
平成 10 年度

厚生省生活安全総合研究事業

病者用食品開発及び有用性評価に関する
基礎的調査研究

研究報告書

序

病者用食品は、厚生省によって許可された特定の疾患を持つ人の治療等を目的として食事療法を行うためにデザインされた食品群である。規格基準設定型の病者用食品については、すでに多数が表示許可を受けているが、平成9年度よりさらに個別評価により許可される個別評価型病者用食品が新規に設けられた。

以上の状況を背景に、本研究は病者用食品について、これまで認可され実際に使用されているもの、さらに将来の開発を急がれているものについて調査・考察するとともに、特に現在その開発が最も期待される病者用食品については、実際にその評価法、開発に関する研究を実行することを目的としたものである。平成10年度の研究においては次の3研究項目を中心に展開した。

(1) 将来病者用食品として申請が予想されるアレルギー関係食品、自己免疫疾患用食品、免疫機能向上食品等を中心に国内外の文献を調査探索し、国内外における病者用食品の動向について調査研究を行なった。

(2) 自己免疫疾患病者用食品開発およびこれを評価するための方法開発の研究として、慢性関節リウマチの動物モデルとしてコラーゲン誘導性関節炎を用い、II型コラーゲンの経口摂取により関節炎症状が軽減することを明らかにした。

(3) 免疫関連や自己免疫疾患用病者用食品の簡易評価法を開発するため、腸管由来各種リンパ球の分離方法について検討し、さらに、新しく発見した腸管リンパ組織クリプトパッチからの細胞分離方法も確立した。

この報告書はその成果をまとめたものである。この小冊が今後の病者用食品の推進、開発の一助となり得ればと願っている。

平成11年4月

主任研究者
上野川修一

目次

病者用食品開発及び有用性評価に関する基礎的調査研究 (総括研究報告書	主任研究者 上野川修一)	1
1. 総括		1
2. 病者用食品の動向についての調査研究		11
3. 自己免疫疾患病者用食品開発およびこれを評価するための方法開発 の研究		16
4. パイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球 の分離法の確立		44
5. 腸管免疫組織クリプトパッチ細胞の分離と特性		49
腸管免疫組織クリプトパッチ細胞の分離と特性 (分担研究報告書	分担研究者 石川博通)	53

病者用食品開発及び有用性評価に関する基礎的調査研究

主任研究者 上野川修一 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

病者用食品は、厚生省によって許可された特定の疾患を持つ人を治療するためにデザインされた食品群である。本研究は病者用食品について、これまで認可され実際に使用されているもの、さらに将来の開発を急がれているものについて調査・考察するとともに、特に現在その開発が最も期待される病者用食品については、実際にその評価法、開発に関する研究を実行することを目的とした。本年度の研究においては次の3研究項目を中心に展開した。

(1) 将来病者用食品として申請が予想されるアレルギー関係食品、自己免疫疾患用食品、免疫機能向上食品等を中心に国内外の文献を調査探索し、国内外における病者用食品の動向について調査研究を行なった。

(2) 自己免疫疾患病者用食品開発およびこれを評価するための方法開発の研究として、慢性関節リウマチの動物モデルとしてコラーゲン誘導性関節炎を用い、II型コラーゲンの経口摂取により関節炎症状が軽減することを明らかにした。

(3) 免疫関連や自己免疫疾患用病者用食品の簡易評価法を開発するため、腸管由来各種リンパ球の分離方法について検討し、さらに、新しく発見した腸管リンパ組織クリプトパッチからの細胞分離方法も確立した。

以上の成果は、各種の病者用食品の開発とその評価法の確立に大きく貢献し、さらにはこれを基盤に国民の健康の向上に大きく寄与することが期待される。

分担研究者 石川博通
慶應義塾大学医学部
助教授

1. 総括

A. 研究目的

病者用食品は、厚生省によって許可された特定の疾患を持つ人を治療するためにデザインされた食品群である。本研究は病者用食品について、これまで認可され実際に使用されてい

るもの、さらに将来の開発を急がれているものについて、調査・考察するとともに、特に現在その開発が最も期待される病者用食品については、実際にその評価法、開発に関する研究を実行することを目的とした。本年度の研究においては次の3研究項目を中心に展開した。

(1) 将来病者用食品として申請が予想されるアレルギー関係食品、自己免疫疾患用食品、免疫機能向上食品等を中心に国内外の文献を調査探索し、国

内外における病者用食品の動向について調査研究を行なった。

(2) 自己免疫疾患病者用食品開発およびこれを評価するための方法開発の研究として、自己免疫疾患における経口免疫寛容の誘導について、慢性関節リウマチの動物実験モデルとして利用されるコラーゲン誘導性関節炎 (collagen-induced arthritis; CIA) を用いて解析した。

(3) 免疫関連や自己免疫疾患用病者用食品の簡易評価法を開発するため、腸管由来各種リンパ球の分離方法について検討し、さらに、新しく発見した腸管リンパ組織クリプトパッチからの細胞分離方法も確立し、その性質を解析した。

B. 研究方法

1. 病者用食品の動向についての調査研究

国内外の病者用食品の制度、また疾患の食事療法と病者用食品の応用開発について医学情報雑誌、MEDLINE 等により関連論文を検索した。

2. 自己免疫疾患病者用食品開発およびこれを評価するための方法開発の研究

(1) II型コラーゲン (CII) の精製および CII 飼料

ウシ軟骨よりウシ CII を精製し、これを用いて、CII が 10%、1%、0.1%、0.01% 含む飼料 (全タンパク中、CII がそれぞれ 50%、5%、0.5%、0.05% の割合で含まれている) を作製した。

(2) CIA の誘導と評価

DBA/1 マウスを CFA を用いて CII 免疫し、初感作後 21 日目に IFA を用いて追加免疫した。初感作後 25 日目頃から 2、3 日おきに観察した。CIA の症状の評価については、各マウスの 4 本の足全てについて 0 から 3 までの評価を関節炎症状の強弱に応じて与え、A. I. (Arthritis Index) として評価した。

