

状態に関して、高齢者においては一般に、血清アルブミン 3.5g/dL 未満がタンパク低栄養とされるが、対照群においては平均 4g/dL であったものの、骨折群での平均は、男性 3.48g/dL、女性 3.61g/dL と、低栄養状態にあることが示唆された。

ビタミン D に関しては、血清 25(OH)D 濃度が 20ng/mL 未満であればビタミン D は充足していないと考えられるが、男性での平均は、対照群で 20.7ng/mL、骨折群 19.0ng/mL と、両群間に有意差を認めなかったが、女性においては、対照群の 18.6ng/mL に比して、骨折群では 9.1ng/mL と著しく低い値であった。PTH に関しては、男性では両群間に差を認めず、女性では骨折群で高い傾向ではあったものの、ばらつきが大きく $p=0.07$ と有意差には至らなかった。この結果を図にしたものが、図 1 である。

ビタミン K に関しては、いまだビタミン D ほど明確には基準値が定まっていないが、最近津川（神戸薬科大学）が、長野県在住者を対象として調査した結果では、70 歳以上 ($N=136$) の血中ビタミン K 濃度は、PK が 1.29 ± 1.09 ng/mL (median 0.94)、MK-4 が 0.09 ± 0.15 ng/mL (median 0.02)、MK-7 が 4.21 ± 6.81 ng/mL (median 2.14) であった³⁾。MK-4 は濃度が低く評価困難と思われるが、PK に関して、対照群もこれらの値より低く、骨折群ではそれよりさらに低い結果であった。

MK-7 に関しても、対照群に比して、骨折群において、有意に低い結果であった。この結果を図にしたものが、図 2 である。

これらの結果に対して、ロジスティック分析を行った結果を表 4 に示す。その結果、血清アルブミンが 1g/dL 増加すると骨折の Odds 比は 0.005 と著しく低くなり、25(OH)D 濃度が 10ng/mL 増加すると骨折の Odds 比は 0.217、

PK 濃度が 1ng/mL 増加すると Odds 比は 0.061 と、極めて低くなることが明らかとなった。またここで得られた回帰式は、90.6%の例を、骨折群と非骨折群に正しく判別した。

今回得られたデータを少数のサマリーにまとめるべく、主成分分析を行った (図 3)。その結果、2つの主成分が得られ、第 1 主成分は、アルブミン・総コレステロールなどとの関連が深く、全般的栄養状態を表すものと考えられ、25(OH)D、MK-7 は第 1 主成分との関連が深かった。しかし PK、MK-4 は第 1 主成分との関連が薄く、第 1 主成分とは独立の、第 2 主成分と強い関連を示した。

D. 考察

本研究において、大腿骨頸部骨折患者を対象として、ビタミン D・ビタミン K の欠乏(不足)頻度調査を行った。その結果、これら患者では、これらビタミンの血液中濃度が、年齢をそろえた非骨折対照群に比べて、著明に低いという結果であった。ほとんどの患者において、受傷後 24 時間以内に採血が行われており、今回得られた結果は、おそらくこれら患者の受傷前の状態を表しているものと考えられる。以下、ビタミン K・ビタミン D の順に考察を加える。

「第六次改定日本人の栄養所要量」においては、ビタミン K の肝臓以外での作用については、全く考慮されていなかった。平成 17 年から使用されはじめた「日本人の食事摂取基準 (2005 年版)」において初めて、骨折の予防に必要なビタミン K は、肝臓での作用のみを考えた場合に比べて多い可能性に言及されたが、摂取基準策定への取り入れは見送られている。すなわち現行の食事摂取基準は、肝臓以外におけるビタミン K の役割を考慮したものではない⁴⁾。

ビタミン K は、タンパクのグルタミン酸残

基にカルボキシル基を導入して Gla 化する酵素, γ -carboxylase の補酵素である。ビタミン K の K は Koagulation (凝固) の頭文字であり, 肝臓において血液凝固因子 (II・VII・IX・X) を Gla 化し, それによって, これら凝固因子はカルシウムイオン結合能を獲得する。しかしビタミン K によって Gla 化されるタンパクは, 血液凝固因子以外にも存在する。骨の基質タンパクとして最も多いのは, コラーゲンであるが, オステオカルシン (osteocalcin, bone Gla protein; BGP とも呼ばれる) は非コラーゲンタンパクとしては最も多く存在する。またマトリックスグラタンパク (matrix Gla protein; MGP) は, 骨や血管に存在する。

