

令和元年5月21日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07756

研究課題名(和文) 経皮感作する食物アレルギーの同定と、抑制しうる食品因子の検討

研究課題名(英文) Identification of percutaneously sensitizing food allergens and analysis of preventing food factors

研究代表者

森山 達哉 (Moriyama, Tatsuya)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60239704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、食物アレルギーの一部は、皮膚からの抗原浸入が感作源となることが示唆されている。これを経皮感作と呼ぶが、種々の食品に含まれる経皮感作抗原に関しては未だ不明な点が多い。そこで、マウスモデル系を構築し、食品抽出液を皮膚に塗布した際のIgE、IgG1産生を指標に経皮感作抗原を探索した。大豆や乳、卵黄、卵白、ソバ、ゴマなどの経皮感作抗原を同定した。また、塗布するタンパク質を経口摂取させると、経口免疫寛容が作動し、経皮感作を抑制しうることを大豆をモデルにして示した。さらに、経皮感作を抑制しうる食品成分についても同定することができた。また、これらの食物アレルギーの各種処理における変動解析も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚から食品タンパク質が侵入して体内に抗体が産生されることが引き金となる新しい食物アレルギーが知られている。本研究では、どのような食品タンパク質が皮膚から浸入して免疫系に認識されて抗体産生が起こるかという点について、マウスモデル系を用いて、本邦での主要な食品について明らかにした。また、日常的に経口摂取することで、このような経皮感作が抑制しうることを示唆した。さらに、食品の各種処理によってアレルギーリスクがどう変化するかという点も、虫害大豆をモデルに明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been suggested that, for some food allergens, antigen infiltration from the skin is a sensitization source. This is called transdermal sensitization, but there are still many unclear points regarding transdermal sensitization antigens contained in various foods. Therefore, a mouse model system was constructed, and percutaneous sensitization antigens were searched using IgE and IgG1 production as an index when food extract was applied to the skin. Transdermal sensitization antigens such as soybean, milk, egg yolk, egg white, buckwheat and sesame were identified. In addition, we showed that oral intake of protein to be applied activates oral immune tolerance and can suppress transcutaneous sensitization, using soybean as a model. Furthermore, it was also possible to identify food components that can suppress transdermal sensitization. In addition, fluctuation analysis in various treatments of these food allergens was also conducted.

研究分野：食品機能学

キーワード：経皮感作 アレルギー 食物アレルギー 大豆 ソバ 鶏卵 マウスモデル ゴマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、食物アレルギーの一部は、皮膚からの抗原浸入が引き金となることが示唆されている。このような現象を経皮感作と呼ぶが、個々の食品中のどのような分子が経皮感作されやすいかという点や、経皮感作を抑制しうる共存物や条件、要因などに関しては、ほとんど未解明であった。食品中の経皮感作抗原分子に関しては、鶏卵や牛乳などで一部研究があるにすぎなかった。また、経皮感作のマウスモデル系も十分には確立されていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まずはじめに、個体差が少なく、再現性・効率性に優れた経皮感作マウスモデルを構築することを試みた。次に日常的に本邦で摂取しうる主要タンパク質食品について、粗抽出液を調製し、これを経皮感作マウスモデルの皮膚に塗布することで、マウス血清中に産生される IgE 抗体や IgG1 抗体を検出し、それらが反応する抗原を同定することで、各種食品における経皮感作抗原の同定を行った。さらに、共存する食品成分や使用する界面活性剤の種類、摂取食品要因等によって、これらの経皮感作が抑制されるかどうか検討した。これらの研究によって、経皮感作マウスモデルの確立、主要食品中の経皮感作抗原の同定、経皮感作を制御しうる方策の検討の3つに関して明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 経皮感作マウスモデルの確立

これまでの検討から、雌性 Balb/c マウスの背中の中毛を剃毛し、テープを用いてテープストリッピングを行うことで皮膚のバリア構造を脆弱にし、抗原タンパク質溶液を界面活性剤である SDS 存在下でハケを用いて塗布することで、経皮感作が起こりうることが判明していた。しかし、この方法では、個体差が多く、その理由として、テープストリッピングの効率が個体によって変わりうることを示唆された。そこで、SDS の濃度やテープストリッピングの有無、抗原タンパク質濃度などを変化させ、1週間毎に部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE や IgG1 のレベルを経時的に測定することで、どの条件がモデル系として適当か検討した。なお、塗布中は塗布タンパク質を含まない飼料を用いて飼育した。反対に、経口免疫寛容の検討実験では、塗布タンパク質を含む飼料を用いて、含まない飼料を用いた場合と経皮感作能を比較検討した。

(2) 食品タンパク質の抽出と塗布

本邦で重篤なアレルギーが発症しうる原因食品として、特定原材料表示指定の7品目がある。また、表示推奨食品として21品目が知られている。これらの中から、鶏卵(卵黄、卵白)、牛乳、大豆、ソバ、ゴマを選び、蒸留水でタンパク質を抽出し、タンパク質濃度を測定後、そこに終濃度を変えた SDS を加えて塗布サンプルとした。塗布は週5回行った。

(3) 抗原特異的 IgE、IgG1 の検出

抗原タンパク質を固相化した ELISA プレートブロッキング後、適宜希釈したマウス血清を加え、反応・洗浄後、2次抗体としてアフィニティー精製 HRP 標識抗マウス IgE 抗体またはアフィニティー精製 HRP 標識抗マウス IgG1 抗体を反応させ、最終的に TMB 試薬にて発色させた。吸光度はプレートリーダーを用いて測定した。マウス IgE や IgG1 標品を用いて検量線を作製し、濃度計算を行った。また、純品タンパク質アレルギーコンポーネントを固相化することで、各コンポーネントに対する抗体の産生を評価した。

(4) IgE・IgG1 結合タンパク質(経皮感作抗原候補分子)の検出

各種塗布サンプルを SDS - PAGE によって電気泳動したのち、イムノプロットにて IgE や IgG1 が結合するタンパク質バンドを検出した。検出は感度の優れた化学発光法を用いた。

(5) 各種処理に対する、食品中の経皮感作抗原等のアレルギーの変動解析

大豆をモデルとして、作製したアレルギー抗体を用いた ELISA やイムノプロットングによって、各種アレルギーの変動解析を行った。

4. 研究成果

(1) 経皮感作マウスモデルの確立

卵白を用いた経皮感作実験において、塗布条件を種々検討した結果、サンプル濃度は 1 - 20 mg / ml の範囲で、かつ、共存 SDS の 5% がよく、テープストリッピングは無い方が個体差が少なく、2週間の塗布で抗体価の上昇が見られ、少なくとも塗布後 4 - 5週間は高値を維持したことが判明した。そこで、この条件をスタンダード法として確立した。

(2) 主要食品中の経皮感作抗原の検出と同定

マウスモデル系を構築し、大豆を皮膚に塗布した際の IgE、IgG1 産生と反応性を指標に大豆の経皮感作抗原を探索した。その結果、Gly m 5 や Gly m 6、trypsin inhibitor が経皮感作抗原となることを世界で初めて明らかにした(Murakami et al. BBB, 2018) (図1)。

興味深いことに、ヒトでの症例報告で、大豆の経皮感作が報告され、その原因抗原として、今回示した3つのアレルギーのうち、Gly m 6 であると示されている。この結果は、マウスモデル系とヒトでの臨床が類似していることを示唆する。一方、花粉症に関連する大豆アレルギーである Gly m 3 や Gly m 4 については、経皮感作抗原とはならないことが示された。

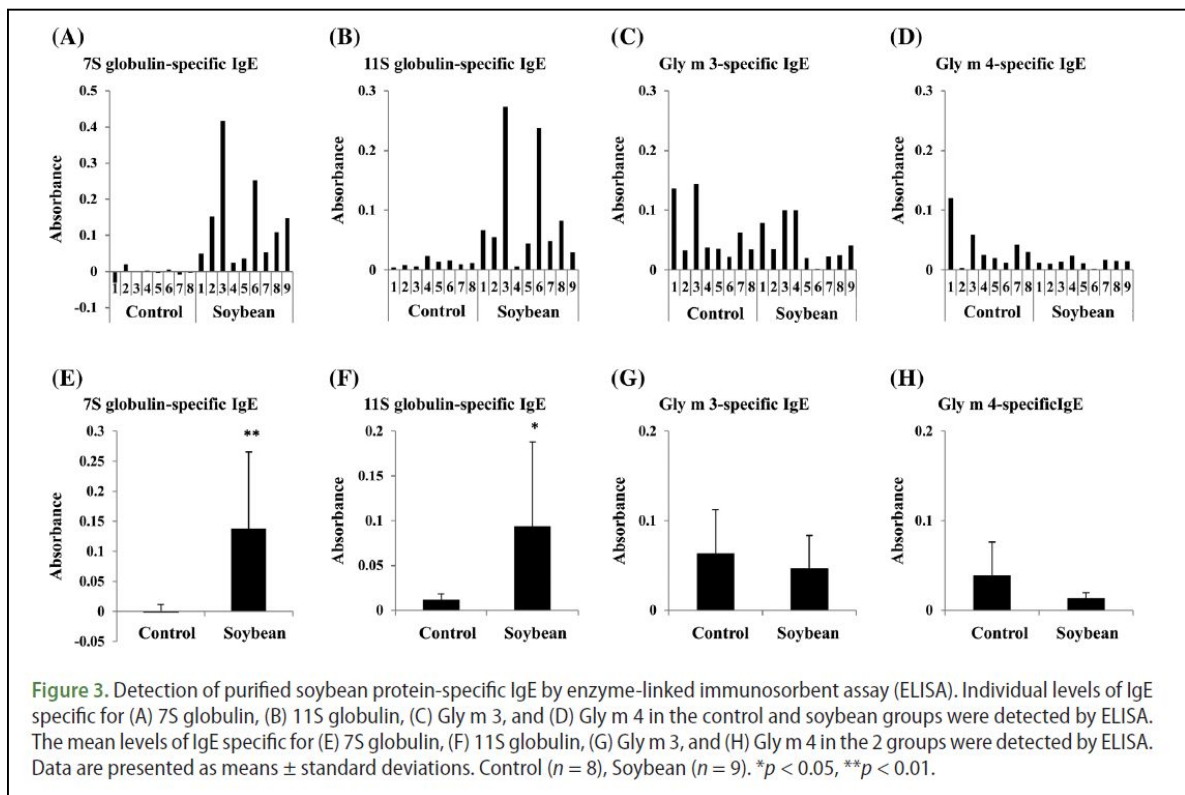


図 1 . 大豆塗布によってマウスで産生された IgE が反応する大豆アレルゲンの同定

卵白塗布の場合も、卵白特異的 IgE や IgG1 が産生され、また卵白の経口投与で直腸温の低下等のアレルギー症状惹起も起こり、卵白タンパク質の経皮感作が確認された。この場合、イムノプロットや ELISA、競合 ELISA などによって、オボアルブミン (OVA)、オボトランスフェリン (OVT)、オボムコイド (OVM) が主要な経皮感作抗原であることが判明した。これらは、ヒトにおける卵白の食物アレルゲンとしても知られているもので、本モデル系がヒトでのアレルゲン探索のモデルとして使用しうる可能性を示唆した。卵黄に関して、経皮感作実験を行ったところ、卵黄特異的な IgE 産生を認め、卵黄中の約 60 kDa 付近のタンパク質が経皮感作抗原である事が示唆された。この分子は、分子量的には、卵黄アレルゲンとして知られている - リベチンである可能性がある。牛乳塗布の場合は、乳清タンパク質である - ラクトグロブリンが主要経皮感作抗原となった。それ以外にも、 - カゼインも弱いながらも経皮感作しうる事が示唆された (図 2)。その他、ソバやゴマなどを用いて実験を行った。ソバの場合も、経皮感作が認められ、IgE 反応性の主要経皮感作抗原を同定することに成功した。この場合も、本アレルゲンはヒトでのソバアレルゲンとして知られている分子の一つであった (未発表)。ゴマの場合は、興味深いことに、白ゴマと黒ゴマで経皮感作能が異なり、黒ゴマに比べて白ゴマでは有意に強い経皮感作能を示した。この原因としては黒ゴマ中に含まれる成分が経皮感作を抑制する可能性を示唆した。その候補成分としてタンニン (酸) を塗布サンプルと共存させて用いたところ、確かに経皮感作が抑制されることが示された。従って、タンニン酸は経皮感作を抑制しうる成分として応用できる可能性を示唆した。その詳細なメカニズムの解明は今後の課題である。

(3) 大豆を用いた経皮感作実験の際に、飼料として大豆を摂取させたマウスでは、大豆を摂取していないマウスと比べて、有意に大豆抗原の経皮感作が抑制されたことが判明した。この結果から、大豆の摂取によって経口免疫寛容が作動し、経皮感作を抑制しうることを明らかにした (Murakami et al, JNSV, 2018)。

(4) 各種処理に対する、食品中の経皮感作抗原等のアレルゲンの変動解析

大豆をモデルとして、今回明らかとなった経皮感作抗原 (Gly m 5 や Gly m 6、trypsin inhibitor) を含む各種アレルゲンが、栽培条件や加工条件、各種処理などでどのように変化しうるか検討した。特に今回は、虫害被害を受けた際の変動について検討した。その結果、虫害被害を受けた大豆や枝豆では、これら 3 種類の経皮感作抗原は変動しなかったが、花粉症に関連する 2 つのアレルゲン、Gly m 3 と Gly m 4 が有意に増加することが判明した。このように、栽培条件によって特定のアレルゲンが変化することは、食の安全性を議論する上で重要な知見と考えられる。

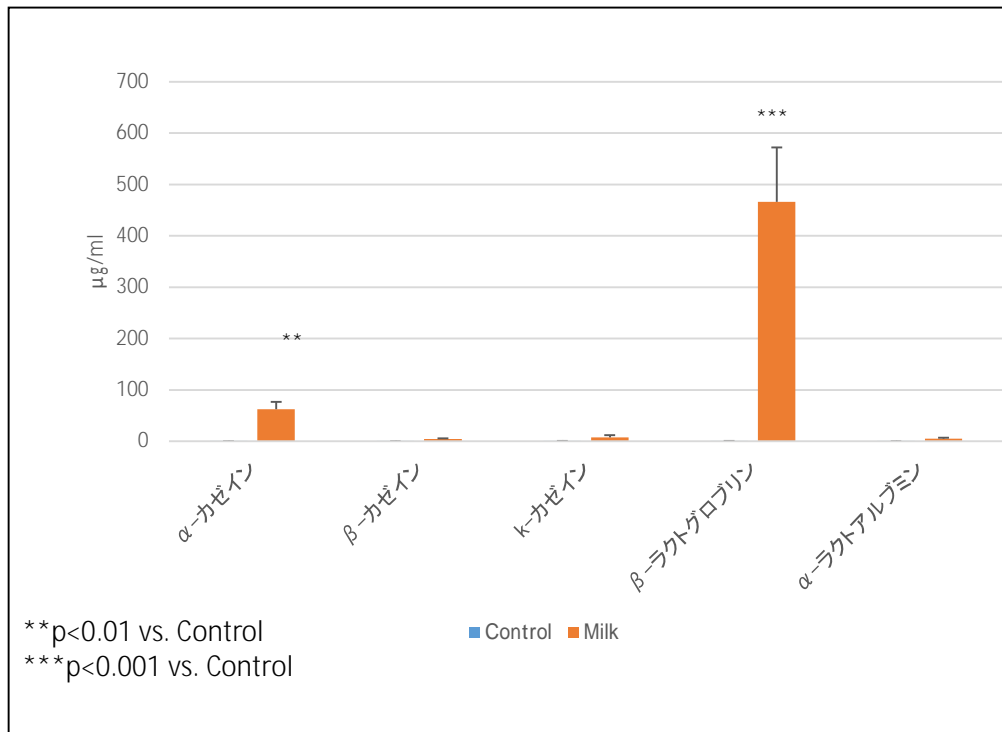


図2. 乳塗布によってマウスで産生された IgG1 が反応する乳アレルゲンの同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- 1) Murakami, H., Ogawa, T., Takafuta, A., Yano, E., Zaima, N., and Moriyama, T: (2018) Percutaneous sensitization to soybean proteins is attenuated by oral tolerance. **J. Nutr. Sci. and Vitaminol.** 査読有、64, 683-686.
- 2) Hanafusa, K., Murakami, H., Ueda, T., Yano, E., Zaima, N., Moriyama, T: (2018) Worm wounding increases levels of pollen-related food allergens in soybean (*Glycine max*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 査読有、82, 1207-1215. DOI. 10.1080/09168451.2018.1456319
- 3) Murakami, H., Ogawa, T., Takafuta, A., Yano, E., Zaima, N., and Moriyama, T: (2018) Identification of the 7S and 11S globulins as percutaneously sensitizing soybean allergens as demonstrated through epidermal application of crude soybean extract. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 査読有、82, 1408-1416. DOI.10.1080/09168451.2018.1460573
- 4) 松尾綾人、徳舛直樹、矢野えりか、財満信宏、森山達哉、(2018) 「各種食用豆類における花粉症関連食物アレルゲンの検出」、**アレルギーの臨床**、査読有、38(3)、64-67.
- 5) 高蓋秋穂、小川昂志、岩本和子、矢野えりか、財満信宏、森山達哉 (2018) 「食物アレルギーの感作経路の多様性:花粉症と経皮感作の関与」**アグリバイオ**、査読無し、2(6)、601-604、
- 6) 小川昂志、高蓋秋穂、矢野えりか、財満信宏、森山達哉 (2018) 「経皮感作とアレルゲン」**アレルギーの臨床**、査読有、38、472-475
- 7) 村上浩規、財満信宏、森山達哉 (2018) 「食物アレルギーの現状と多様性」**食品加工技術**、査読無し 38(2) p.49-61

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 森山達哉:「大豆アレルギーを科学する」農研機構シンポジウム「大豆研究最前線 - 新時代の大豆を目指して - 」2019.3.8、(フクラシア東京ステーション、東京)
- 2) 森山達哉:「食物アレルギーの原因コンポーネント解析」第8回東京皮膚科学研究会招待講演 2019.3.7、(京王プラザホテル、東京)
- 3) 松下佳穂、松尾綾人、矢部由貴、矢野えりか、財満信宏、森山達哉「遺伝子組換え大豆のアレルゲンレベルの解析」第57回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 2018.12.8 (奈良)
- 4) 徳舛直樹、正木涼平、矢野えりか、岩本和子、財満信宏、森山達哉「新規大豆アレルゲン Gly m 7 の特性解析と低減化の試み」第57回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 2018.12.8 (奈良)

- 5) 松尾綾人、竹名由希、矢野えりか、足立厚子、財満信宏、森山達哉 「花粉症関連大豆アレルギーと交差反応しうる各種食用豆類の検討」第 57 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 2018.12.8 (奈良)
- 6) 森山達哉:「果実等の農作物に含まれる食品成分の健康機能性とアレルギー性」第 16 回果実酒・果実飲料と健康に関する研究会、2018.10.13 (和歌山)
- 7) 松尾綾人、徳舛直樹、植田啄也、矢野えりか、岩本和子、足立厚子、財満信宏、森山達哉「花粉症関連大豆アレルギーのコンポーネントベースでの各種豆類との交差反応性評価」第 72 回日本栄養・食糧学会 2018.5.13 (岡山)
- 8) 徳舛直樹、松尾綾人、花房佳世、矢野えりか、岩本和子、財満信宏、森山達哉「新規大豆アレルギー Gly m 7 の検出と特性解析」第 72 回日本栄養・食糧学会 2018.5.13 (岡山) 他

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.nara.kindai.ac.jp/laboratory/cell-biology/top.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。