

《原著》

経口免疫療法に効果的な食品摂取方法の探索

山田千佳子* 小瀬木一真* 和泉 秀彦*

要旨

食物アレルギーの治療法として注目を集めている免疫療法を評価するための動物モデル(マウス)を作製し、このマウスを用いて、免疫療法の効果を高めるアレルゲンの投与方法を検討することを目的とした。卵白アレルゲンの一つであるリゾチームに感作させたマウスに、量の異なるリゾチーム、他の食品成分とリゾチームの混合物、化学修飾したリゾチームを経口投与し、免疫療法に対する効果を解析した。その結果、リゾチームの投与量によって、免疫療法後の免疫応答に差がみられた。また、デキストランとリゾチームを混合投与した場合、およびリゾチームにグルコースによる化学修飾を施した場合には、投与後の免疫応答がリゾチームのみ投与した場合とは異なり、特にデキストランとの混合投与は治療効果が高まる傾向がみられた。以上の結果から、免疫療法に用いられるアレルゲンは、他の食品成分との混合や他の食品成分による化学修飾によってその治療効果が変化することが明らかとなり、投与方法を改善することでより効果的な治療が出来る可能性が示唆された。また、その評価に、このモデルマウスが有効であると考えられた。

キーワード：食物アレルギー、経口免疫療法、リゾチーム、アナフィラキシーショック、アミノ-カルボニル反応

はじめに

食物アレルギーの治療法の一つである経口免疫療法は、最終的にはその食品を食べられるようになるという点で、大変有効な食物アレルギーの治療法だと考えられる。経口免疫療法とは、患者が医師の管理の下で原因食品を少量ずつ摂取し、症状が現れれば薬でそれを抑えながら徐々に摂取量を増やしていき、これを通常の食事が問題なく食べられるところまで続ける治療法である¹⁾。そのため、患者には不安や苦痛に加えて経済的または時間的な負担がともなう。したがって、治療に用いる食品(アレルゲン)には免疫応答を効果的に改善し、苦痛が少なく、かつ短期間で済むような工夫が望まれる。ところが現在のところ、治療に用いる食

品についてあまり関心が払われておらず、加熱などの簡単な加工を施しただけのものが使用されているため、患者は薬のように治療食を食べなければならない。また、医師によって投与量や投与期間が異なっており、患者への効果も様々であることから、確立された治療法とは言い難いのが現状である。

一方、食品は大抵様々な加工を施してから食すことが多いため、その過程で他の食品成分と相互作用をする。その結果、食品中のアレルゲンは抗原性が変化し、元の状態よりも免疫療法の効果を高める可能性が期待される。食品成分の相互作用とアレルゲンの消化・吸収および抗原性の変化に関するこれまでの研究では、大豆アレルゲンとコーンオイルを同時摂取すると大豆アレルゲンの吸収量が増加するとの報

*名古屋学芸大学大学院栄養科学研究科

告がある²⁾。また、食物繊維の一種であるキトサンを結合させた牛乳アレルギー(β-ラクトグロブリン)と元のβ-ラクトグロブリンの抗原性を比較すると、キトサン結合β-ラクトグロブリンでは抗原性が低下したとの報告などがある³⁾。したがって、これらの知見をもとに免疫療法で用いる食品の加工方法を検討することによって、アレルギー症状が誘発されことなく治療ができ、かつ患者もおいしく食べられる治療食が提案できると考えられる。

そこで本研究では、免疫療法の効果を上げるために、治療に用いる食品の調理・加工方法を検討した。まず、(1)免疫療法の効果を評価するためのモデルマウスの作製および評価系の構築を行い、これを用いて(2)免疫療法に効果的なアレルギー投与方法の検討を行った。

実験方法

(1) 投与アレルギー

アレルギーとして用いたリゾチームは、和光純薬工業株式会社より購入したものを使用した。リゾチームは単独投与、デキストラン(MW. 40,000)(和光純薬工業株式会社)との混合投与、グルコースと結合させた糖結合リゾチーム投与について検討した。

糖結合リゾチームは、次のように作製した。リゾチーム5gとグルコース5gをElix水中に溶解し、0.1M NaOHを用いてpH8に調整後、凍結乾燥機にて粉末化した。これをデシケーター内に入れ、60℃で24時間アミノカルボニル反応させた。未反応のグルコースを除去するために4日間透析後、再度凍結乾燥したものを使用し、糖の結合による化学的性質の変化を調べた。まず、SDS-PAGE⁴⁾でグルコースの結合による分子量の変化を調べた。解析には15%アクリルアミドゲルを用い、泳動後のゲルはCBBを含む染色液で染色してタンパク質を検出した。また、グルコースの結合による抗原性の低下をELISAで確認した。さらに、リゾチームはグラム陽性菌に対して溶菌活性を示すことから、グルコース結合リゾチームの溶菌活性を測定し、リゾチームと比較した。基質に

は*Micrococcus luteus*菌体(和光純薬工業株式会社)を用い、540nmにおける吸光度の減少を溶菌活性として算出した。以上のようにして作製、性質の変化を解析したグルコース結合リゾチームを20mgずつアレルギーマウスに経口投与し、治療効果を解析した。

(2) 抗体

マウス血清中のIgG₁の検出にはPOD-Linked anti mouse IgG₁(Southern Biotech)を、IgEの検出にはPOD-Linked anti mouse IgE(Nordic Immunology)を、糞中のIgAの検出にはPOD-Linked anti mouse IgA(Zymed Laboratories)を使用した。

また、リゾチームと糖結合リゾチームの抗原性を比較するために、anti LY rabbit IgG(ROCKLAND)とPOD-linked anti rabbit IgG(BETHYL)を使用した。

(3) 実験動物及び飼育方法

日本エスエルシー株式会社のB10.A/SgSnSlcマウス(5~6週齢、雌)を用いた。このマウスはリゾチームに対しては経口投与のみでIgEが増加するほど感受性が高いことが分かっている⁵⁾。ソフトチップを敷いたプラスチック製の飼育ケージにマウスを入れ、室温24±2℃、明暗サイクル12時間で飼育した。市販の固形飼料(CE-2:オリエンタル酵母)と水は自由に摂取させた。

