

マウスにおける接触皮膚炎モデルの検討と大麦摂取の効果に関する研究

Effect of dietary composition and barley supplementation on contact hypersensitivity in mice

小林 悦子¹, 高波 嘉一², 青江 誠一郎²

¹大妻女子大学大学院人間文化研究科, ²大妻女子大学家政学部

Etsuko Kobayashi¹, Yoshikazu Takanami², and Seiichiro Aoe²

¹Graduate School of Studies in Human Culture, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

²Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

キーワード：接触皮膚炎, 肥満, 大麦

Key words : Contact hypersensitivity, Obesity, Barley

抄録

【目的および方法】肥満とアレルギー疾患の関連性に着目した基礎研究は少なく、食物繊維としての大麦摂取による両者の抑制効果に関する研究も少ない。本研究では、BALB/cマウスとC57BL/6JマウスのF1であるCBF1マウスに高脂肪食(CO), 大麦添加高脂肪食(BF)を与え、ハプテンの反復塗布によってアレルギー性接触皮膚炎の病態を形成し、食事内容の違いがマウスにおける接触皮膚炎に及ぼす影響および大麦添加によるアレルギー症状抑制効果の有無の検討を行うことを目的とした。

【結果】BF群はCO群に比べ体重増加量が低い傾向にあり、飼料効率、腹腔内脂肪総重量、副睾丸周辺脂肪重量、後腹壁脂肪重量が有意に低値を示した。両群ともにハプテン(TNCB; トリニトロクロロベンゼン)を塗布した右耳の肥厚は左耳に比べ顕著に増加したが、耳介のトルイジンブルー陽性細胞数はCO群に比べてBF群で有意に少なかった。BF群で盲腸内容物の*Lactobacillus*属の菌数が有意に多く、*Bifidobacterium*属の菌数は多い傾向にあった($p=0.065$)。BF群で*Clostridium coccoides*グループの菌数は有意に少なかった。*Eubacterium*属、*Bacteroides*属の菌数は、群間に有意差は見られなかった。【考察】マウスにおける接触皮膚炎の症状は食事内容および食餌性肥満と関連することが示唆された。また、大麦摂取によって肥満とアレルギー症状の両者が抑制されることが示唆され、その機構の一部に腸内細菌叢の状態変化が関与していると考えられた。

1. 序論

近年、日本を含む先進諸国ではアレルギー疾患の患者数が増加している。アレルギー疾患の症状緩和の方法として原因物質の除去や薬による対症療法が行われているが、より副作用の心配が少ない食事内容の改善効果によるアレルギー疾患の予防や治療の可能性に注目が集まっている。

肥満は2型糖尿病、高血圧、脂質異常症の重要な原因であるのみならず、全身の免疫系が関与する様々な疾患との関連性が示唆されている。肥満者においては感染症、特に術後感染症や乳幼児期の呼吸器感染症の発症リスクが高いという報告^[1]、また、小児期の肥満と喘息の関連性を示唆する多

くの調査研究^[2-4]から、肥満は免疫機能の異常に強く関与していることが推察され、アレルギー疾患の予防や治療の戦略を考えるうえで肥満との関連性は重要なテーマであるといえる。疫学調査の結果から肥満が免疫機能に影響を及ぼし、アレルギー疾患を含む免疫系の異常を呈する疾患との関連性が強いことが示唆されるが、肥満や脂肪組織の炎症状態とアレルギー疾患の関係に着目した基礎研究は未だ例が少ないのが現状である。

大麦は日本において古来より継続的に食べられてきた穀物の一つであり、血中コレステロールの低下作用を中心とした効果が注目されている。当研究室における研究により、大麦の摂取によって

GLP-1 分泌量の増加を介してインスリン抵抗性が改善されること、インスリン抵抗性の誘導因子の1つである脂肪細胞の初期炎症を抑制することが明らかになった。しかしながら、食物繊維源としての大麦の摂取によるアレルギー疾患症状の抑制効果に関する研究例は少ない。

本研究では、高脂肪食によって肥満を誘発したマウスを用い、接触皮膚炎の炎症を惹起して食事内容の違いがマウスにおける接触皮膚炎に及ぼす影響および大麦の摂取によるアレルギー疾患の症状と肥満の抑制効果の有無を検討することを目的とした。

2. 方法

2.1. 実験の概略

アレルギー応答性が高いことで知られているBALB/c マウスと高脂肪食摂取により肥満を呈するC57BL/6J マウスのF1であるCBF1 マウスに高脂肪食ならびに大麦(ビューファイバー全粒粉)添加高脂肪食を摂取させた。本マウスにおいて1%TNCBを反復塗布して皮膚炎症状を惹起させて高いアレルギー応答性を示すか、ならびに肥満を形成するかどうか、また大麦による両者の抑制効果が得られるかを検討した。

2.2. 実験動物

5 週齢雄の CBF1 マウス(日本エスエルシー株式会社)を 16 匹用いた。固形飼料(NMF;オリエンタル酵母工業株式会社)による 1 週間の予備飼育後、体重が均一になるように 1 群 8 匹の 2 群に群分けした。

2.3. 実験飼料

飼料組成を Table1 に示した。

コントロール(CO)群の飼料は AIN-93G 組成を基本とし、脂肪エネルギー比が 50%になるよう、ラードを添加し高脂肪食とした。大麦(BF)群の飼料はビューファイバー全粒粉(総食物繊維 23.5%, タンパク質 8.8%, 脂質 4.3%)を添加し、総食物繊維として 5%になるように調整した。

大麦は独立行政法人農研機構作物研究所より分与を受けた。大豆油、重酒石酸コリン、*t*-ブチルヒドロキノンは和光純薬工業株式会社、ラードは植田製油株式会社より購入した。

Table1 飼料組成

	(g/kg diet)	
	CO	BF
カゼイン	200	180.36
L-シスチン	3	3
β-コーンスターチ	132	-
α-コーンスターチ	197.486	195.507
スクロース	100	100
大豆油	70	70
ラード	200	200
セルロース	50	-
大麦(ビューファイバー全粒粉)	-	212.8
AIN-93Gミネラル混合	35	35
AIN-93ビタミン混合	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5
<i>t</i> -ブチルヒドロキノン	0.014	0.014

2.4. 飼育方法(動物実験)

動物は、室温 22±1°C、湿度 50±5%、12 時間明暗サイクル(8:00~20:00)で飼育した。Table1 に示した実験飼料と水をそれぞれ自由摂取させ、2~3 日毎に体重と飼料摂取量を測定した。飼料添加前および添加後の給餌器の重量を測定し、その差を摂取量とした。測定記録より、体重増加量、飼料摂取量、飼料効率を求めた。

接触皮膚炎の病態を形成するために、マウスの耳介にハプテンとしてトリニトロクロロベンゼン(TNCB,和光純薬工業株式会社)を反復塗布した。各飼料の摂取開始から 4 週間後、初回感作としてアセトン溶液に溶解した 1%TNCB を 20μL、右耳介内側に塗布した。初回感作の 1 週間後より、同様の方法を 2~3 日毎に繰り返し、4 週間の間に計 12 回塗布を行って炎症を惹起した。

2.5. 動物解剖とサンプル採取

12 回目のハプテン塗布の 24 時間後、ダイヤルシクネスゲージ(アズワン株式会社)を用いて左右の耳介の肥厚を測定し、差を肥厚増加量とした。麻酔下で開腹し、心臓より採血、耳介、肝臓、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。血液は氷中保存し、6,000rpm、4°Cで 15 分間遠心分離し、血清を採取して-80°Cで保存した。

2.6. 分析方法

(1)血清分析

採取した血液より血清を分離したのち、100 倍希釈し「レビス IgE-ELISA キット(マウス)」(株式会社シバヤギ)を用いて総 IgE を分析した。

(2)耳介のトルイジンブルー陽性細胞数の測定

耳介の一部を10%のホルマリン溶液に浸漬して固定したのち、株式会社栄養・病理学研究所に依頼し、脱水・パラフィン浸透埋・薄切・伸展・乾燥した後、0.05%トルイジンブルー水溶液で染色し、パラフィン包埋した。耳の病理組織標本を光学顕微鏡(キーエンス・デジタルマイクロスコープ)で観察し、画像解析ソフトで250 μ m²当たりのトルイジンブルー陽性細胞を一検体につき10視野計測し、平均値をトルイジンブルー陽性細胞数とした。

