第３分野　課題番号 KH31035

新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究

所属　国立医薬品食品衛生研究所・生薬部
研究者　合田幸広

分担研究者
(1) 国立医薬品食品衛生研究所　生薬部　合田幸広
(2) アサヒビール（株）酒類研究所　庄司俊彦
(3) カゴメ（株）総合研究所基礎研究部　猪熊隆博
(4) 三栄源 FFI（株）第一研究部　大本俊郎
(5) 東京大学大学院農学生命科学研究科　戸塚　護
(6) 東京大学大学院薬学系研究科　海老塚　豊

要旨
食品として、ひとの健康保持増進や疾病予防に積極的に役立つ食品化学的特性を持つ新機能素材を評価系を開発し、素材中の活性成分並びに活性機構の解析を行った。食品化学的特性としては、抗アレルギー性、抗高脂血性、抗炎症性等を対象とした。

１．研究目的

食品として、ひとの健康保持増進や疾病予防に積極的に役立つ食品化学的特性を持つ新機能素材を評価する。食品化学的特性としては、抗アレルギー性と、抗高脂血性、抗炎症性、抗日和見感染症作用等を対象とし、有用な活性をもつ素材について、活性成分並びに活性機構の解析を行う。種々の食品には、アレルギー反応を起こすアレルゲンや、高脂血症を起こす成分が含まれていることは良く知られた事実だが、これまでの研究から、逆にアレルギー作用を低減化したり、抗脂血作用を持つ食品があることも明かになっている。従って、食品及び食品素材について抗アレルギー活性並びに抗脂血活性を評価し、さらにその活性成分及び作用を解明、解析することで、これらの有用な活性を持つ新機能素材の開発につながるだけでなく、食品のもつダイナミックな体調節作用を科学的根拠に基づき説明することが可能になる。また、抗日和見感染症作用の評価系の開発にも着手する。

２．研究方法

2.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

６０種の野菜のエタノール抽出物について、既に確立したヒト由来ラノステロール合成酵素及び、[^{14}C]標識オキシドスクアレンを用いたインビトロアッセイ法によりスクリーニングをした結果、3 種の野菜（サトイモ、ショウガ、セリ）のエタノール抽出物が強い同酵素阻害活性を示した。そこでまず、サトイモ中に含まれるラノステロール合成酵素阻害活性を有する成分について同アッセイ法での酵素阻害活性を指標として、詳細な検討を行った。27 品種のサトイモのエタノール抽出物について阻害活性を検討し、その中で強い活性を有するものについて大量抽出を行い、得られた抽出物について各種クロマトグラフィーを用い分画、含有される活性成分を単離、その構造を決定した。

また、別に 45 種類の食品素材について、各 5g を 100 mL の 95 %エタノール、50 %エタノールおよび水により 80 ℃、2 時間で抽出を行なった。得られた 64 種のエキスを濃縮・乾燥した後、同インビトロアッセイ法によりスクリーニングを行なった。次に、活性の見られたセイヨウノコギリソウ（*Achillea millefolium*

L.）及び、ローレルパウダーについて、大量抽出を行った後、液液分配、各種クロマトグラフィーを組み合わせ、含有化合物の検討を行った。

2.2 抗日和見感染症作用の評価系の開発に関する研究

既にクローニング(R. Kelly, et. al., Gene, 87, 177-183 (1990))されているカンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子をガラクトースで誘導されるプロモーターを持つ酵母発現ベクター(pYES2)に組み込み、ラノステロール合成酵素欠損の酵母株 GIL77 を形質転換する。ガラクトースで誘導後、細胞を収穫し無細胞系酵素画分を調製する。［^{14}C］標識オキシドスクアレンとインキュベートし酵素活性を測定することにより、in vitro のカンジダ菌のラノステロール合成酵素に対する阻害活性評価系の構築を行った。

2.3 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

平成 12 年度までの研究でリンゴ未熟果実中プロアントシアニジンである縮合型タンニン画分（ACT）が、in vitro 及び in vivo でⅠ型アレルギーに対して抗アレルギー活性を有することを報告してきた。本年度は、まずウイスター系ラットを用いて ACT の吸収動態について検討を行った。ACT は、リンゴポリフェノールよりスチレン系吸着樹脂カラム、逆相系カラムを用いて分画した。次いで 8 週令ウイスター系ラットに経口投与し、経時的に全量採血し血漿中のプロシアニジン含量を比色定量した。

次に、ACT の中で最も in vivo 活性が強い 2 量体の主成分である procyanidin B2（PB2）をについて、マウスへの経口投与後の吸収率、及び血中動態を追跡した。雌性 BALB / c マウス 7 週齢に PB2 一定量（400μg / mouse）を単回経口投与後、一定時間（0 分、15 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間）経過後の血液を段階ごとに採取し、血清試料を得た。血清試料は、96-Well SPE Plate (3M Empore ユニバーサルプレート) を用いて、除タンパク・クリーンアップ処理を行ない、この抽出試料について、LC/ECD により PB2 の測定を行なった。分離カラムには Inertsil Ph-3 (3mm) 3.0×150mm を用いた。

さらに、ACT が腸管免疫系を介して全身免疫系へ作用する可能性を検討するために、ACT を経口摂取させたマウスから摘出した脾臓由来の培養脾細胞から産生される各種サイトカインを指標に腸管免疫系を介した全身免疫系に及ぼす影響について検討した。雌性 BALB/c マウス（7 週齢）に 1％濃度で水に溶解して調整した ACT を 1 次感作の 1 週間前から脾細胞採取の日まで自由に摂取させた。2 次感作後、脾臓を摘出して細胞懸濁液（5.0×10^6 cells/ml）を調製し、培養プレートに分注し、*in vitro* において卵白アルブミン（OVA）を最終濃度 100 ppm となるよう添加して再刺激した。対照群には生理食塩水を添加した。培養温度 37℃、CO_2 濃度 5％の条件で培養し、3 日、7 日後に培養液を回収し各種サイトカイン産生を ELISA 法により測定した。

