

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究 (H16-食品-003)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上野川 修一

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究

上野川 修一 1

II. 分担研究報告

1. 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

上野川 修一 11

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

河野 洋一 21

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

戸塚 護 26

2. 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

池上 幸江 35

食品のもつ生活習慣病（精神疾患）の予防効果の評価方法

志村 二三夫 56

食品のもつ生活習慣病（循環器疾患）の予防効果の評価方法

篠塚 和正 68

3. 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再石灰化能の評価方法

花田 信弘 85

食品の口腔におけるエナメル質脱灰能の評価方法：人工口腔装置による検討

今井 奨 91

食品の口腔における酸産生性およびバイオフィルム形成の評価方法：DNA マイクロアレイによる口腔微生物叢の検討

高橋 信博 98

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

. 105

IV. 研究成果の刊行物・別刷

. 110

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究

主任研究者 上野川修一 日本大学生物資源科学部 教授

研究要旨 いわゆる健康食品はその保健効果に関する国民の関心は高いが、その科学的根拠には不確かなものがあることや、厳正な有効性の評価方法が存在しないなどの問題点がある。そこで、本研究は医薬品とは違った意味で食の保健効果を科学的、厳正に評価する独自の方法を確立すべく、特に免疫調節・アレルギー予防機能、生活習慣病予防機能、口腔内の疾病予防機能に対して有効性の高い健康食品を正しく評価し、その成果を国民の健康維持・増進に役立てることを目的とした。

- 1) 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を目指し、食品成分による抗感染作用または抗アレルギー作用について有効性評価方法を設定し、免疫調節作用が期待されるプロバイオティクス菌体などを用いて検証を行った。ヒトを対象にした評価系として新生児からのアレルギー追跡調査と臍帯血単核球からのサイトカイン産生能解析を現在実施中であるが、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性が期待できる。加えて、免疫調節機能の評価系としてマウス腸管免疫系の細胞応答を遺伝子発現、抗体やサイトカイン産生などへの影響を解析し、臨床データとの関連を考慮したニュートリゲノミクスによる解析を加えた総合的な評価することは、本評価系のスクリーニングや作用メカニズムの解明に極めて有効である。
- 2) 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を目指し、まず EU における科学的根拠の調査研究報告書（PASSCLAIM）を検証し、評価方法について検討した。がん予防に対する健康食品の評価系としては、食品としてがん予防を標榜することは難しいため、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。肥満・脂質代謝に関わる健康食品の評価方法としては、成長期ラット・卵巣摘出肥満ラット・KK マウスを用いて評価する方法について検討し、その有用性を確認している。循環器疾患予防に対する健康食品の評価方法としては、生活習慣病ラット（SHR/NDmcr）を用いたテレメトリーによる循環動態測定、共焦点顕微画像解析システムによる循環器疾患予防への評価を行うことが有効な評価方法として期待される。精神疾患予防に対する健康食品の評価方法としては、Natural Medicines Comprehensive Database を用いて一次スクリーニング後、安全性試験を二次スクリーニングとして行い、さらに DNA マイクロアレイ法を用いたトランスクリプトミクスによる有効性・安全性の総合的試験がその有効な評価方法として期待される。いずれも既にヒトにおいてその効果が確認されている食品素材を用いることによって評価方法の検証を行っており、さらなる実験データの蓄積が必要である。
- 3) 食品の口腔における有効性評価方法の確立を目指した。口腔内再石灰化能に対する健康食品の評価方法として、定量的可視光励起蛍光法が簡便な方法として有効であり、口臭予防のための健康食品の評価方法としては、官能試験やガスクロマトグラフィーの他、リアルタイム PCR 法や電子嗅覚装置測定法が応用できることが示唆された。また、人工口腔装置を用いてバイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度の定量、口腔内細菌叢の評価（舌苔中のう蝕原性細菌と歯周病原性細菌の検出のための PCR 法）を行った。口腔内酸産生性に対する健康食品の評価方法としては、プラーク pH テレメトリー法が最も信頼性の高い方法であることが確認され、口腔表面に形成されるバイオフィームに対する健康食品の評価方法としては、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が高い口腔微生物特異性かつ肉眼で判定可能な方法として有用性が期待された。

以上、今後はさらなる食品素材についてデータの蓄積を行い、厳正な有効性評価方法の確立を目指していきたい。

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)
- 戸塚 護 (東京大学大学院農学生命科学研究科 客員助教授)
- 池上 幸江 (大妻女子大学家政学部 教授)
- 志村二三夫 (十文字学園女子大学 教授)
- 篠塚 和正 (武庫川女子大学薬学部 教授)
- 花田 信弘 (国立保健医療科学院口腔保健部 部長)
- 今井 奨 (国立保健医療科学院口腔保健部室長)
- 高橋 信博 (東北大学大学院歯学研究科 教授)

研究協力者

- 細野 朗 (日本大学生物資源科学部 講師)
- 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)
- 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)
- 山田 潔 (東京大学大学院農学生命科学研究科 寄付講座教員)
- 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)
- 窪田 洋子 (武庫川女子大学薬学部 助手)
- 稲葉 大輔 (岩手医科大学歯学部予防歯科学講座 助教授)
- 雫石 聡 (大阪大学大学院歯学研究科予防歯科学教室 教授)
- 岸 光男 (岩手医科大学歯学部予防歯科学講座 講師)
- 佐藤 拓一 (東北大学大学院歯学研究科 講

師)

A. 研究目的

いわゆる健康食品はその保健効果に関する国民の関心は高いが、その科学的根拠には不確かなものがあることや、厳正な有効性の評価方法が存在しないなどの問題点がある。そこで、本研究は医薬品とは違った意味で食の保健効果を科学的、厳正に評価する独自の方法を確立すべく、特に免疫調節・アレルギー予防機能、生活習慣病予防機能、口腔内の疾病予防機能に対して有効性の高い健康食品を正しく評価し、その成果を国民の健康維持・増進に役立てることを目的とした。そこで、まず、食品のもつそれぞれの機能性を評価する方法を文献調査によって総合的に整理するとともに、各実験条件での最適な評価方法確立を目指して進めた。

B. 研究方法

平成 16 年度に実施した情報収集・評価方法の探索をもとに、厳密な意味でのいわゆる健康食品の有効性評価方法について、①免疫調節機能、アレルギー予防機能を有する食品の評価方法の確立、②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、③主に口腔における保健機能を有する食品の評価方法の確立をめざした。すなわち、それぞれの有効性が期待されるいわゆる健康食品の食品成分について、各評価系を用いた検証を行い、評価方法についての有用性を検討した。①食品のもつ免疫調節機能、アレルギー予防機能の評価は、ヒトを対象にした評価系として、新生児からのアレルギー追跡調査と臍帯血単核球からのサイトカイン産生能解析、およびマウスへの経口投与による腸管免疫系や全身免疫系の細胞応答の解析、小腸上皮細胞株を樹立して網羅的遺伝子発現、抗体やサイトカイン産生などについて解析することなどによって行った。②食品のもつ生活習慣病（主にがん、循環器疾患、精神疾患）予防効果の評価は、*in vitro* での Ames 変異原性試験（突然変異の誘発を抑える食品成分のスクリーニング法として）、末梢血を用いる小核

試験（食品成分の抗変異原性の簡便な評価法として）、成長期ラット・卵巣摘出肥満ラット・KK マウスを用いた脂質代謝に対する有効性評価、亜鉛欠乏ラットを用いた DNA マイクロアレイ法による遺伝子解析（脳・神経系の健康や精神保健の用途における食品素材の有効性評価として）、実験動物（ラット）を用いた生体レベルにおける循環パラメータ・組織レベルにおける機能変化・細胞レベルにおける細胞内カルシウムレベルのそれぞれの測定（循環器系諸機能の網羅的評価）を実施し、食品成分の有効性を検証した。③主に口腔における保健機能を有する食品の評価は、口腔内再石灰化能を定量的可視光励起蛍光法およびヒト唾液浸漬試験で、口臭の評価を官能試験やガスクロマトグラフィー、リアルタイム PCR 法や電子嗅覚装置測定法で、さらに人工口腔装置を用いたバイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度の定量、口腔内細菌叢の評価としては舌苔中のう蝕原性細菌と歯周病原性細菌の検出を PCR 法で、口腔内酸産生性の評価はプラーク pH テレメトリー法、口腔バイオフィームに関する微生物叢は口腔細菌に対する DNA マイクロアレイ解析システムにて、それぞれ食品を用いた検証を行った。

（倫理面への配慮）

食品のもつ免疫調節機能、アレルギー予防機能の評価に関しては、千葉大学の関連病院において同大学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行った。食品の口腔における有効性評価に関しても、被験者にはあらかじめ研究の趣旨を十分に説明し、承諾を得た後に研究に協力していただいた。

C. 研究結果

1. 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

ヒト臍帯血単核球のサイトカイン（TNF- α 、IL-10）産生能に注目したプロバイオティクスの影響は、臍帯血単核球の個体差やプロバイオティク

ス菌種によって異なること、新生児単核球の IL-10 産生能が乳幼児のアレルギー疾患の発症と関連することが示唆されたことから、アレルギー発症予防に用いられるプロバイオティクスの選択に臍帯血単核球の IL-10 産生誘導能が指標となる可能性が考えられた。また、抗感染作用が期待されるプロバイオティクス菌などはマウスに経口投与することにより腸管関連リンパ組織に菌体が入り込まれて免疫系細胞が IgA 抗体やサイトカイン産生の誘導が活性化することが明らかとなり、動物に食品成分を経口投与することによって腸管免疫系の応答を評価することがその食品成分の有効性評価としてのスクリーニングや免疫調節作用の作用機序解明に重要で、本評価法の有用性が高いと考えられた。さらに、食品成分による腸管免疫系への作用の網羅的遺伝子解析を可能にすべく、腸管小腸上皮細胞の細胞株を樹立することができた。

2. 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

抗酸化作用が期待されている食品素材（イソフラボン・カテキン・ルチン・ヘスペリジン・クルクミン・エラグ酸など）について *in vitro* の Ames 試験および末梢血小核試験による抗変異原性での評価を行い、その有効性評価が可能であった。脂質代謝に対する有効性評価はダイエット素材として期待されている食品成分の検証を行ったところ、水溶性粘性食物繊維には効果がみられるものがある一方で、L-カルニチンには脂肪組織への効果がみられなかった。また、亜鉛欠乏ラットを用いた DNA マイクロアレイ法により、亜鉛投与後に亜鉛結合タンパク質 methallothionein 1 (MT1) 遺伝子の強い発現が認められた。生活習慣病モデルラット（SHR/NDmcr）を用いたテレメトリーによる循環動態測定、共焦点顕微画像解析システムによる循環器疾患予防への評価により杜仲茶、イチョウ葉エキスによる影響は検出できたが、プロポリスの効果は本評価系では検出できなかった。

3. 食品の口腔における保健機能についての有効性評価

食品成分（高溶解性カルシウム食材および低濃度フッ化物）の口腔内再石灰化能を定量的可視光

励起蛍光法およびヒト唾液浸漬試験によって検証したところ、有効な評価法として簡便に実施できることが示唆された。また、口臭の評価をリアルタイム PCR 法や電子嗅覚装置測定法を応用できる可能性があること、人工口腔装置を用いるとバイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度の定量等でシュガーレスキャンディーなどを簡便に評価できること、口腔内細菌叢の評価として舌苔中細菌数を定量 PCR 法によって評価できる可能性が示唆されたこと、口腔内酸産生性をプラーク pH テレメトリー法によって評価することが最も信頼性の高い方法であること、口腔バイオフィームに関する微生物叢を口腔細菌に対する DNA マイクロアレイ解析システムへの実用可能性がそれぞれ示された。

D. 考察

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について検討を行った。ヒトを対象にしたアレルギー予防に関する評価系として、新生児からのアレルギー追跡調査と臍帯血単核球からのサイトカイン産生能解析を行うことによって、IL-10 産生能が乳幼児のアレルギー疾患の発症と関連することが示唆され、アレルギー発症予防に用いられるプロバイオティクスの選択に臍帯血単核球の IL-10 産生誘導能が指標となる可能性が考えられた。抗感染食品の評価に関しては、マウスへの食品成分の経口投与による腸管免疫系や全身免疫系の細胞応答の解析、小腸上皮細胞株を樹立して網羅的遺伝子発現、IgA 抗体やサイトカイン産生などについて解析することによって、プロバイオティクス細菌などは腸管関連リンパ組織に到達して、直接、腸管免疫系の IgA 産生応答を誘導していることが示唆され、抗感染食品のスクリーニングやその作用機序の解明に有用性が高いことが示された。さらに厳密な評価方法として確立するには、感染実験と免疫関連マーカーとの詳細な検討、および遺伝子レベルでの網羅的な解析により総合的に評価する必要があると考えられる。

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について検討を行

った。食品ががんを予防するという機能性を直接標榜することは難しいことから、抗変異原性の評価方法について検討したところ、*in vitro* の Ames 試験（突然変異の誘発性を抑える食品成分の評価としてのスクリーニング）・末梢血を用いる小核試験（*in vivo* での食品成分の抗変異原性を簡便に評価）は抗酸化作用が期待される食品成分について有用であると思われた。さらに、痩身・脂質代謝を評価する方法、脳・神経系の健康や精神保健の有用性評価方法、薬理学的手法による循環諸機能の網羅的な評価を既にヒトでその効果が確認されている食品素材を用いて評価方法確立を試みた。いずれも作用機序を明確に示すことでその有効性を評価する方法として、動物実験レベルの評価方法と併せて臨床への応用についてさらなるデータの蓄積が必要であると考えている。食品の口腔における有効性評価方法については、本研究で用いた方法が有効な評価方法として利用可能性が高いことが示唆された。しかし、プラーク pH テレメトリー法などは被験者・測定者の負担が大きく、測定システムも高価である等の問題もあり、さらなる改善や専門の検定機関を設置するなどの対応も必要となると思われる。いずれも実用化に向けた検討をさらに進める必要がある。

E. 結論

いわゆる健康食品を医薬品とは違った意味で食の保健効果を科学的、厳正に評価する独自の方法を確立すべく、特に免疫調節・アレルギー予防機能、生活習慣病予防機能、口腔内の疾病予防機能に注目したその有効性を正しく評価し、その成果を国民の健康維持・増進に役立てることを目的として本研究を行った。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については、抗感染食品または抗アレルギー食品としての評価方法を設定し、ヒト臨床試験と併せて動物実験、遺伝子レベルでの解析、*in vitro* 試験による総合的な評価方法の確立を目指している。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については、動物実験および *in vitro* 試験による薬理的・栄養学的な評価方法を設定し、

データの蓄積を進めている。食品の口腔における有効性評価方法については、う触予防をふまえた評価方法を設定し、実用性の高い簡便な評価方法として有効性の高いものが明らかとなってきた。いずれもさらなるデータの蓄積により、信憑性の高い評価方法として確立しなければならない。これら得られた結果をもとに信頼性の高い厳正な有効性評価系が構築され、国民の健康の維持・増進に役立つことが期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

・論文発表

- 1) Nagura T, Hachimura S, Kaminogawa S, Aritsuka T, Itoh K, Characteristic intestinal microflora of specific pathogen-free mice bred in two different colonies and their influence on postnatal murine immunocyte profiles. *Exp. Anim.* 54, 143-148 (2005)
- 2) Komoto S, Miura S, Koseki S, Goto M, Hachimura S, Fujimori H, Hokari R, Hara Y, Ogino T, Watanabe C, Nagata H, Kaminogawa S, Hibi T, Ishii H, Effect of specific antigen stimulation on intraepithelial lymphocyte migration to small intestinal mucosa. *Clinical and Experimental Immunology* 140, 249-257 (2005)
- 3) Lo DY, Chen TH, Chien MS, Koge K, Hosono A, Kaminogawa S, Lee WC, Effect of sugar cane extract on the modulation of immunity in pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 591-597 (2005)
- 4) Kim JY, Lee S, Jeong DW, Hachimura S, Kaminogawa S, Lee HJ, Effects of intraperitoneal administration of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* cellular fraction on immune response. *Food Sci. Biotechnol.* 14, 405-409 (2005)
- 5) Hattori M, Hiramatsu K, Kurata T, Nishiura M, Takahashi K, Ametani A, Kaminogawa S, Complete refolding of bovine beta-lactoglobulin requires disulfide bond formation under strict conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1752, 154-165 (2005)
- 6) Ise W, Nakamura K, Shimizu N, Goto H, Fujimoto K, Kaminogawa S, Hachimura S Orally tolerized T cells can form conjugates with APCs but are defective in immunological synapse formation. *J. Immunol.* 175, 829-838 (2005)
- 7) Nakanishi Y, Hosono A, Hiramatsu Y, Kimura T, Nakamura R, Kaminogawa S Characteristic immune response in Peyer's patch cells induced by oral administration of *Bifidobacterium* components, *Cytotechnology* 47, 69-77 (2005)
- 8) Tamauchi H, Yoshida Y, Sato Tm Hachimura S, Inoue M, Kaminogawa S, Habu S, Oral antigen induces antigen-specific activation of intraepithelial CD4+ lymphocytes but suppresses their activation in spleen. *Immunobiology* 210, 709-721 (2005)
- 9) 下条直樹, 鈴木修一, 河野陽一, プロバイオティクスと疾患 アトピー性皮膚炎とプロバイオティクス, *医学のあゆみ 別冊プロバイオティクス*, 63-66, (2005.05).
- 10) Akiyama, H., Sato, Y., Watanabe, T., Nagaoka, H., Yoshioka, Y., Shoji, T., Kanda, T., Yamada, K., Totsuka, M., Teshima, R., Sawada, J., Goda, Y., Maitani, T.: Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Letters*, 579 (20), 4479-4484 (2005).
- 11) Totsuka, M.: Gut immune system as a pivotal site to direct the antigen-specific immune response to either allergy or tolerance. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 210 (10), 929-935 (2005).
- 12) 志村二三夫, ハーブサプリメントの現状と展望, *アンチ・エイジング (日本抗加齢医学会雑誌)* 1, 23-30 (2005)
- 13) 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, *FOOD STYLE* 21 9(9), 134-139 (2005)
- 14) Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K., Effects of Ginkgo biloba extract on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in

- SHR. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58 (2): 243-9 (2006).
- 15) Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K., Effects of Ginkgo biloba extract feeding salt-induced hypertensive by acetylcholine in Dahl rats rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 29 (2): 266-9 (2006).
- 16) Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, Kubota Y, Kobayashi K, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K., Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci.* 78: 1187-1196 (2006).
- 17) Takeuchi H, and Hanada N: Physicochemical and Immuno-logical Research to Reduce the Dental Caries Epidemic –A Paradigm Shift in the Role of a Caries Vaccine. *Journal of Oral Sciences* 47: 243-252 (2005).
- 18) Usui Y, Imai S, Saito N, Hanada N, and Uematsu H. Effect of 3.8% Ag(NH₃)₂F solution as an anti-caries agent on dentin in artificial mouth model system using *Actinomyces naeslundii*. *J Dental Health*, 55:186-193 (2005).
- 19) Hayashida A, Imai S, Hanada N, Hoshi K, and Uematsu H. Relationship between breath odors and odor emission sources in the elderly investigated using the electric nose. *Japanese J Gerodontology*, 20:3-9 (2005).
- 20) Yano A, Onozuka A, Asahi-Ozaki Y, Imai S, Hanada N, Miwa Y, and Nisizawa T. An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine*, 23:2322-2326 (2005).
- 21) 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).
- 22) Washio J, Sato T, Koseki T, Takahashi N. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue coating and its relationship with oral malodor. *J Med Microbiol* 54(9): 889-895 (2005).
- 23) Yamaura M, Sato T, Echigo S, Takahashi N. Quantification and detection of bacteria from postoperative maxillary cyst by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 20(6): 333-338 (2005).
- 24) 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 Res* 39: 521-528 (2005).
- 25) Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Takahashi N. Difference in the xylitol sensitivity of acid production among *Streptococcus mutans* strains, and its biochemical mechanism. *Oral Microbiol Immunol* (in press).
- 26) Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* (in press).
- ・ 学会発表
- 1) 平松靖浩・細野朗・武藤正達・佐藤隆一郎・八村敏志・上野川修一. *Bifidobacterium*生菌体および菌体破砕物をマウスに経口投与した場合の生体内移行および免疫調節作用について. 日本食品免疫学会2005年度大会(第1回学術大会)(2005年11月9-10日, 東京)
- 2) 村島弘一郎・細野朗・中西祐輔・深澤朝幸・窪田英俊・鐘ヶ江穰・河野敏明・荒森幾雄・上野川修一. フラクトオリゴ糖を構成する糖鎖構造の違いが誘導するマウス腸管部位ごとの腸内細菌叢変化と免疫応答について. 日本食品免疫学会2005年度大会(第1回学術大会)(2005年11月9-10日, 東京)
- 3) 富田響子・名倉泰三・奥原康英・重松典宏・有塚勉・上野川修一・八村敏志. 二糖メリビオースのT細胞応答調節作用. 日本食品免疫学会2005年度大会(第1回学術大会)(2005年11月9-10日, 東京)

- 4) 後藤浩文, 伊勢涉, 上野川修一, 佐藤隆一郎, 八村敏志. 経口免疫寛容状態を誘導されたT細胞の抗原刺激に対する細胞内シグナル伝達の解析. 日本食品免疫学会2005年度大会(第1回学術大会)(2005年11月9-10日, 東京)
- 5) Tomoyuki Fukasawa, Koichiro Murashima, Ichiro Matsumoto, Akira Hosono, Hiroki Ohara, Chuhei Nojiri, Hidetoshi Kubota, Shuichi Kaminogawa, Keiko Abe and Toshiaki Kono. Gene Expression Analysis of Ileum in Mice Administrated with Dietary Fructooligosaccharides. ILSI's First International Conference on Nutrigenomics - Opportunities in Asia, Raffles City Convention Center, Singapore (Dec. 6-9, 2005)
- 6) Yoko Akema, Masayuki Kuraoka, Yukiko Umeda, Masaaki Hashiguchi, Wataru Ise, Taku Kouro, Yoshimasa Takahashi, Kiyoshi Takatsu, Shuichi Kaminogawa, Ryuichiro Sato, Satoshi Hachimura, CD3-IL-2R⁺ Peyer's Patch cells are a novel cell subset which promote IgA production: cell lineage and role in class switch recombination. 第35回日本免疫学会総会・学術総会(2005年12月13-15日, 横浜)
- 7) Yukiko Umeda, Masayuki Kuraoka, Yoko Akema, Kiyoshi Yamada, Masaaki Hashiguchi, Wataru Ise, Taku Kouro, Mamoru Totsuka, Kiyoshi Takatsu, Shuichi Kaminogawa, Ryuichiro Sato, Satoshi. CD3-IL-2R⁺ Peyer's patch cells respond to TLR and cytokine stimulation. 第35回日本免疫学会総会・学術総会(2005年12月13-15日, 横浜)
- 8) Shuichi Hamaguchi, Wataru Ise, Kenichiro Fujimoto, Shuichi Kaminogawa, Ryuichiro Sato, Satoshi Hachimura. Expression pattern of CD62L/CD44 and regulatory function of T cells induced by oral administration of antigen. 第35回日本免疫学会総会・学術総会(2005年12月13-15日, 横浜)
- 9) 津田真人・細野朗・藤岡美蘭・八村敏志・平山和宏・梅崎良則・伊藤喜久治・上野川修一. *Bifidobacterium*の定着がマウスパイエル板細胞の食品抗原特異的な免疫応答を修飾する. 第39回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会(2006年1月24-25日, 仙台)
- 10) 中西祐輔・細野朗・平松靖浩・上野川修一. *Bifidobacterium*菌体成分に対するパイエル板樹状細胞の応答. 日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月25-28日, 京都).
- 11) 平松靖浩・細野朗・中西祐輔・武藤正達・八村敏志・佐藤隆一郎・上野川修一. *Bifidobacterium*菌体をマウスに経口投与した場合の小腸および大腸各部位への取り込みと免疫修飾作用についての比較. 日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月25-28日, 京都).
- 12) 津田真人・細野朗・柳橋努・八村敏志・平山和宏・伊藤喜久治・上野川修一. 無菌マウス由来免疫系細胞の抗原特異的なサイトカイン応答に及ぼす*Bifidobacterium pseudocatenulatum* 7041菌体の影響. 日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月25-28日, 京都).
- 13) 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. 無菌またはコンベンショナルマウス由来大腸・小腸粘膜固有層リンパ球のin vitro細菌刺激に対するIgA産生の比較. 日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月25-28日, 京都).
- 14) 原田岳・細野朗・濱口修一・八村敏志・佐藤隆一郎・上野川修一. フラクトオリゴ糖(FOS)の構成糖をマウス経口投与したときの食品抗原特異的な免疫応答に与える影響. 日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月25-28日, 京都).
- 15) 高知尾良徳・細野朗・内田健治・元島英雅・上野川修一. ケフィアグレインのマウス経口投与によって修飾される免疫応答について. 日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月25-28日, 京都).
- 16) 武藤正達・堀紗也香・佐藤あゆ子・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志. 腸管IgA抗体産生とパイエル板樹状細胞の応答の解析. 日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月25-28日, 京都).

- 17) 明間洋子・倉岡雅征・梅田幸子・土方僚子・伊勢渉, 高橋宜聖・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志. パイエル板CD3⁺IL-2R⁺細胞によるIgA産生誘導機構の解析. 日本農芸化学会2006年度大会 (2006年3月25-28日, 京都) .
- 18) 梅田幸子・明間洋子・倉岡雅征・山田潔・戸塚護・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志. パイエル板CD3⁺IL-2R⁺細胞におけるTLRの発現パターンおよびTLR刺激に対する応答性. 日本農芸化学会2006年度大会 (2006年3月25-28日, 京都) .
- 19) 後藤浩文・後藤貴康・野中敦子・伊勢渉・山田潔・戸塚護・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志. 免疫寛容を誘導されたT細胞に特異的に発現する遺伝子の解析. 日本農芸化学会2006年度大会 (2006年3月25-28日, 京都) .
- 20) 濱口修一・伊勢渉・藤本賢一郎・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志. 経口抗原より誘導されるT細胞のCD62L/CD44の発現パターンと免疫抑制機構. 日本農芸化学会2006年度大会 (2006年3月25-28日, 京都) .
- 21) 上野川修一. 食品の免疫機能研究の展望. 日本食品免疫学会 2005 年度大会 (第 1 回学術大会) (2005 年 11 月 9 日, 東京)
- 22) 上野川修一. 機能性食品 (特定保健用食品を含む) の現状と免疫調節作用の評価基準. 日本食品免疫学会第 2 回シンポジウム-食品の免疫調節作用の評価基準とは- (2006 年 2 月 14 日, 東京)
- 23) 鈴木修一・下条直樹・田尻義人・久米村恵・河野陽一. 乳児期の腸内細菌叢とアレルギー発症との関連. 第 9 回日本腸内細菌学会 (2005 年 5 月 26, 27 日, 東京) .
- 24) 鈴木修一・下条直樹・田尻義人・久米村恵・河野陽一. 乳児期における栄養法と 2 歳迄の腸内細菌叢についての検討. 第 8 回日本腸内細菌学会 (2004 年 6 月 3, 4 日, 東京) .
- 25) 穂山浩, 佐藤雄嗣, 渡邊敬浩, 長岡 (浜野) 恵, 吉岡靖雄, 庄司俊彦, 神田智正, 山田潔, 戸塚護, 手島玲子, 合田幸広, 澤田純一, 米谷民雄: プロシアニジンの食物アレルギー発症抑制作用について. 日本食品化学会第 11 回総会・学術大会 (2005 年 4 月, 東京) .
- 26) 山田潔, 森下聡, 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. 第 9 回腸内細菌学会 (2005 年 5 月, 東京) .
- 27) 山田潔, 江本哲朗, 森下聡, 中村吉孝, 矢島高二, 戸塚護: 新規マウス小腸上皮細胞株の樹立. 日本動物細胞工学会 2005 年度大会 (2005 年 7 月, 東京) .
- 28) 山田潔, 江本哲朗, 森下聡, 岩本拓, 小関千愛, 戸塚護: 新規マウス小腸上皮細胞株の免疫学的な性質の解析. 2005 年度第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月, 横浜) .
- 29) Hiroshi Akiyama, Yuji Sato, Takahiro Watanabe, Megumi H. Nagaoka, Yasuo Yoshioka, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Kiyoshi Yamada, Mamoru Totsuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Yukihiko Goda, Tamio Maitani: Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergy in murine models. 2005 年度第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月, 横浜) .
- 30) Yukiko Umda, Masayuki Kuraoka, Yoko Akema, Kiyoshi Yamada, Masaaki Hashiguchi, Wataru Ise, Taku Koro, Mamoru Totsuka, Kiyoshi Takatsu, Shuichi Kaminogawa, Ryuichiro Sato, Satoshi Hachimura: Characterization of CD3-IL-2R+ Peyer's patch cells II: response to TLR and cytokine stimulation. 2005 年度第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月, 横浜) .
- 31) 山田潔, 江本哲朗, 波多野良, 小関千愛, 岩本拓, 戸塚護: 新規マウス小腸上皮細胞株の特性 (1) 抗原提示機能. 日本農芸化学会 2006 年度大会 (京都), 2006 年 3 月.
- 32) 江本哲朗, 山田潔, 岩本拓, 戸塚護: 新規マウス小腸上皮細胞株の特性 (2) 菌体成分に対する応答性. 日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006 年 3 月, 京都) .
- 33) 黒木千恵子, 土師智寿, 小谷康介, 山田潔, 戸塚護: 食品抗原摂取による小腸上皮内リンパ球の制御性 T 細胞機能の変化. 日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006 年 3 月, 京都) .
- 34) 土師智寿, 山田潔, 戸塚護: 小腸上皮内リンパ球 CD4 陽性サブセットの特性と機能. 日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006 年 3 月,

- 京都)。
- 35) 鎌田啓明、中村吉孝、山田潔、山崎靖正、池上秀二、矢島高二、戸塚護：経口抗原で誘導される特異 IgE 産生に対する *Lactobacillus gasseri* OLL2809 の抑制効果とその作用機序の検討。日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006 年 3 月、京都)。
 - 36) 堀口美恵子、青江誠一郎、田中千恵、筒木宏美、山田雅巳、松井恵子、能美健彦、池上幸江、Inhibitory effects of food components on DNA damage using Ames test、第 34 回日本環境変異原学会大会 (2005 年 11 月 16-18 日、東京)
 - 36) 青江氏一郎、薄井えりか、高野可菜子、小貫順子、堀口美恵子、池上幸江、物理化学的性質の異なる水溶性食物繊維素材が卵巣摘出ラットの脂質代謝に及ぼす影響、第 59 回日本栄養食糧学会 (2005 年 5 月 12-15 日、東京)
 - 37) 山岸あづみ、岡本奈津子、青江誠一郎、池上幸江、食物繊維がラット脂肪組織の脂質動態に及ぼす影響、第 10 回日本食物繊維学会 (2005 年 11 月 18, 19 日、長崎)
 - 38) 山田敦子、塚田明香、船橋ひとみ、渡邊愛子、道川優子、志村二三夫、ラット肝臓における亜鉛による遺伝子発現の誘導-DNA マイクロアレイによる検討、第 52 日本栄養改善学会 (2005 年 9 月、徳島)。
 - 39) 佐野 涼子、相原 直美、竹内 宏美、戸澤 佳恵、道川 優子、志村 二三夫、亜鉛欠乏ラットにおける亜鉛投与への応答-視床下部における遺伝子発現、第 60 回日本栄養・食糧学会大会 (2006 年 5 月 (予定))。
 - 40) 籠田智美、窪田洋子、瀬占奈美江、中村一基、国友 勝、篠塚和正、メタボリックシンドロームラットの腎動脈における NO および EDHF の産生バランス、第 5 回日本 NO 学会、(2005 年 4 月 27-28 日、札幌)
 - 41) Satomi Kagota, Yoko Kubota, Namie Nejime, Kazuki Nakamura, Masaru Kunitomo, Kazumasa Shinozuka, Balance between EDHF and NO released from renal arteries of SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. Symposium on Mechanism of vasodilation & EDHF (2005, 5/31-6/4, Antwerp, Belgium)
 - 42) 瀬占奈美江、籠田智美、窪田洋子、中村一基、国友 勝、橋本道男、篠塚和正、P2Y 受容体を介した内皮細胞間物質透過促進機構。第 107 回日本薬理学会近畿部会 (2005 年 6 月 24 日、金沢)
 - 43) 遊道桂子、田中直子、瀬占奈美江、籠田智美、窪田洋子、中村一基、国友 勝、篠塚和正、ラット赤血球における細胞内カルシウムイオンレベルに対する ATP の影響。第 107 回日本薬理学会近畿部会 (2005 年 6 月 24 日、金沢)
 - 44) 窪田洋子、籠田智美、中村一基、国友 勝、篠塚和正、生活習慣病モデルラットの循環器系機能に及ぼすイチョウ葉エキスの影響、第 41 回高血圧関連疾患モデル学会 (2005 年 9 月 2-3 日、札幌)
 - 45) 籠田智美、窪田洋子、中村一基、国友 勝、篠塚和正、生活習慣病モデルラット胸部大動脈における血管弛緩反応減弱に対する降圧薬の効果、第 41 回高血圧関連疾患モデル学会 (2005 年 9 月 2-3 日、札幌)
 - 46) 鄭 炯美、田淵正樹、瀬占奈美江、窪田洋子、籠田智美、東野英明、橋本道男、篠塚和正、高血圧・肥満自然発症ラット (SHR/NDmcr-cp) に対するニコランジルの影響、第 33 回薬物活性シンポジウム (2005 年 10 月 4-5 日、新潟)
 - 47) 佐藤麻由子、窪田洋子、籠田智美、瀬占奈美江、中村一基、国友 勝、梅垣敬三、篠塚和正、SHR/NDmcr-cp(cp/cp)ラットの循環動態に対するイチョウ葉エキス食摂取の影響、第 55 回日本薬学会近畿支部 (2005 年 10 月 29 日、西宮)
 - 48) 瀬占奈美江、籠田智美、田中直子、窪田洋子、鄭 炯美、中村一基、国友 勝、篠塚和正、生活習慣病モデルラットの尾動脈におけるプリン作動性交感神経伝達調節機能の減弱に対する降圧薬の影響、第 108 回日本薬理学会近畿部会 (2005 年 11 月 11 日、西宮)
 - 49) 鄭 炯美、田淵正樹、瀬占奈美江、窪田洋子、籠田智美、東野英明、橋本道男、篠塚和正、SHR/NDmcr-cp (SHR-cp) の交感神経伝達機能に対するニコランジルの影響、Effect of nicorandil on sympathetic neurotransmission in SHR/NDmcr-cp. 第 79 回日本薬理学会年会 (2006 年 3 月 8-10 日、横浜)
 - 50) 籠田智美、窪田洋子、瀬占奈美江、山口 優、中村一基、国友 勝、篠塚和正、生活習慣病モデルラット大動脈に生じる NO 産生能亢進に対

- する各種降圧薬の効果 Effects of antihypertensive drugs on enhanced nitric oxide production in aortas of SHR/NDmcr-cp(cp/cp) rats, a new animal model of metabolic syndrome. 第79回日本薬理学会年会 (2006年3月8-10日, 横浜)
- 51) 窪田洋子、梅垣敬三、瀬古奈美江、籠田智美、中村一基、国友 勝、篠塚和正, ラットにおけるニカルジピンの降圧作用に対するイチヨウ葉エキス短期投与の影響. Effects of short-term *Ginkgo biloba* extract feeding on hypotensive action of nicardipine in rat. 第79回日本薬理学会年会 (2006年3月8-10日, 横浜)
- 52) 武内博朗、的場一成、西川原総生、奥田健太郎、泉福英信、花田信弘: 歯周病関連菌由来バイオフィルムの光学的検出評価法の検討. 第54回日本口腔衛生学会総会 (2005年10月、東京).
- 53) 金子 昇、泉福英信、花田信弘、宮崎秀夫: 高齢者における唾液中抗 PAc (361-386) IgA 抗体. 第54回日本口腔衛生学会総会 (2005年10月、東京).
- 54) 新井貴子、林田亜美子、苗代明、今井奨、花田信弘、鴨井久一、沼部幸博: 呼吸と歯肉溝滲出液中の歯周病原性細菌量との関連、日本歯周病学会 (2005年9月、札幌).
- 55) Takahashi N. Metabolic System of Periodontal Pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*: Similarity and Difference. The 8th European Oral Microbiology Workshop (Halkidiki, Greece) (2005年5月13日).
- 56) Takahashi N. Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. The 8th European Oral Microbiology Workshop (Halkidiki, Greece) (2005年5月14日).
- 57) 石井瑛一郎、山田雄大、小川裕平、天野一字、五十嵐公英、高橋信博、佐々木啓一、小関健由: 口腔内環境計測装置の試作. 東北大学歯学会 (2005年6月29日).
- 58) 鷲尾純平、佐藤拓一、小関健由、高橋信博: 舌苔中の硫化水素産生菌数の網羅的検索と菌種の同定—口臭との関連—. 第47回歯科基礎医学会学術大会 (2005年9月29日、仙台) 歯基礎誌 47(S): 126 (2005).
- 59) 中條和子、岩見憲道、高橋信博: *Enterococcus faecalis* の、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus sanguinis* の糖代謝の耐酸性と耐アルカリ性. 第47回歯科基礎医学会学術大会 (2005年9月29日、仙台) 歯基礎誌 47(S): 138 (2005).
- 60) 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 pH 低下能、酸中和能とう蝕罹患経験との関連. 第54回口腔衛生学会・総会 (2005年10月8日、東京) 口腔衛生会誌 55(4): 509 (2005).
- 61) 熊耳隆洋、清水弘一、五十嵐公英、高橋信博: 歯周疾患リスクファクターとしてのプラーク中のアンモニア濃度. 第53回口腔衛生学会・総会 (2005年10月8日、東京) 口腔衛生会誌 55(4): 510 (2005).
- H. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む)。
- 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。

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—

分担研究者 上野川修一 日本大学生物資源科学部 教授

研究協力者 細野 朗 日本大学生物資源科学部 講師

研究要旨 いわゆる健康食品はその保健効果に関する国民の関心は高いが、その科学的根拠には不確かなものがあることや、厳正な有効性の評価方法が存在しないなどの問題点がある。そこで、本研究は医薬品とは違った意味で食の保健効果を科学的、厳正に評価する独自の方法を確立すべく、特に免疫系に対して有効性の高い健康食品を正しく評価し、その成果を国民の健康維持・増進に役立てることを目的とした。

平成 17 年度は免疫系の有効性についての最適評価法の確立を目指し、マウスを実験モデルにさまざまな食品成分を対象にした免疫系の有効性評価法の検証を行った。特に、平成 16 年度に論文調査によってまとめた食品の免疫調節機能の評価法の中で、特に感染を予防する抗感染食品としての有効性評価法について以下の食品成分を被検物質としてその有効性を検証した。

・対象とした食品成分：プロバイオティクス成分（*Bifidobacterium* 菌体成分、ケフィアグレイン）、プレバイオティクス成分（フラクトオリゴ糖）、酵母由来精製多糖成分（ β -グルカン）、さとうきび抽出物など

BALB/c マウスに各食品成分を一定量経口投与し、マウス個体より腸管および腸管免疫系の関連リンパ組織であるパイエル板、腸間膜リンパ節、粘膜固有層、盲腸リンパ小節などを採取し、腸管免疫系の粘膜感染防御において重要な免疫グロブリン A (IgA) 抗体の腸内容物中濃度、各腸管免疫系の関連リンパ組織の細胞群が産生するサイトカイン (IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ など) や IgA 抗体、細胞増殖活性、さらに全身免疫系の中の脾臓細胞のサイトカイン産生、末梢血単核細胞の細胞傷害活性（ナチュラルキラー活性）などを解析した。その結果、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* 7041 菌体成分、ケフィアグレイン、フラクトオリゴ糖をマウスに経口投与すると、パイエル板細胞の IgA が高産生されること、パイエル板細胞が IgA 産生を誘導するのに関係の深いサイトカイン産生 (IL-5、IL-6、IFN- γ など) の応答が亢進することが明らかとなった。さらに、ケフィアグレインやさとうきび抽出物をマウス経口投与すると、末梢血単核球のナチュラルキラー活性が亢進し、脾臓細胞のサイトカイン産生などへも影響がみられたことから、全身免疫系における免疫調節作用にもこれらの食品成分が関与することが示唆された。なお、これらの食品成分による腸管免疫系への作用機序を解明すべく、蛍光標識した *Bifidobacterium* 菌体成分をマウスに経口投与したところ、投与後数時間後にパイエル板、小腸粘膜固有層、盲腸リンパ小節にこの菌体を取り込まれているのが観察され、さらに各部位に存在している樹状細胞 (CD11c 陽性細胞) に直接作用していることが観察されたことから、パイエル板においてはこの菌体成分の投与によって腸管免疫系の樹状細胞、および CD4 陽性 T 細胞の応答が直接修飾され、IgA 産生の誘導が活性化されることが示唆された。以上より、本評価法が食品の免疫調節作用を実験動物レベルでの有効性を評価するものとして有用な方法であることが示唆された。今後さらに、その作用機序を解明するために、感染実験との関連性、臨床データとの関連を考慮したニュートリゲノミクスによる解析を加えた総合的な評価が必要である。

1. 動物実験による抗感染食品および抗アレルギー食品としての免疫調節作用の有効性評価方法の確立

A. 研究目的

いわゆる健康食品についてその有効性評価を厳正に行うためには、医薬品とは違った意味で食の保健効果を科学的、厳正に評価する独自の方法を確立しなければならない。本研究は、特に免疫系に対して有効性の高い健康食品を正しく評価し、その成果を国民の健康維持・増進に役立てることを目的とした。さらに、ヒトでの有効性を評価するためのスクリーニング系として、かつ健康食品のもつ生体への保健機能の詳細なメカニズムを解明する意味で、動物実験による評価方法確立の重要性は大きい。そこで、本研究は免疫系について、特に抗感染食品および抗アレルギー食品としての免疫系有効性の評価方法を動物実験系で確立することを目指した。

B. 研究方法

プロバイオティクス菌体成分やプレバイオティクス、さらに免疫調節作用が期待される食品成分をマウスに経口投与し、動物個体や免疫系細胞の免疫学的パラメータの解析を行った。

1) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 7041 (Bp) 菌体をマウスに経口投与したときの腸管関連リンパ組織への菌体成分の取り込みと細胞応答 (IgA 抗体およびサイトカイン産生) に与える影響についての評価

Bifidobacterium pseudocatenulatum 7041 (Bp) 菌体はその菌体成分にリンパ球に対する強いマイトジェン活性を有する菌体多糖を有しているプロバイオティクス菌体である。この菌体成分による腸管免疫系応答の修飾作用を解明するために、あらかじめ 5- (and 6-) carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE) で蛍光標識をした Bp 菌体を雌性 BALB/c マウス (7-9 週齢) に 1×10^9 CFU/head 経口投与し (対照は生理食塩水のみ投与)、投与後 1 時間後、4 時間後、6 時間後の小腸パイエル板 (PP)、小腸絨毛部位、盲腸リンパ小節 (CF)

を含む盲腸粘膜組織のそれぞれの凍結組織切片を作成した。さらに、各腸管組織切片を Cy5 標識抗マウス CD11c 抗体によって免疫染色し、共焦点顕微鏡観察により Bp 菌体の腸管組織中における局在性を観察した。また、Bp 菌体成分を雌性 BALB/c マウス (7-9 週齢) に 1×10^9 CFU/head、7 日間、生理食塩水に懸濁して連続経口投与し (対照は生理食塩水のみ投与)、パイエル板 (PP)、盲腸リンパ小節 (CF) のそれぞれの細胞を採取して超音波破砕した菌体成分 (*Bifidobacterium immunomodulator*, BIM) と共培養を行った。このときのそれぞれの細胞培養上清より、総 IgA 量、サイトカイン産生量を ELISA 法にて定量した。

2) ケフィアグレイン (KG)、さとうきびエキスなどのマウス経口投与による免疫調節作用についての評価

KG、さとうきびエキスなどを 1) と同様に雌性 BALB/c マウス (7-9 週齢) に 10 mg/head、7~14 日間、生理食塩水に懸濁して連続経口投与し (対照は生理食塩水のみ投与)、パイエル板 (PP)、腸間膜リンパ節 (MLN)、脾臓 (SP) のそれぞれの細胞を採取して BIM と共培養を行った。このときのそれぞれの細胞培養上清より、総 IgA 量、サイトカイン産生量を ELISA 法にて定量した。また、全採血によって得られた血液より比重分離法により末梢血単核細胞 (PBMC) を精製した。そして、精製した PBMC をエフェクター細胞として、マウスリンパ腫細胞株である YAC-1 をターゲット細胞として共培養し、溶解した細胞から放出される安定な細胞質性酵素であるラクトースデヒドロゲナーゼを定量的に測定し、ナチュラルキラー (NK) 活性の測定を行った。

3) フラクトオリゴ糖 (FOS) の構成糖をマウスに経口投与したときの免疫調節作用についての評価

FOS はグルコース 1 分子に対してフルクトースが 2~4 分子結合した形の難消化性糖類であり、その主要な構成糖はケストース (GF2) およびニストース (GF3) である。これらは経口摂取することによって腸内細菌叢に対して選択的に資化されて腸内環境を変化させるプレバイオティクスとして生

体への保健効果が期待されている。そこで、プレバイオティクスの腸管免疫系への修飾作用を解明すべく、0、それぞれ7.5%配合のFOS、GF2、GF3添加飼料をマウスに4週間自由摂取させ、腸内容物中IgA量に与える影響を解析した。

C. 研究結果

1) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 7041 (Bp) 菌体の免疫調節作用の評価

Bp菌体の腸管関連リンパ組織への取り込みについては、小腸部位では経口投与1時間後小腸パイエル板(PP)、および粘膜固有層に菌体が到達していた(図1)。一方、盲腸リンパ小節(CF)には経口投与4時間後に菌体の取り込みを観察することができたが盲腸粘膜固有層では菌体を検出できなかった(図2)。いずれもBp菌体が存在する部位はCD11c陽性細胞の存在と一致していることが観察された。次に、Bp菌体を1週間連続経口投与することによって、腸管免疫系の誘導部位と考えられているPPと、盲腸に存在するがその免疫学的な機能がまだよくわかっていないCFの細胞応答に与える影響を解析したところ、総IgAや各種サイトカイン産生はBIMの刺激によって総IgA産生量は亢進し、IL-5、IFN- γ 産生が増加する特徴がみられ、さらにIL-12産生も高い傾向がみられた。これらの結果はPPとCF細胞が極めて類似したパターンの応答であった(図3)。

2) ケフィアグレイン(KG)、さとうきびエキスなどの免疫調節作用の評価

KGの経口投与によって腸内容物中の総IgA量には影響はみられなかったが、PP細胞のIgA産生およびIL-6、IFN- γ 産生、SPL細胞のIFN- γ 、IgA、IL-12産生量が亢進し、また、細胞増殖活性の増強が認められた(図4、5)。さらに、末梢血単核細胞(PBMC)のNK活性が有意に増強された(図6)。また、さとうきびエキスのマウス経口投与によってPBMCのNK活性が亢進した(データ掲載なし)。

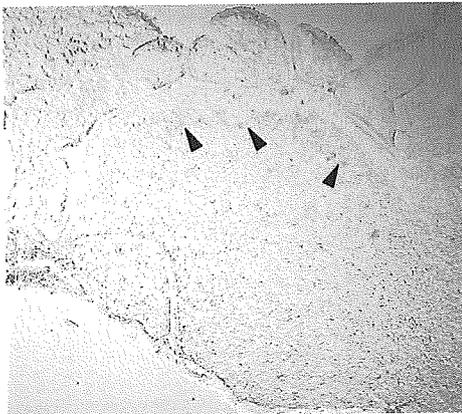
3) フラクトオリゴ糖(FOS)構成糖の免疫調節作用の評価

FOSのマウス経口投与によって、腸管粘膜中に分泌される総IgA量は増加することがこれまでに

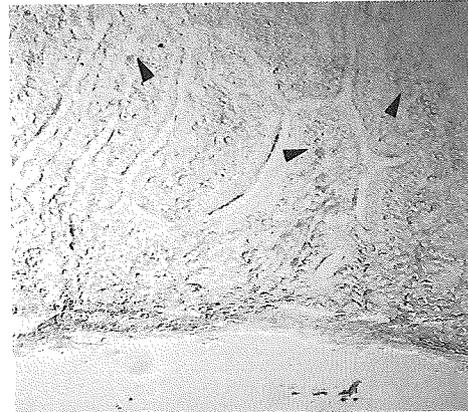
明らかになっているが、FOSを構成している主要な構成糖であるGF2およびGF3の4週間のマウス経口投与によっても、腸内容物中の総IgA量が有意に増加し、特に盲腸・結腸・直腸を含む大腸内容物中の総IgA量の増加が小腸(空腸・回腸)部位の内容物に比べて顕著であった(図7)。

D. 考察

マウスに経口投与されたプロバイオティクスとしての*Bifidobacterium pseudocatenulatum* 7041(Bp)菌体は、主に小腸部位においてはパイエル板および粘膜固有層に取り込まれ、循環帰巣経路を介して腸間膜リンパ節に到達することが推察された。特に、小腸パイエル板においてはM細胞から抗原の取り込みが比較的容易に起こることが知られており、このBp菌体についてもパイエル板のM細胞より取り込まれていることが考えられる。また、小腸絨毛部には絨毛M細胞というパイエル板M細胞とよく似た抗原取り込み部位が報告されており、小腸部位の粘膜固有層に経口投与後1時間という比較的短時間の間にBp菌体の存在が確認されたことから、小腸粘膜固有層には小腸絨毛M細胞または腸上皮細胞間のタイトジャンクションを経由して取り込まれている可能性が考えられた。さらに、本研究において盲腸部位のリンパ小節(CF)においてもBp菌体を取り込まれていることがはじめて明らかになり、小腸・盲腸部位の腸管関連リンパ組織に経口摂取したBp菌体を取り込まれ、CD11c陽性細胞を介して直接腸管免疫系細胞応答を感作している可能性が示唆された。実際に、小腸パイエル板細胞、盲腸リンパ小節の細胞ともIgA産生やサイトカイン産生の誘導が活性化されており、食品として摂取したプロバイオティクス菌体が直接腸管免疫系細胞に作用していることが示唆された。同様に、他の食品成分(ケフィアグレイン、さとうきびエキス、フラクトオリゴ糖など)による免疫調節作用についても腸管免疫系におけるIgA産生の誘導、および全身免疫系における細胞傷害活性を活性化する作用がみられ、宿主の感染防御に対してこれらの食品成分が有効に作用している可能性が示唆される。しかし、



小腸パイエル板(1時間後)

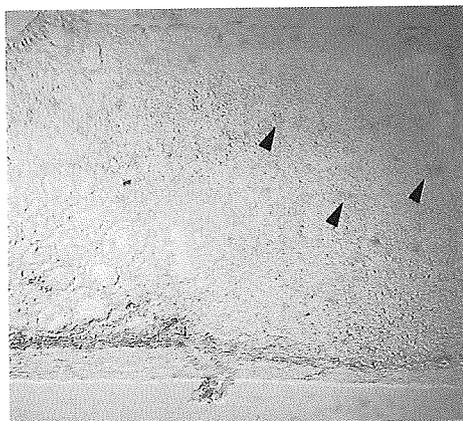


小腸絨毛(1時間後)

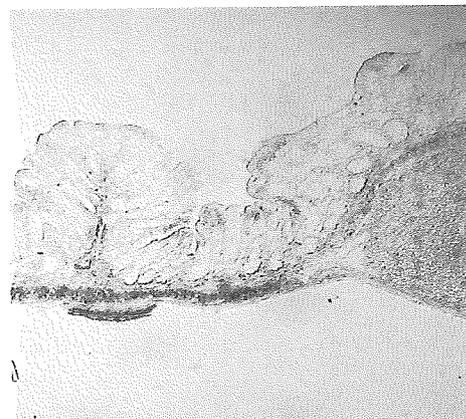
Bp ; FITC, CD11c ; Cy5

図1. 経口投与した*Bifidobacterium*(Bp)菌体の小腸部位での局在性

- ・パイエル板だけでなく絨毛部位でも経口投与した菌体がとりこまれていた。
- ・組織内に取り込まれた菌体と樹状細胞の局在位置が一致していた。



盲腸リンパ小節(4時間後)

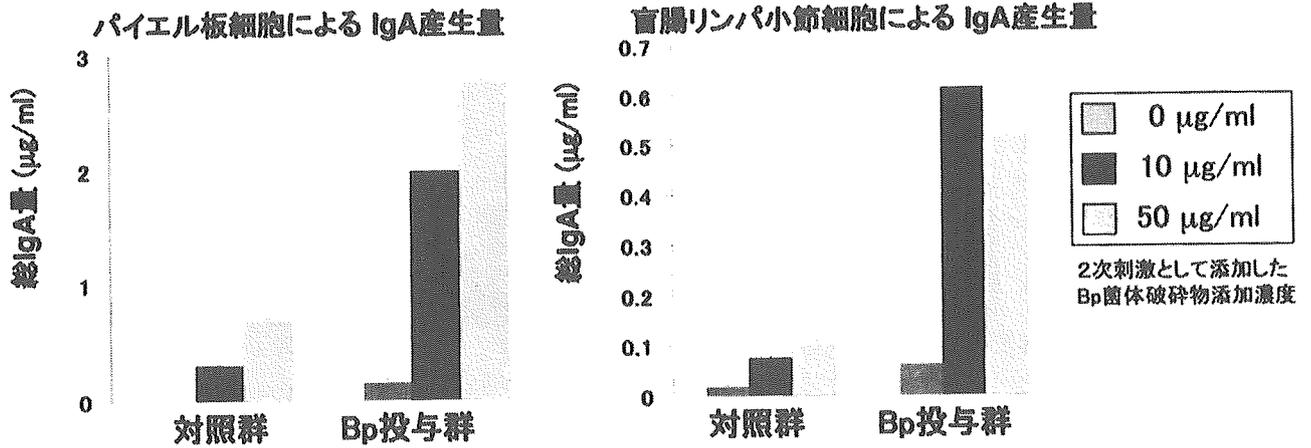


盲腸(4時間後)

Bp ; FITC, CD11c ; Cy5

図2. 経口投与した*Bifidobacterium*(Bp)菌体の盲腸部位での局在性

- ・盲腸リンパ小節以外では投与後6時間以内で菌体の存在を確認できなかった。
- ・組織内に取り込まれた菌体と樹状細胞の局在位置が一致していた。



対照群 (Bp 菌体非投与群) と比較したときの細胞応答

	IL-5	IL-6	IL-12	IFN- γ
パイエル板	↑	↔	↑	↑
盲腸リンパ小節	↑	↔	↑	↑

図3. *Bifidobacterium* (Bp) 菌体を1週間マウスに経口投与したときの各腸管免疫系組織におけるIgAおよびサイトカイン産生に与える影響

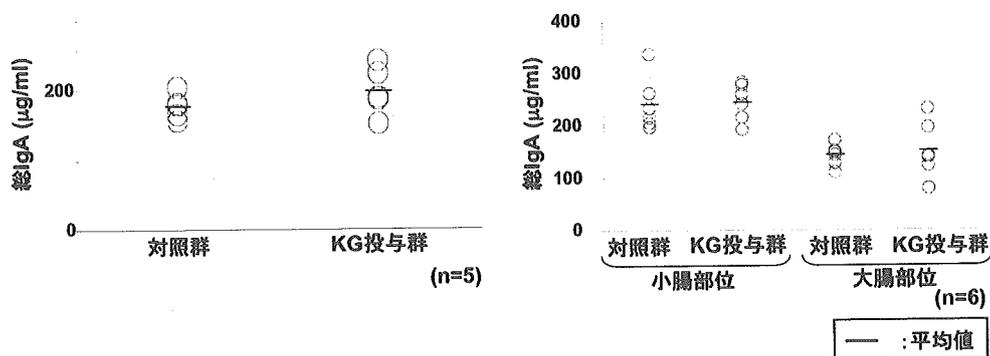


図4. ケフィアグレインを1週間マウスに経口投与したときの腸内容物中総IgA量に与える影響

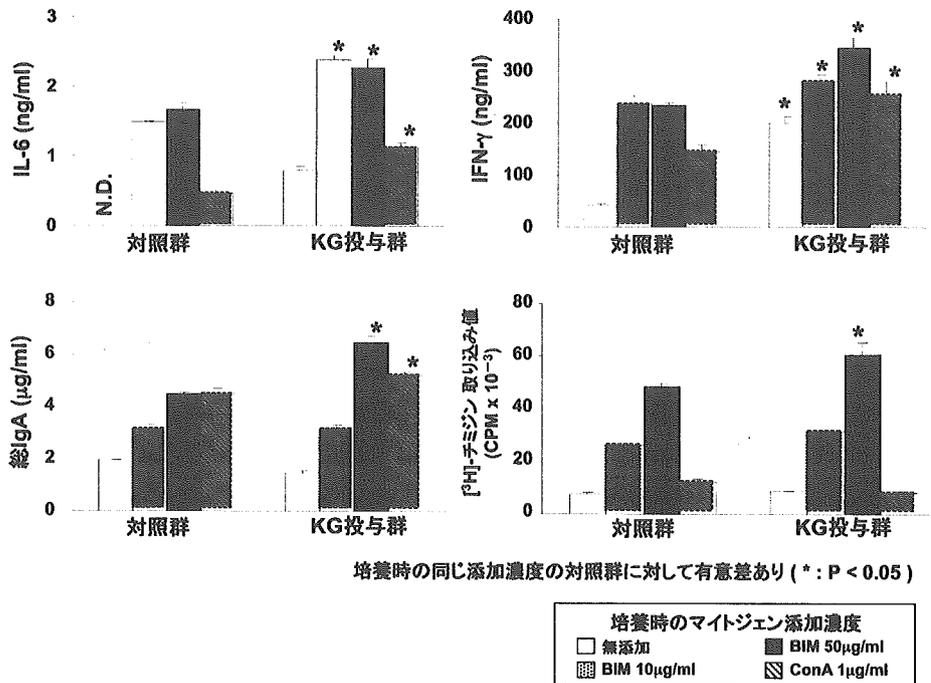


図5. ケフィアグレインを1週間マウスに経口投与したときの
パイエル板細胞応答に与える影響

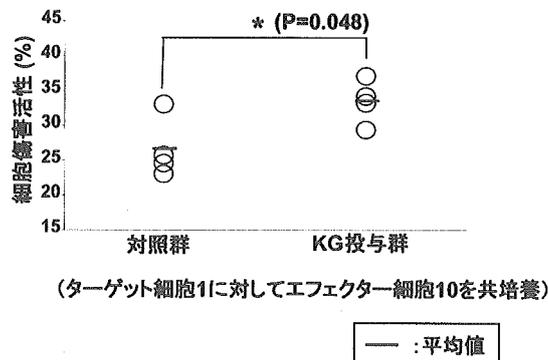


図6. ケフィアグレインを1週間マウスに経口投与したときの
末梢血単核球のNK活性に与える影響

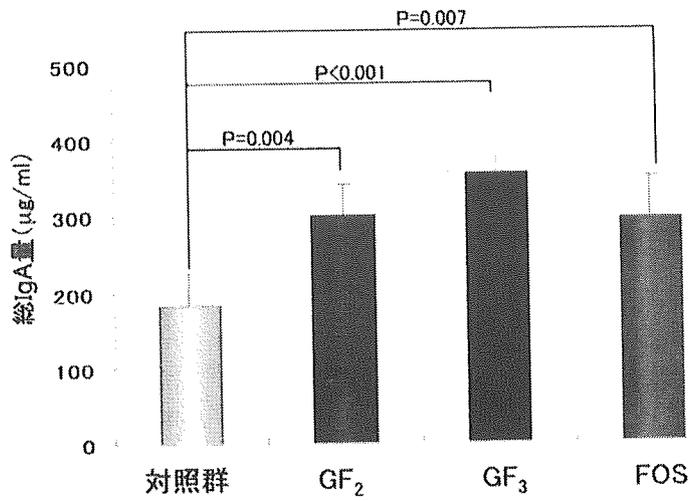


図7. FOS、GF₂、GF₃をマウスに投与したときの大腸内容物中総IgA量

厳密な免疫調節作用についての評価系という観点からは、これらの免疫系のマーカーが実際の感染防御やアレルギー制御反応にどの程度関与しているのかを評価することが必要である。そのためにはマウスを用いた動物実験レベルでの感染実験やそのときの免疫系マーカーの変動、さらに遺伝子レベルでの解析を総合的に評価することが必要であると考えられ、今後、動物実験による免疫調節作用の評価方法がより精度の高いものとして確立させる必要があると考えている。加えて、さらなる免疫系への作用機序の解明を進め、信憑性の高い免疫調節作用の証明をめざしたい。

E. 結論

健康食品の免疫調節作用について動物実験による手法による評価系を用いることは、ヒトでの有効性を評価するためのスクリーニング系として、かつ健康食品のもつ生体への保健機能（免疫調節作用）の詳細なメカニズムを解明する意味で、その重要性は大きい。したがって、抗感染食品の評価方法には感染防御反応に重要な IgA 抗体、さらにその IgA 抗体産生の誘導に重要な IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ などのサイトカインなどを測定することが有効性評価方法として意義がある。そこで、今年度はマウスに免疫調節作用が期待される食品成分を実際に経口摂取させ、その免疫応答への影響を検証した。すなわち、プロバイオティクス菌体やケフィアグレイン、プレバイオティクスとしてのフラクトオリゴ糖などの食品成分を経口投与したところ、プロバイオティクスとしての *Bifidobacterium* 菌体は腸管連リンパ組織中（パイエル板、小腸粘膜固有層、盲腸リンパ小節、腸間膜リンパ節など）に取り込まれ、CD11c 陽性細胞を介して免疫反応を感作していることが示唆された。そして、感染防御反応に重要な IgA 抗体の誘導に積極的に関与していることが明らかとなった。今後は、健康食品の免疫調節作用について、その評価結果の信憑性を高めるために、さらに、その作用機序の解明を進める必要があり、感染実験と免疫系マーカーの関連を厳密に評価すること、さらに遺伝子レベルでのニュートリゲノミクスに

よる解析を加えた総合的な評価を行い、厳密な意味で食品の免疫調節作用の評価系を確立させる必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

・論文発表

- 1) Nagura T, Hachimura S, Kaminogawa S, Aritsuka T, Itoh K, Characteristic intestinal microflora of specific pathogen-free mice bred in two different colonies and their influence on postnatal murine immunocyte profiles. *Exp. Anim.* 54, 143-148 (2005)
- 2) Komoto S, Miura S, Koseki S, Goto M, Hachimura S, Fujimori H, Hokari R, Hara Y, Ogino T, Watanabe C, Nagata H, Kaminogawa S, Hibi T, Ishii H, Effect of specific antigen stimulation on intraepithelial lymphocyte migration to small intestinal mucosa. *Clinical and Experimental Immunology* 140, 249-257 (2005)
- 3) Lo DY, Chen TH, Chien MS, Koge K, Hosono A, Kaminogawa S, Lee WC, Effect of sugar cane extract on the modulation of immunity in pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 591-597 (2005)
- 4) Kim JY, Lee S, Jeong DW, Hachimura S, Kaminogawa S, Lee HJ, Effects of intraperitoneal administration of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* cellular fraction on immune response. *Food Sci. Biotechnol.* 14, 405-409 (2005)
- 5) Hattori M, Hiramatsu K, Kurata T, Nishiura M, Takahashi K, Ametani A, Kaminogawa S, Complete refolding of bovine beta-lactoglobulin requires disulfide bond formation under strict conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1752, 154-165 (2005)
- 6) Ise W, Nakamura K, Shimizu N, Goto H, Fujimoto K, Kaminogawa S, Hachimura S Orally tolerized T cells can form conjugates with APCs but are defective in immunological synapse formation. *J.*