

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18700614
 研究課題名 (和文) 飲水中残留塩素による卵白アルブミン特異的免疫反応の誘導：塩素と食物アレルギー
 研究課題名 (英文) Induction of ovalbumin -specific immune responses by oral administration of residual chlorine: chlorine and food allergy
 研究代表者
 若林 あや子 (WAKABAYASHI AYAKO)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：30328851

研究成果の概要：飲水中の残留塩素が食物アレルギーの発症や進行に関与するかを明らかにすることを目的に、動物実験と調査研究を行った。マウスに長期間、0.1%塩素水または蒸留水を自由摂取させた後、卵白アルブミン (OVA) を用いて免疫し、OVA 特異的なアレルギー反応について測定した。塩素水を摂取したマウスにおいては、OVA 特異的な抗体価 (Ⅲ型アレルギー)、遅延型過敏反応 (Ⅳ型アレルギー)、および小腸粘膜の細胞障害性 T 細胞の割合 (Ⅳ型アレルギー) が、塩素を摂取しなかったマウスに比べて高い値であった。一方、浄水場からの距離が 10km 未満、10km 以上 20km 未満、および 20km 以上の地域において、水道水を採水し、残留塩素濃度を測定した。その結果、浄水場に近いほど、水道水中の残留塩素濃度は高い傾向がみられた。更に、浄水場の付近および遠隔地域に在住する 20 歳代女性を対象に、アレルギーに関する質問調査を行ったところ、浄水場に近いほど食物アレルギーやアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の有病率が高かった。したがって今回、動物実験と調査研究により、飲水中の残留塩素は、アレルギー反応を亢進させ、アレルギー疾患の発症や進行に関与する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と環境、アレルギー、衛生

1. 研究開始当初の背景

水道水は、衛生上の安全を図るため塩素消毒の実施が義務づけられている。塩素は水に溶解、次亜塩素酸などの遊離残留塩素となる。一部の次亜塩素酸は、水中の窒素化合物と結

合し、結合残留塩素となる。これらの残留塩素は細菌を酸化することにより殺菌作用を示す重要な物質であり、日本の水道法では、蛇口における遊離残留塩素濃度が 0.1 ppm 以上、結合残留塩素濃度は 0.4 ppm 以上と定められている。このように残留塩素濃度の下限

が定められている一方、上限は定められていない。近年、水中の遊離残留塩素は、アトピー性皮膚炎患者の皮膚角質層の保水能力を低下させ、病状を悪化させることが報告された（文献1）。残留塩素により保水能力が低下した皮膚はバリア機能が低下し、アレルゲンの皮膚への侵入を促進させることが推測される。このような現象が皮膚だけでなく、消化管粘膜においても見られ、残留塩素が食物アレルギーの発症や進行に関わっている可能性は否定できない。そこで本研究において、飲水中の残留塩素が、食物アレルギーの発症や進行に関与するかを調べた。

文献1) Free residual chlorine in bathing water holding capacity of the stratum corneum in atopic skin. Seki T, Morimatsu S, Nagahori H, Morohashi M. *The Journal of Dermatology* 30 (3): 196-202, 2003.

2. 研究の目的

(1) 動物実験により、残留塩素が食物中のタンパク質抗原に対する特異的免疫反応を増強させ、食物アレルギーの発症や進行に関わるかを明らかにする。これは、残留塩素を経口投与したマウスに卵白アルブミン (OVA) を経口投与し、その後の OVA 特異的なアレルギー免疫状態の誘導を検討するものである。このとき、残留塩素を経口投与しない場合の免疫反応と比較し、違いを追求する。

(2) 東京都および近郊の水道水中の残留塩素濃度と食物アレルギーの発症率の関係について、調査を行う。まず、水の塩素消毒が行われる浄水場の付近および遠隔地域の水道水の残留塩素濃度を測定し、浄水場からの距離と水道水中の残留塩素濃度の相関関係について調査する。更に質問調査法により、浄水場の付近と遠隔地域の住民の食物アレルギーの既往歴を調査し、浄水場からの距離と食物アレルギーの発症率との相関関係について明らかにする。

