

アレルギー感作母マウスの摂取タンパク質が 母乳を介して仔マウスに経口免疫寛容を誘導する

松 永 安 由¹, 木 津 久 美 子², 有 田 真 緒¹,
廣 瀬 潤 子³, 成 田 宏 史^{1,*}

(2015年9月14日受付; 2015年11月26日受理)

要旨: 雌マウスをカゼイン餌で飼育し、オボアルブミン (OVA) と水酸化アルミニウムゲル (Alum) で腹腔免疫してアレルギー感作させた後交配し、授乳期間中のみ卵白餌を与えた母親を Allergy Egg (AE) 母とした。OVA で感作せずに交配し、授乳期間中のみ卵白餌を与えた母親を Egg (E) 母、授乳中もカゼイン餌を与え続けた母親を Milk (M) 母とした。各々の母親に母乳哺育された仔を離乳後 OVA と Alum で腹腔免疫し、OVA の経口投与によるアレルギー性下痢誘発試験を行ったところ、AE・E 仔では M 仔に比べて下痢が抑制された。さらに、血清中 OVA 特異的 IgE、脾臓細胞培養液中 IL-4 も有意に低かった。また、AE 母乳中に IgA および IgG1 と OVA との免疫複合体が有意に増加していた。以上の結果より、母親がアレルギー感作を受けていても、母親が摂取したタンパク質特異的に母乳を介した経口免疫寛容が仔に誘導されること、その過程に母乳中の OVA 免疫複合体が関与している可能性が判明した。

キーワード: 母乳哺育, 経口免疫寛容, 食物アレルギー, IgA, 免疫複合体

母乳は、ヒトが摂取するために作られる唯一の本来的な食品であり、乳児の未熟な身体機能に適した、栄養学的にも精神的にも優れた食品である¹⁾。さらに、母乳中の IgA は乳児が自身で抗体を産生できない間、乳児を感染症から守るという受動免疫因子として重要な役割を果たしている²⁻⁴⁾。一方、離乳食開始前にアトピー性皮膚炎と診断された生後 2-6 カ月の乳児の血清中に種々の食物抗原特異的 IgE が検出されることから、母親が摂取した食品タンパク質が経母乳的にアレルギー感作を誘発していることが考えられ、母乳哺育の妨げとなっている⁵⁾。

しかしながら近年、アレルギー素因を持った母親の妊娠中・授乳中の除去食は子供のアトピー性皮膚炎の予防に効果がないどころか母親および子供の栄養に悪影響を及ぼす可能性がある⁶⁾、かなり厳密なタマゴ除去をしても臍帯血や母乳へのオボアルブミン (OVA) の移行を阻止できなかったことから、妊娠中および授乳中の母親の除去食は“fruitless exercise”である⁷⁾などの報告が出されている。このような経緯から現在では、食物アレルギーの治療・管理は「正しい診断に基づいた必要最小限の原因食物の除去」が原則とされ⁸⁾、妊娠中・授乳中にアレルギー疾患発症予防のために食物制限を行うことは、両

親・同胞に 1 人以上のアレルギーを持つハイリスク児に対してさえも、欧米同様我が国においても推奨されていない⁹⁾¹⁰⁾。しかし今のところ「除去の有効性に十分な根拠がない」というのがその理由であり、我が子の食物アレルギー発症を不安に思う母親の独断による予防的な食物除去をなくすためには、「リスクがある場合でも食べた方がよい」という積極的な科学的根拠を明確にしておくことが必要であると思われる。

我々は先行研究において、ヒト母乳中に卵白タンパク質が特異的 IgA との免疫複合体 (IgA-Immune Complex : IgA-IC) の形で存在すること¹¹⁾、卵白タンパク質を摂取している母親の母乳で育った仔ラットおよび仔マウスでは、卵白タンパク質特異的に経口免疫寛容が誘導され、卵白タンパク質に対するアレルギーが抑制されることを明らかにし¹²⁾¹³⁾、母乳哺育の食物アレルギー予防効果を立証している。本研究では、あらかじめ卵白タンパク質でアレルギー感作を受けた母マウスの場合でも、母乳哺育を介した仔のアレルギー抑制が可能かどうかを検討することを目的として行った。正常マウスの場合と同様の抑制がかかれば、母親がアレルギー素因を持っているハイリスク児においても、母親は食物制限を行う必要

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: narita@kyoto-wu.ac.jp)

¹ 京都女子大学家政学部食物栄養学科 (605-8501 京都市東山区今熊野北日吉町 35)

² 大阪成蹊短期大学総合生活学科栄養コース (533-0007 大阪市東淀川区相川 3-10-62)

³ 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科 (522-8533 彦根市八坂町 2500)

がない、むしろ食べた方がよいことを示すことができる。

実験材料および方法

1. 実験動物および飼料

雌 BALB/c マウス (日本エスエルシー(株)) を室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度約 50%、明暗サイクル 12 時間 (6:00–18:00 明期) の条件下でプラスチックケージに入れて飼育した。実験に用いた卵白食は、タンパク質として卵白タンパク質 (キューピー(株)、乾燥卵白 K タイプ (CS) No. 2 に 0.00025% ビオチンを補足) を用い、AIN-93G に準じて調製し、加水後練って成形した。卵白食摂取期間以外は、タンパク質源がカゼインの市販飼育実験用餌 (MF(飼育用)、オリエンタル酵母工業(株)) を与え、水および餌は自由摂取させた。

なお、動物実験は「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年文部科学省告示第 71 号)」に基づき、京都女子大学動物実験委員会の許可を得て実施した (許可番号: 26-2)。

2. 実験方法

2.1 アレルギー感作母マウスによる母乳哺育 (図 1 上段) 8 週齢の雌マウスに OVA (シグマアルドリッチジャパン, Grade V) $50 \mu\text{g}$ を水酸化アルミニウムゲル (Alum, サーモフィッシャーサイエンティフィック) 2 mg と混合して腹腔免疫し、その 14 日後に同量の OVA と Alum を追加免疫して感作した。感作および未感作のマウスを、初回免疫の 7 日後にあたる 9 週齢で交配した。感作し、授乳期間中のみ卵白食を摂取させた母マウスを Allergy Egg (AE) 母とした。対照として、感作せず授乳期間中のみ卵白食を摂取させた母マウスを Egg (E) 母、感作せず実験を通して MF を摂取させた母マウスを Milk (M) 母とした。いずれの群においてもそれぞれの母マウスの母乳で仔を育て、出産後 21 日目に母親の搾乳および採血を行った。なお、出産後 10 日目以降はケージから餌を除去し、母マウスだけを日中 9 時間別のケージに移して餌を摂取させ、仔マウスが母マウスの餌および糞を食べないようにした。

2.2 仔マウスにおける OVA 特異的下痢誘発試験 (図 1 下段) 各群の母親の母乳で育った仔マウスに、生後 21 日目の離乳と同時に OVA $10 \mu\text{g}$ を Alum 1 mg とともに腹腔免疫し、さらにその 14 日後に追加免疫をした。追加免疫の 14 日後から、OVA 20 mg/200 μL PBS (Phosphate buffered saline, 10 mM NaPi, 140 mM NaCl, pH 7.4) の胃内強制投与による下痢誘発試験を開始した¹³⁾¹⁴⁾。マウスは、投与実施 3–4 時間前から絶食させた。投与後 1 時間下痢症状を呈するかどうかを個別に観察し、水様便が見られたマウスを下痢誘発ありと判断した。この下痢誘発試験は 1 日もしくは 2 日おきに計 7 回行った。5 回目と 6 回目の試験の間に、全群に牛血清アルブミン (BSA, シグマアルドリッチジャパン) 20 mg を投与し、下痢症状が OVA 投与により特異的に起こること

を確認した。下痢誘発試験終了後に採血ならびに脾臓摘出を行った。

2.3 マウス血清および母乳 マウスから採取した血液は 37°C 、1 時間で凝固させ、 $3,000 \times g$ 、5 分、 4°C で遠心分離後上清を回収し血清試料とした。

母乳は出産 21 日後の母マウスから採取した。搾乳前 16 時間母子を別居させ、搾乳 10 分前に母マウスにオキシトシン (シグマアルドリッチジャパン) 1 単位を皮下注射した。搾乳は実験動物搾乳装置 WAT-2001 ((有)リトルレオナルド) を用いて行い、各母マウスから 100–500 μL の母乳を採取した。得られた母乳を 0.1% BSA/TBS (0.1% BSA, 0.05% Tween 20 添加 Tris buffered saline) で 2 倍希釈後、 $10,000 \times g$ 、10 分、 4°C で遠心分離し、浮遊する脂質層と沈殿層の中間層にあたる溶液部分を回収して母乳試料とした。いずれの試料も使用時まで -20°C で保存し、凍結融解を繰り返すことは避けた。

2.4 特異的 IgE, IgG1 および免疫複合体の定量 血清試料中の OVA 特異的 IgE および IgG1 は固相 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) により測定した¹³⁾。OVA 特異的 IgE の定量は、得られた血清試料を Ig-Accept Protein G (ナカライテスク(株)) に供して IgG を除去した後に行った。なお、標準物質には市販のマウス IgE (サザンバイオテック) および IgG1 (サザンバイオテック) を用いたため、結果は IgE および IgG1 相当量として示した。

母乳試料中の OVA の免疫複合体は、抗 OVA 抗体と抗 IgA 抗体もしくは抗 IgG1 抗体で構成されたサンドイッチ ELISA で定量し¹³⁾¹⁵⁾、それぞれの測定値は IgA (標準物質: インターセルテクノロジー) もしくは IgG1 相当量として示した。

2.5 IL-4, OVA の定量 仔マウスから採取した脾臓細胞を、10% の牛胎児血清を含む RPMI1640 培地に OVA 添加および無添加条件で培養した。培養上清中の IL-4 を市販の ELISA キット (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて定量し、結果は OVA 添加条件の IL-4 値から OVA 無添加条件の IL-4 値を差し引いて示した。

