

0.1%卵白添加食餌による経口免疫療法は、 強制経口投与による治療と同等の症状緩和を誘導した

松 島 麻 鈴¹, 前 田 晃 宏¹, 高 橋 享 子^{*,1}

(2018年7月13日受付; 2018年9月18日受理)

要旨: 0.1%抗原添加食餌による経口免疫療法 (OIT) が, 強制経口投与 (ゾンデ) による OIT と同等の症状緩和及び免疫寛容を誘導するか検討した。マウスへの卵白アレルギー誘導は, 卵白混合水酸化アルミニウムゲルの腹腔感作と卵白経口惹起で行った。惹起されたマウスを3群 (非治療群, ゾンデ群, 食餌群) に分け, 非感作マウスも用意した。治療期間中は4週間とし, 食餌群は0.1%卵白含有20%カゼイン食を, 他の群は20%カゼイン食を与えた。また, ゾンデ群は30 mg/mL卵白溶液を, 他の群はリン酸緩衝生理食塩水を各々100 μ L 毎日強制経口投与した。ゾンデ群と食餌群の卵白腹腔負荷試験後の直腸温低下は, 非治療群より抑制された。さらに, ゾンデ群と食餌群の血漿中オボアルブミン特異 IgE 濃度とオボムコイド特異 IgE 価は, 非治療群より低値を示した。しかし, ゾンデ群と食餌群とでこれらの指標に差はなかった。したがって, 1日の抗原摂取量が少量かつ同等であれば, 持続的摂取は単回摂取と同等の治療効果を有することが示唆された。

キーワード: 卵白アレルギー, 経口免疫療法, IgE, IgA

食物アレルギー児は増加傾向である¹⁾。乳児・幼児早期の即時型食物アレルギーの主な原因食物は鶏卵である¹⁾。食物アレルギーの治療法は, 「正しい診断に基づいた必要最小限の原因食物の除去」を原則とし, 完全除去食が行われている¹⁾。近年, 食物アレルギーの治療法として, 経口免疫療法 (OIT) が注目されている¹⁾。OIT は, 「自然経過では早期に耐性獲得が期待できない症例に対して, 事前の食物経口負荷試験で症状誘発閾値を確認した後に原因食品を医師の指導のもとで経口摂取させ, 閾値上昇または減感作状態とした上で, 究極的には耐性獲得を目指す治療法」である¹⁾。OIT の問題点は, 予期せずにアナフィラキシーを引き起こすことがある点や経過中の症状誘発は必須である点が挙げられ, 一般診療として推奨されていない¹⁾。抗原投与量や投与期間などは検討されているが, 統一的な OIT 方法は提唱されていない¹⁾。また, 抗原摂取方法と治療効果についての報告もない。

Faria *et al.*²⁾ は, アレルギー感作前の抗原投与方法の違いがアレルギー耐性の獲得に影響を与えることを報告している。Maeta *et al.*³⁾ は, 卵白アレルギーモデルマウスに0.1%卵白添加飼料を4週間与えると, 弱い免疫寛容が誘導できることを報告している。抗原を食餌に混ぜ

る方法は, 1日の抗原摂取量を分割できる点や摂取させる抗原量の調節が容易な点, 抗原の臭いや味を隠せる点などの利点が考えられ, ヒトにおいても有用であると示唆される。しかし, 1日分の抗原量を単回摂取させる従来の方法と比較して, 食餌に混合した方法で同等の寛容効果が得られるかは明らかにされていない。

本研究では, 卵白アレルギーモデルマウスに対して, 一定量の抗原を異なった2種類の投与方法 (単回強制経口投与方法 (ゾンデ群), 随時経口摂取法 (食餌群)) で OIT を実施し, 投与方法の違いが免疫寛容効果に及ぼす影響を検討した。

実 験 方 法

1. 実験材料及び, 卵白アレルギーモデルマウス作製と OIT プロトコル

1.1 実験動物

6週齢 BALB/c 雌マウス (日本クレア (株), 東京) 35匹を室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 60%, 1日12時間サイクル (明サイクル8時から20時) の条件下で飼育した。また, OIT 期間はマウスを個別飼育用プラスチックケージに移し, 体重及び飼料摂取量を毎日測定した。20%カゼイン食を基本飼料 (表1) とし, 水及び飼料は自由摂食とした。

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: taka@mukogawa-u.ac.jp)

¹ 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 (663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

表1 飼料組成[†]

	20%カゼイン食	0.1%卵白添加食
	g/kg of diet	
ミルクカゼイン	200	199
卵白粉末 [‡]	0	1
DL-メチオニン	2	2
糊化コーンスターチ	453	453
スクロース	200	200
コーン油	50	50
セルロース粉末	50	50
ミネラル混合 (AIN-93G)	35	35
ビタミン混合 (AIN-93)	10	10

[†] ミルクカゼイン, 糊化コーンスターチ, セルロース粉末, AIN-93G ミネラル混合, AIN-93 ビタミン混合は, オリエンタル酵母工業(株)(東京) から購入した。DL-メチオニンおよびコーン油は, 和光純薬工業(大阪) から購入した。スクロースは, 三井製糖(株)(東京) から購入した。

[‡] 卵白粉末は, 生卵白を水で3倍に希釈し1時間混合した後, ガーゼで濾過し凍結乾燥させた。全ての飼料は研究室で作製した。

本実験は, 武庫川女子大学動物実験の承認 (FSN-01-2016-02-A) を得て実施した。

1.2 動物飼料

20%カゼイン食は, ミルクカゼイン (オリエンタル酵母(株), 東京), L-メチオニン (和光純薬工業(株), 大阪), 糊化コーンスターチ (オリエンタル酵母(株)), セルロースパウダー (オリエンタル酵母(株), 東京), AIN-93G ビタミン混合 (オリエンタル酵母(株)), AIN-93 ミネラル混合 (オリエンタル酵母(株)), スクロース (三井製糖(株), 東京) を表1の組成に従って作製した。

卵白粉末は, 卵白の3倍の蒸留水を加え攪拌し, 卵白溶液を作製した³⁾。その卵白溶液を凍結乾燥させ作製した。0.1%卵白添加食は, ミルクカゼインの重量を一部卵白粉末に置き換えて作製した (表1)。

1.3 卵白アレルギーモデルマウス作製と OIT プロトコル

1.3.1 卵白アレルギーモデルマウスの作製 実験プロトコルは, 図1Aに示した。卵白アレルギーモデルマウスは, Maeta *et al.*³⁾の方法に従って作製された。感作群 (28匹) に, 1 mg/mL 卵白溶液と水酸化アルミニウムゲル (Imject™ Alum Adjuvant, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を等量ずつ混合した溶液を 200 μ L 腹腔投与した。非感作群 (7匹) に, 生理食塩水と水酸化アルミニウムゲルを等量ずつ混合した溶液を 200 μ L 腹腔投与した。腹腔感作は, 2週間おきに2回 (Day -15, -29) 実施した。Day -10に, イソフルラン麻酔下で頰部静脈より採血した。Day -8, -6, -4に, 全てのマウスに 100 mg/mL 卵白溶液を 200 μ L 強制経口投与し, アレルギー惹起を行った。アレルギー誘導は, Day -10の血漿中オボアルブミン特異 IgE (OVA-IgE) 濃度と OIT 前の卵白経口負荷試験 (Day -1)

で確認した。

1.3.2 0.1%卵白添加飼料による OIT と, 卵白強制経口投与による OIT 非感作群7匹及び, 経口負荷試験で顕著な症状誘発が認められた感作群21匹を使用した。感作群は, 非治療群・食餌群・ゾンデ群の3群に分けられた (Day -1)。

非感作群及び非治療群, ゾンデ群は20%カゼイン食で4週間飼育し, 食餌群は0.1%卵白添加食を与えた。ゾンデ群に 100 μ L の 30 mg/mL に調整した卵白溶液を, 非感作群及び非治療群, 食餌群に 100 μ L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を毎日強制経口投与した。OIT 期間は, 4週間 (Day 1-28) とした。OIT 期間の中間 (Day 14) で, 頰部静脈採血を行った。その翌日に経口負荷試験を行った (Day 15)。OIT 期間終了後に, 卵白腹腔負荷試験 (Day 29) と卵白経口負荷試験 (Day 30) を行った。試験食終了後1週間以内に解剖を行った。解剖前日の夜からマウスは12時間絶食させ, 当日朝にイソフルラン麻酔下で全血と脾臓, 小腸を採取した (Day 32: 非感作群と非治療群, Day 34: ゾンデ群と食餌群)。糞便は, Day 14 と Day 29 に回収した。

2. アレルギー重症度及びアレルギー関連バイオマーカーの測定

2.1 卵白経口負荷試験, 卵白腹腔負荷試験

経口負荷試験では消化管を介した即時型反応の重症度を測定し, 抗原に対する局所反応性を検討した。卵白経口負荷試験には 200 mg/mL 卵白溶液を使用した。経口負荷試験の前日の夜から当日の朝まで, マウスは12時間絶食させた。当日の朝に直腸温測定 (KN-91-AD-1687-M, (株)夏目製作所, 東京) し, その後マウスに 200 μ L ずつ卵白溶液を強制経口投与しアレルギー症状を誘発させた。投与15分後に再度直腸温を測定し, 投

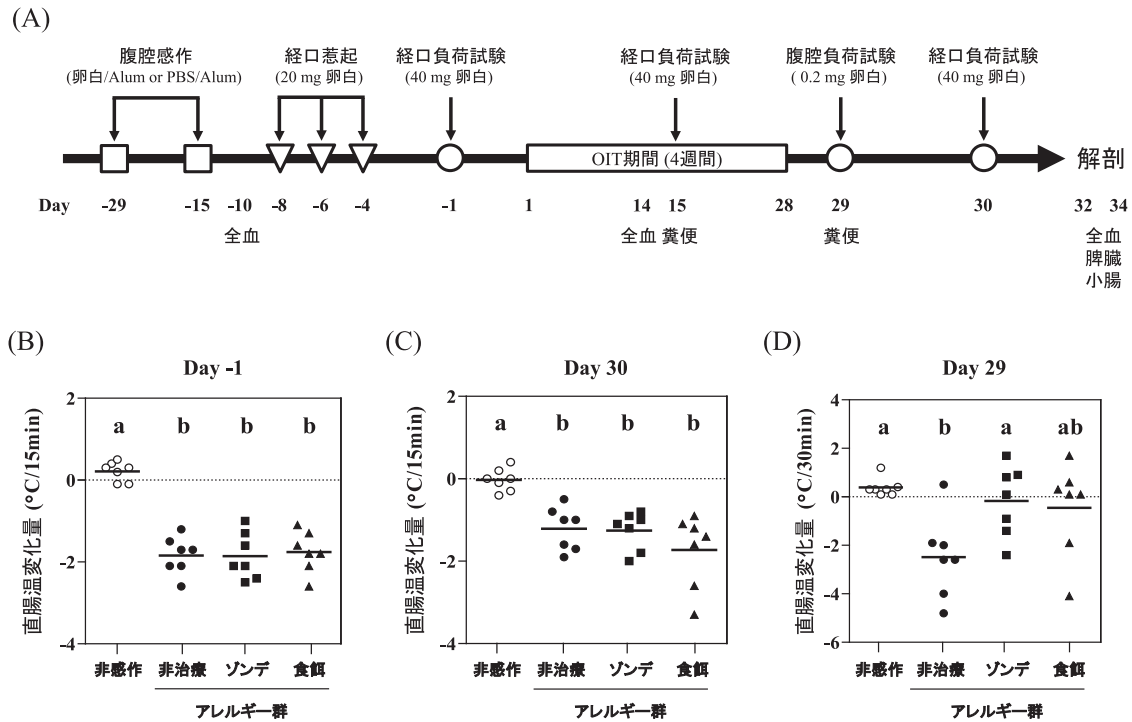


図1 実験プロトコル (A) 及び卵白経口負荷試験 (B; Day -1 (OIT 開始前), C; Day 30 (OIT 終了後)) 及び腹腔負荷試験 (D) による直腸温変化
負荷試験のデータ (B-D) は、個々の卵白溶液投与前直腸温からの変化量と平均値で記載した。有意差検定は一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用い、有意水準は p 値で5%未満とした。各群間の有意差は、異なるアルファベット (a, b) で表した。

与前直腸温からの変化量を求めた。

腹腔負荷試験では消化管を介さない即時型反応の重症度を測定し、抗原に対する全身反応性を検討した。卵白腹腔負荷試験には、フィルター滅菌済み 2 mg/mL 卵白溶液を使用した。当日の朝に直腸温測定し、その後マウスに 100 μ L ずつ卵白溶液を腹腔投与しアレルギー症状を誘発させた。投与 30 分後に再度直腸温を測定し、投与前直腸温からの変化量を求めた。

2.2 血漿抗原特異抗体価測定 (IgE, IgA, IgG1, IgG2a)

