

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上野川 修一

平成 19（2007）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 14

妊婦の腸内細菌叢および臍帯血単核球からのサイトカイン産生を指標とした
アレルギー改善食品の評価法に関する研究

河野 洋一 25

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

戸塚 護 30

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

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

池上 幸江 38

作用機序が明確でない食品の有効性の評価方法に関する研究

—精神疾患の改善や精神保健の用途における有効性が人試験で示唆されている食品素材について—

志村 二三夫 68

食品のもつ生活習慣病の予防効果の評価方法の検討(薬理学的方法による健康食品の有用性の評価)

篠塚 和正 84

3. 食品の口腔における有効性評価方法の確立

主に口腔における保健機能を有する食品の評価に関する検討

花田 信弘 111

人工口腔装置による健康食品のエナメル質脱灰能の評価法に関する検討

健康食品の舌バイオフィーム形成に及ぼす影響に関する検討

今井 奨 117

健康食品の酸産生性の評価方法に関する検討

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

高橋 信博 126

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

. 137

IV. 研究成果の刊行物・別刷

. 142

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

まず MEDLINE を利用した文献調査を行い、ヒトを対象にした評価方法、動物実験および in vitro 実験系による評価方法についてまとめた。さらに、食品成分による抗感染作用の有効性評価方法として、動物実験による経口投与試験での腸管免疫系細胞応答（IgA 抗体産生やサイトカイン産生など）や腸管関連リンパ組織の組織学的な検討、新規に樹立した腸上皮細胞（IEC）株を用いた免疫関連遺伝子や蛋白質の発現の解析などを行い、免疫調節機能の評価系に適した条件の検討を行った。また、抗アレルギー作用についてのヒトを対象にした有効性評価方法として、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、さらに、臍帯血中 IgE 値と出産後早期の母の糞便中の *Bifidobacterium* 量との関連を解析する方法を検討した。その結果、本動物実験や細胞を用いた評価方法は免疫調節機能、アレルギー予防機能を有する食品のスクリーニングやその作用量の検定に有用であると考えられ、早期の乳児期アレルギー発症の予測には臍帯血単核球からの腸内細菌刺激による IL-10 産生量の評価が有用である可能性が見出された。さらに国民生活の健康維持増進のために最も重要なことはヒトを対象にした評価方法を確立させることであり、その検証を精度よく進める今後の展開はますます期待が大きいと考えられる。

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

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。そして、がん発症予防の評価法としては抗変異原性試験による DNA 損傷を抑制する食品成分の評価、肥満・脂質代謝の評価法としては動物実験による脂肪組織や脂肪細胞の評価、脳・神経系の健康や精神保健への評価法は Natural Medicines Comprehensive Database 等のデータベースによる検索と DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現応答の網羅的解析方法を、さらに循環器疾患に対する食品の有効性評価は病態モデルラットを用いた各種循環パラメータ、血管組織の諸機能と細胞内カルシウムレベルを総合評価することによって、それぞれの評価方法を検証した。これらはいずれも in vitro 試験による有効性試験、動物実験による有効性試験としては作用機序の解明を含めた一定の成果がみられたが、ヒトによる有効性試験評価の重要性が高いことはいままでの間もない。

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

再石灰化促進機能評価のための代替評価法の有用性確認に Quantitative Light-induced Fluorescence system（可視光励起傾向定量法）を用いた初期う蝕の定量化・画像化による評価を、口臭の評価として電子嗅覚装置による総臭気指数を、また、人工口腔装置を用いた食品のう蝕誘発性評価、食品の酸産生検定システムの検討と「健康食品酸産生評価マニュアル」の作成、口腔疾患に関連する口腔微生物の DNA マイクロアレイによる微生物検出法の検討などを行った。これら食品の口腔内保健機能の評価方法は客観性、高精度、実用性（容易さ）などから有効な方法であることが示唆された。

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、応用化を図っていきたい。

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)
- 高橋 恭子 (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)
- 籠田 智美 (武庫川女子大学薬学部 講師)
- 多田有加里 (武庫川女子大学薬学部 副手)
- 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

実際に効果があると確認されている食品であるが、必ずしも作用機序が明確化されていない食品、あるいは食品そのものであるためまたは複数の成分が効果に関与しているため関与成分の特定が困難な食品等の有効性を、以下の①～③のテーマを中心に行った。

- 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

①では、抗感染作用を有する免疫調節機能の評価方法確立のため、免疫調節作用の有効性評価方法について MEDLINE を利用した文献調査を行い、ヒトを対象にした評価方法、動物実験および *in vitro* 実験系による評価方法についてまとめた。また、選別したプロバイオティクス菌をマウスに経口摂取させたときに腸管免疫系細胞に作用する応答 (IgA 抗体産生やサイトカイン産生など)

を解析した（平成 16 年度）。さらに、抗感染食品として期待される食品成分をマウスに経口投与したときの実際の腸管関連リンパ組織への直接的な作用を解析するために、摂取したプロバイオティクスの腸管リンパ組織での取り込みや各細胞応答の解析、腸管免疫応答の評価系に重要な新規腸上皮細胞（IEC）株の樹立と菌体刺激による免疫関連遺伝子や蛋白質の発現の解析を行い、免疫調節機能の評価系に適した条件の検討を行った（平成 17 年度）。そして、形状の異なるプロバイオティクス菌体成分、難消化性オリゴ糖類などさまざまな食品成分をマウスに経口投与したときの腸管免疫系の IgA 抗体産生誘導への作用機序、さらに全身免疫系における細胞傷害活性（NK 活性）に与える影響、プロバイオティクス菌体成分の刺激による IEC 細胞株への免疫関連遺伝子や蛋白質発現についても詳細に解析することにより、本研究で確立した免疫調節機能の評価方法の検証を進めた（平成 18 年度）。また、アレルギー発症予防に期待されるプロバイオティクスの選別方法を確立するため、追跡調査可能な新生児のコホート集団を設定し（平成 16 年度）、臍帯血単核球をプロバイオティクスで刺激したときに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免疫パラメータとの関連について検討を行い（平成 17 年度）、さらに、児のアレルギー発症の指標の一つである臍帯血中 IgE 値と出産後早期の母の糞便中の *Bifidobacterium* 量との関連、および乳児期の最初のアレルギー症状である湿疹の発症と *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E.coli* および腸内細菌菌体成分の刺激による臍帯血抗原提示細胞からのサイトカイン産生との関連を解析した（平成 18 年度）。

②では、EU における機能性食品の有効性判定法と表示内容について調査を行い、がん発症予防作用の評価法としての抗変異原性試験について DNA 損傷を抑制する食品成分の評価、肥満発症のメカニズム解析と食品成分の関与について抗酸化性分や食物繊維およびダイエットサプリメント素材を用いた評価方法の検証を行った。

