

機関番号： 15401
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20580134
 研究課題名（和文） 微粉碎食物繊維による新規な抗アレルギー作用機構の解明と応用
 研究課題名（英文） Elucidation of a novel anti-allergic mechanism of pulverized dietary fiber and its application
 研究代表者
 河本 正次（KAWAMOTO SEIJI）
 広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授
 研究者番号： 90294537

研究成果の概要（和文）：

本研究ではコンニャクグルコマンナンをモデルとした微粉碎食物繊維の抗アレルギー作用機構を解析し、アトピー合併性自己免疫応答に対する予防効果やアレルギー性鼻炎における局所肥満細胞浸潤への抑制作用、また過剰な抗原特異的T細胞応答に対する寛容誘導作用など、本品が多段階の免疫学的作用点に働いて抗炎症作用を発揮している実態を突き止めた。更に本品の機能性発揮に最適な粒子径を検討すると共に、機能性食品の試作を行った。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, I analyzed the mode of anti-allergic mechanism of pulverized dietary fiber, especially focused on konjac glucomannan (KGM) as a model diet. I found that dietary pulverized KGM (PKGM) had beneficial effect on the prevention of atopy-associated autoimmune response as well as on the suppression of nasal mast cell infiltration in the allergic rhinitis. I also found that PKGM supplementation induced T cell tolerance against excessive antigen-specific proliferative response. These results suggest that PKGM acts on multiple immune targets to fulfill its anti-inflammatory potency. I also determined optimal particle size of PKGM to achieve its anti-allergic effect, and generated a trial product of PKGM-supplemented food.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：微粉碎食物繊維、グルコマンナン、アトピー性皮膚炎、機能性食品

1. 研究開始当初の背景

コンニャクはその独特のテクスチャーから長年嗜好されている日本の伝統食品である。欧米型食生活に伴う食物繊維摂取量の減少は懸案であるが、コンニャクはそれを補う食品素材としても魅力的であり、その主成分

であるコンニャクグルコマンナン（KGM）は水溶性食物繊維に分類される高分子多糖類である。従来からKGMがメタボリックシンドロームに対して予防効果を有することが提案されているが、そのメカニズムも含めてKGMの機能性食品素材としての作用機序に関

する基礎的知見は少ないのが現状である。

研究代表者はKGMパウダーに微粉砕を施すことにより著明な抗アレルギー作用を賦与できることを見いだした。すなわち、アトピー性皮膚炎モデルマウスに微粉砕KGM含有食を与えることにより、炎症性皮膚疾患のみならずアトピーに特徴的な高IgE血症と炎症性免疫応答を顕著に抑制できることを発見した (*Biofactors* **21**, 163, 2004; *Int. Arch. Allergy Immunol.* **136**, 258, 2005; *Int. Arch. Allergy Immunol.* **114**, 95, 2007)。更に研究代表者は、本KGMパウダーがアレルギー性鼻炎も抑制できることを動物病態モデルを駆使して実証した (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2551, 2007)。アレルギーは日本人の3人に1人が罹患する国民病であるが、現行医療ではその急増に歯止めをかけるには至っていない。それゆえ、我々の食生活を通じてアレルギーを予防医学的に制御しようという試みに対して近年ますます注目が集まっている。

2. 研究の目的

本研究ではKGMをモデルとして微粉砕食物繊維の抗アレルギー・抗炎症作用とその免疫調節メカニズムを解明すると共に、アトピー予防食品設計への展開を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アトピー性皮膚炎モデルマウス (NC/Nga マウス) の自己免疫性炎症応答に対する微粉砕コンニャクグルコマンナン (PKGM) の経口投与効果の解析

NC/Nga マウスがしばしばアトピー性皮膚炎に合併して自己免疫疾患様症状を呈することから、同マウスへのPKGM 5%混餌飼料の自由摂食が脾腫とリンパ節腫脹、自己抗体応答、および自己免疫症状を悪化させる起炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調査した。

(2) PKGM がアレルギー性鼻炎モデルマウスの局所炎症反応に及ぼす影響の解析

PKGM はNC/Nga マウスに対するアトピー予防効果のみならず、卵白アルブミン (OVA) をモデルアレルゲンとするアレルギー性鼻炎モデルマウスに対しても著明な抑制効果を示す (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2551, 2007)。そこで、当該予防作用の病態局所レベルでの作用点を探るべく、PKGM 摂食群の鼻粘膜における起炎症性細胞動態の組織病理学的解析を行った。

(3) PKGM がT細胞性免疫応答に及ぼす影響の解析

PKGM が示す抗炎症作用の免疫学的基盤を

探る一環として、本品の摂食群におけるT細胞の各種刺激に対する増殖応答をラット (PVG 系統) の系を用いて解析した。PKGM 摂食群の脾細胞をT細胞活性化レクチン (Con A)、薬理的T細胞活性化薬剤 (PMA/ionomycin)、および、系統の異なるDAラット脾細胞との共培養によるアロ混合リンパ球反応の刺激に供して、各種T細胞の活性化に対するPKGMの摂食効果を検証した。

(4) PKGM の抗アレルギー作用における粒子系の影響解析

PKGM を基調としたアレルギー予防食品設計への展開を図る端緒として、本品の粒子経が抗アレルギー作用に及ぼす影響を調査した。研究代表者が従来の試験にて用いてきたPKGMパウダー (平均粒子経 77 μm) に加えて、粒径のより微細な2種類のPKGMパウダー (平均粒子経 30 μm 、および 17 μm) を試作し、各標品の摂食がNC/Ngaマウスの病態進行と高IgE産生に及ぼす影響を評価した。

(5) PKGM を基調とする機能性食品の試作品設計

PKGM を含有する機能性食品の形態としてサプリメントを想定し、崩壊剤と賦形剤の検討を基調としたPKGM含有錠剤の試作を試みた。更に本試作品の安全性をマウスへの経口投与により評価した。

4. 研究成果

(1) NC/Nga マウスの自己免疫応答に対する食餌性PKGMの予防効果

NC/Nga マウスが自己免疫疾患様の症状を合併することから、PKGMが本モデルマウスの自己免疫応答に及ぼす影響を調べた。その結果、PKGMの摂食により同マウスの皮膚炎病態進展に付随して認められる脾腫、ならびに所属リンパ節の腫脹がいずれも著明に抑制されていることが判明した。一方、微粉砕を施していないKGMを摂食させた対照群では当該効果は認められず、KGMパウダーの粒子経がこれらの自己免疫応答の抑制に重要であることが示唆された。またPKGM摂食群では、二本鎖DNAおよびrheumatoid factorに対する自己抗体価の上昇も顕著に抑制されていることが明らかとなった。更に同群では、自己免疫疾患の進展に関わるサイトカイン・B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF/BLyS) の高産生も非発症対照群のそれと同等のベースラインレベルにまで抑制されていた。これらの結果から、PKGMがアレルギー性炎症のみならず自己免疫応答に対しても予防作用を示しうること、また本食品成分が有する多彩な抗アレルギー効果が上記のごとく、広範な抗炎症および免疫抑制作用をも内包して発揮されている

可能性が示唆された。

(2) 食餌性 PKGM によるアレルギー性鼻炎モデルマウスの局所肥満細胞浸潤に対する抑制効果

研究代表者は OVA 免疫と同抗原の点鼻感作を基調とするアレルギー性鼻炎モデルに PKGM を摂食させた場合、そのくしゃみ症状のみならず、アレルギー特異的 IgE 抗体産生も著明に抑制されることを見いだしている (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2551, 2007)。一方、本試験系において PKGM の摂食は T ヘルパー 1 型 (Th1) および 2 型 (Th2) のサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13) 産生や IgE 以外の抗体サブクラス (IgG1, IgG2a) の産生応答には影響を及ぼしておらず、PKGM の鼻炎予防作用機序が従来の Th1/Th2 サイトカインバランスの是正に依存しない、新規のメカニズムによる可能性が高いことが示唆された。そこで PKGM による当該抗アレルギー作用点を更に探る一環として、本鼻炎モデルマウスへの PKGM の摂食が鼻粘膜局所の炎症性細胞動態に影響を及ぼしている可能性を組織病理学的手法により検証した。その結果、PKGM 試験区の鼻局所における肥満細胞の浸潤が対照区 (通常食) のそれと比較して有意に抑制されていることが判明した。この結果から、PKGM の本アレルギー性鼻炎モデルマウスに対する予防効果の作用点として、従来の検討にて判明していた「アレルギー特異的 IgE 抗体産生の抑制」に加えて、「鼻粘膜局所における I 型アレルギー反応の場としての肥満細胞数の減少」も関与していることが示唆された。

(3) 食餌性 PKGM が T 細胞性免疫応答に及ぼす影響

PKGM の多彩な抗炎症作用の免疫学的基盤を探るべく、本品の摂食群における T 細胞の各種刺激に対する増殖応答を PVG ラット由来脾細胞を用いて解析した。その結果、T 細胞活性化レクチン (Con A) による刺激や薬理的に T 細胞の活性化を促す PMA/ionomycin 刺激に伴う非特異的な T 細胞の増殖応答は PKGM 摂食群において対照の通常食群との間に有意な差異を認めなかった。一方、PKGM 摂食群から得た脾細胞を系統の異なる DA ラット脾細胞との共培養によるアロ混合リンパ球反応に供したところ、このアロ抗原特異的な T 細胞増殖応答が有意に減退していることが明らかとなった。以上の結果から、PKGM の摂食が過剰な抗原特異的 T 細胞応答を負に調節しうる可能性が示唆された。

(4) PKGM の粒子系が抗アレルギー作用に及ぼす影響

PKGM を基調としたアレルギー予防食品設

計への展開を図るための食品工学的知見を得ることを目的として、本品の粒子径が抗アレルギー作用に及ぼす影響を調査した。従来研究にて用いてきた平均粒子径 77 μ m の PKGM パウダー、および、更に粒径の微細な 2 種類の PKGM パウダー (30 μ m、および 17 μ m) を 5% 含む混餌飼料の自由摂食が NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎病態進行に及ぼす影響を評価した。その結果、2 つの新規試作品のいずれも従来標品と同程度の皮膚炎病態と搔痒行動に対する予防効果、ならびに高 IgE 血症に対する抑制効果を示すことが分かった。これらの結果から、PKGM 含有抗アレルギー食品を設計する上では研究代表者が使用してきた粒子径 (75-100 μ m) がその機能性を発揮させる上においては充分であり、更なる粒径の微細化は必ずしも必要ではないことが示唆された。

(5) PKGM を基調とする機能性食品の試作

続いて研究代表者は PKGM を含有する機能性食品の試作を試みた。食品形態としてまずサプリメントを作製すべく検討した結果、崩壊剤としてゼラチン、賦形剤としてマルクトールを用いて PKGM 含有率 75% の錠剤を作製することに成功した。更に本試作品の安全性をマウスに対する急性経口毒性試験により確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kawamoto S., Kaneoke M., Ohkouchi K., Amano Y., Takaoka Y., Kume K., Aki T., Watanabe K., Kadowaki M., Hirata D., Ono K. (2011) Sake lees fermented with lactic acid bacteria prevents allergic rhinitis-like symptoms and IgE-mediated basophil degranulation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 140-144. (査読有り)
2. Ibrahim A. R. N., Kawamoto S., Mizuno K., Shimada Y., Rikimaru S., Onishi N., Hashimoto K., Aki T., Hayashi T., Ono K. (2010) Molecular cloning and immunochemical characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to plant subtilisin-like serine protease. *World Allergy Organization J.* **3**: 262-265. (査読有り)
3. Nakano T., Goto S., Lai C. Y., Hsu L. W., Takaoka Y., Kawamoto S., Chiang K. C., Shimada Y., Ohmori N., Goto T., Sato S., Ono K., Cheng Y. F., Chen C.

- L. (2010) Immunological aspects and therapeutic significance of an auto-Ab against histone H1 in a rat model of Con A-induced hepatitis. *Immunology* **129**: 547-555. (査読有り)
4. Ibrahim A. R. N., Kawamoto S., Aki T., Shimada Y., Rikimaru S., Onishi N., Babiker E. E., Oiso I., Hashimoto K., Hayashi T., Ono K. (2010) Molecular cloning and immunochemical characterization of a novel major Japanese cedar pollen allergen belonging to the aspartic protease family. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **152**: 207-218. (査読有り)
5. Ibrahim A. R. N., Kawamoto S., Nishimura M., Pak. S., Aki T., Diaz-Perales A., Salcedo G., Asturias J. A., Hayashi T., Ono K. (2010) A new lipid transfer protein homolog identified as an IgE-binding antigen from Japanese cedar pollen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 504-509. (査読有り)
6. Onishi N., Kawamoto S., Suzuki H., Hide M., and Ono K. (2008) Development of autoantibody responses in NC/Nga mice: its prevention by pulverized konjac glucomannan feeding. *Arch. Dermatol. Res.* **300**: 95-99. (査読有り)
7. 河本正次、秋庸裕、小埜和久 (2008) アレルギーワクチンの開発に向けて *BIO INDUSTRY* **25**: 69-77. (査読無し)

[学会発表] (計2件)

1. Kawamoto S., Aki T., Ono K. (2010) Recombinant allergens for immunotherapy. *BIT's 1st Annual World Congress of Immunodiseases and Therapy* (invited lecture, May 15, 2010, Beijing, China)
2. Kawamoto S., Aki T., Ono K. (2008) Recombinant allergens for future component-resolved molecular diagnosis and tailor-made immunotherapy. *BIT's 1st Annual World Congress of Vaccine 2008* (invited lecture, Dec. 4, 2008, Foshan, Guandong, China)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 正次 (KAWAMOTO SEIJI)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・
准教授
研究者番号： 90294537

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：