

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700757

研究課題名（和文） 鶏卵白中 L-PGDS による卵アレルギー発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） The mechanism by which egg white allergen, L-PGDS increases serum OVA-IgE level in OVA-sensitized mice

研究代表者 鈴木 麻希子 (MAKIKO SUZUKI)  
岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：60437001

研究成果の概要（和文）：先行研究により、オボアルブミン（OVA）で感作したマウスに、我々が既に卵白アレルギーとして報告している lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) を OVA と共に経口投与すると、OVA 単独の経口投与に比べて OVA 特異的 IgE が上昇することを見出していた。本研究においては、L-PGDS が Th1/Th2 バランスの偏向を引き起こして、OVA-IgE 上昇を引き起こすこと、また、末梢のアレルギー炎症にも関与することを明らかにした。さらに、鶏卵白中の L-PGDS 量を定量し鶏卵種および保存期間によってその量に変化することを示した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism by which egg white allergen, L-PGDS increases serum ovalbumin (OVA)-IgE level in OVA-sensitized mice. L-PGDS enhances OVA-IgE via Th1/Th2 polarization. L-PGDS also induces peripheral allergic inflammation. The amount of L-PGDS in various egg whites and the change of quantity by preservation were measured by ELISA.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と栄養、食物アレルギー、オボアルブミン、lipocalin-type prostaglandin D synthase

## 1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、近年増加の一途を辿り、社会的問題となっている。卵アレルギーは小児の食物アレルギーの原因食品の第1位であり、その症状はアナフィラキシーを引き起こして、生死に拘わることも珍しくない。我々は卵の新規アレルギーとして L-PGDS が存在

することを明らかにした。L-PGDS は、prostaglandin D (PGD<sub>2</sub>) を合成する酵素であり、その生成物の PGD<sub>2</sub> はアレルギー炎症誘発物質である。また、過去にヒト L-PGDS を過剰発現させたマウスに ovalbumin (OVA) を投与して喘息を誘発させると、その症状の程度は野生型マウスに比べ悪化することが報告

されている。したがって、我々は卵白中の L-PGDS が IgE 依存性のアレルゲンとしてのみでなく、IgE 非依存性の機序によっても、卵アレルギー反応を惹起する可能性を考え、検討を行ってきた。その結果、マウスにオボアルブミン (OVA) と組み換え型鶏 L-PGDS (rL-PGDS) を共に経口投与すると、OVA 単独投与に比べ、OVA 特異的 IgE 値が上昇することを平成 19 年度科学研究費補助金 (若手研究スタートアップ) を明らかにした。これまで誰もが着目してこなかった鶏卵中 (外因性) の L-PGDS が卵アレルギーの炎症を悪化させるという我々の仮説を証明するものである。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1) 鶏卵中の L-PGDS が OVA 特異的 IgE を上昇させる作用機構を解明すること、(2) 鶏卵種や保存方法による L-PGDS 量の変化を明らかにし、鶏卵中 L-PGDS の低減化を行うことを目的に行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ① アレルギーモデルマウスの作製

6 週齢の Balb/c マウス (雄) に OVA 50  $\mu\text{g}$  と硫酸アルミニウムカリウム (Alum) 1 mg の混合液を Day0, 14 の 2 回腹腔内投与し、その後、生食投与群 (S 群)、OVA 50  $\mu\text{g}$  の単独投与群 (O 群)、OVA 50  $\mu\text{g}$  と rL-PGDS 3  $\mu\text{g}$  の併用投与群 (O/L 群) の 3 群に分け、経口投与を Day28, 30, 32, 35, 37, 39 に 6 回行った。最終経口投与から 30 分後に血液・胃・脾臓を採取した。血清中の総 IgE 抗体価および OVA 特異的 IgE 抗体価は ELISA により測定し、モデルマウスが作製できていることを確認した。

### ② 脾臓中サイトカイン発現量の測定

脾臓より RNA の抽出を行い逆転写により cDNA を得た。得られた cDNA を用いて real-time PCR を行い、IL-4、IL-5、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の発現量を測定し、 $\beta$ -actin の発現量で補正した。

### ③ 血清中サイトカイン量の測定

血清中の IL-2、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF、IL-17A、IL-10 の測定は Mouse Th1/Th2/Th17 Cytometric bead array (CBA) kit を用いて行った。

