

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：33939

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700765

研究課題名（和文） 食物アレルギー予防・治療のための食品摂取方法の探索

研究課題名（英文） Search for how to eat allergy-provoking foods to protect and cure of food allergy

研究代表者

山田 千佳子（YAMADA CHIKAKO）

名古屋学芸大学・管理栄養学部・講師

研究者番号：30351216

研究成果の概要（和文）：

アレルギーの治療法の一つである免疫療法の動物モデル（マウス）を卵白アレルギーの一つであるリゾチームを用いて作製した。リゾチームに感作させたマウスに、量の異なるリゾチーム、他の食品成分とリゾチームの混合物、化学修飾したリゾチームを投与し、免疫療法の効果を解析した。その結果、免疫療法後の症状に差がみられ、このモデルマウスを用いて、免疫療法に効果的なアレルギーの摂取方法が評価できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We established the mouse model of immune therapy to food allergy with egg-white lysozyme. The mice were administrated different dose lysozyme, mixture with another constituent and chemically-modified lysozyme for therapy and analyzed symptoms induced after therapy. These mice showed shock symptoms but severity of them differed depending on the dose and form of the lysozyme. These results indicated that this mouse model is useful for evaluation of effect of immune therapy with the allergen itself.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000円	630,000円	2,730,000円
2011年度	500,000円	150,000円	650,000円
2012年度	500,000円	150,000円	650,000円
総計	3,100,000円	930,000円	4,030,000円

研究分野：食品学

科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般

キーワード：食物アレルギー、リゾチーム、免疫療法（減感作療法）

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの治療法は様々であるが、経口免疫療法が最終的にはその食品を食べられるようになるという点で、一番有効な食物アレルギーの治療法だと考えられる。免疫療法は、患者が医師の管理の下で原因食品を少量ずつ摂取し、症状が現れれば薬でそれを抑えながら、徐々に摂取量を増やして行く治

療法である。そのため、患者には不安や苦痛に加えて経済的または時間的な負担がともなう。したがって、免疫応答を効果的に改善し、苦痛が少なく、かつ短期間で済む治療が望ましいと考えられる。ところが現在の治療法では、治療に用いる食品についてあまり関心が払われておらず、加熱などの簡単な加工を施しただけのものが使用されている。また、

医師によって投与量や投与期間が異なっており、患者への効果も様々であることから、確立された治療法とは言い難いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、食品による効果的な食物アレルギー症状の改善を目指して、(1) 免疫療法の効果の評価するためのモデルマウスの作製および評価系の構築を行い、これを用いて(2) 免疫療法に効果的なアレルゲンの投与方法を検討することとした。さらに、効果があった場合には、その(3) アレルギー抑制機構についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫療法の効果の評価するためのモデルマウスの作製および評価系の構築

抗原タンパク質として、卵の主要アレルゲンのひとつであるリゾチーム (LY) を使用し、この LY に対するアレルギー応答が非常に高い B10. A マウスを用いてアレルギーモデルマウスを作製した。さらに、このアレルギーマウスに免疫療法として LY (0、0.2、2.0、20 mg/mouse) を経口投与した。この経口投与 LY の効果を解析するために、治療後のマウスに LY を経口投与してアナフィラキシーを誘導し、その症状を解析した。

(2) 免疫療法に効果的なアレルゲンの投与方法の検討

アレルギーマウスに治療として投与する LY の投与方法を検討した。まず、①同時摂取した他の成分の影響について調べるために、デキストラン (M. W. 40000) 100mg と LY20mg の混合物を投与した。次に、②加工した LY の影響について調べるために、アミノカルボニル反応を利用して LY にグルコースを結合させ、化学的性質の変化を調べた。分子量を SDS-PAGE で解析し、抗原性を ELISA で解析した。また、LY はグラム陽性菌に対して溶菌活性を示すことから、グルコースを結合させた LY の溶菌活性を測定し、LY と比較した。このグルコース結合 LY をアレルギーマウスに 20mg 投与した後、(1) と同様にアナフィラキシーを誘導し、その症状を LY 投与の場合と比較した。

(1) および (2) の実験において、マウスに免疫療法として LY またはグルコース結合 LY を経口投与する前後で採血および採糞を行い、各サンプル中の LY 特異的抗体価を ELISA 法で測定した。さらに、治療効果を確かめるために免疫療法終了後に LY を経口投与してアナフィラキシーを誘導し、直腸温の測定、ショック症状の観察をおこなった。ま

た、小腸炎症度についてはマウスにエバンズブルーを投与後に小腸を摘出した。これを 3 等分して胃側の上部組織から色素を抽出し、吸光度を測定して炎症の指標とした。

4. 研究成果

(1) 免疫療法の効果の評価するためのモデルマウスの作製および評価系の構築

LY アレルギーにしたマウスに、免疫療法として LY (0、0.2、2.0、20 mg/mouse) を経口投与した。投与前後での抗体応答の変化を解析した結果、血中 IgG₁ には各群で差は認められなかったが、アレルギーの指標である血中 IgE は 20mg 投与群で減少する傾向がみられた。また、糞中 IgA は 20mg 投与群で増加する傾向が認められた (図 1)。さらに、治療効果を確かめるために免疫療法終了後に LY を経口投与してアナフィラキシーを誘導し、直腸温の測定、ショック症状の観察を行った結果、20mg 投与群で直腸温の低下が抑制され、ショック症状が軽減される傾向がみられた (図 2)。以上の結果より、LY を 20mg 投与することにより免疫療法の効果がみられ、この動物実験系を用いることにより、免疫療法に効果的なアレルゲンの摂取方法を評価できるのではないかと考えられた。

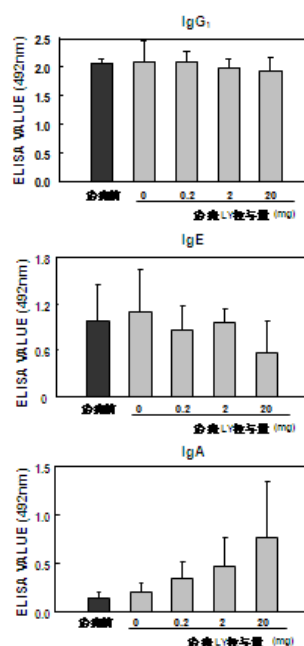


図 1 治療前後での LY 特異的抗体応答の変化

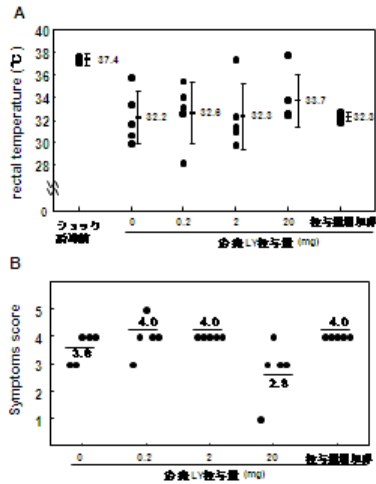


図2 アナフィラキシーショック誘導時の体温変化および症状の比較
A: 直腸温度の測定 B: 症状の比較

Symptoms score

- 1: 鼻や頭を掻く、擽る
- 2: 目や鼻の周りが腫れる、毛が逆立つ、下痢、行動減少、呼吸数増加
- 3: 喘息、不自然な呼吸、チアノーゼ
- 4: 意識を失う、痙攣
- 5: 死亡

(2) 免疫療法に効果的なアレルゲンの投与方法の検討

① デキストランとの混合投与が免疫療法に与える影響

(1) の実験結果から、LY 20mg 投与が最も免疫療法の効果が高いことが明らかとなったため、次に LY 20mg と同時にデキストランを投与し、免疫療法に影響を及ぼすかどうか調べた。その結果、血中 IgG₁ および IgE には差は見られなかったが、糞中の LY 特異的 IgA はデキストランと混合投与することにより増加した (図 3)。さらに、アナフィラキシーショック誘導時には、直腸温の低下が抑制され、症状が軽減される傾向がみられた (図 4)。以上の結果より、糖との混合摂取は免疫療法の効果に影響を与える可能性が示唆された。

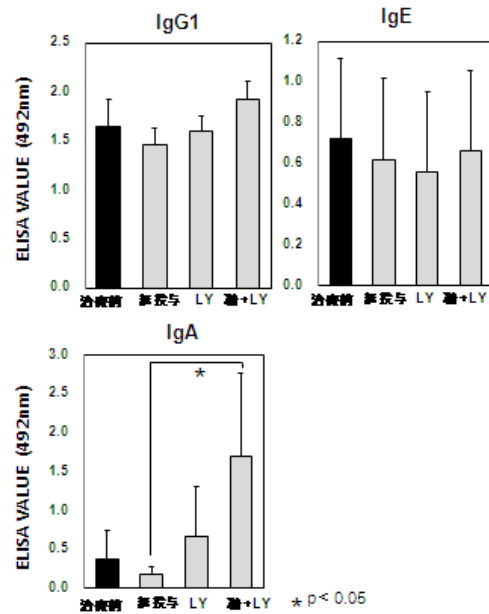


図3 デキストランとLYの混合投与による治療後のLY特異的抗体応答の変化

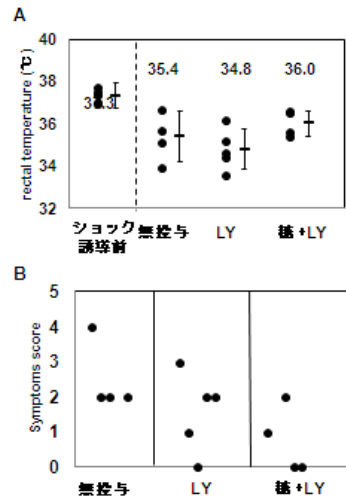


図4 デキストランとLYの混合投与による治療後にアナフィラキシーショックを誘導した時の体温変化および症状の比較
A: 体温の測定 B: 症状の比較

Symptoms score

- 1: 鼻や頭を掻く、擽る
- 2: 目や鼻の周りが腫れる、毛が逆立つ、下痢、行動減少、呼吸数増加
- 3: 喘息、不自然な呼吸、チアノーゼ
- 4: 意識を失う、痙攣
- 5: 死亡

② グルコース結合 LY が免疫療法に与える影響

加工したLYの影響について調べるために、アミノカルボニル反応を利用してLYにグルコースを結合させ、化学的性質の変化について解析した。SDS-PAGEにより分子量の変化を調べた結果、元のLYと比較してバンドが上方にシフトしており、見かけの分子量が増加していることが確認された。また、LYは溶菌活性を持つタンパク質であるため、この活性

を測定し、LY と比較したところ、グルコースを結合させることによって 30%以下に低下していた。さらに、グルコースが結合したことによって抗原性が低下しているのではないかと考え、ELISA 法で抗体の結合能を LY と比較した結果、抗体の結合性は変化がみられなかった (図 5)。このようにして作製したグルコース結合 LY をマウスに 20mg 投与し、免疫療法の効果を解析した。その結果、LY 投与で観察された糞中 IgA の増加が抑制され、直腸温度の低下抑制もみられなかった。また、小腸の炎症について比較した結果からもグルコース結合 LY より LY の方が炎症が少ない結果であった (図 6)。以上の結果から、アレルゲンに糖を結合させるという加工は、免疫療法においては効果がないと推察された。

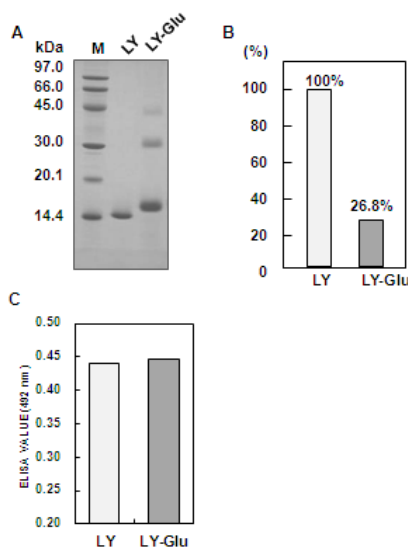


図5 グルコース結合LYの作製と化学的性質の変化の解析
A: グルコース結合による分子量の変化
B: グルコース結合による溶菌活性の変化
C: グルコース結合による抗原性の変化

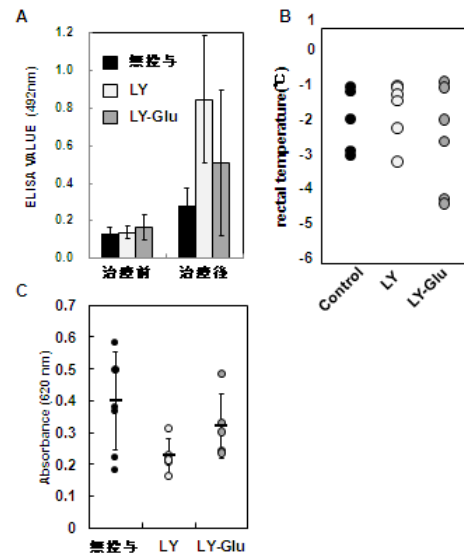


図6 グルコース結合LY投与による治療後のLY特異的IgAの変化と
アナフィラキシーショック誘発時の小腸炎症度の比較
A: 糞中IgAの定量 B: 直腸温度の測定 C: 小腸炎症度の比較

(3) まとめ

本研究により、現在食物アレルギーの治療法として行われている免疫療法に効果的な食品の摂取方法を動物実験により評価することが可能となった。

また、他の食品成分との相互作用が免疫療法の効果に影響を及ぼす可能性が示唆された。

今後、この実験系を用いてさらに免疫療法に効果的な食品の摂取方法が探索できると考えられる。

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 山田千佳子、小瀬木一真、都築育己、松田幹、和泉秀彦、経口投与 LY の免疫寛容誘導効果の解析、第 66 回日本栄養・食糧学会 (平成 24 年 5 月 19 日、東北大学 川内北キャンパス)
- ② 山田千佳子、松田幹、和泉秀彦、アミノカルボニル反応を利用した糖付加タンパク質の消化性、第 65 回日本栄養・食糧学会 (平成 23 年 5 月 15 日、お茶の水女子大学)
- ③ 山田千佳子、間崎剛、和泉秀彦、食物アレルギー予防と治療のための食品摂取方法の探索、日本調理科学会平成 22 年度大会 (平成 22 年 8 月 28 日、中村学園大学)
- ④ 都築育己、山田千佳子、間崎剛、松田幹、和泉秀彦、食物アレルギー治療のための食品摂取方法の探索、第 64 回日本栄養・

食糧学会（平成 22 年 5 月 23 日、アステ
ィとくしま）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 千佳子 (YAMADA CHIKAKO)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・講師

研究者番号：30351216