



有限会社バイオ研  
Bio-Lab.Co.,Ltd.

## nEF 投与による Treg を介したマウス DSS 腸炎の症状緩和

第 70 回日本栄養・食糧学会大会にて発表 (2016 年 5 月 13 日～15 日於：神戸)

nEF の効果検証試験として、DSS 腸炎モデルを用いて nEF 投与による腸炎症状改善効果(腸の炎症症状の軽減効果)とそのメカニズムを検証した。

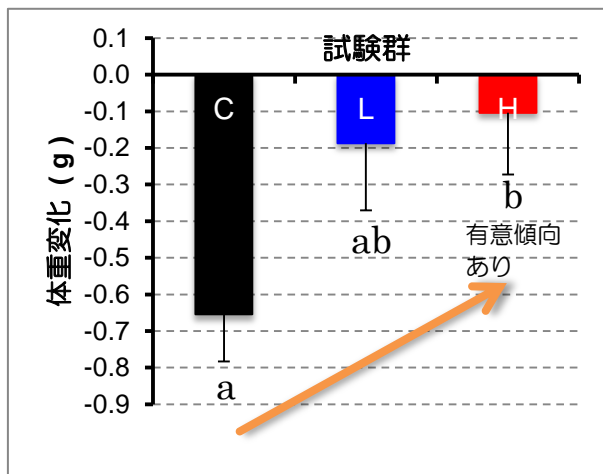
試験は、回腸パイエル板(iPP)および腸間膜リンパ節(MLN)リンパ球中の制御性 T 細胞である Treg 細胞(CD4<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup>)と炎症を惹起させる Th17(CD4<sup>+</sup>RORγ<sup>t</sup>)細胞の割合の検証、結直腸の病理学的検査、さらに結直腸組織から RNA 抽出し 16S rRNA をターゲットとした菌叢メタゲノム解析と総細菌数の real-time PCR による解析を行った。

試験の結果、DSS 腸炎発症マウスに nEF を予め投与しておくことで、DSS 腸炎発症を予防できることが確認できた。

### 【試験内容】

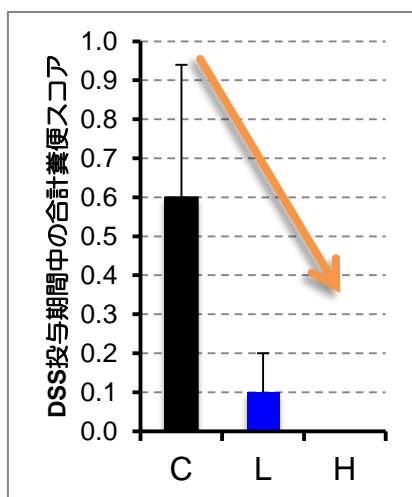
1. 被験物質：ナノ型乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2 株 加熱殺菌菌体末「nEF」
2. 供試動物：C57BL/6 系雌性マウス (日本 SLC, 9 週齢) 30 匹 (n=10)
3. 基礎飼料：AIN93G 20% Casein diet (Research Diet)
4. 試験群
  - ① 生理食塩水投与対照群 (無投与対照 C 群)
  - ② nEF 2 mg/kg B.W./day 投与群(低用量 L 群)
  - ③ nEF 10 mg/kg B.W./day 投与群(高用量 H 群)
5. DSS 投与開始後の体重推移と糞便スコア
6. 結直腸の長さ
7. 結直腸の病理組織学的検査
8. フローサイトメーターによる Treg 細胞と Th17 細胞割合の解析
9. リアルタイム PCR による 16SrRNA をターゲットとした結直腸組織の菌叢メタゲノム解析と総細菌数の解析。(Bartosch et al. 2004. AEM 参照)

【DSS 投与後の体重変化】



DSS 投与開始後は体重減少が認められた。平均体重変化は、無投与対照(C)群の体重減少が最も高く、nEF 10mg/KgB.W./day 投与(H)群の体重減少が最も低かった。統計学的解析の結果、C群とH群間に有意傾向が認められた。

