

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460185

研究課題名(和文)食品添加物の新規抗原感作性評価手法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Study on the development of evaluation method for the sensitization of food additives

研究代表者

穂山 浩 (Akiyama, Hiroshi)

国立医薬品食品衛生研究所・食品部・部長

研究者番号：10260259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト単球系細胞株から分化した樹状細胞(TDDC)を用いた食品添加物の抗原感作性評価法を確立した。TDDCのHLA-DR発現量はオボアルブミン添加濃度依存的に増加することが示された。オボムコイド、 $\beta$ -ラクトグロブリン、そば由来アレルゲンの各種食物アレルゲンを添加によってHLA-DR発現量の有意な増加が示された。またTDDCの遊走能を測定した結果、抗原提示能と同様の傾向が示された。またハプテン抗原であるDNP-BSAの添加により、HLA-DR、CD86の発現量およびIL-8産生量が有意に増加した。同評価法は食品添加物のハプテン抗原や酵素に応用可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The evaluation method for the sensitization of food additives using human monocytic THP-1-derived DCs (TDDCs) by culturing with PMA and IL-4 was developed. The expression levels of HLA-DR (MHC class II) and CD86 (costimulatory molecule) were measured as an indicator of antigen presentation in TDDCs. When TDDCs were stimulated with OVA in the range of 0.01-0.5 mg/mL, the expression of HLA-DR and CD86 were dose-dependently increased compared with the control cells. The addition of ovomucoid, beta-lactoglobulin, Fag e1 on the TDDCs also gave the similar results. The production of chemokines such as RANTES and CCR7 also increased by the addition of food antigens. The sensitization of food additive enzymes and hapten allergens were evaluated using the developed method.

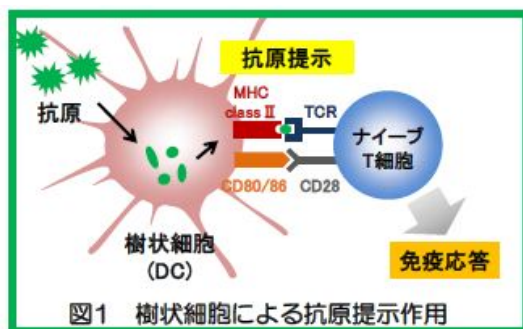
研究分野：食品衛生化学、免疫化学

キーワード：食物アレルギー アレルゲン 抗原感作性 樹状細胞 オボアルブミン ケモカイン ハプテン抗原 HLA-DR

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、食品添加物、医薬品添加物、化粧品(医薬部外品)原材料が生体内に免疫学的機序で感作され、同様の原材料を含む食品の摂取により、重篤なアレルギー症状が惹起する事例が報告されており、従来では予想できない医薬品、化粧品及び食品の複合経路に起因する新たな健康危害が起こっていると考えられる。実際に、小麦加水分解物を含有する医薬部外品・化粧品により感作され、小麦の食物アレルギーが発症される事故が社会問題となっている。この問題は、医薬品添加物、化粧品原材料、食品添加物の品質・組成が、それぞれ薬事法や食品衛生法により規制されているが、化学物質としては同一物質である場合や天然に存在する多種多様な物質も含まれており、暴露経路が経口摂取でなく、吸入や経皮等による健康危害発生の可能性も検討する必要があることを示している。I型アレルギー反応の抗原感作性試験は、モルモット感作性試験、マウス抗原性試験、マウス PLNA (Popliteal Lymph Node Assay) 法などがあるが、試験操作が複雑で、結果に多くのばらつきがあり、再現性等に課題がある。また昨今の動物愛護管理法の改正により、動物実験を用いない代替法として簡易で信頼性のある抗原感作性評価手法の開発が望まれている。

(2) 樹状細胞は、抗原提示細胞としてヘルパーT細胞の免疫応答において起点となる重要な働きを有している(図1)。これまで、数多くの有用性の抗アレルギー物質に関する評価系が報告されているが、樹状細胞の機能を指標とした評価系はほとんどないのが現状である。これまで樹状細胞の調製には、健康人の末梢血単核球が用いられてきたが、実験の都度に、健康人ドナーの血液が必要であることに加えて、末梢血単核球を調製する際に技術面でのバラつきが生じやすいなど多くの問題を抱えており、網羅的な解析は困難



であった。一方、単球細胞である THP-1 や KG-1 など細胞株を用いて樹状細胞の代わりに使用する報告もあるが、これらはほとんど抗原提示能を有しておらず正確な樹状細胞の機能を評価できなかった。

(3) 申請者は、いままでに食品の有効性の研究として食品素材の持つ抗アレルギー・活

性および動物モデルによる評価を行い、論文報告を行っている。また、*in vitro*、*in vivo* 試験を指標として、各種食品素材の抗アレルギー・作用を明かにし、さらに、各種機器分析を駆使し、活性成分の解明を行っている。特に、ニンジン果汁およびβ-カロテンの抗アレルギー・活性とそのメカニズムを明らかにした研究等は、学会の注目演題及び2004年ハイライト論文に選ばれるなど評価が高い。また申請者はすでに、ヒト単球性細胞株 THP-1 から樹状細胞への分化に成功し、抗アレルギー物質の評価を行っている(Food Chem, 2012)

(4) 本研究では、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞から分化した樹状細胞を使用して、食品添加物及び医薬品添加物の抗原感作性を評価するための *in vitro* 手法を確立することを目的とする。また THP-1 由来樹状細胞に種々の I 型アレルギーおよびハプテン抗原とタンパク質と結合物等で刺激し、既存のアレルギーと呼ばれる物質を評価・解析する。さらに確立された評価方法を標準化することを試みる。

2. 研究の目的

食品添加物、医薬品添加物、医薬部外品には共通の成分がある。医薬品添加物及び医薬部外品に共通する食品添加物あるいは食品成分が、吸入や経皮経路で生体内に浸潤し免疫学的に感作され、同じ食品添加物・食品の摂取によって、重篤な食物アレルギー症状が惹起される事例がある。しかし、生活様式の高度化及び複雑化から、その原因の特定が困難となっていると考えられる。この問題を解決するためには、食品添加物及び医薬品添加物等の信頼性の高い、迅速で抗原感作性評価の新規手法の開発が必要である。本研究は、食品添加物及び医薬品添加物の *in vitro* の抗原感作性評価手法を開発し、標準化することを検討する。

3. 研究の方法

(1) THP-1 を培養プレートに播種し、PMA および IL-4 添加のもと、7日間分化誘導を行った。抗体染色後、FACS 解析により樹状細胞マーカー CD11c の蛍光強度を測定した。得られた CD11c+細胞を TDDC とした。遊走能は Transwell migration assay により評価した。TDDC に試料刺激下でインキュベーション後、HLA-DR 発現量をフローサイトメトリーにより測定した。細胞遊走能では、TDDC をトランスウェル(24 well, 5 μm pore size) の upper chamber (上層) に播種し、試料刺激下でインキュベーション後、lower chamber (下層) へ遊走した細胞数をトリパンブルー染色によりカウントした。培養上清中の RANTES および CCR7 産生量の測定は ELISA 法を用いて行った。

(2) エリスリトールおよびコチニール色素の抗原性評価は下記のとおり行った。エリスリトールは Sigma 社 (St. Louis, MO) より、コチニール色素 (色価 1500) は長谷川香料社 (Tokyo, Japan) より入手した。コチニール色素についてはタンパク質結合体 (ハプテン抗原) での効果を評価するため、BSA をキャリアとしてハプテン化コチニールを作製した。BSA 0.1 mg に対し、モル比で 5 倍量および 25 倍量のコチニール色素を混合し、37 で 1 時間インキュベート後、スピнкаラム (分画分子量; 10,000 K) により未反応のコチニール色素を除去し、調製した。エリスリトール、ハプテン抗原として知られる DNP-BSA、キャリアとして使用した BSA、およびハプテン化コチニールを添加し、培養 3 日後の HLA-DR および CD86 の発現量をフローサイトメトリーにて測定した。また、抗原添加後 72 時間後の HLA-DR および CD86 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて測定した。このときの培養上清を回収し、白血球走化性因子である IL-8 の産生量を ELISA 法にて測定した。

(3) 食品加工用酵素として Rhizopus 属由来リパーゼ、Bacillus 属由来  $\alpha$ -アミラーゼ、大豆由来  $\beta$ -アミラーゼ、および卵白由来リゾチームを使用した。卵白由来リゾチームは抗原感受性が既に報告されていることから、ポジティブコントロールとして使用した。供試試料を TDDC に添加し 20 h インキュベーション後、抗原提示分子 HLA-DR の抗体で染色しフローサイトメーターを用いて測定した。遊走能は Transwell migration assay により評価した。食品加工用酵素原体の抗原含有量の測定については、2 種類の ELISA 法検査キット (卵、乳、小麦、および大豆) 用いて検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種 I 型アレルギータンパク質の評価

TDDC に食物アレルギーのオボアルブミン (OVA) を 0.01、0.05、0.1、0.5 mg/mL の濃度で添加しフローサイトメトリーで HLA-DR の発現量を測定した。その結果、HLA-DR 発現量は抗原濃度依存的に増加することが示された。特に、0.1 mg/mL および 0.5 mg/mL 添加時において、有意な HLA-DR 発現増加が認められた。各種食物アレルギーを添加したところ、鶏卵由来オボムコイド (Ovomucoid, OM)、乳由来  $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -Lactoglobulin,  $\beta$ -LG)、蕎麦由来 Fag e 1 および Fag e 2 の添加によって HLA-DR 発現量の有意な増加が示された。これに対して、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) 添加時では、大きな変化は認められなかった。次に、TDDC の遊走能を測定した結果、その結果、抗原提示能の結果と同様、OVA, OM,  $\beta$ -LG、Fag e 1 および Fag e 2 の添加によって HLA-DR 発現量の有意な増加が示された。

一方、BSA 添加においては、顕著な変化は認められず、抗原提示と細胞遊走能の結果はよく一致していた。

続いて、ケモカイン (走化性因子) の一種である RANTES とケモカイン受容体である CCR7 を測定した結果、OVA 添加により両者とも顕著に増加していることが示された。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  と IL-1 産生量においても、OVA 添加による産生増加は認められたが、産生量はケモカイン量と比較して少なかった。一方、Th1 型サイトカインである IL-12 の産生量は OVA 添加により低下していたが、産生量は微量であった。以上より、サイトカインのなかでもケモカイン関連因子の産生量測定が抗原評価において有用であることが示唆された。

以上の結果から、TDDC を用いた評価法においては、抗原提示能、細胞遊走能、およびケモカイン関連因子の測定により、ヒト血液を用いずに食物タンパク質の抗原感受性を *in vitro* で評価できることが示唆された。

##### (2) 食品添加物及び医薬品添加物への適用

近年、甘味料として知られるエリスリトールや食品添加物であるコチニール色素等の低分子化合物の摂取による重篤な食物アレルギーが報告されている。消費者庁の注意喚起、厚生労働省によるアレルギー発症に関する情報提供が行われる中、これらのアレルギーの実態把握ならびに原因解明が急務となっている。そこで、I 型アレルギーの発症報告のあるエリスリトールやコチニール色素等の低分子化合物の抗原性評価を行った。

その結果、TDDC の HLA-DR 発現量はエリスリトール添加によって増加することがフローサイトメトリー解析によって明らかとなった。また、遺伝子発現量および IL-8 産生量においても上昇する傾向が認められた。特に IL-8 産生量は HLA-DR の細胞表面発現の挙動とよく一致していた。以上より、エリスリトールが抗原提示物質として樹状細胞に提示されることが示唆された。

次に、コチニール色素の抗原性評価を行ったところ、コチニール色素を添加した場合は、発現量および IL-8 産生量はコントロールと比較して大きな変化は認められなかった。次に、ハプテン抗原としてのコチニール色素のアレルゲン性を評価するため、ハプテン抗原として知られる DNP-BSA と BSA 単体を添加したところ、HLA-DR、CD86 の発現量および IL-8 産生量は DNP-BSA で有意に上昇し、BSA では全く変化が見られなかった。すなわち、TDDC はハプテン抗原を抗原物質として認識することが示された。そこで、ハプテン化コチニールを TDDC に添加したところ、モル比 25 倍量で作製したハプテン化コチニールにおいて、HLA-DR および CD86 の発現が顕著に上昇することが示された。さらに、IL-8 産生量においても同様の挙動が認められた。以上の結果より、TDDC を用いた抗

原性評価によって、コチニール色素はハプテン抗原として抗原性を有することが示唆された。

### (3) 食品加工用酵素への適用

TDDC に未変性の食品加工用酵素を添加し、HLA-DR 発現量を測定した。その結果、大豆由来 - アミラーゼと *Rhizopus* 属由来リパーゼの添加では HLA-DR 発現量に変化は認められなかったが、卵白由来リゾチームと *Bacillus* 属由来 - アミラーゼでは顕著な HLA-DR 発現増加が示された。続いて、供試試料に対する TDDC の遊走能を測定したところ、リゾチーム、-アミラーゼ、リパーゼにおいて遊走率が増加することが示された。以上より、卵白由来リゾチームと *Bacillus* 属由来 - アミラーゼは未変性の状態で抗原感作性を有することが示唆された。*Bacillus* 属由来 - アミラーゼは発酵培地に乳および大豆を使用していたが、抗原含有検査の結果はいずれも 1.0 µg/g 以下であった。すなわち、*Bacillus* 属由来 - アミラーゼは未変性の状態で抗原感作性を有する可能性はあるが、酵素の製造段階で混入する既知のアレルゲンの抗原感作性は低いことが示唆された。

(4) 以上の結果より、THP-1 由来樹状細胞を用いた *in vitro* 評価法は、抗原提示能、細胞遊走能、およびケモカイン関連因子の測定により、ヒト血液を用いずに各種タンパク質の抗原感作性を *in vitro* で評価できることが示唆された。今後は、その検出限界を含めて本手法の標準化について更なる検討を進めることが望まれる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K, Evaluation of the safety and efficacy of extracts of *Glycyrrhiza uralensis* roots produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation system, *J. Nat. Med.*, 査読有 71, 265-271 (2017).

Suzuki I, Kubota H, Terami S, Hara T, Hirakawa Y, Iizuka T, Tatebe C, Ohtsuki T, Yano T, Sato K, Akiyama H, Development of an analytical method for copper chlorophyll and sodium copper chlorophyllin in processed foods, *Jpn. J.*

*Food Chem. Safety*, 査読有 23, 55-62 (2016).

Nakamura K, Matsuoka H, Nakashima S, Kanda T, Nishimaki-Mogami T, Akiyama H, Oral administration of apple condensed tannins delays rheumatoid arthritis development in mice via downregulation of T helper 17 (Th17) cell responses, *Mol. Nutr. Food Res.*, 59, 査読有 1406-1410 (2015).

Hashimoto H, Hongo T, Hayashi C, Nakamura K, Nakanishi K, Ikeda M, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, A method for the detection of shrimp/prawn and crab DNAs to identify allergens in dried seaweed products, *Jpn J. Food Chem. Safety*, 査読有 22, 1-10 (2015).

Akiyama H, The role of carotenoid intake in food allergy prevention, *CAB Reviews*, 12, 009, 1-7 (2017).

[学会発表](計 3 件)

福島悠依子、片山茂、小俣洋奈、穠山浩、中村宗一郎、樹状細胞の遊走能を指標とした抗原感作性評価法の確立、日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会、東京都江東区、2015 年 5 月 22 日

片山茂、福島悠依子、三谷壘一、穠山浩、中村宗一郎、未変性の食品加工用酵素の抗原感作性評価、日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会、高知県高知市、2016 年 6 月 3 日

鈴木湧太、松本果楠子、片山茂、三谷壘一、穠山浩、中村宗一郎、THP-1 由来樹状細胞を用いた食物タンパク質の抗原感作性の評価、日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会、三重県伊勢市、2017 年 6 月 2 日

[図書](計 1 件)

森山達哉、穠山浩、食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

穠山 浩 (AKIYAMA, Hiroshi)

国立医薬品食品衛生研究所食品部・部長  
研究者番号：10260259

(3) 連携研究者

片山 茂 (KATAYAMA, Shigeru)  
信州大学農学部・准教授  
研究者番号：30443922

(3)連携研究者  
中村 公亮 (NAKAMURA, kousuke)  
国立医薬品食品衛生研究所生化学部・室長  
研究者番号：60540926

(3)連携研究者  
杉本 直樹 (SUGIMOTO, Naoki)  
国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部・室長  
研究者番号：50300918