

目次

略号および記号一覧

序論	1
本論	6
第1章 酸化植物油脂が示す即時型と遅延型のアレルギー反応増悪化 ならびに最適な皮膚アレルギー研究モデルの選定	6
第1節 緒言	6
第2節 実験方法	8
第3節 即時型、遅延型およびそれら二相性アレルギー反応に対する 酸化植物油脂の影響	13
第4節 マウス接触性過敏反応の増悪化に寄与する油脂中の成分の解明	16
第5節 考察	20
第2章 酸化オリブ油による遅延型反応増悪化と炎症性サイトカイン発現 との関連性	21
第1節 緒言	21
第2節 実験方法	23
第3節 遅延型反応の感作相および惹起相に及ぼす酸化オリブ油の影響	26
第4節 考察	33
第3章 酸化オリブ油による遅延型反応増悪化時における IL-18 増大機序 と T 細胞分化に及ぼす影響	34
第1節 緒言	34
第2節 実験方法	36
第3節 遅延型反応の感作相における T 細胞分化と抗原特異的なサイト カイン産生に及ぼす酸化オリブ油の影響	39
第4節 考察	46
総括	48
謝辞	50
引用文献	51

略号および記号一覧

ACA	: Active cutaneous anaphylaxis
AGPC	: Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction
APC	: Antigen presenting cell
AP-1	: Activator protein 1
ARE	: Antioxidant response element
AV	: Acid value
cDNA	: complementary DNA
CD	: Cluster of differentiation
CHS	: Contact hypersensitivity
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DNFB	: Dinitrofluorobenzene
FBS	: Fetal bovine serum
GATA3	: GATA binding protein 3
HE	: Hematoxylin-Eosin
IFN	: Interferon
Ig	: Immunoglobulin
IL	: Interleukin
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
mRNA	: messenger RNA
NK	: Natural killer
Nrf2	: Nuclear factor E2-related factor 2
OVA	: Ovalbumin
OXA	: 4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazoline-5-one
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
POV	: Peroxide value
ROS	: Reactive oxygen species
RT	: Reverse transcription
TBARS	: Thiobarbituric acid reactive substances
TMP	: 1,1,3,3-tetramethoxypropan
TNF	: Tumor necrosis factor
TRE	: TPA responsive element

序論

近年、先進国を中心として花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の罹患率が増加しており、社会問題となっている。我が国においては、平成 17 (2005) 年の『リウマチ・アレルギー対策委員会報告書(厚生労働省)』によると、気管支喘息の罹患率は過去 30 年間で 1%から 3%に増加しており、約 400 万人が罹患している¹⁾。また、その僅か 6 年後の平成 23 (2011) 年の『リウマチ・アレルギー対策委員会報告書』によると、喘息の有病率は 5.4%に達し、国民全体で少なくとも約 800 万人が気管支喘息に罹患していると報告されている²⁾。花粉症を含むアレルギー性鼻炎の頻度では 47.2%、アトピー性皮膚炎も 20~30 歳代で 9%前後の人で認められることが明らかとなっている。これらの報告は、わが国の全人口の約 2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患に罹患していることを示しており、急速な罹患者数の増加が懸念されている。このように、アレルギー疾患の罹患率が増加していることから、その原因を解明し、疾病の予防・増悪化の抑制に繋げることは、極めて重要である。

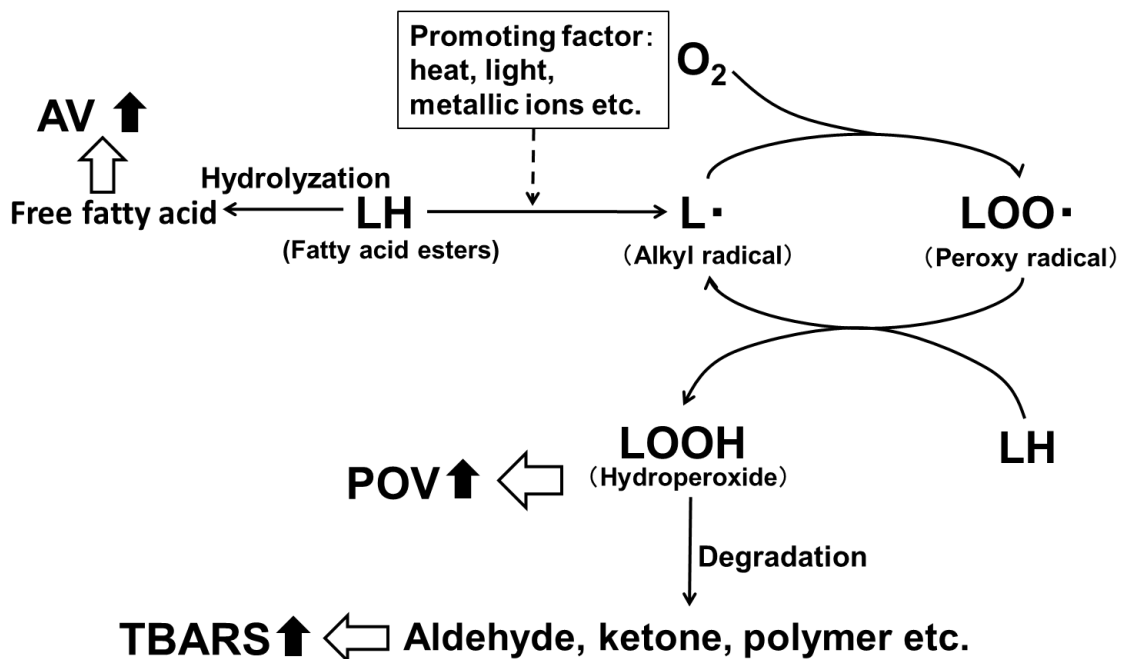
アレルギーとは、特定の抗原が体内に侵入し、二度目以降に同じ抗原が侵入した際に正常よりも過敏な反応を起こし、炎症・組織障害が生じる現象である。アレルギーはその発生機序により即時型アレルギーと遅延型アレルギーに大別される^{3,4)}。即時型アレルギーは抗原の刺激を受けてから 10 分前後で反応が起こると共に、約 30 分後には最大となる。この反応には抗体が関わっていることから、体液性免疫ともいわれ、Gell-Coombs の分類^{3,4)}では I ~ III 型に分類される。このアレルギーの代表的な疾患には、気管支喘息やアレルギー性鼻炎、蕁麻疹、全身性アナフィラキシーショックやアトピー性皮膚炎などがある^{3,5,6)}。一方、遅延型アレルギーは感作リンパ球が関わる細胞性免疫が関わっており、抗原刺激から通常 24~48 時間後に最大反応を示し、Gell-Coombs の分類では IV 型に分類される。このアレルギーの代表的な疾患にはアレルギー性接触性皮膚炎やツベルクリン反応が挙げられる⁷⁾。

一般に、生体防御に重要な機能である免疫応答は多種類の免疫担当細胞から成り立っており、それらが複雑に制御し合ってバランスを保つことで免疫機能が正常に保たれている。そして、この免疫機能の均衡を説明するために Th1/Th2 バランス仮説が提唱されている⁸⁾。この仮説によると、免疫細胞の司令塔として機能するヘルパー T 細胞には Th1 細胞と Th2 細胞が存在し、Th1 細胞は IL-2 や IFN- γ を分泌して T 細胞や NK 細胞を活性化し、Th2 細胞は IL-4 や IL-10 を分泌して B 細胞の抗体産生を亢進する。Th1 細胞から分泌された IFN- γ は Th2 細胞の分化を抑制し、Th2 から分泌される IL-4 および IL-10 は Th1 細胞を抑制する。このように、Th1 と Th2 はお互いに制御し合うことでバランスが維持されているが、このバランスが破綻して Th1 あるいは Th2 型免疫に傾いた状態が、自己免疫疾患や様々なアレルギー疾患の減少となる。遅延

型アレルギーの一つである接触性皮膚炎のモデルである接触性過敏反応 (contact hypersensitivity: CHS) は細胞性免疫によって引き起こされるため、Th1/Th2 バランスが Th1 優位に傾いていることが考えられる⁹⁾。CHS の炎症には細胞傷害性 T 細胞だけでなく Th1 細胞がエフェクター細胞として機能することが報告されている^{10,11)}。また、IFN- γ が細胞傷害活性の亢進など炎症の増強に非常に重要な役割を担っていることから¹²⁾、CHS の増悪化機構を解明するためには Th1 細胞の分化・増殖や IFN- γ 産生を促進する IL-12、IL-18 などを含めたサイトカインの発現量を解析することが重要となる。一方で、気管支喘息や蕁麻疹などの体液性免疫によって引き起こされるアレルギー疾患では Th2 優位に傾いていると考えられ、その発症や増悪化には Th2 サイトカインが重要な役割を担っている。

アレルギー疾患の発症や増悪化と関連する二大要因として、遺伝的要因と環境的要因が重要である。すなわち、遺伝的要因にはアレルギー体質があり、IgE 抗体を産生しやすい遺伝的性質によりアレルギー反応や症状を起こしやすい高感受性の人が存在する¹³⁾。一方、環境要因としてはアレルギー疾患発症の直接的な要因となる原因因子と、発症を促進する寄与因子がある。前者はアレルギー反応を直接引き起こす抗原が挙げられ、後者は、ストレスやウイルス感染等の他に衛生環境や水・大気環境、食環境の変化が挙げられる。これら両要因のうち、どちらがアレルギー疾患の罹患率の増加に寄与しているかについて考察した時に、遺伝的要因が多くの人々に短期間で共通した遺伝的変異をきたしたとは考えにくいことから、著者は遺伝的要因よりもむしろ環境要因の変化が深く関与していると考えられる。近年、急激に変化した環境要因としては、衛生環境、水・大気環境、土壌環境などのほか、食事環境の変化もその一つである。厚生労働省により策定された「国民健康・栄養調査報告」によると、昭和 50 (1975) 年以降、日本人の総エネルギー摂取量に占める脂質から摂取するエネルギーの割合は増加しており、平成 19 (2007) 年度では脂質エネルギー比率は 25% を超え、平成 29 (2017) 年度の報告では 28.0% と漸増の傾向が示されている^{14,15)}。食事から摂取する脂質のうち、オリーブ油、コーン油やゴマ油などの植物油脂が頻繁に使用されている。これらの植物油脂の主な組成は、いずれも不飽和脂肪酸を多く含むトリアシルグリセロールであり、不飽和脂肪酸のアリル水素は反応性が高いため、Scheme 1 に示すように、熱や水分、紫外線、金属イオンなどの反応促進因子の存在下で酸化が進行する^{16,17)}。すなわち、空気中の酸素と油脂中の不飽和脂肪酸エステル (LH) が反応することでアリル水素が引き抜かれ、アルキルラジカルやペルオキシラジカルを生じ、さらに別の脂質分子と反応することで油脂自動酸化の第一次生成物であるヒドロペルオキシドが生成する。これらの反応が連鎖的に進行することでヒドロペルオキシドが蓄積され、過氧化物価 (peroxide value: POV) が上昇する^{18,19,20)}。しかし、ヒドロペルオキシドは不安定であるため、さらに酸化反応が進行するとヒドロペルオキシドはマロンジアルデヒドやアルケナール類などの第二次生成物に分解・重合され、チオバルビツール酸

反応性物質 (thiobarbituric acid reactive substances: TBARS) が上昇する^{20,21)}。また、脂肪酸エステルのエステル結合が加水分解されることで脂肪酸が遊離し、酸価 (acid value: AV) が上昇する²⁰⁾。これら植物油脂が酸化変敗し、生成した酸化物の摂取によって、肝障害が生じることが動物実験において報告されている²⁰⁾。また、酸化植物油脂の摂取により、酸化ストレスマーカーである肝臓中 8-イソプロスタン²²⁾および血漿中の酸化型グルタチオンの上昇²³⁾、血漿中の α -トコフェロールの減少²⁴⁾や、抗酸化酵素系であるカタラーゼ²⁵⁾やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)²³⁾の活性低下が引き起こされることが報告されている。従って、酸化油脂が酸化ストレスを亢進することが強く推察される。この推察は、酸化油脂の摂取が胸腺細胞や脾臓細胞の増殖に影響を及ぼすこと²⁶⁾や、ヘルパーT 細胞の分化に影響すること²⁷⁾からも支持される。それ故に、酸化油脂による免疫器官や免疫機能の亢進または抑制などといった免疫毒性が懸念される。そのため、脂質摂取量の増加に伴う酸化油脂摂取が、アレルギー疾患の罹患率増大の要因の一つであることが考えられ、酸化生成物を含有する酸化油脂がアレルギー反応に及ぼす影響を調べることは、増加の一途をたどるアレルギー疾患の発症を予防するための対策を講じるうえで極めて重要である。そこで本研究では、食事から摂取される酸化油脂のアレルギー反応に及ぼす影響とその作用機序を解明する目的で、各種アレルギーマウスモデルを用いた検討を行うとともに、アレルギー反応増悪化に寄与する酸化油脂中の酸化生成物の影響について調べた。また、酸化油脂による増悪化が認められた CHS について、アレルギー反応の感作相および惹起相の炎症性サイトカイン発現と T 細胞亜集団分布について解析を行った。



Scheme 1. Oxidation mechanisms of fatty oil

第 1 章では、酸化植物油が実際にアレルギー反応を増悪化するのか否かを明らかにするために、実験に用いた酸化油脂として、3 ヶ月以上室温で静置することで自然酸化させた酸化オリブ油が示す各種アレルギー反応に及ぼす影響を検討した。皮膚アレルギーはアレルギーモデルとして遅延型、即時型および二相性のいずれのアレルギーモデルも存在するため、遅延型アレルギー反応を示す接触性過敏反応 (contact hypersensitivity: CHS)、即時型アレルギー反応を示す能動皮膚アナフィラキシー (active cutaneous anaphylaxis: ACA) および即時型と遅延型の二相性のアレルギー反応を示す dinitrofluorobenzene (DNFB) 誘発性皮膚炎の 3 つのアレルギーモデルを用いて評価した。その結果、酸化オリブ油投与によっていずれのアレルギー反応も増悪化を惹起することが観察された。また、酸化油脂中のどのような酸化生成物がアレルギー反応の増悪化に寄与するのかを明らかにするために、高 POV 以外にも高 AV や高 TBARS 値の試料をそれぞれ調製したほか、UV 照射で酸化した POV が高値の植物油を調製し、これら試料が CHS に及ぼす影響を検討した。その結果、酸化植物油による CHS の増悪化は AV や TBARS 値および油脂の脂肪酸組成には関係なく、POV 依存的であることから、アレルギー反応の増悪化は植物油一般に含まれる不飽和脂肪酸エステルの過酸化物に起因することが示唆された。

第 2 章では、投与する油脂の酸化度とアレルギー反応の増悪化に用量依存性が認められた CHS に着目し、酸化オリブ油による CHS 増悪化の作用機序の解明を試みた。具体的には、CHS の感作相および惹起相の炎症性サイトカイン発現を経日的、経時的に解析したところ、酸化オリブ油は感作相において、耳介中の IL-18 発現量を増大させることが明らかとなった。また、炎症惹起相においては IFN- γ 発現量が増大し、CHS が増悪化することが観察された。これらの結果から、酸化オリブ油は、CHS の炎症部位において IFN- γ 誘導因子である IL-18 の増大を介して、炎症時の IFN- γ の発現量を増大することにより、耳介腫脹を増大させていることが考察された。

第 3 章では、酸化オリブ油による炎症部位における IL-18 増大の作用機序と IL-18 増大による Th1 分化の亢進が認められるか否かを明らかにするために、まず、IL-18 の転写因子である activator protein 1 (AP-1) およびプロセシング酵素である caspase-1 の活性に及ぼす酸化オリブ油の影響を検討した。その結果、酸化オリブ油は脾臓細胞において、AP-1 および caspase-1 の活性化促進を介した転写および翻訳後修飾を促進することにより脾臓および血中の IL-18 量を増大することを明らかにした。また、Th1 細胞の分化・増殖を促進する IL-18 産生が増大したことから、T 細胞亜集団分布が変動していることが考えられたため、T 細胞亜集団解析を行ったところ、酸化オリブ油は接触性過敏反応の感作相において CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞のいずれも増加させることを見出した。さらに、CD3⁺CD4⁺細胞の Th1/Th2 バランスについて検討したところ、酸化オリブ油投与によって Th1 細胞の指標である IFN- γ および T-bet 発現量は増大し、Th2 細胞の指標である IL-4 および GATA3 発現量は減少していること

を認めた。また、 $CD3^+CD4^+$ 細胞および $CD3^+CD8^+$ 細胞による抗原刺激によるサイトカイン産生を *in vitro* 実験系において検討したところ、酸化オリーブ油は $CD3^+CD4^+$ 細胞による抗原特異的な $IFN-\gamma$ 産生を増大させた。これらのことから、酸化オリーブ油の摂取は、脾臓、血中および炎症部位における $IL-18$ 発現増大を介して $Th1$ 型免疫応答を増強することにより、接触性過敏反応による炎症反応を増悪化することが明らかとなった。

本研究では、アレルギー疾患の罹患率増加、症状の増悪化に寄与する環境要因の一つとして酸化油脂摂取による影響を検討した結果、その油脂中に含まれる不飽和脂肪酸エステル¹の過酸化物の量に依存したアレルギー反応が増悪化されることを見出した。また、酸化オリーブ油は接触性過敏反応の感作相において $IL-18$ 産生を増大させることで $IL-12$ 存在下での $Th1$ 細胞の分化・増殖を促進し、炎症惹起時における $IFN-\gamma$ 産生を増大させることによって、接触性過敏反応を増悪化させることを見出した。これら酸化植物油脂がアレルギー反応を増悪化することを明らかにした成果は、アレルギー疾患の罹患率増加、症状の増悪化の原因解明に貢献するとともに、将来、 $IL-18$ を指標としたアレルギー疾患の早期発見や増悪化の予防対策に繋がることが期待される。

本論

第 1 章 酸化植物油脂が示す即時型と遅延型のアレルギー反応増悪化ならびに最適な皮膚アレルギー研究モデルの選定

第1節 緒言

アレルギー疾患の罹患率増加への寄与が示唆される環境要因の中でも、食事環境の変化に伴った酸化植物油脂の摂取がアレルギー疾患の増悪化に関与することが考えられる。アレルギーはその発症機序から即時型と遅延型の二つに分類される^{3,4)}。即時型アレルギーの中でもアレルギー疾患の多くを占める I 型アレルギーは、一度目の抗原侵入により、その抗原に対して特異的に結合する IgE 抗体が産生され、肥満細胞や好塩基球にあらかじめ結合する。再度抗原が侵入した際に直ちに抗原抗体反応が起こる結果、肥満細胞や好塩基球からヒスタミンやロイコトリエンなどの生理活性物質が放出され、血管拡張や血管透過性の亢進が起こり、浮腫や掻痒などが生じる現象である。蕁麻疹や気管支喘息、全身性アナフィラキシーがこのタイプに分類される^{3,5,6)}。一方、遅延型アレルギーは IV 型アレルギーともいわれ、抗原と特異的に反応する T 細胞によって起こる反応である。一度目の抗原侵入後、マクロファージや樹状細胞、ランゲルハンス細胞などの抗原提示細胞がリンパ節に移行して抗原提示を行うことにより T 細胞が応答し、その抗原と特異的に反応する T 細胞が分化・増殖する。再度、抗原が侵入した際には抗原提示細胞が感作 T 細胞に抗原提示を行うことにより生理活性物質が放出されてマクロファージを活性化し、周囲の組織障害、炎症が起こる現象である。IV 型アレルギーは抗原侵入からリンパ球の集積、増殖、活性化に時間を要し、通常 24~48 時間後に浮腫や発赤などの反応が最大となる。アレルギー性皮膚炎やツベルクリン反応がこのタイプに分類される⁷⁾。また、アトピー性皮膚炎のように、体液性免疫による IgE 抗体の関与だけでは説明がつかず、即時型反応と遅延型反応の両方が認められることから体液性免疫と細胞性免疫の両方が関わっているアレルギー疾患も存在する^{28,29,30)}。

食事から摂取される植物油脂にはオリーブ油やコーン油、ゴマ油など、多様なものが存在するが、いずれも多くの不飽和脂肪酸を含むトリアシルグリセロールを主成分とする単純油脂である。これらの油脂は不飽和脂肪酸を含むため、自動酸化によって容易に酸化される^{16,17)}。油脂の自動酸化によって第一次生成物であるヒドロペルオキシドが生成し^{18,19,20)}、さらに酸化されることで第二次生成物であるマロンジアルデヒドやアルケナル類が生成する^{20,21)}。また、水と反応し、脂肪酸エステルが加水分解されることで脂肪酸が遊離する²⁰⁾。このように、酸化変敗した油脂にはいくつかの酸化生成物が含まれることが考えられる。脂質摂取量の増加に伴って、長期保存や加熱調理等により酸化された油脂を摂取する機会が増加することが想定されるため、酸化植物油

