

## 合成及び天然 $\beta$ -カロチン投与ラット における補体系免疫因子の変動

藤 沢 由美子, 林 知 子  
大 城 恵美子, 坂 本 元 子

### 〔諸 言〕

$\beta$ -カロチンはビタミンAの前駆物質としてばかりでなく、抗酸化物質としてあるいは免疫賦活物質として最近注目を集め、多方面での利用が期待されている。

疫学的研究で $\beta$ -カロチンを多く含む果物、野菜の摂取量と発癌頻度が逆相関することが明らかになり<sup>1,2)</sup>、その後血中カロチノイド濃度と発癌頻度が逆相関すること<sup>3-5)</sup>、血中カロチノイド濃度は $\beta$ -カロチン摂取量を反映すること<sup>6,7)</sup>等が報告され $\beta$ -カロチンの摂取が重要視されるようになった。また、腫瘍免疫学的研究でも動物及びヒトの実験から $\beta$ -カロチンの効果が証明され作用機序の研究も進んできている<sup>8-10)</sup>。

このような作用を持った $\beta$ -カロチンの採取を効率よく藻類より行って天然 $\beta$ -カロチンとして製品化されているものもあり、その有効性等については検討されつつある<sup>11,12)</sup>。

そこで今回はその $\beta$ -カロチンの影響が未だ明らかにされていない補体系免疫因子の動態を指標に $\beta$ -カロチンの由来（合成・天然）や濃度が及ぼす影響を動物を用いて検討を行った。

### 〔方 法〕

#### 1. 動物及び飼育条件

動物はSprague Dawley (SD) 系雄ラット、4週齢、体重80g~90g（日本チャールスリバー株式会社）のものを用いた。動物31匹を予備飼育後、5つのグループに分け、それぞれコントロール食（6匹）、合成高濃度 $\beta$ -カロチン食（7匹）、合成低濃度 $\beta$ -カロチン食（6匹）、天然高濃度 $\beta$ -カロチン食（6匹）、天然低濃度 $\beta$ -カロチン食（6匹）で14日間飼育した。各群の飼料組成については表1に示した。合成及び天然 $\beta$ -カロチン非添加の基本飼料（船橋農場株式会社）にコーンオイル2%を加えたものをコントロール食とし、実験食はそれ

表1 飼料組成

(重量%)

成分	群	コントロール	合成高BC	合成低BC	天然高BC	天然低BC
Vit.-free casein		20	20	20	20	20
DL-Methionine		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Vit. mix (AIN-76)* <sup>1</sup>		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Meneral mix (AIN-76)* <sup>2</sup>		3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Sucrose		45.0	45.0	45.0	45.0	45.0
Cornstarch		15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Cellulose		3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil		10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
$\beta$ -carotene in oil	(Corn oil 2.0)		2.0	2.0	2.0	2.0
$\beta$ -carotene ( $\mu$ g/kg diet)		0	20,000	400	20,000	400

\* 1 AIN-76ビタミン混合組成 (100g中)

成分	割合(単位: mg)
ビタミンA・アセテート 50万IU	80.0 (40000IU)
ビタミンD <sub>2</sub> 4000万IU	0.25 (10000IU)
ビタミンE・アセテート	500.0
ビタミンB <sub>1</sub>	60.0
ビタミンB <sub>2</sub>	70.0
ビタミンB <sub>6</sub>	60.0
ビタミンB <sub>12</sub>	0.1
ビタミンK <sub>3</sub>	0.5
ビチオン	2.0
葉酸	20.0
パントテン酸カルシウム	160.0
ナイアシン	300.0
賦形物質(セルロースパウダー)	

\* 2 AIN-76ミネラル混合組成 (100g中)

成分	割合(単位: mg)
CaHPO <sub>4</sub>	50.0
NaCl	7.4
K <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ・H <sub>2</sub> O	22.0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.2
MgO	2.4
MnCO <sub>3</sub>	0.35
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ・nH <sub>2</sub> O	0.6
ZnCO <sub>3</sub>	0.16
CuCO <sub>3</sub>	0.03
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.001
KIO <sub>3</sub>	0.001
CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ・12H <sub>2</sub> O	0.055
賦形物質(セルロースパウダー)	

BC:  $\beta$ -カロチン、以下の図表も同様に表記。

ぞれ基本飼料に合成あるいは天然の $\beta$ -カロチンを2段階の濃度にコーンオイルで溶解して添加したものをを用いた。なお、基本飼料にはビタミンAが4000IU/kg diet含まれている。合成 $\beta$ -カロチンには、 $\beta$ -カロチン30%懸濁液 (日本ロッシュ株式会社) を、天然 $\beta$ -カロチンはプロバテノール [藻類抽出カロチン (天然濃縮 $\beta$ -カロチン30%)、光洋商会株式会社] を使用した。実験食開始前及び開始後14日目に採血を行い、実験に供した。なお、飼育は金網ケージで1匹飼育とし室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ の室内で12時間点灯の条件で行った。水は水道水を自由摂取させた。

## 2. 測定項目及び方法

測定項目は、栄養系指標として体重、飼料摂取量、赤血球数・白血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値を、補体系指標として血清C3濃度、補体溶血活性 (CH50) 及びC3b・iC3b形成能を測定した。

赤血球数・白血球数は自動血球カウンター (MEK-1100、日本光電工業) で測定した。ヘモグロビン濃度の測定はヘモグロビンメーター (DC401、横河電機) を用いた。ヘマトクリットはヘマトクリット用高速遠心機を用いて測定した。補体C3濃度は一元放射状免疫拡散法 (SRID法) により<sup>13)</sup>、CH50はMayer法の変法により測定した<sup>14)</sup>。C3b・iC3b形成能の測定は免疫粘着反応を利用し、U型マイクロプレートを用いて測定した<sup>15)</sup>。

## 〔結 果〕

### 1. 体重の変化

体重の変化については図1に示した。また、1日当たりの体重増加量は表2に示した。実験食開始体重はいずれの群も115~120gで実験食開始3日目の測定値から合成及び天然高濃度 $\beta$ -カロチン投与群がやや高い傾向を示し、実験終了時14日目までその傾向が続いた。1日

表2 1日当たり体重増加量

群	体重増加量 (g/日)
コントロール	4.3 $\pm$ 0.4
合成高 B C	4.7 $\pm$ 0.3
合成低 B C	4.8 $\pm$ 0.3
天然高 B C	5.0 $\pm$ 0.2
天然低 B C	4.5 $\pm$ 0.4

値は平均値 $\pm$ SE (n = 6~7)

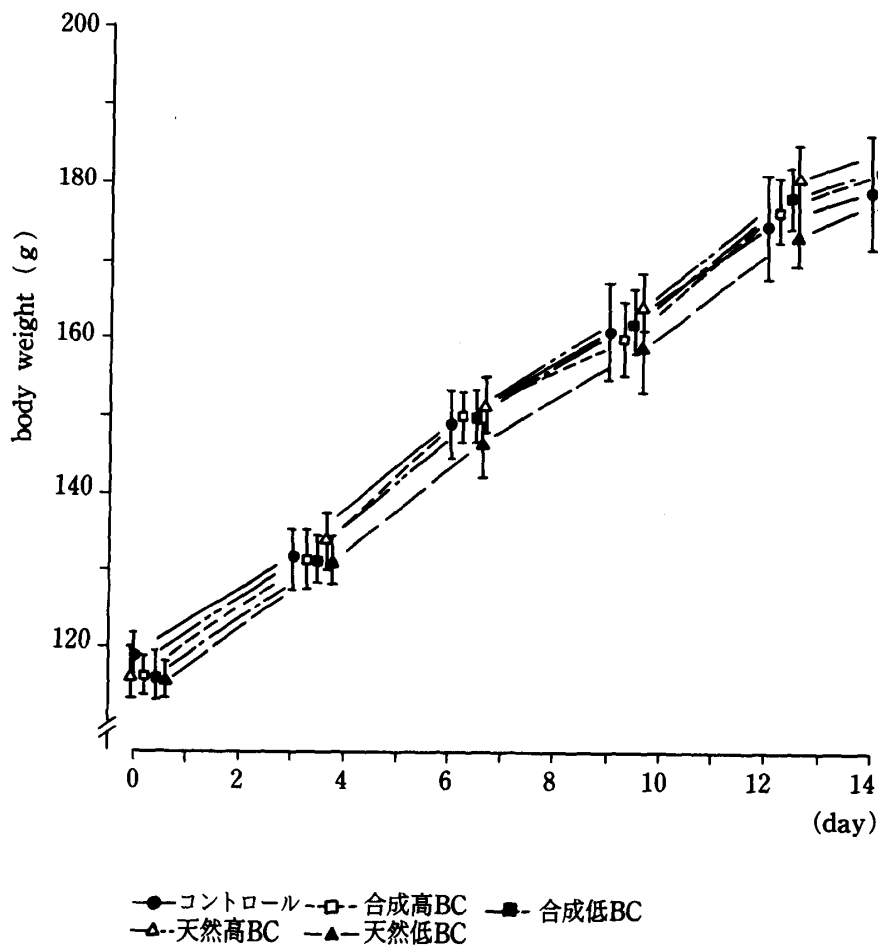
当たりの体重増加量で見ると、有意差は認められないものの、合成、天然に拘らず高濃度 $\beta$ -カロチン投与群で体重増加が認められた。

