

# 変性卵白を用いた効果的な寛容誘導方法の確立と その持続性の評価

神奈川県衛生研究所理化学部・主任研究員 渡邊 裕子

## ■ 緒言

食物アレルギー疾患は、増加する様々なアレルギー疾患の入り口として、その治療の重要性が認識され、現在、経口免疫寛容を利用した積極的な治療が臨床研究として進められている。しかし、その効果は報告されているものの、アレルギー発症のリスクを伴い、寛容誘導の指標やその持続性などのメカニズムが明らかとなっていないことから、未だ治療法の確立には至っていない。これまで我々は、卵白の主要アレルゲンであるオボアルブミン(OVA)に対し、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する卵白の変性条件を明らかにした。そこで、本研究ではこの変性卵白の条件を用い、より安全で効果的な寛容誘導の方法を確立し、さらに寛容誘導の持続性の評価に有用な指標を選定することを目的とした。

## ■ 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。

### 変性卵白粉食の作製

未変性および変性卵白粉末の作製には、凍結卵白(P)を用いた。変性卵白の加熱処理条件は、OVAと抗体との結合能が完全に消失する100°C5分<sup>1)</sup>処理とし、加熱処理した卵白をフリーズドライし、粉食に10%または20%混合し作製した。

対照食として、カゼイン20%含有粉末食(CN)を作製した。実験期間中のインターバル時にはCE食(日本クレア)を用いた。

### OVAに対する感作および卵白投与方法

マウスは、7日間順化後、Alumと共にOVA 50 $\mu$ g/匹を免疫し、2週間後にCNまたは未変性卵白20%含有粉末食(EW)または変性卵白10%、または20%含有粉末食(10%HEW, 20%HEW)を4週間自由摂取させた後、インターバルを2週間取り、その後7日間CNまたはEWを自由摂取させた(実験条件1)。同様に免疫した後4種の粉末食を6週間自由摂取させた(実験条件2)。さらに、同様に6週間3種の粉末食(CN, EW, 10%HEW)を自由摂取させた後、2週間または4週間インターバルを取り、その後7日間CNまたはEWを自由摂取させた(実験条件3, 4)。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、糞便中のOVA特異的IgA産生(S-IgA)、血清中OVA特異的IgG1, IgG2a, IgE抗体産生(S-IgG1, S-IgG2a, S-IgE)、MCP-1量、腸間膜リンパ節(MLN)および脾臓細胞(SP)中のCD4<sup>+</sup>T細胞の応答を解析した。

### OVA特異的IgG1, IgG2a, IgE抗体量の測定

既報に従い<sup>2,3)</sup>、血清中S-IgG1, S-IgG2a, S-IgE抗体量を測定した。

### OVA特異的IgA抗体量の測定

マウスの糞便を採取し、0.05%アジ化ナトリウムと5%ウシ血清を含むPBSを加えホモジナイズ後遠心し、上清を採取した。ヤギ抗マウスIgA(BETHYL LAB.Inc.)を用いてS-IgA抗体量を測定した。

### MCP-1量の測定

血清中MCP-1量の測定はMCP-1 ELISA Development Kit, mouse(PromoKine)を用いた。

### OVA刺激に対するCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖応答とサイトカイン産生量の測定

実験終了時にマウスSPおよびMLNからCD4<sup>+</sup>T細胞を分離し、10%牛血清入りRPMI中に2 $\times$ 10<sup>6</sup>cell/mLとマイトマイシン処理したBALB/cマウスSP 8 $\times$ 10<sup>6</sup>cell/mLと共に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, IL-10, IFN- $\gamma$ )を既報に従い<sup>2,3)</sup>測定した。

## CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合および Foxp3 分子の発現量の測定

実験終了時にマウス SP および MLN を採取し、抗マウス 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 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 (アフィメトリクス・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。

### 統計処理

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

## ■ 結果

### 実験条件 1: 4 週間変性卵白摂取による寛容誘導後の未変性卵白摂取

図 1 に体重変化と血中 S-IgE 抗体産生量を示した。4 週間の粉末食摂取により、EW は下痢の症状を示し体重が有意に減少したが、10%HEW および 20%HEW は 5 日目まで減少した後に回復した。2 週間のインターバルで全ての群の体重がほぼ同レベルとなった。その後の EW7 日間摂取により 20%HEW (-11.8%) > EW (-10.8%) > 10%HEW (-5.9%) の順で体重が減少した。また、実験期間中の血中 S-IgE 産生は EW に比べ HEW が高く、インターバル後 EW 摂取により有意に上昇した。さらに腸管の炎症症状では盲腸の肥大が観察された。

### 実験条件 2: 6 週間変性卵白摂取による寛容誘導

実験条件 1 において HEW による 4 週間の寛容誘導後の EW 摂取は、むしろ EW による寛容誘導に比べ炎症症状が悪化したことから、6 週間寛容誘導について検討を行った。図 2 に体重変化と血中 S-IgE 抗体産生量、MLN および SP の増殖応答を示した。6 週間後の体重は EW、20%HEW は CN に比べ有意に低かった。この時の S-IgE 産生は EW と 10%HEW、20%HEW で差はなかった。SP の増殖応答はいずれも有意に応答が低下し、寛容が誘導された。そこで、10%HEW による 6 週間の寛容誘導後の EW 摂取について、持続性の評価を行った。

### 実験条件 3: 6 週間の寛容誘導、2 週間インターバル後の未変性卵白摂取

図 3 に体重変化と血中 S-IgE 抗体産生量を示した。6 週間 EW は実験期間中体重が有意に減少したが、10%HEW では 3 日目に若干低下したのみであった。2 週間のインターバル中の EW の体重は CN や HEW までには回復しなかった。その後の EW7 日間摂取で EW は -15.2% と体重が大きく減少したが、10%HEW は -5% となった。また、この時の血中 S-IgE 産生は CN 摂取と比べ EW、10%HEW いずれも有意な上昇はみられなかった。さらに、盲腸の肥大も観察されなかった。

### 実験条件 4: 6 週間の寛容誘導、4 週間インターバル後の未変性卵白摂取

図 4 に体重変化と血中 S-IgE 抗体産生量を示した。4 週間のインターバルでは EW の体重は CN および HEW の体重とほぼ同レベルに回復した。その後、EW7 日間摂取後の体重は 10%HEW -18.3%、EW -16.0% の減少となった。また、10%HEW の血中 S-IgE 抗体産生は有意に上昇した。盲腸の肥大は EW、10%HEW のいずれも観察された。

### 実験条件 1,3,4 における免疫応答の比較

図 5 に糞便中 S-IgA 産生および血中 MCP-1 量を示した。実験条件 1 では 20%HEW が腸管の炎症症状を表す血中 MCP-1 量の有意な上昇を示し、糞便中 S-IgA 産生も上昇傾向を示した。実験条件 3 では、10%HEW で MCP-1 量の上昇傾向がみられたが、個体差が大きく、糞便中 S-IgA 産生は EW と同等であった。実験条件 4 では 10%HEW の糞便中の S-IgA 産生量は EW に比べ高い傾向を示し、MCP-1 量は有意に上昇した。この時の血中 S-IgG サブクラス (図 6) をみると、いずれの実験条件の EW も変化は認められなかったが、実験条件 1 と 4 の 10%HEW では S-IgG1 産生の有意な上昇がみられた。SP および MLN のリンパ球の応答では、実験条件 1 においては EW、HEW による MLN CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合と CD4<sup>+</sup>T 細胞中の Foxp3 分子の発現が減少し、インターバル後の EW 摂取により CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合はさらに減少した。また、SP CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合はインターバル後の EW 摂取により増加した (表 1)。一方、実験条件 3、4 では明確な差は認められなかった (データは示さず)。増殖応答では (図 7-1)、いずれの実験条件においても MLN の応答は EW に比べ HEW 摂取で有意に増加した。また、実験条件 4 では CN に比べ EW、HEW 摂取で OVA に対する MLN の応答が有意に高かった。実験条件 1 と 4 では、SP の応答においても同様に EW に比べ HEW 摂取で有意に増加した。実験条件 3 と 4 のサイトカイン産生をみると (図 7-2)、MLN の IFN- $\gamma$ 、IL-4 産生が EW に比べ HEW で高かった。SP では IL-4 は検出されず、IFN- $\gamma$  産生では EW と HEW で差がなかった。実験条件 3 では EW、HEW のいずれも IL-10 産生が増加したが、実験条件 4 では検出されなかった。

## ■ 考 察

HEW 摂取による寛容誘導の持続性を、HEW 摂取量および摂取期間、インターバル期間を変化させ、寛容誘導後の EW 摂取により評価した。その結果、4 週間の 20%HEW 摂取による寛容誘導では、2 週間のインターバル後の 7 日間 EW 摂取により体重は EW 摂取に比べ低下し、10%、20%HEW 摂取ではいずれも血中 S-IgE、IgG1 産生の上昇や盲腸の肥大など Th2 型の腸管におけるアレルギー様症状が増強され、EW 摂取に比べその症状は悪化した。ゆえに HEW4 週間摂取では寛容誘導が不十分であることが明らかとなった。次に 6 週間の 10%HEW 摂取による寛容誘導では、2 週間のインターバル後の EW 摂取による体重減少および腸管のアレルギー様症状は EW 摂取に比べ顕著に軽減し、脾臓細胞の増殖応答、IL-10 産生から全身性の寛容が持続されていた。そこで、インターバルを 4 週間に延長したところ、EW 摂取による体重の有意な減少や血中 S-IgE、IgG1 産生の上昇や MLN の IL-4 産生といった Th2 型の腸管におけるアレルギー様症状が誘導された。

以上の結果から、変性卵白による寛容誘導では継続的な摂取による体重の回復および脾臓細胞の OVA 特異的な応答の低下だけでなく、血中 S-IgE、IgG1 産生の低下が重要であることが明らかとなった。また、これらの寛容誘導の持続には適切な変性卵白摂取の間隔が存在することが示唆された。さらに不十分な寛容誘導並びに不適切な抗原除去後の摂取においてアレルギー症状の急激な悪化が起こることが示唆された。本実験系で示された変性卵白摂取によるアレルギー症状の悪化の要因として、OVA に対する抗体の認識能の違いが B 細胞と T 細胞の相互作用に変化を及ぼしていることが考えられ、今後詳細に検討する必要があると考えられた。

## ■ 要 約

変性卵白摂取による寛容誘導の持続性を、変性卵白摂取量および摂取期間、インターバル期間を変え、寛容誘導後の未変性卵白摂取により評価した。その結果、変性卵白による寛容誘導では継続的な摂取による体重の回復および脾臓細胞の OVA 特異的な応答の低下だけでなく、血中 S-IgE、IgG1 産生の低下が重要であることが明らかとなった。また、これらの寛容誘導の持続には適切な変性卵白摂取の間隔が存在することが示唆された。さらに不十分な寛容誘導並びに不適切な抗原除去後の摂取においてアレルギー症状の急激な悪化が起こることが示唆された。

## ■ 文 献

1. Rumbo, M. et al.(1996)Analysis of structural properties and immunochemical reactivity of heat-treated ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3793-3798.
2. Watanabe, H. et al.(2014)Heat treatment of egg white controls allergic symptoms and induces oral tolerance to ovalubumin in a murine model of food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 394-404.
3. Burggraf M. et al.(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 実験条件1におけるマウス腸間膜リンパ節細胞および脾臓細胞 CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合とその Foxp3 分子の発現

マウス群	細胞表面分子の発現量 (%)			
	腸間膜リンパ節		脾臓	
	CD4 <sup>+</sup>	Foxp3	CD4 <sup>+</sup>	Foxp3
CN	54.5	23.7	21.7	20.0
EW/CN	47.4	16.9	21.8	21.3
EW/EW	41.1	16.3	24.1	19.9
10HEW/CN	45.3	16.7	22.1	20.3
10HEW/EW	40.5	14.3	28.8	20.0
20HEW/CN	46.3	17.5	22.3	22.4
20HEW/EW	39.3	15.0	32.3	18.4

