

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価に関する研究

平成25年度 総括分担研究報告書

研究代表者 長谷 耕二

平成26(2014)年 5月

## 目 次

### I . 総括研究報告

- 短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価に関する研究 --- 1  
長谷 耕二  
(資料) 図1および図2

### II . 分担研究報

- 1 . 食物アレルギーにおける短鎖および中鎖脂肪酸の安全性評価に関する研究 -5  
國澤 純  
(資料) 資料名 : 図1-3
- 2 . 炎症性腸疾患患者における短鎖脂肪酸の解析に関する研究 ----- 9  
飯島 英樹

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 11

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 12

## 短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価に 関する研究

研究代表者 長谷 耕二 東京大学医科学研究所

### 研究要旨

腸内発酵の推進を目的としたプレバイオティクスと各種免疫疾患との関連については、これまで安全性評価の観点から十分に検証されていない。本研究では、炎症アレルギー性疾患との関連から、短鎖・中鎖脂肪酸の安全性について、基礎的・臨床的研究を遂行する。その結果、短鎖脂肪酸は大腸炎モデルに対する炎症抑制効果を示す一方で、食物アレルギーモデルにおける下痢を悪化させることが示唆された。中鎖脂肪酸に関しては特に炎症アレルギーへの効果は観察されなかった。病態モデルマウスで認められた知見をヒトにおいても確認するために、炎症性腸疾患患者の糞便サンプルの収集を開始した。

### 分担研究者:

國澤純（独立行政法人医薬基盤研究所・プロジェクトリーダー）  
飯島英樹（大阪大学医学部・講師）

同様に、体に脂肪が付きにくいことで食用油としての消費が高まっている中鎖脂肪酸についても、そのほとんどが健康への影響が懸念されている飽和脂肪酸であることから、免疫学的安全性を検証する必要がある。

そこで本研究では、炎症アレルギー性疾患との関連から、短鎖・中鎖脂肪酸の安全性について、基礎的・臨床的研究を遂行する。

### A. 研究目的

近年、「お腹の調子を整える」効果を謳った特定保健用食品が数多く普及しているが、これらは腸内細菌の発酵能を利用して短鎖脂肪酸など代謝物の産生を促すプレバイオティクスが主体である。短鎖脂肪酸はこれまで生体への有効性が強調されてきた。一方、腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、食品との不適切な免疫学的相互作用は、アレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。つまり、食事性成分や発酵代謝産物には、腸管免疫応答の方向性を左右することで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が予想される。しかしながら、腸内発酵の推進を目的としたプレバイオティクスと各種免疫疾患との関連については、これまで安全性評価の観点から十分に検証されていない。

### B. 研究方法

マウス大腸炎モデルとして、CD45RBhi細胞移入誘発性大腸炎モデルおよび卵白アルブミン誘発性下痢モデル（国澤分担報告書参照）を用いた。大腸炎モデルでは、野生型マウスの脾臓よりCD3+CD4+CD45RBhi細胞をフローサイトメーターにより単離し、これをRag1欠損マウスに尾静脈注射した。その直後より短鎖脂肪酸脂肪酸を餌に混ぜて投与を行った。細胞移入後6週間に亘り、体重を測定した。6週目に病理組織学的解析を行った。

ヒト試料のうち炎症性腸疾患患者（クローン病、潰瘍性大腸炎）および健康者（各々30例）由来の糞便および大腸剖検サンプルは、研究分担者である飯島が採取中である（飯島

分担研究書参照)  
(倫理面への対応)

実験動物使用にあたっては、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針に基づき、東京大学医科学研究所動物実験委員会の管理下で実験を行う(機関承認 PM25-61)。ヒトサンプルを用いた解析については、サンプルの収集を行う大阪大学医学系研究科、NTT 東日本関東病院、解析を行う東京大学医科学研究所、いずれにおいても倫理申請を終え承認を得ている[承認番号: 13165 (大阪大学) 東総人医病企第 11-549 号 (NTT 東日本関東病院)、25-42-1122、および 21-36-1221(東大医科研)]

### C. 研究結果

#### 1) 炎症性腸疾患モデルにおける各種脂肪酸の影響

炎症性腸疾患では腸内細菌叢の異常がしばしば観察されることから、主要な腸内発酵代謝産物である短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸)と病態との関わりが予想される。CD45RBhi 細胞移入により Rag1 欠損マウスに慢性大腸炎を誘導し(図 1)、本モデルマウスに短鎖脂肪酸を食餌に混ぜて投与した。短鎖脂肪酸の投与により、盲腸および糞便中の短鎖脂肪酸濃度が上昇することを確認した。

本モデルでは大腸炎に伴う体重減少や大腸粘膜組織の肥厚が観察されるが、酪酸摂取群では、これらの症状が有意に抑制された(図 2)。また制御性 T 細胞の割合が増加することが判明した。一方で、プロピオン酸や酢酸には大腸炎の抑制効果は認められなかった。これより、短鎖脂肪酸のうち酪酸は大腸炎に改善に有効であるとの結果が得られた。

#### 2) 食物アレルギーモデルにおける各種脂肪酸の影響

本結果については分担研究報告書(国澤)を参照

#### 3) 炎症性腸疾患患者糞便サンプルの取得

本結果については分担研究報告書(飯島)を参照

### D. 考察

今回、酪酸による大腸炎の抑制作用が確

認できた。酪酸は食物繊維の微生物発酵によって腸内で産生される。よって食物繊維含量が低く腸内発酵による酪酸産生が起こりにくい欧米型の食生活は炎症性腸疾患のリスクを高めると予想できる。今後、酪酸による炎症抑制メカニズムを調べるとともに、炎症性腸疾患患者と健常人から採取した糞便サンプルにおいて短鎖脂肪酸の濃度を測定する予定である。

### E. 結論

酪酸には大腸炎を抑制する生理作用があることが判明した。食品の安全性を考慮した場合には、腸内発酵を初めとする腸内環境への食品の影響を十分に考慮する必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NR, Murakami M, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K & Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. *Nature* 2013, **504**: 446-450, 2013.

#### 2. 学会発表

長谷耕二, 腸内発酵産物による粘膜免疫修飾作用, 第 67 回栄養食糧学会大会, 2013 年 5 月 24-25 日, 名古屋 (招待講演)

Koji Hase, Commensal microbiota shapes the gut immune system through epigenetic modifications. The 8<sup>th</sup> RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1 大腸炎モデルマウスの作成

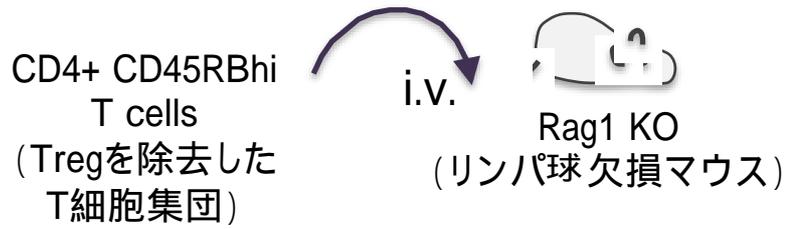
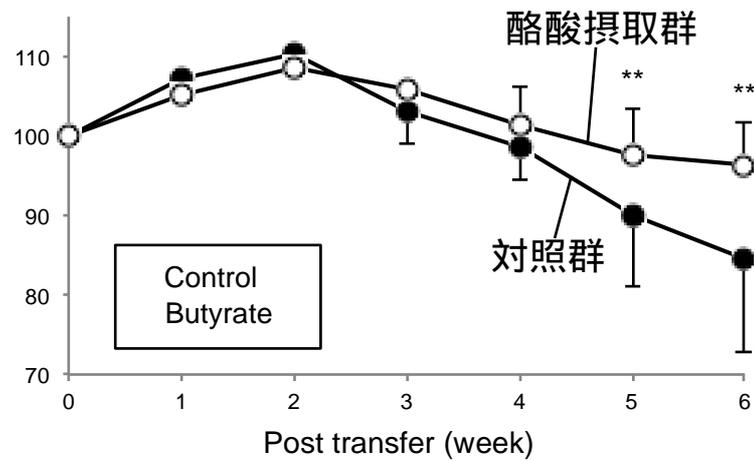


