

ることはできない。そのため、このような絶対的な表現よりも、「栄養摂取量の不足もしくは充足の確率は何%である」と確率的な表現をすることが必要とされる。

II. 確率的な考え方に必要となる指標

栄養摂取量の評価を確率的に考えるためには、食事摂取基準で定義されているいくつかの指標を用いる必要がある(図2)。

栄養摂取量の不足や充足の有無、そしてその程度を判断するために、推定平均必要量(estimated average requirement: EAR)と推奨量(recommended dietary allowance: RDA)の2つの値がある。

推定平均必要量(以下、EARとする)は、ある対象集団の50%の人が必要量を満たすと推定される1日あたりの摂取量として定義されている。EARを摂取している場合、確率的には50%の者が欠乏症に陥ることになる。また、日常の摂取量がEARより低くなるにつれて不足している確率は高くなっていく。

推奨量(以下、RDAとする)はある対象集団のほとんどの人(97~98%)が1日の必要量を満たすのに十分な摂取量として定義されている。習慣的な摂取量がEAR以上となりRDAに近づくにつれて、不足している確率は低くなる。ただし、RDA以上を摂取していたとしても、不足する確率はゼロにはならないということに注意が必要である。

EARやRDAを算定するのに十分な科学的根拠が得られない栄養素に関しては、目安量(adequate intake: AI)が設定されている。これは、ある対象集団が良好な栄養状態を維持するために十分な量と定義されている。習慣的な摂取量が目安量(以下、AIとする)以上の者は不足している確率は非常に低くなる。

また、過剰摂取による健康被害を未然に防ぐことを目的として、上限量(tolerable upper intake level: UL)が設定されている。これは、ある対象集団において過剰摂取による健康被害を起こすことのない栄養素摂取量の最大限の量として定義されている。習慣的に上限量を越える栄養素を摂取している者は過剰症のリスクが高くなる。

以上の指標を用いて、栄養摂取量の評価を確率的に考えるための統計学的栄養評価法を次に述べる。

III. EARを用いた統計学的栄養評価法

EARを用いて栄養評価を行うためには、以下の点を仮定する必要がある。

- 1) EARは個人の必要量を評価するのに最も良い指標である。
- 2) 個人の間には必要量に変動がある。必要量の標準偏差は個人の栄養素の必要量が母集団のEARの中央値からどのくらいバラツキがあるかを示している。
- 3) 個人の平均摂取量は個人の日常の摂取量を示す最も良い指標である。
- 4) 個人の摂取量には日差変動がある。摂取量の標準偏差は日常の摂取量のバラツキを示している。

個人の栄養摂取量が適切かどうかという推論は、平均摂取量と必要量の中央値の差であるDから判断できる。つまり、Dは個人の平均摂取量と個人の年齢と性別に対応する集団のEARの差である。

もしDの差が大きく正の値であれば、それはつまり、EARよりも多く摂取しているということであり、個人の摂取量は充足していると言える。逆を言えば、もしDの差が大きく負の値であれば、それはつまり、EARよりも少なく摂取しているということであり、個人の摂取量は不足していると言える。

ここで、個人の未知の日常の摂取量が個人の未知の真の必要量を上回ると結論づけるためには、いったいDはどの程度大きければよいのだろうかという疑問が浮かぶ。この疑問を解くにはDの標準偏差(SD_b)を求める必要がある。 SD_b は食事調査の日数、必要量の標準偏差(これはほとんどの栄養素でEARの10~15%である)、そして集団の平均摂取量の標準偏差に依存する。Dと SD_b を求めることができれば、その比率(D/SD_b)から正規分布表を用いて、摂取量がどのくらい必要量を上回っているのか、または下回っているのかという確率を予測することができる。図3にDと SD_b の式を示す。

ここでわかりやすく説明するために例をあげ

$$D = \bar{y} - \text{EAR}$$

$$SD_D = \sqrt{V_r + \frac{V_{\text{within}}}{n}}$$

- \bar{y} : 個人の平均摂取量
- V_r : 必要量の標準偏差の2乗 (=EARの10~15%の2乗で代用)
- V_{within} : 集団の平均摂取量の標準偏差の2乗
- n : 食事調査の日数

図3 EARを用いた場合の統計学的栄養評価法

る。ある40歳女性が3日間の食事調査から平均で270 mg/dayの葉酸を摂取していたとする。問題となるのは、この女性が3日間以上、平均で270 mg/dayの葉酸を摂取していた場合、日常の葉酸の摂取量はどの程度の確率で充足しているのかということである。評価方法は以下の様に行う。

- 1) 30~49歳女性の葉酸のEARは200 mg/dayであり(表1)、必要量の標準偏差はその10%の20 mg/dayとなる。
- 2) Dは平均摂取量からEARを引いた値であり70 mg/dayとなる。
- 3) SD_Dを求めると87 mg/dayとなる。SD_Dは次のように求める。

30~49歳女性の葉酸の摂取量の標準偏差は147.1 mg/dayであり(表2)、その分散は [147.1 mg/day]²となる。これを食事調査の日数である

3で割ると7212.8という値が得られる。また、必要量の分散は [20 mg/day]²である。したがって、これら2つの値を足した平方根の値は87 mg/dayとなる。

以上の値からD/SD_Dを求めると、70/87≒0.805となる。したがって、正規分布表と表3から、葉酸の摂取量は約80%の確率で充足していると判定することができる。

ここで注意すべき点は、30~49歳女性の葉酸のRDAは表1より240 mg/dayということである。3日間の食事調査の結果から、この40歳女性は平均で270 mg/dayの葉酸を摂取しておりRDAよりも多い。しかしながら、その摂取量は充足していると判定されるものの、その確率は約80%であるということである。もし、3日間の食事調査から、95%の確率で葉酸の摂取量が充足していると判定するためには、平均で344 mg/dayの摂取量が必要であり、これは30~49歳女性の葉酸のRDAを大きく超えることになる(表4)。

なお、これらの評価を行う際に、この40歳女性の3日間の食事調査で得られた葉酸の平均摂取量の標準偏差は用いなかった。その理由として、先にも述べたが、個人の栄養摂取量の日差変動は非常に大きいため、標準偏差の値がひどく偏ってしまう可能性がある。そのため、母集団が大きい平成15年度国民健康・栄養調査で得られた値を用いた。

表1 葉酸の食事摂取基準 (mg/day)

性別 年齢	男性				女性			
	EAR	RDA	AI	UL	EAR	RDA	AI	UL
0~5 (月)	-	-	40	-	-	-	40	-
6~11 (月)	-	-	60	-	-	-	60	-
1~2 (歳)	80	90	-	-	80	90	-	-
3~5 (歳)	90	110	-	-	90	110	-	-
6~7 (歳)	110	140	-	-	110	140	-	-
8~9 (歳)	140	160	-	-	140	160	-	-
10~11 (歳)	160	200	-	-	160	200	-	-
12~14 (歳)	200	240	-	-	200	240	-	-
15~17 (歳)	200	240	-	-	200	240	-	-
18~29 (歳)	200	240	-	1,000	200	240	-	1,000
30~49 (歳)	200	240	-	1,000	200	240	-	1,000
50~69 (歳)	200	240	-	1,000	200	240	-	1,000
70以上 (歳)	200	240	-	1,000	200	240	-	1,000
妊婦 (付加量)					+170	+200	-	-
授乳婦 (付加量)					+80	+100	-	-

表2 平成15年度国民健康・栄養調査における1日あたりの各栄養素の摂取状況

栄養素	単位	男性 (18-29歳)		女性 (18-29歳)		男性 (30-49歳)		女性 (30-49歳)		男性 (50-69歳)		女性 (50-69歳)	
		n=615		n=613		n=1314		n=1355		n=1587		n=1785	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ビタミンA	μg RE	838	1034	780	797	857	809	828	948	1005	1041	1026	832
ビタミンD	μg	6.8	7.7	7.0	8.2	8.4	9.8	7.3	8.4	11.2	11.5	9.3	9.6
ビタミンE	mg-α TE	9.2	7.8	8.5	14.8	9.9	15.7	11.0	28.9	10.6	16.0	12.2	31.3
ビタミンK	μg	230.2	216.1	215.8	188.3	261.7	211.5	246.7	203.7	326.4	264.2	326.7	253.0
ビタミンB ₁	mg	1.16	3.16	1.23	4.73	1.36	4.69	1.23	3.51	1.83	7.17	1.73	7.31
ビタミンB ₂	mg	1.34	1.02	1.47	3.29	1.48	2.65	1.50	3.78	1.55	2.79	1.68	5.71
ナイアシン	mgNE	15.5	7.6	12.9	6.0	17.5	8.1	13.9	6.4	18.7	8.5	15.3	6.9
ビタミンB ₆	mg	1.48	4.21	1.40	3.48	1.68	3.68	1.81	6.35	2.18	6.66	2.33	10.05
葉酸	μg	277.2	175.5	257.5	138.8	299.8	144.8	280.2	147.1	364.7	174.7	360.5	156.2
ビタミンB ₁₂	μg	7.60	9.54	6.10	6.85	7.75	8.29	6.15	7.32	9.62	9.67	8.08	8.54
パントテン酸	mg	5.9	2.4	4.9	1.8	5.8	2.0	5.0	1.8	6.2	2.1	5.6	1.9
ビタミンC	mg	93.9	213.3	103.8	293.3	97.3	157.1	114.4	209.0	125.5	138.1	165.8	261.5
カルシウム	mg	494.2	305.4	451.7	262.5	481.6	242.3	477.5	257.4	573.2	283.5	576.8	298.5
鉄	mg	8.1	4.3	7.0	2.9	8.3	3.5	8.1	15.0	9.5	3.7	9.0	3.7
リン	mg	1062	408	890	311	1080	346	928	313	1178	371	1023	336
マグネシウム	mg	244.2	104.8	209.6	77.0	263.8	90.8	230.8	83.0	306.5	107.1	276.9	99.5
カリウム	mg	2198	953	1956	775	2305	834	2121	799	2743	1014	2624	971
銅	mg	1.29	0.57	1.02	0.39	1.29	0.45	1.07	0.37	1.44	0.56	1.26	0.46
亜鉛	mg	9.9	4.1	7.4	2.9	9.4	3.3	7.5	2.6	9.5	3.3	8.0	2.7

表3 EARを用いた日常の摂取量の判定とその確率

基準	判定	確率 (%)
D/SD _D > 2.00	充足している	98
D/SD _D > 1.65	充足している	95
D/SD _D > 1.50	充足している	93
D/SD _D > 1.00	充足している	85
D/SD _D > 0.50	充足している	70
D/SD _D > 0.00	充足または不足している	50
D/SD _D < -0.50	不足している	70
D/SD _D < -1.00	不足している	85
D/SD _D < -1.50	不足している	93
D/SD _D < -1.65	不足している	95
D/SD _D < -2.00	不足している	98

