

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24650496

研究課題名（和文）消化管免疫による関節リウマチ治療へのアプローチ

研究課題名（英文）The roles of changes in the gut immunity on rheumatoid arthritis.

研究代表者

久保 薫 (KUBO KAORU)

奈良県立医科大学・動物実験施設・准教授

研究者番号：20254493

研究成果の概要（和文）：通常食餌、食物繊維欠乏食餌あるいはGF0B食餌を8週間給餌後のアジュバント関節炎モデルにけるアジュバント非投与側の腫脹は、通常食餌に比して食物繊維欠乏食餌で増大し、GF0B食餌ではアジュバント投与後21日目以降で通常食餌群と同程度に減少した。アジュバント非投与側の骨密度は有意に減少したが、GF0B食餌群では食物繊維欠乏食餌群より僅かに高く、通常食餌群と同程度であった。腸内環境の変化と関節リウマチとの関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the adjuvant-induced arthritis in rats fed with control diet (AIN-93G), a cellulose-free diet or GFOB diet for 8 weeks, an immunologically caused paw swelling, which appeared on days 11 after an adjuvant injection, was enhanced in a cellulose-free diet group more than that in control diet group. This secondary arthritis in GFOB diet group showed a time course change similar to that in control diet group from on days 21. It was confirmed by X-ray image and bone density measurement that the bone density of tibia was clearly reduced. The bone density of a cellulose-free diet group was low comparing with GFOB diet group. These changes in the adjuvant-induced arthritis may be related with changes in the gut environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	800,000	240,000	1,040,000

研究分野：実健動物学、薬理学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：関節リウマチ、機能食品、ビフィズス菌、食物繊維

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチの治療では、リウマトイド因子と免疫グロブリンGとの結合により産生された抗原抗体結合物（免疫複合体）が関節炎ならびに関節の破壊を惹起し、関節痛、関節の変形へと進行することから、抗リウマチ薬(DMARDs)、生物学的製剤、ステロイド、抗サイトカイン療法が推奨されている。

(2) 申請者は、グルタミン、セルロース、オリゴ糖ならびにビフィズス菌の混合食餌（以下、GF0B食餌）を8週間摂取することによりエラスターゼ肺気腫モデルにおける気腔（気腫性病変）の拡大を軽減し、さらにはアルサス型受け身皮膚反応の腫脹を軽減することを見出した。

2. 研究の目的

(1) 補助食品による関節リウマチにおける腫脹ならびに骨破壊の治療を、G F O B食餌で試みた。

3. 研究の方法

(1) 関節炎治療とG F O Bとの関連性を明らかにする目的で、通常食餌、食物繊維欠乏食餌あるいはG F O B食餌の不断給餌を8週間実施したラットにアジュバント関節炎を惹起し、腫脹の経日変化ならびに惹起後28日目に骨塩、骨密度と骨面積などを評価した。

(2) 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 (6 mg/ml, Difco Laboratories) の0.1 mlを注射し、惹起した。陽性対照群ではプレドニゾロン (10 mg/kg) を1日1回、毎日経口投与した。腫脹の程度は、左右後肢容積を惹起日 (Day 0) から28日間、足容積測定装置を用いて測定し、惹起前の容積差とともに惹起後28日目には脛骨を摘出し、骨塩量測定装置を用いて骨塩、骨密度と骨面積を評価した。

(3) 特殊食餌の作製

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、通常食餌) の配合を基準に、食物繊維欠乏食餌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)。この食物繊維欠乏食餌にG F O (大塚製薬) を5%(W/W)、ビフィズス菌末 (BB536, 森永乳業) を1%(W/W)の割合で添加し、G F O B食餌を作製した。

表1 通常食餌と食物繊維欠乏食餌

成分	通常食餌	食物繊維欠乏食餌
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)

4. 研究の成果

(1) 体重増減の評価

8週間の給餌期間において、通常食餌と食物繊維欠乏食餌およびG F O B食餌と間で体重増加に有意な影響は認められなかった。一方、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の体重減少が認められた (表2)。

表2 体重増加

群	惹起前	惹起後28日目
食物繊維欠乏食餌	189.3 ± 11.1	102.1 ± 20.2
通常食餌	190.6 ± 28.4	106.4 ± 14.3
GFOB食餌	195.9 ± 10.8	100.9 ± 17.9
通常食餌 (プレドニゾン投与)	207.4 ± 33.9	153.9 ± 28.6

(平均 ± 標準偏差, g)

(2) 後肢腫脹の評価

アジュバント関節炎群において、右後肢 (投与側) の腫脹容積は投与後1日目から正常動物に比して有意に増加し、通常食餌、食物繊維欠乏食餌ならびにG F O B食餌を摂食した動物においては投与後28日目まで同様に増加した。プレドニゾロンは接種1日目以降の食物繊維欠乏食餌群の腫脹を有意に抑制した (図1)。

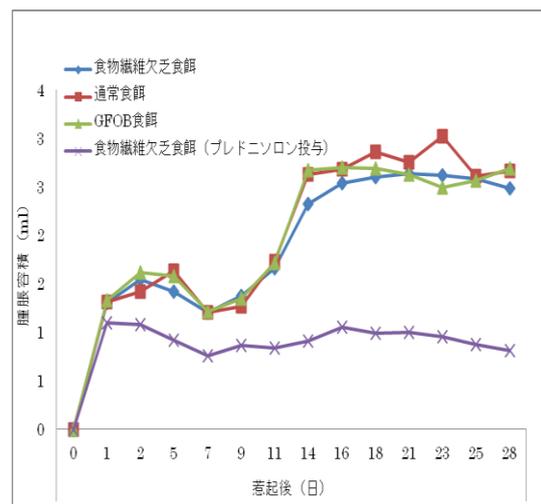


図1 右後肢容積の推移

一方、左後肢 (非投与側) の腫脹は、投与後11日目以降から有意に増加し、食物繊維欠乏食餌群の腫脹は通常食餌群のそれよりも増大し、実験最終の投与後28日目まで持続した。

GFOB食餌群の腫脹は、投与後14～21日において食物繊維欠乏食餌群と同程度であったが、投与21日以降は通常食餌群と同程度に減少した。プレドニゾロンは右後肢（投与側）と同様に接種11日目以降の食物繊維欠乏食餌群の腫脹を有意に抑制した（図2）。

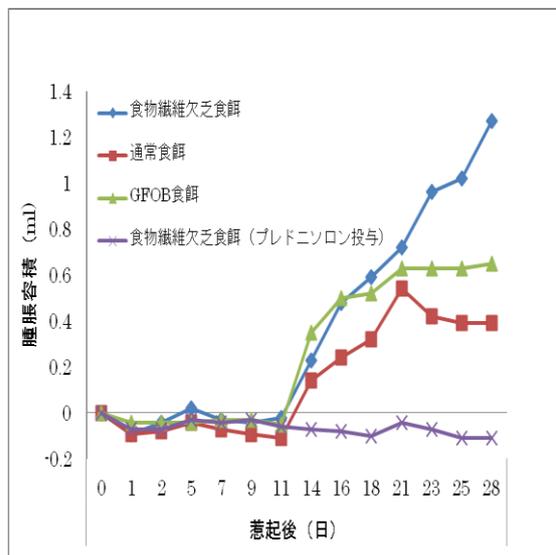


図2 左後肢容積の推移

(3) 器官重量測定の結果

最終観察日の翌日、胸腺、副腎および脾臓を摘出し、個別に重量を測定し、当日の体重を基に相対重量を算出した。

- ①胸腺の相対重量は、アジュバント関節炎の惹起により、通常食餌群、食物繊維欠乏食餌群、食物繊維欠乏食餌（プレドニゾロン投与）群、GFOB食餌群のいずれにおいても、有意に減少した（表3）。
- ②副腎の相対重量は、アジュバント関節炎の惹起により、通常食餌群、食物繊維欠乏食餌群、GFOB食餌群のいずれにおいても、有意に増加した（表4）。
- ③脾臓の相対重量は、アジュバント関節炎の惹起により、通常食餌群、食物繊維欠乏食餌群、GFOB食餌群のいずれにおいても、有意に減少した（表5）。

表3 胸腺の相対重量

群	無処置	処置
通常食餌	116.0 ± 20.8	83.6 ± 9.1
食物繊維欠乏食餌	118.2 ± 17.7	83.3 ± 17.6
GFOB食餌	115.6 ± 14.4	70.7 ± 4.9
食物繊維欠乏食餌 (プレドニゾロン)	97.0 ± 6.4	63.3 ± 14.9