動物実験は、名古屋学芸大学動物実験規程に基づき、「実験動物の飼育および保管に関する基準(昭和55年総理府告示第6号)」を遵守して行った。

(4) 実験計画

図1に従って実験を行った。まず、マウスをアレルギー状態にするため、リゾチーム/PBS溶液(50μg/200μl)に水酸化アルミニウム(和光純薬工業株式会社)を1mg混合したものをマウスの腹腔に3回投与した。その後、実験開始50日目にマウスから採血して血中のIgEをELISAで測定し、アレルギーの誘発を確認した。このアレルギーマウスを各群に分け、それ

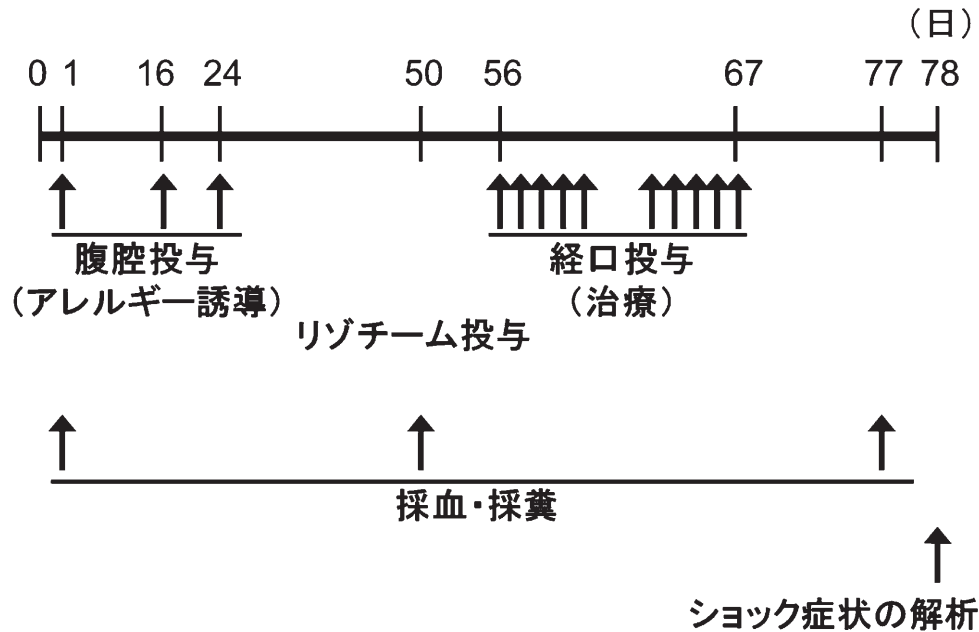


図1 免疫スケジュール

ぞれ治療用リゾチームを1日1回10日間経口投与した。この治療前後で採血および採糞を行い、各試料中のリゾチーム特異的抗体価をELISAで測定し、免疫応答の変化を調べた。最後に、この治療効果を評価するためにマウスにリゾチームを100mg経口投与してアナフィラキシーショックを誘導し、その症状についても解析を行った。

(5) 試料の調製

採取後の血液は、4℃で1時間静置後、10分間遠心分離(4℃・3,000×g)を行い、その上清を採取した。上清は腐敗防止のためアジ化ナトリウムを終濃度0.05~0.1%になるように加え、-20℃で保存した。

また、糞中のIgAの抽出は以下のように行った。採取した糞0.1gに対して可溶性画分抽出溶液⁶⁾(PBS溶液中にBSA10μg、バシトラシン50μg、ベンズアミジン300μg、ロイペプチン80μg、キモスタチン20μg、およびペプスタチン25μg/mlを含む)を1ml加え、in vitro shaker(TAITEC ROTATOR RT-50)で一晩振とうした。その後10分間遠心分離(4℃・20,000×g)し、その上清をIgA測定試料として-20℃で保存した。

(6) ELISA

マウスの血清および糞中のリゾチーム特異的抗体価の測定は以下のように行った。まず、96穴マイクロプレートにリゾチーム/PBS溶液(10μg/ml)をコーティングし、その後1%BSA(和光純薬工業株式会社)/PBST(PBS溶液中にtweenを0.05%含む)溶液でブロッキングした。その後、マウス血清は1,000倍(リゾチーム特異的IgG₁測定)、100倍(リゾチーム特異的IgE測定)に希釈して加え、糞中IgA抽出溶液は原液を加えて、プレートにコーティングされたリゾチームと反応させた。プレートを洗浄後、プレート内に残存した抗体を検出するために、(2)に示した抗体を反応させた。発色にはo-フェニレンジアミン(和光純薬工業株式会社)を使用して一定時間発色させ、2N硫酸溶液で反応を停止させた。その後、MICROPLATEREADER(コロナ電気株式会社MTP-650FA)を用いて492nmの吸光度を測定した。

リゾチームと糖結合リゾチームの抗原性を比較するためには、まず、96穴マイクロプレートにリゾチーム/PBS溶液、グルコース結合リゾチーム/PBS溶液(10μg/ml)をそれぞれコーティングした。1%BSA/PBST溶液でブロッキング後、anti-LY rabbit IgGを反応さ

せ、さらにプレートを洗浄後、POD-linked anti rabbit IgG を加えた。発色は上記と同様に行い、492nm の吸光度を測定した。

(7) アナフィラキシーショックの解析

アナフィラキシーショックの解析は、直腸温の測定、ショック症状の観察および小腸の炎症度について行った。直腸温は、DIGITAL THERMOMETER (株式会社芝浦電子 TD-320) を用いてショック誘導前と誘導30分後に測定し、低下度を比較した。また、経口投与直後から30分間マウスのアレルギー症状を観察し、スコア化した⁷⁾。ショック症状は、鼻や頭を掻く、擦る、目や鼻の周りが腫れる、毛が逆立つ、下痢、行動減少、呼吸数増加、喘息、不自然な呼吸、チアノーゼ、意識を失う、痙攣、死亡の項目について観察し、1つの症状を1点として数値化し、その合計数を比較した。さらに、小腸の炎症度については、エバンスブルーの小腸組織透過性を測定することにより比較した。ショック誘導30分後のマウスにエバンスブルー (和光純薬工業株式会社) を投与し、10分後に小腸を摘出した。これを3等分して胃側の上部組織からホルムアミド (和光純薬工業株式会社) を用いて色素を抽出し、620nm の吸光度を測定して炎症の指標とした。

