

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860105

研究課題名(和文) 運動負荷やNSAIDsの服用による食物抗原の吸収と食物アレルギー発症への影響解析

研究課題名(英文) Effects of exercise and NSAIDs on oral allergen absorption and development of food allergy in rats

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)・准教授

研究者番号：70389120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食物アレルギーの消化管吸収と感作におよぼす運動負荷とアスピリンの影響について解明することを試みた。その結果、アレルギーに感作した際には正常時よりもアレルギーの吸収が増加し、アスピリンを処置した時には細胞間隙輸送を介した吸収がさらに増加することで、重篤なアナフィラキシー症状が惹起されることを明らかにした。一方で、クロモグリク酸ナトリウムはマスト細胞依存的なアレルギーの吸収を抑制し、アレルギー症状の誘発を抑制することが示された。さらに、アスピリンは臨床投与量で食物アレルギーの感作を増加させた。これらの結果は、FDEIAの病態解明や新たな予防法・治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the effects of exercise and NSAIDs, especially aspirin on oral sensitization to an egg-white allergen, ovalbumin (OVA) as well as OVA absorption, in rats. In OVA-sensitized rats, plasma concentrations of OVA and a paracellular marker, FD-40 were significantly higher than those in unsensitized rats after oral administration. Aspirin increased oral absorptions of OVA and FD-40 via the paracellular pathway, and exhibited a lower rectal temperature in OVA-sensitized rats. Sodium cromoglycate ameliorated these aspirin-facilitated absorptions and allergic reactions in a dose-dependent manner. Aspirin also exhibited higher plasma levels of OVA-specific IgE and IgG1 than those in control at 6 and 8 weeks after initiation of oral sensitization. In conclusion, facilitation of OVA absorption via paracellular pathway due to impairment of intestinal barrier function by aspirin is considered to be one of the reasons of enhanced oral sensitization with OVA by aspirin.

研究分野：医療薬学

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 運動負荷 感作 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、アレルギー疾患の増加に伴い、特定の食物を摂取した後の運動負荷によりアレルギー症状が誘発される食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) の症例報告も増加傾向にある。運動負荷が FDEIA を誘発する要因は未だ解明されていない点が多いが、その一つとして運動負荷による食物アレルギーの消化管から血中への移行量、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。Matsuo らは、健常者 4 名と FDEIA 患者 6 名に小麦を摂取させ運動負荷を行った結果、両群で運動負荷により血清中の小麦アレルギー (グリアジン) のレベルが上昇することを報告している。Matsuo らはまた、運動負荷に代わり、アスピリン (ASP) などの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を服用することによっても同様の症状が誘発されることも報告している。さらに、我々は、NSAIDs の服用が卵白アレルギーであるリゾチームの細胞間隙輸送を介した消化管吸収を増加させ、その吸収亢進は NSAIDs の種類 [シクロオキシゲナーゼ (COX)-1 および COX-2 に対する選択性] により異なることやプロスタグランジン製剤であるミソプロストールの服用により抑制されることを動物実験により明らかにしている。これらの報告は、運動負荷や NSAIDs による食物アレルギーの消化管吸収量の増加が FDEIA 発症機構の一つであることを示唆するものであるが、その詳細な機構については明らかでない。運動負荷と消化管機能に関する過去の研究では、運動負荷により一時的な消化管の虚血状態が引き起こされることが知られている。また、運動負荷時には反応性の高い活性酸素が発生し、消化管の機能に障害が起こることが報告されている。しかしながら、運動負荷によるアレルギー吸収の増加に消化管の虚血や活性酸素の発生が関与しているか否か、また、どのような機序で吸収亢進が起こるのかに関する報告は例がない。さらに、運動負荷や NSAIDs の服用による食物アレルギータンパク質の吸収増加はアレルギー感作率を増強させることが予測される。このような背景から、本研究による FDEIA の病態解明が新規食物アレルギーの治療法の開発につながるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、運動負荷や NSAIDs による食物アレルギータンパク質の消化管吸収亢進の機構を明らかにするとともに、食物アレルギーの感作における運動負荷や NSAIDs の関与について解明することを目的とした。最初に食物アレルギーの吸収と食物アレルギー疾患の発症におよぼす NSAIDs の影響について検討した。また、FDEIA の予防法の開発を目的として、ASP 併用時の卵白アルブミン (OVA) の消化管吸収とアナフィラキシー症状の発症におよぼすクロモグリク酸ナトリ

ウム (SCG) の影響についても検討した。

3. 研究の方法

実験動物には雄性 SD 系ラットを用いた。ラットに OVA (1 mg) と Alum [Al(OH)₃, 10 mg; Mg(OH)₂, 10 mg] の混合液を週 1 回で 4 ~ 6 週間、腹腔内投与することで OVA 感作モデルラットを作製した。また、非感作ラットには Alum のみを同様のスケジュールで投与した。OVA の感作は血漿中の OVA 特異 IgE 抗体価を測定することで評価した。OVA の消化管吸収機構と ASP の影響は非感作ラット消化管上部または下部を FITC-OVA または FITC-デキストラン (FD-40, 分子量 40, 000) 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-OVA と FD-40 の吸収量を経時的に測定した。また、FITC-OVA の吸収におよぼす非標識 OVA、ウシ血清アルブミン (BSA)、各種エンドサイトーシス阻害剤 (コルヒチン, COL; パフィロマイシン A₁, BAF; フェニルアルシンオキシド, PAO; メチル-β-シクロデキストリン; MCD), および ASP の影響について同様に検討した。さらに、OVA 非感作および感作モデルラットを用いて、OVA と FD-40 の混合液を経口投与した際の血漿中濃度を経時的に測定した。アナフィラキシー症状は OVA と FD-40 の混合液を経口投与後に直腸温の変化とエバンスブルーを用いた血管透過性を測定する方法で評価した。さらに、これらの血漿中濃度とアナフィラキシー症状におよぼす ASP および SCG (10 および 100 mg/kg) の影響について同様に検討した。OVA の経口感作におよぼす ASP の影響は、雄性 BN 系ラットに週 3 回の頻度で 8 週間、OVA (50 mg/匹) を経口投与した。OVA の負荷を開始した後、隔週で採血を行い血清中の OVA 特異的 IgE と IgG₁ 抗体価を測定した。また、OVA の経口感作におよぼす ASP の影響については ASP (20 または 2 mg/kg) を OVA の投与 30 分前に経口投与することで検討した。

4. 研究成果

1. FITC-OVA の消化管吸収機構の解析

非感作ラットの消化管下部における FITC-OVA の吸収速度は非特異的吸収マーカーである FD-40 と比べて有意に高く、エンドサイトーシスの阻害剤である COL の処置により有意な低下を示した (図 1)。一方、消化管上部における FITC-OVA の吸収速度は消化管下部よりも低く、COL 処置によりわずかな減少を示した。これらの結果より、OVA の消化吸収には部位差が存在し、その吸収にはエンドサイトーシスと細胞間隙輸送が関与すると考えられた。消化管下部における FITC-OVA の吸収特性について検討した結果、FITC-OVA の吸収速度は非標識 OVA や BSA の添加により有意な低下を示した。さらに、消化管下部における FITC-OVA の吸収は、エンドソーム内の酸性化によりリガンドと受

容体の乖離を起こす vacuolar H⁺-ATPase の阻害剤である BAF の処置, クラスリン介在性エンドサイトーシスの阻害剤である PAO の処置により阻害されたが, カベオラ介在性エンドサイトーシスの阻害剤である MCD の処置による有意な変化は認められなかった (図 1)。これらの結果は, 消化管下部における OVA の吸収に, BSA 輸送と共通の受容体によるクラスリン介在性エンドサイトーシスと細胞間隙輸送が関与することを示すものである。

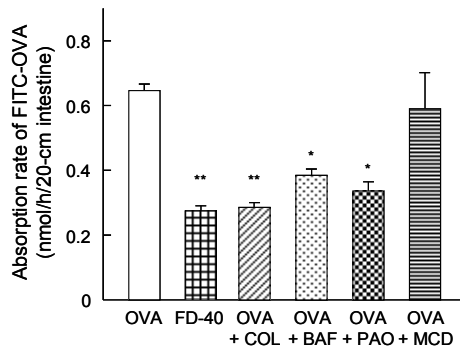


図 1 消化管下部における FITC-OVA の吸収と各種エンドサイトーシス阻害剤の影響

2. OVA の消化管吸収におよぼす ASP の影響解析

消化管の上部および下部における FITC-OVA の吸収は ASP の併用により約 2 倍の有意な増加を示した (図 2)。また, ASP と COL を併用した群では両部位ともに COL 単独処置に比べ有意な増加を示した。報告者らの過去の研究で, 細胞間隙輸送のマーカーである 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ーである FD-150 の血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC) は ASP 処置により有意な増加を示している。これらの結果から, ASP は OVA 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。

