

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07611

研究課題名(和文)「消化管からはじまるアレルギー」と「皮膚からはじまるアレルギー」

研究課題名(英文) "Allergy via Intestine" and "Allergy via Skin"

研究代表者

山下 弘高 (Yamashita, Hiroataka)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40453055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、食物抗原の腹腔内注射による感作のマウス食物アレルギーモデルを作製していた。また、感作に先立ち食物抗原を経口投与することで、経口免疫寛容を誘導したモデルも作製していた。近年、加水分解小麦含有の洗顔石鹸の使用により小麦アレルギーを発症する事例が報告された。そこで、皮膚を介する感作による食物アレルギーモデルを作製し、経口免疫寛容の破たんを試みた。最初、食物抗原を貼付するモデルを作製したが、IgE産生は認められたがアナフィラキシーショックは誘導されなかった。次に、皮内注射による感作モデルを作製した。その結果、経口免疫寛容を破たんさせ、アナフィラキシーショックを誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食べ物が消化管を介して吸収された場合は経口免疫寛容が誘導され、皮膚を介して侵入した場合はアレルギーが生じるという仮説が提唱されている。加水分解小麦含有の洗顔石鹸の使用によって小麦アレルギーが生じた事例は、その仮説を支持するものであったが、獲得した経口免疫寛容を破たんさせ食物アレルギーを発症させるマウスモデルは報告されていなかった。今回の研究において、皮内注射による感作が経口免疫寛容を安定的に破たんさせられることが示された。このモデルの詳細を解析することで、皮膚を介した暴露が食物アレルギーを起こしやすい理由や、食べた物がアレルギーの対象として認識される根本的な原因の解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported a murine food allergy model with intraperitoneal injection of the food antigen. Then, preliminary oral administration of the antigen prevented the development of food allergy in the model. Recently, the incident of wheat allergy to use facial soap containing wheat protein hydrolyze was reported. Therefore, we made the food allergy models via skin exposure of the food antigen. At first, we made the model with pasting the antigen. The pasting model could break oral tolerance partially because antigen specific IgE level in blood was elevated but not induced anaphylaxis. Then, we made the model with sensitization by intradermal injection of the food antigen. In the intradermal injection model, oral tolerance was overridden, and food allergy developed with IgE elevation and anaphylaxis.

研究分野：免疫アレルギー

キーワード：食物アレルギー 経口免疫寛容 経皮感作

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは難治性の慢性アレルギー疾患である。一般的に、食べた物に対しては、経口免疫寛容と呼ばれる免疫制御システムが働きアレルギーは誘導されない。食物アレルギー患者は、食べた物に対して、経口免疫寛容が獲得できなかったか、もしくは、獲得したものが無効化されることによって、アレルギーが生じている。食べた物に対して、免疫寛容が誘導されるか、それとも、アレルギーが誘導されるかについての仮説として、「二重抗原暴露仮説」が提唱されている¹。この仮説によると、消化管を介して食物抗原を吸収した場合は免疫寛容が、皮膚を介して暴露された場合にはアレルギーが誘導される。いくつかの疫学調査において、早期の食物抗原の摂取が食物アレルギーの発症リスクを軽減することが報告されており²、消化管を介する食物抗原の吸収が免疫寛容を誘導することを支持している。また、加水分解小麦末を含有する洗顔石鹸の使用によって小麦アレルギーを発症した事例（この事例では、小麦製品を摂取してもアレルギーを起こさなかった人において小麦アレルギーが発症した）は³、皮膚を介する食物抗原の暴露が食物アレルギーを発症させる可能性を示した。しかしながら、獲得していた経口免疫寛容が破たんするシステムは不明である。

2. 研究の目的

これまでに私たちは、マウスに卵の代表的なアレルゲンである卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を腹腔内注射で感作した食物アレルギーモデルを作製した⁴。また、感作に先立ち OVA を経口投与する経口免疫寛容モデルも作製した。経口免疫寛容モデルでは、OVA の腹腔内注射による IgE 上昇が完全に抑制されるため、食物アレルギーの発症が抑えられた。

これまでに皮膚を介した感作による食物アレルギーモデルの報告はあったが⁵、経口免疫寛容と併用した検討はほとんどされていなかった。そこで、まず、皮膚を介する感作による食物アレルギーモデルが、私たちの実験環境でも作製できるかについて検討し、そのモデルにおいて経口免疫寛容を誘導することで、経口免疫寛容が経皮的な感作によって無効化されるかについて検討する。そして、経口免疫寛容が経皮的な感作によって破たんする機序について解析する。

3. 研究の方法

皮膚を介した感作のマウス食物アレルギーモデル

マウスモデルのプロトコルの概略を 図 1 に示す。

(1) 腹腔内注射によるマウス食物アレルギーモデル

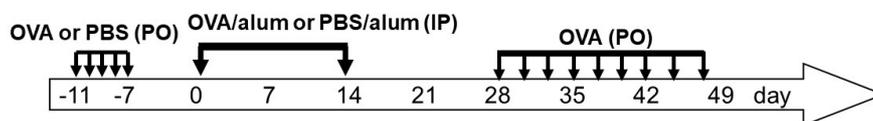
BALB/c マウスに、OVA と免疫アジュバントとして水酸化アルミニウムゲル (alum) を混合したものを 2 回腹腔内注することで感作し、その後、30 mg の OVA 溶液を 9 回経口投与し食物アレルギーを誘発した (intraperitoneal injection model, IP model)。経口免疫寛容の誘導は、最初の OVA 溶液の注射に先立って、1 mg の OVA 溶液を経口投与することで誘導した。

(2) OVA 貼付による食物アレルギーモデルと経口免疫寛容

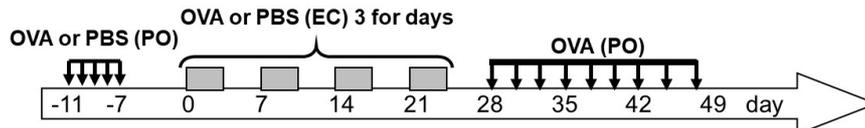
BALB/c マウスの後背部を予め剃毛しておき、剃毛部にテープストリッピング (サージカルテープを貼って剥がす操作) を 3 回行い、OVA 溶液をしみこませてる紙を 3 日間貼付した。OVA 溶液の貼付は 4 週間、もしくは、6 週間行った。その後、30 mg の OVA 溶液を 9 回経口投与し、食物アレルギーを誘発した (epicutaneous sensitization model, EC model)。経口免疫寛容の誘導は、最初の OVA 溶液の貼付に先立って、1 mg の OVA 溶液を経口投与することで誘導した。

図1：食物アレルギーモデルと経口免疫寛容モデル

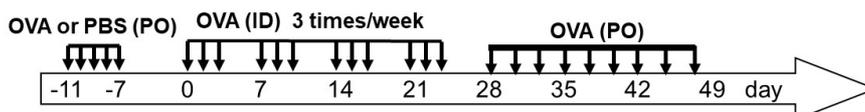
(1) IP model



(2) EC model



(3) ID model



(3) OVA の皮内注射による食物アレルギーモデルと経口免疫寛容

BALB/c マウスの後背部に OVA 溶液を皮内注射した (剃毛やテープストリッピングは行っていない)。OVA 溶液は、連続 3 日間を 4 週間行った。その後、30 mg の OVA 溶液を 9 回経口投与し、食物アレルギーを誘発した (intradermal injection model, ID model)。経口免疫寛容の誘導は、最初の OVA 溶液の皮内注射に先立って、1 mg の OVA 溶液を経口投与することで誘導した。Interleukin (IL)-33 をアジュバントとした食物アレルギーモデルでは、皮内注射する OVA 溶液に IL-33 を添加した。IL-33 を加えた OVA 溶液は、同様に連続 3 日間を 4 週間行った。

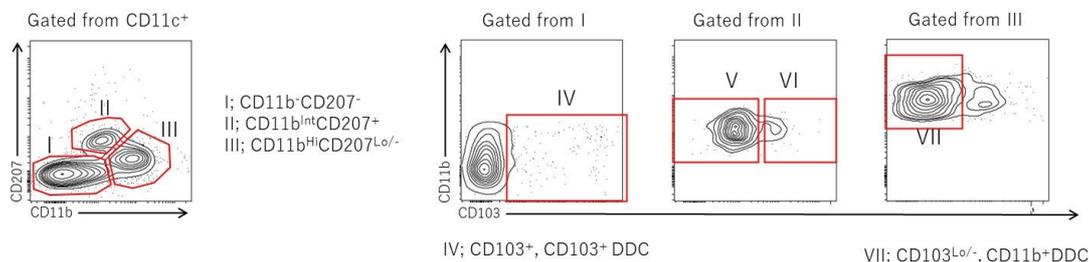
食物アレルギーの評価

食物アレルギーの評価は、OVA 溶液投与後 1 時間の体温の変化と、その時の糞便の状態にスコアをつけて評価した。体温は、無麻酔で体温測定端子を肛門へ挿入して測定した。スコアは、スコア 0 を通常の固形の糞便とし、スコア 3 を水溶性の下痢として、その水分の含有量に応じて 0~3 のスコアをつけた。また、定期的に採血し、血中の OVA 特異的 IgE 値を評価した。

樹状細胞や制御性 T 細胞の解析

経口免疫寛容を誘導し OVA 溶液を皮内注射したマウスの皮膚所属リンパ節を採取し、リンパ節へ遊走している樹状細胞 (dendritic cell, DC) やリンパ節での制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) の割合をフローサイトメーターで測定した。DC の分類は、これまでの報告を参考とし⁶、CD11c⁺CD11b⁻CD207⁻CD103⁺DC を CD103⁺dermal DC (DDC)、CD11c⁺CD11b^{Int}CD207⁺CD103^{Lo/-}DC を Langerhans cell (LC)、CD11c⁺CD11b^{Int}CD207⁺CD103^{Hi}DC を CD207⁺DDC、CD11c⁺CD11b^{Hi}CD207^{Lo/-}CD103^{Lo/-}DC を CD11b⁺DDC と定義した (図 2)。

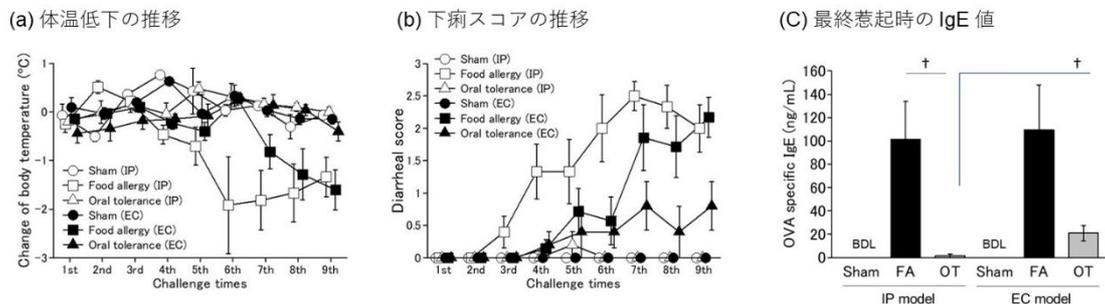
図2：フローサイトメーターのゲート戦略



4. 研究成果

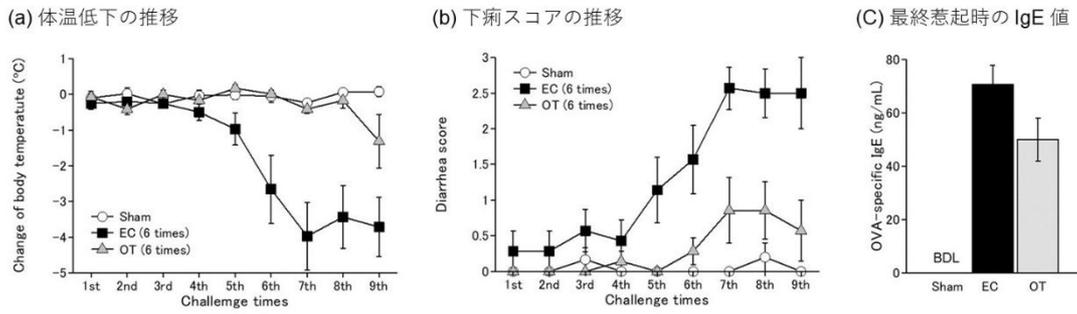
まず、(1) の腹腔内注射による食物アレルギーモデル (IP model) では、9 回の 30 mg OVA 溶液の経口投与によって、重症度のアナフィラキシーショックが惹起され、複数のマウスが死亡した。予め 1 mg OVA 溶液を経口投与しておくこと、OVA 特異的 IgE 産生が完全に抑制され、食物アレルギー症状は抑制された。(2) の OVA 貼付によるマウス食物アレルギーモデル (EC model) においても、OVA 特異的 IgE 産生に伴い体温低下やアレルギー性下痢が観察された。EC model において経口免疫寛容を誘導すると、OVA 特異的 IgE 産生が確認されたが、顕著なアナフィラキシーは確認できなかった (図 3)。経口免疫寛容の状態を無効化するには感作が弱かった可能性が考えられたため、経皮感作の回数を 4 回から 6 回へ増やし、同様の検討を行った。その結果、血中の OVA 特異的 IgE 値は増加したものの、明確なアナフィラキシーショックは認められなかった (図 4)。

図3：EC model (4回貼付)



†P<0.05 (Student or Welch's t-test); IP, 腹腔内注射感作群; EC, 経皮感作群; FA, 食物アレルギー群; OT, 経口免疫寛容誘導群; BDL, 検出限界以下

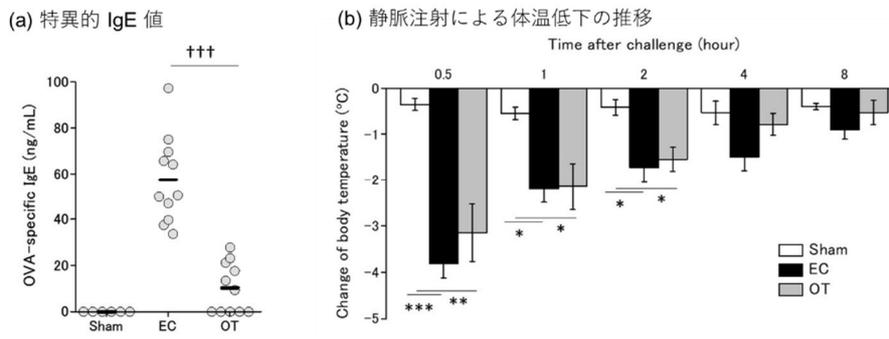
図4：EC model（6回貼付）



EC, 経皮感作群; OT, 経口免疫寛容誘導群; BDL, 検出限界以下

経口免疫寛容後の OVA の貼付によって上昇した IgE にはなんらかの機能制限がある可能性が考えられたため、経口免疫寛容を誘導した後に 6 回の経皮感作で OVA 特異的 IgE を上昇させたマウスに、OVA 溶液を尾静脈内投与した。その結果、アナフィラキシーショックが誘導され、顕著な体温低下が確認されたことから、上昇した IgE は十分に機能していると思われる。経口免疫寛容を誘導し 6 回経皮感作を行ったマウスの IgE 値は、20 ng/mL 程度上昇している個体群と検出限界以下の個体群に分かれていた (図 5)。これは、経皮感作の操作の複雑性が原因であると考えた。経皮感作では、予め剃毛した後背部に、3 回のテープストリッピングを行い、そこへ OVA 溶液をしみ込ませたろ紙を 3 日間貼付する。貼付したろ紙は、3 日間で、マウスが自身で引掻いて除いてしまったり、別のマウスによって噛みちぎられてしまうケースがみられた。また、経皮感作の操作は複雑であるため、実験者によるバラツキも生じやすいと考えられた。

図5：経口免疫寛容状態で上昇した IgE の機能の確認



††† P<0.001 (Student or Welch's t-test); *, **, *** P<0.05, 0.01, 0.001 (Dunnnett test); EC, 経皮感作群; OT, 経口免疫寛容誘導群

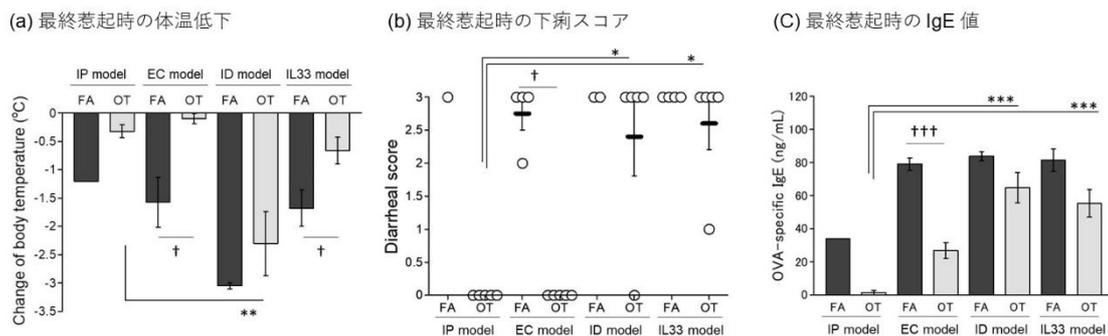
そこで、より手技が安定する (3) の OVA 溶液を皮内注射することで感作を行う食物アレルギーモデル (ID model) の作製を行った。また、経口免疫寛容と皮内注射による感作を併せた検討を行った。EC model において経皮感作が成立するには、テープストリッピングによって生じる前炎症性サイトカインである IL-33 や TSLP が必要であると考えていたため、単純な OVA 溶液の皮内注射群に加え、OVA 溶液に IL-33 を添加した溶液を皮内注射した (IL-33 model)。その結果を図 6 に示す。まずは食物アレルギー誘導群において、ID model や IL-33 model では、IP model や EC model と同程度かそれ以上のアナフィラキシーが観察された。そして経口免疫寛容を誘導した ID model では、顕著な IgE 値の上昇に加え、体温低下やアレルギー性下痢が観察された。すなわち、経口免疫寛容が皮内注射によって無効化された。また、ID model と IL-33 model を比較すると、同程度か、むしろ ID model のほうが顕著なアレルギーが確認されたことから、皮内注射時の免疫アジュバントは必要ないと考えられた。

皮内注射による経口免疫寛容の無効化の機序を解明するため、皮膚所屬リンパ節における DC の遊走状態と Treg の誘導状態をフローサイトメーターによって測定した。データは 4 週目の皮内注射時の注射前 (Day 0)、注射後 1 日後と 3 日後 (Day1, Day 3) を示している。経口免疫寛容誘導群では免疫寛容を担っている CD103+DDC が遊走していたが、皮内注射によって炎症性の CD11b+DDC が併せて遊走してくることが明らかとなった。また、それに伴い、最初の皮内注射時では有意差があった Treg の誘導が最終週では抑制されることが明らかとなった (図 7)。

以上のことから、加水分解小麦含有洗顔石鹸の使用により小麦アレルギーが発症した事例のように、食物抗原を皮膚を介して暴露することによって、獲得していた経口免疫寛容を無効化し、食物アレルギーを発症させることができた。ただし、本来は EC model のように、皮膚バリア

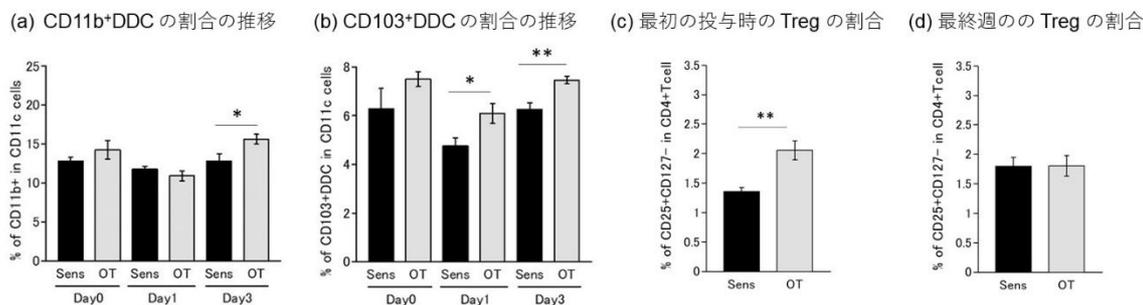
を障害させ表皮より食物抗原を侵入させるモデルのほうが臨床状態に即していると思われるが、残念ながら、EC model では免疫寛容を安定的に無効化することはできなかった。そして経口免疫寛容の無効化には、炎症性 CD11b+DDC が遊走し Treg の誘導が妨げられることによって生じたと考えられた。

図6：EC modelとID model と IL-33 model の比較



†, ††† P<0.05, 0.001 (Student or Welch's t-test, or Mann-Whitney U test); *, **, *** P<0.05, 0.01, 0.001 (Dunnett test, or Steel's test); FA, 食物アレルギー群; OT, 経口免疫寛容誘導群;

図7：樹状細胞の遊走と制御性T細胞の誘導



*, ** P<0.05, 0.01 (Student or Welch's t-test); Sens, 感作群; OT, 経口免疫寛容誘導群;

参考文献

1. Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:1187e1197.
2. Du Toit G et al. Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N Engl J Med.* 2015;372:803e813.
3. Fukutomi Y et al. Epidemiological link between wheat allergy and exposure to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *Allergy.* 2014;69:1405e1411.
4. Yamashita H et al. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy.* 2012;67:201e209
5. Muto T et al. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *Int Immunol.* 2014;26:539e549.
6. Yamashita H et al. Artificial sweeteners and mixture of food additives cause to break oral tolerance and induce food allergy in murine oral tolerance model for food allergy. *Clin Exp Allergy.* 2017;47:1204e1213.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamashita Hirotaka, Shigemori Akari, Murata Misato, Tanaka Hiroyuki, Inagaki Naoki, Tsutsui Masato, Kimura Mariko	4. 巻 85
2. 論文標題 Impact of orally-administered oligosaccharides in a murine model of food allergy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 104643 ~ 104643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2021.104643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato Kaori, Tsutsui Masato, Noguchi Shingo, Iha Yukitoshi, Naito Keisuke, Ogoshi Takaaki, Nishida Chinatsu, Tahara Masahiro, Yamashita Hirotaka, Wang Ke-Yong, Toyohira Yumiko, Yanagihara Nobuyuki, Masuzaki Hiroaki, Shimokawa Hiroaki, Tanimoto Akihide, Yatera Kazuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Spontaneous pulmonary emphysema in mice lacking all three nitric oxide synthase isoforms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01453-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimamori Yuzuki, Mitsunaka Shoichi, Yamashita Hirotaka, Suzuki Tohru, Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Takeda Shigeki, Ando Hiroki	4. 巻 13
2. 論文標題 Staphylococcal Phage in Combination with Staphylococcus epidermidis as a Potential Treatment for Staphylococcus aureus-Associated Atopic Dermatitis and Suppressor of Phage-Resistant Mutants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 7~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13010007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Teruaki, Yamashita Hirotaka, Kitamura Katsumasa, Makino Atsushi, Takasato Yoshihiro, Sugiura Shiro, Ito Komei	4. 巻 78
2. 論文標題 Prophylactic steroid use is ineffective in food allergy: A randomized controlled clinical trial and a murine model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 537 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15451	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 Yamashita Hirotaka、Matsuhara Hiroki、Tanaka Hiroyuki、Inagaki Naoki、Tsutsui Masato	4. 巻 152
2. 論文標題 Oral allergy induction through skin exposure to previously tolerated food antigens in murine models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 76～85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山下弘高、田中宏幸、稲垣直樹、筒井正人
2. 発表標題 マウス食物アレルギーモデルを用いた経口免疫寛容に対する経皮的な食物抗原暴露の影響
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下弘高、田中宏幸、稲垣直樹、筒井正人
2. 発表標題 マウス食物アレルギーモデルを用いた食物アレルギーの発症における経口免疫寛容と経皮的な抗原負荷のバランスの解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下弘高
2. 発表標題 慢性アレルギー疾患に奏効する漢方薬の探究
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下弘高、田中宏幸、稲垣直樹、筒井正人
2. 発表標題 マウスモデルを用いた食物アレルギーの発症に及ぼす食品添加物の影響についての検討
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森翔太、山下弘高、松井照明、伊藤浩明、田中宏幸、稲垣直樹
2. 発表標題 食物アレルギーの即時型症状に対するステロイド薬の有効性の検討
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田美怜、山下弘高、森翔太、松井照明、伊藤浩明、稲垣直樹、檜井栄一、田中宏幸
2. 発表標題 食物アレルギーの即時型症状に対するステロイド薬の作用機序の解析
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 山下弘高
2. 発表標題 マウス食物アレルギーモデルによる食品添加物が食物アレルギーの発症に及ぼす影響について
3. 学会等名 第6回黒潮カンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下弘高、伊波幸紀、田中宏幸、稲垣直樹、筒井正人
2. 発表標題 マウス食物アレルギーモデルによる皮膚を介した食物抗原の暴露により経口免疫寛容を破たんさせる方法の探索
3. 学会等名 第75回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下弘高、伊波幸紀、田中宏幸、稲垣直樹、筒井正人
2. 発表標題 皮膚を介した食物抗原の暴露によって獲得した経口免疫寛容を破たんさせる方法の探索
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------