

厚生科学研究研究費補助金

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

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 上野川 修一

平成 13 (2001) 年 3 月

## 目 次

I. 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	1
上野川修一	
1. 循環器、糖尿病関連病者用食品の評価法についての調査研究	2
2. アレルギー疾患用食品、免疫向上食品の開発及び評価法開発のための 基礎研究-ヌクレオチドの摂取が免疫系に及ぼす影響-	8
3. パイエル板樹状細胞により誘導される腸管免疫応答の解析	47
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	54
5. アレルゲンペプチドによる食物アレルギーの治療に関する基礎研究	58
II. 分担研究報告	
1. 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
石川博通	
2. アレルゲンペプチドによる食物アレルギーの治療に関する基礎的研究	65
河野陽一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷	69

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）循環器、糖尿病関連病者用食品の現状、それをういた食事療法、また開発・評価法について、国内外の文献等から調査研究を行った。（2）アレルギー疾患用食品、免疫向上食品の開発および評価法開発のための基礎研究として、経口摂取したヌクレオチドの免疫系への影響を検討し、アレルギーの抑制に有効である可能性を明らかにした。（3）腸管特有の免疫応答に重要な役割を示すと思われるパイエル板樹状細胞についてその抗原提示能、サイトカイン産生能について検討し明らかにした。（4）マウス腸管免疫組織独特の発生器官におけるリンパ球発達分化機構について前年度に引き続き検討した。（5）食物アレルギーの治療法として、T細胞エピトープによる減感作療法について検討した。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  
教授

## 1. 循環器、糖尿病関連病者用食品の評価法 についての調査研究

### A. 研究目的

「生活習慣病」に位置づけられる糖尿病をはじめとした循環器系の疾患は、主に食生活にその発症が起因すると考えられ、我が国の食生活の欧米化に伴い近年患者数が劇的に増加している。現在我が国において国民の 10 %以上が糖尿病を発症または発症の恐れがあり、さらに糖尿病は危険な循環器系の合併症を誘発する可能性も非常に高い。我が国独自の制度である「特別用途食品」は食事療法による治療を目的としたものであり、食生活に起因する疾患の根本的治療方法として今後ますますその必要性が増加してくる。特に「特別用途食品」内の「病者用食品」は、特定の疾患を持つ人の治療を目的としてデザインされた食品群であり、本研究は糖尿病などの循環器系の「病者用食品」を使用した食事療法の現状とそれに関連のある国内外での研究開発に注目した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. 循環器、糖尿病関連病者用食品の現状 についての調査研究

国内の循環器、糖尿病関連病者用食品についての文献調査、またこれら疾患の現状の調査を、World Wide Web (WWW)等を用いて行った。

#### 2. 国外における糖尿病や循環器系疾患の

#### 食事療法の現状と開発状況

国外における食品を用いた循環器、糖尿病患者に対する臨床・研究の状況をアメリカ国立衛生研究所(NIH)の MEDLINE を用いて文献検索を行った。

#### 3. 食事療法における動物モデルを使用した研究の状況調査

糖尿病モデル動物を使用した研究状況及び将来の展望について、書籍や文献検索を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 循環器、糖尿病関連病者用食品の現状 についての調査研究

「特別用途食品」は栄養改善法において厚生大臣によって許可される食品群であり、特定の疾患を患っている人々や乳児・妊産婦・高齢者など健康上特別の用途に使用することを目的としている。特に「特別用途食品」内の「病者用食品」は、特定の疾患を持つ人に対して治療効果・症状の改善効果が得られると期待されており、許可基準型と個別評価型の 2 分類からなる(古畑、臨床栄養、92 : 258)。許可基準型の病者用食品は、病者用単一食品と病者用組合わせ食品からなり、平成 13 年 1 月 24 日現在病者用単一食品として低ナトリウム食品 (許可件数 : 98)、低カロリー食品 (22)、低タンパク質食品 (7)、低(無)たんぱく質高カロリー食品 (1)、高たんぱく質食品 (10)、アレルギー疾患用食品 (19)、無乳糖食品 (2)、病者用組合わせ食品として減塩食調整用組合わせ食品 (0)、糖尿病食調整用組合わせ

食品 (176)、肝臓病食調整用組合わせ食品 (0)、成人肥満症食調製組合わせ食品 (7)が認められている。個別基準型の病者用食品は、その許可に個別の食事療法上の効果、学識経験者による評価検討会で審査が必要なことから、平成 13 年 1 月 24 日現在で 4 品目しか認められていない(以上(財)日本健康・栄養食品協会、特別用途食品表示許可一覧表内訳(平成 13 年 1 月 24 日現在)より抜粋)。これら病者用食品の許可件数はここ 1、2 年の間で 40 件ほど増加しており、そのうち半数以上の割合で糖尿病食調製組合わせ食品が増加している。

糖尿病は 1980 年および 1985 年に WHO によって、インスリン依存型糖尿病(insulin dependent diabetes mellitus : IDDM, I 型糖尿病)とインスリン非依存型糖尿病(non-insulin dependent diabetes mellitus : NIDDM, II 型糖尿病)に分類される。NIDDM は糖尿病全体の 90 から 95 %を占め、その発症起因は遺伝的要因・環境的要因が複雑に混ざりあっており、多くの病態はインスリン分泌の低下とインスリン感受性の低下(インスリン抵抗性)の二形態に分離される。欧米における NIDDM の多くはインスリン抵抗性が原因であり、その多くは肥満を伴っている。一方日本において NIDDM は、従来インスリン分泌性能低下が主な原因だったが、食生活の欧米化に伴い肥満を伴ったインスリン抵抗性型 NIDDM も増加の一途を辿っている。さらに、糖尿病における合併症として、冠動脈硬化疾患、心筋梗塞、高脂血症などの循環器系の疾患による死亡例も劇的に増加

している。(門脇等編集、実験医学別冊メディカル用語ライブラリー 糖尿病)。特にインスリン抵抗性は、NIDDM だけでなく「生活習慣病」と呼ばれる多嚢胞性卵巣病、高脂血症、高血圧、心筋梗塞、睡眠無呼吸症、ある種のホルモン感受性ガン、肥満の共通した特徴となっており、インスリン抵抗性の治療がさかんに研究されている。

これら IDDM・NIDDM をはじめとした循環器系疾患の治療戦略としては、食事療法・運動療法・薬物療法を組み合わせる方法が一般的であり、中でも食事療法は治療戦略の中でその根幹をなしている。国内における食事療法の基盤は、上記の特別用途食品・病者用食品である。高血圧、全身性浮腫疾患(腎臓疾患、心臓疾患など)には低ナトリウム食品・低たん白質食品・減塩食調製用組合わせ食品を、糖尿病には低カロリー食品・糖尿病食調製用組合わせ食品が、それぞれ特別用途表示として許可されている(樋口等、臨床栄養、92 : 263)。しかしながら、これら当該品の臨床成績については許可基準設定型病者用食品のために、報告は見あたらないのが現状である。現在までに唯一の臨床例として、播磨等が行った糖尿病食調製用組合わせ食品を使用した NIDDM 症例における食事療法の臨床成績がある(播磨等、臨床と研究、76 : 205)。その結果によると、27 例の NIDDM 症例を対象に 2 ヶ月間にわたって糖尿病食調製用組合わせ食品による食事療法を実施した結果、試験開始 1 ヶ月後にヘモグロビン A<sub>1c</sub> は有意に低下し血糖状態の改善が認められると共に中性脂

肪および総コレステロールの低下が見られた。試験開始 2 ヶ月後には、ヘモグロビン A<sub>1c</sub> は試験直前の水準に達しなかったが、1 ヶ月後に比べて上昇し、中性脂肪および総コレステロールは試験直前の水準に戻った。これらの結果は食事制限が長期に渡ったため患者の食生活に乱れが生じたことが原因であり、総合的に判断して糖尿病食調製用組合わせ食品の有効性が確認されている。この報告に限らず、食事療法を用いた治療においてその有効性を最大限に発揮するには患者自身のライフスタイルにあった食事療法を医師や栄養士と相談して継続することが、重要であると認識されている。すなわち、循環器系などの合併症などの危険性を減らし、患者自身の生活の質(Quality of Life)を維持することが、糖尿病の食事治療の必須課題である。

## 2. 国外における糖尿病や循環器系疾患の食事療法の現状と開発状況

特別用途食品は、日本独自の制度であるが国外において糖尿病の食事治療も変化を見せつつある。Glycemic Index (GI)は、同じ量の糖質を含む食品を摂取しても、血糖に及ぼす影響が異なるので、食品摂取後の血糖の変化量をブドウ糖やパンと比較して数値化したものであるが、この数値を用いた目新しい分析点は、食品を栄養素からではなく生体への生理的効果から分類するという点にある(宇佐美等、糖尿病 43 (12) : 1015)。低 GI 食品は HDL の増加を促し NIDDM の危険性を減らし、さらにインスリンの感受

性を人で増加させる報告もある(Wolver TM, Br. J. Nutr. 83 Suppl 1 : S97)。また、その他多くの研究で低 GI 食品が血糖の反応性が低いことが示されている。そして糖質を摂取する食品は血糖値を急激に上昇させない、インスリン分泌をあまり促さない食品が望ましく、このような観点からもヨーロッパやオーストラリアなどの国々では GI の臨床的評価が高く、食事療法の指針には低 GI 食品の摂取を勧めており、さらに主食製品(パン・米・パスタなど)を低 GI の材料から生産するよう食品産業界の協力の必要性を促している(宇佐美等糖尿病 43 (12) : 1015)。GI は多くの食品で計算されているが、GI は食事という点で各々の食品を組み合わせるということから、実際の生理的な吸収の段階において、複雑な変化を見せることは否定できない(Rendell M, N. Engl. J. Med, 342 : 1440)。また、栄養素が必ずしもバランスよく取れない点も、GI 重視の食事療法の問題点であると考えられている。一方、American Diabetes Association (ADA)の食事療法の指針では(Nutrition Recommendations and Principles for People With Diabetes Mellitus, volume 24 Suppl 1, 2001)、主に血糖・脂質・血圧・体重の維持に主眼が置かれ、勧める栄養食のカロリー配分はタンパク質から 10~20%、糖質と脂質からのカロリー配分はその個人の状態に合わせて摂取するという非常に柔軟なものとなっている。さらに、近年の研究結果から(Luscombe ND et al, Euro. J. Clin. Nutr, 53 : 473 & Medigan C et al, Diabetes Care, 23 : 1472)、食品に含まれる脂肪の種類が飽

和脂肪酸よりも一価不飽和脂肪酸や魚肉などに多く含まれる多価不飽和脂肪酸の方が、血糖値の増加を抑制することが明らかとなってきた。また、食品中の食物繊維の量が多いと同じ糖質の量を食べたときに、血糖値の上昇を IDDM・NIDDM の人において抑制できることが報告されている (Giacco et al, Diabetes Care, 23 : 1461 & Chandalia M et al, N. Engl. J. Med., 342 : 1392)。それらのことをふまえて ADA の食事療法の指針では、飽和脂肪酸から摂取するカロリー量を全体の 10%以下に抑えるように勧めているほか、20~35 g の食物繊維(このうち 3 分の 1 は水溶性食物繊維)を 1 日に摂取するよう勧めている。さらに、ADA の指針の特徴として、いわゆる「糖尿病食」や「ADA 食」は存在せず、推薦する栄養素があるのみで個人個人の健康状態に合わせた栄養管理が非常に重要であると述べている。

以上のように、糖尿病の食事療法に用いる食品の成分については、国内海外を問わずに研究が進むにつれ刻々と、その内容を変化させている。現在のところ推奨されている食事療法は、総エネルギーを抑制しつつも糖質・タンパク質・脂質の三大栄養素のバランスのとれた食事に加え、ビタミン・ミネラル・食物繊維の補給というのが基本となっている。さらに、近年の研究結果から、活性酸素が糖尿病患者において、腎臓や血管などの循環器系、神経系への合併症の危険性を増大させることが明らかとなってきた。これらに加えて、抗酸化剤(ビタミン E、ベータカロチン、ビタミン C な

