

原 著

免疫応答に及ぼす脂肪食の影響

加 藤 保 子

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

(平成 7 年10月18日受理)

Effect of Fatty Diet on Immune Response of Rats

Yasuko KATO

*Department of Clinical Nutrition
Faculty of Medical Professions
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-01, Japan
(Accepted Oct. 18, 1995)*

Key words : dietary oil, fish oil, safflower oil, lard, butter, hemagglutination, passive cutaneous anaphylaxis

Abstract

SD rats were divided into 4 groups, fed with the fish oil, safflower oil, butter and lard diets through 45 days, respectively. The body weight and the fatty acid composition in the serum of each rat was measured. Immune responses were observed by the hemagglutination and the passive cutaneous anaphylaxis tests. The rats fed with the fish oil diet showed the highest body weight, and the rats fed with the butter diet the lowest one. The fatty acid composition in serum was well in agreement with that in the oil diet. Inflammation tested by the passive cutaneous anaphylaxis showed no difference according to the diet specification. The immune responses tested by the hemagglutination in the fish oil diet group were significantly higher than in the other groups.

要 約

SD ラットを 4 群に分け、それぞれ魚油、サフラワー油、バターおよびラード食を45日間投与した。体重増加率、血清脂肪酸組成を測定した。次いで、羊赤血球抗体に対する抗体価および受身皮膚アナフィラキシーテストによる炎症反応を調べた。体重増加率は魚油食ラットが最も高く、バター食ラットが最も低かった。血清中の脂肪酸組成は餌の脂肪酸組成をよく

反映したものであった。受身皮膚アナフィラキシーテストによる炎症反応は、脂肪食によって影響されず、魚油食ラットの赤血球凝集反応による抗体価は、他の脂肪食ラットに比べて有意に高値を示した。

緒 言

食物アレルギーには I 型アレルギーが最も深く係わっている。この I 型アレルギーは、IgE 抗体が肥満細胞表面のレセプターと結合し、そこに抗原が再侵入するとその刺激で放出される化学伝達物質が組織障害を引き起こすことによる。アラキドン酸から生合成されるロイコトリエン類やトリボキサン等は深くアレルギーの炎症反応とかがわっている。特にロイコトリエン B₄ には強力な平滑筋の収縮や血管透過性亢進作用があり、単球、リンパ球、好酸球等の運動性を強力に高め、喘息やアトピー性皮膚炎の病態への関わりも示されている¹⁻³⁾。また、アラキドン酸は血小板活性化因子生成とも係わっている。この血小板活性化因子は、血小板凝集作用とともに、好中球、好酸球、単球などの活性化、血管透過性亢進等への関与が示されている。このようにいわゆる n-6 系列の脂肪酸であるリノール酸、 γ -リノレン酸やアラキドン酸は、アレルギーの炎症反応を亢進することが指摘されてきている。

一方、n-3 多価不飽和脂肪酸を含む魚油を 3～6 週間投与すると、ロイコトリエン B₄ の産生をある程度低下させる^{4,5)}。また、健常人に魚油を 6 週間投与すると、単球や好中球によるロイコトリエン B₄ 産生が抑制されたとも報告されている⁶⁾。さらに、イコサペンタエン酸は、抗原提示能を抑制するという報告もある⁷⁾。このように n-3 多価不飽和脂肪酸から生合成されるプロスタグランジンなどはアレルギー症状をやわらげるあるいは抑制するという研究が進み、体質改善を目指したアレルギー疾患者の魚油の摂取が重要視されるようになってきた。

本報告では、n-3 系の脂肪酸に富む魚油、n-6 脂肪酸に富むサフラワー油、低鎖脂肪酸に富むバターおよび飽和脂肪酸に富むラードをそれぞれ脂肪飼料として、ラットに投与し、これらの構成脂肪酸による羊赤血球を用いた細胞抗原

に対する抗体価と各脂肪食による化学伝達物質の生成量を受身皮膚アナフィラキシーテストで測定し比較した。

実験材料および方法

1) 油脂飼料の調製およびその投与

バター、サフラワー油、豚油は市販のものを購入して用いた。魚油は日本油脂株式会社より入手した。各油脂食は、Happer の飼料を基にして、上記各油脂を脂質として 5 % 加えた (Table 1)。

4 週令 SD 系雄ラット 16 匹を各群 4 匹ずつの 4 群とし、体重当たり 10 % 相等の粉末状油脂精製飼料を自由摂取の形で与え、45 日間飼育した。実験食投与後 15 日目に第 1 回免疫を行い、その 5 日後に採血、第 2 回免疫は 36 日飼育後に行い、採血は第 2 回免疫後 5 日目に行った。飼育開始後 25 日目まで体重測定を行った。実験開始後 26 日目に各群 2 匹ずつを受身皮膚アナフィラキシーテストに用いた。

2) 受身皮膚アナフィラキシー (PCA) テスト

25 日実験食で飼育後、各群 2 匹ずつを PCA テストに用いた。抗オボアルブミン抗血清 (C3H mouse) を 1/100 希釈から連続的に 1/2 希釈したものの 0.1 ml ずつを、毛を刈ったラットの背中に皮内

Table 1 Composition of experimental diets

	%
casein	22
corn starch	68.7
oil*	5.0
mineral mixture	5.0
choline chloride	0.15
water soluble vitamine mixture	0.25 in starch
fat soluble vitamine mixture	0.5 in corn oil

* : Dietary oil was used fish, safflower, lard and butter, respectively.

注射した。2時間後、オボアルブミン(10mg/ml) 0.1mlと0.5%エバンスブルー溶液(PBS中) 0.9 mlを混合して静注した。30分後青色のスポットを観察し径5 mm以上のスポットを陽性とした。

3) 羊赤血球(SRBC)の免疫および抗体価の測定

市販羊赤血球(SRBC) 10%浮遊液 1 ml中の赤血球数は 2×10^9 個であった。この浮遊液を PBS (phosphate buffer saline) で3回洗浄後、PBSで希釈して1 ml当たりの赤血球数を 1×10^8 とした。1匹当たり SRBC 懸濁液 1 mlを腹腔内投与した。2次免疫は1匹当たり 10^7 とした。一次および二次免疫後の5日目に眼窩から採血し、抗血清を得た。

4) 赤血球凝集反応

試料血清を PBS で連続的に10倍希釈をして赤血球凝集反应用プレートの小孔に各50 μ lずつ注入、これに SRBC の2%浮遊液を50 μ lずつ加えた。抗体価は、赤血球凝集反応の見られた血清希釈倍数の逆数とした。

5) 血清中脂質の脂肪酸の測定

血清 1 mlからエーテル抽出を3回繰り返し、蒸留水で洗浄後、エーテルを除去、ベンゼン100 μ lを加えて脂質抽出液を得た。この抽出液に HCl-MeOH 250 μ lを添加して56°C、2時間インキュベートして脂肪酸をメチルエステル化した。脂肪酸のメチルエステルをヘキサンで3回抽出、0.2% KHCO₃ で洗浄後 NaSO₄ で脱水してガスクロ用試料とした。脂肪酸の測定は chromosorb WAW に polyethylen glycol 20M を20% wtコーティングした充填剤を用いた。測定条件は N₂:1.6kg, H₂:1.0kg, Air:0.8kgとし、150から250°Cまで7.5°C/minの昇温で行った。既知試料は methyl caproate(C6), methyl caprylate(C8), methyl caprate(C10), methyl laurate(C12), methyl myristate(C14), methyl palmitate(C16), methyl stearate(C18), methyl arachidate(C20) および methyl bahenate (C22) の混合試料(ガスクロ工業株式会社製)を用いた。

