

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658128

研究課題名(和文) アレルギー予防・治療に対するIgA免疫複合体ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of IgA-Immune Complex Vaccine for the Prevention and Treatment of Allergy

研究代表者

成田 宏史(Narita, Hiroshi)

京都女子大学・家政学部・教授

研究者番号：30155999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、母乳中には食物アレルギーが特異的IgAとの免疫複合体として存在していることを発見し、「母乳は本来食物アレルギー予防の天然の飲むワクチンである」との独創的仮説を提唱してきた。本研究ではヒト唾液から調製した天然のIgA免疫複合体および人工的にIgAにオボアルブミンを結合させた仮性免疫複合体をマウスに経口投与し、IgAの免疫複合体が直接の寛容誘導因子としてワクチン作用を持つことを証明した。また、プロバイオティクスによるこの寛容誘導補強効果を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We found existence of food allergens as immune complexes with specific IgAs in mother's milk and have proposed a hypothesis that mother's milk is a natural drinkable vaccine for food allergy prevention. In this research, we proved that both natural IgA immune complex prepared from human saliva and pseudo immune complex which chemically coupled ovalbumin with IgA showed vaccine function as a direct factor for tolerance induction in mice. In addition, we clarified reinforcement effect by the probiotics on this tolerance induction.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食物アレルギー 母乳哺育 IgA免疫複合体 飲むワクチン 経口免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

離乳食を始めていない幼児血清にすでに卵白蛋白質に対する IgE が高く、アトピー性皮膚炎を発症する可能性があることから、経母乳感作の可能性が示唆されている。このような状況下で、我々はまず、「ヒト母乳中に主要食物アレルゲンである卵白オボムコイドが特異的分泌型 IgA との免疫複合体(IC)として存在している」ことを発見した。また、ヒト母乳中にはオボムコイドだけでなく母親の食べた食物蛋白質が分泌型 IgA との IC として普遍的に存在していること、まれに遊離の食物アレルゲンを含んでいる母乳が存在すること、食物摂取により特異的 IgA が誘導されることなどを明らかにした。一方、Harvard 大学の Mantis らは、腸管 M 細胞は IgA 受容体を発現しており、IgA-IC を積極的に取り込む機構があると報告、近年 IgA-IC 形成により抗原のプロテアーゼ耐性が増すほか、分泌型 IgA の受容体への結合が強くなることも明らかにされている。これらの結果から我々は、「母乳にはアレルゲンを IC として積極的に取り込ませることにより、乳児に経口免疫寛容を誘導し、授乳中に離乳を始める機能がある」換言すれば、「母乳は食物アレルギー予防の天然の飲むワクチンである」という独創的な仮説の提唱に至った。

我々は既にラット・マウス母乳中にも食物抗原が分泌型 IgA との IC として存在していること、蛋白質として卵白だけを食べている母親の母乳を飲んだ仔では、卵白蛋白質に対する Th2 応答 (IgG・E 産生能) が抑制され、これに伴ってアレルギー性下痢も抑えられることを明らかにし、この仮説の正当性を裏付けつつある。

2. 研究の目的

本研究では上記仮説の証明・応用を目的として、動物にアレルゲンと IgA との IC を投与し、経口免疫寛容が誘導されるか否かを調べる。これにより、IgA-IC が直接の寛容誘導因子であることを証明するとともに、新たなドラッグデリバリーシステムの構築、アレルギー予防法・治療法の開発を目指す。

具体的には下記 3 つのマウスを使った実験を行う。

- (1) ヒト唾液から調製した天然の IgA-IC を投与する
- (2) モノクローナル IgA を用いて作製した人工的な IgA-IC を投与する
- (3) プロ・プレバイオティクス手法により、生体内の IgA-IC を増やす

3. 研究の方法

- (1) ヒト唾液からの IgA-IC の調製と投与

平均年齢 23 歳成人女性から唾液および涙を同時に採取し、食品タンパク質と IgA との IC をサンドイッチ ELISA で測定したところ、両外分泌液中に IC がほぼ同レベルで検出された。また、0~12 カ月の健康な乳児、成人男

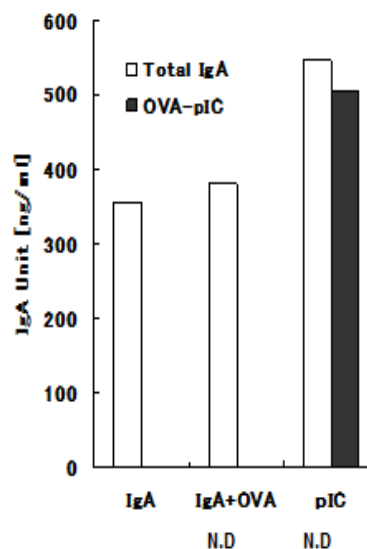
女・授乳婦の唾液中 OVA 特異的 IgA 及び OVA-IC を測定したところ、両者共に乳児より成人、成人より授乳婦で高値を示した。

よって、IC が母乳に限らず、性・年齢を問わず、普遍的に外分泌液中に分泌されていることが明らかとなった。母乳のみならず唾液にも食品タンパク質 IgA-IC が含まれていることを確認したため、健康なボランティアに唾液を供与いただき、硫酸分画、ゲル濾過により IgA-IC 画分を調製した。続けてこの画分をプロテイン G カラムに供し、IgG-IC を除去した。大豆食で飼育した成熟マウスに、ヒト唾液 IgA-IC を強制投与後、IgE 応答を活性化させる免疫助剤である Alum をアジュバンドに用いて卵白あるいは牛乳たんぱく質で免疫し、血液中の卵白あるいは牛乳たんぱく質特異的 IgE を測定した。なお、M 細胞に発現されている IgA 受容体はヒトとマウスを区別しないと報告されている。

- (2) モノクローナル IgA, 人工的な IgA-IC の作製と投与

マウスの腸管パイエル板あるいは腸間膜リンパ節リンパ球を用いて、常法に従い IgA 産生ハイブリドーマを確立し、腹水ガン化により IgA を大量調製した。プロテイン L カラムにより純化した IgA にオボアルブミン (OVA) を化学的に結合させて仮性 IC (図中 pIC) を調製し、抗 OVA 抗体と抗マウス IgA (α) 抗体のサンドイッチ ELISA により、その形成を確認した (図 1)。これをマウスに経口投与して上記と同様に経口免疫寛容成立の如何を調査した。

図1. IgA-IC形成の確認



- (3) プロ・プレバイオティクス手法により生体内の IgA-IC を増やす

マウス脾臓細胞培養系において IgA 産生を活性化する乳酸菌を検索した。得られた菌体を母マウスに経口投与し、その母乳を飲んだ仔マウスの母乳による経口免疫寛容が補強されるか否かを検討した。

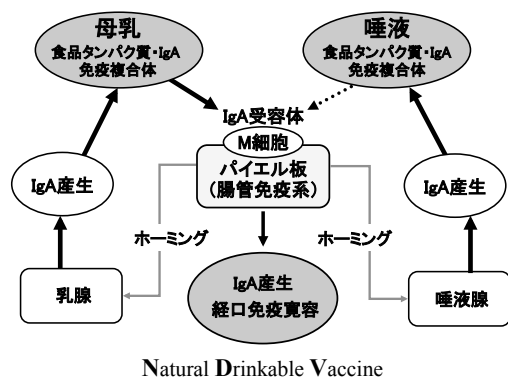
4. 研究成果

(1) ヒト唾液から調製した天然の IgA-IC による経口免疫寛容の誘導

唾液から精製した OVA-IC 画分を、8 週齢の Balb/c マウスに 1 日おきに 6 回経口投与し、これを試験群とした。一方、対照群には試験群に投与した OVA-IC に最大含まれると考えられる量の OVA を同様に経口投与した後、Alum とともに、マウスに卵白タンパク質を免疫した。免疫後、マウスに OVA を経口投与して OVA 特異的アレルギー性下痢が誘発されるかどうか観察したところ、IC を投与した試験群において対照群に比べて下痢が抑制されていた。マウスのパイエル板 M 細胞 IgA レセプターは、ヒトの IgA-IC も区別せず取り込むことがわかっているため、種の違いによる影響は無視できると考えている。したがって、今回観察されたアレルギー性下痢症状の抑制は、IgA-IC により経口免疫寛容が誘導されることによって起こった現象ではないかと考えられた。

以上の実験結果より、母乳や唾液等の外分泌液中の IgA-IC が経口免疫寛容の誘導因子であり、母乳や唾液が食物アレルギー予防の天然の飲むワクチンとして機能していることが明らかとなった(図 2)。

図 2. 外分泌液中の IgA 免疫複合体の意義



(2) モノクローナル IgA を用いて作製した

仮性 IC を成マウスに経口投与後、OVA 感作したところ、遊離 OVA を相当量投与した対照群に比べて血清 OVA 特異的 IgG1 が有意に低下していた。また、脾臓細胞の培養上清への OVA 依存 IL4 産生も抑制されていた。したがって、IgA-IC が経口免疫寛容の直接の誘導因子と成り得ることが証明できた。更にこの手法を使えば、寛容誘導を少量のアレルゲンで安全に行えたり、花粉アレルギーに対する舌下減感作療法 (SLIT) にも応用できる可能性があり、新たな Drug Delivery System として期待できる。

なお、母乳による寛容も仮性 IC による寛容も、耐性を獲得した抗原をその後摂取しなければ解除されてしまう可逆的なものであることが判明している。経口免疫寛容のメカニズムには、高濃度の抗原摂取により誘導さ

れるクローナルデリーション、アナジー、低濃度の抗原摂取により誘導されるアクティブサプレッションの 3 つがある。母乳中の免疫複合体が低濃度であることから、母乳による Th2 応答の抑制はアクティブサプレッションのような弱い可逆的なものであると考えられる。したがって、母乳による抑制が持続している間に、離乳食を導入して乳児が自分自身の確固たる寛容を獲得していく必要がある。アレルゲン感作を恐れて、自らの判断で離乳を遅らせたり、除去を試みる母親が少なくないといわれているが、離乳のタイミングと進行に関する正しい知識が必要である。このことは、食物アレルギー治療としての寛容誘導 (特異的経口寛容誘導: SOTI) においても獲得された寛容が解除される例が報告されていることと併せて、今後重要な課題となってくる様に思われる。

(3) プロ・プレバイオティクス手法による IgA-IC を増やす

妊娠 Balb/c マウスを卵白タンパク質を含む餌で飼育し、2 群に分けた後試験群には *Lactobacillus gasseri* GCL1355 株の凍結乾燥粉末を混餌投与した。分娩後、母乳中の IgA-IC を測定したところ、乳酸菌投与群では対照群に比べてオボムコイドおよび OVA の IgA-IC の濃度が有意に上昇していた。また、盲腸内容物中の特異的 IgA 濃度も乳酸菌投与群で上昇傾向が見られていたことから、プロバイオティクスによる腸管免疫系の活性化によって、母乳中の IC 分泌の上昇につながったと考えられた。

次に、妊娠 Balb/c マウスを (1) 卵白タンパク質を含まない餌、(2) 卵白タンパク質を含む餌、(3) 卵白タンパク質および乳酸菌を含む餌で飼育し、分娩させた。仔マウスを OVA で 2 回腹腔免疫し、血中の OVA に対する抗体価を測定したところ、OVA に対する IgG1 濃度は (1) > (2) > (3) の順で、有意差が認められた。

以上のことから、妊娠・授乳中に *L. gasseri* GCL1355 株を投与することにより IgA 産生が亢進され、母親が食べたタンパク質とその特異的 IgA との IC の母乳への分泌量が増加し、食物アレルゲンに対する仔の免疫寛容が増強されることが示唆された。ヒトは雑食であるので、マウスのように単一タンパク質を食べるわけではない。プレ・プロバイオティクスにより全体の IgA 産生能を高めることで天然の飲むワクチンの効果を増幅できることは、ヒトに於いて特に重要となってくるであろう。

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 12 件)

- ① 成田宏史, 母乳中の鶏卵アレルゲンの存在形態と生物学的役割, 日本食品科学工学

- 会誌, 査読無し, 印刷中
- ② Naoko Inomata, Hiroshi Narita, (他 7 人, 8 番目) Identification of peamaclein as a marker allergen related to systemic reactions in peach allergy, *Ann Allergy Asthma Immunol.* 査読あり, 112(2): 175-177, doi:10.1016/j.anai.2013.11.003. Epub 2013 Nov 23. (2014)
 - ③ Yasuji Inamo, Hiroshi Narita (他 5 名, 5 番目) Compound heterozygous mutations in *SLC30A2/ZnT2* results in low milk zinc concentrations: a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant, *PLoS ONE*, 査読あり 8(5): e64045, doi:10.1371/journal.pone.0064045 (2013)
 - ④ Tatsutoshi Inuzuka, Hiroshi Narita (他 5 名, 5 番目) ALG-2-interacting Tubby-like protein superfamily member PLSCR3 is secreted by an exosomal pathway and taken up by recipient cultured cells, *Biosci. Rep.* 査読あり, 33, e00026, doi 10.1042/BSR20120123 (2013)
 - ⑤ Satoshi Kotoura, Hiroshi Narita (他 6 名, 8 番目) Establishment of a sandwich ELISA for the determination of beef content in processed foods by using monoclonal antibodies against myoglobin, *Food and Agricultural Immunology*, 査読あり, 23, 289-301, (2012)
 - ⑥ Ken-ichi Fujita, Hiroshi Narita (他 8 名, 9 番目) Establishment of the monitoring system which detects the inhibition of mRNA processing, *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読あり 76 (6), 1248-1251 (2012)
 - ⑦ Mikiko Uchigashima, Hiroshi Narita, (他 3 名, 3 番目) Development of an immuno-affinity column for ochratoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody, *Methods*, 査読あり 56(2), 180-185, (2012)
 - ⑧ Mika Kondo, Hiroshi Narita, (他 8 名, 9 番目) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Residue Analysis of the Fungicide Azoxystrobin in Agricultural Products, *J. Agric. Food Chem.* 査読あり, 60, 904-911, (2012)
 - ⑨ Yukie Yamaguchi, Hiroshi Narita, (他 4 名, 6 番目) Quality Control System for Beer Developed with Monoclonal Antibodies Specific to Barley Lipid Transfer Protein, *Antibodies*, 査読あり 1, 259-272, (2012)
 - ⑩ 木津 久美子, 成田 宏史 (他 2 名, 4 番目) 母乳哺育により母ラットの摂取タンパク質特異的に仔ラットの Th2 応答が

抑制される, 栄養食糧学会誌, 査読あり 65(1), 13-19, (2012)

[学会発表] (計 15 件)

- ① Fukuie Tatuki. et al., Study on the peach allergic patients who had systemic reaction to peach in Japan, EAACI Congress 2014, 2014 年 06 月 22 日, Copenhagen
- ② 松永安由ら, 母親が食物アレルギーでも母乳哺育による経口免疫寛容が誘導される, 日本栄養食糧学会, 2014 年 6 月 1 日, 酪農学園大学
- ③ 成田宏史ら, 新規モモアレルギー Pru p 7: 特異抗体による定量とリコンビナント抗原の作製, 日本アレルギー学会, 2013 年 11 月 27 日, ホテルニューオオタニ
- ④ Inomata Naoko et al., Identification of an antimicrobial peptide, Snakin, as a novel peach allergen, which relates to systemic reactions, EAACI-WAO Congress 2013, 2013 年 06 月 22 日, Milan, Italy
- ⑤ 松永安由ら, 食品タンパク質・IgA 免疫複合体による経口免疫寛容の誘導, 日本栄養食糧学会, 2013 年 05 月 26 日, 名古屋大学
- ⑥ 猪又直子ら, 新規モモアレルギー Snakin の同定: 本邦モモアレルギーの重症マーカーか?, 日本アレルギー学会, 2013 年 05 月 11 日, パシフィコ横浜

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: ウシミオグロビン部分ペプチドに対する抗体、及び当該抗体を用いた検査方法並びに検査用キット

発明者: 丸大食品株式会社, 成田宏史

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4597172 号

取得年月日: 2013 年 6 月 8 日

国内外の別: 国内

[その他]

京都女子大学ホームページ内 教員業績データベース <http://www.kyoto-wu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 宏史 (NARITA Hiroshi)

京都女子大学家政学部食物栄養学科・教授

研究者番号: 3 0 1 5 5 9 9 9