(8) 統計処理

統計解析にはエクセルを用いた。免疫療法前後およびショック誘導前後の解析値の比較には Paired t-test を、各群間の比較には Non-repeated measures ANOVA 検定の後、Dunnett's test を用いた。

結果

モデルマウスの作製および治療リゾチームの投与量による免疫応答の変化の解析

まず、経口免疫療法のモデルマウスを作製し、治療に用いるアレルギー量を変化させた場合の免疫療法に与える効果を解析した。図1にしたがって B10.A マウスにリゾチームを投与し、リゾチームアレルギーにした。このマウス

に、免疫療法としてリゾチーム (0、0.2、2.0、20 mg/mouse) を1日1回、10日間経口投与した。このリゾチーム投与による免疫応答の変化を解析するために、投与前後で採血および採糞を行い、試料中のリゾチーム特異的抗体価を測定した (図2)。その結果、血中のリゾチーム特異的 IgG₁ には治療による変化は認められなかったが、リゾチーム特異的 IgE は20mg 投与群で減少する傾向がみられた。また、糞中のリゾチーム特異的 IgA は20mg 投与群で増加する傾向が認められた。さらに、治療効果を確認するために、治療用リゾチームの投与終了10日後に再度リゾチームを経口投与してアナフィラキシーを誘導し、直腸温の測定およびショック症状の観察を行い、ショック症状についてはスコア化して比較した (図3)。その結果、20mg 投与群では他群より直腸温の低下が抑制される傾向およびショック症状が軽減される傾向がみられた。

以上の結果より、B10.A マウスにリゾチームを投与してアレルギーマウスを作製し、このマウスにリゾチームを経口投与するとアレルギー症状が改善されることが確認された。また、その効果は投与量に依存し、今回検討を行った中では最も投与量の多い20mg 投与群で最も免疫療法の効果が高かった。したがって、この動物実験系を用いて免疫療法に効果的なアレルギーの摂取方法を評価し、ヒトへの治療に応用できるのではないかと考えられた。

免疫療法に効果的なアレルギーの投与方法の検討

① デキストランとの混合投与が免疫療法に与える影響

先の実験結果から、リゾチーム 20mg 投与が最も免疫療法の効果が高いことが明らかとなったため、次にリゾチーム 20mg と同時にデキストランを投与し、同時投与した他の食品成分が免疫療法に及ぼす影響について調べた。治療による免疫応答の変化を解析するために、血中および糞中のリゾチーム特異的抗体価を測定した結果 (図4)、血中のリゾチーム特異的 IgG₁ および IgE には治療前後で変化が見られ