実験結果および考察

I 各種脂肪の栄養的側面

バター、サフラワー油、豚油および魚油の精

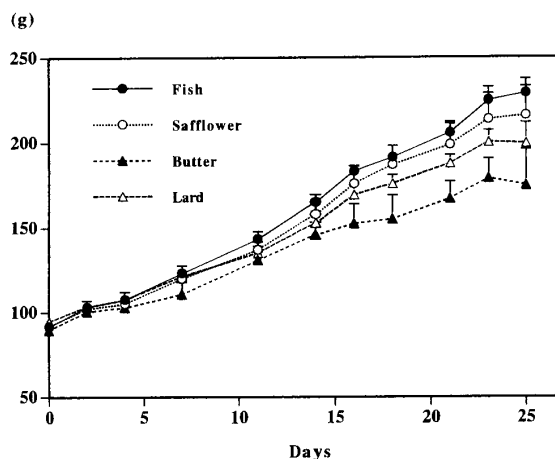


Fig. 1 Changes in body weight

Rats were divided into 4 groups and fed fish, safflower, lard and butter diets through the experimental period. Each point and vertical bar indicate mean \pm SEM for 4 rats.

製飼料中の脂肪含量は5%とした。これは Harper 混合飼料組成における4.5%とほぼ同程度とした。脂肪分の増過分はコーンスターチで補正した。25日間の体重変化を Fig. 1 に示した。飼育開始から11日まで4群間の体重にはほとんど差が認められなかった。飼育14日目以降の各群の平均体重間には開きが生じ、魚油摂取のラットの平均体重が最も高く、バター摂取のラットの体重増加が最も低くなった。Table 2 に各脂肪の脂肪酸組成を示した。ラード、バター、魚油に含まれるリノール酸、リノレン酸、アラキドン酸の含有量はかなり低かったが、皮膚障害などの特徴的な所見は認められなかった。

4種類の精製飼料に含まれる主要脂肪酸とそれぞれの精製飼料を摂取したラットの血清中の脂肪酸をガスクロマトグラフィーで分析し、比較した(Table 3)。魚油に含まれる主要脂肪酸としてパルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、イコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸が検出された。これら脂肪酸は、魚油精製飼料を摂取したラットの血清からほぼ同程度検出された。4種類の脂肪のうち魚油にのみ含まれるイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の分析値はそれぞれ18.3および14.2であり、血清中脂肪酸では15.7および13.0%と魚油に含まれる両脂肪

Table 2 Fatty acid compositions of dietary oil

(%)

Fatty acid	Safflower	Lard	Butter	Fish
C 4:0			3.2	
C 6:0			2.3	
C 8:0			1.4	
C 10:0			3.1	
C 10:1			0.3	
C 12:0			3.7	0.2
C 14:0		2.0	12.0	7.6
C 14:1		0.3	1.1	
C 15:0			1.4	0.5
C 15:1		0.1		
C 16:0	7.3	26.5	29.6	17.8
C 16:1		3.7	1.9	5.7
C 16:4				1.0
C 17:0		0.5	0.8	0.6
C 17:1		0.4		0.8
C 18:0	2.6	12.1	11.1	2.7
C 18:1	13.4	42.5	24.6	12.1
C 18:2	76.4	9.8	2.6	1.5
C 18:3	0.2	0.7	0.7	1.2
C 18:4				2.4
C 20:0		0.2	0.2	
C 20:1		0.6		5.7
C 20:4		0.3		1.9
C 20:5				12.6
C 21:5				0.6
C 22:1				4.3
C 22:5				2.4
C 22:6				11.5
C 24:1				1.3
その他				5.6

Fatty acid compositions of safflower oil, lard and butter were reproduced from Japanese standard tables of food composition.

Fatty acid composition of fish oil was analyzed by NOF Co., Ltd.

酸の含有比は飼料中の脂肪酸含有比とよく一致した。ラード食を投与したラット血清中の主要脂肪酸組成はパルミチン酸およびオレイン酸で

あった。これらの脂肪酸組成は、ラード中の脂肪酸組成をよく反映したものとなった。サフラワー油食のラットの血清中の脂肪酸組成はリノール酸がほぼ半減し、パルミチン酸が3倍以上に増加し、Rt:17.18の未同定脂肪酸が11.1%検出された。バター食の場合にはパルミチン酸が減少し、サフラワー油食の場合と同様の Rt:17.18 の未同定脂肪酸が11.07%検出された。

このように4種類の脂肪食を投与したラットの血清中の主要脂肪酸組成は、各々の精製飼料に含まれる脂肪酸組成をよく反映したものであった。

II 各種脂肪食と抗体価

実験食開始後15日目および36日目に羊赤血球 (SRBC) を腹腔内免疫し、各5日後に採血して抗体価を測定した。その結果を Fig. 2 に示した。魚油食ラットの抗体価は他の脂肪食の抗体価と比べて著しく高く (ラード食およびバター食に対して危険率1%, サフラワー食に対して危険率5%), ラード食およびバター食ラットの抗体価は顕著に低かった。実験食開始後36日目に行った2次免疫後の抗体価はさらに増加した。但し、バター食ラットの抗体価はほとんど変化しなかった。二次免疫でも魚油食ラットの抗体価が最も高く、バター食ラットの抗体価が顕著に低かった (Fig. 3)。

SRBC による免疫は、細胞を抗原とした実験系であり、抗体価は抗原の抗原提示細胞への取り込み、補体、抗体など免疫機構全体が反映したものである。魚油食ラットの SRBC に対する抗体価が顕著に高かった主要因は、抗体のうち最も量の多い IgG 抗体量が反映していると考えられる。そこで、I 型アレルギー反応に係わる免疫反応を直接反映しないことから、IgE 抗体と抗原が肥満細胞表面で反応して産生する化学伝達物質によって生じる炎症反応を比較するために、受身皮膚アナフィラキシー (PCA) テストを行った。4種類の油脂食によるラット (各群2匹) の背中に、抗オボアルブミン抗血清を皮内注射した。抗原オボアルブミンを色素エバンスブルーと共に静注し、エバンスブルーの青色スポットの大きさから抗体価を求めた。抗体価はどの脂肪食のラットも1/20と全く同じ値であ

Table 3 Comparison of major fatty acid proportion in diets and sera of rats fed four oil diets

(%)

Fatty acid	Fish		Safflower		Lard		Butter	
	Feed	Serum	Feed	Serum	Feed	Serum	Feed	Serum
C 14:0	8.6	2.7					12.6	1.2
C 16:0	26.2	28.5	7.3	26.6	29.0	36.0	38.8	25.0
C 16:1							39.0	32.9
C 18:1	17.2	18.6	13.6	20.7	57.9	50.0		
C 18:2			761	35.3				
U.N.*				11.1				19.5
C 20:5	18.3	15.7						
C 22:6	14.2	13.0						

* : Retention time (RT) of this fatty acid was detected at 17.18

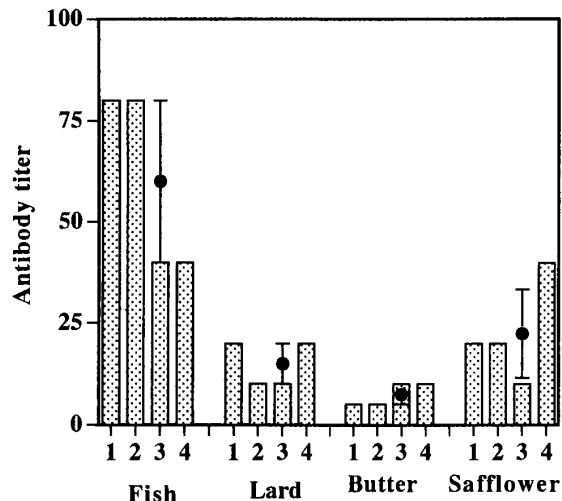


Fig. 2 Primary immune response analyzed by hemagglutination

Each circle and vertical bar indicate mean \pm SEM for 4 rats.

った。スポットの大きさは肥満細胞の脱顆粒によるヒスタミンやプロスタグランジン、血小板活性化因子等を共に、リン脂質のアラキドン酸から生合成されて放出されるロイコトリエン B₄ 等による。しかし、25日間完全に4種類の脂肪のみを脂肪源とした実験結果では、アレルギーの炎症反応に全く影響を与えなかった。即ち、これらの化学伝達物質の生成は脂肪食に影響されなかったことを示している。

