株を投与することで、その子供の AD の発症が抑制されたという臨床試験の結果が報告されているので、これらの乳酸菌株は AD を予防するプロバイオティクスということが出来る。一方、発育後の乳酸菌の投与では、花粉症の抑制に効果がなかったことも報告されている。これらの結果は、アレルギーの予防のためにはプロバイオティクスを投与する時期が重要であることを示唆しているが、そのメカニズムは明らかではない。難消化性オリゴ糖は、腸内に常在する *bifidobacteria* や *lactobacilli* の増殖を選択的に刺激することで宿主の健康に良い影響を与えるプレバイオティクスである。プロバイオティクスとして用いられる菌株のほとんどは *bifidobacteria* および *lactobacilli* に属するので、これらがアレルギー予防に有効であるならば、プレバイオティクスにも有効性が期待できる。実際、フラクトオリゴ糖とガラクトオリゴ糖の混合物を AD 発症の遺伝背景を有する乳児に与えたところ、AD の発症が抑えられたという報告がある。以上のことから、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アレルギー発症に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、マウスを用いた解析を以下のように行った。

胎児は子宮内では無菌状態であるが、出生時に産道や肛門周辺に生息する微生物に曝露されるため、母親の菌叢の影響を受ける。そこで、このような母から子への菌叢の垂直伝播を利用して、離乳前の子どもの腸内細菌叢を操作することを試みた。妊娠・授乳期の母マウスを基本飼料あるいはフラクトオリゴ糖 (FOS) 添加飼料 (それぞれ FOS(-) および FOS(+)) で飼育した。糞中細菌を 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子生物学的方法 (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) で解析したところ、FOS を摂取することで腸内細菌叢が変化することが示された。加えて、仔マウスの腸内細菌叢

も、生後 0、7、14、および 21 日齢のいずれにおいても母マウスの摂取した FOS の影響を受けた。これらの結果は、妊娠・授乳期の母親に難消化性オリゴ糖を摂取させることで、発育初期の仔マウスの腸内細菌叢を修飾できることを示唆している。

NC/Nga マウスは通常飼育環境下で AD 様の皮膚炎を自然発症するマウスで、ヒトの AD モデルとしてよく用いられる。そこで、妊娠・授乳期の NC/Nga マウスに FOS を摂取させることにより、仔マウスの発育初期の腸内細菌叢を変化させ、発育後の皮膚炎発症に及ぼす影響を調べた。すなわち、母マウスには FOS(-)あるいは FOS(+)を摂取させ、生まれた仔マウスはさらに 2 群に分けて FOS(-)あるいは FOS(+)を摂取させた。皮膚炎は 7 週齢から発症し始めたが、母マウスが FOS を摂取した 2 群では、有意に皮膚炎の発症が抑えられた。その他、引っ掻き回数、Th2 系の抗体である IgG1、炎症性サイトカインである TNF- α も母マウスが FOS を摂取した 2 群で有意に低い値を示した。一方、離乳後に仔マウスが FOS を摂取しても、皮膚炎の抑制効果は弱かった。これらの結果は、FOS によって発育初期（乳児期）における腸内細菌叢を修飾することにより、発育後の皮膚炎発症を予防することができること、発育後（この実験では離乳後）に FOS を摂取して皮膚炎発症を予防することはより難しいことを示唆している。

接触皮膚炎（contact hypersensitivity、CHS）は、T 細胞が中心的な役割を果たす遅延型（IV 型）アレルギー反応で、IgE 抗体が関わる即時型（I 型）アレルギーであるアトピー性皮膚炎とは発症機構が異なる。そこで、妊娠・授乳期の NC/Nga マウスに FOS を摂取させることにより、仔マウスの発育初期の腸内細菌叢を変化させ、発育後の CHS 発症に及ぼす影響を調べた。離乳後 3 週目から、耳に 2,4-dinitrofluorobenzene（DNFB）を 7 日間隔で 4 回繰り返し塗布することにより CHS を誘導し、耳介の肥厚により CHS を評価した。AD モデルでの結果とは異なり、母マウスの FOS 摂取によって仔マウスの耳介の肥厚は抑制されず、むしろ離乳後の FOS 摂取によって抑制された。したがって、母マウスが FOS を摂取したことによる仔マウスの腸内細菌叢の修飾は、タイプの異なるアレルギー反応に対して、異なる影響を与えるものと考えられる。私達は以前、BALB/c マウスに FOS を摂取させると DNFB による CHS が抑えられ、この抑制に腸内の *Bifidobacterium pseudolongum* の増加が関与することを報告した。しかしながら本研究で用いた NC/Nga マウスにおいては *bifidobacteria* は検出されなかった。したがって、*bifidobacteria* 以外の腸内細菌が CHS の炎症抑制に関与していると考えられるが、それを明らかにするためには更なる研究が必要である。