これら肝臓以外の Gla タンパクの役割の解明に関しては, ノックアウトマウスを用いた研究が大きく寄与した。MGP ノックアウトマウスは, 全身の動脈が石灰化して死亡したことから, MGP は血管において, 過剰な石灰化を抑制していることが示された⁵⁾。また BGP ノックアウトマウスでは骨量が増加したが, 卵巣摘出後には急速な骨量減少を示すことから, 一見増加した骨量は正常のものではなく, 正常な骨形成にはやはりオステオカルシンが必要であることが示された⁶⁾。

重症のビタミン K 欠乏によって血液凝固異常をきたすほどではない, 軽度の不足を検出する指標として用いるのが, PIVKA-II と ucOC である。PIVKA-II は肝細胞ガンの腫瘍マーカーとして有名であるが, 元来 PIVKA は, protein induced by vitamin K absence (antagonist) すなわちビタミン K の不足によって増加するタンパクという意味であり, II は凝固の第 II 因子すなわちプロトロンビンである。すなわち PIVKA-II はビタミン K 不足のため Gla 化されていない, 異常プロトロンビンであり, 肝臓におけるビタミン K 作用不足の指標である。一方 ucOC は,

undercarboxylated osteocalcin すなわち十分 Gla 化されていないオステオカルシンという意味であり, 骨におけるビタミン K 作用不足の指標である。

近年, 骨折予防におけるビタミン K の意義を示す論文が報告されつつある。Booth によると, ビタミン K 摂取量によって 4 群に分けて分析したところ, ビタミン K 摂取量の最も高かった群の骨折リスクは, 最も低かった群のリスクの半分以下であった⁷⁾。また Vergnaud によると, 骨密度低下によって大腿骨頸部骨折のリスクは 2.4 倍, ucOC 高値によって 1.9 倍に増加し, 骨密度低下と ucOC 高値の両方を有する例では, 骨折のリスクは 5.5 倍にも上昇し, ucOC 高値すなわち骨におけるビタミン K の作用不足は, 骨密度とは独立した骨折の危険因子であった⁸⁾。

治療的介入に関しては, 白木は, 241 例の骨粗鬆症患者をランダムに, ビタミン K₂ 45mg/day 投与と対照群に割り付けて 2 年間フォローしたところ, ビタミン K₂ 投与群においては, ucOC が低下し, 骨密度低下が防止され, さらに新規骨折発生が有意に減少したと報告し⁹⁾, また佐藤らは, アルツハイマー病女性患者に対し, ビタミン K₂・D₂・カルシウム補給を行ったところ, 非椎体骨折の発生が著しく抑制されたと報告している¹⁰⁾。

このように骨において, ビタミン K が不足しやすい理由の一つは解剖学的構造である。腸管から吸収されたビタミン K は, 門脈を通過して肝臓に運ばれ, その後肝臓以外の組織に至ることから, ビタミン K は, 肝臓でまず血液凝固因子の Gla 化に使われた後のものが肝臓以外で利用されるわけであり, これを first pass effect と言う。したがって, 肝臓ではビタミン K が充足していても, 骨や血管など肝臓では不足しているという状況が十分起こりうる。

次にビタミンDに関しては、男性では対照群・骨折群の間に差を認めなかったが、女性では骨折群における25(OH)D濃度は、極めて低い値であった。従来ビタミンDの骨折のリスクに関する役割に男女差があるという報告はなく、この結果の意義については、さらに検討を要する。

図4に示すのは、今回の結果と、昨年の米国骨代謝学会(ASBMR)にてLipsらによって発表された、世界の2500人の閉経後女性を対象とした調査結果をまとめて図示したものである。その結果、Lipsらのデータでは、25(OH)D濃度が20-30ng/mlの範囲に63.9%が分布したのに対し、今回の結果では、非骨折群においても9-20ng/mlに57%が分布し、骨折群に至っては、91%の例が20ng/ml未満であり、そのうち9ng/mlという重症の欠乏例が46.7%にも達した。数年前に、アメリカで入院患者を対象とした調査が行われ、血清25(OH)D濃度が8ng/ml未満の例が20%以上、60%近くが15ng/ml未満という結果が大きな反響を呼んだが¹¹⁾、今回の結果もそれに匹敵するような結果であった。

