

ニッポンハム食の未来財団 平成 29 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	うるち米デンプンとアレルゲンの共摂食による経口免疫寛容誘導の検討
フリガナ	フジムラ タカシ
代表者名	藤村 孝志
所属機関（機関名） （役職名）	広島大学 大学院先端物質科学研究科 特任助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	2017 年度の発表実績なし

研究結果要約

食物アレルギーや花粉症をはじめとするアレルギー疾患は増加の一途を辿っており、深刻な社会問題となっている。アレルギー疾患の根治療法としてアレルゲン特異的免疫療法があげられるが、食物アレルギーでは効果が低くあまり実施されていない。本研究では、「低用量アレルゲンの予防投与により誘導される経口免疫寛容の効果がうるち米デンプン摂食により増強されるか？」を明らかにすることを目的とした。鶏卵白アルブミン（OVA）をモデルアレルゲンとして、食物アレルギーマウスにおける下痢症状を指標に治療効果を解析した。飼料中のコーンスターチをうるち米デンプンと全置換した餌を自由摂食させることで米デンプン投与を行い、低用量 OVA をゾンデにより予防投与した後、高用量 OVA の経口投与により下痢症状を誘導した。その結果、OVA を予防投与していない群では、米デンプン飼料、通常飼料のいずれにおいても 67%(4/6) が下痢症状を示したが、米デンプン飼料摂食下で低用量 OVA を予防投与した群では 67%が無症状であった。通常飼料摂食下で低用量 OVA を予防投与した群では 33%が無症状、50%が重度の下痢を示したことから、一部のマウスでは OVA の予防投与が逆に食物アレルギーの悪化に働いていると示唆された。以上の結果より、低用量アレルゲンの予防的投与により誘導される免疫療法の治療効果が米デンプンの共摂食により増強されることが示された。

研究目的

現在、食物アレルギーや花粉症をはじめとするアレルギー疾患は年々増加の一途を辿っており、

重要な社会問題となっている。本邦におけるアレルギー疾患増加のアウトブレイクは食・住環境の欧米化に伴うものと考えられており、アレルギー罹患者数は和食に必須である味噌や醤油に代表される発酵食品の消費量と逆相関している。すなわち、食の欧米化が日本人のアレルギー増加の一因と推測される。和食の中心である「うるち米」のアレルギー抑制能を解析する目的で、「うるち米デンプン含有飼料摂食マウスに低用量の鶏卵白アルブミン(OVA)を予防的に経口投与した群」では、「米デンプン飼料のみ」および「通常飼料で OVA を経口投与した群」と比較して OVA 点鼻後のくしゃみ回数の有意な減少が認められた。この結果は、うるち米が経口免疫療法の効果を増強しうることを示唆している。この結果より、米消費量が減少の一途を辿っている現在、パン食の増加及び米食離れにより、従来うるち米により誘導されてきた主菜・副菜に対する免疫寛容の誘導が行われなくなり、その結果、食物アレルギーが増加の一途を辿っているのではないかと考えた。

そこで本研究では、OVA をモデルアレルゲンとして、飼料中の炭素源をうるち米デンプンと全置換した餌を用いて、うるち米デンプンと低用量アレルゲンの共摂取により経口免疫寛容の効果が増強されるか？ うるち米による経口免疫寛容増強能を OVA による食物アレルギーモデルマウスを用いて明らかとし、経口免疫寛容誘導メカニズムの作用機序解明を行うことを目的とした。本研究の成果により、より効果的な食物アレルギーに対する経口免疫療法の実施が可能になると期待できる。

研究計画及び研究手法

要約—実験的食物アレルギーモデルマウスに、米デンプン含有飼料摂食下で低用量のアレルゲンを予防的に経口投与し、米デンプンによる経口免疫寛容増強効果を検証した。OVA をモデルアレルゲンとして、OVA 感作前に米デンプン飼料、陰性対象飼料の 2 群に分け、少量の OVA を予防的に経口投与した後、それぞれの群で OVA 特異的 IgE 抗体を誘導後、高用量の OVA を経口投与し下痢を誘導した。米デンプン含有飼料と低用量 OVA の予防投与により OVA 特異的経口免疫寛容が誘導され、下痢およびアレルギー因子の産生が抑制されるか検討した。

餌—通常飼料は炭素源としてコーンスターチが用いられている。コーンスターチの全量をうるち米デンプンに置換した「米デンプン飼料」を作成し、マウスに自由摂食させた。コーンスターチも米デンプンとは粒径が異なるアミロース構造を有するため、アミロース構造を含まない寒天を用いた陰性対象飼料を使用する計画であったが、コーンスターチを寒天に全置換した飼料は造粒が困難であり作成できなかったため、通常飼料を陰性対象として使用した。

