

令和元年6月20日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16293

研究課題名(和文) 食事を利用した新規経口免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of new oral immunotherapy using diet supplemented with allergen.

研究代表者

前田 晃宏 (MAETA, Akihiro)

武庫川女子大学・生活環境学部・助手

研究者番号：30735014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーの新規治療法である経口免疫療法は、閾値以下の原因食物を継続的に摂取し、経口減感作を誘導する治療法である。本研究では、原因食物を食餌に混ぜ込み分割摂取させることで、卵白アレルギーモデルマウスのアレルギー重症度が改善するかを調べた。その結果、凍結乾燥卵白や酵素加水分解卵白ペプチドを1%添加した食餌を4週間摂取したモデルマウスは、アレルギー重症度が改善した。免疫寛容に関わる制御性T細胞への分化を抑制すると重症度の改善度が弱まった。従って、原因食物添加食餌を活用した経口免疫療法は免疫寛容を誘導し、その寛容メカニズムに制御性T細胞が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギー患者は増加傾向であり、乳幼児の発症率が高い。さらに、重篤な全身性過敏反応であるアナフィラキシーショックにより、救急搬送される症例も存在する。経口免疫療法は、食物アレルギーの新たな治療法として注目されているが、治療中のアレルギー症状誘発リスクが高い。本研究結果は、原因食物の1日摂取量の分割摂取や原因食物と他の栄養素の同時摂取であっても、経口減感作が誘導されることを明らかとした。従って、本研究結果は原因食物の分割摂取指導が可能となり、1回当たりの原因食物摂取量を減らし、アレルギー症状の誘発予防に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Oral immunotherapy, which is a novel treatment for food allergy, induces oral desensitization by continuous intake of allergen without severe allergic reaction. In this study, it was examined whether the intake of diet supplemented with allergen ameliorated the severity of allergy in an egg white allergic mouse model. The results was that the mouse models fed diet supplemented with 1% freeze-dried egg white and enzymatically-hydrolyzed egg white peptides for four weeks were improved in the severity of allergy. Moreover, the suppression of differentiation of regulator t cells, which relate immune tolerance, counteracted the amelioration of the severity of allergy. Therefore, it was suggested that oral immunotherapy using diet including allergen induced immune tolerance, and regulatory T cells were involved in the tolerance mechanism.

研究分野：アレルギー

キーワード：食物アレルギー 鶏卵 経口免疫療法 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの根治療法として、経口免疫療法 (OIT; Oral immunotherapy) が注目されている。OIT は、食物アレルギー患者に対して、閾値量以下の抗原を投与し、積極的に耐性を獲得させるという方法である (図 1)。しかし、OIT には克服すべき課題も多く、一般診療でも推奨されていない。中でも最も大きな課題は、治療期間中のアレルギー症状誘発リスクである。そこで研究申請者は、少量の抗原を食事に混ぜ込む OIT を提案した。この方法について、臨床応用の前段階として、モデル動物を用いた基盤研究を行う必要があった。