## 2. 飼料摂取量及び飼料効率

飼料摂取量及び飼料効率については表3に示した。

1日当たり飼料摂取量については、有意差は認められないものの、合成及び天然高濃度 $\beta$ -カロチン投与群がコントロール群及びそれぞれの低濃度群に比べ高い傾向を示した。1日当たり $\beta$ -カロチン摂取量については飼料摂取量に差が見られなかったことから合成及び天然の間に大きな差は認められなかった。

飼料効率については、体重、飼料摂取量と同様に有意差は認められないものの、コントロール群よりも $\beta$ -カロチン投与群の方が高い傾向が見られた。 $\beta$ -カロチンの濃度から見ると、合成、天然ともに高濃度群が低濃度群に比べやや高値を示した。



値は平均値±SE (n = 6~7)

図1 体重の変化

表3 飼料摂取量及び飼料効率

群	飼料摂取量 (g/日)	BC摂取量 (μg)	飼料効率
コントロール	10.6±0.4	0	0.403±0.028
合成高BC	11.3±0.3	225.0±6.7	0.436±0.013
合成低BC	11.0±0.4	4.4±0.1	0.429±0.017
天然高BC	11.4±0.5	228.3±10.3	0.439±0.012
天然低BC	10.7±0.7	4.3±0.3	0.420±0.014

値は平均値±SE (n = 6~7)

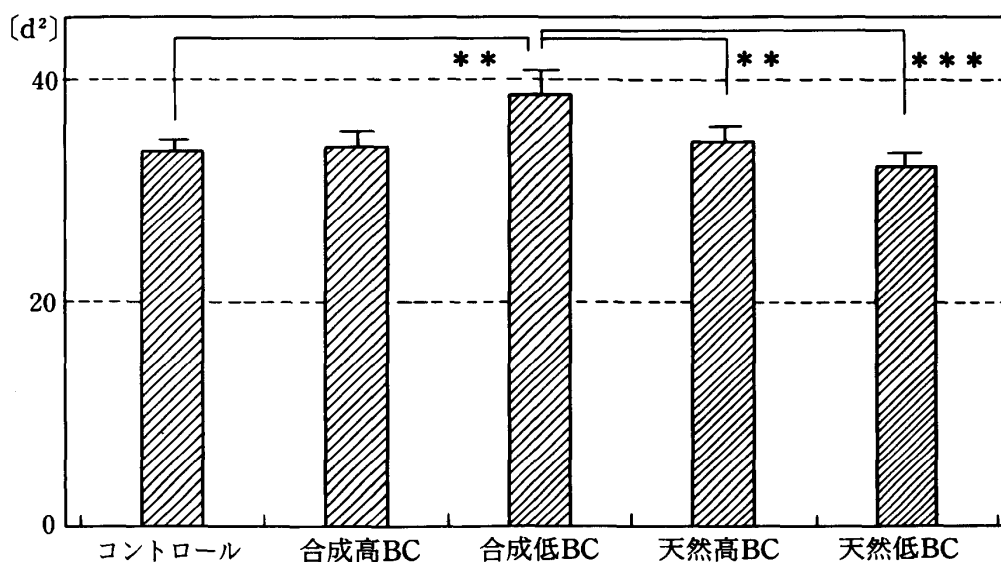
### 3. 血液性状

赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値については図、表に示さないが、いずれもコントロール群とβ-カロチン群の間に大きな差は見られず、β-カロチン投与の影響は認められなかった。

### 4. 血中C3濃度

血中C3濃度については図2に示した。

各群間に大きな差は認められなかったが、天然低濃度β-カロチン群がやや低値を示し、合成低濃度β-カロチン群及び天然高濃度β-カロチン群に対して有意差が認められた。



値は平均値±SE (n = 5~6)

\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.001表示間に有意差有り

図2 血中C3濃度

5. 補体溶血活性 (CH50)

CH50については図3に示した。

C3濃度と同様に、 $\beta$ -カロチン投与の影響はあまり認められず、各群間に大きな差は見られなかった。合成高濃度 $\beta$ -カロチン群がやや高値を示したことから、天然高濃度 $\beta$ -カロチン群との間に有意差が認められた。

