

牛乳脂肪に特徴的な共役型リノール酸の生理機能解析に関する基礎的研究：とくに免疫制御機能発現の増強化

熊本県立大学生活科学部 教授 菅野道廣
九州大学農学部 教授 山田耕路

1. 緒言

共役型リノール酸 (conjugated linoleic acid、以下CLAと略称する) はリノール酸の位置および幾何異性体の総称で、図1に示すような数種の異性体からなっている。この脂肪酸は、反芻動物の反芻胃内微生物によって飼料中のリノール酸からつくられるので、それら動物の体脂肪、乳脂肪中に少量成分ながら常在している¹⁻⁶⁾。その他、単胃動物でも腸内細菌によっても生成する可能性が指摘されており、また畜産食品の加熱に際して、あるいはリノール酸の過酸化に際しても生成する¹⁻⁶⁾。

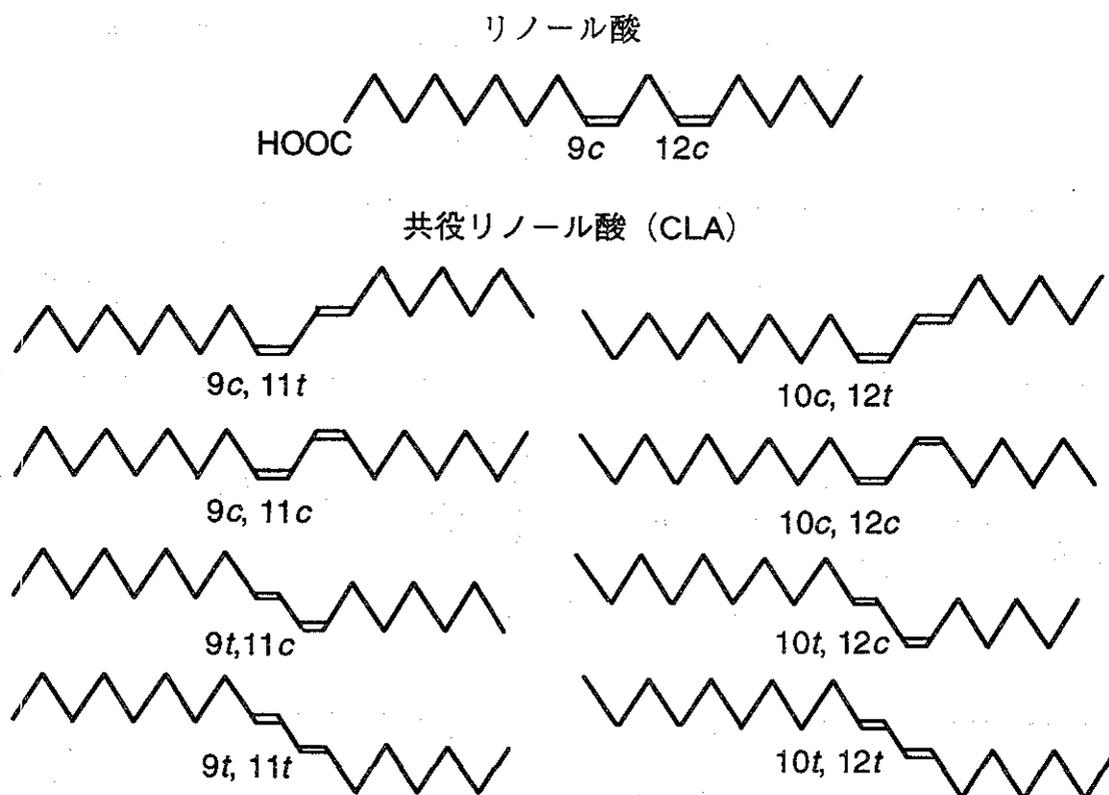


図1. 共役リノール酸の構造式

CLAの生理機能に関する研究は、加熱した肉類中の発癌物質検索の過程で抗変異原活性をもつ成分として見いだされたことに端を発している¹⁻⁶⁾。そしてCLAは乳癌をはじめとするいくつかの癌に対し優れた抗癌作用を示すことが確かめられてきている¹⁻⁶⁾。その活性は、同様な抗癌作用を示すn-3系多価不飽和脂肪酸に比べ少なくとも10倍以上に及ぶと見なされている。作用機構はまだ十分には解明

されていないが、発癌抑制に対してCLAを必ずしも継続して摂取する必要はないことも知られてきている^{7, 8)}。

CLAにはこの他、動脈硬化抑制、肥満防止、飼料効率の向上などの多彩な機能が報告されている¹⁻⁶⁾。これらの作用についてもメカニズムは明らかではないが、このような多様な機能性の背景にエイコサノイド産生への影響が関与していることは十分推測される。われわれは、食餌中のn-6系多価不飽和脂肪酸の発癌促進作用の一因と考えられているプロスタグランジンE₂ (PGE₂)の組織濃度が、CLAの摂取によって低下することを観察し、CLAがリノール酸からアラキドン酸、そしてエイコサノイドに至る代謝系に影響する可能性を指摘した⁹⁾。これに加え、CLAそれ自身が不飽和化、長鎖化を受け¹⁰⁾、まだ証明されていないがエイコサノイドの基質となり得ることも考えられた。

このような仮説が証明されれば、摂取する多価不飽和脂肪酸の種類に依存している多くの疾病に対し、CLAがきわめて有用な効果を発現することが期待される。そこで、そのような疾病の一つで近年わが国でも増加の一途をたどっている食物アレルギー^{11, 12)}に焦点を当て本研究を行った。食物アレルギーの臨床症状は、アレルゲン特異的なイムノグロブリンE (IgE)が引き金となるヒスタミンやロイコトリエン、プロスタグランジンなどのケミカルメディエーターの産生によって引き起こされる^{13, 14)}。

われわれは先に、ラットにおいてCLAが典型的なケミカルメディエーターの一つであるPGE₂の血清濃度を低下させることを観察した⁹⁾。このことに関連し、BeluryとKempa-Steczko¹⁵⁾はCLAが摂取量に依存して肝臓リン脂質中のリノール酸の割合を減少させることを認め、肝外組織でのアラキドン酸からのエイコサノイドの産生にCLAが影響するのではないかと示唆している。またWongら¹⁶⁾は、CLAがリンパ細胞の増殖などを介して、ある種の免疫防御機構に影響する可能性を報告している。

このような研究は、われわれの報告を除いてわが国ではまったく行われていない。そこで、本研究においては、脂質栄養学と食物アレルギー学の専門家の協同態勢を構築し、食物アレルギーに関わる免疫機能への影響を検討することにした。そのため、まず、細胞レベルでのCLAの効果調べ、それと平行して動物個体レベルでの実験を実施した。さらに、動物実験では食餌構成によるCLA効果の増強を目途した実験にも着手した。これらの研究は、きわめて斬新かつ画期的なものであり、共役リノール酸は飽和脂肪の典型として忌避されがちな反芻動物の脂肪中に含まれる神様が授けた特別の脂肪酸として、その機能性に期待できる知見をもたらすものである。

2. 実験方法

本研究は、細胞レベルから実験動物の個体レベルの研究へと展開し、共役型リノール酸が食物アレルギーに関連する免疫機能に及ぼす効果を中心に解析し、ヒトへの適用のための基礎知見を得ることに焦点を置いている。

