

氏名	高橋 秀明
学位の種類	博士 (栄養科学)
学位番号	第24号
学位授与年月日	令和8年3月20日
学位論文名	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
論文審査委員	主査 教授 大野 欽司 副査 北浦 靖之 副査 教授 和泉 秀彦 副査 教授 藤木 理代

論文内容の要旨

【背景】食物アレルギーは世界的に増加しており、有効かつ安全な予防・治療法の開発が求められている。近年、腸内細菌叢が免疫系の発達や調節に深く関与することが明らかとなり、腸内細菌叢を標的とした介入による食物アレルギーの予防・改善効果に注目が集まっている。

プレバイオティクスである 1-Kestose (Kes) および Inulin (Inu) は、フルクタンに分類され腸内細菌が保有する glycoside hydrolase family 32 (GH32) に属する酵素群によって分解・利用される。また、それぞれ単独摂取によりアレルギー症状抑制効果が報告されている。GH32 に属する酵素群は菌種により基質特異性が異なるため、Kes と Inu はそれぞれ異なる GH32 保有菌によって選択的に代謝され得る。そのため、Kes と Inu を併用摂取することで、より広範な GH32 保有菌の増加を介してアレルギー抑制効果が高まる可能性が考えられる。

しかし、Kes と Inu の併用摂取によるアレルギー抑制効果はこれまで十分に検討されていない。さらに、ヒトにおいて Kes と Inu の併用摂取によりどのような腸内細菌叢が誘導されるかは不明である。加えて、ヒトは日常の食事内容の違いにより腸内細菌叢が個々人で異なるため、併用摂取に対する応答性も個々人で異なると予測されるが、Kes と Inu の併用摂取において食事因子とその応答性に関しては不明である。

そこで本研究では GH32 に着目し、食物アレルギーモデルマウスにおいて Kes および Inu の併用摂取が単独摂取よりも食物アレルギー反応を強く抑制するかを、予防試験 (研究①) および改善試験 (研究②) で検証した。また、健常成人を対象とした介入試験により、Kes と Inu の併用摂取により誘導される GH32 に注目した腸内細菌叢の変化および食事因子との関連を調査した (研究③)。

研究①Kes および Inu 併用摂取による食物アレルギー予防効果の評価

【方法】BALB/c マウスを Ctrl 群、オボアルブミン (OVA) 誘導食物アレルギー群 (OVA 群)、Kes 5%群 (Kes 群)、Inu 5%群 (Inu 群)、Kes 2.5%+Inu 2.5%群 (Kes+Inu 群) に分け、OVA 感作を行った。8週目に OVA を経口投与 (チャレンジ) し、30 分間の症状スコアおよび直腸温度変化によりアレルギー反応を評価した。その後、血液・糞便・盲腸内容物・パイエル板を採取し、血清 OVA 特異的 IgE、糞便中総 IgA および OVA 特異的 IgA を ELISA で測定した。パイエル板ではサイトカイン関連遺伝子を RT-qPCR で相対比較し、盲腸内容物では 16S rRNA アンプリコン解析ならびに短鎖脂肪酸 (SCFAs)・乳酸の定量を行った。

【結果および考察】Kes と Inu の摂取はいずれも OVA チャレンジ後のアレルギー症状を軽減し、特に Kes+Inu 群で症状スコアの低下および直腸温度低下の抑制が最も強かった。OVA 群で認められた血清 OVA 特異的 IgE 上昇および糞便中 OVA 特異的 IgA 関連の変動は、プレバイオティクス摂取で有意に減少し、糞便中総 IgA は Kes+Inu 群でのみ有意に改善した。

腸内細菌叢解析では、OVA 感作により減少した *Alloprevotella* や *Parabacteroides* がプレバイオティクス摂取により増加し、*Parabacteroides* の中でも *P. distasonis* が Kes 群および Kes+Inu 群で、*P. goldsteinii* が Inu 群および Kes+Inu 群で有意に増加した。加えて、各菌種に対応する GH32 遺伝子コピー数も同様の増加を示した。また、酢酸は Kes+Inu 群で、プロピオン酸は Kes 群で、乳酸は Inu 群および Kes+Inu 群で有意に増加した。

以上より、Kes と Inu はそれぞれ異なる GH32 を持つ腸内細菌に利用され、異なる代謝産物を介して食物アレルギー予防効果を誘導する可能性が示唆された。

研究②Kes および Inu 併用摂取による食物アレルギー改善効果の評価

【方法】研究①と同様に OVA 感作により食物アレルギーモデルを作製し、OVA チャレンジによりアレルギー反応を評価した。その後、OVA 感作マウスを OVA 群、Kes 群、Inu 群、Kes+Inu 群に割り付け、各飼料で 4 週間介入した。介入後に再度 OVA チャレンジを行い、症状スコア、直腸温度変化、血清 OVA 特異的 IgE を評価した。さらに、盲腸内容物を用いて 16S rRNA アンプリコン解析および SCFAs・乳酸の定量を行った。

【結果および考察】プレバイオティクス摂取は、いずれも症状スコアおよび直腸温度変化の改善を示した。一方、OVA 特異的 IgE は Kes+Inu 群でのみ有意に低下した。

腸内細菌叢では、*UBA7173* が Inu 群および Kes+Inu 群で増加し、とくに Kes+Inu 群で顕著であった。*UBA7173* の中でも、*U. sp900540205* は Inu 群および Kes+Inu 群で、*U. sp002491305* は Kes 群および Kes+Inu 群で増加した。代謝産物として、酢酸は Kes+Inu 群で有意に増加した。*UBA7173* の存在量は各 SCFA 濃度と正の相関を示し、特に酢酸との相関が強かった。

以上より、Kes と Inu の併用摂取により *UBA7173* 増加と酢酸産生の増強が促進され、これが IgE 低下を伴う食物アレルギー改善効果に関与する可能性が示唆された。

研究③ヒトにおける Kes および Inu 併用摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響

【方法】健常成人 40 名を対象に、二重盲検プラセボ対照ランダム化比較試験を実施した。被験者は Kes 3 g/日+Inu 3 g/日を 4 週間摂取する Prebio 群、またはプラセボ（マルトース 3 g/日+コーンスターチ 3 g/日）を摂取する Placebo 群に無作為に割り付けた。最終的に解析対象となったのは Prebio 群が 19 名、Placebo 群が 18 名であった。

介入前後で糞便サンプルを採取し、16S rRNA アンプリコン解析および SCFAs・乳酸定量を行った。さらに、糞便中の *Bifidobacterium longum* および *B. adolescentis* に由来する GH32 遺伝子 (*cscA*, *inuA*) を qPCR で測定した。加えて、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 株および *B. adolescentis* JCM 1275 株をスクロース、Kes、Inu を基質として培養し、資化性を評価した。

食事内容はベースライン時に Brief Diet History Questionnaire (BDHQ) で評価し、GH32 遺伝子との関連を解析した。

【結果および考察】Kes と Inu の併用摂取により、*B. adolescentis* および *B. longum* が有意に増加し、対応する GH32 遺伝子 (*inuA*, *cscA*) の増加が認められた。培養試験では、*B. longum* は Kes を基質とした場合にのみ増殖し、*B. adolescentis* は Kes および Inu の双方を利用して増殖した。

Prebio 群の中で *B. adolescentis* および *B. longum* がともに増加した被験者（レスポンドー）およびそうでない被験者（ノンレスポンドー）に分けたサブグループ解析では、レスポンドーにおいて糞便中

inuA および *cscA* が有意に増加した。また、この増加はベースライン時の特定の栄養素、特にレチノールと C16:3 脂肪酸の摂取量、および緑葉野菜とツナ缶の摂取量と関連していた。以上より、Kes と Inu の併用摂取は、基質特異性の異なる GH32 関連菌を介してヒト腸内細菌叢を変化させ、その応答性には食事背景が関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 博士論文の要旨

本論文は、重合度 (degree of polymerization, DP) の異なる 2 種類のプレバイオティクスである短鎖フルクタン (1-kestose: Kes) と長鎖フルクタン (inulin: Inu) の併用摂取が、食物アレルギーの予防および改善に及ぼす効果を、マウスモデルとヒトを対象に多角的に検証した研究である。本研究は、「DP の異なるフルクタンを併用することで、基質特異性の異なる分解酵素 (glycoside hydrolase family 32, GH32) を保有する多様な腸内細菌群を活性化させ、アレルギー抑制効果を増強し得る」という独創的な仮説に基づくものである。本論文は、この仮説を検証するため、3 つの主要な研究から構成されている。

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」では、卵白アルブミン (OVA) 誘発食物アレルギーモデルマウスを用い、アレルギー発症前から Kes および Inu を単独または併用で摂取させた際の効果を検討した。その結果、フルクタン摂取群、特に併用摂取群において、アレルギー症状スコアの低下、直腸温低下の抑制、血清 OVA 特異的 IgE および糞便中 OVA 特異的 IgA の上昇抑制が最も顕著に認められた。腸内細菌叢解析では、フルクタン摂取により、アレルギー誘導で減少した *Bacteroidota* 門、特に *Parabacteroides distasonis* および *Parabacteroides goldsteinii* の存在量が増加した。さらに、酵素反応解析により、*P. distasonis* 由来 GH32 酵素が Kes を、*P. goldsteinii* 由来 GH32 酵素が Inu を分解する活性を持つことを明らかにした。また、盲腸内では酢酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 濃度が上昇しており、これらの代謝産物を介した免疫調節がアレルギー予防に寄与する可能性が示唆された。

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」では、既にアレルギーが成立したマウスモデルに対し、同様にフルクタンを摂取させ、その改善効果を評価した。併用摂取群では、単独摂取群と比較して OVA 特異的 IgE レベルの有意な低下が認められ、治療的介入においても併用が有効であることが示された。興味深いことに、この改善試験で増加した主要な細菌は予防試験とは異なり、*Muribaculaceae* 科に属する *UBA7173* であった。この菌の増加は盲腸内 SCFAs 濃度、特に酢酸濃度の上昇と正の相関を示した。この結果は、介入時期 (予防か改善か) によって応答する菌種は異なるものの、「GH32 酵素を介したフルクタン分解と SCFAs 産生」という機能的側面がアレルギー抑制の共通機序である可能性を示唆した。

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」では、健康成人を対象としたランダム化二重盲検比較試験を実施し、Kes と Inu の併用摂取がヒト腸内細

菌叢に与える影響を検討した。その結果、併用摂取群では、有用菌として知られる *Bifidobacterium adolescentis* および *Bifidobacterium longum* が選択的に増加した。さらに、これらの菌種に特異的な GH32 遺伝子 (*inuA* および *cscA*) のコピー数も同様に増加しており、フルクタンを直接的な資化が菌の増殖に関与していることが強く示唆された。また、培養実験により、*B. adolescentis* が Inu と Kes の両方を、*B. longum* が Kes を主に利用することが確認され、併用摂取が異なる基質特異性を持つ有用菌を同時に増殖させる戦略として有効であることが示された。さらに本研究の特筆すべき点として、プレバイオティクスへの応答性には個人差が存在し、その応答性（レスポonder/ノンレスポonder）が、日常の食事におけるレチノールや特定の脂肪酸 C16:3 (n-6) の摂取量、さらには緑黄色野菜やツナ缶の摂取習慣と関連することが見出された。

第五章「総合考察」では、これら3つの研究成果を統合し、Kes と Inu の併用摂取が、マウスとヒトにおいて共通して「GH32 酵素を介してフルクタンを分解し、SCFAs 等の有益な代謝産物を産生する菌群」を選択的に増加させることを結論づけている。そして、その応答性は宿主の介入時期や食事背景によって変動しうることを示し、個別化栄養戦略への応用の可能性を提示している。

2. 本論文の成果

本論文が栄養科学分野にもたらした学術的成果は、以下の点において高く評価される。

2.1 フルクタン併用摂取の有効性の実証と作用機序の解明

これまで単独での効果が報告されてきた短鎖および長鎖フルクタンについて、両者を併用摂取することの優位性を、アレルギーの「予防」と「改善」という異なる病態ステージのマウスモデルを用いて初めて体系的に実証した。特に、併用によって単独摂取を上回る効果が得られる場合があることを明確に示した点は、プレバイオティクス応用における重要な知見である。

2.2 機能遺伝子 (GH32) に着目した種を超えた普遍的機序の提示

マウスとヒトでは腸内細菌叢の構成が大きく異なるという課題に対し、本研究は特定の菌種ではなく「GH32 酵素」に着目した。これにより、異なる宿主や異なる条件下（予防 vs 改善）で優勢となる菌種は変動するものの、その背後には「フルクタン分解能」という共通の機能が存在することを明らかにした。このアプローチは、動物モデルからヒトへの研究成果の橋渡しを行う上で、非常に独創的かつ説得力のある視点を提供している。

2.3 ヒトにおけるプレバイオティクス応答性の個人差と食事因子の関連性の発見

ヒト介入試験において、フルクタン併用摂取に対する腸内細菌叢の応答に個人差（レスポonder/ノンレスポonder）が存在すること、そしてその差異がベースラインの菌叢構成のみならず、ビタミン A（レチノール）や特定の脂肪酸、さらには緑黄色野菜や魚介類の摂取といった日常の食事パターンと関連することを世界で初めて見出した。この発見は、プレバイオティクスの効果を最大化するための「個別化栄養」アプローチの実現に向けた基盤的知見であり、臨床応用の観点からも極めて意義深い。

2.4 フルクタン資化性菌の基質特異性の生化学的証明

マウスモデルで増加した *P. distasonis* および *P. goldsteinii* が持つ GH32 酵素が、それぞれ

Kes と Inu に対して異なる基質特異性を持つことを酵素学的に証明した。これにより、フルクタン DP の違いが、腸内細菌叢の応答を規定する重要な因子であることを直接的に示した。これは、プレバイオティクスの作用機序を分子レベルで解明した重要な成果である。

以上の成果は、食物アレルギーの予防・治療戦略に新たな科学的根拠を提供するとともに、腸内細菌叢を標的とした個別化栄養学の発展に大きく貢献するものであり、その学術的価値は非常に高い。

3. 審査の概要と評価

2026 年 2 月 10 日に実施された最終口頭試問では、申請者による研究内容の発表に続き、審査委員との間で活発な質疑応答が行われた。各審査委員からの評価は一致して極めて高く、本論文が博士論文として十分な水準に達していることが確認された。副査からの意見を要約すると以下の通りである。

- **一貫した研究テーマ：**「重合度の異なるフルクタンの併用摂取は、より広範な GH32 保有菌を活性化し、アレルギー反応抑制効果を増強し得る」という明確な仮説を軸に、マウスでの予防・改善試験からヒト介入試験へと展開しており、単なる個別研究の羅列ではなく、問いを深化させる一貫した構成が高く評価された。
- **研究の新規性と独創性：**フルクタンの併用効果と、それがヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を初めて検討した点、また、マウスとヒトの種差という課題に対し「GH32 保有」という機能に着目して類似性を検証した点に、高い新規性と独創性が認められた。特に、ヒト試験における応答性の個人差を機能遺伝子指標と食事背景に結びつけた点は、個別化プレバイオティクス設計の観点から意義深いとの評価を得た。
- **学識と研究遂行能力：**申請者は、食物アレルギーの免疫学、腸内細菌の機能、菌叢解析技術、食生活と腸内環境の関連など、本研究を遂行する上で不可欠な多角的な分野において、深い学識と優れた研究遂行能力を有していることが確認された。実験計画、データ解析、結果の解釈はいずれも妥当であり、論旨は明快であった。
- **批判的検討能力と将来性：**最終口頭試問において、申請者は、併用効果の限界、予防と改善で異なる腸内環境変化のメカニズム、先行研究との相違点などに関する審査委員からの鋭い質問に対し、自身の実験データと最新の科学的知見に基づき、論理的かつ的確に回答した。現時点で断定できる点と今後の課題を明確に区別し、将来の研究の方向性についても具体的に展望を述べるなど、研究者としての高い批判的検討能力と誠実な姿勢が示された。

以上のように、審査委員会は、本論文が栄養科学分野において新規性・有用性の高い重要な知見を提供したものであり、その内容、構成、論理展開のいずれにおいても博士論文として卓越した水準にあると一致して判断した。また、最終口頭試問における質疑応答を通じて、申請者が自立した研究者として十分な能力を備えていることも確認された。

4. 結論

以上の審査結果に基づき、本審査委員会は、高橋秀明君の博士論文「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」が、本大学院栄養科学研究科の博士論文として十分な水準に達していると判断し、同君に博士（栄養科学）の学位を授与することを勧奨する。