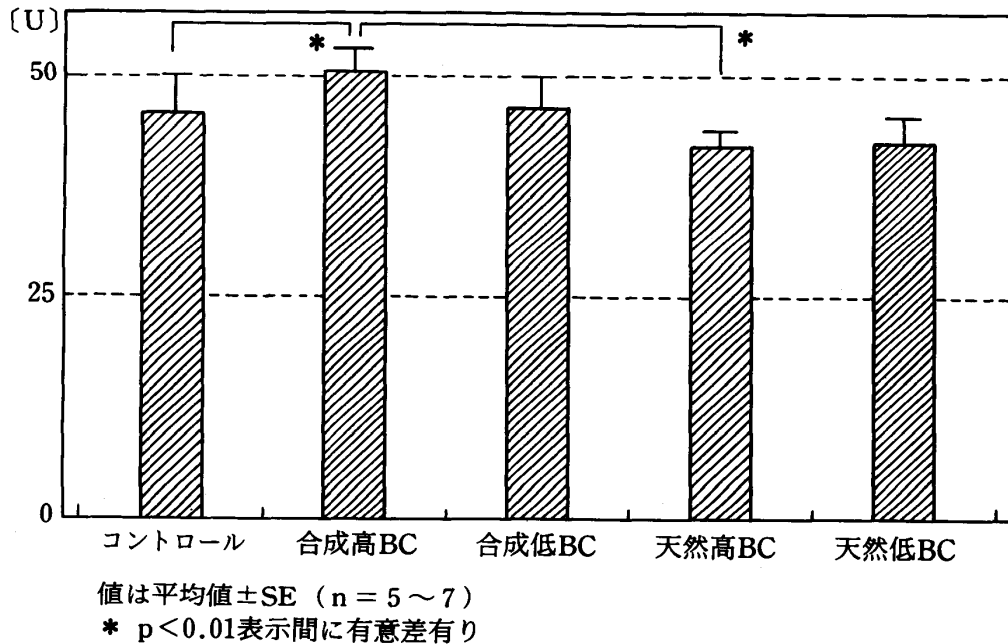


図3 補体溶血活性

6. C3b・iC3b形成能

C3b・iC3b形成能については図4に示した。

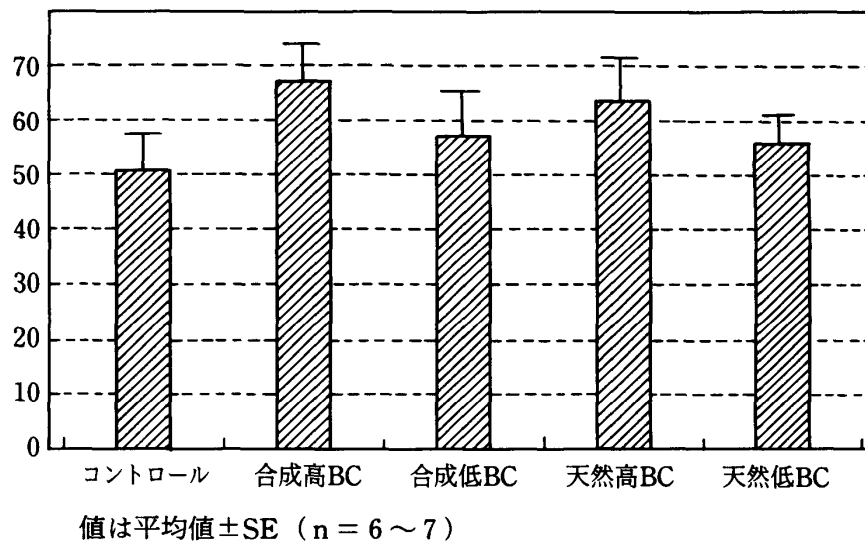
C3bについてはコントロール群に比べ $\beta$ -カロチン投与群が有意差は認められないがやや高値を示す傾向が見られた。 $\beta$ -カロチンの濃度が合成、天然に拘らず高い方が高値を示す傾向があった。また、合成と天然の比較では合成 $\beta$ -カロチンの方がわずかではあるが高値を示す傾向が見られた。

iC3bについてはコントロール群に比べ $\beta$ -カロチン投与群が高値を示す傾向があった。 $\beta$ -カロチンの濃度から見ると、合成、天然いずれも低濃度群が高い値を示した。合成、天然の比較では天然の方がわずかに高値を示した。

〔考 察〕

$\beta$ -カロチンは特に細胞性免疫において増強効果を示すことが明らかになっているが、生

(1) C3b形成能



(2) iC3b形成能

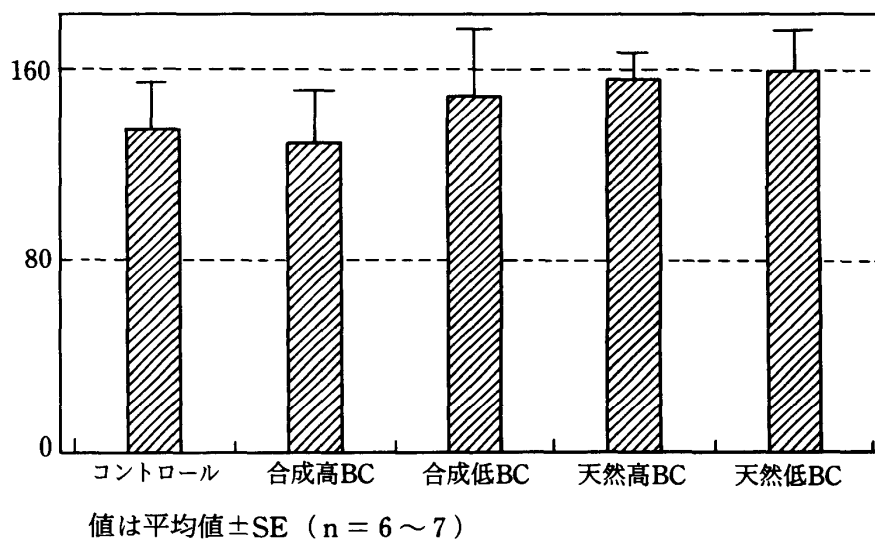


図4 C3b・iC3b形成能

体防衛機構においてその細胞性免疫因子と相互に作用し重要な役割を果たしている補体系に及ぼす影響については未だ明らかでない。そこで今回はラットに $\beta$ -カロチン添加食を投与してその投与により補体系にどのような変動が起こるかを検討した。