全血をエチレンジアミン四酢酸 2Na 入り 1.5 mL チューブに回収し、遠心分離 (860 $\times g$, 4°C, 30 分間) し血漿を得た。

抗原特異 IgE 及び IgA は、Capture ELISA によって測定された³⁾⁴⁾。本研究では、OVA (Grade VI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 及びエタノール沈殿法によって卵白から精製したオボムコイド (OM) を抗原として使用した⁵⁾。さらに、OVA と OM のビオチン化は、ビオチン化キット (Sulfo-OSu, (株)同人化学研究所, 熊本) を用いた。

96 ウェル平底 ELISA マイクロプレート (Nunc-Immuno Maxisorp, Thermo Fisher Scientific Inc.) に、2 μ g/mL の Goat anti-mouse IgE antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) または、Goat anti mouse IgA antibody (Bethyl Laboratories) を播種し、一晚 4°C で吸

着させた。OVA-IgE 及び OVA 特異 IgA (OVA-IgA) は、ビオチン化 OVA と horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (Abcam, Cambridge, UK) で検出した。HRP 基質に α -フェニレンジアミン (OPD, ナカライテスク (株), 京都) を使用した。Mouse anti-OVA IgE monoclonal antibody E-G5 (Chondrex Inc., Redmond, WA, USA) 及び Mouse anti-OVA IgA monoclonal antibody 2G12E12 (Chondrex, Inc.) を用いて濃度を決定した。OM 特異 IgE (OM-IgE) 価及び IgA (OM-IgA) 価をビオチン化 OM と HRP-conjugated streptavidin を用いて検出した。OM-IgE 価及び OM-IgA 価では HRP 基質に OPD を使用し、結果は吸光度 492 nm で示した。抗原特異 IgG1 及び IgG2a は、間接 ELISA で測定した。抗原は OVA と OM を使用し、濃度は特異 IgG1 では 1 μ g/mL で、特異 IgG2a では 10 μ g/mL で行った。HRP 抗体は、Goat anti-mouse IgG1 HRP-conjugated (Bethyl Laboratories) または、Goat anti-mouse IgG2a HRP-conjugated (Bethyl Laboratories) を使用した。OVA 特異 IgG1 (OVA-IgG1) 価及び OM 特異 IgG1 (OM-IgG1) 価では HRP 基質に 2,2'-アジノ-ビス ニアンモニウム塩 (ABTS, 和光純薬工業 (株)) を使用し、OVA 特異 IgG2a (OVA-IgG2a) 価及び OM 特異 IgG2a (OM-IgG2a) 価では OPD を使用した。これらの結果は、吸光度 (IgG1 : 415 nm, IgG2a : 492 nm) で示した。

2.3 糞便及び小腸のIgA抽出方法

糞便は、12時間サイクル（前日20時-当日8時）で行い1ゲージ1匹ごとに採取された。採取された糞便は速やかに凍結乾燥され、乾燥糞便重量を測定した。糞便中IgAの抽出は、Jiménez-Saiz *et al.*⁶⁾の方法に従った。初めに、乾燥重量の7倍量のPBSを加え60分間懸濁した。懸濁液を遠心分離（1,600×g, 4℃, 15分間）し、上清を回収後、さらに遠心分離（9,500×g, 4℃, 10分間）した。上清は0.8 µm フィルター（DISMIC-25cs, 東洋濾紙(株), 東京）で濾過し、糞便抽出液として-40℃の冷凍庫で保存した。

小腸の処理と抽出は、Leonard *et al.*⁷⁾の方法に従った。初めに、4 mLのプロテアーゼインヒビター（Protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland）を含む滅菌PBSで小腸内に通し洗浄した。小腸洗浄液及び内容物を全て絞り出した後に小腸重量を測定した。小腸洗浄液及び内容物は、遠心分離（1,600×g, 4℃, 15分間）され、その上清を小腸洗浄液とした。洗浄後の小腸に5倍量のプロテアーゼインヒビターを含む滅菌PBSを加え、氷中でホモジナイズ（T25 digital ULTRA-TURRAX®, IKA®-Werke GmbH & CO, Staufen im Breisgau, Germany）した。小腸ホモジネイトを、遠心分離（25,000×g, 4℃, 30分間）し、上清を回収し測定試料とした。

2.4 糞便及び小腸洗浄液、小腸ホモジネイト中OVA-IgA濃度測定

各試料のOVA-IgA濃度は、間接ELISAで測定された。吸着抗体は、10 µg/mL OVA (Sigma-Aldrich)を使用した。HRP抗体にGoat anti mouse IgA-HRP (Bethyl Laboratories)を、HRP基質にABTSを使用した。標準は、Mouse anti-OVA IgA monoclonal antibody 2G12E12 (Chondrex, Inc.)を用いた。

2.5 糞便中OVA特異IgA免疫複合体価（OVA-IgA IC）測定

Hirose *et al.*⁸⁾の報告より、糞便中OVA-IgAの一部はOVA-IgAの可変領域にOVAが結合したOVA-IgA ICを形成していることが想定された。そこで、糞便中OVA-IgA IC価は、サンドイッチELISAで測定した。96ウェル平底ELISAマイクロプレート（Nunc-Immuno Maxisorp, Thermo Fisher Scientific Inc）に2 µg/mLに調製したGoat anti mouse IgA antibody (Bethyl Laboratories)を播種し、一晚4℃で吸着させた。OVA-IgA ICはOVAを保持しているため、二次抗体としてRabbit anti OVA IgG (Sigma-Aldrich)を使用しOVAを検出した。HRP抗体にはGoat anti Rabbit IgG-HRP (Thermo Fisher Scientific Inc.)を、OPDをHRP基質に使用した。OVA-IgA IC価は、吸光度（492 nm）で結果を示した。

2.6 脾リンパ球培養上清中サイトカイン測定

脾臓からのリンパ球の回収及び培養方法はMaeta *et al.*³⁾の方法に従った。マウスから採取した脾臓をハンク

ス溶液（0.98% Hank's solution（日新製薬(株), 東京）, 0.46% HEPES（(株)同仁化学研究所）, 0.2% NaHCO₃, 1.0% penicillin-streptomycin（ナカライテスク(株)）, 10% fetal bovine serum（Corning Inc, New York, NY, USA））でホモジナイズし、Lympholyte(R)-M Cell Separation Media（Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada）でリンパ球を回収した。脾リンパ球はRPMI1640完全培地（1% RPMI-1640（日水製薬(株)）, 0.23% NaHCO₃, 1.0% penicillin-streptomycin, 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L L-glutamine（ナカライテスク(株)）, 1 × 2-mercaptoethanol（和光純薬工業(株)））で懸濁し、24ウェル細胞培養プレート（IWAKI(株), 東京）に1.5 × 10⁷ 個/ウェルずつ播種した。脾リンパ球は2 mg 卵白/ウェルで刺激し、5% CO₂ 下で48時間培養した。培養上清は、測定まで-40℃で保存した。培養上清中インターフェロンγ（IFN-γ）及びインターロイキン4（IL-4）濃度は、市販ELISAキット（BioLegend, San Diego, CA, USA）を使用した。

