

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350157

研究課題名(和文) シンバイオテイクスによる慢性関節リウマチの予防・治療に関する研究

研究課題名(英文) Glutamine, dietary fiber, oligosaccharide and Bifidobacterium lungum exert symbiotic effects on adjuvant arthritis in rats.

研究代表者

久保 薫 (KUBO, KAORU)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20254493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン(G)、ポリデキストロース(P)、ラクチュロース(L)と Bifidobacterium lungum(B)を各々2%、3.2%、3%と5%含む飼料を8週間摂取することによりアジュバント関節炎の免疫応答を介した腫脹と骨密度の減少が有意に抑制され、また糞便中のFirmicutes門に対する Bacteroidetes門の組成比率の減少も改善された。8週間の煙草喫煙によりアジュバント関節炎の免疫応答を介した腫脹は増大したが、2%G、1.6%P、0.48%Lと5%Bを含む飼料の摂取が拮抗した。以上、腸内細菌叢の改善を介したシンバイオテイクスによる関節リウマチの改善の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An immunologically caused paw swelling and the decrease of bone density in the adjuvant arthritis were significantly inhibited by taking the diet including 2% glutamine, 3.2% polydextrose, 3% lactulose and 5% Bifidobacterium lungum for 8 weeks. This diet intake improved a reduced Firmicutes to Bacteroidetes ratio in cecal content. Cigarette smoking exposure for 8 weeks increased an immunologically caused paw swelling. The diet including 2% glutamine, 1.6% polydextrose, 0.48% lactulose and 5% Bifidobacterium lungum significantly inhibited this increased paw swelling. The above-mentioned result suggested improvement of the rheumatoid arthritis by symbiotic effects of glutamine, polydextrose, lactulose and Bifidobacterium lungum via improving an intestinal dysbiosis.

研究分野：実験動物学 薬理学

キーワード：関節リウマチ 喫煙 シンバイオテイクス

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチの原因は未だ不明であるが、遺伝因子と環境因子の交絡による自己免疫反応の産物としての炎症性タンパクによる慢性炎症と考えられ、対症療法として炎症性タンパクを抑制する治療法が汎用されている。一方、ハリスン内科第18版(2011年)では喫煙が関節リウマチ発症の重要な環境因子であることが認知され、喫煙者における抗体価の上昇、抗CCP抗体の陽性率の上昇、関節破壊の高度化が報告されている。しかしながら喫煙による関節リウマチモデルはなく、研究は着手されていない。

申請者は疾患モデル研究から、以下の研究成果を得ている。

自然発症高血圧ラットに8週間の喫煙曝露を実施すると、腸内細菌の代謝物で腸内環境維持に重要な役割を果たす短鎖脂肪酸やビフィズス菌が減少した(Tomoda K, Kubo K, et al. J. Toxicol. Sci. 2011)。

自然発症高血圧ラットに8週間の喫煙曝露とともにセルロース欠乏飼料で飼育すると、血中抗酸化ストレス活性が低下し(Tomoda K, Kubo K, et al. J. Toxicol. Sci. 2012) 肺気腫と骨粗鬆症が発症した。これら肺気腫と骨粗鬆症は、喫煙曝露と共に5%GFO®(グルタミン、食物繊維とオリゴ糖を含む補助栄養食品、大塚製薬)と1%ビフィズス菌末 BB536 (*Bifidobacterium lungum*, 森永乳業)を添加したセルロース欠乏飼料を摂取することにより改善した(特許実用出願 2013年3月31日)。

関節炎好発系統である Lewis 系ラットにセルロース欠乏飼料を8週間給餌した後に、アジュバント関節炎を惹起すると、免疫応答による後肢足蹠の腫脹が惹起後の後期より増大し、骨密度の減少が亢進した(平成24年度:挑戦的萌芽研究「消化管免疫による関節リウマチ治療へのアプローチ」)。

2. 研究の目的

喫煙曝露を背景とした関節リウマチモデルを作成し、その関節リウマチ改善のための栄養素(グルタミン、食物繊維、オリゴ糖)とビフィズス菌の組成率、濃度と摂取期間を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)プロトコール

関節リウマチに対するグルタミン、食物繊維、オリゴ糖とビフィズス菌の改善効果、煙草喫煙の影響および煙草喫煙の影響に対する食物繊維、オリゴ糖とビフィズス菌の効果を明らかにする目的で以下の実験系を設定した。通常飼料、セルロース欠乏飼料あるいはグルタミン、食物繊維ならびにオリゴ糖を添加したセルロース欠乏飼料にビフィズス菌を添加した飼料(以下、GF0B飼料)の不断給餌を8週間実施した後に、アジュバント関節炎を惹起した。煙草喫煙とともに

