

アレルギー腸管透過抑制活性の 評価系構築と活性成分

小林 彰子*¹ 渡辺 純*² 田辺 創一*³

*¹こばやし・しょうこ (高崎健康福祉大学 健康福祉学部)

*²わたなべ・じゅん (食品総合研究所 食品機能部)

*³たなべ・そういち (広島大学大学院 生物圏科学研究科)

1. はじめに

近年、食物アレルギー患者が急増し深刻な社会問題となっている。食物アレルギーは食物抗原に対する免疫系の過剰応答であり、アトピー性皮膚炎、喘息、下痢など多様な症状を呈する。これまで行われてきた食物アレルギー対策は大きく分けて2つに分類される。1つは薬剤による対症療法、もう1つはアレルギー除去食療法である。しかし、対症療法で使用される抗ヒスタミン剤やステロイド剤は、副作用が懸念される場合が多い。また、除去食療法では、栄養上問題が生じる。特にアレルギー原因食品には卵や牛乳など高栄養価な物が多く、これらは食物アレルギー患者の集中する年齢層である乳幼児にとって不可欠な食品である。そのため食物アレルギー患者のための食生活設計はかなり難しいものとなっている。このような背景から、アレルギーを起こさない低アレルギー化食品の開発が行われてきた。食物アレルギーの原因となる物質は通常、特有のタンパク質性の成分(アレルギー)である。低アレルギー化食品の基本は、アレルギーの性質を明らかにした上でそれらを特異的に分解あるいは除去し、アレルギーを低減化することである。具体的には、妊婦・授乳中の母親向けに開発された乳清加水分解ミルクや乳の主要なアレルギーを除去した β -ラクトグロブリン除去ミルクなど、また、米のアレルギー画分を酵素処理により分解・除去した低アレルギー化米などが開発されている。

2. 低アレルギー化小麦粉のアレルギー治療・予防効果

著者らのグループは、米および小麦アレルギーを酵素処理により低減化した低アレルギー化米および小麦粉を開発した^{1) 2)}。これらの臨床評価の過程で、摂取によりアレルギーが寛解し、米あるいは小麦粉が食べられるようになる患者が多く見られた。小麦アレルギーは難治性であることから自然寛解以外に、低アレルギー化小麦粉にはアレルギー治療・予防効果があると予測できた。そこで著者らは低アレルギー化小麦粉のアレルギー治療・予防効果について検討を行った。

アレルギーの発症機序は、端的には①食物アレルギーの腸管吸収→②アレルギーのT細胞による認識→③アレルギーに対するIgE抗体の産生→④IgE抗体のマスト細胞上レセプターへの結合→⑤IgE抗体へのアレルギーの結合→⑥マスト細胞の脱顆粒→⑦発症にまとめられる(図1)。我々はこれまでに図1のステップ⑤に対する阻害として低アレルギー化小麦粉のハプテン様作用(低アレルギー化小麦粉中のIgE結合性の低分子ペプチドが患者IgE抗体をブロックすること)について、³⁾ またステップ②および③の抑制作用として、低アレルギー化小麦粉による免疫寛容の誘導について報告してきた⁴⁾。今回新たにアレルギー治療効果の1つとして、①に対する阻害、つまりア

アレルギー発症の第一段階であるアレルギーの腸管透過に対する抑制効果に着目した。食物アレルギーは腸管から吸収されたアレルギーに対する過剰な免疫応答だと考えられている。腸管上皮細胞は高分子化合物の吸収に対するバリア的役割を果たしている。しかし、実際には、健康人であっても食事のタンパク質の $10^{-3} \sim 10^{-4}$ は未分解のまま腸管を透過すると報告されている⁵⁾。さらにアレルギー患者においては腸管での高分子化合物の透過性が上昇しているとの報告がある⁶⁾⁷⁾。そこで食物アレルギー発症の第一段階である腸管からのアレルギー吸収を抑制することができれば、アレルギーの治療・予防に繋がるのが期待された。著者らはアレルギー腸管透過抑制活性を測定する新たな評価系を確立し、数種の活性成分を決定し新知見を得たのでここに報告する。