以上のように動物実験と調査法により、水道水中残留塩素の、食物アレルギーの発症や進行への関与を明らかにすることが、本研究の目的である。

2. 研究の方法

(1) 動物実験

①動物

実験には、3週齢の BALB/c または C57BL/6 雌性マウスを用いた。マウスは、日本医科大

学動物実験施設において、特定病原体を含まない (Specific pathogen free: SPF) 環境下で飼育した。

②短期間または長期間のマウスへの塩素経口投与

次亜塩素酸ナトリウムを蒸留水で希釈し、塩素を 0%、0.1% または 1% 含んだ蒸留水 0.5ml を 5 日間、マウスに経口投与した。長期間の投与としては、塩素を 0% または 0.1% 含んだ蒸留水を 2~3 ヶ月間マウスに自由摂取させた。

③OVA による免疫

OVA 50 μg を水酸化アルミニウムゲル (アラム) アジュバント 4 mg と共にマウスの腹腔に投与した。初回免疫の 2 週間後に同様な方法で追加免疫を行った。また、経口免疫として、OVA 10 mg または 100 mg をコレラトキシン (CT) アジュバント 10 μg と共に経口投与した。2 週間おきに同様な方法で追加免疫を行った。

④血清中抗 OVA IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM 抗体価の測定: III型アレルギーの測定

麻酔下のマウスから末梢血を採取し、血清を得た。酵素抗体 (ELISA) 法を用いて、マウス血清中の OVA に特異的な IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM 抗体価を吸光度測定した。

⑤遅延型過敏反応 (DTH) の測定: IV型アレルギーの測定

OVA 20 μg をマウスの耳皮内に注入し、24 時間後の腫脹率を測定した。

⑥OVA 特異的 T 細胞の増殖反応の測定: IV型アレルギーの測定

マウスの脾臓と腸間膜リンパ節を摘出し、細胞浮遊液を作成した。ナイロンウールカラムを用いて T 細胞を採取し、抗原である OVA、および X 線照射した脾臓細胞と共に 4 日間培養した。T 細胞における OVA 特異的な増殖反応を、テトラゾリウム塩 (MTT) 法により測定した。

⑦OVA 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の測定: IV型アレルギーの測定

C57BL/6 マウス (H-2^b) から脾臓と小腸を摘出した。脾臓細胞を調整すると共に、小腸からは小腸上皮細胞間リンパ球を精製した。これらの細胞を、H-2K^b OVA Tetramer と抗 CD8 抗体で染色し、OVA 特異的な CTL をフローサイトメトリーにより測定した。

⑧小腸粘膜の樹状細胞 (DC) の表面抗原の解析

マウスから小腸を摘出し、小腸粘膜の DC を精製した。これらの細胞を、様々な表面抗原 (CD11c, 33D1, DEC-205) に対する抗体で染色し、陽性細胞をフローサイトメトリーにより測定した。

(2) 調査研究

①水道水中の pH および残留塩素濃度の測定
東京都内およびその近郊の浄水場からの距離が 10km 未満、10km 以上 20km 未満、および 20km 以上の地域において、家庭の水道水を採水した。採水した水道水中の pH をフェノールレッド法により測定した。また、水道水中の全残留塩素、遊離残留塩素濃度については、ジエチルパラフェニレンジアミン (DPD) 法により測定した。全残留塩素濃度から遊離残留塩素濃度を引いた値を、結合残留塩素濃度とした。

