

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)

・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, 伊勢渉, 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 Hachimura. 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)
- 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（食品の安心・安全確保推進研究事業）
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
-アレルギー改善食品の評価法の開発：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
	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

1) 臍帯血単核球について *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. bifidum*) 刺激による TNF- α 、IL-10 産生能を解析し、質問票により生後 4 か月までアレルギー発症の有無を追跡できた児において解析したところ、生後 4 か月までに湿疹を発症した群では、非湿疹発症群よりも *Bifidobacterium* 刺激による IL-10 産生能が低下していた。この差異は *B. bifidum* 刺激において顕著であった。以上から、①新生児の免疫細胞に対する刺激能はプロバイオティクスの菌種によって異なること、②プロバイオティクスに対する新生児単核球の IL-10 産生能が乳児期のアレルギー疾患の発症と関連すること、が示唆された。さらにこの結果は、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を示している。また、TLR2 リガンドである peptidoglycan (*Lactobacillus acidophilus*) 刺激での臍帯血単核球の TNF- α 産生能は臍帯血 IgE と逆相関をとっており、臍帯血単核球 TLR2 を介するサイトカイン産生能は胎児期の IgE 産生と関連することが示唆された。今後、アレルギー発症と臍帯血単核球のサイトカイン産生を対比させていく作業を進めていくことにより、アレルギー予防に有用な食品の評価法確立が期待される。

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。

昨年度の研究では、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

B. 方法

平成16年度に設定した追跡調査可能な新生児のコホート集団について、*Bifidobacterium* 刺激により臍帯血単核球から産生される炎症性サイトカイン、調節性サイトカインの解析を行い、アレルギー発症と臍帯血 IgE 値などの免疫パラメーターとの関連について検討を行った (図1)。

C. 研究結果

1) 臍帯血単核球からのサイトカイン産生能に与える *Bifidobacterium* 菌種間の相違

昨年度、24臍帯血単核球について *B. bifidum*、*B. adolescentis* の標準株による刺激での TNF- α および IL-10 産生を解析したところ、*B. adolescentis* の方が有意に TNF- α および IL-10 産生を誘導した。今年度は解析臍帯血数を増やして解析を行ったが昨年と同様の結果が得られ、昨年度の結果を確認した (図2)。

2) *Bifidobacterium* 菌種による臍帯血単核球からのサイトカイン産生能とアレルギー発症

臍帯血単核球からのプロバイオティクス刺激によるサイトカイン産生とアレルギーの発症の関連を解析する目的で、生後4か月の時点で湿疹を発症した児 (12名) と非発症児 (26名) の *B. bifidum*、*B. adolescentis* 刺激での TNF- α および IL-10 産生量を比較した。*B. adolescentis* 刺激での臍帯血単核球からの TNF- α および IL-10 産生量には湿疹群と非湿疹群の間で差異は認められなかった。一方、*B. bifidum* 刺激での臍帯血単核球からの TNF- α は両群で差異が認められなかったが、IL-10 産生量は湿疹群において非湿疹群に比べて統計学的に有意に低値であった (図3)。従来からアレルギー疾患発症の予測マーカーとしての有用性が指摘されている臍帯血 IgE 値は湿疹群と非湿疹群の間で差異は認められなかった (図4)

3) TLR2 および TLR4 刺激による臍帯血単核球

からのサイトカイン産生能と臍帯血 IgE の関連

妊娠中の胎児のアレルギー反応を反映している可能性がある臍帯血 IgE と臍帯血単核球からのサイトカイン産生能の関連を解析した。特異的リガンドによる臍帯血単核球の Toll like receptor (TLR) 2 および TLR4 刺激による TNF- α および IL-10 産生量が高値であるほどの相関を検討すると、臍帯血 IgE 値と TNF- α および IL-10 産生量は逆相関する傾向が認められ、TLR2 リガンド (ペプチドグリカン) 刺激による TNF- α 産生量と臍帯血 IgE 値の間には統計学的に有意な負の相関が認められた (図5)。臍帯血単球上の TLR2、TLR4、CD14 発現量と臍帯血 IgE 値の間には相関はなかった (図6)。

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、今年度はプロバイオティクス刺激による臍帯血中単核球からのサイトカイン産生とアレルギー疾患の発症の関連を解析した。その結果、*B. bifidum* 刺激による臍帯血単核球刺激による IL-10 産生能に、4 か月での湿疹群と非湿疹群の間で差異が存在することが示された。4 か月での湿疹の有無が直ちにアレルギーを示すかについてはその後の児の症状を追跡する必要があり、4 か月以降のアレルギー症状の有無について調査を行っている。

アレルギー疾患を有する児ではアレルゲン刺激による末梢血単核球からの IL-10 産生が健常児に比較して低いことやプロバイオティクスである *Lactobacillus rhamnosus* 投与によりアトピー性皮膚炎の改善に伴い血清中の IL-10 ならびに単核球からの IL-10 産生能が増加することが報告されている。このように免疫担当細胞からの IL-10 産生低下はアレルギー疾患の発症に関連することが示されている。昨年度および今年度の我々の検討では、*B. adolescentis* に比べて、*B. bifidum* が有意に臍帯血単核球からの TNF- α お

よびIL-10産生能が低いことが示された。アレルギー疾患発症の有無を予測する上では、サイトカイン産生誘導能の弱い腸内細菌による刺激での臍帯血単核球サイトカイン産生の評価がアレルギー発症のリスクを有する児の同定には有用であることが示唆される。一方、アレルギー疾患発症予防という点からは、IL-10産生誘導能の高いプロバイオティクスが有用である可能性がある。これについては、アレルギー疾患発症高リスクの新生児に対するプロバイオティクスの投与による介入試験が必要となると考えられるが、臍帯血単核球からのIL-10産生能の評価は、アレルギー発症予防に有用なプロバイオティクスの選択の方法である可能性がある。

従来からアレルギー疾患発症のマーカーのひとつとされてきた臍帯血IgEと臍帯血単核球からのTLR刺激によるサイトカイン産生を比較すると、臍帯血IgE値とTNF- α およびIL-10産生量は逆相関する傾向が認められ、TLR2リガンド刺激によるTNF- α 産生量と臍帯血IgE値の間には統計学的に有意な負の相関があった。臍帯血IgEは胎児のアレルギーの状態を反映していると考えられるが、胎児の自然免疫系の反応性の低下がIgE値の上昇の原因なのか、IgE値を上昇させる胎内環境が自然免疫系からのサイトカイン産生能の低下を規定しているのかは明らかではない。しかし、近年出生時の単核球の活性化レベルが低いことがアレルギー疾患発症のリスクであるとの報告もあることから、臍帯血単核球からのサイトカイン産生能の低下は胎児のアレルギー反応を反映し、またアレルギー疾患発症に関連すると考えられる。プロバイオティクスが単核球からのサイトカイン産生能を促進するとすれば、母体に対してのプロバイオティクス投与は胎児の自然免疫系の活性化につながる可能性もある。今回の検討では、臍帯血単核球上のTLR発現は、臍帯血IgE値と関連がなかった。したがってTLR刺激による臍帯血単核球からのサイトカイン産生はTLRの下流のシグナル伝達経路に障害があるこ

とが示唆される。今後はサイトカイン産生能の低い児の臍帯血単核球のTLR（特にTLR2）を介するシグナル伝達経路の分子レベルでの解析が望まれる。

来年度は、アレルギー粗疾患の発症の有無と母体および児の便中細菌叢を解析して、臍帯血単核球からのサイトカイン産生能ともあわせて検討を行いたい。

E. 結論

1) *Bifidobacterium* 菌種による臍帯血単核球からのサイトカイン産生誘導能の違いが確認された。*B. bifidum*は*B. adolescentis*に比べてサイトカイン、特にIL-10産生誘導能が低かった。臍帯血単核球からのIL-10産生誘導能の弱い*B. bifidum*は、臍帯血単核球のIL-10産生の個体差の評価に適しており、アレルギーを発症する可能性のある児の同定に有用である可能性がある。

2) TLR2リガンド（同様に*Bifidobacterium*も）刺激による臍帯血単核球のTNF α 産生能は胎内での児の免疫能を反映しており、その活性のレベルは胎児のIgE産生能と逆相関する。アレルギー発症予防のためのプロバイオティクスとしては、臍帯血単核球からのサイトカイン産生能の高い菌が有用である可能性がある。

本研究の結果は、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、アレルギー発症予防において有用と考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・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).

2. 学会発表

- ・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．
- ・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．

図1 アレルギーの予知と予防研究のためのコホート

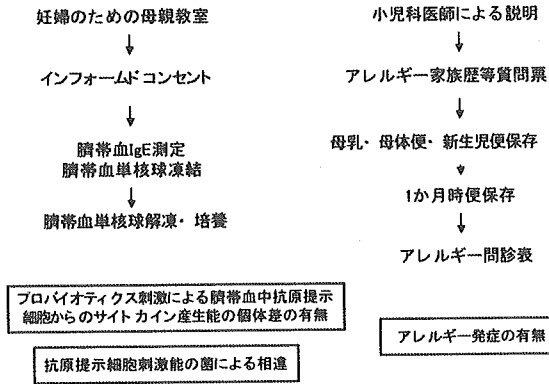


図4 生後4か月時湿疹の有無と臍帯血IgEとの関連

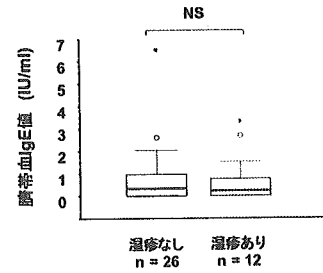


図2 Bifidobacterium菌種によるサイトカイン産生誘導能の違い

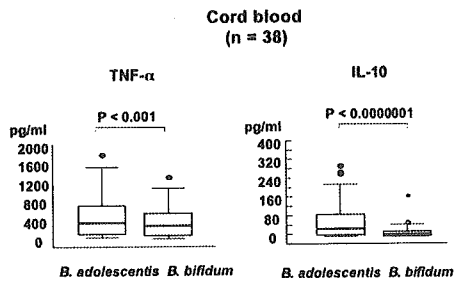


図5 Toll like receptor刺激による臍帯血単核球のサイトカイン産生能と臍帯血IgEの関連

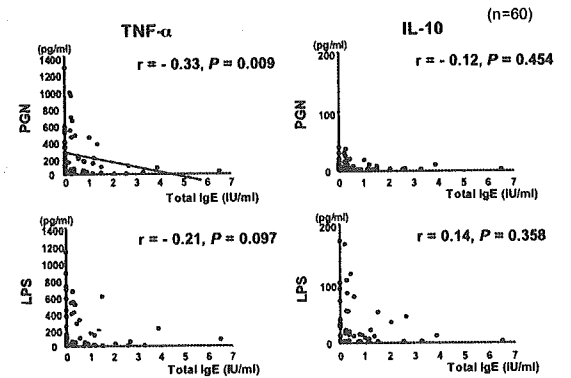


図3 Bifidobacterium刺激による臍帯血単核球からのサイトカイン産生能と生後4か月時湿疹の有無

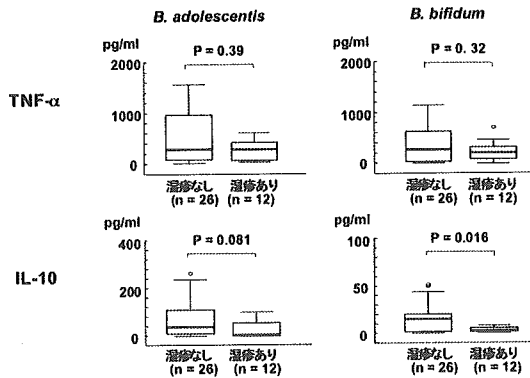
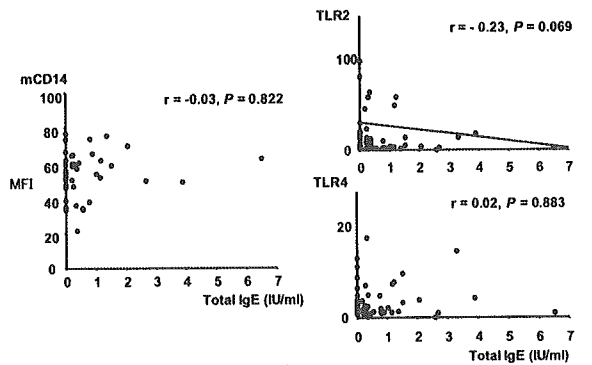


図6 臍帯血単核球mCD14, TLR2, TLR4発現量と臍帯血IgEとの関連



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
研究協力者 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

研究要旨 食品成分の免疫調節機能、特に腸管免疫系に対する調節機能を評価するシステムの構築を目的として、マウス胎仔小腸由来の初代培養上皮細胞を用いた解析を行ってきた。しかし得られる細胞数に制限があり、様々な食品成分の評価系としての利用は困難であると考えられた。そこで、マウス初代培養上皮細胞にガン遺伝子を導入して不死化することにより、新規上皮細胞培養株の樹立を行った。得られた細胞株は抗原提示機能を有し、初代培養と比較して反応の強さは弱いものの、細菌成分刺激に対して同様の炎症性サイトカインやケモカインの発現上昇が観察された。この細胞株を用いることにより、今後網羅的な遺伝子発現の解析が可能となった。また、マウス小腸上皮細胞の培養上清は、T細胞の抗原特異的増殖応答に対して抑制的に作用した。この抑制作用は上清中に含まれるプロスタグランジン E₂によるものであ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や、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。本研究では、DNA マイクロアレイ、プロテオミクス解析など、ある現象に関わる分子を網羅的に解析する手法を利用して、食品成分の腸管免疫調節機能を評価するシステムを構築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管腔壁を覆う小腸上皮細胞（Intestinal epithelial cell; IEC）に着目した。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 抗体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。近年、IEC が樹状細胞や T 細胞との相互作用により免疫応答の調節に大きく関与することが明らかにされつつある。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なっている可能性が考えられている。

本研究では、これまで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 の自然免疫応答や免疫調節機能について解析してきた。しかしながら、初代培養 IEC は得られる細胞数に制限があり実験計画上の制約となるとともに、多種類の食品成分の評価系としての利用は困難であると考えられた。そこで本年度は、免疫応答制御の基礎的研究に有用なマウスを由来とする新規 IEC 培養株の樹立を試みた。得られた細胞株について、細胞骨格タンパク質、消化酵素、細胞表面分子の発現、T 細胞に対する

抗原提示能、細菌成分に対する応答性を解析した。

一方、IEC は T 細胞の抗原特異的な増殖を抑制することが報告されているが、その機構は未だ不明な点が多い。これまでにマウス初代培養 IEC 培養上清中に抑制性の物質が含まれることを明らかにしており、本研究ではその物質の同定を試みた。

B. 研究方法

<新規マウスIEC培養株の作製>

ガン遺伝子のひとつである SV40 ラージ T 抗原 (TAg) の cDNA をレトロウイルス発現ベクター pMX-IG のクローニング部位へ挿入し、発現ベクター pMX-TAg-IG を得た。パッケージング細胞 PLAT-E に pMX-TAg-IG をリポフェクション法により導入し、TAg 発現レトロウイルスを産生させた。PLAT-E および pMXs-IG (Kitamura, T. *et al.*, *Exp. Hematol.* 31:1007-1014 (2003)) は、東京大学医科学研究所の北村俊雄教授より供与していただいた。

胎生期 16 日目の BALB/c マウス胎仔から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、DMEM 培地で培養した。

培養 5 日目に組織片を除き、TAg 発現レトロウイルスを感染させた。感染 48 時間後、培地交換を行い、さらに、10-14 日間培養した。IEC をトリプシン処理により回収後、サブクローニングを行い、単クローンからなる IEC 培養株を得た。

<免疫組織染色>

得られた IEC 培養株について、細胞骨格タンパク質、消化酵素に対する免疫組織化学染色を行った。コラーゲンコーティングした 8-well Chamber Slide に 2×10^4 個/well で IEC 細胞株をまき、4 日間培養後、氷冷アセトンで固定した。1% 正常ヤギ血清 (NGS)、0.1% Triton-X-100 を含む PBS でブロッキング後、1% NGS、0.1% Triton-X-100 を含む PBS で希釈した一次抗体を用いて 1 時間室温中で抗原抗体反応を行った。洗浄後、PBS で希釈した二次抗体を用いて 1 時間室温中で反応させた後、封入操作を行い、蛍光顕微鏡で観察した。また、細胞表面分子のフローサイトメトリー解析も行った。

<T 細胞増殖誘導試験>

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) の脾臓由来 CD4⁺T 細胞を磁気細胞分離法 (MACS) により調製した。脾臓由来 CD4⁺T 細胞は、脾臓由来 Thy1.2⁺ 細胞を抗原提示細胞として 0.5 μ M の OVA323-339 で刺激後、10 日間休止させたものを用いた。増殖誘導試験は T 細胞を OVA323-339 ペプチドの存在下、マイトマイシン C 処理した IEC 培養株ともに培養し、³H]チミジンの取り込みを指標として増殖を測定した。

<細菌成分刺激に対する応答の解析>

前日 12-well プレートに 2×10^5 /well となるように播種した IEC 細胞株に対し、細胞の接着を確認後、1 μ g/ml のリポ多糖 (LPS)、または 10 μ g/ml のペプチドグリカン (PGN) で 5 時間の刺激培養を行った。刺激培養後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA を Oligo-dT プライマーと混合し、逆転写酵素 (SuperScript II, Invitrogen) により cDNA を得た。各遺伝子に特異的なプライマーセットを用い、QuantiTectTM SYBR Green I PCR Kit (QIAGEN) を用いて LightCyclerTM (Roche Diagnostics GmbH) による定量的 RT-PCR 法を行った。未処理群での各遺伝子の発現量を 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。

<IEC 上清中の T 細胞増殖抑制因子の解析>

BALB/c マウス胎仔小腸より調製した初代培養 IEC を 24 時間培養し、上清を回収した。上清の加熱処理は 95°C 30 分間の条件で行った。また、分画分子量 5000 の限外濾過により低分子画分と高分子画分に分画した。インドメタシン存在下での培養の場合は、最後の 24 時間培養時に 0.1、1、または 10 μ g/ml インドメタシン (Sigma) を添加した。

DO11.10 マウスの脾臓由来 CD4⁺T 細胞を MACS により調製した。これを OVA323-339 ペプチドと抗原提示細胞で抗原刺激後、IL-2 存在下で 9-15 日間培養した細胞を T 細胞として用いた。

様々な処理をした IEC 培養上清の存在下、上記の T 細胞を OVA323-339 ペプチドと抗原提示細胞で抗原刺激して 96 時間培養し、最後の 24 時間の ³H]チミジンの取り込みを指標として増殖を測定した。

<プロスタグランジン E₂ の定量>

初代培養 IEC 上清中のプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 量を競合 EIA 法により測定した。PGE₂ の検出にはポリクローナル PGE₂ EIA キット

(Oxford Biomedical Research) を用いた。

LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)、PGN 10 $\mu\text{g/ml}$ 、CpG (3 μM)、Pam3CSK4 (0.5 $\mu\text{g/ml}$)、*E. coli* (30 $\mu\text{g/ml}$)、*L. casei* (30 $\mu\text{g/ml}$) で刺激し、培養 5 時間後に培地を全量置換し、24 時間培養後の上清中の PGE_2 量を定量した。また、同時に細胞も回収し、RNA を抽出し、 PGE_2 の生合成に関わる酵素の mRNA 発現を定量 RT-PCR 法により測定した。

C. 研究結果

<新規マウス IEC 培養株の樹立>

初代培養マウス IEC に SV40 ラージ T 抗原遺伝子を導入することによって、新規マウス IEC 培養株 (#1-1、#1-2、#1-6、#1-13) の樹立に成功した。これらはいずれも上皮細胞に特有の敷石状の培養像を示した (図 1)。

これらの IEC 培養株について、上皮細胞に特異的なサイトケラチンの発現を免疫組織化学染色法により解析したところ、いずれもサイトケラチン陽性であることが明らかとなった。一方、間葉系細胞に特異的なビメンチンの発現はいずれも陰性であった (データ省略)。

IEC の成熟マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼの発現を抗アルカリフォスファターゼ抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析したところ、いずれにおいても弱いながらも発現が認められた (データ省略)。このことから、得られた IEC 培養株は機能的に分化したものであることが示唆された。

免疫組織染色により、マウス初代培養 IEC は MHC クラス II 分子を恒常的に発現していることが示されている。IEC 培養株でその発現をフローサイトメトリー解析したところ、恒常的な発現は認められなかったが、インターフェロン γ (IFN- γ) の存在下で 3 日間培養した場合に、MHC クラス II 分子の細胞表面への発現が観察された (図 2)。一方、未感作 T 細胞の活性化に重要な補助刺激分子である CD80/CD86 分子の発現は IFN- γ 刺激の有無に関わらず認められなかった (データ省略)。

次に、IEC 培養株の T 細胞に対する抗原提示能を調べた。IFN- γ 刺激した IEC 培養株を抗原提示細胞とした用い、D011.10 マウス由来 CD4^+ T 細胞の抗原特異的増殖応答を解析した (図 3)。その結果、予め抗原で感作を受けた CD4^+ T 細胞に対して、増殖応答誘導能が認められた。

IEC 培養株の細菌成分刺激に対する自然免疫応答を、炎症性サイトカインおよびケモカインの mRNA 発現を指標として調べた (図 4)。そ

の結果、細菌成分に応答して IL-1、IL-6、IL-12 および MCP-1 の遺伝子発現が増加したが、その応答は初代培養 IEC と比べて低いことが示された。

<IEC 上清中の T 細胞増殖抑制因子の解析>

初代培養 IEC 上清の T 細胞増殖応答に対する抑制効果は、抗 IL-10 抗体、抗 TGF- β 抗体を添加しても変化が認められなかった (データ省略)。このことから、IEC 上清の T 細胞に対する抑制活性にこれらのサイトカインは関与しないことが示された。また、T 細胞抑制活性は IEC 培養上清の低分子画分に認められ、また加熱によって消失しなかった (図 5)。IEC が産生することが知られている低分子物質のうち、熱に安定で T 細胞増殖を抑制する作用が知られているものとして PGE_2 が考えられた。 PGE_2 産生阻害剤であるインドメタシン存在下で培養した初代培養 IEC の上清は抑制活性を示さなかった (図 6)。また、IEC 培養上清中には PGE_2 が検出され、インドメタシン添加によりその産生量が減少した (図 7)。以上から、IEC の培養上清による T 細胞増殖抑制には PGE_2 が関与することが示唆された。また、本研究で樹立した IEC 培養株の上清中にも PGE_2 の産生が認められた (データ省略)。

菌体及び菌体成分刺激により、IEC の PGE_2 分泌量、誘導型 COX である COX-2 の遺伝子発現、COX-2 の下流で PGE_2 合成に働くプロスタグランジン E 合成酵素 (PTGES) の遺伝子発現が増加することが明らかとなった (図 8)。

D. 考 察

本研究で樹立された新規マウス IEC 培養株は、T 細胞に対する抗原提示機能を有すること、炎症性サイトカインやケモカイン、プロスタグランジン E_2 を産生するとともに、細菌成分刺激に応答しその産生が変化することから、腸管免疫系における IEC の機能解析や、食品成分の IEC を介した免疫調節機能を解析する上で、非常に有用な細胞となることが期待できる。得られる細胞数に制限がある初代培養 IEC を用いた場合には困難であった、免疫調節機能を有する様々な食品成分の IEC に

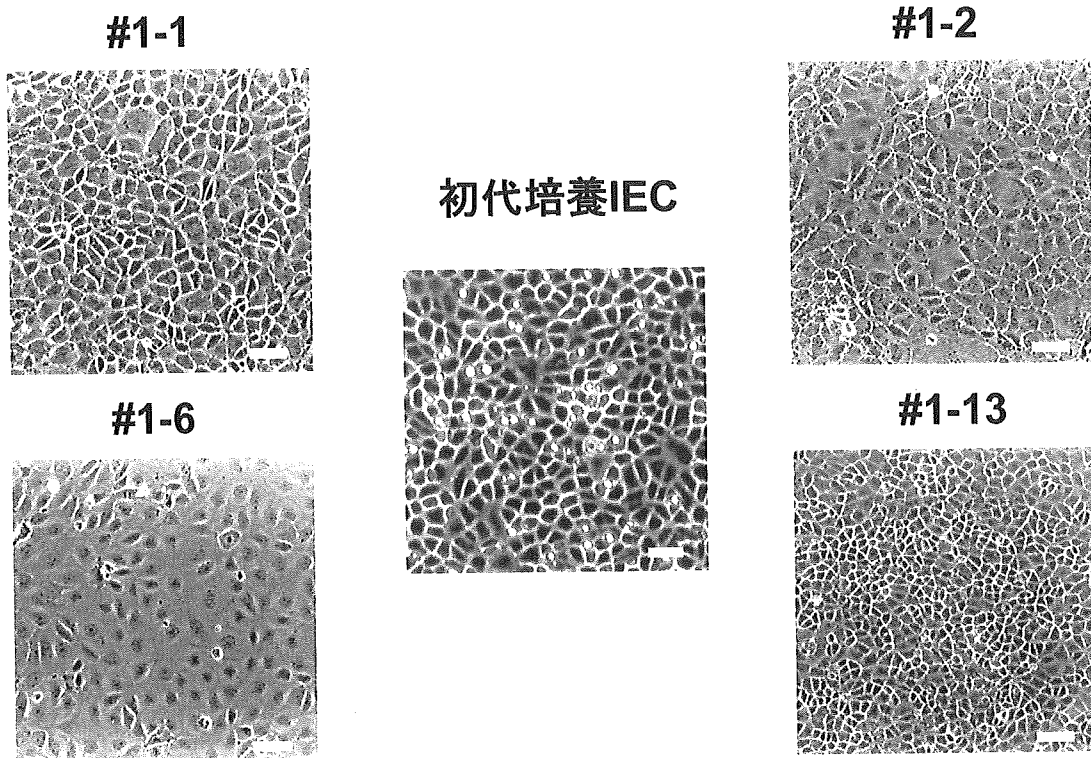


図1. 新規マウスIEC株の位相差顕微鏡像

樹立した新規マウスIEC株(#1-1、#1-2、#1-6、#1-13)について示した。初代培養マウスIECは培養後、14日目の細胞を示した。Scale bar = 50 μ m.

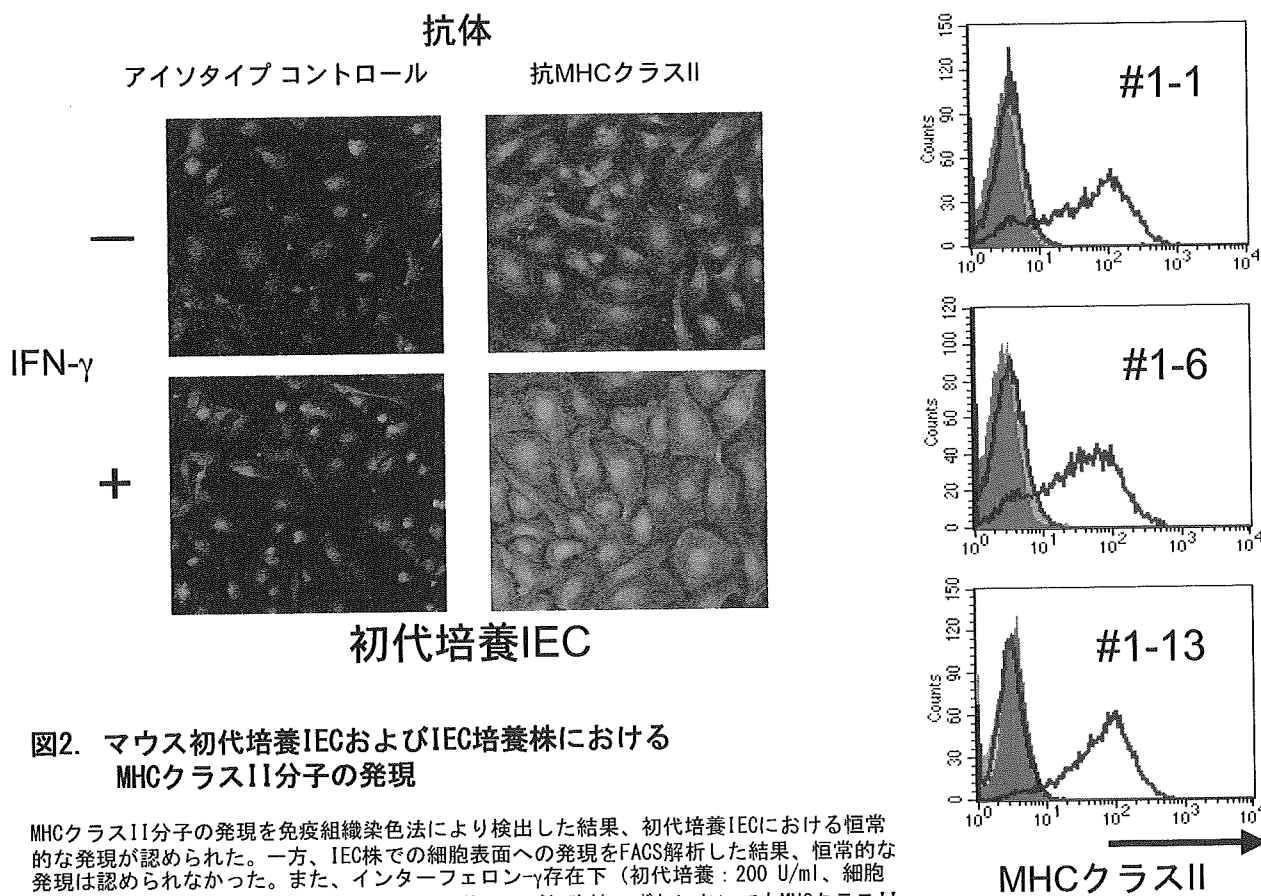


図2. マウス初代培養IECおよびIEC培養株におけるMHCクラスII分子の発現

MHCクラスII分子の発現を免疫組織染色法により検出した結果、初代培養IECにおける恒常的な発現が認められた。一方、IEC株での細胞表面への発現をFACS解析した結果、恒常的な発現は認められなかった。また、インターフェロン γ 存在下(初代培養: 200 U/ml、細胞株: 10 U/ml)で3日間培養した結果、初代培養および細胞株いずれにおいてもMHCクラスII分子の発現が上昇した。

SPL primed CD4 T細胞

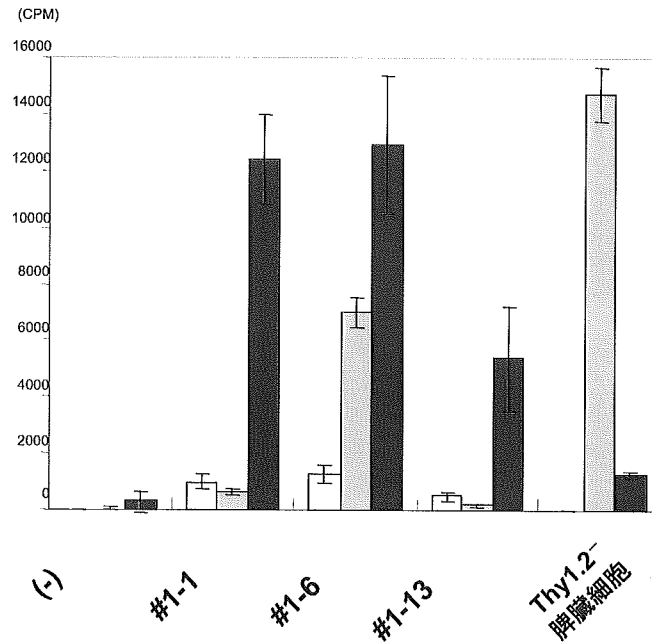


図3. IEC株で誘導される脾臓CD4⁺ T細胞の抗原特異的増殖応答

50 U IFN- γ で48時間培養したIEC培養株を抗原提示細胞としたDO11.10マウス脾臓(SPL)由来CD4⁺ T細胞の抗原特異的増殖応答を解析した。T細胞は1度抗原刺激をした後、IL-2とともに培養したものをを用いた。抗原: OVAペプチド 0 () 0.5 () 1.0 ()。

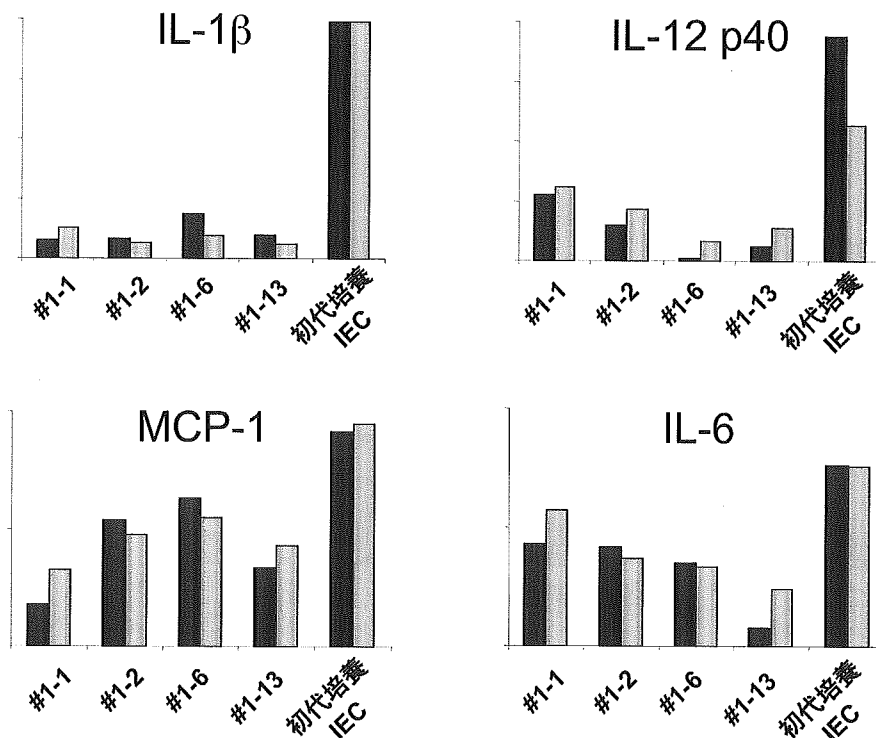


図4. 細菌成分に対するIEC培養株の炎症性サイトカインおよびケモカインの遺伝子発現応答

リポ多糖 (1 μ g/ml、青) またはペプチドグリカン (10 μ g/ml、灰) 存在下で5時間培養したIEC株および初代培養IECからRNAを抽出し、定量RT-PCR法を用いた遺伝子発現比較を行った結果を示した。グラフには、細菌成分を添加せずに培養したIECにおける発現量を1とした値を示した。

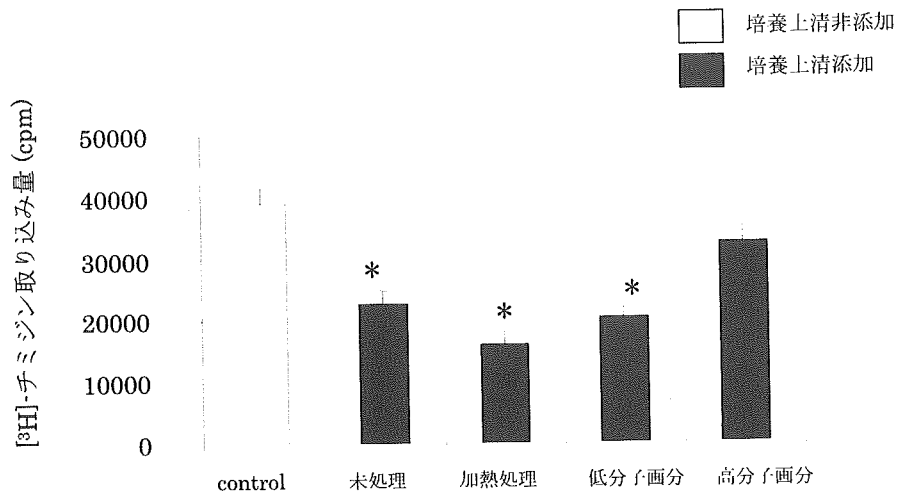


図5. 初代培養IEC培養上清中に存在する抑制因子の性質

IECの培養上清に対して、95°C、30分間の加熱処理または分画分子量5000の限外ろ過を行った。未処理上清、加熱処理上清、あるいは上清の低分子画分、高分子画分をそれぞれ添加し、CD4⁺ T細胞の増殖応答を比較した。CD4⁺ T細胞の増殖はAPCとOVA323-339とともに培養することで誘導した。培養72時間から96時間の[³H]-チミジン取り込み量を測定し、増殖応答を評価した。

*: IEC培養上清非添加群に対して危険率5%で有意差あり

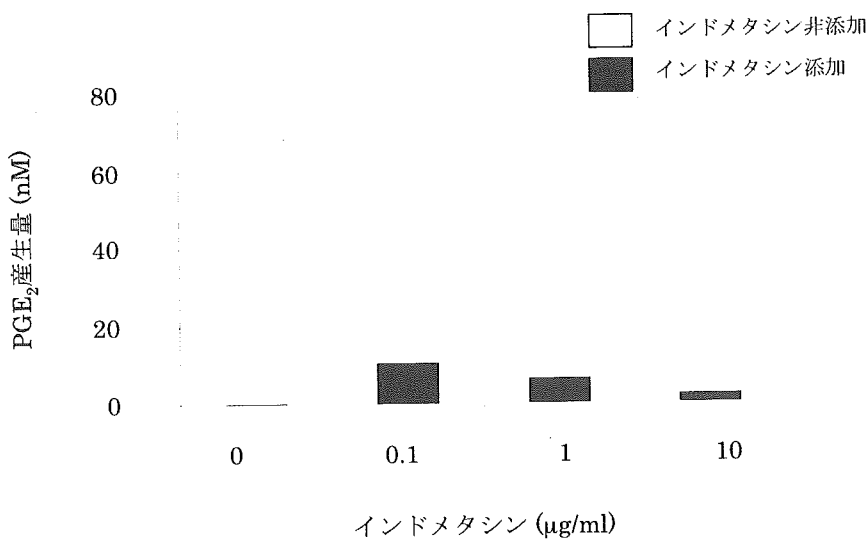


図6. 初代培養IECによるPGE₂の分泌とインドメタシンによる産生抑制

初代培養IECを24時間培養し、培養上清中のPGE₂量を競合EIA法を用いて測定した。また、インドメタシン存在下で培養したときの培養上清中のPGE₂量についても測定した。

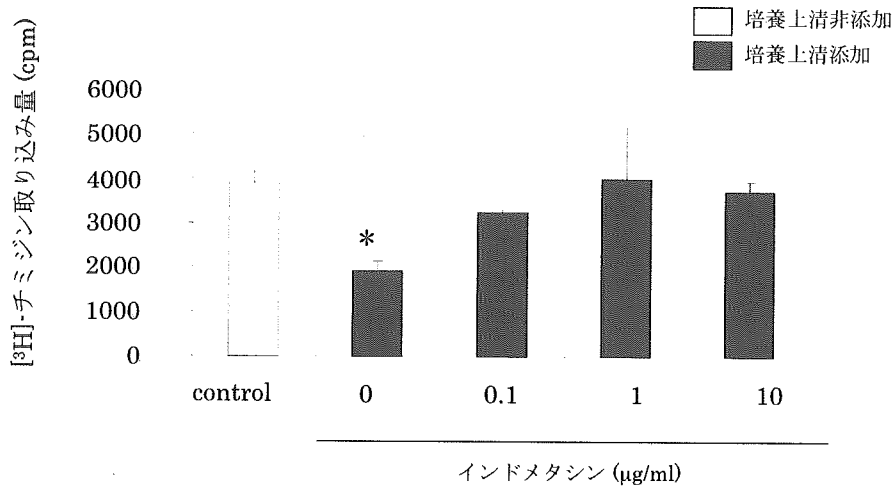


図7.インドメタシン共存下で培養した初代培養IECの培養上清におけるT細胞増殖抑制活性

CD4⁺ T細胞をAPCとOVA323-339とともに培養し、増殖を誘導した。インドメタシン存在下で24時間培養したIECの培養上清を添加し、CD4⁺ T細胞の増殖に対する抑制活性を評価した。培養72時間から96時間の増殖活性を測定した。

*: IEC培養上清非添加群に対して危険率5%で有意差あり

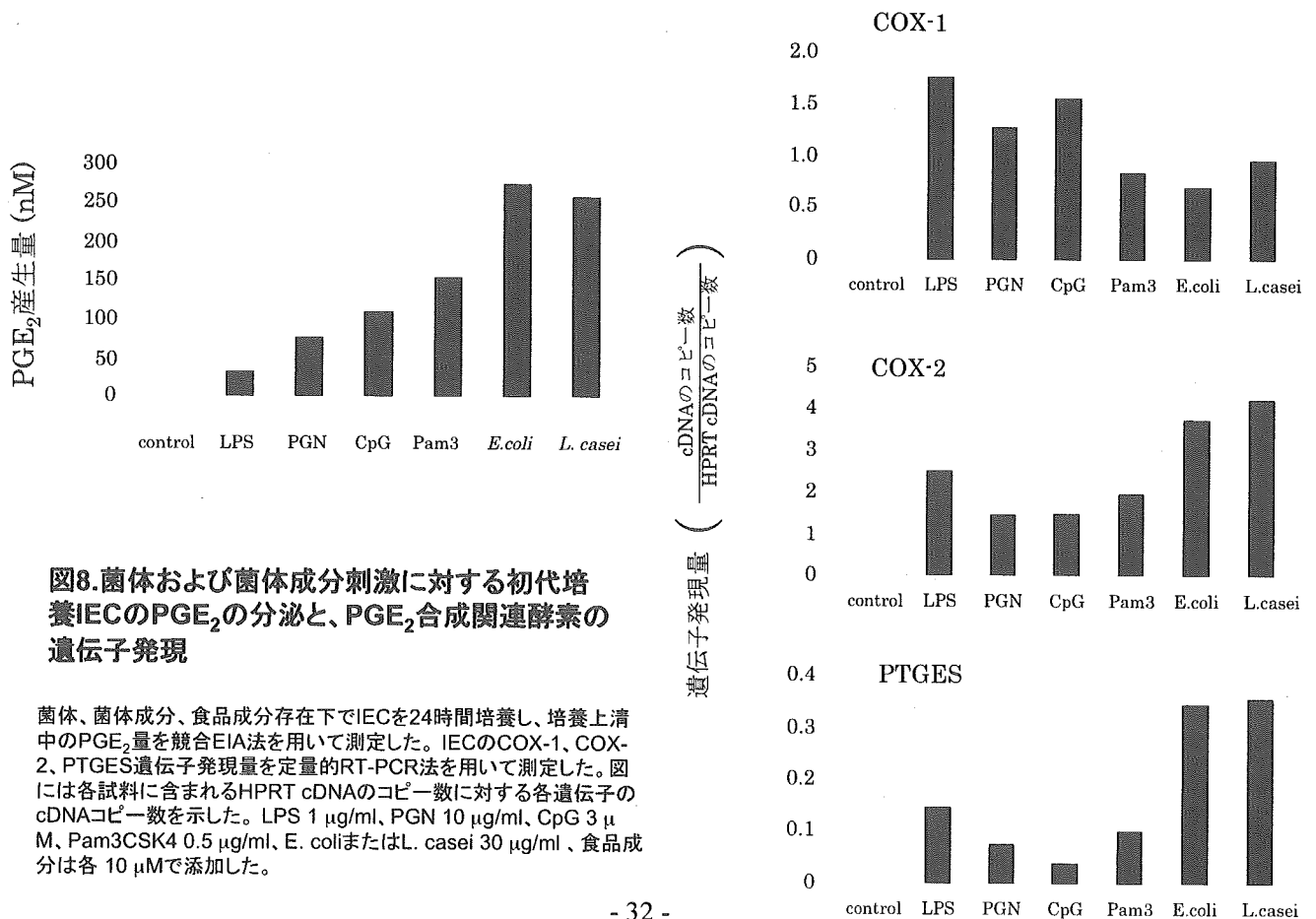


図8.菌体および菌体成分刺激に対する初代培養IECのPGE₂の分泌と、PGE₂合成関連酵素の遺伝子発現

菌体、菌体成分、食品成分存在下でIECを24時間培養し、培養上清中のPGE₂量を競合EIA法を用いて測定した。IECのCOX-1、COX-2、PTGES遺伝子発現量を定量的RT-PCR法を用いて測定した。図には各試料に含まれるHPRT cDNAのコピー数に対する各遺伝子のcDNAコピー数を示した。LPS 1 μg/ml、PGN 10 μg/ml、CpG 3 μM、Pam3CSK4 0.5 μg/ml、E. coliまたはL. casei 30 μg/ml、食品成分は各 10 μMで添加した。

対する作用を検索するというような実験も可能となろう。生体に経口的に投与した場合に同じような免疫調節作用を示す食品成分が、それぞれ IEC や樹状細胞など個々の免疫細胞に作用した場合にどのような変化を生じるのかを網羅的な遺伝子発現解析の観点から比較検討することにより、食品成分の免疫調節機能の評価法の確立が可能になると思われる。さらに、小腸上皮内リンパ球 (IEL) や粘膜固有層のリンパ球や樹状細胞と IEC との相互作用を明らかにすることにも役立つものと考えられる。

一方で、IFN- γ 刺激無しでは MHC クラス II 分子の発現が認められない点、細菌刺激に対する応答が弱い傾向が認められる点など、初代培養 IEC とは異なる点も明らかにされている。培養株で得られた知見を、初代培養 IEC あるいは実験動物個体にもどって検証する必要があると思われる。初代培養 IEC との違いが、ガン遺伝子を導入したために生じたものであるのか、今回得られた培養株がそういう性質の細胞株であっただけなのかは不明である。ガン遺伝子の発現を制御できるような細胞株、あるいは IEC の生理的な増殖を司る遺伝子を導入し、その発現を制御することで、より生体内での IEC の状態に近い細胞株が得られることも考えられる。

これまでの研究で、IEC は膜分子と液性因子を介した異なる機構により T 細胞増殖を抑制することを示唆する結果が得られている。膜分子を介した抑制には TGF- β が関与することが示唆されているが、その機構の詳細は不明である。一方、本研究の結果から液性因子を介した機構では、PGE₂ が主要な抑制因子であることが示唆された。また、IEC による PGE₂ 産生は細菌や細菌成分の刺激により増加することも示された。

昨年、PGE₂ による T 細胞増殖抑制には、制御性 T 細胞のマスター遺伝子である Foxp3 遺伝子の発現誘導が関与することが報告された。プロバイオティクスの経口投与がアトピー性皮膚炎などのアレルギー症状の緩和に寄与することが報告されているが、そのメカニズムは依然不明である。経口投与された菌体が IEC の PGE₂ 産生を増強することによって、腸管において制御性 T 細胞を増加あるいは機能強化することが、アレルギー症状緩和に寄与している可能性も考えられる。

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 IEC に着目した。これまでに確立した方法で得られた初代培養 IEC にガン遺伝子を導入することにより、新規マウス IEC 細胞株を樹立することに成功した。これらは、初代培養 IEC で認められた免疫機能をほぼ同様に保持しているものと考えられた。今後この培養株をもちいることにより、免疫調節機能を有する食品成分が IEC にどのような変化をもたらすのかについて、網羅的遺伝子発現解析により明らかにしていくことが可能となった。

また、IEC が PGE₂ の産生を介して T 細胞応答を抑制的に制御していることが示唆された。PGE₂ 産生は菌体刺激により増大することから、プロバイオティクスによるアレルギー症状緩和のメカニズム解明に向けて有用な知見であると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).

2. 学会発表

- 1) 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 (東京)、2005 年 4 月。
- 2) 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 (東京)、2005 年 5 月。
- 3) 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 (東京)、2005 年 7 月.
- 4) 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 (横浜)、2005 年 12 月.
 - 5) Hiroshi Akiyama, Yuji Sato, Takahiro Watanabe, Megumi H. Nagaoka, Yasuo Yoshioka, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Kiyoshi Yamada, Mamoru Totsuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Yukihiro 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 (横浜)、2005 年 12 月.
 - 6) 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 (横浜)、2005 年 12 月.
 - 7) 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.
 - 8) 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 (京都)、2006 年 3 月.
 - 9) 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 (京都)、2006 年 3 月.
 - 10) 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 (京都)、2006 年 3 月.
 - 11) 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 (京都)、2006 年 3 月.

(予定を含む。)
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

生活習慣病予防効果に対する健康食品等の評価法の検討

分担研究者：池上幸江、研究協力者：青江誠一郎、堀口美恵子（大妻女子大学）

研究要旨

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。なお、がん予防効果を食品では標榜することはできないので、本研究では、採用した方法との関連から、抗変異原性として表記した。

今回行った *in vitro* の Ames 試験は、突然変異の誘発を抑える食品成分を評価するスクリーニング法として、また末梢血を用いる小核試験は *in vivo* での食品成分の抗変異原性を簡便に評価する方法として有用である可能性が示唆された。また、健康食品素材として広く用いられている 19 種の成分に本法を適用し、抗酸化作用が示唆されている 6 種（イソフラボン、カテキン、ルチン、ヘスペリジン、クルミン、エラグ酸）については小核試験において効果を確認した。

他方、痩身や脂質代謝に対する健康食品素材の有効性は、3 種の実験動物：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を検討し、現在メタボリックシンドロームとの関係が明らかにされている脂肪組織に対する影響を中心として検討した。その結果、これらの 3 種の実験動物は痩身や脂質代謝への効果の評価する方法として有効であることが示された。これらの方法を用いて食物繊維の効果の評価したところ、水溶性で粘性のある食物繊維：タマリンドガム、アルギン酸ナトリウム、サイリウムの有効性が認められた。ダイエット素材として広く用いられているキトサンでは脂質の消化吸収阻害による影響が見られたが、脂肪組織への影響は粘性のある食物繊維に比べて弱いものであった。他方新たな食物繊維素材として注目されているレジスタントスターチでは有効性は確認できなかった。

現在食物繊維以外にも痩身や脂質代謝への効果が標榜されている α -リポ酸、L-カルニチンについて内臓脂肪蓄積型の KK マウスによってその有効性を評価したところ、 α -リポ酸では脂肪組織への効果が認められたが、L-カルニチンでは効果が見られなかった。

今後はさらに新たな評価法と素材について検討の予定である。

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。なお、がん予防効果を食品では標榜することはできないので、本研究では、採用した方法との関連から、抗変異原性として表記した。

抗変異原性効果に関する研究では、近年、国民の健康志向の高まりとともに、がん予防効果を期待させる食品が市場に数多く出回っている。しかし、そのような食品の中には科学的根拠が不確かなものがあることや、有効性の評価法が存在しないなどの問題がある。本研究では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構築することを目的とし、変異原性試験を応用して実験を行った。

他方、痩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、肥満予防効果をメタボリックシンドロームと関連させながら、脂肪組織に対する食品成分の関与を評価する方法と実際の食品成分への適用について検討した。

B. 研究方法

1) 抗変異原性を標榜する健康食品成分の有効性の評価

抗変異原性は、DNA 損傷誘発の抑制作用によって評価した。始めに *Salmonella typhimurium* の遺伝子突然変異による変異原性を評価する Ames 試験を行い、抗変異原性を示す食品成分をスクリーニングした。次にその食品成分を与えて飼育したマウスの末梢血を用い、骨髄での染色体損傷度を評価する小核試験を行った。

① Ames 試験

Ames 試験は、ヒスチジン要求性とした変異株 (His^-) に化学物質を作用させ、ヒスチジン非要求性となった復帰変異株 (His^+) を検出する変異原性試験である。用いた菌株は、Ames 氏らによって分

離された *Salmonella 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 株である (TABLE 1)。すなわち、グアニン:シトシン塩基対を標的とする塩基置換型変異を検出できる TA1975、その *uvrB* 欠損株である TA1535、またアデニン:チミン塩基対を標的とする塩基置換型変異を検出できる TA102、およびそれぞれの *mutM_{ST}* 欠損株である YG3002、YG3001、YG3003 の 6 種類である。*mutM_{ST}* 欠損株は、7、8-ジヒドロ-8-オキシグアニン (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。これらの 6 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。これらの菌株を Benzo[a]pyrene (B[a]P) 2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で処理し、可視光線照射下 (日立白色蛍光ランプ:15W、370 ~750nm、1000 lux)、37°C で 48 時間培養した。TA102 と YG3003 は、 H_2O_2 0.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で処理し、可視光線非照射下で同様に培養した。培養後に各菌株のヒスチジン復帰変異体数を数え、食品成分を添加 (各 1 $\mu\text{mol}/\text{plate}$) した場合との DNA 損傷誘発作用を比較した。食品成分としてゲニステイン、ゲニスチン、ダイゼイン、ダイジン、グリシテイン、グリシチン、ナリンギン、ケルセチン、ルチン、エピガロカテキンガレート (以下、エピガロカテキン)、フラボン、フラバノン、クルクミン、エラグ酸は和光純薬株式会社 (東京) から、ナリンゲニン、ヘスペレチン、ヘスペリジンは東京化成工業 (東京) から購入した。また、食品素材としてイソフラボンを 40.38% 含む大豆抽出物 (以下、イソフラボン) は A 社より、エピガロカテキンを 95% 含む緑茶抽出物 (以下、カテキン) は B 社より分与して頂いた。なお生菌数の測定により、上記 19 種類の食品成分は使用菌株への生育阻害がないことを確認して使用した。

②小核試験

小核は赤血球の元である赤芽球が分裂増殖していく過程で変異原物質 (小核誘発物質) が作用すると、分裂中期で染色体異常が起こり生成される。小核試験は幼若赤血球 (Polychromatic erythrocyte:PCE) に対する有小核幼若赤血球 (micronucleated polychromatic erythrocyte:MNPCE) の出現頻度を染色体損傷の指標とする変異原性試験である。

本研究では 5 週齢の ICR 雄マウス (チャールス・リバー株式会社) を対照飼料で 3 日間予備飼育した後、1 群 5 匹の 7 群に分け、TABLE 2 に示した AIN-93G 組成を基本とする対照飼料、および Ames 試験でスクリーニングした食品成分 6 種類をそれぞれ 0.5% 配合する各試験飼料で 3 週間飼育した。なお、飼育環境は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル (明期:9~21 時) とし、飼料と水は自由摂取させた。解剖 48 時間前に小核誘発物質として B[a]P を腹腔内投与 (125mg/kg) し、解

剖前に尾動脈より採血した末梢血をアクリジン・オレンジで蛍光染色した。なお、小核誘発の経時変化を確認するために、B[a]P 投与前、および B[a]P 投与 24 時間後にも採血し、染色を行った。次に蛍光顕微鏡 (落射蛍光装置: CX-RFL-2 (OLYMPUS)) 下で PCE をマウス 1 匹当たり 1,000 個観察し、その中に出現する MNPCE を数えた。なお、小核誘発物質の投与条件 (誘発物質の種類、投与量、投与時間) は予備実験によって設定した。

③統計処理

各測定結果は、平均値±標準偏差で示し、各群の有意差検定は Tukey-Kramer 法によって多重比較を行い、危険率は 5% とした。

2) 肥満・脂質代謝に関与する健康食品成分の有効性の評価

現在市販されている健康食品の中にはダイエット効果を標榜しているものが多い。これらの有効性については明確ではない。そこで、本研究では瘦身効果の有効性評価を、メタボリックシンドロームへの有効性も考慮した方法で行うこととした。脂肪組織の動態は、成長期では脂肪細胞数の増加と肥大化がみられ、中年期女性ではホルモンの分泌の変化に伴う脂肪組織の増加がみられ、とくにメタボリックシンドロームでは内臓脂肪の蓄積が問題となる。そこでこれらに該当する 3 種類の動物を用いた。第 1 の実験動物は成長期の正常ラットである。第 2 はリタイアラットに卵巣摘出術を施し、高脂肪飼料を投与する肥満ラットを用いた。第 3 には遺伝的に内臓に脂肪を蓄積しやすい KK マウスを用いた。

食品素材としては、各種食物繊維と瘦身効果を謳っている成分を用いた。

(1) 実験 I : 成長期ラットによる評価

①試験試料

実験には食物繊維素材としてコントロール群はセルロースを用い、キトサン、タマリンドガム、アルギン酸ナトリウムを用いた。セルロースは純度 96% 以上 (オリエンタル酵母株式会社製)、キトサンは 90% 以上 (甲陽ケミカル株式会社製)、タマリンドガムは 74% (大日本製薬株式会社製)、アルギン酸ナトリウムは 85% (大日本製薬株式会社製) を用いた。

②動物実験

実験飼料の組成を TABLE I-1 に示す。

動物は Sprague Dawley (SD) 系雄の 4 週齢ラットを用いた。1 群 6 匹とし、4 種目の食物繊維を含む飼料を 3 週間投与した。用いた食物繊維はコントロールとしてのセルロースの他、瘦身効果を標榜しているキトサンと粘性をもち、種々の生理活性のあるタマリンドガムとアルギン酸ナトリウムを用いた。

体重および飼料摂取量を測定し、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 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50%、12 時間明暗サイクル (12:00~24:00) とした。

実験終了日に4時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より採血、肝臓、副睪丸周辺脂肪、後腹壁脂肪、皮下脂肪を摘出し、皮下脂肪を除いて重量を測定した。重量測定後、肝臓は凍結乾燥後に粉碎し、分析用の試料とした。脂肪組織は10%ホルマリン溶液で固定し、組織検討の試料とした。

③血清脂質の分析

血清の脂質としては、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。総コレステロール濃度の定量には「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。

④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法により抽出、水洗後、総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度を酵素法にて分析した。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)を使用した。

⑤脂肪細胞の分析

副睪丸周辺脂肪、後腹壁脂肪、皮下脂肪組織は、ホルマリンに浸漬して固定した後、5 μ m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画像をNIH Image1.62を用いてラット当たり100個の細胞の直径を測定して平均値を求めた。各脂肪組織の脂肪細胞数は、Catherineらの方法(1998)により計算により求めた。

⑥血清アディポサイトカインの分析

血清レプチンは血清を5倍希釈し、マウス・レプチン・イノムアッセイキット(R&Dシステムズ社製)を用いて、ELISA法にて分析した。血清アディポネクチンは、血清を1111倍希釈し、マウス/ラットアディポネクチンELISAキット(大塚製薬株式会社)を用いて、ELISA法にて分析した。

⑦統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値 \pm 標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

(2) 実験II: 卵巣摘出肥満ラットによる評価

①試験試料

実験には食物繊維素材であるキトサン、サイリウム、レジスタントスターチを用いた。キトサンはキトサン含量が90%の素材を用いた(焼津水産化学工業株式会社)。サイリウムは総食物繊維

含量が96%の素材を用いた(敷島紡績株式会社)。レジスタントスターチはコーンスターチを湿熱処理した素材で、総食物繊維含量が55%の素材を用いた(日本エヌエスシー株式会社)。

②動物実験

対照飼料は、AIN-93G組成を基本とし、脂肪エネルギー比が50%になるようにラードをコーンスターチと置き換えた。キトサン、サイリウム、レジスタントスターチはそれぞれ、セルロースと置換して総食物繊維量が5.0%になるように添加した(TABLE II-1)。

動物は、10ヶ月齢以上、体重250~350g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(以下OVXと略す)、1週間の回復期間を設け、1群8匹の4群に群分けした。ラットにはTABLE II-1に示した実験飼料と水を56日間自由摂食させ、体重と飼料摂取量を測定した。また、擬似手術をしたラット(SHAM)群も8匹設け、対照試料を同期間与えた。

糞は、試験最終週の3日間分を採取し、表面を洗浄して凍結乾燥、粉碎し、分析用試料とした。ラットは実験最終日(56日目)に、飼料摂取量、体重を計測し、4時間絶食後にエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈より、血液を採取、肝臓、子宮、後腹壁脂肪、子宮周辺脂肪を摘出し、重量を測定した。その後、肝臓は凍結乾燥、粉碎し、後腹壁脂肪は10%ホルマリン溶液で固定し、それぞれ分析用の試料とした。

③血清脂質の分析

血清脂質のうち、総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質の分析は実験Iと同様に行った。HDL-コレステロールは酵素法にて分析した。血清non-HDLコレステロールは、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。HDL-コレステロールの定量には「HDL-コレステロールE-テストワコー」(和光純薬株式会社)を用いた。

④肝臓脂質の分析

肝臓脂質の分析は実験Iと同様に行った。

⑤糞中ステロールならびに総脂質の分析

酸性ステロールの定量は、凍結乾燥、粉碎した糞を80 $^{\circ}$ Cの熱エタノールで抽出後、総胆汁酸濃度を分析した。胆汁酸の定量には「総胆汁酸-テストワコー」(和光純薬工業株式会社)を使用した。総中性ステロールの定量には、内部標準として5 α -コレスタン(Sigma社)を加え、アルカリメタノールでケン化後、石油エーテルで抽出した。抽出液をTMS化させ、ヘキササンに溶解後、キャピラリーガスクロマトグラフィー(GC/MS)で分析した。総脂質は、4%酢酸含有Folch溶液により抽出後、Folchの水洗法により、塩類を除去し、重量法により測定した。

⑥脂肪細胞のサイズと数の計測

摘出した後腹壁脂肪組織について実験Iと同様に行った。

⑦血清レプチンおよびアディポネクチンの分析
血清レプチンと血清アディポネクチンは、実験 I と同様に行った。

⑧統計解析

平均値の差の検定はTukey-Kramerの多重比較法を用いた。測定結果は平均値±標準偏差で示し、有意水準は5%とした。

(3) 実験Ⅲ：KKマウスによる評価

①試験試料

実験にはサプリメントに使用されているキトサン、 α -リポ酸、L-カルニチンを用いた。キトサンはキトサン含量が90%の素材を用いた(焼津水産化学工業株式会社)。 α -リポ酸は純度99%以上の試薬を用いた(SIGMA社)。L-カルニチンは純度99%以上の試薬を用いた(BACHEM社)。

②動物実験

実験飼料の対照試料はAIN-93G組成を基本とし、脂肪エネルギー比が50%となるように、 α -コーンスターチをラードと置換した高脂肪飼料を用いた(TABLE III-1)。キトサンは、セルロースと置換して総食物繊維量が5.0%になるように飼料中に5.6%添加した。 α -リポ酸は、0.5%を α -コーンスターチと置換して添加した。カルニチンは、1.0%を α -コーンスターチと置換して添加した。

4週齢、雄のKKマウス(日本クレア株式会社)を1週間予備飼育した後、1群8匹の4群に群分けした。TABLE III-1に示した実験飼料と水をそれぞれ7週間、自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。

糞は、実験最終週の3日間分を採取し、表面を洗浄して、凍結乾燥後、粉砕し、分析用試料とした。飼育終了後、4時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取、肝臓、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織を摘出し、重量測定した。肝臓は凍結乾燥後、粉砕し、後腹壁脂肪組織は10%ホルマリン溶液で固定し、それぞれの分析用の試料とした。

③血清脂質の分析

血清脂質の分析は実験Ⅱと同様に行った。

④肝臓脂質の分析

肝臓脂質の分析は実験Ⅰと同様に行った。

⑤糞中ステロールならびに総脂質の分析

糞中ステロールと総脂質は実験Ⅱと同様に行った。

⑦血清レプチンおよびアディポネクチンの分析

血清レプチンと血清アディポネクチン濃度は、実験Ⅰと同様に行った。

⑧脂肪細胞のサイズと数の計測

後腹壁脂肪組織の脂肪細胞サイズと数は実験Ⅰと同様に行った

⑧統計解析

平均値の差の検定はコントロール群との比較をDunnettの多重比較法を用いた。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) 抗変異原性の可能性のある健康食品成分の有効性の評価

1) Ames試験

① B[a]Pによる突然変異誘発能とその抑制

TA1535、YG3001、YG3002における変異体数は、可視光線を照射して培養した場合、非照射に比べてそれぞれ31.2倍、41.2倍、44.7倍と有意に増加した(Fig. 1)。さらに可視光照射下のB[a]Pにおける変異体数は、可視光線照射のみに比べ、TA1975、TA1535、YG3001、YG3002でそれぞれ3.2倍、2.0倍、2.8倍、2.7倍と有意に増加した。TA102とYG3003では変異体数の有意な増加がみられなかった。

次に、可視光照射下のB[a]Pが誘発する突然変異を、食品成分が抑制する効果を調べた。Fig. 2は、グアニン:シトシン塩基対を標的とする塩基置換型変異を検出し、酸化型変異原に高感受性であるYG3001における抑制割合を示したものである。その抑制割合はエピガロカテキン、ケルセチン、ナリンゲニン、ヘスペレチン、クルクミン等で大きかった。また、アグリコン(ゲニステイン、ダイゼイン、ナリンゲニン、ケルセチン、ヘスペレチン)の方が、各配糖体(ゲニスチン、ダイジン、ナリンギン、ルチン、ヘスペリジン)における抑制割合より大きかった。なお、食品抽出物であるイソフラボンやカテキンについても、試薬として購入した純粋な食品成分とほぼ同様の傾向が見られた。TA1975、TA1535、YG3002においても、ほぼ同様の結果が得られた。

② H₂O₂による突然変異誘発能とその抑制

Fig. 1で可視光線照射による変異原性が誘発されなかったTA102とYG3003では、H₂O₂処理により変異体数が非照射に比べ、それぞれ1.5倍、5.1倍と有意な増加を示した(Fig. 3)。H₂O₂処理はTA1535、TA1975、YG3001、YG3002に対しては変異原性を示さなかった。

次に、H₂O₂が誘発する突然変異を、食品成分が抑制する効果を調べた。Fig. 4は、アデニン:チミン塩基対を標的とする塩基置換型変異を検出するTA102における抑制割合を示したものである。その抑制割合は、ヘスペレチン、ナリンゲニン等で大きかった。またYG3001と同様に、アグリコンの方が配糖体における抑制割合より大きかった。

以上、変異原物質によって*Salmonella typhimurium*に誘発される突然変異に対する食品成分の影響と各食品成分の価格等を考慮し、*in vivo*試験に用いる6種類(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)を選択した。

2) 小核試験

① 飼育結果

マウスの飼育結果をTABLE 3に示す。マウスの体重増加量、および飼料効率、対照群と6種類