

食物アレルゲンに対する経口免疫寛容に及ぼす 軽度ストレスの影響

高松 寛子^{*1}, 山内真知子^{*2}, 美野祐里佳^{*3}, 松村 愛子^{*3},
水羽 陽子, 坂井堅太郎

Effect of Light Stress on Oral Tolerance against Ovalbumin as
a Food Allergen in Mice

Hiroko TAKAMATSU^{*1}, Machiko YAMAUCHI^{*2}, Yurika MINO^{*3}, Aiko MATSUMURA^{*3},
Yoko MIZUHA and Kentaro SAKAI

Abstract

Oral tolerance is a unique immune system in the intestinal mucosa to prevent adverse reaction against harmless antigens through the oral route. We assessed several immunological indicators to investigate whether there is an effect of induction of oral tolerance against dietary antigens on light stress in mice. Mice were given light stress through the experimental period and constructed to an animal model of oral tolerance against ovalbumin (OVA) by oral administration for four consecutive days before intraperitoneally immunization with the same protein. The amount of total IgE and the titers of OVA-specific antibodies classified into IgE, IgG, and IgG₁ in serum were elevated in the immunized mice suffering from stress or not. Mice treated with OVA by oral administration followed by immunization resulted in induction of immunological tolerance against this protein showing suppressed levels of total IgE and all types of OVA-specific antibody in serum, which was remarkable in mice without stress. IL-4, an index for distribution of T cell immunological phenomena against Th2, were observed in lower in culture media from spleen cells in mice given stress, while the group without stress was not affected. These results suggested that light stress modulate immunological phenomena into corresponding to suppress induction of oral tolerance against innocuous antigens through the oral route.

^{*1} 2007年度広島女学院大学大学院人間生活学研究科修了

^{*2} 2008年度広島女学院大学大学院人間生活学研究科修了

^{*3} 広島女学院大学大学院人間生活学研究科生活科学専攻

I 緒 言

近年, 日本では飛躍的な経済の発展と食生活の向上とともに, アレルギーを発症する人も急増している。アレルギーとは, ある特定の物質に対して免疫機構が異常に反応することをいい, アレルギーを引き起こす原因となる物質をアレルゲンという¹⁾。食物を摂取することにより, 生体に様々な病的徴候を引き起こすことを“Adverse Reaction to Food”とよび, このうち非毒性のもので免疫を介する反応が食物アレルギーとされている²⁾。しかし, 生体には, 経口的に摂取した食物成分に対して, 免疫反応を抑制しようとする経口免疫寛容機構 (Oral Tolerance) が腸管組織に備わっている^{3,4)}。食物アレルギーの発症は食生活や遺伝などの要因が複雑に絡み合っていると考えられているが, 近年, 腸管組織に備わっている経口免疫寛容機構の解明は食物アレルギーの発症機構の本質的な治療と予防へと発展するものと期待されている。

一方, 食物アレルギーを起こす人でも, アレルゲンが体内に進入すると, 常にアレルギー反応を起こすわけではなく, そのときの体調によって起こしたり, 起こさなかったりすることが知られている。このことは, アレルゲンの量的な暴露以外にもアレルギー症状の強さを決める要因となるものがあることを意味しており, それを取り除くことで食物アレルギーを引き起こす割合を減少させることができる可能性を示唆している。その要因のひとつにストレスがあげられる。

ストレスは, 体の内外から受けるストレス要因により, 肉体的, 精神的な疲労が蓄積された状態である⁵⁾。ストレスは, 免疫力を低下させることが解明されており, これまでのアレルギーとストレスに関する研究では, ヘルパーT細胞による液性免疫が優位に傾き, IL-4産生の増強を経て, IgAおよびIgE産生が亢進することが示唆されている。また, ストレスは腸管免疫系と密接な関係を有することが知られており, 抗原刺激によって粘膜上皮や血管の透過性が変化することも報告されている⁶⁾。