(3) CII 食の摂取による CIA の抑制

2 週間または 4 週間 CII 食を自由摂取させたマウスに CII を感作し、誘導される CIA 症状を観察し、CII を含まない飼料を飼育した対照群と比較し、CII 食の摂取による CIA 症状が抑制されるかどうか検討した。

(4) CII 食の摂取による CII に対する抗体産生応答、T細胞応答の低下

10% CII 食をマウスに自由摂食させた場合、CII に対する抗体産生応答、T細胞応答が低下するかどうか以下のように検討した。抗体産生応答については 10% CII 食をマウスに 2 週間摂取させた後、ウシ CII で皮内免疫し、35 日目に採血して得た抗血清中の抗体のウシ CII 及びウシ CII の CNBr 分解物 124-202 (CB11) に対する抗体価を、酵素免疫測定法 (ELISA) によって調べた。T細胞応答に関しては、10% CII 食をマウスに自由摂食させた後、CII を CFA とともに投与して、1 週間後リンパ節細胞の抗原特異的増殖応答をチミジンの取り込みを指標に計測した。

3. パイエル板細胞、腸管上皮内リン

パル球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球の分離法の確立

(1) パリエル板細胞の調製

パリエル板を小腸より摘出し、1.5 mg/ml の Dispase を含む 2.5-5% FCS RPMI 中 37°C で 30 分間攪拌し、上部懸濁液を回収した後、下部懸濁液にあらたに同様の溶液を加え、同様の条件で攪拌した。計 4 回の攪拌の後、回収した懸濁液を培地で洗浄し、細胞懸濁液を得た。

(2) IEL の調製

マウスから小腸を摘出し、ポリエチレンチューブで小腸を反転し、腸管腔側を露出した。露出した後ペーパータオルで腸内分泌物を軽く除去した。37°C に保温した HBSS (FCS 5%含有) 45 ml の入った 50 ml チューブに小腸を 4 等分し入れ、45 分間 37°C、150 rpm で振盪した。中の細胞浮遊液をガラスウールカラムに通し、接着性の細胞や細胞の破片などの夾雑物を除去した。30% パーコール液中で遠心し、底に沈んだ細胞を懸濁した。この細胞浮遊液を 44% 及び 70% パーコールを用いた不連続密度勾配遠心に供し、界面に存在する細胞層回収し、培地で洗浄後、IEL とした。

(3) 粘膜固有層リンパ球の分離

マウスから小腸を摘出し、ポリエチレンチューブで小腸を反転し、腸管腔側を露出した。反転させた腸管はパリエル板を注意深くハサミで取り除いた後、あらかじめ 37°C に加温した 5% FCS-HBSS (-) (Ca, Mg フリー, 5 mM EDTA) の入ったチューブに 4 等分し

て入れ、37°C、135 rpm で 20 分間振盪した。その後、ガーゼでろ過して再び 5% FCS-HBSS で振盪処理をした。この振盪操作を 3 回行った後、腸管を約 1 cm の長さに切り、35 mg/50 ml コラゲナーゼおよび 5% FCS-HBSS (+) の入った三角フラスコ中にて、37°C で 20-30 分間スターラーで静かに攪拌しながら反応させた。腸管がバラバラになる直前の状態で反応を止め、速やかにガーゼでろ過し、得られたろ液を遠心処理をした。得られた細胞を HBSS (+) で洗浄し、ガラスウール・カラムを通してろ過した。さらにパーコール液を用いた密度勾配遠心法により 44% パーコール液と 70% パーコール液の境界面に得られるリンパ球画分を採取した。さらに得られた細胞を 5% FCS-RPMI 培地にて 37°C、2-3 時間シャーレにて培養し、非付着性細胞を回収して粘膜固有層リンパ球を得た。

4. 腸管免疫組織クリプトパッチ細胞の分離と特性

マウス小腸を長さ 1 cm 程度に切断し、縦方向に切り開いてシート状にした。この腸管シートの管腔面を濾紙に張り付けることにより粘液を取り除いた後、細胞培養用 6 cm プラスチック皿の上に平らになるように置き、透過照明型実体顕微鏡(拡大率約 20_30 倍)で観察した。クリプトパッチを視認しながら、21 G 注射針を加工して作製した金属筒を用いてクリプトパッチを含む腸管組織を打ち抜いた。このクリプトパッチを含む組織を 4°C の FCS

(ウシ胎児血清) 中で、精密ピンセットの先を用いて切れ目を入れ、崩れた組織から出てきた単細胞を回収してクリプトパッチ細胞とした。クリプトパッチの評価には、免疫組織化学染色、FACS 解析、RT-PCR の手法を用いた。

C. 研究結果

1. 病者用食品の動向についての調査研究

わが国における病者用食品は、「許可基準設定型」と「許可基準のない個別評価型」の二つに分類されるが、現在認可されている病者用食品のほとんどが前者である。近年の傾向として糖尿病組合せ食品の許可品目の顕著な増加が挙げられ、潰瘍性大腸炎やアレルギーなどの現代病ともいえる疾患に対応した新規の病者用食品も徐々に申請されつつある。一方で病者用食品の範疇には含まれずに「治療用食品・栄養補助食品」として広く用いられている食品群がある。これらは病者用食品に比べて圧倒的に多く、逆に病者用食品の制度が十分に生かされていない側面がある。国外では病者用食品の評価に関する文献は認められなかったが、アメリカにおける健康強調表示、栄養補助食品の制度の確立などからも食品摂取と健康・疾患との関連についての関心の高さがうかがえた。また国外における様々な疾患の食事療法に関する研究は数多く、慢性関節リウマチを例にとり調査したところ、各患者に合わせた食事療法の必要性や適切な臨床試験の評価系の確立な

どの課題が浮き彫りになった。

2. 自己免疫疾患患者用食品開発およびこれを評価するための方法開発の研究

(1) CII の摂食による CIA の抑制

ウシ大腿骨軟骨より精製した II 型コラーゲン (CII) を 10% 含む飼料 (10% CII 食) を DBA/1 マウスに 2 週間自由摂食させ、その後、ウシ CII で免疫し、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) の症状経過を観察した。その結果 10% CII 食を摂取したマウスは CII を含まない飼料を摂食させた対照群と比べて、CIA の症状が強く抑制された。このことから CII を経口投与することにより、CIA が抑制されることが確かめられた。次に飼料中の CII 含量、および投与期間を変化させた。その結果、1% CII 食を 4 週間自由摂食させたマウスにおいても同様な抑制効果がみられ、飼料中の CII 含量を低下させても摂食期間を長くすることにより CIA が抑制された。

(2) CII の摂食による CIA の抑制機構の解析

このように CII の経口投与により CIA が効果的に抑制されることが示されたが、このときの CII に対する免疫応答について調べた。10% CII 食を摂食することより、CII に対する抗体産生応答が、CIA の発症に関与するとされる IgG2a, IgG2b アイソタイプの応答を含め、コントロール群に比較して有意に低下していた。さらに CII 食摂取群においては CII に対する T 細胞増殖

応答がほとんど認められなくなった。これらのことより CII の経口投与による CIA の抑制には CII 特異的な免疫応答の低下が伴うことが示された。

3. パイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球の分離法の確立

パイエル板は Dispace を用いた Frangakis らの方法をもとに分離法を検討し、分離した。IEL については石川らの方法にもとづき分離した。この方法は、パイエル板の混入を防ぎ、切断箇所が少ないため切断断面からの粘膜固有層の細胞のリークをより防止することができる。粘膜固有層リンパ球も腸を反転する方法をもとに確立した。

4. 腸管免疫組織クリプトパッチ細胞の分離と特性

(1) クリプトパッチ細胞の分離法の確立

実体顕微鏡下クリプトパッチが存在する腸管部を 21G 注射針を研磨して作製した金属筒を用いて打ち抜いた。この実体顕微鏡下で目視される構造物がまさにクリプトパッチであることは、打ち抜いた腸管組織から凍結切片を作製し、これを抗 c-kit 抗体で免疫組織染色することにより確認した。

クリプトパッチ組織を 4 °C 100% FCS 中で微小手術用ピンセットを用いて一つ一つ丹念にほぐすと、打ち抜いた腸管から単細胞のリンパ球が崩れ出てきた。この手法により 1 つのク

リプトパッチ組織から約 1,000 個のリンパ球を得ることに成功した。

(2) クリプトパッチ細胞の FACS 解析
クリプトパッチ c-kit⁺細胞の中には主に T 細胞系列が発現する CD4 陽性、Thy-1 陽性細胞が存在することが確かめられ、免疫組織化学的検索からの予想と一致した。一方、成熟した T 細胞が発現する CD3 の発現はみられず、これらは未熟な T 細胞系列の細胞であることがあらためて確認された。

(3) クリプトパッチ c-kit⁺細胞による IEL の再構成能

クリプトパッチ細胞に IEL 前駆細胞が含まれているかどうかを確認するために、4 週齢ヌード (nu/nu) マウスからクリプトパッチ細胞を調製し、c-kit⁺ Lin⁻ 細胞 10,000 個を 2.5 Gy 放射線照射した SCID (severe combined immunodeficient) マウスの静脈内へ移入した。5 週間後、IEL 画分および腸管膜リンパ節細胞を調製し、FACS にて TCR の発現を解析したところ、成熟 IEL が再構成されていた。

(4) クリプトパッチ細胞および IEL における T 細胞分化初期マーカーの解析

胸腺における T 細胞の発達分化は詳しく調べられており、その過程において発達段階に特異的なマーカーがいくつか知られている。このような T 細胞分化初期マーカーとして RAG-2, pT α , TdT の mRNA の発現を半定量的 RT-PCR を用いて調べた。RAG-2, pT α , TdT の各 mRNA は、胸腺と比較すると弱いものの、クリプトパッチ細胞および IEL においても発現がみられた。こ

のことはT細胞が腸管局所で発達分化していることを裏付けるものである。

D. 考察

1. 病者用食品の動向についての調査研究

個別の疾患を対象とした「個別評価型」の病者用食品については、その必要性が高まっているにも関わらず取り組みが遅れている。これには評価方法の規格基準が未整備であることに加え、社会制度としてその認知と有効性が高く評価されていないという背景がある。ヒトを対象とした有効性評価について、どのような評価基準が要求されるのかを明確にする必要がある。現在様々な疾患と食との関わりについて研究が進められているが、特に社会問題となっているアレルギーや自己免疫疾患などでは長期間の食事療法に適応させるだけのバリエーションと簡便な評価系を視野に入れた研究開発が必要である。さらに高齢化社会に対応した免疫機能向上食品開発も期待されている。今後、病者用食品については行政・研究開発の両面から本制度の整備と推進を積極的に行うことが重要である。

2. 自己免疫疾患病者用食品開発およびこれを評価するための方法開発の研究

以上の結果より食餌中の成分としてCIIを経口投与することによりCIAを効果的に抑制できることが示された。抗原の経口摂取による抗原特異的免

疫応答の低下は経口免疫寛容と呼ばれ、本研究で示したCIAの抑制は経口免疫寛容現象を利用したものである。本研究の結果より、自己免疫疾患用食品として経口免疫寛容を利用した食品の可能性が示された。また、CIAなどのモデル動物系が自己免疫疾患用病者用食品の評価法として有用であることが示された。

3. パイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球、粘膜固有層リンパ球の分離法の確立

パイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球、粘膜固有層リンパ球に対する食品成分の作用を解析することにより、病者用食品の免疫系に対する機能の評価系を築くことが可能であると考えられる。

4. 腸管免疫組織クリプトパッチ細胞の分離と特性

クリプトパッチはマウス腸管に散在するリンパ球小集積で、小腸あたり1,500個存在する。1クリプトパッチあたりの細胞数は約1,000細胞であり、胸腺や脾臓の 10^8 細胞と比較しごくわずかしか構成細胞は存在しない。このような組織から純度よく構成細胞を採取する方法は至難であることが予想された。我々は、マウス腸管を切り開き、粘液を十分にはがした腸管壁を透過照明型実体顕微鏡で観察すると、クリプトパッチが小腸あたり約200個視認できることを見出した。さらに、21Gの注射針を研磨して作製した金属

