

博士学位論文

GH32 酵素に着目した

短鎖・長鎖フルクタン併用摂取による
動物モデルでの食物アレルギー抑制効果および
ヒト腸内細菌叢応答と食事との関連

2026年2月

名古屋学芸大学大学院

栄養科学研究科

高橋秀明

目次

第一章 序論.....	3
第二章 短鎖・長鎖フルクタン併用摂取による食物アレルギー予防効果の評価.....	5
目的.....	5
材料と方法.....	5
結果.....	13
考察.....	20
第三章 短鎖・長鎖フルクタン併用摂取による食物アレルギー改善効果の評価.....	24
目的.....	24
材料と方法.....	24
結果.....	27
考察.....	32
第四章 ヒトにおける短鎖および長鎖フルクタン併用摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響.....	37
目的.....	37
材料と方法.....	38
結果.....	41
考察.....	52
第五章 総合考察.....	56
謝辞.....	58
略語.....	60
参考文献.....	61
補足資料.....	73

第一章

序論

食物アレルギーは、「特定の食品への曝露によって再現性をもって生じる特異的免疫反応に起因する健康への悪影響」と定義され[1]、世界的に増加傾向にあることから重要な公衆衛生上の課題である[2]。先進国における小児の有病率は約3~6%とされ[3]、日本では約10%と報告されており、主な原因食品として卵、牛乳、小麦、ナッツ類などが挙げられる[4]。発症要因は完全には解明されていないが、食事内容、衛生状態、遺伝的素因、性別など、複数の因子が関与すると考えられている[3,5]。症状は軽度の皮膚症状から生命を脅かすアナフィラキシーまで多岐にわたり、患者や家族の生活の質を著しく損ない、社会経済的負担も大きい[3,6]。

食物アレルギーの治療法として経口免疫療法（oral immunotherapy: OIT）やアレルゲン除去・代替食が行われているが、OITにはアナフィラキシーなどの重篤な副作用や治療継続の負担が伴い、除去・代替食はカルシウムやビタミン欠乏、経済的負担、製造過程でのコンタミネーションリスク、さらには社会的孤立感の増大などの課題を有する[7,8]。したがって、安全性と実用性を兼ね備えた新たな予防・治療戦略の開発が強く求められている。

近年、腸内細菌叢がヒトの健康と疾患、特に免疫系の発達と調節において重要な役割を果たすことが明らかにされつつある[9]。例えば、卵アレルギー児と健常児の糞便細菌叢を比較した研究では、アレルギー児において細菌叢の乱れが確認されている[10]。また、Feehleyらは健常児または牛乳アレルギー児の糞便を無菌マウスに移植したところ、健常児由来の細菌を定着させたマウスは牛乳アレルゲンによるアナフィラキシー反応から保護されることを報告した[11]。これらの研究は、腸内細菌叢とアレルギー疾患との間に強い関連があること、そして腸内細菌叢を標的とした介入が新たな戦略となり得ることを示唆している。

これらの治療・管理アプローチの中でも、プレバイオティクスは近年大きな注目を集めている。プレバイオティクスは2008年の国際プロバイオティクス・プレバイオティクス科学協会（ISAPP）により、「選択的に発酵され、腸内微生物叢の構成および活性に特定の変化をもたらし、宿主の健康に利益をもたらす成分」と定義されている[12]。プレバイオティクスの中でもフルクトタンは最も広く研究されているものの一つであり[13]、スクロースのフルクトース末端にフルクトースが β (2→1)結合で連なった直鎖構造を有する。代表的なものにフルクトオリゴ糖（fructooligosaccharides: FOS）およびイヌリン（inulin: Inu）があり、短鎖フルクトタンである1-kestose（1-kestose: Kes）は重合度（degree of polymerization: DP）が3、Inuは最大で約60に達する。KesおよびInuはいずれも単独で免疫機能やアレルギー症状に有益な作用をもたらすことが報告されている[14,15]。これ

らのフルクタンは、腸内の有用菌、特に *Bifidobacterium spp.* や酪酸産生菌といった有用菌の増殖を促進し [16,17]、それらの菌が産生する短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids: SCFAs) などの代謝産物を介して腸管バリア機能や免疫応答の調節に寄与すると考えられている [18]。

フルクタンの分解には glycoside hydrolase family 32 (GH32) に属する酵素群が関与しているとされている。また、酵素ならびにそれをコードする GH32 遺伝子の保有状況や酵素の基質特異性は菌種ごとに異なることが知られている [19]。そのため、短鎖のみを分解する菌、短鎖と長鎖の双方を分解する菌など代謝特性は多様であり [20,21]、DP の異なるフルクタンを併用摂取することで、より広範な GH32 酵素を保有する有用菌群を増殖できる可能性がある。

このような背景があるにも関わらず、Kes および Inu を併用投与した際のアレルギー予防・改善効果を検討した研究はこれまで存在しない。くわえて併用摂取がヒトにおいてどのような腸内細菌叢構成に変化させるのかは不明である。

以上の背景から、本研究では GH32 酵素に着目し、Kes および Inu の併用摂取が単独摂取と比較した際にアレルギー症状がより抑制されるかを検証するとともに、ヒトにおいてどのような腸内細菌叢変化を誘導するのかを明らかにすることを目的とした。

第二章

短鎖・長鎖フルクタン併用摂取による 食物アレルギー予防効果の評価

目的

先行研究によりフルクタンである Kes および Inu は、腸内細菌叢を調節することによりアレルギー疾患に対して有益な作用を示すことが報告されている。フルクタンは GH32 に属する酵素によって分解されることが知られており、その基質特異性から、Kes と Inu を併用することでより広範な GH32 酵素保有菌を活性化させ、アレルギーに対する効果が増強される可能性が考えられる。

そこで第二章では、まずアレルギーの予防に着目し、卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) 誘発食物アレルギーモデルマウスを用いて、Kes、Inu の単独投与および併用投与による食物アレルギー予防効果を検討した。

材料と方法

マウス

5 週齢、体重 14–19 g の雌性 BALB/c マウス 28 匹を日本 SLC (Hamamatsu, Japan) より購入した。マウスは通常環境下で、2~3 匹ずつソフトチップを敷いたケージに収容し、 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル、空気循環下で飼育した。飼料と水は自由摂取とした。実験用飼料は CLEA Japan (Tokyo, Japan) によりペレット状実験飼料を用いた。マウスの反応に対する環境因子の影響を避けるため、ケージの配置は無作為に行った。全ての動物実験は名古屋学芸大学の動物実験指針に従って実施され、環境省の基準に基づき同大学動物実験倫理委員会の承認を得た (承認番号: 128)。

実験概要

本実験の概要を Figure 1 に示す。本研究では、アレルギー研究において一般的に使用される Balb/c マウスを用い、腹腔内投与によって感作を行うモデルを使用した[22]。マウスは対照群 (Ctrl 群、n=5)、OVA 誘導アレルギー群 (OVA 群、n=5)、OVA 誘導アレルギー+Kes 投与群 (Kes 群、n=6)、OVA 誘導アレルギー+Inu 投与群 (Inu 群、n=6)、および OVA 誘導アレルギー+Kes+Inu 投与群 (Kes+Inu 群、n=6) の 5 群に無作為に分けた。群分けは Excel を用いてランダム化を行い、各群のマウスは 2~3 匹ずつ同一ケージで飼育した。

すべてのマウスは、CLEA Rodent Diet CE-2 (CLEA Japan) を用いて 1 週間の予備飼育を行った。その後、腹腔内 OVA 投与前の 0 週目から解剖時まで各群の実験飼料を摂取させた。Ctrl 群および OVA 群には AIN-93G 半合成飼料 (CLEA Japan) を与えた。フルクタン摂取群には AIN-93G 飼料中の 5%セルロースを、Kes 群には 5%の Kes (>97% purity; Itochu Sugar, Hekinan, Japan)、Inu 群には 5%の Inu (Inulia®; Teijin, Tokyo, Japan: DP = 8-13)、Kes+Inu 群には 2.5%の Kes および 2.5%の Inu に置換した飼料を与えた。

OVA 群、Kes 群、Inu 群、および Kes+Inu 群のマウスには、14 日目から 56 日目にかけて計 6 回の OVA による感作を実施し、最終週に経口 OVA チャレンジを行った。チャレンジ後にアレルギー症状の軽減効果を評価し、同時に糞便サンプルを収集した。Ctrl 群には、対照としてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を腹腔内投与した。

OVA チャレンジの翌日、マウスをイソフルラン吸入により麻酔し、立ち直り反射およびつま先・尾・耳へのピンセット刺激による痛覚反射の消失をもって十分な麻酔深度を確認した。その後、心穿刺により安楽死を行い、採取した血液を血清 IgE 測定に用いた。また、パイエル板を採取してサイトカイン mRNA 発現解析を行い、さらに盲腸内容物を採取して腸内細菌叢解析および SCFAs 測定に供した。血清は -20°C、盲腸内容物および臓器は -80°C にて保存した。

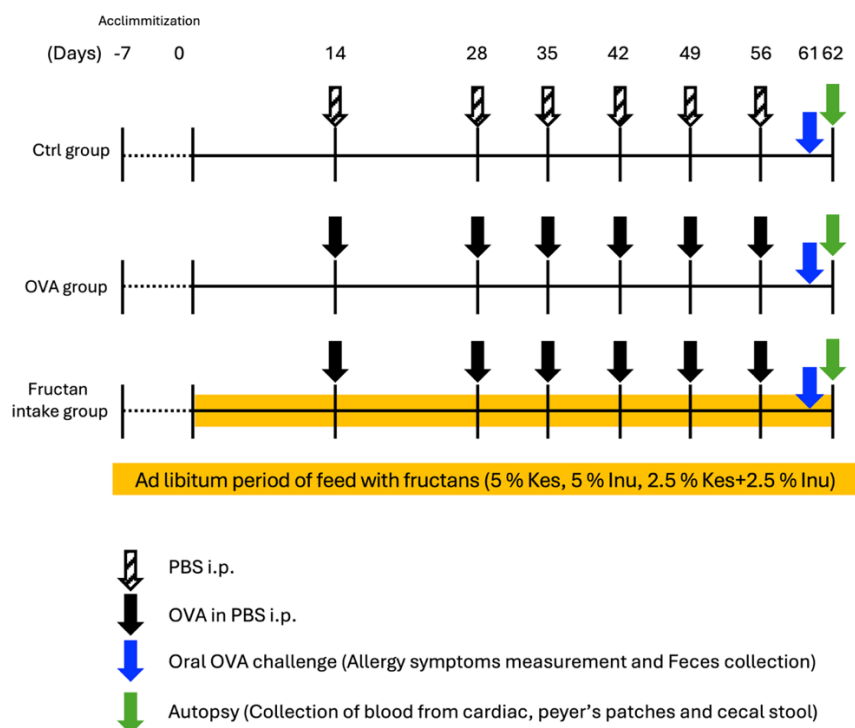


Figure 1. Experimental schedule for establishing the OVA-induced food allergy mouse model in the allergy prevention study.

食物アレルギーの誘導

Ctrl 群を除くすべてのマウスに対して、14 日目に 100 μg の OVA および 100 μL の PBS に溶解した水酸化アルミニウムを腹腔内投与し、感作を開始した。28 日目から 56 日目までの各初日には、50 μg の OVA および 50 μL の PBS 溶解水酸化アルミニウムを同様に腹腔内投与した。Ctrl 群のマウスには、同量の PBS を腹腔内に投与した。

OVA の調製

マウスの感作に使用する OVA は、市販の卵白から硫酸アンモニウム沈殿法、硫酸処理、および等電点沈殿法を組み合わせる単離・精製した。得られた OVA の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドとして確認した。

アレルギー症状の評価

61 日目に、OVA チャレンジとして、すべての群に PBS 200 μL 中に溶解した OVA 50 mg を経口投与した。投与直後、複数の研究者が盲検した状態で 30 分間アレルギースコアを測定し、アレルギー症状に基づいて最大スコアを算出した。アレルギー症状は次のように評価された。0：症状なし、1：鼻や頭部周辺の掻きむしり、通常の行動とは明らかに異なる異常行動、2：目や口周辺の腫れ、3：喘鳴、呼吸困難、口や尾周辺のチアノーゼ、4：刺激後活動なしまたは震えと痙攣、5：死亡 [23]。OVA の経口投与前と投与後 30 分後に体温計で直腸温度を測定し、その変化を算出した。人道的な終了基準は、直腸温度が 3°C 以上低下した場合と定義したが、本実験では該当するマウスはいなかった。

酵素免疫測定法 (ELISA)

各種抗体に関する測定は ELISA により実施した。OVA 特異的 IgE の測定は OVA 溶液 (1 mg/mL PBS) を 96 ウェルマイクロプレート (Nunc-Immuno™ Plate; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に添加し、 4°C で一晩静置して固相化した。翌日、1% スキムミルクを含む PBS に 0.05% Tween-20 を加えたブロッキング溶液を用い、 37°C で 1 時間インキュベートした。続いて、PBS で 1:9 に希釈した血清試料を加え、 37°C で 1 時間反応させた。その後、ペルオキシダーゼ結合抗マウス IgE 抗体 (GAM/IgE (Fc)/PO; 1:1,000 PBS; Nordic Immunology Laboratories, Tilburg, Netherlands) を添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。測定時には、基質としてテトラメチルベンジジン (TMB) を加え、1 N HCl により反応を停止した。吸光度はマイクロプレートリーダー (Corona Electric, Hitachinaka, Japan) を用いて 450 nm で測定した。

OVA 特異的 IgA の測定には、プロテアーゼ阻害剤カプセル錠剤 (lot No. 56,079,200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を滅菌 PBS 2 mL に溶解し、25 倍希釈した IgA 抽出溶液を作成した。抽出溶液 1 mL を収集した糞便 0.1 g に加え、 4°C で一晩攪拌した。 4°C 、15,000rpm で 10 分間遠心分離後、上清を回収してサンプル溶液を調製した。OVA 溶液

(1 mg/mL PBS) は、4°Cで一晩かけて 96 ウェルマイクロプレートに固相化した。Pierce™ Protein-Free Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific) にて 37°Cで 1 時間ブロッキングした後、サンプル溶液を加え、プレートを 37°Cで 1 時間インキュベートした。その後、POD 結合抗マウス IgA (Lot No. 60,203,562; 1:5,000 PBS; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) を加え、プレートを 37°Cで 1 時間インキュベートした。TMB を用いて発色させ、1 N HCl を加えて反応を停止させた。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて 450 nm で測定した。

総 IgA の測定には、抗マウス IgA (α 鎖特異的) 抗体 (M1272; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を 1 mg/mL PBS で希釈し、96 ウェルマイクロプレートに添加し、4°Cで 1 時間インキュベートした。Pierce™ Protein-Free Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific) にて 37°Cで 1 時間ブロッキングした後、サンプル溶液 (1:9 PBS) を添加し、プレートを 37°Cで 1 時間インキュベートした。次に、POD 結合型抗マウス IgA 抗体 (Lot No. 60,203,562; 1:5,000 PBS; Zymed) を加え、プレートを 37°Cで 1 時間インキュベートした。TMB を用いて発色させ、1 N HCl を加えて反応を停止させた。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて 450 nm で測定した。

RNA 抽出および定量逆転写 PCR (RT-qPCR)

バイエル板から RNA を抽出するために、BioMasher® II Micro Tissue Homogenizer (DWK Life Sciences, Millville, NJ, USA) と RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用した。RNA の濃度は、Qubit™ RNA (Broad-Range) Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して測定した。RNA は、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して逆転写した。qPCR は、PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、ハウスキーピング遺伝子として 18S rRNA 遺伝子を使用し、IL-2、IL-4、IL-6、および IL-10 遺伝子を対象としたプライマーを使用して実施した (Table 1)。増幅サイクルプロトコルは、95°Cで 2 分間保持した後、95°Cで 10 秒、60°Cで 60 秒、72°Cで 1 分間のサイクルを 50 回繰り返した。増幅後、PCR 産物の確認のため溶解曲線解析を実施した。定量は $\Delta \Delta C_t$ 法を用いて行なった。

Table 1. PCR primers used in the study 1

target gene	Primer name	Oligonucleotide sequence	Reference	Used for
18S rRNA	18S rRNA forward	TTGGAGGGCAAGTCTGGTG	[24]	RT-qPCR
	18S rRNA reverse	CCGCTCCCAAGATCCAACATA		
IL-2	IL-2 forward	AACCTGAAACTCCCCAGGAT	[25]	RT-qPCR
	IL-2 reverse	CGCAGAGGTCCAAGTTCATC		
IL-4	IL-4 forward	GGCATTGTTGAACGAGGTCAC	[25]	RT-qPCR
	IL-4 reverse	AAATATGCGAAGCACCTTGG		
IL-6	IL-6 forward	AACGATGATGCACTTGCAGA	[25]	RT-qPCR
	IL-6 reverse	GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA		
IL-10	IL-10 forward	TGAATCCCTGGGTGAGAAG	[25]	RT-qPCR
	IL-10 reverse	TGGCCTTGTAGACACCTTGG		
16S rRNA	Pro341F	CCTACGGGNBGCASCAG	[26]	sequencing
	Pro805R	GACTACNVGGGTATCTAATCC		
GH32 from <i>P. distasonis</i>	Parab.distasonis_sig.GH32_F	GGTGAATAAGGTGGATTATTTTCGTTCCG	This study	qPCR
	Parab.distasonis_sig.GH32_R	GCCATACGGATTGTATTGATAGAACAATGATACTC		
GH32 from <i>P. goldsteinii</i>	Parabac goldsteinii_sig.GH32_F	TAAAAGGAAACGGATTATTTTCGTCCT	This study	qPCR
	Parabac goldsteinii_sig.GH32_R	CATCCTTATAAACAGTCCGTTCCG		
16S rRNA	F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	[27]	qPCR
	R_Prok1492	TACGGCTACCTTGTTACGACTT		
GH32 from <i>P. distasonis</i>	PgsA_Par.disGH32fromNo12_F	aaatctaaaagatccRCAGAACGTACTATAGATATAAAGCATCTGGGCG	This study	expression
	PgsA_Par.disGH32fromNo12_R	tttaccagactcgagTTTGAARGGATAAATGGTTAATGACGTAACCG		
GH32 from <i>P. goldsteinii</i>	PgsA_Par.goldGH32fromNo27_F	aaatctaaaagatccTGCCAGTCCGCCTTAAAGAAGGATTTA	This study	expression
	PgsA_Par.goldGH32fromNo27_R	tttaccagactcgagCAGTGCCAGTTTATAAATATCAACGAATTTACCCGGC		

Lower case sequences indicate 15 bases homologous to the entry vector.

16S rRNA アンプリコンシーケンシング

盲腸内容物からの DNA 抽出は、以前に報告された方法[26]に従った。具体的には、凍結された盲腸内容物は氷上で解凍され、各サンプルから 100 mg を、4 M グアニジンチオシアン酸塩、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、および 40 mM エチレンジアミン四酢酸を含む溶液に懸濁させた。懸濁後、FastPrep FP100A 装置 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) を使用して、ジルコニアビーズで破碎した。その後、Magtration System 12GC および GC シリーズ MagDEA DNA 200 (Precision System Science, Matsudo, Japan) を使用して抽出した。原核生物の 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域の PCR 増幅には、Pro341F および

Pro805R プライマーを使用した (Table 1)。シーケンシングは生物技研 (Sagamihara, Japan) にて実施した。ペアエンドシーケンシング (2×300 bp) は、Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) と MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を使用した。本試験の 16S rRNA 遺伝子 NGS データセットは、NCBI Sequence Read Archive (SRA) に登録されている (accession number : PRJNA1369788)。

バイオインフォマティクス解析

QIIME2 (ver.2022.2) を使用して 16S rRNA 遺伝子配列解析を実施した[28]。配列データの品質フィルタリングとノイズ除去は、DADA2 パイプライン (パラメーター : p-trunc-len-f 290 および p-trunc-len-r 190) を使用して行なった[29]。フィルタリングされた出力シーケンスは、「qiime feature-classifier classify-sklearn」コマンドを使用してデフォルトパラメーターで分類した[30]。分類の参照データベースとして Greengenes2 (v2022.10) を使用した[31]。 β 多様性である Weighted UniFrac Distance を用いた主座標分析 (PCA) は「qiime diversity core-metrics-phylogenetic」コマンドを使用し「qiime diversity beta-group-significance」コマンドを使用して群間差を評価した。

qPCR を用いた腸内細菌の定量解析

Carbohydrate-Active enZymes (CAZy: <https://www.cazy.org/>) データベースに登録されている *Parabacteroides distasonis* の GH32 遺伝子およびそのホモログ配列について、塩基配列のアラインメントを行った。このアラインメント結果から、*P. distasonis* に共通する領域を同定し、その領域を標的とする GH32 遺伝子断片の PCR 増幅用プライマーセットを設計した (Table 1)。

また、CAZy データベースにおいて GH32 を保有する *P. goldsteinii* 株は BFG-241 のみであったため、*P. goldsteinii* BFG-241 株の GH32 配列と、*P. goldsteinii* MTS01 株および近縁種である *Bacteroides fragilis* に由来する GH32 ホモログ配列をアラインメントした。その後、*P. goldsteinii* に共通し、かつ *B. fragilis* とは一致しない特異的配列領域を抽出し、この領域を標的とする *P. goldsteinii* GH32 遺伝子断片の PCR プライマーセットを設計した。

糞便 DNA 試料中の GH32 遺伝子コピー数を定量するため、QIAcuity One 5plex Platform System FUL-1 (Qiagen) を用いて qPCR を実施した。各反応液 (16.875 μ L) は、3× EvaGreen PCR Master Mix (Qiagen) 5.500 μ L、フォワードおよびリバースプライマー (50 μ M) 各 0.132 μ L、RNase-free water 9.611 μ L、および糞便 DNA 1.500 μ L で調製した。GH32 遺伝子検出に使用したプライマーは Table 1 に示した。

調製した PCR 反応液は、QIAcuity Nanoplate 8k with 96 wells (Qiagen) の各インレットに分注し、QIAcuity Nanoplate Seal (Qiagen) を用いてローラーでシールした。プレートを装置に挿入し、プライミング、サイクリング、イメージングを実施した。増幅条件

は、95°Cで2分間の後、95°Cで15秒、60°Cで15秒、72°Cで15秒のサイクルを40回行い、最後に72°Cで1分間の伸長反応を行った。イメージングは150 msの露光時間で取得した。

得られたデータはQIAcuity 2.0.20 software suite (Qiagen) を用いて解析した。各試料のGH32 遺伝子コピー数は、全細菌数で正規化した。具体的には、GH32 遺伝子コピー数をテンプレート DNA 1 μ L あたりの GH32 コピー数で表し、同量のテンプレート DNA 中に含まれる全細菌数 (16S rRNA 遺伝子コピー数) で除することで算出した。

全細菌数の推定には、16S rRNA 遺伝子コピー数を QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) を用いた qPCR により定量した。反応液は、PowerTrack SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、メーカーのプロトコールに従って調製した。16S rRNA 遺伝子の検出に用いたプライマー配列は Table 1 に示した。増幅条件は、95°Cで2分間の初期変性の後、95°Cで10秒、60°Cで15秒、72°Cで15秒のサイクルを40回行い、最後に72°Cで1分間の伸長反応を行った。増幅後、メルティングカーブ解析を実施し、PCR産物の特異性を確認した。絶対定量には、*P. distasonis* JCM 5825 由来の16S rRNA 遺伝子 PCR フラグメントを用いた。

本研究で得られた *P. distasonis* および *P. goldsteinii* の GH32 遺伝子配列は、GenBank に登録されている (GenBank 登録番号: それぞれ LC771243 および LC771244)。

GH32 発現 *E. coli* を用いた酵素反応解析

P. distasonis および *P. goldsteinii* の GH32 に由来する細胞外酵素活性は、既報の方法に従って評価した[19]。Kes 群および Inu 群の糞便サンプルから抽出した DNA を、それぞれ *P. distasonis* および *P. goldsteinii* の GH32 遺伝子の鋳型として用いた。GH32 遺伝子は KOD Plus DNA polymerase kit (Toyobo, Osaka, Japan) および Table 1 に示したプライマーを用いて増幅し、その後 In-Fusion Cloning kit (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて In-Fusion クローニングした。遺伝子クローニングには pCDF-PgsA を使用した。このプラスミドは、surface display system を用いて *E. coli* 細胞表面に GH32 を発現させ、その活性を評価する目的で開発されたものである[32]。

得られた融合プラスミドは、まず *E. coli* JM109 (Takara Bio) に導入し、FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を用いて抽出した後、*E. coli* BL21 (DE3, Takara Bio) へ導入した。形質転換した *E. coli* BL21 は、streptomycin sulfate (12.5 μ g/mL) を加えた Terrific broth (Sigma-Aldrich) にて 30°C、24 h 培養した後、Overnight Express™ Instant TB Medium (Merck, Darmstadt, Germany) に抗生物質を加えて 24°C、24 h 培養した。

培養後、1.0 mL を Eppendorf tube に回収し、6,000 rpm、3 min の遠心により回収した形質転換 *E. coli* を 0.5 mL の 10 mM PBS (pH 7.0) に懸濁し、2×細胞懸濁液を調製した。

各基質 (Sucrose [Fujifilm-Wako, Osaka, Japan]、Kes、chicory 由来 Inu [Sigma-Aldrich]) の 5% (w/w) 溶液を含む 10 mM PBS (pH 7.0) 360 μ L に、2 \times 細胞懸濁液 40 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 min の反応を行った。反応は 96 Well Deep Well Plate (AxyGen Scientific, Union City, CA, USA) を用い、インキュベーションには MBR-034P shaker (Taitec, Nagoya, Japan) を使用した。

反応後、反応液 180 μ L を回収し、遠心後の上清を 90 $^{\circ}$ C で 5 min 加熱して酵素反応を停止した。反応液 100 μ L を水 900 μ L で希釈し、0.45 μ m フィルターで濾過した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により糖を定量した。HPLC 分析は HPLCProminence (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、Shodex Sugar KS802 (8.0 mm I.D. \times 300 mm) および Shodex Sugar KS801 (8.0 mm I.D. \times 300 mm) カラム (Showa Denko, Tokyo, Japan) を直列接続して実施した。移動相には 1 mM PBS (pH 7.0) を用い、流速 0.25 mL/min、カラム温度 80 $^{\circ}$ C、20 min の条件で分離した。溶出成分は RID-20A (Shimadzu) で検出した。

GH32 発現 *E. coli* の Kes および Inu 分解活性は、各基質 (Kes または Inu) から産生される fructose 量を、Sucrose を基質とした際の fructose 産生量に対する割合 (%) として算出し、相対分解活性として評価した。

盲腸内容物中の SCFAs および乳酸濃度の測定

盲腸内容物中の SCFAs および乳酸のカルボキシル基は、Short- and Long-Chain Fatty Acid Analysis Kit (YMC, Kyoto, Japan) の改良プロトコルを用いて 2-nitrophenyl hydrazide によりラベリングした。具体的には 20–50 mg の盲腸内容物試料を 1.5 mL Eppendorf tube に秤量し、氷上で PBS 1 mL を加えて、30 秒間均一に混和した。続いて、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、2 min の条件で遠心し、得られた上清をラベリング反応に用いた。上清 50 μ L に、PBS 50 μ L、内部標準として 2 mM caproic acid (Fujifilm-Wako) 200 μ L、20 mM 2-nitrophenylhydrazine 200 μ L、および 0.25 M N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride HCl (ethanol 溶液; 3% pyridine in ethanol と等量混合) 200 μ L を加えて混合し、60 $^{\circ}$ C で 20 min 反応させた。反応後、15% (w/v) potassium hydroxide 200 μ L を加え、再び 60 $^{\circ}$ C で 15 min インキュベートした。

反応液は、0.03 M PBS (pH 6.4) と 0.5 M hydrochloric acid の 3.8:0.4 (v:v) 混合溶液 4 mL に加え、0.45 μ m フィルター (PTFE, PuradiscTM 13 mm Syringe Filters, Whatman, Kent, England) でろ過した。得られた誘導体は diethyl ether 5 mL により抽出し、diethyl ether 層を室温で窒素気流下にて蒸発乾固した。得られた残渣を methanol 200 μ L に溶解し、その 10 μ L を測定サンプルとした。

HPLC 分析は Nexera XL series HPLC Instrument (Shimadzu) を用い、YMC-Pack FA カラム (6.0 mm I.D. \times 250 mm; YMC) にて分離を行った。移動相は acetonitrile (Fujifilm-Wako) : methyl alcohol (Fujifilm-Wako) : ultrapure water = 30:16:54 (v:v:v)

とした。流速は 1.2 mL/min、カラム温度は 50°C、分析時間は 20 min とした。溶出成分は、2-nitrophenylhydrazine 誘導体の吸収波長である 400 nm にて検出した。

統計解析

β 多様性は、permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) を用いて p 値を算出した。腸内細菌叢の占有率に関する統計解析は、GraphPad Prism v9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、Mann-Whitney test または Kruskal-Wallis test を実施した。それ以外のデータは、parametric ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) を行った。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

アレルギー予防試験における OVA 誘導食物アレルギー指標に対するフルクタンの効果
低 DP フルクタンである Kes と、高 DP フルクタンである Inu のアレルギー症状抑制作用を評価するため、OVA 誘導食物アレルギーモデルマウスを用いた試験を実施した。

その結果、OVA 群では Ctrl 群と比較してアレルギー症状スコアが有意に高値を示したのに対し、フルクタン投与群 (Kes、Inu、Kes+Inu) では OVA 群と比較して有意にアレルギー症状スコアが低値を示した (Figure 2a)。

直腸温は OVA 群で有意に低下したが、Kes 群および Kes+Inu 群ではこの低下が有意に抑制された (Figure 2b)。なお、いずれの群においても体重および飼料摂取量に有意な差は認められなかった。

次に、ELISA を用いて血清 OVA 特異的 IgE、糞便中 OVA 特異的 IgA、および糞便中総 IgA を測定した。血清 OVA 特異的 IgE および糞便中 OVA 特異的 IgA は、OVA 群で Ctrl 群より有意に増加したが、これらの増加はフルクタン投与 (Kes、Inu、Kes+Inu) により有意に抑制された (Figure 2c, d)。また、糞便中総 IgA は OVA 群で有意に低下したが、この低下は Kes+Inu 群でのみ有意に回復した (Figure 2e)。

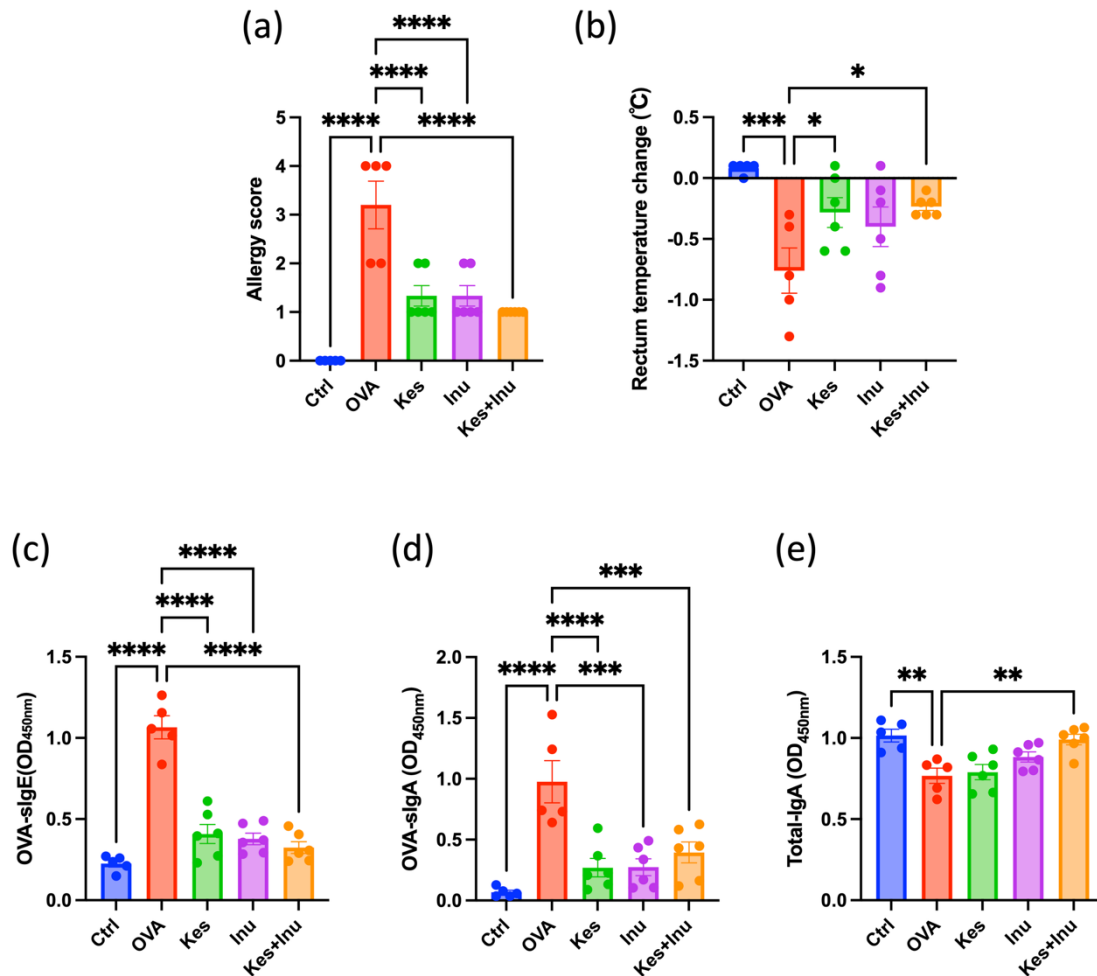


Figure 2. Preventive effects of short- and long-chain fructans on OVA-induced food allergy.

(a) Allergy scores of BALB/c mice subjected to food allergy. (b) Changes in rectal temperature 30 min after oral administration of OVA. (c) OVA-specific IgE levels in the serum, (d) OVA-specific IgA levels in the feces, and (e) total IgA levels in the feces. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. OVA group.

アレルギー予防試験におけるパイエル板のサイトカイン遺伝子発現に対するフルクタン の影響

次に、OVA チャレンジ後のパイエル板における炎症性サイトカイン発現に対するフルクタンの影響を検討した。炎症性サイトカインである IL-4 の発現は OVA 群で Ctrl 群と比較して有意に増加したが、この増加はフルクタン投与群 (Kes、Inu、Kes+Inu) において有

意に抑制された (Figure 3b)。一方、抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現は OVA 群と Ctrl 群の間で有意差は認められなかったものの、Kes 投与群 (Kes、Kes+Inu) において有意な増加がみられた (Figure 3d)。なお、抗炎症性サイトカイン IL-2 および炎症性サイトカイン IL-6 の発現量については、いずれの群間にも有意差は認められなかった (Figure 3a, c)。

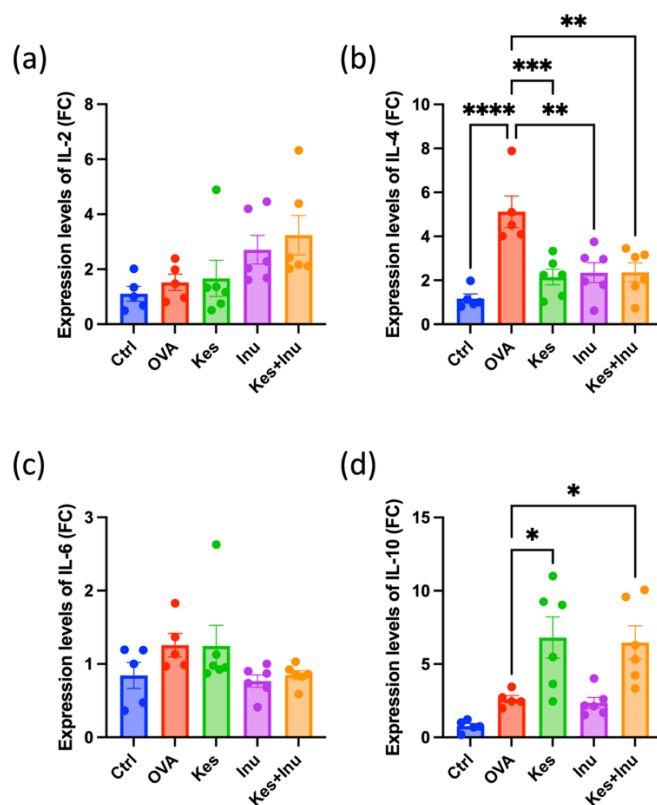


Figure 3. RT-qPCR assay of cytokine gene expression in OVA-induced food allergy with or without fructan administration.

Gene expression levels of (a) IL-2, (b) IL-4, (c) IL-6, and (d) IL-10 in Peyer's patches. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. OVA group.

アレルギー予防試験におけるフルクタン摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響

腸内細菌叢は免疫細胞の恒常性[33]やアレルギー性炎症への感受性[34]に大きな影響を与えることが知られている。そこで、OVA 誘導食物アレルギーモデルマウスにおいて、フルクタン摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響を解析した。まず、群間の分類学的多様性を評価する α 多様性指標の一つである Shannon index を算出し、群間における分類学的多様性の違いを評価したところ、フルクタン投与群では有意な低下が認められた (Figure 4a)。次に、weighted UniFrac 距離に基づく主座標分析を用いて β 多様性を評価した。

その結果、Ctrl 群と OVA 群は有意に分離しており ($p=0.006$)、アレルギーによる腸内細菌叢の変化が明確に認められた (Figure 4b)。さらに、OVA 群は各フルクタン投与群 (Kes、Inu、Kes+Inu) とも有意に異なる β 多様性を示した。(それぞれ $p=0.006$ 、 0.003 、 0.004)。

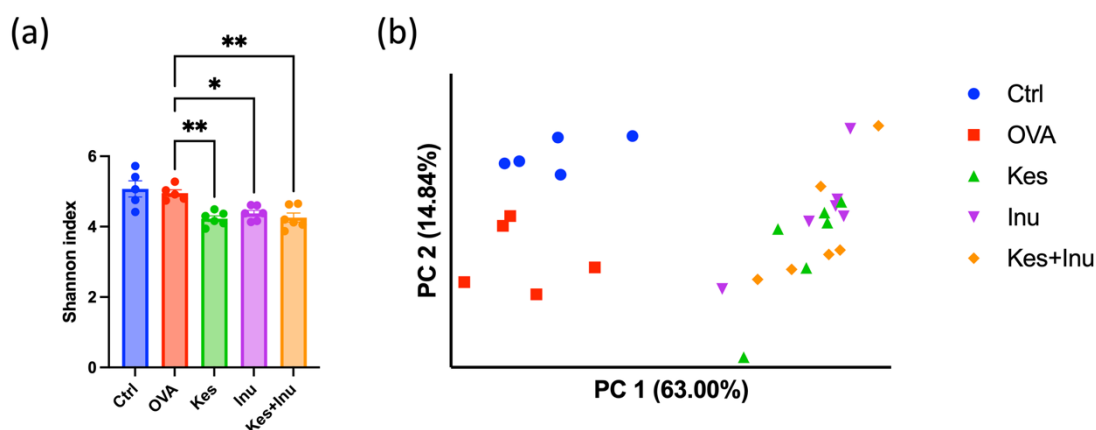


Figure 4. Alpha and beta diversity of the cecal microbiota in the allergy prevention study.

(a) Shannon index values. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. OVA group. (b) Principal coordinate analysis based on weighted UniFrac distances. The first primary component is plotted on the horizontal axis (PC1) and the second primary component is plotted on the vertical axis (PC2). Plots represent individual mice and bars represent mean \pm SEM.

門レベルで腸内細菌叢の相対存在量を解析したところ、OVA 群では Ctrl 群と比較して *Bacteroidota* が有意に減少し、*Firmicutes* が有意に増加していた (Figure 5a, b)。さらに、*Bacteroidota* 内を属レベルで詳細に解析した結果、OVA 群では *Parabacteroides_B_862,066* (*Parabacteroides*) および *Alloprevotella* の相対存在量が Ctrl 群と比較して有意に低下していた (Figure 5c, d)。これらの低下はフルクタン投与群で回復し、とくに Kes 投与群 (Kes、Kes+Inu) ではこれらの相対存在量が有意に回復した (Figure 5e, f)。さらにアンプリコンシーケンスバリエーション (ASV) レベルに基づき菌種レベルの推定を行ったところ、*Parabacteroides* に分類された ASV は 3 種類のみであり、それぞれの存在率は 45.1%、53.3%、1.6%であった。このうち、45.1%を占めた ASV は *P. distasonis* に、53.3%を占めた ASV は *P. goldsteinii* にそれぞれ対応していた。これら 2 菌種の相対存在量を比較したところ、*P. distasonis* は Kes 投与群で、*P. goldsteinii* は Inu 投与群で、それぞれ OVA 群より有意に高値を示した (Figure 5g, h)。なお、*Alloprevotella* を構成する菌種については、ASV からの推定はできなかった。

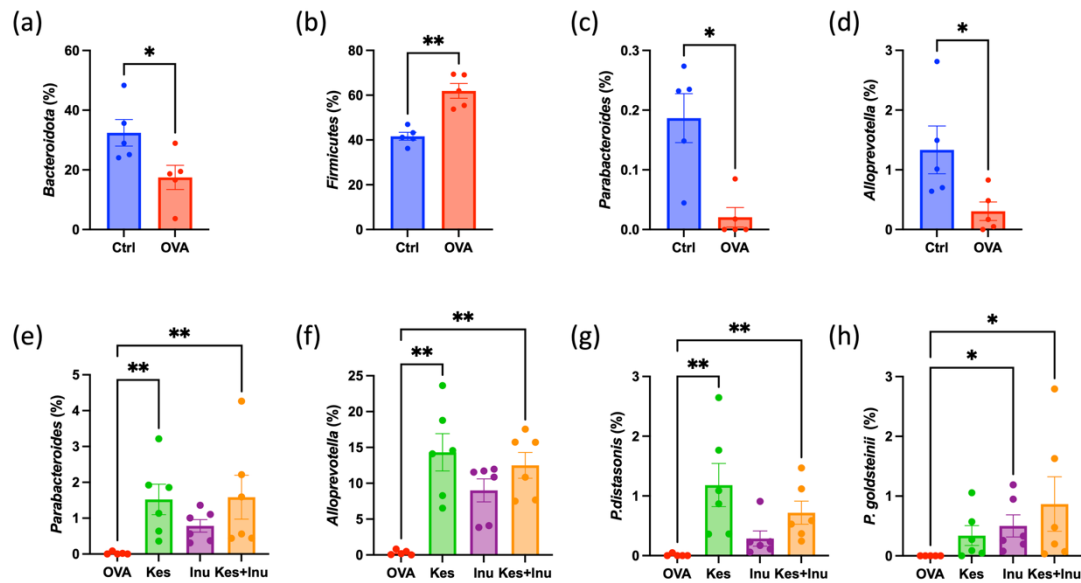


Figure 5. Changes in cecal bacterial abundances and their restoration by fructan administration in the allergy prevention study.

Changes in relative abundances of (a) *Bacteroidota*, (b) *Firmicutes*, (c) *Parabacteroides*, and (d) *Alloprevotella* in OVA-induced food allergic mice. Statistical significance is determined using the Mann–Whitney test. Fructan administration suppresses the reductions in the relative abundances of (e) *Parabacteroides*, (f) *Alloprevotella*, (g) *P. distasonis*, and (h) *P. goldsteinii* induced by OVA-induced food allergy. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. OVA group.

アレルギー予防試験におけるフルクタン摂取が盲腸内容物中 GH32 遺伝子コピー数および GH32 酵素の分解活性に与える影響

本研究では、Kes 群で増加した *P. distasonis* および Inu 群で増加した *P. goldsteinii* が、それぞれ Kes や Inu を分解する酵素 (GH32) を保持しているために増加した可能性があると考え、この仮説を検証した。一般に、フルクタンは GH32 に属する酵素によって加水分解され、生成したフルクトースやグルコースは各菌種の固有の代謝経路で利用されるとされている [35]。

まず、*P. distasonis* および *P. goldsteinii* の GH32 遺伝子配列からコンセンサ領域を基にプライマーセットを作製し、qPCR により盲腸内容物中 GH32 遺伝子コピー数を定量した。その結果、Kes 投与群では *P. distasonis* の GH32 遺伝子コピー数が、Inu 投与群では *P. goldsteinii* の GH32 遺伝子コピー数が、それぞれ OVA 群と比較して有意に増加していた (Figure 6a,b)。これは各菌種の相対存在量の増加と概ね一致していた。

次に、両菌種由来 GH32 酵素のフルクタン分解活性を評価した。GH32 酵素は細胞外酵素であり通常の細胞内発現が困難なため、surface display system を用いて *E. coli* の細胞表面に発現させ、基質 (Sucrose、Kes、Inu) に対する分解活性を測定した[32]。

盲腸内容物から増幅された *P. distasonis* GH32 遺伝子断片 (GenBank LC771243) は、*P. distasonis* BFG-592 株などの GH32 遺伝子と 99.18% の相同性を示した。また、Inu 群から増幅された *P. goldsteinii* GH32 遺伝子断片 (GenBank LC771244) は、*P. goldsteinii* MTS01 株の GH32 遺伝子と 99.89 % の相同性を示した。

GH32 を発現させた *E. coli* による酵素反応試験の結果、*P. distasonis* 由来 GH32 は Kes に対する分解活性を示し、*P. goldsteinii* 由来 GH32 は Inu に対する分解活性を示した (Figure 6c,d)。一方、pCDF-PgsA のみを保持する *E. coli* では基質分解に伴うフルクトース生成は認められなかった。

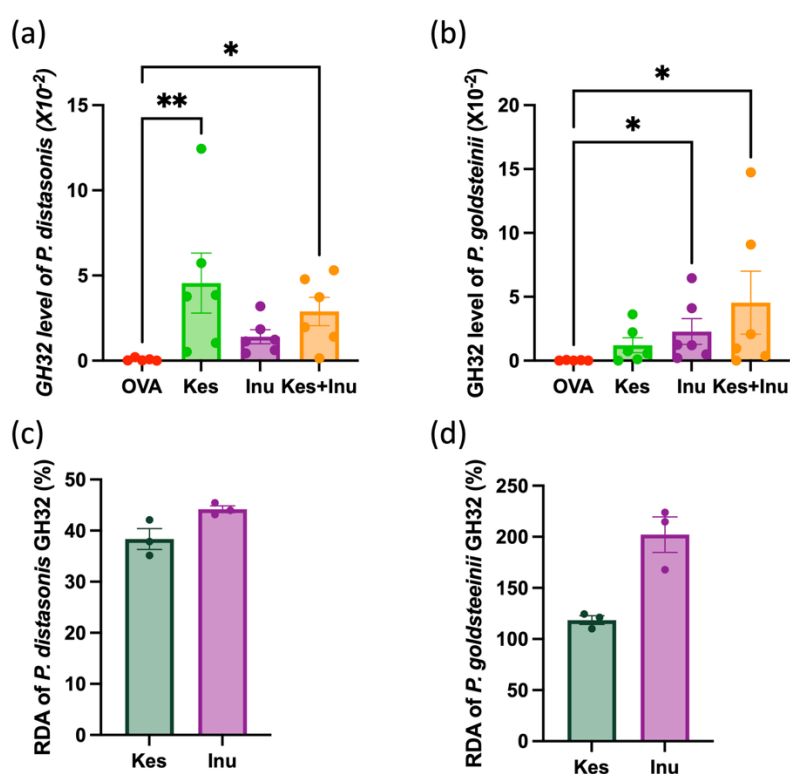


Figure 6. GH32 gene abundance and GH32 enzyme-mediated degradation of fructans.

GH32 gene copy numbers in (a) *P. distasonis* and (b) *P. goldsteinii* in cecal samples. Circles represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. OVA group. Relative degradation activities of recombinant GH32 enzymes of (c) *P. distasonis* and (d) *P. goldsteinii* towards Kes and Inu against Sucrose. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM.

アレルギー予防試験における盲腸内容物中の SCFAs および乳酸産生に対するフルクタン の影響

共生細菌は食物繊維を代謝して SCFAs を産生し、これらは制御性 T (Treg) 細胞の増殖や IL-10 産生などの免疫抑制作用を誘導することで、腸内の炎症反応を調節することが知られている [36]。そこで本研究では、マウス盲腸内容物中の主要 SCFAs (酢酸、プロピオン酸、n-酪酸) および乳酸の濃度を測定した。その結果、OVA 群と比較して、フルクタン投与群では酢酸、プロピオン酸、乳酸濃度が上昇しており、とくに酢酸は Kes+Inu 群で有意に高値を示した。またプロピオン酸は Kes 群で、乳酸は Inu 群および Kes+Inu 群でそれぞれ有意に増加していた (Figure 7)。一方、盲腸内の n-酪酸濃度については、フルクタン投与による有意な変動は認められなかった。

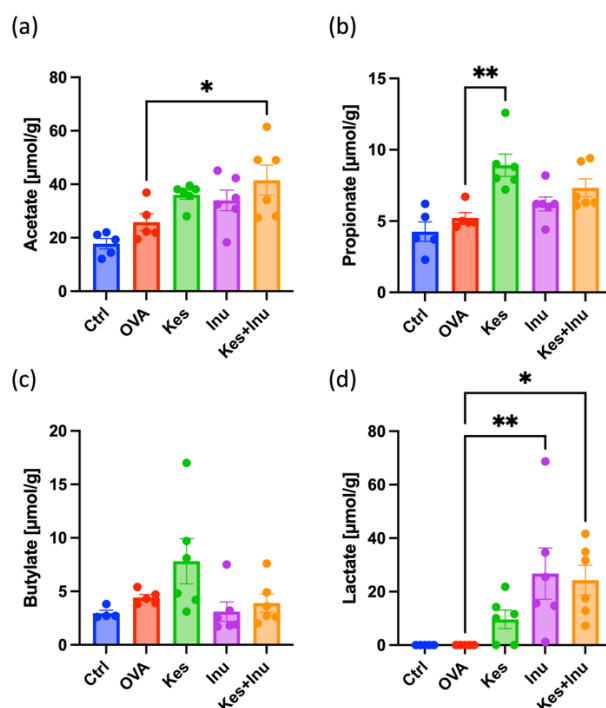


Figure 7. Effects of fructan administration on cecal short-chain fatty acid and lactate levels in the allergy prevention study.

Changes in (a) acetate, (b) propionate, (c) n-butylate, and (d) lactate levels in cecal samples of OVA-induced food allergic mice with and without fructan administration. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. OVA group.

考察

これまでの研究により、低 DP フルクタンである Kes と高 DP フルクタンである Inu は、それぞれ異なるアレルギー予防機構を有する可能性が示唆されており、両者を併用摂取することで、より高い食物アレルギー予防効果が得られると仮説を立てた。本研究の目的は、Kes と Inu の併用摂取が食物アレルギーの予防に有効であるか OVA アレルギーマウスモデルを用いて検討することである。

経口投与されたフルクタンは、アレルギー症状スコアを低下させ、直腸温の低下および総 IgA の減少、ならびに OVA チャレンジにより誘導された OVA 特異的 IgE および IgA の増加を抑制した。これらの結果から、フルクタン投与が本マウスモデルにおける典型的なアレルギー症状を抑制したことが示唆された。特に、Kes と Inu の併用摂取は、唯一これらすべての指標において抑制効果を示したことから、単独摂取と比較して同等、あるいはそれ以上の食物アレルギー症状抑制効果を有する可能性が示唆された。

パイエル板は腸管関連リンパ組織の一部であり、腸内細菌などの腸内物質に対する免疫応答の制御に関与する組織である。パイエル板で発現するサイトカインは、食物アレルギー症状に関与することが報告されている[37]。そこで、食物アレルギーと関連する各種サイトカインの mRNA 発現を比較した。マクロファージを刺激し細胞性免疫を担うヘルパー T 細胞 1 型 (Th1) 細胞由来の IL-2、ならびに免疫応答と炎症の双方に関与する IL-6 の発現量は、いずれの群間でも有意な差を示さなかった。一方、ヘルパー T 細胞 2 型

(Th2) 細胞由来で B 細胞を活性化し、体液性免疫を誘導する IL-4 はアレルギー群で増加していたが、この増加はフルクタン投与により有意に抑制された。これらの結果は、短鎖および長鎖フルクタンの摂取が IL-4 や Th2 細胞を介した免疫応答を調節することでアレルギー予防効果を発揮する可能性を示している。一方、Treg 細胞の分化を促進する抗炎症性サイトカインである IL-10 は、OVA 群と Ctrl 群で差はなかったが、Kes 投与群において有意に増加した。このことは、短鎖フルクタンによる IL-10 や Treg 細胞を介した免疫調節作用に基づくアレルギー予防効果の可能性を示唆する。ただし、本研究ではパイエル板におけるサイトカインの mRNA 発現のみを評価しており、ELISA によるタンパク質レベルの測定やフローサイトメトリーによる細胞レベルでの検討は今後の課題である。

アレルギー疾患は、環境や生活習慣の変化により、腸内細菌叢、上皮バリア、免疫系という三つの相互依存的な生物学的システムが破綻することと関連している[38]。本研究では、Kes と Inu の OVA 誘発アレルギーに対する予防効果の違いが、それぞれの腸内細菌叢への作用の違いに起因する可能性があるかと推測し、腸内細菌叢の 16S rRNA アンプリコンシーケンスを実施した。バイオインフォマティクス解析の結果、 α 多様性については OVA 群と Ctrl 群の間で有意な差は認められなかったものの、 β 多様性には明確な差が認められた。アレルゲンを腸管内ではなく腹腔内に投与したにもかかわらず、腸内細菌叢が影響を受けた可能性を示唆している。さらに、フルクタン投与群では α 多様性が有意に

低下し、 β 多様性は Ctrl 群および OVA 群とは明確に異なる構造を示した。このことは、フルクタン摂取が腸内細菌叢を非感作状態に戻すというよりも、むしろ食物アレルギー感作に対する耐性を付与する方向に変化させた可能性を示唆する。本研究では、異なる飼料の導入前、初回 OVA 投与直前、および最終 OVA 経口投与前の腸内細菌叢は解析していない。しかし、飼料変更前に 1 週間の予備飼育期間を設けているため、飼料導入前の腸内細菌叢に群間差は存在しなかったと考えられる。

フルクタンが特定の腸内細菌を増加させる可能性があることから、本研究では OVA 感作により有意に減少した唯一の門である *Bacteroidota* に焦点を当てた。*Bacteroidota* を構成する属で、*Parabacteroides* と *Alloprevotella* の相対存在量が OVA 群で有意に低下していたが、フルクタン投与によりこれらは増加し、特に Kes 投与群で顕著であった。また、*Parabacteroides* を構成する種は *P. distasonis* と *P. goldsteinii* であり、Kes または Inu の投与により、それぞれの菌種の相対存在量が有意に増加した。

Alloprevotella は SCFAs 産生菌として知られており、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎モデルにおいて IL-10 レベルと正の相関が報告されている [39]。*P. distasonis* は azoxymethane 処理マウスの結腸粘膜において IL-4 を抑制し IL-10 産生を誘導することが示されている [40]。さらに、*P. distasonis* は樹状細胞を活性化し、ナイーブ CD4⁺ T 細胞から Treg 細胞を誘導するとともに、末梢血単核球において IL-10 産生を誘導することが報告されている [41]。*P. goldsteinii* は Treg 細胞および IL-10 の産生を促進し、肥満により誘導される肝臓の炎症を改善することが知られている [42]。これらの知見および本研究の結果から、フルクタン摂取により増加した *Alloprevotella*、*P. distasonis*、*P. goldsteinii* は、炎症抑制作用およびアレルギー症状抑制作用を有する可能性が高いと考えられる。

P. distasonis と *P. goldsteinii* の GH32 遺伝子を標的とした qPCR の結果、それぞれの GH32 遺伝子コピー数は Kes 投与群および Inu 投与群で有意に増加しており、これは両菌種の相対存在量の増加と一致していた。さらに、*P. distasonis* および *P. goldsteinii* 由来 GH32 を発現させた *E. coli* を用いた酵素反応アッセイにより、これらの酵素が Kes および Inu を分解する活性を有することが確認された。GH32 酵素が分解可能なフルクタンの DP は酵素によって異なり、多くの GH32 酵素は Sucrose のみを分解することが知られている [19]。これらの結果は、Kes と Inu を分解可能な GH32 を保有しているために、*P. distasonis* および *P. goldsteinii* の相対存在量が増加した可能性を示唆している。

Bifidobacterium spp. や酪酸産生菌における GH32 酵素によるフルクタン代謝については報告がある一方で [19,43]、*Parabacteroides spp.* の GH32 酵素についてはこれまでその機能が明確にされていなかったため、酵素工学の観点からも、今回の結果は非常に興味深いといえる。

OVA 群と比較して、フルクタン投与群では酢酸、プロピオン酸、および乳酸の濃度が上昇していた。SCFAs と乳酸は、腸内細菌叢と免疫系の間をつなぐ橋渡し役として機能し、免疫恒常性を維持する働きを有することが知られている [44]。これまでの研究により、

SCFAs が G タンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptor : GPCR) を介して樹状細胞、T 細胞、マクロファージなどの多くの細胞に作用することが明らかにされている。酢酸、プロピオン酸、酪酸は、GPR43 を介して制御性機能を有する Th1 細胞における IL-10 の発現を促進することが示されている[45,46]。また、乳酸は GPR81 を活性化することが報告されている[47]。

角膜感染マウスモデルでは、プロピオン酸投与 (500 mM を 3 週間) により、Treg 細胞の増加と Th1 および Th17 の炎症性 T 細胞の減少が同時に生じ、眼病変部において免疫調節効果を示すことが明らかにされている[48]。さらに、マウスおよびヒトのマクロファージをリポ多糖で刺激した試験では、乳酸の添加が Toll-like receptor 4 依存的な炎症反応を抑制することが報告されている[49]。加えて、GPR81 遺伝子が欠損したマウスでは、IL-10 のような免疫調節因子の発現低下により Th1/Th17 の分化が増加し、Treg 細胞の分化が減少することが示されている[50]。

Figure 8 に示すように、Kes と Inu は OVA 誘発食物アレルギーモデルにおいて、それぞれ異なる経路でアレルギーを制御している可能性がある。Kes は GH32 を介して Kes を分解可能な *Alloprevotella* や *P. distasonis* を増加させ、腸内プロピオン酸濃度を上昇させることで、プロピオン酸受容体を介した免疫調節を誘導した可能性がある。一方、Inu は GH32 により Inu を分解可能な *P. goldsteinii* を増加させ、腸内乳酸濃度を上昇させることで乳酸受容体を介した免疫調節を誘導したと考えられる。また、Kes+Inu では酢酸を介した免疫調節も関与している可能性がある。

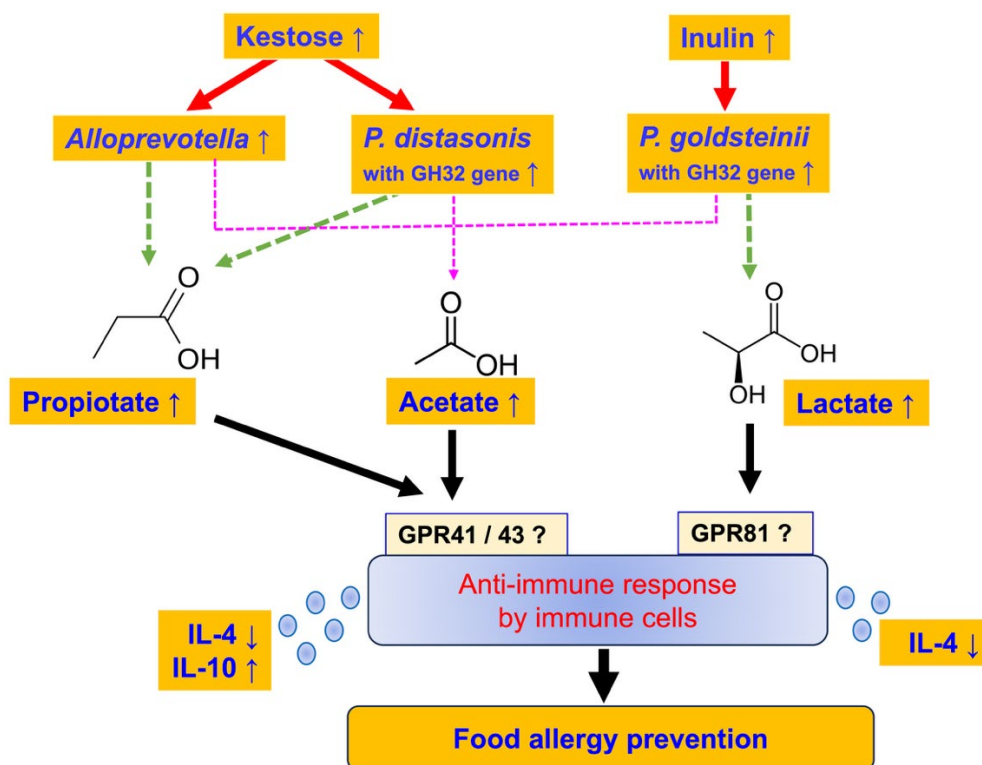


Figure 8. Proposed mechanism of OVA-induced food allergy prevention by fructan administration.

Blue letters indicate the results of this study. Solid red lines indicate effects shown in this study, and dashed lines indicate possible effects suggested by this study. Solid black lines indicate effects suggested by previous studies.

本研究にはいくつかの限界が存在する。免疫細胞に対する詳細な作用機序は十分には解明されておらず、SCFAs や GPCR を介したアレルギー抑制機構の検証も不十分であった。また、アレルゲンとして OVA のみを用いており、OVA 感作によって減少した *Bacteroidota* のみに着目し、逆に増加した *Firmicutes* の解析は行っていない。さらに、OVA やフルクタン投与に伴う腸内細菌叢の変化についてもより包括的な解析が必要である。今後は、無菌マウスを用いた *P. distasonis* および *P. goldsteinii* の摂取試験や、遺伝的背景などから推察されるアレルギーリスクが高い乳幼児への介入試験などを実施すべきである。

結論として、低 DP フルクタンである Kes と高 DP フルクタンである Inu の併用摂取により、症状ならびに OVA 特異的抗体応答の抑制に加えて、糞便中総 IgA の回復が認められた。これらの結果から、併用摂取は単独摂取と比較して同等またはそれ以上に病態予防へ寄与する可能性が示唆された。また、Kes と Inu はそれぞれ異なる機序でアレルギー予防効果を発揮する可能性が示唆され、短鎖および長鎖フルクタンの併用摂取が、より強い食物アレルギー予防効果をもたらす可能性がある。

第三章

短鎖・長鎖フルクタン併用摂取による 食物アレルギー改善効果の評価

目的

第二章では、Kes と Inu の併用摂取により、単独摂取では認められなかった指標を含め、複数の指標で改善が認められた。以上より、併用摂取は単独摂取と比較して同等、あるいはそれ以上に病態予防に寄与する可能性が示唆された。この結果は、健常な状態から短鎖および長鎖フルクタンを併用摂取することで、*P. distasonis* および *P. goldsteinii* といった有用菌が同時に増加し、腸内細菌叢がアレルギー予防に有利な方向へと変化したことを示唆している。

一方、アレルギー児では健常児とは異なる腸内細菌叢を有することが報告されている [10,51,52]。このことから、すでにアレルギーが成立した場合、介入開始時点の腸内細菌叢が健常とは大きく異なるため、Kes、Inu の単独あるいは併用投与によって変化する菌種も、予防時とは異なる可能性が高い。その結果、アレルギーに対する効果やメカニズムも、第二章とは異なる挙動を示すと考えられる。

以上を踏まえ、第三章ではアレルギー改善試験と称し、アレルギー誘導後のモデルマウスにフルクタンを投与し、アレルギー反応がどの程度改善されるかを評価するとともに、腸内細菌叢がどのように変化し、それが改善効果とどのように関連するのかについて検討した。

材料と方法

マウス

合計 40 匹の 6 週齢の雌 BALB/c マウス（体重 15 – 20 g）を SLC Japan（Hamamatsu, Japan）から購入した。マウスは、ケージ（n=3 または 4/ケージ）内で、第二章と同様の施設、同様の条件にて飼育した。第二章と同様の資料を用いた。全ての動物名古屋学芸大

学の動物実験指針に従って実施され、環境省の基準に基づき同大学動物実験倫理委員会の承認を得た (approval no. 144)。

実験概要

実験プロトコルは Figure 9 に示す。予備飼育後、全群 AIN-93G 飼料を摂取させ第二章と同様の方法でアレルギーを誘導し、48 日目に OVA チャレンジにより症状を確認した。その後尾静脈から採血を行い、OVA 感作群を OVA、Kes、Inu、Kes+Inu の 4 群 (各 n=8) に無作為に分けた。脱落により、最終的な数は Kes (n=7)、Inu (n=6)、Kes+Inu (n=7) であった。試験 49 日から 78 日まで、Ctrl および OVA 群は AIN-93G 飼料を給与した。また、Kes、Inu、Kes+Inu の 3 群には第二章と同様のフルクタン置換飼料を給与した。77 日目に 48 日目と同様の評価を実施した。翌日、マウスを解剖し、血清は-20°Cで保存し、盲腸内容物および各種臓器は-80°Cで保存し、後の実験に使用した。

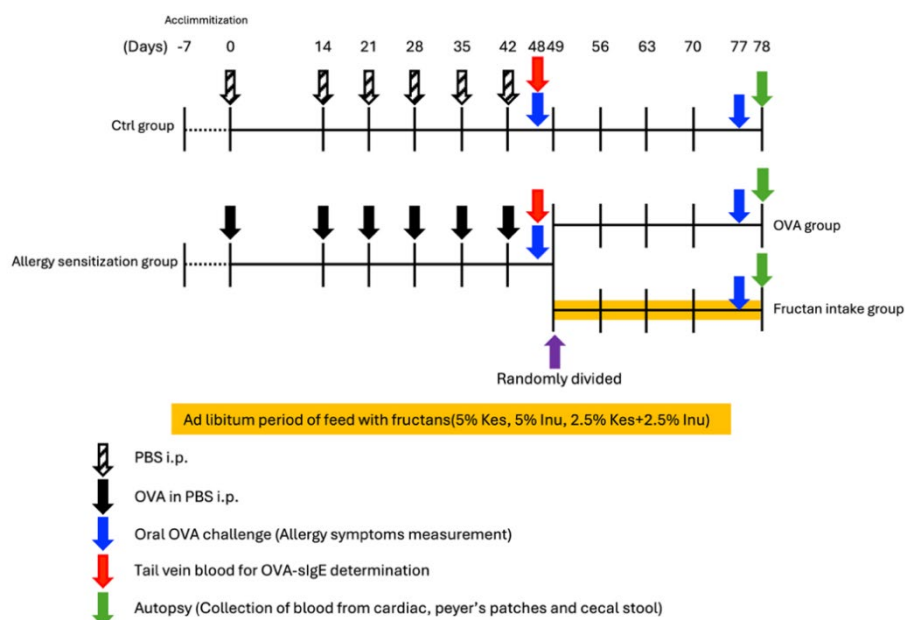


Figure 9. Experimental schedule for establishing the OVA-induced food allergy mouse model in the allergy improvement test.

OVA の調製

第二章と同様の方法で実施した。

アレルギー症状の評価

第二章と同様の方法で実施した。

ELISA

OVA 特異的 IgE の測定は第二章の方法を一部変更した。具体的には POD-linked anti-mouse IgE を第二章では PBS にて希釈していたが、1:1,000 ブロッキング溶液の割合で希釈した。この変更点以外は第二章と同様の方法を用いた。

RNA 抽出および RT-qPCR

パイエル板中の RNA 抽出および逆転写は第二章と同様の方法を用いた。

RT-qPCR は、QIAcuity One 5plex Platform System FUL-1 (QIAGEN) を用いた。各反応液は 3× EvaGreen PCR Master Mix (QIAGEN) 5.500 μL、forward および reverse primer (50 μM) 各 0.132 μL、RNase-free water 9.611 μL、cDNA 1.500 μL を使用した。プライマーは第二章と同様のものを用いた。PCR mixture を QIAcuity Nanoplate 8k with 96 wells (QIAGEN) に分注し、ローラーを用いて QIAcuity Nanoplate Seal (QIAGEN) で封止した。プレートを装置にセットし、priming、cycling、imaging の各ステップを自動的に実行した。image acquisition は 150 ms の露光時間で実施した。

データは QIAcuity 2.0.20 software suite (QIAGEN) を用いて解析した。各サンプルのサイトカイン遺伝子コピー数は総遺伝子数(18S rRNA 数)にて補正した。具体的には、テンプレート cDNA 1 μL あたりのサイトカイン遺伝子コピー数をテンプレート cDNA 1 μL あたりの総遺伝子数で割った値として定義した。総遺伝子数は QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) を用いた qPCR により定量した。

16S rRNA アンプリコンシーケンシング

第二章と同様の方法を用いた。本試験の 16S rRNA 遺伝子 NGS データセットは、SRA に登録されている (accession number : PRJNA1156344)。

バイオインフォマティクス解析

QIIME2 のバージョン (v2023.5) および Quality filtering and denoising of sequence data were performed using the DADA2 pipeline のパラメーター処理 (parameters: p-trunc-len-f 240 and p-trunc-len-r 240) 以外は第二章同様の方法を用いた。

盲腸内容物中の SCFAs および乳酸濃度の測定

第二章と同様の方法で実施した。

統計解析

β 多様性は、PERMANOVA を用いて p 値を算出した。腸内細菌叢の占有率に関する統計解析は、GraphPad Prism v 10.2.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、Kruskal-Wallis test を実施した。それ以外のデータは、parametric ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) を行った。UBA7173 と SCFAs または乳酸の相関解析は

nonparametric Spearman correlation を用いて実施した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

アレルギー改善試験におけるフルクタンによる OVA 誘導食物アレルギー指標に対する影響
 アレルギー予防効果が知られているフルクタンを併用摂取することで、アレルギー改善効果が増強されるかどうかを検討するため、OVA アレルギーマウスモデルにて検討した。フルクタン摂取群は、OVA 群と比較してアレルギースコアおよび直腸温が有意に改善した (Figure 10a,b)。さらに、Kes+Inu 群では OVA 特異的 IgE レベルが顕著に低下した (Figure 10c)。また、OVA チャレンジ後の食餌摂取に伴うパイエル板における炎症性サイトカイン発現へのフルクタンの影響を評価した。しかし、パイエル板のサイトカイン解析では、OVA 群とフルクタン摂取群の間に有意な差は認められなかった (Supplementary Table S1)。フルクタン摂取前のアレルギー感作終了時点では、すべての OVA 感作群で、Ctrl 群と比較してアレルギースコアおよび OVA 特異的 IgE が有意に高く、直腸温変化が顕著に低下していた。加えて、OVA 感作群間では有意な差は認められなかった (Supplementary Figure S1)。なお、いずれの群においても体重および飼料摂取量に有意な差は認められなかった。

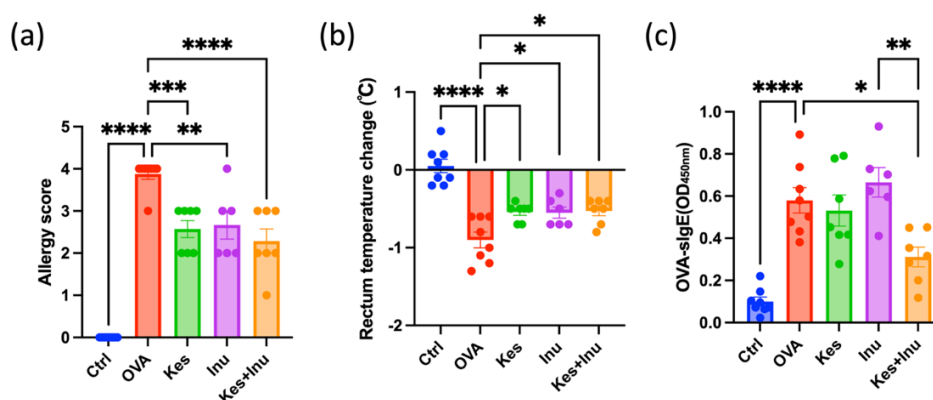


Figure 10. Improvement effects of short- and long-chain fructans on OVA-induced food allergy.

(a) Allergy scores of BALB/c mice subjected to OVA-induced food allergy. (b) Changes in rectal temperature 30 min after oral administration of OVA. (c) OVA-specific IgE levels in the serum.

Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs OVA and among fructan-treated groups.

アレルギー改善試験におけるフルクタンが腸内細菌叢に及ぼす影響

第二章では、短鎖および長鎖フルクタンの摂取により腸内細菌叢が変化し、それが食物アレルギー予防効果に関連していたことが示唆された。第三章においても、前述のようにフルクタンがアレルギー症状を改善したことから、その作用に腸内細菌叢が関与している可能性を検討するため、腸内細菌叢の構造変化を解析した。第二章では Shannon index を用いたが、本改善試験でも Shannon index を算出したところ群間差が明瞭ではなかった (data not shown)。そのため、本章では Chao1 index を用いた。その結果、Ctrl 群と OVA 感作群の間に差は認められなかった (Figure 11a)。しかし、すべてのフルクタン摂取群では、OVA 群と比較して α 多様性指標である Chao1 指数が有意に低下した。さらに、全サンプル間の類似性を評価するため、主座標分析を行い、 β 多様性の評価として weighted UniFrac 距離を用いて生態学的距離を算出した (Figure 11b)。Ctrl 群と OVA 群の間では β 多様性に有意な変化は認められなかったが、OVA 群と Kes 群、Inu 群、Kes+Inu 群の間にはそれぞれ有意に異なる分布であった (各比較において $p < 0.01$)。また興味深いことに、第二章とは異なり、フルクタン摂取群間の比較においても有意差が認められ、Kes 群 vs Inu 群、Kes 群 vs Kes+Inu 群、Inu 群 vs Kes+Inu 群のすべての組み合わせで有意に異なる分布であることが示された (各比較において $p < 0.01$)。

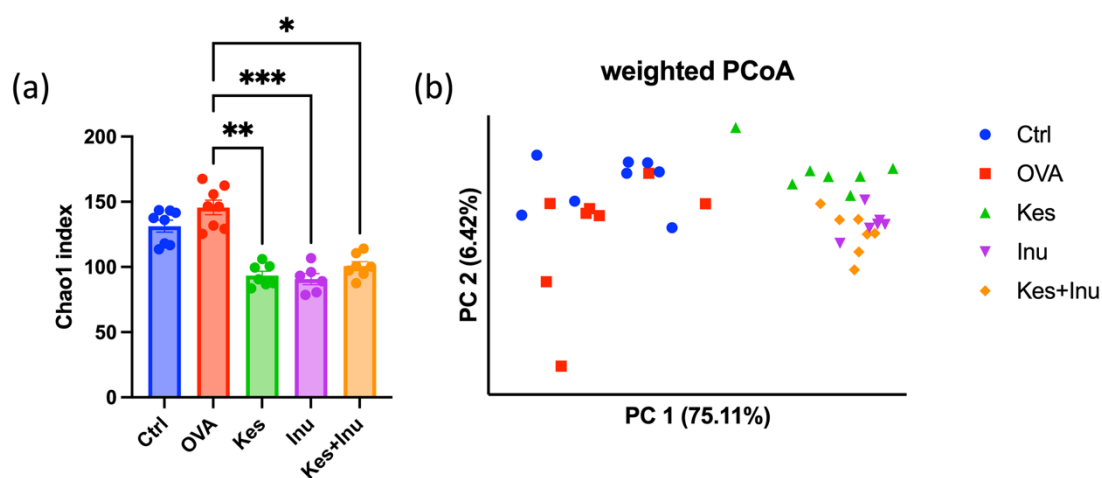


Figure 11. Alpha and beta diversity of the cecal microbiota in the allergy improvement study.

(a) Chao1 index values. Plots represent individual mice and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs OVA and among fructan-treated groups OVA group. (b) Principal coordinate analysis based on weighted UniFrac distances. The first primary component is plotted on the horizontal axis (PC1) and the second primary component is plotted on the vertical axis (PC2).

続いて腸内細菌叢の相対存在量を属レベルで解析した。Figure 12a には、各群において相対存在量が 1% を超える属を示した。*Bacteroides_H* はフルクタンを摂取することで増加したが、Kes+Inu 群で特徴的に増加していなかった。注目すべきことに、*Muribaculaceae* 科に属する *UBA7173* は Inu 群および Kes+Inu 群で有意に高く、特に Kes+Inu 群で顕著な増加が認められた (Figure 12b)。さらに、ASV に基づき菌種レベルの推定を行ったところ、*UBA7173* は主に *U. sp900540205* および *U. sp002491305* に対応する ASV がその主要構成種を占め (それぞれ平均 64.3%、35.7%)、前者は Inu 摂取群で、後者は Kes 摂取群で増加していたことが明らかとなった (Figure 12c, d)。また、第二章において増加が認められた *P. goldsteinii*、*P. distasonis*、および *Alloprevotella* についても評価した (Supplementary Figure S2)。その結果、*P. goldsteinii* は Kes 群で、*P. distasonis* は Kes 群および Kes+Inu 群で有意に増加していたが、Kes+Inu 群における相対存在量は 1% 未満であった。一方で、相対存在量が 1% 以上を示した *Alloprevotella* は、Kes 群でのみ増加し、Kes+Inu 群では増加しなかった。

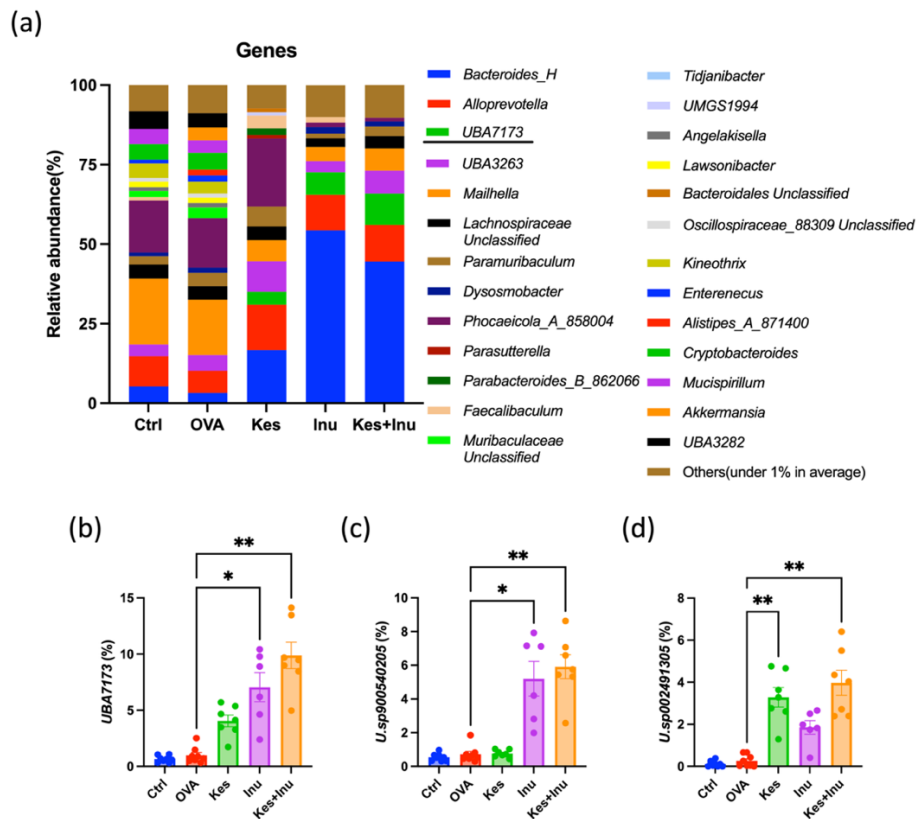


Figure 12. Changes in cecal bacterial abundances and their restoration by fructan administration in the allergy improvement study.

Changes in the relative abundances of (a) genus-level taxonomic profiles, (b) *UBA7173*, (c) *U. sp900540205* and (d) *U. sp002491305*. Genera with an average relative abundance lower than 1.0% are included in “Others.” Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs OVA and among fructan-treated groups.

アレルギー改善試験における盲腸内容物中の SCFAs および乳酸産生に対するフルクタンの影響

次に、第二章と同様にマウス盲腸内容物中の SCFAs および乳酸の濃度を定量した。OVA 群と比較して、酢酸濃度は Kes+Inu 群で有意に増加した (Figure 13a)。注目すべきことに、プロピオン酸および酪酸は Inu 群においてのみ有意に増加した (Figure 13b,c)。一方、乳酸濃度については群間で有意な差は認められなかった (Figure 13d)。また、*UBA7173* の存在量と酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度との間に有意な正の相関が認められ、とりわけ酢酸との相関が最も強かった (Figure 13e)。

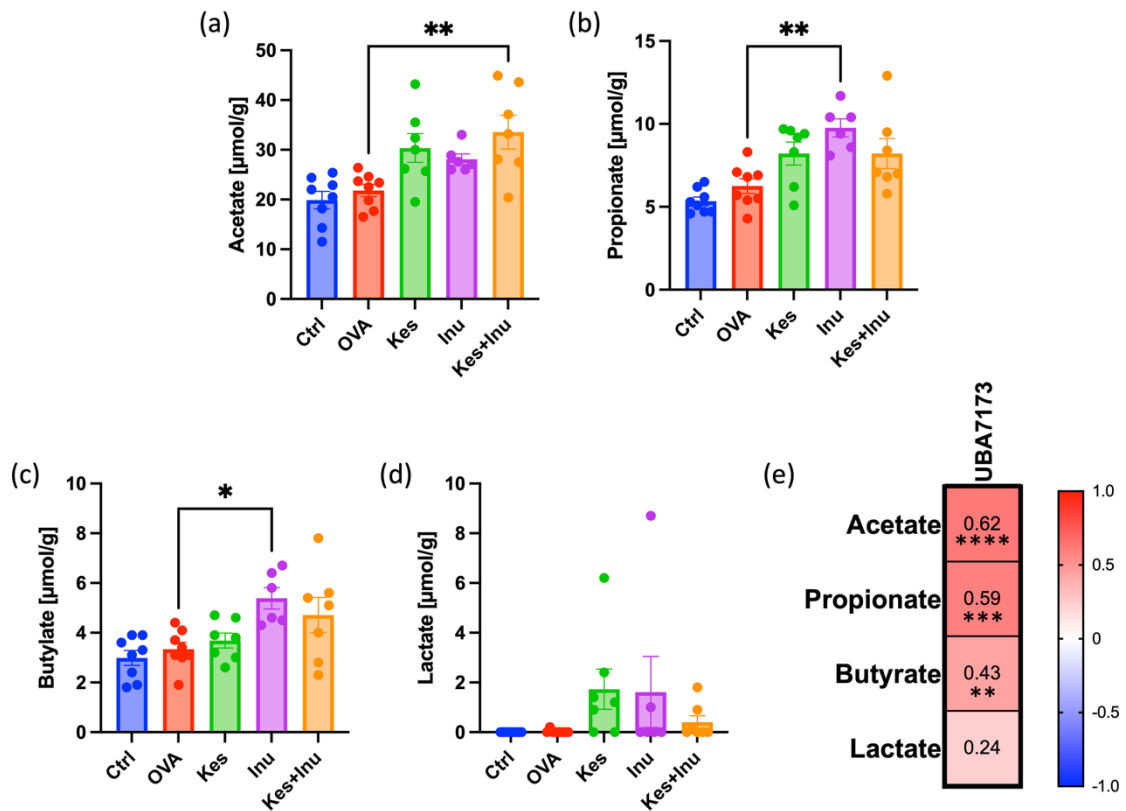


Figure 13. Effects of fructan administration on cecal short-chain fatty acid and lactate levels in the allergy improvement study.

Changes in (a) acetate, (b) propionate, (c) n-butyrate, and (d) lactate levels in cecal samples of OVA-induced food allergic mice with and without fructan administration. (e) Correlation analysis between UBA7173 and SCFAs or lactate was performed using nonparametric Spearman correlation. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. Correlation coefficients (r) are shown in each box. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. vs OVA and among fructan-treated groups.

考察

腸内細菌叢とアレルギーは深く相互に関連している。この知見は、第二章において、OVA 群と Ctrl 群の腸内細菌叢における β 多様性が異なること、またフルクタン摂取が腸内細菌叢を変化させ、アレルギーに対して有益な効果を誘導することが示されていることから支持される。本改善試験では、フルクタンの併用摂取が OVA 誘導食物アレルギーマウスモデルにおけるアレルギー症状をどのように緩和し得るかを検討した。

本研究の結果、OVA 処置群ではアレルギー症状の著しい増加、直腸温の有意な低下、および食物アレルギーの主要な指標である OVA 特異的 IgE の高値が認められた[22]。重要な点として、Kes および Inu の単独あるいは併用摂取は、これらの症状をいずれも有意に軽減した。なかでも、OVA 特異的 IgE レベルの有意な低下が認められたのは Kes+Inu 群のみであり、この併用が OVA 誘導食物アレルギー症状の緩和においてとくに優れた有効性を有することが示唆された。

序論で述べたように、Kes および Inu は腸内細菌叢を介してアレルギーを軽減し得るプレバイオティクスであり[14,15]、また DP の異なるフルクタンは、異なる細菌種により選択的に利用されることが報告されている[20,21]。このことから、Kes と Inu を併用した際に、単独摂取よりも強い OVA 特異的 IgE の低下が観察された理由として、DP の異なるフルクタンが異なる腸内細菌群に作用し、それらの併合作用が増強された可能性が考えられる。この仮説を検証するため、16S rRNA アンプリコンシーケンスを用いて腸内細菌叢を解析したところ、OVA 群と各プレバイオティクス介入群との間には β 多様性の有意な差が認められた（いずれの比較においても $p < 0.01$ ）。すなわち、Kes、Inu およびその併用は、アレルギー誘導後において腸内細菌叢組成を大きく変化させることが明らかとなった。さらに、プレバイオティクス介入群同士の比較（Kes vs Inu、Kes vs Kes+Inu、Inu vs Kes+Inu）においても、すべての組み合わせで β 多様性に有意に異なる分布であり（各比較において $p < 0.01$ ）、これは Kes と Inu が異なる腸内細菌叢に作用し、併用摂取によって単独摂取とは異なる独自の腸内細菌叢組成が形成されている可能性を示唆するものである。

興味深いことに、本改善試験においては、アレルギースコア、直腸温、OVA 特異的 IgE などのアレルギー関連指標が重度のままであったにもかかわらず、OVA 群の β 多様性は Ctrl 群と類似していた。この結果は、アレルギー感作後に OVA 群と Ctrl 群の β 多様性が異なっていたことを示した予防試験の知見とは対照的である。すなわち、アレルギー除去後 4 週間を経て腸内細菌叢が Ctrl 群に類似した状態へ戻ったとしても、それだけではアレルギー症状が軽減しない可能性が示唆される。この点から、単に「非アレルギー時の構成に近づける」ことではなく、フルクタンを介したさらなる腸内細菌叢の調節が、OVA アレルギーモデルマウスにおける症状の軽減に寄与していると考えられる。

次に、Kes と Inu の併用摂取によって最も大きな影響を受けた細菌群に着目して解析を行った。その結果、*Muribaculaceae* 科に属する *UBA7173* の存在量が Kes+Inu 群で有意に増加していることが明らかとなった。*Muribaculaceae* 科は、以前は *S24-7* 科として知られており、フルクタン投与により増加すること[53]、ならびに複雑な多糖を分解しうる能力を有すること[54]が報告されている。さらに、DSS 誘導性大腸炎マウスにおいて、ナノ粒子を用いた処置後に *Muribaculaceae* レベルと TNF- α 、IL-6、IL-1 β といった炎症性サイトカインとの間に負の相関が報告されていること[55]、肥満モデルにおいて *Muribaculaceae* の増加がプレバイオティクス介入による代謝および粘液層マーカーの改善と関連していること[56]など、*Muribaculaceae* 科は一貫して抗炎症的性質を有することが示されている。これらの知見を踏まえ、本研究において *Muribaculaceae* 科に属する *UBA7173* が増加したことは、Kes+Inu 群における OVA 特異的 IgE レベルの低下およびアレルギー症状の改善に寄与した可能性があると考えられる。

また、 β 多様性の結果および属レベルの分類学的解析から、Inu は Kes と比較して腸内細菌叢により大きな変化を誘導することが示唆された。しかし、Inu 単独摂取では OVA 特異的 IgE レベルの有意な低下は認められなかった。このことから、Inu によって誘導される微生物叢の変化のみならず、Kes によって誘導される変化も、OVA 特異的 IgE 低下に重要な役割を果たしていると考えられる。実際、Kes+Inu 群では *UBA7173* の存在量が最も大きく増加しており、Inu による腸内細菌叢の変化が基盤を形成し、その上に Kes がさらなる影響を及ぼすことで、腸内細菌叢への作用が増強された可能性がある。したがって、本研究において観察された Kes と Inu 併用摂取後の *UBA7173* の顕著な増加は、宿主における抗炎症反応の増強に寄与した可能性が高い。一方で、本改善試験では Treg 細胞などの免疫学的マーカーや炎症関連因子を直接測定しておらず、これらの機序を直接的に裏付けることはできていない点は本研究の限界である。

また、*UBA7173* に属する菌種を調査したところ、*U. sp900540205* および *U. sp002491305* が主要構成種であり、それぞれ Inu 摂取群および Kes 摂取群で有意に増加していた。dbCAN_seq (https://bcb.unl.edu/dbCAN_seq/index.php) による機能予測では、*U. sp900540205* は GH32 酵素を有していると予測され、これは endo-/exo-inulinase、invertase、levan-fructotransferase などを含む GH32_Inu-like サブファミリーに属すると推定されている。このことから、*U. sp900540205* は Inu を含むフルクタン系基質を分解しうる β -fructofuranosidase 様酵素をコードしている可能性があり、本試験において Inu 摂取群で *U. sp900540205* が増加した一因となったことが考えられる。*U. sp002491305* についても Kes 摂取群での増加が認められたことから、同様に Kes などの短鎖フルクタンの利用能に関与する GH32 酵素を保有している可能性が示唆される。しかしながら、*U. sp002491305* の GH32 に関連する遺伝子配列が公開されておらず、GH32 遺伝子の有無や、これら GH32 酵素の基質特異性および分解活性を生化学的に検証するには

至らなかった。さらに各 GH32 遺伝子の発現量を PCR 等により存在量比較することも実施できなかった。これらの点は、今後の重要な検討課題である。

先行研究により、*Muribaculaceae* 科はフルクタンなどの多糖を分解し、酢酸およびプロピオン酸といった SCFAs を産生し得ることが示されている[57,58]。また、食物アレルギー患者では SCFA レベルが低下していること[59]、落花生アレルギーモデルやアレルギー性気道炎症モデルマウスに SCFAs を投与するとアレルギー症状が軽減すること[60,61]、さらに Kes や Inu が SCFAs 産生を増加させること[62,63,64]が報告されている。これらの知見および第二章の結果を踏まえ、本改善試験においても同様に盲腸内容物中の SCFAs および乳酸濃度を測定した。その結果、Kes+Inu 群では酢酸濃度が有意に上昇していた。さらに、酢酸濃度の上昇は *UBA7173* 存在量と正の相関を示した。Kes+Inu 群では唯一 OVA 特異的 IgE レベルの有意な低下が認められていることから、アレルギー症状の改善には、*UBA7173* の増加を含む腸内細菌叢の変化に起因した酢酸産生の増強が関与している可能性が高いと考えられる。

第二章では、Kes 摂取により *Alloprevotella* および *P. distasonis* の増加、Inu 摂取により *P. goldsteinii* の増加が認められた。また、これらの食物繊維は異なる代謝産物にも影響を及ぼし、Kes はプロピオン酸を、Inu は乳酸を増加させた。Kes+Inu 群では、OVA 特異的 IgE が最も大きく低下するとともに、酢酸および乳酸の両方が増加していた。一方、本改善試験において同じフルクタンを使用したにもかかわらず、代謝産物および細菌組成の変化は予防試験とは異なる挙動を示した (Figure 14)。具体的には、Kes 摂取では酢酸の増加傾向がみられ、Inu 摂取ではプロピオン酸および酪酸の増加が認められたものの、これらの群では OVA 特異的 IgE レベルの有意な低下は観察されなかった。対照的に、Kes+Inu 群は唯一 OVA 特異的 IgE レベルの有意な低下を示した群であり、この群では *UBA7173* の存在量が有意に増加するとともに、酢酸レベルも上昇していた。このことは、同一の介入であっても、介入開始時点における腸内細菌叢の状態の違いにより、その作用様式が異なり、異なる細菌群の変化を介して多様なアレルギー症状抑制機構が発現し得ることを示唆している。

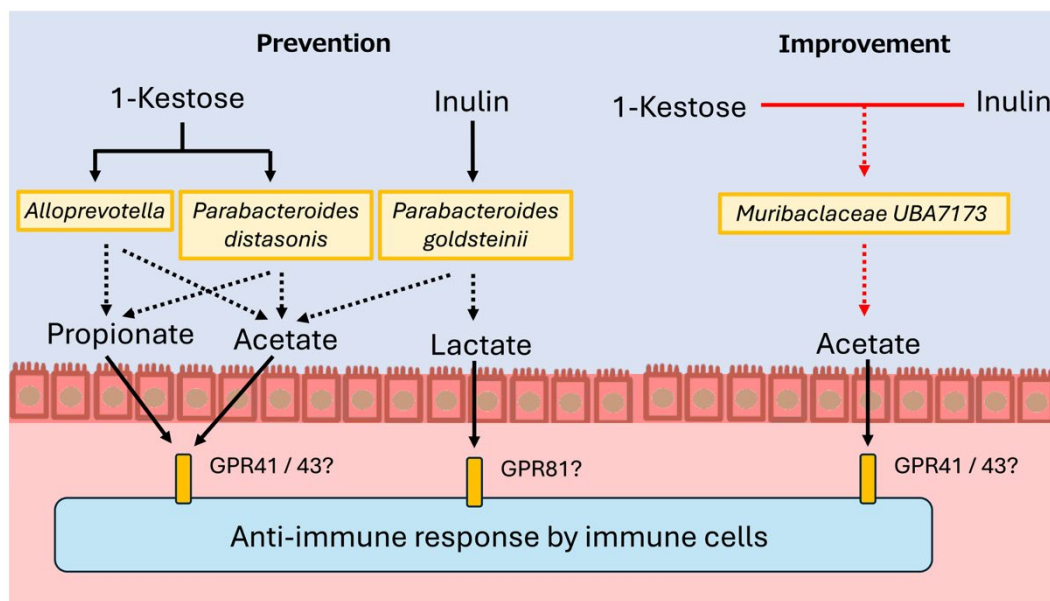


Figure 14. Comparison of OVA-induced food allergy prevention and improvement by fructan administration.

Blue letters indicate the results of this therapeutic study. Red dashed lines indicate possible effects suggested by this therapeutic study. Solid black lines indicate effects shown in previous studies, and black dashed lines indicate possible effects suggested by previous studies.

本改善試験には、結果を解釈する際に考慮すべきいくつかの限界が存在する。第一に、*UBA7173* および関連する SCFAs の増加が認められたものの、本研究では、これらの変化の抗炎症作用を明確に裏付ける腸管内の Treg 細胞などの特異的バイオマーカーを含めておらず、抗炎症効果を決定的に示すには至っていない。このことは、微生物学的変化を機能的な健康アウトカムに直接結びつけるために、さらなる生化学的および免疫学的解析の必要性を示している。第二に、Kes と Inu の併用摂取がアレルギー症状に有益な影響を示したことは有望であるが、これらのフルクタンが腸内細菌叢を調節し、SCFAs 産生を高める正確な生物学的機序は未だ十分に解明されていない。より詳細な検討として、*UBA7173* の分離、制御された条件下での培養、遺伝学的解析などを行うことで、その代謝機能や SCFAs 産生への寄与について、より深い理解が得られる可能性がある。最後に、今後の研究では、本改善試験の予備的知見を発展させるためにヒトを対象とした臨床試験を実施する必要がある。これらの研究により、アレルギー反応に対する介入の適用性および有効性に関する重要な知見が得られる可能性がある。加えて、これらの食餌成分が腸内細菌叢の構成や機能にどのように影響を及ぼすのかを明らかにするため、詳細な機序解明研究も実施されるべきである。これにより、標的化された食事指針や治療的介入の開発につながる事が期待される。

結論として、本研究は、Kes と Inu の併用摂取が、OVA アレルギーマウスモデルにおいてアレルギー症状を有意に軽減することを示した。この効果は、*Muribaculaceae* 科に属する *UBA7173* の増加と関連した酢酸を中心とする SCFAs 産生の増加に起因している可能性が示唆される。これらの知見は、アレルギー管理のための新規介入物として、フルクタンに関する新たな研究の道を拓くものである。臨床現場への応用を進めるとともに、これらの物質がアレルギー反応に機序的にどのような影響を及ぼすのかをより深く理解することで、アレルギー予防および改善に対する有効な食事戦略の開発につながることを期待される。

第四章

ヒトにおける短鎖および長鎖フルクタン併用摂取が

腸内細菌叢に及ぼす影響

目的

第二章および第三章において Kes と Inu の併用摂取により、フルクタン分解に関与する GH32 酵素を有すると予測される有用菌が効果的に増加することが示唆された。また、この菌群の増加が、アレルギーの予防および改善効果に寄与している可能性も示唆された。

しかしながら、一般にヒトとマウスでは遺伝的背景や食事内容が大きく異なるため、腸内細菌叢の構成や代謝機能にも相違がみられる[65]。このため、フルクタン摂取によって増加する菌種が一致しない可能性がある。

ヒトにおける先行研究では、Kes の摂取により *Bifidobacterium* や *Faecalibacterium prausnitzii* の増加、あるいは *Escherichia coli* の減少が報告されている[66-70]。一方、Inu の摂取では *Bifidobacterium*、*Anaerostipes*、*Faecalibacterium*、*Lactobacillus* の増加に加え、*Bacteroides* の相対存在量が低下することが報告されている[71,72]。これら既存の研究の多くは、疾患を有する被験者を対象としており、健康な成人を対象とした試験は限定的である。また、Kes と Inu を併用して評価した試験はほとんど存在しない。数少ない報告として、青年期男性を対象とした研究で、短鎖および長鎖フルクタンの併用摂取がカルシウム吸収および骨ミネラル化を促進したことが報告されているが[73]、その際にどのような有用菌が増加したかは明らかでない。そのため、Kes および Inu の併用摂取がヒトにおいてどのような有用菌の増加を誘導するのかを調査することを目的とした。

本研究では、Kes および Inu の併用摂取によりヒトにおいて増加する菌について、その増加様式を調査するため、フルクタン分解に関与する GH32 酵素に着目した。すなわち、ヒト介入後に増加した菌が GH32 を保有し、さらに *in vitro* において Kes または Inu を基質として増殖することが確認できれば、当該菌の増加にフルクタンの直接資化が関与している可能性を支持する根拠となると考えられる。

加えて、ヒトでは個人ごとの食事習慣や栄養摂取状態といった宿主側因子が、腸内細菌叢の構成およびプレバイオティクスに対する反応性に強く影響することが知られている[74]。したがって、併用摂取による腸内細菌叢変化を適切に評価するためには、日常の食事要因を把握した上で検討することが望ましい。一方で、プレバイオティクスと食事因子の相互作用を同時に評価した研究は依然として限られている。

以上の背景を踏まえ、第四章では、健康な成人を対象に二重盲検ランダム化比較試験 (randomized controlled trial: RCT) を実施し、Kes および Inu 併用摂取後の腸内細菌叢の変化を評価した。特に、フルクタン分解に関与する GH32 酵素を保有する細菌種に焦点を当てた。さらに、食事調査を行い、食事因子がプレバイオティクス反応性にどのような影響を及ぼすかを検討した。

材料と方法

倫理的承認

本研究プロトコルは、名古屋学芸大学倫理委員会の承認を受けた (承認番号: 772)。研究は、ヘルシンキ宣言および「人を対象とする医学・生物学的研究に関する倫理指針」に準拠して実施した。また、本研究プロトコルは Japan Registry of Clinical Trials (jRCT) に登録されている (登録番号: jRCT1041240180)。

研究デザインおよび参加者

本ランダム化比較試験には、合計 40 名の健常成人ボランティアが登録された。組み入れ基準は以下のとおりである: (1) 消化器疾患の診断を受けていない者、(2) 過去 1 週間にプロバイオティクスまたはプレバイオティクスのサプリメントを摂取していない者、(3) 過去 1 週間に抗生物質を使用していない者。すべての参加者は、研究目的および手順について十分な説明を受けた後、書面によるインフォームドコンセントを取得した。個人情報には匿名化され、機密性の保持に努めた。

ランダム化および盲検化

すべての組み入れ基準を満たした参加者は、Oe らの方法[75]に従い、Microsoft Excel におけるランダム関数に基づいて、プレバイオティクス群 (Prebio 群) またはプラセボ群 (Placebo 群) のいずれかに 1:1 の割合で無作為に割り付けられた。ランダム化は、研究に関与しない大学職員により実施された。割付情報はパスワードで保護されたファイルにより秘匿され、介入期間を通じて参加者および研究者の双方に対し盲検化が維持された。

介入内容および研究手順

Prebio 群の参加者には、Kes (DP3, 98% purity; Itochu Sugar Co., Ltd., Hekinan, Japan) 3 g/日と Inu (average DP 8-13; Inulia®, Teijin, Japan) 3 g/日を 4 週間摂取させた。Placebo 群には、マルトース (food-grade; Awajiya, Osaka, Japan) 3 g/日およびコーンスターチ (food-grade; Hinokunishokuhin, Kumamoto, Japan) 3 g/日を摂取させた。す