しかし, ストレスと食物アレルギー, 特に経口免疫寛容との関係についての直接的な研究は, ほとんどなされていない。そこで本研究では, 日常的に多くの人が経験していると思われる軽度のストレス負荷を想定し, 実験動物としてマウスを使用し, 1日1時間という軽度の拘束ストレスを負荷し, 食物アレルギーに対する経口免疫寛容に及ぼす影響について検討を行った。

Ⅱ 実験方法

1. 実験動物の飼育

BALB/c AnNCrj マウス（初体重 12~17 g, 4 週齢, 雌; 日本チャールス・リバー株式会社）を実験動物として使用した。1 週間の予備飼育後, 動物はストレス負荷を行う群と行わない群に分類した。実験中, ストレス負荷を与える群では, 毎日, マウスを図 1 に示す細い管の中に, 1 時間, 閉じ込めることによる拘束ストレスを与えた。なお, 実験期間中, 飼料として MF と水は自由摂取させた。また, 摂食量は毎日, 体重は 3 日に 1 回測定した。飼育終了後, 麻酔下で解剖し, 下大静脈より血液を採取した。採取した血液は, 遠心により血球と血清に分離し, 血清を -80°C で凍結保存した。

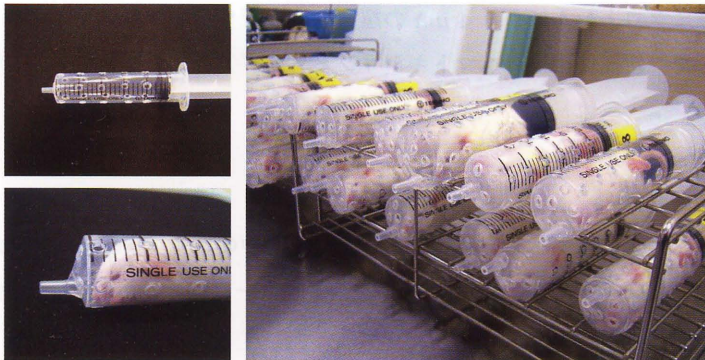


図1 ストレス負荷の方法

2. 経口免疫寛容の誘導

オボアルブミンに対する経口免疫寛容の誘導は, 図 2 に示す免疫スケジュールに従って行った。ストレス負荷の開始から 1 週間後に抗原タンパク質として 5 mg のオボアルブミンを含む水溶液 (0.5 ml) を 1 日 1 回, 4 日間連続して胃内に強制的に経口投与した。最初の経口投与から 1 週間後に硫酸カリウムアルミニウム 12 水和物をアジュバンドとした 5 μg の卵白アルブミン (0.25 ml) を腹腔内に投与することにより免疫し, さらにその 2 週間後に同様の方法で第 2 回目の腹腔免疫を行った。このように処置したマウスは, オボアルブミンに対して経口免疫寛容が誘導された動物となり, T 群とした。なお, 対照群として蒸留水を経口投与し, オボアルブミンを腹腔免疫した群を I 群とした。また, 腹腔免疫を行わず, 蒸留水を経口投与した群を N 群とし, オボアルブミンを経口投与した群を O 群とした。

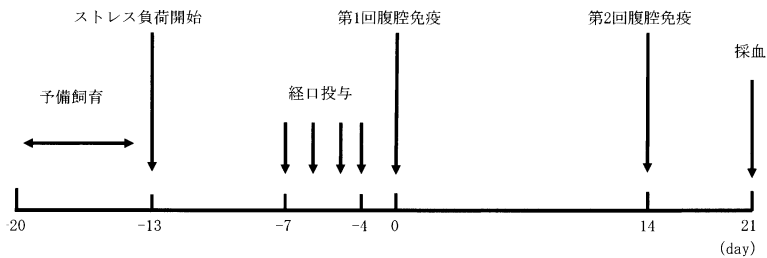


図2 経口免疫寛容の誘導

3. 小腸粘膜の組織観察および小腸パイエル板の組織染色

マウスの小腸の空腸部分を採取し、解剖バサミで粘膜領域を開き、ストレスによる出血の有無を確認するためにデジタルカメラで写真撮影した。また、パイエル板を付属する小腸の一部は、リン酸緩衝10%ホルマリン溶液にて組織固定し、4°Cで保存した。固定した組織はパラフィンにて包埋し、ミクロトームにより4 μm の超薄切片をゼラチンコーティングしたスライドガラス上に作成した。組織切片は、ヘマトキシリンとエオジンにより染色し、光学顕微鏡下で写真撮影した。

4. 栄養状態の評価

実験期間中のマウスの栄養状態を評価するため、血清中のアルブミン濃度と総タンパク質濃度をアルブミン・グロブリン比測定用 A/G B-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。

5. 脾臓リンパ球の培養

マウスから脾臓を採取し、7 ml の Hanks 液 (Sigma 社) を入れた 10 cm の無菌シャーレの中に置いた。その後、クリーンベンチ内にて、脾臓細胞をステンレス製のメッシュで磨碎し、浮遊細胞を調整した。このようにして得られた脾臓細胞を、10% 牛胎児血清 (Sigma 社)、50 μM 2-メルカプトエタノール (Sigma 社) および 1/100 容 Antibiotic-antimycotic Mixed Stock Solution (ナカライテスク) になるように添加した Hepes Modified RPMI1640 培地 (RPMI1640 培養培地) (Sigma 社) 2 ml に浮遊させた。脾臓細胞浮遊液の細胞濃度は、トリパンブルーの色素を排除する生細胞を光学顕微鏡下でカウントすることにより求めた。各群のマウスから得られた脾臓細胞は、RPMI1640 培養培地で 6×10^6 cells/ml になるように調整し、各 1 ml を組織培養用マイクロプレート (24 well; IWAKI) の各穴に分注し、50 μl のオポアルブミン (8 mg/ml) を添加し、5% CO_2 、37°C 条件下で、無菌的に72時間培養した。

6. 血清中の総 IgE 濃度の測定

血清中の総 IgE 濃度は二抗体サンドイッチ ELISA 法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) により測定した。ELISA プレート (96well; IWAKI) に一次抗体として 50 mM Carbonate Buffer (pH 9.6) で希釈した Rat Antimouse IgE (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Yamasa) 100 μl を添加し、室温で30分間振とう後、4°C で一晩静置させた。その後 TBS-T で4回ウェル内を洗浄し、3% BSA 200 μl で1.5時間の室温処理により、ブロッキングを行った。ウェル内を洗浄後、PMSF, EDTA \cdot 3Na および 10^{-5} M Leupeptin 含有の 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) で希釈したマウスの血清 (N群およびO群; 20倍希釈, I群およびT群; 50倍希釈) および Monoclonal Mouse IgE 標準液 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 ng/ml; Yamasa) のそれぞれを 100 μl 添加し、1.5時間室温で反応させ、ウェル内を洗浄後、二次抗体として Biotinylated Rat Antimouse IgE (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Yamasa) 100 μl を添加し、室温で1.5時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Avidin-biotin-alkaline Phosphate Complex (Vectastain) 100 μl を添加し、室温で1.5時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Blue Phos Substrate Solution (KPL) 100 μl を添加し発色反応を開始し、適切な発色が認められた時点で Blue Phos Stop Solution (KPL) 100 μl を添加し反応を停止した。発色の程度はイムノミニ NJ-2300 (システムインスツルメンツ株式会社) を用いて 620 nm で測定し、Monoclonal Mouse IgE 標準液の標準曲線より血清中の総 IgE 濃度を算出した。

7. オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE, IgG, IgG₁ および IgG_{2a} の測定

オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE, IgG, IgG₁ および IgG_{2a} は ELISA 法により測定した。ELISA プレートに 50 mM Carbonate Buffer (pH 9.6) で希釈した 100 μl のオボアルブミン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、室温で30分間振とう後、4°C で一晩静置させた。その後、TBS-T で4回ウェル内を洗浄し、3% BSA 200 μl を加えて1.5時間室温で処理することにより、ブロッキングを行った。ウェル内を洗浄後、PMSF, EDTA \cdot 3Na および 10^{-5} M Leupeptin 含有の20 mM Tris-HCl (pH 7.2) で希釈したマウスの血清 (IgE; 20倍希釈, IgG; 4,000倍希釈, IgG₁; 4,000倍希釈, IgG_{2a}; 50倍希釈) 100 μl を添加し、室温で1.5時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Biotinylated Antimouse IgE Rat Monoclonal Antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Yamasa), Antimouse IgG Horse Serum (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Vectastain), Antimouse IgG₁ Rat Monoclonal Antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; BD PharMingen) もしくは Antimouse IgG_{2a} Rat Monoclonal Antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; BD PharMingen) 100 μl を添加し、室温で1.5時間反応させた。これ以降は血清中の総 IgE 濃度の測定と同様の手順で行い、イムノミニ NJ-2300 を用いて 620 nm で吸光度を求めた。

8. 脾臓リンパ球培養上清中の IL-4 の測定

脾臓リンパ球培養上清中の IL-4 は, 組み替えマウス IL-4 を標準 (0, 12.5, 25, 50, 75, 100 ng/ml; PEPRO TECH) として, 二抗体サンドイッチ ELISA 法により測定した。測定は, 一次抗体として Rat Antimouse IL-4 (0.5 mg/ml; BD PharMingen), 二次抗体として Biotinylated Rat Antimouse IL-4 (0.5 mg/ml; BD PharMingen) を用い, 脾臓リンパ球培養上清を測定範囲になるように希釈して行った。操作は血清中の総 IgE 濃度の測定と同様の手順で行った。

9. 検定方法

検定は, t 検定を行い, 有意水準 5% 以下を有意とした。

Ⅲ 結果および考察

経口免疫寛容とは腸管組織に備わっており, 生体にとって不必要な免疫反応を抑制する機構である。食物アレルギーの発症機構においては, この経口免疫寛容の破綻により引き起こされるとも考えられている⁷⁾。食物アレルゲンとなる主な食品には鶏卵, 牛乳, 小麦などがあり, 特に鶏卵に対するアレルギーは乳幼児期に発症し, 学童期以降に寛解する 경우가多く, これは成長に伴う消化管の発達と適切な経口免疫寛容の成立によるものと考えられている。食物や花粉など, 本来は生体に障害を及ぼすことがない異物の場合, 生体の抗原提示細胞は, リンパ球を活性化することなく, これらの抗原の侵入を無視している。これは, 体内のリンパ球が分泌する Th1 (IFN- γ) と Th2 (IL-4, IL-10) のサイトカインによる液性免疫により, 過剰な免疫応答を抑制し, アレルギーなどの自己障害が引き起こさないようにバランスが保たれているからである。

経口免疫寛容の機序に関しては, 現在のところ T 細胞を中心とした免疫応答を抑制するような調節性 T 細胞が関わっているとの考えに加えて, ヘルパー T 細胞の不応答化 (アネルギー) または選択的な細胞死 (アポトーシス) により説明されることもあるが不明な点も多い⁸⁾。一方, 経口免疫寛容機構は, 食物を取り込む腸管で構築されている⁹⁾。食物抗原に対する経口免疫寛容の詳細な機構は不明な点が多いものの, 特異抗体産生の抑制, 遅延型過敏反応や脾臓・リンパ節の抗原特異的 T 細胞からのサイトカイン産生の低下によることが, 動物実験を通して報告されている¹⁰⁾。また, 生体が受ける様々なストレスも, 経口免疫寛容に何らかの影響を及ぼす要因となっているかもしれない。生体にストレスが負荷されることにより, 内分泌系の視床下部-下垂体-副腎軸が活性化されると, 副腎皮質からグルココルチコイドが分泌される。体外からのストレスの程度が強まるとグルココルチコイドはさらに多量に分泌されるようにな

り、胸腺の萎縮やリンパ球の機能低下を招くといわれている¹¹⁻¹³⁾。また、拘束ストレスを負荷する研究により、脾臓リンパ球数の減少や、抗原刺激による IL-2 や IL-4 の産生量の増加などが確認されていることから、ストレスは免疫機能と深く関わりあっていると思われる¹⁴⁾。

本研究では、食物アレルギーに対する経口免疫寛容に及ぼすストレスの影響を実験動物としてマウスを用い、ストレス負荷を行う群と行わない群に分け、経口免疫寛容の誘導能の相違を血清中の抗体価の測定と、脾臓リンパ球によるサイトカインの産生量を測定することにより行った。実験動物には BALB/c マウスの雌を使用した。BALB/c マウスは IgG₁、IgA、IgE などのイムノグロブリン量が高値で、Th2 サイトカインの免疫反応が高いため、アレルギーを研究する分野において広く使用されている¹⁵⁾。また、経口免疫寛容を誘導するための抗原タンパク質は、免疫応答が良好なオボアルブミンを用いた。なお、実験群の中で蒸留水を経口投与しオボアルブミンで腹腔免疫を行った I 群はオボアルブミンを免疫された動物となり、経口投与および腹腔免疫ともにオボアルブミンで行った T 群は、オボアルブミンに対する経口免疫寛容が誘導された動物となった。

実験期間中のマウスの摂食量は、腹腔免疫を行った群で 1 回目と 2 回目の腹腔免疫直後に低下がみられたが、体重の減少に反映されることはなかった。マウスの体重は系統により異なり、雌で 18~40 g となっていることから、本研究で飼育したマウスの成長は良好と思われるが、ストレス負荷を行った群のほうが行わなかった群に比べて上昇がやや少なく、ストレス負荷の影響があったと考えられた。血清アルブミン濃度では、本研究で飼育したマウスで若干の高値を示したが顕著な差はなく、実験期間中の各群のマウスの栄養状態は良好と思われた。しかし、ストレス負荷を行った群と行わない群と比較すると、総タンパク質濃度では O 群と I 群で若干の差がみられ、マウスの栄養状態にわずかながらストレス負荷の影響があったと考えられる。

小腸空腸粘膜の組織観察では、ストレス負荷の有無に関わらず、通常、強いストレス負荷により観察される出血などの病変はなく、今回の拘束ストレス負荷の強度は、軽度のものであったと判断した。パイエル板を付属する小腸を光学顕微鏡下で観察したところ、オボアルブミンを免疫した I 群で組織の肥厚と固有層の発達が観察されたが、経口免疫寛容を誘導した T 群では、腹腔免疫を行っていない群 (N 群, O 群) に近い状態であった。また、各群ともストレス負荷を行った群の方がストレス負荷を行っていない群よりも固有層の発達が観察された。

次に、血清中の総 IgE 濃度とオボアルブミンに対する抗体価の測定を行った (図 3)。その結果、経口免疫寛容を誘導した T 群においては、ストレス負荷を行った群、行わなかった群ともに総 IgE 濃度の上昇の抑制がみられたが、ストレス負荷を行った群においてストレス負荷を行わなかった群よりも、総 IgE 濃度が有意に高値を示したことから、ストレス負荷を行った群で経口免疫寛容の誘導が抑制されたと考えられる。また、オボアルブミンに対する特異的抗体

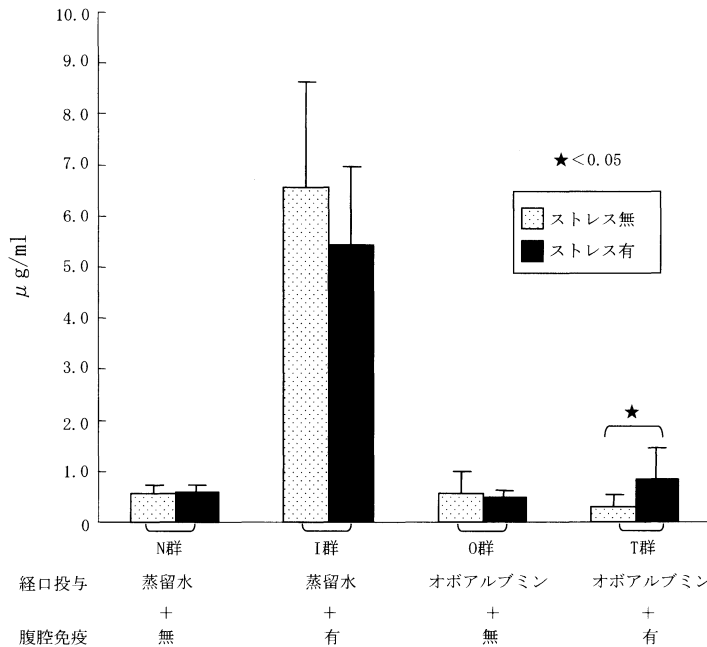


図3 血清総 IgE 濃度

価 IgE, IgG, IgG₁ は, 腹腔免疫を行っていない群 (N群, O群) で, オボアルブミンの経口投与の有無に関わらず, 抗体価の上昇はみられなかったが, オボアルブミンを免疫した I 群においては, ストレス負荷を行った群, 行っていない群ともに抗体価の上昇がみられた。一方, 経口免疫寛容を誘導した T 群においては, ストレス負荷を行った群, 行っていない群ともに抗体価の強い抑制がみられた (図 4)。このことから, ストレス負荷を行った群においてストレス負荷を行わなかった群よりも経口免疫寛容の誘導性が低くなっていると考えられた。

オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG_{2a} においては, オボアルブミンを免疫した I 群および経口免疫寛容を誘導した T 群で同程度の抗体価の上昇がみられ, 他の抗体価と著しく異なっていた (図 5)。IgG_{2a} 抗体は, IgM のクラススイッチにより産生される抗体であり, このクラススイッチには IL-4 が重要な役割を果たしている。IL-4 は, 主に Th2 細胞や肥満細胞から産生され, IgE や IgG₁ 抗体の産生を促進し, IgG_{2a} へのクラススイッチを抑制する作用がある^{16,17)}。このことは IgG_{2a} 抗体の上昇がみられる場合は, 生体内での IL-4 の産生量が少ないことが予想され, アレルギー患者がアレルギー症状を引き起こしにくい状況となっていることが考えられるが, 今回の研究において, I 群と T 群で抗体価 IgG_{2a} の値に顕著な差はなく, IgG_{2a} 抗体と経口免疫寛容機構の誘導やストレス負荷による影響に顕著な関連性はみられなかった。

脾臓培養上清中のオボアルブミンに応答して産生する IL-4 については, 全ての群で検出され

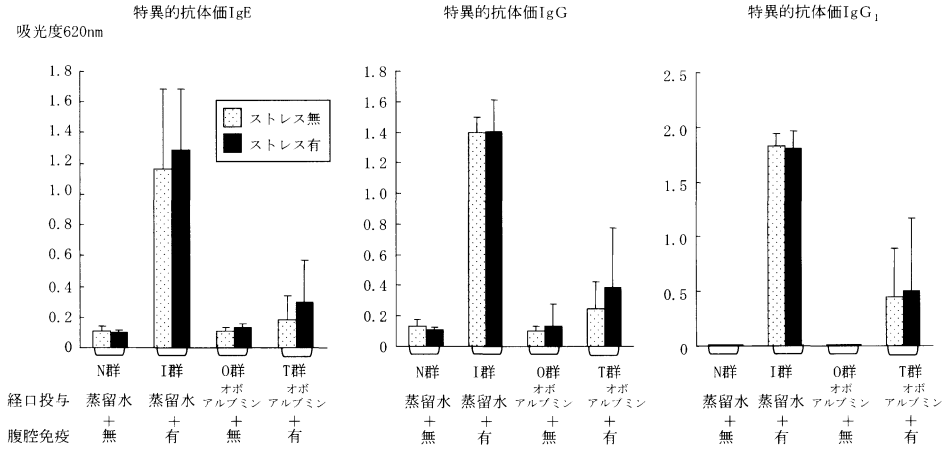


図4 オボアルブミンに対する特異的抗体価 (IgE、IgG、IgG₁)

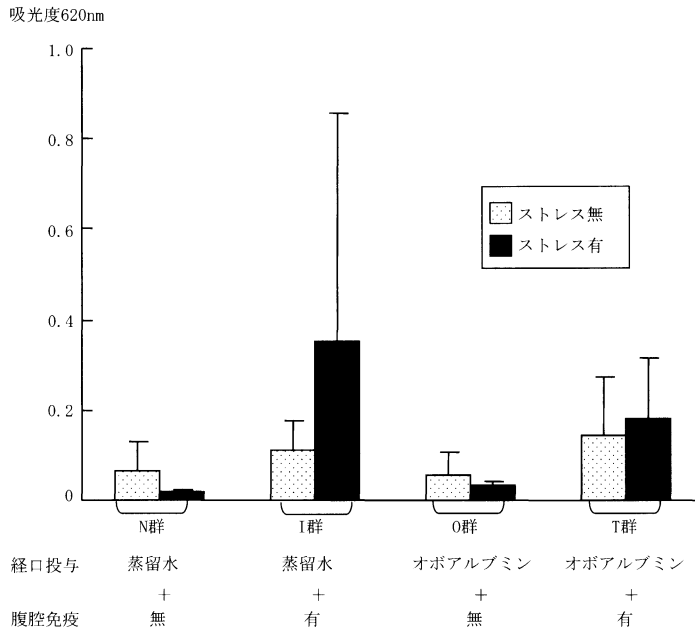


図5 オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG_{2a}

たが、脾臓リンパ球をオボアルブミン刺激した群とオボアルブミン刺激していない群ともに、腹腔免疫を行っていない群 (N群, O群) で産生量が高かった (図6)。また、脾臓リンパ球をオボアルブミンで刺激し、腹腔免疫を行ったI群を除いて、全ての群でストレス負荷を行わなかった群の方がストレス負荷を行った群よりも IL-4 の産生量が高かった。IL-4 は抗体を産生

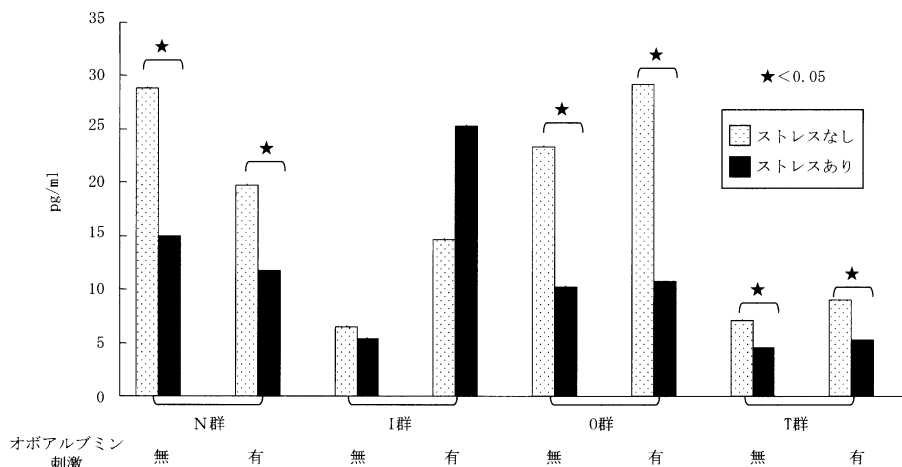


図6 脾臓リンパ球培養上清中のIL-4

する形質細胞に対して IgE 産生にクラススイッチを誘導する強力なサイトカインであり、アレルギーの発症と進展に深く関わっているとされることから、IL-4 の産生量と経口免疫寛容機構の誘導とに関連性があることが認められた。

以上の研究結果より、総合的にはストレス負荷を行った群と行わなかった群で、血清総 IgE 濃度と食物抗原として用いたオポアルブミンに対する抗体価が高いことが示された。特にストレス負荷により、血清総 IgE 産生の亢進が示唆された。また、ストレスの暴露は、腸管免疫系と密接な関係を有することが知られており、抗原刺激によって粘膜上皮や血管の透過性が変化し、免疫促進作用が報告されている。一方、ストレスの強度や個体のストレスへの対応能力により、免疫作用が抑制される場合があることも報告されている⁶⁾。今回の研究でストレスの負荷に対するマウスの感受性には多少の個体差があると思われたが、ストレスの影響と思われる抗体価の上昇が認められ、経口免疫寛容の誘導性にも抑制的に働くものと示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、マウスの拘束ストレスについてご助言を賜りました東元 稔先生に感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 坂井堅太郎：食物アレルギーの実態と食生活，食物アレルギーがわかる本，上田伸男編，日本評論社，

- 東京 (1999) 3-12.
- 2) Foschi FG, Marsigli L, Chiappelli F, Kung MA, Bernardi M, Stefanini GF (2000) Adverse reaction to food. *In: Nutrition and Immunology Principles and Practice* (Gershwin ME, German JB, Keen CL, eds), 233-247. Humana Press Inc, New Jersey.
 - 3) 上野川修一: 最近の食物アレルギーの考え方, 食物アレルギーの手引き—正しい知識と治療, 食生活指導—, 馬場 實・中川武正編, 南江堂, 東京 (1995) 1-11.
 - 4) 上野川修一, 八村敏志: 経口免疫寛容の機序と自己免疫疾患・アレルギーの発症抑制, Annual Review 免疫 1997, 菊池浩吉・矢田純一・奥村 康編, 中外医学社, 東京 (1996) 409-416.
 - 5) 上田伸男: 食物アレルギーを起こす要因, 食物アレルギーがわかる本, 上田伸男編, 日本評論社, 東京 (1999) 63.
 - 6) 深田順一: 情動ストレスと腸管免疫, 食物アレルギーの最前線, 名倉 宏編, 医歯薬出版株式会社, 東京 (1999) 66-70.
 - 7) 足立 (中嶋) はるよ, 上野川修一: 食物アレルギーと腸管免疫システム, アレルギー科 (2000) 9 (1): 89-96.
 - 8) 近藤直美: 食物アレルギーと経口免疫寛容, 医学のあゆみ, 出版, Vol 198, No. 13, 東京 (2001) 883-887.
 - 9) 伊藤浩明: 腸内細菌叢とアレルギーの発症, 臨床栄養 Vol. 107 No. 3, 医歯薬出版株式会社, 東京 (2005) 289-294.
 - 10) 上野川修一編: 食品とからだ—免疫・アレルギーのしくみ, 朝倉書店, 東京 (2003) 153.
 - 11) 村瀬元康: 拘束ストレスがラットの炎症性細胞浸潤に及ぼす影響, 愛知学院大学歯学会誌 35, 愛知 (1997) 125-138.
 - 12) Okimura T, Nigo Y (1986) Stress and immune responses. I. Suppression of T cell function in restraint-stressed mice. *Jpn J Pharmacol* 40: 505-511.
 - 13) Okimura T, Satomi-Sasaki Y, Ohkuma S (1986) Stress and immune responses. II. Identification of stress-sensitive cell in murine spleen cells. *Jpn J Pharmacol* 40: 513-525.
 - 14) 柘植郁哉, 宇理須厚雄: アレルギーの臨床 No. 319, 北隆館, 東京 (2004) 34-37.
 - 15) 須藤カツ子, 辻紘一郎: 動物実験の準備, 初心者のための動物実験手技 I, 鈴木 潔編, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1995) 1-13.
 - 16) 高津聖志: サイトカインとその受容体, 標準免疫学, 谷口 克・宮坂昌之編, 医学書院, 東京 (2002) 273-288.
 - 17) 義江 修: ケモカインとその受容体, 標準免疫学, 谷口 克・宮坂昌之編, 医学書院, 東京 (2002) 289-299.