

唐辛子粉中のスーダン I	119 件	発ガン性の可能性がある色素スーダン I がとうがらし粉に違法に使用されていたことが最初、フランスで発見。その後広範囲に広がった。
--------------	----------	--

② 英国の Food Hazard Warnings²⁵⁾

Food Hazard Warnings(FHWs)は地方機関や消費者に食品に関連した問題、場合によっては特別な対処の詳細を知らせる食品基準庁のシステムである。本情報は関係省庁にも警告される。

現在4つのカテゴリーに分けて発信される。

カテゴリーA	緊急対応(For immediate action)
カテゴリーB	要対応(For Action)
カテゴリーC	必要と判断されれば対応(For Action as Deemed Necessary)
カテゴリーD	情報のみ(For Information)

FHWs は多くの場合、製造者、小売業者、卸売業者によって製品が回収またはリコールされた場合に連動して発信される。登録するとE-mailにて新しい警告情報が自動的に発信される他、携帯電話に送信することが可能。

肝臓に対して毒性があるのでKava Kavaを含む食品の販売を禁止 (カテゴリーD)、魚油サプリメントに発癌性の可能性があるダイオキシンまたはPCBが混入していたため回収 (カテゴリーD)などの例がある。

③ 英国の医薬品庁の警告・注意喚起²⁶⁾

英国の医薬品庁(Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA)は医薬品管理局(Medical Control Agency)と医療器具開発局(Medical Devices Agency)が合併して2003年4月に設立。ハーブの安全性について”Herbal safety news”として詳細にまとめている。ハーブ治療の健康被害のリスクについて消費者、企業、開業医に知らせることを目的としている。もう一つの警告として”Current Problems in Pharmacovigilance”にニュースとして掲載している。このニュースはハーブに関する有害作用についてイエローカードスキームを用いて判定した結果を記載している。

④ 参考例1 米国の食品の安全性に関する合同組織

Food Safety Risk Analysis Clearinghouse²⁷⁾は、Food Safety and Applied Nutrition(JIFSAN)ならびにメリーランド大とFDAの共同研究による組織である。世界のあらゆる食品の安全性に関する情報を集めて公開している。Risk Analysis、Nutrition and Labeling、Hazards、Commodityなどに分かれている。Hazardsにdietary supplementが掲載されている。内容は一般消費者向けではなく、専門家向けである。

⑤ 参考例2 日本の警告・注意喚起

- ・ 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 健康食品安全情報ネット⁴⁾にて過去に健康食品が問題となった事例を紹介している。高麗人参エキス、クロレラ、ギムネマ、ローヤル

ゼリー、ガルシニア、グルコマンナンなどが取り上げられている。

- ・ 東京都健康局 食品医薬品安全部 安全対策課 安全情報係 健康食品注意報²⁸⁾にて健康食品に含まれる医薬品成分、健康食品についての警告・注意喚起をしている。中国産ダイエット食品、エフェドラ含有製品、センナ葉、葉軸含有製品、シブトラミン、カバ、ステロイド、クエン酸シナデルフィル、グリベンクラミド含有製品、中国製漢方薬、健康茶、D-ソルビトール高含有製品、アマメシバ粉末含有製品などの事例を紹介している。

4) 健康食品、サプリメントあるいは関連する食品の警告・注意喚起事例

国と発信機関	年月	内容	詳細
アイルランド(Food Safety Authority of Ireland)	2004年 2月	アイルランドで照射ハーブサプリメントが依然として販売されている	2003年に検査したハーブサプリメントの50%以上が照射されているか、もしくは照射成分を含有していた。いずれも表示がされておらずEU法違反である。
英国(FSA)	2003年 7月	コンニャクを含む発売禁止のゼリー2製品が英国で見つかる。(カテゴリーBのFood Hazard Warning)	世界で推定18人の子供がコンニャクを含むゼリーで窒息により死亡していることから、欧州では昨年より販売を禁止していた。台湾産のミニフルーツゼリー菓子が販売されていると報告を受け、警告した。英国では2002年4月から禁止になっていた。
EU(EFSA) 英国(FSA)	2003年 6月	2、4-ジニトロフェノール(DNP)を含む脂肪燃焼カプセルに対する警告 (Press Release)	このカプセルを3~4錠(DNP1000mg)を一度に飲むと死亡する可能性がある。より少量摂取を長期間続けると白内障などの重大な健康影響を及ぼす。
英国(FSA) Committee on Toxicity(COT)	2003年 5月	植物エストロゲンが健康に及ぼす影響についてレポート提出	ヒトに対して有害か有益であるか議論が分かれているとことであるが、甲状腺機能の低下している人に対して有害である可能性を指摘。
英国(FSA)	2003年 5月	ビタミンやミネラルには高濃度に摂取すると健康に害を与える可能性があるものと勧告	ピコリン酸クロムを含むさまざまなダイエット商品がインターネットを介して販売されている。ピコリン酸クロムの形のクロムはガンを引き起こす可能性があるので消費者はこの形でのクロムは摂取しないようにと勧告。その他の形でのクロムでは、総量10mg/日以下であれば害はないとしている。

英国(FSA)	2002年 7月	消費者はKava Kava製品を買わないように勧告(カテゴリーDのFood Hazard Warning)	ハーブの成分であるkava kavaを含む製品は肝臓毒性を有するかもしれない。業者に回収を要請。
英国(FSA)	2002年 3月	中国産ローヤルゼリーにクロラムフェニコール(カテゴリーBのFood Hazard Warning)	生産国は明らかではないが、組成からして中国産と推定。ローヤルゼリーは栄養補助食品として錠剤で販売される。ローヤルゼリーに抗生物質であるクロラムフェニコールが検出されるのは違法。栄養補助食品として販売されているローヤルゼリーは当該物質が含まれていることや中国産であることを確認することなく回収命令。
英国(FSA)	2002年 1月	2つのブランドのオリーブ油(olive-pomace oil)を回収(カテゴリーDのFood Hazard Warning)	Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)を高濃度含有するために、イタリア産の2つのブランドのオリーブ油の回収を要請。特に、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(a)アントラセンを高濃度含有する。
EU(EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Evaluation of Medicines for Human Use)	2000年 10月	アリストロキンを含んだ中国製ダイエット用ハーブの禁止	ヘルギー、英国、フランスでは、アリストロキンを含んだ中国製ダイエット用ハーブ製品摂取が原因とされる発ガン、腎障害が報告され禁止措置をとった。依然としてインターネット販売が確認されFDAも注意を呼びかけた。

5) 被害者への対応について

欧州における被害者への対応について記載された資料は多くない。基本的にはEUレベルもしくは国レベルで個人の被害救済活動は行わない。代表的な英国の状況についてまとめる²⁹⁾。

① 国レベルの対応

公正取引庁(OFT)は消費者からの苦情申出を受け付けているが、規制行政に活用するのみである。通商産業省(DTI)は、苦情を受け付けている自治体の機関を紹介するための消費者への情報提供あるいは消費者相談を処理している地方局(取引基準局、市民助言局)を紹介するための”The Consumer GATEWAY(<http://www.consumer.gov.uk>)”を開設している。本サイトは車、食品、金融などあらゆるカテゴリーを網羅しており、食品のカテゴリーに「食品の安全性」の項目がある。個々の苦情事例は紹介しておらず、内容に応じて各専門サイトにリンクしている。”A-Zof Food Safety”などで、消費者にわかりやすく解説している。

② 自治体の対応

取引基準局(TSD)と市民助言局(CAB)が消費者苦情を受け付けている。明確な区分はないが TSD は刑事訴追を含む行政権限を背景にした被害救済、CAB は非公式な救済活動になっている。CAB が 2001～2002 年で受け付けた相談件数はイングランド内で約 525 万件であり、その内の 20%が消費者問題である。ボランティアを前提とした相談処理体制を支援するための情報ネットワーク”The Electronic Information System(EIS)”が提供されている。あらゆる生活上の相談にあまり専門知識を有しない相談員が対応できるように検索機能のついた情報システムである。

【要約】

わが国では平成 3 年より特定保健用食品制度が発足し、世界に先駆けて国による食品に対する健康強調表示を認可した。平成 7 年には栄養成分表示基準制度、平成 13 年度には保健機能食品制度を発足させ、食品に対する栄養表示、栄養機能表示、健康強調表示が整備されたことになる。これらの表示制度は CODEX における勧告や勧告案作成の議論、世界各国における制度の状況、国内の健康食品をめぐる状況や規制緩和のながれなどを踏まえて整備されてきたものである。

しかし、CODEX では健康強調表示については各国の合意には達していない。また、米国や EU とヨーロッパ諸国でも健康強調表示に関してはきわめて流動的である。また、わが国においてもいわゆる健康食品のあり方についての検討も厚生労働省で継続している。そこで、本分担研究ではわが国の健康強調表示のあり方を考える上で重要と思われる健康強調表示の国際的な動向について調査するとともに、併せて健康食品などによる健康被害に対する対応についても調査した。

CODEX においては、第 31 回食品表示部会(カナダ、オタワ、2003 年 4 月 28 日～5 月 2 日)において健康強調表示のガイドライン案が承認され、ステップ 6 から 8 へ進んだ。特に疾病リスク低減表示が承認されたことは注目に値する。EU でも疾病リスク低減表示について議論され、食品の栄養強調表示、および健康強調表示に関する EU 指令(Regulation of the European Parliament and of the Council on nutrition and health claims on foods)が出されたことから、今後加盟国はこれに併せて制度整備が進められることになる。いずれも「疾病には多様なリスク要因があるので、それらのリスク要因の一つを改善することは、有益な効果をもたらすかもしれないし、もたらさないかもしれない。」という表現をリスク低減表示と併せて示し、消費者の誤解を招かないようにしなければならないとしている。

米国の限定的健康強調表示について、FDA のホームページを中心に制度制定の背景や表示の格付けシステム、認可済み疾病リスク低減効果の表示などの資料を収集し、それらの動向をまとめることを試みた。食物成分による疾病リスク低減表示の評価法は 1990 年に制定された NLEA によって規制されていたが、1997 年には評価の迅速化を目的に FDAMA が制定された。さらに、2000 年 10 月には規制緩和の一環として限定的健康強調表示が承認され、2003 年 10 月より暫定的に運用が開始された。認可済の条件付疾病リスク低減表示を見ると、FDA と申請者との科学的根拠の解釈に差異がある場合、その双方が記載される。このため消費者は、表示が許可された食品、または栄養補助食品を選択する際の判断が難しく、表示制度に再検討の余地があると推察された。今後も次々と申請の項目、および各項目内での申請件数が増加していく

ことが予想されるか、特定の食品に条件付で疾病リスク低減効果が表示されることは、消費者の誤解を招くことにつながる懸念された。EU 担当官による「Disclaimer を添付することは、強調表示自体の意味を無くすのではないか。」との見解もある。この制度の施行予定は 1 年後である。その間の様々な意見を基にした改善が期待されるので、今後の動向にも注目したい。FDA のホームページからリンクする Center for Food Safety and Applied Nutrition では、FDA の最優先課題である「消費者がより良い健康状態を得られるようにサポートする」ための広範囲にわたる健康情報が系統的に構築されている。その中の Food Labeling and Nutrition のサイトでは、消費者、および専門家や産業界向けの食品、栄養補助食品の健康強調表示に関する詳細な情報が得られた。このように FDA が健康強調表示に関する正確なデータの効率的な提供を強化していることは、正しい食品選択を介して、国民全体の健康状態の向上に大きな影響を与えるだけでなく、虚偽表示を行う企業を排除することにも役立つことか示唆された。以上、米国の新しい試みである限定的健康強調表示について、その動向を調査することにより、我が国の健康強調表示制度の充実に向けての有益な資料を得ることができた。

欧州の行政等による健康食品、サプリメント等の警告・注意喚起の現状について各種報告書、セミナー資料、ホームページ等から資料を収集し、関連する項目を抽出してまとめた。欧州における健康食品の警告・注意喚起は、一般食品またはサプリメントのカテゴリーから発信されていた。ハーブ製品については、欧州では医薬品も販売されているため、医薬品の安全情報にも警告・注意喚起があった。その中でも特徴的なシステムとして、EU の RASFF (the rapid alert system for food and feed)と英国の FHWs (Food Hazard Warnings)があげられる。前者は、危険度により警告通知と情報通知に分けて加盟国に発信される。後者は4つのカテゴリーに分け、より対応が分かりやすくなっている。フランス、ドイツ、オランダ、スウェーデンなども情報は共有化され、同様の告知を行っているが母国語のみの公開が多かった。個々の警告・注意喚起を見ると、医薬品の成分を含んだ健康食品、サプリメントの事例は少なく、微生物汚染、化学物質汚染が最も多かった。消費者の被害救済は自治体レベルで行われているが、詳細は不明であった。英国では電子情報システム(EIS)というデータベースを提供し、市民相談業務支援を行っているのが特徴的であった。

【参考文献・ホームページアドレス】

- 1) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lab-ssa.html>
- 2) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/labstruc.html>
- 3) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lab-qhc.html>
- 4) <http://humpty.nih.gov/food/>
- 5) <http://www.fda.gov/default.htm>
- 6) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/02/s0226-9e1.html>
- 7) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0625-10b.html>
- 8) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/02/s0226-9e2.html>
- 9) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/02/s0226-9a.html>
- 10) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/flg-6c.html>
- 11) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/labfdama.html>
- 12) <http://www.cfsan.fda.gov/list.html>

- 13) [http //www cfsan fda gov/label.html](http://www.cfsan.fda.gov/label.html)
- 14) [http //www cfsan fda gov/~dms/nuttf-b.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/nuttf-b.html)
- 15) [http //www cfsan fda gov/~dms/nuttf-e.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/nuttf-e.html)
- 16) Official Journal of the European Communities L183、2002
- 17) [http //www efsa eu int](http://www.efsa.eu.int)
- 18) [http //www food gov uk](http://www.food.gov.uk)
- 19) [http //afssa fr](http://afssa.fr)
- 20) [http //www bgvv de](http://www.bgvv.de)
- 21) [http //arch rivm nl/csr](http://arch.rivm.nl/csr)
- 22) [http //www slv se/engdefault.asp](http://www.slv.se/eng/default.asp)
- 23) Official Journal of the European Communities L31、2002
- 24) Annual Report on the Functioning of the RASFF 2003 (Final ver 16-02-2004)
- 25) [http //www food gov uk/enforcement/alerts](http://www.food.gov.uk/enforcement/alerts)
- 26) [http //medicines mhra gov uk](http://medicines.mhra.gov.uk)
- 27) [http //www foodriskclearinghouse umd edu](http://www.foodriskclearinghouse.umd.edu)
- 28) [http //www kenkou metro tokyo jp/anken/supply/index.html](http://www.kenkou.metro.tokyo.jp/anken/supply/index.html)
- 29) 米英韓三カ国の行政による消費者被害救済制度に関する調査研究 2003年3月(国民生活センター)

【謝辞】

本調査を行うに当たり、CODEXにおいて配布された資料、および米国の健康強調表示に関連した資料の提供をいただきました、フレスコジャパン代表 清水俊雄氏に深謝いたします。

糖質関連食品素材の消化管に及ぼす影響

分担研究者 山田和彦 国立健康・栄養研究所、食品表示・規格研究部
研究協力者 石田達也 国立健康・栄養研究所、食品表示・規格研究部

【研究目的】

健康に対する関心の高まりなどにより、生活習慣病を予防する特定保健用食品や難消化性食物成分を利用した加工食品が日々開発、利用されている。その中には、*Lactobacillus* 菌種や *Streptococcus* 菌種などの乳酸菌や、*Bifidobacterium* 菌種に属するプロバイオティクス機能を有する菌種を利用したものがあり、現在約 60 品目存在する (表 1)。また、糖やガラクトオリゴ糖、食物繊維である難消化性デキストリンやサイリウム種皮など、腸内環境の改善機能を有するものを用いた食品も数多く、これまでに約 100 品目を超えている (1)。一方、健康への安全性、有用性について科学的な資料が不足しているものもあり、情報伝達手段が発達した現在では誤った知識のまま情報が伝わってしまうことがある。そのため、新開発食品素材の文献的な調査および食品素材の安全性、有用性についての研究は重要である。

これまで低カロリー性食品素材、特に甘味料として多く利用されているオリゴ糖、糖アルコール、単糖類の開発状況や安全性および将来利用される可能性のある糖質関連物質である難消化性オリゴ糖などの多糖類や食物繊維のプレバイオティクス機能、消化管機能を中心とした健康への安全性及び有用性についての文献的な調査を行った。そこで、本年度はこれまでの研究成果を参考にし、特定保健用食材志向および現在特定保健用食品に用いられているプロバイオティクス機能を有する菌種などについて摂取時期、対象者などを違えた場合の健康に対する影響ならびに消化管に及ぼす影響に着目し、健康への安全性、有用性に焦点をあて、文献的な調査を継続した。

昨年度の実験研究において、一般家庭に広まっている「カスピ海ヨーグルト種菌セット」より、含まれている菌種を単離し、形態学的、生化学的性状を調べ簡易同定を行うとともに、嫌気度、温度、pH、培養時間などの培養条件による菌叢の変動について調べ、その安全性、有用性を検討した。その結果、一般家庭において想定されるヨーグルト作成方法を用いても、雑菌の混入は認められず、大腸菌群等の出現は認められない等安全であると考えられた。しかしながら、含有された 2 株の菌について、1 株はおそらく *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* であると考えられたが、もう 1 株は、*Gluconobacter* に属すると考えられたが、種同定には至らなかった。*Lactococcus* はヨーグルト製造に用いられることが少なく、*Gluconobacter* については乳酸菌とは全く異なる等、いずれの菌株も新しいヨーグルト構成菌であるため DNA/DNA 相同性試験等、より詳細な種同定を行う必要がある。そこで、構成菌の分類学的な帰属決定を目的に、16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析・DNA/DNA 相同性などの分類学的性状を調べ、表示の妥当性および安全性、有用性を検討した。

現在、特定保健用食品中のプロバイオティクス機能を有する菌株 (関与成分) の定量は培養法が

用いられている。しかしながら、段階希釈の際の誤差や、また多くの製品は複数の菌種が含まれているため複雑な選択培地が必要であるなど、多くの問題を残している。近年、分子生物学的手法の発達により、16S rDNA 塩基配列の比較による菌種の同定および特異的プライマーを用いた検出・定量が行われるようになった(2, 3)。しかしながら、その対象試料は主に糞便や土壌であり、特定保健用食品についてはあまり検討されていない。そこで、本研究では特定保健用食品に含まれるプロバイオティクス機能を有する菌種について新たな遺伝子、*groEL* に着目し、新規迅速同定法の開発を行い、表示の妥当性の検討および新規同定法の有用性について検討することを目的とした。

表1 現在関与成分として特定保健用食品に用いられている菌株および製品数^a

菌株名	製品数
<i>Lactobacillus</i>	
<i>L. acidophilus</i> CK 92	7
<i>L. casei</i> NY1301	1
<i>L. casei</i> SBR1202	2
<i>L. casei</i> Shirota	26
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	6
<i>L. helveticus</i> CK60	7
<i>L. rhamnosus</i> GG	2
<i>Bifidobacterium</i>	
<i>B. breve</i> Yakult	4
<i>B. lactis</i> FK120	2
<i>B. lactis</i> LKM512	2
<i>B. longum</i> BB536	5
<i>Streptococcus</i>	
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ^a 1131	6

a. 平成 15 年 3 月 31 日現在

b: 現在の学名は *S. thermophilus*

【研究方法】

《調査研究》

特定保健用食材志向および現在特定保健用食品に用いられているプロバイオティクス機能を有

する菌種などについて摂取時期、対象者の違いに着目し、健康への安全性、有用性に焦点をあて、消化管に及ぼす影響について文献的な調査を継続した。

《実験研究》

＜研究 1＞ カスピ海ヨーグルト種菌セットに含有される菌種に関する分類学的研究

カスピ海ヨーグルト種菌セットより分離された 2 種について分類学的な帰属の検討を行った。

1) 供試菌株

昨年度に引き続きカスピ海ヨーグルト種菌セットより分離された分離菌 A、B (表 2) を供試菌株として用いた。さらに *Lactococcus* 菌種 4 株、*Acetobacter* 菌種 4 株の基準株 (表 2) をカルチャーコレクションより入手し、DNA/DNA 相同性試験の際に用いた。

表 2 供試菌株

菌株名	培地 ^a	培養温度 (°C)
分離菌 A	MRS	30
分離菌 B	804	30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> DSM 20069 ^T	MRS	30
<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> JCM 5805 ^T	MRS	30
<i>L. lactis</i> subsp <i>hordniae</i> JCM 1180 ^T	MRS	30
<i>L. garvieae</i> JCM 10343 ^T	MRS	30
<i>Acetobacter orientalis</i> NBRC 16606 ^T	804	30
<i>A. cibirongensis</i> NBRC 16605 ^T	804	30
<i>A. tropicalis</i> NBRC 16470 ^T	804	30
<i>A. orleanensis</i> NBRC 13752 ^T	804	30

T type strain

a・表 3 参照

2) 試薬等

M. R. S BROTH は OXIOD より購入した。BactTM Agar、BactoTM Yeast Extract は Becton, Dickinson and Company より購入した。N-acetylmuramidase は生化学工業より購入した。ポリペプトン、D(+)-グルコース、硫酸マグネシウム 7 水和物、塩化ナトリウム、EDTA・2Na、リゾチーム、アクロモペプチターゼ、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンシオール (Tns)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、TE 飽和フェノール、酢酸ナトリウム、酢酸、20×SSC、RNase A、RNase T1 は和

光純薬工業 (株) より購入し、品質は特級のものを用いた。エタノールは シグマ アルドリッチ ジャパン (株) より購入し、特級を用いた。Microbial DNA Extraction Kit は MoBio Laboratories より購入した。QIAquick Gel Extraction Kit は (株) キアゲンより購入した。PCR プライマーは、(株) バイオシカに依頼して合成されたものを用いた。KOD-plus- は東洋紡績 (株) より購入した。

実験 1-1 16S rDNA 塩基配列に基づく分離菌 A、B の系統解析

昨年度分離した分離菌 A を MRS 寒天培地 (表 3) プレート 2 枚に塗布およびプレート 1 枚に画線し、30℃、72 時間培養を行った。培養後、コンラージ棒で菌体を掻き取り集菌、生理食塩水 (0.85 % 塩化ナトリウム) に懸濁後、Microbial DNA Extraction Kit を用い、マニュアル通りに操作して、分離菌 A の DNA を得た。分離菌 B については、培地に 804 寒天培地 (表 3) を用い、その後は分離菌 A と同様に操作し、DNA を得た。

表 3 培地組成

MRS 寒天培地		804 寒天培地	
		ポリペプトン	5 g
		Bacto™ Yeast Extract	5 g
		D (+) - グルコース	5 g
M R S BROTH	52 g	硫酸マグネシウム 7 水和物	1 g
Bacto™ Agar	15 g	Bacto™ Agar	15 g
脱イオン水	1000 ml	脱イオン水	1000 ml
(adjust pH to 6.2 ± 0.2)		(adjust pH to 6.8 ± 0.2)	

得られたそれぞれの DNA を template として Forward プライマー 8F、Reverse プライマー 1525R (表 4) を用いて下記のプロトコル (PCR 反応液、表 5、PCR サイクル条件、図 1) に従い、16S rDNA を増幅した。増幅産物について 1% アガロースゲルを用いて Mupid-2 ((株) アドバンス) 上で電気泳動を行った。泳動後のゲルをエチシウムブロマイドで染色した後、トランスイルミネーターにより紫外線照射を行い、約 15 kb 付近に認められたバンドを確認後、切り出しを行い、QIAquick Gel Extraction Kit を用いてマニュアル通りに操作し、増幅産物の精製を行った。精製した増幅産物をシーケンス用プライマーと共に (株) バイオマトリックス研究所に送付して、16S rDNA 塩基配列の決定を行った。また、分離菌 A 塩基配列の決定の際には、シーケンス用プライマーとして、8F、16S2F、16S3F、1525R、16S2R、16S3RLC (表 4) を、分離菌 B については、8F、16S2F、16S3F、1525R、16S2R、16S3RAC (表 4) を用いた。

決定した分離菌 A、B それぞれの 16S rDNA 塩基配列情報をもとに日本 DNA データバンク (5) の BLAST (6) を用いてホモロジー検索を行い、近縁種の探索を行った。探索と同時に近縁とされた菌種の 16S rDNA 塩基配列の情報を入手し、Clustal W (7) を用いてアライメントを行い、塩基置換率 (Knuc) の計算 (8) を行った。計算結果をもとに近隣結合法 (9) により系統樹を作成し、統計的信頼度は 1000 回のブートストラップ解析 (10) により求め系統解析を行った。

表 4 16S rDNA の増幅および塩基配列決定に用いたプライマー

Primer	Sequence	Target site ^a
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27
1525R	AAAGGAGGTGATCCAGCC	1542-1525
16S2F	AGCAGCCGCGGTAATACG	520-537
16S3RLC	CACCAGACTTAATAAACCACC	604-584
16S3RAC	CATCTGACTGTACAAACCGCC	604-584
16S2R	CTACCAGGGTATCTAATCCTG	803-783
16S3F	AAGCGGTGGAGCATGTGG	937-954

a *Escherichia coli* (V00348) の 16S rRNA (4) に対応

表 5 16S rDNA 増幅に用いた PCR 反応液の組成

Components	Volume
10×PCR buffer for KOD -Plus-	5 μl
2mM dNTPs	5 μl
25mM MgSO ₄	2 μl
8F (10 μM)	1.5 μl
1525R (10 μM)	1.5 μl
Template DNA	1 μl
KOD -Plus- DNA Polymerase	1 μl
Autoclaved, distilled water	33 μl
Total	50 μl

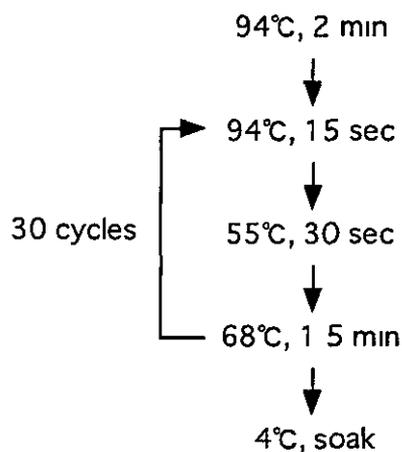


図 1 PCR サイクル条件 (16S rDNA)

実験 1-2 DNA/DNA 相同値に基づく分離菌 A、B の帰属決定

分離菌 A、*L. lactis* subsp *cremoris* DSM 20069^T を MRS 寒天培地プレート 30 枚に、*L. lactis* subsp *lactis* JCM 5805^T、*L. lactis* subsp *hordniae* JCM 1180^T、*L. garvieae* JCM 10343^T については、プレート 15 枚にそれぞれ塗布し、実験 1 と同様、30°C、72 時間培養を行った。培養、集菌後、Saito & Miura の方法 (11) に改変を加えた方法 (12、図 2) を用いて DNA を抽出した。

- 1 集菌した菌体 1g を Saline-0.1M EDTA (0.15 M 塩化ナトリウム + 0.1 M EDTA, pH 8.0) を用いて洗浄後、同溶液 5ml に懸濁。
 - 2 Lysozyme をスパーテル小さじ 1、アクロモペプチターゼをマイクロスパーテル 1、N-acetylmuramidase 溶液 (1 mg/100 μ l) 30 μ l を加え 37°C、一夜振とう。
 - 3 エタノールドライアイスにて凍結、60°C にて融解を 4 回繰り返す。
 - 4 等量の Tns-SDS buffer を加え、攪拌しながら 60°C、120 分間振とう。
 - 5 冷却後、等量の TE 飽和フェノール を加え、10 分間混和。
 - 6 10,000 rpm、15 分間、4°C にて遠心分離。
 - 7 水中にて上清をビーカーに移し、1/10 容の Acetate-EDTA (3 M 酢酸ナトリウム / 酢酸 + 1 mM EDTA, pH 7.0) を加え攪拌。
 - 8 2 倍量の冷エタノールを加え、ゆっくり攪拌しながら DNA をガラス棒に巻き取る。
 - 9 巻き取った DNA をガラス棒ごと 70%、80%、90%、および 100% の冷エタノールで順番に洗浄する。
 - 10 風乾後、5ml の 0.1 \times SSC を加え、4°C にて一夜放置し、完全に DNA を溶解。
 - 11 RNase A (2 mg/ml of 0.15 M NaCl, pH 5.0) および RNase T1 (800 units/ml of 0.1 M Tns-HCl, pH 7.2) を 1/40 容加え、37 °C、60 分間振とう。
 - 12 氷冷後、等量の TE 飽和フェノールを加え、再度 5～11 の行程を繰り返す。
 - 13 再度氷冷後、5～9 の行程を行い、2 ml の 0.1 \times SSC に溶解させ、DNA 溶液とする。
- 図 2 DNA の調整法

調整した DNA をフォトビオチンとマイクロプレートを用いて Ezaki らの方法 (13) に従い DNA/DNA 相同性試験を行った。

<研究 2> 菌種・菌株特異的プライマーを用いた特定保健用食品中の関与成分の検出

groEL 塩基配列の情報をもとに、菌種・菌株特異的プライマーを設計し、特定保健用食品に含まれる *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 等の関与成分の検出に関する検討を行った。

1) 試料および供試菌株

市販されている乳酸菌飲料 3 品目、発酵乳 5 品目を実際に購入し、計 8 品目を試料として用いた (表 6)。さらに *Lactobacillus* 菌種 6 株、*Bifidobacterium* 菌種 3 株、*Streptococcus* 菌種 1 株の基準株 (表 7) をカルチャーコレクションより入手し、特異的プライマーの特異性の確認の際に用いた。

2) 試薬等

BL 寒天培地は日水製薬 (株) より購入した。AnaeroPack・ケンキ、アネロパック角型ジャー、嫌気指示薬は三菱ガス化学 (株) より購入した。その他の試薬等の購入は研究 1 と同様に行った。

実験 2-1 特定保健用食品中の関与成分の単離および 16S rDNA を用いた簡易同定

製品それぞれより無菌的に発酵乳等を約 1g 採取後、生理食塩水 9ml 入りの試験管中に溶解

表 6 試料および含有されている関与成分

製品	関与成分 ^a	単離 ^b	groEL
製品 A	<i>L. acidophilus</i> CK 92 <i>L. helveticus</i> CK60	○	○
製品 B	<i>L. casei</i> Shirota	○	○
製品 C	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ^b 1131	○	
製品 D	<i>L. rhamnosus</i> GG	○	○
製品 E	<i>B. breve</i> Yakult	○	○
製品 F	<i>B. lactis</i> FK120	○	○
製品 G	<i>B. lactis</i> LKM512	○	○
製品 H	<i>B. longum</i> BB536	○	○

a *L.*, *Lactobacillus*, *B.*, *Bifidobacterium*

b 現在の学名は *Streptococcus thermophilus*

c 種の確認は、16S rDNA 部分塩基配列の相同性に基づく

表 7 供試菌株および培養条件

菌株名	培地 ^a	培養温度 (°C)	通気条件
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132 ^T	MRS	37	好気
<i>L. casei</i> JCM 1134 ^T	MRS	37	好気
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM 1002 ^T	MRS	37	好気
<i>L. helveticus</i> JCM 1120 ^T	MRS	37	好気
<i>L. gasseri</i> JCM 1131 ^T	MRS	37	好気
<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 ^T	MRS	37	好気
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1192 ^T	BL	37	嫌気
<i>B. lactis</i> DSM 10140 ^T	BL	37	嫌気
<i>B. longum</i> JCM 1217 ^T	BL	37	嫌気
<i>Streptococcus thermophilus</i> DSM 20617 ^T	53	37	好気

T type strain

a 表 3, 8 参照

させ、1次希釈液とした。*Bifidobacterium* 菌種を含む製品 E、F、G、H (表 6) については、嫌気状態にしたグローブボックス (COY LABORATORY PRODUCTS 製) 内で採取を行った。1次希釈液より 1 ml 採取し、新たな 9 ml 生理食塩水入り試験管に移して 2次希釈液とした。順次、10倍段階希釈を行い 6次希釈液まで作成した。4次~6次希釈液よりそれぞれ 100 µl 採取し、BL血液寒天培地 (表 8) それぞれ 2枚に滴下後、コンラージ棒で塗抹し、37 °C にて培養を行った。培養は、好気培養と嫌気培養の 2種行い、嫌気培養は、酸素吸収・炭酸ガス発生剤である AnaeroPack・ケンキを用いて、アネロパック角型シャー中で行った。嫌気状態の確認には嫌気指示薬を用いた。48時間培養後、出現したコロニーをコロニーの種類ごとに白金耳で採取後、新しい培地に画線し、純粋なコロニーであることを確認した。また、嫌気条件下で出現していたコロニーは好気条件下で、それぞれ新たな培地に植菌して培養を行い酸素要求性を調べた。それぞれのコロニーごとに光学顕微鏡による形態観察を行った。コロニー形態、酸素要求性、菌型等より関与成分と考えられた菌株のみ以下の実験に用いた。

関与成分と考えられた菌株については、それぞれ実験 1-1 と同様に純粋培養、DNA 抽出、PCR による 16S rDNA の増幅、増幅産物の精製を行った。塩基配列の決定の際のシークエンプライマーは、8F (表 4) を用いた。得られた 16S rDNA 部分塩基配列それぞれについて、実験 1-1 と同様にホモロジー検索を行い、簡易同定を行った。

表 8 使用培地

53 寒天培地		
Bacto™ Peptone	10 g	
Bacto™ Yeast Extract	5 g	BL 血液寒天培地
D (+) - グルコース	5 g	BL 寒天培地
塩化ナトリウム	5 g	脱イオン水
Bacto™ Agar	15 g	(115°C 20 分間加圧滅菌後、約 50°C に冷却して馬脱繊維血液 50 ml を加え、血液寒天培地とする)
脱イオン水	1000 ml	
(adjust pH to 7.3 ± 0.1)		

実験 2-2 単離した関与成分の *groEL* 塩基配列の決定および *groEL* 塩基配列に基づく系統解析

実験 2-1 で得られたそれぞれの DNA を template として、PCR による *groES*、*groEL* の増幅を行った (PCR 反応液、表 9、PCR サイクル条件、図 3)。プライマーセットは、*L. acidophilus* CK92 については、ESLb1-32 と ELLbR を、*L. casei* Shirota、*L. rhamnosus* GG については、ELLbF と ELLbR を、*Bifidobacterium* 菌種 4 株 (*B. breve* Yakult、*B. lactis* FK120、*B. lactis* LKM512、*B. longum* BB536) については、ELBifCF と ELBifCR を用いた (表 10)。それぞれの増幅産物について実験 1-1 と同様に電気泳動、染色、紫外線照射を行い、*L. acidophilus* CK92 については約 1 kb 付近、*L. casei* Shirota、*L. rhamnosus* GG については、約 450 bp 付近、*Bifidobacterium* 菌種 4 株については、約 550 bp 付近に認められたバンドの確認を行い、増幅産物の精製を行った。シークエンシングプライマーは *Lactobacillus* 菌種については ELLbFseq および ELLbRseq (表 11)、*Bifidobacterium* 菌

表 9 *groES*、*groEL* 増幅に用いた PCR 反応液の組成

Components	Volume
10×PCR buffer for KOD -Plus-	5 μ l
2mM dNTPs	5 μ l
25mM MgSO ₄	2 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1.5 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1.5 μ l
Template DNA	1 μ l
KOD -Plus- DNA Polymerase	1 μ l
Autoclaved, distilled water	33 μ l
Total	50 μ l

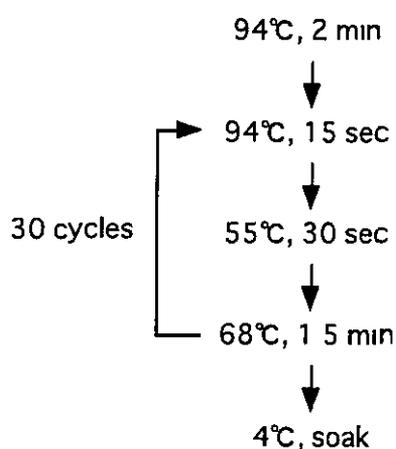


図 3 PCR サイクル条件 (*groES*、*groEL*)

表 10 *groES*、*groEL* の増幅に用いたプライマー

Primer	Sequence ^a	Target site
ESLb1-32	AAGACTGTTGGCGGTATTGTCYTRGCWTCWAAYGC	55-89 ^b
ELLbF	AAGAACGTTACAGCCGGTGCTAAYCCNGTNGG	310-341 ^c
ELLbR	GTCAGCAATGATCAACAGTGNYTTRCCYTGYTG	750-718 ^c
ELBifCF	AACTGTGCTTGCTCAGTCTCTNGTKCAYGARGG	273-305 ^d
ELBifCR	AGCCTTAACAGCGCAGGACTTRAARGTRCCNCG	828-796 ^d

a Y=C or T, R=A or G, W=A or T, N=A or C or G or T, K=G or T

b *Lactobacillus acidophilus* CRL 639 (AF3000645) の *groES* に対応

c *Lactobacillus acidophilus* CRL 639 (AF3000645) の *groEL* に対応

d *Bifidobacterium lingum* NCC2705 (AE014614) の *groEL* に対応

表 11 *groES*、*groEL* の塩基配列決定に用いたプライマー

Primer	Sequence	Target site
ELLbFseq	AAGAACGTTACAGCCGGTGC	310-329 ^a
ELLbRseq	GTCAGCAATGATCAACAGTG	750-731 ^a
ELBifFseq	AACTGTGCTTGCTCAGTCTC	273-292 ^b
ELBifRseq	AGCCTTAACAGCGCAGGAC	828-810 ^b

a *Lactobacillus acidophilus* CRL 639 (AF3000645) の *groEL* に対応

b *Bifidobacterium lingum* NCC2705 (AE014614) の *groEL* に対応

種については、ELBifFseq および ELBifRseq(表 11) を用いた。

決定した *groEL* 塩基配列情報をもとに、実験 1-1 と同様にホモロジー検索を行い、近縁種の探索を行った。近縁とされた菌種の *groEL* 塩基配列の情報を入手し、系統樹の作成を行い、系統解析を行った。

実験 2-3. 菌種、菌株特異的プライマーの設計および適用

実験 2-2 の系統解析結果より、近縁で塩基配列が類似していると考えられた菌種に着目し、関与成分およびその近縁種に特異的なプライマーを設計した(表 12)。PCR 反応は *Lactobacillus* 菌種用プライマーを用いた際には、3 ステップ、アニーリング温度 58 °C (表 13、図 4)にて、*Bifidobacterium* 菌種用プライマーを用いた際には、2 ステップにて行った(表 14、図 5)。設計したプライマーの特異性を単離された 8 株(表 6) および基準株 10 株(表 7) から抽出した DNA を用いて PCR 法により実験 1-1 と同様に確認した。ただし、目的とするサイズが約 100 bp ~400 bp と比較的短いため、電気泳動の際には、2.5 % アカロースゲルを用いた。基準株の培地には、*Lactobacillus* 菌種については MRS 寒天培地、*Bifidobacterium* 菌種については BL 血液寒天培地、*Streptococcus* 菌種については S3 Medium をそれぞれ使い、*Bifidobacterium* 菌種のみ嫌気にて培養を行った(表 7)。基準株の DNA の抽出は実験 1-1 と同様に行った。

表 12 菌種、菌株特異的プライマー

Strain ^a	Primer	Sequence	Target site ^b	product size
<i>L. acidophilus</i> CK92	LBacIF	TGCTGCTGTTTCTTCAGCATC	438-458	108
	LBacIR	TTGATACCACGTGAATCTTCG	545-525	
<i>L. casei</i> Shirota	LBcasF	GTCCGTTTCTTCCTCAAATAC	441-461	223
	LBcasR	GGTGATCAAGATATAAGGATCG	663-642	
<i>B. breve</i> Yakult	BIFbreF	ATCGTCAAGGAGCTCGTCGT	376-395	400
	BIFbreR	TCGGCAGAGCCTCGCCGTC	775-756	
<i>B. lactis</i> FK120	BIFlacF	CGTCAAGCAGCTTGTCGCTT	378-397	191
<i>B. lactis</i> LKM512	BIFlacR	CCTCGGTGAAATCGAGATCG	568-549	
<i>B. longum</i> BB536	BIFlonF	CGTCAAGGAACCTCGTCGCTG	378-397	219
	BIFlonR	GCGATGTAGCCCTTGTC	596-579	

a *L.*, *Lactobacillus*; *B.*, *Bifidobacterium*

b *Lactobacillus acidophilus* CRL 639 (AF3000645) の *groEL* (LBacIF LBacIR, LBcasF, LBcasR) および *Bifidobacterium longum* NCC2705 (AE014614) の *groEL* (BIFbreF, BIFbreR, BIFlacF, BIFlacR, BIFlonF, BIFlonR) に対応

表 13 *Lactobacillus* 菌種用特異的プライマーを用いた際の PCR 反応液の組成

Components	Volume
10×PCR buffer for KOD -Plus-	2.5 μl
2mM dNTPs	2.5 μl
25mM MgSO ₄	1 μl
Forward Primer (10 μM)	0.75 μl
Reverse Primer (10 μM)	0.75 μl
Template DNA	0.5 μl
KOD -Plus- DNA Polymerase	0.5 μl
Autoclaved, distilled water	16.5 μl
Total	25 μl

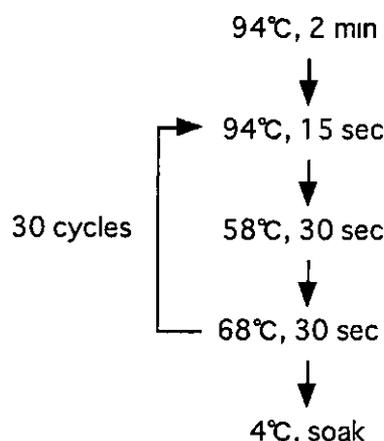


図 4 *Lactobacillus* 菌種用特異的プライマーを用いた際の PCR サイクル条件

表 14 *Bifidobacterium* 菌種用特異的プライマーを用いた際の PCR 反応液の組成

Components	Volume
10×PCR buffer for KOD -Plus-	2.5 μl
2mM dNTPs	2.5 μl
25mM MgSO ₄	0.75 μl
Forward Primer (10 μM)	0.75 μl
Reverse Primer (10 μM)	0.75 μl
Template DNA	0.5 μl
KOD -Plus- DNA Polymerase	0.5 μl
Autoclaved, distilled water	16.75 μl
Total	25 μl

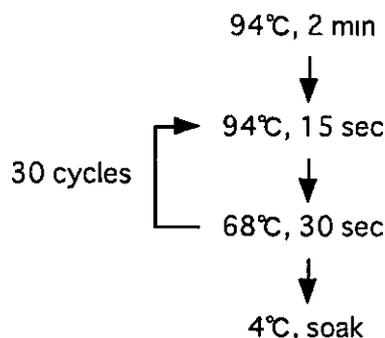


図 5 *Bifidobacterium* 菌種用特異的プライマーを用いた際の PCR サイクル条件

【研究結果】

《調査研究》

糖質関連物質である難消化オリゴ糖にはプレバイオティクス機能があり、そのプレバイオティクスという言葉は比較的近年になって定義された言葉で「結腸内に定着している有用菌だけの増殖を促進する、あるいはその活性を高めることによって宿主の健康に有利に作用する難消化性食品成分」とされている (14)。一方、その有用菌に関連し、対をなして用いられることが多いプロバイオティクスは「宿主の腸内菌叢のバランスを改善することにより宿主に良い効果をもたらす生きた微生物を含む食品添加物」と定義されている (15)。プロバイオティクスが人に与える影響

については数多く研究されており、我が国でもその機能を利用した特定保健用食品が現在約 60 品目存在する (表 1)。これまでプロバイオティクスは主、栄養生理機能や腸内細菌叢の変動、便秘状態などの整腸作用について研究されてきた。食品として取り扱われてきたことにより、創薬の際に行われるような規模な研究はほとんど行われてこなかった。そのため、プロバイオティクスの効果、安全性について評価する際、の知見が不十分な面もあった。

現在、プロバイオティクスの新たな機能として疾病予防、改善効果について注目され、数多くの研究が行われている。*L. johnsoni* La1 のピロリ菌の抑制効果については、感染しているボランティアに対する重盲検法による臨床研究において、その培養上清を 1 日 4 回、50 ml、2 週間投与したところピロリ菌の減少が認められ、投与終了 4 週間後においてもその効果が持続したという報告がある (16)。また、酸性化乳を 1 日 2 回、180 ml、3 週間摂取した研究においても減少が考えられたが、ピロリ菌に対する殺菌作用は示さなかったという (17)。*L. gasseri* OLL2716 (LG21) についても長期間にわたる研究が行われており、31 人のボランティアに毎日 120 g のヨーグルトを 24 週間摂取させたところ、呼吸テストにおいて減少が認められ、粘膜の炎症の指標となる血清ペプシゲン I/II に関しても良好であった。LG21 により、ピロリ菌の減少だけでなく、胃の炎症の低減効果があると考えられている (18)。炎症性腸疾患とアトピー性皮膚炎等のアレルギーについても数多く研究が行われている。炎症性腸疾患は、難治性の慢性腸炎であり、通常潰瘍性大腸炎とクローン病に代表され、サイトカインをはじめとする各種免疫異常の関与が示唆されている。潰瘍性大腸炎は、活動期、非活動期を繰り返すことが知られているが、活動期と非活動期で腸内細菌叢に変動があり、活動期に *Lactobacillus* 菌種が減少し、また酢酸により人工的に腸炎を起こさせたラットにおいても炎症が進んだ 4 日目には、同様に *Lactobacillus* 菌種の減少が認められることが知られている (19)。また健常人との比較において、クローン病の患者の腸内細菌は *Lactobacilli* および *Bacteroides* については、差違は認められなかったが、*Bifidobacterium* 菌種の大きな減少が認められるという (20)。*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* の潰瘍性大腸炎に対する投与実験がいくつか行われている。予備実験ではあるが、クローン病の子供に *Lactobacillus* GG の菌体をタブレット状にして 6 ヶ月投与した研究においては、1 週間後には改善効果が表れ、この効果は試験中続き、クローン病を安定化させる効果があると考えられた (21)。潰瘍性大腸炎を起こすマウスを用いた研究では、*Bifidobacterium breve*、*B. bifidum*、*L. acidophilus* を用いた発酵乳を 17 週間投与した結果、生理食塩水、乳の群に比べ、組織の損傷が減少しており、回腸の組織重量の減少が認められたという (22)。これらのように、大腸炎が起こっているときに減少していた菌属、菌種、*Lactobacillus* や *Bifidobacterium* を投与することにより改善が認められている。しかしながら、同じ属、種であっても株が異なると応答も異なる可能性があるためそのメカニズムは不明な部分が多い。一方、アレルギーについてもエストニアとスウェーデンの 2 歳児を対象にしたアレルギーと腸内フローラの関連研究について興味深い発表がなされている。それによると、卵または牛乳に対するテストによりアレルギーと診断された子供の腸内細菌叢は、どちらの地域においても健常児に比べ、*Lactobacillus* 菌種が少なくなっており、好気性菌、特に大腸菌群や、*Staphylococcus* 菌種の増加が認められている (23)。そこで、潰瘍性大腸炎と同様に、治療にプロバイオティクスの利用が試みられている。例えば、乳幼児、幼児のアトピー性湿疹について研究が数多く行われている。牛乳にアレルギーを持ちアトピー性湿疹を有する 2 歳児に *L. rhamnosus* GG を生菌、もしくは不活化させて摂取させた研究では、プラセボを含む全ての摂取群においてアトピー性湿疹の緩和が認められたが、不活化させた状態で摂取させたところ、一部に胃腸不良の徴

候及び下痢が認められた (24)。しかしながら、傾向としては生菌摂取群のほうが、より緩和傾向が強かったようである。また、4 歳児に対しても同様の研究が行われており、摂取群においては、53 人中 14 人にアトピー性湿疹に認められたのに対し、プラセボ群では 54 人中 25 人に認められるとの報告がある (25)。

これまでは主に現象についてであるが、近年の免疫学の発展により、その作用機序が明らかとなってきている。既に知られていることではあるが、例えば、T 細胞については Th1 型と Th2 型が存在し、このバランスが T1 に傾くと、自己免疫疾患、Th2 に傾くとアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の発症の原因となることが知られている (26)。また、Th1 と Th2 のバランスが取れていれば健常であり、インターロイキン-12 (IL-12) や、インターフェロン- γ (IFN- γ) が native T 細胞から Th1 への分化誘導を引き起こすことが知られており (26)、IL-10 は Th2 誘導型である。これらについて、一般的にグラム陽性細菌 T 細胞を Th1 型に誘導すると考えられており、それについていくつかの研究がある。例えば、グラム陽性菌、陰性菌それぞれ 7 株、計 14 株を培養後、殺菌し、ヒト細胞と作用させたところ、グラム陰性菌は、IL-12/IL-10 が 2 以下であるのに対し、グラム陽性菌は 6 株において、IL-12/IL-10 の割合が 5 以上であり、Th1 を主に誘導すると考えられている (27)。この研究において、グラム陽性菌の *Clostridium perfringens* は、IL-12/IL-10 の値が 13 と低いが、この菌は病原菌であるため興味深い点である。他にも、発酵食品、腸内から分離された乳酸菌をアレルギー患者由来の単核細胞に作用させ、ELISA により調べたところ、Th2 を誘導するサイトカインである IL-4、IL-5 を抑制し、結果的にアレルギー抑制に働くことが考えられるという報告もある (28)。

このようにアレルギー抑制に関する作用機序が明らかとなり、またプロバイオティクスとされる菌は、主に *Lactobacillus* 菌種、*Bifidobacterium* 菌種、*Streptococcus* 菌種といずれもグラム陽性菌であり、アレルギー抑制などの免疫機能が期待できそうである。しかしながら、全てのグラム陽性菌が同じように働くわけではない。*L. plantarum*、*L. rhamnosus*、*L. paracasei* subsp *paracasei* を同濃度培養し、殺菌後、ヒトの単核細胞との IL-10、IL-12 との応答を調べた研究では、*L. paracasei* subsp *paracasei* が他の菌体成分に比べ、10 倍以上の IL-12 産生を誘導し、IL-10 産生については、*L. rhamnosus* が、他の菌体成分に比べ、5 倍以上であったという (29)。また、不活化した *Bifidobacterium* 菌種 27 株についての研究では、*B. adolescentis*、*B. longum* が *B. bifidum*、*B. breve*、*B. infantis* に比べ、IL-12 が誘導されたという報告がある (30)。プロバイオティクスのアトピー性湿疹に対する効果について、効果はあるが全員が治るわけではなく、また大人のアトピーとプロバイオティクスとの関連についてはほとんど研究されていない。すなわち、菌種、菌株によって応答が異なり、同じ菌株を用いた場合でも、個人個人によって、さらに摂取時期によってもプロバイオティクスに対する免疫応答が異なる可能性が考えられる。今後、菌種、菌株の応答の違いは何によるものか、またヒトの遺伝型とどう対応していくのか等、今後も研究していく必要があると考えられた。

《実験研究》

<研究 1> カスピ海ヨーグルト種菌セットに含まれる菌種に関する分類学的研究

実験 1-1 16S rDNA 塩基配列に基づく分離菌 A、B の系統解析

分離菌 A の培養後、画線プレートより単一コロニーであることを確認した後、集菌を行った。

集菌後、DNA の抽出を行い DNA template として用いた。プライマー 8F、1525R (表 4) を用いて PCR により 16S rDNA を増幅し、その増幅産物を確認した結果、15 kb 付近に明瞭なバンドが認められたものの、他の部位にもバンドが認められたため再度 PCR、電気泳動を行った。隣接する 3 レーンにそれぞれ 20 μ l アプライし、3 レーン分をまとめて 15 kb 付近を切り出した後、増幅産物の精製、濃縮を行った。分離菌 B についても同様に行った。16S rDNA の塩基配列については分離菌 A、B それぞれ 1489 bp、1437 bp とほぼ全長を決定した。ホモロジー検索の結果、分離菌 A は *L. lactis* subsp *cremoris* の基準株の塩基配列と 100%、分離菌 B は *A. orientalis* の基準株と 99.9% 一致した。系統解析の結果、分離菌 A は、*L. lactis* subsp *cremoris* と最も近縁となり、他に *L. lactis* subsp *lactis*、*L. lactis* subsp *hordnae* と近縁であることが明らかとなった (図 6)。分離菌 B については *A. orientalis* と最も近縁となり、他に *A. cibinongensis*、*A. tropicalis*、*A. orleanensis* と近縁であることが明らかとなった (図 7)。

実験 1-2 DNA/DNA 相同値に基づく分離菌 A、B の帰属決定

分離菌 A については、4 種 (*L. lactis* subsp *cremoris*、*L. lactis* subsp *lactis*、*L. lactis* subsp *hordnae*、*L. garvieae*) それぞれの基準種と DNA/DNA 相同性試験を行った。分離菌 A をプローブとした際に、*L. lactis* subsp *cremoris* の基準株と相同値 108 %、*L. lactis* subsp *cremoris* の基準株をプローブとした際に分離菌 A と相同値 64 % (表 15) を示した。分離菌 B については分離菌 B をプローブとした際に *A. orientalis* の基準株と相同値 92 %、*A. orientalis* の基準株をプローブとした際に分離菌 B と相同値 91 % を示した (表 16)。

<研究 2> 菌種、菌株特異的プライマーを用いた特定保健用食品中の関与成分の検出

実験 2-1 特定保健用食品中の関与成分の単離および 16S rDNA を用いた簡易同定

製品より関与成分と考えられた菌株が最終的に 8 製品より、*Lactobacillus* 菌種 3 株、*Streptococcus* 菌種 1 株、*Bifidobacterium* 菌種 4 株、計 8 株単離された (表 6)。これら 8 株について、16S rDNA 部分塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行ったところ、いずれも分離源の製品に記載されている関与成分の種名と最も相同性が高かった。そのため、以下の実験では、今回単離した 8 株を関与成分、*L. acidophilus* CK 92、*L. casei* Shirota、*L. rhamnosus* GG、*Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* 1131、*B. breve* Yakult、*B. lactis* FK120、*B. lactis* LKM512、*B. longum* BB536 とし扱った (表 6)。

実験 2-2 単離した関与成分の *groEL* 塩基配列の決定および *groEL* 塩基配列に基づく系統解析

データベースより *Lactobacillus* 菌種および *Bifidobacterium* 菌種の *groEL* 塩基配列の情報入手し、プライマーの設計を行った。プライマーの設計の際には、Rose らの方法 (31) を参考に 5' 側に共通領域、3' 側縮重領域を有するプライマーを設計した。PCR の結果、*L. acidophilus* CK92 については約 1 kb 付近、*L. casei* Shirota、*L. rhamnosus* GG については、約 450 bp 付近、*Bifidobacterium* 菌種 4 株については、約 550 bp 付近に増幅が認められた。系統解析の結果 *L. acidophilus* CK92 は、*L. acidophilus* CRL639 と、*L. casei* Shirota は、*L. casei* に属する 5 菌種とそれぞれ近縁であった (図 8)。また、*B. breve* Yakult は、*B. breve* JCM 1192^T と、*B. lactis* FK120 および *B. lactis* LKM512 は、*B. lactis*、*B. animalis* に属する 7 菌種と、*B. longum* BB536 は、*B. longum*、*B. infantis*、*B. suis* に属