

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：平成18年度～平成20年度
 課題番号：18604011
 研究課題名（和文）カロテノイド摂取による食物アレルギー感作成立の抑制に関する研究
 研究課題名（英文）Carotenoids Carotenoides intake inhibits the oral sensitization and the development of food allergy
 研究代表者
 稲山 浩(AKIYAMA HIROSHI)
 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
 研究者番号 10260259

研究成果の概要：オボアルブミン(OVA)経口連続投与で感作が誘導可能な B10A マウスを用いて、カロテノイド強化食摂取による食物アレルギー発症抑制のメカニズムについて検討した。血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1、IgG2a 抗体価がカロテン摂取群で有意に減少し、ASA 誘導後のカロテン摂取群での血中ヒスタミン濃度が低下した。また脾臓細胞由来 CD4⁺T 細胞の Th1 及び Th2 の master regulator の測定結果からもカロテノイド強化食による抗原感作の抑制が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究分野：分析科学、免疫学

科研費の分科・細目：時限・アレルギー

キーワード：食物アレルギー、β-カロテン、B10A マウス、ヒスタミン、サイトカイン、Th1/Th2 バランス、オボアルブミン

1. 研究開始当初の背景

(1)食品中の抗アレルギー活性を持つ成分に着目して研究を行った結果、ニンジン摂取が I 型アレルギー反応を司る特異的 IgE 抗体産生を抑制することで I 型アレルギー反応を抑制するのを明らかにした¹⁾。また、オボアルブミン(OVA)を腹腔内投与で感作した BALB/c マウスへの β-carotene 経口摂取が I 型アレルギー反応を抑制する作用を有することも既に報告した²⁾。これらのことは、

ニンジンの抗アレルギー成分の1つが β-carotene であることを示唆している。

本研究では OVA を連日経口投与することで感作が誘導できる B10A マウスを用い、ビタミン A の前駆体でありニンジン中に多く含まれる α-carotene と β-carotene 経口摂取の食物アレルギー発症過程への影響について検討した。1) Akiyama, H. et al. (1999) Biol. Pharm. Bull. 22:551-555. 2) Sato, Y. et al. (2004) Biol. Pharm. Bull. 27:978-

2. 研究の目的

(1) 食物アレルギーは乳児期に発症することが多く、一度発症すると年齢によってアレルギー症状や抗原が変わる「アレルギーマーチ」を誘発する発端と考えられる。しかたがって食物アレルギーの発症を抑制することは、アレルギーマーチも抑制することができる可能性があり、その予防法が望まれている。我々はニンジンの摂取が即時側アレルギーを抑制し、有効成分のひとつがβ-カロテンであることを既に示している。本研究では、経口感作誘導可能なB10Aマウスを用いてβ-カロテンやα-カロテンの摂取が食物アレルギー発症過程に与える影響を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物・免疫感作：B10Aマウス(雌性、7週齢)を用い、試験群は対照群(標準粉末飼料摂取)、α-カロテン群、β-カロテン群、リコピン群(2mg/100g含有標準粉末飼料摂取)の4群に分けて検討を行った。予備飼育を2週間行い、その後カロテン投与群はカロテン強化食に切り換え自由摂取させた。試料の切り換え日から、卵白アルブミン(ovalbumin, OVA)(1mg/匹)を9週経口連続投与して免疫感作させた。対照群には生理食塩水を投与した。連続投与最終日に1.0mgのOVAを腹腔投与し能動的アナフェラキシーショック(ASA)を起こさせた。ASAの指標として、OVA腹腔投与直後から体温を経時的に測定した。

(2) 10分間の体温測定後に全採血を行い、血中ヒスタミン濃度及び血清中OVA特異的抗体価(IgE、IgG1及びIgG2a)を測定した。また、各群の糞中より抗体を抽出し、血清中抗原特異的IgA抗体価を測定した。

(3) 細胞分離と表面抗原解：カロテン摂取によるOVA感作マウスの脾臓細胞への影響を調べるため、CD4⁺T細胞をB10Aマウスの脾臓、

腸間膜リンパ節(MLN)、パイエル板(PP)から分離した。分離後の細胞を調整し、細胞表面抗原の解析をフローサイトメーター(FCM)で行った。同様にして、樹状細胞をB10aマウスの脾臓、MLN、PPから分離しFCMで解析を行なった。

(4) マウスにおけるOVA特異的IgE産生の抑制機構を明らかにするために、OVA刺激を与えたマウスの脾臓を用いて、in vitroでのサイトカイン産生を調べた。

4. 研究成果

(1) ①血清中のOVA特異的抗体価(IgE、IgG1及びIgG2a)を測定した。(図1)OVAを強制経口投与させた対照群において、OVA特異的IgE、IgG1及びIgG2a抗体価が有意に検出された。対照的にカロテン強化食摂取群のOVA特異的IgE、IgG1及びIgG2a抗体価は対照群に比べて有意に減少していた。これらの結果から、カロテノイド摂取の増加によりB10aマウスのOVA経口感作を抑制することが示唆された。

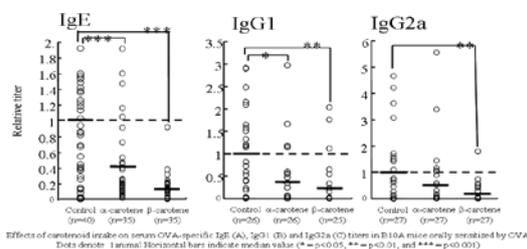


図1

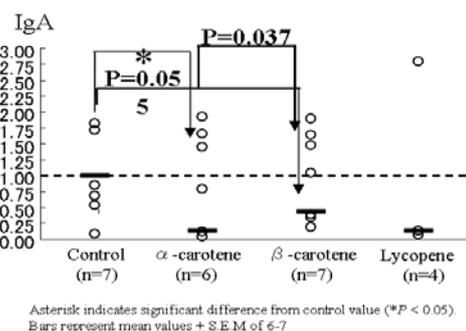


図2

②カロテン摂取群における糞中のOVA特異的抗体価(IgA)は、対照群に比べてカロテン摂取群で減少していた。(図2)また、リコピン群は対照群に比べて減少傾向を示していた。

(2) 抗原の腹腔内惹起により ASA を誘導後の体温を測定した結果、 α -carotene 群、 β -carotene 群において体温の低下が抑制された。さらに血清中ヒスタミン濃度も対照群に比べ α -carotene 群、 β -carotene 群は有意に抑制された。(図 3)以上の結果から、B10a マウスにおいて、カロテノイド摂取によって食物アレルギーの発症が抑制された。

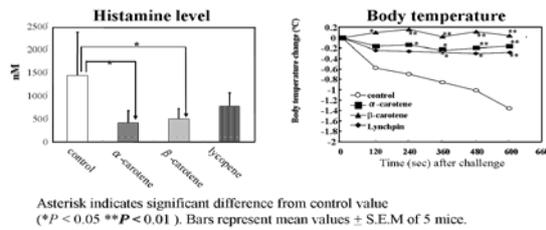


図3

(3) in vitro での脾臓細胞のサイトカイン産生:カロテン投与群の脾臓細胞では IFN- γ と IL-2 産生が対照群よりも増加していた。対照的に Th2 型サイトカインである IL-5、IL-6、IL-10 及び IL-13 の産生能はカロテン摂取群において減少していた。(図 4)また、リコピン投与群において IL-6 が減少傾向を示していた。(図 5)

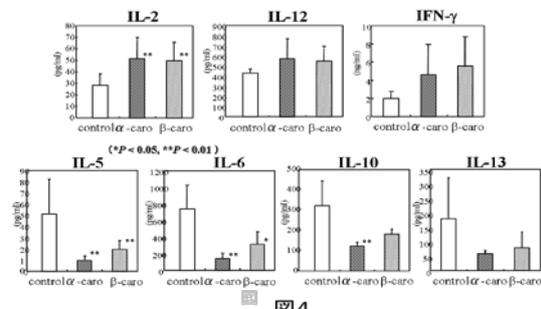


図4

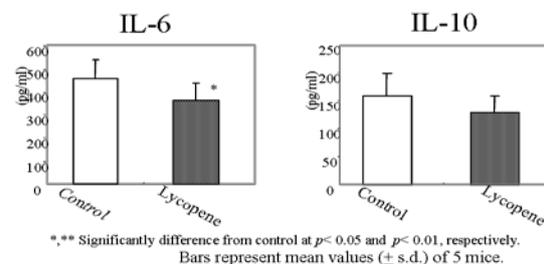


図5

(4) 脾臓細胞の表面解析:脾臓細胞の CD4⁺細胞と CD8⁺細胞の占める割合を示した。脾

臓細胞における T 細胞の割合は、対照群のマウスで 36.2%、カロテン摂取群のマウスで 38.0%であった。脾臓細胞の B 細胞の割合は、対照群に比べてカロテン摂取群が有意に増加していた。さらに高カロテン摂取の影響が T 細胞の分化にどのような影響を与えているかを検証するため、CD4⁺/CD8⁺T 細胞の発現を調べた。脾臓細胞の CD4⁺T 細胞の割合は対照群(14.3%)と比べてカロテン摂取群(α -カロテン摂取マウスでは 17.1%、 β -カロテン摂取マウスで 16.7%)は有意に増加していた。カロテノイド強化食摂取マウス由来の脾臓細胞の CD8⁺T 細胞の割合(α -カロテン摂取マウスで 15.8%、 β -カロテン摂取マウスで 16.2%)は、対照群のマウス(11.8%)よりも有意に高い値を示した。しかしながら、カロテノイド強化食摂取マウス由来の脾臓細胞の CD4⁺CD25⁺/CD8⁺CD122⁺制御性 T 細胞(Treg)は 対照群と有意差が認められなかった。(図 6)

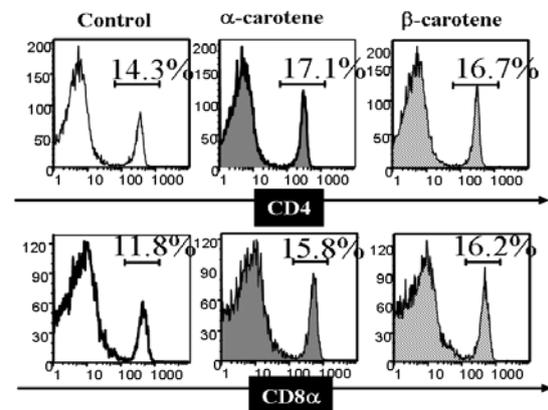


図6

(5) mRNAs の Th1/Th2 master regulators の検出: Th1 細胞の master regulator である T-bet と Th2 細胞の master regulator である GATA3 の mRNA を Real time PCR で測定した。カロテン摂取群における GATA3 と T-bet の発現は対照群よりも低い値を示した。これらの結果より、カロテノイド摂取群のマウスは Th1 と Th2 細胞の分化が共に抑制されていると示唆された。(図 7)

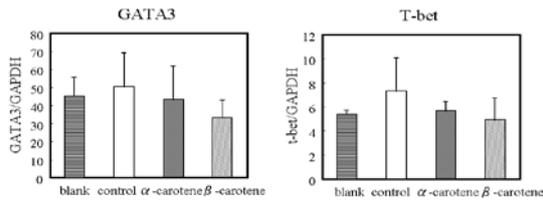


図7

(6) MLN と PP の細胞の表面解析：OVA 経口感作マウスから MLN と PP を摘出し、リンパ球の表面抗原解析を FCM で行なった。経口感作マウス由来 PP における CD4⁺CD103⁺T 細胞の割合は経口感作されていない群よりも増加した。CD4⁺CD103⁺T 細胞の割合は、抗原に対する経口感作のマーカーと考えられる。対照的に、カロテノイド強化食摂取マウス由来の PP 細胞における CD4⁺CD103⁺T 細胞の割合は、コントロール群に比べて有意に低下した。しかしながら、カロテノイド強化食摂取マウス由来の CD4⁺FoxP3⁺T 細胞の割合は対照群と比べて有意差が認められなかった。これらの結果より、高カロテン摂取は OVA 経口感作された PP 細胞において上昇した CD4⁺CD103⁺細胞の割合を抑制する傾向が示唆された。対照群マウスの MLN 細胞は、カロテノイド強化食摂取マウスの CD4⁺FoxP3⁺と CD4⁺CD103⁺T 細胞の割合と類似している(図8)。加えて、カロテノイド摂取マウスの CD11c⁺CD103⁺樹状細胞(DCs)は、対照群と比較しても有意差は認められなかった。

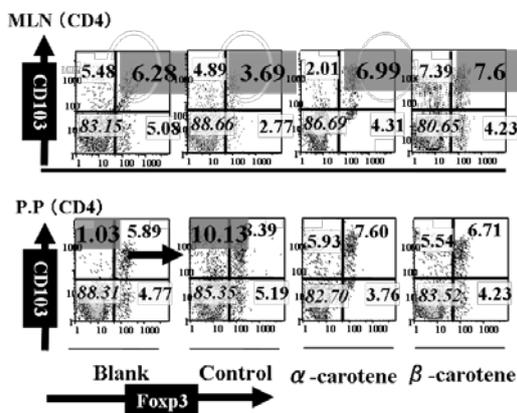


図8

【考察】 近年、B10a マウスへの高カロテノ

イド含有飼料の給餌によって、in vitro で経口感作にともなう OVA 特異的 IgE、IgG1 産生を抑制することが報告されており、我々は OVA で経口感作を行なった B10a マウスへの高カロテノイド飼料の給餌によって、抗原刺激により引き起こされるアナフェラキシー症状が著しく抑制されることを証明した。

α-カロテン、β-カロテン含有飼料は in vitro でビタミン A(retinol)に転化され、レチノールの潜在源として母乳を介して乳児へと与えられている。またα-カロテン、β-カロテンは慢性疾患に対する長期間防御が期待されており、ヒトの母乳に含まれることで免疫防御効果を乳児へ与えている。レチノールとその代謝産物(レチノイド)は免疫の制御に重要な役割を担っている。レチノイドは様々な種類の免疫細胞のエフェクター機能に影響を与えている。

腸管関連リンパ組織(GALT)の樹状細胞は、レチノールからレチノイン酸(RA)を生成することができ、また B 細胞と T 細胞の CCR9 と α4β7 のホーミング受容体を upregulate させることが明らかになっている。さらに、動物へのレチノールの投与によって TNF-α や IL-1 のような炎症性サイトカインの血清中濃度の減少がみられ、同時に IL-10 などの抑制性サイトカインの血清中濃度が増加したと報告されている。それゆえ、レチノールとレチノイドが免疫制御機能を有していることが示唆されている。

近年、Mucida らは、RA が炎症性 Th17 細胞を誘導する IL-6 を抑制し、抗炎症性制御性 T 細胞の分化を促進することができる能力を持っており、TGF-β 依存性の免疫反応を制御している鍵になっていると報告している。Benson らは、CD103⁺腸管樹状細胞によって相対的に retinol dehydrogenase の高レベルの発現が認められることと、RA により従来の過

程が増強され $\alpha 4 \beta 7$ integrin の upregulation が行なわれること、CCR9 によって GALT に新しく作りだされた Treg を特異的に蓄積することを示した。さらに、Coombes や Sun は、RA の転化が他のリンパ組織よりも GALT において効果的に起こることを示唆し、マウスに OVA を飲水投与させたときにも 1.3% の OVA 特異的 T 細胞が Treg 細胞へ分化されたことを示した。In vitro において、GALT で抗原提示された CD103⁺樹状細胞は Foxp3 細胞を誘導させることが示された。CD103⁺細胞によって誘導された RA 転化は、retinol dehydrogenases の抑制によって減少し、CD103⁺樹状細胞によって生成された RA は転化の過程と関係していることが示唆された。GALT の CD103⁺樹状細胞は、抗原特異的 T 細胞から RA 依存的あるいは TGF- β 依存的で Foxp3⁺Treg 細胞へと分化するための環境が整っている。Treg は経口感作において重要な役割を担っている。TGF- β はナイーブ T 細胞から自己免疫を抑制する Treg へと分化させる。IL-6 の存在下では、TGF- β はナイーブ T 細胞が炎症性 IL-17 サイトカインを産生する Th 細胞 (Th17 細胞) へ分化を促進する。しかしながら、これらの研究は in vitro または動物モデルにおいて細胞移入を誘導する in vivo においても機能する。

それゆえ、レチノールと RA の経口摂取が in vivo で MLN と PP の Treg 細胞の誘導を促進するかどうかを調査する必要がある。しかしながら、これらの実験はレチノールと RA の副作用のために困難を極めている。今回の結果では、カロテノイド摂取の強化によって、MLN と PP における FoxP3 Treg 細胞の誘導と CD103⁺樹状細胞の誘導がしめされなかったが、経口感作への OVA 特異的 IgE と IgG1 産生反応や抗原刺激によるアナフェラキシーの誘導は抑制された。経口感作によって

CD103⁺CD4⁺T 細胞の割合が増加し、PP における CD4⁺T 細胞の活性化マーカーの発現した細胞の割合が増加した。しかしカロテノイド摂取を強化すると経口感作によって増加した CD103⁺CD4⁺T 細胞の割合が抑制された。Integrin CD103 は粘液部において発現が高いが、粘膜免疫の CD103⁺T 細胞の役割は理解されていない。

Weiner は経口寛容の主要なメカニズムによって、デリヒーション、アナジー、能動抑制などが調整されていると提唱している。この発見を踏まえ、今回の結果は Foxp3Treg 細胞の能動抑制を介したメカニズムよりも、アネルギー反応または感作された T 細胞のクローン除去反応などを介するメカニズムによって、カロテノイドの摂取による経口感作が抑制されていると示唆した。

β -カロテンのプロビタミン A 活性は α -カロテンのものよりも高い。それ故に、経口感作の抑制はプロビタミン A 活性よりも α -カロテノイド、 β -カロテノイドの抗酸化作用と関連していることが推察された。

母親の初乳中に高濃度の β -カロテンが含まれていることは知られているが、生理学的意義はいまだに判明していない。また、初乳に含まれる高濃度の β -カロテンによって、乳幼児の食物アレルギーの進行を妨げる働きがあると報告されている。Canfield の報告では、栄養状態の良い授乳中の母親への β -カロテンの単回経口投与により、投与 2~3 日後の血清・母乳中の β -カロテンが大幅に増加した。カロテノイドは乳幼児が必要とするレチノールを部分的に供給している。典型的な西洋型の食事をしてきた母親においては、食事由来カロテノイドの総レチノール摂取量の 2 分の 1 と同じになる。それゆえに、母乳と血清のレチノール濃度に対する食事由来のカロテノイドの生体内貢献は、栄養状

態の良い人々にとっても栄養学的に重要なものである。

近年のデータで、授乳中の母親の母乳に含まれるβ-カロテンのレベルは、およそ二十年前の日本のレベルよりも有意に減少していたと報告されている。(personal communication)この報告は、日本における食物アレルギー患者数の増加と関連しているかもしれない。一方、β-カロテンがレチノールの供給源になっていることや毒性があるということはあまり知られておらず、母親がα-カロテン・β-カロテンを多く摂取していた場合に母乳中のβ-カロテン濃度が高くなっているかどうか、また、彼らの子供らの食物アレルギー症状の発症を抑えているかどうかを評価することはとても重要である。

近年、α-カロテン、β-カロテンの摂取によって経口感作を抑制することが報告されており、アレルギーマーチと同様の食物アレルギーの進行を防ぐために用いることができるのではないかと考えられる。我々の発見は経口感作のメカニズム明らかにする可能性をもっている。さらに研究が進めば、食物アレルギーの進行の抑制と腸管免疫システムの制御の基本メカニズムを明らかにしてくる。授乳中の母親へのカロテノイドの補給によって、乳児への経口感作システムが強化されているのではないかと考えられており、これは高レベルのカロテノイドが初乳に含まれているという生理学的意義を明らかにする手がかりになるかもしれない。早期乳児期に母乳または高カロテノイドの摂取によって、食物アレルギーの進行とその後のアレルギーマーチの進行を妨げるのではないかと考えられる。さらに、カロテノイドの日常的な摂取は有効な粘液免疫システムをバランスのとれた状態に促進することが可能と期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① □ 穂山浩、食べ物にアレルギーに対する効果とは？、Q&Aでわかるアレルギー疾患、4、327-329、2008 査読の有無：無
- ② □ Shinobu Sakai, Hiroshi Akiyama, 他6人 (contributed equally)、Chondroitin sulfate intake inhibits the IgE-mediated allergic response by down-regulating Th2 responses in mice, Journal of Biological Chemistry, 281, 19872-19880, 2006. 査読の有無：有
- ③ □ Toshihiko Toida, Shinobu Sakai, Hiroshi Akiyama, and Robert J. Linhardt Immunological Activity of Chondroitin Sulfate, Advances in Pharmacology, 53, 403-415, 2006、査読の有無：有
- ④ □ Reiko Teshima, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, 他2名 Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W^v mice, Allergology International, 55, 43-48, 2006 査読の有無：有

[学会発表] (計3件)

- ① 発表者：Hiroshi Akiyama 発表標題：Dietary apple procyanidins inhibit the development of oral sensitization and food allergies 学会等名：The 3rd International Conference on Polyphenols and Health (ICPH 2007) 発表年月日：2007年11月26日、発表場所：京都
- ② 発表者：Hiroshi Akiyama、発表標題：Prevention of food allergy development by food factors 学会等名：The International Conference on Food Factors for Health Promotion (ICOFF2007) 発表年月日：2007年11月30日 発表場所：京都
- ③ 発表者：Hiroshi Akiyama、発表標題：Carotenoid intake inhibits the oral sensitization and development of food allergies. 学会等名：日本免疫毒性学会、発表年月日：2008年9月12日、発表場所：東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

穂山浩 (AKIYAMA HIROSHI)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・室長

研究者番号：18604011

(3) 連携研究者

小西良子 (KONISHI YOSHIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・部長

研究者番号：10155761