

研究課題名	食物アレルギー予防を目指した食品成分による腸内環境制御法の開発
フリガナ	ハルサト アキヒト
代表者名	春里 暁人
所属機関 (機関名) (役職名)	京都府立医科大学消化器内科 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	該当なし。 補足事項：Cell Symposia: Infection Biology in the Age of the Microbiome 2020 年 12 月発表予定であったがコロナ禍により延期。

研究結果要約

戦後、本邦では高度経済成長に伴う食糧の大量消費が可能となり、我々は「欧米化」した食生活を享受してきた。一方、我が国における疾病構造は変化し、自己免疫疾患、アレルギー疾患に加えて生活習慣病やがんといった疾病の罹患数は増加の一途である。食品乳化剤は欧米を中心に多くの食品に添加されているが、これらが腸内細菌叢に影響し腸管粘液層を破壊し、結果として腸炎やメタボリックシンドロームを促進することが報告された。¹本研究では、食品乳化剤が食物アレルギーに及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにするための検討を行った。

本研究では OVA アルブミン感作により誘導される食物アレルギーが、出生後早期からの食品乳化剤摂取により有意に増悪した。16s rRNA シークエンスを用いた腸内細菌叢の解析では、食品乳化剤投与群においてコントロール群と比較して明瞭な腸内細菌叢構成の変化が観察された。宿主側の因子について腸管免疫細胞の網羅的遺伝子解析を RNA シークエンスにて実施し、IL-4, IL-13 といった 2 型サイトカインの発現が亢進することを見出した。抗生剤カクテル投与により食品乳化剤によるアレルギー増悪は消失し、腸内細菌叢が食品乳化剤を介したアレルギー増悪メカニズムに寄与することが示唆された。さらに本研究では新規サイトカイン IL-36 の発現が食物アレルギーで亢進す

ることを世界で初めて見出し、今後研究を進めていく。

研究目的

食物アレルギーの発症リスクとして遺伝的因子や生活環境因子が挙げられているが、現在、食物アレルギーの予防法は二次予防としてのアレルゲン摂取の徹底した管理であり、有効な一次予防法がないのが現状である。² 一方、近年の研究により出生後早期の腸内環境が免疫系の発達に極めて重要であり、その後のアレルギー疾患発症に影響する可能性が示唆されている。^{3,5} しかしながら、このような腸内環境の変化が、食物アレルギーの発症に及ぼす影響やそのメカニズムは未だ明らかでなく、本研究では腸内環境制御を基盤とする食物アレルギーの一次予防確立に向けた研究開発を実施した。特に、本研究では欧米を中心に汎用されている「食品乳化剤」をモデルとし、食品成分が腸内細菌叢の変化を介して食物アレルギーに及ぼす影響を明らかにすることを主眼に研究を行った。

研究計画及び研究手法

A. 研究計画

食物アレルギーによるアナフィラキシーは致死的な病態を引き起こす一方、主に消化管を介したアレルギーであることから、下痢や腹痛といった慢性の症状を引き起こすこともある。現在、食物アレルギーは世界的にも非常に重要な健康問題として認識されており、近年の疫学的研究から、食物アレルギーの有病率が世界的に急増していること、その傾向が特に先進国で顕著であることが明らかとなった。食物に加えて遺伝的要因や環境的要因により、経口免疫寛容が破綻し、食物アレルギーを生じると考えられているが、食物アレルギーの根本的な病因は未だ解明されていない。また、一旦発症した食物アレルギーに対する効果的な治療戦略も確立されているとは言えない状況である。したがって、現時点ではアレルゲンへの暴露を避けるため、アレルゲン除去食による二次予防が、食物アレルギーによるアナフィラキシーの危険性を減少させるための重要な手段となっている。つまり、食物アレルギーの病態解明及び新たな予防・治療戦略の確立は、国内的にも国際的にもアンメットメディカルニーズであると考えられる。⁶

一方で、20 世紀後半より、特に先進国を中心とした「大量生産・大量消費」といった食品産業構造の変革、それに伴うグローバルな食習慣の変化が、様々な慢性炎症性疾患や悪性腫瘍、メタボリックシンドローム、および食物アレルギーの発症率の増加と関連することが示唆されている。このような食事内容の変化は、野菜、果物といった食物繊維などの自然由来成分を豊富に含む未加工食品の消費が減少し、ケーキミックス、チョコレート、アイスクリームなど高度に加工された食品の摂取が増加していることに特徴づけられる。これらの高度に加工された食品の中で、食品用乳化剤は、食品の質感、風味、発色を安定させるため、幅広く使用されている。これらの乳化剤は、加工食品の親水性成分と疎水性成分の分離を避けるための界面活性剤として働き、食品の保存期間の延長にも有用である。

本研究の共同研究者である Chassaing 博士は、食品乳化剤が上述した疾患群の発症率の急増と関連する可能性について研究を行い、特に欧米で使用されている乳化剤であるポリソルベート 80 (P80) およびカルボキシメチルセルロース (CMC) の常用量を投与することで、マウスで腸炎が誘発され、腸内細菌の侵入を促進することを見出した。^{1,7}しかし、これらの食品乳化剤が食物アレルギーに伴うアナフィラキシーや 2 型免疫応答に影響を及ぼすかどうかはこれまで検討されてこなかった。また、最近の研究では、特に早期ライフステージにおける腸内細菌叢の異常が食物アレルギーの病因に重要な役割を果たしている可能性も示唆されている。したがって、本研究では、新生児期以降より食品乳化剤に曝露された場合、食物アレルギー病態および腸内細菌叢の構成にどのように影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とし以下の研究を実施した。

B. 研究手法

動物実験は 3 週齢の BALB/c マウスを用いた。本研究課題で実施する動物実験に関しては、京都府立医科大学内動物実験委員会が整備されており、本研究計画もこれに従い実施した(図 1)。食品乳化剤については CMC および P80 は飲料水に希釈して (1.0%)、12 週間に渡って投与した。16s rRNA シークエンス解析のために実験の開始時と終了時に糞便を採取した。食物アレルギーモデル

の作製に関しては、CMC および P80 を 6 週間投与した後、BALB/c マウスに OVA の腹腔内投与 (20 μ g) を実施した。2 週間後に再度、OVA の腹腔内投与を行った後、その 2 週間後から OVA を合計 5 回経口投与 (50mg) しアレルギーを誘導した。経口投与は経胃ゾンデを使用して行った。水投与群を対照群として設定し、CMC 投与群、P80 投与群との比較検討を行った。最終回の OVA 経口投与後、下痢のスコアと直腸温度を評価し、その後、腸管組織と血液を採取した。

ELISA 法による OVA 特異的 IgE の測定

のため、血漿を単離した。また RNA シーケンス解析のため、腸管組織をコラゲナーゼ含有液にて溶解したのち、腸管粘膜固有層細胞群を単離し、磁気ビーズを用いて CD45+免疫細胞を分離した。そ

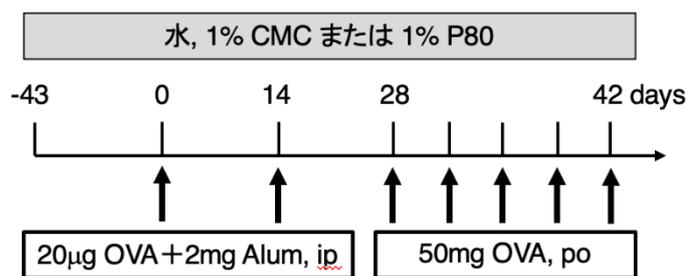


図 1. 動物実験のフローチャート

の後、分離した細胞から RNA を単離しシーケンスに供与した。

結果と考察

A. 結果

食物アレルギーモデルによる検討

食物アレルギー発症とその病態における食品乳化剤の影響を調査するため、3 週齢の BALB/c マウスに、1.0%の CMC 及び P80 を含む飲料水を 12 週間投与し食物アレルギーを誘導した。水投与群、CMC 投与群に比較して、P80 投与群はより重篤な低体温を示した。また、P80 投与群は水投与群、CMC 投与群に比較して、下痢症状が増悪していた。さらに、P80 投与群は水投与群、CMC 投与群に比較して、血中 OVA 特異的 IgE の上昇を認めた。これらの結果から、P80 投与群において、OVA 誘導性食物アレルギーおよびアナフィラキシー症状が有意に悪化することが示唆された。

PAS 染色

次に、12 週間の食品乳化剤を投与し食物アレルギーを誘導したマウスの十二指腸および大腸組織

の杯細胞過形成について PAS 染色を用いて検討した。大腸組織では水投与群、CMC 投与群に比較して、P80 投与群において杯細胞過形成が有意に亢進していた。(図 2) 一方、十二指腸組織では 3 群間に有意な差を認めなかった。

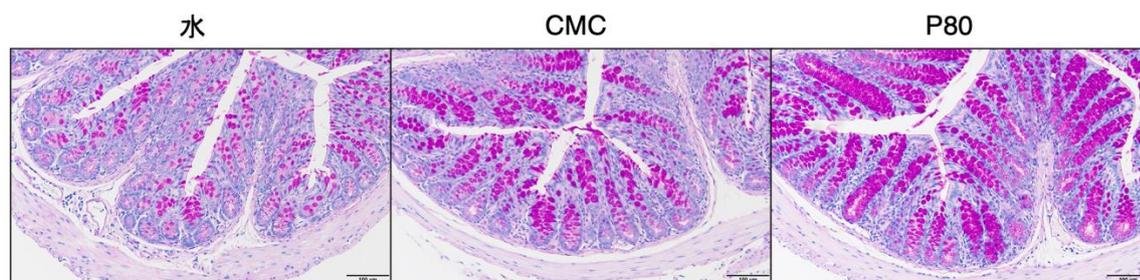


図 2. 大腸組織の PAS 染色

腸管免疫細胞の RNA シークエンス解析

食物アレルギー応答に関連する遺伝子群に、食品乳化剤の摂取がどの程度影響を与えるかを網羅的に調べるため、腸管 CD45+免疫細胞を単離した上で RNA シークエンス解析を実施した。その結果、食品乳化剤、特に P80 が、CD45+免疫細胞の遺伝子発現レベルに有意な影響を与えることが明らかとなった。具体的には、2 型サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13、IL-33) の発現の上昇、マスト細胞活性化に關与する遺伝子 (Mcpt1、Mcpt2、Mcpt4) の発現亢進を認めた。また、IL-1 サイトカインファミリーのメンバーである IL-1f9 (IL-36 γ) が食品乳化剤投与群で有意に上昇していた (図 3)。

	水	CMC	P80
Il4	3.11027	3.21436	7.49334
Il5	15.2505	35.8845	52.9944
Il13	10.8246	14.0388	44.0492
Il33	5.45392	11.1643	19.2835
Il1f9	0.521632	5.10063	11.3234
Mcpt1	61.1677	103.177	713.029
Mcpt2	23.3651	41.6845	349.684
Mcpt4	21.0739	31.9782	76.3059

図 3. RNA シークエンス解析結果

腸内細菌叢の解析

16S rRNA 遺伝子シーケンスを用いて、食物アレルギーモデルにおける腸内細菌叢の構成を解析した。治療前の 3 群間で腸内細菌叢の構成に違いは観察されなかったが、P80 の摂取によって腸内細菌叢の構成に劇的な変化が見られた (図 4)。また、腸間リンパ節の細菌叢の構成も 16S rRNA シークエンス解析を使用して調べたが、3 群間で有意な変化は認めなかった。

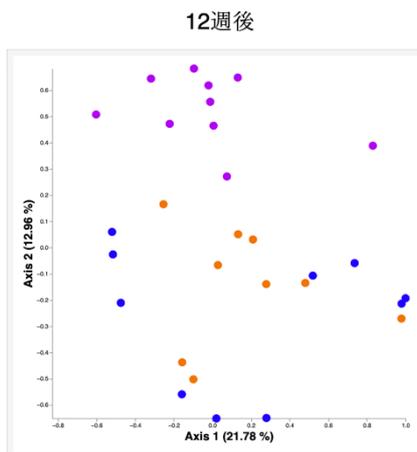


図 4. 16s rRNA シークエンス解析 青、水投与群；オレンジ、CMC 投与群、紫、P80 投与群

抗生剤カクテルによる検討

腸内細菌叢の変化が食事用乳化剤投与に伴う食物アレルギー増悪に寄与する可能性が示唆されたことから、食物アレルギーにおける腸内細菌の役割を明らかにするために、抗生剤カクテルの投与実験を実施した。抗生剤カクテルの投与により、食事用乳化剤によるアレルギー増悪効果の消失が観察された (図 5)

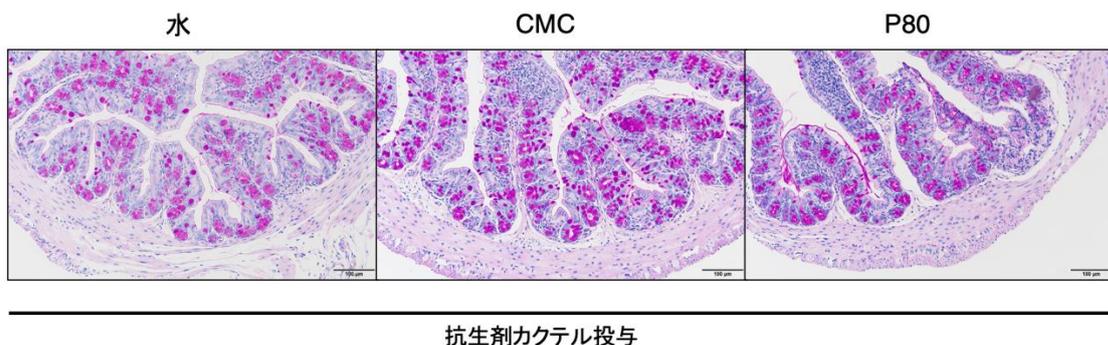


図 5. 大腸組織の PAS 染色:食品乳化剤投与により誘導された杯細胞の過形成が消失

B. 考察

食物アレルギーの発症における環境要因として食品成分の影響が重要であることが示され、腸内免疫応答および腸内細菌叢との相互作用が食物アレルギーの発症において重要な役割を果たす可能性が示唆された。したがって、腸内細菌叢との相互作用をターゲットにした治療法は、2型免疫応答の制御において有望である可能性がある。また、本研究のデータから、腸内細菌叢および腸管免疫応答が食物アレルギーの発症や病態に与える影響について、更なる調査が必要である。

尚、本研究成果は、栄養学分野の国際科学誌に投稿予定である。また、コロナ禍に伴い延期となった Cell Symposia: Infection Biology in the age of Microbiome にて 2023 年 6 月にフランス・パリにて学会発表を予定している。

今後の研究活動について

本助成研究の結果、新規 IL-1 ファミリーメンバーである IL-36 の発現が食物アレルギーで上昇していることを世界で初めて見出した。IL-36 は様々な免疫関連疾患の多様な局面において 1 型及び 2 型免疫応答に関与する可能性が報告されている。⁴ 今後、食物アレルギーとの関連について、更なる研究を進めていく必要があると考えられる。

また、食品添加物の健康影響について、本邦においては厳密な管理がなされているが、世界的には懸念される事項である。京都府は伝統的な日本の食文化を発信してきた地域であり、京都府から食物アレルギーを含めた疾病リスクに関する研究や日本の食文化の多様性を尊重できるような食育を推進している。

参考文献

1. Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96. 10.1038/nature14232.
2. Lopes, J.P., and Sicherer, S. (2020). Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment. *Curr. Opin. Immunol.* 66, 57–64. 10.1016/J.COI.2020.03.014.

3. Al Nabhani, Z., and Eberl, G. (2020). Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol.* 13, 183–189. 10.1038/s41385-020-0257-y.
4. Harusato, A., Abo, H., Ngo, V.L., Yi, S.W., Mitsutake, K., Osuka, S., Kohlmeier, J.E., Li, J.D., Gewirtz, A.T., Nusrat, A., et al. (2017). IL-36 γ signaling controls the induced regulatory T cell-Th9 cell balance via NF κ B activation and STAT transcription factors. *Mucosal Immunol.* 10, 1455–1467. 10.1038/mi.2017.21.
5. Harusato, A., Viennois, E., Etienne-Mesmin, L., Matsuyama, S., Abo, H., Osuka, S., Lukacs, N.W., Naito, Y., Itoh, Y., Li, J.D., et al. (2019). Early-life microbiota exposure restricts myeloid-derived suppressor cell-driven colonic tumorigenesis. *Cancer Immunol. Res.* 7, 544–551. 10.1158/2326-6066.CIR-18-0444.
6. Dantzer, J.A., Kim, E.H., Chinthrajah, R.S., and Wood, R.A. (2022). Treatment for Food Allergy: Current Status and Unmet Needs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 10.1016/J.JACI.2022.08.008.
7. Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P.E., Maue, A.C., Dauriat, C.J.G., Barnich, N., Gewirtz, A.T., and Chassaing, B. (2020). Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E. coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Rep.* 33. 10.1016/j.celrep.2020.108229.

以上