

平成17年度厚生労働科学研究費（循環器疾患総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

III. 分担研究者の報告書

5. ビタミンE（ α -トコフェロール）栄養状態と食物アレルギーに関する研究

分担研究者 森口覚 山口県立大学 教授

研究要旨

ビタミンEは日本人の食事摂取基準2005年版から α -トコフェロールとしての摂取でその栄養摂取状況を考えることとなり、人体への生理作用に対する影響について興味を持たれる。本研究では、食物アレルギーの発症・進展とビタミンEとの関連について卵白アルブミン誘発食物アレルギーモデルマウスを用いて、 α -トコフェロール（ α -Toc）のみならずその同族体の γ -トコトリエノール（ γ -T3）の抗アレルギー作用とそのメカニズムについて検討した。その結果、高 α -Toc食摂取により食物アレルギー発症に伴い高値を示す血清総IgEおよびOVA特異的IgE濃度が低下することを認めた。また、それがTh細胞割合の低下およびTh細胞とB細胞幼若化能の低下と関連することを認めた。高 γ -T3食摂取においてはIgE産生に対する効果はみられなかった。また、血清ヒスタミンおよびLTB₄濃度については高 α -Tocおよび高 γ -T3食摂取により低下する傾向を認めた。そのメカニズムを検討するため、RBL-2H3細胞を用いて*in vitro*でのFc ϵ R IとIgEの結合能を検討した。その結果、 γ -T3添加によりFc ϵ R IとIgEとの結合能が低下することを認めた。また、Fc ϵ R Iの発現については、 α -Toc添加により抑制される可能性が示唆された。

本研究により、 α -Tocおよび γ -T3がそれぞれ異なるメカニズムで食物アレルギー発症を抑制することが明らかとなった。特に、 γ -T3についてはこれまでにアレルギーに対する効果は明らかにされておらず、新たな知見を得ることができた。また、本研究のようにFc ϵ R Iに注目し、その発現やIgEとの結合能に対する影響を検討した例はほとんどない。他のVE同族体についてもアレルギーに対する効果を検討し、これら同族体を適当な比率で摂取することにより、アレルギー発症に対するVEのより強い抑制作用が誘導される可能性も考えられ、今後、さらなる研究が期待される。

A. 目的

近年、我が国では食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、花粉症、気管支喘息などのアレルギー疾患を持つ人が増加しており、問題となっている。中でも、食物アレルギーは、本来は健康保持・増進のための3本柱の一つである栄養となる食物が、逆に生体に対して有害な反応を引き起こすという点で強い関心を持たれている。魚中心の食生活が西洋化され、魚油の摂取量が低下したことに伴うロイコトリエン産生量の増加およびアレルギー性の強いたんぱく質摂取量の増加などの栄養摂取レベルの変化がアレルギー疾患を増加させる原因の一つであるとされている¹⁾。平成9年度厚生省食物アレルギー対策検討委員会の報告では、食物アレルギー症状を呈したことがある者の割合は3歳児で8.6%、小学校1年生で7.4%、小学校5年生で6.2%、中学校2年生で6.3%、成人で9.3%と報告されている²⁾。また、平成10・11年度の報告では、食物アレルギーの原因物質としては鶏卵、乳製品、小麦の順に多く、従来多いと言われていた大豆は10番目に後退していることが明らかとなった²⁾。この調査結果をもとに、食品衛生法施行規則を改定して、2001年4月よりアレルギー患者への健康障害を防止する目的で食品の中から小麦、そば、卵、乳、落花生の5品目を含むものについてはそれらの表示を義務づけることになった³⁾。このことから、我が国において食物アレルギーへの関心・対応が高まっていることがうかがえる。

一方、ビタミンE (VE) は、1922年に Evans と Bishop により発見された脂溶性ビタミンである。VE は、自然界にはクロマン

環にイソプレン側鎖が結合した構造を持ち、側鎖に不飽和結合のないトコフェロールと不飽和結合があるトコトリエノールとがある。さらに、クロマン環に結合するメチル基の数と位置により α 体、 β 体、 γ 体および δ 体の4種類があり、合計8種類のVE同族体が存在する。同族体の中でも α -トコフェロール (α -Toc) が最も活性が強く⁴⁾、生体内では約90%を占めている。その要因は、食事由来のVEが腸管から吸収されキロミクロンにより肝臓に輸送された後、肝臓内で α -Toc のみが α -トコフェロール輸送蛋白質 (α -TTP) によって選択され、VLDL とともに優先的に血液中に放出されるためである⁵⁾。わが国においてVEの栄養所要量は、成人男性で10mg α -トコフェロール当量

(α -TE)、女性で8mg α -TEと定められている⁶⁾。また、VEの欠乏症として未熟児の溶血性貧血や脂肪吸収障害に伴う深部感覚障害や小脳失調などの神経症状が知られている。VEの安全性について Kappus と Diplock

は、1日800mg α -TEの摂取で影響ないと結論づけている⁷⁾。また、健常日本人男性において1日800mgの α -Toc摂取を28日間続けても、血液凝固能および血小板減少能に影響を与えず、臨床的な副作用および一般血液検査上の異常も認められないことが報告されている⁸⁾。このようにVEは、脂溶性ビタミンでありながら大量に摂取しても副作用はほとんどみられないと考えられているが、安全を考慮して成人のVEの許容上限摂取量は600mg α -TEと定められている⁶⁾。VEの主要な役割は、その抗酸化能によりリノール酸、リノレン酸やアラキドン酸などの細胞膜に局在する多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の過酸化を抑制することである^{9,10)}。

また、疾病予防の観点から、VE 補給により、癌¹¹⁻¹³⁾ および虚血性心疾患¹⁴⁾ の危険率が減少することや、LDL の酸化が抑制される¹⁵⁾ ことなどが知られている。さらに、高 VE 摂取により実験動物およびヒトにおいて体液性免疫と細胞性免疫が亢進することが多くの研究から明らかとなっている¹⁶⁻¹⁹⁾。

最近、VE の抗アレルギー効果が期待されている。アレルギーと VE に関する最近の報告を表 1 にまとめた²⁰⁻²⁶⁾。アレルギーモデルマウスおよびアトピー性皮膚炎患者などにおいて高 α -Toc 摂取により免疫グロブリン E (IgE) 産生が抑制されることやアレルギー症状が軽減されることが報告されている。しかし、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで、本研究では、オボアルブミン (OVA) 誘発食物アレルギーモデルマウスを用いて、食物アレルギー発症に対する高 VE 投与の影響について検討した。また、これまでの研究のほとんどは VE として α -Toc を用いているが、我々の過去の研究において、高 γ -トコトリエノール (γ -T3) 食摂取により NK 細胞活性が上昇することや、血清 NO 濃度の低下すること等を認めていることから、本研究では γ -T3 についても併せて検討を行った。さらに、VE の抗アレルギー作用の詳細なメカニズムを検討する目的で、ラット好塩基球白血病 (RBL-2H3) 細胞を用いて、*in vitro* での高親和性 IgE レセプター (Fc ϵ R I) と IgE との結合能および Fc ϵ R I の発現に対する影響についても検討を行った。

B.

研究方法

研究 I

OVA 誘発食物アレルギーモデルマウスに対する高 VE 食投与の影響

1. 食物アレルギーモデルマウスの作成および食餌へのビタミン E 添加

BALB/c マウス、雌、8 週齢 (体重 20~24 g, 日本クレア株式会社) を実験動物として用いた。食物アレルギーモデルマウスは Halteren ら²⁷⁾ の方法により作成した。マウスは、1 週間予備飼育後、実験開始時にリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2, 和光純薬工業株式会社) に溶解したオボアルブミン (OVA 和光純薬工業株式会社) と OVA の抗原性を増強させるアジュバントである水酸化アルミニウムゲル (ALUM, 和光純薬工業株式会社) を腹腔内投与 (2 μ g OVA + 25 μ L ALUM/0.5 mL/匹) することにより感作した。さらに、14 日目に OVA を腹腔内投与 (1 μ g/0.5 mL/匹) して再感作後、18 日目に OVA を経口投与 (1mg/0.2 mL/匹) することにより、食物アレルギーを誘発した (図 1)。

実験期間中 AIN-76 標準食 (株式会社船橋農場) を与える群をコントロール群とし、VE 添加食群は 2 回目の感作までは標準食を与え、その後から標準食に α -Toc (和光純薬工業株式会社) または γ -T3 (タマ生化学株式会社) を 200 および 450mg/kg 添加した食餌を与えた計 5 群にて実験を行った。また、水は水道水を自由摂取させた。飼育環境条件としては、温度 22 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 60 \pm 10% に保ち、照明は午前 8 時より 12 時間の明暗サイクルとした。飼育期間中、体重および摂食量を毎週 1 回測定した。

OVA 経口投与の 4 日後の 22 日目にネンブタール (大日本製薬株式会社) 麻酔下 (0.1

mL/100 g B.W.)にて開腹し、下大静脈より採血した。さらに、十分に脱血後、脾臓を摘出し、重量を測定した。採取した血液を30分静置後、3,000rpm、20分間遠心することにより血清を分離し、-80℃で保存した。

2. 脾臓リンパ球の分離

本研究では、RPMI-1640 MEDIUM HEPES Modification (Sigma), 炭酸水素ナトリウム (Sigma), ベンジルペニシリンカリウム (和光純薬工業株式会社), ストレプトマイシン硫酸塩 (和光純薬工業株式会社) を注射用蒸留水 (大塚製薬) に溶解後、0.22 μ m の滅菌フィルター (IWAKI) にて濾過滅菌して作製した培地を基本培地とした。

脾臓を10 mL 基本培地の入ったシャーレ内で無菌的にステンレススクリーンに通し10 mL シリンジと27G注射針を用いて、細胞を単離した。脾臓細胞浮遊液を2,000 rpm、5分間遠心し、上清を除いた後2 mL 基本培地で再浮遊した。そして、2 mL マウスリンパ球分離溶液 (Cedarlane) 上に脾臓細胞浮遊液を重層し、1,000 g、20分間遠心することにより脾臓リンパ球を得た。この脾臓リンパ球の一部を0.2%酢酸にて希釈後、血球計算盤 (萱垣医理工業株式会社) にて細胞数を算定した。残りの脾臓リンパ球は基本培地に5%牛胎児血清 (FBS, Vitromex) および50 μ M 2-メカプトエタノール (2-ME, 片山化学工業株式会社) を加えた培養培地を用いて、各分析に必要な細胞数に調整された。

3. 脾臓リンパ球中のCD4⁺ (ヘルパーT) 細胞およびCD8⁺ (サブレッサーT) 細胞の割合

脾臓リンパ球 2×10^6 cells を試験管にとり FITC 標識抗マウス CD4 モノクローナル抗体 (BECKMAN COULTER) および PE 標識抗マウス CD8 モノクローナル抗体

(BECKMAN COULTER) を5 μ L ずつ加え暗所で30分間反応させることにより染色を行った。染色された細胞は0.5%パラホルムアルデヒド (和光純薬工業株式会社) 溶液0.5 mL により固定後、24時間以内に自動細胞解析装置 FACS Calibur および解析用ソフト CELL QuestTM (Becton Dickinson) を用いて、ヘルパーTおよびサブレッサーT細胞割合の解析に用いた。

4. 脾臓リンパ球幼若化能

脾臓リンパ球幼若化能は、MTT assay Kit (Chemicon) を用いて MTT 法²⁸⁾ により測定した。脾臓リンパ球を 2×10^6 cells/mL に調整し、平底96 well プレート (IWAKI) に50 μ L ずつ duplicate で加え、さらに培養培地、concanavalin A (Con A, 終濃度5 μ g/mL, Sigma) phytohemagglutinin (PHA, 終濃度10 μ g/mL Sigma), lipopolysaccharide (LPS, 終濃度1 μ g/mL, Sigma), pokeweed mitogen (PWM, 終濃度10 μ g/mL, Sigma) および OVA (終濃度100 μ g/mL) と共培養した。37℃の5%CO₂ インキュベーター内で72時間培養後、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrasodium-bromide (MTT)/PBS を10 μ L/well 添加し、さらに4時間培養した。その後、100 μ L Isopropanol/HCl を加え、ピペッティングすることにより細胞を可溶化後、Microplate Fluorescence (セントラル科学貿易) にて吸光度 (570 nm - 630 nm = Δ OD) を測定した。測定結果は、刺激サンプルの

吸光度を培地のみで培養した細胞の吸光度で除した値（刺激係数）として表した。

5. 脾臓リンパ球からのインターフェロン- γ (IFN- γ) およびインターロイキン-4 (IL-4) 産生

脾臓リンパ球を Con A 添加（終濃度 5 μ g/mL）培養培地を用いて 1 \times 10⁷cells/mL に調整し、37 $^{\circ}$ C の 5%CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養後、3,000rpm、10 分間遠心し、上清を採取した。上清は、測定まで -80 $^{\circ}$ C にて保存した。マウス IFN- γ 測定キット（BioSource International）を用い ELISA 法により吸光度（450nm）を測定し、検量線から脾臓リンパ球培養上清中の IFN- γ 濃度を換算した。また、マウス IL-4 測定キット（TECHNE Corporation）を用い ELISA 法により吸光度（測定波長 450nm、副波長 570nm）を測定し、検量線から脾臓リンパ球培養上清中の IL-4 濃度を換算した。

6. 血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度

-80 $^{\circ}$ C で保存しておいた血清を解凍し、Mouse IgE ELISA Quantitation Kit (BETHYL) を用い、以下の方法で測定した。イムノプレート (Nunc) に、総 IgE は Goat anti-Mouse IgE-affinity purified (10 μ g/mL, 0.05M Na₂CO₃, pH9.6) , OVA 特異的 IgE 濃度は OVA (20 μ g/mL, 0.05M Na₂CO₃, pH 9.6) を 100 μ L/well 入れ、室温で 60 分間反応させ、固相化した。洗浄液 (50mM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0) で洗浄後、ブロッキング液 (50mM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0) を 200 μ L/well 入れ、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、20 倍希釈した血清サンプルまたはスタンダード (0-250ng/mL

Mouse IgE Calibrator) を 100 μ L/well 入れ、室温で 60 分間反応させた。洗浄後、Goat anti-Mouse IgE-HRP conjugate (0.1 μ g/mL, 50mM Tris, 0.14M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH8.0) を 100 μ L/well 入れ、室温で 60 分間反応させた。洗浄後、TMB Peroxidase Substrate (KPL, Inc.) を 100 μ L/well 入れ、室温で正確に 20 分間反応させ、2N 硫酸 (H₂SO₄) を 100 μ L/well 加えて反応を停止した。30 分以内に Microplate Fluorescence にて吸光度 (450nm) を測定し、検量線から血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度を換算した。

7. 血清ヒスタミンおよびロイコトリエン B4 (LTB₄) 濃度

-80 $^{\circ}$ C で保存しておいた血清を解凍し、ヒスタミン ELISA キット (Neogen Corporation) により吸光度 (450-650nm) を測定し、検量線よりヒスタミン濃度を換算した。また、LTB₄ELISA キット (Oxford Biomedical Research) により吸光度 (450nm) を測定し、検量線より LTB₄ 濃度を換算した。

8. 統計学的処理

得られたデータは、平均値 \pm 標準誤差 (SE) で表した。また、検定は *t* 検定を用い、有意差水準 5% ($p < 0.05$) で統計学的に有意とした。また、相関係数は、ピアソンの方法にて検討を行った。

研究 II

RBL-2H3 細胞における FcεR I と IgE の結合能および FcεR I 発現に対する VE の影響

1. RBL-2H3 細胞の培養

RBL-2H3 細胞は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSRRB) より入手した。

RBL-2H3 細胞の培養には、inimum Essential Medium Eagle (MEM, INC Biomedicals Inc.)、炭酸水素ナトリウム、ベンジルペニシリンカリウムおよびストレプトマイシン硫酸塩を注射用蒸留水に溶解後、0.22μm の滅菌フィルターにて濾過滅菌し、5 %FBS を添加した培地を用いた。また、RBL-2H3 細胞は付着細胞であるため、使用する際には Trypsin-EDTA (0.05 % Trypsin, 0.2g/L EDTA・4Na in HBSS, Invitrogen Corporation) を用いた。

2. マウス血清の採取

RBL-2H3 細胞を培養する際に添加する目的で、標準食、高 α-Toc および高 γ-T3 添加食を摂取したマウス血清を採取した。

BALB/c マウス、雌、8 週齢 (体重 20~24g, 日本クレア株式会社) を用い、研究 I と同様の標準食および α-Toc または γ-T3 を 450mg/kg 添加した食餌を 3 週間与えた。その後、ネンプター麻酔下 (0.1 mL/100 g B.W.) にて開腹し、下大静脈より採血した。採取した血液を 30 分静置後、3,000rpm, 20 分間遠心することにより血清を分離し、-80 °C で保存した。

3. FcεR I と IgE の結合能

α-Toc および γ-T3 は、直接培地に添加す

るためにエタノール (和光純薬工業株式会社) に溶解した。

FcεR I の測定は Chen ら²⁹⁾ の方法を参考にして行った。RBL-2H3 細胞を 4×10^5 cells/mL に調整し、ポリプロピレンチューブに 0.5 mL ずつ加え、さらに、培地、エタノール添加培地 (エタノール終濃度 0.2 %)、α-Toc および γ-T3 添加培地 (終濃度 5μg/mL)、標準食、高 α-Toc および高 γ-T3 食摂取マウス血清添加培地 (終濃度 1 %) をそれぞれ 0.5 mL ずつ加え、37 °C の 5 %CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。PBS で洗浄後、10μg/mL Rat IgE Kappa Myeloma

(UK-Serotec Ltd) を 100μL ずつ加え、37 °C で 5, 10, 30 および 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、5μg/mL Mouse anti-Rat IgE FITC Conjugate

(BIO SOURCE International) を 100μL ずつ加え、37 °C、暗所で 60 分間反応させることにより染色を行った。PBS で洗浄後、0.5 % パラホルムアルデヒド溶液 0.5 mL により固定し、24 時間以内に自動細胞解析装置 FACS Calibur および解析用ソフト CELL QuestTM を用いて、FcεR I と IgE の結合能の解析を行った。

4. FcεR I の発現

上記 3 と同様の方法で RBL-2H3 細胞を調整し、エタノール、α-Toc、γ-T3、標準食、高 α-Toc および高 γ-T3 食摂取マウス血清を添加し、37 °C の 5 %CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。PBS で洗浄後、過剰の Rat IgE Kappa Myeloma (50μg/mL) を 100μL ずつ加え、37 °C で 60 分間反応させた。

なお、Rat IgE Kappa Myeloma は、濃度 50μg/mL で 60 分間反応させることにより細

胞表面のほぼ全ての FcεR I と結合することを予備実験で確認している。PBS で洗浄後、上記 3 と同様の方法で染色、固定し、24 時間以内に自動細胞解析装置 FACS Calibur および解析用ソフト CELL Quest™ を用いて、FcεR I 発現の解析を行った。

5. 統計学的処理

本研究により得られたデータは、平均値±標準誤差 (SE) で表した。また、マウス血清添加の実験結果の検定は *t* 検定を用い、有意差水準 5% ($p < 0.05$) で統計学的に有意とした。

C. 結果

研究 I

OVA 誘発食物アレルギーモデルマウスに対する高 VE 食投与の影響

1. 摂食量および体重

摂食量の変化を図 2 に示した。

各週においてコントロール群と VE 添加食群との間に差違を認めなかった。飼育期間中の 1 匹あたりの 1 日平均摂食量についても、コントロール群(4.3g)と 200mg/kgα-Toc 添加食群(4.8g)、450mg/kgα-Toc 添加食群(5.2g)、200mg/kgγ-T3 添加食群(4.9g)および 450mg/kgγ-T3 添加食群(5.0g)との間に大きな差違を認めなかった。

体重の変化を図 3 に示した。

各週においてコントロール群と VE 添加食群との間に有意な差違を認めなかった。また、解剖時の各群の平均体重は、コントロール群(23.5±0.6g)、200mg/kgα-Toc 添加食群(23.3±0.2g)、450mg/kgα-Toc 添加食群(24.5±0.5g)、200mg/kgγ-T3 添加食群

(24.3±1.2g)、450mg/kgγ-T3 添加食群(24.3±0.5g)と各群間に大きな差違はみられなかった。

2. 脾臓重量および脾臓リンパ球数

体重 100g あたりの脾臓重量を図 4 に示した。

コントロール群(0.46±0.03g)と 200mg/kgα-Toc 添加食群(0.43±0.03g)、450mg/kgα-Toc 添加食群(0.41±0.01g)、200mg/kgγ-T3 添加食群 (0.36±0.03g) および 450mg/kgγ-T3 添加食群 (0.41±0.02g) との間に有意な差違を認めなかった。

脾臓 0.1g あたりのリンパ球数を図 5 に示した。

コントロール群{(3.44±0.36)}×10⁷cells) と 200mg/kgα-Toc 添加食群 {(3.4±0.40)×10⁷cells}、450mg/kgα-Toc 添加食群{(3.63±0.13)×10⁷cells}および 450mg/kgγ-T3 添加食群 {(3.05±0.44)×10⁷cells}と各群の間に有意な差違を認めなかった。しかし、200mg/kgγ-T3 添加食群のリンパ球数{(2.44±0.36)×10⁷cells}は、コントロール群と比較しやや少ない傾向を認めた。

3. 血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度

血清総 IgE 濃度を図 6 に示した。

コントロール群(2282.1±395.4ng/mL)と比較して 200mg/kgα-Toc 添加食群(2089.1±308.7ng/mL)および 450mg/kgα-Toc 添加食群(1436.0±333.4ng/mL)において低い傾向を認めた。一方、200mg/kgγ-T3 添加食群(2545.2±373.1ng/mL)および 450mg/kgγ-T3 添加食群(2505.3±237.3ng/mL)においてはコントロール群との間に有意な差違を認めな

かった。

血清 OVA 特異的 IgE 濃度を図 7 に示した。

コントロール群(560.5±73.6ng/mL)と比較し 200mg/kgα-Toc 添加食群(368.7±44.6ng/mL)において低い傾向を認め、450mg/kgα-Toc 添加食群(277.7±59.8ng/mL)においては有意に低いことを認めた(p<0.05)。また、コントロール群と 200mg/kgγ-T3 添加食群(620.0±89.3ng/mL)との間に有意な差違を認めず、450mg/kgγ-T3 添加食群(439.9±58.0ng/mL)においてはコントロール群と比較して OVA 特異的 IgE 濃度が低い傾向を認めた。

4. 脾臓リンパ球幼若化能

脾臓リンパ球幼若化能を図 8 に示した。

Con A 刺激に伴う脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群(2.41±0.23)と比較して有意な差違はないものの、200mg/kgα-Toc 添加食群(2.74±0.28)、450mg/kgα-Toc 添加食群(3.24±0.93)、200mg/kgγ-T3 添加食群(3.15±0.44)および 450mg/kgγ-T3 添加食群(2.97±0.40)において高い傾向を認めた。

PHA 刺激に伴う脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群(1.97±0.12)と比較して 450mg/kgα-Toc 添加食群(1.64±0.07)において低い傾向を認めたが、200mg/kgα-Toc 添加食群(1.87±0.06)、200mg/kgγ-T3 添加食群(1.86±0.09)および 450mg/kgγ-T3 添加食群(1.87±0.11)においてはほとんど変化を認めなかった。

LPS 刺激に伴う脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群(4.33±0.19)と 450mg/kgγ-T3 添加食群(4.32±0.10)の間には差違を認めなかったが、200mg/kgα-Toc 添加食群

(5.05±0.45)において高い傾向を、450mg/kgα-Toc 添加食群(3.59±0.32)および 200mg/kgγ-T3 添加食群(3.86±0.22)においては低い傾向を認めた。

PWM 刺激に伴う脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群(1.87±0.15)と比較して有意な差違はないものの、200mg/kgα-Toc 添加食群(2.52±0.32)、450mg/kgα-Toc 添加食群(2.30±0.15)、200mg/kgγ-T3 添加食群(2.32±0.12)および 450mg/kgγ-T3 添加食群(2.28±0.24)において高い傾向を認めた。

OVA 刺激に伴う脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群(1.14±0.09)と比較して 200mg/kgα-Toc 添加食群(1.34±0.05)、200mg/kgγ-T3 添加食群(1.43±0.12)および 450mg/kgγ-T3 添加食群(1.37±0.09)において高い傾向を認め、さらに、450mg/kgα-Toc 添加食群(1.48±0.05)においては有意に高いことを認めた。

5. CD4⁺ (ヘルパーT) 細胞と CD8⁺ (サブプレッサーT) 細胞割合および CD4/CD8 比

CD4⁺ (ヘルパーT) 細胞および CD8⁺ (サブプレッサーT) 細胞割合の測定結果の一例を図 9 に示した。

CD4⁺ (ヘルパーT) 細胞割合を図 10-A に示した。

コントロール群(18.1±1.7%)と 200mg/kgα-Toc 添加食群(18.3±1.4%)、200mg/kgγ-T3 添加食群(19.2±1.7%)および 450mg/kgγ-T3 添加食群(17.3±1.3%)との間に有意な差違を認めなかった。450mg/kgα-Toc 添加食群(15.2±0.5%)においてはコントロール群と比較して CD4⁺ (ヘルパーT) 細胞割合が低い傾向を認めた。

CD8⁺ (サブプレッサーT) 細胞割合を図 10-B

に示した.

コントロール群 (6.8±0.2%) と 200mg/kg α -Toc 添加食群 (6.6±0.5%), 450mg/kg α -Toc 添加食群 (6.9±0.4%), 200mg/kg γ -T3 添加食群 (6.5±0.3%) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 (6.5±0.5%) との間 に有意な差違を認めなかった.

CD4/CD8 比を図 10-C に示した. コントロール群 (2.7±0.3) と 200mg/kg α -Toc 添加食群 (2.9±0.4), 200mg/kg γ -T3 添加食群 (3.0±0.2) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 (2.7±0.2) との間に有意な差違を認めなかった. 450mg/kg α -Toc 添加食群 (2.2±0.1) においてはコントロール群と比較して CD4/CD8 比の低い傾向を認めた.

6. 脾臓リンパ球からの IFN- γ 産生

脾臓リンパ球からの IFN- γ 産生を図 11 に示した.

コントロール群 (257.9±31.0ng/mL) と比較し 200mg/kg α -Toc 添加食群 (304.9±48.3ng/mL), 200mg/kg γ -T3 添加食群 (343.3±51.4ng/mL) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 (397.5±56.0ng/mL) においては増加する傾向を認めた. しかし, 450mg/kg α -Toc 添加食群 (254.0±45.2ng/mL) の IFN- γ 産生はコントロール群と比較して差違を認めなかった.

7. 脾臓リンパ球からの IL-4 産生

脾臓リンパ球からの IL-4 産生を図 12 に示した.

コントロール群 (113.4±1.9pg/mL) と 200mg/kg α -Toc 添加食群 (114.7±4.0pg/mL) および 450mg/kg α -Toc 添加食群 (112.2±4.2pg/mL) との間に有意な差違を認

めなかった. 一方, 200mg/kg γ -T3 添加食群 (209.5±93.1pg/mL) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 (260.5±100.9pg/mL) の IL-4 産生は, コントロール群と比較して増加する傾向を認めた.

8. IFN- γ /IL - 4 の比率

脾臓リンパ球から産生されるサイトカインの比率 (IFN- γ /IL - 4) を図 13 に示した.

コントロール群の比率を 100 とした場合, 200mg / kg α -Toc 添加食群 (116.8) および 450mg / kg α -Toc 添加食群 (99.5) においては, コントロール群との間に差違を認めなかった. 一方, 200mg/kg γ -T3 添加食群 (72.1) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 (67.1) においてはコントロール群と比較して低い傾向を認めた.

9. 血清ヒスタミン濃度

血清ヒスタミン濃度を図 14 に示した.

コントロール群 (92.3±15.8ng/mL) と比較して 200mg/kg α -Toc 添加食群 (68.2±5.4ng/mL), 450mg/kg α -Toc 添加食群 (77.2±12.5ng/mL), 200mg/kg γ -T3 添加食群 (79.8±10.2ng/mL) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 (68.1±2.6ng/mL) とともに血清ヒスタミン濃度が低い傾向を認めた.

10. 血清 OVA 特異的 IgE 濃度とヒスタミン濃度の相関

血清 OVA 特異的 IgE 濃度とヒスタミン濃度の相関を図 15 に示した.

血清 OVA 特異的 IgE 濃度と血清ヒスタミン濃度との間には有意な相関を認めなかった.

11. 血清ロイコトリエン B4 濃度

血清 LTB₄ 濃度を図 16 に示した.

コントロール群 (13.8±3.1ng/mL) と比較して 200mg/kg α -Toc 添加食群 (8.2±2.4ng/mL), 450mg/kg α -Toc 添加食群 (7.2±0.5ng/mL) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 (10.4±0.6ng/mL) において低下する傾向を認めた. しかし, 200mg/kg γ -T3 添加食群 (14.2±7.6ng/mL) とコントロール群との間には有意な差違を認めなかった.

12. 血清 OVA 特異的 IgE 濃度とロイコトリエン B4 濃度の相関

血清 OVA 特異的 IgE 濃度と LTB₄ 濃度の相関を図 17 に示した.

血清 OVA 特異的 IgE 濃度と LTB₄ 濃度との間には有意な正の相関を認めた (p<0.01) .

研究Ⅱ

RBL-2H3細胞におけるFcεRIとIgEの結合能およびFcεRI発現に対するVEの影響

1. FcεRIとIgEの結合能

測定結果の一例を図18に示した。グラフの縦軸は細胞数、横軸は細胞の蛍光強度を表し、グラフが右側に移動するほど蛍光強度が高い、つまりFcεRIと結合しているIgEが多いことを示している。

FcεRIとIgEの結合能に対するVE添加の影響を図19に示した。

各群とも時間を追うごとに蛍光強度の高くなることを認めた。つまり、FcεRIと結合しているIgEが増加していることを認めた。無添加のコントロール群(5分:107.2±1.1, 10分:144.7±1.5, 30分:191.3±1.6, 60分:227.3±2.7)とエタノール添加群(5分:109.3±0.9, 10分:171.3±.2, 30分:190.5±2.9, 60分:246.9±2.9)との間に差を認めなかった。また、エタノール添加群と5μg/mL α-Toc添加群(5分:129.9±2.3, 10分:145.2±1.3, 30分:167.5±1.8, 60分:229.7±2.6)との間にも差を認めなかったが、5μg/mL γ-T3添加群(5分:97.3±1.1, 10分:102.9±1.4, 30分:142.3±2.1, 60分:169.8±2.9)においては蛍光強度が低い傾向を認めた。

FcεRIとIgEの結合能に対する高VE食摂取マウス血清添加の影響を図20に示した。

血清を添加した場合においても、エタノールに溶解したVEを添加した場合と類似した結果を認めた。高γ-T3食摂取マウス血清添加において10分(156.3±2.3)と60分(247.0±10.6)に標準食摂取マウス血清添加(10分:170.5±2.5, 60分:298.1±10.9)と比較して蛍光強度が有意に低いことを認め

た(p<0.05)。また、高α-Toc摂取マウス血清添加では標準食摂取マウス血清添加と比較して差を認めなかった。

2. FcεRIの発現

FcεRI発現に対するVE添加の影響を図21に示した。

無添加のコントロール群(926.4±8.4)と比較しエタノール添加群(658.1±8.6)ではFcεRI発現が低くなることを認めた。また、エタノール添加群と比較して5μg/mL α-Toc添加群(1088.2±8.8)および5μg/mL γ-T3添加群(798.2±8.0)においてFcεRIの発現が高くなることを認めた。

FcεRI発現に対する高VE食摂取マウス血清添加の影響を図22に示した。

標準食摂取マウス血清添加(794.3±31.4)と比較して高α-Toc摂取マウス血清添加(657.9±14.3)により蛍光強度が有意に低いことを認めた。一方、高γ-T3食摂取マウス血清添加(890.8±101.6)では標準食摂取マウス血清添加と比較して有意な差を認めなかった。

D. 考察

アレルギーには、抗原に感作された生体が抗原と再接触してから障害反応が最大に達するまでの時間が数分～数時間のもので、24～48時間を要するものがあり、前者を即時型、後者を遅延型と呼んでいる。CoombsとGellは、これらのアレルギー反応を免疫病理学的に、即時型アレルギーを(I)アナフィラキシー型、(II)細胞障害型、(III)免疫複合体型の3型に分け、それに(IV)遅延型を加えた4型に分類している。食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、花粉症、

気管支喘息などは I 型アレルギーである。しかし、実際のアレルギー疾患においては、いくつかの機序が同時に重複して病態を形成していると考えられている。

食物アレルギーの発症機序は、食物抗原（アレルゲン）が抗原性を保ったまま腸管から吸収されると、まず始めにマクロファージ (MΦ) に取り込まれ、断片化される。さらに、その情報がヘルパー T (Th) 細胞に提示される。Th 細胞がその情報を認識すると IL-4 を分泌し、その刺激を受けた B 細胞が抗体産生細胞である形質細胞へと分化し、IgE を産生する。IgE は主に肥満 (マスト) 細胞や好塩基球の細胞膜表面にある FcεR I に結合する。この状態が感作であり、再びそのアレルゲンに暴露され、アレルゲンがこの IgE に結合すると IgE が架橋化されて FcεR I が凝集し、細胞内シグナル伝達が始動する。その後、細胞は活性化されて脱顆粒し、ヒスタミンなどの活性物質が遊離される。さらに細胞膜のアラキドン酸カスケードも活性化され、脂質メディエーターであるロイコトリエンなどが産生、分泌される。それらの化学伝達物質が血管透過性の亢進、平滑筋の収縮および粘液分泌増加を引き起こし、アレルギー症状を引き起こす³⁰⁻³²⁾。従って、アレルギー症状を軽減または改善させるためには、アレルギー発症のいずれかの過程を抑制する必要がある。

研究 I では、食物アレルギーモデルマウスを用いて、食物アレルギー発症に伴う IgE 産生とそれに関与するリンパ球機能および血清ヒスタミンと LTB₄ 濃度に対する高 VE 食摂取の影響について検討した。

食物アレルギーモデルマウスは、Halteren²⁷⁾ の方法により作成した。この方法では、

アレルゲンとして OVA を用い、2 回の腹腔内投与により感作し、その後アレルゲンを経口投与することにより食物アレルギーを誘発する。つまり、腸管でのアレルゲン暴露により血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度が顕著に上昇し、アレルギーを発症するため、食物アレルギーモデルとして有用であると考えられている。さらに、感作までの過程ではなく食物アレルギー発症までの過程に対する VE の効果を明確にするため、高 VE 食摂取は 2 回目の感作終了後から開始した。

摂食量および体重については、コントロール群と各 VE 添加食群との間に有意な差違を認めなかったことから、高 VE 食摂取によるマウスの成長への影響はないと考えられる。また、脾臓重量および脾臓リンパ球数についても、コントロール群と各 VE 添加食群との間に有意な差違を認めなかった。

今回、図中には示していないが、OVA 感作していない正常な BALB/c マウスの血清総 IgE 濃度は 151.9 ± 39.7 ng/mL、OVA 特異的 IgE 濃度は 18.0 ± 0.7 ng/mL であった。従って、食物アレルギー発症に伴い総 IgE 濃度は約 15 倍、OVA 特異的 IgE 濃度は約 30 倍上昇した。高 α -Toc 食摂取により、食物アレルギー発症に伴い高値を示していた血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度が低下することを認めた (図 6, 7)。特に、血清 OVA 特異的 IgE 濃度は、食餌中の α -Toc 量依存的に低下し、200mg/kg α -Toc 添加食群ではコントロール群の約 2/3、450mg/kg α -Toc 添加食群では約 1/2 程度であった。高 α -Toc 食摂取による血清 IgE 濃度の低下は、同じくアレルギーモデルマウスを用い

た Zheng ら²⁰⁾ や Bando ら²⁵⁾ の知見と一致するものである。また, Inagaki ら³³⁾ は, α -Toc が直接的に IgE 産生を抑制することを見出し, 報告している。本研究では, γ -T3 の影響についても検討を行ったが, 450mg/kg γ -T3 添加食群において血清 OVA 特異的 IgE 濃度のやや低下する傾向を認めたものの, 明らかな IgE 産生の低下は認められなかった。IgE 産生に至るまでには M Φ , Th 細胞, B 細胞ならびに形質細胞の関与が知られている。そこで, IgE 産生の低下機序を明らかにするため, IgE 産生に関与するリンパ球機能やその質的変化について検討した。IgE 産生の低下のみられた 450mg/kg α -Toc 添加食群において, PHA および LPS 刺激に伴う脾臓リンパ球幼若化能が低い傾向にあることを認めた (図 8)。PHA は Th 細胞を, LPS は B 細胞を刺激するマイトジェンである。従って, 450mg/kg α -Toc 添加食群においてコントロール群と比較して Th 細胞および B 細胞幼若化能が低下していることが示唆される。また, Th 細胞割合が 450mg/kg α -Toc 添加食群において低下する傾向を認めている。これらのことから, 高 α -Toc 食摂取により Th 細胞および B 細胞機能が低下していたことが IgE 産生の抑制につながったものと思われた。

Th 細胞はその産生するサイトカインの種類に従い 2 つのクラス (Th1, Th2) に分類することができる。Th1 細胞は IL-2, IFN- γ などを分泌し^{34,35)}, それらは IgE 抗体の反応や即時型アレルギー反応の誘発を抑制する^{36,37)}。一方, Th2 細胞は IL-3, 4, 5, 6, 10 などを分泌し^{34,35)}, それらは IgE 産生や B 細胞, マスト細胞などの分化, 増殖を促進する^{38,39)}。アレルギー状態では,

Th1/Th2 バランスが Th2 優位になっており, このバランスを正常に保つことによりアレルギー症状を抑制することができると考えられる。そこで, Th1 および Th2 細胞から産生される代表的なサイトカインである IFN- γ および IL-4 の脾臓リンパ球培養上清中の濃度を測定し, Th1/Th2 バランスについての検討を行った。コントロール群の IFN- γ /IL-4 の比率と比較して, 200mg/kg α -Toc 添加食群ではやや高いことを認めたが, γ -T3 添加食群では逆に低いことを認めた (図 13)。IgE 産生が抑制されることを認めた α -Toc 添加食群の IL-4 産生は, コントロール群と比較してほとんど差を認めなかった (図 13)。今回の食物アレルギーモデルマウスにおいては, IL-4 産生と IgE 産生の抑制とは直接関連がみられないと考えられる。しかし, α -Toc により IL-4 産生が抑制されることも報告されている^{20,23)}。また, α -Toc が Th1 型サイトカイン産生を増加させることも報告されている⁴⁰⁾。これらのことから, α -Toc がサイトカイン産生に影響を及ぼす可能性は必ずしも否定できない。

次に, 実際にアレルギー症状を引き起こす化学伝達物質の代表的なものとしてヒスタミンと LTB₄ 産生について検討した。ヒスタミンは, マスト細胞や好塩基球の細胞質内顆粒に貯えられており, マスト細胞や好塩基球が IgE を介した刺激を受けて遊離される化学伝達物質である。今回, 図としては示していないが, 正常な BALB/c マウスの血清ヒスタミン濃度は 56.3 ± 2.5 ng/mL であった。従って, 食物アレルギー発症に伴い血清ヒスタミン濃度は約 1.6 倍上昇した。食物アレルギーモデルマウスの血清ヒスタミン濃度は, コントロール群と比較し α -Toc

および γ -T3 添加食群ともに低下する傾向を認めた (図 14) . マスト細胞腫²⁴⁾ やラットマスト細胞⁴¹⁾ からのヒスタミン遊離に対する *in vitro* での α -Toc の効果については既に報告されている. ヒスタミン遊離過程において活性酸素種 (ROS) が必要であり, マスト細胞の脱顆粒を起こすためのシグナル伝達を調節していることが知られている⁴²⁾. VE がその抗酸化作用を介して ROS の発生を抑制することによりヒスタミン遊離を抑制している可能性が考えられる. 本研究では, 高 VE 食摂取により血清ヒスタミン濃度の低下することを認めている. しかし, 血清 OVA 特異的 IgE 濃度とヒスタミン濃度との間には有意な相関を認めなかった (図 15) ことから, 血清ヒスタミン濃度の低下には OVA 特異的 IgE が産生された後の何らかの過程での VE 作用が関与している可能性が示唆される. 一方, LTB₄ は, アラキドン酸から 5-リポキシゲナーゼなどの一連の酵素反応により生成される脂質メディエーターであり, 好中球に対して遊走活性, 脱顆粒作用, 血管内皮細胞への付着増強作用などを有している. 今回, 図としては示していないが, 正常な BALB/c マウスの血清 LTB₄ 濃度は $4.7 \pm 1.0 \text{ ng/mL}$ であった. 従って, 食物アレルギー発症に伴い血清 LTB₄ 濃度は約 3 倍上昇した. 食物アレルギーモデルマウスの血清 LTB₄ 濃度は, コントロール群と比較して 200 および 450 mg/kg α -Toc 添加食群と 450 mg/kg γ -T3 添加食群において低下する傾向を認めた (図 16) . これは, 血清 OVA 特異的 IgE 濃度の結果と類似した結果であった. さらに, 血清 OVA 特異的 IgE 濃度と LTB₄ 濃度との間に有意な相関を認めた (図 17) ことから, OVA 特異的 IgE 産生

の抑制が血清 LTB₄ 濃度の低下を誘導したことが示唆される. 高 α -Toc および高 γ -T3 食摂取により食物アレルギーモデルマウスの血清ヒスタミンおよび LTB₄ 濃度の低下することを認めた. このことから, 高 α -Toc および高 γ -T3 食摂取によりアレルギー症状が軽減される可能性が示唆された. 実際に, ヒトにおいてアトピー性皮膚炎や花粉症の症状が高 α -Toc 摂取により軽減したという報告がみられる^{22,26)}. しかし, これまでに γ -T3 摂取が抗アレルギー効果を示すことを見出した報告はない.

さらに, 研究 II では, 特に γ -T3 の抗アレルギー効果について詳細なメカニズムを検討するために RBL-2H3 細胞を用いて *in vitro* での Fc ϵ R I と IgE の結合能および Fc ϵ R I の発現に対する影響について検討を行った. 本研究では, マスト細胞および好塩基球モデルとして RBL-2H3 細胞を用いた. RBL-2H3 細胞は, その細胞表面に Fc ϵ R I を有し, IgE との結合を介して細胞が活性化され, ヒスタミンを遊離することが知られている⁴³⁾.

Fc ϵ R I は, α , β および γ の 3 種類のサブユニットから構成されており, IgE は α 鎖を介して特異的に, しかも極めて高い親和性で結合する. Fc ϵ R I は, マスト細胞や好塩基球にのみ発現していると考えられてきたが, 活性化好酸球やランゲルハンス細胞, 単球, 血小板などのさまざまな細胞においてもその存在が確認されている⁴⁴⁾. これまで, Fc ϵ R I に注目し, IgE との結合やその発現をターゲットにした研究はほとんど行われていないが, 羅ら⁴⁵⁾ のバラの熱水抽出物に強力な IgE - Fc ϵ R I 結合阻害活性のあることを見出した報告がある.

本研究では、RBL-2H3細胞を用いて FcεR I と IgE の結合能に対する VE または高 VE 食摂取マウス血清添加の影響について検討した。FcεR I と IgE の結合能は、RBL-2H3 細胞と一定量の Rat IgE Kappa Myeloma を 5, 10, 30 および 60 分間反応させ、洗浄後、FcεR I に結合している IgE を FITC 標識抗ラット IgE 抗体と反応させ、その蛍光強度を測定することにより検出した。結果としては示していないが、60 分間の反応でほとんどすべての FcεR I が IgE と結合していることを認めた。より短い反応時間で FcεR I が IgE と結合した場合、結合に対する親和性は高いと考えられる。エタノール添加（終濃度 0.2%）と無添加のコントロールとの間に差を認めなかったことから、FcεR I と IgE の結合に対してエタノール添加による影響はないものと考えられる（図 19）。さらに、エタノール添加と α-Toc 添加との間には差を認めなかったが、γ-T3 添加においては蛍光強度が低くなることを認めた（図 19）。従って、γ-T3 添加により FcεR I と IgE の結合能が低下したことが示唆される。また、*in vitro* 実験系であるが、より *in vivo* に近い状態を再現するため、高 VE 食摂取マウス血清を添加して同様の実験を行った。その結果、高 VE 食摂取マウス血清を添加した場合はエタノールに溶解した VE を添加した場合と同様の結果を得た。また、高 γ-T3 食摂取マウス血清を添加した場合は蛍光強度の有意な低下を認めた（図 20）。これらのことから、γ-T3 は FcεR I と IgE 結合能を低下する作用を有する可能性が示唆された。研究 I で、高 γ-T3 食摂取により血清ヒスタミンおよび LTB₄ 濃度の低下する傾向を認めたが、脾臓リンパ球機能、IgE

産生および脾臓リンパ球からのサイトカイン産生に関してはそれら変化と関連する結果を認められなかった。従って、高 γ-T3 食摂取により FcεR I と IgE 結合能を低下することが血清ヒスタミンおよび LTB₄ 濃度の低下を誘導したと推測した。

さらに、RBL-2H3 細胞を用いて FcεR I 発現に対する VE または高 VE 食摂取マウス血清添加の影響を検討した。これまでに、アレルギー疾患患者では細胞あたりの FcεR I 発現量が高い傾向にあることや FcεR I 発現量が細胞の活性化程度と相関があることなどから、FcεR I 発現量がアレルギー疾患と関連することが推察されている⁴⁶⁾。FcεR I 発現は、FcεR I と IgE の結合能の測定時よりも過剰な Rat IgE Kappa Myeloma

(50μg/mL) を RBL-2H3 細胞と 60 分間反応させ、FcεR I に結合している IgE を FITC 標識抗ラット IgE を用いて検出した。その結果、エタノール添加において無添加のコントロールと比較して蛍光強度が低下することを認めた。また、エタノール添加と比較して α-Toc 添加では蛍光強度が高いことを認めた。また、γ-T3 添加においても蛍光強度がやや高い傾向を認めた（図 21）。しかし、逆に高 α-Toc 食摂取マウス血清添加においては標準食摂取マウス血清添加と比較して有意に蛍光強度が低いことを認めた。また、高 γ-T3 食摂取マウス血清添加においては差を認めなかった（図 22）。エタノールに溶解した α-Toc と高 α-Toc 食摂取マウス血清の添加を比較した場合、FcεR I 発現が異なる結果を認めた。FcεR I 発現量が血中 IgE 濃度と正の相関にあることは以前より知られており⁴⁶⁾、最近、IgE が FcεR I に結合することによる FcεR I の構造安定化が

細胞膜表面への FcεR I の蓄積を促すことがその機構の一つと考えられている⁴⁷⁾。従って、食物アレルギーモデルマウスにおいて高 α-Toc 食摂取により IgE 産生の抑制を認めていることから、*in vivo* では FcεR I 発現量が低下していることが推察される。

VE の食物アレルギー発症抑制メカニズムを図 23 にまとめた。本研究では、食物アレルギーモデルマウスを用いて食物アレルギー発症に対する VE の発症予防効果とそのメカニズムについて検討を行った。その結果、高 α-Toc 食摂取により食物アレルギー発症に伴い高値を示す血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度が低下することを認めた。また、それが Th 細胞割合の低下および Th 細胞と B 細胞幼若化能の低下と関連することを認めた。高 γ-T3 食摂取においては IgE 産生に対する効果はみられなかった。また、血清ヒスタミンおよび LTB₄ 濃度については高 α-Toc および高 γ-T3 食摂取により低下する傾向を認めた。そのメカニズムを検討するため RBL-2H3 細胞を用いて *in vitro* での FcεR I と IgE の結合能を検討した。その結果、γ-T3 添加により FcεR I と IgE との結合能が低下することを認めた。また、FcεR I の発現については、α-Toc 添加により抑制される可能性が示唆された。

本研究により、α-Toc および γ-T3 がそれぞれ異なるメカニズムで食物アレルギー発症を抑制することが明らかとなった。特に、γ-T3 についてはこれまでにアレルギーに対する効果は明らかにされておらず、新たな知見を得ることができた。また、本研究のように FcεR I に注目し、その発現や IgE との結合能に対する影響を検討した例はほとんどない。他の VE 同族体についてもアレ

ルギーに対する効果を検討し、これら同族体を適当な比率で摂取することにより、アレルギー発症に対する VE のより強い抑制作用が誘導される可能性も考えられ、今後、さらなる研究が期待される。

E. 健康危機情報
特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

1) 森口 覚, 兼安真弓: ビタミン E と免疫、ビタミン E の臨床—最近の知見と臨床応用への展望—, 平井俊策編、医薬ジャーナル, 2005, PP.85-104.

2) Ogawa K, Nakada K, Yamashita S, Hasegawa T. and Moriguchi S, Beneficial effects of the vegetable juice Aojiru on cellular immunity in Japanese young women. *Nutr. Res.*, 613-620, 2004.

3) Moriguchi S. and Kaneyasu M, Role of vitamin E in immune system. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 34, 97-109, 2003.

2. 学会発表

1) 兼安真弓, 長田久美子, 田中ゆみ, 森口覚: オボアルブミン誘発食物アレルギー発症に対するビタミン E の抑制効果とそのメカニズムに関する研究. 日本栄養改善学会第 2 回中国支部学術総会. 倉敷, 2005 年 7 月

2) 兼安真弓, 森口覚: オボアルブミン誘発食物アレルギーの発症・進展に対するビタミン E の抑制効果とそのメカニズムに関する研究. 第 52 回日本栄養改善学会学術総会. 徳島, 2005 年 9 月

- 3) 加藤元士, 兼安真弓, 川本美紗子, 細川由起子, 青木由典, 吉村寛幸, 森口覚: 2型糖尿病の発症・進展に対するオリーブ葉抽出物投与の影響. 第38回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会. 松江, 2005年11月
 - 4) 兼安真弓, 長田久美子, 森口覚: 第2回日本トコトリエノール研究会. 岡山, 2005年11月
 - 5) 兼安真弓, 長田久美子, 青木由典, 吉村寛幸, 森口覚: オボアルブミン誘発食物アレルギー発症に対するビタミンEの抑制作用とそのメカニズム. 第17回ビタミンE研究会. 徳島, 2006年1月
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許予定
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- H. 引用文献
1. 斎藤博久: 食物アレルギー増加の原因, 最新 食物アレルギー. 中村晋, 飯倉洋治 編, 永井書店, pp445-449, 2002.
 2. 今井孝成: 食物アレルギーの疫学. アレルギー・免疫, **10**, 699-705, 2003.
 3. 厚生労働省令第23号: 食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令. 官報 3075, 2-4, 2001-3-15日付.
 4. Burton, GW., and Ingold, KU.: Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6472-6477, 1981.
 5. Arita M, Sato, Y, Miyata A, Tanabe T, Takahashi E, Kayden HJ, Arai H, and Inoue K.: Human alpha - tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem. J.*, **306**, 473-443, 1995.
 6. 健康・栄養情報研究会 編: 第六次改定 日本人の栄養所要量 —食事摂取基準—. 第一出版, pp88-91, 1999.
 7. Kappus H, and Diplock AT.: Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free. Radic. Biol. Med.*, **13**, 55-74, 1992.
 8. Morinobu T, Ban R, Yoshikawa S, Murata T, and Tamai H.: The safety of high - dose vitamin E supplementation in healthy Japanese male adults. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 6-9, 2002.
 9. Tappel AL.: Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **203**, 12-28, 1972.
 10. Oski, FA.: Metabolism and physiologic roles of vitamin E. *Hosp. Pract.*, **12**, 79-85, 1977.
 11. Heinonen OP, Albanes D, Virtamo, J., Taylor PR, Huttunen JK, Hartman AM, Haapakoski J, Malila N, Rautalahti M, Ripatti S, Maenpaa H, Teerenhovi L, Koss L, Virolainen M, and Edwards BK.: Prostate cancer and supplementation with

- alpha – tocopherol and beta – carotene: incidence and mortality in controlled trial. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **90**, 440-446, 1998.
12. Bostick, RM., Potter, JD., McKenzie, DR., Sellers, TA., Kushi, LH., Steinmetz, KA., and Folsom, AR.: Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E: the Iowa Women's Health Study. *Cancer. Res.*, **53**, 4230-4237, 1993.
 13. Gridley, G., McLanughlin, JK., Block, G., Blot, WJ., Gluch, M., and Fraumeni, JF.: Vitamin supplement use and reduced risk of oral and pharyngeal cancer. *Am. J. Epidemiol.*, **135**, 1083-1092, 1992.
 14. Stampfer, MJ., and Rimm, EB.: Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1365S-1369S, 1995.
 15. Jialal, I., Fuller, CJ., and Huet, BA.: The effect of alpha – tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose – response study. *Arterioscler. Thromb. asc. Biol.*, **15**, 190-198, 1995.
 16. Moriguchi, S., Kobayashi, N., and Kishino, Y.: High dietary intakes of vitamin E and cellular immune function in rats. *J. Nutr.*, **120**, 1096-1102, 1990.
 17. Meydani, SN., and Beharka, AA.: Recent developments in vitamin E and immune response. *Nutr. Rev.*, **56**, S49-58, 1998.
 18. Tanaka, J., Fujiwara, H., and Torisu, M.: Vitamin E and immune response. I . Enhancement of helper T cell activity by dietary supplementation of vitamin E in mice. *Immunology.*, **38**, 727-734, 1979.
 19. Franchini, A., Bertuzzi, S., Tosarelli, C., and Manfreda, G.: Vitamin E in viral inactivated vaccines. *Poult. Sci.*, **74**, 666-671, 1995.
 20. Zheng, K., Adjei, AA., Shinjo, M., Shinjo, S., Todoriki, H., and Ariizumi, M.: Effect of dietary vitamin E supplementation on murine nasal allergy. *Am. J. Med. Sci.*, **318**, 49-54, 1999.
 21. Fogarty, A., Lewis, S., Weiss, S., and Britton, J.: Dietary vitamin E, IgE concentrations, and atopy. *Lancet*, **356**, 1573-1574, 2000.
 22. Tsourelis – Nikita, E., Hercogova, J., Lotti, T., and Menchini, G.: Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. *Int. J. Dermatol.*, **41**, 146-150, 2002.
 23. Li – Weber, M., Giaisi, M., Treiber, MK., and Krammer, PH.: Vitamin E inhibits IL-4 gene expression in peripheral blood T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2401-2408, 2002.
 24. Gueck, T., Aschenbach, JR., and Fuhrmann, H.: Influence of vitamin E on mast cell mediator release. *Vet. Dermatol.*, **13**, 301-305, 2002.

25. Bando, N., Yamanishi, R., Terao, J.: Inhibition of immunoglobulin E production in allergic model mice by supplementation with vitamin E and beta – carotene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2176-2182, 2003.
26. Shahar, E., Hassoun, G., and Pollack, S.: Effect of vitamin E supplementation on the regular treatment of seasonal allergic rhinitis. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.*, **92**, 654-658, 2004.
27. van, Halteren, AG., van, der, Cammen, MJ., Biewenga, J., Savelkoul, HF., and Kraal, G.: IgE and mast cell response on intestinal allergen exposure: a murine model to study the onset of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 94-99, 1997.
28. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55-63, 1983.
29. Chen, XJ, Juliusson, S., Aldenborg, F., and Enerback, L.: Cytofluorometric quantification of IgE and IgE receptors on individual mast cells. *J. Immunol. Methods.*, **177**, 139-150, 1994.
30. Will-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, CL.: The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol.*, **1**, 69-75, 2001.
31. Arm, JP., Spur, BW., and Lee, TH.: The effects of inhaled leukotriene E4 on the airway responsiveness to histamine in subjects with asthma and normal subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **82**, 654-660, 1988.
32. Kaliner, M., Shelhamer, JH., and Ottesen, EA.: Effects of infused histamine: correlation of plasma histamine levels and symptoms. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **69**, 283-289, 1982.
33. Inagaki, N., Nagai, H., and Koda, A.: Effect of vitamin E on IgE formation in mice. *J. Pharmacobiodyn.*, **7**, 70-74, 1984.
34. Mosmann, TR., and Coffman, RL.: Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.*, **46**, 111-147, 1989.
35. Mossmann, TR., Schumacher, JH., Street, NF., Budd, R., O'Garra, A., Fong, TA., Bond, MW., Moore, KW., Sher, A., and Fiorentino, DF.: Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunol. Rev.*, **123**, 209-229, 1991.
36. Finkelman, FD., Katona, IM., Mosmann, TR., and Coffman, RL.: IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.*, **140**, 1022-1027, 1988.
37. Iwamoto, I., Nakajima, H., Endo, H., and Yoshida, S.: Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J. Exp. Med.*, **177**, 573-576, 1993.

38. Finkelman, FD., Katona, IM., Urban, JF., Holmes, J., Ohara, J., Tung, AS., Sample, JV., and Paul, WE.: IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J. Immunol.*, **141**, 2335-2341, 1988.
39. Coffman, RL., Seymour, BW., Hudak, S., Jackson, J., Rennick, D.: Antibody to interleukin – 5 inhibits helminth – induced eosinophilia in mice. *Science.*, **245**, 308-310, 1989.
40. Wang, Y., Huang, DS., Liang, B., and Watson, RR.: Nutritional status and immune responses in mice with murine AIDS are normalized by vitamin E supplementation. *J. Nutr.*, **124**, 2024-2032, 1994.
41. Ranadive, NS., and Lewis, R.: Differential effects of antioxidants and indomethacin on compound 48/80 induced histamine release and Ca²⁺ uptake in rat mast cells. *Immunol. Lett.*, **5**, 145-150, 1982.
42. Hamawy, MM., Mergenhagen, SE., and Siraganian, RP.: Protein tyrosine phosphorylation as mechanism of signaling in mast cells and basophils. *Cell. Signal.*, **7**, 535-544, 1995.
43. Barsumian, EL., Isersky, C., Petrino, mg., and Siraganian, RP.: IgE – induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur. J. Immunol.*, **11**, 317-323, 1981.
44. 川本恵子, 羅智靖 : マスト細胞の IgE レセプター. 臨床検査, **43**, 751-761, 1999.
45. 羅智靖 : 高親和性 IgE レセプター (FcεR I) を標的にした IgE 結合阻害. 臨床免疫, **38**, 386-393, 2002.
46. 西山千春 : IgE 受容体発現調節因子. 医学のあゆみ, **206**, 941-945, 2003.
47. Borkowski, TA., Jouvin, MH., Lin, SY., and Kinet, JP.: Minimal requirements for IgE – mediated regulation of surface Fc epsilon RI. *J. Immunol.*, **167**, 1290-1296, 2001.

表1 最近のアレルギーとビタミンEに関するエビデンス

| 出典 | 著者名 | 場所 | 対象 | 方法 | 結論 |
|--|--------------------------|-------|---|---|---|
| <i>Am. J. Med. Sci.</i> , 318, 49-54, 1999. | Zheng K et al | 日本 | BALB/cマウス メス 4週齢 | 4週間 標準食 (50mg α -Toc/kg) または VE 添加食(585mg α -Toc/kg) にて飼育後, 鼻アレルギーを TDI により感作, 暴露し, 暴露直後 10 分間アレルギー症状 (くしゃみ, 鼻汁など) を観察した. その 1 週間後に解剖, 採血し, 血清 IgE 濃度, 脾臓リンパ球幼若化能, サイトカイン産生 (IFN- γ , IL-2, 4, 5) を測定した. | アレルギー症状 改善 血清 IgE 濃度 ↓ リンパ球幼若化能 ↓ IL-2, IFN- γ 産生 → IL-4, IL-5 産生 ↓ 高 VE 食摂取は鼻アレルギー反応を抑制する. |
| <i>Lancet.</i> , 356, 1573-4, 2000. | Fogarty A et al | イギリス | ヒト 2,633 名 18-70 歳 | VE, VC, マグネシウム, 多価不飽和脂肪酸などの摂取量を調査した. アレルゲン皮膚テスト, 血清総 IgE 濃度の測定を行った. | VE 摂取量と血清総 IgE 濃度には負の相関がある. VE 摂取量とアトピーのリスク発生には負の相関がある. |
| <i>Int. J. Dermatol.</i> , 41, 146-50, 2002. | Tsourelis-Nikita E et al | イタリア | ヒト アトピー性皮膚炎患者 96 名 10-60 歳 | 400IU (268mg) α -Toc(50 名)またはプラセボ(46 名)を 1 日 1 回 8 ヶ月間摂取した. 血清 IgE 濃度の測定と, アトピー性皮膚炎症状の変化を評価した. | 血清 IgE 濃度 ↓ VE 摂取群の 80% の者の症状が改善. VE の摂取はアトピー性皮膚炎の治療に対して優れた効果を有する. |
| <i>Ann. Allergy. Asthma. Immunol.</i> , 92, 654-658, 2004. | Shahar E et al | イスラエル | ヒト アレルギー性鼻炎 (花粉症) 患者 112 名 18-70 歳 | 3-5 月の花粉の飛散の多い時期に 800mg VE/日 (58 名) またはプラセボ (54 名) を摂取した. また, アレルギー症状についてのアンケートを行った. 0: 症状が全くない 1: 軽減した 2: 普通 3: 悪化した | 視覚上の症状の改善は認められなかったが, VE 摂取群において症状のスコアが低下した. VE 摂取は花粉症に対して有効である可能性がある. |

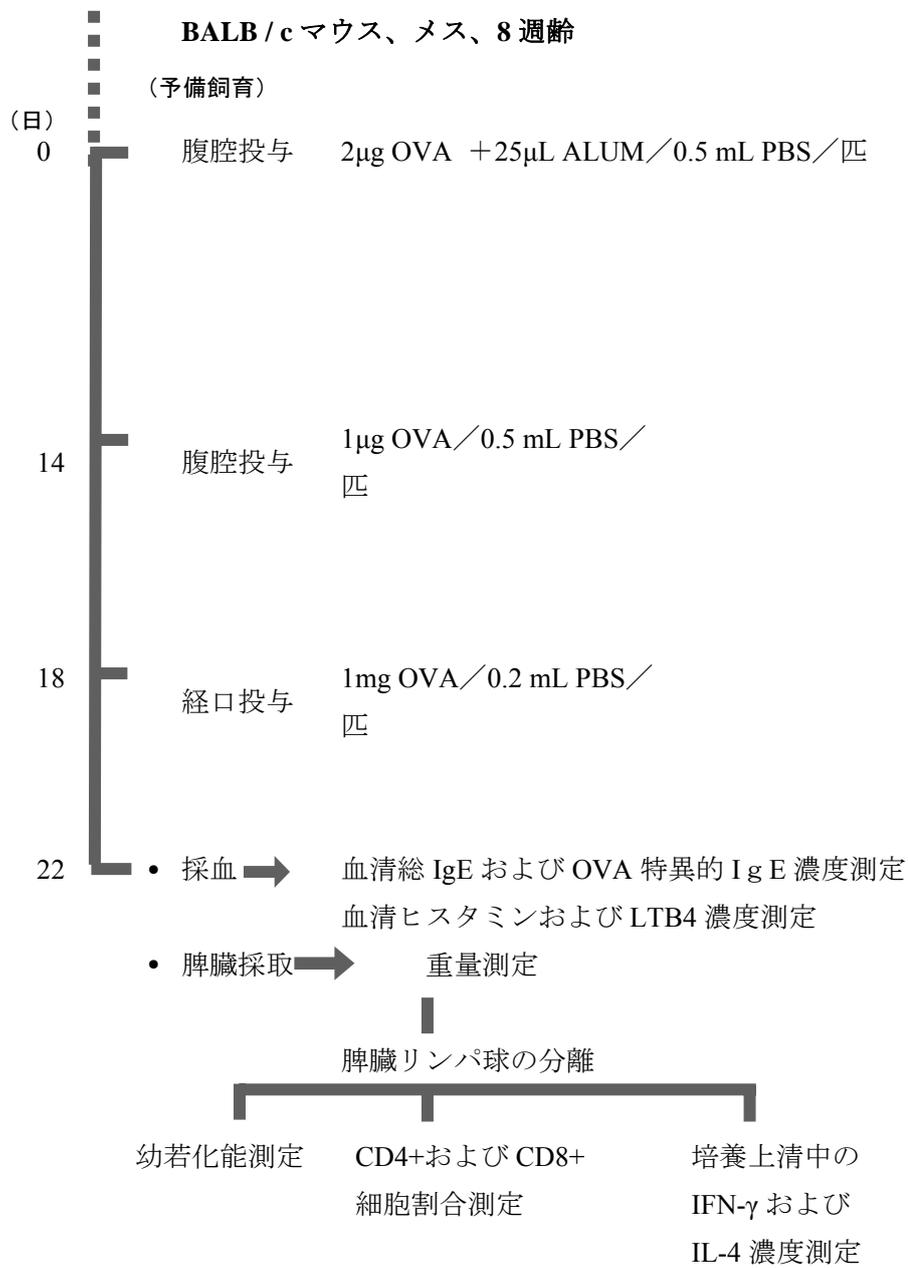


図 1 食物アレルギーモデルマウスの作成と実験計画 (研究 I)

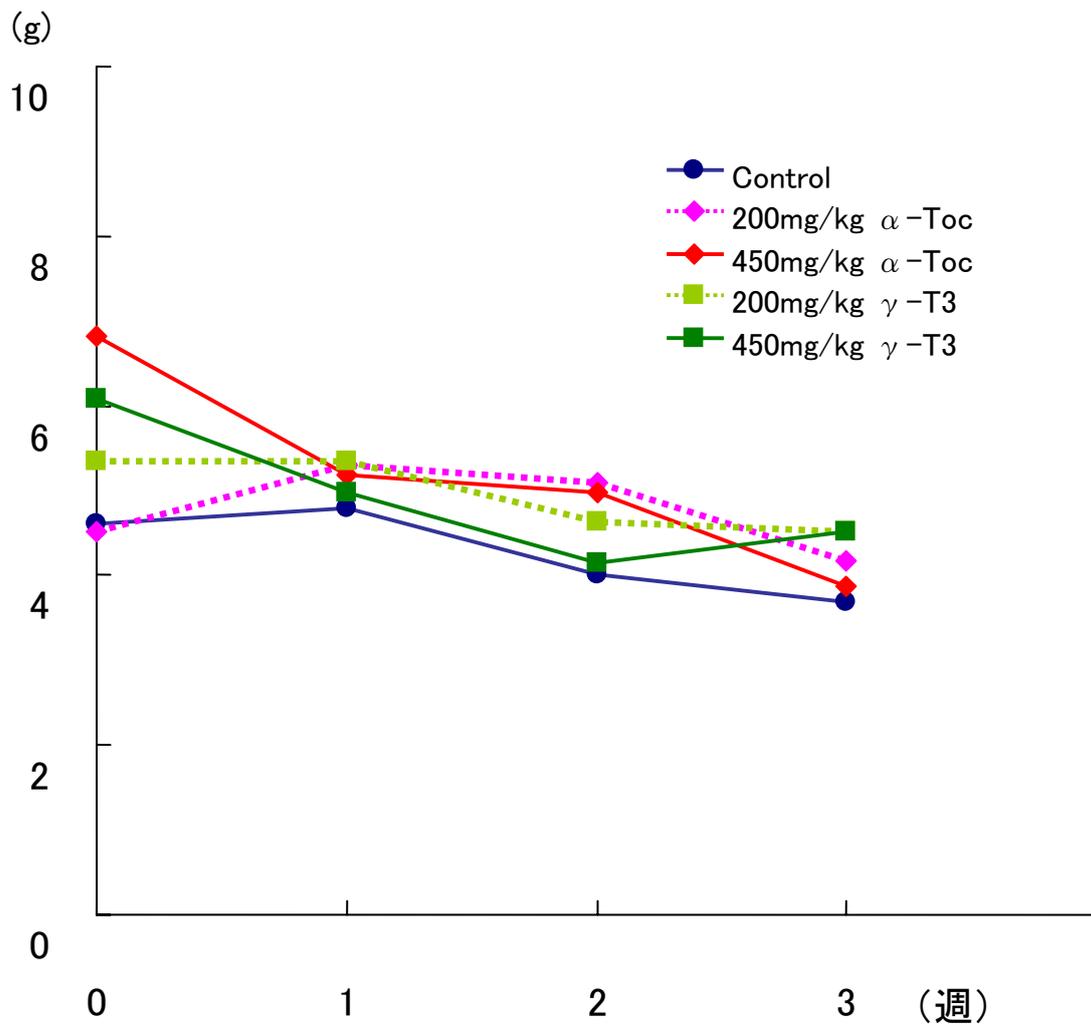


図2 摂食量の変化

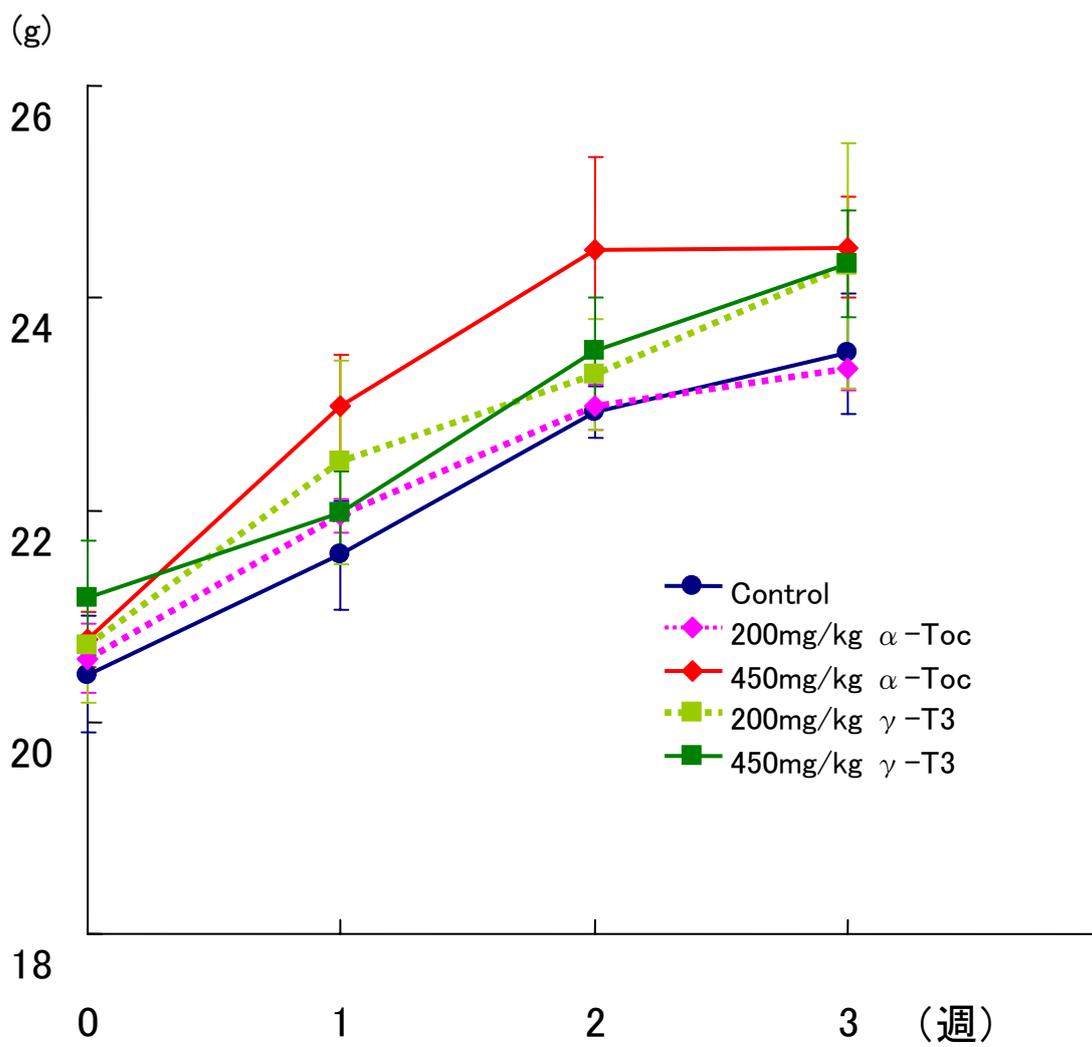


図3 体重の変化

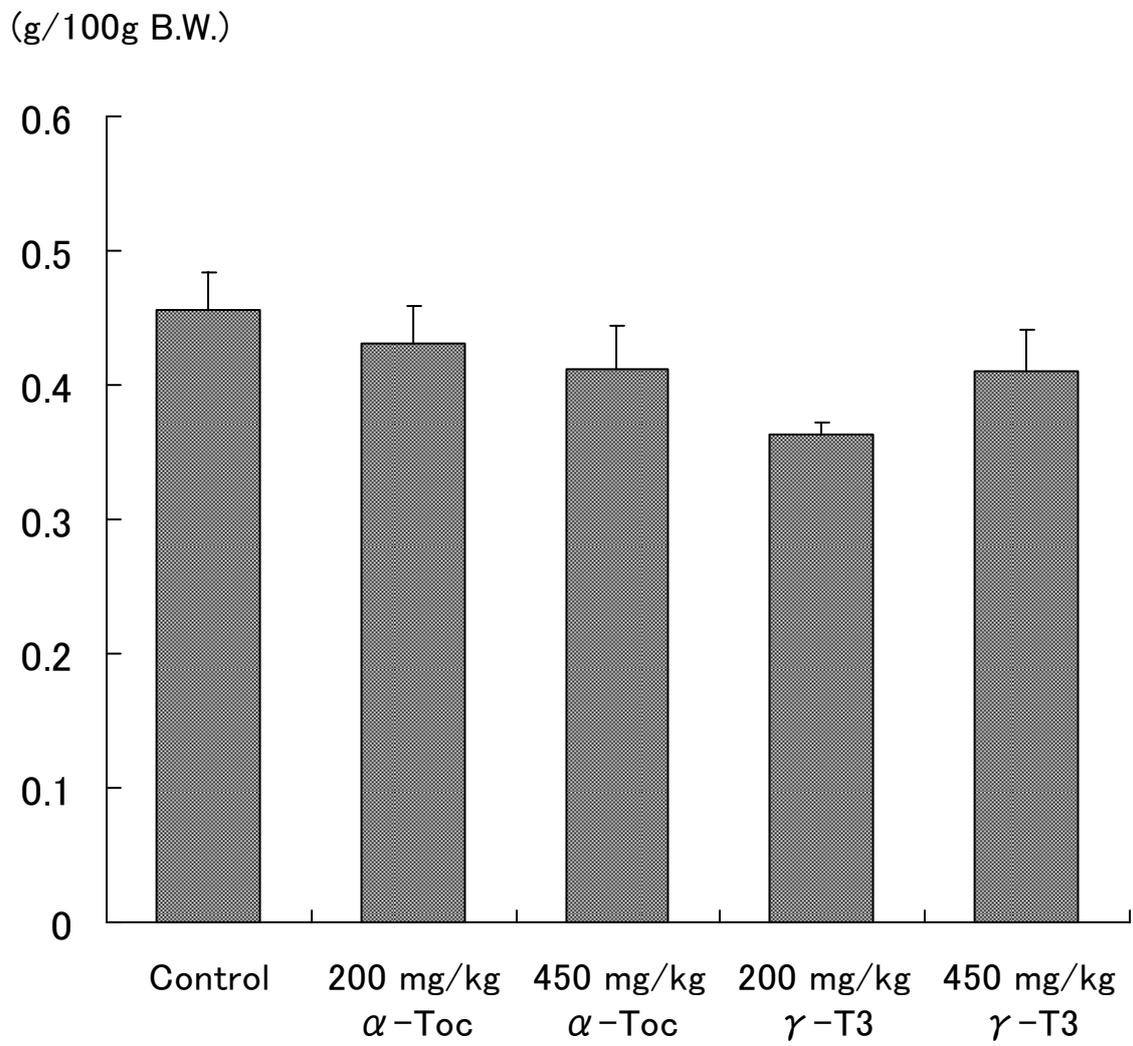


图4 脾臟重量

($\times 10^7$ cells/0.1g spleen)

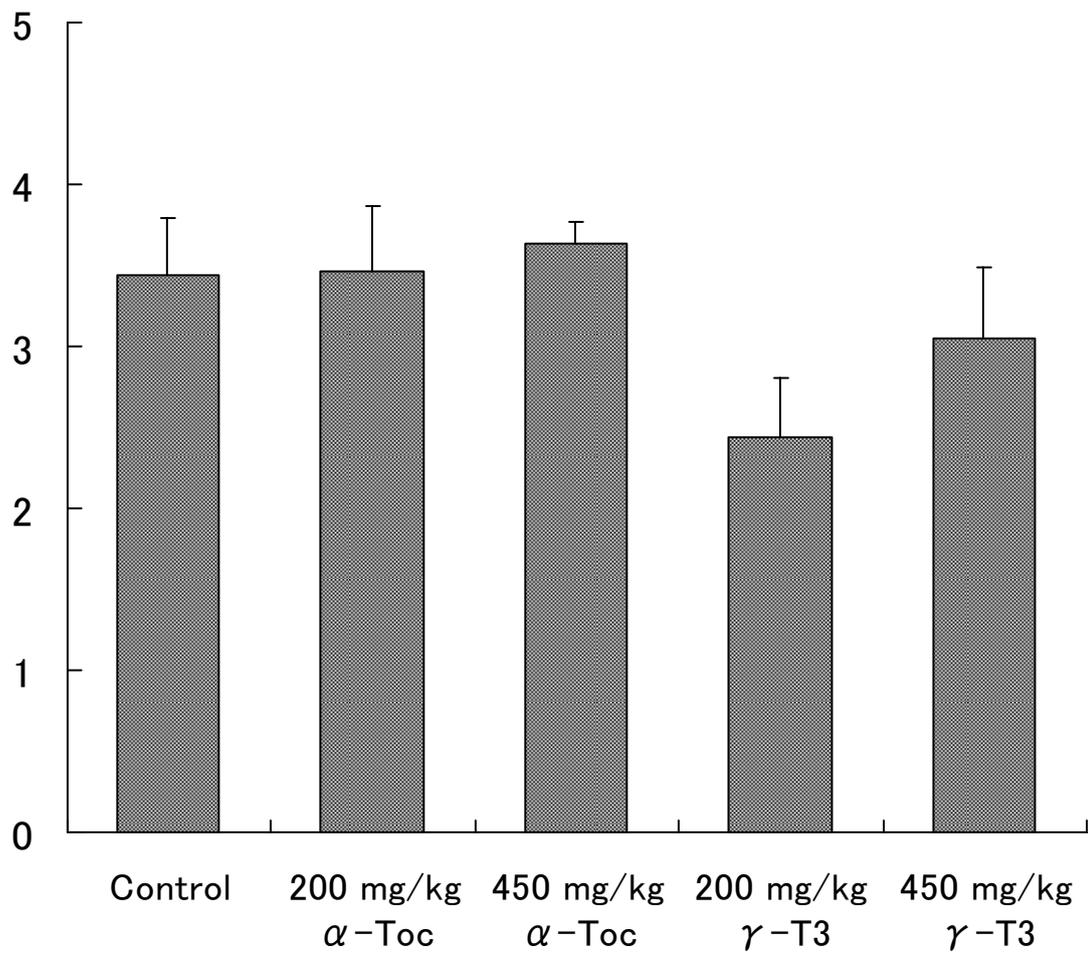


図5 脾臓リンパ球数

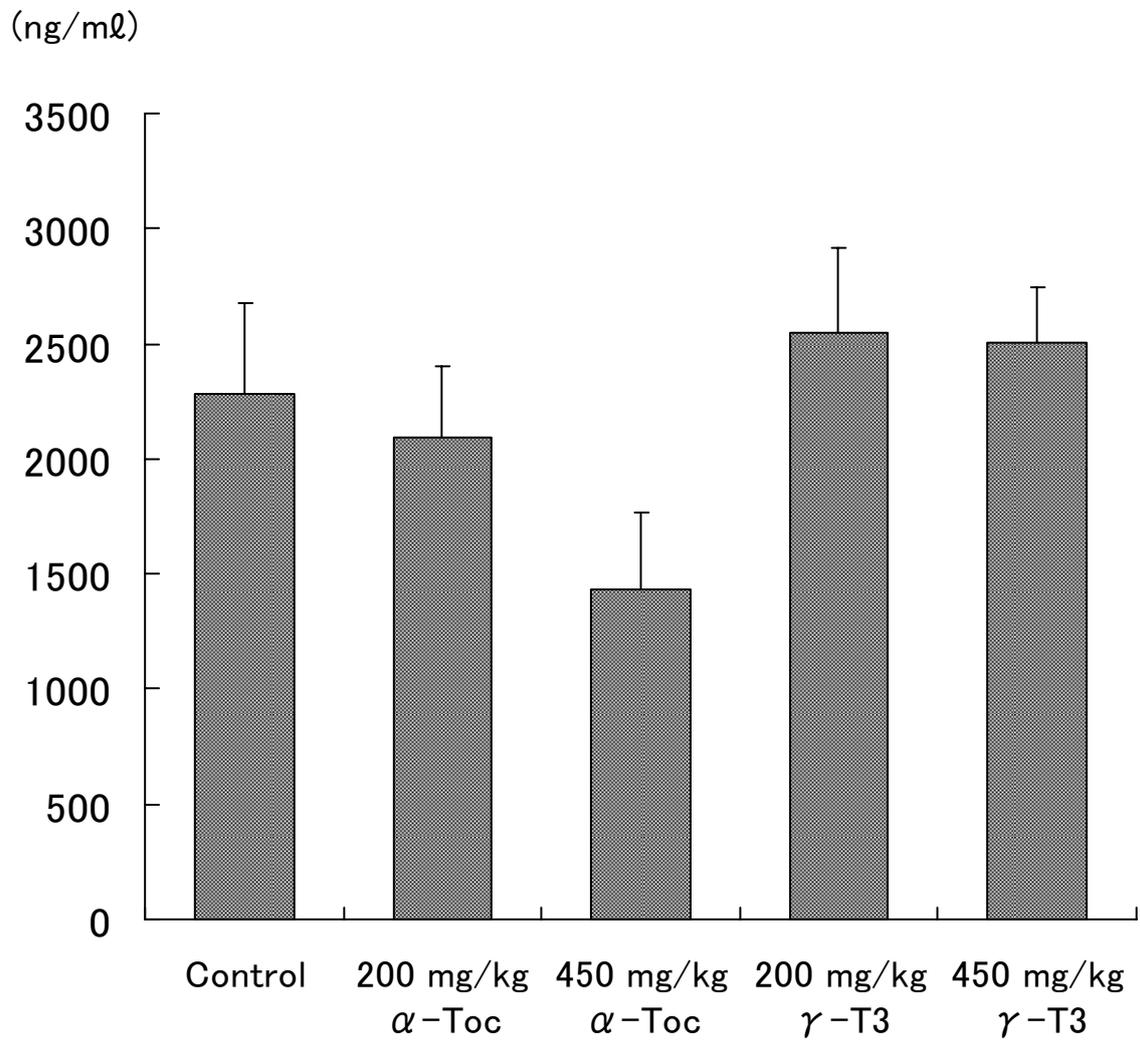


図6 血清総IgE濃度

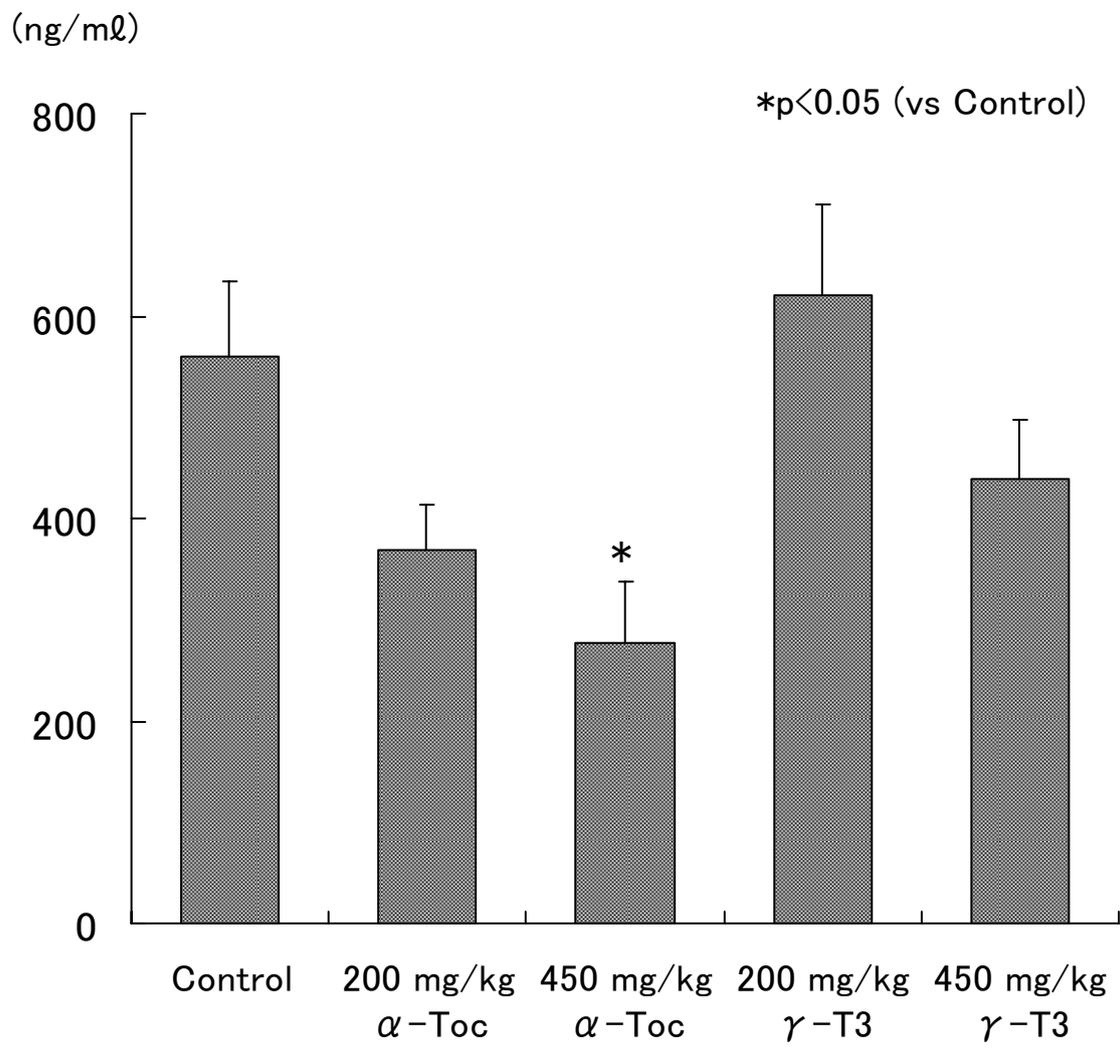


图7 血清 OVA 特异的 IgE 浓度

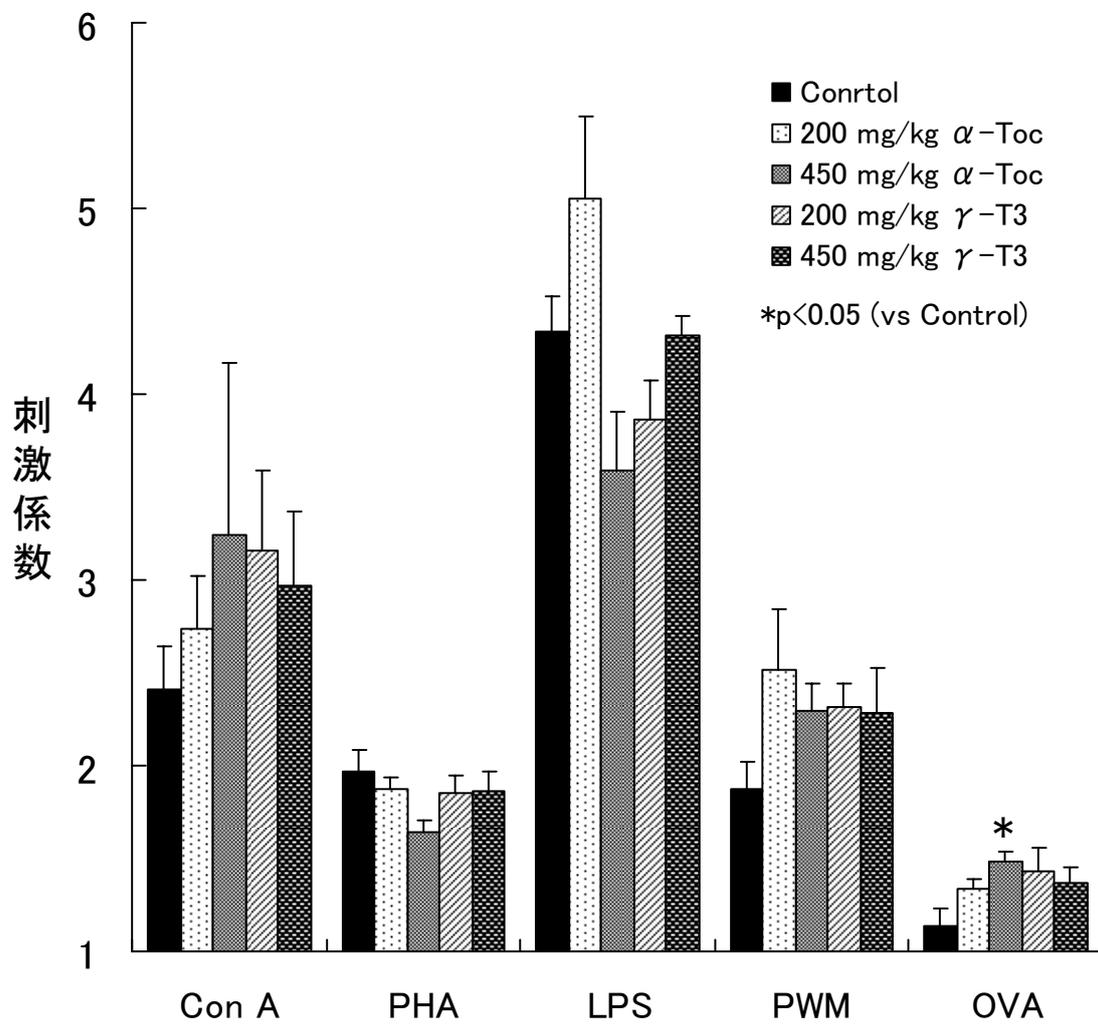


図8 脾臓リンパ球幼若化能

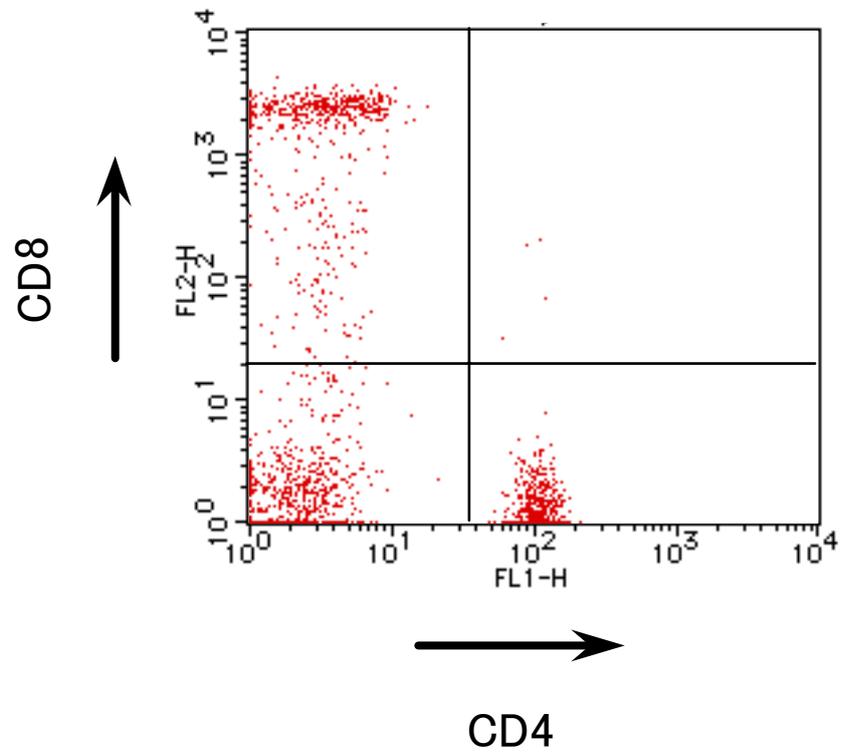
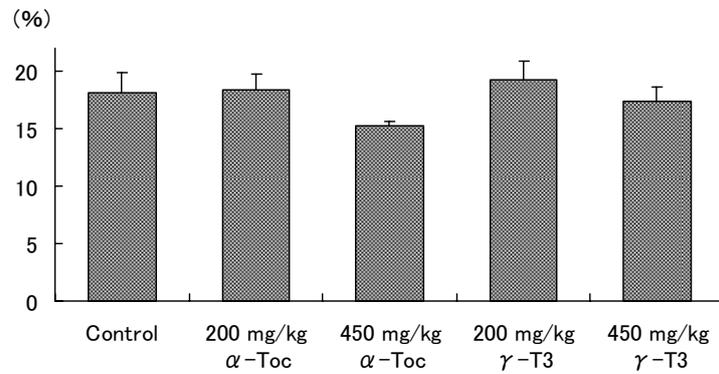
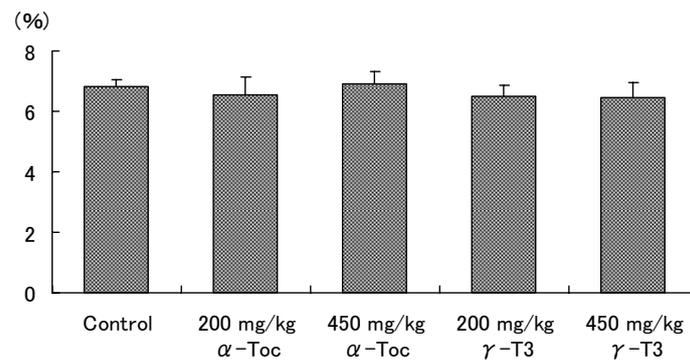


図9 CD4⁺（ヘルパーT）細胞およびCD8⁺（サブプレッサーT）細胞割合の測定

(A) CD4⁺ (ヘルパーT) 細胞割合



(B) CD8⁺ (サブレッサーT) 細胞割合



(C) CD4/CD8 比

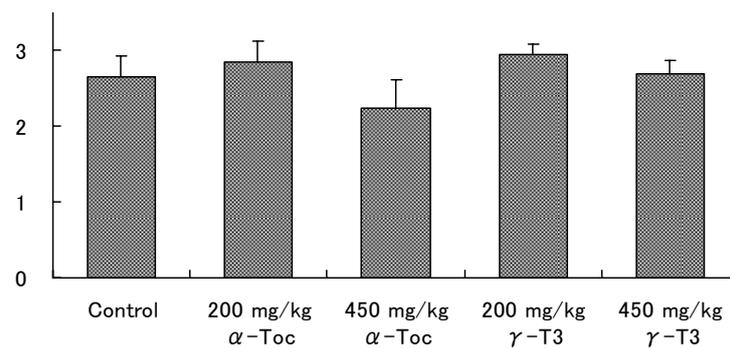


図 10 CD4⁺ (ヘルパーT) 細胞および CD8⁺ (サブレッサーT) 細胞割合と CD4/CD8 比

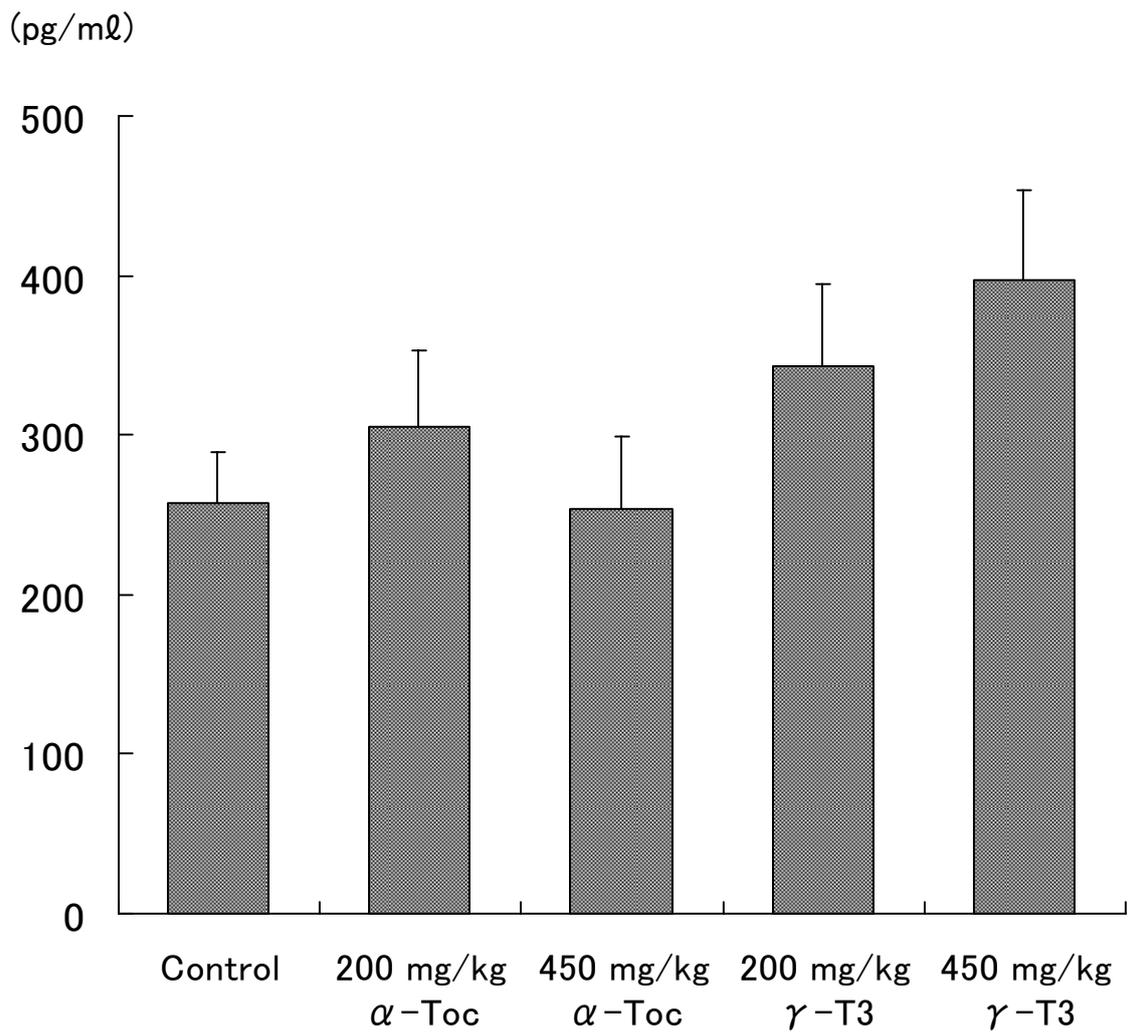


図 11 脾臓リンパ球からの IFN- γ 産生

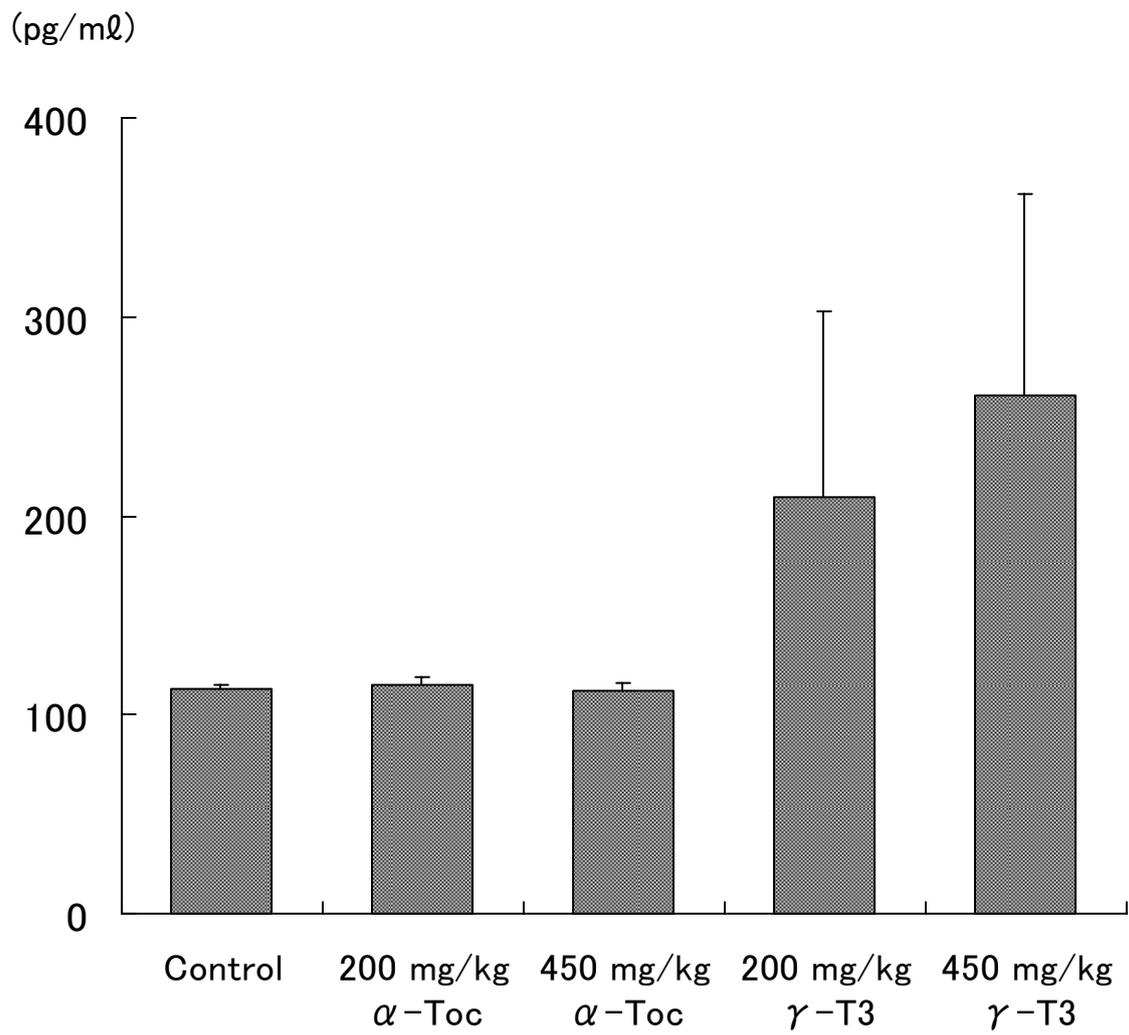


図 12 脾臓リンパ球からの IL-4 産生

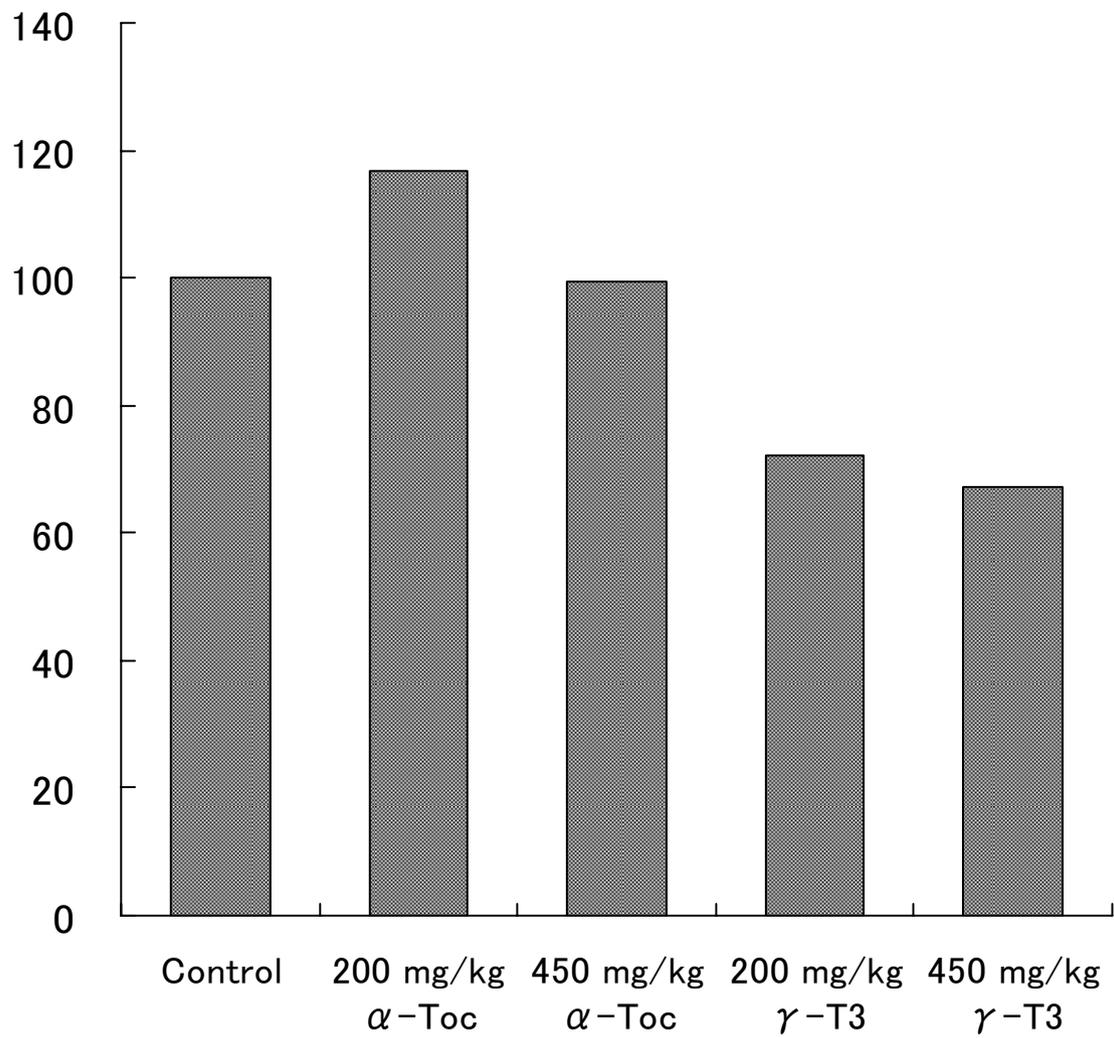


図 13 脾臓リンパ球からの Th1 および Th2 サイトカイン産生の比率
(IFN- γ /IL-4 ; Control を 100 とした場合)

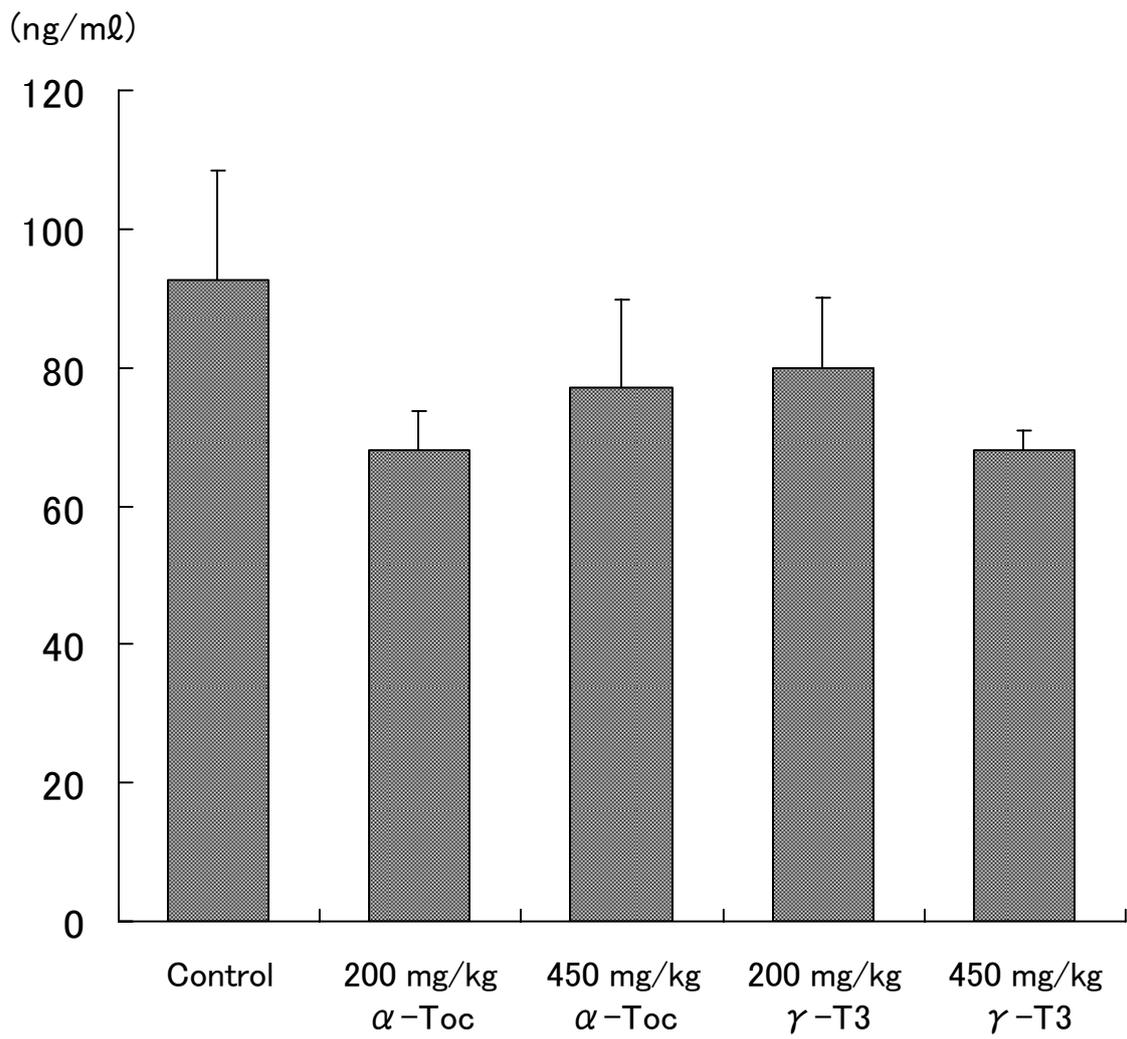


図 14 血清ヒスタミン濃度

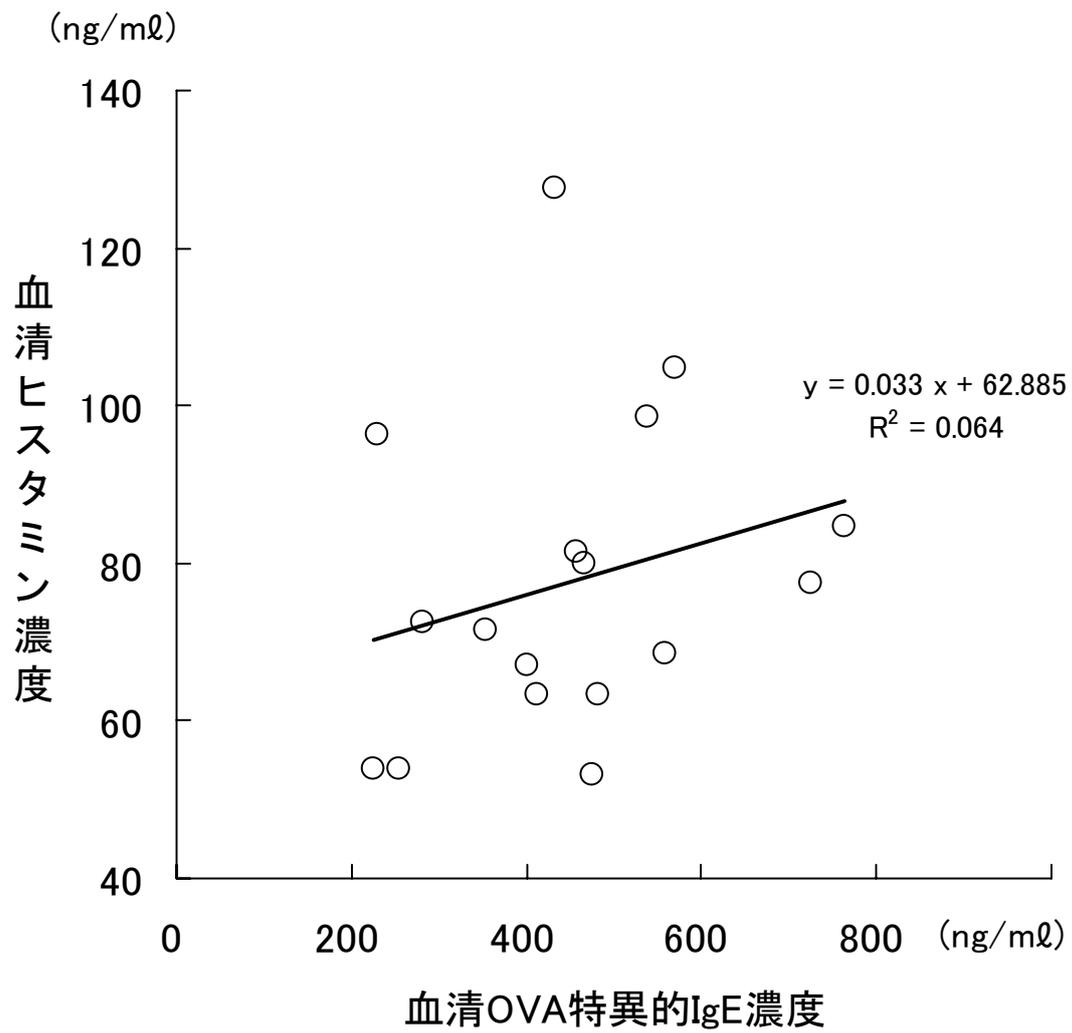


図 15 血清 OVA 特異的 IgE 濃度とヒスタミン濃度との相関

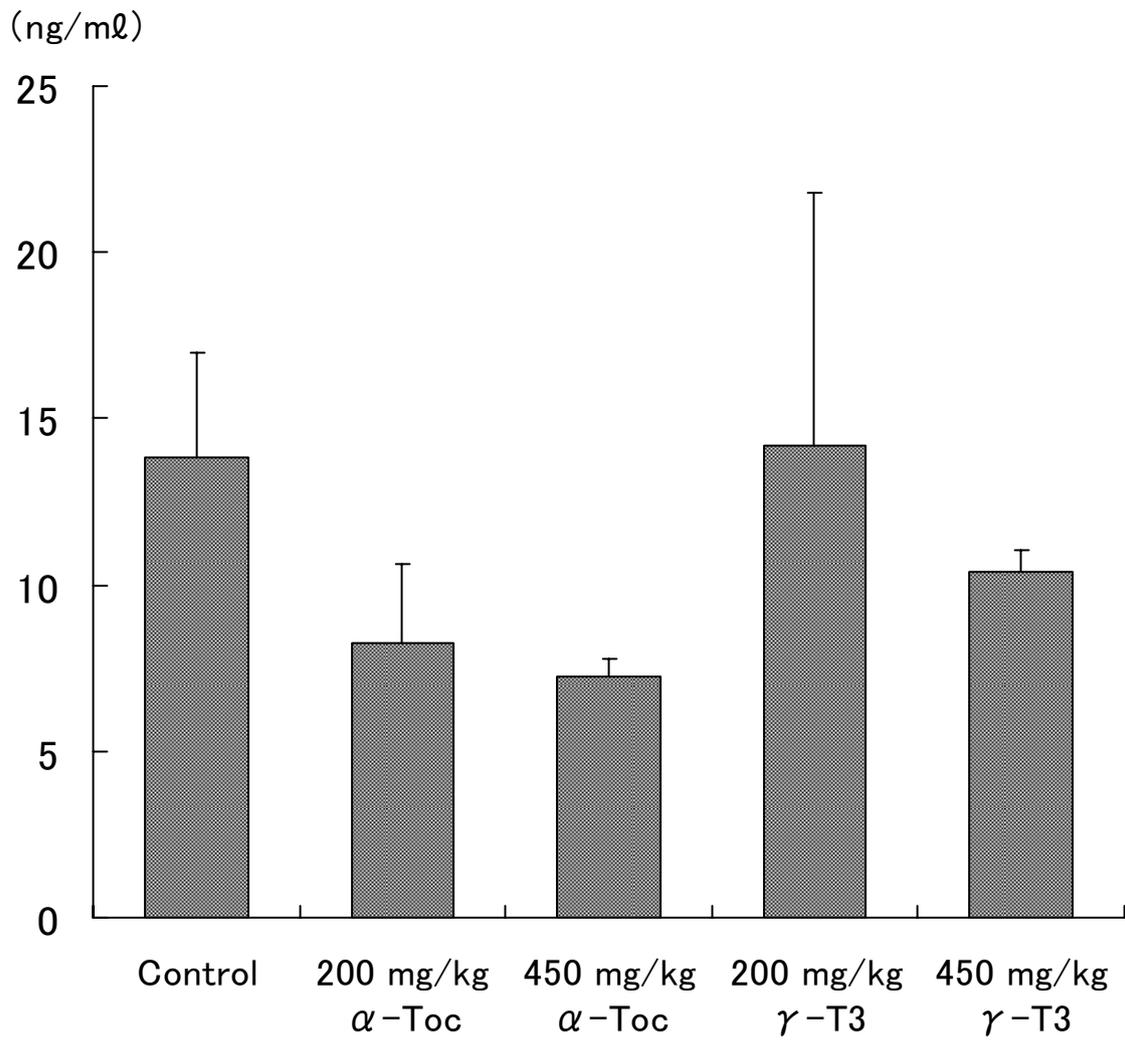


图 16 血清 LTB₄ 浓度

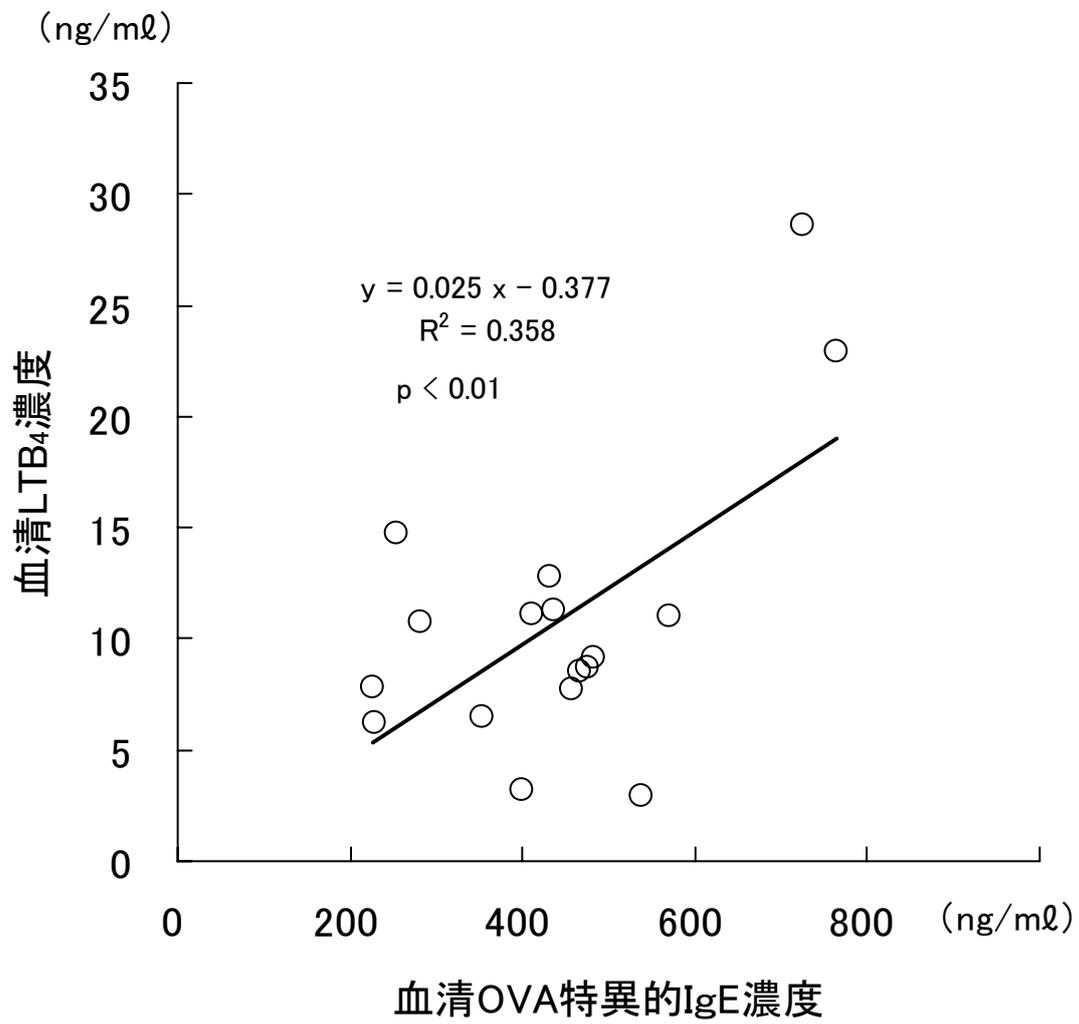
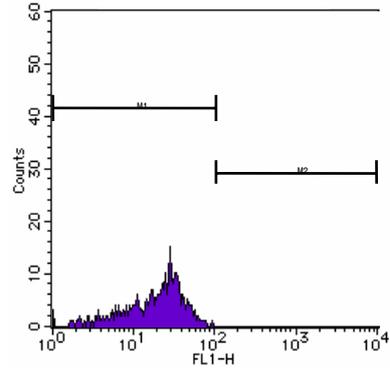
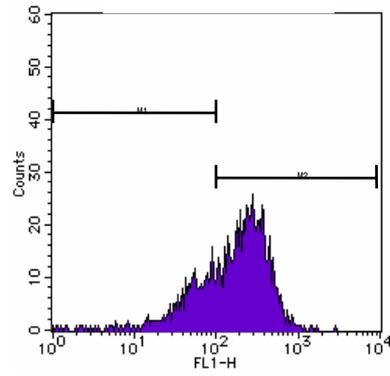


図 17 血清 OVA 特異的 IgE 濃度と LTB₄ 濃度との相関

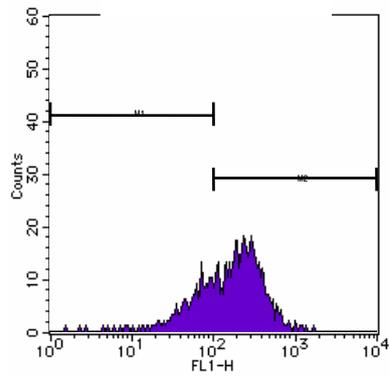
(A)染色なし



(B)エタノール



(C)5 μ g/mL α -Toc



(D)5 μ g/mL γ -T3

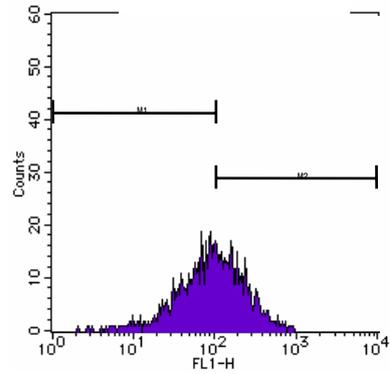


図 18 FcεR I と IgE 結合能の測定

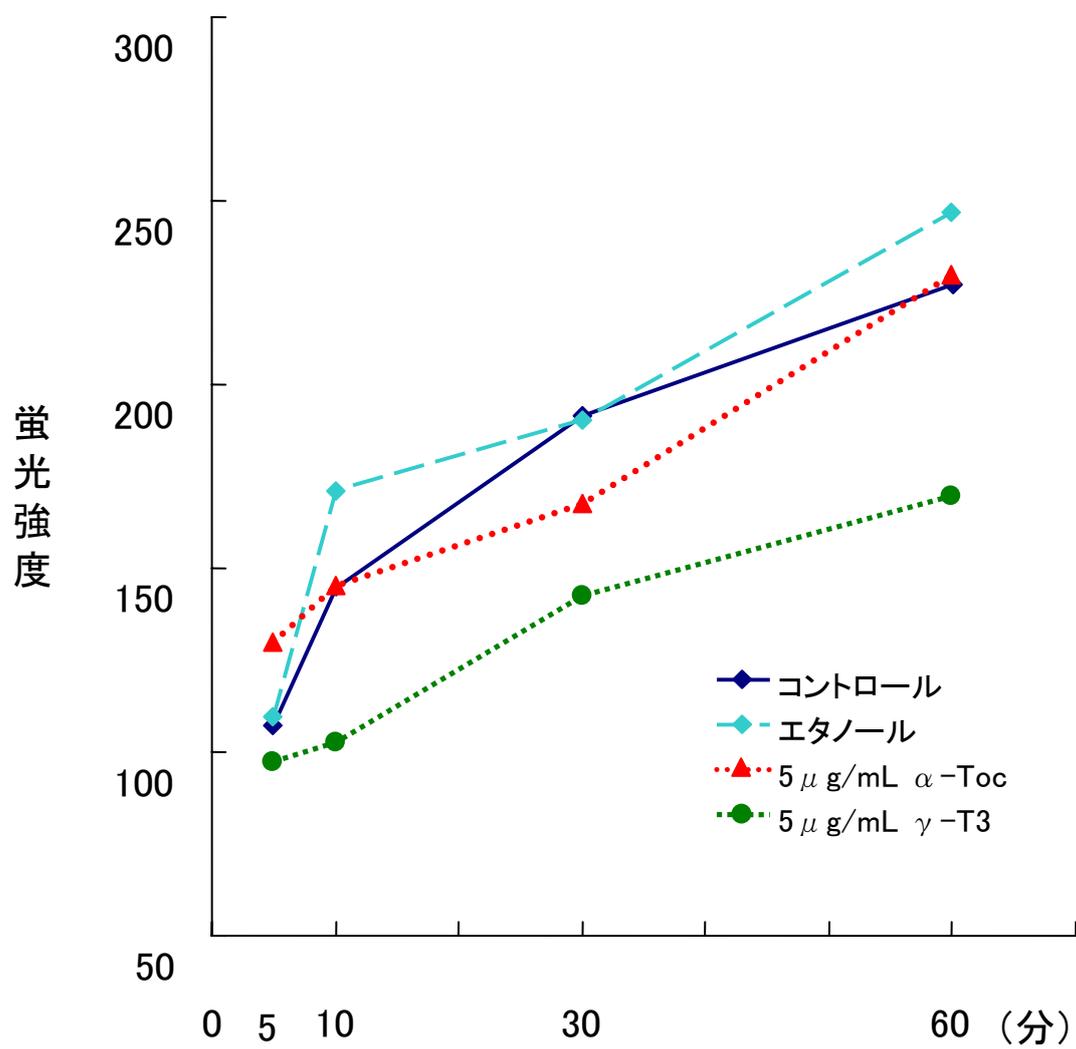


図 19 FcεR I と IgE の結合能に対する VE 添加の影響

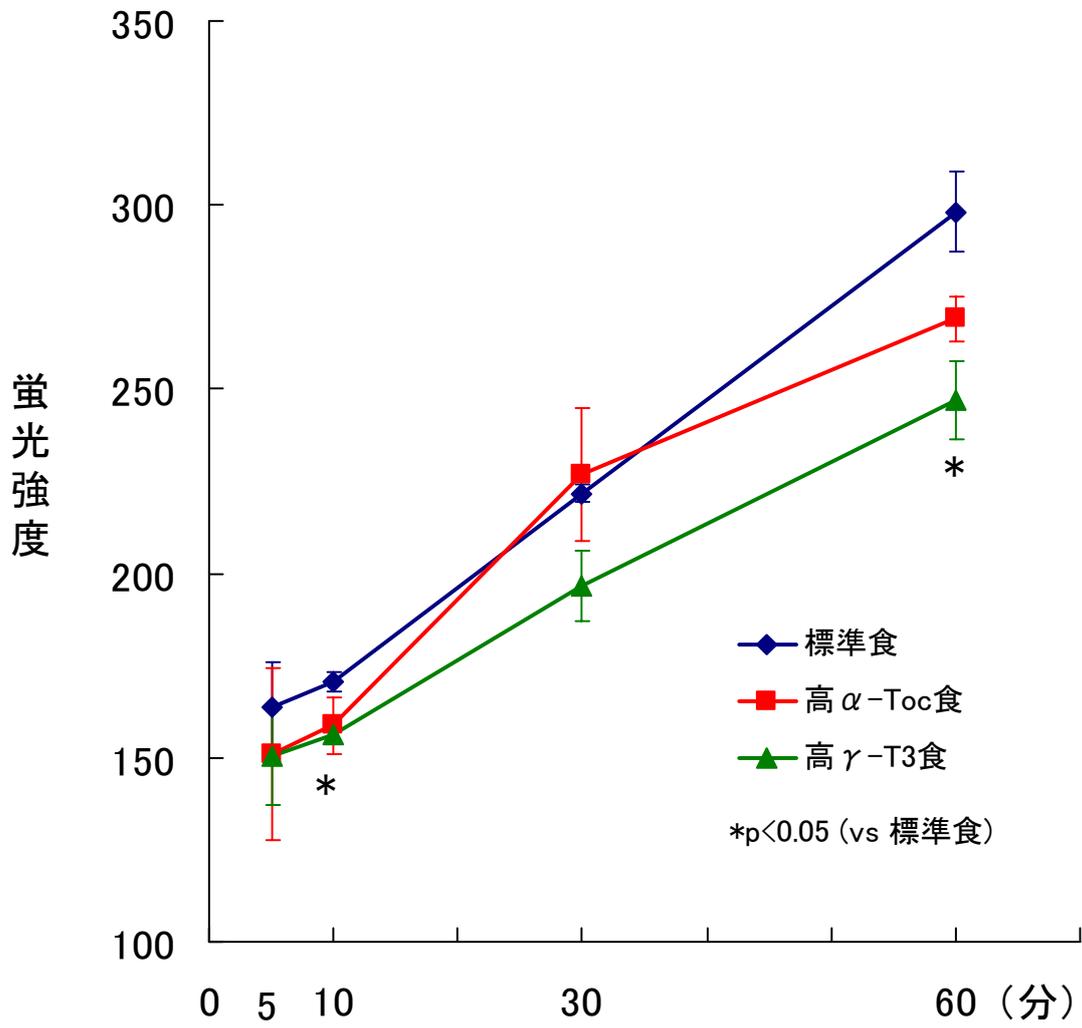


図 20 FcεR I と IgE の結合能に対する高 VE 食摂取マウスの血清添加の影響

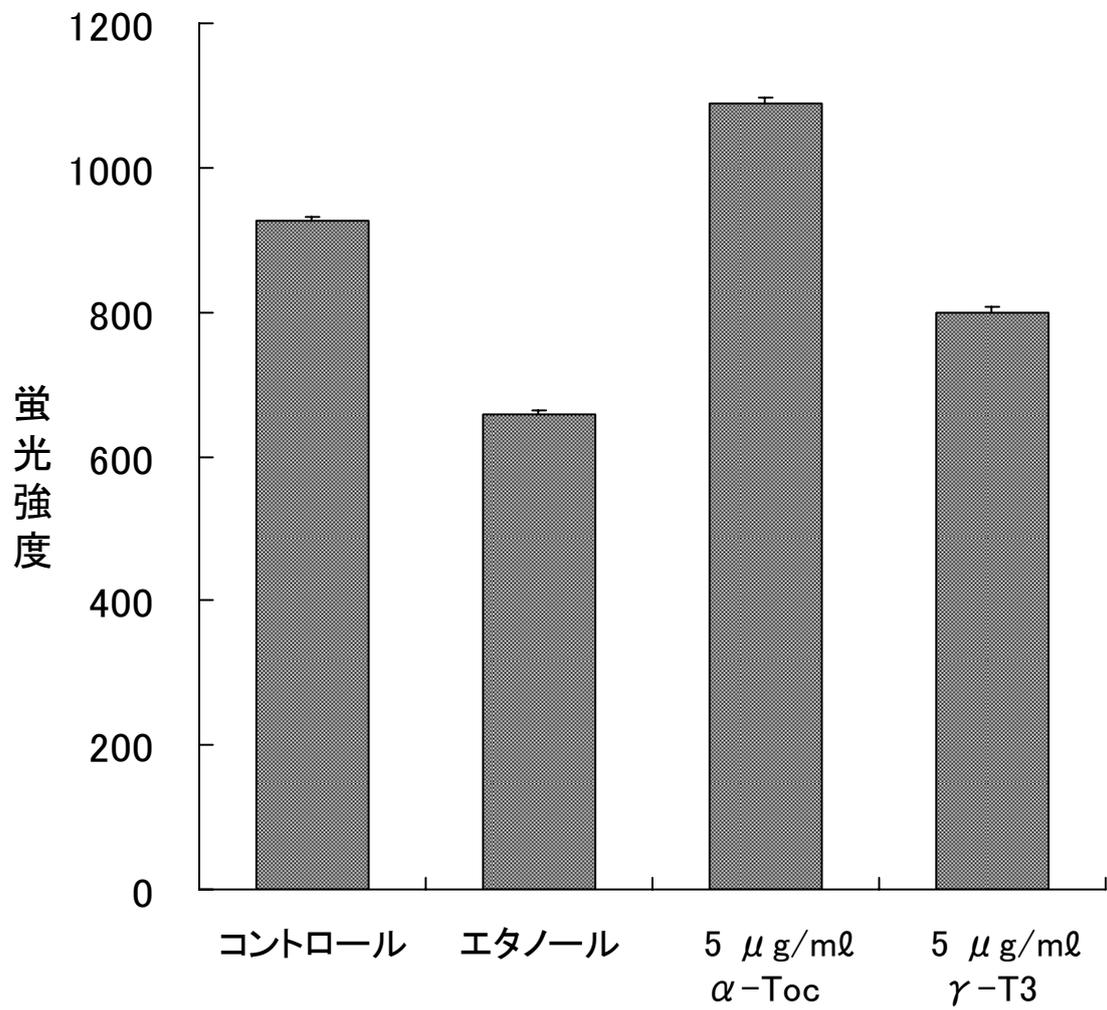


図 21 FcεR I 発現に対する VE 添加の影響

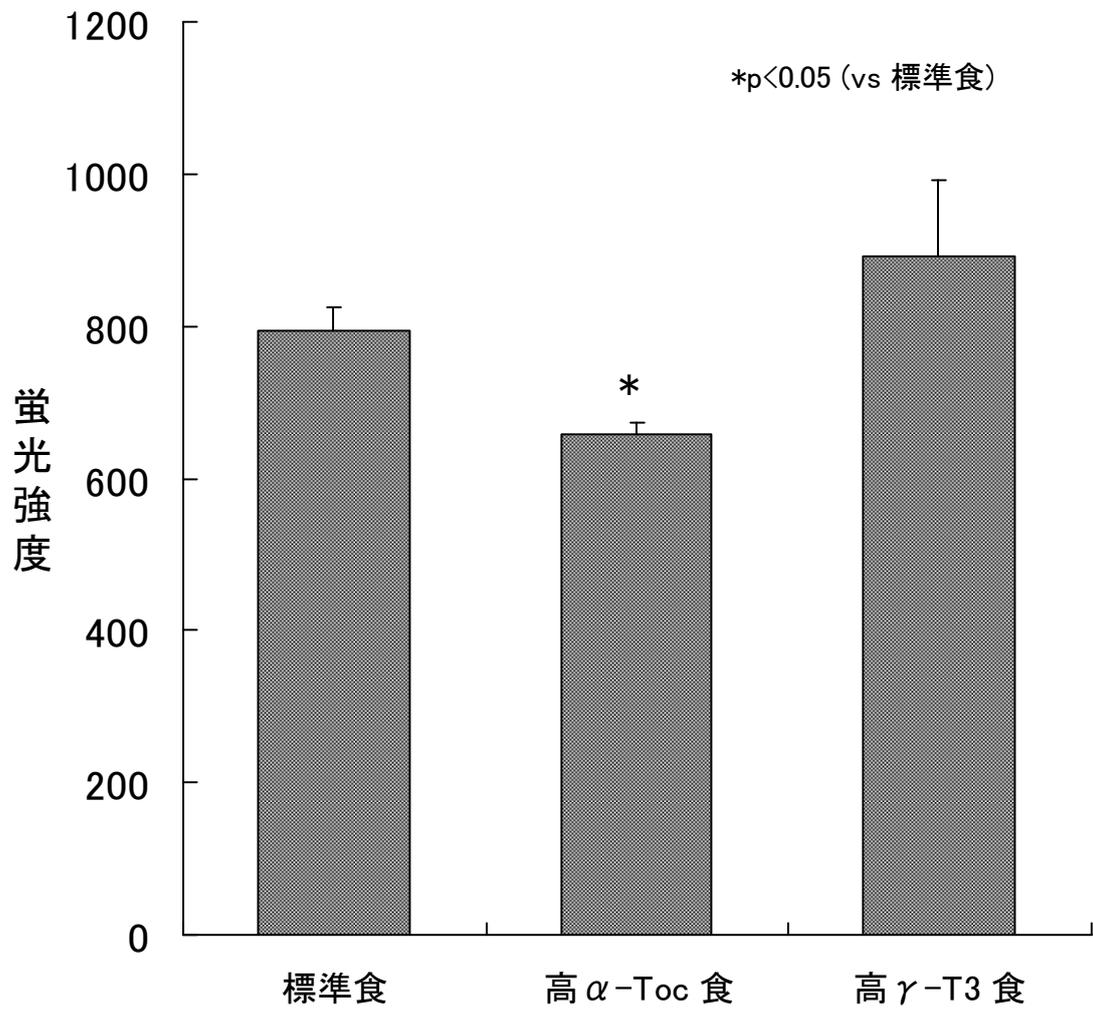


図 22 FcεR I 発現に対する高 VE 食摂取マウスの血清添加の影響

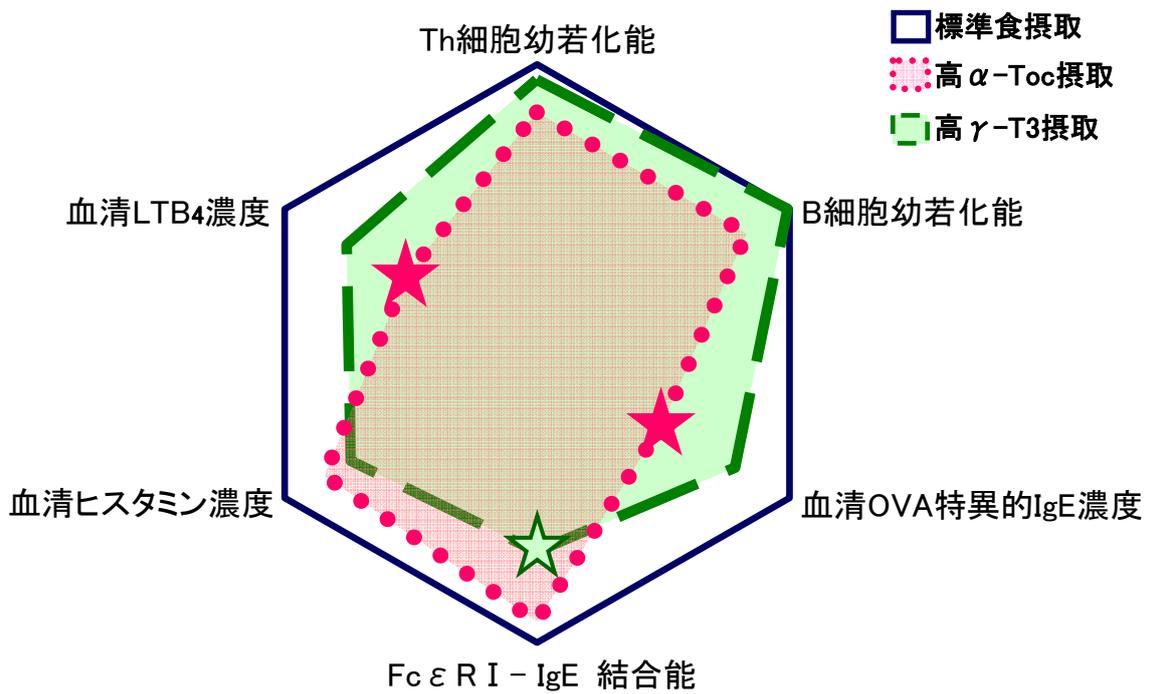


図 23 VE による食物アレルギー発症抑制メカニズム