

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790157

研究課題名(和文) NSAIDsの服用による食物アレルギーの吸収増加機構の解明

研究課題名(英文) Effect of NSAIDs on intestinal absorption of food allergens

研究代表者

横大路 智治 (Yokooji, Tomoharu)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号：70389120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の服用による食物アレルギーの消化管吸収亢進の機構を解明することを試みた。その結果、消化管上部における卵白リゾチームの吸収にはエンドサイトーシスと細胞間隙輸送が関与し、アスピリンやジクロフェナクなどのNSAIDsが食物アレルギーの細胞間隙輸送を増加させることで消化管吸収が亢進することが明らかとなった。また、プロスタグランジンE1製剤であるミソプロストールがNSAIDsの服用によるアレルギーの吸収増加を抑制できることが示された。これらの結果は、食物依存性運動誘発アナフィラキシー(FDEIA)の病態解明や治療法の開発に有用な知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the absorption pathway(s) of a representative food allergen, lysozyme, and the mechanisms of lysozyme absorption facilitated by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in rats. We showed that lysozyme was absorbed by endocytic and paracellular pathways in the proximal intestine, and the absorption was facilitated by aspirin and diclofenac after impairment of the paracellular pathway. Furthermore, we found that a synthetic prostaglandin-E1 analog, misoprostol suppressed the intestinal absorption of allergens facilitated by aspirin. These findings may help to clarify the pathophysiology of FDEIA and aid its treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：食物アレルギー 消化管吸収 非ステロイド性抗炎症薬 エンドサイトーシス 細胞間隙輸送

### 1. 研究開始当初の背景

近年、気管支喘息や花粉症などのアレルギー疾患は増加傾向にあり、食物の摂取によって誘発される食物アレルギーも重大な社会的問題となっている。食物アレルギーのひとつである食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) は通常、原因となる食物を経口摂取した後に運動負荷が加わることによりアレルギー症状が誘発される疾患である。運動負荷が FDEIA を誘発する要因は未だ不明な点が多いが、その一因として、運動負荷による食物抗原の消化管から血清中への移行量、すなわち消化管吸収量が増加することが考えられている。実際、Matsuo らは健常者 4 名と FDEIA 症例 6 名に小麦を摂取させ運動負荷をかけた結果、両群で運動負荷による血清小麦アレルギー (グリアジン) のレベルが上昇することを報告している。また、Yano ら、および Sakamoto らは、運動負荷が消化管粘膜組織に障害をおよぼし、抗原の消化管吸収が増加することを動物実験により明らかにしている。さらに、Matsuo らは、運動負荷に代わり、アスピリンなどの NSAIDs を前処置することでも同様の FDEIA 症状が誘発されることを明らかにしており、アレルギーの増強効果はアスピリンの用量依存性であることや NSAIDs の種類 (COX-1 および COX-2 に対する選択性) により異なることを報告している。これらの報告は、NSAIDs による消化管からの食物アレルギーの吸収量の増加が FDEIA 発症機構の一つであることを示唆するものであるが、その詳細は明らかでない。

一般に、ペプチドやタンパク質などの高分子を経口投与した場合、その分子サイズの大きさによる消化管粘膜透過性の低さや消化管上皮細胞に発現する分解酵素への不安定性により消化管吸収率は低い。消化管上皮細胞における高分子化合物の吸収機構には細胞間隙を通過する輸送やエンドサイトーシス (トランスサイトーシス) を介した経細胞輸送が考えられている。さらに近年では、パイエル板に存在する M cell を介した膜輸送機構の存在も報告されている。しかしながら、高分子である食物アレルギーの消化管吸収機構に関しては全く明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では FDEIA の発症機序の解明を目指し、食物アレルギーのモデルである卵白リゾチームの消化管吸収特性を明らかにするとともに、リゾチームの消化管吸収におよぼす NSAIDs の影響について明かにすることを目的とした。また、FDEIA の予防法の開発を目的として、アスピリン併用時のリゾチームの消化管吸収におよぼすプロスタグランジン  $E_1$  製剤 (ミソプロストール) の影響について検討した。

### 3. 研究の方法

実験動物には 7-8 週齢の雄性 SD 系ラット

を用いた。リゾチームの吸収におよぼすアスピリンの影響は、消化管上部にループを作製し、ループ内に FITC で標識したリゾチーム (FITC-Lys, 分子量 14,300) を投与した際の血漿中挙動と消化管組織への蓄積をアスピリン (Asp) の存在下または非存在下で評価した。また、非特異的吸収マーカーである FITC-デキストラン (FD-10, 分子量 9,400; FD-150, 分子量 167,000) の吸収におよぼすアスピリンの影響についても同様に検討した。さらに、リゾチームの消化管吸収機構と NSAIDs およびミソプロストールの影響は消化管上部または下部を FITC-Lys または FD-10 を含有したリン酸緩衝液 (pH 6.5 または pH 7.4) で灌流し、灌流液中からの FITC-Lys の吸収量を経時的に測定した。また、FITC-Lys の消化管吸収におよぼすエンドサイトーシス阻害剤 (コルヒチン, Col)、NSAIDs (アスピリン, Asp; ジクロフェナク, Dic; メロキシカム, Mel; ロキソプロフェン, Lox.) およびミソプロストール (Mis) 処置の影響について同様に検討した。