Prickett ら⁸⁾はラットに魚油食あるいは牛脂食

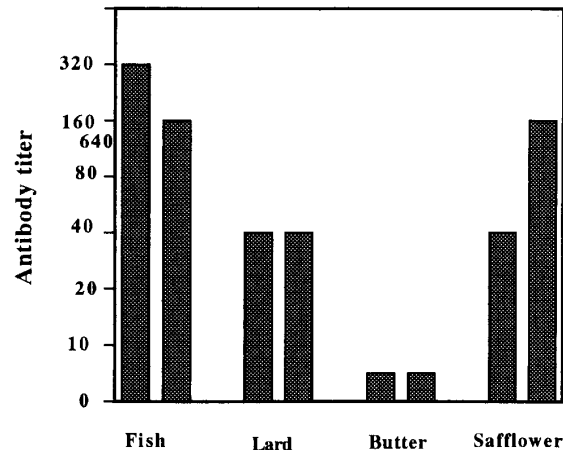


Fig. 3 Secondary immune response analyzed by hemagglutination

を投与したとき、魚油食ラットの IgE および IgG 抗体産生は牛脂食ラットのそれらに比べて4～8倍高かったと報告している。この場合の魚油食ラット肝臓のアラキドン酸脂肪酸は牛脂食ラットのそれより低く、イコサペンタエン酸量は顕著に低かったという。一方、Watanabe ら⁹⁾は、マウスにシソ油を投与すると紅花油投与に比べて、IgE 抗体の産生が有意に強かったと報告している。シソ油投与マウスの脾臓構成リン脂質のうちアラキドン酸は、紅花油投与マウスに比べて顕著に低く、イコサペンタエン酸は有意に高かったという。このように n-3 系の脂肪酸投与による動物実験では、相異なる結果が得られ

ている。n-3 系多価不飽和脂肪酸を大量に投与するとプロスタグランジン E_2 の生合成が極端に抑制されてそれが免疫系を亢進させるとも考えられる。

本研究でも上記研究同様に、血清脂肪酸組成は顕著に脂肪食の脂肪酸組成を反映していた。また、魚油食ラットのアレルギー性炎症反応は、

他の脂肪食ラットのそれらと全く変わらなかった。即ち、アレルギー症状は4種類の脂肪食によって変わらなかったものの、魚油食ラットでは赤血球凝集反応による抗体価が有意に高く、細菌感染症に対する免疫応答を強め得るものと考察される。

文 献

- 1) Ternowitz T, Herlin T and Fogh K (1987) Human monocyte and polymorphonuclear leukocyte chemotactic and chemokinetic responses to leukotriene B_4 and FMLP. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*[C], **95**, 47—54.
- 2) Ruzicka T, Simmet T, Peskar BA and Ring J (1986) Skin levels of arachidonic acid-derived inflammatory mediator and histamine in atopic dermatitis and psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, **86**, 105—108.
- 3) Fogh K, Herlin T and Kraballer K (1989) Eicosanoids in skin of patients with atopic dermatitis: prostaglandin E_2 and leukotriene B_4 are present in biologically active concentrations. *Acta Pathologica. Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **83**, 450—455.
- 4) Hawthorne AB, Filipowicz BI and Edwards TJ (1990) High dose eicosapentanoic acid ethyl ester: effects on lipids and neutrophil leukotriene production in normal volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **30**, 187—194.
- 5) Lee TH, Hoover RI, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J 3th, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA and Austen KF (1985) Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on *in vitro* neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *New England Journal of Medicine*, **312**, 1217—1224.
- 6) 奥山治美 (1993) 食事中の n-3/n-6 バランスと疾患. 臨床栄養, **83**, 606—611.
- 7) Fujikawa M, Yamashita N, Yamazaki K, Sugiyama E, Suzuki H and Hamazaki T (1992) Eicosapentaenoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splenocytes. *Immunology*, **75**, 330—335.
- 8) Prickett JD, Robinson DR and Bloch KJ (1982) Enhanced production of IgE and IgG antibodies associated with a diet enriched in eicosapentaenoic acid. *Immunology*, **46**, 819—826.
- 9) Watanabe S, Sakai N, Yasui Y, Kimura Y, Kobayashi T, Mizutani T and Okuyama H (1994) A high α -linolenate diet suppress antigen-induced immunoglobulin E response and anaphylactic shock in mice. *Journal of Nutrition*, **124**, 1566—1573.