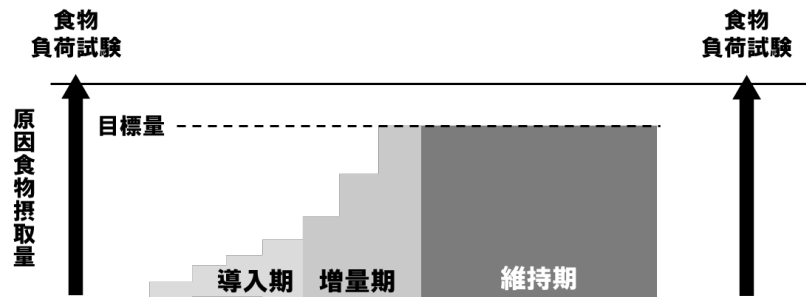


図 1 経口免疫療法 (OIT; Oral immunotherapy) の模式図

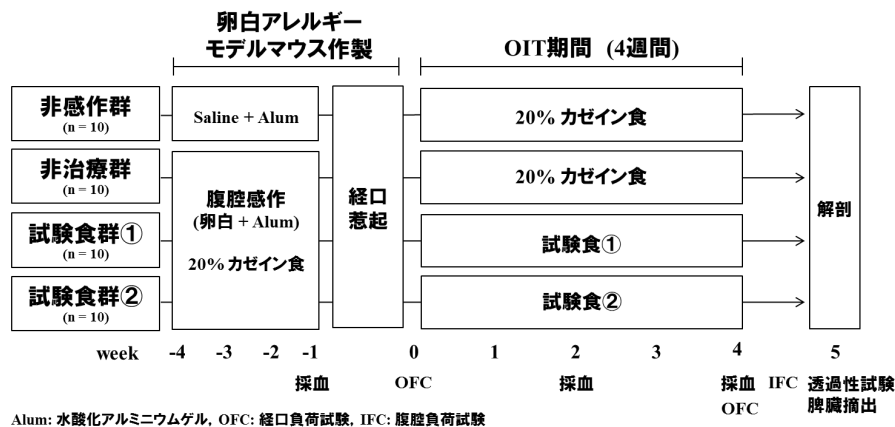
### 2. 研究の目的

卵白アレルギーモデルマウスに対して、凍結乾燥卵白粉末や酵素処理により低減化した卵白粉末を添加した飼料を与え、アレルギー症状や体内バイオマーカーが改善されるかを調べた。

### 3. 研究の方法

6 週齢の Balb/c 雌マウスに、抗原の凍結乾燥卵白を含む水酸化アルミニウムゲルを腹腔投与し、アレルギー感作を行った。腹腔投与は、2 週間に 1 回のペースで、計 2 回行った。感作確認後、卵白経口投与により、経口誘発型卵白アレルギーモデルマウスを作製した。作製したモデルマウスに抗原を添加した飼料を自由摂食させ、免疫寛容を誘導した。実験 1 (図 2; 平成 28 年度) の試験食は、0.01%凍結乾燥卵白添加食 (0.01% EW) と 0.1%凍結乾燥卵白添加食 (0.1% EW), 1%凍結乾燥卵白添加食 (1% EW) を使用し、4 週間の OIT を実施した。実験 2 (図 2; 平成 29 年度) の試験食は、1%市販乾燥卵白添加食 (S-EW) と 1%市販卵白ペプチド添加食 (PF) を使用し、4 週間の OIT を実施した。比較対象として、抗原非添加飼料を摂取させる群とアレルギー感作を行わない群も用意した。免疫寛容の指標として、卵白経口負荷試験後の直腸温低下量と卵白腹腔負荷試験後の直腸温低下量、皮膚血管透過性、血漿中オボアルブミン特異抗体価 (IgE, IgA, IgG1, IgG2a), 48 時間卵白刺激脾リンパ球培養上清サイトカイン放出量、脾リンパ球中制御性 T 細胞 (CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞) 分化比率を測定した。

実験 3 (図 3; 平成 30 年度) では OIT による免疫寛容における制御性 T 細胞 (CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞) の関与を検討した。卵白アレルギーモデルマウスは、前述の方法で作製した。OIT として、1%凍結乾燥卵白添加食を 2 週間摂取させた。制御性 T 細胞の抑制方法として、一週間おきに Anti-mouse CD 25 を 4 回腹腔投与した。免疫寛容の指標は、前述の項目に加え、脾リンパ球中 CD4 陽性 CD25 陽性細胞分化比率を測定した。



Alum: 水酸化アルミニウムゲル, OFC: 経口負荷試験, IFC: 腹腔負荷試験

図 2 動物実験スケジュール概略 (実験 1, 実験 2)

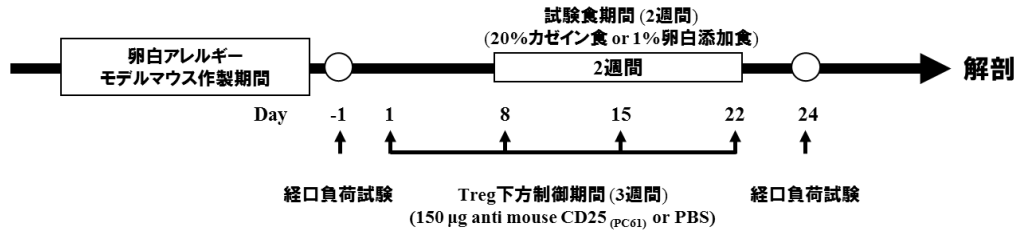


図3 動物実験スケジュール概略 (実験3)

#### 4. 研究成果

##### 【実験1】

4週間のOIT終了後の卵白経口負荷試験において、1%EW群は他のアレルギー群よりも直腸温低下が抑制された(図4)。さらに、脾リンパ球解析では、1%EW群のIFN- $\gamma$ とIL-10産生量はNon-OIT群よりも有意に高値であった(IFN- $\gamma$ 約8倍、IL-10約2倍)。CD4陽性Foxp3陽性細胞比率においても、1%EW群はNon-OIT群よりも有意に高値であった[Mean $\pm$ SE(%); 3.61 $\pm$ 0.15(Non-OIT群)vs 4.61 $\pm$ 0.32(1%EW群)]。