脂摂取が健康に及ぼす影響について検討する重要性が高まっている。実際に、酸化植物油摂取が肝臓中 8-イソプロスタン²²⁾、血漿中酸化型グルタチオン²³⁾および α -トコフェロール²⁴⁾の減少のおよびカタラーゼ²⁵⁾や GPx²³⁾などの抗酸化酵素系の活性低下を引き起こすことが動物実験で報告されており、酸化ストレスの亢進に關与することが推察される。酸化ストレスの亢進は、気管支喘息^{31,32,33)}、アトピー性皮膚炎^{34,35,36)}の増悪化と關連していることが報告されている。これらのことを合わせて考えると、酸化油脂摂取がアレルギー疾患の増悪化にも關与している可能性を示唆している。実際に、マウスを用いた動物実験において、酸化植物油の摂取によって胸腺細胞およびリンパ球の増殖率が変動した²⁶⁾との報告や、ヘルパーT 細胞の分化に影響を及ぼすこと²⁷⁾が報告されている。しかし、実際に酸化油脂摂取がアレルギー反応に及ぼす影響についてはほとんど検討されておらず、アレルギー疾患の罹患率増加の原因解明と発症予防対策を講じる上で、酸化油脂摂取とアレルギー反応増悪化との關係性を明らかにすることが極めて重要である。

アレルギー疾患には即時型反応、遅延型反応およびその両方の反応を示すものがあることから、酸化植物油によるアレルギー反応増悪化について検討するためにはまず最適なアレルギーモデルを選定することが必要である。そこで本研究では、遅延型および即時型のアレルギー反応の両方のアレルギーモデルが存在する皮膚アレルギーに着目し、遅延型アレルギーとして CHS、即時型アレルギーとして ACA および即時型と遅延型の二相性のアレルギー反応として DNFB 誘発性皮膚炎のマウスモデルを用いて検討することとした。植物油は、日本人の摂取する一価不飽和脂肪酸の 88%はオレイン酸であることから、80~90%程度がオレイン酸で構成されるオリブ油を代表として用いて、開封後 3 ヶ月から 3 年間静置することで自動酸化によって自然酸化されて POV が高値を示すオリブ油について検討を行った。また、投与する油脂の酸化度依存的な増悪化が認められた CHS に着目し、CHS の増悪化がどのような酸化生成物に起因するのかを明らかにするために、POV 以外にも AV または TBARS 値のみが高い油脂試料を作製した。すなわち、脂肪酸としてオレイン酸を、マロンジアルデヒドの前駆体として 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP)をそれぞれオリブ油に添加することで AV または TBARS 値が高値を示す油脂試料を作製し、これらが CHS に及ぼす影響について検討した。さらに、油脂の酸化方法や脂肪酸組成、含有する夾雑物によって生じる酸化生成物が異なることが考えられるため、オリブ油以外にもコーン油、ゴマ油およびオレイン酸のトリグリセリドで構成される合成油脂であるトリオレインを用い、その UV 照射による酸化生成物が CHS に及ぼす影響についても検討した。

第2節 実験方法

1) 動物

SPF-BALB/c 系雌性マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan)から購入した。γ線滅菌固形試料 CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)とろ過滅菌水道水を自由に摂取させ、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 47~67%、明暗サイクル 12 時間のバリアシステムを施した動物室で感作を行うまで 1 週間飼育した。動物実験は摂南大学の動物実験に関する規定に従って実施した。

2) 試薬

オリーブ油は山善製薬株式会社 (Osaka, Japan)、コーン油は味の素株式会社 (Tokyo, Japan)、ゴマ油は小堺製薬株式会社 (Tokyo, Japan)から購入した。4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one (OXA)、ovalbumin (OVA) および dinitrofluorobenzene (DNFB)はt-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, U.S.A.)から購入した。トリオレインは東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)から購入した。その他、一般試薬はいずれも特級品を用いた。

3) 油脂試料の調製および投与

自然酸化オリーブ油は、オリーブ油を開封後室温で 3 ヶ月から 3 年間保存したオリーブ油のうち、自動酸化により POV が高値を示し、Table 1 の条件を満たすものを用いた。UV 酸化されたオリーブ油、コーン油、ゴマ油およびトリオレインは紫外線を照射することにより酸化した。すなわち、直径 100 mm のガラス製シャーレに油脂約 50 mL を入れ、波長 253.7 nm、出力 3.0 W の UV ランプを約 50 cm の距離から実測値 38.5 mW/cm^2 の照射量で照射した。紫外線強度は紫外線強度計 UVC-254 (Sato Shoji Co., Ltd., Tokyo, Japan)で測定した。自然酸化および UV 酸化した油脂としては、Table 1 に示す POV が 30 mEq/kg 以上で AV および TBARS が新鮮なオリーブ油と同程度のものを用

Table 1 Index of experimental fatty oil

	Fresh oil	Oxidized oil
Peroxides value (POV)	< 10 mEq/kg	$\geq 30 \text{ mEq/kg}$
Acid value (AV)	$\leq 1 \text{ mg/g}$	$\leq 1 \text{ mg/g}$
Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)	N.D.	N.D.

N.D.: not detected.

いた。

AV または TBARS のみが高値を示す油脂試料は新鮮な油脂に脂肪酸またはアルデヒド類をそれぞれ添加することで作製した。すなわち、新鮮なオリーブ油 10 mL にオレイン酸 250 μ L を添加して AV が 5 mg/g 以上のものを high AV 油脂、マロンアルデヒドの前駆体である 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP) 0.18 μ L を添加して TBARS が 50 μ mol/g 以上のものを high TBARS 油脂として用いた。これらの油脂はマウスに 100 μ L/day の投与量で強制経口投与した。

4) 油脂変質試験

(1) 過酸化値 (peroxide value: POV)

油脂 1 g に acetic acid-chloroform (3:2) 25 mL および飽和 KI 溶液 1 mL を加え、密栓して緩く振り混ぜ、暗所で 10 分間静置した。その後、H₂O 30 mL を加えて激しく振り混ぜた後、デンプン溶液を指示薬として 0.01 mol/L Na₂S₂O₃ 溶液で滴定した。別に空試験を行い、次式に従い POV (mEq/kg) を算出した。

$$\text{POV (mEq/kg)} = \frac{(a - b)f}{\text{試料採取量(g)}} \times 10$$

a: 試料における 0.01 mol/L Na₂S₂O₃ 溶液の滴定数 (mL)

b: 空試験における 0.01 mol/L Na₂S₂O₃ 溶液の滴定数 (mL)

f: Na₂S₂O₃ 溶液の力価

(2) 酸価 (acid value: AV)

油脂約 5 g を中性の ethanol-diethylether (1:1) 100 mL に溶かし、phenolphthalein 試液を指示薬として 0.1 mol/L KOH 溶液で滴定した。滴定値から以下の式に従って AV (mg/g) を算出した。

$$\text{AV (mg/g)} = \frac{a \times 5.611}{\text{試料採取量(g)}} \times f$$

a: 0.1 mol/L KOH の消費量 (mL)

f: 0.1 mol/L KOH の力価

(3) チオバルビツール酸反応生成物 (TBARS)

油脂約 150 mg に 0.81% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液 10 mL、20% acetate buffer 75 mL、0.8% butylated hydroxytoluene (BHT) 2.5 mL を加えた後、H₂O を加え

で全量を 100 mL とし、激しく振り混ぜて均一な乳濁液とした。この乳濁液 2 mL を 5°C に冷却し、同様に冷却した 0.6% 2-thiobarbituric acid (TBA) 溶液 2 mL を加えて混和し、5°C で 60 分間冷却した後、沸騰水浴中で 60 分間加熱した。冷後、H₂O 1 mL、*n*-butanol-pyridine (15:1, v/v) 混液 5 mL を加えて振とうし、1,300×g で 20 分間遠心分離した後、*n*-butanol 層について波長 532 nm における吸光度を測定した。別に、油脂を含まない対照液について同様に処理した得られた上清の吸光度を測定し、以下の式に従って TBARS (μmol/g) を算出した。

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/g}) = \frac{(A - A_0) \times 5.8 \times 10^6 \times 50}{\text{試料採取量(g)} \times 156000}$$

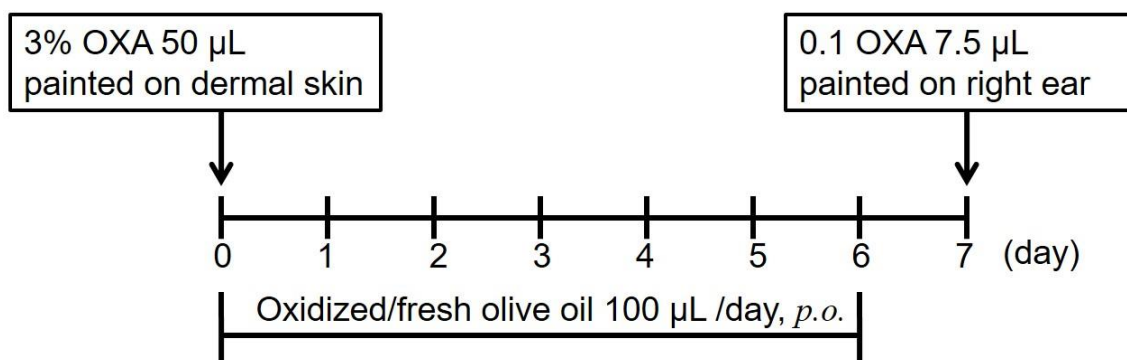
A: 試料の 532 nm における吸光度

A₀: 対照液の 532 nm における吸光度

5) 接触性過敏反応 (Contact hypersensitivity: CHS) の誘発

不完全抗原である OXA は皮膚に塗布することで皮膚のキャリアタンパク質と結合して抗原性を獲得する。この OXA を用いて CHS モデルを作成した。すなわち、麻酔下、バリカンで剃毛したマウス (7 週齢、1 群 4-6 匹) の背部に、3% OXA/ethanol-acetone (3:1 v/v) 50 μL を塗布することで感作した。感作した後、1 週間毎日あるいは隔日で 3) に示す条件に従って油脂を経口投与し、その後、右耳介に 0.1% OXA/ethanol 7.5 μL を塗布することにより CHS を惹起した (Scheme 2)。その後、デジタルシックネスゲージ (Ozaki MFG Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、経時的に左右耳介の厚さを測定した。なお耳介の腫脹は、以下の式を用いて算定した。

耳介の腫脹 = (OXA 側の塗布後の厚さ - OXA 側の塗布前の厚さ) - (対照側の塗布後の厚さ - 対照側の塗布前の厚さ)

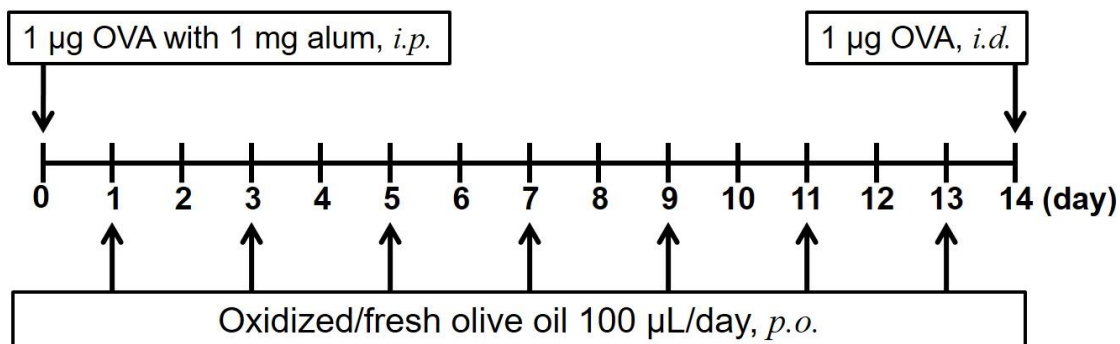


Scheme 2. Experimental protocol of CHS

6) 能動皮膚アナフィラキシー (active cutaneous anaphylaxis: ACA) の誘発

ACA の誘発は Inagaki らの方法に従って行った。すなわち、生理食塩水 100 μ L 中に OVA 1 μ g、水酸化アルミニウムゲル (alum) 1 mg を混合したものをマウス (7 週齢、1 群 5-6 匹) に腹腔内投与することで感作した。感作した後、2 週間隔日で 3) に示す条件に従って油脂を経口投与した。その後、麻酔下でマウス尾静脈より 0.5% Evans blue 0.25 mL を投与し、右耳介に 0.01% OVA 10 μ L を皮内投与することで ACA を惹起した (Scheme 3)。惹起した 30 分後に耳介を摘出し、1 mol/L KOH 0.3 mL に浸漬し、37°C で一晩反応させることで溶解した。その後、3.3 mol/L H₃PO₄-acetone (3:67 v/v) 0.7 mL を加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌し、室温、1,000 \times g で 10 分間遠心した後、acetone 層について波長 620 nm における吸光度を測定した。また、Evans blue を一定量皮内投与した耳介を用いて検量線を作製した。この検量線から耳介中における Evans blue の血管外漏出量を定量した。また、左耳介には OVA を含まない生理食塩水を同量皮内投与し、非特異的な Evans blue 量の漏出量を求め、以下の式を用いて能動皮膚アナフィラキシー反応に基づく Evans blue の血管外漏出量を算定した。

$$\text{色素漏出量}(\mu\text{g}) = \text{OVA 側の色素漏出量} - \text{対照側の色素漏出量}$$



Scheme 3. Experimental protocol of ACA

7) DNFB 反復塗布誘発性皮膚炎の誘発

不完全抗原である DNFB は皮膚に塗布することで皮膚のキャリアタンパク質と結合して抗原性を獲得する。この DNFB を用いて DNFB 誘発性の二相性皮膚炎モデルを作成した。すなわち、麻酔下、0.15% DNFB/acetone 7.5 μ L をマウス (5 週齢、1 群 5-6 匹) の右耳介に塗布することで感作した。油脂の投与は 3) に従って行い、感作を行った翌日から 1 週間当たり 3 回、4 週間経口投与した。感作の 1 週間後から、右耳介に

0.15% DNFB/acetone 7.5 μ L を 1 週間間隔で反復塗布することで即時型および遅延型の二相性アレルギー性皮膚炎を惹起した。その後、デジタルシックネスゲージを用いて、経時的に左右耳介の厚さを測定した。なお耳介の腫脹は、以下の式を用いて算定した。

耳介の腫脹 = (DNFB 側の塗布後の厚さ - DNFB 側の塗布前の厚さ) - (対照側の塗布後の厚さ - 対照側の塗布前の厚さ)

8) 血漿中 IgE 力価の測定

血漿試料は抗凝血処理した注射筒を用いてマウスから全血を採取し、4°C、12,000 \times g で 3 分間遠心分離して調製した。血漿中の OVA 特異的 IgE 力価の測定は Mouse OVA-IgE ELISA KIT (Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan)を用いて測定した。すなわち、OVA を固相化した 96 穴プレートを洗浄液で洗浄後、biotin 結合抗マウス IgE 抗体 50 μ L、10 倍希釈した血漿 10 μ L を加えて攪拌し、室温で 1 時間反応させた。洗浄液で洗浄した後、peroxidase-avidin 結合物 100 μ L を加えて攪拌し、室温で 30 分間反応させた。さらに、洗浄液で洗浄し、発色液 100 μ L を加えて攪拌し、室温で 20 分間反応させた後、反応停止液 100 μ L を加えて攪拌し、450 nm における吸光度を測定した。また、OVA 特異的 IgE 標準溶液を用いて検量線を作製した。この検量線から血漿中の OVA 特異的 IgE の力価を定量した。

9) 統計解析

実験値は平均値 \pm 標準偏差で表し、2 群間の検定には Student の *t* 検定を、多群の検定には Bonferroni の多重比較検定を伴う一元配置 ANOVA を用いて統計学的に処理した。*p* 値が 0.05 未満のときに有意であると判定した。

第3節 即時型、遅延型およびそれら二相性アレルギー反応に対する酸化植物油の影響

遅延型、即時型および二相性アレルギー反応に及ぼす酸化オリーブ油投与の影響を検討した。はじめに、遅延型アレルギー反応を示す CHS に及ぼす酸化オリーブ油の影響について検討した。まず、日本人の脂質エネルギー摂取比率の推移を調査したところ、最近 20 年間で約 3%程度増加していること^{14,15)}がわかった。マウスの摂取食餌量は約 4 g/day、飼料のカロリーは 357 kcal/100 g であることから、カロリー換算すると 14.3 kcal/day となり、さらにこの 3%に相当する 0.43 kcal を脂質量に換算すると 48 mg、すなわち 50 μ L 程度と算出された。そこで摂取カロリーの 3%に合わせて、投与する油脂の量は 1 日当たり 50 μ L が適当であると判断し、1 日間隔で投与することから 100 μ L/匹と設定した。3% OXA を剃毛したマウスの背中に塗布して感作した後、新鮮または酸化オリーブ油を 100 μ L/day の投与量で 1 週間強制経口投与した。感作から 7 日後にマウスの耳介に 0.1% OXA を塗布して CHS を惹起し、耳介の厚さを測定して腫脹を算出した。その結果、Fig. 1 に示すように、新鮮オリーブ油を投与した群では、OXA 塗布 6 時間後から徐々に耳介腫脹が増大し、24 時間後をピークにその後減少した。油脂を投与しなかったときの耳介腫脹は新鮮オリーブ油投与群と差異は認めらず、

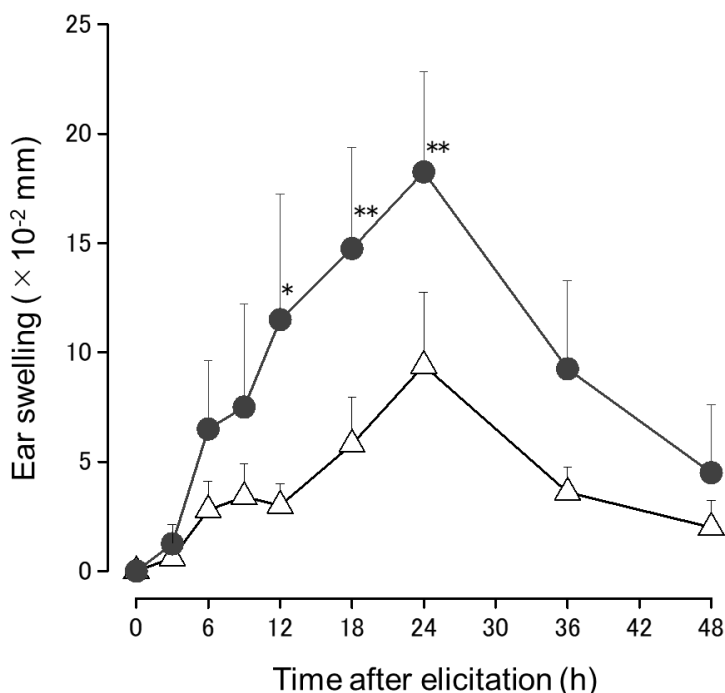


Fig. 1. Time-dependent effects of oxidized olive oil on ear swelling due to CHS. Mice were orally administered fresh olive oil (POV = 6.34 ± 1.50 mEq/kg) and oxidized olive oil (POV = 36.6 ± 1.79 mEq/kg) for 7 days and CHS was elicited. Fresh olive oil (Δ) and oxidized olive oil (\bullet). The values are the mean \pm SD (n = 4). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. fresh olive oil group.

Allergol Int. 2015 64(1):66-72 から一部改変して引用

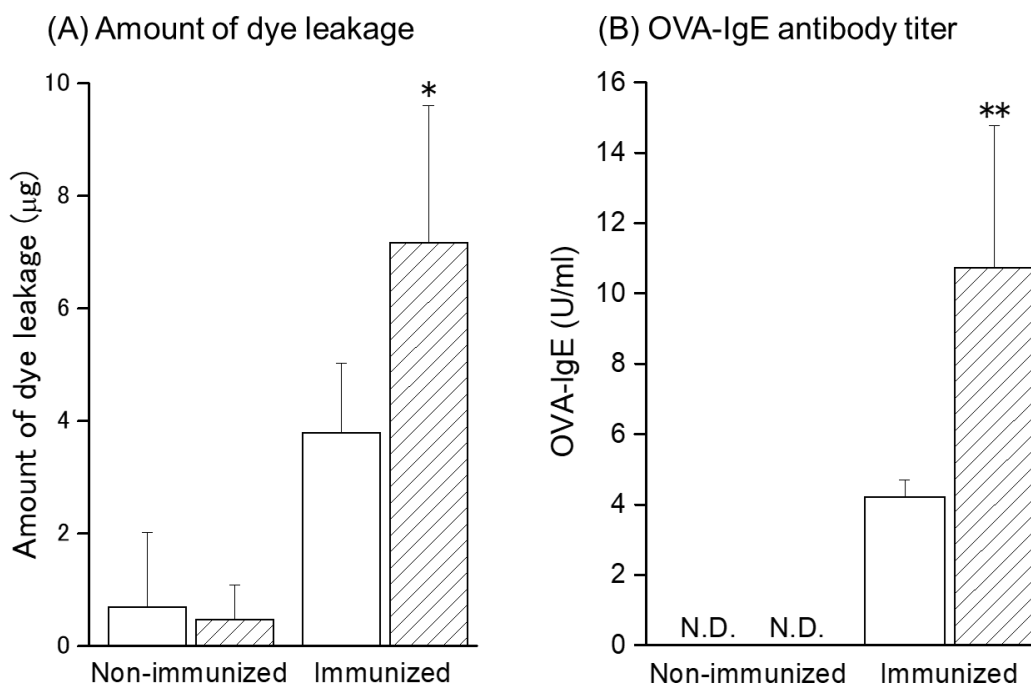


Fig. 2. Effect of oxidized olive oil on ACA. Mice were administered fresh olive oil (POV = 3.66 ± 1.75 mEq/kg) and oxidized olive oil (POV = 75.0 ± 3.03 mEq/kg) for 14 days and ACA was elicited. Fresh olive oil (□) and oxidized olive oil (▨). The values are the mean ± SD (n = 5-6). *P<0.05, **P<0.01 vs. fresh olive oil group.