### ④ 小腸における好酸球数の測定

L-PGDS が小腸のアレルギー炎症に及ぼす影響を検討するため、ホルマリン固定を行った小腸をパラフィンで包

埋し、薄切切片を作製した。切片のギムザ染色を行い、好産球数のカウントを行った。

### ⑤ 組み換え型 L-PGDS の酵素活性の測定

L-PGDS による total IgE ならびに OVA 特異的 IgE 上昇に酵素活性が関わる可能性を検討するため、大腸菌によって発現させた L-PGDS の酵素活性を常法により測定した。その際、消化酵素の影響 {ペプシン処理 (37  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分) またはペプシン処理 (37  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分) + トリプシン処理 (37  $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間)} も検討した。

### (2) ① 卵白および卵黄中 L-PGDS の比較

これまでに卵白中の L-PGDS については検討してきたが、卵黄中の L-PGDS については、これまで検討しておらず、過去の報告もないため、卵黄中の L-PGDS 量の存在およびその量についてイムノブロットにより検討を行った。

### ② サンドイッチ ELISA 法の改良

我々はこれまでに作製した抗 L-PGDS モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法の感度を上昇させるため、rL-PGDS を変性させた場合の抗体の親和性およびサンドイッチ ELISA の検出限界を検討した。rL-PGDS の変性は 1% SDS および 10 mM mercaptoethanol を含む 50 mM Tris-HCl buffer, pH8.0 により 4 $^{\circ}\text{C}$  で 4 時間透析して行った。その後、PBS pH 7.4 にて一晩透析し、翌朝再び PBS を交換して 3 時間透析して、標準試料とした。

### ③ 鶏卵種および鶏卵の保存条件による L-PGDS 量の検討

改良したサンドイッチ ELISA 法を用いて鶏卵中の L-PGDS 量を測定し、鶏卵種による比較および鶏卵の保存期間による影響を検討した。鶏卵種の比較には、我々が日常的に入手可能な市販の白色卵; ジュリアライト由来「元気印たまご」、DHA・VE 卵; ポリスブラウン由来「DHA・ビタミン E 強化ココ一番」、平飼卵; デカルブラウン由来「“放し飼ひ” 庭先たまご」(株式会社 のだ初)、ヨード卵; ポリスブラウン由来「ヨード卵ひかり」(日本農産工業 株式会社) の 4 種類の鶏卵を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ① 血清中 total IgE, OVA-IgE の測定

作製したアレルギーモデルマウスの血清中 total-IgE および OVA-IgE の測定を行った。その結果、total-IgE、OVA-IgE とも S 群、OVA 群に比べ O/L 群で有意に上昇しており、L-PGDS によるアレルギーモデルマウスが作製できていることを確認した (図 1)。

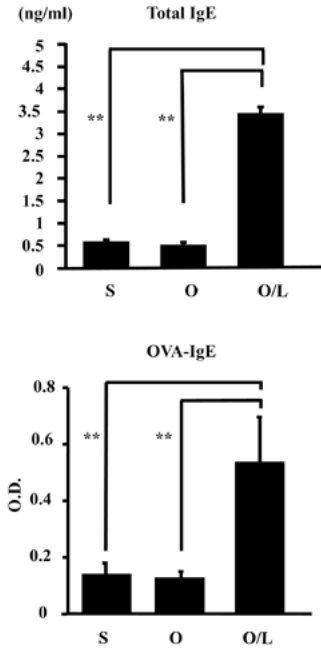


図 1

②脾臓中サイトカイン発現量および血清中サイトカイン量の測定

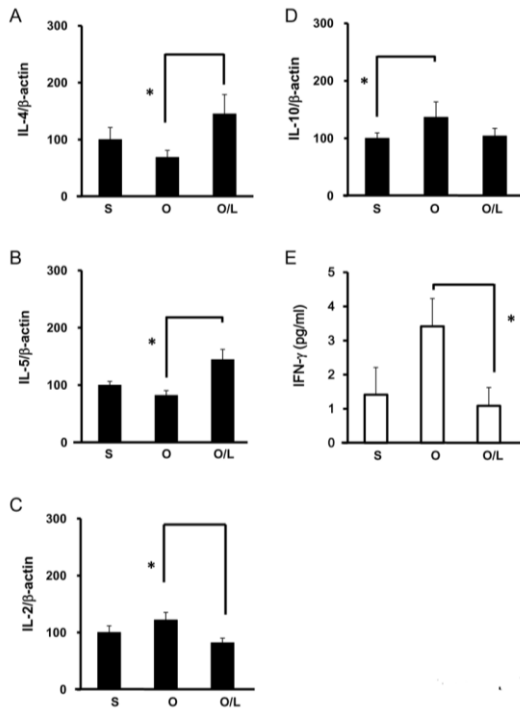


図 2

測定した脾臓中のサイトカインのうち、IL-4、IL-5、IL-2、IL-10 の mRNA 発現量に有意差が認められた (図 2A~D)。Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 の mRNA 発現量は OVA 群に比べ OVA/L-PGDS 群で有意に高値を示した。一方、Th1 サイトカインである IL-2 の mRNA 発現量は O 群に比べ O/L 群で抑制された。IL-10 は Th2 サイトカインであるが、Th 1 細胞への分化を誘導するサイトカインであり、免疫寛容に重要であるとされるサイトカインである。IL-10 の mRNA 発現量は O 群で S 群に比べ有意に上昇していたが、O/L 群では生食群に比べ有意な上昇は見られなかった。一方、Th1 サイトカインである IFN-γ は、脾臓中の mRNA 発現量には 3 群間で有意な差は認められなかったのに対し、血清中では O 群で O/L 群に比べ有意に高値を示した (図 2E)。これらのことから、L-PGDS による total IgE および OVA-IgE の上昇は Th1/Th2 バランスの偏向によるものであることが示唆された。

③小腸におけるアレルギー炎症について

L-PGDS がアレルギー炎症に及ぼす影響を検討するため、小腸における好酸球数のカウントを行った。その結果、S 群、O 群に比べ、O/L 群で有意に好産球の浸潤が認められた (図 3)。

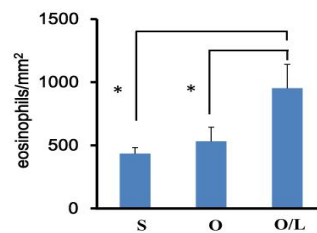
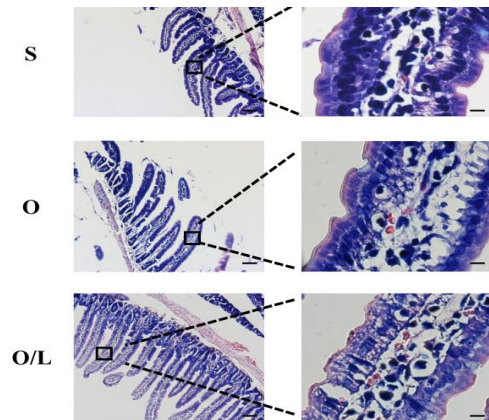


図 3

④組み換え型 L-PGDS の酵素活性の測定

上記の L-PGDS の作用には、L-PGDS の酵素活性が関与している可能性が考えられる。しかしながら、L-PGDS は経口的に投与しているため、消化酵素によって分解される可能性がある。そこで、未処理、ペプシン処理、ペプシン+トリプシン処理による L-PGDS の酵素活性の測定を行った。その結果、我々が発現させた組み換え型 L-PGDS の酵素活性は 4.4 nmol/mg/min であることが明らかとなり、その活性はペプシン処理を行っても 60%維持された。しかしながら、ペプシン+トリプシン処理ではその活性が失われた。このことから、L-PGDS の活性は胃内では維持され、小腸通過時に失活することが示唆された。

以上 (1) の検討より、L-PGDS による OVA 特異的 IgE 上昇は、Th1/Th2 バランスの偏向によるものであることが示唆された。また、本検討に用いた rL-PGDS は酵素活性を有しており、その活性は胃内では維持されていることから、L-PGDS による PGD2 合成が本作用に関与していることも考えられる。また、L-PGDS は末梢におけるアレルギー炎症を誘発することも示した。好産球の遊走には IL-5 が重要な役割を果たすことが知られているため、脾臓における IL-5 の発現が高値であったことが関連していると考えられる。

(2) ①卵白および卵黄中 L-PGDS の比較

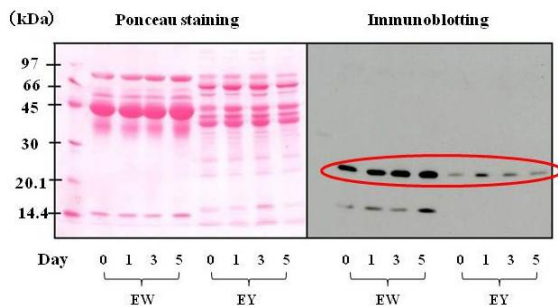


図 4

我々が作製した鶏卵 L-PGDS と特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、卵黄のイノムブロットを行い、比較対照として卵白を用いた。図 4 より卵黄には L-PGDS が存在すること、またその量は卵白の方がはるかに多いことが明らかとな

った。本結果より、卵白中の L-PGDS が鶏卵中の L-PGDS を反映し、アレルゲンとして問題となると考えられることから卵白中 L-PGDS の定量を行うこととした。

②サンドイッチ ELISA 法の改良

変性抗原と未変性抗原に対する抗体の親和性を比較した。未変性抗原(未変性 rL-PGDS)に比べ変性抗原(変性 rL-PGDS)に対する抗体の親和性は特に⑫抗体で高くなった(表 1)。

表 1

mAb	親和定数 K(M)
変性⑫	$9.3 \times 10^{-11}$
未変性⑫	$1.1 \times 10^{-10}$
変性⑬	$3.2 \times 10^{-10}$
未変性⑬	$4.1 \times 10^{-10}$

サンドイッチ ELISA では相乗効果が期待できることから変性条件でのサンドイッチ ELISA を試みた。その結果、未変性 rL-PGDS を用いた場合の検出限界は 0.6 μg/ml であったのに対し、変性 rL-PGDS を用いた場合には、検出限界が 0.05 μg/ml と感度の高上が見られた(図 5)。

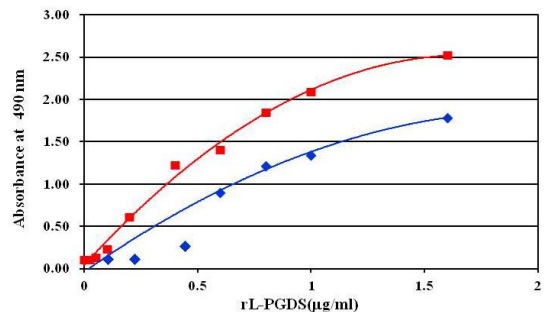


図 5

③鶏卵種及び鶏卵の保存条件による L-PGDS 量の変化

これまで検討してきたサンドイッチ ELISA 法を用いて、鶏卵白中

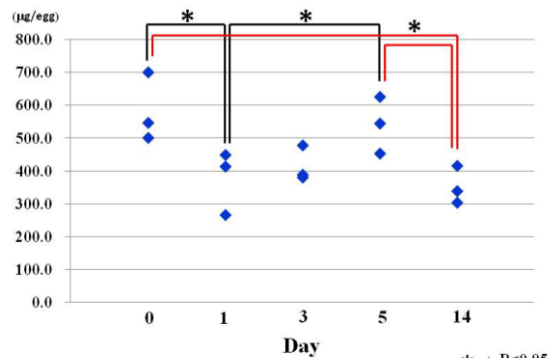


図 6

\* ; P<0.05

L-PGDS の定量を行った。最終的な鶏卵白中 1 個あたりの L-PGDS 量を算出する際には、内部標準より回収率を計算し、L-PGDS 量を補正後、鶏卵 1 個あたりの卵白量を 34.7g (平均的な鶏卵を 50 g としたとき、卵白重量は鶏卵重量の 69.4%であるとされている<sup>13)</sup>)として、それぞれの試料を標準化した。鶏卵白中 L-PGDS は産卵直後からその保存温度や期間によって変化する可能性が考えられる。そこで産卵直後から入手可能であった岡山県農林水産総合センター畜産研究所から提供された白色レグホン由来の鶏卵を用いて検討を行った。図 6 は 4°C 保存による鶏卵中 L-PGDS の変化を示した。L-PGDS 量は Day 0 に最大値を示し、その後一旦、Day 1 に有意に減少傾向、そして Day 3、Day 5 では増加傾向を示し、Day 5 では Day 0、Day 1 に比べて有意に高かった。Day 14 では Day 1 程度にまで減少し、Day 0、Day 5 に比べて有意に低かった。Fig. 4 の結果は Fig. 5 と同じく鶏卵を 4°C 保存した時のイムノプロットの結果であるが、卵黄中 L-PGDS 量が Day 1 では増加しており、Day 3、Day 5 では減少していることから卵白中 L-PGDS が卵黄中に移行することも考えられる。Day 14 での L-PGDS の減少は、L-PGDS の分解によるものではないかと思われる。

次いで、鶏卵種による卵白中 L-PGDS 量の比較を行った。鶏卵には赤玉・白玉の区別があるが、栄養価の違いはないとされているため、赤玉・白玉の区別では検討を行わなかった (図 7)。Day 3 では鶏卵種間で有意差はなく、その平均は DHA・VE 卵: 341.9±25.6 μg, 白玉: 325.0±49.1 μg, 平飼い卵: 241.7±78.7 μg, ヨード卵: 295.8±28.1 μg であり、平飼い卵は他の卵に比べて低い傾向があった。Day 5 では、平飼い卵とヨード卵で L-PGDS 量が Day 3 に比べて有意に増加し、その平均は、平飼い卵: 392.5±80.6 μg, ヨード卵: 692.1±70.1 μg であった。DHA・VE 卵と白色卵については Day 3 と Day 5 でほとんど変わらず (DHA・VE 卵: 303.5±60.1 μg, 白色卵: 286.0±34.7 μg)、ヨード卵は他の鶏卵すべてと比べ有意に高くなった。L-PGDS はレチノイン酸トランスポーター

であり、過去の報告の中で L-PGDS 分泌型のトランスポーターとして報告されている。したがって、平飼い卵およびヨード卵の Day 3、Day 5 にかけての L-PGDS の増加は卵黄または卵黄膜に由来する可能性が考えられる。即ち、庭先卵およびヨード卵については卵黄中 L-PGDS 量が多いことが予測される。今後、平飼い卵とヨード卵の卵黄中 L-PGDS の測定が必要であると考えられる。

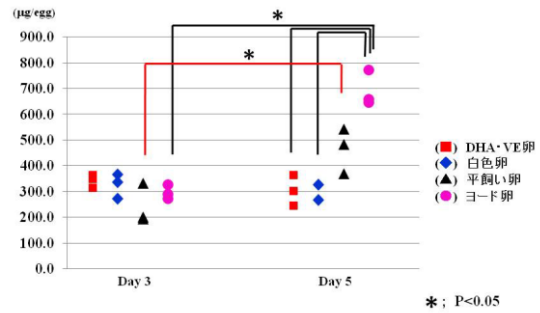


図 7

II の検討では、卵黄中には L-PGDS が存在することを初めて明らかにし、その量は白色レグホン由来の鶏卵においては卵白に比べて極めて低いことを明らかにした。また、鶏卵白中 L-PGDS 量を定量するため、過去に報告した L-PGDS のサンドイッチ ELISA 法を改良し、内部標準を置くことで、卵白中 L-PGDS 量の測定を可能にした。鶏卵中 L-PGDS 量はヨード卵を除き、300~400 μg 程度であると考えられる。

I の検討より L-PGDS は、Th1/Th2 バランスを偏向させることにより、IgE 産生を増加させること、また、末梢のアレルギー炎症も引き起こすことが明らかとなっている。したがって、鶏卵中の L-PGDS 量が少しでも少ないものを乳幼児には摂取させたいところである。II の鶏卵種による L-PGDS の比較においては、鶏卵種によっては保存期間で卵白中の L-PGDS 量が増加するものが見られた。本検討は、もう少し N 数を増やした詳細な検討が必要であるが、保存期間や鶏卵種によって、乳幼児期に与える鶏卵を選択することで、アレルギー発症の軽減につながる可能性も考えられる。

今後、学術雑誌への発表を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 鈴木麻希子、山本登志子、比江森美樹、山下広美、高橋吉孝、辻英明、木本眞順美 卵アレルギー L-PGDS による OVA 特異的 IgE 上昇作用機構の解析 第 65 回日本・栄養食糧学会 平成 23 年 5 月 13～15 日 お茶の水女子大学
- (2) 鈴木麻希子、比江森美樹、藤井秀比古、清島 満、近藤直実、高橋吉孝、辻英明、木本眞順美 鶏 lipocalin-type prostaglandin D synthase が卵アレルギーの発症に及ぼす影響, 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 平成 22 年 11 月 25 日～27 日
- (3) 鈴木麻希子、山本登志子、比江森美樹、山下広美、高橋吉孝、辻英明、木本眞順美 鶏 lipocalin-type prostaglandin D synthase が卵アレルギーの発症に及ぼす影響, 第 64 回日本栄養・食糧学会 アスティとくしま 平成 22 年 5 月 21～23 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 麻希子 (MAKIKO SUZUKI)

岡山県立大学・保健福祉学部栄養学科・助教

研究者番号：60437001