表4 ある40歳女性の葉酸の日常の摂取量と確率の関係

	mg/day	% RDA
30~49歳女性の葉酸のEAR	200	
必要量の標準偏差	20.0	
集団の平均摂取量の標準偏差	147.1	
30~49歳女性の葉酸のRDA	240	
85%の確率で充足していると判定するのに必要な平均摂取量		
1日	348	145
3日	287	120
7日	259	108
95%の確率で充足していると判定するのに必要な平均摂取量		
1日	444	185
3日	344	143
7日	297	124

IV. AIを用いた統計学的栄養評価法

栄養素にEARが設定されていない場合は、その代わりにAIを用いて栄養評価を行う方法がある。EARは必要量で示されているが、AIは摂取量で示されている。AI以上であれば摂取量は充足していると判定できるが、AI以下の場合でも摂取量は充足していると判定できることもある。しかしAI以下のある点からは摂取量は不足しているというリスクが高まる。たとえ摂取量がAI以上でも、非常に多くの摂取量のデータが集まらない限り、日常の摂取量がAI以上であると評価するべきではない。

簡単なZ式により、個人の未知の日常の摂取量がどの程度の確率で充足しているかどうかを

表5 AIを用いた日常の摂取量の判定とその確率

基準	判定	確率 (%)
Z > 2.00	充足している	98
Z > 1.65	充足している	95
Z > 1.50	充足している	93
Z > 1.25	充足している	90
Z > 1.00	充足している	85
Z > 0.85	充足している	80
Z > 0.68	充足している	75
Z > 0.50	充足している	70
Z > 0.00	充足している (と言える)	50
Z > -0.50	充足していると言える	30
Z > -0.85	充足していると言える	20
Z > -1.00	充足していると言える	15

判定することができる。この評価を行うには、集団の平均摂取量の標準偏差が必要であり、こ

表6 カルシウムの食事摂取基準 (mg/day)

性別 年齢	男性			女性		
	AI	DG	UL	AI	DG	UL
0~5(月) 母乳栄養児	200	-	-	200	-	-
人工乳栄養児	300	-	-	300	-	-
6~11(月) 母乳栄養児	250	-	-	250	-	-
人工乳栄養児	400	-	-	400	-	-
1~2(歳)	450	450	-	400	400	-
3~5(歳)	600	550	-	550	550	-
6~7(歳)	600	600	-	650	600	-
8~9(歳)	700	700	-	800	700	-
10~11(歳)	950	800	-	950	800	-
12~14(歳)	1,000	900	-	850	750	-
15~17(歳)	1,100	850	-	850	650	-
18~29(歳)	900	650	2,300	700	600	2,300
30~49(歳)	650	600	2,300	600	600	2,300
50~69(歳)	700	600	2,300	700	600	2,300
70以上(歳)	750	600	2,300	650	550	2,300
妊婦(付加量)				+0	-	-
授乳婦(付加量)				+0	-	-

DG:目標量

越えていた者は2人しかいなかったことになる。

$$Z = \frac{\bar{y} - AI}{\frac{SD_{within}}{\sqrt{n}}}$$

\bar{y} : 個人の平均摂取量

SD_{within} : 集団の平均摂取量の標準偏差

n : 食事調査の日数

図4 AIを用いた場合の統計学的栄養評価法

こでも平成15年度国民健康・栄養調査で得られた値を用いることにする。Z式は図4に示したようになる。得られたZ値から正規分布表と表5を用いて、個人の平均摂取量の判定とその確率を求めることができる。

ここでカルシウムを例にして、個人の平均摂取量とAIから栄養評価を行うことにする。ある22歳女性5人の3日間の食事調査におけるカルシウムの平均摂取量はそれぞれ750、800、850、900、950 mg/dayであった。また18~29歳女性のカルシウムのAIは700 mg/dayであり(表6)、集団の平均摂取量の標準偏差は262.5 mg/dayである。これらの値からZ値を求めると、それぞれ0.33、0.66、0.99、1.32、1.65となる。得られたZ値を正規分布表と表5を用いて、平均摂取量が充足している確率を求めるとそれぞれ63、74、84、91、95%となる。日常の平均摂取量はAIを越えているため、摂取量は充足していると判定できる。しかしながら、その確率が85%以上を

V. まとめ

従来の栄養評価法では、数日間の食事調査の平均摂取量の成績をEARまたはRDAと比較して栄養摂取量が適切かどうかの判定を行っていた。しかしながら、日常の栄養摂取量や必要量には変動があるため、これらを考慮せずに平均摂取量のみを用いた場合では、誤った栄養評価が行われる可能性がある。この統計学的栄養評価法を用いることにより、日々変動する摂取量や必要量、食事調査の日数を考慮することができ、さらにその摂取量がどの程度の確率で不足もしくは充足しているかということを求めることができる。

今後の課題として、EARを用いた場合では不足もしくは充足している確率と栄養素の血中濃度との関係、そしてAIを用いた場合では確率が何%以上であれば十分な摂取量であると判定できるのかといったことを明らかにしていく必要がある。

文献

- 1) National Research Council: Dietary Reference Intakes -Applications in Dietary Assessment-. Washington, DC, National Academy Press, 52-69, 185-202, (2000)
- 2) 田中平三 他: 食事調査のすべて - 栄養疫学 -. 第2版, 36-53, 第一出版, 東京, (2003)
- 3) 縣俊彦: 基本医学統計学 - EBM・医学研究・SAS

- への応用 - 第4版, 中外医学社, 東京, (2004)
- 4) 厚生労働省ホームページ: 日本人の食事摂取基準 (2005年版).
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/11/h1122-2.html>
- 5) 厚生労働省ホームページ: 平成15年度国民健康・栄養調査 (平成15年).
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou-chosa2-01/index.html>

[Editor's comment]

食事摂取基準に基づく栄養素摂取量の 統計学的評価

Statistical assessment of the amount of
nutrient intakes based on the DRIs

細萱 茂実*

Shigemi Hosogaya

[はじめに]

国民健康・栄養調査結果において、最近の糖尿病有病者・予備軍の増加、肥満者の増加や野菜摂取量の不足など、健康状態はむしろ悪化の傾向にあることが指摘されている¹⁾。これら状況の中で、厚生労働省は生活習慣病の減少という観点から、内臓脂肪症候群（メタボリックシンドローム）の概念を導入した標準的な健診・保健指導プログラム（暫定版）²⁾を公示した。本プログラムは、生活習慣病のリスクファクター保有状況により対象者を層別化し、個人が自ら健康状態を意識した生活習慣の改善に結びつけ、生活習慣病を予防しようとするもので、平成20年4月からの施行に向け準備が進められている。

生活習慣病を予防するために、個々人の生活習慣の改善に主眼をおいた保健指導が重点的に行われるが、対象者が健診結果に基づき自らの健康状態を認識したうえで、代謝等の身体のメカニズムと食習慣や運動習慣等との関係を理解

*山梨大学医学部附属病院検査部

〒409-3898 山梨県中央市下河東1110

Department of Clinical Laboratory, University of Yamanashi Hospital,

1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan

し、生活習慣の改善を実践する必要がある。その際、エネルギーや栄養素の摂取量を客観的に把握し、生活習慣病の予防、また過剰摂取による健康障害の予防に努めることが重要である。

一方、栄養素の真の望ましい摂取量は、個人によって異なり、また個人内においても変動するため、望ましい摂取量を考えるにあたり、確率論的なアプローチが必要となる。生活習慣病の予防を重視した場合、それに対応する摂取量の範囲を示し、その範囲内であれば生活習慣病のリスクが低いとし、上限を越えて摂取すると過剰摂取による健康障害のリスクが高くなるという考え方が適用されるが、その際にもものさしとなる食事摂取基準が設定されている。松本らは、食事摂取基準に基づく栄養素摂取量の評価にあたり、個人差や個人内の変動を考慮した統計学的評価法の意義を報告しているが³⁾、このような科学的根拠を背景とした客観的評価は、健康状態を認識した生活習慣の改善の必要性が叫ばれている今日、重要な課題である。

[食事摂取基準とは]

食事摂取基準 (dietary reference intakes, DRI) は、健常者を対象とした異なる観点に基づく複数の基準の総称である。まず、推定平均必要量 (estimated average requirement, EAR) と推奨量 (recommended dietary allowance, RDA) は、健康の維持・増進と欠乏症予防のために設定した基準であり、これらを設定するための十分な科学的根拠が得られない栄養素については目安量 (adequate intake, AI) が設定されている。生活習慣病の一次予防のために日本人が当面の目標とすべき摂取量が目標量 (tentative dietary goal for preventing life-style related disease, DG) である。また、過剰摂取による健康障害を防ぐことを目的として上限量 (tolerable upper intake level, UL) が設定されている⁴⁾。

推定平均必要量 (EAR) は、性・年齢階級別に日本人の必要量の平均値 (M) を推定したものであり、当該性・年齢階級に属する人々の50%が必要量を満たすと推定される1日の摂取量である。

推奨量 (RDA) は、ある性・年齢階級に属する人々のほとんど (97~98%) が1日の必要量

を満たすと推定される摂取量であり、原則として「EAR+標準偏差の2倍(2SD)」とされる。ただし、これらの実測は非常に困難であり、集団における必要量の分布を正規分布と仮定し、その変動係数(CV=SD/M)を例えば10%とすると、推奨量(RDA)の近似値は「 $RDA=1.2 \times EAR$ 」と推定される。なお、基礎代謝量のCV値は約10%、蛋白質必要量のCV値は約12.5%である⁴⁾。

また目安量(AI)は、EARやRDAが算定できない場合に、ある性・年齢階級に属する人々が良好な栄養状態を維持するのに十分な量として設定される。

[食事摂取基準の利用上の留意点]

食事摂取基準は、健康な個人または集団を対象として、栄養評価や栄養計画に利用されるが、ここでは栄養評価を中心に利用上の留意点について述べる。

個人の習慣的な摂取量が推定平均必要量(EAR)以下の場合、その栄養素が不足している確率が50%以上であり、摂取量が低くなるほど不足の確率が高くなる。また、推奨量(RDA)に近づけば不足の確率は低くなり、目安量(AI)以上になれば不足の確率はほとんどなくなる。また、習慣的な摂取量が上限量(UL)以上になれば、過剰摂取に由来する健康障害のリスクが高くなる。

集団を対象とした場合、習慣的な摂取量が推定平均必要量(EAR)以下の割合は、不足者の割合と一致する。集団における摂取量の中央値が目安量(AI)以上の場合には不足者の割合は少ない。また、習慣的な摂取量が上限量(UL)を上回っている者の割合は、過剰摂取による健康障害のリスクをもっている者の割合と一致する。

ただし、これらの摂取基準に基づいた評価は、スクリーニング的な意味であり、よりの確に栄養状態を把握するには臨床情報、生化学的測定値、身体計測値等が必要である。

一方、食事摂取基準に基づいて栄養素摂取量を評価するには、摂取量の個人差(個人間変動)と個人内における変動(個体内変動であり日間の摂取量のばらつきなど)への認識が必要である。これらは、健常者の血中成分濃度の恒常性

に関する個人間・個体内生理的変動に対応する。

[推定平均必要量(EAR)を用いた評価]

推定平均必要量(EAR)は、性・年齢階級別の個人の必要量の期待値を、多数の観測データをもとに推定した平均値(M)である。それに基づいて個人の栄養素摂取量(y)を評価する場合、基準からの差(y-M)が評価指標となる。ただし、その解釈には必要量の個人差と、個人内における変動を考慮する必要がある。必要量の個人差は、継続的に実施されている大規模調査結果より推定でき、必要量の個人間のばらつきを示す標準偏差(SD_m)が得られる^{1,3,4)}。一方、個人ごとの摂取量は、一般にn日間の食事調査から1日あたりの平均値(y_B)として求められる。個人内におけるばらつきは、同様な大規模調査結果から個人内変動の標準偏差(SD_w)が得られる^{1,3,5,6)}。

これらデータから、実際の評価指標D(=y_B-EAR)と、その標準偏差SD_D(= $\sqrt{(SD_m^2+SD_w^2/n)}$)が求められる。個人の必要量が正規分布に従うと仮定できれば、評価指標の信頼の程度は統計量z(=D/SD_D)が標準正規分布に近似することを利用して判定できる^{3,5)}。ここでの評価は、個人の栄養素摂取量が性・年齢階級別の必要量の平均値に対して不足しているか否かの程度が確率で示される。

[目安量(AI)を用いた評価]

推定平均必要量(EAR)に基づく評価は、栄養素が不足しているか否かを集団の平均値を基準にして評価するものである。これに対して、目安量(AI)を用いた評価は、ほとんどのケースが必要要求量はすでに超えており、個々人における摂取量と目安量(AI)との比較が主な問題となる。したがって、この場合は個人差によるばらつきを考える必要がなく、評価指標は統計量z(=(y_B-AI)/(SD_w/√n))が標準正規分布に近似することを利用して判定できる^{3,5)}。ここでの評価は、個人の習慣的な栄養素摂取量が、性・年齢階級別の目安量(AI)に対して十分に良好な状態にあるかの程度が確率で示される。

ここでの考え方は、目標量(DG)や上限量

(UL) を用いた評価にもあてはまる。

生活習慣病を予防するには、栄養素摂取量を客観的に把握し、生活習慣の改善に繋げて行くことが重要である。ただし、栄養素摂取量の評価にあたり、摂取量の個人差と個人内における変動を考慮する必要があり、食事摂取基準を適正に利用するためにも科学的根拠に基づいたアプローチが大切となる。松本らの報告³⁾は、その意味において貴重な提言を与えている。今後は、国内規模あるいは国際的にも、生活習慣病予備軍に対する生活習慣への介入の効果についてエビデンスが蓄積されそれら成果が現実に還元されてくることが期待される。

文献

- 1) 厚生労働省:日本人の食事摂取基準(2005年版). 国民健康・栄養調査結果(平成15年). <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou.html>
- 2) 厚生労働省:標準的な健診・保健指導プログラム(暫定版).平成18年7月, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/seikatsu/pdf/02.pdf>
- 3) 松本貴行 他:栄養摂取量からみたDRIsの統計学的栄養評価法. 生物試料分析, 29: 420-426, 2006
- 4) 石川秀次 他:厚生労働省策定 日本人の食事摂取基準(2005年版). 第一出版, 東京, 2005
- 5) National Research Council: Dietary Reference Intakes -Applications in Dietary Assessment-. Washington, DC, National Academy Press, 52-69, 185-202, (2000)
- 6) USDA Food Surveys: Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1994-1996. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=7787>

原 著

鳥類における卵胞ビオチンおよびビオチニダーゼの変化

兵庫県立大学環境人間学部食環境解析学教室*

谷口 歩美, 渡邊 敏明

Vitamins (Japan), 81 (2), 43-48 (2007)

Changes in Biotin and Biotinidase in Ovarian Follicles in Domestic Fowl

Ayumi Taniguchi, Toshiaki Watanabe

Department of Dietary Environment Analysis, School of Human Science and Environment, University of Hyogo
1-1-12 Shinzaike Honcho, Himeji 670-0092, Japan

It is known that biotin deficiency induces both external and skeletal malformations in the embryos of fowl. Also biotin is greatly required for maintaining reproductive function and is contained in a large amount in the egg yolk. Therefore, this study was designed to elucidate the mechanism of biotin transport from hens to eggs and the nutritional magnitude of biotin during ovarian follicular growth. Biotin concentration in ovarian follicles was 87.5 ± 29.3 ng/g in the early stage of ovarian follicular growth, which had drastically increased to 674.1 ± 91.4 ng/g in the late stage and reached its highest value of 1072.5 ± 197.6 ng/g just prior to ovulation. The percentage of free biotin was $75.5 \pm 21.1\%$ in the early stage, which had decreased to $28.2 \pm 8.8\%$ with the growth of ovarian follicles in the late stage. These values subsequently increased to $73.9 \pm 19.2\%$ just prior to ovulation and was $90.9 \pm 11.8\%$ in mature egg yolk. These results demonstrate that biotin is stored as "protein binding biotin" from the early to middle stages of ovarian follicular growth and is metabolized to "free biotin" before ovulation, in which a large amount of biotin is transported from hens to eggs. It appears that free biotin is required for maintaining embryonic development soon after fertilization. From these findings, it is suggested that biotin is an essential nutrient and plays an important role in the normal development of embryos in fowls.

Key words: biotin, fowl, ovarian follicle, egg yolk, biotinidase

(Received July 31, 2006)

ビオチンは、水溶性ビタミンのひとつで、生体内においてカルボキシラーゼの補酵素として、炭酸固定反応に関与している¹⁾²⁾。ビオチンは、メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC)、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)、ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC)、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC) の 4 つのカルボキシラーゼの補酵素として、脂肪酸合成、糖新生、アミノ酸代謝などに関わっている。

ビオチンが欠乏すると、これらの代謝が阻害され、脱

毛などの皮膚症状、神経炎、易感染症などが引き起こされることが知られている。また、ビオチン欠乏状態の生殖生理学的影響として、鳥類ではヒナに形態異常が起こることが古くから知られている³⁾。ほ乳動物においても、ビオチンが妊娠を維持したり、胎児や乳児の成長を保つのに関与していることが明らかにされている⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。また、妊娠の経過に伴って血中や尿中のビオチンが低下することや、尿中の 3-HIA (3-hydroxyisovaleric acid) が増加することが示唆されている⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。最近の報告では、ビオ

*〒 670-0092 兵庫県姫路市新在家本町 1-1-12

チンと糖尿病の関連が示唆されており、糖尿病患者の血中ピオチン濃度が健常人と比較して低いことや、ピオチン投与によって糖尿病の症状が改善することが報告されている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。また、ヒストンのピオチン化が細胞増殖において DNA 合成に大きな役割を果たしていることが明らかにされており、Jurkat 細胞では、ピオチン欠乏状態にしてもヒストンのピオチン化が正常に保たれることが報告されている¹⁴⁾。

鳥類は、ビタミン要求性が高く、ピオチンに関しても例外ではない¹⁵⁾。鳥類の卵黄中には、ピオチンが多量に含まれている。食餌から摂取されたピオチンの多くが卵に移行し、卵黄にはピオチンが多量に蓄積している¹⁶⁾。このことから、ピオチンが鳥類の胚発育に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、本研究では、ニワトリを用いて、母体から卵胞あるいは卵黄へピオチンが供給される機序を、卵胞の発達段階によって分析し、卵形成におけるピオチンの栄養学的意義を検討した。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

ニワトリの卵胞および卵黄（いずれも無精卵）は、産卵用の白色レグホン 5 羽から採取した（Table 1）。ニワトリは屠殺前に採血し、遠心分離後、血清を得た。また、屠殺後、直ちに卵巢、卵管、肝臓を摘出した。

ニワトリの卵巢は、肝臓前方に位置しており、卵巢間膜によって吊るされ、白色や黄色の球形をした大小様々な卵胞が、各発達段階によってブドウ状に集合している¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。卵巢内の卵細胞の数は肉眼で数えられるもので約 1,900 個、顕微鏡下で確認できるもので 12,000 個以上存在している。これらの卵胞は、成長して卵黄として排卵されるまでに数年を要する。直径 1mm 以下の卵胞が 5mm 程度に成長するには数ヶ月以上、さらに約 10mm に成長するに数ヶ月を要する。その後、卵胞は排卵直前の 10 日前後で急激

に数 cm まで成長する。また、ニワトリでは約 27 時間の間隔で排卵がおこなわれ、排卵された卵胞は、全長 70cm 程度の卵管を、約 24 時間かけて移動することが知られている。ニワトリの卵管は、上部から漏斗部、膨大（卵白分泌）部、峡部、卵管腺（子宮）部および膣部に分類され、排卵された卵胞は、卵管を移動する間に、卵白、卵殻膜、卵殻の形成の段階を経て、完全な卵として体外へ放出させる機能を持っている。

これらのことから、本研究では、卵胞の成長の過程により、大きさから、便宜的に 5 段階のステージに分類した（Table 1）。具体的に、単独で採取することが不可能な 1mm 以下の卵胞をステージ A（発生初期）、肉眼で数えることができ、個体での採取が可能な 1mm 以上 5mm 未満のものをステージ B（成長前期）、5mm 以上 10mm 未満のものをステージ C（成長後期）、排卵が近づき急成長した段階で 10mm 以上のものをステージ D、卵巢内で最も大きく成長した排卵直前のものをステージ E とした。卵胞は、ニワトリの個体別にステージごとにまとめて 1 サンプルとした。また、排卵されて卵管内に存在する成熟卵（卵黄のみ）も採取した。排卵後の卵黄は、卵白を完全に除去するために 1/15M リン酸緩衝液（pH7.2）で洗浄した。このほか、卵管組織を卵管の上部および下部から採取した。卵管上部としては、卵白タンパク質の合成や分泌がおこなわれる膨大部を採取し、下部としてはカルシウムの分泌と卵殻の形成がおこなわれる子宮部を採取した。

血清はそのまま測定試料とし、それ以外の試料に関しては、1/15M リン酸緩衝液（pH7.2）およびサンプルの 0.01% 量の界面活性剤（TRITON X-100）を加えて十分にホモジナイズしたものを測定試料とした。また、サンプルはすべて、測定時まで -40℃ で凍結保存した。

2. ビオチンの分析

ピオチンの定量は、ピオチン要求株である乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014）を用いた微生物学的

Table 1. Developmental stages of ovarian follicle in laying hens.

Stage	A	B	C	D	E	Egg yolk
Size (mm)	< 1	< 5	< 10	< 20	≥ 20	—
No. of ovarian follicles collected.	—	53	25	9	5	5
Weight (g)	—	< 0.02 (5)	0.16 ± 0.04 (5)	0.68 ± 0.35 (5)	10.5 ± 1.4 (5)	18.5 ± 3.6 (5)

^amean ± SD

() no. of ovarian follicles analyzed.

定量法²²⁾²³⁾²⁴⁾に従い、比濁測定した。乳酸菌は16時間培養後洗浄し、菌濃度を濁度(OD₆₁₀ = 0.15)で調製したものを接種菌液とした。定量には、ビオチン定量用基礎培地(日水製薬(株),東京)を用いて18時間培養後、610nmで測定した。

生体試料や食品に含まれるビオチンは、ほとんどが結合型ビオチンとして存在するため、本研究では総ビオチンと遊離型ビオチンを測定した。結合型ビオチンとは、タンパク質やペプチドと共有結合した状態で存在しているビオチンであり、生体内ではそのまま利用することはできない「貯蔵型」である。一方、遊離型ビオチンとはタンパク質などと結合せず、単独で存在している状態のもので、いわゆる「酵素型」である。生体内でのビオチンの吸収や利用は遊離型ビオチンが関与している。また、総ビオチンに対する遊離型ビオチンの割合を、遊離型ビオチン率(遊離率)とした。ビオチンの測定を概略すると、測定試料に同量の4.5N硫酸を加え、オートクレーブ(121℃, 2気圧, 60分)で酸加水分解後、4.5N水酸化ナトリウムで中和して測定したものを総ビオチンとした。遊離型ビオチンの定量は、試料を酸加水分解せず、そのままもしくは希釈して測定に供した。なお、ビオチン濃度はng/g(ml)またはμg/gで表した。

3. ビオチニダーゼの活性の測定

ビオチニダーゼには2つの役割がある²⁵⁾²⁶⁾。1つは、食品や生体内に存在する結合型ビオチンはそのままで利用できないため、消化管や細胞内でビオチニダーゼに

よって遊離化される。また、ビオチニダーゼは、ビオチン結合タンパクのひとつとして知られており、ビオチンの吸収、運搬および保持などに関与していることが明らかにされつつある。そこで、ビオチンの動態との関連を検討するため、ビオチニダーゼ活性を測定した。

ビオチニダーゼ活性の測定は、Wolfら²⁷⁾の方法に従い、比色測定した。また、活性は、nmol/min/g(ml)で表した。

4. 統計学的解析

データは、平均値±標準偏差で示した。統計処理には、統計ソフト StatView Ver.5.5(SAS Institute Inc., Cary) および Excel 統計 Statcel (OMS 出版, 埼玉)を用いた。また、 $p < 0.05$ を統計学的に有意な差異があると判定した。

結 果

各ステージにおける卵胞の状態は、ステージAおよびBでは、白色に近い黄色をしており、粘性が低い液体状であった。しかし、ステージCから卵黄の色は次第に濃い黄色を帯び始め、ステージD以降のものでは鮮やかな黄色をしており、粘性も高かった。卵胞のビオチン濃度およびビオチニダーゼ活性をFig. 1に示した。各ステージでの総ビオチン濃度の変化をみると、ステージAでは 87.5 ± 29.3 ng/gであったが、ステージCで 674.1 ± 91.4 ng/gと急激に増加し、排卵直前のステージEでは 1072.5 ± 197.6 ng/gとすべてのステージの中で最も高値であった。また、排卵後の卵黄においても、 944.2 ± 116.7 ng/gと高値を示した。ビオチン遊離率の変化をみる

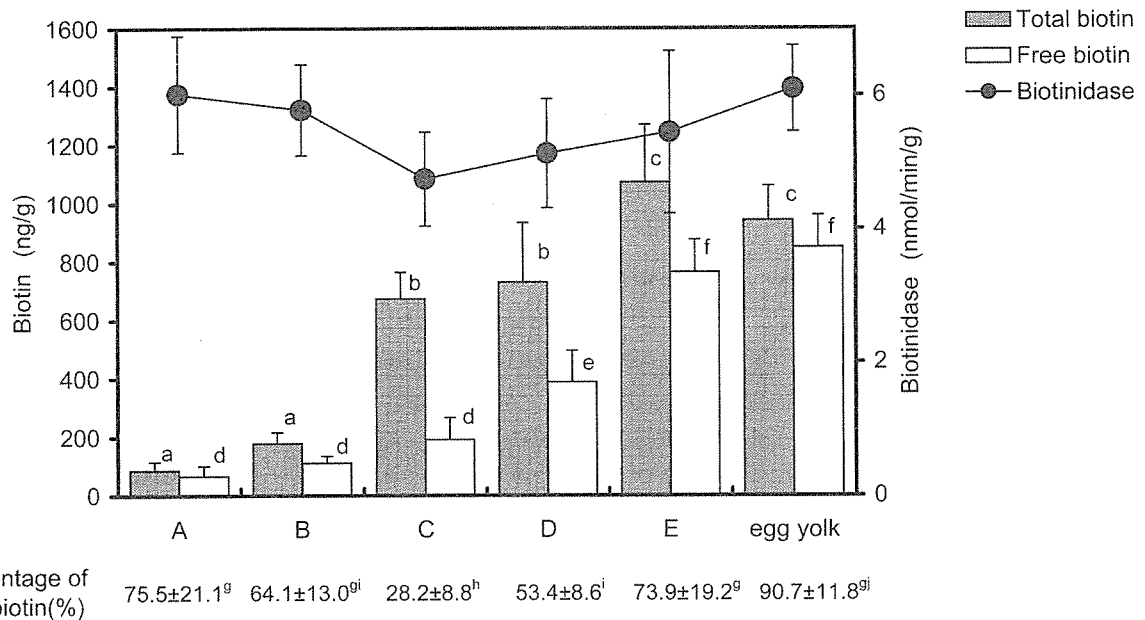


Fig. 1 Biotin concentrations of ovarian follicle and egg yolk in laying hens.
means ± SD, n = 5

a-b-c, d-e-f, g-h-i-j The data were analyzed by Tukey-Kramer after one-way ANOVA ($p < 0.05$). Means without a common letter differ ($p < 0.05$).

と、ステージ A では $75.5 \pm 21.1\%$ と高値であったが、次第に減少し、総ビオチン濃度が増加したステージ C では $28.2 \pm 8.8\%$ と低値であった。しかし、ステージ C 以降では、卵胞の成長とともに遊離率は再び高くなり、排卵直前のステージ E では $73.9 \pm 19.2\%$ 、排卵後の卵黄では $90.7 \pm 11.8\%$ であった。一方、卵胞のビオチンダーゼ活性に有意な変化はみられなかった。

ニワトリの血清および肝臓のビオチン濃度を Fig. 2-A に示した。総ビオチン濃度は、血清では $52.0 \pm 9.3 \text{ ng/ml}$ 、肝臓では $2.9 \pm 0.7 \text{ } \mu\text{g/g}$ であり、遊離型ビオチン濃度はそれぞれ $26.2 \pm 2.7 \text{ ng/ml}$ および $1.6 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{g/g}$ であった。また、ビオチンダーゼ活性は、血清で $20.2 \pm 3.9 \text{ nmol/min/ml}$ 、肝臓で $19.4 \pm 0.3 \text{ nmol/min/g}$ であった (Table 2)。卵管組織のビオチン濃度を示したのが Fig. 2-B である。総ビオチン濃度は卵管上部の膨大部で $45.6 \pm 14.0 \text{ ng/g}$ 、下部の子宮部で $49.0 \pm 12.1 \text{ ng/g}$ であり、遊離型ビオチン濃度はそれぞれ $4.8 \pm 1.5 \text{ ng/g}$ および $3.8 \pm 2.5 \text{ ng/g}$ と低値であった。膨大部と子宮部のビオチンダーゼ活性は、それぞれ $10.1 \pm 0.3 \text{ nmol/min/g}$ および $9.4 \pm 0.1 \text{ nmol/min/g}$ であった。

考 察

ビオチンがほ乳動物の胎児や鳥類の胚の発育に不可欠であることが知られている。ほ乳動物では、妊娠マウス

(ICR) に乾燥卵白を 25% 添加した精製飼料を与えると、90% 以上の胎児に口蓋裂、小顎症、短肢症などの外表奇形が認められる^{4) 5) 28)}。また、C57BL マウスおよび CD-1 マウスでも、ビオチン欠乏によって口蓋や四肢に異常が観察される。A/Jax マウスは、口蓋裂の自然発症率が高い系統であるが、ビオチン欠乏による口蓋裂誘発率はあまり高くないことが報告されている⁵⁾。ハムスターにおいても、妊娠中のビオチン欠乏によって、胎児発育の抑制や、吸収胚や死亡胎児の増加がみられている⁶⁾。一方、ラットでは妊娠中のビオチン欠乏状態によって、胎児に体重の低下はみられるが、形態異常や組織学的変化は認められていない⁵⁾。このように、ほ乳動物では動物種や系統によって感受性が異なるものの、妊娠中にビオチンが欠乏すると胎児に発育の抑制や形態異常が起こることから、ビオチンは胎児の形態形成や発育に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

一方、鳥類のビオチン欠乏状態の生理生殖機能への影響に関しては、古くから報告されている。ニワトリや七面鳥では、ビタミン要求性が高いため、精製飼料を与えることで容易にビオチン欠乏状態に陥ることが知られている^{15) 29)}。若い雌レグホン鶏に、低ビオチンの精製飼料を与えると、成長が抑制されたり、皮膚炎などの症状が現れる。また、ビオチン欠乏によって、産卵数には影響

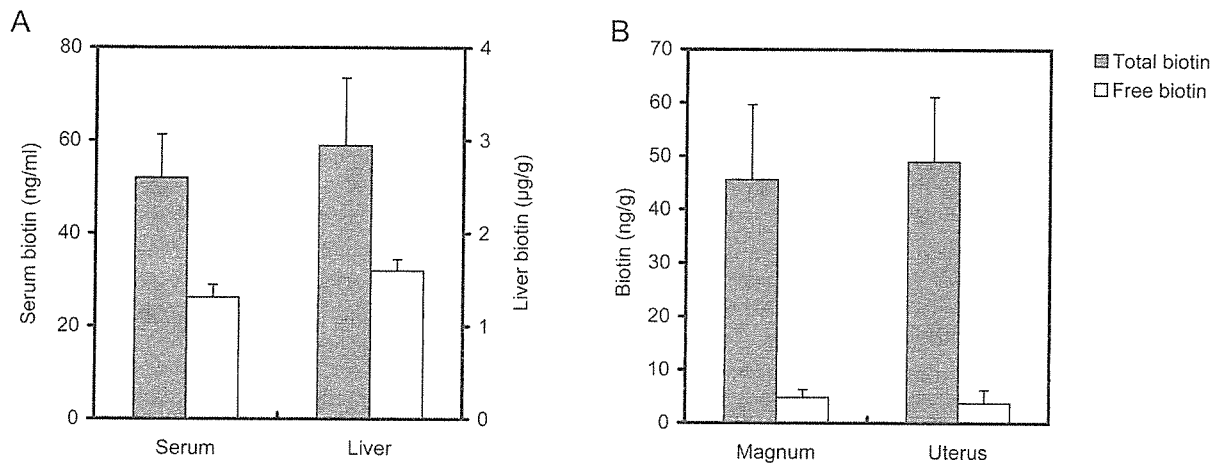


Fig. 2 Biotin concentrations of serum, liver and oviduct in laying hens.

A: serum and liver, B: oviduct
means \pm SD, n = 5

Table 2. Biotinidase activity of serum and organs laying hens.

Biotinidase nmol/min/ml(g)	Serum	Liver	Magnum	Uterus
	20.2 ± 3.9^a	19.4 ± 0.3	10.1 ± 0.3	9.4 ± 0.1

^amean \pm SD, n = 5

しないが、胚の死亡率が増したり、孵化率が著しく低下することが知られている³⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾。低ビオチン精製飼料を与えられた親鳥から孵化したヒナには、腱麻痺や運動失調、翼脚の骨格異常などが観察される。このような個体にビオチンを与えると孵化率が急激に回復する。

Cravensら³⁰⁾の報告では、ビオチン欠乏のヒナに軟骨異常栄養症や合指症などの骨格の異常が観察されているが、これらの親鳥には皮膚炎などのビオチン欠乏症状はみられていない。また、ニワトリや七面鳥で、飼料にビオチン0.55mg/kgを添加した場合にも、産卵数の増加がみられ、胚の死亡率が減少し、孵化率が高くなることが報告されている³³⁾。このように、親鳥に比べて、胚ではビオチン欠乏による影響を受けやすいと考えられる。しかし、Whitehead¹⁶⁾は、飼料にビオチン0.06-0.40mg/kgを添加しても、飼料の摂取量、産卵数、鶏卵の大きさ、孵化率に変化がみられなかったと報告している。

雌レグホン鶏では飼料からのビオチン摂取量と、鶏卵のビオチン含量には直線的な関係があることが報告されている¹⁶⁾³¹⁾³⁴⁾。飼料からビオチンが多量に摂取されると、卵への移行率は低くなるが、摂取されたビオチンの50%以上が卵に移行する¹⁶⁾。とくに卵黄には多量のビオチンが蓄積しているが、卵黄のビオチン濃度が50ng/g以下の場合には胚発育はみられず、正常な胚発育を維持するためには150ng/g以上必要であることが報告されている³⁵⁾。本研究での卵黄ビオチン濃度は 944.2 ± 116.7 ng/gであることから、正常な胚発育に十分なビオチンが存在するといえる。これらのことから、鳥類でもビオチンが親鳥の正常な生殖生理機能を維持したり、胚の発育や分化を維持するために不可欠であると考えられる。

卵胞のビオチン濃度の変化をみると、卵胞の発生初期や成長前期と比較して、卵胞の成長後期には総ビオチンは3倍以上に増加していた。しかし、排卵を約10日後に控えた成長後期では、卵胞の成長過程の中で遊離率は最も低値であった。また、排卵直前期には、卵胞の大きさや色、粘性にも顕著な変化がみられ、ビオチン濃度の増加とともに遊離率も高くなった。さらに、排卵後の卵黄ではビオチンの90%以上が遊離型で存在した。これらのことから、卵胞の成長に伴って、胚の発育に必要な他の栄養素と同時にビオチンも卵胞に多量に取り込まれている可能性が考えられる。また、初期の卵胞で遊離率が高いことや、排卵直前に遊離型ビオチン濃度が急激に増加していることから、卵胞へのビオチンの供給は遊離型でおこなわれていると考えられる。なお、成長後期では総ビオチン濃度が著しく増加しているにもかかわらず遊離率は低値であるが、これは卵胞が数ヶ月かけて数mmから約10mmに成長する間に、徐々に蓄積されたビオチンが結合型で保存されている可能性が考えられる。

一方、卵胞のビオチニダーゼ活性には、全ステージを通して変化はみられなかった。しかし、卵胞の発生初期

から遊離率の低下する成長後期にかけて活性は減少し、排卵期に再び増加する傾向がみられた。そこで全ステージの卵胞と卵黄におけるビオチニダーゼ活性とビオチンの遊離率の関連をみると、両者の間には相関($r = 0.51$, $p < 0.01$)がみられた(Fig.3)。卵胞へのビオチンの取り込みが遊離型でおこなわれていることとあわせて考察すると、ビオチニダーゼが卵胞においてもビオチンの遊離化としての機能を果たしている可能性が考えられる。

排卵前後の卵胞や卵黄へのビオチンの取り込みのおこなわれる部位や時期が明確ではない。今回の結果では、卵管組織のビオチン濃度は膨大部、子宮部ともに低く、遊離率もそれぞれ10.5%および7.7%と低値であった。また、ビオチニダーゼにおいても、卵管組織では卵胞や血清と比較して約半分の活性であった。さらに、卵管へ排卵された卵黄は、膨大部ですぐに卵白で覆われてしまうことから、卵管にビオチンはほとんど存在しておらず、卵黄中のビオチンは、排卵以前に卵巣で取り込まれていることが考えられる。

ニワトリの血清および肝臓では、ビオチン濃度やビオチニダーゼ活性は、ほ乳動物と比較して高値であった。ほ乳動物では、一般飼料を与えたマウスのビオチン濃度は血清で5-6ng/ml、肝臓で1.0-1.2 μ g/gであり、ヒトでは健康成人における血清ビオチン濃度は1.6-3.7ng/mlである。ニワトリではマウスと比較して血清で約10倍、肝臓で約3倍の高値であった。また、血清および肝臓の両方で、ビオチンの50%以上が遊離型すなわち活性型で存在しており、これは、鳥類におけるビタミン要求性の高いことの証左であると考えられる。

これらの結果から、卵胞中のビオチンは、卵胞の成長

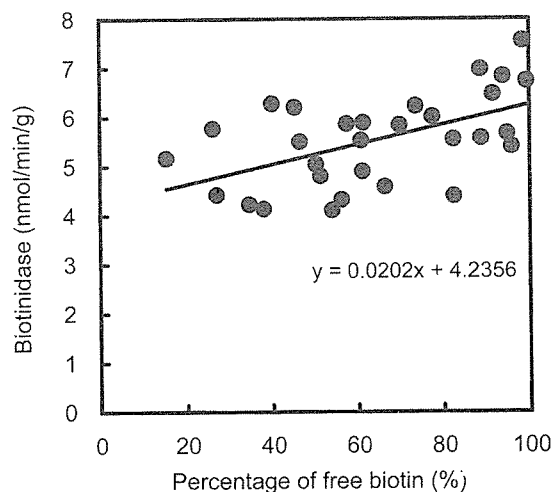


Fig. 3 A linear correlation between biotinidase activity and percentage of free biotin in ovarian follicle. $r = 0.51$, $p < 0.01$ (Spearman rank correlation)

に伴い、とくに排卵直前に卵巣で多量に取り込まれることが明らかになった。また、卵胞の発生初期から成長期にかけて取り込まれたビオチンは結合型で貯蔵され、排卵直前に再び遊離化されることが示唆された。これは、胚の分化や成長の維持に必要なビオチンが、受精後すぐに利用できる状態にするためと考えられる。以上のことから、ビオチンは鳥類の胚の発育における不可欠な栄養素として、大きな役割を担っていることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、試料の提供と採取にご協力いただきました兵庫県立農林水産技術総合センターの太田垣進氏、龍田健氏に深謝致します。

(平成 18.7.31 受付)

文 献

- 1) 日本ビタミン学会編(2002) ビタミン研究のブレイクスルー, pp231-250, 学進出版, 大阪
- 2) Mock DM (2001) Biotin : Handbook of Vitamins. pp397-426, Marcel Dekker., New York
- 3) Cravens WW, McGibbon WH, Sebesta EE (1944) Effect of biotin deficiency on embryonic development in the domestic fowl. *Anat Rec* **90**, 55-64
- 4) Watanabe T (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr* **113**, 574-581
- 5) Watanabe T, Endo A (1989) Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr* **119**, 255-261
- 6) Watanabe T (1993) Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. *J Nutr* **123**, 2101-2108.
- 7) Mock DM, Mock NI, Stewart CW, LaBorde JB, Hansen DK (2003) Marginal biotin deficiency is teratogenic in ICR mice. *J Nutr* **133**, 2519-2525
- 8) Mock DM, Stadler DD, Stratton SL, Mock NI (1997) Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J Nutr* **127**, 710-716
- 9) Zemleni J, Mock DM (2000) Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med* **223**, 14-21
- 10) Mock DM, Quirk JG, Mock NI (2002) Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr* **75**, 295-299
- 11) Coggeshall JC, Hegggers JP, Robson MC, Baker H (1985) Biotin status and plasma glucose in diabetics. *Ann NY Acad Sci* **447**, 389-92
- 12) Reddi A, DeAngelis B, Frank O, Lasker N, Baker H (1988) Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci* **42**, 1323-1330
- 13) Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Fukukawa Y (1999) Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* **10**, 237-243
- 14) Manthey KC, Griffin JB, Zemleni J (2002) Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr* **132**, 887-892
- 15) Couch JR, Cravent WW, Elvehjem CA, Halpin JG (1948) Relation of biotin to congenital deformities in the chick. *Anat Rec* **100**, 29-48
- 16) Whitehead CC (1980) Performance of laying hens fed on practical diets containing different levels of supplemental biotin during the rearing and laying stages. *Br J Nutr* **44**, 151-159
- 17) 奥村純市, 藤原昇(2000) 家禽学, pp40-70, 朝倉書店, 東京
- 18) 加藤嘉太郎(1974) 家畜の解剖と生理, pp343-422, 養賢堂, 東京
- 19) 加藤嘉太郎(1969) 家畜比較発生学, pp8-54, 養賢堂, 東京
- 20) 白井敏雄(1990) 発生学, pp489-539, 西村書店, 東京
- 21) Zakaria AH, Miyaki T, Imai K (1984) The relationships of clutch length and egg position on ovarian follicular growth in laying hens. *Poult Sci* **63**, 1250-1254
- 22) Ronald RE, Landen WO (1998) Biotin : Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. pp478-487, CRC Press., Boca Raton
- 23) Ball GMF (2005) Microbiological methods for the determination of the B-group vitamins. *Vitamins in Food*. pp339-368, CRC Press, Boca Raton
- 24) Fukui T, Iinuma K, Oizumi J (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* **40**, 491-498
- 25) Hymes J, Wolf B (1996) Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* **255**, 1-11
- 26) Wolf B (2005) Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. *J Nutr Biochem* **16**, 441-445
- 27) Wolf B, Guier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL (1983) Biotinidase deficiency : the enzymatic defect in late-onset carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* **131**, 273-281
- 28) Watanabe T, Endo A (1984) Teratogenic effects of avidin-induced biotin deficiency in mice. *Teratology* **30**, 91-94
- 29) Harms RH, Damron BL, Simpson CF (1977) Effect of wet litter and supplemental biotin and/or whey on the production of foot pad dermatitis in broilers. *Poult Sci* **56**, 291-296
- 30) Cravens WW, Sebesta EE, Halpin JG, Hart EB (1942) Effect of biotin on reproduction in the domestic fowl. *Proc Soc Exp Biol Med* **50**, 101-104
- 31) Brewer LE, Edwards HM, Jr (1972) Studies on the biotin requirement of broiler breeders. *Poult Sci* **51**, 619-624
- 32) Atuahene YO, Bernier PE, Roush WA, Arscott GH (1984) Effect of biotin on dermatitis and hatchability in dwarf and normal size single comb white leghorn layers. *Poult Sci* **63**, 580-582
- 33) Bradley JW, Atkinson RL, Krueger WF (1976) Relationship of biotin to reproductive performance of leghorn-type hens. *Poult Sci* **55**, 2490-2492
- 34) Whitehead CC, Pearson RA, Herron KM (1985) Biotin requirements of broiler breeders fed diets of different protein content and effect of insufficient biotin on the viability of progeny. *Br Poult Sci* **26**, 73-82
- 35) Couch JR, Cravens WW, Elvehjem CA, Halpin JG (1948) Relation of carbohydrate to intestinal synthesis of biotin and hatchability in mature fowl. *J Nutr* **35**, 57-72

Effects of Alpha Tocopherol and Probucol Supplements on Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in a Mouse Model of Allergic Asthma

Nami Okamoto^a Takuji Murata^a Hiroshi Tamai^a Hiroyuki Tanaka^b Hiroichi Nagai^b

^aDepartment of Pediatrics, Osaka Medical College, Takatsuki City, and ^bDepartment of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University, Gifu, Japan

Key Words

Asthma model mouse · α -Tocopherol · Probucol · Airway hyperresponsiveness · Cytokine · Oxidative stress

Abstract

Objective: We investigated the role of antioxidants in airway hyperresponsiveness to acetylcholine using young asthma model mice, which were sensitized and stimulated with ovalbumin. **Methods:** The mice had been fed either a normal diet, an α -tocopherol-supplemented diet or a probucol-supplemented diet 14 days before the first sensitization. They were immunized with antigen at intervals of 12 days and, starting from 10 days after the second immunization, they were exposed to antigen 3 times every 4th day using an ultrasonic nebulizer. Twenty-four hours after the last antigen inhalation, airway responsiveness to acetylcholine was measured and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected. A blood and lung tissue study was also carried out. **Results:** Twenty-four hours after the last antigen challenge, both IL-4 and IL-5 in the BALF of α -tocopherol-supplemented mice were significantly decreased. The IL-5 level in probucol-supplemented mice was also decreased, but there was no difference in IL-4 levels. The serum IgE level was decreased in probucol-supplemented mice. Differential cell rates of the fluid revealed a significant decrease in eosinophils due to antioxidant supplementation. Airway hyperresponsiveness to acetylcholine was also repressed in antioxi-

dant-supplemented mice. In histological sections of lung tissue, inflammatory cells and mucus secretion were markedly reduced in antioxidant-supplemented mice. We investigated the antioxidant effect on our model mice by examining 8-isoprostane in BALF and lung tissue, and acrolein in BALF; however, our experiment gave us no evidence of the antioxidant properties of either α -tocopherol or probucol contributing to the reduction of airway inflammation. **Conclusion:** These findings indicate that α -tocopherol and probucol suppress allergic responses in asthma model mice, although these two drugs cause suppression in different ways that are unrelated to antioxidation.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways. The inflammatory cells (neutrophils, eosinophils, and macrophages) infiltrating the airways exist even in patients with mild asthma [1–3]. These cells release H_2O_2 or NO, resulting in the formation of superoxide or peroxynitrite anion [4–11], which are highly reactive oxygen species (ROS) that likely play a major role in asthma and are involved in cellular injury [12]. Increased levels of ROS are shown to be associated with many pathophysiological states and characteristics of asthma, such as increased production of lipid peroxidation, increased air-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2006 S. Karger AG, Basel
1018–2438/06/1412–0172\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/iaa

Correspondence to: Dr. Nami Okamoto
Department of Pediatrics, Osaka Medical College
2-7 Daigaku-cho
Takatsuki City, Osaka Prefecture, 569-8686 (Japan)
Tel. +81 72 683 1221, Fax +81 72 684 5798, E-Mail ped029@poh.osaka-med.ac.jp

Table 1. Composition of the normal diet

Ingredients	Concentration, %
Vitamin-free casein	20.0
DL-Methionine	0.3
Glucose	25.0
Sucrose	25.0
Alpha cornstarch	15.0
Cellulose	5.0
AIN-76 mineral mixture	1.0
AIN-76 vitamin mixture	3.5
Tartaric acid	0.2

The normal diet contains 20 mg α -TOC/kg diet. The α -TOC-supplemented diet was prepared by adding 480 mg α -TOC/kg diet to the normal diet and the 1% probucol diet was prepared by adding 1% v/w probucol to the normal diet. The composition is based on the AIN-76 diet.

way reactivity and secretion, increased production of chemoattractants, and increased vascular permeability [13]. Moreover, eosinophils, macrophages and neutrophils from asthmatic patients produce more ROS than those from normal subjects [14, 15]. On the other hand, changes in the antioxidant defenses of asthmatic patients have been reported, including decreased GSH-Px, selenium deficiency, decreased vitamins C and E, and decreased protein sulfhydryls and total antioxidant capacity in plasma [16–23]. As a result, the oxidant-antioxidant balance shifts toward increased oxidative stress in asthma. Some antioxidant therapies have previously been described as disappointing, but superoxide dismutases and N-acetylcysteine could attenuate the hyperresponsiveness of airways [24–26].

Vitamin E is a potent antioxidant that exists in nature and its relationship with immune functions is becoming clearer. Vitamin E can not only affect the metabolism of arachidonic acid via the 5-lipoxygenase pathway but also modulate the immune function directly through cellular and humoral immunity, and lymphoproliferative response at the thymus [27]. Concerning allergic diseases, it has been reported that vitamin E supplementation can reduce the symptoms and levels of serum immunoglobulin E (IgE) in a mouse model of nasal allergy [28], that there is a significant relationship between dietary vitamin E intake and serum IgE concentration in patients with atopic diseases [29], and that an injection of vitamin E reduced the airway hyperresponsiveness (AHR) of sensitized guinea pigs [30]. Vitamin E is therefore thought to

improve the allergic state both as an antioxidant and immune modulator.

Probucol [4,4'-isopropylidenedithio-bis(2,6-di-tert-butylphenol)] is a lipophilic agent effective for hyperlipidemia and atherosclerosis, and is structurally different from other hypocholesterolemic agents. The antiatherogenic effects of probucol are known to relate not only to the hypocholesterolemic effect but also to the antioxidative effect [31–33]. In plasma, it is transported with lipoproteins, mainly by LDL, and prevents the oxidative modification of LDL by its radical-scavenging property [34]. Furthermore, probucol has a direct effect on macrophage migration without major impairment of the ability of the cells to accumulate and metabolize modified LDL. To clarify the effect of this potent antioxidant on asthma, we examined the possible usefulness of probucol to improve the AHR in a murine model compared with one species of vitamin E, α -tocopherol (α -TOC).

Materials and Methods

Animals

Five-week-old female BALB/C mice, weighing 16–20 g, were purchased from Crea Japan and housed in plastic cages in an air-conditioned room at $23 \pm 2^\circ\text{C}$. The animals were divided into three groups (plus one control group) of 15 mice each. One group was fed a normal diet, one an α -TOC-supplemented diet and one a 1% probucol diet. Experiments were performed following the 1987 Japanese Association for Laboratory Animal Science guidelines for the care and use of experimental animals.

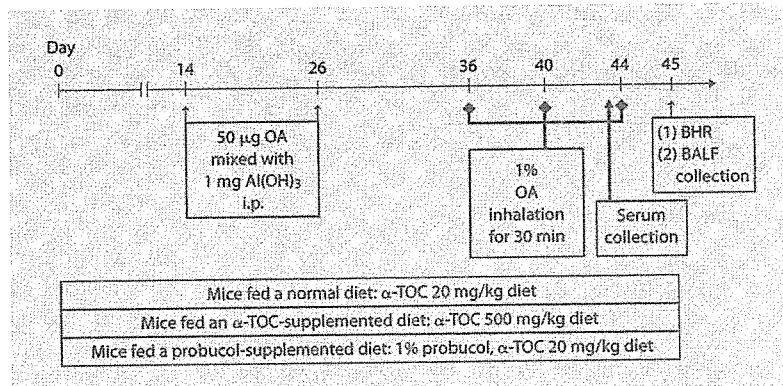
Diets

Normal and α -TOC-supplemented diets were purchased from Funabashi Farm (Chiba, Japan). The 1% probucol diet was made by mixing probucol (Daiichi Seiyaku, Tokyo, Japan) into a normal diet. The normal diet contains 20 mg α -TOC/kg diet and the α -TOC-supplemented diet originally contains 500 mg α -TOC/kg diet. All diets were based on AIN-76 diet (table 1) and prepared by being mixed with stripped corn oil (Tama Biochemical, Tokyo, Japan). The final concentration of corn oil was 9.1% v/w, which falls within the most recent recommended guidelines for the composition of AIN-93G. The diets were stored at -30°C before use. Fresh food was supplied each day.

Sensitization and Antigen Challenge

Figure 1 shows our experimental protocol. All three groups of mice were actively sensitized by intraperitoneal injections of 50 μg ovalbumin (OA; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) with 1 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$: alum (LSL, Tokyo, Japan) on day 14 and day 26. Starting on day 36, they were exposed to OA (1% w/v diluted in sterile saline) for 30 min, 3 times every 4th day according to a previously reported method by Tanaka et al. [35]. Control animals fed a normal diet were injected with 1 mg alum and sterile saline into the peritoneal cavity, and exposed to saline in a similar manner (hereinafter, this group is referred to as 'nonsensitized mice'). The

Fig. 1. Experimental protocol. Mice were fed either a normal diet, an α -TOC-supplemented diet or a probucol-supplemented diet. They were sensitized by intraperitoneal injections (i.p.) of 50 μ g OA with 1 mg Al(OH)₃ on day 14 and day 26, and were exposed to 1% OA for 30 min on day 36 and then twice every 4th day. Nonsensitized mice were injected with Al(OH)₃ only and exposed to saline in a similar manner. Sera were obtained prior to the final antigen provocation. 24 h after the last antigen challenge, the mice were anesthetized and AHR to Ach was measured and BALF was obtained. BHR = Bronchial hyperresponsiveness.



aerosol (particle size: 1–8 μ m) was generated using an ultrasonic nebulizer (NE-U12; Omron, Tokyo, Japan), which filled a cylindrical chamber (diameter 12 cm, height 17 cm), in which the mice were exposed.

Measurement of IgE

Just before the final allergen challenge, blood was collected from amputated tail ends. Sera were obtained by centrifugation and stored at -80°C . Values of IgE in mice sera were measured using the Rbis-IgE-ELISA kit for mice (Shibayagi, Gunma, Japan). Briefly, serum IgE was measured by coating monoclonal rat anti-mouse IgE antibodies. After being blocked with 1% BSA, serum dilutions were incubated for 2 h, then biotinylated-anti-mouse IgE antibodies and peroxidase-conjugated streptavidin were added. Sequentially diluted monoclonal mouse IgE antibodies were used as a standard. Optical densities of the enzymatic reactions were read using an automatic ELISA plate reader (Immuno Mini NJ-2300, Nalge Nunc Int., Tokyo, Japan) at 450 nm.

Detection of α -TOC and Probucol

Concentrations of α -TOC and probucol were detected using an HPLC system with an electrochemical detector (Shiseido, Tokyo, Japan). An LC-18 column (Supelco, Tokyo, Japan) was used with an eluent of methanol/NaClO₄ containing 50 mM NaClO₄ at a flow rate of 1 ml/min. The concentration of α -TOC was calculated by comparing the area under the curve (AUC) with that of an internal standard. The concentration of probucol was calculated from AUC using a standard curve [36].

Measurement of Airway Function

Measurement of bronchial responsiveness to acetylcholine chloride (Ach; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) was carried out according to a modified method previously described [35]. Ten of the 15 mice in each group were anesthetized with pentobarbital sodium salt (Tokyo Kasei, Tokyo, Japan; 80 mg/kg) and a 26-gauge needle was inserted into the jugular vein to inject several doses of Ach. Mice were injected with pancronium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA; 0.1 mg/kg) intravenously to suppress spontaneous respiration. After disclosing the trachea, an 18-gauge cannula was inserted and the mice were ventilated with

a rodent ventilator (SN-480-7; Shinano, Tokyo, Japan) at 0.2-ml tidal volume and 120 strokes/min. Bronchoconstriction was measured directly using a respiratory amplifier (AR-601G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) connected to the tracheal cannula. Changes in bronchial responsiveness to Ach were measured with doses of 62.5, 125, 250, 500, 1,000 and 2,000 μ g/kg of Ach. We defined the area enclosed with the dose-response curve for Ach and each baseline of airway resistance as the AUC [35].

Bronchoalveolar Lavage Study

To evaluate the airway inflammation, we studied the accumulation of inflammatory cells and cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). After measuring airway function, the mice were anesthetized with intraperitoneal injections of pentobarbital sodium salt (150 mg/kg). We used calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline [PBS(-); Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan] containing 0.1% bovine serum albumin (BSA; Biotecx Laboratories, Houston, Tex., USA) and 0.05 mM disodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA-2Na; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) as a solution to collect the BALF. A cannula was inserted into the trachea and 1 ml solution was pumped in and out 4 times, sending it back and forth through the air lumen. This procedure was repeated 3 times (total volume, 3 ml) and about 90% of the injected solution was collected. The BALF of each animal was centrifuged at 1,500 rpm for 10 min. Cell pellets were floated in a 20% BSA solution (20 μ l), then smeared onto slide glasses and stained with hematoxylin and eosin. Values of interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5) and interferon- γ (IFN- γ) in BALF were measured with ELISA kits (Endogen Mouse Interleukin-4 ELISA, Endogen Mouse Interleukin-5 ELISA, Mouse Interferon Gamma ELISA; Endogen, Cambridge, Mass., USA).

Histological Study

Five of 15 mice in each group were euthanized 24 h after the third antigen inhalation. Whole lungs were distended by 10% buffered formalin injected via the trachea. The tissues were then clamped at the trachea, excised from the bodies and immersed in the same fixative for 24 h. Tissues were sliced at 6- μ m thickness, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin, and Luna.

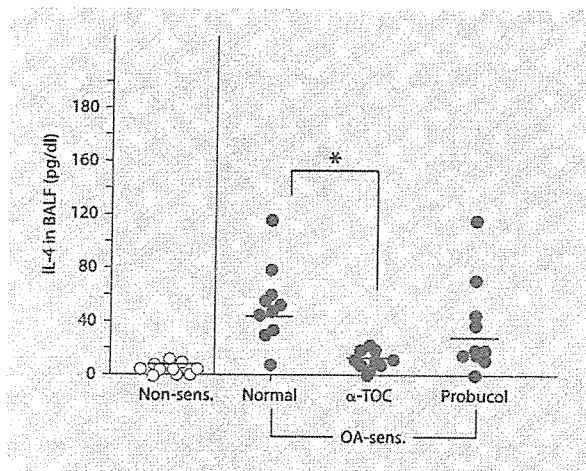


Fig. 2. IL-4 level in BALF was significantly increased by OA sensitization and exposure ($p < 0.005$). In mice fed an α -TOC diet, IL-4 level in BALF was decreased ($* p < 0.05$). Non-sens.: nonsensitized mice; normal: injected with saline and exposed to saline; OA-sens.: sensitized and exposed to OA.

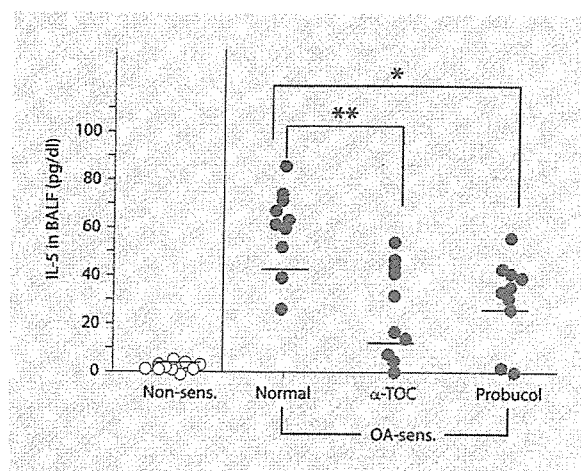


Fig. 3. IL-5 level in BALF was significantly increased by OA sensitization and exposure ($p < 0.05$). This level was decreased both in mice fed an α -TOC-supplemented and a probucol diet compared to mice fed a normal diet. $* p < 0.05$; $** p < 0.001$.

Measurement of Oxidative Stress, 8-Isoprostane and Acrolein

Total 8-isoprostane values in BALF and lung tissue were quantified with an 8-isoprostane EIA kit (Cayman, Ann Arbor, Mich., USA). One milliliter of BALF or supernatant fluid of homogenized lung tissue in saline was incubated with KOH, and all 8-isoprostane was eluted to ethanol. The supernatant was diluted with ultrapure water and acidified with HCl. The samples were then extracted on C18 Sep-Pak cartridges (Waters, Milford, Mass., USA), which had been activated by rinsing first with methanol, then HCl of pH 3.0. After passing the samples through, the cartridges were rinsed first with HCl of pH 3.0, and then with heptane. The samples were eluted on anhydrous sodium sulfate (Wako, Osaka, Japan) with ethyl acetane-containing heptane, and extracted again on Silica Sep-Pak cartridges (Waters), which had been activated by rinsing first with methanol, then ethyl acetane. After the samples were passed through, the cartridges were rinsed again with ethyl acetane. Finally, purified 8-isoprostane was eluted with ethyl acetane-containing methanol. These solvents were evaporated and the samples were reconstituted with an assay buffer.

Acrolein ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$; ACR) in BALF was measured with the ACR-lysine adduct ELISA system (NOF Medical Department, Tokyo, Japan).

Statistical Analyses

Data were presented as the mean \pm SEM. Statistical analysis of data was performed by ANOVA. The significance of the difference between nonsensitized and OA-sensitized animals, and between animals on a normal diet and an antioxidant-supplemented diet sensitized by OA was estimated using Fisher's protected least significant difference. p values less than 0.05 were considered significant.

Results

Serum Concentration of α -TOC and Probulcol

The mean concentrations of serum α -TOC in mice with normal diet and mice with α -TOC-supplemented diet were 213 ± 73 and 651 ± 67 $\mu\text{g/ml}$, respectively ($p < 0.001$). The mean concentration of serum probucol in mice receiving the probucol-supplemented diet was 33.7 ± 9.8 $\mu\text{g/ml}$, which is almost the same as that of humans who take probucol as medication.

IL-4, IL-5 and IFN- γ Levels in BALF

IL-4 levels in BALF of mice fed a normal diet were significantly increased by OA sensitization and exposure compared with nonsensitized mice ($p < 0.05$). Those of α -TOC-fed mice were significantly decreased compared with normal diet mice ($p < 0.05$) and, conversely, those of probucol-fed mice were not different from mice fed a normal diet and significantly increased compared with nonsensitized mice ($p < 0.05$) (fig. 2). IL-5 levels in BALF of mice fed a normal diet were significantly increased compared with nonsensitized mice ($p < 0.005$). Those of α -TOC-fed mice and probucol-fed mice were both significantly decreased compared with mice fed a normal diet ($p < 0.05$) (fig. 3). IFN- γ levels of mice fed a normal diet were significantly decreased compared with nonsensitized mice ($p < 0.0005$). There was no difference in the

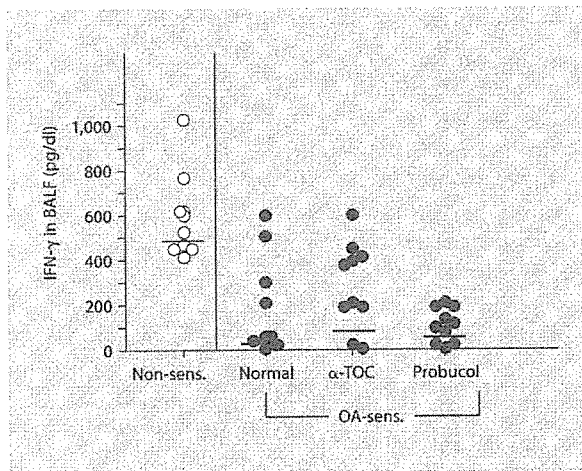


Fig. 4. IFN- γ level in BALF was decreased by OA sensitization and exposure ($p < 0.005$). There was no difference between levels in mice fed a normal, an α -TOC and a probucol diet.

IFN- γ levels of each diet group sensitized and exposed to OA and these were significantly decreased compared with nonsensitized mice (fig. 4).

Serum IgE Level

Serum IgE levels in mice fed a normal diet were significantly elevated by sensitization and exposure to OA compared with nonsensitized mice ($p < 0.0005$). Those of probucol-fed mice were significantly decreased ($p < 0.05$). There was no difference in the levels of mice fed a normal diet and α -TOC-fed mice (fig. 5).

Eosinophil Rates in BALF

Eosinophil rates in BALF of mice fed a normal diet were significantly increased by sensitization and exposure to OA compared with nonsensitized mice ($p < 0.0005$). Those of α -TOC-fed mice and probucol-fed mice were significantly decreased compared with mice fed a normal diet ($p < 0.005$) (fig. 6).

Airway Responsiveness to Ach

Figure 7 shows the dose-response curve of airway responsiveness to Ach after repeated antigen inhalation in each group. A curve of nonsensitized mice is also presented as a control and AHR was not found in these animals. The dose-response curve of airway responsiveness to Ach was shifted leftward in mice fed a normal diet af-

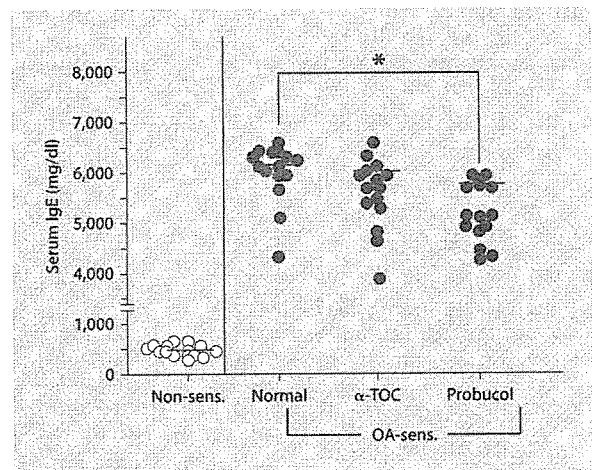


Fig. 5. Serum IgE level was increased by OA sensitization and exposure ($p < 0.005$). That of mice fed a probucol diet was significantly decreased compared with mice fed a normal diet. * $p < 0.05$.

