

ニッポンハム食の未来財団 2021 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	小児の食物アレルギーと腸内細菌叢の関連
フリガナ	アカガワ ショウヘイ
代表者名	赤川 翔平
所属機関 (機関名) (役職名)	関西医科大学医学部小児科学講座 講師
本助成金による 発表論文, 学会発表	<学会発表> タイトル：卵アレルギーの小児における腸内細菌叢の検討 発表者：山岸満、赤川翔平、赤川友布子、中井陽子、山口正、辻章志、金子一成 発表学会：第 124 回日本小児科学会学術大会 <論文> タイトル：Decreased butyric acid-producing bacteria in gut microbiota of children with egg allergy 著者：Mitsuru Yamagishi*, Shohei Akagawa*, Yuko Akagawa, Yoko Nakai, Sohsaku Yamanouchi, Takahisa Kimata, Masaki Hashiyada, Atsushi Akane, Shoji Tsuji, Kazunari Kaneko. (* equally contributed) 掲載誌情報：Allergy. 76 巻 7 号 2279-2282 ページ. 2021 年 <受賞> 賞タイトル：第 17 回日本アレルギー学会学術大会賞 受賞者：赤川翔平 受賞課題：Decreased butyric acid-producing bacteria in the gut microbiome of children with egg allergy

研究結果要約

【背景】短鎖脂肪酸を始めとする腸内細菌の代謝産物は、制御性 T 細胞の分化誘導などを介して免疫寛容に重要な役割を担っている。したがって、腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)がアレルギーの発症に関与している可能性がある。

【目的】卵アレルギー患者の腸内細菌叢の特徴を明らかにする。

【方法】卵アレルギー患者 18 例（FA 群：男児 13 例、年齢中央値 3.1 歳[四分位範囲 1.5-5.5]）と健康小児 22 例（HC 群：男児 12 例、年齢 4.0 歳[2.9-6.1]）から便を採取し、16S rRNA 遺伝子解析を実施した。腸内細菌叢の α 多様性、構成菌目、酪酸産生菌割合について比較した。

【結果】①年齢、性別は 2 群間で差はなかった。② α 多様性は FA 群において有意に低かった。③構成菌目は FA 群において Enterobacteriales 目の割合が高く (17.0% [9.5-22.3] vs. 1.8% [0.9-10.9], $p=0.029$)、Lactobacillales 目の割合が低かった (7.1% [3.6-10.1] vs. 11.5% [7.5-18.5], $p=0.012$)。④種レベルでの酪酸産生菌割合は FA 群において有意に低かった (2.3% [1.0-5.2] vs. 6.9% [2.5-9.6], $p=0.013$)。

【結語】EA 患者の腸内細菌叢は、酪酸産生菌の減少に特徴づけられる dysbiosis を来していた。dysbiosis の是正は食物アレルギーの新たな予防や治療につながる可能性がある。

研究目的

【背景】

アレルギー疾患と腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis)

本邦におけるアレルギー疾患の有病率は 50%を超え、国民病とも言われており、その有病率は上昇傾向である。その背景には、帝王切開分娩の増加や、抗菌薬使用の増加、食の欧米化などが関連しているとされる。これらはいずれも腸内細菌叢に大きな影響を与える因子であり、dysbiosis がアレルギー疾患発症に関与している可能性がある。

ヒトの腸管内には 1000 種類以上、40 兆個以上の細菌が腸内細菌叢を形成しており¹、宿主であるヒトの健康に大きく関与する。近年では次世代シーケンサーを用いた網羅的な 16S rRNA 遺伝子解析により、腸内細菌叢をより正確かつ詳細に分析することが可能となり、腸内細菌叢についての研究が加速している。その結果、アレルギー疾患の患者において dysbiosis が認められることが相次いで報告されている²⁻⁶。しかし、dysbiosis がアレルギー疾患を引き起こす具体的な機序については不明である。

制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) を誘導する酪酸産生菌

過剰な免疫応答を抑制する役割を担う Treg は、Clostridium 属などが産生する短鎖脂肪酸の酪酸によってナイーブ T 細胞から誘導されることが報告された^{7,8}。さらに、2 型糖尿病患者や炎症性腸

疾患患者の腸内細菌叢では酪酸を産生する *Clostridium* 属細菌が減少しているという臨床報告も発表された^{9,10}。私たちの研究グループも、川崎病患儿^{11,12}や頻回再発ネフローゼ患儿における Treg を産生する酪酸産生菌の減少について報告しており、様々な慢性疾患の発症に酪酸産生菌の減少が関与していることが明らかになってきている。

【目的】

以上のことから、アレルギー疾患においても、腸内細菌における酪酸産生菌が減少しているのではないかという着想に至った。そこで、本研究では、「酪酸産生菌の減少に特徴づけられる dysbiosis が、Treg の減少を招き、アレルギー疾患発症に関与する」という仮説を検証することを目的とする。

研究計画及び研究手法

【対象】

1 歳から 8 歳の鶏卵アレルギーの小児 18 例（FA 群: 男児 13 例、年齢中央値 3.1 歳 [四分位範囲 1.5-5.5]）および同年代の健康小児 22 例（HC 群: 男児 12 例、4.0 歳 [2.9-6.1]）とした。

なお、卵アレルギーの診断は以下の基準のいずれかを満たした者とした。

- (1)医師の監督下で実施した卵の経口負荷試験が陽性
- (2)卵摂取後にアレルギー症状出現の既往があり、かつ卵白特異的 IgE 値が 0.35UA/ml 以上

【方法】

1. 対象者の基本情報および腸内細菌叢に影響を与える以下の項目について患者の保護者に対してアンケート調査を行った。

年齢、性別、生年月日、身長、体重、現病歴、既往歴、家族歴、分娩様式、栄養方法、在胎週数、家族構成、ペット飼育歴、両親の喫煙歴、自宅の立地や日当たりなどの環境、抗菌薬使用状況、プレバイオティクスおよびプロバイオティクスの使用状況、両親の最終学歴、世帯収入

2. 診療録から以下の情報、検査結果を収集した。

血清総 IgE 値、特異的 IgE 値、TARC、プリックテスト結果、皮膚状態のスコア（Eczema Area and Severity Index、Patient-Oriented Eczema Measure）

3. 対象から便を約 5g 採取し、速やかに-80℃で凍結保存した。

4. 凍結していた便検体を解凍し、腸内細菌叢解析を行った。

腸内細菌叢解析

① 16S rRNA 超可変領域を Ion 16S Metagenomics Kit を使用して PCR 増幅した。

② Ion Plus Fragment Library Kit を用いてライブラリを作成した。

③ 次世代シーケンサーである Ion PGM Sequencer（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて 16S rRNA 遺伝子解析を行った。

④ 腸内細菌叢構成菌目、 α 多様性（Chao1, Shannon Index）、酪酸産生菌割合を算した。

なお、酪酸産生菌は Haak らが提唱した 61 種の菌と定義した¹³。

5. 対象から末梢血 2 ml を採取し、フローサイトメーターの FC500（ベックマン・コールター社）を用いて、血中制御性 T 細胞数を計測した。なお、制御性 T 細胞の標識には CD4・CD25・Foxp3 抗体を用いた。

6. Mann-Whitney U 検定を用いて、上記結果を 2 群間で比較（制御性 T 細胞数については既報の正常値と比較）することにより仮説を検証した。

<当初の計画から変更した点>

目標対象数は各群 40 名としていたが、中間解析で統計的に十分と考えられる有意な差を認めたため、各群約 20 名のみを対象とした。また、当初は便中有機酸濃度の測定を予定していたが、サンプルの保存状態が不良であり、実施できなかった。

結果と考察

【結果】

(1)対象の背景

年齢、性別は 2 群間で有意差はなかった。FA 群において帝王切開で出生した児が有意に多かった。(50% vs. 18%, $p=0.045$)。便採取 1 か月以内に抗菌薬を使用した者はいなかった。

(2) α 多様性

FA 群において以下の 3 つの α 多様性指数はいずれも有意に低値であり、多様性の低下を認めた。

①観察された菌種数: 29 種 [19-31] vs. 43 種 [32-61], $p=0.001$

②Shannon Index: 3.37 [2.76-3.90] vs. 3.84 [3.54-4.37], $p=0.025$

③Simpson Index: 0.87 [0.77-0.89] vs. 0.90 [0.86-0.93], $p=0.013$

(3) β 多様性

Bray-Curtis 非類似度による主座標分析において、FA 群と HC 群は異なるクラスターを形成した (図 1)。

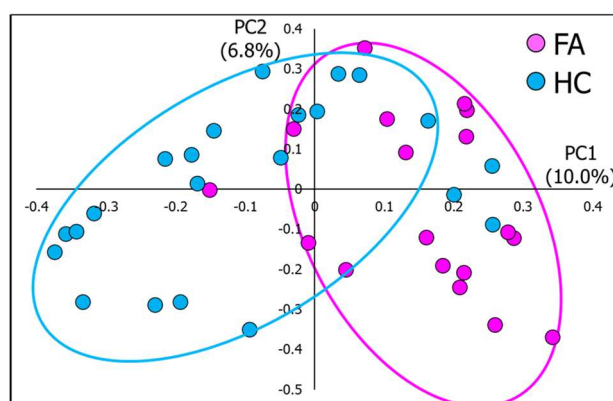


図 1:Bray-Curtis 非類似度による主座標分析

FA 群と HC 群は異なるクラスターを形成した。この解析では、類似している細菌構成をもつ腸内細菌叢が近くにプロットされる。すなわち、FA 群と HC 群の腸内細菌叢が異なることを示している。

(4) 構成菌目

FA 群において Enterobacteriales 目の割合が高く (17.0% [9.5-22.3] vs. 1.8% [0.9-10.9], $p=0.029$)、Lactobacillales 目の割合が低かった (7.1% [3.6-10.1] vs. 11.5% [7.5-18.5], $p=0.012$)

(5) 種レベルでの酪酸産生菌割合

種レベルでの酪酸産生菌割合は FA 群において有意に低かった (2.3% [1.0-5.2] vs. 6.9% [2.5-9.6],

p=0.013) (図 2)。

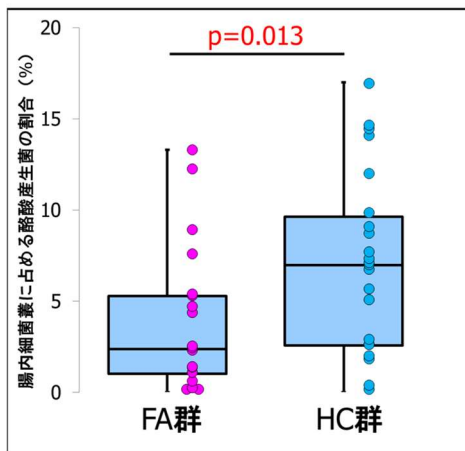


図 2: 腸内細菌叢に占める酪酸産生菌割合の比較

FA 群において、腸内細菌叢に占める酪酸産生菌割合は有意に低かった。箱の中央は中央値、箱の上端、下端はそれぞれ第 3 四分位数、第 1 四分位数を示す。また、線分の上端は最大値、下端は最小値を示す。

(6)末梢血リンパ球に占める Treg 割合

末梢血を採取し得た 9 例について、末梢血リンパ球に占める Treg 割合を測定した。その結果、中央値は 2.7% [1.3-5.7%]であった。これは、過去に報告されている健常小児における末梢血リンパ球に占める Treg 割合の正常値 4.76-5.68%よりも低い傾向にあった。

【結語】

鶏卵アレルギーの小児の腸内細菌叢は、多様性の低下と酪酸産生菌の減少に特徴づけられる dysbiosis が存在する。酪酸産生菌の減少は、Treg の減少を招き、アレルギー疾患発症に関与する可能性が示唆された。(図 3)

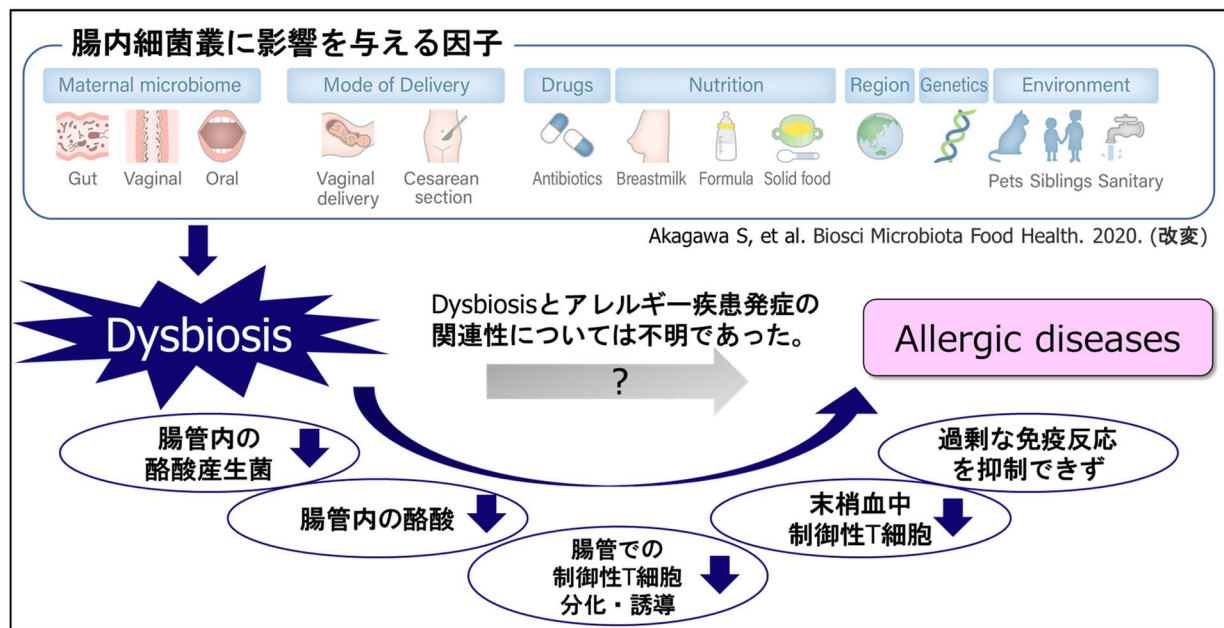


図 3: Dysbiosis がアレルギーを引き起こす機序についての仮説

腸内細菌叢に影響を与える様々な因子によって酪酸産生菌の低下に特徴づけられる dysbiosis を来たと、腸管内の酪酸が減少し腸管での制御性 T 細胞の分化・誘導が抑制される。そのため、末梢血中の制御性 T 細胞が減少し、過剰な免疫反応を抑制することができなくなり、アレルギー疾患を発症する。

<期待される結果との一致>

本助成研究で、所期の結果を得られたと考えられる。FA 患者において、便中酪酸濃度が減少していることが予想されたが、サンプルの保存状態が悪く測定できなかったことが残念である。

<本研究の特色と発展性>

本研究は、小児の鶏卵アレルギー患者の腸内細菌叢において多様性の低下と酪酸産生菌の減少に特徴づけられる dysbiosis が存在していることを世界で初めて明らかにした研究である。また、同一の患者において、末梢血中のリンパ球に占める Treg 割合が減少していることを明らかにした。これまで、dysbiosis がどのようにアレルギー発症に関与しているかは不明であったが、本研究により、腸管における酪酸産生菌の減少が Treg の減少を招いている可能性が示唆された。本研究成果は、酪

酸産生菌や酪酸を投与するという新たなアレルギー疾患の予防法や治療法の開発につながる可能性がある。

今後の研究活動について

酪酸は Naïve T 細胞を制御性 T 細胞に分化させ、過剰な免疫応答を抑制するため、酪酸産生菌の減少がアレルギー疾患の発症の一因となっている可能性がある。よって、酪酸産生菌に特徴づけられる dysbiosis の是正はアレルギー疾患の新たな治療標的となり得る。

機能性大麦はオーストラリア連邦科学産業研究機構が開発した大麦で、一般の大麦に比べて 2 倍の食物繊維と、4 倍のレジスタントスターチ（難消化性でんぷん）を含む。そのため、腸管内でプレバイオティクスとして作用し、腸内細菌叢を改善する。申請者らは 2021 年に機能性大麦を継続して摂取することにより、腸内細菌叢に占める酪酸産生菌割合、および便中酪酸濃度が上昇することを報告した¹⁵。

以上のことから、機能性大麦を継続的に摂取し、腸管内の酪酸産生菌や酪酸を増加させることがアレルギー疾患の新たな予防法や治療法につながるのではないかとこの着想に至った。

そこで、次に実施する研究は、「機能性大麦の継続的な摂取が、食物アレルギー患者の酪酸産生菌減少に特徴づけられる dysbiosis を是正し、食物アレルギーの新たな治療法になり得る」という仮説を検証することを目的とする。上記仮説を検証するために鶏卵アレルギーを有する小児 50 名を対象とし、機能性大麦を含むクッキーを用いたプラセボ対照二重盲検ランダム化並行群間比較試験を計画した。研究計画は既に関西医科大学医学倫理審査委員会の承認を得た（承認番号: 2021159）。また、研究資金は貴財団の 2022 年度個人研究助成を用いる。

参考文献

- 1) Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164:337-40.
- 2) Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A, et al. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy*. 2018;73:1515-1524.

- 3) Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S, et al. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med*. 2016;22:1187-1191.
- 4) Lee KH, Song Y, Wu W, Yu K, Zhang G. The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy. *Clin Mol Allergy*. 2020;18:5.
- 5) Los-Rycharska E, Golebiewski M, Sikora M, et al. A Combined Analysis of Gut and Skin Microbiota in Infants with Food Allergy and Atopic Dermatitis: A Pilot Study. *Nutrients*. 2021;13:
- 6) Akagawa S, Kaneko K. Gut microbiota and allergic diseases in children. *Allergol Int*. 2022;
- 7) Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;500:232-6.
- 8) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504:446-50.
- 9) Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37:2343-50.
- 10) Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9:599-608.
- 11) Kaneko K, Akagawa S, Akagawa Y, Kimata T, Tsuji S. Our Evolving Understanding of Kawasaki Disease Pathogenesis: Role of the Gut Microbiota. *Front Immunol*. 2020;11:1616.
- 12) Tsuji S, Akagawa S, Akagawa Y, et al. Idiopathic nephrotic syndrome in children: role of regulatory T cells and gut microbiota. *Pediatr Res*. 2021;89:1185-1191.
- 13) Haak BW, Littmann ER, Chaubard JL, et al. Impact of gut colonization with butyrate-producing microbiota on respiratory viral infection following allo-HCT. *Blood*. 2018;131:2978-2986.
- 14) Tsuji S, Kimata T, Yamanouchi S, et al. Regulatory T cells and CTLA-4 in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 2017;59:643-646.
- 15) Akagawa S, Akagawa Y, Nakai Y, et al. Fiber-Rich Barley Increases Butyric Acid-Producing Bacteria in the Human Gut Microbiota. *Metabolites*. 2021;11:559

以上