(3)リアルタイムPCR法による腸内細菌叢分析

凍結した盲腸から、「QIAamp DNA Stool」(QIAGEN社)を用いてDNAを抽出した。盲腸内容物の腸内細菌数(*Bifidobacterium*属, *Bacteroides*属, *Lactobacillus*属, *Eubacterium*属, *Clostridium* *coccoides*グループおよび総菌数)をリアルタイムPCR法で測定し、標準菌株を用いた検量線によって菌数を算出した。

2.7.統計解析

すべての測定結果は有意水準を両側5%とした。正規性の確認とBartlettの等分散検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定を用いた。不等分散の場合はWelchの検定を用いた。

3. 結果

3.1.成長結果

大麦添加高脂肪食(BF)群において、対照(CO)群に比べて体重増加量が低い傾向にあった($p=0.082$)。飼料効率はBF群で有意に減少した。飼料摂取量において群間で有意差はみられなかった。

3.2.臓器重量

盲腸重量においてBF群でCO群に比べて有意に高値を示した。後腹壁脂肪重量、副睾丸周辺脂肪重量および腹腔内脂肪総重量はBF群でCO群に比べて有意に低値を示した。腸間膜脂肪重量は群間で有意差はみられなかった。

3.3.耳介の測定結果

耳介の肥厚増加量はBF群でCO群に比べて低い傾向にあった($p=0.058$)。1領域あたりの耳介のトルイジンブルー陽性細胞平均数はBF群で有意に少なかった。

3.4.盲腸内容物の腸内細菌叢

盲腸内容物の総菌数は、群間で有意差は見られ

なかった。菌種別の菌数ではBF群において*Lactobacillus*属の菌数が有意に多く、*Clostridium* *coccoides*グループの菌数が有意に少なかった。また、*Bifidobacterium*属の菌数はBF群で多い傾向にあった($p=0.065$)。

*Eubacterium*属, *Bacteroides*属の菌数は、群間に有意差は見られなかった。

4. 考察

本研究はアレルギー応答性が高いBALB/cマウスと通常では肥満を呈さないが高脂肪食によって肥満を呈するC57BL/6JマウスのF1であるCBF1マウスに、高脂肪食・大麦添加高脂肪食のいずれかを与え、ハプテンの反復塗布によってアレルギー性接触皮膚炎の病態を形成した。CBF1マウスにおいて食事内容の違いおよび大麦添加によるアレルギー症状への影響を検討することを目的とした。

BALB/cマウスはアレルギー応答性が高く、ハプテンの反復塗布によるアレルギー性皮膚炎のモデルマウスとして用いられることの多い系統である^{[5][6]}。しかし、この系統では高脂肪食による肥満が誘導されにくいことが報告されており、高脂肪食がアレルギー疾患の症状に及ぼす影響を評価することは困難である。一方、C57BL/6Jマウスは、通常の食餌では肥満を呈さないが高脂肪食の摂取によって肥満を呈する。しかしこの系統はアレルギー応答性が悪く、ハプテンの反復塗布による炎症を十分に引き起こすことができない^{[7][8]}。そこで本研究では、両者の特性を併せ持つことを期待して両系統のF1であるCBF1マウスを用いた。その結果、両群ともにハプテンを塗布した右耳で、左耳に比較して耳介の厚み、トルイジンブルー陽性細胞数は顕著に増加した。このことから、ハプテン塗布によって慢性的なアレルギー性皮膚炎の病態を形成していたと考えられた。またトルイジンブルー陽性細胞数はBF群で有意に低値を示した。

BF群では飼料効率、腹腔内脂肪重量がCO群に比べて有意に低い値を示したことから、高脂肪食による肥満が形成され、脂肪蓄積が大麦の摂取によって抑制されたことが示唆された。

アレルギー疾患と食事との関連性において、腸内細菌叢の状態改善は重要な因子であると考えられている。Fujiwara et al.はNC/Ngaマウスを用いた研究で、難消化性オリゴ糖の一つであるフラクトオリゴ糖(FOS)を妊娠・授乳期の母マウスに混餌投与することで離乳前の仔マウスの腸内細菌叢を修