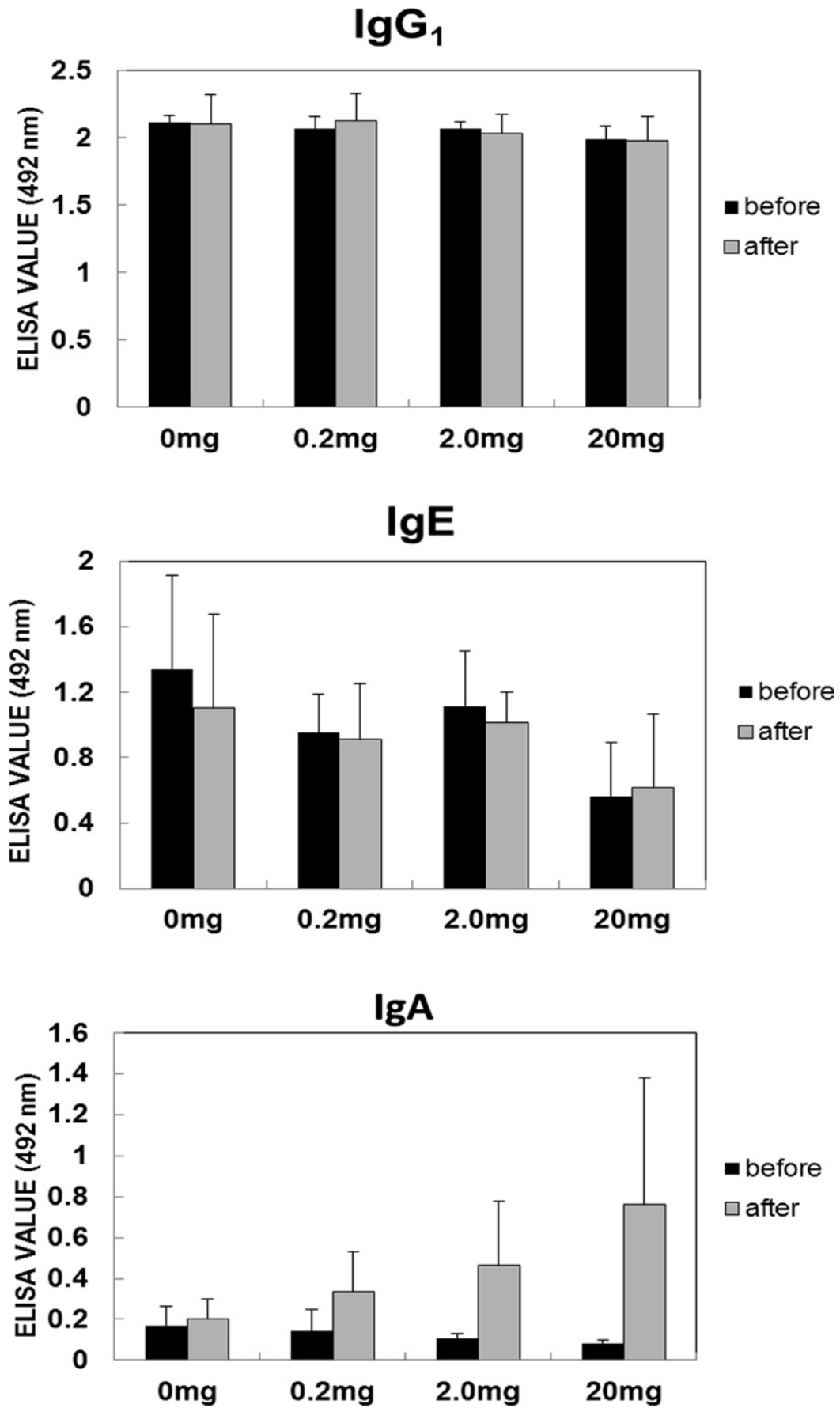


図2 治療前後でのLY 特異的抗体応答の変化

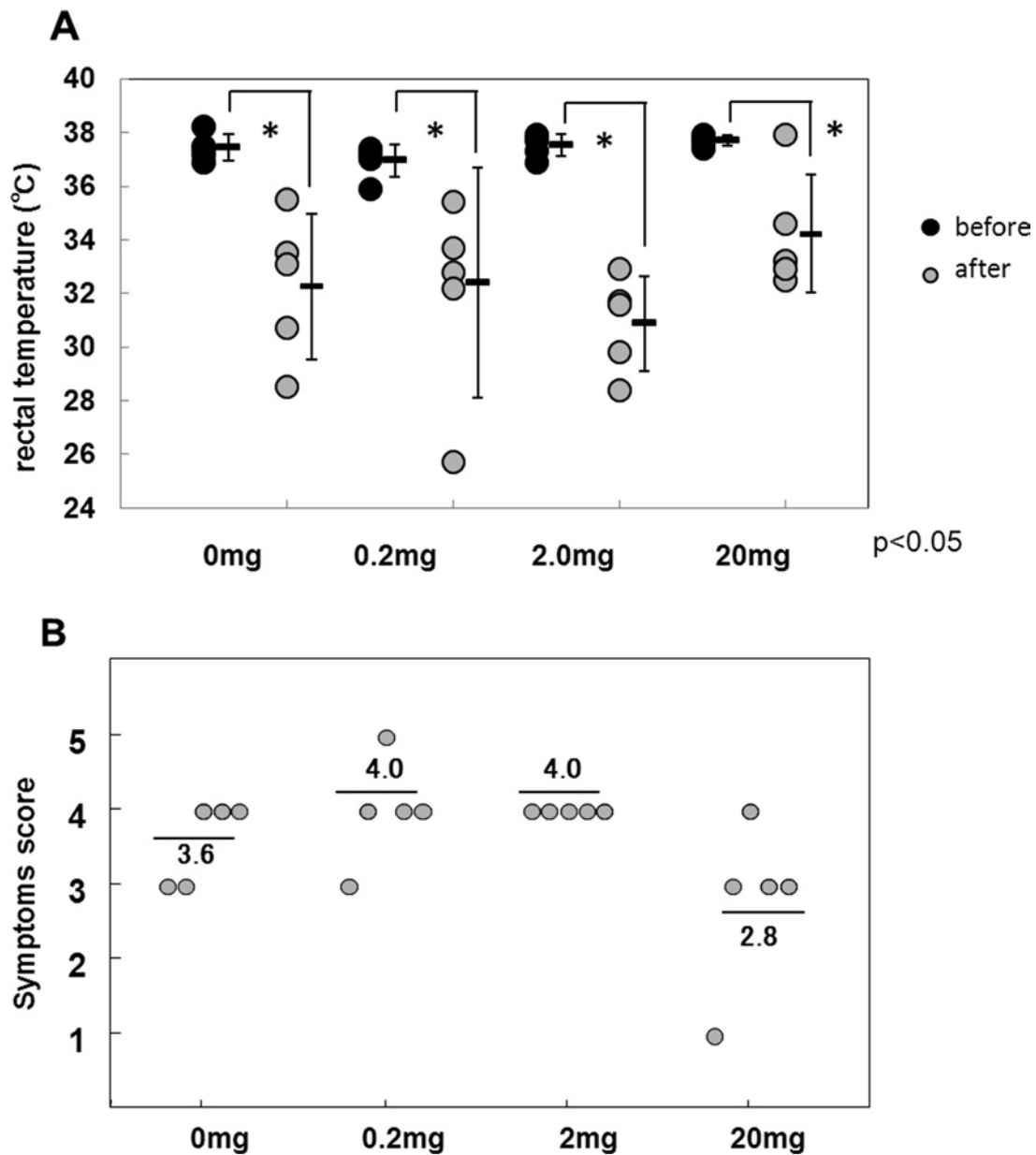


図3 アナフィラキシーショック誘導時の体温変化および症状の比較
 A：ショック誘導前後での直腸温度の測定
 B：ショック症状の比較
 有意差検定には paired-test を用いた

なかったが、糞中のリゾチーム特異的IgAはデキストランと混合投与することにより増加した。さらに、アナフィラキシー誘導時のショック症状の解析結果では（図5）、直腸温の低下が抑制される傾向および症状が軽減される傾向がみられた。

以上の結果より、デキストランとの混合投与は免疫療法の効果を促進する可能性が示唆された。

②グルコース結合リゾチームが免疫療法に与える影響

次に、加工したアレルゲンの投与が免疫療法に及ぼす影響について調べるために、アミノカルボニル反応を利用してリゾチームにグルコースを結合させ、このグルコース結合リゾチームをマウスに投与した。まず、作製したグルコース結合リゾチームについて、グルコースの結合を確認するために、化学的性質の変化に

