

変性卵白を用いた経口免疫寛容誘導メカニズムの解析

神奈川県衛生研究所・主任研究員 渡邊 裕子

■ 緒言

疫学的研究において、何らかのアレルギー疾患を持つ患者は、今や人口の10%に達すると報告されている。アレルギー疾患は乳幼児期の食物アレルギーから始まり、乳幼児健診では、約3割がアレルギーと診断されている。一方では、成長に伴いアレルギーを発症することなく卵や乳を摂取できるようになることが現象として報告されており、このような自然寛解が起きる機構として、経口免疫寛容が挙げられている。現在この機構を利用し、食物アレルギーを寛解へ誘導することを目的とした臨床研究がさかに行われている。しかし、なぜ原因物質がアレルギーを誘発し、一方で経口免疫寛容を誘導するのかといったメカニズムが明らかとなっていないことから、これらの臨床研究にはアレルギー発症のリスクが伴い、また寛解を判断する基準がないことが指摘されている。

我々はこれまで、加熱処理した卵白中の卵アレルゲンのアレルギー性を明らかとするために、オボアルブミン(OVA)の主要エピトープに対する応答について解析を行った。その結果、アレルギー症状を誘発することなく、経口免疫寛容を誘導する卵白の変性条件を明らかとした¹⁾。そこで、本研究ではBALB/cマウスを用いた食物アレルギーモデルマウスを用い、OVAに対する感作においても同様に、変性卵白がアレルギー症状を誘発することなく寛容へ誘導することができるかを検討した。さらにオボムコイド(OVM)に対する感作について検討した。

■ 方法

マウス

マウスは、BALB/cマウス(日本エスエルシー)雌の5週齢を用いた。マウスの飼育および実験は、神奈川県衛生研究所の動物実験環境安全管理部会の承認を得て、神奈川県衛生研究所動物実験実施規約を遵守し、本研究のSPF施設で行った。

OVA に対する感作

マウスは、1週間順化後、Alum 1mg/匹あるいはAlumと共にOVA 50 μ g/匹を免疫し、2週間後にカゼイン粉末食または未変性または3種の変性卵白粉食を7, 28日間自由摂取させ、実験期間中の体重変化と下痢などの糞便の症状を観察し、OVA特異的IgE抗体産生、腸間膜リンパ節(MLN)および脾臓細胞(SPL)中のCD4⁺T細胞の応答を解析した。

OVM に対する感作

マウスは1週間順化後、コレラトキシン(CT) 10 μ g/100 μ L PBS/匹あるいはCTと共にOVM 1mg/100 μ L PBS/匹を2回/週で4週間、合計8回経口投与した。投与後2週間後にPBS 200 μ L/匹あるいはOVM 20mg/PBS 200 μ L/匹あるいは卵白(EW)20mg/PBS 200 μ L/匹を経口投与し、その後30分間マウスの症状(鼻かき、耳かき行動)を観察し、OVM特異的IgE抗体産生およびSPLの応答について解析した。

変性卵白粉食の作製

未変性および変性卵白粉の作製には、凍結卵白(P)を用いた。変性卵白の加熱処理条件はOVAの三次構造が変化し、抗体との結合能に変化がみられる80°C15分²⁾処理と日常の煮る蒸すなどの調理条件であり、OVAと抗体との結合能が完全に消失する100°C5分²⁾処理、および加工食品でのレトルト処理にあたる121°C40分処理とした。加熱処理した卵白をフリーズドライし、未変性卵白粉と同様に餌に20%混合し変性卵白粉食を作製した。

対照食として、カゼイン20%含有粉末食を作製した。

OVA 特異的IgE抗体量の測定

既報に従い³⁾、血清中OVA特異的IgE抗体量を測定した。

OVM 特異的IgE抗体量の測定

既報に従い⁴⁾、血清中OVM特異的IgE抗体量を測定した。

OVA 刺激に対するCD4⁺T細胞の増殖応答とサイトカイン産生量の測定

粉末食投与後7および28日間後のSPLおよびMLNからCD4⁺T細胞を分離し、10%牛血清入り

RPMI 中に 2×10^6 cell/mL とマイトマイシン処理した BALB/c マウス SPL 8×10^6 cell/mL とともに 48 時間培養し、OVA(シグマアルドリッジ)刺激に対する増殖応答およびサイトカイン産生量(IL-2, IL-4, IFN- γ)を既報に従い⁵⁾測定した。

CD4⁺T 細胞の割合および Foxp3 分子の発現量の測定

粉末食投与後 7 および 28 日間後の SPL および MLN を採取し、抗 CD16/CD32 モノクロナル抗体 (BioLegend) で処理した後に APC 標識抗マウスにおける CD4 モノクロナル抗体 (BioLegend) および PE 標識した抗マウス Foxp3 モノクロナル抗体 (アフイメトリクス・ジャパン) で染色し、フローサイトメーター (FACS Verse, BD Biosciences) で測定した。

OVM 刺激に対する脾臓細胞のサイトカイン産生量の測定

既報に従い⁴⁾、SPL を分離し、8% 牛血清入り RPMI 中に 5×10^7 cell/mL を 48 時間培養し、OVM(シグマアルドリッジ)刺激に対するサイトカイン産生量(IL-4, IFN- γ)を測定した。

統計処理

有意差検定は抗体価については Mann-Whitney 検定を用い、その他は Student's t 検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

■ 結果

1. OVA に対する応答の解析

OVA 感作マウスの変性卵白粉食摂取によるアレルギー様症状(図 1)

OVA 未感作卵白粉食群 (Alum) とカゼイン粉末食群 (CN) は実験開始後から体重が増加し、実験終了時は実験開始時の約 1.2 倍に増加した。未変性卵白粉食群 (EW) および変性卵白粉食群はいずれも CN に比べ、体重は有意に低下した。EW のマウスは 3 日目より軟便から下痢の症状を示し、体重は 6 日目に実験開始時の約 8 割に減少し、実験終了時の 28 日目に約 9 割に回復した。80°C 処理卵白粉食群 (80EW) は 6 日目より軟便から下痢の症状を示し、体重が有意に減少したが、EW に比べ症状は軽度であった。8 日目に一旦体重が増加したが、その後減少し、EW と同様な体重変化を示した。100°C 処理卵白粉食群 (100EW) は 6 日目まで 80EW と同様な軟便から下痢の症状を示したが、7 日目から回復し、14 日目に実験開始時の体重に戻り、28 日目まで変化はみられなかった。121°C 処理卵白粉食群 (121EW) は実験期間中に下痢の症状および体重の変化はみられなかった。

OVA 感作マウスの変性卵白粉食摂取による OVA 特異的 IgE 抗体産生(図 2)

Alum では OVA 特異的 IgE 抗体は検出されなかった。CN は 7 日目、28 日目ともに IgE 抗体が検出された。EW は 7 日目から 28 日目に有意に抗体価が上昇した。80EW においても 7 日目から 28 日目に有意に上昇し、EW に比べさらに抗体価が上昇した。100EW は 7 日目から 28 日目に抗体価は増加傾向を示し、28 日目は CN に比べ有意に増加した。121EW は CN と同程度の IgE 抗体価となった。

変性卵白粉食摂取後の OVA 感作マウスの腸間膜リンパ節および脾臓 CD4⁺T 細胞の応答(図 3-5)

7 日間の未変性卵白あるいは変性卵白粉食摂取後の MLN CD4⁺T 細胞の応答を図 3、SPL CD4⁺T 細胞の応答を図 4 に示した。OVA 刺激に対し、EW は MLN および SPL のいずれにおいても CN に比べ高い IL-4 応答を示した。さらに 80EW および 100EW では EW に比べ高い増殖応答および IL-4 応答を示した。121EW の応答は EW に比べ若干高い傾向を示した。

28 日間の未変性卵白あるいは変性卵白粉食摂取後の MLN および SPL CD4⁺T 細胞の応答を図 5 に示した。OVA 刺激に対し、EW は MLN および SPL のいずれにおいても CN に比べ低い IL-2 および IL-4 の応答を示した。80EW および 100EW は SPL では EW と同様な低い応答を示したが、MLN の IL-4 では 100EW は CN と同等、80EW では有意に高い応答を示した。121EW は EW と同様に MLN と SPL のいずれも IL-2 および IL-4 の応答は低かった。

変性卵白粉食摂取後の OVA 感作マウスの腸間膜リンパ節および脾臓 CD4⁺T 細胞の割合とその Foxp3 分子の発現量(表 1 および 2)

7 日間の未変性卵白あるいは変性卵白粉食摂取により、CN に比べ EW、80EW、100EW、121EW のいずれも MLN CD4⁺T 細胞の割合が減少した。特に 80EW および 100EW は有意に減少したが、CD4⁺T 細胞の Foxp3 分子の発現量に差はみられなかった。さらに 28 日間摂取においても 7 日間摂取と同様に、CN に比べ EW、80EW、100EW、121EW のいずれも MLN CD4⁺T 細胞の割合が減少した。一方、EW の SPL における CD4⁺T 細胞の割合は増加し、Foxp3 分子の発現が有意に減少した。

2. OVM に対する感作の検討(図 6)

マウスの OVM に対する感作の成立について検討を行った。OVM を CT と共に経口投与した後、3 週間目に OVM および EW の投与量を上げて経口投与し、マウスの症状を 30 分間観察した。OVM 経

口投与マウスでは、投与後7～25分後に鼻かきおよび耳かきの症状がみられた。CT投与マウスではこれらの症状は見られなかった。また、EW経口投与では、25分後に耳かきの症状がみられた。図6に血清中のOVM特異的IgE抗体価とOVM刺激に対するSPLの応答を示した。OVM投与マウスではOVM特異的IgE抗体価が上り、OVM刺激に対するSPLの応答を観察することができた。ゆえに本実験系でOVMに対する感作が成立することを確認した。しかし、OVM特異的IgE抗体価の個体差が大きいため、抗体価の上昇を確認し、抗体価のレベルごとに分けて検討する必要があると考えられた。

■ 考 察

OVAに感作したマウスのEW摂取による腸管のアレルギー様症状の観察では、3日目より下痢の症状を示し体重が実験開始時の約8割に減少した後、28日目には約9割に回復した。28日間摂取によりOVA特異的IgE抗体価は有意に上昇し、SPLおよびMLNのCD4⁺T細胞の応答は低下した。この食物アレルギーモデルマウスの応答に対し、80EWおよび100EWではEWに比べ体重の減少は軽度であったが、28日摂取後の特異的IgE抗体価は増加し、SPLのCD4⁺T細胞の応答は低下したが、MLN CD4⁺T細胞の応答の低下はみられなかった。121EWでは体重に変化はなく、OVA特異的IgE抗体の上昇もみられず、28日間摂取後のSPLおよびMLN CD4⁺T細胞の応答はCNに比べ低かった。以上の結果から、80EWおよび100EWではアレルギー様症状を誘発するエピトープが残存するものの、免疫応答の質に違いがあることが示された。また、100EWではアレルギー様症状と体重の回復がみられたことから、寛容誘導へ移行したと考えられた。121EWでは、アレルギー様症状を誘発せず、OVA特異的IgE抗体の産生がみられなかったことから、OVAに対する応答が誘導されていないと考えられた。OVM感作実験系について、OVM特異的IgE抗体の産生を確認し、感作系が成立することを確認した。

■ 要 約

BALB/cマウスを用いた食物アレルギーモデルマウスの80°C、100°C、121°C処理卵白に対する応答を解析し、OVAへの感作に対し、アレルギー症状を誘発することなく寛容を誘導できるかを検討した。その結果、80°C処理卵白の継続摂取では症状および体重の回復はみられなかったが、100°C処理卵白では症状および体重の回復がみられたことから、OVAに対するアレルギー様症状を誘発するエピトープは残存するものの、継続摂取により寛容が誘導され症状が回復したと考えられた。121°C処理はOVAに対する応答が誘導されなかったと考えられた。また、OVM感作実験系ではOVM特異的IgE抗体が産生され、感作の成立を確認した。

■ 文 献

1. Watanabe, H., Toda, M., Sekido, H., Wellner, A., Fujii, T., Henle, T., Hachimura, S., Nakajima-adachi, H., (2014) Heat treatment of egg white controls allergic symptoms and induces oral tolerance to ovalbumin in a murine model of food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 394-404.
2. Rumbo, M., Chirido, F., G., Fossati C., A., Anon M., C. (1996) Analysis of structural properties and immunochemical reactivity of heat-treated ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3793-3798.
3. Nakajima-Adachi, H., Ebihara, A., Kikuchi, A., Ishida, T., Sasaki, K., Hirano, K., Watanabe, H., Asai, K., Takahashi, Y., Kanamori, Y., Shimojo, N., Matsuda, H., Kohno, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S. (2006) Food antigen causes T_H2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1125-1132.
4. Jimenez-Saiz R., Rupa P., Mine Y., (2011) Immunomodulatory Effects of Heated Ovomuroid-Depleted Egg White in a BALB/c Mouse Model of Egg Allergy. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 13195-13202.
5. Burgraf M., Nakajima-Adachi, H., Hachimura, S., Ilchmann A., Pemberton A., D., Kiyono, H., Vieths S., Toda, M., (2011) Oral tolerance induction does not resolve gastrointestinal inflammation in a mouse model of food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1475-1483.

表 1 OVA 感作マウスの未変性および変性卵白粉食 7 日間摂取後の腸間膜リンパ節
および脾臓の CD4⁺T 細胞の割合と Foxp3 分子の発現

免疫	餌(7日間)	細胞表面分子の発現量(%)			
		腸間膜リンパ節		脾臓	
		CD4 ⁺	Foxp3	CD4 ⁺	Foxp3
Alum	EW	53.8±2.0	10.8±0.2	18.5±1.8	18.8±1.2
OVA+Alum	CN	54.3±2.4	10.7±0.6	22.5±1.4	15.9±1.1
OVA+Alum	EW	47.0±7.6	10.6±0.8	23.6±2.3	17.4±1.8
OVA+Alum	80EW	44.9±2.5*	11.2±0.8	23.7±1.3	16.4±1.3
OVA+Alum	100EW	42.6±1.4*	11.7±0.3	22.0±1.3	17.7±0.5
OVA+Alum	121EW	50.7±2.9	12.0±0.8	22.5±0.6	16.6±0.7

Alum:アラム, OVA:卵白アルブミン, EW:卵白粉食, CN:カゼイン粉末食, 80EW:80℃処理した卵白粉食, 100EW:100℃処理した卵白粉食, 121EW:121℃処理した卵白粉食, *:p<0.05 vs CN

表 2 OVA 感作マウスの未変性および変性卵白粉食 28 日間摂取後の腸間膜リンパ節
および脾臓の CD4⁺T 細胞の割合と Foxp3 分子の発現

免疫	餌(28日間)	細胞表面分子の発現量(%)			
		腸間膜リンパ節		脾臓	
		CD4 ⁺	Foxp3	CD4 ⁺	Foxp3
Alum	EW	49.1±1.8	14.2±0.6	19.7±0.7	18.8±0.6
OVA+Alum	CN	47.0±2.0	15.1±0.6	19.0±1.4	20.5±0.4
OVA+Alum	EW	36.9±2.6*	15.2±1.1	25.9±3.7*	16.4±1.7*
OVA+Alum	80EW	36.4±4.2*	14.9±0.4	22.6±5.6	19.6±3.6
OVA+Alum	100EW	38.0±1.3*	15.4±0.5	19.1±0.3	20.2±0.8
OVA+Alum	121EW	44.8±1.3	15.4±0.8	21.6±1.4	20.7±0.4

Alum:アラム, OVA:卵白アルブミン, EW:卵白粉食, CN:カゼイン粉末食, 80EW:80℃処理した卵白粉食, 100EW:100℃処理した卵白粉食, 121EW:121℃処理した卵白粉食, *:p<0.05 vs CN

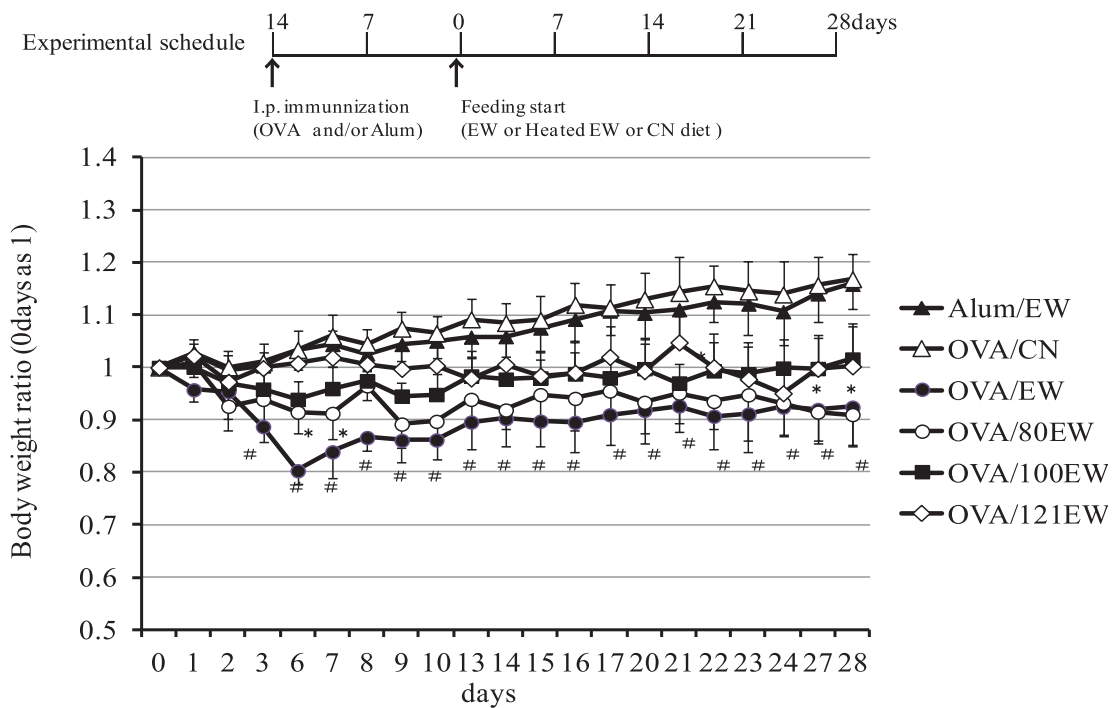


図1 OVA感作マウスの未変性および変性卵白粉食摂取による体重変化

Alum: アラム, OVA: オボアルブミン, CN: カゼイン群, EW: 卵白群,
 80EW: 80°C処理卵白群, 100EW: 100°C処理した卵白群, 121EW: 121°C処理した卵白群
 #: p < 0.05 vs CN, *: p < 0.05 vs EW

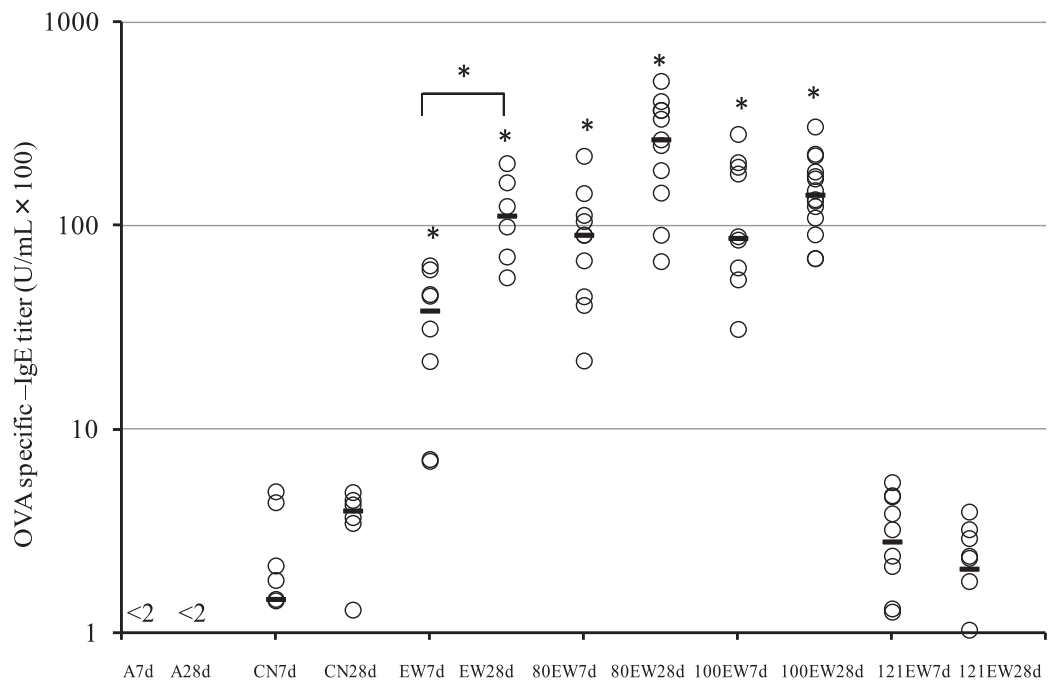


図2 OVA感作マウスの未変性および変性卵白粉食摂取による
 OVA特異的IgE抗体産生

A: アラム群, CN: カゼイン群, EW: 卵白群, 80EW: 80°C処理卵白群, 100EW: 100°C処理した卵白群,
 121EW: 121°C処理した卵白群, 7d: 7日目, 28d: 28日目, *: p < 0.05 vs CN

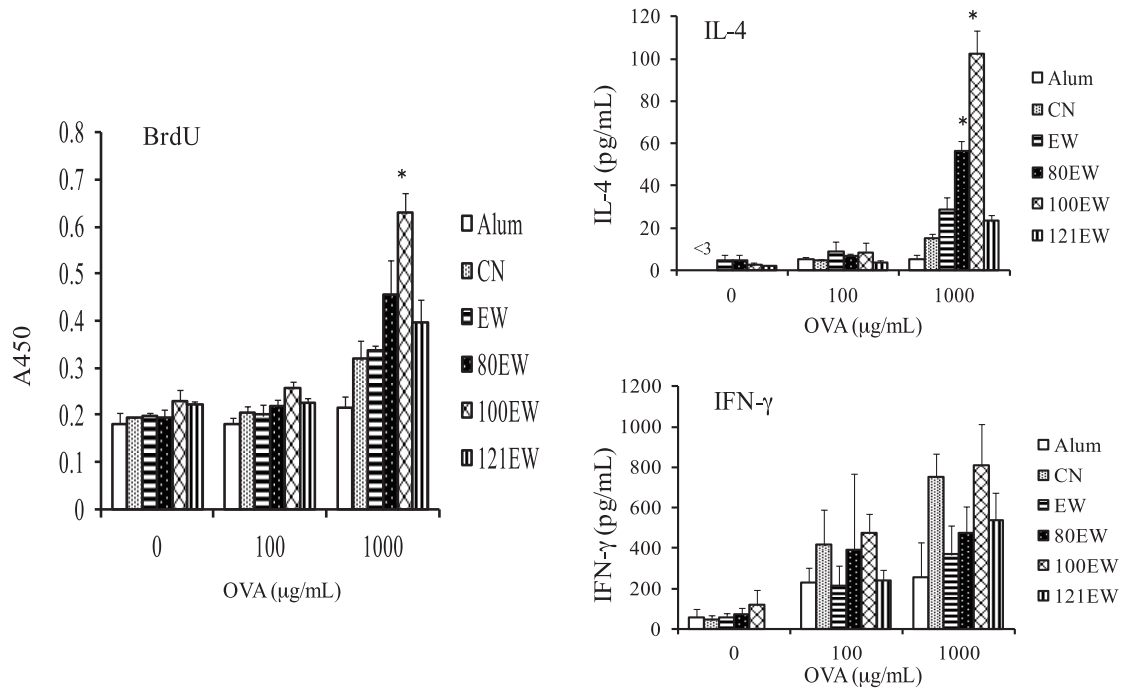


図3 OVA感作マウスの未変性および変性卵白粉食7日間摂取後の腸間膜リンパ節CD4⁺T細胞の応答

Alum:アラム群, CN:カゼイン群, EW:卵白群,
80EW:80℃処理卵白群, 100EW:100℃処理した卵白群, 121EW:121℃処理した卵白群, *:p<0.05

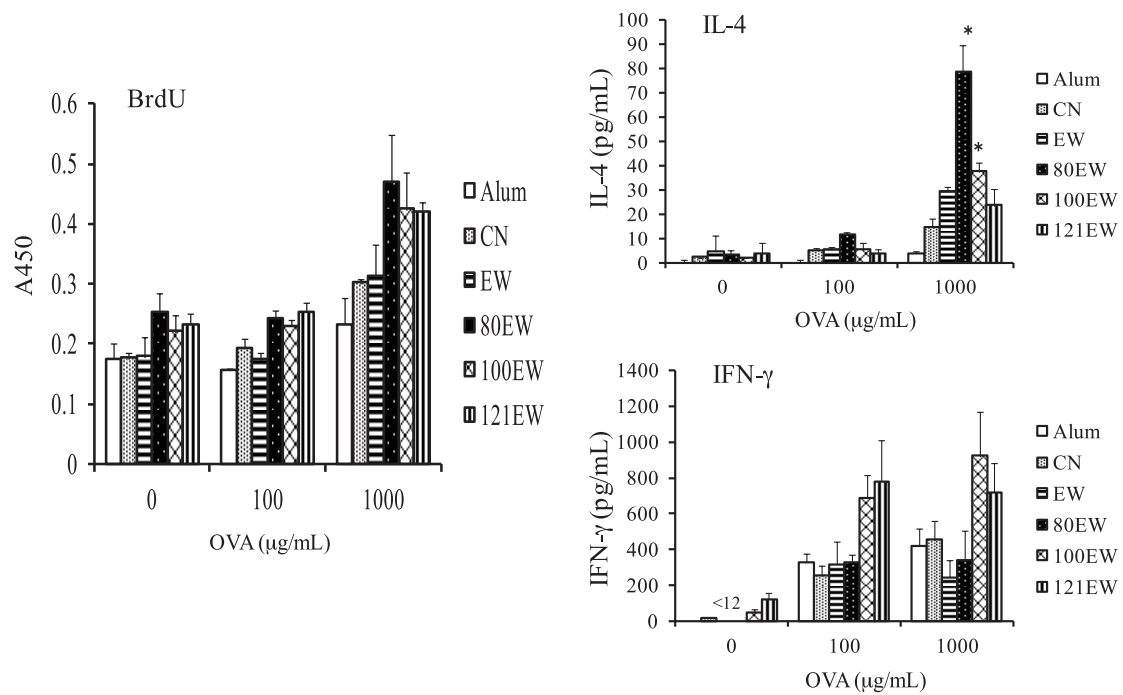


図4 OVA感作マウスの未変性および変性卵白粉食7日間摂取後の脾臓CD4⁺T細胞の応答

Alum:アラム群, CN:カゼイン群, EW:卵白群,
80EW:80℃処理卵白群, 100EW:100℃処理した卵白群, 121EW:121℃処理した卵白群, *:p<0.05

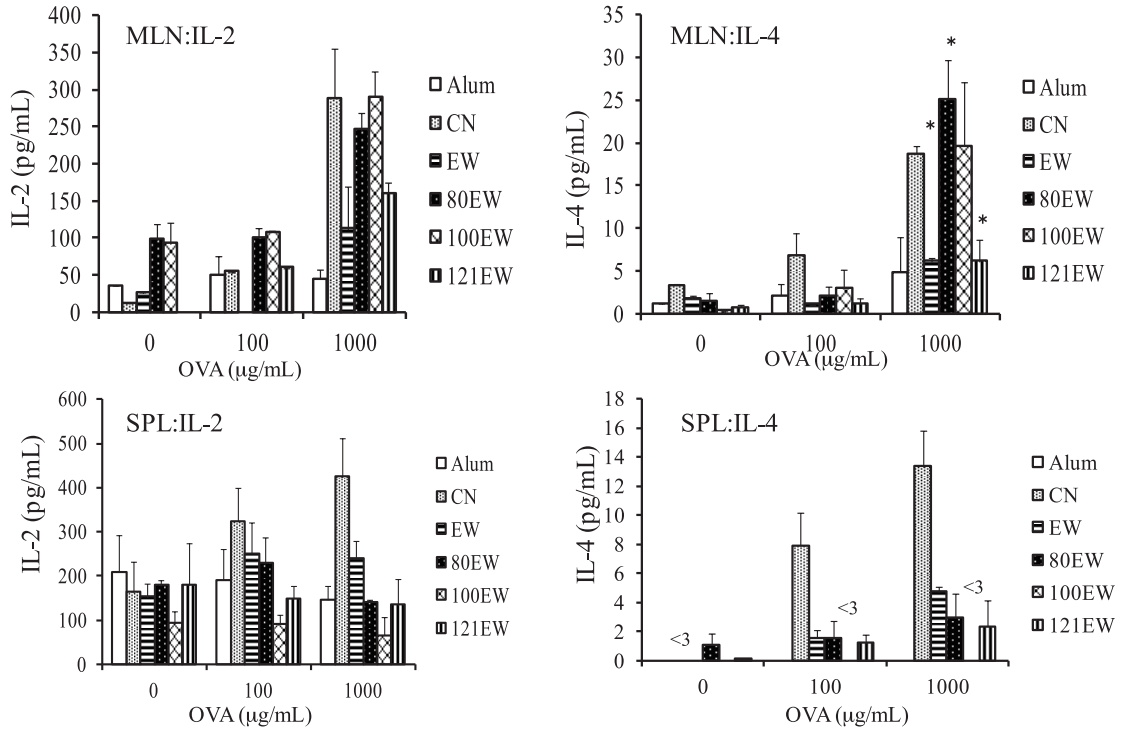


図5 OVA 感作マウスの未変性および変性卵白粉食 28 日間摂取後の腸間膜リンパ節および脾臓 CD4⁺T 細胞の応答

MLN:腸間膜リンパ節, SPL:脾臓, Alum:アラム群, CN:カゼイン群, EW:卵白群, 80EW:80°C処理卵白群, 100EW:100°C処理した卵白群, 121EW:121°C処理した卵白群, *: p < 0.05

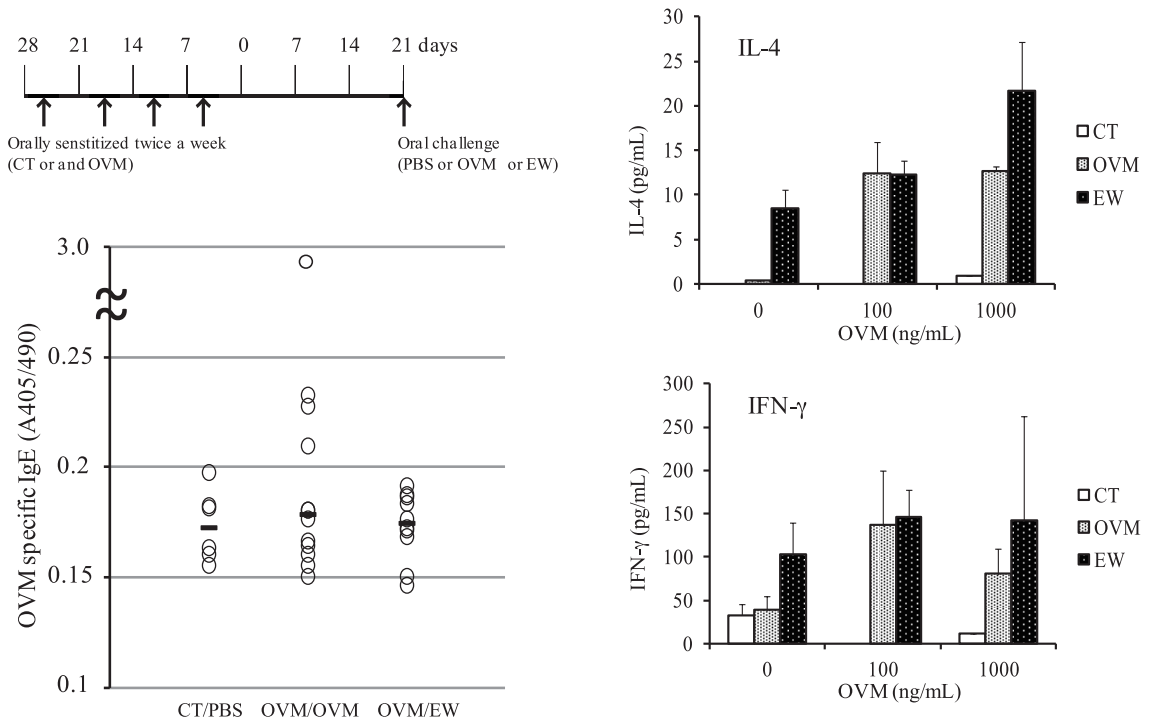


図6 OVM 感作マウスの OVM 特異的 IgE 抗体価および脾臓細胞の応答

CT:コレラトキシン, OVM:オボムコイド EW:卵白