飾し、仔マウスの皮膚炎が抑制されることを示した^[9]。またヒトのアトピー性皮膚炎や食物アレルギーの患者では腸内細菌叢の*Bifidobacterium* / *Clostridium*比が低く、分泌型IgA抗体および上皮中のIgA抗体量が減少した^[10]。総じてアレルギー疾患に罹患している乳児では腸内の乳酸産生菌の減少がみられることも報告されている^[11]。本研究において、BF群では盲腸重量および盲腸内容物の*Lactobacillus*属の数が有意に多く、*Bifidobacterium*属の菌数が多い傾向にあり*Clostridium coccooides*グループは有意に少なかった。この結果から、大麦の摂取により腸内細菌叢の状態が改善されたことによって、肥満とアレルギー症状の緩和に効果がみられたと考えられた。

本研究の結果から、マウスにおける接触皮膚炎の症状は食事内容および食餌性肥満と関連することが示唆された。また、大麦の摂取は肥満とアレルギー疾患の症状を抑制する可能性が示唆され、そのメカニズムの一部は腸内細菌叢の改善を介したものであると考えられた。

付記

本研究は大妻女子大学人間生活文化研究所「共同研究プロジェクト」(D028)の助成を受けたものである。

引用文献

- [1] Calle E, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 348: 1625-1638
- [2] Gilliland FD, Berhane K, Islarm T, et al (1995) Body weight and mortality among women. *N Engl J Med.* 333: 677-685
- [3] Gold DR, Damokosh AI, Dockery DW, Berkey CS. (2003) Body-mass index as a predictor of incident asthma in a prospective cohort of children. *Pediatr Pulmonol.* 36: 514-521

- [4] Tollefsen E. (2007) Female gender is associated with higher incidence and more stable respiratory symptoms during adolescence. *Respir Med.* 101: 896-902
- [5] Alexander, J., Chang, G.Q., Dourmashkin, J.T. and Leibowitz, S.F. (2006) Distinct phenotypes of obesity-prone AKR/J, DBA2J and C57BL/6J mice compared to control strains. *Int. J. Obes.* 30: 50-59.
- [6] West, B.D., Boozer, N.C., Moody, L.D. and Atkinson, L.R. (1992) Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am. J. Physiol.* 262: R1025-R1032
- [7] Scott, P., P. Natovitz, R. L. Coffman, E. Pearce, and A. Sher. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis: T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.* 168: 1675
- [8] Heinzl, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman, and R. M. Locksley. (1989) Reciprocal expression of interferon g or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 169: 59.
- [9] Fujiwara R, Takemura N, Watanabe J, Sonoyama K (2010) Maternal consumption of fructo – oligosaccharide diminishes the severity of skin inflammation in offspring of NC/Nga mice. *Br J Nutr.* 103: 530-538
- [10] Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, et al (2003) Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 111: 587-591
- [11] Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, et al (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo - controlled trial. *Lancet.* 357: 1076-1079

Abstract

There are very few reports on the relationship between obesity and allergic dermatitis, in particular, the effects of barley intake on both obesity and allergic dermatitis are not established. The purpose of this study was to investigate the effect of dietary composition and barley intake on contact hypersensitivity in mice. Mice were fed a high-fat diet with (Beau Fiber; BF) or without (control; CO) barley powder and contact hypersensitivity was induced using 2, 4, 6-trinitrochlorobenzene (TNCB) on the right ear.

The feed efficiency ratio, intraperitoneal and epididymal fat weights in the BF group were significantly lower than those in the CO group. In both groups, the right ear became swollen but the BF diet decreased the number of Toluidine Blue-positive cells compared with the control diet. A significant increase in the number of faecal *Lactobacillus* and decrease in *Clostridium coccooides* were observed in the BF group compared with the CO group. The number of *Bifidobacterium* tended to be higher in the BF group ($p=0.065$). There were no significant differences in the number of *Eubacterium* and *Bacteroides* between the two groups. These results suggested that barley intake may control both diet-induced-obesity and allergic dermatitis through modulation of the composition of intestinal microbiota.

(受付日：2014年6月28日，受理日：2014年7月9日)

小林 悦子（こばやし えつこ）

現職：独立行政法人国立健康・栄養研究所 技術補助員

大妻女子大学大学院人間文化研究科修士課程修了。

現在は食品や食品成分に関する安全性・有効性情報の収集と提供に携わっている。