また、精神疾患への有効性や脳・神経系への作用が期待される食品素材を PubMed、The Cochrane Database of Systematic Review、Natural Medicines Comprehensive Database などのデータベースによりヒト臨床試験において精神疾患への有効性や脳・神経系への作用が示唆されているが作用機序が明らかでない食品素材を選定し、これらをラットに投与したときの DNA マイクロアレイによるトランスクリプトミクスを利用した遺伝子発現の網羅的解析を行った。循環器疾患に対する食品の有効性評価については、イチョウ葉エキスと杜仲茶などを病態モデルラットなどに投与し、各種循環パラメータ、血管組織の諸機能と細胞内カルシウムレベルを評価し、評価法としての有効性を検討した。

③では、食品成分、特に歯科関連機能性食品の口腔内保健機能の評価として、再石灰化促進機能評価のための代替評価法の有用性確認に Quantitative Light-induced Fluorescence system（QLF：可視光励起傾向定量法）を用いた初期う蝕の定量化・画像化による評価を、口臭の評価として電子嗅覚装置による総臭気指数を、また、人工口腔装置を用いた食品のう蝕誘発性評価、食品の酸産生検定システムの検討と「健康食品酸産生評価マニュアル」の作成、口腔疾患に関連する口腔微生物の DNA マイクロアレイによる微生物検出法の検討などを行った。

（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

抗感染作用が期待されるプロバイオティクス菌体成分は、摂取することによって腸管関連リンパ組織（パイエル板や腸間膜リンパ節など）に到達して直接樹状細胞の刺激を介して IL-12 産生、CD4⁺細胞のサイトカイン産生を介した IgA 形質細胞への分化誘導などの細胞応答を誘導していることが明らかとなり、さらに難消化性オリゴ糖類、発酵乳成分も含めて全身免疫系に対しても作用し、末梢単核球における NK 活性を高める作用も明らかになった。同時に、IEC に対してもプロバイオティクス菌体がサイトカイン(IL-6)産生を誘導することが明らかとなり、これらは抗感染食品の評価のためのパラメータとなりうることを期待された。なお、感染実験によるこれらの免疫学的パラメータと微生物感染防御との総合的な検討を現在実施中である。さらに、臍帯血 IgE 高値の児の母親では臍帯血 IgE 低値（測定感度以下）の児の母親に比べて糞便中 *Bifidobacterium* 菌量が有意に少なく、母の糞便中のこの菌量は生後 1 か月の児の菌量と相関が認められたことから、妊婦の糞便中 *Bifidobacterium* 菌量を増やす食品は児のアレルギー発症リスクを低下させる可能性があると考えられた。生後 7 か月時点での湿疹の有無とその児の臍帯血単核球を *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E.coli* および腸内細菌菌体成分で刺激したときの IL-10 産生の関係には負の相関が見られ、早期の乳児期アレルギー発症の予測には臍帯血単核球からの腸内細菌刺激による IL-10 産生量の評価が有用である可能性が見出された。

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

抗酸化成分を中心とした健康食品素材の抗変異原性評価法として、単一細胞レベルにおける DNA 損傷を検出する *in vivo* コメットアッセイと、マウス肝臓の 8-OH d G を検出する方法を小核試験の結果と比較することによって検討した。その結果、小核試験と 8-OH d G は対象とする細胞が異なるにも関わらず、抗変異原性の結果はよく一

致した。他方、コメットアッセイでは検出感度はかならずしも十分ではなかった。小核試験と 8-OH d G はヒトによる評価に適応することも可能であるが、今後さらにヒトでの評価法とするには更なる検討が必要である。痩身や脂質代謝に対する健康食品素材の有効性評価法は、2種類の実験動物（KK マウスと成長期ラット）を用いて評価する方法についてとくに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 2 種の実験動物は痩身や脂質代謝、あるいはメタボリックシンドロームへの効果を評価する方法として有効であることが示されたが、素材によって結果が異なることも明らかとなり、今後更なる検討が必要である。また、神経系への作用についての評価方法については、DNA マイクロアレイによるトランスクリプトミクスを利用した遺伝子発現の網羅的解析を中心とする取り組みが、脳に対する作用機序が明確ではない食品素材の有効性を評価する上で有用であることが見込まれた。循環器系への作用の評価法は、生体・組織・細胞の各レベルにおける効果についてイチヨウ葉エキス (GBE) を用いて示すことができた。循環改善効果が標榜されている GBE は、高齢の高血圧動物と脳卒中易発性生活習慣病ラットでは降圧的な作用は認められず、逆に循環不全や肝機能障害等の兆候が認められた。

3. 食品の口腔における保健機能についての有効性評価

再石灰化促進物質の機能評価のための代替評価系（体外試験法）として、ヒト唾液浸漬試験 (Human Saliva Immersion Test; HSI 試験) と QLF 法を組み合わせたシステムを検討し同法が既存の再石灰化機能性食品（高溶解性カルシウム食品素材配合ガム）の再石灰化促進能の確認に有用であることを確認した。しかし、唾液の Ca 濃度は個人により大きな較差があること、ならびに、その濃度に応じて唾液の再石灰化能にも違いがあることが明らかとなった。再石灰化が唾液により生じることから、再石灰化促進物質の機能評価にあたっては、このような個人差（唾液の質的違い）を考慮する必要

がある。また、電子嗅覚装置により測定される総臭気指数はヒト嗅覚による評価指標と類似しており、口臭予防のための保健用機能性食品の評価法として有用であることが示された。また、揮発性硫化物以外の口臭関連物質は歯周病、舌苔や歯垢の付着のいずれかと関連しており、揮発性硫化物以外の物質も口腔細菌により産生される可能性が示唆された。歯科関連の機能性食品のうち蝕原性、エナメル質脱灰性を人工口腔装置を用いて2種の蝕原性細菌 (*S. mutans* および *S. sobrinus*) によるバイオフィルム形成、バイオフィルム下 pH、エナメル質脱灰の評価をしたところ、動物試験で得られた結果とほぼ一致しており、人工口腔装置による評価の妥当性を支持する結果となった。さらに、現行の「食品の酸産生性検定システム」に対し、これまで行ってきた信頼性と実用性についての検討に基づき、1) 酸産生性評価法の実用性向上のための方策、及び2) 将来における酸産生評価の位置付けについて、具体的提言を策定した。すなわち、検定システムの実用性向上の方策として、①効率性の確保に加え、②信頼性の確保、及び③公益性の確保が可能な検定評価業務を専門的に行う「酸産生性検定評価機構」の設置が提言された。口腔疾患に関連する口腔微生物の DNA マイクロアレイによる微生物検出法は、う蝕・歯内疾患・口腔感染症に関連する菌群 (20 菌種) と歯周炎に関連する菌群 (23 菌種) というカテゴリーに分け、微生物種特異性ならびに検出感度を検討し、プライマー濃度および増幅 cycle 面の改良により、検出可能な菌種数ならびにシグナル強度を増加させることができた。

D. 考察

抗感染作用・抗アレルギー作用を有する免疫調節機能の評価方法は、動物実験および *in vitro* での細胞培養実験による手法により免疫調節機能、アレルギー予防機能を有する食品のスクリーニングやその作用量の検定に有用であると考えられた。また、早期の乳児期アレルギー発症の予測にはヒト臍帯血単核球からの腸内細菌刺激による IL-10 産生量の評価が有用である可能性がある

る。これら免疫系の評価方法は、今後、ヒト評価系としてその有効な方法を確立し、その検証を精度よく進めることが重要である。

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、本研究によって行われた *in vitro* 試験による有効性試験、動物実験による有効性試験が作用機序の解明を含めた一定の成果をもつことが明らかになった。なお、これらに加えてヒトによる有効性試験評価を行う重要性は高いと考えられた。

食品の口腔内保健機能の評価方法については、本研究で用いた再石灰化促進機能評価、口臭の評価、食品のうち蝕誘発性評価、食品の酸産生検定システム、口腔疾患に関連する口腔微生物の微生物検出法が客観性、高精度、実用性 (容易さ) などから有効な方法であることが示唆された。

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、動物実験、遺伝子レベルでの解析、*in vitro* 試験による評価方法は免疫調節機能、アレルギー予防機能を有する食品のスクリーニングやその作用量の検定に有用であると考えられた。さらにヒト臨床試験をあわせた総合的な評価方法の確立が重要である。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が作用機序の解明も含めた一定の成果があるものの、ヒトにおける検証が重要である。食品の口腔における有効性評価方法については、本研究で用いた再石灰化促進機能評価、口臭の評価、食品のうち蝕誘発性評価、食品の酸産生検定システム、口腔疾患に関連する口

腔微生物の微生物検出法が客観性、高精度、実用性（容易さ）などから有効な方法であることが示唆された。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) Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Kikuchi A, Ishida T, Sasaki K, Hirano K, Watanabe H, Asai K, Takahashi Y, Kanamori Y, Shimojo N, Matsuda H, Kohno Y, Hachimura S, and Kaminogawa S, Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 1125-1132 (2006).
- 2) Takahashi K, Hayashi N, Kaminogawa S, and Ra C, Molecular mechanisms for transcriptional regulation of human high-affinity IgE receptor β -chain gene induced by GM-CSF. *J. Immunol.*, 177, 4605-4611 (2006).
- 3) Nakanishi Y, Murashima K, Ohara H, Suzuki T, Hayashi H, Sakamoto M, Fukasawa T, Kubota H, Hosono A, Kono T, Kaminogawa S, and Benno Y, Increase in terminal fragments of 16S rRNA genes derived from *Bacteroidetes* after administration of short-chain fructooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6271-6276 (2006).
- 4) Tsuda M, Hosono A, Fujioka M, Hachimura S, Nakamura R, Hirayama K, Itoh K, and Kaminogawa S, The role of *Bifidobacterium* in the development of gut immune systems: analysis using gnotobiotic TCR-transgenic mice. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 14, 93-99 (2006).
- 5) Nakanishi Y, Hosono A, Kimura T, and Kaminogawa S, The role of CD4⁺ T cells in IgA production in murine Peyer's patches following oral feeding of *Bifidobacterium* components. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 14, 101-106 (2006).
- 6) Suzuki T, Hosono A, Hachimura S, Suzuki T, and Kaminogawa S, Modulation of cytokine and immunoglobulin A release by beta-(1,3-1,6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* strain 1A1. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 14, 369-375 (2006).
- 7) Kim JY, Lee S, Jeong DW, Hachimura S, Kaminogawa S, Lee HJ, In vivo immunopotentiating effects of cellular components from *Lactococcus lactis* ssp lactis. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 786-790 (2006).
- 8) Suzuki S, Shimojo N, Tajiri Y, Kumemura M, and Kohno Y. Differences in the composition of intestinal *Bifidobacterium* species and the development of allergic diseases in infants in rural Japan. *Clin. Exp. Allergy* (in press).
- 9) Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K, Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(8), 1756-1758 (2006).
- 10) Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. Effects of Ginkgo biloba extract feeding on salt-induced hypertensive Dahl rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(2), 266-269 (2006).
- 11) 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 spontaneously hypertensive rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58(2), 243-249 (2006).
- 12) 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(11), 1187-1196 (2006).
- 13) Saotome Y, Tada A, Hanada N, Yoshihara A, Uematsu H, Miyazaki H, and Senpuku H, Relationship of cariogenic bacteria levels with periodontal status and root surface caries in elderly Japanese. *Gerodontol.*, 23(4), 219-225 (2006).
- 14) Kaneko N, Yoshihara A, Ida H, Nomura Y, Imai S, Nisizawa T, Sakuma S, Hanada N, and Miyazaki H, Influence of a fluoride mouthrinse on mutans streptococci in schoolchildren. *Caries Res.*, 40(6), 501-507 (2006).
- 15) Tamaki Y, Nomura Y, Takeuchi H, Ida H, Arakawa H, Tsurumoto A, Kumagai T, and Hanada N, Study of the clinical usefulness of a dental drug system for selective reduction of mutans streptococci using a case series. *J. Oral Sci.*, 48(3), 111-116 (2006).
- 16) Motegi M, Takagi Y, Yonezawa H, Hanada N, Terajima J, Watanabe H, and Senpuku H. Assessment of genes associated with Streptococcus mutans biofilm morphology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(9), 6277-6287 (2006).
- 17) Kamoda T, Imai T, Sato T, Imai S, Nisizawa T, and Hanada N. Effect of disaccharide xylosylfructoside on sucrose cariogenicity in an artificial mouth system. *J. Dental Health*, 56: 281-288 (2006).
- 18) 岸光男, 高橋雅洋, 岸香代, 晴山婦美子, 田村光平, 阿部晶子, 杉浦剛, 相澤文恵, 米満正美 : 口腔ケアの評価指標と real-time PCR による舌苔中細菌数との関連, 口腔衛生学会誌, 56(5) : 665-672 (2006).
- 19) 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.*, 21(5): 283-288 (2006).
- 20) 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.*, 21(4): 201-205 (2006).
- 21) Sato R, Sato T, Takahashi I, Sugawara J, Takahashi N. Profiling of bacterial flora in crevices around titanium orthodontic anchor plates. *Clin. Oral Implants Res.*, 18(1): 21-26 (2007).
- ・ 学会発表
- 1) 津田真人・細野朗・柳橋努・八村敏志・平山和宏・梅崎良則・伊藤喜久治・上野川修二. 無菌マウス由来腸管免疫系細胞の抗原特異的なサイトカイン応答に対するマウス常在細菌刺激の影響. 第10回腸内細菌学会 (2006年6月1-2日, 東京) .
- 2) Masato Tsuda, Akira Hosono, Tsutomu Yanagibashi, Satoshi Hachimura, Kazuhiro Hirayama, Yoshinori Umesaki, Kikuji Itoh, Kyoko Takahashi and Shuichi Kaminogawa. Murine intestinal bacteria modulate antigen-specific cytokine production by intestinal immune cells derived from germ-free TCR-transgenic mice. The 19th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006), Kyoto, Japan (Sep. 25-28, 2006).
- 3) Yasuhiro Hiramatsu, Akira Hosono, Yusuke Nakanishi, Masamichi Muto, Satoshi Hachimura, Ryuichiro Sato, Kyoko Takahashi and Shuichi Kaminogawa. Oral injection of *Bifidobacterium* induces immunomodulation directly following the uptake of bacterial components into the intestinal lymphoid tissues. The 19th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006), Kyoto, Japan (Sep. 25-28, 2006).

- 4) Tsutomu Yanagibashi, Akira Hosono, Masato Tstuda, Satoshi Hachimura, Kazuhiro Hirayama, Kikuji Itoh, Kyoko Takahashi, Shuichi Kaminogawa. In vitro observation of the effect of intestinal bacteria on IgA production by immunocytes in the large intestine: comparison between germ-free and conventional mice. The 19th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006), Kyoto, Japan (Sep. 25-28, 2006).
- 5) 柳橋努・細野朗・津田真人・八村敏志・高橋宜聖・平山和宏・伊藤喜久治・高橋恭子・上野川修二. 無菌・コンベンショナルマウスの比較による大腸部位における IgA 産生に腸内細菌が与える影響について. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京).
- 6) 細野朗・柳橋努・中西祐輔・村島弘一郎・深澤朝幸・高橋恭子・上野川修二. フラクトオリゴ糖を構成する異なる糖鎖構造のオリゴ糖によって誘導される腸管粘膜 IgA 産生について. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京).
- 7) 津田真人・細野朗・柳橋努・八村敏志・平山和宏・伊藤喜久治・高橋恭子・上野川修二. 無菌マウス由来腸管免疫細胞の培養系においてマウス腸内共生細菌の刺激が抗原特異的なサイトカイン応答を調節する. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京).
- 8) 平松靖浩・細野朗・武藤正達・佐藤隆一郎・高橋恭子・八村敏志・上野川修二. 経口投与した *Bifidobacterium* 菌体は腸管免疫組織に取り込まれることで、免疫修飾作用を直接的に誘導する. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京).
- 9) 三枝静江・戸塚護・上野川修一・細井知弘. 非病原性酵母 *Candida albicans* に対する好中球様 HL60細胞のサイトカイン応答. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京).
- 10) 田邊康祐・濱口修一・伊勢渉・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志. 経口免疫寛容において誘導されるT細胞のCD62L/CD44発現パターンと免疫抑制機能. 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. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京).
- 11) 名倉泰三・富田響子・八村敏志・上野川修一. 難消化性オリゴ糖ラフィノースおよびメリビオースの抗アレルギー免疫調節作用. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京).
- 12) Masato Tsuda, Akira Hosono, Satoshi Hachimura, Kyoko Takahashi and Shuichi Kaminogawa. Comparison of the immunomodulatory effects of murine commensal *Lactobacillus* and *Bacteroides* on antigen-specific immune responses by intestinal immune cells derived from germ-free ovalbumin TCR-transgenic mice. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 (2006年12月11-13日, 大阪).
- 13) Kyoko Takahashi, Natsuko Hayashi, Toshibumi Shimokawa, Shuichi Kaminogawa, Chisei Ra, Synergistic activation of Fc receptor γ -chain gene expression by Sp-1 and GABP in mast cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 (2006年12月11-13日, 大阪).
- 14) Yukiko Umeda, Yoko Akema, Masayuki Kuraoka, Kiyoshi Yamada, Masayuki Hashiguchi, Wataru Ise, Taku Kouro, Yoshimasa Takahashi, Mamoru Totsuka, Kiyoshi Takatsu, Shuichi Kaminogawa, Ryuichiro Sato, satoshi Hachimura, CD3⁺IL-2R⁺ Peyer's patch cells respond to poly I:C stimuli and secrete IL-5. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 (2006年12月11-13日, 大阪).
- 15) 津田真人・細野朗・柳橋努・八村敏志・平山和宏・伊藤喜久治・高橋恭子・上野川修二. 無菌マウスにおける食品抗原特異的な免疫応答の特徴: 腸管免疫系と全身免疫系のサイトカイン産生の違い. 日本農芸化学会2007年度大会 (2007年3月24-27日, 東京).

- 16) 高橋恭子・細野朗・上野川修一．腸管上皮細胞におけるTLR4遺伝子の発現制御機構．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月24-27日, 東京)．
- 17) 相澤奉文・高橋恭子・細野朗・石嶋慶太・城内健太・中村亜矢・西村和大・上野川修一．ビフィズス菌菌体破砕物のアレルギー反応抑制効果．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月24-27日, 東京)．
- 18) 笠倉和巳・高橋恭子・青山円佳・石田里沙・大澤香織・細野朗・上野川修一．TLR-2を介したマスト細胞のアレルギー応答の調節．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月24-27日, 東京)．
- 19) 原田岳・何方・川瀬学・細野朗・高橋恭子・上野川修一．*Lactobacillus rhamnosus* GGと*Lactobacillus gasseri* TMC0356による腸管免疫応答に与える影響．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月24-27日, 東京)．
- 20) 田邊康祐・濱口修一・伊勢渉・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志．経口免疫寛容において誘導されるCD62L^{high/Int} CD44^{Int}およびCD62L^{low} CD44^{high}制御性T細胞の機能解析．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月24-27日, 東京)．
- 21) 谷貝英紀・後藤浩文・後藤貴康・野中敦子・伊勢渉・山田潔・戸塚護・高橋宜聖・北村俊雄・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志．経口免疫寛容を誘導されたT細胞に高発現する遺伝子zfhx1bの機能解析．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月24-27日, 東京)．
- 22) Taku Iwamoto, Kiyoshi Yamada, Tetsuro Emoto, Ryo Hatano, Mamoru Totsuka : Establishment and characterization of conditionally immortalized epithelial cells from mouse embryonic intestine. The 19th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006) (2006年9月, 京都)．
- 23) 山田潔、岩本拓、江本哲朗、波多野良、戸塚護 : 新規マウス小腸上皮細胞株の樹立と免疫学的研究における有用性評価．日本食品免疫学会2006年度大会(2006年10月, 東京)．
- 24) 山崎靖正、山田潔、鎌田啓明、中村吉孝、八村敏志、池上秀二、戸塚護 : *Lactobacillus gasseri* OLL2809の経口投与が経口免疫寛容の誘導および維持に与える影響．日本食品免疫学会2006年度大会(2006年10月, 東京)．
- 25) 土師智寿、山田潔、戸塚護 : 特異抗原の経口摂取によるCD4⁺小腸上皮内リンパ球におけるFoxp3の発現誘導．日本食品免疫学会2006年度大会(2006年10月, 東京)．
- 26) 江本哲朗、山田潔、岩本拓、波多野良、清水誠、戸塚護 : 新規マウス大腸上皮細胞株の樹立とその特性の解析．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月, 東京)．
- 27) 波多野良、山田 潔、岩本 拓、江本 哲朗、清水 誠、戸塚護 : マウス小腸上皮細胞株による腸管免疫系T細胞の抗原特異的活性化の解析．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月, 東京)．
- 28) 岩本拓、山田潔、波多野良、江本哲朗、清水誠、戸塚護 : 癌遺伝子の発現制御可能なマウス小腸上皮細胞株の増殖抑制による成熟型への分化．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月, 東京)．
- 29) 山崎靖正、山田潔、中村吉孝、溝上陽子、八村敏志、池上秀二、清水誠、戸塚護 : *Lactobacillus gasseri* OLL2809摂取による経口免疫寛容の強化．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月, 東京)．
- 30) 土師智寿、山田潔、溝上陽子、波多野良、清水誠、戸塚護 : 特異抗原の経口摂取による腸管免疫系CD4⁺T細胞の制御性T細胞機能の変化．日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月, 東京)．
- 31) 青江誠一郎、加藤美智子、堀口美恵子、池上幸江 : KKマウスの内臓脂肪蓄積に及ぼす食品素材の影響、第60回日本栄養食糧学会、(2006年5月19-21日, 静岡)．
- 32) 池上幸江、山岸あづみ、飯塚元美、岡本奈津子、原瀬里美、堀口美恵子、青江氏一郎 : ラット脂肪組織に対する食物繊維素材の影響、第60