3. アレルゲンの腸管透過

腸管上皮細胞は、栄養素の吸収機能と同時に、食物や細菌由来の外來性抗原の体内侵入を防ぐバリアとして機能している。食物として摂取したほとんどのタンパク質はアミノ酸やオリゴペプチドに分解されて吸収されるが、一部は抗原性を残したまま体内に侵入する。体内に侵入したアレルギーは経口免疫寛容を主とした腸管の過敏免疫反応を抑えるための仕組みが働き、通常アレルギー発症は抑えられるが、これらの機能が働かない場合で、かつ生体のアレルギーを起こしやすい遺伝的な要因が重なった場合、食物アレルギーが発症すると考えられている。さらに炎症性腸疾患時において腸管関連リンパ組織に由来するインターフェロン γ が小腸粘膜バリアに作用し、食物抗原の腸管吸収を増大させ炎症反応を助長すると報告されている⁸⁾。また、腸管上皮細胞はある特定の食品成分や細菌性毒素の存在下によって細胞間隙がゆるみ、高分子化合物の透過が促進されることが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。食物アレルギーの腸管からの侵入経路は、細胞間隙経路（パラセルラールート）と細胞内経路（トランスセルラールート）に分けられる。パラセルラールートによる透過は腸管の細胞間（タイトジャンクション）の状態に左右される。Caillardら¹¹⁾はヒト結腸癌由来細胞株Caco-2細胞を用いて β -ラクトグロブリンの腸管透過機作の検討を行い、 β -ラクトグロブリンのトランスセルラールートを明らかにした。腸管上皮細胞に取り込まれた β -ラクトグロブリンは、そのほとんどがリソソームによる細胞内消化によって分解され基底膜側へと輸送されるが、少量はトランスサイトーシスを介してインタクトのまま基底膜側へと輸送される。同様なトランスセルラールートはラットやウサギの腸管切片を用いた系においてホースラディッシュペルオキシダーゼや β -ラクトアルブミン等他のタンパク質でも観察された¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。また、代謝阻害剤であるアジ化ナトリウムと2-デオキシグルコースの存在下で阻害されたことからエネルギー依存性の透過機構であることが示唆された¹³⁾。このように、アレルギーの腸管透過とアレルギー疾患には密接な関係があり、それに伴いアレルギーの腸管透過機序に関する研究が