(1) 細胞レベルでの実験 (九州大学農学部 山田耕路教授分担)

a) 好塩基球および腹腔浸出細胞によるケミカルメディエーター放出測定法

ラット好塩基球細胞 (rat basophilic leukemia cells, RBL-2H3 cells、日本癌研究資源バンク) を用い検討した。この細胞を10%牛胎児血清 (Intergen Co., NY) を含むRPMI 1640培地中で、37°C、10% CO₂/90%空気を通気して24時間培養した。ついで、リノール酸あるいはCLAのジメチルスルフォキシド (DMSO) 溶液を添加した培地で37°Cでさらに48時間培養した。0.5mM EDTAを含むリン酸緩衝液 (Ca²⁺およびMg²⁺を含まない) で緩衝した生理食塩水の0.05%トリプシン溶液で細胞を剥がした後、Tyrode緩衝液で洗浄し、懸濁してヒスタミン放出分析に供した。なお、細胞の生存度はトリパンブルー染色により測定した。CLAで処理した細胞の95%以上が生存していることが確かめられたので、本脂肪酸の毒性はこの実験条件下では無視できるものであることが示された。

LTB₄放出に関しては、8週齢のWistar系雄ラット (成和実験動物研究所) から腹腔浸出細胞を集め (方法は動物実験の項参照)、リノール酸あるいはCLAの存在下で、カルシウムイオノフォアA 23187を添加し、37°Cで20分間培養した。培養液についてHPLC法でLTB₄を測定した (方法は動物実験の項参照)。

b) 脾臓および腸管膜リンパ節リンパ球によるイムノグロブリン産生の測定法

10週齢のWistar系雄ラットから脾臓および腸管膜リンパ節を摘出し、リンパ球を調製した後 (方法は動物実験の項参照)、リノール酸およびCLAをDMSO溶液として加えた培地中で培養した。培養後、上清中のイムノグロブリン濃度をELISA法で測定した。

(2) 動物個体レベルでの実験 (熊本県立大学 菅野道廣分担)

a) CLAの調製法

CLAはIp¹⁷⁾の方法を参照して調製した。すなわち、純度99%以上のリノール酸 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 50gを15gのNaOHを含むエチレングリコール290gに溶解し、窒素気流下で180°Cで2時間加熱した。室温に冷却後、内容物のpHを4に調整し、n-ヘキサンで抽出した。ヘキサン層を5%NaClで洗浄後、3-A molecular sieves (Nacalai Tesqu) で脱水し、窒素気流下でロータリーエバポレーターで乾燥させた。CLAの純度はガスクロマトグラフィー (島津製作所GC-17A) により行った。カラムはSupercowax 10 (0.32mm×60m、フィルム厚0.25mm、Supelco Inc., Bellefonte, PA) を用い、カラム温度は150から220°Cの4°C/分の昇温条件とした。ピークの同定はequivalent chainlength法¹⁸⁾およびガスクロマトーマススペクトル法 (Jeol Auto MS 50) によって行った。調製したCLA標品の純度は80.7%で、組成は9c, 11t/9t, 11c 29.8% ; 10t, 12c 29.6% ; 9c, 11c 1.3% ; 10c, 12c 1.0% ; 9t, 11t/10t, 12t 18.6%, リノール酸5.6%およびその他の脂肪酸13.7%であった。

b) 飼料および実験動物の飼育法

動物実験は熊本県立大学の実験動物飼育ガイドラインに従って行った。雄の4週齢Sprague-

Dawleyラット(日本チャールスリバー)を1匹ずつ飼育かごに入れ、温度20-23℃、照明8~20時の条件で飼育した。4日間飼育環境に慣らした後、各群10匹の3群に分け、実験食を自由に摂食させた。飼料はAmerican Institute of Nutritionの推奨食(AIN-93G)に準じ調製した¹⁹⁾。すなわち基本組成は飼料100g当たりg数で以下の通りである。コーンスターチ39.8；カゼイン20.0；糊化コーンスターチ13.2；蔗糖10.0；大豆油7.0；AIN-93ミネラル混合3.5；AIN-93ビタミン混合1.0；L-シスチン0.3；重酒石酸コリン0.25；セルコース5.0；*tert*-butyl-hydroquinone 0.002；およびリノール酸1.0(コントロール群)、リノール酸：CLA0.5:0.5あるいはCLA1.0であった。つまり、AIN-93G飼料中の大豆油の一部をリノール酸あるいはCLAで置き換えた飼料である。個々の油脂の脂肪酸組成分析の結果から計算で求めた飼料中の油脂の脂肪酸組成では、CLAの割合は0.5%および1.0%群でそれぞれ3.6%および7.2%であり、その分だけリノール酸の割合が少なくなっている以外、他の脂肪酸の組成には差はなかった(表1)。体重と飼料摂取量は隔日毎に記録した。3週間の飼育後、5匹のラットは腹腔浸細胞の調製のために屠殺し、残りを別の分析のために用いた。エチルエーテル麻酔下で腹部大動脈から採血した後、直ちに組織を摘出した。

表1. 食餌脂肪の脂肪酸組成

脂肪酸	食餌群		
	対照	0.5% CLA	1.0% CLA
16:0	9.7	9.7	9.7
18:0	3.4	3.4	3.4
18:1	21.7	21.7	21.7
CLA	-	3.6	7.2
18:2	57.2	53.6	50.0
18:3	8.0	8.0	8.0

脂肪酸組成は個々の脂質成分(共役リノール酸および大豆油)の脂肪酸組成からの計算値。

c) 腹腔内浸出細胞の分離法

Matsuoら²⁰⁾の方法に従い腹腔浸出細胞(peritoneal exudate cells, PEC)を分離した。Tyrode緩衝液(pH7.3, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.4mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂ · 6H₂O, 12mM NaHCO₃, 1.8mM CaCl₂ · 2H₂O, 5.6mM D-glucoseおよび牛血清0.1%fraction Vを含む)を腹腔内に注入し(体重100g当たり6ml)、腹部を2分間ゆるやかにマッサージした。ついで、開腹し、PECを含む緩衝液をプラスチック製ピペットで回収し、4℃、200xgで5分間遠心分離し上清を捨て、細

胞沈殿物をTyrode緩衝液に再分散させた。

d) ロイコトリエンB₄およびヒスタミンの測定法

ロイコトリエンB₄ (LTB₄) はすでに報告している方法で測定した²¹⁻²²⁾。すなわち、PEC(細胞数2×10⁶個)を5mMのカルシウムイオノフォア(Sigma Chemical Co.)を含むTyrode緩衝液に懸濁し、37℃で20分間インキュベートした後、50mlのアセトニトリル-メタノール混液(6:5, v/v)と内部標準として50ngのPGB₂(Sigma Chemical Co.)を加えた。この溶液を-20℃で30分間放置した後、1,000xgで10分間遠心分離した。上清を4-GV 0.22μm filter(Millipore Corp.)で濾過し、試料とした。LTB₄はODS-Aカラム(150×6.0mm, 5μl粒子サイズ、YMC)を用い、逆相HPLC(島津製作所製、SCL-10A)で測定した²³⁾。5mMの酢酸アンモニウムと1mMのEDTA・2Naを含むpH4.5のアセトニトリル:メタノール:水の混液(30:25:45, v/v/v)を移動相として用い、毎分1.1mlの流速で展開した。LTB₄とPGB₂は280nmで検出した。培養上清中のヒスタミン含量は蛍光法より測定した^{20, 24)}。細胞内ヒスタミン含量は超音波処理により細胞を破壊した後、同様に測定した。

e) 脾臓および腸管膜リンパ節リンパ球の調製法

脾臓および腸管膜リンパ節(mesenteric lymph node、MLN)は大動脈採血後直ちに摘出し、RPMI 1640培地(日水薬品)中に浸漬した。リンパ球は同じ培地で3回洗浄し、組織残渣を濾別した。繊維芽細胞を除去するため、5mlの細胞懸濁液を4mlのLympholyte-Rat(Cedarlane, Hornby, Canada)に上層させ、1,500xgで30分間遠心分離した。中間のリンパ球層を回収し、細胞を再度洗浄した。リンパ球はリポポリサッカライド(Bacto-lipopolysaccharide B, *Escherichia coli* 026:B6, Difco Labs. Detroit, MI)の添加あるいは無添加の条件で、10%牛胎児血清(Intergen, Purchase, NY)を含むRPMI培地で細胞密度2.5×10⁶個/mlの条件で培養した。37℃で24および72時間培養した後、上清中のIgA、IgG、IgMおよびIgE濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した²⁵⁾。

f) T細胞サブセットの分析法

脾臓とMLNのリンパ球のCD⁴⁺およびCD⁸⁺細胞は、蛍光標識したマウス抗-CD4抗体(W3/5, mouse IgG1)およびフィコエリスリンで標識したマウス抗CD8抗体(MRC OX-8, mouse IgG1)を用い分析した^{25, 26)}。これらの抗体はSerotec Ltd., Kindlington, Oxford, UKから購入した。染色したリンパ球は2%パラホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメーター(EPICS Profile II, Coulter Electronics Ltd., Luton, UK)で解析した。

g) ELISA法による血清および細胞培養上清中のイムノグロブリンの定量法

総イムノグロブリンの測定はサンドウィッチELISA法で行った²⁷⁾。個々のイムノグロブリンを固定するのにヤギ抗ラットIgE、ウサギ抗ラットIgG(Fab')₂、ヤギ抗ラットIgM(いずれもBiosoft, Paris)、およびマウス抗ラットIgA(Zymed Lab., San Francisco, CA)を用いた。これらの抗体は50mM炭酸塩-重炭酸塩緩衝液(pH9.6)で1,000倍希釈し、96穴プレートの各wellをこの希釈した血清100μlで37℃で1時間(IgAについては2時間)処理した。300μlのブロッキング液で4℃で一夜処理しブロックした後、各wellを100μlの希釈血清あるいは培養上清で37℃で1時間(IgAについては2

時間)処理した。結合したIgAは、100 μ lのペルオキシダーゼ抱合ウサギ抗ラットIgA(1,000倍希釈、Zymed)で37 $^{\circ}$ Cで2時間、IgGは100 μ lのペルオキシダーゼ抱合ウサギ抗ラットIgG(Fab')₂(2,000倍希釈、Cappel, West Chester, PA)そしてIgMは100 μ lのペルオキシダーゼを抱合させたヤギ抗ラットIgM(1,000倍希釈、Cappel)で37 $^{\circ}$ Cで1時間、順次反応させ測定した。各反応過程毎に、wellはリン酸塩で緩衝化したTween 20を含む生理食塩水溶液で3回洗浄した。1.5% 蔞酸溶液100 μ lを加え37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベート後、ELISAリーダー(MPR-A4i, Tosoh)を用い415nmで吸光度を測定した。結合したIgEはビオチン抱合マウス抗ラットIgE(2,000倍希釈、Betyl, Montgomery, TX)と反応させた後、ペルオキシダーゼ抱合アビジン(5,000倍希釈、Zymed Lab)と37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ検出した。

h) 統計処理法

得られた結果は一元配置分散分析を行った後、Duncanのnew multiple-range testによって統計有意差を検定した²⁸⁾。この報告では測定値は平均値 \pm SEで示した。

3. 結 果

(1) 細胞レベルでの実験

a) ケミカルメディエーターの放出に及ぼす影響

RBL-2H3細胞をリノール酸あるいはCLAと共に培養した場合、CLAの細胞への取込は主要構成成分である9c, 11t/9t, 11c型および10t, 12c型ではそれぞれ約20%で、リノール酸の約2倍近く高かった。しかし、トランス・トランス型では取込は低く、約4%であった。RBL-2H3細胞に対し、毒性を示さない濃度範囲(0.01~1.0mM)で、ヒスタミンの放出の程度にはリノール酸とCLAとの間にはっきりとした差は認められなかった。また、LTB₄放出に対しても上記の添加量の範囲で両脂肪酸の間に差はなかった(データは示していない)。

b) イムノグロブリン産生に及ぼす影響

種々の濃度で培地中に添加したリノール酸あるいはCLAの脾臓リンパ球によるイムノグロブリン産生の結果は図2に示している。このリンパ球ではIgMおよびIgGについて測定した。必ずしも添加濃度に依存した一定の応答は得られなかったが、両脂肪酸で同じ応答パターンが観察され、高濃度ではIgM、IgGとも産生は抑えられた。一方、腸管膜リンパ節リンパ球では、リノール酸の場合には低下傾向を示し、とくにIgGの産生低下は添加量に依存した。CLAではいずれの濃度でも影響は認められなかった(図3)。また、別の実験でIgA産生への影響を調べた結果、100 μ M添加ではリノール酸の場合にのみ低下が認められた(データは示していない)。

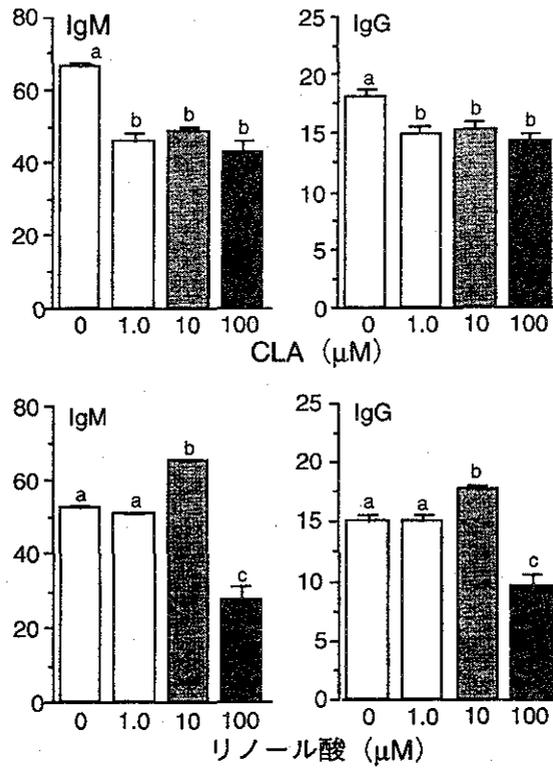


図2. ラット脾臓リンパ球によるイムノグロブリン産生に及ぼすリノール酸とCLAの影響.

5匹の平均値 (ng/ml) ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

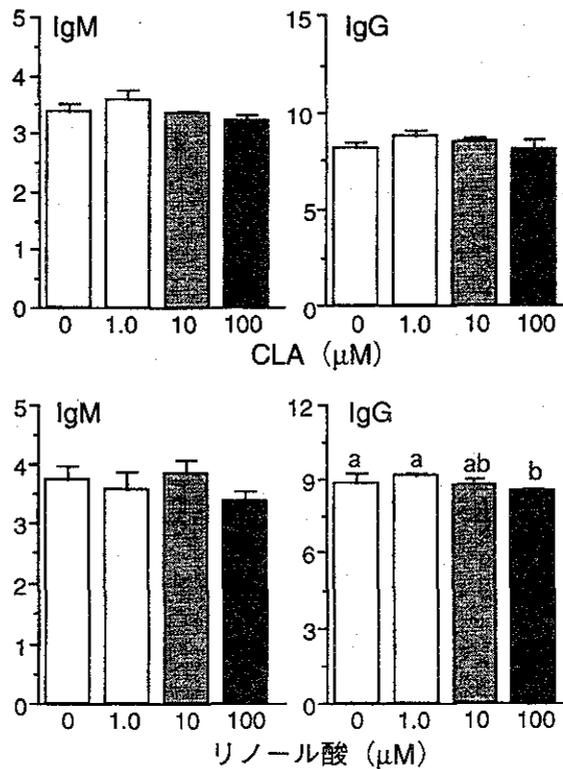


図3. ラット腸管膜リンパ節リンパ球によるイムノグロブリン産生に及ぼすリノール酸とCLAの影響.

