

博士論文

コンニャクグルコマンナンの免疫調節作用 と機能性食品への応用に関する研究

(Studies on immunomodulatory effects of konjac glucomannan
and its application to functional foods)

大西 伸和

広島大学大学院先端物質科学研究科

2008年3月

1. 主論文

コンニャクグルコマンナンの免疫調節作用と機能性食品への応用に関する研究

(Studies on immunomodulatory effects of konjac glucomannan and its application to functional foods)

大西 伸和

2. 公表論文

- (1) The ability of konjac-glucomannan to suppress spontaneously occurring dermatitis in NC/Nga mice depends upon the particle size.

Onishi N, Kawamoto S, Nishimura M, Nakano T, Aki T, Shigeta S, Shimizu H, Hashimoto K, Ono K

BioFactors, 21, 163-166 (2004)

- (2) A new immunomodulatory function of low-viscous konjac glucomannan with a small particle size: its oral intake suppresses spontaneously occurring dermatitis in NC/Nga mice.

Onishi N, Kawamoto S, Nishimura M, Nakano T, Aki T, Shigeta S, Shimizu H, Hashimoto K, Ono K

Int. Arch. Allergy Immunol., 136, 258-265 (2005)

- (3) Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune responses in NC/Nga mice.

Onishi N, Kawamoto S, Suzuki H, Santo H, Aki T, Shigeta S, Hashimoto K, Hide M, Ono K

Int. Arch. Allergy Immunol., 144, 95-104 (2007)

- (4) Dietary pulverized konjac glucomannan prevents the development of allergic rhinitis-like symptoms and IgE response in mice.

Onishi N, Kawamoto S, Ueda K, Yamanaka Y, Katayama A, Suzuki H, Aki T, Hashimoto K, Hide M, Ono K

Biosci. Biotechnol. Biochem., 71 (10), 2551-2556 (2007)

- (5) Development of autoantibody responses in NC/Nga mice: its prevention by pulverized konjac glucomannan feeding.

Onishi N, Kawamoto S, Suzuki H, Hide M, Ono K

Arch. Dermatol. Res., 300, 95-99 (2008)

3. 参考論文

- (1) グルコマンナンの免疫調節機能と食品への応用

大西 伸和

機能性糖質素材の開発と食品への応用，監修：井上國世，シーエムシー出版，
pp.353-360 (2005)

- (2) Oral administration of pulverized Konjac glucomannan prevents the increase of plasma IgE and IgG levels induced by the injection of syngeneic keratinocyte extracts in BALB/c mice.

Oomizu S, Onishi N, Suzuki H, Ueda K, Mochizuki M, Morimoto K, Kawamoto S, Ono K, Kameyoshi Y, Hide M

Clin. Exp. Allergy, **36**, 102-110 (2006)

主 論 文

目 次

【序 論】	1
【第 1 章】 各種 KGM の物理化学的物性と抗アレルギー作用の検討	7
第 1 節 KGM の物理化学的特性	7
1-1. 実験の材料および方法	7
1-2. 結 果	9
第 2 節 各種 KGM の摂取がアトピー性皮膚炎モデルマウスに及ぼす影響	13
2-1. 実験の材料および方法	13
2-2. 結 果	15
第 3 節 考 察	22
【第 2 章】 微粉碎 KGM のアトピー性皮膚炎抑制作用におけるメカニズム解析	25
第 1 節 微粉碎 KGM の全身免疫系における Th1/Th2 応答に及ぼす影響	25
1-1. 実験の材料および方法	25
1-2. 結 果	27
第 2 節 皮膚局所の免疫・炎症応答に及ぼす微粉碎 KGM の影響	29
2-1. 実験の材料および方法	29
2-2. 結 果	32
第 3 節 考 察	39
【第 3 章】 微粉碎 KGM のアレルギー性鼻炎抑制作用に関する検討	43
第 1 節 実験の材料および方法	43
第 2 節 結 果	46
第 3 節 考 察	51

【第4章】 KGMの自己免疫応答に及ぼす影響	53
第1節 NC/Ngaマウスの自己抗体産生に対する微粉砕KGMの抑制効果	53
1-1. 実験の材料および方法	54
1-2. 結果	55
第2節 高粘性KGMの自己免疫応答抑制作用	58
2-1. 実験の材料および方法	58
2-2. 結果	59
第3節 考察	65
【第5章】 微粉砕KGMを含有する機能性食品の開発	69
第1節 微粉砕KGMを高含有する食品形態の検討	69
第2節 微粉砕KGMの安全性と有効性	70
第3節 研究総括	71
【謝辞】	75
【参考文献】	77
【付属資料】	87

【序 論】

我が国の食文化は、世界に誇れる最たるもののひとつである。伝統的な「和食」の特徴は、四季折々の食材を巧みに利用して、海の幸や山の幸を多彩に採り入れる点にあるだろう。その調理方法や食べ方を含め、「和食」の豊富な食材は、まさに日本特有の財産といえる。近年、先進国の中でも食糧自給率が著しく低い日本であるが、食材・食品の種類という点に着目すれば、1万2000種類を有するといわれ、世界を圧倒している¹⁾。因みに、世界最大の食糧供給国である米国の3000種類と比較すれば、その4倍にもなる。食品産業界において、‘made in Japan’を世界にアピールするうえでも、この豊富にある食材を利用しない手はないだろう。

こんにゃくは、1000年以上もの食用歴を持つ伝統的な食品のひとつで、サトイモ科の植物であるコンニャク (*Amorphophallus konjac, K. Koch*) の塊茎から製造される。欧米では、devil's tongue (悪魔の舌) などといわれ敬遠されるが、おそらくヒトが口にするものではない、くらいの認識なのだろう。四季の情趣とともに、その独特の歯ごたえ (食感) を賞味できる日本人が、いかに繊細で洗練された固有の民族であるかを一考できる食材だと思ふ。

原料粉末を水で溶解させ粘性のゾルとした後、アルカリ・熱処理を施すことによってゲル状のこんにゃくが形成される。江戸時代までは芋から製造されていたこともあり、貴族などに限定された珍味であったが、1776年に中島藤右衛門により、こんにゃく原料粉末の製造法が発明され、大衆にも次第に普及した。こんにゃくの科学研究が初めて学術論文として登場したのは、それから120年後(1895年)のことで、辻暢太郎によってその主成分がマンナンであることが明らかにされている^{2,3)}。その後、マンノースの他にグルコースも構成糖に入ることが解り、グルコマンナンと命名され(1922年)、今日に至っている⁴⁾。

Fig. 1に、コンニャクグルコマンナン(KGM)の化学構造を示す。グルコースとマンノースが2:3の割合で β -1,4結合した高分子多糖であるが、その平均分子量は通常100万以上を示し、天然多糖類の中では最大であるともいわれている³⁾。

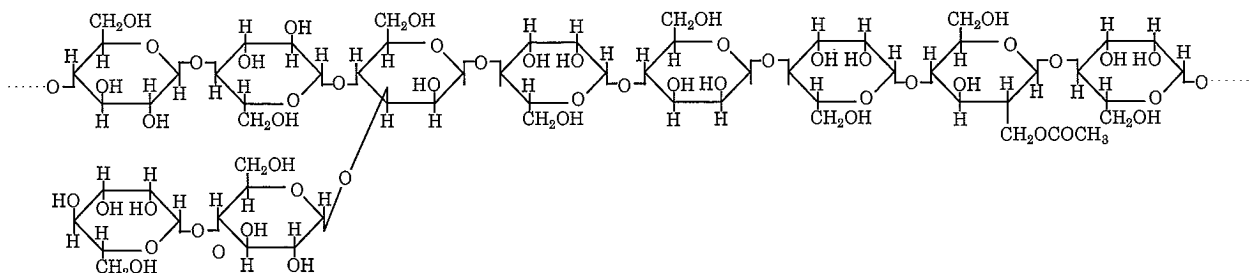


Fig. 1. The chemical structure of konjac glucomannan

こんにゃくは、古くから「腹中の砂下ろし」などといわれ、様々な生理作用が科学的というよりは経験的知識によって伝承されてきた。現在では俗説となっているものも多いが、こんにゃくが生体内では容易に分解されない難消化性物質であることは、古くから認識されていたのであろう。1972年にTrowellによってdietary fiber（食物繊維）の定義が提案されたが⁵⁾、KGMは水溶性食物繊維に分類されている。Burkittによる食物繊維仮説⁶⁻⁸⁾が報告された1970年代以降、KGMの生理作用についても大腸ガン⁹⁾、糖尿病¹⁰⁻¹⁴⁾、高脂血症¹⁴⁻¹⁶⁾などに対する疾病予防効果ならびに腸内細菌叢の改善作用^{17,18)}など、多彩な機能が明らかにされている^{3,14)}。

しかしながら、近年の「食」に関する状況をみると、「環境の変化」、とくに食習慣の欧米化に伴って、食物繊維の摂取量は著しく低下している。また、これらに関連して、ガン、アレルギー、メタボリックシンドロームにより惹起される各種の生活習慣病など、まさに現代病とでもいうべき奇病が急増している。少子・高齢化が加速する今世紀においては、個々人の生活の質（QOL）を向上させ、健康寿命を延伸させることが極めて重要である。2005年には、「食育基本法」が成立し、国民一人一人が健全な食生活を実現することで健康が確保できるよう、食育の推進が奨励されている。和食食材の生理作用を明らかにして、知的で効果的な日本型食習慣を再構築していくことが、これらの問題解決の要所であることは言うまでもない。

上記のような諸問題に対応した国の行政対策のひとつに、特定保健用食品（特保）制度の導入があげられる。1991年、厚生省は食品の生理作用を科学的に評価して、審査に合格したものについては、その食品の生理機能表示（ヘルスクレーム）を一定の範囲で許可することにした。この試みは、Nature誌にも紹介され¹⁹⁾、機能性食品（functional food）が各国に知られるようになってきている。制度の導入から10数年が経過し、特保市場は5669億円（2003年）にまで成長しており、健康志向食品の全体市場も1.3兆円程度にまで達している。残念なことに、このような健康志向の高まりにも関わらず、我が国におけるこんにゃく原料の生産量と消費量は、減少傾向のままとなっている²⁰⁾。

KGMの生理作用は、先にも述べたようにその多彩な機能が明らかにされているが、その殆どが高い粘度特性を持つ精製KGMに限定されている。1970年に清水萬蔵（清水化学株式会社、三原）により、その製法特許が世界各国に申請された後、機能性や物性に関する研究が幅広く実施されてきた。コレステロールや血糖値の上昇抑制作用において、KGMは高粘性であるほど強い活性を有するが、こんにゃく精粉からアルコールによって高純度に精製する必要があるためコスト高になることや、その粘性から食品添加物としての利用が難しいことなど、課題も多く残されている。

このような背景から、近年、精製KGMの粒子径を微細化することにより、短時間で一

定の粘性が得られる易水溶性 KGM が開発されているが、その物理特性によって引き出されるより有効な生理作用は見出されていない。KGM の易水溶化は、製造時間の短縮、また食品添加剤としての利用拡大にも繋がることから、その有益な機能が明らかになれば、コンニャク製品の生産性や市場を、飛躍的に向上させることができるかもしれない。KGM が有する生理機能の中で、これまで殆ど明らかにされていないものに、免疫調節作用が挙げられる。昨今、免疫系を介して生体に良い影響を与えるプロバイオティクスが知られるようになってきているが、KGM を始めとした食物繊維は、腸内細菌叢を改善するプレバイオティクスとして注目されている。ラットを用いた幾らかの研究で、高粘性 KGM がキトサンやペクチンの摂食と同様に、血中の IgG 量を増加させることや、腸管での IgA 産生を増強させることが報告されている²¹⁻²³⁾。しかしながら、各種物性の異なる KGM の免疫調節能の違いを始めとし、その抗アレルギー作用や作用機序の詳細に関する知見はまだ得られていない。そこで著者は、微粉碎（易水溶性）KGM の物理化学特性を調査するとともに、新たな機能性食品素材として抗アレルギー作用に着目した。

アレルギーや自己免疫疾患などの免疫関連疾患は、近年、先進国を中心に急激に増加している。とくに、花粉症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息などに代表される I 型（即時型）アレルギー疾患は、国民の 3 人に 1 人がその何らかの症状を示すといわれ、大きな社会問題にもなっている。その発症および悪化要因として、食生活や居住環境の変化、ストレスや過剰な衛生志向など、多くの事項が議論されているが、QOL を著しく低下させるアレルギーの予防および治療法の確立は、焦眉の急となっている。

生体内における免疫機構は、その微妙な均衡のもとに恒常性が維持されている。何らかの要因でこの制御機構が傷害されると、アレルギーや自己免疫疾患が惹起される。その発現機構は、単純な免疫応答だけでは説明しきれないが、近年の目覚ましい免疫学の進展から、自然免疫系による異物の認識過程、その後の免疫細胞への情報伝達など、その機構の詳細が、徐々に分子レベルで明らかにされている。

アレルギーの発症機構の概略を Fig.2 に示し、その簡易な説明を加えておこう。アレルギーの感作は、Th2 型のサイトカインを産生する CD4⁺T 細胞によってメディエートされる。侵入抗原（アレルゲン）が抗原提示細胞によって認識されると、一般的免疫反応を経由し、特異 IgE 抗体が B 細胞により産生されるが、その Fc 部分がマスト細胞上のレセプターに結合することで感作が成立する。この IgE 抗体の Fab 部分をアレルゲンが架橋すると、ヒスタミンやロイコトリエンなどの炎症メディエーターが放出され、アレルギー症状が誘起される。ここで IgE 抗体は、通常の免疫反応においても IgG などと同様に産生されるが、その量は極めて少ない。多くのアレルギー患者においては、過剰な Th2 応答が誘導され高 IgE 値となるが、その詳しい理由についてはまだよく判っていない。

一方、自己免疫疾患の多くは、自己抗原に対する過剰な Th1 応答によって惹起されることが知られている。インスリン依存性糖尿病や慢性関節リウマチは、それぞれ膵臓β細胞、自己滑膜の抗原によって活性化された Th1 細胞が、マクロファージを活性化することによって起こる疾患で、炎症局所にはこれら免疫担当細胞の顕著な浸潤が認められる。

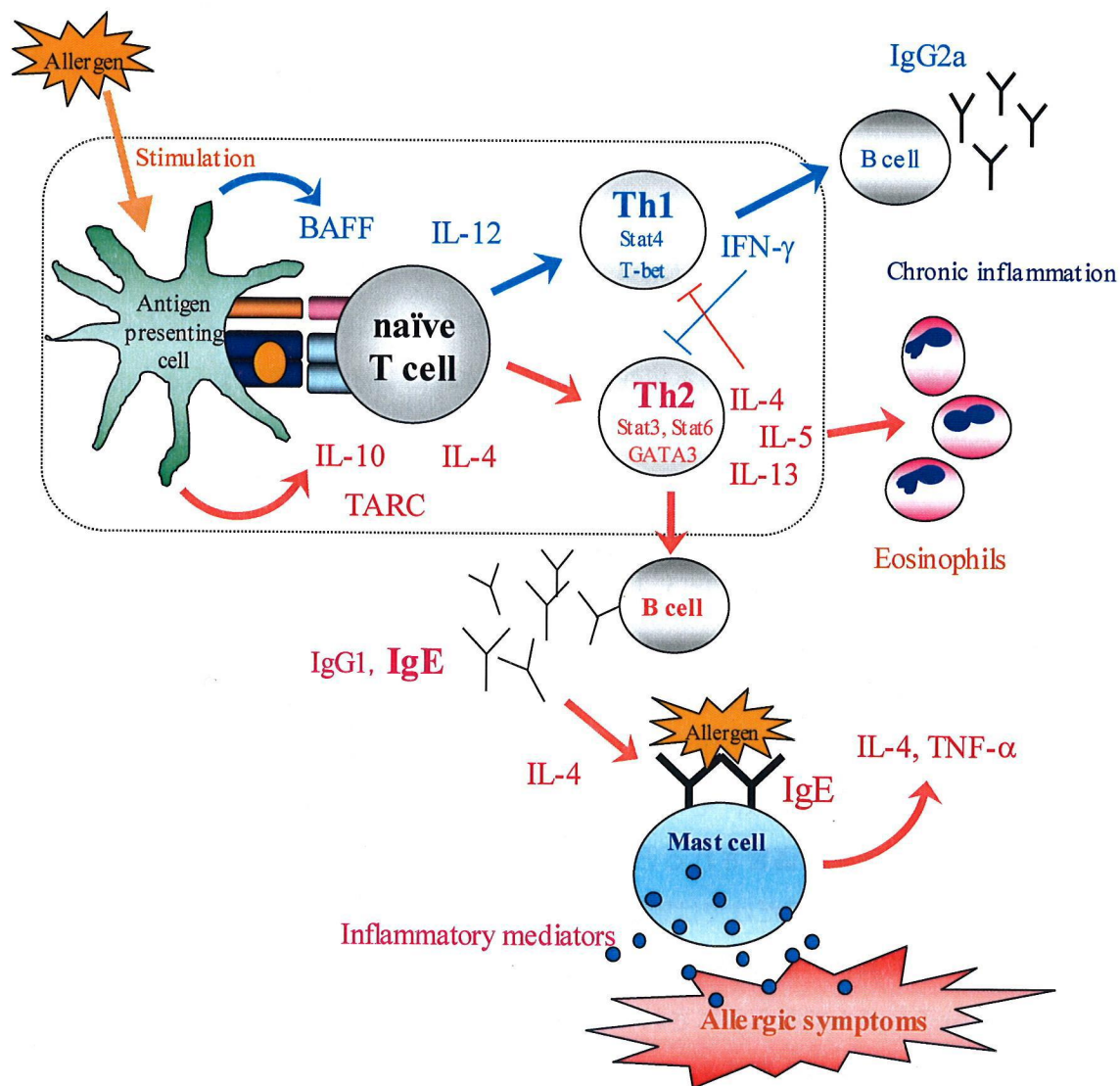


Fig. 2. Outline of immunologic pathways in the pathogenesis of allergic disease.

以上、本博士研究の実施における背景を概説したが、その主な目的は、各種 KGM の免疫調節機能の詳細を明らかにして、免疫関連疾患の予防・緩和食品として産業的な応用を目指すことにある。この研究の中で著者は、各種 KGM の抗アレルギー素材としての有用性を検証し、微粉砕（易水溶性）KGM にその注目すべき作用があることを見出した。さらに、それらの免疫調節における作用メカニズムの一端を明らかにするとともに実用化の可

能性を検討した。これらの研究成果を、以下、第1章～5章に亘って報告する。

第1章では、まず各種 KGM の製造工程ならびにそれらの物理化学的特性について概説する。次に各種 KGM の抗アレルギー素材としての有用性を、アトピー性皮膚炎 (AD) のモデルマウス (NC/Nga) を用いて検討した結果について述べる。この中では、微粉砕を施した易水溶性 KGM が、AD 様の病態亢進ならびに高 IgE 血症を著明に抑制することを報告するが、その抑制作用において KGM の粒子径が重要な役割を担うことについて触れる。

第2章では、微粉砕 KGM のアトピー抑制における作用メカニズムを説明する。まず微粉砕 KGM にみられる皮膚炎病態および高 IgE 血症の抑制作用が、Th1/Th2 バランスの是正ではなく、過剰な全身免疫応答に対するトレランス誘導が深く関与することを述べる。続いて微粉砕 KGM の摂取が、NC/Nga マウスの搔破行動の抑制に伴い、皮膚局所の免疫・炎症応答を幅広く抑制することを報告するが、とりわけマスト細胞応答の抑制作用が重要であることを考察する。

第3章では、微粉砕 KGM が抗原 (アレルゲン) 特異 IgE 応答を抑制するとともに、アレルギー性鼻炎の予防効果を有することを報告する。

第4章では、皮膚炎を発症した NC/Nga マウスが、頸部リンパ節症と脾腫を併発し、自己抗体および BAFF (B cell-activating factor of TNF family) を高産生すること、ならびにこれらの自己免疫・炎症応答を微粉砕 KGM が著明に抑制することについて述べる。次に、全身性エリテマトーデス (SLE) のモデルマウス (MRL/lpr) においてその有効性を調べた結果を報告するが、この中では、予想外にも高粘性を有する KGM が、その自己免疫症状を著明に抑制することを見出した。そこで、各種の自己免疫疾患に対しては、高粘性 KGM が代わりに機能性食品素材として利用できるかもしれない可能性に触れる。

第5章においては、微粉砕 KGM を高含有する機能性食品開発の現状やその安全性などについて触れ、最後にこれまでの研究成果と今後の課題について総括する。

Studies on immunomodulatory effects of KGM and its application to functional foods.

【第1章】各種 KGM の物理化学物性と抗アレルギー作用の検討

序論においても述べたように、コンニャクグルコマンナン (KGM) の多彩な生理作用は、その多くが高い粘度特性をもつ精製 KGM に関するもので、またそれらの免疫調節機能に関する研究は殆ど実施されていない。本章では、まず微粉碎 (易水溶性) KGM の物理化学的特性の違いを述べ、続いて各種 KGM の抗アレルギー作用を、アトピー性皮膚炎 (AD) のモデルマウス (NC/Nga) を用いて検討した結果を報告する。

第1節 KGM の物理化学的特性

1-1. 実験の材料および方法

各種 KGM

各種 KGM の製造フローを Fig. 3 に示す。原料芋を水洗して薄片状にスライスし、乾燥、粉碎することによって、食用こんにゃくの原料となる、こんにゃく精粉 (KP) が得られる。アルコール精製法によって KP からタンパク質、脂質、灰分などの不純物を除去すると精製 KGM が得られるが、その純度は 95% 以上になる。次に、衝撃粉碎機あるいはジェット粉碎機を用いて機械的な微粉碎を施すことにより、粒子径の異なる各種の易水溶性 (微粉碎) KGM が作製できる。このようにして得られた微粉碎 KGM は、粒子の表面積の増大によって高い粘度発現速度を有するが、溶解時にダマになりやすいという欠点もある。流動造粒乾燥装置を用いた凝集造粒によって、分散性の良い造粒品を得ることができる。なお、KP からアルコール精製を繰り返すことにより得られたものが、高純度精製された高粘性 KGM (PA, Propol®) である。研究のための各種 KGM は、清水化学株式会社から提供して頂いた。

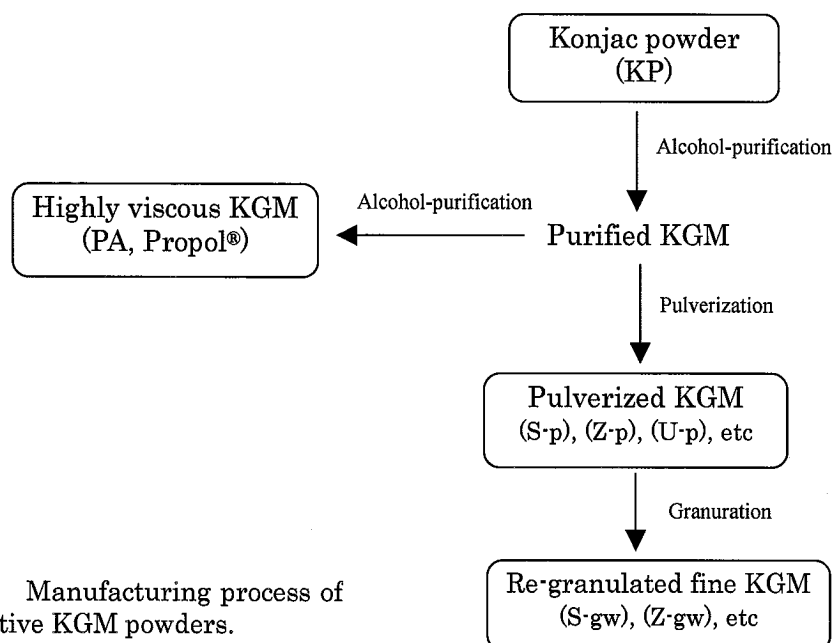


Fig. 3. Manufacturing process of respective KGM powders.

KGM 粉末の表面観察と粒子径の分析

各種 KGM の粉体表面に金をコートさせた後、それらの粒子表面を加速電圧 5~10 kV の条件下で、走査型電子顕微鏡（日本電子(株)製, JSM-5500LV）を用いて観察した。

各種 KGM 粉末の粒子径と粒度分布を、レーザー式粒度分布測定器（セイシン企業製, LMS-24）を用いて分析した。なお、KGM の分散溶媒にはエタノールを使用した。

各種 KGM の粘性ならびに食品としての一般品質

KGM の粘度特性を評価するため、1%濃度で水に溶解した際の絶対粘度を、B 型粘度計（トキメック(株)製, BH 型）を用いて分析した。

各試料の食品としての基本的な品質を、日本薬局方（JP）と衛生試験法に基づき分析した：pH, JP12・一般試験法 38；タンパク質, JP12・一般試験法 30（セミマイクロケルダール法）；灰分, JP12・一般試験法 25（生薬試験法）；大腸菌群, JP11・一般細菌準拠（大腸菌群 1）；脂質, 衛生試験法・注解 1990, 2.1.4.1(2)；一般細菌数, 衛生試験法・注解 1990, 1.3.1.2(4)；食物繊維, 衛生試験法・注解 1990, 2.1.3.1(2)。

1-2. 結果

各種 KGM 粉末の粒子表面を、電子顕微鏡で観察した。それらの結果を、Fig. 4 に示す。こんにやく精粉 (KP) および高粘性 KGM (PA) の粒子表面には、一様な凹凸が観察された。微粉碎 KGM (S-p および Z-p) では、当然粒子のサイズは小さくなっていたが、表面性状は比較的滑らかであった。S-gw に関しては、造粒処理によって微粒子が互いに結合している状態が確認できた。

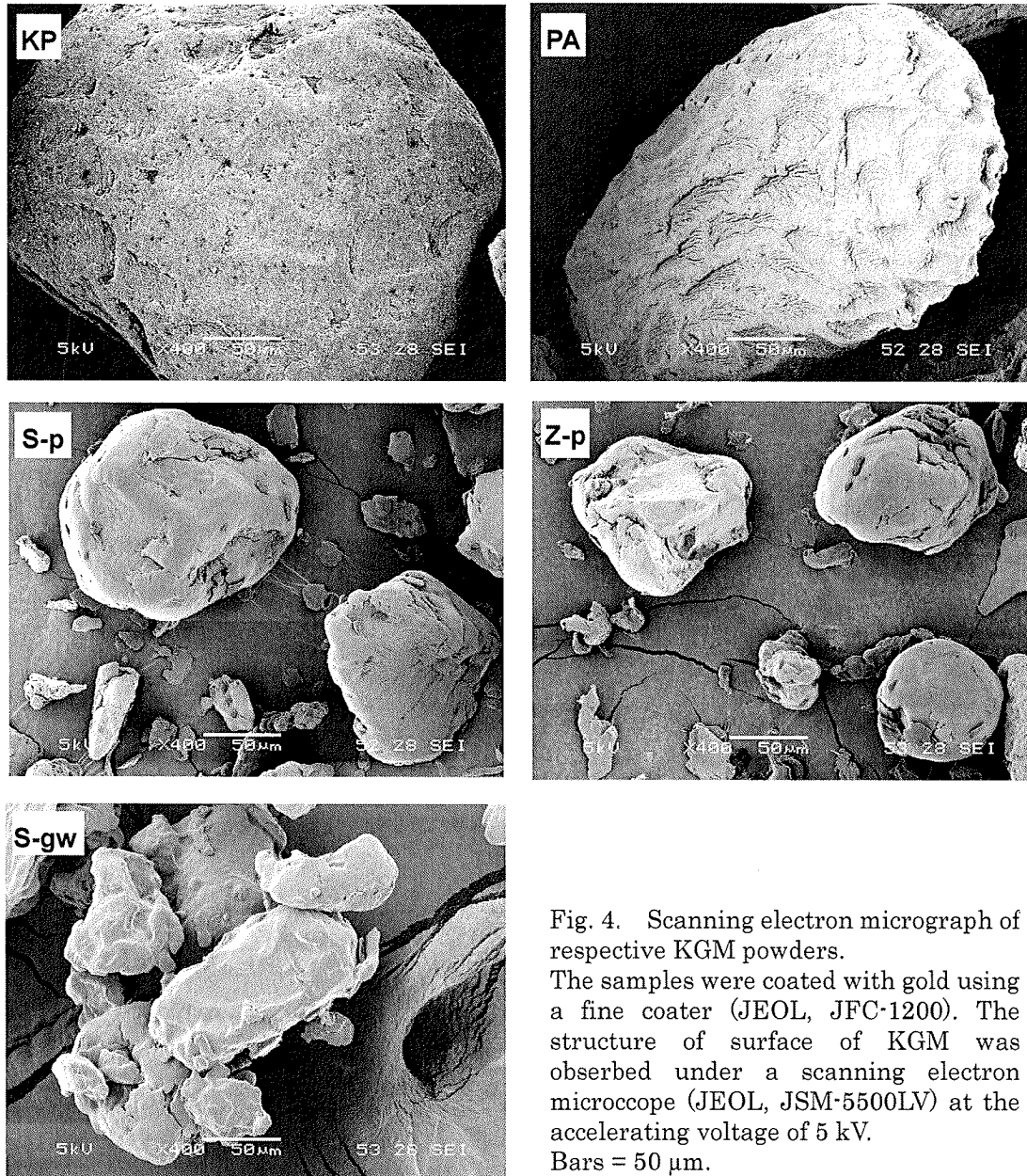


Fig. 4. Scanning electron micrograph of respective KGM powders.

The samples were coated with gold using a fine coater (JEOL, JFC-1200). The structure of surface of KGM was observed under a scanning electron microscope (JEOL, JSM-5500LV) at the accelerating voltage of 5 kV.

Bars = 50 μ m.