Allergol Int. 2015 64(1):66-72 から一部改変して引用

油脂投与による体重の変化や下痢などの症状も認められなかった (data not shown)。酸化オリーブ油投与群では新鮮オリーブ油投与群と同様に OXA 塗布 6 時間後から耳介腫脹が認められ、24 時間後をピークにその後減少したが、6 時間以降のいずれの時間においても、新鮮オリーブ油投与群と比較して耳介腫脹の増大が見られ、12、18 および 24 時間後においてその差は有意であった。

次に、即時型アレルギー反応を示す ACA に及ぼす酸化オリーブ油の影響について検討した。OVA 1 µg を腹腔内投与することによりマウスを感作した。その後、2 週間、1 日間隔で新鮮または酸化オリーブ油を経口投与し、その翌日に、耳介皮内に 1 µg OVA を投与することにより ACA を惹起した。惹起 30 分後における耳介の血管外色素漏出量を測定した結果、Fig. 2A に示すように、新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で有意な増大が見られた。また、血漿中の OVA 特異的 IgE 抗体を測定した結果、Fig. 2B に示すように、酸化オリーブ油投与群で顕著な増大が見られた。

遅延型および即時型のアレルギー反応のいずれにおいても、酸化オリーブ油の投与により増悪化することが認められたため、次に、即時型および遅延型の二相性のアレルギー反応を示す DNFB 反復塗布による皮膚炎マウスモデルを用いて即時型および遅延型のアレルギー反応に及ぼす酸化オリーブ油の影響について検討した。すなわち、

マウスの耳介に DNFB 7.5 μ L を塗布して感作し、新鮮または酸化オリブ油を 1 週間あたり 3 回、4 週間経口投与した。DNFB 感作 1 週間後から DNFB を 1 週間に 1 回の間隔で反復塗布して皮膚アレルギーを惹起し、耳介の厚さを経時的に測定して耳介腫脹を算出した。その結果、Fig. 3A に示すように、感作時には新鮮および酸化オリブ油のいずれの投与群でも刺激性の皮膚炎は認められなかった。次に、Fig. 3B に示すように、1 回目の惹起ではいずれの投与群も 1 時間後をピークとする即時型の皮膚炎および 12~24 時間後にかけて起こる遅延型の皮膚炎が認められ、酸化オリブ油投与群では新鮮オリブ油投与群に比べて遅延型反応における有意な増大が認められた。さらに、反復塗布によって即時型および遅延型のいずれの皮膚炎もより強く誘導され、2 回目の惹起では即時型反応が、3 回目の惹起では即時型および遅延型の両方の皮膚炎が酸化オリブ油投与によって有意に増悪化することが確認された (Fig. 3C, D)。

以上のことから、マウスの遅延型、即時型および二相性の各種アレルギーモデルである CHS、ACA および DNFB 皮膚炎が酸化オリブ油の投与によって増悪化することが明らかとなった。

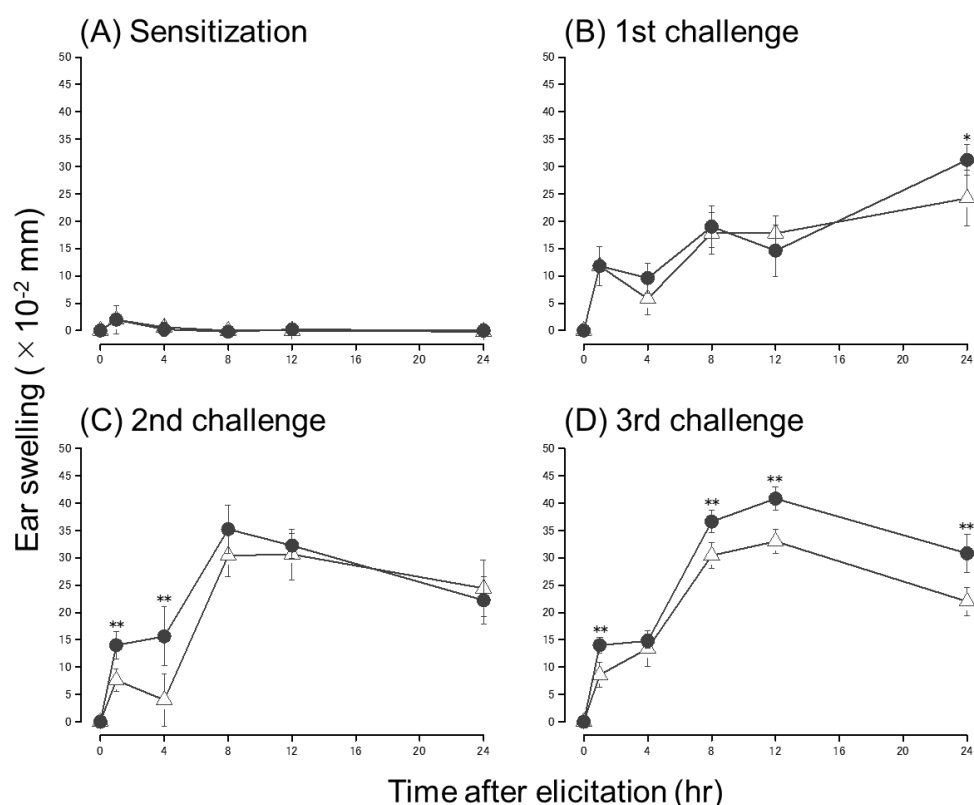


Fig. 3. Effect of oxidized olive oil on DNFB-induced dermatitis. Mice were orally administered fresh olive oil (POV = 3.95 ± 0.81 mEq/kg) and oxidized olive oil (POV = 80.2 ± 2.99 mEq/kg) 3 times a week for 4 weeks and allergic dermatitis was elicited repeatedly at 1-week intervals. Fresh olive oil (Δ) and oxidized olive oil (●). The values are the mean ± SD (n = 5). *P < 0.05, **P < 0.01 vs. fresh olive oil group. *Allergol Int.* 2015 64(1):66-72 から一部改変して引用

第4節 マウス接触性過敏反応の増悪化に寄与する油脂中の成分の解明

酸化オリーブ油の投与によって各種アレルギー反応の増悪化が認められたが、どのような酸化生成物がアレルギー反応の増悪化に関与しているのかは明らかでない。そこでまず、油脂酸化指標の一つである POV とアレルギー反応増悪化との間に用量反応関係が認められるか否かを明らかにするために、POV の異なる酸化オリーブ油を調製し、マウスに同じ用量の酸化オリーブ油をそれぞれ投与したときの CHS に及ぼす影響を検討した。その結果、Fig. 4A に示すように、酸化オリーブ油を1日間隔で7日間経口投与したマウスは酸化オリーブ油の POV に依存して接触性過敏反応による耳介腫脹が増大することが確認された。次に、酸化オリーブ油を投与する回数を1日間隔から毎日に変更し、同様に実験を行った。その結果、Fig. 4B に示すように、1日間隔で投与した時と同様に、POV 依存的な耳介腫脹の増大が認められたが、POV が 56.4 mEq/kg 以上ではプラトーに達していることが示された。また、1日間隔で投与したときと毎日投与したときの耳介腫脹を比較すると、新鮮オリーブ油投与群では顕著な差異は認められなかった

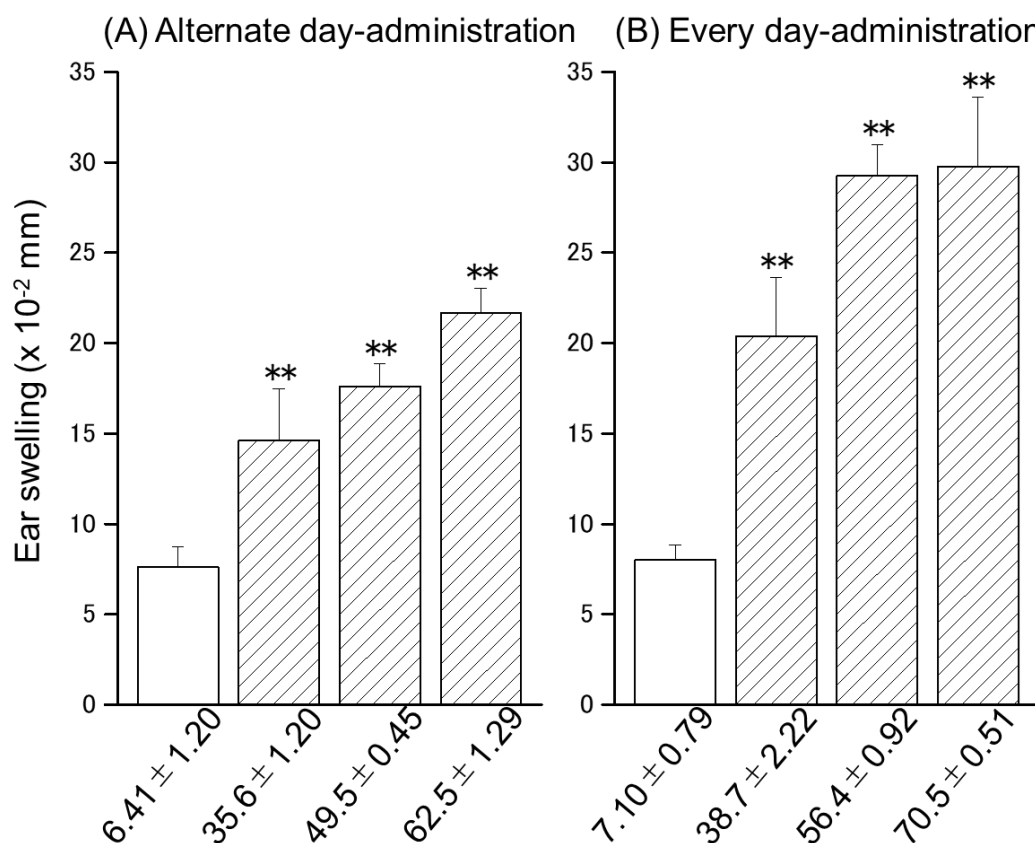


Fig. 4. Dose-dependent effects of oxidized olive oil on CHS. CHS was elicited 7 days after the OXA sensitization. Ear swelling was measured 24 hr after the elicitation. Fresh olive oil (□) and oxidized olive oil (▨). The values are the mean ± SD (n = 5-6). ***P*<0.01 vs. fresh olive oil group.

Allergol Int. 2015 64(1):66-72 から一部改変して引用

が、酸化オリブ油を投与した群では、1 日間隔で投与したときよりも毎日投与したときの方がより増大する傾向が見られた。そのため、接触性過敏反応による耳介腫脹の増大は、投与する油脂の総量ではなく、投与する油脂中のヒドロペルオキシド合計量に依存することが示唆された。同様に、ACA および DNFB 皮膚炎についてもアレルギー反応の増悪化と POV との間に用量反応関係が認められるかどうか検討したところ、明確な濃度依存的な反応は見られなかった (data not shown)。そのため、以降の検討は明確な POV 依存性が認められた CHS に焦点を絞り、詳細な検討を行った。

酸化オリブ油中の酸化生成物には、POV で表されるヒドロペルオキシド以外にもその分解によって生じるアルデヒド・ケトン類や加水分解によって生成される脂肪酸が含まれることが考えられる。これらの酸化生成物が酸化オリブ油による CHS の増悪化に関与するかどうかを明らかにするために、次に、POV 以外の酸価(AV)およびチオバルビツール酸反応生成物(TBARS)が高値を示す油脂試料を投与したときの CHS に及ぼす影響を検討した。すなわち、POV が高値を示す酸化オリブ油以外に、新鮮オリブ油にオレイン酸またはマロンジアルデヒドの前駆体である 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP)をそれぞれ添加することにより AV 高値または TBARS 高値を示す油脂試料を作製した。それぞれの油脂試料の POV、AV および TBARS 値を測定した結果を Table 2 に示す。それぞれ POV、AV または TBARS 値のみが高く、他の指標は新鮮オリブ油と同程度の値を示す油脂が作製できた。これらの油脂をマウスに投与して CHS を惹起した結果、Fig. 5 に示すように、POV 高値の酸化オリブ油は耳介腫脹を増大させたが、POV 値が新鮮オリブ油と同程度で AV または TBARS 高値のオリブ油投与群では新鮮オリブ油群と比べて差異は認められなかった。このことから、遊離脂肪酸やマロンジアルデヒドなどの酸化生成物は CHS の増悪化には関与せず、POV を指標とするヒドロペルオキシドの投与量に依存して増悪化することが示唆された。

酸化オリブ油による CHS の増悪化は、AV や TBARS 値には関係なく POV 依存的事実であることが確認されたが、油脂を構成する脂肪酸の種類やその他の含有成分の違いによって異なるのか否かは明らかでない。そこで、コーン油、ゴマ油およびオレイン酸の脂肪酸エステルで構成される合成油脂であるトリオレインを用いて酸化オリブ油と同程度の POV を示す油脂を作製し、脂肪酸組成やその他含有成分の違いが CHS の増悪化に影響するか否かについて検討した。Table 3 に示すように、オリブ油、コーン油、ゴマ油およびトリオレインはいずれも UV 照射によって POV が上昇したが、AV および TBARS 値は新鮮な油脂と同程度に低値であった。これらの油脂をマウスに投与して CHS を惹起した結果、Fig. 6 に示すように、いずれの酸化油脂を投与したときも新鮮油脂を投与したときに比べて有意な耳介腫脹の増大が認められた。油種に関わらず、新鮮油脂投与群の耳介腫脹は同程度であり、酸化油脂投与群で同様に増悪化が見られたことから、この CHS の増悪化は、オリブ油に限らず、コーン油やゴマ油などの植物油一般に含有する不飽和脂肪酸エステルの過酸化に起因することが示唆さ

れた。

Table 2 Properties of olive oil with a high POV, high AV, and high TBARS level

Index	Fresh oil	High POV	High AV	High TBARS
POV (mEq/kg)	9.40 ± 0.56	55.5 ± 0.95	9.20 ± 0.27	9.23 ± 0.24
AV (mg/g)	0.41 ± 0.02	0.51 ± 0.01	5.34 ± 0.02	0.42 ± 0.03
TBARS (μmol/g)	N.D	N.D	N.D	52.4 ± 0.14

N.D.: not detected

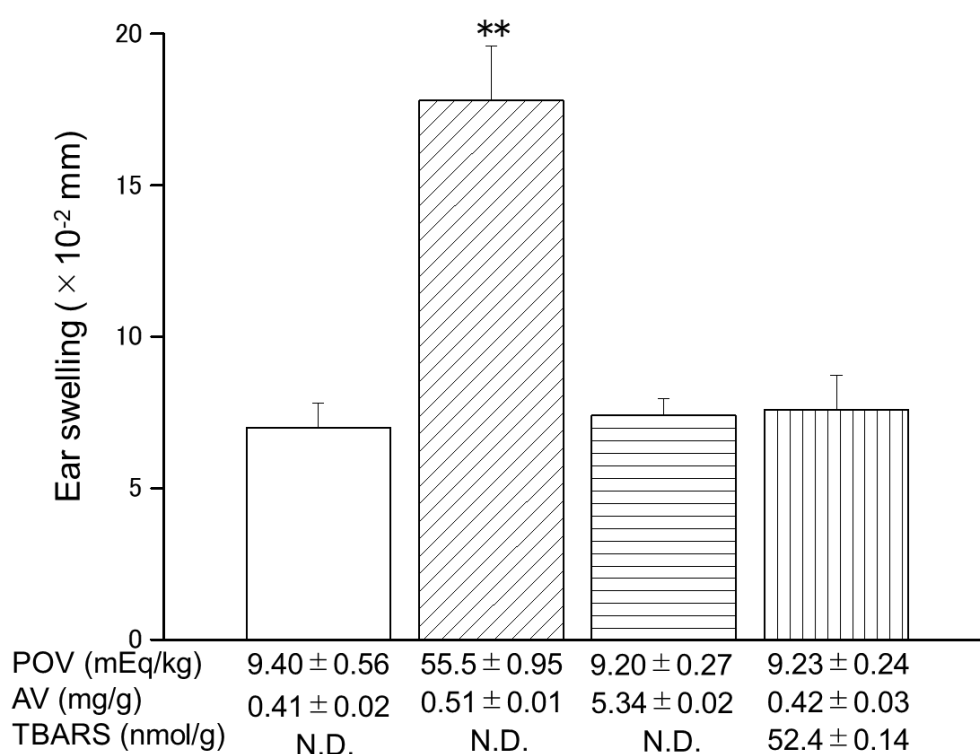


Fig. 5. Effects of possible oxygenated products in oxidized olive oils on CHS. CHS was elicited 7 days after the OXA sensitization. Ear swelling was measured 24 h after the elicitation. The values are the mean ± SD (n = 5-6). Fresh oil (□), high POV oil (▨), high AV oil (▤), and high TBARS oil (▥). **P<0.01 vs. the fresh oil group.

Allergol Int. 2015 64(1):66-72 から一部改変して引用

以上の結果から、酸化オリーブ油による CHS の増悪化は、Table 1 の条件を満たした酸化オリーブ油の場合では、遊離脂肪酸やアルデヒド類などの酸化生成物は関与せず、植物性油脂一般に含まれる不飽和脂肪酸エステル由来のヒドロペルオキシドの含有量に依存して引き起こされることが考えられた。

Table 3 Properties of UV-irradiated oil

Variety	UV-irradiation	POV (mEq/kg)	AV (mg/g)	TBA ($\mu\text{mol/g}$)
Olive oil	-	5.85 ± 1.22	0.34 ± 0.02	N.D.
	+	57.2 ± 0.76	0.40 ± 0.02	N.D.
Corn oil	-	5.90 ± 2.85	0.16 ± 0.03	N.D.
	+	68.2 ± 0.73	0.19 ± 0.06	N.D.
Sesame oil	-	5.11 ± 1.72	0.14 ± 0.02	N.D.
	+	63.5 ± 0.47	0.37 ± 0.10	N.D.
Triolein	-	3.94 ± 0.54	0.34 ± 0.03	N.D.
	+	52.3 ± 0.16	0.39 ± 0.06	N.D.

N.D.: not detected

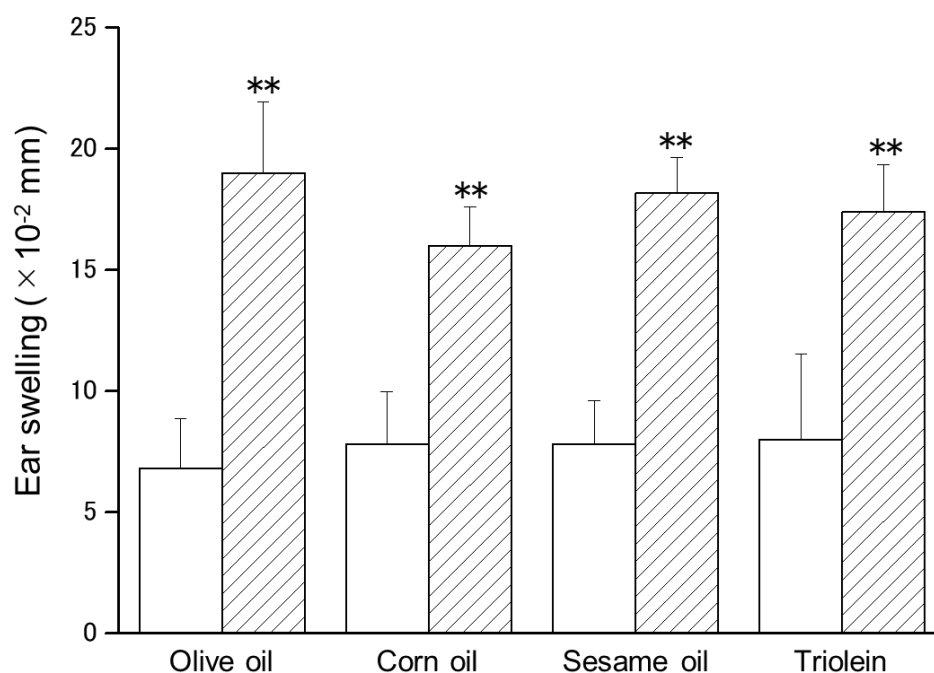


Fig. 6. Effect of various UV-irradiated frying oils on CHS. CHS was elicited 7 days after the OXA sensitization. Ear swelling was measured 24 hr after the elicitation. Fresh oil (\square) and oxidized oil (hatched). The values are the mean \pm SD (n = 5-6). ** $P < 0.01$ vs. fresh oil group.

Allergol Int. 2015 64(1):66-72 から一部改変して引用

第5節 考察

酸化植物油の摂取が酸化ストレスを亢進すること、および酸化ストレスの亢進がアレルギー反応を増悪化することが報告されているが、酸化植物油の摂取がアレルギー疾患の増悪化に関与するか否かについてはほとんど明らかにされていない。そこでまず、本章では、酸化植物油摂取によるアレルギー反応の増悪化について検討するために有用なアレルギーモデルを選定するために、酸化オリブ油が CHS、ACA および DNFB 誘発性皮膚に及ぼす影響について検討した。開封して3ヶ月から3年間室温で静置することによって自然酸化されて POV が高値を示すオリブ油を酸化油脂として用いた。これをマウスに経口投与し、CHS に及ぼす影響を検討したところ、CHS による耳介腫脹が増大した。また、同様に ACA および DNFB 誘発性皮膚に及ぼす影響を検討したところ、いずれのアレルギー反応も酸化オリブ油の投与によって増悪化することが確認された。酸化油脂摂取によって肝障害が引き起こされることが報告されているが、本検討で用いた油脂の酸化度では逸脱酵素の上昇などの明らかな肝障害は認められず、6週間の長期投与によってわずかに肝臓中 TBARS の上昇が認められた (data not shown)。CHS は細胞性免疫によって引き起こされることから初めの抗原感作後に Th1 が誘導され⁹⁾、ACA は体液性免疫によって引き起こされることから Th2 が誘導されると考えられる³⁷⁾。また、DNFB 誘発性皮膚炎は DNFB 塗布を繰り返すうちに遅発相だけでなく即時相の皮膚炎も認められることから細胞性免疫と体液性免疫のいずれもが関与していると考えられる³⁸⁾。さらに、DNFB 誘発性皮膚炎は Th17 と呼ばれる T 細胞サブセットの関与が報告されており^{39,40)}、これらアレルギー反応のいずれもが酸化オリブ油によって増悪化したことから、酸化オリブ油は細胞性免疫または体液性免疫のいずれかを特異的に増強するわけではなく、抗原感作による T 細胞分化において、遅延型反応では Th1 や細胞障害性 T 細胞、即時型反応では Th2、二相性反応では Th17 といったエフェクター細胞の分化を促進することによってそれぞれの免疫応答を増強することが推察された。次に、酸化オリブ油で認められたアレルギー反応の増悪化が酸化オリブ油中のどのような酸化生成物に起因するのかを明らかにするために検討を行った。すなわち、3段階の POV を示す酸化オリブ油を調製してマウスに投与し、CHS を惹起した結果、酸化オリブ油の POV と CHS の増悪化との間に用量反応関係が見られたため、CHS について詳細な検討を行った。また、油脂中のヒドロペルオキシド以外の酸化生成物による影響を検討したところ、オレイン酸または TMP 添加した油脂試料は CHS に影響を及ぼさない一方で、オリブ油以外にも UV 照射によって酸化して POV が上昇したコーン油、ゴマ油およびトリオレインでも同様に CHS の増悪化が認められた。これらのことから、酸化植物油による CHS の増悪化は Table 1 の条件を満たした酸化オリブ油の場合では、油脂中の遊離脂肪酸自体やアルデヒド類は関係せず、植物油一般に含有される不飽和脂肪酸から酸化生成したヒドロペルオキシドに起因する可能性が示唆された。

第 2 章 酸化オリブ油による遅延型反応増悪化と炎症性サイトカイン発現との関連性

第1節 緒言

酸化オリブ油は遅延型アレルギーの一つである CHS、即時型アレルギーの一つである ACA および二相性の反応を示す DNFB 誘発性皮膚炎のいずれのアレルギー反応に対しても増悪化させることが明らかとなった。また、CHS において、投与する油脂の酸化度とアレルギー反応増悪化との間に明瞭な用量反応性が認められたため、CHS に着目して詳細な検討を行ったところ、CHS による耳介腫脹の増大には AV や TBARS 値は関与せず、酸化油脂の POV 依存的であることが示された。このことはオリブ油に限らず一般的な植物油脂においても酸化油脂の摂取がアレルギー反応を増悪化させ、このアレルギー反応の増悪化は植物油脂一般に含まれる不飽和脂肪酸エステルの過酸化物に起因することが考えられる。しかし、この酸化油脂投与によるアレルギー反応の増悪化がどのような作用機序で起こるのかは明らかでない。そこで、本章では上記アレルギー反応のうち、投与する油脂の POV とアレルギー反応の増悪化との間に明瞭な用量反応関係が認められた CHS を代表として、酸化オリブ油投与による CHS の増悪化と感作相および惹起相のサイトカイン発現との関連性を明らかにする目的で検討を行った。

遅延型アレルギー反応の一つである CHS は、主にリンパ球の増殖と遊走を介する Th1 型免疫応答によって炎症が引き起こされる。すなわち、あらかじめ抗原感作されたリンパ球が、再度侵入してきた抗原と接触して活性化することにより炎症反応が惹起される。また、その炎症には種々のサイトカインが関連していると考えられる。T 細胞は胸腺で分化した後、末梢リンパ組織へ移行し、IL-12 存在下で抗原提示細胞から抗原提示を受けることでナイーブ T 細胞 (Th0) から Th1 細胞に分化する^{41,42,43}。再度抗原に曝露されると、抗原を貪食した抗原提示細胞から抗原提示を受けた Th1 細胞は IFN- γ を産生し、マクロファージや NK 細胞を活性化することで炎症を惹起する^{44,45}。さらに、その他にも IL-1 β 、IL-6 および TNF- α などの炎症性サイトカインや Th1 免疫応答を抑制する IL-4 および IL-10 など種々のサイトカインが CHS による炎症に関与すると考えられる。IL-1 ファミリーの一つである IL-18 は、IL-12 と共働することで Th1 細胞の分化を強力に促進する⁴⁶。また、IL-18 はリンパ球の IFN- γ 産生促進、NK 細胞の活性化だけでなく、IL-1 β 、TNF- α および GM-CSF などの様々な炎症性サイトカインを誘導する^{47,48}。このように、CHS には多くのサイトカインが関連していることから、酸化油脂による CHS の増悪化に関与するサイトカインを明らかにするために抗原感作から抗原特異的な T 細胞の分化が起こる感作相と、再度同じ抗原に曝露されて抗原特異的な T 細胞による炎症反応が起こる惹起相に分けて以下の検討を行った。

まず、CHS の感作相におけるサイトカイン発現に及ぼす酸化油脂の影響を明らかに

するために、酸化オリーブ油を投与したマウスに OXA を塗布し、7 日後までの耳介組織中のサイトカイン mRNA 発現量を経日的に測定した。さらに、酸化オリーブ油によって発現量の増大が認められた IL-18 について耳介組織の免疫染色を行い、発現部位の確認と発現量を測定した。次に、酸化油脂が CHS を惹起したときのサイトカイン発現に及ぼす影響を明らかにするために、OXA による感作を行った後、酸化オリーブ油を投与したマウスに再度 OXA を塗布することで CHS を惹起し、24 時間後までの耳介組織中における経時的なサイトカイン mRNA 発現量を測定した。また、発現量に変動が見られた IL-18 および IFN- γ について耳介組織の免疫染色を行い、発現部位の確認と発現量を解析した。

第2節 実験方法

1) 油脂試料の調製および投与

自然酸化オリーブ油は、オリーブ油を開封後室温で3ヶ月から3年間保存することで自動酸化によりPOVが上昇したものを用いた。新鮮および酸化油脂のPOV、AVおよびTBARS値は第1章第2節と同じ条件のものを用いた。油脂の投与は第1章第2節の方法に従って行った。

2) 油脂変質試験

第1章第2節4)の方法に従って行った。

3) 接触性過敏反応(CHS)の誘発

第1章第2節5)の方法に従って行った。

4) 組織学的試験

(1) 組織切片の作製

マウスから耳介を摘出し、リン酸緩衝4% (w/v) paraformaldehyde 溶液に浸漬し、一晚固定した。固定した耳介を70% ethanol に浸漬し、paraffin 包埋して切片を作製した後、スライドガラスに貼付して37°Cで一晩乾燥した。その後、xylene および ethanol 系列によって脱 paraffin 処理を行い、PBS で洗浄した。

(2) Hematoxylin-Eosin (HE)染色

作製した組織切片を Mayer の Hematoxylin 液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) に5分間浸漬し、流水洗浄後、Eosin Yellowish 液 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) に5分間浸漬した。その後、ethanol 系列および xylene で脱水、透徹し、非水溶性封入剤を用いて封入した。

(3) 免疫組織染色

作製した耳介切片を Tris-EDTA 緩衝液に浸漬し、15分間沸騰させた後、30分室温で冷却した。その後、0.3% H₂O₂/methanol 溶液を室温で5分間、blocking serum を室温で1時間反応させた後、primary antibody として anti-mouse IL-18 (rabbit) antibody (Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA, U.S.A.) または anti-mouse IFN- γ antibody (BioLegend, Inc., San Diego, CA, U.S.A.) を4°Cで一晩反応させた。ついで、rabbit ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.) または rat ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用いて horseradish peroxidase (HRP) 酵素活性による発色を行った後、Gill's の hematoxylin 液で対比染色し、ethanol 系列および xylene で脱水、透徹し、非水溶性封入剤を用いて封入した。

(4) 画像解析

染色後の耳介切片は光学顕微鏡で観察した。耳介染色像の画像解析は、染色後の組織標本から無作為に 3 視野を選択し、デジタルカメラを用いて撮影した。この染色像を Image J (Version 1.80, National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.)を用いて画像解析し、染色像中の一定面積当たりの IL-18 および IFN- γ の陽性部位の面積を測定し、平均値を算出した。

5) リアルタイム RT-PCR

(1) RNA の抽出

耳介組織からの total RNA の抽出は acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC)法を用いて行った。すなわち、摘出した耳介組織に Sepasol® (Nacalai Tesque, Inc.) 1 mL を加えてホモジナイザー(ヒスコトロン NS-51, MICROTEC CO., LTD. Chiba, Japan)を用いて 5,000 rpm で 5 分間処理して破碎した。この組織溶解液に chloroform 0.2 mL を加え、ボルテックスミキサーで混和した。その後、4°C、12,000×g で 15 分間遠心分離を行って水層を分取し、isopropanol 0.6 mL 加えた。室温で 10 分間放置後、4°C、12,000×g で 10 分間遠心分離を行って、上清を除去した後、70% ethanol 0.5 mL で洗浄し、RNase-free H₂O 適量を加えて溶解した後、波長 260 nm における吸光度を測定し、モル吸光係数から total RNA 量を算出した。

(2) 逆転写 (RT) 反応

逆転写反応は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, U.S.A.)を用いて行った。すなわち、抽出した total RNA 2 μ g に 10×Reverse Transcription Buffer 2 μ L、25×dNTPs 0.8 μ L、10×Random Primers 2 μ L、MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ L) 1 μ L および RNase-free H₂O 4.2 μ L を加えて全量を 20 μ L とした。この混合液を 25°C で 10 分間プレインキュベートし、37°C で 120 分間加温することにより逆転写反応を行った後、85°C で 5 秒間加熱することによって逆転写酵素を失活させたものを cDNA 溶液とした。

(3) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)によるインターカラー法により行った。すなわち、PCR 用 96 穴ホワイトプレート(Roche Diagnostics GmbH)に 2×SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics GmbH) 10 μ L、10 μ mol/L PCR Forward Primer (Takara Bio Inc.) 1 μ L、10 μ mol/L PCR Reverse Primer (Takara Bio Inc.) 1 μ L、20 倍希釈した cDNA 溶液 5 μ L および dH₂O 3 μ L を加えて全量を 20 μ L とした後、Light Cycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH) にセットしてリアルタイム PCR を行った。PCR は、初期変性を 95°C で 5 分間行った後、

変性を 95°C 10 秒間、アニーリングを 60°C 10 秒間、伸長反応を 72°C 10 秒間で 1 サイクルとし、45 サイクル行った。また、PCR 反応終了後に 65~97°C の範囲で融解曲線分析を行い、非特異的増幅が起こっていないことを確認した。なお、IL-1 β 、IL-12 p35、IL-12 p40、IL-18、IFN- γ および Rps18 のプライマーは Takara Bio Inc.より入手し、配列は下記に示す通りである。

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IL-1 β	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
IL-12 p35	CACCCCTTGCCCTCCTAAACC	GGTTTGGTCCCGTGTGATGT
IL-12 p40	TGGAGCACTCCCCATTCCTA	TGAGCTTGACGCAGACATT
IL-18	AAGACTCTTGCGTCAACTTCAAGGA	AGTCGGCCAAAGTTGTCTGATTC
IFN- γ	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC
Rps18	TTCTGGCCAACGGTCTAGACAAC	CCAGTGGTCTTGGTGTGCTGA

6) 統計解析

実験値は平均値 \pm 標準偏差で表し、2 群間の検定には Student の *t* 検定を、多群の検定には Bonferroni の多重比較検定を伴う一元配置 ANOVA を用いて統計学的に処理した。*p* 値が 0.05 未満のときに有意であると判定した。

第3節 遅延型反応の感作相および惹起相に及ぼす酸化オリーブ油の影響

1) CHS の感作相に及ぼす酸化オリーブ油の影響

CHS の感作相におけるサイトカイン発現に及ぼす酸化オリーブ油の影響について検討した。すなわち、OXA 感作の 1 週間前から測定までの期間、一日間隔で酸化オリーブ油を投与し、OXA 感作から 0~7 日後の耳介組織中において、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-18 および IFN- γ mRNA 発現量を測定するとともに、CHS の感作時において Th1 分化に必須である IL-12 の mRNA について RT-PCR 法で測定した。その結果、IL-18 mRNA は OXA 塗布によって 7 日後に発現が認められ、新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で発現量がより高値を示した (Fig. 7D)。IL-1 β 、IL-12 p35、IL12 p40、および IFN- γ の mRNA 発現量は、OXA 感作によって経日的に増大したが、両群間で顕著な差異は認められなかった (Fig. 7A, B, C, E)。なお、TNF- α 、IL-6 および IL-10 の mRNA 発現量は、両群で顕著な差異は認められなかった (data not shown)。

次に、耳介組織切片の HE 染色および IL-18 免疫染色により観察した。その結果、Fig. 8A に示すように、感作 7 日後において真皮への単核球の浸潤が認められ、酸化オリーブ油投与群で新鮮オリーブ油投与群に比べて浸潤細胞数が多い傾向を示した (Fig. 8C)。また、近接切片を用いて IL-18 を免疫染色した結果、新鮮オリーブ油投与群では、感作 7 日後において IL-18 陽性部位が真皮で見られ、酸化オリーブ油投与群では感作 4 日後から IL-18 陽性部位が観察された (Fig. 8B)。これら耳介組織切片の IL-18 免疫染色画像を Image J で解析して IL-18 陽性面積を算出した結果、IL-18 陽性面積は感作から経日的に増加し、酸化オリーブ油投与 4 日後以降の IL-18 陽性面積は新鮮オリーブ油投与群に比べて有意に増大することが認められた (Fig. 8D)。

以上の結果から、酸化オリーブ油は CHS の感作相において、耳介真皮における IL-18 発現を増大することが示唆された。

2) CHS の惹起相に及ぼす酸化オリーブ油の影響

酸化オリーブ油は感作相において耳介中の IL-18 発現を増大することが示された。そこで次に、酸化オリーブ油の投与が CHS の惹起相のサイトカイン mRNA 発現に及ぼす影響について検討した。すなわち、OXA 感作から 1 週間、1 日間隔で酸化オリーブ油を投与した後、耳介に OXA を塗布して CHS を惹起した。惹起前および惹起から 6、12 および 24 時間後における耳介組織中のサイトカイン mRNA 発現量を RT-PCR 法で測定した。その結果、Fig. 9A-C に示すように、IL-1 β 、IL-12 p35 および IL12 p40 mRNA は惹起 12 時間後をピークに発現することが認められたが、新鮮オリーブ油投与群と酸化オリーブ油投与群との間に顕著な差異は見られなかった。IL-18 mRNA は惹起を行う前、すなわち感作 7 日後の時点で高い発現が認められ、その発現量は酸化オリーブ油投与群で有意に高かった (Fig. 9D)。IFN- γ の mRNA 発現量は惹起 6 時間後に

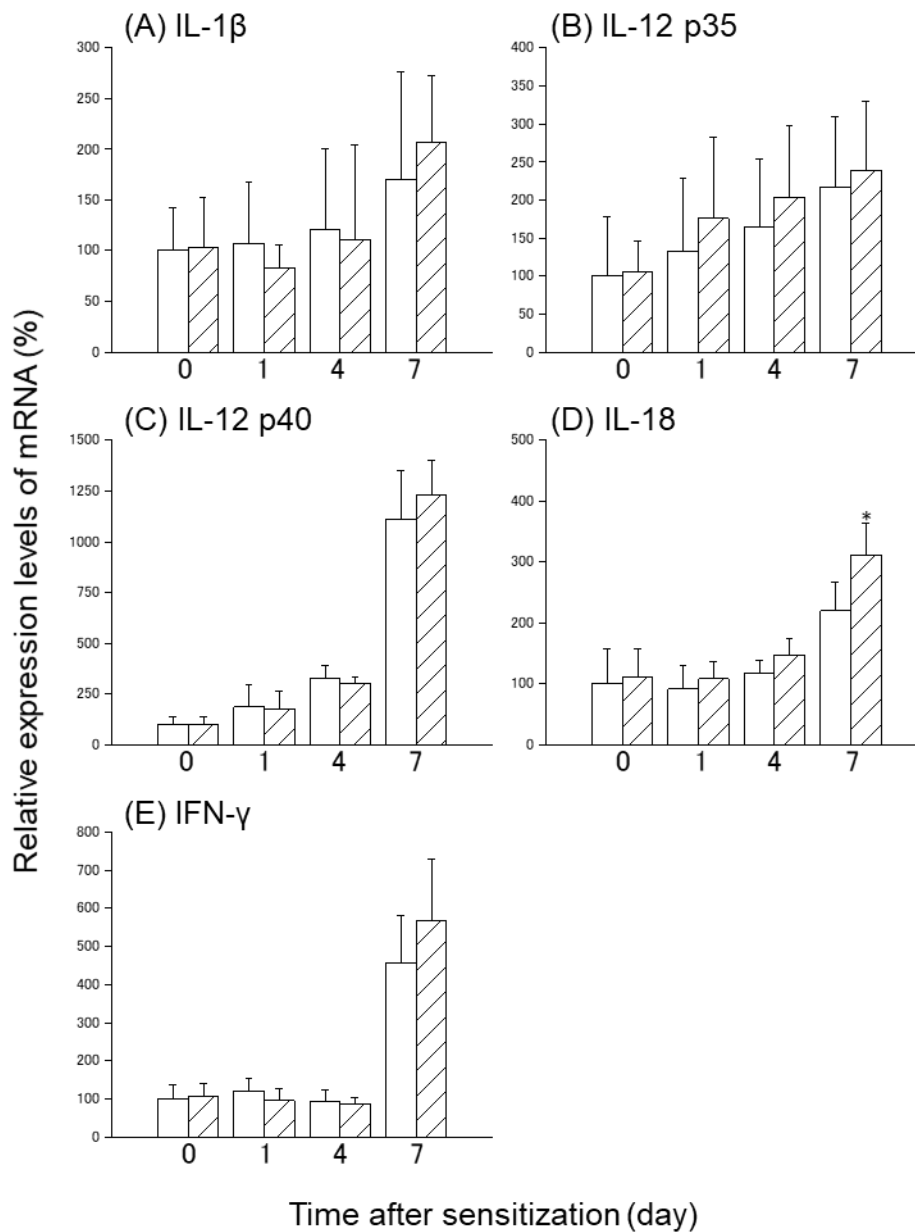
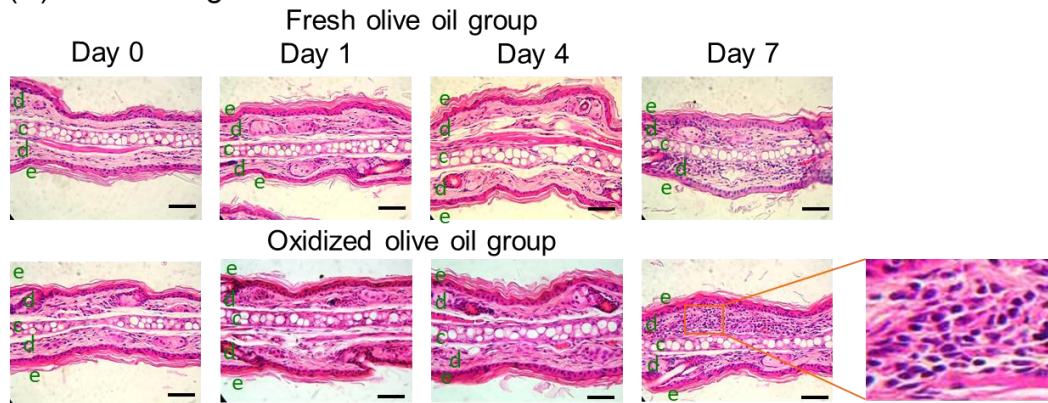


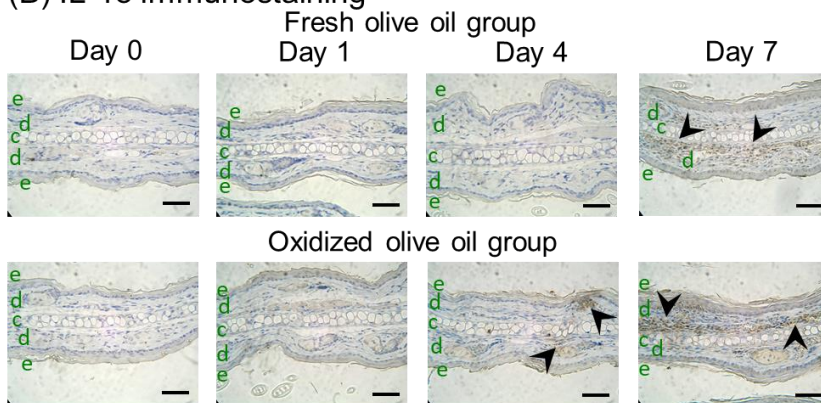
Fig. 7. Cytokine mRNA expression levels in the ear after CHS sensitization. Mice were orally administered fresh olive oil (POV = 7.77 ± 0.27 mEq/kg) and oxidized olive oil (POV = 89.4 ± 2.02 mEq/kg) 7 days before sensitization of CHS. (A) IL-1 β . (B) IL-12 p35. (C) IL-12 p40. (D) IL-18. (E) IFN- γ . The mRNA expression levels of target genes were normalized by Rps18. The relative expression levels of the fresh olive oil group before sensitization were designed as 100%. Day 0 means just before sensitization. Fresh oil (□) and oxidized oil (▨). The values are the mean \pm SD (n = 4-5). * $P < 0.05$ vs. fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 29(1):886-897 から一部改変して引用

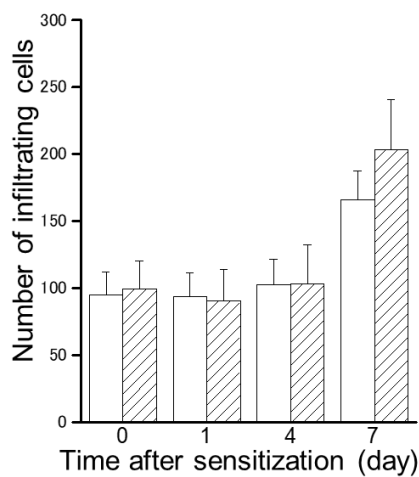
(A) HE staining



(B) IL-18 immunostaining



(C) Infiltrating cells



(D) IL-18-positive area

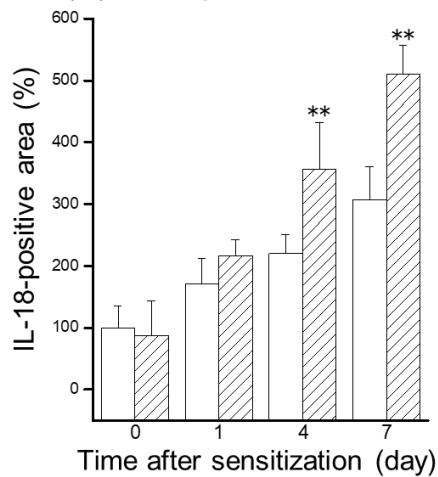


Fig. 8. Histological change and IL-18 expression after CHS sensitization. (A) HE staining. (B) IL-18 immunostaining. (C) Infiltrating cells. (D) IL-18-positive area. The arrowheads represent sites of IL-18. The letters e, d, and c represent epidermis, dermis, and cartilage, respectively. Scale bars, 100 μ m. Day 0 means just before sensitization. IL-18-positive area of fresh olive oil group before sensitization were designed as 100%. Fresh oil (\square) and oxidized oil (\square with diagonal lines). The values are the mean \pm SD (n = 4-5). ** $P < 0.01$ vs. fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 29(1):886-897 から一部改変して引用

急激に増大し、新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で有意な増大が認められた (Fig. 9E)。次に、惹起後の各時間における耳介腫脹の測定と耳介組織切片の HE 染色による観察を行った。その結果、Fig. 10A に示すように、HE 染色による組織切片画像では、惹起後 6、12、24 時間と時間経過に伴って耳介の厚さが増大しており、真皮部分の浮腫が確認された。また、耳介腫脹を測定した結果、6、12、24 時間と経時的に増大し、いずれの時間においても酸化オリーブ油による有意な耳介腫脹の増大が見られた (Fig. 10B)。惹起 12 時間後では真皮への単核球の浸潤が顕著にみられ、その浸潤細胞数は酸化オリーブ油投与群で、新鮮オリーブ油投与群に比べて多い傾向が見られた (Fig. 10C)。また、近接切片を免疫染色し、IL-18 および IFN- γ 発現を確認した。その結果、Fig. 11A に示すように、耳介中 IL-18 発現は真皮部分で多く発現し、惹起前をピークに経時的に減少する傾向が見られた。画像解析により算出した IL-18 陽性面積は惹起前において新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で有意な増大が見られ (Fig. 11B)、これは IL-18 の mRNA 発現と同じ傾向を示した。IFN- γ の免疫染色では、真皮において惹起 6 時間から陽性部位が認められ (Fig. 12A)、酸化オリーブ油投与によって惹起 6-24 時間後における IFN- γ 陽性面積の有意な増大が認められた (Fig. 12B)。

以上の結果から、酸化オリーブ油は惹起を行う前の感作相において、OXA 塗布による IL-18 発現量を増大させ、CHS 惹起後の IFN- γ 発現を促進することにより、耳介腫脹を増悪化させることが考えられた。

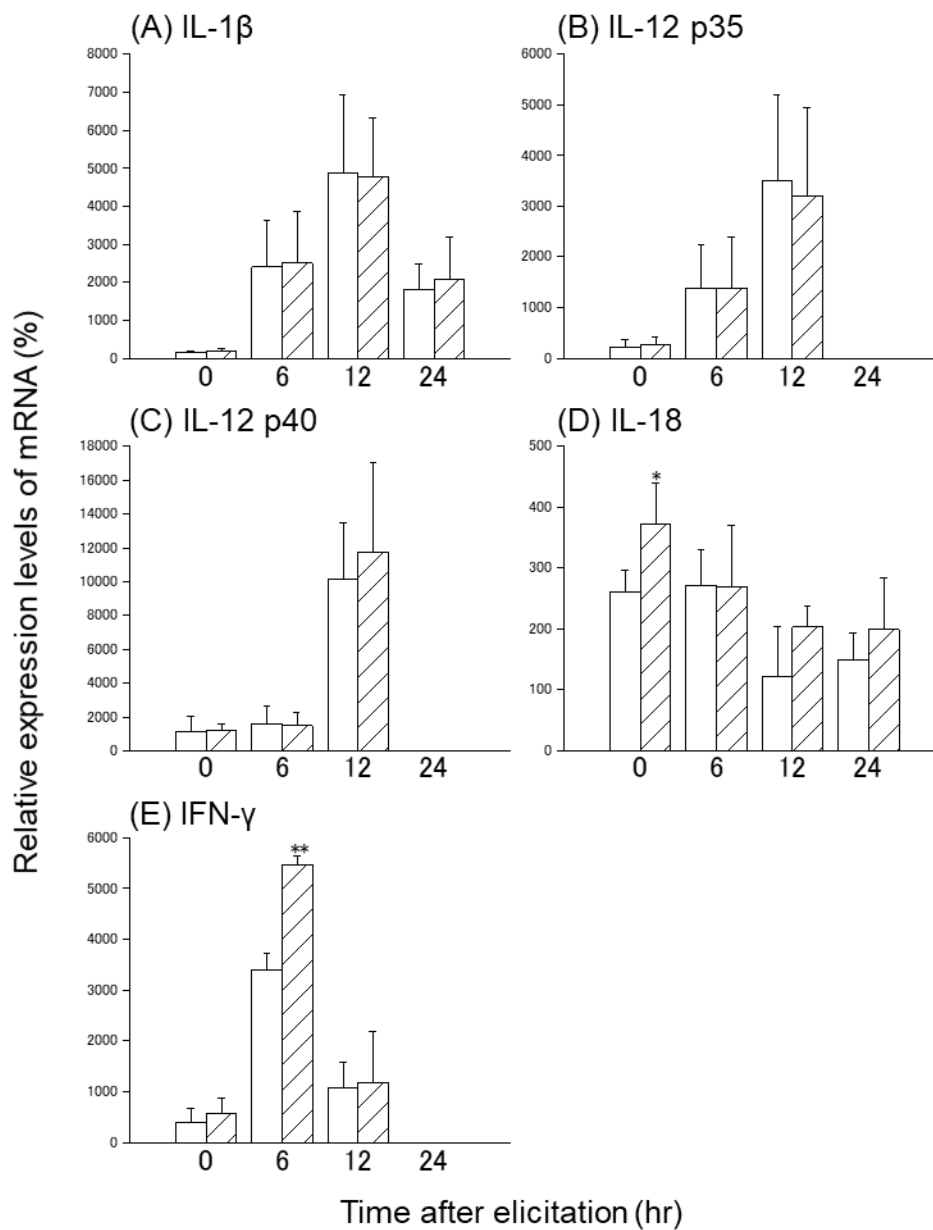
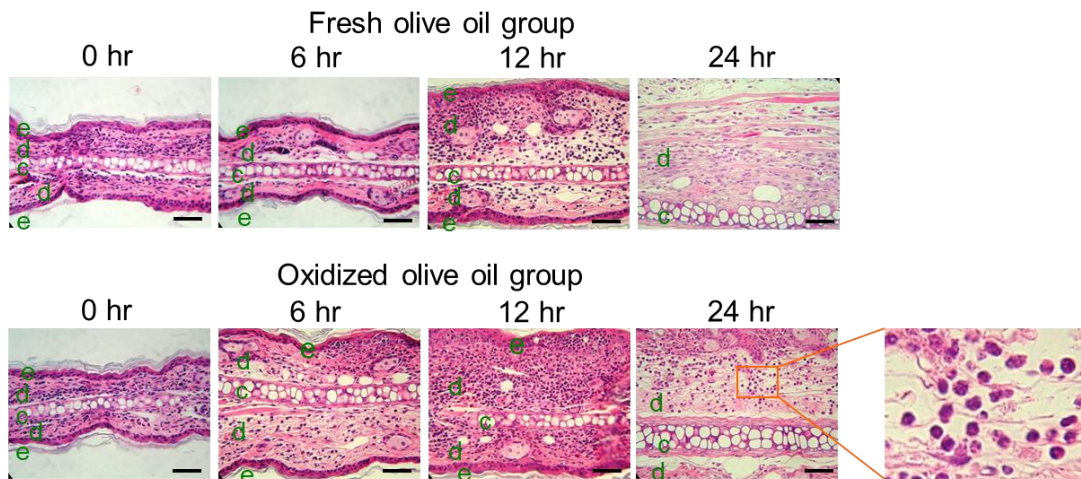


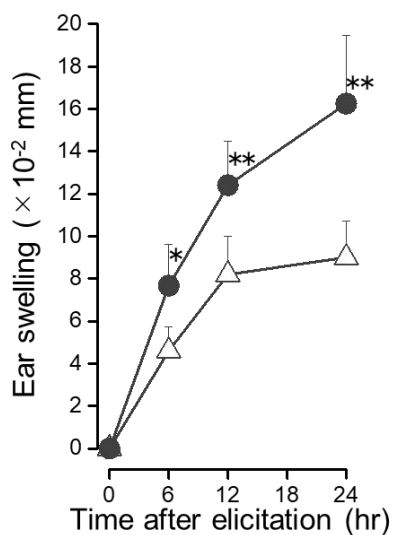
Fig. 9. Time course of cytokine mRNA expression levels in the ear after CHS elicitation. Mice were orally administered fresh olive oil (POV = 1.47 ± 1.01 mEq/kg) and oxidized olive oil (POV = 67.8 ± 1.98 mEq/kg) 7 days before elicitation of CHS. (A) IL-1 β . (B) IL-12 p35. (C) IL-12 p40. (D) IL-18. (E) IFN- γ . The mRNA expression levels of target genes were normalized by Rps18. The relative expression levels of the fresh olive oil group before sensitization were designed as 100%. 0 hr means just before elicitation. Fresh oil (\square) and oxidized oil (hatched). The values are the mean \pm SD (n = 4-5). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 29(1):886-897 から一部改変して引用

(A) HE staining



(B) Ear swelling



(C) Infiltrating cell

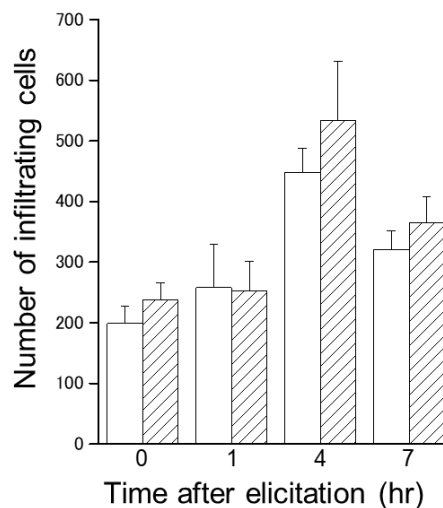


Fig. 10. Time course and histological change of ear swelling from CHS. (A) HE staining. (B) Time-dependent effect of oxidized olive oil on ear thickness. (C) Infiltrating cells. The letters e, d, and c represent epidermis, dermis, and cartilage, respectively. Scale bars, 100 μm . 0 hr means just before elicitation. Fresh olive oil (Δ) and oxidized olive oil (\bullet). The values are the mean \pm SD (n=5). * P <0.05, ** P <0.01 vs. fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 29(1):886-897 から一部改変して引用

(A) IL-18 immunostaining

(B) IL-18-positive area

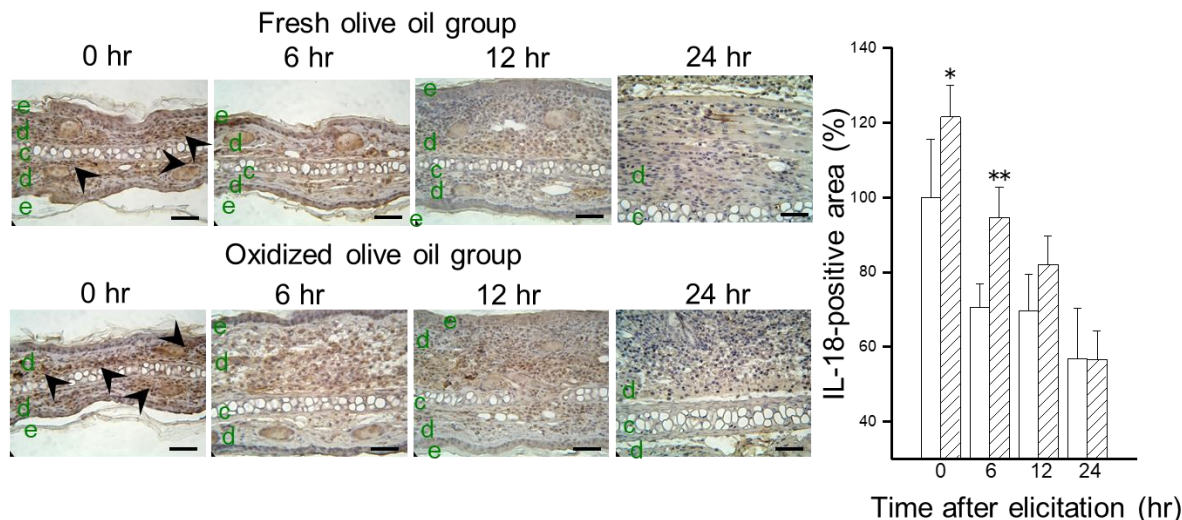


Fig. 11. Time course of IL-18 expression following CHS elicitation. (A) IL-18 immunostaining. (B) IL-18-positive area. The arrowheads represent sites of IL-18. The letters e, d, and c represent epidermis, dermis, and cartilage, respectively. Scale bars, 100 μ m. 0 hr means just before elicitation. IL-18-positive area of fresh olive oil group before sensitization were designed as 100%. Fresh oil (\square) and oxidized oil (hatched). The values are the mean \pm SD (n = 4-5). * P <0.05, ** P <0.01 vs. fresh olive oil group. *Food Agric Immunol.* 2018 29(1):886-897 から一部改変して引用

(A) IFN- γ immunostaining

(B) IFN- γ -positive area

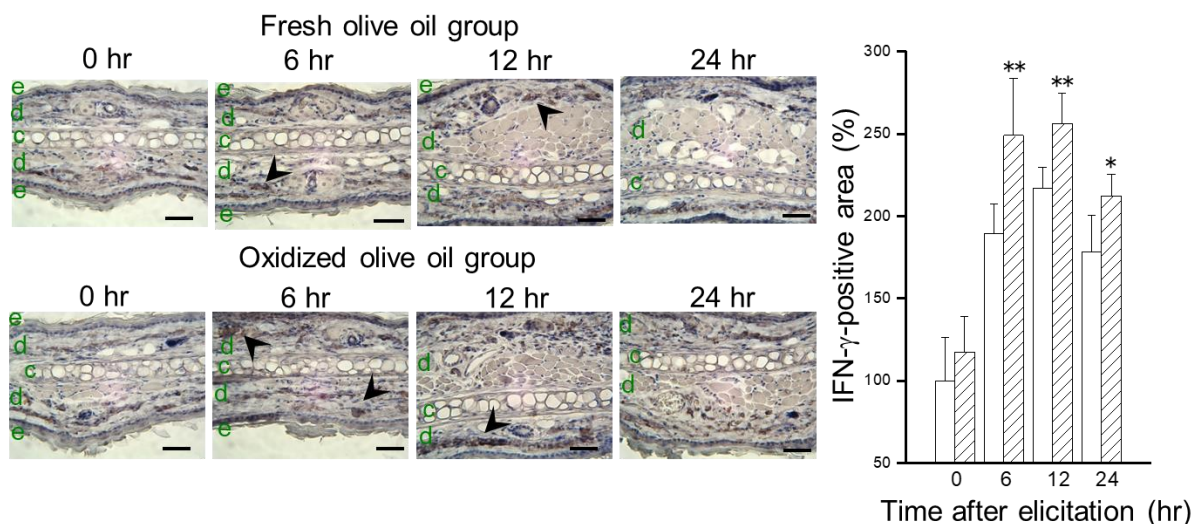


Fig. 12. Time course of IFN- γ expression following CHS elicitation. (A) IFN- γ immunostaining. (B) IFN- γ -positive area. The arrowheads represent sites of IFN- γ . The letters e, d, and c represent epidermis, dermis, and cartilage, respectively. Scale bars, 100 μ m. 0 hr means just before elicitation. IFN- γ -positive area of fresh olive oil group before sensitization were designed as 100%. Fresh oil (\square) and oxidized oil (hatched). The values are the mean \pm SD (n = 4-5). * P <0.05, ** P <0.01 vs. fresh olive oil group. *Food Agric Immunol.* 2018 29(1):886-897 から一部改変して引用

第4節 考察

本章では酸化オリーブ油による CHS 増悪化の作用機序を明らかにする目的で、CHS の増悪化と感作相および惹起相における耳介中炎症性サイトカイン発現との関連性について検討した。まず、CHS の感作相に及ぼす酸化オリーブ油の影響を検討したところ、抗原提示の際にマクロファージや樹状細胞から産生される IL-12 p40⁴¹⁾は経日的に発現量が増大したが両群間で差異は認められなかった。一方、IL-18 は OXA 感作 7 日後に発現が認められ、酸化オリーブ油投与による発現量の増大が認められた。IL-12 および IL-18 のいずれも OXA 感作 7 日後には高い発現が認められたことから、感作 7 日後には Th1 分化が誘導されており、感作が成立していることが推察された。IL-18 は抗原刺激によって樹状細胞などの抗原提示細胞から産生され、IL-12 と協働して Th1 分化を誘導すること⁴⁶⁾から、酸化オリーブ油は CHS の感作相における耳介中 IL-18 発現を増大することで Th1 分化を促進する可能性が考えられた。また、耳介切片の観察から、真皮において酸化オリーブ油による浸潤細胞数の増加と IL-18 発現の増大が見られたことから、酸化オリーブ油による耳介中 IL-18 の増大は、表皮のケラチノサイトによるのではなく、真皮に浸潤してきたリンパ球や単球といった単核球によると考えられ、単核球のうち主要な IL-18 産生細胞である単球によるものと推察された。次に、CHS の惹起相に及ぼす酸化オリーブ油の影響を検討したところ、酸化オリーブ油投与群で惹起を行う前から耳介中 IL-18 の増大と惹起後の IFN- γ の増加と耳介腫脹の増大が認められた。耳介組織の観察から、酸化オリーブ油によって真皮への浸潤細胞数の増加と真皮の浮腫の肥大が認められ、IFN- γ の発現も真皮で多く認められた。IL-18 は IFN- γ の強力な誘導因子であるため、感作の成立した OXA 塗布 7 日後において、酸化オリーブ油によって増加した耳介中 IL-18 が CHS 惹起時の IFN- γ 発現量を増大することによってアレルギー反応が増悪化することが示唆された。IL-18 は IFN- γ によるネガティブフィードバック制御を受けることが報告されており⁴⁷⁾、CHS 惹起後の耳介中 IL-18 発現量の減少は、上昇した IFN- γ によって発現が抑制されたと推察された。

