

研究課題名	経皮感作による甲殻類アレルギーモデル動物の作成とプレバイオティクス投与による予防効果の解析		
フリガナ	ツネヤマ コウイチ		
代表者名	常山 幸一		
所属機関 (機関名) (役職名)	徳島大学 大学院 医歯薬学研究部 疾患病理学分野 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	市村 真祐子	徳島大学・助教	動物モデル作成
	菊池 健太郎	帝京大学・准教授	免疫動態解析
	守時 由起	秋田大学・特任講師	生化学的検査
	平 修	福島大学・教授	イメージング
本助成金による発表論文, 学会発表	英文論文準備中 学会報告予定 (2020 日本病理学会総会、2020 Digestive disease week, USA)		

研究結果要約

生活環境の変化に伴い食物アレルギー患者は増加傾向にある。アナフィラキシーで死に至るような重篤例から口腔不快感にとどまるものまで症状は個人差が大きいですが、総じて患者や家族の QOL を大きく損なっている。近年、食物アレルギーがアレルゲンの皮膚への曝露によって誘導されるという経皮感作説が注目されている。我々は、成人の食物アレルギーで過半数を占めるとされる甲殻類アレルギーに注目し、主要アレルゲンであるエビトポミオシン (rMet e1) の経皮感作による新規モデルマウスの開発に取り組んだ。まず、従来の経口負荷と同量の rMet e1 を経皮的に継続的に塗布したところ、経口負荷よりも血中 IgE 値が上昇することがわかった。次に、rMet e1 塗布時に皮膚のバリア機能を障害する操作を追加することで、皮膚局所に好酸球浸潤を伴う炎症が惹起され、血中 IgE 値が無処置よりも上昇することを明らかにした。なかでも、市販の皮膚塗り薬とともに rMet e1 塗布した際の IgE 値上昇が顕著であり、経口抗原曝露では軽度のアナフィラキシー症状を呈した。このことから、皮膚を保護する目的で使用した外用薬がかえって抗原の皮膚からの取り込みを促進している可能性が推測された。次に、新規モデルマウスにフラクトオリゴ糖を投与し、アレルギー状態が軽減するかどうかを検討した。フラクトオリゴ糖投与群では IgE 値の上昇が抑制されており、腸内細菌叢を改善することでアレルギー状態が軽減する可能性が示された。

研究目的

生活環境の変化に伴い食物アレルギー患者は増加傾向にある。小児の食物アレルギーは成長とともに軽快することも多いが、成人で発症する食物アレルギーは難治性であり、QOLを大きく損なう要因となっている。成人の場合は対象物を避けるなどの対応がしやすく、患者総数などの実態がなかなか表面化していないが、形を変えた食事を誤って摂取してアナフィラキシーに陥るなどの重篤例も報告されており、その対策が望まれている。成人の食物アレルギー患者の上位を占めているのはエビ、カニ、イカなどの甲殻類アレルギーであり、そのアレルゲンとしてトロポミオシンが同定された。我々はアメリカや香港の研究者と共同でエビトロポミオシンで経口感作したモデル動物を作成し、種々の解析を行ってきたが、コレラトキシンによるアジュバントを用いるなど実際のヒトの患者とは発症機序に相違があるモデルであった。

近年アレルゲンに対する感作が腸管ではなく皮膚で起こっているとの仮説が提唱された。経口免疫寛容が皮膚からの曝露では生じないため、経皮感作ではより強い免疫反応が惹起され、食物アレルギー発症のトリガーとなっている可能性が推測される。経皮感作食物アレルギーモデル動物は未だ数が少ないことから、本研究では、トロポミオシンの経皮感作モデル動物の確立を第一の目的とした。さらに、確立されたモデル動物を用いて、皮膚局所の免疫学的な変化や成体内輸送経路について検証するとともに、プレバイオティクスによる食物アレルギーの予防とそのメカニズムの解明に取り組んだ。