各試料の粒子径と粒度分布を分析した結果を、Fig. 5 に示す。こんにゃく精粉 (KP) および高粘性 KGM (PA) の平均粒子径は約 300 μm であった。粒度分布は正規分布に近かったが、分布幅は 100~700 μm と広がっていた。一方、微粉碎 KGM の平均粒子径は、それぞれ S-p は約 100 μm , Z-p は約 75~80 μm であった。10 μm 以下の微細な粒子もみられ、分布に偏りがあったが、分布幅は 5~200 μm と縮小していた。微粉末造粒 KGM (S-gw) においては、微粒子が互いに結合することによって、分布幅はさらに縮小しており、平均粒子径は 150~160 μm 程度にまで大きくなった。

各種 KGM の粘度特性

各種 KGM の粘度特性を評価するため、1%濃度で水に溶解した際の粘度の経時変化を調査した。B型粘度計を用いて絶対粘度を分析したところ (Fig. 6), こんにゃく精粉 (KP) の粘度上昇速度は小さく、ピークに達するまでに約 4 時間を要した。高粘性 KGM (PA) は、10 万 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ 以上の高い粘性があったが、粘度がピークに達するのに約 7 時間を要した。一方、微粉碎 KGM (S-p および Z-p) は、粘度の最大値が KP の約 60% (35,000 $\text{mPa}\cdot\text{s}$) に低下したが、粉体の表面積が大きくなることによって粘度ピークの到達時間が約 30 分と大幅に短縮した。S-gw に関しては、粉体の表面積増加によって溶解初期の粘度上昇が、微粉碎 KGM に比較して低くなる傾向にあったが、粘度と粘度ピーク到達時間に大きな差はなかった。

各種 KGM の食品としての一般品質

各試料の食品としての基本的な品質を、日本薬局方と衛生試験法に基づき分析した。それらの結果を、粘度および平均粒子径と併せて Table 1 に示す。こんにゃく精粉 (KP) と比較すれば、精製後の KGM はいずれも、タンパク質、脂質、灰分などの不純物が除去され、食物繊維の含量が高くなっていることを確認した。

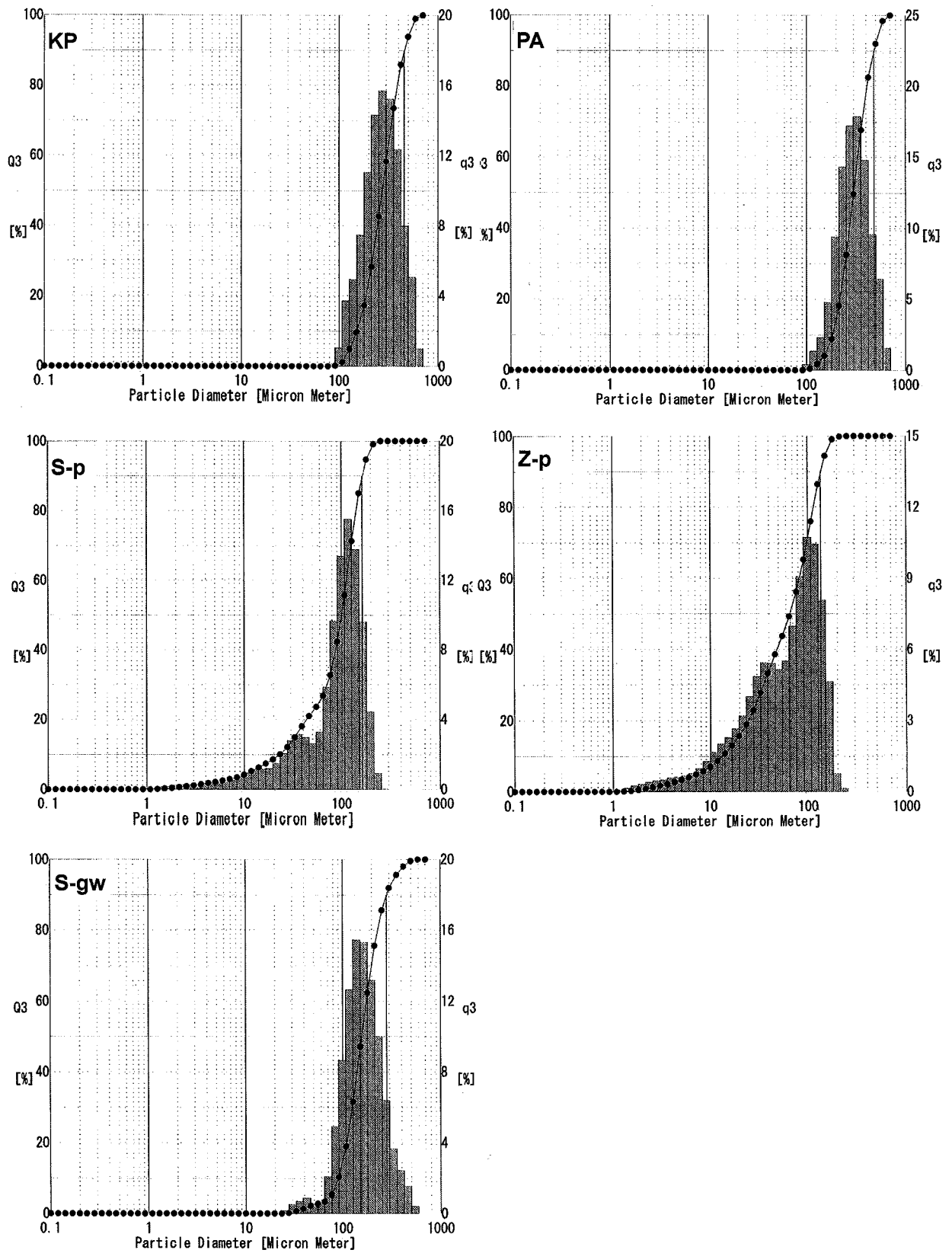


Fig. 5. Particle size distribution of respective KGM powders.

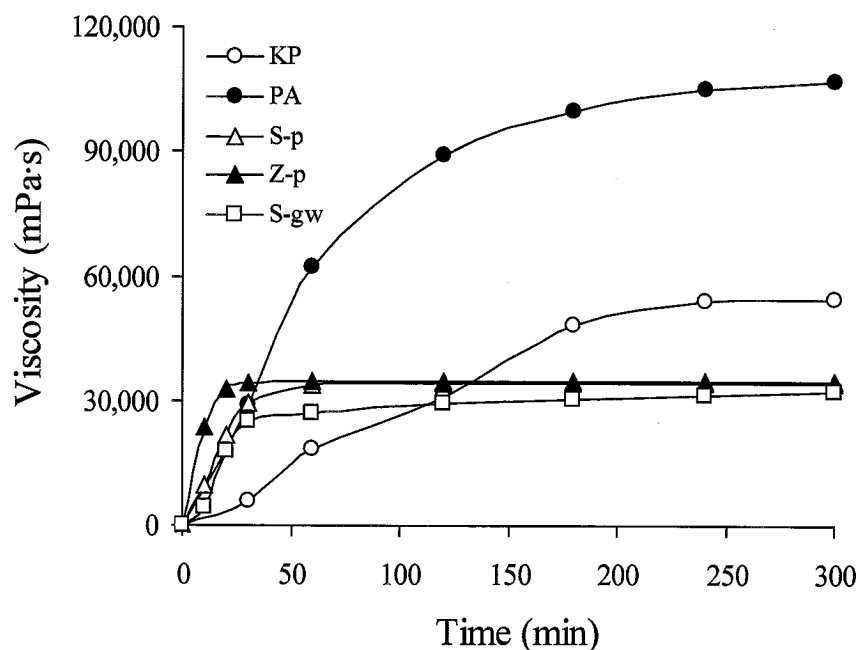


Fig. 6. Change in the viscosities of respective 1% KGM solutions with incubation time. The absolute viscosity of 1% KGM solutions was determined at 25°C by a B-type viscometer.

Table 1. Comparison of general qualities as foodstuffs in respective KGM.

	Konjac glucomannan				
	KP	PA	S-p	Z-p	S-gw
pH	6.8	6.9	7.1	7.0	7.2
Protein (%)	3.4	0.7	0.7	0.9	0.6
Fat (%)	1.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Ash (%)	4.5	0.4	1.0	0.7	1.0
Aerobic plate count (n/g)	< 3,000	< 300	< 1,000	< 1,000	< 3,000
Coliform group	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Carbohydrate (%)	75.0	98.5	96.8	96.8	96.5
Peak viscosity* (mPa·s)	56,200 ^a	123,700 ^b	35,100 ^c	34,700 ^c	32,200 ^c
Average particle size (µm)	274	301	101	77	156

*Viscous value after 4^a, 7^b, and 2^c hours in respective 1% KGM solutions.

第2節 アトピー性皮膚炎モデルマウスの病態亢進に及ぼす各種 KGM の影響

NC/Nga マウスは、日本で古くから愛玩用に飼育されていたニシキネズミを起源とし、1950年代に近藤（名古屋大学）らによって純系化された。当初から、加齢に伴って皮膚炎が誘発されることや糸球体腎炎を発症することなどが知られていたが²⁴⁾、その詳しい発症機序やヒトのどの疾患に対応するかなどについては不明であった。1997年に、松田らは通常環境下で飼育した NC/Nga マウスが、掻痒性の皮膚炎を自然発症し、その病態が臨床的・組織病理学的にヒトのアトピー性皮膚炎（AD）と酷似していることを報告した²⁵⁾。それ以降、本マウスが、AD のモデル動物として国際的にも認知されるようになってきた。そこでまず、各種 KGM の抗アレルギー素材としての有用性を、NC/Nga マウスを用いて検討した。

2-1. 実験の材料および方法

飼育飼料

コントロール飼料として、マウス飼育用 MF（オリエンタル酵母工業㈱製）を使用した。これにこんにやく精粉（KP）、高粘性 KGM（PA）、微粉碎 KGM（S-p および Z-p）、S-p の造粒品（S-gw）を、それぞれ 5 重量%の割合で添加した飼料を作製し、各種 KGM の影響を比較調査した。

微粉碎 KGM の粒子径の影響を検討する際は、Z-p（Av. 77 μm ）、X-p（Av. 30 μm ）および U-p（Av. 17 μm ）を 5 重量%の割合で添加したものを作製し、比較調査した。また、微粉碎 KGM の投与量の検討においては、Z-p を 0.2%、1.0%および 5.0%の割合で添加したものをを用いた。

実験動物とスケジュール

4 週齢の雄性 NC/Nga マウス（Conventional grade）を、日本 SLC 株式会社（静岡）より購入した。1 群 5 匹に分け、 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、12 時間ごとの明暗サイクルで、各種の飼育飼料と水を自由摂取させ、8 週間（12 週齢まで）飼育した。

微粉碎 KGM の治療効果の検討では、12 週齢までコントロール飼料で飼育した後、AD を発症した NC/Nga マウスを、スコア値、搔破行動および血中 Total IgE 量が均等になるよう 2 群に分け、1 群 5 匹に選定した。12 週齢から 5%Z-p 添加飼料と水を 6 週間自由摂取させ、微粉碎 KGM の病態抑制作用を調査した。

皮膚炎病態および搔破行動の評価

松田らによって報告されている方法により、皮膚炎の症状を評価した²⁴⁾。皮膚炎症状は、痒み（搔破行動）、出血・紅斑、浮腫、擦過傷、乾燥の 5 症状の程度をそれぞれスコア化し

た。スコアは、0；無症状，1；軽度，2；中程度，3；強度とし，皮膚炎症状はその合計値で示した。

痒みに関して定量的な評価をするため，ビデオ撮影を行いマウスの搔破行動を観察をした。各群のゲージごとに30分間の撮影を行い，そのうち20分間にマウスが後足で耳介，顔面および背部を引っ掻く回数をカウントした。搔き始めてから止めるまでを1回とし，グルーミングは対象外とした。

血漿中の Total IgE 量の分析

2週間ごとに，尾静脈または眼静脈から採血を行った。採血後はすぐに遠心分離（2000 rpm, 10分間）を行い，得られた血漿は分析まで -20°C で保管した。

血漿中の Total IgE 量は，サンドイッチ ELISA 法によって分析した。

ELISA 法での分析で使用する，固相用抗体（purified rat anti-mouse IgE mAb, clone R35-72），検出用抗体（biotinylated rat anti-mouse IgE mAb, clone R35-118）およびスタンダード（mouse IgE standard）は，BD Biosciences Pharmingen (San Diego, Calif., USA) から購入したものをを用いた。また，試薬は以下のものを使用した：PBS バッファー，NaCl 8.0 g, Na_2HPO_4 1.16 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g / 1L ミリ Q 水（pH 7.2~7.4）；洗浄液，PBS+Tween-20 0.05%；ブロッキングバッファー，PBS+BSA 2%。

ELISA 実験は Pharmingen のプロトコールを参考に実施した。以下にその手順を示す。

ELISA プレートに PBS で希釈した固相用抗体（ $\times 250$ ）を 100 μl 入れ， 4°C で一晩静置した。プレートを洗浄し，ブロッキング処理を1時間行った後，ブロッキングバッファーで希釈したスタンダード（500 ng/ml から8段階で2倍希釈したもの）または血漿サンプルを 100 μl 添加し， 37°C で3時間反応させた。プレートを洗浄した後，希釈した検出用抗体（ $\times 250$ ）を 100 μl 加え，室温で2時間反応させた。その後，1000倍希釈した AKP-streptavidin (Pharmingen) を 100 μl 加え，室温で1時間反応させた。最後に，プレートを十分に洗浄し，Attophos[®] fluorescent substrate system (Promega Corporation, Madison, Wis., USA)を用いて蛍光強度を測定した。

統計解析

得られたデータは，平均値 \pm 標準誤差（SE）で示した。皮膚炎病態スコアの値における各群間の有意差検定は，マンホイットニーのU検定を使用した。また，血中 Total IgE 量の各群間の有意差は，Student's t-test によって検定した。

2-2. 結果

各種 KGM の AD 症状抑制作用

NC/Nga マウスの皮膚炎症状と搔破行動に対する各種 KGM の影響を、各週ごとに調べた結果を、Fig. 7 (a)および(b)に示す。コントロール群では、8 週齢頃から激しい搔破行動がみられ、その後 9~10 週齢にかけて耳介、頸部および背部に脱毛、出血・紅斑、浮腫、乾燥などのアトピー性皮膚炎 (AD) 様の病態進行が確認された。10 週齢におけるコントロール群と S-p 群の外観写真の 1 例を、Fig. 8 に示す。コントロール群と比較して、こんにやく精粉 (KP) 群、高粘性 KGM (PA) 群および微粉末造粒 KGM (S-gw) 群では差はみられずスコアが上昇したが、微粉碎 KGM (S-p および Z-p) 群では、これらの病変の著明な抑制作用が観察された (Fig. 7a)。

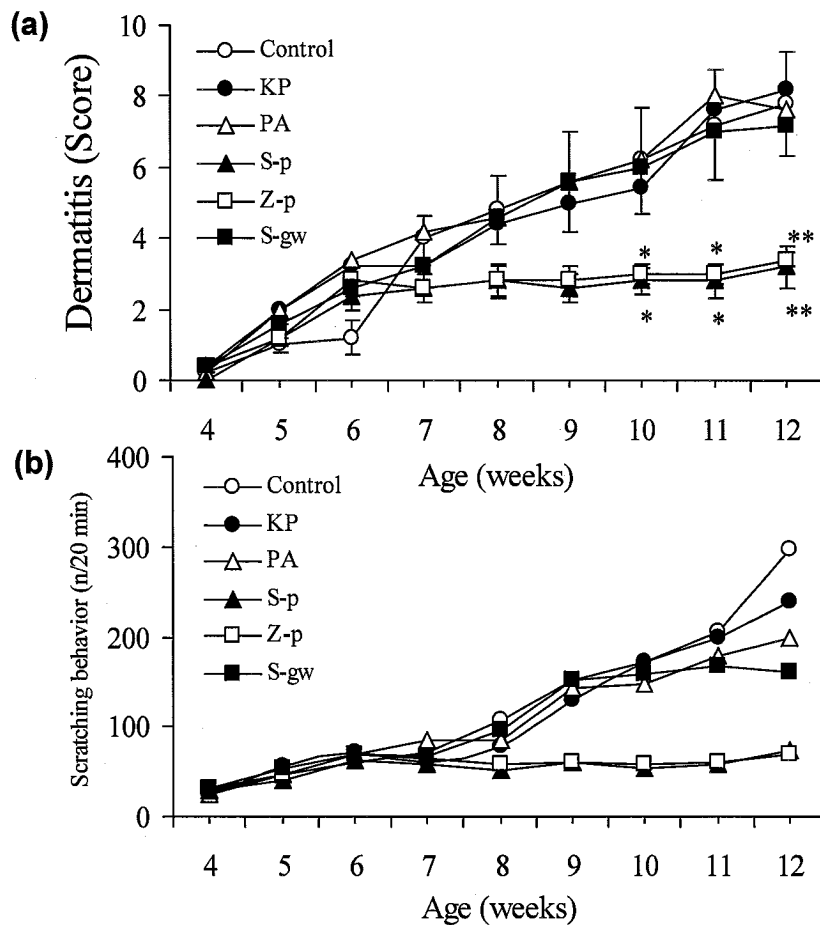


Fig. 7. Inhibitory effects of pulverized KGM (S-p and Z-p) on the increase in dermatitis score and scratching behavior in NC/Nga mice. (a) Clinical skin conditions in mice during the 8-week experiment. Values are expressed as means \pm SE with 5 mice per group. * p <0.05, ** p <0.01, vs. the control diet. (b) Scratching behavior in mice during the 8-week experiment. Values are expressed as the total number of scratching incidents in 5 NC/Nga mice per 20 min.

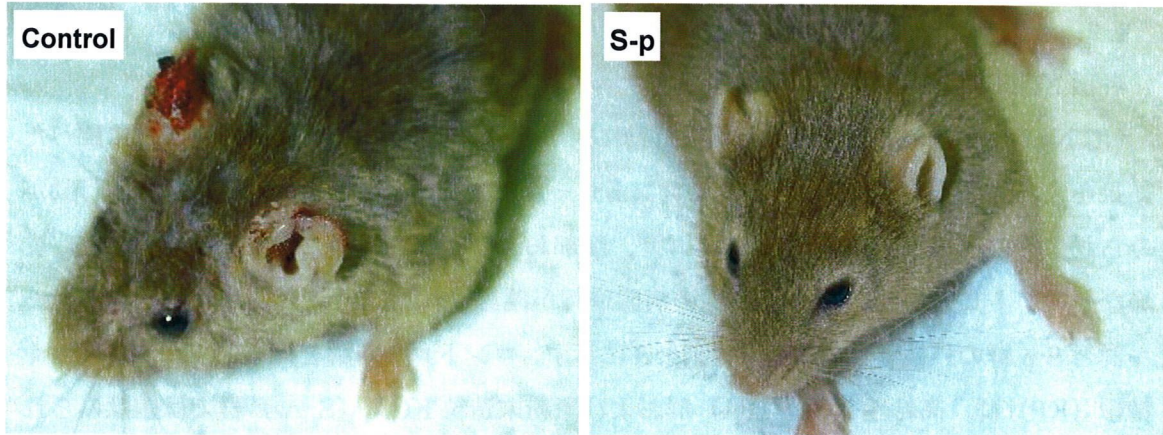


Fig. 8. Representative photographs of NC/Nga mice at 10 weeks of age. The left and right photographs represent the control group and pulverized KGM group, respectively.

搔破行動は、各群（5匹）が20分間に引っ掻いた回数の合計で評価した。搔破回数は、AD様の病態亢進に伴ってコントロール群では顕著な上昇がみられ、12週齢では約300回にも達した。しかしながら、微粉碎KGM群では、7週齢ころから横這いとなり、搔破行動が顕著に抑制された（Fig. 7b）。

2週間ごとに採血を行い、血漿中のTotal IgE量を分析した結果を、Fig. 9に示す。コントロール群では、スコア値の上昇に伴って12週齢までの間にTotal IgE量の顕著な上昇が確認された。コントロール群と比較して、KP群、PA群およびS-gw群では差がみられなかったが、微粉碎KGM群では高IgE産生が有意に抑制された。これらの結果から、微粉碎を施したKGMが、ADの発症を予防・緩和する機能性食品素材として有効であると示唆された。

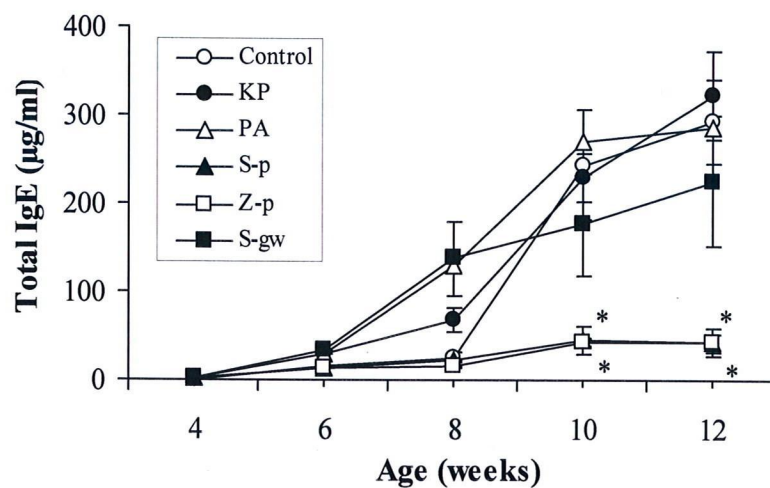


Fig. 9. Inhibitory effects of pulverized KGM (S-p and Z-p) on the increase in plasma IgE levels in NC/Nga mice. Means \pm SE with 5 mice per group. * $p < 0.05$, vs. the control diet.

微粉碎 KGM の皮膚炎抑制における粒子径の影響

前項での実験結果から、微粉碎を施した KGM に抗アレルギー作用があることが示唆されたが、造粒処理を施した S-gw 群において抑制効果がみられなかったことから、その作用は KGM の粘度特性に加えて粒子径が重要な役割をもつことが推察された。そこで、AD 抑制作用における粒子径の影響を調べるため、さらに微細な KGM 粉末の製造を検討した。加工条件の改善を行い、2 種類の微粉碎 KGM (X-p および U-p) を作製した。それらの基本物性として、粘度、粒子径および一般品質を、前項での検討と同様に分析した結果を、Z-p と並べて Table 2 に示す。平均粒子径は、それぞれ X-p が約 30 μm 、U-p が約 17 μm で、粒度分布幅も縮小した。粘度ピークは微細になるほど低下し、それぞれ X-p が約 30,000 mPa·s、U-p が約 9,000 mPa·s であった。

Table 2. Comparison of physicochemical properties in respective fine KGM powders.

	Pulverized KGM		
	Z-p	X-p	U-p
Protein (%)	0.9	0.9	0.8
Fat (%)	<0.1	<0.1	<0.1
Ash (%)	0.7	1.0	0.8
Aerobic plate count (n/g)	< 1000	< 1000	< 3000
Coliform group	Negative	Negative	Negative
Carbohydrate (%)	96.8	97.5	97.9
Peak viscosity*(mPa·s)	34,700 ^a	29,200 ^b	9,000 ^b
Average particle size (μm)	77	30	17
Particle size distribution (μm)	5~200	1~100	1~50

*Viscous value after 2^a and 1^b hours in respective 1% KGM solutions.

前項での実験と同様に、微粉碎 KGM の AD 病態および高 IgE 血症の抑制作用における粒子径の影響を調査した。NC/Nga マウス (4 週齢) を 1 群 5 匹飼いとし、各種飼料と水を自由摂取させ 12 週齢まで観察した。2 週間ごとに、マウスの皮膚炎病態、搔破行動ならびに血中 IgE 量について調べた結果を、Fig. 10 (a)~(c)に示す。コントロール群と比較すれば、いずれの微粉碎 KGM 群においても AD 様の病態亢進(スコア値)、搔破行動ならびに高 IgE 血症が、著明に抑制された。その作用は、X-p 群において強くなる傾向があったが、統計学的にはいずれも同様の抑制効果であった。

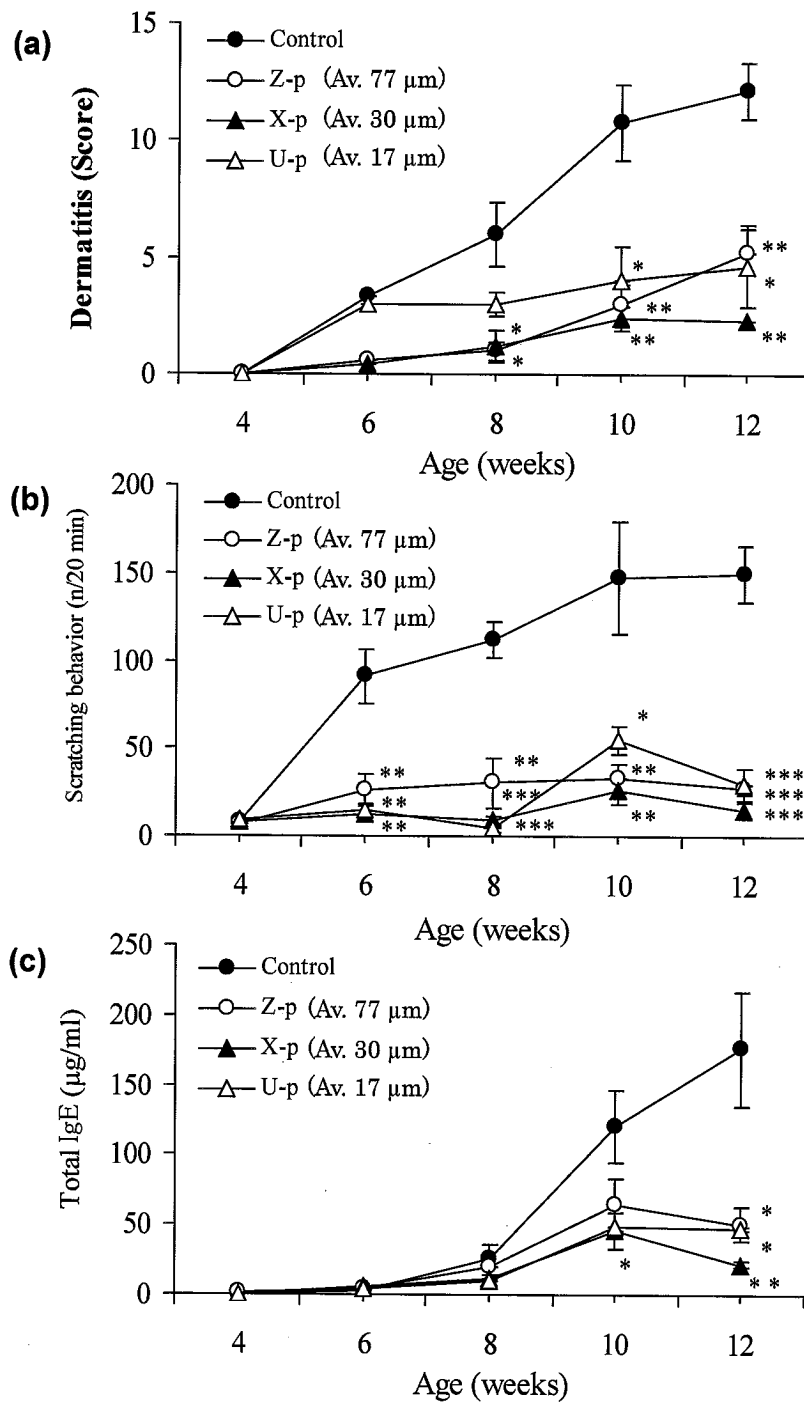


Fig. 10. Dietary finer KGM (X-p and U-p) similarly inhibited the increase in dermatitis score (a), scratching behavior (b), and plasma IgE levels (c) in NC/Nga mice. Means \pm SE with 5 mice per group. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, vs. the control diet.

皮膚炎抑制における投与タイミング（治療効果）および投与量の検討

微粉碎 KGM の AD 抑制作用において、その作用が発揮される投与の時期（治療効果）ならびに投与量の影響を検討した。

前項での実験と同様に、微粉碎 KGM (Z-p) を 5 重量%の割合でコントロールに添加した飼料を用いて、治療効果を検討した。AD を発症した NC/Nga マウス（12 週齢，♂）を選定し、スコア値、搔破行動および血中 Total IgE 量が均等になるよう 2 群に分け、1 群 5 匹とした。12 週齢から Z-p 飼料と水を 6 週間自由摂取させ、微粉碎 KGM の病態抑制作用を調査した。各週ごとに、皮膚炎病態（スコア）および搔破行動（各群（5 匹）が 20 分間に引っ掻いた回数の合計）を観察した結果を、Fig. 11 (a)および(b)に示す。また、2 週間ごとに血中の Total IgE 量を分析した結果を、Fig. 11 (c)に示す。

試験を開始した 12 週齢から、コントロール群では皮膚炎症状（スコア値）と搔破行動に変化はなく、横這いになった。Z-p 群においても、コントロール群との差はなく、変化は観られなかった。血中の IgE 量に関しても同様に両群間で差はみられなかったが、Z-p 群では 16 週齢まではむしろ増加傾向にあり、18 週齢で両群ともに低下した。これらの結果から、微粉碎 KGM の AD 抑制作用は、症状を発症する前からの摂取が重要であり、治療的な作用はみられないことが示唆された。

次に、微粉碎 KGM (Z-p) を 0.2%、1.0%、5.0%の重量割合で添加した飼料をそれぞれ作製し、AD 抑制作用における投与量依存性を検討した。4 週齢から NC/Nga マウスに各飼料と水を 8 週間、自由摂取させた。2 週間ごとに、皮膚炎病態、搔破行動ならびに血中 Total IgE 量について調査した結果を、Fig. 12 (a)~(c)に示す。

コントロール群では、8 週齢頃から AD 様の病態亢進が確認され、スコア値が上昇した。Z-p 群では、10 週齢までは投与量依存的に抑制される傾向があったが、12 週齢では 0.2%の投与量でもスコア値の有意な抑制作用が観察された。搔破行動は、血中の IgE 量に差がみられない 6 週齢の時点から、コントロール群と Z-p 群で顕著な差がみられ、その抑制効果も投与量依存的な挙動を示した。Z-p の 5.0%投与群では、6 週齢から横這いになったが、0.2%群では上昇し、コントロール群と有意な差がなくなった。Z-p の 1.0%投与群は 8 週齢まで上昇したが、10 週齢から減少し 12 週齢では 5.0%投与群と同様の抑制効果が観察された。血中の IgE 量に関しては、8 週齢以降にコントロール群で顕著な上昇が確認された。コントロール群と比較して、Z-p 群では 10 週齢までは投与量依存的に抑制される傾向があったが、12 週齢ではいずれの群においても同様に有意な抑制作用がみられた。

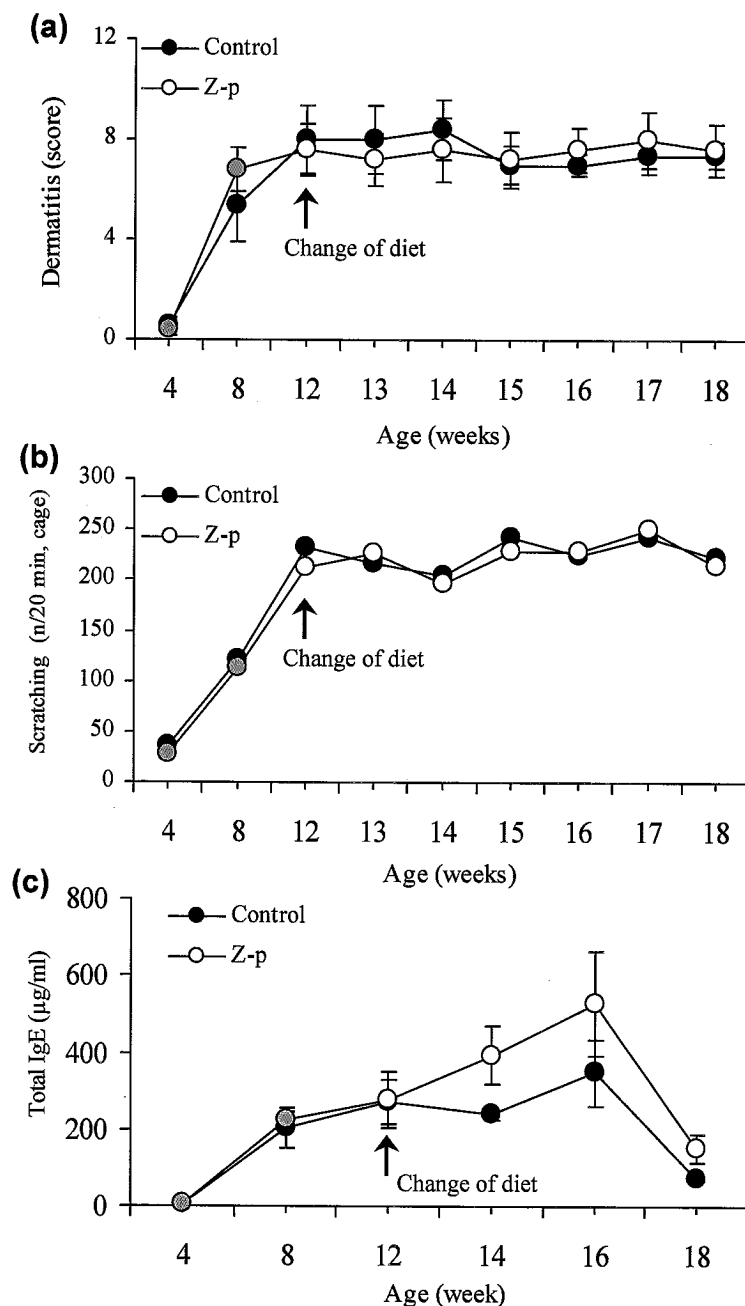


Fig. 11. Dietary pulverized KGM (Z-p) failed to inhibit the dermatitis score, scratching behavior, and plasma IgE levels in eczema developed-NC/Nga mice. (a) Skin severity of dermatitis was evaluated once a week by macroscopic scores. Means \pm SE with 5 mice per group. (b) Scratching behavior in mice during the 6-week experiment. Values are expressed as the total numbers of scratching incidents in 5 NC/Nga mice per 20 min. (c) Plasma IgE levels were quantified by sandwich ELISA. Means \pm SE with 5 mice per group.

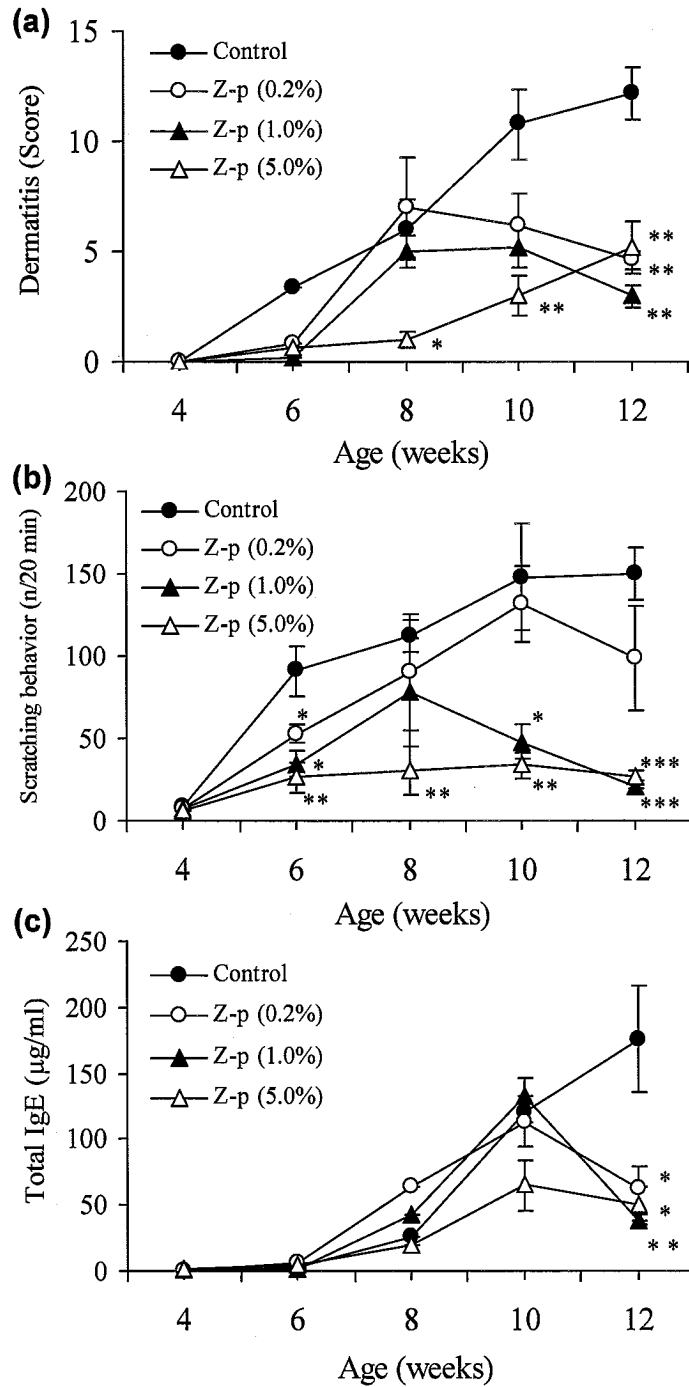


Fig. 12. Dose-dependent effects of pulverized KGM (Z-p) on increasing dermatitis score, scratching behavior, and plasma IgE levels in NC/Nga mice. (a) Skin severity of dermatitis was evaluated every 2 weeks using macroscopic scores. (b) Numbers of scratching incidents per 20 min were assessed. (c) Plasma IgE levels were quantified by sandwich ELISA. Means \pm SE with 5 mice per group. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, vs. the control diet.

第3節 考察

第1章では、まず各種 KGM の製造工程を説明し、微粉碎（易水溶性）KGM の物理化学的特性の違いを明らかにした。高粘性を有する KGM の摂取が、糖尿病や高脂血症など各種の疾病予防に有益なことが明らかになっているが、免疫調節作用に関する研究は未だ発展途上にある。また微粉碎を施した KGM の物性による、有益な生理作用は見出されていない。そこで新たな生理機能の探索として、各種 KGM の抗アレルギー素材としての有用性を、アトピー性皮膚炎（AD）モデルマウスを用いて検証した。

この試験の中で、平均粒子径を 75~100 μm 程度に微細化した易水溶性 KGM の摂取が、NC/Nga マウスにおける AD 様の病態進行、搔破行動ならびに高 IgE 血症を、有意に抑制することを見出した（Fig. 7, 8 および 9）。これらの抑制作用は、高粘性の KGM（KP および PA）ではみられず、また造粒処理によってその活性が消失した。さらに、より微細化した KGM（Av. 17~30 μm ）にも同等の活性があった（Fig. 10）。これらの結果から、粘度特性に加えて KGM の粒子径が、抗アレルギー作用の発揮に重要な役割を担うことが示唆された。

皮膚炎を発症したマウスに対する投与試験では、AD 症状および IgE 産生の抑制効果がなかったことから（Fig. 11）、微粉碎 KGM の作用は、症状を発症する前からの摂取が重要で、治療的な作用はないことが推察された。

上述した結果は、同じ食素材であっても、その形状やサイズ、また摂取時期の違いにより生理作用の発現が大きく異なることを示唆している。

NC/Nga マウスは、病態の進展に伴って後肢による激しい搔破行動が惹起される。この行動は、痒みに関連したものと考えられ、病態亢進に高い相関があると指摘されているが、本モデルにおける搔破行動は、血中 IgE 値と相関がないことが報告されている²⁶⁻²⁸。そこで微粉碎 KGM（Z-p）の投与量の検討では、とくにマウスの搔破行動と IgE 産生量の関係に着目した。6~8 週齢の早期では、IgE 産生に群間の差はなかったが、搔破行動は Z-p 群で顕著な抑制作用があり、その効果は投与量依存的であった（Fig. 12）。一方、8 週齢以降ではコントロール群における血中 IgE 量が顕著に上昇したが、Z-p 群ではいずれの投与群でも同様に IgE 量は有意に減少した。また搔破行動の頻度が高いほど、AD スコアを上昇させる傾向にあった。これらの結果から、本マウスの搔破行動は皮膚炎の発症に高い相関があり、また IgE は発症に直接関与するというよりは、病態亢進の増悪因子となることが推察された。微粉碎 KGM の AD 抑制作用は、投与量が低濃度であるほど若齢期での効果が低かったが、摂取の継続で次第に抑制効果が出てくることが明らかになった。また微粉碎 KGM（Z-p）の 5.0% 投与群を、8 週齢からコントロール飼料に切換えると、搔破行動ならびに血中 IgE 量が次第に上昇することを確認した（データ未提示）。これらの結果から、微

粉碎 KGM の抗アレルギー作用は、継続的な摂取が重要であることが示唆された。

カロリーやミネラルなどの食餌制限は、Th2 細胞の増殖およびサイトカイン産生応答を抑制するとともに、IgE 産生を減少させる^{29,30)}。またこれらの食餌制限は、NC/Nga マウスの皮膚炎の発症を遅延させ、その症状を抑制することが明らかになっている³¹⁾。しかしながら、本実験において、各群間におけるマウスの体重増加や食餌摂取量に明らかな差は認めなかった（データ示提示）。そのため、微粉碎 KGM にみられる AD 様病態および IgE 産生の抑制作用は、これらの食餌制限に関連したものではないと結論した。

Studies on immunomodulatory effects of KGM and its application to functional foods.

【第2章】 微粉砕 KGM のアトピー性皮膚炎抑制作用におけるメカニズム解析

本章では、微粉砕 KGM の AD 様病態および高 IgE 血症の抑制作用におけるメカニズムについて説明する。まず全身免疫系における T 細胞応答 (Th1/Th2 バランス) に及ぼす微粉砕 KGM の影響を報告する。続いて微粉砕 KGM が、NC/Nga マウスの搔破行動の抑制に伴い、皮膚局所の免疫・炎症応答を幅広く抑制することに関して述べる。

第1節 微粉砕 KGM の全身免疫系における Th1/Th2 応答に及ぼす影響

序論においてアレルギーの発症機構に関する簡易な説明をしたが、ヘルパーT (Th) 細胞は、産生するサイトカインの違いにより、異なる二つの細胞集団に分類されている。Th1 細胞は、抗ウイルス活性を誘導するインターフェロン- γ (IFN- γ) などを産生する。これに対して、Th2 細胞は B 細胞による抗体産生の制御に関与する、インターロイキン-4 (IL-4), IL-5, IL-10, IL-13 などのサイトカインを産生する。近年では、新たな T 細胞集団として自己免疫応答に関与する Th-17 や制御性 T 細胞なども注目されるようになっているが、これらの T 細胞集団は、サイトカイン産生能の違いを反映して異なる機能を有し、相互のバランスを制御している³²⁾。IFN- γ は、Th2 細胞への分化を抑制するが、逆に IL-4 や IL-10 はマクロファージや T 細胞に作用し Th1 細胞への分化を抑制することが知られている。少し古典的ではあるが、この相互に働く制御機構が破綻すると、一方向性の過剰な免疫応答が誘起され、各種の免疫疾患が惹起されるとの見解もある^{33,34)}。T 細胞応答に対する微粉砕 KGM の影響の調査は、AD の病態亢進と IgE 産生の抑制メカニズムを考えるうえでは重要である。

1-1. 実験の材料および方法

脾細胞の調製と培養

第1章での検討と同様に NC/Nga マウスを8週間飼育した後(12週齢)、各群のマウスから脾臓をシャーレ内へ摘出した。ピンセットでそれぞれの実質細胞を抜き出し、コンカルチュープへ採取した。脾細胞は、lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 15 mM NaHCO₃, 0.1 mM EDTA2Na, pH 7.3) により、赤血球を取り除いた。それぞれ得られた細胞は、PBS で洗浄した後、抗生物質(100 U/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin), 2-メルカプトエタノール (50 μ M) および 10% 牛胎児血清を添加した RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis, Mo., USA) に懸濁した。その後、トリパンブルーで染色した生細胞数を計測し、 2×10^6 cells/ml に調整した。

抗マウス CD3 抗体(1 μ g/ml)(BD PharMingen)を固相化した 96well プレートに RPMI-1640 medium にて洗浄した後、抗マウス CD28 抗体(1 μ g/ml)(BD PharMingen)を

50 μ l ずつ添加した。これに、調製した細胞懸濁液を 50 μ l ずつまき込み、37°C、5%CO₂ の条件下で 3 日間（72 時間）培養した。

サイトカイン産生量の分析

脾細胞を 3 日間培養した後、培養液をコニカルチューブへ移した。遠心分離（1500 rpm, 5 分間）により、細胞を取り除き、培養上清中のサイトカイン産生量（IL-4 および IFN- γ ）をサンドイッチ ELISA 法で分析した。

血漿中の Total IgG1, IgG2a および IFN- γ 量の分析

12 週齢において、各群のマウスの眼静脈から全採血を行った。採血後はすぐに遠心分離（2000 rpm, 10 分間）を行い、得られた血漿は分析まで-20°Cで保管した。

血漿中の Total IgG1, IgG2a および IFN- γ 量を、サンドイッチ ELISA 法により分析した。

試薬および抗体

ELISA 法での分析で使用する、固相用抗体、検出用抗体およびスタンダードは、全て BD Biosciences Pharmingen から購入したものをを用い、試薬は血中 Total IgE 量の分析の項で記載したものと同一ものを使用した。また、ELISA 実験は Total IgE 量の分析と同様に行った。

盲腸重量の測定

12 週齢において、各群のマウスの盲腸内容物重量を測定した。

統計解析

得られたデータは、平均値±標準誤差 (SE) で示した。各群間の有意差は、Student's t-test によって検定した。

1-2. 結果

抗マウス CD3 と CD28 抗体の刺激によって脾臓 T 細胞のサイトカイン産生能を調査した結果を、Fig. 13 に示す。コントロール群と比較して、微粉碎 KGM (S-p および Z-p) 群に統計的な差はなかったが、こんにやく精粉 (KP) 群および高粘性 KGM (PA) 群と比較すれば有意に減少しており ($p < 0.05$)、IL-4 および IFN- γ の産生量がいずれも微粉碎 KGM 群において減少していることが明らかになった。

次に、12 週齢における血漿中の Total IgG1, IgG2a および IFN- γ 量を分析した。それらの結果を、Fig. 14 に示す。Total IgG1 量に関して、KP 群、PA 群および S-gw 群では同様にコントロール群と差はみられなかったが、微粉碎 KGM 群では有意な抑制作用が確認された。Total IgG2a 量についても、微粉碎 KGM 群で減少傾向にあったが、コントロール群との間に統計的な有意差は認められなかった。また、血中の IFN- γ に関しては、コントロール群と比較して微粉碎 KGM 群では有意な減少がみられた。

これらの結果から、微粉碎 KGM にみられる AD 様病態および高 IgE 産生の抑制作用は、Th1/Th2 バランスの是正では説明できないことが示唆された。

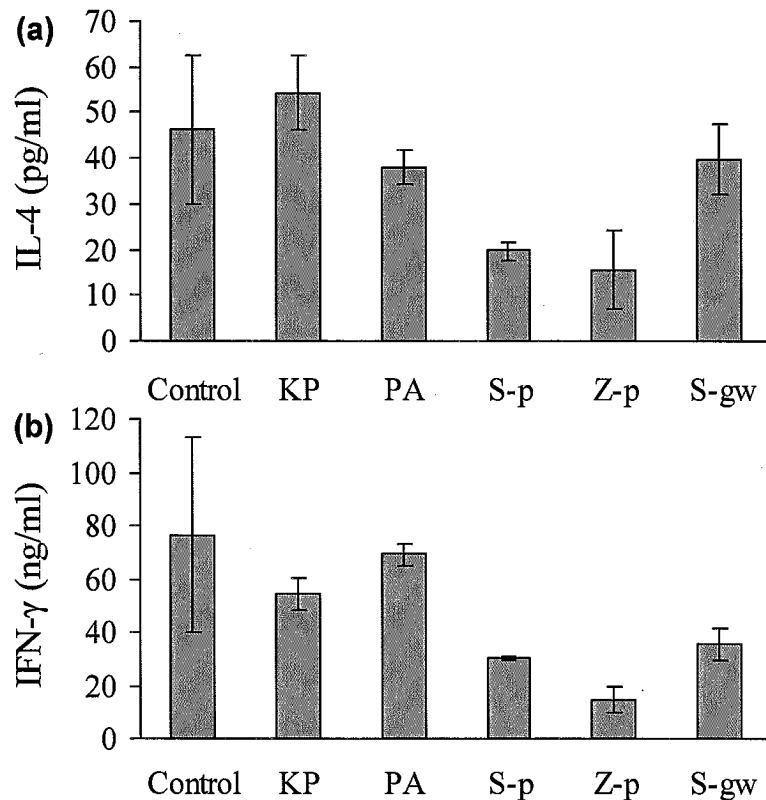


Fig. 13. Effects of KGM on the cytokine production of murine spleen T cells at 12 weeks of age. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 abs for 3 days. IL-4 (a) and IFN- γ (b) levels secreted in the culture supernatant were quantified by sandwich ELISA. Means \pm SE of 3 mice per group.

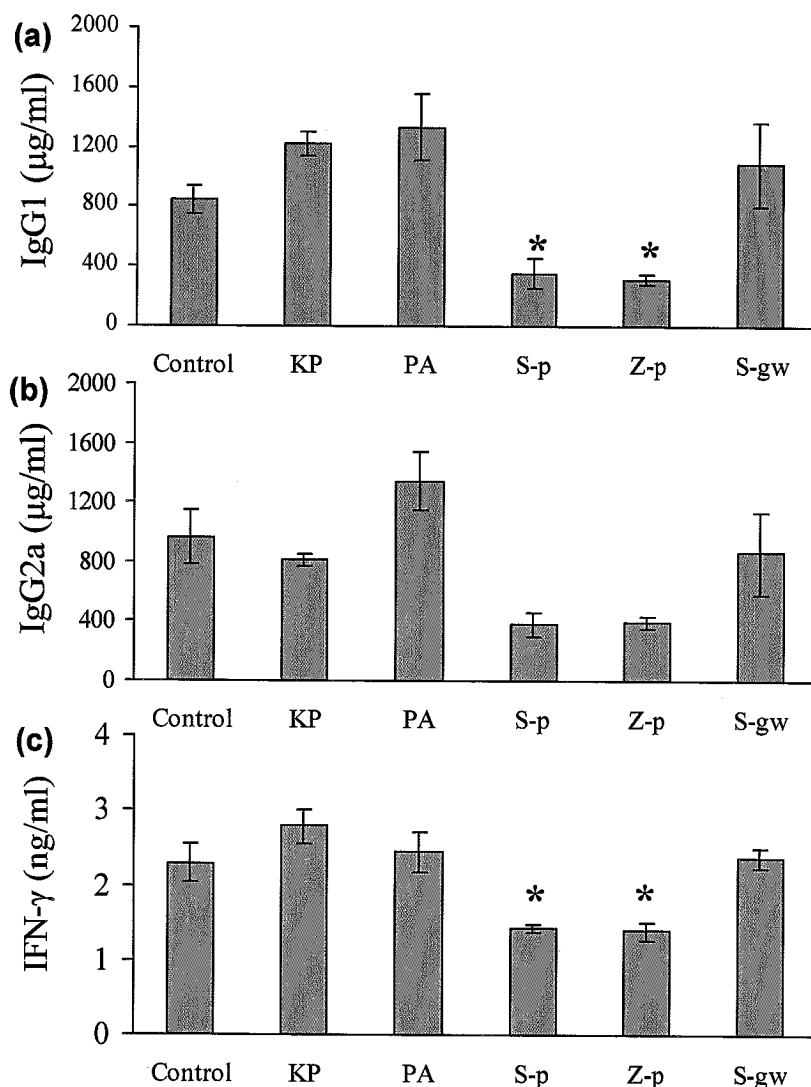


Fig. 14. Effects of KGM on the plasma IgG1, IgG2a, and IFN- γ levels in NC/Nga mice at 12 weeks of age. IgG1 (a), IgG2a (b), and IFN- γ (c) levels were quantified by sandwich ELISA. Means \pm SE of 3 mice per group. * $p < 0.05$, vs. the control diet.

高粘性 KGM の摂取が、盲腸およびその内容物重量を増加させ、腸管での IgA 産生を増強することが明らかになっている²³⁾。そこで 12 週齢において、各群のマウスにおける盲腸内容物の重量を調べた。その結果、コントロール群と比較すれば、どの群においても KGM 摂取群では重量は増加したが、とくに微粉碎 KGM 群ではより増加する傾向にあった：コントロール群, 0.42 ± 0.01 g (mean \pm SE, $n=6$)；KP 群, 0.55 ± 0.08 g ($n=6$)；PA 群, 0.50 ± 0.07 g ($n=6$)；S-p 群, 0.70 ± 0.03 g ($n=6$)；Z-p 群, 0.66 ± 0.17 g ($n=3$)；S-gw 群, 0.46 ± 0.03 g ($n=3$)。

第2節 皮膚局所の免疫・炎症応答に及ぼす微粉碎 KGM の影響

第1章において微粉碎 KGM の摂食が、NC/Nga マウスの搔破行動を著明に抑制することを述べた。この行動は、痒みに関連したものと考えられ、病態の誘発および悪化要因のひとつになることが指摘されている^{26,35,36)}。本マウスの皮膚局所には、サブスタンス P 陽性のマスト細胞が高浸潤するが、サブスタンス P の拮抗薬が搔破行動を著明に抑制することが報告されている^{37,38)}。一方で、本マウスは SPF (Specific Pathogen Free) 環境下で飼育すると皮膚炎を誘発しないことなどから、病態の自然発症には、ダニの寄生が重要であるといわれている^{26,39)}。搔破行動による表皮のバリア機能破壊は、ダニ抗原などに対する皮膚感作を容易にし、皮膚局所の免疫・炎症応答に大きな影響を与えると思われる。また、皮膚局所における免疫応答は、全身免疫系でのそれとは本質的に異なる応答をしているかもしれない。ここでは、本マウスの皮膚局所における免疫・炎症応答を、微粉碎 KGM がどのように調節するかについて調査した。

2-1. 実験の材料および方法

実験動物と飼育

第1章での検討と同様に、NC/Nga マウス (4週齢, ♂, Conventional grade) を、各飼料と水で9週間飼育した。微粉碎 KGM 添加飼料は、コントロール飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) に S-p または Z-p を5重量%の割合で添加したものを使用した。同週齢の SPF (Specific Pathogen Free) 環境下で飼育した NC/Nga マウスを、日本 SLC 株式会社から購入し、ネガティブコントロールとして使用した。

耳介厚みの測定

13週齢において、マウスの両側耳介厚みを thickness gauge (ASKER SDA-12, 高分子計器㈱, 京都) を用いて測定した。

組織病理学的観察

耳介厚みの測定後、耳介部の組織標本を作製し、皮膚局所の炎症を組織病理学的に評価した。以下にその手順を示す。

マウスの耳介部を、10%ホルマリン溶液に浸し、2日以上固定した。

固定終了後、上昇エタノール系列 (70%, 80%, 90%, 100%, 100%) に耳介組織を所定の時間 (24 hr, 12 hr, 6 hr, 2 hr, 2 hr) 漬けていき、脱水処理を行った。その後、レモゾール® A (和光純薬) に浸漬 (30分×3回) させ、脱アルコールを行った。

63°Cで溶かしたパラフィンに組織を浸漬し (1.5時間×2回)、パラフィンを浸透させた。

その後、耳介組織をパラフィンとともに型に入れ、冷却台の上で固定した。

組織を固定したパラフィンブロックを、回転式マイクローム（ライカ）によって5~8 μm の厚さに薄切した。その後、スライドガラスにその切片を貼付け、組織切片を作製した。

皮膚における形態学的変化と、単核球および好酸球の浸潤をヘマトキシリン・エオジン染色によって調査した。単核球と好酸球は、400倍視野あたりの細胞数をカウントし、5視野の平均値で評価した。マスト細胞の浸潤は、トルイジンブルー染色によって評価した。200倍視野あたりのマスト細胞数をカウントし、3~5視野の平均値で評価した。また、CD3陽性T細胞を、抗CD3抗体を用いた免疫組織染色によって評価した。CD3陽性T細胞は、400倍視野あたりの細胞数をカウントし、5視野の合計の平均値で評価した。以下に各種染色法の手順を示す。

ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色

作製した耳介切片を、レモゾールに浸漬（1分×3回）させ脱パラフィンをした後、減少エタノール系列（100%、100%、90%、80%、70%）にそれぞれ20秒ほど浸し、脱水処理を行った。組織切片をマイヤーのヘマトキシリン液（和光純薬）に3~5分浸漬した後、10分間の流水水洗を行い、1%エオジン液（和光純薬）で3~5分染色した。その後、上昇エタノール系列（70%、80%、90%、100%、100%）およびレモゾールに、手早く2~3秒くらいで連続的に浸し、最後にカナダバルサムで封入した。

トルイジンブルー染色

H&E染色と同様に脱パラフィンと脱水処理を行った後、流水水洗を10分間行った。その後、0.05%トルイジンブルー溶液（和光純薬）で30分間染色した。その後、100%アルコール溶液（1分×5回）に浸し、最後にカナダバルサムで封入した。

CD3陽性T細胞の免疫組織染色

各群の耳介切片の脱パラフィンと脱水処理を、H&E染色と同様に行った後、水洗した。オートクレーブで抗原賦活処理（120℃、10分）をした後、内因性ペルオキシダーゼの不活化とブロッキング処理を行った。その後、1次抗体反応を Polyclonal rabbit anti-human CD3 抗体（DAKO社、マウスとの交差反応性確認済み）を用いて行った（4℃、1時間）。PBSで洗浄した後、ビオチン標識2次抗体（Biotin-anti-rabbit IgG）で反応させた。その後、PBSで洗浄し、DAB試薬で発色させた。最後に、ヘマトキシリンで核染色を行い、透徹した。

血中のダニ抗原特異抗体価の分析

12 週齢において採血を行い、血漿中のダニ抗原特異 IgG1, IgG2a および IgE 抗体価を ELISA 法で分析した。ダニ抽出物 (*Dermatophagoides farinae*) は、LSL 株式会社 (東京) から購入し、試薬は Total IgE の分析の項で記載したものと同一ものを使用した。以下に分析の手順を示す。

ELISA プレートに PBS で希釈したダニ抽出物 (5 µg/ml) を 100 µl 入れ、4°C で一晩静置した。プレートを洗浄し、ブロッキング処理を 1 時間行った後、ブロッキングバッファーで希釈した血漿サンプル (IgG1, ×500 ; IgG2a, ×50 ; IgE, ×5) を 100 µl 添加し、室温で 2 時間以上反応させた。プレートを洗浄した後、250 倍希釈した検出用抗体 (biotinylated rat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgE mAbs, BD Pharmingen) を 100 µl 加え、室温で 2 時間反応させた。その後、1000 倍希釈した AKP-streptavidin (Pharmingen) を 100 µl 加え、室温で 1 時間反応させた。最後に、プレートを十分に洗浄し、Attophos® fluorescent substrate system (Promega Corporation, Madison, Mish., USA) を用いて蛍光強度を測定した。

皮膚局所におけるサイトカイン、ケモカイン、サブスタンス P および IgE 量の分析

13 週齢において、マウスの背部の毛をハサミでカットし、各群から皮膚を採取した。皮膚を 0.2 g (約 15×15 mm² 片) の大きさに切り取り、PBS で軽く洗浄した。その後、2 ml のタンパク抽出液 (CellLytic™ MT; Sigma) に 20 µl の protease inhibitor cocktail (Sigma) とともに皮膚片を入れ、ポリトロンホモジナイザー (PT2100; Kinematica, Switzerland) でばらばらになるまで破碎した。破碎液は、すぐに遠心分離 (500 g, 10 分間) を行い、得られた上清は分析まで -80°C で保管した。

破碎上清中のサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α), Th2 ケモカイン (TARC), サブスタンス P 量を以下の検出キットを用い、ELISA 法により分析した。分析は、各メーカーの推奨するプロトコールに従った。また、破碎上清中の IgE 量を血中 Total IgE 量と同様の方法で分析した。以下に各 ELISA 分析で使用したキットを示す。

IL-2, IL-4, IL-10 および IFN-γ : Mouse Th1/Th2 ELISA Ready-SET Go! (eBioscience, San Diego, Calif., USA)

TNF-α : Mouse TNF-α ELISA Ready-SET Go! (eBioscience)

Th2 ケモカイン (TARC) : Mouse TARC/CCL17 Duoset Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minn., USA)

サブスタンス P : Substance P ELISA Kit (R&D Systems)

2-2. 結果

13週齢における各群のマウスの外観写真を、Fig. 15 (a)-(c)に示す。また、耳介の厚みを測定した結果を、Fig. 15 (d)に示す。コントロール群における皮膚の炎症部位は、マウスが後肢で引っ掻く場所に限定的で、顕著な耳介肥厚がみられたが、微粉碎 KGM (PKGM) 群では、これらの症状が有意に抑制された。

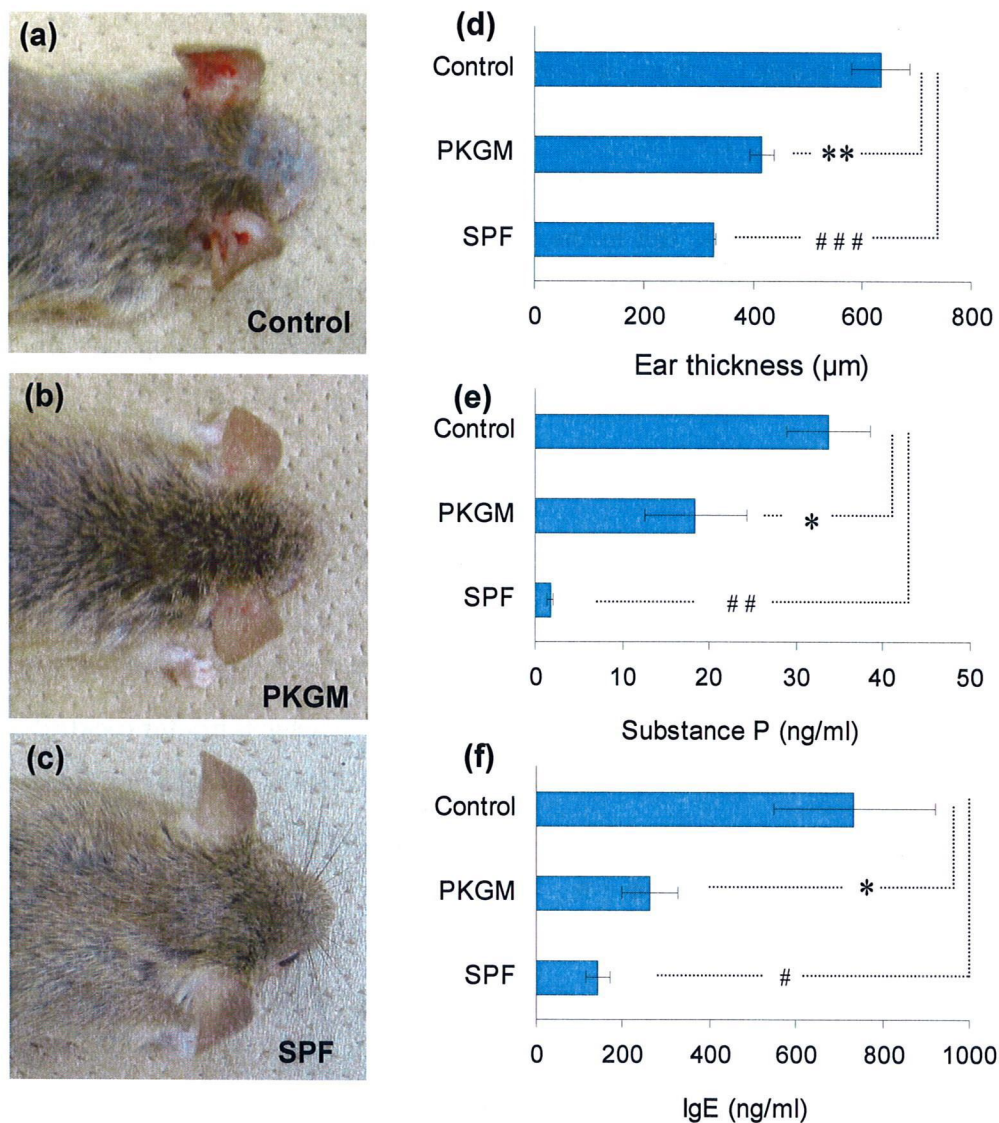


Fig. 15. Inhibitory effects of pulverized KGM (PKGM) on ear swelling and cutaneous substance P and total IgE levels in 13-wk-old NC/Nga mice. Representative photographs of clinical characteristics in NC/Nga mice (a)-(c). Ear thickness (d) in mice was measured by a thickness gauge. Substance P (e) and total IgE levels (f) in skin were measured by ELISA. Values are expressed as means \pm SE with 5 mice for ear thickness (d), 4-5 mice for substance P levels in skin (e), or 5 mice for total IgE levels in skin (f) per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, control mice vs. PKGM-fed mice. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, control mice vs. SPF mice.

皮膚局所におけるサブスタンス P および IgE 量を分析した結果を, Fig. 15 (e)および(f)に示す。コントロール群では, サブスタンス P および IgE の高産生が認められたが, 微粉砕 KGM (PKGM) 群では, いずれも有意な抑制作用がみられた。

次に, 皮膚局所の炎症応答に対する影響を組織病理学的に評価した。ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色の結果の 1 例を, Fig. 16 に示す。また, 真皮における単核球, マスト細胞および好酸球の浸潤数を調査した結果を, Fig. 17 に示す。

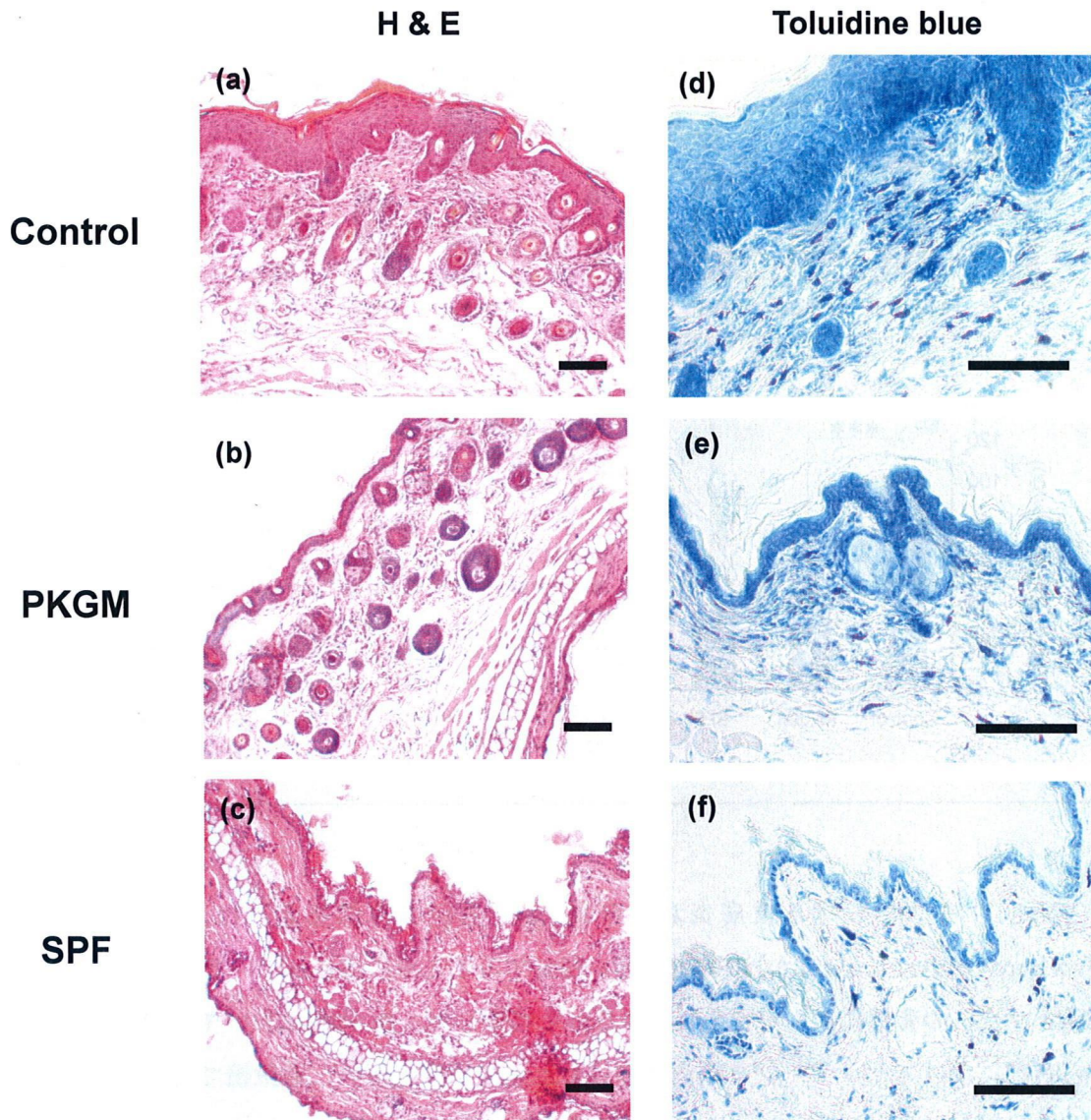
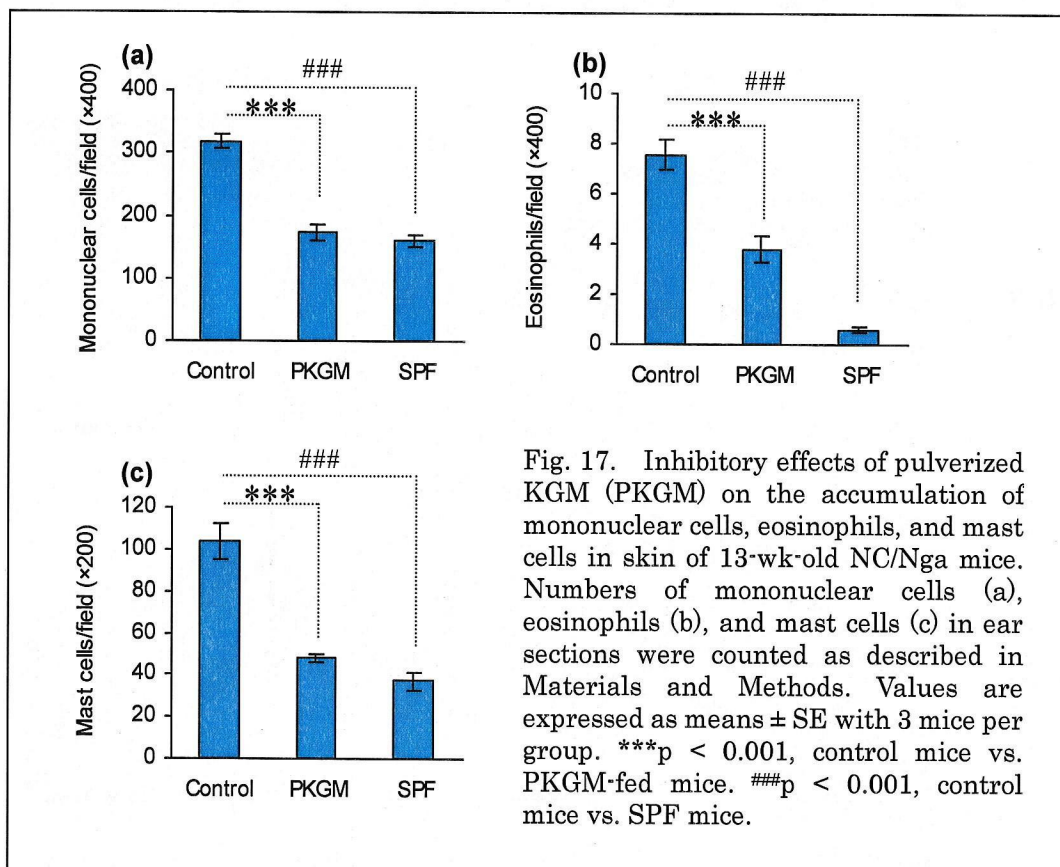


Fig. 16. Representative photographs of histological [hematoxylin and eosin (a-c); toluidine blue (d-f)] characteristics in NC/Nga mice: control-fed mice kept under conventional conditions (a and d); PKGM-fed mice kept under conventional conditions (b and e); and control-fed mice kept under SPF conditions (c and f). Histological sections were observed using a $\times 100$, $\times 200$, or $\times 400$ magnification lens. Scale bar = 100 μm .

コントロール群では、著明な表皮肥厚（表皮角化症）と単核球および好酸球の高浸潤を伴う皮膚炎症が観察されたが、微粉碎 KGM 群ではこれらの有意な抑制作用が確認された。またトルイジンブルー染色による観察では、真皮へのマスト細胞の著しい浸潤とその脱顆粒がコントロール群においてみられたが、微粉碎 KGM 群ではそれらの有意な抑制作用が認められた。



NC/Nga マウスにおける皮膚炎および高 IgE 血症の自然発症には、ケクイダニ (*Myocoptes musculus* ほか) の寄生が深く関与することが指摘されている^{26,39}。そこで、NC/Nga マウスの背部にダニが寄生しているかを調査した。10 週齢において、マウスの頸部から背部にかけてセロテープを軽く貼付けることで採取を行い、顕微鏡でその確認をしたところ、確かに寄生していた。走査型電子顕微鏡で観察したダニの写真を、Fig.18 に示す。

表皮バリア機能の破壊によって、ダニ抗原に対する皮膚感作が誘導されると考えられたため、次に、ダニ抽出物 (*D. farinae*) に対する血中特異抗体価 (IgE, IgG1 および IgG2a) を調査した。12 週齢の血漿を用いて分析した結果を、総抗体量とともに Fig. 19 に示す。コントロール群においてダニ特異 IgE 抗体価の上昇が認められたが、微粉碎 KGM 群では

その有意な減少が確認された。ダニ特異 IgG1 抗体価も同様の抑制効果がみられたが、統計的な有意差は得られなかった ($p=0.07$)。ダニ特異 IgG2a 抗体価に関しては、SPF 群と比較すればコントロール群では有意に上昇したが、微粉砕 KGM 群との間に差はなかった。

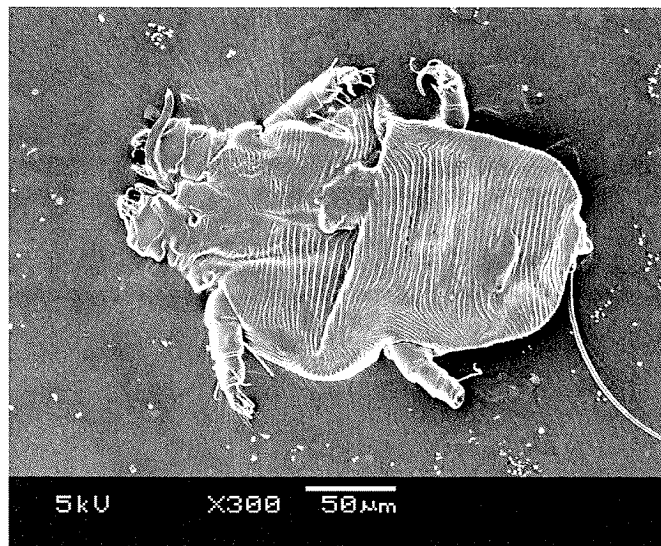


Fig. 18. Scanning electron micrograph of fur mite infested on skin of NC/Nga mice.

皮膚局所の免疫応答に及ぼす微粉砕 KGM の影響を調査するため、皮膚のサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ および TNF- α) および Th2 ケモカイン (TARC) 量を分析した。それらの結果を Fig. 20 に示す。皮膚炎を発症したコントロール群では、IL-4, IL-10, IFN- γ および TNF- α の著しい増加が確認された。これに対して、微粉砕 KGM 群では、IFN- γ に統計的な有意差がみられなかったものの ($p=0.064$)、それらがいずれも著明に抑制された。IL-2 量は、群間での差が認められなかった。これらの結果から、微粉砕 KGM の摂食は、NC/Nga マウスの搔破行動を抑制するとともに、皮膚局所における免疫・炎症応答を幅広く抑制していると考えられた。

次に、皮膚局所における CD3 陽性 T 細胞の浸潤を免疫組織染色によって調査した。その結果を Fig. 21 に示す。予想外にも、皮膚炎を発症したコントロール群では、皮膚における CD3 陽性 T 細胞の数は顕著に減少していた。一方、微粉砕 KGM 群と SPF 群では、コントロール群と比較すれば多くの T 細胞がみられたが、その殆どが表皮に局在していた。この結果から、NC/Nga マウスの病態形成において、皮膚局所における Th2 細胞の関与は低いことが推察された。

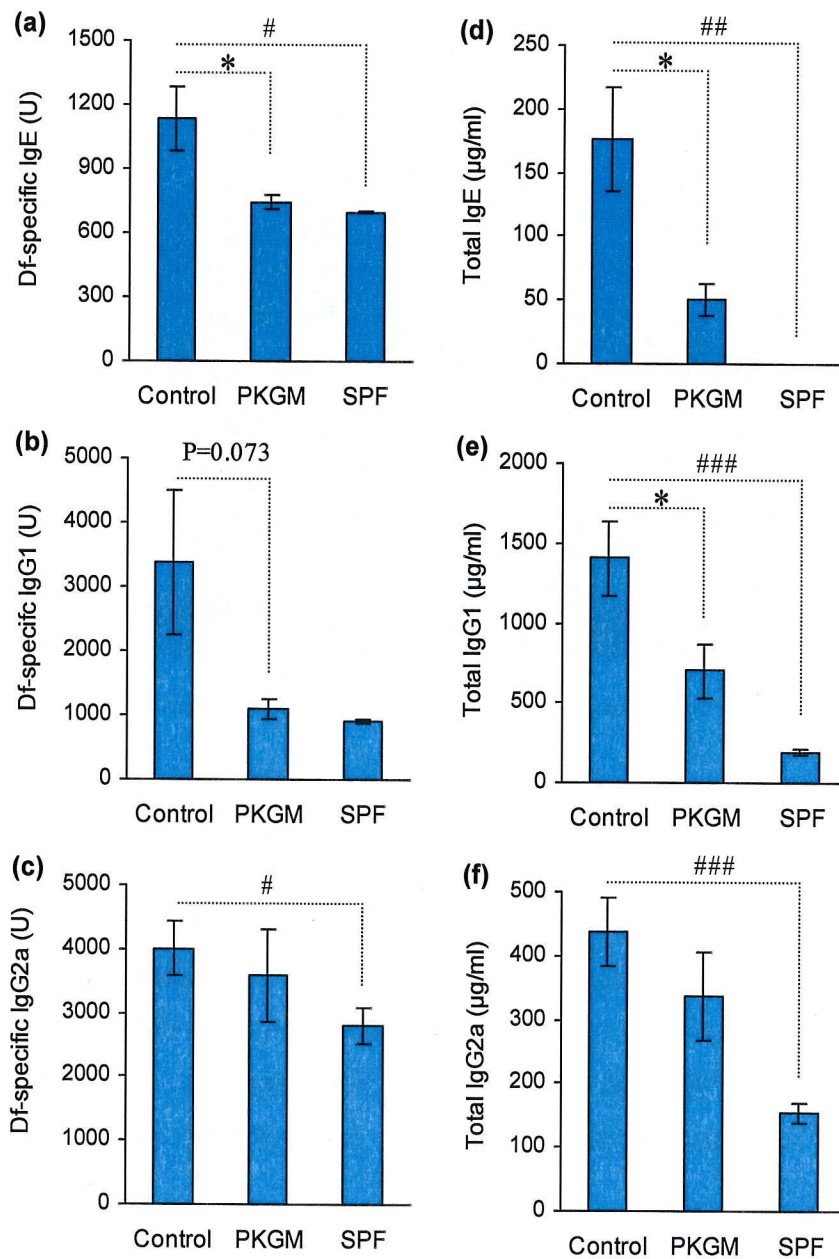


Fig. 19. Effects of pulverized KGM (PKGM) on total and mite (*D.farinae*)-specific IgE, IgG1, and IgG2a levels in plasma of 12-wk-old NC/Nga mice. Plasma IgE (a), IgG1 (b), and IgG2a (c) levels specific to mite (Df) extracts were measured by ELISA, as described in Materials and Methods. Total IgE (d), IgG1 (e), and IgG2a (f) levels in plasma were quantified by sandwich ELISA. Values are expressed as means \pm SE with 5-6 mice per group. * $p < 0.05$, control mice vs. PKGM-fed mice. # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, control mice vs. SPF mice.

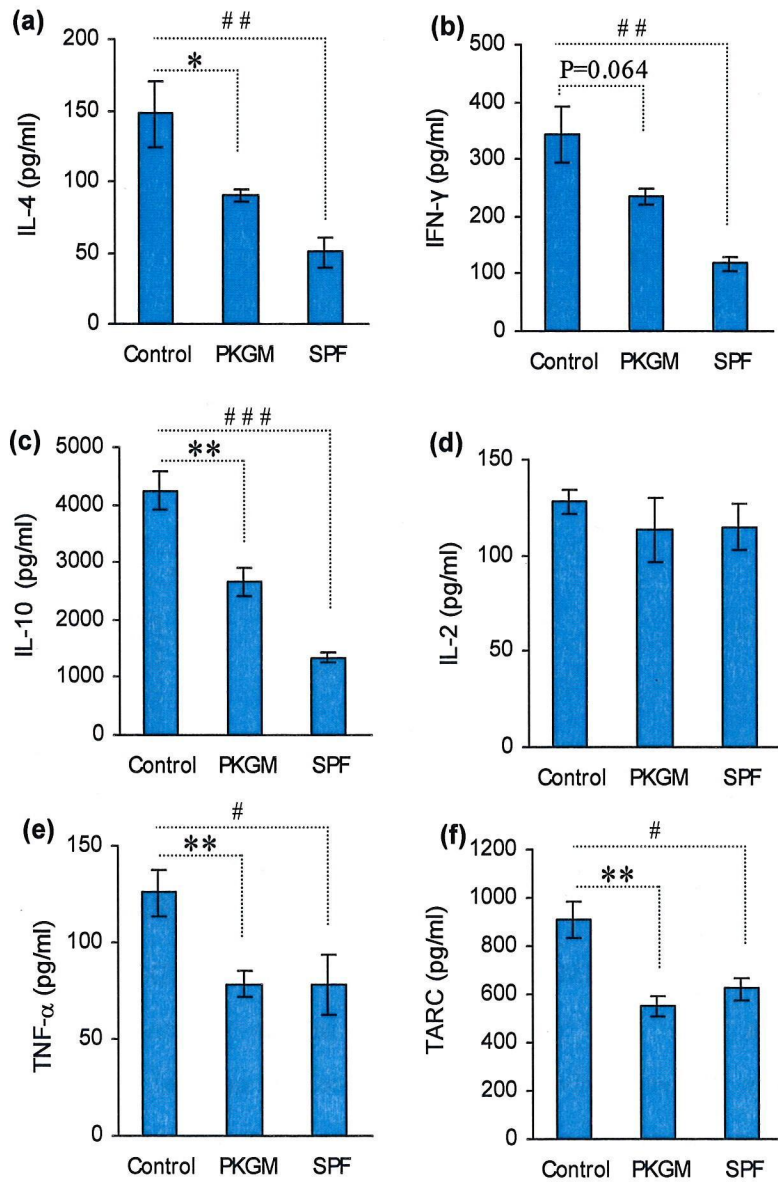


Fig. 20. Effects of pulverized KGM (PKGM) on cytokines and TARC levels in the dorsal skin of 13-wk-old NC/Nga mice. Levels of IL-4 (a), IFN- γ (b), IL-10 (c), IL-2 (d), TNF- α (e), and TARC (f) in the back skin were quantified by sandwich ELISA. Means \pm SE with 5 mice per group. * p < 0.05, ** p < 0.01, control mice vs. PKGM-fed mice. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, control mice vs. SPF NC/Nga mice.

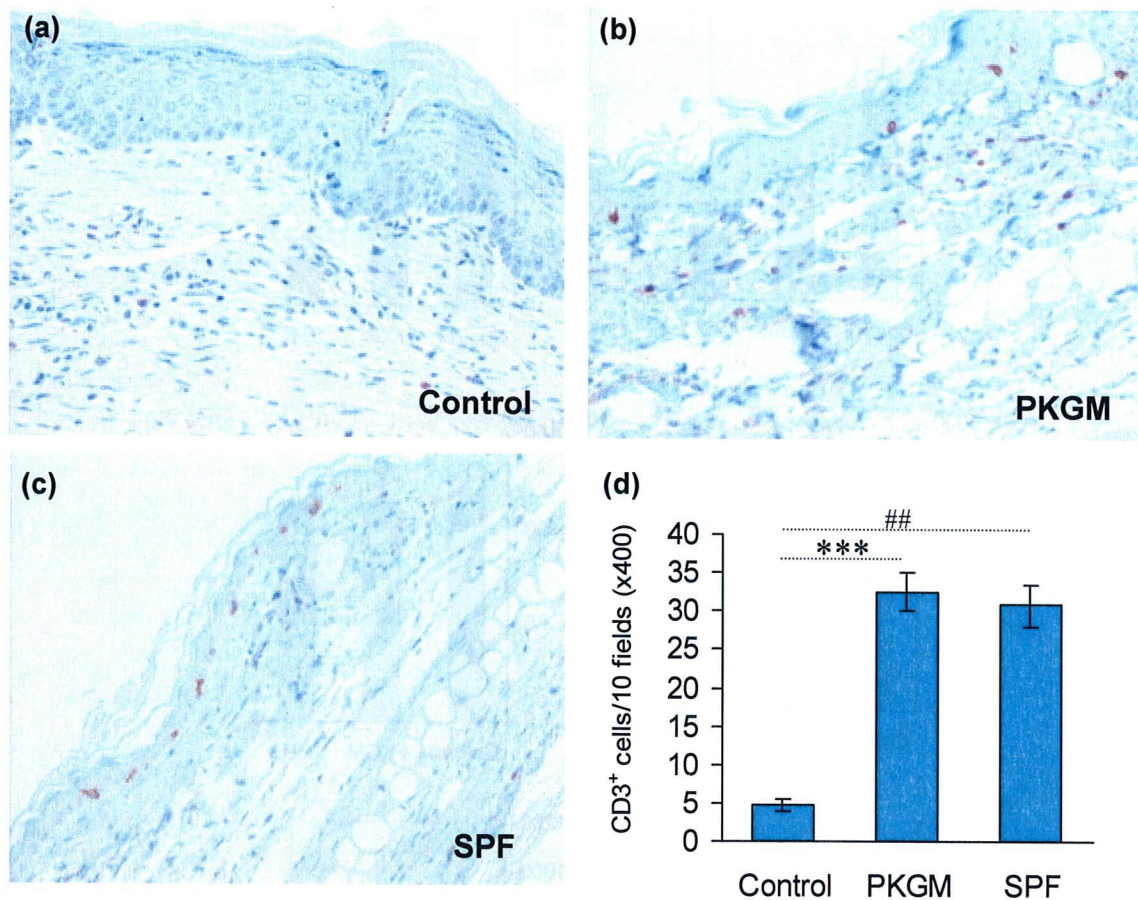


Fig. 21. Effects of pulverized KGM (PKGM) on the infiltration of CD3⁺ T cells in the skin of 13-wk-old NC/Nga mice. CD3 positive T cells in ear sections were stained by immunohistochemistry. Representative photographs in control mice (a), PKGM-fed mice (b), and SPF mice (c). Total numbers of CD3⁺ T cells were counted in 10 fields at ×400 magnification, in sections from 4 different mice (d). Means ± SE of 4 mice per group. ***p < 0.001, control mice vs. PKGM-fed mice. ##p < 0.01, control mice vs. SPF NC/Nga mice.

第3節 考察

第2章では、微粉砕 KGM のアトピー性皮膚炎 (AD) 様病態および高 IgE 血症の抑制における作用メカニズムの解明を目的とし、まず、全身免疫系の T 細胞応答に及ぼす影響を調査した。抗マウス CD3 と CD28 抗体の刺激による脾臓 T 細胞のサイトカイン産生能を調べた結果、IL-4 および IFN- γ の産生量はいずれも微粉砕 KGM 群において減少していた (Fig. 13)。また、血漿中の Total IgG1 および IFN- γ 量に有意な抑制作用がみられ、Total IgG2a 量も微粉砕 KGM 群では減少傾向にあることが判った (Fig. 14)。これらの結果から、微粉砕 KGM にみられる AD 様病態の抑制作用は、Th1/Th2 バランスの是正ではなく、本疾患の過剰な全身免疫応答に対してトレランスを誘導することが深く関与すると示唆された。

近年の研究では、AD の発症および慢性化には、Th1 と Th2 応答の両者が重要な役割をもつことが報告されているが⁴⁰、とくに慢性期では Th1 応答がその主役を演じることなどが指摘されている⁴¹。慢性 AD 患者においては、良好な治験後、皮膚局所における IL-4 発現に変化はないが、IFN- γ が著明に減少する⁴²。実際には、STAT6 を欠損させた NC/Nga マウスは、Th2 応答 (IL-4, IL-5 および IgE 産生など) が欠落するにも関わらず、激しい皮膚炎が惹起され、炎症局所において IL-18 や IFN- γ の高産生ならびに好酸球やマスト細胞の高浸潤が認められる²⁷。この報告の中では、IFN- γ 産生が NC/Nga マウスの病態発現に重要な因子となることが指摘されている²⁷。また、TGF- β の投与やローヤルゼリーの摂取が、IFN- γ 産生の抑制とともに NC/Nga マウスの AD 様病態を抑制することなどが明らかになっている^{43,44}。この様に、従来、I 型アレルギー疾患において病態を抑制的に調節する因子として考えられてきた Th1 (IFN- γ) 応答に再考すべき知見が多く得られているが、微粉砕 KGM にみられる作用は、これらの知見を後押しするものではないかと推察された。

NC/Nga マウスの炎症部位は、マウスが後肢で引っ掻く場所に限定的で、頸部、耳介部および顔面での炎症がとくに顕著であったが、微粉砕 KGM 群では、搔破行動の抑制とともにそれらの症状が著明に抑制された (Fig. 15)。これらの所見は、搔破による表皮バリア機能の破壊が皮膚炎の誘導・悪化因子のひとつになるという見解^{35,36,41}を強く支持するものと思われた。搔破による表皮のバリア機能破壊は、皮膚局所の免疫・炎症応答に多大な影響を与えると思われるが、この局所応答は、全身免疫系でのそれとは本質的に異なる応答をしているかもしれない。そこで次に、微粉砕 KGM の皮膚免疫応答への影響を調査した。

マスト細胞上の IgE レセプターの刺激は、ヒスタミン、サブスタンス P およびキマーゼなど各種の炎症メディエーターの分泌を誘導するが^{45,46}、これらのメディエーターは痒みと搔破を誘起することから⁴⁷、マスト細胞は AD の発症・悪化に重要な役割を担うと考えられている。ハプテンで皮膚炎を誘導した NC/Nga マウスの皮膚局所には、サブスタンス P 陽性のマスト細胞と神経線維の高発現が認められ³⁷、また、サブスタンス P の拮抗薬

(BIIF1149CL)が本マウスの搔破行動と炎症を抑制することが報告されている³⁸⁾。さらに、キマーゼの抑制薬 (SUN-C8257) が本マウスの皮膚炎を著明に抑制することが明らかにされている⁴⁶⁾。本研究では、微粉砕 KGM の摂取によって、皮膚におけるマスト細胞浸潤とサブスタンス P 産生量が有意に減少した (Fig. 15 e, Fig. 16 d-f, Fig. 17 c)。それらの結果は、微粉砕 KGM の搔破行動および AD 症状の抑制作用に、マスト細胞浸潤とサブスタンス P の減少が強く関与することを示唆している。

NC/Nga マウスの皮膚炎の自然発症には、ケクイダニ (*Myocoptes musculus* ほか) の寄生の関与が指摘されているが^{26,39)}、実際に、マウスの皮膚にダニの寄生が認められた (Fig. 18)。皮膚炎を発症したコントロール群のマウスでは、ダニ (*D. farinae*) 特異 IgE および IgG1 抗体価の上昇と皮膚局所の Total IgE 量の増加が確認されたが、微粉砕 KGM 群ではそれらの著明な抑制作用がみられた (Fig. 15 f, Fig. 19 a-c)。これらの知見から、微粉砕 KGM の搔破行動の抑制作用が、表皮バリア機能の破壊とそれに伴う経皮感作の防止に寄与していると考察することもできるだろう。

NC/Nga マウスにおける AD 病態の特徴のひとつに、表皮の肥厚 (過角化症) が挙げられるが²⁵⁾、IFN- γ によって誘導されるケラチノサイトのアポトーシスが、AD における皮膚肥厚に重要な役割を担うことが明らかにされている⁴⁸⁾。本研究においても、コントロール群のマウスでは耳介部の肥大と表皮角化症が観察されたが、微粉砕 KGM 群ではそれらの著明な抑制作用がみられた (Fig. 15 d, Fig. 16 a-c)。皮膚局所における IFN- γ 量は、微粉砕 KGM 群で統計的な有意差はなかったものの ($p=0.064$)、減少傾向にあった (Fig. 20 b)。それらの知見を、全身免疫応答においてみられた IFN- γ の抑制作用 (Fig. 13 b, Fig. 14 c) と併せて考察すれば、微粉砕 KGM の表皮角化症の抑制作用に、IFN- γ の抑制が深く関与していることが示唆された。

NC/Nga マウスの炎症局所においては、AD 患者と同様に IL-10 の高い産生が認められる^{49,50)}。また、皮膚表面への物理的・化学的・生物学的刺激による刺激が、表皮のケラチノサイトから IL-10 を高発現させることが明らかにされている^{51,52)}。これらの知見から、微粉砕 KGM による搔破行動の抑制作用が、NC/Nga マウスの局所 IL-10 産生の抑制に強く影響することが示唆された。抗原 (OVA) による AD 誘発モデルを用いた研究では、抗原提示細胞によって産生される IL-10 が、抗原特異的に誘導される Th2 応答ならびに好酸球浸潤に対して重要な因子となることが指摘されている⁵¹⁾。Th2 ケモカインとして知られる TARC は、TNF- α と IFN- γ の刺激によってケラチノサイトから分泌されるが⁵³⁾、AD 患者の場合と同様に本マウスの皮膚局所で高産生が認められる^{54,55)}。IL-10 は、この TARC の産生を増強することも明らかになっている⁵³⁾。さらに、IL-10 に対するアンチセンス鎖 (オリゴヌクレオチド) を炎症局所に注入すると、NC/Nga マウスの病態を著明に改善することが報告されている⁴⁹⁾。

本研究においては、皮膚局所における好酸球の高浸潤ならびに IL-10, IL-4, IFN- γ , TNF- α および TARC の著しい産生がコントロール群で認められたが、微粉碎 KGM 群ではこれらの応答の著明な抑制作用がみられた (Fig. 17 b, Fig. 20)。これらの結果を上述の知見と併せて考察すると、微粉碎 KGM の IL-10 抑制作用が、好酸球浸潤を伴う皮膚炎症と Th2 応答の防止に深く寄与していると考えられた。

しかしながら、実際には NC/Nga マウスの病態発現に、Th2 応答は必ずしも必要ではないことが報告されている²⁷⁾。この事実は、本マウスの病態形成メカニズムを考えるうえで大変重要であろう。一方、NC/Nga マウスの皮膚局所には、マスト細胞が著しく蓄積されるが、これらは IL-4 および IL-5 を高産生することが報告されている²⁵⁾。また本マウスの病態抑制において、マスト細胞浸潤の抑制がとくに重要であるとの指摘もある⁵⁶⁾。本研究において、皮膚局所の CD3⁺T 細胞の浸潤を調べたところ、予想外にも AD を発症したコントロール群では、微粉碎 KGM 群および SPF 群と比較して、その顕著な減少が認められた (Fig. 21)。これに対して、皮膚におけるマスト細胞浸潤と IL-4 および TNF- α の産生量は、微粉碎 KGM 摂取群で有意に抑制されていた (Fig. 20 a, e)。IgE 刺激応答によって、TNF- α がマスト細胞から分泌されることは良く知られている⁵⁷⁾。ごく最近の研究では、皮膚に誘導された TSLP (Thymic stromal lymphopietin) の刺激によってマスト細胞が活性化されると、それらが Th2 サイトカインを高産生し、T 細胞非依存的な炎症を惹起することが明らかにされている⁵⁸⁾。これらの知見から総合的に考察すれば、NC/Nga マウスの局所炎症応答は主として「マスト細胞応答」に起因している、と考えることができ、また微粉碎 KGM による AD 抑制作用には、Th2 細胞よりもむしろマスト細胞の応答抑制が関与していると推察された。

本研究の中ではまだ明らかにできていないが、全身的な免疫応答の調節において、消化管での粘膜免疫応答への関与が考えられる。経口摂取された食品成分に対して最前線の応答を担う消化管応答は、微粉碎 KGM の作用メカニズムを考えるうえでも無視することはできない。近年では、免疫系を介して生体に良い影響を与えるプロバイオティクスが多く報告されているが^{59,60)}、KGM を始めとした食物繊維は、腸内細菌叢を改善するプレバイオティクスとして注目されるようになってきている^{61,62)}。

高粘性 KGM の摂取は、大腸における *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* の菌数を増加させるが^{17,18,63)}、低分子化した KGM ではその作用が増強されることが報告されている¹⁸⁾。また KGM の摂取が、盲腸の内容物重量を増加させ、腸管での IgA 産生を増強することなどが明らかにされている²³⁾。Kalliomäki らは小児のアトピー患者では、健常小児と比較して糞便中の *Bifidobacterium* が少なく、逆に *Clostridium* の割合が多くなっていることを報告している⁶⁴⁾。またアレルギー症状を有する妊娠中の母親と出産後の乳児に、乳酸菌

(*Lactobacillus rhaminosus* GG) を経口投与すると、2歳までに乳児がアトピー性皮膚炎を発症する割合が半分になったことを報告している⁶⁵⁾。微粉末化されたKGMの摂取では、その表面積の増大によって腸内細菌や酵素への接触が増し、大腸内における醗酵分解を受けやすくなる、と推定できる。実際に、微粉末化した小麦ふすまを摂取すると、大腸内での醗酵効率が増強され、便通が促進されることが報告されている⁶⁶⁾。本研究においても、各種KGMの摂取により、盲腸内容物の増加が認められた。微粉碎KGMのAD抑制作用が、造粒処理によって消失した結果は、全身的な免疫応答の調節に腸管内での醗酵分解のされ易さが影響することを示唆しているのかもしれない。ごく最近の研究では、腸管での抗原刺激によって、未熟T細胞がFoxp3を発現し、腸間膜のCD103⁺樹状細胞との相互作用から制御（抑制）性T細胞に分化することなどが明らかにされている⁶⁷⁾。今後は、摂取された微粉碎KGMの腸管内における分解（醗酵）反応、またそれに伴って得られた産物による粘膜免疫応答への刺激作用、などについての解明が重要であろう。さらに微粉碎KGMによるダイレクトな物理的刺激的刺激の作用についても、検討の必要があるだろう。

【第3章】 微粉碎 KGM のアレルギー性鼻炎抑制作用に関する検討

前章での AD モデル (NC/Nga マウス) を用いた検討から、抗アレルギー食品素材として微粉碎 KGM が有用であることが示唆された。しかしながら、本モデルは病態の誘発因子が明確でないこともあり、免疫調節のメカニズムを考えるうえでは、感作抗原が明確な系での検討が肝要である。また、その他の I 型アレルギー疾患モデルでの有効性の調査は、産業への応用を図るうえで大変有意義である。本章では、卵白アルブミン (OVA) をマウスに免疫・点鼻感作する系を用いて、微粉碎 KGM の抗原 (OVA) 特異的な免疫応答への影響を調べるとともに、アレルギー性鼻炎への有効性を検討した結果について説明する。

第1節 実験の材料および方法

実験動物および飼料

4 週齢の雌性 BALB/c マウスを、日本チャールスリバー株式会社 (横浜) より購入した。1 群 6 匹に分け、 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12 時間ごとの明暗サイクルで、各種の飼料と滅菌水を自由摂取させ、SPF 環境下にて 8 週間飼育した。

第 1 章および第 2 章での研究と同様に、飼育飼料は、コントロール飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) に微粉碎 KGM (PKGM, Z-p) または高粘性 KGM (HV-KGM, PA) を 5 重量%の割合で添加したものを使用した。

感作プロトコールおよびアレルギー性鼻炎症状の評価

鼻炎モデルの免疫・感作プロトコールは、Miyahara らによって報告されている方法⁶⁸⁾を参考に実施した。7 週齢と 9 週齢において (飼育開始から 3 および 5 週後)、 $20 \mu\text{g}$ の抗原 (OVA, Sigma) と 2.25 mg の Alum アジュバント (LSL) の懸濁液 $100 \mu\text{l}$ を、マウスの腹腔内に投与した。追加免疫の 2 週間後 (11 週齢) から、OVA 溶液 (25 mg/ml solution in PBS) をマウスの両鼻腔内に $10 \mu\text{l}$ づつ (合計 $20 \mu\text{l}$) 滴下し、点鼻感作を行った。なお、点鼻感作は、毎日 1 回、麻酔をかけずに行い、合計 11 回実施した。ネガティブコントロールとして PBS を用い、同様に腹腔内投与ならびに点鼻感作を行った。

マウスのくしゃみ症状を、アレルギー性鼻炎症状として評価した。点鼻感作の後、マウスをすぐに観察用のゲージに入れ、5 分間あたりのくしゃみ回数をカウントした。

血漿中の総抗体量および OVA 特異抗体価の分析

最後の点鼻感作 (11 回目) の翌日に採血を行い、血漿サンプルを得た。血漿中の Total IgE, IgG1 および IgG2a 量を、前章と同様にサンドイッチ ELISA 法によって分析した。また、抗原 (OVA) 特異 IgG1, IgG2a および IgE 抗体価を ELISA 法で分析した。以下に分析の

手順を示す。

ELISA プレートに Bicarbonate バッファー (0.1 N NaHCO₃, pH9.2-9.5) で希釈した OVA 溶液 (100 µg/ml) を 50 µl 入れ、4°C で一晩静置した。プレートを洗浄し、ブロッキング処理を 1 時間行った後、ブロッキングバッファー (3% skim milk + 1% BSA in PBS) で希釈した血漿サンプル (IgG1, ×500 ; IgG2a, ×500 ; IgE, ×10) を 50 µl 添加し、4°C で一晩反応させた。プレートを洗浄した後、250 倍希釈した検出用抗体 (biotinylated rat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgE mAbs, BD Pharmingen) を 50 µl 加え、室温で 2 時間反応させた。その後、1000 倍希釈した AKP-streptavidin (Pharmingen) を 50 µl 加え、室温で 1 時間反応させた。最後に、プレートを十分に洗浄し、Attophos® fluorescent substrate system (Promega) を用いて蛍光強度を測定した。

細胞培養およびサイトカイン産生量の分析

脾細胞の調整と培養

前章での実験と同様に、採血後各群のマウスから脾臓をシャーレ内へ摘出した。ピンセットでそれぞれの実質細胞を扱き出し、コニカルチューブへ採取した。脾細胞は、lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 15 mM NaHCO₃, 0.1 mM EDTA2Na, pH 7.3) により、赤血球を取り除いた。それぞれ得られた細胞は、PBS で洗浄した後、抗生物質(100 U/ml penicillin および 100 µg/ml streptomycin), 2-メルカプトエタノール (50 µM) および 10% 牛胎児血清を添加した RPMI-1640 medium(Sigma) に懸濁した。その後、生細胞数(4×10⁶ cells/ml) と抗原刺激濃度 (100 µg/ml) を調整し、37°C, 5%CO₂ の条件下で 4 日間 (96 時間) 培養した。

4 日間培養した後、培養液をコニカルチューブへ移した。遠心分離 (1500 rpm, 5 分間) により、細胞を取り除き、培養上清中のサイトカイン産生量(IL-4, IL-5, IL-13 および IFN-γ) をサンドイッチ ELISA 法で分析した。

サイトカイン (IL-4, IL-5 および IFN-γ) の分析で使用する、固相用抗体、検出用抗体およびスタンダードは、全て BD Biosciences Pharmingen から購入したものを、試薬は前章における血中 Total IgE 量の分析で記載したものと同一ものを使用した。また、サンドイッチ ELISA も、前章と同様に BD Pharmingen の推奨するプロトコールに従った。また、IL-13 の分析は、Mouse IL-13 DuoSet Kit (R&D Systems)を用いて分析した。

鼻局所のマスト細胞の観察

マウスの頭部を 10%ホルマリン溶液に浸漬し、2 日以上固定した。脱灰処理をした後、前章と同様に鼻腔周辺部の組織をパラフィンに包埋した。トルイジンブルー染色によって、

鼻局所に浸潤したマスト細胞を観察した。400倍視野あたりの細胞数をカウントし、6視野の合計値を評価した。

統計解析

得られたデータは、平均値±標準誤差 (SE) で示した。各群間の有意差は、Student's t-test によって検定した。

第2節 結果

本章では、微粉碎 KGM (PKGM) のアレルギー性鼻炎症状への有効性ととも、抗原 (OVA) 特異的な免疫応答への影響を調査した。本実験のプロトコールを、Fig. 22 a に示す。

追加免疫の2週間後から、マウスに OVA の点鼻感作を行い、即時型反応であるくしゃみ症状への影響を調べた。その結果を、Fig. 22 b に示す。OVA/Alum 懸濁液を腹腔内投与したコントロール群では、8 回目の点鼻感作以降に、くしゃみ症状の著しい増加が観察されたが、微粉碎 KGM 群ではそれらの著明な抑制作用がみられた。本モデルにおいては、NC/Nga マウスの AD 症状に対しては抑制作用のなかった高粘性 KGM (HV-KGM) においても、くしゃみ症状の有意な抑制作用がみられた。しかしながら、微粉碎 KGM と比較すればその活性は弱い傾向にあった。PBS を腹腔内投与した群では、いずれの群においてもくしゃみ症状は殆ど観察されなかった。これらの結果から、アレルギー性鼻炎症状を予防する機能性食品素材としても、微粉碎 KGM が有用であると示唆された。

抗原特異的な免疫応答に対する微粉碎 KGM の影響を調査するため、次に各群における血漿中の抗体価を、ELISA 法によって分析した。最後の点鼻感作の翌日に採血を行い、OVA 特異 IgE、IgG1 および IgG2a 抗体価に及ぼす影響について調べた結果を、Fig. 23 a に示す。また、Total 抗体量について分析した結果を、Fig. 23 b に示す。コントロール群では、OVA 特異 IgE 抗体価ならびに Total IgE 量の著明な上昇がみられたが、微粉碎 KGM 群ではこれらの有意な抑制作用が認められた。また、同様に高粘性 KGM 群においても OVA 特異 IgE 抗体価の有意な抑制効果がみられ、Total IgE 量も統計的な有意差はなかったが ($p=0.07$)、減少傾向にあった。一方、本モデルにおいては、OVA 特異 IgG1/IgG2a 抗体価ならびに Total IgG1/IgG2a 量に微粉碎 KGM の摂取は影響しなかった。これらの結果から、微粉碎 KGM の摂取が、本鼻炎モデルにおいては IgE 抗体応答をより選択的に抑制する作用をもつことが明らかになった。

第2章でも触れたが、Th1/Th2 応答の両者は、互いに産生するサイトカインによって、相互の応答を抑制的に制御しており、これらの応答は、抗体産生の制御に大きな影響をもつことが知られている。微粉碎 KGM が、抗原特異的な IgE 応答をどのような機序で抑制しているかを調べるため、次に、OVA 特異的なサイトカイン産生能を調査した。各群から調整した脾細胞を、OVA で4日間培養刺激した後、サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ) 産生量を分析した (Fig. 24)。微粉碎 KGM 群および高粘性 KGM 群における Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) サイトカイン量は、いずれもコントロール群と同等の産生パターンを示した。これらの結果から、微粉碎 KGM の IgE 産生抑制作用は、Th1/Th2 バランスの制御によらない、新たなメカニズムによって誘導されることが示唆された。

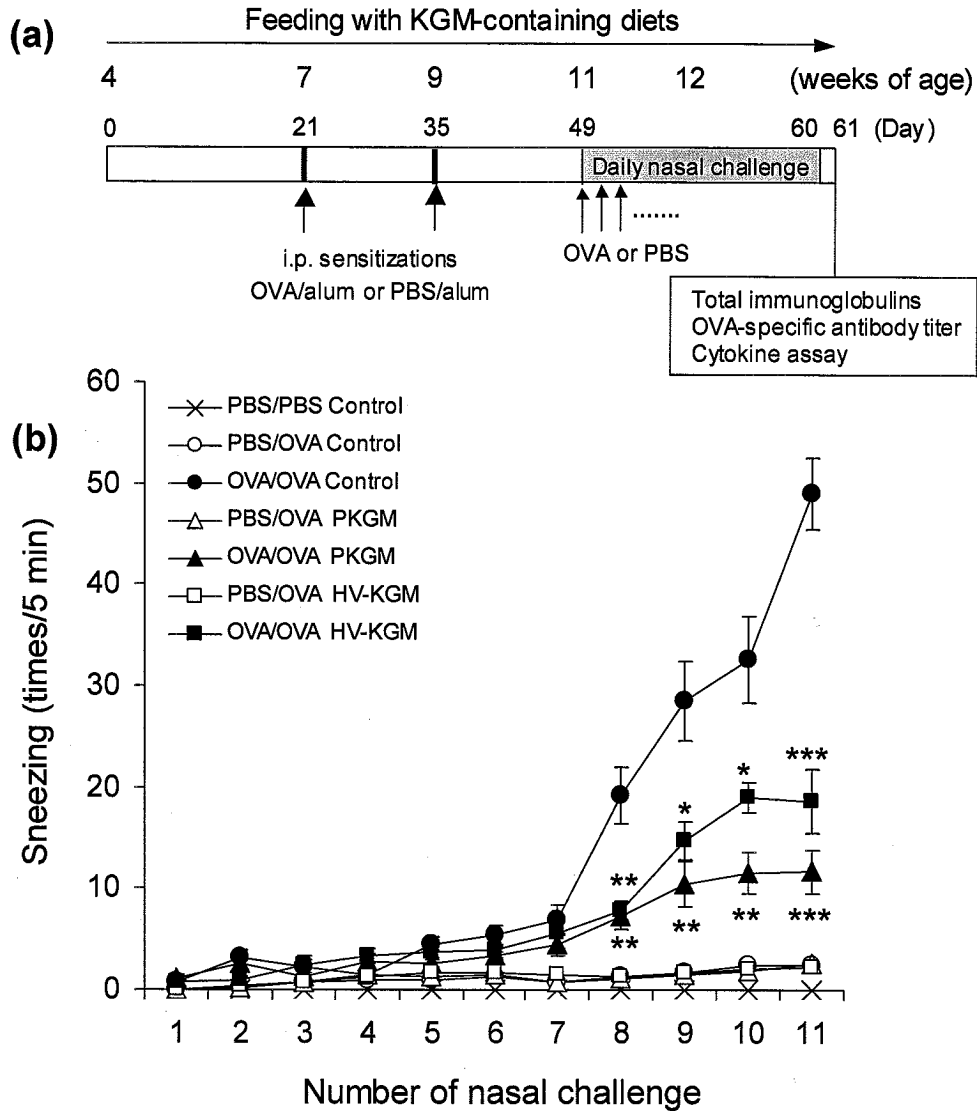


Fig. 22. Dietary pulverized KGM (PKGM) prevents the development of nasal sneezing in BALB/c mice upon sensitization with OVA. (a), Experimental scheme. Four-week-old BALB/c mice were continuously fed a PKGM- or HV-KGM-containing diet. Three weeks later, those mice were immunized and intranasally challenged with OVA, as described in “Materials and Methods”. (b), The numbers of sneezes per 5 min were counted just after nasal challenge with OVA. Values are expressed as means \pm SE with six mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. control OVA/OVA mice.

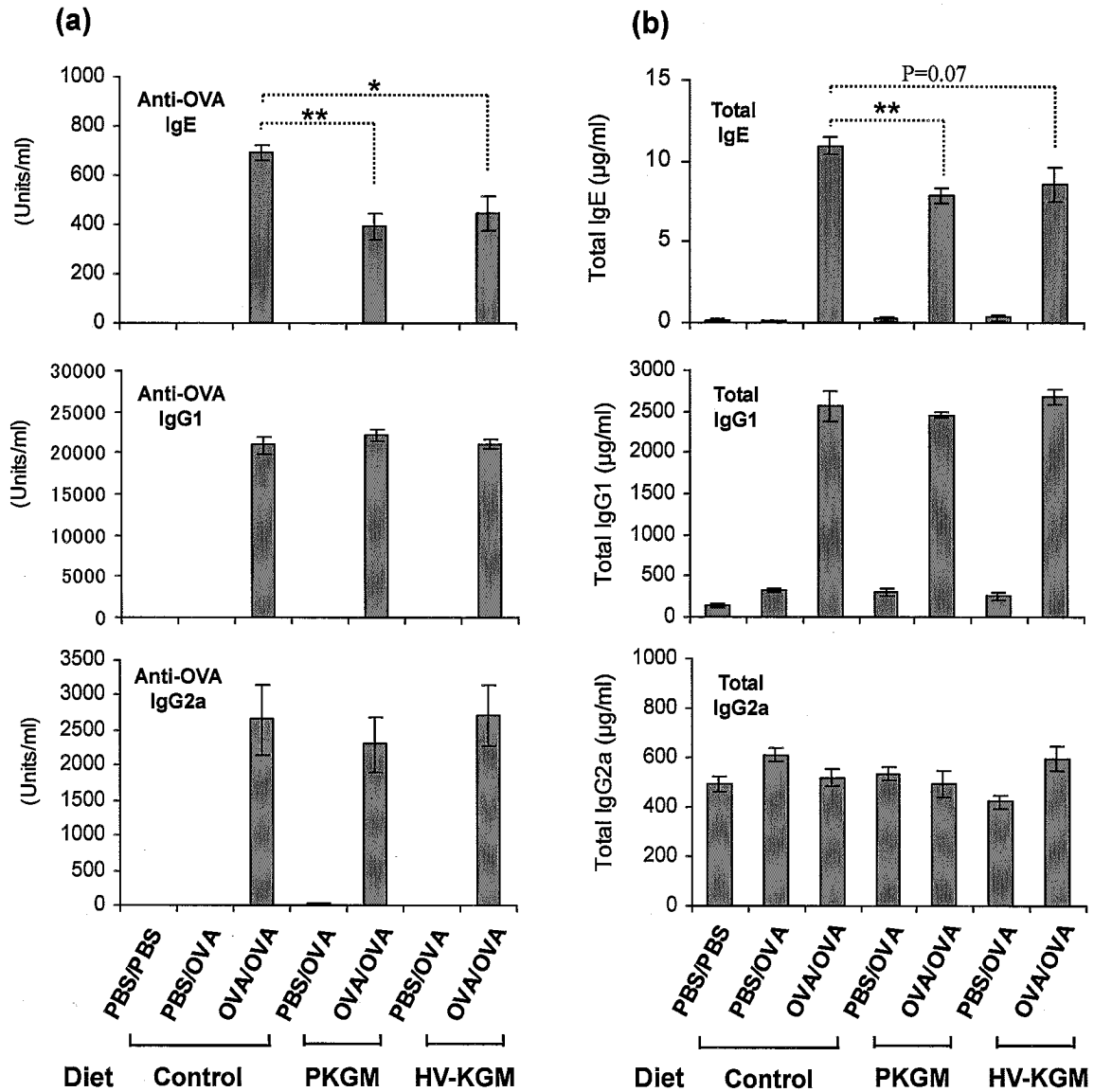


Fig. 23. Dietary pulverized KGM (PKGM) preferentially suppresses allergen-specific IgE response and total IgE Levels upon sensitization with OVA. After the eleventh nasal challenge, plasma samples were collected from each group of mice, and antibody responses were analyzed by ELISA. (a) OVA-specific IgE, IgG1, and IgG2a responses. (b) Total immunoglobulin levels. Values are expressed as means \pm SE with six mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. control OVA/OVA mice.

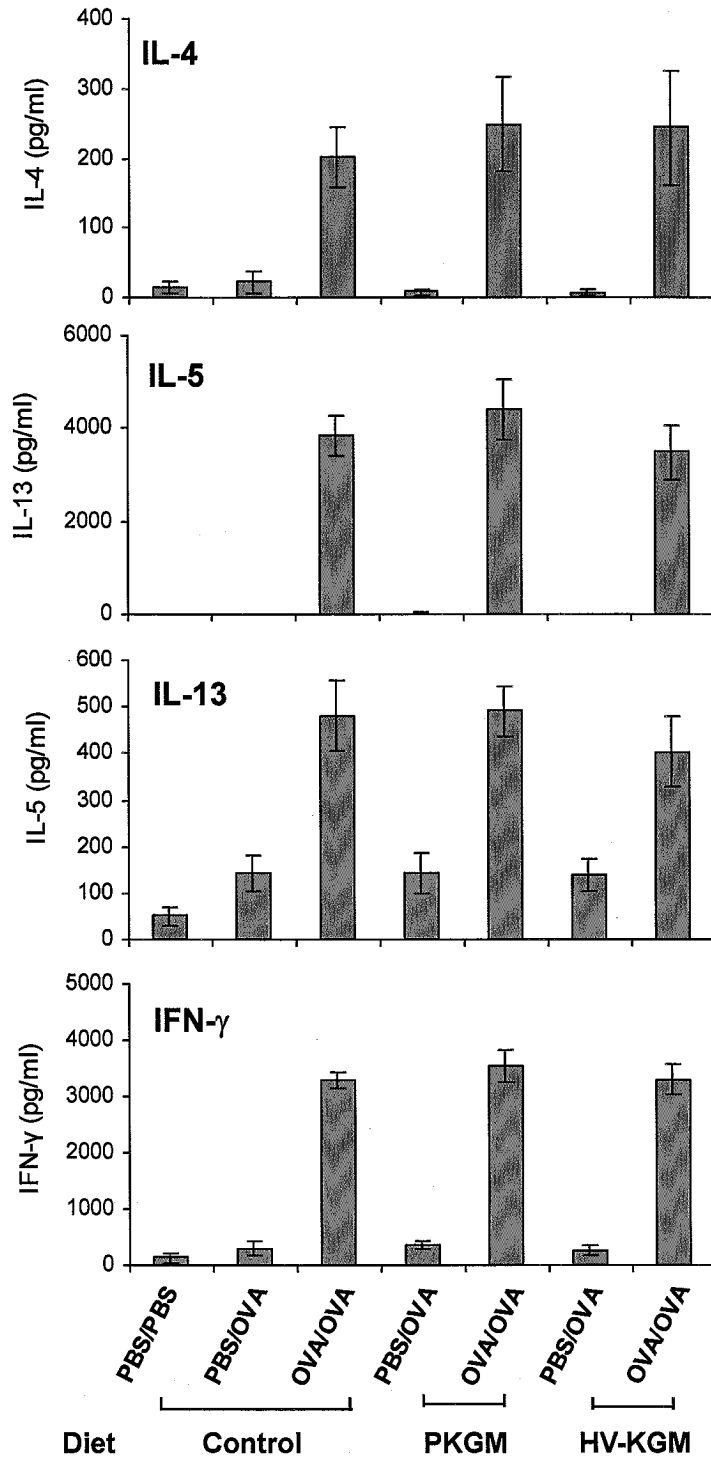


Fig. 24. Dietary KGM did not affect Th1/Th2 cytokine production by splenocytes from OVA-sensitized mice.

Total splenocytes from KGM-fed mice after the eleventh nasal challenge were stimulated with OVA for 96 h, and IL-4, IL-5, IL-13, and IFN- γ levels in the culture supernatant were quantified by sandwich ELISA, as described in "Materials and Methods". Values are expressed as means \pm SE with 6 mice per group.

くしゃみ症状の抑制作用を示した KGM が、鼻局所の炎症応答にどのように影響しているかを調査するため、次にマスト細胞の浸潤を観察した。その結果を Fig. 25 に示す。コントロール群では、点鼻感作によってマスト細胞の著明な浸潤が観察されたが、微粉砕 KGM (PKGM) 群では有意な減少が確認された。高粘性 KGM (HV-KGM) 群においても、マスト細胞浸潤の有意な抑制効果がみられたが、その作用は微粉砕 KGM 群においてより顕著であった。

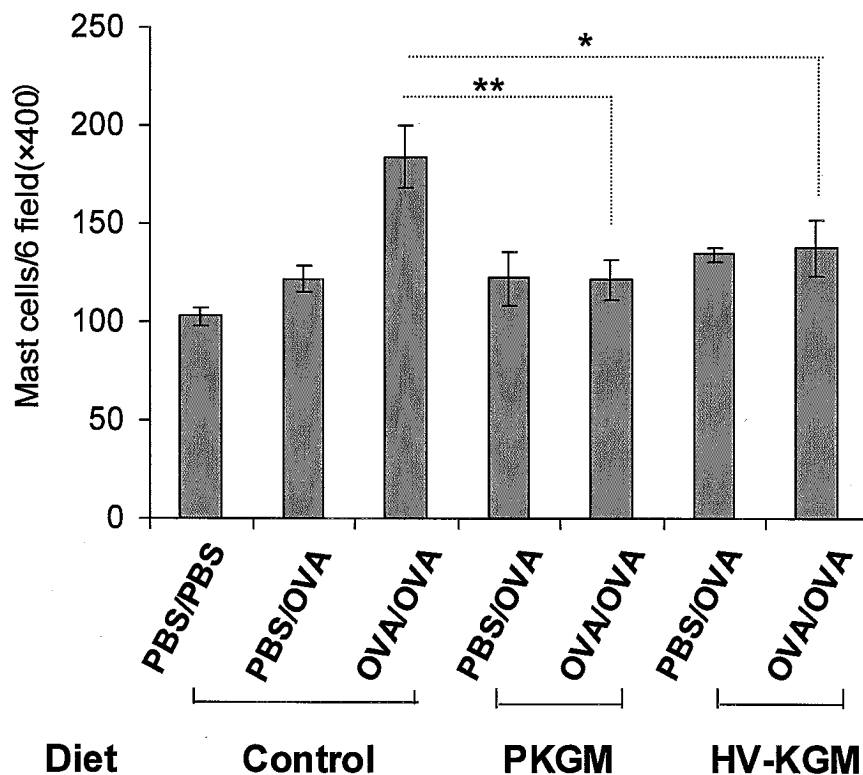


Fig. 25. Inhibitory effects of pulverized KGM (PKGM) on the accumulation of mast cells in the local nose of OVA-sensitized mice. Numbers of mast cells in nasal sections were counted as described in Materials and Methods. Values are expressed as means \pm SE with 6 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. control OVA/OVA mice.

第3節 考察

本章では、微粉碎 KGM がアレルゲン (OVA) 特異 IgE 応答を抑制し、アレルギー性鼻炎の発症予防効果を有することを明らかにした。

前章におけるアトピー性皮膚炎 (AD) モデル (NC/Nga マウス) を用いた検討では、その抑制作用は高粘性 KGM (KP および PA) の摂取ではみられず、また、造粒処理によって微粉碎 KGM の活性は消失した。そのため、KGM の抗アレルギー作用には、粘度特性に加えてその粒子径が重要な役割をもつことが示唆された。しかしながら、本実験 (鼻炎モデル) においては、その活性が微粉碎 KGM と比較すれば弱いものの、くしゃみ症状の有意な抑制作用が、高粘性 KGM (HV-KGM) 群においても観察された (Fig. 22)。この高粘性 KGM にみられた作用の違いから、BALB/c マウスに OVA 特異的に誘発される鼻炎症状と NC/Nga マウスにみられる AD 症状では、その発症メカニズムが明確に異なることが示唆された。実際に、OVA で惹起されるマウスの鼻過敏応答には、IL-13 と同様にマスト細胞上の IgE レセプター (FcεRI) からのシグナルが、必須であることが明らかになっているが^{68,69)}、NC/Nga マウスの AD 病態の誘導には、IgE 産生を始めとした Th2 応答は必ずしも必要ではない²⁷⁾。これらの知見から、アレルゲンで誘発される鼻炎症状は、IgE とマスト細胞を主軸とした応答により依存度が強いと考えられ、またこれらの症状予防に対しては、高粘性 KGM も利用可能であることが示唆された。

本鼻炎モデルにおいて、微粉碎 KGM の摂取は OVA 特異的 IgE 産生を著明に抑制したが、IgG1/IgG2a 抗体産生ならびに Th1(IFN-γ)/Th2(IL-4, IL-5, IL-13)サイトカイン産生には、影響しなかった (Fig. 23, Fig. 24)。これらの結果から、微粉碎 KGM の IgE 産生抑制作用は、従来から良く知られる Th1/Th2 バランスの是正によるものではなく、新たなメカニズムによって誘導されることが示唆された。

NC/Nga マウスにおける検討では、微粉碎 KGM の摂取によって血漿中の Total IgE および IgG1 量がいずれも有意に減少した (Fig. 9, Fig. 14)。また、表皮ケラチノサイト抽出物の連続皮内投与は、BALB/c マウスに顕著な IgE/IgG1 応答を誘導するが、微粉碎 KGM の摂取はこれらの応答をいずれも有意に抑制することが判っている (Oomizu ら, 参考論文 2)。本鼻炎モデルにおいては、微粉碎 KGM が IgG1 産生には影響せず IgE 応答のみを選択的に抑制したが、この抗体産生への調節作用の違いに関する理由は、今のところ明らかでない。病態の発症メカニズムや実験条件の相違が影響すると充分考えられるが、本鼻炎モデルにみられる選択的な IgE 抑制が、どのようなメカニズムで誘導されるかについての考察は重要であろう。

B 細胞の IgE 産生へのクラススイッチを特異的に抑制するサイトカインとして、IL-21 が知られている⁷⁰⁾。IL-21 は、Th2 細胞への分化や CD4⁺T 細胞による IL-4 産生に対して

は影響しないが、IL-4 と CD40L の刺激で誘導される B 細胞からの IgE 産生を特異的に抑制する。また、IL-21 レセプターの欠損マウスにおいては、IgE 産生が増強されることが明らかになっている⁷¹⁾。ごく最近の研究では、活性化 NKT 細胞によって分泌された IL-21 が B_e細胞にアポトーシスを誘導し、IgE 産生を抑制することなどが報告されている⁷²⁾。また、樹状細胞が IgE 産生へのクラススイッチを選択的に抑制することが、Obayashiらによって報告されている⁷³⁾。これらの知見から、微粉砕 KGM の本モデルでの IgE 抑制作用が、IL-21 の産生調節を介したものであることや、腸管粘膜で刺激を受けた樹状細胞によって媒介されることなどが想定できるが、これらに関する今後の検討が必要であろう。

前章において、NC/Nga マウスの皮膚局所における炎症応答（マスト細胞/好酸球浸潤ほか）が、微粉砕 KGM の摂取により幅広く抑制されることを述べた。本鼻炎モデルにおいても、鼻局所におけるマスト細胞浸潤が、微粉砕 KGM 群において有意に抑制された（Fig. 24）。本モデルの鼻過敏症の誘導には、マスト細胞上の IgE レセプター（FcεRI）からのシグナルが必須であることから⁶⁸⁾、微粉砕 KGM の鼻炎抑制作用には、IgE 応答だけでなくマスト細胞浸潤などの幅広い炎症応答の抑制作用も関与することが推察された。

【第4章】 KGMの自己免疫応答に及ぼす影響

前章での研究において、NC/Nga マウスの全身免疫応答における Th1/Th2 応答を、微粉砕 KGM がいずれも抑制していたことから、自己免疫病態の予防にも有効であることが推察された。NC/Nga マウスは、現在、AD のモデル動物として認知されているが、元々は、全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患モデルとして考えられていた背景がある^{24,74,75)}。本章では、皮膚炎を発症した NC/Nga マウスが、頸部リンパ節症と脾腫を併発し、自己抗体および BAFF を高産生すること、さらに微粉砕 KGM がこれらの自己免疫・炎症応答を著明に抑制することについて述べる。続いて、SLE のモデルマウス (MRL/lpr) においてその有効性を調べた結果を報告するが、この中では、予想外にも高粘性 KGM が、その自己免疫症状を著明に抑制することを見出した。そこで次に、各種の自己免疫疾患を予防する機能性食品素材としては、高粘性 KGM の利用が期待できることに関して考察する。

第1節 NC/Nga マウスの自己免疫症状に対する微粉砕 KGM の抑制作用

前章における研究の中で、発症した NC/Nga マウスの手足にリウマチ様の炎症が、まれに誘発されることを確認した (Fig. 26)。本マウスは、元々は、自己免疫性の疾患モデルとして考えられていた背景からも、これらの関節炎症状には、自己免疫応答が関与することが示唆された。1970年代には、自己抗体 (クームス抗体) の産生や腎障害の併発が確認されているが、その後、NC/Nga マウスの自己免疫に関する研究は、ほとんど進展がない。幾らかの研究で、本マウスは、経口トレランスの誘導が破綻していることや、SLE モデルマウス (MRL/lpr) と同様に Fcγレセプター2b のプロモーター領域に遺伝子多型の欠失があることが報告されている^{76,77)}。



Fig. 26. Representative photographs of joint inflammation in NC/Nga mice with eczema.

B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) は、B 細胞の分化、生存および抗体産生に重要な役割をもつ分子として、近年注目されている⁷⁸⁻⁸¹⁾。BAFF 過剰発現マウスでは、B 細胞増殖によるリンパ腫が惹起され、自己抗体の高産生ならびに腎臓への抗体沈着など自己免疫性の病態が誘発される⁷⁹⁾。また、SLE 患者やリウマチ患者ならびに MRL/lpr マウスにおいて血中 BAFF 濃度の上昇が報告されている^{80,82,83)}。さらに、Th1 応答に媒介される皮膚の遅延型過敏反応が、BAFF の過剰産生によって増強することが明らかにされている⁸⁴⁾。上記の知見をもとに、この研究では NC/Nga マウスにおけるリンパ節の障害、血中自己抗体価 (anti-dsDNA, rheumatoid factor IgG) および BAFF 産生量を調べるとともに、それらの自己免疫・炎症応答に対する微粉碎 KGM の影響を調査した。

1-1. 実験の材料および方法

実験動物と飼育

第 1 章および 2 章での検討と同様に、NC/Nga マウス (4 週齢, ♂, Conventional grade) を、各飼料と水で 9 週間飼育した。飼育飼料は、コントロール飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) に微粉碎 KGM (PKGM, S-p または Z-p) または高粘性 KGM (HV-KGM, PA) を 5 重量%の割合で添加したものを使用した。同週齢の SPF (Specific Pathogen Free) 環境下で飼育した NC/Nga マウスを、日本 SLC 株式会社から購入し、ネガティブコントロールとして使用した。

皮膚炎病態、リンパ腫および脾腫の評価

前章での検討と同様に、マウスの AD 症状 (痒み, 出血・紅斑, 浮腫, 擦過傷, 乾燥) をスコア化によって評価した。

13 週齢において、各群のマウスからリンパ節 (頸部, 上腕, 腋か) と脾臓を採取し、観察と重量の測定を行った。

血漿中の自己抗体価および BAFF の分析

4, 8 および 12 週齢において採血を行い、血漿サンプルを得た。血漿中の自己抗体価 (anti-dsDNA および rheumatoid factor IgG) ならびに BAFF 量を ELISA 法によって分析した。自己抗体価の分析は、レビス®Anti-dsDNA マウス ELISA キット (シバヤギ, 群馬) およびレビス®リウマチ因子 IgG マウス ELISA キット (シバヤギ) を用いて行った。また、BAFF の分析には、BAFF soluble (mouse) detection set (APOTECH Corporation, Switzerland)を用いた。分析は、それぞれ各メーカーの推奨するプロトコールに従って実施した。

1-2. 結果

前章における検討と同様に、コントロール群では激しい搔破行動を伴う AD 様症状が 8 週齢以降に観察されたが、微粉碎 KGM (PKGM) 群ではこれらの症状 (AD スコア) が有意に抑制された (Fig. 27a)。

NC/Nga マウスは、IFN- γ 産生 T 細胞とプラズマ B 細胞の蓄積を伴うリンパ節の肥大が、炎症部位の近隣において観られることが報告されている²⁷⁾。そこでまず、本マウスのリンパ球増殖応答に対する微粉碎 KGM の影響を調査した。13 週齢において、リンパ節 (頸部、上腕および腋か) と脾臓を観察したところ、コントロール群では SPF 群と比較して、頸部リンパ節と脾臓の著しい肥大がみられた (Fig. 27 b)。NC/Nga マウスの頸部リンパ節症と脾腫の病変は、微粉碎 KGM 群において有意に抑制されていた (Fig. 27 c)。その他のリンパ節 (上腕および腋か) においても、AD を発症したマウスでは肥大する傾向にあったが、コントロール群と微粉碎 KGM 群の間で明らかな差異は認められなかった (データ示提示)。なお、これらの効果は、AD 病態と高 IgE 血症の抑制作用がみられない高粘性 KGM 群においては観察されなかった。

次に、血中の自己抗体価 (anti-dsDNA および rheumatoid factor(RF)-IgG) に及ぼす微粉碎 KGM の影響を調査した。それらの結果を、Fig. 28 に示す。皮膚炎を発症する初期段階 (8 週齢) では、4 週齢のマウスと比較すれば自己抗体価は幾らか上昇したが、コントロール群と微粉碎 KGM 群で違いはなかった。12 週齢において、皮膚炎が悪化したコントロール群および高粘性 KGM 群では、血中の anti-dsDNA および RF-IgG 抗体価が著しく上昇したが、微粉碎 KGM 群ではそれらが有意に減少していた。

SLE を始めとした全身性の自己免疫疾患には、B 細胞の成熟などに影響する BAFF の産生が深く関与することが報告されている⁷⁸⁻⁸³⁾。実際、BAFF アンタゴニストの投与によって、マウスの SLE 症状や関節炎症状が改善することが知られている^{80,85,86)}。そこで次に、本モデルにおける BAFF の関与について調査した (Fig. 29)。コントロール群では、12 週齢において血中 BAFF 濃度の上昇が認められたが、微粉碎 KGM 群では有意に抑制されていた。

これらの結果から、AD を発症した NC/Nga マウスが、頸部リンパ腫と脾腫を併発し、自己抗体ならびに BAFF を高生産すること、またこれらの自己免疫・炎症応答を微粉碎 KGM の摂取が著明に抑制することが明らかになった。

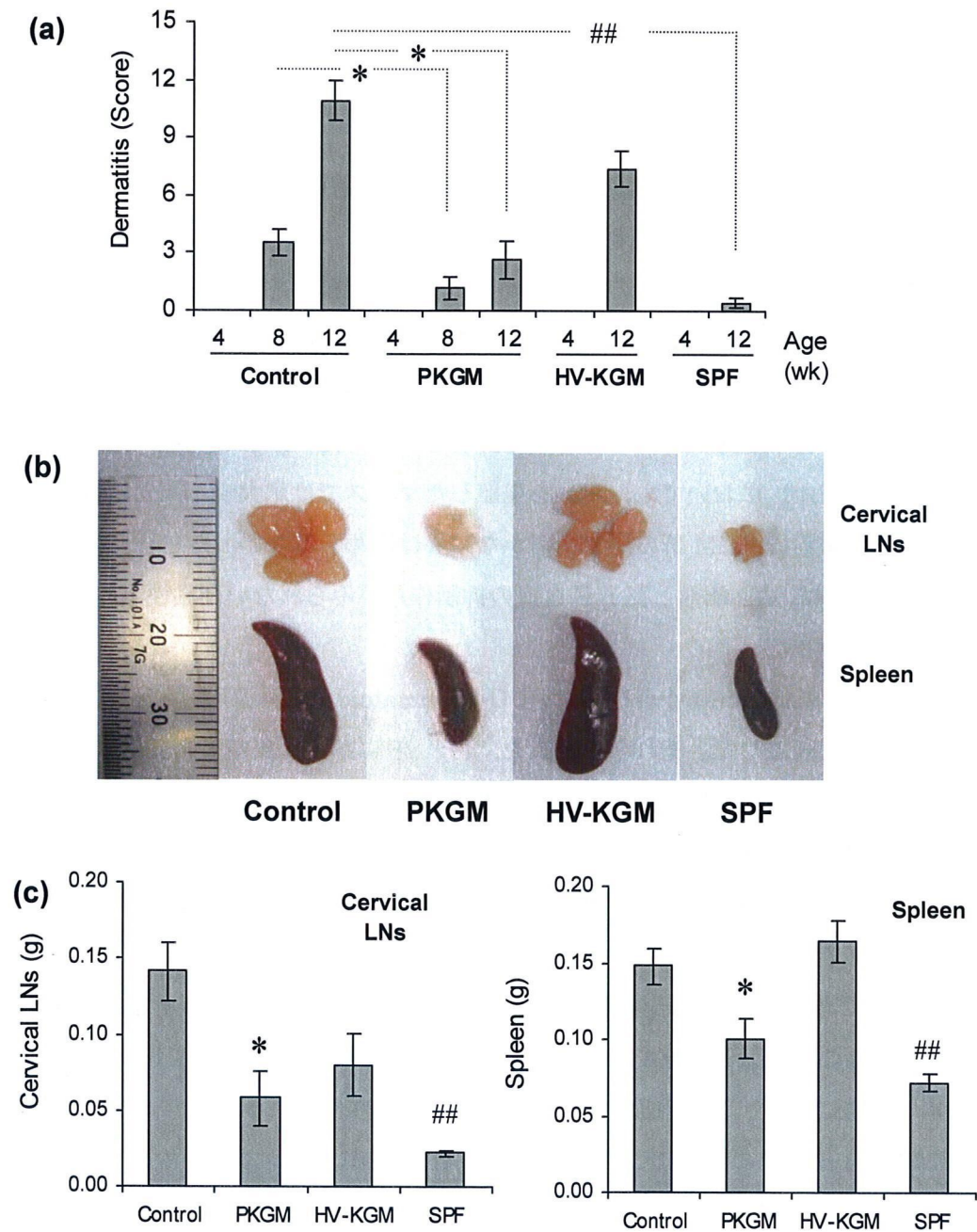


Fig. 27. Inhibitory effects of pulverized KGM (PKGM) on the development of eczema, cervical lymphadenopathy, and splenomegaly in NC/Nga mice.

(a) Clinical skin conditions in NC/Nga mice fed with control, PKGM, or HV-KGM diet (n=5 or 10) and in age-matched SPF NC/Nga mice (n=5) during the experiment. Values are expressed as mean \pm SE. * p <0.05, control mice vs PKGM-fed mice. ## p <0.01, control mice vs SPF mice (Mann-Whitney U test). (b) Representative photographs of four cervical LNs and spleen from NC/Nga mice at 13 weeks of age. (c) The weights of four cervical LNs and the spleen were significantly inhibited by PKGM feeding. Values are expressed as mean \pm SE (n=5). * p <0.05, control mice vs PKGM-fed mice. ## p <0.01, control mice vs SPF mice (Student's t test).

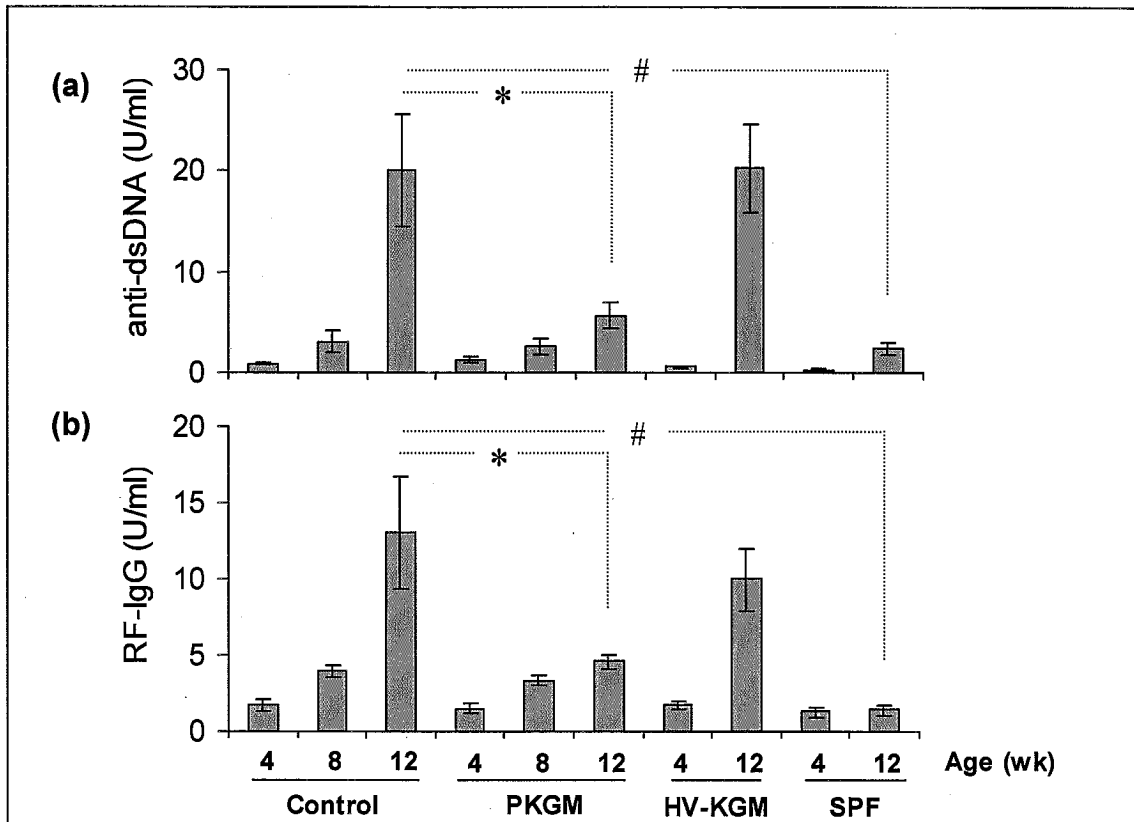


Fig. 28. Inhibitory effects of PKGM on the increase in plasma autoantibody levels in NC/Nga mice.

Plasma anti-dsDNA (a) and rheumatoid factor IgG (b) autoantibodies were measured by ELISA using a kit from Shibayagi. Values are expressed as mean \pm SE, with four 4- and 8-week-old mice or five to eight 12-week-old mice per group. * p <0.05, control mice vs PKGM-fed mice. # p <0.05, control mice vs SPF mice (Student's t -test).

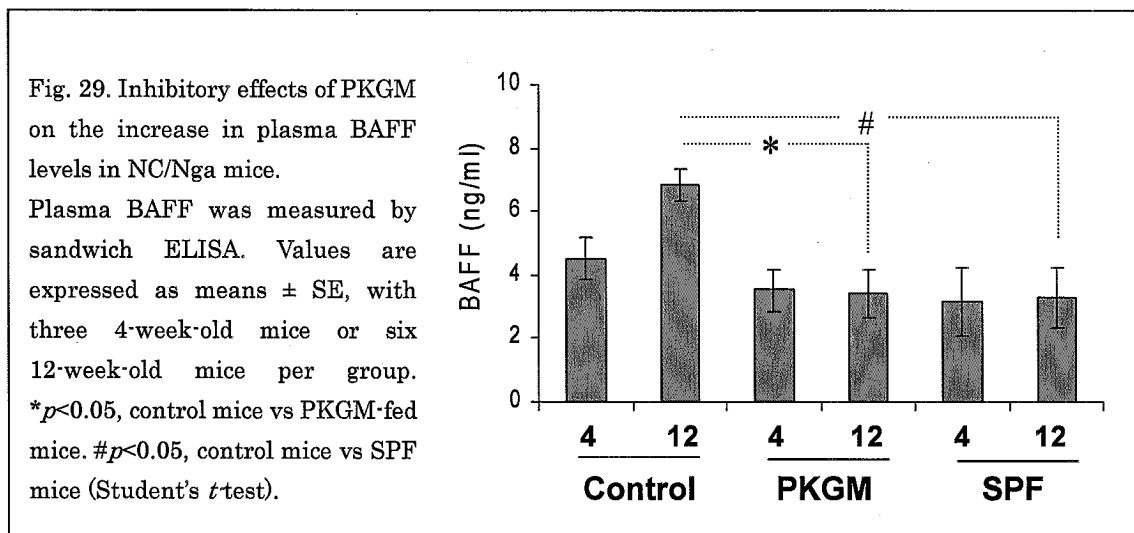


Fig. 29. Inhibitory effects of PKGM on the increase in plasma BAFF levels in NC/Nga mice.

Plasma BAFF was measured by sandwich ELISA. Values are expressed as means \pm SE, with three 4-week-old mice or six 12-week-old mice per group. * p <0.05, control mice vs PKGM-fed mice. # p <0.05, control mice vs SPF mice (Student's t -test).

第2節 高粘性 KGM の自己免疫応答抑制作用

MRL/mp·lpr/lpr (MRL/lpr)マウスは、全身性エリテマトーデス (SLE) の代表的なモデルのひとつとして知られている⁸⁷⁾。本系統は、アポトーシスを誘導する Fas 分子に変異を有し、リンパ球増殖症、各種の自己抗体産生、糸球体腎炎、皮膚炎および関節炎などを自然発症する。次に、MRL/lpr マウスの自己免疫症状に対する微粉碎 KGM (PKGM) および高粘性 KGM (HV-KGM) の影響を調査した。

2-1. 実験の材料および方法

実験動物と飼育

4 週齢の雌性 MRL/mpj·lpr/lpr (MRL/lpr)マウスおよび MRL/mpj·+/+/+ (MRL/++)マウスを、日本 SLC 株式会社より購入した。MRL/lpr マウスは、1 群 6 匹に分け、 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12 時間ごとの明暗サイクルで、各種の飼育飼料と水を自由摂取させ 16 週間飼育した。MRL/lpr マウスを同時にコントロール飼料 (マウス飼育用 MF, オリエンタル酵母工業) を用いて飼育し、ネガティブコントロールとして使用した。

前章での研究と同様に、飼育飼料は、コントロール飼料に微粉碎 KGM (PKGM, Z-p) または高粘性 KGM (HV-KGM, PA) を 5 重量%の割合で添加したものを使用した。

リンパ腫および脾腫の評価

20 週齢において、各群のマウスからリンパ節 (頸部, 両脇 (上腕+腋か), 腸間膜) と脾臓を採取し、観察と重量の測定を行った。

血漿中の自己抗体価およびサイトカインの分析

5 および 20 週齢において採血を行い、血漿サンプルを得た。血漿中の自己抗体価 (anti-dsDNA および rheumatoid factor IgG) ならびにサイトカイン (IFN- γ および BAFF) 量を ELISA 法によって分析した。自己抗体価の分析は、前節と同様にレビス®Anti-dsDNA マウス ELISA キット (シバヤギ) およびレビス®リウマチ因子 IgG マウス ELISA キット (シバヤギ) を用いて行った。IFN- γ は、マウス IFN- γ 'Femto·HS' Ready-SET-Go! (eBioscience) を用いて分析した。また、BAFF の分析には、BAFF soluble (mouse) detection set (APOTECH Corporation) を用いた。分析は、それぞれ各メーカーの推奨するプロトコールに従って実施した。

2-2. 結果

前節の研究において、ADを発症したNC/Ngaマウスが、頸部リンパ節腫脹と脾腫を併発し、自己抗体ならびにBAFFを高生産していること、またそれらの自己免疫・炎症応答を微粉碎KGMが著明に抑制することを明らかにした。そこで次に、SLEモデルマウス(MRL/lpr)の自己免疫症状に対するKGMの影響を調査した。

4週齢のMRL/lprマウスに各種の飼料を摂取させ、リンパ球増殖症への影響を20週齢まで経過観察した。その間、各群間における体重増加の差異は認められなかった(Fig. 30)。コントロール群では、触診によって容易に確認できるリンパ節(頸部および上腕)の肥大が、17週齢以降にみられた(Fig. 31a)。20週齢において、マウスの各リンパ節と脾臓を採取し、KGMの影響を観察調査した(Fig. 31b)。それらの組織重量の測定結果を、Fig. 32に示す。MRL/lprマウスでは、いずれの群においてもMRL/++マウスと比較すれば各リンパ節と脾臓の著しい肥大が観察された。予想外にも、微粉碎KGM(PKGM)群ではコントロール群と比較して明らかな差はみられなかったが、逆に高粘性KGM(HV-KGM)群においてリンパ球増殖症の有意な抑制作用が認められた。

これらの結果から、NC/NgaマウスのAD症状には抑制効果のなかった高粘性KGMが、本SLEモデルにおける自己免疫性のリンパ球増殖症を予防する作用をもつことが示唆された。

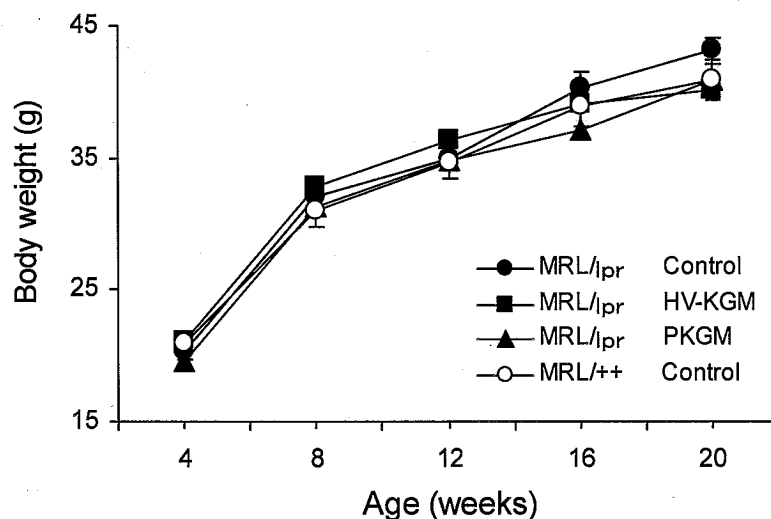


Fig. 30. Dietary KGM did not affect the gain in body weight in MRL/lpr mice during the 16-week experiment. Values are expressed as means \pm SE of 6 mice per group.

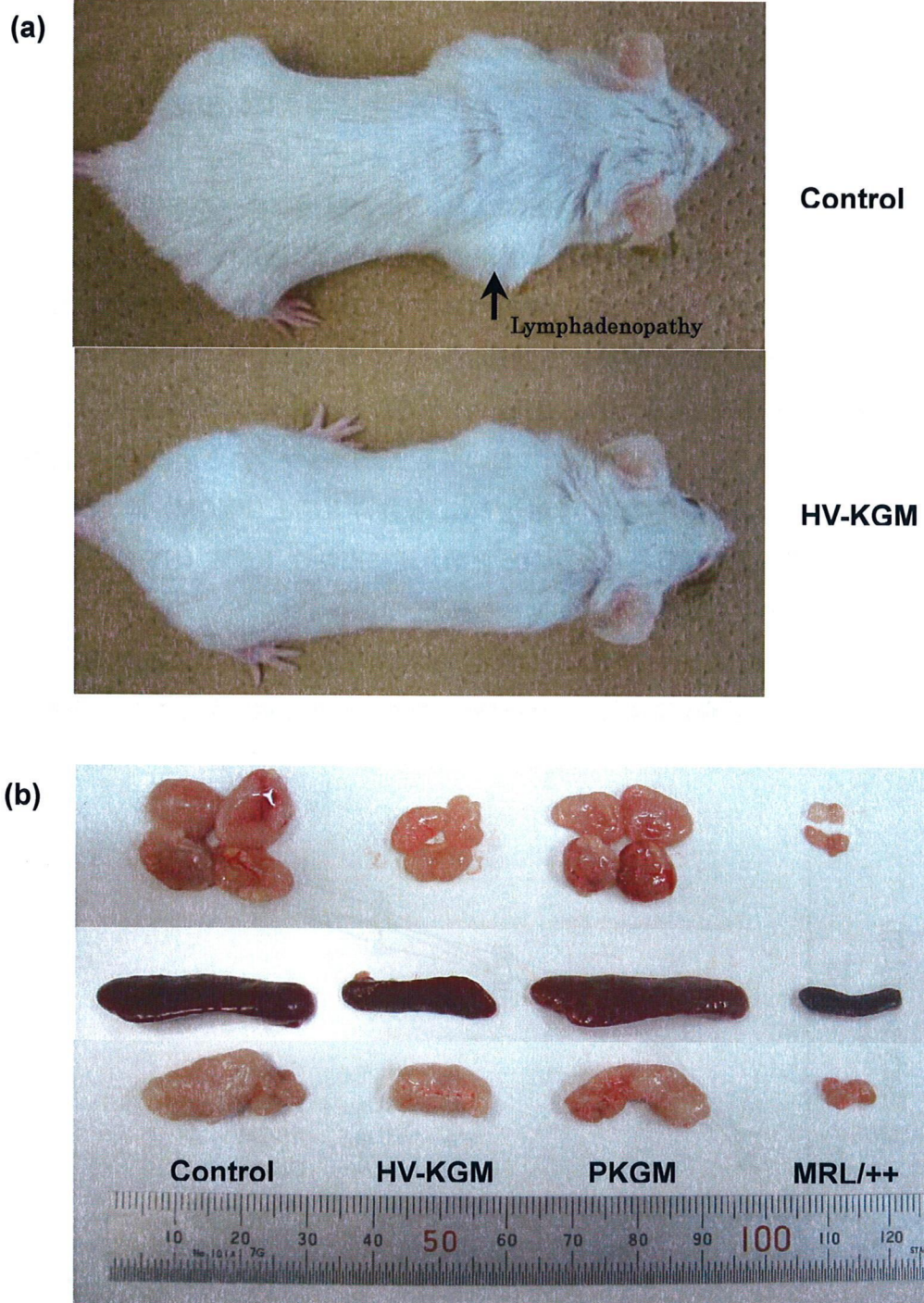


Fig. 31. Representative photographs of clinical characteristics (a) and of peripheral lymph nodes, spleen, and mesenteric lymph nodes (b) in 20-week-old MRL/lpr mice.

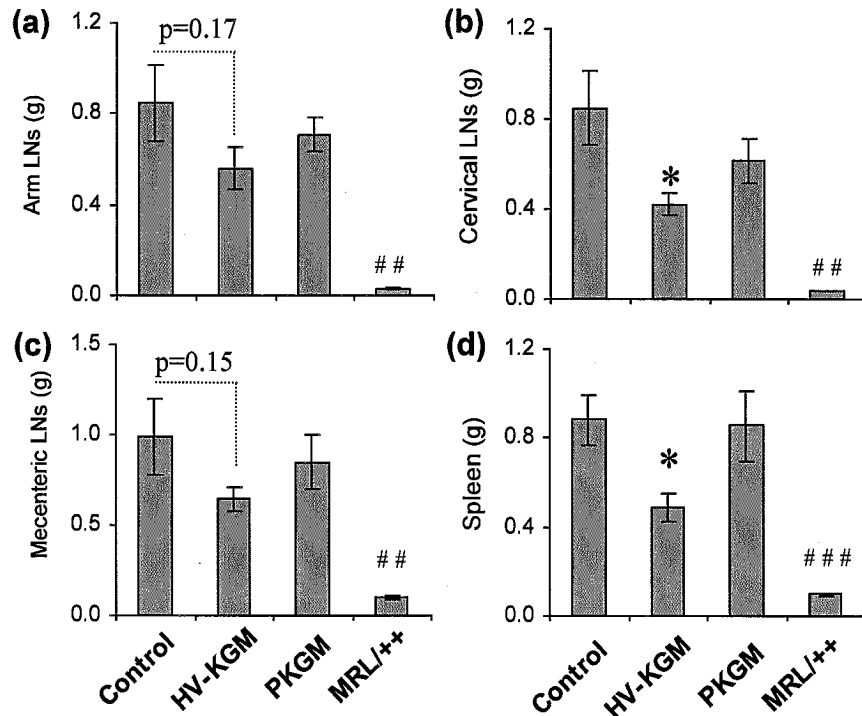


Fig. 32. Inhibitory effects of highly viscous KGM (HV-KGM) on the development of peripheral lymphadenopathy, and splenomegaly in MRL/lpr mice.

The total weight of bilateral arms LNs (a), four cervical LNs (b), mesenteric LNs (c), and spleen (d) was determined. Values are expressed as mean \pm SE, with 6 mice per group. * $p < 0.05$, control mice vs. HV-KGM-fed mice. ## $p < 0.01$, control mice vs. MRL/++ mice (Student's *t*-test).

次に、5 および 20 週齢のマウスにおける血漿中の Total IgG1 および IgG2a 抗体量を分析した結果を、Fig. 33 に示す。20 週齢では、いずれの群においても抗体量が増加したが、各群間で IgG1 量に差はみられなかった。一方、Total IgG2a 量に関しては、コントロール群で顕著な上昇がみられたが、微粉砕 KGM 群および高粘性 KGM 群では同様に有意に抑制されていた。

さらに、血漿中の自己抗体価 (anti-dsDNA および rheumatoid factor(RF)-IgG) に及ぼす KGM の影響を調査した。それらの結果を、Fig. 34 に示す。20 週齢において、リンパ腫を発症したコントロール群では、血中の anti-dsDNA および RF-IgG 抗体価が著明に上昇していた。しかしながら、これらの自己抗体産生は微粉砕 KGM 群および高粘性 KGM 群においていずれも有意に減少していた。

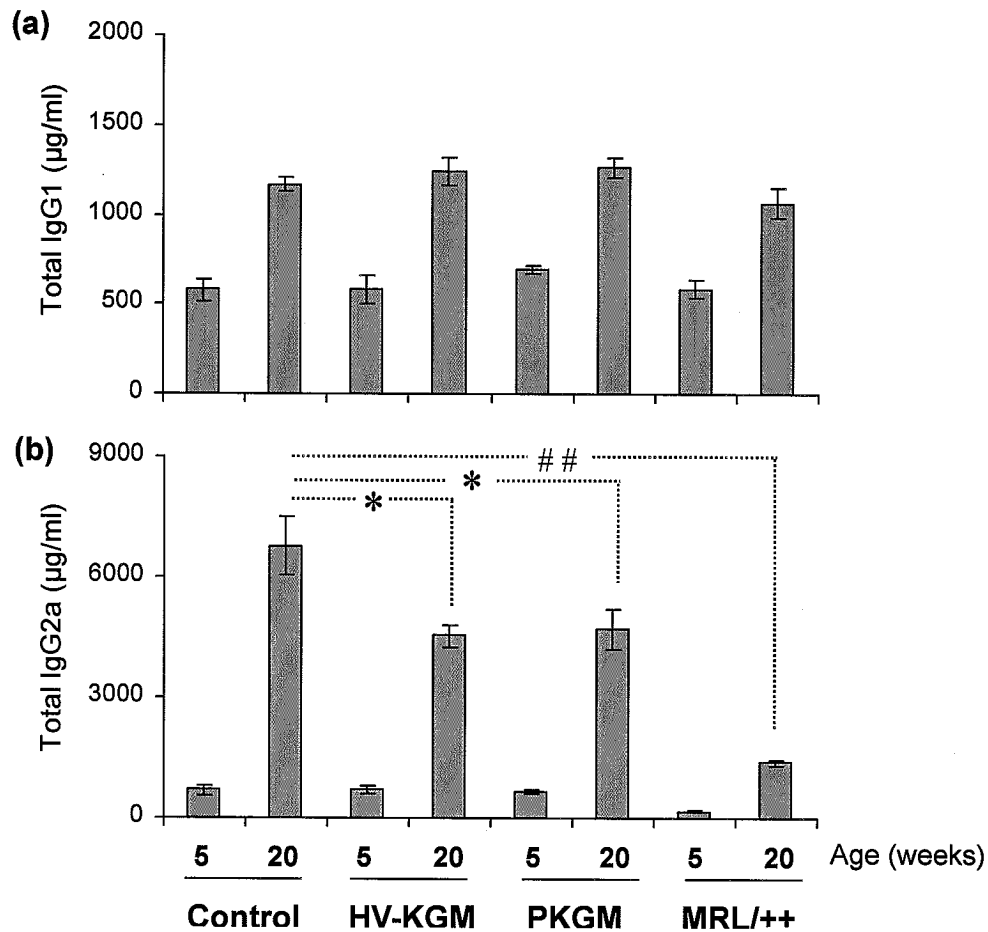


Fig. 33. Inhibitory effect of highly viscous KGM (HV-KGM) on the increase in plasma IgG2a levels in MRL/lpr mice.

Plasma total IgG1 (a) and IgG2a (b) levels were measured by a sandwich ELISA. Values are expressed as mean \pm SE, with four 5-week-old mice or five 20-week-old mice per group. *p<0.05, control mice vs HV-KGM-fed mice or PKGM-fed mice. ##p<0.01, control mice vs MRL/++ mice (Student's *t* test).

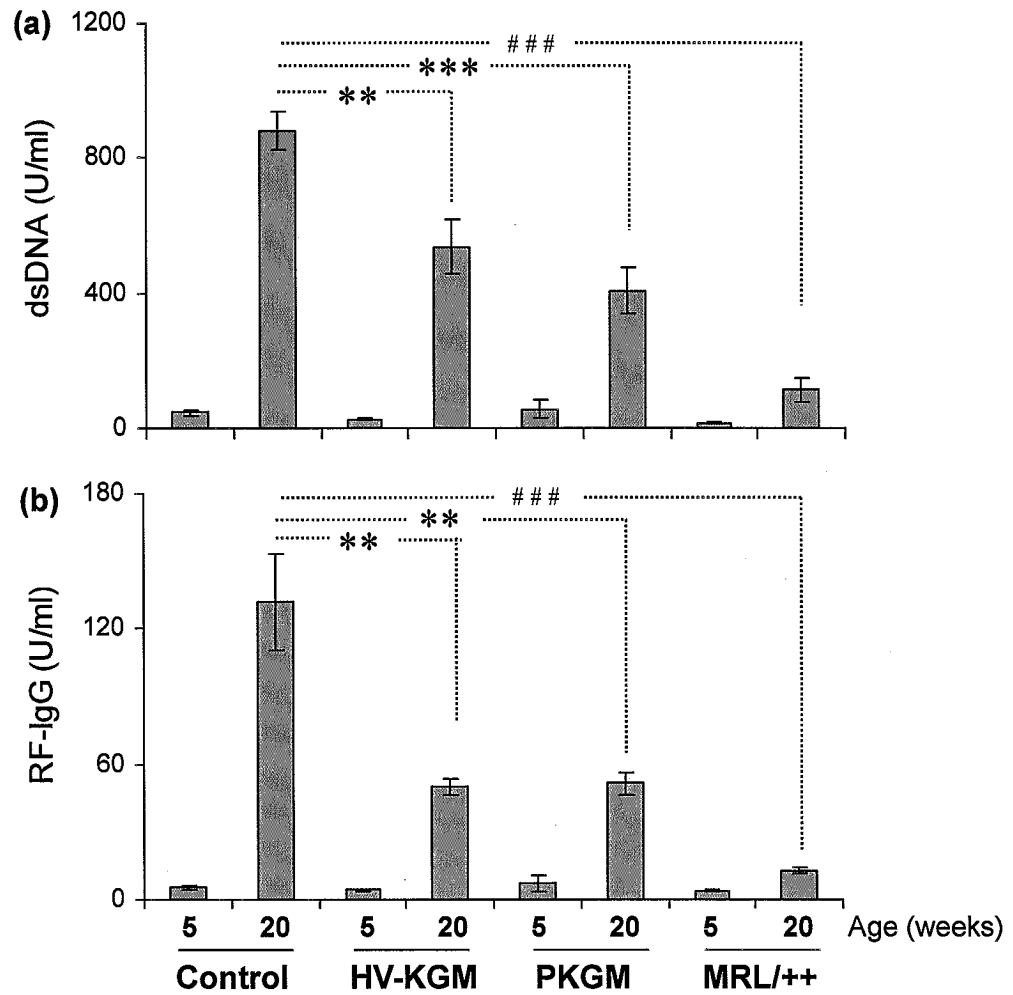


Fig. 34. Inhibitory effects of highly viscous KGM (HV-KGM) on the increase in plasma autoantibody levels in MRL/lpr mice.

Plasma anti-dsDNA (a) and rheumatoid factor IgG (b) autoantibodies were measured by ELISA using a kit from Shibayagi. Values are expressed as mean \pm SE, with four 5-week-old mice or eight 20-week-old MRL/lpr mice per group. ** p <0.01, *** p <0.001, control mice vs HV-KGM-fed mice or PKGM-fed mice. ### p <0.001, control mice vs MRL/++ mice (Student's t -test).

SLE を始めとした全身性の自己免疫疾患の誘導には、Th1 応答が重要な役割をもつことが知られている。また前節でも触れたが、B 細胞の成熟などに関与する BAFF が自己免疫調節に影響することも知られている⁷⁸⁻⁸³⁾。実際、BAFF は炎症局所において IFN- γ で刺激を受けたマクロファージ、好中球および樹状細胞によって産生されることが判っている^{78,81)}。そこで次に、本モデルにおける IFN- γ および BAFF の関与について調査した (Fig. 35)。20 週齢においては、いずれの群においても血中 IFN- γ および BAFF 濃度の上昇が認められたが、微粉碎 KGM (PKGM) ならびに高粘性 KGM (HV-KGM) の摂取はこれらの産生に影響していなかった。これらの結果から、本 SLE モデルにおいてみられる高粘性 KGM のリンパ球増殖症および自己抗体産生の抑制作用は、IFN- γ および BAFF の産生調節によるものではないことが示唆された。

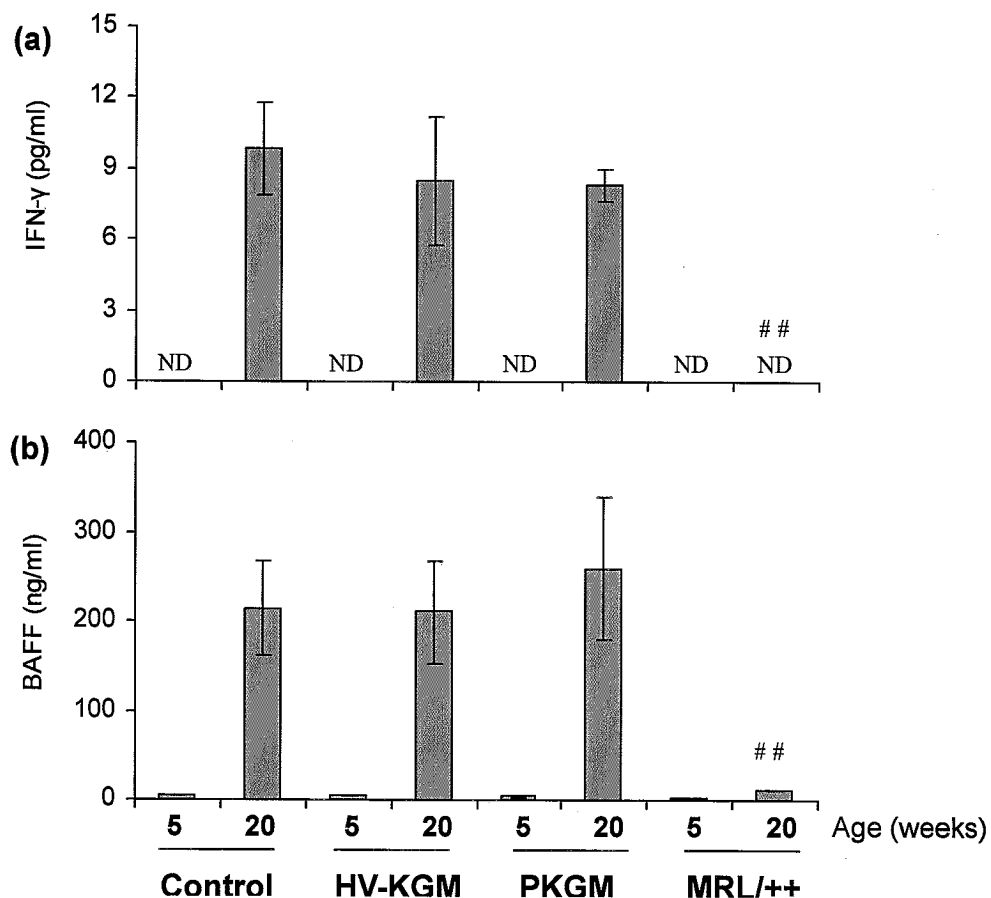


Fig. 35. Dietary HV-KGM did not influence plasma IFN- γ and BAFF levels in MRL/lpr mice.

Plasma IFN- γ (a) and BAFF (b) levels were measured by sandwich ELISA. Values are expressed as mean \pm SE with 3 mice for 5-week-old mice, or 5-6 mice for 20-week-old mice per group. ## p <0.01, control mice vs MRL/++ mice (Student's t -test). ND: not detected.

第3節 考察

第2章での研究において、NC/Nga マウスの全身免疫応答における Th1/Th2 応答を、微粉砕 KGM の摂取がいずれも抑制していたことから、自己免疫病態の予防にも有効であると推察された。NC/Nga マウスは、元々 SLE を始めとした自己免疫性の疾患モデルとして考えられていた背景があるが^{24,74,75)}、近年では本マウスの自己免疫に関する研究は、殆ど実施されていない。そこで第4章では、まず NC/Nga マウスのリンパ球増殖応答と自己免疫症状に着目して研究を行った。

AD を発症したコントロール群のマウスにおいて各リンパ節および脾臓を観察したところ、頸部リンパ節と脾臓の著しい肥大が観察されたが、それらの病変は微粉砕 KGM 群において有意に抑制されていることが明らかになった (Fig. 27 b および c)。また、血中の自己抗体価 (anti-dsDNA および RF-IgG) と BAFF 濃度を分析したところ、コントロール群ではそれらが著明に上昇していたが、微粉砕 KGM 群では有意に減少していた (Fig. 28 および 29)。

SLE を始めとした全身性の自己免疫疾患には、BAFF の産生が深く関与することが報告されている⁷⁸⁻⁸³⁾。実際に、BAFF アンタゴニストの投与によって、マウスの SLE 症状や関節炎症状が改善されるが^{80,85,86)}、BAFF は炎症局所において IFN- γ で刺激を受けたマクロファージ、好中球および樹状細胞によって産生されることが判っている^{78,81)}。また、NC/Nga マウスの炎症部位近隣におけるリンパ節肥大には、IFN- γ 産生 T 細胞とプラズマ B 細胞の蓄積を伴うことが報告されている²⁷⁾。前章での研究において、微粉砕 KGM の摂取が NC/Nga マウスの皮膚局所における単核球浸潤および IFN- γ 産生を著明に抑制することを明らかにした (Fig. 17 および 20)。また微粉砕 KGM の摂取は、本マウスの全身免疫応答における抗体産生 (Total IgG1 および IgE) ならびにサイトカイン産生 (IFN- γ および IL-4) を幅広く抑制していた。これらの知見から総合的に考察すれば、微粉砕 KGM による皮膚局所の単核球浸潤および IFN- γ 産生の抑制作用が、BAFF の抑制にも何らかの関連があると推察され、これらの現象が NC/Nga マウスのリンパ球増殖症の防止に深く寄与すると考えられた。

AD 患者においては、各種の自己抗原 (表皮ケラチノサイト成分など) に対する IgE 陽性反応も高頻度にみられるが、自己感作が AD 病態形成のオーガナイザーとして重要な役割を演じることが判ってきている⁸⁸⁻⁹¹⁾。実際に、表皮ケラチノサイト抽出物を同系マウスの皮下に連続投与すると Th2 応答を介した著明な IgE 産生が誘導されるが、微粉砕 KGM の摂取によってこれらの応答が抑制される (参考文献 2)。これらの知見と併せて考察すると、NC/Nga マウスの皮膚炎病態および高 IgE 血症の誘導においても、全身性の自己免疫応答が関与していると推察された。

MRL/lpr マウスは、SLE の代表的なモデルのひとつとして知られている⁸⁷⁾。次に、微粉砕 KGM および高粘性 KGM の摂取が、MRL/lpr マウスの自己免疫症状にどのように作用するかを調査した。

微粉砕 KGM の摂取は、本 SLE モデルにおいては IgG2a および自己抗体 (anti-dsDNA および RF-IgG) 応答を著明に抑制したが、リンパ球増殖応答に対しては影響がみられなかった。一方、興味深いことに、NC/Nga マウスの病態には影響しなかった高粘性 KGM の摂取が、MRL/lpr マウスにおけるそれらの症状をいずれも著明に抑制することが明らかになった (Fig. 31-34)。これらの結果から、NC/Nga マウスにおけるリンパ球増殖症ならびに自己抗体産生のメカニズムは、SLE モデル (MRL/lpr) マウスのそれらとは明らかに異なることが示唆された。また、微粉砕 KGM 群において得られた結果は、抗 DNA 抗体を始めとする自己抗体産生が、MRL/lpr マウスにおける病態発現に必ずしも必要ではないという見解を⁹²⁾、強く支持するものと考えられた。さらに、Th1 応答を介した各種の自己免疫疾患を予防する機能性食品素材としては、高粘性 KGM の利用が期待できることが推察された。

MRL/lpr マウスにおいて食餌性のカロリー制限を施すと、抗 DNA 抗体産生には影響しないが、リンパ球増殖症ならびに糸球体腎炎の発症を著明に抑制することが報告されている⁹³⁾。しかしながら、本実験では各群間におけるマウスの体重増加や食餌摂取量には明らかな差はみられなかった (Fig. 30)。また高粘性 KGM の摂取では、リンパ球増殖症ならびに IgG2a/自己抗体高産生の両方が著明に抑制されていた。したがって、本モデルにおける高粘性 KGM の自己免疫病態の抑制作用は、これらの食餌制限に関連した作用ではないと考えられた。

SLE を始めとした各種の自己免疫疾患の誘導に、Th1 応答が重要な役割をもつことはよく知られている。MRL/lpr マウスにおいても、Th1 優位の応答が各種の症状を悪化させることや⁹⁴⁾、IL-12、IFN- γ および IFN- γ レセプターの欠損によってリンパ節症および糸球体腎炎が著明に抑制されることが報告されている⁹⁵⁻⁹⁷⁾。実際に、本実験においても血中 IgG1 濃度は各群間で差がみられなかったが、IgG2a 濃度の著明な上昇がコントロール群において認められた (Fig. 33)。しかしながら、高粘性 KGM の摂取は血中の IFN- γ 濃度に影響していなかった (Fig. 35a)。また、BAFF は IFN- γ で刺激を受けたマクロファージ、好中球および樹状細胞によって産生されることが判っているが、血中 BAFF 濃度も各群間で違いがみられず、20 週齢では同様に上昇した (Fig. 35b)。これらの結果から、高粘性 KGM の本 SLE モデルにおけるリンパ球増殖症および IgG2a/自己抗体産生の抑制作用は、IFN- γ や BAFF の産生抑制を介したのではなくその他のメカニズムによって誘導されることが示唆された。

ある種の乳酸菌 (*Lactobacillus casei* strain ほか) の摂取が、マウスにおける発ガンおよびコラーゲン誘導関節炎を抑制することが明らかになっているが^{98,99)}、腸管免疫系を介して高粘性 KGM がどのように全身的な免疫バランスの維持に働くかは明らかでない。Toll like receptor などを介した自然免疫系での認識過程と、その後の免疫担当細胞間の相互作用に対し、物性の異なる KGM が一体どのように影響するのであろうか? 今後は、これらの課題も含め、上述の作用がどのようなメカニズムによって発揮されるかについて、より詳しい解明が重要であろう。さらに、各種自己免疫疾患の予防・緩和食品として産業応用を考慮すれば、関節リウマチやインスリン依存性糖尿病を始めとするその他の疾患モデルでの検証が有用かもしれない。

Studies on immunomodulatory effects of KGM and its application to functional foods.

【第5章】 微粉碎 KGM を含有する機能性食品の開発

本章では、微粉碎 KGM を高含有する機能性（抗アレルギー）食品の形態に関する検討、またその安全性・有効性などについて触れ、最後にこれまでの研究成果と今後の課題について総括する。

第1節 微粉碎 KGM を高含有する食品形態の検討

生理機能の十分な発現と摂取の容易さなどを考慮すれば、食品形態としてサプリメント（錠剤）が第一の候補に挙げられた。そこで生産コストなども考慮して、微粉碎 KGM (S-p) を高含有する錠剤の作製を検討した。

微粉碎 KGM (S-p) を 60~80 重量%の割合で添加し、賦形剤にセルロースを用いて錠剤を作製したところ、微粉末は打錠の際に凝集性が強く、崩壊性が悪くなるという問題があった。錠剤としての機能を発揮するためには、一般に 30 分以内の崩壊が重要であるといわれていることから、崩壊性を一つの品質の目安として各種崩壊剤の添加と賦形剤の使用を検討した。その結果、ゼラチンの添加が崩壊性を高めることがあきらかとなり、賦形剤としてマルチトールまたは寒天の使用が有効であることが判った。配合条件の検討を行い、錠剤に 75%の微粉碎 KGM を含有させることが可能になった。錠剤以外にも、パン類、めん類および菓子類などへの応用が可能になっている。ゼラチンとマルチトールを使用した錠剤の基本品質を Table 3 に示す。また、錠剤の外観写真を Fig. 36 に示す。本錠剤は、1 日 9 粒で約 2.0 g の KGM を摂取することができる。

Table 3. General quantities of respective tablets containing fine KGM (S-p).

	KGM tablets			
	No.1	No.2	No.3	No.4
Pulverized KGM (S-p)	60.0 %	70.0 %	75.0 %	80.0 %
Maltitol	23.5 %	13.5 %	8.5 %	3.5 %
Gelatin	15.0 %	15.0 %	15.0 %	15.0 %
Lubricants	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Weight (mg)	302 ± 1.3	305 ± 1.8	305 ± 1.3	302 ± 1.5
Hardness (kg)	7.1 ± 0.4	8.7 ± 0.4	8.6 ± 0.3	8.2 ± 0.5
Thickness (mm)	5.6 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1
Disintegration (time)	19 min.	20 min.	21 min.	Over 30 min.
Friction loss (%)	0.9	0.2	0.3	0.4



Fig. 36. Tablets containing fine KGM (S-p).

