

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08407

研究課題名(和文) 食物アレルギーの架橋活性に及ぼす環境中マイクロプラスチックの影響

研究課題名(英文) Influence of environmental microplastic to IgE crosslinking ability of food allergens

研究代表者

秋山 晴代 (AKIYAMA, HARUYO)

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：50420229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、マイクロプラスチック(MP)は、世界各地の海域で大量に浮遊していることが確認されている。MPにアレルギーが吸着・結合することにより架橋活性の変化が起こるか解析することを目的とした。細胞膜上での架橋を定量化するEXiLE法を用いて検討したところ、卵白アレルギー単独と比べ、粒子径0.5 μ m以上の2.5%(w/v)ポリスチレンビーズに吸着させた抗原では、非常に高いルシフェラーゼ活性が認められ、架橋活性がビーズとの結合により増強されることが示された。また、反応を96ウェルプレートで行う固相EXiLEでは応答強度のさらなる増強が見られ、表面積が強い応答の要因であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マイクロプラスチックが各種アレルギーの架橋活性を増強する可能性が示唆された。元来海洋に流出したマイクロプラスチックは、残留性有機汚染物質の吸着や魚等の生物濃縮による生態系への影響が懸念されていたが、食物アレルギー増悪化にも関与することが考えられた。本研究では、マイクロプラスチックの新たな側面の検証を実施したという点で非常に有用な知見が得られており、社会的意義が大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, many reports show that massive amount of microplastic (MP) floats on the surface of the global ocean. It was examined whether IgE crosslinking ability of allergens change by absorption and binding to MP.

The EXiLE method, which quantify IgE crosslinking on plasma membrane, was used in this study. Egg white allergen absorbed by 2.5 w/v% polystyrene beads whose diameter were 0.5 μ m or longer gave much higher luciferase activity than free allergen, demonstrating its IgE crosslinking ability was increased by binding to the beads. Further increase of those responses were observed when the reactions were carried out on a 96-well plate ("solid phase EXiLE"), indicating larger surface area bring increased response in the assay.

研究分野：アレルギー内科学

キーワード：マイクロプラスチック IgE 架橋活性 食物アレルギー EXiLE法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋ごみの7割を占めるプラスチックごみが紫外線劣化や摩耗などによって5mm以下の粒子径であるマイクロプラスチック(MP)となり、大量に浮遊している。特に日本の周辺海域はホットスポットと考えられている。これらのMPが魚類により誤飲されることがあり、東京湾で採取したカタクチイワシの約8割からマイクロプラスチックを確認したとの報告もあり、MPに吸着された化学物質が食物連鎖に取り込まれて濃縮後に食用魚からヒトに摂取される可能性が懸念されている。魚は食物アレルギーを引き起こすことがあり、20歳以上の食物アレルギー患者の原因食物第4位(11.2%)であることが報告されている(食物アレルギー診療ガイドライン2012)。魚のアレルゲンとしてパルプアルブミンやコラーゲンが知られているが、これらの抗原タンパク質の誤飲したMPへの吸着やその影響は明らかになっていない。一方、我々は近年全く新しいアレルギー試験法である「IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression(EXiLE)法」を開発している。ヒトの高親和性IgE受容体(FcRI)を発現させたラットの培養マスト細胞株を、アレルギー患者血清により受動的に感作し、抗原の添加による細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイにより高感度に検出する手法で、保存された患者血清と培養細胞により簡便かつ高感度にIgEの「架橋活性」を評価できる画期的な試験法である。これまでEXiLE法を用いてシラカバとリンゴなどの交差反応性を解析する手法を開発したほか、EXiLE法が各種加工食品のアレルゲン性評価(加工に伴う抗原性の変化解析)法として有用であることを明らかにしている。

2. 研究の目的

抗原刺激によるマスト細胞活性化に必須な「架橋活性」を考える上で、MPがアレルゲンタンパク質を高度に吸着し、架橋活性を増強して抗原性を高める可能性に注目した。先行研究として、ある種食物抗原をプラスチック製のビーズに吸着させたところ、通常EXiLE法では応答のない抗原が応答するようになることも確認している。EXiLE法は従来のアレルギー試験法にはない多くの長がある。そこで本研究では、MPが食物アレルゲンの架橋活性に及ぼす影響をEXiLE法を用いて明らかにし、アレルギー増悪化予防の一助になることを目指す。具体的には、MP及びアレルギー患者血清を用いてEXiLE法を行うことで、アレルゲンの抗原性に変化が見られるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

溶液中に存在するアレルゲン分子が、マイクロプラスチックビーズに結合した場合にどの程度架橋活性が変化するかについて、ポリスチレンビーズ(ポリサイエンス社)を用いて検討した。モデル抗原としてOVA及び卵白アレルゲンエキスをを用い、卵アレルギー患者血清を使用して行った。