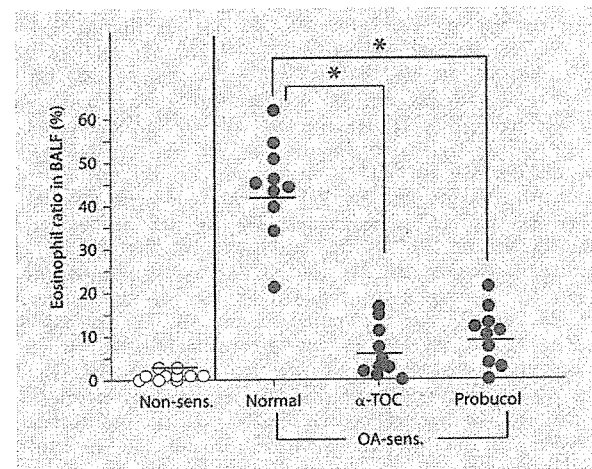


Fig. 6. Ratio of eosinophils to whole cells in BALF was significantly elevated by OA sensitization and exposure ($p < 0.005$). This ratio was decreased in both mice fed an α -TOC and a probucol diet. * $p < 0.05$.

ter repeated allergen provocation and AUC was significantly increased compared with that of nonsensitized mice (943.61 ± 58.3 vs. 655.52 ± 17.4). The degree of airway responsiveness to Ach was smaller both in

Fig. 7. Airway responsiveness to Ach 24 h after the final antigen challenge (mean \pm SD). The AUC was calculated from the dose-response curve for Ach. AUC of mice fed a normal diet was significantly larger than that of nonsensitized mice ($p < 0.05$). AUC of mice fed an α -TOC-supplemented diet and mice fed a probucol diet was significantly smaller than that of mice fed a normal diet ($p < 0.05$).

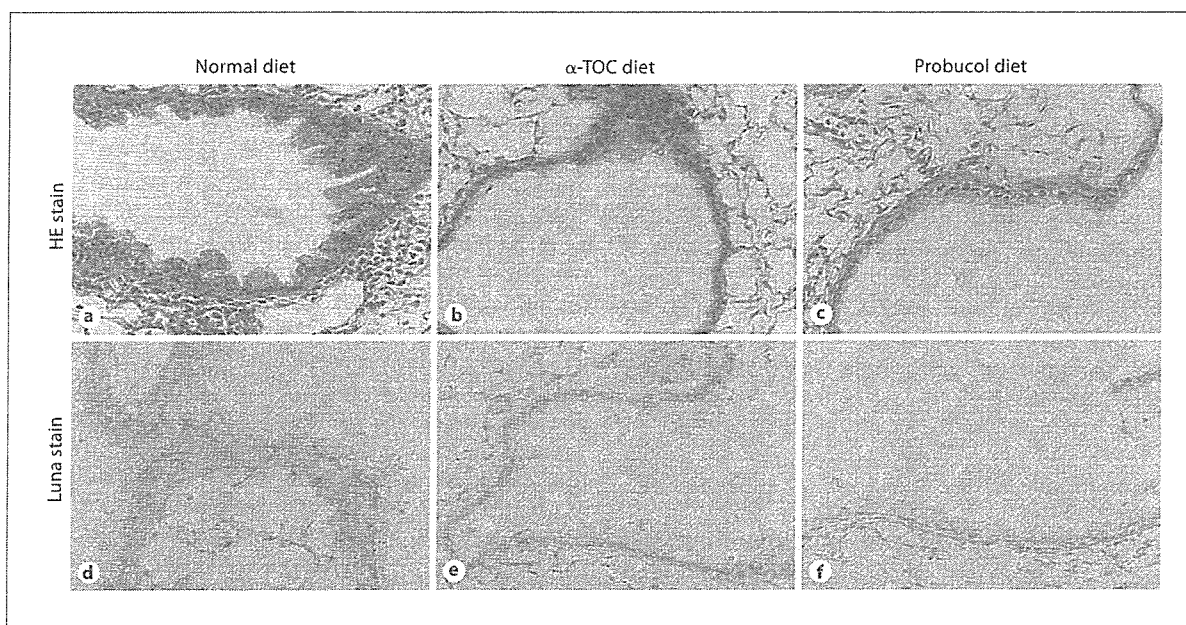
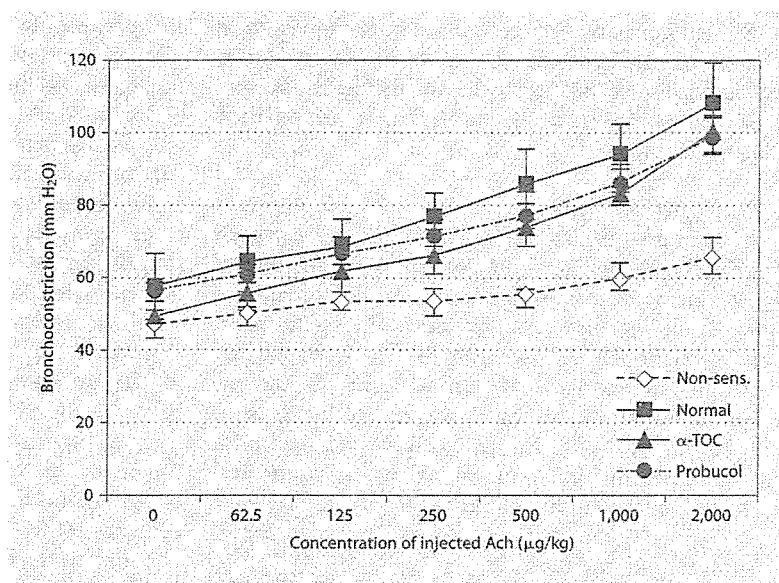


Fig. 8. Histological analysis of lung sections from mice fed a normal diet, an α -TOC diet and a probucol diet. Tissues were stained with hematoxylin and eosin (a-c) and with Luna (d-f). a, d Airway mucus hypersecretion and the infiltration of eosinophils were seen in mice fed a normal diet. b, c, e, f These findings were not detected in mice fed an α -TOC diet and a probucol diet. $\times 400$.

α -TOC-fed mice and in probucol-fed mice than in mice fed a normal diet, and the AUC of α -TOC-fed mice and probucol-fed mice (827.89 ± 23.9 and 890.94 ± 38.2 , respectively) was significantly smaller than that of mice fed a normal diet ($p < 0.05$).

Histological Analysis

We examined the histology of 5 of the 15 mice in each group and made 5 slices from each mouse. The lungs of nonsensitized mice showed normal histology (data not shown). Similar to the results in the BALF study, histological sections of lung tissue from mice fed a normal diet sensitized and provoked with OA exhibited obvious eosinophilic inflammation and airway mucus hypersecretion (fig. 8a, d). α -TOC-fed mice and probucol-fed mice had a marked reduction in airway inflammation and mucus secretion in their bronchiolus (fig. 8b, c, e, f).

8-Isoprostane and Acrolein

The levels of 8-isoprostane in BALF of nonsensitized, normal-diet, α -TOC and probucol group were 366.69 ± 107.44 , 248.24 ± 177.32 , 276.54 ± 61.21 and 264.61 ± 51.99 pg/ml, respectively. There was no difference between sensitized mice groups. The levels of 8-isoprostane in lung tissue of the nonsensitized, normal-diet, α -TOC and probucol group were 447.77 ± 44.00 , $1,629.37 \pm 164.44$, $1,716.75 \pm 395.80$ and $1,843.904 \pm 272.88$ pg/mg, respectively. Those of sensitized mice were significantly increased compared with that of nonsensitized mice ($p < 0.05$), but there was no difference between all three sensitized groups. The levels of acrolein in BALF of the nonsensitized, normal-diet, α -TOC and probucol group were 27.74 ± 5.88 , 48.93 ± 8.54 , 50.48 ± 16.10 and 52.49 ± 14.42 nmol/ml, respectively. These results are statistically almost identical between the three sensitized groups, though it was significantly increased by OA sensitization ($p < 0.05$).

Discussion

In our study, we found that repeated exposure of a sensitized animal to antigen caused a significant increase in several markers of airway inflammation and bronchial responsiveness to Ach, and that these effects were inhibited by both α -TOC and probucol supplements; however, some factors were different in each group. Eosinophil infiltration in BALF and lungs, the values of IL-5 in BALF and serum IgE levels after the final antigen provocation were all significantly decreased in both α -TOC-fed mice

and probucol-fed mice in comparison with mice fed a normal diet. On the other hand, the values of IL-4 in BALF after the final antigen inhalation were significantly decreased in α -TOC-fed mice, and were significantly increased in probucol-fed mice in comparison with mice fed a normal diet. These results indicate that both α -TOC and probucol, which are known to relieve oxidative stress, could also decrease airway inflammation and AHR in sensitized animals. However, we were unable to find any difference in 8-isoprostane and acrolein levels between the three groups. 8-Isoprostanes are arachidonate products formed on membrane phospholipids by the activity of ROS and represent a quantitative measurement of oxidant stress in vivo [37]. Acrolein has a strong cytotoxicity and is also increased by lipid oxidation. We expected the effects of α -TOC and probucol as antioxidants on asthma model mice; however, our experiment gave us no evidence of the antioxidant properties of these drugs contributing to the reduction of airway inflammation. This fact suggests that these drugs could influence the immune system directly (although in different ways), and not merely through the oxidative pathway. Further studies into the usefulness of these products for asthma model mice should be performed.

There have been a few recent reports indicating that α -TOC has a modulating effect on the immune system. Zheng et al. [28] reported that higher doses of vitamin E supplementation may suppress both nasal allergic responses and the increase of serum IgE in nasal allergy model mice sensitized by TDI. They investigated splenocyte proliferation and cytokine production from splenocytes, and found that vitamin E could influence the immune responses directly. Fogarty et al. [29] investigated the relationship between dietary vitamin E intake and serum IgE concentrations and atopy in a random sample of 2,633 adults. They reported that higher concentrations of vitamin E intake were associated with lower serum IgE concentrations and a lower frequency of allergen sensitization. Tsourei-Nikita et al. [38] investigated the dietary intake of vitamin E in patients with atopic dermatitis and found that there were negative correlations between vitamin E intake, and both serum IgE levels and clinical manifestations. Initially, vitamin E, which is a potent antioxidant, exhibited the ability to enhance both cellular and humoral immunity in vitro and in vivo. The results of our study and former findings suggest that vitamin E can play an important role in IgE-mediated atopic responses to allergic stimuli by decreasing the serum IgE levels. For this reason, vitamin E is now thought to be an immune regulator.