

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500796

研究課題名（和文） アルミニウム含有食品添加物の摂取による卵白アルブミン特異的なアレルギー反応の誘導

研究課題名（英文） Induction of ovalbumin-specific allergic reaction by ingestion of food additives including aluminum

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（和文）：アルミニウムを含む食品添加物であるみょうばんの摂取が、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。マウスを用いた実験では、みょうばんの経口投与は、消化管付属リンパ節の樹状細胞を活性化させた。さらに、卵白アルブミン（OVA）と共にみょうばんを摂取させたマウスでは、OVAに対する抗体産生やT細胞免疫反応が過剰に誘導され、みょうばんがアレルギー誘導に関与することが明らかになった。一方、調査研究によって、アレルギー疾患を有する女性は、パンやラーメンといったみょうばんを含むことが多い食品の摂取頻度が高いことが示唆された。本研究によって、みょうばんのようなアルミニウムを含む食品添加物は、免疫反応を増加させ、アレルギーの発症や促進に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether the ingestion of aluminum potassium sulfate (APS) in food additives is involved in the triggering and development of allergies. Our research was conducted through animal experimentation and surveys. Oral administration of APS activated dendritic cells in the mesenteric lymph nodes in mice. Furthermore, production of ovalbumin (OVA)-specific antibodies and T cell proliferative responses were enhanced by oral administration of OVA and APS. We also showed that women with allergies consume foods with APS more frequently than woman without allergies. Thus, it was demonstrated that ingestion of APS enhanced immune responses and may contribute to the triggering and development of allergic reactions in mice and humans.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：健康と食生活、食品衛生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの食品、特に加工食品には、食品の加工や保存の目的のために、様々な食品添加物が添加されている。これらの食品添加物は、食品の製造加工に必要であったり、栄養価を維持したり、腐敗や変質を防いだりするなど、利用に際して多くの利点がある。なおかつ、現在食品添加物として認められているものは、急性・慢性毒性試験や発癌性試験などの安全性試験によって、生体に異常を及ぼさない許容摂取量が定められている。しかし近年、この食品添加物が様々なアレルギーの発症や進行に影響を与えている可能性が示唆されている(参考文献1: Metcalfe D. D. et al., 1997)。現在、保存剤、合成着色料、漂白剤、酸化防止剤、ガムベース、乳化剤といった、多くの食品添加物がアレルギーに関与することが示唆されている。これらの食品添加物がアレルギーを起こすメカニズムは、その化学的性質によって異なり、食品添加物そのものがアレルゲンになる場合や、または免疫アジュバントとして免疫賦活作用を示すためにアレルギーが引き起こされる場合が考えられる。

(2) いくつかの食品添加物には、アルミニウムが含まれている。例えば、合成着色料のアルミニウムレーキや、みょうばん(硫酸アルミニウムカリウム)、アンモニウムみょうばん(硫酸アルミニウムアンモニウム)などである。合成着色料のアルミニウムレーキは、様々な粉末食品や油脂食品、糖衣菓子、シロップなどに広く利用されており、一方、みょうばんは、漬け物や麺のかんすいとして使われる他、ベーキングパウダーにも含まれている。つまり、パン、ケーキ、麺、菓子、漬け物など、日常的に摂取する食品の多くにアルミニウムが添加されているのである。

(3) 実はこのアルミニウムは、強い免疫賦活作用を持つ物質として知られており、タンパク抗原と水酸化アルミニウムを混合して動物に注入すると、タンパク抗原特異的なIgE抗体の上昇を含む強力な免疫反応が誘導される(参考文献2: Wakabayashi A. et al., 2006)。そのため、アルミニウムが添加されている食品を摂取した場合、その食品中タンパク抗原に対するアレルギーが誘導される可能性が考えられる。本研究においては、普段我々が摂取している食品添加物中のアルミニウムが、免疫賦活剤として卵白アルブミン特異的な免疫反応を亢進させ、食物アレルギーの発症や進行に関与するか否かを明らかにした。

## 参考文献

1 : Metcalfe Dean D. et al., Food allergy:

Adverse reactions to foods and food additives, Blackwell science, 1997.

2 : Wakabayashi A. et al., Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunology* 119: 167-177, 2006.

## 2. 研究の目的

(1) まず動物実験により、食品添加物であるみょうばんの経口投与が、免疫を賦活してタンパク抗原特異的な食物アレルギー反応を誘導するか否かを検討した。これは、タンパク抗原にみょうばんを添加したものをマウスに経口投与し、その後のタンパク特異的な免疫反応の誘導を観察することにより行った。免疫反応の測定にあたっては、タンパク質特異的なI、III、IV型アレルギー反応の誘導を検討した。具体的には、血液中の抗原特異的なIgGとIgE抗体価(I、III型アレルギー)および、遅延型過敏反応とT細胞増殖反応(IV型アレルギー)について調べた。このとき、食品添加物を経口投与しない場合の免疫反応と比較し、違いを追求した。

(2) アルミニウムを含む食品添加物が免疫賦活作用を有する場合、免疫反応は消化管局所において誘導されている可能性が高い。消化管の粘膜局所には、免疫反応を誘導する能力を持つ抗原提示細胞である樹状細胞(DC)が局在している。そのため、本研究においては、アルミニウムを含む食品添加物を経口投与した動物における、消化管粘膜樹状細胞の活性化状態を観察し、アレルギー反応の局所誘引メカニズムについて検討した。

(3) これら動物実験を行う一方で、アルミニウムを含む食品添加物の摂取と食物アレルギーの発症率の関係について、調査を行った。アンケート調査により、みょうばんなどの食品添加物を含有する加工食品の摂取頻度や嗜好性と、食物アレルギーの発症の相関関係について調べた。

以上のように動物実験と調査法により、アルミニウムを含む食品添加物の、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。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

#### ① マウス

実験には、6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卵白アルブミン (OVA) とみょうばん (硫酸アルミニウムカリウム) の同時経口投与

短期間投与としては、OVA 10 mg のみ、または OVA 10 mg と共にみょうばん 10 mg を含んだ PBS 0.3 ml を、マウスに 1 日 1 回 5 日間連続経口投与した。長期間投与としては、OVA 10 mg のみ、または OVA 10 mg と共にみょうばん 10 mg を 5 回連日経口投与し、その後、毎週一回同様な経口免疫を 4 回行った。

③ OVA とアルミニウムゲルによる免疫

OVA 50  $\mu$ g 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。

④ 血清中抗 OVA IgG1, IgG2a, IgG2b, IgE 抗体価の測定

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, IgE 抗体価を吸光度測定した。

⑤ 遅延型過敏反応 (DTH)

OVA 20  $\mu$ g 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。

⑥ OVA 特異的 T 細胞の増殖反応

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。培養最終の 18 時間前に、トリチウム-サイミジンを添加し、細胞への取り込みを放射線活性により測定した。

⑦ 腸間膜リンパ節 DC の活性化の測定

マウスから腸間膜リンパ節を摘出し、ここから DC を精製し、CD11c<sup>+</sup> DC における共刺激分子 (CD80, CD86, MHCII) の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

## (2) 調査研究

① アレルギー疾患の既往歴および食事に関する調査

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 46 名において、質問調査を行った。対象者には、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、医師の診断の有無などの記入を依頼した。また、アルミニウムを含むみょうばんが使用されていることが多い食品である、ラーメン、パン、ケーキ、漬け物などの摂取頻度について質問調査を行った。

## 4. 研究成果

(1) 短期間みょうばんを経口摂取したマウスにおける OVA 特異的抗体産生、遅延型過敏反応および T 細胞増殖反応の亢進

マウスに、OVA 10 mg のみ、または OVA 10 mg と共にみょうばん 10 mg を 5 回経口投与し、その後、OVA と水酸化アルミニウムアジュバントの腹腔投与による全身性免疫を 2 回行った。これらのマウスから末梢血を採取し、血清中の抗 OVA IgG1, IgG2a, IgG2b, IgE 抗体価を測定する一方、マウスの耳に注入した OVA に対する遅延型過敏反応を測定した。

そうしたところ、OVA と共にみょうばんを経口投与したマウスの血清中抗 OVA IgG1 と IgE 抗体価は、OVA のみを経口投与したマウスの値に比べ、有意に高い値であった (図 1)。IgG2b と遅延型過敏反応も、有意差はみられなかったものの、OVA とみょうばんを経口投与した群で高い値であった。

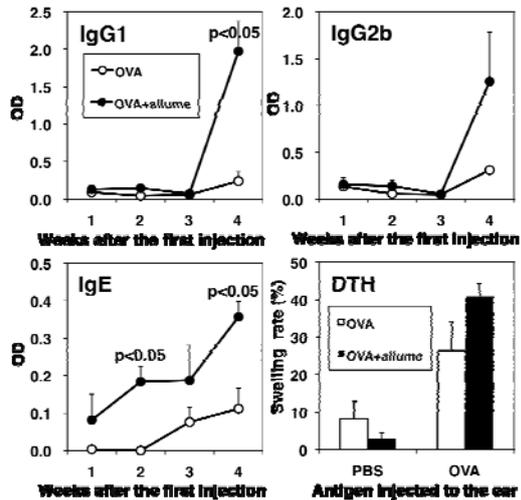


図 1 OVA と共にみょうばんを短期間経口投与したマウスにおける OVA 特異的抗体価と遅延型過敏反応 (DTH)

また、これらのマウスから脾臓と腸間膜リンパ節を摘出し、採取した T 細胞における OVA 特異的増殖反応を検討した。そうしたところ、OVA と共にみょうばんを経口投与したマウスの脾臓と腸間膜リンパ節の T 細胞の OVA 特異的増殖反応は、OVA のみを経口投与したマウスの値に比べ、著しく高い値を示した (図 2)。この時特に、腸間膜リンパ節由来の T 細胞の増殖反応の値は、脾臓由来 T 細胞の値より目立って高い値であった。

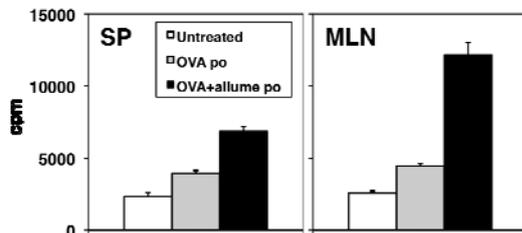


図2 OVAと共にみょうばんを短期間経口投与したマウスにおけるOVA特異的T細胞増殖反応

以上のことより、タンパク抗原と共にみょうばん(硫酸アルミニウムカリウム)をマウスに短期間経口投与した場合、その後の全身性免疫刺激によって、タンパク抗原に対する過剰な免疫反応(アレルギー)が誘導されることが明らかになった。みょうばんのようなアルミニウムを含有する食品添加物は、短期間の経口摂取であっても、食物アレルギーの誘導や進行に関与する可能性が示唆された。

(2) 長期間みょうばんを経口摂取したマウスにおけるOVA特異的抗体産生およびT細胞増殖反応の亢進

マウスに、OVA 10 mgのみ、またはOVA 10 mgと共にみょうばん 10 mgを5回連日経口投与し、その後、毎週一回同様な経口免疫を4回行った。これらのマウスから末梢血を採取し、血清中の抗OVA IgG1、IgG2a、IgG2b、IgE抗体価を測定すると共に、脾臓と腸間膜リンパ節を摘出し、T細胞におけるOVA特異的増殖反応を検討することにより、OVAに対するアレルギー反応の誘導について観察した。

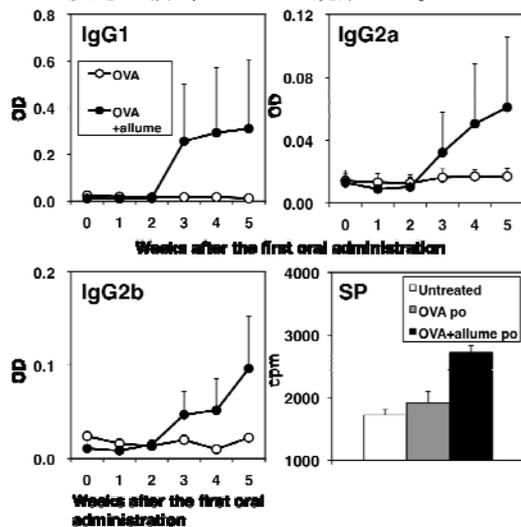


図3 OVAと共にみょうばんを長期間経口投与したマウスにおけるOVA特異的抗体価とT細胞増殖反応

その結果、OVAと共にみょうばん経口投与を長期間くり返したマウスの血清中抗OVA IgG1、IgG2a、IgG2b抗体価は、OVAのみを経口投与し続けたマウスの値に比べ、高い値であった(図3)。また、このOVAとみょうばんの経口投与を長期間続けたマウスの脾臓のT細胞のOVA特異的増殖反応は、OVAのみを経口投与し続けたマウスの値に比べ、高い値を示した(

図3)。一方、血清中抗OVA IgE抗体価と腸間膜リンパ節のT細胞増殖反応のマウス間の差はみられなかった。

以上のことより、タンパク抗原と共にみょうばんを長期間マウスに経口投与した場合、その後の免疫刺激なしにそれだけで、タンパク抗原に対する抗体産生や特異的T細胞が活性化されることが明らかになった。しかし、タンパク抗原のみを長期間くり返し経口投与しても、抗体産生や特異的T細胞が活性化されることはなかった。みょうばんのような、アルミニウムを含有する食品添加物をくり返し頻繁に長期間摂取することは、食物アレルギーの誘導や進行を促す可能性が示唆された。

(3) みょうばんの経口投与による腸間膜リンパ節DCの活性化

本研究によって、みょうばんの経口投与によってT細胞増殖反応や抗体産生が促進されることが明らかになった。これらの免疫反応が起こる原因として、DCのような抗原提示細胞が活性化している可能性が考えられる。そこで、みょうばんを経口投与した場合の、消化管付属リンパ組織におけるDCの変化について解析した。マウスの腸間膜リンパ節においては、CD11c陽性のDCが存在する。マウスにOVAのみを経口投与しても腸間膜リンパ節のCD11c<sup>+</sup> DCの割合に変化はないが、みょうばん 10 mgを経口投与した場合、MLNにおけるCD11c<sup>+</sup> DCの割合は明らかに増加した。これらCD11c<sup>+</sup> DCにおける、CD80、CD86といった共刺激分子やMHCクラスII分子のような、T細胞を活性化する分子の発現を観察したところ、みょうばんを経口投与したマウスのCD11c<sup>+</sup> DCにおける、CD80・CD86・MHCクラスII分子の発現は増加していた(図4)。

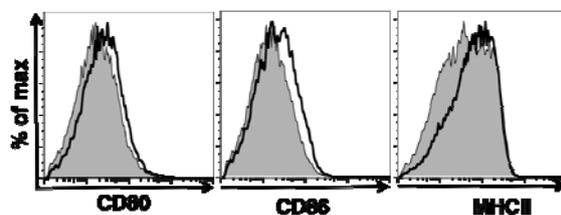


図4 みょうばんを経口投与したマウスの腸間膜リンパ節CD11c<sup>+</sup> DCにおけるCD80、CD86、MHCクラスIIの発現増加

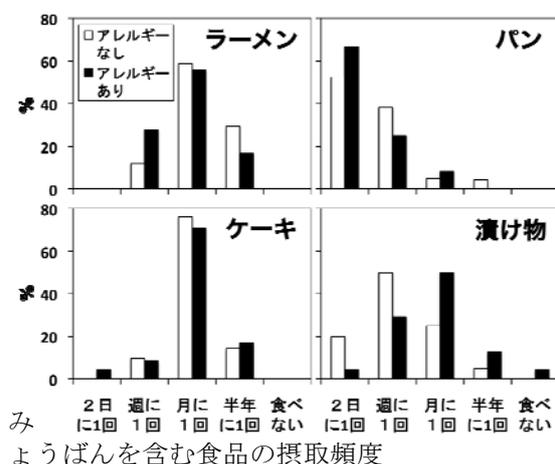
このことより、みょうばんをマウスに経口投与した場合、消化管付属リンパ節におけるDCが活性化することが示された。これらのDCの活性化により、腸間膜リンパ節や全身のT細胞が活性化され、食物抗原特異的な過剰な

免疫反応が誘導される可能性が示唆された。

(4) アレルギー疾患を有するヒトはみょうばんを含む食品の摂取頻度が高い

20代女性を対象にアンケート調査を行い、食物アレルギー、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を有する女性(24人)と、アレルギーがない女性(22人)における食生活を調べた。そうしたところ、パンやラーメンといった、みょうばんを食品添加物として含むことが多い食品の摂取頻度は、アレルギー疾患を有する女性において明らかに高いものであった(図5)。一方、漬け物はみょうばんを含むことがある食品であるが、アレルギーの女性で摂取頻度が低かった。これらのことより、アレルギーの女性が、ご飯食よりもむしろパン食の頻度が高いことが考えられる。

図5 アレルギーがある女性とない女性の



以上のように、マウスを用いた実験により、みょうばんは、消化管付属リンパ節の食物抗原提示 DC を活性化させ、消化管付属リンパ節および全身の抗原特異的 T 細胞免疫反応を過剰に誘導する可能性が示唆された。ヘルパー T 細胞の活性化は、抗体産生を亢進させ、アレルギー状態を促進させる。

また、ヒトにおいても、食物アレルギー、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の女性では、食品添加物であるみょうばんを含むことが多い食品の摂取頻度が高いことが示唆された。みょうばんのような食品添加物は、アレルギーの発症や促進に関与する可能性があり、今後さらに食品添加物とアレルギー疾患の関わり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 2 件)

- ① Keiichi Moriya, Ayako Wakabayashi, Masumi Shimizu, Hideto Tamura, Kazuo Dan, Hidemi Takahashi. Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205<sup>+</sup> dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 査読有、Vol. 59, No. 7, 2010, pp. 1083-1095  
doi: 10.1007/s00262-010-0835-z
- ② Ayako Wakabayashi, Yoko Nakagawa, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi. Development of antitumor immunity by oral vaccination with tumor antigen and cholera toxin. *Journal of Nippon Medical School*, 査読無、Vol. 77, No. 1, 2010, pp. 50-52  
Doi:10.1272/jnms.77.50

[学会発表] (計 6 件)

- ① 中川洋子、清水真澄、野呂瀬嘉彦、若林あや子、高橋めぐみ、高橋秀実、エイズウイルス外被糖蛋白特異的 CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の遊離エペトープペプチドによる in vivo でのアポトーシス誘導とその制御、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30 日、東京
- ② Wakabayashi A, Nakagawa Y, Shimizu M, Takahashi H, Enhancement of co-stimulatory molecule-expression and cross-presentation of antigens in mucosal DCs after oral administration of antigenic molecules plus cholera toxin、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 28 日、千葉
- ③ Wakabayashi A, Moriya K, Shimizu M, Takahashi H. Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205<sup>+</sup> dendritic cells. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, August 25, 2010, Kobe, Japan
- ④ Date T, Moriya K, Wakabayashi A, Takahashi H. Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective activation of innate DEC-205<sup>+</sup> dendritic cells. World Immune Regulation Meeting-IV, March 29, 2010, Davos, Switzerland
- ⑤ Wakabayashi A, Moriya K, Harimoto H, Tomita Y, Shimizu M, Takahashi H. Induction of acquired tumor-specific immunity against already established

tumors by selective stimulation of innate DEC-205<sup>+</sup> dendritic cells with very low-dose of anti-cancer drugs in vivo. 第 39 回免疫学会学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪

- ⑥ 若林あや子、経口ワクチンによる抗腫瘍免疫誘導法の開発、第 77 回日本医科大学医学会総会、2009 年 9 月 5 日、東京

## 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

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：