

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：85502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560077

研究課題名(和文) 胃粘膜環境とエビアレルギー発症および感作との関係

研究課題名(英文) Relationship between the gastric mucosa condition and shrimp allergy risk developing or sensitization.

研究代表者

臼井 将勝 (Usui, Masakatsu)

独立行政法人水産大学校・その他部局等・准教授

研究者番号：50399656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胃粘膜環境の悪化とエビアレルギーとの関係について調査するために、消化管型エビアレルギーマウスモデルの作製を試みた。4回のクルマエビアレルゲン(Pen j 1)とコレラトキシンの共投与によって同モデルを作製できた。同モデルを用いて、胃炎とエビアレルギー重篤化の関係について検討した結果、胃炎状態でPen j 1を投与したマウス群では、胃炎でないマウス群に比べPen j 1特異的IgEの増加レベルがより顕著であった。さらに、胃炎のエビアレルギー獲得への影響について検討した結果、未感作マウスに胃炎を惹起させてPen j 1を経口感作させた場合では、Pen j 1特異的IgEが高値を示す傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate about a relation between deterioration of the gastric mucosa environment and allergy to shrimps, we prepared the shrimp allergy mouse model by 4 times of intra-gastric administration with cholera toxin. After gastritis induction by 25% ethanol administration, these model mice were challenged by receiving one intra-gastric dose of shrimp allergens. Production levels of shrimp allergen-specific IgE were higher than healthy gastric control mice group in gastritis mice group. In addition, the production levels of shrimp allergen-specific IgE in mice sensitized with gastritis induction showed the increased tendency compared to healthy mice.

研究分野：複合領域 食生活学

キーワード：エビアレルギー トロポミオシン 胃粘膜 急性胃炎 重篤化 感作

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の食物アレルギー有病率は全年齢を通じて約 2 %に達し、さらなる増加傾向にある。中でも、エビ・カニを中心とした甲殻類アレルギーは重症例も多く、医療機関受診患者の原因食物第 4 位 (6.2 %) と食物アレルギーの中でも主要なものとなっている (食物アレルギーの診療の手引き 2005, 厚生労働科学研究班)。また、有病者は学童期以降に多く、7 歳以降では原因食物第 1 位となっている。学童期の患者は、日々の食生活 (特に給食等) における自身での選択やコントロールが困難で 2012 年 12 月に東京都調布市の小学校でおこった給食での死亡事故のような非常に痛ましい事態をまねく場合もあり、あらゆる視点での予防対策の充実が強く望まれていた。

(2) 他方で、食物アレルギーの生体内侵入経路においては、腸管吸収および腸粘膜に関する研究が大半を占め、口腔・食道・胃等での吸収 (生体内侵入) やこれらの粘膜バリアーとの関わりはあまり知られていなかった。その中で、岡山県立大学のグループが、クルマエビ主要アレルギー (Pen j 1) がペプシンには抵抗性であるがトリプシンで容易に消化されること、胃粘膜組織の深部まで到達しうること、吸収 (侵入) は腸管ではなく胃壁からの吸収が優位となっていること、を報告した (A. Kunimoto et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 1249-58(2011))。このことより Pen j 1 は胃粘膜と係わりの深いアレルギーであると考えられた。食物アレルギー予防研究においては、アレルギーの生体内侵入ルートの特定は重要課題であり、消化管上部 (口腔・食道・胃等) におけるバリアー機構との係わりについてもさらなる理解が望まれていると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、胃炎や胃潰瘍など胃粘膜環境の悪化と食物アレルギーの発症との関係について調査することである。ストレスや飲酒で悪化しやすい胃粘膜環境と成人に多く見られるエビアレルギーに注目し、(一般的には小腸であるが) 場合によっては胃がアレルギー感作や発症の場となりことを明らかにする。胃粘膜がアレルギー感作・発症の場となっているのであれば、過剰飲酒やストレス条件下でのアレルギー食品の積極的な摂取には大きなリスクとなると理解でき、それは摂取回避や制限、粘膜保護など有効な予防策の足掛かりとなると考え、下記目的の達成を目指した。

(2) 研究に先立ち、食物アレルギーの適切なモデル動物となる消化管を介してアレルギーに感作されたマウスの作製を試みる。

(3) 胃粘膜環境悪化に一例として、マウスに

おけるアルコール性急性胃炎の惹起条件について検討し、胃炎モデルを作製する。

(4) エビアレルギーモデルマウスに胃炎惹起条件を適用し、すでにアレルギーの者が胃炎発症時にアレルギーを摂取するとアレルギーリスクは増大するの否かを検証する。

(5) マウスにおいて、エビアレルギー経口感作時の胃炎併発が感作効率に与える影響を調査し、未感作の者でも傷害時に繰り返し摂取すると感作リスクが増大するの否かについて検討する。

3. 研究の方法

(1) クルマエビ主要アレルギー「Pen j 1」の精製

クルマエビアレルギー Pen j 1 は解凍生クルマエビ可食部 (尾部) を試料とし、研究代表者らによる既報の方法で精製した (Usui et al., Biosci., Biotechnol. Biochem., 77, 948-953 (2013))。具体的には、エビ可食部を破砕後、水溶性タンパク質を除いた画分に 10mM 2-ME + 1M KCl - 20mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え、4 にて一晚抽出した。その後 pH 4.5 にて等電点沈殿、35%飽和硫酸にて分画し、イオン交換クロマトグラフィーにて分離した。SDS-PAGE にて単一のバンドが得られるまで精製し、脱塩・凍結乾燥したものを精製 Pen j 1 とした。これを 50mM Tris-HCl (pH 7.5) または PBS に溶解したものをを用いて各実験を行った。

(2) 食物アレルギー型エビアレルギーマウスモデルの作製

BALB/c マウスに 100 μ g の Pen j 1 および 10 μ g のコレラトキシンを 300 μ l の isotonic bicarbonate solution (HBSS(+)) : 7.5 w/v % Sodium Bicarbonate Solution = 8 : 2) に溶解したものを 0, 7, 21, 35 日目に経口投与して Pen j 1 に対して感作させた。0, 14, 28, 42 日目にマウスの尾部静脈より採血し血清を得た。各マウス血清中の Pen j 1 特異的 IgE 産生レベルの上昇は ELISA にて確認した。

(3) マウス血清中のエビアレルギー特異的 IgE レベルの測定

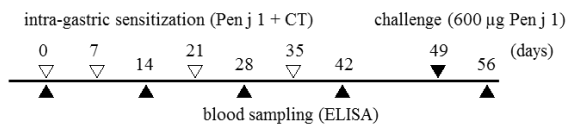
各マウス血清中の Pen j 1 特異的 IgE 産出量の測定は、Sandwich ELISA にて行った。Anti-Mouse IgE でコートした 96 穴プレートに 100 μ l/well となるように加えて、4 で一晚静置した。Blocking したのちに 1% BSA-PBS-Tween を用いて希釈した (20 倍) 各マウスの血清を 100 μ l/well ずつ加え、37 で 90 分インキュベートした。洗浄した後に、Penj1-Biotin (1:5) を BSA-PBS-Tween で 2.5 μ g/ml になるように希釈したものを 100 μ l/well となるように加え、37 で 30 分インキュベートした。洗浄した後に、

Streptavidin-HRP Conjugate (0.5 mg/ml) を PBS で 1.875 $\mu\text{g/ml}$ の濃度となるように調整したものを 100 $\mu\text{l/well}$ となるように加え、37 で 30 分インキュベートした。洗浄後に、発色基質溶液を 100 $\mu\text{l/well}$ となるように加え、25 で 10 分間静置した。停止液を 100 $\mu\text{l/well}$ となるように加えて反応を止めた後に 450 nm の吸光度を測定した。

(4) アルコール性急性胃炎惹起の条件検討
アルコール性急性胃炎誘導条件の検討は、BALB/c マウスを 50% EtOH 投与群, 25% EtOH 投与群, 0% EtOH (滅菌イオン交換水) 投与群の 3 群に分け, 各群 3 匹で行った。6 時間絶食させた後に 50% EtOH, 25% EtOH, 0% EtOH をそれぞれ 150 μl ずつ経口ゾンデを使用して経口投与し、急性胃炎惹起を試みた。1 時間後に開腹、胃を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.2) に浸漬して胃壁を完全に固定した後に実態顕微鏡を用いて撮影および評価を行った。

(5) エビアレルギーマウスにおけるエビアレルゲン負荷試験に対する胃炎の影響

エビアレルギーマウスを EtOH+Pen j 1 群, Pen j 1 群, Control 群の 3 群に分け, 各群 3 匹ずつ配置した。図 1 に示したスケジュールに沿ってエビアレルゲン負荷試験を行った。49 日目に全てのマウスを 6 時間絶食させ、EtOH+Pen j 1 投与群にはチャレンジの 1 時間前に 25% EtOH を 150 μl ずつマウスの胃内に強制投与して胃炎を誘導した。Pen j 1 負荷によるチャレンジテストは 600 μg の Pen j 1 を 300 μl の isotonic bicarbonate solution に溶解したものをマウスの胃内に強制投与した。Pen j 1 投与群には Pen j 1 溶液のみを負荷した。Control 群には溶媒のみを胃内に強制投与した。チャレンジ 5 日後 (54 日目) に採血を行い、各マウスの血清を得た。同血清を用いて ELISA にて Pen j 1 特異的 IgE レベルを測定し、重症度の指標とした。



< mice groups (n = 3) >
EtOH + Pen j 1: administrated 150 μl of 25% EtOH 1 hour before challenge
Pen j 1: healthy gastric control
Control: vehicle (isotonic bicarbonate solution)

図 1 . アレルゲン負荷試験スケジュール

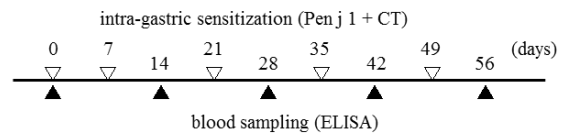
(6) 臨床スコアの評価方法

Pen j 1 負荷の 10 分後から 60 分後までの間に出現した臨床症状について Capobianco らの方法に従ってスコア化した。すなわち、0 点：症状なし, 1 点：鼻や頭部のスクラッチング, 2 点：目や口の腫れ・活動低下, 3 点：チアノーゼ, 4 点：震えや痙攣後失神, 5

点：死亡とし、個体に出現した症状のうち最も高得点のものをその個体の臨床症状スコアとした。

(7) エビアレルゲンによる経口感作に対する胃炎の影響

未感作のマウスを EtOH+Pen j 1 群, Pen j 1 群, Control 群の 3 群に分け, 各群 4 匹ずつ配置した。エビアレルギーマウスの作製方法と同様にして BALB/c マウスに 100 μg の Pen j 1 および 10 μg のコレラトキシンを 300 μl の isotonic bicarbonate solution (HBSS(+): 7.5 w/v % Sodium Bicarbonate Solution = 8:2) に溶解したものを 0, 7, 21, 35, 49 日目に経口投与して Pen j 1 に対して感作させた。図 2 に示したとおり, EtOH + Pen j 1 群には毎回のアレルゲン投与の 1 時間前に 25% EtOH を投与して胃炎を惹起させた。0, 14, 28, 42, 56 日目にマウスの尾部静脈より採血し血清を得た。各マウス血清中の Pen j 1 特異的 IgE 産生レベルを測定し、感作効率の指標とした。



< mice groups (n = 4) >
EtOH + Pen j 1: administrated 150 μl of 25% EtOH 1 hour before every intra-gastric sensitization
Pen j 1: healthy gastric control
Control: vehicle (isotonic bicarbonate solution + CT)

図 2 . 経口感作試験スケジュール

4 . 研究成果

(1) 食物アレルギー型エビアレルギーマウスモデルの作製

Pen j 1 とコレラトキシンの共投与の結果, マウス血清の Pen j 1 特異的 IgE が投与回数に比例して上昇した (図 3)。Pen j 1 + CT 投与群の Pen j 1 特異的 IgE 量は 28 日目以降から control 群に対して有意に上昇し始め ($p < 0.05$), 42 日目においてはさらに高値を示した ($p < 0.01$)。

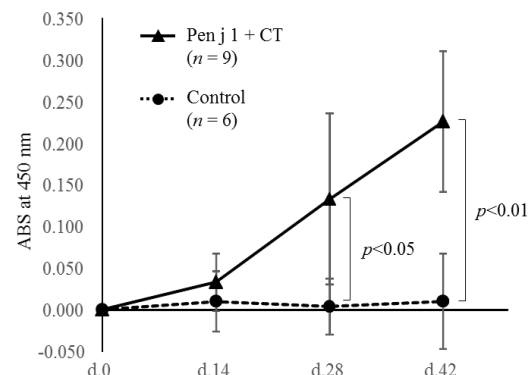


図 3 . 経口感作によるマウス血清中のエビアレルゲン特異的 IgE レベルの増加

(2) アルコール性急性胃炎惹起の条件検討

50% EtOH, 25% EtOH, 滅菌イオン交換水をそれぞれ 150 μ l 投与し, 1 時間後の胃内壁を實體顕微鏡下で観察した結果, 50% EtOH 投与では広範囲にわたる胃粘液層の剥離と出血の痕跡が確認された。さらに, 幽門部に弛緩が観察されたことから, 同条件での胃炎を誘導した場合, 投与液の胃内保持時間に影響を与えると考え不適と判断した。一方 25% EtOH 投与では部分的に胃粘液層の剥離した箇所と軽微な出血痕が散見されたが, 幽門部の顕著な弛緩が観察されなかった。滅菌イオン交換水投与では胃内壁の著変は確認されなかった。以上の結果より, 25% EtOH 投与をアルコール性急性胃炎惹起条件とした。

(3) エビアレルギーマウスにおけるエビアレルゲン負荷試験に対する胃炎の影響

図 1 のスケジュールに従って試験を行い, 49 日目に Pen j 1 600 μ g/mouse を負荷してチャレンジテストを行った。その 7 日後 (56 日目) に採血し血清を得た。チャレンジ前後の血清 (42 日目, 54 日目) を用いて ELISA にて Pen j 1 特異的 IgE 量の変化を調べた結果を図 4 に示した。Pen j 1 特異的 IgE 量は EtOH + Pen j 1 群でチャレンジ後に有意に増加していた ($p < 0.01$)。Pen j 1 群でも IgE 量の増加が確認されたがチャレンジ前後で有意な差は確認されなかった。さらに, Control 群ではチャレンジ前後で IgE 量の増加は確認されなかった。これらの結果はチャレンジ 1 時間前の EtOH 投与, すなわちアルコール性急性胃炎が IgE 産生を亢進させたことを示唆している。この IgE 産生亢進は, 胃粘膜の損傷により Pen j 1 の胃粘膜組織への侵入率が上昇したため, より重篤なアレルギー症状を発症させた結果であると予想した。以上の結果より, アルコール性急性胃炎はエビアレルギーリスクを増大させる可能性が高いことが示唆された。

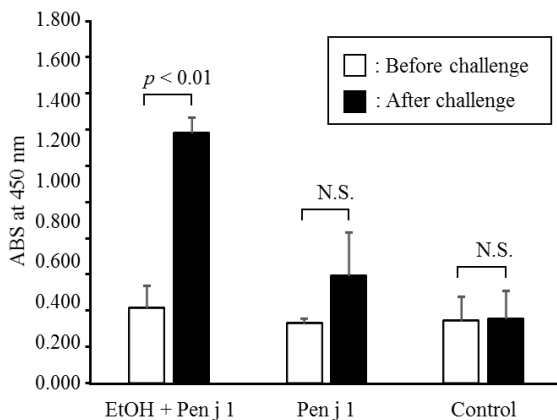


図 4 . エビアレルゲン負荷後の特異的 IgE レベルへの胃炎の影響

(4) エビアレルゲン負荷後の臨床スコアへの胃炎の影響

チャレンジテスト開始 10 分後から 60 分後までの間に各マウスに出現した臨床症状について検討した結果, EtOH + Pen j 1 群と Pen j 1 群において 10 ~ 30 分後から鼻や頭, 頸部のスクラッチ行動が観察され, EtOH + Pen j 1 群では活動が著しく低下した個体も確認された。各群の臨床症状スコアをもとに Mann-Whitney の U-test による 2 群間有意差検定を行った結果, EtOH + Pen j 1 群と Pen j 1 群の両軍とも Control 群に対して有意差 ($p < 0.05$) が確認された (図 5)。このことは, BALB/c マウスに Pen j 1 とコレラトキシンを共投与することで消化管を介した Pen j 1 感作が成立したことを意味しており, すなわち食物アレルギーであるエビアレルギーの病態モデルマウスとしてより現実に近い状態を再現できたと考えられた。他方で, 胃炎惹起の有無による臨床症状の差については, Pen j 1 群では見られなかった活動低下個体 (症状スコア: 2 点) が EtOH + Pen j 1 群において確認されたことから, 若干の影響があったと思われる。しかし, 活動低下が確認された個体は 3 個体中の 1 個体であり, EtOH + Pen j 1 群と Pen j 1 投与群の間に有意な差は認められなかったことから, 胃炎惹起と臨床症状との関係を明確に示すことはできなかった。とはいえ, チャレンジ後の血清中 Pen j 1 特異的 IgE 量は EtOH + Pen j 1 群でより顕著に増加したことから, 胃炎惹起がアレルギー重篤化に影響を与えることは否定できない。よって, アレルゲンへの感作レベルを上げる, または個体数を増やすなどしての再検討が必要であると考えた。

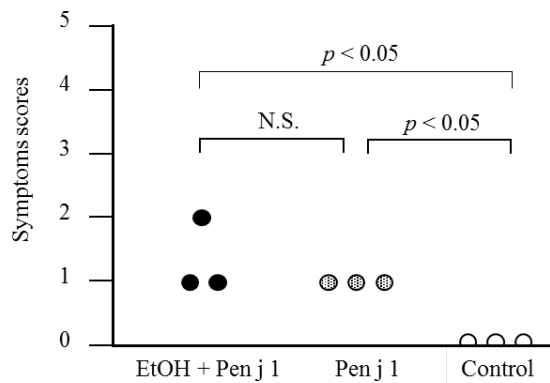


図 5 . エビアレルゲン負荷後の臨床スコアへの胃炎の影響

(5) エビアレルゲンによる経口感作に対する胃炎の影響

図 2 のスケジュールに従って試験を行い, 各血清を得た。56 日後の血清を回収したのちに ELISA にて Pen j 1 特異的 IgE 量の変化を調べた結果を図 6 に示した。42 日目まではいずれの群間においても Pen j 1 特異的 IgE 量の有意な増加は見られなかったが, 56 日目の

EtOH + Pen j 1 群でのみ control 群に対する有意な増加が確認された ($p < 0.01$)。他方で, EtOH + Pen j 1 群と Pen j 1 群の間では有意差は見られず, 胃炎惹起による Pen j 1 感作への影響を直接的に示すデータは得られなかった。とはいえ, 実験に供した EtOH + Pen j 1 群 4 個体中 3 個体は他群の個体に比べて高値を示していたことから, 未感作マウスに胃炎を惹起させた後に Pen j 1 を経口投与した場合には, 胃炎を起こしていない場合に比べて感作を亢進させる可能性は否定できなかった。

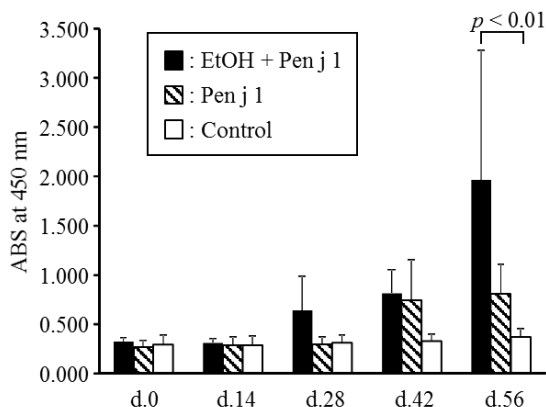


図6. エピアレルゲン経口感作時の特異的IgEレベルへの胃炎の影響

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 2 件)

Masakatsu USUI, Akihito HARADA, Shinya YASUMOTO, Yoshimasa SUGIURA, Anri NISHIDAI, Maria IKARASHI, Honami TAKABA, Taiko MIYASAKI, Hiroyuki AZAKAMI, and Masakazu KONDO, Relationship between the risk for a shrimp allergy and freshness or cooking, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 第 79 巻 10 号, 2015, pp.1698 ~ 1701

臼井将勝, 杉浦義正, 宮崎泰幸, エピアレルゲンの熱安定化機構の理解と調理等に関する迷信の否定, アレルギーの臨床, 査読有, 35 巻 12 号, 2015, pp.43-47

[学会発表](計 3 件)

新井健太, 臼井将勝 他, マウスへのアルコール投与またはストレス負荷による胃粘膜環境異常モデルの作製, 日本農芸化学会中四国支部第 41 回講演会, 2015 年 1 月 24 日, 下関

Kenta Arai, Taiko Miyasaki, Masakatsu Usui, Contribution of structural reversibility to the heat stability of

tropomyosin shrimp allergen, the 2nd Joint Seminar between SOU and NFU, 24 November 2015, Shanghai, China

臼井将勝 他, アルコール性胃炎はエピアレルギーリスクを増大させる可能性がある, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

水産大学校 HP 内 教員研究情報

<http://www.fish-u.ac.jp/kenkyu/sangakukou/sangakukou.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 将勝 (Usui Masakatsu)

水産機構水産大学校・食品科学科・准教授
研究者番号: 50399656

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

阿座上 弘行 (Azakami Hiroyuki)

山口大学・農学部・教授

研究者番号: 40263850