

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11654

研究課題名(和文) 食用カンナデンプンの食物アレルギー予防効果と免疫機能への影響

研究課題名(英文) Food Allergy Prevention Effects of Edible Canna Starch and Its Influence on Immune Function

研究代表者

田中 守 (Tanaka, Mamoru)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：00612350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カンナデンプン摂取が食物アレルギーモデルマウスに及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、(1)直腸温を指標としたアナフィラキシー症状、(2)各種抗体産生能、(3)腸内環境、(4)腸管バリア機能、(5)OVAの取り込み、(6)空腸におけるタイトジャンクション(TJ)関連タンパク質発現の評価を行った。結果、食物アレルギーモデルマウスにカンナデンプンを摂取させると、OVA特異IgEの産生抑制、腸内環境の改善および腸管バリア機能の向上によるアレルゲン取り込み抑制により、アナフィラキシー症状抑制につながることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本を含む先進国では、食物アレルギーや花粉症を呈する 型アレルギー疾患の有症率が増加しており、深刻な社会問題となっている。本研究より、カンナデンプンの機能と免疫疾患に関する影響とその仕組みの一端が明らかとなった。今後、さらに研究を進めていくことにより、日常の食生活からの食物アレルギー等を予防およびアレルギーの発症を抑制する創薬や新たな機能性食品の創出に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of canna starch intake in a murine food allergy model. The following items were evaluated: (1) anaphylactic symptoms using rectal temperature as an index; (2) ability to produce various antibodies; (3) intestinal environment; (4) intestinal barrier function; (5) OVA uptake; and (6) tight junction (TJ)-related protein expression in the jejunum. Results suggest that canna starch supplementation in a murine food allergy model leads to suppression of anaphylactic symptoms through suppression of OVA-specific IgE production, improvement of the intestinal environment, and a reduction in allergen uptake by increasing the intestinal barrier function.

研究分野：食品免疫学

キーワード：カンナデンプン 型アレルギー 腸内環境 IgE産生能 タイトジャンクション マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進国では、食物アレルギーや花粉症を呈する 1 型アレルギー疾患の有症率が増加しており、深刻な社会問題となっている。1 型アレルギーは、免疫学的機序を介してアレルギー症状が引き起こされるため、抗アレルギー薬や抗アレルギー効果を有する食品の摂取は、主にマスト細胞や IgE、脱顆粒、各種受容体をターゲットとしており、既にアレルギー状態にある人が対象となる。一方、アレルギーの予防の観点からすれば、アレルギー状態にならない、もしくはアレルギー症状を発症しないことが重要である。これまでに我々は、カンナデンプンがアレルギー症状の中で、特に重篤とされるアナフィラキシー症状を抑制する現象を見出した。

緑茶に多く含まれているエピガロカテキンガレート (EGCG) は、脱顆粒抑制や IgE 産生抑制といった B 細胞やマスト細胞への抗アレルギー効果が多数報告されているものの、アナフィラキシー症状を抑制することはできなかった。即ち、EGCG のような食品成分はアレルギー症状の緩和には有効と考えられるが、アレルギーを予防するにはマスト細胞や脱顆粒よりも上流で作用する必要がある。我々は、これまでにカンナデンプンをマウスに摂取させると、腸管においてムチン、IgA の分泌を促進するとともに、制御性 T (Treg) 細胞の分化を誘導する細菌として代表的なクロストリジウム属細菌の増加 (Table 1)、および腸内細菌の代謝産物である乳酸や酢酸、酪酸といった短鎖脂肪酸を有意に増加させることを明らかにしてきた (Table 2)。これらの効果は、アレルギー疾患や大腸がん等の免疫疾患の予防・改善に有効であることを示唆する。

2. 研究の目的

消化管においてカンナデンプンは、ムチン、IgA 分泌の促進、クロストリジウム属細菌および乳酸や酢酸、酪酸といった短鎖脂肪酸の増加させることから、我々は、カンナデンプンの食物アレルギーの予防・改善効果に着目した。本研究では、カンナデンプンのアレルギー予防効果、特に消化管に着目し、アレルギー予防効果と免疫機能への影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と群

生後 5 週齢の BALB/c 雌マウスを実験に用いた。実験期間中は室温 22 ± 2 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12/12h (明期 A.M. 8:00-P.M. 8:00) の明暗サイクルの条件で飼育した。マウス購入後の 7 日間は市販飼料・水道水を自由摂取させ、予備飼育した。実験開始前日に、全マウスの体重を測定した後、各群の体重が均等になるよう Control/AIN-93G(CA) (n=8)、Control/Canna(CC) (n=10)、Sensitization/AIN-93G(SA) (n=10)、Sensitization/Canna(SC) (n=9) の 4 群に分けた。なお、全実験は、動物実験ガイドラインに従い、中部大学動物実験委員会の承認を得て行った。

(2) 飼料

飼料は、AIN-93G 飼料をベースとし、表 1 の組成で調整した。実験期間中、CA、SA は AIN-93G 飼料と水道水を、CC、SC は AIN-93G のうち 10% を corn starch からカンナデンプンに置き換えた AIN-93G 飼料 (10% canna starch-added diet) と水道水を自由摂取させた。

表1. 飼料組成 (%)

Ingredient	AIN-93G	10% canna starch-added diet
Corn starch	63.20	53.20
Casein	20.00	20.00
Corn oil (no additives)	7.00	7.00
Fiber	5.00	5.00
Mineral mix (AIN-93G-MX)	3.50	3.50
Vitamin mix (AIN-93VX)	1.00	1.00
L-Cystine	0.30	0.30
Tertiary butyl hydroquinone	0.0014	0.0014
Canna starch	0.00	10.00
Total	100.00	100.00

(3) 食物アレルギーモデルマウスの作製および実験スケジュール

予備飼育を 7 日間行った後、実験開始日 7 日目、21 日目に感作を行った。マウスにイソフルラン吸入麻酔薬で軽く麻酔をかけ、感作群である SA および SC では、卵白アルブミン (OVA) を含む $Al(OH)_3$ を 7、21 日目に軽く麻酔をかけたマウスの腹腔内に投与し、感作を行った。一方、非感作群である CA および CC は OVA を含まない $Al(OH)_3$ を同様に投与した。

実験開始 25 日目からアナフィラキシー症状の評価を行うまでの 3 日間、マウスを個別ケージに移し、糞を採取した。アナフィラキシー症状の評価後、門脈からの採血および臓器の採取・計量・保存を行った。

(4) アナフィラキシー症状の評価

実験開始 28 日目の OVA 投与 30 分後における直腸温をアナフィラキシー症状の指標とした。マウスにイソフルラン吸入麻酔薬で軽く麻酔をかけ、22G 経口投与針を用いて、マウス一匹当たり 20 mg の OVA を含む 0.2 mL の PBS を経口投与した。投与 30 分後に、体温計を用いて直腸温を測定した。

(5) 抗体産生能の評価

飼育開始から 28 日目、アナフィラキシー症状の評価を行った後に門脈から採血を行い、血液を遠心分離(4, 15,000 rpm, 15 分間)し、血清を得た。この血清に等量のグリセリンを加え、以後の実験で使用するまで -20 °C で保存した。

OVA 特異抗体価は、固相 ELISA 法を用いて測定した。コーティングバッファーを 100 μ L ずつ 96 well マイクロプレートの各 well に入れ、4 °C で 1 晩静置した。液を捨て、各 well に PBS-T を 200 μ L 入れ、1 分間待ってから液を捨て、プレートを洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。1%BSA/PBS-T を各 well に 100 μ L ずつ入れ、37 °C で 1 時間静置し、タンパク質末端結合部位をブロックした。PBS-T で 3 回洗浄した後、希釈した血清を 100 μ L ずつ各 well に入れ、37 °C で 1 時間インキュベートした。PBS-T で 5 回洗浄した後、希釈した二次抗体を各 well に 100 μ L ずつ入れ、37 °C で 1 時間インキュベートした。PBS-T で 5 回洗浄し、発色液を各 well に 100 μ L ずつ入れ、OVA 特異 IgE では 5 分間、OVA 特異 IgG、IgG1 および IgG2a では 1-3 分間発色させた。2.5 M 硫酸を各 well に 50 μ L ずつ入れ、酵素反応を停止させ、492 nm の吸光度を測定した。

(6) OVA の体内への取り込み

実験開始 28 日目のアナフィラキシー症状評価後に肝臓を採取し、4%PFA に浸して 4 °C で固定した。1 週間後に 30%スクロース/0.1 mol PB(0.2%NaNO₃)(pH7.4)に浸し、スクロース置換を行った。組織が溶液中に沈んだことを確認し、ジメチル-アミンボランを用いて還元処理後、凍結包埋した。クライオスタットを用いて川本法により 10 μ m の厚さの切片を作製した。作製した切片は、PBS に浮かべて以後の実験で使用するまで 4 °C で保存した。

免疫染色には ImmPRESS[®]Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Kit, Peroxidase を用いた。内因性ペルオキシダーゼをブロックするため、切片を 3%H₂O₂/PBS に 10 分間浸漬した。PBS で 2 回洗浄(各 5 分間)後、キットの Normal Horse Serum, 2.5%に浸し、30 分間室温で放置し、ブロッキングを行った。その後、一次抗体溶液に切片を浸し、4 °C で一晩反応させた。PBS で 2 回洗浄後、キットの Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Reagent に浸し、室温で 2 時間放置し、二次抗体反応を行った。PBS で 2 回洗浄後、DAB 発色液に浸し、5 分間反応させ、PBS に切片を浮かべて発色終了とした。切片の封入には SCMM(R2)を用いた。100%エタノールに 2 回切片を浸して脱水後、スライドガラスに切片をのせて SCMM(R2)をかけ、カバーガラスを被せた。余剰な SCMM(R2)を拭き取った後、UV に 10 分間当て硬化した。染色した組織切片は正立顕微鏡を用いて cellSens イメージングソフトウェアで観察し、撮影した。

(7) 糞中ムチン含量および盲腸内容物重量、盲腸内容物 pH

糞に含まれるムチンは、Fecal Mucin Assay Kit を用いた蛍光測定法によって測定した。盲腸内容物重量、盲腸内容物 pH は、実験開始 28 日目のアナフィラキシー症状評価後に、盲腸を採取し、盲腸全重量を測定した。

(8) 統計分析

すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示した。多群間の検定は、正規分布の場合は一元配置の分散分析後、Post hoc 検定として Turkey もしくは Games-Howell を用いた。正規分布していない場合はノンパラメトリック検定の Kruskal-Wallis を用いた。有意水準 5%未満で有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 体重および飼料摂取量

実験開始前日および最終日の体重、飼料摂取量は、すべての群間において有意な差は認められなかった(表 2)。カンナデンブンを摂取は、体重の増減に影響しないことが考えられた。

表2. 体重および飼料摂取量

	CA	CC	SA	SC
実験開始前日	17.3 \pm 0.3	17.4 \pm 0.3	17.4 \pm 0.3	17.5 \pm 0.3
実験最終日	18.3 \pm 0.4	18.9 \pm 0.2	19.5 \pm 0.4	19.3 \pm 0.4
飼料摂取量(g/匹)	76.7	76.7	75.2	75.4

(2) アナフィラキシー症状の評価

アナフィラキシー症状の評価として OVA 投与 30 分後の直腸温を測定した(図 2)。直腸温は、SA において、非感作群と比較して有意に低下し($p < 0.01$)、アナフィラキシー症状の発生が確認された。一方、SC において、SA と比較して有意に上昇し($p < 0.05$)、また、非感作群と比較して有意な低下は認められず、アナフィラキシー症状の発生は確認できなかった。カンナデンブンの摂取により、アナフィラキシー症状を抑制したことが示唆された。

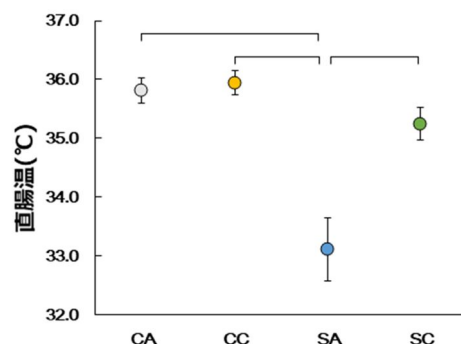


図2. アナフィラキシー症状の評価

(3) 抗体産生能の評価

血清中 OVA 特異 IgE は, SA において, 非感作群と比較して有意に上昇した ($p < 0.01$) ことから, 感作の成立が確認された。一方, SC において, 非感作群と比較して差は認められず, カンナデンブンプ摂取による OVA 特異 IgE の産生抑制が考えられた (図 3)。その他のすべての項目において, 非感作群と比較して, 感作群で有意に上昇した ($p < 0.01$)。一方, SA と SC の間に有意な差は認められなかった (表 3)。カンナデンブンプ摂取は, OVA 特異 IgE 以外の抗体産生能には影響しないことが示唆された。

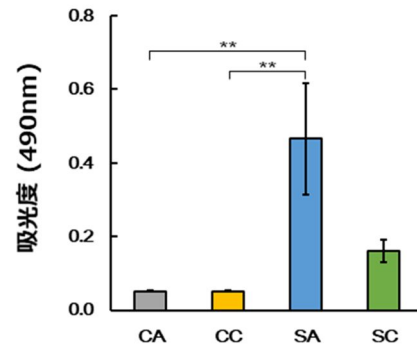


図3. 血清中OVA特異IgE

表3. 抗体産生能

	CA	CC	SA	SC
IgG	0.0801±0.0064 ^a	0.0807±0.0064 ^a	1.4169±0.1362 ^b	1.3898±0.1793 ^b
IgG1	0.0519±0.0028 ^a	0.0491±0.0017 ^a	0.6030±0.0619 ^b	0.5486±0.0619 ^b
IgG2a	0.0448±0.0008 ^a	0.0437±0.0005 ^a	0.1710±0.0276 ^b	0.1752±0.305 ^b
総IgE(μg/mL)	4.4±0.8 ^a	10.4±1.8 ^b	40.2±7.0 ^c	41.2±8.3 ^c
総IgG(mg/mL)	0.4±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	1.4±0.1 ^b	1.4±0.2 ^b

(4) OVA の体内への取り込み

肝臓における OVA の蓄積は, SA で増加 (図 4(c)) し, SC で減少 (図 4(d)) する様子が観察された。感作によって OVA の体内への取り込みは増加するが, カンナデンブンプ摂取により, 取り込みが抑制することが示唆された。OVA の取り込み抑制がアナフィラキシー症状の抑制に繋がった可能性が考えられた。

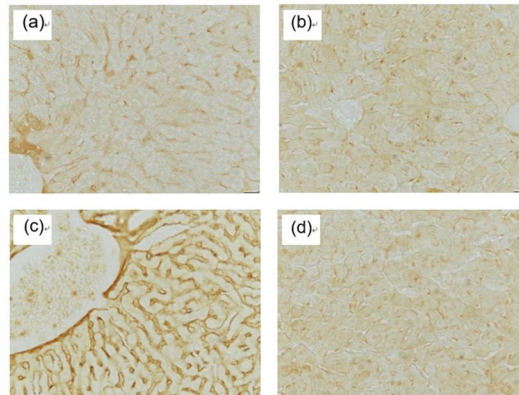


図4. OVAへの体内への取り込みの観察
(a)CA (b)CC (c)SA (d)SC

— 20 μm —

(5) 腸内環境および腸管バリア機能の評価

盲腸内容物重量および盲腸内容物中 pH は群間に差が認められなかったが, カンナデンブンプ摂取により内容物は増加し, pH は低下するという一定の傾向が示され, 腸内環境の改善が示唆された。

腸管バリア機能の評価として糞重量 (図 5(a)), OVA 特異 IgA (図 5(b)), 総 IgA (図 5(c)) およびムチン (図 5(d)) を測定した。一日当たりの糞重量およびムチンは, CA, SA と比較して CC, SC で有意に上昇し ($p < 0.01$), カンナデンブンプ摂取により増加した。OVA 特異 IgA は非感作群と比較して感作群で有意に上昇した ($p < 0.05$) が, 感作群において SA と SC の間に有意な差は認められず, カンナデンブンプ摂取により, OVA 特異 IgA の産生は影響しないことが考えられた。総 IgA は, 群間に差が認められなかった。糞重量およびムチンの増加による腸管バリア機能の上昇が示唆された。

以上の結果から, 本研究では, 食物アレルギーモデルマウスにおけるカンナデンブンプ摂取は, OVA 特異的 IgE 産生の抑制, 腸環境の改善および腸管バリア機能の上昇によるアレルゲン取り込みの低下により, アレルギーを予防する可能性が示唆された。