2.4 体外免疫法を用いた抗アレルギー活性評価法の開発

雌性 BALB/c マウス(7 週齢)にチオグリコレート培地を腹腔投与した。4 日後、脱血致死させたマウス腹腔内に抗生物質含有 PBS を注入し腹腔細胞を遊離させて回収し、無血清培地に浮遊させた。予め調製しておいた血清吸着シャーレに細胞浮遊液を注ぎ 37℃, 5%CO_2 下 15 分放置した。シャーレ底面を培養液で洗浄してリンパ球を除去した後にマクロファージを採取した。採取したマクロファージを細胞培養液に浮遊させ培養プレートに分注し、更に抗原を添加(30 ng/mL)して 37℃, 5%CO_2 下 24 時間感作させた。感作後マクロファージ付着シャーレの上清を捨て、新たに調製したマウス(雌性 BALB/c, 10 週齢)脾細胞浮遊液に C57BL/6 マウス及び BALB/c マウス胸腺細胞培養(3 日間)上清を各 5%添加した浮遊液を分注し、抗原を 30 ng/mL となるように添加し 5%CO_2 下 37℃, 72 時間混合培養した。培養後、培地中に産生されたサイトカイン及び抗体を ELISA 法で定量した。

2.5 複合糖質コンドロイチン硫酸の抗アレルギー活性評価

雌性 BALB/c マウス 7 週齢に卵白アルブミン（OVA）を腹腔感作し、2 週間後に同量 2 次免疫した。2 次免疫後、脾臓を摘出して細胞懸濁液(1.0×10^7 cells/mL)を調製し、培養プレートに分注した。*in vitro* において OVA 再刺激した後、各種コンドロイチン硫酸を最終濃度 1 ppm 及び 0.1 ppm となるように添加した。比較化合物には同等の分子量を有するデキストランを用いた。コントロールには生理食塩水を添加した。培養温度 37℃、CO_2 濃度 5%の条件で培養し、3 日、7 日、14 日後に培養液を回収し各種サイトカイン産生

量及び OVA 特異的 IgE 抗体価を ELISA 法により定量した。更に，脾細胞上に存在する硫酸化多糖結合接着分子として知られる L-セレクチンの抗体を用いて阻害活性を検討し，コンドロイチン硫酸の免疫化学的活性の発現が L-セレクチンを介する応答か否かを調べた.

2.6 食品アレルギー動物モデルにおける腸管免疫応答の解析

卵アレルゲンである卵白アルブミン（OVA）に特異的な T 細胞抗原レセプター（TCR）の遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（OVA23-3 マウス）を用いた。このマウスは東海大学医学部垣生園子教授らによって作製されたものである。OVA23-3 マウスに、20%卵白タンパク質を含む飼料（卵白食）を自由摂取させることにより、血清中の OVA 特異 IgE 抗体価の上昇、小腸に食品アレルギー患者に認められるものと同様の組織学的変化が生じることを、これまでの研究で明らかにしている。この系は in vivo における食品アレルギー反応モデルとして有効であると考えている。本研究ではまず、OVA23-3 マウスに卵白食を摂取させる条件を再検討した。すなわち、6 週間自由摂取させた後、卵白タンパク質を含まない飼料（CE-2 食）を 4 週間摂取させ、再度卵白食を自由摂取させることを試みた。次に、このモデルにおける食品アレルギー反応を抗原のアミノ酸置換アナログを用いて抑制する方法を検討した。このマウスの TCR が認識する、OVA の 323-339 残基に相当するペプチド（OVA323-339；ISQAVHAAHAEINEAGR）の一アミノ酸残基置換アナログのうち、^{326}Ala 残基を Val 残基に置換したペプチド A326V は T 細胞応答を抗原特異的に抑制する活性（TCR アンタゴニスト活性）を示すことを既に明らかにしている。そこで、A326V を不完全フロイントアジュバント（IFA）とともにエマルジョンとしたものを、卵白食摂取開始の 7 日前および 1 日前に OVA23-3 マウスの腹腔に投与した。対照群として、PBS を同様に投与したもの、卵白食摂取のみで無処理のものを設定した。卵白食摂取開始後、体重変化と臨床症状の観察を行うとともに、毎週マウス尾静脈から採血し、血清中の OVA 特異 IgE 抗体価を酵素免疫測定法（ELISA）で測定した。

さらに、分子生物学的な手法を用いて、食品アレルゲンに対する腸管免疫応答における IEL の役割を明らかにするために、ディファレンシャルディスプレイ（Differential Display; DD）法を用いて IEL あるいは脾臓 T 細胞に特異的に発現する遺伝子の断片を取得した。DD 法とは、異なる細胞由来の RNA から合成した cDNA を鋳型として PCR を行い、その産物の電気泳動像において両者間で違いの見られるバンドを切り出し、解析することによって、細胞間において発現差のある遺伝子を同定する手法である。ここでは、OVA23-3 マウスと同様に OVA323-339 を認識する TCR 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（DO11.10 マウス）を用い、OVA 特異的 TCR を発現する、$CD4^+$IEL（$CD4^+CD8^-$IEL と $CD4^+CD8^+$IEL を含む）と脾臓 $CD4^+$ T 細胞をフローサイトメトリーによるセルソーターを用いて分離し、DD 法を行った。その結果得られた遺伝子断片（1129 種）および既知のリンパ球関連遺伝子 34 種、計 1163 種の遺伝子断片を用いて DNA マイクロアレイを作製した。

脾臓T細胞などの全身免疫系 T 細胞がαβT 細胞レセプター（TCRαβ）を発現し、CD4、CD8 分子の発現により 2 つのサブセット（$TCR\alpha\beta^+CD4^+$, $TCR\alpha\beta^+CD8^+$）に分類されるのに対し、IEL は TCRγδ陽性細胞が約半分を占め、CD4、CD8α鎖、CD8β鎖の発現とあわせて 5 つのサブセット（$TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$, $TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^+$, $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$, $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$, $TCR\gamma\delta^+CD8\alpha\alpha^+$）に分類される。これらの細胞群に、腸間膜リンパ節（MLN）T細胞の 2 つのサブセット（$TCR\alpha\beta^+CD4^+$, $TCR\alpha\beta^+CD8^+$）を合わせた 9 つの細胞群に対して、上記で作製した DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の比較解析を行った。MLN T 細胞は腸管免疫系を構成する T 細胞であるが、脾臓 T 細胞と同様に全身免疫系の T 細胞であるため、IEL との比較対照に加えた。上記の 9 つの細胞群をセルソーターを用いて分離・精製し、全 RNA を抽出した。さらに、全 RNA に含まれる mRNA をアンチセンス RNA として増幅した。これを cDNA に逆転写する際に異なる蛍光色素で標識し、DNA マイクロアレイ上で競合的にハイブリダイゼーションさせ、その蛍光強度の強弱により遺伝子の発現差を比較した。さらに、注目すべき遺伝子について、LightCycler を用いた定量的 PCR により、各細胞間での発現差を確認した。

3. 研究成果

3.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

強いヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性を示したサトイモについて同酵素阻害活性を指標として、詳細な検討を行った。その結果、27 品種のサトイモの中で愛知早生（愛知県産）、八つ頭（茨城県産）のエタノール抽出物が比較的強い酵素阻害活性を有していることが判明した。そこで「愛知早生」のエタノール抽出物に含まれる活性成分についての検討を行った。

エタノール抽出物を分画し、得られた各抽出物についての阻害活性を確認した。次いで、活性の見られた hexane ext. 1 (250 mg)、hexane ext. 2 (550 mg) をシリカゲルカラムにより TLC のスポットを指標として分画し、各画分について同様のアッセイを行ったところ、ext.2 の画分 D に比較的強い活性が、Gに強い活性がみられた。画分 D 及び G について HPLC を用い分析を行ったところ、それぞれ複数の成分の混合物であることが明らかとなった。そこでまず、混合物の状態で NMR 及び LC/MS を測定したところ、混合物は同一の骨格をもつ化合物群で構成されていることが判明し、その基本構造をそれぞれ monogalactosyl diacylglycerol（MGDG）及び、digalactosyl diacylglycerol（DGDG）と決定した 。さらに分取 HPLC により各分画を単離、NMR、HR-MS により各化合物が構造内に含む脂肪酸の種類を特定した。サトイモ画分 D から単離した MGDG は 300 μg/mL の濃度で 28-36%、画分Gから単離した DGDG は 41-67%のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性を示した。

MGDG、DGDG についてはそのグリセロール部の脂肪酸の組成が違うものが天然より数多く見つかっており、その脂肪酸の違いにより抗高脂血症作用の強さも異なることが予想される。そこで次に、サトイモより見つかった MGDG、DGDG とは脂肪酸の組成が異なる類縁体を数種合成してその構造活性相関を調べることにした。まず始めに DGDG よりその合成が容易であると考えられる MGDG より合成を行なった。MGDG の合成についてはこれまでに数多く報告がなされている。そのなかでグリセロール部の任意の位置に任意の脂肪酸を導入する方法を検討した結果、永津らの方法で合成を行うことにした。

まず、D-galactose を開始物質として水酸基をアセチル基として保護した後、β－グリコシル化反応によりベンジル保護したグリセロールを導入した。次にグリセロール部を isopropylidene とした後、ガラクトース部の保護基をアセチルより MPM 基へと変換した。次にグリセロール部の isopropylidene を除去したのち *sn*-1、*sn*-2 位へ同じ脂肪酸を導入した。続いて MPM 基の脱保護により同じ脂肪酸の MGDG を得た。また *sn*-1、*sn*-2 位が異なる脂肪酸の MGDG については isopropylidene の除去ののち *sn*-1 に TBDPS 基、*sn*-2 位へ THP 基と別々の保護基でそれぞれ保護することで *sn*-1、*sn*-2 位への相異なるアシル基の導入を達成した。最後にガラクトース部の水酸基の脱保護により目的の相異なるアシル基を持つ MGDG を合成した。以上によりグリセロール部の脂肪酸が多様な MGDG を 20 数種合成した。 得られた化合物についてヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性試験を行なった。その結果、傾向として *sn*-1 位に飽和脂肪酸、*sn*-2 位に不飽和脂肪酸を持つものが活性が強いことがわかった。特に今回合成した中では *sn*-1 位にミリスチン酸、*sn*-2 位にリノール酸の MGDG が最も高い活性を示した。また *sn*-1、*sn*-2 位がともに不飽和脂肪酸、もしくは飽和脂肪酸であるものについては活性が見られなかった。

次に、45 種の食品素材から得られた 64 種のエキスについて、ラノステロール合成酵素阻害活性を調べた。その結果 95%エタノール抽出分についてはセイヨウノコギリソウ（*Achillea millefolium* L.）の花部（42% inhibition）、ローレル（*Laurus nobilis* L.）粉末（55% inhibition）、ウンシュウミカン（*Citrus unshiu* MARC.）のパルプ部（50% inhibition）に同酵素阻害活性がみられた。その他キザミカンゾウ、コリアンダーゲンケイ、ニクジュヨウ、バイセンチコリ、リュウガンニク、レイシ、レモングラス、レモンバーム等は 10%以下の阻害活性であった。また 50%エタノール抽出分ではアセンヤク（阿仙薬、*Uncaria gambir* の葉および若枝）末（49% inhibition）、グリーンペッパー粉末（67% inhibition）、ローレル粉末（21% inhibition）に阻害活性があることがわかった。アニスシード、エゾウコギ、カキノハ、カラフトイラクサ、カルダモンコース、キザミカンゾウ、キダチアロエ、クコシ、クローブゲンケイ、クロコショウ、ゲンチアナマツ、ジャスミン、スターアニスパウダー、スパイスミックス、スペアミント、セージ、ターメリック、ナツメグコ

ース、バイセンチコリ、パセリチップ、ハナサンショウパウダー、フェンネルシード、ホワイトペッパー、マジョラム、マスタードシード、メースパウダー、モミノリパウダー、ラカンカ、レイシ、レモングラス、レモンバーム等は 10%以下の阻害活性であった。水抽出分については、キザミカンゾウ、コリアンダーゲンケイ、セイヨウノコギリソウ、ナツメ、バイセンチコリ、リュウガンニク、レイシ、レモングラス、レモンバーム、ローレル、抗菊花等、すべてその阻害活性が 10%以下であった。

次に、強い活性が見られたセイヨウノコギリソウ（*Achillea millefolium* L.）及びローレルパウダーについて、大量抽出を行ない、得られた抽出物について各種クロマトグラフィーを用い分画し、含有される成分を単離、その構造を決定することにした。

セイヨウノコギリソウの花部 1kg について、エタノール抽出を行った後、溶媒分画を行い、各画分につき、HPLC/PDA 分析を行った。その結果、主成分として、フラボノイド配糖体が含まれている可能性が高いことが判明した。そこで、リサイクルクロマトグラフィーを含む各種クロマトグラフィーを繰り返し、7 種の化合物を単離した。7 種の化合物について、MS 及び NMR を利用し、構造決定を行った結果、6 種の化合物をそれぞれ、5,7,4'-trihydroxyflavone 7-*O*-β-D-glucopyranoside (cosmosiin)、5,7,4'-trihydroxyflavone 4'-*O*-β-D-glucopyranoside、5,7,3'4'-teterahydroxyflavone (luteorin)、apigenin、5,7,3'-trihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone、5, 7, 3'-hydroxy-3, 6, 4'-methoxyflavone と決定した。残りの 1 化合物については、単離後極めて不安定ですぐに黒褐色の沈殿物へと変化したため、現在のところ、構造解析には至っていない。

ローレルパウダーは、800 g をメタノールで温浸して抽出後、分配操作により CH_2Cl_2、EtOAc、*n*-BuOH、H_2O 層に分画した。続いてその CH_2Cl_2 層についてさらに活性炭カラムで 10 個のフラクションに分画した。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに及び HPLC を用い分画を行い、3 種の化合物を単離した。こららの化合物について、NMR、MS 等の測定により構造を解析したところ、2 種の化合物は、3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone 3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone であることが明らかとなった。これら非配糖体のフラボノイドがローレルから単離されたのは初めての例である。また 3 番目の化合物はセスキテルペンの eremanthine (4(15),9,11(13)-guiatrien-12,6-olide) と決定した。これは吉川らによって同じローレルよりすでに単離されている。

3.2 抗日和見感染症作用の評価系の開発に関する研究

カンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子が組み込まれたプラスミドを入手した。このプラスミドを鋳型に PCR を行い、カンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子を増幅し、市販されている酵母の発現ベクター pYES2 に組み込んだ。構築したプラスミドでラノステロール合成酵素欠損の酵母株（GIL77）を形質転換した。形質転換酵母において栄養要求性の相補がおこり、形質転換酵母はエルゴステロールが欠如した培地で成育可能となった。この形質転換酵母を培養し各プロモーターを誘導後、細胞を収穫破砕し、無細胞抽出液を調製した。この無細胞抽出液と［^{14}C］標識オキシドスクアレンを用いてラノステロール合成酵素活性を調べたが、酵素活性は検出限界以下であった。

3.3 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

リンゴポリフェノールから得られた ACT 画分を投与後、経時的に採血測定した結果、投与後 2 時間を最大として ACT 含量が増加し、その後減少していた。また投与２４時間後でも、血液中に残存していることが確認された。さらに、血中への移行は、用量依存的に増加することが確認された。

LC/ECD を用いた PB2 の検量線は 100ng/mL~1μg/mL の範囲で（r=0.9998 以上）良好な直線性を示した。本検量線を使用して測定したマウス血清中の PB2 の検出限界は、30ng/mL であった。また、添加回収実験では 85％以上という良好な回収率が得られた。今回確立した方法を用いて実験を行ったところ、経口投与後の PB2 レベルは、30 分後に血中濃度が最大となり、その後は徐々に減少していくことが確認された。

ACT が腸管免疫系を介して全身免疫系へ作用する可能性を検討するため、ACT を経口摂取させたマウスについて 2 次感作後、脾臓を摘出し、細胞培養を行った。培養液中各種サイトカインを ELISA 法で定量し

たところ、ACT 投与群は対照群と比較して、培養 3 日までに産生された IFN-γは有意に促進され、培養 7 日までに産生された IL-5 及び IL-10 は有意に抑制された。

3.4 体外免疫法を用いた抗アレルギー活性評価法の開発

マウスアルブミン、オボアルブミン、β-ラクトグロブリンの異なる 3 種の抗原を用いて抗アレルギー活性評価を検討した。その結果、刺激した腹腔マクロファージ量に個体差があり、通常マウス 1 匹より 1～2 x 10^7 個のマクロファージが回収されるところ、その回収率が 50～60%と悪いことが判明した。また、クラススイッチ誘導のため、分化誘導因子として TGF-β及び IL-5 を添加したところ、72 時間の培養期間中に脾細胞数が著しく減少すること、培地中に産生される抗体量及びサイトカインの量が同一条件において均一でなく、その再現性が無いことなど、いくつかの問題点が明らかとなった。

3.5 複合糖質コンドロイチン硫酸の抗アレルギー活性評価

培養液中各種サイトカインを ELISA 法で定量したところ、コンドロイチン硫酸添加群はコントロール群と比較して、IFN-γ及び IL-2 は有意に増加し、IL-5 及び IL-10 は有意に減少することが明らかとなった。また、デキストランとの比較においても、コンドロイチン硫酸の方が強い活性を示す傾向が認められた。OVA 特異的 IgE はコンドロイチン硫酸を添加することにより、その産生が有意に抑制された。

次に、構造多様性を有するコンドロイチン硫酸を抗原感作マウス脾細胞と共培養し，そのサイトカイン産生能， 細胞表面抗原組成を指標としてコンドロイチン硫酸の全身性免疫機構に及ぼす影響について免疫化学的活性を検討した。化学的手法を用いて硫酸化度の異なるコンドロイチン硫酸を調製し，糖鎖構造と免疫化学的活性の相関を検討したところ，二糖ユニットあたり硫酸基を 2 個有するコンドロイチン硫酸が最も高い活性を示し，二糖ユニットあたり硫酸基を 4 個有するコンドロイチン硫酸や全く硫酸基をもたないコンドロイチン硫酸では，標準となるウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸よりも活性が低かった．そこで，二糖ユニットあたり 2 個の硫酸基を有する天然物由来コンドロイチン硫酸を用いて活性を検討したところ，サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸-D 及びイカ軟骨由来コンドロイチン硫酸-E に Th1 型サイトカイン産生の促進が認められた．L-セレクチンに対するモノクローナル抗体と共にコンドロイチン硫酸と脾細胞を培養したところ，コンドロイチン硫酸による Th1 型サイトカイン産生促進活性が認められなかった．

3.6 食品アレルギー動物モデルにおける腸管免疫応答の解析

卵白食摂取（摂取量は 1 匹あたり一日 OVA として約 200 mg）を 6 週間続けた後、4 週間 CE-2 食を摂取させ、再度卵白食を摂取させたところ、卵白食摂取の再開後 1~2 週間で、血中の OVA 特異的 IgE 産生応答が著しく増加した。そこで卵白食を再摂取させた時に誘導される特異 IgE 産生応答を、TCR アンタゴニスト活性をもつ A326V を投与することにより抑制できるかどうかを検討した。この実験系では、卵白食の摂取開始前および再摂取前の 2 つの時期に、A326V の投与を行なった群（A326V×2）と卵白食摂取開始前にのみ投与を行なった群（A326V×1）を TCR アンタゴニスト投与群として設けた。その対照群として、PBS×1 群および PBS×2 群、また卵白食摂取のみの群を設けた。

血清中 OVA 特異的 IgE 抗体の濃度を測定したところ、卵白食再摂取後に、卵白食摂取のみの群、PBS×1 および PBS×2 群では非常に強い IgE 抗体産生応答を示す個体が認められた。他方、A326V×2 群ではこのように非常に強い IgE 抗体産生応答を示す個体がなく、また A326V×1 群においてもこのような個体は認められなかった。これより A326V の投与により卵白食の再摂取により誘導される、強い OVA 特異的 IgE 抗体応答が抑制されることが明らかとなった。次に IgE 抗体と同様に Th2 型の応答で誘導される IgG1 抗体応答について検討したところ、卵白食再摂取前、再摂取後のいずれにおいても群間で OVA 特異的 IgG1 応答に差は認められなかった。従って A326V 投与による OVA 特異的抗体応答の抑制効果は IgE 抗体応答に限定されるものである可能性が示唆された。

各群のマウスの体重を測定したところ、全てのコントロール群において、卵白食の摂取開始 1 週間後に体

重の減少が認められた。これに対し A326V×1 群及び A326V×2 群のいずれにおいても、卵白食摂取を開始した後に体重の減少は観察されなかった。卵白食の再摂取 1 週間後には、PBS×1 群において体重の減少が認められた。PBS×2 群、飼料摂取のみの群では緩やかな体重増加が認められた。これに対し A326V×1 群及び A326V×2 群のいずれにおいても、体重は増加していた。特に A326V×2 群で顕著であった。上記の結果より、OVA23-3 マウスの T 細胞に対して TCR アンタゴニスト活性を示す A326V は、本研究で用いた in vivo における食品アレルギー反応モデルにおいて、アレルギー抑制効果を示すことが明らかとなった。

次に分子生物学的な手法を用いて、食品アレルゲンに対する腸管免疫応答における IEL の役割を明らかにするために、IEL あるいは脾臓 T 細胞に特異的に発現する遺伝子の解析を行った。まず、DD 法により $CD4^+$IEL と脾臓 $CD4^+$T 細胞の間で異なる発現を示す遺伝子に由来する遺伝子断片の取得を行った。その結果、IEL あるいは脾臓 T 細胞で強く発現する遺伝子の候補として、それぞれ 567 および 562 遺伝子断片を得た。各遺伝子断片については塩基配列を決定し、遺伝子データベースに対する相同性検索を行い、遺伝子の同定を行った。

IEL の各サブセットにおいて、ここで得た候補遺伝子がどのように発現しているかを解析することにより、各遺伝子が IEL 全般に強く発現しているのか、または特定のサブセットにのみ発現しているのか等が判別でき、各 IEL サブセットの性質をより深く理解できるものと考えられる。そこで、上記の遺伝子断片をもとに作製した DNA マイクロアレイを用いて、IEL の 5 つのサブセット、脾臓T細胞の 2 つのサブセット、MLN T細胞の 2 つのサブセットの 9 つの細胞群に対して遺伝子発現を比較解析した。その結果、脾臓 T 細胞、MLN T 細胞と比較して、IEL の 5 つのサブセットではいずれもグランザイム A、グランザイム B、Rgs1、Hsp70.3 など 10 種の既知遺伝子が高発現していることが明らかになった。これらの遺伝子が IEL で高発現する理由として腸管環境下における IEL の活性化が考えられたため、活性化した脾臓 T 細胞との比較を行った。その結果、グランザイム B と Rgs1 が活性化により発現が増加したが、IEL と比較すると発現は少なかった。従って、IEL においてこれらの遺伝子が高発現するのは、活性化状態であるためだけではないことが明らかになった。

さらに、IEL サブセット間で遺伝子発現を比較したところ、全体的な遺伝子発現の傾向としては、胸腺外分化するとされている $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$と $TCR\gamma\delta^+CD8\alpha\alpha^+$（グループ 1）、$TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8\alpha\alpha^+$と $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$（グループ 2）の各グループ内で類似性が認められた。よって、IEL はグループ 1、グループ 2、および $TCR\alpha\beta^+CD4^+$IEL の 3 つのグループに分けられると考えられた。グループ 1 ではグランザイムが特に高発現しており、最も強い細胞傷害活性を有すると示唆された。また、グループ 2、$TCR\alpha\beta^+CD4^+$IEL と比較して、胸腺内分化の際に発現する CD6 の発現が顕著に低く、胸腺外分化することが改めて示唆された。$TCR\alpha\beta^+CD4^+$IEL では他のグループと比べ CD7 の発現が低い反面、そのリガンドであるガレクチン-1 が強く発現していた。また、グランザイム A の発現は、他の 4 つの IEL サブセットでの発現と比べて著しく低いものであった。グループ 2 における遺伝子発現パターンは、グループ 1 と類似する面と $TCR\alpha\beta^+CD4^+$IEL と類似する面とを併せ持ったパターンを示した。また、今回の解析において、いずれか 1 つのサブセットでのみ特異的に発現することが明らかになった未知遺伝子、EST が 6 種認められた。

4．考察

4.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

これまでの研究から、サトイモ中の抗高脂血症作用をもつ MGDG は、グリセロール部の脂肪酸の種類によって酵素阻害活性が異なることがわかり、脂肪酸がその活性に影響を与えていることが明らかとなった。さらに、合成された標品を用い、各種サトイモの栽培品種についてそれぞれの糖脂質の定量を行ない、酵素阻害活性との相関を調べる予定である。また糖脂質のうち DGDG について単離されたものと異なるアシル基を持つ類縁体を合成し、その構造活性相関を明らかにする予定である。活性物質 MGDG、

DGDG のラノステロール合成酵素に対する作用メカニズムを解明するために NMR を用いて溶液中コンフォメーションについて検討する予定である。また、サトイモと同程度の阻害活性をもつローレル、セイヨウノコギリソウについては、引き続き成分探索を行い、得られた成分について活性試験を行い、活性本体の解明を図る。また新たに、入手した食品素材であるブラジル産植物エキスについてラノステロール合成酵素阻害活性試験を行ない抗高脂血症作用を持つものを探索する。また、強い抗高脂血症作用をもつ野菜であるショウガについても抗高脂血症作用成分の探索を行う予定である。

4.2 抗日和見感染症作用の評価系の開発に関する研究

ラノステロール合成酵素欠損の酵母株に対して、栄養要求性の相補が生じたことより、カンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子が発現していることは明白である。In vitro の酵素活性が検出限界以下あったのは、プロモーターの誘導法、無細胞抽出液の調製法等になんらか問題があったか、あるいは、カンジダ菌のラノステロール合成酵素の酵母での安定性に何らかの問題があるものと推定された。

4.3 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

リンゴポリフェノールの主要活性成分と考えられている ACT はラットに経口投与後血中に移行することが確認され、吸収後、抗アレルギー活性の発現に関与していると考えられた。また、マウスに経口投与した PB2 は LC/ECD での血清からの検出が可能であった。経口投与後の PB2 の未代謝体の血中濃度レベルは低く、投与 30 分後に最大値を示すことが判明した。また、血中に移行した PB2 量は、投与量の 3%程度であった。従って、経口投与後の PB2 は、大部分が吸収されないか、または吸収後速やかに代謝される可能性が示唆された。これまでの研究から、ACT の抗アレルギー活性は、PB2 等の低分子と、高分子画分との相乗作用により、発現することが判明している。今回の実験結果から、epicatechin の dimer である PB2 の血中移行率は、かなり低いことが明らかとなった。In vivo における抗アレルギー活性発現において、相乗作用がどの過程で作用しているかは、明らかになっていない。PB2 の単独投与の場合、PB2 の血中移行率がかなり低いことを考慮すれば、ACT として投与された場合では、消化管内での相乗作用により、PB2 の単独投与の場合より吸収の効率が促進されている可能性も考えられる。また、分子量を考慮すれば、Epicatechin 等のモノマーの移行率は PB2 より高いものと考えられる。従って、monomer 類の活性への関与も考慮する必要がある。

$CD4^+$ヘルパー T 細胞（Th）には、サイトカイン産生パターンにより Th1 と Th2 の 2 種類のタイプが存在し、それぞれが感染症とアレルギーに関与していると考えられている。Th1、Th2 細胞は互いに抑制しあい、これらの細胞によって形成される Th1/Th2 バランスは免疫制御の中枢として位置づけられている。免疫感作マウスに ACT を投与し、ACT が腸管免疫系を介して全身免疫系へ作用する可能性を検討した実験の結果、ACT が Th1 型サイトカインである IFN-γ産生の促進により Th2 型サイトカインである IL-5 及び IL-10 産生が抑制され、Th1/Th2 バランスを Th1 に誘導することが示唆された。培養 7 日目に IL-5 及び IL-10 産生の有意な抑制が示されたのは、培養 3 日目に増加した IFN-γが T 細胞間の情報伝達として機能する際の時間的なずれが生じたためであると考えられる。

4.4 体外免疫法を用いた抗アレルギー活性評価法の開発

体外免疫法は、(1)免疫感作の間、抗原濃度を保持できる。(2)免疫寛容のために従来の免疫感作法で産生されない自己抗原に対する抗体が生産可能。(3)微量抗原(30 ng/mL)で実施可能。(4)生体内毒性抗原を免疫感作できる。(5)従来の免疫感作法と比較し操作時間が短い。(6)従来の免疫感作法と比較して IgA の収量が多い。(7)低分子ペプチド抗原を免疫感作できる。(8)免疫感作の実験動物数を節約できるなど、数多くの利点が挙げられ利用価値の高い手法である。本年度は同法を確立するには至らず、いくつかの問題点が挙げられたが、それらの問題点の改善を詳細に検討する必要がある。今後、抗アレルギー活性評価に適した体外免疫法の確立をめざし、同手法を用いた活性評価法の開発につなげることが急務であると考えられた。

4.5 コンドロイチン硫酸の OVA 感作マウス脾細胞に及ぼす影響

本研究の結果、免疫感作マウス脾細胞にコンドロイチン硫酸を添加することによって Th1 細胞産生サイトカイン(IFN-γ及び IL-2)が有意に増加し、Th2 細胞産生サイトカイン(IL-5、IL-10)が有意に減少し、

Th1/Th2 バランスを Th1 に誘導することが示唆された。また、OVA 特異的 IgE 産生がコンドロイチン硫酸添加によって有意に抑制された結果からも、Th1 型サイトカインの IFN-γや IL-2 が Th2 細胞に対して抑制的に作用することが示唆された。中性多糖であるデキストランとの比較において、コンドロイチン硫酸の方が高い活性を示す傾向が認められた結果から、Th1 への誘導は多糖類全般の非特異的な効果ではなく、酸性多糖類に特異的な活性であると考えられた。また、コンドロイチン硫酸添加によって IgE 産生を抑制した結果から、同化合物が抗アレルギー活性を有する可能性が示唆された。

さらにコンドロイチン硫酸の全身性免疫機構に及ぼす影響について免疫化学的活性を検討したところ、コンドロイチン硫酸の免疫化学的活性の発現には，その糖鎖の微細な構造の変化が重要なファクターとなり，Th1 誘導に特異的な糖鎖配列が存在するものと考えられた．また、コンドロイチン硫酸の免疫化学的活性発現が培養脾細胞上に発現する L-セレクチンとコンドロイチン硫酸の接着を介した応答であるか検討したところ，L-セレクチンに対する抗体を共培養させることにより Th1 型サイトカイン産生の促進効果が阻害された．従って，コンドロイチン硫酸の免疫化学的活性発現の一部は，脾細胞上に発現する L-セレクチンとコンドロイチン硫酸の結合を介した応答であることが示唆された．

4.6 食品アレルギー動物モデルにおける腸管免疫応答の解析

OVA23-3 マウスに卵白食を長期間投与させた後、4 週間の中断期間をはさんで再び卵白食を摂取させることにより、OVA 特異的 IgE 抗体の産生が著しく高まることが明らかとなった。これはアレルゲンに既に感作されているアレルギー患者が再び同じアレルゲンに暴露された時の応答に対応する実験系であると考えられる。また、卵白食再摂取後の IgE 抗体応答に対して、最初の卵白食摂取開始前にだけ TCR アンタゴニスト（A326V）を腹腔内に投与することでも、抑制効果があることが明らかとなった。今回の実験では、卵白食の再摂取前にのみ TCR アンタゴニストを投与した場合は検討していないが、もしこの場合にも抑制効果が認められれば、既に食品アレルギーに感作されている患者の発症予防法として有効な方法になる可能性がある。TCR アンタゴニストを経口的に与えた場合にも抑制効果を示すかどうかについて検討することは、抗アレルギー食品の開発という面からも重要であろう。

$CD4^+$IEL と脾臓 $CD4^+$T 細胞由来に発現する mRNA の違いを解析した結果、IEL と脾臓および MLN T 細胞との間で明らかな遺伝子発現パターンの差があることが示された。IEL の 5 つのサブセットのいずれにおいても、脾臓および MLN T 細胞と比較して強い発現を示す遺伝子の存在が明らかにされたことより、これらの詳細な解析により全身免疫系 T 細胞との比較における IEL の特性を分子レベルで定義できる可能性が示された。IEL はグランザイムを高発現することから細胞傷害活性を持つ一方、ロイコトリエンなどの化学誘引物質からのシグナルを阻害する Rgs1 が常に高発現していることから、刺激への応答が抑制されている可能性が示唆された。

さらに IEL の中でも、各サブセット間で遺伝子発現パターンに違いがあり、同じ IEL の中でもサブセットによって性質や機能が異なるということが遺伝子発現の面から明らかになった。また、その発現パターンの類似性から、IEL は 3 つのグループに分けられることが示され、各グループ内の IEL サブセットは類似した機能をもつ可能性が示唆された。グループ 2（$TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8\alpha\alpha^+$ と $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$）は、グループ 1（$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$ と $TCR\gamma\delta^+CD8\alpha\alpha^+$）と $TCR\alpha\beta^+CD4^+$IEL の中間的な遺伝子発現パターンを示したことから、機能の面で両者の機能を併せ持つことも考えられた。これまでグランザイムの IEL サブセット間での発現の差異に関する報告はなかったが、$TCR\alpha\beta^+CD4^+$IEL 以外のサブセットはグランザイムを強く発現している一方で、$TCR\alpha\beta^+CD4^+$IEL での発現は著しく弱いことが本研究で初めて明らかにされた。また、この IEL サブセットは他のグループと比べ CD7 の発現が低いこと、そのリガンドであるガレクチン-1 が強く発現していることから、これを通じて他の 2 つのグループの活性を制御し、IEL 全体としての恒常性を保っている可能性が示唆された。今後､本研究で特徴的な発現が認められた遺伝子に着目して解析を行うことにより、IEL 各サブセットの生理機能、食品アレルゲンに対する腸管免疫応答における IEL の役割を明らかにすることができると考えられる。

5．まとめ

抗高脂血症作用を有する新機能素材としてサトイモを取り上げ、同野菜より抗高脂血作用を有する成分の単離・同定を行い、活性主成分は MGDG 及び、DGDG であることを明らかにした。さらに、グリセロール部の任意の位置に任意の脂肪酸を導入する合成方法を検討し、脂肪酸部の異なる MDGG について 20 数種合成し阻害活性を測定した結果、グリセロール部の脂肪酸の種類によって活性が異なることがわかり、脂肪酸がその活性に影響を与えていることが明らかとなった。また、45 種類の食品素材について、ヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性を検討した結果、セイヨウノコギリソウの花部、ローレル（*Laurus nobilis* L.）粉末、ウンシュウミカン（*Citrus unshiu* MARC.）のパルプ部等に活性が見られることを明らかにし、セイヨウノコギリソウ及びローレルからはフラボノイド及びセスキテルペンを単離構造決定した、2）抗日和見感染症作用の評価系を構築するために、カンジダ菌のラノステロール合成酵素を標的として選択した。In vitro の酵素活性測定をするために、既にクローニングされているカンジダ菌のラノステロール合成酵素をラノステロール合成酵素欠損の酵母株で発現させた。栄養要求性の相補は確認できたが、in vitro の酵素活性を検出できなかった。3）動物に経口投与されたリンゴポリフェノール類の血中移行について検討した。その結果、血液中に PB2 が確認され、リンゴポリフェノールが吸収され、抗アレルギー活性を示している可能性が示唆された。さらに、ACT が腸管免疫系を介して全身免疫系へ作用する可能性を検討したところ、ACT の経口摂取により全身免疫系に及ぼす影響が示され、その影響が Th1/Th2 バランスを Th1 に誘導することが示唆された。4）体外免疫法を用い抗アレルギー活性評価への応用を試みたところ、数種の問題点が挙げられ同法を確立するに至らなかった。5）コンドロイチン硫酸は、Th1/Th2 バランスを Th1 に誘導することで全身性免疫系に影響を与えることが初めて示された。また合成されたコンドロイチン硫酸を用いて検討した結果、二糖ユニットあたり 2 つの硫酸基を有する構造が最も高い Th1 誘導活性を示した。さらに天然物では、イカ軟骨由来より単離される GalNAc の C4 位及び C6 位に硫酸基が結合したコンドロイチン硫酸-E が最も高い活性を示すことが明らかになった．6）アレルゲンに既に感作されているアレルギー患者が再び同じアレルゲンに暴露された時の応答に対応すると考えられる実験系を構築することができた。また、卵白食開始前にだけ TCR アンタゴニストを投与することによって、この系における食品アレルギー応答を抑制することができた。さらに遺伝子発現の比較解析により、IEL は全身免疫系 T 細胞と大きく異なるのみならず、IEL のサブセット間においてもその機能に差があることが示唆された。

研究発表

論文発表

1. H. Akiyama, R. Teshima, J.-i. Sakushima, H. Okunuki, Y. Goda, J.-i. Sawada, M. Toyoda, "Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice," *Immunology Letters*, 78, 1-5 (2001).
2. S. Takagi, K. Nakagomi, Y. Sadakane, T. Tanimura, H. Akiyama, S. Oka, Y. Fukumori, K. Terasawa, Y. Hatanaka, "Anti-allergic activity of glycopeptide isolated from *Perilla frutescens* Britton, " *J. Trad. Med.* 18, 239-244 (2001).
3. Y. Ueda, S. Hachimura, T. Somaya, T. Hisatsune, S. Kaminogawa, "Apoptosis of antigen-specific T cells induced by oral administration of antigen: comparison of intestinal and non-intestinal immune organs." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1170-1174 (2001).
4. K. Asai, S. Hachimura, T. Toraya, S. Kaminogawa, "Orally tolerant CD4 T cells respond poorly to antigenic stimulation but strongly to direct stimulation of intracellular signaling pathways. " *Cytotechnology* 36, 145-153 (2001).
5. S. Takage , K. Nakagomi , Y. Sadakane, T.Tanimura , H., Akiyama , S. Oka , Y. Fukumori , K. Terasawa and Y. Hatanaka: Anti-allergic activity of Glycopeptide isolated from *Perilla frutescens* BRITTON」

J.Trad.Med.18.239-244, (2001)

6. Y. Kato, H. Sato, H. Aoki, Y. Goda, "Chemical strucutre of an anthocyanain pigment isolated from "Myoga" (Zingiber mioga Rosc.)," *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, 197, 28-33 (2002).
7. T. Shoji, Y. Goda, A. Yanagida, T. Kanda, "Characterization and structures of novel anthocyanin pigments in rose cider during vinification process," *Phytochemistry*, 59, 183-189 (2002).
8. W. Ise, M. Totsuka, Y. Sogawa, A. Ametani, S. Hachimura, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu, S. Kaminogawa, " Naive $CD4^+$ T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell-surface molecules on their primary response to varying doses of antigen. " *J. Immunol.*, 168, 3242-3250 (2002).
9. T. Yoshida, S. Hachimura, M. Ishimori, F. Kinugasa, W. Ise, M. Totsuka, A. Ametani, S. Kaminogawa, "Antigen presentation by Peryer's patch cells can induce both Th1 and Th2 type responses depending on antigen dosage, but a different cytokine response pattern from that of spleen cells. " *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 963-969 (2002).
10. T. Ohtsuki, H. Matsufuji, M. Toyoda, Y. Goda, "Acylated anthocyanins from red radish (Raphanus sativus L.)," *Phytochemistry*, 60, 79-87 (2002).
11. A. Yanagida, T. Shoji, T. Kanda. "Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1972-1975 (2002). Suganuma, H., Kaburagi, S., Inakuma, T., Ishiguro, Y.: Amelioratory effect of dietary ingestion of lycopene and tomato rich in lycopene on learning impairment in senescence-accelerated mice (SAMP8). Food Sci. Technol. Res., 8, 183-187, (2002)
12. Suganuma, H., Oshima, S., Inakuma, T.: Hypocholesterolemic effect of oral administration of β-carotene and carrot juice in exogenous hypocholesterolemic mice. Jap. J. Food Chem., 9, 15-21, (2002)
13. Suganuma, H., Hirano, T., Arimoto, Y., Inakuma, T.: Effect of tomato intake on striatal monoamine level in a mouse model of experimental Parkinson's disease. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 48, 251-254, (2002)
14. S. Sakai, H. Akiyama, N. Harikai, H. Toyoda, T. Toida, T. Maitani, T. Imanari, Effect of chondroitin sulfate on murine splenocytes sensitized with ovalbumin. *Immunol. Lett.*, **84**, 211-216 (2002).
15. Nagafuchi, S., Totsuka, M., Hachimura, S., Goto, M., Takahashi, T., Yajima, T., Kuwata, T., Kaminogawa, S.: Dietary nucleotides increase the mucosal IgA response and the secretion of transforming growth factor _ from intestinal epithelial cells in mice. *Cytotechnology, in press.*
16. Murakami, R., Yamada, K., Nagafuchi, S., Hachimura, S., Takahashi, T., Kaminogawa S., Totsuka M.: Nucleotides enhance the secretion of interleukin 7 from primary-cultured murine intestinal epithelial cells.*Cytotechnology, in press.*
17. Kano, H., Ametani, A., Totsuka, M., Kaminogawa, S.: Murine T cell lines can change CD25 expression patterns as well as proliferation and cell death patterns in response to interleukin 2. *Cytotechnology, in press.*
18. Yoshida, T., Hachimura, S., Ishimori1, M., Ise, S., Totsuka, M., Ametani, A., Kaminogawa, S.: Interleukin 12 and CD86 regulate T helper type 1 and type 2 development induced by various doses of antigen in the antigen presentation by Peyer's patch and spleen cells. *Cytotechnology, in press.*
19. Goto, M., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., Totsuka, M., Ishikawa, H., Kaminogawa, S.: Antigen feeding enhances frequency and antigen-specific proliferation ability of intraepithelial $CD4^+$ T cells in T cell receptor transgenic mice. *Submitted..*
20. Hibi, M., Hachimura, S., Ise, W., Sato, A., Yoshida, T., Takayama, T., Sasaki, K., Senga, T., Hashizume, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S.: Dendritic cells from spleen, mesenteric lymph node and Peyer's patch can induce both production of IL-4 and IFN-γ of naive $CD4^+$ T cells in their primary culture, depending on antigen doses. *Submitted..*
21. T. Shoji, M. Mustuga, T. Nakamura, T. Kanda, H. Akiyama, Y. Goda, "Isolation and structural elucidation of

some procyanidins from apple by NMR at low temperature." *J. Agric. Food Chem.* submitted.

22. 大嶋俊二、菅沼大行、稲熊隆博: ニンジンジュースの摂取がヒト血清コレステロール濃度に及ぼす影響, 日本食品化学学会誌 submitted.

総説

1) 戸塚護：抗原アナログによるアレルギー応答の制御．臨床免疫，36 (5), 771-776 (2001).

2) Goda, Y. "Dose Herb accept as food for specified health uses (FOSHU)?" Food Sanitation Research **52**, 5 (2002).