母乳試料中の遊離 OVA は抗 OVA 抗体 ((株)森永生科学研究所) 同士のサンドイッチ ELISA にて定量した。

3. 統計処理

統計処理はボンフェローニ・ダン検定によって行い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。ソフトは、4 Steps エクセル統計第 2 版 (オーエムエス出版, 2006) 付属エクセルアドインソフト Statcel 2 を用いた。

結 果

本研究では、母マウスをアレルギー感作させたハイリスク児において、母親が摂取したタンパク質特異的に母乳哺育を介して経口免疫寛容が誘導されるか否かを検討した。実験の全体の流れを図 1 にまとめた。

1. 母親の OVA アレルギー感作の確認

まず、8 週齢の雌マウスに IgE 産生を惹起する Alum を助剤として OVA を腹腔免疫し、その 7 日後に交配、14 日後に追加免疫を行った。出産までは MF、出産後（授乳中）は卵白食を与え、これを AE 母とした。出産の 21 日後（離乳時）に採取した血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1 を定量したところ、感作せず授乳期間中のみ卵白食を摂取させた E 母と、感作せず実験を通して MF を摂取させた M 母に比べて、AE 母において OVA 特異的 IgE、IgG1 がともに有意に高かった（図 2）。したがって、AE 母において OVA アレルギー感作が成立したことが確認できた。AE 母の中には授乳中軽い軟便傾向を示すものもいたが、症状の悪化は見られなかった。

2. 食物アレルギー性下痢誘発試験

アレルギー感作を受けた母親による母乳哺育が仔の食物アレルギー発症に及ぼす影響を評価するために、強力

な Th2 細胞応答に付随する液性および細胞性免疫応答や敏感なアレルギー性下痢症状を伴う、経口抗原誘導性の腸管炎症マウスモデル系を導入した¹⁴⁾。離乳後 OVA と Alum で免疫した各群の仔マウスに、OVA を胃内強制投与して下痢症状が誘発されるかどうかを評価した（図 3）。我々は既に本食物アレルギーモデル系を用いた先行研究において、母親が交配時から牛乳タンパク質のみをタンパク源とした餌を摂取していた群では仔の下痢症状が誘発され、逆に卵白食を摂取していた群では抑制されることを報告している¹³⁾。本研究では、仔における経口免疫寛容の誘導が母親の授乳中の食事依存していることを明確に示すために、E 母、AE 母ともに卵白食摂取は授乳中に限定した。その結果、今回の実験条件においても、母乳哺育を介して OVA に対する経口免疫寛容を獲得している E 仔では下痢誘発率は低い水準で推移したが、M 仔では OVA の投与回数が増えるにした

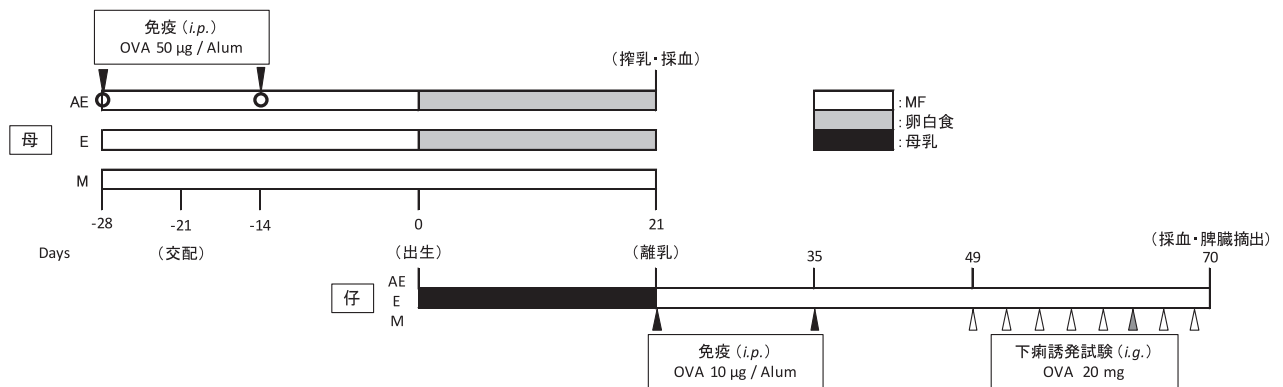


図 1 動物実験の概略

上段に母親、下段に仔の実験プロトコルをそれぞれ示した。試験群である Allergy Egg (AE) 母には、OVA を 2 回腹腔免疫 (*i.p.*) して感作し、授乳期間中のみ卵白食 (■) を摂取させた。対照群の Egg (E) 母は、感作せずに授乳期間中のみ卵白食を摂取させ、Milk (M) 母は感作せずに実験を通して MF (□) を摂取させた。各群の母マウスの母乳 (■) で育った仔マウスに離乳後 OVA を 2 回腹腔免疫 (*i.p.*) して感作し、OVA の胃内投与 (*i.g.*) による下痢誘発試験を行った。