### 4. 研究成果

1. FITC-Lys の吸収におよぼすアスピリンの影響: 消化管上部ループ内に FITC-Lys を投与した場合、60 分後までの血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC) 値はアスピリンの処置により約 1.8 倍の有意な増加を示した。一方、投与 60 分後に消化管組織内に残存する FITC-Lys 量は有意な変化を示さなかった (図 1)。血漿および消化管組織中の FITC-Lys を SDS-PAGE で確認した結果、血漿中では一部の FITC-Lys に分解が認められたが、両試料中で大部分は未変化体のまま存在することが示された。このことから、アスピリンは未変化体の FITC-Lys の吸収を増加させることが示された。

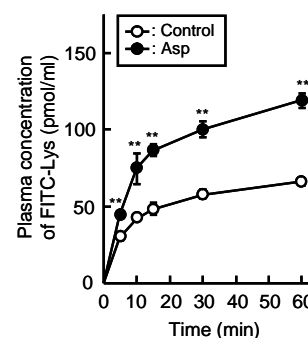


図 1 FITC-Lys の血漿中濃度推移におよぼすアスピリンの影響

2. FITC-Lys の消化管吸収機構の解析: 消化管上部を FITC-Lys を含むリン酸緩衝液で連続灌流した場合、FITC-Lys の吸収速度は同程度の分子量である FD-10 の吸収速度と比べても高く、コルヒチン処置により有意な低下を示した (図 2 および 3A)。一方、消化管下部における FITC-Lys の吸収速度は、FD-10 と同程度であり、コルヒチン処置による有意な影響

は認められなかった (図 2 および 3B)。これらの結果より、リゾチームの消化吸収には部位差が存在し、上部での吸収には一部エンドサイトーシスが関与すると考えられた。

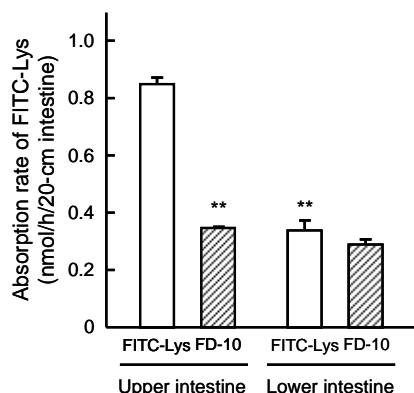


図 2 ラット消化管における FITC-Lys の吸収特性

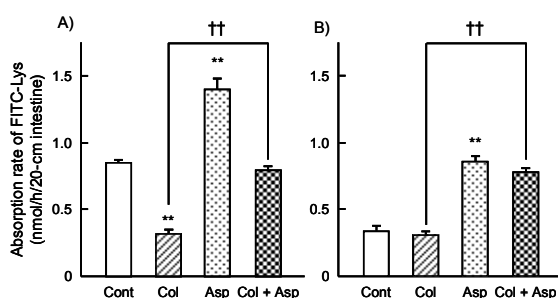


図 3 FITC-Lys の消化管吸収におよぼすコルヒチンとアスピリンの影響 A) 消化管上部; B) 消化管下部

3. アスピリンによる FITC-Lys の吸収増加機構: 消化管の上部および下部における FITC-Lys の吸収はアスピリンの併用により約 1.5 倍の有意な増加を示した (図 3)。また、アスピリンとコルヒチンを併用した群では両部位ともにコルヒチン単独処置に比べ有意な増加を示した。さらに、細胞間隙輸送のマーカである FD-10 や液性エンドサイトーシスと細胞間隙輸送のマーカである FD-150 の消化管吸収はアスピリン処置により有意な AUC 値の増加を示した。これらの結果から、アスピリンはリゾチームの細胞間隙輸送を増加させることにより、その消化管吸収を増加させることが明らかとなった。

4. FITC-Lys の消化管吸収におよぼす NSAIDs の影響解析: 消化管上部における FITC-Lys の吸収速度はジクロフェナクの併用により、アスピリンと同程度の有意な増加を示した (図 4A)。一方、メロキシカムやロキソプロフェンは FITC-Lys の吸収に有意な変化を示さなかった。

5. FITC-Lys の消化管吸収におよぼすミソプロストールの影響: アスピリンの併用により増加した FITC-Lys の吸収速度はミソプロストールの併用によりコントロール群とほぼ同程度まで有意な低下を示した (図 4B)。こ

のことから、NSAIDs の服用時に認められる食物アレルギーの吸収増加には、プロスタグランジン量の低下が関与することが示唆された。

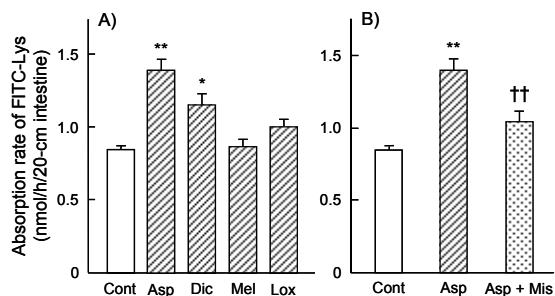


図 4 FITC-Lys の消化管吸収におよぼす NSAIDs (A) およびミソプロストール (B) の影響

6. まとめ: 本研究により、以下の知見が得られた。

- 1) FITC-リゾチームの消化管吸収には部位差が存在し、消化管上部での吸収は下部に比べ高いことが示された。また、上部での吸収に一部エンドサイトーシスが関与することが明らかとなった。
- 2) アスピリンの併用により、消化管上部および下部における細胞間隙輸送が増加し、その結果、FITC-リゾチームの吸収 (血中濃度) が増加した。
- 3) アスピリンと同様、ジクロフェナクの併用により、FITC-リゾチームの消化管吸収は有意に増加した。一方、メロキシカムやロキソプロフェンによる有意な吸収変動は認められなかった。
- 4) ミソプロストールの処置により、アスピリンが誘発する FITC-リゾチームの消化管吸収の増加は有意に抑制された。

前述のように、アスピリンなどの NSAIDs が血中アレルギー濃度を増加させることは既に報告されていた。しかしながら、NSAIDs が細胞間隙輸送を介した食物アレルギーの吸収を増加させるという詳細な機構については報告されていなかった。本研究の結果は、FDEIA の発症機構を生体膜輸送機構の観点から解明するとともに、高分子タンパク質の吸収を促進する薬剤の服用が他の食物アレルギーを発症する可能性を考える上でも非常に有用であると考えられる。現在、我々は卵白アルブミン (OVA) や小麦グリアジン (Gli) についても同様の検討を行い、アスピリンは OVA の吸収を約 3 倍、Gli の吸収を約 10 倍増加させることを明かにしている。このことは、NSAIDs の服用時に認められる食物アレルギーの吸収増加はリゾチームに特異的なものではなく、抗原の種類に関係なく起こりうることを示唆されるものであり、今後食物アレルギーの発症 (感作) 機構とも合わせて考察を進めたいと考えている。

(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2件)

1. Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, Harada S, Ishii K, Hiragun M, Hide M, Matsuo H, Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap, *Allergology International*, 査読あり, 2013, 62, pp435-445
2. Yokooji T, Hamura K, Matsuo H, Intestinal absorption of lysozyme, an egg-white allergen, in rats: Kinetics and effect of NSAIDs, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読あり, 2013, 438, pp61-65

[学会発表](計10件)

1. 横大路智治、農間仁美、松尾裕彰、卵白アルブミンの消化管吸収機構の解明とアスピリンによる吸収増加機構の解明, 日本膜学会第36年会, 2014年5月12-13日, 早稲田大学(東京都)
2. 横大路智治、農間仁美、松尾裕彰、卵白アルブミンの消化管吸収機構の解明と消化管吸収におよぼすアスピリンの影響解析, 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014年5月9-11日, 国立京都国際会館(京都府)
3. 松尾裕彰、横大路智治、羽村光、ラット消化管における卵白リゾチーム吸収に及ぼす非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の影響, 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 2013年11月29日-12月1日, ホテル日航金沢(石川県)
4. 横大路智治、羽村光、松尾裕彰、非ステロイド性抗炎症薬による食物アレルギーの吸収増加機構の解明, 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2013年11月28日-30日, ホテルニューオータニ(東京都)
5. 横大路智治、羽村光、松尾裕彰、非ステロイド性抗炎症薬の服用による食物アレルギーの吸収増加機構の解明, 膜シンポジウム2013, 2013年11月7日-8日, 京都府立医科大学附属図書館ホール(京都府)
6. 横大路智治、羽村光、巖原美穂、松尾裕彰、非ステロイド性抗炎症薬の服用による食物アレルギーの吸収増加機構の解明, 日本膜学会第35年会, 2013年5月20日-21日, 早稲田大学(東京都)
7. 横大路智治、栗原早紀、千貫祐子、原田晋、高橋仁、森田栄伸、石井香、平郡真記子、秀道広、松尾裕彰、加水分解小麦感作による小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの原因抗原の解析, 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2013年5月11日-12日, パシフィコ横浜(神奈川県)
8. Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Harada S, Takahashi H, Morita E, Ishii K, Hiragun M, Hide M, Matsuo H, Characterization

of the Causative Allergens for Wheat-dependent Exercise-induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Proteins in Facial Soap, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI) Annual Meeting 2013, 22-26 Feb 2013, San Antonio U.S.A

9. 栗原早紀、横大路智治、千貫祐子、原田晋、森田栄伸、松尾裕彰、加水分解小麦感作による小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの抗原解析, 第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2012年11月10日-11日, 島根県民会館(島根県)
10. 横大路智治、村上朋子、栗原早紀、千貫祐子、原田晋、高橋仁、森田栄伸、松尾裕彰、加水分解小麦感作による小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの原因抗原解析, 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2012年5月12日-13日, 大阪国際会議場(大阪府)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

横大路 智治 (Yokooji Tomoharu)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号: 70389120