

---

平成 11 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

---

---

平成 11 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11年度の研究においては次の5研究項目を中心に展開した。

(1) 国内外における病者用食品の現状と、将来病者用食品として申請が予想される免疫関連病者用食品の研究開発に注目しその評価系を把握することを目的とし、調査研究を行った。

(2) 免疫機能向上食品の評価法を開発するため、フラクトオリゴ糖の腸管免疫応答増強機能を評価し、これにより増殖する *Bifidobacterium* 由来成分を腸管由来各種リンパ球に作用させて検討した。

(3) 免疫機能向上食品をはじめとした免疫関連病者用食品についてその有効性を評価するための方法を確立するための基礎研究として、T細胞抗原レセプターを発現するトランスジェニックマウスおよびその細胞（特に腸管組織由来）を使用した方法について検討した。

(4) 免疫関連病者用食品の開発および評価法を確立するための基礎研究として、新しく発見した腸管リンパ組織クリプトパッチにおけるリンパ球発達分化機構について解析した。

(5) 免疫関連病者用食品の評価法を確立するための臨床研究として、食物アレルギー刺激による末梢血T細胞上のホーミングレセプター発現を解析した。

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12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. 病者用食品の現状及び評価方法についての調査研究	1
2. フラクトオリゴ糖 (FOS) および <i>Bifidobacterium</i> 由来水溶性多糖の 腸管免疫系に対する免疫増強効果の検討	8
3. T細胞抗原レセプター (TCR) トランスジェニックマウスを用いた 腸管免疫応答の解析	29
4. 腸管免疫細胞を利用した免疫関連病者用食品の評価法の開発のための 基礎研究	59
5. T細胞上ホーミングレセプター発現を指標とする食物アレルギー性 の評価に関する研究	63
腸管免疫細胞を利用した免疫関連病者用食品の評価法の開発のための 基礎研究 (分担研究報告書 分担研究者 石川博通)	65
T細胞上ホーミングレセプター発現を指標とする食物アレルギー性の 評価に関する研究 (分担研究報告書 分担研究者 河野陽一)	71

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
総括研究報告書

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5研究項目を中心に展開した。

(1) 国内外における病者用食品の現状と、将来病者用食品として申請が予想される免疫関連病者用食品の研究開発に注目しその評価系を把握することを目的とし、調査研究を行った。

(2) 免疫機能向上食品の評価法を開発するため、フラクトオリゴ糖の腸管免疫応答増強機能を評価し、これにより増殖する *Bifidobacterium* 由来成分を腸管由来各種リンパ球に作用させて検討した。

(3) 免疫機能向上食品をはじめとした免疫関連病者用食品についてその有効性を評価するための方法を確立するための基礎研究として、T細胞抗原レセプターを発現するトランスジェニックマウスおよびその細胞（特に腸管組織由来）を使用した方法について検討した。

(4) 免疫関連病者用食品の開発および評価法を確立するための基礎研究として、新しく発見した腸管リンパ組織クリプトパッチにおけるリンパ球発達分化機構について解析した。

(5) 免疫関連病者用食品の評価法を確立するための臨床研究として、食物アレルギー刺激による末梢血T細胞上のホーミングレセプター発現を解析した。

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

河野陽一 千葉大学医学部  
教授

石川博通 慶應義塾大学医学部  
助教授

1. 病者用食品の現状及び評価方法に  
ついての調査研究

A. 研究目的

わが国における「病者用食品」の制度は、特定の疾患をもつ人を治療するためにデザインされた食品群のうち、特に厚生大臣によって許可された「特別用途食品」として位置づけられている。本研究はこの「病者用食品」の現状と、特にアレルギー疾患に対する病者用食品の研究開発に注目したその評価系について明らかにすることを目的とし、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」の現状についての調査研究

わが国の病者用食品についての文献調査を行い、「特別用途食品」についての許可申請の流れを厚生省ホームページ「特別用途食品評価検討会議事録」等から検索した。さらに医学情報雑誌、MEDLINE、米国 FDA (Food and Drug Administration、食品・医薬品局) や欧州連合 (EU) のホームページ等から諸外国の現状についても同様に調査研究を行った。

### 2) アレルギー疾患を想定した評価系についての調査研究

アレルギー疾患に関する評価系について、医学情報雑誌、MEDLINE 等による文献検索によって調査し、まとめた。

## C. 研究結果

### 1) 国内外における「病者用食品」の現状

わが国における「病者用食品」は厚生大臣によって許可を受けた「特別用

途食品」に含まれる許可基準型のものと同別評価型の2種類に分類されている。その内訳は1999年9月30日現在で、許可基準型の病者用単一食品として低ナトリウム食品(102)、低カロリー食品(27)、低たんぱく質食品(4)、低(無)たんぱく質高カロリー食品(1)、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160件、許可基準型の病者用組合わせ食品として減塩食調製用組合わせ食品(0)、糖尿病食調製用組合わせ食品(145)、肝臓病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(4)149件、および個別評価型の病者用食品として2件の計311件が許可されている((財)日本健康・栄養食品協会栄養食品部:特別用途食品表示許可一覧表,1999年9月30日現在)。これらは、昨年に比べて低ナトリウム食品、および糖尿病食調製用組合わせ食品などの許可基準型の病者用食品が増加した結果となった。許可基準型の病者用食品はある一定量の食品成分値において条件をクリアすれば、特に臨床試験等のデータが申請に必要ではないことに比べ、個別評価型は適用となる患者への試験結果が申請に必要なために研究開発に時間を要する傾向がある。

一方、米国においては Dietary Supplement, Health and Educational Act (DSHEA) という法令において Dietary Supplement (栄養補助食品) が規定されており、さらに Federal Food, Drug and Cosmetic Act (FDCA) において