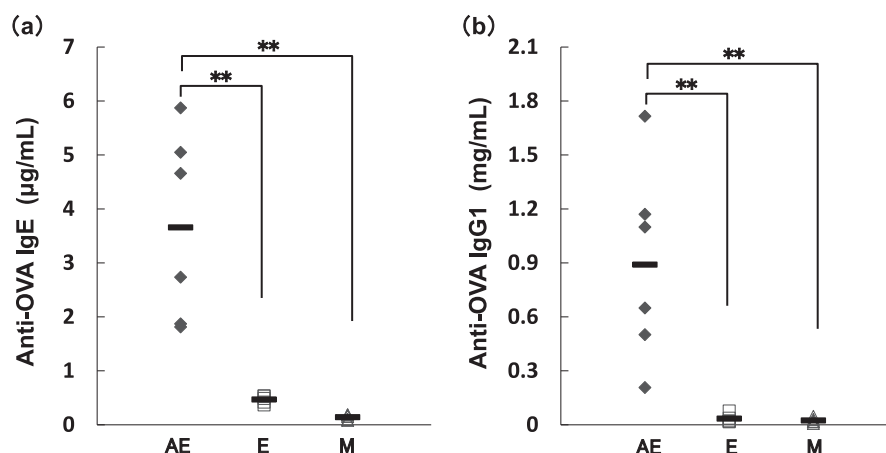


図 2 母マウスの血清中 OVA 特異的 IgE と IgG1

出産 21 日後に AE 母 (◆, $n = 6$) および E 母 (□, $n = 5$), M 母 (△, $n = 5$) より採血し、血清中 OVA 特異的 IgE (a) と IgG1 (b) を測定した。定量結果は IgE、IgG1 相当量で表した。統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値, ** $p < 0.01$ 。

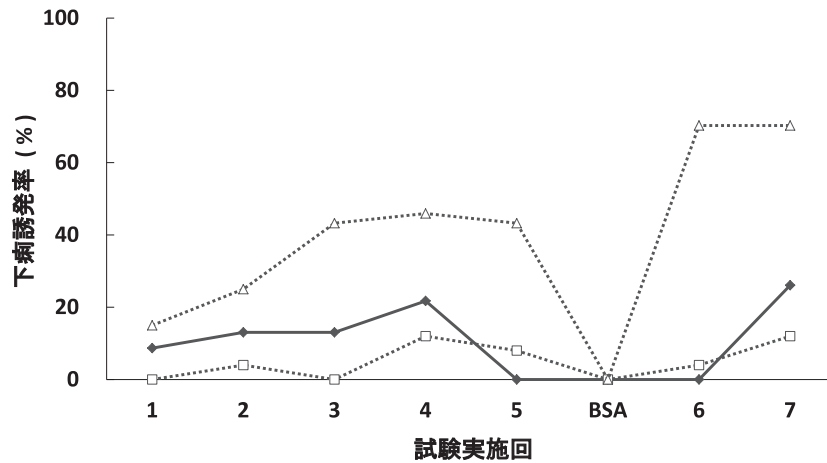


図 3 仔マウス OVA 特異的下痢誘発率

仔マウスを離乳後 OVA で感作した後、計 7 回 OVA を胃内強制投与する下痢誘発試験を行い、下痢誘発率を求めた。5 回目と 6 回目の間には OVA の代わりに BSA を投与した。◆: AE 仔 ($n = 23$), □: E 仔 ($n = 26$), △: M 仔 ($n = 37$)。

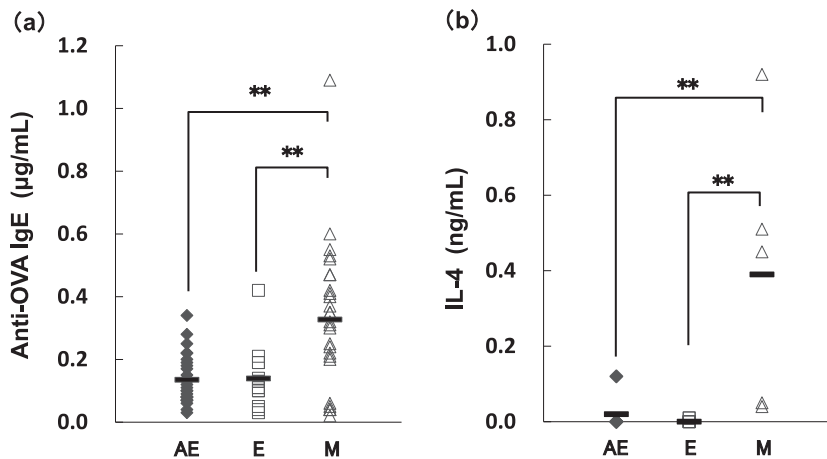


図 4 仔マウスにおける Th2 応答

下痢誘発試験終了後、血清中 OVA 特異的 IgE をサンドイッチ ELISA で測定し、結果は IgE 相当量で表した (a)。AE 仔 (◆, $n = 27$), E 仔 (□, $n = 14$), M 仔 (△, $n = 27$)。さらに、仔マウスから脾臓を摘出して培養し、OVA 刺激下で産生された IL-4 を解析した (b)。AE 仔 ($n = 9$), E 仔 ($n = 7$), M 仔 ($n = 5$)。両者とも統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値, ** $p < 0.01$ 。

がって症状の悪化 (軟便から水様便), 下痢誘発率の上昇が見られた。つまり、寛容誘導は授乳時に成立していることになる。さらに、この下痢誘発率の抑制は AE 仔においても観察され、7 回目の下痢誘発試験時には、M 仔で下痢誘発率が 70% に達しているのに対し、E 仔では 12%, AE 仔においても 26% であった。したがって、母親がアレルギー感作を受けていても、乳児において授乳中に母親が摂取したタンパク質に対する経口免疫寛容が誘導されることが示された。また、全 7 回の OVA 投与に加え、途中で BSA を 1 回投与したところ、すべての群において下痢が起こらなかったことから、ここで観察される下痢は OVA 特異的なアレルギー症状であることが確認された。

このモデルにおける下痢症状は、腸管および全身性の免疫応答つまり抗原特異的な抗体やサイトカインの産生

の結果として生じることが明らかにされている¹⁴⁾。そこで、下痢誘発試験終了後に血清中の OVA 特異的 IgE を解析したところ、M 仔に比べて E 仔のみならず AE 仔においても産生が有意に抑制されていた (図 4 (a), $p < 0.01$)。また、各群のマウスから脾臓を摘出し、OVA 刺激下で脾臓細胞を培養して分泌されるサイトカインを解析したところ、IgE 産生を活性化するサイトカインである IL-4 の産生が E 仔、AE 仔において M 仔に比べて有意に抑制されていた (図 4 (b), $p < 0.01$)。一方、IgE 産生を抑制するサイトカインである TGF- β の産生量には群による有意な差は見られなかった (未発表)。したがって、本実験で観察されたアレルギー性下痢の抑制は、IL-4 産生の抑制による IgE 産生の抑制を経て起っている現象であることが判明した。

3. 母乳中の免疫複合体

このマウス食物アレルギーモデル実験系は経口抗原誘導性である。我々は本モデルを用いた先行研究において、母乳中の IgA 免疫複合体 (IgA-IC) が寛容誘導因子として機能していることを報告した¹³⁾。そこで各群の母親から出産 21 日後に採取した母乳中の OVA の IgA-IC および遊離 OVA を定量したところ、OVA の IgA-IC は E、M 母乳と比べて AE 母乳のみで有意に高く (図 5 (a), $p < 0.01$)、遊離 OVA は E 母乳においてのみ有意に高く含まれていた (図 5 (b), $p < 0.01$)。

先行研究では M 母乳と比較して E 母乳では IgA-IC の濃度が有意に高かったが、本研究では有意差は見られなかった。OVA の IgA-IC 定量は固相化抗体に抗 OVA 抗体を用いたサンドイッチ ELISA によって行っており、遊離の OVA が存在する E 母乳では IgA-IC の定量が阻害

され、定量値が低く出ているものと思われる。また、先行研究の E 母には交配時から卵白食を摂取させていたのに対し、本研究では授乳期間のみと OVA 摂取が 3 週間短いため、IgA の誘導が不十分であったことが影響しているものと考えている。

一方 Mosconi *et al.*¹⁵⁾ は、アレルギー感作後経鼻的に抗原暴露を受けた母親の母乳中に含まれる食品タンパク質と IgG の免疫複合体 (IgG-IC) が、仔マウスに経口免疫寛容を誘導し乳児のアレルギー性喘息を予防すると報告している¹⁵⁾。そこで本食物アレルギーモデルの AE 母乳中の OVA に対する IgG1-IC を測定したところ、M、E 母乳と比較して AE 母乳において有意に高い値を示した (図 6, $p < 0.05$)。前述したように、母親の血清中 OVA 特異的 IgG1 が AE 母で有意に亢進していたことから (図 2 (b), $p < 0.01$)、AE 母乳中の OVA に対する IgG1-IC

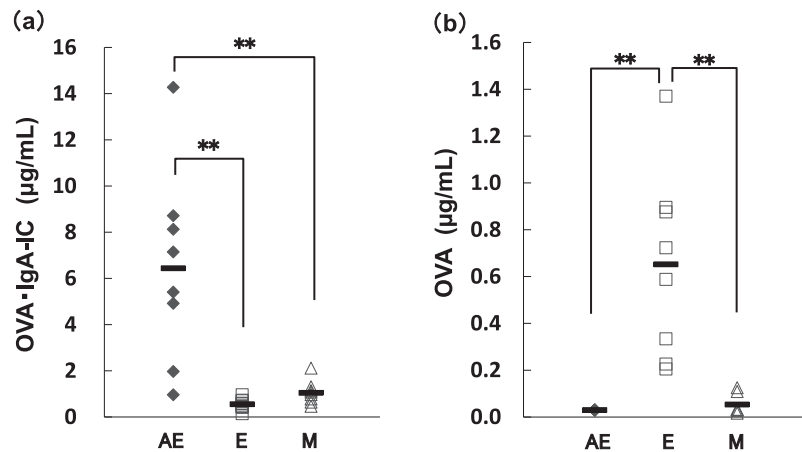


図 5 母乳中の OVA・IgA 免疫複合体と遊離 OVA

出産 21 日後に母マウスから搾乳し、母乳中の OVA・IgA-IC を定量し、結果は IgA 相当量で表した (a)。AE 母乳 (◆, $n = 8$)、E 母乳 (□, $n = 10$)、M 母乳 (△, $n = 11$)。さらに、サンドイッチ ELISA で母乳中の遊離 OVA の定量を行った (b)。AE 母乳 ($n = 6$)、E 母乳 ($n = 8$)、M 母乳 ($n = 7$)。なお、母乳試料数を増やすため、図 2 と同じ条件で仔の下痢実験を実施しない母親を補足飼育し、その母乳を採取・評価した。そのため図 2 とは n 数が異なっている。いずれも統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値, ** $p < 0.01$ 。

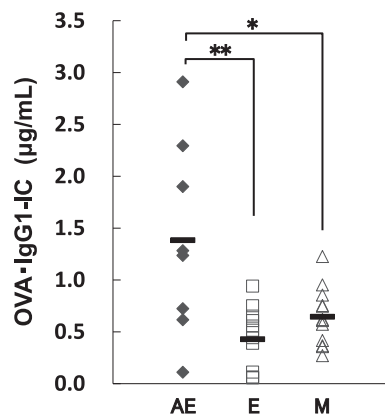


図 6 母乳中の OVA・IgG1 免疫複合体

出産 21 日後に採取した母乳中の OVA・IgG1-IC を定量し、結果は IgG1 相当量で表した。AE 母乳 (◆, $n = 8$)、E 母乳 (□, $n = 12$)、M 母乳 (△, $n = 12$)。統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

の増加は、母親のアレルギー誘導により、IgEに付随して血清中に増加したIgG1が母乳へ移行した可能性が考えられた。

考 察

消化を逃れたタンパク質が粘膜上皮細胞に取り込まれ、その下流に組織化されている腸管免疫系を活性化すると、そのタンパク質特異的な分泌型IgAが合成され、抗原の排除抗体として機能したり経口免疫寛容によってIgE、IgG1産生が抑制される。この系の未熟もしくは破綻が食物アレルギー発症の原因の一つと考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾。我々はこれまでに、正常な母マウスによる母乳哺育を介して、母親の摂食タンパク質に対する経口免疫寛容が仔マウスに誘導され、当該タンパク質に対する食物アレルギーの発症が抑制されることを明らかにしてきた¹³⁾。また、この寛容誘導は、食品、タンパク質、動物の種類にかかわらず普遍的に起こっている自然な現象であった¹²⁾。さらに本論文において、母マウスがアレルギー感作を受けている場合でも母乳哺育により寛容が誘導されることが立証されたことにより、母乳哺育の食物アレルギー予防効果が再確認されるとともに、母親がアレルギー素因を持つハイリスク児においてさえ授乳婦の予防的食物制限は不要であることが明らかとなった。つまり、予防的制限が推奨されないのは「有効性に十分な根拠がない」からという消極的な意味においてではなく、「リスクがあっても食べることに積極的な意味がある」ためと考えて良いのではないだろうか。

このように、母乳哺育は母マウスのアレルギー素因の有無に関係なく仔の食物アレルギーの予防に効果があるが、そのメカニズム（寛容の誘導因子）は素因の有無によって少し異なるのかもしれない。我々は、これまでにヒト、マウス、ラットの母乳中に種々の食物アレルギーがIgA-ICとして存在していることを明らかにし、正常な母ラット、マウスを使った母乳哺育あるいは仮性IgA-ICの直接投与による寛容誘導を証明してきた¹²⁾¹³⁾。IgA-ICがIgA特異的なレセプターを介して抗原のキャリアーとして働き、その結果IgA産生を亢進させ粘膜免疫系を成熟させること¹⁸⁾¹⁹⁾、分泌型IgAに抗原が結合すると小腸プロテアーゼに対する感受性が下がり、細胞のIgAレセプターへの結合性が高まること²⁰⁾が報告されており、正常な母親の母乳中のIgA-ICが乳児の寛容誘導因子として生理的に機能していることを支持している²¹⁾。詳細なメカニズムの検討は今後の課題であるが、IgA-ICのレセプターを介した食物抗原の取り込み効率の向上が腸管免疫系の活性化を惹起し、IL-4やIgE産生の抑制を通じたアレルギー性下痢の抑制、つまり免疫寛容を誘導しているものと思われる。

これに対して、消化管内には胎児性IgGレセプター依存のシャトルが存在し、これを介してIgGが上皮細胞から管腔側に一度分泌され、そこで抗原と結合して形

成されたIgG-ICが、再度細胞内に戻ることによって粘膜免疫系を活性化するというIgG経路が報告されている²²⁾。本論文においても、AE母乳ではIgA-ICとともにIgG1-ICも検知されており、アレルギー感作母による寛容誘導にはこの経路も関与しているかもしれない¹⁵⁾²³⁾²⁴⁾。マウスでは乳腺において胎児性IgGレセプターの発現が明らかにされ、母乳中のIgGの存在とその機能が報告されている²²⁾²⁵⁾。また、IgG1とIgE合成はともにIL-4によって支配されている²⁶⁾。したがって、母マウスへのアレルギー感作でIgEとともに血清中に誘導されたIgG1に抗原が結合して母乳に分泌され、この複合体が仔マウスの腸管の胎児性IgGレセプターで取り込まれて寛容誘導が起こるのではないだろうか。母親がアレルギーの場合、一層仔をアレルギーから守ろうとする機能が働くかもしれないことを考えると、IgA経路に対して補強的となるIgG1-ICによる寛容は生物学的には極めて理にかなった現象と思われる。一方、ヒト乳腺においても胎児性IgGレセプター発現の報告があるが、詳細は不明である²⁷⁾。また、我々の測定結果では、正常ヒト母乳中にOVA特異的IgGおよびその免疫複合体を定量できる場合もあるが、IgAと比較して非常に低いことが判明している（未発表）。今後、ヒトアレルギー母の母乳解析が必要であると思われる。

最後に、正常動物においては食餌による経口免疫寛容によりIgE（IgG1）産生は抑制されるはずであるため、母乳中にIgG1-ICが分泌され寛容誘導に寄与することは辻褄が合わない。つまり、IgG1-IC経路は母親がアレルギーである場合の特殊例であって、正常状態ではIgA-ICが誘導因子として機能しているものと考えられる。したがって、我々は母乳哺育による本来的な寛容が、特別な処置なしに自然な食生活（食習慣）に支えられた哺乳によって乳児に獲得されると考え、「母乳は離乳食のはじまり：食物アレルギー予防の天然の飲むワクチンである」という仮説を提唱している¹³⁾²⁸⁾²⁹⁾。今後は、食事歴、摂取量、個々の母親の健康状態や体質に応じて、ヒトおよび動物の母乳中のIgA-ICがどのように変動するか、また、母乳中のIgA-ICとそれを飲んだ乳児の臨床症状との関連を解析する必要があるだろう。さらに近年、舌下減感作療法（sublingual immunotherapy (SLIT)）や特異的経口耐性誘導（specific oral tolerance induction (SOTI)）が臨床的に導入されてきている³⁰⁾。IgAにせよIgGにせよ、免疫複合体の生物学的重要性が確立できれば、新しいアレルギー治療、ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待できると思われる。

本研究はJSPS 24658128の助成を受けたものである。

文 献

- 1) Johnston M, Landers S, Noble L, Szucs K, Viehmann L (2012) Policy statement: Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* **129**: e827-e841.
- 2) Labbok MH, Clark D, Goldman AS (2004) Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nat Rev Immunol* **4**: 565-72.
- 3) Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D, Trikalinos T, Lau J (2007) Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess* **153**: 1-186.
- 4) Brandtzaeg P (2003) Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* **21**: 3382-8.
- 5) 伊藤節子 (2002) 母乳への食物アレルギーの移行. アレルギー科 **14**, 298-303.
- 6) Kramer MS, Kakuma R (2006) Maternal dietary antigen avoidance during pregnancy or lactation, or both, for preventing or treating atopic disease in the child. *Cochrane Database Syst Rev* **3**: CD000133.
- 7) Vance GH, Lewis SA, Grimshaw KE, Wood PJ, Briggs RA, Thornton CA, Warner JO (2005) Exposure of the fetus and infant to hens' egg ovalbumin via the placenta and breast milk in relation to maternal intake of dietary egg. *Clin Exp Allergy* **35**: 1318-26.
- 8) 宇理須厚雄, 近藤直実監修, 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会作成 (2011) 食物アレルギー診療ガイドライン 2012. 協和企画, 東京.
- 9) Greer FR, Sicherer SH, Burks AW; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Allergy and Immunology (2008) Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* **121**: 183-91.
- 10) 厚生労働科学研究班 (研究代表者: 海老澤元宏) (2015) 食物アレルギーの診療の手引き 2014, p 9-11. <http://www.foodallergy.jp/manual2014.pdf>
- 11) Hirose J, Ito S, Hirata N, Kido S, Kitabatake N, Narita H (2001) Occurrence of the major food allergen, ovomucoid, in human breast milk as an immune complex. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 1438-40.
- 12) 木津久美子, 廣瀬潤子, 本庄 勉, 成田宏史 (2012) 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. 日本栄養・食糧学会誌 **65**, 13-9.
- 13) Kizu K, Matsunaga A, Hirose J, Kimura A, Narita H (2015) Induction of oral tolerance in neonatal mice by transfer of food allergens as IgA-Immune complexes in breast milk. *Food Nutr Sci* **6**: 221-33.
- 14) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME (2003) Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest* **112**: 1666-77.
- 15) Mosconi E, Rekima A, Seitz-Polski B, Kanda A, Fleury S, Tissandie E, Monteiro R, Dombrowicz DD, Julia V, Glaichenhaus N, Verhasselt V (2010) Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal Immunol* **3**: 461-74.
- 16) Brandtzaeg P (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr* **156**: S8-15.
- 17) Berin MC, Mayer L (2013) Can we produce true tolerance in patients with food allergy? *J Allergy Clin Immunol* **131**: 14-22.
- 18) Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Kraehenbuhl JP, Neutra MR (1989) Binding and trans-epithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol* **108**: 1673-85.
- 19) Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR (2002) Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol* **169**: 1844-51.
- 20) Duc M, Johansen FE, Corthésy B (2010) Antigen binding to secretory immunoglobulin A results in decreased sensitivity to intestinal proteases and increased binding to cellular Fc receptors. *J Biol Chem* **285**: 953-60.
- 21) Mantis NJ, Rol N, Corthésy B (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* **4**: 603-11.
- 22) Nakata K, Kobayashi K, Ishikawa Y, Yamamoto M, Funada Y, Kotani Y, Blumberg RS, Karasuyama H, Yoshida M, Nishimura Y (2010) The transfer of maternal antigen-specific IgG regulates the development of allergic airway inflammation early in life in an FcRn-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **395**: 238-43.
- 23) Verhasselt V (2010) Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunol* **3**: 326-33.
- 24) Yamamoto T, Tsubota Y, Kodama T, Kageyama-Yahara N, Kadowaki M (2012) Oral tolerance induced by transfer of food antigens via breast milk of allergic mothers prevents offspring from developing allergic symptoms in a mouse food allergy model. *Clin Dev Immunol* **2012**: 721085.
- 25) Cianga P, Medesan C, Richardson JA, Ghetie V, Ward ES (1999) Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur J Immunol* **29**: 2515-23.
- 26) Siebenkotten G, Esser C, Wabl M, Radbruch A (1992) The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* **22**: 1827-34.
- 27) Cianga P, Cianga C, Cozma L, Ward ES, Carasevici E (2003) The MHC class I related Fc receptor, FcRn, is expressed in the epithelial cells of the human mammary gland. *Hum Immunol* **64**: 1152-9.
- 28) 成田宏史 (2008) 母乳哺育と食物アレルギー: 食物

- アレルギーの治療と管理, 改訂第2版 (小林陽之助, 金子一成監修), p 218-24. 診断と治療社, 東京.
- 29) 成田宏史 (2014) 母乳中の鶏卵アレルギーの存在形態と生物学的役割. 日本食品科学工学会誌 **61**, 450-54.
- 30) Burks AW, Laubach S, Jones SM (2008) Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* **121**: 1344-50.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **69**: 21-28 (2016)

Original Paper

Induction of Oral Immune Tolerance in Infant Mice via Breastfeeding from Allergic and Non-allergic Mothers

Ayu Matsunaga,¹ Kumiko Kizu,² Mao Arita,¹ Junko Hirose,³ and Hiroshi Narita^{*,1}

(Received September 14, 2015; Accepted November 26, 2015)

Summary: Female BALB/c mice were fed cow's milk proteins. After sensitization with ovalbumin and alum, they were bred and fed egg white proteins during lactation. The pups breastfed by them were named Allergy-Egg (AE) group. As controls, Egg (E) group was breastfed by non-sensitized mothers fed egg white proteins during lactation, and Milk (M) group was breastfed by non-sensitized mothers fed milk proteins throughout the experiment. After sensitizing all the pups with ovalbumin and alum, diarrhea associated with experimental Th2 intestinal inflammation was tested by oral administration of ovalbumin. Diarrhea was suppressed in AE and E pups in comparison with M pups. Concomitantly, AE and E pups showed a low level of serum anti-ovalbumin IgE and suppression of ovalbumin-dependent IL-4 synthesis by spleen cells. Immune complexes of ovalbumin IgA and IgG1 were significantly increased in AE breast milk. Thus it was proved that oral tolerance was induced in the pups via breastfeeding even from allergic mothers as well as from non-allergic mothers. Immune complexes in breast milk are suggested to be involved in this process.

Key words: breastfeeding, oral immune tolerance, food allergy, IgA, immune complex

* Corresponding author (E-mail: narita@kyoto-wu.ac.jp)

¹ Kyoto Women's University, Department of Food and Nutrition, 35 Kitahiyoshi-cho, Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto 605-8501, Japan

² Department of Life and Living, Osaka Seikei College, 3-10-62 Aikawa, Higashiyodogawa-ku, Osaka 533-0007, Japan

³ Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassaka-cho, Hikone, Shiga 522-8533, Japan