

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08371

研究課題名(和文) 食物抗原の吸収と食物アレルギーの感作を増強する因子の探索とその機構の解析

研究課題名(英文) Identification of factors enhancing oral absorption and sensitization of food allergens

研究代表者

横大路 智治 (Yokooji, Tomoharu)

広島大学・医歯薬保健学研究科(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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでの研究で、一部の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の服用が食物抗原の吸収を増加させ、食物アレルギーの症状を惹起させることを明らかにしている。本研究では、NSAIDsの服用が抗原の感作に影響するか否かを明らかにすることを試みた。その結果、解熱・鎮痛薬として用いられる用量のアスピリンが卵白アルブミンの消化管吸収を増加させ、経口感作を亢進させることを明らかにした。また、NSAIDsによる抗原の経口感作の亢進にはCOX-1の阻害が関与することや、その亢進作用は感作経路に依存しないことが示唆された。今後、薬剤の種類や観察期間を検討することでさらに詳細な機構が解明できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らは、アスピリンの服用が食物抗原タンパク質の消化管吸収を増加させ、食物アレルギーの症状を誘発することを明らかにしている。一方、抗原タンパク質の吸収増加は抗原タンパク質に対する感作の亢進に関与する可能性が考えられるが、その詳細は不明である。本研究で、アスピリンの服用は食物抗原タンパク質に対する感作の亢進に関与することを明らかにした。この結果は、近年、増加傾向にある食物アレルギーの発症メカニズムを解明する一助となる。さらに、本研究で得られた結果は、食物アレルギーの予防法の確立だけでなく、タンパク質やペプチド性医薬品の新たな経口投与法の開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have shown that oral absorption of food allergens enhanced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) was an exacerbating factor in the development of food allergy. In this study, we tried to examine the effect of aspirin on oral sensitization to an egg-white allergen ovalbumin (OVA) in rats. As results, enhancement of OVA absorption 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. However, enhanced oral sensitization to OVA cannot be ascribed to increased absorption of OVA from the intestinal tract only. We also found that inhibition of cyclooxygenase-1 activity by NSAIDs might involve in the enhancement of sensitization with OVA irrespective of sensitization pathway. These findings shed new light on the pathophysiological mechanisms underlying oral sensitization to food allergens.

研究分野：医療薬学

キーワード：食物アレルギー 食物アレルギー NSAIDs 消化管吸収 経口感作

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

1. 研究開始当初の背景

食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) は、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アレルギーである。FDEIA の症状は運動負荷の代わりにアスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を服用することでも誘発される。我々はこれまでに、FDEIA の病態解明を目的に運動負荷や NSAIDs の服用による症状誘発のメカニズムを解析した。その結果、アスピリンの服用が卵白抗原であるリゾチームやオボアルブミン (OVA) の細胞間隙輸送を介した消化管吸収を増加させること、NSAIDs のシクロオキシゲナーゼ (COX)-1 に対する選択性の違いが抗原の吸収促進作用に影響すること、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アスピリンの抗原吸収促進作用が抑制されることを明らかにしている。また、運動負荷やアスピリンによる抗原の吸収増加は、小麦抗原であるグリアジンにおいても認められることを明らかにしている。これらの結果は、運動負荷やアスピリンによる抗原吸収の増加が食物抗原の種類に関係なく起こりうるものであり、運動負荷や NSAIDs による消化管からの食物抗原の吸収量の増加が FDEIA 発症機構の一つであることを示唆するものである。このような背景から、運動負荷やアスピリンの服用による食物抗原の吸収増加は、食物アレルギーの症状惹起だけでなく、抗原への感作も増強することが予測される。しかし、運動負荷やこれらの薬剤の服用が抗原吸収の増加と食物アレルギーの感作を助長するという報告はほとんどない。本研究で得られる成果は、FDEIA の病態解明と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薬剤の服用に着目して、食物抗原タンパク質の吸収と感作との関係を明らかにすることを最終目的とした。最初に、NSAIDs による OVA の吸収増加が感作を亢進させるか否かを検討した。また、感作の亢進における COX 活性の阻害や感作経路による違いの影響についても検討した。

3. 研究の方法

1) OVA の経口感作におよぼす NSAIDs の影響解析

雄性 Brown Norway 系ラット (4 週齢) 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 NSAIDs の影響を解析するため、OVA の投与 30 分前に、コントロール群には生理食塩水 (生食, 1 mL/kg) のみ、COX-1 および COX-2 阻害剤投与群にはアスピリン (3 または 30 mg/kg)、ジクロフェナク (1.5 mg/kg) またはインドメタシン (3 mg/kg)、COX-2 選択的阻害剤投与群にはメロキシカム (0.3 mg/kg) をそれぞれ経口投与した。さらに、抗原吸収を促進するスペルミンの影響解析には、スペルミン (5 mg) を OVA と同時に経口投与した。OVA の負荷を開始した後、8 週目まで隔週で頸静脈から採血を行い、採取した血液を遠心分離することで血漿を得た。感作の成立は、血漿中の OVA 特異的 IgE および IgG₁ 抗体価を測定することで評価した。

2) OVA の腹腔内感作と経皮感作におよぼすアスピリンの影響解析

雄性 Brown Norway 系ラット (4 週齢) を無作為に以下の群に割り付けた。

腹腔内感作群: 生食に 2 mg/mL の濃度となるように OVA を溶解させた。この溶液 0.5 mL を Imject® Alum [20 mg/mL Al(OH)₃, 20 mg/mL Mg(OH)₂] 0.5 mL とともに週 1 回腹腔内に投与した。

経皮感作群: ラットの背部を一部剃毛した後、セロハンテープの貼剥を 10 回繰り返す方法で角質層を剥離した。その後、0.5% SDS に溶解した OVA (20 mg/mL) 50 μL をガーゼに染み込ませ、週 3 回の頻度で貼付した。

アスピリンの影響解析では、コントロール群に対して生食 (1 mL/kg)、アスピリン投与群に対しては、アスピリン (30 mg/kg) を OVA の投与 30 分前にそれぞれ経口投与した。OVA の負荷を開始した後、腹腔内感作群では隔週、経皮感作群では毎週、頸静脈から採血を行った。採取した血液を遠心分離し、得られた血漿中の OVA 特異的 IgE および IgG₁ 抗体価を測定することで感作を評価した。

3) 血漿中 OVA 特異的 IgE および IgG₁ 抗体価の測定 (ELISA 法)

OVA 特異的 IgE および IgG₁ 抗体価の測定は、二次抗体に 1,000 倍希釈した HRP 標識抗ラット IgE 抗体または 100,000 倍希釈した HRP 標識抗ラット IgG₁ 抗体、基質に 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine 溶液を用いて ELISA 法で行った。

4. 研究成果

1) OVA の経口感作におよぼすアスピリンの影響解析

OVA を週 3 回、経口投与した結果、生食のみを投与したコントロール群およびアスピリン投与群で感作 2 週目から OVA 特異 IgE 抗体価の増加が認められた。また、OVA の消化管吸収を増加させた量のアスピリン (30 mg/kg) を投与した群では、8 週目でコントロール群よりも高い IgE 抗体価を示した。さらに、コントロール群およびアスピリン投与群では経日的な OVA 特異 IgG₁ 抗体価の上昇が認められたが、アスピリン投与群では 6 週目および 8 週目でコントロール

群よりも IgG₁ 抗体価が高い傾向を示した。次に、OVA の消化管吸収に影響を与えない量のアスピリン (3 mg/kg) の影響を解析した。その結果、OVA 特異 IgE および IgG₁ 抗体価はいずれもコントロール群とほぼ同程度であった。したがって、アスピリンは用量依存的に OVA 感作を増強させることが明らかとなり、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。

2) OVA の経口感作におよぼすスペルミンの影響解析

アスピリンによる OVA の経口感作の増強と OVA の消化管吸収の増加との関連性を明らかにすることを目的に、アスピリンと同様に高分子の消化管の透過性を亢進させるスペルミンを用いて 1) と同様の方法で評価した。我々のこれまでの検討で、OVA の投与と同時にスペルミン (20 mg/kg) を経口投与した場合、OVA の吸収は約 5 倍増加することを明らかにしている。そこで、OVA の経口感作におよぼすスペルミンの影響を評価した結果、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、スペルミンはアスピリンと同様に OVA の消化管吸収を増加させるが、アスピリンと異なり OVA の経口感作の増強には影響しないことを示している。

3) OVA の経口感作におよぼす各種 NSAIDs の影響解析

OVA の経口感作の亢進における COX 活性の阻害の関与を明らかにするため、OVA の経口感作におよぼす各種 NSAIDs の影響を解析した。ジクロフェナク投与群では、2 週目より IgE 抗体価の増加が認められ、8 週目で生食のみを投与したコントロール群よりも高い抗体価を示した。また、インドメタシン投与群では 6 週目および 8 週目でコントロール群よりも高い抗体価を示した。一方、メロキシカム投与群ではコントロール群との有意な差は認められなかった。次に IgG₁ 抗体価を測定した結果、いずれの群においても 2~4 週目以降に抗体価の上昇が確認された。ジクロフェナク投与群では 6 週目および 8 週目でコントロール群と比較して増加傾向を示した。また、インドメタシン投与群では、2 週目で有意に高い IgG₁ 抗体価を示したが、メロキシカムの投与による変化は認められなかった。ジクロフェナクやインドメタシンは COX-1 と COX-2、メロキシカムは COX-2 を選択的に阻害する薬剤である。これらの結果から、NSAIDs による OVA 感作の増強に COX-1 の阻害活性が関与する可能性が示唆された。

4) OVA の腹腔内感作および経皮感作におよぼすアスピリンの影響解析

アスピリンによる感作の増強が経口感作以外の感作経路でも認められるか否かを確認するため、OVA の腹腔内感作と経皮感作におよぼすアスピリンの影響を解析した。OVA を週 1 回腹腔内に投与した結果、コントロール群およびアスピリン投与群の両群において、感作 2 週目で IgE 抗体価の増加が認められた。また、アスピリン投与群では 4 週目および 6 週目において、生食のみを投与したコントロール群と比べて、IgE 抗体価の上昇傾向が確認された。OVA を週 3 回、経皮投与した結果、両群ともに感作 1 週目から IgE 抗体価の増加が認められた。アスピリン投与群ではコントロール群と比べて 2 週目以降に IgE 抗体価の上昇傾向が確認され、4 週目で有意に高い値を示した。以上の結果は、アスピリンによる感作の増強が経口感作以外でも起こる可能性を示唆するものである。

本研究では、OVA の消化管吸収と経口感作におよぼすアスピリンの影響について解析した。その結果、解熱・鎮痛薬として用いられる用量のアスピリンが 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、アスピリンと同様に OVA の消化管吸収を増加させたスペルミンは OVA の経口感作に有意な影響を与えなかった。したがって、アスピリンによる 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も関与している可能性が考えられた。さらに、NSAIDs による抗原の経口感作の増強には COX 選択性が関与する可能性があること、その増強は感作経路に依存しないことが示唆された。今後、薬剤の種類や観察期間を検討することでさらに詳細な機構が解明できると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Yokooji T, Fukushima T, Hamura K, Ninomiya N, Ohashi R, Taogoshi T, Matsuo H. Intestinal absorption of the wheat allergen gliadin in rats. *Allergol Int.* 2019;68(2):247-253. 査読有.
2. Yokooji T, Nouma H, Ogino R, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Quantification of the 5- and -gliadin content in wheat flour and rat plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay using antibodies specific to their IgE-binding epitopes. *Allergol Int.* 2019;68(1):112-113. 査読有.
3. Kimura H, Inami M, Hamaguchi Y, Takehara K, Akimoto S, Yokooji T, Matsuo H, Matsushita T. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to shrimp associated with 43 kDa, a new antigen. *J Dermatol.* 2018;45(3):366-367. 査読有.

4. 飯島 茂子, 津田 毅彦, 森山 達哉, 荻野 龍平, 横大路 智治, 松尾 裕彰. 水溶性アルブミン画分に原因抗原の存在が疑われたスパゲッティ依存性運動誘発アナフィラキシーの1例. 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌. 2017;11(3): 259-265. 査読有.
5. 田中 賀治代, 蟹江 悠紀, 内藤 宙大, 鈴木 美沙, 榎村 春江, 田上 和憲, 酒井 一徳, 古田 朋子, 山田 千佳子, 和泉 秀彦, 横大路 智治, 松尾 裕彰, 伊藤 浩明. 加工食品における小麦タンパク質の不溶化とアレルギー性の変化について. アレルギー. 2017;66(3): 222-230. 査読有.
6. Fujimoto W, Fukuda M, Yokooji T, Yamamoto T, Tanaka A, Matsuo H. Anaphylaxis provoked by ingestion of hydrolyzed fish collagen probably induced by epicutaneous sensitization. Allergol Int. 2016;65(4):474-476. 査読有.

[学会発表](計 13 件)

1. 秋本 栞里, 横大路 智治, 松永 千裕, 前原 宏樹, 荻野 龍平, 千貫 祐子, 森田 栄伸, 松尾 裕彰. 精製アレルギーコンポーネントを利用したエビ依存性運動誘発アナフィラキシー検査法の開発. 日本皮膚科学会 第 136 回山陰・第 32 回島根合同開催地方会. 2019 年 3 月 3 日. 出雲市.
2. Yokooji T, Hamura K, Ninomiya N, Taogoshi T, Matsuo H. Enhancing effect of aspirin on intestinal absorption of gliadin, wheat allergen, and its mechanism. 78th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2 Sep 2018, Glasgow (UK).
3. 荻野 龍平, 大本 亜沙妃, 横大路 智治, 埜越 崇範, 松尾 裕彰, 森田 栄伸. 質量分析装置を用いた血漿中食物抗原定量法の開発. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会. 2018 年 6 月 22 日. 千葉市.
4. Ito K, Furuta T, Tagami K, Matsui T, Sugiura S, Kando N, Tanaka A, Sjölander S, Yokooji T, Matsuo H. Component-specific IgE levels were associated with intractable exercise-induced allergic reactions to wheat after rush oral immunotherapy. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2018, 26 May 2018, Munich (Germany).
5. Ogino R, Chinuki Y, Takizawa D, Yokooji T, Matsuo H, Morita E. Identification of allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis developed by sensitization to grass pollen. International Investigative Dermatology (IID) 2018, 16 May 2018, Orlando, Florida (USA).
6. 荻野 龍平, 大本 亜沙妃, 横大路 智治, 埜越 崇範, 森田 栄伸, 松尾 裕彰. 質量分析装置を用いた血漿中食物抗原定量法の開発. 第 47 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会・第 41 回皮膚脈管・膠原病研究会. 2017 年 12 月 10 日. 鹿児島市.
7. 山本 崇弘, 横大路 智治, 埜越 崇範, 松尾 裕彰. 魚由来コラーゲンアレルギーの原因抗原の精製. 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会第 56 回中国四国支部学術大会. 2017 年 10 月 21 日. 徳島市.
8. 大本 亜沙妃, 荻野 龍平, 横大路 智治, 埜越 崇範, 松尾 裕彰. 質量分析法による血漿中小麦グリアジン定量法の開発. 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会第 56 回中国四国支部学術大会. 2017 年 10 月 21 日. 徳島市.
9. 滝沢 大吾, 荻野 龍平, 横大路 智治, 埜越 崇範, 千貫 祐子, 森田 栄伸, 松尾 裕彰. イネ科花粉に感作された小麦アレルギー患者の抗原の同定. 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会第 56 回中国四国支部学術大会. 2017 年 10 月 21 日. 徳島市.
10. 荻野 龍平, 大本 亜沙妃, 横大路 智治, 埜越 崇範, 森田 栄伸, 松尾 裕彰. 質量分析装置を用いた血漿中抗原濃度測定法の開発. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会. 2017 年 6 月 16 日. 東京都.
11. 荻野 龍平, 大本 亜沙妃, 横大路 智治, 埜越 崇範, 松尾 裕彰. 質量分析法による卵白アレルギー定量法の開発. 日本皮膚科学会第 132 回山陰・第 28 回島根合同開催地方会. 2017 年 3 月 5 日. 出雲市.
12. 二宮 直紀, 横大路 智治, 埜越 崇範, 森田 栄伸, 松尾 裕彰. ラットモデルを用いた 5-グリアジン欠損小麦のアレルギー活性評価. 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会第 55 回中国四国支部学術大会. 2016 年 11 月 5 日. 岡山市.
13. 荻野 龍平, 大本 亜沙妃, 横大路 智治, 埜越 崇範, 松尾 裕彰. 質量分析法による血漿中卵アレルギー定量法の開発. 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会第 55 回中国四国支部学術大会. 2016 年 11 月 5 日. 岡山市.

〔図書〕(計1件)

1. 横大路 智治, 松尾 裕彰. 食物アレルギーのすべて-基礎から臨床・社会的対応まで-. 伊藤 浩明 編, II 食物アレルギー, 小麦・ソバ・穀物. 診断と治療社. 2016. 100-109.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 低アレルギー化小麦

発明者: 森田 栄伸, 河野 邦江, 遠藤 隆, 松尾 裕彰, 横大路 智治

権利者: 島根大学, 遠藤 隆, 広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2019-004081 号

出願年: 2019年1月15日

国内外の別: 国内

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。