- 回日本栄養食糧学会(2006年5月19-21日,静岡).
- 33) 加藤美智子、堀口美恵子、池上幸江、青江誠一郎：KKマウスの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす食品素材の影響、第61回日本栄養食糧学会(2007.5.18-20, 京都)。
- 34) 堀口美恵子、石橋澄子、青江誠一郎、池上幸江：Ames試験による食品成分のDNA損傷抑制効果の評価、第58回日本家政学会大会(2006年5月27-28日, 秋田)。
- 35) 堀口美恵子、石橋澄子、中山陽子、青江誠一郎、池上幸江：Evaluation of the inhibitory effects of food components on benzo[a]pyrene induced chromosomal aberration、第35回日本環境変異原学会大会(2006年11月20-21日, 大阪)。
- 36) 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—視床下部近傍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, 静岡)。
- 37) 竹内宏美、戸澤佳恵、相原直美、佐野涼子、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—ニュートリゲノミクスによる検討、第53回日本栄養改善学会学術総会、(2006年10月, 茨城)。
- 38) 窪田洋子、梅垣敬三、籠田智美、瀬占奈美江、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ョウ葉エキス短期投与の影響、第79回日本薬理学会年会(2006年3月, 横浜)。
- 39) Kubota Y., Kagota S., Tada Y., Nejime N., Nakamura K., Kunitomo M., Umegaki K., Shinozuka K. Influence of Ginkgo Biloba Extract Feeding on Heart rate, blood pressure and Various Blood parameters in Aged Spontaneously Hypertensive rats. The 12th International Symposium on SHR. October, 2006.
- 40) Kubota Y., Kagota S., Tada Y., Nejime N., Nakamura K., Kunitomo M., Umegaki K., Shinozuka K. Effects of Ginkgo Biloba Extract Feeding on Aged Spontaneously Hypertensive rats. 2nd International Symposium on Lifestyle Related Diseases. October, 2006.
- 41) A Nonaka, M Tanaka, M Noda, K Kataoka, J Kita and S Shizukuishi: Contribution of Volatile Organic Compounds to Oral Malodor. 85th General Session and Exhibition of the IADR March 2007, New Orleans, USA.
- 42) 稲葉大輔：食品の再石灰化促進能の評価と展望、シンポジウム1「厚生労働省許可特定保健用食品の歯科における課題と展望」、第55回日本口腔衛生学会総会(2006年10月, 大阪)。
- 43) D. Inaba, K. Minami, K. Tamura, M. Yonemitsu : Combined Human Saliva Immersion Test and QLF for Remineralization Assessment of Calcium-enriched Chewing Gum, 53rd Congress of the European Organisation for Caries Research (ORCA), Glasgow, UK, July, 2006.
- 44) D. Inaba, K. Minami, K. Tamura, M. Yonemitsu : Combined Human Saliva Immersion Test and QLF for Remineralization Assessment, 85th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research, New Orleans, USA, March, 2007.
- 45) T. Arai, S. Imai, N. Hanada, K. Yaegaki, K. Kamoi, Y. Numabe. Evaluation of Periodontopathic Microorganisms in Subgingival Plaque by Mouth Air. The 3rd Conference of Asian Association for Breath Odor Research, Okayama, November, 2006.
- 46) S. Imai, M. Tagashira, T. Kanda, Y. Ohtake, M. Itayama, Y. Yamamoto, and N. Hanada. Inhibition of Streptococcus Mutans Activity by Hop Bract Polyphenols. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.
- 47) N. Hanada, M. Hiramatsu, M. Kimura, and S. Imai. Inhibitory Effect of Lactobacilli against Growth of Mutans Streptococci. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.
- 48) Y. Usui, S. Imai, E. Kaeriyama, N. Hanada and H. Uematsu. Evaluation of Ag(NH₃)₂F Solution as an Inhibitor of Dentin Demineralization. 84th

- International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.
- 49) H. Takeuchi, K. Okuda, H. Okayama, S. Imai, H. Senpuku and N. Hanada. New fluorescence method to detect periodontopathic biofilm. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.
- 50) Takahashi, M., Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S. and Yonemitsu, M.: Distribution of periodontopathic bacteria in tongue coats in aged subjects. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.
- 51) 今井奨. 食品のエナメル質脱灰性の評価と展望. シンポジウム: 厚生労働省許可特定保健用食品の歯科における課題と展望. 第 55 回日本口腔衛生学会・総会 (2006 年 10 月, 大阪).
- 52) 福島和雄、門澤久美子、河内太吉、井田博久、西山佳秀、小林清吾、今井奨、花田信弘. S. mutans と S. sobrinus の口腔内レベルを同時評価できる集団歯科検診用の簡便・低コスト培養システムの確立. 第 55 回日本口腔衛生学会・総会 (2006 年 10 月, 大阪).
- 53) 薄井由枝、今井奨、花田信弘、植松宏. 要介護者における口腔細菌数の経時的変化に関する研究. 第 23 回日本障害者歯科学会総会、仙台、2006 年 10 月.
- 54) 岸光男, 高橋光恵, 岸香代, 相澤文恵, 佐々木勝忠, 清水潤, 高橋雅洋, 米満正美: 歯科衛生士による訪問口腔ケアが家庭介護に及ぼす影響 第 2 報 要介護高齢者の口腔内と介護家族の QOL の変化. 第 55 回日本口腔衛生学会総会 (2005 年 10 月 8 日, 大阪).
- 55) 高橋信博: 食品の口腔における酸産生性及びバイオフィルム細菌叢の評価と展望. 第 55 回日本口腔衛生学会・総会 シンポジウム 1 (厚生労働省許可特定保健用食品の歯科における課題と展望) (2006 年 10 月 7 日, 大阪) 口腔衛生学会誌 56(4): 416, 2006.
- 56) 高橋信博: 口腔環境と微生物生態系—多様で微細な小宇宙 (マイクロコスモス). 第 48 回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム (SS-6) (2006 年 9 月 21 日, 鶴見) *J Oral Biosci* 48(S): 96, 2006.
- 57) Takahashi N: Mutans streptococci and non-mutans streptococci. ORCA Symposium Japan, Dental Caries and tooth erosion: some current perspective (Nagoya, Japan) 2006 年 11 月 13-14 日.
- 58) Nakajo K, Washio J, Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Sato T, Takahashi N. pH-tolerant acid production from glucose by *Enterococcus faecalis*. 第 84 回 IADR (Brisbane, Australia) 2006 年 6 月 30 日 *J Dent Res* 85 (Special Issue B): #2338, 2006.
- 59) Washio J, Nakajo K, Sato T, Matoba S, Seki T, Yamamoto M, Yamamoto N, Takahashi N. Metabolic properties of hydrogen sulfide production by oral *Veillonella*. 第 84 回 IADR (Brisbane, Australia) 2006 年 6 月 30 日 *J Dent Res* 85 (Special Issue B): #1853, 2006.
- 60) Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Quantification of periodontopathic bacteria from periodontal sites by real-time PCR. 第 84 回 IADR (Brisbane, Australia) 2006 年 6 月 30 日 *J Dent Res* 85 (Special Issue B): #1855, 2006.
- 61) Ito Y, Sato T, Mayanagi G, Yamaki K, Shimauchi H, Takahashi N. Profiling of root-canal microflora before and after root-canal treatments. 第 84 回 IADR (Brisbane, Australia) 2006 年 6 月 29 日 *J Dent Res* 85 (Special Issue B): #1384, 2006.
- 62) Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Takahashi N. α -amylase and its inhibitors affect starch fermentation by *Streptococcus mutans*. 第 84 回 IADR (Brisbane, Australia) 2006 年 6 月 30 日 *J Dent Res* 85 (Special Issue B): #2305, 2006.
- 63) Sato R, Sato T, Takahashi I, Sugawara J, Takahashi N. Predominance of anaerobes in crevices around titanium orthodontic anchor plates. 第 84 回 IADR (Brisbane, Australia) 2006 年 6 月 29 日 *J Dent Res* 85 (Special Issue B): #1383, 2006.
- 64) Nakajo K, Takahashi Y, Kiba W, Imazato S, Takahashi N. Fluoride released from glass-ionomer

- cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日.
- 65) Washio J, Nakajo K, Sato T, Matoba S, Seki T, Yamamoto N, Yamamoto M, Takahashi N. The hydrogen sulfide production by oral Veillonella: effects of substrate and environmental pH. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日.
- 66) Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Washio J, Takahashi N. Inhibitory effects of maltotriitol on the growth and the adhesion of mutans streptococci. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日.
- 67) Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora of healthy and periodontitis subjects by real-time PCR. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日.
- 68) Ito Y, Sato T, Mayanagi G, Yamaki K, Shimauchi H, Takahashi N. Microflora profiling of root canal utilizing real-time PCR and cloning-sequence analyses based on 16S rRNA genes -Differences between before and after root canal treatments-. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日.
- 69) Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Mayanagi H, Takahashi N. The effect of amylase and its inhibitors on acid production from starch by Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日.
- 70) Matsuyama J, Sato T, Takahashi N, Sato M, Hoshino E. Real-time PCR analysis of genera Veillonella and Streptococcus in healthy supragingival plaque biofilm microflora of children. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日.
- 71) 中條和子、川嶋順子、丸尾将太、山下宗、高橋信博：フッ化物は酸性環境、エタノールはアルカリ環境でう蝕関連菌 Enterococcus faecalis と Streptococcus mutans の糖代謝を阻害する。第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月23日 *J Oral Biosci* 48(S): 208, 2006.
- 72) 鷺尾純平、高橋信博：口腔 Veillonella による硫化水素産生に関する検討—菌種・基質・環境 pH による違い—。第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月23日 *J Oral Biosci* 48(S): 200, 2006.
- 73) 宮澤一堀はるみ、相澤志津子、高橋信博：マルチトリートメントのミュータンス連鎖球菌に対する増殖及び菌体付着抑制効果。第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月22日 *J Oral Biosci* 48(S): 147, 2006.
- 74) 安彦友希、佐藤拓一、真柳弦、高橋信博：歯肉縁下プラークバイオフィルムの多様性解析から見た Porphyromonas gingivalis と Streptococcus gordonii の関連性。第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月23日 *J Oral Biosci* 48(S): 202, 2006.
- 75) 相澤志津子、宮澤一堀はるみ、真柳秀昭、高橋信博：ミュータンスレンサ球菌のデンプンからの酸産生とそのアミラーゼ阻害剤による影響。第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月22日 *J Oral Biosci* 48(S): 140, 2006.
- 76) 松山順子、佐藤拓一、高橋信博、佐藤ミチ子、星野悦郎：小児の歯垢細菌叢の Streptococcus, Veillonella の定量的解析。第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月23日 *J Oral Biosci* 48(S): 208, 2006.
- 77) 鷺尾純平、佐藤拓一、竹内裕尚、高橋信博：唾液細菌および口腔 Veillonella による口臭成分の一つ硫化水素の産生とその唾液や口腔環境との関わり。第55回日本口腔衛生学会・総会（大阪）2006年10月8日 *口腔衛生会誌* 56(4): 609, 2006.
- 78) 清水弘一、五十嵐公英、熊耳隆洋、高橋信博：乳幼児プラークの酸産生能、アルカリ産生能と齲蝕増加との関連。第55回日本口腔衛生学会・総会（大阪）2006年10月8日 *口腔衛生会誌* 56(4): 578, 2006.

79) 中條和子, 高橋雄介, 騎馬和歌子, 今里 聡,
高橋信博: フッ化物徐放性修復材料溶出液は齲
蝕関連菌の酸産生を抑制する. 第 125 回日本歯
科保存学会 2006 年度秋季学術大会(鹿児島)2006
年 11 月 10 日 日歯保存誌 49(秋季特別号): 62,
2006.

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
研究協力者 高橋 恭子 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。

本研究では、抗感染作用を有する免疫調節機能の評価方法確立のため、免疫調節作用の有効性評価方法について MEDLINE を利用した文献調査を行い、ヒトを対象にした評価方法、動物実験および *in vitro* 実験系による評価方法についてまとめた。また、選別したプロバイオティクス菌をマウスに経口摂取させたときに腸管免疫系細胞に作用する応答 (IgA 抗体産生やサイトカイン産生など) を解析した (平成 16 年度)。さらに、抗感染食品として期待される食品成分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直接的な作用を解析するために、摂取した食品成分の腸管リンパ組織での取り込みや各細胞応答の解析を行い、免疫調節機能の評価系に適した条件の検討を行った (平成 17 年度)。平成 18 年度は本研究プログラムの最終年度であることから、免疫系の有効性についての最適評価法の確立を目指し、平成 16・17 年度に条件検討を行ってきたマウスを実験モデルとした系を中心に、さまざまな食品成分を用いて免疫系の有効性評価法の検証を行った。

BALB/c マウスに抗感染作用が期待される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、そ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* 菌体成分、ケフィア関連成分、難消化性小糖類 (オリゴ糖類) 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 (IL-5、IL-6、IFN- γ など) 産生応答が亢進すること、食品成分によっては腸管内に分泌される総 IgA 量を増加させるはたらきがあることなどが明らかとなった。さらに、被検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へも影響がみられたものもあり、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。特に、*Bifidobacterium* 菌体成分をマウスに経口投与すると、投与後 1~20 時間後にパイエル板、小腸粘膜固有層、盲腸リンパ小節、腸間膜リンパ節にこの菌体を取り込まれているのが観察され、パイエル板樹状細胞 (CD11c 陽性細胞) に取り込まれるなど、各リンパ組織に直接作用していることが明らかになった。さらにこの *Bifidobacterium* 菌体成分については、生菌体はもとより超音波破砕物、加熱処理菌体にも免疫調節作用があることが確認された。以上より、本評価方法は動物実験レベルでの免疫調節機能を有する食品のスクリーニングやその作用量の検定に有用であると考えられる。最後に、国民生活の健康維持増進のために最も重要なことはヒトを対象にした評価方法を確立させることであり、その検証を精度よく進める今後の展開はますます重要性が高いと考えられる。

1. 食品のもつ免疫調節作用およびアレルギー予防機能について、有効性評価方法の確立のための文献調査

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。そこで、まず、食品のもつ免疫調節作用およびアレルギー予防機能について、有効性評価方法の確立のための文献調査を行い、食品免疫学的な視点で検索した文献情報などをとに総合的に整理した。

B. 研究方法

情報収集には研究内容の精度と汎用性を考慮し、医学分野で世界最大の文献データベースである Medline を用いた。なお、本研究で行った文献調査は 1992 年 1 月から 2004 年 9 月までの過去 13 年間を検索対象期間とし、検索言語は英語、日本語を基本としたが、他の言語に関しても Abstract などを用いて引用、翻訳し用いた。特に食品のもつ免疫調節作用およびアレルギー予防機能について、有効性評価方法の確立のため、食品免疫学的視点から文献を検索して収集、整理した。すなわち、評価基準作成の上で参考になると考えられる文献を次のような方針で選抜し、免疫系評価方法についてまとめた。

- ① 食品が、疾患、免疫因子、免疫効果細胞、免疫機能に影響を及ぼす状態、または免疫機能を制御する技術に与える影響を調べた文献を選択すること。
- ② 疾患、免疫機能に影響を及ぼす状態、または免疫機能を制御する技術に関する文献のうち、Randomized Controlled Trial を行っている文献を選択すること。

以上より、いわゆる健康食品素材に対して食品および免疫に関する文献を絞り込んだ。そして、食品免疫学的な視点で検索した文献情報などをとに総合的に整理し、評価方法としてまとめる作業を行った。

C. 研究結果

食品免疫学的な視点からみた場合、ヒトを対象にした評価方法については、食品成分による抗感染作用として、主に *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* などのプロバイオティクス、ビタミンやミネラル、核酸、アミノ酸、オリゴ糖、キトサンなどの食品素材に対して、IgA 抗体、末梢血中のナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性 (NK 活性)、食細胞の貪食能、T 細胞数、サイトカイン産生などの免疫学的指標についての測定方法が数多く実施されていることがわかった。また、食品成分による抗アレルギー作用としては、プロバイオティクス、および EPA、DHA などの食品素材に対して、アトピー性湿疹のスコア、炎症細胞、サイトカインなどの免疫学的指標の測定方法について報告例が多かった。なお、これらはいずれも免疫機能が低下した感染症患者や免疫系が未発達な乳幼児、またはガンなどの術後の患者に対して適応免疫系 (①遅延型過敏反応、②抗原特異的抗体産生、③T 細胞増殖性、④T 細胞数など)、自然免疫系 (⑤NK 活性、⑥食細胞貪食能など) の評価項目を扱っているのが特徴であった。

D. 考察

近年の健康ブームで注目されているプロバイオティクス、プレバイオティクス (難消化性オリゴ糖類など)、アミノ酸や核酸などは、動物実験や *in vitro* 実験なども含め比較的研究報告が多かった。しかしながら、全体的にヒトに対する食品免疫学的な報告は動物実験や *in vitro* 実験などに比べて少なく、乳幼児やガンなどの術後患者に対する経腸栄養剤としての利用がいくつかみられることや、健康人に対する食品免疫学的な観点での評価方法が十分に確立されていないことなどがその問題点として考えられた。ヒトでの有効性、およびその

作用メカニズム解明のための動物実験系を厳正に評価できる客観的な評価方法の確立が求められている現状において、食品として摂取したときに、適応免疫系および自然免疫系に対する作用について十分な科学的な検証を行うことが重要となる。そのためには、特に免疫系への有効性評価法を設定するにあたって、抗感染食品または抗アレルギー食品として、ヒト血液サンプルなどを用いた以下のような評価項目より設定した有効性評価を厳正な試験によって行う必要があると考えられる。

- ・ 適応免疫系：遅延型過敏反応・T細胞増殖性・抗原特異的抗体産生・T細胞数の測定
 - ・ 自然免疫系：NK活性・食細胞貪食能の測定
- なお、抗アレルギーに関しては臨床的な知見（例えば SCORAD スコア・気管支喘息症状スコア・食物経口負荷試験など）による評価が必要であろう。

E. 結論

食品のもつ免疫調節作用およびアレルギー予防機能について、有効性評価方法の確立のための文献調査を行った。すなわち、医学分野で世界最大の文献データベースである Medline を用いて文献調査をし、食品免疫学的な視点で検索した文献情報などをもとに総合的に精査・解析・整理した。その結果、ヒトを対象にした評価系は、免疫機能が低下した感染症患者や免疫系が未発達な乳幼児、またはガンなどの術後の患者に対して適応免疫系（①遅延型過敏反応、②抗原特異的抗体産生、③T細胞増殖性、④T細胞数など）、自然免疫系（⑤NK活性、⑥食細胞貪食能など）の評価項目を扱っている報告が多くみられた。したがって、抗感染食品、および抗アレルギー食品としては獲得免疫系、自然免疫系とも上記の有効性評価方法の項目、およびアレルギー症状に関する臨床的な知見（例えば SCORAD スコア・気管支喘息症状スコア・食物経口負荷試験など）による評価をめやすに厳正な試験によって行う必要があると考えられた。さらに、ヒトでの有効性評価と合わせてその作用機序を解明するためには、動物試験や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になる。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。

2. 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。

a) *Bifidobacterium* 菌体成分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) 菌体はその菌体構成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組織ごとに解析す

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、6、20 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)、腸間膜リンパ節 (MLN) を含む腸管組織のそれぞれの凍結組織切片を作成した。さらに、各腸管組織切片を抗マウス CD11c 抗体処理、および蛍光色素 Cy3 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。あわせて、この Bp 菌体を 1×10^9 CFU/head 経口投与し (対照は生理食塩水のみ投与)、24 時間後にマウスパイエル板細胞を採取し、この PP 細胞培養系で超音波破碎した菌体成分 (*Bifidobacterium immunomodulator*, BIM) と共培養を行った。このときの 12 時間細胞培養上清より、IL-12 p40 産生量を ELISA 法にて定量した。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)、PP、CF、MLN、脾臓 (SP) のそれぞれの細胞を採取して超音波破碎した菌体成分 (*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。加えて、この Bp 菌体を生菌体、超音波破碎処理、凍結乾燥処理、加熱処理 (85-90°C、30 分間) という処理条件の異なる菌体成分について、上記と同様にマウスに経口投与して (いずれも 1×10^9 CFU/head 相当量)、IgA、サイトカイン産生、細胞増殖応答に与える影響を検討した。

b) 発酵乳成分のマウス経口投与による免疫調節作用についての評価

ケフィア関連成分 (KG) など発酵乳成分を a) と同様に雌性 BALB/c マウスまたは C57/BL6 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。

c) 難消化性オリゴ糖類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

難消化性オリゴ糖類 (FOS、GF2、GF3) を用いて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、それぞれオリゴ糖 7.5% 配合の FOS、GF2、GF3 添加飼料または対照の実験飼料をマウスに 4 週間自由摂取させ、IgA 産生応答などの免疫系への影響および腸内細菌叢について解析を行った。

C. 研究結果

a) *Bifidobacterium* 菌体成分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 時間後に小腸パイエル板 (PP) に到達し、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 (図 1)。また、Bp 菌体は小腸粘膜固有層 (1 時間後)、盲腸リンパ小節 (CF) および粘膜固有層に菌体が到達していた (図 2)。さらに、Bp 菌体の経口投与 24 時間後のマウスよりパイエル板細胞を採取してその細胞応答を解析したところ、IL-12 p40 産生が Bp 菌体の摂取によって亢進していることが明らかになった (図 3)。次に、Bp 菌体を 1 週間連続経口投与することによって、腸管関連リンパ組織および全身免疫系 (脾臓) 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 Bp 菌体の投与によって総 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た (表 1)。なお、この Bp 菌体

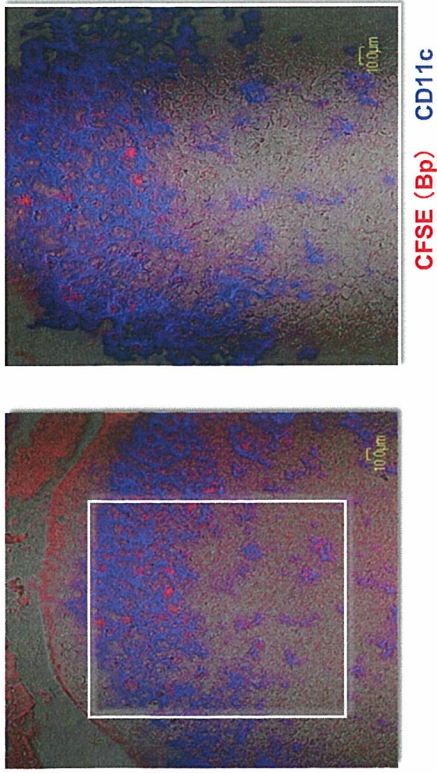


図1. *Bifidobacterium*菌体のマウス経口投与1時間後におけるパイエル板へのBp菌体の局在性

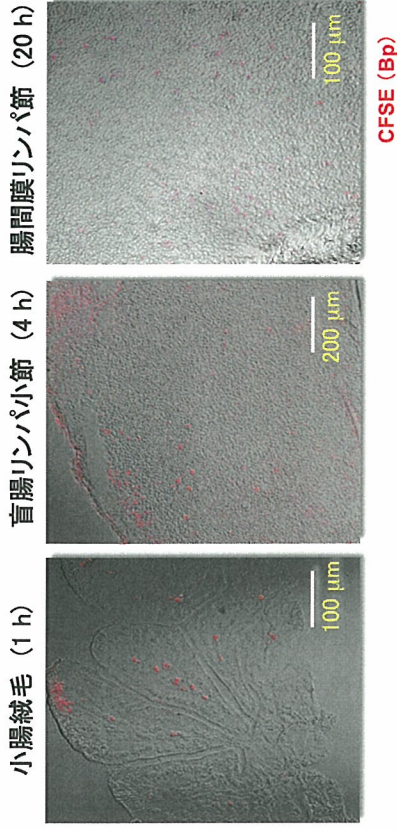


図2. *Bifidobacterium*菌体のマウス経口投与によって腸管関連リンパ組織へみられるBp菌体の局在性

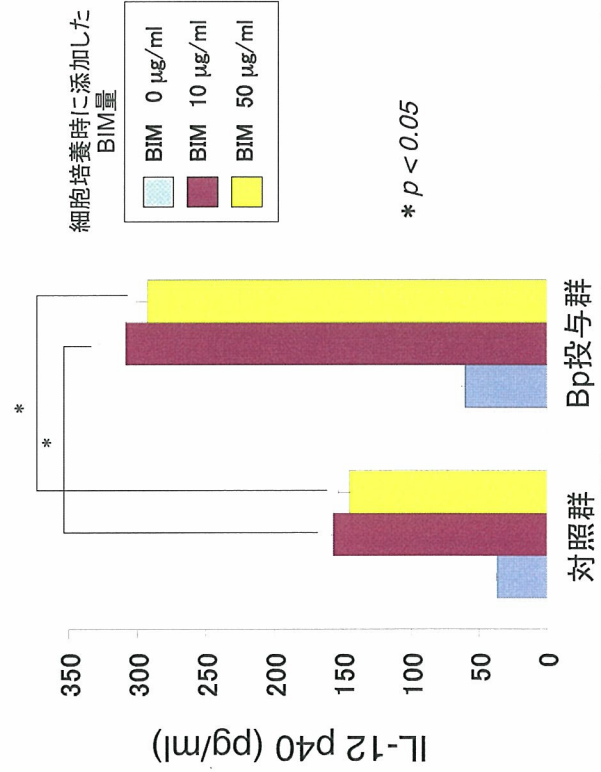


図3. *Bifidobacterium*菌体のマウス経口投与12時間後のパイエル板細胞のIL-12 p40産生

表1. *Bifidobacterium*菌体のマウスへの7日間連続経口投与したときの各免疫系組織の細胞応答

	IL-5	IL-6	IL-12	IFN-γ	IgA
パイエル板	↑	↔	↔	↑	↑
盲腸リンパ小節	↑	↔	↔	↑	↑
腸間膜リンパ節	N.D.	↔	↔	↔	↑
脾臓	N.D.	↔	↔	↑	↔

対照に比べて: ↑有意に増加 ↔有意差なし □ N.D. 検出限界以下