「第6次改定日本人の栄養所要量」において、成人及び高齢者に対する所要量決定の根拠として、「20~46歳の人で、68IU/日のビタミンD摂取を数年間続けると骨軟化症が認められるようになり、100IU/日では発生はみられなかったとの報告があるので、100IUとした」という記載がある。しかしそこで引用されているのは1969年の論文であり、血液中ビタミンDが測定できるようになり、より軽症の不足が注目されるようになるよりはるか以前のものである。最近欧米においては、Vitamin D Deficiency(欠乏)とVitamin D Insufficiency(不足)という言葉が使い分けられている。すなわち欠乏はより重症のものであり、顕著な2次性副甲状腺機能亢進症・カ

ルシウム吸収障害・骨軟化症・筋力低下等をきたす。一方不足はより軽度のものであり、骨軟化症はきたさないが、軽度の2次性副甲状腺機能亢進症・軽度カルシウム吸収障害を介して、骨密度減少すなわち骨粗鬆症の原因となる。すなわち「第6次改定日本人の栄養所要量」における100IUというのは、欠乏対策を考えたものと理解される。

諸外国のビタミンD栄養所要量に関しては、特に高齢者だからといって所要量を変更していない国もあるが、イギリスでは65歳以上に対しては400IUと定めており、アメリカ・カナダでは51歳以上に対して400IU、さらに71歳以上に対しては600IUと定めている。高齢者においては、同量の紫外線照射に対して皮膚で生成されるビタミンD量が若年者に比べて低下していることが報告されている。また高齢者においては、脂溶性ビタミンの腸管からの吸収が若年者に比べて低下しており、複数の要因によって、高齢者はビタミンDの不足により陥りやすいと考えられる¹²⁾。

このように日本よりはるかに高い所要量(摂取基準)を定めているにも関わらず、アメリカではAmerican Journal of Clinical Nutritionにおいて、現行の所要量は低すぎ、日光に当たらない高齢者では800-1000IU以上が必要であると、またイギリスでも、British Medical Journal editorialにおいてもイギリスの400IUという所要量は高齢者には低すぎると述べられている。

このような調査を行った場合の一つの問題点は、得られた結果が、本当にビタミンD・ビタミンK不足のためであると言えるのかという点である。実際今回のデータにおいても、骨折群では血清アルブミン濃度が低く、全般的低栄養の要素があることは確実である。問題は全般的低栄養だけなのかどうかと

ということである。これに対する決定的な解答を提出することは困難であるが、その一つの試みとして行ったのが、図に示す主成分分析である。これは多変量解析の一種であり、データをできるだけ少数の主成分にサマリー化しようとするものである。結果的には、単一の指標にサマリー化することはできず、2つの主成分が得られた。第1主成分は、アルブミン・総コレステロールなどとの関連が深く、全般的栄養状態を表すものと考えられ、25(OH)D、MK-7は第1主成分との関連が深かった。しかしPK、MK-4は第1主成分との関連が薄く、第1主成分とは独立の、第2主成分と強い関連を示した。もちろんこの結果は、予備的なものであるが、脂溶性ビタミンの不足は、全般的低栄養だけによるものではないことを示唆している。

以上、大腿骨頸部骨折患者において、血清ビタミンD・ビタミンK濃度が極めて低いことを示した。ほとんどの例で受傷直後に採血したので、おそらく今回の結果は、患者の受傷前の状態を反映していると考えられる。すなわち大腿骨頸部骨折患者では、ビタミンD・ビタミンK欠乏症の頻度が高く、骨折の危険因子としての意義が示唆された。今後の摂取基準策定に向けて、ビタミンD不足をどう考えるのか、ビタミンKの肝臓以外での作用をどうとらえるのか、などの問題に関して、さらなる研究が求められる。

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

田中 清, 姫野雅子, 桑原晶子, 木戸詔子
ビタミンK摂取と骨 骨粗鬆症治療 (印刷中)
2006

田中清 骨粗鬆症の予防・治療 食事療法
第18回腰痛シンポジウム講演記録集
p.35-41 2005

田中清 内科医に必要な栄養の知識・骨粗鬆症
診断と治療 93:1819-1822,2005

田中清, 中西祐子, 木戸詔子 骨粗鬆症の予防
と管理 WHO テクニカルレポートをめぐ
って 栄養についての評価 Clinical Calcium
15(4):666-672, 2005

2. 学会発表

T Nakano, K Tanaka, M Yoshizawa, M Kamao,
N Tsugawa, T Okano. Deficiency of Vitamin D
and K Is Highly Prevalent in Patients with Hip
Fracture. 27th Annual Meeting, American Society
for Bone and Mineral Society. September 2005,
Nashville, Tennessee, USA

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. 田中清 骨粗鬆症 わかりやすい内科学
第2版 (井村裕夫編) p819-824 文光
堂 2002

2. 田中清, 武田英二, 門脇孝, 恩地森一,
立川俱子, 清野裕 生活習慣病の治療・
予防における栄養療法の意義と医療経済
評価 日本病態栄養学会雑誌 (印刷中)
2006

3. Tsugawa N, Shiraki M et al. Am J Clin Nutr
83:380-6, 2006

4. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C et al. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15:515-521, 2000
5. Sato Y, Kanoko T, Satoh K et al. Menatetrenone and vitamin D2 with calcium supplements prevent nonvertebral fracture in elderly women with Alzheimer's disease. *Bone* 36:61-68, 2005
6. Luo G, Ducy P, McKee MD et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386:78-81, 1997
7. Ducy P, Desbois C, Boyce B et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452, 1996
8. Booth SL, Tucker KL, Chen H et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 71:1201-1208, 2000
9. 田中清, 白木正孝 ビタミンD 基準値の国際比較 *The Bone* 75:183-189, 2004
10. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, et al: Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med.* 338(12):777-83, 1998
11. Holick MF: Too little vitamin D in premenopausal women: why should we care? *Am J Clin Nutr* 76(1):3-4, 2002
12. Compston JE: Vitamin D deficiency: time for action. Evidence supports routine supplementation for elderly people and others at risk. *BMJ* 317(7171):1466-7, 1998

表1 成人病・生活習慣病の治療目標

疾患	指標	疾患の最終像
高血圧	血圧	脳血管障害
高脂血症	血清脂質	虚血性心疾患
糖尿病	血糖	慢性合併症
骨粗鬆症	骨量	骨折

表2 大腿骨頸部骨折の予後

- 手術・長期入院を要する 95%
- 受傷前の日常生活レベルに戻れない 66%
- 受傷後独歩不可能 50%
- 施設で長期のケアを要する 25－39%
- 1年以内の死亡 24%

(National Osteoporosis Foundation, 1998)

表3 患者背景・血液検査結果

	男性			女性		
	対照群	骨折群	p value	対照群	骨折群	p value
N	13	27		35	72	
年齢	82.2 (9.3)	82.6 (7.6)	0.8851	84.1 (7.8)	85.5 (7.0)	0.3636
Albumin (g/dL)	4.25 (0.52)	3.48 (0.56)	0.0003 *	4.38 (0.22)	3.61 (0.37)	<0.0001 *
総コレステロール (mg/dL)	175.4 (41.9)	156.1 (36.6)	0.1825	232.3 (37.0)	179.4 (39.4)	<0.0001 *
BUN (mg/dL)	24.1 (14.4)	29.5 (26.1)	0.4942	20.6 (7.4)	20.6 (10.2)	0.9956
ヘモグロビン (g/dL)	12.4 (2.2)	11.9 (1.9)	0.4449	12.5 (1.1)	10.8 (1.8)	<0.0001 *
GOT (U/L)	26.2 (20.4)	32.1 (39.4)	0.6143	23.9 (7.2)	20.9 (7.5)	0.0507
GPT (U/L)	19.3 (16.2)	22.8 (21.1)	0.6081	13.7 (8.6)	14.0 (8.4)	0.8393
25(OH)D (ng/mL)	20.7 (7.3)	19.0 (13.0)	0.6919	18.6 (6.3)	9.1 (4.6)	<0.0001 *
Intact PTH (pg/mL)	64.3 (53.7)	61.4 (34.4)	0.8498	56.0 (23.2)	67.8 (33.9)	0.0744
K1 (ng/mL)	0.55 (0.31)	0.31 (0.24)	0.0146 *	0.77 (0.36)	0.46 (0.36)	<0.0001 *
MK-4 (ng/mL)	0.04 (0.03)	0.05 (0.04)	0.5896	0.05 (0.04)	0.06 (0.11)	0.4425
MK-7 (ng/mL)	4.28 (3.75)	1.60 (1.60)	0.0041 *	10.77 (7.01)	2.67 (4.13)	<0.0001 *
ucOC (ng/mL)	2.73 (1.00)	4.77 (3.86)	0.2569	4.41 (2.02)	5.50 (7.31)	0.5476

参考: 70歳以上(N=136)の血中ビタミンK濃度 (Tsugawa N, Shiraki M et al. Am J Clin Nutr 83:380-6, 2006)

K1(PK): 1.29±1.09ng/ml (median 0.94) MK-4: 0.09±0.15ng/ml (median 0.02),

MK-7: 4.21±6.81ng/ml (median 2.14)

表4 ロジスティック解析の結果

• 方法

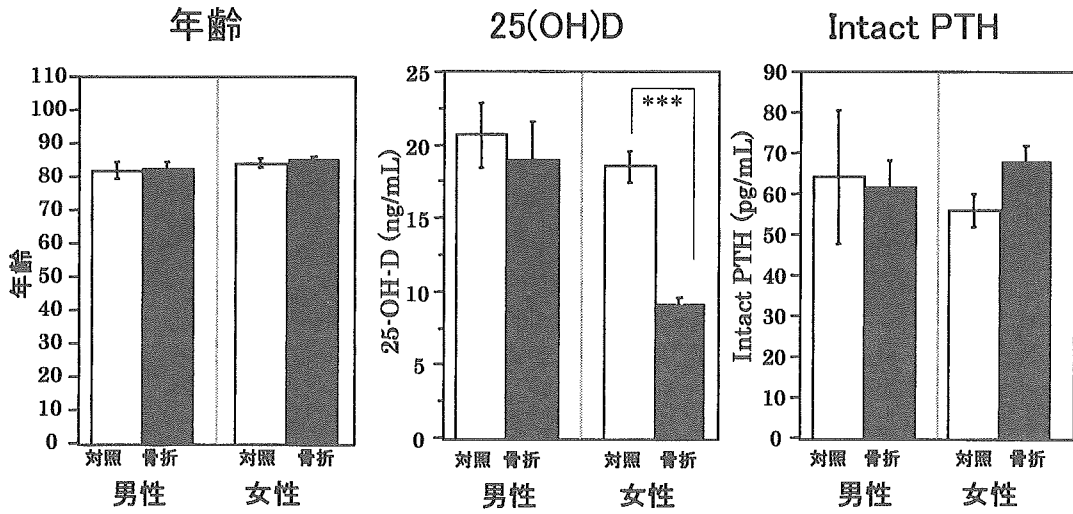
– SPSS13.0, 変数増加法(Wald)

• 結果

	Odds比 (95% CI)	p
– 25(OH)D (10ng/ml増加ごと)	0.217 (0.084-0.560)	0.002
– PK (1ng/ml増加ごと)	0.061 (0.009-0.416)	0.004
– Alb (1g/dl増加ごと)	0.005 (0.001-0.038)	<0.001

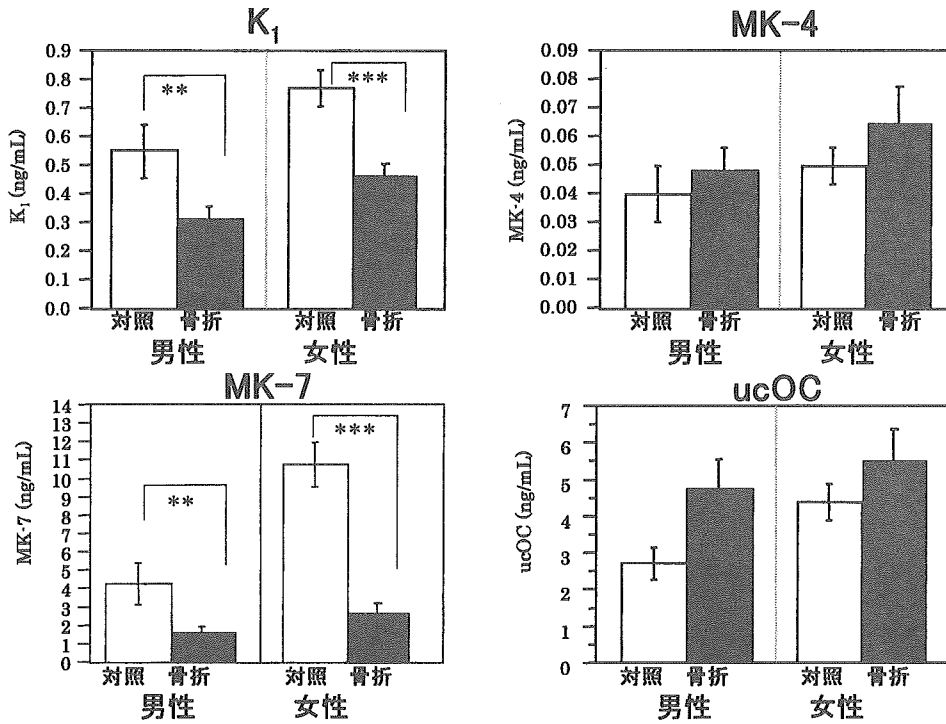
求められた回帰式は90.6%の例を正しく判別できた。

図1 年齢・血清25(OH)D・Intact PTH



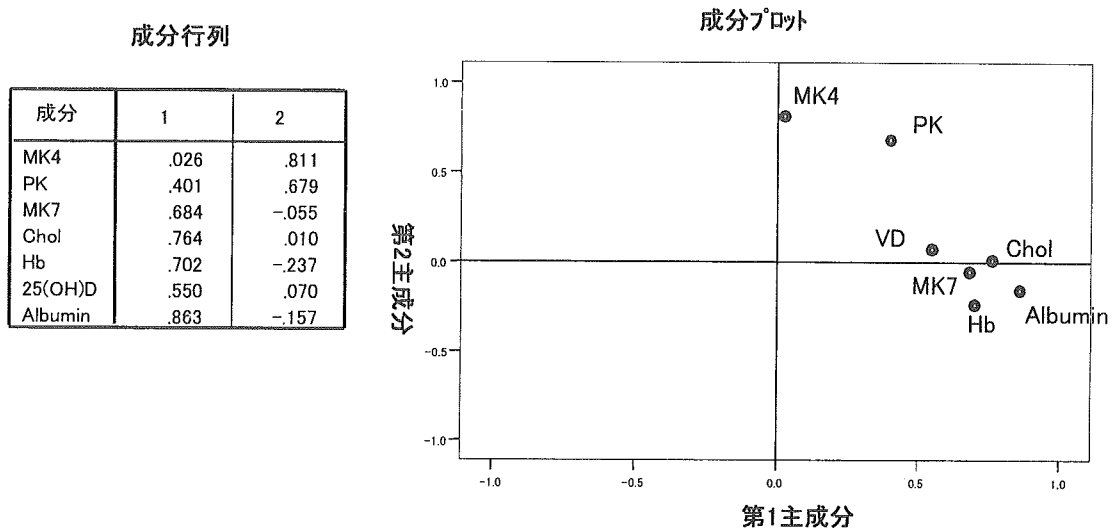
***: 有意差 $p < 0.0001$ (Student's t-test)

図2 血清中ビタミンKおよびucOC濃度



有意差 **: $p < 0.001$ ***: $p < 0.0001$ (Student's t-test)

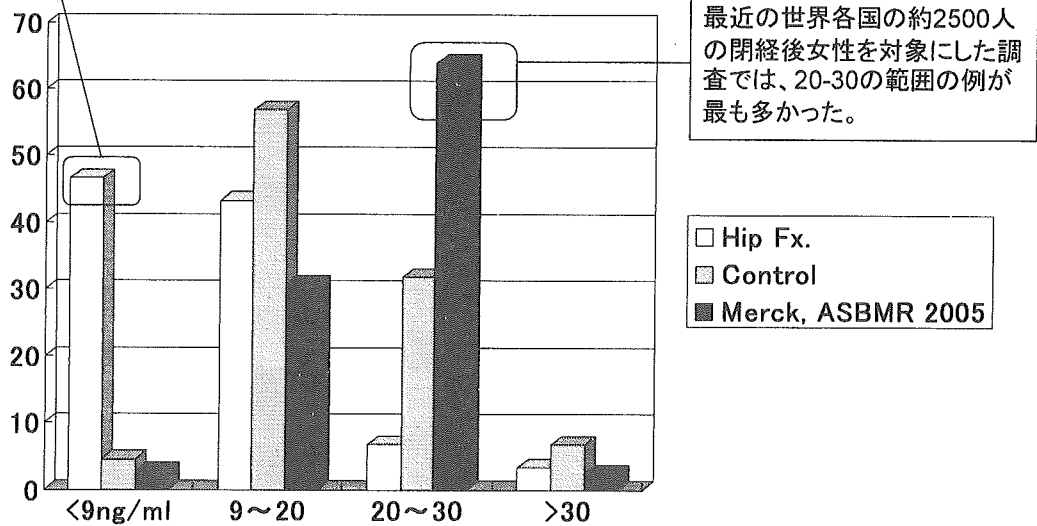
図3 主成分分析の結果



SPSS 13.0J, 主成分分析、Ward法、最小固有値1にて選択

今回の骨折例では、9未満の例が最も多かった。

図4 血清25(OH)D濃度の分布



Ref. Lips P et al. High prevalence of vitamin D inadequacy among community dwelling postmenopausal women with osteoporosis. ASBMR 2005

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とされておらず、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。

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が持たれている。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のある者の割合は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 日目にネブブタール (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⁺ (サプレッサー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 およびサプレッサー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-giphenyl-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 1×10^7 cells/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、LTB₄ ELISA 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 FcεRI と IgE の結合能および FcεRI 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 細胞は附着細胞であるため, 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. FcεRI 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。

FcεRI 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 Quest™ を用いて, FcεRI と IgE の結合能の解析を行った。

4. FcεRI 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)との間には差を認めなかったが、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 ($6.8 \pm 0.2\%$) と 200mg/kg α -Toc 添加食群 ($6.6 \pm 0.5\%$), 450mg/kg α -Toc 添加食群 ($6.9 \pm 0.4\%$), 200mg/kg γ -T3 添加食群 ($6.5 \pm 0.3\%$) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 ($6.5 \pm 0.5\%$) との間には有意な差を認めなかった.

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) との間には有意な差を認めなかった. 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 ($257.9 \pm 31.0\text{ng/mL}$) と比較し 200mg/kg α -Toc 添加食群 ($304.9 \pm 48.3\text{ng/mL}$), 200mg/kg γ -T3 添加食群 ($343.3 \pm 51.4\text{ng/mL}$) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 ($397.5 \pm 56.0\text{ng/mL}$) 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 ($254.0 \pm 45.2\text{ng/mL}$) の IFN- γ 産生はコントロール群と比較して差を認めなかった.

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 ($113.4 \pm 1.9\text{pg/mL}$) と 200mg/kg α -Toc 添加食群 ($114.7 \pm 4.0\text{pg/mL}$) および 450mg/kg α -Toc 添加食群 ($112.2 \pm 4.2\text{pg/mL}$) との間には有意な差を認

めなかった. 一方, 200mg/kg γ -T3 添加食群 ($209.5 \pm 93.1\text{pg/mL}$) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 ($260.5 \pm 100.9\text{pg/mL}$) 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 ($92.3 \pm 15.8\text{ng/mL}$) と比較して 200mg/kg α -Toc 添加食群 ($68.2 \pm 5.4\text{ng/mL}$), 450mg/kg α -Toc 添加食群 ($77.2 \pm 12.5\text{ng/mL}$), 200mg/kg γ -T3 添加食群 ($79.8 \pm 10.2\text{ng/mL}$) および 450mg/kg γ -T3 添加食群 ($68.1 \pm 2.6\text{ng/mL}$) 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FcεR IとIgEの結合能およびFcεR I発現に対するVEの影響

1. FcεR I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FcεR Iと結合しているIgEが多いことを示している。

FcεR I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、FcεR I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。

FcεR I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. FcεR Iの発現

FcεR I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FcεR I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FcεR Iの発現が高くなることを認めた。

FcεR I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～数時間のものと、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、