従って、卵白アレルギーモデルマウスにおいて、抗原を添加した食餌により経口減感作が誘導できることが示唆された。さらに、添加量依存的に治療効果が亢進することが示唆された。

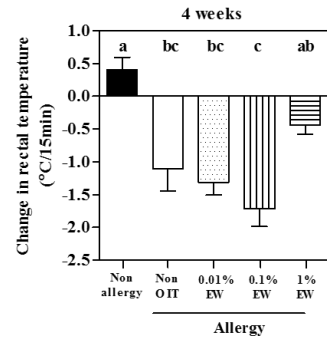


図4 経口負荷試験結果

##### 【実験2】

4週間のOIT終了後の卵白腹腔負荷試験において、S-EW群とPF群は他のアレルギー群よりも直腸温低下が抑制された(図5)。しかし、卵白経口負荷試験では、アレルギー惹起群間で直腸温低下量に差は認められなかった。CD4陽性Foxp3陽性細胞比率では、PF群はNon-OIT群よりも有意に高値であった[Mean $\pm$ SE(%); 3.33 $\pm$ 0.18(Non-OIT群)vs 4.28 $\pm$ 0.18(PF群)]。また、PFの抗原性はS-EWよりも低かった。

従って、PFはS-EWよりも安全なOIT食品であることが示唆された。一方で、PFやS-EWは凍結乾燥卵白よりも免疫寛容を誘導しにくいことも示された。

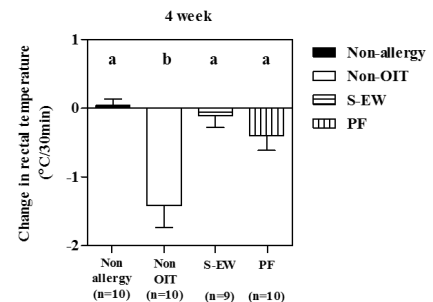


図5 腹腔負荷試験結果

##### 【実験3】

実験1と2より、OITによる免疫寛容にCD4陽性Foxp3陽性細胞の誘導が関与していることが示唆された。そこで、OITによるCD4陽性Foxp3陽性細胞の誘導をAnti-mouse CD25の腹腔投与により抑制し、それに伴い治療効果が変動するかを調べた。その結果、Anti CD25群(OITとAnti-mouse CD25投与を併用)の卵白経口負荷試験後の直腸温低下量抑制は、OIT群よりも弱かった(図6A)。更に、CD4陽性Foxp3陽性細胞比率は、OIT群でNon-OIT群より有意な高値を示し、Anti CD25群はNon-OIT群よりも有意な低値を示した(図6B)。

従って、OITによる免疫寛容誘導には、CD4陽性Foxp3陽性細胞の分化亢進が重要な役割を果たしていることが示唆された。

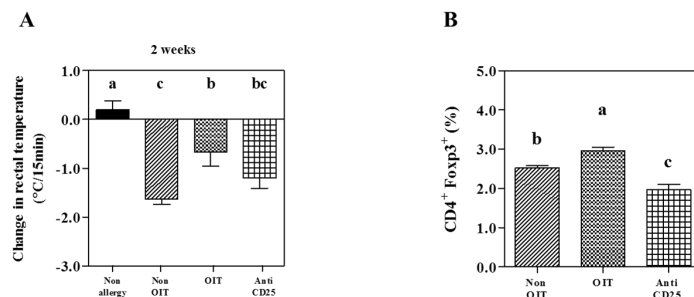


図6 経口負荷試験結果 (A) と脾リンパ球解析結果 (B)

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Maeta A, Matsushima M, Katahira R, Sakamoto N, Takahashi K. Diets Supplemented with 1% Egg White Induce Oral Desensitization and Immune Tolerance in an Egg White-Specific Allergic Mouse Model. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018;176(3-4):205-214. doi: 10.1159/000488858.

### 〔学会発表〕(計2件)

前田晃宏, 松島麻鈴, 片平梨沙子, 大西晴日, 中村優, 高橋享子. 卵白アレルギーモデルマウスにおける市販酵素加水分解卵白を用いた経口免疫療法の効果検証.

第72回日本栄養・食糧学会大会(岡山)

2018年5月

前田晃宏, 片平梨沙子, 坂本なつみ, 高橋享子. 卵白アレルギーモデルマウスの卵白含有食餌摂取が経口免疫療法に及ぼす影響.

第71回日本栄養・食糧学会大会(沖縄)

2017年5月

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：高橋 享子

ローマ字氏名：TAKAHASHI Kyoko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。