Health Claims (健康強調表示)として「カルシウムと骨粗しょう症」、「葉酸と神経管欠損症」、「脂肪とガン」、「脂肪と心臓疾患」、「ナトリウムと高血圧」、「食品に含まれる食物繊維とガン」、「食品に含まれる食物繊維と心臓疾患」、「食品に含まれる抗酸化物質とガン」、「水溶性繊維と心臓疾患」、「糖アルコールと虫歯」の10種類が承認されている。これらは厳密にわが国における「病者用食品」に相当するものではないが、「カルシウムと骨粗しょう症」、「葉酸と神経管欠損症」、「水溶性繊維と心臓疾患」は栄養補助食品に対して健康強調表示が認められている(大浜宏文, 健康・栄養食品研究, 2(1), 72-88, 1999)。欧州においては European Union (EU) において Scientific Committee on Food の中で食品成分の機能性についても取り上げられ、その関心も高いが、その取り組みは各国間でのばらつきが大きく、「病者用食品」という制度が十分に整備されているとはいえない状況である。

## 2) アレルギー疾患を想定した評価系についての調査研究

### a) アレルギー動物モデル

ある疾患の病態を解明し、有効な治療法を確立していくためには、患者から得られた検体のみの解析では不十分である。特に食品アレルギーなどのように小児期から発症する疾患では、初期病変の検体を得ることは容易ではない。このような場合、疾患によく類似した病態を呈する動物モデルの樹

表1 国内外で作製・使用されているアレルギー動物モデル

動物	疾患モデル
ラット	食品アレルギー
マウス	接触過敏症、喘息、アトピー性皮膚炎、食品アレルギー
モルモット	喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎
ヒツジ	喘息
イヌ	アトピー性皮膚炎

立が重要であり、これが抗疾患薬、病者用食品開発の成否の鍵を握っていると言っても過言ではない。近年、アレルギー患者は増加の一途をたどっており、今後アレルギー治療を想定した病者用食品の開発が急がれる。そこで本研究では国内外で作製・使用されているアレルギー動物モデルについて文献調査を行った(表1)。

これまでアレルギーモデルとして抗アレルギー薬の開発によく用いられてきた動物はラットであり、特に IgE 抗体を高率に産生する Brown-Norway ラットが使用されてきた。この実験系においては、抗原をアジュバントなしで経口投与するプロトコル、あるいは抗原をアジュバントと共に腹腔内投与した後に抗原を経口投与するプロトコルが用いられており、この操作により抗原特異的な IgE 抗体産生が誘導される (Atkinson et al., Food Chem. Toxicol. 34:27, 1986,

Knippels et al., Clin. Exp. Allergy 28:368, 1998, Knippels et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 156:161, 1999)。またこの系においては抗原の腸管透過性、小腸病理組織の変化が観察される。典型的な即時型アレルギー反応はIgEを介した肥満細胞及び好塩基球の活性化によって引き起こされるが、一般にヒトの肥満細胞は入手が困難である。これに対しラットは腹腔内に遊離の状態では $10^6$ 個を超える結合組織型肥満細胞をもっており、その採取、精製などが極めて容易である。実際、イギリスで開発されたクロモグリク酸ナトリウムなどの抗アレルギー薬は、上述した実験系で得たラット肥満細胞の活性化を著明に抑制する (Goose et al., Immunology 16:749, 1969)。わが国においても同効薬のスクリーニングにはこのようなモデル系が多用された (Saijo et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78:43, 1985)。

ラットに対し、マウスには免疫学的な特性が明らかな多数の純系が確立されており、解析には極めて有利である。実際、いくつかのアレルギーモデル実験系が確立されている。マウス耳殻の皮膚アナフィラキシー誘発系では、抗原をアジュバントと共に腹腔内へ注射してIgE産生を誘発した後、抗原を耳殻に注射して反応を誘発する系 (能動感作) (Inagaki et al., J. Pharmacol. 59:201, 1992)、耳殻にIgE抗体を注射し、抗原を静脈内注射して反応を誘発する系 (受動感作) (Inagaki et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.

78:113, 1985) が用いられている。いずれの場合にも反応誘発時に色素を静脈内注射し、反応部位に漏出する色素を定量して評価を行う。近年活発に検討されているのは喘息モデルである。これは腹腔内に抗原をアジュバントと共に投与して感作し、抗原を複数回吸入させた後に気道反応を誘発する系である (Tanaka et al., Life Sci. 62:169, 1998)。さらに皮膚炎モデル実験系も開発されている (Braun et al., Eur. J. Immunol. 28:3240, 1998)。これはマウスにハプテンを反復塗布して皮膚炎を誘発する系である。アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患ではTh2型の応答が優位であると考えられているが、この実験系においても初期にはTh1細胞の活性化が優位であるのに、次第にTh2型細胞優位の反応形態へと移行することが示されている。アトピー性皮膚炎モデルに関しては、近交系として樹立されたNC/Ngaマウスが、飼育環境の変化に応じてアトピー性皮膚炎に酷似した皮膚炎を自然発症することが明らかにされている (Matsuda et al., Int. Immunol. 9:461, 1997, Matsumoto et al., J. Immunol. 162:1056, 1999)。このNC/Ngaマウスは、conventionalな環境下において皮膚炎が自然発症し、症状は加齢とともに悪化する。また血中IgE濃度の増加、浸潤T細胞及び肥満細胞のIL-4高感受性、皮膚バリアの低下などが確認され、アトピー性皮膚炎モデルマウスとしての有用性が示されている。

接触過敏症、皮膚炎、喘息等のモデ



ル系は多数報告されているものの、食品アレルギーの優れたモデル系についてはこれまで樹立が困難であり、食品アレルギーの治療に有効な薬、食品の開発研究には大きな壁が存在した。しかしながら近年アジュバントを伴わずに DBA/2 マウスに経口的に抗原を投与することで IgE 抗体産生応答が誘導されることが示された (Ito et al., *Eur. J. Immunol.* 27:3427, 1997)。また我々も単一の T 細胞抗原レセプターを持つトランスジェニックマウスに抗原を含む飼料を自由摂取させることにより強い IgE 抗体産生応答が誘導されることを見いだした (Shida et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* in press)。この系においては血中 IgE 応答のみならず、小腸絨毛の著しい浮腫、炎症細胞の浸潤が観察されることから、食品アレルギーモデルマウスとしての有用性が確認されつつある。

