

- Japan (Nov. 15-18, 2004).
- 4) Takahiro Suzuki, Akira Hosono, Satoshi Hachimura, Toshio Suzuki, and Shuichi Kaminogawa. Immunomodulatory activity of purified β -(1,3)-(1,6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* strain 1A1. The 17th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2004), Nagoya, Japan (Nov. 15-18, 2004).
- 5) 中西祐輔・細野朗・木村貞司・上野川修一. *Bifidobacterium* 菌体の経口投与によって誘導されるパイエル板 T 細胞および抗原提示細胞の特徴. 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005 年 3 月, 予定).
- 6) 津田真人・細野朗・藤岡美蘭・八村敏志・平山和宏・伊藤喜久治・上野川修一. 食餌抗原に対する腸管免疫系応答における *Bifidobacterium* 定着の影響. 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005 年 3 月, 予定).
- 8) 柳橋努・細野朗・津田真人・八村敏志・平山和宏・伊藤喜久治・上野川修一. 無菌マウスとコンベンショナルマウス由来各リンパ組織の菌体成分の刺激に対する *in vitro* 細胞応答についての比較. 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005 年 3 月, 予定).
- 9) 平松靖浩・細野朗・八村敏志・上野川修一. 経口投与した *Bifidobacterium* 菌体のマウス腸管免疫系組織における経時的な局在性の変化. 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005 年 3 月, 予定).
- 10) 原田岳・細野朗・八村敏志・上野川修一. *Bifidobacterium* 菌体成分のマウス経口投与による食餌抗原特異的免疫応答に与える影響. 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005 年 3 月, 予定).
- 11) 高知尾良徳・細野朗・内田健治・元島英雅・上野川修一. ケフィアグレイン経口投与がマウス腸管免疫系に及ぼす影響について. 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005 年 3 月, 予定).
- 12) 鈴木隆浩・細野朗・八村敏志・鈴木利雄・上野川修一. 黒酵母由来高純度 β -(1,3-1,6)-グルカンの摂取によって誘導される免疫調節効果について. 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2005 年 3 月, 予定).
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) 特になし。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

分担研究報告書

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究

—食品のもつ免疫調節機能、アレルギー予防機能の評価方法の確立—

食品のもつアレルギー予防効果の評価方法：臍帯血単核球の腸内細菌への反応性の解析

分担研究者	河野 陽一	千葉大学大学院医学研究院小児病態学 教授
研究協力者	下条 直樹	千葉大学大学院医学研究院小児病態学 講師
	鈴木 修一	千葉大学大学院医学研究院小児病態学
	Eduardo Campos	千葉大学大学院医学研究院小児病態学
	河田 誠	JFE 健康保険組合川鉄千葉病院 副院長
	勝木 利行	JFE 健康保険組合川鉄千葉病院小児科 医長
	池上 秀二	明治乳業研究本部食機能科学研究所 課長
	山口 真	明治乳業研究本部食機能科学研究所

研究要旨 プロバイオティクスによるアレルギー疾患発症の予防効果には個体差が認められている。したがって、アレルギー予防のために有用なプロバイオティクスの特性や効果発現機構を明らかにする必要がある。われわれは当科関連施設において新生児からのアレルギーに関する追跡調査を開始し、出産時に得られた臍帯血単核球 23 検体における腸内グラム陽性桿菌刺激によるサイトカイン産生能を解析した。その結果、①菌体刺激による TNF- α 産生量は個体により大きく異なっていた。②菌体およびペプチドグリカン刺激による TNF- α 産生量には有意な相関が認められることから、菌体刺激は TLR2 を介することが示唆された。③同一菌属であっても菌種によりサイトカイン産生誘導能に差異が認められ、*Bifidobacterium adolescentis* は *Bifidobacterium bifidum* よりも TNF- α ・IL-10 産生誘導能が有意に高かった。これは TLR2 を高発現している単球を精製し比較しても同様であった。以上より、TLR2 刺激によるサイトカイン産生量を規定する個体側の因子と菌体側の因子が存在することが明らかとなった。今年度の研究から腸内細菌刺激による臍帯血単核球からのサイトカイン産生能はプロバイオティクスなどのアレルギー改善食品の評価法として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

腸内細菌叢の偏倚はアレルギー疾患の発症や症状の増悪に関与していると考えられる。北欧では、プロバイオティクス投与による乳児アトピー性皮膚炎の発症率の低下が報告されている。しかし、

人種・食習慣・気候等の異なる他の地域ではその効果は報告されていない。さらに、上記の研究では IgE 抗体値への抑制は認められず、またアトピー性皮膚炎を発症した児の重症度は対照群と差を認めていない。以上のことから、食習慣・人種の異

なる我が国において、どのようなプロバイオティクスが、どのような個体において、アレルギーの予防に有効であるのかを明らかにする必要がある。

プロバイオティクスとして健康保健食品に使用されることの多い*Bifidobacterium*はグラム陽性桿菌に属している。その主要な細胞壁成分であるペプチドグリカン(PGN)などがToll like receptor (TLR)2を刺激し、一般にTh1型の免疫反応を誘導すると考えられる。しかしながら、われわれの疫学的研究より、生後6か月児の腸内細菌叢における*Bifidobacterium*菌種の検出率の検討では、非アレルギー児では*Bifidobacterium adolescentis*が有意に多く、逆にアレルギー児において*B. bifidum*が高率に検出されたこと。すなわち、同じ*Bifidobacterium*属であっても異なる菌種により免疫反応誘導に差異がある可能性がある。本研究ではプロバイオティクス刺激による抗原提示細胞からのサイトカイン産生能の個体差の有無、および菌種による抗原提示細胞刺激能の差異の有無を解析することを目的に、腸内細菌の臍帯血単核球からのサイトカイン産生を解析した。

B. 方法

分娩数の多い産科を有する千葉大学の関連病院において倫理委員会の承認を得て、妊婦から臍帯血および母体・新生児の便の取得および児のアレルギー疾患の有無に関する追跡調査が可能であるコホートを設定した(図1)。出産時に得られた臍帯血単核球を凍結保存し、その後解凍して得られた単核球を腸内グラム陽性菌死菌体および*Lactobacillus acidophilus*由来 PGN とともに培養し、培養上清のサイトカインを測定した。

また、解凍した単核球中の CD14 陽性単球上の TLR2 発現をフローサイトメトリーで解析した。

C. 研究結果

1) プロバイオティクス刺激による臍帯血単核球からのサイトカイン産生能の個体差

現在までのところ40数名の臍帯血単核球を凍結し、そのうち23検体について解凍単核球のサイトカイン産生を解析している。解凍時の生細胞の割合はすべて90%以上であった。23の臍帯血単核球を*B. bifidum*および*B. adolescentis* 10 μ g/mlで刺激した培養上清中のTNF α 量は個体により大きく異なっていた(図2)。*B. adolescentis*刺激およびPGN刺激でのTNF α 産生量の間には有意な相関が認められたことから、*Bifidobacterium*の刺激はTLR2を介することが確認された(図3)。そこでPGN刺激による臍帯血単核球からのTNF α 産生量を検討したところ、*Bifidobacterium*刺激と同様に個体差が認められた。以上から*Bifidobacterium*刺激に対する単核球のサイトカイン産生の個体差はTLR2を介するシグナルの差異と考えられる。

2) 臍帯血単核球からのサイトカイン産生能に対する腸内グラム陽性菌種間での差異

3名の臍帯血単核球を*B. bifidum*、*B. adolescentis*、*Lactobacillus rhamnosus* GG (10 μ g/ml)で刺激して24時間後の培養上清中のTNF α 量を市販のELISA法で測定した(図4)。臍帯血によって産生量は異なるが、臍帯血No.1とNo.2では*B. adolescentis*、*B. bifidum*、*Lactobacillus rhamnosus* GGの順でTNF α 産生が認められた。臍帯血No.3では*B. bifidum*、*B. adolescentis*、*Lactobacillus rhamnosus* GGの順であった。すなわち、菌属、菌種により臍帯血単核球からのサイトカイン産生誘導能に差異がある可能性が示唆された。そこで、24臍帯血単核球について両菌種刺激でのTNF α およびIL-10産生を解析したところ、両者の間には統計学的に有意差があり、*B. adolescentis*の方がTNF α およびIL-10産生を誘導することが明らかとなった(図6)。TLR2は主に単核球中の単球に発現することから、臍帯血から

単球をマグネットビーズ法にて精製して *B. adolescentis*, *B. bifidum* のサイトカイン産生誘導能を比較した。その結果、複数の菌濃度で *B. adolescentis* が *B. bifidum* よりも多くの TNF α および IL-10 産生を誘導することが確認された (図 7)。さらに複数の臍帯血由来単球の刺激実験からこの結果を確認した (図 8)。以上から、グラム陽性球菌の中で菌属、菌種によりサイトカイン産生誘導能が異なることが示唆された。

D. 考察

アレルギー改善食品の評価法の開発を最終的な目的として、今年度は具体的には臍帯血中免疫担当細胞からのサイトカイン産生に対するプロバイオティクスの効果とこれに関わる自然免疫分子の同定を目指して研究を開始した。その結果、プロバイオティクスへの反応性には個体間での差異、ならびにプロバイオティクスの菌属、菌種による免疫刺激能の差異が存在する可能性が示された。この結果はアレルギー疾患の発症には、個体側の因子と腸内細菌のバランスの2つが重要な因子であることを示している (図 9)。今後、臍帯血単核球を用いてプロバイオティクスに対して反応しうる個体および至適なプロバイオティクスの選択が可能となることが期待される。

プロバイオティクスに対するサイトカイン産生の個体差はTLRを介するシグナルの個体差によるものと考えられる。PGN刺激によるサイトカイン産生を規定する機序として、単核球中の単球数、単球上のTLR2発現量、TLR2下流のシグナル伝達機構などが考えられる。また図 1 に示したように、本研究は妊婦からのコホートシステムに基づいて研究が行われていることから、今後これらの臍帯血単核球の菌刺激によるサイトカイン産生能とその後のアレルギー発症の有無についてアンケート等で確認することが可能である。実際に、TLR2刺激

によるサイトカイン産生不全がアレルギー発症に関与することが明らかとなれば、どのような因子がTLR2を介する刺激によるサイトカイン産生能を決定しているのかを明らかにすることでアレルギー発症予防につながる可能性がある。また仮にTLR2を介するサイトカイン産生がある程度保たれているのなら積極的にプロバイオティクスを投与することにより、アトピー素因の強い乳児のアレルギー発症を予防することも可能かもしれない。

本研究により日本人乳児に適するプロバイオティクスの同定、また出生時においてプロバイオティクスに対する反応性の予知などが可能となり、アレルギー発症予防に有用と考えられる。来年度は引き続き、臍帯血を用いたプロバイオティクスへの反応性について例数を増やして解析するとともに、菌刺激に対する自然免疫応答性の個体差の機序を明らかとしたい。また、生後6か月および1歳でのアレルギー疾患の有無をアンケートにて調査することにより臍帯血単核球のサイトカイン産生能とアレルギー発症の関連を解析する予定である。

E. 結論

TLR2刺激によるサイトカイン産生量を規定する個体側の因子と菌体側の因子が存在することが明らかとなった。今後は両因子を同定するとともに、アレルギー疾患発症・非発症両群間における菌体刺激によるサイトカイン産生能を比較することで、どのような個体において、どのようなプロバイオティクスが、アレルギーの予防に有効であるのかが明らかになると考えられる。腸内細菌刺激による臍帯血単核球からのサイトカイン産生能はプロバイオティクスなどのアレルギー改善食品の評価法として有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) *Bifidobacterium* 菌種におけるヒト CD14 陽性細胞のサイトカイン産生誘導能の差異 鈴木修一, 下条直樹, 井上祐三朗, 富板美奈子, 勝木利行, 河野陽一 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2004 年 11 月

2) *Bifidobacterium* 属菌種刺激による臍帯血単核球サイトカイン産生における菌種および個体の差異 鈴木修一, 下条直樹, 山口真, 成島聖子, 池上秀二, 勝木利行, 矢島高二, 河野陽一 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 2004 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図2 プロバイオティクス刺激による臍帯血単核球からのTNF- α 産生能の個体差

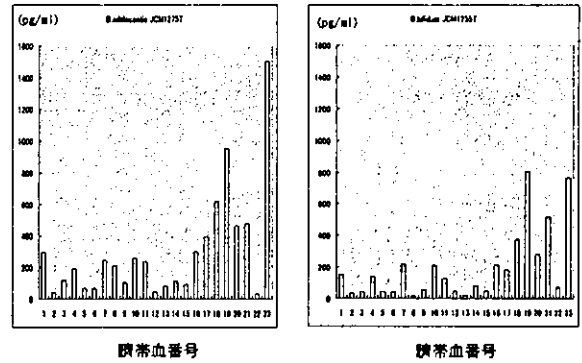


図3 *B. adolescentis*刺激およびペプチドグリカン刺激によるTNF- α 産生量の相関

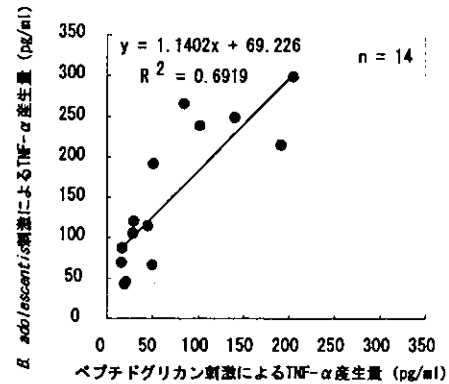


図4 ペプチドグリカン刺激によるTNF- α 産生量の個体差

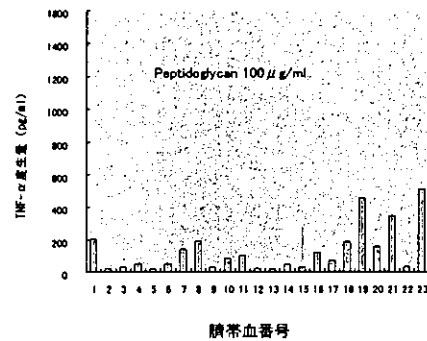


図1 アレルギーの予知と予防研究のためのコホートのセットアップ

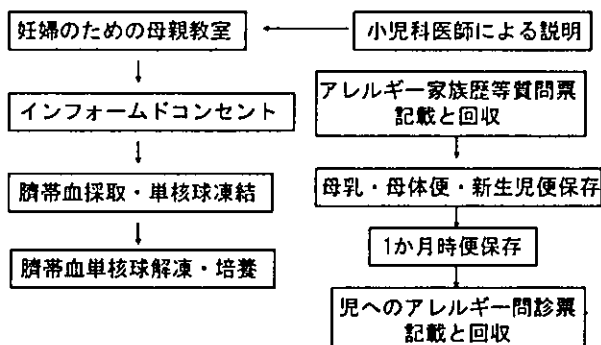


図5 4種類の腸内細菌刺激による
臍帯血単核球からのTNF- α 産生能

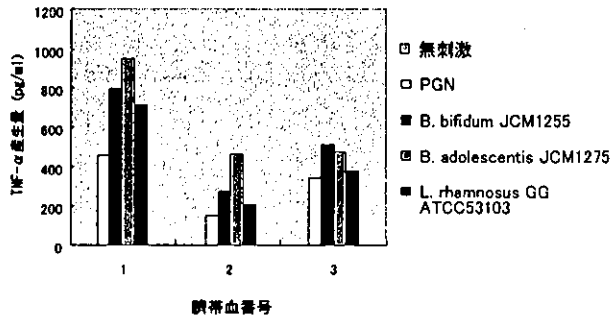


図8 臍帯血単核球におけるサイトカイン産生誘導能の差異
(複数検体での比較)

10⁵ CD14 enriched cells cultured for 24 hrs with 4 μ g/ml of bacteria (n = 9)

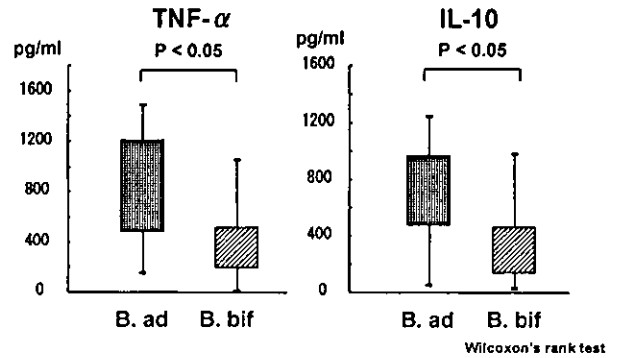


図6 臍帯血単核球におけるサイトカイン産生誘導能の差異

4x10⁵ mononuclear cells cultured for 24 hrs with 10 μ g/ml of bacteria n = 24

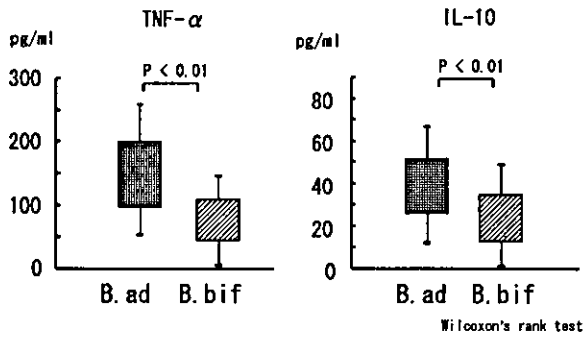


図9 アレルギー発症に関わる内因性および外因性因子

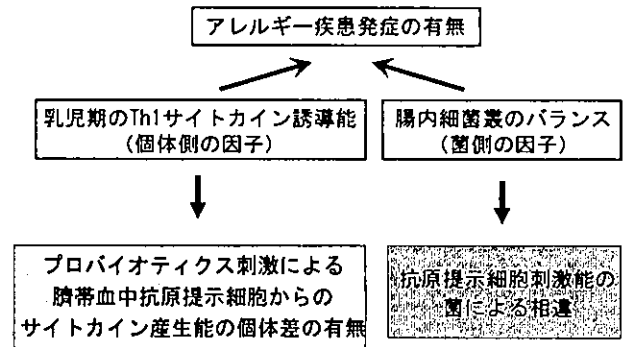
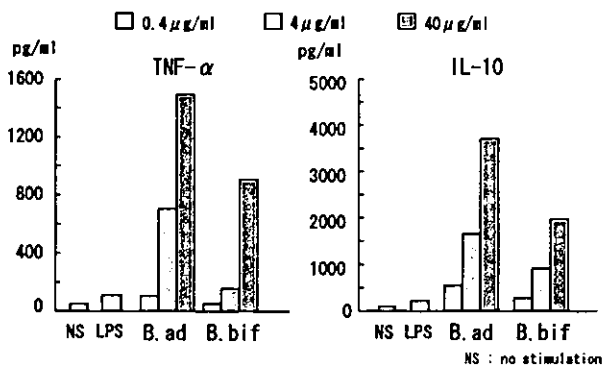


図7 臍帯血単核球におけるサイトカイン産生誘導能の差異
(菌濃度による比較)

10⁵ CD14 enriched cells cultured with bacteria for 24 hrs



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究
—食品のもつ免疫調節機能、アレルギー予防機能の評価方法の確立—
食品のもつ免疫調節機能の評価方法：網羅的遺伝子発現の解析

分担研究者 戸塚 護 東京大学大学院農学生命科学研究科 客員助教授

研究要旨 食品成分の免疫調節機能を評価するシステムの構築を検討するため、マウス胎仔小腸由来の初代培養上皮細胞を用い、細菌成分に対する遺伝子発現応答を解析した。また、食品抗原の経口投与による小腸上皮内リンパ球の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより解析した結果、免疫抑制作用をもつインターロイキン 10 の遺伝子発現増大が判明し、生体内での免疫抑制機能が亢進していることが示唆された。

A. 研究目的

近年、食品成分が免疫系に与える影響の重要性に対する認識が高まっている。プロバイオティクスなどの食品が、免疫調節機能、アレルギー予防機能を有することも明らかにされてきている。その作用は、食品成分に常に曝される腸管免疫系において最も顕著に現れると考えられる。しかしながら、多様な機能を示す腸管免疫系を構成する各細胞の機能、機能発揮に重要な分子や作用メカニズムは十分に明らかにされていない。そのため、食品成分の腸管免疫系に与える影響を評価するための基盤は整っていない。DNA マイクロアレイ、プロテオミクス解析などにより、ある現象に関わる分子を網羅的に解析する手法が確立されつつある。本研究では、このような手法を利用して、食品成分の腸管免疫調節機能を評価するシステムの構築を検討することを目的とする。

本研究では、腸管免疫系を構成する細胞のうち小腸上皮層に存在する細胞、すなわち小腸上皮細胞 (Intestinal epithelial cell; IEC) と小腸上皮内リンパ球 (Intestinal intraepithelial lymphocyte; IEL) を主な対象として解析を行った。腸管上皮は腸管粘膜における感染防御の最前線を形成しており、同時にその存在位置からプロバイオティクス等の食品成分の影響を強く受けることが予想される。

消化吸收機能を担う IEC は、IgA を管腔側へ分泌する機能を有するほか、T 細胞への抗原提示に必須である MHC クラス II 分子を発現し、様々なサイトカインやケモカインを産生する。さらに Toll 様レセプター (TLR) など、感染微生物に保存された分子パターンを認識するパ

ターン認識レセプターを発現することから、それらを介して腸内細菌やプロバイオティクスなどの微生物成分を認識し、腸管免疫系の調節を行っている可能性が考えられている。そこで、本研究ではマウス胎仔小腸由来の初代培養 IEC を用い、細菌成分に対する IEC の自然免疫応答を解析した。

一方、IEL は、小腸上皮細胞に挟まれるように存在する T 細胞であり、その数は IEL 以外の通常のリンパ組織に存在する T 細胞に匹敵するが、これらとは性状が異なる独自の細胞群である。IEL の生理機能として、上皮層の恒常性維持や感染防御、免疫応答の制御などが報告されているが、未だ十分には明らかにされていない。我々はこれまでに、食品成分の摂取が IEL に様々な変化をもたらすことを明らかにしており、本研究では、食品抗原の経口摂取により IEL に生じる変化について、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現の解析により明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

既に確立した初代培養法によりマウス胎仔小腸から調製した IEC を用いて、グラム陰性菌及び陽性菌の主要な細胞壁構成成分であるリポ多糖 (LPS) 及びペプチドグリカン (PGN) に対する免疫関連分子の遺伝子発現応答を調べた。胎生期 16 日目の BALB/c マウス胎仔より摘出した小腸を切開しシート状にした後、約 1 mm の断片に切断した。腸組織片を EDTA 溶液中で浸とうを繰り返した後、腸組織片を 6 cm ディッシュ中で培養した。培養開始 6 日目にコロニーの中心にある小腸組織片を除去し、約 10 日間培養

した。シート状の上皮細胞を回収し、 4×10^4 個/well で 48 ウェルプラスチックプレートにまき直した。24 時間後各ウェルに試料を添加した。試料としては、*Escherichia coli* 0111:B4 由来 LPS (Sigma)、*Staphylococcus aureus* 由来 PGN (Fluka, Buchs, Switzerland) を用いた。5 時間培養した後、細胞を回収し全 RNA を抽出した。逆転写反応により cDNA を合成し、LightCycler™ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いた定量的 PCR 法により、各遺伝子の mRNA 存在量を測定した。各遺伝子における未処理群での発現量を 1.0 とし、細菌成分添加群での相対的な遺伝子の発現量を算出した。相対的な遺伝子発現量は HPRT 遺伝子の発現量が等しくなるように補正を行った。

IEL の機能解析においては、卵白アルブミン特異的 T 細胞レセプター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) を用いた。DO11.10 マウスに 20% 卵白タンパク質を含む飼料 (卵白食) を自由摂取させた場合と対照食 (カゼインを 20% 含む飼料: カゼイン食) を摂取させた場合とを比較して、IEL において mRNA の発現がどのように変化するかについて、DNA マイクロアレイ解析を行った。

まず DO11.10 マウスに卵白食、あるいはカゼイン食を 3 日間自由摂取させた後、各群のマウス小腸から粗精製 IEL を調製した。粗精製 IEL からセルソーターを用いて TCR β^+ あるいは TCR $\gamma\delta^+$ である画分を精製し、これを全 IEL とした。実験によっては、全 IEL からセルソーターを用いて細胞表面分子の発現パターンによって分類される IEL の各サブセット (CD4 $^+$ 、CD8 $\alpha\alpha^+$ 、CD8 $\alpha\beta^+$) を分離精製した。

調製した細胞から全 RNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip® (Murine Genome U74Av2 Array) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。また、いくつかの遺伝子については、各細胞における mRNA 発現を、定量的 RT-PCR 法により解析した。すなわち、調製した細胞から全 RNA を抽出した後、これを鋳型として逆転写反応を行い cDNA を得た。各遺伝子に特異的なプライマーセットを用い、LightCycler™ を用いて定量的 RT-PCR 法による解析を行った。

また、調製した細胞を固層化抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体による刺激、あるいは PMA とイオノマイシンによる刺激を加え、72 時間後の培養上清中に産生されたサイトカイン量をサンドイッチ ELISA 法により測定した。

食品抗原摂取によって変化した IEL の制御性

T 細胞としての機能について、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導腸炎モデルを用いて検討した。7% DSS を加えた蒸留水を飲水として 7 日間自由摂取させることによって DSS 誘導腸炎モデルマウスを作製した。卵白食またはカゼイン食を 3 日間摂取させた DO11.10 マウスから粗精製 IEL (EW-IEL、CN-IEL) あるいは腸間膜リンパ節リンパ球 (EW-MLN) を調製し、BALB/c マウス尾静脈から移入した。1 週間後から 7% DSS 投与を行い、体重変化を測定し、組織の観察を行った。

C. 研究結果

初代培養 IEC を LPS あるいは PGN で 5 時間刺激した場合、どちらのリガンド刺激を加えた時にも炎症性サイトカインである IL-1 β は約 3000 倍、TNF- α は約 500 倍、IL-6 は約 50 倍の遺伝子発現上昇が認められた (図 1)。 $\gamma\delta$ T 細胞の分化誘導に関わる IL-7 もどちらのリガンド刺激を加えた時にも約 10 倍の遺伝子発現上昇が認められた。TGF- β に関しては、発現は認められたが、刺激による発現変化は特に認められなかった。ケモカインについても調べたところ、どちらのリガンド刺激を加えた時にも MIP-1 α (CCL3) は約 100 倍、KC (CXCL1) は約 500 倍、MCP-1 (CCL2) は約 70 倍、ENA-78 (CXCL5) は 100-300 倍、MIP-2 (CXCL2) は 3000-7000 倍の遺伝子発現の上昇が認められた (図 1)。しかし、T 細胞の腸管への遊走に関わる TECK (CCL25) に関しては遺伝子の発現自体は認められたが、刺激による変化は特に認められなかった。LPS、PGN で刺激したときに IL-6 および MCP-1 の分泌量が増加すること、TGF- β 、TECK については産生は認められたが、刺激による変化は認められないことが、タンパク質レベルでも確認された (data not shown)。

細菌やウイルスの感染後に自然免疫系の細胞から分泌されるサイトカインである IL-15 は LPS 刺激を加えた場合のみ約 5 倍の発現上昇が認められ、抗ウイルスサイトカインである IFN- β は 40 倍、IL-12p35 は 5 倍の遺伝子発現上昇が認められた (図 2)。IL-12p40 は LPS 刺激により約 6000 倍、PGN 刺激により 180 倍の遺伝子発現上昇を示し、LPS 刺激の方が著しく強い発現誘導を示した。タンパク質レベルでも IL-12p40/70 は PGN 刺激よりも LPS 刺激においてより強い産生を示した (data not shown)。

パターン認識レセプターのうち、TLR2 はどちらのリガンド刺激を加えた時においても約

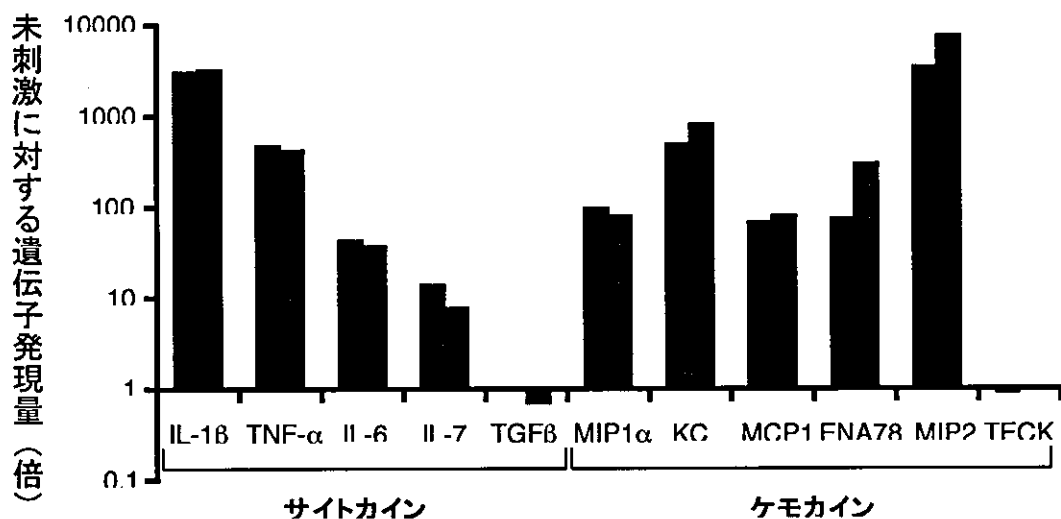


図1. LPS及びPGN刺激に対する初代培養マウスIECのサイトカインおよびケモカイン遺伝子発現応答

BALB/c マウス胎仔小腸由来初代培養 IEC を 1 μg/ml リポ多糖 (LPS : 黒) あるいは 10 μg/ml ペプチドグリカン (PGN : 斜線) 存在下 5 時間培養し、全 RNA を抽出後、定量 RT-PCR 法により各遺伝子の mRNA 量を測定した。

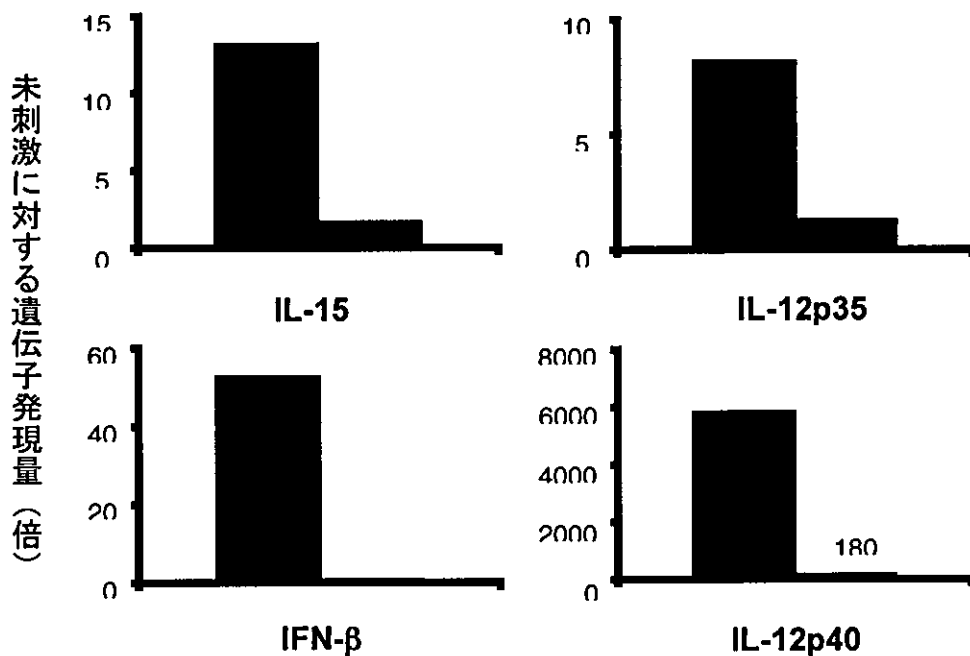


図2. LPS及びPGN刺激に対する初代培養IECの異なる遺伝子発現応答

BALB/c マウス胎仔小腸由来初代培養 IEC を 1 μg/ml リポ多糖 (LPS : 黒) あるいは 10 μg/ml ペプチドグリカン (PGN : 斜線) 存在下 5 時間培養し、全 RNA を抽出後、定量 RT-PCR 法により各遺伝子の mRNA 量を測定した。

10 倍の遺伝子発現の上昇が認められた。TLR3 は LPS 刺激を加えた時のみ約 10 倍の遺伝子発現の上昇が認められた。TLR1、TLR4-9、主にグラム陰性菌のペプチドグリカンがもつジアミノピメリン酸 (DAP) 構造を認識する Nod-1、酵母細胞壁に由来する β グルカンをもつ TLR2 と共同して認識する Dectin-1 は、遺伝子発現自体は認められたが、刺激による変化は認められなかった。

次に、特異抗原を経口摂取した場合に IEL に生じる遺伝子発現変化を解析した。卵白食あるいはカゼイン食を 3 日間経口摂取させた DO11.10 マウスから全 IEL を精製し、全 RNA を抽出したのち DNA マイクロアレイ解析を行った。独立に行った 2 回の実験で、ともに卵白食摂取により mRNA 発現が上昇した遺伝子は 98 個、減少した遺伝子は 24 個、合計 122 個の遺伝子発現の変化が確認された。表 1 には 2 回の実験でともに 3 倍以上の発現上昇が認められた遺伝子を示した。発現が上昇した遺伝子には、Ki-67 抗原やトポイソメラーゼ II、チミジンキナーゼなど、細胞周期および増殖に関する遺伝子が 44 個、また免疫に関連する遺伝子が 14 個認められた。その他、シグナル伝達、アポトーシ

ス、代謝、転写に関わる遺伝子においても発現の変化が認められた。

表 1 に示すように、免疫機能に関連する遺伝子として特に卵白食摂取による発現上昇が顕著であったのは、インターロイキン 10 (IL-10) であった。定量的 RT-PCR 法により解析したところ、全 IEL における IL-10 遺伝子の発現上昇は、3 日間、7 日間、14 日間の卵白食投与によっても認められた。また、卵白食あるいはカゼイン食を 3 日間自由摂取させた DO11.10 マウスから全 IEL を調製し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激を加えた後の培養上清中の IL-10 量を測定したところ、卵白食群で IL-10 の分泌量が増加しており、遺伝子発現で得られた結果との一致が認められた。

次に、DO11.10 マウスの IEL の各サブセットにおける IL-10 遺伝子の発現を解析した結果、CD4 IEL において強い発現が認められたのに対し、CD8 $\alpha\beta^+$ IEL、CD8 $\alpha\alpha^+$ IEL では発現はほとんど認められなかった。また、CD4 IEL を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激した培養上清中には、IL-10 の分泌が認められた。しかしながら、CD4 IEL での IL-10 の発現は、mRNA 発現あるいは培養上清中への分泌のどちらにおいても、卵白

表 1 特異抗原の経口摂取により全 IEL において発現が上昇した遺伝子

Accession No.	遺伝子名	発現倍率 (卵白食群/対照食群)	
		実験 1	実験 2
細胞周期・細胞増殖			
AF002823	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (Bub1)	16.0	26.0
AF016583	checkpoint kinase 1 homolog (Chk1)	11.3	3.5
AW213883	RIKEN cDNA A730011O11 gene (A730011O11Rik)	9.9	4.9
X60980	thymidine kinase 1 (Tk1)	8.0	4.9
AW209238	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	5.7	19.7
AB025409	CDC28 protein kinase 1 (Cks1)	4.9	26.0
M14223	ribonucleotide reductase M2 (Rrm2)	4.9	12.1
U01915	topoisomerase (DNA) II alpha (Top2a)	3.7	42.2
X66449	S100 calcium binding protein A6 (S100a6, calyculin)	3.7	4.0
AJ223087	cell division cycle 6 homolog (Cdc6)	3.5	7.0
AI317217	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (Cdkn3)	3.5	9.8
X82786	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 (Mki67)	3.3	9.8
免疫関連			
M37897	interleukin 10 (IL-10)	9.2	22.6
X15986	lectin, galactose binding, soluble 1 (Lgals1, galectin 1)	3.3	8.0
細胞骨格			
AJ223293	kinesin family member 11 (Kif11)	4.9	13.0
AI591702	kinesin family member 23 (Kif23)	3.5	4.3
転写因子・転写調節			
M90397	B-cell leukemia/lymphoma 3 (Bcl3)	9.2	4.0
代謝・ハウスキーピング			
D55720	karvopherin (importin) alpha 2 (Kona2)	3.3	3.7
シグナル伝達			
AI838080	stathmin 1 (Stmn1)	4.6	21.1
EST			
AI22538	RIKEN cDNA 2810417H13 gene (2810417H13Rik)	4.9	21.1

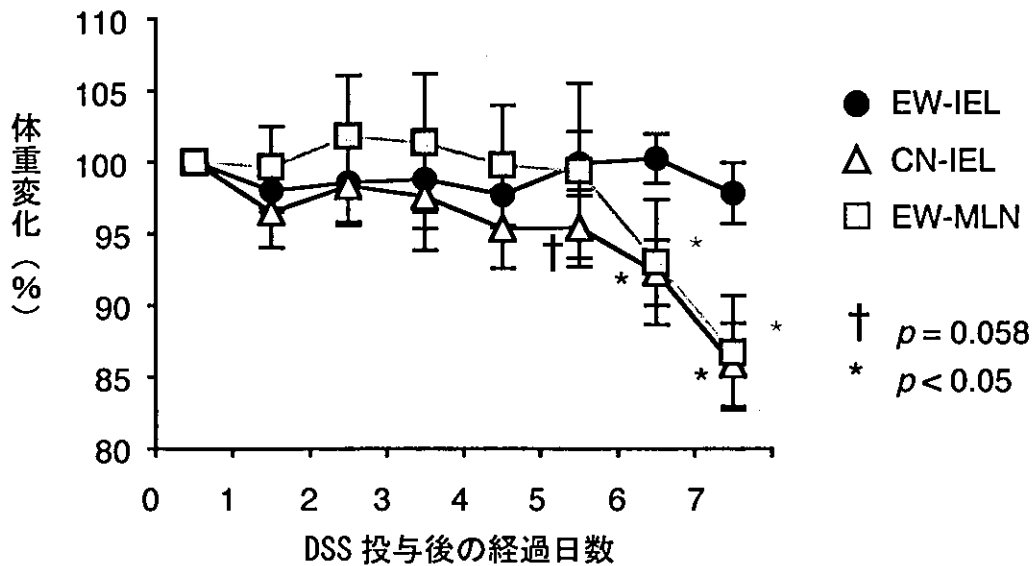


図3. DSS誘導腸炎モデルにおける卵白食群IELの移入による体重減少抑制効果

卵白食またはカゼイン食を3日間摂取させた DO11.10 マウスから調製した粗精製 IEL (EW-IEL、CN-IEL) あるいは腸間膜リンパ節リンパ球 (EW-MLN) を BALB/c マウスに静脈注射により移入した。7日後、7% DSS を含む飲水の投与を開始し、体重変化を測定した。

食群および対照食群の間で顕著な差は認められなかった。一方、卵白食摂取によって CD4⁺ IEL の増加がみられたことから、特異抗原摂取による全 IEL の IL-10 発現上昇は CD4⁺ IEL 細胞数の増加が主に関与していることが示唆された。

IL-10 は一部の制御性 T 細胞で発現するサイトカインであることから、卵白食摂取により IEL に制御性 T 細胞が増加している可能性が考えられた。そこで、DSS 誘導腸炎モデルで IEL の腸炎抑制活性を検討した。卵白食あるいはカゼイン食を3日間摂取させた DO11.10 マウスから粗精製 IEL (EW-IEL、CN-IEL) あるいは腸間膜リンパ節リンパ球 (EW-MLN) を調製し、BALB/c マウス尾静脈から移入した。1週間後から7% DSS 投与を行い、体重変化を測定した結果、CN-IEL または EW-MLN 移入マウスでは DSS 投与6日目以降に有意な体重減少が認められたのに対し、EW-IEL 移入マウスでは DSS 投与7日目まで体重減少が認められなかった (図3)。また腸管組織の所見から、盲腸と近位結腸部において腸炎症でみられる糞便中に混ざる血液量が CN-IEL や EW-MLN を移入したマウスと比較して EW-IEL 移入マウスで減少していることが観察された。以上の結果より、卵白食を摂取することにより、DO11.10 マウス由来の IEL は腸炎抑制活性を獲得することが明らかとなっ

た。

D. 考 察

これまで IEC の細菌成分に対する応答は主に培養株を用いて研究されているが、培養系ごとに反応性が異なり見解の一致を得ていない。本研究では、マウス胎仔小腸に由来する初代培養 IEC を用いることにより、細菌成分に対する応答を検討した結果、LPS、PGN による刺激に対して様々な遺伝子発現、サイトカイン分泌などが観察され、細菌成分に対する応答を観察するのに適した系であることが明らかとなった。

IEC 細胞株を用いた実験では PGN などの TLR2 リガンドに対して応答性が低いことが報告されているが、我々は酪酸の存在下でのみ IEC の TLR1 および TLR6 の発現が上昇し、TLR2 リガンドに反応できるようになることを明らかにしている。本研究で用いた初代培養 IEC では TLR1 および TLR6 が十分発現していることが考えられる。一般にクリプト部から分化したばかりの成熟段階の IEC は細菌成分に対する感受性が高いといわれており、用いた初代培養 IEC の応答はクリプト部に近い上皮細胞の状態を反映しているのかもしれない。また、胎仔マウスに由来することから、出生直後の上皮細胞の状

態を反映している可能性も考えられる。

初代培養 IEC の LPS と PGN に対して異なる発現応答をする遺伝子が認められた。この遺伝子発現の違いが腸内におけるグラム陰性菌とグラム陽性菌に対する応答を反映しているのかもしれない。しかしながら、同じ菌種に属するものでも菌株毎に免疫系に対する作用が異なることも知られており、実際には細菌は LPS, PGN 以外の成分が IEC の応答誘導に関与していることが予想される。今後、実際にマウス免疫系に作用する乳酸菌株と対照菌株に対する初代培養 IEC の応答について、網羅的な遺伝子発現応答解析を行うことにより、免疫系に対する作用を評価する上でのマーカーとなる遺伝子を明らかにできる可能性がある。我々がこれまでにヌクレオチドが IEC の IL-7 産生を増強することを明らかにしているように、プロバイオティクス以外にも様々な食品成分が IEC の遺伝子発現を変化させることによって腸管免疫を調節していることも予想される。マウス個体において免疫調節機能を有する食品成分について、マウス初代培養 IEC に対する作用を観察することでその作用メカニズムを評価することが可能となることも考えられる。

一方、食品成分の IEL に対する作用としては、同じくヌクレオチドやリンゴポリフェノールの経口摂取が IEL の $\gamma\delta$ TCR⁺ IEL サブセットの数を増大させることをこれまでに明らかにしている。今回は食品成分の経口摂取が IEL にどのような遺伝子発現変化をもたらすかについて、実際に DNA マイクロアレイ解析を行って検証することを目的として、まず遺伝子発現変化を観察しやすいと考えられる、IEL が特異的に認識する抗原を経口投与した場合について解析を行った。

独立した 2 回の実験を行ったが、どちらか 1 回のみで遺伝子発現変化が認められたものも数多く認められた。生体に経口投与した場合に確実に起こっている遺伝子発現変化を明らかにするには、複数回の実験を行い、いずれの実験においても変化が認められるものをその後の検討の対象とすることが適当であると考えられる。しかしながら、発現変化は小さいが生体内においては重要な意味をもつ変化であり、微弱な変化であるが故に検出されにくいものもあることが考えられるため、その点は注意が必要であろう。

本研究の結果、食品抗原摂取により IEL では、細胞増殖・細胞周期に関連する多数の遺伝子の発現が上昇することが明らかとなり、(1) IEL

が腸管上皮層において増殖した、あるいは (2) 経口抗原を認識して増殖した T 細胞が腸管上皮層に侵入し IEL となった、のいずれかであると考えられる。今後の研究により、この 2 つの可能性のどちらが正しいかを明らかにする必要がある。

免疫応答に対して抑制的に機能する IL-10 の遺伝子発現が、卵白食摂取により IEL において顕著に上昇したことから、IEL は IL-10 産生を介して経口免疫寛容現象、あるいは腸管における炎症反応の抑制において機能を果たしている可能性が示唆された。実際、DSS 腸炎モデルにおいて、卵白食摂取群 IEL のみが体重低下を抑制しており、抗原経口摂取によって IEL に免疫抑制機能が付与される、あるいは亢進されることが示唆された。IEL における IL-10 遺伝子発現は、CD4⁺IEL サブセットにおいて顕著に認められたことから、この腸炎症抑制機能の亢進には、CD4⁺IEL サブセットの IL-10 を介したメカニズムが推測される。今後この細胞の機能を詳細に検討することにより、腸管免疫のメカニズムの一端を明らかにすることができると考えられる。食品成分の免疫調節機能の作用点としての IEL の特性・機能や、そのバイオマーカーを明らかにすることは機能評価系の構築に資するものと考えられる。

E. 結論

食品成分の免疫調節機能の評価系構築を目的として、腸管免疫系における食品成分の重要な作用点と考えられる 2 つの細胞、すなわち IEC と IEL の食品成分に対する遺伝子発現解析を中心とした検討を行った。IEC については、我々の構築したマウス初代培養 IEC がプロバイオティクスなどの細菌成分に対する応答を解析するために有用であることが明らかとなった。また、LPS と PGN による刺激で異なる発現を示す遺伝子を明らかにした。

IEL については、食品成分摂取の有無による遺伝子発現の変化について実際に DNA マイクロアレイ解析を行い、特異抗原の経口摂取で細胞増殖・細胞周期関連の遺伝子、免疫機能関連遺伝子の発現が増大していることを明らかにした。また、IL-10 遺伝子の発現上昇が認められたことから、IEL の制御性 T 細胞としての機能が予想され、腸炎モデルにおいてその機能を検討したところ、特異抗原摂取群 IEL にのみ腸炎抑制機能が認められた。IEL は免疫調節機能を有するものと考えられ、食品成分の免疫調節機能

の作用点としての IEL の重要性が示唆された。

本研究により、今後、マウス初代培養 IEC やその他の腸管免疫細胞に対する *in vitro* での食品成分の作用、また食品成分を経口摂取させた場合の IEL やその他腸管免疫細胞の変化を検討するための、実験基盤を構築することができたものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Saegusa, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and T. Hosoi: *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 41, 227-235 (2004).
- 2) R. Takato-Kaji, M. Totsuka, W. Ise, M. Nishikawa, S. Hachimura and S. Kaminogawa: T-cell receptor antagonist modifies cytokine secretion profile of naive CD4⁺ T cells and their differentiation into type-1 and type-2 helper T cells. *Immunology Letters*, 96 (1), 39-45 (2005).
- 3) 戸塚護, 山田潔: 特異抗原経口投与時における小腸上皮内リンパ球の遺伝子発現変化. *臨床免疫*, 43 (2), 156-161 (2005).

2. 学会発表

- 1) S. Morishita, K. Yamada, H. Kamada and M. Totsuka: Expression of immune-associated molecules in primary-cultured murine intestinal epithelial cells stimulated with microbial components. The seventeenth annual and international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology - JAACT2004 (Nagoya), 2004 年 11 月.
- 2) K. Kotani, K. Yamada, N. Iwasaki, S. Kaminogawa, and M. Totsuka: Analysis of gene expression in intestinal intraepithelial lymphocytes induced by oral administration of the specific food antigen. The seventeenth annual and international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology - JAACT2004 (Nagoya), 2004 年 11 月.
- 3) 森下聡、山田潔、中村吉孝、戸塚護: マウス初代培養小腸上皮細胞の乳酸菌に対する応答. 2004 年度第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌)、2004 年 12 月.
- 4) 穂山浩、佐藤雄嗣、渡邊敬浩、長岡恵、吉岡

靖雄、庄司俊彦、神田智正、山田潔、戸塚護、合田幸広、米谷民雄: 食物アレルギー経口感作におけるリンゴプロシアニジンの抑制効果. 2004 年度第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌)、2004 年 12 月.

- 5) 小谷康介、山田潔、上野川修一、戸塚護: 食品抗原摂取および *in vitro* 抗原刺激による小腸上皮内リンパ球の IL-10 遺伝子発現変化. 2005 年度日本農芸化学会 (札幌)、2005 年 3 月 (予定).
- 6) 森下聡、山田潔、中村吉孝、矢島高二、戸塚護: マウス小腸上皮細胞の炎症性サイトカイン発現に対する乳酸菌 DNA の抑制効果. 2005 年度日本農芸化学会 (札幌)、2005 年 3 月 (予定).
- 7) 鎌田啓明、山田潔、中村吉孝、矢島高二、戸塚護: マウス脾臓 B 細胞の IgE 産生に対するビフィズス菌の直接的な抑制効果. 2005 年度日本農芸化学会 (札幌)、2005 年 3 月 (予定).
- 8) 小関千愛、山田潔、森下聡、戸塚護: 抗原特異的な T 細胞増殖に対する初代培養マウス小腸上皮細胞の抑制効果. 2005 年度日本農芸化学会 (札幌)、2005 年 3 月 (予定).
- 9) 三枝静江、戸塚護、上野川修一、細井知弘: *Saccharomyces cerevisiae* および *Candida albicans* に対する好中球様 HL60 細胞のサイトカイン産生応答. 2005 年度日本農芸化学会 (札幌)、2005 年 3 月 (予定).

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究
—食品のもつ生活習慣病（主にがん、循環器疾患、精神疾患）予防効果の評価方法の確立—
食品のもつ生活習慣病（がん、肥満等）の予防効果の評価方法

分担研究者 池上 幸江 大妻女子大学家政学部 教授
研究協力者 青江誠一郎 大妻女子大学家政学部 助教授
堀口美恵子 大妻女子大学家政学部 講師

研究要旨

いわゆる健康食品では、各種の生活習慣病の予防を標榜しているものが多い。これらの一部は科学的な根拠が明確にされれば、特定保健用食品としての申請も可能である。しかし、食品には疾病の治療や予防を標榜することが原則としては許されないところから、その限界を明確にすることも必要である。

本研究は生活習慣病予防を標榜する健康食品を対象として、その科学的根拠について検討することとした。とくに広く販売されているがん予防効果と肥満・脂質代謝に関わる健康食品の評価法の確立とそれらの効果の可能性を明らかにすることとした。

本年は、これらの研究目的に関わるEUにおける科学的根拠の調査研究報告書(PASSCLAIM)を検証し、この考え方を基本としながら評価方法について検討した。がん発生予防を標榜する健康食品成分については、Ames 変異原性試験を応用し、その有効性を抗変異原性の面から評価する試験法を確立した。すなわち、使用菌株には各種損傷ヌクレオチドの除去修復能を欠損する *Salmonella typhimurium* を用いることによって、遺伝子損傷の種類を変えた条件において、健康食品成分が直接的に作用することが確認できる系を確立した。他方、肥満・脂質代謝改善の評価を行う試験法としては、リタイアラットに卵巣摘出術を施し、さらにフルクトース食を摂取させることによって、肝臓、血清脂質並びに蓄積脂肪が増加する系の有効性を明らかにした。この系では脂肪細胞の肥大傾向も確認し、肥満に対する効果の確認に利用できることを明らかにした。

今後はさらに新たな評価法を検討し、また実際の健康食品への適応によって評価法の確立をめざす。

A. 研究の目的

本研究は生活習慣病予防を標榜する健康食品を対象として、その科学的根拠について検討することとした。とくに広く販売されているがん予防効果と肥満・脂質代謝に関わる健康食品の評価法の確立とそれらの効果の可能性を明らかにすることとした。

現在EUにおいては食品の健康強調表示についてその科学的根拠と可能な表示の範囲、さらにそれに基づく法律整備が行われている。この動向はCODEXにおける食品の健康強調表示の議論にも強い影響を与えている。すでに科学的根拠と表示の範囲についての考え方はPASSCLAIM (Process for Assessment of Scientific Support for Claims on Foods)の通称の下に2つの報告書が公表されている。そこで、本年は本研究の対象範囲に該当する部分について、EUにおける考え方を整理し、我々の研究の方向性の参考とした。

がん予防効果に関する研究では、DNA損傷の抑制に注目した。生体内のDNAは、環境変異原物質や紫外線などの外的要因に加え、細胞内で発生する活性酸素などの内的要因によって、常に損傷を受けている。DNA損傷の中でも酸化的DNA損傷は、老化や発がんの原因損傷として注目を集めている。一

方、食品成分の中には抗酸化作用などにより、DNA損傷の誘発を抑制する機能性成分が存在するものと思われる。本研究では突然変異を検出するAmes変異原性試験を応用し、健康食品成分の有効性を抗変異原性の面から評価する試験系を確立することを目的とした。

近年、瘦身作用を標榜または暗示する健康食品が上市されているが、有効性について科学的根拠が明らかではないものが多い。また、一方で肥満発症モデル動物がいくつか提案されているが、健康食品の有効性評価に適した実験系を探索する必要がある。そこで本研究では、肥満発症モデル動物における食餌因子の応答性を把握し、健康食品成分の有効性評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) PASSCLAIMにおける科学的根拠の考え方

PASSCLAIMの報告書は2003年と2004年にいずれもヨーロッパにおいて発行されている栄養学関係の学術誌の別刷として公表されている。その中から機能性食品の健康強調表示の種類とその科学的指標の関連に対する考え方、がんと食事に関する科学的根拠、体重抑制と食事の関連と機能性表示、心臓血

管疾患と食事の関連と機能性表示の部分についてまとめた。

使用資料名:

① European Journal of Nutrition:42(1), supplement (2003)

② European Journal of Nutrition:43(2), supplement (2004)

2) がん発生予防を標榜する健康食品成分の有効性の評価

①使用菌株

変異原性試験に用いた菌株としては、Ames 氏らによって分離された *S.typhimurium* LT-2 株由来の TA 株、および国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部で作成された YG 株を用いた (Table 1)。これらの菌株は細胞膜のリポ多糖の一部が欠如しているため、化学物質の膜透過性が増しており、突然変異を鋭敏に検出することが可能である。TA1535、YG3001 はヌクレオチド除去修復機能を欠失しているため、変異原に対して高感受性である。YG3001、YG3002、YG3003 はそれぞれ TA1535、TA1975、TA102 に対する *mutM_{ST}* 欠損株であり、7、8-ジヒドロ-8-オキソグアニン (8-OHG) の除去修復能を欠失しているため、酸化型変異原に高感受性である。TA1535、TA1975、YG3001、YG3002 はグアニン:シトシン塩基対の損傷に対して、TA102、YG3003 はアデニン:チミン塩基対の損傷に対して高感受性である。

②Ames 試験法

Ames 試験法は、ヒスチジン要求性とした変異株に化学物質を作用させ、ヒスチジン非要求性となった His⁺ 復帰変異を検出する変異原性試験である。本研究ではまず、変異原物質によって誘発される DNA の突然変異を、各種健康食品成分が抑制する効果を効率的に検出するため、ヌクレオチドの除去修復能、および 8-OHG の除去修復能を欠損した上記の菌株を組み合わせて用い、各種化学物質によって誘発される突然変異の種類、および頻度を解析した。サルモネラ菌に対する変異原物質としては、間接型変異原である benzo[a]pyrene (B[a]P)、直接型変異原である過酸化水素水 (H₂O₂)、N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanine (MNNG) を用いた。B[a]P は、蛍光灯 (白色、15W、波長 370~750nm、日立) によって可視光線を照射して活性化させた。

③抗変異原性試験法

Ames 試験で変異誘発性を確認した変異原物質について、健康食品成分のひとつである大豆イソフラボンが DNA の損傷を抑制する作用を検索した。なお、その際、イソフラボンの添加 (1 μmol/1 プレート) によって各菌株が生育阻害を受けないことを、生菌数の測定により確認した。

④統計処理

すべての統計処理は Stat View を使用し、母平均の仮説検定を行った。各測定結果は平均値 ± 標準偏差で示し、有意水準は 5% とした。

3) 肥満・脂質代謝に関与する健康食品成分の有効

性の評価

①動物実験

実験飼料の組成を Table 2 に示す。実験飼料は、AIN-76 組成を基本としスクロースまたはフルクトースを糖質源とした飼料を用いた。体重 310~320g のリタイア SD 系雌ラット (日本エスエルシー株式会社) に卵巣摘出手術を施し (OVX)、1 週間の回復期間の後、1 群 8 匹の 2 群に群分けをし、Table 2 に示した実験飼料と水を 5 日間自由摂取、26 日間ペアフィーディングし、計 31 日間を飼育期間とした。また、同様に擬手術 (Sham) 群も実験飼料をそれぞれ同期間与えた。体重および飼料摂取量は連日測定し、飼料効率を「体重増加量 ÷ 飼料摂取量 × 100」の式にて算出した。なお、飼育環境は、室温 22 ± 1°C、湿度 50%、12 時間明暗サイクル (12:00~24:00) とした。

糞は、解剖前の 3 日間採取し、表面を洗浄して、凍結乾燥後、粉碎し、ステロール分析用試料とした。実験 31 日目の 17:00 より絶食させ、最終日 (32 日目) にエーテル麻酔下で開腹し、心臓より採血、肝臓、後腹壁脂肪を摘出し、重量を測定した。重量測定後、それぞれの臓器は凍結乾燥後に粉碎し、分析用の試料とした。

②血清脂質の分析

採取した血液は、血清を分離し、総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度を分析した。血清 VLDL+LDL-コレステロール濃度は、総コレステロール濃度から HDL-コレステロール濃度を差し引いて算出した。総コレステロール濃度の定量には「コレステロール E-テストワコー」、HDL-コレステロール濃度の定量には「HDL-コレステロール E-テストワコー」、トリグリセリド濃度の定量には「トリグリセリド E-テストワコー」、リン脂質の定量には「リン脂質 C-テストワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社) を使用した。

③肝臓脂質の分析

肝臓を凍結乾燥、粉碎し、クロロホルム:メタノール (2:1) 溶液を用いた Folch 法より抽出、水洗後、総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度を分析した。総コレステロールの定量には「コレステロール E-テストワコー」、トリグリセリドの定量には「トリグリセリド E-テストワコー」、リン脂質の定量には「リン脂質 C-テストワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社) を用いた。

④脂肪細胞の分析

後腹壁脂肪組織は、ホルマリンに浸漬して固定した後、5 μm に切り出し、脱水、脱脂、パラフィン浸透、パラフィン包埋、薄切、伸展、乾燥後、ヘマトキシリン・エオジン染色し、封入した。各脂肪細胞を光学顕微鏡で観察し、標本をデジタルカメラで撮影した。同時に撮影したスケール付きのプレパラートの目盛りから、各脂肪細胞の直径を NIH Image 1.62 を用いて計測した。

⑤統計解析

すべての統計処理は食事 (糖質の違い) と卵巣摘

出(卵巣の有無)を因子とした二元配置の分散分析を行った。全ての項目において交互作用が有意ではなかったため、主効果について有意差を表示した。測定結果は平均値±標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

C. 研究結果

1) PASSCLAIMにおける科学的根拠の考え方

① EUにおける食品の健康強調表示の考え方

1998年ECでは、Functional Foods Science in Europe(FUFOSE)の共同プロジェクトをつくり、健康強調表示に対する概念とその科学的根拠の考え方の提言を行った。このFUFOSEプロジェクトの実際的な活動はPASSCLAIMによって実施され、全体的な表示の考え方と8つのテーマに分かれて、それぞれの研究の到達点や問題点を、食事や食品成分との関連性、可能な表示内容、測定可能なマーカーと測定方法などを中心として整理している。

Fig.1には生理的なマーカーと表示内容の関係が示されている。摂取された成分はまず体内に吸収されることが必要である。ターゲットとなる臓器や組織においてその成分が作用することによって一定の生理的な変化がおこる。この変化がこれまでの研究からどの程度の確実性や可能性があるかが、文献的に検証されている。ここで科学的な根拠が明確に検証できるものであれば、それは機能性食品として認められ、一定の表示が可能である。

他方、最終的な疾病発症に改善が及ぶことが科学的に検証されれば、それは疾病リスク低減表示としての健康強調表示が可能となる。

具体的に健康強調表示に対する科学的な根拠に関するこれまでの研究結果の整理と表示の可能性が検討された8つのテーマは以下のとおりである。前半の4つは2003年に後半の4つは2004年に報告されている。

1. 食生活に関係する心臓血管疾患
2. 骨の健康と骨粗鬆症
3. 運動能力とフィットネス
4. 各国の制度と評価方法の検証
5. 体重制御、インスリン感受性と糖尿病のリスク
6. 食事が関与するがん
7. 精神状態と行動能力
8. 腸の健康と免疫

これらのうち、我々の研究テーマに関連のある部分について以下にまとめた。

② 食事が関連するがん

食事が関連するがんとしては、結腸がん、肺がん、乳がん、前立腺がんに限定している。がんと食事や食品成分の関連についての可能な表示、その根拠となるマーカーなどはTable 3 にまとめた。現在のわが国の食薬区分の考え方から判断すると、がん予防に対する食品成分の健康強調表示の可能性はないであろう。疾病リスク低減表示に限定されている。しかし、PASSCLAIMではきめの細かい表示の可能性が考え

られている。現在わが国で販売されている健康食品については、どこまで有効性があるのか、今後EUのような表示の可能性を考える方向性はあるのだろうか。また、動物実験の成績も考慮されようとしていることは、十分検討が必要である。

③ 食事が関連する心臓血管疾患

心臓血管疾患に関連するマーカーとしては、報告書ではコレステロール、脂質トリポたんぱく質代謝、血栓形成、酸化損傷、ホモシステイン代謝、血圧が取り上げられた。それぞれの研究成果から食品への表示として可能性が高い指標ではLDLコレステロールと血圧があげられている。ここではとくに脂質代謝関係を取り上げ、血清脂質に影響する食品成分に可能な健康強調表示の内容については、Table 4にまとめた。

ここでは、わが国の現在の特定保健用食品における表示の実態を考慮して、血清や肝臓脂質成分への影響を考えるとともに、今後は脂質代謝の遺伝子レベルにおける変化から脂質代謝の分子生物学的なレベルにおける検証を行うことで、脂質レベルの変化の妥当性を明らかにしていくことを念頭において、報告書をまとめた。

④ 食事や食事成分による体重抑制

体重抑制はインスリン感受性との関連、ひいては糖尿病予防を最終目的としてまとめられているが、ここではその中から体重抑制の部分を引き出してTable 5にまとめた。

わが国では糖尿病予防というよりは、若い女性を中心としたやせ願望のひろがり背景として、様々なダイエット食品が氾濫している。我々はそれらの健康食品にどれだけの科学的な根拠があるのかを明らかにするために、PASSCLAIMからその示唆を得ようとした。

Table 5では、体重抑制の最終機能と関連マーカーを示した。これらの一部はすでにわが国の特定保健用食品の表示として採用されている。我々はさらに体重抑制のメカニズムの分子生物学的な指標も検証を計画している。報告書では、甲状腺ホルモン、グルココルチコイド、成長ホルモン、レプチンとレプチン受容体、ニューロペプチドYと関連指標、 β -3アドレナリン受容体、セロトニン、PPAR- γ 、グルカゴン様ペプチド1、グレリンなどの指標の変化から考察できる可能性を示唆している。

2) がん発生予防を標榜する健康食品成分の有効性の評価

① B[a]Pによる突然変異誘発能

B[a]Pの各菌株に対する突然変異誘発能の用量依存性を調べた結果、B[a]Pを1プレート当たり2.5 μ g添加した場合にTA1535、TA1975、YG3001、YG3002の復帰突然変異体数が最大値を示した。これより、以下の実験ではB[a]Pの添加量を1プレート当たり2.5 μ gと設定した。なお、TA102とYG3003ではB[a]Pによる突然変異の誘発が認められなかった。Fig. 2に可視光線、および可視光線で活性化した

Table 1 Genotypic character of the *Salmonella typhimurium*

Strains	Description	Source
TA1535	As TA1975 but $\Delta(gal\ bio\ chl\ uvrB)$	Maron,D.M.
TA1975	As LT2 wild-type stain but <i>hisG46 rfa</i>	Maron,D.M.
TA 102	As LT2 wild-type stain but <i>hisD(G) 8476rfa/pAQ1/pKM101</i>	B.N.Ames
YG3001	As TA1535 but <i>mutM_{ST}</i> Km ^r	Suzuki,M.
YG3002	As TA1975 but <i>mutM_{ST}</i> Km ^r	Suzuki,M.
YG3003	As TA102 but <i>mutM_{ST}</i> Km ^r	Suzuki,M.

Table 2 Composition of the test diet(%)

	Sucrose diet	Fructose diet
Casein	20	20
DL-methionine	0.3	0.3
Corn oil	1	1
Lard	9	9
Mineral mixture*	3.5	3.5
Vitamin mixture*	1	1
Cellulose	5	5
Choline bitartrate	0.2	0.2
Corn starch	15	15
Sucrose	45	—
Fructose	—	45

*This was identical with AIN-76 mixture.

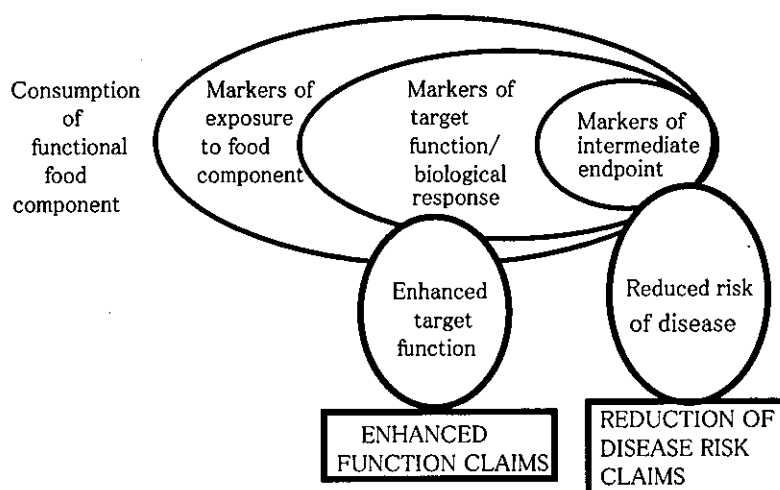


Fig.1 Functional foods: a proposal for a scientific basis for claims

Table 3 Possible claim and markers/targets in diet-related cancer

Possible claims	Markers/targets	Supportive data from animals/in vitro studies	Evidence from human studies	Target group	Potential application of marker for claim
Reduction in exposure to carcinogens	Gut enzymes	+++	++	Healthy population High risk persons	A
	Gut metabolisms				
	Faecal cytotoxicity DNA adducts (DNA strand breaks) (Cytogenetic effects)				
Inactivation of carcinogens	Biotransformation of carcinogens(e.g.GSTs)	++	+	Healthy populations	A
Reduction of DNA damage	DNA strand breaks DNA repair	+	+	Healthy populations	A
	Cytogenetic effects (Apoptosis)				
Modulation of cellula events	Proliferation	+++	++	Healthy populations Patients	A
	Differentiation				
	Apoptosis COX-2				
Prevention of precancerous lesions	Aberrant crypt foci Polyps	+++	++	Healthy populations High risk persons Patients	A
Prevention of tumors	Tumours in animals	+++	-	Healthy population High risk persons	A
Inhibition of tumour progression	Angiogenesis	++	+	Patients	A
	Metastasis				

Table 4 Biomarkers and possible claims in lipid metabolisms

Biomarkers	Possible claims
Serum total cholesterol	Can help to lower cholesterol as part of a low-fat diet Can help to reduce cholesterol as part of a low-fat diet Can be beneficial in reducing cholesterol concentrations As part of a low-fat diet Lowers cholesterol Regulates cholesterol Controls cholesterol Reduces cholesterol concentrations Helps reduce cholesterol Helps reduce cholesterol Helps maintain a healthy heart
HDL-cholesterol	May increase HDL-cholesterol concentrations
Fasting and postprandial Triacylglycerol	May lower triacylglycerol concentrations(after a meal)
Lipoprotein	May improve your lipoprotein profiles

Table 5 Target function and possible claim in reduced body weight

Target function	Claims based on modification of markers
Reduced the risk of body weight Contributes to body weight reduction Decreases body fat Reduces body fat Reduces abdominal fat	Helps to reduce energy/food intake Reduces appetite Increases satiety Increases metabolic rate/energy expenditure Increases lipid oxidation

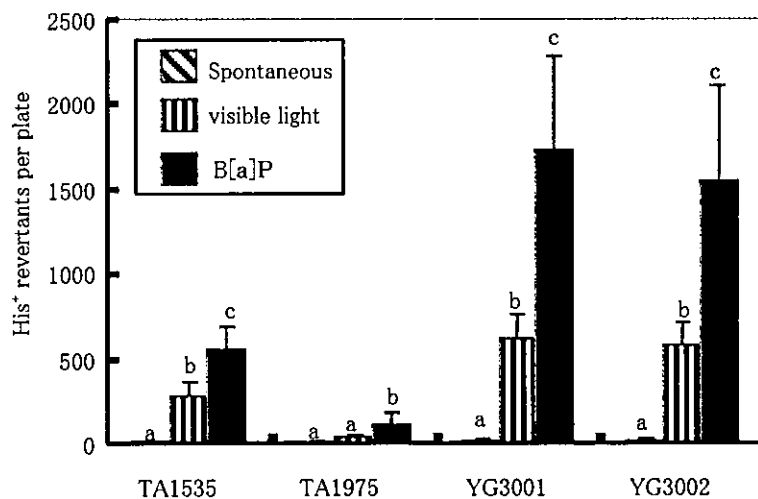


Fig. 2 Mutagenic sensitivities of 8-OHG repair deficient *S. typhirium* strains to BP in the presence of visible light

Significantly different between the different symbols ($p < 0.05$)

B[a]P による突然変異誘発能を示した。自然突然変異に比べ可視光線照射では、TA1535、YG3001、YG3002における突然変異体数がそれぞれ31倍、41倍、44倍と有意に増加した。さらに可視光線照射に比べB[a]Pでは、TA1535で2.0倍、TA1975で3.2倍、YG3001で2.8倍、YG3002で2.7倍、それぞれ有意に増加した。

②H₂O₂による突然変異誘発能

H₂O₂の各菌株に対する突然変異誘発能の用量依存性を調べた結果、H₂O₂を1プレート当たり0.25μgを添加した場合にYG3003、TA102の復帰突然変異体数が最大値を示した。これより、以下の実験ではH₂O₂の添加量を1プレート当たり0.25μgと設定した。なお、TA1535、TA1975、YG3001、YG3002ではH₂O₂による突然変異の誘発が認められなかった。Fig. 3にH₂O₂による突然変異誘発能を示した。自然突然変異に比べH₂O₂では、TA102で1.5倍、YG3003で5.1倍、それぞれ有意に増加した。

③MNNGによる突然変異誘発能

MNNGの各菌株に対する突然変異誘発能の用量依存性を調べた結果、MNNGを1プレート当たり0.5μg添加した場合にすべての菌株の復帰突然変異体数が最大値を示した。これより、以下の実験ではMNNGの添加量を1プレート当たり0.25μgと設定した。Fig. 4にMNNGによる突然変異誘発能を示した。自然突然変異に比べTA1535で105倍、TA1975で1431倍、TA102で28倍、YG3001で79倍、YG3002で105倍、YG3003で31倍それぞれ有意に増加した。

④B[a]Pの変異原性を抑制する大豆イソフラボンの影響

Fig. 1に示したB[a]Pの変異原性をイソフラボンのアグリコンであるゲニステイン、ダイゼイン、グリシチン、および配糖体であるゲニスチン、ダイジン、グリシチンが抑制する効果を調べた(Fig. 5)。その結果、TA1535、TA1975、YG3001、YG3002の各菌においてイソフラボンによる抑制効果が認められた。なお、ゲニステインとダイゼインについてはすべての菌株でそれぞれの配糖体より強い抑制効果が認められた。

3) 肥満・脂質代謝に関与する健康食品成分の有効性の評価

①成長結果

成長結果をTable 6に示す。初体重には有意差が認められなかったが、終体重、体重増加量ならびに飼料効率は、スクロース群が、フルクトース群に比べて有意に高かった(p<0.05)。また、各糖質群ともにOVX群がSham群に比べて有意に高いことが認められた(p<0.05)。飼料摂取量は、ペアフィーディングを行ったが、Sham群は共通して飼料摂取量が少なく、有意差が認められた。

②臓器重量

解剖時に摘出した臓器重量の結果をTable 7に示す。卵巣摘出によりOVX群の子宮重量が著しく減少した(p<0.05)。また、成長結果とは逆に、フルクトース

群がスクロース群より肝臓重量が重い傾向にあった(p=0.05)。後腹壁脂肪ならびに子宮重量は、各群間に有意差は認められなかった。

③血清脂質濃度

絶食解剖時に採血して分離した血清の脂質濃度をTable 8に示す。血清総コレステロール濃度はフルクトース群で有意に高い値を示した(p<0.05)。血清HDL-コレステロール濃度には差がなく、したがって、両者の差より算出した血清VLDL+LDL-コレステロール濃度はフルクトース群で高く、卵巣摘出(OVX群)でさらに高くなることが認められた(いずれもp<0.05)。血清トリグリセリド濃度はフルクトース群で有意に低かった(p<0.05)。血清リン脂質濃度には各群間に有意差が認められなかった。

④肝臓脂質濃度

肝臓に蓄積した脂質量をTable 9に示す。肝臓コレステロール、トリグリセリド、リン脂質ともにフルクトース群で有意に高い値を示した(p<0.05)。卵巣摘出の影響はトリグリセリド量がOVX群で高い傾向にあったが有意差は認められなかった(p=0.09)。

⑤フルクトース群の後腹壁脂肪の細胞の大きさ

フルクトース群の後腹壁脂肪細胞の大きさを測定した結果をFig. 6に示す。OVX群で有意に脂肪細胞の大きさが肥大することが認められた。

D. 考察

1) PASSCLAIMにおける科学的根拠の考え方

PASSCLAIMでは健康強調表示を機能性表示と疾病リスク低減表示に分け、それぞれに可能性のある生体指標とその測定法、具体的な表示内容が、これまでの研究論文を基に検討されている。今後この考え方が具体的な表示の審査システムとどのように関わるかは明らかではない。今回我々が本報告書に注目した点は、わが国のいわゆる健康食品について科学的根拠がありうるのか、その評価の方法、実際の商品の可能性を検証するための示唆を得るためであった。

PASSCLAIMの報告書の中から、食事に関連するがん、体重抑制、脂質代謝の部分に注目した。がんでは生体指標とその測定法に基づいて表示の可能性はかなり広くとらえている点が注目された。我々はin vitro からin vivo の系によってがんへの治療や予防を標榜する健康食品について検証する意味を認識できた。体重抑制については、最終目標を糖尿病にしている関係から、わが国のダイエット食品の有効性を評価する考え方としては部分的な示唆に止まった。他方脂質代謝に関しては、最終目標を心臓血管疾患にしている点は、わが国での考え方にも一致するところから、我々の目的にもあっている。今後測定をしようとしている指標は、PASSCLAIMの考え方からさらに代謝のメカニズムにも踏み込んで研究する意義を確認できた。

2) がん発生予防を標榜する健康食品成分の有効性の評価