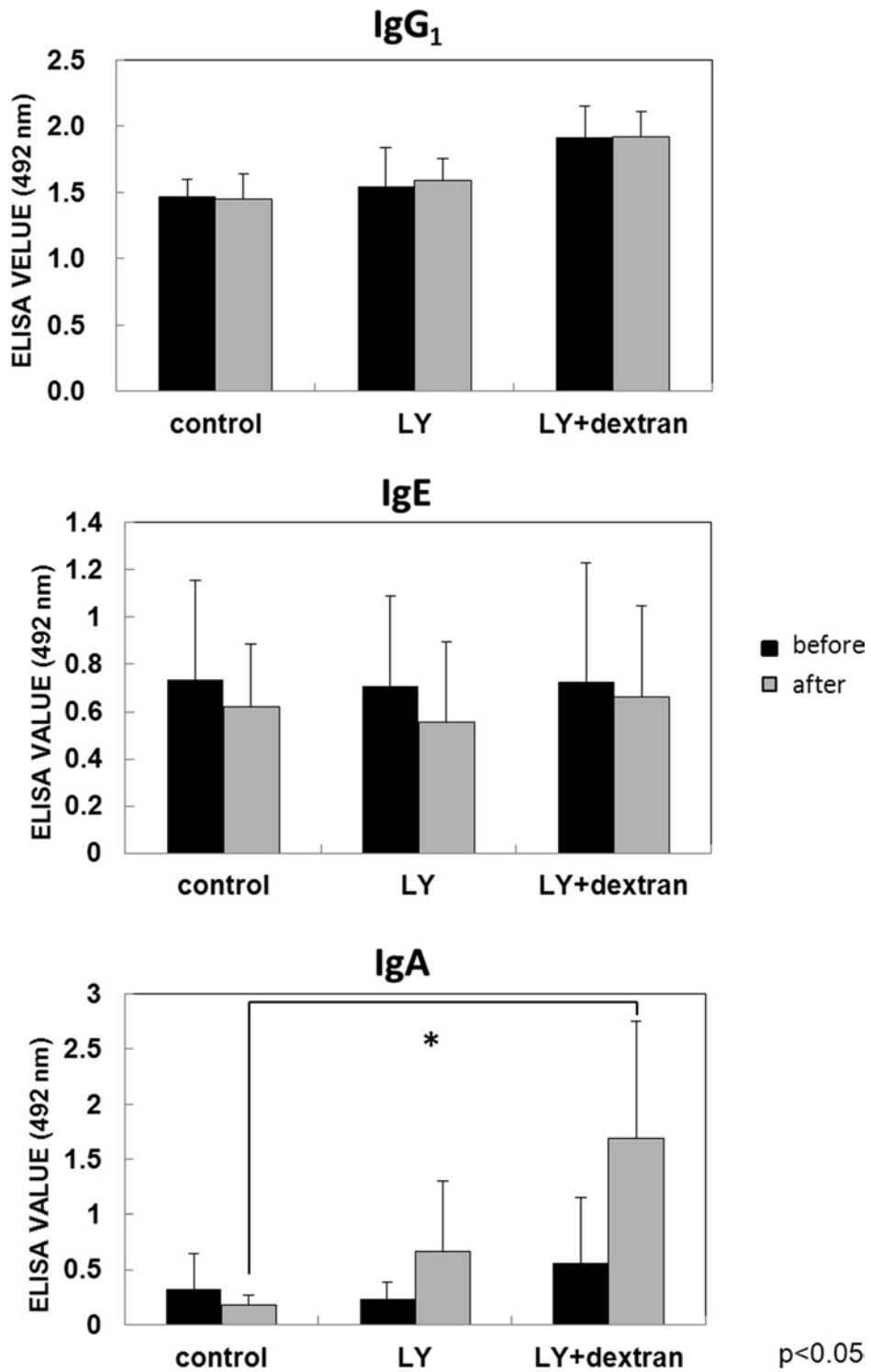


図4 デキストランとLYの混合投与による治療後のLY特異的抗体応答の変化

有意差検定には Non-repeated measures ANOVA 検定の後、Dunnnett's test を用いた

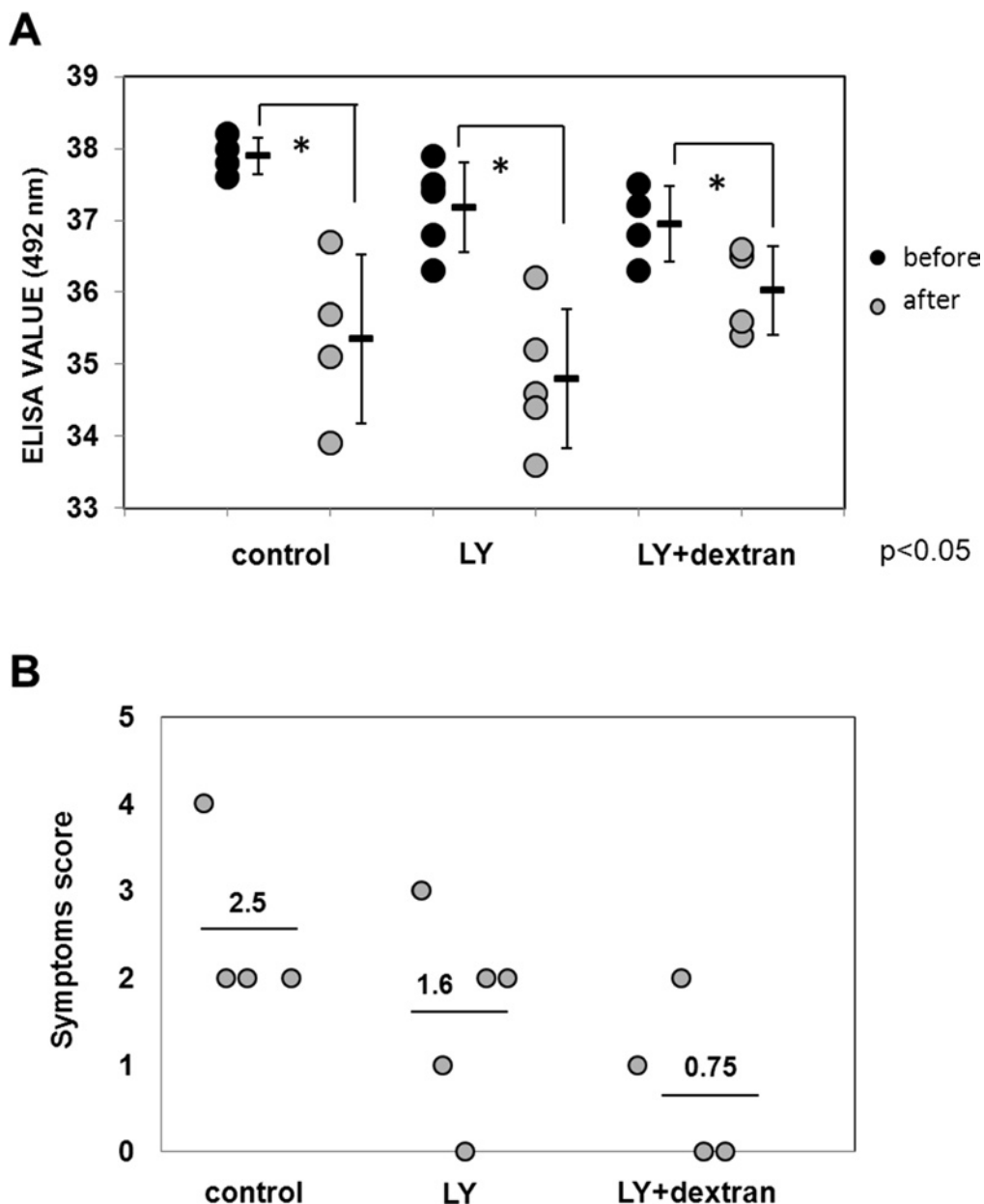


図5 デキストランとLYの混合投与によるアナフィラキシーショック誘導時の体温変化および症状の比較

A：ショック誘導前後での直腸温度の測定

B：ショック症状の比較

有意差検定には paired-test を用いた

ついて解析した。SDS-PAGEにより分子量の変化を調べた結果(図6-A)、元のリゾチームと比較してバンドが上方にシフトした。これは、グルコースの結合によって見かけの分子量が増加したためと考えられた。また、リゾチームは溶菌活性を持つ酵素タンパク質でもあるため、この活性を測定し、リゾチームと比較したところ(図6-B)、グルコースを結合させることによって元の活性の約30%に低下した。

この活性の低下は、リゾチームの酵素活性部位にグルコースが結合したためと考えられた。以上の結果から、リゾチームへのグルコースの結合を確認した。

さらに、グルコースの結合がリゾチームの抗原性に影響を与えていないかどうか確かめるために、ELISAで抗体の結合能を測定し、リゾチームと比較した(図6-C)。その結果、抗体の結合能には変化がみられなかった。この