CN: カゼイン食、EW:20%未変性卵白含有食、10%HEW:10%加熱卵白含有食、20%HEW:20%加熱卵白含有食

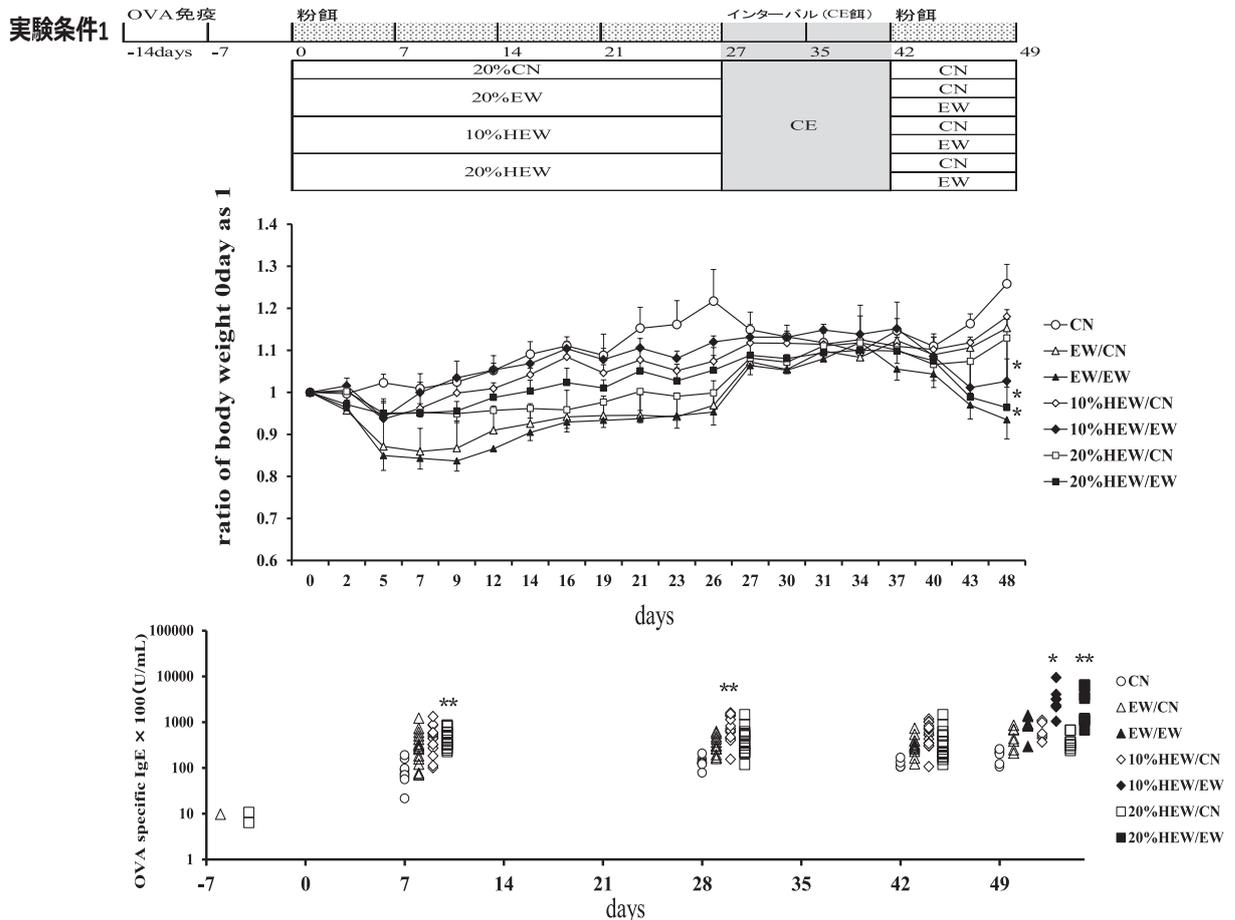


図1 27日間未変性および変性卵白を投与し、2週間のインターバルを取った後に未変性卵白を投与したマウスにおける免疫応答(実験条件1)

OVA: オボアルブミン、CN: カゼイン食、EW:20%未変性卵白含有食、10%HEW:10%加熱卵白含有食、20%HEW:20%加熱卵白含有食、\*:P<0.01, \*\*:P<0.05 vs CN

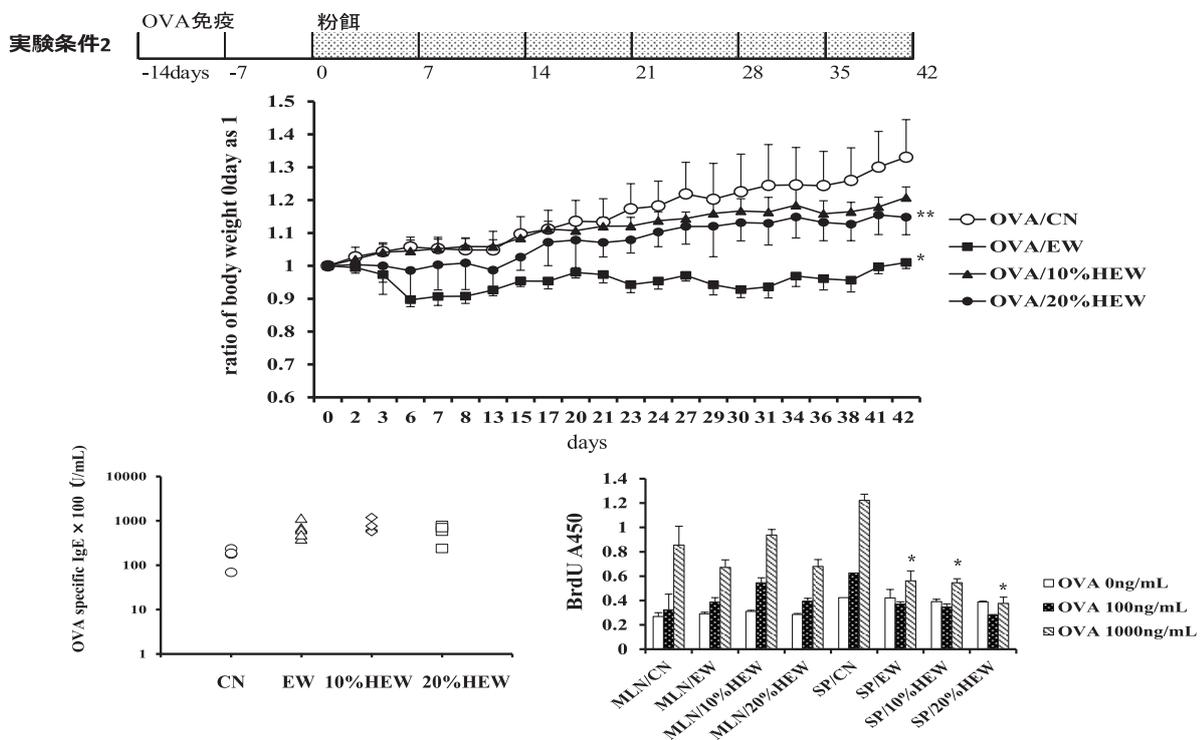


図2 42日間未変性および変性卵白を投与したマウスにおける免疫応答(実験条件2)  
 OVA:オボアルブミン、CN:カゼイン食、EW:20%未変性卵白含有食、10%HEW:10%加熱卵白含有食、20%HEW:20%加熱卵白含有食、MLN:腸間膜リンパ節細胞、SP:脾臓細胞、\*:P<0.01, \*\*:P<0.05 vs CN

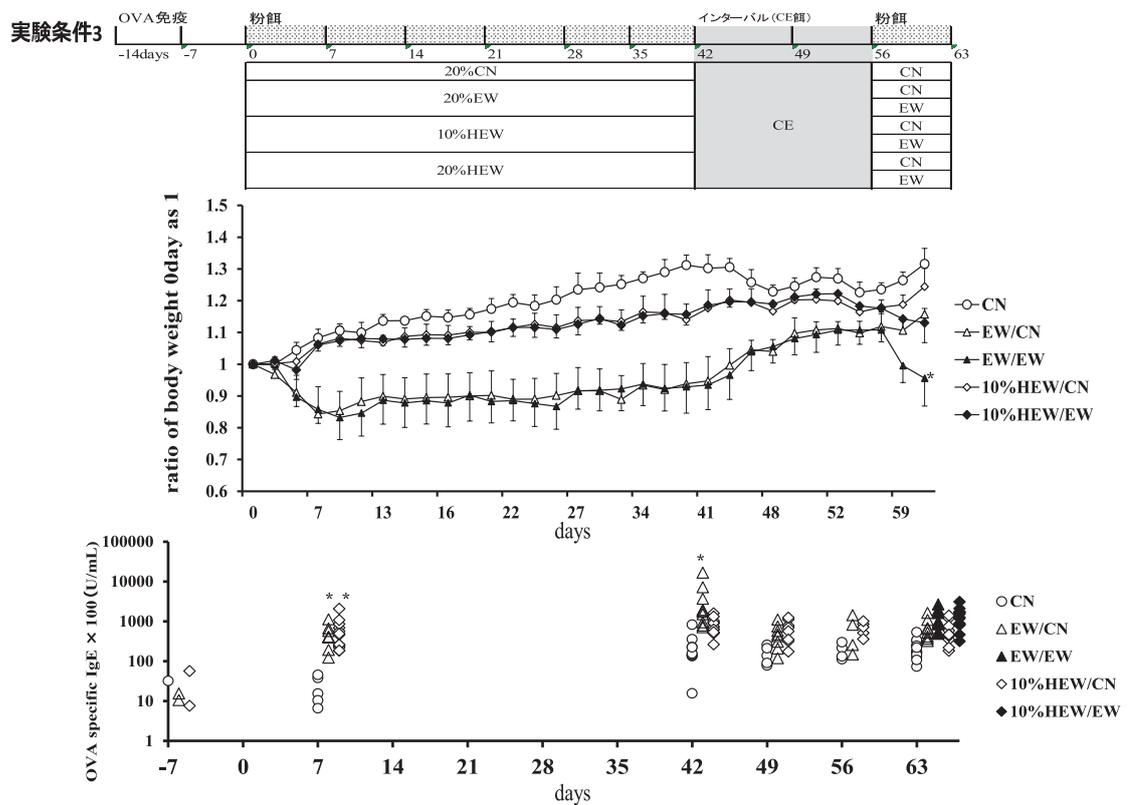


図3 42日間未変性および変性卵白を投与し、2週間のインターバルを取った後に未変性卵白を投与したマウスにおける免疫応答(実験条件3)

OVA: オボアルブミン、CN: 20%カゼイン含有食、EW: 20%未変性卵白含有食、10%HEW: 10%加熱卵白含有食、CE: CE食、\*:  $P < 0.01$  vs CN

実験条件4

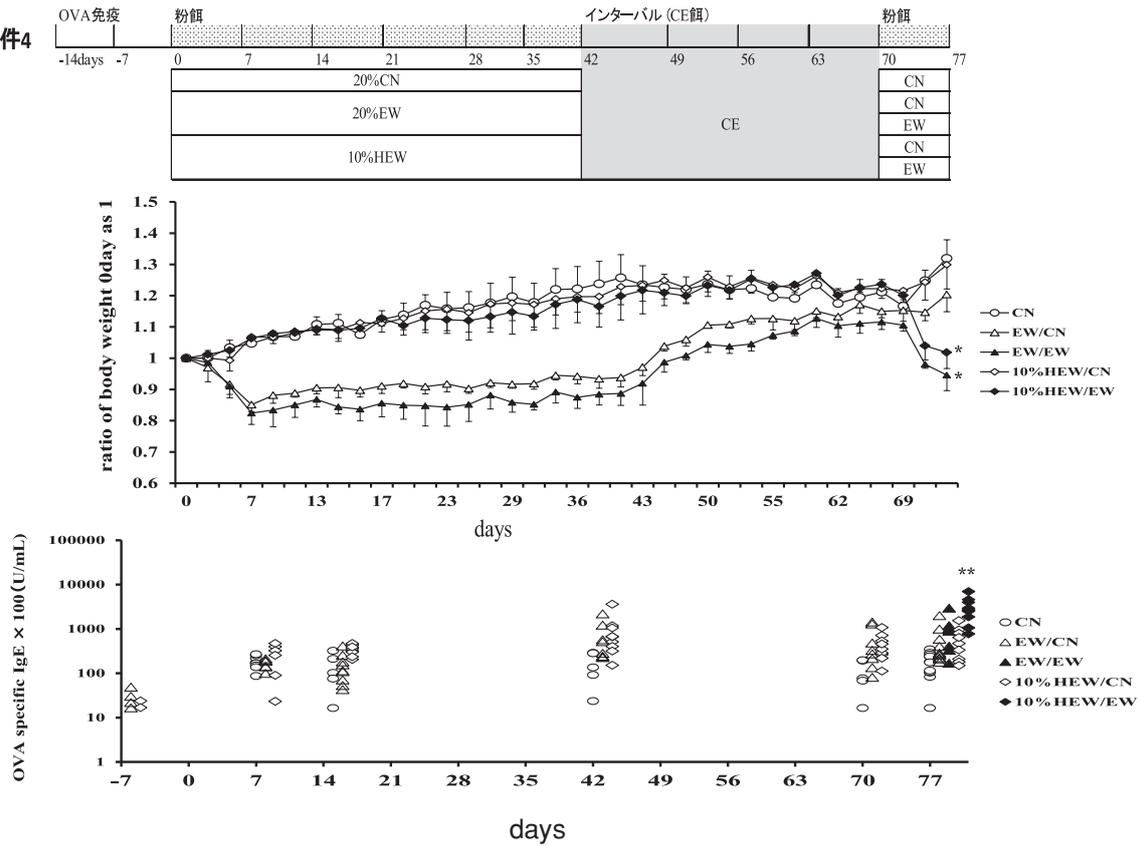


図4 42日間未変性および変性卵白を投与し、4週間のインターバルを取った後に未変性卵白を投与したマウスにおける免疫応答(実験条件4)

OVA: オボアルブミン、CN: 20%カゼイン含有食、EW: 20%未変性卵白含有食、10%HEW: 10%加熱卵白含有食、CE: CE食、MLN: 腸間膜リンパ節細胞、SP: 脾臓細胞、\*: P<0.01, \*\*: P<0.05 vs CN

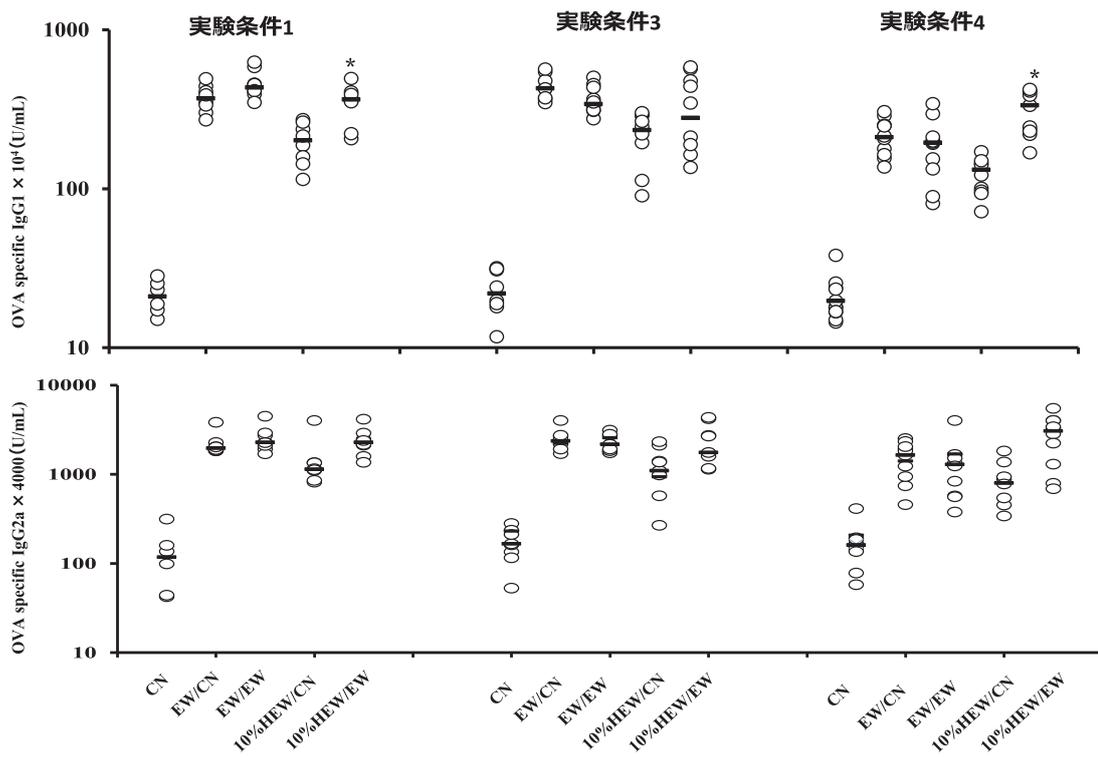


図5 3実験条件におけるマウス血清中OVA特異的IgGサブクラス産生  
 CN:20%カゼイン含有食、EW:20%未変性卵白含有食、10%HEW:10%加熱卵白含有食、CE:CE食、  
 \*:P<0.01 vs CN

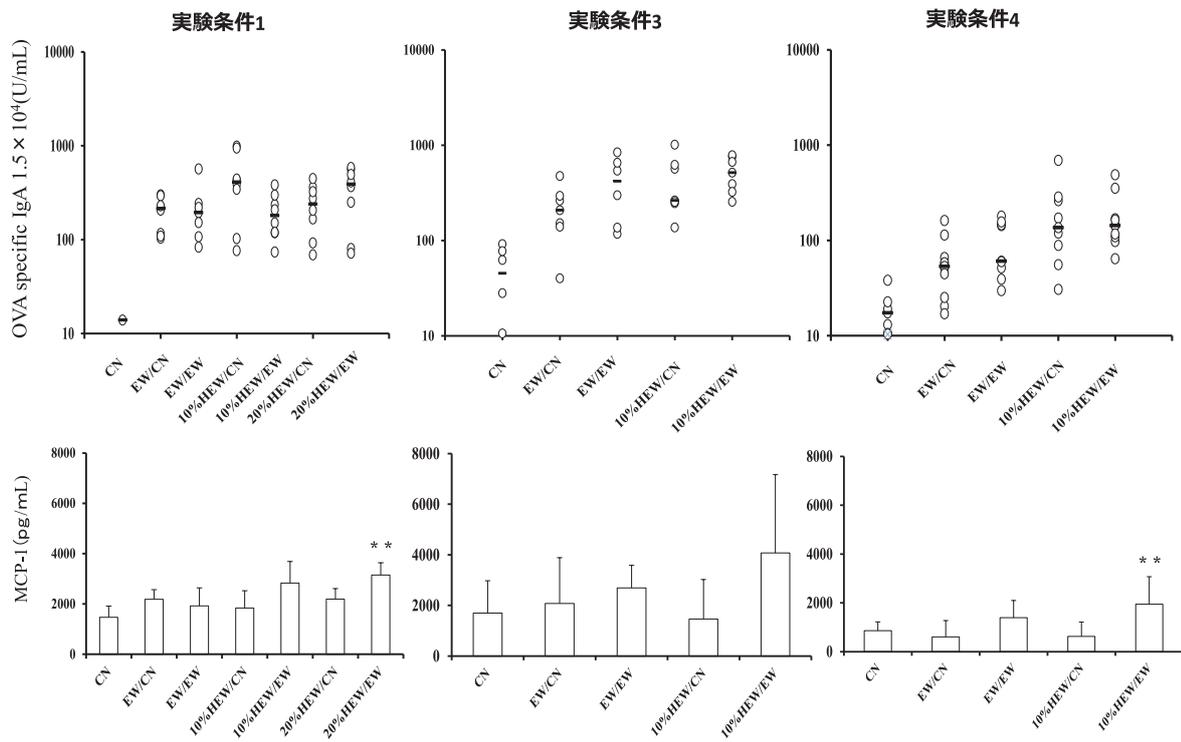


図6 3 実験条件におけるマウス糞便中 OVA 特異的 IgA 産生および血中 MCP-1 産生  
 CN:20%カゼイン含有食、EW:20%未変性卵白含有食、10%HEW:10%加熱卵白含有食、CE:CE 食、  
 \*:P<0.01, \*\*:P<0.05 vs CN

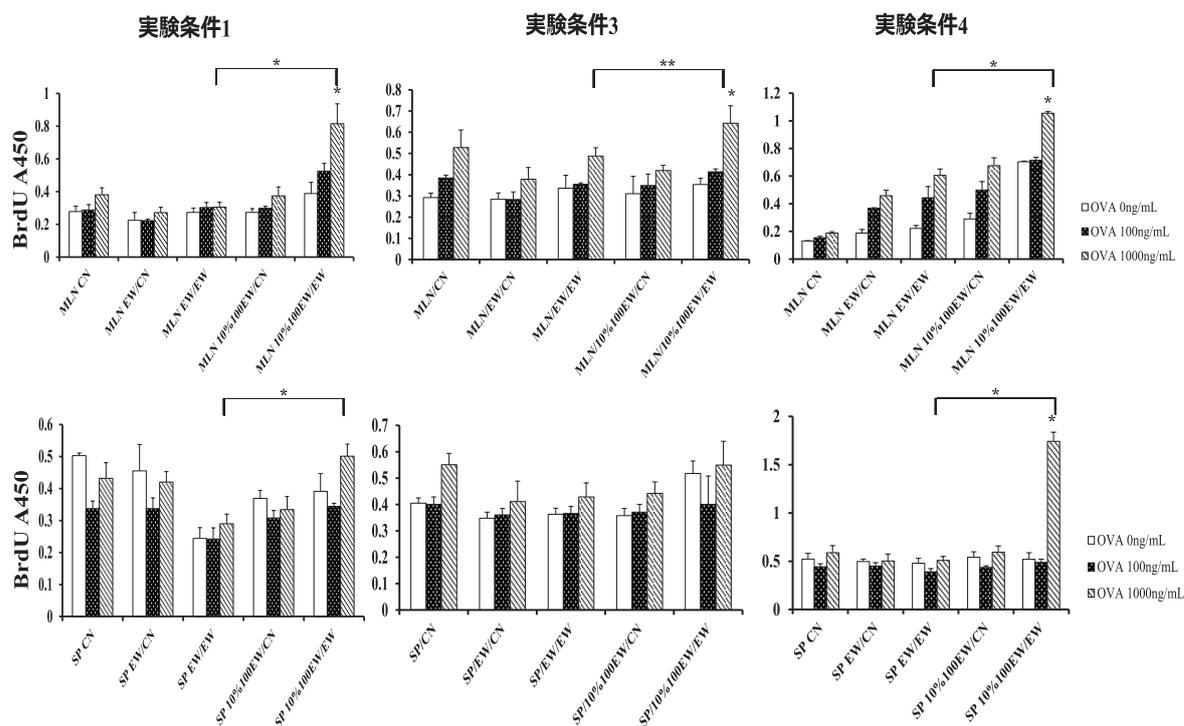


図 7-1 3 実験条件におけるマウス腸間膜リンパ節細胞および脾臓細胞 CD4<sup>+</sup>T 細胞の応答  
 CN:20%カゼイン含有食、EW:20%未変性卵白含有食、10%HEW:10%加熱卵白含有食、CE:CE食、MLN:腸間膜リンパ節細胞、SP:脾臓細胞、\*:P<0.01, \*\*:P<0.05 vs CN

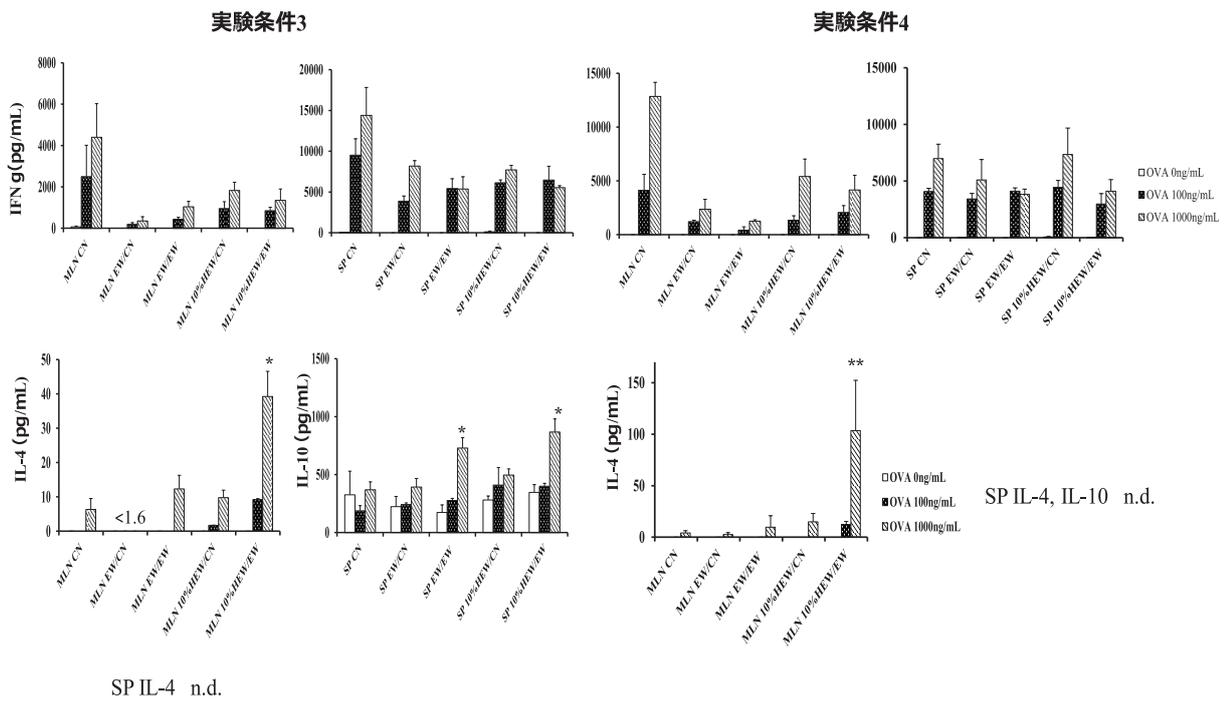


図 7-2 2 実験条件におけるマウス腸間膜リンパ節細胞および脾臓細胞中 CD4<sup>+</sup>T 細胞の応答  
 CN:20%カゼイン含有食、EW:20%未変性卵白含有食、10%HEW:10%加熱卵白含有食、CE:CE 食、  
 MLN:腸間膜リンパ節細胞、SP:脾臓細胞、n.d.:not detected, \*:P<0.01, \*\*:P<0.05 vs CN