ど)の補給は、糖尿病患者の症状改善に効果的であった(Jakus V, Bratisl. Lek. Listy. 101 : 541)から、抗酸化剤の補給も食事療法の中に今後多く取り入れられて行くであろう。

### 3. 食事療法における動物モデルを使用した研究の状況調査

これまでに述べてきたような例は、実際に糖尿病患者や合併症を誘発している人を対象に臨床試験が行われてきていた例であるが、人を対象とした研究の大きな欠点として、数年から数十年といった長期的な視野に立った研究を出来ないということがある。このことを解決する手段として多くのモデル動物を使用した実験が行われている。

糖尿病における実験動物モデルは古くから多く創られている。そのタイプは以下に分類され、実験的に誘発したもの、遺伝的に発症するもの(自然発症型およびトランスジェニック型)である。実験的に誘発するモデルでもっとも使用されているのは、*Streptomyces acromogenes* の培養液に含まれる抗ガン剤ストレプトゾトシンを添加することで、膵臓β細胞を破壊して糖尿病を誘発するモデルである。遺伝的に発症する動物はラットとマウスがほとんどであり、IDDM 自然発症型モデル動物として BB ラット・NOD マウス・LETL ラットなどがあり、NIDDM 自然発症型モデル動物として OLETF ラット・db/db マウス・GK ラット・ob/ob マウスなどがある(門脇等編集、実験医学別冊メディカル用語ライブラリー 糖尿病)。

OLETF ラット(Kawano K et al, Diabetes, 41 : 1422)は、肥満を伴った NIDDM モデル動物マウスであるが、その病体の推移は下表のようになる(森、糖尿病、43 : 1025 より抜粋)。

月齢	病態
0	出生
3	インスリン抵抗性 高インスリン血症
6	糖尿病発症
12	冠動脈分枝に硬化像出現
18	冠動脈に硬化像進展

この OLETF ラットを用いた研究においても、上記の食物繊維、多価不飽和脂肪酸の食事の増加が、抗動脈硬化作用を示した(森、糖尿病、43 : 1025)。

以上のように、実験動物モデルを用いた糖尿病などの食事療法の改善は有効であると考えられ、今後も継続して多種多様な研究が行われていくと推測される。さらに、今後最も注目の浴びる動物モデルとして、ゲノム解析の研究結果から作製されるノックアウトマウスやトランスジェニックマウスがあり、これらのマウスを用いた実験と食事療法の研究が組み合わされることで、多様な成果が得られることが期待される。

#### D. 考察

我が国において、糖尿病患者の増大は、単に食生活が欧米化しているだけでなく、生活習慣それ自体に問題がでてきていることが考えられる。そのようななかで、我が

国独自の「病者用食品」の使用に一番求められるのは患者の生活習慣の改善と、患者の治療意欲であると考えられる。ここ数年の「病者用食品」における新規申請は糖尿病食調製用組合わせ食品が最も多く、また「病者用食品」内での糖尿病関連食の割合は圧倒的に高い。このことは、患者の長期的な食生活の改善に大きな精神的負担の軽減、安易な栄養改善を推進できる環境が整いつつあることを示唆しているが、一方で管理栄養士の不足や、無自覚な患者の増大など、個人個人に依存した負の部分が増えることも否定できない。今後ただ単に「病者用食品」を増大させるのではなく、徹底した患者との連携が「病者用食品」のメリットを増大させる鍵となるであろう。

また、これまで成分の操作により許可基準型の「病者用食品」はたくさん認可されてきているが、個別評価型の「病者用食品」はいまだに4種しか認められていない。この研究で述べたように、許可基準型の「病者用食品」の臨床的研究は、数限られたものであり、今後「病者用食品」が有効であるという臨床結果の提出が「病者用食品」の普及の一役を担うと考えられる。その点で、個別評価型の「病者用食品」が増加することが望ましいと考えられる。

食事療法の開発状況における実験動物の使用は、長期的視野に立たなければならないヒトと違って、短期的により多くの研究が可能となる点などにおいて非常に有効な手段のひとつである。特にこれからの開発



において、ヒトゲノムプロジェクトを始めとした一連のゲノム解析の結果から、新たな治療戦略がうまれてくるのは時間の問題である。近い将来、遺伝子を基盤とした新たな研究成果から、食事療法が出てくることを期待したい。

#### E. 結論

本研究は、糖尿病や循環器系疾患の「病者用食品」に関する現状を、文献・書籍等から調査したものである。「病者用食品」は、許可基準型の品目がそのほとんどを占めるが、実際の臨床結果が不足しているのが現状であり、個別評価型品目の増加が望まれる。国内において「病者用食品」を用いた食事療法は、その処方方法を守れば症状が改善されていくが、実際には患者の生活習慣に大きく依存してしまっている。今後、「病者用食品」だけでなく患者を取り巻く環境の整備も期待される。海外においては、「病者用食品」という厳密に定義された食品はないが、食事療法における栄養バランスを推進し、さらに患者個人の治療意欲を促している。また食事療法の研究開発状況として、糖尿病のモデル動物を取り上げたが、今後もこれらを利用した研究は有効であると考えられる。さらに近い将来ヒトゲノムプロジェクトの成果を受け、遺伝子を基盤とした新たな研究成果から、食事療法をはじめとした評価系が構築されることが、期待できる。

## 2. アレルギー疾患用食品、免疫向上食品の開発及び評価法開発のための基礎研究-ヌクレオチドの摂取が免疫系に及ぼす影響-

### A. 研究目的

#### 免疫系とは

生体に病原体や異種タンパク質が侵入してくると、生体はこれらを体外に排除する、あるいは無毒化する。このように病原体や異種タンパク質に対する防御機構が生体には備わっている。この生体防御の最も主要な機構として免疫系が挙げられる。

抗体を産生するなど、免疫系に関与している細胞を免疫担当細胞という。免疫担当細胞には、リンパ球やマクロファージなどがある。リンパ球は骨髄中の多能性幹細胞から分化した細胞で、T細胞やB細胞などがある。外来の様々な抗原に対して、B細胞は抗体で、T細胞はT細胞レセプターで認識する。T細胞上のT細胞レセプターは2種類のポリペプチド( $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖または $\gamma$ 鎖と $\delta$ 鎖)から成るヘテロ二量体で、CD3分子がT細胞レセプターに会合している。外来の抗原は抗原提示細胞(B細胞やマクロファージなど)によって取り込まれ、分解された後、抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子と結合した形で細胞の表面に発現する。このMHCクラスII分子と抗原の複合体が、T細胞上のその抗原に対して特異的なT細胞レセプターと結合する。さらに、T細胞や抗原提示細胞上の接着分子同志が補強的に結

合することで、T細胞レセプターに結合しているCD3分子を介してシグナルが細胞内へ伝達され、T細胞が活性化される。活性化されたT細胞は、サイトカインを産生し、細胞表面に機能分子を発現し、他の細胞に作用する。B細胞は、この活性化したT細胞と直接接触したり、T細胞の放出したサイトカインにより、抗体産生細胞へと分化し、抗原に特異的に結合する抗体を産生ようになる。このようにB細胞の抗体産生を補助しているのがヘルパーT細胞である。T細胞には、他にT細胞やB細胞の免疫応答を抑制する調節T細胞がある。こうして、生体内では、様々な抗原に対して抗原特異的な免疫応答が誘導される。

#### アレルギーの制御

##### 1. アレルギーとは

生体の免疫系が、外来の抗原に対して正常よりも過度にあるいは不適當に過敏な反応を示すことがある。そして、感染防御や異物の排除という本来の免疫系の機能を越えて、自己の組織に対しても障害を引き起こすことがある。このような現象をアレルギーという。この過敏反応が起こる原因として、生体が大量の抗原に出会うこと、外来の抗原に対する免疫応答が過剰に起こった結果、その後引き起こされる炎症反応が自分の体を攻撃してしまうことが挙げられる。アレルギーには、主にI-IVまでの4つの型に分類されている。このアレルギーの4つの型の中で、近年その患者数が急速に増大しており、いまや現代病として大きな社会問題となっているのは、IgE抗体が重

要な役割を果たす I 型アレルギーである。I 型アレルギーの疾患には、喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどがある。しかし、その治療法に関しては今なお、対症療法にその主体を頼らざる得ないのが現状である。

I 型アレルギーの発症に、抗原特異的な IgE が深く関与することが知られている。この抗原に対して特異的な IgE 抗体は目、鼻、のどなどの、粘膜内にいる好塩基球や肥満細胞などの Fcε レセプターに付着する。そこへ再び同一の抗原が侵入すると、好塩基球や肥満細胞に付着していた IgE 抗体同志が抗原により架橋され、レセプターの変化を引き起こし、細胞から顆粒が放出される（脱顆粒）。この顆粒からヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質が放出されて、これらの物質によって、血管透過性の亢進、平滑筋収縮、粘液分泌亢進などのさまざまな症状が引き起こされ、I 型アレルギーの疾患が起こる。このように、抗原特異的な IgE は I 型アレルギーの発症に非常に重要な役割を果たす。

## 2. 全身免疫系のヘルパー T 細胞のバランスによるアレルギーの制御

アレルギーの発症には様々な原因が考えられている。その一つとしてヘルパー T 細胞のサイトカイン産生の偏りが考えられている。ヘルパー T 細胞には 1 型 (Th1) と 2 型 (Th2) があり、それぞれ異なったタイプのサイトカインを産生することが明らかになっている(7)。アレルギー患者では、生体内のヘルパー T 細胞のバランスが Th2

優位になっていることが知られている。Th1 は、インターフェロン-γ (IFN-γ)、インターロイキン-2 (IL-2) を産生し、B 細胞の IgG2a の産生を誘導する。それに対し、Th2 はインターロイキン-4 (IL-4) を産生し、B 細胞の IgE、IgG1 の産生を誘導する。また、産生されたこれらのサイトカインは相互に作用し合って、免疫、アレルギー反応を調節する。例えば、Th1 の産生する IFN-γ は、Th2 の活性を抑制し、Th2 の産生する IL-4 は、Th1 の活性を抑制する。この Th1 と Th2 のバランスが均衡することによって、生体内の免疫反応は正常に保たれる。しかし、Th1 と Th2 のバランスがどちらかに傾くと、免疫系に異常が現れる。例えば、Th1 と Th2 のバランスが Th1 優位になると遅延型過敏症になりやすい。一方、Th1 と Th2 のバランスが Th2 優位になると、喘息や花粉症などの I 型アレルギーの発症を引き起こしやすくなる。

この Th1 と Th2 のバランスの制御機構については多数の報告がある。例えば、抗原提示細胞上の CD80 と CD86 が Th1 と Th2 のバランスに重要な役割を果たす。外来の抗原や病原菌は、抗原提示細胞 (B 細胞やマクロファージなど) によって取り込まれ、分解され、MHC と結合した形で抗原提示細胞の表面上に発現する。抗原提示細胞上の MHC 分子とともに抗原の分解物が、T 細胞上の T 細胞レセプターと結合すると、細胞内にシグナルが伝達される (第一シグナル)。しかし、これだけでは抗原特異的な T 細胞の十分な活性化は起こらない。T 細胞が活性化するには、この第一シグナルと

は別の第二シグナルが必要である。第二シグナルは、T細胞上の細胞表面分子と抗原提示細胞上の CD80 や CD86 との結合により伝達される。Kuchroo らは、Th1 により引き起こされる疾患である実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) において、抗 CD80 抗体を投与すると EAE を改善させ、抗 CD86 抗体を投与すると EAE を悪化させるという結果を報告した。したがって、CD80 は T 細胞を Th1 の方向に、CD86 は Th2 の方向に傾けることが考えられる。また、単球、マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞の産生する IL-12 が、IFN- $\gamma$  の産生や Th1 の分化の誘導に重要であることも知られている。

### 3. 腸管免疫系によるアレルギーの制御

腸管は消化吸收の場であるとともに、多数の免疫担当細胞が分布している。この腸管の免疫系もアレルギーの発症に関与することが示唆されている。腸管は常に食餌由来の外来抗原や毒素および無数の微生物(腸内常在細菌や病原性微生物)に曝されている。腸管ではそれらの抗原や細菌の生体内への侵入を阻止したり、組織侵襲による組織細胞傷害を防御する機能がある。腸管では外来の抗原が生体内に入るのを防ぐことで、生体がアレルギーになるのを防いでいる。また、腸管免疫系では、これらの抗原に対し過剰な免疫応答を制御している。この腸管における防御機構の主要な担い手が、腸管関連リンパ組織である。腸管関連リンパ組織は、パイエル板、腸管上皮/腸管上皮間リンパ球 (IEL)、粘膜固有層 (LPL)

の3種類の基本的な免疫学的構造によって、構築されている(図1)。この腸管免疫系で中心をなす抗体が分泌型 IgA である。外来抗原と直接接する粘膜面では、この分泌型 IgA を多量に産生し、粘膜表面からの病原体や外来の抗原の侵入を防いでいる。パイエル板は、腸管の IgA 産生の誘導部位で、パイエル板において、膜型 IgM を発現している B 細胞に TGF- $\beta$  が作用して、膜型 IgA 発現 B 細胞にクラススイッチする。一方、LPL で IgA 産生前駆 B 細胞が形質細胞へ分化、成熟する。このため、LPL は IgA 産生の実効部位であると言われている。

腸管の IgA は、食物アレルギーの抑制に大きな役割を果たしていることが知られている。食物アレルギーは消化管で吸収された食物抗原に感作されて生じた抗体や感作されたリンパ球が再度消化管から吸収された食物抗原と反応して起こる。食物が経口摂取されると、食物抗原のほとんどは、消化酵素で抗原性のないアミノ酸やペプチドに分解される。しかし、実際には、一部の食物抗原は、抗原性を保った大分子のまま消化管から吸収されることが知られている。とくに、生体が初めて遭遇した抗原ではこの現象が顕著である。同じ抗原に繰り返し暴露されるに従い、この現象は減弱する。この機序として、消化管内の抗原に対する IgA 抗体による抗原の排除機構が考えられている。

例えば、出生直後の新生児では、IgG や分泌型 IgA などの免疫グロブリンが、母乳を介して伝達されている。母乳や初乳では、多量の免疫グロブリンが含まれ、そのうち

IgG は腸管上皮細胞の管腔側、微絨毛間の細胞膜上にある Fc レセプターと結合して細胞内に取り込まれ、血中に入る。一方、分泌型 IgA は、微絨毛表面に結合し、生体表面で抗原の侵入を防御する。このように、新生児期の生体防御は、母乳中の免疫グロブリンを介する受動免疫によって行われる。しかし、分泌型 IgA などの免疫グロブリンを欠く人工乳で哺育された乳児では、母乳で育てられた乳児より、腸管からの抗原物質の吸収が多く、アレルギーの疾患が高頻度に見られる。また、IgA 欠損症の小児や IgA の免疫系の発達が不十分な無菌動物や新生児では、血中に外来の抗原に対して高い抗体価が見られ、生体が抗原に対する感作を受けやすくなっていることが示唆されている(14)。一般に食物アレルギーは年齢とともに軽快していき、2~3 歳頃には耐性となる。食物アレルギーが乳幼児に多い原因は、腸管の免疫系が未熟であるためと考えられている。乳幼児の腸管粘膜は未熟で、腸管感染症にもかかりやすく、種々の因子により容易に損傷を受けやすい。さらに、乳幼児の場合は、腸管粘膜上に IgA が少量しか存在しない。このため、高分子の食物抗原が比較的容易に粘膜を通過して体内に侵入し、抗原に対する感作が成立しやすくなり、経口免疫寛容が破綻すると考えられている。

#### 4. 腸管上皮間リンパ球の生理作用とその制御機構

腸管には、腸管上皮にもリンパ球が存在し、これを腸管上皮間リンパ球 (IEL) とい

う。IEL の 90%以上が T 細胞で、この IEL と末梢の T 細胞を比較すると、それぞれ異なった細胞表面上の分子を発現し、性質も大きく異なっている。T 細胞レセプター (TCR) は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖から成るヘテロ二量体 (TCR $\alpha\beta$ ) と  $\gamma$  鎖と  $\delta$  鎖から成るヘテロ二量体 (TCR $\gamma\delta$ ) が存在する。末梢の T 細胞のほとんどが TCR $\alpha\beta$  陽性 T 細胞であるが、IEL には、TCR $\alpha\beta$  陽性 T 細胞だけでなく、TCR $\gamma\delta$  陽性 T 細胞も多く存在する。また、IEL の TCR $\alpha\beta$  陽性 T 細胞は、末梢のそれと機能や性質が異なっている。CD8 分子は胸腺や末梢のリンパ組織では、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の 2 つのサブユニットから構成されたヘテロ二量体 (CD8 $\alpha\beta$ ) である。しかし、IEL では 2 つの  $\alpha$  鎖で構成される CD8 分子 (CD8 $\alpha\alpha$ ) を持つ T 細胞 (CD8 $\alpha\alpha$  陽性 T 細胞) が存在する。一般に、TCR $\alpha\beta$  を発現している IEL は、CD4 陽性 CD8 陰性 (CD4+CD8-)、CD4-CD8 $\alpha\beta$ +、CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +、CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + および CD4-CD8- の 5 種類の細胞群に分けられる。また、TCR $\gamma\delta$  を発現している IEL は CD4-CD8 $\alpha\alpha$ + と CD4-CD8- の 2 種類の細胞群に分けられる (表 1)。

TCR $\gamma\delta$  陽性 T 細胞は、アレルギー反応に影響を与えていることが示唆されている。McMenamin らは、OVA 特異的 IgE 産生が OVA の吸入によって抑制される機序を検討し、TCR $\gamma\delta$  陽性 T 細胞が抗原特異的サブレッサー細胞であることを示した。彼らは、OVA を気道内に導入したマウス由来の脾臓細胞のうち、TCR $\gamma\delta$  陽性 T 細胞を他のマウスに移入すると OVA 特異的 IgE 産生が

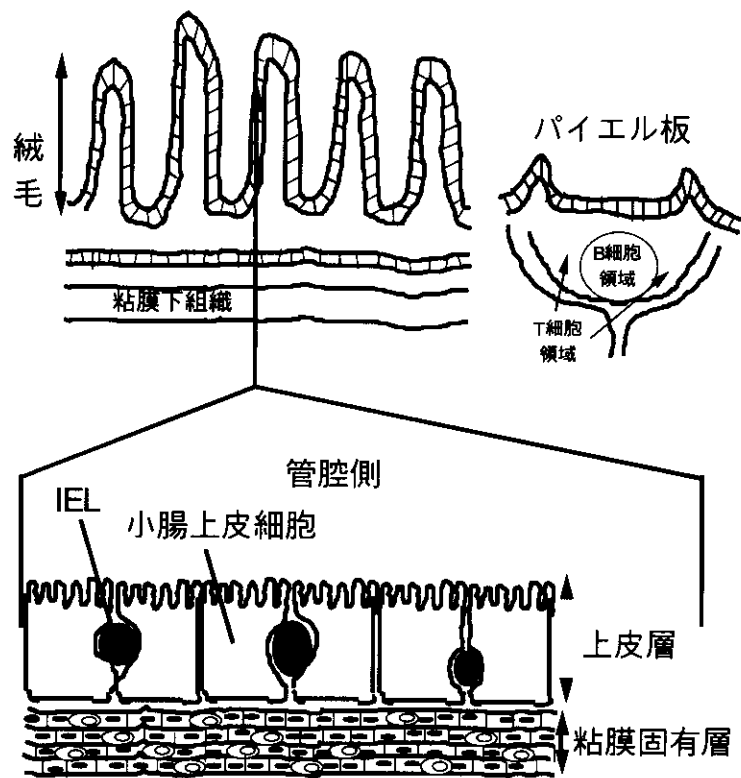


図1 腸管付属リンパ組織

表1 IELのサブセット

	IELのサブセット
TCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞	CD4 <sup>+</sup> CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>
	CD4 <sup>-</sup> CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>
	CD4 <sup>-</sup> CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>
TCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞	CD4 <sup>-</sup> CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>

抑制されたことを報告している。さらに、TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性T細胞が Th1 と Th2 細胞の分化に関与するという報告もある。*Listeria monocytogenes* の感染はヘルパー T 細胞のバランスを Th1 型に、*Nippostrongylus brasiliensis* の感染はヘルパー T 細胞のバランスを Th2 型に誘導する。Ferrick らは、*Listeria monocytogenes* をマウスに感染させると、TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞は、感染初期の段階で IFN- $\gamma$  を産生し、その後、CD4 陽性 T 細胞による IFN- $\gamma$  の産生の上昇を観察した。一方、マウスに *Nippostrongylus brasiliensis* を感染させると、感染初期に TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞の IL-4 の産生が見られたことから、彼等は、TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞により産生されるサイトカインが CD4 陽性 T 細胞の Th1 あるいは Th2 への分化に重要な影響を与えている可能性を示唆した。

また、IEL 中の TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞が腸管の IgA に影響を与えていることも示唆されている。Fujihashi らは、TCR $\delta$  鎖欠損マウスにおいては、野生型マウスに比較して腸管粘膜固有層の IgA 産生細胞数が減少し、糞便中の IgA 量が低下することを見出した。このときの脾臓の IgG や IgM 産生細胞数と血清中の IgG や IgM 濃度は野生型マウスとほとんど変わらなかった。さらに、Choleratoxin (コレラ菌の毒素でアジュバント活性を示す) とともに Tetanus Toxoid (破傷風菌の毒素でアジュバント活性を示す) を投与すると、TCR $\delta$  鎖欠損マウスで抗 Tetanus Toxoid 特異的 IgA の応答が有意に低下し、TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞は腸管での IgA 産生を促進することも示唆した。

この IEL と腸管上皮細胞はお互いの分化や活性を相互に制御し合う。皮膚や腸管由来の TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞は、上皮細胞の増殖因子 (Keratinocyte Growth Factor ; KGF) を産生し、上皮細胞の発達分化を促進するという報告がある。また、TCR $\gamma$   $\delta$  欠損マウス (T 細胞の  $\delta$  鎖の遺伝子が欠損したマウス) では、上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現が低下していることも示唆されている。一方、腸管上皮細胞は IL-7 を発現し、この IL-7 は IEL の制御に重要な役割を果たす。IL-7 レセプターまたは IL-7 ノックアウトマウスでは、IEL 中に TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞がほとんど存在しない。また、IL-7 のトランスジェニックマウスは、リンパ組織中の TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞の割合が高くなっている。このように、細胞や分子を通じた IEL や腸管上皮細胞の相互作用が、IEL (特に TCR $\gamma$   $\delta$ 陽性 T 細胞) や腸管上皮細胞の分化に重要であると考えられている。

#### ヌクレオチドが免疫系に与える影響

ヌクレオチドや核酸 (ヌクレオチドが重合したもの) は、全ての生物に普遍的に存在し、細胞の遺伝情報の伝達など生命維持活動に必須の役割を果たしている。ヌクレオチドは生体内で合成されるため、一般的にヒトにとっては、必須な栄養素でない。しかし、急速に成長する新生児や感染症の人のように生体がストレス下にある場合には、ヌクレオチドは、生体内の合成だけでは生体の必要量に満たない。このため、ヌクレオチドや核酸は、新生児にとって重要

な栄養素となる。実際、母乳は、人工乳と比べて、ヌクレオチドや核酸を多く含み、乳児の必要量を満たしている。このヌクレオチドや核酸の生理作用には、1) 免疫賦活作用、2) 細菌に対する感染防御効果、3) 小腸上皮の分化の促進や小腸の粘膜の萎縮に対する防御、4) 脂質代謝の改善、5) 肝再生の促進などがある。

これらの生理作用の中で、ヌクレオチドが免疫賦活作用に与える影響については、多くの研究が報告されている。ヌクレオチドの経口摂取は、遅延型過敏症の促進、IL-2 産生の促進、ナチュラルキラー (NK) 細胞の活性促進、脾臓細胞の増殖や抗体産生の促進が知られている。また、ヌクレオチドや核酸は、B 細胞よりも T 細胞に対してその活性を高めることが示唆されている。Kulkarni や Jyonouchi らは、T 細胞依存性抗原で刺激したマウスの脾臓細胞の抗体産生細胞数は、培養系に FNA を添加することにより、有意に上昇することを報告している。T 細胞が存在しないとこの上昇は全く見られなかった。さらに、T 細胞非依存性の抗原による抗体産生や B 細胞の活性の上昇は、FNA を培地に添加しても全く認められなかったことを示した。さらに、これまでの研究で、ヌクレオチドや核酸は、ヘルパー T 細胞に影響を与えることが考えられている。Van Buren らは、核酸無添加食、通常の食餌および核酸添加食を投与したマウスに、完全フロイントアジュバントで免疫すると、核酸無添加食のマウスは、通常の食餌あるいは核酸添加食を投与したマウスに比べて、脾臓細胞の Lyt1+表面マーカー

(ヘルパー T 細胞の表面マーカー) を持つ細胞が有意に減少していたが、CD8+ (サプレッサー T 細胞の表面マーカー) や免疫グロブリン (B 細胞の表面マーカー) を発現する細胞は変化しなかったことを観察している。

#### 本研究の目的

このヘルパー T 細胞の Th1 と Th2 のバランスはアレルギーの発症に関与する。しかし、経口摂取されたヌクレオチドや核酸がサイトカイン及び抗体の産生パターンに与える影響を調べた報告はこれまでほとんどなく、ヘルパー T 細胞の Th1 と Th2 のバランスに与える影響についても十分明らかにされていない。我々はこれまで、ヌクレオチドがヘルパー T 細胞のバランスに影響を与える可能性について検討を行い、ヌクレオチドの経口摂取は生体内の Th1 / Th2 バランスを Th1 優位にすることを示している。また、抗原特異的な IgE はアレルギーの発症に重要な役割を果たす。そこで、ヌクレオチドの投与によりアレルギーを抑制する可能性について、アジュバントを用いて抗原で免疫したマウスの抗原特異的な抗体 (特に抗原特異的な IgE) の産生に対してヌクレオチドが与える影響についても検討している。その結果、ヌクレオチドの経口投与により抗原特異的な IgE 産生応答が抑制されることが判明した。アジュバントは人為的に免疫応答を修飾するものである。しかし、食物アレルギーはアジュバント無しで食物アレルゲンを摂取した場合に誘発される。従って、このアジュバン



トを用いた刺激方法は、食物アレルギーの発症の機序を正確に反映していない可能性がある。そこで、この状態に近い実験系として、抗原の経口摂取によって抗原特異的な IgE を誘導する実験系がいくつか知られている。本研究では、これらの実験系を用いて、ヌクレオチドの経口投与が、抗原特異的な Th1 と Th2 のバランスに与える影響を検討し、その機構についても解析した（第一章）。

一方、腸管の IgA も食物アレルギーの抑制に重要な役割を果たすことから、ヌクレオチドが腸管の抗原特異的な IgA 産生に与える影響を検討した（第二章）。ところで、*in vitro* や *in vivo* の実験で、経口摂取されたヌクレオチドは、正常な腸管の機能を維持し、腸管上皮細胞の活性を高めることが明らかとなっている。このことから、経口摂取されたヌクレオチドが、腸管上皮細胞の活性の促進を通して、IEL に影響を与える可能性が考えられる。しかし、ヌクレオチドが IEL に与える影響については、ほとんど分かっていない。そこで、本研究では、ヌクレオチドが IEL のサブセットや腸管上皮細胞のサイトカイン産生に与える影響についても検討した（第二章）。

## 第一章：ヌクレオチドが経口摂取された抗原に対する Th1、Th2 型応答に与える影響とその機構

### 序

我々はこれまでに、ヌクレオチドの経口摂取により、生体内の Th1 と Th2 のバランスが Th1 優位になること、また Alum とともにマウスに抗原を投与した場合、ヌクレオチドの投与により抗原特異的な IgE 抗体が有意に低下することを明らかにしている。

アジュバントそれ自身が、T細胞反応を修飾する。しかし、食物アレルギーはアジュバント無しで食物アレルゲンを摂取した場合に誘発される。このため、アジュバントの使用は、食物アレルギー等の研究にとって望ましいものでない。そこで、最近、アジュバントを用いないで IgE を誘導する研究についての報告がある。Ito らは、DBA/2 マウスにカゼインを摂取させることで、アジュバントを用いて免疫しなくても、カゼイン特異的な IgE を誘導できることを示している。また、OVA 特異的な T 細胞レセプターのトランスジェニックマウス (OVA-TCR Tg マウス) に OVA を経口摂取させることにより、その血清中に OVA 特異的な IgE 抗体を発現することが報告されている。このとき、その脾臓細胞を in vitro で OVA 刺激下で培養すると、OVA 特異的にサイトカインを産生することも知られている。

そこで、本章では、DBA/2 マウスや

OVA-TCR Tg マウスを用いて、ヌクレオチドが、経口摂取された抗原によって誘導される血清中の抗原特異的な抗体価 (IgE、IgG1、IgG2a) に与える影響を検討した。また、ヌクレオチドが OVA-TCR Tg マウスの脾臓細胞の抗原特異的なサイトカイン産生能 (IFN- $\gamma$  と IL-4) に与える影響についても検討した。

生体内の Th1-Th2 バランスの調節については、これまでに様々な機構の関与が示唆されている。例えば、Kuchroo らは、Th1 により引き起こされる疾患である実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) において、抗 CD80 抗体の投与が EAE を改善させ、抗 CD86 抗体の投与が EAE を悪化させることを明らかにした。したがって、CD80 は T 細胞を Th1 の方向に、CD86 は Th2 の方向に傾けると考えられている。

また、IL-12 も Th1 と Th2 のバランスに重要な役割を果たす。IL-12 は、単球、マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞が産生するサイトカインである。その生理作用として、NK 細胞の活性の増強、T細胞や NK 細胞の増殖促進作用がある。また、IL-12 は、IFN- $\gamma$  の産生やヘルパー T細胞の Th1 への分化の誘導に重要なサイトカインであることも知られている。Gazzinelli らは *Toxoplasma gondii* をマウスに感染させると、脾臓や腹腔の細胞の IL-12 産生が上昇し、このマウスにさらに抗 IL-12 抗体を投与すると、脾臓細胞の IFN- $\gamma$  産生が低下し、IL-4 や IL-10 産生が上昇することを報告した。また、Nastala らは、ガンを移植したマウスに IL-12 を投与する

と、ガンの増殖を抑制し、血中の IFN- $\gamma$  濃度が上昇することを見出している。この IL-12 は、p35 と p40 の 2 つのサブユニットから構成されたヘテロダイマー (p70 型) で、p35 や p40 単独では活性を示さず、p70 型で活性を示す。

以上のような背景のもとで、本章では、ヌクレオチドが Th1 優位にする機構をさらに詳しく調べるため、経口摂取されたヌクレオチドが、抗原提示細胞上の CD80 や CD86 の発現に与える影響について検討した。また、ヌクレオチドの経口摂取が IL-12 産生に与える影響を検討した。

## B-1 研究方法

### マウス

BALB/c マウスは日本 SLC から、DBA/2 マウスはチャールスリバー (Tokyo, Japan) から購入した。OVA-TCR Tg マウスは東京大学農学部の動物室で飼育したものをを用いた。また、離乳直後 (3 週齢) の DBA/2 マウスには、表 2 に示した組成のヌクレオチドを 0.4% 添加した飼料 (Casein-NT(+)) 食; タンパク質源はカゼイン (New Zealand Milk Pro., Wellington, New Zealand)) またはヌクレオチド無添加の飼料 (Casein-NT(-)) 食を自由摂取させた (表 3)。DBA/2 マウスの採血は、5 週齢と 7 週齢で行った。また、離乳直後 (3 週齢) の OVA-TCR Tg マウスには、2% OVA 水溶液を自由摂取させるとともに、NT(+)) 食または NT(-)) 食を自由摂取させた。OVA-TCR Tg マウスの採血は、5、7 および 9 週

齢で行った。採血したサンプルは、遠心分離後、上清を回収し、-70°C で保存した。また、OVA-TCR Tg マウスの脾臓細胞の培養は 7 週齢で行い、上清のサイトカイン濃度や抗原提示細胞の CD80 と CD86 の発現について調べた。

### 特異抗体の測定

抗原特異的な抗体価の測定は、ELISA で検討した。0.1mg/ml の OVA またはカゼインを含む pH9.6 の 0.05M 炭酸緩衝液を 96 ウェルプレートに 1well 当たり 100  $\mu$ l ずつコーティングし、4°C で一晩静置した。0.1% の Tween 20 を含む PBS で 4 回洗浄し、1.5% のゼラチンを含む 0.05M 炭酸緩衝液をプレートに加え、室温で 30 分間静置した。洗浄後、0.1% Tween 20 と 3% PEG6000 を含む PBS で希釈した血清サンプルを 1well 当たり 100  $\mu$ l ずつプレートに加え、室温で 2 時間静置した。4 回洗浄後、パーオキシダーゼ標識またはアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG1 抗体 (Zymed) および抗マウス IgG2a 抗体 (Zymed) をプレートに加え、遮光して室温で 2 時間静置した。4 回洗浄後、1mg/ml の *o*-フェニレンジアミンと 0.06% の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むクエン酸-リン酸バッファー (pH5.0) または 1mg/ml の *p*-ニトロフェニルリン酸を含むジエタノールアミンバッファー (pH9.8) をプレートに加え、遮光して室温で 1 時間静置した。その後、2N の硫酸または 5N の水酸化ナトリウムを 1well 当たり 20  $\mu$ l ずつプレートに加え、

表2 NT(+)食のヌクレオチドの組成

ヌクレオチド	g/Kg
シチジン5'-1リン酸 (CMP)	1.62
グアノシン5'-1リン酸 (GMP)	0.57
イノシン5'-1リン酸 (IMP)	1.10
ウリジン5'-1リン酸 (UMP)	0.71

表3 実験食に用いた食餌 (NT(-)食およびNT(+)食) の組成 (%)

	NT (-) 食	NT (+) 食
Whey protein isolate	22.0	22.0
Sucrose	5.0	5.0
Starch	60.0	59.6
Cellulose	3.0	3.0
Soybean oil	5.0	5.0
Vitamins(1)	1.0	1.0
Minerals(2)	4.0	4.0
Nucleotides	-	0.4

(1) 以下の組成のビタミン類を用いた (食餌1 kg当たりmg) : vitamin A, 20 IU; 7-dehydrocholesterol, 2000 IU;  $\alpha$ -tocopheryl acetate, 50 mg; menadione, 5 mg; choline chloride, 2000 mg; p-aminobenzoic acid, 100 mg; inositol, 100 mg; niacin, 40 mg; calcium pantothenate, 40 mg; riboflavin, 8 mg; thiamine HCl, 5 mg; pyridoxine HCl, 5 mg; folic acid, 2 mg; D-biotin, 0.4 mg; cyanocobalamine, 0.03 mg.

(2) 以下の組成の無機物を用いた (食餌1 kg当たりmg) : NaCl, 5572; KI, 31.6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15560;  $\text{MgSO}_4$ , 2292;  $\text{CaCO}_3$ , 15256,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1080;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 160.4;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.053;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 19.1;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.92