以上のことから、酸化オリーブ油は CHS の感作 7 日後において OXA 塗布による耳介中 IL-18 発現を増大させることによって IL-12 による Th1 の分化を促進し、惹起時における IFN- γ の産生を促進することによって耳介腫脹を増大させることが考えられた。

第 3 章 酸化オリーブ油による遅延型反応増悪化時における IL-18 増大機序と T 細胞分化に及ぼす影響

第1節 緒言

酸化オリーブ油の経口投与によって CHS の感作相における耳介中 IL-18 発現量の増加と惹起相における IFN- γ 発現量の増加が認められ、その結果としてマウス耳介腫脹が増大することが明らかになった。IL-18 は T 細胞以外にも B 細胞、NK 細胞、マクロファージおよび樹状細胞などの活性化した免疫担当細胞から分泌される^{47,48)}。これらの細胞において、まず前駆体である不活性な pro-IL-18 として産生された後、caspase-1 によって切断されて活性化され、細胞外へ分泌される。そのため、IL-18 は AP-1 などの転写因子による転写調節⁴⁹⁾だけでなく、caspase-1 で切断されることによって活性化される、いわゆる翻訳後修飾による調節を受けることが知られている⁵⁰⁾。また、IL-18 は IL-12 による Th1 細胞の分化・増殖を相乗的に促進させるため、CHS の感作相における Th1 細胞の分化・増殖が酸化オリーブ油の投与によって促進されている可能性が考えられる。そこで、本章では酸化オリーブ油による IL-18 産生増大と転写因子および翻訳後修飾による分泌制御との関連性と T 細胞亜集団分布の変動と抗原刺激特異的なサイトカイン産生に及ぼす酸化オリーブ油の影響について検討した。

c-Jun N-terminal kinase (JNK) および p38 は、ストレス応答性の mitogen-activated protein kinase (MAPK) として知られており^{51,52)}、紫外線や熱ショック、酸化ストレスなどのストレスに応答して活性化される。とくに JNK は、これらのストレス応答によって活性化されると、c-Jun をリン酸化して、AP-1 応答配列に結合することによって AP-1 による転写を誘導する^{53,54)}。また、抗酸化遺伝子群の主要転写因子である nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) は、酸化ストレスに応答して抗酸化酵素系の発現を調節する転写因子として知られているが、最近、caspase-1 を含む inflammasome の活性化に必須であることが報告されている⁵⁵⁾。酸化油脂摂取による酸化ストレス亢進が報告されていることから、酸化オリーブ油による IL-18 の産生促進には酸化ストレスを介した AP-1 や caspase-1 の活性化促進が関与することが考えられる。

CHS による炎症は CD8⁺ T 細胞によって引き起こされ、これは、リンパ組織内で増殖し、抗原惹起された部位に遊走して細胞傷害活性を示す^{56,57)}。また、CD4⁺ T 細胞は、接触性過敏反応の発症において他のリンパ球の活性化やサイトカイン発現調節などの重要な役割を担っており、自身もエフェクター細胞として機能する^{58,59)}。抗原感作の段階において、IFN- γ は Th1 の主要転写因子である T-bet の発現を誘導し、T-bet は IFN- γ をはじめとする Th1 分化に重要なタンパク質の発現を制御することで Th0 から Th1 細胞への分化を促進する^{60,61)}。一方、IL-4 は Th2 の主要転写因子である GATA3 を誘導し、GATA3 は IL-4 をはじめとする Th2 分化に重要なタンパク質の発現を制御することにより Th2 細胞への分化を促進する^{60,61)}。また、Th1 細胞から分泌された IFN-

γ は、Th2 細胞の分化を抑制するが、反対に Th2 から分泌される IL-4 および IL-10 は Th1 細胞の分化を抑制する^{62,63}。このように、Th1 と Th2 はお互いに制御し合っているが、Th1 型免疫応答で発症する CHS は Th1 優位になっていると考えられている。酸化オリーブ油の投与によって感作相で Th1 分化を促進する耳介中 IL-18 の上昇と、CHS 惹起時における IFN- γ の増大が認められており、通常よりもさらに Th1 に偏向していることが推察される。

以上のことから、酸化オリーブ油による IL-18 産生の増大と AP-1 および caspase-1 活性との関係を明らかにするために、OXA 感作 7 日後における耳介、リンパ節および血清中の IL-18 量を測定した。また、末梢リンパ組織として脾臓細胞中における AP-1 および caspase-1 活性を測定した。次に、これらの組織中で増大した IL-18 が実際に T 細胞の亜集団分布に影響するの否かについて、フローサイトメトリーを用いて脾臓細胞中の T 細胞亜集団解析を行った。また、脾臓細胞中にヘルパー T 細胞 (CD3⁺CD4⁺ cells) の増加が認められたことから、脾臓細胞から単離した CD3⁺CD4⁺細胞中における Th1/Th2 バランスの指標となる遺伝子について mRNA 発現量を検討した。さらに、CD3⁺CD4⁺細胞および細胞傷害性 T 細胞 (CD3⁺CD8⁺ cells) による抗原刺激時の IL-4 および IFN- γ 産生量を *in vitro* 実験系で測定した。

第2節 実験方法

1) 油脂試料の調製および投与

自然酸化オリーブ油は、オリーブ油を開封後室温で3ヶ月以上保存することで、経年変化により酸化されたものを用いた。新鮮および酸化油脂の POV、AV および TBARS は第1章第2節3)と同じ条件のものを用いた。油脂の投与は第1章第2節の方法に従って行った。

2) 油脂変質試験

第1章第2節4)の方法に従って行った。

3) 接触性過敏反応 (CHS) の誘発

第1章第2節5)の方法に従って行った。

4) 脾臓細胞の調製

マウス脾臓細胞は摘出した脾臓をスライドガラスを用いてすり潰した後、ナイロンメッシュフィルターを通して結合組織を除去した。この細胞懸濁液に ammonium chloride-potassium (ACK) buffer を加えて赤血球を溶血させた後、10% FBS 含有 RPMI-1640 培地に懸濁させ脾臓細胞を調製した。

5) フローサイトメリーによる T 細胞亜集団解析と細胞分取

4)の方法に従って調製した脾臓細胞を TruStain fcX (BioLegend, Inc.)を用いて Fcレセプターをブロッキングした後、蛍光標識した anti-mouse CD3、CD4 および CD8 抗体を用いて染色した。洗浄後 BD FACSAria Fusion (BD Biosciences, San Diego, CA, U.S.A.)を用いて解析し、解析結果に基づいて CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞を分取した。

6) 抗原提示細胞 (antigen-presenting cell: APC) の調製

抗原提示細胞は Koike らの方法⁶⁴⁾に従ってマウス腹腔マクロファージを採取した。すなわち、腹腔洗浄により採取したマウス腹腔細胞を3分の1濃度の生理食塩水に懸濁させた後、通常の生理食塩水で洗浄した後、10% FBS 含有 RPMI-1640 培地に懸濁させ、培養用シャーレに播種した。1時間後に非接着性の細胞を除去して接着細胞を回収したものを抗原提示細胞として用いた。回収した細胞は zymosan の貪食活性試験によって95%以上がマクロファージであることを確認した。

7) T 細胞と APC との共培養

脾臓細胞から分取した CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞を APC と 96 穴プレ

ートで共培養した。すなわち、T 細胞および APC を 5×10^5 cells/well および 1×10^5 cells/well でそれぞれ播種し、20 ng/mL 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (PMA)と 1 μ g/mL ionomycin (Io)および 10 μ g/mL OXA で刺激した。48 時間培養後、培養上清を回収し、IL-4 および IFN- γ 産生量を Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, U.S.A.)を用いて測定した。

8) リアルタイム RT-PCR

脾臓細胞から分取した CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞中の遺伝子発現量の解析は第 2 章第 2 節の方法に従って行った。IFN- γ および Rps18 のプライマーは第 2 章第 2 節 5)と同様であり、それ以外に使用した IL-4、T-bet および GATA3 のプライマーは Takara Bio Inc.より入手し、配列については下記に示す通りである。

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IL-4	TCTCGAATGTACCAGGAGCCATATC	AGCACCTTGGAAGCCCTACAGA
T-bet	TACAACAGCCAGCCAAACAG	CACCCTTCAAACCCCTTCCTC
GATA3	TACCACCTATCCGCCCTATG	GCCTCGACTTACATCCGAAC

9) IL-18 の測定

耳介組織、所属リンパ節である腋窩リンパ節および血清中の IL-18 の定量は、抗 IL-18 抗体を用いた ELISA 法により測定した。すなわち、ビーズ破砕装置 Micro Smash™ (TOMY SEIKO CO., LTD., Tokyo, Japan)を用いて破砕した組織または血清を用い、Mouse IL-18 Platinum ELISA (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて測定した。

10) AP-1 活性の測定

脾臓細胞の AP-1 活性の測定は抗 c-Jun 抗体を用いた ELISA 法により測定し、c-Jun のリン酸化レベルから評価した。すなわち、4)に従って調製した脾臓細胞をビーズ破砕機を用いて破砕し、c-Jun (pS73) + Total c-Jun SimpleStep ELISA Kit (Abcam plc., Cambridge, U.K.)を用いて測定した。

11) Caspase-1 活性の測定

脾臓細胞の caspase-1 活性の測定は Z-WEHD substrate を用いた酵素法により測定した。すなわち、4)に従って調製した脾臓細胞をビーズ破砕機を用いて破砕し、Caspase-Glo1 Inflammasome Assay (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.)を用いて測定した。

12) タンパク質定量

回収した試料のタンパク質量は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いた BCA 法により測定した。すなわち、試料 5 μL に BCA working reagent を 50 μL 加えて 37°C で 30 分間反応させた後、595 nm における吸光度を測定した。また、各濃度のウシ血清アルブミン (BSA) 溶液を用いて同様の操作を行い、検量線を作成してタンパク質量を算出した。

13) 統計解析

実験値は平均値 \pm 標準偏差で表し、2 群間の検定には Student の t 検定を、多群の検定には Bonferroni の多重比較検定を伴う一元配置 ANOVA を用いて統計学的に処理した。 p 値が 0.05 未満のときに有意であると判定した。

第3節 遅延型反応の感作相における T 細胞分化と抗原特異的なサイトカイン産生に及ぼす酸化オリーブ油の影響

1) 酸化オリーブ油投与による IL-18 発現上昇に対する AP-1 および caspase-1 の寄与

感作相における局所皮膚組織や腋窩リンパ節の IL-18 量と酸化オリーブ油による CHS の増悪化との関係を明らかにするために、OXA 感作 7 日後における耳介組織、リンパ節および血清中の IL-18 量を ELISA 法で測定した。その結果、Fig. 13 に示すように、耳介組織、リンパ節および血清中のいずれも酸化オリーブ油の投与により、感作時における IL-18 量の有意な増大が認められた。この結果は、前章で示した OXA 感作 7 日後における耳介中の IL-18 発現量と同様であった。いずれの組織も OXA 感作を行わないときの IL-18 量は感作時と比べて 1/2 から 1/5 程度と低く、投与するオリーブ油による差異は認められなかったことから (data not shown)、酸化オリーブ油は OXA 感作による IL-18 発現を増加させる可能性が考えられた。そこで次に、IL-18 の発現量増大が転写活性化による調節と活性化酵素によるプロセッシングの制御のいずれか、またはその両方によるものか否かを明らかにするために、IL-18 の転写因子である AP-1 および IL-18 の変換酵素である caspase-1 の活性化に及ぼす酸化オリーブ油投与の影響につ

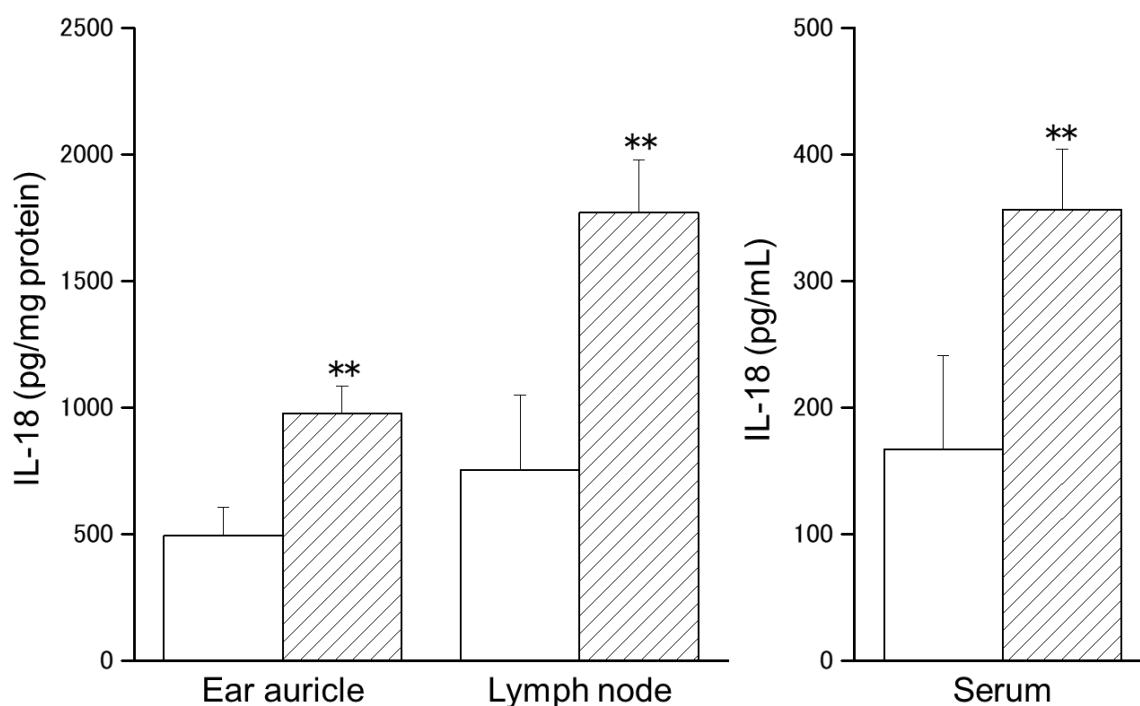


Fig. 13. IL-18 content 1 week after sensitization. Mice were orally administered fresh olive oil (POV = 0.92 ± 0.21 mEq/kg) and oxidized olive oil (POV = 50.5 ± 1.51 mEq/kg) 7 days from OXA-sensitization. Fresh olive oil (\square) and oxidized olive oil (hatched). The values are mean \pm SD (n = 5). ** $P < 0.01$ vs. the fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 30(1):74-86 から一部改変して引用

いて検討した。AP-1 活性は c-Jun の発現量を測定し、リン酸化レベルから評価した。OXA 感作 7 日後の AP-1 活性はリンパ節中では差異は見られなかったが、脾臓細胞中では酸化オリーブ油を投与した群で有意に増大した (Fig. 14A)。また、リンパ節中の caspase-1 活性は低く、酸化オリーブ油投与による影響は認められなかったが、脾臓細胞中の caspase-1 活性は新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で約 2 倍高かった (Fig. 14B)。

以上の結果から、酸化オリーブ油は、AP-1 転写活性を促進することにより IL-18 mRNA 発現を増大させ、さらに caspase-1 活性を上昇させることによって IL-18 の活性化および細胞外への分泌を促進させることが考えられた。

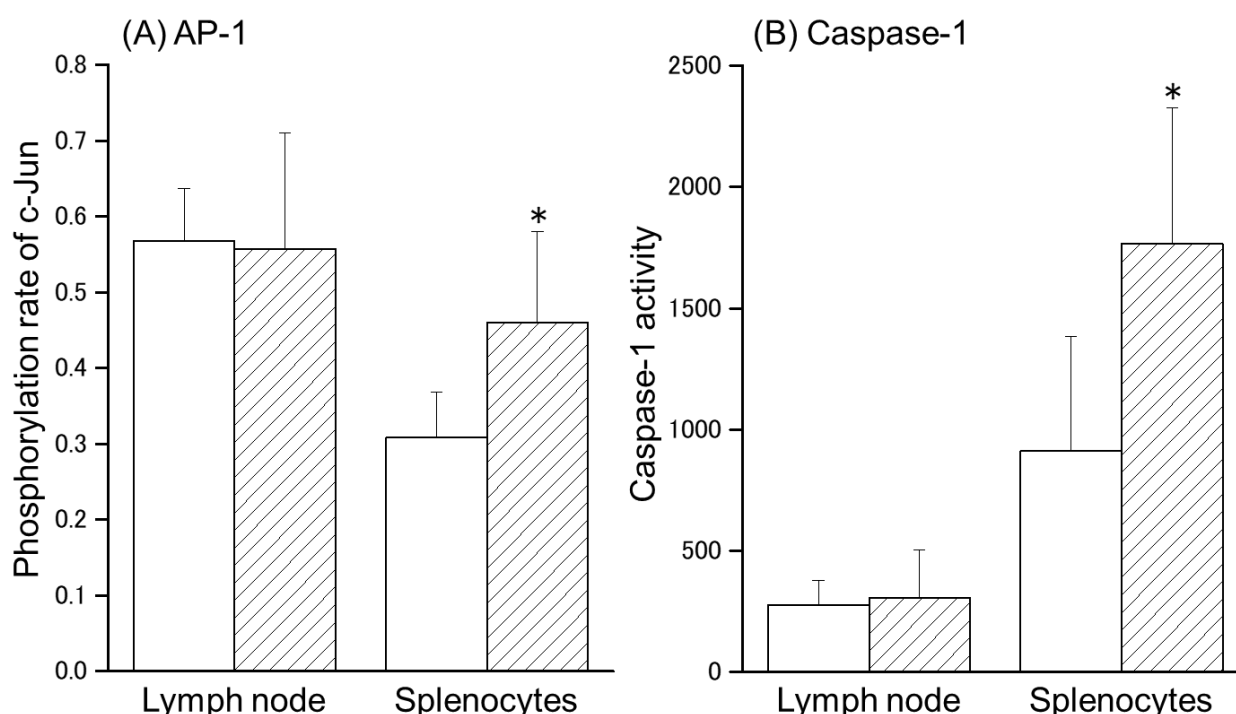


Fig. 14. AP-1 and Caspase-1 activity in lymph node and splenocytes. AP-1 activity was evaluated as p-c-Jun/total c-Jun. Fresh olive oil (□) and oxidized olive oil (▨). The values are mean ± SD (n = 5). * $P < 0.05$ vs. the fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 30(1):74-86 から一部改変して引用

2) T 細胞亜集団分布と抗原刺激によるサイトカイン産生に及ぼす酸化オリーブ油の影響

酸化オリーブ油の投与による CHS 惹起時において、IFN- γ 増大が感作相での T 細胞亜集団分布の変動に起因するか否かを明らかにするために、OXA 感作 7 日後における

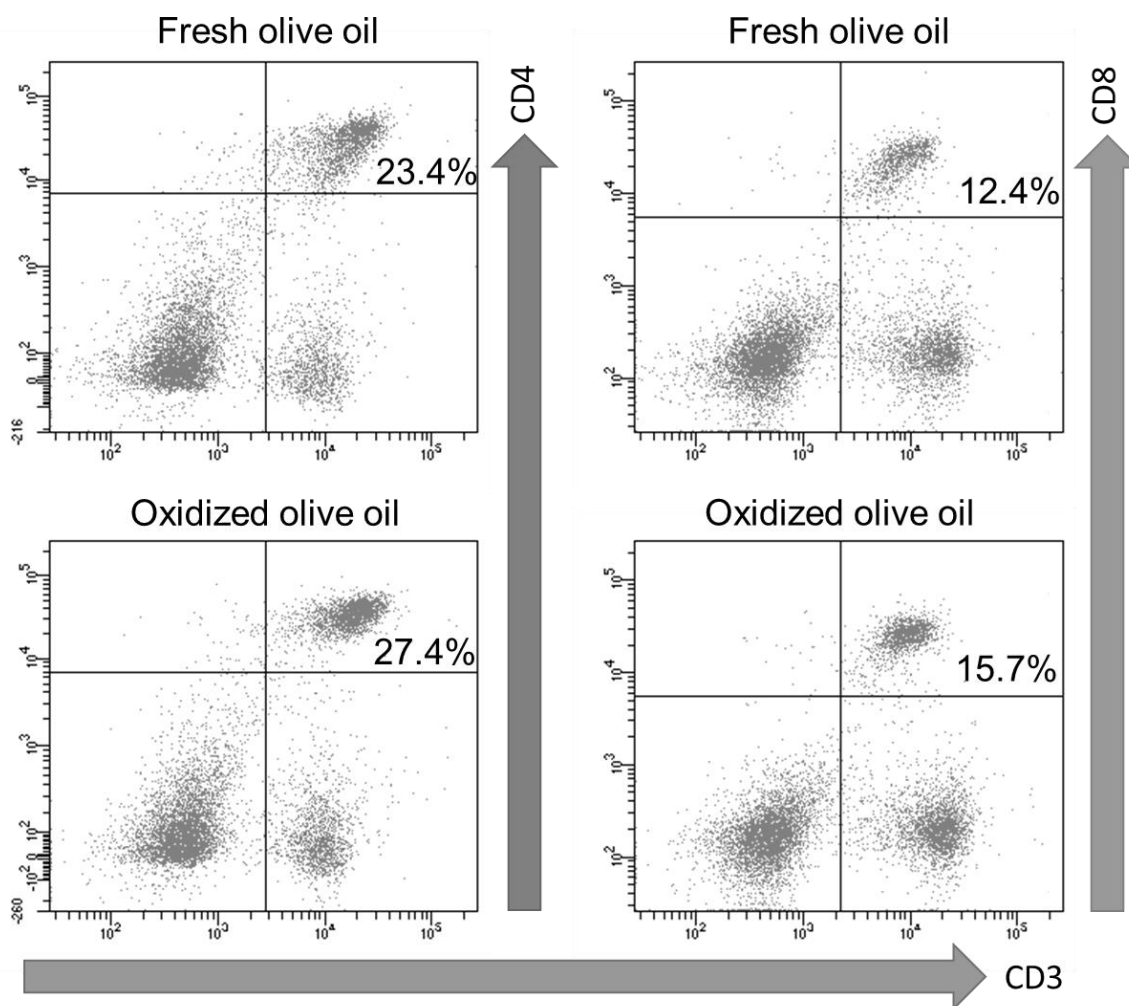


Fig. 15. CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ cell subpopulation. Mice were orally administered fresh olive oil (POV = 1.52 ± 1.31 mEq/kg) and oxidized olive oil (POV = 51.8 ± 0.09 mEq/kg) 7 days from OXA-sensitization. Seven days after sensitization, splenocytes were analyzed by flow cytometry. Shown are representative dot plots of CD3 vs. CD4 and CD8 staining.

Food Agric Immunol. 2018 30(1):74-86 から一部改変して引用

Table 4 T cell subpopulation rate

	Non-immunized		Immunized	
	Fresh oil	Oxidized oil	Fresh oil	Oxidized oil
CD3 ⁺ CD4 ⁺ cell (%)	19.6 ± 2.39	20.5 ± 0.88	23.5 ± 1.39	27.2 ± 1.77**
CD3 ⁺ CD8 ⁺ cell (%)	12.0 ± 1.40	11.2 ± 0.93	13.9 ± 0.92	15.9 ± 1.39*

The values are mean ± SE (n = 8). *P<0.05, ** P<0.01 vs. fresh olive oil group

脾臓細胞中の T 細胞亜集団解析を行った。すなわち、OXA 感作から 7 日間、一日間隔で酸化オリーブ油を投与した後、脾臓細胞を分離し、蛍光標識した抗 CD3、CD4 および CD8 抗体を用いて染色し、T 細胞の割合をフローサイトメーターで測定した。その結果、Fig. 15 および Table 4 に示すように、CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞の割合は OXA 感作によって増加が認められ、CD3⁺CD4⁺細胞の割合は新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で有意に増加した。また、CD3⁺CD8⁺細胞の割合も酸化オリーブ油投与群で同様に増加することが確認された。OXA 感作による T 細胞分化および増殖が酸化オリーブ油によって促進されることが確認されたため、次に、CD3⁺CD4⁺のヘルパー T 細胞の中でも Th1/Th2 バランスに偏向が生じているかどうかを検討した。T-bet および IFN- γ は Th1 で、GATA3 および IL-4 は Th2 で発現が亢進していることから、Th1/Th2 バランスを評価するための有用なマーカーとなりうるため、これらを指標として Th1/Th2 バランスを評価した。すなわち、脾臓細胞からセルソーターを用いて単離した CD3⁺CD4⁺細胞中において、T-bet、IFN- γ 、GATA3 および IL-4 の mRNA 発現量を測定した。その結果、Fig. 16 に示すように、T-bet および IFN- γ の mRNA 発現量は、新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で有意に高かった。一方、GATA3 および IL-4 の mRNA 発現量は有意ではないものの、新鮮オリーブ油

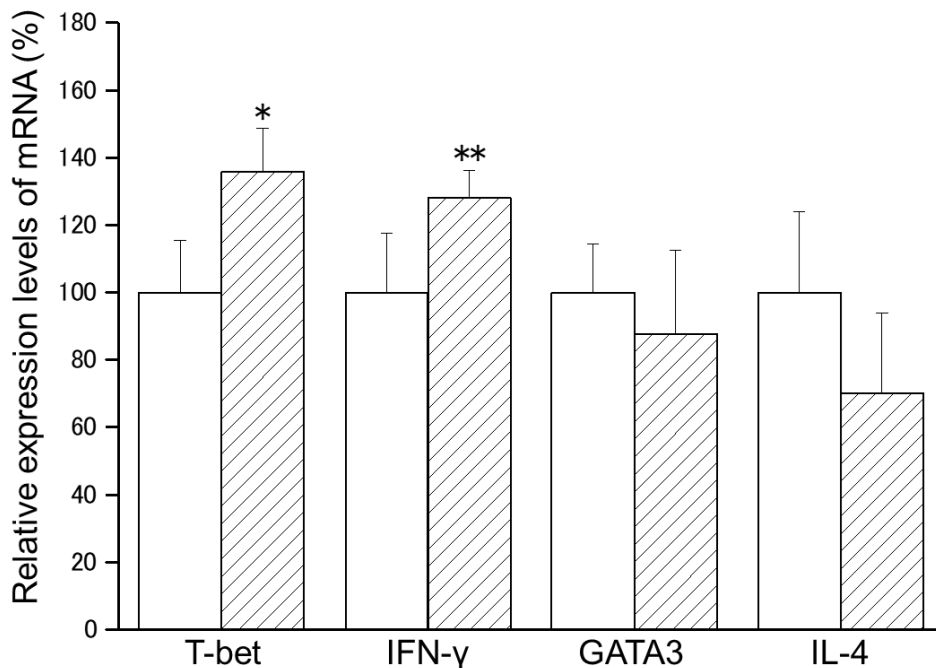


Fig. 16. mRNA expression in CD3⁺CD4⁺ cells. CD3⁺CD4⁺ cells were sorted from splenocytes by FACS. POV of fresh and oxidized olive oil were 6.04 \pm 1.01 and 48.8 \pm 0.54 mEq/kg. The mRNA expression levels of target genes were normalized by Rps18. The relative expression levels of the fresh olive oil group were designated as 100%. Fresh olive oil (\square) and oxidized olive oil (hatched). The values are mean \pm SD (n = 4). * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. the fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 30(1):74-86 から一部改変して引用

投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で低い傾向を示した。CHS は細胞性免疫が関与する遅延型アレルギー反応の一つであるため、Th1 優位であることが考えられるが、酸化オリーブ油の投与によって Th1 分化がさらに促進されることが考えられた。そこで、次に、抗原刺激による Th1/Th2 サイトカイン産生に及ぼす酸化オリーブ油の影響を *in vitro* 系で詳細に検討した。すなわち、OXA 感作から1週間、酸化オリーブ油をマウスに経口投与した後、脾臓細胞または脾臓細胞から CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞を単離した。これら細胞を同群のマウスの腹腔から分離した APC と共培養し、OXA 曝露時の IL-4 および IFN- γ 産生量を測定した。その結果、IL-4 産生については Fig.17A に示すように、脾臓細胞単独培養では OXA 刺激による IL-4 産生はわずかであったが、抗原非特異的な刺激である PMA/Io 曝露により顕著な IL-4 産生が認められた。また、脾臓細胞と APC の共培養時では OXA 刺激によるわずかな IL-4 産生が見られ (Fig. 17B)、CD3⁺CD4⁺細胞と APC の共培養時では新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で OXA 刺激による IL-4 産生量が低い傾向を示した (Fig. 17C)。しかし、CD3⁺CD8⁺細胞は OXA 刺激の有無に関わらず IL-4 を産生しなかった (Fig. 17D)。また、脾臓細胞単独培養では OXA 刺激による IFN- γ 産生はほとんど認められなかったが、抗原非特異的な PMA/Io 刺激では顕著な IFN- γ 産生が認められた (Fig. 18A)。次に IFN- γ 産生については、脾臓細胞と APC の共培養時で OXA 刺激による IFN- γ 産生と酸化オリーブ油投与による IFN- γ 産生量の有意な増大が認められた (Fig. 18B)。さらに、CD3⁺CD4⁺細胞と APC の共培養時の OXA 刺激による IFN- γ 産生量は、新鮮オリーブ油投与群に比べて酸化オリーブ油投与群で有意に増大した (Fig. 18C)。CD3⁺CD8⁺細胞と抗原提示細胞の共培養時では、OXA 刺激によって顕著な IFN- γ 産生が見られたが、新鮮オリーブ油投与群と酸化オリーブ油投与群の間で有意な差異は見られなかった (Fig. 18D)。

以上のことから、酸化オリーブ油は接触性過敏反応の感作相において CD3⁺CD4⁺細胞の中でも Th1 の分化・増殖を促進し、惹起時における抗原特異的な IFN- γ の産生を促進することにより、接触性過敏反応を増悪化することが考えられた。

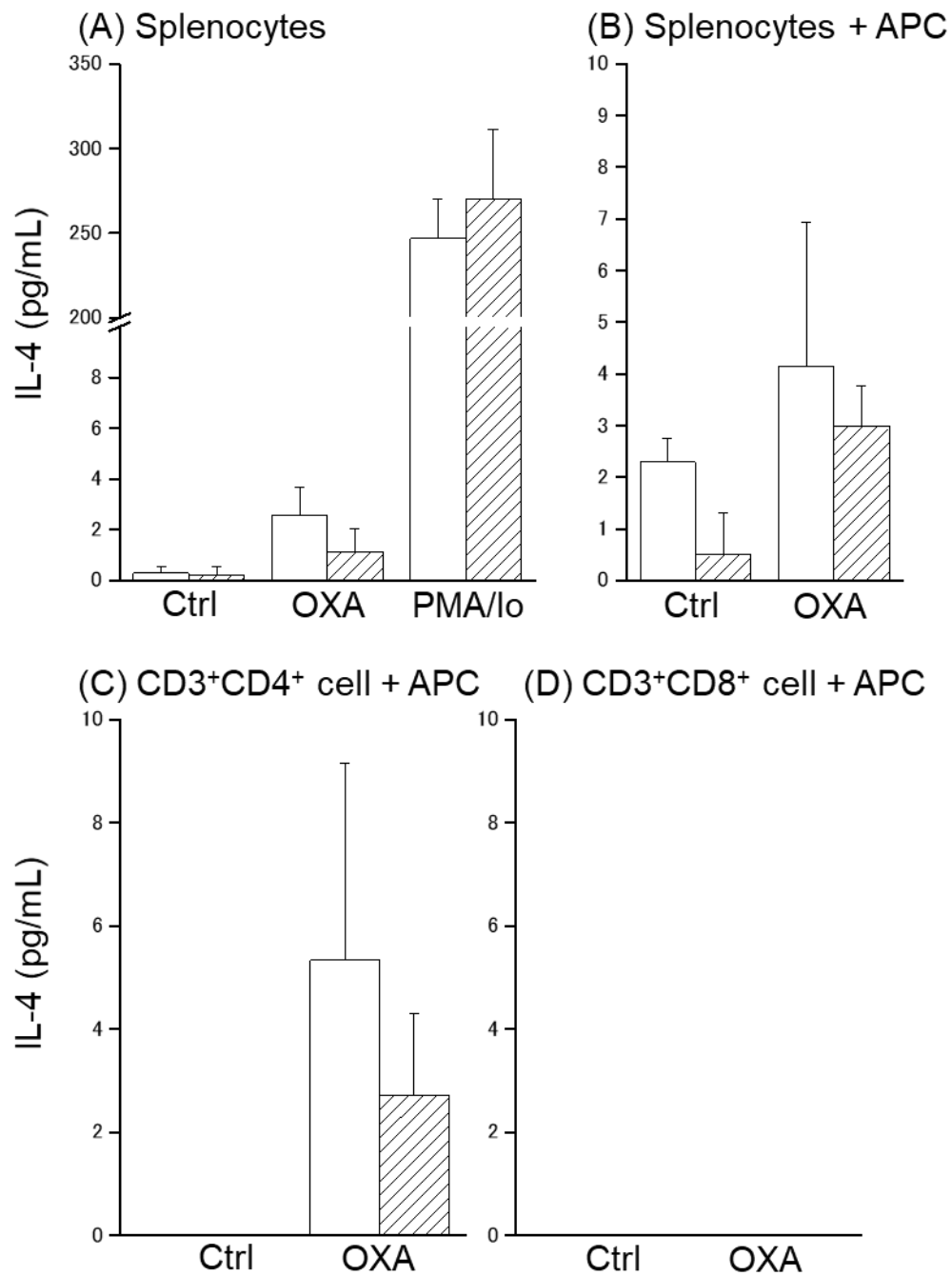


Fig. 17. IL-4 production by splenocytes and sorted T cells. IL-4 in culture supernatant 24 h after stimulation was measured by ELISA. (A) Monoculture of splenocytes. (B) Co-culture of splenocytes with APC. (C) Co-culture of CD3⁺CD4⁺ cells with APC. (D) Co-culture of CD3⁺CD8⁺ cells with APC. POV of fresh and oxidized olive oil were 7.20 ± 2.18 and 53.1 ± 1.07 mEq/kg. Fresh olive oil (\square) and oxidized olive oil (hatched). The values are mean \pm SD (n = 5).

Food Agric Immunol. 2018 30(1):74-86 から一部改変して引用

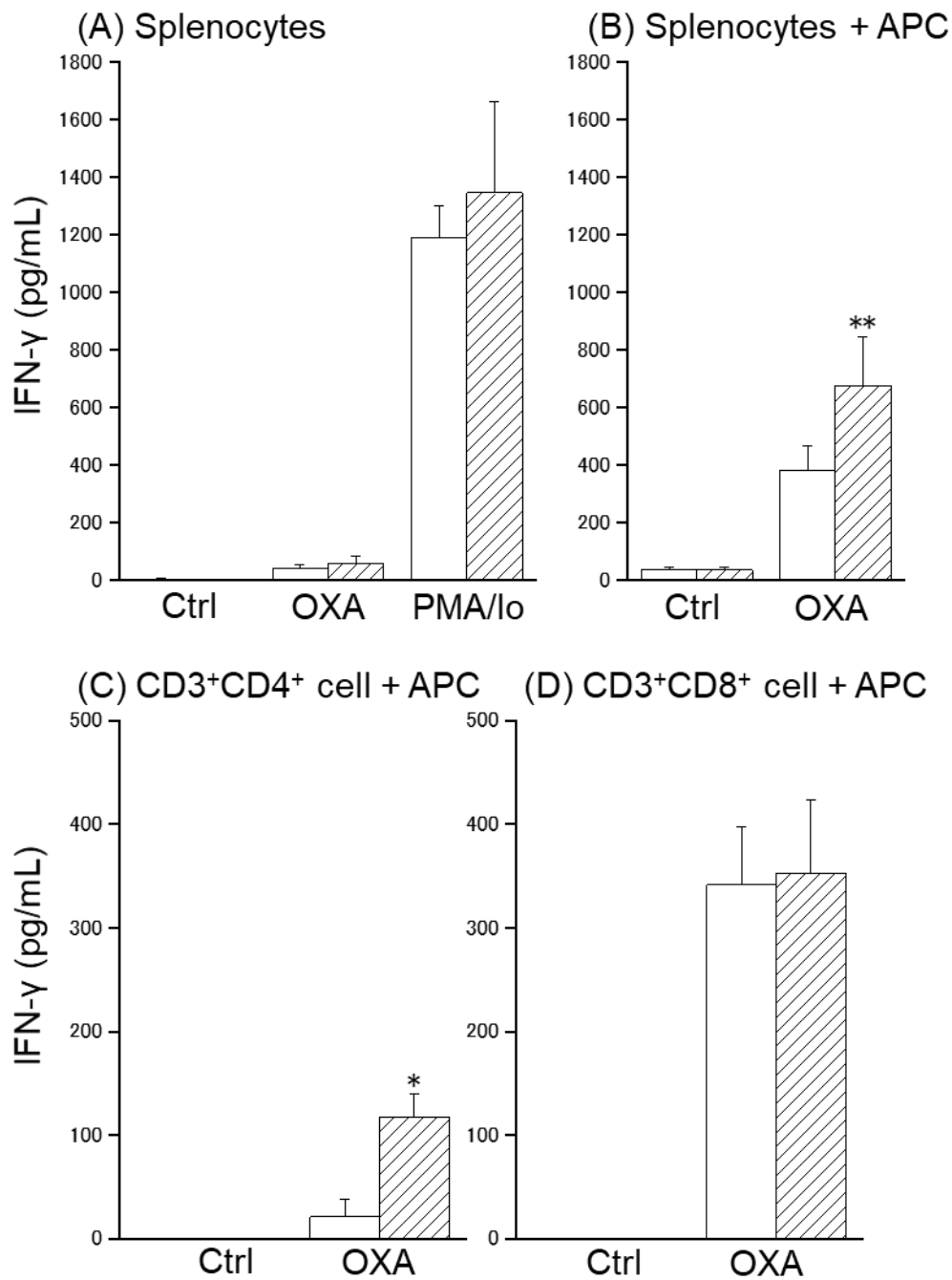


Fig. 18. IFN- γ production by splenocytes and sorted T cells. IFN- γ in culture supernatant 24 h after stimulation was measured by ELISA. (A) Monoculture of splenocytes. (B) Co-culture of splenocytes with APC. (C) Co-culture of CD3⁺CD4⁺ cells with APC. (D) Co-culture of CD3⁺CD8⁺ cells with APC. POV of fresh and oxidized olive oil were 7.20 ± 2.18 and 53.1 ± 1.07 mEq/kg. Fresh olive oil (\square) and oxidized olive oil (hatched). The values are mean \pm SD (n = 5). *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the fresh olive oil group.

Food Agric Immunol. 2018 30(1):74-86 から一部改変して引用

第4節 考察

本章では、酸化オリーブ油による CHS 感作時の血中およびリンパ節中の IL-18 産生増大機序と惹起時の IFN- γ 増大が Th1 分化の促進に起因するか否かを明らかにする目的で検討を行った。まず、酸化オリーブ油による IL-18 産生の増大がどのような作用機序によるかを明らかにするために、CHS 感作後の耳介、リンパ節および血清中 IL-18 量と IL-18 の転写因子である AP-1 および IL-18 のプロセシング酵素である caspase-1 の活性を測定した。その結果、いずれの組織においても酸化オリーブ油による IL-18 発現量の増大が認められた。また、脾臓細胞中の AP-1 および caspase-1 のいずれの活性も酸化オリーブ油によって増大が認められた。AP-1 はストレス応答性 MAPK の一つである JNK シグナルによって活性化され^{53,54}、実際に酸化ストレス亢進によって AP-1 が活性化されることが報告されている⁶⁵。また、Nrf2 を介した酸化ストレス亢進による NLRP3 inflammasome による caspase-1 活性化が示唆されている⁵⁵。そのため、酸化オリーブ油は、酸化ストレスの亢進を介して AP-1 および caspase-1 活性を増大させることによって IL-18 産生を促進することが推察された。リンパ節においては AP-1 および caspase-1 のいずれも両群間で差異は認められなかった。リンパ節は次に、T 細胞の亜集団分布に変動が見られるかどうかを検討したところ、OXA 感作によって脾臓細胞中の CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞の分化・増殖が認められた。また、酸化オリーブ油投与によって CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞のいずれも割合が増加することが確認され、T 細胞の増殖が促進している可能性が考えられた。CHS による炎症反応では CD3⁺CD8⁺細胞が主なエフェクター細胞として機能する⁵⁷が、Th1 はリンパ球の増殖や活性化を調節し、自身もエフェクター細胞として機能すること^{58,59}から、CD3⁺CD8⁺細胞の増加は Th1 の増加によって二次的に引き起こされていることが推察された。さらに、CD3⁺CD4⁺細胞中の Th1/Th2 のバランスの指標としてそれぞれの細胞が発現する主要転写因子とサイトカインの mRNA 発現量を測定した結果、酸化オリーブ油によって T-bet および IFN- γ の発現量増大と GATA3 および IL-4 の発現量の減少傾向が認められた。このことから、酸化オリーブ油は、感作の段階において T 細胞の、特に Th1 の分化と増殖を促進させることが示唆された。そこで次に、この Th1 の分化・増殖の促進が CHS 惹起時の IFN- γ 産生の増大に関与するかどうかを検討するために、脾臓細胞から単離した CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8⁺細胞のサイトカイン産生量を測定することで評価した。T 細胞の刺激方法には抗原非特異的に全ての T 細胞を刺激する PMA/Io による刺激と、抗原特異的な T 細胞のみを刺激する APC 共培養下での抗原刺激の2種類を用いることによって抗原特異的な T 細胞応答を評価した。その結果、APC 共培養時の CD3⁺CD4⁺細胞は抗原刺激によってわずかな IL-4 産生を認め、酸化オリーブ油投与群では新鮮オリーブ油投与群に比べて低い傾向を示した。また、PMA/Io 刺激した脾臓細胞に比べて CD3⁺CD4⁺細胞の IL-4 産生量ははるかに低かったことから、CD3⁺CD4⁺細胞中の抗原特異的な Th2 は少ないことが推察された。また、

抗原刺激による脾臓細胞および $CD3^+CD4^+$ 細胞の $IFN-\gamma$ 産生は酸化オリーブ油で顕著な増大を示したことから、 $CD3^+CD4^+$ 細胞中の抗原特異的な Th1 が酸化オリーブ油によって増加することが考えられた。 $CD3^+CD4^+$ 細胞の $IFN-\gamma$ 産生量に比べて、 $CD3^+CD8^+$ 細胞の $IFN-\gamma$ 産生量は 3~10 倍程度多かったが、 $CD3^+CD8^+$ 細胞の $IFN-\gamma$ 産生量は酸化オリーブ油に影響されなかった。また、油脂を投与していないマウスから単離した APC と共培養した結果においても同様の傾向が見られたこと (data not shown)、酸化オリーブ油を投与した OXA 感作マウスの脾臓細胞中の Th1 が増加したことから酸化オリーブ油による CHS の増大は $CD3^+CD4^+$ 細胞、すなわち Th1 による $IFN-\gamma$ 産生量増大によることが考えられた。第 1 章において、CHS 以外にも ACA および DNFB 誘発性皮膚炎も同様に酸化オリーブ油による増悪化が認められたが、これらのアレルギー反応は発症機序が異なるため、IL-18 増大による Th1 への偏向とは異なった作用機序が推定される。一方で、CHS の感作相で増大が認められた IL-18 は、IL-12 非存在下では IgE 産生を亢進し、アトピー性皮膚炎⁶⁶⁾や気管支喘息⁶⁷⁾を増悪化することが報告されている。また、DNFB 誘発性皮膚炎は Th1 や Th2 とは異なったサブタイプである Th17 がエフェクター細胞として重要であること⁶⁸⁾が明らかになってきており、IL-18 は Th17 の分化を促進する可能性が示唆されている⁶⁹⁾。これらのことから、酸化オリーブ油による即時型および二相性のアレルギー反応の増悪化も IL-18 の増大が関与することが推察され、さらなる検討が必要であると考えられる。

総括

近年、気管支喘息や花粉症をはじめとするアレルギー疾患の患者が急速に増加しており、この罹患率増加の要因を解明することは、本疾患の発症とその増悪化を予防するための対策を講じるうえで極めて重要である。酸化植物油脂の摂取による酸化ストレスの亢進とアレルギー疾患の増悪化に対する酸化ストレスの関与がこれまでに数多く報告されており、これらを合わせて考えるとアレルギー疾患の罹患率増加に酸化植物油脂の摂取が関与する可能性が示唆されるが、酸化植物油脂とアレルギー疾患との関連性についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、食事から摂取される酸化植物油脂のアレルギー反応に及ぼす影響とその作用機序を解明する目的で検討を行った。まず、第 1 章において酸化植物油脂の摂取がアレルギー反応を増悪化させるか否かについて、遅延型のアレルギー反応を示す CHS、即時型のアレルギー反応を示す ACA および即時型と遅延型の二相性のアレルギー反応を示す DNFB 誘発性皮膚のマウスモデルを用いて検討した。酸化植物油脂は調理等に頻繁に用いられる代表としてオリーブ油を用いて自然酸化させることによって POV が高値を示すものを用いた。その結果、いずれのアレルギー反応も酸化オリーブ油によって増悪化されることが認められた。さらにアレルギー反応の増悪化に関与する酸化植物油脂中の成分を明らかにするために、POV 以外にも AV および TBARS 値が高いオリーブ油や、オリーブ油とは脂肪酸組成が異なる他の植物油脂を用いて CHS に及ぼす影響について検討を行った。その結果、酸化植物油脂による CHS の増悪化には、酸化生成物のうちでも、遊離脂肪酸やアルデヒド類は関与せず、油脂の脂肪酸組成や夾雑物に関わらず酸化によって生成するヒドロペルオキシドに起因することが推察された。そこで次に、酸化オリーブ油による CHS 増悪化の作用機序を明らかにするために、第 2 章では CHS の感作相および惹起相の炎症性サイトカイン発現に及ぼす酸化オリーブ油の影響について検討を行った。その結果、感作相において経日的に上昇する IL-18 の発現量を酸化オリーブ油はさらに増大させ、そのことによって惹起相における IFN- γ の産生量を増大させ、結果として CHS を増悪化することが考えられた。酸化オリーブ油によって感作相における IL-18 の増大が認められたため、感作時の Th1 分化および増殖が促進されていることが示唆された。そこで、第 3 章では、酸化オリーブ油による IL-18 発現量増大の作用機序と増加した IL-18 によって T 細胞亜集団分布に変動が見られるかどうかを検討した。その結果、酸化オリーブ油の経口投与は CHS の感作時において、血中およびリンパ節中 IL-18 発現の増大を介して IL-12 存在下での Th1 の分化・増殖を促進し、惹起時における抗原特異的な IFN- γ の産生を促進すると考察された。以上の検討結果を統合的に解析することによって、アレルギー増悪化因子としての酸化植物油脂の免疫毒性の解明を試みた。本研究で得られた結果を要約すると、ヒドロペルオキシドを含有する酸化オリーブ油は、摂取されてリンパ管を介して吸収された後、感

作時における抗原提示細胞中で AP-1 および caspase-1 活性化を介して耳介中の IL-18 産生量を増加させることが示唆された。増大した IL-18 は、IL-12 によるナイーブ T 細胞から Th1 への分化および増殖を促進し、抗原特異的な Th1 を増加させることにより惹起時の抗原刺激による IFN- γ 産生が増大し、CHS を増悪化させることが明らかとなった。

IL-18 はアトピー性皮膚炎モデルの皮膚アレルギー症状と相関を示すこと⁷⁰⁾や気管支喘息の急性増悪時に IL-18 の増加が認められること⁷¹⁾ IL-18 の過剰発現系でマウスの皮膚アレルギーが増悪化すること⁷²⁾がこれまでに報告されているが、本研究ではアレルギー反応の増悪化因子としての酸化油脂摂取といった環境要因によって、実際にアレルギー反応が増悪化すること、その増悪化は IL-18 が増大し、抗原特異的な Th1 応答を促進することによって起こることを初めて明らかにした。

本研究成果はアレルギー疾患の発症および増悪化の原因解明に貢献するとともに、感作相での IL-18 の増大がアレルギー症状を増悪化することから、将来 IL-18 を指標としたアレルギー疾患の早期発見や増悪化の予防対策に繋がることが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました摂南大学薬学部公衆衛生学研究室教授、上野仁先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究に際して、数多くの有益なご助言ならびにご支援を賜りました摂南大学公衆衛生学研究室准教授、奥野智史先生に厚く敬意を表し感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたりご討論、ご指導を賜りました大阪大谷大学薬学部衛生・毒性学講座教授、坂崎文俊先生に深く感謝いたします。

組織学的試験の遂行に際し、技術面での丁寧なご指導ならびに多くのご助言を賜りました摂南大学薬学部病理学研究室教授、尾崎清和先生に心より感謝いたします。

さらに、研究を進めるにあたり、数々のご協力ならびにご討論を賜りました大阪府健康安全基盤研究所、村野晃一博士に厚く御礼申し上げます。また、実験の補助など多大なるご協力を頂きました岡山圭学士、北山美帆学士、井口崇士学士、藪田委久学士、瓜生雅之学士、朝倉祥吾学士、菊池裕介学士、別當知佐学士、米光涼学士、金由希学士、中嶋隆宏学士、南愛衣学士、岡央子学士、北村侑基学士、六反田春菜学士、伊藤淳津子学士、小池咲里学士、山田真吾学士、柿花美沙紀学士、厚主裕美学士、坂井孝徳学士、大門潔之学士、岡田雅史学士、水野可鈴学士、平松英司学士、上田陽紀氏、川嶋美帆氏、岸本早織氏、野内直矢氏、舟越将哉氏、山崎稜真氏ならびに公衆衛生学研究室の諸氏に感謝致します。

最後に、いつも陰ながら支え、応援してくれた両親、家族ならびに親族一同に心から感謝致します。

引用文献

- 1) 厚生労働省. 平成 17 年度 リウマチ・アレルギー対策委員会報告書.
- 2) 厚生労働省. 平成 23 年度 リウマチ・アレルギー対策委員会報告書.
- 3) Kirchner DB. The spectrum of allergic disease in the chemical industry. *Int Arch Occup Environ Health*. 2002; **75**:107-112.
- 4) Rajan TV. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*. 2003; **24**(7): 376-379.
- 5) Platts-Mills TA. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; **164**: 1-5.
- 6) Fernandez OL, Canosa JM, Lazzarini R, Duarte I. Association of contact urticaria and allergic contact dermatitis to rubber. *An Bras Dermatol*. 2009; **84**(2): 177-179.
- 7) Wang B, Feliciani C, Howell BG, Freed I, Cai Q, Watanabe H, Sauder DN. Contribution of Langerhans cell-derived IL-18 to contact hypersensitivity. *J Immunol*. 2002; **168**(7): 3303-3308.
- 8) Wilczyński JR. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005; **122**(2): 136-43.
- 9) Usatine RP, Riojas M. Diagnosis and management of contact dermatitis. *Am Fam Physician*. 2010; **82**(3): 249-255.
- 10) Engeman T, Gorbachev AV, Kish DD, Fairchild RL. The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J Leukoc Biol*. 2004; **76**(5): 941-949.
- 11) Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, Goebeler M. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2011; **66**(9): 1152-1163.
- 12) Kish DD1, Li X, Fairchild RL. CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *J Immunol*. 2009; **182**(10): 5949-5959.
- 13) Okamoto M, Van Stry M, Chung L, Koyanagi M, Sun X, Suzuki Y, Ohara O, Kitamura H, Hijikata A, Kubo M, Bix M. MINA, an IL-4 repressor controls TH2 bias. *Nat Immunol*. 2009; **10**(8): 872-879.

-
- 14) 厚生労働省. 平成 19 年度 国民健康・栄養調査結果の概要.
- 15) 厚生労働省. 平成 29 年度 国民健康・栄養調査結果の概要.
- 16) Min DB, Boff JM. Lipid oxidation of edible oil. In *Food lipids*. 2nd ed. New York: CRC Press; 2002.
- 17) Takeoka GR, Full GH, Dao LT. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected flying oils and fats. *J Agric Food Chem*. 1997; **45**(8):3244-3249.
- 18) Bastida S, Sanchez-Muniz FJ. Thermal oxidation of olive oil, sunflower oil and a mix of both oils during forty discontinuous domestic fryings of different foods. *Food Sci Technol Int*. 2001; **7**(1): 15-21.
- 19) Guillen MD, Goicoechea E. Formation of oxygenated α,β -unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles. *Food Chem*. 2008;**111**:157-164.
- 20) Totani N, Burenjargal M, Yawata M, Ojiri Y. Chemical properties and cytotoxicity of thermally oxidized oil. *J Oleo Sci*. 2008; **57**(3): 153-160.
- 21) Gonzalez MJ, Gray JI, Schemmel RA, Dugan Jr L, Welsch CW. Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants. *J Nutr*. 1992; **122**(11): 2190-2195.
- 22) Fontagné-Dicharry S, Larroquet L2, Dias K, Cluzeaud M, Heraud C, Corlay D. Effects of dietary oxidized fish oil supplementation on oxidative stress and antioxidant defense system in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*. 2018; **74**: 43-51.
- 23) Olivero David R1, Bastida S, Schultz A, González Torres L, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J. Fasting status and thermally oxidized sunflower oil ingestion affect the intestinal antioxidant enzyme activity and gene expression of male Wistar rats. *J Agric Food Chem*. 2010; **58**(4): 2498-2504.
- 24) Liu P, Kerr BJ, Weber TE, Chen C, Johnston LJ, Shurson GC. Influence of thermally oxidized vegetable oils and animal fats on intestinal barrier function and immune variables in young pigs. *J Anim Sci*. 2014; **92**(7): 2971-2979.
- 25) Liang F, Jiang S, Mo Y, Zhou G, Yang L. Consumption of Oxidized Soybean Oil Increased Intestinal Oxidative Stress and Affected Intestinal Immune Variables in Yellow-feathered Broilers. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2015; **28**(8): 1194-1201.
- 26) Oarata M. マウスの免疫系に及ぼす食用油脂の油脂過酸化物の影響. *日本栄養・食糧学会誌*. 2002; **55**(2): 119-124.

-
- 27) Lin BF, Lai CC, Lin KW, Chiang BL. Dietary oxidized oil influences the levels of type 2 T-helper cell-related antibody and inflammatory mediators in mice. *Br J Nutr*. 2000; **84**(6): 911-917.
- 28) Varela P, Selores M, Gomes E, Silva E, Matos E, dos Santos L, Amado J, Massa A. Immediate and delayed hypersensitivity to mite antigens in atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol*. 1999; **16**(1): 1-5.
- 29) Okada M, Terui T, Honda M, Tanaka M, Chikama R, Tabata N, Takahashi K, Tagami H. Cutaneous late phase reaction in adult atopic dermatitis patients with high serum IgE antibody to *Dermatophagoides farinae*: correlation with IL-5 production by allergen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *J Dermatol Sci*. 2002; **29**(2): 73-84.
- 30) Usmani N, Wilkinson SM. Allergic skin disease: investigation of both immediate- and delayed-type hypersensitivity is essential. *Clin Exp Allergy*. 2007; **37**(10): 1541-1546.
- 31) Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; **110**(3): 349-356.
- 32) Inoue K, Yanagisawa R, Koike E, Nishikawa M, Takano H. Repeated pulmonary exposure to single-walled carbon nanotubes exacerbates allergic inflammation of the airway: Possible role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2010; **48**(7): 924-934.
- 33) Wood LG, Garg ML, Smart JM, Scott HA, Barker D, Gibson PG. Manipulating antioxidant intake in asthma: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2012; **96**(3): 534-543.
- 34) Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci*. 2001; **69**(2): 223-228.
- 35) Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, Hiraoka M, Yoshida A, Nishima S, Mayumi M. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci*. 2003; **72**(22): 2509-2516.
- 36) Tsukahara H, Shibata R, Ohta N, Sato S, Hiraoka M, Ito S, Noiri E, Mayumi M. High levels of urinary pentosidine, an advanced glycation end product, in children with acute exacerbation of atopic dermatitis: relationship with oxidative stress. *Metabolism*. 2003; **52**(12): 1601-1605.
- 37) Inagaki N, Miura T, Nagai H, Koda A. Active cutaneous anaphylaxis (ACA) in the mouse ear. *Jpn J Pharmacol*. 1992; **59**(2): 201-208.
- 38) Natsuaki M, Yano N, Yamaya K, Kitano Y. Immediate contact hypersensitivity induced by repeated hapten challenge in mice. *Contact Dermatitis*. 2000; **43**(5): 267-

- 39) Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007; **19**: 652-657.
- 40) Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*. 2007; **19**: 362-371.
- 41) Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 1995; **154**(10): 5071-5079.
- 42) Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996; **184**(2): 747-752.
- 43) Ma X, Trinchieri G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv Immunol*. 2001; **79**: 55-92.
- 44) Fong TA, Mosmann TR. The role of IFN-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *J Immunol*. 1989; **143**(9): 2887-2893.
- 45) Wakabayashi T, Hu DL, Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y, Hanada K, Nakane A. IFN-gamma and TNF-alpha are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice. *Immunol Cell Biol*. 2005; **83**(1): 18-24.
- 46) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995; **378**(6552): 88-91.
- 47) Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 2013; **4**: 289.
- 48) Lebel-Binay S, Berger A, Zinzindohoué F, Cugnenc P, Thiounn N, Fridman WH, Pagès F. Interleukin-18: biological properties and clinical implications. *Eur Cytokine Netw*. 2000; **11**(1): 15-26.
- 49) Cho D, Seung Kang J, Hoon Park J, Kim YI, Hahm E, Lee J, Yang Y, Jeon J, Song H, Park H, Kim T, Pang S, Kim CW, Il Hwang Y, Jae Lee W. The enhanced IL-18 production by UVB irradiation requires ROI and AP-1 signaling in human keratinocyte cell line (HaCaT). *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; **298**(2): 289-295.
- 50) Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by

interleukin-1beta converting enzyme. *Science*. 1997; **275**(5297): 206-209.

51) Adler V, Schaffer A, Kim J, Dolan L, Ronai Z. UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J Biol Chem*. 1995; **270**(44): 26071-26077.

52) Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, Davis RJ, Paulson KE. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; **93**(23): 12908-12913.

53) Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991; **1072**(2-3): 129-157.

54) Ausserer WA, Bourrat-Floek B, Green CJ, Laderoute KR, Sutherland RM. Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol Cell Biol*. 1994; **14**(8): 5032-5042.

55) Garstkiewicz M, Strittmatter GE, Grossi S, Sand J, Fenini G, Werner S, French LE, Beer HD. Opposing effects of Nrf2 and Nrf2-activating compounds on the NLRP3 inflammasome independent of Nrf2-mediated gene expression. *Eur J Immunol*. 2017; **47**(5): 806-817.

56) Kolesaric A, Stingl G, Elbe-Bürger A. MHC class I/II- dendritic cells induce hapten-specific immune responses in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*. 1997; **109**(4): 580-585.

57) Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C, Bosset S, Akiba H, Kehren J, Kanitakis J, Kaiserlian D, Nicolas JF, Berard F. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol*. 2003; **120**(4): 641-647.

58) Kondo S, Beissert S, Wang B, Fujisawa H, Kooshesh F, Stratigos A, Granstein RD, Mak TW, Sauder DN. Hyporesponsiveness in contact hypersensitivity and irritant contact dermatitis in CD4 gene targeted mouse. *J Invest Dermatol*. 1996; **106**(5): 993-1000.

59) Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Freed I, Howell BG, Shahid S, Shivji GM, Mak TW, Sauder DN. CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol*. 2000; **165**(12): 6783-6790.

60) Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol*. 2000; **18**: 451-494.

61) Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002; **2**(12): 933-944.

-
- 62) Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*. 2003; **4**(12): 1169-1176.
- 63) Inoue H, Kubo M. SOCS proteins in T helper cell differentiation: implications for allergic disorders? *Expert Rev Mol Med*. 2004; **6**(22): 1-11.
- 64) Koike A, Shibano M, Mori H, Kohama K, Fujimori K, Amano F. Simultaneous addition of Shikonin and its derivatives with lipopolysaccharide induces rapid macrophage death. *Biol Pharm Bull*. 2016; **39**(6): 969-976.
- 65) Rao GN, Glasgow WC, Eling TE, Runge MS. Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity. *J Biol Chem*. 1996; **271**(44): 27760-27764.
- 66) Konishi H, Tsutsui H, Murakami T, Yumikura-Futatsugi S, Yamanaka K, Tanaka M, Iwakura Y, Suzuki N, Takeda K, Akira S, Nakanishi K, Mizutani H. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**(17): 11340-11345.
- 67) Hartwig C, Tschernig T, Mazzega M, Braun A, Neumann D. Endogenous IL-18 in experimentally induced asthma affects cytokine serum levels but is irrelevant for clinical symptoms. *Cytokine*. 2008; **42**(3): 298-305.
- 68) Kish DD, Li X, Fairchild RL. CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *J Immunol*. 2009; **182**(10): 5949-5959.
- 69) Harrison OJ, Srinivasan N, Pott J, Schiering C, Krausgruber T, Ilott NE, Maloy KJ. Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3⁺ Treg cell function in the intestine. *Mucosal Immunol*. 2015; **8**(6): 1226-1236.
- 70) Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Kirii Y, Nishiwaki E, Maeda Y, Takeda J, Okamoto M, Kato S, Imaizumi T, Aizawa H, Yoshino K. Exacerbated and prolonged allergic and non-allergic inflammatory cutaneous reaction in mice with targeted interleukin-18 expression in the skin. *J Invest Dermatol*. 2003; **121**(3): 502-509.
- 71) Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Teramoto S, Shiratori M, Hashimoto M, Ohmichi M, Abe S. IL-18 might reflect disease activity in mild and moderate asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; **107**(2): 331-336.
- 72) Inoue Y, Aihara M, Kirino M, Harada I, Komori-Yamaguchi J, Yamaguchi Y, Nagashima Y, Ikezawa Z. Interleukin-18 is elevated in the horny layer in patients with atopic dermatitis and is associated with Staphylococcus aureus colonization. *Br J Dermatol*. 2011; **164**(3): 560-567.