ここまでラットとマウスを用いたアレルギーモデル系について述べてきたが、これ以外の動物を用いたモデル系も存在する。ラットやマウス同様、気管支喘息治療薬の評価系としてモルモットの喘息モデルも繁用されてきた (Muller et al., *Z. Erkr. Atmungsorgane.* 144:246, 1976, Fujimura et al., *Allergy* 40:98, 1985)。またアレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎のモデル作成にもモルモットが繁用されている (Ishida et al., *Ann. Allergy* 72:240, 1994, Garceau, et al., *Eur. J. Pharmacol.* 134:285, 1987)。気道の反応性がヒトと類似することから、喘息

モデルとして優れていると考えられるが、モルモットの場合にはサイトカイン、抗体などの定量法が確立されていないため、モデルの免疫学的な特徴を明らかにすることは困難であり、薬物の効果を解析するには制約が多い。またヒツジにおいても喘息様の症状を誘発することが可能である。回虫に感染したヒツジに回虫抗原を吸入させると喘息様の症状が引き起こされることが報告されている (Abraham et al., *Am. Rev. Respir. Dis.* 128:839, 1983)。その他、アトピー性皮膚炎様の症状を示す犬の系なども報告されているが (Frick, *Adv. Exp. Med. Biol.* 409: 1, 1996)、これらの動物は実験動物として大型であり、広い実験施設を要すること、さらに手軽に実施できる実験系ではないことから、一般的ではない。

最後に、抗アレルギー薬のスクリーニング、開発はラット、マウスの喘息、皮膚炎等のモデル系を用いて行われてきたが、アレルギー疾患における病者用食品開発の対象の多くは食品アレルギーであると考えられる。前述したように食品アレルギーモデル動物はその他のアレルギーモデルと比較すると有用な系は断然少なく、今後優れたモデル系が数多く樹立されることが期待される。また数多くのアレルゲン、食品についてモデル系が確立されることも期待したい。

- b) アレルギー関係食品のヒト評価系 (臨床試験) における一例
  - i. 低アレルゲン米のアトピー性皮膚

炎に対する臨床効果

放射性アレルゲン吸着試験 (radioallergosorbent test, RAST) において米 RAST スコアが2以上の患者で、皮疹の状態が重度である44例について、低アレルゲン米を4週間摂取させ、皮膚症状の程度と病巣部位の範囲を指数化し、IgE-RASTにて評価し、67%以上の有用率を評価した (Ikezawa et al., Acta. Derm. Venereol. (Stockh), 176 (Suppl.) 108-112, 1992)。

ii.  $\beta$ -ラクトグロブリン除去ミルクの臨床評価

牛乳アレルギーと診断されたアトピー性皮膚炎の小児患者7名について、ミルクおよび $\beta$ -ラクトグロブリン除去ミルクを負荷し (ブリックテスト)、皮膚症状の改善を7例中4例に観察した (篠田紳司, 食品アレルギー対策ハンドブック, サイエンスフォーラム, 308-317, 1996)。

iii. 大豆ペプチドの臨床評価

大豆アレルギー小児患者7例とその他の食物アレルギー小児患者 (大豆アレルギーを認めないもの)3例に対し、大豆ペプチド飲料を1日200g、3ヶ月間の継続投与した結果、大豆アレルギー患者5例にアトピー性皮膚炎の改善、血清IgE値は8例中6例が低下、特に大豆特異的IgE値は5例が低下と、全体で10例中8例に大豆ペプチドの有用性を評価した (岩崎栄作, 食品アレルギー対策ハンドブック, サイエンスフォーラム, 340-350, 1996)。

D. 考察

わが国の「病者用食品」において、許可基準型病者用食品は年々許可品目を増やしている一方、個別評価型は許可基準型に比べてより開発に時間を要するというのが現状である。前者が食品中の該当食品成分の分析方法および分析値を十分に要件を満たしていれば比較的早い段階で許可を受けやすいのに対し、後者は十分な有効性を動物実験やヒト臨床試験等による証明を必要とするからである。さらに、この種のヒトを対象とした評価試験は、医薬品の場合と比べてどのように評価基準を定めるのかについて、明確な規定を設けることの難しさもその要因となっているようである。米国や欧州においても栄養補助食品や健康補助食品、さらに食品成分の機能性についての関心が年々高まっているものの、「病者用食品」としての評価基準について明確な規定はまだ十分に整備されているとはいえない状況である。医薬品と食品を区別した中で、健康強調表示の根拠となる評価基準をどのようにしていくかについての課題もまだ残っているようである。

そういった意味で、食品の有効性を評価する系としての動物実験は、ヒトでの臨床試験に比した簡便性や有効成分の作用機構を解明する上できわめて有効な方法である。現在世界中で増加している種々のアレルギー疾患に対しては、様々な動物実験モデルが考案されているが、対象となるアレルゲンによってケース・バイ・ケースでその評価は異なることと、ヒトにおけ

る評価との相関が必ずしも一致しない問題点も指摘されている。一方で、接触過敏症、皮膚炎、喘息等のモデルに比べ、食物（食品）アレルギーに関係した動物実験モデルはその抗原特異的な生体の過敏反応の評価が難しく、これまで研究開発がなかなか難しかったが、近年アジュバントを用いずに食品抗原のみでIgE抗体産生や炎症性形態学的特徴も再現できるようになったことから、食品アレルギー疾患に対応した病者用食品の開発にも有用性が期待されている。さらに、種々の食品アレルゲンに対する有効な動物実験モデルの確立が望まれている。

したがって、アレルギー疾患に対する病者用食品の研究開発には、動物実験モデルにおいて確認した有効性を迅速にヒトでの臨床試験と併せて評価するシステム化を整備していくことが必要であり、この際に、「病者用食品」としての評価の基準を明確化していくことが急務であると思われる。

## E. 結論

国内外の「病者用食品」についての動向、さらにアレルギー疾患を想定した評価法を明らかにするために、文献調査、およびインターネットにおける検索を中心に調査研究した。国内においては評価基準型の病者用食品の許可品目が増加しているが、個別評価型の病者用食品の研究開発にはより時間を要している状況である。海外においても健康強調表示のできる栄養補助食品等への取り組みが進んでいるが、医薬品と区別した中でどこまで有効性を評価していくかといった評価基準の難しさが問題視されている。また、アレルギー疾患を想定した評価法をまとめたが、近年、食品アレルギーモデルとしての有用性が期待される実験動物も開発されてきたことから、ヒトでの臨床試験と併せた評価システムを整備していくことが望まれている。

## 2. フラクトオリゴ糖 (FOS) および *Bifidobacterium* 由来水溶性多糖の腸管免疫系に対する免疫増強効果の検討

### A. 研究目的

難消化性のオリゴ糖であるフラクトオリゴ糖 (FOS) はショ糖に 1~3 分子のフラクトースが $\beta$ -1, 2結合したオリゴ糖の混合物である (図 2-1)。FOS には、経口摂取することによって、ヒトにおいては腸内に常在する *Bifidobacterium* 属菌の増殖を促進する機能があることが知られており、腸管免疫系を修飾するプレバイオティクスとしての効果が期待されている。

腸管免疫系は、生体の免疫系を制御しているシステムの中でも非常にユニークな腸管関連リンパ組織 (GALT) として知られ、気管支関連リンパ組織 (BALT)、鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)、乳腺、唾液・涙腺、尿生殖器、内耳などと粘膜系リンパ組織 (GALT) を構成している。そして粘膜面で生体と体外環境を境界していることから、生体内への抗原の侵入を阻止して生体防御系の維持にあたっている。また、この粘膜系の生体防御機能ばかりでなく、全身の炎症免疫反応を抑制し、侵襲抗原に対する生体の過剰な反応 (アレルギーや自己免疫疾患などの発症) を制御していることも興味深い。この腸管免疫系による生体防御機能のなかで、最も特徴的なものの一つに分泌型 IgA (secretary IgA, S-IgA) の作用がある。S-IgA は、腸管のパイエル板で取り込まれた抗原によって感作された B 細胞から分化成熟し、粘膜固有層に分布する IgA 形質細胞によって分泌された 2 量体の IgA である。その主要な役割は、微生物の粘膜上皮への接着阻止、

毒素・酵素・ウイルスに対する中和抗体作用、腸管での高分子成分の吸収作用などが知られている。IgA の分泌量がヒトで約 66 mg/kg/日 (ちなみに IgM は 7.9 mg/kg/日、IgG は 34 mg/kg/日) と非常に多く、その 2/3 以上は粘膜面に体外分泌されているということであるから、健全な粘膜面において十分量の IgA が分泌されることは生体防御系にとって重要なことであると考えられる。そして、親和性の高い分泌小片 (secretary component, SC) を有する S-IgA は、非特異的凝集能をもち、これは粘膜面の正常な生理状態維持に役立つ重要な機能である。誘導組織 (inductive site) であるパイエル板において抗原が取り込まれると、CD4<sup>+</sup> T 細胞によって sIgM<sup>+</sup>B 細胞 (IgM を細胞表面に有する B 細胞) から sIgA<sup>+</sup>B 細胞 (IgA を細胞表面に有する B 細胞) へのクラススイッチが誘導され、さらにこれが実効組織 (effector site) である粘膜固有層へホーミングして IgA 形質細胞として分布し、IgA が産生される。分泌された IgA は少なくとも 2 分子が会合し、さらに J 鎖および分泌小片と呼ばれる分子とも共有結合して分泌される。この IgA は IEC の基底側にあるポリ Ig レセプターによって IEC 内に取り込まれ、IEC の管腔側で SC が分解されて IgA から離れ、S-IgA として管腔側に分泌される。IgA 形質細胞はヒト腸管においては大腸に最も多く認められ、粘膜固有層中の 80-90% が IgA 産生細胞であることから、腸管の部位による免疫応答の違いについても興味深い。

したがって、本研究では、FOS の摂取によって腸管内で増加する *Bifidobacterium*

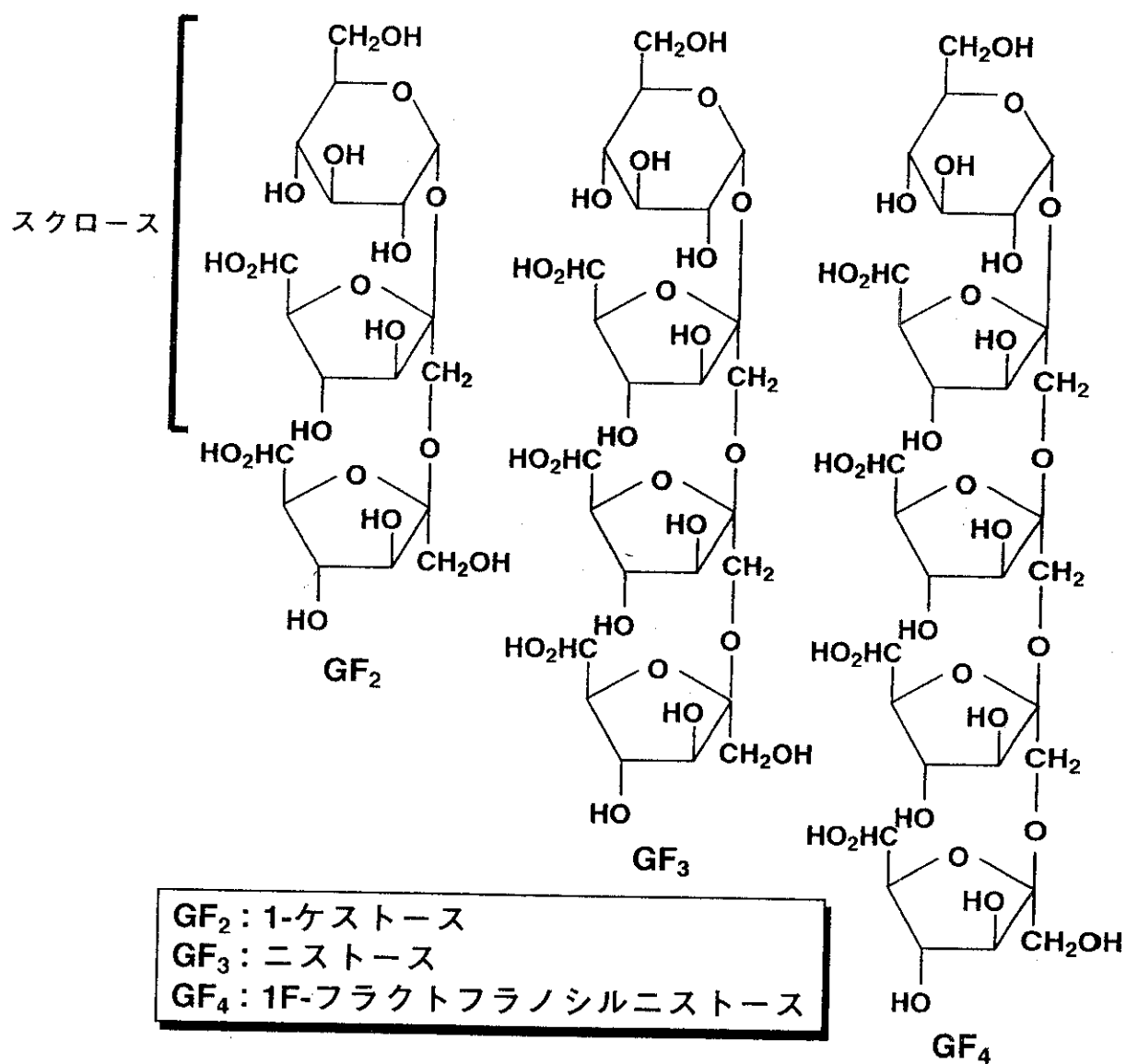


図 2-1. フラクトオリゴ糖の化学構造式

属菌の菌体成分,特に水溶性多糖の免疫系細胞への活性化について,腸管免疫系の細胞を用いて検討した.さらに,腸管の嫌気性微生物において作用する FOS は,腸管免疫系の IgA 産生にも何らかの影響を与え得るのかどうかについて in vivo で検討した.

これらの研究は免疫機能向上病者用食品の開発と評価の基礎となると期待される.

### 1. *Bifidobacterium* 属菌由来水溶性多糖の免疫賦活効果

*Bifidobacterim* 属菌には,マイトーゲン活性,アジュバント活性,マクロファージ活性化,抗体産生能の亢進,抗腫瘍活性のような,免疫学的な生物活性をもつことが知られ,菌体成分による免疫系への修飾作用について注目されている. Lee, J. et al. は, *Bifidobacterium* をはじめとする腸内細菌に注目し,免疫賦活活性をもつ菌体のスクリーニングを in vitro でのマウスリンパ球の増殖活性を指標としたアッセイによって探索した結果,ヒト腸内細菌由来である *B. adolescentis* M101-4 の菌体破碎成分由来の水溶性画分,非水溶性画分のいずれにも高い免疫賦活活性があることを明らかにし,さらにその水溶性活性画分の特徴として多糖の関与を示唆している.そこで,本研究では食品に応用されているこれら食品微生物のもつ免疫賦活活性に注目し,特に加工上有用であるその水溶性画分について,腸管免疫細胞に対する活性を検討した.

### 2. FOS 摂取によるマウス腸管免疫系への影響の検討

難消化性糖類は,その作用部位が主に腸管であることから,近年は栄養学的な機能のみならず,腸管における生理作用全般(代謝,免疫系,抗酸化,抗化学毒性,腸内フローラへの作用,ミネラルの生物活性など)について興味もたれている.特に,プレバイオティクスとしての効果が期待されている FOS については,大腸の抗腫瘍効果についても報告され,ガン抑制作用の可能性も新しい機能の一つとして注目されている.

腸内フローラと腸管の免疫系の関係に関してはその重要性を述べたが, *Bifidobacterium* 属菌やその菌体由来物質には,腸管免疫系において特に重要な機能である IgA 産生を亢進するものがあり,マウスパイエル板細胞の増殖や抗体産生能を刺激するはたらきが報告されている.一方で,食物繊維の摂取により腸管内の IgA 産生が増加するという報告や,食物繊維の摂取により腸管内で生成される短鎖脂肪酸(SCFA)が腸上皮細胞中にポリ Ig レセプターの発現を誘導しているという推察もあり,難消化性糖類の摂取によって腸内フローラの変化が誘導されたときにも,その腸内細菌の発酵生成物である SCFA に同様の腸管免疫系の活性化作用が期待される.ところが, FOS の腸管免疫系に対する作用は未だ明らかになっておらず,本節では FOS の摂取によってマウスにおける in vivo での腸管免疫系に対する影響,すなわち IgA 産生をはじめとする抗体産生に与える影響について検討した.

### B. 研究方法

#### 1. *Bifidobacterium* 属菌由来水溶性多糖の

## 免疫賦活効果

### 1) 菌体の培養および菌体由来免疫活性画分の分離

まず、Lee, J. et al.の方法に従い、*B. adolescentis* M101-4 (日本ビフィズス菌センター, 東京) を GAM ブイヨン培地 (日本製薬, 東京) にて、37°C, 48 時間の嫌気培養 (静置培養) を 4-5 L のスケールで行い、得られた菌体は 6000 x g, 5°C で 10 分間の遠心分離にて回収した。この菌体は蒸留水にて 3 回洗浄後、直ちに全菌体画分 (WC) として凍結乾燥して菌体破碎処理までは -20°C にて冷凍保存された。超音波破碎処理にあたっては、あらかじめ凍結菌体を 4 mg/ml で蒸留水に懸濁し、氷冷しながら Branson 200 (Danbury, CT, U.S.A.) にて 15 分間の断続的な超音波処理を行った。さらに、800 x g, 5°C, 10 分間の遠心により、未処理の細胞や超音波処理で生じた金属くずを除去した。得られた上清を破碎全菌体画分 (SWC) とし、これを 70,000 x g, 5°C, 30 分間の超遠心分離によって、上清を水溶性画分 (SF), 沈澱を非水溶性画分 (IF) とした。得られたすべての画分はいずれも直ちに凍結乾燥後、-20°C にて保存された。

なお、*Bifidobacterium* 菌株間での菌体由来活性成分の比較を行う目的で、*B. adolescentis* M101-4 (M101-4), *B. pseudocatenulatum* MBL8320 (MBL8320), および *B. catenulatum* MBL8318 (MBL8318) の 3 株を以下の組成の MP 培地にて上記と同様に培養し (ただし培養スケールはいずれも 20 L のパイロットプラントにて行った), 水溶性画分および非水溶性画分を分離した。なお、MBL8320 および MBL8318

はいずれも明治製菓 (株) 生物科学研究所所有のヒト腸内細菌由来の菌株である。MP 培地は、1.0% ポリペプトン (日本製薬, 東京), 3.0% Pine-dex #4 (松谷化学), 4.2% Meast P2G (アサヒビール食品, 東京), 0.04%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.002%  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.05% L-アスコルビン酸からなり、蒸留水にて調製 (pH 7.0) した。

### 2) リンパ球幼若化試験を用いた免疫賦活活性の測定

雌性、6-8 週齢の BALB/c マウス (チャールズリバー日本, 横浜) より脾臓細胞、パイエル板細胞、小腸上皮内リンパ球 (IEL) を調製し、RPMI 1640 培地 200  $\mu$ l (10% ウシ胎児血清, 50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール含有), アッセイ用サンプル (20  $\mu$ l) とともに、96 ウェル平底プレート (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, U.S.A.) を用いて 37°C, 5%  $CO_2$  条件下で 48 時間培養した (5 x 10<sup>5</sup> cells/well の細胞数)。その後、1  $\mu$ Ci の [<sup>3</sup>H]チミジン (ICN, Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, U.S.A.) を添加してさらに 20 時間の培養後、細胞をハーベストし、液体シンチレーションカウンター (Packard, Downers Grove, IL, U.S.A.) で細胞に取り込まれた [<sup>3</sup>H]チミジンの量 (cpm) を測定した。

### 2. FOS 摂取によるマウス腸管免疫系への影響の検討

#### 1) 実験動物

18 匹の雌性 BALB/c マウス (日本クレア) 5 週齢を、温度 24-25°C, 湿度 40-60% の条件下で個々にステンレスのワイヤーケージで飼育した。最初の 1 週間は、固型試料

MF (オリエンタル酵母) と蒸留水を自由摂取させる馴化飼育を行い、その後、1群6匹の3群に無作為に分けた後、それぞれ試験食にて30日間の飼育を行った。

## 2) 試験群および試験食

試験食は表 2-1 に示したとおりで、コントロール食群, FOS 5% 添加食群, FOS 10% 添加食群の 3 群に分け、船橋農場 (千葉) にてペレット状に加工された精製飼料を 30 日間自由摂食させた。なお、飲水は試験期間中も自由摂取させた。

試験食給餌期間中は、1 週間毎に糞便採取を行い、2 週間毎に尾静脈採血を行った。試験開始 30 日目には脱血法により屠殺し、パイエル板、脾臓、および十二指腸から肛門部までの腸管を摘出した。

## 3) 血中免疫グロブリン (Ig) の測定

血液サンプルは定法に従い血清を分離した (Ig の定量までは  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した)。各血清サンプルについて、サンドイッチ ELISA 法にて IgA, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> をそれぞれ定量した。

### ①抗体

ヤギ抗マウス IgA, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> (Cappel, ICN Pharmaceuticals, Inc., CA, U.S.A.), ビオチン標識抗マウス IgA, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.)

### ②試薬

ウシ血清アルブミン (Sigma), ストレプトアビジン標識アルカリフォスファターゼ (Zymed), *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (和光純薬工業)

### ③ELISA 法

ヤギ抗マウス Ig 抗体を PBS/Tween (0.2% NaN<sub>3</sub> および 0.05% Tween-20 含

PBS 溶液) にて調製し (10  $\mu\text{g/ml}$ ), 96 ウェルのマイクロタイタープレート (Maxisorp immunoplate, Nunc, Roskilde, Denmark) に 100  $\mu\text{l}$ /ウェルずつまき、一次抗体をコーティングした ( $4^{\circ}\text{C}$  にて一晚静置)。PBS/Tween で 3 回洗浄し、1% BSA-クエン酸緩衝液 (pH 6.4) を 200  $\mu\text{l}$ /ウェル加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベーションした (ブロッキング)。その後、PBS/Tween で 3 回洗浄し、適当な希釈倍率で調製した血清サンプル (1% BSA-PBS/Tween にて希釈) を 100  $\mu\text{l}$ /ウェル加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベーションした。PBS/Tween で 4 回洗浄した後、1% BSA-PBS/Tween にて 1/1,000 に希釈したビオチン標識抗マウス Ig 抗体 (二次抗体) を 100  $\mu\text{l}$ /ウェル加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベーションした。さらに PBS/Tween で 8 回洗浄した後、1% BSA-PBS/Tween にて 1/500 に希釈したストレプトアビジン標識のアルカリフォスファターゼを 100  $\mu\text{l}$ /ウェル加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベーションした。その後 PBS/Tween で 6 回洗浄した後、ジエタノールアミン緩衝液 (97 ml のジエタノールアミン, 100 mg の MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 200 mg の NaN<sub>3</sub> を 1 L の水溶液に調製したもの/pH 9.8) 中に 0.1% の *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを溶解させて調製した基質溶液 (用事調製) を 100  $\mu\text{l}$ /ウェル加え、 $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベーションして発色させた。そして 405 nm にて吸光値を測定した。

## 4) 糞便中および腸内容物中の総 IgA 量の定量

### ①糞便サンプルの調製

糞便サンプルは毎週 1 回、19 時から翌朝 9 時までの 14 時間分の糞を個別に採取



表 2-1 実験食の配合表

	コントロール食	5% FOS食	10% FOS食
	(g/kg 飼料)		
カゼイン	200	200	200
コーンスターチ	532	532	532
コーン油	70	70	70
ビタミン混合 <sup>1</sup>	10	10	10
ミネラル混合 <sup>1</sup>	35	35	35
セルロース	50	50	50
スクロース	100	50	0
FOS <sup>2</sup>	0	50	100
L-シスチン	3	3	3

<sup>1</sup> AIN-93 配合 (Reeves et al. 1993) による

<sup>2</sup> フラクトオリゴ糖 (メイオリゴ-P, 明治製菓)

し、それぞれを凍結乾燥後、乳鉢にて細かく破碎してよく混合し、100 mg/mlの濃度で50 mM EDTA および0.1 mg/ml トリプシンインヒビター含 PBS (pH 7.4) に懸濁した。さらに、3,000rpm, 4℃, 20 分間の遠心処理によって上清を得、これよりさらに10,000rpm, 4℃, 10 分間の遠心処理により上清を採取し、これを糞便サンプルの総 IgA 測定用サンプルとした(測定までは-20℃にて保存)。

## ②腸内容物の調製

30 日間の試験期間の最終日に、マウスより消化管を十二指腸から肛門部まできれいにハサミで採取し、15 ml チューブ中にて2 ml の50 mM EDTA および0.1 mg/ml トリプシンインヒビター含 PBS 溶液を加え、スパーテルでよく攪拌した(腸内容物をホモジナイズするように十分に懸濁した)。さらに、650 x g (2,500rpm), 4℃, 10 分間の遠心処理により上清を採取した。この上清に10 µl の1% NaN<sub>3</sub>を加え、総IgA 測定用サンプルとした(測定までは-20℃にて保存)。

## ③総 IgA 量の定量

いずれも ELISA 法にて測定した。

## 5) パイエル板細胞および脾臓細胞が産生する総 IgA 量の定量

30 日間の試験期間の最終日にマウスより無菌的に採取した脾臓および小腸に付着しているパイエル板は、10% FBS 含 RPMI1640 培地にて脾臓細胞：5 x 10<sup>6</sup> cells/ml, パイエル板細胞：4 x 10<sup>6</sup> cells/ml となるように細胞を調製した。なお、パイエル板は50 ml チューブにて4 ml の10% FCS 含 RPMI 1640 培地と2 ml のディスペーゼ溶液(2.4 U/ml)とともにスターラー

にて37℃, 1時間ゆっくり攪拌し, 1,000rpm, 10 分間の遠心処理により上清を除いた。この処理を2回繰り返してRPMI 培地にて洗浄後, 細胞溶液を調製した。上記のように調製した細胞溶液は, 96 ウェルマイクロプレート (Falcon, Becton Dickinson) に100 µl/ウェルずつまき, マイトージェン刺激としてコンカナバリン A (Con A), LPS, M101-4由来のSWC (*B. adolescentis* M101-4由来の菌体破碎物) を100 µl/ウェル添加して, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 濃度にて4日間培養した。なお, 添加した濃度はそれぞれ, 2 µg/ml (Con A), 20 µg/ml (LPS), 20 µg/ml (SWC) である。4日間の培養後, 培養上清を採取し, これを総 IgA 定量用サンプルとした。総 IgA 量の定量は ELISA 法によって行った。

## 6) 統計処理

糞便中および腸内容物中の総 IgA 量のデータは, 一元配置分散分析を行い, 平均値の差の分析は Tukey's test により危険率5%以下を有意差とした。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いはずべて大学の定めるガイドラインを順守して行った。

## C. 研究結果

### 1. *Bifidobacterium* 属菌由来水溶性多糖の免疫賦活効果

それぞれの菌体の SF/IF 回収率(乾燥重量%) は次のとおりであった。M101-4, 14.6/61.1% ; MBL8320, 25.5/48.4% ; MBL8318, 12.5/65.4%。

M101-4 における菌体由来免疫賦活物質の分布を調べるために, 菌体, および超音

波破碎処理都, 超遠心分離により分離された細胞壁および細胞質画分についてリンパ節細胞増殖試験, 脾臓細胞, パイエル板細胞を用いたリンパ球幼若化試験により比較した(図 2-2)。その結果, リンパ節細胞増殖試験では, 細胞壁画分の方が細胞質画分と比較して強い活性を示したが, 脾臓細胞, パイエル板の幼若化試験においては細胞質, 細胞壁画分とも同等な強い活性を示した。

M101-4, MBL8320, および MBL8318 における菌体由来免疫賦活物質の分布を調べるために, それぞれの菌体の WC, および超音波破碎処理して得られた SWC, SF, IF の各画分 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  について, マウス脾臓細胞を用いたリンパ球幼若化試験により比較したところ, 3 株すべてにおいて SWC, SF, IF の活性が WC よりも高いという結果が得られた。この結果は, 3 株とも菌体の超音波破碎処理により活性成分が菌体表面に暴露された結果であると考えられる。なお, MBL8318 由来の画分が M101-4 および MBL8320 由来の画分よりも低い活性を示した(図 2-3)。

さらにマウス小腸上皮間リンパ球 (IEL) を調製し, *in vitro* 培養系において抗原提示細胞存在下, M101-4, MBL8320 および MBL8318 由来の WC, SF, IF を添加してリンパ球増殖活性を測定したところ, M101-4 および MBL8320 由来の SF には IEL に対する高い増殖活性がある結果が得られた(図 2-4)。

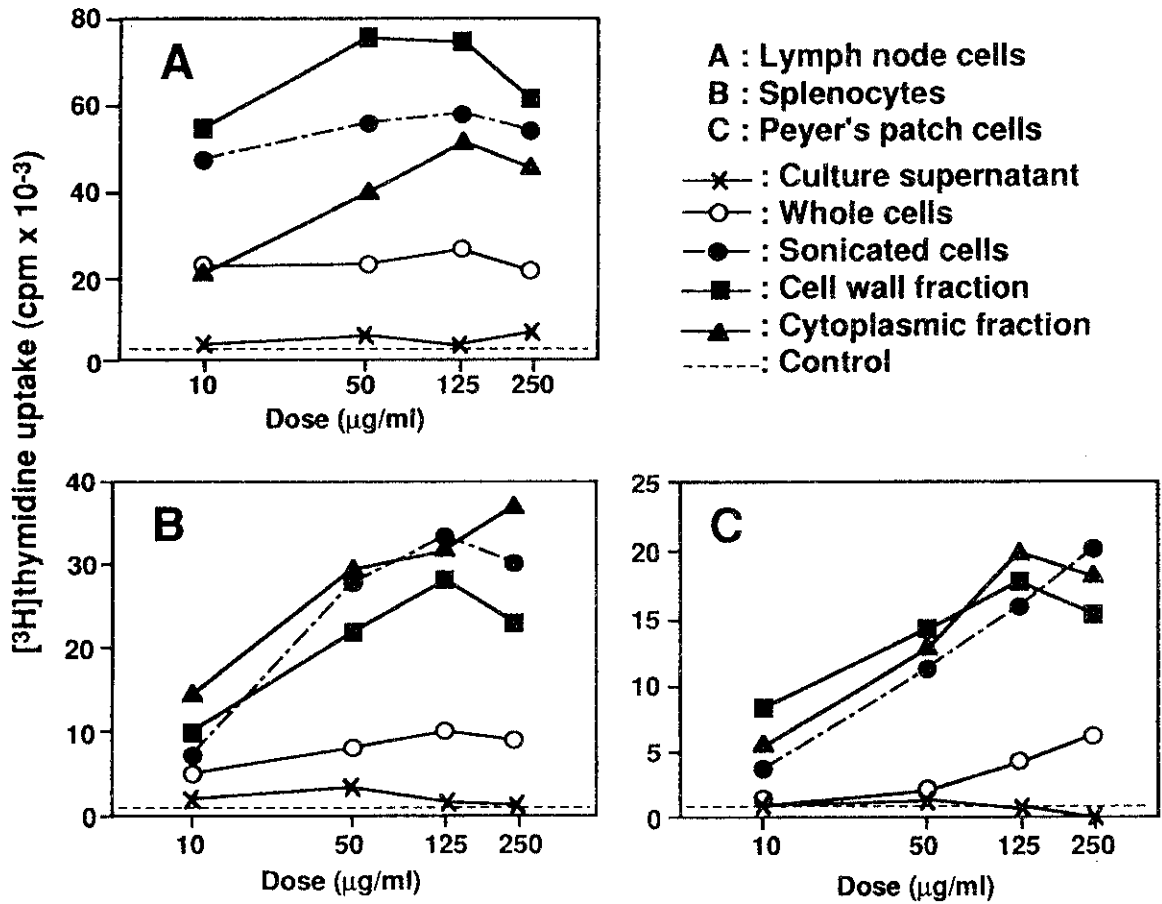
## 2. FOS 摂取によるマウス腸管免疫系への影響の検討

### 1) マウス腸内フローラの検索

試験食開始直前, 2 週目および 4 週目の各群それぞれ 3 匹ずつの糞便を採取し(9:00-10:00 の 1 時間), 定法に従い嫌気性菌の構成を検索したところ, 嫌気性菌の総菌数は FOS 5%食群および FOS 10%食群において 2 週目以降上昇し, 4 週目において FOS 10%食群が最も高かった(コントロール食群,  $10^{9.98}$  cells/g; FOS 5%食群,  $10^{10.11}$  cells/g; FOS 10%食群,  $10^{11.21}$  cells/g)。*Bifidobacterium* はいずれの群からも検出されなかったが, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Bacteroidaceae* は 4 週間の試験期間中で, FOS 5%食群および FOS 10%食群において増加傾向が認められた。*Staphylococcus* は逆に FOS 食群において減少傾向であった。なお, 試験食開始 1-2 週間は, FOS 10%食群において下痢様の症状を示すマウスが 6 匹中 3-4 匹みられたが, 3 週目以降は下痢症状は改善された。また, 試験期間中の摂食量および体重については各群間で有意な差は認められなかった。

### 2) 糞便中および腸内容物中の総 IgA 量

4 週間の試験期間中の糞便中総 IgA 量および最終日 (30 日後) の腸内容物中の総 IgA 量を図 2-5 および表 2-2 に示した。糞便中総 IgA 量は, 試験食開始直前 (0 週目) はいずれも 200  $\mu\text{g}$  以下であった。コントロール食群が 4 週間の間で 140-300  $\mu\text{g}$  と大きな変化がなく推移したのに対し, FOS 5%食群は 1 週目に 885  $\mu\text{g}$  と大きく上昇し, その後徐々に減少傾向はあるものの, コントロール食群よりは常に高い傾向がみられ, 4 週目では有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。FOS 10%食群では, 2 週目をピークにコントロール食群よりも高い傾向がみられたが, 3-4 週目は糞便量が他の 2 群に



⊠ 2-2 . Distribution of immunopotentiating components from *B. adolescentis* on proliferation of murine lymph node, splenocytes and Peyer's patch cells.