

Title	ラクtoferrin摂取によるアトピー性皮膚炎抑制効果の分子機構の解明
Sub Title	Elucidation of the suppression mechanisms of lactoferrin treatment against atopic dermatitis.
Author	大場, 春佳(Oba, Haruka)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015.) ,p.128- 170
JaLC DOI	
Abstract	<p>アトピー性皮膚炎(Atopic Dermatitis : AD)とは紅斑・丘疹・擦過傷等の症状がみられる慢性皮膚疾患である。ADの発症には免疫系の過剰反応や皮膚常在菌叢の構成など、様々な要因が複合的に関与していると考えられており、現時点ではその原因は特定されていない。近年では、皮膚の状態だけでなく腸内環境も関連があるといった報告がなされており、腸内細菌叢を介したADの予防・改善が期待される。腸内環境を整える手段として、人体に有益な腸内細菌の増殖を促す食品や物質を摂取する"プレバイオティクス"が注目されている。プレバイオティクス的一种であるラクtoferrin(Lactoferrin, LF)は、これまでの研究から、喘息や花粉症などのアレルギー症状を緩和させることが報告されている。また、共同研究者の実験においても、ADモデルマウス(NC/Ngaマウス)にLFを投与した際に、LF非投与群と比較して皮膚炎の重症度が低下することが示された。そこで我々は、LFによる皮膚炎改善効果は腸内細菌叢が関与しているのではないかと推測し、これらのマウスから採取した糞便と小腸内容物について細菌叢解析と代謝物質解析を行った。16S rRNA遺伝子の網羅的解析による腸内細菌叢の構造解析の結果、糞便中細菌叢には変化が見られなかったが、小腸内容物の細菌叢では、LF投与群で細菌叢の多様性が増加し、細菌叢構造もLF未投与群とは異なることが明らかになった。小腸内容物代謝物質解析の結果、カテコールアミン代謝経路に属する代謝物質の濃度がLFの投与によって増加することが示唆された。また、細菌の割合と各代謝物質濃度の相関解析を行い、細菌叢と代謝物質の関連について解析を行った。これらの結果から、LFは皮膚炎の重症度を低下させる効果があり、小腸内で細菌叢の構造変化を引き起こすこと、一部の代謝物質濃度を変化させることが明らかになった。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0128

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学士卒業論文

ラクトフェリン摂取によるアトピー性皮膚炎

抑制効果の分子機構の解明

Elucidation of the suppression mechanisms of
lactoferrin treatment against atopic dermatitis.

慶應義塾大学 環境情報学部 4年

学籍番号 71242156

大場春佳

目次

1. 背景	132
1.1. アトピー性皮膚炎について	132
1.2. プロバイオティクスおよびプレバイオティクスの AD に対する効果	132
1.3. 本研究の目的	134
2. 対象と手法	135
2.1. 対象	135
2.2. 超並列シーケンサーを用いた細菌叢解析	136
2.2.1. DNA 抽出と PCR 法による 16S rRNA 遺伝子の増幅	136
2.2.2. GS Junior によるシーケンシング	136
2.3. CE-TOFMS による代謝物質解析	137
2.4. 統計解析	137
2.5. 細菌および代謝物質の相関解析	138
3. 結果	138
3.1. 対象マウスの各スコア測定結果	138
3.2. 糞便細菌叢解析	138
3.2.1. 糞便細菌叢構造の比較	138
3.2.2. UniFrac distance を用いた細菌叢の解析	141
3.3. 小腸内容物細菌叢解析	143
3.3.1. 小腸内容物細菌叢の比較	143
3.3.2. UniFrac distance を用いた細菌叢の解析	146
3.3.3. OTU レベルでの細菌叢の違い	148
3.4. CE-TOFMS による代謝物質解析	150

3.4.1. 糞便代謝物質・小腸内容物代謝物質の主成分分析	150
3.4.2. 糞便代謝物質解析	151
3.4.3. 小腸内容物代謝物質解析	155
3.5. 小腸内容物細菌叢-代謝物質間の相関関係	161
4. 考察と今後の展望	162
5. 謝辞	166
6. 参考文献	167

要旨

アトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis: AD) とは紅斑・丘疹・擦過傷等の症状がみられる慢性皮膚疾患である。AD の発症には免疫系の過剰反応や皮膚常在菌叢の構成など、様々な要因が複合的に関与していると考えられており、現時点ではその原因は特定されていない。近年では、皮膚の状態だけでなく腸内環境も関連があるといった報告がなされており、腸内細菌叢を介した AD の予防・改善が期待される。腸内環境を整える手段として、人体に有益な腸内細菌の増殖を促す食品や物質を摂取する“プレバイオティクス”が注目されている。プレバイオティクス的一种であるラクトフェリン (Lactoferrin, LF) は、これまでの研究から、喘息や花粉症などのアレルギー症状を緩和させることが報告されている。また、共同研究者の実験においても、AD モデルマウス (NC/Nga マウス) に LF を投与した際に、LF 非投与群と比較して皮膚炎の重症度が低下することが示された。そこで我々は、LF による皮膚炎改善効果は腸内細菌叢が関与しているのではないかと推測し、これらのマウスから採取した糞便と小腸内容物について細菌叢解析と代謝物質解析を行った。16S rRNA 遺伝子の網羅的解析による腸内細菌叢の構造解析の結果、糞便中細菌叢には変化が見られなかったが、小腸内容物の細菌叢では、LF 投与群で細菌叢の多様性が増加し、細菌叢構造も LF 未投与群とは異なることが明らかになった。小腸内容物代謝物質解析の結果、カテコールアミン代謝経路に属する代謝物質の濃度が LF の投与によって増加することが示唆された。また、細菌の割合と各代謝物質濃度の相関解析を行い、細菌叢と代謝物質の関連について解析を行った。これらの結果から、LF は皮膚炎の重症度を低下させる効果があり、小腸内で細菌叢の構造変化を引き起こすこと、一部の代謝物質濃度を変化させることが明らかになった。

Keywords: アトピー性皮膚炎・プレバイオティクス・ラクトフェリン・腸内細菌叢・代謝物解析

1. 背景

1.1. アトピー性皮膚炎について

アトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis: AD) とは主に先進国で多く見られるアレルギー性の慢性皮膚疾患の一種である。症状としては紅斑・丘疹・擦過傷等の症状がみられ、AD患者では健常者に比べて血中IgE量の増加や血中好酸球数の増加などが認められる。日本全国では約38万人がAD患者であると言われており(1, 2), 20歳以下の日本人に限れば、そのおよそ10人に1人がAD患者であると推測されている。疾患の多くは子供であることも大きな特徴である(3)。古くから、ADの発症にはフィラグリン遺伝子の異常による皮膚バリアの弱体化や皮膚の乾燥が関与するとされてきたが、フィラグリン遺伝子が正常であるにも関わらずADを発症する例もあり、必ずしも必須の要素ではない(4)。近年では皮膚や腸内に共生している人体常在菌もADを含むアレルギー疾患の発症に関与していることが指摘されており、AD患者の炎症部位では黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が増加すること(5)、健常者とAD患者では幼児期、青年期ともに腸内細菌叢の構造が異なることや(6, 7)、AD患者の腸内では細菌叢の多様性が低いこと(8)、幼少期の腸内細菌叢の多様性が生涯のIgE値の決定に深く関与していることなどが報告されている(9)。また、*Lactobacillus rhamnosus* GGの投与は乳幼児においてADの予防効果を有しており、その際に腸内で*L. crispatus* や*L. salivarius*などを含む9株の*Lactobacillus*属菌や*Bifidobacteriaceae* genomsp. C1が増加することが報告されている(10-12)。このように、ADの発症には人体常在菌叢の構成などが関与していることが示唆されているが、未だに明確な原因は特定されていない。そのため、現時点では根本的な治療法は開発されておらず、AD発症のメカニズムの解明と治療法の開発は重要な課題である。

1.2. プロバイオティクスおよびプレバイオティクスのADに対する効果

本研究では、腸内環境を整える手段の一つである「プレバイオティクス」に着目し、AD症状緩和の可能性を模索した。プレバイオティクスとは、人体に有用な菌を直接経口摂取するプロバイオティクスに対し、人体に有用な影響を与える腸内細菌の増殖を促し健康維持に寄与する物質のことを指す。一般的にプレバイオティクスには、オリゴ糖などの多糖類や食物繊維などが用いられる。本研究ではラクトフェリン (Lactoferrin: LF) という、主にヒトやウシなどの哺乳類の乳に含まれる鉄結合タンパク質を用いた。LFは、トランスフェリンやオボトランスフェリン等、他の鉄結合タンパク質に比較しても鉄イオンに対する親和性が100倍以上高いことが知られており(13)、その鉄イオンをキレートする作用によって、喘息や花粉症など複数のアレルギー症状が緩和されることが報告されている(14, 15)。また、他の多くの細菌の生育に必要な鉄分を奪うことで、鉄要求性の高い細菌の増殖を抑制し、乳酸菌やビフィズス菌などの鉄要求性の低い細菌の相対比を増加させることが示されており

(16), その効果によって内臓脂肪に対する脂肪蓄積緩和効果があることも報告されている(17, 18). 乳酸菌やビフィズス菌は, 腸内で増加することでADの予防・治療効果を持つことが明らかになっている. 例えば先に述べたように, 乳幼児においてADの予防効果を持つ乳酸菌として *Lactobacillus rhamnosus* GGが挙げられる(10). また他の調査では, 成人AD患者に *Lactobacillus* LS01 DSM 2275と*Bifidobacterium* BR03 DSM 16604を混合した菌液を投与することで, 血漿LPSおよび活性化T細胞数が減少し, アレルギー反応が抑制されることが明らかになっている(19). 具体的には, 1×10^9 CFU(colony-forming units)/g濃度の*L.* LS01 DSM 2275と*B.* BR03 DSM 16604を12週間経口投与したプロバイオティクス投与群と, 溶媒のみを経口投与したプラセボ群の炎症性刺激(アレルギー)の強さを示す血漿LPS濃度と活性化T細胞数を, 調査開始時, 12週間の投与終了時, 終了から2か月後の3つのタイムポイントにおいて経時的に比較した. その結果, アレルギーの強さを示す血漿LPS濃度およびアレルギーへの免疫反応の強さを示す活性化T細胞数の両方がプロバイオティクス投与群でプラセボ群に比較し有意に減少した(図1). これより, プロバイオティクス投与群ではアレルギー反応が抑制され炎症が抑制されたことが明らかになった. このようにADの発症や治癒には特定の腸内細菌が関与している可能性があること, また, LFの投与により複数のアレルギー症状が緩和されることなどから, 我々はLFには腸内細菌叢を介してアレルギーを緩和させる効果を有する可能性があるのではないかと推測した.

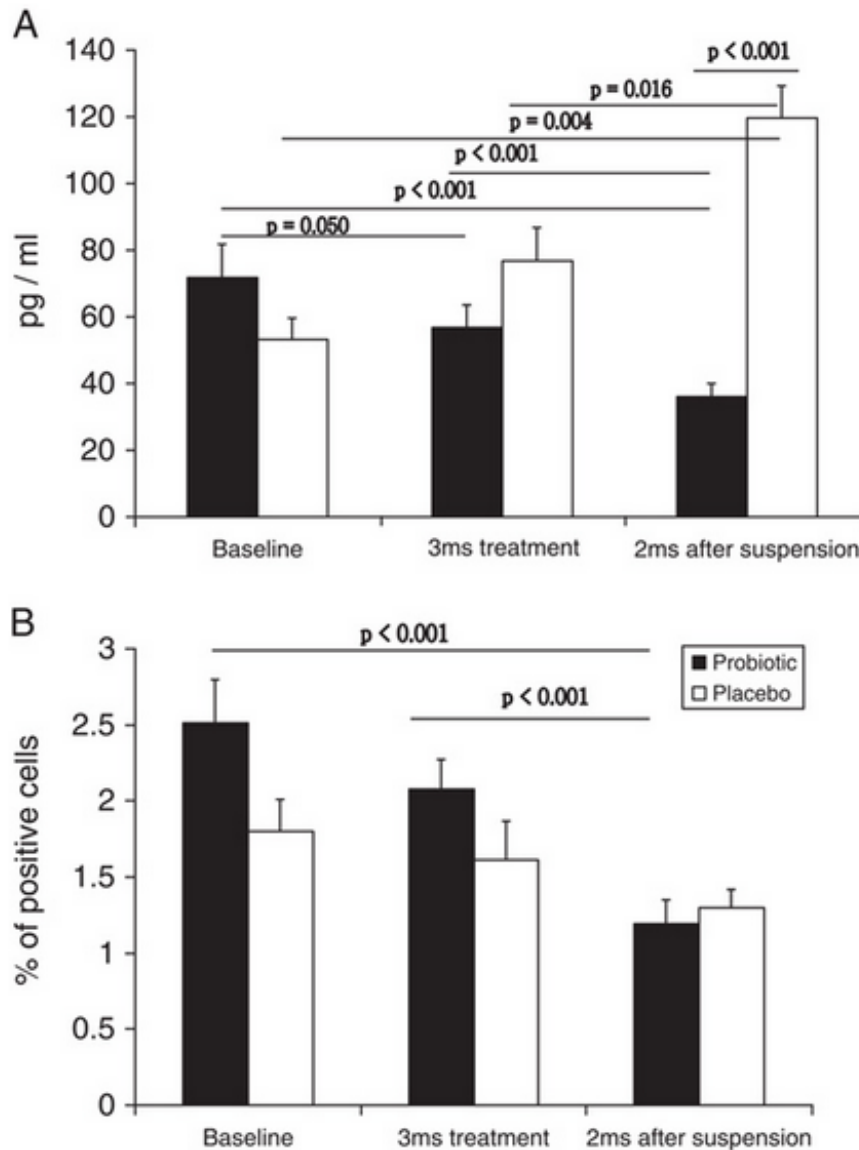


図1 プロバイオティクス投与による血漿LPS濃度と活性化Tリンパ細胞数の推移(19)

A：血漿LPS濃度 B：活性化T細胞数 白：プロバイオティクス投与群 黒：非投与群
 それぞれ投与開始時，投与開始後3カ月時，投与終了後2カ月時の値を比較している。

1.3. 本研究の目的

これより本研究では，LFによるアレルギー症状改善効果がADに対しても有効であるのかを調査するため，アトピー性皮膚炎モデルマウスの，NC/Ngaマウスと呼ばれる抗原（本研究ではダニ抽出物の塗布）に反応してAD様皮膚炎を起こすマウスを用い，LFを予防的に投与した群と投与しなかった群との比較を行った．LF投与による皮膚炎症状の緩和効果を調べた結果，LF投与群では非投与群に比べて，皮膚炎の重症度が低下した．先行研究から，ADの発症と治癒には腸内細菌叢が関係していること，またLFはプレバイオティクスとし

腸内環境を整えることが明らかになっていることから、このAD症状緩和効果は腸内細菌叢の構成の変化や腸内細菌叢が産生する代謝物質によって引き起こされている可能性があると考えられる。本研究ではマウスから採取した糞便と小腸内容物について、超並列シーケンサーを用いた細菌叢解析と、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析法 (capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry :CE-TOFMS) による代謝物質解析により、LF投与による腸内環境の変化を網羅的に分析した。

2. 対象と手法

2.1. 対象

AD発症群、LF投与群、コントロール群の3群のNC/Ngaマウス(9週齢, ♀, 各群 N=4)から採取された糞便及び小腸内容物を対象とした(図2)。AD発症群は6週齢から9週齢までの3週間にわたって、週5回背面及び耳にコナヒョウダニ抽出物を抗原として塗布することでAD様の症状を発症させた。LF投与群は抗原塗布の2週間前である4週齢から9週齢までLFを継続的に投与し、AD群と同様にダニ抽出物の塗布を行った。コントロール群はLFの投与も抗原の塗布も行わずに飼育した。ADが発症していることの確認として血中IgE値の測定を行い、ADの程度の評価は皮膚科医による皮膚外観スコア(紅斑・発赤, 浮腫, 痂皮・乾燥, 組織剥離の4項目について、無症状(スコア0), 軽度(スコア1), 中等度(スコア2), 高度(スコア3)の4段階に分類し、それらの合計を臨床スコアとした)と皮膚バリア(TEWL)の値, 皮膚水分量によって行った。糞便, 各スコアについては複数回測定・採取したが、最終ポイントで得られたもののみを使用した。なお、マウスの飼育から各スコアの測定, サンプルの採取までは共同研究先である株式会社ライオンによって実施された。

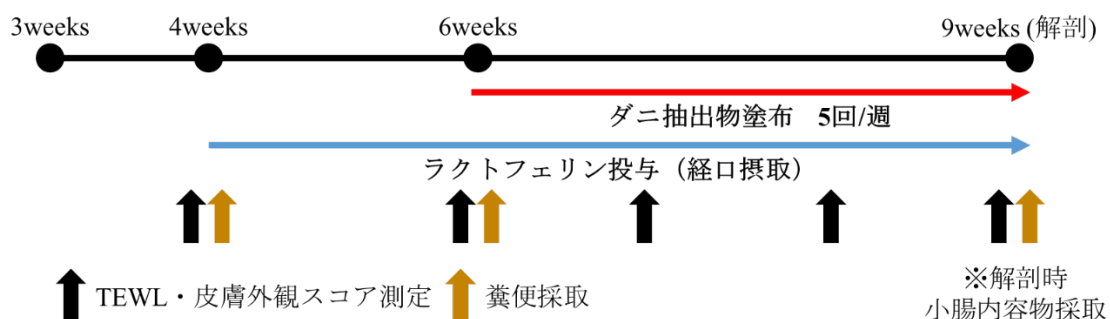


図2 サンプリングスケジュール

2.2. 超並列シーケンサーを用いた細菌叢解析

2.2.1. DNA 抽出と PCR 法による 16S rRNA 遺伝子の増幅

凍結乾燥させた糞便サンプル，小腸内容物サンプルに 0.1 mm ガラスビーズ 0.1 g と 3.0 mg ガラスビーズ 4 つを加え，Shake Master (Bio Medical Science) を用いて破砕を行ったのち，フェノール・クロロホルム法を用いて DNA を抽出した．RNase A (Takara Bio Inc.) で RNA を分解して除去した後，得られた DNA から 16S rRNA 遺伝子配列を増幅するために PCR を行った．増幅のためのプライマーにはバクテリア特異的な 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーである 27 Fmod (5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG) と 338 R (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT) を用いた(20)．DNA ポリメラーゼには TaKaRa Ex Taq Hot Start Version DNA Polymerase (Takara Bio Inc.)を用いた．PCR で 16S rRNA 遺伝子配列を増幅する際に，それぞれのサンプルに対して適切なサイクル数を推定するため，Quantitative PCR (qPCR) を用いて DNA の増幅曲線を描き，PCR のサイクル数を 13 から 27 サイクルまでの 7 種類の条件に設定した．PCR はディネイチャーを 96°C で 2 分を行った後に，ディネイチャーを 95°C で 30 秒，アニーリングを 55°C で 30 秒，エロンゲーションを 72°C で 1 分，これらを qPCR によって決定したサイクル数行い，最後にエロンゲーションを 72°C で 10 分を行った．PCR 後の残留プライマーなどの短い DNA 断片を取り除くため，Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製を行った．得られた溶液を BioAnalyzer (Agilent) にて電気泳動し，目的の長さの DNA 断片（約 300 bp 長）が増幅されていることを確認した．

2.2.2. GS Junior によるシーケンシング

GS junior によるシーケンスに必要なアダプターと，サンプル識別に必要なタグ配列 (MID) を付加するために再び PCR を行った．PCR 条件はディネイチャーを 96°C で 2 分を行った後に，ディネイチャーを 96°C で 30 秒，アニーリングを 55°C で 45 秒，エロンゲーションを 72°C で 1 分，これらを 3 サイクル行い，最後にエロンゲーションを 72°C で 10 分を行った．PCR 後の残留プライマーを取り除くため，Agencourt AMPure XP を用いて精製を行い，得られた DNA 溶液を BioAnalyzer にて電気泳動し，目的配列が増幅されていることを確認した．また，Picogreen (Molecular Probes Inc.) にて DNA 濃度を測定し，BioAnalyzer の結果との大きな相違がないかを確認した．

BioAnalyzer で測定した結果から得られた目的 DNA 断片の濃度をもとに，DNA 分子の割合が等しくなるようにサンプルの濃度を調整・混合したのち，エマルジョン PCR を行った．PCR 条件はディネイチャーを 94°C で 4 分を行った後に，ディネイチャーを 94°C で 4 分，アニーリングを 58°C で 4 分 30 秒，エロンゲーションを 68°C で 30 秒，これらを 50 サイクル行った．PCR 後ビーズを回収し，ビーズ回収量が規定の範囲である 50 万～200 万ビーズ

に収まっていることを確認した後、454 GS Junior (Roche) を用いてシークエンスを行った。

2.3. CE-TOFMS による代謝物質解析

凍結乾燥させた糞便及び小腸内容物サンプル各10 mgに50 %メタノール（内部標準物質であるmethionine sulfone, D-camphor-10-sulfonic acid (CSA) , 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) をそれぞれ200 μ M 含む) を400 μ l混合し, 3 mmジルコニアビーズ4個と0.1 mmジルコニアビーズ約0.1 gを加え, 1,500 rpm, 3分破碎することで代謝物質を抽出した. 溶液を15,000 \times g, 5分遠心分離し, 上清を限外濾過フィルターを用いて濾過することで, タンパク質を取り除いた. ろ液を真空乾燥機で40 $^{\circ}$ C, 3時間乾燥させて濃縮し, 内部標準である3-aminopyrrolidineとtrimesateを含む超純水 40 μ lで再溶解したものをサンプルとした. それらのサンプルの質量電荷比とキャピラリー電気泳動した際の泳動時間をcapillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) を用いて測定した. 解析用ソフトウェアであるMasterHands (Version 2.17.0.8) (21)を用いて測定されたマススペクトルデータの各ピークの積分値を算出した. また, サンプルと同時に測定された標準物質の質量電荷比と泳動時間との比較によって代謝物質の同定を行った. 各代謝物質の濃度は内部標準の積分値及びサンプルとして用いた糞便もしくは小腸内容物の質量を用いて算出した. なお CE-TOFMSによる代謝物質の測定は慶應義塾大学政策・メディア研究科の石井千晴氏により行われた. 今回の測定において, 1サンプルあたり平均556物質を同定し, そのうち213代謝物が95%以上のサンプルで検出されたため, これらのデータを解析対象とした.

2.4. 統計解析

細菌叢解析で得られた塩基配列情報はソフトウェアであるQIIME(Version 1.7.0) (22)を用いて解析した. 塩基配列の相同性が97%以上のもので OTU を構築し, Ribosomal Database Project の配列情報を用いて各 OTU に最も近縁な生物種を推定した. また各サンプル, 各群のリード数の違いを補正するため, 同定された OTU の数は各サンプルや各群における割合に換算し細菌叢データとした. これを統計解析ソフトウェアである MeV (Version 4.9) (23) および XLSTAT(Version 2015.2)を用いて統計解析を行った. AD 群, LF 群, コントロール群の3群間の比較には Kruskal-Wallis 検定, 事後検定には Tukey 法を用いた. 代謝物質データの主成分分析および PLS 判別分析には SIMCA (Version 13.0.3)を用いた. AD 群と LF 群の2群間での有意差検定には, MeV を用いて Mann-Whitney の U 検定を行った. また, ウェブ解析ツールである Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA, 24)を用いて, 有意差のあった代謝物についてそれらがどのパスウェイに属しているかを推定した. 代謝物と細菌叢の相関解析には, JMP (Version 12) を用いて Spearman の順位相関係数を算出した. これら統計解

析の結果、 $P < 0.05$ の場合に有意差があると記載した。

2.5. 細菌および代謝物質の相関解析

2.2.で得られた細菌叢データと 2.3.で得られた代謝物質のデータの相関解析を行うため、糞便および小腸内容物細菌のうち、属レベルで分類した細菌叢と Mann-Whitney の U 検定において 3 群間で有意に割合に違いがあった代謝物質との相関関係について解析した。解析には統計解析ソフトウェアである JMP (Version. 12) を用い、各細菌の検出割合データと各代謝物の濃度データの Spearman の順位相関係数を、総当りで算出した。

3. 結果

3.1. 対象マウスの各スコア測定結果

AD 群, LF 群, コントロール群 3 群の NC/Nga マウス (各群 N=12) それぞれのマウスの TEWL 値, 皮膚水分量, 皮膚外観スコアを測定した。コントロール群では体表に炎症が見られないのに対して, AD 群では体表に皮膚炎が見られた, LF 群では症状が緩和し, 体表の様子は炎症が起こっていないコントロール群に近いことがわかった (data not shown)。皮膚の外観のみならず, TEWL の値および皮膚水分量についても AD 群では低下していたが, LF 群では双方においてコントロール群に近い値が得られた (data not shown)。また, 血中 IgE 値についても LF 群で低下傾向が見られたことから (data not shown), LF 群において AD 群に比較して過剰免疫が抑制される傾向があったことが明らかになった。各群 12 個体の中から, コントロール群には TEWL 値が平均的な 4 個体を, AD 群には皮膚外観スコアが高いほうから 4 個体を, LF 群には皮膚外観スコアが低いほうから 4 個体を選び研究対象とした。

3.2. 糞便細菌叢解析

3.2.1. 糞便細菌叢構造の比較

糞便細菌叢における 3 群それぞれのリード数およびそれに含まれる細菌種の多様性を確かめるため, レアファクションカーブと呼ばれる, リード数に対し検出された菌種の数を表す曲線を作成した。3 群において共通して得られている 3000 リード数時に検出された菌種数を Kruskal-Wallis 検定を用いて比較すると有意差がみられなかった ($P=0.939$)。これより, 細菌叢の多様性は 3 群間で差がないことが示された (図 3)。

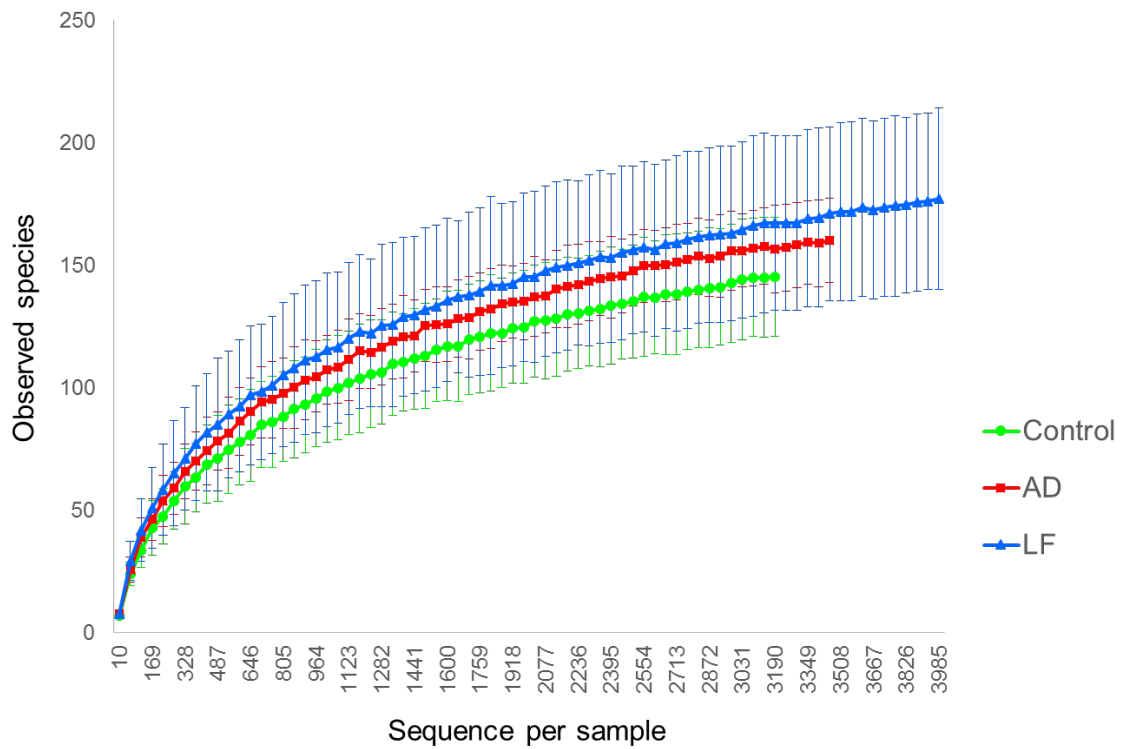
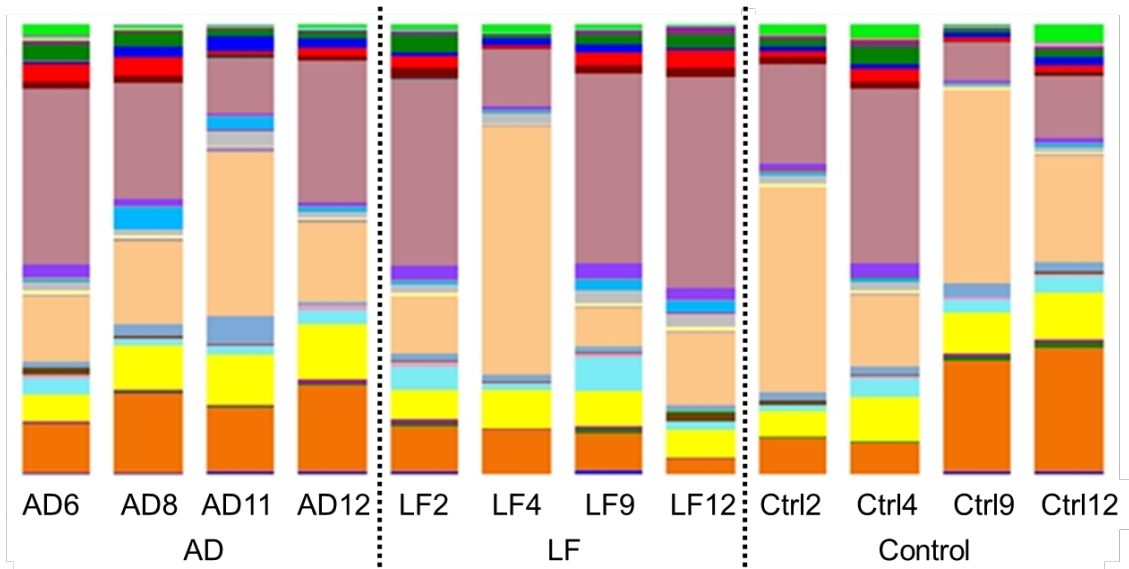


図3 3群ごとの細菌種の多様性（レアファクションカーブ）

赤はAD群，青はLF群，緑はコントロール群を表す．X軸は読まれた16S rRNA遺伝子配列の本数，Y軸は検出された細菌種の数を示している．

サンプルごとに細菌叢の構成を示す棒グラフからは，ほとんどのサンプルにおいて *Lactobacillus* 属菌と *Lachnospiraceae* 科菌が全体の7割ほどを占めていることがわかった．また，皮膚などで炎症が起きる際に炎症部位で増加していると言われる *Bacteroides* 属菌(25)の割合も全体の3割ほどを占めていることがわかった（図4）．



- Lactobacillus*
- Lachnospiraceae
- Bacteroides*
- Rikenellaceae
- Bacteroidales S24-7
- Lactobacillaceae
- Ruminococcaceae *Oscillospira*
- Ruminococcaceae *Other*

図4 各サンプルの糞便細菌叢構造（属レベル）

左から AD 群 4 サンプル， LF 群 4 サンプル， コントロール群 4 サンプルのそれぞれから検出された細菌種（属レベル）とその数を 100%の積み上げ棒グラフで表した。

また，属ごとに平均化した棒グラフからも， AD 群， LF 群， コントロール群それぞれに明らかな違いは見られない（図 5）。

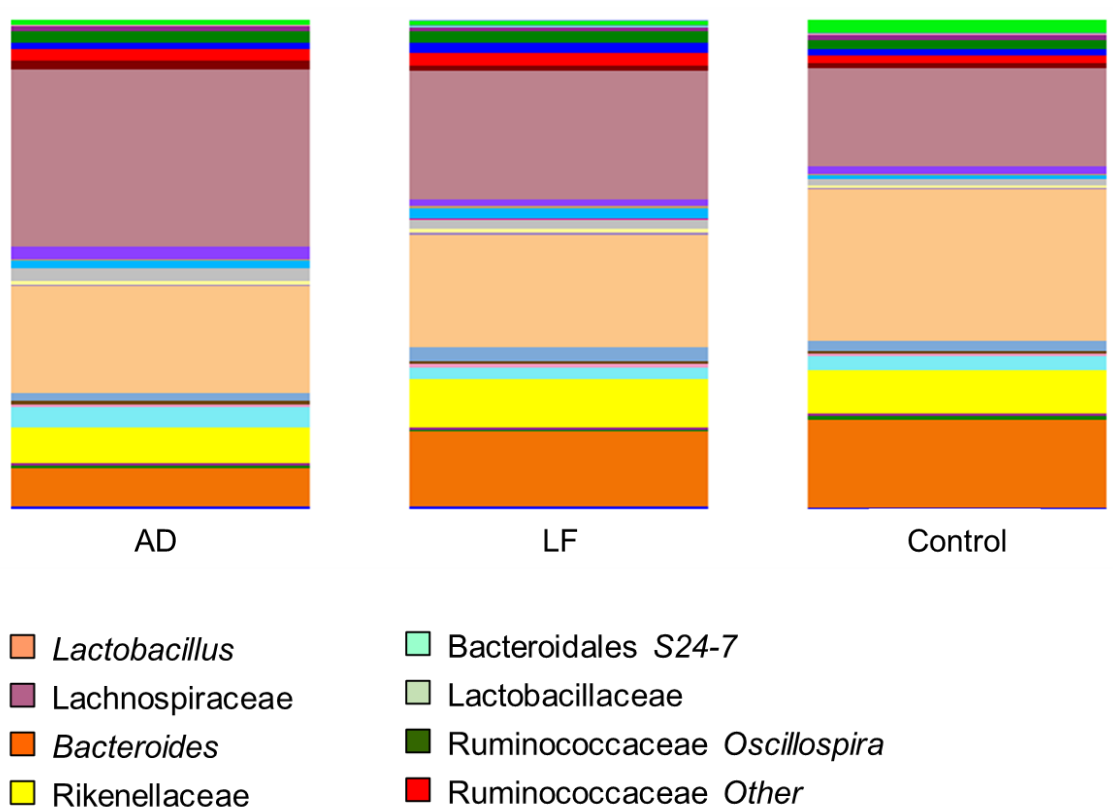


図5 各群の糞便細菌叢構造（属レベル）

左からAD群, LF群, コントロール群のそれぞれから検出された細菌種とその平均数を100%の積み上げ棒グラフで表した.

3.2.2. UniFrac distance を用いた細菌叢の解析

サンプル間の細菌叢構造の類似度を評価するため, UniFrac 解析を行った. UniFrac 解析とはサンプル内に含まれる細菌群の系統的な距離と群衆構造から, 細菌叢同士の構造の類似度を数値化する解析の手法である(26). この手法を用いて, 細菌叢の類似度を2点の距離に置き換えて2次元・3次元の座標上にプロットすることができる. よってこの座標上では, 2点の距離が近いほど2サンプルの細菌叢が近似していることを表す.

細菌叢に含まれる菌の種類のみを考慮した unweighted UniFrac 解析から得られた主座標分析および系統樹の結果から, 3群間でクラスターは分離されず, 細菌叢を構成する菌の種類には相違が見られないことが示された(図6). このことから, 各群のマウス糞便細菌叢に含まれる菌種は類似していることが示された.

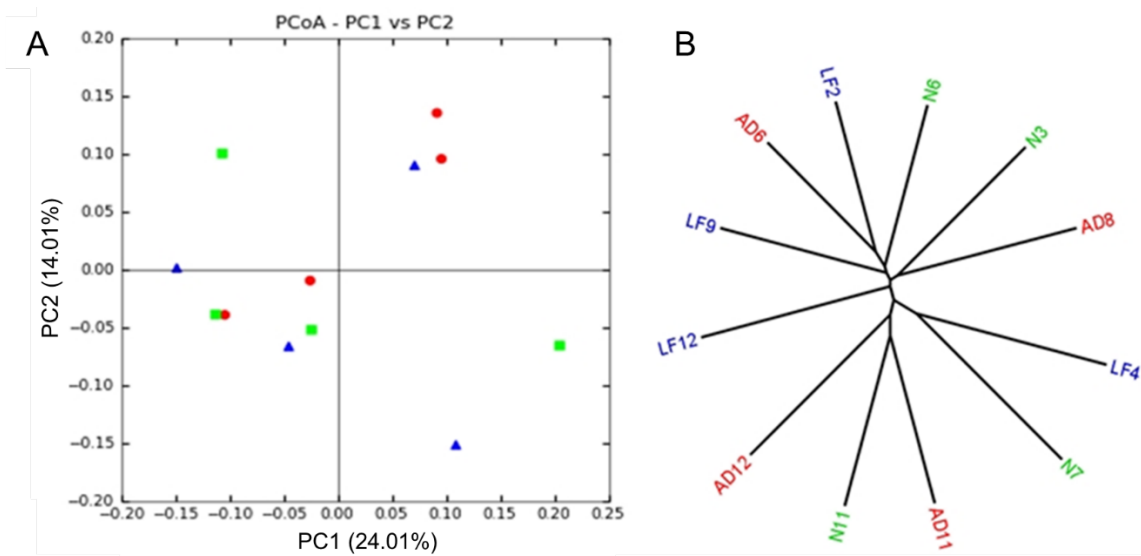


図6 unweighted UniFrac の結果

A : Unifrac distance を元にした主座標分析の結果. 各点はサンプルを表す (赤 : AD, 青 : LF, 緑 : コントロール). B : UniFrac distance を元にした系統樹.

細菌叢に含まれる菌種とその割合を考慮した weighted UniFrac 解析から得られた主座標分析および系統樹の図の結果からも, 3 群でクラスターは分離されず, 細菌叢の菌種とその数においても相違は見られないことが示された (図 7). このことから, 3 群の細菌叢構造は細菌叢を構成する菌種の観点でも, 各々の細菌の割合を考慮した群衆構造の観点でも類似していることが示され, AD 発症や LF の経口投与に伴う糞便 (大腸) 中の細菌叢の変化は小さいことが示唆された. 先行研究では, LF はペプシン処理を行ったものはプレバイオティクス効果が低く, 腸溶性コーティングと呼ばれる小腸内に入るまで消化されない特殊なコーティングを施したもののほうが高い整腸作用を表すことが報告されている(27, 28). そのため, このような結果が示された理由のひとつとして, LF が胃で消化されてしまい, 大腸まで到達しなかった可能性が考えられる.

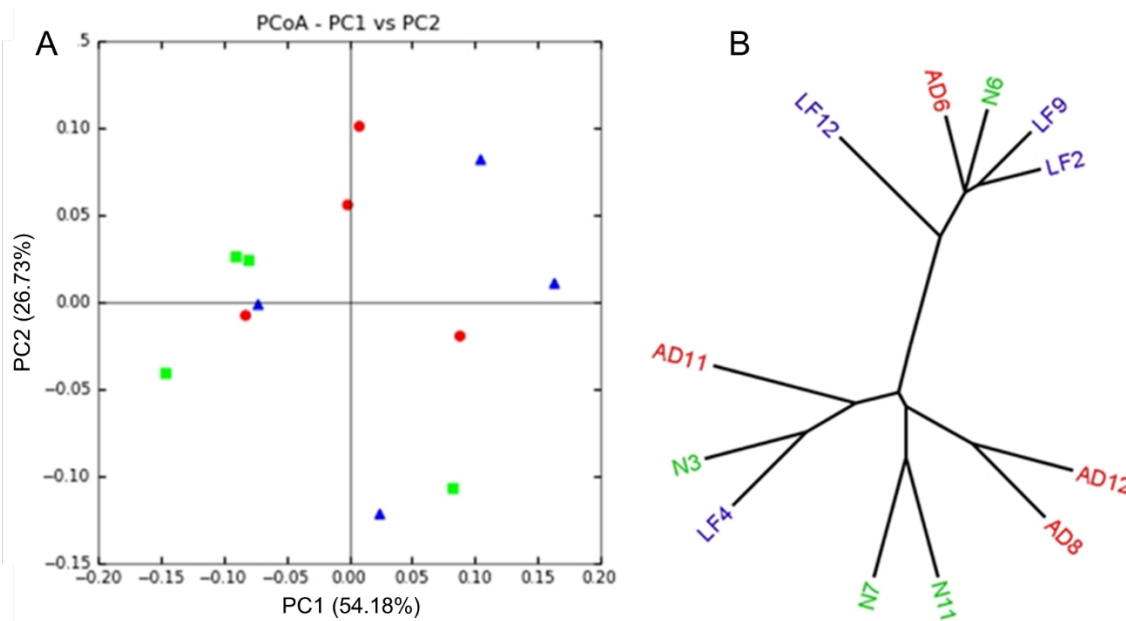


図7 weighted UniFrac の結果

A : UniFrac distance を元にした主座標分析の結果. 各点はサンプルを表す (赤 : AD, 青 : LF, 緑 : コントロール). B : UniFrac distance を元にした系統樹.

3.3. 小腸内容物細菌叢解析

3.3.1. 小腸内容物細菌叢の比較

3.2 の結果をふまえて, LF が大腸まで届いていない可能性を考慮し, 糞便で調査できる大腸よりも上方の, 小腸の内容物について 16S rRNA 遺伝子解析を行った.

レアファクションカーブから, 3 群のうち LF 群が最も細菌叢の多様性が高く, AD 群が最も低いことが示された (図 8). このことから LF の経口投与が, 細菌叢の多様性を増加させていることが示唆された.

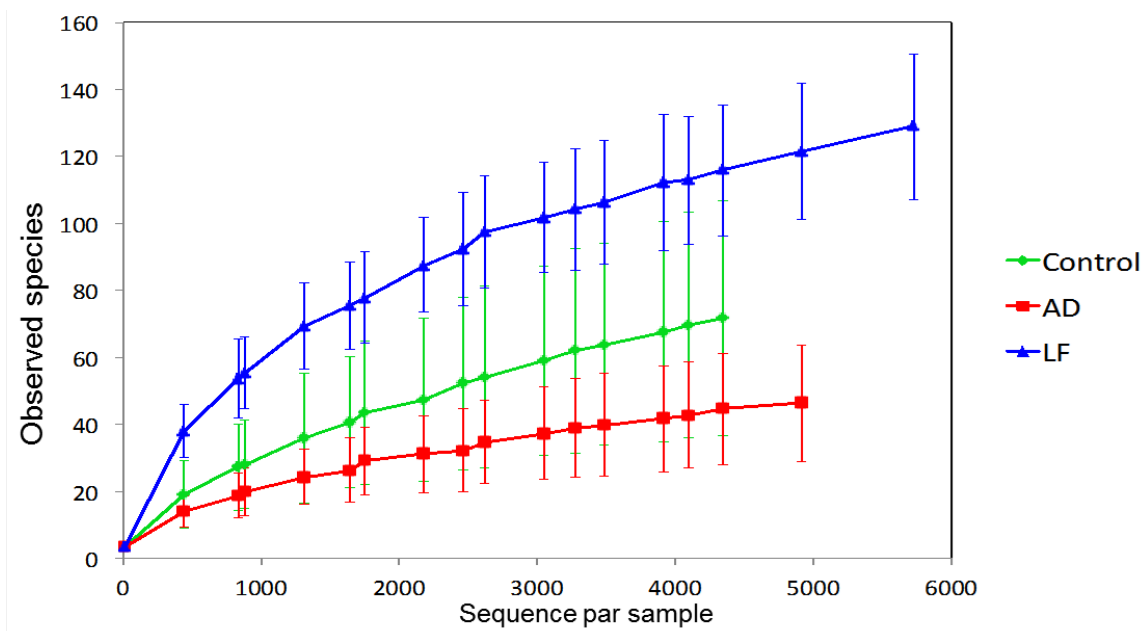
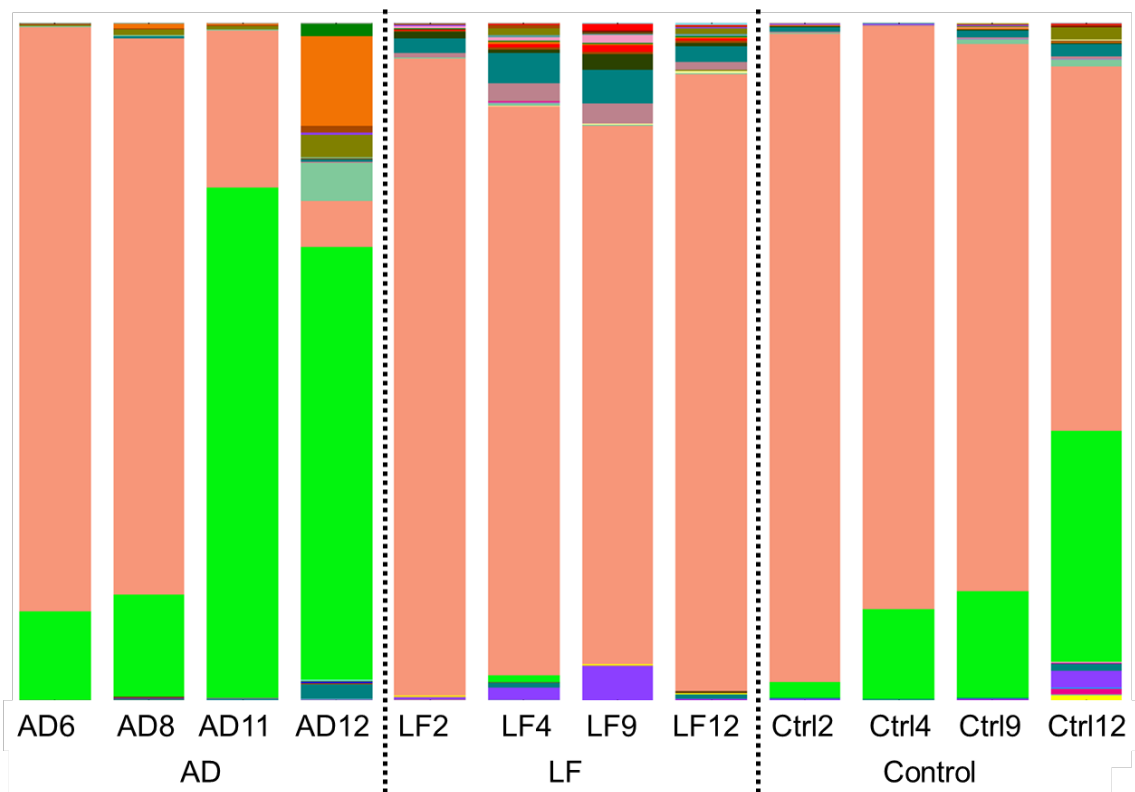


図8 3群ごとの細菌種の多様性（レアファクションカーブ）

緑はコントロール群，赤はAD群，青はLF群を表す．X軸は読まれた16S rRNA 遺伝子配列の本数，Y軸は検出された細菌種の数を示している．

サンプルごとに細菌叢の構成を示す棒グラフから，個体差はあるものの小腸内部では，*Lactobacillus* 属菌，*Lactobacillaceae* 科菌が大きな割合を占めているが，LF群では *Lactobacillaceae* 科菌 が少なく，*S24-7*，*Lachnospiraceae* 科菌が他の群よりも多い傾向があることがわかった．一方AD群では *Lactobacillaceae* 科菌が増加する傾向にあることがわかった（図9）．

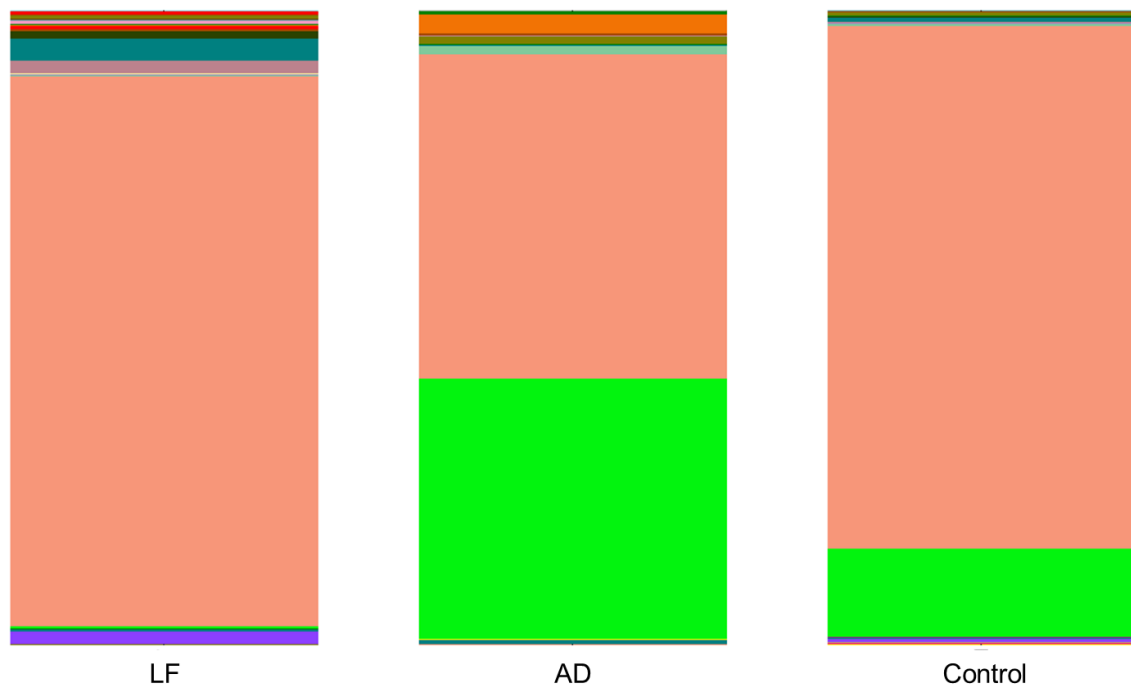


- Lactobacillus*
- Bacteroidales S24-7
- Ruminococcaceae
- Streptococcus*
- Lactococcus*
- Lachnospiraceae
- Lachnospiraceae Other
- Lactobacillaceae
- Enterobacteriaceae

図9 各サンプルの細菌叢（属レベル）

左からコントロール群4サンプル，AD群4サンプル，LF群4サンプルのそれぞれから検出された細菌種とその数を100%の積み上げ棒グラフで表した。

また，属ごとに平均化した棒グラフからも LF群では Lachnospiraceae 科菌が特徴的に見られ，AD群では *Lactobacillus* 属菌の割合が少なく Lactobacillaceae 科菌が多いなど，3群それぞれが特徴的な細菌叢の構造を持っていることが示された（図10）。



- | | |
|--|--|
| ■ <i>Lactobacillus</i> | ■ Lachnospiraceae |
| ■ Bacteroidales S24-7 | ■ Lachnospiraceae <i>Other</i> |
| ■ Ruminococcaceae | ■ Lactobacillaceae |
| ■ <i>Streptococcus</i> | ■ Enterobacteriaceae |
| ■ <i>Lactococcus</i> | |

図 10 各群の細菌叢（属レベル）

左からコントロール群 4 サンプル，AD 群 4 サンプル，LF 群 4 サンプルのそれぞれから検出された細菌種とその数を 100%の積み上げ棒グラフで表した。

3.3.2. UniFrac distance を用いた細菌叢の解析

細菌叢に含まれる菌の種類情報のみを考慮した unweighted UniFrac 解析の主座標分析の結果からは，LF 群と他の 2 群 が分離されていることが明らかになった（図 11）。このことから，LF 群は他の 2 群とは異なる細菌叢の構成を持っていることが示唆された。

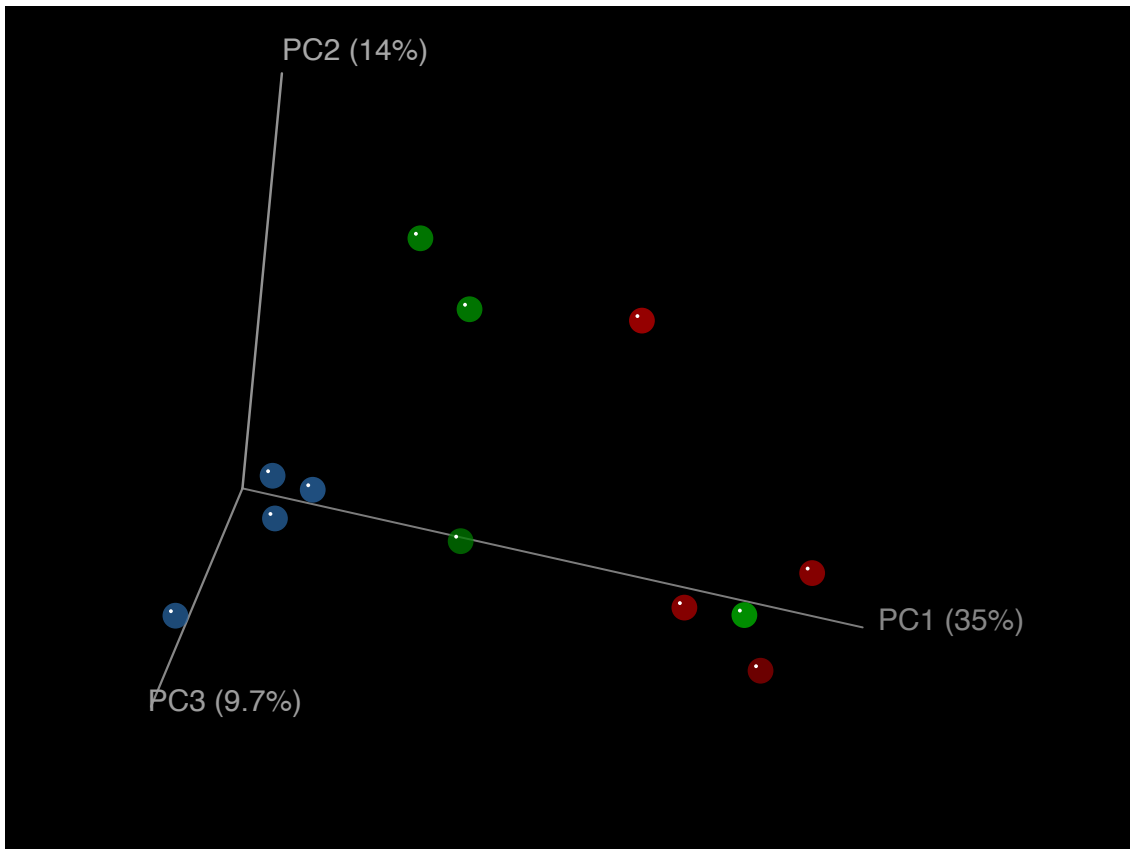


図 11 unweighted Unifrac の結果

Unifrac distance を元にした主座標分析の結果.

各点はサンプルを表す (赤 : AD, 青 : LF, 緑 : コントロール).

細菌叢に含まれる菌種とその数を考慮した weighted UniFrac 解析でも LF 群は他の 2 群とは分離され、独自のクラスターを持つことが示された (図 12). このことから 3 群のうち LF 群の細菌叢が、含まれる菌種とそれぞれの数において他の 2 群と異なり、小腸では AD 発症に伴う細菌叢の変化や LF の経口投与により細菌叢が変化していることが示唆された.

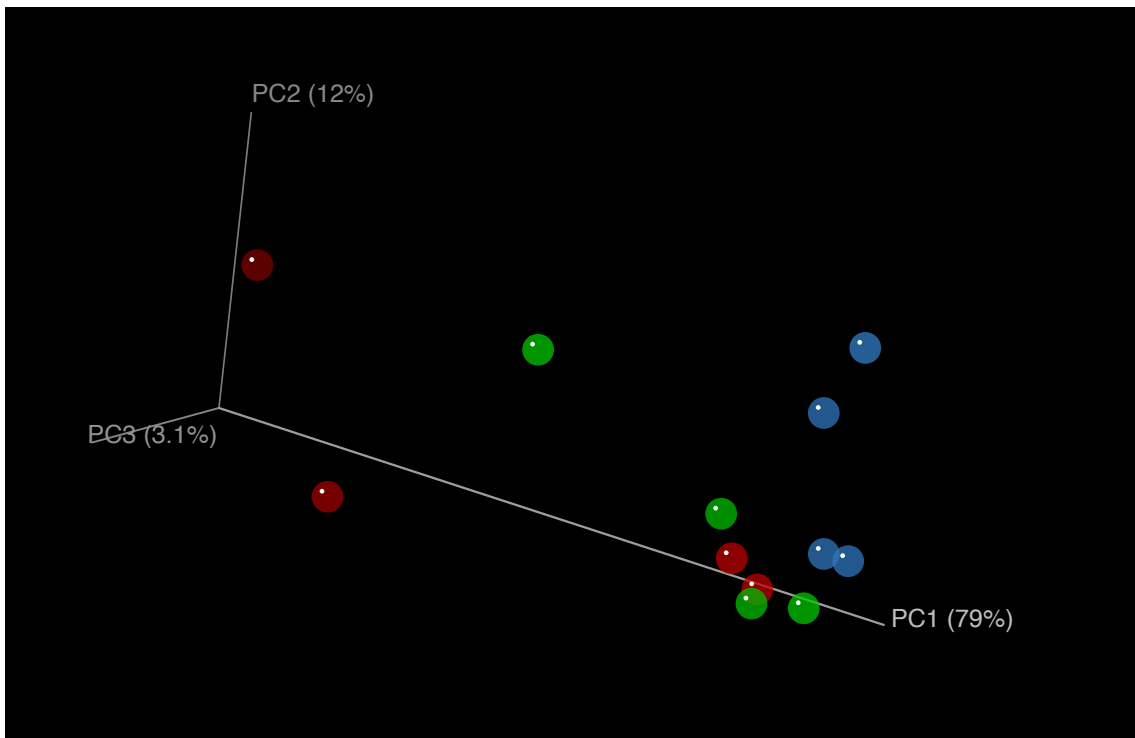


図 12 weighted UniFrac の結果

UniFrac distance を元にした主座標分析の結果.

各点はサンプルを表す (赤 : AD, 青 : LF, 緑 : コントロール).

3.3.3. OTU レベルでの細菌叢の違い

これまでの結果から, LF 投与により細菌叢は大腸内では変化しないが, 小腸内においては変化することが示唆されたため, より詳細に各群に特異的な細菌を明らかにするために, OTU レベル (種レベル) での解析を行った.

Kruskal-Wallis 検定によって 3 群間で有意 ($P < 0.05$) に差があることが示された 47 つの OTU をピックアップし, それらの特徴を探った. その結果, LF 群で減少傾向にあった Lactobacillaceae 科菌と増加傾向にあった S24-7 は, それぞれ 1 つの OTU に由来していたことが示された. また, Lachnospiraceae 科菌については複数の OTU が LF 群で増加した結果, Lachnospiraceae 科菌全体の合計が増加しており, AD 群で増加していた Enterobacteriaceae 科菌は 2 つの OTU で増加していたことが明らかになった (図 13).

3.4. CE-TOFMS による代謝物質解析

3.4.1. 糞便代謝物質・小腸内容物代謝物質の主成分分析

まず、糞便・小腸内容物それぞれについておおまかな代謝物質プロファイルの傾向を分析するため、主成分分析を行った。その結果、代謝物質プロファイルは糞便と小腸内容物の間で分離されることが示された (図 14 A)。この2群の分離には第一主成分の影響が大きいと考えられ、ローディング図よりこれら第一主成分は Leucine などであること、また第二主成分は Muscimol などであることが示された (図 14 B)。

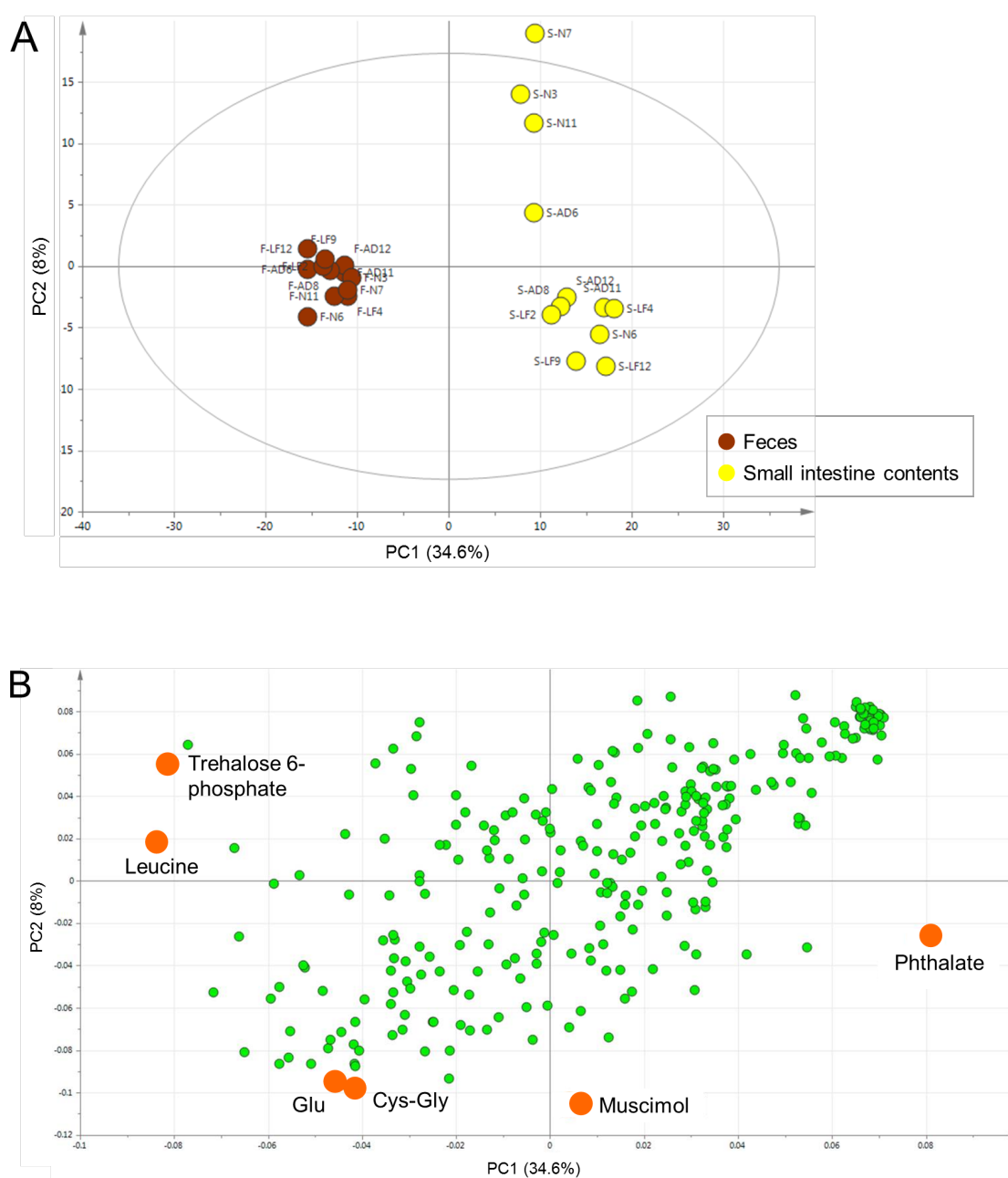


図 14 糞便代謝物質・小腸内容物代謝物質の主成分分析 (PCA) の結果

A: スコアプロット (茶: 糞便代謝物質 黄: 小腸内容物代謝物質)

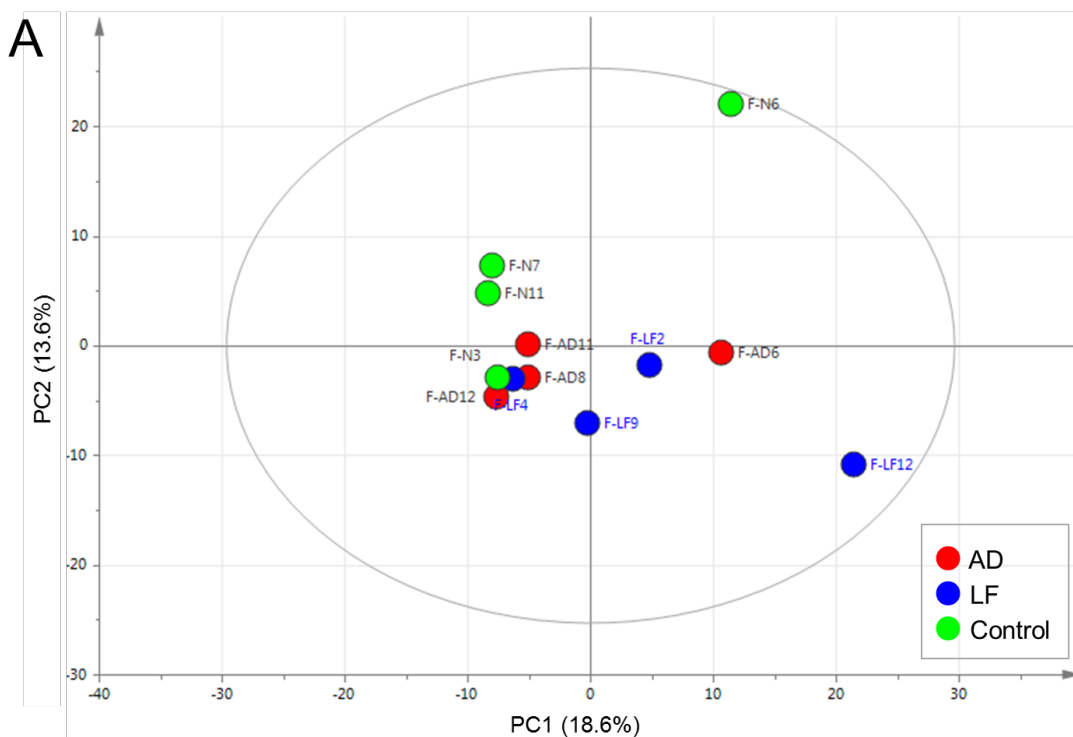
B: 因子負荷量プロット 第一主成分, 第二主成分ともに寄与率の高いほうから 3 物質をオレンジ色の点で示した.

図中 Glu は glutamine, Cys-Gly は cysteinyl-glycine を表す.

3.4.2. 糞便代謝物質解析

i) 糞便代謝物質の主成分分析

AD 群, LF 群, コントロール群それぞれの糞便の代謝物質プロファイルの傾向を見るため, 主成分分析を行った. その結果 3 群はクラスターに分離されなかった (図 15 A). ローディング図から, 第一主成分の分離には Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate (FAD) や Hexanoate など, 第二主成分の分離には 2,3-Pyridinedicarboxylate などが寄与していることが示唆された (図 15 B).



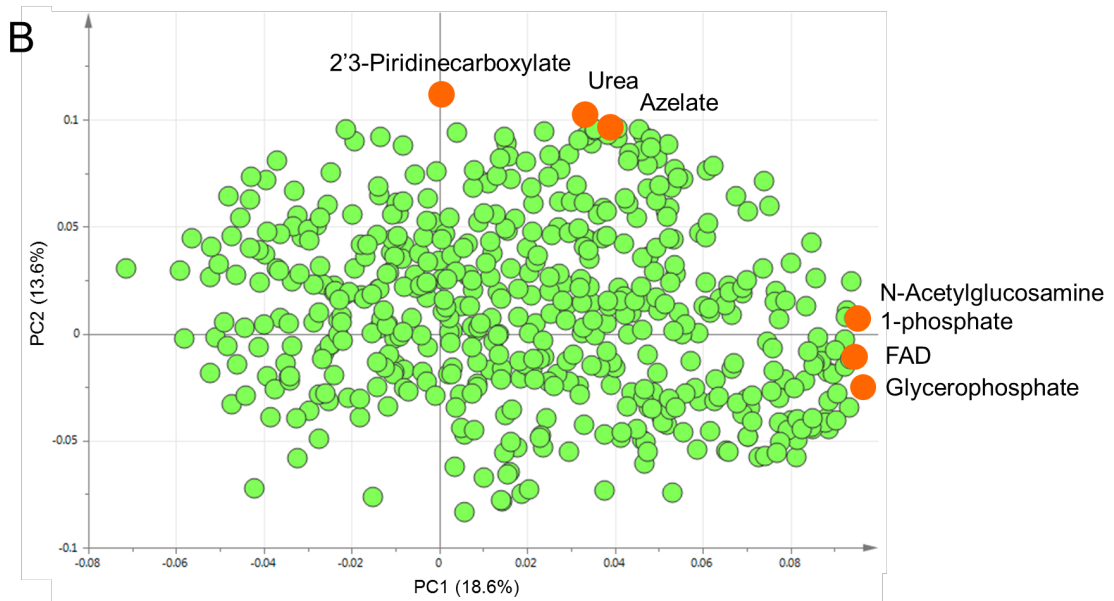


図 15 糞便代謝物質の主成分分析の結果

A : スコアプロット (赤 : AD 群 青 : LF 群 緑 : コントロール群)

B : 因子負荷量プロット 第一主成分, 第二主成分ともに寄与率の高いほうから 3 物質をオレンジ色の点で示した.

ii) 糞便代謝物質の判別分析

糞便において 3 群間での代謝物質プロファイルには特徴的な傾向が見られなかったため, AD 群と LF 群の 2 群について判別分析 (OPLS-DA) を行った. この 2 群間の条件の差異は LF 投与の有無のみだが, AD の発症スコアには大きな差異が見られた. OPLS-DA の結果, 2 群間の代謝物質プロファイルの分離に寄与し, LF 群で濃度の高い物質は SAH (S-Adenosyl-L-homocysteine) や Glutamine, AD 群で濃度高い物質は Acetylcholine, Tyrosine methyl ester などであることが示された (図 16 A, B).

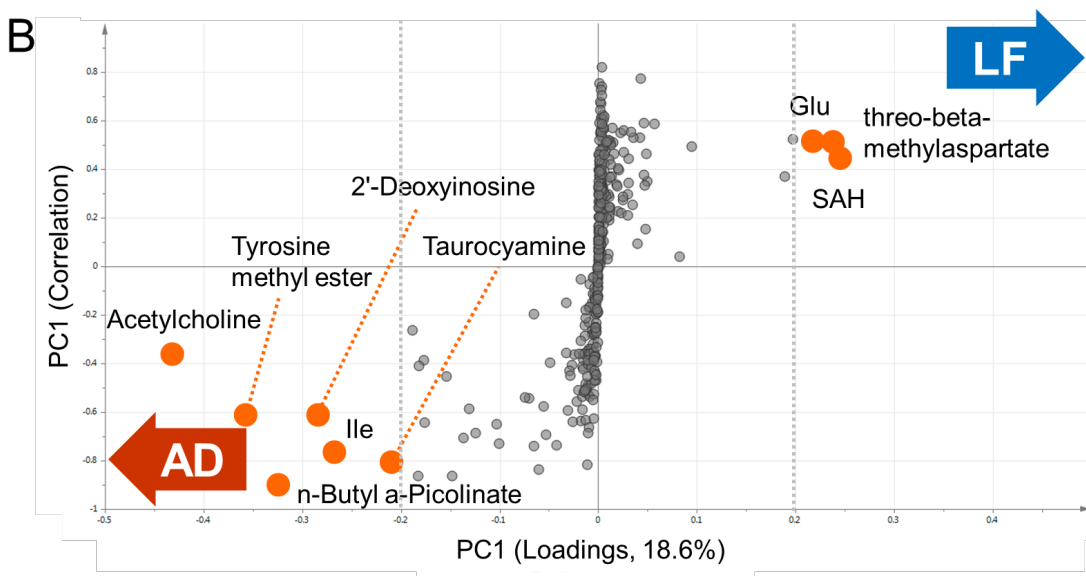
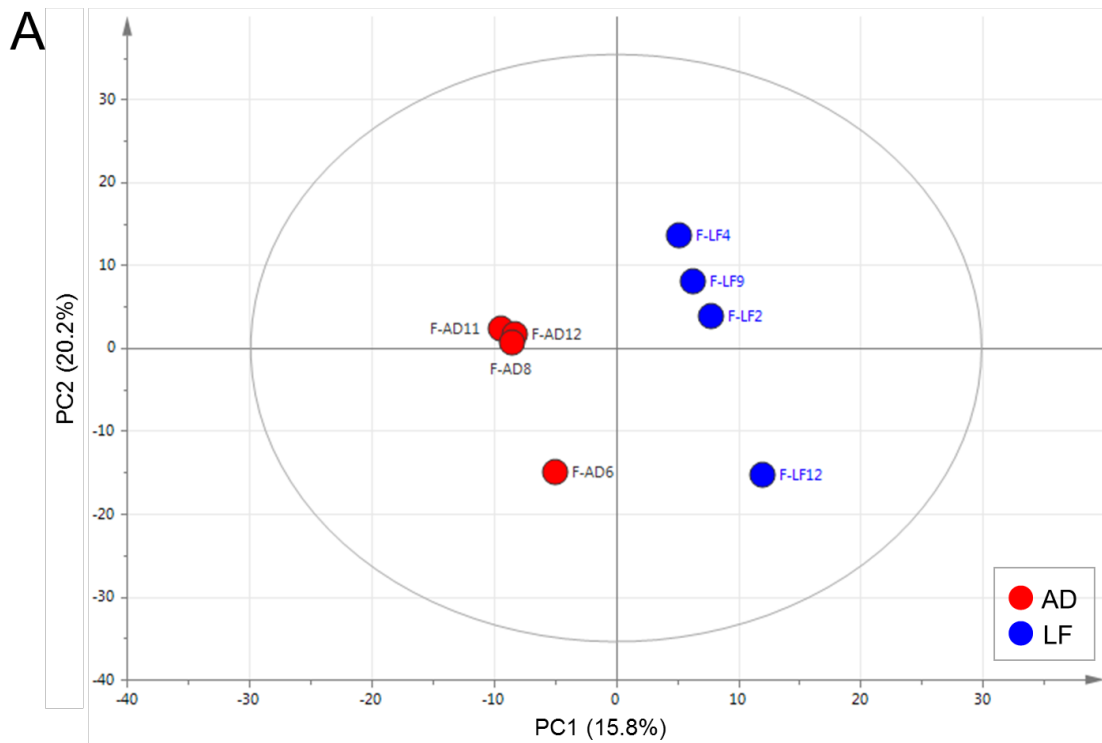


図 16 糞便代謝物質 AD 群対 LF 群の判別分析 (OPLS-DA) の結果

PC1 の寄与率 $>|0.2|$ のものをオレンジ色の点で示した.

A : スコアプロット (赤 : AD 群 青 : LF 群)

B : S プロット 横軸はピークの強度, 縦軸は 2 資料間の相関性を示す.

図中 Glu は glutamine, Ile は isoleucine を表す.

iii) 糞便代謝物質の有意差検定 (Mann-Whitney の U 検定)

Mann-Whitney の U 検定を行った結果、糞便代謝物質のうち 18 物質の濃度に AD 群と LF 群の間で有意な差があった (表 1)

表 1 AD 群と LF 群の間で有意な差があった糞便代謝物質

Metabolite	P-value	Concentration
Alliin	0.021	-
Melatonin	0.021	-
Pimelate	0.021	-
Digalacturonate	0.021	-
Citrulline	0.021	-
N-alpha-Benzenolarginine ethylester	0.021	-
N-Acetylneuraminate	0.021	-
Cholate	0.021	-
G1P	0.021	+
Pipecolate	0.043	+
beta-Cyanoalanine	0.043	-
Sebacate	0.043	-
Alpha-Methylserine	0.043	-
4-Methyl-2-oxopentanoate	0.043	-
Dodecanedioate	0.047	-
Leu-Leu-Tyr	0.047	-
3'-AMP	0.047	-
Trehalose 6-phosphate	0.047	+

LF 群において AD 群よりも低い濃度だったものには-を、高かったものには+を記した。

また、AD 群と LF 群の間で有意差のあった 18 物質について、それらがどのようなパスウェイに関係する代謝物質かを調査するため、MSEA を用いてパスウェイ解析を行った (図 17)。しかし、どのパスウェイに関しても有意差はなく、これらの代謝物質が特定のパスウェイを有意に変化させているとは言えないことが明らかになった。

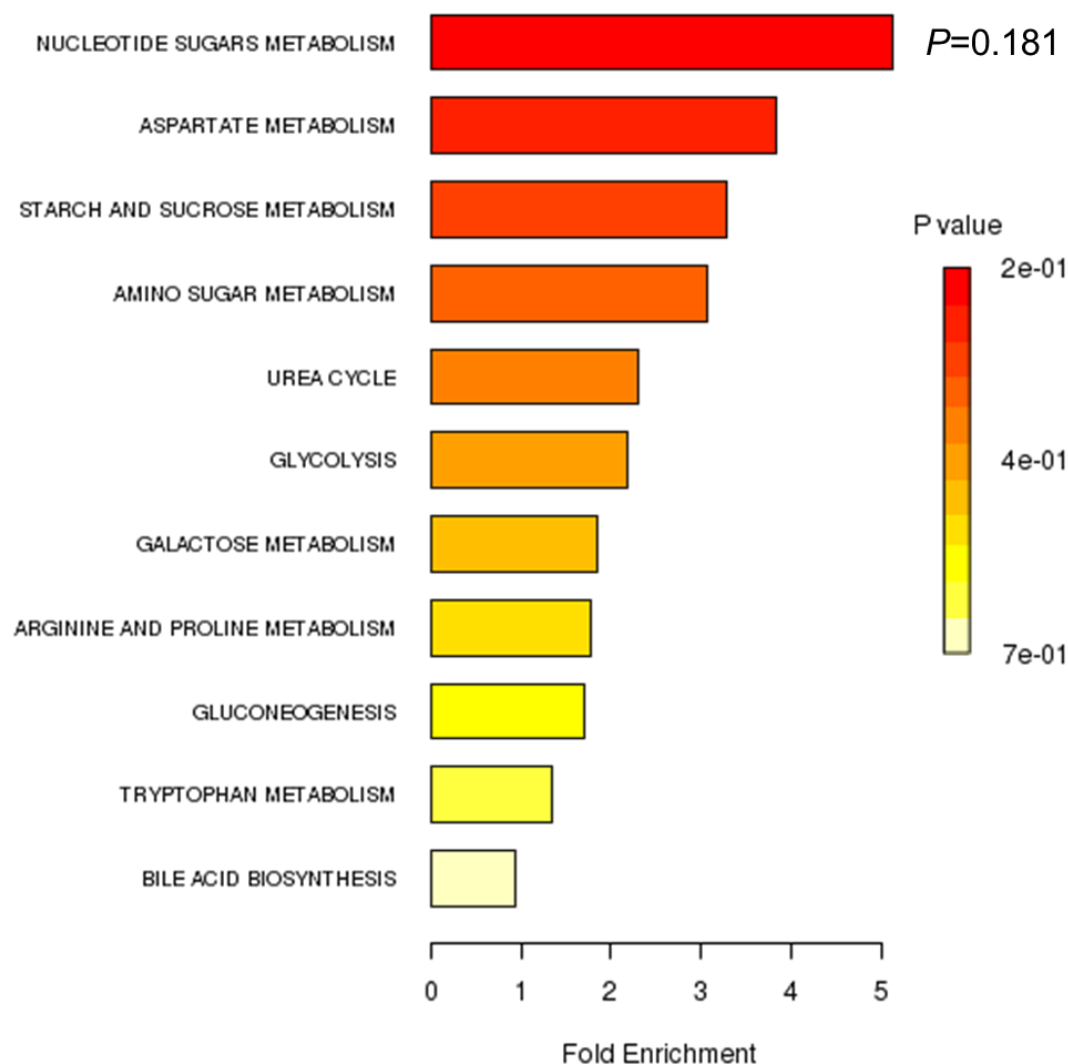


図 17 AD 群と LF 群の間で有意差のあった糞便中代謝物質（18 物質）が属するパスウェイ

MSEA を用い，AD 群対 LF 群の Mann–Whitney の U 検定において有意差のあった代謝物質について所属するパスウェイを予想した結果.

3.4.3. 小腸内容物代謝物質解析

i) 小腸内容物代謝物質の主成分分析

AD 群，LF 群，コントロール群それぞれの小腸内容物の代謝物質プロファイルの傾向を見るため，主成分分析を行った．その結果，その結果 3 群はクラスターに分離されなかった（図 18 A）．ローディング図から，第一主成分の分離には proline など，第二主成分の分離には creatinine などが寄与していることが示された（図 18 B）．

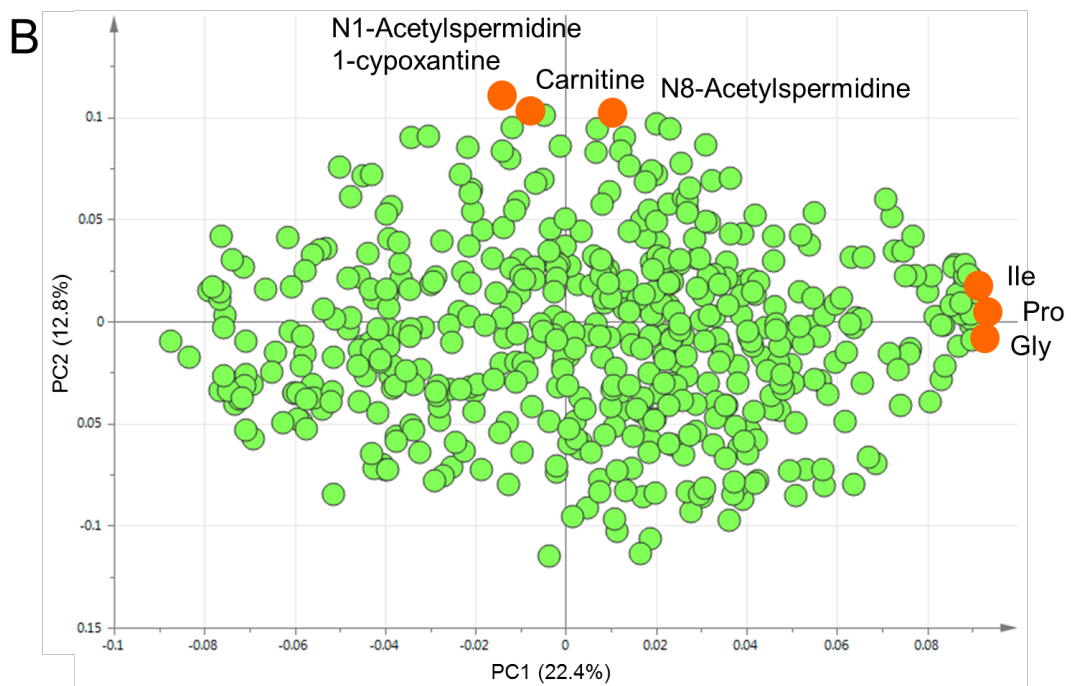
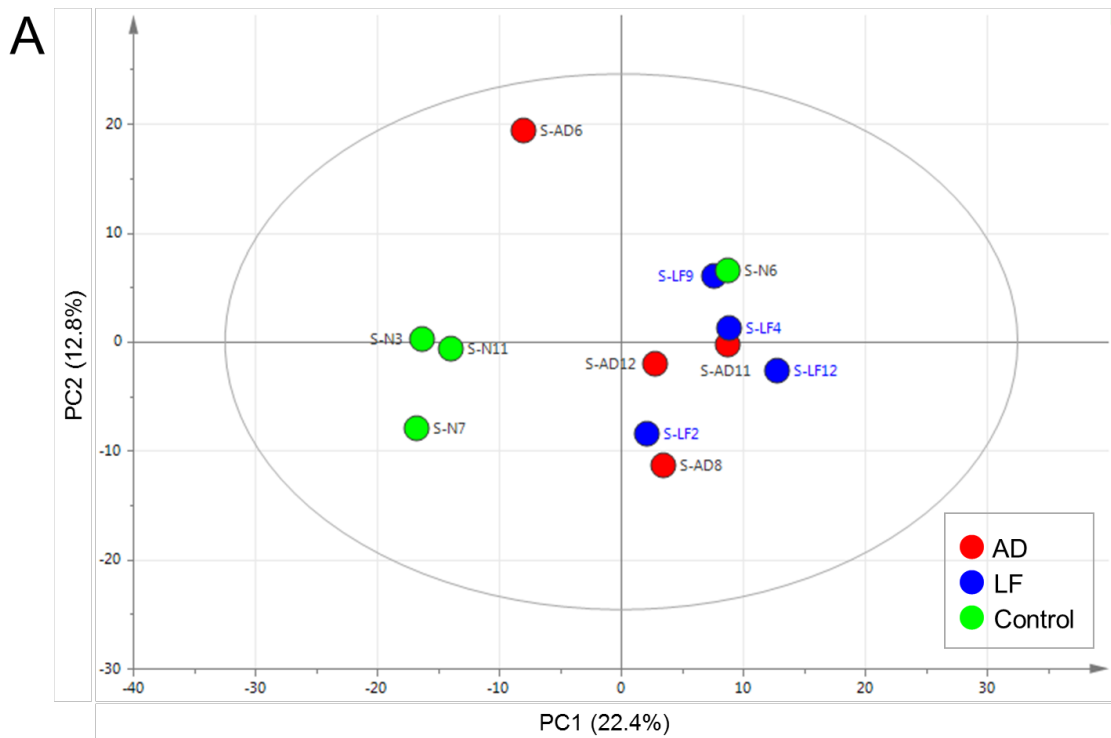


図 18 小腸内容物代謝物質の主成分分析の結果

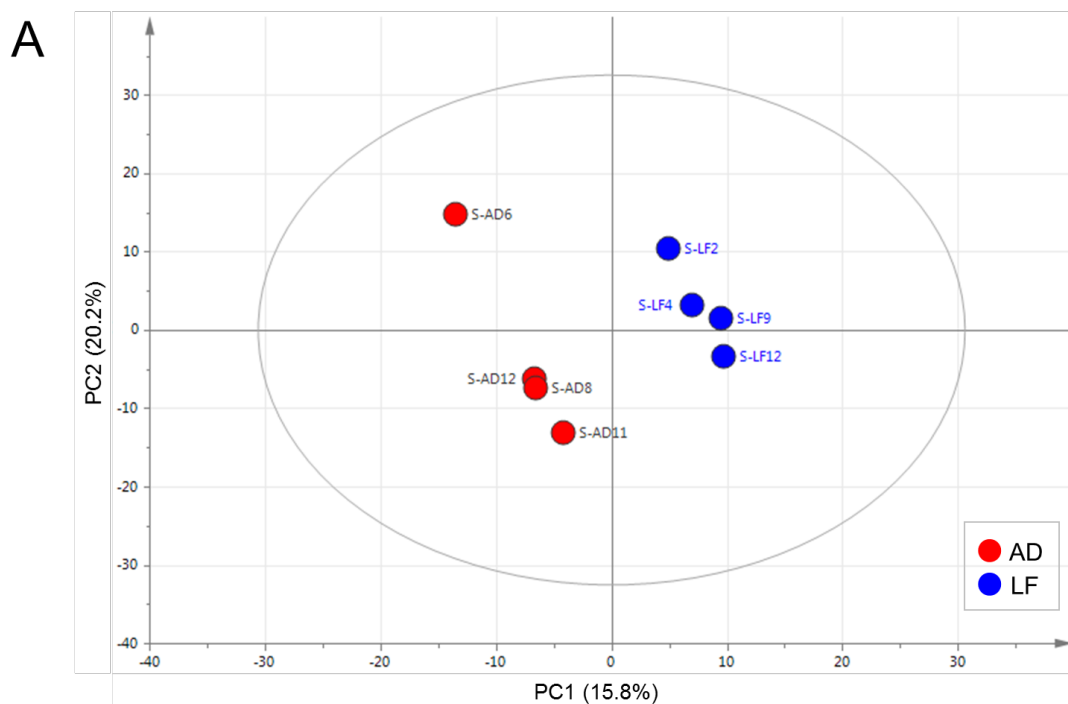
A : スコアプロット (赤 : AD 群 青 : LF 群 緑 : コントロール群)

B : 因子負荷量プロット 第一主成分, 第二主成分ともに寄与率の高いほうから 3 物質をオレンジ色の点で示した.

図中 Ile は Isoleucine, Pro は proline, Gly は glycine を示す.

ii) 小腸内容物代謝物質の判別分析

小腸内容物において, AD 群と LF 群の 2 群について OPLS-DA を行った. その結果, 2 群間の代謝物質プロファイルの分離に寄与し, LF 群で濃度の高い物質は 2'-deoxyionsine や Alpha-Methylserine, AD 群で濃度の高い物質は Taurocholate などであることが示された (図 19 A, B).



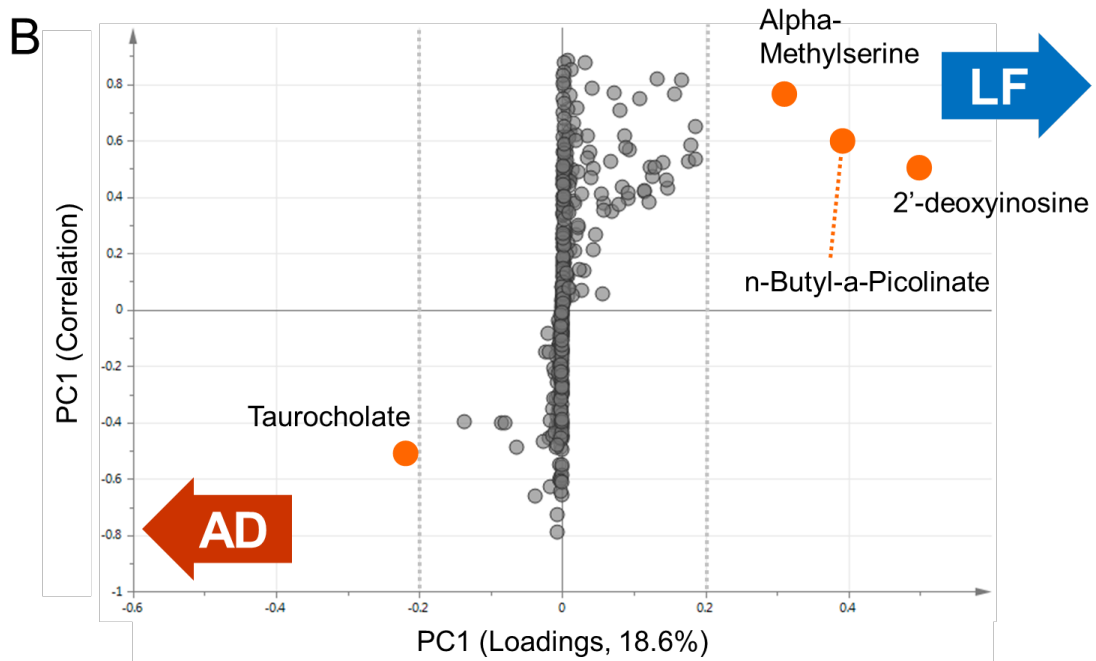


図 19 小腸内容物代謝物質 AD 群対 LF 群の判別分析 (OPLS-DA) の結果

PC1 の寄与率 $> |0.2|$ のものをオレンジ色の点で示した.

A : スコアプロット (赤 : AD 群 青 : LF 群)

B : S プロット 横軸はピークの強度, 縦軸は 2 資料間の相関性を示す.

iii) 小腸内容物代謝物質の有意差検定 (Mann-Whitney の U 検定)

Mann-Whitney の U 検定を行った結果, 小腸内容物中代謝物質のうち 25 物質の濃度に AD 群と LF 群の間で有意な差があった (表 2)

表 2 AD 群と LF 群の間で有意な差があった小腸内容物中代謝物質

Metabolites	P-value	Concentration
2-Hydroxyglutarate	0.0209	-
Quinate	0.0209	-
Val	0.0209	-
Ile	0.0209	+
Noradrenaline	0.0209	+
Tyr	0.0209	+
N-alpha,N-alpha-Dimethylhistidine	0.0209	+
N-Acetylglucosylamine	0.0209	-
Nicotinate	0.0433	-
Phenylpyruvate	0.0433	+
3-Indolebutyrate	0.0433	-
N-Acetylphenylalanine	0.0433	-
Glucosamine 6-phosphate	0.0433	+
2-Aminophenol	0.0433	-
Uracil	0.0433	-
Metformin	0.0433	+
Leu	0.0433	-
Dopamine	0.0433	+
Indole-3-acetaldehyde	0.0433	-
N-Acetylvaline	0.0433	-
Tryptamine	0.0433	-
Harman	0.0433	+
5-Methoxyindoleacetate	0.0433	+
N-Acetylglucosylamine	0.0433	-
Melatonin	0.0433	-

LF 群において AD 群よりも低い濃度だったものには-を，高かったものには+を記した。

また，Mann-Whitney の U 検定で有意差のあった代謝物質について，それらがどのようなパスウェイに関係する代謝物質かを調査するため，MSEA を用いてパスウェイ解析を行った。その結果，カテコールアミン生合成経路，タンパク質生合成経路やトリプトファン代謝などのパスウェイに代謝物質が集中していることが示された（図 20）。特にカテコールアミン生合成経路については代謝が有意に変化した可能性があることが明らかになった（ $P=0.0167$ ）。

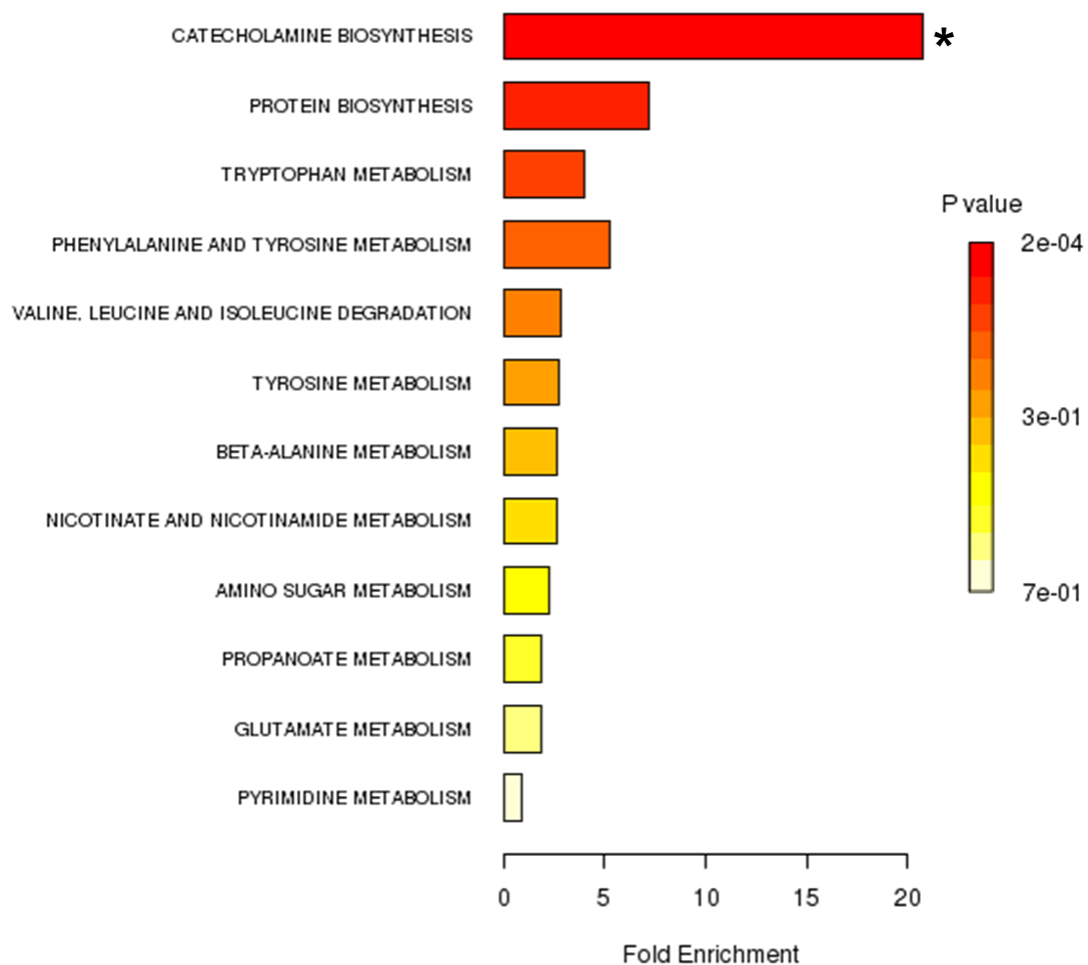


図 20 AD 群と LF 群の間で有意差のあった小腸内容物中代謝物質 (25 物質) が属するパスウェイ

MSEA を用い, AD 群対 LF 群の Mann-Whitney の U 検定において有意差のあった代謝物質について所属するパスウェイを予想した結果.

また, カテコールアミン生成経路の関連物質である tyrosine, dihydroxy phenylalanine(DOPA), dopamine, noradrenaline, adrenaline の濃度を AD 群と LF 群で比較した結果, 誘致差がない代謝物質に関しても LF 群において AD 群に比べて増加傾向にあり, LF の投与によってこの経路が亢進している傾向があることが示唆された (図 21).

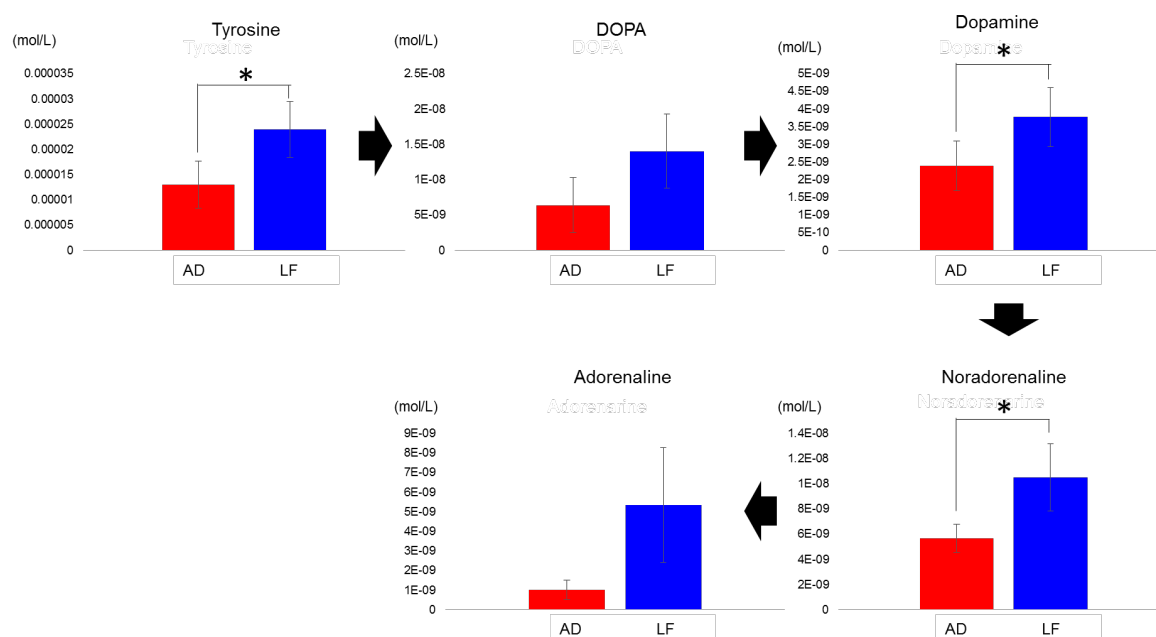


図 21 カテコールアミン生成経路関連代謝物質の濃度

棒グラフは濃度の平均値を表し、Mann-Whitney の U 検定において $P < 0.05$ だったものに*を記した。(赤 : AD 群 青 : LF 群)

3.5. 小腸内容物細菌叢-代謝物質間の相関関係

Spearman の順位相関係数を用いた相関解析の結果、細菌-代謝物質間で有意に ($P < 0.05$) 相関関係が認められる組み合わせは 548 組あった。OPLS-DA の結果から AD 群において濃度が高かった taurocholate は抱合型胆汁酸の一種で、一部の腸内細菌によって taurin と cholate に脱抱合されることが知られているため(29)、taurocholate, taurin, および cholate と相関関係を有する組み合わせに着目した。しかし、これら 3 物質に共通して有意に相関する属はみられなかった。LF 群で AD 群に比べて増加していたカテコールアミン生成経路の関連物質である noradrenaline と adrenaline において *Lactobacillus* 属菌との間に有意な正の相関関係が示された (表 3)。

表 3 カテコールアミン生成経路の関連物質と *Lactobacillus* 属菌の相関係数

Spearman の順位相関係数とその P 値を以下に示す。

Bacteria	Metabolites	Spearmanの順位相関係数	P-value
<i>Lactobacillus</i>	Tyr	0.266	0.404
<i>Lactobacillus</i>	DOPA	0.301	0.342
<i>Lactobacillus</i>	Dopamine	0.566	0.055
<i>Lactobacillus</i>	Noradrenaline	0.629	0.028
<i>Lactobacillus</i>	Adorenaline	0.580	0.048

4. 考察と今後の展望

本研究の結果から、LF 群では、AD 群に比較して表皮の外観スコア、TEWL 値、皮膚水分量すべてにおいてコントロール群に近い値が得られ、LF の投与によって AD 症状が抑制されることが示された (data not shown) . この結果が LF のプレバイオティクス効果によるものなのかを調査するため、糞便と小腸内容物について細菌叢解析と代謝物質解析を行った。まず糞便のレアファクションカーブから、3 群全ての細菌叢の多様性に違いがないことが明らかとなった (図 3) . また、属レベルで細菌叢の構成を表した積み上げ棒グラフからは、ほとんどのサンプルにおいて *Lactobacillus* 属菌や *Lachnospiraceae* 科菌が全体の 7 割ほどを占めており、群ごとに平均化したグラフからも 3 群に明らかな違いは見られないことが明らかになった (図 4, 5) . 続いて行った UniFrac distance を用いた主座標分析においても、細菌叢に含まれる菌の種類のみを考慮した unweighted, 菌の種類とその割合を考慮した weighted どちらにおいても 3 群はクラスタリングされなかった。このことから、3 群の細菌叢構造は細菌叢を構成する菌種の観点でも、各々の細菌の割合を考慮した群衆構造の観点でも類似していることが示された (図 6, 7) . LF にはプレバイオティクス効果があることが知られているが、本研究の結果から LF の投与によって少なくとも糞便 (大腸) に存在する腸内細菌叢の群集構造は変化しないことが示された。しかし、先行研究では、LF はペプシン処理を行ったものはプレバイオティクス効果が低く、腸溶性コーティングと呼ばれる小腸内に入るまで消化されない特殊なコーティングを施したもののほうが高い整腸作用を表すことが報告されている(26, 27) . のため、このような結果が示された理由のひとつとして、LF が胃で消化されてしまい、大腸まで到達しなかった可能性が考えられる。

そのため本研究では、大腸よりも腸管の上部に位置する小腸内容物の細菌叢解析も行った。小腸内容物のレアファクションカーブから、AD 群では細菌叢の多様性がコントロール群に比べて減少するのに対して、LF の経口投与することで細菌叢の多様性がコントロール群以上に増加することが明らかになった (図 8) . AD の発症により小腸細菌叢の多様性が減少することが報告されているが(8), 本研究の結果から LF の投与は AD で起こる小腸細菌叢の多様性の減少を予防する効果があることが示唆された。また、属レベルで細菌叢の構成を表し

た積み上げ棒グラフからは、LF 群では *Lactobacillus* 属菌が少なく、S24-7, Lachnospiraceae 科菌が他の群よりも多い傾向があることがわかった (図 9, 10). UniFrac distance を用いた主座標分析においても、細菌叢に含まれる菌の種類のみを考慮した unweighted, 菌の種類とその割合を考慮した weighted のどちらにおいても LF 群は他の 2 群とは分離された (図 11, 12). このことから小腸では LF の投与によって、細菌叢が変化していることが示唆された. ここまでの結果から、LF 投与により細菌叢は大腸内では変化しないが、小腸内において 3 群間で明確に変化することが示されたため、より詳細に各群に特異的な細菌を明らかにするために、OTU レベルでの解析を行った. その結果、LF 群で減少傾向にあった Lactobacilaceae 科菌に分類される OTU のうち有意差があった OTU は 1 つのみであった (図 13). *Lactobacillus* 属菌に分類された OTU を含めると Lactobacilaceae 科菌に属する OTU は 21 個存在したが、そのうち LF の投与によって有意に存在割合が変化した OTU は 1 つのみであったことから、Lactobacilaceae 科菌の中でも種や株によって LF に対する感受性が異なる可能性が示唆された.

LF 投与に伴う代謝物質濃度の変化を分析するため、糞便と小腸内容物の代謝物質解析を行った. 糞便代謝物質と小腸内容物代謝物質の主成分分析からは、代謝物質プロファイルは糞便中と小腸内容物中で異なることが示された (図 14). これには宿主が分泌する消化液や食物の消化・吸収による代謝物質濃度の変化、pH、酸素濃度、腸内細菌叢の構造の違いなどの様々な要因が影響していると考えられる.

糞便代謝物質プロファイルのみの主成分分析では、代謝物質プロファイルの傾向が 3 群間で変化しないことが明らかになった (図 15). そこで、LF を投与するかしないかの条件のみが異なり、AD の発症スコアには大きな差異が見られた AD 群と LF 群の 2 群間で OPLS-DA を行った. その結果、2 群間の代謝物質プロファイルの分離に寄与し、LF 群で濃度の高い物質は SAH や Glutamine, AD 群で濃度高い物質は Acetylcholine, Tyrosine methyl ester などであることが示されたが、それらの物質について AD との関連性は報告されていなかった (図 16). また、Mann-Whitney の U 検定の結果、AD 群と LF 群の 2 群間で 18 個の代謝物質濃度が有意に変化していることが示された (表 1). この 18 物質が生体内のどのようなパスウェイに関係する代謝物質かを調査するため、MSEA を用いてパスウェイ解析を行ったが、いずれのパスウェイにも有意差がないことが示された (図 17). これにより糞便中代謝物質に関しては、LF 投与により増減した代謝物質は 18 物質あったものの、ある特定の代謝経路に影響を与えているわけではないことが示唆された.

小腸内容物中の代謝物質プロファイルのみの主成分分析の結果、小腸内容物においても代謝物質プロファイルの傾向は 3 群間で変化しないことが明らかになった (図 18), 糞便代謝物質と同じく、AD 群と LF 群の 2 群間の OPLS-DA を行った結果、2 群間の代謝物質プロフ

アイルの分離に寄与し、LF 群で濃度の高い物質は 2'-deoxyionsine など、LF 群で濃度の高い物質は taurocholate であることが示された (図 19)。Taurocholate は胆汁酸の一種で、一部の腸内細菌によって taurine と cholate に脱抱合されることが明らかになっており、免疫系への関与や腸内細菌とのクロストークも注目されている(30)。これら 3 種の代謝物質と相関関係を有する細菌種を属レベルで探索したが、これらと有意に相関するものの中で胆汁酸の脱抱合能を持つと既に報告されている細菌種は認められなかった。また、Mann-Whitney の U 検定の結果、AD 群と LF 群の 2 群間で 25 個の代謝物質濃度が有意に変化していることが示された (表 2)。この 25 物質に対して MSEA を用いてパスウェイ解析を行った結果、カテコールアミン生合成経路、タンパク質生合成経路などのパスウェイに代謝物質が集中していることが明らかになった (図 20)。特にカテコールアミン生合成経路については、この経路に含まれる 5 物質全ての濃度 (tyrosine, DOPA, dopamine, noradrenaline, adrenaline) が LF 群で高い傾向が見られることから、LF 群においてこの代謝が亢進した可能性が示唆された。これら 5 種の代謝物質と相関関係を有する細菌種を属レベルで探索したところ、*Lactobacillus* 属菌との間で正相関を有する傾向が見られた (表 3)。これらのことから、LF の経口投与により小腸内で細菌叢と代謝物質の変化が起きており、特にカテコールアミン生合成経路について代謝が亢進していることが示唆された。またこれらの物質と正の相関関係のあった細菌種である *Lactobacillus* 属菌が、カテコールアミンの産生に何らかの関連性を持っている可能性が示唆された。カテコールアミンは、腸管内でリンパ球などの免疫細胞を自然細胞死させる作用があり (31, 32)、カテコールアミン遮断薬の投与によって敗血症で惹起される心筋傷害および腸管壁防御機構の破綻を軽減することが示唆されているため(33)、カテコールアミンの増加は生体にとって有害であると考えられている。一方で、カテコールアミンの一種であるアドレナリンは、肥満細胞からヒスタミンなどのアレルギー性メディエーターが遊離することを抑制することが知られており、アナフィラキシーショックなどの治療に使用されている(34-36)。肥満細胞から遊離するヒスタミンは血管拡張による紅斑や皮膚のかゆみを引き起こすことが知られているため、ヒスタミンの減少は AD の症状の緩和につながる。そのため、AD においては LF の投与によってカテコールアミンが増加し、ヒスタミンの遊離の抑制や、免疫細胞の細胞死の誘導が起こることで、AD 症状を緩和させた可能性も考えられる。しかし、この仮説を検証するためには、ヒスタミン量の測定や免疫細胞数の測定、カテコールアミンの単独投与実験などを行う必要があり、さらなる調査が必要である。

ここまでの結果から、本研究によって、LF の投与は AD モデルマウス (NC/Nga マウス) の AD 症状を軽減させる効果があること、小腸細菌叢の構造を変化させ、多様性を増加させること、小腸内容物中の代謝物質のうち特にカテコールアミン代謝経路の代謝物質濃度を増加させることが明らかになった。また、糞便中細菌叢には変化がなかったことから、腸溶性

カプセルなどを併用しない場合、LF の効果は大腸まで到達しないことが示唆された。LF の AD 症状緩和のメカニズムを解明するためにはさらなる調査が必要であるが、LF の投与によってカテコールアミンが増加し、ヒスタミンの遊離の抑制や、免疫細胞の細胞死が誘導されることで、免疫機構の過剰な応答を抑制し AD 症状を緩和させるという仮説を提案した。ラクトフェリンを含むプレバイオティクスによる腸内細菌叢の変化やその効能のすべては未だ明らかにされていない部分も多いが、ラクトフェリン摂取マウスの腸内細菌叢解析および代謝物質解析を行うことで、ラクトフェリンによる腸内細菌叢の免疫機能亢進作用のメカニズム、またアレルギーと腸内細菌とその代謝物質との関連の解明に一步でも近づけたことを期待する。

5. 謝辞

4年間を通じ、実験や解析など全てにおいてきめ細かな指導とご協力をいただいた博士2年の石井千晴さんに深く感謝致します。私が本研究をこのような一つの形にまとめることができたのも、ひとえに、できの悪い私を見放さずに叱咤激励し尽力してくださった石井さんのおかげです。ピシッとしている時はデキ女過ぎて雲の上の存在ですが、わいわいしている時などは、あれっ今テンション一緒かも～、なんてうれしくなるときもあり、そんな姉御かわいちはさんが大好きです。これからもずっとずっと、よろしく願います。また、博士3年の村上慎之介さんには直接アドバイザーをしていただいた学期は1学期のみでしたが、しょっちゅうわからないことを助けていただいたりして、最後まで面倒をおかけしました。バイオキャンプ時代だけでなく春プロ、夏プロなどで鶴岡に行くと、ウェルネスめし！ウェルネス飲み！などといってむらかみカップルとわいわい一緒に過ごせることがうれしくて、何よりの楽しみでした。同じように、直接アドバイザーをしていただいた学期は1学期のみでしたが飛田匠太さんには、代謝物質解析の部分で様々な検定の種類や解析手法を教えてくださいました。永遠に壊れ続けるマスターハンズファイルの闇から救い出してくださったのも飛田さんでした。ありがとうございました。学部2年次に1年間、山形県鶴岡市でバイオキャンプ生として勉強していた時期には、同じ常在菌グループの皆さんに実験や解析の仕方を教えていただいたり、休日には遊んでいただいたり、屋久島合宿で楽しい時を過ごしたり、公私ともに大変お世話になりました。バイオキャンプのメンバーにも、実習やその後の実習レポートなど、様々なイベントでお世話になりました。学年もグループもバラバラなメンバーでしたが、花金、鼻水（花水）などといって毎日のようにお酒を飲んだり、メンバーの誕生日にはサプライズ企画をしたり、山形文化論という授業で泥まみれになってタケノコを掘ったり、一緒に仙台旅行へ行ったり、楽しい思い出が数えきれないくらいたくさんできました。また、同期でグループも一緒だった学部4年の渡部翔さん、吉川実亜さん、高萩航君とは一緒にいる時間がとても楽しく、じんかた（人生を語る会）をしたり、悩み相談などもしていただいたり、大変ありがたかったです。短い期間でしたがアドバイザーとしてついでくれた学部2年の鶴巻萌さんと岸本加奈子さんには、アドバイザーとしてできたことはとても少なかったですが、ふたりともとても素直に話を聞いてくれ、後輩を育てることの喜びを教えてくださいました。以上富田研究会でお世話になった皆さま、仰木研究会でお世話になった仰木裕嗣准教授、サンプルを提供してくださった共同研究先のライオン株式会社みなさまに改めて感謝いたします。最後になりましたが、このような素晴らしい研究をする機会と素晴らしい環境を与えてくださった福田真嗣特任准教授、富田勝教授にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。ありがとうございました。

6. 参考文献

1. 実験医学 (2014) Vol.32 常在細菌叢が操るヒトの健康と疾患 増刊 5:824-829.
2. 厚生労働省HP <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/05/05.html> .
3. Yamamoto S (2007) コメディカルのための アトピー性皮膚炎対処ガイドブック p.1-2.
4. Horimukai K et al. (2015) Transepidermal water loss measurement during infancy can predict the subsequent development of atopic dermatitis regardless of filaggrin mutations. *Allergology International* 65(1):103-108.
5. Heidi H. Kong¹ and Julia A. Segre (2012) Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. *Journal of Investigative Dermatology* 132(3 Pt 2):933-939.
6. Storrø O et al. (2011) Temporal variations in early gut microbial colonization are associated with allergen specific immunoglobulin E but not atopic eczema at 2 years of age. *Clinical & Experimental Allergy* 41(11):1545-1554.
7. Watanabe S et al. (2003) Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(3):587-591.
8. Abrahamsson TR et al. (2012) Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129(2):434-440.
9. Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, Geuking MB, McCoy KD (2013) Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 14(5):559-570.
10. Kalliomäki M et al. (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 357(9262):1076-1079.
11. Magali N R et al. (2013) A microbiota signature associated with experimental food allergy

- promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(1):201-212.
12. Cox MJ et al. (2010) Lactobacillus casei Abundance Is Associated with Profound Shifts in the Infant Gut Microbiome. *PLoS One* 5(1):e8745.
 13. Xiaonan P et al. (2015) Research progress in physicochemical characteristics of lactoferrin and its recombinant expression systems. *Journal of genetics and genomics*. 37(9):873-884.
 14. Marian L Kruzel, Attila Bacsı, Barun Choudhury, Sanjiv Sur, Istvan Boldogh (2007) Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology* 119(2):159–166.
 15. Wang SB et al. Lactoferrin administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis and its mechanisms. (2013) *Scandinavian Journal of Immunology*. 78(6):507-515.
 16. Oda H, Wakabayashi H, Yamauchi K, Abe F (2014) Lactoferrin and bifidobacteria. *Biometals* 27(5):915-922.
 17. Morishita S et al. (2013) Bovine lactoferrin reduces visceral fat and liver triglycerides in ICR mice. *Journal of Oleo Science* 62(2):97-103.
 18. Ono T et al. (2010) Potent anti-obesity effect of enteric-coated lactoferrin: decrease in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets. *British Journal of Nutrition* 104(11):1688-1695.
 19. Iemoli E et al. (2012) Probiotics Reduce Gut Microbial Translocation and Improve Adult Atopic Dermatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 46 Supply1 S33-40.
 20. Seok-Won Kim et al. (2013) Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Research* pp.1-13
 21. Sugimoto M, Kawakami M, Robert M, Soga T, Tomita M. (2012) Bioinformatics Tools for

- Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. *Current Bioinformatics* 7(1):96-108.
22. Caporaso JG et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7(5):335-336.
23. Chu VT, Gottardo R, Raftery AE, Bumgarner RE, Yeung KY (2008) MeV+R: using MeV as a graphical user interface for Bioconductor applications in microarray analysis. *Genome Biology* 9(7):R118
24. Xia J, Wishart D S (2010) MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. *Nucleic Acids Research* 38 Supply 2:W71–W77.
25. Kong HH et al. (2012) Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research* 22(5):850-859.
26. Fukuyama J, McMurdie PJ, Dethlefsen L, Relman DA, Holmes S (2012) *Pacific Symposium on Biocomputing* 213-224.
27. Ono T et al. (2011) Effects of pepsin and trypsin on the anti-adipogenic action of lactoferrin against pre-adipocytes derived from rat mesenteric fat. *British Journal of Nutrition* 105(2):200-211.
28. Suzuki N et al. (2013) Effects of Enteric-coated Lactoferrin Tablets Containing *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on Fecal Properties, Defecation Frequency and Intestinal Microbiota of Japanese Women with a Tendency for Constipation: a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 32(1):13-21
29. Ramasamy K, Abdullah N, Wong MC, Karuthan C, Ho YW (2010) Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. *Journal of Science Food Allergic* 90(1):65-9.
30. Devkota S, Chang EB (2015) Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut

Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive Diseases and Sciences* 33(3):351-356.

31. Montoro J et al. (2009) Stress and allergy. *Journal Investigational Allergology and Clinical Immunology* 19 Supply 1:40-47.

32. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA (2008) Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Molecular Medicine* (3-4):195-204.

33. Suzuki T et al. (2005) Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Critical Care Medicine* 33(10):2294-2301.

34. Lieberman P (2003) Use of epinephrine in the treatment of anaphylaxis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 3(4):313-318.

35. Simons FE (2004) First-aid treatment of anaphylaxis to food: focus on epinephrine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113(5):837-844.

36. Simons FE (2010) Anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2) Supply 2:S161-81.