通常飼料、セルロース欠乏飼料あるいはGF0B飼料の不断給餌の8週間目にアジュバント関節炎を惹起した。

(2) 特殊飼料の作製

これまでの研究でプレバイオティクスとして用いたGF0®(15g, 大塚製薬)には、L-グルタミン(3.0g)、食物繊維(5.0g:ポリデキストロース、グァーガム酵素分解物)、ラクツクロース(1.45g)、炭水化物(6.0g)、タンパク質(3.6g)とナトリウム(0.5mg)が含まれている。これら成分を参考に、食物繊維としてポリデキストロース、オリゴ糖としてラクチュロースとL-グルタミンを組み合わせてプレバイオティクスを作製した。

標準的な栄養バランスを有する精製原料を基礎とした成長期・繁殖期用のAIN-93G(以下、通常飼料)の配合を基準に、セルロース欠乏飼料はセルロースを加えず、その基準量に相当する sucrose を増量することにより作製した(表1)。このセルロース欠乏飼料に1%あるいは2%グルタミン、1.6%あるいは3.2%ポリデキストロース、0.48%あるいは3%ラクチュロースを組み合わせ添加した飼料にビフィズス菌末 BB536 (*Bifidobacterium lungum*, 森永乳業)を1%、あるいは5%(W/W)の割合で添加した飼料をGF0B飼料とした。

表1 通常食餌とセルロース欠乏飼料

成分	通常食餌	セルロース欠乏飼料
Cornstarch	397.486	397.486
casein	200	200
Dextrinized cornstarch	132	132
Sucrose	100	150
Soybean oil	70	70
Cellulose	50	0
Mineral mix	35	35
Vitamine mix	10	10
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014

(g/kg)

(3)アジュバント関節炎モデルの作成と解析

Lewis 系雄性ラットの右足蹠皮内に *Mycobacterium tuberculosis* H37RA 流動パラフィン懸濁液(6mg/ml)の0.1mlを注射し、惹起した。腫脹の程度は、左右後肢容積を惹起日(0日目)から28日間、足容積測定装を用いて測定し、腫脹容積を求めた。また、感作した後肢以外の肢におけるリウマチの臨床徴候を4段階のスコアで評価した。惹起後28日目には脛骨を摘出し、Dual Energy X-ray Absorptiometryを用いて骨塩量、骨面積と骨密度を算出した。

(4)喫煙曝露

実験動物を専用ホルダーで保定し、MIPS社

製喫煙曝露装置を用いて、喫煙曝露(ハイライト\*15本/30分、2回/日)を6回/週(月から土曜日)、8週間の条件で実施した。

#### (5)腸内細菌の解析

実験期間の最終週に、新鮮便を採取し、腸内細菌の16S rRNA 配列解析を次世代シーケンズにより解析した。

#### (6)IL-6、抗 CCP (Cyclic Citrullinated Peptide) 抗体およびIgA 抗体の定量

実験期間の最終日に得た血漿あるいは血清から IL-6 と抗 CCP 抗体を、新鮮糞便から IgA 抗体を ELISA kit で定量した。

### 4. 研究成果

#### (1)体重増減の評価

8週間の給餌期間において、通常飼料群とセルロース欠乏飼料群およびGFOB飼料群での体重増加に有意な影響は認められなかった。また、アジュバント関節炎惹起後はいずれの群においても同程度に体重が減少し、有意な差は認められなかった。

#### (2)アジュバント関節炎の腫脹に対するGFOB飼料摂取の評価

右足蹠(感作側)の腫脹容積は投与後1日目から正常動物に比べて有意に増加し、通常飼料群、セルロース欠乏飼料群ならび様々な組成率のGFOB飼料群において、実験最終の感作後28日目まで同様に増加した。一方、免疫応答による左足蹠の腫脹容積は、投与後11日目以降から有意に増加し、実験最終の感作後28日目まで持続した。様々な組成率のGFOB飼料のなかでも、GFOB(2%, 3.2%, 3%, 5%)飼料群の腫脹は、セルロース欠乏飼料群ならびに通常飼料群に比べて投与後16日より軽減し、18日~23日においては有意な抑制が認められた。(図1)。