すべての粉末は事前に計量・混合し、盲検化を維持するため不透明のアルミ包装に1週間分ずつ分包した。参加者には1日当たり6gを摂取するよう指示した。ベースライン(0週目)では、Brief Self-administered Diet History Questionnaire (BDHQ)を用いて食事調査を実施した。

糞便サンプルは、0週目(ベースライン)および4週目(介入後)にFS-0015採便キット(TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd., Japan)を用いて採取した。参加者には、介入期間中は通常の食事および生活習慣を維持するよう指示した。介入期間中は、有害事象および研究からの脱落をモニタリングした。

有害事象(例:腹痛)により研究を中止した参加者はいませんでした。すべての研究中止は、急性胃腸感染症(例:ウイルス性胃腸炎)に対する抗生物質の使用に起因し、事前に定義された除外基準に従ったものであった。

DNA抽出および16S rRNA 遺伝子シーケンシング

糞便サンプルからのDNA抽出は、QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて、メーカーのプロトコールに従って実施した。16S rRNA 遺伝子シーケンシングは、第二章と同様の方法にて実施した。本試験の16S rRNA 遺伝子NGSデータセットは、SRAに登録されている(accession number: PRJNA1301572)。

バイオインフォマティクス解析

第三章と同様の方法を用いて実施した。

qPCRを用いた糞便中微生物の定量解析

NCBIデータベースに登録されている*B. adolescentis*および*B. longum*株に由来するGH32遺伝子である*inuA*および*cscA*ホモログ配列を対象に塩基配列アラインメントを実施した。これらのアラインメントから得られたコンセンサス領域に基づき、*B. adolescentis*および*B. longum*に特異的なGH32遺伝子断片を選択的に増幅するためのプライマーセットを設計した。

qPCRは、*B. longum*および*B. adolescentis*に特異的なGH32遺伝子のコピー数と、16S rRNA 遺伝子のコピー数を測定するために実施した。増幅反応は、メーカーの手順に従い、PowerTrack SYBR Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を用いてQuantStudio 3システム(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)により行った。

qPCR反応条件は、95°Cで2分間の初期変性、72°Cで1分間の最終伸長とし、各アッセイは40サイクルの反応から構成した。各サイクルは、95°Cで10秒間の変性、15秒間のアニーリング、72°Cで15秒間の伸長からなる。アニーリング温度は、*inuA*については65°C、*cscA*および16S rRNAについては60°Cに設定した。プライマー配列はSupplemental Table S2に示した[27]。

絶対定量は、糞便 DNA サンプルから得られた PCR アンプリコンを外部標準として用いることで行った。*inuA* および *cscA* のレベルは、それぞれの遺伝子コピー数を 16S rRNA 遺伝子コピー数で除し、 10^3 を乗じた値として定義した。*inuA* および *cscA* レベルの変化量は、介入後値からベースライン値を差し引くことで算出した。

細菌株および培養条件

B. longum subsp. *longum* JCM 1217 および *B. adolescentis* JCM 1275 のタイプ株は、Japan Collection of Microorganisms (JCM) より取得した。すべての菌株は、既報の配方に基づいて調製した改変 brain heart infusion (BHI) 培地である reinforced flora (RF) 培地を用いて培養した[76]。RF 培地は、BHI broth (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に、5 g/L yeast extract (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA)、5 g/L K_2HPO_4 (Fujifilm-Wako, Osaka, Japan)、8 g/L glucose (Fujifilm-Wako)、0.5 g/L L-cysteine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1 g/L Tween 80 (Tokyo Kasei Chemical Co., Tokyo, Japan)、0.005 g/L hemin (Fujifilm-Wako)、0.002 g/L vitamin K_1 (Fujifilm-Wako)、0.001 g/L resazurin sodium salt (Tokyo Kasei Chemical Co.)、0.025 g/L sodium acetate (Fujifilm-Wako)、0.01 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Fujifilm-Wako) を加え、pH を 6.8 に調整して調製した。必要に応じて、0.2 μm セルロースアセテートフィルター (DISMIC-25CS, Advantec, Tokyo, Japan) で滅菌した Kes (<98% purity; Itochu Sugar Co., Ltd., Hekinan, Japan) 0.25% (w/v) 溶液および chicory 由来 Inu (Sigma-Aldrich) 0.25% (w/v) 溶液を、インキュベーション前に RF 培地へ添加した。増殖アッセイでは、各菌株をまず Kes 0.25% (w/w) および Inu 0.25% (w/w) を含む RF 培地で 37°C、嫌気条件下 (AnaeroPack system; Mitsubishi Gas Chemical Company, Tokyo, Japan) にて 20 時間前培養した。得られた培養液を滅菌水で 10 倍希釈 (180 μL の滅菌水 + 20 μL の培養液) し、OD660 nm を測定した。次に、得られた細菌懸濁液を RF 培地に加えて初期 OD660 nm が 0.1 となるよう調整した。

まず、96-deep well plate (AxyGen Scientific, CA, USA) の各ウェルに、RF 培地 300 μL を分注し、2.5% (w/w) Kes、2.5% (w/w) Inu または 2.5% (w/w) Sucrose のいずれかを 80 μL 添加した。続いて、調整した細菌懸濁液 20 μL を接種し、基質の最終濃度が 0.5% となるようにし、37°C、嫌気条件下でインキュベートした (n=6)。接種 27 時間後、各培養液 20 μL を滅菌水 180 μL に移し、96-well flat-bottomed plate (4845-96F; Watson Bio Lab, CA, USA) にて希釈し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2; Molecular Devices, CA, USA) を用いて OD660 nm を測定し濁度を評価した。

増殖評価は、基質非存在下の対照 (RF 培地のみ) における OD660 nm 値を差し引くことで背景補正を行い、その補正後の値を基質ごとに算出した。相対増殖量は、同一実験内で Sucrose を基準 (100%) として、各基質での背景補正後の増殖量を正規化することで算出した。

糞便サンプル中の SCFAs および乳酸濃度の測定

第二章と同様の方法を用いて実施した。

食事評価

食事調査は、ベースライン時に BDHQ を用いて実施した。BDHQ は、過去 1 か月における日本人成人の習慣的な食品および栄養素摂取量を推定するために開発され、妥当性が検証された調査票である [77,78]。BDHQ は 80 項目で構成され、58 種類の食品群および 100 種類以上の栄養素摂取量の推定が可能である。標準的な摂取量は日本の一般的な調理法に基づいて設定されている。また、栄養補助食品の摂取は解析に含めなかった。栄養素および食品群の摂取量は、統計解析に先立ち、密度法 [79] を用いて、エネルギー摂取量 1000 kcal 当たりの摂取量 (g/1000 kcal) に調整した

統計解析

すべての統計解析は GraphPad Prism version 10.0.6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて実施した。*Bifidobacterium* 株の *in vitro* 増殖アッセイについては、unpaired-t test を用いて解析した。その他のデータについては、ノンパラメトリック手法を用いて解析し、群間比較には Mann-Whitney U test を、介入前後の群内比較には Wilcoxon test を用いた。食事因子と腸内細菌叢指標との関連の評価には nonparametric Spearman correlation を用いた。p < 0.05 を統計学的に有意とし、p < 0.1 を傾向ありとした。

結果

参加者の詳細およびベースライン特性

Figure 15 に本研究のフローチャートを示す。研究期間中、Prebio 群で 2 名、Placebo 群で 1 名が抗生物質使用により除外され、最終的に 37 名 (Prebio 18 名、Placebo 19 名) が解析対象となった。腹痛などの有害事象による中止者は認められなかった。すべての除外は、急性胃腸炎 (例: ウイルス性胃腸炎) に対する抗生物質使用によるものであり、事前に設定した除外基準に従うものであった。ベースライン特性は Table 2 に示した。参加者は全員健常成人であったが、各群に 1 名ずつ季節性アレルギー性鼻炎を有する者が含まれていた。性別、年齢、体重、BMI については群間に有意差は認められなかった。一方、身長は Prebio 群で Placebo 群よりも高く、サプリメント摂取日の総数は Placebo 群で Prebio 群より有意に多かった。

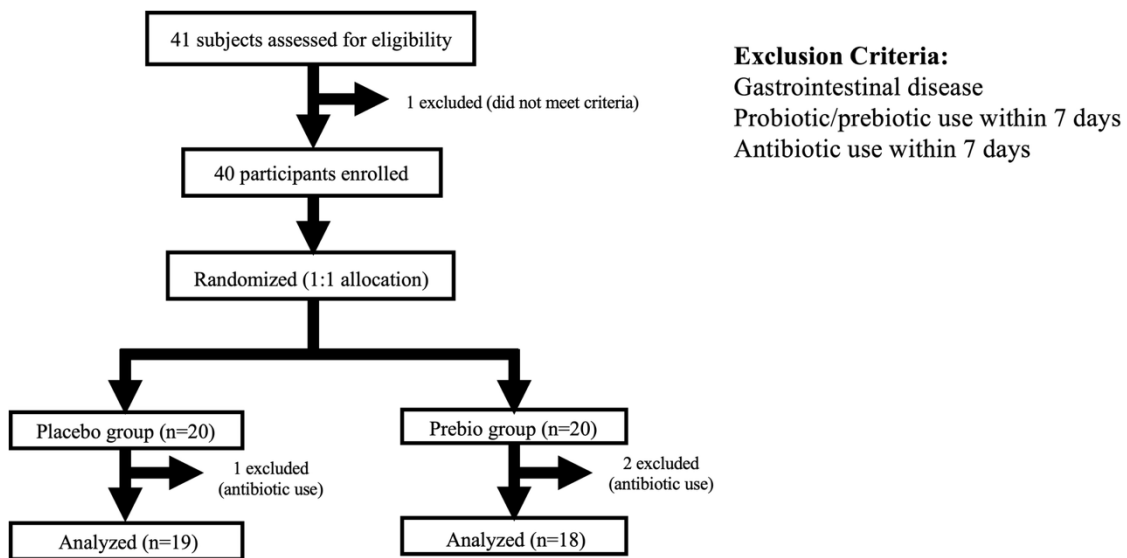


Figure 15. Flow diagram of participant enrollment, randomization, and analysis according to the study protocol.

Table 2. Baseline characteristics of the two groups.

	Placebo group	Prebio group	p-value
Sex (Male / Female)	1 / 18	1 / 17	>0.9999
Age (years)	20.38 ± 1.12	20.68 ± 0.82	0.4076
Height (cm)	156.30 ± 6.19	160.54 ± 6.47	0.0222
Body weight (kg)	50.27 ± 5.18	52.17 ± 7.93	0.3383
BMI (calculated from BDHQ)	20.57 ± 1.85	20.17 ± 2.18	0.3312
Pre-existing medical conditions	1 participant: hay fever	1 participant: hay fever	>0.9999
Medications and supplements	1 participant: Fexofenadine	1 participant: Fexofenadine 1 participant: Pyridoxal phosphate, Jumihaidokuto	0.6039
Intake Days	27.74 ± 0.13	27.06 ± 0.3	0.0497

Data are presented as mean ± SEM.

ベースラインおよび介入後の糞便中腸内細菌叢の多様性および構成

Kes および Inu 補給が腸内細菌叢組成に及ぼす影響を評価するため、ベースラインおよび介入後に収集した糞便サンプルについて 16S rRNA 遺伝子シーケンシングを実施した。プレバイオティクス摂取に対する腸内細菌叢の応答を明らかにするため、微生物多様性および分類学的構成の変化について解析した。Shannon index を用いて評価した α 多様性は、Prebio 群においてのみ介入後に有意な低下が認められた一方、Placebo 群では有意な変化は認められなかった (Figure 16a)。weighted UniFrac 距離に基づく PCoA により評価した β 多様性では、両群ともベースラインと介入後の間に有意な差は認められず (Figure 16b)、介入期間を通じて腸内細菌叢全体の構成は比較的安定していたことが示唆された。

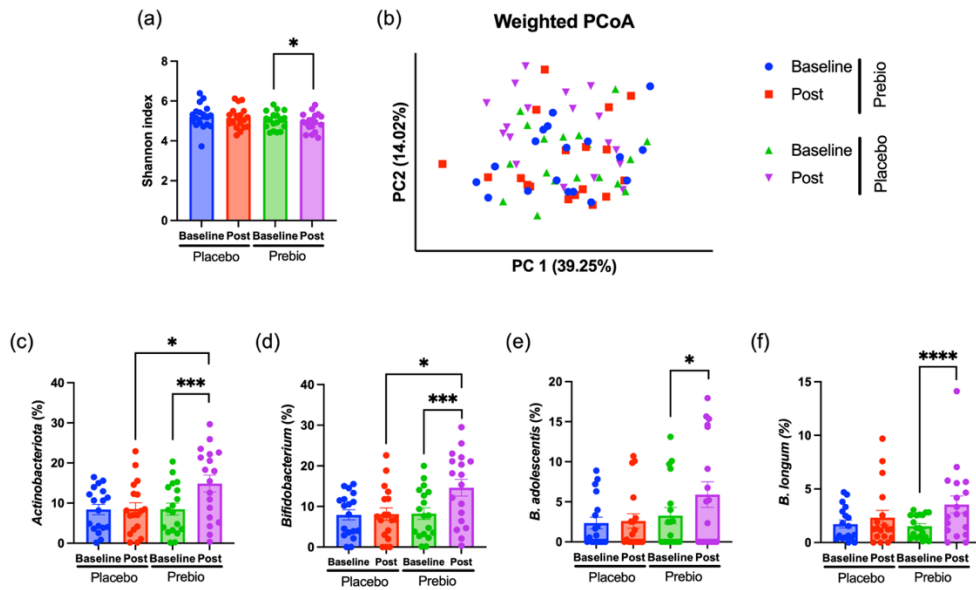


Figure 16. Effects of 1-Kestose and Inulin supplementation on fecal microbiota diversity and composition.

(a) Shannon index at baseline and post-intervention (Post) in the Prebio and Placebo groups. (b) Principal coordinates analysis (PCoA) based on weighted UniFrac distances. The first principal coordinate (PC1) is plotted on the x-axis, and the second principal coordinate (PC2) is plotted on the y-axis. (c) Relative abundance of phylum *Actinobacteria* that were significantly increased in the Prebio group after intervention. (d) Relative abundance of genus *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium_388775*) within *Actinobacteria* that significantly increased in the Prebio group post-intervention. Relative abundance of species (e) *B. adolescentis* and (f) *B. longum* within *Bifidobacterium* that significantly increased in the Prebio group post-intervention * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

本研究においても第二章と同様に、補給に応答して増加した分類群について検討した。門レベルでは、介入後に有意な増加が認められたのは Prebio 群における *Actinobacteria* のみであった (Figure 16c)。*Actinobacteria* に属する菌の中で、Prebio 群において介入後に有意な増加を示したのは *Bifidobacterium_388775* (*Bifidobacterium*) のみであった (Figure 16d)。さらに、ASV に基づき菌種レベルの推定を行ったところ、*Bifidobacterium_388775* に属する菌の中で同様に増加した菌種では、*B. adolescentis* および *B. longum* のみであった (Figure 16e, f)。

これらの結果は、Placebo 群では同様の変化が認められなかったことから、観察された *Bifidobacterium* の増加がプレバイオティクス補給に対する特異的な応答であることを示している。一方、これらの分類学的変化が認められたにもかかわらず、糞便中の SCFAs 濃

度は、いずれの群においてもベースラインと介入後の間で有意な差は認められなかった (Supplementary Table S4)。

腸内細菌応答に基づくサブグループ解析

プレバイオティクス補給に対する腸内細菌叢の個人差を検討するため、Prebio 群の参加者を2つのサブグループに分類した。すなわち、ベースラインから介入後にかけて *B. adolescentis* および *B. longum* の両方が増加した者を「レスポonder」、どちらか一方でも増加しなかった者を「ノンレスポonder」と定義した。

性別、年齢、身長、体重、BMI、サプリメント摂取日数を含む被験者特性について、レスポonderとノンレスポonderの間に有意な差は認められなかった (Supplementary Table S5)。

α 多様性については両サブグループ間で差は認められなかったが、 β 多様性については、レスポonderの介入後において、ノンレスポonderのベースラインおよび介入後のいずれとも有意に異なる分布を示した (vs ノンレスポonder ベースライン $p < 0.01$ 、vs ノンレスポonder 介入後 $p < 0.05$) (Figure 17a, b)。

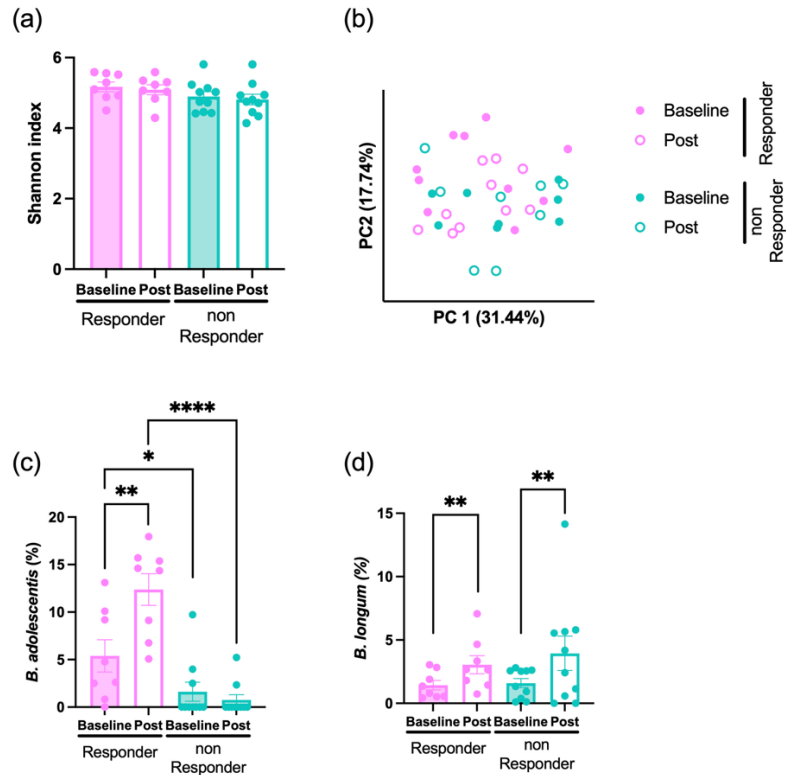


Figure 17. Subgroup analysis based on microbial response to prebiotic supplementation.

(a) Shannon index at baseline and post-intervention (Post) in responders and non-responders. (b) PCoA based on weighted UniFrac distances. The first principal coordinate (PC1) is plotted on the x-axis, and the second principal coordinate (PC2) is plotted on the y-axis. Relative abundances of (c) *B. adolescentis* and (d) *B. longum* at Baseline and Post in responders and non-responders. Plots represent individual participants; bars indicate mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

このことは、レスポンドーにおいて介入後に腸内細菌叢の構成が明瞭に変化したことを示唆する。次に、これまで特定された細菌群の分類学的変化をサブグループ別に解析した。レスポンドーでは、*B. adolescentis*と*B. longum*の相対存在量は介入後にベースラインと比較して有意に高値を示した。一方、ノンレスポンドーでは*B. longum*のみが介入後に有意に増加し、*B. adolescentis*は増加を示さなかった。また、*B. adolescentis*の相対存在量は、ベースラインおよび介入後のいずれにおいても、レスポンドーの方がノンレスポンドーより有意に高かった (Figure 17c, d)。ベースラインにおける門レベルおよび属レベルの比較では、レスポンドーとノンレスポンドーの間に顕著な差異は認められず、*B. adolescentis*を除くと、*Blautia_A_141781 unclassified*および*Bacteroides_H ovatus*のみが有意な差を示し、いずれもノンレスポンドーで高値であった (Supplementary Figure. S3)。したがって、両サブグループ間の細菌叢構成の差異は限定的であった。

このようにレスポonderで *Bifidobacterium* が特異的に増加したにもかかわらず、糞便中 SCFAs 濃度は、ベースラインおよび介入後のいずれにおいても両サブグループ間で有意な差を示さなかった (Supplementary Table S6)。

レスポonderおよびノンレスポonderにおける GH32 遺伝子量と *B. adolescentis* および *B. longum* によるフルクタン利用能

レスポonderにおいて *B. adolescentis* および *B. longum* の存在量が増加したことが、これらの菌種がフルクタンを分解する機能的能力に関連しているかどうかを検証するため、それぞれの分類群に特異的な GH32 遺伝子量を解析した。*B. adolescentis* に特異的な *inuA* ホモログの存在量は、*B. adolescentis* の相対存在量と類似した推移を示した。*inuA* はレスポonderにおいてのみ有意な増加を示し、ベースラインおよび介入後のいずれにおいてもレスポonderの方がノンレスポonderより高値であった (Figure 18a)。さらに、*inuA* の変化量 ($\Delta inuA$) はレスポonderで有意に大きかった (Figure 18b)。また、*B. longum* に特異的な *cscA* ホモログについても、レスポonderでのみ有意な増加を示し、ノンレスポonderでは変化が認められなかった (Figure 18c)。*cscA* の変化量 ($\Delta cscA$) も、レスポonderの方が大きい傾向を示した (Figure 18d)。

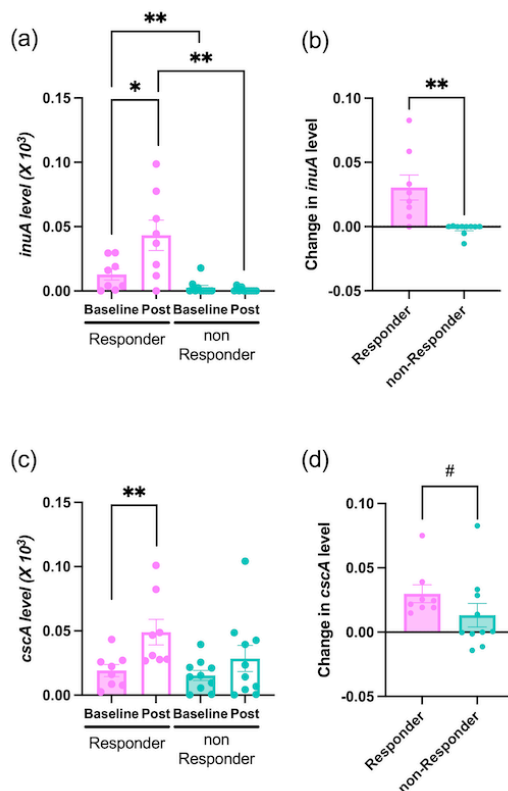


Figure 18. Abundance of GH32 gene homologs in responders and non-responders in the Prebio group.

(a) *inuA* level at baseline and post-intervention (Post). (b) Changes in *inuA* abundance ($\Delta inuA$). (c) *cscA* level at baseline and Post. (d) Changes in *cscA* abundance ($\Delta cscA$). Gene abundances were quantified using qPCR and normalized to total bacterial 16S rRNA gene copy number. The change in *inuA* and *cscA* levels was calculated as the difference between post-intervention and baseline values. Bars indicate mean \pm SEM. Pink bars, responders; blue bars, non-responders. # $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

inuA および *cscA* の qPCR 解析に続いて、*B. adolescentis* と *B. longum* を Kes または Inu を添加した培地で培養した。Kes を添加した培地では、両菌種とも有意な増殖を示したものの、*B. adolescentis* の増殖は *B. longum* より低かった (Figure 19a)。一方、Inu を添加した培地では、*B. adolescentis* のみが増殖を示し、*B. longum* は増殖しなかった (Figure 19b)。

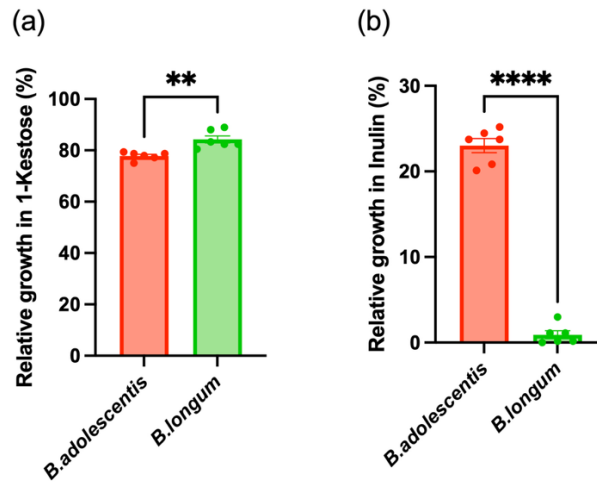


Figure 19. Growth responses of bifidobacteria to fructan.

(a) Growth of *B. adolescentis* and *B. longum* in Kes-supplemented medium. (b) Growth of *B. adolescentis* and *B. longum* in Inu-supplemented medium. Data are presented as mean \pm SEM; individual values are shown as dots. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

摂取栄養素と GH32 遺伝子応答との関連

レスポnderでは、*inuA* のベースライン値が高いこと、ならびに $\Delta inuA$ および $\Delta cscA$ が大きいという GH32 遺伝子量の特徴的な変化が認められたことから、次に、これらの遺伝子指標が BDHQ によって評価されたベースライン時の栄養素摂取量と関連するかどうかを検討した。nonparametric Spearman correlation の結果、ベースラインにおける亜鉛摂取量と *inuA* 量との間に傾向レベルの関連が認められた (Figure 20a)。また、 $\Delta inuA$ については、レチノールおよび C16:3 (n-6) 脂肪酸の摂取量と傾向レベルの正の相関が認められた。さらに、 $\Delta cscA$ については、C18:3 (n-3) 脂肪酸摂取量との間に負の相関の傾向が認められた。次に、これらの栄養素が微生物学的レスポnderの分類と関連しているかを検討するため、レスポnderとノンレスポnder間で摂取量を比較した。候補となった栄養素のうち、レチノールおよび C16:3 (n-6) 脂肪酸の摂取量はレスポnderでノンレスポnderよりも有意に高かった。一方、亜鉛および C18:3 (n-3) 脂肪酸の摂取量については群間に有意な差は認められなかった (Figure 20b, c)。

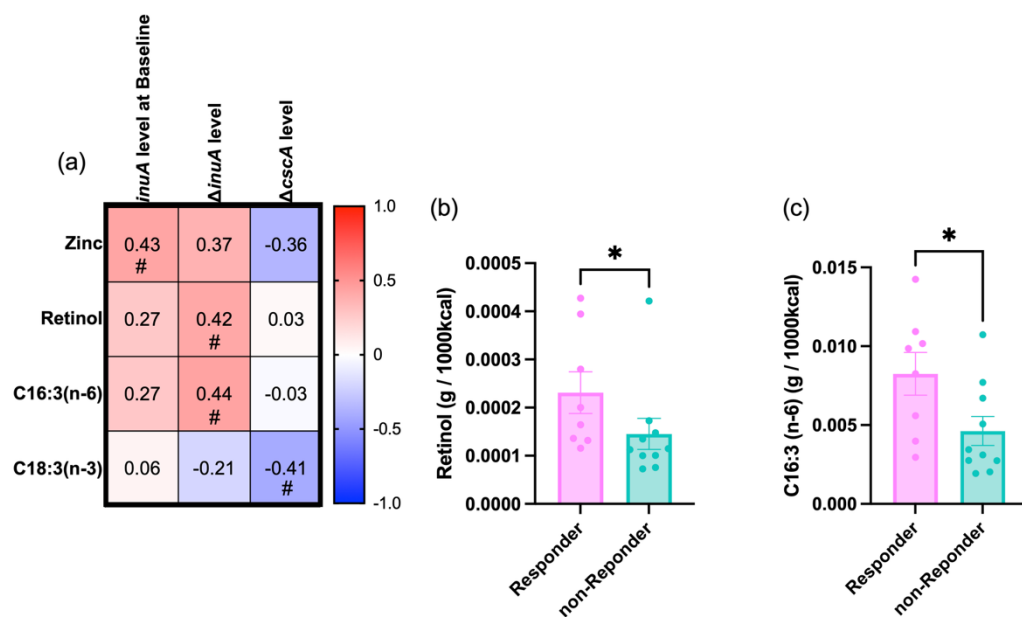


Figure 20. Associations between baseline nutrient intake and microbial GH32 gene response.

(a) nonparametric Spearman correlation between nutrient intake (zinc, retinol, C16:3 (n-6), and C18:3 (n-3)) and GH32 gene abundance markers (*inuA* at Baseline, $\Delta inuA$, $\Delta cscA$). (b) Comparison of baseline retinol intake between responders and non-responders. (c) Comparison of baseline C16:3 (n-6) intake between responders and non-responders. Plots represent individual value, and bars represent mean \pm SEM. Correlation coefficients (r) are shown in each box. #p < 0.1, *p < 0.05.

摂取食品と GH32 遺伝子応答および摂取栄養素との関連

GH32 関連の微生物遺伝子応答に関連する食事要因をより詳細に明らかにするため、食品項目の摂取量と、3つの GH32 関連指標 ($\Delta inuA$ 、レチノール、C16:3 (n-6) 脂肪酸) との相関を検討した。nonparametric Spearman correlation の結果、これらの指標は複数の食品項目と傾向レベル以上の関連 ($p < 0.1$) を示した (Figure 21a)。特に、緑黄色野菜の摂取量は C16:3 (n-6) 脂肪酸と強い相関を示し、 $\Delta inuA$ とともに正の傾向が認められた。また、少なくとも 1つの GH32 関連指標と正の関連を示した食品には、レバー、ツナ缶、赤身魚、卵、豆腐および油揚げ、にんじん・かぼちゃ、大根・かぶ、その他の根菜類、海藻類が含まれた。一方で、脂の多い魚類、きのこ類、食塩、料理用砂糖の摂取量は、これら GH32 関連指標のいずれかと負の関連を示した。さらに、これらの食品が微生物学的レスポンス分類と関連しているかを検討したところ、レスポンスはノンレスポンスと比較して緑黄色野菜およびツナ缶の摂取量が有意に多かった (Figure 21b,c)。その他の食品項目については、両群間に有意な差は認められなかった。

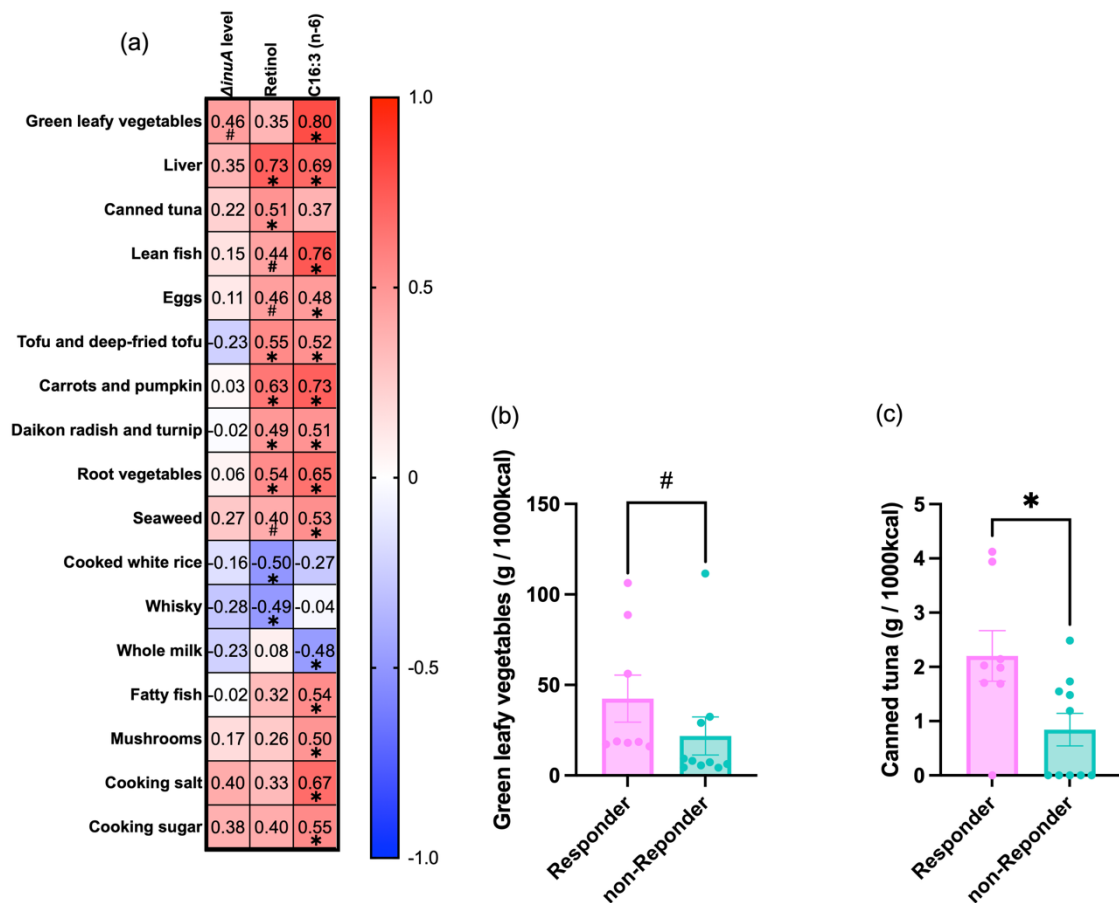


Figure 21. Associations between food group intake and microbial gene response markers.

(a) Heatmap showing nonparametric Spearman correlation between intake of selected food groups and GH32-related response markers ($\Delta inuA$, retinol, and C16:3 (n-6)). (b) Intake of green leafy vegetables in responders and non-responders at baseline. (c) Intake of canned tuna in responders and non-responders at baseline. Food group intakes were assessed using BDHQ at baseline. Plots represent individual value, and bars represent mean \pm SEM. Correlation coefficients (r) are shown in each box. [#]p < 0.1, *p < 0.05.

考察

本 RCT では、Kes と Inu の併用補給がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を初めて評価した。一般にフルクタンは GH32 ファミリーに属する酵素によって加水分解され、生成したフルクトース単量体は菌種特異的な代謝経路で利用される。*B. adolescentis* と *B. longum* は、それぞれ Inu および Kes を炭素源として利用可能にする GH32 遺伝子、すなわち *inuA* および *cscA* を保有することが知られている[43,80]。本介入では、これら 2 菌種の増殖が選択的に促進され、それに対応する GH32 酵素の増加も認められた。加えて、その増加の応答性には被験者の摂取食品、摂取栄養素が関連することが示唆された (Figure 22)。これらの知見は、食事由来フルクタンに対する微生物応答には、GH32 ファミリーのような関連分解酵素の存在や宿主の食事パターンなど、複数の因子が関与している可能性を示唆するものである。

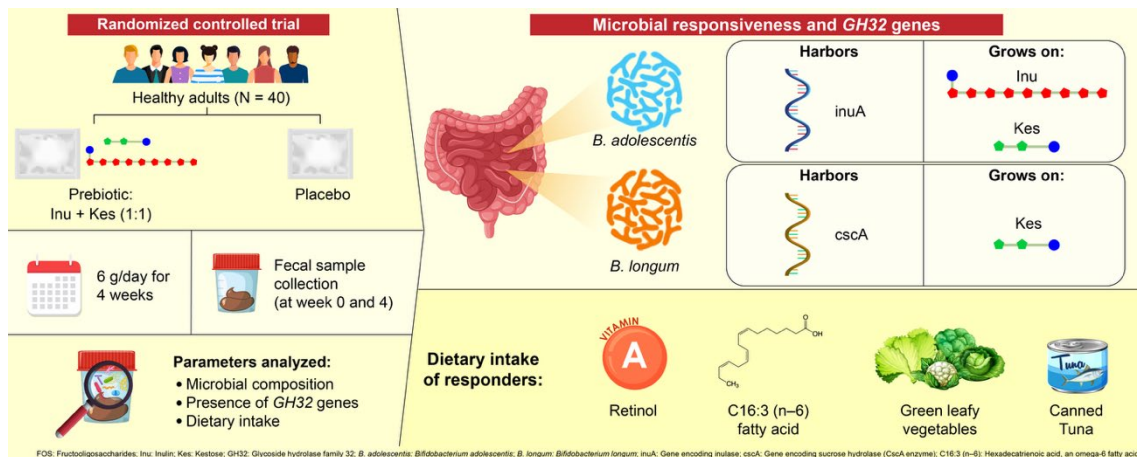


Figure 22. Graphical summary of the findings from human intervention study

本研究で増加が確認された両菌種は、免疫調節作用や腸管バリア維持作用を有することが報告されている。*B. adolescentis* は、タイトジャンクションの維持および炎症性サイトカインの調節を通じてデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎を改善することがマウス試験において報告されており[81]、コクサッキーウイルス B3 に対する抗ウイルス防御への寄与も示唆されている[82]。一方、*B. longum* は、Treg 細胞の誘導やタイトジャンクション維持などを含む抗炎症作用が炎症性腸疾患モデルで示されている[83]。さらに、*B. adolescentis* と *B. longum* の併用投与は、T 細胞応答、NK 細胞活性、マクロファージの貪食能、抗体産生など広範な免疫機能を活性化することが報告されている[84]。以上のことから、併用摂取によるこれら *Bifidobacterium spp.* の増加は、単独摂取よりも腸内細菌叢を介した免疫恒常性の維持および宿主防御機構の強化に寄与する可能性がある。

第二章で述べたように、腸内細菌叢が産生する代謝物には酢酸、プロピオン酸、酪酸などの SCFAs があり、これらは宿主免疫関連細胞に作用し、免疫恒常性および炎症の制御

に關与する[85]。 *B. adolescentis* および *B. longum* は酢酸を産生することが知られており[86]、これら菌種の増加は一般に腸内での SCFAs 産生の増加を示唆するとされている。

本研究では、腸内環境の非侵襲的指標として糞便中 SCFAs 濃度を測定したが、介入後に有意な変化は認められなかった。糞便中 SCFAs 測定は広く用いられる手法であるものの、実際に産生された SCFAs の大部分は腸上皮に吸収され全身に分布するため[63]、糞便中濃度は産生量の一部しか反映しない可能性がある。そのため、本試験において SCFAs 産生の変動が糞便中に十分に反映されなかった可能性が考えられる。同様の知見は、Kes を小児の牛乳アレルギー患者に介入した先行研究でも報告されており、酢酸産生菌が増加したにもかかわらず糞便中 SCFAs レベルに変化が見られなかった[14]。さらに、本研究では糞便サンプルが自己採取であったため、取り扱いや保存のわずかな差異が変動要因となった可能性も否定できない。今後は、血漿 SCFAs 解析や標準化された採取手順を取り入れることで、SCFAs 総産生量のより正確な評価が可能になると考えられる。

フルクタン応答性のパターンを明らかにするため、介入後に *B. adolescentis* および *B. longum* の両方が増加した参加者をレスポンドー、それ以外をノンレスポンドーと定義した。レスポンドーでは、これら 2 菌種の存在量だけでなく、対応する GH32 遺伝子 (*inuA* および *cscA*) の存在量も一貫して増加した。さらに、培養実験では、*B. adolescentis* は Inu および Kes の双方を基質として増殖可能であったが、Kes での増殖は *B. longum* より弱かった。一方、*B. longum* は Kes でのみ増殖を示した。これらの増殖パターンは、*B. adolescentis* における Inulinase が FOS および Inu の双方に作用する一方、*B. longum* の CscA は短鎖フルクタンに限定された基質特異性を示すとした先行研究の報告と一致する[43,80,87]。総合すると、Kes と Inu の併用摂取は、基質特異性の異なる GH32 酵素を保有する *Bifidobacterium spp.* を選択的に増加させる可能性があることが示唆された。

腸内細菌叢は宿主の食事内容に強く影響を受ける。本研究では、この点を踏まえ、観察された微生物学的変化に關連する栄養素について検討した。レスポンドーは、ベースラインにおける *inuA* の値が高く、さらに介入期間中の *inuA* および *cscA* の増加量が大きいという特徴を示した。これらの特徴のうち、特にレチノイン酸 (RA) の前駆体であるレチノールおよび C16:3 (n-6) 脂肪酸の摂取量が $\Delta inuA$ と關連していた。

レチノールは代謝物である RA を介して T 細胞分化や抗菌ペプチド発現を制御することが知られている。ビタミン A 欠乏 (VAD) は T 細胞プロファイルの変化[88]や抗菌ペプチド産生の低下[89]を介して宿主防御を著しく損ない、この免疫抑制により病原体感染に対する感受性が増大する。実際、VAD モデル動物 (家畜・家禽を含む) では *E. coli* 感染に対する抵抗性の低下が認められている[90,91]。また、メキシコの小児を対象とした疫学研究では、VAD 状態がノロウイルス感染時の炎症性サイトカイン応答を増強することが示されている[92]。加えて、VAD は腸内細菌叢構成にも影響し、*Bifidobacterium* を含む共生細菌の減少と *Staphylococcus* などの病原性細菌の増加が報告されている[93]。これらの知見は、レチノールの代謝物である RA が、免疫調節のみならず腸内細菌叢の恒常性維

持にも重要な役割を果たしていることを示唆する。これらは VAD 状態での知見であるものの、健常者においてもレチノール摂取が免疫および上皮環境を介してフルクタン応答性に影響を及ぼす可能性を示唆している。

一方、C16:3 (n-6) 脂肪酸に関する直接的な研究は限られている。しかし、他の n-6 多価不飽和脂肪酸 (n-6 PUFAs) は、過剰摂取時には炎症性エイコサノイドの前駆体となり、慢性炎症のリスク因子とされている [94]。しかしながら、免疫恒常性の維持には適切な n-6 PUFAs 摂取が不可欠であり、量的バランスが重要であると考えられている [95]。例えば、n-6 PUFAs が IL-4 誘導性腸管透過性の上昇を抑制すること [96]、抗生物質処理マウスの 1 型糖尿病発症を抑制すること [97] などが報告されている。以上から、レチノールおよび C16:3 (n-6) 脂肪酸の摂取量は、宿主の免疫および上皮環境に影響することで、フルクタン補給に対する腸内細菌叢の応答性に個人差を生じさせている可能性がある。

本研究の食品群解析では、レスポンドーはノンレスポンドーと比較して緑黄色野菜およびツナ缶の摂取量が有意に高いことが示された。特に緑黄色野菜、とりわけホウレンソウには C16:3 脂肪酸が多く含まれており (Human Metabolome Database: <https://www.hmdb.ca/>)、 β -カロテン、食物繊維、ポリフェノールなどの機能性成分も豊富である。また、ツナ缶は n-3 PUFA (DHA, EPA) やビタミン D、亜鉛の良好な供給源であり、これらは宿主生理および腸内細菌叢構成に影響することが知られている [98,99]。本研究では、緑黄色野菜の摂取量は C16:3 (n-6) 脂肪酸および $\Delta inuA$ と正の関連を示しており、適度な緑黄色野菜の摂取が GH32 酵素の誘導を介してフルクタン代謝を促進する可能性が示唆された。

一方、ツナ缶摂取と $\Delta inuA$ との間に直接的な関連は認められなかったものの、ツナ缶と併食される食品、またはツナ缶に含まれるその他の栄養素が微生物のフルクタン応答性に寄与している可能性は否定できず、今後の検討が必要である。

本研究にはいくつかの限界が存在する。

第一に、特定の栄養素 (レチノールおよび C16:3 (n-6) 脂肪酸) と腸内細菌叢応答との関連は相関的であり、因果関係を示すものではない。本研究では、これらの栄養素や食品 (緑黄色野菜、ツナ缶) に着目した食事介入は実施していない。そのため、将来的にはフルクタンとツナ缶などの栄養素源との併用条件を変化させる食事統制下の介入研究が必要である。

第二に、本研究では Kes と Inu を併用して投与したため、ヒト試験において観察された微生物応答への各フルクタンの寄与を個別に特定することはできなかった。今後、単独フルクタンによる介入研究が必要である。

第三に、介入期間は 4 週間と比較的短期であるため、観察された微生物学的変化の持続性は不明であり、長期追跡研究が求められる。

最後に、本研究は 40 名と比較的小規模であり、レスポンドーおよびノンレスポンドーの人数も少ない (それぞれ $n=8$ 、 $n=10$)。このことは統計的検出力や再現性を制限してい

る可能性がある。また、参加者の大多数が20歳前後の若年女性（女性94.59%）であったため、性・年齢・民族背景における一般化可能性にも限界がある。今後は、より多様な性別・年齢・健康状態を含む大規模多施設共同研究による検証が必要である。

本研究は、KesとInuの併用摂取がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を、ランダム化二重盲検試験により検討した初めての研究である。併用摂取により、基質特異性の異なるGH32を有する複数の有用菌が増加した。また有用菌のフルクタン応答性に基づくレスポonderとノンレスポonderが明確に区別され、これらは微生物によるフルクタン利用に関与するGH32遺伝子（*inuA*および*cscA*）の発現差に関連していた。また、これらの酵素応答は、レチノールおよびC16:3（n-6）脂肪酸など特定の栄養素の習慣的摂取量、さらには緑黄色野菜やツナ缶のより高い摂取と関連している可能性が示唆された。以上の知見は、プレバイオティクス摂取に対する個体差には、細菌が有する酵素学的特徴と宿主の食事パターンの双方が寄与していることを示唆するものである。本研究は、腸内細菌の機能特性および食事要因に基づき、フルクタン応答性腸内微生物を調節するための個別化栄養戦略を構築するうえでの基盤的知見を提供するものである。

第五章

総合考察

本研究では、DP の異なる 2 種類のフルクタンである Kes と Inu の併用摂取による効果について、マウスアレルギー予防試験（第二章）、マウスアレルギー改善試験（第三章）、ヒト介入試験（第四章）の 3 つの試験で検討した。いずれの試験においても共通して見出されたのは、「どの菌が増殖するか」は条件によって大きく変化する一方で、「増加した菌が担っている機能」には共通性がある、という点である。具体的には、GH32 酵素を有すると予測される菌がフルクタンを分解し、酢酸・プロピオン酸・酪酸といった SCFAs や乳酸などの代謝産物を産生しうる菌が選択的に増加するという構図が示唆された。

第二章では、Kes と Inu の併用摂取により、OVA 誘導食物アレルギーモデルマウスにおいてアレルギー症状スコアの低下、直腸温低下の抑制、OVA 特異的 IgE・IgA の上昇の抑制が認められた。さらに、併用群では単独摂取では認められなかった指標の改善も示された。腸内細菌叢を見ると、*P. distasonis* や *P. goldsteinii*、*Alloprevotella* などが増加し、それぞれの *Parabacteroides spp.* が有する GH32 酵素が Kes あるいは Inu を分解することも示唆された。盲腸内では複数の SCFAs が増加しており、これらの SCFAs や乳酸が免疫細胞に作用して炎症を抑制する経路が、一定程度関与している可能性が示唆される。

第三章の改善試験では、すでにアレルギーが成立したマウスにフルクタンを投与した。Kes、Inu、Kes+Inu のいずれの群でも症状の改善が認められ、とくに Kes+Inu 群で OVA 特異的 IgE の低下が顕著であった。一方、腸内細菌叢の変化は予防試験とは異なり、*Muribaculaceae* 科に属する *UBA7173* が Kes+Inu 群で大きく増加し、その存在量は SCFAs と正の相関を示した。すなわち、予防段階での介入か、アレルギーが成立した後の介入かといった介入時期の相違により優勢となる菌種は異なるものの、いずれの条件においてもフルクタンを分解して SCFAs などを産生しうる菌群が増加し、その機能がアレルギー反応の制御に関与しているという点で、共通した特徴が認められたと解釈できる。

ヒトを対象とした第四章では、Kes と Inu を併用摂取させたところ、*B. adolescentis* および *B. longum* が選択的に増加した。さらに、これらに特異的な GH32 遺伝子である *inuA* および *cscA* のコピー数も増加しており、フルクタンを分解する GH32 遺伝子量の変化と菌種の増加が対応していることが示された。培養実験では、*B. adolescentis* が Inu と Kes の両方で増殖できるのに対し、*B. longum* は Kes でのみ増殖することが明らかとなり、短鎖フルクタンと長鎖フルクタンを組み合わせることで、基質特異性の異なる GH32 を有する *Bifidobacterium spp.* を同時に増殖させ得ることが示唆された。

本研究のヒト試験では健常若年者を対象としていることから、観察された *B. adolescentis* および *B. longum* の増加は、健康な腸内環境においてフルクタン資化能の高い菌種が選択的に増殖しうることを示す結果と位置づけられる。*B. longum* や *B. adolescentis* は、これ

までにさまざまな疾患モデルやヒト研究で注目されている有用菌であり、潰瘍性大腸炎や感染症、アレルギーなどに対する有効性が報告されていることを踏まえると[100]、Kes+Inuによるフルクタン介入は、このような疾患において単独よりも併用摂取でより強力な予防・改善効果が期待される。

第四章のもう一つの特徴は、GH32 遺伝子応答と食事因子との関連が示された点である。具体的には、レチノールや C16:3 (n-6) の摂取量、さらには緑黄色野菜やツナ缶の摂取量が、*inuA* や *cscA* の変化量と関連していることから、プレバイオティクスへの応答性が摂取栄養素および日常的な食事内容によって影響を受ける可能性が示唆された。近年、がん領域では、免疫チェックポイント阻害薬をはじめとする抗がん薬に対する奏効性が腸内細菌叢の構成により影響を受けること[101-104]、が報告されている。加えて、ワクチンの有効性[105,106]、炎症性腸疾患における生物学的製剤への治療反応性[107,108] も腸内細菌叢と関連することが示されている。これらの報告では、関連する菌種は疾患や治療法ごとに異なるものの、総じて腸内細菌叢が薬剤のアジュバントとして機能しうることが示唆されており、それぞれの疾患に適したプレバイオティクス介入による効果が期待されている。このような背景および第四章の結果を踏まえると、疾患ごとに適したプレバイオティクス介入そのものに加え、その効果を十分に発揮させるための基盤となる日常的な食事・栄養状態を整えることも、薬物療法やプレバイオティクスのアジュバント効果を高めるうえで重要な戦略となり得ると考えられる。

本研究は、「Kes と Inu という 2 種類のフルクタンを組み合わせることで、GH32 酵素を持つフルクタン応答性菌を選択的に増やし、SCFAs などの代謝を変化させ得る」ことを、マウスおよびヒトを対象としたデータから示した。そのうえで、宿主の食事パターン（ビタミン A や脂肪酸、緑黄色野菜や魚の摂取量など）が、こうしたプレバイオティクスへの反応性に関与するという手がかりも得られた。今後、より大規模で多様な集団を対象とした試験や、疾患患者を対象とした試験、さらに栄養素とフルクタンを組み合わせ介入研究を重ねることで、「腸内細菌の酵素機能（GH32）と代謝産物（SCFAs 等）、そして個々人の食事」を組み合わせ、一人ひとりに最適化された食事・プレバイオティクス戦略へと発展していくことが期待される。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP24K14784、ならびに一般財団法人 杏の杜財団の「2024 年度公募型研究助成事業」の助成を受けたものである。

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、日々の実験指導のみならず、研究に向き合う姿勢や研究者としての在り方について丁寧にご教示くださいました藤木理代教授ならびに山田千佳子教授に、心より深く御礼申し上げます。藤木教授には、*in vivo* データからヒト試験へと展開していくにあたり、多角的な視点から貴重なご助言と示唆を賜り、本研究の方向性を定めるうえで大きなお力添えをいただきました。山田教授には、学部生時代より通算 6 年間にわたり、研究面において一貫して温かくご指導・ご支援を賜りました。また、*in vivo* 試験の計画立案から実施・結果の解釈に至るまで、終始丁寧かつ多大なご指導を賜りました。両教授のご指導がなければ、本研究をここまでまとめ上げることはできませんでした。

藤田医科大学 消化器内科 医科プレ・プロバイオティクス共同研究講座の栃尾巧教授、藤井匡准教授には、菌培養の手技や qPCR の実施から得られた結果の考察に至るまで、専門的な立場から幅広くご助言をいただきました。お二人から頂戴したご意見は、本研究の質を高めるうえで大きな支えとなりました。また、同研究室の研究をサポートいただいている嶋崎麻紀子様、梅崎沙紀様には、DNA 抽出や SCFAs 測定など、多くの実験場面において惜しみないご協力を賜りました。日々の実験が円滑に進んだのはプレ・プロバイオティクス講座の皆様方の細やかなご配慮とご尽力のおかげであり、ここに厚く御礼申し上げます。

藤田医科大学 消化器内科の廣岡芳樹教授、大野栄三郎教授、船坂好平准教授には、本研究結果を臨床の視点からご検討いただき、新たな臨床的示唆や今後の展望に関する多くのご助言を賜りました。いただいたお言葉は、本研究の意義を再認識し、将来の研究の方向性を考えるうえで大きな励みとなりました。心より感謝申し上げます。

ウェルネオシュガー株式会社の近藤修啓様には、16S rRNA 解析の手技についてご指導いただくとともに、フルクタンと栄養素との関連性に関する新たな視点をご提供いただきました。深く感謝申し上げます。

名古屋大学大学院 生命農学研究科の倉満健人様には、本論文全体の構成や議論の流れ、データの示し方に至るまで、たいへん鋭いご指摘と建設的なコメントをいただきました。倉満様からの助言により、本論文の内容をより明瞭かつ説得力のあるものへと高めることができました。ここに深く感謝の意を表します。

応用栄養学研究室および食品学研究室 II に所属する 4 年生および 3 年生の皆様には、多大なご協力をいただきました。皆様の支えがあって本研究を成し遂げることができました。深く感謝申し上げます。

略語

BDHQ: Brief Self-administered Diet History Questionnaire

BHI: Brain heart infusion

DP: Degree of polymerization

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FOS: Fructo-oligosaccharides

GH: Glycoside hydrolase

HPLC: High-performance liquid chromatography

Inu: Inulin

JCM: Japan Collection of Microorganisms

jRCT: Japan Registry of Clinical Trials

Kes: 1-kestose

n-6 PUFAs: n-6 polyunsaturated fatty acids

OVA: Ovalbumin

PBS: Phosphate-buffered saline

PCoA: Principal coordinate analysis

RA: Retinoic acid

RCT: Randomized controlled trial

RF: Reinforced flora

RT-qPCR: Quantitative reverse transcription PCR

SCFAs: Short-chain fatty acids

SRA: Sequence Read Archive

VAD: Vitamin A deficiency

参考文献

1. Boyce, J.A.; Assa'ad, A.; Burks, A.W.; Jones, S.M.; Sampson, H.A.; Wood, R.A.; Plaut, M.; Cooper, S.F.; Fenton, M.J.; Arshad, S.H.; et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *J Allergy Clin Immunol* **2010**, *126*, 1105–1118, doi:10.1016/j.jaci.2010.10.008.
2. Tang, M.L.K.; Mullins, R.J. Food Allergy: Is Prevalence Increasing? *Intern Med J* **2017**, *47*, 256–261, doi:10.1111/imj.13362.
3. du Toit, G.; Tsakok, T.; Lack, S.; Lack, G. Prevention of Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol* **2016**, *137*, 998–1010, doi:10.1016/j.jaci.2016.02.005.
4. Yamamoto-Hanada, K.; Ohya, Y. Overviewing Allergy Epidemiology in Japan - Findings from Birth Cohorts (JECS and T-Child Study). *Allergol Int* **2024**, *73*, 20–30, doi:10.1016/j.alit.2023.11.005.
5. Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. Food Allergy: A Review and Update on Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Management. *J Allergy Clin Immunol* **2018**, *141*, 41–58, doi:10.1016/j.jaci.2017.11.003.
6. Gupta, R.; Holdford, D.; Bilaver, L.; Dyer, A.; Holl, J.L.; Meltzer, D. The Economic Impact of Childhood Food Allergy in the United States. *JAMA Pediatr* **2013**, *167*, 1026–1031, doi:10.1001/jamapediatrics.2013.2376.
7. Wood, R.A. Oral Immunotherapy for Food Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* **2017**, *27*, 151–159, doi:10.18176/ji.0143.
8. Ebisawa, M.; Ito, K.; Fujisawa, T.; Committee for Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy, The Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology; Japanese Society of Allergology Japanese Guidelines for Food Allergy 2020. *Allergol Int* **2020**, *69*, 370–386, doi:10.1016/j.alit.2020.03.004.
9. Shi, N.; Li, N.; Duan, X.; Niu, H. Interaction between the Gut Microbiome and Mucosal Immune System. *Mil Med Res* **2017**, *4*, 14, doi:10.1186/s40779-017-0122-9.
10. Fazlollahi, M.; Chun, Y.; Grishin, A.; Wood, R.A.; Burks, A.W.; Dawson, P.; Jones, S.M.; Leung, D.Y.M.; Sampson, H.A.; Sicherer, S.H.; et al. Early-Life Gut Microbiome and Egg Allergy. *Allergy* **2018**, *73*, 1515–1524, doi:10.1111/all.13389.
11. Feehley, T.; Plunkett, C.H.; Bao, R.; Choi Hong, S.M.; Culleen, E.; Belda-Ferre, P.; Campbell, E.; Aitoro, R.; Nocerino, R.; Paparo, L.; et al. Healthy Infants Harbor Intestinal Bacteria That Protect against Food Allergy. *Nat Med* **2019**, *25*, 448–453, doi:10.1038/s41591-018-0324-z.

12. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14*, 491–502, doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
13. Slavin, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* **2013**, *5*, 1417–1435, doi:10.3390/nu5041417.
14. Shibata, R.; Koga, Y.; Takahashi, M.; Murakami, Y.; Tochio, T.; Kadota, Y. In Children with Cow's Milk Allergy, 1-Kestose Affects the Gut Microbiota and Reaction Threshold. *Pediatr Res* **2023**, *94*, 1067–1074, doi:10.1038/s41390-023-02557-7.
15. Vogt, L.; Meyer, D.; Pullens, G.; Faas, M.M.; Smelt, M.J.; Venema, K.; Ramasamy, U.; Schols, H.A.; Vos, P. de Immunological Properties of Inulin-Type Fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2015**, *55*, 414–436, doi:10.1080/10408398.2012.656772.
16. Endo, A.; Nakamura, S.; Konishi, K.; Nakagawa, J.; Tochio, T. Variations in Prebiotic Oligosaccharide Fermentation by Intestinal Lactic Acid Bacteria. *Int J Food Sci Nutr* **2016**, *67*, 125–132, doi:10.3109/09637486.2016.1147019.
17. IDE, K.; SHINOHARA, M.; YAMAGISHI, S.; ENDO, A.; NISHIFUJI, K.; TOCHIO, T. Kestose Supplementation Exerts Bifidogenic Effect within Fecal Microbiota and Increases Fecal Butyrate Concentration in Dogs. *J Vet Med Sci* **2020**, *82*, 1–8, doi:10.1292/jvms.19-0071.
18. Chen, C.; Liu, C.; Zhang, K.; Xue, W. The Role of Gut Microbiota and Its Metabolites Short-Chain Fatty Acids in Food Allergy. *Food Science and Human Wellness* **2023**, *12*, 702–710, doi:10.1016/j.fshw.2022.09.003.
19. Tanno, H.; Fujii, T.; Hirano, K.; Maeno, S.; Tonozuka, T.; Sakamoto, M.; Ohkuma, M.; Tochio, T.; Endo, A. Characterization of Fructooligosaccharide Metabolism and Fructooligosaccharide-Degrading Enzymes in Human Commensal Butyrate Producers. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1869503, doi:10.1080/19490976.2020.1869503.
20. Scott, K.P.; Martin, J.C.; Duncan, S.H.; Flint, H.J. Prebiotic Stimulation of Human Colonic Butyrate-Producing Bacteria and Bifidobacteria, in Vitro. *FEMS Microbiol Ecol* **2014**, *87*, 30–40, doi:10.1111/1574-6941.12186.
21. Astó, E.; Méndez, I.; Rodríguez-Prado, M.; Cuñé, J.; Espadaler, J.; Farran-Codina, A. Effect of the Degree of Polymerization of Fructans on Ex Vivo Fermented Human Gut Microbiome. *Nutrients* **2019**, *11*, 1293, doi:10.3390/nu11061293.

22. Schülke, S.; Albrecht, M. Mouse Models for Food Allergies: Where Do We Stand? *Cells* **2019**, *8*, 546, doi:10.3390/cells8060546.
23. Li, X.M.; Serebrisky, D.; Lee, S.Y.; Huang, C.K.; Bardina, L.; Schofield, B.H.; Stanley, J.S.; Burks, A.W.; Bannon, G.A.; Sampson, H.A. A Murine Model of Peanut Anaphylaxis: T- and B-Cell Responses to a Major Peanut Allergen Mimic Human Responses. *J Allergy Clin Immunol* **2000**, *106*, 150–158, doi:10.1067/mai.2000.107395.
24. Olmeda, D.; Cerezo-Wallis, D.; Mucientes, C.; Calvo, T.G.; Cañón, E.; Alonso-Curbelo, D.; Ibarz, N.; Muñoz, J.; Rodriguez-Peralto, J.L.; Ortiz-Romero, P.; et al. Live Imaging of Neolymphangiogenesis Identifies Acute Antimetastatic Roles of dsRNA Mimics. *EMBO Mol Med* **2021**, *13*, e12924, doi:10.15252/emmm.202012924.
25. Banerjee, E.R.; Henderson, W.R. Role of T Cells in a Gp91phox Knockout Murine Model of Acute Allergic Asthma. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **2013**, *9*, 6, doi:10.1186/1710-1492-9-6.
26. Takahashi, S.; Tomita, J.; Nishioka, K.; Hisada, T.; Nishijima, M. Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* **2014**, *9*, e105592, doi:10.1371/journal.pone.0105592.
27. Furet, J.-P.; Firmesse, O.; Gourmelon, M.; Bridonneau, C.; Tap, J.; Mondot, S.; Doré, J.; Corthier, G. Comparative Assessment of Human and Farm Animal Faecal Microbiota Using Real-Time Quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol* **2009**, *68*, 351–362, doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x.
28. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **2019**, *37*, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
29. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat Methods* **2016**, *13*, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
30. Bokulich, N.A.; Kaehler, B.D.; Rideout, J.R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R.; Huttley, G.A.; Gregory Caporaso, J. Optimizing Taxonomic Classification of Marker-Gene Amplicon Sequences with QIIME 2's Q2-Feature-Classifer Plugin. *Microbiome* **2018**, *6*, 90, doi:10.1186/s40168-018-0470-z.
31. McDonald, D.; Jiang, Y.; Balaban, M.; Cantrell, K.; Zhu, Q.; Gonzalez, A.; Morton, J.T.; Nicolaou, G.; Parks, D.H.; Karst, S.M.; et al. Greengenes2 Unifies Microbial

- Data in a Single Reference Tree. *Nat Biotechnol* **2024**, *42*, 715–718, doi:10.1038/s41587-023-01845-1.
32. Fujii, T.; Tochio, T.; Hirano, K.; Tamura, K.; Tonozuka, T. Rapid Evaluation of 1-Kestose Producing β -Fructofuranosidases from *Aspergillus* Species and Enhancement of 1-Kestose Production Using a PgsA Surface-Display System. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2018**, *82*, 1599–1605, doi:10.1080/09168451.2018.1480347.
 33. Hill, D.A.; Hoffmann, C.; Abt, M.C.; Du, Y.; Kobuley, D.; Kirn, T.J.; Bushman, F.D.; Artis, D. Metagenomic Analyses Reveal Antibiotic-Induced Temporal and Spatial Changes in Intestinal Microbiota with Associated Alterations in Immune Cell Homeostasis. *Mucosal Immunol* **2010**, *3*, 148–158, doi:10.1038/mi.2009.132.
 34. Hill, D.A.; Siracusa, M.C.; Abt, M.C.; Kim, B.S.; Kobuley, D.; Kubo, M.; Kambayashi, T.; Larosa, D.F.; Renner, E.D.; Orange, J.S.; et al. Commensal Bacteria-Derived Signals Regulate Basophil Hematopoiesis and Allergic Inflammation. *Nat Med* **2012**, *18*, 538–546, doi:10.1038/nm.2657.
 35. Scott, K.P.; Martin, J.C.; Chassard, C.; Clerget, M.; Potrykus, J.; Campbell, G.; Mayer, C.-D.; Young, P.; Rucklidge, G.; Ramsay, A.G.; et al. Substrate-Driven Gene Expression in *Roseburia Inulinivorans*: Importance of Inducible Enzymes in the Utilization of Inulin and Starch. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 4672–4679, doi:10.1073/pnas.1000091107.
 36. Bollrath, J.; Powrie, F. Feed Your Tregs More Fiber. *Science* **2013**, *341*, 463–464, doi:10.1126/science.1242674.
 37. Tokuhara, D.; Kurashima, Y.; Kamioka, M.; Nakayama, T.; Ernst, P.; Kiyono, H. A Comprehensive Understanding of the Gut Mucosal Immune System in Allergic Inflammation. *Allergology International* **2019**, *68*, 17–25, doi:10.1016/j.alit.2018.09.004.
 38. Brosseau, C.; Selle, A.; Palmer, D.J.; Prescott, S.L.; Barbarot, S.; Bodinier, M. Prebiotics: Mechanisms and Preventive Effects in Allergy. *Nutrients* **2019**, *11*, 1841, doi:10.3390/nu11081841.
 39. Li, A.; Ni, W.; Zhang, Q.; Li, Y.; Zhang, X.; Wu, H.; Du, P.; Hou, J.; Zhang, Y. Effect of Cinnamon Essential Oil on Gut Microbiota in the Mouse Model of Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *Microbiology and Immunology* **2020**, *64*, 23–32, doi:10.1111/1348-0421.12749.
 40. Koh, G.Y.; Kane, A.V.; Wu, X.; Crott, J.W. *Parabacteroides Distasonis* Attenuates Tumorigenesis, Modulates Inflammatory Markers and Promotes Intestinal Barrier

- Integrity in Azoxymethane-Treated A/J Mice. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 909–917, doi:10.1093/carcin/bgaa018.
41. Cuffaro, B.; Assohoun, A.L.W.; Boutillier, D.; Súkeníková, L.; Desramaut, J.; Boudebbouze, S.; Salomé-Desnoulez, S.; Hrdý, J.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Maguin, E.; et al. In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of Parabacteroides Distasonis Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells* **2020**, *9*, 2104, doi:10.3390/cells9092104.
 42. Chang, C.-J.; Lin, T.-L.; Tsai, Y.-L.; Wu, T.-R.; Lai, W.-F.; Lu, C.-C.; Lai, H.-C. Next Generation Probiotics in Disease Amelioration. *Journal of Food and Drug Analysis* **2019**, *27*, 615–622, doi:10.1016/j.jfda.2018.12.011.
 43. Tanno, H.; Fujii, T.; Ose, R.; Hirano, K.; Tochio, T.; Endo, A. Characterization of Fructooligosaccharide-Degrading Enzymes in Human Commensal Bifidobacterium Longum and Anaerostipes Caccae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2019**, *518*, 294–298, doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.049.
 44. Verstegen, R.E.M.; Kostadinova, A.I.; Merenciana, Z.; Garssen, J.; Folkerts, G.; Hendriks, R.W.; Willemsen, L.E.M. Dietary Fibers: Effects, Underlying Mechanisms and Possible Role in Allergic Asthma Management. *Nutrients* **2021**, *13*, 4153, doi:10.3390/nu13114153.
 45. Rangan, P.; Mondino, A. Microbial Short-Chain Fatty Acids: A Strategy to Tune Adoptive T Cell Therapy. *J Immunother Cancer* **2022**, *10*, e004147, doi:10.1136/jitc-2021-004147.
 46. Sun, M.; Wu, W.; Chen, L.; Yang, W.; Huang, X.; Ma, C.; Chen, F.; Xiao, Y.; Zhao, Y.; Ma, C.; et al. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Th1 Cell IL-10 Production to Maintain Intestinal Homeostasis. *Nat Commun* **2018**, *9*, 3555, doi:10.1038/s41467-018-05901-2.
 47. Liu, C.; Wu, J.; Zhu, J.; Kuei, C.; Yu, J.; Shelton, J.; Sutton, S.W.; Li, X.; Yun, S.J.; Mirzadegan, T.; et al. Lactate Inhibits Lipolysis in Fat Cells through Activation of an Orphan G-Protein-Coupled Receptor, GPR81. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 2811–2822, doi:10.1074/jbc.M806409200.
 48. Sumbria, D.; Berber, E.; Rouse, B.T. Supplementing the Diet with Sodium Propionate Suppresses the Severity of Viral Immuno-Inflammatory Lesions. *J Virol* **2021**, *95*, e02056-20, doi:10.1128/JVI.02056-20.
 49. Hoque, R.; Farooq, A.; Ghani, A.; Gorelick, F.; Mehal, W.Z. Lactate Reduces Liver and Pancreatic Injury in Toll-like Receptor- and Inflammasome-Mediated Inflammation via GPR81-Mediated Suppression of Innate Immunity. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1763–1774, doi:10.1053/j.gastro.2014.03.014.

50. Ranganathan, P.; Shanmugam, A.; Swafford, D.; Suryawanshi, A.; Bhattacharjee, P.; Hussein, M.S.; Koni, P.A.; Prasad, P.D.; Kurago, Z.B.; Thangaraju, M.; et al. GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J Immunol* **2018**, *200*, 1781–1789, doi:10.4049/jimmunol.1700604.
51. Kourosh, A.; Luna, R.A.; Balderas, M.; Nance, C.; Anagnostou, A.; Devaraj, S.; Davis, C.M. Fecal Microbiome Signatures Are Different in Food-Allergic Children Compared to Siblings and Healthy Children. *Pediatr Allergy Immunol* **2018**, *29*, 545–554, doi:10.1111/pai.12904.
52. Hara, M.; Suzuki, H.; Hayashi, D.; Morii, W.; Nakamura, T.; Kiyoki, K.; Hara, H.; Ishii, R.; Noguchi, E.; Takada, H. Gut Microbiota of One-and-a-Half-Year-Old Food-Allergic and Healthy Children. *Allergol Int* **2024**, *73*, 550–555, doi:10.1016/j.alit.2024.03.004.
53. Zhu, L.; Qin, S.; Zhai, S.; Gao, Y.; Li, L. Inulin with Different Degrees of Polymerization Modulates Composition of Intestinal Microbiota in Mice. *FEMS Microbiol Lett* **2017**, *364*, doi:10.1093/femsle/fnx075.
54. Lagkouravdos, I.; Lesker, T.R.; Hitch, T.C.A.; Gálvez, E.J.C.; Smit, N.; Neuhaus, K.; Wang, J.; Baines, J.F.; Abt, B.; Stecher, B.; et al. Sequence and Cultivation Study of Muribaculaceae Reveals Novel Species, Host Preference, and Functional Potential of This yet Undescribed Family. *Microbiome* **2019**, *7*, 28, doi:10.1186/s40168-019-0637-2.
55. Wang, H.; Huang, J.; Ding, Y.; Zhou, J.; Gao, G.; Han, H.; Zhou, J.; Ke, L.; Rao, P.; Chen, T.; et al. Nanoparticles Isolated From Porcine Bone Soup Ameliorated Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis and Regulated Gut Microbiota in Mice. *Front Nutr* **2022**, *9*, 821404, doi:10.3389/fnut.2022.821404.
56. Paone, P.; Suriano, F.; Jian, C.; Korpela, K.; Delzenne, N.M.; Van Hul, M.; Salonen, A.; Cani, P.D. Prebiotic Oligofructose Protects against High-Fat Diet-Induced Obesity by Changing the Gut Microbiota, Intestinal Mucus Production, Glycosylation and Secretion. *Gut Microbes* **2022**, *14*, 2152307, doi:10.1080/19490976.2022.2152307.
57. Jin, L.; Zhang, Z.; Pan, P.; Zhao, Y.; Zhou, M.; Liu, L.; Zhai, Y.; Wang, H.; Xu, L.; Mei, D.; et al. Low-Dose Ethanol Consumption Inhibits Neutrophil Extracellular Traps Formation to Alleviate Rheumatoid Arthritis. *Commun Biol* **2023**, *6*, 1–16, doi:10.1038/s42003-023-05473-y.

58. Zhu, Y.; Chen, B.; Zhang, X.; Akbar, M.T.; Wu, T.; Zhang, Y.; Zhi, L.; Shen, Q. Exploration of the Muribaculaceae Family in the Gut Microbiota: Diversity, Metabolism, and Function. *Nutrients* **2024**, *16*, 2660, doi:10.3390/nu16162660.
59. Goldberg, M.R.; Mor, H.; Magid Neriya, D.; Magzal, F.; Muller, E.; Appel, M.Y.; Nachshon, L.; Borenstein, E.; Tamir, S.; Louzoun, Y.; et al. Microbial Signature in IgE-Mediated Food Allergies. *Genome Med* **2020**, *12*, 92, doi:10.1186/s13073-020-00789-4.
60. Tan, J.; McKenzie, C.; Vuillermin, P.J.; Goverse, G.; Vinuesa, C.G.; Mebius, R.E.; Macia, L.; Mackay, C.R. Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Rep* **2016**, *15*, 2809–2824, doi:10.1016/j.celrep.2016.05.047.
61. Roudit, C.; Frei, R.; Ferstl, R.; Loeliger, S.; Westermann, P.; Rhyner, C.; Schiavi, E.; Barcik, W.; Rodriguez-Perez, N.; Wawrzyniak, M.; et al. High Levels of Butyrate and Propionate in Early Life Are Associated with Protection against Atopy. *Allergy* **2019**, *74*, 799–809, doi:10.1111/all.13660.
62. Tochio, T.; Kitaura, Y.; Nakamura, S.; Sugawa, C.; Takahashi, M.; Endo, A.; Shimomura, Y. An Alteration in the Cecal Microbiota Composition by Feeding of 1-Kestose Results in a Marked Increase in the Cecal Butyrate Content in Rats. *PLoS One* **2016**, *11*, e0166850, doi:10.1371/journal.pone.0166850.
63. E, B.; L, D.; E, H.; K, V.; Sv, G.; Ja, D.; K, V. Quantification of in Vivo Colonic Short Chain Fatty Acid Production from Inulin. *Nutrients* **2015**, *7*, doi:10.3390/nu7115440.
64. Cm, van der B.; Ee, C.; Am, K.; Shm, G.; Swm, O.D.; Hm, van E.; Jj, H.; Ee, B.; Chc, D.; K, L. The Prebiotic Inulin Improves Substrate Metabolism and Promotes Short-Chain Fatty Acid Production in Overweight to Obese Men. *Metabolism: clinical and experimental* **2018**, *87*, doi:10.1016/j.metabol.2018.06.009.
65. Nguyen, T.L.A.; Vieira-Silva, S.; Liston, A.; Raes, J. How Informative Is the Mouse for Human Gut Microbiota Research? *Dis Model Mech* **2015**, *8*, 1–16, doi:10.1242/dmm.017400.
66. Shibata, R.; Kimura, M.; Takahashi, H.; Mikami, K.; Aiba, Y.; Takeda, H.; Koga, Y. Clinical Effects of Kestose, a Prebiotic Oligosaccharide, on the Treatment of Atopic Dermatitis in Infants. *Clin Exp Allergy* **2009**, *39*, 1397–1403, doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03295.x.
67. Koga, Y.; Tokunaga, S.; Nagano, J.; Sato, F.; Konishi, K.; Tochio, T.; Murakami, Y.; Masumoto, N.; Tezuka, J.-I.; Sudo, N.; et al. Age-Associated Effect of Kestose on

- Faecalibacterium Prausnitzii and Symptoms in the Atopic Dermatitis Infants. *Pediatr Res* **2016**, *80*, 844–851, doi:10.1038/pr.2016.167.
68. Tominaga, K.; Tsuchiya, A.; Nakano, O.; Kuroki, Y.; Oka, K.; Minemura, A.; Matsumoto, A.; Takahashi, M.; Kadota, Y.; Tochio, T.; et al. Increase in Muscle Mass Associated with the Prebiotic Effects of 1-Kestose in Super-Elderly Patients with Sarcopenia. *Biosci Microbiota Food Health* **2021**, *40*, 150–155, doi:10.12938/bmfh.2020-063.
 69. Ikegami, S.; Nakamura, M.; Honda, T.; Yamamura, T.; Maeda, K.; Sawada, T.; Ishikawa, E.; Yamamoto, K.; Furune, S.; Ishikawa, T.; et al. Efficacy of 1-Kestose Supplementation in Patients with Mild to Moderate Ulcerative Colitis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. *Aliment Pharmacol Ther* **2023**, *57*, 1249–1257, doi:10.1111/apt.17387.
 70. Nakaoka, K.; Ohno, E.; Kuramitsu, K.; Kuzuya, T.; Funasaka, K.; Tochio, T.; Fujii, T.; Takahashi, H.; Kondo, N.; Miyahara, R.; et al. Efficacy of 1-Kestose Supplementation in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Randomized Controlled Pilot Study. *Nutrients* **2024**, *16*, 2889, doi:10.3390/nu16172889.
 71. Leyrolle, Q.; Cserjesi, R.; D G H Mulders, M.; Zamariola, G.; Hiel, S.; Gianfrancesco, M.A.; Portheault, D.; Amadiou, C.; Bindels, L.B.; Leclercq, S.; et al. Prebiotic Effect on Mood in Obese Patients Is Determined by the Initial Gut Microbiota Composition: A Randomized, Controlled Trial. *Brain Behav Immun* **2021**, *94*, 289–298, doi:10.1016/j.bbi.2021.01.014.
 72. Le Bastard, Q.; Chapelet, G.; Javaudin, F.; Lepelletier, D.; Bataud, E.; Montassier, E. The Effects of Inulin on Gut Microbial Composition: A Systematic Review of Evidence from Human Studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2020**, *39*, 403–413, doi:10.1007/s10096-019-03721-w.
 73. Abrams, S.A.; Griffin, I.J.; Hawthorne, K.M.; Liang, L.; Gunn, S.K.; Darlington, G.; Ellis, K.J. A Combination of Prebiotic Short- and Long-Chain Inulin-Type Fructans Enhances Calcium Absorption and Bone Mineralization in Young Adolescents. *Am J Clin Nutr* **2005**, *82*, 471–476, doi:10.1093/ajcn.82.2.471.
 74. Moles, L.; Otaegui, D. The Impact of Diet on Microbiota Evolution and Human Health. Is Diet an Adequate Tool for Microbiota Modulation? *Nutrients* **2020**, *12*, 1654, doi:10.3390/nu12061654.
 75. Oe, M.; Sasaki, S.; Shimura, T.; Takaki, Y.; Sanada, H. Effects of Multilayer Silicone Foam Dressings for the Prevention of Pressure Ulcers in High-Risk Patients: A Randomized Clinical Trial. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2020**, *9*, 649–656, doi:10.1089/wound.2019.1002.

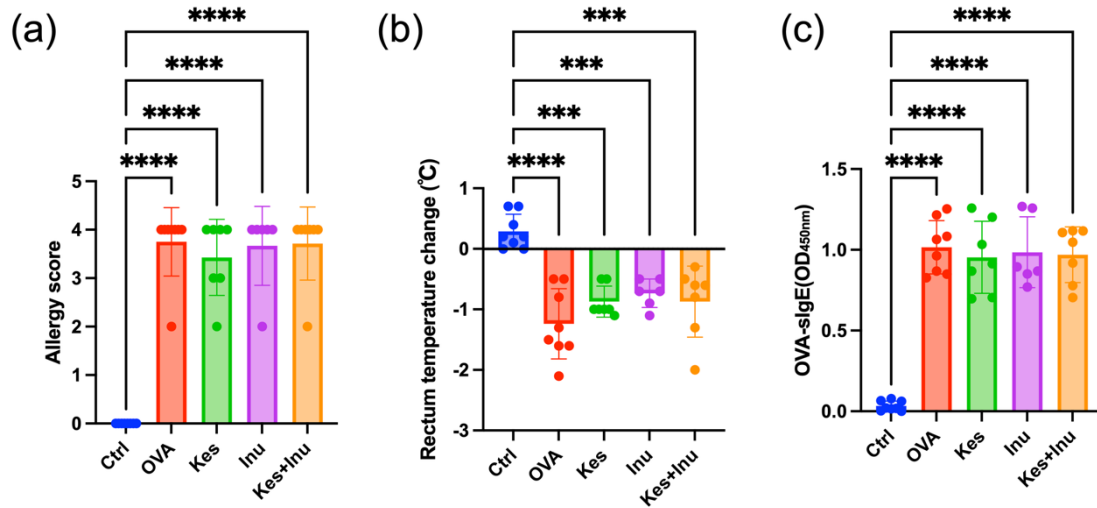
76. Le Blay, G.; Lacroix, C.; Zihler, A.; Fliss, I. In Vitro Inhibition Activity of Nisin A, Nisin Z, Pediocin PA-1 and Antibiotics against Common Intestinal Bacteria. *Lett Appl Microbiol* **2007**, *45*, 252–257, doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02178.x.
77. Kobayashi, S.; Murakami, K.; Sasaki, S.; Okubo, H.; Hirota, N.; Notsu, A.; Fukui, M.; Date, C. Comparison of Relative Validity of Food Group Intakes Estimated by Comprehensive and Brief-Type Self-Administered Diet History Questionnaires against 16 d Dietary Records in Japanese Adults. *Public Health Nutr* **2011**, *14*, 1200–1211, doi:10.1017/S1368980011000504.
78. Kobayashi, S.; Honda, S.; Murakami, K.; Sasaki, S.; Okubo, H.; Hirota, N.; Notsu, A.; Fukui, M.; Date, C. Both Comprehensive and Brief Self-Administered Diet History Questionnaires Satisfactorily Rank Nutrient Intakes in Japanese Adults. *Journal of Epidemiology* **2012**, *22*, 151–159, doi:10.2188/jea.JE20110075.
79. Murakami, K.; Sasaki, S.; Uenishi, K.; Japan Dietetic Students' Study for Nutrition and Biomarkers Group The Degree of Misreporting of the Energy-Adjusted Intake of Protein, Potassium, and Sodium Does Not Differ among under-, Acceptable, and over-Reporters of Energy Intake. *Nutr Res* **2012**, *32*, 741–750, doi:10.1016/j.nutres.2012.09.001.
80. Duranti, S.; Milani, C.; Lugli, G.A.; Mancabelli, L.; Turrone, F.; Ferrario, C.; Mangifesta, M.; Viappiani, A.; Sánchez, B.; Margolles, A.; et al. Evaluation of Genetic Diversity among Strains of the Human Gut Commensal Bifidobacterium Adolescentis. *Sci Rep* **2016**, *6*, 23971, doi:10.1038/srep23971.
81. Li, B.; Wang, H.; Wang, M.; Liang, H.; Hu, T.; Yang, J.; Li, S.; You, X.; Xia, B.; Yuan, Y.; et al. Genome Analysis of Bifidobacterium Adolescentis and Investigation of Its Effects on Inflammation and Intestinal Barrier Function. *Front. Microbiol.* **2025**, *15*, doi:10.3389/fmicb.2024.1496280.
82. Kim, M.J.; Lee, D.K.; Park, J.E.; Park, I.H.; Seo, J.G.; Ha, N.J. Antiviral Activity of Bifidobacterium Adolescentis SPM1605 against Cocksackievirus B3. *Biotechnol Biotechnol Equip* **2014**, *28*, 681–688, doi:10.1080/13102818.2014.945237.
83. Yao, S.; Zhao, Z.; Wang, W.; Liu, X. Bifidobacterium Longum: Protection against Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research* **2021**, *2021*, 8030297, doi:10.1155/2021/8030297.
84. Yang, H.-Y.; Liu, S.-L.; Ibrahim, S.A.; Zhao, L.; Jiang, J.-L.; Sun, W.-F.; Ren, F.-Z. Oral Administration of Live Bifidobacterium Substrains Isolated from Healthy Centenarians Enhanced Immune Function in BALB/c Mice. *Nutr Res* **2009**, *29*, 281–289, doi:10.1016/j.nutres.2009.03.010.

85. Parada Venegas, D.; De la Fuente, M.K.; Landskron, G.; González, M.J.; Quera, R.; Dijkstra, G.; Harmsen, H.J.M.; Faber, K.N.; Hermoso, M.A. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* **2019**, *10*, 277, doi:10.3389/fimmu.2019.00277.
86. Marx, S.P.; Winkler, S.; Hartmeier, W. Metabolization of Beta-(2,6)-Linked Fructose-Oligosaccharides by Different Bifidobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **2000**, *182*, 163–169, doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb08891.x.
87. Rivière, A.; Selak, M.; Geirnaert, A.; Van den Abbeele, P.; De Vuyst, L. Complementary Mechanisms for Degradation of Inulin-Type Fructans and Arabinoxylan Oligosaccharides among Bifidobacterial Strains Suggest Bacterial Cooperation. *Appl Environ Microbiol* **2018**, *84*, e02893-17, doi:10.1128/AEM.02893-17.
88. Hurwitz, J.; Surman, S.; Jones, B.; Sealy, R.; Woodland, D.; Rudraraju, R. Vitamin A Deficiency Alters Antibody Forming Cell and CD8+ T Cell Responses Following Intranasal Vaccination with a Respiratory Virus Vaccine (105.9). *J Immunol* **2012**, *188*, 105.9, doi:10.4049/jimmunol.188.Supp.105.9.
89. Filipe Rosa, L.; Petersen, P.P.; Görtz, L.F.; Stolzer, I.; Kaden-Volynets, V.; Günther, C.; Bischoff, S.C. Vitamin A- and D-Deficient Diets Disrupt Intestinal Antimicrobial Peptide Defense Involving Wnt and STAT5 Signaling Pathways in Mice. *Nutrients* **2023**, *15*, 376, doi:10.3390/nu15020376.
90. Friedman, A.; Meidovsky, A.; Leitner, G.; Sklan, D. Decreased Resistance and Immune Response to Escherichia Coli Infection in Chicks with Low or High Intakes of Vitamin A. *J Nutr* **1991**, *121*, 395–400, doi:10.1093/jn/121.3.395.
91. He, X.; Li, Y.; Li, M.; Jia, G.; Dong, H.; Zhang, Y.; He, C.; Wang, C.; Deng, L.; Yang, Y. Hypovitaminosis A Coupled to Secondary Bacterial Infection in Beef Cattle. *BMC Vet Res* **2012**, *8*, 222, doi:10.1186/1746-6148-8-222.
92. Long, K.Z.; Garcia, C.; Ko, G.; Santos, J.I.; Al Mamun, A.; Rosado, J.L.; DuPont, H.L.; Nathakumar, N. Vitamin A Modifies the Intestinal Chemokine and Cytokine Responses to Norovirus Infection in Mexican Children. *J Nutr* **2011**, *141*, 957–963, doi:10.3945/jn.110.132134.
93. Chen, B.; Liu, S.; Feng, D.; Xiao, L.; Yang, T.; Li, T.; Sun, W.; Chen, J. Vitamin A Deficiency in the Early-Life Periods Alters a Diversity of the Colonic Mucosal Microbiota in Rats. *Front Nutr* **2020**, *7*, 580780, doi:10.3389/fnut.2020.580780.

94. Patterson, E.; Wall, R.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P.; Stanton, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Nutr Metab* **2012**, *2012*, 539426, doi:10.1155/2012/539426.
95. Ilag, L.L. Are Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids the Link between the Immune System and the Microbiome towards Modulating Cancer? *Medicines (Basel)* **2018**, *5*, 102, doi:10.3390/medicines5030102.
96. Willemsen, L.E.M.; Koetsier, M.A.; Balvers, M.; Beermann, C.; Stahl, B.; van Tol, E.A.F. Polyunsaturated Fatty Acids Support Epithelial Barrier Integrity and Reduce IL-4 Mediated Permeability in Vitro. *Eur J Nutr* **2008**, *47*, 183–191, doi:10.1007/s00394-008-0712-0.
97. Shen, J.; Zhang, L.; Wang, Y.; Chen, Z.; Ma, J.; Fang, X.; Das, U.N.; Yao, K. Beneficial Actions of Essential Fatty Acids in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus. *Front Nutr* **2022**, *9*, 890277, doi:10.3389/fnut.2022.890277.
98. Man, A.W.C.; Zhou, Y.; Xia, N.; Li, H. Involvement of Gut Microbiota, Microbial Metabolites and Interaction with Polyphenol in Host Immunometabolism. *Nutrients* **2020**, *12*, 3054, doi:10.3390/nu12103054.
99. Patel, D.; Evanchuk, J.; Wang, R.; Dunbar, C.L.; Munhoz, J.; Field, C.J. Regulation of Immune Function in Healthy Adults: One-Stop Guide on the Role of Dietary Fatty Acids, Gut Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids, and Select Micronutrients in Combination with Physical Activity. *Appl Physiol Nutr Metab* **2023**, *48*, 554–568, doi:10.1139/apnm-2022-0456.
100. Chen, J.; Chen, X.; Ho, C.L. Recent Development of Probiotic Bifidobacteria for Treating Human Diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fbioe.2021.770248.
101. Routy, B.; Le Chatelier, E.; Derosa, L.; Duong, C.P.M.; Alou, M.T.; Daillère, R.; Fluckiger, A.; Messaoudene, M.; Rauber, C.; Roberti, M.P.; et al. Gut Microbiome Influences Efficacy of PD-1–Based Immunotherapy against Epithelial Tumors. *Science* **2018**, *359*, 91–97, doi:10.1126/science.aan3706.
102. Gopalakrishnan, V.; Spencer, C.N.; Nezi, L.; Reuben, A.; Andrews, M.C.; Karpinets, T.V.; Prieto, P.A.; Vicente, D.; Hoffman, K.; Wei, S.C.; et al. Gut Microbiome Modulates Response to Anti-PD-1 Immunotherapy in Melanoma Patients. *Science* **2018**, *359*, 97–103, doi:10.1126/science.aan4236.
103. Matson, V.; Fessler, J.; Bao, R.; Chongsuwat, T.; Zha, Y.; Alegre, M.-L.; Luke, J.J.; Gajewski, T.F. The Commensal Microbiome Is Associated with Anti-PD-1 Efficacy in Metastatic Melanoma Patients. *Science* **2018**, *359*, 104–108, doi:10.1126/science.aao3290.

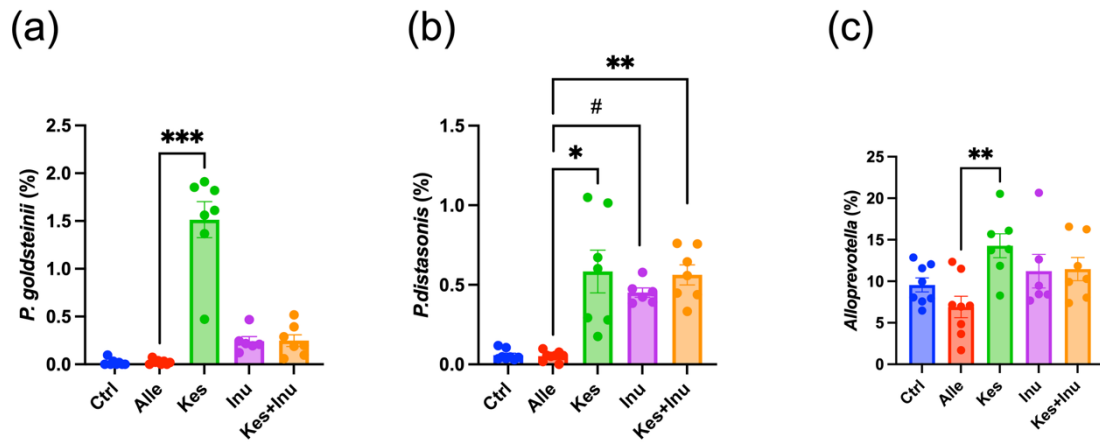
104. Vétizou, M.; Pitt, J.M.; Daillère, R.; Lepage, P.; Waldschmitt, N.; Flament, C.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Roberti, M.P.; Duong, C.P.M.; et al. Anticancer Immunotherapy by CTLA-4 Blockade Relies on the Gut Microbiota. *Science* **2015**, *350*, 1079–1084, doi:10.1126/science.aad1329.
105. Jordan, A.; Carding, S.R.; Hall, L.J. The Early-Life Gut Microbiome and Vaccine Efficacy. *The Lancet Microbe* **2022**, *3*, e787–e794, doi:10.1016/S2666-5247(22)00185-9.
106. Kim, Y.-G. Microbiota Influences Vaccine and Mucosal Adjuvant Efficacy. *Immune Netw* **2017**, *17*, 20–24, doi:10.4110/in.2017.17.1.20.
107. Revés, J.; Chapman, T.P.; Satsangi, J.; Torres, J. Probing the Microbiome to Predict Response to Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease—One Step Closer to Precision Medicine? *Gastroenterology* **2022**, *162*, 2120–2122, doi:10.1053/j.gastro.2022.03.028.
108. Ananthakrishnan, A.N.; Luo, C.; Yajnik, V.; Khalili, H.; Garber, J.J.; Stevens, B.W.; Cleland, T.; Xavier, R.J. Gut Microbiome Function Predicts Response to Anti-Integrin Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 603-610.e3, doi:10.1016/j.chom.2017.04.010.

補足資料

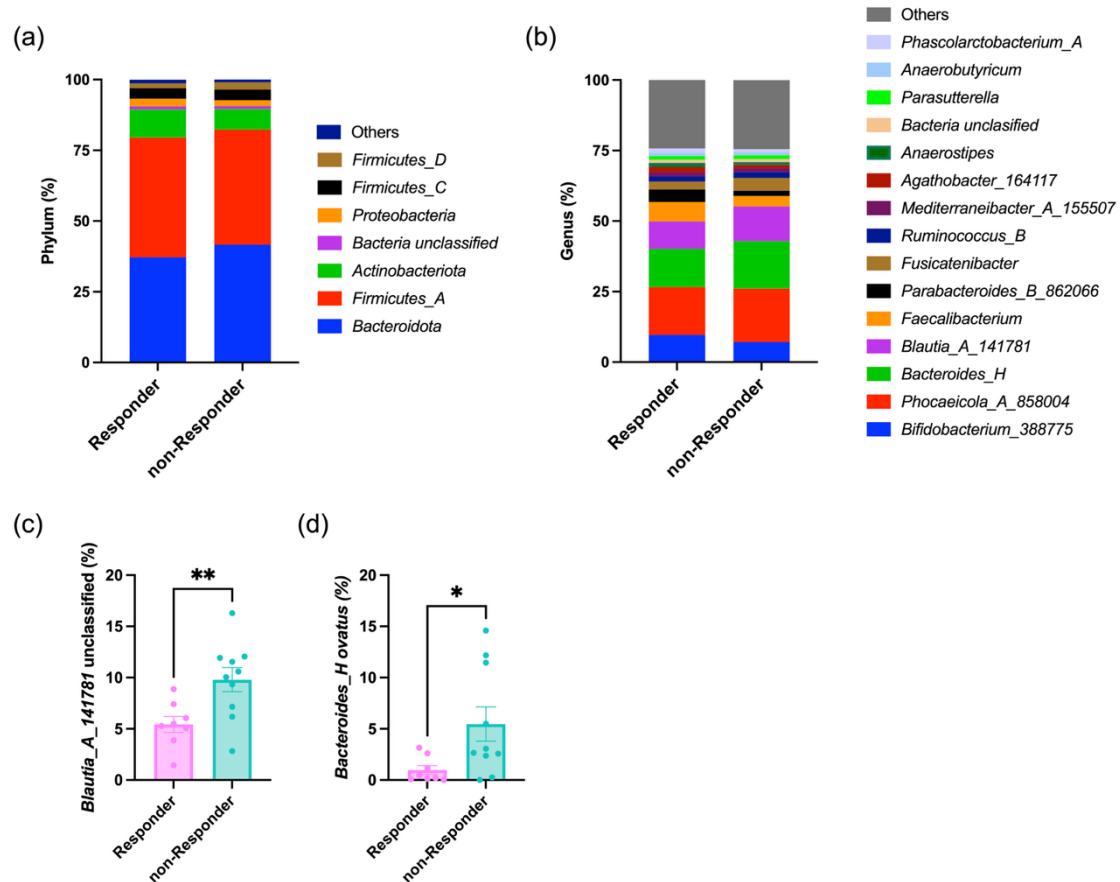


Supplementary Figure S1. Severity of OVA-induced food allergy and OVA sensitization before fructan intervention in the improvement study.

(a) Allergy scores of BALB/c mice with food allergies. (b) Changes in rectal temperature 30 min after oral administration of OVA. (c) Serum OVA-specific IgE levels. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs OVA and among fructan-treated groups.



Supplementary Figure S2. Relative abundances of key bacteria altered in the prevention test and examined in the improvement test. (a) *Parabacteroides goldsteinii*, (b) *P. distasonis*, and (c) *Alloprevotella*. Plots represent individual mice, and bars represent mean \pm SEM. # $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs OVA and among fructan-treated groups.



Supplementary Figure S3. Baseline gut microbiota in responder and non-responder subgroups.

(a) Phylum- and (b) Genus-level compositions at baseline, shown as 100% stacked bar charts. For (a) and (b), taxa with $\geq 1\%$ relative abundance in both subgroups are displayed; taxa below this threshold are grouped as Others. Relative abundances of (c) *Blautia_A_141781 unclassified* and (d) *Bacteroides_H ovatus* at baseline in the responder and non-responder subgroups. Plots represent individual participants; bars indicate mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supplementary Table S1. Cytokine levels were calculated by normalizing the cytokine gene copy numbers in each sample to the total number of 18S genes.

	Ctrl		OVA		Kes		Inu		Kes+Inu	
IL-2 levels	0.75	± 0.42	0.57	± 0.43	0.11	± 0.04	4.52	± 2.46	0.35	± 0.28
IL-4 levels	0.24	± 0.16	4.52	± 2.77	0.26	± 0.11	4.45	± 2.61	1.18	± 0.74
IL-6 levels	4.90	± 3.88	2.78	± 1.72	0.70	± 0.21	15.68	± 9.86	2.33	± 1.65
IL-10 levels	7.14	± 3.50	43.07	± 21.46	12.71	± 4.15	45.78	± 20.22	13.10	± 6.74

Data are presented as mean ± SEM, with 6 to 8 animals per group. Statistical analyses were performed using parametric ordinary one-way ANOVA. Data represent mean ± SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$. However, no significant differences were found.

Supplemental Table S2. PCR primers used in the present study

target gene	Primer name	Oligonucleotide sequence	Reference	Used for
16S rRNA V3-V4	Pro341F	CCTACGGGNBGCASCAG	[26]	16S rRNA amplicon sequencing
	Pro805R	GACTACNVGGGTATCTAATCC		
16S rRNA	F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	[27]	qPCR
	R_Prok1492	TACGGCTACCTTGTTACGACTT		
<i>InuA</i>	GH32_inuA_type_108F	GATTGGCCTGCACAGCCCA	This study	qPCR
	GH32_inuA_type_108R	CCAGTTCCAAGGGCGCTACCA		
<i>cscA</i>	GH32_cscA_type_108F	AACAACCGCTGGTAYCCGAAGT	This study	qPCR
	GH32_cscA_type_108R	CAGCTGGTAGAASACGTGCCA		

Supplementary Table S4. Fecal short-chain fatty acid concentrations at baseline and post-intervention in both groups.

	Placebo group						Baseline vs Post	Prebio group						Baseline vs Post	Baseline vs Post
	Baseline		Post		Baseline			Post		Baseline		Post			
Lactate (μ mol/g)	0.63	\pm 0.40	1.13	\pm 0.79	0.8672	0.28	\pm 0.24	0.12	\pm 0.09	>0.9999	0.3172	0.5428			
Acetate (μ mol/g)	32.64	\pm 4.96	32.22	\pm 4.54	0.6433	25.71	\pm 3.27	29.10	\pm 3.69	0.5509	0.4079	0.7133			
Propionate (μ mol/g)	11.04	\pm 1.39	11.87	\pm 1.37	0.8211	10.02	\pm 0.76	11.56	\pm 1.18	0.2986	0.7241	0.8866			
Butyrate (μ mol/g)	8.52	\pm 1.35	8.22	\pm 1.31	0.8827	7.28	\pm 0.88	8.15	\pm 1.17	0.4878	0.7928	0.7241			

Data represent mean \pm SEM.

Supplementary Table S5. Baseline characteristics of the subgroups.

	Responder group	non-Responder group	p-value
Sex (Male / Female)	0 / 8	1 / 9	>0.9999
Age (years)	20.63 \pm 0.38	20.70 \pm 0.21	0.9323
Height (cm)	161.48 \pm 2.03	159.53 \pm 2.35	0.5529
Body weight (kg)	51.98 \pm 1.91	50.43 \pm 3.48	>0.9999
BMI (calculated from BDHQ)	19.91 \pm 0.48	20.30 \pm 0.89	0.7791
Pre-existing medical conditions	-	1 participant: hay fever	>0.9999
Medications and supplements	-	1 participant: Fexofenadine	>0.9999
Intake Days	27.13 \pm 0.52	27.00 \pm 0.37	0.5882

Data represent mean \pm SEM.

Supplementary Table S6. Fecal short-chain fatty acid concentrations at baseline and post-intervention in subgroups.

	Responder						Baseline vs Post	non-Responder						Baseline vs Post	Baseline vs Post	Post vs Post
	Baseline		Post		Baseline			Post		Baseline		Post				
Lactate (μ mol/g)	0.08	\pm 0.08	0.27	\pm 0.19	0.5000	0.44	\pm 0.44	0.00	\pm 0.00	>0.9999	>0.9999	0.183				
Acetate (μ mol/g)	22.99	\pm 3.62	32.09	\pm 7.09	0.4609	27.89	\pm 5.19	26.71	\pm 3.68	0.8457	0.7618	0.7618				
Propionate (μ mol/g)	8.88	\pm 0.93	10.88	\pm 2.02	0.6172	10.93	\pm 1.11	12.10	\pm 1.44	0.4746	0.1947	0.4082				
Butyrate (μ mol/g)	6.34	\pm 0.97	9.29	\pm 2.51	0.3828	8.03	\pm 1.39	7.24	\pm 0.74	>0.9999	0.6162	0.8492				

Data represent mean \pm SEM.