(平均 ± 標準偏差, mg%)

表4 副腎の相対重量

群	無処置		処置	
	副腎 (右)	副腎 (左)	副腎 (右)	副腎 (左)
通常食餌	5.8 ± 0.7	6.2 ± 0.7	10.9 ± 1.4	11.3 ± 1.2
食物繊維欠乏食餌	5.1 ± 0.8	6.2 ± 1.3	13.0 ± 3.1	12.1 ± 2.2
GFOB食餌	4.9 ± 0.5	5.4 ± 0.3	11.2 ± 0.8	11.7 ± 0.7
食物繊維欠乏食餌 (プレドニゾロン)	6.0 ± 0.2	6.2 ± 0.5	6.5 ± 0.9	7.0 ± 0.9

(平均 ± 標準偏差, mg%)

表5 脾臓の相対重量

群	無処置	処置
通常食餌	163.7 ± 10.2	448.5 ± 113.5
食物繊維欠乏食餌	165.3 ± 6.4	371.9 ± 35.6
GFOB食餌	163.9 ± 4.7	479.2 ± 140.7
食物繊維欠乏食餌 (プレドニゾロン)	175.3 ± 6.5	157.3 ± 25.6

(平均 ± 標準偏差, mg%)

(4) 脛骨近位部の骨塩、骨密度と骨面積の評価

- ①骨面積：無処置動物の通常食餌 ($0.163 \pm 0.004 \text{ cm}^2$) あるいは食物繊維欠乏食餌 ($0.162 \pm 0.004 \text{ cm}^2$) と処置動物の非投与側における通常食餌群 ($0.161 \pm 0.005 \text{ cm}^2$)、食物繊維欠乏食餌群 ($0.159 \pm 0.006 \text{ cm}^2$) 及びGFOB食餌群 ($0.163 \pm 0.003 \text{ cm}^2$) との間に有意な差は認められなかった。
- ②骨塩：無処置動物の通常食餌 ($14.3 \pm 0.8 \text{ mg}$) あるいは食物繊維欠乏食餌 ($14.1 \pm 1.0 \text{ mg}$) に比して、処置動物の非投与側における通常食餌群 ($12.6 \pm 1.2 \text{ mg}$)、食物繊維欠乏食餌群 ($11.3 \pm 1.3 \text{ mg}$) とGFOB食餌群 ($12.2 \pm 1.5 \text{ mg}$) に有意な減少が認められた。
- ③骨密度：無処置動物の通常食餌 ($82.9 \pm 2.9 \text{ mg/cm}^2$) あるいは食物繊維欠乏食餌 ($82.5 \pm 4.0 \text{ mg/cm}^2$) に比して、処置動物の非投与側における通常食餌群 ($73.3 \pm 5.1 \text{ mg/cm}^2$)、食物繊維欠乏食餌群 ($66.6 \pm 7.7 \text{ mg/cm}^2$) とGFOB食餌群 ($69.9 \pm 8.6 \text{ mg/cm}^2$) に有意な減少が認められた。

以上の結果より、食物繊維の摂取不足は関節リウマチにおける腫脹の増大とともに骨破壊の進行に関与することが見出された。この現象に対してGFOB（グルタミン、セルロー

ス、オリゴ糖、ビフィズス菌) 摂取による軽減効果の可能性が示唆されたが、関節リウマチに対する量的・質的な抑制効果には至らなかった。腸内環境の変化は関節リウマチの発症と進展の要因のひとつとして考えられ、今後、腸内環境の改善から消化管免疫を介した治療法の開発が期待できる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①発表代表者：久保薫

発表表題：「喫煙曝露ラットに対する分子鎖アミノ酸の効果」

学会名：第 86 回日本薬理学会年会

発表年月日：2013 年 03 月 23 日

発表場所：福岡市

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

①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

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

木村 弘 (KIMURA HIROSHI)

奈良県立医科大学 医学部・教授

研究者番号：20195374

友田 恒一 (TOMODA KOICHI)

奈良県立医科大学 医学部・講師

研究者番号：90364059