5匹の平均値 (ng/ml) ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $P < 0.05$.

(2) 動物個体レベルでの実験

a) ラットの成長と組織重量

表2に示すように、3週間の飼育期間中におけるラット飼料摂取量および成長に各群間で差は認められなかった。したがって、飼料効率も3群間で同じであった(平均値0.41~0.42)。秤量したいくつかの組織のうち、食餌CLAの摂取によって肝臓重量は増加し、腎臓周辺脂肪組織の重量は減少する傾向にあり、リノール酸群と1%CLA群との間でその差は有意であった。

表2. 共役リノール酸のラットの成長および組織重量に及ぼす影響

パラメーター	食餌群		
	対照	0.5% CLA	1.0% CLA
初体重 (g)	102 ± 1	101 ± 1	102 ± 1
終体重 (g)	170 ± 2	166 ± 3	162 ± 4
飼料摂取量 (g/日)	19.1 ± 0.2	18.9 ± 0.3	18.6 ± 0.3
組織重量 (g/100 g体重)			
肝臓	4.17 ± 0.09 ^a	4.11 ± 0.09 ^a	4.54 ± 0.07 ^b
腎臓	0.85 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.87 ± 0.05
腎臓周辺脂肪組織	1.41 ± 0.07 ^a	1.09 ± 0.09 ^{ab}	0.97 ± 0.14 ^b
心臓	0.40 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.34 ± 0.04
肺	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0.01
脾臓	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.02
脳	0.66 ± 0.02	0.70 ± 0.01	0.70 ± 0.01
辜丸	0.96 ± 0.04	0.87 ± 0.10	1.00 ± 0.03

5匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

b) 腹腔浸出細胞からのケミカルメディエーターの放出

実験食を摂取したラットから単離した腹腔内浸出細胞(PEC)をカルシウムイオノフォアA23187の添加・無添加の条件下でインキュベートし、培地中のヒスタミンおよびロイコトリエン(LTB₄)濃度を測定した。細胞内のヒスタミン含量も測定した。図4に示すように、ヒスタミンの放出に及ぼすCLAの影響は一定でなく、どの測定値にも群間で有意な差は認められなかった。しかし、細胞内ヒスタミン量は食餌のCLAレベルが増すと減少する傾向にあった。LTB₄放出も食餌のCLAレベルに応じて減少する傾向を示したが、差は有意ではなかった。

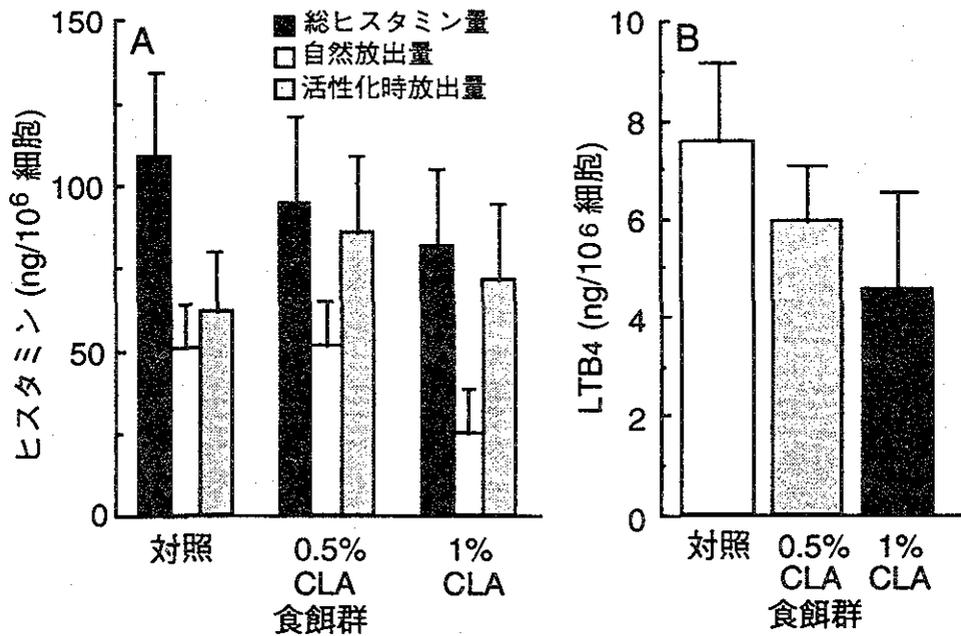


図4. 共役リノール酸(CLA)の腹腔浸出細胞のヒスタミン含量と放出(A)およびロイコトリエンB₄ (LTB₄)放出(B)に及ぼす影響.

5匹の平均値±SE. ヒスタミンの放出はカルシウムイオノホアA23187の添加・無添加の条件で測定した.

c) 組織のエイコサノイドレベル

脾臓のLTB₄および肺のLTC₄レベルに及ぼすCLAの影響を図5にまとめている。CLAは投与量依存的に脾臓のLTB₄レベルを低下させ、LTC₄レベルにはCLAの影響は見られなかった。しかし、

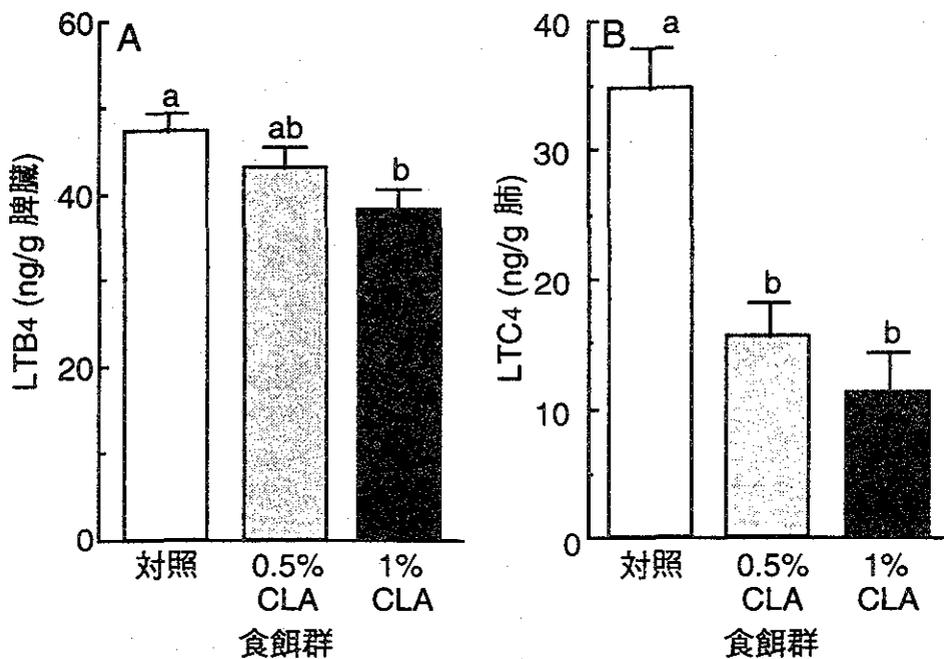


図5. 共役リノール酸(CLA)の脾臓のロイコトリエンB₄ (LTB₄) (A)および肺のロイコトリエンC₄ (LTC₄) (B)濃度に及ぼす影響.

5匹の平均値±SE. 異なった文字間で有意差あり、p<0.05.

肺ではLTC₄濃度はCLA摂取で低下し、0.5%レベルでも有意に低下した。LTB₄濃度も低下傾向を示したが、有意な差は認められなかった。脾臓および血清のプロスタグランジンE₂(PGE₂)の測定結果を図6に示している。CLAの摂取によって血清のPGE₂は有意に低下したが、脾臓のPGE₂レベルには影響はなかった。

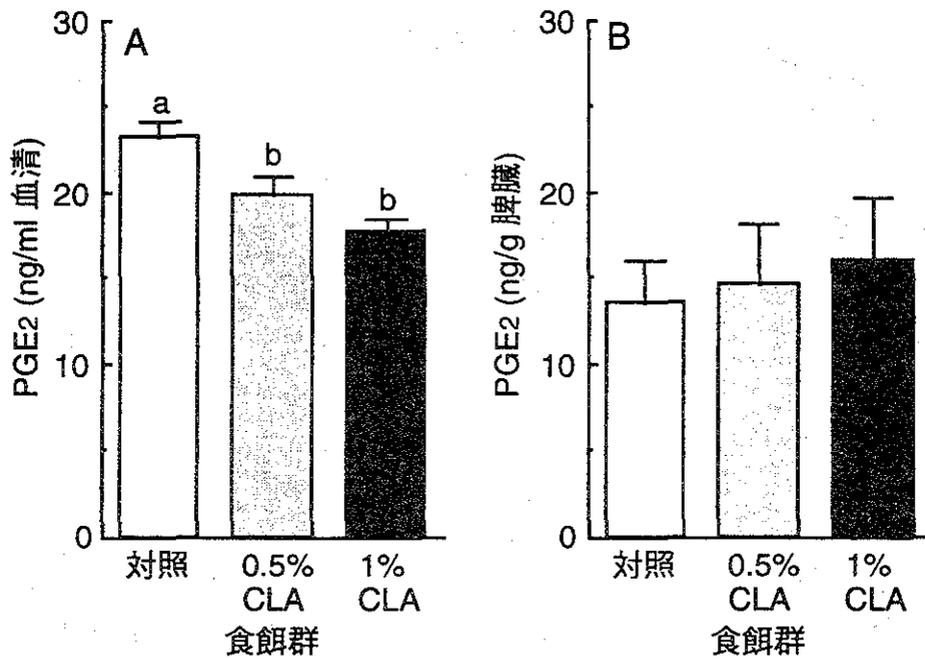


図6. 共役リノール酸(CLA)の血清(A)および脾臓(B)のプロスタグランジンE₂(PGE₂)濃度に及ぼす影響。

5匹の平均値±SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

d) 腹腔浸出細胞および脾臓リンパ球脂質の脂肪酸組成

PECと脾臓リンパ球の総脂質の多価不飽和脂肪酸組成を表3に示している。CLAの摂取量に依存してPEC脂質中ではすべてのn-6系多価不飽和脂肪酸(18:2, 20:3, 20:4および22:4)の割合が減少した。同様の低下が脾臓リンパ球脂質で観察され、20:4n-6の減少は1%CLA食群では有意であった。22:6n-3も低下傾向にあった。このようなCLAの摂取による多価不飽和脂肪酸の割合の低下は、主として主要な飽和脂肪酸の軽度の増加によるものであり、オレイン酸は多価不飽和脂肪酸と同様、低下傾向を示した。

表3. 共役リノール酸の腹腔内浸出細胞および脾臓リンパ球の総脂質中の多価不飽和脂肪酸組成に及ぼす影響。

脂肪酸	食餌群		
	対照	0.5% CLA	1.0% CLA
(Weight %)			
腹腔浸出細胞			
18:2n-6	5.5	5.3	4.2
20:3n-6	0.8	0.7	nd
20:4n-6	12.7	11.3	9.0
22:4n-6	5.6	5.3	4.2
22:6n-3	0.6	0.6	0.5
CLA			
9 <i>t</i> ,11 <i>c</i> /9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	nd	0.1	0.2
10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	nd	0.2	0.2
脾臓リンパ球			
18:2n-6	12.2 ± 0.8	10.4 ± 0.9	9.3 ± 0.9
20:3n-6	1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.1
20:4n-6	20.2 ± 0.8 ^a	15.4 ± 1.3 ^{ab}	14.7 ± 1.7 ^b
22:4n-6	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.2
22:6n-3	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
CLA			
9 <i>t</i> ,11 <i>c</i> /9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	nd	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0

腹腔内浸出細胞は2プール試料の平均値、脾臓リンパ球は3～5匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

e) 血清のチオバルビツール酸(TBA)価

血清中のTBA反応性物質の濃度は食餌CLAの影響を受けず、すべての群のラットでその値は4.1～5.5ng/mlの範囲であった。

f) 血清のイムノグロブリンレベル

CLAは血清のIgA、IgGおよびIgM濃度を上昇させ、IgE濃度を低下させた。これらのイムノグロブリン濃度には、対照群と1%CLA群との間で有意な差が認められた。

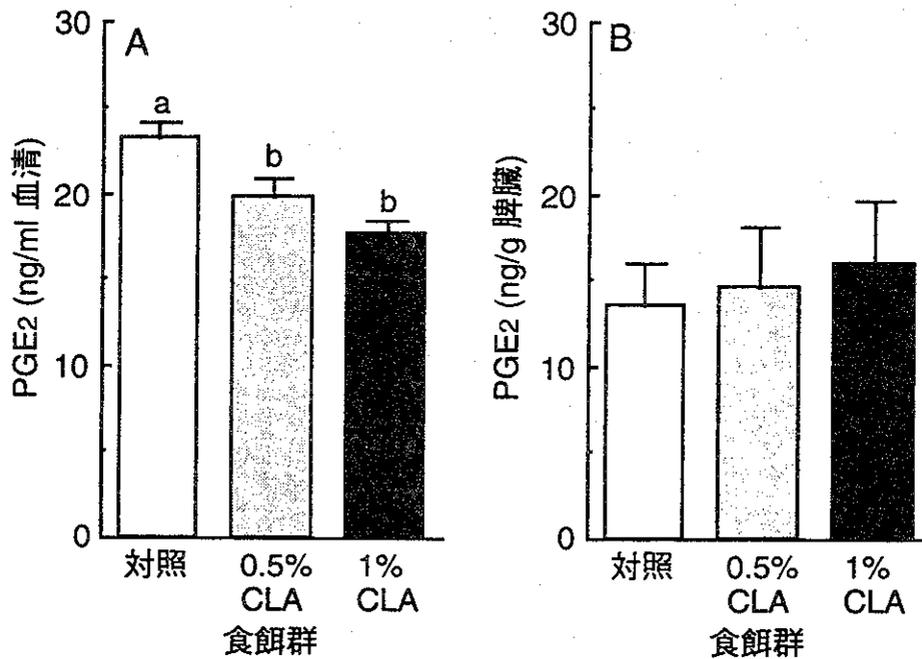


図6. 共役リノール酸(CLA)の血清(A)および脾臓(B)のプロスタグランジンE₂(PGE₂)濃度に及ぼす影響.

5匹の平均値±SE. 異なった文字間で有意差あり、p<0.05.

g) 脾臓および腸管膜リンパ節リンパ球のイムノグロブリンレベル

表4にリポポリサッカライド添加・無添加でラットの脾臓およびMLNリンパ球を72時間培養した際の培地中のイムノグロブリン濃度を示している。リポポリサッカライド添加の有無にかかわらず、CLAは脾臓リンパ球でのイムノグロブリンレベルに影響しなかった。例外はリポポリサッカライド添加時のIgMレベルで、CLAは投与量依存性に増加させた。同じ条件下で、CLAはMLN

表4. 共役リノール酸の脾臓および腸管膜リンパ節リンパ球による免疫グロブリン産生への影響

イムノグロブリン	リポポリサッカライド無添加			リポポリサッカライド添加		
	対照	0.5% CLA	1% CLA	対照	0.5% CLA	1% CLA
脾臓リンパ球						
IgA (ng/ml)	3.75 ± 1.23	4.83 ± 0.99	3.78 ± 0.96	9.74 ± 2.45	13.6 ± 3.27	8.30 ± 2.50
IgG (ng/ml)	51.0 ± 4.6	53.8 ± 2.3	61.5 ± 2.8	68.1 ± 2.4	71.9 ± 1.9	74.4 ± 1.9
IgM (ng/ml)	223 ± 22	228 ± 6	246 ± 9	311 ± 9 ^A	348 ± 8 ^B	394 ± 6 ^C
IgE (ng/ml)	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
腸管膜リンパ節リンパ球						
IgA (ng/ml)	1.65 ± 0.13 ^a	4.78 ± 1.77 ^b	5.05 ± 0.10 ^b	2.91 ± 0.23 ^A	8.72 ± 0.90 ^B	22.3 ± 0.7 ^C
IgG (ng/ml)	検出せず	3.08 ± 0.69 ^a	28.1 ± 4.38 ^b	検出せず	4.64 ± 0.11 ^A	31.9 ± 4.1 ^B
IgM (ng/ml)	1.86 ± 0.34 ^a	4.74 ± 0.50 ^a	96.6 ± 13.4 ^b	2.85 ± 0.44 ^A	6.36 ± 0.48 ^B	122 ± 9 ^C
IgE (ng/ml)	3.81 ± 0.32	4.02 ± 0.33	3.64 ± 0.47	4.81 ± 0.17 ^A	4.52 ± 0.29 ^A	3.74 ± 0.21 ^B

5匹の平均値±SE. 異なった文字間で有意差あり、P<0.05.

リンパ球でのIgA、IgGおよびIgM濃度を上昇させ、上昇の程度は1%CLA群でとくに顕著であった。これに対し、IgEレベルは1%CLA食を摂取したラットからのリンパ球をリポポリサッカライド存在下でインキュベートした場合、対照群に比べ有意に低下した。なお、同様な結果が細胞を24時間培養した場合にも観察された。

h) 腸管膜リンパ節リンパ球のサブセット

MLNのT-リンパ球の構成をCD⁴⁺およびCD⁸⁺サブセットとして分析した。CLAはこれらのサブセット相対的割合に影響を及ぼさなかった(CD⁴⁺/CD⁸⁺比は対照群、0.5%CLA群および1%CLA群でそれぞれ2.6±0.3, 2.4±0.2および2.8±0.1)。

4. 考 察

リノール酸からアラキドン酸、そしてエイコサノイドが産生される経路は、多くの代謝性疾患にかかわるきわめて重要な反応系である^{29, 30)}。食物アレルギーもそのような疾患の一つで、ある種のエイコサノイドがケミカルメディエーターとして過敏反応の臨床症状発現にかかわっていることが知られている^{3, 14)}。そして、ロイコトリエン産生阻害剤が現在では臨床的に適用されている^{31, 32)}。しかしながら、この代謝系に及ぼす食品成分の影響についてはあまり知られていない。いくつかの食品成分が*in vitro*でエイコサノイド産生を低下させることが示されているが、その効率が限られているために、実践上からは満足のいく成績はない^{22, 23)}。本研究の結果は、CLAが効果的にLTB₄、LTC₄およびPGE₂の産生を制御することを示した。CLAは肺でのLTC₄産生を有意に低下させたが、脾臓では効果はなかった。同様な組織特異的なLTC₄産生の低下が、セサミンと α -トコフェロールを同時に与えたラットでも認められているが、脾臓ではLTC₄でなくLTB₄のみ低下した^{22, 23)}。これらの観察は、食餌脂肪と抗酸化剤との間でロイコトリエン産生系において複雑な相互作用が働いていることを示唆している。

多くの動物実験で、食餌の多価不飽和脂肪酸が効果的にエイコサノイド産生を修飾し、n-6系とn-3系との間で相互作用があることが知られている³³⁾。n-3系の多価不飽和脂肪酸はアラキドン酸からのエイコサノイド産生を抑制し、乳癌や結腸癌の発癌を明らかに抑える^{34, 35)}。しかし、n-3系多価不飽和脂肪酸の制癌効果はCLAに比べるとはるかに低い^{1, 6)}。エイコサノイド産生は基質となる脂肪酸の有効性に依存することが示されている³⁶⁾。CLAは、肝臓や他の組織で見られているのと同様に^{9, 15)}、免疫細胞中のアラキドン酸を含むn-6系多価不飽和脂肪酸の割合を低下させた。PECについては脂肪分析に供する試料の量が限られていたため、2~3匹のラットからプールした2試料について分析を行った。したがって、この分析数から明確な結論を導くことは難しいが、PECの脂肪酸組成もまた脾臓リンパ球と同様に応答したとみなすことができるようである。この低下は、少なくともこれらの細胞でのロイコトリエンやプロスタグランジンの産生低下に関連するであろう。CLAは肝臓での脂肪酸の代謝的転換に影響し、究極的には肝外組織での脂肪酸組成、そしてアラキドン酸由来のエイコサノイド産生を修飾することになる¹⁵⁾。しかし、CLAの代謝物がもっと直接的に関与していることも無視できな

い^{10, 37)}。つまるところ、本研究の結果は食品によって引き起こされるアレルギー反応を制御するのに、CLAは有用な化合物であることを示している。CLAのイムノグロブリン産生に及ぼす影響がMLNリンパ球と脾臓リンパ球との間で異なったことから、前者の脂肪酸組成を分析すれば、作用機構の理解に資する知見が得られるであろう。

エイコサノイド産生とは対照的に、肥満細胞の受容体非依存性の脱顆粒を反映しているPECからのヒスタミンの放出は、CLA、そしてもっと直接的には膜リン脂質の脂肪酸組成によって修飾されなかった。Englesら³⁸⁾は、食餌脂肪の種類、すなわち肥満細胞のリン脂質の脂肪酸組成の変化がこの細胞の脱顆粒に影響しないことを観察している。CLAは腫瘍細胞ではリン脂質よりもトリグリセリドにより多く取り込まれることが報告されている⁸⁾。つまり、CLAは膜リン脂質の脂肪酸組成には大きな影響は及ぼさず、したがって、膜の構造や機能にも影響しないようである。そのような環境では、肥満細胞の脱顆粒はあまり変化しないと考えられる。

興味ある観察は、CLAがイムノグロブリンの産生をクラス特異的に制御するという点である。食物アレルギー反応はアレルゲン特異的なIgEの産生が引き金となる^{13, 14)}。IgAはこれとは対照的に、腸からのアレルゲンの吸収に干渉することにより、また、IgGはアレルゲンが肥満細胞や好塩基球などの標識細胞の表面の受容体と結合することを妨げ抗アレルゲン因子として働く^{13, 14)}。CLAは、細胞賦活化因子であるリポポリサッカライドの存否にかかわらず、リンパ球、とくにMLNリンパ球でのIgAやIgGの産生を上昇させ、逆にIgE産生を抑えた。脾臓リンパ球のCLAに対する応答はあまり明確ではなく、リポポリサッカライド賦活化後のIgMの有意ではあるが僅かな増加が認められただけであった。しかし、血清ではMLNリンパ球の場合と同様な応答パターンが観察されたことから、CLAは身体全体のレベルでもイムノグロブリンレベルを好ましい方向に修飾することができることが指摘された。胆汁酸²⁵⁾と不飽和脂肪酸²⁶⁾もまた抗体産生をクラス特異的に調節するが、作用の様式はCLAとは異なっているようである。胆汁酸や不飽和脂肪酸はIgE産生を高め、IgAやIgGの産生を抑えることによってアレルギー応答を促進すると考えられている。このように、IgEとIgA、IgGの産生は逆方向に制御されているようである。つまり、CLAはエイコサノイド産生に対する好ましい影響に加えて、イムノグロブリン産生への影響をも併せて、食物アレルギー反応を緩和するものと期待された。

この実験で摂取されたCLAの量は0.5%と1%の食餌レベルで、それぞれ約30および60mg/100g体重に相当する。このような量はヒトに外挿すると体重60kgの場合1日当たり18および36gとなり、薬理的なレベルである。しかし、ヒトでの肥満改善の場合には、1日当たり約3gを2～3カ月間与えられているので²⁾、長期の摂取はより低い投与量で好ましい効果をもたらすかも知れない。それで、低い食餌レベルでの長期飼育試験が今後必要である。

細胞ないしはリンパ球をCLAあるいはリノール酸と共に培養した場合、CLAがとくに毒性を示すことはなかった。RBL-2H3細胞へのCLAの取込は、主要成分についてはリノール酸の約2倍にも及ぶことから、この脂肪酸が細胞内で何らかの機能性を発現することが推察された。しかし、ヒスタミンやLTB₄の放出に対しては、CLAが特別の影響を及ぼすことは認められなかった。

一方、脾臓リンパ球をCLAと共に培養した場合には、IgMおよびIgG産生は低下傾向を示した。しかし、検討した最高濃度では、リノール酸の低下作用のほうが明らかに強いようであった。

結論として、CLAは食物アレルギー反応を緩和する好ましい環境をもたらした。この効果は0.5%あるいは1%という低レベルでも認められるので、CLAは種々の代謝過程を強く制御できるようである。予め免疫をかけた動物での研究によって、これらの問題に対するより直接的な知見がもたらされるであろう。いずれにしても、これらの成績から、臨床試験が待たれる。In vitroでの成績は、摂食実験と一致しない点があったが、免疫細胞に取り込まれやすいという観察は、この脂肪酸の高い機能性と何らかの関係があるのではないかと考えられた。

5. 要 約

好塩基球を用いたin vitroでの培養実験では、CLAはケミカルメディエーターの放出に一定の影響を及ぼさず、ラット腹腔浸出細胞によるイムノグロブリンの産生をむしろ低下させる傾向にあった。In vitroでの結果の解釈には注意が必要である。

一方、ラットでの摂食実験では、飼料中に0.5%および1.0%レベルでCLAを添加し14日間飼育した結果、腹腔内浸出細胞からのLTB₄の放出は投与量に依存して低下したが、ヒスタミン放出に対しては影響しなかった。同様な投与量依存性の応答が脾臓、肺および血清で観察され、それぞれLTB₄、LTC₄およびPGE₂が低下し、1.0%CLA食では差は有意であった。このような応答は、浸出細胞や脾臓リンパ球でのn-6系多価不飽和脂肪酸の割合の減少によるものとみなされた。1.0%CLAの摂取により、脾臓のIgA、IgGおよびIgM濃度は上昇し、IgEは逆に低下した。MLNリンパ球でも同様の応答があったが、T-リンパ球のサブセットには影響は認められなかった。これらの結果から、CLAは食物アレルギー反応を緩和する可能性が指摘された。

謝辞：本研究は、牛乳栄養学術助成金の援助によって行われた。ここに深甚の謝意を表する。

6. 引用文献

- 1) Belury, M. S. and Vanden Hauvel, J. P. (1997) Protection against cancer and heart disease by CLA : potential mechanisms of action. *Nutr. Disease Update*, 1, 58-63.
- 2) 池田郁男 (1998) 共役リノール酸の生理作用. 生物機能研究会誌, 2, 35-43.
- 3) Ip, C., Scimeca, J. A. and Thompson, H. J. (1994) Conjugated Linoleic Acid. A Powerful Anticarcinogen from Animal Fat Sources. *Cancer*, 74, 1050-1054.
- 4) Belury, M. A. (1995) Conjugated Dienoic Linoleate : A Polyunsaturated Fatty Acid with Unique Chemo-protective Properties. *Nutr. Rev.*, 53, 83-89.

- 5) Haumann, B. F. (1996) Conjugated Linoleic Acid Offers Research Promise. *INFORM*, 7, 152-159.
- 6) Ip, C. (1996) in *Breast Cancer-Advances in Biology and Therapeutics* (Calvo, F., Crepin, M. and Magdelenat, H. eds.) pp. 53-58, John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, France.
- 7) Ip, C. and Scimeca, J. A. (1997) Conjugated Linoleic Acid and Linoleic Acid are Distinctive Modulators of Mammary Carcinogenesis. *Nutr. Cancer*, 27, 131-135
- 8) Ip, C., Jiang, C., Thompson, H. J. and Scimeca, J. A. (1997) Retention of Conjugated Linoleic Acid in the Mammary Gland Is Associated with Tumor Inhibition During the Post-initiation Phase of Carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18, 755-759.
- 9) Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Yamada, K., Ikeda, I. and Kritchevsky, D. (1997) Lymphatic Recovery, Tissue Distribution, and Metabolic Effects of Conjugated Linoleic Acid in Rats. *J. Nutr. Biochem.*, 8, 38-43.
- 10) Sebedio, J. L., Juaneda, P., Dobson, G., Ramilison, I., Martin, J. D. and Chardigny, J. M. (1997) Metabolites of Conjugated Isomers of Linoleic Acid (CLA) in the Rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1345, 5-10.
- 11) Calder, P. C. (1995) Fatty Acids, Dietary Lipids and Lymphocyte Functions. *Biochem. Soc. Transact.* 23, 302-309.
- 12) Zurier, R. B. (1993) Fatty Acids, Inflammation and Immune Responses. *Prostagl. Leukotr. Essen. Fatty Acids*, 48, 57-62.
- 13) Metcalfe, D. D. (1991) Food Allergy. *Curr. Opinion Immunol.*, 3, 881-886.
- 14) Lemke, P. J. and Taylor, S. L. (1994) in *Nutritional Toxicology* (Kotsonis, F. N., Mackey, H and Hjelle, J., eds.) pp. 117-137, Raven Press, Ltd., New York.
- 15) Belury, M. A. and Kempa-Steczko, A. (1997) Conjugated Linoleic Acid Modulates Hepatic Lipid Composition in Mice. *Lipids*, 32, 199-204.
- 16) Wong, M. W., Chew, B. P., Wong, T. S., Hosick, H. L., Boylston, T. D. and Shultz, T. D. (1997) Effects of Dietary Conjugated Linoleic acid on Lymphocyte Function and Growth of Mammary Tumors in Mice. *Anticancer Res.*, 17, 987-993.
- 17) Ip, C., Chin, A. F., Scimeca, J. A. and Pariza, M. W. (1991) Mammary Cancer Prevention by Conjugated Dienoic Derivative of Linoleic Acid. *Cancer Res.*, 69, 6118-6124.
- 18) Ha, Y. L., Grimm, N. K. and Pariza, M. W. (1989) Newly Recognized Anticarcinogenic Fatty Acids : Identification and Quantification in Natural and Processed Cheeses. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 75-81
- 19) Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, G. C. (1993) AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodens : Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.*, 123, 1939-1951.
- 20) Matsuo, N., Yamada, K., Yamashita, K., Shoji, K., Mori, M. and Sugano, M. (1995) Inhibitory Effect of Tea Polyphenols on Histamine and Leukotriene B₄ Release from Rat Peritoneal Exudate Cells. *In Vitro*

Cell. Develop. Biol., 32, 340-344.