3. 統計処理

データは平均±標準誤差で示した⁹⁾。統計処理は、一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用いて解析し、有意水準は5%未満とした。解析ソフトはGraph Pad Prism version 5.0（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いた。

実験結果

1. 卵白アレルギーモデルマウスにおけるゾンデまたは食餌によるOIT効果

初めに、OITによる体重変化及び食餌量の影響を調べた。その結果、OIT期間中の体重変化量と1日あたりの平均飼料摂取量において、全ての群で差は認められなかった（表2）。OIT開始前の群分け時（Day -1）の卵白経口負荷試験において、アレルギー群間で直腸温変化に有意差は認められなかった（図1B）。OIT中間時の卵白経口負荷試験（Day 15）において、ゾンデ群と食餌群共に非治療群との間に有意差は認められなかった（表3）。さらに、OIT終了後（Day 30）の卵白経口負荷試験の直腸温変化においても、ゾンデ群と食餌群共に非治療群との間に有意差は認められなかった（図1C）。

OIT終了後に実施した卵白腹腔負荷試験（Day 29）において、ゾンデ群の直腸温低下は非治療群より有意に抑制され、食餌群の直腸温低下は抑制傾向を示した（図1D）。さらに、ゾンデ群及び食餌群の直腸温変化量は、非感作群との間に有意差は認められなかった（図1D）。

2. ゾンデまたは食餌によるOITが血漿抗原特異抗体価と脾臓リンパ球サイトカイン産生に及ぼす影響

中間時（Day 14）の血漿中OVA-IgE濃度及びOM-IgE価は、アレルギー群間で有意差は認められなかった（表3）。一方、OVA-IgA濃度及びOM-IgA価において、ゾンデ群と食餌群共に非治療群と比較して高値を示した

表2 OIT 期間中の体重と体重変化量, 1 日あたりの平均飼料摂取量[†]

	非感作群	アレルギー群			p 値 [‡]
		非治療群	ゾンデ群	食餌群	
OIT 開始時体重 (Day 1) (g)	23.2±0.29	23.4±0.59	23.1±0.52	23.6±0.53	N.S.
OIT 終了時体重 (Day 28) (g)	23.9±0.50	22.2±0.97	23.0±0.62	22.4±0.83	N.S.
OIT 期間中の体重変化量 (g)	0.67±0.37	-1.23±1.08	-0.08±0.26	-1.15±0.92	N.S.
1 日当たりの平均飼料摂取量 (g)	3.00±0.15	2.78±0.13	2.76±0.15	2.54±0.14	N.S.

[†] データは, 平均値±標準誤差で示した (N=6-7)。

[‡] 有意差検定は一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用い, 有意水準は p 値で 5% 未満とした。N.S.: not significant。

表3 OIT 中間時における卵白経口負荷試験後の直腸温変化と血漿中抗原特異抗体価, 糞便中 OVA-IgA 及び OVA-IgA IC[†]

	非感作群	アレルギー群			p 値 [‡]
		非治療群	ゾンデ群	食餌群	
卵白経口負荷試験					
直腸温変化 (°C / 15 min)	-0.4±0.3 ^a	-2.6±0.2 ^{bc}	-1.9±0.2 ^b	-2.8±0.2 ^c	<0.001
血漿中 OVA 特異抗体価					
OVA-IgE (μg/mL)	3.30±0.72 ^b	26.2±3.9 ^a	36.5±6.3 ^a	32.6±3.2 ^a	<0.001
OVA-IgA (μg/mL)	0.255±0.039 ^b	26.5±5.6 ^{ab}	43.9±11.0 ^a	56.6±11.8 ^a	0.002
OVA-IgG1 (Abs 405 nm)	0.001±0.001 ^c	0.214±0.018 ^b	0.347±0.033 ^a	0.230±0.039 ^b	<0.001
OVA-IgG2a (Abs 492 nm)	0.159±0.055 ^b	0.540±0.091 ^a	0.693±0.154 ^a	0.341±0.059 ^{ab}	<0.001
血漿中 OM 特異抗体価					
OM-IgE (Abs 492 nm)	0.007±0.003 ^b	0.171±0.031 ^a	0.221±0.034 ^a	0.248±0.009 ^a	<0.001
OM-IgA (Abs 492 nm)	0.000±0.000 ^b	0.073±0.012 ^b	0.390±0.070 ^a	0.279±0.039 ^a	<0.001
OM-IgG1 (Abs 405 nm)	0.002±0.001 ^c	0.221±0.075 ^b	0.451±0.114 ^a	0.275±0.123 ^b	<0.001
OM-IgG2a (Abs 492 nm)	0.003±0.002 ^b	0.344±0.073 ^a	0.495±0.123 ^a	0.212±0.067 ^{ab}	<0.001
糞便中 OVA 特異抗体価					
OVA-IgA (μg/g 乾燥糞便)	0.014±0.002 ^b	17.2±3.0 ^a	18.8±3.9 ^a	8.33±3.05 ^{ab}	<0.001
OVA-IgA IC (Abs 492 nm)	0.000±0.000 ^b	0.008±0.005 ^b	0.324±0.070 ^b	1.649±0.191 ^a	<0.001

[†] データは, 平均値±標準誤差で記載した (N=6-7)。卵白経口負荷試験の結果は, 卵白溶液投与前直腸温からの変化量で示した。血漿中 OVA-IgE と OVA-IgA 及び糞便中 OVA-IgA は濃度で結果を表記した。その他の抗体価は吸光度 (405 nm または 492 nm) で表した。血漿の希釈倍率は, OVA-IgG1 で 50,000 倍, OVA-IgG2a で 1,000 倍, OM-IgE と OM-IgA で 50 倍, OM-IgG1 で 10,000 倍, OM-IgG2a で 250 倍とした。糞便抽出液の希釈倍率は, OVA-IgA IC で 10 倍希釈とした。HRP 反応時間は, OVA-IgG1 と OM-IgE, OM-IgA, OM-IgG2a で 10 分間, OVA-IgG2a と OM-IgG1 で 6 分間, OVA-IgA IC で 5 分間とした。

[‡] 有意差検定は一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用い, 有意水準は p 値で 5% 未満とした。各群間の有意差は, 異なるアルファベット (a, b, c) で表した。

(表3)。また, ゾンデ群の OVA-IgG1 価及び OM-IgG1 価は, 他の群よりも有意に高値を示した (表3)。それに反して, 食餌群の OVA-IgG2a 価及び OM-IgG2a 価は, 非治療群とゾンデ群と比較して低値傾向であった。

解剖時の血漿中 OVA-IgE 濃度において, ゾンデ群は非治療群より低値傾向を示し, 食餌群は非治療群より有意な低値を示した (表4)。さらに, OM-IgE 価では, ゾンデ群と食餌群共に非治療群と比較して有意に低値であった (表4)。OVA-IgA 濃度及び OM-IgA 価は, アレルギー群間で有意差は認められなかった (図2A, 表4)。食餌群の OVA-IgG2a 価と OM-IgG1 価, OM-IgG2a 価は, 非治療群よりも有意に低値を示した (表4)。一方, ゾンデ群では, OM-IgG2a 価のみ非治療群と比較して

低値傾向を示した (表4)。

抗原存在下で脾臓リンパ球を培養し, 産生されるサイトカインを測定することで脾臓リンパ球の分化状況を推定できる¹⁰⁾。本研究では, ヘルパーT1 細胞 (T_H1) 由来のサイトカインとして IFN-γ を, ヘルパーT2 細胞 (T_H2) 由来のサイトカインとして IL-4 を測定した。また, これらのサイトカインの比率 (IFN-γ/IL-4) は, T_H1/T_H2 バランスを反映する指標となる。培養上清中 IFN-γ と IL-4 濃度及び IFN-γ/IL-4 比率において, アレルギー群間で有意差は認められなかった (表5)。

3. ゾンデまたは食餌による OIT が腸管内 OVA-IgA 及び OVA-IgA IC 産生に及ぼす影響

小腸ホモジネイト中 OVA-IgA 濃度は, 食餌群は非治

表4 解剖時の血漿中 OVA 特異抗体価 (IgE, IgG1, IgG2a) 及び OM 特異抗体価 (IgE, IgA, IgG1, IgG2a)[†]

	非感作群	アレルギー群			<i>p</i> 値 [‡]
		非治療群	ゾンデ群	食餌群	
血漿中 OVA 特異抗体価					
OVA-IgE (μg/mL)	2.15 ± 0.24 ^c	94.7 ± 9.0 ^a	73.3 ± 6.8 ^{ab}	53.3 ± 10.2 ^b	<0.001
OVA-IgG1 (Abs 405 nm)	0.001 ± 0.001 ^b	0.355 ± 0.057 ^a	0.392 ± 0.028 ^a	0.257 ± 0.046 ^a	<0.001
OVA-IgG2a (Abs 492 nm)	0.011 ± 0.005 ^b	0.469 ± 0.075 ^a	0.437 ± 0.078 ^a	0.182 ± 0.029 ^b	<0.001
血漿中 OM 特異抗体価					
OM-IgE (Abs 492 nm)	0.000 ± 0.000 ^c	0.461 ± 0.036 ^a	0.363 ± 0.058 ^b	0.357 ± 0.026 ^b	<0.001
OM-IgA (Abs 492 nm)	0.002 ± 0.002 ^b	0.622 ± 0.134 ^a	0.645 ± 0.074 ^a	0.487 ± 0.067 ^a	<0.001
OM-IgG1 (Abs 405 nm)	0.004 ± 0.001 ^c	0.338 ± 0.054 ^a	0.377 ± 0.022 ^a	0.162 ± 0.027 ^b	<0.001
OM-IgG2a (Abs 492 nm)	0.002 ± 0.001 ^b	0.950 ± 0.279 ^a	0.445 ± 0.091 ^{ab}	0.165 ± 0.046 ^b	<0.001

[†]データは平均 $\pm$ 標準誤差で記載した ($N=6-7$)。また、OVA-IgE のみ濃度 ($\mu\text{g/mL}$) で、それ以外の抗体価は吸光度 (405 nm または 492 nm) で示した。血漿の希釈倍率は、OVA-IgG1 で 50,000 倍、OVA-IgG2a と OM-IgG1 で 10,000 倍、OM-IgE と OM-IgA で 50 倍、OM-IgG2a で 500 倍とした。HRP 反応時間は、OVA-IgG1 と OM-IgG2a で 10 分間、OVA-IgG2a で 15 分間、OM-IgE と OM-IgA で 7 分間、OM-IgG1 で 5 分間とした。

[‡]有意差検定は一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用い、有意水準は p 値で 5% 未満とした。各群間の有意差は、異なるアルファベット (a, b, c) で表した。

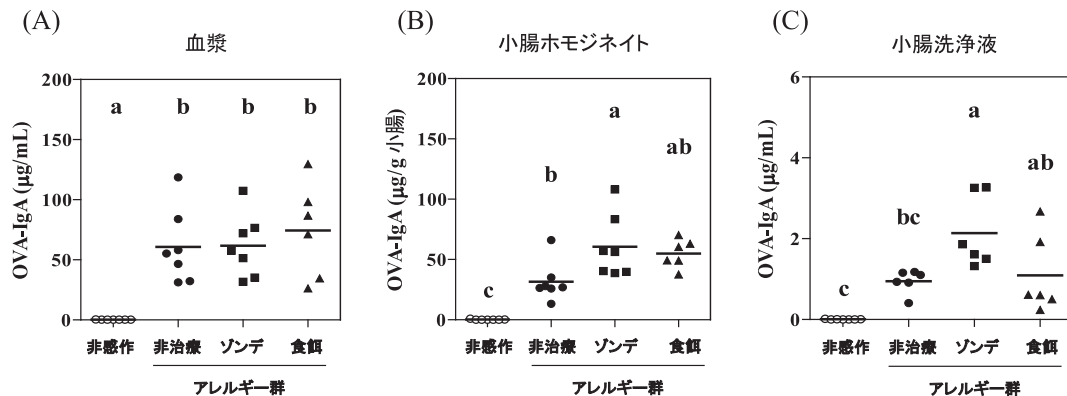


図2 解剖時の血漿中 OVA-IgA 濃度 (A) 及び、小腸ホモジネイト中 OVA-IgA 濃度 (B)、小腸洗浄液中 OVA-IgA 濃度 (C)

データは、個々の OVA-IgA 濃度と平均値で記載した。有意差検定は一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用い、有意水準は p 値で 5% 未満とした。各群間の有意差は、異なるアルファベット (a, b, c) で表した。

療群より高値傾向を示し、ゾンデ群は非治療群より有意な高値を示した (図 2B)。また、小腸洗浄液中 OVA-IgA 濃度は、食餌群と非治療群は同程度であったが、ゾンデ群は非治療群よりも有意に高値であった (図 2C)。

中間時 (Day 15) の糞便中 OVA-IgA 濃度は、ゾンデ群と非治療群は同程度であったが、食餌群は非治療群よりも低値傾向であった (表 3)。しかし、食餌群の糞便中 OVA-IgA IC 価は、ゾンデ群と非治療群より有意に高値であった (表 3)。OIT 終了時 (Day 29) の糞便中 OVA-IgA 濃度は、アレルギー群間で有意差は認められなかった (図 3A)。一方、OIT 終了時 (Day 29) の糞便中 OVA-IgA IC 価は、ゾンデ群と食餌群共に非治療群と比較して有意に高値であった (図 3B)。さらに、食餌群はゾンデ群よりも有意に高値を示した (図 3B)。

考 察

OIT は食物アレルギーの治療法として様々な施設で研究されているが、統一的な治療方法は提唱されていない¹⁾。動物モデルにおいて、Faria *et al.*²⁾ はアレルギー感作前の抗原投与方法の違いがアレルギー耐性の獲得に影響することを報告している。そこで本研究は、卵白アレルギーモデルマウスを用いて、抗原投与方法の違いが OIT 治療効果に及ぼす影響を検討した。

本研究において、OIT 終了後の卵白経口負荷試験における直腸温低下はアレルギー群間で差は認められなかったが、卵白腹腔負荷試験における直腸温低下はゾンデ群及び食餌群で非治療群より抑制された。食餌群の平均食餌摂取量は 2.5 g/日であった。即ち、食餌群の卵白摂取量は 2.5 mg/日で、ゾンデ群 (3 mg/日) よりも少量となっ

表5 脾臓リンパ球培養上清中 IFN- γ と IL-4 濃度及び IFN- γ /IL-4 比率[†]

	アレルギー群			<i>p</i> 値 [‡]
	非治療群	ゾンデ群	食餌群	
IFN- γ (pg/mL)	431 $\pm$ 43	287 $\pm$ 63	470 $\pm$ 73	N.S.
IL-4 (pg/mL)	378 $\pm$ 76	218 $\pm$ 57	269 $\pm$ 69	N.S.
IFN- γ /IL-4 比率	1.28 $\pm$ 0.18	1.91 $\pm$ 0.58	2.30 $\pm$ 0.52	N.S.

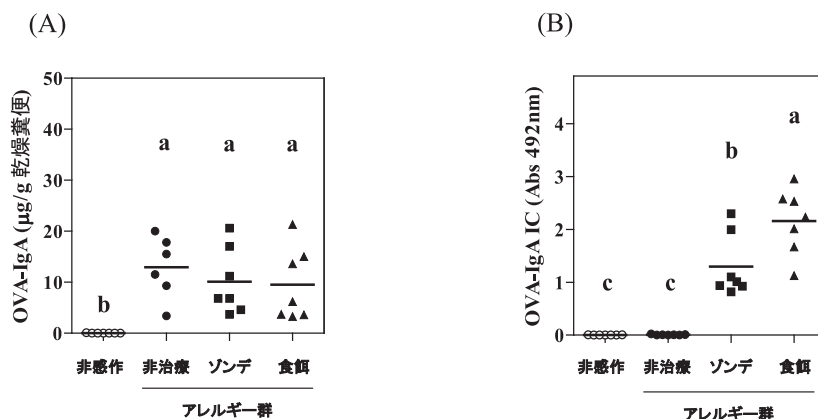
[†] データは平均 $\pm$ 標準誤差で記載した ($N=6-7$)。[‡] 有意差検定は一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用い、有意水準は *p* 値で 5% 未満とした。N.S.: not significant.

図3 OIT 終了時 (Day 29) の糞便中 OVA-IgA 濃度 (A) と OVA-IgA IC 価 (B)

データは、個々の OVA-IgA 濃度及び OVA-IgA IC 価と平均値で記載した。糞便中 OVA-IgA 価 (B) の測定において、サンプルの希釈倍率は 10 倍希釈し、反応時間は 5 分とした。有意差検定は一元配置分散分析とチューキーの多重比較検定を用い、有意水準は *p* 値で 5% 未満とした。各群間の有意差は、異なるアルファベット (a, b, c) で表した。

た。本研究は、食餌による OIT がゾンデによる OIT と同等の症状緩和及び免疫寛容を誘導するかを検討したため、この卵白摂取量の差は結果の解釈に影響しないと判断した。したがって、1 日に摂取する抗原量が同等であれば、摂取方法の違いは OIT 効果に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。村地¹¹⁾は、タンパク質分子の腸管取り込み及び吸収量は、投与量の 0.1-2% 程度であると報告している。Warshaw *et al.*¹²⁾ の報告において、ラットに強制経口投与した³H-牛血清アルブミンは、腸管リンパ液中では投与 1 時間後に最大濃度を示し、門脈血中では投与後 3 時間は経時的な濃度上昇を示した。さらに、経口投与したタンパク質は、投与 6-7 時間後であっても腸管リンパ液や門脈血中に存在することが明らかにされている¹³⁾¹⁴⁾。したがって、強制経口投与された抗原は腸管内に投与後数時間貯留することが推察された。食餌群は、1 回あたりの抗原量は微量であるが常に抗原を摂取した。即ち、どちらの投与方法であっても、抗原は毎日数時間腸管内に存在するため、治療効果に大きな差はなかったと示唆された。また、非治療群において、経口負荷試験により卵白に暴露されているにもかかわらずアレルギー重症度の改善は認められなかった。Faria *et al.*²⁾ は、アレルギー感作前の継続的な抗原投与は、単

回の抗原投与よりもアレルギー耐性を強く誘導したことを報告している。即ち、OIT においても、継続的な抗原摂取が治療効果に影響すると示唆された。

アレルギーモデルマウスを用いた過去の報告⁶⁾¹⁵⁻¹⁷⁾において、寛容誘導に必要な抗原摂取量は約 1-5 mg/日であった。本研究において、一定の OIT 効果が認められたゾンデ群と食餌群の 1 日抗原摂取量は約 3 mg/日であり、過去の報告と同量であった。日本人の食事摂取基準 2015 年度版¹⁸⁾において、3-7 歳児のタンパク質の推奨量は 25-35 g/日である。0.1% 卵白添加食に含まれるタンパク質中の卵白比率は 0.5% であるため、3-7 歳児では 0.125-0.175 g/日と換算できる。Yanagida *et al.*¹⁹⁾ は、鶏卵アレルギー患児が加熱全卵 1/32 個 (卵白量: 6.45 g protein/50 g $\times$ 0.7 $\times$ 1/32 = 0.14 g) を 1 年間とり続けることで、半数弱の患児が加熱全卵 1/2 個を安全に摂取できたと報告している。また我々は、低アレルゲン化卵ボーロ (卵白タンパク質量: 7.9-11 mg/個) を重症鶏卵アレルギー患児 11 名に 4 か月間毎日摂取 (最大摂取個数: 10 個/日) させた結果、7 名で固ゆで卵白閾値の上昇が認められた²⁰⁾。これらの報告と実験結果より、本研究で利用したモデルマウスの結果はヒトにも応用することができると考えられた。本研究で用いた随時摂取法をヒト

の食事に置き換えた場合、1食あたりの抗原摂取量は0.042-0.052 g ((0.125-0.175)/3食)になる。よって、食事を活用したOITは1食に摂取する抗原量が少なく、安全性が高い方法であると期待される。

一般に、食物アレルギーはIgE依存性反応の即時型症状に分類される¹⁾。ヒトOIT研究²¹⁾において、治療効果が認められた群は血清中抗原特異IgE濃度が低下することが報告されている。さらに、Yanagida *et al.*¹⁹⁾²²⁾は、抗原摂取量が少量であるLow-dose OITであっても患者の血清中抗原特異IgE濃度を低下させると報告している。動物実験³⁾⁶⁾¹⁵⁻¹⁷⁾においても、同様の結果が得られている。本研究において、中間時の血漿中OVA-IgE濃度及びOM-IgE価はアレルギー群間で有意差は認められなかったが、解剖時のゾンデ群と食餌群の血漿中OVA-IgE濃度及びOM-IgE価は非治療群と比較して低値を示した。したがって、少量の抗原であっても長期間継続して摂取することでIgE産生に影響を与えることができることと示唆された。

抗原暴露によるI型アレルギー反応は、T_H2細胞とB細胞を活性化する¹⁰⁾。さらに、T_H2細胞はIL-4を産生し、IL-4はB細胞のクラススイッチを誘導し、IgEやIgG1の産生が亢進する¹⁰⁾。また、T_H1細胞はIFN- γ を産生し、IFN- γ はB細胞のクラススイッチを誘導し、IgG2a産生が亢進する¹⁰⁾。さらに、IFN- γ はナイーブT細胞からT_H2細胞への分化を抑制する²³⁾。しかしながら、中間時におけるゾンデ群の血漿中OVA-IgG1価及びOM-IgG1価は、非治療群と食餌群と比較して有意に高値であった。また、解剖時におけるゾンデ群の血漿中OM-IgG1価は、食餌群と比較して有意な高値を示した。卵白アレルギーモデルマウスに対してタンパク質源を全て卵白で供給した卵白食を与えた場合、著しい体重減少と血漿中OVA-IgE及びOVA-IgG1濃度の上昇が認められたと報告されている²⁴⁾²⁵⁾。この現象は、卵白食により強いアレルギー反応が誘発されていると推測される。しかし本研究では、OIT期間中の体重変化量にアレルギー群間で差はなかった(表2)。ゾンデ群において著しい体重減少は認められなかったが、抗原特異IgG1価が他の群よりも高値を示した。Warshaw *et al.*¹²⁾は、タンパク質を強制経口投与すると、そのタンパク質は一過的に腸管リンパ液中へ移行することを報告している。そのため、1日分の抗原を一度に投与したことによって弱い免疫反応が生じていたと考えられる。一方、食餌群においては、著しい体重減少及び抗原特異IgG1価の高値が認められなかった。さらに、食餌群は、ゾンデ群と同等のアレルギー症状の改善が認められた。また、有意差は認められなかったが、ゾンデ群と食餌群のIFN- γ /IL-4比率は非治療群よりも高値であり、T_H2細胞優位の改善傾向が示唆された。したがって、食事を活用したOITはアレルギー反応が誘発しにくく、かつ免疫寛容効果が得られる治療方法であると期待される。

IgAは、粘膜面において生体の防御機能として働く¹⁰⁾。ヒトOIT研究²⁰⁾²⁶⁾において、OIT効果と血清中抗原特異IgA濃度の上昇との間に関連が報告されている。本研究において、中間時におけるゾンデ群と食餌群の血漿中OVA-IgA濃度及びOM-IgA価は、非治療群と比較して高値であった。また、解剖時における血漿中OVA-IgA濃度及びOM-IgA価はアレルギー群間で差は認められなかったが、ゾンデ群と食餌群の小腸ホモジネイト中OVA-IgA濃度は非治療群よりも高値であった。松永ら²⁷⁾は、母乳中の抗原特異IgA IC価がアレルギー耐性の獲得に重要であると報告している。そこで我々は、糞便中OVA-IgA濃度だけではなくOVA-IgA IC価も測定した。その結果、糞便中OVA-IgA濃度はアレルギー群間で有意差は認められなかったが、糞便中OVA-IgA IC価は非治療群よりもゾンデ群と食餌群で高値であった。以上のことから、腸管内の抗原特異IgAやIgA ICが免疫寛容に影響していると示唆された。

本研究より、卵白アレルギーモデルマウスにおいて、1日に摂取する抗原量が少量でかつ同等であれば、持続的摂取は単回摂取と同等の治療効果を有することが明らかとなった。ヒトOIT研究¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁹⁾において、少量の抗原を継続して摂取することで、アレルギー重症度が改善することが報告されている。したがって、少量の抗原を3食に分割するOITは、一度に喫食する抗原量が少なく安全性が高い方法であると期待される。

利益相反

本論文発表内容に関連して申告すべきCOI状態はない。

本研究の一部は、JSPS科研費(課題番号:16K16293)の助成を受けた。

文 献

- 1) 海老澤元宏, 伊藤浩明, 藤澤隆夫監修 (2016) 食物アレルギー診療ガイドライン, 協和企画, 東京.
- 2) Faria AM, Maron R, Ficker SM, Slavin AJ, Spahn T, Weiner HL (2003) Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 20: 135-45.
- 3) Maeta A, Matsushima M, Katahira R, Sakamoto N, Takahashi K (2018) Diets supplemented with 1% egg white induce oral desensitization and immune-tolerance in egg white specific allergic mouse model. *Int Arch Allergy Immunol* 176: 205-14.
- 4) Strouse RJ, Anderson DW, Argentieri DC (1991) Rapid detection of antigen-specific mouse IgE by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay* 12: 113-24.
- 5) Maeta A, Sakamoto Y, Yuki S, Takahashi K (2017) Intake of diet including 1% ovomucoid for 4 weeks induces oral desensitization in ovomucoid specific al-

- lergic mouse model. *J Nutr Sci Vitaminol* **63**: 104-10.
- 6) Jiménez-Saiz R, Rupa P, Mine Y (2011) Immunomodulatory effects of heated ovomucoid-depleted egg white in a BALB/c mouse model of egg allergy. *J Agric Food Chem* **59**: 13195-202.
 - 7) Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC (2012) Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* **129**: 1579-87.
 - 8) 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.
 - 9) Cumming G, Fidler F, Vaux DL (2007) Error bars in experimental biology. *J Cell Biol* **177**: 7-11.
 - 10) Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2011) Cellular and Molecular Immunology, Ed 7. Elsevier Saunders, Philadelphia.
 - 11) 村地 孝 (1981) タンパク質分子の体内とり込みとその意義. 化学と生物 **19**: 37-43.
 - 12) Warshaw AL, Walker WA, Isselbacher KJ (1974) Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology* **66**: 987-92.
 - 13) Katayama K, Fujita T (1972) Studies on biotransformation of elastase. II. Intestinal absorption of ¹³¹I-labelled elastase *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* **288**: 181-9.
 - 14) Williams EW, Hemmings WA (1978) Intestinal uptake and transport of proteins in the adult rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **203**: 177-89.
 - 15) Rupa P, Nakamura S, Katayama S, Mine Y (2014) Attenuation of allergic immune response phenotype by mannosylated egg white in orally induced allergy in BALB/c mice. *J Agric Food Chem* **62**: 9479-87.
 - 16) Yang M, Yang C, Nau F, Pasco M, Juneja LR, Okubo T, Mine Y (2009) Immunomodulatory effects of egg white enzymatic hydrolysates containing immunodominant epitopes in a BALB/c mouse model of egg allergy. *J Agric Food Chem* **57**: 2241-8.
 - 17) Rupa P, Mine Y (2012) Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. *Allergy* **67**: 74-82.
 - 18) 厚生労働省 (2016) 日本人の食事摂取基準 (2015年版), p 150. 医歯薬出版, 東京.
 - 19) Yanagida N, Sato S, Asaumi T, Nagakura K, Ogura K, Ebisawa M (2016) Safety and efficacy of low-dose oral immunotherapy for hen's egg allergy in children. *Int Arch Allergy Immunol* **171**: 265-8.
 - 20) Maeta A, Matsushima M, Muraki N, Asano M, Takaoka Y, Kameda M, Takahashi K (2018) Low-dose oral immunotherapy using low-egg-allergen cookies for severe egg-allergic children reduces allergy severity and affects allergen-specific antibodies in serum. *Int Arch Allergy Immunol* **175**: 70-6.
 - 21) Sugimoto M, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, Kido H (2016) Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol* **27**: 276-82.
 - 22) Yanagida N, Sato S, Asaumi T, Okada Y, Ogura K, Ebisawa M (2015) A single-center, case-control study of low-dose-induction oral immunotherapy with cow's milk. *Int Arch Allergy Immunol* **168**: 131-7.
 - 23) Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S (1993) Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* **150**: 353-60.
 - 24) 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.
 - 25) Batista NV, Pereira RV, Noviello ML, Dourado LP, Perez DA, Foureaux G, Ferreira AJ, Ferreira AV, Cara DC (2014) Prolonged ingestion of ovalbumin diet by sensitized mice improves the metabolic consequences induced by experimental food allergy. *Clin Exp Immunol* **178**: 416-27.
 - 26) Wright BL, Kulis M, Orgel KA, Burks AW, Dawson P, Henning AK, Jones SM, Wood RA, Sicherer SH, Lindblad RW, Stablein D, Leung DY, Vickery BP, Sampson HA (2016) Component-resolved analysis of IgA, IgE, and IgG4 during egg OIT identifies markers associated with sustained unresponsiveness. *Allergy* **25**: 1552-60.
 - 27) 松永安由, 木津久美子, 有田真緒, 廣瀬潤子, 成田宏史 (2016) 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. 日本栄養・食糧学会誌 **69**: 21-8.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **72**: 3–12 (2019)

Original Paper

Oral Immunotherapy Using Diet Supplemented with 0.1% Egg White Ameliorates the Severity of Allergy to an Extent Comparable to Oral Gavage Therapy

Marin Matsushima,¹ Akihiro Maeta,¹ and Kyoko Takahashi^{*,1}

(Received July 13, 2018; Accepted September 18, 2018)

Summary: We examined whether oral immunotherapy (OIT) using a diet supplemented with 0.1% egg white ameliorates the severity of allergy and immunological tolerance to an extent comparable to OIT by oral gavage. Allergy to egg white was induced in mice via peritoneal administration of egg white-mixed aluminum hydroxide gel, and the allergy reaction was induced via oral gavage of egg white. Mice sensitized with egg white were divided into three groups (untreated group, oral gavage group, and diet group), and non-sensitized mice were also prepared. The OIT period lasted 4 weeks. The diet group was fed a 20% casein diet containing 0.1% egg white, and the other groups were fed a 20% casein diet alone. Furthermore, the oral gavage group was forcibly administered 100 μ L of 30 mg/mL egg white solution orally every day, while each of the other groups received 100 μ L of phosphate-buffered saline by daily forced oral gavage. The change in rectal temperature following intraperitoneal food challenge was inhibited to a greater degree in the oral gavage and diet groups than in the untreated group. Moreover, the ovalbumin-specific IgE concentrations and ovomucoid-specific IgE titers in plasma were lower in the oral gavage and diet groups than in the untreated group. However, these antibodies did not differ between the oral gavage and diet groups. These findings suggest that if the amount of allergen ingested per day is small and equivalent, continuous intake of the allergen has therapeutic efficacy similar to that of single oral administration of the allergen.

Key words: egg white allergy, oral immunotherapy, IgE, IgA

* Corresponding author (E-mail: taka@mukogawa-u.ac.jp)

¹ Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan