

表3 日内変動および日差変動

		PK	MK-4	MK-7
日内変動 (n=10)				
コントロール血清	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.145±0.014	0.179±0.014	0.067±0.013
	変動係数 (%)	9.6	7.5	19.3
健常人血漿	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.270±0.084	0.353±0.021	0.693±0.061
	変動係数 (%)	6.6	6.0	8.8
日差変動 (n=10)				
コントロール血清	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.152±0.008	0.191±0.011	0.076±0.011
	変動係数 (%)	5.3	5.7	13.9
健常人血漿	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.193±0.058	0.332±0.031	0.598±0.038
	変動係数 (%)	4.9	9.2	6.3

表4 健常人およびMK-4を投薬されている骨粗鬆症患者の血漿中ビタミンK濃度

		PK	MK-4	MK-7
健常人 (n=20)				
蛍光検出法	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.814±1.107	0.149±0.172	16.27±20.58
LC-APCI/MS法	平均±標準誤差 (ng/mL)	2.163±1.340	0.392±0.457	17.53±22.55
骨粗鬆症患者 (n=10)				
蛍光検出法	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.621±0.245	46.83±46.41	4.179±6.281
LC-APCI/MS法	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.850±0.272	51.89±44.88	4.128±6.373

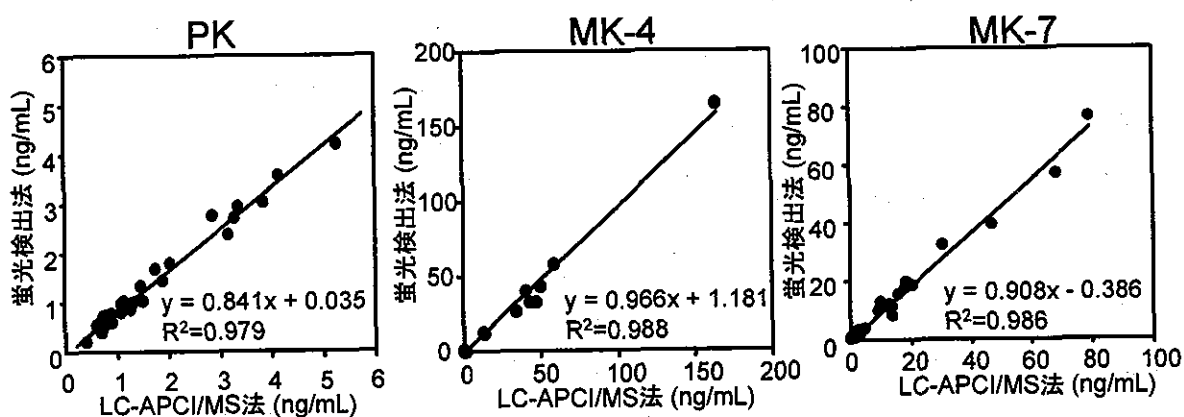


図5 蛍光検出法と LC-APCI/MS 法の相関

3. LC-APCI/MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度定量法の確立

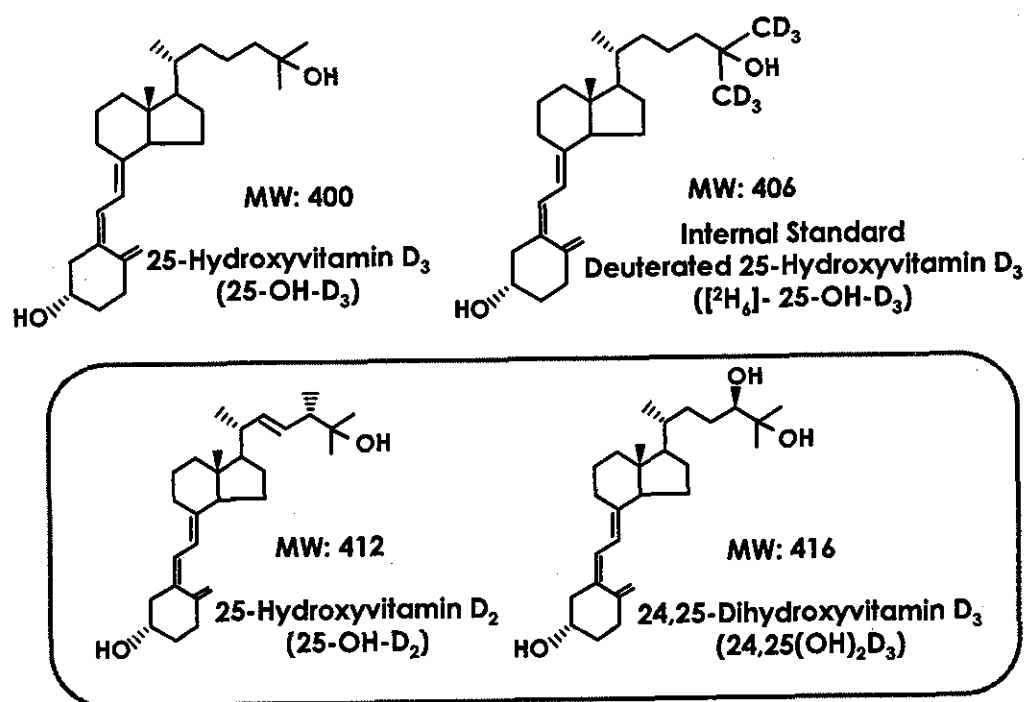


図6 25-OH-D₂/D₃, 24, 25 (OH)₂D₃ 及び [²H₆]-25-OH-D₃ の化学構造

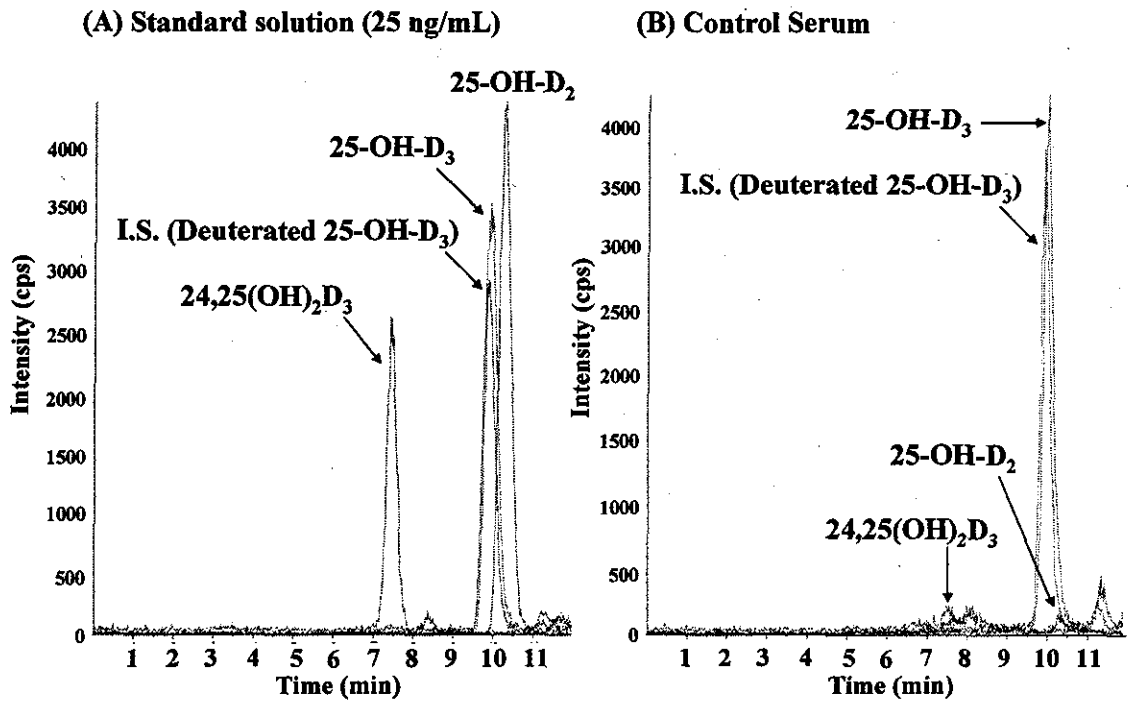
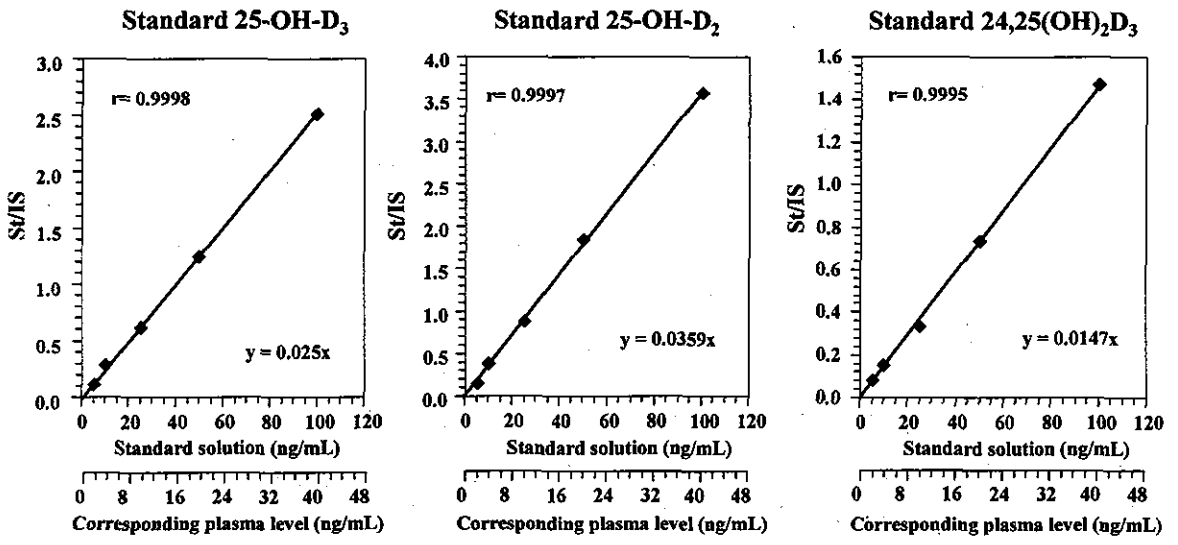


図7 LC-APCI/MS/MS 分析におけるクロマトグラム



Calibration curves for 25-OH-D₃, 25-OH-D₂ and 24,25(OH)₂D₃. Deuterated 25-OH-D₃ was used as internal standard for three vitamin D metabolites. All values were calculated as ratios St (intensity of standard are) / IS (intensity of internal standard area). The measured data of samples were converted to the concentration in 1 ml of plasma according to the following equation: plasma concentration (ng/mL) = measured data x (20/50).

図8 ビタミンD代謝物の標準検量線

表 5 標準血清を用いたビタミンD代謝物濃度の精度評価

Metabolites	Mean ± SD	RSD %
25-OH-D₃		
Intra assay (n=10)	20.0 ± 1.1 ng/mL	5.7
Inter assay (n=5)	18.6 ± 0.5 ng/mL	2.5
Recovery (n=5)	103.8 ± 4.3 (%)	4.1
25-OH-D₂		
Intra assay (n=10)	2.5 ± 0.1 ng/mL	4.5
Inter assay (n=5)	2.7 ± 0.1 ng/mL	5.1
Recovery (n=5)	99.3 ± 2.2 (%)	2.2
24,25(OH)₂D₃		
Intra assay (n=10)	2.8 ± 0.3 ng/mL	11.4
Inter assay (n=5)	2.5 ± 0.3 ng/mL	9.9
Recovery (n=5)	98.8 ± 5.1 (%)	5.2

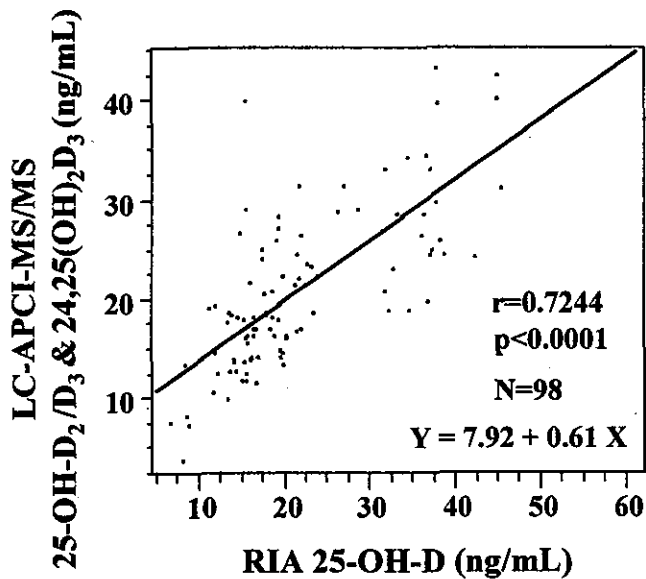


図 9 LC-APCI/MS/MS 法と RIA 法による 25-OH-D 濃度測定値の比較

表 6 25-OH-D 濃度と血中 PTH 濃度との相関

	Whole PTH		Total intact PTH	
	r	p value	r	p value
LC-APCI MS/MS				
25-OH-D ₃	- 0.2078	0.0401*	- 0.2323	0.0213 *
25-OH-D ₂ /D ₃	- 0.2294	0.0231 *	- 0.2489	0.0135 *
25-OH-D ₂ /D ₃ & 24,25(OH) ₂ D ₃	- 0.2273	0.0244 *	- 0.2461	0.0146 *
RIA 25-OH-D	- 0.0817	0.4240	- 0.0587	0.5660

4. 日本人を対象とした母乳中脂溶性ビタミン含量の測定

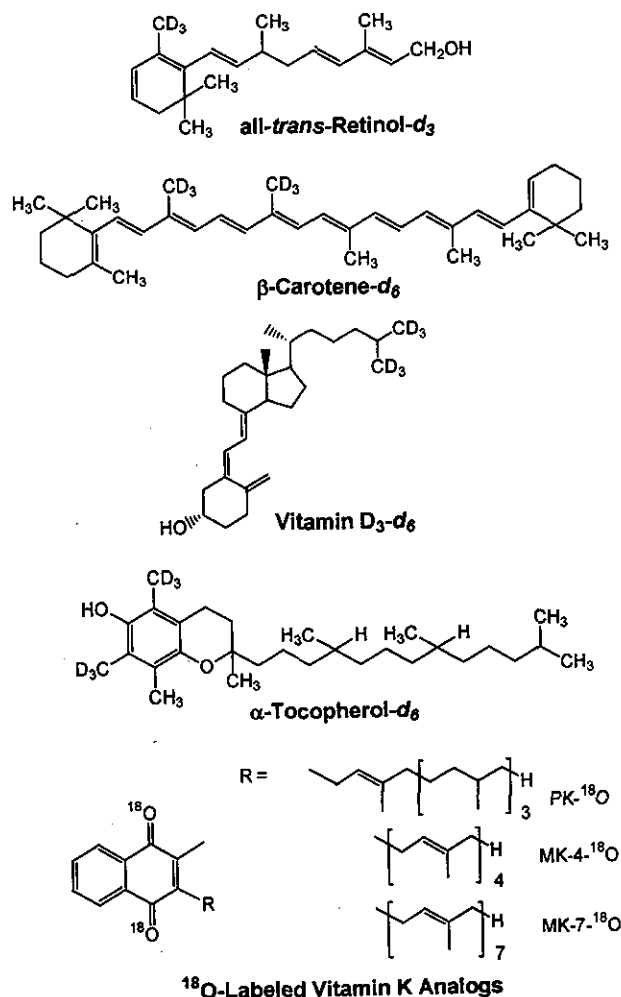


図 10 内部標準物質として合成した安定同位体ラベル化合物

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
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

カロテノイドの必要量

分担研究者 寺尾純二 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
研究協力者 板東紀子 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教務員

研究要旨

植物性食品に普遍的に含まれるカロテノイドは食事から吸収され組織に蓄積する。このうち、プロビタミンAとして機能するのはわずかであり、多くは抗酸化活性や免疫賦活活性などの機能を発揮すると考えられている。一方、ヒト介入試験においてβ-カロテン大量摂取が発がんを誘発する可能性が示唆されたことから、日常摂取するカロテノイドの質と量を明らかにする必要がある。そこで、ヒトでのカロテノイド摂取と体内蓄積および活性発現を解析することを目標として、本年度はマウスへのβ-カロテンおよびリコペン長期摂取実験を行い、組織からの両者の高感度HPLC分析法を確立した。さらにリコペンは肝臓や脾臓、皮膚に大量に蓄積するが、その他の組織（例えば脳、眼球）にも少量蓄積することが明らかになった。これらのデータはヒト実験における対照値として今後利用したい。

A. 目的

カロテノイドは植物性食品素材に普遍的に含まれる機能性物質である。その種類は500種を越えるが、プロビタミンAとして機能するのはわずかである。一方、ヒトは食事由来の多様なカロテノイドを吸収するとともに、そのままの形態で組織に蓄積することが知られている。これらの中には抗酸化活性や免疫賦活活性などにより生体に様々な生理効果をもたらす可能性があるものが多い。ところが、代表的なカロテノイドであるβ-カロテンの大量摂取は喫煙者に肺ガンを誘発したとするヒト介入試験結果も報告されている。したがって、遺伝要因や環境要因が異なるヒトの多様な集団において食品から摂取すべきカロテノイドの質と量を明らかにする必要がある。今回の日本人の食事摂取基準策定(2005年版)ではカロテノイドの摂取量に関する踏み込んだ結論は得られていない。そこで、今回のプロジェクトはプロビタミンAおよびその他の生理作用の面からヒトにおけるカロテノイドの必要量を明らかにすることを目的とする。とくに本年度は次年度以降のヒトボランティア実験に先だて、血漿や組織からのカロテノイドの分析方法を確立する。さらに、実験動物マウスを用いて摂取カロテノイドの各臓器への蓄積量を明らかにすることで、今後のヒト摂取実験の対照データとして利用したい。

B. 研究方法

動物飼育

Hos・HR-1ヘアレスマウス(♂, 8週令)(日本SLC)を実験動物として用い(n=5), 飼育は25°C, 12時間の明暗サイクルの条件下で行った。飼料はカロテノイドの吸収を高めるために0.25%のタウロコール酸を添加した20%カゼイン食に0.05%のリコペンまたはβ-カロテンを混合して作成した¹⁾。この試験食をリコペンは5週間, β-カロテンは4週間自由摂取させた後, 麻酔下で脱血屍殺し, 背部皮膚とその他の臓器を摘出した。採取した臓器は氷冷した生理食塩水で洗浄した後, ろ紙で水分を除去して重量を測定した。これらの臓器を9倍量のPBSを加えてポリトロンホモジナイザーまたはポッター型ホモジナイザーでホモジナイズ

し, 調製したホモジネートは分析に供するまで-20°Cで保存した。採取した臓器のうち脾臓, 心臓, 精巣, 眼球は小さく個別別にカロテノイドの蓄積量を測定するには不可能であるためプールしてホモジナイズした。

分析

ホモジネート0.5~1mlをネジ栓付試験管にとり, 内部標準と, 10μlの10mMBHT/ヘキサンを加えた。このサンプルに3mlのメタノール/ジクロロメタン(2:1, v/v)を加えてvortexして脂質画分を抽出し, 次いでヘキサン2mlを加えて激しく攪拌した後, 4°Cで, 3000rpm×5分遠心を行い2層分離した。上層のヘキサン層を褐色のバイアル瓶に移し, 下層には再び1mlのジクロロメタンと2mlのヘキサンを加えて再抽出した。得られたヘキサン層を先のヘキサン層と合わせチソガスで乾固し, これに酢酸エチルを500μl加えて残渣を溶解しHPLCの分析に供した。内部標準として, リコペンの定量にはβ-カロテンをβ-カロテンの定量には8-アポカロテナールを用いた。分析条件を以下に示す。移動層: リコペン(メタノール/酢酸エチル; 7:3, v/v), β-カロテン(メタノール/アセトニトリル/ジクロロメタン/水; 7:7:2:0.16v/v), 検出波長: リコペン(470nm), β-カロテン(450nm), 流速: 1ml/min, カラム: TSKgel ODS-80Ts (4.6×250mm)(TOSOH Co., Japan)で行った。リコペンはリコペンとβ-カロテンの比から, β-カロテンはβ-カロテンと8-アポカロテナールのモル比から標準曲線を作成し蓄積量を求めた。

C. 結果および考察

リコペンの分析条件の検討

サンプルの前処理を図1に示している。組織ホモジネートから塩化メチレン・メタノールで抽出し, ヘキサンを加えて二層分配した後, ヘキサン層を濃縮し, HPLC分析用の試料とした。分析の一例を図2に示した。また作成した標準曲線よりリコペンの検出限界は0.16pmolであった。

各種臓器におけるリコペンとβ-カロテンの蓄積

0.05%のリコペンを含む飼料を5週間摂取したマウスにおいて, 肝臓を始めとする各種臓器に摂取カロテノイドの蓄積が認め

られた。新鮮重量あたりの蓄積は肝臓で顕著であり、次いで皮膚に高濃度に蓄積していた。また、微量ではあるが眼球、脾臓にもそれぞれ 0.9pmol/wet weight, 1.0pmol/wet weight 蓄積が確認された。β-カロテン添加飼料を4週間摂取したマウスの肝臓、皮膚、腎臓、脳における蓄積は飼料摂取期間がリコペン摂取より短いにもかかわらず、すべての期間でリコペンより高濃度であった(表1)。

D. 考察

本研究はカロテノイドの必要量を明らかにすることを目的として組織のリコペン分析法を検討し、確立した分析方法に従いリコペン摂取マウスの各種臓器の蓄積量を測定した。確立したリコペンの検出限界は 0.16pmol 以下という高感度であり、蓄積量の少ない心臓、脾臓、眼球においても定量することができた。しかしながら蓄積量については採取臓器に僅かながら残存する血液由来のカロテノイドを含む可能性がある。リコペンの HPLC 分析に供する試料はβ-カロテン試料と同じヘキササン・ジクロロメタンの2層分離法で調製できる。また、HPLC 分析に要する時間も16分と短時間であり、多量の試料を簡便にかつ短時間に分析定量でき、すでに分析方法が確立されているβ-カロテンの分析結果との比較も可能である²⁾。他のカロテノイドも本分析法で定量可能と判断できる。また、本年定量した各種臓器への蓄積量の結果は次年度以降に定量するヒト血漿濃度からヒト臓器への蓄積量を推定するための基礎データとして用いることにした。

E. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

ヘアレスマウスにおける摂取リコペンの臓器への蓄積：UVA 照射の影響
2004 年度日本農芸化学会中四国支部大会

F. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許予定

なし

3. 実用新案登録

なし

4. その他

なし

G. 引用文献

1. Umegaki K, Aoshima M, Hirota S, Esashi T. Simultaneous dietary supplementation of sodium cholate and beta-carotene markedly enhances accumulation of beta-carotene in mice. *J Nutr* (1995) 125, 3081-3086.
2. Bando N, Yamanishi R, Terao J. Inhibition of immunoglobulin E production in allergic model mice by supplementation with vitamin E and β-carotene. *Biosci Biotechnol Biochem* (2003) 67, 2176-2182.

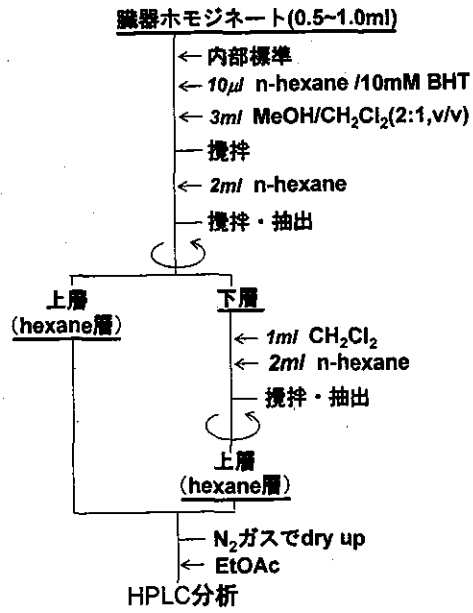


図1. カロテノイド分析用試料の調製方法

内部標準は、リコペン分析には β -カロテンを β -カロテン分析には 8-アポカロテナールを用いた。

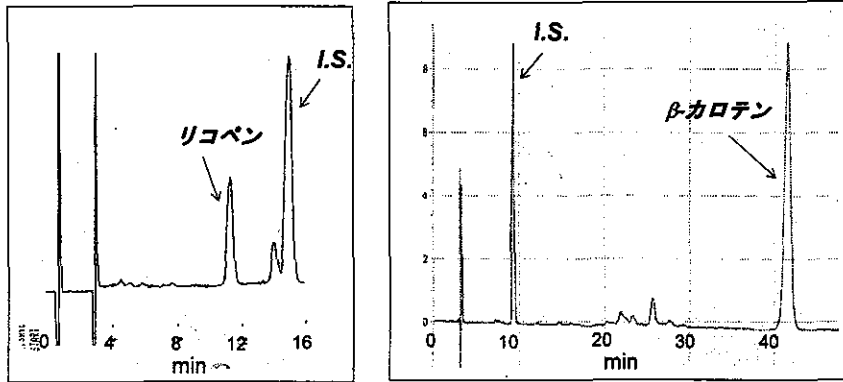


図2. 代表的なリコペンとβ-カロテンのHPLCパターン

表1. リコペンとβ-カロテンの蓄積量

リコペン		β-カロテン	
	pmol/wet tissue		pmol/wet tissue
肝臓	1238±539	肝臓	2010±550
皮膚	71.0±11.1	皮膚	1647±349
脾臓	67.4±52.4	腎臓	57.2±7.4
腎臓	7.2±2.9	脳	2.6
脳	2.4±1.5		
精巣	2.3		
心臓	2.1		
膵臓	1.0		
眼球	0.9		

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
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・研究協力者の報告書

13. ビタミン E 測定法に関する検討

分担研究者 玉井 浩 大阪医科大学 教授

研究要旨

生体試料中のビタミン E の測定方法を検討し、精度の高い方法に改良することができた。

A. 目的

食事摂取基準を設定するには、現代の日本人が摂取している食事の中のビタミン量を性格に測定する必要がある。これまで、種々検討されてきた方法を再度検討し、今後の検体測定を信頼あるものにすることが今年度の目的である。

B. 方法

(1) ビタミンE 測定方法

測定には HPLC を用いるが、検出には電気化学検出(ECD 法)、蛍光検出(蛍光法)、紫外外部吸光検出(UV 法)などが存在するため、それぞれ検討した。

血清からの抽出方法は、これまでの研究ではほぼ確立されていると考えられるため、代表的なものを図1に示した。また、HPLCによる測定条件を表1に示し、細部の相違点を示している。

今回は測定項目として α -tocopherol を検査対象とした。

(2) 血清中の α -トコフェロール含量

ボランティア女性 54 名から空腹時に採血し、遠心分離後測定まで、血清を -20°C 以下で保存した。

上記の方法に従って、血清から α -tocopherol 抽出し、それぞれの方法に従って HPLC にて測定した。

C. 結果

表2に示すように、外部標準法では数値がやや高くなり、内部標準法を採用しているその他の方法では比較的近似する数値であった。

D. 考察

1つのサンプルを5本に分け、別々に抽出し HPLC で測定した場合の再現性は5%以内、1つの抽出サンプルから5回 HPLC で測定した場合の再現性は2%以内であった(データ省略)。

この条件のもとで行った結果、検出器として蛍光検出器を用いる方法と電気化学検出器を用いる方法との間の差は小さくなく、どちらを用いても問題はないと考えられた。

今後は、多数の母乳サンプルを入手する予定であり、上記方法を応用し、正確に抽出及び測定する予定である。これらから食事摂取基準策定のための乳児のビタミンE摂取量を推測できると考えている。

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
なし
2. 学会発表
なし

G 知的財産権の出願・登録状況

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

なし

表 1. 各施設のビタミン E 測定方法

方法	検出方法	内部標準物質	カラム	移動相	流速 ml/min
A	ECD 法	tocol	Capcell pak C18 (4.6 x 250 mm)	メタノール /H ₂ O-NaClO ₄ =1000/2/7 (v,v,w)	1.0
B	蛍光法 (Ex 298 nm, Em 325 nm)	PMC*	Unisil Q NH ₂ (4.6 x 250 mm)	n-ヘキサン/ イソプロパノール =98/2	1.0
C	蛍光法 (Ex 290 nm, Em 325 nm)	tocol	YMC-GEL A-600(NH ₂) (4.6 x 50 mm)	n-ヘキサン/ イソプロパノール =98/2	0.6
D	UV 法	..**			

*抽出後に PMC を添加

**絶対検量線法により計算

表 2. 血中ビタミン E 濃度

方法	血中濃度(n=54) (Mean±SD, µg/ml)
A	8.48±2.38
B	8.17±1.66
C	9.28±1.90
D	10.12±1.91

図1.
ビタミンE測定法

血清 0.2mL

- ← 精製水 0.8mL
- ← エタノール 2.0mL (含トコール 2 μ g)
- 混和振盪 5分
- ← n-ヘキサン 5.0mL
- 混和振盪 5分

遠心分離 3,000rpm, 5分

ヘキサン層

減圧下溶媒留法

エタノール 0.2mL に溶解

20 μ L を HPLC に注入

平成16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

14. ビタミンE (α -トコフェロール) 栄養状態の加齢に伴う変化と食物アレルギーに対する作用

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 (α -T) 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、①健常高齢者の血漿ビタミンE 栄養状態、②健常高齢者の血漿ビタミンE 濃度と細胞性免疫能および③食物アレルギーの発症・進展とビタミンE について検討した。まず、健常高齢者の血漿ビタミンE 濃度に関しては、65歳以上の健常高齢者では血漿 α -T 濃度の低下はほとんどみられず、むしろ20歳代の若者と比べ若干高い値を示す者さえみられた。しかし、実際は α -T が血中に存在する際にはVLDL-コレステロール内にあり、しかも、高齢者ではコレステロール、中性脂肪の血中レベルの上昇する者が多いことから、高齢者のビタミンE 栄養状態を判断する場合にはこれら脂質の変動も考慮する必要がある。次に、健常高齢者の血漿ビタミンE 濃度と細胞性免疫能に関しては、末梢血T細胞機能は20歳代の若者と比べ明らかに高齢者では低下していた。さらに、65歳以上の高齢者においても年齢の上昇に伴いT細胞機能が低下することを認めた。血漿 α -T濃度と末梢血T細胞機能との関連をみた場合、有意な相関はみられなかったが、血漿 α -T濃度を血漿VLDL-コレステロール濃度で除したものと末梢血T細胞機能との関連をみた場合には有意な正相関を認めた。これら結果から、高齢者の健康保持・増進を図るうえで十分な α -Tの摂取が必要であると考えられる。最後に、食物アレルギー発症・進展に対するビタミンE補足効果に関しては、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、アレルギーの発症・進展に対する α -T投与効果について検討したところ、 α -T摂取により血中ヒスタミン濃度やロイコトリエン(LTB4)濃度が対照に比べ低いことを見出した。この機序として、血清総IgE濃度や卵白アルブミン特異的血清IgE濃度が α -T摂取により著明に低下することを見出した。さらに、以上、 α -Tは免疫賦活作用だけでなく、アレルギーなどの免疫系が異常に亢進した場合にもそれを正常化する作用を有していることが示唆された。

A. 目的

わが国では急速に高齢化が進み、2020年には65歳以上の高齢者人口は総人口の25%を超えると予測されている¹⁾。高齢者の主たる死因として、脳血管疾患、心疾患、悪性新生物そして肺炎があげられ、中でも、肺炎による死亡率が高齢者において高いという特徴がある²⁾。これは、高齢者における細胞性免疫能の低下と関連していることが考えられ^{3, 4)}、高齢者にとって細胞性免疫能の維持は肺炎等の感染症を予防する上でも重要である。

我々は、老化モデル動物である自然高血圧易発症ラット (SHR) を用いて、高ビタミンE食投与が加齢に伴い低下した細胞性免疫能を改善することを見出し、報告している^{5, 6)}。また、Meydaniらは、高齢者における細胞性免疫能低下が、プロスタグランジンE₂ (PGE₂)産生の増加と密接に関係すること、そしてさらに、高齢者にビタミンE (VE)を補足することによりPGE₂産生が抑制され、その結果として低下した細胞性免疫能が改善されることを見出している⁷⁾。

また、我々は高齢者の細胞性免疫能を維持するためにはマクロファージ (Mφ) が重要な役割を果たしていることを見出している⁸⁾。最近Mφから産生される一酸化窒素 (NO) が、マイトジェン刺激に伴うT細胞増殖能に対して抑制的に作用することが報告されている^{9, 10)}。さらに、NOは生体内で遊離のアラキドン酸からPGE₂を合成する酵素であるシクロオキシゲナーゼ (Cox) の活性を上昇することが見出されている¹¹⁾。この結果は、NOによるT細胞増殖能の抑制がPGE₂産生と関連することを示唆するものである。

そこで、本研究では疫学的に高齢者の細胞性免疫能について調査するとともに、それと血中ビタミンEおよびNO濃度との相関について比較検討した。

また、一方では、近年、我が国では食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、花粉症などのアレルギー疾患を持つ人が著明に増加しており問題となっている。その原因として、高蛋白・高栄養な食生活や、大気汚染、花粉、ダニなどのアレルゲンの増加、社会的ストレスの増加など多くの要因の関与が考えられている。最近、ヒトおよび実験動物において高ビタミンE (VE)

摂取がアレルギーの発症、進展に対して有益な効果をもたらすことが見出され、その効果が期待されている¹²⁻¹⁴⁾。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アレルギー発症に対する高VE食投与の影響について検討した。また、これまでの報告のほとんどはVEとしてα-トコフェロール (α-Toc) を用いているが、今回の実験ではα-Tocに加えてγ-トコリエノール (γ-T3) の抗アレルギー作用についても併せて検討を行った。

B. 研究方法

健常高齢者におけるビタミンE栄養状態と細胞性免疫能に関する研究

対象者ならびに調査期間

山口県大島群東和町在住の高齢者の中で、調査内容を説明し、承諾が得られた者の中から、さらに、血液検査等によって選ばれた健常高齢者192名 (男性66名、女性126名、平均年齢75.1±0.4歳) を対象として、2003年9月から2004年10月にかけて調査を実施した。比較対象として、本大学の女子大生14名 (平均年齢19.4±0.3歳) についても同様の調査を実施した。血液サンプルは調査当日の午前中に各被験者から採取され、以下の免疫能測定および生化学分析に用いられた。

末梢血リンパ球の調整

ヘパリン処理された血液をリンパ球分離培地 (LSM; ICN Biomedicals, Inc.) 上に重層、2000rpm、20分間遠心することにより末梢血リンパ球を得た。リンパ球の一部は0.2%酢酸にて希釈後、血球計算盤にて数の算定に用いられた。残りのリンパ球は5%ウシ胎児血清 (FBS) 入りRPMI-1640培養培地 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) を用いて各分析に必要な数に調整された。

末梢血リンパ球増殖能

2×10⁶ cells/ml に調整された末梢血リンパ球を96wellの平底プレートにtriplicateで加え、さらに培地、PHA (終濃度10μg/ml) あるいはCon A (終濃度5μg/ml) (ともにSigma) と共培養した。72時間、37°CのCO₂ インキュベーター内で培養後、10μlのMTT溶液を各wellに添加し、さらにCO₂ インキュベーター内で4時間培養した。その後、

100 μ l の Isopropanol/HCl を加え、ピペッティング後、マイクロプレートリーダー (Bio Rad, 東京) により、550nm の波長で吸光度を測定した。測定結果は刺激サンプルの吸光度を培地のみと培養したサンプルの吸光度で割った刺激係数として表した。

血漿 NO 濃度

生体内で産生された NO は直ちに代謝され、より安定な NO₂⁻ あるいは NO₃⁻ になる。NO₂⁻ を測定するグリース法¹⁵⁾ (測定波長 540nm) を用いて測定した値を血漿 NO 濃度として考察した。50 μ l の血漿と同量のグリース試薬 (1% スルファニルアミド, 0.1% の N-1-ナフチルチレンジアミン \cdot 2HCl を含む 2.5% ホスホン酸溶液) を混合し、15 分間室温にて反応させた。マイクロプレートリーダー (Bio Rad, 東京) により 540nm で吸光度を測定した。NO 濃度は、亜硝酸ナトリウム溶液を用いた標準曲線の吸光度から算出された。

血漿 α -トコフェロール濃度

血漿中の α -トコフェロールは、既報¹⁶⁾ のごとく高速液体クロマトグラフィ- (HPLC) を用いて測定された。

血清トリグリセリドと VLDL コレステロール濃度

血清トリグリセリド (TG) 濃度は、多項目自動分析装置 U-240PLUS (日本テクトロン株式会社, 東京) により測定された。さらに、その測定値から血清 VLDL コレステロール濃度 (TG/5) を換算した¹⁷⁾。

統計学的処理

本研究により得られた全てのデータは平均値 \pm 標準偏差 (SE) で表した。データは分散分析 (Excel 統計, (株) エミス), あるいは相関分析 (エクセル統計 2000, (株) 社会情報サービス) を行い、有意水準 5% で統計学的有意差があったとした。

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 の作用に関する研究 実験動物と食物アレルギー誘発

実験動物として BALB/c マウス, 雌, 8 週齢を用いた。1 週間予備飼育後, Halteren ら¹⁸⁾ の方法により実験開始時に OVA 2 μ g と水酸化アルミニウムゲル (ALUM) 25 μ l を腹腔内投与し, さらに 14 日目に OVA 1 μ g を腹腔内投与後, 18 日目に OVA 1 mg を経口投与することにより食物アレルギーモデルマウスを作成し

た (図 1)。実験期間中, コントロール群は標準食 (50mg α -Toc/kg) にて飼育した。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 または γ -T3 を 200 または 450 mg/kg 添加した食餌を与えた。実験期間中の摂食量および体重については週 1 回測定し, OVA 経口投与の 4 日後の 22 日目に採血し, 脾臓を摘出した。

血清 IgE およびサイトカインの測定

採取した血液から血清を分離し, 血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度を ELISA 法により測定した。免疫能として, Con A, PHA 等のマイトジェンおよび OVA 刺激による脾臓リンパ球幼若化能, ヘルパー T (CD4) およびサプレッサー T (CD8) 細胞割合, Con A 刺激 48 時間後の脾臓リンパ球培養上清中のインターロイキン 4 (IL-4) 濃度について検討した。

C. 結果

健常高齢者におけるビタミン E 栄養状態と細胞性免疫能に関する研究

加齢に伴う末梢血リンパ球増殖能の変化

Con A 刺激に伴う末梢血リンパ球増殖能は大学生に比べ高齢者では有意に低下しており, 特に, 70-74 歳, 80-84 歳, および 85-89 歳の被験者において有意な低下を認めた (P<0.05) (図 2)。また, 65 歳以上の高齢者間においても加齢に伴い末梢血リンパ球増殖能の低下がみられた。加齢に伴う細胞性免疫能低下により, 感染症にかかりやすくなることやがんの発生する頻度が高くなることが知られている¹⁹⁾。したがって, 高齢者にとって細胞性免疫能を維持することは, 健康を保持・増進する上でも重要である。

加齢に伴う血漿 NO 濃度の変化と末梢血リンパ球増殖能との関係

加齢に伴い M ϕ 由来の炎症性産物である NO の産生が増加することにより, Cox 活性が高まり, その結果として PGE₂ の生成が増大し, 細胞性免疫能の低下が誘導されることが推察される (図 3)。血漿 NO 濃度は, 大学生では 7.02 \pm 0.78 μ M であるのに対し, 高齢者では 11.86 \pm 0.73 μ M と有意に高値であり, 加齢に伴う NO 濃度の増加を認めた (P<0.01)。また, 高齢者における Con A 刺激に伴う末梢血リンパ球増殖能と血漿 NO 濃度との間に有意な負の相関関係を認めた

($P < 0.01$) (図4). 本研究では, 高齢者の血中 PGE_2 レベルを測定していないが, これらの結果は, 加齢に伴う血中 PGE_2 レベルの増加が原因として生じた細胞性免疫能の低下が, 増加した NO 産生によって引き起こされている可能性を示唆するものである.

加齢に伴う血漿 α -トコフェロール濃度の変化と末梢血リンパ球増殖能との関係

加齢に伴い低下した細胞性免疫能は, VE 補足により改善されることがすでに明らかになっているが, それは, VE が NO 産生を低下し, PGE_2 生成が減少された結果であると考えられる. 血漿 α -トコフェロール濃度を測定した結果, 女子大生では $8.04 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し, 高齢者では $11.81 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ と低下するどころか, 高齢者の方が, 約 1.5 倍高値 ($p < 0.01$) であった. また, Con A 刺激に伴う末梢血リンパ球増殖能と血漿 α -トコフェロール濃度との間には有意な相関関係はみられなかった ($r = 0.036$).

VLDL コレステロールと α -トコフェロールとの関係

VE は肝臓で α -トコフェロール輸送たんぱく (α TTP) と結合し, その後, VLDL コレステロールとして血中に入ることが知られている²⁰⁾ (図5). つまり, 血清中の VLDL コレステロールが高ければ, α -トコフェロール濃度も高いことが考えられる. そこで, 高齢者の血漿 VLDL コレステロール濃度と α -トコフェロール濃度との関係を調べたところ, 両者の間に有意な正相関を認めた ($r = 0.29$, $P < 0.01$).

末梢血リンパ球増殖能と VLDL コレステロール当たりの α -トコフェロール濃度との関係

VLDL コレステロール当たりの α -トコフェロール濃度と Con A 刺激に伴う末梢血リンパ球増殖能との関係についてみたところ, 両者の間に有意な正相関を認めた ($P < 0.05$)

(図6). このことは, VLDL コレステロール当たりの α -トコフェロール濃度を高めること, つまり血漿 α -トコフェロール濃度を高めることにより加齢に伴う細胞性免疫能の低下が改善される可能性を示唆している.

血漿 NO 濃度と VLDL コレステロール当たりの α -トコフェロール濃度との関係

Con A 刺激に伴う末梢血リンパ球増殖能との間に負の相関を認めた血漿 NO 濃度と, 正相関を認めた VLDL コレステロール当たりの α -トコフェロール濃度との関係をみたところ, 両者の間に有意な負の相関を認めた ($P < 0.01$) (図7). Beharka らは, 刺激なしでの M ϕ からの PGE_2 産生とリポ多糖類 (LPS) によって刺激された場合の M ϕ からの NO 産生が, VE の経口摂取により減少することを見出している²¹⁾. これらの結果から, PGE_2 産生の加齢に伴う増加は, 加齢に伴い増加した NO 産生による可能性を示唆している. その後の研究で彼等は, ラットに VE を経口投与することにより, 加齢に伴う Cox 活性の上昇が抑制され, その結果として M ϕ からの PGE_2 産生が減少することを明らかにした. さらに, VE によるこの Cox 活性の抑制が NO 産生の低下によって誘導される可能性についても示唆している²²⁾. また, Packer らは, 抗酸化作用を有する銀杏葉エキス Egb761 が in vitro にて直接 NO を消去することができ²³⁾, さらに, Egb761 が同時に誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の mRNA の発現と iNOS の酵素活性を抑制することによって LPS + インターフェロン (IFN) - γ により活性化された M ϕ からの NO 産生が抑制されることを見出している²⁴⁾. 他の研究においても, フラボノイド²⁵⁾ やクルクミン²⁶⁾ のような抗酸化物質が, LPS による iNOS 発現や NO 産生を抑制する作用を有することが見出されている. 本研究の結果とこれらの報告より, VE が M ϕ からの NO 産生を低下させることにより, Cox 活性の上昇が抑制され, PGE_2 産生が低下し, その結果として高齢者の低下した細胞性免疫能の改善が誘導されたものと思われる (図8).

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 の作用に関する研究
体重, 脾臓重量ならびに脾臓リンパ球数

実験期間中の摂食量については, α -Toc および γ -T3 投与の影響はみられず, コントロール群と各 VE 添加食群との間に差異を認めなかった. 体重, 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異を認めなかった.

血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度

血清総 IgE 濃度は, コントロール群と比較し

450 mg/kg α -Toc 添加食群において低い傾向を認めたものの、 γ -T3 添加食群については変化を認めなかった(図9)。

血清 OVA 特異的 IgE 濃度は、コントロール群と比較し 200 mg/kg α -Toc 添加食群においては低い傾向を認め、さらに 450 mg/kg α -Toc 添加食群においては有意な低下を認めた。また、450 mg/kg γ -T3 添加食群の血清 OVA 特異的 IgE 濃度は、コントロール群と比較してやや低い傾向を認めた(図10)。

脾臓リンパ球幼若化能

Con A および PWM 刺激に対する脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群と比較し各 VE 添加食群において高い傾向を認めた。しかし、PHA および LPS 刺激に対する脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群と比較し 450 mg/kg α -Toc 添加食群において逆に低い傾向を認めた。一方、OVA 刺激に対する脾臓リンパ球幼若化能は、コントロール群と比較し 450 mg/kg α -Toc 添加食群において有意に高いことを認めた(図11)。

ヘルパーT (CD4) およびサプレッサーT (CD8) 細胞割合, CD4/CD8 比

ヘルパーT (CD4) 細胞割合は、コントロール群と比較し 450 mg/kg α -Toc 添加食群において低い傾向を認めた。サプレッサーT (CD8) 細胞割合については、コントロール群と各 VE 添加食群との間に有意な差異を認めなかった。また、CD4/CD8比については、コントロール群と比較し 450 mg/kg α -Toc 添加食群においてやや低い傾向を認めた。

Con A 刺激に伴う脾臓リンパ球からの IL-4 産生

Con A 刺激に伴う脾臓リンパ球からの IL-4 産生は、コントロール群と α -Toc 添加食群との間に有意な差異を認めなかった。しかし、 γ -T3 添加食群では IL-4 産生がコントロール群と比較し高い傾向を認めた。

D. 考察

健常高齢者におけるビタミン E 栄養状態と細胞性免疫能に関する研究結果をまとめると、(1) 高齢者の末梢血リンパ球増殖能は若齢者に比べ低下していた。また、(2) 高齢者において血漿 NO 濃度が高い者ほど Con A 刺激に伴う末梢血リンパ球増殖能は低値であること、(3) VLDL コレステロール当たりの α -トコフェロール濃度が高い者

ほど末梢血リンパ球増殖能も高いことを見出した。さらに、(4) VLDL コレステロール当たりの α -トコフェロール濃度が高い者ほど血漿 NO 濃度が低いことを認めた。これらの結果から、VE が M ϕ からの NO 産生を減少することにより、Cox 活性を低下し、PGE₂ 産生が減少し、その結果として高齢者の低下した細胞性免疫能を改善することが示唆された。以上のことより、高齢者において T リンパ球を中心とする細胞性免疫能の低下を改善し、それを保持し、健康の保持・増進を図る上で十分なビタミン E 摂取が不可欠であることが示唆された。

次に、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 の作用に関する研究結果をまとめると、まず、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 濃度の上昇が、高 α -Toc 食摂取により抑制されることを認めた。このことは、鼻アレルギーモデルマウスを用いた Zheng らの知見¹²⁾と一致する。また、今回は γ -T3 についても検討を行ったが、明らかな IgE 産生の抑制を認めなかった。図12に要約したように、IgE 産生に至るまでにはマクロファージ(M ϕ)、ヘルパーT(Th)細胞、B細胞ならびに形質細胞の関与が知られている。今回の研究では、 α -Toc 添加食群において PHA および LPS 刺激に対する脾臓リンパ球幼若化能および Th 細胞割合の低下を認めた。このことから、高 α -Toc 食摂取により Th 細胞および B 細胞機能が低くなっているために IgE 産生が抑制されたものと考えられる。また、脾臓リンパ球からの IL-4 産生については、 α -Toc の影響を認めなかったことから、IgE 産生の抑制とは関連しないことが示唆される。VE のアレルギー抑制機序として、 α -Toc が直接的に IgE の産生を抑制すること²⁷⁾や犬の肥満細胞腫において *in vitro* の α -Toc 添加によりヒスタミンおよびプロスタグランジン D₂ (PGD₂) の放出が抑制されること²⁸⁾などが報告されている。今後さらにマスト細胞からのヒスタミン遊離など VE による抗アレルギー作用の詳細なメカニズムを解明していく必要がある。

以上、本研究により、高 α -Toc 食摂取により OVA 誘発食物アレルギー発症に伴う IgE 産生が抑制されることを認めた。