筒を用いることにより、実体顕微鏡下クリプトパッチを含む腸管組織を打ち抜くことに成功した。この組織片を実体顕微鏡下、超精密ピンセットを用いてクリプトパッチ部分の組織を掻き開くと、浮遊性の細胞がFCS中に放出された。このように回収された浮遊細胞は、c-kitの発現に富むことから、真にクリプトパッチ細胞であることが証明された。

クリプトパッチ細胞はFACSで解析すると、c-kit⁺画分にCD4⁺およびThy-1⁺細胞を認めるが、これらはすべてCD3⁻, Lin⁻であった。IELは以前より胸腺外分化する集団が存在することが知られており、おそらくは腸管局所において発達分化しているのではないかと推測されてきた。このような背景より、未熟なリンパ球マーカーを発現するクリプトパッチ細胞は、IELの前駆細胞ではないかと推測された。クリプトパッチがIELの前駆細胞を含むかどうかを確認するため、成熟T細胞を持たない免疫不全SCIDマウスに分離・精製したクリプトパッチc-kit⁺Lin⁻細胞を移入したところ、IEL画分に成熟T細胞が出現するのを確認した。このことより、クリプトパッチはIELが腸管局所で分化発達する場であることが示された。また、クリプトパッチ細胞はRAG-2, pT α , TdTのT細胞分化初期マーカーを発現しており、このことからクリプトパッチはIELが腸管局所部発達分化していることが示された。

E. 結論

1. 病者用食品の動向についての調査研究の結果、国内外問わず食品摂取と健康・疾患との関連に対する関心の高さがうかがえたが、食事療法及び臨床試験の難しさが明らかとなった。わが国においては今後、個別評価型病者用食品を評価する際の規格標準を明確にし、許可品目を広げる必要性が考えられ、行政・研究開発の両面から本制度を整備・推進することが重要である。

2. 経口免疫寛容現象を利用することにより慢性関節リウマチの動物実験系であるコラーゲン誘導性関節炎(CIA)を抑制できることが示された。自己免疫疾患用病者用食品として経口免疫寛容を利用した食品が期待される。また、CIAなどのモデル動物系が自己免疫疾患用病者用食品の評価法として有用であることが示された。

3. パイエル板細胞、腸管上皮内リンパ球(IEL)、粘膜固有層リンパ球の分離法を示した。さらに新たに発見された腸管リンパ組織クリプトパッチの細胞分離方法を確立し、その特性を明らかにした。クリプトパッチ細胞の解析の結果は、クリプトパッチがIELの発達分化する場であることを支持する。パイエル板細胞、IEL、クリプトパッチ細胞に対する食品成分の作用を解析することにより、病者用食品の免疫系に対する機能の評価系を築くことが可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Kaminogawa, S. Hachimura, H. Nakajima-Adachi, M. Totsuka. Food allergens and mucosal immune systems with special reference to recognition of food allergens by gut-associated lymphoid tissue. *Allergol. Int.* 48: 15 (1999)
2. H. Yoshida, S. Hachimura, K. Hirahara, T. Hisatsune, K. Nishijima, A. Shiraishi, S. Kaminogawa. Induction of oral tolerance in splenocyte-reconstituted SCID mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 87: 282 (1998)
3. T. Matsumoto, A. Ametani, S. Hachimura, A. Iwaya, Y. Taguchi, K. Fujita, T. Shigehisa, S. Kaminogawa. Intranasal administration of denatured type II collagen and its fragments can delay the onset of collagen-induced arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88: 70 (1998)
4. H. Saito, Y. Kanamori, T. Takemori, H. Nariuchi, E. Kubota, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, H. Ishikawa. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 280: 275 (1998).

2. 学会発表

1. 凌梅, 八村敏志, 植田祥啓, 海江田功, 久恒辰博, 橋口昌章, 志田寛, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. TCR トランスジェニックマウスにおける経口免疫寛容の誘導. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.107 (1998).
2. 後藤真生, 八村敏志, 飴谷章夫,

衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. 食餌抗原は小腸上皮内リンパ球 (IEL) を感作する TCR トランスジェニックマウスを用いた解析. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.107 (1998).

3. 衣笠文貴, 後藤真生, 八村敏志, 飴谷章夫, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. TCR トランスジェニックマウスより樹立した小腸上皮内リンパ球 (IEL) の細胞株の性質と抗原に対する応答に関する研究. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.107 (1998).
4. 種田貴徳, 加藤真吾, 斉藤恒, 石川博通, 上野川修一. 新しい腸管リンパ組織 (cryptopatch) 未分化リンパ球の TCR 遺伝子再構成に関する遺伝子発現の検索. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.352 (1998)
5. 橋口昌章, 八村敏志, 飴谷章夫, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. T 細胞レセプター トランスジェニックマウスを用いたパイエル板 T 細胞のサイトカイン分泌応答の解析. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.352 (1998).
6. 石杜美奈, 好田正, 八村敏志, 衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 脾臓及びパイエル板細胞の抗原提示能の解析 I. 日本農芸化

- 学会 1998 年度大会講演要旨集, p.352 (1998).
7. 好田正, 八村敏志, 石杜美奈, 衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 脾臓及びパイエル板細胞の抗原提示能の解析 II. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p353 (1998).
 8. 植田祥啓, 八村敏志, 久恒辰博, 海江田功, 凌梅, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 抗原の経口投与によって誘導されるクローン消去の検討. 日本農芸化学会 1998 年度講演要旨集, p.353 (1998).
 9. 海江田功, 久恒辰博, 八村敏志, 植田祥啓, 凌梅, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. 経口免疫寛容における p53 遺伝子の関与について. 日本農芸化学会 1998 年度大会講演要旨集, p.353 (1998).
 10. 種田貴徳, 鈴木健司, 斉藤亘, 石丸薫, 久保田英朗, 伊藤守, 石川博道, 上野川修一. 腸管リンパ組織 cryptopatch リンパ球と上皮間 T 細胞の T 前駆細胞マーカー遺伝子発現と TCR 遺伝子再構成. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.94 (1998)
 11. 好田正, 八村敏志, 石杜美奈, 衣笠文貴, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. パイエル板細胞の抗原提示能に関わる液性因子の解析. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.140 (1998)
 12. 香山雅子, 南野昌信, 鈴木健司, 斉藤亘, 渡辺守, 日比紀文, 久保田英朗, 上野川修一, 石川博道. T 細胞抗原受容体 α 鎖欠損マウスの腸管 $\gamma\delta$ T 細胞の機能亢進について. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.143 (1998)
 13. 橋口昌章, 倉岡雅征, 八村敏志, 飴谷章夫, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 上野川修一. TCR トランスジェニックマウスを用いたパイエル板 T 細胞の IL-5 分泌応答の解析. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.147 (1998)
 14. 凌梅, 八村敏志, 植田祥啓, 橋口昌章, 志田寛, 後藤貴康, 伊勢涉, 戸塚護, 海江田功, 久恒辰博, 佐藤健人, 熊谷善博, 垣生園子, 飴谷章夫, 上野川修一. 抗原を経口摂取した TCR トランスジェニックマウスにおける抗体産生応答と T 細胞トレランスの誘導. 日本免疫学会総会・学術集会記録第 28 巻, p.370 (1998)
 15. 鈴木健司, 石丸薫, 種田貴徳, 斉藤恒, 南野昌信, 上野川修一, 久保田英郎, 石川博通腸管リンパ組織 cryptopatch 欠如マウスにおける上皮間 T 細胞の発達分化 日本免疫学会学術集会 (1998)
 16. 石丸薫, 鈴木健司, 斉藤恒, 金森豊, 久保田英郎, 石川博通マウス腸管リンパ組織 cryptopatch と上皮間 T 細胞の細胞学および免疫組

組織化学的検索 日本免疫学会学術
集会 (1998)

2. 病者用食品の動向についての調査研究

A. 研究目的

「病者用食品」は、厚生省によって許可された特定の疾患を持つ人を治療するためにデザインされた食品群である。本研究は「病者用食品」について、これまで認可され実際に使用されているもの、さらに将来の開発を急がれているものについて調査・考察することを目的とした。本年度の研究においては将来病者用食品として申請が予想されるアレルギー関係食品、自己免疫疾患用食品、免疫機能向上食品等を中心に国内外の文献を調査探索し、国内外における「病者用食品の動向について調査研究を行った。

B. 研究方法

1. 国内外における「病者用食品」の動向についての調査研究

わが国の「病者用食品」制度について文献調査を行い、「特別用途食品」の許可申請の流れについては厚生省の「特別用途食品評価検討会議事録」を厚生関係審議会議事録（インターネットの厚生省ホームページ）等により検索した。さらに、医学情報雑誌、MEDLINE 等により疾患に対応した食餌療法および機能性食品素材の「病者用食品」としての応用開発の可能性について調査した。国際的な食品表示と病者用食品（疾病用治療食）についても同様な方法で検索を行った。

C. 研究結果

1. 国内外における「病者用食品」の動向についての調査研究

1) わが国における「病者用食品」の現状

「病者用食品」は栄養改善法（1952年制定）第12条において「販売に供する食品につき、乳児用、幼児用、妊産婦用、病者用等の特別の用途に適する旨を表示しようとするものは、厚生大臣の許可を受けなければならない」と規定される「特別用途食品 (foods for special dietary use)」に含まれ、さらに1995年の栄養改善法の一部改正により「栄養表示基準制度 (Nutrition Labelling Standards in JAPAN)」が制定され、現在では図1のように位置づけられている。なお、認可にあたっては「許可基準型」と「個別評価型」で多少異なるが、必要な表示事項とあわせて厚生省許可マーク（図2）を表示することになっている。

現在のところ認可されている「病者用食品」は「許可基準型」の病者用単一食品と病者用組合わせ食品がほとんどで、「個別評価型」は1997年に新規に設けられたこともあり、アトピー性皮膚炎用「低グロブリン米（商品名：ファインライス）」および慢性腎不全用「低リンミルク（商品名：低リンミルク L. P. K.）」の2品目である。なお、この2品目はいずれも「特定保健用食品」として先行して認可されていたものである。病者用単一食品の内訳（1998年12月末現在）は、低ナトリウム食品（96）、低カロリー食品（28）、低（無）たんぱく質高カロリー食品（1）、低たんぱく質食品（2）、高たんぱく質食品（10）、アレルギー除去食品（14）、無乳糖食品（2）の153品目で、さらに病者用組合わせ食品は、減塩食調製用組合わせ食品（0）、成人肥満症食調製用組合わせ食品（1）、肝臓病食調製用食品（0）、糖尿病食調製用組合わせ食品（120）の121品目となり、病者用食品としての

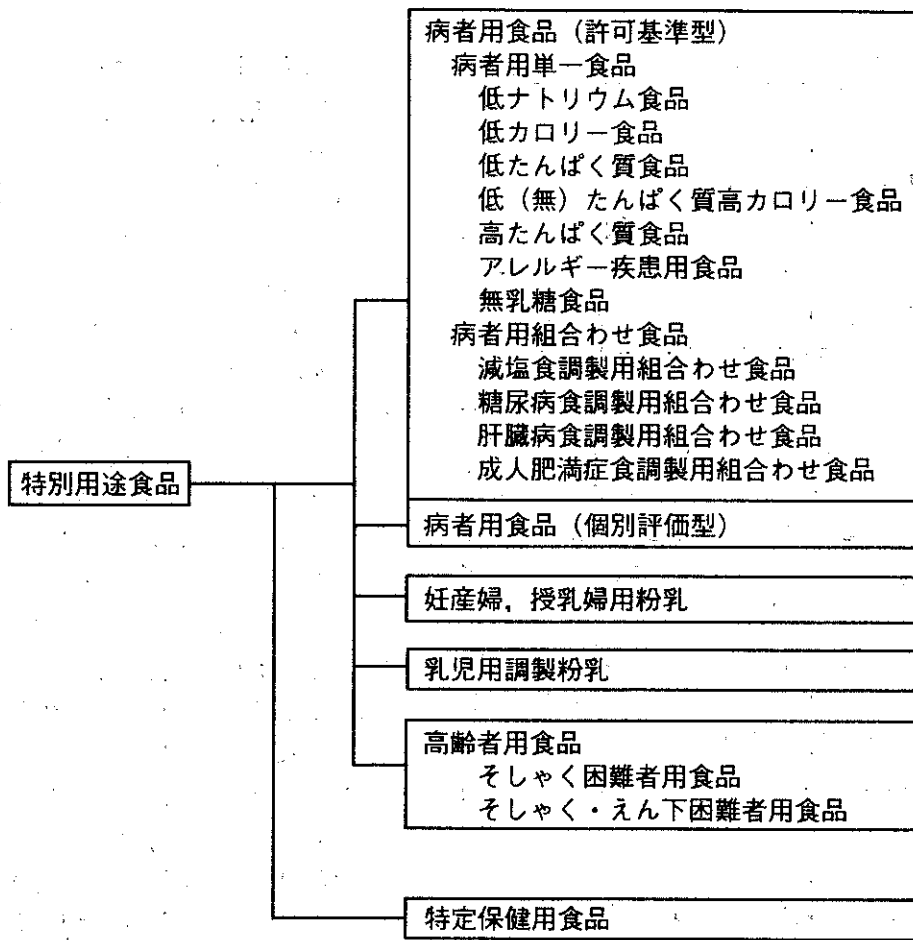


図1 特別用途食品の分類

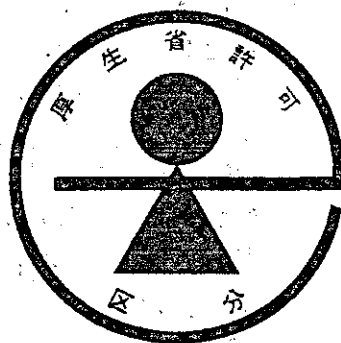


図2 厚生省許可マーク

備考：区分欄には、乳幼児用にあつては「乳幼児用食品」と、幼児用食品にあつては「幼児用食品」と、妊産婦用食品にあつては「妊産婦用食品」と、病所用食品にあつては「病者用食品」と、その他の特別用途に適する食品にあつては、当該特別の用途を記載すること

合計は 276 品目である（（財）日本健康・栄養食品協会：特別用途食品表示許可一覧表，1998 年 12 月 31 日現在）。近年の傾向としては糖尿病組合せ食品の許可品目が 1998 年以降に顕著な増加がみられ、また、乳たんぱくのアレルゲン除去食品といった現代病ともいえる疾患に対応した病者用食品も徐々に増えつつある。潰瘍性大腸炎の患者用についても現在申請中である。いずれも、「病者用食品」はある特定の患者に理論的根拠をもって用いた場合に、医学的・栄養学的に臨床的効果が得られるとされる食品であり（樋口久美子，出浦照國．臨床栄養，92（3），263-275，1998）、医師に指示された場合に限り使用すべき旨（厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室監修：改訂新開発食品ハンドブック，中央法規出版，100-192，1996）とされている。一方で、「病者用食品」というカテゴリーには含まれずに「治療用食品・栄養補助食品」として医療や介護の現場で用いられている食品群がある。流動食品、軟菜食品、低たんぱく食品、低エネルギー食品、減塩食品、鉄分補給食品、カルシウム補給食品、その他の食品などであり（佐原勝代．老人ホーム・在宅介護のための治療食・介護食ガイド，第一出版，180-193，1998）、厚生省の認可制度はないものの、それぞれの食品成分表の表示があり実用的かつ有用性のある食品として利用されている。これらは「病者用食品」に比べて数も圧倒的に多いのが特徴であり、逆に現行制度で食品の用途を表示できるはずの「病者用食品」が十分に生かされていないのが現状である。

2) 海外の「病者用食品（疾病用治療食

）」の状況

「病者用食品（Foods for the sick）」をキーワードとして検索を行ったが、病者用食品の評価に関する文献は認められなかった。しかしながら、国際的に食品摂取と健康・疾患との関連についての関心は多いに高まっている。実際に、アメリカは 1993 年に「栄養表示と栄養教育に関する法令（nutrition labeling and education act；NLEA 1990）」を施行し、1994 年から完全に実施している。この法令によって健康強調表示（health claim）が許可された。これにより科学的根拠に基づいた適切なものであれば、食品に対する健康強調表示が許可された。これに続き、栄養補助食品（dietary supplements）の制度も確立され、1994 年に Dietary supplements, Health and Educational acts, DSHEA として法制化されている。アメリカは dietary supplement として、ビタミン、ミネラル、ハーブ（漢方も含む）、植物性のもの（ある種の生薬類なども）、アミノ酸、dietary substance 食事として摂取されるもの、濃縮物、代謝産物、構成成分、抽出物などを取り扱っている。

様々な疾患に対する食事療法開発を目指した基礎及び臨床レベルでの研究は各国で精力的に行われている。その成果・評価は多様であるが、ここではその一例として慢性関節リウマチ（rheumatoid arthritis, RA）の食事療法に関する学術論文調査の結果について紹介する。RA の食事療法研究では Elemental diet の効果が数多く報告されている。Elemental diet とは必須アミノ酸、グルコース、ビタミン、微量元素などの消化された形だけの成分を組み合わせた経腸栄養であり、RA 患者に Elemental diet を与えることで、通

常食を摂取したグループと比較して統計的に有意に症状が軽減されることが報告されている (Kavanaghi et al. *Br. J. Rheumatol.* 34, 270-273, 1995)。しかし Elemental diet 終了後通常食に戻すと症状の改善はみられなくなり、むしろ進行が認められている。また Elemental peptide diet による RA の軽減も報告されているが、やはりその効果は一時的であり軽減の度合いも小さい (Holst-Jensen et al. *Scand. J. Rheumatol.* 27, 329-336, 1998)。他の Elemental diet を用いた研究においても同様の結果が得られている (Haugen et al. *Clin. Exp. Rheumatol.* 12, 275-279, 1994, Panush et al. *Arthritis & Rheumatism* 26, 462-471, 1983)。Elemental diet 以外には、魚油に含まれる n-3 脂肪酸の摂取 (James et al. *Semin. Arthritis & Rheumatism* 27, 85-97, 1997) や lactobacilli に富んだ無調理野菜食 (Nenonen et al. *Br. J. Rheumatol.* 37, 274-281, 1998) が RA に効果的であることが報告されているが、試験の規模も小さく、評価は難しいのが現状である。

これらの報告から RA の食事療法の難しさと今後の課題が浮き彫りになった。すなわちある特定の食事療法を施しても全ての RA 患者に有効なわけではないこと、患者の食習慣が療法の効果に大きく影響することが示されており、各患者に合わせた食事療法開発の必要性が考えられた。さらに食事療法期間中の症状悪化に伴う患者の脱落率も高く、これが評価を難しくしている理由の一つであると考えられている。今後 RA に限らず、様々な疾患の食事療法を目指すにあたっては、適切な評価系を確立しこれらの課題に取り組むことが重要であろう。

D. 考察

1) 今後の「病者用食品」開発への展望

「病者用単一食品」としてのカテゴリーはわずかに7つであり、さらに「病者用組合わせ食品」にも含まれない個別の疾患を対象にした「病者用食品」については、厚生省が個別許可申請制度を 1998 年より導入したことにより幾分規制が緩和された。しかしながら、「アレルギー疾患用食品」についてみた場合、近年、特定の食品アレルギーをもつ患者が急増してきているにもかかわらず、表示許可できるアレルギー除去についての項目は乳たんぱくのアレルゲンに限られており、卵・大豆・穀類等のアレルギー除去といった代表的な食品由来アレルゲンに十分対応できていない問題点がかがえる。これには、アレルギー除去の評価基準についての規格標準が未だ十分に確立されていないことによるところが大きい。また、自己免疫疾患用に対応した食品、感染防御に有用な食品等についても数多くの動物試験による報告がある一方で、ヒトを対象にしたデータの蓄積が少ないことはまだまだ研究開発の段階での遅れが目につくところかもしれない。

「特別用途食品」の中の「特定保健用食品」についても個別評価型病者用食品と同様に、第1部会（代謝・内分泌関係）、第2部会（腎・血圧関係）、第3部会（免疫関係）、第4部会（消化関係）、第5部会（その他）に分かれた特別用途食品評価検討会での評価結果をもとに厚生省の許可が得られる仕組みであるが、こちらの方は徐々に制度が社会的に浸透しつつある。その一方で、個別評価型「病者用食品」への取り組みが遅れている背景には、上記に述べた評価方法の規格標準が未整備であることに加え、社会制

度としての認知とその有用性がそれほど高く評価されておらず、その結果、開発する企業の側でも必ずしも十分な研究開発を展開しにくいことがあるようである。問題になってくるヒトを対象とした有効性評価について、医薬品のケースと比べてどのような評価基準が求められるのかを明確にする必要性が求められるであろう。

最近の先端的科学の探求は生命科学（ライフサイエンス）分野の著しい発展を遂げてきているが、「食」との関わりにおいても生活習慣病・アレルギー疾患・先天性代謝異常・自己免疫疾患・感染症等からの生体防御系などに対応した研究開発が進められている。特に近年罹患率の増加が社会問題化されてきているアレルギー疾患・自己免疫疾患などは、長期間の食事療法に適應させるだけのバリエーションと簡便な評価系を視野に入れた研究開発が必要である。現在、自己免疫疾患用食品として、慢性関節リウマチ用コラーゲン含食品が考えられているが、動物実験とヒトでの臨床試験とを合わせた評価系が確立される必要がある。海外でのRAと食事療法に関する報告からも将来の病者用食品としての応用が期待され、生理的作用メカニズムの解明に向けた研究も進められている。加えて、高齢化社会に対応した（感染防御系）免疫機能向上食品は、粘膜ワクチンという発想も取り入れた臨床医学的立場とも絡んで、さらなる発展が望まれている。米国における粘膜ワクチンの開発は、発展途上国等の乳幼児期の感染症用の経口ワクチンから、エイズまで視野に入れた応用開発を目指している。わが国における免疫機能向上食品の可能性としては、現在食品素材に使われている乳酸

菌やビフィズス菌由来多糖や、母乳や牛乳中に含まれるラクトフェリン、核酸などがその応用開発に考えられるが、食品素材を原料に用いているという点で安全性については比較的問題が少ないことから、今後は臨床的評価系の確立とあわせて今後議論されていくことになるであろう。

以上、今後の「病者用食品」については、行政・研究開発の両面から本制度の整備と推進を積極的に行うことが重要である。

E. 結論

国内外の「病者用食品」についての動向を明らかにするために、国内外の文献およびインターネットによる検索を中心に調査研究を行った。国内においては個別評価型病者用食品への適用に向けた食品が徐々に生まれつつあるが、評価基準の規格標準を早急に整備し、当制度による許可品目の拡大と運用が推進されるべく、行政・研究の両面からの積極的な取り組みが重要であると考えられた。国外においては「病者用食品」という制度そのものはないものの、米国では科学的根拠に基づく健康強調表示が認められるなど、食品に対する関心は高く、各国でも食事療法での臨床的研究は数多く報告されている。いずれも評価系の確立が難しい点が、臨床で十分に生かされない問題点となっていることから、評価基準の整備が必要である。

3. 自己免疫疾患患者用食品開発およびこれを評価するための方法開発の研究—II型コラーゲン (CII) の摂食によるコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) の抑制

A. 研究目的

高等脊椎動物において高次の生体調節機構を司どっている免疫系は、リンパ球を含む多種多様な細胞群からなる巧妙な統御体系をつくっている。この免疫機構が病原体など外来侵入物に対する防御体制を一面こして進化したであろうことは、免疫機能なしでは我々を取り巻く生態系での生存は不可能であることから推測できる。限りなく多様な外来侵入物に対するリンパ球を創造した免疫系の進化は、同時に、自己体成分を攻撃し得るリンパ球の技能を確実に消去しておく機構の確立でもある。外来侵入物”非自己”に対する免疫応答機構には、自己体構成成分”自己”に対する不応答性----self tolerance (自己トレランス、自己寛容) ----が不可欠となる。