図2 大腸炎モデルにおける  
体重変化(%)



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進 研究事業）  
「短鎖および中鎖脂肪酸の腸管免疫修飾作用と安全性評価」  
研究報告書

## 食物アレルギーにおける短鎖および中鎖脂肪酸の安全性評価に関する研究

研究分担者 國澤 純 （独）医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー  
研究協力者 長竹貴広 同上 研究員

### 研究要旨

近年、「お腹の調子を整える」「体に脂肪がつきにくい」などの効果を謳った特定保健用食品が数多く普及しているが、これらには腸内細菌の発酵能を利用して産生される短鎖脂肪酸やエネルギー変換効率の高い中鎖脂肪酸が主体となっているものが含まれる。一方でこれら機能性食品の作用を最も強く受けると考えられる腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、食品との不適切な免疫学的相互作用はアレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。つまりこれまで有効性が強調されてきた機能性食品においても腸管免疫応答の方向性を左右することで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が考えられる。そこで本研究ではこれまであまり研究のすすんでいない短鎖および中鎖脂肪酸に着目し、食物アレルギーへの影響を解析している。本事業の初年度にあたるH25年度は短鎖脂肪酸に焦点を当てた解析を行い、短鎖脂肪酸の一つであるプロピオン酸が食物アレルギーモデルにおいて、アレルギー特異的IgEの産生やマスト（肥満）細胞の脱顆粒に影響を与えることなく下痢症状を悪化させることを見いだした。

#### A. 研究目的

近年、「お腹の調子を整える」「体に脂肪がつきにくい」などの効果を謳った特定保健用食品が普及しているが、これらには腸内細菌の発酵能を利用して産生される短鎖脂肪酸やエネルギー変換効率の高い中鎖脂肪酸が主体となっているものが含まれる。これらは生体応答の一側面から有効性が強調されているが、腸管に多く存在し、生体の免疫応答や代謝などを制御している免疫担当細胞との相互作用については十分に解析されているとは言えないのが現状である。特に食品との不適切な免疫学的相互作用は、アレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明していることを考えると、これら機能性食品により腸管免疫応答の方向性が規定されることで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が予想される。そこで本研究では、これまであまり

研究のすすんでいない短鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸に着目し、食物アレルギーへの影響を解析した。本事業の初年度にあたるH25年度は短鎖脂肪酸に焦点を当てた解析を行った。

#### B. 研究方法

でんぷんにプロピオン酸を結合させた特殊飼料を含む餌で1ヶ月飼育したマウスに、フロイント完全アジュバントを用い1mgの卵白アルブミン（OVA）を皮下投与することで全身感作を行った。全身感作の一週間後から週3回の頻度で50mgのOVAを経口投与することでアレルギー性下痢を誘導し、下痢の発症をOVA投与1時間後に観察した。

血清中のOVA特異的IgE抗体、ならびにmouse mast cell protease-1 (mMCP-1)の産生はDS mouse IgE ELISA (OVA) kit (DSファーマ社)とmouse MCPT-1 (mMCP-1) ELISA kit

(eBioscience 社)を用い、プロトコルに従い測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は(独)医薬基盤研究所のガイドラインに則り行った(承認番号 DS25-2R4)。

### C. 研究結果

水溶性脂肪酸であり、腸内発酵によって生理的に産生される各種短鎖脂肪酸の食物アレルギーに対する安全性を評価したところ、大腸組織でプロピオン酸が大量に産生される特殊餌で飼育したマウスでは特にアレルギー誘導初期における顕著なアレルギー性下痢の増悪化が認められた(図1)。一方で別の短鎖脂肪酸である酢酸群では下痢発症に変化は認められなかった(データは示さず)。