第2節 微粉碎 KGM の安全性と有効性

微粉碎 KGM (S-p および Z-p) の急性経口毒性試験を、OECD Guidelines for the testing of Chemicals 401(1981) に準拠して行った。試験群に 5,000 mg/kg の検体を用い、対照群には溶媒対照として綿実油を使用した。それぞれを雄雌マウスに単回投与した後、2 週間観察を行った。観察期間中に死亡例は認められなかったことから、微粉碎 KGM の LD50 値は、5,000 mg/kg 以上であると考えられた。

KGM は伝統的な食素材のひとつであることから、その安全性は充分にあると考えられる。実際に、ヒトでの試験において、上記の各食品形態における安全性は確認しているが、その抗アレルギー作用に関する確かな根拠はまだ得られていない。錠剤 (微粉碎 KGM, S-p) の3ヶ月間の摂取によって、アレルギー性鼻炎患者におけるくしゃみ症状の緩和作用が、数例で認められている¹⁰⁰⁾。これらの結果は、抗アレルギー食品素材として微粉碎 KGM が産業応用できることを期待させるものであるが、今後はヒトでの有用性に関してより多くの臨床例を得るとともに、免疫調節における詳細な作用メカニズムの解明が、肝要であろう。

第3節 研究総括

本研究の主な目的は、各種 KGM の免疫調節作用の詳細を明らかにして、免疫関連疾患の予防および緩和食品として産業的な応用を図ることであった。とりわけ、微粉砕を施した易水溶性 KGM の抗アレルギー食品への応用が、素材の利便性（コストほか）と新たな生理作用（用途）の探索、という観点からとくに重要な課題であった。

花粉症やアトピー性皮膚炎（AD）に代表される I 型アレルギー疾患は、近年、先進国を中心に急増しており、大きな社会問題にもなっている。第 1 章では、各種 KGM の抗アレルギー素材としての有用性を、AD モデルマウス（NC/Nga）を用いて検討した。この中で、微粉砕を施した KGM の摂取が AD 様の病態進展ならびに高 IgE 血症を著明に抑制することを見出した。こんにやく精粉および高粘性 KGM の摂取では影響がみられず、またこれらの作用が造粒処理によって消失したことから、KGM の抗アレルギー作用は、粘度特性に加えて粒子径が重要な役割をもつと推察された。

血糖値やコレステロールの上昇抑制作用を始めとして、これまで知られている KGM の有益な作用の多くは、高粘性を有するほどその活性が強いという特徴があった。そのため、第 1 章で見出した AD 抑制作用は、微粉砕 KGM の機能性食品素材としての応用や、免疫調節機能に関する研究の展開を考慮すれば、大きなセレンディピティを引きだせたものと考えている。

第 2 章では、微粉砕 KGM の AD 抑制における作用メカニズムの一端を明らかにした。「Th1 応答増強効果」を謳い文句に、食品成分の抗アレルギー作用が続々と発表されだしていたこともあり、微粉砕 KGM の摂取が、全身免疫における IL-4 および IFN- γ 産生をいずれも抑制していた結果は、驚きとともに興味深い知見であった。如何せん、NC/Nga マウスの AD 発症機構が研究途上にあることから、そのメカニズムの説明が満足にできない部分もあったが、本マウスの病態発現に Th2 応答が必ずしも必要ではないこと²⁷⁾や AD の慢性期では Th1 応答が炎症に関与すること⁴¹⁾、また最近では super Th1 細胞によるアレルギー炎症誘導能¹⁰⁾が明らかにされた。微粉砕 KGM の AD 抑制作用は、Th1/Th2 バランスの是正ではなく、本モデルにおける過剰な免疫応答にトレランスを誘導することが関与すると推察されたが、とくに IFN- γ 抑制作用が重要であると結論した。

続いて、NC/Nga マウスの搔破行動と皮膚局所における免疫・炎症応答に着目し、微粉砕 KGM の影響を調査した。微粉砕 KGM の摂取は、皮膚炎症と高 IgE 産生のみられない早期から本マウスの搔破行動を著明に抑制していた。また、微粉砕 KGM が皮膚局所の免疫・炎症応答（表皮肥厚、マスト細胞と好酸球の高浸潤、サブスタンス P および炎症性サイトカイン（IL-10, IL-4 および TNF- α ）の高産生）を幅広く抑制することを明らかにしたが、驚いたことに AD を発症したマウスの皮膚では、CD3 陽性 T 細胞の浸潤が殆ど観察されな

かった。実際、本マウスの皮膚局所には夥しい数のマスト細胞とその脱顆粒が観察されるが、マスト細胞が IL-4 および IL-5 を高産生し、AD の誘導に重要であることが指摘されている^{25,56)}。したがって、本マウスの搔破行動と局所の炎症応答は、主としてマスト細胞応答に起因するものではないかと推察した。また、微粉碎 KGM の AD 抑制作用において、皮膚局所では Th2 応答よりもむしろマスト細胞応答の抑制が重要な役割をもっているだろうと結論した。

第 3 章では、抗原（アレルゲン）の免疫・点鼻感作モデルを用いて、抗原特異的な IgE 応答の抑制作用およびアレルギー性鼻炎の予防効果を、微粉碎 KGM が有することを明らかにした。錠剤（微粉碎 KGM, S-p）の摂取によって、アレルギー性鼻炎患者におけるくしゃみ症状の緩和作用が数例で認められている¹⁰⁰⁾。そのため、微粉碎 KGM の産業応用という点を考慮すれば、ここでの研究は大変有意義なものであったと考えている。本鼻炎モデルにおける検討では、抗原特異的な IgG1/IgG2a 抗体応答および Th1/Th2 サイトカイン応答に、微粉碎 KGM が影響しなかった。そのため、NC/Nga マウスでみられた作用との違いを始めとして、これらのメカニズムに関する研究が、今後肝要と考えている。

第 4 章では、皮膚炎を発症した NC/Nga マウスが、頸部リンパ節症と脾腫を併発し、自己抗体（anti-dsDNA および RF-IgG）および BAFF を高産生すること、さらにこれらの免疫・炎症応答を、微粉碎 KGM の摂取が著明に抑制することを明らかにした。本マウスの自己免疫に関する研究が、近年殆ど実施されていないことから、表面的ではあるが類の少ない研究ができたと考えている。実際に、AD 患者では自己成分による炎症反応もしばしば観察されるが⁸⁸⁻⁹¹⁾、自己免疫応答が AD の病態発現にどのように関与しているかのメカニズムを、より詳細に明らかにする必要があるだろう。

続いて、全身性エリテマトーデス（SLE）のモデルマウス（MRL/lpr）において有効性を調査したところ、微粉碎 KGM の摂取は、本モデルの IgG2a/自己抗体の高産生は抑制したが、リンパ球増殖症に対する影響はなかった。予想外にも、これらの症状を高粘性 KGM の摂取がいずれも抑制することが明らかになったが、その摂取が全身の IFN- γ および BAFF 産生に影響することはなかった。これらの結果から、NC/Nga マウスにおけるリンパ球増殖症ならびに自己免疫症状のメカニズムが、SLE モデル（MRL/lpr）におけるそれとは明らかに異なるものであると結論した。さらに、Th1 応答を介した各種の自己免疫疾患を予防する機能性食品素材としては、逆に高粘性 KGM の利用が期待できると推察された。

第 5 章では、産業应用する上で最も重要である機能性を維持した食品形態の検討を行い、微粉碎 KGM を高含有する錠剤の作製を可能にした。また、パン類、めん類および菓子類などへの応用も可能にしているが、ここでの研究成果は、清水化学株式会社殿の尽力によるものが大半であることを明記しておきたい。素材の安全性は充分検証されていることか

らも、今後、ヒトでの有用性に関してより多くの臨床例を得るとともに、免疫調節作用のより詳細なメカニズムの解明が肝要であろう。

本研究の中で、微粉碎（易水溶性）KGMの摂取が、I型アレルギーにおける炎症反応を幅広く抑制できることを明らかにした。またこれに対し、従来から良く知られる高粘性KGMには、自己免疫応答を抑制する作用があることを見出した。今後は、各種の免疫疾患を予防・緩和する機能性食品素材として、これらの産業応用が期待できるだろう。

光陰矢のごとしであるが、著者がKGMの免疫調節能に関する研究をスタートして、9年目を迎えている。この間、市場の拡大とともに、食品成分に対する応答を免疫学的に捉える研究が、急速な拡がりをみせてきた。このような時勢の高まりは、科学と産業の発展を考慮すれば喜ばしいことと思っているが、残念なことに、食品の生理機能を紹介するテレビ番組のデータ捏造事件¹⁰²⁾や効能の過大広告など、弊害も出てきている。確固たる科学的根拠をもった製品とともに、それらに関する確かな情報をどのように提供するかが、今後の大きな課題であるだろう。

「医食同源」が叫ばれている。各種疾病の予防とセルフケアに役立つ食品の機能性研究は、知的な日本型食文化の再構築という観点から、さらに発展することを期待している。微粉碎を施したKGMが、こんにゃく（食品）産業の発展においてひとつの布石になることを期待し、今後さらに研究を広げたいと考える。また、免疫・アレルギー疾患の克服を目指して、複雑な免疫ネットワークの謎を少しでも解き明かし、社会に貢献していきたい。

【謝 辞】

本研究の遂行にあたり、終始貴重なご指導ご鞭撻を賜りました、広島大学大学院先端物質科学研究科教授、小埜和久博士に深甚な万謝をささげる次第であります。

また、本実験の遂行および論文の執筆にあたり、終始細かなところまで熱心にご指導ご助言をいただきました、広島大学大学院先端物質科学研究科助教、河本正次博士に深甚な感謝の意を表します。

会社の業務の中で大変有意義な研究の機会を与えていただき、最後まで多大なご支援を賜りました、西川ゴム工業株式会社技術開発部次長、橋本邦彦博士に深く感謝申し上げます。

さらに、本研究において医学的な見地から貴重なご指導ご助言を賜りました、広島大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学教授、秀道広博士に甚大なる謝意を表します。

本学位論文の審査をいただきました、広島大学大学院先端物質科学研究科、山田隆教授、木梨陽康教授ならびに秋庸裕准教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究に関して、熱心なご指導ご助言をいただきました、広島大学大学院先端物質科学研究科元助教、重田征子博士に厚く謝意を申し上げます。

ここで、微粉砕 KGM 原料の物性評価ならびに食品形態の検討による成果は、清水化学株式会社の方々のご協力によるところが多いことを明記し、その開発に多大なご尽力をいただきました清水化学株式会社開発課課長、清水寿夫殿に深くお礼申し上げます。また、こんにやくの科学研究の温故知新について興味深いお話をいただきました、清水化学株式会社代表取締役社長、清水秀樹博士に心より謝意を表します。

本研究の実施に関して、貴重なご助言を賜りました、広島大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学研究員、鈴木秀規博士に感謝致します。

細胞培養実験において多大なご協力をいただきました、小埜研究室の中野敏明博士（現長庚記念医院高雄分院准教授）に謝意を表します。また、小埜研究室の西村賢殿、山藤裕之殿、生田務殿、上田和志殿の方々には卒業研究としてご協力いただき、心よりお礼申し上げます。

さらに短い期間ではありましたが、本研究の分析に関して多大なご協力をいただきました、西川ゴム工業株式会社の前濫可奈子殿に感謝申し上げます。

なお、本研究の多くは、農林水産省（ニューフード・クリエーション技術研究組合）の助成金（平成 11 年～15 年、食品の機能性向上技術の開発事業）を得て実施したものであることを付記し、ここに謝意を表します。

最後に、本研究を進めるにあたり、終始激励をいただいた、家族と両親に感謝します。

Studies on immunomodulatory effects of KGM and its application to functional foods.

【参考文献】

- 1) 河田孝雄：外貨を稼げる機能性食品産業を育成しよう。バイオサイエンスとインダストリー, Vol.61 No.9, pp 624-627 (2003)
- 2) Tsuji C: Mannane as an Article of Human Food. J. Coll. Agric., Tokyo Imp. Univ., 2, 103 (1895)
- 3) 沖増哲 編著：こんにゃくの科学, 溪水社 (1993)
- 4) Goto K: The nature of the Carbohydrates in the Leaf, Stem and Tuber of *Amorphophallus konjaku* and their variations in amount under different conditions. J. Biochem. Tokyo, 1, 201 (1922)
- 5) Trowell HC: Ischemic heart disease and dietary fiber. Am J Clin Nutr, 25, 926-932(1972)
- 6) Burkitt DP: Epidemiology of cancer of the colon and rectum. Cancer, 28, 3-13 (1971)
- 7) Trowell HC, Burkitt DP: Dietary fiber and cardiovascular disease. Artery, 3, 107-109 (1977)
- 8) Burkitt DP: Colonic-rectal cancer: Fiber and other dietary factors. Am J Clin Nutr, 31, S58-S64 (1978)
- 9) Mizutani T, Mitsuoka T: Effect of konjac mannan on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in fischer 344 rats. Cancer letters, 19, 1-6 (1983)
- 10) Doi K, Matsuura M, Kawara A, Baba S: Treatment of diabetes with glucomannan (konjac mannan). Lancet, 1, 987-988 (1979)
- 11) Vuksan V, Jenkins DJA, Spadafora P, Sievenpiper JL, Owen R, Vidgen E, Brighenti F, Josse R, Leiter LA, Bruce-Thompson C: Konjac-mannan (glucomannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes: a randomized controlled metabolic trail. Diabetes Care, 22, 913-919 (1999)
- 12) Vuksan V, Sievenpiper JL, Owen R, Swilley JA, Spadafora P, Jenkins DJ, Vidgen E, Brighenti F, Josse RG, Leiter LA, Xu Z, Novokmet R: Beneficial effects of viscous dietary fiber from Konjac-mannan in subjects with the insulin resistance syndrome: results of a controlled metabolic trial. Diabetes Care, 23, 9-14(2000)
- 13) Vuksan V, Sievenpiper JL, Xu Z, Wong EYY, Jenkins AL, Beljan-Zdravkovic U, Leiter LA, Josse RG, Stavro MP: Konjac-mannan and american ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. J Am Coll Nutr, 20, 370S-380S (2001)

- 14) Doi K: Effect of konjac fibre (glucomannan) on glucose and lipids. *Eur J Clin Nutr*, 49, S190-S197 (1995)
- 15) 清水秀樹：高コレステロール血症治療薬の開発研究。博士学位論文 (1995)
- 16) Chen HL, Sheu W H-H, Tai T-S, Liaw Y-P, Chen Y-C: Konjac supplement alleviated hypercholesterolemia and hyperglycemia in type 2 diabetic subject-a randomized double-blind trial. *J Am Coll Nutr*, 22, 36-42 (2003)
- 17) Mizutani T, Mitsuoka T: Effect of Konjac mannan on spontaneous liver tumorigenesis and fecal flora in C3H/He male mice. *Cancer Letters*, 17, 27-32 (1982)
- 18) Chen HL, Fan YH, Chen ME, Chan Y: Unhydrolyzed and hydrolyzed konjac glucomannans modulated cecal and fecal microflora in Balb/c mice. *Nutrition*, 21, 1059-1064 (2005)
- 19) Swinbanks D, O'Brien J: Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature*, 364, 180 (1993)
- 20) こんにゃくに関する資料, (財) 日本こんにゃく協会 (2007年3月)
- 21) Lim BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P, Sugano M: Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J Nutr*, 127, 663-667 (1997)
- 22) Yamada K, Tokunaga Y, Ikeda A, Ohkura K, Mamiya S, Kaku S, Sugano M, Tachibana H: Dietary effect of guar gum and its partially hydrolyzed product on the lipid metabolism and immune function of Sprague-Dawley rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 2163-2167 (1999)
- 23) Kudoh K, Shimizu J, Ishiyama A, Wada M, Takita T, Kanke Y, Innami S: Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. *J Nutr Sci Vitaminol*, 45, 173-181 (1999)
- 24) 玉田康彦, 大橋勝, 小林敏夫, 吉田孝人, 近藤恭司: NCマウスの紅斑, 脱毛病変の発生過程における病理学的変化. *アレルギー*, 25, 829 (1976)
- 25) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C: Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol*, 9, 461-466 (1997)
- 26) Yamaguchi T, Maekawa T, Nishikawa Y, Nojima H, Kaneko M, Kawakita T, Miyamoto T, Kuraishi Y: Characterization of itch-associated response of NC mice with mite-induced chronic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 25, 20-28 (2001)
- 27) Yagi R, Nagai H, Iigo Y, Akimoto T, Arai T, Kubo M: Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J Immunol*, 168,

- 2020-2027 (2002)
- 28) Hashimoto Y, Arai I, Nakanishi Y, Sakurai T, Nakamura A, Nakaike S: Scratching of their skin by NC/Nga mice leads to development of dermatitis. *Life Sciences*, 76, 783-794 (2004)
- 29) Shi HN, Scott ME, Stevenson MM, Koski KG: Energy restriction and zinc deficiency impair the functions of murine T cells and antigen-presenting cells during gastrointestinal nematode infection. *J Nutr*, 128, 20-27 (1998)
- 30) Koski KG, Su Z, Scott ME: Energy deficits suppress both systemic and gut immunity during infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 264, 796-801 (1999)
- 31) Fan WY, Kouda K, Nakamura H, Takeuchi H: Effects of dietary restriction on spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Exp Biol Med*, 226, 1045-1050 (2001)
- 32) Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2, and more. *Immunol Today*, 17, 138 (1996)
- 33) Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787-793 (1996)
- 34) 久保允人 : Th1 反応と Th2 反応による感染防御と疾患, 小安重夫編集「免疫学がわかる」, 羊土社, 74-80 (2003)
- 35) Arkwright PD, Fujisawa C, Tanaka A, Matsuda H: *Mycobacterium vaccae* reduces scratching behavior but not the rash in NC mice with eczema: a randomized, blinded, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol*, 124, 140-143 (2005)
- 36) Mihara K, Kuratani K, Matsui T, Nakamura M, Yokota K: Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Br J Dermatol*, 151, 335-345 (2004)
- 37) Ohmura T, Tsunenari I, Hayashi T, Satoh Y, Konomi A, Nanri H, Kawachi M, Morikawa M, Kadota T, Satoh H: Role of substance P in an NC/Nga mouse model of atopic dermatitis-like disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 133, 389-397 (2004)
- 38) Ohmura T, Hayashi T, Satoh Y, Konomi A, Jung B, Satoh H: Involvement of Substance P in scratching behaviour in an atopic dermatitis model. *Eur J Pharmacol*, 491:191-194 (2004)
- 39) Morita E, Kaneko S, Hiragun T, Shindo H, Tanaka T, Furukawa T, Nobukiyo A, Yamamoto S: Fur mites induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mice, NC/Kuj. *J Dermatol Sci*, 19, 37-43 (1999)
- 40) Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, Bhan AK, Geha RS: Roles of Th1 and Th2

- cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest*, 103, 1103-1111 (1999)
- 41) Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA: New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 113, 651-657 (2004)
 - 42) Grewe M, Gyufko K, Schopf E, Krutmann J: Lesional expression of interferon- γ in atopic eczema. *Lancet*, 343, 25-26 (1994)
 - 43) Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H, Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R, Ra C, Ogawa H: Transforming growth factor- β_1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Clin Exp Allergy*, 32, 309-314 (2002)
 - 44) Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M: Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol*, 3, 1313-1324 (2003)
 - 45) Greaves MW, Wall PD: Pathophysiology of itching. *Lancet*, 348, 938-940 (1996)
 - 46) Watanabe N, Tomimori Y, Saito K, Miura K, Wada A, Tsudzuki M, Fukuda Y: Chymase inhibitor improves dermatitis in NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 128, 229-234 (2002)
 - 47) Inagaki N, Nagao M, Igeta K, Kawasaki H, Kim JF, Nagai H: Scratching behavior in various strain of mice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 87-96 (2001)
 - 48) Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, Altnauer F, Simon HU, Graeve T, Noll M, Brocker EB, Blaser K, Akdis CA: T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest*, 106, 25-35 (2000)
 - 49) Sakamoto T, Miyazaki E, Aramaki Y, Arima H, Takahashi M, Kato Y, Koga M, Tsuchiya S: Improvement of dermatitis by iontophoretically delivered antisense oligonucleotides for interleukin-10 in NC/Nga mice. *Gene Therapy*, 11, 317-324 (2004)
 - 50) Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, Rea TH, Wyzykowski R, Kim J, Jullien D, Mchugh T, Nassif AS, Chan SC, Modlin RL: Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol*, 154, 1956-1963 (1995)
 - 51) Laouini D, Alenius H, Bryce P, Oettgen H, Tsitsikov E, Geha RS: IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest*, 112,

- 1058-1066 (2003)
- 52) Enk AH, Katz SI: Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol*, 149, 92-95 (1992)
- 53) Vestergaard C, Kirstejn N, Gesser B, Mortensen JT, Matsushima K, Larsen CG: IL-10 augments the IFN- γ and TNF- α induced TARC production in HaCaT cells: a possible mechanism in the inflammatory reaction of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 26, 46-54 (2001)
- 54) Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K: Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest*, 104, 1097-1105 (1999)
- 55) Uchida T, Suto H, Ra C, Ogawa H, Kobata T, Okumura K: Preferential expression of Th2 chemokine and its receptor in atopic dermatitis. *Int Immunol*, 14, 1431-1438 (2002)
- 56) Nakamura H, Aoki M, Tamai K, Oishi M, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R: Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NF- κ B decoy oligodeoxynucleotides in NC/Nga atopic mouse model. *Gene therapy*, 9, 1221-1229 (2002)
- 57) Gordon J, Galli S: Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor α (TNF- α)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc ϵ RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF- α during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med*, 174, 103-107 (1991)
- 58) Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, Paquette N, Ziegler SF, Sarfati M, Delespesse G: Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med*, 204, 253-258 (2007)
- 59) Sawada J, Morita H, Tanaka A, Salminen S, He F, Matsuda H: Ingestion of heat-treated *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Clin Exp Allergy*, 37, 296-303 (2007)
- 60) Inoue R, Otsuka M, Nishio A, Ushida K: Primary administration of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 in weaning period suppresses the elevation of proinflammatory cytokines and CD86 gene expressions in skin lesions in NC/Nga mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 50, 67-76 (2007)

- 61) Hosono A, Ozawa A, Kato R, Ohnishi Y, Nakanishi Y, Kimura T, Nakamura R: Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 758-764 (2003)
- 62) Nakamura Y, Nosaka S, Suzuki M, Nagafuchi S, Takahashi T, Yajima T, Takenouchi-Ohkubo N, Iwase T, Moro I: Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clin Exp Immunol*, 137, 52-58 (2004)
- 63) Chen HL, Cheng HC, Liu YJ, Liu SY, Wu WT: Konjac acts as a natural laxative by increasing stool bulk and improving colonic ecology in healthy adults. *Nutrition*, 22, 1112-1119 (2006)
- 64) Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauli E: Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*, 107, 129-134 (2001)
- 65) Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauli E: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*, 357, 1076-1079 (2001)
- 66) Jenkins DJA, Kendall CW, Vuksan V, Augustin LS, Li YM, Lee B, Mehling CC, Parker T, Faulkner D, Seyler H, Vidgen E, Fulgoni V: The effect of wheat bran particle size on laxation and colonic fermentation. *J Am Coll Nutr*, 18, 339-345 (1999)
- 67) Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F: A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induce Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204, 1757-1764 (2007)
- 68) Miyahara S, Miyahara N, Takeda K, Joetham A, Gelfand EW: Physiologic assessment of allergic rhinitis in mice: role of the high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI). *J Allergy Clin Immunol*, 116, 1020-1027 (2005)
- 69) Miyahara S, Miyahara N, Matsubara S, Takeda K, Koya T, Gelfand EW: IL-13 is essential to the late-phase response in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 118, 1110-1116 (2006)
- 70) Suto A, Nakajima H, Hirose K, Suzuki K, Kagami S, Seto Y, Hoshimoto A, Saito Y, Foster DC, Iwamoto I: Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C (epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood*, 100,

4565-4573 (2002)

- 71) Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC, Liu C, 3rd, Schwartzberg PL, Leonard WJ: A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*, 298, 1630-1634 (2002)
- 72) Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, Horiguchi S, Okamoto Y, Nakayama T, Suzuki N, Yeh WC, Akira S, Kitamura H, Ohara O, Seino K, Taniguchi M: IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med*, 203, 2929-2937 (2006)
- 73) Obayashi K, Doi T, Koyasu S: Dendritic cells suppresses IgE production in B cells. *Int. Immunol*, 19, 217-226 (2007)
- 74) Natsuume-Sakai S, Kondo K, Migita S: Quantitative estimation of serum Ss level: changes upon the development of autoantibodies, environment and acute inflammation in inbred mice. *Jpn J Exp Med*, 47, 117-123 (1977)
- 75) Gutermuth J, Ollert M, Ring J, Behrendt H, Jakob T: Mouse models of atopic eczema critically evaluated. *Int Arch Allergy Immunol*, 135, 262-276 (2004)
- 76) Sakai T, Kogiso M, Mitsuya K, Komatsu T, Yamamoto S: Defect of oral tolerance in NC/Nga mice. *J Med Invest*, 53, 29-33 (2006)
- 77) Sakai T, Kogiso M, Mitsuya K, Komatsu T, Yamamoto S: Deletion polymorphisms in the promoter region of Fcγ receptor IIB is not associated with antigen-specific IgG2a and IgG2b antibody responses in NC/Nga mice. *Microbiol Immunol*, 50, 475-480 (2006)
- 78) Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D, Li Y, Galperina O, Giri J, Roschke V, Nardelli B, Carrell J, Sosnovtseva S, Greenfield W, Ruben SM, Olsen HS, Fikes J, Hilbert DM: BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 285, 260-263 (1999)
- 79) Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL: Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*, 190, 1697-1710 (1999)
- 80) Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish-Novak J, Foster D, Lofton-Day C, Moore M, Littau A, Grossman A, Haugen H, Foley K, Blumberg H, Harrison K, Kindsvogel W, Clegg CH: TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*,

404, 995-999 (2000)

- 81) Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM: Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*, 97, 198-204 (2001)
- 82) Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcón GS, Fessler BJ, Bastian H, Kimberly RP, Zhou T: Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166: 6-10 (2001)
- 83) Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W: Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 44, 1313-1319 (2001)
- 84) Sutherland AP, Ng LG, Fletcher CA, Shum B, Newton RA, Grey ST, Rolph MS, Mackay F, Mackay CR: BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. *J Immunol*, 174, 5537-5544 (2005)
- 85) Ramanujam M, Wang X, Huang W, Liu Z, Schiffer L, Tao H, Frank D, Rice J, Diamond B, Yu KO, Porcelli S, Davidson A: Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J Clin Invest*, 116, 724-734 (2006)
- 86) Wang H, Marsters SA, Baker T, Chan B, Lee WP, Fu L, Tumas D, Yan M, Dixit VM, Ashkenazi A, Grewal IS: TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nat Immunol*, 2, 632-637 (2001)
- 87) Theofilopoulos AN, Dixon FJ: Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol Rev*, 55, 179-216 (1981)
- 88) Valenta R, Maurer D, Steiner R, Seiberler S, Sperr WR, Valent P, Spitzauer S, Kapiotis S, Smolen J, Stingl G: Immunoglobulin E response to human proteins in atopic patients. *J Invest Dermatol*, 107, 203-208 (1996)
- 89) Valenta R, Natter S, Seiberler S, Wichlas S, Maurer D, Hess M, Pavelka M, Grote M, Ferreira F, Szepfalusi Z, Valent P, Stingl G: Molecular characterization of an autoallergen, Hom s 1, identified by serum IgE from atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol*, 111, 1178-1183 (1998)
- 90) Valenta R, Seiberler S, Natter S, Mahler V, Mossabeh R, Ring J, Stingl G: Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol*, 105, 432-437 (2000)
- 91) Kortekangas-Savolainen O, Peltonen S, Pummi K, Kalimo K, Savolainen J:

- IgE-binding components of cultured human keratinocytes in atopic eczema/dermatitis syndrome and their crossreactivity with *Malassezia furfur*. *Allergy*, 59,168-173 (2004)
- 92) Christensen SR, Kashgarian M, Alexopoulou L, Flavell RA, Akira S, Shlomchik MJ: Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med*, 202, 321-331 (2005)
- 93) Kubo C, Day NK, Good RA: Influence of early or late dietary restriction on life span and immunological parameters in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 5831-5835 (1984)
- 94) Takahashi S, Fossati L, Iwamoto M, Merino R, Motta R, Kobayakawa T, Izui S: Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J Clin Invest*, 97, 1597-604 (1996)
- 95) Schwarting A, Wada T, Kinoshita K, Tesch G, Kelley VR: IFN- γ receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Fas (lpr) mice. *J Immunol*, 161, 494-503 (1998)
- 96) Haas C, Ryffel B, Le Hir M: IFN- γ is essential for the development of autoimmune glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J Immunol*, 158, 5484-5491 (1997)
- 97) Kikawada E, Lenda DM, Kelley VR: IL-12 deficiency in MRL-Fas (lpr) mice delays nephritis and intrarenal IFN- γ expression, and diminishes systemic pathology. *J Immunol*. 170, 3915-3925 (2003)
- 98) Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T: Intestinal microflora: Probiotics and autoimmunity. *J Nutr*, 137, 798S-802S (2007)
- 99) Kano H, Kaneko T, Kaminogawa S: Oral intake of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 prevents collagen-induced arthritis in mice. *J Food Prot*, 65, 153-160 (2002)
- 100) 亀好良一, 望月満, 竹野幸夫, 鈴木秀規, 秀道広: 微粉碎コンニャクグルコマンナンの臨床応用に関する基礎的検討. *薬理と治療 (JPT)*, 34, 97-102 (2006)
- 101) Terada M, Tsutsui H, Imai Y, Yasuda K, Mizutani H, Yamanishi K, Kubo M, Matsui K, Sano H, Nakanishi K: Contribution of IL-18 to atopic-dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 8816-8821 (2006)
- 102) Cyranoski D: Japanese TV show admits faking science. *Nature*. 445, 804-805 (2007)

Studies on immunomodulatory effects of KGM and its application to functional foods.

公表論文

本博士論文の内容は、以下の学術雑誌に公表した。

- (1) The ability of konjac-glucomannan to suppress spontaneously occurring dermatitis in NC/Nga mice depends upon the particle size.
Onishi N, Kawamoto S, Nishimura M, Nakano T, Aki T, Shigeta S, Shimizu H, Hashimoto K, Ono K
BioFactors, 21, 163-166 (2004)
- (2) A new immunomodulatory function of low-viscous konjac glucomannan with a small particle size: its oral intake suppresses spontaneously occurring dermatitis in NC/Nga mice.
Onishi N, Kawamoto S, Nishimura M, Nakano T, Aki T, Shigeta S, Shimizu H, Hashimoto K, Ono K
Int. Arch. Allergy Immunol., 136, 258-265 (2005)
- (3) Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune responses in NC/Nga mice.
Onishi N, Kawamoto S, Suzuki H, Santo H, Aki T, Shigeta S, Hashimoto K, Hide M, Ono K
Int. Arch. Allergy Immunol., 144, 95-104 (2007)
- (4) Dietary pulverized konjac glucomannan prevents the development of allergic rhinitis-like symptoms and IgE response in mice.
Onishi N, Kawamoto S, Ueda K, Yamanaka Y, Katayama A, Suzuki H, Aki T, Hashimoto K, Hide M, Ono K
Biosci. Biotechnol. Biochem., 71 (10), 2551-2556 (2007)
- (5) Development of autoantibody responses in NC/Nga mice: its prevention by pulverized konjac glucomannan feeding.
Onishi N, Kawamoto S, Suzuki H, Hide M, Ono K
Arch. Dermatol. Res., 300, 95-99 (2008)

参考論文

- (1) グルコマンナンの免疫調節機能と食品への応用

大西 伸和

機能性糖質素材の開発と食品への応用，監修：井上國世，シーエムシー出版，
pp.353-360 (2005)

- (2) Oral administration of pulverized Konjac glucomannan prevents the increase of plasma IgE and IgG levels induced by the injection of syngeneic keratinocyte extracts in BALB/c mice.

Oomizu S, Onishi N, Suzuki H, Ueda K, Mochizuki M, Morimoto K, Kawamoto S, Ono K, Kameyoshi Y, Hide M

Clin. Exp. Allergy, 36, 102-110 (2006)