

イヌリン型フルクタン摂取の腸管バリア機能に及ぼす影響に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2012-01-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 弘幸 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00006366

静岡大学博士論文

イヌリン型フルクタン摂取の腸管バリア機能に
及ぼす影響に関する研究

2010年1月

大学院 自然科学系教育部
バイオサイエンス専攻

伊藤 弘 幸

博士學位論文目次

伊藤弘幸

審査申請論文名 イヌリン型フルクタン摂取の腸管バリア機能に及ぼす影響
に関する研究

目次

緒論	1	頁
第1章 イヌリン型フルクタンの重合度が盲腸内IgA量に及ぼす影響	4	頁
1.1 緒論	5	頁
1.2 実験方法	6	頁
1.3 結果	14	頁
1.4 考察	15	頁
第2章 イヌリン型フルクタンの重合度が盲腸内ムチン量に及ぼす影響	29	頁
2.1 緒論	30	頁
2.2 実験方法	32	頁
2.3 結果	36	頁
2.4 考察	37	頁
第3章 イヌリン型フルクタンの急性期TNBS誘発大腸炎に対する予防効果	49	頁
3.1 緒論	50	頁
3.2 実験方法	51	頁
3.3 結果	54	頁
3.4 考察	55	頁

第4章	イヌリン型フルクタン摂取による TNBS 誘発大腸炎モデルに対する治癒促進効果	68	頁
4. 1	緒論	69	頁
4. 2	実験方法	70	頁
4. 3	結果	71	頁
4. 4	考察	72	頁
第5章	TNBS 誘発再発大腸炎モデルの作成	80	頁
5. 1	緒論	81	頁
5. 2	実験方法	81	頁
5. 3	結果	84	頁
5. 4	考察	84	頁
総括		91	頁
参考文献		93	頁
謝辞		103	頁

緒論

腸管粘膜は表皮と同様に外界との接点に位置しており、機械的、化学的刺激や無数の外来抗原、細菌等の異物に曝されている。そのため、腸管は厚い粘液層で覆われ非特異的バリアを形成している。この粘液の主成分は高分子糖タンパク質であるムチンであり、主として腸杯細胞から分泌される。また腸管からは免疫グロブリンの一種であるイムノグロブリン A (immunoglobulin A, IgA) が分泌されており、その役割は細菌由来毒素、ウイルス、アレルゲンとの中和や、腸内細菌と結合・凝集することで細菌の腸管粘膜への接着を防ぐなど多岐に渡っている。さらに IgA とムチンは腸内細菌と共にバイオフィルムを形成し、病原性細菌等の腸管粘膜への接着を防いでいる^{1,2)}。これらのバリアを超えて粘膜中へ侵入した細菌や異物に対しては、腸管免疫系の働きにより、免疫応答が誘導される。一方で腸管腔内には栄養素や乳酸菌やビフィズス菌などの無害な菌も存在しており、これらに対しては免疫応答を無視する、いわゆる免疫寛容が成立している。この免疫寛容は制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺T 細胞) から分泌される抑制性または抗炎症性サイトカインと呼ばれる IL-10 や TGF- β により誘導される³⁾。これらのサイトカインは IgA 分泌にも関係しており、抗体のサブタイプをアレルギー反応型の IgE ではなく免疫寛容型の IgA へとクラススイッチする応答を誘導する⁴⁾。このように腸管はムチン、IgA といったバリアにくわえ腸管免疫系により複合的に守られている。

フラクトオリゴ糖 (fructooligosaccharides, FOS) やイヌリンに代表されるイヌリン型フルクタンは β 2-1 フルクトースポリマーの還元末端にグルコースが 1 分子結合した構造のオリゴ多糖であり、天然にはチコリーやニンニク等の幅広い植物中に貯蔵炭水化物として存在するほか、人工的にスクロースにフルクトシルトランスフェラーゼを反応させることでも合成されている⁵⁾。このフルクトースポリマーの β 2-1 結合は哺乳動物の膵消化酵素や膜消化酵素では分解されないため、摂取したフルクタンは小腸を通過し、大腸へと流入する。大腸においてこれらフルクタンは腸内細菌の発酵基質として利用され、短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFA)、乳酸、コハク酸等の有機酸へと変換され、大腸内 pH の低下に寄与するほか、in situ での結腸灌流試験の結果から、SCFA、特に *n*-酪酸には迷走神経の刺激を介したムチン分泌促進作用が報

告されている⁶⁻⁸⁾。また、フルクタンは *lactobacilli* や *bifidobacteria* の良好な発酵基質となり増殖を刺激し^{9,10)}、同時に大腸内 IgA 分泌量を高めることが知られている^{11,12)}。フルクタン摂取時に誘導されるこれらの乳酸産生菌は小腸パイエル板細胞と共培養したとき IgA の分泌を誘導するほか、マウスへの経口投与試験の結果から小腸洗浄液中の IgA 濃度を増加させることが報告されている^{13,14)}。しかし、小腸内 IgA の大半は胆汁に由来することから¹⁵⁾、フルクタンの主たる作用部位である大腸での IgA 分泌量の解析とその作用機序の解明こそが重要であると考えられる。

ところで、Roberfroid ら¹⁶⁾はヒト結腸由来の腸内細菌を用いた *in vitro* 発酵試験において、フルクタンの重合度 (degree of polymerization, DP) が DP<10 の場合、DP>10 に比べて発酵速度が2倍速いことを報告している。この知見は低 DP の方が腸内細菌への基質 (単糖) の供給速度が速いことを意味しており、供給量によっては発酵基質としての C/N 比インバランスを引き起こし、発酵産物は乳酸やコハク酸に偏り SCFA 産生量は減少すると考えられる^{17,18)}。これらの有機酸は解離度が高く (pKa<4.5) , SCFA と異なり腸管からの吸収速度が遅いため大腸内に蓄積し、大腸内 pH は極度に低下する¹⁹⁾。*Lactobacilli* や *bifidobacteria* などの乳酸産生菌は強酸性環境下においても増殖可能であるが^{20,21)}、一般に他の菌種では増殖は抑制され、その結果、SCFA 産生量は益々抑制されると考えられる。したがって、フルクタンの DP は発酵速度を介して有機酸パターンや腸内フローラ、引いては腸管バリア機能に関与するムチン及び IgA 分泌量に影響を及ぼすと考えられる。

本研究では DP の異なるフルクタンをラットに摂取させたときの大腸バリア機能に及ぼす影響について大腸内 IgA およびムチンに焦点をあて解析し、次いで大腸内 IgA 及びムチン濃度の上昇が炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) の予防に果たす役割について明らかにすることを目的とした。第1章では DP の異なるフルクタン摂取時の盲腸内 IgA 分泌量の変動について、盲腸内発酵パターン、腸内細菌叢 (特に乳酸産生菌)、盲腸粘膜固有層中 IgA plasma cell の観点から解析を行うとともに、IgA 分解速度を測定することで分解速度の観点からも解析を行った。また、盲腸粘膜固有層 CD4⁺T 細胞を分離し、CD3/CD28 共刺激下で培養し、そのサイトカインプロファイルを解析することで、フルクタンの腸管免疫系に及ぼす影響についても詳細に検討し

た。第2章ではDPの異なるフルクタン摂取時の盲腸内ムチン分泌量の変動について分泌要因 (SCFA, *Muc gene* 発現量, 杯細胞数) から解析するとともに, ムチン分解酵素活性を測定することで分解速度の側からもムチン量を解析した。また, ムチンは分子種以外に糖鎖種によって中性, シアロまたは硫酸ムチンに分類され²²⁾, なかでも硫酸ムチンは粘性が高く, 腸内細菌による分解に抵抗性を示すことから²³⁾バリア機能にも重要な役割を示すと考えられる。したがって, 本章ではDPの変化がこれらムチン糖鎖種に及ぼす影響について, 組織学的, 分子生物学的手法を用いて解析した。

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される自己免疫疾患であるIBDの病因は未だ明確でないが, 遺伝的因子に加え, 腸内環境因子 (食事, 腸内細菌), 免疫機構の破綻, 異常が絡み合って発症すると考えられる。この疾患の特徴は寛解と再燃を繰り返すことで, 炎症の再発には腸内細菌の透過が強く関わっている²⁴⁾。フルクタン摂取は大腸バリア機能を増強し, また腸管免疫系を修飾することで透過細菌に対する寛容を誘導し, 炎症の抑制に繋がるのではないかと考えられる。したがって, 第3章, 第4章および第5章ではIBDの動物実験モデルとしてトリニトロベンゼンスルホン酸

(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 誘発大腸炎を作成し, 本モデルに対するフルクタン摂取の効果を評価した。このモデルは急性期においてTNBSと溶媒であるエタノールの同時投与による腐食作用に端を発し, 細菌やエンドトキシンの透過により増強される急性炎症像を示し, 慢性期においてTNBSによりハプテン化された菌体タンパクや自己粘膜タンパクに対する免疫応答により炎症が持続する慢性炎症像を示すモデルと考えられている。第3章では腸管バリア機能の観点から急性炎症に対する抑制効果の評価を行い, 第4章では慢性炎症に対する治癒促進効果の評価を行った。また第5章ではより臨床を反映する大腸炎モデルとしてTNBS誘発再発大腸炎モデルを作成し, 本モデルの免疫学的特徴付けを行った。

第1章

イヌリン型フルクタン¹⁾の重合度が盲腸内IgA量に及ぼす影響

第1節 緒論

腸管は消化・吸収の場であると同時に腸内細菌をはじめとする種々の異物に対する生体防御を司る免疫器官でもある。この腸管免疫系は病原性細菌やその他の異物に対しては免疫応答，食事タンパク質や常在腸内細菌に対しては免疫寛容を誘導している。さらに免疫グロブリンの一種である IgA を分泌し，細菌由来毒素，ウイルスやアレルギーの中和や細菌の粘膜上皮への付着を阻止することで腸管を保護している。

IgA は粘膜固有層中に存在する IgA plasma cell により二量体として合成され，腸上皮細胞基底部に存在する多量体免疫グロブリン受容体 (polymeric immunoglobulin receptor, pIgR) と結合し，トランスサイトーシスにより管腔側へ輸送される²⁵⁾。

先に述べたようにフルクタンは小腸で消化吸収されず，大腸において，腸内細菌の発酵基質として利用され，SCFA，乳酸やコハク酸等の有機酸へと変換されるほか，*lactobacilli* や *bifidobacteria* 等の乳酸産生菌の増殖を刺激するプレバイオティクスとして知られている^{9,10)}。これら乳酸産生菌は *in vitro* や *in vivo* (経口投与試験) での結果から腸管免疫系を修飾し IgA 分泌を誘導することが小腸組織で報告されている^{13,14)}。しかし，実際にフルクタンを摂取させたときの大腸内の乳酸産生菌数の変化と IgA 分泌および腸管免疫修飾との関連性を明確に示した報告はない。また大腸内の IgA 量は小腸からの分泌量のほかに小腸や胆汁由来の流入量や，腸内細菌による分解量のバランスによって決まるが，フルクタンの摂取がこれらの流入量や分解量に及ぼす影響については十分に検討されていない。

本試験では，イヌリン型フルクタンの DP が盲腸内 IgA 量に及ぼす影響について盲腸内発酵パターン，腸内細菌叢(特に乳酸産生菌)，盲腸粘膜固有層 IgA plasma cell 比，IgA 分解速度から解析するとともに盲腸粘膜固有層から CD4⁺T 細胞を分離し CD3/CD28 共刺激下で培養を行いそのサイトカインプロファイルについても解析した。

第2節 実験方法

2.1 実験試料

実験に用いたフルクタンは平均DPがDP4, DP8, DP16 およびDP23のもので, DP4 (44% 1-kestose, 46% nystose および 10% 1-f- β -fructofuranosyl nystose) は明治製菓(株) (メイオリゴP, 東京) から購入した²⁶⁾。DP23はDPの範囲がDP10-60の混合物であるラフテリン®HP (Tienen, Belgium) を用いた²⁷⁾。DP8 (DP3-13) およびDP16 (DP5-30) は Bacillus sp. 217C-11 由来の新規 β -フルクトシダーゼを用いた酵素合成により調製されたものを²⁷⁾, フジ日本精糖(株) (静岡) から供与された。フルクタンの平均DPは Tosoh SK-Gel G3000PWXL (300 \times 7.8mm) ゲル浸透クロマトグラフィー用カラムを装着した HPLC により分析し²⁷⁾, フルクタンの DP 分布は高性能陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC, DX-500, DIONEX, 東京) により分析した²⁷⁾ (Figure 1)。

2.2 動物実験

7 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラット (日本エスエルシー (株), 浜松) を用い, 室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 相対湿度 45~55%, 12 時間の明暗周期 (7:00 に点灯) の条件下, ステンレス製ケージ内で個別飼育した。ラットは搬入後, 飼育室に慣れさせるために標準飼料で 3 日間予備飼育を行った。標準飼料は, AIN-76 組成を基本とし, 65.25% コーンスターチ, 25%カゼイン, 5%コーンオイル, 3.5%ミネラル混合物, 1%ビタミン混合物, 0.25%酒石酸コリンで構成されたものを用いた¹⁸⁾。予備飼育後, 体重を基準に群分けを行い, 試験飼料のいずれかを水道水とともに自由摂取させた。飼育期間中, 毎朝体重および飼料摂取量を記録した。なお, すべての動物実験は, 静岡大学動物実験管理委員会において定められた「動物実験に関する指針」に則って実施した。

実験1 40匹のラット (体重 232-264 g) を 5 群 (1 群 8 匹) に分け, 対照飼料 (標準試料と同一) または対照飼料中のスターチとの置換でフルクタンを夫々6%添加したフルクタン飼料を与え 15 日間飼育した。飼育開始 12-14 日目にかけて回収した糞便は, 10 倍量のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2, プロテアーゼ阻害剤 (Complete®, Roche, USA) を 1 錠/200 mL の割合で含む) で均一化し, 遠

心分離 (15, 000 × g, 4°C, 30 分) 後の上清を IgA の測定まで -80°C で保存した。試験終了後、小腸および盲腸を摘出し、小腸内容物は小腸内を氷冷 PBS (pH7.2) 15 mL + 空気 20 mL でフラッシュすることで回収した。回収した内容物は PBS で 15 mL に定容した後、1.5 mL をサンプリングし、遠心分離を行い (10, 000 × g, 4°C, 10 分) 上清を IgA の測定まで -80°C で保存した。盲腸は全重量を測定後、切り開いて内容物をポリプロピレン製の容器に回収し、窒素ガス気流下で均一化した。ここから直ちに内容物 50-100 mg を 1.5 mL 容マイクロチューブに秤り取り、1 mM ジチオスレイトール, 0.01% Tween20 を含む滅菌 PBS (染色用バッファー) 1 mL を加えボルテックスミキサーで 3 分間攪拌し、フローサイトメーターによる菌数測定のため解剖終了まで水中で保存した。また盲腸内容物 200 mg を 1.5 mL 容マイクロチューブに秤り取り、等量の蒸留水を加えペレットミキサーで均一化した後、コンパクト pH メータ (株堀場製作所, 東京) で pH を測定した。有機酸測定用には盲腸内容物 150 mg を 1.5 mL 容マイクロチューブに秤り取り、測定まで -80°C で保存した。IgA 測定用には盲腸内容物 100 mg を 1.5 mL 容マイクロチューブに秤り取り、これに 0.5% Tween20, 0.02 M アジ化ナトリウム を含む PBS (Tween-PBS, pH7.4) 1 mL を加え均一化した。これを遠心分離し (15, 000 × g, 4°C, 30 分), 回収した上清を IgA の測定まで -80°C で保存した。また IgA については同時に分解速度の測定も行った。内容物を 100 mg ずつ 3 本の 1.5 mL 容マイクロチューブに分注し、脱気蒸留水 500 μL を加え均一化した後 37°C で 0, 1, 3 時間インキュベートした。反応終了後 1% Tween20, 0.04 M アジ化ナトリウム を含む二倍濃縮 PBS 500 μL を加え、遠心分離し (15, 000 × g, 4°C, 30 分), その上清中の IgA を測定した。残りの内容物はリアルタイム PCR による *lactobacilli* と *bifidobacteria* 量の測定のために -80°C で保存した。盲腸組織は 2 分割し、一方は液体窒素により直ちに凍結後、OCT compound (サクラファインテックジャパン, 東京) で包埋し凍結ブロックを作成した。もう一方はフローサイトメトリーにより粘膜固有層単核球 (lamina propria mononuclear cells, LPMC) 中の IgA plasma cell 比を求めた。

実験 2 40 匹のラット (体重 240-253 g) を 5 群 (1 群 8 匹) に分け、実験 1 と同様の試験群で 15 日間飼育した。試験終了後盲腸を摘出し、盲腸組織から粘膜固有層中 CD4⁺T 細胞を分離し、CD3/CD28 共刺激による培養を行った。

2.3 盲腸内容物中細菌数の測定

総菌数の測定は解剖当日に行った。染色用バッファーで均一化した盲腸内容物は遠心分離し (700 × g, 4°C, 1 分間), その上清 900 μL を再度遠心分離することで (6,000 × g, 4°C, 3 分間), 細菌画分を沈殿として回収した。細菌画分は染色用バッファー 1 mL を加え懸濁させ, 遠心分離 (6,000 × g, 4°C, 3 分間) する洗浄作業を 3 回繰り返した後, 最終的に染色用バッファー 1 mL で再懸濁させた。この細菌懸濁液を染色用バッファーで 10, 000 倍希釈した後, 5 μM の SYTO BC (Invitrogen, USA) 1 μL (終濃度 5 nM), 1 mg/mL のヨウ化プロピジウム (同仁化学研究所, 熊本) 2 μL (終濃度 2 μg/mL) および内部標準として蛍光ビーズ (Flow Check, 1 × 10⁶/mL, Beckman Coulter, USA) 50 μL を加え (終濃度 5 × 10⁴/mL) 室温, 遮光下で 15 分間静置した。これをフローサイトメーター (EPICS-XL, Beckman Coulter) に供し, ディスクリミネーターは側方散乱光 (SSC) を 1.0 に設定した。SYTO BC の蛍光の検出には検出波長が 505-545 nm のフィルター (FL1) を, PI の蛍光の検出には検出波長が 605-635 nm のフィルター (FL3) をそれぞれ用いた。FL1/FL3 パネルにおいて SYTO BC 陽性の細胞集団を生細胞, PI 陽性の細胞集団を死菌, 二重陽性の細胞集団を損傷菌としてゲートで区切った (Figure 2)。生菌, 死菌, 損傷菌の和を総菌カウントとしてカウント数が 20,000 を超えた時点で解析を手動で終了させた。総菌数は Flow Check ビーズのカウント数との比から, 次の式で求めた。

$$\text{総菌数/mL} = (\text{総菌カウント}) / (\text{ビーズカウント}) \times 5 \times 10^4 \times (\text{希釈倍率 ; } 10, 000)$$

2.4 有機酸の測定

有機酸 (酢酸, プロピオン酸, *n*-酪酸, コハク酸および乳酸) は, 分離用カラム (SCR-102H, 株島津製作所) および電気伝導度検出器 (CDD-10A, 株島津製作所) を備えた高速液体クロマトグラフ (LC-10AD, 株島津製作所) を用いて内部標準法で測定した¹⁸⁾。すなわち 1.5 mL 容マイクロチューブに 150 mg 前後を正確に秤り取った盲腸内容物に対し, 全量が 0.5 g となるように蒸留水を加えた後, 内部標準として 10 mM 水酸化ナトリウム溶液で調製したクロトン酸溶液 (0.3 mg/L) を 0.5 mL 加え

た。これをポリトロンホモジナイザー (PT-2100, KINEMATICA, Switzerland) を用いて均一化 (4°C, 30 秒) した後, 15,000 × g, 4°C で 15 分間遠心分離し, 上清 0.5 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移した。これに等量のクロロホルムを加えボルテックスミキサーで 1 分間攪拌した後, 15,000 × g, 4°C で 15 分間遠心分離した。この上層 (水相) をフィルター濾過 (DISMIC, 13CP045AN, アドバンテック東洋株, 東京) した後, 分析に供した。

2.5 IgA の測定

Grewal らの方法²⁸⁾を一部改変した ELISA 法で測定した。すなわち, 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で 5 µg/mL に調製したマウス抗ラット IgA 抗体 (CLONE MARA-1 purified, コスモバイオ (株), 東京) を 96 ウェルマイクロプレート (Nunc イムノプレート, Maxisorb F96, Nalge nunc international, USA) に 100 µL/well 加え 4°C で一晩放置した。PBS (pH 7.4) でプレートを 6 回洗浄した後, 1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を含む PBS (BSA-PBS, pH 7.4) を用いて非特異的結合に対してブロッキング処理を行った。PBS でプレートを 6 回洗浄した後, 0.1% BSA-PBS で 1000 - 7.8125 ng/mL の範囲の希釈系列を調製した標品 (ラット骨髄 IgA, Zymed Laboratories, INC, USA) および PBS で希釈した検体 (小腸内容物および糞, 100 倍; 盲腸内容物, 500 倍) を各ウェルに 50 µL 入れ, 4°C で一晩放置した。PBS でプレートを 7 回洗浄した後, 1% BSA-PBS で 2 µg/mL となるように調製したホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 標識マウス抗ラット IgA 抗体 (CLONE MARA-2 PEROXIDASE, コスモバイオ (株)) 溶液を 50 µL/well 加え, 室温で 2 時間反応させた。PBS でプレートを 8 回洗浄した後, O-フェニレンジアミンタブレット (3mg/1 錠, SIGMA-ALDRICH, USA) を含む 15 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (1 錠/7.5 mL, pH 5.0) に 30% H₂O₂ 6 µL 加えた発色試薬を 100 µL/well 加え, 遮光下で 5-7 分間反応させた。これに反応停止液 (2N 硫酸) を 100 µL/well 加えた後, マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad, USA) で 490 nm の吸光度を測定した。測定は全て 2 連で行った。なお, サンプルは希釈前に遠心分離を行い (12,000×g, 4°C, 30 分間), その上清を希釈に用いた。

2.6 細菌 DNA の抽出ならびにリアルタイム PCR による *Lactobacilli* および

bifidobacteria 量の測定

一定量サンプリングした盲腸内容物 (30-50 mg) は、滅菌 PBS 1mL を加え懸濁させた後、遠心分離 (700 × g, 4°C, 1 分間) を行った。この上清 900 μL を再度遠心分離することで (10,000 × g, 4°C, 10 分間) , その沈殿を細菌画分として回収した。細菌 DNA の抽出には ISOPLANT (ニッポンジーン, 東京) を使用し, 添付の説明書に従い抽出した。細菌画分に Solution I (SDS 溶液) 300 μL を加えよく懸濁させた後, Solution II (塩化ベンジル溶液) 150 μL を加え 50°C, 15 分間反応させた。次いで Solution III (酢酸ナトリウム溶液) 150 μL を加え氷中で 15 分間放置後, 遠心分離 (12,000 × g, 4°C, 15 分間) を行った。水相 400 μL を回収し, 1 mL のエタノール (-30°C) を加え混合し, 直ちに遠心分離 (12,000 × g, 4°C, 10 分間) を行い, 細菌 DNA を沈殿として回収した。細菌 DNA は 70%エタノールでリンスした後, 乾燥させ付属のトリス-EDTA 緩衝液 (TE) 50 μL に溶解させた。抽出した DNA の純度は 260/280 nm の吸光度を測定することで算出し, 260/280 nm の吸光度比 1.6-1.9 を被検可能な許容範囲とした。

Lactobacilli および *Bifidobacteria* の定量には 16S rDNA を標的としたリアルタイム PCR 法を用いた。各菌種特異的なプライマーは以下のものを用いた; *Lactobacilli*²⁹⁾, TGGAACAGRTGCTAATACCG (sense), GTCCATTGTGGAAGATTCCC (antisense); *Bifidobacteria*³⁰⁾, TCGCGTCYGGTGTGAAAG (sense), CCACATCCAGCRTCCAC (antisense)

リアルタイム PCR には LightCycler (ST300, ロシュ USA) を使用し, 一検体あたり SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) 10μL, 5 μM のプライマー溶液 (sense, antisense, 終濃度 0.2 μM) 各 0.8 μL, 滅菌 Milli-Q 水 6.4 μL を混合した master mix を作成し, 20 μL ガラスキャピラリーに 18 μL 加え, さらに細菌 DNA サンプル 2 μL を加え測定した。95°C, 10 秒間の初期熱変性後, PCR は熱変性 (95°C, 5 秒間) , アニーリング/伸長反応 [*Lactobacilli* (65°C, 10 秒間) ; *bifidobacteria* (64°C, 10 秒間)] を 1 サイク

ルとし、40 サイクル行った。PCR 終了後、反応産物は融解曲線分析により解析した。本試験では既知濃度の DNA を用いた標準曲線による絶対定量を行っており、標品として北海道大学 園山慶准教授から割譲された *Lactobacillus murinus* JCM 1717 および *Bifidobacterium longum* DCM 20219 由来の 16S rDNA を用いた。

2.7 盲腸粘膜固有層中 IgA plasma cell の免疫染色

凍結切片は凍結ブロックから 4 μm 厚で薄切し、アミノシラン (APS) コートスライドガラス (マツナミ, 東京) 上に貼り付け、37°C で 30 分間乾燥させた。その後、Cytofix/Cytoperm (BD bioscience) を切片上に滴下し、湿箱内で固定処理を行った (室温, 30 分間)。切片は 2.5% ヤギ血清を含む PBS (ブロッキングバッファー) でブロッキングした後 (室温, 30 分間), PBS で希釈したマウス抗ラット IgA 抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MARA-1, AbD Serotec, UK) 80 μL を滴下し反応させ (室温, 1 時間), 次いでブロッキングバッファーで希釈した Alexa fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen, USA) 80 μL を滴下し室温で 1 時間反応させた。その後切片はブロッキングバッファーで希釈したビオチン標識マウス抗ラット CD45R (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, HIS24, eBioscience, USA) 80 μL を滴下し反応させ (室温, 1 時間), 次いで Alexa Fluor 546 標識ストレプトアビジン (PBS で 200 倍希釈, Invitrogen) 80 μL を滴下し室温で 30 分間反応させた。また各反応の間には、0.05% Tween-20/PBS (wash buffer) 中に 2 分間 \times 3 回浸漬させる洗浄作業を挟んだ。最終的に切片は VECTASHIELD with DAPI (Vector laboratories, Peterborough, UK) で封入し、蛍光顕微鏡 (BX60, オリンパス, 東京) 下で IgA plasma cell の観察を行った (Figure 3-a)。

2.8 フローサイトメトリーによる盲腸粘膜固有層 IgA plasma cell 比の解析

5mm 角程度に細切した盲腸組織は、10 mM ジチオスレイトールを含むハンクス平衡塩溶液 (Hanks' balanced salt solution, HBSS, Ca, Mg 不含, フェノールレッド含有) 50 mL 中で 2×10 分間 (室温), 1 mM EDTA 含有 HBSS 50 mL 中で 3×30 分間 (37°C) 攪拌することで、粘液および上皮細胞を除去した。次いで RPMI-1640 中で組織に残存する EDTA を洗い流した後、1.5 mg/mL コラゲナーゼ (細胞分離用, 200

unit/mg, 和光純薬株, 大阪) および 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) を含む RPMI-1640 20 mL 中で 37°C, 30 分間 × 2 回攪拌し間質系組織を消化した。その後, 細胞濾過器 (池本理化, 東京) を用い上清を回収し, 遠心分離 (300 × g, 4°C, 5 分間) により沈殿を LPMC として回収した。LPMC は 2%FBS/PBS 10mL に懸濁させ, 遠心分離 (300 × g, 4°C, 5 分間) により残存するコラゲナーゼを洗い流した。この操作を 2 回繰り返した後, LPMC は 2%FBS/PBS 5 mL に再懸濁させ, トリパンプル一染色により viability を測定した (>93%)。LPMC (1×10⁶cells) に対し 2%FBS, 0.05%NaN₃ を含む PBS で希釈した FITC 標識抗ラット IgA 抗体 (5 μg/mL, MARA-1, AbD Serotec) および PE 標識抗ラット CD45R 抗体 (5 μg/mL, HIS24, BD bioscience) のカクテル 50 μL を加え氷冷, 遮光下で 1 時間反応させた。抗体染色した細胞はフローサイトメーター (EPICS-XL, Beckman Coulter) に供し, IgA⁺CD45R^{low or -}の細胞集団を IgA plasma cell と定義した³¹⁾ (Figure 3-b)。

2.9 CD4⁺T 細胞の分離と培養

CD4⁺T 細胞は採取量が少ないため, 各群 2 検体を一つにまとめて調製を行った。盲腸組織から上記と同様に LPMC を分離し, これを 40% Percoll (GE healthcare Ltd, Buckinghamshire, UK) 8 mL に懸濁させ, 70% Percoll 2 mL の上に重層し遠心分離した (760 × g, 20°C, 20 分間)。40%/70% Percoll 境界面の粘膜固有層リンパ球 (lamina propria lymphocyte, LPL) を回収し, 磁気細胞分離装置 (magnetic cell sorting, MACS) により CD4⁺T 細胞を精製した³²⁾。LPL 1×10⁷ cells に対し, 0.5% BSA, 2% EDTA を含む PBS (MACS buffer, フィルター滅菌済み) で希釈したビオチン標識抗体カクテル (抗ラット顆粒球 (5 μg/mL, HIS48, eBioscience, USA), 抗ラット NKR/P1A (5 μg/mL, 10/78, BD biosciences), 抗ラット CD45R (5 μg/mL, HIS24, eBioscience), 抗ラット RT1B (10 μg/mL, OX-6, BD biosciences) および抗ラット CD8α (10 μg/mL, OX-8, BD biosciences) 100 μL を加え 4°C で 30 分間反応させた。その後 MACS buffer 5 mL を加え遠心分離 (300 × g, 4°C, 5 分間) し, 上清を捨て余剰な抗体を洗い流し, 次いで細胞は MACS buffer で希釈した磁気ビーズ標識抗ビオチン抗体 (4 倍希釈, Milteny Biotec, German) 100 μL を加え 4°C で 15 分間反応させた。その後 MACS buffer

5 mL を加え遠心分離 (300×g, 4°C, 5 分間) し, 細胞は MACS buffer 1 mL に再懸濁させ MACS カラム (LS カラム, Milteny Biotec) に通した。MACS カラムは MACS buffer 3 mL を流し平衡化させた後, 細胞懸濁液を流し, 次いで MACS buffer を 3 mL × 3 回を流し, 抗体標識された細胞 (B 細胞, 抗原提示細胞, マクロファージ, 顆粒球および NK 細胞) はカラムに保持させて, CD4⁺T 細胞を分離した。分離した CD4⁺T 細胞は遠心分離後 (300×g, 4°C, 5 分間), complete medium (10% FBS, 50 μM 2-メルカプトエタノール, 50 unit/ml penicillin および 50 μg/ml streptomycin を含む RPMI-1640) 1 mL に再懸濁した。このうちの一部 (1×10⁵ cells) は 2% FBS, 0.05% NaN₃ を含む PBS (pH 7.2) で希釈した FITC 標識マウス抗ラット CD3 抗体 (2 μg/mL, G4.18, BD bioscience), PE 標識マウス抗ラット CD4 抗体 (5 μg/mL, OX-35, BD bioscience) のカクテル 50 μL を加え氷冷, 遮光下で 1 時間反応させた後, フローサイトメーターによって純度の測定に用いた (>70%, Figure 4)。残りの細胞は, 滅菌 PBS で希釈した抗ラット CD3 抗体 (10 μg/mL, G4.18, BD bioscience) 50 μL/well を加え 4°C で一晚コーティングした後, 滅菌 PBS でウェルを 3 回洗浄した 96 ウェルプレート (Costar®3595, Corning, USA) に 2×10⁵ cells/100 μL の割合で加え, 次いで complete medium で希釈した抗ラット CD28 抗体 (1 μg/mL, JJ219, BD bioscience) を 100 μL/well を加え 5%CO₂, 37°C の条件下で 72 時間培養を行った。培養終了後上清を回収し, サイトカインの測定まで -30°C で保存した。

2.10 培養上清中サイトカイン濃度の測定

サイトカイン (IL-4, 6, 10 および IFN-γ) 濃度は BD OptEIA ELISA set (BD Biosciences, CA, USA) を用い, 添付の説明書に従い測定した。

2.11 統計処理

結果は平均値と標準誤差 (等分散) または中央値と範囲 (不等分散) で示した。各データは Bartlett 検定により分散の均一性を確認した後, 群間の差の検定を一元配置分散分析 (ANOVA) 後, Tukey-Kramer test で行った。不等分散を示すデータについては対数変換後, 再度 Bartlett 検定を行い, 等分散の場合は上記に示した解析を行い,

不等分散の場合は Kruskal-Wallis 検定を行い、群間に有意差が認められた場合は対照群との間で Kolmogorov-Smirnov two sample test を行った。いずれの統計結果も、危険率が 5%未満のとき、有意とみなした。

第3節 結果

実験 1

試験期間中の飼料摂取量は、対照群に比べ全フルクタン群で有意に低下し、この傾向は体重増加量にも反映されたが群間に差は認められなかった。盲腸組織重量は対照群に比べ全フルクタン群で有意に増加し、内容物量は対照群に比べ DP4, DP8 および DP23 で有意に増加し、DP16 群で増加傾向を示した ($P=0.08$)。また、盲腸内 pH は対照群に比べ全フルクタン群で有意に低下した (Table 1)。盲腸内 SCFA 濃度 (酢酸, プロピオン酸, *n*-酪酸の総和) は DP8, DP16 および DP23 群で対照群に比べ 30-40% の増加が認められたが群間で有意差は認められなかった。*n*-酪酸濃度は対照群に比べ DP8, DP16 および DP23 群で有意に増加した。乳酸およびコハク酸濃度は低 DP 側で高値を示し、対照群に比べ乳酸濃度は DP4, DP8 および DP16 群で、コハク酸濃度は DP4 群で有意に増加した (Table 1)。また盲腸内 SCFA 量は濃度と同様に中-高 DP 側で高値を示し、対照群に比べ DP8 群で有意に増加した。酢酸量は DP23 群、プロピオン酸量は DP4 および DP8 群、*n*-酪酸量は全フルクタン群で対照群に比べ有意に増加し、*n*-酪酸量は DP8 で最高値を示した。乳酸量は濃度と同様の傾向を示し全フルクタン群で有意に増加し、コハク酸量は対照群に比べ DP4, DP8, DP23 群で有意な増加を示した (Table 1)。

小腸内 IgA 量は群間で差が認められなかった。盲腸内 IgA は濃度、量ともに対照群に比べ DP4, DP8, DP16 群で有意な増加が認められ、DP4 群で最高値を示した。糞中 IgA 濃度はフルクタン群間内では盲腸内 IgA 濃度の挙動とよく似ているが、対照群に比べ DP16 および DP23 群で有意な低値を示した。糞中 IgA 量では対照群に比べ DP23 群で有意な低下を示した (Figure 5)。

16S rDNA を標的としたリアルタイム PCR によって分析した盲腸内容物 1g あたりの *lactobacilli* 数は対照群に比べ全フルクタン群で有意に増加し、特に低 DP 側の DP4,

DP8 群で顕著であった。一方, *bifidobacteria* 数は対照群に比べ DP8, DP16, DP23 群で有意に増加した (Figure 6)。また盲腸内容物 1g あたりの細菌数は対照群に比べ DP4 群で有意に低下しており, このときすべてのフルクタン摂取群で生菌率の有意な低下と死菌率の有意な上昇が認められた (Table 2)。

盲腸 LPMC に対する IgA plasma 細胞比は対照群に比べ DP4, DP8, DP16 群で有意な高値を示し, DP8 群で最高値を示した (Table 3)。

盲腸内 IgA の分解はフルクタン摂取により抑制され, 盲腸内容物中を 37°C で培養開始したときの各群の IgA 濃度を 100 としたとき, 培養 3 時間後の相対変化率は対照群で 74% の低下であったのに対し, DP4 群, 49%; DP8 群, 28%; DP16 群, 2%; DP23 群, 15% の低下であった (Figure 7)。

実験 2

CD4⁺T 細胞の培養の結果, IFN- γ では対照群に比べ DP4 群で有意な増加, DP16, DP23 群で有意な低下を示し, IL-10 では DP4 群でのみ有意な増加を示した。また DP4 群のこれらサイトカインに対する増加は対照群に比べ IFN- γ で 3 倍, IL-10 で 1.8 倍であった。IL-4 は対照群との間で有意差は認められないが, フルクタン群間内において DP4 群で DP23 群に対し有意な高値を示した。IL-6 は群間で差は認められなかった (Figure 8)。

第4節 考察

本試験では DP の異なるフルクタンの発酵パタンの差異をより明確にするため, それぞれ許容量上限の 6% を飼料に添加した。その結果, 盲腸内の発酵は発酵速度が速いと予測される低 DP 側では乳酸発酵を呈し, 発酵速度が緩やかと予測される高 DP 側では SCFA 量の増加が認められた。このときの *lactobacilli* 数は乳酸濃度の変化とよく一致しており, 低 DP 側で顕著に増加していた。従来, 腸内細菌は基質として単糖を菌体内に取り込むと考えられていたが, 最近, *lactobacilli* は DP2 または DP3 までのフルクタンを直接菌体内に取り込み代謝すると報告されている³³⁾。したがって, 発酵速度 (資化速度) の差異に加え, 低 DP 側では高 DP 側に比べて *lactobacilli* に対す

る選択的誘導能³⁴⁾が強く作用したと考えられる。一方、従来の報告から FOS (本試験で用いた DP4 と同一) にはヒト、マウスやラットにおいて *bifidobacteria* を増加させることが知られている³⁵⁻³⁷⁾。本試験において、*bifidobacteria* 数は DP4 では対照群に比べ僅かに増加しているものの、有意差は認められず、高 DP 側でのみ有意に増加していた。本試験において盲腸内 *bifidobacteria* 数は *lactobacilli* 数に比べ少ないのに対し (対照群で 1/30 以下)、ヒトでは *lactobacilli* より *bifidobacteria* が優勢とされている。また Nagura ら³⁸⁾は同じ系統のマウスであっても繁殖業者のコロニーが異なれば、腸内細菌叢も異なり、難消化性糖質 (ラフィノース) を摂取させたときの発酵が異なることを報告している。したがって、本試験で使用したラット盲腸内に定着している *bifidobacteria* の絶対数が少ないため、DP4 (FOS) 摂取による *bifidobacteria* 誘導能が弱かったと考えられた。フルクタン摂取により盲腸内容物中 1g あたりの *lactobacilli* および *bifidobacteria* 数は増加していたにもかかわらず、総細菌数の増加は認められなかった。またこのとき、フルクタン摂取により生菌率は対照群に比べ有意に低下し、死菌率が有意に増加していた。フルクタン摂取は盲腸内 pH を有意に低下させる。多くの細菌 (特に至適 pH が中性付近の酵素を持つタンパク分解細菌など) は低 pH 条件下で生育できないのに対し³⁹⁾、乳酸産生菌は低 pH 条件下でも耐性を示すため^{20,21)}、フルクタン摂取により乳酸産生菌は増加するが、総細菌数に占める生菌率は低下したものと考えられた。

次いでインスリン型フルクタンの DP 変化が盲腸内 IgA 分泌量に及ぼす影響について解析した。その結果、盲腸内 IgA は濃度・量ともに低 DP 側で顕著な増加を示した。このとき盲腸内 IgA 濃度は乳酸濃度および *lactobacilli* 数と強い有意な正の相関 (vs. *lactobacilli*, $r=0.97$, $P<0.01$; vs. 乳酸, $r=0.93$, $P=0.03$) を示したが、*bifidobacteria* 数やフローサイトメーターにより測定した総細菌数とは有意な相関を示さなかった (vs. *bifidobacteria*, $r=-0.14$, $P=0.81$; vs. 細菌数, $r=-0.28$, $P=0.65$)。従来、乳酸産生菌投与による IgA 分泌促進作用は小腸での知見であるのに対し^{13,14)}、FOS や synergy (オリゴフルクトースとインスリンの混合物) 等のフルクタン摂取による IgA 分泌促進作用は大腸 (糞および盲腸) での知見であり^{11,12)}、これまで大腸における IgA 分泌メカニズムと乳酸産生菌との関連性は不明確であった。本試験結果から、フルクタン摂取に

よる盲腸内 IgA 分泌促進作用は小腸での知見と同様に乳酸産生菌、特に *lactobacilli* 特異的に誘導された結果であると考えられた。また IgA にはパイエル板を介し T 細胞依存的に産生された抗原特異性と親和性の高い IgA と、粘膜固有層中の樹状細胞を介し T 細胞非依存的に産生された抗原非特異的で親和性の低い IgA が存在するが⁴⁰⁾、上述のようにフルクタン摂取時の盲腸内 IgA 分泌は *lactobacilli* 数に依存していることから、この IgA は T 細胞依存的に誘導されたものと推定された。また、本試験では小腸内 IgA 量（小腸、胆汁由来）に変化が認められないことから、この盲腸内 IgA 濃度／量の増加は盲腸での分泌促進あるいは分解抑制が関与すると考えられた。

フルクタン摂取により盲腸粘膜固有層中の IgA plasma cell 比は対照群に比べ DP4, DP8, DP16 群で増加するが、このとき最大値を示したのは盲腸内 IgA 量の結果と異なり、DP8 群であった。粘膜固有層で産生された IgA は pIgR に結合し管腔側に輸送されるが、IFN- γ は pIgR の産生を up-regulate することが報告されている⁴¹⁾。本試験結果から DP4 の摂取は CD4⁺T 細胞の IL-10 および IFN- γ 分泌を高める。したがって、DP4 の摂取は IgA plasma 細胞の増加に加え pIgR の産生を促進した結果、最も効果的に IgA 分泌を高めた可能性がある。

また、一般に IgA はプロテアーゼによる分解を受けにくいとされているが⁴²⁾、実際には *bacteroides*, *streptococcus*, *clostridium* が分泌する IgA protease により分解されることが報告されている⁴³⁻⁴⁵⁾。本試験において盲腸内 IgA の分解速度はフルクタン摂取により抑制されたが、その傾向は高 DP 側でより顕著であった。この酵素の至適 pH は中性付近であり⁴⁶⁾、フルクタン摂取では盲腸内 pH の低下が認められることから、IgA 分解抑制は基本的には pH 低下によると推定される。しかしながら、上述の盲腸内 IgA 濃度と乳酸および乳酸菌数との強い相関関係を見る限り、盲腸内 IgA 量に及ぼすフルクタンによる分解抑制の寄与は比較的小さいと考えられる。

以上をまとめると、DP の異なるイヌリン型フルクタン摂取時の盲腸内 IgA 分泌量は DP4, DP8 群で顕著に増加し、この増加には *lactobacilli* を介した腸管免疫の修飾が推定された。また DP4 群では盲腸粘膜固有層 IgA plasma cell の増加に加え CD4⁺T 細胞での IL-10 および IFN- γ の分泌を促進させることが確認された。

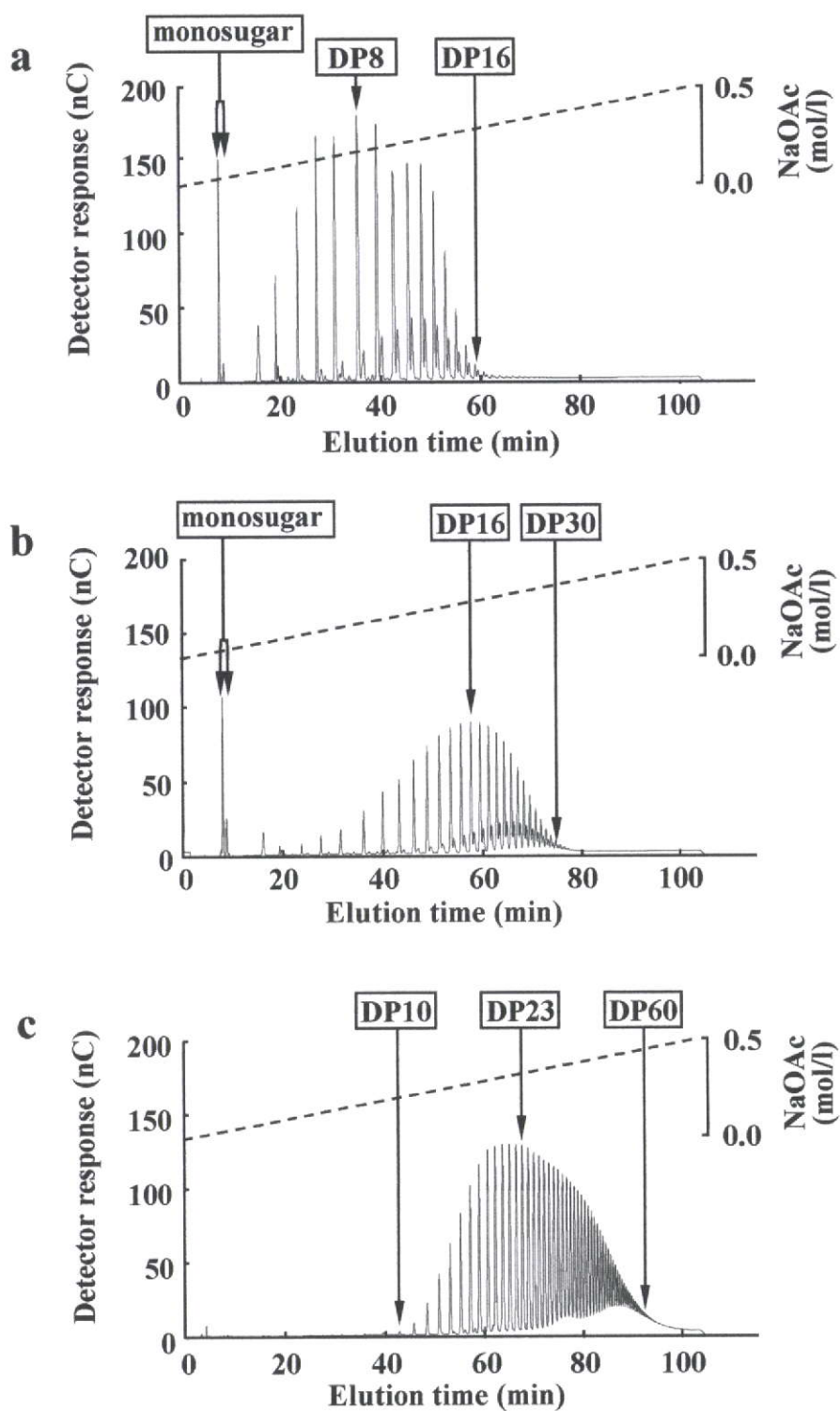


Figure 1 HPAEC analysis of inulin-type fructan on a CarboPack PA-1 column
 Effluent, 150 mmol/L NaOH; flow rate, 1 mL/min; injection, 25 μ l; detector, pulsed amperometric detector.
 (a), DP8; (b), DP16; (c), DP23.

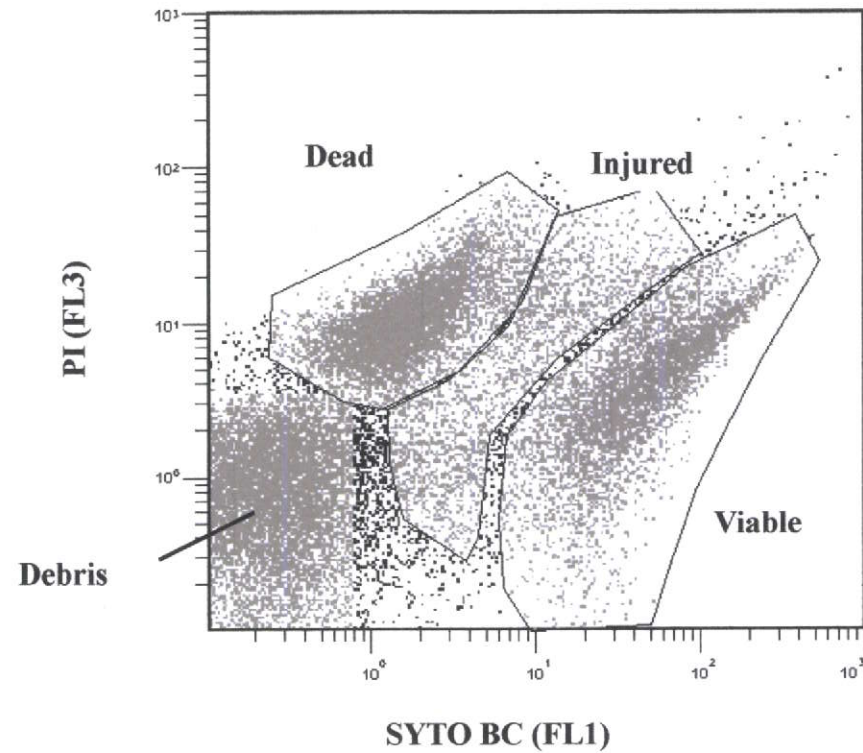


Figure 2 Flow cytometric analysis of a cecal bacterial fraction stained with SYTO BC and PI

The two-color dot plot discriminated between SYTO BC-stained viable cells, double-stained injured cells and PI-stained dead cells.

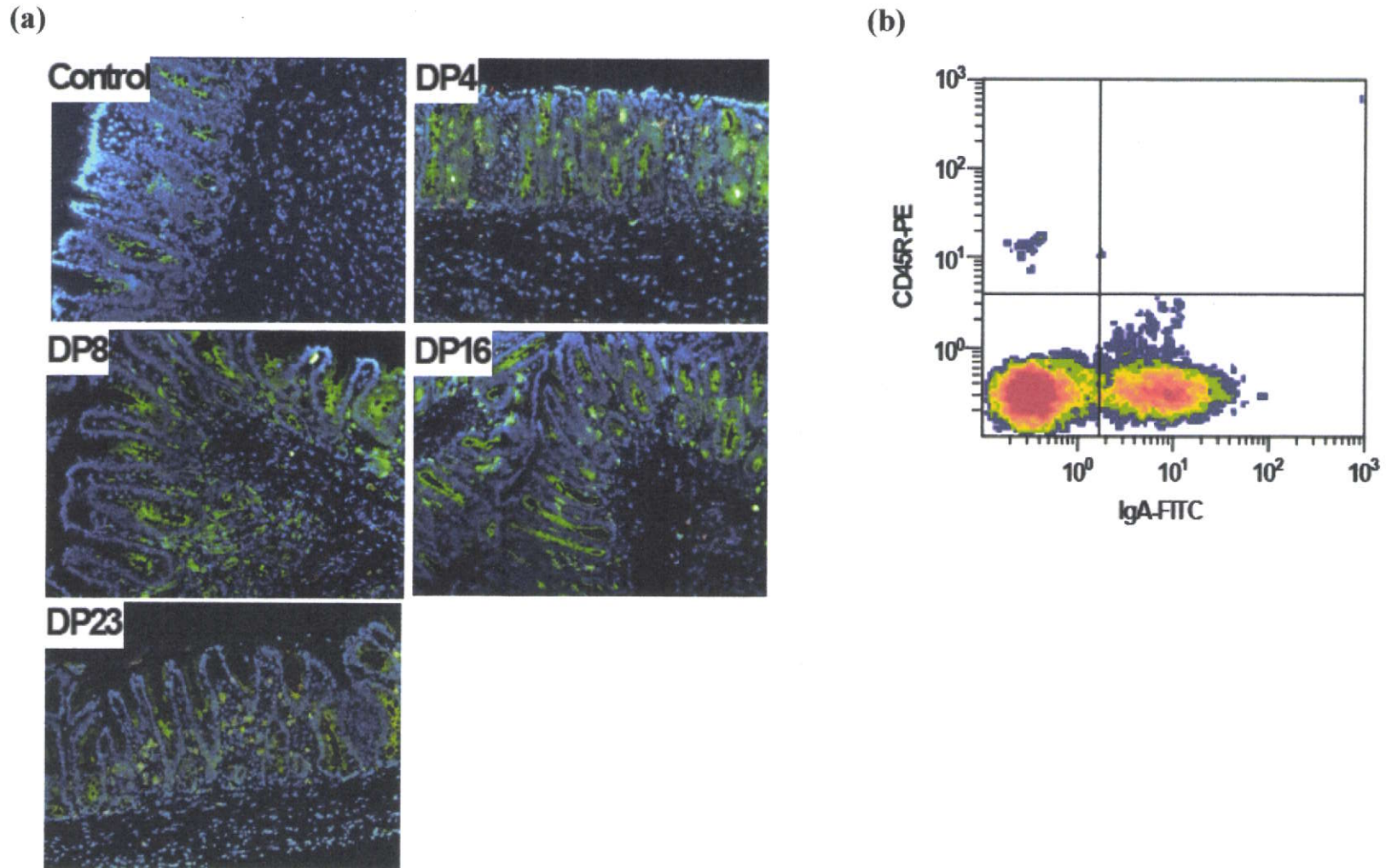


Figure 3 Immunofluorescence staining image (a) and flow cytometric dot-plot image (b) of IgA plasma cells in the cecum

(a) Three-color immunofluorescence staining of IgA (green), CD45R (B cell, red) and nuclear (blue) in the cecum. IgA plasma cells were the cells produced green fluorescence around nuclear in the lamina propria. Magnification = 200 \times .

(b) Cells were stained with FITC-labeled anti-rat IgA and with PE labeled anti-rat CD45R. IgA plasma cells were defined as IgA⁺ and CD45R^{low} cells (lower-right region).

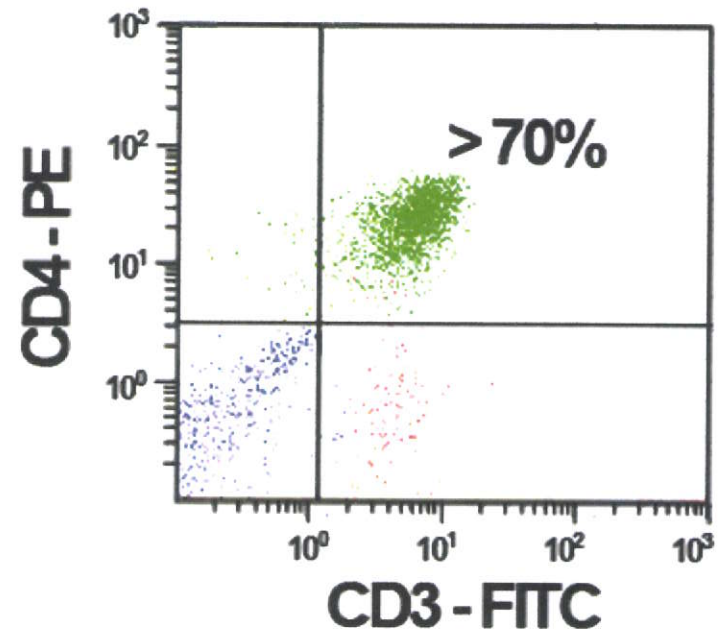


Figure 4 Purity analysis of cecal lamina propria CD4⁺ T cells (CD3⁺ CD4⁺ cells) using the flow cytometer

Table 1 Food intake, body weight gain, and cecal variables in rats fed the respective diets for 15 days

	Control	DP4	DP8	DP16	DP23
Food intake, g/15d	329±13 ^b	298±9 ^{ab}	288±8 ^a	288±7 ^a	288±8 ^a
Body weight gain, g/15d	102±9	95±5	89±5	86±5	84±7
Cecum					
Tissue, g	0.7±0.0 ^a	1.4±0.1 ^b	1.5±0.1 ^b	1.5±0.1 ^b	1.5±0.1 ^b
Contents, g	2.2±0.2 ^a	5.6±0.7 ^c	4.5±0.2 ^{bc}	3.5±0.4 ^{ab}	3.9±0.4 ^{bc}
pH	7.2±0.1 ^b	5.6±0.1 ^a	5.7±0.1 ^a	5.9±0.2 ^a	5.7±0.1 ^a
Organic acids					
Concentration, µmol/g contents					
Acetate	61±5 ^{ab}	37±10 ^a	62±11 ^{ab}	71±9 ^{ab}	80±11 ^b
Propionate	18±3	25±7	26±5	24±6	23±8
<i>n</i> -Butyrate ¹	7(4-11)	6(3-58)	21(15-46)*	17(15-37)*	15(5-33)*
SCFA ²	86±8	77±20	113±19	115±16	120±21
Succinate	6±2 ^a	23±3 ^b	14±3 ^{ab}	12±3 ^{ab}	13±3 ^{ab}
Lactate ¹	0(0-21)	35(9-82)*	36(3-83)*	18(0-45)*	10(3-49)
Total amounts, µmol/cecum					
Acetate	138±19 ^a	174±31 ^{ab}	272±48 ^{ab}	234±36 ^{ab}	298±36 ^b
Propionate	42±9 ^a	132±35 ^b	114±24 ^b	80±23 ^{ab}	79±24 ^{ab}
<i>n</i> -Butyrate	17±3 ^a	64±20 ^b	109±16 ^b	68±10 ^b	62±11 ^b
SCFA ²	196±30 ^a	369±76 ^{ab}	496±85 ^b	384±63 ^{ab}	438±66 ^{ab}
Succinate	14±6 ^a	130±22 ^c	67±16 ^{bc}	42±13 ^{ab}	50±12 ^{bc}
Lactate ¹	1(0-60)	168(52-727)*	164(11-389)*	37(1-151)*	52(12-193)*

Data are expressed as mean ± SEM or median (ranges) (n=8).

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by Tukey-Kramer test.

¹Data are examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample test. **P*<0.05 vs. control.

²Sum of acetate, propionate and *n*-butyrate.

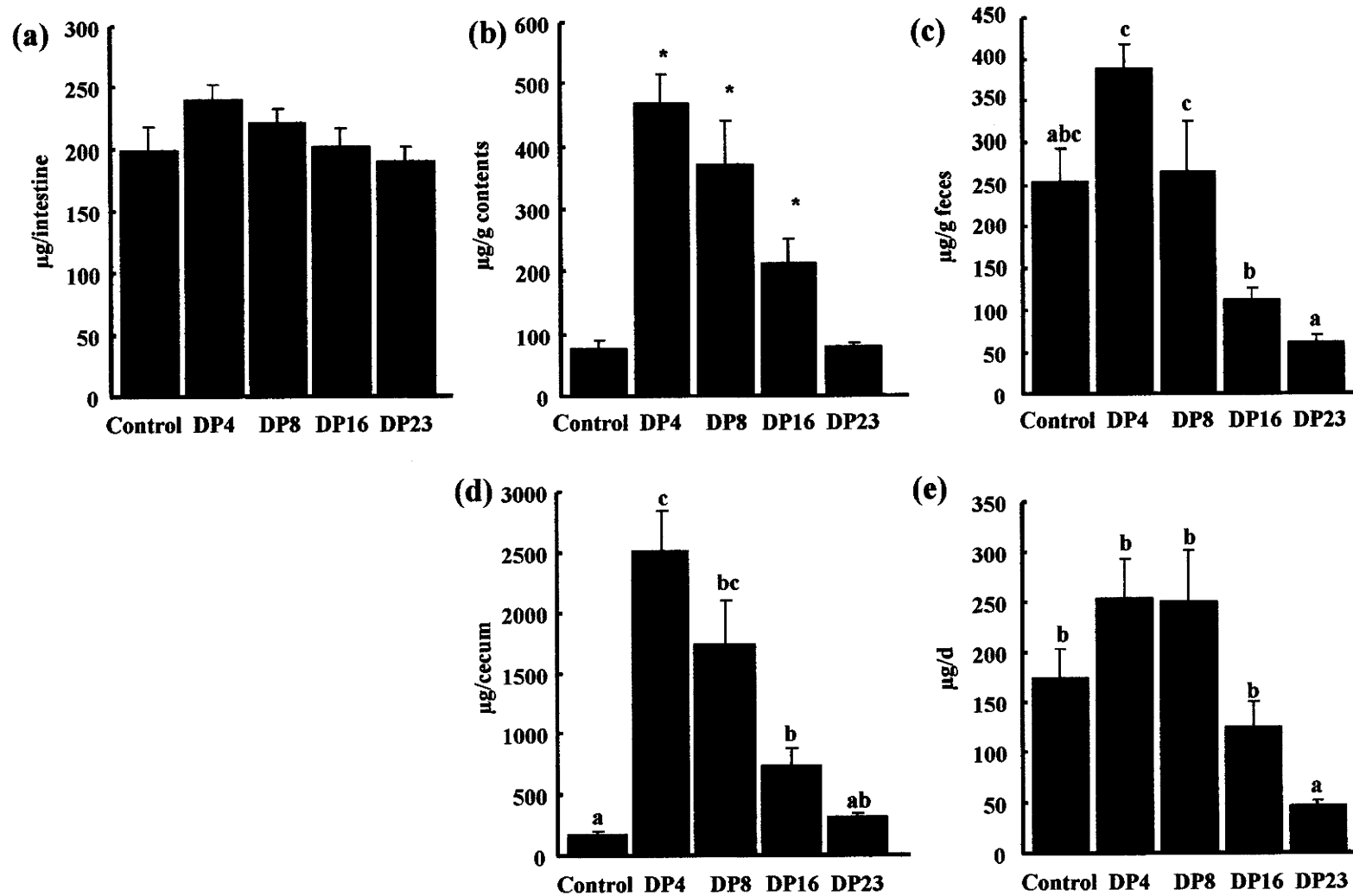


Figure 5 Secretory IgA in the small intestine (total amounts, a), the cecum (concentrations, b; total amounts, d) and feces (concentrations, c; total amounts, e) in rats fed the respective diets for 15d

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

Cecal IgA concentrations were examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample test. * $P < 0.05$ vs. control.

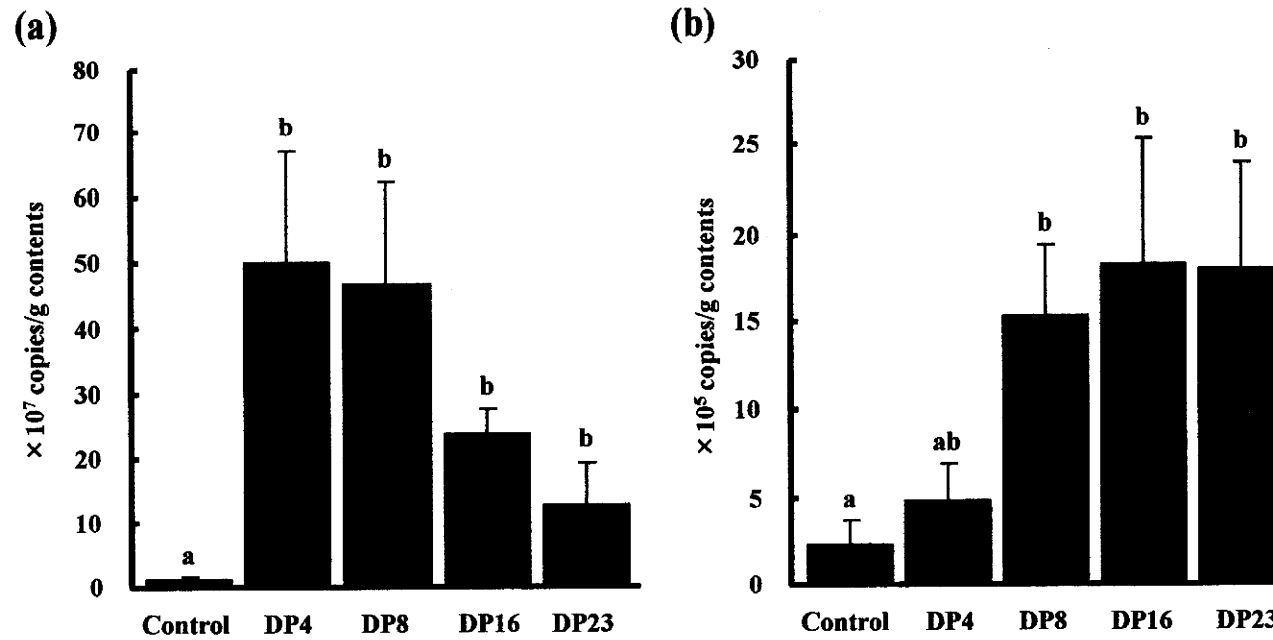


Figure 6 Cecal concentrations of *lactobacilli* (a) and *bifidobacteria* (b) in rats fed the respective diets for 15d

Bacterial numbers in the cecal contents were quantified by real-time PCR with genus-specific primers. Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

Table 2 Total cell number and viability of cecal bacteria analyzed by using a FCM and membrane integrity probes (PI and SYTO BC)

	Control	DP4	DP8	DP16	DP23
Total cell number ¹ ($\times 10^{10}$ counts/g wet contents)	5.6 (5.0-7.7)	2.6 (2.1-4.4)*	7.8 (2.4-22.0)	6.1 (5.0-8.0)	5.2 (3.5-7.4)
Viable cells ² , %	65.7 \pm 3.3 ^b	43.2 \pm 2.1 ^a	41.9 \pm 5.0 ^a	40.4 \pm 0.8 ^a	47.7 \pm 1.8 ^a
Injured cells ² , %	19.8 \pm 3.9	23.5 \pm 2.1	21.0 \pm 2.4	22.0 \pm 1.0	18.6 \pm 1.8
Dead cells ² , %	14.4 \pm 1.0 ^a	33.4 \pm 1.6 ^b	37.1 \pm 5.0 ^b	37.6 \pm 0.3 ^b	33.7 \pm 1.6 ^b

¹Total cell number was sum of viable, injured and dead cells. Data are expressed as median (ranges) (n=8), and examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample test. * $P < 0.05$ vs. control.

²Data are expressed as mean \pm SEM (n=8). Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by Tukey-Kramer test.

Table 3 Flow cytometric analysis of IgA plasma cell population in the cecal lamina propria

	Control	DP4	DP8	DP16	DP23
IgA plasma cells, %	28 ± 1 ^a	33 ± 1 ^b	36 ± 2 ^c	31 ± 2 ^b	25 ± 1 ^a

Data are expressed as mean ± SEM (n=8).

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by Tukey-Kramer test.

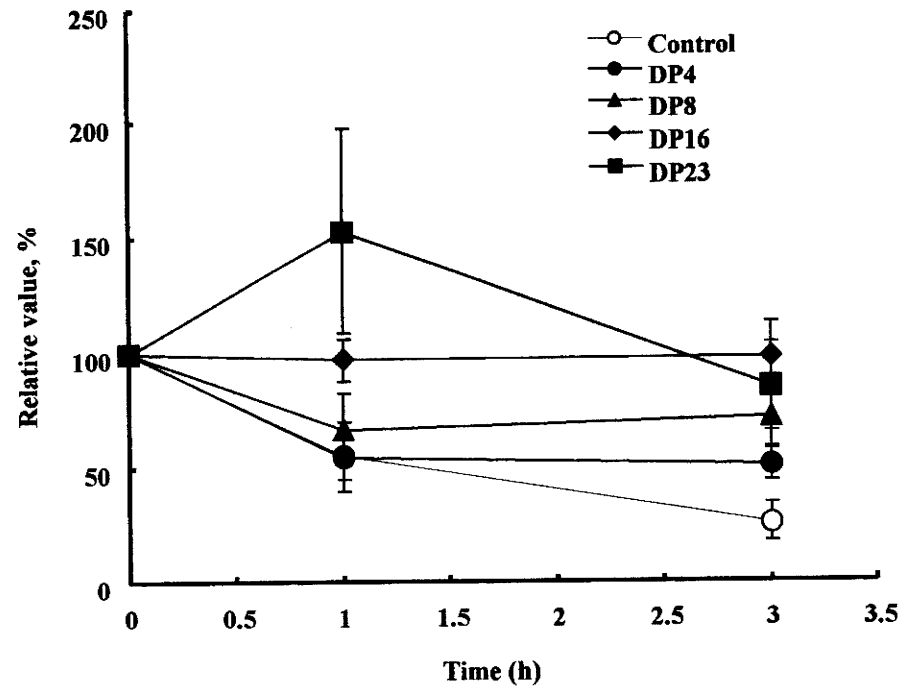


Figure 7 Degradation rate of cecal IgA in rats fed the respective diets for 15d

Value are expressed as relative value when the initial value as 100 (n=8).

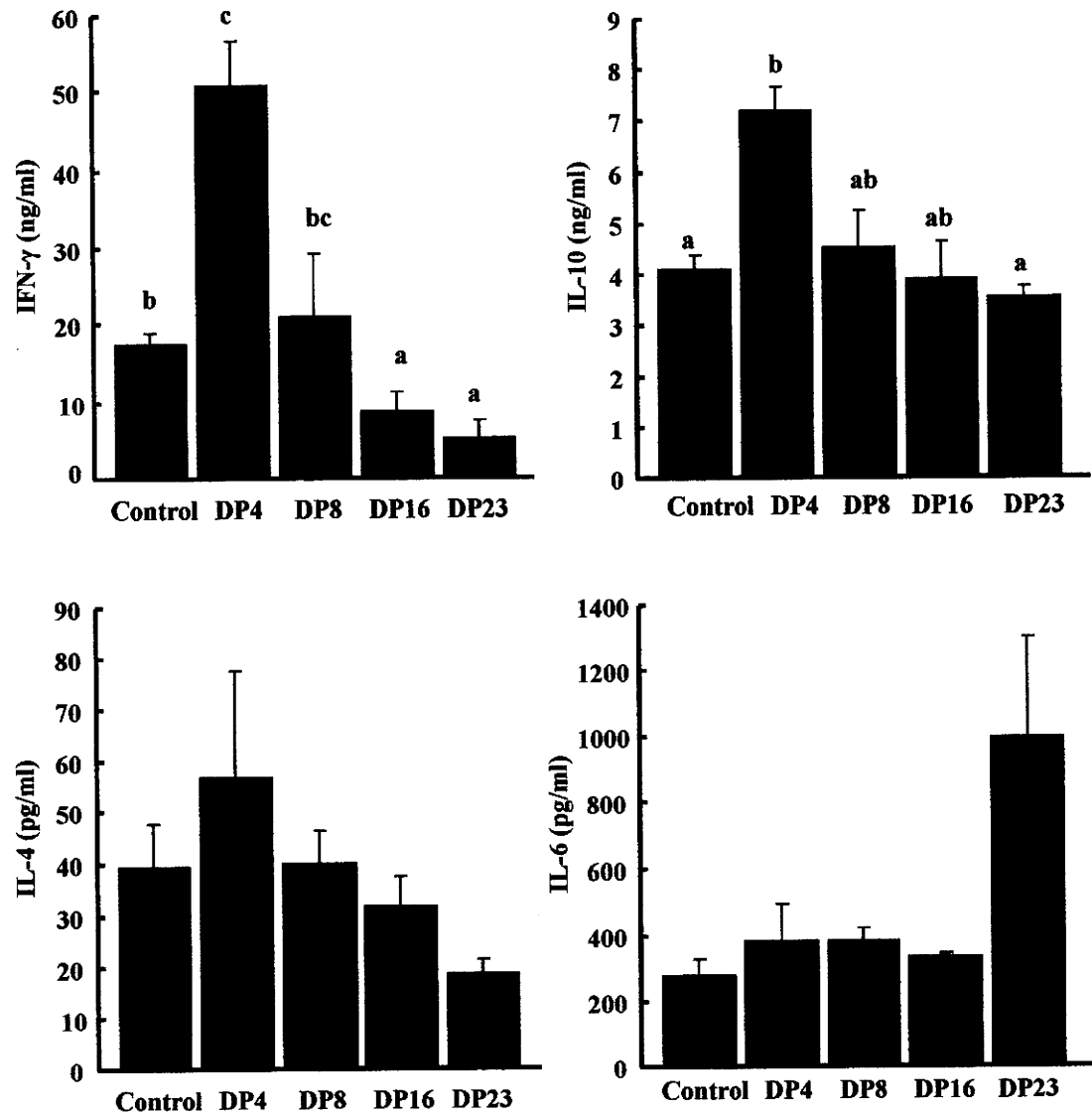


Figure 8 Cytokine production of cecal lamina propria CD4⁺ T cells stimulated with anti-rat CD3/CD28 in rats fed the respective diets for 15d

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

第2章

イヌリン型フルクタンの重合度が盲腸内ムチン量に及ぼす影響

第1節 緒論

IgAと同様に腸管バリアを構成する主要な要素であるムチンは、腸管上皮を覆う粘液の主成分として物理化学的バリアとしてだけでなく、IgAのリザーバーとしても機能している。ムチンは分子量300 kDa以上の高分子糖タンパク質であり、セリン、スレオニン、プロリンを主体としたアミノ酸の繰り返しドメインから構成されるコアタンパク質にGalNAc, GlcNAc, Gal, Fuc, シアル酸が10前後の糖鎖として結合したもので、いずれの糖鎖もコア部分にGalNAcをもち、セリン、スレオニンの水酸基とO-グリコシド結合をしている⁴⁷⁾。腸管においてムチンは主に杯細胞で合成・分泌されており、ムチンをコードしている遺伝子はヒトにおいて20種類報告されているが⁴⁸⁾、ヒト同様ラットにおいても小腸・大腸では分泌型ムチンである*Muc2*と膜結合型である*Muc3*が主であり、杯細胞(*Muc2*, *Muc3*)および吸収上皮細胞(*Muc3*)で発現している⁴⁹⁾。

イヌリン型フルクタンをはじめとする発酵性食物繊維やレジスタントスターチは大腸において腸内細菌による発酵を受けSCFA等の有機酸へと変換されるが、*in situ*でのラット結腸灌流実験の結果から、SCFA、特に*n*-酪酸には迷走神経の刺激を介したムチン分泌促進作用が報告されている⁶⁻⁸⁾。第1章の結果よりフルクタンDPの変化は発酵パターンに影響を及ぼす。DPの異なるフルクタンの摂取は、発酵パターンの変化を介してムチン分泌量に影響を及ぼすと考えられる。

このムチン分泌量の増加には、杯細胞数の増加と杯細胞あたりのムチン合成量の増加の二つの要素が関係する。また、大腸内ムチンは、分泌と同時に常に腸内細菌による分解にも曝されており、さらに胃、小腸由来のムチン流入量によっても左右される。したがって大腸内ムチン量は小腸からの流入量ならびに大腸での分泌量および分解量のバランスによって決まると考えられる。

ところで、ムチンはその遺伝子型以外にも組織化学的に酸性度の違いから、中性ムチンと酸性ムチンに大別される。これらはムチンを構成する糖鎖種の違いによるものであり、酸性ムチンはシアル酸を多く含むシアロムチンと硫酸エステル化された糖を多く含む強酸性の硫酸ムチンに分類され²²⁾、これらの糖鎖の相違は溶液中でのムチンの物性(粘性)に大きな違いをもたらす、硫酸ムチンの方がシアロムチンに比べ粘

性が高く、また腸内細菌のムチン分解酵素に対する抵抗性も強いと考えられている²³⁾。つまり硫酸ムチン量の増加はバリア機能の増強に寄与すると考えられる。先の研究ではイヌリンやオリゴフラクトースの摂取は大腸における硫酸ムチンの割合を増加させると報告されている^{50,51)}。しかしながら、これらの報告は組織染色像を元に推定されたものであり、実際の盲腸内ムチンあたりの硫酸基量等の定量的解析は行われていない。

本章では、DPの異なるフルクタンをラットに摂取させたときの盲腸内ムチン量に及ぼす影響について、分泌（SCFA, *Muc* 遺伝子発現量, 杯細胞数）と分解（糞ムシナーゼ活性）の両面から解析を行うとともに、フルクタン摂取がムチン糖鎖種に及ぼす影響（ SO_4^{2-} の定量, 硫酸転移酵素, シアル酸転移酵素の遺伝子発現, 組織染色）を解析することを目的とした。

第2節 実験方法

2.1 実験試料

第1章と同様のものを用いた。

2.2 実験動物および飼料組成

使用した飼料および飼育条件は第1章に従った。70匹のSD系雄ラット(体重226~258g)は体重を基準に1群14匹の5群に分け、対照飼料または各フルクタン飼料で15日間飼育した。途中10-12日目にかけて回収した糞はムチンの測定に、13および14日目に回収した新鮮便はムシナーゼ活性の測定に用いた。試験終了後、小腸および盲腸を摘出し、各内容物は第1章と同様に回収した。小腸内容物は凍結乾燥後、ムチン量の測定に用い、盲腸内容物の一部はpHおよび有機酸の測定用に小分けし、残りは凍結乾燥し、ムチン量の測定に用いた。盲腸組織は二分割し、一方は粘膜を回収しリアルタイムPCRによる *Muc2*, *Muc3*, sialyltransferase (*Siat4c*), sulfotransferase (*Gal3ST2*, *Gal3ST4*) mRNA 発現量の解析に用い、他方は組織染色のためパラフィンブロックの作成に用いた。組織は10%中性緩衝ホルマリンに24時間浸漬後、70% EtOHに一晩、80% EtOH, 90% EtOH, 95% EtOH, 100% EtOH×3に各2時間浸漬させ脱水処理を行い、次いでキシレンに30分間×3回浸漬させ透徹処理し、最後に60°Cのパラフィンに30分間×2回浸漬した後包埋し、パラフィンブロックを作成した。

2.3 有機酸の測定

第1章と同様に行った。

2.4 ムチン画分の調製

小腸内容物中ムチン画分の調製はLienらの方法に準じた⁵²⁾。すなわち、凍結乾燥した小腸内容物1gあたり20mLの0.15M塩化ナトリウム溶液(0.02Mアジ化ナトリウム含)を加えポリトロンホモジナイザーで均一化した溶液を遠心分離した(20,000×g, 4°C, 30分間)。その上清を0.15M塩化ナトリウム溶液で一定量(10-15mL)に定容し、これに2倍量の90%エタノール(EtOH)を加え(終濃度60%), -30°C

で一晩静置後、遠心分離 (2330×g, 4°C, 10 分間) により得られた EtOH 沈殿画分をムチン画分とした。盲腸内容物および糞中ムチン画分の調製については Bovee-Oudenhoven らの方法⁵³⁾を一部改変して行った⁵⁴⁾。盲腸内容物および糞の凍結乾燥物 200 mg に対し 30 倍量 (6 mL) の PBS (pH7.4) を加え 90°C で 10 分間加熱し細菌由来のグルコシダーゼを失活させ、続いて 37°C で 90 分間攪拌しムチンの可溶化を促進した。その後ポリトロンホモジナイザーで均一化し、遠心分離後 (20,000 × g, 4°C, 30 分間) 得られた上清のうち半量 (3 mL) を回収し、これに 3 倍量の 100% EtOH を加え (終濃度 75%) 小腸内容物と同様に操作し、ムチン画分を得た。本画分中には高 DP のフルクタンが混入しており、以後の測定に干渉することが予備試験の結果から明らかになったため、ムチン画分は 0.4 M 酢酸緩衝液 (pH4.8) 2.5 mL に再溶解させ、イヌリナーゼ (Fructozyme KIN 00040, 2000 U/g, NOVO) 50 μL を加え 60°C で 6 時間インキュベートすることでフルクタンを完全に分解した。これを再度エタノール沈殿することで、ムチン画分を回収した。各ムチン画分は凍結乾燥後、小腸内容物は 5 mL、盲腸内容物および糞便は 3 mL に蒸留水で定容した。

2.5 O-結合性糖鎖当量の測定

ムチン量の指標としての O-結合性糖鎖当量の測定は Crowther & Wetmore らの方法に準じた⁵⁵⁾。蒸留水で適宜希釈した試料 100 μL に対しアルカリ化 2-シアノアセトアミド (2-cyanoacetamide, 2-CNA) 溶液 (0.15 M NaOH と 0.4 M 2-CNA を 5:1 の割合で混合) 120 μL を加え 100°C で 30 分間加熱した後、0.6 M ホウ酸緩衝液 (pH8.0) 1 mL を加え、蛍光光度計 (F-2000, 日立製作所, 東京) で 383 nm の蛍光強度を測定した (励起光 336 nm)。測定に際しては、光度計にガラスセルをセット後、10 秒後の蛍光強度を測定した。また、標準曲線は N-アセチルガラクトサミン (0.156-10 μg/mL) を用いて作成した。

2.6 RNA 抽出およびリアルタイム PCR

各消化管粘膜 (50-100 mg) は 1 mL の RNAiso (タカラバイオ, 東京) 中でホモジネートし、これに 0.2 mL のクロロホルムを加え攪拌し、室温で 5 分間放置した。

遠心分離後 (12,000 × g, 4°C, 15 分間) の上清に 0.5 mL のイソプロパノールを加え室温で 10 分間放置後, 再び遠心分離 (12,000 × g, 4°C, 10 分間) を行い, RNA を沈殿として回収した。回収した RNA は 75%EtOH で洗浄後, ジエチルピロカーボネート (diethylpyrocarbonate, DEPC) 処理した Milli-Q 水 200 μL に溶解させた。RNA 濃度および純度は 260/280 nm の吸光度を測定することで算出した。RNA の逆転写反応には PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) を使用し, 37°C, 15 分間の条件下で 1 μg の RNA を逆転写し cDNA を得た。リアルタイム PCR には LightCycler (ST300, ロシュ) を使用し, ハウスキーピング遺伝子には hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT-1) を用いた。各遺伝子のプライマーと PCR 条件は table 4 に示した⁵⁶⁻⁵⁸⁾。20 μL ガラスキャピラリーに SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) 10 μL, 10 μM のプライマー溶液 (sense, antisense, 終濃度 0.4 μM) 各 0.8 μL, 滅菌 Milli-Q 水 6.4 μL および cDNA サンプル 2 μL を加え測定した。95°C, 1 分間の初期変性後, PCR は熱変性 (95°C, 5 秒間), アニーリング, 伸長反応を 1 サイクルとし, 40 サイクル行った。PCR 終了後, 反応産物は融解曲線分析により解析し, 発現量の解析には比較 C_T法を用いた⁵⁹⁾。

2.7 糞ムシナーゼ活性の測定

糞ムシナーゼ活性の測定は Shiau らの方法に準じた⁶⁰⁾。酵素溶液には新鮮便に 100 倍量の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) を加え均一化した懸濁液を用いた。基質にはブタ胃粘膜ムチンを用い, これを 0.5% 含むリン酸緩衝液 1.9 mL に酵素溶液 100 μL を加え 30°C で 20 分間反応させ, 反応後溶液中の遊離還元糖量を Somogyi-Nelson 法で測定した^{61,62)}。酵素溶液中の窒素量は Kjeldahl 法で求め⁶³⁾, 酵素比活性は酵素溶液中窒素 1 mg 当りの 1 分間における遊離還元糖量として示した。すなわち, ムシナーゼ活性はムチン糖鎖分解活性として表した。

2.8 過ヨウ素酸-シッフ (periodic acid-shiff, PAS) 染色, 高鉄ジアミン-アルシアンブルー (high iron diamine-alcian blue, HID-AB) 染色

パラフィンブロックを薄切し 4 μm 厚のパラフィン切片を作成後, キシレン, エ

タノール (100%, 90%×2, 80%×2, 70%) による脱パラフィン, 水和処理を行った。PAS 染色はスライドを 0.5%過ヨウ素酸溶液 (10 分間), シッフ試薬 (15 分間) (和光純薬, 大阪), 亜硫酸水 (3×3 分間) の順に浸漬させ, ヘマトキシリンで対比染色後脱水, 封入した。PAS 染色された細胞を総杯細胞として計測した。HID-AB 染色は高铁ジアミン溶液 (0.24% N, N-ジメチル-*m*-フェニレンジアミン, 0.04% N, N-ジメチル-*p*-フェニレンジアミン溶液 100 mL に 40% 塩化鉄 (III) 溶液 4.2 mL を加え混合) に 21 時間浸漬, 流水洗浄を行った後, 1%アルシアンブルーを含む 3%酢酸溶液 (pH2.5) に 1 時間に浸漬し, その後透徹, 封入処理を行った。HID-AB 染色により, 硫酸ムチンに富む杯細胞を HID 陽性細胞, シアロムチンに富む杯細胞を AB 陽性細胞として計測した。

2.9 盲腸ムチン画分中 SO₄ の定量

盲腸ムチンサンプルは 50 μ L を 1.5 mL エッペンドルフチューブにサンプリングし, 遠心濃縮処理を行い (40 分間) 完全に水分を蒸発させた後, Milli-Q 水で調製した 4M の塩酸 200 μ L を加え, ヒートブロックを使用し, 100°C で 4 時間加熱しムチンを加水分解した。このとき, ヒートブロックの設定温度は 110°C とし, エッペンドルフチューブをセットしてからヒートブロックの電源を入れ, 反応時間は温度計が 100°C に達してから 4 時間とした。加水分解後, 遠心濃縮処理を行い (1 時間), 塩酸が完全に揮発していることを確認してから, 加水分解物は Milli-Q 水 300 μ L に再溶解させ, 再度遠心濃縮処理を行った (1.5 時間)。この Milli-Q 水による加水分解物の洗浄作業を合計で 3 回繰り返した後, 最終的に加水分解物は Milli-Q 水 500 μ L に溶解させた。これをフィルターろ過 (DISMIC, 13CP045AN, アドバンテック東洋株) し, 分析カラムとして IonPac AS17 (4×250 mm, DIONEX, USA) をセットしたイオンクロマトに供した。なお, 本測定法は加水分解に使用するムチン画分中のタンパク量は盲腸ムチンの場合 20-130 μ g/assay, 小腸内ムチンでは 2-30 μ g/assay の範囲でのみ定量性が確保されている。本試験ではサンプル 50 μ L あたりの Lowry 法⁽⁶⁴⁾によるタンパク定量値は 30-50 μ g の範囲にあった。

2.10 統計処理

第1章と同様に行った。

第3節 結果

試験期間中の飼料摂取量は対照群に比べ全フルクタン群で有意に低下し、体重増加量も対照群に比べDP8, DP16 およびDP23 群で有意に低下した。盲腸組織重量は対照群に比べ全フルクタン群で有意な高値を示し、内容物量においても同様の傾向を示した。盲腸内 pH は対照群に比べ全フルクタン群で有意な低下を示した (Table 5)。これらの結果は第1章の試験結果を再現するものであった。

盲腸内有機酸濃度では、総 SCFA 濃度は対照群に比べ DP16 群で有意な増加, DP4 群で有意な低下を示した。このうち、酢酸濃度では対照群に比べ DP16 および DP23 群で有意な増加, DP4 群で有意な低下, プロピオン酸濃度では対照群に比べ全フルクタン群で有意な低下, *n*-酪酸濃度では対照群に比べ DP4, DP8 および DP16 群で有意な増加が認められた。またコハク酸濃度は対照群に比べ DP8 および DP23 群で有意な低下が認められ、乳酸濃度は対照群に比べ, DP4 および DP8 群で有意な増加が認められた。盲腸内有機酸量 (盲腸プールサイズ) では、総 SCFA 量は対照群に比べ DP8, DP16 および DP23 群で有意な増加が認められた。酢酸量は SCFA 量と同様の傾向を示し, *n*-酪酸量では対照群に比べ DP4, DP8, DP16 群で有意な増加が認められた。またコハク酸量は対照群に比べ DP4 群で有意な増加を示し, 乳酸量は濃度と同様の傾向を示した (Table 5)。以上の結果も第1章の試験結果とほぼ一致していた。

小腸ムチン量は群間で差が認められず、盲腸では濃度、量ともに対照群に比べ全フルクタン群で有意な増加を示し、濃度では DP4 群に比べ DP8, DP16 および DP23 群が有意に高い値を示した。また糞中ムチンは濃度、量ともに対照群に比べ DP8, DP16 および DP23 群で有意な増加を示した (Figure 9)。このとき盲腸粘膜 *Muc2* 発現量は対照群に比べ DP4 群で有意な低下を示し, *Muc3* は群間で差がなかった (Figure 10)。盲腸組織染色の結果, クリプト長は対照群に比べ全フルクタン群で有意に伸長したが, クリプトあたりの杯細胞数は対照群との間で有意差は認められず, フルクタン群間内では DP4 群に比べ DP8, DP23 群で有意な増加が認められた (Table 6)。

盲腸ムチン糖鎖種の変化については、ムチンあたりの SO_4 量が対照群に比べ DP8, DP16 群で有意な低下, DP23 群で低下傾向を示した ($P=0.08$) (Figure 11)。このときの盲腸粘膜 *Gal3ST2* 発現量は DP に伴い低下し, DP8, DP16, DP23 群で有意差が認められ, *Gal3ST4* は対照群に比べ DP4 で有意に低下した。一方, *Siat4c* 発現量は DP に伴い上昇し, DP16, DP23 群で対照群に比べ有意差が認められた (Figure 12)。また, HID-AB 染色の結果, クリプトあたりの HID^+ 細胞および AB^+ 細胞数は群間で差は認められなかった (Table 6, Figure 13)。

糞ムシナーゼ活性は対照群に比べ全フルクタン群で同等に有意に低下していた (Figure 14)。

第4節 考察

本試験において DP の異なるフルクタン摂取により盲腸内ムチンは濃度, 量ともに対照群に比べ全フルクタン群で有意に増加し, 特に濃度では DP8, DP16, DP23 群は DP4 群に対しても有意な高値を示した。このとき小腸内ムチン量で差がないことから, フルクタン摂取による盲腸内ムチン濃度/量の増加は盲腸内での分泌促進または分解抑制によると考えられた。

ムチン分泌促進にはムチン分泌細胞である杯細胞数あたりのムチン合成量の増加と杯細胞数の増加が関係する。ムチン分泌促進要因として坂田ら⁸⁾は結腸灌流試験において生理的濃度の SCFA (20-130 mM) にムチン分泌促進作用が認められるが, 乳酸およびコハク酸には効果がなかったことを報告している。一方, Barcelo ら⁹⁾は分泌促進が認められたのは酢酸と *n*-酪酸のみであったと報告している。本試験でも盲腸内ムチン量は SCFA 量と有意な正の相関を示すが ($r=0.96$, $P=0.01$), 乳酸及びコハク酸とは有意な相関を示さなかった (vs. 乳酸, $r=-0.06$, $P=0.92$; vs. コハク酸, $r=0.10$, $P=0.87$)。

一方, SCFA 濃度とムチン濃度との間に有意な相関は認められず ($r=0.71$, $P=0.17$), 対照群を除いた場合にのみ相関傾向が認められた ($r=0.91$, $P=0.09$)。少なくともフルクタン群間内でのムチン濃度/量の変動は, SCFA 濃度/量の変動を反映した結果であると考えられた。一方, 盲腸での主要ムチン分子種である *Muc2* の発現量はフル

クタン摂取によっても上昇せず、むしろ DP4 では対照群に比べ有意に低下し、DP の上昇とともに対照群レベルにまで回復する傾向を示した。この Muc2 発現量と SCFA 濃度との間には正の相関傾向が認められた ($r=0.82$, $P=0.08$)。また、盲腸クリプトあたりの杯細胞数は群間で差が認められなかった。以上の結果は、フルクタン摂取による盲腸内ムチン濃度/量の増加は SCFA を介した杯細胞からのムチン分泌のみでは説明できないことを示している。

盲腸内ムチンは常に腸内細菌による分解に曝されているが、腸内細菌によるムチン分解にはシアル酸 *O*-アセチルエステラーゼやグリコサルファターゼが律速になっており、これらが作用した後、結合特異的なグリコシダーゼ活性が進む^{65,66}。単一の細菌では *Akkermansia muciniphila* が唯一すべての分解酵素活性を有していることが報告されているが⁶⁷、通常、ムチン分解は *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Clostridium* などの “mixed culture” でのみ認められる⁶⁸。本試験で測定したムシナーゼ活性は上述の酵素が作用することで遊離した還元糖を測定した結果であるが、対照群に比べ糞ムシナーゼ活性はフルクタン摂取により同等に有意な低下を示した。したがって、フルクタン摂取はムチンの分解抑制を介して、盲腸内ムチン濃度/量を上昇させると考えられた。フルクタン摂取時の盲腸内 pH の低下はムチン分解活性を持つ *Bacteroides*, *Clostridium* 等の増殖を抑制すると考えられた。

ムチンは遺伝子コードからの分類 (分子種) 以外に、その構成糖の特徴から中性ムチン、シアロムチン、硫酸ムチンに分類されるが²²、硫酸ムチンは中性ムチン、シアロムチンに比べ高粘性を示し、腸内細菌による分化にも受けにくいことから²³、細菌の透過抑制等、腸粘膜のバリア機能の増強に繋がると考えられる。本試験においてムチンあたりの SO_4^{2-} 量は対照群に比べ DP8, DP16 群で有意に低下し、DP23 群で低下傾向を示した。また硫酸転移酵素である *Gal3ST2* 発現量は対照群に比べ DP8, DP16, DP23 群で有意に低下し、*Gal3ST4* は対照群に比べ DP4 群で有意な低下を示した。一方シアル酸転移酵素である *Siat4c* 発現量は対照群に比べ DP16, DP23 群で有意な上昇を示した。盲腸 HID-AB 染色の結果、クリプトあたりの HID⁺細胞数は群間で有意な差は認められなかった。これらの結果はいずれもフルクタン摂取によっても硫酸ムチンは増加しないことを示している。

以上をまとめると、フルクタン摂取による盲腸内ムチン濃度および量は中-高 DP 側 (DP8, 16, 23) でのみ増加するが、この増加には SCFA を介したムチン分泌促進に加え、低 pH によるムシナーゼ活性の抑制が関与すると考えられた。また、フルクタンの摂取は DP に係わらずムチン糖鎖には影響しないことが明らかになった。

Table 4 PCR Primers and PCR condition

Gene	Sequence(5-3')	Annealing	Extension
Muc2 ⁵⁶⁾	AAGCCAGATCCCGAAACCAT (sense) ATGGCCCCATTCACAACCTGCC (antisense)	62°C, 10 sec	72°C, 10 sec
Muc3 ⁵⁶⁾	GGTACAGCGGTGAAAACCT (sense) CATGGGGAAATCTCAACG (antisense)	62°C, 10 sec	72°C, 20 sec
GalBST2 ⁵⁷⁾	TCTGGTGCTCATCGCAGACT (sense) GTGCGGTTGAAATGCTCGTA (antisense)	63°C, 10 sec	72°C, 15 sec
GalBST4 ⁵⁷⁾	CTCCGTCCTTTCCAGTTTGG (sense) ATGGGGTCAGTGGCTTTGAG (antisense)	65°C, 10 sec	72°C, 15 sec
Sia4c ⁵⁷⁾	CTACACCTCTGCGACTTGGT (sense) GGTTCCTGACAGCTCCCATC (antisense)	55°C, 10 sec	72°C, 10 sec
HPRT-1 ⁵⁸⁾	GATTTTATCAGACTGAAGAGCTACTGTAAATG (sense) CCAGTGTCAATTATATCTTCAACAATCAA (antisense)	57°C, 10 sec	72°C, 10 sec

Table 5 Food intake, body weight gain, and cecal variables in rats fed the respective diets for 15 days

	Control	DP4	DP8	DP16	DP23
Food intake, g/15d	299±5 ^b	261±5 ^{ab}	253±4 ^a	252±7 ^a	262±7 ^a
Body weight gain, g/15d	105±4 ^b	91±4 ^{ab}	83±3 ^a	87±6 ^a	87±4 ^a
Cecum					
Tissue, g	09±0.0 ^a	1.7±0.2 ^b	1.9±0.1 ^c	1.9±0.1 ^{bc}	2.0±0.1 ^c
Contents, g	2.8±0.2 ^a	7.1±0.4 ^c	4.8±0.2 ^b	5.2±0.4 ^{bc}	5.0±0.4 ^b
pH	7.0±0.1 ^b	6.0±0.1 ^a	6.1±0.1 ^a	5.8±0.2 ^a	6.1±0.1 ^a
Organic acids					
Concentration, μmol/g contents					
Acetate	33±2 ^b	14±2 ^a	35±3 ^b	47±3 ^c	43±3 ^b
Propionate	9±1 ^b	6±1 ^a	6±1 ^a	5±1 ^a	4±1 ^a
<i>n</i> -Butyrate	3±1 ^a	10±2 ^c	12±2 ^c	9±1 ^{bc}	4±1 ^{ab}
SCFA ¹	45±2 ^b	31±4 ^a	52±4 ^{bc}	61±4 ^c	51±3 ^{bc}
Succinate ²	44(16-86)	29(16-69)	24(2-41)*	34(4-60)	26(13-42)*
Lactate ²	0(0-0.4)	38(0-73)*	6(0-64)*	0(0-14)	1(0-19)
Total amounts, μmol/cecum					
Acetate	92±8 ^a	99±13 ^a	177±19 ^b	251±30 ^b	224±34 ^b
Propionate	25±2 ^{ab}	42±6 ^b	31±6 ^{ab}	30±8 ^{ab}	22±5 ^{ab}
<i>n</i> -Butyrate	8±2 ^a	70±14 ^c	62±10 ^c	50±9 ^{bc}	19±4 ^{ab}
SCFA ¹	125±11 ^a	211±24 ^{ab}	271±29 ^b	331±42 ^b	266±40 ^b
Succinate	121±16 ^a	223±28 ^b	119±16 ^a	184±26 ^{ab}	130±16 ^a
Lactate ²	0(0-1)	285(0-607)*	27(0-341)*	2(0-56)	4(0-120)

Data are expressed as mean±SEM or median (ranges) (n=14).

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by Tukey-Kramer test.

¹Sum of acetate, propionate and *n*-butyrate.

²Data are examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample test. **P*<0.05 vs control.

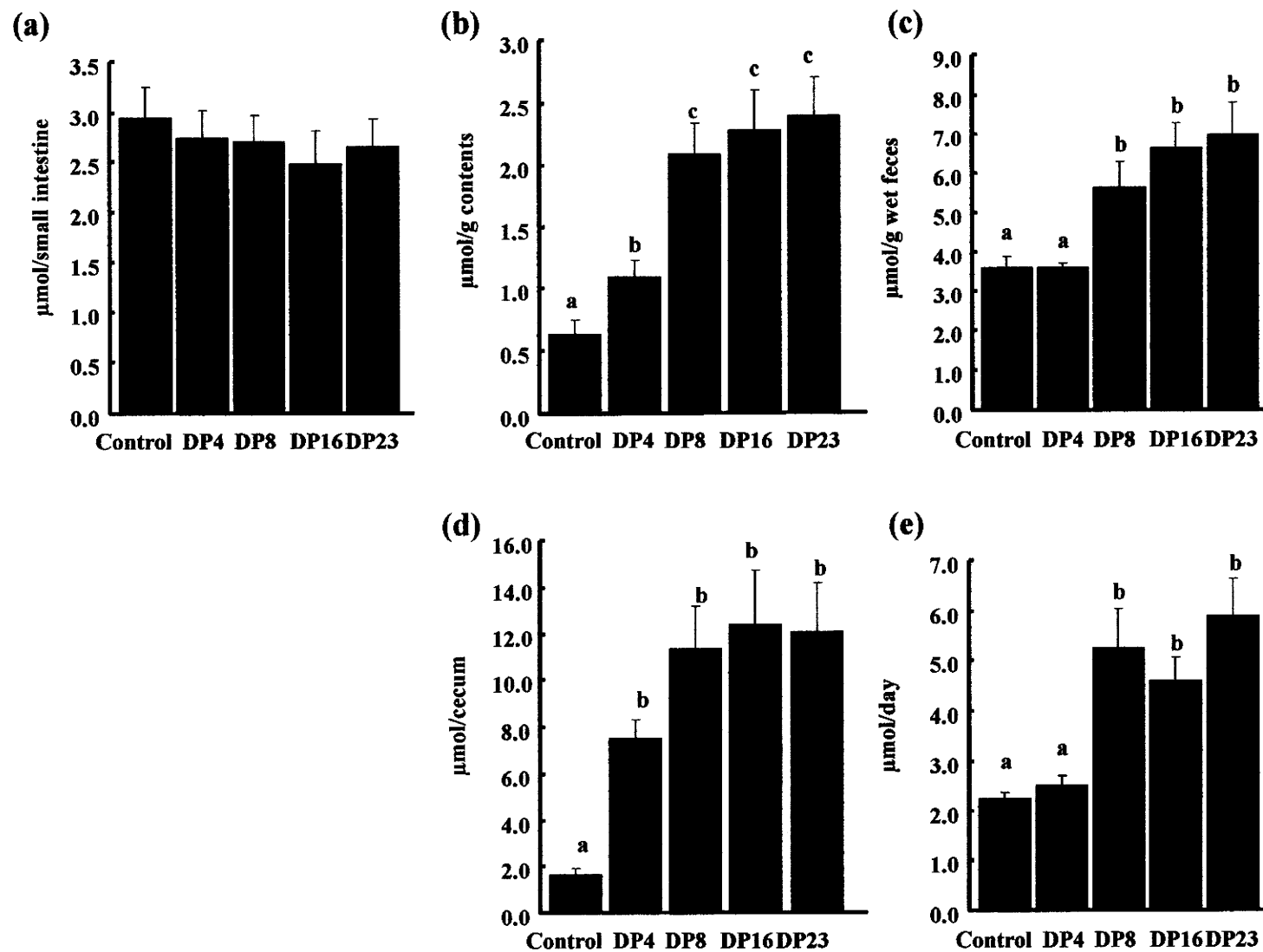


Figure 9 Luminal mucin in the small intestine (total amounts, a), the cecum (concentrations, b; total amounts, d) and feces (concentrations, c; total amounts, e) in rats fed the respective diets for 15d

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

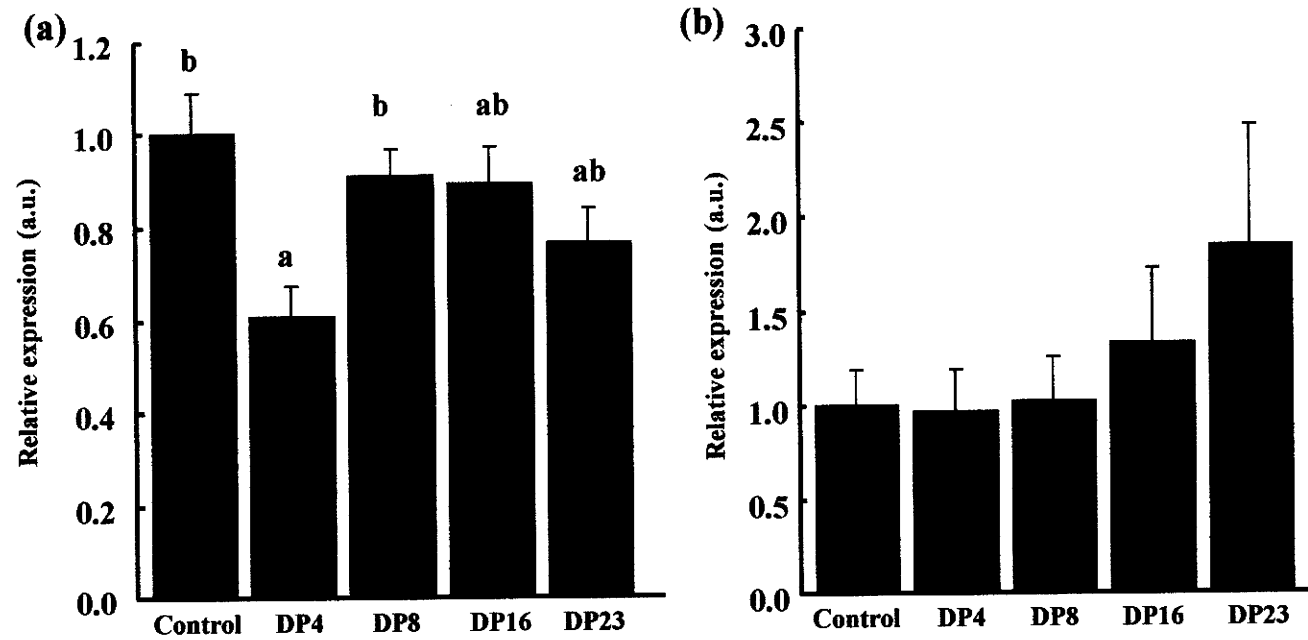


Figure 10 *Muc2* (a) and *Muc3* (b) expression in the cecal mucosa in rats fed the respective diets for 15d

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

Table 6 Histometrical evaluation of cecum section from rats fed the respective diet for 15 d

	Control	6%DP4	6%DP8	6%DP16	6%DP23
Crypt length, μm	202 \pm 5 ^a	234 \pm 6 ^b	274 \pm 12 ^c	267 \pm 10 ^{bc}	261 \pm 10 ^{bc}
Goblet cells, number/crypt	269 \pm 0.5 ^{ab}	259 \pm 0.8 ^a	297 \pm 1.2 ^b	282 \pm 0.8 ^{ab}	293 \pm 0.8 ^b
HID positive cell, number/crypt	178 \pm 0.8	185 \pm 0.9	200 \pm 0.8	204 \pm 0.7	198 \pm 0.5
AB positive cell, number/crypt	93 \pm 0.6 ^{ab}	73 \pm 0.5 ^a	97 \pm 0.7 ^{ab}	94 \pm 0.7 ^{ab}	109 \pm 0.7 ^b

Data are expressed as mean \pm SEM (n=14).

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by Tukey-Kramer test.

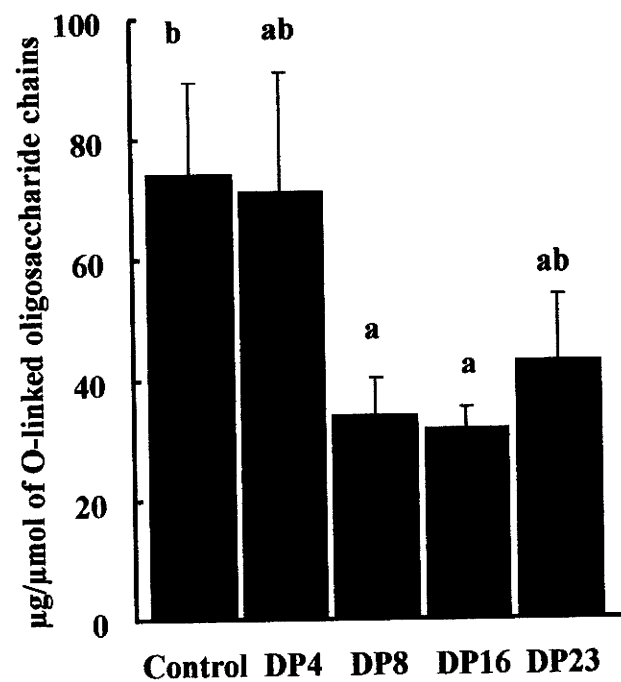


Figure 11 Relative amounts of SO₄²⁻ in cecal mucin from rats fed the respective diets for 15d

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

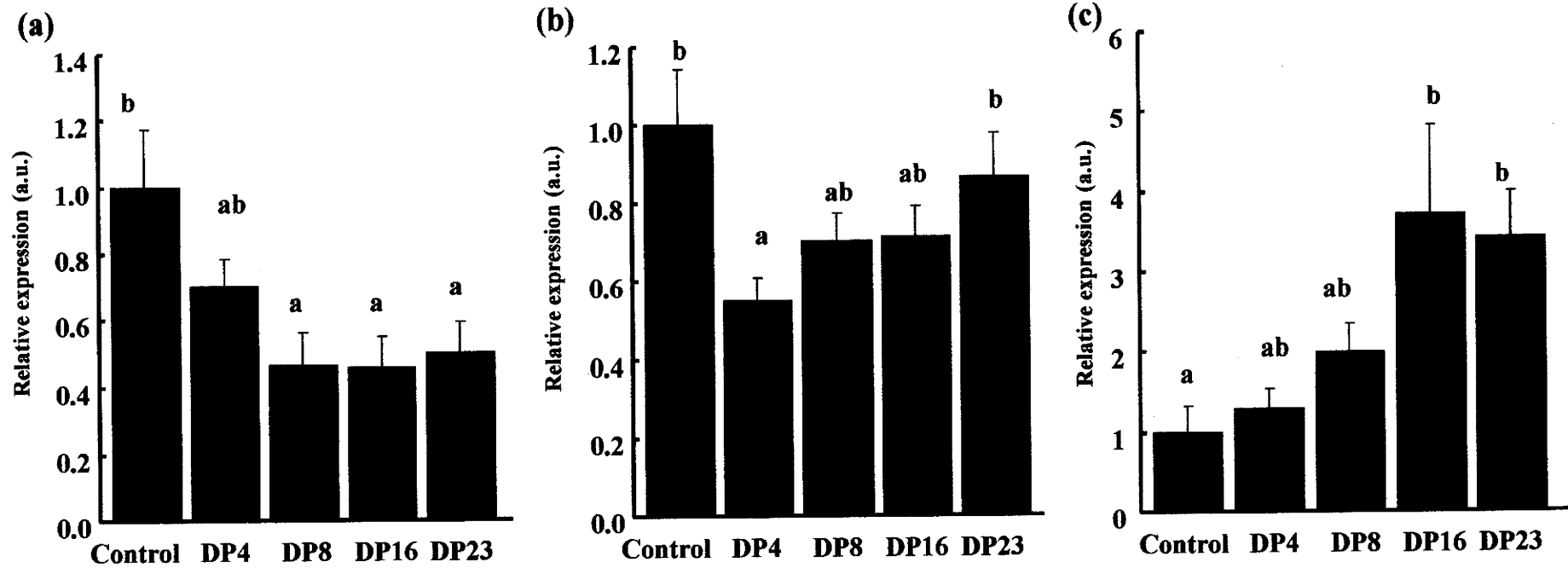


Figure 12 *Gal3ST2*(a), *Gal3ST4* (b) and *Siat4c* (c) expression of the cecum in rats fed the respective diets for 15d

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

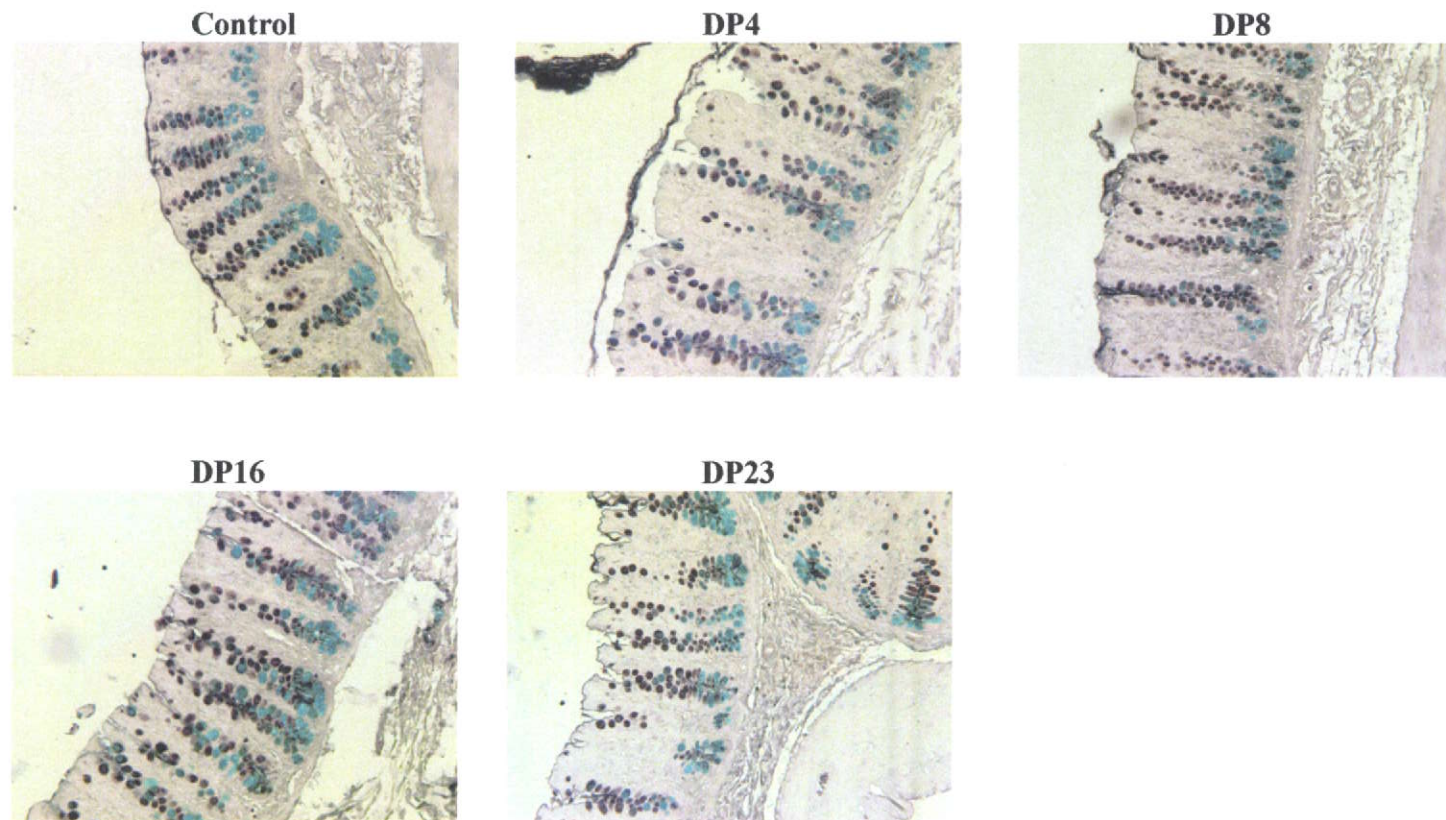


Figure 13 HID-AB staining of the cecum tissue from rats fed the respective diet for 15d

Dark brown-stained cell, HID positive cell; blue-stained cell, AB positive cell. Magnification=200 ×.

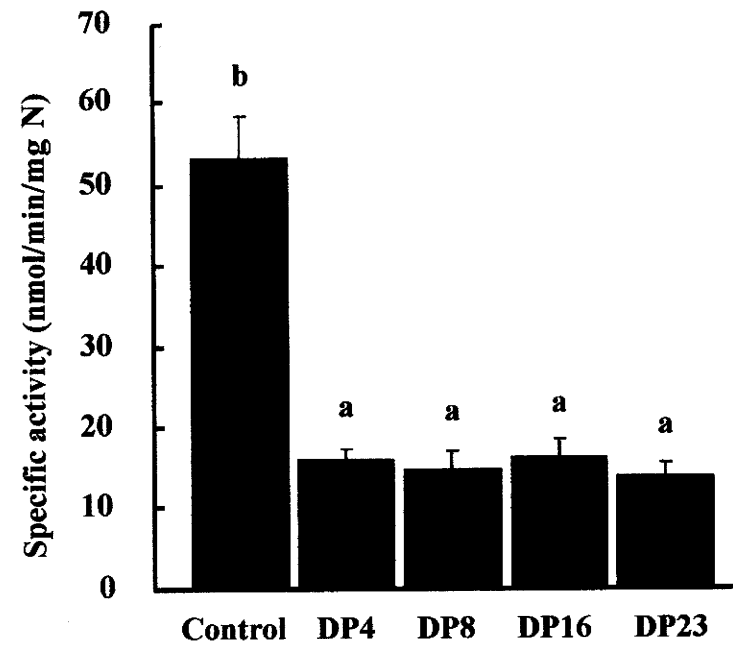


Figure 14 Fecal mucinase activity in rats fed the respective diets for 15d

Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

第3章

イヌリン型フルクタンの急性期 TNBS 誘発大腸炎に対する予防効果

第1節 緒論

本邦においてもクローン病や潰瘍性大腸炎をはじめとするIBDは増加の一途を辿っている。これらの病因は未だ不明な点が多いが、腸内細菌叢の異常および腸内細菌に対する免疫寛容の破綻が指摘されている。IBDの病態モデルとしては、TNBSとEtOHの同時注腸により炎症を誘発させる大腸炎モデルが汎用されている。このモデルはTNBSおよびEtOH自体の腐食作用に端を発し、腸内細菌の粘膜固有層へ暴露により炎症が増強され、また一部はTNBSによりハプテン化されたタンパクに対しIL-12産生が誘導され、Th1型の炎症を示すとされる⁶⁹⁻⁷¹⁾。しかしながら、ラットにおいて、TNBS/EtOH投与から1-2週間後の炎症像は酢酸誘発大腸炎モデルと同様に非特異的なもので免疫反応を介したものではないと考えられる⁷²⁾。以前の研究ではTNBS誘発大腸炎の急性期の炎症程度は細菌の透過(bacterial translocation, BT)と同様にエンドトキシンの流入量に比例することが報告されている^{73,74)}。したがって、腸管バリア機能の増強は本モデルの急性期に対する予防ないし防御に効果的に作用すると考えられる。

第1章および第2章の結果からDPの異なるイヌリン型フルクタンの摂取により、盲腸内IgA濃度はDP4およびDP8群で、盲腸内ムチン濃度はDP8, DP16, DP23群で有意な増加を示すことが明らかである。ムチンとIgAはそれぞれが共役して腸内細菌やエンドトキシンの透過に対する防御を担っていると考えられる。したがってこの両者がバランスよく増加しているフルクタンとして本試験ではDP8を選択し、さらに陽性対照として既報でTNBS誘発大腸炎モデルでの予防効果が知られているDP4⁷⁵⁾

(FOSと同一)を用いて急性期TNBS誘発大腸炎に対するDPの炎症抑制作用を比較検討した。

第2節 実験方法

2.1 実験試料

試験には第1章で用いたフルクタンのうちDP4 およびDP8 を使用した。

2.2 実験動物

試験には8週齢のF344雄ラットを用い、第1章と同じ飼育環境下で実験を行った。ラットは予備飼育後、体重を基準に3群に分け、対照飼料、6%DP4飼料または6%DP8飼料のいずれかを水道水とともに自由摂取させ、以下の実験を行った。詳しい試験スケジュールはFigure 15に記した。

実験1 24匹のラット(体重148-169g)を1群8匹の3群に分け、各試験飼料で7日間飼育した。試験終了後、盲腸を摘出した。摘出した盲腸から第1章・第2章と同様にして盲腸内容物中のpH、有機酸、IgAおよびムチン濃度を測定した。

実験2 42匹のラット(体重149-177g)を1群8匹の3群に分け、各試験飼料で17日間飼育した。試験開始7日目にエーテル麻酔下でグリセリン注腸を行い、この1時間後に再びエーテル麻酔下で、50%エタノールに溶解したTNBS溶液(120mg TNBS/mL)を肛門から8cmの部位に0.25mL投与することで大腸炎を誘発させた。また、予備試験の結果から門脈へのエンドトキシン流入および腸間膜リンパ節

(mesenteric lymph node; MLN) へのBTは炎症誘発から3日後に最大となるため(Figure 16)、この時点で一部のラット(1群6匹)からヘパリン処理したシリンジで無菌的に門脈血300 μ Lを採血し、さらに腸間膜からMLNを無菌的に摘出し、滅菌生理食塩水を含んだ滅菌シャーレ中に移した。門脈血は滅菌済の0.5mL容マイクロチューブに移し、200 \times g、4 $^{\circ}$ C、10分間遠心分離し血漿を回収しエンドトキシンの測定に用いた。残りのラットはTNBS投与から10日後に解剖を行い、盲腸および結腸を摘出した。摘出した盲腸については内容物のpH、有機酸、IgAおよびムチン濃度を測定した。また、摘出した結腸は全長を測定した後、縦方向に切り開き、内容物を除去した。その後、生理食塩水で洗浄し、キムタオル上で軽く水分を除いた後、組織重量を測定した。次いで、組織障害部位の写真撮影を行い、Bellら⁷⁶⁾の基準に従い、組織傷害の程度を0-10のスケールでスコア化した(Table 7)。その後結腸は縦

に二分割し、一方はミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase ; MPO) 活性の測定に、他方は組織切片を作成し PAS 染色による組織観察に用いた。また、TNBS 投与 6 日目から 10 日目にかけて、糞便を採取し IgA およびムチンの測定に用いた。

2.3 有機酸濃度の測定

第 1 章と同様に行った。

2.4 IgA の測定

第 1 章と同様に行った。

2.5 ムチン画分の調製と O-結合性当鎖当量の測定

第 2 章と同様に行った。

2.6 血漿エンドトキシン濃度の測定

門脈血中のエンドトキシンはリムルス試験⁷⁾に基づく比濁時間分析法により測定した。前処理として血漿は 100 μ L を注射水 (大塚蒸留水, 大塚製薬工場) 900 μ L の入った乾熱滅菌済アルミキャップ付試験管に加えた後, 80°C で 5 分間反応させ, 血漿中のリポ多糖結合タンパクを不活性化させた。標品には標準エンドトキシン (control standard endotoxin, CSE, 和光純薬 (株)) を用い注射水にて 250~0.4883 pg/mL の希釈系列を作成した。カプトガニ血球から抽出した LAL 試薬 (limulus ameocyte lysate, 和光純薬 (株)) 100 μ L の入ったエンドトキシン測定用試験管 (和光純薬 (株)) に標品および前処理後の検体を 100 μ L 加え軽く攪拌した後, 直ちにトキシノメーター (ET-2000, 和光純薬 (株)) で分析した。なお, 以上の操作で使用したピペットチップ (ep.TIPS Biopure, eppendorf) はエンドトキシンフリーのものを用い, ガラス製品は 250°C, 1 時間乾熱滅菌を行ったものを使用した。

エンドトキシンは LAL 中の凝固酵素を活性化し, この酵素の働きにより LAL 中のコアギュローゲン (凝固性タンパク質) がコアギュリンに変換されゲル化する。ゲル化反応に伴い試料の濁度は増加するため, ゲル化反応を透過光量の変化として捉

え、一定の濁度を超えるまでの時間をゲル化時間として測定する。ゲル化時間と試料中のエンドトキシン濃度の間には相関関係が成り立つので、ゲル化時間を測定することでエンドトキシンの定量を行うことができる。

2.7 MLN への細菌透過量の測定

MLN への BT は、MLN の組織懸濁液を逆培養することにより測定した。すなわち、剥離した MLN は 2.0 mL 容マイクロチューブに移し、ヒビテンで滅菌した眼科バサミを用いて良く細切した。これにブレインハートインフュージョンブロス（日水製薬（株），東京） 500 μ L を加えハンディポリトロンホモジナイザー（PT1200E, KINEMATICA, Switzerland）を用い均一化（3 秒 \times 3）した。この組織懸濁液 100 μ L を 20 mL のブレインハートインフュージョン寒天培地（日水製薬（株））に加え、コンラージ棒で均一に塗布した。1 検体につき 2 枚塗布し、この一方は好気培養用として 37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養し、他方は嫌気培養用として嫌気パック（アネロメイト P, 日水製薬（株））に入れ、37 $^{\circ}$ C で 72 時間培養した。培養終了後、コロニー数を計測した。

2.8 結腸 MPO 活性

結腸組織からの MPO の抽出は Bradley らの方法に準じて行った⁷⁸⁾。すなわち、結腸組織は 50 mL ビーカーに移し、氷上で細切した後、50 mL コニカルチューブに移した。これに 0.5% ヘキサデシルトリメチルアンモニウム臭化物

(hexadecyltrimethylammonium bromide, HTAB) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を組織重量 50 mg に対して 1 mL の割合で加えた。次いでポリトロンホモジナイザーを用いて均一化（4 $^{\circ}$ C, 15 秒間）した後、0.5% HTAB-リン酸緩衝液で 30 mL に定容した。ここから 10 mL を採取し、凍結（-30 $^{\circ}$ C）/融解後、超音波洗浄機を用いて 2 分間超音波処理を行った。この操作を 3 回繰り返した後、これを遠沈管に移し 20,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離を行い、上清を回収した。これを 0.0005% H₂O₂, 0.167 mg/mL o-ジアニシジンジヒドロクロライド（Sigma）を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2.9 mL の入った石英セルに 100 μ L を加え直ちに攪拌した後、分光光度

計にレートアッセイ用プログラムパック (株) 島津製作所) を装着し, 460 nm の吸光度変化を 30 秒間測定した。なお, 活性値は分子吸光係数から以下の式を用いて算出し, 活性量は 25°C, 1 分間あたりに酵素が 1 μmol の H_2O_2 を消費したとき 1U とした。

結腸組織重量あたりの MPO 活性 (U) = 吸光度 ($\Delta\text{ABS}/\text{min}$) \times 反応液量 (3.0 mL) / 分子吸光係数 ($11.3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) / 光路長 (1.0 cm) / 反応液中酵素量 (0.1 mL) / Δt (1min) \times 結腸ホモジネート液全量 (30.0 mL)

2.9 統計処理

第 1 章と同様に行った。

第 3 節 結果

実験 1 試験期間中の飼料摂取量および体重増加量は対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意に低下した。盲腸組織重量および内容物重量は対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意に増加しており, 盲腸内 pH は対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意に低下した (Table 8)。盲腸内プロピオン酸, *n*-酪酸および乳酸濃度は群間で差が認められ, それぞれ DP4 および DP8 群で対照群に比べ有意な高値を示した。盲腸内ムチン濃度は対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意に増加し, DP8 群で最高値を示した。盲腸内 IgA 濃度は対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意な増加を示した。

実験 2 TNBS 投与前の 1 日あたりの飼料摂取量および体重増加量は対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意に低く (Figure 17-a, b), TNBS 投与から 3 日間は, 飼料摂取量および体重は全群とも一様に低下し, その後徐々に回復していった。TNBS 投与後 5-10 日目にかけて, 飼料摂取量は対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意に増加し, 体重の回復にも反映されていた (Figure 17-a, b)。

TNBS 投与後 3 日目の門脈血中エンドトキシンは対照群では全検体で検出され, その濃度は $6.9 \pm 0.9 \text{ pg/mL}$ であった。これに対し, DP4 および DP8 群の検出率はそれぞれ 4/6 と 1/6 であり, さらに DP8 群では対照群に比べ門脈血中エンドトキシン濃度の有意な低下が認められた (Figure 18-a)。MLN への BT は対照群に比べ DP4 およ

びDP8群で70%の有意な低下を示した (Figure 18-b)。

TNBS 投与後 10 日目の結腸粘膜は対照群では組織傷害スコア, 相対重量および MPO 活性のいずれの指標からも顕著な炎症を示した。対照群に比べ, 組織傷害スコア および相対重量では DP4 および DP8 群で有意な低下を示し, また MPO 活性は DP8 群で有意に低下した (Figure 19, Figure 20)。

TNBS 投与後であっても盲腸組織および内容物重量は, 対照群に比べ DP4 および DP8 群で有意な高値を示し, 内容物 pH は対照群に比べ DP4 および DP8 群で変動は小さいが有意に低い値を示した (Table 9)。一方で TNBS 投与直前 (実験 1) に比べ盲腸内有機酸, ムチンおよび IgA 濃度は群間で差は認められなかった。糞中 IgA 濃度は群間で差は認められなかったが, 糞中ムチン濃度は対照群に比べ DP8 群で有意に増加した (Table 9)。結腸炎症部位の組織像は対照群では粘膜への顆粒球の浸潤と杯細胞数の減少が観察された。これに対し DP4 および DP8 群では杯細胞の形態学的特徴から粘膜組織の回復が観察された (Figure 21-a, b, c)

第4節 考察

第1章, 第2章での結果と同様に本試験において TNBS 投与直前の盲腸内ムチン濃度はDP8群で最高値を示し, DP4群においても対照群に対し有意な高値を示した (実験 1)。一方, 盲腸内 IgA 濃度は DP4, DP8 群ともに同程度に増加し, 対照群に比べ有意差が認められた (実験 1)。DP4 および DP8 を TNBS 投与前に 7 日間摂取することで, TNBS 投与後 10 日目の炎症は結腸傷害スコア, 相対重量および結腸 MPO 活性のいずれの結果からも抑制されていた。さらに TNBS 投与後 3 日目の BT は対照群に比べ DP4, DP8 群で有意に減少しており, また DP8 群では門脈血中エンドトキシン濃度も有意に低下していた (実験 2)。

TNBS 自体は腐食作用を示し, またエタノールにより粘膜が変性することで粘膜バリアは破壊され, 細菌やエンドトキシンと組織との接触頻度が増え, IL-1 β , IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカインが分泌され, 炎症反応が増強される。本試験結果は, TNBS 誘発大腸炎の急性期炎症の重症度は BT と全身性のエンドトキシン濃度に比例するという Gardiner らの報告⁷⁴⁾と概ね一致する。事実, DP8 の摂取により MLN

へのBTと同様に門脈血中エンドトキシン濃度は劇的に減少し、結腸MPO活性は有意に抑制された。このDP8摂取による門脈血中エンドトキシン濃度の減少の詳細なメカニズムは不明であるが、Enssら⁷⁹⁾は、上皮表面を覆うムチンは大腸菌との結合能を有しており、エンドトキシンのtrapperとして働くことを報告している。また、ムチン層中のIgAは乳酸菌と接着することでバイオフィルムを形成し、エンドトキシン透過に対する効果的バリアとして機能したと考えられる。本試験においてTNBS投与直前の盲腸内ムチン濃度はDP8群で最高値を示しており、このムチン濃度の増加が、DP4を凌ぐDP8の優れたエンドトキシン透過抑制作用に繋がったと考えられた。その他の可能性として、フルクタン摂取による乳酸産生菌誘導能が挙げられる。*Bifidobacteria*は管腔内のエンドトキシン濃度を低下させることが示されており^{80,81)}、また*lactobacilli*はエンドトキシンと結合する可能性が示唆されている⁸²⁾。第1章の結果より、DP8は*lactobacilli*と*bifidobacteria*の両者に対する誘導能を有することから、このこともエンドトキシンの透過抑制に関与していると考えられる。

興味深いことに、TNBS投与10日後ではDP4およびDP8摂取による盲腸SCFA、乳酸、pH、ムチン及びIgAに及ぼす有用性が完全に消失していた。これらの結果はFOS（本試験で用いたDP4と同一）を摂取させたラットでTNBS投与7日後のpHの低下、乳酸およびn-酪酸量の増加を報告しているCherbutらの結果⁷⁵⁾と異なっている。この理由については不明であるが、フルクタンの投与方法が本試験では混餌であるのに対しCherbutらは胃内強制投与であることが関係しているのかもしれない。いずれにせよ、本試験ではTNBS投与10日後にはフルクタン摂取による盲腸内SCFA、ムチンおよびIgA濃度に及ぼす効果が消失しているにも関わらず炎症が抑制されていたことから、本試験系において観察されたフルクタン摂取による抗炎症作用はTNBS投与後初期に起こるエンドトキシンの流入やBTを抑制するshield-like effectによると考えられた。

一般に大腸炎に対するこれらフルクタンの有用性を説明するメカニズムは2つあると考えられてきた。一つは腸内細菌叢の修飾であり、乳酸産生菌の選択的な増殖、もう一つはSCFA濃度の増加である^{11,34,75)}。これに関してCherbutらはFOSの抗炎症作用についてSCFA量の増加よりむしろ*lactobacilli*誘導能が主たるメカニズムである

ことを示唆している⁷⁵⁾。実際、第1章の結果からDP4の摂取は*lactobacilli*を増殖させ、盲腸内IgA分泌を促進し、さらに盲腸粘膜固有層CD4⁺T細胞からの抗炎症サイトカインであるIL-10分泌を高める。また、乳酸産生菌の増殖は大腸内のエンドトキシン源であるグラム陰性桿菌数を相対的に減少させると考えられるからである。しかし、本試験結果はDP8摂取によるエンドトキシンの流入抑制効果は盲腸内ムチン濃度の増加によるところが大きいことを示唆している。このムチン分泌促進にはSCFA、特に*n*-酪酸の刺激が関与すると考えられた。事実、本試験および第2章の結果において盲腸内ムチン濃度はSCFA特に*n*-酪酸濃度と有意な正の相関を示している。

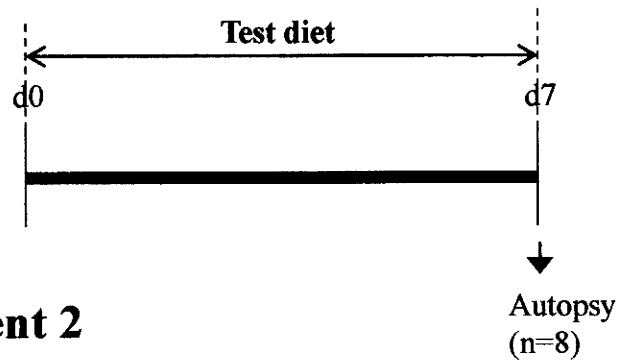
以上をまとめると、DP4およびDP8フルクタンの摂取には急性期TNBS誘発大腸炎に対する予防効果が認められ、この効果にはエンドトキシンの流入およびMLNへのBTの抑制が関与すると考えられた。またDP8ではDP4と比較してエンドトキシン流入抑制が顕著であり、より強い抗炎症作用が認められたが、これには盲腸ムチン濃度の増加が関与すると推定された。

Animal; F344 rat, ♂, 8wk-old
 Test group; control, DP4, DP8

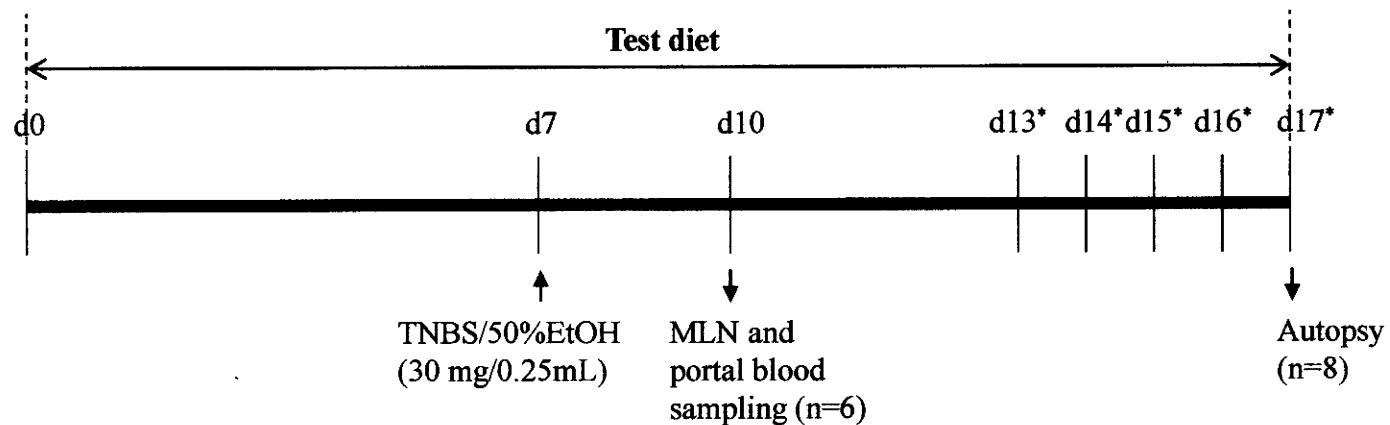
Composition of experimental diets

Ingredients	Control	DP4	DP8
	g/kg		
Cornstarch	652.5	592.5	592.5
DP4 fructan	0	60	0
DP8 fructan	0	0	60
Casein	250	250	250
Corn oil	50	50	50
Mineral	35	35	35
Vitamin	10	10	10
Choline	2.5	2.5	2.5

Experiment 1
 (n=8/group)



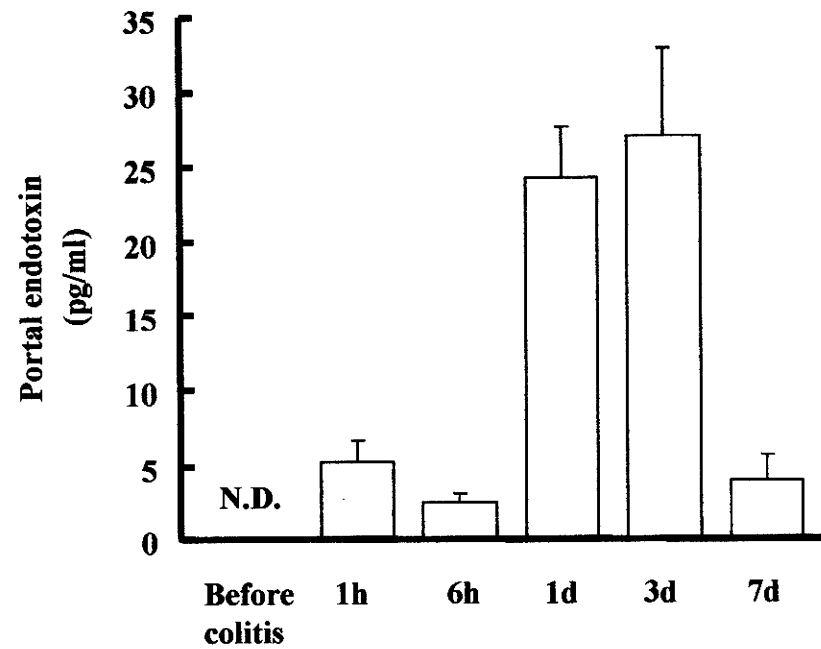
Experiment 2
 (n=14/group)



*Fecal sampling
 for analysis of mucin and IgA

Figure 15 Experimental schedules in Chapter 3

(a)



(b)

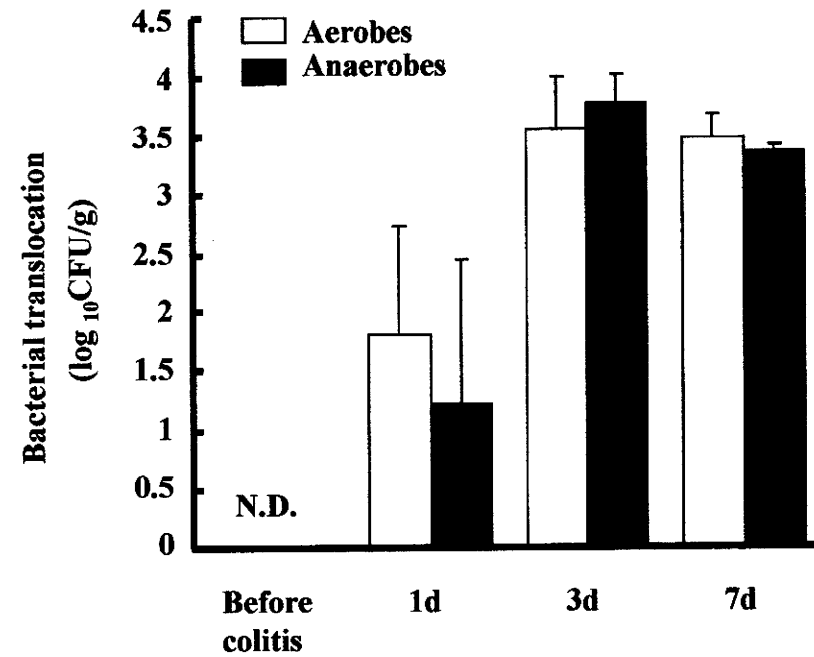


Figure 16 Changes in portal endotoxin concentration (a) and bacterial translocation to MLN (b) in rats after TNBS administration

Data are expressed as mean \pm SE (n=5). N.D.: not detected.

Table 7 Criteria for assessment of macroscopic damage score

Score	Criteria
0	No damage
1	Hyperemia, no ulcers
2	Linear ulcer with no significant inflammation
3	Linear ulcer with inflammation at one site
4	Two or more sites of ulceration/inflammation
5	Two or more sites of ulceration and inflammation or one site of ulceration/inflammation extending > 1 cm along the length of the colon
6-10	If damage covers > 2 cm along the length of colon, the score is increased by 1 for each additional centimeter of involvement

Table 8 Food intake, body weight gain and cecal variables before TNBS treatment

	Control	DP4	DP8
Food intake, g/7d	119 ± 2 ^a	100 ± 2 ^a	99 ± 3 ^a
Body weight gain, g/7d	29 ± 2 ^b	24 ± 2 ^a	21 ± 2 ^a
Cecum			
Tissue, g	0.4 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.0 ^b
Contents, g	1.7 ± 0.0 ^a	3.5 ± 0.3 ^b	3.0 ± 0.3 ^b
pH	7.4 ± 0.1 ^b	6.0 ± 0.1 ^a	5.9 ± 0.1 ^a
Organic acids, µmol/g			
Acetate ¹	38(31-53)	20(9-89)	30(16-80)
Propionate ¹	14(11-15)	22(14-82)*	21(11-59)*
<i>n</i> -Butyrate ¹	3(2-3)	6(2-25)*	15(9-27)*
SCFA ^{1,2}	54(48-67)	49(26-196)	61(45-164)
Lactate ¹	0(0-18)	38(13-102)*	24(0-127)*
Succinate	16 ± 5	16 ± 4	26 ± 6
Mucin, µmol/g	0.4 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.3 ^b
IgA, µg/g	133 ± 24 ^a	794 ± 169 ^b	542 ± 100 ^b

Data are expressed as mean ± SE or median (range), n=8. Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by the Tukey-Kramer test.

¹Data are examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample test. **P* < 0.05 vs. control.

²Sum of acetate + propionate + *n*-butyrate.

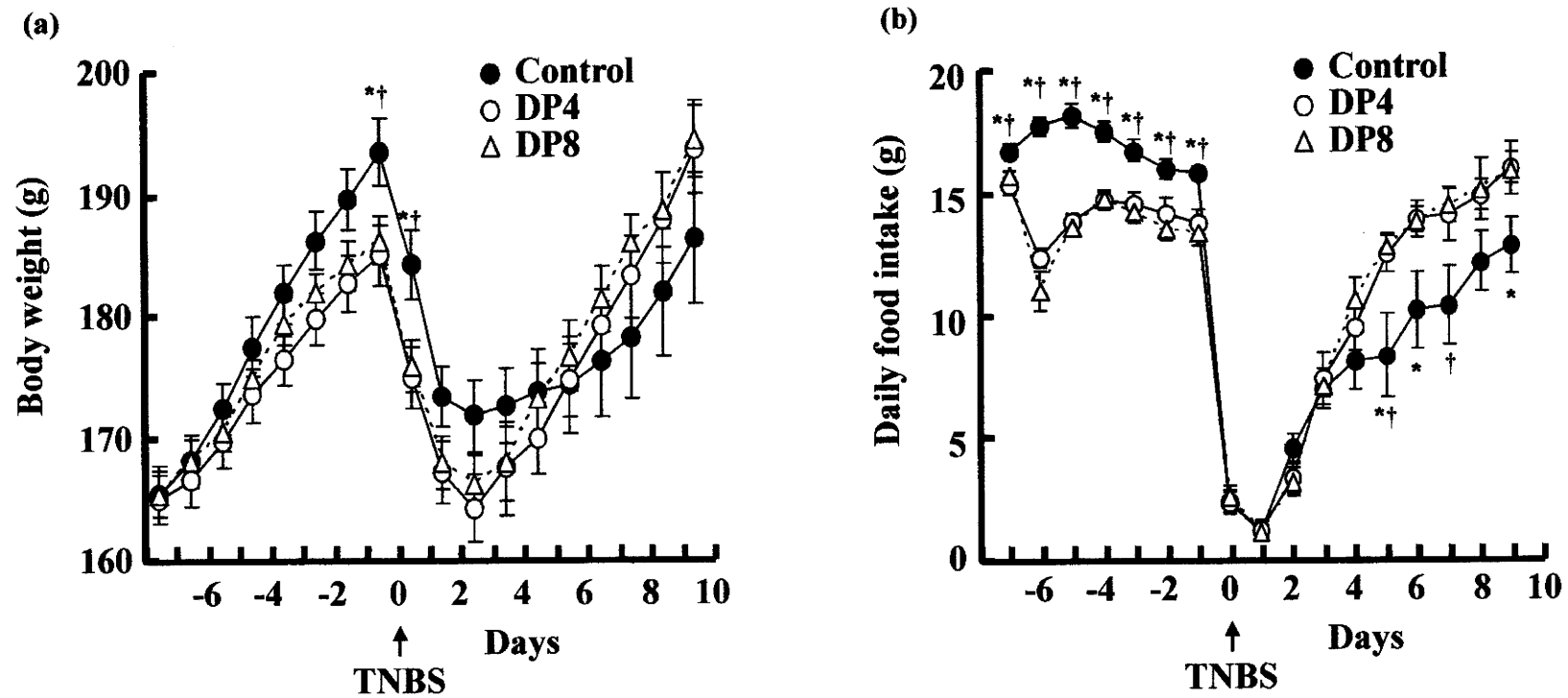


Figure 17 Changes in body weight (a) and daily food intake (b) in rats fed the respective diets before and after TNBS administration

Data are expressed as mean \pm SE (n=8).

* $P < 0.05$ vs. DP4. † $P < 0.05$ vs. DP8.

Table 9 Food intake, body weight gain and cecal variables at 10d after TNBS treatment

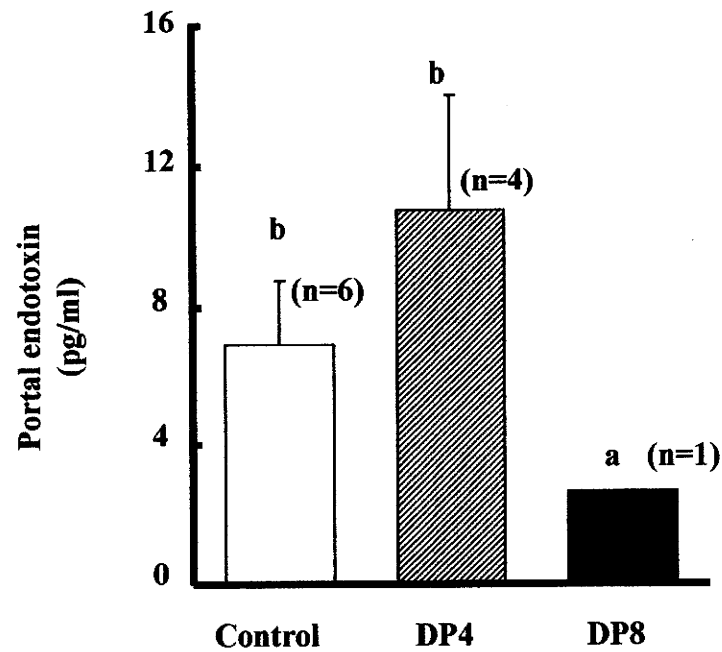
	Control	DP4	DP8
Cecum			
Tissue, g	0.5 ± 0.0 ^a	0.9 ± 0.0 ^b	0.9 ± 0.0 ^b
Contents, g	1.9 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.3 ^b	4.9 ± 0.2 ^b
pH	7.8 ± 0.1 ^b	7.4 ± 0.1 ^a	7.3 ± 0.1 ^a
Organic acids, μmol/g			
Acetate	60 ± 8	52 ± 9	57 ± 3
Propionate ¹	46(11-58)	26(20-75)	19(15-25) [*]
<i>n</i> -Butyrate ¹	8(2-15)	9(7-20)	7(5-9)
SCFA ²	105 ± 17	102 ± 14	83 ± 5
Lactate	0	0	0
Succinate	13 ± 4	23 ± 4	20 ± 7
Mucin, μmol/g	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
IgA, μg/g	103 ± 9 ^b	55 ± 4 ^a	61 ± 6 ^b
Feces			
Mucin, μmol/g	1.2 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.2 ^{ab}	2.0 ± 0.2 ^b
IgA, μg/g	79 ± 23	64 ± 18	4711

Data are expressed as mean ± SE or median (range), Control, n=7; DP4 and DP8 n=8. Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by the Tukey-Kramer test (parametric data)

¹Data are examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample test. **P* < 0.05 vs. control.

²Sum of acetate + propionate + *n*-butyrate.

(a)



(b)

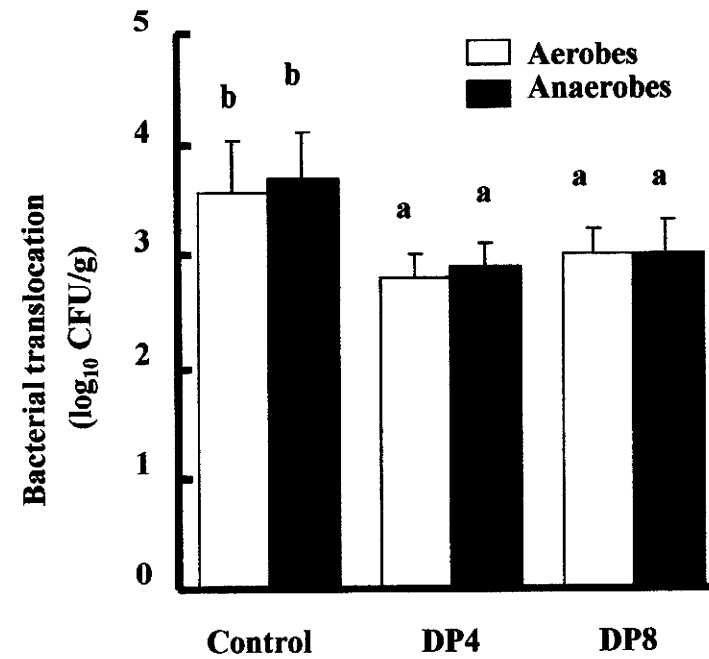


Figure 18 Portal endotoxin concentration (a) and bacterial translocation to MLN (b) in rats fed the respective diets at 3d after TNBS administration

Data are expressed as mean \pm SE, values with different superscript letters are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

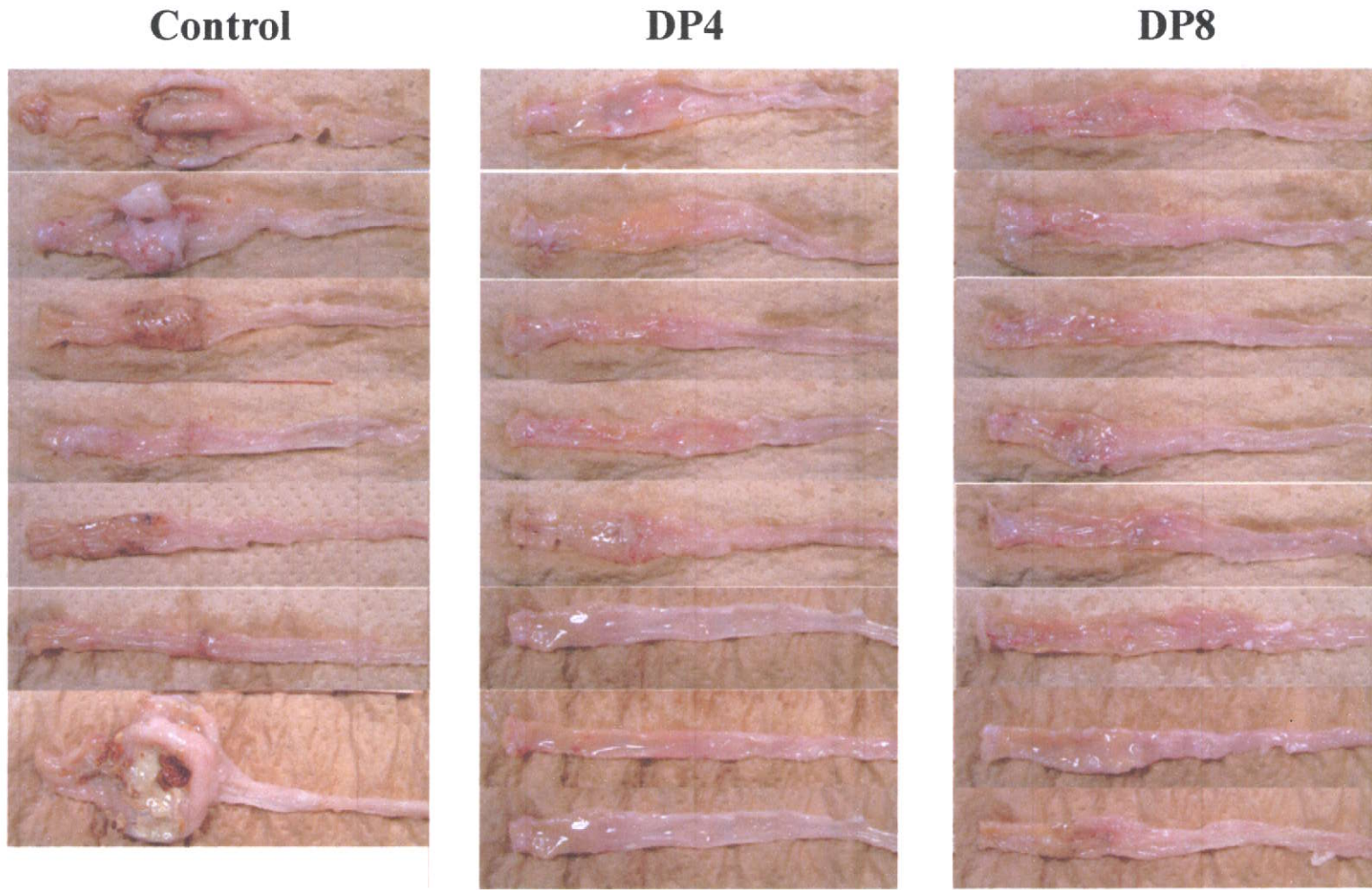


Figure 19 Macroscopic appearance of colonic lesions in rats fed the respective diets at 10 days after TNBS treatment

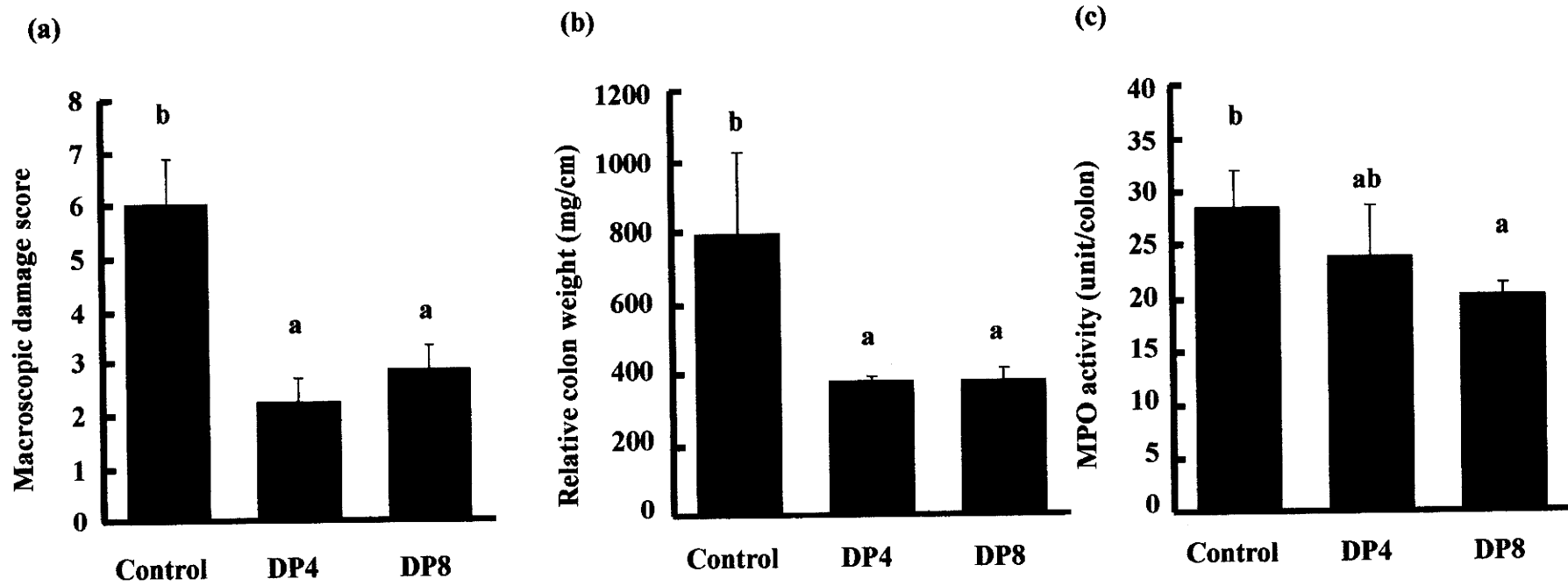


Figure 20 Macroscopic damage score (a), relative colon weight (b), and MPO activity (c) in rats fed the respective diets at 10d after TNBS administration

Data are expressed as mean \pm SE (n=8), values with different superscript letters are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

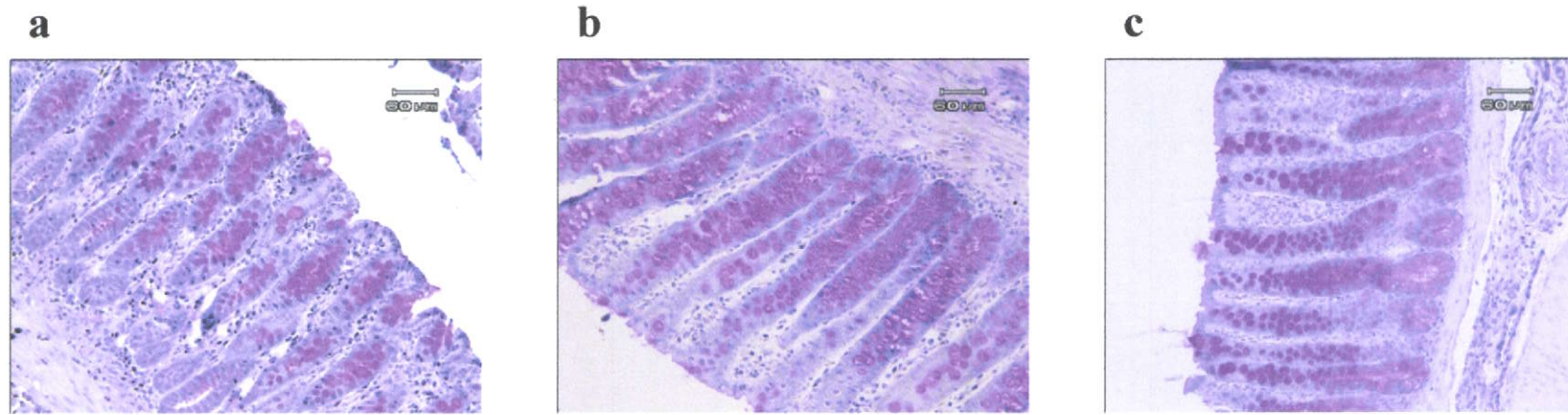


Figure 21 Histological appearance of colonic lesions in rats fed the respective diets at 10 d after TNBS administration

a, control; b, DP4; c, DP8

第4章

イヌリン型フルクタン摂取による TNBS 誘発大腸炎モデルに対する治癒促進効果

第1節 緒論

第3章では、DP4 および DP8 フルクタンの摂取は急性期での TNBS 誘発大腸炎に対する炎症抑制効果について検討した。その結果、フルクタン摂取による急性期での炎症抑制効果は TNBS 投与前のバリア機能（盲腸内 IgA およびムチン濃度）の増強による TNBS 投与後の細菌およびエンドトキシンの透過抑制を介した予防効果であると推定された。本章ではフルクタン摂取による TNBS 誘発大腸炎に対する治癒促進効果に焦点を当て検討を行った。

従来報告されている FOS 等のオリゴ糖や *lactobacilli* 等の乳酸産生菌の摂取による TNBS 誘発大腸炎に対する炎症抑制効果は、その殆どが TNBS 投与前にこれらを摂取させることで認められた予防効果であった^{34, 75, 83, 84}。これに対し TNBS 投与後（病態成立後）に試験飼料を摂取させる治癒促進効果についての報告例は限られている。

Kennedy ら⁸⁵は、ラットにおいて TNBS 投与後に *Lactobacillus plantarum* とオート麦繊維の混合物を7日間摂取させたところ、炎症抑制は認められなかったことを報告している。これに関して、彼らはこの時点での評価は急性炎症が強すぎるために治癒促進効果が得られなかったと述べている。TNBS 誘発大腸炎モデルは TNBS と EtOH 自体の腐食作用による非特異的で強烈な急性炎症（細菌やエンドトキシン透過による炎症の増幅を伴う）と TNBS でハプテン化された菌体タンパクや粘膜タンパクに対する免疫応答を伴う比較的緩やかな慢性炎症の二つの特徴をもち、急性炎症が TNBS 投与後1-2週間でピークを迎えその後、減弱するのに対し、免疫応答は TNBS 投与後2週間以降から顕著になり⁸⁶、これらが急性期の非特異的炎症と重なり慢性炎症は TNBS 投与後8週間後まで持続する⁸⁷。したがってフルクタン摂取による TNBS 誘発大腸炎に対する治癒促進効果を評価するためには急性期に比べ炎症が緩やかな慢性期で行う必要があると考えた。

本試験では、TNBS 投与9日後からフルクタン飼料を3週間摂取させ、慢性期の治癒促進効果について検討した。本試験では TNBS 投与9日後に群分けを行うため、この時点での障害の程度を群間で均一にしておく必要がある。そこで予備試験として TNBS 投与1週間後の炎症指標として大腸脱落上皮細胞とともに糞中に混入すると考えられる好中球のマーカー酵素である MPO 活性または血清中の急性炎症性タンパク

(α 1-acid glycoprotein, α AG) 濃度の検討を行うことにした。また糞MPO 活性についてはフルクタン飼料による腸内細菌叢の変化自体がMPO 活性に影響を及ぼすことがあるか、否かについても検討した。

第2節 実験方法

2.1 実験動物

試験には7週齢のSD系オスラットを用い、飼育条件は第1章に従った。ラットは対照飼料で1週間予備飼育後、第4章と同様にしてTNBS/50% EtOH 溶液を結腸内に投与し大腸炎を誘発させた。

予備実験1 対照飼料を摂取させた8匹のラットにTNBS 結腸内投与を施してから8日目に結腸および血清を採取し、組織中MPO 活性および血清中 α AG 濃度の測定を行った。また糞MPO 活性についてはTNBS/EtOH 投与後6-8日目にかけて回収した糞便を測定に用いた。

予備実験2 24匹のラットを一群8匹の3群に分け、対照飼料、6%DP4 または6%DP8 を添加した飼料のいずれかを摂取させ1週間飼育した後、糞便を回収し糞MPO 活性の測定に用いた。

本実験 実験の詳細なスケジュールはFigure 22 に記載した。対照飼料を摂取させた44匹のラットからTNBS/EtOH 投与後6, 7, 8, 9日目の糞便を回収し、MPO 活性(6-7日目) およびIgA (8-9日目) の測定に用いた。このときの糞MPO 活性と体重を基準に3群に分け対照飼料、6%DP4 または6%DP8 添加飼料(試験飼料) のいずれかを与え24日間飼育した(対照飼料群は22匹、残りの飼料群は一群11匹)。途中1週間ごとに3週間に渡り糞便を採取し、糞MPO 活性とIgA を測定した。また糞IgA についてはTNBS/EtOH 投与直前の糞も回収し測定に用いた。試験終了後、盲腸および結腸を摘出し、盲腸からは内容物を回収し、有機酸、pH およびIgA を測定し、結腸はMPO 活性の測定に用いた。なお、本試験では試験飼料の摂取開始時点を試験開始0週目とした。

2.2 糞MPO 活性の測定

糞に対し 10 倍量の HTAB 溶液を加え、ポリトロンホモジナイザーで均一化後 (4°C, 30 秒間), 遠心分離を行い (20,000 × g, 4°C, 15 分間), その上清を MPO サンプルとして用いた。MPO 活性の測定は結腸 MPO 活性の測定と同様に行い, 測定は当日中に行った。

2.3 血清中 α AG の測定

血清中 α AG の測定には α 1-acid glycoprotein ELISA kit (コスモバイオ, 東京) を使用し, 添付の説明書に従い測定した。

2.3 IgA の測定

第 1 章と同様に行った。

2.4 有機酸の測定

第 1 章と同様に行った。

2.5 結腸 MPO 活性の測定

第 3 章と同様に行った。

2.6 統計処理

第 1 章と同様に行った。

第3節 結果

予備実験 1 TNBS 投与 1 週間後の結腸 MPO 活性と血清 α AG 濃度および糞 MPO 活性との相関を解析したところ, 結腸 MPO 活性は血清 α AG 濃度とは相関せず, 糞 MPO 活性との間に有意な正の相関を示した (Figure 23-a, b)。

予備実験 2 フルクタンの摂取自体が糞 MPO 活性に影響を及ぼすことはなかった (Figure 23-c)。

本実験 糞 MPO 活性は対照群では全期間を通してほぼ一定であるのに対し, DP 4 群

では1週目で一過性の上昇を示すが、時間経過とともに低下し、3週目では対照群と同程度にまで低下した。DP8群の糞MPO活性は試験試料摂取開始から上昇を示し、2週目で最大に達し、3週目でも対照群に比べ高値($P=0.07$)を示していた(Figure 24-a)。糞IgA濃度はTNBS投与前に比べ0週目で40%の低下を示した。それ以降の変化は対照群では1週目にTNBS投与前と同程度に回復した後、試験終了時までほぼ一定であった。これに対し、フルクタン摂取群では試験飼料摂取開始から対照群に比べ常に高値を示し、DP4群では1および3週目で増加傾向、DP8群では2および3週目で有意な増加を示した(Figure 24-b)。

試験試料摂取開始から試験終了時までの総飼料摂取量は、対照群に比べDP8群で有意な低下が認められ、体重増加量も同様の傾向を示した(Table 10)。試験終了時の盲腸組織重量はDP4およびDP8群、内容物重量はDP4群で対照群に比べ有意に増加した。盲腸内pHは対照群に比べDP4、DP8群で有意に低下した(Table 10)。盲腸内SCFA濃度は対照群に比べDP4群でのみ有意な増加を示した。*n*-酪酸濃度はDP4、DP8群で有意な増加を示し、DP4群はDP8群に対しても有意な増加を示した。プロピオン酸濃度は対照群に比べDP8群で有意な低下を示した。乳酸濃度は対照群に比べDP4で有意な増加を示した(Table 10)。盲腸内IgA濃度では群間で差は認められなかった(Table 10)。

結腸相対重量は対照群に比べDP8群でのみ有意に増加していた(Figure 25-a)。一方、結腸MPO活性は対照群に比べDP4群でのみ40%程度の有意な低下を示した。(Figure 25-b)

第4節 考察

本試験はTNBS大腸炎の慢性期におけるフルクタンの治癒促進効果を検討した。急性期での評価結果から、TNBS投与前にフルクタンを摂取させると予防効果と治癒促進効果との区別ができなくなると予測されたため、本試験ではTNBS投与9日後(病態確立後)から試験飼料を与えた。その結果、治癒促進効果(結腸MPO活性の低下)はDP4群でのみ認められた。

解剖時の盲腸内SCFA濃度はTNBS投与前の結果と異なりDP4群で最高値を示

し、特に DP4 群の *n*-酪酸濃度は対照群だけでなく DP8 群に対しても有意な高い値を示した。TNBS の投与は総好気性菌やグラム陰性菌の増殖⁸⁴⁾と *Lactobacilli* や *Bifidobacteria* の減少⁸³⁾を伴う腸内細菌叢異常を呈することが報告されており、TNBS 投与を受けたラットではフルクタンは資化能力が低下していると考えられる。腸内細菌がフルクタン等の多糖を発酵基質として利用する場合、基本的には単糖にまで分解してから菌体内に取り込む。したがって、資化能力が低下している状況下では DP8 に比べ DP の低い DP4 の方が腸内細菌の基質として効果的に利用され易いのかもしい。また、*Lactobacilli* は DP2-DP3 までのフルクタンを直接菌体内に取り込み利用することが可能と報告されている³³⁾。このような DP4 と DP8 の資化性の相違が盲腸内 *n*-酪酸濃度に反映されたと考えられた。事実、本試験において DP8 群の盲腸内総有機酸量は対照群と同等であり、積極的な盲腸内発酵は認められない。また、DP4 群での盲腸内 *n*-酪酸濃度の上昇を説明する別の可能性として、長期摂取時の発酵パタンの変化が考えられる。Le Blay ら⁸⁸⁾は、FOS (DP4 と同一) を長期摂取 (8 週間) させると、短期摂取時 (2 週間) に比べ乳酸濃度が低下し、一方で *n*-酪酸濃度が上昇することを報告している。これに関して彼らは FOS の長期摂取により腸内細菌叢が変化し、乳酸を発酵基質として *n*-酪酸をはじめとする SCFA を産生する細菌が増加すると推定している。近年、乳酸を発酵基質として利用し代謝産物として *n*-酪酸を産生する *Eubacterium hallii* や *Anaerostipes caccae* の存在が報告されている⁸⁹⁾。第 1-3 章までの結果から、元来、DP4 は DP8 に比べ乳酸発酵を呈しやすい。したがって、本試験で認められた DP4 摂取による *n*-酪酸濃度の上昇には、上記の乳酸代謝細菌の適応的増加も関与しているのかもしれない。

n-酪酸は大腸上皮細胞の主要なエネルギー源であり、TNBS 大腸炎ラットにおいて *n*-酪酸注腸による組織修復作用⁹⁰⁾が報告されている。また、*n*-酪酸には抗炎症作用⁹¹⁾や TNF- α を始めとする炎症性サイトカインの発現を調節する核内転写因子である NF- κ B の発現抑制⁹²⁾などの多彩な生理作用が報告されている。したがって、本試験で認められた DP4 群の治癒促進効果は *n*-酪酸による作用を介したものと推定される。

また、本章の緒論で述べたように慢性期での炎症は減弱化された急性炎症像にアレルギー性腸炎が重なったものである。第 1 章で示したように盲腸 CD4⁺T 細胞から

抗炎症性（抑制性）サイトカインである IL-10 分泌を促進させるフルクタンは DP4 のみである。したがって、DP4 では *n*-酪酸による治癒促進効果に加え、アレルギー性腸炎に対する抑制効果が作用することで慢性期炎症に対し著効を示したと推定される。

予備試験の結果から糞 MPO 活性は TNBS 投与後 1 週間目の結腸 MPO 活性と有意な相関を示すため、これを本試験における試験期間中の炎症マーカーとして経時的に測定した。その結果、興味深いことにフルクタン摂取により糞 MPO 活性の一過性の上昇が認められた。この糞 MPO 活性の増加には先に述べたグラム陰性桿菌の増殖に伴う盲腸内エンドトキシンプールの上昇が関与すると考えられる。したがって、フルクタン摂取開始から 1-2 週間後では逆に炎症が悪化していると考えられ、DP4 による治癒促進効果の発現には少なくとも 3 週間以上の摂取期間を必要とすると考えられた。

以上をまとめると、TNBS 誘発大腸炎の慢性期における治癒促進効果は DP4 群のみで認められ、この効果には *n*-酪酸を介した組織修復作用に加え、腸管免疫の修飾が関与すると考えられた。また、本効果の発現には少なくとも 3 週間以上の摂取期間が必要であると考えられた。

Animal; SD rat, ♂, 7wk-old
 Test group; control (n=22), DP4 (n=11), DP8 (n=11)

Composition of experimental diets

Ingredients	Control	DP4	DP8
	g/kg		
Cornstarch	652.5	592.5	592.5
DP4 fructan	0	60	0
DP8 fructan	0	0	60
Casein	250	250	250
Corn oil	50	50	50
Mineral	35	35	35
Vitamin	10	10	10
Choline	2.5	2.5	2.5

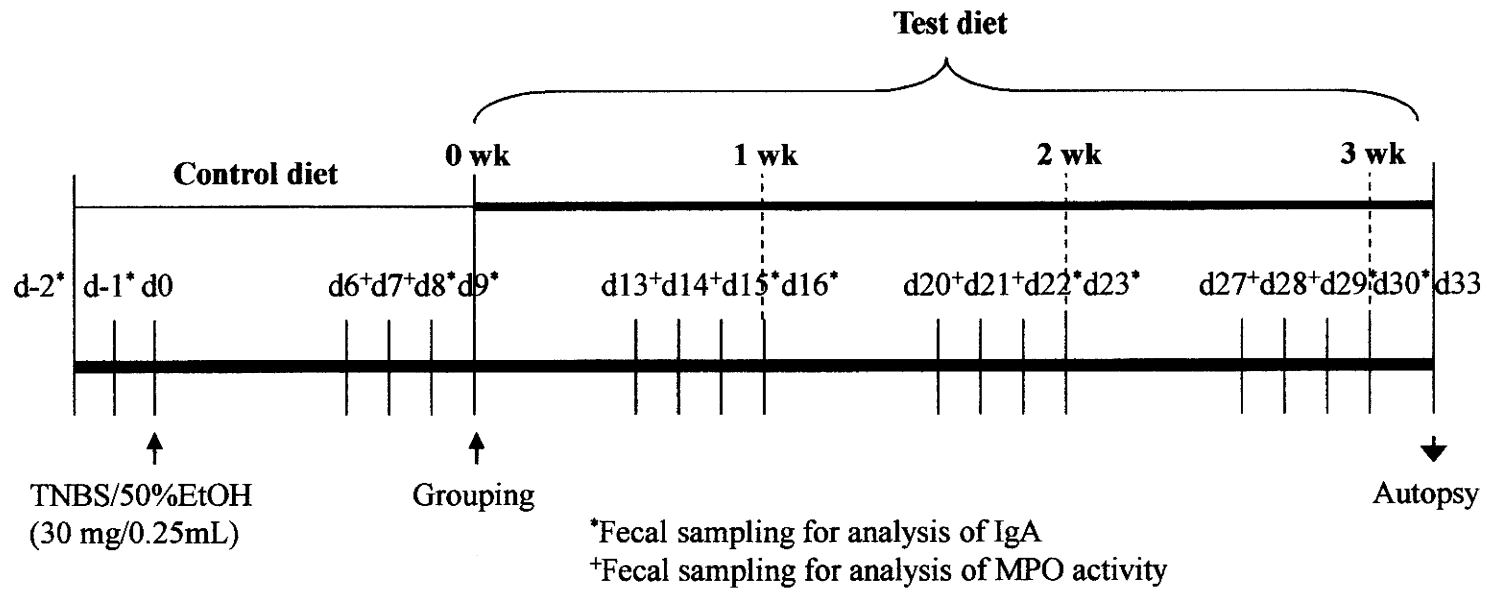


Figure 22 Experimental schedule in Chapter 4

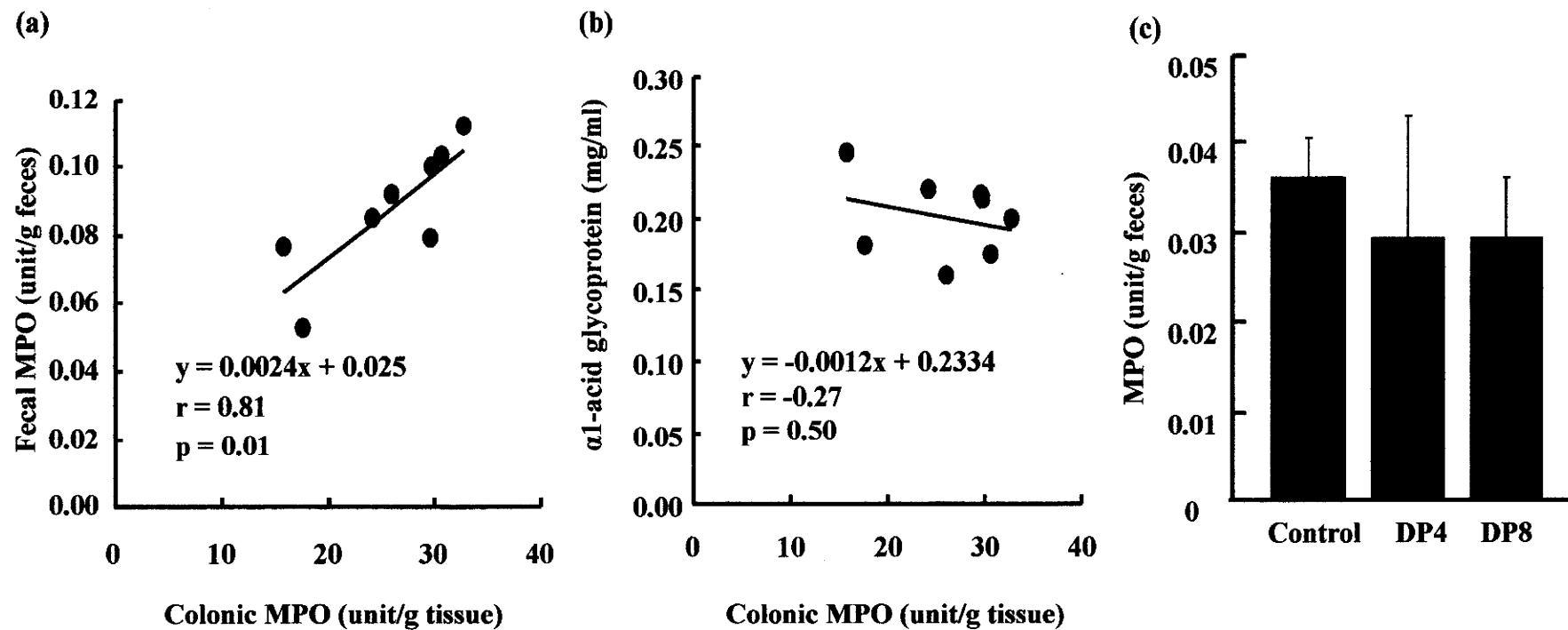


Figure 23 Correlations of colonic MPO activity and fecal MPO activity (a) or $\alpha 1$ -acidglycoprotein (b) in rats at 8d after TNBS administration (preliminary experiment 1), and effects of the fructan diet on the fecal MPO activity (c) in normal rats (preliminary experiment 2)

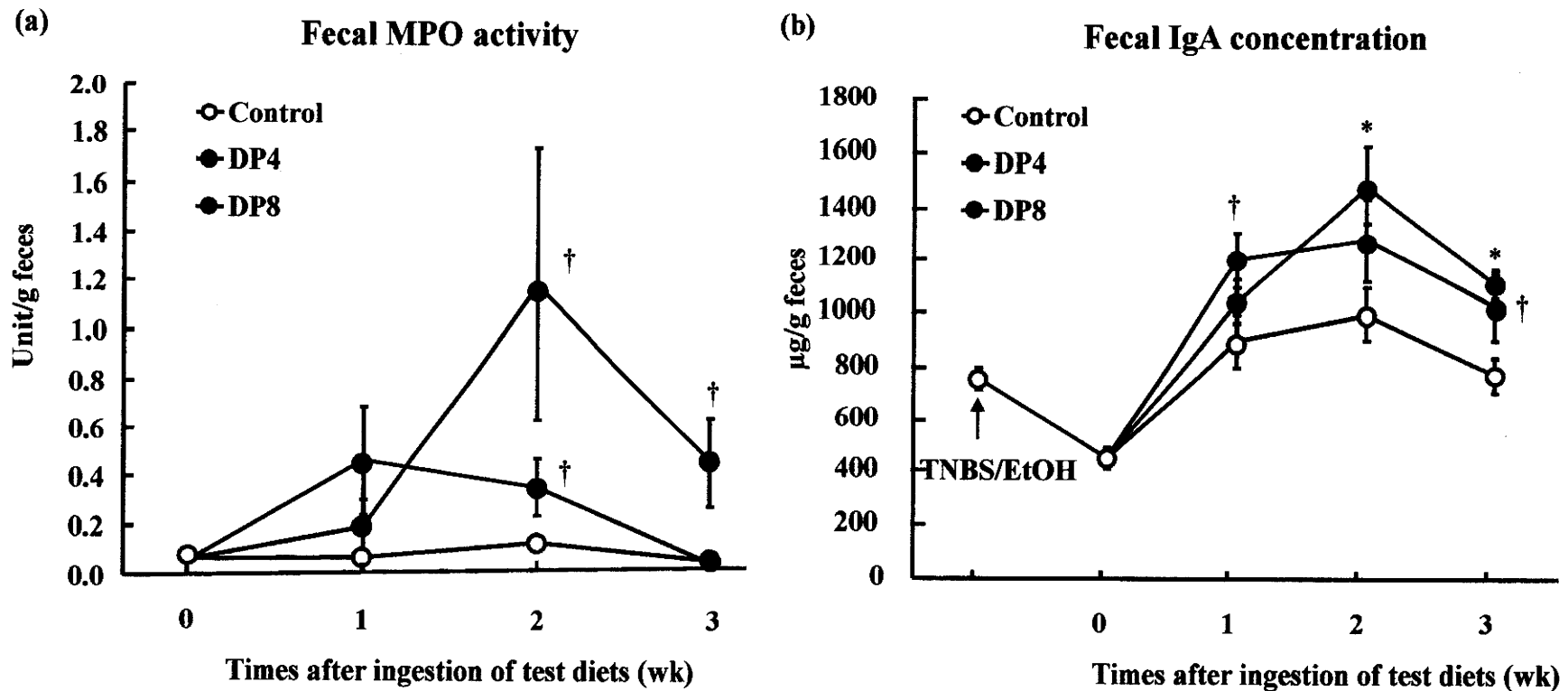


Figure 24 Changes in fecal concentrations of MPO activity (a) and IgA (b) in TNBS-induced colitis rats fed the respective diet for 3 wk

Data are expressed as mean \pm SE (Control, n=22; DP4, n=11; DP8 n=11).

* P <0.05 vs. control, † P <0.1 vs. control.

Table 10 Food intake, body weight gain and cecal variables in TNBS-induced colitis rats after ingestion of the respective diets

	Control	DP4	DP8
Food intake, g/24 d	680 ± 11 ^b	648 ± 12 ^b	575 ± 20 ^a
Body weight gain ¹ , g/24 d	423 (355-458)	411 (393-452)	382 (308-426)*
Cecum			
Tissue ¹ , g	0.8 (0.7-1.0)	1.8 (1.3-3.8)*	2.7 (1.9-4.9)*
Contents ¹ , g	2.5 (1.6-3.3)	5.2 (4.3-8.0)*	2.9 (1.7-5.1)
pH	7.6 (7.2-8.0)	6.6 (6.3-7.3)*	6.2 (5.7-7.4)*
Organic acids			
Concentration, µmol/g			
Acetate	44 ± 2	52 ± 4	50 ± 4
Propionate ¹	7 (5-9)	6 (4-37)	3 (0-4)*
<i>n</i> -Butyrate	3 ± 0 ^a	19 ± 2 ^c	11 ± 2 ^b
SCFA ²	54 ± 2 ^a	81 ± 7 ^b	64 ± 5 ^{ab}
Lactate ¹	0 (0-10)	13 (0-50)*	9 (0-25)
Succinate	30 ± 6	28 ± 3	39 ± 12
IgA			
Concentration, µg/g	609 ± 54	704 ± 96	773 ± 64

Data are expressed as mean ± SE or median (range); control, n=22; DP4, n=11; DP8 n=11. Values not sharing a common superscript letter are significantly different when analyzed by the Tukey-Kramer test.

¹Data are examined by Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Kolmogorov-Smirnov two-sample test. **P* < 0.05 vs. control.

²Sum of acetate + propionate + *n*-butyrate.

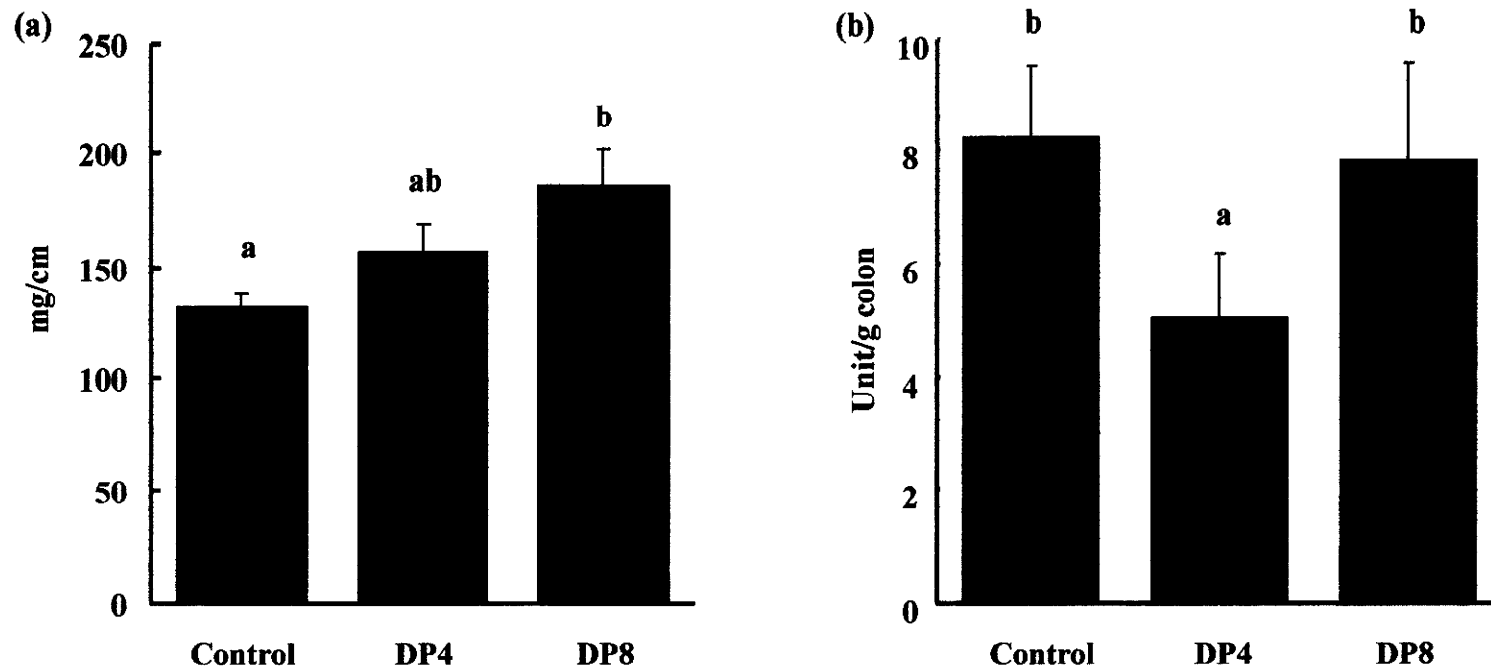


Figure 25 Relative colon weight (a) and MPO activity (b) in TNBS-induced colitis rats fed the respective diet for 3 wk

Data are expressed as mean \pm SE (control, n=22; DP4, n=11; DP8, n=11). Values with different superscript letters are significantly different when analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

第5章

TNBS 誘発再発大腸炎モデルの作成

第1節 緒論

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表されるIBDはその特徴として炎症の寛解と再発を繰り返すことで、慢性的経過を辿っていくことが知られている。本疾患は腸管免疫機能の異常が根底に存在し、その再発には腸内細菌の透過が強く関与すると考えられる²⁴⁾。これまでにFOSなどのオリゴ糖類や*lactobacilli*, *bifidobacteria*等の乳酸産生菌摂取による炎症抑制効果がIBDの病態モデルであるTNBS誘発大腸炎で報告されてきた^{34, 75, 83, 84, 93)}。しかしながら、これらの評価のほとんどはTNBS投与後2週間以内の急性期で行われており、この時点での炎症像は炎症誘発後に免疫抑制作用を示すステロイド剤であるdexamethasoneを投与しても、胸腺でT細胞の分化抑制は認められるが、結腸組織傷害スコアに変化が認められないことから⁹⁴⁾、TNBS/EtOH自体の腐食作用に端を発したBTとエンドトキシンの流入により増幅される好中球を主体とした急性炎症に過ぎない。この急性期炎症に対してFOSや乳酸産生菌の炎症抑制効果が認められるのはTNBS投与前に摂取させて場合のみであり^{34, 75, 83, 84, 93)}、TNBS投与後に摂取させても効果がないことから⁸⁵⁾、これらの効果は予防効果であると考えられる。これらの急性期での評価は、IBDの特徴である炎症の再発に対する抑制効果(寛解期の延長)を評価するモデルとしては不适当である。したがって、再発抑制効果に焦点をあて評価するためには実際の病態をより反映した炎症再発モデルが必要であると考えた。本試験ではTNBSの初回結腸内投与から5週間後にTNBSを静脈内に再投与することで炎症を再発させるTNBS誘発再発大腸炎モデルを確立するとともに、本モデルの免疫学的特徴付けを行った。

第2節 実験方法

2.1 実験動物

試験には7週齢のSD系雄ラットならびに8週齢のWistar系およびF344系雄ラットを用い、飼育条件は第1章に従い、水とともに標準飼料を自由摂取させた。TNBSの結腸内投与は第3章と同様に行った。各実験の詳細なスケジュールはFigure 26に記載した。

実験1 24匹のSDラット(体重224-240g)、24匹のWistarラット(体重165-182g)

および16匹のF344ラット(体重180-206g)は1週間の予備飼育後、TNBSを結腸内投与し炎症を誘発させた。その5週間後に各系統8匹のラットに24時間ごとに計3回TNBS/生理食塩水を尾静脈内投与し(5mg/kg)、同数のラットには対照として生理食塩水を同様に尾静脈内投与し、最終投与から24時間後に解剖し、結腸MPO活性を測定した。さらにSDおよびWistarラットについては残りの8匹に尾静脈内投与の代わりにTNBS/生理食塩水を腹腔内投与し(30mg/rat)、投与から7日後に解剖を行い、結腸MPO活性を測定した。

実験2 20匹のSD系ラット(体重231-240g)は1週間予備飼育した後、TNBS/EtOHを結腸内投与し炎症を誘発させた。炎症誘発から10日後に一部(4匹)を解剖し、結腸を摘出後、凍結ブロックを作成し、T細胞および顆粒球の免疫染色を行った。残りのラットは炎症誘発から5週間後に実験1と同様にTNBS/生理食塩水(一群8匹)または生理食塩水のみ(一群8匹)を尾静脈内投与し、最終投与から24時間後に解剖し、胃、空腸、回腸、盲腸、結腸および腎臓を摘出した。結腸は縦裂きし内容物を除いた後、縦に二分割し、一方は凍結ブロック作成後、T細胞および顆粒球の免疫染色に、他方はその他の組織とともにMPO活性の測定に用いた。

実験3 18匹のSD系ラット(体重226-253g)は1週間予備飼育した後、12匹はTNBS/EtOHの結腸内投与により炎症を誘発させ、残りの6匹は生理食塩水を結腸内投与する正常群とした。炎症誘発から5週間後、TNBS再投与前に一部のラット(6匹)を解剖し、残り6匹は実験1と同様にTNBS/生理食塩水の静脈内投与終了から24時間後に正常群とともに解剖し結腸を摘出した。結腸から粘膜固有層中CD4⁺T細胞を分離し、CD3/CD28共刺激下で培養を行い、培養上清中のサイトカイン(IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10)を測定した。

2.2 MPO活性の測定

各組織中のMPO活性の測定は第3章に記載された結腸MPO活性の測定と同様に行った。

2.3 T細胞および顆粒球の免疫染色

凍結切片の固定は第1章の IgA plasma cell の染色と同様に行った。T 細胞の染色では切片は 10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬し、100°C、20 分間反応させ抗原賦活化を行った。次いで切片は 10% H₂O₂/PBS を滴下し内因性ペルオキシダーゼのクエンチングを行った後 (室温, 10 分間), 2.5%ウマ血清 (VECTASTAIN universal Elite ABC kit, Vector laboratory) でブロッキングを行った (室温, 30 分間)。その後切片は PBS で希釈したマウス抗ラット CD3 抗体 (10 µg/mL, G4.18, BD bioscience), ビオチン化抗マウス/ウサギ抗体 (VECTASTAIN universal Elite ABC kit, Vector laboratory), アビジン-ビオチン複合体 (avidin-biotin complex, ABC) 試薬 (VECTASTAIN universal Elite ABC kit, Vector laboratory) の順で滴下し, それぞれ室温で 1 時間反応させた。また各反応の間には, wash buffer による洗浄作業 (3×2 分間) を挟んだ。次いで PBS で 500 倍希釈したテトラメチルローダミン結合チラミド (Perkin Elmer, MA, USA) を滴下し, 室温, 遮光下で 5 分間反応させた後, wash buffer で洗浄し (3×2 分間), VECTASHIELD with DAPI (Vector laboratory) で封入した。顆粒球の染色は, 切片を 2.5%ヤギ血清を含む PBS (ブロッキングバッファー) でブロッキングした後 (室温, 30 分), PBS で希釈したマウス抗顆粒球抗体 (5 µg/mL, HIS24, eBioscience) を滴下し室温で 1 時間反応させた。wash buffer 中で切片を洗浄後 (3×2 分間), ブロッキングバッファーで希釈した Alexa fluor 546 標識ストレプトアビジン (1:200, Invitrogen, USA) を滴下し室温で 1 時間反応させ, 最後に VECTASHIELD with DAPI (Vector laboratory) で封入した。

2.4 結腸粘膜固有層 CD4⁺T 細胞の分離と培養

第1章の盲腸粘膜固有層 CD4⁺T 細胞と同様に分離, 培養を行った。ただし, 培養時間は 48 時間で行った。

2.5 サイトカインの測定

IFN- γ , IL-4, IL-6 および IL-10 の測定は第3章と同様の ELISA set を使用した。IL-2 の測定には R&D systems 社 (MN, USA) の Rat IL-2 Duoset を用い, 添付の説明書に従い測定した。

2.6 統計処理

結果は平均値と標準誤差（等分散）で示した。各データは Bartlett 検定により分散の均一性を確認した後、再発群と対照群または正常群との間で Student's-T test を行い、危険率が 5%未満のとき、有意とみなした。

第3節 結果

実験1 試験の結果、結腸 MPO 活性の有意な上昇が認められたのは、SD ラットの尾静脈内投与群のみであった (Figure 27)。

実験2 TNBS 投与 10 日後の急性期の結腸組織には T 細胞の集積は少なく、顆粒球の集積が顕著に認められた (Figure 28)。TNBS 投与から 5 週間後の生理食塩水を再投与した対照群の結腸組織では T 細胞の集積は少なく、顆粒球の集積も認められなかった (Figure 28)。これに対し TNBS を再投与した再発群では明確な T 細胞の集積が認められ、急性期ほどではないが顆粒球の集積も認められた (Figure 28)。また、TNBS 再投与による MPO 活性の有意な上昇は結腸に局限されていた (Figure 29)。

実験3 TNBS 再投与後の結腸 CD4⁺T 細胞からのサイトカイン分泌は正常ラットならびに TNBS 再投与前に比べ、IFN- γ 、IL-10、IL-2、IL-4、IL-6 の全てが有意に上昇していた (Figure 30)。

第4節 考察

本研究ではフルクタン摂取による IBD 再発抑制を評価するための病態モデルとして TNBS 誘発再発大腸炎モデルの確立を目的とし、ラットの系統および TNBS 再投与経路について検討を行うとともにその免疫学的特徴付けを行った。その結果、再発は SD ラットでのみ認められ、MPO 活性は再投与経路を尾静脈内投与としたとき最も強く誘導され、対照群に比べ約 3 倍にまで上昇した。既報では Wistar ラットにおいても再発モデルが確認されているのに対し^{95,96)}、本試験では Wistar ラットでの再発は確認できなかった。このラット系統間での再発に対する感受性の違いが何に基づくものであるか不明であるが、元来、TNBS 大腸炎の程度が腸内細菌叢の相違によって変動

することから⁹³⁾、系統間の遺伝的な違いでなく、むしろ両系統間で定着している腸内細菌叢の違いによると推定される。

また本再発モデルは TNBS 再投与時に結腸でのみ特異的に MPO 活性が上昇すること、急性期と異なり結腸組織に T 細胞の集積が認められることが明らかになった。TNBS 誘発大腸炎モデルはラットでは TNBS 投与 2 週間以降で Th1 サイトカインである IFN- γ の発現上昇が認められ⁸⁶⁾、マウスでは TNBS 投与後 7 日目の結腸 CD4⁺T 細胞の CD3/CD28 共刺激培養結果から、IFN- γ 分泌は誘導されるが、Th2 サイトカインである IL-4 の分泌は誘導されないことから⁶⁹⁾、一般に Th1 型の大腸炎モデルとされている。しかしながら、このモデルの炎症像は慢性期においても免疫反応を伴う炎症（慢性炎症）と同時に免疫反応と無関係な非特異的炎症（急性炎症）が重なっており、両者の識別は困難であると考えられる。これに対し、TNBS 再発大腸炎では TNBS 結腸内投与 5 週間後の急性炎症がほぼ治まった状態で TNBS 尾静脈内投与により炎症を再発させているため、急性炎症の残像がないアレルギー性腸炎モデルであると推定される。同様のモデルはこれまで 2 つの研究室から報告されているが^{86,94)}、それらの免疫学的解析は損傷部位への T 細胞の集積や IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 および IL-10 mRNA 発現上昇といった組織学的または遺伝子発現レベルの結果からしか行われていない⁸⁶⁾。一方、我々は再発前後の結腸粘膜固有層から CD4⁺T 細胞を分離し、CD3/CD28 共刺激を行いタンパク質レベルでサイトカインプロファイルを解析した。その結果、再発後ラットでは Th1 (IL-2, IFN- γ) および Th2 サイトカイン (IL4, IL-6, IL-10) の両者が正常ラットならびに再発前ラットに比べ有意に増加しており、本モデルは Th1, Th2 免疫反応が組み合わさった腸管免疫異常を伴う再発大腸炎モデルであることが明らかになった。

以上の結果より TNBS 誘発再発大腸炎モデルは TNBS 再投与により結腸特異的な炎症を再発し、Th1, Th2 免疫反応が組み合わさった腸管免疫異常を伴うことが明らかとなった。現在本モデルを用いたフルクタン摂取による再発大腸炎抑制効果について検討中である。

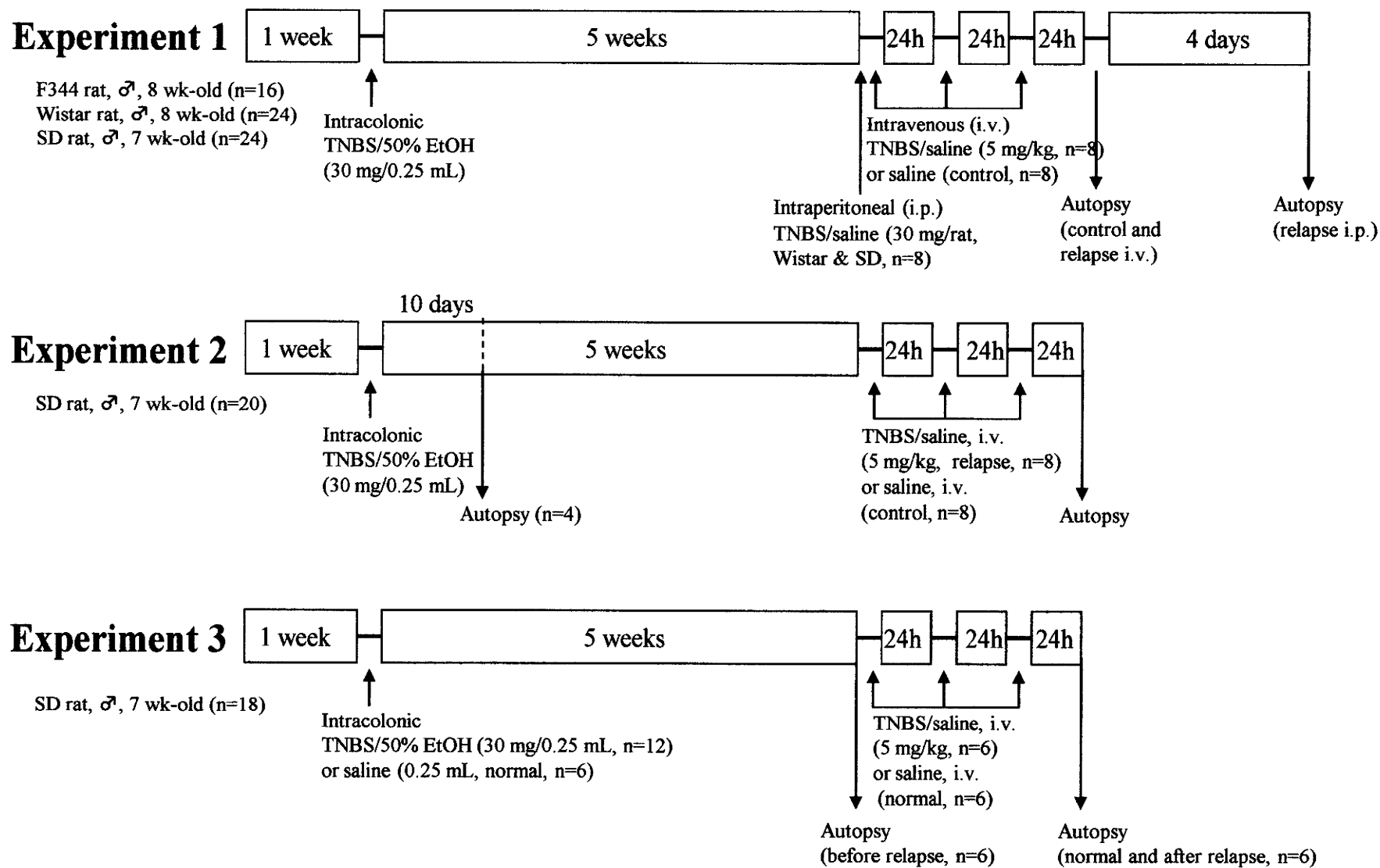


Figure 26 Experimental schedules in Chapter 5

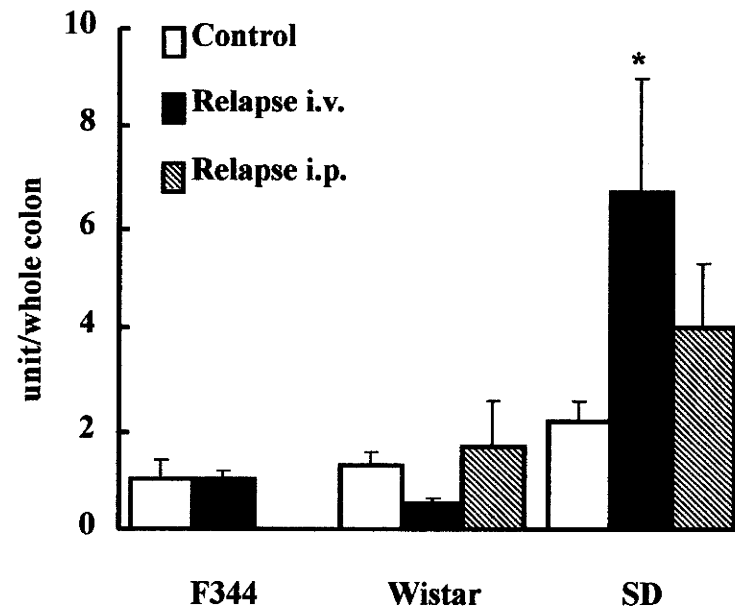


Figure 27 Colonic MPO activity in rats with different strains (F344, Wistar and SD) relapsed by intravenous (5 mg/kg) or intraperitoneal (30mg/rat) injection of TNBS at 5 wk after intracolonic administration of TNBS/EtOH

Control groups were re-administrated saline i.v. at 5 wk after intracolonic administration of TNBS/ EtOH.

Data are expressed as mean \pm SE (n=8). *P<0.05 vs. control.

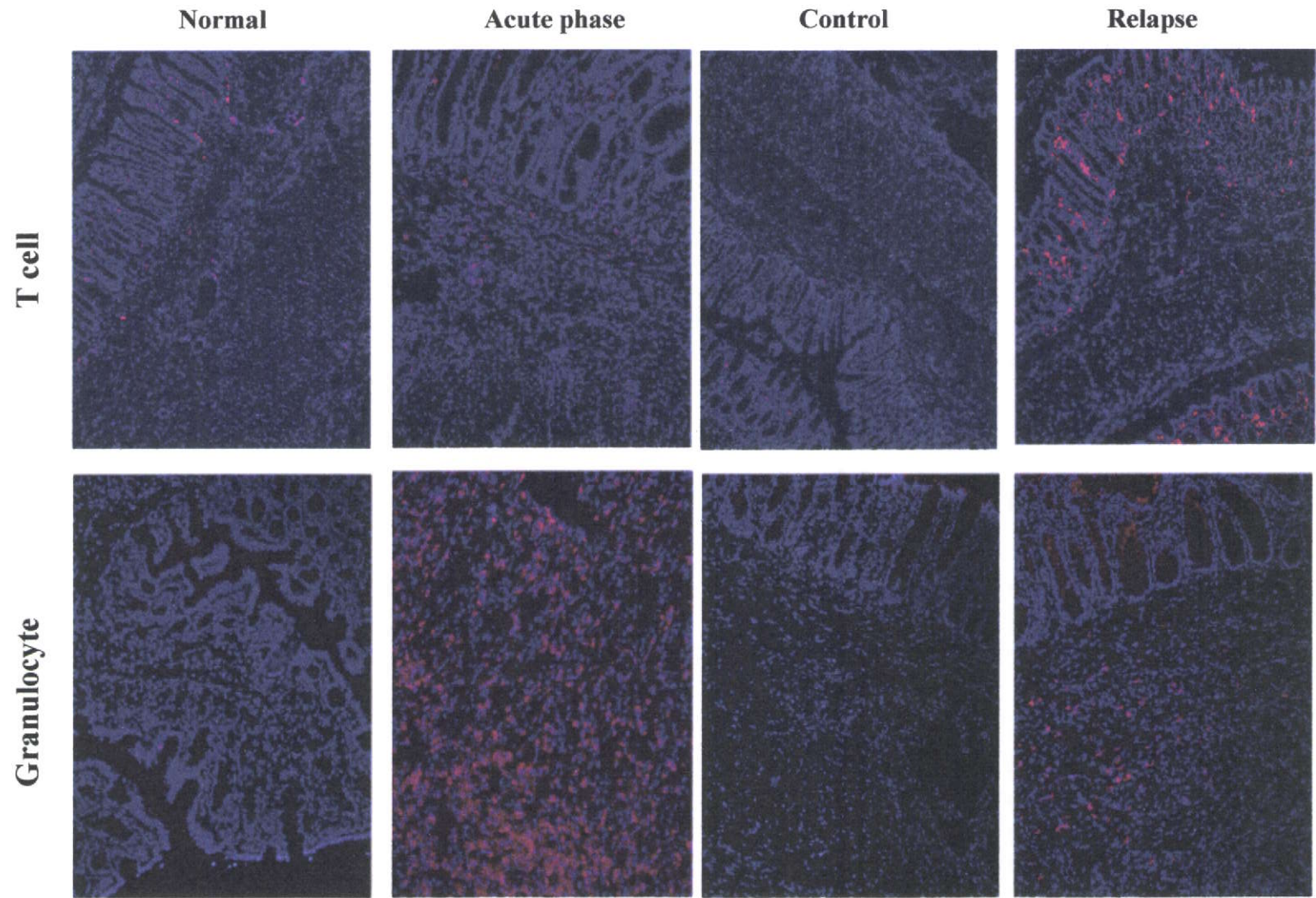


Figure 28 Fluorescent immunostaining of T cell (CD3) and granulocyte in the colon

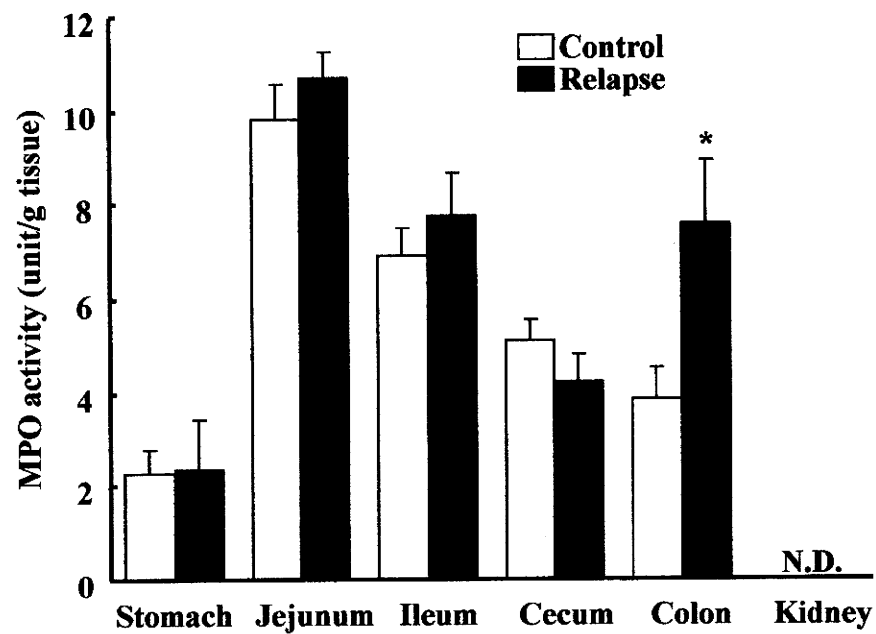


Figure 29 MPO activity in various tissues in rats re-administrated TNBS (relapse) or saline (control) at 5 wk after intracolonic administration of TNBS/EtOH

Data are expressed as mean \pm SE (n=8). *P<0.05 vs. control.
N.D.: not detected.

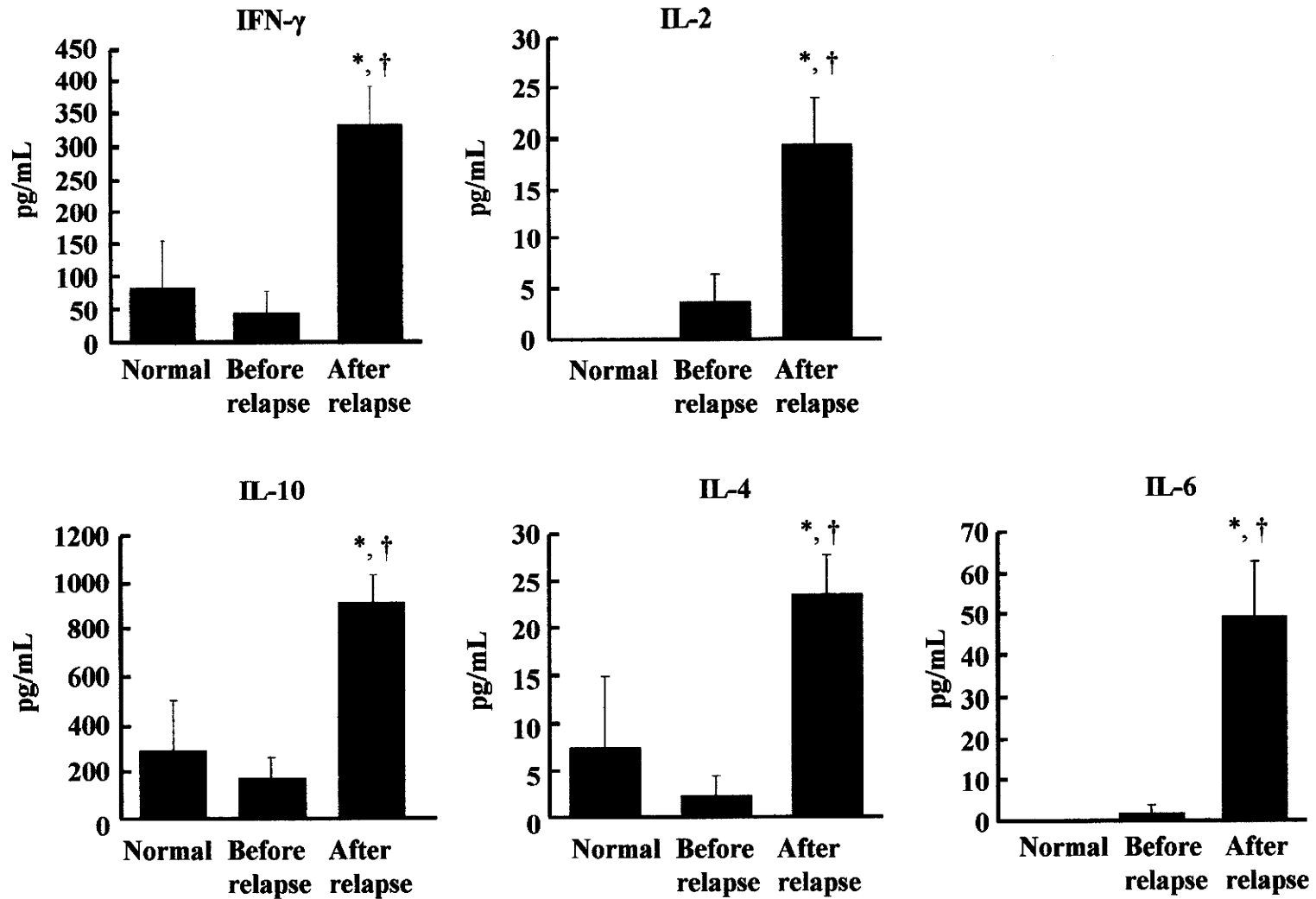


Figure 30 Cytokine production of colonic lamina propria CD4⁺ T cells stimulated with anti-rat CD3/CD28 in rats before (before relapse) and after re-administration of TNBS (after relapse) at 5 wk after intracolonic administration of TNBS/EtOH

Data are expressed as mean \pm SE (n=6). *P<0.05 vs. normal, †P<0.05 vs. before relapse.

総括

本研究ではDPの異なるフルクタン (DP4, DP8, DP16, DP23) をラットに摂取させたときの大腸バリア機能に及ぼす影響について盲腸内IgAおよびムチン量に焦点を当て解析し、さらにこれらの上昇がIBDの予防に果たす役割について明らかにした。

DPの異なるフルクタン摂取時の盲腸内発酵パターンは発酵速度が速いと予測される低DP側 (DP4, DP8) では乳酸発酵を呈し、発酵速度が緩やかだと予測される中-高DP側 (DP8, DP16, DP23) ではSCFA産生量が増加した。このとき盲腸内IgA量は低DP側 (DP4, DP8) で高値を示し、乳酸量および盲腸内 *lactobacilli* 数との間に高い有意な相関が認められた。一方、盲腸内IgA量は *bifidobacteria* 数および総菌数との間には有意な相関が認められなかったことから、フルクタン摂取による盲腸内IgA分泌促進は *lactobacilli* を介した免疫修飾によることが明らかとなった。また、DP4の摂取は、盲腸IgA plasma cellを増加させるだけでなく、盲腸粘膜固有層中CD4⁺T細胞からのIFN- γ およびIL-10分泌を促進させることが明らかとなった。一方盲腸内ムチン量は中-高DP側 (DP8, DP16, DP23) で増加するが、この増加にはSCFAを介した分泌促進に加え、低pHによるムチン分解活性の抑制が関与することを明らかにした。また、フルクタン摂取はムチン糖鎖種に影響を及ぼさなかった。

フルクタン摂取によるIBD抑制効果を評価する目的でバリア機能の主要因であるムチン、IgA量とともに高めるDP8と、既報で炎症抑制効果が示されているDP4を陽性対照として用い、IBD病態モデルであるTNBS誘発大腸炎に対する炎症抑制作用について解析を行った。その結果、急性期ではDP4およびDP8、慢性期ではDP4で炎症抑制作用が認められ、この作用は急性期ではTNBS投与前投与前の盲腸内ムチンおよびIgA濃度の上昇によるTNBS投与3日後の細菌透過やエンドトキシンの流入抑制を介した予防効果であり、一方慢性期では *n*-酪酸産生上昇による組織修復作用を介した治癒促進効果であることを明らかにした。

また、これらフルクタンのIBDに対する予防および治癒促進効果に加え、IBDの特徴である再発に対する抑制効果を評価する目的で、臨床をより反映したTNBS誘発再発大腸炎モデルを確立させ、その免疫学的特徴付けを行った。その結果、本モデルは、結腸特異的に炎症が再発し、T細胞の集積が認められ、Th1/Th2免疫応答が複雑

に組み合わさった大腸炎モデルであることを明らかにした。現在、本モデルを用いてフルクタン摂取による再発抑制効果について解析中である。

参考文献

1. Bollinger RR, Mary Lou E, Daniel P, Stephanie DL, Shu SL, William P. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology*. 2003;109:580-7.
2. Bollinger RR, Everett ML, Wahl SD, Lee Y-H, Orndorff PE, Parker W. Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili. *Mol Immunol*. 2006;43:378-87.
3. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000;101:455-8.
4. Per B, Finn-Eirik J. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev*. 2005;206:32-63.
5. Kawai G, Taniguchi H, Nakamura M. Polyfructan and oligofructans synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Agric Biol Chem*. 1973;37:2111-9.
6. Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, Plaisancie P. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*. 2000 Feb;46:218-24.
7. Sakata T, Setoyama H. Local stimulatory effect of short-chain fatty acids on the mucus release from the hindgut mucosa of rats (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1995;111:429-32.
8. Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000;125:525-31.
9. Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of *bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 1995;108:975-82.
10. Kaplan H, Hutkins RW. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and *bifidobacteria*. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:2682-4.

11. Hosono A, Ozawa A, Kato R, Ohnishi Y, Nakanishi Y, Kimura T, Nakamura R. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67:758-64.
12. Roller M, Rechkemmer G, Watzl B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J Nutr.* 2004;134:153-6.
13. Gaku H, Fang H, Manabu K, Akira H, Kyoko T, Shuichi K. Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch. *Microbiol Immunol.* 2009;53:475-80.
14. 国東礼美, 小土井理恵, 安田隆弘, 早川克志, 高橋宜聖, 八村敏志. *Lactobacillus plantarum* AYA の樹状細胞を介したIgA産生誘導機構. 日本食品免疫学会 2008年度大会; 2008年. p. 83.
15. Lemaitre-Coelho I, Jackson GD, Vaerman JP. Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. *Scand J Immunol.* 1978;8:459-63.
16. Roberfroid MB, Van Loo JAE, Gibson GR. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr.* 1998;128:11-9.
17. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* 2003;62:67-72.
18. Morita T, Kasaoka S, Ohhashi A, Ikai M, Numasaki Y, Kiriya S. Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *J Nutr.* 1998;128:1156-64.
19. Morita T, Kasaoka S, Hase K, Kiriya S. Oligo-L-methionine and resistant protein promote cecal butyrate production in rats fed resistant starch and fructooligosaccharide. *J Nutr.* 1999 July 1, 1999;129:1333-9.
20. Cotter PD, Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:429-53.
21. Sanchez B, Champomier-Verges M-C, Collado MdC, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Zagorec M. Low-pH adaptation and the acid tolerance

- response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. Appl Environ Microbiol. 2007;73:6450-9.
22. Filipe MI. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. Invest Cell Pathol. 1979;2:195-216.
 23. Rhodes JM. Colonic mucus and mucosal glycoproteins: the key to colitis and cancer? Gut. 1989;30:1660-6.
 24. Monica P, Maria Teresa M, Ping-Chang Y, Jennifer J, Mary HP, Patri V. Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. Inflamm Bowel Dis. 2006;12:843-52.
 25. Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. Immunol Rev. 2005;206:83-99.
 26. Hidaka H, Hirayama M, Yamada K. Fructooligosaccharide enzymatic preparation and biofunction. J Carbohydr Chem. 1991:509-22.
 27. Wada T, Ohguchi M, Iwai Y. A novel enzyme of *Bacillus* sp. 217C-11 that produces inulin from sucrose. Biosci Biotechnol Biochem. 2003;67:1327-34.
 28. Grewal HM, Hemming Karlsen T, Vetvik H, Ahr inverted question mark C, Gjessing HK, Sommerfelt H, Haneberg B. Measurement of specific IgA in faecal extracts and intestinal lavage fluid for monitoring of mucosal immune responses. J Immunol Methods. 2000;239:53-62.
 29. Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *lactobacillus* species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol. 2004;42:3128-36.
 30. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. J Appl Microbiol. 2004;97:1166-77.
 31. Kuo IL, Chainarong T, Kathryn C. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. Immunol Rev. 2003;194:19-28.
 32. Janelidze S, Enell K, Visse E, Darabi A, Salford LG, Siesjo P. Activation of purified

allogeneic CD4⁺ T cells by rat bone marrow-derived dendritic cells induces concurrent secretion of IFN- γ , IL-4, and IL-10. *Immunol Lett.* 2005;101:193-201.

33. Kaplan H, Hutkins RW. Metabolism of Fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:2217-22.

34. Lara-Villoslada F, de Haro O, Camuesco D, Comalada M, Velasco J, Zarzuelo A, Xaus J, Galvez J. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. *Eur J Nutr* 2006;45:418-25.

35. Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourie B, Brouns F, Bornet FR. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal *bifidobacteria* in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1658-64.

36. Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Raimondi S, Matteuzzi D, Rossi M. Administration of folate-producing *bifidobacteria* enhances folate status in Wistar rats. *J Nutr.* 2007;137:2742-6.

37. Suzuki N, Aiba Y, Takeda H, Fukumori Y, Koga Y. Superiority of 1-kestose, the smallest fructo-oligosaccharide, to a synthetic mixture of fructo-oligosaccharides in the selective stimulating activity on *bifidobacteria*. *Biosci Microflora.* 2006;25:109-16.

38. Nagura T, Hachimura S, Kaminogawa S, Aritsuka T, Itoh K. Characteristic intestinal microflora of specific pathogen-free mice bred in two different colonies and their influence on postnatal murine immunocyte profiles. *Exp Animals.* 2005;54:143-8.

39. Erfle JD, Boila RJ, Teather RM, Mahadevan S, Sauer FD. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *J Dairy Sci.* 1982;65:1457-64.

40. Macpherson AJ, McCoy K. APRIL in the intestine: a good destination for immunoglobulin A2. *Immunity.* 2007;26:755-7.

41. Nakamura Y, Nosaka S, Suzuki M, Nagafuchi S, Takahashi T, Yajima T, Takenouchi-Ohkubo N, Iwase T, Moro I. Dietary fructooligosaccharides up-regulate

immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. Clin Exp Immunol. 2004;137:52-8.

42. Lindh E. Increased resistance of immunoglobulin a dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. J Immunol. 1975;114:284-6.
43. Frandsen EV, Reinholdt J, Kilian M. Enzymatic and antigenic characterization of immunoglobulin A1 proteases from *Bacteroides* and *Capnocytophaga* spp. Infect Immun. 1987;55:631-8.
44. Fujiyama Y, Kobayashi K, Senda S, Benno Y, Bamba T, Hosoda S. A novel IgA protease from *Clostridium* sp. capable of cleaving IgA1 and IgA2 A2m(1) but not IgA2 A2m(2) allotype paraproteins. J Immunol. 1985;134:573-6.
45. Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher RE. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* Produce Immunoglobulin A1 protease. Infect Immun. 1979;26:143-9.
46. Mortensen SB, Kilian M. Purification and characterization of an immunoglobulin A1 protease from *Bacteroides melaninogenicus*. Infect Immun. 1984;45:550-7.
47. Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. J Biol Chem. 1999;274:31751-4.
48. Theodoropoulos G, Carraway KL. Molecular signaling in the regulation of mucins. J Cell Biochem. 2007;102:1103-16.
49. Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. Gut. 2000;47:589-94.
50. Fontaine N, Meslin JC, Lory S, Andrieux C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. Br J Nutr. 1996;75:881-92.
51. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated *bifidobacteria* in gnotobiotic rats. Br J Nutr. 2003;89:597-606.

52. Lien KA, McBurney MI, Beyde BI, Thomson AB, Sauer WC. Ileal recovery of nutrients and mucin in humans fed total enteral formulas supplemented with soy fiber. *Am J Clin Nutr.* 1996;63:584-95.
53. Bovee-Oudenhoven IM, Termont DS, Heidt PJ, Van der Meer R. Increasing the intestinal resistance of rats to the invasive pathogen *Salmonella enteritidis*: additive effects of dietary lactulose and calcium. *Gut.* 1997;40:497-504.
54. Tanabe H, Ito H, Sugiyama K, Kiriyama S, Morita T. Dietary indigestible components exert different regional effects on luminal mucin secretion through their bulk-forming property and fermentability. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:1188-94.
55. Crowther RS, Wetmore RF. Fluorometric assay of *O*-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal biochem.* 1987;163:170-4.
56. Tsuboi Y, Kim Y, Paparella MM, Chen N, Schachern PA, Lin J. Pattern changes of mucin gene expression with pneumococcal otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2001;61:23-30.
57. Soga K, Yamauchi J, Kawai Y, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Mitsufuji S, Yoshikawa T, Arizono N. Alteration of the expression profiles of acidic mucin, sialyltransferase, and sulfotransferases in the intestinal epithelium of rats infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitol Res.* 2008;103:1427-34.
58. Hedemann MS, Theil PK, Bach Knudsen KE. The thickness of the intestinal mucous layer in the colon of rats fed various sources of non-digestible carbohydrates is positively correlated with the pool of SCFA but negatively correlated with the proportion of butyric acid in digesta. *Br J Nutr.* 2009;102:117-25.
59. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-94.
60. Shiau SY, Chang GW. Effects of dietary fiber on fecal mucinase and beta-glucuronidase activity in rats. *J Nutr.* 1983;113:138-44.
61. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry.* 1944;153:375-80.

62. Somogyi M. Notes on sugar determination. *J Biol Chem.* 1952;195:19-23.
63. Fukumoto H, Chang G. Manual salicylate hypochlorite procedure for determination of ammonia in Kjeldahl digests. *J Assoc Off Anal Chem.* 1982;65:1076-9.
64. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
65. Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyl esterase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immun.* 1992;60:3971-8.
66. Corfield AP, Wagner SA, O'Donnell LJ, Durdey P, Mountford RA, Clamp JR. The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyl esterase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin. *Glycoconj J.* 1993;10:72-81.
67. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1469-76.
68. Willis CL, Cummings JH, Neale G, Gibson GR. *In vitro* effects of mucin fermentation on the growth of human colonic sulphate-reducing bacteria: ECOLOGY. *Anaerobe.* 1996;2:117-22.
69. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med.* 1995;182:1281-90.
70. Gardiner KR, Anderson NH, Rowlands BJ, Barbul A. Colitis and colonic mucosal barrier dysfunction. *Gut.* 1995;37:530-5.
71. Tatsumi Y, Lichtenberger LM. Molecular association of trinitrobenzenesulfonic acid and surface phospholipids in the development of colitis in rats. *Gastroenterology.* 1996;110:780-9.
72. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology.* 1992;102:1524-34.
73. Neilly PJD, Gardiner KR, Kirk SJ, Jennings G, Anderson NH, Elia M, Rowlands BJ.

- Endotoxaemia and cytokine production in experimental colitis. Br J Surg. 1995;82:1479-82.
74. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, Barr JG, Halliday MI, Rowlands BJ. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. Br J Surg. 1993;80:512-6.
 75. Cherbut C, Michel C, Lecannu G. The Prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. J Nutr. 2003;133:21-7.
 76. Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 1995;268:G622-30.
 77. Levin J, Bang F. Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorrh 1968:186-97.
 78. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Investig Dermatol. 1982;78:206-9.
 79. Enss ML, Müller H, Schmidt-wittig U, Kownatzki R, Coenen M, Hedrich HJ. Effects of perorally applied endotoxin on colonic mucins of germfree rats. Scand J Gastroenterol. 1996;31:868 - 74.
 80. Wang Z, Xiao G, Yao Y, Guo S, Lu K, Sheng Z. The role of *bifidobacteria* in gut barrier function after thermal injury in rats. J Trauma. 2006;61:650-7.
 81. Wang ZT, Yao YM, Xiao GX, Sheng ZY. Risk factors of development of gut-derived bacterial translocation in thermally injured rats. World J Gastroenterol. 2004;10:1619-24.
 82. El-Nezami H, Polychronaki N, Salminen S, Mykkanen H. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. Appl Environ Microbiol. 2002;68:3545-9.
 83. Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailon E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, et al. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. Br J Nutr. 2007;97:96-103.
 84. Lamine F, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L, Theodorou V. Colonic responses to

Lactobacillus farciminis treatment in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats.

Scand J Gastroenterol. 2004;39:1250-8.

85. Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K, Kirk SJ, Gardiner KR. Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis. Scand J Gastroenterol. 2000;35:1266 - 71.

86. Sun FF, Lai PS, Yue G, Yin K, Nagele RG, Tong DM, Krzesicki RF, Chin JE, Wong PY. Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat. Inflammation. 2001;25:33-45.

87. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology. 1989;96:795-803.

88. Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbut C. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. J Nutr. 1999;129:2231-5.

89. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. Appl Environ Microbiol. 2004;70:5810-7.

90. Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. Gut. 1996;38:568-73.

91. Saemann MD, Bohmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stockl J, Horl WH, Zlabinger GJ. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. FASEB J. 2000;00-0359fje.

92. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. Gut. 2000;47:397-403.

93. Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius*

ssp. salivarius, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol.* 2005 7;11:5185-92.

94. Palmen MJ, Dieleman LA, Soesatyo M, Pena AS, Meuwissen SG, van Rees EP.

Effects of local budesonide treatment on the cell-mediated immune response in acute and relapsing colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 1998;43:2518-25.

95. Wallace JL, McKnight W, Asfaha S, Liu DY. Reduction of acute and reactivated colitis in rats by an inhibitor of neutrophil activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998;274:G802-8.

96. Appleyard CB, Wallace JL. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1995;269:G119-25.

謝辞

本研究を遂行するにあたり適切な御助言を賜り、数多くの御尽力を頂きました、森田達也教授に心より感謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、多大な御援助を戴くとともに、本論文をまとめるに際して御高閲を戴いた河岸洋和教授、塩尻信義教授ならび近藤満准教授に心より感謝致します。

また、本研究を行うにあたり、イオンクロマトによる SO_4 の分析について後助言を頂きました森田明雄教授ならびにフローサイトメーターを用いた菌数測定やリアルタイム PCR による乳酸菌の定量法を教えて頂いた北海道大学園山慶准教授に心より感謝いたします。

最後に、本実験遂行中に多大なるご協力を頂きました静岡大学農学部応用生物化科食品栄養化学研究室の皆様心より御礼申し上げます。