

食品および環境中の免疫調節因子に関する研究

倉本, 雄一郎
九州大学農学研究科食糧化学工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3135076>

出版情報 : 九州大学, 1997, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

第6章 ヒトリンパ球および培養細胞株の抗体産生に及ぼす

ローズベンガルの影響

第1節 緒論

われわれの生活スタイルおよびわれわれをとりまく環境は過去40年で大きく変わった。ディーゼル排気ガス中の微粒子がアジュバント効果を示すとの報告 (Muranaka *et al.*, 1986; Takafuji *et al.*, 1987, 1989; Takenaka *et al.*, 1995) や、タバコの副流煙を慢性的にラットに吸引させたところ、胸腺依存のおよび非依存の抗原に対する抗体産生細胞の応答を抑制し、機能不全にさせるという報告 (Savage *et al.*, 1991) もあり、これらの環境変化 (悪化) がアレルギー患者を増加させた原因として考えられている。一方、食生活に視点を移すと、多くの食品添加物や化学物質に囲まれているのに気づく。食物がわれわれの手元に届くまで、害虫の駆除や輸送中の品質劣化を防ぐために多くの種類の農薬が用いられている。食品添加物は着色、保存、着香などのために用いられている。しかし、いくつかの食品添加物においては、摂食したときに副作用を引き起こす数多くの事例が報告されている。例えば、保存料である亜硫酸塩は喘息を引き起こし、着色料であるタートラジンはじんましんを誘発することが知られており、さらにアナトー色素はアナフィラキシー反応を引き起こすといわれている (Nish *et al.*, 1991; Tarlo *et al.*, 1993; Weber 1993; Wuthrich *et al.*, 1993)。

通常4つに分類されるアレルギー反応の中で、I型アレルギーは食品成分や、大気中の抗原物質に対する反応誘発に重要な役割を演じている (Metcalf 1991)。I型アレルギーの特徴として、アレルギー特異的IgEの誘導が挙げられるが、健常人ではアレルギー特異的IgGが競合することによってアレルギー反応は抑制される。クラス特異的抗体産生調節は、IL-4、IL-5、IFN- α 、IFN- γ によって誘導されることが知られている (Elson *et al.*, 1994; Gauchat *et al.*, 1991; Ochel *et al.*, 1991; Pene *et al.*, 1988; Rousset *et al.*, 1991)。同様な抗体のクラス特異的な産生調節は胆汁酸やレクチンでも知られている (Lim *et al.*, 1994a,

1994b; Yamada *et al.*, 1993)。胆汁酸は1 mM以上の濃度でラット腸間膜リンパ節 (MLN) リンパ球のIgE産生を増強し、IgA、IgGおよびIgM産生を抑制した (Lim *et al.*, 1994b)。コンカナバリンA (Con A) はIgE産生を増強し、アメリカマゴボウレクチン (PWM) はそれを抑制し、それ以外のクラスには影響を及ぼさないことが報告された (Lim *et al.*, 1994b)。こういった背景に立ち、第5章においてラットおよびマウスリンパ球の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響について論じたが、種の違いによって影響が異なるかどうかを確かめるため、本章ではヒトリンパ球の抗体産生に及ぼす影響について検討した。

第2節 実験方法

第1項 試薬

ローズベンガルは、和光純薬工業 (大阪) より購入した。酵素抗体法に用いる試薬として、洗浄液には、0.05% Tween 20含有PBS (TPBS) を、ブロッキング液にはBlock Ace (大日本製薬、大阪) を用いた。固相抗体には、抗ヒトIgM抗体としてアフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgM μ 鎖を、抗ヒトIgG抗体としてアフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgG γ 鎖を、抗ヒトIgE抗体としてアフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgE ϵ 鎖 (全て、Bio Source International社, Camarillo, CA) を用いた。酵素標識抗体には、抗ヒトIgM抗体としてHRP標識アフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgM μ 鎖を、抗ヒトIgG抗体としてHRP標識アフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgG γ 鎖を、抗ヒトIgE抗体としてHRP標識アフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgE ϵ 鎖 (全て、Bio Source International社) を用いた。

第2項 細胞調製および細胞培養

ヒト末梢血リンパ球は、健康なドナーからヘパリン入り真空チューブを用いて採血し、リンパ球分離液 (LSM; Organon Teknika社, Durham, NC) を用いた密度勾配遠心法によりリンパ球画分を分離し、10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有ERDF培地 (極東製薬、東京) で1日培養して接着細胞を除くことにより調製し

た。得られた末梢血リンパ球を 1×10^6 cells/mlに調整し、終濃度0-100 μ Mのローズベンガルを添加して5% FBS含有ERDF培地で培養し、3日および5日後の細胞生存率を測定すると共に、培養上清中の抗体濃度を酵素抗体法で測定した。

ヒトバーキットリンパ腫由来の細胞株であるNAT-30細胞およびヒト形質細胞株であるHMy-2細胞は九州大学農学部食糧化学研究室において継代しているものを用いた。U-266細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) より提供された。NAT-30細胞、HMy-2細胞およびU-266細胞は、5%ウシ胎児血清 (FBS; GIBCO BRL社, Grand Island, NY) 含有ERDF培地を用いて、5% CO₂環境下において継代培養した。実験に供するとき、細胞濃度は 1×10^5 cells/mlに調整した。終濃度0-10 μ Mのローズベンガルを添加して培養し、培養開始から1、2、3、4、5、6日後の細胞生存率および抗体産生量を酵素抗体法を用いて測定した。

第3項 酵素抗体法

抗体価の測定は、Yamada *et al.* (1993) の方法に従って行った。IgGおよびIgMの定量には直接法を用い、IgEの定量にはアビジン-ビオチン法を用いた。まず、96穴イムノプレートに固相抗体を加えて37°Cにて1時間保温し、TPBSで3回洗浄した。次に、ブロッキング液を加え、37°Cにて1時間保温もしくは4°Cにて一晩放置した後、洗浄した。これ以後の洗浄操作ではアビジン-ビオチン法で各4回、直接法で各3回行った。次に、一次抗体 (サンプル上清) を加えて37°Cで1時間保温し、洗浄した。IgE定量ではさらに二次抗体を加えて37°Cにて1時間保温し、洗浄した。最後に、酵素標識抗体を加えて37°Cで1時間保温して、洗浄液で洗浄後、基質溶液を加えて37°Cで15分間反応後、反応停止液を加えて415nmで吸光度を測定した。

第3節 結果

第1項 ヒト末梢血リンパ球の抗体産生に及ぼすローズベンガルの効果

前章までに、ローズベンガルがラットおよびマウスのリンパ球もしくはWEHI-279細胞のIgE産生を増強し、IgGおよびIgM産生を抑制することが明らかにされた。本実験においては、ヒトリンパ球の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響を検討するため、まずヒト末梢血より分離したリンパ球に終濃度0-100 μM のローズベンガルを添加して5% FBS含有ERDF培地で培養し、3日および5日後の細胞生存率および抗体産生量を酵素抗体法で測定した。その結果、ローズベンガルを終濃度100 μM で添加したときには培養開始から3日までに細胞生存率は10%以下まで低下したが、10 μM 以下で添加したときには培養開始から5日まで細胞生存率は90%以上であった。

一方、抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響については、培養開始から3日後にはFig. 6-1に示したように、1 μM のローズベンガルはIgE産生を増強しIgGおよびIgM産生を抑制する傾向が見られたが、0.1および1 μM ではIgGおよびIgM産生には影響を及ぼさなかったがIgE産生を有意に増強した。

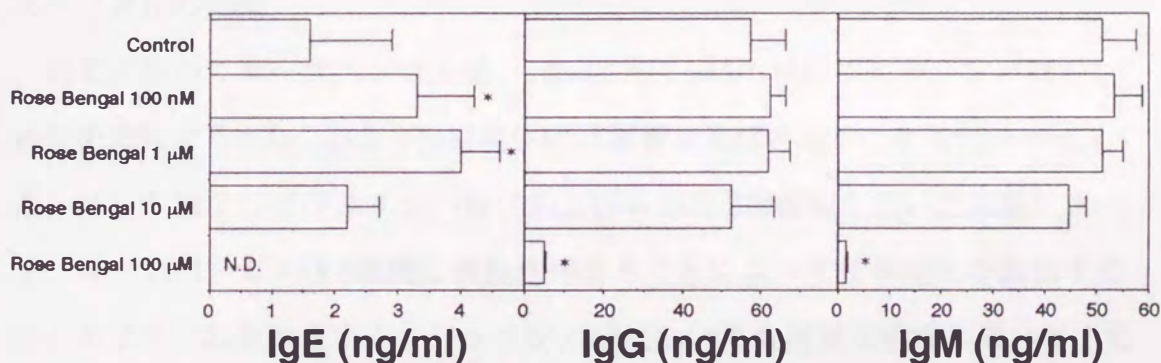


Fig. 6-1. Effect of Rose Bengal on Immunoglobulin Production by Human Peripheral Blood Lymphocytes. Cells were cultured with 0-100 μM Rose Bengal for 72 h and Ig concentration in the supernatant was measured by ELISA. Data were indicated as Mean \pm SD (n=4). * p < 0.05 compared with the control. N.D. = Not detected.

培養開始から5日後にはFig. 6-2に示したように、10 μ MのローズベンガルはIgGおよびIgMレベルを低下させるが、IgEレベルについてはコントロールに対して有意な差は認められなかった。0.1および1 μ Mでは、IgE、IgGおよびIgMレベルはコントロールに対して有意な差は認められなかった。

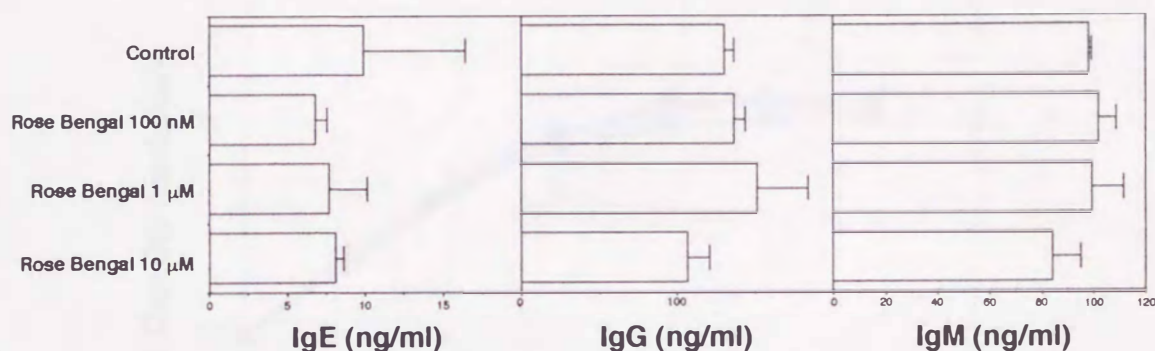


Fig. 6-2. Effect of Rose Bengal on Immunoglobulin Production by Human Peripheral Blood Lymphocytes. Cells were cultured with 0-100 μ M Rose Bengal for 120 h and Ig concentration in the supernatant was measured by ELISA. Data were indicated as Mean \pm SD.

第2項 NAT-30細胞、HMy-2細胞およびU-266細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの効果

前項においてローズベンガルは、1および0.1 μ Mにおいてヒトリンパ球のIgE産生を増強するがIgGおよびIgM産生には影響を及ぼさないことを明らかにした。ラットおよびマウスリンパ球、およびWEHI-279細胞を用いた実験によって、ローズベンガルはB細胞に直接作用することによって抗体産生を調節することが示唆されたことから、ヒトリンパ球においても同様な機構が働いているかどうかを検討した。ヒトB細胞の樹立細胞株として、NAT-30細胞、HMy-2細胞およびU-266細胞を用いた。まず、NAT-30細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響について検討した。NAT-30細胞はヒトバーキットリンパ腫由来の樹立細胞株であり、IgM抗体を産生することが知られている。まず、ローズベンガルを添加したときの細胞数を経時的に測定した。NAT-30細胞を 1×10^5

cells/mlに調整し、0-10 μ Mのローズベンガルを添加して6日間培養した。Fig. 6-3に示したように、ローズベンガルはNAT-30の増殖速度には影響しないことが確認された。また、培養期間中の細胞生存率も80%以上であった。

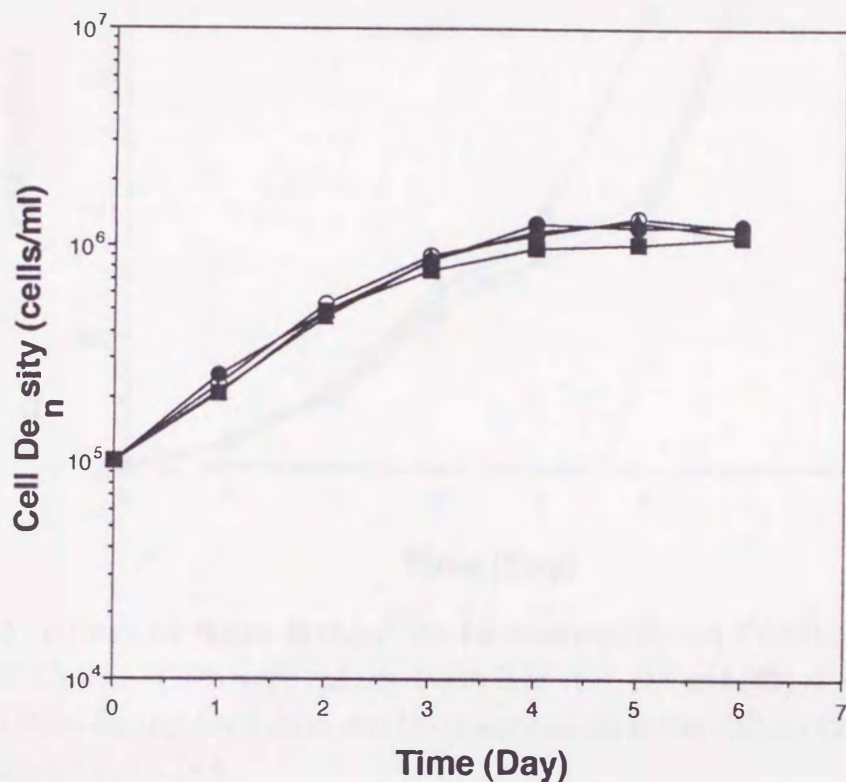


Fig. 6-3. Effect of Rose Bengal on the Growth of NAT-30 Cells. Cells were cultured with 0 M (○), 100 nM (●), 1 μ M (▲) or 10 μ M (■) Rose Bengal for 6 days.

つづいてNAT-30細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響について検討した。NAT-30細胞を 1×10^5 cells/mlに調整し、0-10 μ Mのローズベンガルを添加して6日間培養し、培養上清中の抗体価を酵素抗体法で測定した。Fig. 6-4に示したようにIgM抗体においては、3日目まではコントロールと同様なレベルであったが、5日目には10 μ Mのローズベンガルがコントロールに比べて約1.8倍に上昇させることが認められた。0.1および1 μ Mのローズベンガルには抗体産生調節効果は認められなかった。他のクラスの抗体産生は認められなかった。

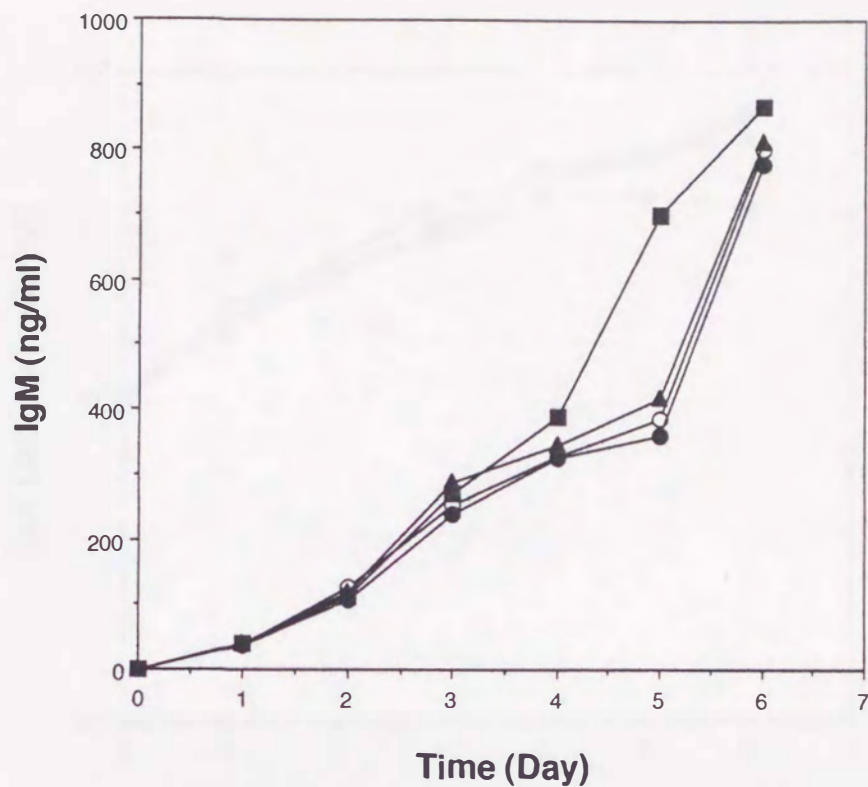


Fig. 6-4. Effect of Rose Bengal on Immunoglobulin Production by NAT-30 Cells. Cells were cultured with 0 M (○), 100 nM (●), 1 μM (▲) or 10 μM (■) Rose Bengal for 6 days and Ig concentration in the culture supernatant was measured by ELISA.

次に、U-266細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響について検討した。U-266細胞はヒト形質細胞由来の樹立細胞株であり、IgE抗体を産生することが知られている。まず、ローズベンガルを添加したときの細胞数を経時的に測定した。U-266細胞を 1×10^5 cells/mlに調整し、0-10 μMのローズベンガルを添加して6日間培養した。Fig. 6-5に示したように、ローズベンガルは4日目までU-266細胞の増殖速度には影響しなかったが、5日目以降には10 μMにおいてやや増殖抑制的に働くことを確認した。また、培養期間中の細胞生存率は80%以上であった。

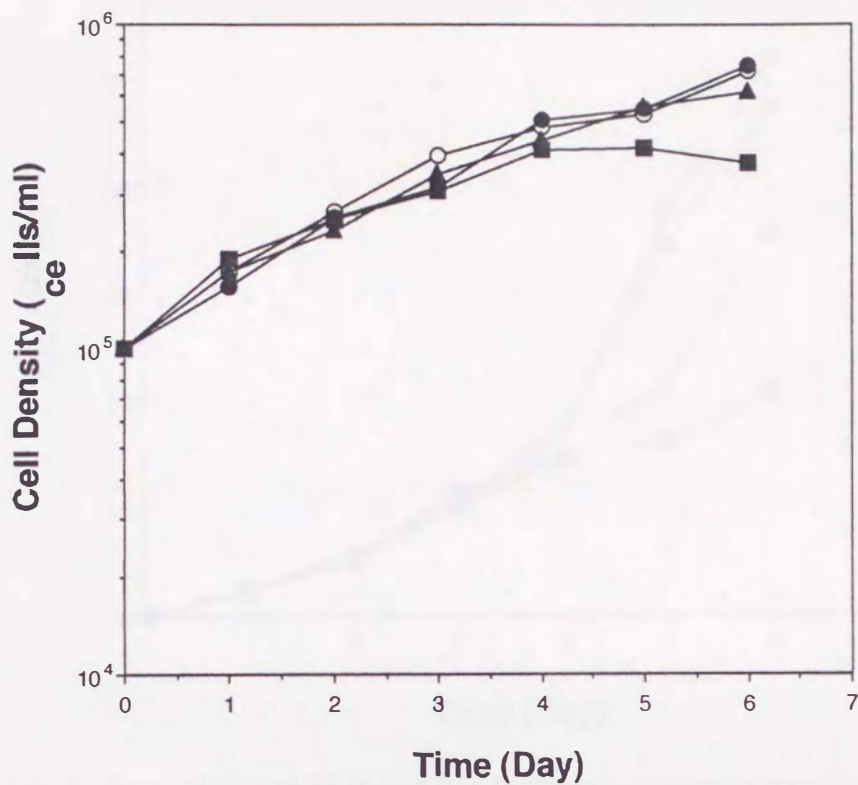


Fig. 6-5. Effect of Rose Bengal on the Growth of U-266 Cells. Cells were cultured with 0 M (○), 100 nM (●), 1 μM (▲) or 10 μM (■) Rose Bengal for 6 days.

つづいてU-266細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響について検討した。U-266細胞を 1×10^5 cells/mlに調整し、0-10 μMのローズベンガルを添加して6日間培養し、培養上清中の抗体価を酵素抗体法で測定した。Fig. 6-6に示したように、4日目まではローズベンガルはU-266細胞の抗体産生には影響を及ぼさなかったが、5日目以降においては、ローズベンガルは濃度依存的にIgEレベルを低下させた。特に、10 μMではコントロールの50%以下まで低下させた。

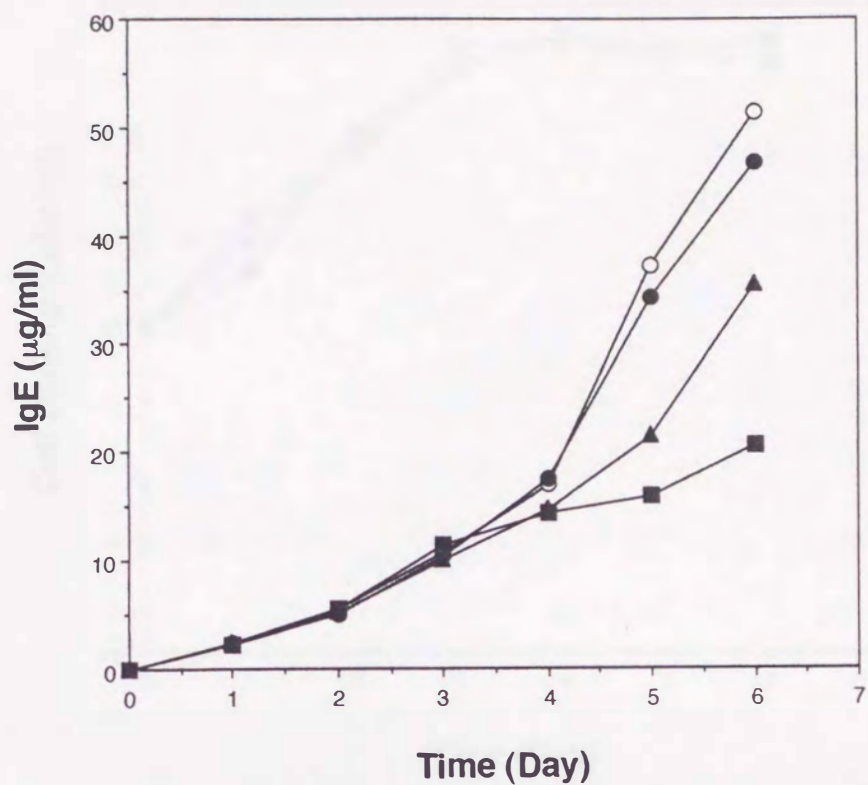


Fig. 6-6. Effect of Rose Bengal on Immunoglobulin Production by U-266 Cells. Cells were cultured with 0 M (○), 100 nM (●), 1 µM (▲) or 10 µM (■) Rose Bengal for 6 days and Ig concentration in the culture supernatant was measured by ELISA.

最後に、HMy-2細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響について検討した。HMy-2細胞はヒト形質細胞由来の樹立細胞株であり、IgG抗体を産生することが知られている。まず、ローズベンガルを添加したときの細胞数を経時的に測定した。HMy-2細胞を 1×10^5 cells/mlに調整し、0-10 µMのローズベンガルを添加して6日間培養した。Fig. 6-7に示したように、ローズベンガルは6日目までHMy-2細胞の増殖速度には影響しなかった。また、培養期間中の細胞生存率は80%以上であった。

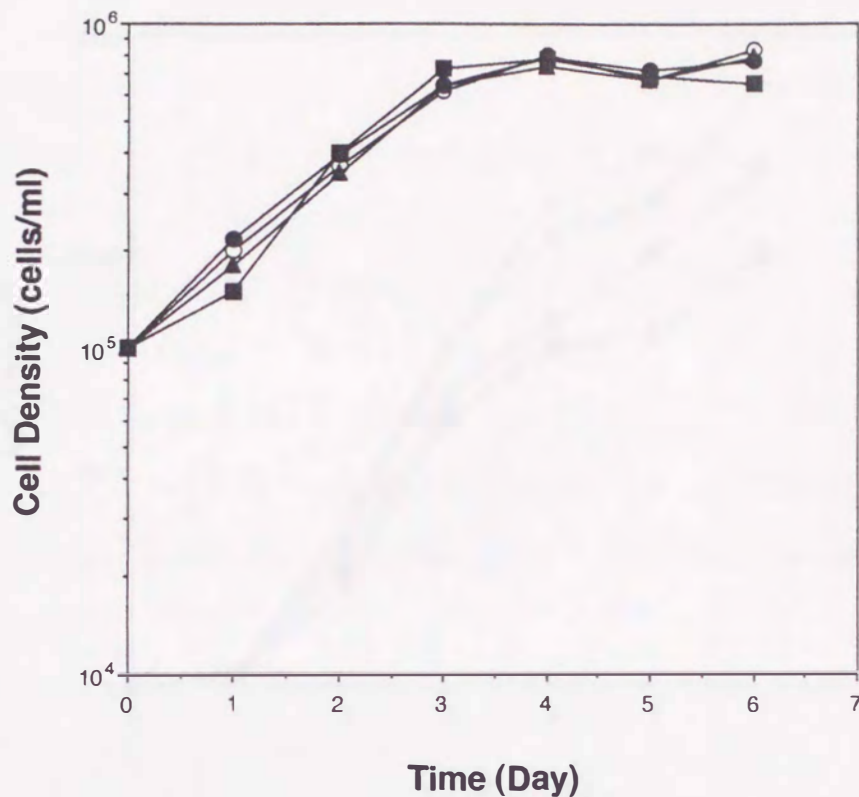


Fig. 6-7. Effect of Rose Bengal on the Growth of HMy-2 Cells. Cells were cultured with 0 M (○), 100 nM (●), 1 μM (▲) or 10 μM (■) Rose Bengal for 6 days.

つづいてHMy-2細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響について検討した。HMy-2細胞を 1×10^5 cells/mlに調整し、0-10 μMのローズベンガルを添加して6日間培養し、培養上清中の抗体価を酵素抗体法で測定した。Fig. 6-8に示したように、1日目まではローズベンガルはHMy-2細胞の抗体産生には影響を及ぼさなかったが、2日目以降においては、ローズベンガルは濃度依存的にIgGレベルを低下させた。

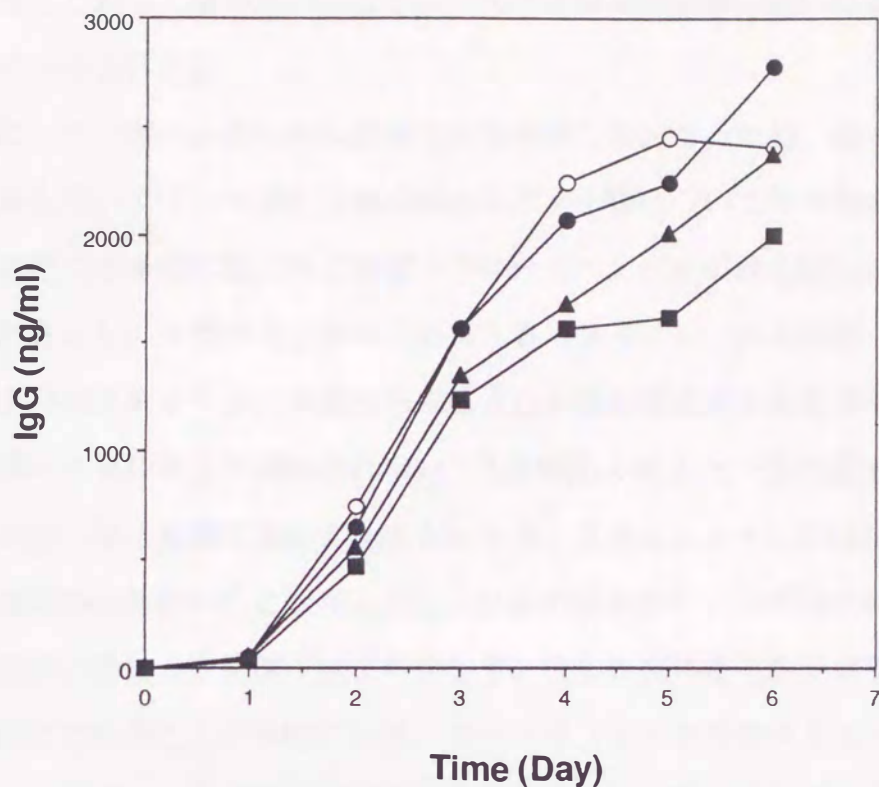


Fig. 6-8. Effect of Rose Bengal on Immunoglobulin Production by HMy-2 Cells. Cells were cultured with 0 M (○), 100 nM (●), 1 μM (▲) or 10 μM (■) Rose Bengal for 6 days and Ig concentration in the culture supernatant was measured by ELISA.

第4節 考察

これまでに、キサントン色素の一つであるローズベンガルが処理濃度50 μMにおいてラットリンパ球のIgE濃度を上昇させ、IgGおよびIgM濃度を低下させることを明らかにした。ヒト細胞においてローズベンガルが及ぼす影響を検討するため、本章においてはヒト末梢血リンパ球およびヒト樹立細胞株の抗体産生に及ぼすローズベンガルの効果について検討した。その結果、ローズベンガルはヒト末梢血リンパ球のIgE産生も増強することが明らかとなった。さらに、B細胞に直接及ぼす影響を調べるためにヒト樹立細胞株を用いたところ、ローズベンガルは、IgG産生細胞であるHMy-2細胞の抗体産生を抑制することが確かめられた。これらの結果はマウスおよびラットリンパ球について得られた結

果を反映しており、種の違いによるローズベンガルの影響の違いは認められないことが示唆された。

さらに、ローズベンガルの抗体産生調節機構を検討するため、様々なキサントレン色素を用いてリンパ球の抗体産生に及ぼす影響について調べた結果、4個のヨウ素原子と4個の塩素原子を有するローズベンガルが最も強いIgE濃度の上昇効果を示し、4個のヨウ素原子を有するエリスロシンがそれにつづくIgE濃度の上昇効果を示すが、4個の臭素原子と4個の塩素原子を有するフロキシニンには弱い上昇効果しか認められないことを明らかにした(第5章参照)。また、ハロゲン原子を持たないアシッドレッド、フルオレセインには抗体産生調節機能は認められないことを示した。これらの結果から、芳香環に結合したハロゲン原子、特にヨウ素原子は、キサントレン色素の抗体産生調節効果に重要な役割を演じていることが示唆された。ローズベンガルを摂食させたマウスの甲状腺腫瘍の誘導にヨウ素原子が重要な役割を演じていることが報告されており(Ito *et al.*, 1986)、ヨウ素原子は甲状腺細胞と何らかの相互作用を及ぼしていることが考えられる。したがって、ヨウ素原子がリンパ球に対してどのような作用を及ぼすかを検討することが必要である。

また、キサントレン色素は光増感反応により一重項酸素を放出することが知られており、その色素をより重い原子(I>Br>H)で置換すると、光増感作用を受けやすいことが報告されている(Legrum, 1991)。また、胆汁酸、不飽和脂肪酸および過酸化水素はラット腸間膜リンパ節(MLN)リンパ球のIgE産生を増強し他のクラスの抗体産生を抑制するという報告もあり(Yamada *et al.*, 1996)、活性酸素の生成がキサントレン色素の抗体産生調節活性の原因であることも考えられる。

ローズベンガルのIgE産生促進機構を検討するために、IgE重鎖mRNAであるP ϵ の発現に及ぼすローズベンガルの影響についてRT-PCR法を用いて検討した結果、ローズベンガルはWEHI-279細胞のP ϵ の発現を濃度依存的に増強する一方、IgMからIgEへのクラススイッチにおいて認められるWEHI-279細胞における ϵ 鎖の胚型転写物(G ϵ)の発現は変化しないことから、ローズベンガルは

IgMからIgEへのクラススイッチに影響せず、Pεの翻訳促進を通じてIgE合成を促進することが考えられたが、ヒトリンパ球におけるそれらの発現については不明であるため検討する必要がある。Gεの発現に影響を及ぼすことなしにPε-の発現を促進させた物質に関しては、Epstein-Barrウイルスで形質転換したヒトB細胞樹立細胞株である2C4/F3細胞をディーゼル排気ガス中の微粒子 (DEP) と共に培養したとき、DEPに含まれる芳香族炭化水素である phenanthreneが細胞質中のAhレセプターに結合し、転写因子の誘導を通じてPε-の発現を増強させることが報告された (Tsien *et al.*, 1997)。phenanthreneは非水溶性であり細胞膜を通過して細胞内に侵入できるが、ローズベンガルは水溶性であるために細胞内に入ることが出来ないことから、ローズベンガルによるPεの発現増強には別の機構、つまり細胞表面に結合しその結合シグナルが発現増強につながる可能性が考えられた。

ローズベンガルがB細胞に直接及ぼす影響について検討するために、樹立細胞株としてNAT-30細胞、HMy-2細胞およびU-266細胞を用いたが、初代培養細胞を用いた培養の結果を反映したのはHMy-2細胞だけであった。NAT-30細胞は無血清培養においても増殖可能なクローンから選抜された細胞であるため (Murakami *et al.*, 1985)、増殖に血清を必要とする抗体産生細胞とは抗体産生に至るメカニズムが異なる可能性がある。また、U-266細胞はヒト-マウスハイブリドーマでありIgEを多量に産生する細胞株であるため、IgE抗体産生を抑制する因子の検索には有用であるが、本実験系においてはそのメカニズムの解明は困難であるので他の細胞株を用いてさらに検討する必要がある。

第7章 大気汚染物質の免疫調節機能の解明

第1節 緒論

高度経済成長期を境に種々のアレルギー罹患率が増加した。その原因として食生活および環境の変化が挙げられ、その考えに基づいて前章までに食品中の免疫調節因子の検索について検討した。本章においては、大気中の免疫調節因子の検索を行った。最近の研究によって様々な大気中の免疫調節因子が明らかにされている。例えば、タバコの煙に含まれるニコチンはヒト末梢血単核細胞の抗体産生を調節することが報告されている (Fischer *et al.*, 1994)。また、自動車、特にディーゼルエンジンの排出ガス中成分がアレルギー発症と深く関係していることが明らかにされている (Muranaka *et al.*, 1986; Takafuji *et al.*, 1987, 1989)。ディーゼルエンジンの排出ガス中成分は大きく2種類に分けられる

(Kaji, 1993; Westerholm *et al.*, 1995; Zapponi *et al.*, 1997)。一つはガス状燃焼生成物であり、二酸化硫黄、窒素酸化物、二酸化炭素、アルデヒドおよび未燃焼炭化水素が含まれる。もう一つは粒子状燃焼生成物であり、硫酸塩、炭素質粒子、有機溶媒可溶成分 (多環芳香族炭化水素、ニトロ多環芳香族類) および抽出不能物質である。アレルギー発症の原因物質としては、ガス状燃焼生成物よりも粒子状燃焼生成物の方が注目されており、例えば炭素質粒子 (DEP) はアジュバント作用を有し、IgE産生を増強することが報告されている (Diaz-Sanchez *et al.*, 1994; Takenaka *et al.*, 1995)。また、多環芳香族炭化水素

(PAH) が免疫抑制作用を有すること (Holladay *et al.*, 1994)、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) がB細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させること (Karras *et al.*, 1996) などの報告もある。

食品および環境アレルゲンに対するアレルギーは主としてI型アレルギー反応により引き起こされるが、この反応においてはアレルゲン特異的IgEの誘導が重要な役割を演じる (Metcalf, 1991)。一方、アレルゲン特異的IgAはアレルゲンの腸管吸収を阻害することによりアレルギーの発症を抑制する。また、

アレルギー特異的IgGはIgEとの競合によりI型アレルギーを抑制する。また、細胞表面レセプターに結合した抗原特異的IgEを抗原が架橋することにより肥満細胞はヒスタミンおよびロイコトリエン (LT) などのケミカルメディエーターを産生し、アレルギー症状を引き起こすことが知られている (Plaut *et al.*, 1993)。LTは肥満細胞の膜リン脂質から遊離されるアラキドン酸のリポキシゲナーゼ酸化によって生成される (Dahlen *et al.*, 1986)。ロイコトリエンのうちLTB₄は、好中球の走化性によって誘導される炎症反応を亢進したり (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980)、可溶性CD23の発現およびその遊離を増強し、B細胞のIgE産生を増強することが知られている (Dugas *et al.*, 1990; Yamaoka *et al.*, 1989)。こういった背景に立ち、本章においてはマウス脾臓リンパ球およびWEHI-279細胞の抗体産生およびラット腹腔内滲出細胞のLTB₄産生に及ぼすディーゼルエンジンの排出ガス中成分の影響について検討した。

第2節 実験方法

第1項 動物

マウス脾臓リンパ球は8週齢雄のBalb/cマウスより、腹腔内滲出細胞は8週齢雄Sprague Dawleyラットより分離し、いずれもセアック吉富 (吉富、福岡) より購入した。餌はMF (オリエンタル酵母、東京) を用いた。マウスおよびラットは購入後直ちに実験に供するか、数日予備飼育してから実験に用いた。予備飼育の際は、マウスもしくはラット用ケージにおがくず床 (ホワイトフレーク : オリエンタル酵母) を敷いて飼育した。

第2項 用いた試薬、緩衝液および反応液の調製、および器具

多環状芳香族炭化水素としてアントラセン系化合物にはアントラセン、9-メチルアントラセン、9,10-ジメチルアントラセンおよび γ -BHCを、フルオレン系化合物としてフルオランセン、ベンゾ (b) フルオランセン、2,3-ベンゾフルオレンおよび2,7-ジニトロフルオレンを、ベンズアントラセン系化合物としてベ

ンズ (a) アントラセン、1,2-ベンズアントラセン、7-メチルベンズ (a) アン
トラセンおよび9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセンを、ピレン系化合物に
はピレン、ベンゾ (a) ピレン、1-ニトロピレンおよび1-アミノピレンを選び、
これら全ては大阪市立環境科学研究所より提供された。各サンプルをDMSO
(ナカライテスク、京都) に溶解して10 mMに調製し、培養液に対して1/1000
量を添加した。

マウス抗体の定量には、固相抗体には抗IgG抗体としてヤギ抗マウスIgG
(Zymed社, San Francisco, CA) を、抗IgE抗体としてラット抗マウスIgE
(EIU社, Brussels, Belgium) を、抗IgM抗体としてウサギ抗マウスIgM F(ab')₂
断片 (Zymed社) を、抗IgA抗体はウサギ抗マウスIgA (Zymed社) を用いた。
酵素標識抗体にはペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウスIgG F(ab')₂ 断片
(Zymed社)、HRP標識ウサギ抗マウスIgM F(ab')₂ 断片 (Zymed社) および
HRP標識ウサギ抗マウスIgA (Zymed社) を用いた。またIgE定量においてはビ
オチン標識ラット抗マウスIgE (EIU社)、およびHRP標識ストレプトアビジ
ン (Prozyme社, San Leandro, CA) を用いた。

ラット腹腔内細胞 (PEC) の摂取において、次に挙げる緩衝液を調製した。
まず、肥満細胞用緩衝液 (Tyrode液) は、NaCl、KCl、NaH₂PO₄(2H₂O)、
MgCl、NaHCO₃、D-glucose (いずれも和光純薬工業、大阪)、gelatin (Sigma
社, St. Louis, MO)、Albumin Fraktion V (BSA; Boehringer Mannheim社,
Germany) をそれぞれ 7.889 g、0.201 g、0.058 g、0.048 g、1.008 g、1.009 g、
1.000 g、1.000 gずつ1000 mlの超純水に溶解させ、pHを7.2に調整する。つづい
て、赤血球溶解用緩衝液 (modified-ACT) は、NH₄Cl、KHCO₃ (いずれも和
光純薬工業)、EDTA-2Na (同仁化学研究所、熊本) をそれぞれ8.29 g、1.00
g、3.67 gずつ1000 mlの超純水に溶解させ、pHを7.4に調整した。

サンプル調製用試薬においては、Calcium Ionophore A23187 (Sigma社) は
ジメチルスルホキシド (DMSO) (和光純薬工業) に溶解させ、10 mMに調整
した。プロスタグランジンB₂ (Sigma社) は、メタノール (和光純薬工業) に
溶解し、50 μg/mlに調整した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用アセトニトリルおよびHPLC用メタノールはナカライテスクより購入した。ロイコトリエン B_4 測定には、HPLC (SCL-10A; 島津製作所、京都) を用いた。移動相にはアセトニトリル:メタノール: $H_2O=30:25:45$ になるように混合し、さらに12.5 mMの酢酸アンモニウム、1 mMのEDTAを添加しpHが5.6になるように酢酸で調整した。カラムには、C18逆相カラム (YMC社、京都) を用いた。

第3項 細胞調製および細胞の刺激方法

リンパ球を得るために、マウスをエーテル麻酔下で屠殺し、脾臓を摘出した。RPMI-1640培地 (日水製薬、東京) 中で脾臓をすりつぶしてリンパ球を滲出させ、Lympholyte-Mouse (Cedarlane社、Hornby, Canada)を用いて密度勾配分離法によりリンパ球画分を得た。脾臓より分離したリンパ球は、10%ウシ胎児血清 (Intergen社、Purchase, NY) 存在下でRPMI-1640培地を用いて細胞数を 2×10^6 cells/mlに調整し、5% CO_2 インキュベータで72時間培養した。樹立細胞株としては、WEHI-279細胞 (九州大学医学部付属生体防御医学研究所から提供を受けた) を用いた。細胞は10%ウシ胎児血清 (GIBCO BRL社、Grand Island, NY) を含むRPMI-1640培地を用いて、5% CO_2 環境下において継代培養してきた細胞を 1×10^5 cells/mlに調整し、5% CO_2 インキュベータで72時間培養した。

ラット腹腔内細胞 (PEC) の調製については次のように行った。ジエチルエーテルにより致死させたラットの表皮をはぎ取り、腹腔内にTyrode液を1匹につき20 ml注入し、腹部を2分間軽くマッサージした後、開腹して腹水液を摂取し、全匹分を1本の遠心管にまとめた。これを $200 \times g$ で5分間遠心し、上清吸引後にD-glucose、gelatin、BSAを除いたTyrode液を20 ml添加して細胞数を 1×10^6 cells/mlに調整した。

細胞の刺激方法は、以下の方法で行った。 2×10^6 cellsを含む細胞懸濁液を $300 \times g$ で5分間遠心後、カルシウムイオノファーA23187を5 μ M、 $CaCl_2$ を0.9 mM含む反応液50 μ lにサンプルを加えたのち、37°Cで20分間インキュベートした。添加直前まで-30°Cで冷却しておいた反応停止液 (アセトニトリル:メ

タノール=6:5) を50 μ lおよび内標準としてプロスタグランジンB₂を1 μ l添加し、反応を停止させた。その後13000 x g、4°Cで10分間冷却遠心し、-30°Cで60分間放置したのち、上清を0.22 μ mフィルター（日本ミリポア、東京）で濾過し、濾液をサンプル液とした。

第4項 酵素抗体法

抗体価の測定は、Yamada *et al.* (1993) の方法に従って行った。IgGおよびIgMの定量には直接法を用い、IgEの定量にはアビジン-ビオチン法を用いた。まず、96穴イムノプレートに固相抗体を加えて37°Cにて1時間保温し、TPBSで3回洗浄した。次に、ブロッキング液を加え、37°Cにて1時間保温もしくは4°Cにて一晩放置した後、洗浄した。これ以後の洗浄操作ではアビジン-ビオチン法で各4回、直接法で各3回行った。次に、一次抗体（サンプル上清）を加えて37°Cで1時間保温し、洗浄した。IgE定量ではさらに二次抗体を加えて37°Cにて1時間保温し、洗浄した。最後に、酵素標識抗体を加えて37°Cで1時間保温して、洗浄液で洗浄後、基質溶液を加えて37°Cで15分間反応後、反応停止液を加えて415nmで吸光度を測定した。

第5項 ロイコトリエンB₄の測定方法

HPLCによってロイコトリエンB₄を定量した (Powell *et al.*, 1987)。カラムはメタノールで洗浄し、移動相を流してHPLCを安定化させた後、流速を1.1 ml/min、rangeを0.01とし、測定吸光度を280nmに設定して調製したサンプルを20 μ lずつ注入し、測定した。

第6項 統計計算

得られた結果は、Duncanの統計計算法 (Duncan, 1955) に従って有意差検定を行った。

第3節 結果

第1項 マウス脾臓リンパ球およびWEHI-279細胞の抗体産生に及ぼす大気中汚染物質の影響

大気汚染物質が免疫系に及ぼす影響を確認するため、はじめに、現在主な大気汚染物質の一つであるディーゼルエンジンから排出される排気ガス中の多環状芳香族炭化水素 (PAH) がマウスリンパ球の抗体産生に及ぼす影響について検討した。終濃度で10 μ MになるようなPAH溶液を調製し、これを1 pMまで1/10毎に希釈しそれぞれマウス脾臓リンパ球に添加して10%FBS含有RPMI-1640培地で72時間培養し、培養後の上清中抗体濃度を酵素抗体法で測定した。その結果Fig. 7-1およびFig. 7-2に示したように、各PAHはマウス脾臓リンパ球のIgMおよびIgGレベルには影響を及ぼさないことが明らかとなった。なお、その際のマウス脾臓リンパ球の生存率は全実験区において80%以上であった。

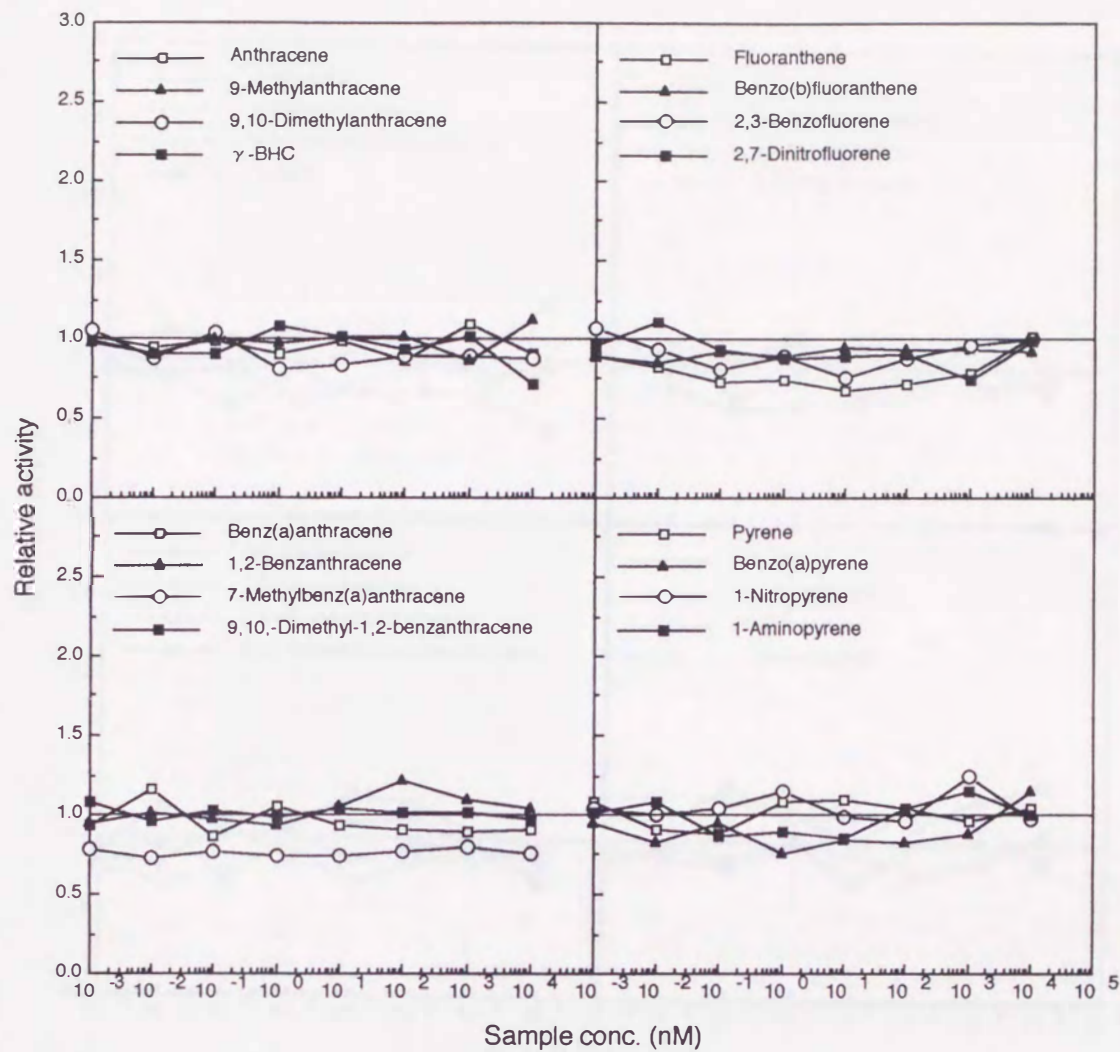


Fig. 7-1. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on IgM Production by Mouse Spleen Lymphocytes. Cells were cultured with 0-10⁵ nM PAH for 72 h and IgM concentration in the culture supernatant was measured by ELISA.

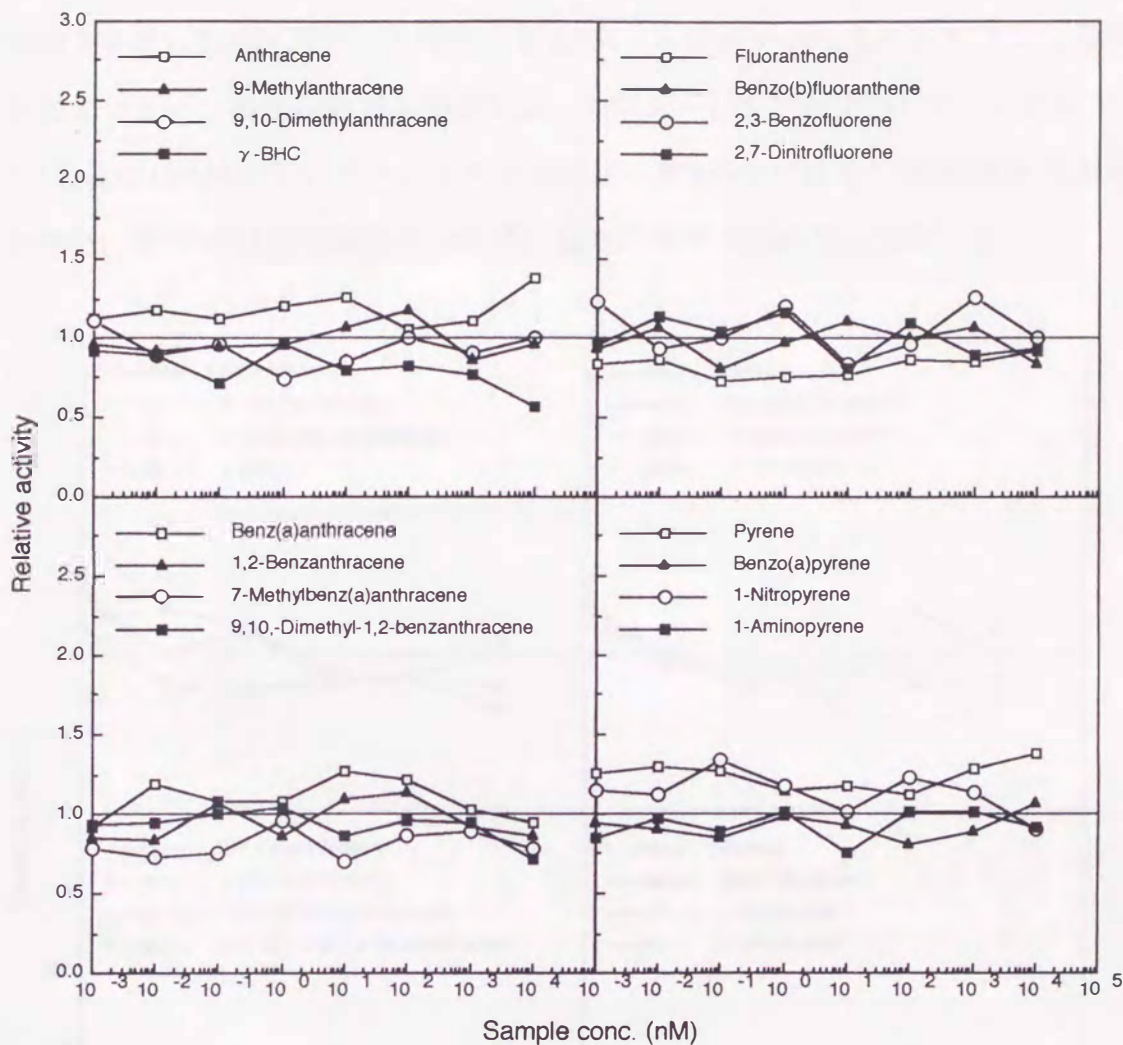


Fig. 7-2. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on IgG Production by Mouse Spleen Lymphocytes. Cells were cultured with $0-10^5$ nM PAH for 72 h and IgG concentration in the culture supernatant was measured by ELISA.

つぎに、B細胞の抗体産生に及ぼすPAHの影響を直接検討するために、マウスリンパ腫WEHI-279細胞を用いて同様の実験を行った。終濃度で10 μ MになるようにPAH溶液を調製し、これを1 pMまで1/10毎に希釈しそれぞれWEHI-279細胞に添加して10%FBSを含むRPMI-1640培地で72時間培養し、培養後の上清中抗体濃度を酵素抗体法で測定した。その結果Fig. 7-3およびFig. 7-4に示したように、低濃度領域においてIgMおよびIgGレベルが高くなる傾向が確認された。特に、アントラセン系化合物である9-メチルアントラセンおよび γ -BHC、

フルオレン系化合物である2,7-ジニトロフルオレン、ベンズアントラセン系化合物である1,2-ベンズアントラセンおよび9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセンおよびピレン系化合物であるピレン、1-ニトロピレンおよび1-アミノピレンが1および10 pMにおいてコントロールに比べてIgGレベルを1.7倍程度まで上昇させた。各PAHは細胞毒性を示さず、細胞生存率は80%以上であった。

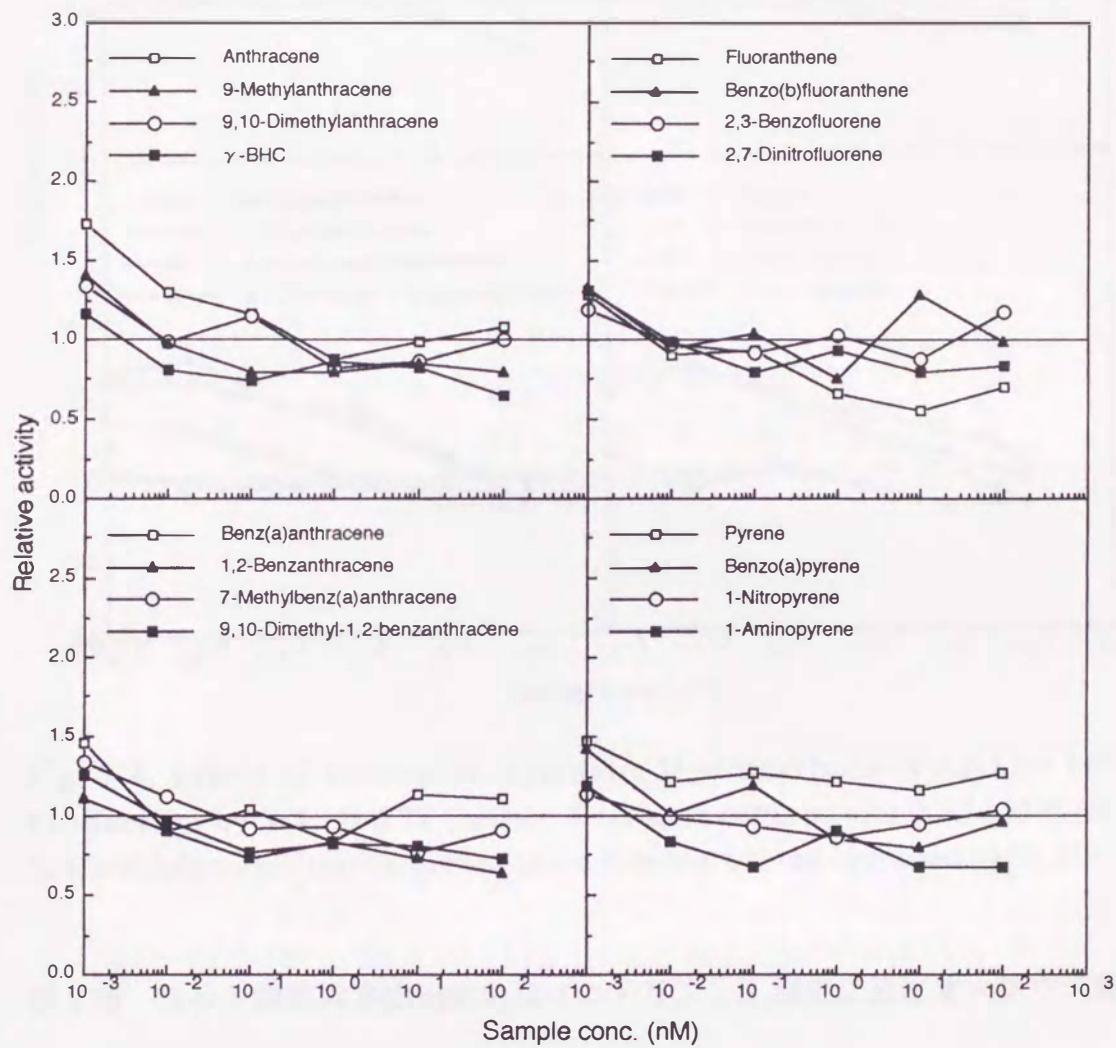


Fig. 7-3. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on IgM Production by WEHI-279 Cells. Cells were cultured with $0-10^5$ nM PAH for 72 h and IgM concentration in the culture supernatant was measured by ELISA.

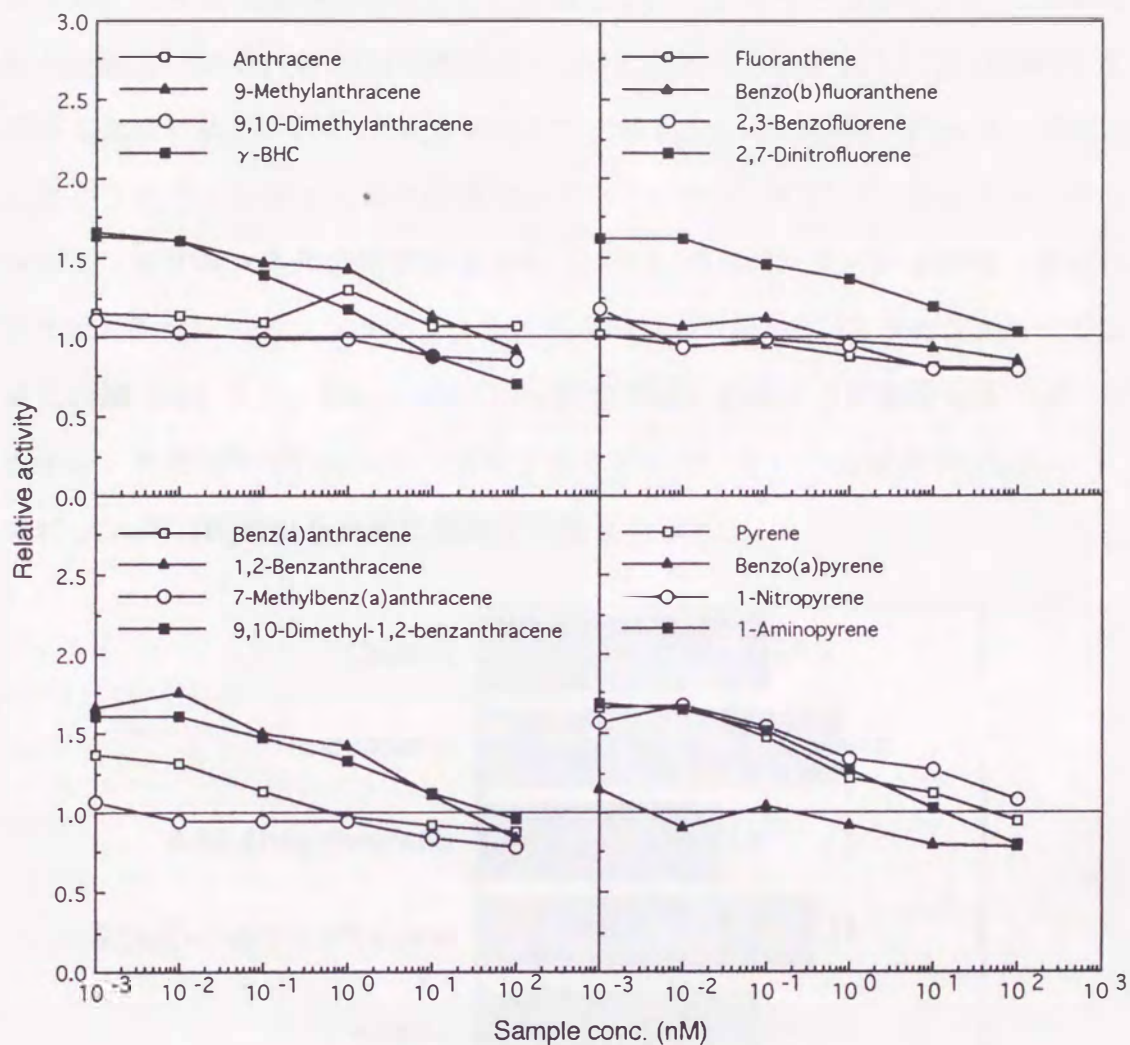


Fig. 7-4. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on IgG Production by WEHI-279 Cells. Cells were cultured with 0-10⁵ nM PAH for 72 h and IgG concentration in the culture supernatant was measured by ELISA.

第2項 ラット腹腔内滲出細胞のロイコトリエンB₄産生に及ぼす大気中汚染物質の影響

PAHは低濃度領域においてIgG濃度を上昇させる傾向が認められたが、抗体産生以外の免疫機構に及ぼすPAHの影響については未だ不明な点が多い。そこで、ラット腹腔内滲出細胞(PEC)のロイコトリエン(LT) B₄産生に及ぼすPAHの影響について検討した。LTB₄は、肥満細胞や好塩基球などの細胞膜リン脂質第2位のアラキドン酸がホスホリパーゼA₂によって加水分解され、アラキドン酸カスケードを経て合成されるエイコサノイドの一種であり、血管透過

性上昇、気管支平滑筋収縮などを引き起こし、アレルギー反応において重要な役割を演じている。各PAHを終濃度10 μ Mとなるように添加して20分間PECを刺激した後に放出されたLTB₄をHPLCで定量した。その結果、Figs. 7-5~8に示したようにアントラセン系化合物ではアントラセン、9,10ジメチルアントラセンが、フルオレン系化合物ではフルオランセンが、ベンズアントラセン系化合物では1,2-ベンズアントラセン、7-メチルベンズ (a) アントラセンが、ピレン系化合物では1-アミノピレンがLTB₄放出を有意に増強する効果を示す一方、フルオレン系化合物では2,7-ジニトロフルオレンが、ピレン系化合物では1-ニトロピレンがLTB₄放出を有意に抑制する効果を示した。

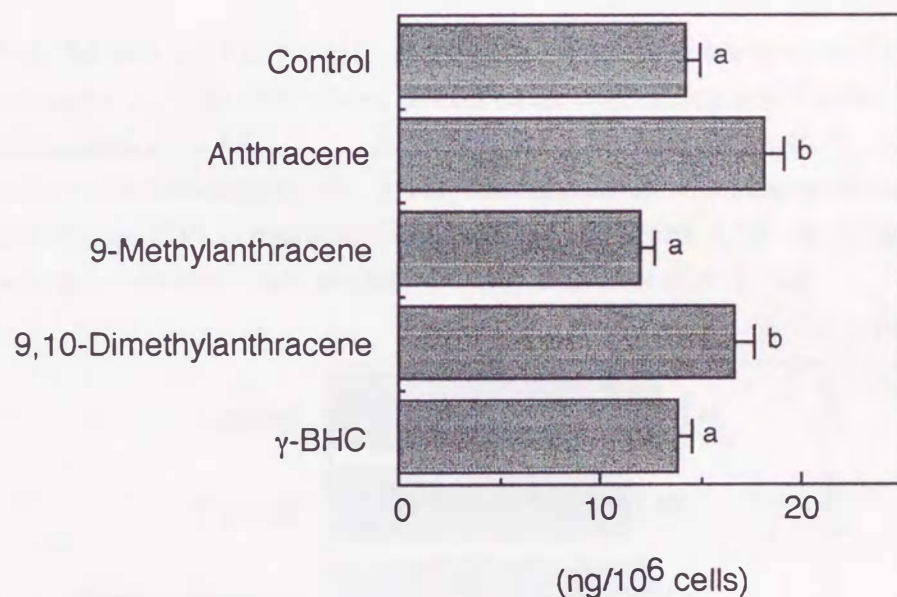


Fig. 7-5. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on Leukotriene B₄ Release from Rat Peritoneal Exudate Cells. Cells were stimulated with A23187 for 20 min in the presence of various PAH including anthracene and its derivatives. LTB₄ concentration in the supernatant was measured by the HPLC method. Results were the mean \pm SE (n=4) and ^{a-c} values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

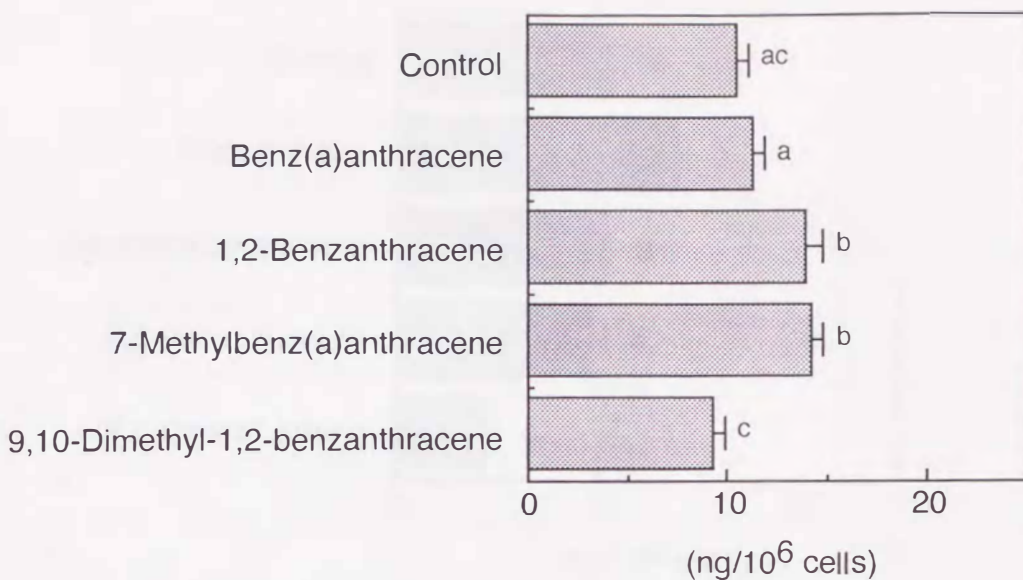


Fig. 7-6. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on Leukotriene B₄ Release from Rat Peritoneal Exudate Cells. Cells were stimulated with A23187 for 20 min in the presence of various PAH including fluoranthene and its derivatives. LTB₄ concentration in the supernatant was measured by the HPLC method. Results were the mean \pm SE (n=4) and ^{a-c} values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

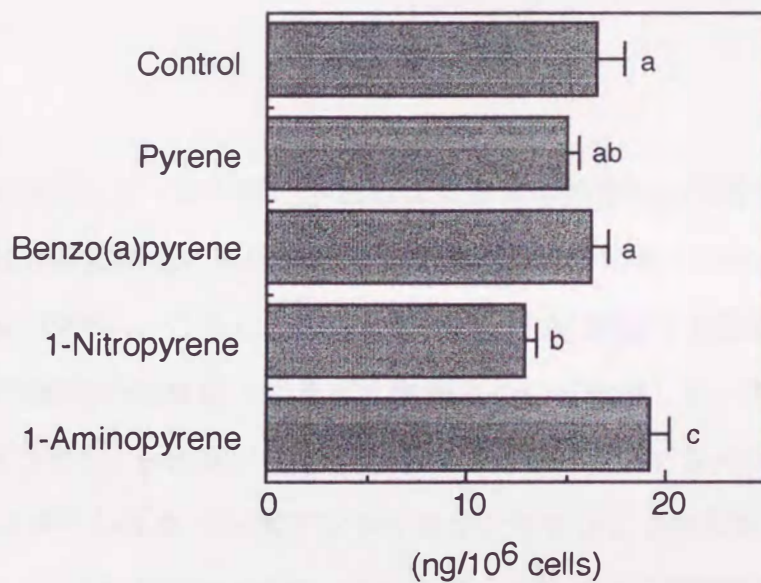


Fig. 7-7. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on Leukotriene B₄ Release from Rat Peritoneal Exudate Cells. Cells were stimulated with A23187 for 20 min in the presence of various PAH including benzo(a)anthracene and its derivatives. LTB₄ concentration in the supernatant was measured by the HPLC method. Results were the mean \pm SE (n=4) and ^{a-c} values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

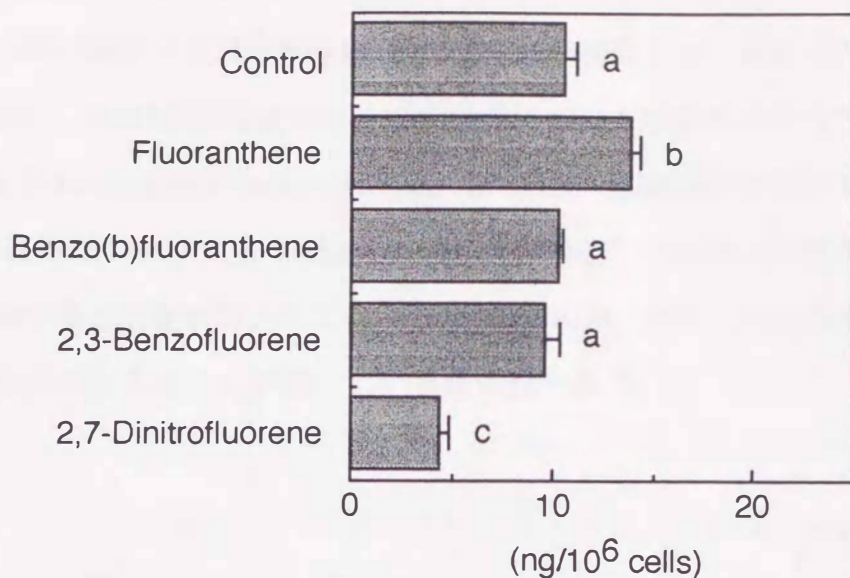


Fig. 7-8. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on Leukotriene B₄ Release from Rat Peritoneal Exudate Cells. Cells were stimulated with A23187 for 20 min in the presence of various PAH including pyrene and its derivatives. LTB₄ concentration in the supernatant was measured by the HPLC method. Results were the mean \pm SE (n=4) and ^{a-c} values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

第4節 考察

ディーゼルエンジンから排出される排気ガス中の多環状芳香族炭化水素 (PAH) は呼吸器疾患の原因物質として注目されている (Diaz-Sanchez, 1997; Sisovic *et al.*, 1996)。こうした報告に基づき、PAHがマウス脾臓リンパ球およびWEHI-279細胞の抗体産生に及ぼす影響について検討した。その結果、9-メチルアントラセン、 γ -BHC、2,7-ジニトロフルオレン、1,2-ベンズアントラセン、9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン、ピレン、1-ニトロピレンおよび1-アミノピレンが1および10 pMで、コントロールに比べてWEHI-279細胞におけるIgGレベルを1.7倍程度まで上昇させた。Juvenile chinook salmon

(*Oncorhynchus tshawytscha*) をTNP-KLHで免疫したとき9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセンを同時に投与したB細胞には影響がなかったが (Arkoosh *et al.*, 1994)、PAHの一種であるフェナンスレンはEpstein-Barr virus (EBV)

で形質転換したヒトB細胞のIgE産生を増強したこと (Tsien *et al.*, 1997) から、リンパ球の機能に及ぼすPAHの影響はその構造によって異なることが示唆された。また、PAHが抗体産生に及ぼす影響についてはまだ分からない点が多いが、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は細胞内に存在するaryl hydrocarbonレセプター (AhR) を介してヒトBリンパ球の免疫グロブリン産生を抑制することが報告されており (Masten *et al.*, 1995)、PAHの構造とAhRとの親和性が抗体産生に影響している可能性がある。

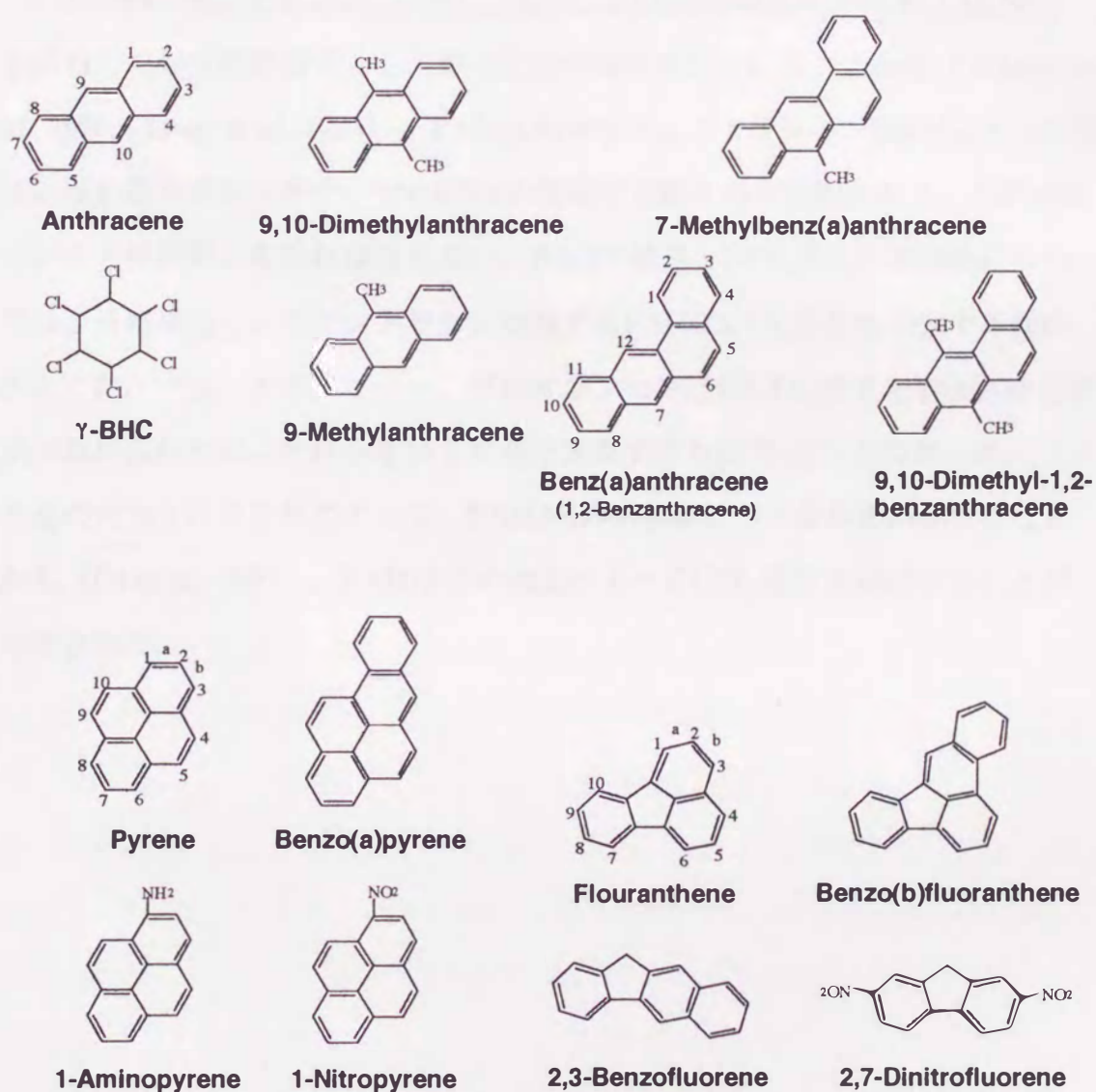


Fig. 7-9. Structures of Poly Aromatic Hydrocarbon (PAH).

さらにPAHの免疫調節機能を調べるため、ラットPECのLTB₄放出に及ぼす影響について検討した。その結果、アントラセン、9,10-ジメチルアントラセン、フルオランセン、1,2-ベンズアントラセン、7-メチルベンズ (a) アントラセンおよび1-アミノピレンがLTB₄放出を有意に促進する効果を示す一方、2,7-ジニトロフルオレンおよび1-ニトロピレンがLTB₄放出を有意に抑制する効果を示した。PAHはAhRを介して様々な影響を及ぼすことが知られており、たとえばAhRを欠損したマウスでは免疫機能が著しく低下し、PAHの一種であるダイオキシンによって誘導される酵素の発現応答が見られないことが報告されている (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995)。また、AhRは核輸送タンパク (ARNT) と結合して転写調節因子として働くことが報告されていることから (Abbott *et al.*, 1996; Carver *et al.*, 1994)、PAHはAhRを介してアラキドン酸からLTへの合成に関わるリポキシゲナーゼmRNAの発現を調節する可能性があり、この点について今後検討しなければならない。PAHの構造とLTB₄産生との関係については、骨格構造としてアントラセンを有するPAHにLTB₄産生を増強する傾向があった。一方、アミノピレン、フルオランセンにはLTB₄産生を増強させる効果が認められたが、それらをニトロ基で置換するとLTB₄産生を抑制した。ニトロ基の付加される位置によって、PAHがDNA損傷に与える影響が異なることから (Fu *et al.*, 1997)、PAHはその構造によってLTB₄産生を調節することが示唆された。

第8章 総括

高度成長期を境に、われわれの食生活および環境は大きく変化した。それに伴って、日本においてアレルギー患者の増加が顕著になってきた。その原因の一つとして、環境中の汚染物質が挙げられる。多くの研究者は環境中の汚染因子とアレルギー罹患率の関係について研究してきた。ディーゼル排気ガス中の微粒子 (DEP) をオブアルブミン (OVA) と共に腹腔および鼻腔に投与したとき、DEPは免疫グロブリン産生に対してアジュバント効果を示すことが明らかとなった (Takafuji *et al.*, 1987, 1989; Takenaka *et al.*, 1995)。しかし、アレルギー患者の増加は、これら大気汚染物質の増加のみで説明することは出来ない。そこで、われわれは大気汚染物質および食品成分とアレルギー発症との関係について検討した。

食餌および環境アレルゲンに対するアレルギーは、おもにI型アレルギー反応、つまり、アレルゲン特異的IgEの誘導が重要な役割を演じる反応によって誘導されると考えられている (Metcalf, 1991)。クラス特異的な抗体産生調節では、胆汁酸やコンカナバリンAはラットリンパ球のIgE産生を増強する (Lim *et al.*, 1994)。一方、ポークウィードマイトジェンはその産生を抑制することが報告されている (Lim *et al.*, 1994)。まず、われわれはラットリンパ球の抗体産生に及ぼす様々な天然食用色素および合成食用色素の影響について検討した。その結果、各天然食用色素は1から10 μM においてIgE産生を抑制した。これらの色素は、様々な食物に0.1% (2-3 μM) の濃度で添加されている。クルクミンを含む*Curcuma longa*の粉末は、漢方薬として用いられるときその投与量は6-10 g/dayであり、この量はクルクミン800 μM に相当する。この濃度は食品添加物として摂食される濃度の約400倍であり、クルクミンの吸収率については不明な点が多いことを考慮する必要があるが、クルクミンを含めた天然色素はIgE産生を抑制することによって抗アレルギー的に作用することが示唆された。また、ガーディニア色素の主成分であるクロシンおよびアナトー色素の主成分であるピキシンは抗酸化剤として用いられている (Escribano *et al.*, 1996;

Thresiamma *et al.*, 1996; Ursini *et al.*, 1994) ので、ガーディニア色素およびアナト一色素のIgE産生抑制効果は抗酸化作用が関係していることが考えられた。

一方IgGおよびIgMは体液性免疫において重要な働きをする抗体である。水溶性天然色素は1 mMで、非水溶性天然色素のクルクミンは100 μ MでIgGおよびIgM産生を抑制したが、10 μ M以下の濃度ではその効果は認められなかった。一方、脂溶性天然色素はIgM産生をわずか1 μ Mで促進した。種々の食品成分による同様なIgM産生促進効果が、ヒト-ヒトハイブリドーマおよびヒトリンパ球において報告されている (Yamada *et al.*, 1989, 1990a, 1990b, 1991; Maeda *et al.*, 1990)。今回用いた天然食用色素の免疫調節機構は明らかでないが、桂皮酸2モルからなるクルクミンはその2量体構造によって、免疫応答調節能を有することが報告されている (Li *et al.*, 1993)。今回の研究により、脂溶性食用色素は体液性免疫応答に対し、増強作用を有することが示唆された。さらに、本研究で用いられた天然食用色素は主要成分以外の微量成分を含んでおり、これらが免疫グロブリン産生に影響を及ぼしていることも考えられる。

一方、合成食用色素に関しては、アゾ色素は、脾臓リンパ球の抗体産生に対しては有意な影響を与えないものの、MLNリンパ球に対してはIgE濃度を上昇させることが示された。また、胆汁酸をIL-4もしくはIL-5の存在下でLPSと共に添加したとき、脾臓リンパ球のIgE産生は抑制されるが、MLNリンパ球のIgE産生は増強されることが報告されている (Lim *et al.*, 1994b; 1995)。これらの結果は、食品成分に対する脾臓およびMLNリンパ球の応答はそれぞれ異なることを示唆している。さらに、病因における食品成分および食品添加物の役割と、それに関連する免疫学的変化を確立するために行われた研究報告によると (Morales *et al.*, 1995)、食品添加物 (タートラジンを含む) とアレルギー発症との間に相関性は認められないことが示されている。それゆえに、全身免疫系に及ぼすアゾ色素の影響は、腸管免疫系に及ぼす影響より穏やかであることが考えられる。

非アゾ色素では、今回選んだ濃度においてIgGおよびIgMはコントロールと同じ産生レベルであった。一方、トリフェニルメタン色素であるブリリアント

ブルーFCFおよびファストグリーンFCF、さらに銅クロロフィリンナトリウムは、脾臓リンパ球では1 μM 以上、MLNリンパ球では10 μM 以上の濃度で脾臓およびMLNリンパ球のIgE産生を強く抑制した。また、IgE産生抑制は銅および鉄クロロフィリンによって誘導されたが、マグネシウムを配位したクロロフィリンにはその効果は認められなかった。

この結果に関して次のような報告がある。銅クロロフィリンナトリウムの毒性は遊離した二価銅イオンに由来するというものである (Worden *et al.*, 1955)。また、ヒトTおよびBリンパ球さらに単球の細胞膜は、 Pb^{2+} もしくは Zn^{2+} に比べて Cu^{2+} によって強い傷害を受けることが走査型電子顕微鏡によって確認された (Steffensen *et al.*, 1994)。免疫グロブリンもしくは免疫応答に及ぼす銅イオンの抑制効果はモルモット (Boroskova *et al.*, 1993) およびヒト

(Bumgardner *et al.*, 1993; Mehanna *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996) においても報告されている。これらの結果より、銅イオンはヒトおよびそれ以外の動物の抗体産生に重要な役割を演じることが示唆された。また、 Fe^{2+} に関しては、マラリア色素から遊離した鉄は脂質の過酸化を誘導することが報告されている

(Schwartz *et al.*, 1992)。 Cu^{2+} もまた不飽和脂肪酸の過酸化を促進することが報告されている (Albertini *et al.*, 1996)。これらの報告および本実験の結果より、 Fe^{2+} もしくは Cu^{2+} イオンによって促進された脂質過酸化はIgE産生の抑制に重要な役割を果たすことが示唆されたが、その作用機構については今後検討する必要がある。

つぎに、食品中微量成分として香辛料を選び、それらが抗体産生に及ぼす影響について検討した。香辛料は食品に風味を付与するほかに腐敗や細菌の繁殖を防ぐ働きがあり (Adegoke *et al.*, 1994)、様々な保存食に利用されてきた。一方、香辛料が生体に及ぼす影響についてはここ数十年間に数多くが報告されてきた。香辛料の薬理作用としては、クローブおよびガラムマサラの抗腫瘍作用 (Zheng *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1995)、黒胡椒および*Capsicum annum*の抗変異原性作用 (Higashimoto *et al.*, 1993; Azizan, *et al.*, 1995) などが報告され、反対に副作用としては、香辛料の摂食によるアレルギー症状の惹起や (Sastre *et*

al., 1996)、赤とうがらしの摂取による皮膚炎の発症 (Cooper *et al.*, 1996; Kanerva *et al.*, 1996) およびaniseedによる喘息の発症 (Fraj *et al.*, 1996) などが報告されている。一方、生体の免疫機構に及ぼす影響については、ヨーロッパにおける「セロリ・ニンジン・ヨモギ・香辛料症候群」においてニンジン特異的IgEの産生に香辛料が関与することが報告されたり (Helbling *et al.*, 1993)、また香辛料中のアレルゲンが花粉や野菜中のアレルゲンと交差反応するという報告 (Niinimaki *et al.*, 1995) があるが、抗体産生に及ぼす影響についてはほとんど報告されていない。そのため、はじめにわれわれはマウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす種々の香辛料の影響について検討した。その結果、オールスパイスパウダー、オニオンパウダー、ニンニクにIgGおよびIgA産生を増強し、カレーパウダー、クローブ、黒胡椒、白胡椒、西洋わさびにIgG産生を増強する傾向が認められた。また、シナモン、ショウガ、セージには強い細胞毒性が認められた。香辛料はDNA修飾誘導作用を有するが (Randerath *et al.*, 1993)、今回見られた細胞毒性がどの作用によって起こったかはさらなる検討が必要である。

多くの香辛料は抗酸化成分を含んでおり、たとえばオールスパイスおよびクローブのメタノール抽出物はヒドロキシラジカルを除去することにより、N- α -t-butoxycarbonyl-fructoselysineおよびN- α -t-butoxycarbonyl-arginineのpentosidine形成を抑制することが報告されている (Oya *et al.*, 1997) ことから、香辛料は生体内において発生したラジカルを抑制し、抗体産生を調節することが考えられる。またWEHI-279細胞においては香辛料は強い抗体産生能を示さないことから、香辛料の抗体産生調節作用にはT細胞由来のサイトカインおよび細胞間の相互作用の関与が考えられる。また、香辛料中の脂溶性成分の含有率は0.1から5.2%であることから、本実験において細胞に香辛料のエタノール抽出物を添加したとき、細胞に対して約30 nMのオイゲノールを添加したものと換算されるが、オイゲノールは抗体産生に影響を及ぼさなかったことから、オイゲノール以外の成分に活性が存在することが示唆された。

これまでわれわれはマウスおよびラットの脾臓あるいは腸間膜リンパ節

(MLN) リンパ球を用いて、様々な食品および環境中の抗体調節因子の検索を行った。この系を用いることによって多くの試料を迅速かつ簡便にスクリーニングすることができた。しかし、さらに詳しいメカニズムを検討する際に問題になるのはT細胞由来のサイトカインの関与を考慮しなければならないということである (Armitage *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1995; Ling *et al.*, 1995)。そのため、われわれは直接B細胞に作用する抗体産生調節因子の検索を行うために、マウスBリンパ腫であるWEHI-279細胞を利用した系も併せて用いることにした。本実験においては九州大学医学部附属生体防御医学研究所より提供されたWEHI-279細胞を用いたが、本来この細胞はWalter and Eliza Hall Institute (WEHI, Melbourne, Australia) において樹立された細胞株である。樹立当初のWEHI-279細胞はB細胞の分化の初期段階に位置し、高密度の細胞膜表面IgM (軽鎖は κ 鎖) を発現しているが、培養上清中における抗体は検出されないことが報告されている (Warner *et al.*, 1979; Gutman *et al.*, 1981)。しかし、この細胞についての情報は非常に少ないため産生される抗体、細胞膜免疫グロブリンおよび抗体に関する遺伝子発現について検討した。まず、われわれはIgGおよびIgE抗体を培養上清中において見出した (Fig. 2-3)。この結果については、B細胞より産生したサイトカインはautocrineまたはparacrine的な作用によってB細胞自身を刺激する (Pistoia, 1997) など、サイトカインの作用もしくは継代途中の突然変異によって抗体産生細胞に分化したことが考えられる。つぎに、細胞膜免疫グロブリンについて検討したところ、本実験におけるほとんどのWEHI-279細胞はIgMを細胞表面に発現していたが、一部にはIgGやIgEを発現することがフローサイトメーターによる分析で示唆された。異なるクラスの抗体を細胞表面に同時に発現するとアポトーシスによって排除されるが (Kindler *et al.*, 1997)、本細胞にこのことが当てはまるかどうかはさらに検討し、IgGおよびIgE発現細胞をクローニングする必要がある。

最後に抗体に関する遺伝子発現については次のようなことが見出された。B細胞がIgMからIgGもしくはIgEへクラススイッチを引き起こすとき胚型転写物 (G γ およびG ϵ) の発現が認められることが知られているが (Ichiki *et al.*, 1993;

Li *et al.*, 1994)、WEHI-279細胞はG γ 、G ϵ 双方の発現が認められたことから、この細胞はIgMからIgGおよびIgEへクラススイッチを起こす能力を備えていることが示唆された。食品中には様々な抗体産生調節因子が見出されているが (Ahmed *et al.*, 1997; Verdaguer *et al.*, 1993)、その調節メカニズムはいまだ不明である。WEHI-279細胞を用いた食品成分および環境中の抗体産生調節因子の検索系は、抗体産生調節メカニズムの解明に対して非常に有用であると思われる。

つづいて、色素を含む様々な食品添加物を用いて、それらがリンパ球の抗体産生に及ぼす影響について検討した。その結果、キサントレン色素であるローズベンガルが50 μ MにおいてIgE濃度を上昇させ、IgGおよびIgM濃度を低下させることが認められた。さらに、ローズベンガルの抗体産生調節機構を検討するため、様々なキサントレン色素を用いてリンパ球の抗体産生に及ぼす影響について調べた。その結果、4個のヨウ素原子と4個の塩素原子を有するローズベンガルが最も強いIgE濃度の上昇効果を示し、4個のヨウ素原子を有するエリスロシンがそれにつづくIgE濃度の上昇効果を示したが、4個の臭素原子と4個の塩素原子を有するフロキシシンには弱い上昇効果しか認められなかった。さらに、ハロゲン原子を持たないアシッドレッド、フルオレセインには抗体産生調節能は認められなかった。これらの結果から、芳香環に結合したハロゲン原子、特にヨウ素原子は、キサントレン色素の抗体産生調節効果に重要な役割を演じていることが示唆された。さらに、ローズベンガルを摂食させたマウスの甲状腺腫瘍の誘導にヨウ素原子が重要な役割を演じていることが報告され (Ito *et al.*, 1986)、ヨウ素原子は甲状腺細胞と何らかの相互作用を及ぼしていることが考えられるため、リンパ球に対してどのような作用を及ぼすかを検討する必要がある。

また、キサントレン色素は光増感反応により一重項酸素を放出することが知られており、その色素をより重い原子 (I>Br>H) で置換すると、光増感作用を受けやすいことが報告されている (Legrum, 1991)。さらに、胆汁酸、不飽和脂肪酸および過酸化水素はラット腸間膜リンパ節 (MLN) リンパ球のIgE産生

を増強し他のクラスの抗体産生を抑制するという報告 (Yamada *et al.*, 1996) もあることから、活性酸素の生成がキサント色素の抗体産生調節活性の原因であることも考えられる。キサント色素以外のヨウ素化合物の効果を調べるため、10 pMから3 mMのチロシン、モノヨードチロシン、ジヨードチロシン、トリヨードサイロニンおよびチロキシンをラット脾臓リンパ球に添加し、抗体産生に及ぼす影響を検討したが、これらにはリンパ球からの抗体産生に影響を及ぼすものは認められなかった。この結果から、芳香環に結合したハロゲン原子の種類および数だけでなくキサント色素の基本構造が抗体産生調節活性に関与していることが示唆された。

ラット脾臓リンパ球を用いた実験ではT細胞の関与が考えられるので、ローズベンガルの抗体産生調節活性のメカニズムをさらに検討するためにマウスBリンパ腫WEHI-279細胞を用いてB細胞に対するローズベンガルの直接的な影響を検討した。WEHI-279細胞は高密度に細胞表面IgMを発現しており、抗体は産生していないという報告がある (Gutman *et al.*, 1981) が、われわれはこの細胞の抗体産生を確認した。さらに、WEHI-279.1細胞は、細胞分化における最終的な成熟期への細胞の活性化およびBリンパ球の免疫グロブリン合成を研究するモデルとして用いられていること (Sibley *et al.*, 1980, 1981; Paige *et al.*, 1982) から、今回われわれが用いた細胞は細胞の分化経路において抗体を産生するように分化したと考えられた。

われわれはローズベンガルをラット脾臓リンパ球に添加したとき、培養上清中のIgE濃度を上昇させ、IgGおよびIgM濃度を低下させることを先に確認したが、抗体濃度の変化はリンパ球からの抗体分泌に影響したものかそれともリンパ球の抗体産生に影響したものかを明らかにするため、WEHI-279細胞に100 μ Mのローズベンガルを添加し24時間後の細胞内および細胞外 (培養上清中) の抗体濃度を酵素抗体法で定量したところ、ローズベンガルは双方におけるIgE濃度を上昇させることを確認した。この結果から、ローズベンガルはT細胞に由来するサイトカイン等の影響を受けずにB細胞に直接働きかけ、抗体分泌ではなく抗体の合成に対して影響を及ぼすことが示唆された。

ローズベンガルのIgE産生促進機構を検討するために、IgE重鎖mRNAであるP ϵ の発現に及ぼすローズベンガルの影響について、RT-PCR法を用いて検討した。この結果、ローズベンガルはWEHI-279細胞のP ϵ の発現を濃度依存的に増強することを見出した。一方、IgMからIgEへのクラススイッチにおいて ϵ 鎖の胚型転写物 (G ϵ) の発現が認められるが (Alt *et al.*, 1982)、今回G ϵ の発現には影響を及ぼさないことから、ローズベンガルはIgMからIgEへのクラススイッチに影響せず、P ϵ の翻訳促進を通じてIgE合成を促進することが考えられた。

同様に、G ϵ の発現に影響を及ぼすことなしにP ϵ の発現を促進させた物質については、Epstein-Barrウイルスで形質転換したヒトB細胞樹立細胞株である2C4/F3細胞をディーゼル排気ガス中の微粒子 (DEP) と共に培養したとき、DEPに含まれる芳香族炭化水素であるフェナンスレンが細胞質中のAhレセプターに結合し、転写因子の誘導を通じてP ϵ の発現を増強させることが報告されている

(Tsien *et al.*, 1997)。フェナンスレンは非水溶性であり細胞膜を通過して細胞内に侵入し、上記のように作用することは容易に想像できる。一方、ローズベンガルは水溶性であるがその構造中にハロゲン原子を有することから疎水的性質も合わせ持つので細胞内に入ることが出来る。よって、ローズベンガルは細胞内におけるシグナル伝達を活性化させP ϵ の発現を促進する可能性が考えられた。

また、今回用いたWEHI-279細胞はG ϵ およびG γ 1を常時発現していることが本研究によって明らかとなった。つまり、IgMからIgEまたはIgG1にクラススイッチを起こしやすいことを意味しており、本来IgMを産生するこの細胞においてIgEおよびIgGの産生が認められる理由ではないかと考えている。本細胞は種々の物質のクラス特異的抗体産生を検討する系として優れた細胞系であると思われる。

本研究において、キサントゲン色素であるローズベンガルが50 μ MにおいてIgE濃度を上昇させ、IgGおよびIgM濃度を低下させることが明らかとなった。ヒト細胞においてローズベンガルが及ぼす影響を検討するため、つぎにわれわれはヒト末梢血リンパ球およびヒト樹立細胞株の抗体産生に及ぼすローズベンガ

ルの効果について検討した。その結果、ローズベンガルはヒト末梢血リンパ球のIgE産生も促進することが明らかとなった。さらに、B細胞に直接及ぼす影響を調べるためにヒト樹立細胞株を用いたところ、ローズベンガルは、IgG産生細胞であるHMy-2細胞の抗体産生を抑制することが確かめられた。これらの結果はマウスおよびラットリンパ球について得られた結果を反映しており、種の違いによるローズベンガルの影響は認められないことが示唆された。

ローズベンガルがB細胞に直接及ぼす影響について検討するために、樹立細胞株としてNAT-30細胞、HMy-2細胞およびU-266細胞を用いたが、初代細胞を用いた培養の結果を反映したのはHMy-2細胞だけであった。NAT-30細胞は無血清培養においても増殖可能なクローンから選抜された細胞であるため

(Murakami *et al.*, 1985)、増殖に血清を必要とする抗体産生細胞とは抗体産生に至るメカニズムが異なる可能性がある。また、U-266細胞はヒト-マウスハイブリドーマでありIgEを多量に産生する細胞株であるため、IgE抗体産生を抑制する因子の検索には有用であるが、本実験系においてはそのメカニズムの解明は困難であるので他の細胞株を用いてさらに検討する必要がある。

さらに、大気汚染物質の免疫調節機構について検討した。ディーゼルエンジンから排出される排気ガス中の多環状芳香族炭化水素 (PAH) は呼吸器疾患の原因物質として注目されている (Diaz-Sanchez, 1997; Sisovic *et al.*, 1996)。こういった報告に基づき、われわれはPAHがマウス脾臓リンパ球およびWEHI-279細胞の抗体産生に及ぼす影響について検討した。その結果、9-メチルアントラセン、 γ -BHC、2,7-ジニトロフルオレン、1,2-ベンズアントラセン、9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン、ピレン、1-ニトロピレンおよび1-アミノピレンが 10^{-3} および 10^{-2} nMで、コントロールに比べてWEHI-279細胞におけるIgGレベルを1.7倍程度まで上昇させた。Juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) をTNP-KLHで免疫したとき9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセンを同時に添加したB細胞には影響がなかったが (Arkoosh *et al.*, 1994)、PAHの一種であるフェナンスレンはEBVで形質転換したヒトB細胞のIgE産生を増強したこと (Tsien *et al.*, 1997) から、リンパ球の機能に及ぼすPAHの影響は

PAHの構造によって異なることが示唆された。また、PAHが抗体産生に及ぼす影響についてはまだ分からない点が多いが、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は細胞内に存在するaryl hydrocarbonレセプター (AhR) を介してヒトBリンパ球の免疫グロブリン産生を抑制することが報告されており (Masten *et al.*, 1995)、PAHの構造とAhRとの親和性が抗体産生に影響している可能性がある。

さらにPAHの免疫調節機能を調べるため、ラットPECのLTB₄放出に及ぼす影響について検討した。その結果、アントラセン、9,10ジメチルアントラセン、フルオランセン、1,2-ベンズアントラセン、7-メチルベンズ (a) アントラセンおよび1-アミノピレンがLTB₄放出を有意に促進する効果を示す一方、2,7-ジニトロフルオレンおよび1-ニトロピレンがLTB₄放出を有意に抑制する効果を示した。PAHはAhRを介して様々な影響を及ぼすことが知られており、たとえばAhRを欠損したマウスでは免疫機能が著しく以下し、PAHの一種であるダイオキシンによって誘導される酵素の発現応答が見られないことが報告されている (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995)。また、AhRは核輸送タンパク (ARNT) と結合して転写調節因子として働くことが報告されていることから (Abbott *et al.*, 1996; Carver *et al.*, 1994)、PAHはAhRを介してアラキドン酸からロイコトリエンへの合成に関わるリポキシゲナーゼmRNAの発現を調節する可能性があり、この点について今後検討しなければならない。PAHの構造とLTB₄放出との関係については、骨格構造としてアントラセンを有するPAHにLTB₄放出を促進する傾向があった。一方、アミノピレン、フルオランセンにはLTB₄放出を促進させる効果が認められたが、それらをニトロ基で置換するとLTB₄放出を抑制した。ニトロ基の付加される位置によって、PAHがDNA損傷に与える影響は異なることから (Fu *et al.*, 1997)、PAHはその構造によってLTB₄放出を調節することが示唆された。

参考文献

- Abbott B. D. and Probst M. R. (1995) Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo. *Development. Dynamics*, 204, 144-155.
- Achinewhu S. C., Ogbonna C. C. and Hart A. D. (1995) Chemical composition of indigenous wild herbs, spices, fruits, nuts and leafy vegetables used as food. *Plant Foods for Human Nutr.*, 48, 341-348.
- Adegoke G. O. and Skura B. J. (1994) Nutritional profile and antimicrobial spectrum of the spice *Aframomum danielli* K. Schum. *Plant Foods for Human Nutr.*, 45, 175-182.
- Ahmed T., Sumazaki R., Nagai Y., Shibasaki M. and Takita H. (1997) Immune response to food antigens: kinetics of food-specific antibodies in the normal population. *Acta Paediatrica Japonica*, 39, 322-328.
- Albertini R., Rindi S., Passi A., Pallavicini G. and De Luca G. (1996) Heparin protection against Fe²⁺- and Cu²⁺-mediated oxidation of liposome. *FEBS Letters*, 383, 155-158.

Ammon H. P. T., Safayhi H., Mack T. and Sabieraj J. (1993)

Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *J. Ethnopharmacol.*, 38, 113-119.

Arkoosh M. R., Clemons E., Myers M. and Casillas E. (1994)

Suppression of B-cell mediated immunity in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) after exposure to either a polycyclic aromatic hydrocarbon or to polychlorinated biphenyls. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 16, 293-314.

Armitage R. J., Macduff B. M., Spriggs M. K. and Fanslow W. C.

(1993) Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J. Immunol.*, 150, 3671-3680.

Azizan A. and Blevins R. D. (1995) Mutagenicity and

antimutagenicity testing of six chemicals associated with the pungent properties of specific spices as revealed by the Ames *S almonella*/microsomal assay. *Arch. Environ. Contami. Toxicol.*, 28, 248-258.

Boroskova Z., Benkova M., Soltys J., Krupicer I. and Simo K. (1993)

Effects of heavy metals emission on the cellular immunity of guinea pigs with experimental ascariasis. *Vet. Parasitol.*, 47, 245-254.

- Bumgardner J. D., Lucas L. C., Alverson M. W. Jr. and Tilden A. B. (1993) Effects of copper-based dental casting alloys on two lymphocyte cell lines and the secretion of interleukin 2 and IgG. *Dental Materials*, 9, 85-90.
- Carver L. A., Hogenesch J. B. and Bradfield C. A. (1994) Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3038-3044.
- Collins R. A. and Oldham G. (1995) Effect of recombinant bovine IL-1 and IL-2 on B cell proliferation and differentiation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 44, 141-150.
- Cooper R. L. and Cooper M. M. (1996) Red pepper-induced dermatitis in breast-fed infants. *Dermatology*, 193, 61-62.
- Dahlen S. E., Kumlin M., Granstrom E. and Hedqvist P. (1986) Leukotrienes and other eicosanoids as mediators of airway obstruction. *Respiration*, 50, 22-29.
- Diaz-Sanchez D., Dotson A. R., Takenaka H. and Saxon A. (1994) Diesel exhaust particles induce local IgE production *in vivo* and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J. Clin. Invest.*, 94, 1417-25.
- Diaz-Sanchez D. (1997) The role of diesel exhaust particles and their associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the induction of

allergic airway disease. *Allergy*, 52, 52-56; discussion 57-58.

Dugas B., Paul-Eugene N., Cairns J., Gordon J., Calenda A., Mencia-Huerta J. M. and Braquet P. (1990) Leukotriene B4 potentiates the expression and release of Fc epsilon RII/CD23, and proliferation and differentiation of human B lymphocytes induced by IL-4. *J. Immunol.*, 145, 3406-3411.

Duncan, D. B. (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11, 1-42.

Escribano J., Alonso G. L., Coca-Prados M. and Fernandez J. A. (1996) Crocin, safranal acid and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett.*, 100, 23-30.

Fernandez-Salguero P., Pineau T., Hilbert D. M., McPhail T., Lee S. S., Kimura S., Nebert D. W., Rudikoff S., Ward J. M. and Gonzalez F. J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, 268, 722-726.

Fischer A. and Konig W. (1994) Modulation of *in vitro* immunoglobulin synthesis of human peripheral blood mononuclear cells by nicotine and cotinine. *Clinical Investigator*, 72, 225-232.

- Ford-Hutchinson A. W., Bray M. A., Doig M. V., Shipley M. E. and Smith M. J. (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, 286, 264-265.
- Fraj J., Lezaun A., Colas C., Duce F., Dominguez M. A. and Alonso M. D. (1996) Occupational asthma induced by aniseed. *Allergy*, 51, 337-339.
- Fu P. P., Qui F. Y., Jung H., Von Tungeln L. S., Zhan D. J., Lee M. J., Wu Y. S. and Heflich R. H. (1997) Metabolism of isomeric nitrobenzo[a]pyrenes leading to DNA adducts and mutagenesis. *Mutat. Res.*, 376, 43-51.
- Fujiyama-Fujiwara Y., Umeda R. and Igarashi O. (1992) Effects of sesamin and curcumin on delta 5-desaturation and chain elongation of polyunsaturated fatty acid metabolism in primary cultured rat hepatocytes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 353-363.
- Gerondakis S. (1990) Structure and expression of murine germ-line immunoglobulin epsilon heavy chain transcripts induced by interleukin 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1581-1585.
- Gough N. M. and Bernard O. (1981) Sequences of the joining region genes for immunoglobulin heavy chains and their role in generation of antibody diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 509-513.

Gronowicz E. and Coutinho A. (1974) Selective triggering of B cell subpopulations by mitogens. *Eur. J. Immunol.*, 4, 771-776.

Gutman G. A., Warner N. L. and Harris A. W. (1981) Immunoglobulin production by murine B-lymphoma cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 18, 230-244.

Helbling A., Lopez M., Schwartz H. J. and Lehrer S. B. (1993) Reactivity of carrot-specific IgE antibodies with celery, apiaceous spices, and birch pollen. *Ann. Allergy*, 70, 495-499.

Higashimoto M., Purintrapiban J., Kataoka K., Kinouchi T., Vinitketkumnun U., Akimoto S., Matsumoto H. and Ohnishi Y. (1993) Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand. *Mutat. Res.*, 303, 135-142.

Holladay S. D. and Smith B. J. (1994) Fetal hematopoietic alterations after maternal exposure to benzo[a]pyrene: a cytometric evaluation. *J. Toxicol. Environment. Health*, 42, 259-273.

Honjo T., Obata M., Yamawaki-Kataoka Y., Kataoka T., Kawakami T., Takahashi N. and Mano Y. (1979) Cloning and complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin γ 1 chain gene. *Cell*, 18, 559-568.

Huang T. S., Lee S. C., and Lin J. K. (1991) Suppression of *c-Jun/AP-1* activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5292-5296.

Ichiki T., Takahashi W. and Watanabe T. (1993) Regulation of the expression of human C epsilon germline transcript. Identification of a novel IL-4 responsive element. *J. Immunol.*, 150, 5408-5417.

Ishida N., Ueda S., Hayashida H., Miyata T. and Honjo T. (1982) The nucleotide sequence of the mouse immunoglobulin epsilon gene: comparison with the human epsilon gene sequence. *EMBO J.*, 1, 1117-1123.

加地浩成. (1993) ディーゼル機関からの排出物の測定. *環境資源対策*, 29, 1125.

Kakar S. S., and Roy D. (1994) Curcumin inhibits TPA induced expression of *c-fos*, *c-jun* and *c-myc* proto-oncogenes messenger RNAs in mouse skin. *Cancer lett.*, 87, 85-89.

Kanerva L., Estlander T. and Jolanki R. (1996) Occupational allergic contact dermatitis from spices. *Contact Dermatitis*, 35, 157-162.

Karras J. G., Morris D. L., Matulka R. A., Kramer C. M. and Holsapple M. P. (1996) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) elevates basal B-cell intracellular calcium concentration and suppresses

surface Ig- but not CD40-induced antibody secretion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 137, 275-284.

Kataoka T., Yamawaki-Kataoka Y., Yamagishi H. and Honjo T. (1979) Cloning of immunoglobulin γ 2b chain gene of mouse: characterization and partial sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4240-4244.

Kawakami T., Takahashi N. and Honjo T. (1980) Complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin μ gene and comparison with other immunoglobulin heavy chain genes. *Nucleic Acid Res.*, 8, 3933-3945.

Kindler V. and Zubler R. H. (1997) Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3. *J. Immunol.*, 159, 2085-2090.

Li C. J., Zhang L. J., Dezube B. J., Crumpacker C. S. and Pardee A. B. (1993) Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1839-1842.

Li S. C., Rothman P. B., Zhang J., Chan C., Hirsh D. and Alt F. W. (1994) Expression of $I\mu$ - $C\gamma$ hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int.*

Immunol., 6, 491-497.

Lim B. O., Yamada K. and Sugano M. (1994a) Inhibition of immunoglobulin production in human Namalwa cells and rat spleen lymphocytes by bile acid. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1107-1111.

Lim B. O., Yamada K. and Sugano M. (1994b) Effects of bile acids and lectins on immunoglobulin production in rat mesenteric lymph node lymphocytes. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, 30A, 407-413.

Lim B. O., Yamada K., Yoshimura K., Watanabe T., Hung P., Taniguchi S. and Sugano M. (1995) Free bile acids inhibit IgE production by mouse spleen lymphocytes stimulated by lipopolysaccharide and interleukins. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 624-627.

Ling N. R., Brown B. and Hardie D. (1995) Production of immunoglobulins by human sIgD⁺ and sIgD⁻ human blood B lymphocytes in response to stimulation with activated T cells and agonistic antibodies; effect of IL-10, IL-2 and mode of activation of T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 101, 369-375.

Loft S. and Poulsen H. E. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.*, 74, 297-312.

Lu Y. P., Chang R. L., Lou Y. R., Huang M. T., Newmark H. L., Reuhl

and A. H. Conney (1994) Effect of curcumin on 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of *c-Jun* and *c-Fos* in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 15, 2363-2370.

Maeda M., Yamada K., Ikeda I., Nakajima H., Tajima M. and Murakami H. (1990) Effects of phenyl compounds on proliferation and IgM production of human-human hybridoma HB4C5 cells cultured in serum-free medium. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1093-1096.

Masten S. A. and Shiverick K. T. (1995) The Ah receptor recognizes DNA binding sites for the B cell transcription factor, BSAP: a possible mechanism for dioxin-mediated alteration of CD19 gene expression in human B lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 27-34.

Mehanna M. T., Rizk M. A., Ramadan M. and Schachter J. (1994) Chlamydial serologic characteristics among intrauterine contraceptive device users: does copper inhibit chlamydial infection in the female genital tract? *Am. J. Obstetrics Gynecol.*, 171, 691-693.

Metcalf D. D. (1991) Food allergy. *Current Opinion Immunol.*, 3, 881-886.

- Morales C., Penarrocha M., Bagan J. V., Burches E. and Pelaez A.
(1995) Immunological study of Melkersson-Rosenthal syndrome.
Lack of response to food additive challenge. *Clin. Exp. Allergy*,
25, 260-264.
- Muranaka M., Suzuki S., Koizumi K., Takafuji S. and Miyamoto T.
(1986) Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the
production of IgE antibody in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 77,
616-623.
- Niebauer J., Hambrecht R., Schlierf G., Marburger C., Kalberer B.,
Kubler W. and Schuler G. (1995) Five years of physical exercise
and low fat diet: effects on progression of coronary artery
disease. *J. Cardiopulmonary Rehabilitation*, 15, 47-64.
- Niinimaki A., Hannuksela M. and Makinen-Kiljunen S. (1995) Skin
prick tests and *in vitro* immunoassays with native spices and
spice extracts. *Ann. Allergy, Asthma, Immunol.*, 75, 280-286.
- Nish W. A., Whisman B. A., Goetz D. W. and Ramirez D. A. (1991)
Anaphylaxis to annatto dye: a case report. *Ann. Allergy*, 66, 129-
131.
- Oya T., Osawa T. and Kawakishi S. (1997) Spice constituents
scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in
a model system. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 263-266.

- Pistoia V. (1997) Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol. Today*, 18, 343-350.
- Plaut M. and Zimmerman E. M. (1993) Allergy and mechanisms of hypersensitivity. In: "Fundamental Immunology", ed by Paul W. E. 3rd ed. New York: Raven Press. 1399-1425.
- Powell W. S. (1987) Precolumn extraction and reversed-phase high-pressure liquid chromatography of prostaglandins and leukotrienes. *Analytical Biochem.*, 164, 117-131.
- Punnonen J., Aversa G. and de Vries J. E. (1993) Human pre-B cells differentiate into Ig-secreting plasma cells in the presence of interleukin-4 and activated CD4⁺ T cells or their membranes. *Blood*, 82, 2781-2789.
- Randerath K., Putman K. L. and Randerath E. (1993) Flavor constituents in cola drinks induce hepatic DNA adducts in adult and fetal mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 192, 61-68.
- Rao A. R. and Hashim S. (1995) Chemopreventive action of oriental food-seasoning spices mixture Garam masala on DMBA-induced transplacental and translactational carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer*, 23, 91-101.
- Sastre J., Olmo M., Novalvos A., Ibanez D. and Lahoz C. (1996) Occupational asthma due to different spices. *Allergy*, 51, 117-

Savage S. M., Donaldson L. A., Cherian S., Chilukuri R., White V. A. and Sopori M. L. (1991) Effects of cigarette smoke on the immune response. II. Chronic exposure to cigarette smoke inhibits surface immunoglobulin-mediated responses in B cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 111, 523-529.

Schwarzer E., Turrini F., Ulliers D., Giribaldi G., Ginsburg H. and Arese P. (1992) Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J. Exp. Med.*, 176, 1033-1041.

Sisovic., Fugas M. and Segal K. (1996) Assessment of human inhalation exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Exposure Analysis Environment. Epidemiol.*, 6, 439-447.

Smith M. A., Easton M., Everett P., Lewis G., Payne M., Riveros-Moreno V. and Allen G. (1996) Specific cleavage of immunoglobulin G by copper ions. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 48, 48-55.

Soni K. B., Rajan A. and Kuttan R. (1992) Reversal of aflatoxin induced liver damage by turmeric and curcumin. *Cancer Lett.*, 66, 115-121.

Srivastava K. C., Bordia A. and Verma S. K. (1995) *Prostaglandin Leukot. Essent. Fatty Acids*, 5 2, 223-227.

Steffensen I. L., Mesna O. J., Andruchow E., Namork E., Hylland K. and Andersen A. R. (1994) Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes *in vitro*. *General Pharmacol.*, 2 5, 1621-1633.

Sui Z., Salto R., Li J., Craik C. and Ortiz de Montellano P. R. (1993) Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. *Bioorg. Med. Chem.*, 1, 415-422.

Takafuji S., Suzuki S., Koizumi K., Tadokoro K., Miyamoto T., Ikemori R. and Muranaka M. (1987) Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 7 9, 639-645.

Takafuji S., Suzuki S., Muranaka M. and Miyamoto T. (1989) Influence of environmental factors on IgE production. In: "IgE, Mast Cells and the Allergic Response", Wiley, Chichester (*Ciba Foundation Symposium* 1 47), 188-204.

Takenaka H., Ke Z., Diaz-Sanchez D., Tsien A. and Saxon A. (1995) Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: Direct effects on B-cell IgE production. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 9 5, 103-115.

Tarlo S. M. and Sussman G. L. (1993) Asthma and anaphylactoid reactions to food additives. *Can. Fam. Physician*, 39, 1119-1123.

Thresiamma K. C., George J. and Kuttan R. (1996) Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced toxicity. *Indian J. Exp. Biol.*, 34, 845-847.

Tsien A., Diaz-Sanchez D., Ma J. and Saxon A. (1997) The organic component of diesel exhaust particles and phenanthrene, a major polyaromatic hydrocarbon constituent, enhances IgE production by IgE-secreting EBV-transformed human B cells *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 142, 256-263.

Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P., Roveri A. and Pifferi G. (1994) A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biol. Med.*, 16, 547-553.

Verdaguer J., Corominas M., Bas J., Valls A., Mestre M., Romeu A., Gonzalez L., Massip E. and Buendia E. (1993) IgE antibodies against bovine serum albumin in a case of eosinophilic gastroenteritis. *Allergy*, 48, 542-546.

Warner N. L., Daley M. J., Richey J. and Spellman C. (1979) Flow cytometry analysis of murine B cell lymphoma differentiation. *Immunol. Rev.*, 48, 197-243.

Weber R. W. (1993) Food additives and allergy. *Ann. Allergy*, 70, 183-192.

Wels J. A., Word C. J., Rimm D., Der-Balan G. P., Martinez H. M., Tucker P. W. and Blattner F. R. (1984) Structural analysis of the murine IgG3 constant region gene. *EMBO J.*, 3, 2041-2046.

Westerholm R. and Egeback K. E. (1994) Exhaust emissions from light- and heavy-duty vehicles: chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. *Environment. Health Perspectives*, 102, 13-23.

Wuhrich B. (1993) Adverse reactions to food additives. *Ann. Allergy*, 71, 379-384.

Yamada K., Ikeda I., Sugahara T., Shirahata S. and Murakami H. (1989) Screening of immunoglobulin production stimulating factor (IPSF) in foodstuffs using human-human hybridoma HB4C5 cells. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2987-2991.

Yamada K., Ikeda I., Sugahara T., Hashizume S., Shirahata S. and Murakami H. (1990a) Stimulation of proliferation and immunoglobulin M production by lactoferrin in human-human and mouse-mouse hybridomas cultures in serum-free conditions. *Cytotechnology*, 3, 123-131.

- Yamada K., Ikeda I., Maeda M., Shirahata S. and Murakami H.
(1990b) Effect of immunoglobulin production stimulating factors in foodstuffs on immunoglobulin production of human lymphocytes. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1087-1089.
- Yamada K., Ikeda I., Nakajima H., Shirahata S. and Murakami H.
(1991) Stimulation of proliferation and immunoglobulin production of human-human hybridoma by various types of caseins and their protease digests. *Cytotechnology*, 5, 279-285.
- Yamada K., Lim B. O. and Sugano M. (1993) Suppression of immunoglobulin production of rat lymphocytes by bile acids. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, 29, 840-841.
- Yamaoka K. A., Claesson H. E. and Rosen A. (1989) Leukotriene B₄ enhances activation, proliferation, and differentiation of human B lymphocytes. *J. Immunol.*, 143, 1996-2000.
- Yasukawa K., Takahashi M., Natori S., Kawai K., Yamazaki M., Takeuchi M. and Takido M. (1994) Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mice. *Oncology*, 51, 108-112.
- Yasni S., Yoshiie K., Oda H., Sugano M. and Imaizumi K. (1993) Dietary *urcuma xanthorrhiza* Roxb. increases mitogenic responses of splenic lymphocytes in rats, and alters populations of the lymphocytes in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 39, 345-354.

Zapponi G. A., Attias L. and Marcello I. (1997) Risk assessment of complex mixtures: some considerations on polycyclic aromatic hydrocarbons in urban areas. *J. Environment. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 16, 209-214.

Zheng G. Q., Kenney P. M. and Lam L. K. (1992) Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J. Natural Products*, 55, 999-1003.

謝 辞

本論文を作成するにあたって終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜わった九州大学農学部山田耕路教授に深甚なる感謝の意を表します。

また本研究中、御指導、御鞭撻をいただいた九州大学農学部菅野道廣名誉教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究中、御助言、御鞭撻をいただいた九州大学農学部今泉勝巳教授ならびに同立花宏文助教授に感謝の意を表します。

本研究に協力された野中美智子助手、宮崎義之氏、徳永陽子氏、鶴田攻氏、春田洋孝氏、原崇氏、林秉佑博士、野田敏司博士、伊藤勇二氏、松尾哲孝博士ならびに九州大学農学部食糧化学講座の方々に感謝します。

マウスおよびヒト細胞株、マウス抗体遺伝子および β -actinのプライマーを提供し、また御助言をいただいた九州大学医学部附属生体防御医学研究所岸原健二助手に感謝の意を表します。

最後に本論文作成を支援していただいた私の両親ならびに親戚の方々に感謝の意を表します。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