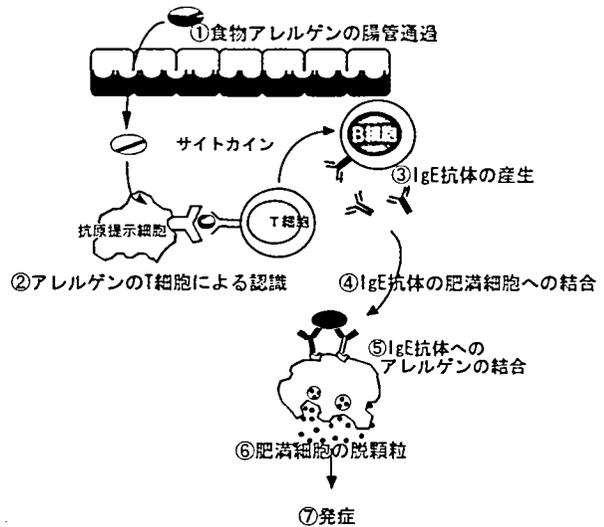


図1 食物アレルギー発症のメカニズム

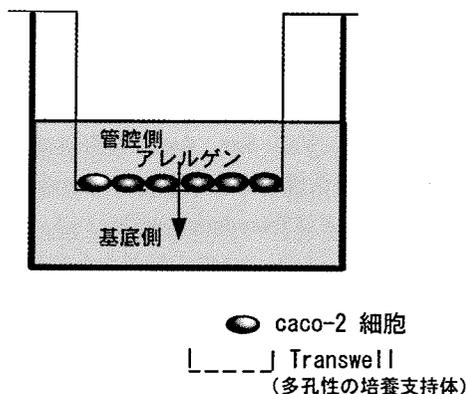


図2 Caco-2細胞を用いた透過試験の模式図

報告されているが、腸管からのアレルギー透過抑制活性に関する研究例はほとんど存在しなかった。

4. アレルギー腸管透過抑制活性の評価系

腸管におけるアレルギー透過抑制活性を測定するため、著者らはCaco-2細胞を用いた評価系を確立した。ヒト結腸癌由来細胞株であるCaco-2は、分化が進むと細胞表面に微絨毛を形成し、栄養素の輸送担体やタイトジャンクションなどを発現することから小腸の上皮細胞のモデルとして広く用いられている^{14) 15)}。活性測定の手順は図2の通りである。Caco-2細胞をトランズウェル内のメンブレンフィルター上で2週間培養し、単層膜を形成させた。単

層膜が形成されたか否かは経上皮電気抵抗 (TEER) を測定することにより判定した。即ちMillicell-ESRを用いてTEERを測定し、TEERが $300\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上となり単層が完成しているものを透過試験に用いた。透過試験では被験化合物の影響をより強く見る目的で、透過試験前日から化合物を細胞培養用培地に添加し前培養を行った。前培養の後、透過試験用緩衝液で2回洗浄してから管腔側および基底膜側の両方に化合物を添加した状態で、管腔側にアレルギーを添加し、30分間に基底膜側へ透過する量を測定した。食物アレルギーの代表として卵白アルブミン (OVA) を用いた。また、OVAの透過量を迅速に測定するため、あらかじめ蛍光標識 (FITC) 化したOVAを用いた。FITC-OVAを用いることにより透過液の蛍光強度を測定するだけで迅速にOVAの透過量を測定することができた。抑制活性は化合物を添加していない群をネガティブコントロールとし、(ネガティブコントロールの透過量-サンプル添加時の透過量) / ネガティブコントロールの透過量 $\times 100$ で表した。基底膜側透過液の電気泳動を行った結果、透過したOVAのほとんどがインタクトなOVAとして検出された¹⁶⁾ ので、この手法により腸管におけるアレルギー透過を的確に評価できる系が構築できたと考えられた。

5. 低アレルギー化小麦粉に含まれるアレルギー腸管透過抑制活性成分¹⁷⁾

確立した評価系によって活性測定を行った結果、低アレルギー化小麦粉の50%メタノール抽出物にOVA透過抑制活性が認められた (図3)。一方、無処理の原料小麦粉には本活性が認められなかった。このことから、低アレルギー化小麦粉の製造に使われた酵素製剤自体あるいは酵素処理を受けた小麦粉にOVA透過抑制活性が存在することが推察された。小麦粉の低アレルギー化には、タンパク質性アレルギー分解酵素としてのアクチナーゼ、および非タンパク性アレルギー¹⁸⁾ 分解酵素としてのセルラーゼが使われている。それ