本食物アレルギーモデルはIL-4などのTh2型サイトカインの産生、アレルギー特異的IgE抗体の産生、マスト細胞の大腸への集積、マスト細胞の活性化と脱顆粒、といった免疫学的連続反応によりアレルギー性下痢が誘導されるI型アレルギーモデルである。そこでプロピオン酸による腸管アレルギー増悪化の作用点を解析する目的で、アレルギーの誘導と発症において重要因子となるアレルギー特異的IgEの産生とマスト細胞の脱顆粒を測定した。その結果、プロピオン酸群ではアレルギー性下痢の発症促進が起こっているのにも関わらず、アレルギー特異的IgE産生、マスト細胞脱顆粒マーカーmMCP-1の産生に変化は認められなかった(図2, 図3)。

### D. 考察

短鎖脂肪酸は極めて類似した構造を取るにも関わらず、本食物アレルギーモデルにおいてはプロピオン酸において選択的なアレルギー性下痢の増悪化が認められた。短鎖脂肪酸の生理作用としてGpr41, Gpr43, Gpr109aなどの受容体を介した作用やヒストンアセチル化阻害

作用が知られている。短鎖脂肪酸の鎖長により各受容体への結合性が変化することが知られていることから、短鎖脂肪酸間における各受容体の結合性、ならびに受容体を発現している細胞の検証が重要であると考えられる。

一方、免疫学的作用機序を検討したところ、アレルギー誘導因子であるアレルギー特異的IgE抗体の産生、さらにはアレルギー発症因子であるマスト細胞の脱顆粒に変化は認められなかった。このことからプロピオン酸はマスト細胞の脱顆粒以降のイベントである上皮細胞を介したイオンバランス・透過性制御機構に作用している可能性が考えられる。

### E. 結論

プロピオン酸には食物アレルギーを悪化させる可能性が示唆されることから、プロピオン酸を増加させる食品については免疫学的な安全性を考慮する必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. A. Lamichhane, H. Kiyono, and J. Kunisawa\*, Nutritional components regulate the gut immune system and its association with intestinal immune disease development, *J Gastroenterol Hepatol* 28: 18-24, 2013
2. J. Kunisawa\* and H. Kiyono, Vitamin-mediated regulation of intestinal immunity. *Front in Immunol* 4:189, 2013
3. J. Kunisawa\* and H. Kiyono, Immune regulation and surveillance at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discov Today* 18:87-92, 2013
4. S. Kishino, M. Takeuchia, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono,

R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, and J. Ogawa, Novel fatty acid metabolism in gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition, **Proc Natl Acad Sci USA** 110: 17808-17813, 2013

## 2. 学会発表

1. 國澤純 脂質ネットワークを介した腸管免疫の制御と創薬への展開 千里ライフセミナー メタボローム研究の疾患への応用を目指して 大阪(千里ライフサイエンスセミナー)(2013年5月26日)(招待講演)
2. 國澤純 腸内環境ネットワークによる免疫制御とワクチン開発、創薬への展開 第12回四国免疫フォーラム 香川(徳島文理大学香川校)(2013年6月22日)(招待講演)
3. 國澤純 腸内フローラと腸管免疫による疾

患制御 第13回日本抗加齢医学会総会 横浜(パシフィコ横浜)(2013年6月28日)(招待講演)

4. 國澤純 腸内環境を介した免疫制御と炎症性腸疾患 第34回日本炎症・再生医学会 京都(国立京都国際会館)(2013年7月2日)(招待講演)
5. 國澤純 腸管免疫ネットワークを標的とした創薬研究の最前線 第5回生命科学阿波おどりシンポジウム 徳島(徳島大学)(2013年8月16日)(招待講演)
6. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御と疾患、創薬・ワクチンへの展開 第9回霊長類医科学フォーラム つくば(文部科学省研究交流センター)(2013年11月14日)(招待講演)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 炎症性腸疾患患者における短鎖脂肪酸の解析に関する研究

研究分担者 飯島 英樹 大阪大学医学部 講師

### 研究要旨

近年、「お腹の調子を整える」「体に脂肪がつきにくい」などの効果を謳った特定保健用食品が数多く普及しているが、これらには腸内細菌の発酵能を利用して産生される短鎖脂肪酸やエネルギー変換効率の高い中鎖脂肪酸が主体となっているものが含まれる。一方でこれら機能性食品の作用を最も強くうけると考えられる腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、食品との不適切な免疫学的相互作用はアレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。つまりこれまで有効性が強調されてきた機能性食品においても腸管免疫応答の方向性を左右することで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が考えられる。そこで本研究ではこれまであまり研究のすすんでいない短鎖および中鎖脂肪酸に着目し、食物アレルギーへの影響を解析している。本事業の初年度にあたるH25年度は短鎖脂肪酸に焦点を当てた解析を行い、炎症性腸疾患患者の糞便サンプルにおける短鎖脂肪酸濃度を測定するための試料の採取を行った。

### A. 研究目的

短鎖脂肪酸は腸管生理や脂質代謝に様々な影響を及ぼすことが報告されている。一方で免疫系への影響については不明な点が多い。腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、食品との不適切な免疫学的相互作用は、アレルギーや炎症などの発症を引き起こすことが判明している。つまり、食事性成分や発酵代謝産物には、腸管免疫応答の方向性を左右することで、各種免疫疾患の発症につながる潜在的な危険性が予想される。本研究は、炎症性腸疾患患者の糞便サンプルにおける短鎖脂肪酸濃度を測定することで、疾患発症との関わりを解析する。

### B. 研究方法

大阪大学医学部附属病院に通院中の潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者および健常ボランティアより糞便約20gの提供を受け、速やかに匿名化の上-80度に保存する。検体は、大

阪大学消化器内科、東京大学医科学研究所・国際粘膜ワクチンセンター 粘膜バリア学、独立行政法人 医薬基盤研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト、静岡大学農学部・応用生物化学科 食品栄養化学研究室にて成分の解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、事前に大阪大学医学系研究科における倫理申請を終え承認を得て実施している[承認番号：13165（大阪大学）]。

### C. 研究結果

健常人および炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎またはクローン病）患者との間で糞便および血液中の短鎖脂肪酸濃度に関する基礎データを取得するため、倫理委員会への申請を行い、承認が得られたためサンプルの収集を開始した。同様に小児アレルギー疾患と脂肪酸の関わりを調べるために、糞便に含まれる脂肪酸の基礎データを取得するための倫理申請を行い、承認を得て

サンプリングを開始している。サンプルが揃い次第、短鎖脂肪酸の解析を実施する。

**D．考察**

現在サンプリング中のため省略。

**E．結論**

現在サンプリング中のため省略。

**F．健康危険情報**

なし

**G．研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

**H．知的財産権の出願・登録状況**

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NR, Murakami M, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K & Ohno H.	Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells.	Nature	504	446-450	2013
A. Lamichhane, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Nutritional components regulate the gut immune system and its association with intestinal immune disease development,	J Gastroenterol Hepatol	28	18-24	2013
J. Kunisawa and H. Kiyono,	Vitamin-mediated regulation of intestinal immunity	Front in Immunol	4	189	2013
J. Kunisawa and H. Kiyono,	Immune regulation and surveillance at the epithelial surface of the intestine.	Drug Discovery Today	18	87-92	2013
S. Kishino, M. Takeuchi, S. B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shimizu, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, and J. Ogawa	Novel fatty acid metabolism in gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition,	Proc Natl Acad Sci USA	110	17808-17813	2013

### III. 研究成果の刊行物・別刷り