経口免疫寛容誘導—マウス購入後すぐに、うるち米デンプン飼料、陰性対象飼料の自由摂食を開始

し、うるち米デンプン飼料投与の2週間後から1日おきに5 μ g OVAを含む生理食塩水100 μ lをゾンデにて経口投与した。小用量OVAの投与から1週間後にOVAの全身免疫を開始しOVA特異的IgE抗体産生を誘導した。全身免疫後、50 mg OVAを含む生理食塩水100 μ lをゾンデにより経口投与し、アレルギー性の下痢を誘導した(図1A, B)。

マウスの全身感作—野生型のBALB/cマウスをセボフルラン麻酔下において後背部の毛をそり、3日に1度、6回テープストリッピングを行い表皮バリアを損傷させた後に、100 μ gのOVAを含む生理食塩水を染み込ませたガーゼを貼付・テープ固定することにより経皮感作を行った。マウスのストレス軽減のために6日の経皮投与の後5日間のインターバルを設置し、経皮感作を繰り返した¹⁾(図1A)。また、同様に野生型のBALB/cマウスに5 μ gのOVAを免疫賦活剤であるアラム2 mgと共に腹腔内投与し、その2週間後に5 μ gのOVAを後背部に皮下投与することでOVA特異的IgE抗体産生を誘導した²⁾(図1B)。

図1

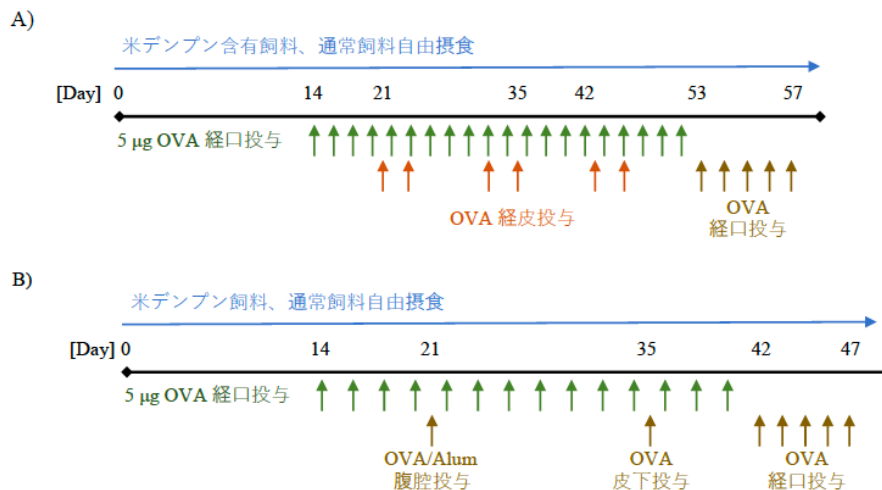


図1. 実験スケジュール。A) OVA 経皮感作による全身免疫スケジュール。
 B) OVA と alum 共投与による全身免疫スケジュール。

下痢症状の評価—50 mg OVA をゾンデを用いて5日連続でマウスに経口投与した後、最後の経口投与から1時間後に下痢症状の数値化を行った。下痢症状のスコアとして0: 通常便 (normal stools)、1: 少数の湿便および不形成便 (a few wet and unformed stools)、2: 肛門周りの汚れを伴う軟便もしくは水様便 (a numbers of wet and unformed stools with moderate perianal staining of the coat)、3: 肛門周りのひどい汚れを伴う水様便 (severe and water stools with severe perianal staining of the coat) を採用した³⁾。

細胞培養—OVA 最終経口投与の翌日マウスを安楽死させ、脾臓細胞を分離し5 μ g/ml のOVA存在

下で3日間細胞培養後、脾細胞の増殖活性と培養上清中のサイトカイン産生量をELISAにより解析した。抑制性サイトカインであるIL10とTh1サイトカインであるIFN- γ 産生量に群間で差が認められなかったことから、細胞レベルでの解析は今回行わなかった。