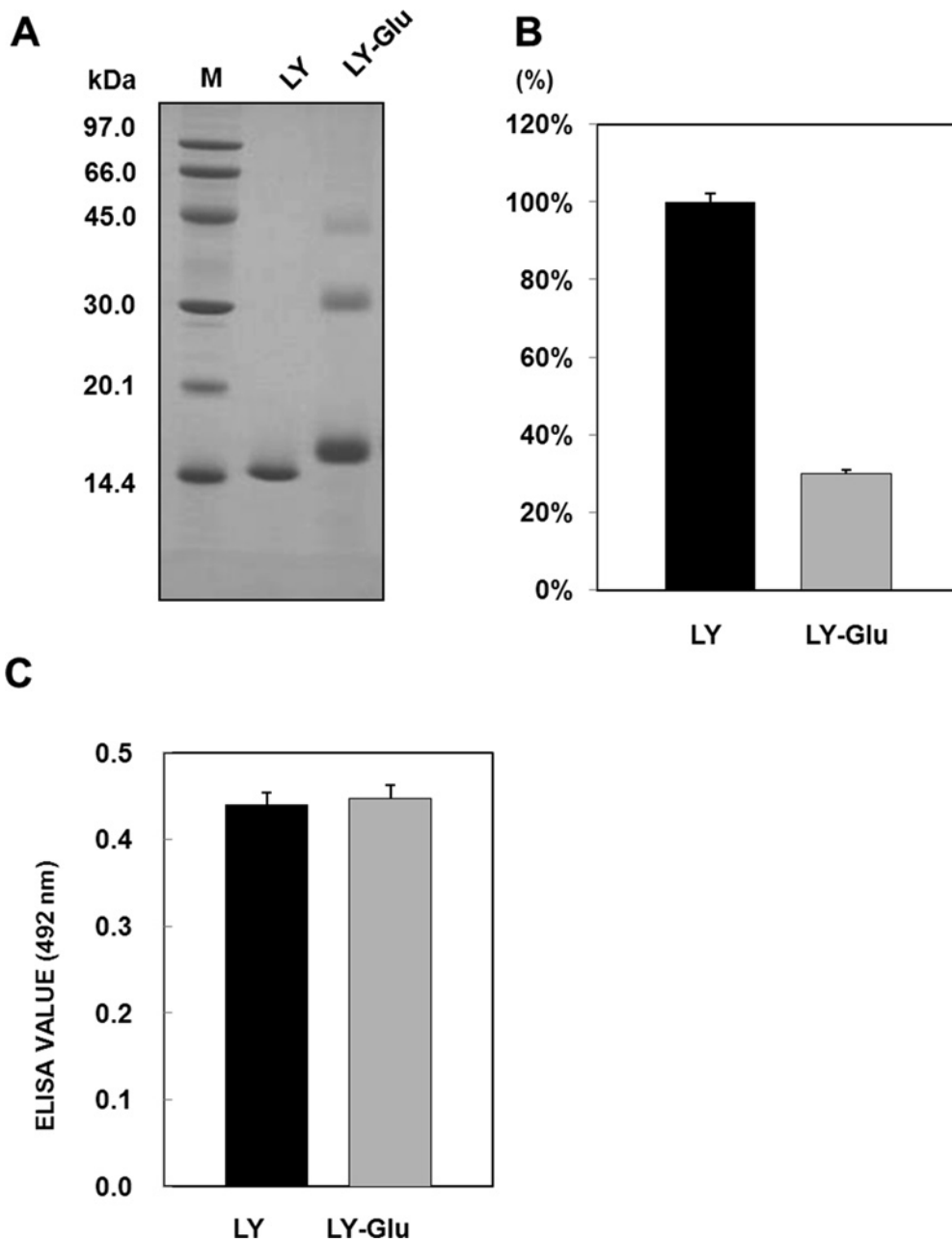


図6 グルコース結合LYの作製と化学的性質の変化の解析
 A：グルコース結合による分子量の変化
 B：グルコース結合による溶菌活性の変化
 C：グルコース結合による抗原性の変化

ようにして作製したグルコース結合リゾチームをマウスに20mg投与し、免疫療法の効果を解析した。その結果、リゾチーム投与群では観察された糞中IgAの増加（図7-A）および直腸温の低下（図7-B）が、グルコース結合リゾチーム投与群では観察されなかった。また、小腸の炎症度を解析し、比較した結果についても（図7-C）、グルコース結合リゾチーム投与群よりリゾチーム投与群の方が炎症が少ない

結果であった。

以上の結果から、アレルゲンにグルコースを結合させるという加工は、免疫療法の効果を抑制すると考えられた。

考察

現在、ヒトで行われている経口免疫療法では、まず初めに患者に経口負荷試験を行い、

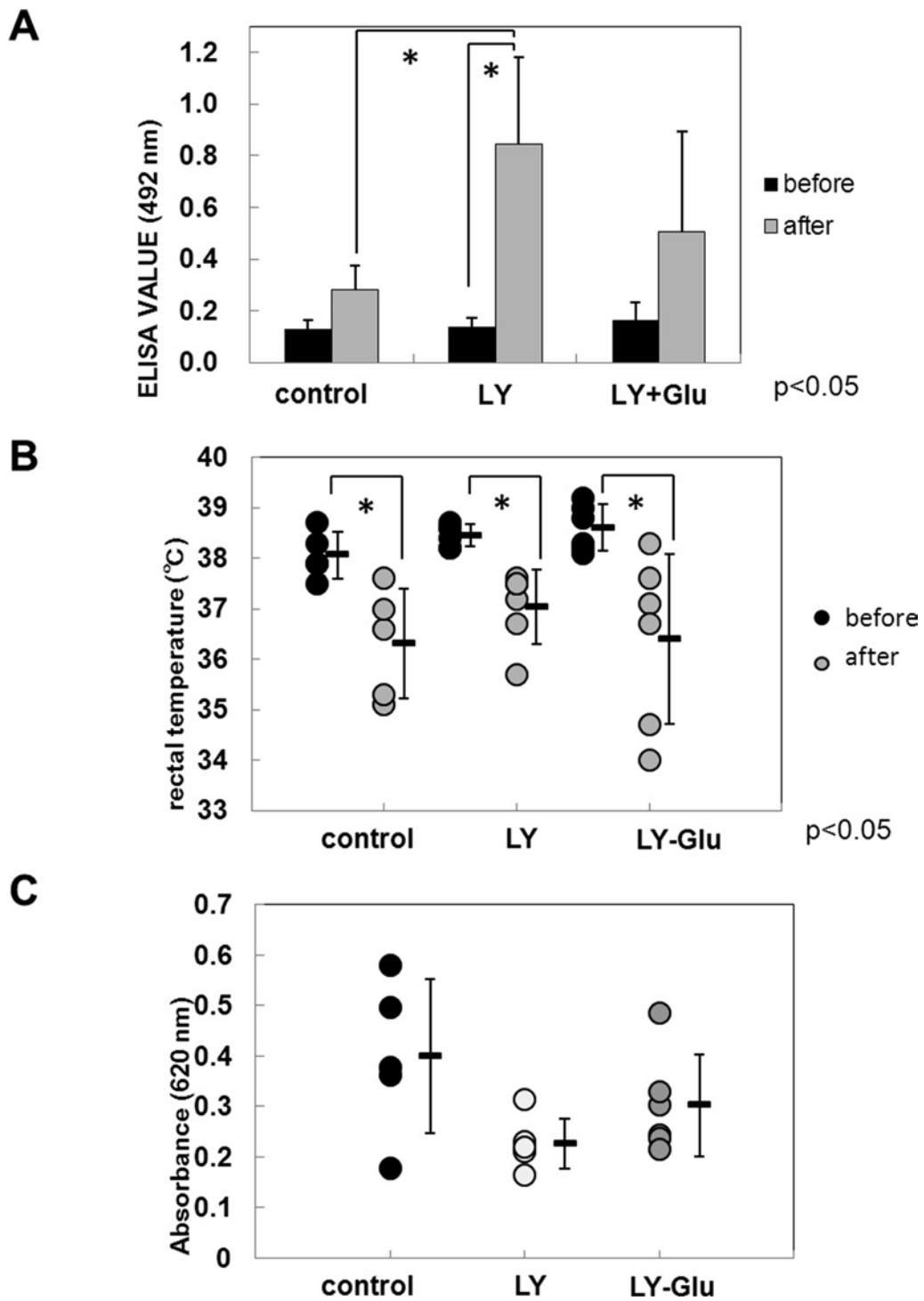


図7 グルコース結合LY投与によるLY特異的IgAの変化とアナフィラキシー誘導時の直腸温度および小腸炎症度の比較

A: 糞中IgAの定量 B: 直腸温度の測定 C: 小腸炎症度の比較

Before-after間の有意差検定にはpaired-testを用い、3群間の比較にはNon-repeated measures ANOVA検定の後、Dunnett's testを用いた

