

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580173

研究課題名(和文) 超高压処理による牛乳アレルギーの低アレルギー化と経口免疫寛容の誘導

研究課題名(英文) Preparation of hypoallergenic milk allergen using high pressure treatment and oral tolerance induced by the hypoallergen

研究代表者

山田 潔 (YAMADA, KIYOSHI)

宇都宮大学・農学部・講師

研究者番号：30313076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：高圧下でペプシン処理することで、 β -ラクトグロブリン(β -LG)の分解と、特異的マウスIgG1への結合の低下が顕著に認められた。また、高圧下ペプシン処理した β -LG分解物のマウスへの投与では、皮膚アナフィラキシーと全身性アナフィラキシーの誘導が顕著に低下した。さらに、 β -LG分解物をマウスに経口投与することにより経口免疫寛容が誘導された。高圧を利用したペプシン処理法が経口免疫寛容誘導能を保持したまま低アレルギー化する方法につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：By pepsin treatment under high pressure, β -lactoglobulin (β -LG) was almost entirely hydrolyzed and the ability of β -LG to bind to β -LG-specific IgG1 was markedly reduced. The cutaneous or systemic anaphylactic responses were diminished or abrogated when the β -LG hydrolysates were injected into the mice previously immunized with β -LG. Moreover, oral administration of the β -LG hydrolysates to mice induced the oral tolerance to intact β -LG. The pepsin treatment under high pressure may be a useful method to produce hypoallergenic milk with tolerogenic property.

研究分野：食品科学

キーワード：食物アレルギー 経口免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

近年、食品アレルギーの患者は増加傾向にあり、日本の乳幼児・小児では、鶏卵、牛乳、小麦が三大アレルゲンと呼ばれている。特に、牛乳アレルギーは、鶏卵に次いで頻度が高く、即時型食物アレルギー患者の原因食物の約16%を占める。食物アレルギー発症を回避する原則は食事からの完全除去であるが、発育期にある乳幼児から完全食品である牛乳や乳製品を除くことは、栄養学的見地から決して望ましくない。特に、人工栄養児の牛乳アレルギーは、調製粉乳以外の選択肢が少ないため低アレルゲン化食品開発の重要性が高いが、加熱や発酵による抗原性の低減は他の食品に比べ困難である。

食物アレルギーにおける即時型アレルギー反応は、肥満細胞および好塩基球の細胞表面上のIgEレセプターに結合したIgE抗体にアレルゲンが結合し、架橋化することにより惹起される。食品アレルゲンの低アレルゲン化には、IgE抗体を架橋化できないほどにアレルゲンを低分子化あるいは構造変化させることが必要となる。これまで牛乳のアレルゲン性の低減は他の食物抗原と同様に、酵素消化、化学修飾、変性、遺伝子組換えなどの方法により試みられてきたが、抗原性分子の残存、苦味のあるペプチドの生成、牛乳中の有用な機能性成分の損失といった問題が残されている。

近年、新規の低アレルゲン化法として注目される超高压処理による食品加工は熱発生を抑制し、加熱に伴う食品の風味、新鮮さ、栄養素の損失を著減できる。一方、タンパク質分子内部のSH/SS内部交換反応による立体構造変化はアレルゲンの構造変化や消化性に変化をもたらす、IgE抗体への結合だけでなく、アレルギー発症に関わるIgE産生の低下や免疫調節機構に影響を与える可能性が考えられる。しかし、超高压処理した牛乳アレルギーに対する生体でのアレルギー反応を詳細に検討した報告はこれまでにない。

免疫系は常在微生物や食物抗原など非病原性因子に対しては免疫寛容を誘導する。炎症性腸疾患や食物アレルギーといった全身疾患は、免疫系の免疫寛容が破綻することにより発症すると考えられている。しかし、超高压処理した食物アレルギーに対する免疫系の応答については、不明な点が多い。とくに、超高压処理したアレルゲンの摂取が経口免疫寛容の誘導を促進・増強させた報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

超高压処理により構造変化をもたらした食物アレルギータンパク質の免疫系への作用に着目し、牛乳中の主要なアレルゲンであるβ-ラクトグロブリン(β-LG)の超高压処理がアレルギー応答の誘導をどのように抑制するか、またアレルゲンに対する経口免疫寛容

の誘導にどのような影響を及ぼすかについて解明することを目的とした。抗原特異的IgE抗体への結合性、アレルギーモデルのマウスにアレルゲンを投与した時のアナフィラキシー応答、および経口投与されたアレルゲンに対するT細胞の応答を解析することによって、アレルギー発症およびそれを抑制する機構と考えられている経口免疫寛容に対して、超高压処理したβ-LGがどのような効果をもたらすかを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 高压下酵素処理 β-LGの調製

β-LGを10 mg/mlとなるように溶解した。超高压試験機(三菱重工業MFD-7000)を使用して、400MPaまたは600MPa下で処理をおこなった。高压下での消化酵素処理では、理の直前に400 mgのβ-LGに対し、4 mgのペプシンを添加し、pH2に調整した。高压処理後、pH8に調整した。

(2) 逆相HPLC

カラムは、CAPCELL PAK C18 カラム(4.6 mm x 250 mm ;SHISEIDO)を使用した。0.45 μm孔径フィルターでろ過した試料を注入後、0.09 % TFA-90 %アセトニトリルで濃度勾配をかけて溶出した。流速は1.0 ml/minとし、210 nmにおける吸光値を測定した。

(3) 競合ELISA

β-LGを96 well ELISAプレートに添加し、4で一晚インキュベートした。洗浄後、ブロッキング処理し、段階希釈した高压下ペプシン処理β-LGをプレートに添加した後に、希釈した抗β-LGマウス血清を添加した。洗浄後、希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG1を添加し、インキュベートした。洗浄後、TMB溶液を添加し、インキュベート後、硫酸を添加して発色停止し、吸光値を測定した。

(4) Alum免疫と血清IgE濃度の測定

BALB/cマウス(6週齢、メス)に、β-LGとAlumアジュバントを1:1の割合で混合したもの(50 μg β-LG)を2週間おきに2回免疫した。マウス血清中のIgE濃度は、サンドイッチELISA法により測定した。

(5) 皮膚アナフィラキシー応答の誘導

抗原溶液の調製は以下のように行った。高压ペプシン処理したβ-LG反応液(10 mg/ml)を1000倍希釈した。コントロールとなる未処理のβ-LGは、未処理のβ-LGを10 mg/mlとなるように溶解した後、1000倍希釈した。アナフィラキシー誘導試験は、次のように行った。マウスの背部を除毛し、滅菌した1%エバンスブルー/PBS溶液を、尾静脈より100 μl注射した。エバンスブルー色素が全身にわたったことを確認し、マウス背部に抗原溶液を1か所あたり50 μl皮内注射し、30分間静置した。注射部位を切除し、ジメチルホルムア

ミドで抽出した。抽出した色素溶液は分光光度計 (HITACHI、U-2000 Spectrophotometer) で 655 nm における吸光値を測定した。

(6) 全身性アナフィラキシーの誘導

β -LG を Alum アジュバントとともに 2 回免疫したマウスに、 β -LG (1 mg/ml) を 0.2 mL 腹腔注射した。体温計 (TECHNOL SEVEN HIGH TRACEABLE THERMOMETER D642) を用いて 0、30、60、120 分ごとの直腸温を測定した。アナフィラキシースコアの評価は、 β -LG 投与後のマウスの様子を、0；無症状、1；口や目の周囲の掻痒、2；刺激による移動、3；刺激時に移動なし、4；死亡、としてアナフィラキシーショック症状をスコア化した。

(7) 経口免疫寛容の誘導とその評価

BALB/c マウス (6 週齢、メス) を用い、あらかじめ 5 日間で 5 回 β -LG または β -LG 分解物を経口投与した。両後足裏に β -LG/CFA を免疫した 1 週間後に膝下リンパ節を摘出し、リンパ節細胞を β -LG とともに培養した。培養 48 または 72 時間後に培養上清を回収し、培養上清中のサイトカイン量を ELISA 法により測定した。また上清回収後の細胞は RI 標識したチミジンの取込み量を指標とした細胞増殖応答試験を行った。

4. 研究成果

(1) 高圧処理を用いた牛乳アレルギーの低アレルギー化

β -ラクトグロブリン (β -LG) は主要な牛乳アレルギーである。これまでに、高圧下でタンパク質分解酵素の処理を行うことによる様々なアレルギータンパク質の低アレルギー化が報告されているが、 β -LG における手法は確立されていない。本研究では高圧下酵素処理による β -LG の低アレルギー化の検討を行った。 β -LG の高圧処理 (400-600MPa) だけではタンパク質の構造変化が十分ではないことが示唆された。また、高圧処理後の β -LG をタンパク質分解酵素処理 (ペプシン、パンクレアチン) を検討した結果、完全分解には至らなかった。これらの酵素処理を高圧化で行うことを検討した結果、Tricine SDS-PAGE、逆相 HPLC を用いて分解性を確認したところ、適切な酵素と高圧処理条件を組み合わせることにより、高圧下ペプシン処理で顕著な分解が認められた。さらに競合 ELISA の結果から β -LG 特異的抗体との結合性が著しく低下することが示された。しかし、これらの分解は圧力、時間という処理条件によって分解性に差が生まれた。さらに、分解性と結合度がかならずしも一致しないという結果を得た。逆相 HPLC 解析の結果から、高圧下ペプシン処理の多くの条件において、未切断 β -LG の残存は認められなかった。逆相 HPLC で未切断 β -LG の検出が認められなかった試料では β -LG 特異的マウス IgG1 との結合度が顕著に低下していた。

さらに、低アレルギー化の処理をした β -LG 分解物を皮膚に接種することにより誘導した皮膚アナフィラキシー応答の強度を比較した結果、未処理の β -LG では強いエバンスブルーの血管外漏出が認められたのに対し、高圧下ペプシン処理した β -LG では有意に漏出が減少し、アレルギー性の低下が認められた。

これらの結果から、高圧下ペプシン処理により、 β -LG の低アレルギー化が可能なが示唆された。

次に、アレルギー特異的 IgE 抗体を上昇させたアレルギーモデルのマウスを用いて高圧下ペプシン処理した β -LG のアレルギー性を評価した。免疫免疫による血清 IgE 濃度の上昇を確認したマウスに、高圧下でペプシン処理した β -LG、または未処理の β -LG を 0.2 mg 腹腔内に投与した。投与後、30、60、120 分における直腸温を測定し、投与後のマウスの様子を観察した。誘導されたアナフィラキシーショックによる体温低下と、アナフィラキシーショック症状のスコアを指標として低アレルギー化した β -LG の安全性を評価した。

腹腔注射による全身性アナフィラキシーショック誘導試験において、未処理 β -LG 投与では体温が投与後 30 分に 4.0 ± 1.4 、60 分後には 6.0 ± 3.1 低下した。一方、400MPa あるいは 600MPa でペプシン処理した β -LG の投与後には有意な体温低下は認められず、条件による違いも認められなかった。さらに、観察されたショック症状のスコアからも、いずれの条件で高圧下酵素処理しても、低アレルギー化 β -LG 分解物の投与ではアナフィラキシーショックが誘導されないことが示された。

これらのことから、本研究で検討した高圧下酵素処理のいずれの条件でも β -LG の低アレルギー化が可能であること、アナフィラキシーショック症状の抑制効果に低アレルギー化の処理条件の違いによる差はないことが示唆された。

(2) 次に、高圧下ペプシン処理した低アレルギー化 β -LG をマウスに経口投与することにより経口免疫寛容が誘導できるかどうか検討した。400MPa あるいは 600MPa で 10 分間高圧下ペプシン処理した β -LG 分解物を 5 日間経口投与し、免疫後のリンパ節細胞の抗原特異的応答を解析した。未分解の β -LG を経口投与したときと同様に、いずれの分解物を経口投与しても、抗原で再刺激したリンパ節細胞の β -LG 特異的な細胞増殖応答の抑制が認められた。細胞増殖応答に関連するサイトカインである IL-2 の産生量も同様に、高圧下ペプシン処理した β -LG 分解物の経口投与により、抑制されることが認められた。また、リンパ節細胞を抗原で再刺激したときの Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を解析した結果、400MPa および 600MPa のいずれの条件で処理した分解物を経口投与した場合でも抑制が認められた。

これらのことから、高圧下でペプシン処理したβ-LGの分解物は、経口摂取することにより抗原特異的なT細胞応答が抑制される経口免疫寛容を誘導する機能を保持している可能性が示唆された。

(1)および(2)で明らかにした結果より、主要な牛乳アレルギーであるβ-LGを高圧下でペプシン処理することで、食物アレルギーを起こす状態にある生体に投与しても、特異的なIgEとの結合が抑制されるとともに、皮膚の浮腫や体温低下を特徴とする食物アレルギーによるアナフィラキシーショックを防止できることが示唆された。さらに、高圧下ペプシン処理β-LGを摂取することにより、食物アレルギーの予防・治療と関連する経口免疫寛容が誘導されることが示唆された。本研究で示した牛乳アレルギーの低アレルギー化法により作製される低アレルギー分解物は、牛乳アレルギー患者が安全に摂取できるばかりでなく、一定期間摂取することによりアレルギー症状を惹起させることなく牛乳アレルギーに対する耐性を獲得するための有用な食品素材になる可能性が期待される。

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)

[雑誌論文](計3件)

Nakamura Y, Terahara M, Iwamoto T, Yamada K, Asano M, Kakuta S, Iwakura Y, Totsuka M. Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor expression by the heat-inactivated potential probiotic *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 in a mouse intestinal explant model. *Scand. J. Immunol.* 75:176-183, 2012. (査読有)

Tatsumi Y, Sasahara Y, Kohyama N, Ayano S, Endo M, Yoshida T, Yamada K, Totsuka M, Hattori M. Introducing site-specific glycosylation using protein engineering techniques reduces the immunogenicity of β-lactoglobulin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76:478-85, 2012. (査読有)

Hatano R, Yamada K, Iwamoto T, Maeda N, Emoto T, Shimizu M, Totsuka M. Antigen presentation by small intestinal epithelial cells uniquely enhances IFN- γ secretion from CD4+ intestinal intraepithelial lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435:592-6, 2013. (査読有)

[学会発表](計4件)

藤原麻美、呉曦、友野美怜、原理恵子、古田早紀、東徳洋、山田潔「低アレルギー化を

目指したβ-ラクトグロブリンの高圧処理」2012年度酪農科学シンポジウム 2012年8月17日 大妻女子大学千代田キャンパス

藤原麻美、原理恵子、呉曦、友野美怜、古田早紀、東徳洋、山田潔「高圧下酵素処理によるβ-ラクトグロブリンの低アレルギー化」日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月26日 東北大学河内キャンパス

藤原麻美、楯岡潤、勝俣雅之、東徳洋、山田潔「高圧下酵素処理した低アレルギー化β-ラクトグロブリンで誘導されるアナフィラキシーの評価」日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月29日 明治大学生田キャンパス

楯岡潤、齋藤里穂、藤原麻美、勝俣雅之、東徳洋、山田潔「高圧下ペプシン処理がβ-ラクトグロブリンの抗原性に及ぼす影響」日本農芸化学会 2015年度大会 2014年3月27日 岡山大学津島キャンパス

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
山田 潔 (YAMADA KIYOSHI)
宇都宮大学・農学部・講師
研究者番号: 30313076

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし