

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02375

研究課題名(和文) 化学修飾エビタンパク質によるアレルギー体質改善の可能性

研究課題名(英文) An approach for immuno tolerance induction for prawn allergy using chemically modified allergenic protein

研究代表者

菰田 俊一 (Komoda, Toshikazu)

宮城大学・食産業学群・教授

研究者番号：50404843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エビ由来のアレルゲンタンパク質(トロポミオシン)を糖類と結合させ、これをアレルギーマウスが長期摂取すると、脱感作を促し、アレルギー状態を脱することができるか評価を行った。この結果、適切な条件で長期投与を行うと、脱感作し、アレルギー体質を改善できる可能性はあるものの、不適切な条件で長期投与を実施すると、よりアレルギー状態が深刻になりアナフィラキシーショックを発生する可能性もあることが示された。本研究では、4週間の自由摂取条件のマウスでは、アレルギー体質改善の兆候を示したが、8週間のゾンデ給餌による強制摂取では、アナフィラキシーが発症し、アレルギー状態が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギーは、社会的に大きな問題となっている。その中でも、エビ・カニ等の甲殻類については、成人の15-20%程度がアレルギーに罹患しているという報告がある。食物アレルギーに関しては、減感作療法による体質改善法が有効である可能性があり、本研究では低アレルゲン化エビタンパク質を使って、マウスレベルでの評価を行った。この結果、条件によっては効果のある可能性は示されたが、不適切な条件ではより深刻な状況になることも明らかになり、実際に応用する際には、厳格な管理が求められることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The allergenic protein (tropomyosin) derived from shrimp was combined with sugars and evaluated to see if long-term ingestion of the protein by allergic mice would induce desensitization and allow them to escape from their allergic state. The results showed that long-term administration under appropriate conditions could desensitize the mice and improve their allergic condition, but long-term administration under inappropriate conditions could make the allergic condition more severe and cause anaphylactic shock. In this study, mice in the 4-week in appropriate condition showed signs of improvement in their allergic constitution, but after 8 weeks of forced feeding by sonde feeding, anaphylaxis developed, and the allergic state was enhanced.

研究分野：食品衛生学

キーワード：甲殻類アレルギー 免疫寛容 メイラード反応 トロポミオシン ガラクトマンナン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在でも、食物アレルギーは、社会的に大きな問題となっている。その中でも、エビ・カニ等の甲殻類については、成人の15-20%程度がアレルギーに罹患しているという報告があった。また、甲殻類に含まれるアレルゲンタンパク質は耐熱性ということもあり、容易には除去できず大きな問題となっていた。

(2) 本研究をはじめの際、当グループの先行的な研究の成果として、エビ由来のアレルゲンタンパク質を糖類により化学修飾することで、アレルゲン性を低減化させる可能性が示されていた。

(3) 他グループ先行研究で、ソバ由来のアレルゲンタンパク質を糖類によって化学修飾し、ソバアレルギーに罹患したマウスに、長期投与した報告があった。最大8週間の投与で、アレルギー罹患マウスが、脱感作したことを示すいくつかの徴候が観測されていた。¹⁾

2. 研究の目的

(1) 食物アレルギーは、大きな社会問題となっており、罹患者にとっては食生活が大きく制限され、ストレスとともに生活することが強いられる。特に、エビ・カニ等の甲殻類は、成人のアレルギー原因食材の第1位であり、年齢が高くなるに従って、罹患率が多くなる傾向にある。エビ・カニに含まれるアレルゲンタンパク質を低アレルゲン化することができれば、多くの罹患者の食生活に関するストレス軽減につながると考え、はじめにタンパク質の低アレルゲン化に取り組むこととした。その結果、当該タンパク質に還元糖を反応させることにより、そのアレルゲン性が低減化される可能性を見出した。本研究では、はじめにタンパク質のアレルゲン性を評価し、研究の材料とできるかを評価することとした。

(2) 他グループの先行研究により、いくつかの食関連アレルゲンタンパク質に関して当該アレルゲンタンパク質を少量長期間摂取すると、脱感作を促し、アレルギー体質を脱することができる可能性が示されている。この中にソバ由来のアレルゲンタンパク質に関する報告があり、ソバ以外のアレルゲンタンパク質に関しても、ソバと同様に脱感作できる可能性がある。このことから、本研究では、甲殻類アレルゲンタンパク質の例として、エビ由来のアレルゲンタンパク質(トロポミオシン、TM)を一旦低アレルゲン化し、これを少量ずつマウスに長期間投与し、脱感作できるか評価を行うこととした。

(3) 本研究では、はじめにエビ由来のアレルゲンタンパク質について検討を進めるが、他の魚介由来アレルゲンタンパク質にも研究対象を広げられるか予備的な検討を進める。具体的には牡蠣に含まれるアレルゲンタンパク質を材料とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、はじめにブラックタイガー種のエビから由来アレルゲンタンパク質(トロポミオシン、TM)を抽出した。エビ TM は耐熱性のタンパク質であるので、はじめに試料のエビをPBS中で煮沸し、ホモジナイザーで粉碎後、遠心分離により固形物を取り除き、その上澄みを粗タンパク質とした。得られた粗タンパク質は、硫酸アンモニウムを用いた塩析法、アセトン沈殿法、疎水相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等を用いて精製し、約37kDa 付近のアレルゲンタンパク質(トロポミオシン、TM)を得た。タンパク質の確認には SDS-PAGE のCBB 染色による方法を用いた。

(2) 次に得られたエビ TM の化学修飾を行った。化学修飾には、メイラード反応を用いた。メイラード法はタンパク質と還元糖を乾燥条件で加熱することにより、複合体を形成する方法であり、本研究では還元糖としてグルコース(G)及びリボース(R)を用いた。また、これと同時に多糖類のガラクトマンナン(GM)も糖修飾の材料として使用した。メイラード反応は、60 の条件下単糖類のグルコース及びリボースとの反応においては、最大7日間、多糖類のガラクトマンナンを用いる場合には最大14日間の反応を行った。反応の様子は、SDS-PAGE により確認した。

(3) 化学修飾後のエビ TM はアレルゲン性の評価に供した。本研究ではモデルマウスを用いた動物レベルでのアレルゲン性評価を行った。マウスはC3H/HeJ(メス)を用い、1群5頭の頭数で1週間ごと3回の腹腔内投与(100 µg・タンパク質・Alum/マウス)を行うことで感作した。感作の後、対象のアレルゲンタンパク質を腹腔内投与し、血中ヒスタミンレベルを把握することにより、各試料のアレルゲン性を評価した。

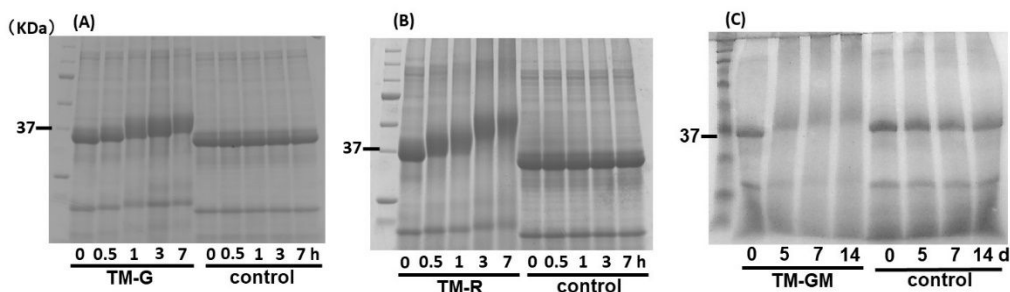
(4) 化学修飾 TM の長期摂取試験は、C3H/HeJ(メス)を用いて試験を行った。摂取の期間は4週

または 8 週とし、摂取の方法は自由摂取および強制摂取の両方を試した。摂取期間が終了した後、解剖により脾臓を取り出し、RNA を抽出して、逆転写酵素によって cDNA へ導いた後、リアルタイム PCR に供し、シグナル強度を定量化した。本研究ではヘルパー T 細胞の分化に関する代表的なシグナルの IL-4 および IFN- γ の発現を指標に感作の状況を判断した。アレルゲンタンパク質に感作し、アレルギー体質になると Th1/Th2 バランスが Th2 側に偏り、アレルゲンタンパク質に対して過剰な反応し、発症につながるが、本研究では Th2 側に偏ったバランスを Th1 側に戻すことによりアレルギー体質の改善を目指している。IL-4 の発現は Th2 の分化を促すシグナルであり、IFN- γ は Th1 への分化を促すシグナルであり、長期摂取の結果、IFN- γ の分泌が活発になり、IL-4 の発現が抑制されるとアレルギー体質の改善を示すこととなる。

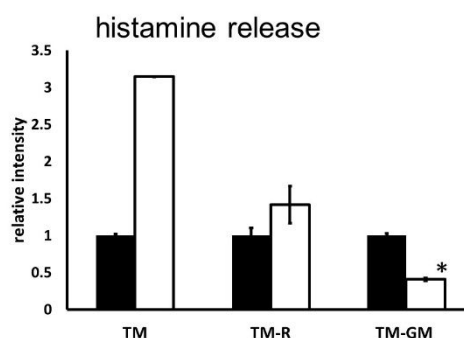
(5) エビ TM 以外の海産物アレルゲンタンパク質への展開として、本研究では牡蠣アレルゲンタンパク質を研究対象とした。牡蠣由来のアレルゲンタンパク質はエビ TM と同様の方法で得た。牡蠣タンパク質の化学修飾には、エビ TM の化学修飾とは違って、オリーブ由来のポリフェノール画分 (OLEx) との結合反応を使うこととした。OLEx 中には、分子中にアルデヒドを 2 つもつジアルデヒド化合物が含まれ、タンパク質とメイラード反応様の反応が起こると予想された。

4. 研究成果

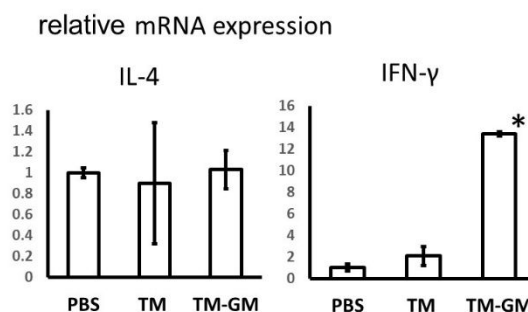
(1) エビ由来のアレルゲンタンパク質 (トロポミオシン, TM) を抽出し、単糖類のグルコース (G) およびリボース (R)、さらに多糖類のガラクトマンナン (GM) を 60 °C で反応させたところ、反応時間に伴って糖類が TM と反応が徐々に分子量が大きくなっていることが示された。単糖類のグルコースとリボースを比べると、リボースの方が、反応速度が早いことがわかった。このことから、TM-リボース複合体 (TM-R) を動物実験に供することとした。また、多糖類を反応基質とした TM-ガラクトマンナン複合体 (TM-GM) も動物実験の材料とした。



(2) 動物実験によるアレルゲン性試験を行った結果、TM-R および TM-GM の両方において、血中へのヒスタミン放出が抑制されていた。エビ TM に感作したマウスから尾静脈血を採取後、腹腔内に TM を腹腔内接種すると、発症につながるヒスタミンが血中へ放出され、接種前後でその値に大きな差が生じる。一方で、糖で修飾した TM-R または TM-GM を接種したときは、接種の前後でヒスタミンレベルが抑制されていた。このことは、TM-R および TM-GM の両方が、TM に比べてアレルゲン性が抑制されていることを示していた。ソバの報告を参考にすると、ソバのアレルゲンタンパク質を酵母由来ガラクトマンナンで化学修飾したものを、マウスが長期間自由摂取すると、アレルギー体質が改善するとの報告があり、これを参考に本研究では多糖類を用いて化学修飾を行った TM-GM について長期投与の試験を行うこととした。



(3) 長期試験には、TM-GM を用いた。エビアレルゲンタンパク質に感作したモデルマウスに、4 週間の自由摂取を行い、解剖の後、脾臓からの IL-4 および IFN- γ の分泌をリアルタイム PCR で定量した。この結果、コントロールとして PBS を自由摂取した群または未処理のエビアレルゲンタンパク質を自由摂取した群と比べて、TM-GM を長期摂取した群では、IL-4 の分泌は群間で大きな違いは見られなかった。一方で、IFN- γ の分泌は TM-GM 摂取群で増加していることがわかった。このことは、4 週間の自由



摂取では、Th1/Th2 のバランスが改善傾向にあると考えられた。

次に、より鮮明な結果を得るため、条件を変更し、8 週間の強制摂取を行った。この結果は、4 週間の自由摂取とは別の結果を導いた。エビ TM に感作したマウスに、8 週間の強制摂取を行った後、アレルゲンタンパク質の TM を腹腔内投与したところ、TM-GM 摂取群のマウスはアナフィラキシーを発症し、腹腔内投与直後に死亡した。

以上をまとめると、TM-GM の長期摂取を行う際、適切な条件で摂取を続けると脱感作を促し、アレルギー体質が改善する可能性があるが、条件を誤ると、感作の状態が深刻になり、重篤なアナフィラキシー発症に繋がる可能性を示すものであった。今回の検討の中では、ゾンデによる強制摂取を行っているため、これがマウスにとって大きなストレスになり、アレルギー状態の亢進に繋がった可能性があると考えられた。

(4) エビ TM 以外の海産物アレルゲンの例として、牡蠣アレルゲンタンパク質を挙げこれに関する化学修飾について、予備実験を行った。その結果、牡蠣アレルゲンタンパク質とオリーブ由来ポリフェノール画分(OLEx)を結合させると、アレルゲンタンパク質が重合化し、物理的・化学的性質が影響を受け、動物試験においてアレルゲン性が低減化している可能性が示された。

<引用文献>

- 1) Yasuhiro Suzuki et.al., Modulation of immunoresponse in BALB/c mice by oral administration of Fag e 1-glucomannan conjugate, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 9787-9792.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0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 菰田俊一	4. 巻 41
2. 論文標題 食物アレルギーの化学修飾	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 82-87
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 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 41
2. 論文標題 食品化学からみた食物アレルギー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 72-77
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 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 40(6)
2. 論文標題 化学修飾によるアレルギー性低減化の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 69-74
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 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 40(14)
2. 論文標題 食品側から見た食物アレルギー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 82-87
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 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 39
2. 論文標題 甲殻類アレルギー，食品化学の立場から	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 60-65
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 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 39
2. 論文標題 甲殻類アレルギーに対する食品化学からのアプローチ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 76-81
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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toshikazu KOMODA and Mina ORIMOTO
2. 発表標題 Evaluation of an immuno tolerance introducing activity against prawn allergy using long term allergen-polysaccharide conjugate intake in mouse study.
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Pacificchem 2021 Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菰田 俊一、折本 未奈、赤澤 隆志
2. 発表標題 オリブ成分による牡蠣アレルギータンパク質の重合化とモデルマウスによるアレルギー性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菰田 俊一、山口 春菜、赤澤隆志
2. 発表標題 オリブ抽出物によるカキアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 春菜、目黒 帆乃佳、菰田 俊一
2. 発表標題 糖修飾エビアレルゲンタンパク質のモデルマウスによるアレルゲン性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関