

マウスにおける消化管免疫と食物繊維の腸内発酵の関係に関する研究

Study of relationship between intestinal immune system and intestinal fermentation of dietary fiber in mice.

青江 誠一郎¹, 加藤 美智子², 山岸 あづみ², 築館 香澄²
Seiichiro Aoe¹, Michiko Kato², Azumi Yamagishi², and Kasumi Tsukidate²

¹大妻女子大学大学院人間文化研究科, ²大妻女子大学人間生活文化研究所

キーワード：消化管免疫, 食物繊維, 腸内発酵, マウス

Key words : Intestinal immune system, Dietary fiber, Intestinal fermentation, Mice

1. 研究目的

ヒトの腸管には約 1,000 種類, 100 兆個以上の腸内細菌が生息している。腸内では, 腸内細菌叢を形成し, 食物繊維などを発酵基質とすることで, 短鎖脂肪酸などの代謝産物を産生する。この短鎖脂肪酸は, 腸上皮細胞のエネルギー源となることや, 腸管免疫機能を高める効果があることが報告されている。最近の研究により, 生きた腸内細菌を利用したプロバイオティクスや特定の腸内細菌を増殖させるプレバイオティクスの研究が盛んになり, 腸内細菌叢が免疫系の成熟やその機能維持に寄与していることが報告された。無菌マウスや特定の腸内細菌を定着させたノトバイオオートマウスを用いた研究により, 粘膜の主要抗体である分泌型免疫グロブリン A (sIgA) を作る形質細胞や, 制御性 T 細胞の数も腸内細菌叢が関係していることが明らかになった。しかし, どのような食物繊維を摂取し, どのような腸内細菌叢のバランスが腸管内で免疫系を調節するかについては明らかにされていない。そこで, 高繊維食と, 低繊維食をマウスに投与してその影響を調べたところ, 高繊維食群でのみ制御性 T 細胞の増加が観察された。この結果から, 腸内発酵で作られる酪酸が制御性 T 細胞への分化誘導に重要であることが示されたが, 食物繊維の質の評価はなされていない。

本プロジェクトでは, 制御性 T 細胞を測定する系を導入し, 消化管免疫を活性化する食物繊維成分を共同研究により体系的に検索していくことを目的とする。研究期間内で, 以下の素材の効果を検証することを目的とした。

1) プロバイオティクスの効果 : *Lactobacillus plantarum* 発酵豆乳と消化管免疫賦活作用との関

係を調べる。

2) 大麦 β -グルカンの効果 : 発酵性食物繊維である β -グルカンに富む大麦の摂取が, 腸内細菌叢と消化管マーカーとの関係を調べる。

3) 昆布アルギン酸の効果 : 発酵性食物繊維であるアルギン酸に富む昆布の摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響と消化管マーカーとの関係を調べる。

2. 研究実施内容

1) プロバイオティクスの効果

飼料組成を Table1 に示す。飼料は AIN-93G 組成を基本とし, 脂肪エネルギー比が 25% となる様にラードを添加し, 凍結乾燥させた豆乳を加え豆乳群の飼料とした。他の 2 群は豆乳の代わりにそれぞれ *Lactobacillus Plantarum* (LP) 生菌, LP 殺菌粉末を 10% ずつ添加した。LP 生菌群は豆乳を *L. plantarum* BF-LP284 株で発酵したのち凍結乾燥させたもので, LP 殺菌群は生菌発酵液を 70°C, 15 分加熱処理したのち凍結乾燥させたものである。豆乳群, LP 殺菌群, LP 生菌群のたんぱく質はそれぞれ 44.3%, 43.8%, 44.3% であり, 脂質はそれぞれ 17.0%, 18.9%, 20.2% であった。

LP 生菌群は, *Lactobacillus plantarum* BF-LP284 株を ALA 中央研究所より提供を受けた。生菌群の菌数は 5×10^8 (CFU/g) であった。動物は, 4 週齢の NC/Nga マウス(日本チャールス・リバー)を固形飼料(NMF,オリエンタル酵母社製)で 1 週間の予備飼育後, 体重が均一になるように 1 群 8 匹ずつの 3 群に群分けした。マウスには Table1 に示した実験飼料と水を 71 日間自由摂取させた。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)を反復塗布した。各飼料の摂取開始から 3

週間後、初回感作としてアセトン溶液に溶解した 1%TNCB を 20 μ l, 右耳介内側に塗布した. 初回感作の 4 日後より, 同様の方法を 1~3 週間毎に繰り返し, 7 週間の間に計 6 回塗布を行って炎症を惹起した.

Table1 飼料組成

| | (g/kg diet) | | |
|------------------|-------------|--------|--------|
| | 豆乳 | LP生菌 | LP殺菌 |
| カゼイン | 147.9 | 147.9 | 148.5 |
| 豆乳 | 100 | | |
| LP生菌 | | 100 | |
| LP殺菌 | | | 100 |
| L-シスチン | 3 | 3 | 3 |
| コーンスターチ | 314.51 | 317.70 | 315.83 |
| α コーンスターチ | 132 | 132 | 132 |
| ショ糖 | 100 | 100 | 100 |
| 大豆油 | 70 | 70 | 70 |
| ラード | 23.0 | 19.8 | 21.1 |
| セルロース | 50 | 50 | 50 |
| AIN-93G特殊ミネラル混合 | 35 | 35 | 35 |
| CaCO3 | 12.05 | 12.06 | 12.07 |
| AIN-93ビタミン混合 | 10 | 10 | 10 |
| 重酒石酸コリン | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| t-ブチルヒドロキノン | 0.014 | 0.014 | 0.014 |

マウスは実験最終日に飼料摂取量, 体重測定後, 一晚絶食させ, イソフルラン/CO₂ 麻酔下で安楽死させて開腹し, 心臓より血液を採取した. その後, 耳介, 肝臓, 盲腸, 腸間膜リンパ節を摘出し, 重量測定した. 血液は水中保存し, 6000rpm, 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. 肝臓は-30°Cで保存した. 耳介の半分を 10%ホルマリン溶液に漬けて固定し, 半分を RNeasy later に入れ mRNA 測定に用いた. 腸間膜リンパ節は Treg 解析を行った.

マウスの腸間膜リンパ節(MLN)を摘出後, 付着する脂肪組織をはがし, 加熱非動化した牛胎児血清 (FBS; HANA-NESCO BIO, Tokyo, Japan) を 10% (v/v) 加えた RPMI-1640 (SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan) 培地を入れたシャーレ上で細かくせん断し, シリンジにて軽く押しつぶした. さらに 10%FBS/RPMI-1640 培地を加えナイロンメッシュ (#150) にて濾過し, 遠心 (200G 10min) した. 得られたペレットを 10%FBS/RPMI-1640 培地にて 2 回洗浄した後, 血球計算盤にて細胞数をカウン

トし 1 \times 10⁷ 個/mL に調整し MLN 細胞懸濁液とした.

Treg 解析は, BioLegend 社の True-Nuclear™ One Step Stating Mouse Treg Flow™ Kit (FOXP3 ALlexa Flour 488/CD25 PE/CD4 PerCP) を用い, Beckman Coulter 社の CytoFLEX にて測定した. 各サンプル 2 本ずつ用意し, MLN 細胞懸濁液 100 μ l に Fix solution 1mL を加えボルテックス後, 暗所室温にて 30~60 分間インキュベートした. Perm Buffer 2mL を加えて 2 回洗浄後, 400G で 5 分間遠心した. ペレットに 100 μ l の Perm Buffer を加え, さらに Alexa Fluor® 488 anti-mouse FOXP3/CD25 PE/CD4 PerCP antibody cocktail と Alexa Fluor® 488 rat IgG2b,kisotype control/CD25 PE/CD4 PerCP antibody cocktail をサンプル 1 本ずつに加えた. 30 分間以上暗所室温にてインキュベートした. 2mL の Perm Buffer を加え, 400G で 5 分間遠心した. 上清を捨て staining buffer を 2mL を加え, 400G で 5 分間遠心した. 上清を捨て cell staining buffer 0.5mL を加え, セルストレーナーにかけフローサイトメトリー用サンプルとし, 測定した.

すべての統計処理は統計ソフト(JMPpro12)を用いて, 一元配置の分散分析を行い, 平均値の差の検定は Turkey-Kramer の多重比較法を用いた. 測定結果は平均値 \pm 標準偏差で示し, 有意水準は 5% とした.

Treg 解析結果を Figure 1 に示す. LP 生菌群に比較して, LP 死菌群が有意に高い値を示した($p=0.0241$). LP 死菌群が有意に高い値を示したことから, Treg 細胞により自己免疫疾患を抑えたことが考えられた.

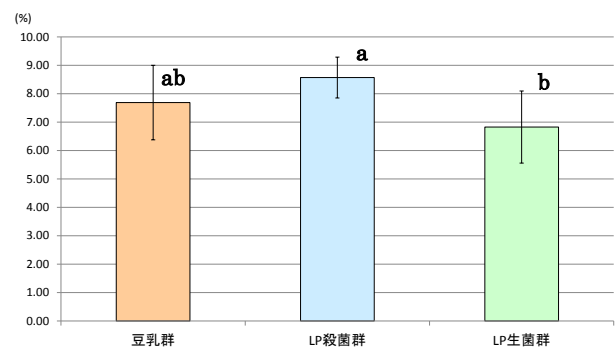


Figure 1 小腸パイエル板の Treg(%) エラーバーは標準偏差を示す.

異なるアルファベット間で有意差あり ($P<0.05$)

2) 大麦 β -グルカンおよび昆布アルギン酸の効果
飼料組成を Table2 に示す. AIN-G93 組成を飼料基本として, 脂肪エネルギー比が 20%になるようにラードを添加した. 総食物繊維量は 5.0%になるようセルロースを添加したものをコントロール群の飼料とした. 昆布群の総食物繊維量についても, 以下に記した飼料を 5.0%となるように添加し, 脂質とたんぱく質がコントロール群と同量になるように調整した. 以下に試験群の飼料を示す.

昆布は, 北海道 函館産のガゴメ昆布を購入し, 凍結乾燥後に粉碎して使用した. 凍結乾燥物を常法により分析した結果, 食物繊維 35.4%, タンパク質 9.1%, 脂質 0.5%, カルシウム 0.9%であった. 大麦は, 永倉精麦製のビューファイバー62%搗精粉を使用した. 成分分析の結果, 食物繊維 19.8%, タンパク質 11.0%, 脂質 5.1%であった. 動物は, 4 週齢雄の Balb/c マウス (日本チャールス・リバー) を固形飼料 (NMF,オリエンタル酵母社製) で 1 週間の予備飼育後, 体重が均一になるように 1 群 8 匹ずつの 3 群 (コントロール: C, 昆布: G, 大麦: B) に群分けした. マウスには Table2 に示した実験飼料と水を 57 日間自由摂取させ 2 ~3 日おきに体重と飼料摂取量を測定した. なお, 飼育環境は, 室温 $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\pm 5\%$, 12 時間の明暗サイクル (9:00~21:00) とした.

Table2 飼料組成

| | 対照 | 大麦 | 昆布 |
|-----------------|---------|--------|---------|
| アルファ化コーンスターチ | 184.986 | 26.635 | 109.719 |
| コーンスターチ | 132.0 | 132.0 | 132.0 |
| ミルクカゼイン | 200.0 | 168.7 | 187.9 |
| グラニュー糖 (ショ糖) | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| 大豆油 | 70.0 | 70.0 | 70.0 |
| ラード | 200.0 | 187.1 | 199.3 |
| セルロースパウダー | 50.0 | 0.0 | 0.0 |
| ビューファイバー全粒 | - | 252.5 | - |
| ガゴメ昆布 | - | - | 141.2 |
| AIN-93G特殊ミネラル混合 | 35.0 | 35.0 | 35.0 |
| CaCO3 | 12.5 | 12.5 | 9.31 |
| AIN-93ビタミン混合 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| L-シスチン | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| 重酒石酸コリン | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| t-ブチルヒドロキノン | 0.014 | 0.014 | 0.014 |

腸内細菌叢の分析は, リアルタイム PCR 法にて分析した. 凍結した盲腸から QIAamp DNA Stool kit

(QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した. 抽出した DNA 量を吸光度で測定し, Abs.260/280が 1.7~1.9, 260nm での吸光度が 0.1~1.0であることを確認した.

リアルタイム PCR 法は, Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System を用いた SYBER Green 法で測定した. DNA サンプルを 100 倍希釈 (DNA サンプル $2\mu\text{l} + \text{DEPC } 198\mu\text{l}$) したものを DNA 溶液とし, DNA 溶液 ($2\mu\text{l}$) に *Bifidobacterium* 属, *Lactbacillus* 属, *Bacteroides* 属, *Clostridium coccoides* グループそれぞれのプライマーを添加した SYBER Green 溶液 ($10.5\mu\text{l}$) を加えて増幅させた. 求められた Ct 値から, 検量線を用いてそれぞれの菌数を算出した. なお, 検量線は標準菌株から抽出した DNA 溶液を段階希釈して測定した Ct 値を用いて作成した.

使用した標準菌株を Table3 に示す.

Table3 標準菌株

| 菌数 | 番号 | 生菌数 (CFU/g) |
|---|----------|-------------------|
| <i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i> | JCM1217 | 3.2×10^8 |
| <i>Bacteroides thetaiotamicron</i> | JCM5827 | 2.4×10^8 |
| <i>Lactbacillus rhamnosus</i> | ATCC8530 | 1.3×10^8 |
| <i>Clostridium coccoides</i> | JCM1395 | 1.7×10^8 |

また, 菌の検出に用いたプライマーを Table4 に示す.

すべての統計処理は統計ソフト (JMP Pro12) を用いて, 一元配置の分散分析を行い, 平均値の差の検定は Turkey-Kramer の多重比較法を用いた. 測定結果は平均値 \pm 標準偏差で示し, 有意水準は 5% とした.

Table 4 プライマー配列

| 菌数 | プライマー配列 |
|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Bifidobacterium</i> 属 | F AGGGTTCGATTCTGGCTCAG |
| | R CATCCGGCATTACCACCC |
| <i>Lactbacillus</i> 属 | F TGGAAACAGGTGCTAATACCG |
| | R GTCCATTGTGGAAGATTCCC |
| <i>Bacteroides</i> 属 | F GTCAGTTGTGAAAGTTTGC |
| | R CAATCGGAGTTCTTCGTG |
| <i>Clostridium coccoides</i> グループ | F AAATGACGGTACCTGACTAA |
| | R CTTTGAGTTTCATCTTTCGAA |

腸内細菌叢の 1g あたりの菌数を Table 5 に示す. *Bifidobacterium* 属については, C 群と他 2 群で有意差は見られなかったが, C 群に比べ G 群は高い傾向にあった ($p=0.072$). *Lactbacillus* 属は, C 群に比べ G 群が有意に高かった. *Bacteroides* 属は, C 群に比べ G 群が有意に低かった. *Clostridium*

coccoides グループについては、C 群に比べ B 群が有意に低かった。また、G 群も C 群と比較して低い傾向にあった ($p=0.0969$)

Table 5 腸内細菌叢

| | コントロール | G(昆布) | B(大麦) |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <i>Bifidobacterium</i> 属 (logCFU/g) | 8.42 ± 0.17 ^{ab} | 8.86 ± 0.55 ^a | 8.26 ± 0.22 ^b |
| <i>Lactobacillus</i> 属 (logCFU/g) | 8.55 ± 0.18 ^a | 9.83 ± 0.16 ^b | 8.53 ± 0.19 ^a |
| <i>Bacteroides</i> 属 (logCFU/g) | 8.56 ± 0.13 ^a | 7.57 ± 0.66 ^b | 8.37 ± 0.33 ^a |
| <i>Clostridium coccoides</i> グループ(logCFU/g) | 8.67 ± 0.11 ^a | 8.19 ± 0.16 ^{ab} | 8.1 ± 0.43 ^b |

消化管免疫に関与する回腸の炎症マーカーの mRNA 発現量の測定を行った。Total RNA の抽出をし、抽出した RNA に含まれる mRNA を、逆転写反応 (RT-PCR) にて相補的に DNA (cDNA) を調節して測定した。mRNA 発現量は、Applied Biosystems の 7300 の Real-Time PCR System を用い、SYBR Green 法にて、内部標準として用いた 36B4 との相対比より求めた。

用いたプライマーを以下に示す。

[36B4]

Fw : GGCCCTGCACTCTCGCTTTC

Rv : TGCCAGGACGCGCTTGT

[TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α]

Fw : ACCCTCACACTCAGATCATCTTC

Rv : TGGTGGTTTGCTACGACGT

[IL-6]

Fw : ACAACCACGGCCTTCCCTACTT

Rv : CACGATTTCCAGAGAACATGTG

[MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1]

Fw : CCACTCACCTGCTGCTACTCAT

Rv : TGGTGATCCTCTTGTAGCTCTCC

[F4/80]

Fw : CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC

Rv : GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG

Table 6 消化管マーカー

| | コントロール | G(昆布) | B(大麦) |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 回腸TNF- α (arbitrary unit/36B4) | 1.00 ± 0.85 | 0.78 ± 0.19 | 0.64 ± 0.50 |
| 回腸IL-6 (arbitrary unit/36B4) | 1.00 ± 0.94 ^a | 0.52 ± 0.41 ^{ab} | 0.1 ± 0.10 ^b |
| 回腸MCP-1 (arbitrary unit/36B4) | 1.00 ± 0.64 | 0.64 ± 0.6 | 0.4 ± 0.19 |
| 回腸F4/80 (arbitrary unit/36B4) | 1.00 ± 0.38 ^a | 0.43 ± 0.16 ^b | 0.37 ± 0.21 ^b |

消化管マーカーを Table 6 に示す。TNF- α , MCP-1 は有意差が見られなかった。IL-6 は C 群と比較して、B 群が有意に低かった。F4/80 は C 群と比較して G 群、B 群で有意に低かった。

腸内細菌叢に関して、G 群ではラクトバチルスと回腸 TNF- α で正の相関、バクテロイデスと回腸 MCP-1 で負の相関が見られた。B 群ではバクテロイデスと回腸 MCP-1 で正の相関が見られた。腸内細菌叢と消化管マーカーに関連性が見られた。

3. まとめと今後の課題

1) プロバイオティクスの効果

炎症性サイトカイン発現量による効果が確認できなかったが(データ示さず), LP 殺菌群において Treg 細胞比率に効果が認められた。本結果より, LP 殺菌群には耳介のアトピー性皮膚炎の軽減効果のメカニズムに, 制御性 T 細胞の増加が関与していると考えた。今後, 制御性 T 細胞を対象とする殺菌処理物のアトピー性皮膚炎の免疫応答を亢進もしくは抑制させる研究が必要がある。

2) 大麦 β -グルカンおよび昆布アルギン酸の効果

大麦および昆布の摂取により, 腸内細菌叢が変動し, 消化管の炎症マーカーに影響することが示された。今後, 短鎖脂肪酸の分析を進めるととも消化管免疫マーカーの指標も増やして検討していく必要がある。

4. この助成による発表論文等

公開講座：一般社団法人 日本昆布協会 講演会
「昆布の機能性について」
(平成 29 年 3 月 14 日, 神戸)