結果と考察

近年、幼少期における皮膚を介した食物アレルギー感作により、血中に食物アレルギー特異的IgE抗体が誘導され、その結果食物アレルギーが誘導されると考えられてきている。皮膚感作によるアレルギー感作誘発の危険性は、本邦において「小麦加水分解物を含む美容石鹸」使用者が相次いで小麦アレルギーを発症したことから急速に認識が高まった⁴⁾。現在、マウスの食物アレルギー研究においても、従来型のアジュバントを用いたアレルギー腹腔投与アレルギーモデルよりも、アジュバント非存在下で経皮感作によるアレルギーモデルの方がヒトの食物アレルギーの病態を、より反映していると考えられるようになってきている。そこで、本申請試験においてもまず皮膚感作による食物アレルギーモデルの構築を試みた。

既に報告されている皮膚感作型食物アレルギーモデル構築の報告を参考として食物アレルギーモデルの構築を下痢症状の発現を指標に行った。参考とした論文と同じ条件では野生型のBALB/cマウスに下痢症状を誘導できなかったため、皮膚感作時の投与アレルギー量、皮膚感作パッチの貼付け日数と投与間隔、皮膚感作の回数の条件を変えて検討を行った結果、図1Aに示す様に3日間のOVA皮膚感作2回を1セットとして行い、5日間のインターバルを挟んで、合計3セットのOVA皮膚感作後に50mgのOVAを経口感作することにより、最終経口投与の1時間後に下痢症状の発現を確認できた。しかしながら、本実験系においてOVA投与後の下痢症状は確認できたものの、血中のOVA特異的IgE抗体価並びにOVA特異的IgG抗体価は、参考論文¹⁾²⁾並びに従来の腹腔投与型のアレルギーマウスと比較して非常に低値であった。さらに、脾臓及び腸間膜リンパ球をOVAで刺激後のアレルギー炎症関連サイトカイン(Th2型サイトカイン及び炎症性サイトカイン)産生量も非常に低値であるか検出限界以下であった。本実験系において、米デンプン含有飼料摂食及び低用量OVAの予防投与による下痢症状の軽減能を解析したが、誘導されている全身免疫が弱いためか、下痢症状、OVA特異的血清抗体価、脾細胞からのサイトカイン産生に試験群間の顕著な差は認められなかった。そこで、従来型のアジュバントを使用した腹腔内投与モデル系を用いて検討を行った。

OVA腹腔投与の系においてもOVAの経口投与により下痢症状を誘発できるか確認する目的で、OVAをアラムとともに腹腔内投与後、OVAを皮下投与してOVA特異的IgE抗体を誘導し、その後、高用量OVAの経口投与を行った。下痢を誘導するOVAの経口投与量を検討した結果、5mg以下のOVA経口投与では下痢は誘導できず、経皮感作の系と同様に50mgのOVA投与でし

か下痢症状を誘発できなかった。高用量 OVA 経口投与の前後で OVA 特異的 IgE 抗体価の上昇は認められなかったが、OVA 特異的 IgG 抗体価の有意な上昇を認めた。そこで、米デンプン飼料摂取が小用量 OVA の予防投与によるアレルギー症状の緩和を増強するか？解析する目的で、野生型 BALB/c マウスを米デンプン飼料摂取群と通常飼料摂取群に分け、飼料交換から 2 週間後に各群で低用量 OVA を予防投与する群と陰性対象としての生理食塩水を予防投与する群に分け 1 日おきに経口投与を行った (図 1B)。経口投与の 1 週間後に OVA をアラムと共に腹腔内投与し、その 2 週間後に OVA を皮下投与し OVA 特異的 IgE 抗体産生を誘導し、その 1 週間後から毎日 50 mg の OVA を 5 日間連続して経口投与を行い、経口投与最終日の経口投与 1 時間後の下痢症状と大腸内の糞便の状態を解析することで米デンプン飼料の免疫寛容増強能を評価した。