- 21) Powell, W. S. (1987) Precolumn Extraction and Reversed-phase High Pressure Liquid Chromatography of Prostaglandins and Leukotrienes. *Anal. Biochem.*, 164, 117-131.
- 22) Gu, J.-Y., Nonaka, M., Yamada, K., Yoshimura, K., Takasugi, M., Ito, Y. and Sugano, M. (1994) Effect of sesamin and α -tocopherol on the production of chemical mediators and immunoglobulins in Brown-Norway rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1855-1858.
- 23) Gu, J.-Y., Wakizono, Y., Tsujita, A., Lim, B. O., Nonaka, M., Yamada, K. and Sugano, M. (1995) Effect of Sesamin and α -Tocopherol, Individually or in Combination, on the Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism, Chemical Mediator Production, and Immunoglobulin Levels in Sprague-Dawley Rat. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 2198-2202.
- 24) Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. (1959) A Method for the Fluometric Assay of Histamine in Tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 127, 182-186.
- 25) Lim, B. O., Yamada, K. and Sugano, M. (1994) Effect of Bile Acids and Lectins on Immunoglobulin Production in Rat Mesenteric Lymph Node Lymphocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30A, 407-413.
- 26) Yamada, K., Hung, P., Yoshimura, K., Taniguchi, S., Lim, B. O. and Sugano, M. (1996) Effect of Unsaturated Fatty Acids and Antioxidants on Immunoglobulin Production by Mesenteric Lymph Node Lymphocytes of Sprague-Dawley Rats. *J. Biochem.*, 120, 138-144.
- 27) Lim, B. O., Yamada, K., Nonaka, M., Kuramoto, Y., Hung, P. and Sugano, M. (1997) Dietary Fibers Modulate Indices of Intestinal Immune Function in Rats. *J. Nutr.*, 127, 663-667.
- 28) Duncan, D. B. (1995) Multiple Range and Multiple F Test. *Biometrics*, 11, 1-42.
- 29) Kinsella, J. E., Lokesh, B., Broughton, S. and Whelan, J. (1990) Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids : Potential Effects on the Modulation of Inflammatory and Immune Cells : An Overview. *Nutrition*, 6, 24-44.
- 30) Holman, R. T. (1997) in *Handbook of Essential Fatty Acid Biology* (Yehuda, S. and Mostofsky, D. I., eds.) pp. 139-182, Humana Press, Totowa, NJ.
- 31) Harris, R. A., Cater, G. W., Bell, R. L., Moore, J. L. and Brooks, D. W. (1995) Clinical Activity of Leukotriene Inhibitors. *Int. J. Immunopharmac.*, 17, 147-156.
- 32) Ara, G. and Teicher, B. A. (1996) Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitors in Cancer Therapy. *Prostaglandins Leukotr. Essen. Fatty Acids*, 54, 3-16.
- 33) Simopoulos, A. P. (1996) in *Handbook of Lipids In Human Nutrition* (Spiller, G. A., ed.) pp. 51-73, CRC Press, Inc., New York.
- 34) Carroll, K. K. (1991) Dietary Fat and Cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1064S-1067S.
- 35) Glauert, H. P. (1992) in *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications* (Chow, C. K., ed.) pp. 753-768, Marcel Dekker, Inc., New York.

- 36) Lee, H. L., Ikeda, I. and Sugano, M. (1992) Effects of Dietary n-6/n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Balance on Tissue Lipid Levels, Fatty Acid Patterns, and Eicosanoid Production in Rats. *Nutrition*, 8, 162-166.
- 37) Ip, C., Briggs, S. P., Haegele, A. D., Thompson, H. J., Storkson, J. and Scimeca, J. A. (1996) The Efficacy of Conjugated Linoleic Acid in Mammary Cancer Prevention Is Independent of the Level or Type of Fat in the Diet. *Carcinogenesis*, 17, 1045-1050.
- 38) Engels, W., VanHaaster, C. M. C. J., Lemmens, P. J. M. R., VanderVusse, G. J. and Hornstra, G. (1997) Dietary Modulation of Fatty Acid Composition of Mast Cell Phospholipids Does Not Affect Histamine Release Induced by Compound 48/80. *Inflammation Res.*, 46, 185-190.

追 記

食餌成分によるCLAの効果増強に関する実験として、食餌タンパク質の種類の影響について検討した。この実験は現在進行中であるので、予備的成績として報告する。

Sprague-Dawley系雄ラットを上述の飼育実験と同様な飼料で3週間飼育した。タンパク質源としてカゼインおよび大豆タンパク質を用い、脂肪としてはエゴマ油を用いた。その結果、ラットの成長、臓器重量については同様な結果が得られた。種々の組織の脂肪酸組成を分析した結果、図8に示すように、CLAの取り込みは組織によってかなり異なり、また、軽度ではあるが両タンパク質間でCLAの

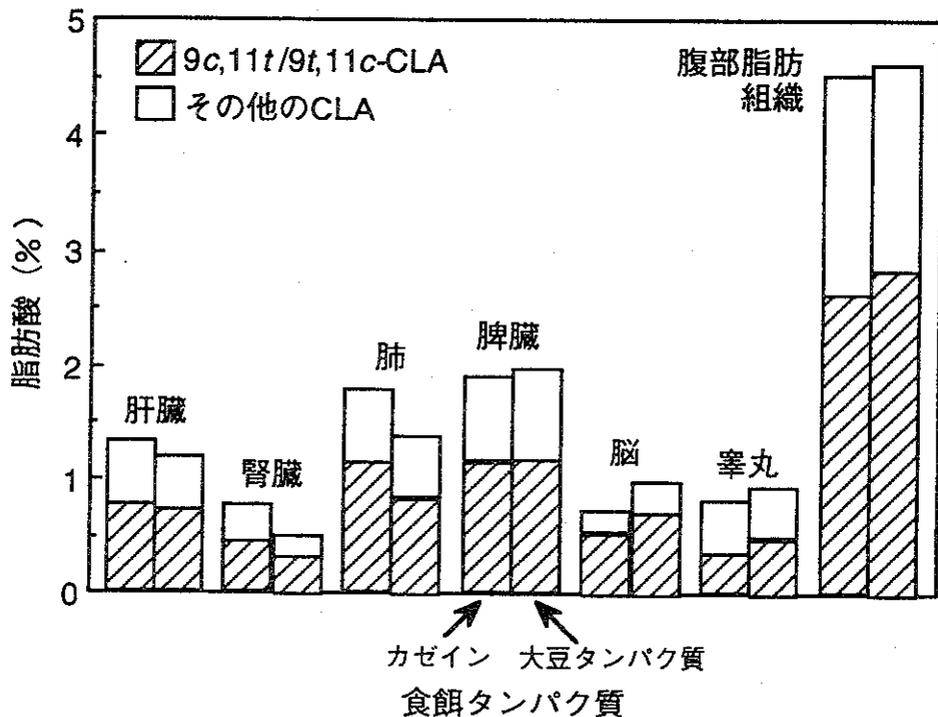


図7. 共役リノール酸の組織への取り込みに及ぼす食餌タンパク質（カゼインあるいは大豆タンパク質）の影響。

取り込み割合に違いが認められた。このような違いは、それぞれの組織における代謝活性に異なった影響を及ぼす可能性を示唆している。また、脂肪組織の重量に対し、n-3系の α -リノレン酸に富むエゴマ油を脂肪源とした場合には、通常の実験で用いられるn-6系のリノール酸の場合とはCLAに対する応答にいくらかの違いがあるようであった。これらの観察から、食餌成分の適当な組み合わせはCLAの生理機能増強策として有用な方策の一つとなるものと判断される。CLAの体脂肪減少効果は、現在実用化されている唯一の例であり、そのような作用をより少ない量のCLAで発現させることについて、今後引き続き解析する予定である。