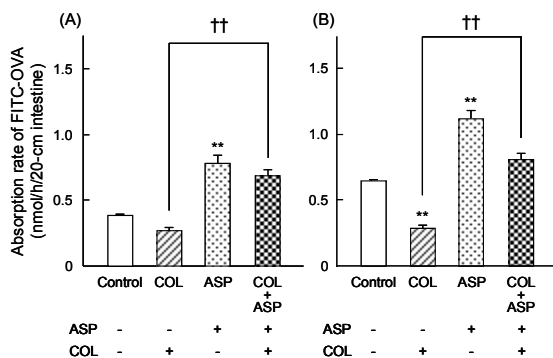


図 2 FITC-OVA の消化管吸収におよぼすコルヒチンとアスピリンの影響

A) 消化管上部; B) 消化管下部

3. 経口投与後の OVA と FD-40 の吸収とアレルギー症状の惹起におよぼす ASP と SCG の影響

非感作ラットにおける OVA 投与 3 時間後までの OVA と FD-40 の AUC は ASP の処置により, それぞれ約 3 倍および 2 倍の有意な増加を示した (図 3)。一方, 感作ラットにおける OVA や FD-40 の AUC 値は非感作ラットよりも高く, ASP を処置することでいずれも約 2 倍の増加を示した。さらに, 感作ラットで認められた OVA や FD-40 の血中濃度の増加は, マスト細胞の脱顆粒を抑制する SCG の用量依存的に有意に抑制された。この結果から, 感作ラットにおいては細胞間隙輸送などの非特異的な吸収経路の増加により OVA の吸収が促進され, その吸収の増加にマスト細胞の脱顆粒が関与する可能性が示唆された。

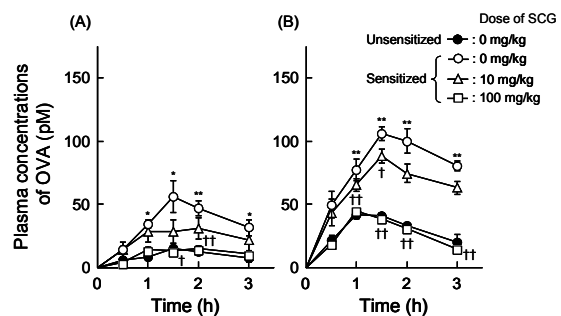


図 3 OVA の経口吸収におよぼす ASP と SCG の影響

A) 無処置群; B) ASP 処置群

次に, OVA を経口負荷した後のアナフィラキシー反応におよぼす ASP の影響を検討するため, OVA 投与 3 時間後までの直腸温と血管透過性の変化を評価した。その結果, 非感作ラットでは OVA を投与しても体温に有意な変化は認められなかったが, 感作ラットでは OVA の経口負荷により体温の低下が認められた (図 4)。さらに, 感作ラットに ASP を処置した場合, ASP 非処置時よりもさらに大きな体温低下が観察された (図 4)。これらの体温低下は, SCG 前処置により用量依存的な回復が認められた。

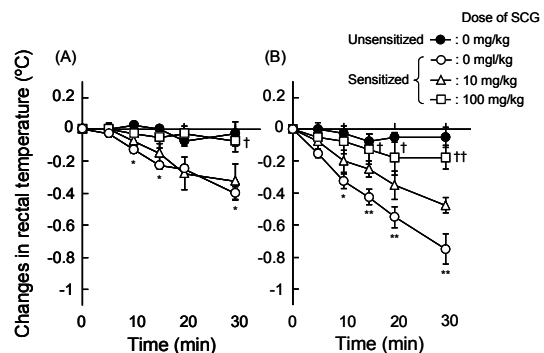


図 4 OVA 経口負荷後の体温変化におよぼす ASP と SCG の影響

A) 無処置群; B) ASP 処置群

さらにエバンスブルー静注後の消化管組織内濃度を測定して血管透過性を評価した結果, 感作ラットでは ASP を併用することで有

意な上昇が認められたが、SCG 処置により、血管透過性の亢進は抑制された。これらの結果から、OVA に感作した際には非感作時よりも細胞間隙を介した OVA の消化管吸収が増加することや ASP 処置時には OVA の細胞間隙輸送が大きく増加し、より重篤なアナフィラキシー症状が惹起される可能性が示された。一方で、SCG は症状の誘発を抑制することが示された。

4. OVA の経口感作におよぼす ASP およびスperlミン (SPM) の影響解析

OVA を週 3 回、経口投与したところ、ASP を負荷していないコントロール群および ASP 投与群の両群で感作 2 週目から IgE 抗体価の増加が認められたが、6 週目と 8 週目では 4 週目よりも IgE 抗体価の減少が確認された (図 5)。高用量の ASP を処置した群ではコントロール群と比べ、6 週目と 8 週目で有意に高い OVA 特異的 IgE 抗体価を示した。一方、コントロール群では経日的な IgG₁ 抗体価のわずかな上昇傾向が認められたが、ASP 処置により 8 週目で有意な増加が認められた。

