

図3 Real-time PCR法による舌苔歯周病細菌の比率と呼気中揮発性硫化物濃度との関係

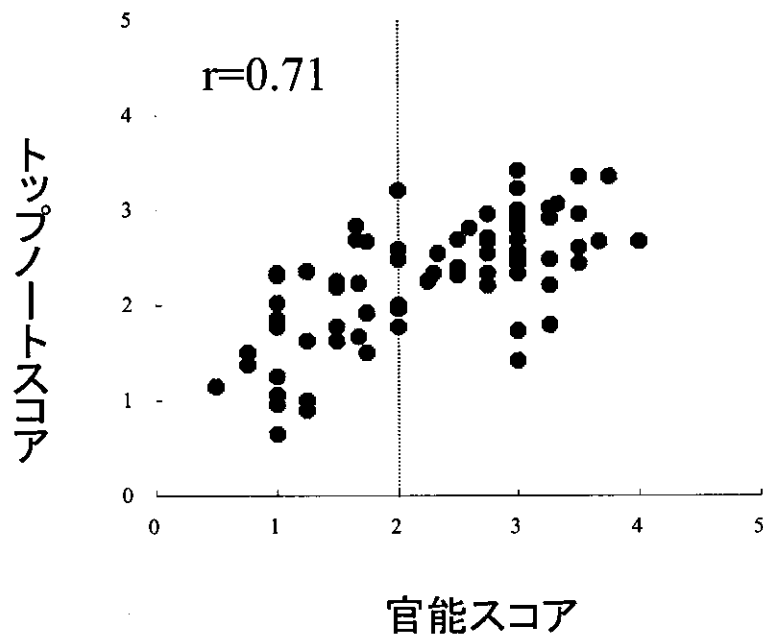


図4 電子嗅覚装置によるヒト呼気口臭強度と官能スコアとの関係

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
—食品の口腔における有効性評価方法の確立—
食品の口腔におけるエナメル質脱灰度の評価方法：人工口腔装置による検討

分担研究者 今井 奨 国立保健医療科学院口腔保健部 室長
研究協力者 岸 光男 岩手医科大学歯学部予防歯科学講座 講師

研究要旨 健康食品の機能評価に人工口腔装置を応用するための検討を行った。人工口腔装置の稼動条件を詳細に検討し、食品評価に適した装置に完成させることを目的として、ヒト口腔内での pH テレメトリー法で有機酸を産生しないことがわかっている食品について、ガイドラインに沿って調製した抽出液の人工口腔装置による評価を試みた。その結果、有機酸非産生食品の抽出液によるバイオフィーム形成、pH 低下、エナメル質脱灰度のいずれもが対照のそれよりも有意に低く、特にエナメル質脱灰度まで評価できる本装置の有用性が示唆された。本装置に用いるエナメル質の初期硬度が評価結果に与える影響をみたところ、初発硬度が低いほど脱灰度が高くなり、使用エナメル質の選択には注意が必要であることが分かった。また、健康食品がう蝕細菌数に及ぼす影響を簡便に評価するための方法として Single step colony direct PCR 法を開発し、その有用性を検討した。その結果、*S. mutans* と *S. sobrinus* の標準株において、Single step colony direct PCR 法とゲノム抽出した従来の PCR 法の結果は完全に一致し、Single step colony direct PCR 法の有用性が示唆された。

A. 研究目的

口腔領域に用いる健康食品、機能性食品の評価を行う場合、これまでヨーロッパや日本ではヒト口腔による評価システムが使われてきた。しかし、ヒトを用いる方法は費用がかかるばかりでなく、年齢差、個体差が大きく倫理問題もあり評価システムとしては問題がないわけではない。そこで、ヒトに替わる信頼性、再現性の高い評価法の構築が必要となる。我々はこれまで医薬品・食品の評価方法に利用可能な人工口腔装置を試作してきた。口腔領域に用いる機能性食品の科学的評価のためには本研究で提案するような人工口腔装置による効果判定が必要であると考える。そこで人工口腔装置の稼動条件を詳細に検討し、食品評価に適した装置に完成させることを目的としている。また、健康食品がう蝕細菌数に与える影響を迅速に評価するため、ミュータンスレンサ球菌迅速検出法として最近開発した Single step colony direct PCR 法の有用性を検討することを目的としている。

本年度はエナメル質脱灰評価に用いるウシ・エナメル質歯片の初発硬度が、ミュータ

ンスレンサ球菌のバイオフィーム下で起こる脱灰度を評価する際にどのように影響するかを検討した。また、すでにヒト口腔内での pH テレメトリー法で有機酸を産生しないことがわかっている食品について、ガイドラインに沿って調製した抽出液の人工口腔装置による評価を試みた。さらにミュータンスレンサ球菌迅速検出のため、ミュータンスレンサ球菌標準株を用いて Single step colony direct PCR 法と従来の PCR 法について比較検討した。

B. 研究方法

1. 人工口腔装置

本装置は3台の人工口腔部分、送液用ポンプ2台、恒温槽、冷却攪拌器3台、pHレコーダから構成されている。上部からは5本のステンレスチューブを固定したシリコン栓を、下部からはドレイン用チューブと平面 pH 電極を逆さに固定したシリコン栓を装着して密閉した。人工口腔部分のウォータージャケットに温水を循環して装置内部を 37℃ に維持した。平面 pH 電極周囲にはテフロン製ホルダーにユーティリティーワックスを

用いて4個のウシエナメル質歯片(3.5mm×3.5mm×1.5mm)を固定した。その上部から糖質含有ハートインフュージョン培地、細菌懸濁液、PBSを連続的に滴下した。対照としてスクロース溶液を、実験群としてチューインガム抽出液を滴下した。細菌として *Streptococcus mutans* MT8148 株または *Streptococcus sobrinus* 6715 株の懸濁液を滴下した。pHを連続的に記録しながら15~20時間滴下を続け、人工プラーク形成に伴ってpHが4付近まで低下した時滴下を終了した。エナメル質歯片上およびpH電極上に形成された人工バイオフィルムを0.5N水酸化ナトリウム溶液で処理して遠心分離し、沈澱物の濁度を500nmで測定して菌体量とした。その上清をフェノール硫酸法によって定量し非水溶性グルカン(WIG)量とした。エナメル質の脱灰度を実験前後のVickers硬度変化(ΔH)から評価した。

エナメル質の初期硬度が人工口腔装置における脱灰度に及ぼす影響を調べるため、初期硬度が240、260、280、300台の4歯片を3基の人工口腔に装着して3段階のミュータンスレンサ球菌の菌体濃度で検討した。

2. ミュータンスレンサ球菌の簡便な弁別定量法 (Single step colony direct PCR法) の開発

ミュータンスレンサ球菌の標準株 (*S. mutans* MT8148, *S. sobrinus* 6715) および幼児から採取した唾液試料株をMSB寒天培地上に接種、培養した。形成された単一コロニーを直接PCR mixtureに投入し、菌種特異的プライマーによるPCR法を行い、BHI液体培地で培養したペレットから抽出したゲノムDNAをテンプレートとした通法のPCR法と比較した。

C. 研究結果および考察

1. 人工口腔装置による特定保健用食品の脱灰性評価

厚生労働省によって特定保健用食品に許可されている食品(再石灰化能をもつオリゴ糖含有チューインガム)について、ガイドラインに沿ってその抽出液を調製し、人工口腔装置によって酸産生能、バイオフィルム形成能、エナメル質脱灰能を評価した。*S. sobrinus* 6715株の菌体懸濁液、HI液体培

地のほか、1%スクロース(対照)またはチューインガム抽出液(実験側)を滴下して、平面電極上に形成されたバイオフィルム直下のpHの経時変化を記録した。図1に示したように対照の場合にpHは滴下3時間ほどから低下し始めて、5時間後にはpH5.5に、15時間後にはpH4.0になった。一方、チューインガム抽出液の場合にはpH低下はみられず、18時間後でもpH6.5であった。実験側のエナメル質歯片の脱灰度は対照のそれに比較して有意に低く(図2)、エナメル質歯片上に形成されたバイオフィルム量も対照に比べて実験側では有意に少なかった(図3)。本チューインガムはヒト口腔内での電極内蔵法によってすでにpH低下を起こさないことが確かめられており、今回の結果はそれを支持するものである。また、今回の実験により本チューインガムがエナメル質の脱灰を惹起しないことが観察され、本実験条件下ではあるが非う蝕誘発性であることが示唆された。

次いで、人工口腔装置による評価に用いるウシ・エナメル質歯片の初期硬度が脱灰度によりにどのように影響をあたえるかを調べた。硬度240、260、280、300台の歯片を用意し、菌体懸濁液も3段階調製した。人工口腔装置稼働後のそれぞれの歯片の脱灰度を調べた結果、初期硬度の低い歯片ほど一定時間後の硬度変化が大きいことが分かった。したがって、人工口腔装置で食品による脱灰度を調べる際には一定の範囲内のエナメル質歯片を揃えて評価する必要があることが示唆された。

2. ミュータンスレンサ球菌の弁別定量法

Single step colony direct PCR法を用いてミュータンスレンサ球菌の同定を行った結果、標準株においても、唾液試料においても従来のPCR法と完全に一致した。幼児集団の唾液試料の分析において、MSB培地上のコロニー形態によるミュータンスレンサ球菌の同定結果は、ミュータンスレンサ球菌の検出頻度を高く評価する傾向にあり、とくに *S. mutans* のCFUでは有意に高く算定される傾向にあった。ヒト口腔内から採取した唾液をミュータンスレンサ球菌の選択培地であるMSB寒天培地で培養したとき、*S. mutans* と *S. sobrinus* のコロニー形態が判別困難なことがある。本研究で検討した

Single step colony direct PCR 法は MSB 培地上のコロニーを直接採取して PCR に供する方法であり、そのような不定形コロニーの同定をゲノム抽出のステップを省略して行える利点を持っている。今後、唾液や歯垢を検体として健康食品のう蝕に関連した機能評価を行う際、有効な手段となりうる事が示唆された。

D. 結論

バイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度を定量できる人工口腔装置を構築し、特定保健用食品として許可されているチューインガムの評価をした結果、本装置の評価系としての有用性が示唆された。本装置による評価に用いるエナメル質歯片の初期硬度を揃えておく必要のあることが分かった。

また、ミュータンスレンサ球菌を迅速に弁別する方法として Single step colony direct PCR 法を開発し、従来の PCR 法と比較検討した結果、Single step colony direct PCR 法の有用性が示唆された。

E. 健康危惧情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yano A, Onozuka A, Asahi-Ozaki Y, Imai S, Hanada N, Miwa Y, Nisizawa T. An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine* 23, 2322-2326, 2005.
- (2) Nomura Y, Takeuchi H, Kaneko N, Matin K, Iguchi R, Toyoshima Y, Kono Y, Ikemi T, Imai S, Nisizawa T, Fukushima K, Hanada N. Feasibility of eradication of mutans streptococci from oral cavities. *Journal of oral science* 46: 179-183, 2004.
- (3) Kamasaka H, Inaba D, Minami K, To-o K, Nishimura T, Kuriki T, Imai S, Hanada N, Yonemitsu M. Application of phosphoryl oligosaccharides of calcium (Pos-Ca) for oral Health. *J. Appl. Glycoscience* 51: 129-134, 2004.
- (4) Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashizume S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. Oral streptococci exhibit

diverse susceptibility of human b-defensin-2: Antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci. *Current Microbiol.* 48: 85-87, 2004.

- (5) 今井 奨. 虫歯と砂糖、*FFI Journal*, 210: 1-8, 2005.
- (6) 今井 奨. 食品による齲蝕予防、*細胞* 37(3): 18-21, 2005.

2. 学会発表

- (1) Hayashida A, Hoshi K, Sato Y, Ito J, Arai T, Imai S, Hanada N, Uematsu H. Comparison of Sampling Bags Used for Measuring Breath Odor. 6th International Conference on Breath Odor. 2004 April 20-22: Royal College of Surgeons of England, UK. Program P12.
- (2) Imai S. Symposium: "Toward establishment of new concept of caries treatment" Prevention of dental caries by functional hoods. 52nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2004, November 27-28, Tokyo.
- (3) Matin K, Imai S, Hanada N, Tagami J. Biofilm Formation on Resin Composites in an Artificial Mouth System. 52nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2004, November 27-28, Tokyo.
- (4) Ono M, Matin K, Nikaido T, Ikeda M, Imai S, Hanada N, Tagami J. Biofilm formation on resin composites in an artificial mouth system. 52nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2004, November 27-28, Tokyo.
- (5) Usui Y, Imai S, Hanada N, Uematsu H. Efficacy of 3.8% Ag(NH₃)₂F on dentin in artificial mouth system. 52nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2004, November 27-28, Tokyo.
- (6) Hayashida A, Hoshi K, Imai S, Arai T, Hanada N, Uematsu H. Discrimination of oral malodor components in elderly patients by e-nose. 52nd Annual Meeting of Japanese Association for

- Dental Research, 2004, November 27-28, Tokyo.
- (7) Kishi M, Abe A, Kishi K, Yonemitsu. Quantity of mutans streptococci of mothers and infants' dental caries. 52nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2004, November 27-28, Tokyo.
- (8) 今井 奨、シンポジウム「特定保健用食品の有用性の評価について」人工口腔装置を用いた食品の脱灰能評価について、第53回口腔衛生学会総会。盛岡。2004.9.17-19. p.305.
- (9) 今井 奨、「再石灰化の実験法ならびに評価基準について考える」特定保健用食品の立場から再石灰化の実験法ならびに評価基準について考える、第53回口腔衛生学会総会。盛岡。2004.9.17-19. p.307.
- (10) 井上一彦、今井奨、武内博朗、岸光男、野村義明、平尾幸憲、花田信弘、歯科医院の衛生環境に関する研究、第一報 現状の歯科医院の衛生環境について、第53回口腔衛生学会総会。盛岡。2004.9.17-19. p.407.
- (11) 新井貴子、林田亜美子、星桂芳、苗代明、今井奨、花田信弘、鴨井久一、呼気と歯周病スコアおよび歯周病原性細菌との相関性、第53回口腔衛生学会総会。盛岡。2004.9.17-19. p.458.
- (12) 米田早織、今井 奨、花田信弘、大田洋二郎、植松 宏、放射線化学同時併用療法を行った癌患者の口腔内清掃効果に関する細菌学的検討、第53回口腔衛生学会総会。盛岡。2004.9.17-19. p.475.
- (13) 新井貴子、林田亜美子、星 佳芳、今井 奨、花田信弘、鴨井久一。各種におい検出装置を用いた口臭の日内変動に関する検討。第20回日本歯科医学会総会；横浜。2004.10.29-31.
- (14) 岸 光男、シンポジウム「特定保健用食品の有用性の評価について」食品機能の細菌学的評価について、第53回口腔衛生学会総会。盛岡。2004.9.17-19. p.305.
- (15) 岸 光男、稲葉大輔、阿部晶子、南 健太郎、相澤文恵、渡 美子、森谷俊

電極面人工プラーク下pHの経時変化
(*S. sobrinus* 6715)

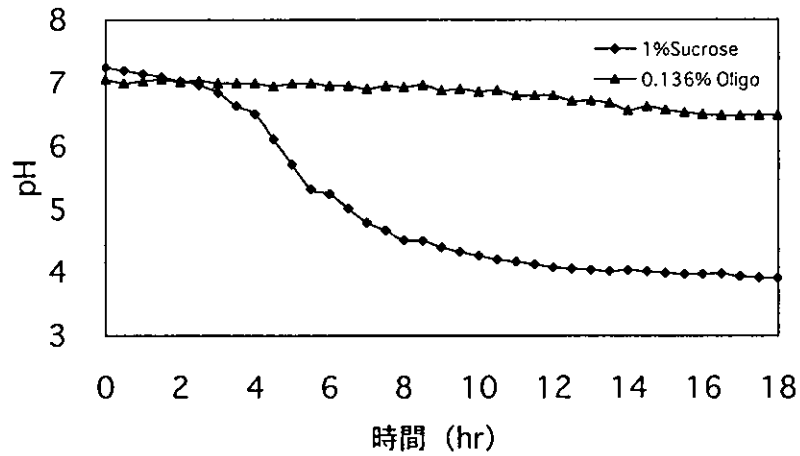


図1. 人工口腔装置電極面の人工バイオフィーム直下 pH の経時変化
対照 (1%スクロース)、
実験側 (0.136% Oligo: チューインガム抽出液)

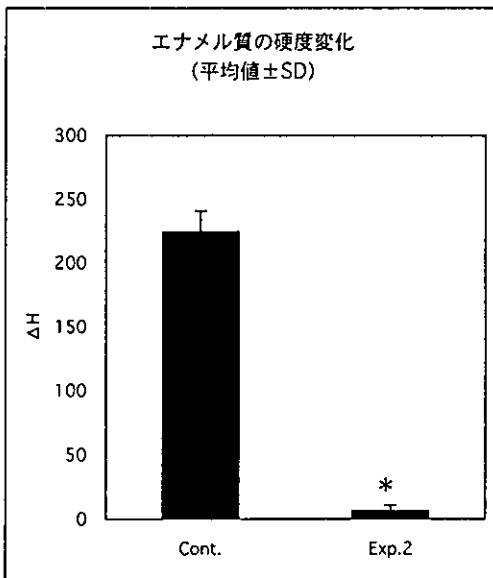


図2. エナメル質歯片の硬度変化
Cont: 1%スクロース
Exp.2: チューインガム抽出液

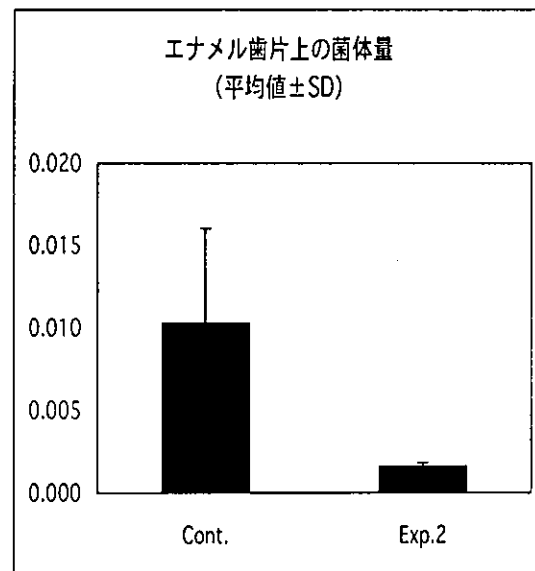


図3. エナメル質歯片上に形成された
バイオフィーム量 (菌体量)

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

—食品の口腔における有効性評価方法の確立—

食品の口腔における酸産生性およびバイオフィーム形成の評価方法：

DNA マイクロアレイによる口腔微生物叢の検討

分担研究者 高橋 信博 東北大学大学院歯学研究科 教授
研究協力者 佐藤 拓一 東北大学大学院歯学研究科 講師
研究協力者 尹 梅 東北大学大学院歯学研究科 客員研究員

研究要旨：

1. 食品摂取に伴うプラーク細菌の糖代謝による酸産生が、直接歯表面を脱灰し「う蝕」を発生させる原因となることから、食品のう蝕誘発性能を評価する方法の一つとして、食品摂取後のプラーク pH を測定することが推奨されている。そこで本研究では、これまでに報告されているヒト・プラークの酸産生能測定方法を検討した。その結果、最も信頼性の高い方法は“プラーク pH テレメトリー法（電極内蔵法）”であることを確認した。しかし、この方法は①被験者の確保が容易ではないこと、②被験者、③測定者の負担が大きいこと、④測定システムが高価であること等の欠点を持つことから、これを効率的に行う専門の検定機関の設置等が必要であると考えられた。
2. う蝕や歯周病などの口腔内細菌性疾患の発症は、口腔表面に形成されるバイオフィーム微生物叢生態系によって惹起されることから、この微生物叢をコントロールすることがこれらの疾患を予防する一方法となる。そこで、口腔疾患に関連すると報告されている口腔微生物約 30 種を同時にかつ簡便に検出できる DNA マイクロアレイの作成を試みた。その結果、口腔微生物特異性が高くかつ肉眼で判別可能な「口腔バイオフィーム微生物叢 DNA マイクロアレイ解析システム」の実用化の可能性が示唆された。

1. 健康食品の酸産生性の評価方法に関する検討

1-A. 研究目的

食品摂取に伴うプラーク細菌の糖代謝による酸産生が、直接歯表面を脱灰し「う蝕」を発

生させる原因となることから、健康食品全般においても酸の原因とならないこと、すなわち「う蝕」の原因とならないことが望まれる。過去 3 回の国際会議（米国 San Antonio：1986 年、仙台：1994 年、英国 London：1999 年）のいずれでも、食品のう蝕誘発性能を評価する方法の一つとして、食品摂取後のヒト・プラーク

ク pH を測定することが推奨されている。そこで本研究では、これまで報告されている各種ヒト・プラーク酸産生能測定法を検討した。

1-B. 研究方法

これまで報告されている各種ヒト・プラークの酸産生能測定方法を表 1-1 に挙げた。これらの方法を文献的および実験的に比較検討した。

表 1-1 ヒト・プラーク酸産生測定法

① *In vitro* 測定法

採取したプラークを懸濁し、これに食品を加えた時の pH 低下を測定する (プラーク懸濁法)

② *In situ* 測定法

- ・食品摂取後、経時的にプラークを採取し、その pH を測定する (プラーク採取法)
- ・食品摂取後、経時的に pH 電極をプラークに挿入し、その pH を測定する (電極挿入法)

③ *In vivo* 測定法

pH 電極を口腔内に設置しプラークを蓄積させた後、食品摂取時の pH 変化を経時的に測定する (電極内臓法=プラーク pH テレメトリー法)

1-C. 研究結果

1-D. 考 察

① *In vitro* 測定法は、被験者から採取したプラークを口腔外で緩衝液等に懸濁し、各種糖液や食品水溶液を加え、pH 低下を測定する方法であり、簡便ではあるが、食品の形状や咀嚼等による唾液の影響等を測定することはできず、また、採取する際にヒト・プラークの物理化学的構造を破壊してしまうことから、実際の口腔内プラークの pH 変化とは異なる結果が得ら

れてしまう。

② *In situ* 測定法は、食品摂取後、断続的にプラークを採取しその pH を測定することで、あるいはニードル型の pH 電極をプラークに挿入してプラーク pH を測定することで、食品摂取後の実際のプラーク pH 変化を推測することができる。しかし、プラーク採取あるいはプラークへの電極挿入の際にプラーク構造を破壊するために、プラーク周辺の唾液がプラーク内へ流入し、プラーク pH 値が実際より高くなることが報告されている。また、一度測定したプラークは使用できないため、プラーク pH を連続的にモニターするためには、予め被験者に十分量のプラークを口腔内に蓄積してもらわなければならない、倫理的な懸念が生ずる。

一方、③ *In vivo* 測定法、すなわち「ヒト口腔内に微小電極 (ion-sensitive field effect transistor pH electrode: pH-ISFET electrode) を設置し、そこにプラークを形成させ、*in vivo* でプラーク pH を測定する“電極内蔵法 (プラーク pH テレメトリー法)” (図 1-1)」は、実際に口腔内でう蝕の発症する部位である「歯表面とプラークの接するインターフェイス」の pH をモニターできる唯一の方法であることを確認した。また、微小電極上に形

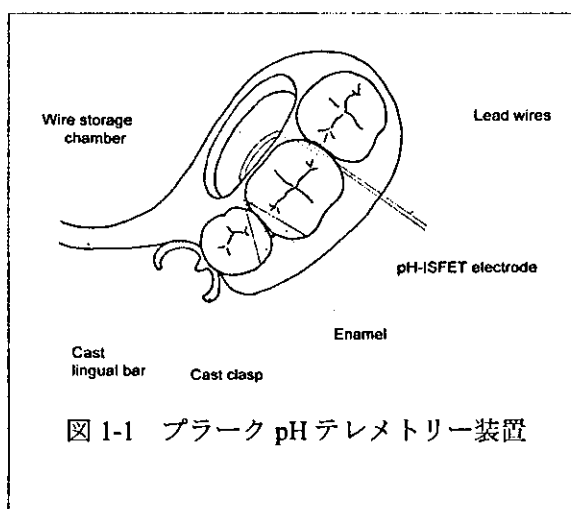


図 1-1 プラーク pH テレメトリー装置

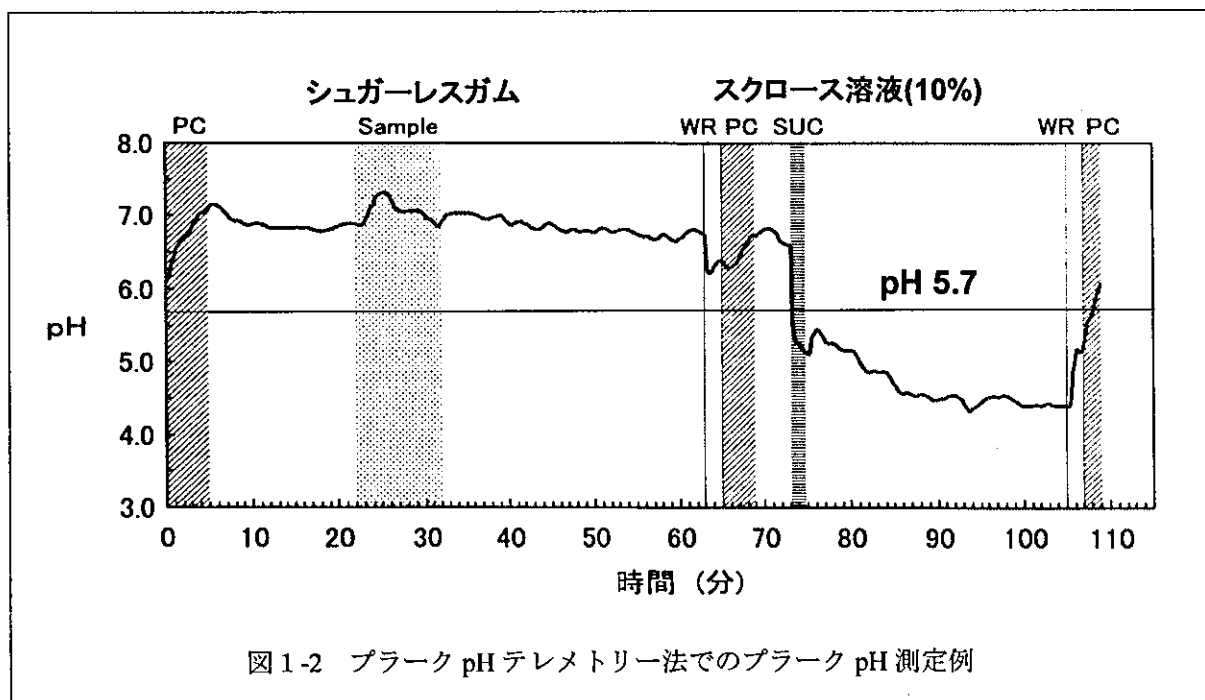


図 1-2 プラーク pH テレメトリー法でのプラーク pH 測定例

成されるプラークを構成する微生物叢は、歯表面に形成されるプラーク微生物叢と類似していることが既に報告されており、ヒト・プラーク pH 測定法として信頼性が高い。

実際、我々の研究室ではこの方法を用いて、被験者に食品（シュガーレスガム）を通常通り咬んでもらい、その際の酸産生能の結果（図 1-2）から、食品のう蝕誘発性を評価している。この過程で、本法が食品の酸産生能およびう蝕誘発能の検定・評価法として、実用的な方法であることを確認している。

しかし、この方法は、①被験者の確保が容易ではないこと、②被験者の負担が大きいこと、③測定者の負担が大きいこと、④測定システムが高価であること等の欠点を持つことから、これを効率的に行う専門の検定機関の設置等が必須であると考えられる。

1-E. 結 論

以上のことから、“プラーク pH テレメトリー法（電極内蔵法）”が最も優れたヒト・プ

ラークの酸産生能測定法であることが確認された。

しかし、この方法を食品の酸産生評価法としてシステム化するためには、検定・評価を効率的に行う専門の検定機関の設置等が必須であると考えられた。

*

2. 健康食品のバイオフィーム形成に及ぼす影響に関する検討

(DNA マイクロアレイによる口腔細菌叢の検討)

2-A. 研究目的

う蝕や歯周病などの口腔内細菌性疾患の発症は、口腔表面に形成されるバイオフィーム微生物叢によって惹起される。口腔バイオフィームは、膨大な数と種類の微生物によって構成される微生物叢生態系であり、この微生物叢をコ

ントロールすることがこれらの疾患を予防する一方法となる。そこで本研究では、健康食品のバイオフィルム微生物叢生態系への影響を簡便に測定することを目的に、口腔微生物叢解析用マイクロアレイの作成を試みた。

2-B. 研究方法

口腔疾患に関連すると報告されている口腔微生物 30 種を選択し、その 16S ribosomal RNA gene の塩基配列から、各種微生物種特異的 DNA プローブを作成した。プローブの微生物特異性は GeneBank 等のデータベースを用いて検討し、さらに各微生物標準株を用いて検証した。

次いで、これら DNA プローブをスライドガラス上に固定し、DNA マイクロアレイ化を行った。

2-C. 研究結果

2-D. 考 察

現在までに 24 種の微生物特異性プローブが完成し、順次、DNA マイクロアレイ化しつつある。現在、標準口腔微生物株および臨床サンプル（プラーク）を用いて、微生物種特異性ならびに検出感度を検討中である。

また、DNA マイクロアレイのスポット検出方法としては、

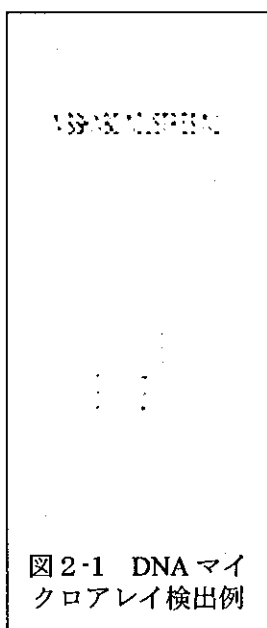


図 2-1 DNA マイクロアレイ検出例

一般に蛍光イメージアナライザー等の特別な検出器が必要となるが、本法では操作の簡便性、安価性から、容易に肉眼で判定できる手法を採用した（図 2-1）。

なお、本 DNA マイクロアレイおよび検出装置については、現在「口腔バイオフィルム微生物叢 DNA マイクロアレイ解析システム」として、共同研究企業とともに特許取得の準備を進めている。

2-E. 結 論

以上のことから、口腔微生物特異性が高くかつ肉眼で判別可能な口腔バイオフィルム微生物叢 DNA マイクロアレイ解析システムの実用化の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報：特になし

G. 研究発表（囲みは関連の強いもの）

研究発表（原著のみ）

1. Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. *p53* gene status and expression of p53, MDM2 and p14^{ARF} proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 33 (5): 292-299, 2004.
2. Kumamoto H, Takahashi N, Ooya K. *K-Ras* gene status and expression of Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 33 (6): 360-367, 2004.

Res (in press)

3. Kato K, Sato T, Takahashi N, Fukui K, Yamamoto K, Nakagaki H. A method for mapping the distribution pattern of cariogenic streptococci within dental plaque *in vivo*. *Caries Res* 38 (5): 448-453, 2004.
4. Ohki K, Kumamoto H, Ichinohasama R, Sato T, Takahashi N, Ooya K. *PTC* gene mutations and expression of SHH, *PTC*, SMO, and GLI-1 in odontogenic keratocysts. *Int J Oral Maxillofacial Sur* 33 (6): 584-592, 2004.
5. Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of subjects with periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* 19 (6): 379-385, 2004.
6. Shimonishi M, Sato J, Takahashi N, Komatsu M. Expression of type IV collagen and laminin in the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. *Eur J Oral Sci* 113 (1): 34-40, 2005.
7. Maehara H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Synergistic inhibition by combination of fluoride and xylitol on the glycolysis by mutans streptococci and its biochemical mechanism. *Caries*

学会発表

1. 松山順子、高橋信博、野田忠：小児口腔内からのミュータンスレンサ球菌のPCR法による検出について。第42回日本小児歯科学会大会および総会（福岡）2004年5月21日 小児歯誌 42 (2): 210, 2004.
2. 前原裕子、高橋信博、真柳秀昭：フッ素とキシリトールの併用によるミュータンスレンサ球菌の糖代謝抑制効果とその生化学的機構。第42回日本小児歯科学会大会および総会（福岡）2004年5月21日 小児歯誌 42 (2): 283, 2004.
3. 中條和子、小森亮、石川恵生、岩見憲道、高橋信博：歯内疾患関連菌 *Enterococcus faecalis* の酸・アルカリ耐性とその生化学的機構。第46回歯科基礎医学会学術大会（広島）2004年9月24日 歯基礎誌 46 (5): 423, 2004.
4. 宮澤一堀はるみ、相澤志津子、高橋信博：*Streptococcus mutans* におけるキシリトール代謝阻害感受性は糖取込み酵素系の生化学的特性に由来する。第46回歯科基礎医学会学術大会（広島）2004年9月24日 歯基礎誌 46 (5): 423, 2004.
5. 角田初恵、田中光郎、高橋信博：キシリトールによる増殖抑制効果の *Streptococcus mutans* 菌株間での違い。第46回歯科基礎医学会学術大会（広島）2004年9月25日 歯基礎誌 46 (5): 476, 2004.
5. 五十嵐公英、浅沼慎、熊耳隆洋、清水弘一、高橋信博：広範囲年齢層の含有アンモニア量、およびブラク酸産生のに伴うアンモニア産生について。第53回口腔衛生学会・総会（盛岡）2004年9月19日 口

腔衛生会誌 54 (4): 481, 2004.

6. 清水弘一、五十嵐公英、熊耳隆洋、高橋信博：乳幼児プラークのアンモニア産生能、酸産生能とう蝕罹患経験との関連。第53回口腔衛生学会・総会（盛岡）2004年9月19日 口腔衛生会誌 54 (4): 480, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（予定）

- (1) 口腔バイオフィルム微生物叢 DNA マイクロアレイ解析システム

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
志村二三夫 (分担執筆)	第3章 脳機能を支える栄養素, 3.5 ミネラル	横越英彦	脳機能と栄養	幸書房	東京	2004	125-149

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takato-Kaji R, Totsuka M, Ise W, Nishikawa M, Hachimura S, Kaminogawa S	T-cell receptor antagonist modifies cytokine secretion profile of naïve CD4(+) T cells and their differentiation into type-1 and type-2 helper T cells.	Immunology Letters	96 (1)	39-45	2005
Kohyama M, Yasogi Y, Nakano N, Ise W, Kaminogawa S, Hozumi N	Ca ²⁺ signaling down-regulates TGF-beta 1 gene expression in CD4 ⁺ T cells.	Biochemical & Biophysical Research Communications	327 (2)	494-499	2005
Kikuchi A, Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Takahashi Y, Hosono A, Itoh K, Hachimura S, and Kaminogawa S	Oral administration of food antigen induces T cell mediated intestinal inflammation: A model using TCR-transgenic mice.	Biofactors	21	159-162	2004
Hu FY, Furihata K, Ito-Ishida M, Kaminogawa S, Tanokura M	Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: Analysis of existing states of compounds and detection of new compounds.	Journal of Agricultural and Food Chemistry	52 (16)	4969-4974	2004
Kuraoka M, Hashiguchi M, Hachimura and S, Kaminogawa S	CD4(-)c-kit(-)CD3 epsilon-IL-2R alpha(+) Peyer's patch cells are a novel cell subset which secrete IL-5 in response to IL-2: implications for their role in IgA production.	European Journal of Immunology	34 (7)	1920-1929	2004
Saegusa S, Totsuka M, Kaminogawa S, and Hosoi T	Candida albicans and Saccharomyces cerevisiae induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid.	FEMS Immunology and Medical Microbiology	41 (3)	227-235	2004
Honda A, Ametani A, Matsumoto T, Iwaya A, Kano H, Hachimura S, Ohkawa K, Kaminogawa S, Suzuki K, Sercarz EE, and Kumar V	Vaccination with an immunodominant peptide of bovine type II collagen induces an anti-TCR response, and modulates the onset and severity of collagen-induced arthritis.	International Immunology	16 (5)	737-745	2004

Ogino T, Miura S, Komoto S, Hara Y, Hokari R, T Suzuki Y, Watanabe C, Koseki S, Nagata H, Hachimura S, <u>Kaminogawa S</u> , and Ishii H	Senescence-associated decline of lymphocyte migration in gut-associated lymphoid tissues of rat small intestine.	Mechanisms of Aging and Development	125 (3)	191-199	2004
Fujioka M, Hachimura S, Hosono A, Nakamura R, Hirayama K, Itoh K, and <u>Kaminogawa S</u>	Establishment and analysis of germfree T cell receptor transgenic mice.	Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects	13	243-247	2004
<u>Kaminogawa S</u> & Nanno M	Modulation of immune functions by foods.	Evidence-based Complementary and Alternative Medicine	1 (3)	241-250	2004
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
道川優子, 志村二三夫	ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして。I. ハーブとは何か	Food Style 21	8 (10)	26-29	2004
道川優子, 志村二三夫	ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして。II. ハーブサプリメントとは何か	Food Style 21	8 (11)	20-22	2004
道川優子, 志村二三夫	ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして。III. ハーブサプリメントの安全性・有効性の科学的根拠とその情報源(1)	Food Style 21	8 (12)	17-20	2004
道川優子, 志村二三夫	ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして。IV. ハーブサプリメントの安全性・有効性の科学的根拠とその情報源(2)	Food Style 21	9 (1)	22-26	2005
道川優子, 志村二三夫	ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして。V. セイヨウオトギリソウ	Food Style 21	9 (2)	18-22	2005
道川優子, 志村二三夫	ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして。VII. バレリアン	Food Style 21	9 (3)	20-24	2005
Kubota Y, Umegaki K, Kobayashi K, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, <u>Shinozuka K</u>	Anti-hypertensive effects of brazilian propolis in spontaneously hypertensive rats.	Clin. Exp. Pharmacol. Physiol	31	S29-S30	2004
Kubota Y, Kobayashi K, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, <u>Shinozuka K</u>	Pretreatment of Ginkgo biloba extract weakens hypnosis action of phenobarbital and its plasma concentration in rats.	J Pharm Pharmacol	56	401-405	2004

Sugiyama T, Kubota Y, <u>Shinozuka K</u> , Yamada S, Yamada K, Umegaki K.	Induction and recovery of hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with Ginkgo biloba extract.	Food Chem Toxicol	42	953-957	2004
窪田洋子, 小林恭子, 田中直子, 籠田智美, 中村一基, 国友勝, 梅垣敬三, 篠塚和正	高齢ラットの循環機能に対するイチョウ葉エキス4週間反復投与の影響	日本食品化学学会誌	11	81-85	2004
梅垣敬三, 杉山朋美, 窪田洋子, 篠塚和正, 山田静雄, 山田浩	ラットにおける糖尿病治療薬トルブタミドとイチョウ葉エキスの相互作用に関する検討	臨床薬理	35	209S	2004
Amarasena N, Ogawa H, Yoshihara A, <u>Hanada N</u> , Miyazaki H	Serum vitamin C-periodontal relationship in community-dwelling elderly Japanese.	J Clin Periodontol	32	93-97	2005
Tamaki Y, Nomura Y, Teraoka K, Nishikahara F, Motegi M, Tsurumoto A, <u>Hanada N</u>	Characteristic and willingness of patients to pay for regular dental check-up in Japan	J Oral Science	46	127-133	2004
Nomura Y, Takeuchi H, Kaneko N, Matin, K, Iguchi R, Toyoshima Y, Kono Y, Ikemi T, <u>Imai S</u> , Nisizawa T, Fukushima K, <u>Hanada N</u>	Feasibility of eradication of mutans streptococci from oral cavities.	Journal of oral science	46	179-183	2004
Kamasaka H, Inaba D, Minami K, To-o K, Nishimura T, Kuriki T, <u>Imai S</u> , <u>Hanada N</u> , Yonemitsu M	Application of phosphoryl oligosaccharides of calcium (Pos-Ca) for oral Health.	J. Appl. Glycoscience	51	129-134	2004
Morita E, Narikiyo M, Nishimura E, Yano A, Tanabe C, Sasaki H, <u>Hanada N</u>	Molecular analysis of age-related changes of <i>Streptococcus anginosus</i> group and <i>Streptococcus mitis</i> in saliva Molecular analysis of age-related changes of <i>Streptococcus anginosus</i> group and <i>Streptococcus mitis</i> in saliva.	Oral Microbiol Immunol	19	1-4	2004
Nomura Y, Tsuge S, Hayashi M, Sasaki, M, Yamauchi, T, Ueda N, <u>Hanada N</u>	A survey on the risk factors for the prevalence of dental caries among preschool children in Japan.	Pediatric Dental Journal	14	79-85	2004

Nomura Y, Tsurumoto A, Nishigawara F, Motegi M, Hanada N, Kumagai T	Controlling cariogenic bacteria by the regular check-up system.	Pediatric Dental Journal	14	95-101	2004
Tsuha Y, Hanada N, Asano T, Abei T, Yamaguchi S, Salam MA, Nakao R, Takeuchi H, Kurosaki N, Senpuku H	Role of peptide antigen for induction of inhibitory antibodies to <i>Streptococcus mutans</i> in human oral cavity.	Clin Exp Immunol	137	393-401	2004
Yoshihara A, Seida Y, Hanada N, Miyazaki H	A longitudinal study of the relationship between periodontal disease and bone mineral density in community-dwelling older adults.	J Clin Periodontol	31	680-684	2004
Tada A, Hanada N	Sexual differences in oral health behaviour and factors associated with oral health behaviour in Japanese young adults.	Public Health	118	104-109	2004
Abdus Salam M, Matsumoto N, Matin K, Tsuha Y, Nakao R, Hanada N, Senpuku H	Establishment of an animal model using recombinant NOD.B10.D2 mice to study initial adhesion of oral streptococci.	Clin Diagn Lab Immunol	11	379-386	2004
高田将成、佐藤勉、泉福英信、花田信弘	自立高齢者と要介護高齢者の口腔微生物叢の比較	口腔衛生学会雑誌	54 (3)	178-187	2004
葭原明弘、清田義和、片山照二郎、花田信弘、宮崎秀夫	地域在住高齢者の食欲とQOLとの関連	口腔衛生学会雑誌	54 (3)	241-247	2004
Yano A, Onozuka A, Asahi-Ozaki Y, Imai S, Hanada N, Miwa Y, Nisizawa T	An ingenious design for peptide vaccines.	Vaccine	23	2322-2326	2005
Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashizume S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N	Oral streptococci exhibit diverse susceptibility of human b-defensin-2: Antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci.	Current Microbiol	48	85-87	2004
今井奨	虫歯と砂糖	FFI Journal	210	1-8	2005
今井奨	食品による齲蝕予防	細胞	37(3)	18-21	2005
Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K	p53 gene status and expression of p53, MDM2 and p14 ^{ARF} proteins in ameloblastomas.	J Oral Pathol Med	33 (5)	292-299	2004
Kumamoto H, Takahashi N, Ooya K	K-Ras gene status and expression of Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling molecules in ameloblastomas.	J Oral Pathol Med	33 (6)	360-367	2004

Kato K, Sato T, <u>Takahashi N</u> , Fukui K, Yamamoto K, Nakagaki H	A method for mapping the distribution pattern of cariogenic streptococci within dental plaque <i>in vivo</i> .	<i>Caries Res</i>	38 (5)	448-453	2004
Ohki K, Kumamoto H, Ichinohasama R, Sato T, <u>Takahashi N</u> , Ooya K	<i>PTC</i> gene mutations and expression of SHH, <i>PTC</i> , SMO, and GLI-1 in odontogenic keratocysts.	<i>Int J Oral Maxillofacial Sur</i>	33 (6)	584-592	2004
Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, <u>Takahashi N</u>	Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of subjects with periodontitis and healthy subjects.	<i>Oral Microbiol Immunol</i>	19 (6)	379-385	2004
Shimonishi M, Sato J, <u>Takahashi N</u> , Komatsu M	Expression of type IV collagen and laminin in the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament.	<i>Eur J Oral Sci</i>	113 (1)	34-40	2005
Maehara H, Iwami Y, Mayanagi H, <u>Takahashi N</u>	Synergistic inhibition by combination of fluoride and xylitol on the glycolysis by mutans streptococci and its biochemical mechanism.	<i>Caries Res</i>			(in press)



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

Rumi Takato-Kaji^a, Mamoru Totsuka^{a,*}, Wataru Ise^a, Megumi Nishikawa^a, Satoshi Hachimura^a, Shuichi Kaminogawa^{a,b}

^a Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

^b Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Japan

Received 1 January 2004; received in revised form 14 May 2004; accepted 30 May 2004

Available online 26 June 2004

Abstract

A T-cell receptor (TCR) antagonist is an analog of a peptide ligand for TCR that inhibits T-cell responses to the original peptide. We investigated the effects of a TCR antagonist on cytokine secretion of naive CD4⁺ T cells and their differentiation into type-1 and type-2 helper T cells (Th1 and Th2) induced by stimulation with varying doses of an antigenic peptide. In the presence of a TCR antagonist peptide, proliferation of naive CD4⁺ T cells and antigen dose-dependent secretion of interferon- γ , a typical Th1-type cytokine, by these cells was down-regulated. With respect to the secretion of interleukin-4 (IL-4), a typical Th2-type cytokine, the TCR antagonist raised the concentration of the antigenic peptide required to elicit maximal IL-4 production and, surprisingly, significantly increased the maximum level of IL-4 secretion. Similar effects induced by the TCR antagonist were observed on the Th1/Th2 differentiation of naive CD4⁺ T cells. These results clearly indicate that, for naive CD4⁺ T cells, a TCR antagonist has the potential to change the balance of Th1/Th2 cytokine secretion and even enhance Th2 responses.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: TCR antagonist; Naive CD4⁺ T cell; Th1/Th2 cytokine response

1. Introduction

The T-cell receptor (TCR) recognizes an antigen as a short peptide bound to a major histocompatibility complex (MHC) molecule on the surface of antigen presenting cells (APCs). Interaction between the TCR and MHC/peptide complex leads to activation of T cells, which is strictly regulated by environmental factors, including the structure and dose of TCR ligands. It has been well documented that changes in the structure and dose of an antigenic peptide modifies T-cell responses, not only in quantity, but also in quality, i.e. partial elicitation of effector functions [1–5] or alteration of cytokine responses [6,7]. In naive CD4⁺ T cells from TCR-transgenic mice, differences in the structure or dose of an antigenic peptide profoundly

affect polarized differentiation into two types of helper T cells, interferon- γ (IFN- γ)-predominant type-1 and interleukin (IL)-4-predominant type-2 helper T cells (Th1 and Th2) [8–11]. Furthermore, we have previously shown that changes in the structure or dose of an antigenic peptide altered the Th1/Th2-type cytokine secretion profile of naive CD4⁺ T cells even in their primary responses [12,13].

Certain analogs of an antigenic peptide containing single amino acid substitutions in the TCR contact residues have been shown to fail to stimulate T-cell responses on their own, but are able to diminish, or even inhibit, T-cell activation induced by the original peptide. These peptides are known as TCR antagonists [14]. The inhibitory function of TCR antagonist has been shown not only in vitro but also in vivo [15–17]. Previous studies on TCR antagonists have mainly used T-cell clones [18,19] and, therefore, the effects of TCR antagonists on the primary responses of naive CD4⁺ T cells and on their functional differentiation are yet to be elucidated.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5841 8110; fax: +81 3 5841 8013.
E-mail address: atotuka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp (M. Totsuka).

In the present study, we utilized naive CD4⁺ T cells derived from ovalbumin (OVA)-specific TCR-transgenic mice (OVA23-3) and examined the effects of a TCR antagonist on distinct Th1/Th2 responses elicited by varying dose of a specific antigenic peptide. Our results demonstrate that a TCR antagonist not only inhibits T-cell responses but also modifies the cytokine secretion profile and Th1/Th2 differentiation of naive CD4⁺ T cells.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Six-week-old female BALB/c mice were purchased from Japan CLEA (Tokyo, Japan). OVA323-339-specific TCR Tg mice (OVA23-3) with the BALB/c genetic background [20] were generously provided by Prof. S. Habu (Tokai University, Isehara, Japan) and maintained in our animal facility. All studies were performed according to the Guidelines for Animal Experiments of the Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

2.2. Peptides

OVA323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) and a series of single amino acid-substituted analogs of OVA323-339 were purchased from Mimotopes Pty., Ltd. (Clayton, Victoria, Australia).

2.3. Preparation of naive CD4⁺ T cells and APC

Naive CD4⁺ T cells were prepared as described previously [13]. T cell-depleted splenocytes, used as APCs, were prepared from splenocytes of BALB/c mice by incubation with anti-mouse Thy 1.2 anti-serum (Cederlane, Ontario, Canada), followed by incubation with low-toxicity rabbit complement (Cederlane), and were treated with 50 mg/ml mitomycin C (Sigma, St. Louis, MO, USA). Isolated naive CD4⁺ T cells and APCs were routinely >96% CD4⁺CD62L^{high} and <5% Thy1.2⁺, respectively.

2.4. T-cell proliferation assay and TCR-antagonist assay

Naive CD4⁺ T cells (1×10^5 cells/well) in a total volume of 200 μ l were cultured with APCs (3×10^5 cells/well) for 96 h in the presence of each peptide in 96-well flat-bottom plates (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Proliferation was assessed by measuring the incorporation of [³H] thymidine (37 kBq/well) during the final 24 h of culture. To screen TCR-antagonist peptides, naive CD4⁺ T cells (1×10^5 cells/well) were cultured with APCs (3×10^5 cells/well) for 96 h in the presence of OVA323-339 plus each analog peptide. For the prepulse TCR-antagonist assay, naive CD4⁺ T cells (1×10^5 cells/well) were cul-

tured in the presence of each analog peptide and APCs (3×10^5 cells/well) preincubated with OVA323-339 at 0.2 μ M for 2 h at 37 °C.

2.5. Cytokine secretion assay

Naive CD4⁺ T cells (1×10^5 cells/well) were cultured with APCs (3×10^5 cells/well) in the presence of peptides in 96-well flat-bottom plates in a total volume of 200 μ l. The culture supernatants were recovered after 24 h for assaying IL-2 and after 72 h for assaying IL-4 and IFN- γ .

To examine the effect of TCR-antagonists on Th1/Th2 differentiation, primary cultures were set up in 24-well flat-bottomed plates with naive CD4⁺ T cells (1×10^6 cells/well) and APCs (1×10^6 cells/well) plus various concentrations of OVA323-339 and 50 μ M A326V in a total volume of 2 ml. After 7 days of priming, viable cells were recovered and counted. T cells (1×10^5 cells/well) were re-plated in 200 μ l volume in 96-well plates with fresh APCs (3×10^5 per well) and 5 μ M of OVA323-339. Supernatants were collected for cytokine analyses 48 h later for assaying IL-4, IL-5, and IFN- γ . The cytokine concentration was determined by means of two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously [12].

2.6. Intracellular cytokine staining

Naive CD4⁺ T cells (1×10^6 per well) and APCs (1×10^6 per well) were cultured with OVA323-339 at 0.05, 0.5, or 5 μ M in the presence or absence of 50 μ M A326V in 24-well plates in a total volume of 2 ml for 7 days. Viable cells (1×10^6 per well) were stimulated with PMA (50 ng/ml) plus ionomycin (500 ng/ml) for 6 h in the presence of monensin in 24-well plates. Cells were stained with anti-CD4 labeled with cy-chrome (BD PharMingen, San Diego, CA, USA). Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature and made permeable by washing twice with 0.5% saponin in PBS. Cells were incubated with anti-IFN- γ labeled with fluorescein isothiocyanate (BD PharMingen) and anti-IL-4 labeled with phycoerythrin (BD PharMingen). Their staining profiles were analyzed by BD LSR and CellQuest Software (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA).

2.7. Quantitative RT-PCR

Naive CD4⁺ T cells (1×10^6 per well) in a total volume of 2 ml were cultured with peptides in the presence of APC (3×10^6 per well) in 24-well plates. Cells were harvested 24 h after stimulation. Preparation of total RNA and reverse transcription was performed as described previously [13]. The LightCycler PCR and real-time detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used for the measurement of relevant mRNAs for GATA-3 and GAPDH as described previously [13]. The level of GAPDH mRNA was used to normalize the amounts of assayable RNA in each

sample. The data are shown as relative expression index, compared to the lowest amount of mRNA detected.

3. Results

3.1. Screening of TCR-antagonist peptides for naive CD4⁺ T cells

In our previous study, we identified the essential residues in OVA323-339 that interact with the TCR of CD4⁺ T cells derived from OVA23-3 mice. We also showed that substitutions of ³²⁶Ala can modify the primary activation profile of naive CD4⁺ T cells including proliferation and cytokine secretion [12]. Therefore, a series of analogs of OVA323-339 with all 19 possible substitutions for ³²⁶Ala was prepared to identify TCR-antagonist peptides.

First, the degree of proliferation of naive CD4⁺ T cells induced by stimulation with each analog was determined (Fig. 1A). Analogs with a substitution of Asp, Glu, Phe, Lys, Leu, Met, or Val for ³²⁶Ala failed to induce T-cell

proliferation. Next, we tested the ability of each analog to act as a TCR antagonist for the CD4⁺ T cells stimulated with OVA323-339 (Fig. 1B). Analog peptides, A326D, A326E, and A326V effectively inhibited CD4⁺ T-cell proliferation. Furthermore, a prepulse assay used to confirm TCR-antagonist activity demonstrated that A326V efficiently inhibited the proliferation of CD4⁺ T cells stimulated with APC preincubated with OVA323-339 in a dose-dependent manner (Fig. 1C). These results show that A326V is able to act as a potent TCR antagonist for CD4⁺ T cells derived from OVA23-3 mice. We then examined the effect of A326V on the proliferative response of CD4⁺ T cells stimulated with various doses of OVA323-339. A326V, at 50 μ M, down-regulated the proliferation of CD4⁺ T cells stimulated with OVA323-339 at less than 5 μ M.

3.2. A326V did not induce cytokine secretion by itself but altered the cytokine secretion profile of naive CD4⁺ T cells and the Th1/Th2 differentiation profile induced by varying doses of OVA323-339

As we reported previously [13], OVA323-339 induced a distinct cytokine secretion profile in naive CD4⁺ T cells from OVA23-3 mice, depending on the dose of the peptide (Fig. 2B–D, open square). Of all the doses tested, maximal IL-4 secretion was induced by stimulation at 0.1 μ M and decreasing IL-4 secretion was observed by stimulation at higher concentrations. Secretion of IL-2 and IFN- γ was increased in a dose-dependent fashion. In contrast, A326V alone did not elicit secretion of IL-2, IFN- γ , or IL-4 at any of the tested doses (data not shown).

We examined the effects of A326V on cytokine secretion from naive CD4⁺ T cells induced by OVA323-339. OVA323-339 at 0.5 μ M, in the absence of A326V, induced IFN- γ secretion but not IL-4 secretion, a typical Th1-type cytokine response (Fig. 2A). Addition of A326V to the culture inhibited IFN- γ secretion completely and induced IL-4 secretion, resulting in a typical Th2 profile (Fig. 2A). These results clearly indicate that, whereas a TCR antagonist inhibits the proliferation of naive CD4⁺ T cells in response to antigenic peptide stimulation, it has the potential to completely change the Th1/Th2 cytokine balance of these cells.

Next, the influence of A326V on the dose-dependent cytokine pattern induced by varying doses of OVA323-339 was analyzed. In the presence of A326V, secretion of IL-2 and IFN- γ was down-regulated at every dose of OVA323-339 tested (Fig. 2B and C). A326V appears to raise the concentration of OVA323-339 required to elicit secretion of the same levels of IL-2 and IFN- γ as those induced in the absence of the TCR antagonist. Likewise, in the case of IL-4, the dose of OVA323-339 eliciting secretion of the highest amount of IL-4 was shifted from 0.1 to 0.5 μ M in the presence of A326V (Fig. 2D). Interestingly, the maximum amount of IL-4 secreted was increased considerably in the

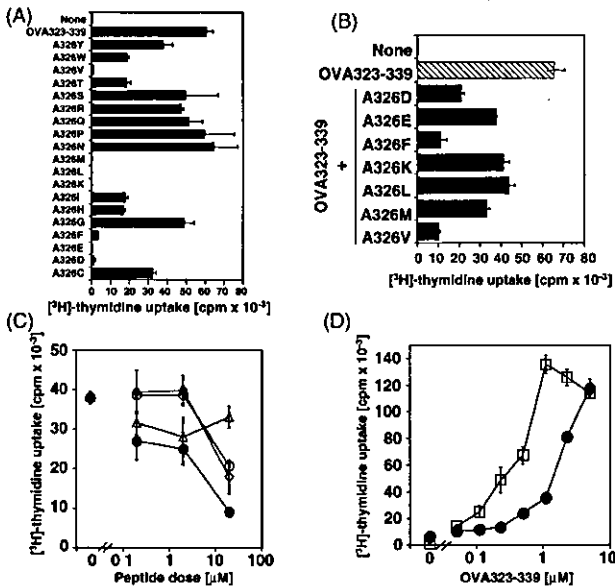


Fig. 1. Identification of OVA323-339 analogs with TCR-antagonist activity for naive CD4⁺ T cells of OVA23-3 transgenic mice. Proliferative response of CD4⁺ T cells was determined by culturing CD4⁺ T cells in the presence of APCs and peptides for 96 h. (A) Proliferation of CD4⁺ T cells stimulated with OVA323-339 or its analogs at 5 μ M. (B) Proliferation of CD4⁺ T cells stimulated with OVA323-339 at 0.02 μ M in the absence or presence of each analog peptide at 20 μ M. (C) A prepulse assay to determine TCR-antagonist activity of each analog peptide; proliferation of CD4⁺ T cells stimulated with indicated concentrations of A326D (open circle), A326F (open diamond), A326V (closed circle), or A326L (open triangle) in the presence of APCs preincubated with OVA323-339 at 0.2 μ M for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. (D) Proliferation of CD4⁺ T cells stimulated with various concentrations of OVA323-339 in the absence (open square) or presence (closed circle) of A326V at 50 μ M. The data are shown as the average from triplicate cultures \pm S.D. The results shown are representative of more than three independent experiments.