0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.5)に2.5%(w/v)ポリスチレンビーズ(粒径0.1、0.2、0.5、1、2、4.5、10、25、45、90 μ m)を懸濁させ、ここに抗原溶液を加えて4、室温、または37で吸着させた。抗原量が一定(1 μ g/mL)になるよう調製し、あらかじめ患者血清とインキュベートしたRS-ATL8細胞を加え、EXiLE法を行った。

高感度な検出が可能な固相EXiLE法を0.5 μ mビーズを用いて行った。一定量の抗原(1 μ g/mL)を、2~200000個のビーズに加えて96ウェルプレートに撒き、37で一晩インキュベーションした。あらかじめ患者血清を加えて37、CO₂下でインキュベーションしたRS-ATL8細胞を加え、37で3時間置いた後にルシフェラーゼ基質を加えて発光強度を測定した。

4. 研究成果

始めにポリスチレンビーズと抗原の吸着率を検討した。ホウ酸緩衝液中で4、室温、または37でビーズと抗原をインキュベーションしたところ、粒子径で吸着率は異なるものの、4より室温または37の方が吸着率は高かった。

次に、抗原量を1 μ g/mL一定とし、EXiLE法に供した。その結果、抗原単独(4.3(fold change))と比べ、粒子径0.5 μ m以上のビーズと吸着させた抗原では、非常に高いルシフェラーゼ活性が認められた(8.6~10.9fold change)(図1)。

これまでの検討により、固相EXiLE法をすることで通常EXiLE法と比べ高感度に検出可能であることが分かっている。そこで0.5 μ mビーズを用い固相EXiLE法を行った。

一定量の抗原を、ビーズ懸濁液に加えて96ウェルプレートに撒き、37で一晩インキュベーションすることにより固相化した。あらかじめ患者血清とインキュベーションしたRS-ATL8細胞を加え、37で3時間刺激した後、基質を加えて発光強度を測定した。その結果、通常EXiLE法では応答が微弱なのに対し、固相EXiLE法では、より強いEXiLE法応答が認められ、粒子数200個/wellから顕著に上昇した(図2)。

以上の結果より、卵白アレルゲンの架橋活性がプラスチックビーズとの吸着により増強されることが示された。EXiLE法応答の増強にはある程度以上の粒子径が必要であることが分かった。また、固相EXiLE法でより強い応答が見られたことはプレートにも抗原タンパク質が吸着することを示しており、ビーズが多いほど増強されたことと合わせ、表面積が応答の強さに影響することが示された。

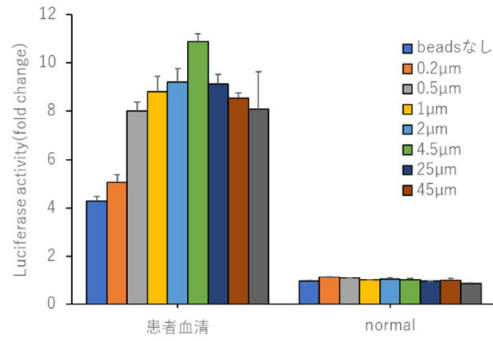


図1. 卵白アレルギーを吸着させたプラスチックビーズを用いたEXiLE法.

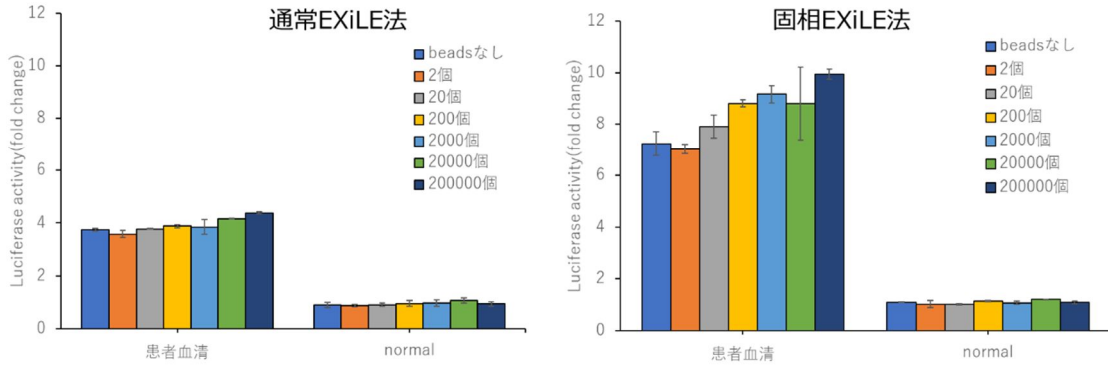


図2. 0.5μmビーズを用いたEXiLE法に対する固相の影響.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Izaki Satoshi, Toyoshima Shota, Endo Takahiro, Kanegae Kazuko, Nunomura Satoshi, Kashiwakura Jun-ichi, Sasaki-Sakamoto Tomomi, Nakamura Ryosuke, Akiyama Haruyo, Ra Chisei, Hayama Koremasa, Terui Tadashi, Okayama Yoshimichi | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce Fc RI crosslinking, as compared to anti-Fc RI AAbs | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Allergology International | 6. 最初と最後の頁 342 ~ 351 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.01.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Akiyama Haruyo, Kawamata Konatsu, Fukutomi Yuma, Matsufuji Hiroshi, Kai Shigemi, Miyazawa Maki, Nakamura Ryosuke | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Novel in vitro test for pollen-related vegetable/fruit allergy using the EXiLE method | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Allergology International | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.12.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 中村 亮介 | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 アレルギー試験法と標準化免疫療法用アレルゲン | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス | 6. 最初と最後の頁 525-532 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 我妻ななみ、山本海、栗坂知里、櫻井大樹、岡本美孝、中村亮介、秋山晴代 |
| 2. 発表標題 スギ花粉舌下免疫療法実施時における減感作状態のin vitro評価（第2報） |
| 3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 栗坂知里、宮坂美帆、木下美穂、堀雅之、松原康策、中村亮介、秋山晴代 |
| 2. 発表標題 花粉-食物アレルギー症候群におけるEXiLE法を用いた交差反応性評価 |
| 3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Saori Ohmae, Ryosuke Nakamura, Haruyo Akiyama, Katsuyo Ohashi-Doi |
| 2. 発表標題 The validation of EXiLE test for House dust mite allergy |
| 3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 栗坂知里、甲斐茂美、坂本博則、高橋香帆、小林征洋、堀雅之、中村亮介、宮澤眞紀、松原康策、秋山晴代 |
| 2. 発表標題 EXiLE法を用いた加熱・加圧処理による魚肉アレルギー性低減化の評価 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 秋山晴代、中村亮介、櫻井大樹、平野吉彬、根来孝治、岡本美孝 |
| 2. 発表標題 舌下免疫療法実施時における減感作状態のin vitro評価法の検討 |
| 3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平野吉彬、柱山綾香、中村亮介、櫻井大樹、岡本美孝、根来孝治、秋山晴代 |
| 2. 発表標題 スギ花粉舌下免疫療法実施時における減感作状態のin vitro評価法の検討 |
| 3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nakamura, R., Akiyama, H., Sakurai, D., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Okamoto, Y. |
| 2. 発表標題 Crosslinking ability of the serum IgE correlates to the effectiveness of allergen immunotherapy for Japanese cedar pollen. |
| 3. 学会等名 WAO International Scientific Conference 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村亮介、秋山晴代、櫻井大樹、松澤由美子、斎藤嘉朗、岡本美孝 |
| 2. 発表標題 スギ花粉症の舌下免疫療法の奏効性は血清中IgEの架橋能と相関する |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 秋山晴代、鈴木麻希、中村亮介、田中裕、甲斐茂美、栗原和幸、宮澤真紀 |
| 2. 発表標題 EXiLE法を用いた経口免疫療法実施時における減感作状態の評価法の検討（第2報） |
| 3. 学会等名 第66回日本アレルギー学会学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 秋山晴代、西村光平、中村亮介、堀雅之、甲斐茂美、松藤寛、根来孝治、宮澤真紀、松原康策 |
| 2. 発表標題 経口免疫寛容誘導時における減感作状態のEXiLE法を用いた評価 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第138年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 為広紀正、安達玲子、中村政志、竹尾直子、山口正雄、中村亮介、永井晶代、矢上晶子、松永佳世子、近藤一成 |
| 2. 発表標題 EXiLE法によるコチニールアレルギー患者IgEの抗原性解析 |
| 3. 学会等名 第66回日本アレルギー学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|------------------------------|
| 1. 著者名 Ali-Ali E, Nakamura R, Falcone FH. | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 Use of humanized RS-ATL8 reporter system for detection of allergen-specific IgE sensitization in human food allergy. | 5. 総ページ数 299 (pp.147-161) |
| 3. 書名 Food Allergy, Methods and Protocols, Part II | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

魚類アレルギーのアレルギー反応性の低減化に関する研究
<http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/yakubutsuchiryougaku.html>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 中村 亮介 (NAKAMURA RYOSUKE) (50333357) | 国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・協力研究員 (82601) | |