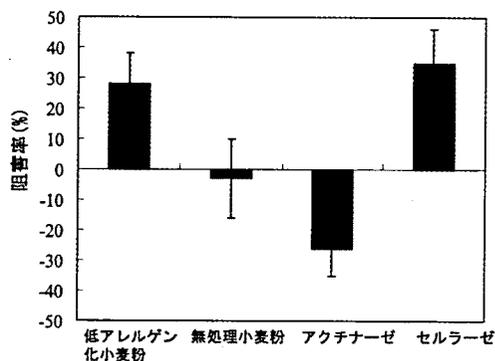


図3 低アレルギー化小麦粉、無処理小麦粉、アクチナーゼおよびセルラーゼの、50%メタノール抽出物のOVA透過抑制活性

それぞれの酵素50%メタノール抽出物の活性測定を行った結果、セルラーゼ製剤抽出物に活性が認められたのでセルラーゼ製剤から活性成分の精製を行った。セルラーゼ製剤を50%メタノールで抽出した後、ODSカラムを用いた逆相HPLCで繰り返し精製することにより活性成分を単離した。 ^1H 、 ^{13}C および2次元NMR測定の結果、活性成分はTrp, Phe, Lys, Val, Ser, Asnを含むペプチドであることが示唆された。さらにアミノ酸配列を解析した結果、活性化合物はTrp-Ser-Asn-Ser-Gly-Asn-Phe-Val-Gly-Glyであることが明らかとなった。このペプチドは*Trichoderma endo-1,4-\beta*-xylanase (EC 3.2.1.8) の39-48番目のアミノ酸配列と一致した。また、NMRの結果からC末端のアミノ酸はLysであると決定した。以上の結果から活性成分をTrp-Ser-Asn-Ser-Gly-Asn-Phe-Val-Gly-Gly-Lys (P 11) と決定した。

さらにP 11の濃度活性相関の検討を行った (図4)。P 11はウンデカペプチドと比較的分子量が大きかったことから、実際の腸管では透過した後には活性を発現するとは考えにくい。透過試験に際してはCaco-2細胞の管腔側のみに添加した群でも活性測定を行った。その結果、管腔側のみに添加した群でも管腔側、基底膜側両方に添加した群と同様にP 11は 10^{-5}M ~ 10^{-7}M で活性を示した。また活性の強さは $10^{-6}\text{M} > 10^{-7}\text{M} > 10^{-5}\text{M}$ であったことから濃度依存적ではなく、最適濃度があることが推察された。さらにP 11の活性発現に重要な構造を明らかにするため、部分ペプチドであるTrp-Ser-Asn-Ser-Gly, Trp-Ser-AsnおよびTrp-Serを合成し活性測定を行った (図5)。その結果、どのペプチドにおいても 10^{-7}M の添加で活性を示したことからN末端にあるTrpが重要であることが推察された。Trp-Glyでも 10^{-7}M の添加で活性を示したことからこの推察は支持された。さらに、Trpの最小活性発現濃度は 10^{-2}M であるのに対し、TrpをN末端に持つペプチドおよびTrpエチルエステルは 10^{-7}M の添加で活性を示したことから、活性発現にはTrp残基が寄与し、遊離のカルボキシル基の存在は活性を低下させることが示唆された。

6. エダムチーズに含まれるアレルゲン腸管透過抑制活性成分¹⁶⁾

低アレルゲン化小麦粉のアレルゲン透過抑制活性成分は*Trichoderma*の産生するセルラーゼ製剤に含まれるペプチドであったことから、微生物発酵食品にも活性成分が存在することが期待された。また、消化管が未発達な乳幼児であっても、

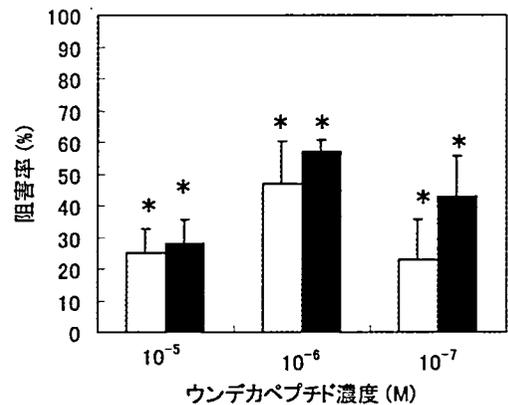


図4 セルラーゼ由来ウンデカペプチド(P11)のOVA透過抑制活性

□ 管腔側のみにP11を添加した群
■ 管腔側・基底膜側双方にP11を添加した群

*はコントロールと比較し5%水準で統計的に有意に異なることを示す。

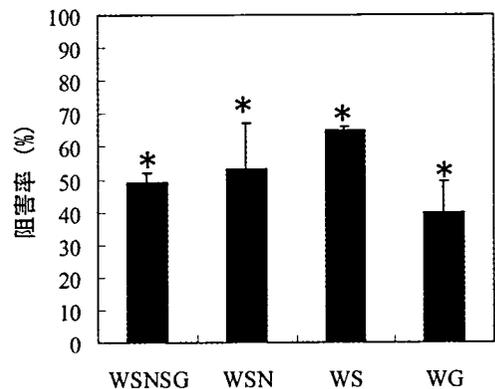


図5 セルラーゼ由来P11の部分ペプチド (WSNSG, WSN, WS) およびその類縁体 (WG) のOVA透過抑制活性 (濃度: 各 10^{-7}M)

アレルギーが微量に残っている育児用調整牛乳を飲んでもアレルギーにならないことから、乳および乳製品にはアレルギー腸管透過抑制活性成分が存在する可能性が考えられた。以上の様な観点から乳の微生物発酵食品であるチーズに着目し活性成分の単離を行った。

数種のチーズをメタノールで抽出し活性試験を行った結果、エダムチーズに活性が認められた。エダムチーズメタノール抽出物をODSカラムを用いた逆相HPLCで繰り返し精製することにより活性成分を単離した。¹Hおよび2次元NMRおよびMS測定の結果、活性成分はIle, Pro, Lys, Phe, His, Aspを含むペプチドであることが示唆された。さらにアミノ酸配列を解析した結果、活性成分はAsp-Lys-Ile-His-Pro-Pheであることが明らかとなった。活性ヘキサペプチドのホモロジー検索の結果、 β -カゼインの47~52番目のアミノ酸配列と一致したため、Asp-Lys-Ile-His-Pro-Pheはチーズの製造過程で β -カゼインが分解され生成されたと考えられた。活性ペプチドの濃度活性相関の測定を行った結果、セルラーゼから得られたペプチド同様、濃度依存的ではなく 10^{-5} Mよりも 10^{-7} Mを添加した場合のほうが活性が高く、最適濃度が存在すると考えられた(図6)。さらに、OVA以外のタンパク質性食物アレルギーの代表例として、乳の主要なアレルギーである β -ラクトグロブリンを選び、透過抑制活性の検討を行った。図7に示すように活性成分はOVAだけ

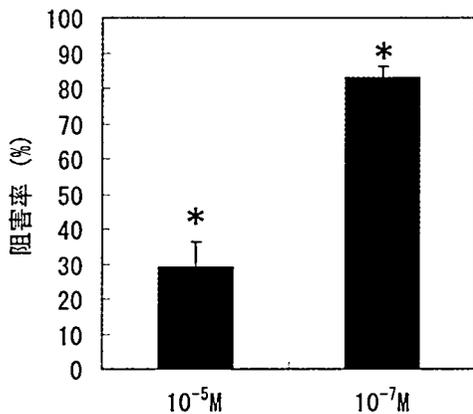


図6 エダムチーズ由来ヘキサペプチドのOVA透過抑制効果

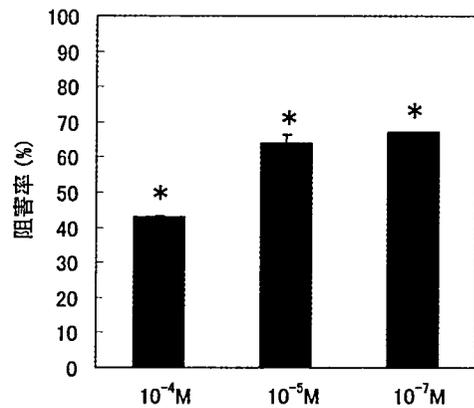


図7 エダムチーズ由来ヘキサペプチドの β -ラクトグロブリン透過抑制効果

ではなく β -ラクトグロブリンの透過も 10^{-7} Mの添加で抑制したことから、卵アレルギーだけでなく牛乳アレルギー、ひいては食物アレルギー全般の治療・予防効果が期待された。加えてこの研究結果によって、新しい重要な哺乳の意義が見出されたと考えられた。即ち、消化管機能の未発達な乳児期に陥りやすい高分子化合物の侵入を抑制する成分を乳から供給する働きである。人乳 β -カゼインのアミノ酸配列を検索した結果、牛乳カゼインと同じ位置に高いホモロジーを有するペプチドが存在することが明らかとなった。このようなペプチドが乳児の体内で生じ、アレルギー侵入を阻止する役割を担っている可能性が考えられる。