②アレルギー疾患の既往歴に関する調査

対象者は東京都および近郊に在住の 20 歳代女性であった。調査内容を説明の上、調査協力に同意が得られた 58 名において、質問調査を行った。これらの対象者の自宅住所および浄水場を調査し、対象者の自宅と浄水場までの距離が 10km 未満、10km 以上 20km 未満、および 20km 以上で、対象者を分類をした。対象者には、本人および同居の家族のアレルギーの既往歴、どんなアレルギー疾患にかかったことがあるか、または現在かかっているか、医師の診断の有無、アレルギーにかかっていた時の自宅住所などの記入を依頼した。

4. 研究成果

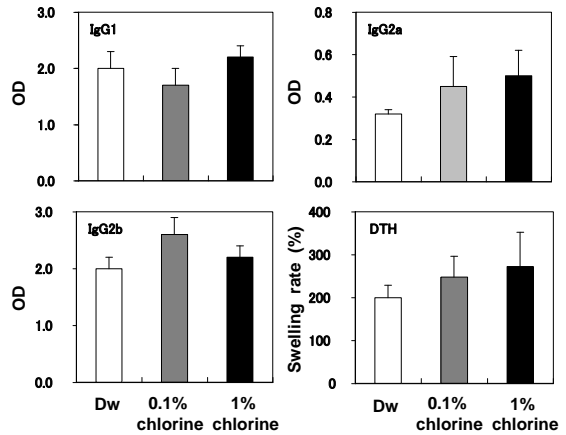
(1) マウスへの塩素の経口投与が OVA 特異的免疫反応に及ぼす影響

①短期間塩素を経口摂取したマウスにおける OVA 特異的 IgG2a, IgG2b 産生および DTH の亢進

はじめに、マウスへの塩素の短期間投与が、OVA 特異的免疫反応に与える影響を検討した。塩素を 0%、0.1% または 1% 含んだ蒸留水 0.5ml を 5 日間、BALB/c マウスに経口投与した後、OVA を水酸化アルミニウムアジュバントと共に 2 回腹腔に免疫した。その後、マウス血清中の抗 OVA 抗体価を ELISA 法により測定すると共に、OVA 特異的 DTH を測定した。塩素を投与したマウスの抗 OVA IgG2a と IgG2b 抗体価、および DTH は、塩素を投与しなかったマウスに比べて高い値を示した (図 1)。また、IgG2a 抗体産生と DTH の亢進の度合いは、塩素の投与量に依存していた。一方、抗 OVA

IgG1 抗体については、高濃度の塩素を投与したマウスにおいてやや高い値であった。

図 1 塩素を短期間経口投与したマウスに



おける OVA 特異的抗体産生と DTH

②長期間塩素を経口摂取したマウスにおける OVA 特異的 IgG2a, IgG2b 産生の亢進

次に、低濃度の塩素を長期間投与した場合の、OVA 特異的免疫反応に与える影響を検討した。OVA 特異的免疫反応の誘導の際は、OVA を腹腔投与でなく経口的に免疫した。塩素を 0% または 0.1% 含んだ蒸留水を 9 週間 C57BL/6 マウスに自由摂取させた。その間、OVA を CT アジュバントと共に 3 回経口免疫し、マウス血清中の抗 OVA 抗体価を測定した。マウスに塩素を長期間経口摂取させた場合も、短期間投与の際と同様に、抗 OVA IgG2a と IgG2b 抗体産生が、塩素を投与しないコントロールマウスに比べて高い値であった (図 2)。また、塩素を投与したマウスの抗 OVA IgG1 抗体は、コントロールマウスに比べて低い値であった。

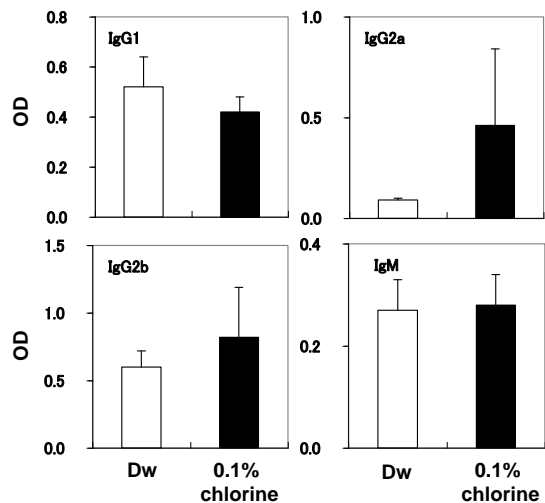


図 2 塩素を長期間経口摂取したマウスにおける OVA 特異的抗体産生

以上より、塩素を含む水を短期間または長

期間摂取した場合、食物タンパク抗原に対するIgG2a, IgG2b抗体産生やDTHといったタイプ1ヘルパーT細胞(Th1)免疫反応が優位に誘導される可能性が示唆された。

③塩素を長期間経口摂取したマウスの脾臓と腸間膜リンパ節(MLN)のT細胞におけるOVA特異的増殖反応

塩素を0%または0.1%含んだ蒸留水を8週間マウスに自由摂取させ、その間、OVAをCTアジュバントと共に3回経口免疫した後、脾臓とMLNを摘出した。そしてこれら臓器から精製したT細胞におけるOVA特異的な増殖反応を、テトラゾリウム塩(MTT)法により測定した。塩素を投与したマウスの脾臓とMLNのT細胞のOVA特異的な増殖反応は、塩素を投与しなかったマウスに比べて明らかな差がみられなかった。

④塩素を長期間経口摂取したマウスの小腸粘膜におけるOVA特異的細胞障害性T細胞(CTL)の増加

塩素を0%または0.1%含んだ蒸留水を3ヶ月間マウスに自由摂取させた後、OVAをCTアジュバントと共に2回経口免疫し、脾臓細胞と小腸上皮間リンパ球を採取して、これらの細胞におけるOVA特異的CTLの割合をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、塩素を摂取したマウスの小腸粘膜において、塩素を投与しなかったマウスに比べて、OVA特異的CTLが増加していた(図3)。一方、脾臓T細胞においては、塩素投与による影響はみられなかった。したがって、塩素を経口摂取したマウスの小腸粘膜において、Th1反応であるCTLの誘導が亢進している可能性が示唆された。

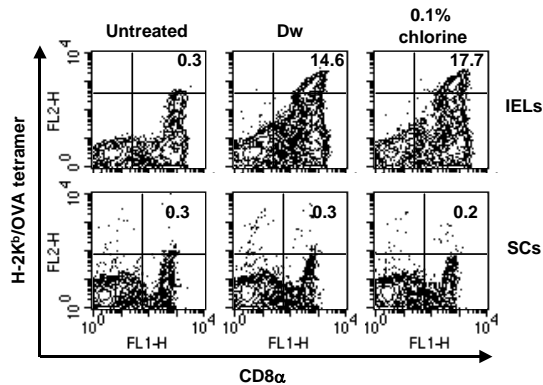


図3 塩素を長期間経口摂取したマウスの小腸粘膜と脾臓におけるOVA特異的CTL

⑤塩素を長期間経口摂取したマウスの小腸粘膜における33D1陽性樹状細胞(DC)の減少

次に、塩素を長期間摂取させた上で、OVA

を経口免疫したマウスの小腸粘膜のDCを採取し、そのサブタイプについて調べたところ、塩素を摂取したマウスの小腸粘膜においては、Th2反応を誘導する33D1陽性DCが著しく減少していた(図4)。