四半世紀以上にわたって免疫生物学者、分子生物学者を魅了してきた Burnet の免疫理論の中心柱の一つは、自己寛容の論理構築であった。その中で、彼は免疫系は何らかの”自己””非自己”職別機構を持つこと、それは核酸遺伝因子による末代不変的なものでなく、胎生、新生期に免疫系が成熟するなかで後天的に獲得される形質であることを示している。非常に短縮しているならば、免疫系が確立しつつある中で存在する抗原 (外来物質であろうとも) が”自己”とされ、それ以外が”非自己”ということになる。この”自己”に対する不応答性を「自己反応性リンパ球クローンの排除」と呼んだ。このクローンの死滅の証明には実に~30年の年月を要し、近年、ついに事実として捉えられた。

免疫寛容の研究は免疫応答の研究の進

展に平行して、あるいは残念ながら追従して進まざるを得ない感があった。それは、不応答つまり応答しない事のメカニズムを探るという点にあり、「しない事」を科学的に直接証明するのは不可能であり、従ってポジティブ (応答) の”裏返し”として捉えようとする傾向があった。しかし、近年、このネガティブな事像 (不応答) が能動的なポジティブな指標で捉えられつつある。なかでも自己反応性T細胞の胸腺における除去という自己寛容成立の最も重要な機構についての研究が進んだ。

T細胞は膜結合型の抗原認識レセプター (TCR, T cell receptor; 通常 α 鎖 β 鎖のヘテロダイマーを形成) を介して”抗原”を認識する。TCRは、シグナル伝達部位であるCD3と呼ばれる細胞表面分子群との間で安定した複合体を形成している。抗体による免疫応答の多様性がFc部位 (アイソタイプ) の多様性に起因しているに対して、T細胞機能の多様性はTCRを介したシグナル伝達の結果、放出される種々のリンホカインの多様性による点に特徴がある。B細胞や抗体が抗原分子自体と結合認識するに対してT細胞は、抗原が自己の主要組織的合性複合体 (major histocompatibility complex, MHC) 分子と結合して生ずる構造変化をみており、単に自己MHC分子に結合した抗原分子ではなく、生じた抗原-MHC分子複合体を認識している。ここに、T細胞の抗原認識時における”自己”との関わりが生じてくることになる。体を構成する通常抗原とMHC分子複合体が”自己”であり、外来抗原とMHC分子複合体が”非自己”と認識される。そして胸腺でのT細胞の成熟過程において抗原-MHC分子複合体を強く結合するTCRを有する細胞は死に至り、この過程により自己反応性のT細胞が除去されるのである。

こうして、外来抗原由来ペプチドとMH

C分子複合体を認識するT細胞が末梢に送り出されるが、その後、抗原刺激に対し次のようにして活性化される。一般に、捕食された侵入抗原（タンパク質抗原）は抗原処理細胞の消化作用によって細胞に捉えられ、エンドソーム中でアミノ酸～20個程のペプチド断片に分解され、この細胞内小器官の中でMHC-クラスII分子との間に複合体を形成して抗原処理細胞の細胞表面に露呈される。人為的に切断したペプチド断片や合成ペプチドを用いて、既に細胞表面に発現されているクラスII分子に結合させて複合体を形成させクラスII分子と親和性のあるCD4分子を持つヘルパー系T細胞に認識シグナルを与えることができる。同様に、MHC-クラスI分子と親和性のあるCD8分子を持つ細胞傷害性T細胞の活性化シグナルの一つとして、抗原クラスI分子複合体も人為的に形成できる。宿主細胞に感染するウイルス（抗原）に対してはCD8+細胞傷害性T細胞応答が惹起され易い。このT細胞に認識される抗原クラスI分子複合体は細胞質内に抗原がある状態で生ずるといわれ、恐らく抗原の細胞内での処理過程の差異が応答儀式の差となっているのであろう。

さて、抗原ペプチドII複合体-クラスを細胞表面に形成した抗原処理細胞がCD4陽性ヘルパー系T細胞を活性化させるにはTCR-CD3を介した”第一シグナル”に加えて、IL-1などの増殖因子、あるいはB7、CD28等の膜表面分子を介した”第二シグナル”が必要となる。この全ての技能を持つ細胞が抗原提示細胞（antigen presenting cell, APC）と呼ばれる。抗原ペプチド-MHC分子複合体はMHC分子を発現する多種の細胞膜上で形成されるが、免疫応答の初期段階におけるAPC活性は主にリンパ組織内の樹状細胞や皮膚のランゲルハンス細胞などに認められる。

一方で、外来抗原に対しても免疫系が抗出来ないこともある。この不応答の原因として次の2つが挙げられる。一つはdeterminant selection theoryと呼ばれ、抗原ペプチドとMHC分子との複合体形成がうまく進行しないため、TCRとの結合が起きず、従ってT細胞による抗原認識ができないことによる。これには、MHC分子、ペプチド分子の構造上の問題から複合体が生じない場合と、不応答系動物にMHC分子発現の遺伝的欠損のある場合がある。他の一つはclonal deletion theoryで、ペプチド抗原に対応するT細胞の欠除による。つまり、自己体中に抗原ペプチド-MHC分子複合体と同一（交差する）構造物を持つために、その抗原に反応するT細胞が寛容（自己寛容）状態に陥っている場合である。

さらに、上記以外に外来抗原に対し後天的に抗原特異的免疫不応答、すなわち免疫寛容が誘導される場合があることが知られている。この種の免疫寛容誘導は抗原に投与経路、投与量等に依存する。このなかで、抗原を経口投与すると免疫寛容が誘導される、すなわちその抗原に対する免疫反応が抑制されるという現象は経口免疫寛容（経口寛容、経口トレランス）として知られている。この現象は、Wellsが1911年に卵白アルブミン（OA）でモルモットを感作する前にOAを経口投与しておくこととOAによるアナフィラキシー反応が抑えられると報告して以来、その機序について多くの研究が積み重ねられてきた。経口投与された抗原は、腸管の中で消化の過程を経て、腸管免疫という特殊なシステムを介して処理される。免疫トレランスは、抗原反応クローンの消去（クローナルデリベーション）、免疫不反応（アナジー）、免疫抑制（アクティブサプレッション）の3つの機序が考えられている。最近の研究から経口免疫寛容については、免疫抑制とアナジーが重要な機序であることが明らかにな