7. おわりに

アレルギーの腸管透過を抑制することによりアレルギーを治療・予防するという戦略、および、培養細胞を用いて直接透過したアレルギー量を測定することによってアレルギー透過抑制活性を評価する手法は今までに報告がなく、全く新しい提案である。今回明らかとなった活性成分を

図8に示した。セルラーゼから得られたペプチド (P11) およびTrpを含むペプチド群が活性を示したことから、アレルゲン腸管透過抑制活性にはN末端にあるTrpが重要であることが示唆された。セルラーゼから得られたP11とエダムチーズから得られたヘキサペプチドの構造的類似性については現在検討を行っている。また、OVAや β -ラクトグロブリンに代表される食物アレルゲンはパラセルラールートおよびトランスセルラールートの両方で腸管上皮細胞を透過すると報告されているが、今後はこれらの活性成分がどのような機構で食物抗原の透過を抑制するのかを明らかにしていく予定である。今後さらにアレルゲン腸管透過抑制の検討を行うことにより、透過抑制という新たな食物アレルギー抑制に対する戦略を提唱していきたいと考えている。

セルラーゼ由来
Trp-Ser-Asn-Ser-Gly-Asn-Phe-Val-Gly-Gly-Lys (P11)

P11部分ペプチドおよびその類縁体
Trp-Ser-Asn-Ser-Gly
Trp-Ser-Asn
Trp-Ser
Trp-Gly
Trp-ethylester

エダムチーズ由来
Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe

図8 アレルゲン腸管透過抑制ペプチドおよびその類縁体

参考文献

- 1) Watanabe, M., Watanabe, J., Sonoyama, K., and Tanabe, S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2663-2667 (2000).
- 2) Watanabe, M., *Trends Food Sci. Technol.*, **4**, 125-128 (1993).
- 3) Tanabe, S., Tesaki, S., Yanagihara, Y., Mita, H., Takahashi, K., Arai, S., and Watanabe, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **223**, 492-495 (1996).
- 4) Watanabe, J., Tanabe, S., Watanabe, M., Kasai, T., and Sonoyama, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1729-1735 (2001).
- 5) Kaminogawa, S., Hachimura, S., Nakajima-Adachi, H., and Totsuka, M., *Allergol. Int.*, **48**, 15-23 (1999).
- 6) Majama, H., and Isolauri, E., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **97**, 985-990 (1996).
- 7) Knutson, T. W., Bengtsson, U., Dannaeus, A., Ahlstedt, S., and Knutson, L., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **97**, 1225-1232 (1996).
- 8) Heyman, M., *Proc. Nutr. Soc.*, **60**, 419-426 (2001).
- 9) Heyman, M., and Desjeux, J. F., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **15**, 48-57 (1992).
- 10) Jensen-Jarolim, E., Gajdzik, L., Haberl, I., Kraft, D., Scheiner, O., and Graf, J., *J. Nutr.* **128**, 577-581 (1998).
- 11) Caillard, I., and Tome, D., *Reprod. Nutr. Dev.*, **35**, 179-188 (1995).
- 12) Stern, M., and Walker, W. A., *Am. J. Physiol.*, **246**, G556-562 (1984).
- 13) Marcon-Genty, D., Tome, D., Kheroua, O., Dumontier, A. M., Heyman, M., and Desjeux, J. F., *Am. J. Physiol.*, **256**, G943-948 (1989).
- 14) Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T., *Gastroenterology*, **96**, 736-749 (1989).
- 15) Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, E., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., and Zweibaum, A., *Biol. Cell* **47**, 323-330 (1983).
- 16) Tanabe, S., Tesaki, S., Watanabe, J., Fukushima, E., Sonoyama, K., and Kawabata, J., *J. Dairy Sci.*, **86**, 464-468 (2003).
- 17) Tesaki, S., Watanabe, J., Tanabe, S., Sonoyama, K., Fukushima, E., Kawabata, J., and Watanabe, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1930-1935 (2002).
- 18) Tanabe, S., Watanabe, J., Oyama, K., Fukushima, E., Kawabata, J., Arai, S., Nakajima, T., and Watanabe, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1675-1680 (2000).