【DSS 投与開始後の糞便性状】



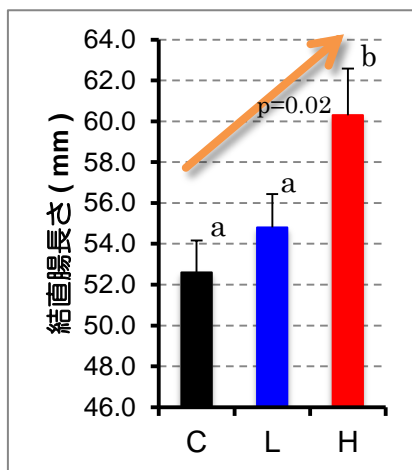
糞便の異常は DSS 投与開始後 4 日以降確認できるようになった。DSS 投与期間中の合計糞便スコアは、nEF 10mg/KgB.W./day 投与(H)群が他の 2 群よりも低値を示したが、群間に有意差は認められなかった。

※糞便スコア：

0 = 正常便

1 = 軟便、2 = 泥状便、3=血便

【剖検時結直腸長さ】

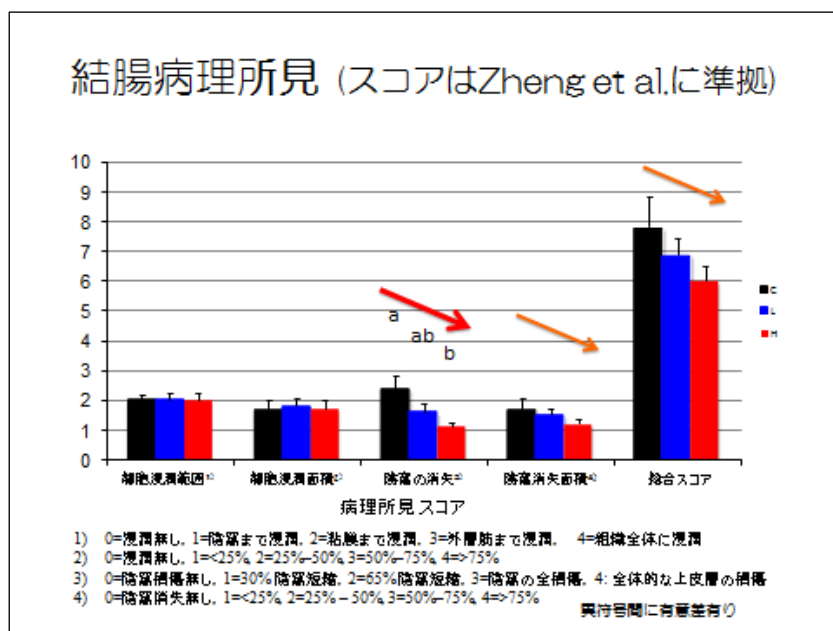


平均結直腸長さは、nEF 10mg/KgB.W./day 投与(H)群が最も高値を示した。

無投与対照(C)群とH群間に有意差(p=0.02 H>>C)が認められた。

(異符号間に有意差有り)

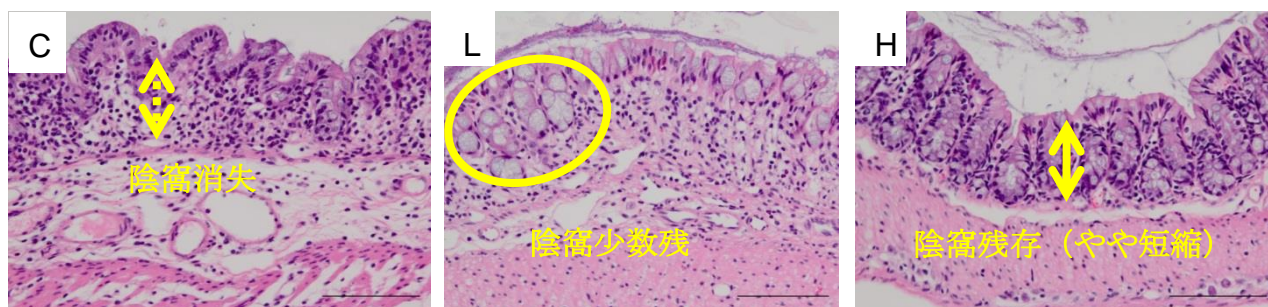
【結腸病理所見】



平均陰窩消失スコアは、nEF 10mg/KgB.W./day 投与 (H) 群が最も高値を示し、**無投与対照 (C) 群と H 群間に有意差が認められた**。平均陰窩消失面積スコアも H 群が最も高値を示したが、群間に有意差は認められなかった (病理写真参照)。

平均結腸総合スコアは、H 群が最も高値を示したが、群間に有意差は認められなかった。

【結腸組織 陰窩の病理写真】

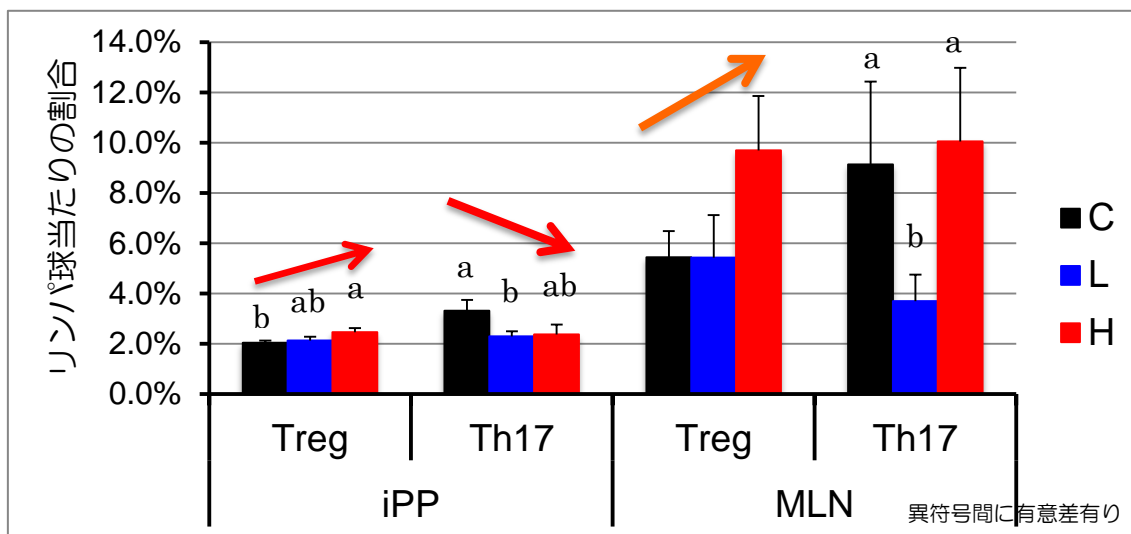


無投与対照 (C) 群

nEF 2mg/KgB.W./day(L)群

nEF 10mg/KgB.W./day(H)群

【パイエル板及び腸間膜リンパ節のリンパ球の Treg 及び Th17 細胞数割合】



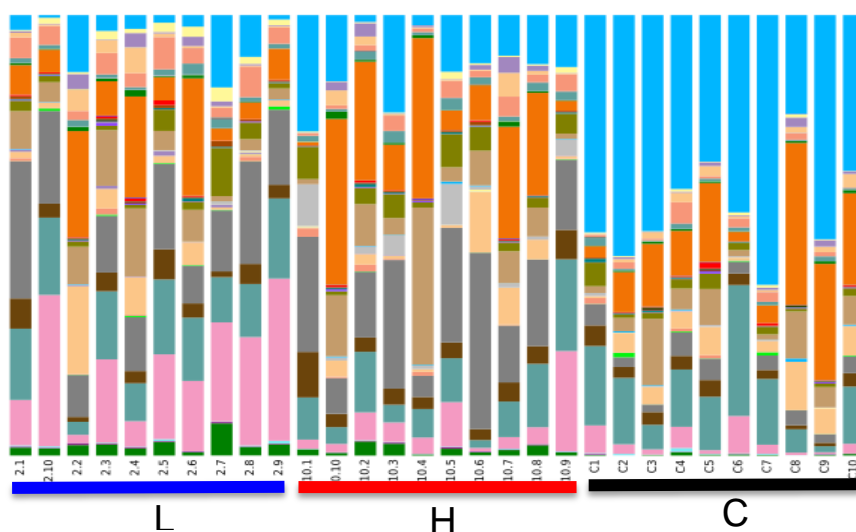
〔回腸パイエル板内 iPP〕

平均全リンパ球当たりの Treg (CD4+foxp3+)細胞割合は、nEF 10mg/KgB.W./day 投与(H)群が最も高値を示し、nEF 2mg/KgB.W./day(L)群、無投与対照(C)群の順に低値を示した。C群とH群間に有意傾向が認められた。Th17 (CD4+ROR・t+)細胞割合は、C群が最も高値を示し、H群、L群の順に低値を示した。C群とL群間に有意傾向が認められた。

〔腸間膜リンパ節 MLN〕

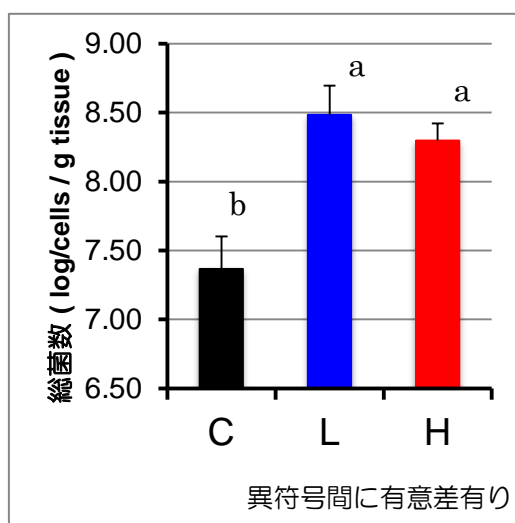
平均全リンパ球当たりの Treg 細胞割合は、H群が最も高値を示したが、群間に有意差は認められなかった。Th17 細胞割合は、C群とH群が高値を示し、C及びH群とL群間に有意傾向も認められた。

【結腸粘膜細菌の占有率(属で表示)】



次世代シーケンサによる属レベルでの菌占有率として表した。結腸粘膜細菌占有率は各群間で細菌占有率のパターンに相違が認められた。

### 【結腸粘膜の総菌数】



結腸粘膜の総菌数は、結腸組織から抽出した total RNA を用いて逆転写を行い cDNA 溶液を得、cDNA を用いて real-time PCR を行い総菌数の測定を行った。

結腸粘膜の総菌数は、対照群(C 群)に対し nEF 投与群で高く、C 群と L 群および H 群間に有意差が認められた。

### 【総括】

## まとめ

EFを毎日経口給与することで、DSS腸炎の症状を緩和

- ❖ 症状緩和には、EF給与による腸管でのTreg (CD4<sup>+</sup>foxp<sup>+</sup>)細胞増、およびTh17(CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>)細胞減が関与か
- ❖ 結腸組織の腸内細菌構成が顕著に変化
- ❖ 大腸粘膜に存在する細菌数が減少→→→→粘膜恒常性の破綻を示唆？

試験の結果、DSS 腸炎発症マウスに nEF を予め投与しておくことで、腸炎発症を予防できることが確認できた。腸炎予防の作用機序は、iPP 及び MLN のリンパ球の Treg 細胞割合が高値化し、Th17 細胞割合が減少することによるものと示唆された。