成人型食物アレルギーの半数以上を占める甲殻類アレルギーの経皮感作モデル動物は未だ確立さ

れておらず、モデル動物の確立は研究の推進に非常に有用である。さらに、経皮感作の程度を皮膚の状態から検討することで、皮膚が置かれた環境がアレルゲンへの感作にどのような役割を果たしているかを知る手がかりとなり、成人の経皮感作の予防に繋がる情報が得られると期待される。また、医療行為の対象になりにくい食物アレルギーを、プレバイオティクスという食によって軽快できれば、潜在的な食物アレルギー患者にも取り入れやすい容易な方法となり、QOLの改善に寄与することができる。これらの取り組みは、食の問題を食で解決する画期的なものであり、その意義は大きいと考えられる。

研究計画及び研究手法

予備実験：

エビアレルゲン（トロポミオシン）の作製

エビアレルゲンであるトロポミオシン（rMet e1）は MTA を締結し、Chinese University of Hong Kong の Wai 博士に供与頂いた。そのタンパク質は遺伝子組換えによって E.coli に発現させ、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーで精製したものである¹⁾。それらの濃度および純度は BCA protein assay (Thermo Fisher)を用いたタンパク質の定量および SDS-PAGE によって確認した（図1）。

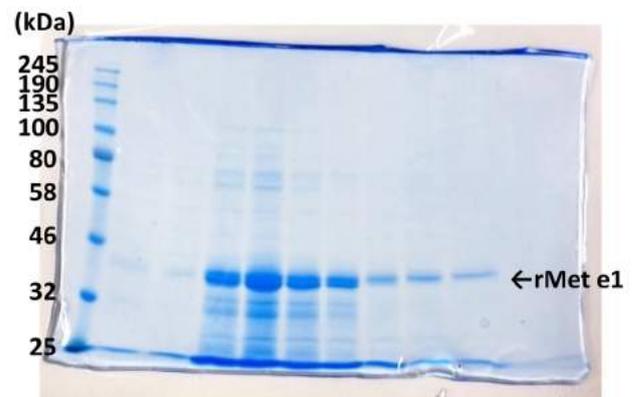


図1

実験 1 :

経皮感作による食物アレルギーモデルと同時に従来の経口感作によるモデル¹⁾も作成して比較検証した (図 2)。

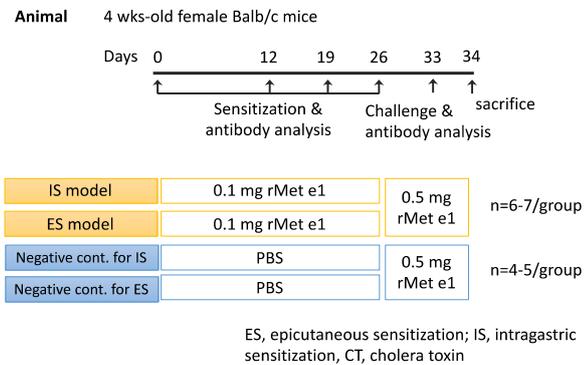


図 2 Experimental design Expt.1

4 週齢雌性 Balb/c マウスを経口感作 (IS) 群、経皮感作 (ES) 群、およびそれらのコントロール群の 4 群に分けた。IS 群には胃ゾンデで rMet e1 0.1mg を投与し、ES 群には背中 of 皮膚に rMet e1 0.1mg を塗布した。皮膚バリアの破壊には tape-stripping 法を用いた。各コントロール群には rMet e1 の代わりに PBS を用いた。感作は実験開始後 0、12、19、26 日目に行い、感作の 24 時間後に採血した。最後の感作から 1 週間後に rMet e1 を胃ゾンデで経口負荷をした。経口負荷後、1 時間の間、基準に従ってアナフィラキシーおよび糞便を観察した (表 1、2)。経口負荷の翌日に解剖し、血液および臓器を採取した。

表 1 アナフィラキシーのスコアリングシステム

Grade	Symptoms
0	no symptoms
1	scratching and rubbing
2	puffiness around eyes or reduced activity
3	labored respiration
4	no activity after prodding, tremor and convulsion
5	death

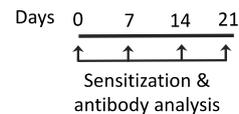
表 2 糞便形状の分類

Grade	Symptoms
0	hard feces
1	soft feces
2	liquid feces
3	white, mucus-like feces
>= 2	diarrhea

実験 2 :

感作によって産生されるトロポミオシン特異的 IgE の増加を目的とし、皮膚バリアの破壊方法 (tape-stripping 法、SDS 塗布法、抗生物質塗布法) を比較検討した (図 3)。マウスおよび感作に用いた rMet e1 は実験 1 と同様である。感作は実験開始後 0、7、14、21 日目に実施した。

Animal 4 wks-old female Balb/c mice



Non-sense	PBS	n=1
Tape-stripping	0.1 mg rMet e1	n=4
SDS	0.1 mg rMet e1	n=3
Oxytetracyclin	0.1 mg rMet e1	n=4

図 3 Experimental design Expt.2

実験 3 :

プレバイオティクスによる食物アレルギーの予防効果を評価した。マウスおよび感作、経口負荷のスケジュールは実験 1 と同様である。プレバイオティクスにはフラクトオリゴ糖 (FOS) を用い、5% 添加した飼料を自由摂取させた (図 4)。

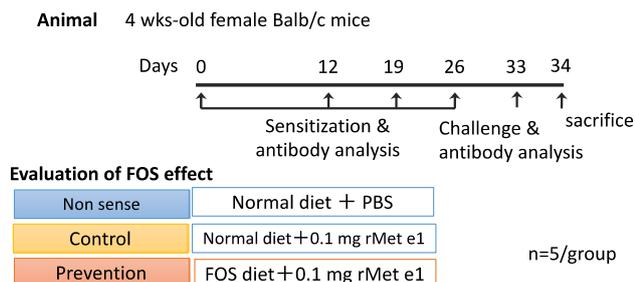


図4 Experimental design Expt. 3

各実験における検索項目

1) 血中トロポミオシン特異的 IgE の測定

実験 1 – 3 の全ての検体について、血中トロポミオシン特異的 IgE 値を文献 1 に準じ、ELISA 法により測定した。

2) 組織学的評価

実験 1 – 3 の全ての検体について、解剖時に採取した臓器はすべて 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋、薄切後、HE 染色、特殊染色および免疫染色を行った。また、アレルギー曝露部位の皮膚については凍結標本を作成し、rMet e1 のイメージング質量分析や、樹状細胞等のマーカーの免疫染色を試みた。

3) サイトカイン解析 (解析中)

実験 1 – 3 で組織学的に顕著な変化を示した個体を選択し、腸に発現するサイトカイン等を Real time-PCR 法によって現在解析を行っている。

4) 短鎖脂肪酸 (SCFA) 解析 (解析中)

立命館大学の井之上、長友らは最近、2-ピコリルアミンの簡単な誘導體化を伴う高感度超高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析

(UHPLC-MS/MS) を用いて、酢酸 (AA)、プロピオン酸、酪酸 (BA)、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、カプロン酸、4-メチル吉草酸およびコハク酸 (SA) などの短鎖脂肪酸 (SCFA) の同時定量を行う方法を確立した^{2,3,4)}。実験 1 – 3 で組織学的に顕著な変化を示した個体を選択し各個体より 25µl の血清を採取し、凍結保存の上で同法による SCFA 網羅的同時測定を検討中である。

結果と考察

実験 1 :

感作 3 回目 (19 日目) で血中トロポミオシン特異的 IgE が増加し、IS 群より ES 群が高値を示す傾向にあった (図 5)。

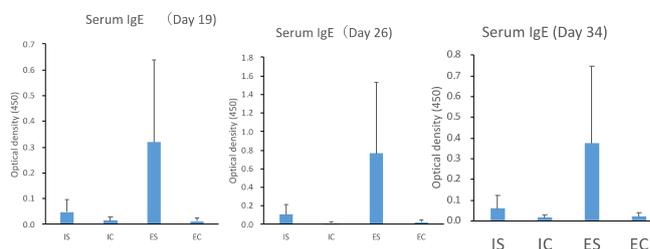
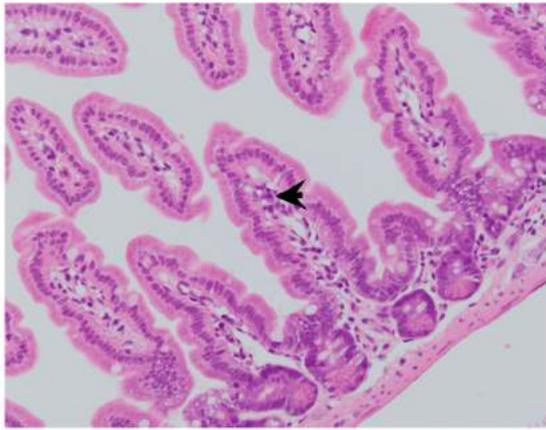


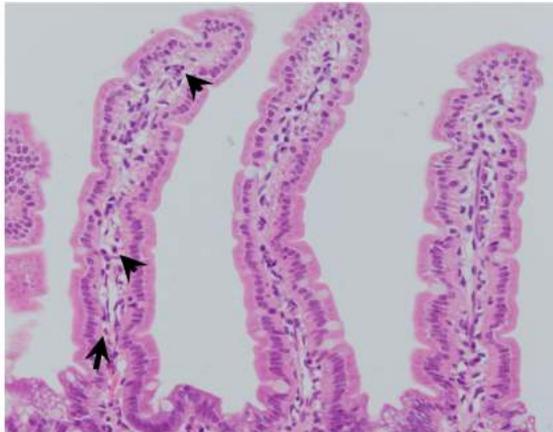
図5 Shrimp Tropomyosin-Specific IgE

経口負荷後、アナフィラキシー等のアレルギー反応は IS 群、ES 群ともにみられなかった。組織学的には腸管および肝臓において各群で有意な差はみられなかった (図 6 – 8)。従来の経口感作モデルでは、コレラトキシンを併用することで腸内環境を破壊して抗原曝露を促進していたが、今回はコレラトキシンを使用せず、同量のアレルゲンを経腸管経路と経皮経路で曝露している。実験 1 の結果からは、正常に近い腸内環境の際には、経皮的な感作のほうが生じやすい可能性を示していると考えられた。



ES group:

図6 Plasma cells in Jejunum



ES group:

図7 Neutrophils and eosinophils in Jejunum

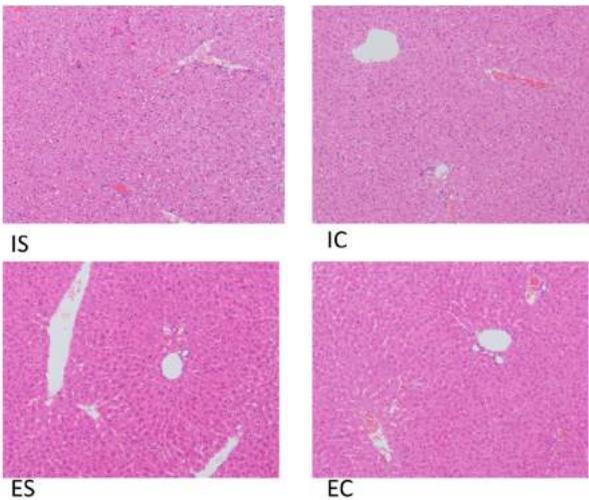


図8 No differences in liver among groups.

実験 2 :

感作 3 回目 (14 日目) で血中トロポミオン特異的 IgE が増加し、そのレベルは **tape-stripping** 法に比べて **SDS** および抗生物質塗布法の方が高い傾向を示した (図 9)。

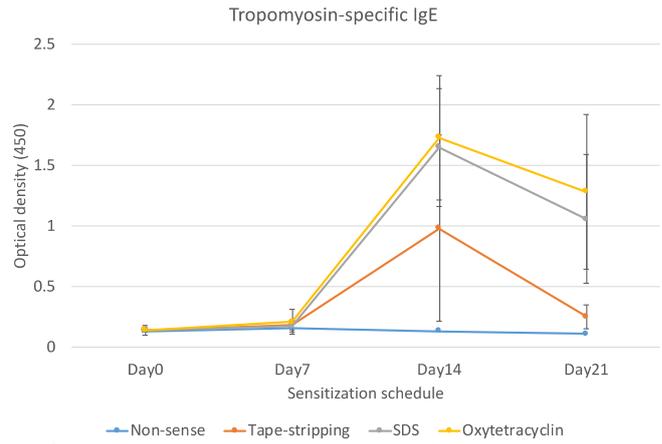


図9

また、本実験による **SDS**、及び抗生物質塗布群では、経口負荷後に、実験 1 ではみられなかったアナフィラキシー反応が軽度にも観察された。

次に、抗生物質塗布法の皮膚を **Day 21** に採取し、組織像をホルマリン固定標本、及び凍結標本で解析した。ホルマリン固定標本において、**HE** 染色では浅層から皮下の筋肉内に至るまで炎症細胞浸潤が軽度に認められた。核が分葉した細胞が多く、ルナ染色では細胞質が好酸性を示し、好酸球浸潤と考えられた (図 10)。

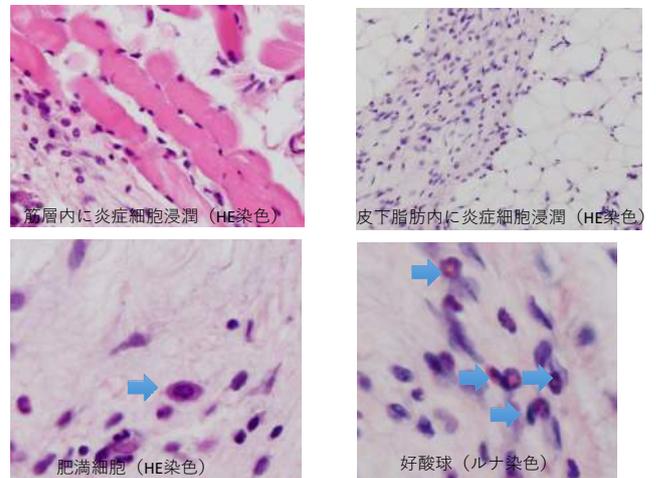


図10 抗生物質塗布法によるアレルギー塗布部

その他、肥満細胞も散見され、アレルギー曝露部位で炎症反応が生じていると考えられた。次に、同部の凍結標本を用いて CD207, CD103 の免疫染色で樹状細胞の同定を、及びイメージング質量分析(福島大・平教授に依頼)による rMet e1 の局在解析を試みた。しかしながら、皮膚の凍結標本は膠原線維の変性が強く、挫滅によって細胞成分が離開し、十分な解析ができなかった。現在、ホルマリン固定標本を用いたイメージング質量分析により、rMet e1 の局在解析を検討中である。

Tape-stripping 法も SDS 塗布も、皮膚のバリア機能を機械的に破壊する方法としてすでに報告された手法である。一方、抗生剤塗布法は我々のオリジナルであり、機械的破壊なしに皮膚のバリア機構が破綻しうる可能性を示す結果となった。その機序としては、皮膚の表在菌叢の減少や消失が関与している可能性が考えられる。現代人は日焼け止めや皮膚の保護を目的に様々な薬剤を皮膚に使用しているが、それら皮膚を保護する目的で使用している薬剤が、アレルギーの皮膚からの感作を促進している可能性は否定できない。今後は抗生物質に加え、ハンドクリームや日焼け止めなど様々な皮膚に関する薬剤による抗原曝露の増強の可能性を検証する予定である。

実験 3 :

感作 2 回目 (12 日目) で血中トロポミオシン特異的 IgE が増加し、そのレベルは Normal diet 群と FOS diet 群では同等であった。しかし、感作 3 回目 (19 日目)、および感作 4 回目 (26 日目) には血中トロポミオシン特異的 IgE は Normal

diet 群に比べて FOS diet 群で低値を示す傾向がみられた (図 1 1)。

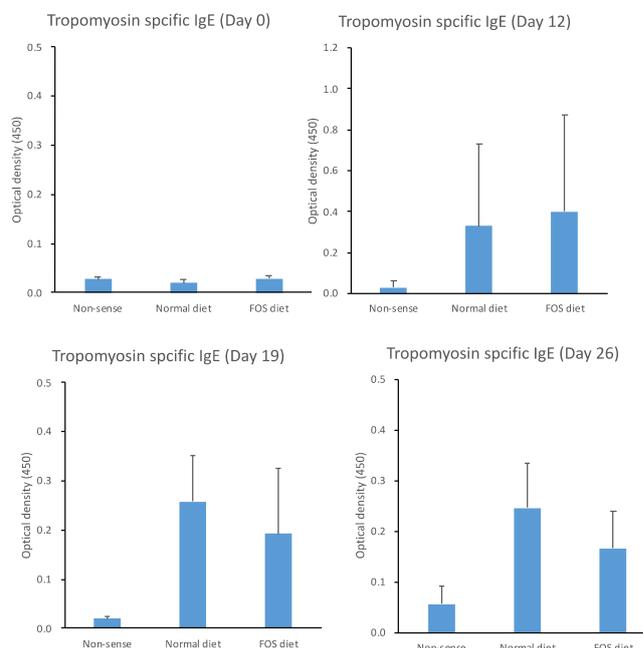


図 1 1

現在、腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸(SCFA)の解析を施行中である。今回の結果から、腸内細菌叢への介入によって、食物アレルギーの病態が軽快する可能性が示された。今後は、フラクトオリゴ糖のみならず、他のオリゴ糖群を検証する予定である。また、短鎖脂肪酸の変化が見られた群については、腸内細菌叢の次世代シーケンスを用いた解析を追加する予定である。

残された課題

現時点で結果が出ていない項目(サイトカイン測定や短鎖脂肪酸解析など)については、可能な限り早い段階で検討を行い、作用機序についての考察を行う。また、より広範な介入実験を計画し、食による食物アレルギーの予防・治療の実現を目指す。

学会発表・論文作成の予定

本研究内容は、サイトカイン解析や短鎖脂肪酸解析の結果が揃った時点で、国内外の学会での発表や英文論文作成を計画している。具体的には、2020年の日本病理学会総会、及び2020年の米国消化器病週間（DDW）での発表を予定している。

今後の研究活動について

本研究で、成人型食物アレルギーモデルの過半数を占める甲殻類アレルギーモデルマウスを経皮的に作成することに成功した。また、腸内細菌叢への介入によって、食物アレルギーの症状が軽快する可能性が示された。食物アレルギーは程度の差こそあれ、患者のQOLを大きく損なう疾患であるが、その治療法は未だ確立されていない。成人の場合は病院にも行かず、個人で対応しているケースも多く、容易に取り入れられる食による病態改善法の確立は多くの患者にとって福音となると考えられる。本検討ではプレバイオティクスによる介入を試みたが、プレバイオティクスにも、様々な種類があり、ガラクトオリゴ糖や乳菓オリゴ糖、コーヒーオリゴ糖など他のオリゴ糖類の検討も必要と考えられる。さらに、乳酸菌などの有用な菌叢の摂取とオリゴ糖の摂取を組み合わせた、シンバイオティクスの本モデル動物への応用も重要なトライアルになると考えられる。さらに、漢方薬や天然薬物、サプリメントなど、食に近く安価に長期間摂取が可能な候補物質の有用性を検証することも重要な課題である。

また、経皮感作の成立には皮膚のバリア機構の

破綻があり、その要因として皮膚に使用している様々な薬剤が悪影響を与えている可能性が示唆される。皮膚を強くすることで、皮膚からの感作の成立が抑制される可能性もあり、食物アレルギーを皮膚を標的に予防する試みも必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Leung PS, Lee YS, Tang CY, Kung WY, Chuang YH, Chiang BL, Fung MC, Chu KH. Induction of shrimp tropomyosin-specific hypersensitivity in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147(4):305-14.
- 2) Nishitsuji K, Watanabe S, Xiao J, Nagatomo R, Ogawa H, Tsunematsu T, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K. Effect of coffee or coffee components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep.* 2018 Nov 1;8(1):16173.
- 3) Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep.* 2017 Nov 20;7(1):15876.
- 4) Nagatomo R, Okada Y, Ichimura M,

Tsuneyama K, Inoue K. Application of Short-chain Fatty Acids in Feces Samples. Anal
2-Picolylamine Derivatized Ultra-high Sci. 2018 Sep 10;34(9):1031-1036.
Performance Liquid Chromatography Tandem
Mass Spectrometry for the Determination of