腸内の糞便状態は低用量 OVA を予防投与した群では固形状の糞便が残っている個体が多かったのに対し、低用量 OVA を予防投与していない群では餌の種類にかかわらず、液状便か下痢により大腸内に固形便を有していない個体が多かった(図 2A)。低用量 OVA を投与した通常餌摂取群では大腸内に軟便が確認でき、軟便を示した個体は低用量 OVA を予防投与した米デンプン飼料群よりも多かった。一方で、下痢症状スコアは OVA を予防投与していない群では、米デンプン含有飼料、通常飼料のいずれにおいても 67% (4/6)が下痢症状を示したが、米デンプン飼料と低用量 OVA を投与した群では 67%が無症状であった。通常飼料と低用量 OVA を摂取した群では 33%が無症状、50%が重度の下痢を示したことから、通常飼料の一部のマウスでは低用量 OVA の予防投与が逆に食物アレルギーの悪化に働いていることが示唆された (図 2B)。以上のことから、米デンプン含有飼料が低用量 OVA の予防投与による経口免疫寛容誘導の効果を増強すると結論した。一方で、米デンプン飼料と低用量 OVA の予防投与により Th2 応答を抑制する Th1 応答もしくは免疫応答を抑制する抑制性 T 細胞応答が誘導されると期待していたが、脾臓細胞を OVA 刺激後の抗原特異的細胞増殖活性及び培養上清中のサイトカイン産生量を解析した結果、脾細胞増殖活性および、T 細胞増殖と T 細胞無応答 (アナジー) の誘導に重要な役割を果たす IL2、Th1 サイトカインである IFN- γ 、抑制性 T 細胞誘導の指標である IL10 産生量に群間で有意な差はなく、Th2 サイトカインである IL5 と IL13 の産生量にも差は認められなかった (表 1)。また、炎症性サイトカインである IL17 産生量にも群間で違いは認められなかった。以上の結果から、米デンプン含有飼料と低用量 OVA の予防投与は、全身免疫の変調を伴わずに食物アレルギーによる下痢症状を抑制していると示唆された。

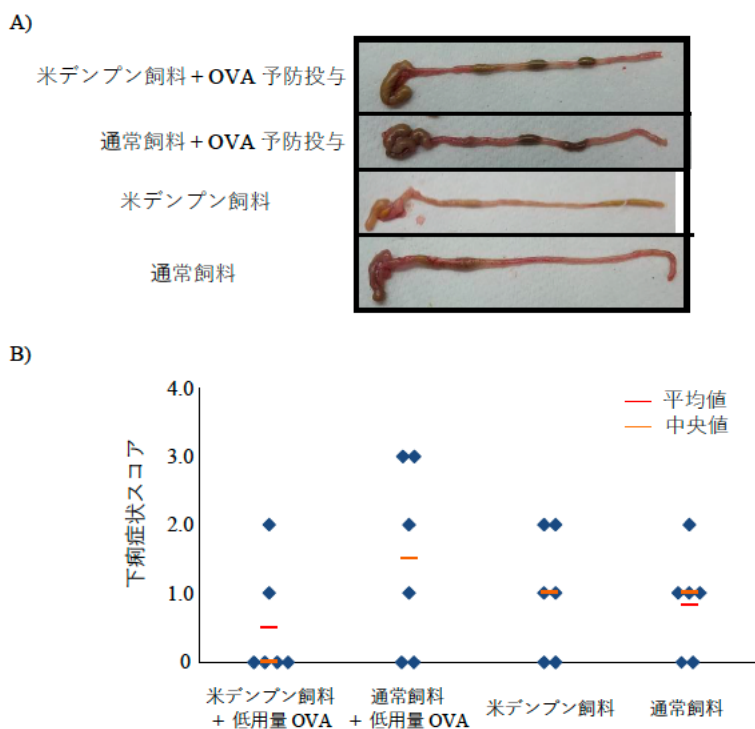
抗ヒストン H1 抗体の経鼻投与および赤シソ由来の食品因子であるメトキシフラバノンの経口投与は、全身免疫の変調を介さずにアレルギー性鼻炎症状を軽減し、これらの物質は炎症局所における肥満細胞の脱顆粒を直接的に抑制すると報告されている⁵⁾⁶⁾。今回構築した実験系においても米デンプン由来のアルファグルカンもしくはその代謝物が、低用量の OVA と協調的に腸管でのマ

スト細胞の活性化と脱顆粒を直接抑制している可能性が考えられる。本可能性については、受動的アナフィラキシー反応 (PCA) 誘導モデルを用いて、米デンプン含有飼料と PCA アレルゲンの予防的共投与により PCA による肥満細胞依存的炎症を抑制しうるか？ 米デンプン飼料摂取による症状の軽減効果は抗原特異的か？について今後調べる必要がある。

本申請期間中に「経皮感作により血清中の OVA 特異的 IgE 抗体価の上昇を伴って下痢症状を呈する食物アレルギーモデル」の構築は達成できなかった。現在、経皮感作による食物アレルギーマウスモデル作成の実績を有するハーバード大学の研究室と技術交流を開始しており、彼らの実験方法とノウハウを取り入れた後に、経皮感作食物アレルギーモデルにおける米デンプン含有飼料と低用量 OVA の予防投与による食物アレルギー炎症抑制増強効果を再解析する予定である。経皮感作食物アレルギーモデルにおいても下痢症状の抑制が観察されれば、脾臓及び腸間膜リンパ節の免疫細胞を OVA 刺激後の各種サイトカイン産生量と抑制性 T 細胞の活性化を解析し、従来型の腹腔投与モデルと比較して学会発表、またアレルギー専門誌もしくは食品系の学術雑誌に研究成果を発表したいと考えている。