まず基本的な観察として $\beta$ -カロチンの投与による成長及び血液性状に及ぼす影響につい

てみると、体重の変化については14日間の投与であったが、高濃度 (20000 $\mu\text{g}/\text{kg diet}$ ) 及び低濃度 (400 $\mu\text{g}/\text{kg diet}$ ) の $\beta$ -カロチン投与によりやや増加の傾向が認められた。 $\beta$ -カロチンの由来による差はなく、合成、天然同様に体重増加が認められた。飼料効率については、 $\beta$ -カロチンの投与により飼料効率が高い傾向にあった。また、合成及び天然ともに高濃度 $\beta$ -カロチンの投与の方が低濃度 $\beta$ -カロチンの投与よりも高い傾向が認められた。飼料中に $\beta$ -カロチンが存在することにより飼料の消化吸収率が変化し、体重増加傾向、飼料効率上昇傾向が認められるのか、その原因の解明には今後の検討が必要と思われる。

血液性状については、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値について測定した。いずれの測定項目についても $\beta$ -カロチンの投与による大きな変化は見られなかった。

予備実験において同様の条件における動物の血漿中の $\beta$ -カロチン濃度及び血漿レチノールを検討したが検出されなかった。ヒトの場合では $\beta$ -カロチンの摂取量が血中カロチノイド濃度に反映していることが玉井らの報告<sup>16)</sup>で明らかになっている。一般に $\beta$ -カロチンは他の主要な栄養素と比べて消化吸収率が低いと言われている。その中で合成 $\beta$ -カロチンと天然 $\beta$ -カロチンの吸収率の比較では合成の方が吸収率がよいとされており<sup>17)</sup>、玉井らの研究<sup>16)</sup>でもall-trans型の合成 $\beta$ -カロチンの方が吸収率がよいとの報告がされている。ラットにおいても合成、天然の違いが血中レベルに反映されることを期待していたが、ラットにおいてはもともと血中カロチノイド濃度が低く検出されにくいという報告<sup>18)</sup>があり、また、レチノールが本来レチノール結合蛋白 (RBP) と結合して存在しRBPによって制御を受けて血中の濃度が厳密に調節されていること、今回のラットの基本飼料にビタミンAが含まれていること、等の理由から大きく変動しなかったと考えられる。 $\beta$ -カロチンが肝臓中にレチノールとして蓄積することも知られているので<sup>19)</sup>、肝臓中のレチノールを検討することによってその効果が明確に確認できたかもしれない。

補体系は感染防御において重要な役割を果たしており、異物の侵入に対して抗体の介在の有無に拘らず活性化されるC3を中心にその作用機序が分子レベルで明らかにされている<sup>20,21)</sup>。CH50はこの補体の活性を測定する方法で、ヒツジ血球を抗原にした、抗体、補体結合の一連の酵素活性による抗原溶解能を見ている。今回の検討では、C3及びCH50に大きな変化は見られなかった。

C3の分解産物C3bは免疫粘着反応を起こし赤血球表面のCR1レセプターと結合する。その後CR1に結合しているC3bはI因子により分解されiC3bの形成が見られるが、このiC3b結合体は食細胞の表面にあるCR3レセプターを介して貪食を誘導する。従ってC3の濃度ばかり



りでなく、C3が活性化されてその後の機能的な面をこの測定で観察していると考えられる。このC3b、iC3b形成能についてはいずれもコントロール群に比べ、β-カロチン投与群は有意差は認められないものの高値を示す傾向があった。C3濃度やCH50に比べ、β-カロチンの由来や濃度の影響を受けやすいように思われた。

以上の結果をまとめると、合成あるいは天然のβ-カロチン (濃度は20000μg/kg diet及び400μg/kg diet) をSDラットに14日間投与した場合、補体系の因子にはβ-カロチンの由来や濃度による大きな変化は認められなかった。非特異的及び特異免疫応答能がβ-カロチンの投与で増強される機序としては一重項酸素を消去させることによる抗酸化機能であると考えられている<sup>10)</sup>。しかしながら、フリーラジカルの補体系に及ぼす直接の影響の詳細は不明な点が多く、今後、細胞性、補体系の双方及び他の面も含めて多角的に検討していく必要がある。更にβ-カロチンの吸収、代謝の種差なども今後研究を進めるにあたっては考慮しなければならぬと思われる。

本研究を行うにあたり、合成及び天然β-カロチンを提供下さいましたワイス・エーザイ株式会社、深山伸行氏、大和愉美子氏に感謝いたします。

#### [参考文献]

- 1) Hirayama T. :Diet and Cancer. Nutr. Cancer 1 :67-81, 1979
- 2) Shekelle R.B., Lepper M., Liu S. et al. :Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric Study. Lancet 2:1185-1190, 1981
- 3) Nomura A.M.Y., Stemmerman G.N., Heilbert L.K., et al. :Serum vitamin levels and the risk of cancer of specific sites in men of Japanese ancestry in Hawaii. Cancer Res. 45: 2369-2372, 1985
- 4) Menkes M.S., Comstock G.W., Vuilleumier J.P., et al. :Serum betacarotene, vitamins A and E, selenium, and the risk of lung cancer. N.Engl. J.Med. 315:1250-1254, 1986
- 5) Wald N.J., Thompson S.G., Densem J.W., et al. :Serum β-carotene and subsequent risk of cancer :results from the BUPA study. Br.J.Cancer 57:428-433, 1988
- 6) Dimitrov N., et al. :Bioavailability of β-carotene in humans. Am.J.Clin. Nutr. 48: 298-304, 1988
- 7) Brown E.D., Micozzi N.E., Craft J.G. et al. :Plasma carotenoides in normal men after a single ingestion of vegetables or purified β-carotene. Am.J.Clin. Nutr. 49:1258-1265, 1989
- 8) Tomita Y., Himeno K., Momoto K., et al. :Augumentation of tumor immunity against syngeneic tumors in mice by β-carotene. J.Natl. Cancer Inst. 78:679-680, 1987

- 9) Alexander M., Newmark H., Miller R.G. :Oral beta-carotene can increase the number of OKT4+ cells in human blood. Immunol. Letters 9:221-224, 1985
- 10) Bendich A. :Carotenoids and the immune response. J.Nutr. 119:112-115. 1989
- 11) Mokady S.A., Cogan U. :The safety evaluation of Dunaliella Bardawil as a potential food supplement. Fd. Chem. Toxic. 27:221-226, 1989
- 12) Nagasawa H., Fujii Y., Yamamoto K., et al. :No deleterious side-effects on mammary growth and endocrine parameters of chronic ingestion of beta-carotene-rich alga Dunaliella bardawil in virgin mice in comparison with synthetic all-trans beta-carotene Cancer J. 2: 391-394, 1989
- 13) Sakamoto M., Ishii S., Nishioka K. :Heightened resistance against Listeria monocytogenes infection in malnourished rats after lentinan treatment :correlation with C3 levels. Nutr. Res. 3:705-718, 1983
- 14) Mayer M.M. :Complement and complement fixation. Experimental immunochemistry (ed. by Kabat E.A., Mayer M.M. )2nd ed. C.C.Thomas, Springfield, 133-240, 1961
- 15) Kawanobe Y., Sakamoto M., Nishioka K. :C3bi formation at the time of complement enhancement in malnourished rats. Nutr. Res. 8:1277-1286, 1988
- 16) 玉井浩、村田卓士、森信孝雄、他 : Dunaliella bardawil由来の $\beta$ -カロテン製剤長期服用時のヒトにおける血中動態 Vitamins (Japan) 67:127-132, 1993
- 17) Bauernfeild J. :Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Academic Press New York. 1981
- 18) 四童子好広、西脇理英 : 利用効率VI. カロチン類(カロチノイド)栄養食生活情報6:33-40, 1993
- 19) Ben-Amotz A., Mokady S., Avron M. :The  $\beta$ -carotene-rich alga Dunaliella bardawil as a source of retinol in a rat diet. Br. J.Nutr. 59:443-449, 1988
- 20) 西岡久壽彌 : 分子内C 3 カスケード補体系と生体防衛担当細胞の相互作用— 医学のあゆみ 136:903-909, 1986
- 21) 坂本元子、西岡久壽彌 : バイオフィラキシー 朝倉書店1991

藤 沢 由 美 子(本学専任講師)

林 知 子(本学助手補)

大 城 恵 美 子(本学卒業生)

坂 本 元 子(本学教授)