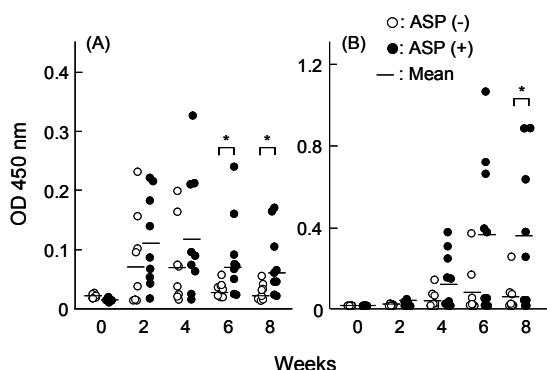


図 5 血漿中 OVA 特異抗体価の上昇におよぼす ASP の影響
A) IgE; B) IgG₁

次に、OVA の経口感作におよぼす低用量 ASP (2 mg/kg) の影響を検討した結果、OVA 特異的 IgE および IgG₁ 抗体価はいずれも低用量 ASP 処置による有意な変化を示さなかった。これらの結果は、ASP による OVA 感作の増強作用が用量依存性であることを示すものであり、ASP は解熱・鎮痛薬として服用する量で、OVA の消化管吸収を増加させ、かつ OVA の経口感作を増加させることが明らかとなった。ASP 処置による OVA の経口感作の増強が OVA の消化管吸収の増加、すなわち血中濃度の増加と関連するものか否かを確認するため、ASP と同様に高分子の消化管の透過性を亢進させる SPM を用いて同様の検討を行った。最初に、OVA の血漿中濃度におよぼす SPM の影響について検討した。OVA の投与と同時に SPM (20 mg/kg) を経口投与した場合、投与 1 時間後に最高血漿中濃度を示し、AUC 値や吸収率は約 4.9 倍および 4.8 倍の有意な増加を示した。次に、OVA の経口感

作におよぼす SPM の影響を検討した。その結果、検討した 8 週目までに OVA 特異的 IgE や IgG₁ 抗体価の有意な上昇は認められなかった。これらの結果は、SPM は ASP と同様に OVA の消化管吸収を増加させるが、ASP とは異なり OVA の経口感作の増強には影響しないことを示している。

5. まとめ

本研究により以下の知見が得られた。

- 1) OVA の消化管吸収には部位差が存在し、小腸下部での吸収は上部に比べて高いことが示された。また、吸収には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) 小腸下部における OVA の吸収には、BSA 輸送と共通の受容体によるクラスリン介在性エンドサイトーシスと細胞間隙輸送が関与し、カベオラ介在性エンドサイトーシスは関与しないことが示された。
- 3) OVA 感作時には非感作時よりも細胞間隙を介した OVA の吸収 (血中濃度) が増加する。また、ASP の処置は小腸における細胞間隙輸送を増加させ、その結果、より重篤なアナフィラキシー症状を惹起することが明らかとなった。
- 4) ASP は OVA の消化管吸収と感作能を増加させたが、OVA 感作能の増加には OVA の消化管吸収 (血中濃度) の増加とは別の要因が大きく関与していることが示唆された。

前述のように、ASP の服用が FDEIA 患者の血中アレルギー濃度を増加させることはすでに報告されていた。また、本研究の結果から、ASP の服用時に認められる食物アレルギーの吸収増加はタンパク質特異的なものではなく起こりうることを示唆された。さらに、感作された状態では小腸に存在するマスト細胞の脱顆粒が ASP による吸収の増加をさらに強めることが明らかとなった。このように、アスピリンが細胞間隙輸送を介した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明らかにされていなかった。一方、運動負荷による FDEIA の発症機構についても消化管からのアレルギーの吸収増加が主な要因と考えられるが、これには運動負荷に伴う交感神経系の亢進や腸管の一時的な虚血・再灌流などの関与が考えられる。今後、運動負荷による FDEIA 症状の誘発機構についても解明したいと考えている。

また、本研究では OVA の消化管吸収と経口感作におよぼす ASP の影響について、ラットモデルを用いて解析し、解熱・鎮痛薬として用いられる用量の ASP が OVA の消化管吸収を増加させ、経口感作を増強させることを明らかにした。一方、ASP と同様に OVA の消化管吸収を増加させた SPM は OVA の経口感作に有意な影響を与えなかった。したがって、ASP による OVA の経口感作の増強には OVA の消化管吸収 (血中濃度) の増加とは別の要因が関与している可能性が考えられた。

現時点では、食物アレルギーの有効な予防法や治療法は確立されておらず、食物アレルギーの発症を予防する方法として、原因となる食物の摂取を避ける除去食療法が行われている。しかしながら、多くの食品から原因となる食物を除くことは患者や家族にとって大きな負担となり、今後、新たな治療法・予防法の開発が望まれる。アレルギーの消化管吸収機構の解明やアレルギーの消化管透過性を制御する物質の探索が、新たな食物アレルギーの予防法・治療法の開発につながるものと期待される。

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4件)

1. Yokooji T, Matsuo H, Sodium cromoglycate prevents exacerbation of IgE-mediated food-allergic reaction induced by aspirin in a rat model of egg allergy, *International Archives of Allergy and Immunology*, 査読あり, 2015, 167, pp193-202
2. Yokooji T, Intestinal absorption of food allergens and development of food allergic symptoms, *膜 (MEMBRANE)*, 査読あり, 2015, 40, pp284-290
3. Yokooji T, Okamura Y, Chinuki Y, Morita E, Harada S, Hiragun M, Hide M, Matsuo H, Prevalences of specific IgE to wheat gliadin components in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis, *Allergology International*, 査読あり, 2015, 64, pp206-208
4. Yokooji T, Nouma H, Matsuo H, Characterization of ovalbumin absorption pathways in the rat intestine, including the effects of aspirin, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 査読あり, 2014, 37, pp1359-1365

[学会発表](計12件)

1. 二宮直紀, 羽村光, 横大路智治, 松尾裕彰, 小麦グリアジンの消化管吸収特性とアスピリンによる吸収増加機構の解明, 膜シンポジウム 2015, 2015年11月25日, 神戸大学(兵庫県)
2. 農間仁美, 羽村光, 横大路智治, 松尾裕彰, 抗IgE結合エピトープ抗体を用いた血清中小麦グリアジンコンポーネントの定量法の確立, 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 第54回中国四国支部学術大会, 2015年11月01日, 高知市文化プラザ かるぼーと(高知県)
3. 早瀬佑紀, 平野太暉, 横大路智治, 松尾裕彰, 小麦グルテン感作における加水分解処理と感作経路の影響, 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 第54回中国四国支部学術大会, 2015年11月01日, 高知市文化プラザ かるぼーと(高知県)

4. Tomoharu Yokooji, Taiki Hirano, Hiroaki Matsuo, Aspirin facilitates the intestinal absorption and oral sensitization of food allergens in rats, World Allergy Congress (WAC) 2015, 14 Oct 2015, Seoul (Korea)

5. 松尾裕彰, 平野太暉, 横大路智治, アスピリンによる食物アレルギー吸収増加が感作に及ぼす影響, 第64回日本アレルギー学会学術大会, 2015年05月27日, グランドプリンスホテル新高輪 国際間パミール(東京都)

6. 横大路智治, 羽村光, 松尾裕彰, 小麦グリアジンの消化管吸収特性とアスピリンの影響解析, 第64回日本アレルギー学会学術大会, 2015年05月27日, グランドプリンスホテル新高輪 国際間パミール(東京都)

7. 横大路智治, 食物アレルギーの吸収機構の解明と食物アレルギーの発症に関する研究, 日本膜学会第37年会, 2015年05月15日, 早稲田大学(東京都)

8. 横大路智治, 松尾裕彰, 食物アレルギーの吸収とアレルギー症状の発症におよぼすアスピリンとクロモグリク酸ナトリウムの影響解析, 日本膜学会第37年会, 2015年05月14日, 早稲田大学(東京都)

9. 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とアスピリンの影響解析, 膜シンポジウム 2014, 2014年11月27日, 神戸大学(兵庫県)

10. 羽村光, 横大路智治, 松尾裕彰, 小麦グリアジンの消化管吸収に及ぼすアスピリンの影響, 第53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, 2014年11月08日, 広島国際会議場(広島県)

11. 平野太暉, 横大路智治, 松尾裕彰, 卵白アルブミン感作に及ぼすアスピリンの影響, 第53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, 2014年11月08日, 広島国際会議場(広島県)

12. 小麦グルテン感作における加水分解処理と感作経路の影響, 早瀬佑紀, 平野太暉, 農間仁美, 横大路智治, 松尾裕彰, 日本皮膚科学会第128回山陰・第24回島根合同開催地方会, 2014年08月30日, 松江東急イン(鳥取県)

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)・准教授
研究者番号: 70389120