以上のことから、本助成研究により、うるち米デンプン摂取が低用量アレルゲンの予防投与により誘導される経口免疫寛容誘導能を増強し、食物アレルギーの主調である下痢症状を抑制することが明らかとなった。

図 2



OVA 経口投与 5 日目の下痢症状。 A) OVA 投与 1 時間後の大腸と腸内滞留物 (糞便) の各群代表例。 B) 各群の個々のマウスの下痢症状スコア (N=6)。 赤線が群内の平均値、オレンジ線が中央値を示す。

表 1 各群のサイトカイン産生量

	Proliferation	IL2 [pg/ml]	IL5 [pg/ml]	IL10 [pg/ml]	IFN- γ [pg/ml]
米デンプン飼料 + OVA	1.08 \pm 0.22	119.4 \pm 63.4	17.5 \pm 16.7	97.5 \pm 86.7	725.7 \pm 474.6
通常飼料 + OVA	1.10 \pm 0.25	121.5 \pm 35.8	4.4 \pm 6.6	173.8 \pm 153.4	1252.5 \pm 915.9
米デンプン飼料	0.85 \pm 0.10	128.5 \pm 35.0	16.9 \pm 27.3	271.2 \pm 216.8	476.0 \pm 356.7
通常食	0.81 \pm 0.14	154.0 \pm 37.3	3.6 \pm 5.5	172.1 \pm 102.2	927.8 \pm 574.8

脾細胞をOVA存在下で3日間 *in vitro* 刺激後の脾細胞増殖活性および培養上清中のIL2、IL5、IL10、およびIFN- γ 産生量 (N=6)。 平均値 \pm 標準偏差を示す。

今後の研究活動について

本助成研究により、米デンプン摂食下での低用量アレルゲンの予防投与により食物アレルギーによる下痢症状を緩和できることが明らかとなった。 残念ながら本助成期間中に、ヒトの食物アレルギーに近いと考えられている経皮感作によるIgE依存的食物アレルギーモデルを構築できなかった。 現在、経皮感作によるIgE依存的食物アレルギーモデル作成に実績のあるハーバード大学の研究室と技術交流を開始しており、引き続き経皮感作モデルにおける米デンプンの免疫寛容誘導増強能について研究を継続する予定である。 一方で、米デンプンに特徴的なアミロース構造を含まない炭素源を含む陰性対象餌を使用した試験が必要であるが、炭素源にアミロース構造を含まない寒天を使用した飼料は造粒が困難であり作成できない為、寒天以外のアミロース構造を含まない炭素源の探索並びに陰性対象飼料の作成法について検討する必要がある。

今回、最終的には従来型のアラムを用いたアレルゲン腹腔内投与によるアレルギーモデルを採用した。 経皮感作食物アレルギーモデルを構築後、経皮感作モデルを用いて脾臓及び腸間膜リンパ節の免疫細胞の抗原特異的反応性、ならびに腸管組織の肥満細胞の活性化を解析することでうるち米デンプンと低用量アレルゲンによる経口免疫増強作用機序を明らかにできると期待している。 引き続き経皮感作モデルの構築を行い、本助成研究の結果をもとに、米デンプンと低用量OVAの予防投与により誘導される腸管免疫の変調について解析を進める予定である。

参考文献

- 1) Galand C, Leyva-Castillo JM, Yoon J, et al. IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Nov;138(5):1356-66.
- 2) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(11):1666-77.
- 3) Kurita A, Kado S, Kaneda N, et al. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;46(3):211-20.
- 4) Yagami A, Aihara M, Ikezawa Z, et al. Outbreak of immediate-type hydrolyzed wheat

protein allergy due to a facial soap in Japan. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Sep;140(3):879-881.

- 5) Nakano T, Kamei R, Fujimura T, et al. Impact of Histone H1 on the Progression of Allergic Rhinitis and Its Suppression by Neutralizing Antibody in Mice. *PLoS One.* 2016 Apr 18;11(4):e0153630.
- 6) Kamei R, Fujimura T, Matsuda M, et al. A flavanone derivative from the Asian medicinal herb (*Perilla frutescens*) potently suppresses IgE-mediated immediate hypersensitivity reactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 29;483(1):674-679

以上