

公益財団法人 高木俊介パン科学技術振興財団

2022 年度 助成研究報告書

研究課題名

「パン酵母の有用形質をもたらす遺伝子の機能解析」

広島大学大学院 統合生命科学研究科

水沼 正樹

1. 研究目的

実用酵母は、パンや酒類の製造などに利用されており、ストレス耐性や高い発酵力を有する酵母として選抜・育種されてきた。しかし、実用酵母の有用な形質を支配している遺伝子については不明な点が多い。我々は、実験室酵母の *SSGI* 変異によってメチル基供与体・*S*-アデノシルメチオニン (SAM) が液胞内に高蓄積し、酸化ストレス耐性や細胞寿命が延長することを見出した。興味深いことに、実用酵母は *SSGI* 変異を野生型として元々持っていることが分かった。このことから、*SSGI* 変異は実用酵母の特徴的な表現型を付与することが予想された。また、*SSGI* 変異株の表現型の多くは *S*-アデノシルホモシステイン (SAH) を野生株に作用させるだけでも観察された。そこで、実験室酵母 *SSGI* 変異株の解析と SAH の作用メカニズムの解明を通して、実用酵母の有用形質の一端を分子レベルで解き明かすことを目的とした。

2. 方法

液胞膜小胞を使った SAM 輸送活性解析：伸長型 *SSGI* を過剰発現するベクターもしくは空ベクターを導入した酵母株から単離した液胞膜小胞に ATP 存在下もしくは非存在下で SAM を添加し、1 分間と 4 分間インキュベーションした後の小胞内 SAM 量を質量分析 (LC/MS/MS) により測定した。

酸化ストレス耐性試験：実験室野生酵母株を SD 液体培地で 2×10^6 cells/ml になるまで培養し、最終濃度が 1 mM となるよう SAH を添加後、さらに 8 時間培養した。培養液から 1 ml 採取し、等量の H_2O_2 (10 mM) を加えて 30 分間振盪した後、滅菌水で 2 回洗浄した。そのサンプルを YPD 固体培地にスポットし、25°C で 2 日間培養した。

DNA マイクロアレイ解析：実験室野生酵母株を SD 液体培地に植菌して 25°C で 12 時間培養した。12 時間後に 2×10^6 cells/ml (コントロールは 5×10^6 cells/ml) になるように植え継ぎ、12 時間培養し、SAH を添加した株は最終濃度が 1 mM となるよう SAH を添加後、さらに 6 時間培養した。mRNA の回収は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて行い、RNA 純度 A260/A280=1.7 ~ 2.1 に精製した。その後、GeneChip® Yeast Genome 2.0 Array (Affimetrix) を用いてマイクロアレイ解析を実施した。

3. 結果と考察

SSGI 遺伝子は、実用酵母において高発現によりエチオニン(メチオニンの構造アナログ)耐性を獲得する遺伝子 *ERC1* としても報告されている¹⁾。*SSGI* はフレームシフト変異が生じたため、その結果 36 個のアミノ酸分タンパク質が大きくなった²⁾。興味深いことに、清酒酵母をはじめとした実用酵母は *SSGI* 変異を野生型として元々有していた²⁾。*SSGI* 変異株は、SAM が高蓄積し、酸化ストレス耐性や寿命延長を示した²⁾。清酒酵母の醸造特性の一つに SAM の高蓄積が知られており、QTL (Quantitative Trait Locus: 量的形質遺伝子座) 解析から、*SSGI* が清酒酵母における SAM 高蓄積に寄与する主要な遺伝子の一つとして同定された³⁾。以上の結果から、*SSGI* 変異株の解析は実用酵母における有用形質の理解に貢献できると考えた。

そこで、Ssg1 の機能解析を行った。フレームシフト変異による伸長型 Ssg1 タンパク質(以後、単に Ssg1)の局在を調べたところ液胞膜に発現した。また、*SSGI* 変異株では液胞内に SAM を高蓄積したことから、Ssg1 は SAM を液胞内へと輸送するトランスポーターであると予想した(図 1)。

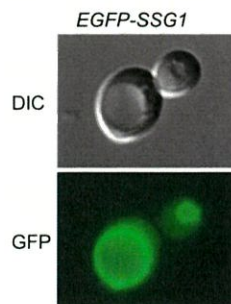


図1. Ssg1は液胞膜に局在する。

そこで、*SSGI* を過剰発現するプラスミドもしくは空ベクターを導入した酵母株から単離した液胞膜小胞を用いて、小胞内 SAM 量を質量分析により測定した。空ベクターを導入した株の小胞では ATP の有無にかかわらず SAM 含量はほとんど変化しなかったのに対し、*SSGI* を過剰発現させた株の小胞では時間経過とともに SAM 含量が増加した。このことから Ssg1 は SAM を液胞膜小胞へと取り込むことが示唆された。

これまでの解析から、*SSGI* 変異株では SAM のみならず SAM の競合阻害剤である SAH も高蓄積していた²⁾。また、SAH を実験室野生株に作用させると、SAM の高蓄積と寿命延長を誘導することも発見した⁴⁾。そこで、*SSGI* 変異株の表現型の一つである酸化ストレスについても SAH により耐性を獲得することが予想されたため、1 mM の SAH を添加した際の H₂O₂ の酸化ストレスに対する応答を調べた。その結果、SAH を添加するとコントロールの野生株に比べて酸化ストレスに耐性を示した(図2)。このことから、*SSGI* 変異株で観察された表現型は SAH によるものであることが示唆された。

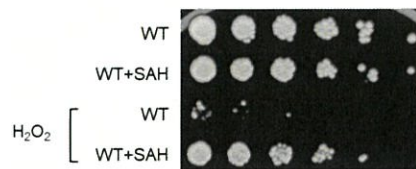


図2. SAHにより野生株は酸化ストレス耐性を獲得する。
 2×10^7 cells/mlから順次5倍希釈をした。これをYPD固体培地にスポットし、H₂O₂の有無で、25℃で2日間培養した。

さらに、SAH による SAM 高蓄積、酸化ストレス耐性や寿命延長メカニズムを明らかにするため、野生株に SAH を作用させ、DNA マイクロアレイ解析を行なった。その結果、69 個の遺伝子の発現が増加し、292 個の遺伝子の発現が減少していた。そこで、発現が低下した遺伝子について機能ごとに分類したところ、翻訳に関わる遺伝子の発現が多数低下していた(図3)。

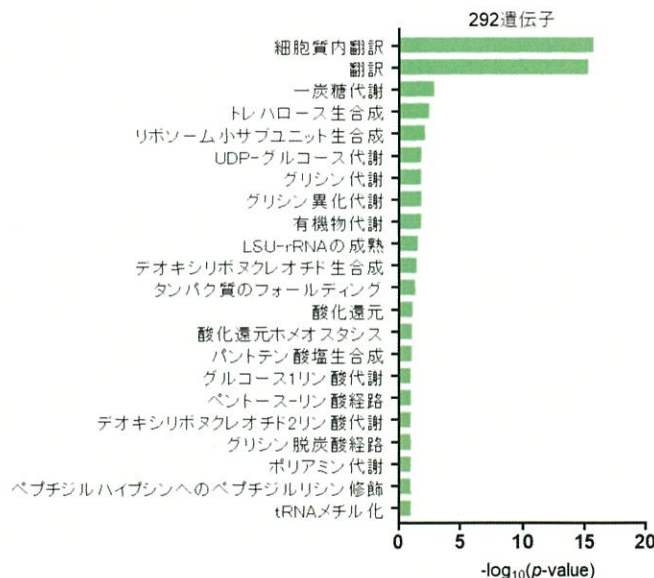


図3. SAHにより翻訳関連遺伝子の発現が減少した。
 発現が減少した遺伝子(292個)の機能的分類。

翻訳の制御には、TOR (Target of Rapamycin) 複合体 1 経路が大きな役割を果たしていることが知られているため、SAH によって TOR1 の機能が低下していることが予想された。Tor1 はオートファジーを抑圧していることから、SAH によって TOR1 の機能を低下させ、オートファジーが活性化することが予想された。そこで、GFP-Atg8 Processing assay を行い、SAH によるオートファジーへの影響を調べた。その結果、SAH の添加により GFP-Atg8 の分解が誘導され、遊離 GFP の増加が観察された。この結果から、SAH によってオートファジーが促進されたことが示唆された。さらに、SAH による新たな細胞機能を見出した。これらの結果から、SAH は Tor1 の機能低下に関与し、その結果、オートファジーが誘導され、酸化ストレス耐性や寿命が延長したことが示唆された。

本研究から、Ssg1 が液胞膜における SAM 輸送に関与することが示唆され、SAH が Ssg1 の機能に重要な役割を果たしていることが予想された。

4. 今後の展望

これまでに、SAH 処理した酵母では SAM 合成の活性化を介して寿命延長に関与することを見出しているが、SAH がどのように SAM 合成に関与するかは不明である⁴⁾。SSG1 変異株が示す表現型は SAH の効果と類似していたことから、SAH は Ssg1 の活性制御に関与することが予想され、このメカニズム解明や生理的意義が鍵となると思われる。

清酒酵母などの実用酵母では SSG1 変異を有していることから、清酒酵母は SAH を上手く利用して発酵中の高グルコースや高温など過度なストレス環境下に適応しているのかもしれない。SAM はメチル基供与体としての役割が注目を浴びているが、SAH はメチル基供与後の副産物としか認識されていなかったため、SAH そのものには着目されてこなかった。今後は、SAH による細胞機能の詳細、特にエタノール発酵に及ぼす影響を詳細に解析することで、これまでにない視点から食品や発酵・醸造科学、進化論的観点からのメカニズム解明・考察など様々な分野へ貢献したい。

5. 謝辞

本研究をご支援いただいた高木俊介パン科学技術振興財団ならびに財団事務局の鍛冶谷孝氏に深く感謝いたします。また、本研究にご協力いただいた愛媛大学大学院農学研究科の関藤孝之博士、河田美幸博士、米山香織博士、独立行政法人酒類総合研究所の金井宗良博士、広島大学大学院統合生命科学研究科の小川貴史博士、益村晃司博士、古原優希氏、小山哲也氏、並びに同研究科健康長寿学研究室のメンバーに深く感謝申し上げます。

6. 引用文献

- 1) Shiomi, N. *et al.*: Nucleotide sequence and characterization of a Gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 211~215 (1991)
- 2) Ogawa, T. *et al.*: Stimulating *S*-adenosyl-L- methionine synthesis extends lifespan via activation of AMPK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 11913~11918 (2016)
- 3) Kanai, M. *et al.*: Sake yeast *YHR032W/ERC1* haplotype contributes to high *S*-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains, *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 8~14 (2017)
- 4) Ogawa, T. *et al.*: *S*-adenosyl-L-homocysteine extends lifespan through methionine restriction effects, *Aging Cell*, 21, e13604 (2022)

公益財団法人 高木俊介パン科学技術振興財団 2022 年度助成研究報告書

研究課題名：脳情報に基づくパンのおいしさの基礎検討

広島大学大学院人間社会科学研究所 富永美穂子
広島大学 脳・こころ・感性科学研究センター 町澤まる

1. 目的

国内においてはパンへの支出額が米への支出額を上回り、パン食のニーズが増加している。パンは、その種類が非常に豊富であり、パンの好みや選択は、購入方法も含め、個々人の生活スタイルや TPPO により多様であると考えられる。広島大学町澤グループ・富永グループとアンデルセングループは、文部科学省・JST 事業「COISTREAM」において、2020 年度より本研究テーマの試金石となる「石窯パンのおいしさ」について、石窯以外の焼成パンとの比較を、視覚・実食と質問紙により行ってきた。その研究の一部を 2021 年度の卒論研究としても取り組み、パンに対する大学生の意識に関する調査の成果として、①大学生は、自身の居住場所において朝食時にスーパーで購入した食パンを食べる割合が高い。②もちもち感のあるしっとりとしたパンを好み、焼き立ての香りや食感、パン選択購入時には大きさや見た目を重視している。③女性の方が男性よりもパンに対して、お腹や心が満たされる満足感や幸福感を感じる割合が高く、パンに対する消費選択行動や価値意識に男女差があること、などを明らかにした¹⁾が、対象が大学生のみにとどまっている。

通常、食品のおいしさは実食により、判断・評価されてきたが、近年、ネット通販や SNS を通じて、食品を画像で見る機会が増えており、提示された画像のみから味覚や食感などの感覚特性をイメージして評価し、最終的に購入に至っていると考えられる。また、これまでパンのおいしさ等にかかわる評価については、人による主観評価（香ばしさ、甘さ、硬さなど）、機器測定による成分評価（糖度、味覚応答）、表面・内相の色や物理的評価（保水性、もろさ、付着性）などの指標で行われてきた。パンの購入者が実食した際の感動や味覚体験の評価は、回答者の意識的な主観評価反応は分かるものの無意識的な生理反応までは読み取ることができず、リアルタイム性にも欠けるという点で課題があったといえる。そのような課題を解決するためには、生理反応の一種であり、脳細胞の活動によって生じる電位変化を記録した脳波を用いることが有効であると考えられ、18 歳以上の幅広い年代を対象にパンに対する意識や摂取頻度、食生活に関するアンケートを行うとともに、パン画像から受ける印象を評価してもらうこととした。そして、20 代（主に大学生）に加え、40 代の女性を対象に、一般的なパン種の画像評価の際に脳波を計測する機会を設け、各画像評価時の脳波の傾向、先行しているアンケートとの相関を分析し、主観的アンケートと客観的脳波データとの複合解析により、パンのおいしさ指標を開発することを目的に検討を試みた。

2. 調査内容および方法

(1) 調査対象者

2022 年 11 月上旬～12 月上旬にかけて「パンに関するアンケート」として居在地を問わない全国、全世代の方を対象に Web アンケートを実施し、522 部を回収した。欠損値のあるデータおよび 18 歳未満の回答を削除し、男性 127 名、女性 340 名、計 467 名のデータを解析に用いた。な

お、有効回答率は 89.5%であった。

(2) 調査内容および回答方法

1) パンに対する意識等に関するアンケート

性、年齢、居住地、出身地、職業、学部、居住形態、同居人数、未既婚、パンの摂取頻度、パンに対する意識、好みのパンの特徴などのパンに関する項目、外食頻度や食事の摂取頻度、食生活に対する意識などの食生活に関する項目、世界価値観^{2) 3)}、ビックファイブ^{4) 5)}に関する項目などで構成し、選択肢からの選択や5~7件法により回答してもらった。

2) 市販パン画像の印象評価に関するアンケート

8種の市販パン(4パターン(ケースもの(食パン)、ロールパン、直焼き、菓子パン)×2種)を外観、内層が見えるアングルで撮影した画像を使用した。各パンのかたさ、甘さ、苦さ、朝または夜の食べたさ、高級感の6項目をVAS(Visual Analogue Scale)法(0(全くそうでない)100(とてもそうである))により評価してもらった。

3) 市販パン画像による印象評価と脳波計測

8種の市販パン(4パターン(ケースもの(食パン)、ロールパン、直焼き、菓子パン)×2種)を外観、内層が見える、真横、スライスなど、6アングルで撮影した画像を使用した。ランダム表示されるパン画像に対して、画像提示4秒後に甘さ、苦さ、食べたさの何れかを評価してもらった。3条件毎に分け同様に実施し、評価課題中の脳波を多チャンネルドライ脳波計(CGX社製Quick30)を装着してもらい、測定した。

(3) 分析方法

調査の集計および解析には、統計用ソフトSPSS ver.28(日本IBM(株))を使用した。調査項目の単純集計ならびに全体、男女別、年代別(10代、20代、30代、40代、50代以降の5段階)にクロス集計、 χ^2 検定、残差分析等を行った。5件法~7件法の回答項目に関しては、分類ごとに平均値を算出し、 t 検定、分散分析等を行った。なお、有意水準は5%とした。

22名の脳波データはMatlab(Mathworks社)およびEEGLAB v2022.0(University of California San Diego)を用いて、視覚の認知に関連する後頭部(側後頭葉及び後頭頂葉周辺の電極: O1/2, PO7/8, PO3/4,)を対象に事象関連電位(event-related potential)を算出した。全29電極を用いてそれぞれのtime-windowにおける頭皮上トポグラフィを算出した。

(4) 倫理的配慮

本調査において、Webアンケートへの回答内容は、本研究のみに使用し個人が特定されることなく、調査への協力は強制ではなく任意であり、回答をもって同意とした。なお、本研究は、本学大学院人間社会科学部倫理審査委員会(心理学専門領域部会)の承認(承認番号:HR-PSY-000370)を得て実施した。

3. 結果および考察

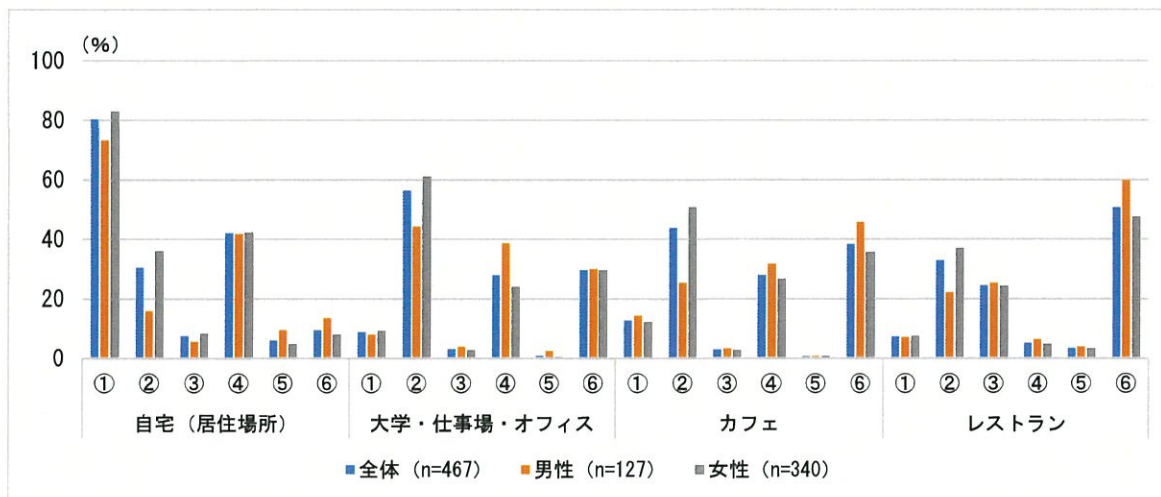
(1) パンの摂取頻度やパンに対する意識

本調査の男性の平均年齢は27.9±12.2歳、女性の平均年齢は27.6±12.2歳であった。男女比は約3:8で、20代の回答割合が約5割と最も高く、30代以降の回答割合が約3割であった。居住地は約7割が中国・四国圏、そのうち広島県は約7割、約1割が関東・関西圏、約2割が東北圏であった。居住形態において、学生は自宅と下宿での比率が約1:2であった。学生以外の居住形態に関しては持ち家が約5割と最も高かった。一人暮らしが約半数を占め、次いで4人での同居

割合が高かった。回答者の職業に関しては学生が約7割と最も高かったが、約3割は就業者であった。学生の学部は教育学部が約5割で最も高かった。

パンを食する場所や時間帯について、男女別に集計を行った結果を図1に示す。「自宅（居住場所）」で「朝食」時にパンを食べる割合が男女ともに最も高く、女性は昼食として、「大学・仕事場・オフィス」や「カフェ」でパンを食べる、を選択した割合も高く、レストランも含め、昼食時にパンを選択する割合が年代問わず男性よりも高かった。男性は「大学・仕事場・オフィス」で「おやつ・間食」としてパンを食べる割合が女性よりも高かった。

パンを選ぶ時に重視するポイントを提示した選択肢から、全て選択してもらい、男女、年代別に比較した。その結果の一部を図2に示す。10代、20代は「ボリュームがある」、「大きさがちょうどよい」などの量に関する選択割合が高かった。他方、30～50代はパンの質を重視する傾向にあり、「添加物が入っていない」、「国産小麦」、「天然酵母」、「全粒粉」、「ライ麦」などを使用しているパンを重視する割合が10代、20代よりも高かった。



①朝食、②昼食、③夕食、④おやつ・間食、⑤夜食、⑥食べない

図1 パンを食する場所や時間帯（男女比較）

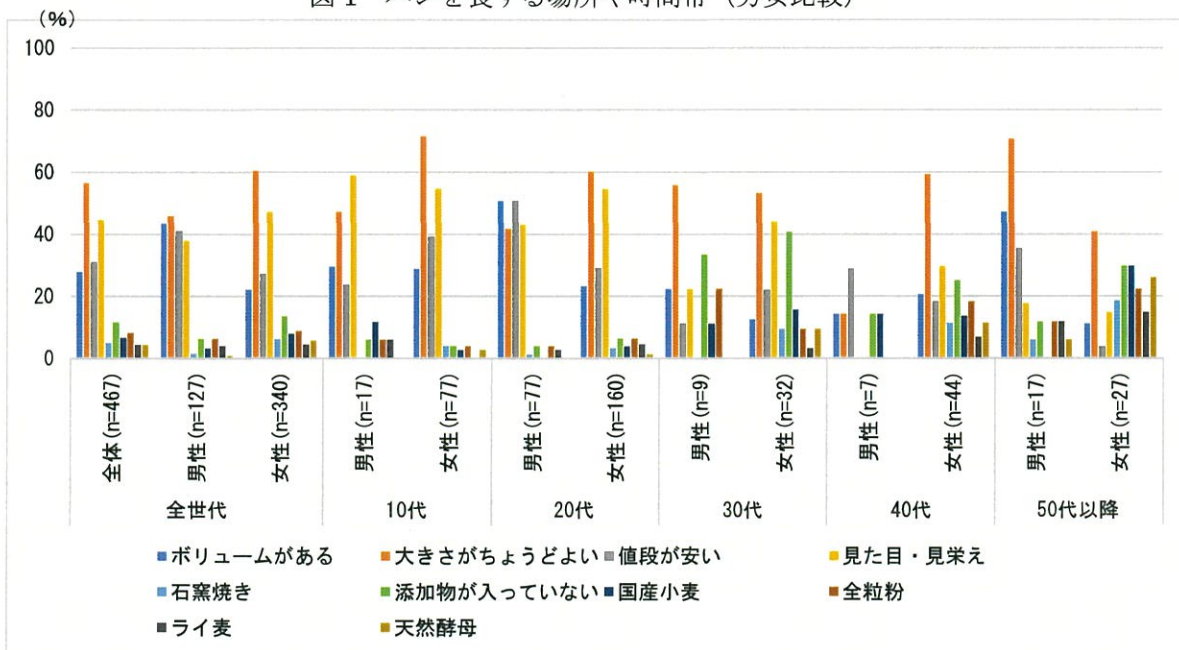


図2 パン選択時に重視するポイント（男女・年代比較）

パン屋（ベーカリー）を選択するとき重視するポイントについて、男女、年代別に比較した結果の一部を図3に示す。「清潔にされている店」、「種類が豊富な店」と回答した割合が全体では高かった。10～20代は「落ち着いた雰囲気」を選択する割合が40代以降の世代に比較的高く、10代は「甘いパンがおいしい店」を選択する割合、20代は「SNS等で人気の高い店」を選択する割合が他世代に比較的高かった。30代以降の女性は「ハード系パンがおいしい店」を選択する割合が比較的高かった。回答者数は少ないが30代以降の男性は「特にこだわりのない」と回答した割合が4割を超えていた。年代、男女により重視するポイントが異なっており、価値観の違いが窺われる。

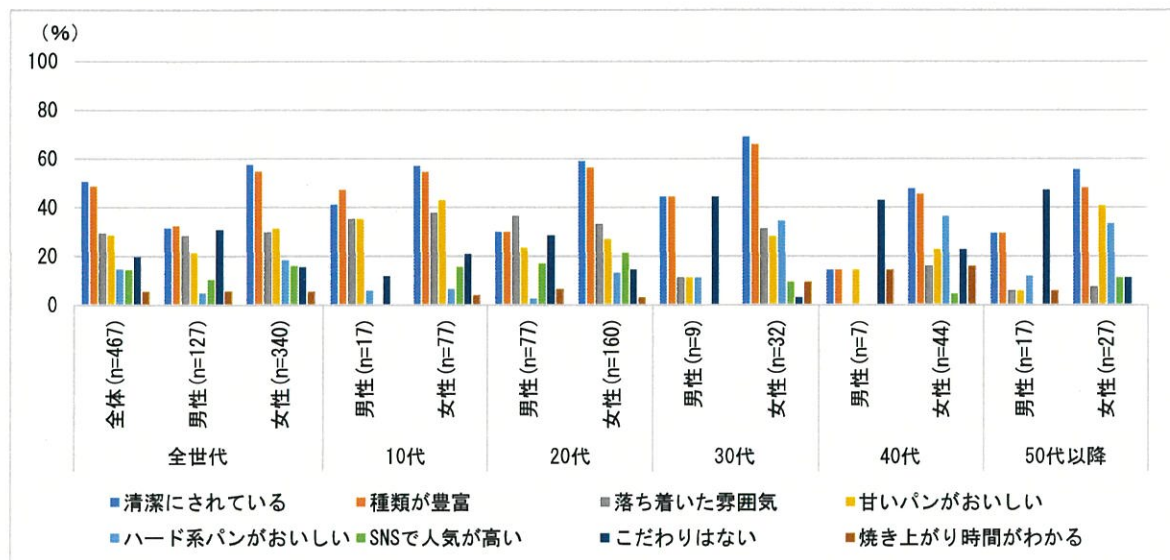


図3 パン屋（ベーカリー）選択時に重視するポイント（男女・年代比較）

好きなパンの特徴を提示した選択肢から全て選択してもらい、全体および男女、年代別に集計した結果の一部を図4に示す。全体では「とにかくおいしい」、「外はカリッとしていて、中はもっちり」、「しっとりもちもち」の選択割合が高く、それらの割合は10代女性が高かった。10～20代は「焼き立ての香り」を選択する割合、10代は「甘い香り」、30代は「しっとりもちもち」、30代以降の女性は「小麦の香り」や「素材の味」を好む割合が比較的高かった。回答者自体は少ないが、40代以降の男性は香りにあまりこだわらない傾向がみられた。10代は香りを含めて、甘いパンを好んでいる割合が他世代よりも高く、栄養的な要求との関連もあるかもしれない。

食生活におけるこだわりにおいて、男女、年代別に集計し、まとめた結果の一部を図5に示す。全体では、「ご褒美においしいものを食べる」、「食にある程度お金を使ってよい」、「食事は癒しの時間」を選択する割合が高かった。30～40代女性は「ご褒美においしいものを食べる」を選択した割合、30～40代男性は「食にある程度お金を使ってよい」を選択する割合が8割を超えていた。一方、30～40代女性は「食にある程度お金を使ってよい」を選択する割合は他世代よりも低い傾向にあり、普段はそれほど食にお金をかけず、ご褒美としての食に重きを置いていると考えられた。「1日3食食べる」、「身体によいものを食べる」、「添加物は極力避ける」割合は30代以降上昇する傾向にあり、健康を意識して食品を選択するようになってくるのがパンの選択からも分かる。他国の生活に慣れ親しんだ世代は30代が他世代よりも高かった。

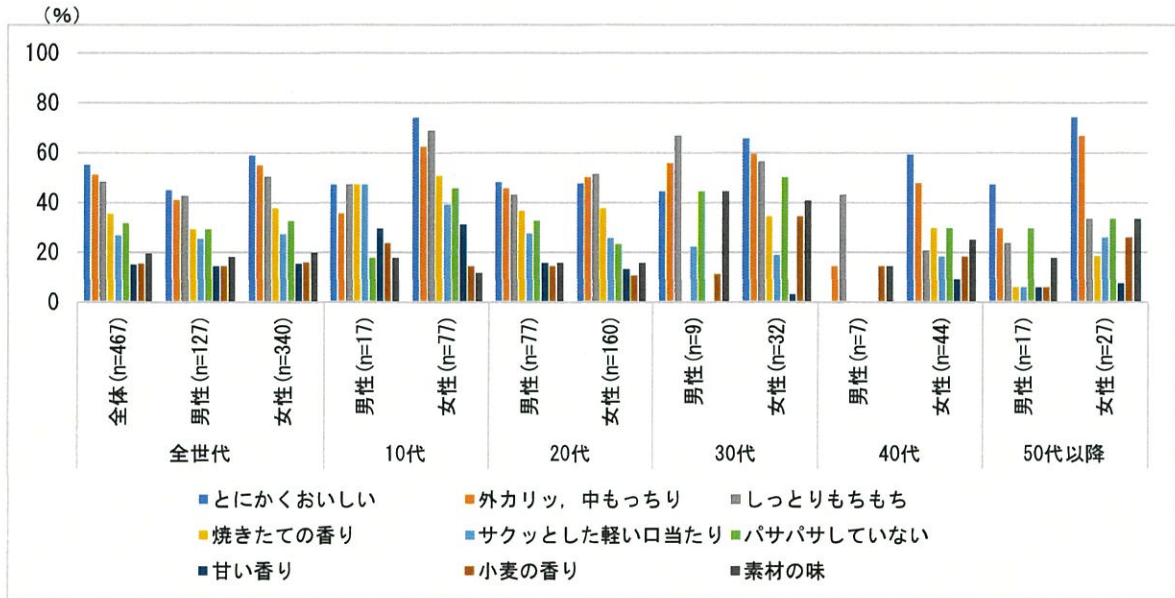


図4 好きなパンの特徴 (男女・年代比較)

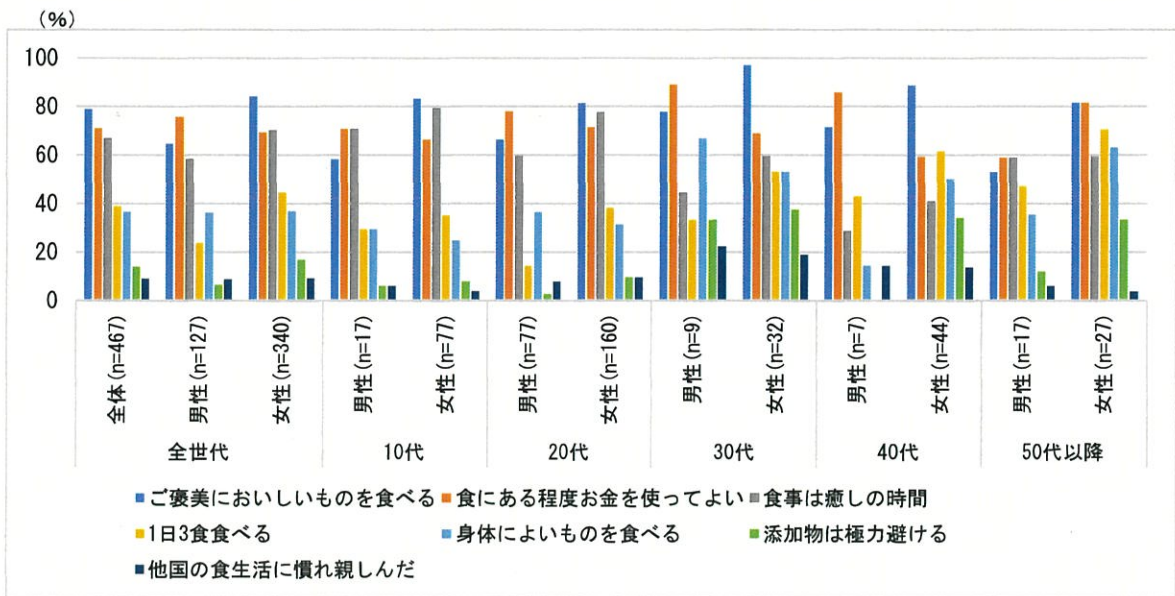


図5 食生活のこだわり (男女・年代比較)

外食状況に関して、食べ歩きや料理など、食に関する趣味がある割合は全体で5割程度であった。コンビニエンスストアを利用する割合は20～40代の男性が高く、多少高くても、おいしい店で外食をする割合は30代の女性、店選びは人気を重視する割合は20代女性が他世代よりも高かった(図表省略)。そのほか、時間感覚、理想の暮らし、モノを選ぶときに重視すること、生活において重視することなどについて尋ねたが、それら選択項目に男女差や年代による特徴がみられた(図表省略)。

これらの特徴の違いにおいて、個人特性ともいえる価値観や性格特性の関与も考えられ、国内外で使用頻度の高い世界価値観、ビッグファイブの尺度を使用し、男女、年代別に比較した結果を図6および7に示す。

世界価値観(図6)に関しては、「まったく当てはまらない」を1点、「非常によく当てはまる」

を6点とする平均値を示している。全体的な特徴としては、「周囲を助けて、幸せにすることが大切な人」、「楽しい時間を過ごす、自分を「甘やかす」ことが大切な人」、「安全な環境に住む、危険なことはすべて避けることが大切な人」の平均値が高かった。一般的に10代の平均値が他世代よりも高い傾向にあり、年齢を重ねることにより個々人の人生における着地点がおおよそ推測できるようになり、現実に対する客観視の影響で平均値が低下することが推察される。

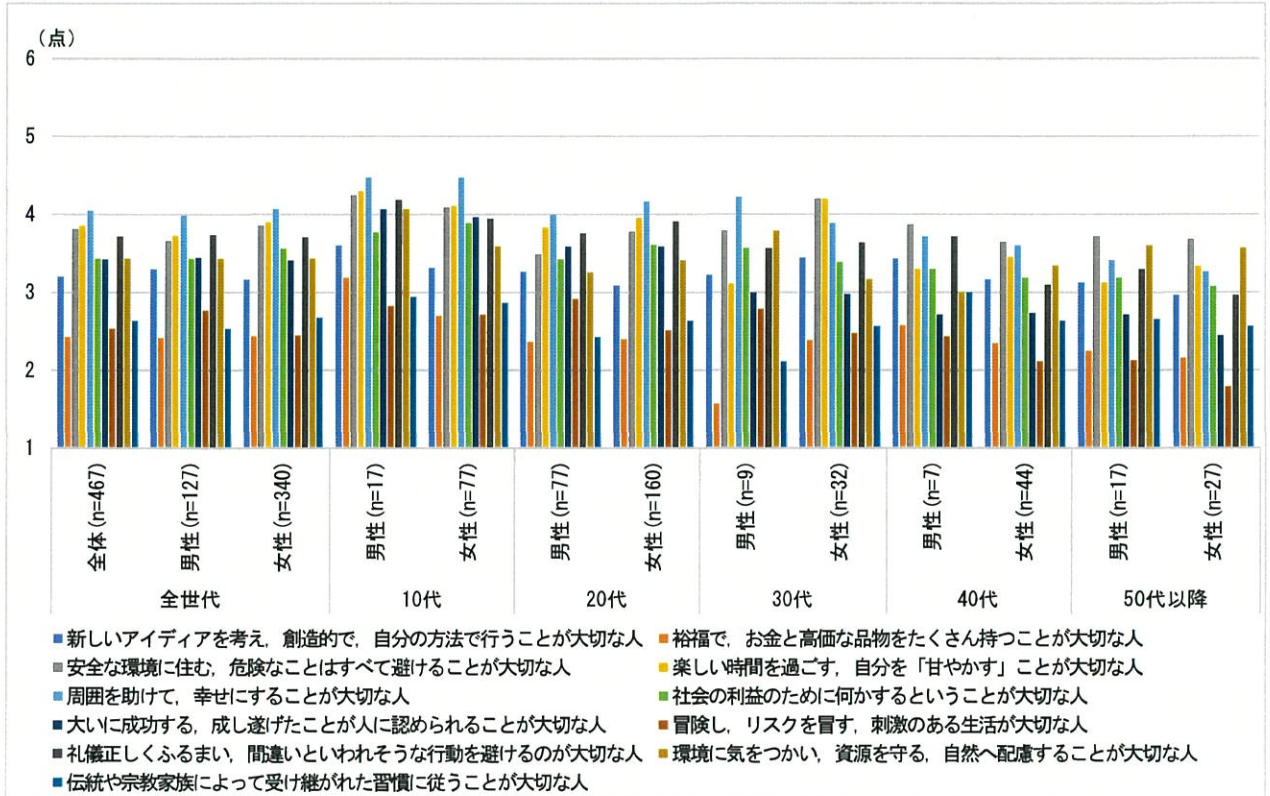


図6 世界価値観（男女・年代比較）

人の性格は外向性、協調性、誠実性、神経症傾向、開放性の5基本特性から構成されており、その基本特性を調査する尺度として一般的に使用されているビッグファイブ尺度で回答者の傾向を比較した。その結果を図7に示す。「どちらでもない」を4点とする7件法で評価してもらったが、回答者の全体的な特徴として、「人に気をつかう優しい人間だ」、「心配性でうろたえやすい」、「だらしなくうっかりしている」などの平均値が他の項目よりも高く、「他人に不満を持ち、もめごとを起こしやすい」の平均値が最も低かった。多少の変動はあるものの男女や年代でその傾向は大きく変化しておらず、日本人の一般的な性格特性と考えられる。「他人に不満を持ち、もめごとを起こしやすい」の平均値は女性の方が男性よりも低く、20代女性の平均値が最も低かった。特に若年世代の女性はもめごとをできるだけ避ける性格特性が強いと考えられた。

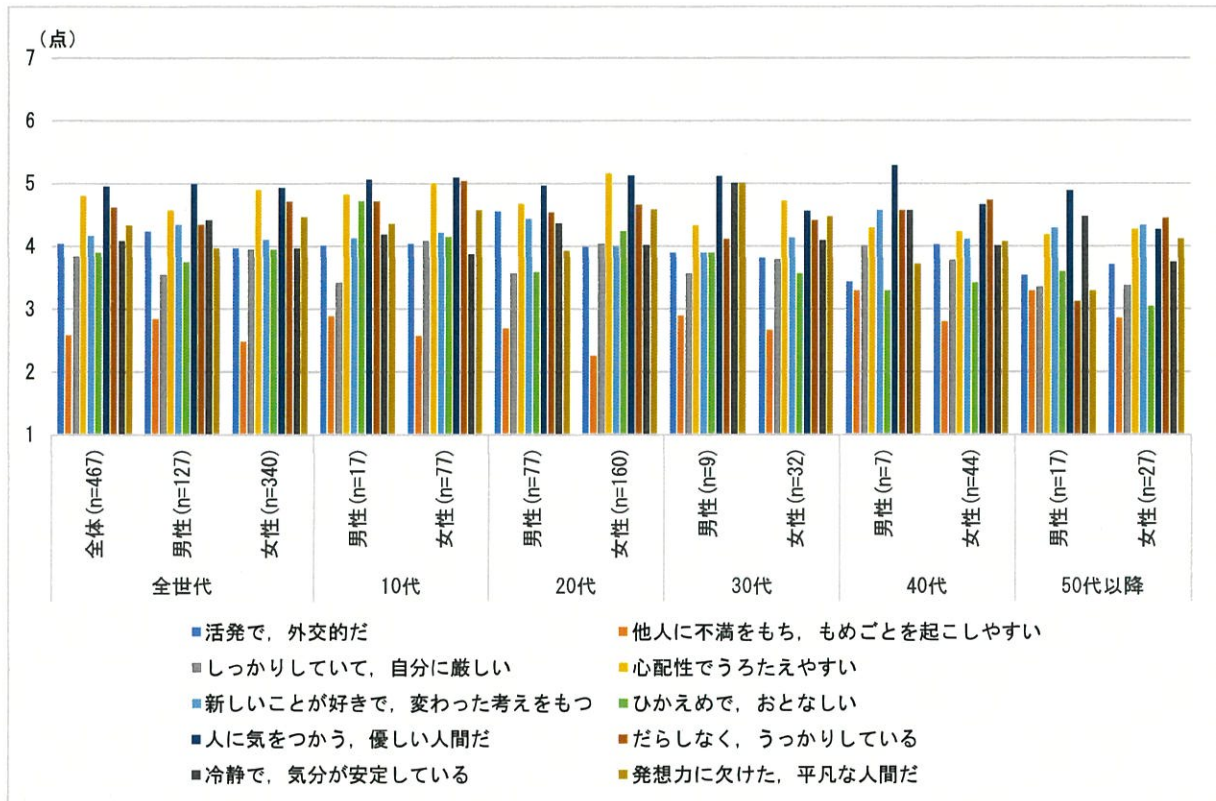


図 8 性格特性（ビッグファイブ）（男女・世代比較）

(2) パン画像の印象評価

8種の市販パン画像について、各評価項目の平均値を集計した結果 9 に示す。パン種間における「かたさ」、「甘さ」、「高級感」の得点差が大きく、菓子パンであるサンライズ、あんパンは他のパン種よりも突出して甘く、石窯パンは他種よりもかたく、高級であると評価された。どのパンも「朝の食べたさ」の方が「夜の食べたさ」よりも得点が高かったが、朝はケースもの、夜は直焼きのパンが好まれていた。女性は男性よりも「苦さ」、「かたさ」において、他のパン種より得点が高い石窯パンを高級感があると評価していた。図表は省略するが、10、20代の若年世代の方が他世代よりもかたさに対する得点が有意に高いパン種が多かった。また、女性において、「夜の食べたさ」自体の得点は高くないが、菓子パンに対する「夜の食べたさ」は10代が他世代よりも高かった。

画像評価において、パンは朝食時にトースト型を食べる、菓子パンは甘い、石窯パンはかたく、やや苦味や高級感が感じられるなど、相対的に見れば予想される結果であった。一方で、各パンの評価項目に対する平均得点の標準偏差が20点以上ある項目が全評価項目の8割を超えており（SD省略）、使用したパンサンプルの食経験の差も影響している可能性がある。さらに朝や夜の食べたさに対するバラツキが大きく、菓子パン2種は「朝の食べたさ」の標準偏差が30点以上あり（SD省略）、朝食として、喫食したいパン種の個人差が大きいと考えられた。男女差や年代差がみられるパンもあり、特に年代において、食品のかたさや甘さに対する受容性が異なり、個人の価値意識に加えて、食生活の変化なども関連している可能性が示唆された。今後はクラスター解析、主成分分析等の多変量解析を行い、パンに対する意識や好みと個人特性との関連性を解析していく予定である。

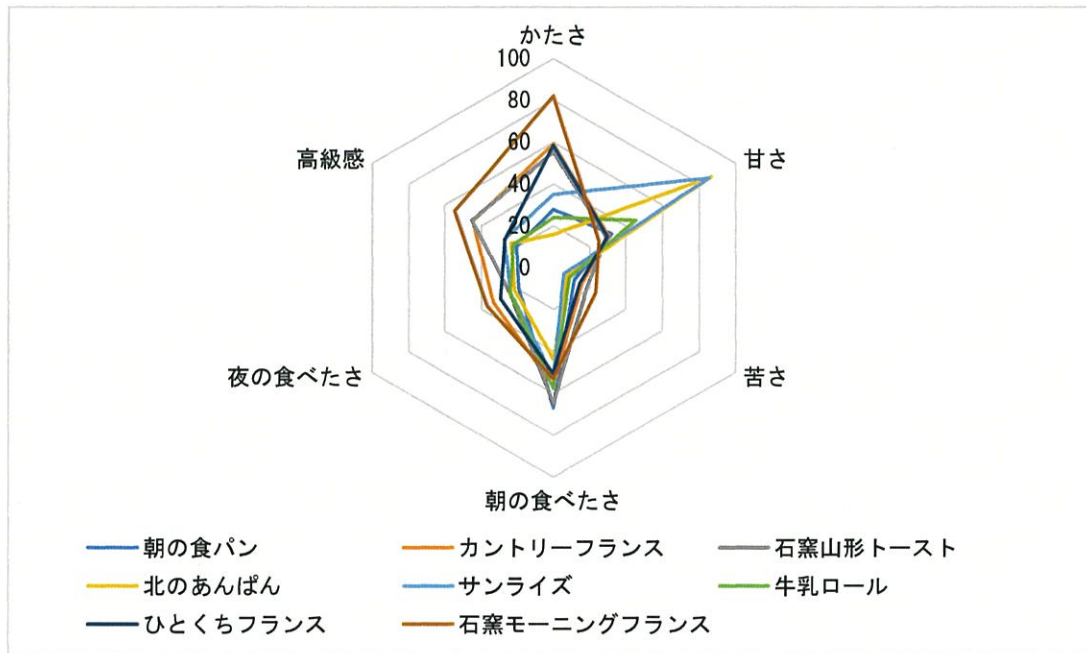


図 9 市販パンの印象評価 (n=467)

(3) 市販パン印象評価時の脳波

脳波測定に関しては、行動実験プログラムに不具合が生じたり、コロナ禍により予想以上に協力者が確保できず、現状女子学生 22 名のデータ収集にとどまっている。しかしながら、画像評価するにあたり、学生から本共同研究で新たに用意した素材をもちいた視覚評価が脳波データから、通常の脳波反応がみられることが確認された(図 10)。後頭頂葉および側後頭葉電極(PO3/4, P7/8, PO7/8, O1/2)において、P1 (120-130msec), N1 (150-170msec), P300 (280-500msec), NSW (500-3000msec) など、それぞれ視覚知覚、認識、注意、記憶の脳機能を反映する脳波指標が確認された(図 11)。今後、さらに協力者を増やし、特に脳に注意をひきつけたのか、記憶に残るインパクトがあったのかを、質問紙調査のクラスタリングをもとに精査していく予定である。

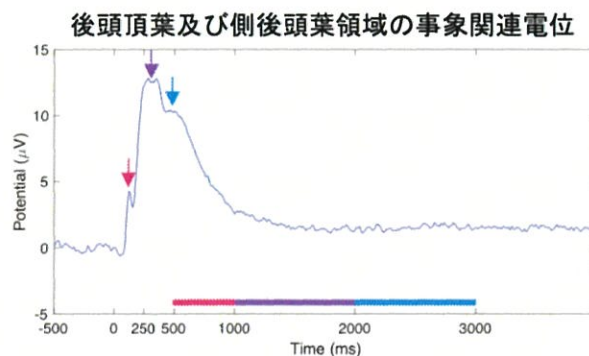


図 10 脳波測定協力者の事象関連電位 (n=22)

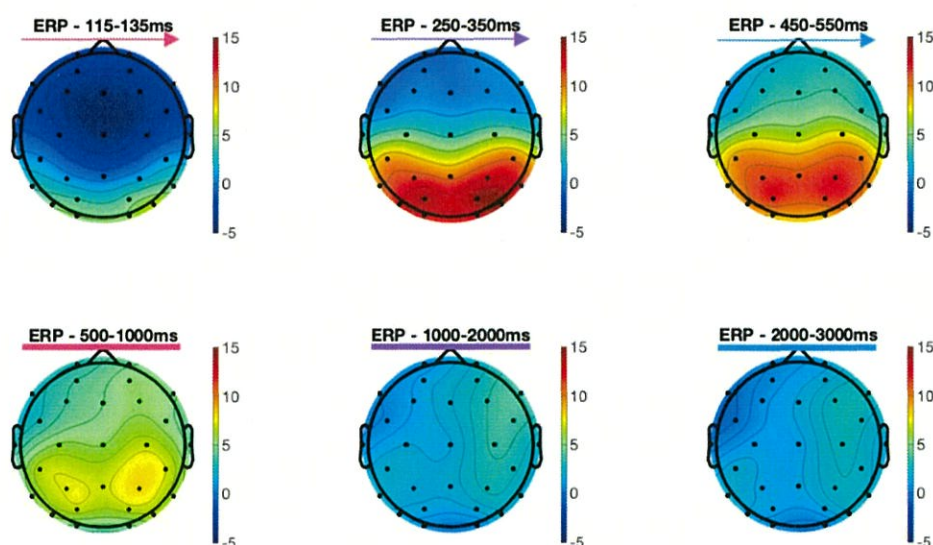


図 11 脳波測定協力者の頭皮上トポグラフィ (n=22)

謝 辞

本研究実施にあたり、公益財団法人 高木俊介パン科学技術振興財団の助成をいただきました。心より御礼申し上げます。また、アンケートの作成やパン画像の印象評価の実施において、画像の提供やご助言等いただきました(株) アンデルセン・パン生活文化研究所 室長 三山雅代様および上田雅子様ならびに Web アンケートおよび脳波測定にご協力いただきました学内外の皆様 に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 今井亜希, 三山雅代, 上田稚子, 町澤まろ, 富永美穂子 (2022). 大学生のパンに対する消費選択行動および価値意識の男女比較, 日本調理科学会研究発表要旨集, P-83.
- 2) Schwartz, S. H. (1992). Universals in the content and structure of values: Theoretical advances and empirical tests in 20 countries, *Advances in Experimental Social Psychology*, 25, 1-65.
- 3) 真鍋一史, 前田忠彦, 清水香基 (2018). Schwartz の「価値観理論」の構築とその後の展開: 「円環連続体モデル/ヒエラルヒカル構造モデル」に焦点を合わせて, 関西学院大学社会学部紀要, 139号, 1-41.
- 4) Gosling, S. D., Rentfrow, P. J., and Swann, W. B., Jr. (2003). A very brief measure of the Big-Five personality domains. *Journal of Research in Personality*, 37, 504-528.
- 5) 小塩真司, 阿部晋吾, カトローニピノ (2012). 日本語版 Ten Item Personality Inventory (TIPI-J) 作成の試み, パーソナリティ研究, 21, 40-52.

公益財団法人 高木俊介パン科学技術振興財団
2022年度 助成研究成果報告書 (若手研究者対象助成)

研究課題名「植物乳酸菌による生薬発酵液の抗炎症作用を活用した小麦アレルギー改善
効果に関する研究」

広島大学 大学院医系科学研究科
未病・予防医学共同研究講座
馬 青苗

1. 緒言

小麦は世界中で食される主要な穀物のひとつであるが、人によっては重度のアレルギー反応を引き起こすアレルゲンにもなる。小麦アレルギーの有病率は過去10年で増加している¹⁾。成人と子供とでは、小麦アレルギーでみられる臨床症状のタイプが異なっており、子供はアトピー性湿疹/皮膚炎症候群 (Atopic Eczema/ Dermatitis Syndrome; AEDS) の罹患率が主であり、成人では小麦依存的な運動誘発性アナフィラキシー (Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis; WDEIA) の罹患率が高い²⁻⁴⁾。

小麦にはグリアジンという物質が含まれている。この物質は難水溶性タンパク質 (プロラミン) であり、WDEIAのアレルゲンとして初めて同定された。その後、成人WDEIAのアレルゲンはおよそ8割が ω -5グリアジンであること、そして ω -5グリアジンが小児の即時型小麦アレルギーのメジャーアレルゲンであることが明らかにされた⁵⁻¹⁰⁾。

植物は、糖質、ビタミン類、ミネラルなどのほか、抗酸化物質、フェノール性物質、そして食物繊維といった化学物質を内在している。また、乳酸菌は種(species)や菌株ごとに異なった発酵特性を示し、さまざまな二次代謝産物を産生する¹¹⁾。したがって、これらを組み合わせた植物素材の乳酸菌による発酵プロセスは、配糖体のアグリコンへの変換や、化学合成法では困難な化合物へのバイオコンバージョンを可能にする。すなわち、ファイトケミカルのバイオアベイラビリティの改善と、生物活性物質を新生することから、ヒトの健康維持に有益な物質の生産法として期待されている¹²⁾。

本研究では、植物乳酸菌による薬用植物エキスの発酵による生物活性物質の新生に期待し、グリアジン食物アレルギーモデルマウスの症状に対する予防・改善効果を調べた。

2. 実験方法

2.1. 乳酸菌発酵生薬エキスの調製

薬用植物として、予備実験と文献調査によって抗アレルギー活性の期待される白朮 (ビヤクジュツ, *Atractylodes macrocephala* の根茎 (rhizome)) を用いた¹³⁾。乳酸菌株としては、

過去の研究成果から、抗炎症活性をもつ細胞外多糖体 (exopolysaccharide, EPS) を産生する *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68¹⁴⁻¹⁸⁾を用いた。

白朮を秤量し、終濃度 7.5 (w/v) %となるよう水を加え、105°Cで 30 分間加熱した後、遠心によって白朮残渣を取り除き、白朮熱水抽出液を回収した。NaOH により pH を 7.0 に調整後、121°Cで 15 分間滅菌した後、予め de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) 培地で培養していた IJH-SONE68 株の種培養液を 1 (v/v) %となるよう接種し、24 時間静置培養を行った。

2.2. 小麦グリアジンの抽出と調製

田中らの方法¹⁹⁾に従って調製した。具体的には、市販の小麦粉 (日清フラワー, 日清製粉ウエルナ) 50 g に 0.5 M 塩化ナトリウム水溶液 500 mL を加え、室温で 2 時間攪拌した。遠心分離 (1,700 × g, 15 分) 後、水溶液中に含まれる塩溶性タンパク質を除去し、残渣に 500 mL の蒸留水を加え、室温で 2 時間攪拌した。遠心分離 (1,700 × g, 15 分) によって水溶性アルブミンと塩類を除去するこの過程を 2 回繰り返した。次に、残渣に 500 mL の 70 (v/v) % エタノールを加え、4°Cで 2 時間攪拌した後、遠心分離 (1,700 × g, 15 分) してエタノール抽出物を回収した。エタノール抽出液を透析膜に入れ、30 倍容量の 1 (v/v) %酢酸水溶液で 4°C、60 時間攪拌しながら透析を行った。透析外液は、1 日目は 2-3 時間ごとに、それ以降は 1 日につき 2-3 回交換した。透析後、透析液内液を凍結乾燥機で乾燥させてグリアジン画分を得た。

2.3. 動物実験

動物実験の際、マウスはプラスチック製飼育ケージに 3-5 匹飼いとし、飼育は温度 20-26°C、湿度 40-60%、照明時間 8:00-20:00 (12 時間) の環境に調節された動物飼育室 (広島大学霞動物実験施設内) で行った。馴致期間を含め、餌は固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業) を、飲用水は精製水をそれぞれ自由摂取させた。

2.4. グリアジン感作モデルマウスの作製と実験計画

7 週齢の雌性 BALB/cCrSlc マウス (清水実験材料) を購入し、1 週間の馴致期間の後に実験に供した。1 週間経過時点を Day 0 とし、Day 3 から 4 日ごとに Day 11 まで 10 mg/mL のグリアジン溶液 0.1 mL をゾンデによって経口投与し、感作させた。この時、グリアジンを可溶化するために、溶媒として終濃度 0.75 (v/v) %のエタノールを添加したりノール酸/レシチン (4:1) の混液を使用した。また、グリアジン溶液には経口感作および経口惹起におけるアナフィラキシー症状の発症を促すため、新藤らの報告²⁰⁾を参考に、3 mg/mL となるようサリチル酸ナトリウムを混合させておいた。各マウスを非感作群 (gliadin (-) = non-sensitization, N)、感作コントロール群 (gliadin (+), non-treatment; G/N)、未発酵白朮エキス投与群 (G/AMR)、発酵白朮エキス群 (G/AMR+Sone68) の 4 つの群に分け、Day 0 よりそれぞれの群に応じ、0.1 mL の生理食塩水 (G および G/N 群) 若しくは発酵/未発酵の白朮エキス

をゾンデによって毎日経口投与した。この期間中、1 週間に 1 度体重を測定しておいた。解剖する前日 (Day 14) に感作量の 100 倍量のグリアジンを経口投与し、その 1 時間後に各マウスにおけるアナフィラキシー症状を観察してスコア化した。Day 15 にマウスをイソフルラン吸入深麻酔により安楽死させ、血液サンプルを採取し、IgE 濃度およびサイトカインの測定に供した。実験スケジュールの概要を図 1 に示す。

各測定データにおいて、群間の有意差検定には Tukey-Kramer 検定を用い、 p 値が 0.05 未満で有意差有りと判定した。なお、本動物実験は予め広島大学動物実験委員会による倫理審査およびその承認を受けて実施した (承認番号 A22-156)。

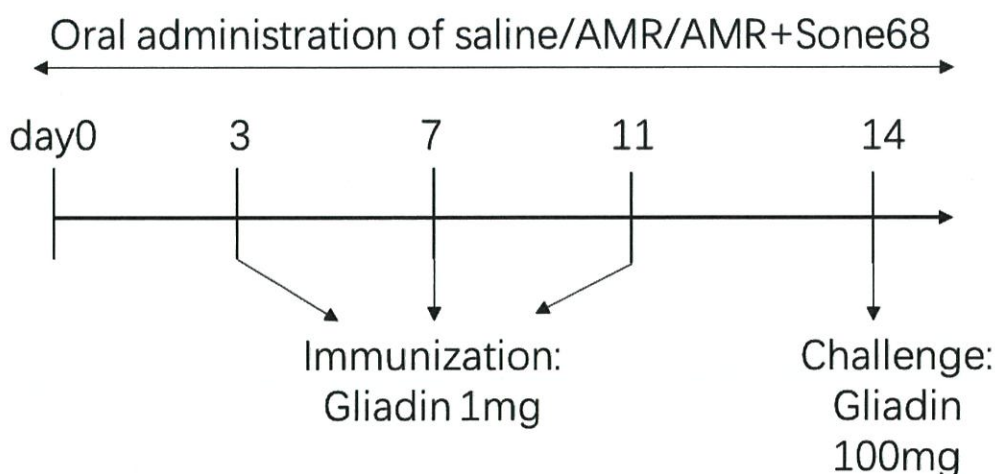


図 1. 本課題における動物実験のアウトライン。

マウスは、Day 3、7、および 11 に 1 mg のグリアジンを経口投与することで計 3 回感作し、その後 Day 14 に 100 mg のグリアジンを経口投与してアナフィラキシー症状を惹起した。

2.5. 各評価項目について

グリアジン投与 1 時間後にマウスの全身性アナフィラキシー症状を観察し、新藤らの基準に則って以下の様に症状をスコア化し評価した²¹⁾。全身性アナフィラキシー症状は、無症状を 0、立毛や鼻こすりを 1、吐き気を 2、努力呼吸やチアノーゼを 3、死亡 (24 時間以内) を 4 としてスコアをつけて、発症の頻度と強度を評価した。

採取した血液から血清を回収し、各個体の血液中総 IgE 濃度、インターロイキン-4 (IL-4)、およびインターフェロン γ (IFN- γ) 量について、それぞれに対応した ELISA キット (BioLegend) によって測定した。

3. 結果

3.1. 体重とアナフィラキシー症状における影響

発酵白朮エキスの摂取がグリアジン感作マウスにおける体重とアナフィラキシー症状にどのような影響を及ぼすかを評価した。図 2 に示すように、グリアジン感作によって G/N

群では N 群と比べて有意な体重減少が観察された ($p<0.01$) が、発酵/未発酵を問わず、白朮エキスの摂取により体重減少が抑制され、その有意な変化は解消の方向へシフトした。

グリアジンによるアナフィラキシー反応を惹起した後、N 群では目立った変化は観察されなかったが、G/N 群では 2 匹のマウスが 24 時間以内に死亡した。また、同群の残りのマウスには立毛が見られるとともに、うち 3 匹は努力呼吸、5 匹は吐き気を催していることが確認された。G/AMR 群では惹起後に 1 匹のマウスが死亡し、5 匹のマウスに立毛、3 匹に嘔吐、そして 1 匹のマウスに努力呼吸が認められた。しかし、AMR+Sone68 群では 1 匹にのみ立毛のみみられただけであった (図 2B)。

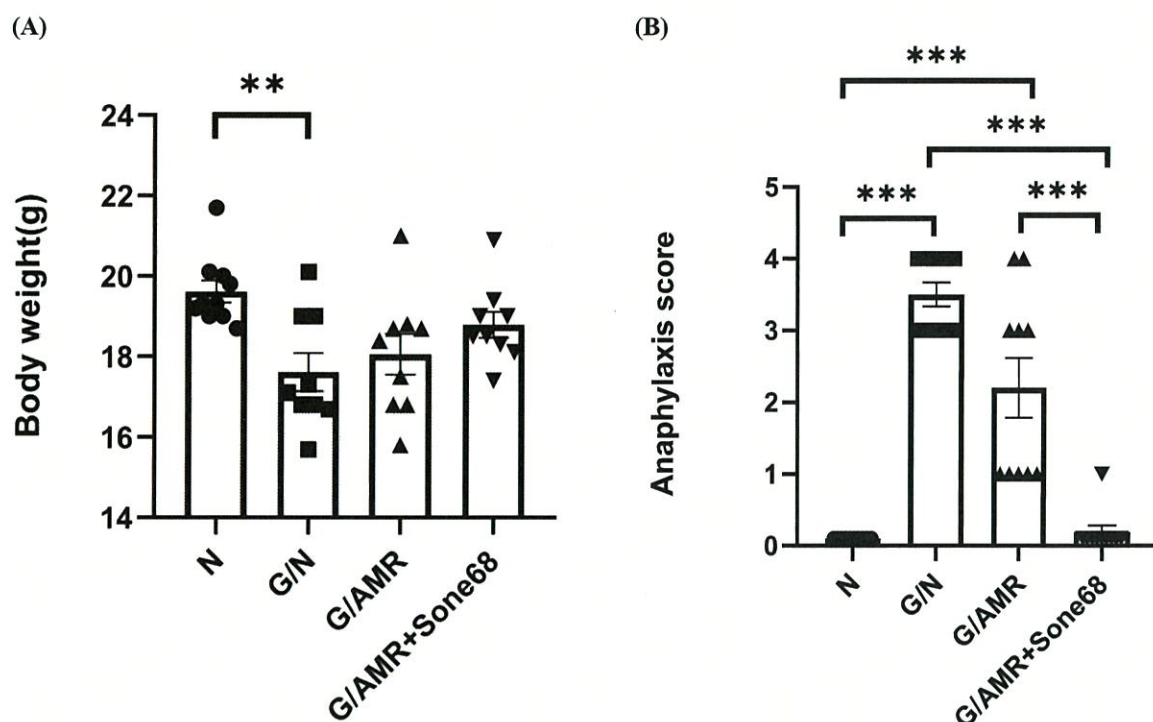


図 2. 体重とアナフィラキシー症状における影響。

Day 14 における各群の体重 (A) と、100 mg のグリアジンを経口投与してアナフィラキシー症状を惹起した際のスコア (B) における違い。

N, 非感作群; G/N, 感作コントロール群; G/AMR, 未発酵白朮エキス投与群; G/AMR+Sone68, 発酵白朮エキス群 (平均値±S.E., n=10).

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (Tukey-Kramer test).

3.3. 血中 IgE 濃度およびサイトカイン量への影響

各群のマウスより回収した血清サンプルを用いて、ELISA 法により血清中の総 IgE 濃度、および Th1 型サイトカインとして IFN- γ 、Th2 型サイトカインとして IL-4 をそれぞれ測定した (図 3)。

血清中の総 IgE 濃度は、陰性コントロールである N 群と比較して、グリアジン感作コントロールである G/N 群で有意に増加した ($p<0.01$, 図 3A)。未発酵エキスの投与では IgE 濃

度が減少しなかったが、一方で発酵エキスの投与では G/N 群と比べて IgE 濃度が有意に低下しており ($p < 0.01$)、N 群と同程度まで上昇が抑制されていた。

IL-4 レベルはグリアジンの感作によって有意に増加した ($p < 0.001$, 図 3B)。この増加は未発酵及び発酵を問わず両エキスの投与によっても有意な低下が認められたが (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$)、発酵エキスの方が、IL-4 レベルの減少度が大きかった。

IFN- γ レベルは、N 群と比較して G/N 群で有意に低下していた ($p < 0.05$, 図 3C)。未発酵エキスの投与では G/N 群とほぼ同程度のレベルであったが、発酵エキスの投与により G/N 群と比べて有意に上昇した様子が確認された ($p < 0.05$)。

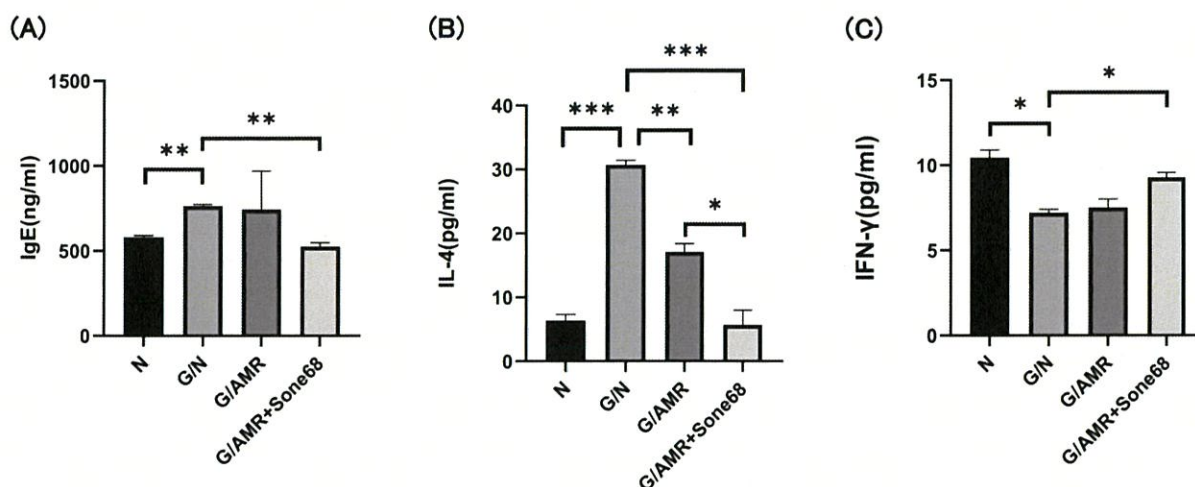


図 3. IgE および 2 つのサイトカイン濃度への影響。

Day 15 に各群のマウスから回収した血清における IgE およびサイトカイン濃度を ELISA 法にて測定した。

N, 非感作群; G/N, 感作コントロール群; G/AMR, 未発酵白朊エキス投与群; G/AMR+Sone68, 発酵白朊エキス群 (平均値 \pm S.E., n=10).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Tukey-Kramer test).

4. 考察

小麦アレルギーは最も一般的な食物アレルギーのひとつであるが、特に WDEIA はアレルゲンである小麦の摂取のみでは症状が誘発されないことから、患者自身にも認識されていないことが多く、小麦アレルギーの真の有病率は過小評価されている。小麦に含まれるグルテン摂取によって誘発される腸管粘膜の炎症に対する、プロバイオティクスの予防・改善効果の役割は、未だ不明な点が多い。一般に、食物タンパク質によるアレルギー反応は腸管粘膜で開始され、免疫反応はサイトカイン産生、腸管組織障害、そして粘膜の障害を伴う²²⁾。宿主の消化管細胞に加え、アレルギー疾患患者における腸内微生物のアンバランスも広く報告されており、乳酸菌や *Synechococcus* 属、*Clostridium* 属細菌の減少をはじめ、腸内細菌叢の多様性の変化が指摘されている^{23,24)}。プロバイオティクスは、最近の 10 年間で、食物アレルギーに対する潜在的な代替療法として注目されるようになった。現在の知見では、口腔摂取できるプロバイオティクスは、抗原修飾、腸管バリア機能修復、腸

内細菌叢修復、および全身性免疫調節に寄与すると考えられている²⁵⁻²⁸)。しかし、プロバイオティクスによる抗アレルギー作用のメカニズムはまだ十分に解明されていないため、臨床への応用には課題が山積している。したがって、さまざまな食物アレルギーに対してそれぞれ有効なプロバイオティクスをスクリーニングするとともに、その作用機構解明に向けた厳密な科学的努力が求められている²⁹)。

イチジクの葉から分離された *L. paracasei* IJH-SONE68 は、中性および酸性 EPS を産生する¹⁷)。当研究グループの先行研究で、中性 EPS が主に *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) からなる α -1,6 結合の糖鎖で構成されており、これまで報告されていない新規構造を持つことを見出した。さらに、本株の産生する EPS は、ヒアルロニダーゼ (EC 3.2.1.35) の触媒活性を強く阻害することが明らかにされている。ヒアルロニダーゼは、細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸の加水分解を触媒する。この酵素は、炎症条件下でヒアルロン酸を加水分解することにより、炎症を促進する³⁰⁻³³)。興味深いことに、ヒアルロニダーゼに対する阻害活性は、ケミカルメディエーター遊離阻害剤として用いられるいくつかの抗アレルギー剤におけるヒスタミン遊離阻害活性と正の相関関係を示すことが知られており³⁴)、すなわち、ヒアルロニダーゼ阻害作用を示す物質は、アレルギー性疾患や炎症性疾患の予防や改善に寄与する可能性がある^{35,36})。

アレルギー感作や症状発見のメカニズムの理解には、関連する動物モデルが有効である。マウス免疫学が理解され、遺伝的に十分に特徴付けられた株や試薬が利用できるため、マウスは Th1、Th2、または Th17 表現型に対する免疫応答の誘導の研究に広く利用されている。マウスの IgE 産生は、Th2 細胞から分泌される IL-4 と IL-13 によって誘導され、また IgE 産生は同じく IL-4 によっても誘導される IgG1 の産生を伴う。一方、Th1 細胞は IFN- γ を分泌し、これが T 細胞介在性免疫と IgG2a 産生を誘導し、Th2 細胞をダウンレギュレートする³⁷)。Th17 細胞は、自己免疫疾患に関連することが指摘されている³⁸)。今回実験に用いた BALB/c 系統マウスは、他の系統のマウスと比較して、外来抗原や感染に対して Th2 が活性化しやすく、その結果として高い IgE 応答を示すマウスである。食物アレルゲンの感作に広く用いられ、胃内および腹腔内投与後に特異的な IgE 応答を得ることができる³⁹⁻⁴²)。例えば、BALB/c 系統マウスにオボアルブミンまたはウシ β -ラクトグロブリンを腹腔内投与すると、ヒトのアレルギー患者に関与する同じエピトープに特異的な IgE 応答が誘導される^{39,43})。また、この系統は、腹腔内感作および気道刺激後のアナフィラキシーの初期および後期段階の研究にも使用されている。このように、タンパク質の構造的特徴とアレルギー反応の病態生理学との関連性実証に汎用されている⁴¹)。

食物アレルギーは、過剰な Th2 免疫応答と関連し、Th1 と Th2 の免疫応答におけるアンバランスは、食物アレルギーの有効な指標となる^{14,15})。したがって、Th1 および Th2 細胞のアンバランスを改善すると、アレルギー反応の緩和が期待できる。本研究では、グリアジン感作マウスの Th1 および Th2 細胞応答がどう変化しているか、また発酵白朮エキス投与によってどのような影響を受けるか調査するため、血清中の IFN- γ および IL-4 レベルを

測定した。その結果、アナフィラキシー反応を起こしたマウスでは Th1 型サイトカインである IFN- γ が減少し、Th2 型サイトカインである IL-4 が上昇しており、Th1/Th2 のアンバランスが観察された。また、それぞれの変化は、発酵白朮エキスの投与によって抑制されたことから、本発酵エキスは Th1 および Th2 の細胞免疫応答をそれぞれ増強および抑制の方向に制御することによって Th1/Th2 バランスを改善し、アレルギー反応を緩和していると示唆される。

白朮（びやくじつ）とは、漢方薬に用いる生薬の一つで「朮」ともいう。キク科オケラの若い根の外皮を取り除き乾燥したものであり。利尿、解熱、鎮痛、消化器疾患、リウマチなどの治療に用いられる。この生薬は、セスキテルペン、フェノール酸、ポリエチレングリコールなどの成分を含有している⁴⁴⁾。ポリエチレンアルキン抽出物である Atractylodin (ATL) は、mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ, MAPK) の活性化を制御することで腸の炎症を改善し、また、ヌクレオチド結合ドメイン (NOD) 様受容体タンパク質 (NLR) 3 インフラマソームおよび Toll 様受容体 4 の活性化を抑制することで急性肺障害を軽減することが分かっている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。最近の研究ではさらに、ATL が樹状細胞の成熟を調節することにより、マウスのコラーゲン誘発性関節炎を改善することが示されている⁴⁹⁾。

白朮エキスを発酵することで、バイオアベイラビリティの上昇や、新たな活性成分への代謝反応等により、その発酵エキスは、未発酵の状態のものよりも優れた抗アレルギー、抗炎症効果を示す可能性がある。白朮エキスに元より含まれている各種成分と、乳酸菌による生物変換反応は複雑であり、本研究において有効性を示した活性成分の化学構造の解明にはまだ至っていない。しかしながら、少なくとも乳酸菌発酵技術と生薬エキスを組み合わせることにより、相加・相乗的に生物活性を高める可能性があることを、本研究成果により示すことができた。本技術がグリアジン食物アレルギーに対する新たな予防・改善法の一助となり得ることを期待している。

【参考文献】

- 1) Pasha I, Saeed F, Sultan MT, Batool R, Aziz M, Ahmed W. Wheat allergy and intolerance; recent updates and perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **56**, 13–24 (2016).
- 2) Inomata N. Wheat allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **9**, 238–243 (2009).
- 3) Samasca G, Sur G, Iancu M, Lupan I, Deleanu D. Current trends and investigative developments in wheat allergy. *Int Rev Immunol*, **34**, 538–541 (2015).
- 4) Scibilia J, Rossi Carlo M, Losappio Laura M, Mirone C, Farioli L, Pravettoni V, Pastorello E. Favorable prognosis of wheat allergy in adults. *J Investig Allergol Clin Immunol*, **29**, 118–123 (2019).
- 5) Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T. Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol*, **108**, 634–638 (2001).

- 6) Morita E, Kameyoshi Y, Mihara S, Hiragun T, Yamamoto S. gamma-Gliadin: a presumptive allergen causing wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Br J Dermatol*, **145**, 182–184 (2001).
- 7) Morita E, Yamamura Y, Mihara S, Kameyoshi Y, Yamamoto S. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: a report of two cases and determination of wheat-gamma-gliadin as the presumptive allergen. *Br J Dermatol*, **143**, 1059–1063 (2000).
- 8) Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Koivuluhta M, Mikkola J, Keskinen H, Kalkkinen N, Reunala T. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 912–917 (1999).
- 9) Varjonen E, Vainio E, Kalimo K. Life-threatening, recurrent anaphylaxis caused by allergy to gliadin and exercise. *Clin Exp Allergy*, **27**, 162–166 (1997).
- 10) Morita E, Matsuo H, Chinuki Y, Takahashi H, Dahlström J, Tanaka A. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis—importance of omega-5 gliadin and HMV-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis—. *Allergol Int*, **58**, 493–498 (2009).
- 11) Di Cagno R, Filannino P, Gobbetti M. Novel fermented fruit and vegetable-based products. In *Novel Food Fermentation Technologies* (Ojha KS, Tiwari BK eds.), Springer, Berlin, pp.279–291 (2016).
- 12) Hussain A, Bose S, Wang JH, Yadav MK, Mahajan GB, Kim H. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. *Food Res Int*, **81**, 1–16 (2016).
- 13) 华晓东等. 抗过敏中药及其作用机制研究进展. *天津药学*, **21**, 69–72 (2009).
- 14) Danshiitsoodol N, Noda M, Kanno K, Uchida T, Sugiyama M. Plant-derived *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 improves the gut microbiota associated with hepatic disorders: a randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. *Nutrients*, **14**, 4492 (2022).
- 15) Noda M, Kanno K, Danshiitsoodol N, Higashikawa F, Sugiyama M. Plant-derived *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 improves chronic allergy status: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients*, **13**, 4022 (2021).
- 16) Noda M, Danshiitsoodol N, Kanno K, Uchida T, Sugiyama M. The exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 prevents and ameliorates inflammatory responses in DSS-induced ulcerative colitis. *Microorganisms*, **9**, 2243 (2021).
- 17) Noda M, Sugimoto S, Hayashi I, Danshiitsoodol N, Fukamachi M, Sugiyama M. A novel structure of exopolysaccharide produced by a plant-derived lactic acid bacterium *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68. *J Biochem*, **164**, 87–92 (2018).
- 18) Noda M, Sultana N, Hayashi I, Fukamachi M, Sugiyama M. Exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 prevents and improves the picryl chloride-induced contact dermatitis. *Molecules*, **24**, 2970 (2019).
- 19) Tanaka M, Nagano T, Yano H, Matsuda T, Ikeda TM, Haruma K, Kato Y. Impact of ω -5 gliadin on wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 313–317

- (2011).
- 20) Shindo T, Kanazawa Y, Saito Y, Kojima K, Ohsawa M, Teshima R. Effective induction of oral anaphylaxis to ovalbumin in mice sensitized by feeding of the antigen with aid of oil emulsion and salicylate. *J Toxicol Sci*, **37**, 307–315 (2012).
 - 21) 新藤智子、金澤由基子、斎藤義明、白見憲司、小島幸一、手島玲子. 経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル. 日本免疫毒性学会—第10回学術大会奨励賞
 - 22) Nowak-Wegrzyn A, Szajewska H, Lack G. Food allergy and the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **14**, 241–257 (2017).
 - 23) Goldberg MR, Mor H, Magid Neriya D, Magzal F, Muller E, Appel MY, Nachshon L, Borenstein E, Tamir S, Louzoun Y, Youngster I, Elizur A, Koren O. Microbial signature in IgE-mediated food allergies. *Genome Med*, **12**, 92 (2020).
 - 24) Joseph CL, Sitarik AR, Kim H, Huffnagle G, Fujimura K, Yong GJM, Levin AM, Zoratti E, Lynch S, Ownby DR, Lukacs NW, Davidson B, Barone C, Cole Johnson C. Infant gut bacterial community composition and food-related manifestation of atopy in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol*, **33**, e13704 (2022).
 - 25) Fu L, Fu S, Wang C, Xie M, Wang Y. Yogurt-sourced probiotic bacteria alleviate shrimp tropomyosin-induced allergic mucosal disorders, potentially through microbiota and metabolism modifications. *Allergol Int*, **68**, 506–514 (2019).
 - 26) Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, Jones SM, Leung DYM, Sampson H, Sicherer S, Clemente JC. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol*, **138**, 1122–1130 (2016).
 - 27) Rao RK, Samak G. Protection and restitution of gut barrier by probiotics: nutritional and clinical implications. *Curr Nutr Food Sci*, **9**, 99–107 (2013).
 - 28) Nermes M, Salminen S, Isolauri E. Is there a role for probiotics in the prevention or treatment of food allergy? *Curr Allergy Asthma Rep*, **13**, 622–630 (2013).
 - 29) Fu W, Chen C, Xie Q, Gu S, Tao S, Xue W. *Pediococcus acidilactici* strain alleviates gluten-induced food allergy and regulates gut microbiota in mice. *Front Cell Infect Microbiol*, **12**, (2022).
 - 30) Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*, **277**, 4589–4592 (2002).
 - 31) Litwiniuk M, Krejner-Bienias A, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds*, **28**, 78–88 (2016).
 - 32) Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 435–461 (2007).
 - 33) Bourguignon LYW, Wong G, Earle CA, Xia W. Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NFκB signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast

- tumor invasion. *Cytoskeleton*, **68**, 671–693 (2011).
- 34) Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem Pharm Bull*, **33**, 642–646 (1985).
- 35) Maeda Y, Yamamoto M, Masui T, Sugiyama K, Yokota M, Nakagomi K, Tanaka H, Takahashi I, Kobayashi T, Kobayashi E. Inhibitory effect of tea extracts on hyaluronidase (studies on anti-allergic activity in tea. II). *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **31**, 233–237 (1990).
- 36) Fujitani N, Sakaki S, Yamaguchi Y, Takenaka H. Inhibitory effects of microalgae on the activation of hyaluronidase. *J Appl Phycol*, **13**, 489–492 (2001).
- 37) Gao H, Jin Y, Jian DI, Olson E, Ng PKW, Gangur V. Development and validation of a mouse-based primary screening method for testing relative allergenicity of proteins from different wheat genotypes. *J Immunol Methods*, **464**, 95–104 (2019).
- 38) Castan L, Villemain C, Claude M, Aubert P, Durand T, Neunlist M, Brossard C, Magnan A, Bodinier M, Bouchaud G. Acid-hydrolyzed gliadins worsen food allergies through early sensitization. *Mol Nutr Food Res*, **62**, 1800159 (2018).
- 39) Zhou C, Ludmila T, Sun N, Wang C, Pu Q, Huang K, Che H. BALB/c mice can be used to evaluate allergenicity of different food protein extracts. *Food Agric Immunol*, **27**, 589–603 (2016).
- 40) Joo YH, Lee DH, Lee NT, Chung N. Model development for prediction of the allergic response to the wheat proteins ω -5 gliadin and HMW-glutenin. *Appl Biol Chem*, **59**, 827–831 (2016).
- 41) Jin Y, Ebaugh S, Martens A, Gao H, Olson E, Ng PKW, Gangur V. A Mouse Model of Anaphylaxis and Atopic Dermatitis to Salt-Soluble Wheat Protein Extract. *Int Arch Allergy Immunol*, **174**, 7–16 (2017).
- 42) Castan L, Cheminant M-A, Colas L, Brouard S, Magnan A, Bouchaud G. Food allergen-sensitized CCR9⁺ lymphocytes enhance airways allergic inflammation in mice. *Allergy*, **73**, 1505–1514 (2018).
- 43) Goldberg MR, Mor H, Magid Neriya D, Magzal F, Muller E, Appel MY, Nachshon L, Borenstein E, Tamir S, Louzoun Y, Youngster I, Elizur A, Koren O. Microbial signature in IgE-mediated food allergies. *Genome Med*, **12**, 92 (2020).
- 44) Xia YG, Yang BY, Wang QH, Liang J, Wang D, Kuang HX. Species classification and quality assessment of cangzhu (*Atractylodes rhizoma*) by high-performance liquid chromatography and chemometric methods. *J Anal Methods Chem*, **2013**, 497532 (2013).
- 45) Tang F, Fan K, Wang K, Bian C. Atractylodin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome and TLR4 pathways. *J Pharmacol Sci*, **136**, 203–211 (2018).
- 46) Chae HS, Kim YM, Chin YW. Atractylodin inhibits interleukin-6 by blocking NPM-ALK activation and MAPKs in HMC-1. *Molecules*, **21**, 1169 (2016).
- 47) Yu C, Xiong Y, Chen D, Li Y, Xu B, Lin Y, Tang Z, Jiang C, Wang L. Ameliorative effects of atractylodin on intestinal inflammation and co-occurring dysmotility in both constipation and

- diarrhea prominent rats. *Korean J Physiol Pharmacol*, **21**, 1–9 (2017).
- 48) Jun X, Fu P, Lei Y, Cheng P. Pharmacological effects of medicinal components of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. *Chin Med*, **13**, 59 (2018).
- 49) Chuang CH, Cheng YC, Lin SC, Lehman CW, Wang SP, Chen DY, Tsai SW, Lin CC. Atractylodin suppresses dendritic cell maturation and ameliorates collagen-induced arthritis in a mouse model. *J Agric Food Chem*, **67**, 6773–6784 (2019).