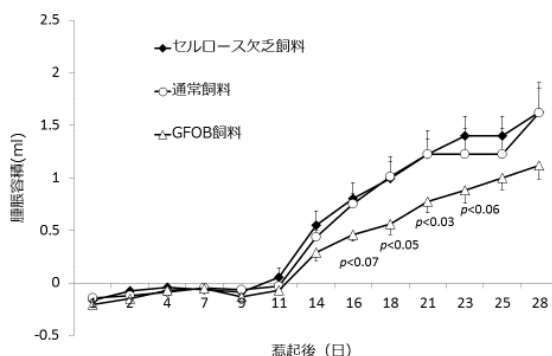


図1 免疫応答による左足蹠腫脹容積の推移

#### (3)アジュバント関節炎に対する喫煙曝露の影響及びGFOB飼料摂取の効果

喫煙8週間後のアジュバント関節炎惹起に伴う免疫応答による左足蹠の腫脹容積は、喫煙曝露により通常飼料群とセルロース欠

乏群で有意に増加し、実験最終の感作後28日目まで持続した(表2)。

この喫煙曝露による腫脹増強作用に対してGFOB(2%, 3.2%, 3%, 5%)飼料の給餌を喫煙期間に試みたが、動物が軟便あるいは下痢を示したため、改善効果は得られなかった。

そこで、GFOB飼料の組成率を再度検討し、GFOB(2%, 1.6%, 0.48%, 5%)飼料で試みた。結果、喫煙曝露によるセルロース欠乏飼料群における左足蹠腫脹容積の有意な増加に対してGFOB(2%, 1.6%, 0.48%, 5%)飼料群は有意な抑制を示し、また通常飼料群に比べて抑制傾向が認められた。(表2)

非喫煙群において、セルロース欠乏飼料群は通常飼料群に比べて有意に腫脹が増加し、これに比べてGFOB飼料群では有意な抑制が認められた。

感作した後肢以外の足蹠および指趾におけるリウマチの臨床徴候を4段階のスコア評価し、集計した結果は左足蹠腫脹容積の推移と同様の傾向が認められた。

表2 左足蹠腫脹容積の推移

喫煙曝露	飼料	惹起後(日)			
		14	18	23	28
喫煙	通常飼料	0.64* ±0.11	0.94* ±0.09	1.63** ±0.14	1.74* ±0.3
	セルロース欠乏飼料	1.03 ±0.1	1.59& ±0.15	1.85## ±0.02	1.92# ±0.12
	GFOB飼料	0.43\$\$ ±0.06	0.72\$\$ ±0.11	1.37 ±0.25	1.47 ±0.19
非喫煙	通常飼料	0.19 ±0.08	0.47 ±0.14	0.58 ±0.14	0.66 ±0.2
	セルロース欠乏飼料	0.93* ±0.17	1.15 ±0.2	1.44** ±0.14	1.38* ±0.12
	GFOB飼料	0.36## ±0.1	0.59# ±0.14	0.86 ±0.23	0.75 ±0.19

平均 ± 標準誤差

\*\* :  $p < 0.05$ , vs. 非喫煙通常飼料群

\*\* :  $p < 0.01$ , vs. 非喫煙通常飼料群

# :  $p < 0.05$ , vs. 非喫煙セルロース欠乏飼料群

## :  $p < 0.01$ , vs. 非喫煙セルロース欠乏飼料群

\$ :  $p < 0.05$ , vs. 喫煙セルロース欠乏飼料群

\$\$ :  $p < 0.01$ , vs. 喫煙セルロース欠乏飼料群

& :  $p < 0.05$ , vs. 喫煙通常飼料群

#### (4)脛骨の骨塩、骨面積と骨密度の評価

骨塩：喫煙曝露ならびに非喫煙曝露の通常飼料群、セルロース欠乏飼料群ならびにGFOB飼料群の骨塩量は、無処置の通常飼料群、セルロース欠乏飼料群ならびにGFOB飼料群に比べて有意に減少した。喫煙曝露ならびに非喫煙曝露の群間に有意な差は認められなかった。

骨面積：喫煙曝露の通常飼料群、セルロース欠乏飼料群ならびにGFOB飼料群の骨面積は、無処置の通常飼料群、セルロース欠乏飼料群ならびにGFOB飼料群に比べて有意に減少した。喫煙曝露の群間に有意な差は認められなかった。

骨密度：喫煙曝露ならびに非喫煙曝露の通常飼料群ならびにセルロース欠乏飼料群の骨塩密度は、無処置の通常飼料ならびにセルロース欠乏飼料群に比して、有意に減少した。喫煙曝露ならびに非喫煙曝露の群間に有意な差は認められなかった。一方、喫煙曝露ならびに非喫煙曝露のGFOB飼料群では無処置のGFOB飼料群と比べて有意な差は認められなかった(表3)。

表3 アジュバント関節炎の骨密度に対する喫煙曝露の影響とGFOBの効果

	喫煙曝露	飼料	骨密度 (mg/cm <sup>2</sup> )
アジュバント関節炎	喫煙	通常飼料	100.8 ± 0.6**
		セルロース欠乏飼料	102.2 ± 2.1#
		GFOB飼料	102.4 ± 2.6
	非喫煙	通常飼料	99.1 ± 2.9**
		セルロース欠乏飼料	98.9 ± 5##
		GFOB飼料	102.6 ± 3.6
無処置	無処置	通常飼料	105.3 ± 1.8
		セルロース欠乏飼料	105.7 ± 2.1
		GFOB飼料	106.2 ± 4.1

平均 ± 標準偏差

\*\* :  $p < 0.001$ , vs. 無処置通常飼料群

# :  $p < 0.05$ , vs. 無処置セルロース欠乏飼料群

## :  $p < 0.01$ , vs. 無処置セルロース欠乏飼料群

#### (5) 腸内細菌叢の解析

アジュバント関節炎ならびに喫煙曝露された動物の糞便中の菌種組成を門レベル解析した結果、Firmicutes 門が優位に占める腸内細菌叢の不均衡が認められた。これに対してGFO(2.0%、3.2%、3.0%)と5% *Bifidobacterium lungum* を含むGFOB飼料の摂取によりFirmicutes 門が有意に減少し、Bacteroidetes 門、Verrucomicrobia 門 Actinobacteria 門およびTenericutes 門が有意に増加した。

一方、GFO(2.0%、1.6%、0.48%)と5% *Bifidobacterium lungum* を含むGFOB飼料の摂取では有意な変化は認められなかった。

#### (6) IL-6、抗 CCP 抗体および IgA 抗体の定量

血中 IL-6 量は、アジュバント関節炎により無処置群に比べて有意に増加したが、通常飼料群、セルロース欠乏飼料群ならびにGFOB飼料群の群間で有意な差は認められなかった。血中抗 CCP 抗体がアジュバント関節炎で検出されたが、通常飼料群、セルロース欠乏飼料群ならびにGFOB飼料群の群間で有意な差は認められなかった。糞便中 IgA 抗体は、通常飼料群とセルロース欠乏飼料群に比べてGFOB飼料群で高い値が認められた。

その他、血中のTNF- $\alpha$ 、IL-1 とIL-10の定量を試みたが、検出できなかった。

以上の結果より、関節リウマチモデルであるアジュバント関節炎における免疫応答を介

した足蹠および指趾の腫脹は、セルロース欠乏飼料の摂取により増大することが認められ、関節リウマチと食物繊維摂取との関連が示唆された。このセルロース欠乏をグルタミン、ポリデキストロース、ラクチュロースで置換し、*Bifidobacterium lungum* を添加した飼料を用いて、アジュバント関節炎の腫脹及び骨密度の減少を抑制するGFOBの組成率を見出した。さらに、糞便中のFirmicutes 門に対するBacteroidetes 門の組成比率の減少の改善も認められたことから、腸内細菌叢の組成が関節リウマチに關与する可能性が示唆された。

煙草喫煙の前処置はアジュバント関節炎の腫脹の増大を招いたことから、煙草喫煙は関節リウマチの増悪因子と考えられた。この煙草喫煙の増悪に対して拮抗するGFOBの組成率も見出した。一方、アジュバント関節炎の腫脹及び骨密度の減少に対するGFOBの制御に関する機序の解明には至らず、今後の課題を残した。

以上より、グルタミン、ポリデキストロース、ラクチュロースと *Bifidobacterium lungum* で構成するシンバイオティクスの組成率、濃度と摂取期間が見出され、腸内細菌叢の改善を介した関節リウマチの改善の可能性が示唆された。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療用組成物

発明者：久保薫、友田恒一、吉川雅則、木村弘、清水金忠、小田巻俊孝

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-072191 号

出願年月日：平成 25 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

名称：創傷治癒剤

発明者：久保薫、友田恒一、木村弘、清水金忠、小田巻俊孝

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-264338 号

出願年月日：平成 25 年 12 月 20 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 薫 (KUBO KAORU)  
奈良県立医科大学 医学部・准教授  
研究者番号：20254493

(2) 研究分担者

田中 康仁 (TANAKA YASUHITO)  
奈良県立医科大学 医学部・教授  
研究者番号：30316070

友田 恒一 (TOMODA KOICHI)  
奈良県立医科大学 医学部・准教授  
研究者番号：90364059