以上、2 つの型の異なるアレルギー反応に対する発育初期の腸内細菌叢の影響を観察してきたが、AD に関しては発育初期における腸内細菌叢が発育後の疾患発症に影響を及ぼし、CHS に関しては、発育初期の腸内細菌叢よりもむしろアレルギー誘導時の腸内細菌叢が疾患発症に影響を及ぼすことが示唆された。これらのメカニズムは現在のところ不明であるが、これらのモデルを用いて解析することにより、それを明らかにすることができる。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 園 山 慶
副 査 教 授 有 賀 早 苗
副 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 横 田 篤 (農学院)

学 位 論 文 題 名

Prevention of allergic disease by manipulating gut microbiota in mouse infants

(乳仔期マウスの腸内細菌叢の修飾によるアレルギー予防に関する研究)

近年、先進諸国においてアレルギーが増加しているが、このことに発育初期の腸内細菌叢が関与するという仮説が提唱されている。難消化性オリゴ糖は、腸内に常在する *bifidobacteria* や *lactobacilli* の増殖を選択的に刺激する食品成分であるので、このものの摂取は腸内細菌叢を修飾してアレルギーを予防するかもしれない。

本論文は、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アレルギー発症に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、主として動物実験ならびに分子生物学的手法による腸内細菌叢の分析により、解析したものである。

胎児は子宮内では無菌状態であるが、出生時に産道や肛門周辺に生息する微生物に曝露されるため、母親の菌叢の影響を受ける。そこで、このような母から子への菌叢の垂直伝播を利用して、離乳前の子どもの腸内細菌叢を操作することを試みた。妊娠・授乳期の母マウスを基本飼料あるいはフラクトオリゴ糖 (FOS) 添加飼料 (それぞれ FOS(-) および FOS(+)) で飼育した。糞中細菌を 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子生物学的方法 (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) で解析したところ、FOS を摂取することで腸内細菌叢が変化することが示された。加えて、仔マウスの腸内細菌叢も、生後 0、7、14、および 21 日齢のいずれにおいても母マウスの摂取した FOS の影響を受けた。これらの結果は、妊娠・授乳期の母親に難消化性オリゴ糖を摂取させることで、発育初期の仔マウスの腸内細菌叢を修飾できることを示唆している。

NC/Nga マウスは通常飼育環境下でアトピー性皮膚炎様の皮膚炎を自然発症するマウスで、ヒトのモデルとしてよく用いられる。そこで、妊娠・授乳期の NC/Nga マウスに FOS を摂取させることにより、仔マウスの発育初期の腸内細菌叢を変化させ、発育後の皮膚炎発症に及ぼす影響を調べた。皮膚炎は 7 週齢から発症し始めたが、母マウスが FOS を摂取した 2 群では、皮膚炎の発症が低く抑えられた。一方、離乳後に仔マウスが FOS を摂取しても、皮膚炎の抑制効果は弱かった。これらの結果は、FOS によって発育初期 (乳児期) における腸内細菌叢を修飾することにより、発育後の皮膚炎発症を予防することができること、発育後 (この実験では離乳後) に FOS を摂取して皮膚炎発症を予防することはより難しいことを示唆している。

接触皮膚炎 (contact hypersensitivity, CHS) は、T 細胞が中心的な役割を果たす遅延型 (IV 型) アレルギー反応で、IgE 抗体に関わる即時型 (I 型) アレルギーであるアトピー性皮膚炎とは発症機構が異なる。そこで、妊娠・授乳期の NC/Nga マウスに FOS を摂取させることにより、仔マウスの発育初期の腸内細菌叢を変化させ、発育後の CHS 発症に及ぼす影響を調べた。離乳後 3 週目から、耳に 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を繰り返し塗布することにより CHS を誘導し、耳介の肥厚により CHS を評価した。アトピー性皮膚炎モデルの結果とは異なり、母マウスの FOS 摂取によって仔マウスの耳介の肥厚は抑制されず、むしろ離乳後の FOS 摂取によって抑制された。したがって、母マウスが FOS を摂取したことによる仔マウスの腸内細菌叢の修飾は、タイプの異なるアレルギー反応に対して、異なる影響を与えるものと考えられる。

これを要するに、著者は、腸内細菌の母子間伝播を利用して発育初期の腸内細菌叢を修飾する動物モデルを確立し、発育初期の腸内細菌叢がアレルギー発症に影響を及ぼすことを証明することにより、腸内細菌叢とアレルギーとの関係に関する新知見を得たものであり、アレルギー予防のための新たな方策確立へ貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。