

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2015～2017  
課題番号：15K07776  
研究課題名(和文) 環境要因によるTリンパ球レパトア形成と実験動物アレルギー発症との関連性の解明  
  
研究課題名(英文) Analysis of the relationship between T cell repertory and incidence of laboratory animal allergy by environmental factors  
  
研究代表者  
土佐 紀子 (Tosa, Noriko)  
  
北海道大学・医学研究院・助教  
  
研究者番号：20312415  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から、Tリンパ球レパトア形成が確立する期間である胎仔期および幼若期のマウスにおける抗原暴露が実験動物アレルギーの誘導を抑制したことから、胎仔期および幼若期の環境要因が実験動物アレルギー発症に影響を与え、その影響はレパトア形成と関係する可能性が示唆された。さらに、動物アレルギーであるCan f 1感作マウスにおいてアルミニウム塩アジュバントによりCan f 1特異的IgEとIL-13のレベルが抑制され、この現象は食物アレルギーである卵白アルブミンでは認められなかったことから、実験動物アレルギーの誘導機構は食物アレルギーとは異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, exposure of antigens to fetus or juvenile mice suppressed the induction of laboratory animal allergy. These results suggest incidence of laboratory animal allergy is influenced by environmental factors and the relationship between the influence and establishment of T cell repertory as T cell repertory is established in fetus or juvenile mice. Moreover, animal allergen Can f 1-specific IgE and IL13 levels in the mice immunized with Can f 1 were influenced by aluminum hydroxide, differing from the results for immunization with OVA as a food allergen. These results suggest that the immune mechanism for laboratory animal allergy is different from that with food allergy.

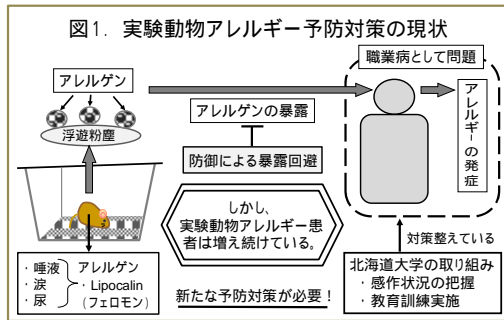
研究分野：実験動物学

キーワード：動物アレルギー 食物アレルギー 胎仔期 幼若期 IgE IL-13 Can f 1

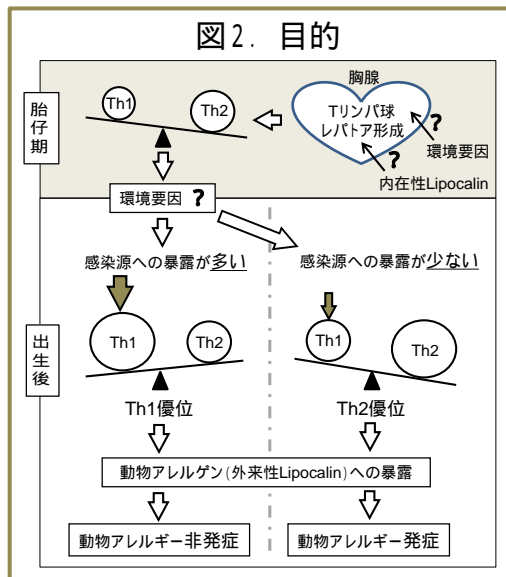
1. 研究開始当初の背景

(1) 実験動物アレルギーの発症機構は未だ不明な点が多い(図1)。

実験動物アレルギーは、動物実験従事者において職業病として重大な問題となっている。これまでの予防対策は、アレルゲン暴露を防御により回避する方法が取られてきたが、実験動物アレルギーは増えている。アレルゲン暴露回避の限界を鑑み、アレルギーの発症機構を解明することが実験動物アレルギーの抜本的な予防対策の礎石となると考えられる。



(2) 胸腺におけるTリンパ球の抗原認識特異性レパトア形成が実験動物アレルギー発症の鍵を握っていると考えられる(図2)。



実験動物アレルギーのアレルゲンは、Lipocalinファミリーを形成しており、脊椎動物、無脊椎動物、植物、微生物に恒常的に存在している。ヒトの体内においてもLipocalinが恒常的に存在している。Tリンパ球は、胸腺内で提示される自己抗原分子群への反応親和性によって細胞生死と分化系譜の選択を受け、自己成分に寛容で非自己分子に反応する抗原認識特異性レパトア(レパトア)を確立する。この胸腺におけるレパトア形成は、胎仔期および新生仔期に完了する。興味深いことに、この時期の妊娠中の母血清中および羊水中に高濃度のLipocalinが検出されている。これらの結果は、胸腺分化

において内在性Lipocalinが外来性Lipocalinに反応するTリンパ球の排除を助長することに参与していることを示唆している。

(3) 胎仔期、新生仔期および幼若期の環境要因に着目し解析する必要がある。

Lipocalinは、成長ホルモンや性ホルモンによる合成調節を受けるだけでなく、フェロモン、臭分子、ステロイド等と結合する機能を有していることからBehaviorに影響を与える環境要因によっても調節を受けることが報告されている。従って、内在性Lipocalinに対するTリンパ球レパトア形成は、胎仔期(母体)および新生仔期の環境要因に密接な影響を受けると予想されるが、この点を解析した報告は少ない。

日本を含めた先進国におけるアレルギー疾患患者の急増には、環境要因が強く関与していることが指摘されている。環境要因には、アレルゲンや大気汚染物質の増加以外に、Strachan, D.P.により提唱された「衛生仮説」も含まれる。「衛生仮説」とは、出生後、感染源への暴露が少ないことにより末梢Tリンパ球がTh2優位になることがアレルギー発症の引き金と考える説である。動物アレルギーの疫学的調査結果では「衛生仮説」が指示されており、実験動物アレルギーもTh2優位の免疫応答が誘導されることから、出生後のTh1/Th2バランスが重要と考えられるが、そのメカニズムについての細胞分子レベルでの解明はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、1) 胎仔期と幼若期の環境要因が外来性Lipocalinによるアレルギー発症に影響を与えるかTh1/Th2バランスに注目して解析し、2) その影響には胸腺における内在性Lipocalinに対するレパトア選択が関与しているか明らかにする(図2.)。

3. 研究の方法

(1) 外来性Lipocalinの感作: 外来性Lipocalinとして犬アレルギーCan f 1を用い、6週齢のBALB/cまたはC57BL/6の首背側皮下に二週間ごとに5 μg/匹の抗原を3回投与し、第1回目の抗原投与から35日目に感作の評価を行った。

(2) 感作の評価: 血清中の総IgE、抗原特異的IgEおよび分離・培養した脾細胞を各抗原で刺激後48時間の培養上清中のIL-13とIFN-γの産生をELISA法にて解析した。

(3) 幼若期の抗原暴露: 生後7日目と14日目に0.5 μg/匹のCan f 1またはDer p 1(ダニアレルゲン)をBALB/cマウスの首背側皮下に投与した。その後、6週齢で上記1)に記載した通りにCan f 1による感作を実施した。

(4) 胎生期の抗原暴露: プラグを確認した日をDay0としDay8とDay15に、BALB/cマウ

スの首背側皮下に 5 µg/匹の Can f 1 を投与した。出生後、6 週齢で上記 1) で記載した通りに Can f 1 による感作を実施した。  
 (5) 統計解析：二群間の比較にはマン・ホイットニ解析を行った。要因(系統、Alum、抗原)の影響の解析には重回帰分析を行った。P<0.05 を有意とした。

#### 4. 研究成果

(1) 出生後、感染源への暴露が多いと Th1 優位に、感染源への暴露が少ないと Th2 優位になり、この Th2 優位になることがアレルギー発症の引き金となると考えられている(図 2.)

SPF 環境下において C57BL/6 は Th1 優位、BALB/C は Th2 優位であることが明らかとなっており、前者は感染源への暴露が多い環境を、後者は暴露が少ない環境における免疫応答を反映していると考えられる。そこで Can f 1 で両系統を感作し免疫応答を解析したところ、血清中の総 IgE、Can f 1 特異的 IgE および IL-13 のレベルは、いずれもコントロール群より有意に増加していた(図 3~5)。これらの増加における系統による影響は、総 IgE レベルにおいて認められたが、Can f 1 特異的 IgE と IL-13 のレベルにおいては認められなかった(表 1~3)。一方、IFN-γ レベルは、Can f 1 刺激による影響は受けなかった。

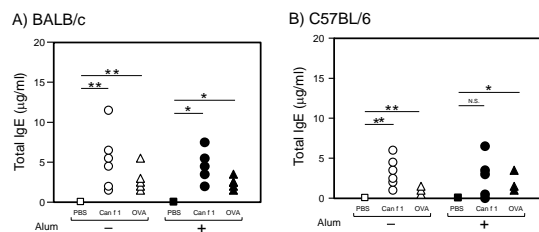


図 3. 総IgEレベル

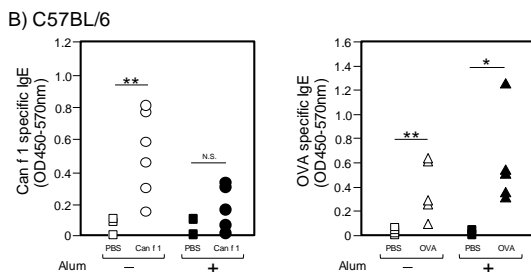
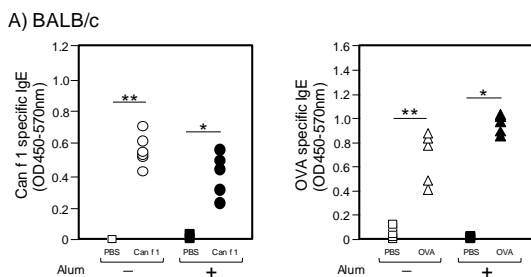


図 4. 抗原特異的IgE

次に、Th2 アジュバントであるアルミニウム塩 (Alum) を用いて Th2 優位の免疫応答を誘導した時の Can f 1 感作マウスにおける血

清中の総 IgE、Can f 1 特異的 IgE および IL-13 のレベルを解析し、の結果と比較したところ、総 IgE、Can f 1 特異的 IgE および IL-13 のレベルは、いずれもコントロール群より有意に増加していた(図 3~5.)。興味深いことに、Can f 1 特異的 IgE と IL-13 のレベルは Alum による影響を受け(表 2、3)、IL-13 のレベルは有意に抑制されていた(図 5)。この抑制が動物アレルゲンに特異的であることを確認するため、食物アレルゲンである卵白アルブミン(OVA)との比較解析を行ったところ、OVA 感作マウスにおける OVA 特異的 IgE と IL-13 のレベルは Alum による影響を受けなかった(表 2、3)。

以上の結果から、Alum により Can f 1 特異的 IgE と IL-13 のレベルが抑制されたことから Th2 優位の免疫応答が動物アレルギーの誘導に抑制的に働き、その抑制は OVA では認められないことから食物アレルギーとは異なる動物アレルギー特異的な免疫誘導機構が存在することが示唆された。

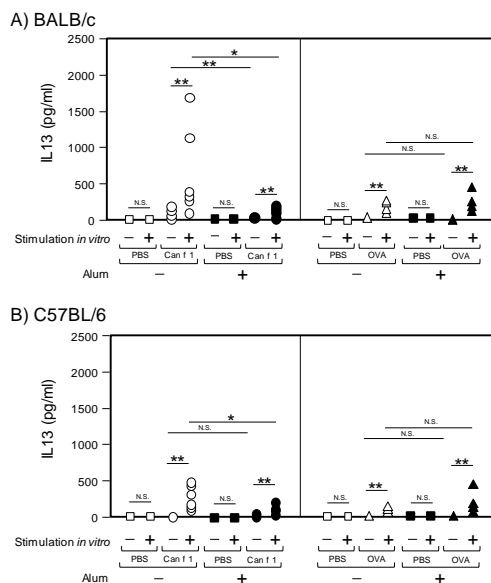


図 5. IL-13

Independent Variable	Coefficient	S.E.	t	P (p<lt)
Can f 1	3940.454	547.299	7.20	<0.0001 **
Genetic backgrounds	-1231.273	547.292	-2.25	0.0300 *
Alum	-265.791	549.567	-0.48	0.6313
OVA	1714.039	251.750	6.81	<0.0001 **
Genetic backgrounds	-869.476	251.204	-3.46	0.0013 **
Alum	95.939	251.750	0.38	0.7053

表 1. Multiple regression model showing the relationships between total IgE level and independent variables. \*P<0.05;

\*\*\*P<0.01.

Independent Variable	Coefficient	S.E.	t	P (p<lt)
Can f 1	0.4075	0.0430	9.46	<0.0001 **
Genetic backgrounds	-0.0487	0.0430	-1.13	0.2644
Alum	-0.1271	0.0432	-2.94	0.0055 **
OVA	0.5717	0.0615	9.28	<0.0001 **
Genetic backgrounds	-0.1701	0.0614	-2.77	0.0087 **
Alum	0.1149	0.0615	1.87	0.0698

表 2. Multiple regression model showing the relationships between antigen-specific IgE level and independent variables.

\*P<0.05; \*\*P<0.01.

Independent Variable	Coefficient	S.E.	t	P (p> t )
Can f 1	277.768	79.732	3.48	0.0012 **
Genetic backgrounds	-96.7407	79.732	-1.21	0.2321
Alum	-194.963	80.063	-2.44	0.0194*
OVA	130.651	23.101	5.66	<0.0001 **
Genetic backgrounds	-35.804	23.051	-1.55	0.1286
Alum	35.990	23.101	1.56	0.1275

表 3. Multiple regression model showing the relationships between IL13 levels after stimulation with each antigen in vitro and independent variables. \*P<0.05; \*\*P<0.01.

(2) 幼若期に抗原に暴露されることが外来性 Lipocalin による感作誘導に影響を与えるか明らかにするため、幼若期に BALB/c マウスを Can f 1 および Der p に暴露させ、6 週齢で Can f 1 感作し解析したところ、Can f 1 特異的 IgE レベルは、いずれの場合も幼若期に抗原に暴露されていないマウスより有意に低かった (Can f 1 : P<0.05、Der p 1 : P<0.01) (図 6-A)。一方、IL-13 レベルは有意差が認められなかった (図 6-B)。

以上の結果から、幼若期における特定抗原の暴露は動物アレルギーの誘導を抑制し、その抑制機構には IL-13 の関与は低いことが示唆された。

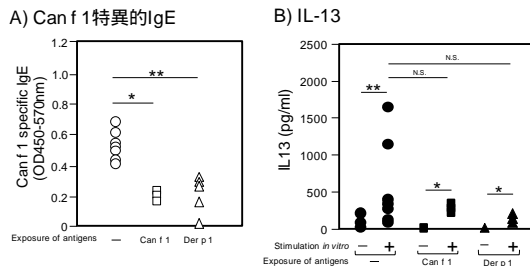


図 6. 幼若期における抗原暴露による影響

(3) 胎仔期において抗原に暴露されることが、出生後の外来性 Lipocalin による感作誘導に影響を与えるか明らかにするため、妊娠 BALB/c マウスを Can f 1 で感作を行った。感作の時期は、胸腺が発生する胎齢 10.5 日の前の胎齢 8 日と後の胎齢 15 日に実施し、生後 6 週齢で Can f 1 で感作を行い、免疫応答を解析した。Can f 1 特異的 IgE レベルは、胎仔期に抗原に暴露されていないマウスより有意に低かった (P<0.05) (図 7-A)。一方、IL-13 レベルは有意差が認められなかった (図 7-B)。

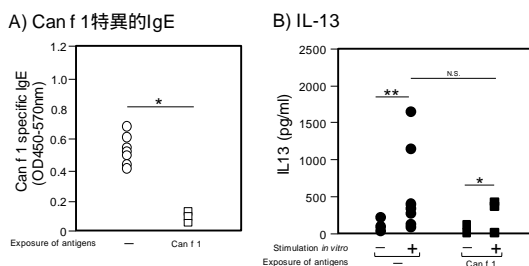


図 7. 胎仔期の抗原暴露による影響

以上の結果から、胎仔期における特定抗原の暴露は動物アレルギーの誘導を抑制し、その抑制機構には IL-13 の関与は低いことが示唆された。

(4) まとめ: 本研究から、Alum により Can f 1 特異的 IgE と IL-13 のレベルが抑制されたことから Th2 優位の免疫応答が動物アレルギーの誘導に抑制的に働き、その抑制は OVA では認められなかったことから食物アレルギーとは異なる動物アレルギー特異的な免疫誘導機構が存在することが示唆された。

さらに、胎仔期および幼若期における抗原暴露が動物アレルギーの誘導を抑制したことから、胎仔期および幼若期の環境要因が動物アレルギー発症に影響を与えることが示唆された。

今後は、Alum による Can f 1 に対する免疫応答の抑制機序の解明、および、胎仔期および幼若期における抗原暴露が、この期間に確立する胸腺におけるレパトア形成に影響を与えるか解析する必要がある。

## 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 2 件)

土佐紀子、吉松組子、有川二郎、犬アレルギー (Can f 1) 感作誘導による免疫応答に関する卵白アルブミン (OVA) との比較解析、第 64 回日本実験動物学会総会、平成 29 年 5 月 25 - 27 日 (郡山市)

土佐紀子、吉松組子、有川二郎、犬アレルギー (Can f 1) 感作誘導におけるマウス系統特異的免疫応答の解析、第 159 回日本獣医学会学術集会、平成 28 年 9 月 6 - 8 日 (藤沢市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土佐 紀子 (TOSA, Noriko)  
北海道大学・医学研究院・助教  
研究者番号: 20312415