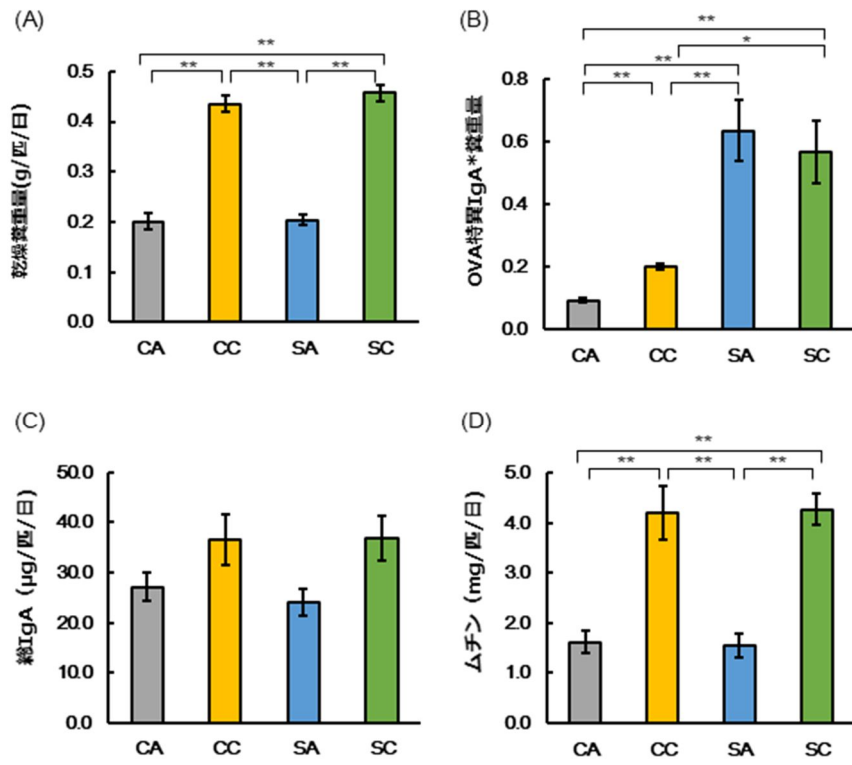


図5. 腸管バリア機能②
 (A)糞重量 (B)OVA特異IgA (C)総IgA (D)ムチン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 恋田彩加, 田中 守	4. 巻 21
2. 論文標題 食用カンナの食品・栄養学的価値と利用実態	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 中部大学生物機能開発研究所紀要	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 守, 恋田彩加, 加藤 匠, 三宅香穂, 都築雅士, 高橋 永, 矢野哲, 竹本和仁, 井治賢希, 山田晋行, 渡邊浩幸
2. 発表標題 食用カンナのデンプン特性とマウス腸内細菌叢に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回 日本栄養・食料学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恋田彩加, 渡邊浩幸, 三宅香穂, 香西はな, 田中 守
2. 発表標題 食用カンナのデンプン特性と食物アレルギーモデルマウスの腸管免疫機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第27回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恋田彩加, 佐藤真理奈, 田中守, 香西はな
2. 発表標題 カンナデンプン中のアミロースおよびレジスタントスターチ含有率
3. 学会等名 愛知県栄養士会研究大会 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 守, 恋田彩加, 加藤 匠, 三宅香穂, 都築雅士, 高橋 永, 矢野哲, 竹本和仁, 井治賢希, 山田晋行, 渡邊浩幸
2. 発表標題 食用カンナのデンプン特性とマウス腸内細菌叢に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回 日本栄養・食料学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	呂 銳 (Lu Rui) (80381862)	中部大学・応用生物学部・講師 (33910)	
研究分担者	渡邊 浩幸 (Watanabe Hiroyuki) (30369425)	高知県立大学・健康栄養学部・教授 (26401)	
研究分担者	竹井 悠一郎 (Takei Yuichiro) (10711377)	高知県立大学・健康栄養学部・講師 (26401)	
研究分担者	吉本 好延 (Yoshimoto Yoshinobu) (60627371)	聖隷クリストファー大学・リハビリテーション学部・教授 (33804)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------