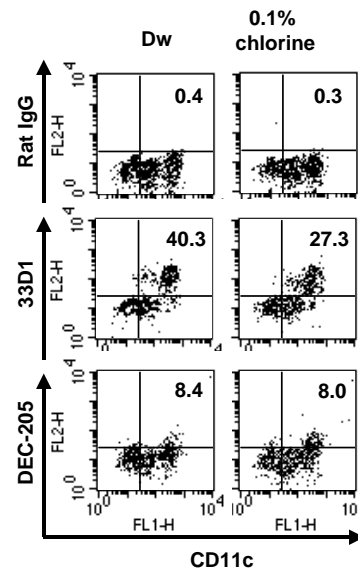


図4 塩素の長期間経口摂取がマウスの小腸粘膜のDCサブセットに与える影響

以上より、塩素の経口摂取はマウスの小腸粘膜のTh2誘導性DCを減少させ、小腸粘膜のCTLの誘導や、遅延型過敏反応、血中IgG2a, IgG2b抗体産生といったTh1反応を亢進することが示された。このように塩素水の摂取は、消化管粘膜と全身性の食物抗原特異的なTh1優位なアレルギー反応を亢進させる可能性が示唆された。

(2) 住居と浄水場との間の距離とアレルギー疾患の発症について

①浄水場に近いほど水道水中の残留塩素濃度は高く、pHは低い

東京都内およびその近郊の浄水場からの距離が10km未満、10km以上20km未満、および20km以上の地域において、水道水を採水し、全残留塩素、遊離残留塩素、結合残留塩素の濃度およびpHを測定した。その結果、浄水場との距離が短くなるにしたがって、水道水中の全残留塩素、遊離残留塩素および結合残留塩素濃度は高く、pHは低い傾向がみられた(図5)。

②浄水場と住居の距離が短いほどアレルギー疾患の有病率が高い

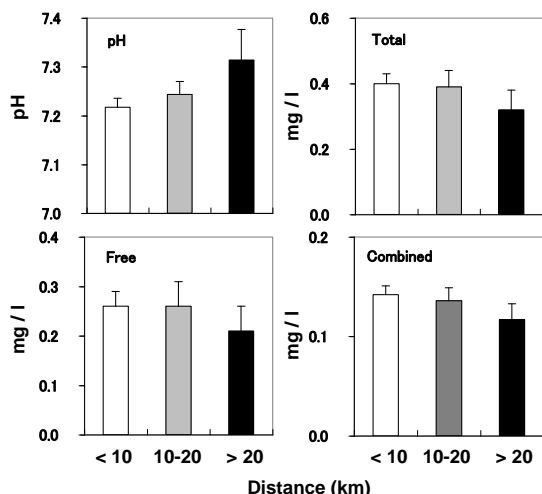


図5 浄水場の付近および遠隔地域の水道水におけるpHと残留塩素の濃度

次に、住居と浄水場との距離と食物アレルギーの有病率との関係を調べた。20歳代女性を対象に質問調査を行い、浄水場から10km未満、10km以上20km未満、および20km以上の地域に住んでいる女性における、食物アレルギーやアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の発症率を調べた。その結果、本人または同居の家族が食物アレルギーの症状を呈したことがあると答えた女性は、浄水場から近い順に、11.1%、5.6%、0%であり、一方、本人または同居の家族がアトピー性皮膚炎の症状を呈したことがあると答えた女性は、24.6%、11.1%、0%であった(図6)。従って、浄水場に近い程、食物アレルギーとアトピー性皮膚炎の発症率が高くなることが示唆された。その他、花粉症とぜんそくにおいても同様な傾向がみられた。

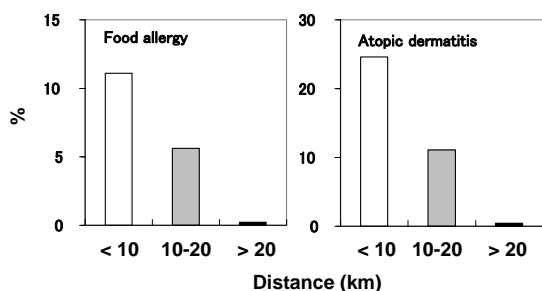


図6 浄水場の付近および遠隔地域におけるアレルギー疾患の有病率

以上のように、マウスを用いた実験により、飲水中の塩素は、消化管粘膜のTh2誘導性抗原提示DCを減少させ、消化管粘膜および全身のTh1免疫反応を過剰に誘導する可能性が示唆された。また、ヒトにおいても、水道水

中の塩素濃度が高くなるに従って、食物アレルギーやアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の発症率が高い傾向が示された。ヒトのアレルギー症状においては、Th1のみならずTh2反応の亢進の関与が報告されている。様々な病原体と接触するヒトの環境とは異なり、今回実験に使用したマウスは病原体の存在しない特殊な環境で飼育された。動物種の違いに加えて、このような環境微生物の違いが、ヒトとマウスの免疫反応の違いに関与している可能性が考えられる。動物種や環境微生物の影響も含めて、今後さらに塩素とアレルギー疾患の詳細を研究する必要があると考える。

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4件)

①Wakabayashi A., Nakagawa Y., Shimizu M., Moriya K., Nishiyama Y., Takahashi H.: Suppression of an already established tumor growing through activated mucosal CTLs induced by oral administration of tumor antigen with cholera toxin. The Journal of Immunology, 査読有り, vol. 180, 2008, 4000-4010.

②若林あや子、高橋秀実: 感染症と栄養・機能性食品. 機能性食品と薬理栄養, 査読無し vol. 4, 2008, 373-380.

③Wakabayashi A., Kumagai Y., Watari E., Shimizu M., Utsuyama M., Hirokawa K., Takahashi H.: Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. Immunology, 査読有り, vol. 119, 2006, 167-177.

④Wakabayashi A., Utsuyama M., Hosoda T., Sato K., Takahashi H., Hirokawa K.: Induction of immunological tolerance by oral, but not intravenous and intraportal, administration of ovalbumin and the difference between young and old mice. The Journal of Nutrition, Health & Aging, 査読有り, vol. 10, 2006, 183-191.

[学会発表] (計7件)

①Wakabayashi A., Moriya K., Harimoto K., Watari E., Takahashi H.: Enhancement of expression DEC-205 and co-stimulatory molecules in intraepithelial DCs after

oral administration of an antigen and its involvement in mucosal CTL induction. 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008 年 12 月 1-2 日 (京都)

②守屋慶一、若林あや子、清水真澄、渡辺恵理、田村秀人、壇和夫、高橋秀実：マウスにおける 33D1+およびDEC-205+樹状細胞のサイトカイン産生と腫瘍増殖抑制に対する効果. 第 70 回日本血液学会総会 2008 年 10 月 10-12 日 (京都)

③若林あや子、高橋秀実：経口免疫法による抗腫瘍ワクチンの開発. 第 1 回中央大学・日本医科大学学術合同ワークショップ 2008 年 5 月 10 日 (東京)

④若林あや子：粘膜免疫賦活による抗腫瘍免疫の誘導. 第 18 回千駄木感染免疫アレルギー研究会 2008 年 3 月 11 日 (東京)

⑤Moriya K., Wakabayashi A., Shimizu M., Watanabe E., Takaku S., Dan K., Takahashi H.: Effects of 33D1+ or DEC-205+ dendritic cell depletion on cytokine secretion and tumor growing in mice. 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007 年 11 月 20-22 日 (東京)

⑥Wakabayashi A., Kumagai Y., Watari E., Shimizu M., Utsuyama M., Hirokawa K., Takahashi H.: Effect of gastrointestinal ingestion of orally administered macromolecular antigens on the induction of oral tolerance. 13th International Congress of Mucosal Immunology, 2007 年 7 月 9-12 日 (東京)

⑦Wakabayashi A., Kumagai Y., Watari E., Shimizu M., Moriya K., Utsuyama M., Hirokawa K., Takahashi H.: Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. 第 36 回日本免疫学会学術集会 2006 年 12 月 11-13 日、(大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 あや子 (WAKABAYASHI AYAKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：30328851

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者