アレルギー症状の出ない最大摂取量を確定する⁸⁾。この量を基にして患者にはアレルギー原因食品を定期的に摂取してもらい、様子を見ながら徐々に摂取量を増やしていく方法がとられている。したがって、マウスの場合にもリゾチーム投与量が少ないとアレルギー症状に影響がでない、もしくはアレルギー症状の改善がみられ、投与量が摂取限界を超えている場合にはアレルギー症状が悪化するのではないかと予想した。しかし興味深いことに、今回検討したリゾチーム投与量のうち、最も多量にあたる20mg投与群でアレルギー症状の緩和傾向がみられ、一方で0.2、2.0mg投与群では症状が悪化した(図3)。このことから、ある程度のアレルゲン量を効果的に摂取することが免疫療法においては必要と考えられる。

また、血中のIgG₁およびIgEはリゾチーム投与量にかかわらず、治療前後で変化がみられなかった。一方で、治療後にアナフィラキシーを誘導すると、体温の低下やショック症状は治療用リゾチームの投与量によって異なった(図2および図3)。通常は、IgEを指標にアレルギーの診断が行われ、IgEの増減が最も重要と考えられている。しかし、最終的にはショック症状の緩和が患者にとっては最も重要であり、ヒトに対する免疫療法においては、治療後にIgEの減少が認められないにもかかわらず、ショック症状が緩和し、治療効果が認められる場合がある。したがって、今回のモデルマウスにおいても、IgEの増減とショック症状の間には相関関係は認められなかったが、治療の効果はあったと評価できる。

また今回の実験では、デキストランとの混合投与においてリゾチーム特異的IgAの増加が観察され、これにともなってアナフィラキシー誘導時のショック症状が軽減された(図4および図5)。また、グルコース結合リゾチームの投与においてリゾチーム特異的IgAがリゾチーム投与より減少し、これにともなってショック症状についてもリゾチーム投与より悪化傾向がみられた(図7)。したがって、糞中IgAの増加がその後に誘導されるショック症状の軽減に関与している可能性が示唆され

る。消化管内に分泌されたIgAは、①アレルゲンと結合してそのまま排泄されることにより、消化管から体内へアレルゲンが吸収されるのを抑制する。②アレルゲンと結合した状態で一部が吸収され、IgA産生をさらに亢進させることから^{9), 10)}、経口免疫寛容の誘導に関与する可能性があることが知られている¹¹⁾。今回の実験におけるIgA分泌までの免疫応答のメカニズムと、分泌されたIgAの働きについてはさらなる解析が必要と考えられる。

また、グルコース結合リゾチームを治療に用いた場合、リゾチームよりも治療効果が下がった。マウスをアレルギーにするために行った最初の免疫に用いたアレルゲンは加工を施していないリゾチームを使用したため、グルコースの結合による構造の変化は治療効果を高めるのではないかと期待したが、逆の結果となった。このグルコースの結合による治療効果の低下に関するメカニズムについても今後解析が必要である。

本研究では、現在ヒトで食物アレルギーの治療のひとつとして行われている免疫療法に着目し、治療効果を高める効果的な食品の摂取方法を探索するために動物モデルを作製し、評価系を構築した。この評価系を用いて食品中の他の成分との相互作用について解析した結果、他の食品成分との相互作用が免疫療法の効果に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、この実験系を用いることでさらに免疫療法に効果的な食品の摂取方法を検討することができると考えられる。

参考文献

- 1) 今井 孝成: 食物アレルギーの診断と治療 経口免疫療法(解説/特集). アレルギーの臨床2013; 33: 339-342.
- 2) Weangsrivanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T, Kawada T: Dietary fat and an exogenous emulsifier increase the gastrointestinal absorption of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K, in mice. J Nutr, 2005; 135: 1738-1744.
- 3) Aoki T, Iskandar S, Yoshida T, Takahashi K, Hattori M: Reduced immunogenicity of beta-

-
- lactoglobulin by conjugating with chitosan. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006; 70: 2349–2356.
- 4) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680–685.
 - 5) Matsuda T, Matsubara T, Hino S: Immunogenic and allergenic potentials of natural and recombinant innocuous proteins. *J Biosci Bioeng*, 2006; 101: 203–211.
 - 6) Adel-Patient K, Ah-Leung S, Creminon C, Nouaille S, Chatel JM, Langella P, Wal JM: Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin Exp Allergy*, 2005; 35: 539–546.
 - 7) Zhang T, Pan W, Takebe M, Schofield B, Sampson H, Li XM: Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses. *Clin Exp Allergy*, 2008; 38: 1808–1818.
 - 8) Ito K: Diagnosis of food allergies: the impact of oral food challenge testing. *Asia Pac Allergy*, 2013; 3: 59–69.
 - 9) Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR: Selective adherence of IgA to murine Peyer’s patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol*, 2002; 169: 1844–1851.
 - 10) Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Kraehenbuhl JP, Neutra MR: Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol*, 1989; 108: 1673–1685.
 - 11) 木津 久美子, 廣瀬 潤子, 本庄 勉, 成田 宏史: 母乳哺育により母ラットの摂取タンパク質特異的に仔ラットの Th2 応答が抑制される. *日本栄養・食糧学会誌* 2012 ; 65 卷 : 13-19.

Abstract

Search for a good preparation method of allergen for oral immunotherapys

Chikako Yamada*, Kazumasa Ozeki*, and Hidehiko Izumi*

We established the mouse model of immune therapy to food allergy with egg-white lysozyme. The mice were administrated different dose lysozyme, mixture with another constituent and chemically-modified lysozyme for therapy and analyzed symptoms induced after therapy. These mice showed shock symptoms but severity of them differed depending on the dose and form of the lysozyme. These results indicated that this mouse model is useful for evaluation of effects of immune therapy with the allergen itself.

Keywords: food allergy, oral immunotherapy, lysozyme, anaphylactic shock, aminocarbonyl reaction

* Graduate School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences