

博士論文

食物アレルギーの消化管吸収と経口感作におよぼす
非ステロイド性抗炎症薬の影響解析

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

病院薬剤学研究室

平成 27 年度入学 福島 隆宏

主指導教員 松尾 裕彰

目次

序論	1
本論	6
第 1 章 小麦グリアジンの消化管吸収機構とアスピリンの影響解析	6
第 1 節 グリアジンの消化管吸収とアスピリンの影響	9
1-1. 緒言	9
1-2. 結果	9
1-3. 考察	11
第 2 節 小腸連続灌流法によるグリアジンの吸収に与えるアスピリンの影響解析	13
2-1. 緒言	13
2-2. 結果	13
2-3. 考察	17
第 3 節 経口吸収されたグリアジンの分子量とアレルギー活性の解析	20
3-1. 緒言	20
3-2. 結果	20
3-3. 考察	22
第 4 節 小括	24
第 2 章 OVA の消化管吸収と感作におよぼす NSAIDs の影響解析	25
第 1 節 OVA の消化管吸収におよぼすアスピリンの影響	26
1-1. 緒言	26
1-2. 結果	26
1-3. 考察	28
第 2 節 OVA の経口感作におよぼす NSAIDs の影響	30
2-1. 緒言	30
2-2. 結果	30
2-3. 考察	35
第 3 節 OVA の経皮感作におよぼす NSAIDs の影響	37
3-1. 緒言	37
3-2. 結果	37
3-3. 考察	40
第 4 節 小括	41
結論	42
実験方法	44
論文目録	53
参考文献	54

略語一覽

COX	Cyclooxygenase
Da	Dalton
EBD	Evans blue dye
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FD	Fluorescein isothiocyanate–dextran
FDEIA	Food-dependent exercise-induced anaphylaxis
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IL	Interleukin
IAP	Intestinal alkaline phosphatase
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate buffered saline
PGs	Prostaglandins
Th	Helper T cell
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
Tween-20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
WDEIA	Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis

序論

食物アレルギーは「食物によって引き起こされるアレルゲン特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義されている [1]。近年、食物アレルギーの患者数は増加傾向にあり、食物アレルギーを罹患した学童が誤食によりアナフィラキシーを生じ、死亡した例が報告されるなど重大な社会問題となっている。Sampson によるアメリカでの疫学調査や Venter らによるイギリスでの疫学調査の結果、小児の 5~6%、成人の 3~4%が何らかの食物アレルギーに罹患していると報告されている [2,3]。また、Urisu らの疫学調査によると、我が国における食物アレルギーの罹患率は乳児で 5~10%、幼児で 5%、学童で 4.5%であり他国と同程度の罹患率であったことが報告されている [1]。

食物アレルギーの病態は、発症に関与する免疫学的機序によって immunoglobulin-E 抗体 (IgE) 依存性反応と非 IgE 依存性 (細胞依存性) 反応の 2 つに大別される。非 IgE 依存性食物アレルギーには、新生児期や乳児期に嘔吐や下痢を引き起こす新生児・乳児消化管アレルギーがある。非 IgE 依存性食物アレルギーの発症機序には T 細胞の関与が推測されているが、その詳細は明らかでない。一方、IgE 依存性食物アレルギーには、原因食物の摂取後 2 時間以内にアレルギー症状が惹起される即時型食物アレルギーや花粉症や運動誘発が関与する特殊型がある。また、乳児アトピー性皮膚炎にも食物アレルギーが関与することが知られている。これらのうち、最も発症頻度の高い即時型食物アレルギーの症状は多岐にわたり、蕁麻疹や紅斑などの皮膚症状や粘膜症状が多く症例で認められるが、呼吸器症状やショック症状など致死的な症状を呈することも少なくない。我が国における即時型食物アレルギーの主要原因食物には鶏卵や牛乳、小麦、甲殻類、そば、ピーナッツなどがある。特に、鶏卵や牛乳、小麦は全体の約 70%を占めており、食物アレルギーの三大原因食物と称されている [1]。また、特殊型には花粉アレルゲンに対する IgE が果物や野菜中のアレルゲンと交差反応を示すことで口唇・口腔粘膜症状を示す口腔アレルギー症候群 (OAS) や原因食物を摂取した後に、運動負荷が加わることでアナフィラキシーが惹起される食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) などが存在する [1]。FDEIA の初発年齢は 10 歳代が最も頻度が高いことか

ら、運動をする機会が多い年齢層に偏っていることが特徴である。多くは食後 2 時間以内の運動で発症し、原因食物の摂取と運動負荷に加えて、複数の誘発要因が関与する。例えば、疲労やストレスなどの全身状態や低温などの環境、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) などの薬剤の服用が発症に影響することが知られている。FDEIA の原因食物はパンやうどんなどの小麦製品の頻度が 57% と最も多く、次いでエビやカニなどの甲殻類である。一方、即時型食物アレルギーの原因食物として高い頻度を示す鶏卵や牛乳は、FDEIA の原因食物としては頻度が低い [4]。

IgE 依存性食物アレルギーの発症機序は、他の I 型アレルギーと同様に、“感作の成立”と“症状の惹起”という 2 つの過程を経る。通常、経口や経気道、経皮によって体内に侵入した食物アレルギーの一部は、異物としてマクロファージや皮膚の樹状細胞であるランゲルハンス細胞などの抗原提示細胞により貪食される。アレルギーを取り込んだ抗原提示細胞は、その一部をナイーブ T 細胞に提示する。提示を受けたナイーブ T 細胞は 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞に分化し、インターロイキン (IL)-4 や IL-5、IL-13 などのサイトカインを放出する。これらのサイトカインは、B 細胞をアレルギーに対する特異 IgE 抗体を産生することのできる形質細胞へと分化させる。形質細胞より産生されたアレルギー特異 IgE 抗体は肥満細胞や好塩基球表面上に発現する高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) と高い親和性を持って結合することで感作が成立する (Fig. 1)。感作が成立した後、再び体内に侵入したアレルギーは肥満細胞や好塩基球上に結合した 2 分子以上のアレルギー特異 IgE 抗体と架橋結合を形成する。架橋結合の形成により、肥満細胞や好塩基球などの細胞が活性化され、脱顆粒が惹起される。脱顆粒時にはヒスタミンやセロトニンなどのケミカルメディエーターが放出され、その生理活性に基づき、血管の透過性や粘液分泌、好酸球遊走を亢進する。その結果、蕁麻疹や喘息、血圧の低下などの即時型アレルギー反応が惹起される。一方、肥満細胞上の IgE とアレルギーとが架橋結合を形成した際には、脱顆粒反応に加えて、ロイコトリエンやプロスタグランジンなどの脂質メディエーターの合成が亢進する。これらの物質は血管透過性亢進作用や気管支平滑筋収縮作用を有している。また、脂質メディエーターの放出は脱顆粒よりも時間を要するため、即時型反応の消失から数時間後に再び炎症反応や喘息様症状が遅発反応として惹起される [1]。

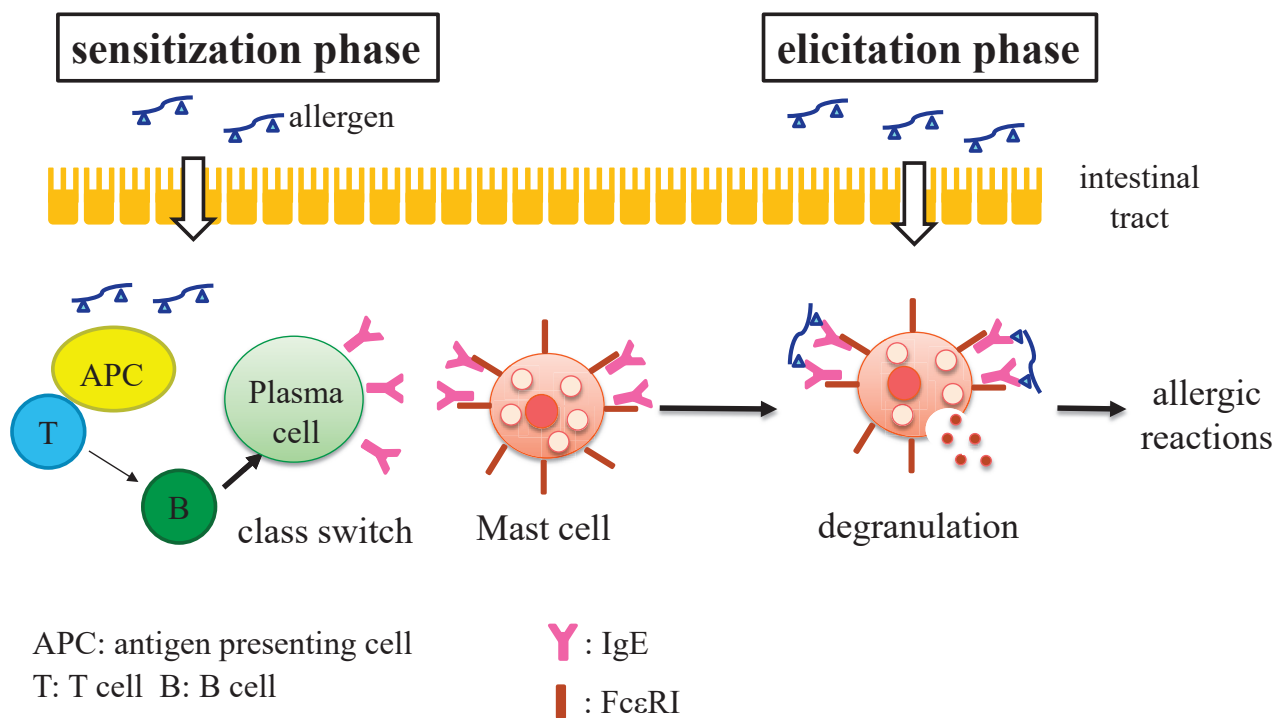


Fig. 1. Pathogenesis of IgE-mediated type I allergic reaction

NSAIDs はプロスタグランジン類 (PGs) の合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) の活性を阻害することで、解熱・鎮痛作用や抗炎症作用を示す薬剤である。COX には COX-1 と COX-2 の 2 種類のアイソザイムが存在する。COX-1 は胃や腎臓、血小板などあらゆる組織に恒常的に発現しており、胃粘膜の保護や血小板の凝集、腎機能の調節など生体の恒常制を維持する上で重要な役割を果たしている [5,6]。一方、COX-2 は炎症反応により誘導される酵素であり、炎症反応の上昇に伴い発現が促進される。古典的な NSAIDs の多くは COX-1、COX-2 のどちらのアイソザイムの活性も阻害する (Table 1)。したがって、それらの NSAIDs は COX-2 の阻害に起因する消炎・鎮痛効果だけでなく、COX-1 の阻害に起因する消化管傷害などの副作用を惹起する [7]。

NSAIDs の 1 つであるアスピリンは胃腸障害が原因で忍容性の低かったサリチル酸のアセチル化誘導体として開発された。アスピリンは用量によって臨床での用途が異なり、低用量 (成人で 1 日 100 mg) で用いる場合には抗血小板薬として、高用量 (成人で 1 日 1000 mg) で用いる場合には解熱・鎮痛薬として用いられる。これまでの研究で、アスピリンの服用が運動負荷と同様に小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) 患者のアレルギー症状を惹起することが報告されている [8]。アスピリンによる WDEIA の誘発機序については、複数の報告がある。Aihara らは、アスピリンが WDEIA 患者に対する皮膚プリックテストの反応性を亢進させたことを報告している [9]。

Table 1. Clinical dose and cyclooxygenase (COX) selectivity of NSAIDs

NSAIDs	Clinical dose (mg/day)	IC ₅₀ for COX-1 (μ M)	IC ₅₀ for COX-2 (μ M)	IC ₅₀ ratio of COX-1/COX-2	Ref
Celecoxib	200-400	82 \pm 36	6.8 \pm 5.4	12	[10]
Meloxicam	10-15	37 \pm 11	6.1 \pm 3.8	6.1	[10]
Diclofenac	75-100	0.076 \pm 0.018	0.026 \pm 0.010	2.9	[10]
		0.5 \pm 0.2	0.35 \pm 0.15	1.42	[11]
Ibuprofen	600	12 \pm 1	80 \pm 52	0.15	[10]
		1.0 \pm 0.07	15 \pm 5.3	0.06	[11]
Indomethacin	50-75	0.0090 \pm 0.0012	0.31 \pm 0.20	0.029	[10]
		0.01 \pm 0.001	0.6 \pm 0.08	0.016	[11]
Aspirin	1000-4500	0.3 \pm 0.2	50 \pm 10	0.006	[11]

また、アスピリンが Syk キナーゼを活性化することでヒトの好塩基球からのヒスタミン分泌を促進することが明らかにされている [12]。これらの報告から、アスピリンがアレルゲンに対する免疫細胞の反応性を亢進（反応閾値を低下）させることで WDEIA の症状を惹起している可能性が考えられる。

Kohno らは小麦を摂取する 30 分前にアスピリンを服用することで、WDEIA の原因アレルゲンであるグリアジンの血中濃度が上昇したことを報告している [13]。また、健常なヒトやラットにおけるアレルゲンの消化管吸収がアスピリンやジクロフェナクなど高い COX-1 阻害活性を示す NSAIDs を服用することにより増加したことが報告されている [12,13]。アスピリンは COX-1 の活性を阻害し、PGE₂ の産生を抑制することで胃腸障害を引き起こすことから、アスピリンの服用が消化管上皮細胞を障害し、食物アレルゲンの吸収を促進させることでアレルギー症状が惹起される可能性が考

えられる。しかしながら、グリアジンの消化管吸収やアスピリンの服用によるグリアジンの消化管吸収増加の機序については不明である。

さらに、アスピリンの服用による食物アレルギーの吸収増加は、免疫細胞へのアレルギー曝露量を増加させ、感作の成立にも影響を与えるのではないかと考えた。通常、消化管には経口摂取した食物抗原に対して、免疫反応を抑制する経口免疫寛容の機能が備わっているため、抗原の経口負荷のみでは感作しない。コレラトキシン (CT) などの細菌性毒素と共に食物アレルギーを経口投与した場合、免疫寛容の破綻によりアレルギーへの感作が促進されることが報告されている [16]。アスピリンは臨床現場でも汎用されている薬剤であり、アスピリンの服用が食物アレルギー発症のリスク因子であった場合には、アスピリン服用患者の生活の質 (QOL) が著しく低下する可能性がある。また、感作の成立にアスピリンが関与することを明らかにすることができれば、増加傾向にある食物アレルギーの病態解明や治療・予防法の開発に重要な知見を得ることができる。

本研究では、食物アレルギーの消化管吸収経路とアスピリンによるアレルギーの消化管吸収亢進の機序、および、食物アレルギーの感作におよぼすアスピリンの影響を明らかにすることを目的とし、小麦グリアジンおよび卵白オボアルブミン (OVA) アレルギーモデルラットを用いた解析を実施した。

本論

第1章 小麦グリアジンの消化管吸収機構とアスピリンの影響解析

小麦は即時型小麦アレルギーや小麦接触性皮膚炎、パン職人喘息、WDEIA などの原因食物である。特に小麦は FDEIA の原因食物として最も頻度が高い。小麦粉中には小麦タンパク質が 8–12% 含まれており、塩水溶液への溶解性の違いにより塩可溶性と塩不溶性タンパク質の 2 つに大別される (Fig. 2) [17]。塩可溶性画分は小麦タンパク質の約 15% を占め、水や酸、塩基に可溶なアルブミン画分と中性から塩基性の希薄な塩溶液に可溶で、熱により凝固するグロブリン画分に分類される。また、塩不溶性タンパク質のグルテンは小麦タンパク質の約 85% を占め、70% エタノールへの溶解性により、グリアジンとグルテニンにさらに分類される。グリアジン分子の多くはモノマーで存在し、構成するアミノ酸組成や分子量により α/β -、 γ -および ω -グリアジンに分類される。さらに ω -グリアジンは $\omega 1,2$ -と $\omega 5$ -グリアジンに分けられる。 α/β -や γ -グリアジンはグルテンの約 60% を占めるが、 $\omega 1,2$ -と $\omega 5$ -グリアジンはそれぞれグルテンの 5% 前後である。一方でグルテニン分子は多くのポリペプチド鎖がジスルフィド結合を介して重合して構成されており、分子量により高分子量 (HMW) グルテニン (分子量 67–88 kDa) と低分子量 (LMW) グルテニン (分子量 32–35 kDa) に分類される [18]。これらの小麦タンパク質のうち、グリアジンは様々な病型の小麦アレルギーの主要アレルゲンとして報告されている。特に、 $\omega 5$ -グリアジンは WDEIA の主要アレルゲンであり、WDEIA のアレルゲンの割合は $\omega 5$ -グリアジンが約 80%、HMW-グルテニンが約 20% と報告されている [19]。

通常、経口摂取された食物アレルゲンタンパク質の大部分は胃や膵臓から分泌される消化酵素や小腸の刷子縁膜に発現するタンパク質分解酵素により消化を受けてアレルゲン性を失う。しかし、消化を逃れた一部のアレルゲンはアレルゲン性を維持したまま、パイエル板に存在する M 細胞や上皮細胞より吸収される。物質が吸収される経路には、経細胞経路 (トランスサイトosis) や細胞間隙経路が知られている。タンパク質を含む物質の経細胞経路には、分子量や電荷の有無、脂溶

性などの物理化学的性質が大きく寄与する。例えば、卵白アレルギーであるリゾチーム（分子量 14 kDa、*pI* 11）が小腸の上部においてエンドサイトーシスにより取り込まれることが報告されている [15]。一方、同じ卵白アレルギーである OVA（分子量 45 kDa、*pI* 4.7）は小腸の下部でキャリアーを介したエンドサイトーシスにより吸収されることを報告している [20]。経細胞経路に加えて、一部のタンパク質は細胞間隙経路により上皮細胞の間隙から吸収されることが知られている。通常、正常な上皮細胞は異物の侵入を防ぐために密着結合で細胞間を強く結合しており、高分子の輸送を制限している。しかし、運動負荷や薬物の服用、消化管に存在するマスト細胞の活性化により密着結合に障害が惹起された場合、タンパク質の細胞間隙経路による吸収は促進されると考えられている。

これまでの研究で、食物アレルギーの吸収量はIgE依存性アレルギーの重篤度を決定する要因のひとつであることが示されてきた [13]。また、経口摂取されたアレルギーの消化や小腸上皮細胞内での分解はアレルギー性に直接影響するため、アレルギーの吸収機序を解明し、吸収に影響を与える因子を解析することはアレルギーの病態を解明する上で重要である。これまでに、小麦運動負荷試験時にアスピリンを服用したWDEIA患者ではグリアジンの吸収が増加し、アレルギー症状が惹起されたことを報告している [8]。しかし、グリアジンの消化管吸収やアスピリンの服用による

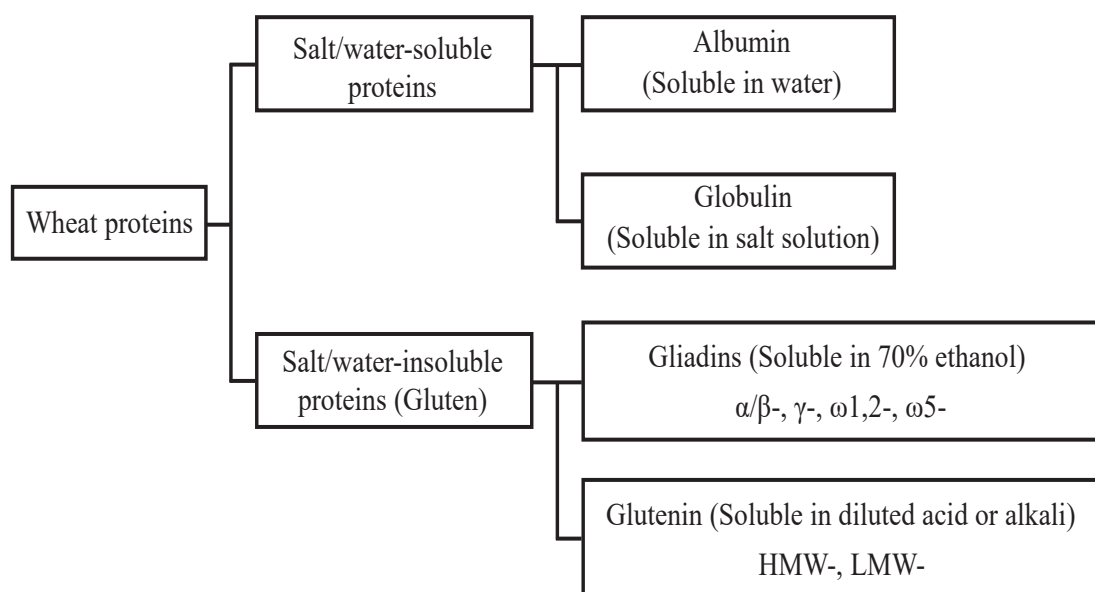


Fig. 2. Classification of wheat proteins.

HMW, high molecular weight; LMW, low molecular weight.

グリアジンの消化管吸収増加の機序については不明である。本章の目的は、グリアジンの消化管吸収に関連する経路とその吸収特性、およびアスピリンによるグリアジンの消化管吸収亢進の機序についてラットを用いて明らかにすることである。

第1節 グリアジンの消化管吸収とアスピリンの影響

1-1. 緒言

食物アレルギーの詳細な吸収機構をヒトで解析するのは困難である。これまでの研究で、卵白アレルギーの一つである OVA の消化管からの吸収をラットを用いて評価できることを明らかにした[18,19]。ヒトを用いた解析と異なり、ラットを用いた解析では一個体で比較的多くのポイントで採血し、血中濃度を経時的に評価できるとともに、消化酵素の影響を排除したアレルギーの吸収挙動を解析することも可能である。そこで、本研究では小麦グリアジンをアレルギーとして用いて、消化管からのアレルギー吸収におよぼすアスピリンの影響についてラットを用いて解析した。

ラット消化管を用いて物質の吸収を評価する方法には、経口投与方法や消化管の特定部位に閉塞ループを作成し、ループ内に被験物質を投与した後に血中濃度やループ内に残存する物質の量を測定する消化管ループ法、消化管腔側に被験物質を含む溶液を灌流し、灌流液から消失する被験物質の量から吸収を見積もる消化管灌流法、消化管を摘出し、*in vitro* で管腔側から血液側への移行を見る Ussing chamber 法などがある。本節ではヒトにおける小麦アレルギー診断のための負荷試験に近い条件で小腸におけるグリアジンの吸収を評価するため、経口投与方法と小腸上部に作成したループに、未消化のグリアジンを直接投与する小腸ループ法で、未消化グリアジンの吸収におよぼすアスピリンの影響を解析した。

1-2. 結果

溶媒を経口投与したラット（コントロール群）にグリアジン（100 mg/kg）を経口投与した場合、血漿中のグリアジン濃度は投与 1 時間後に最高血漿中濃度（ C_{\max} , 3.23 ± 0.99 ng/mL）を示した（Fig. 3A）。一方、アスピリン（30 mg/mL）を投与した場合、 C_{\max} 値や投与 3 時間までの血漿中-時間曲線下面積（ AUC_{0-3h} ）がコントロール群に比べて、それぞれ 8.6 倍（ 3.23 ± 0.99 ng/mL vs 27.7 ± 7.96 ng/mL, $P < 0.05$ ）および 11.3 倍（ 5.15 ± 0.47 ng-h/mL vs 58.0 ± 16.2 ng-h/mL, $P < 0.05$ ）高い値を示した。この結果から、ヒトで認められたアスピリンの服用による血中グリアジン濃度の上昇が、ラットでも認められることが確認された。

対照的に、コントロール群の小腸上部ループ内にグリアジン（100 mg/kg）を投与した場合、グリアジンは投与 10 分後に C_{max} （ 20.6 ± 10.2 ng/mL）を示した（Fig. 3B）。アスピリン投与群では投与 15 分後に C_{max} （ 19.8 ± 9.5 ng/mL）に達し、その後はコントロール群と同様の推移を示した。このとき、コントロール群とアスピリン投与群で血漿中グリアジン濃度に有意な差は認められなかった。このことから、小腸ループ内に高濃度のグリアジンを直接投与した場合にはアスピリンによるグリアジン吸収の促進作用が認められないことが明らかになった。

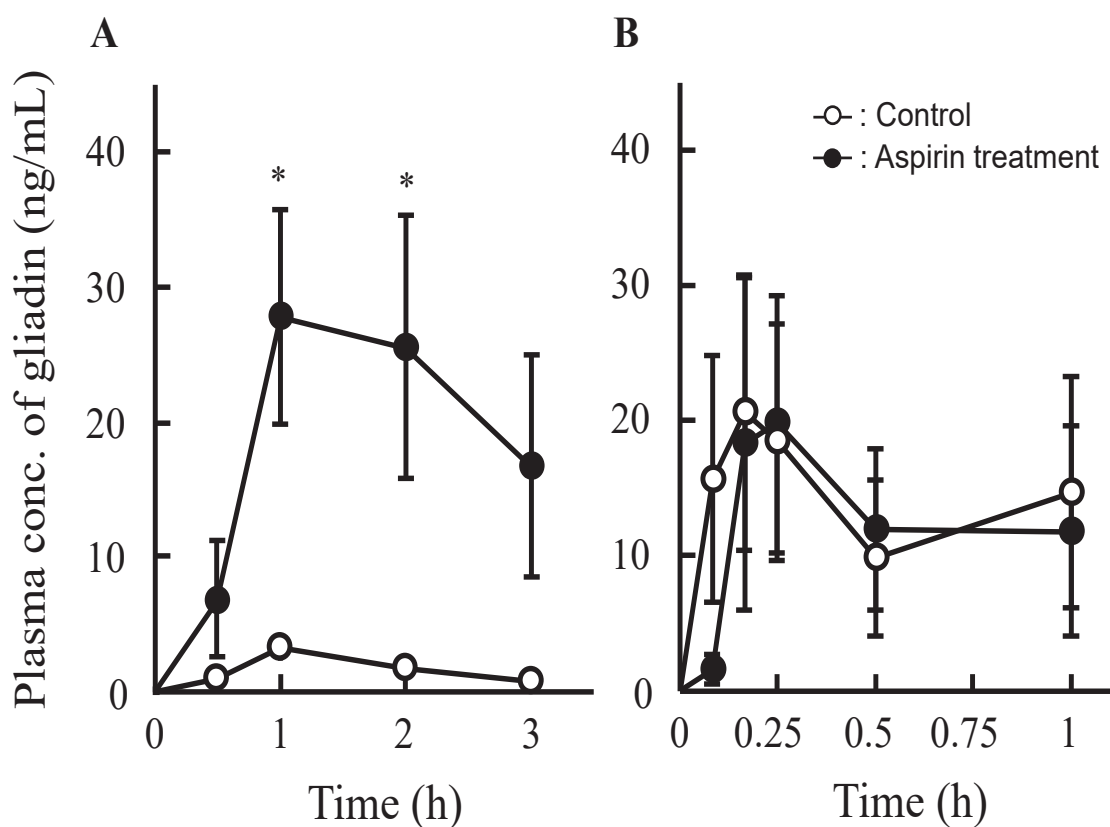


Fig. 3. Effect of aspirin on plasma concentrations of gliadin after oral (A) and intra-intestinal loop (B) administration in SD rats. Aspirin (30 mg/kg) was administered 30 min before oral or intra-intestinal loop administration of gliadin at a dose of 100 mg/kg. Open and closed circles represent the control (vehicle alone) and aspirin treatment, respectively. Each value represents the mean \pm S.E. of five (A) and seven (B) rats. * $P < 0.05$ with respect to control. In these studies, two rats, a control rat and an aspirin treatment rat, were evaluated simultaneously. The oral (A) and intra-intestinal loop (B) administration studies were independently performed five and seven times, respectively and we confirmed the results were almost same among these independent trials.

1-3. 考察

グリアジンを経口投与した場合、血漿中のグリアジン濃度はアスピリンの服用によりコントロール群よりも有意に増加した (Fig. 3A)。この結果は、健常なヒトで認められたアスピリンの服用による血中グリアジン濃度の上昇がラットでも認められたことを示している。アメリカ食品医薬品局 (FDA) のガイドラインによると、ラットへの化合物の投与量をヒトでの投与量に換算する際には、ラットの体表面積に応じたHED (Human Equivalent Dose: ヒト相当量) 換算係数6.2で除す必要がある [22]。本実験で用いたグリアジンの投与量は100 mg/kgであり、この投与量はヒトにおいて16.1 mg/kgに相当する。小麦粉には約6%のグリアジンが含まれているため [14]、投与したグリアジンを小麦粉量として概算すると、ヒトで約0.27 g/kgを摂取したことになる。通常ヒトにおける小麦負荷試験では70–135 gの小麦粉を経口負荷する [8]。したがって、本実験で用いたグリアジンの投与量はヒト負荷試験よりも低用量で負荷したことになる。さらに、実験で投与したアスピリンの量は30 mg/kgであり、これはヒトで約4.8 mg/kgを投与したことに相当する。臨床でアスピリンを解熱鎮痛薬として使用する際、500–1,500 mgの用量で用いられる。ヒトの体重を50 kgと仮定した場合、アスピリンの臨床服用量は10–30 mg/kgとなる。したがって、アスピリンについても本実験で用いた投与量 (30 mg/kg) は実臨床で認められる量であると考ええる。

経口投与の血漿中グリアジン濃度はアスピリンの処置により上昇することが示された。一方で小腸ループ法による検討では、コントロール群とアスピリン投与群間でグリアジンの吸収に差が認められなかった。両実験系でグリアジンの吸収におけるアスピリンの影響が異なった要因は本研究では明らかにできなかったが、要因として胃内でのグリアジン分子の修飾や低分子化が関与している可能性が考えられる。グリアジンは水に対して難溶解性のタンパク質であり、その溶解度は約0.3 mg/mLと報告されている [23]。本実験では、グリアジン100 mgをオリーブ油 1 mLに懸濁した液を小腸ループ内に直接投与した。小腸ループ法の結果より投与30分以降の血漿中グリアジン濃度はほぼ定常状態となり、吸収速度が消失速度より遅いflip-flop反転を起こしている可能性が考えられる。したがって、胃を通過しない小腸ループ法の場合、グリアジンの溶解度は通常の経口投与よりも低くなる可能性が考えられ、これはグリアジンの溶解性や吸収に個体差が生じる要因となる。グリア

ジンは構造中にグルタミン残基を多く有しており、酸加水分解やキモトリプシンなどの酵素処理でこれらの残基が脱アミド化され、グルタミン酸残基に変化する。また、Kumagaiらは脱アミド化したグリアジンの水への溶解度はもとのグリアジンよりも大きくなることを報告している [23]。グリアジンが胃内の酸性条件下でどの程度、脱アミド化されるかは不明であるが、小腸におけるグリアジンの吸収に胃内での分子修飾による溶解度の増加が関与しているものと考えられる。

さらに、胃内にはタンパク質分解酵素であるペプシンが分泌されている。ペプシンは、胃底腺の主細胞より胃液中に分泌されたペプシノーゲンから生成される酵素であり、酸性下で強い活性を示す。グリアジンはペプシンによる消化を受け、一部低分子化されることが知られている [24]。したがって、小腸ループ法では起こらないペプシンによる低分子化がアスピリンによるグリアジンの吸収増加に影響した可能性も考えられる。実際に小腸ループ法において、卵白アレルギーのリゾチームの吸収がアスピリンの処置により促進されることが報告されている [15]。このことはアスピリンによるグリアジンの吸収増加機構がリゾチームと異なり、グリアジンの吸収に胃内でのペプシンによる消化が重要である可能性を示している。リゾチーム (14.3 kDa) はグリアジン (32 kDa) に比べ、分子量が小さく、水溶性が高いタンパク質である。このことから、アスピリンによるグリアジンの吸収促進機構において胃内での分子修飾による溶解度の亢進や低分子化が関与している可能性が推察される。

ペプシンに加えて、トリプシンやキモトリプシンなどの消化酵素が、小麦グリアジンやグルテンの低分子化に関与することが報告されている [23]。しかし、トリプシンやキモトリプシンによるグリアジンの消化はペプシンと比較して小さく、これらの酵素の作用は無視できると考えられる。さらに、胆汁中に含まれる胆汁酸はコレステロールなど脂溶性の高い物質とミセルを形成することでその吸収を促進させる。本研究で行った小腸ループ法では、胆管を結紮することにより、胆汁の影響を排除している。胆汁によるミセルの形成がグリアジンの吸収にどの程度寄与するかに関しては、今後さらに解析を行う必要がある。

第2節 小腸連続灌流法によるグリアジンの吸収に与えるアスピリンの影響解析

2-1. 緒言

前節において、小腸ループ法ではグリアジンの吸収におよぼすアスピリンの影響が認められなかった。その要因として、経口投与時に認められた胃酸やペプシンの消化作用によるグリアジンの分子修飾や低分子化が推測された。すなわち、小腸ループ法では高濃度のグリアジン懸濁液を投与したため、グリアジンの溶解性や吸収に個体差が大きく反映され、血漿中濃度の変化にアスピリンの影響が反映されにくくなったと推察される。本節では低濃度で消化管吸収を評価できる小腸連続灌流法によりグリアジンの吸収を評価することを目的とした。

小腸連続灌流法は、血管系や神経系などの生理的防御系を保持した状態で、消化管から血中内の移行過程を排除して、管腔内の消失から消化管吸収の過程を評価することができる。血漿中濃度を測定する方法では、消化管から血中へ移行する間に吸収以外の様々な寄与が考えられるが、本法ではそれらを考慮に入れる必要がなく、消化管の膜透過のみを評価することが可能である。したがって、投与するグリアジンの濃度をループ法よりも低く設定することができ、溶解性の問題を排除した条件で吸収を評価することができるという特徴がある。今回、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識グリアジンを用いて小腸連続灌流を行い、灌流液中の蛍光の減少を評価した。また、胃酸やペプシンの消化作用によるグリアジンの低分子化の関与については、模擬胃液処理としてペプシンと反応させた FITC 標識グリアジンを用い、グリアジンの低分子化が消化管吸収とアスピリンによる吸収増加作用にどのような影響をおよぼすのかを解析した。

2-2. 結果

最初に、FITC-グリアジンのペプシン処理時間について検討した。ペプシン処理は、Kumagai らの報告を参考に 0.1 M 塩酸 (pH 1.48) に溶解したペプシン (474 IU/mL, 5.12 µg/mL) 250 µL と FITC-グリアジン (512 µg/mL) 250 µL を 37°C で反応させる方法で行った [23]。反応液を経時的にサンプリングし、SDS-PAGE で解析した結果、ペプシンの非存在下 (0.1 M 塩酸のみ) では α/β -や γ -、 ω 1,2-グリアジンに相当する分子量 (30–50 kDa) のバンドが確認されたが、他のグリアジンよりも含量の

少ない ω 5-グリアジンの分子量の位置にバンドは認められなかった (Fig. 4)。ペプシン非存在下では、処理開始 1 時間までに泳動像の変化は認められなかった。一方、ペプシン存在下では処置開始前に確認された 30–50 kDa のタンパク質は経時的に減少し、約 25 kDa のタンパク質が増加した。30–50 kDa のバンドは 0.75 時間でほぼ消失したため、連続灌流法で用いる FITC-グリアジンのペプシン処理時間を 0.75 時間に設定した。

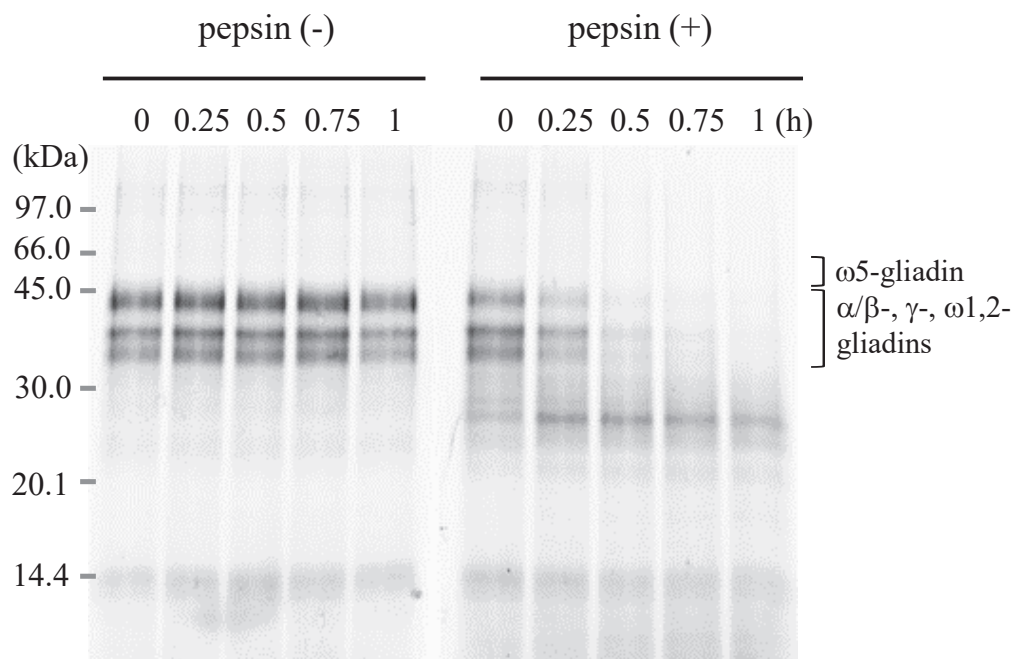


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of pepsin-digested gliadin. FITC-gliadin was incubated for 1 h at 37°C in the absence [pepsin (-)] or presence [pepsin (+)] of pepsin under acidic conditions (pH 1.5). FITC-gliadin was detected using a Fluoroimage Analyzer FLA-7000 after separation by SDS-PAGE. This trial was repeated three times independently to confirm the reproducibility.

次に、グリアジンの吸収経路の解明とアスピリンによるグリアジンの吸収増加におよぼすペプシン処理の影響を解析することを目的に小腸連続灌流法を行った。予備的検討として、消化管を介さずにシリコンチューブのみで FITC-グリアジンの灌流を行った結果、FITC-グリアジンの蛍光消失は確認されなかった (Data not shown)。このことから、シリコンチューブへの FITC-グリアジンの吸着は無視できることを確認した。FITC-グリアジンを含む灌流液を小腸上部の管腔側に投与した場合、コントロール群では灌流開始 0.5 時間後まで FITC-グリアジンの吸収がおこり、灌流開始

1.5 時間後で投与量の約 20%が吸収された (Fig. 5A)。同様に細胞間隙を介して吸収される非特異的吸収マーカーである FITC-デキストラン 40 (FD-40、分子量 40 kDa) の吸収を評価した結果、灌流開始 1.5 時間までに約 30%の吸収が確認された。アスピリンを投与した群では、灌流開始 1.5 時間後で投与量の約 40%が吸収され、コントロール群と比べて有意な吸収の増加が確認された。これらの結果は、アスピリンが細胞間隙経路を介したグリアジンの消化管吸収を促進させたことを示唆するものである。灌流開始 1.5 時間後に灌流液中に含まれる FITC-グリアジンを SDS-PAGE で解析した結果、未消化の FITC-グリアジンが確認された (Fig. 6)。したがって、FITC-グリアジンは灌流液中から未消化体として吸収された可能性が示唆された。

次に、ペプシン処理した FITC-グリアジンの消化管吸収とアスピリンの影響を同法にて評価した。ペプシン処理した FITC-グリアジンをコントロール群の小腸管腔側に灌流した場合、ペプシン処理した FITC-グリアジンは経時的に吸収され、灌流開始 1.5 時間後で投与量の約 20%が吸収された (Fig. 5B)。アスピリンを投与した場合、ペプシン処理した FITC-グリアジンの吸収はコントロール群よりも高く、灌流開始 1.5 時間後で投与量の約 55%が吸収された。このとき、アスピリンの投与によりペプシン処理群では未処理群よりも約 1.4 倍高い吸収を示した。この結果から、ペプシン消化はアスピリンによるグリアジンの吸収増加をさらに促進させることが明らかになった。

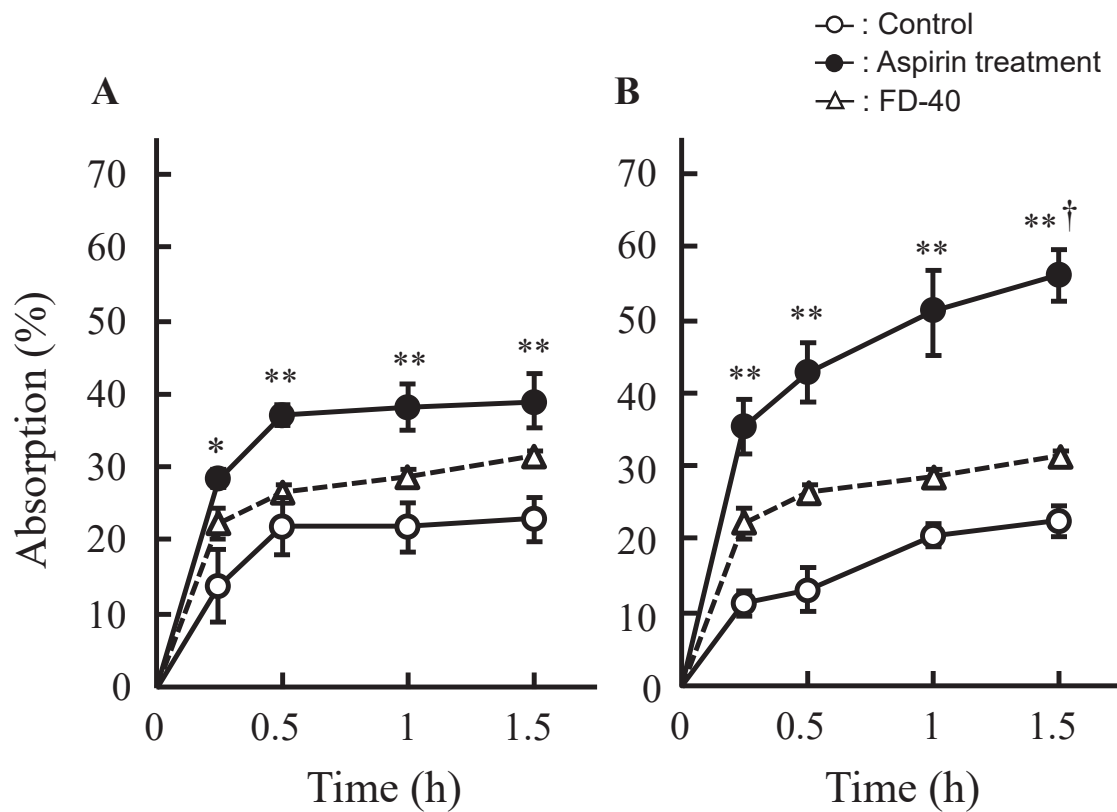


Fig. 5. Effect of aspirin on intestinal absorption of intact (A) or pepsin-digested (B) FITC-gliadin in the *in situ* re-circulating perfusion study. The amount of FITC-gliadin absorbed was assumed to be equivalent to the amount eliminated from perfusate. The concentration of aspirin in the perfusate was 3 mg/mL. Open and closed circles represent the control (vehicle alone) and aspirin treatment, respectively. Open triangles represent absorption of FD-40. Each value represents the mean \pm S.E. of four rats. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ with respect to control. † $P < 0.01$ with respect to intact FITC-gliadin. In the re-circulating perfusion study, five rats, a control and an aspirin treatment rat for intact FITC-gliadin (A), a control and an aspirin treatment rat for pepsin-digested FITC-gliadin (B), and a rat for FD-40, were evaluated simultaneously. This experiment was independently performed four times and we confirmed results were almost same among these independent trials.

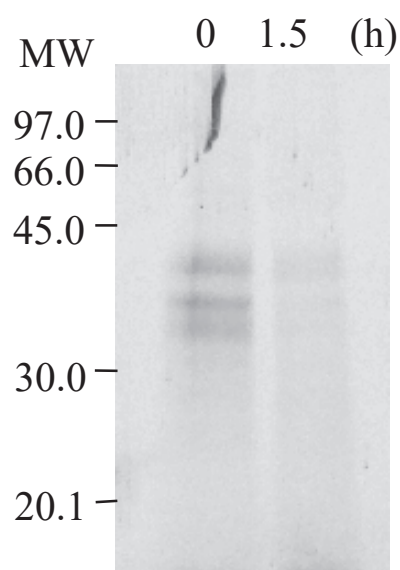


Fig. 6. Intactness of FITC-gliadin in the intestinal perfusate. FITC-gliadin intactness in intestinal perfusate, obtained at 1.5 h, was analyzed using a Fluoroimage Analyzer FLA-7000 after separation by SDS-PAGE.

2.3. 考察

本節では胃酸やペプシンの消化作用によるグリアジンの低分子化がグリアジンの消化管吸収やアスピリンによる吸収増加作用におよぼす影響を小腸連続灌流法により解析した。FITC-グリアジンの吸収はアスピリン処置によりコントロール群に比べ、約 1.7 倍高い値を示した。生理的なヒト消化管内液の平均は 50–1100 mL（平均 500 mL）であり、今回用いた灌流液中のアスピリン濃度である（3.0 mg/mL）は経口投与方法と同様の消化管内濃度を再現している条件である。小腸灌流法では、前節の小腸ループ法で認められなかったアスピリン投与群とコントロール群との間に有意な差が認められた（Fig. 5A）。この要因は、小腸灌流法ではループ法に比べ、極めて低濃度のグリアジンを用いることができ、グリアジンが溶解した状態で吸収を評価できたことによるものと考えられた。この結果は、溶解度が問題となるような高用量のグリアジンを摂取した場合には胃内でグリアジンの溶解度が亢進し、溶解の程度により小腸におけるグリアジンの吸収が変動する可能性を示唆するものである。

消化管連続灌流法による FITC-グリアジンの吸収は、非特異的吸収マーカーとして知られている FD-40 の吸収と同様の吸収率の変化を示し、FD-40 よりはやや低い吸収率であった（Fig. 5A）。

このことから、消化管上部における FITC-グリアジンの吸収にクラスリンやカベオニンを介する特殊なエンドサイトーシスの寄与は低く、細胞間隙経路が主に寄与すると考えられた。一方で、FITC-グリアジンの吸収は灌流開始 0.5 時間以降でほとんど認められなかった。この要因は明らかではないが、消化管に存在する、組織トランスグルタミナーゼがグリアジンを重合させるという報告があることから [25,26]、灌流液中でグリアジンが高分子量の重合体を形成している可能性が考えられる。

前節においてアスピリンによるグリアジンの吸収増加機構に胃酸やペプシンによるグリアジンの消化が関与している可能性が考えられた。本節では、酸性条件下でペプシンにより消化した FITC-グリアジンを用いて、グリアジンの吸収とアスピリンの影響におよぼすペプシン処理の影響について解析した。グリアジンをコントロールラットの管腔側に投与した場合、ペプシン処理の有無による有意な影響は認められなかった (Fig. 5)。本節では小腸上部における未消化の FITC-グリアジンの吸収に細胞間隙経路が関与することを示した。通常、細胞間隙経路は異物の通過を制限するために密着結合で細胞間が強く結合しており、高分子の輸送は制限されている。本実験で、35-45 kDa のグリアジンはペプシンによる消化を受けて低分子化されたが、その大部分は分子量 25-30 kDa である。このことから、通常時の小腸におけるグリアジン吸収にペプシンによる低分子化はほとんど影響しない可能性が考えられる。一方、アスピリンを処置したラットでは、ペプシンの処理によりグリアジンの吸収は大きく増加した。これまでにアスピリンが小腸ループ内に投与した FD-10 (平均分子量 9.4 kDa) や FD-150 (平均分子量 167 kDa) の吸収を促進することが報告されている [15]。このとき、消化管組織内の FD-150 濃度にアスピリン処置による有意な影響は認められていない。さらに、経口投与方法においてアスピリンは FD-40 の吸収を約 2 倍増加させる [27]。これらの結果から、アスピリンは細胞間隙経路を増加させることで、グリアジンを含む高分子化合物の吸収を促進させることが示された。

アスピリンが細胞間隙経路を増加させる機序については、いくつか報告がある。PGE₁ 製剤であるミソプロストールを併用することにより、アスピリン処置により増加したリゾチームの消化管吸収を抑制できることが明らかにされている [15]。また、COX-1 と COX-2 の両者を阻害するジクロフェナクは、アスピリンと同様にグリアジンやリゾチームの吸収が増加するのに対し、COX-2 に選

択性の高いメロキシカムはこれらのアレルゲンの吸収に影響しないことを報告している [14,15]。このことから、アスピリンによる細胞間隙経路の増加に COX-1 を阻害することによる PG 類の産生の阻害が関与しているものと考えられる。また、アスピリンが細胞間隙の密着結合に関与する zonulia occuludien-1 や claudin-7 の発現を減少させているという報告もある [28]。さらに、Hamarneh らは小腸アルカリホスファターゼ (IAP) の発現減少が FD-4 や FD-10 などの消化管透過性を増加させることを報告している [29]。Kaur らはアスピリンの経口投与が小腸上部の IAP 活性を減少させることも報告している [30]。これらの報告から、アスピリンによるグリアジンの細胞間隙経路の増加には、COX-1 阻害による PG の産生抑制や IAP の活性阻害などが関与する可能性が考えられる。

第3節 経口吸収されたグリアジンの分子量とアレルギー活性の解析

3.1. 緒言

前節までの解析の結果、アスピリンによるグリアジンの吸収増加には胃におけるグリアジンの分子修飾や低分子化が重要であることが示唆された。一方、経口投与方法や小腸ループ法の実験ではグリアジンを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定している。ELISA 法で生体サンプル中のタンパク質を定量する場合、未消化のタンパク質に加え、ELISA で用いた抗体に認識されるエピトープ部位を持つ消化タンパク質の断片も同時に検出される。したがって、本研究で認められたアスピリンによる血漿中グリアジン濃度の増加には、未変化体のグリアジン以外にも、グリアジンの消化断片を含んでいる可能性がある。この点について明らかにするために、本節では血漿中に存在するグリアジンを抽出し、Western blot 法で解析した。また、経口投与後の血漿中グリアジンがアレルギー活性を有しているか否かを解析するため、血漿中よりグリアジンを抽出し、Yokooji らの方法 [27] を一部改変して、グリアジン感作モデルラットにおける皮内アレルギー反応試験を行った。

3.2. 結果

経口吸収後の血漿中グリアジンの分子量を確認するために、グリアジンの経口投与3時間後の血漿から70%エタノールでグリアジンを抽出し、抗グリアジン抗体を用いた Western blot 法で解析した (Fig. 7)。投与前のグリアジン (intact gliadin) には α/β -や γ -、 $\omega 1,2$ -グリアジンに相当する 35–50 kDa のバンドが確認されたが、 $\omega 5$ -グリアジン (~60 kDa) のバンドはほとんど検出されなかった。また、グリアジン投与ラットから採取した血漿サンプルのうち、17.1 および 47.1 ng/mL の濃度のグリアジンを含むサンプルでは、35–45 kDa のバンドが検出された。さらに、これらの血漿サンプルでは低分子量 (<35 kDa) および高分子量 (≥ 64 kDa) のグリアジンも検出された。この結果より、大部分のグリアジンは分解されることなく元の分子量を維持したまま吸収されるが、一部のグリアジンは吸収される前に消化管腔や消化管組織に存在する酵素によって分解されることが示された。

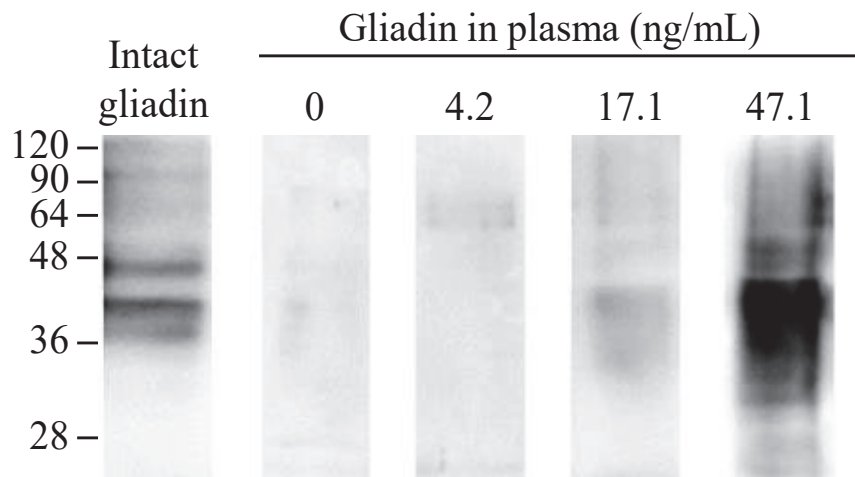


Fig. 7. Western blot analysis of gliadin circulating in plasma after oral administration in rats. Aspirin (30 mg/kg) was administered 30 min before oral administration of gliadin at a dose of 100 mg/kg (Gliadin in plasma). The sample “0” was obtained from one rat administered with aspirin and olive oil (vehicle for gliadin). Each plasma sample was collected from one (individual) rat used in the four independent oral administration studies. As a reference, gliadin was spiked into rat plasma containing no gliadin at a concentration of 150 ng/mL (Intact gliadin). Gliadin was extracted with 70% ethanol from plasma 3 h after oral gliadin administration. Each gliadin sample was separated by 12.5% SDS-PAGE and blotted onto a PVDF membrane. The membrane was incubated with anti-gliadin antibody. Plasma concentrations of gliadin were determined by ELISA. Western blot analysis was repeated three times independently to confirm the molecular sizes of ingested gliadin.

次に、経口吸収後の血漿中グリアジンのアレルギー活性を評価するため、エバンスブルーの血管外漏出を利用して、皮内アレルギー反応試験をおこなった (Fig. 8)。グリアジンの腹腔内投与により感作したラットにヒスタミンを皮内投与すると、エバンスブルーの血管外漏出が確認できた。したがって、グリアジンのアレルギー活性の評価に本ラットモデルを用いることとした。

グリアジン感作ラットにサンプリングした血漿を皮内投与した場合、血漿サンプル中のグリアジン濃度に依存してエバンスブルーの血管外漏出量が増加した。このとき、グリアジンを含まない血漿から抽出したサンプルではエバンスブルーの血管外漏出は確認されなかった。以上の結果より、ラットを用いた本実験系においてもグリアジンはアレルギー活性を維持したまま、小腸から吸収されることが示された。

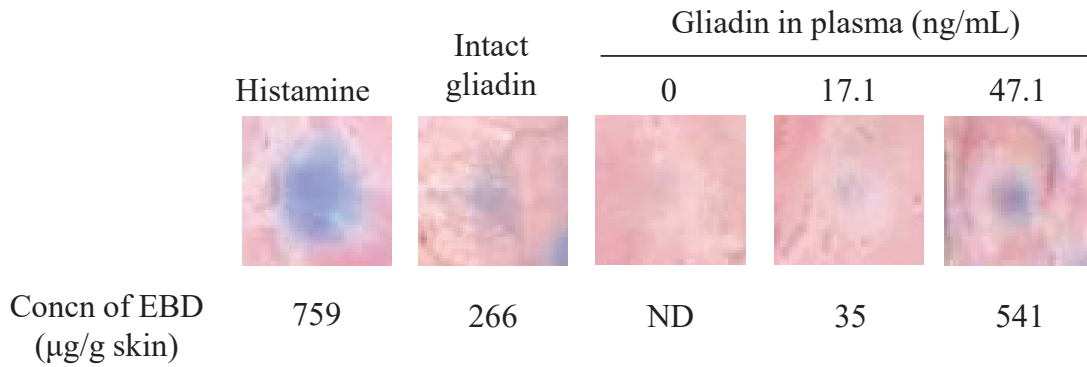


Fig. 8. Allergenicity of gliadin circulating in plasma after oral administration in rats. Aspirin (30 mg/kg) was administered 30 min before oral administration of gliadin at a dose of 100 mg/kg (Gliadin in plasma). The sample “0” was obtained from one rat administered with aspirin and olive oil (vehicle for gliadin). Each plasma sample was collected from individual rat used in the three independent oral administration studies. As a reference, gliadin was spiked into rat plasma containing no gliadin at a concentration of 150 ng/mL (Intact gliadin). Gliadin was extracted with 70% ethanol from plasma 3 h after oral gliadin administration. Intact gliadin was spiked into rat plasma containing no gliadin at a concentration of 150 ng/mL. As a positive control, 100 µL of histamine dissolved in physiologic saline (150 µg/mL) was simultaneously injected intradermally. Intradermal reaction test was repeated three times independently to confirm the allergenicity. ND represents the value which bellows the detection limit [concentration of Evans blue dye (EBD): 1.78 µg/mL] in the assay.

3-3. 考察

グリアジンはペプシンやトリプシン、キモトリプシンなどの消化酵素によって消化されることが知られている。しかし、本節の Western blot 法による解析の結果、血中に吸収された大部分のグリアジンは未消化グリアジンの分子量を維持していることが明らかとなった。また、グリアジンの含有量が多い血漿サンプルでは 65 kDa 以上の高分子量タンパク質の存在が確認された (Fig. 7)。本研究では、このタンパク質についての同定を行っていない。しかしながら、過去の研究でグリアジンは消化管に発現する組織トランスグルタミナーゼ (t-TG) により架橋結合を形成し、グリアジン-グリアジン複合体を形成することが報告されている[25,26]。したがって、観察された高分子量のタンパク質は、グリアジンやその分解物のグルタミン残基とリジン残基が t-TG によって架橋して生成されたと推察される。

血漿中から抽出したグリアジンをグリアジン感作ラットに投与すると、サンプル中のグリアジン量に依存してエバンスブルーの漏出量は増加した (Fig. 8)。しかしながら、未消化グリアジンを 150 ng/mL の濃度となるように血漿に添加したサンプルよりも、47.1 ng/mL の濃度を示した経口投与後の血漿サンプルの方が、エバンスブルーの漏出量が多かった。この理由として、グリアジン感作ラットでは血漿中で修飾を受けたグリアジンに対して特異的な IgE 抗体が産生され、経口投与後の修飾を受けたグリアジンと強く反応することでエバンスブルーの漏出量が増加した可能性が考えられる。消化管吸収されたグリアジンと未消化のグリアジンに対する IgE 抗体の反応性の違いについてはさらに解析が必要である。

第4節 小括

本章では、小麦アレルギーであるグリアジンの消化管吸収経路とその吸収特性およびアスピリンによるグリアジンの消化管吸収の亢進機構をラットで解析した。

第1節では、解熱鎮痛に用いる臨床投与量に相当するアスピリンの投与が経口投与後のグリアジンの吸収を亢進することを示した。一方、小腸ループ法による解析、アスピリンの投与によるグリアジンの吸収に変化は認められなかった。したがって、経口投与後のグリアジンの吸収には胃酸やペプシンによるグリアジン分子の修飾や低分子化による溶解度の亢進が関与する可能性が考えられた。第2節では、グリアジンが完全に溶解する低濃度で消化管吸収を評価できる小腸連続灌流法によりグリアジンの吸収とアスピリンの影響を評価した。グリアジンの吸収量は非特異的吸収マーカーであるFD-40と同程度の吸収率であったことから、消化管上部におけるグリアジンの吸収には細胞間隙経路が主に寄与することが示された。また、同実験法にて、アスピリンは胃を通過しなくても溶解したグリアジンの吸収を促進したことから、アスピリンによるグリアジンの吸収促進に溶解性が重要であるという仮説が裏付けられた。さらに、アスピリンは未消化グリアジンよりもペプシン消化により低分子化したグリアジンの吸収を大きく増加させたことから、アスピリンによるグリアジンの吸収増加に胃内でのグリアジンの低分子化も関与することが示唆された。過去の研究で、アスピリンがCOX-1の阻害やIAPの活性阻害を介して細胞障害を惹起し、FDの吸収を促進することが報告されている。したがって、アスピリンはCOX-1阻害によるPGの産生抑制やIAPの活性阻害などを介してグリアジンの細胞間隙経路を増加させる可能性が考えられる。第3節では、Western blot法により、吸収された大部分のグリアジンが未消化グリアジンの分子量を維持していること、および、皮内アレルギー反応試験の結果から、吸収されたグリアジンがアレルギー活性を保持していることを明らかにした。

第2章 OVAの消化管吸収と感作におよぼすNSAIDsの影響解析

鶏卵は即時型食物アレルギーの中で最も頻度の高い原因食品である。鶏卵アレルギーの患者は乳幼児に多く、患児の大部分は生後1年以内に寛解する [1]。鶏卵の全重量のうち卵白は56–61%を占め、卵白の9–11%はタンパク質である。卵白に含まれるタンパク質にはOVAやオボトランスフェリン、リゾチームなどがあり、OVAは最も含量が多い [31]。OVAは分子量45 kDaの糖タンパク質であり、セリンプロテアーゼインヒビター（セルピン）ファミリーに属している。また、OVAは即時型鶏卵アレルギーの主要アレルゲンとして知られており、水への溶解性が高く、取り扱いが簡便であることから、アレルギーモデル動物の作成に汎用されている。

第1章で、アスピリンはアレルゲン性を維持したままグリアジンの細胞間隙経路を介した吸収を増加させることを明らかにした。また、これまでのヒトやラットを用いた研究により、アスピリンなどのNSAIDsの服用が食物アレルゲンの消化管吸収を増加させ、食物アレルギー症状を惹起・増悪させることが明らかにされている [8]。これらの知見は、薬剤による消化管組織の傷害が食物アレルギーの”症状の惹起”に関与することを示唆している。一方、薬剤の服用により食物アレルゲンの吸収が増加した場合、免疫細胞に対するアレルゲンの曝露量も増加し、”感作の成立”にも影響を与える可能性が考えられるが詳細な報告はない。本章では、薬剤による食物アレルゲンの消化管透過性の亢進が食物アレルギーの感作に与える影響を明らかにすることを目的として、アスピリンを含む種々のNSAIDsの服用がOVAの経口感作におよぼす影響を解析した。

第1節 OVAの消化管吸収におよぼすアスピリンの影響

1-1. 緒言

第1章で、小腸上部におけるグリアジンの吸収には主に細胞間隙経路が関与することを明らかにした。一方、これまでの研究によりOVAの吸収には細胞間隙経路に加えて、クラスリンを介したエンドサイトーシス経路が関与することを報告している [20]。このようなタンパク質の違いによる吸収機構の差はアスピリンによる吸収促進作用にも影響する可能性が考えられる。また、第1章では、解熱鎮痛薬として用いられる用量 (500–1500 mg) のアスピリンについてのみ解析を行ったが、アスピリンは低用量 (100–300 mg) で抗血小板薬としても使用される。このような背景のもと、本節では最初にOVAを経口投与した後の血漿中濃度推移におよぼすアスピリンの影響について解析した。また、OVAの吸収に対して、高分子化合物の消化管吸収を促進させるスペルミン [32] の影響についても同様に解析した。

1-2. 結果

リン酸緩衝液-生理食塩水 (PBS) 投与群 (コントロール群) にOVAを経口投与した場合、血漿中のOVA濃度は経時的に増加し、投与後1.5時間で C_{\max} (0.81 ± 0.09 ng/mL) を示した (Fig 9A)。また、OVAの経口投与30分前に高用量 (30 mg/kg) のアスピリンを投与した群ではコントロール群と比較して、 C_{\max} が約2.3倍、投与から3時間までのAUC (AUC_{0-3h}) 値が約3.4倍に上昇した (Table 2)。一方、低用量 (3 mg/kg) のアスピリンを投与した群では血漿中のOVA濃度にコントロール群との差は確認できなかった (Fig. 9A)。OVAの経口投与と同時にスペルミンを投与した群では、高用量アスピリン投与群と同様にOVAの吸収増加が認められた (Fig. 9B)。このとき、 C_{\max} は約2.8倍、 AUC_{0-3h} は約4.0倍への上昇が認められた (Table 2)。以上の結果から、高用量のアスピリンやスペルミンはグリアジンと同様にOVAの吸収も促進することが確認された。

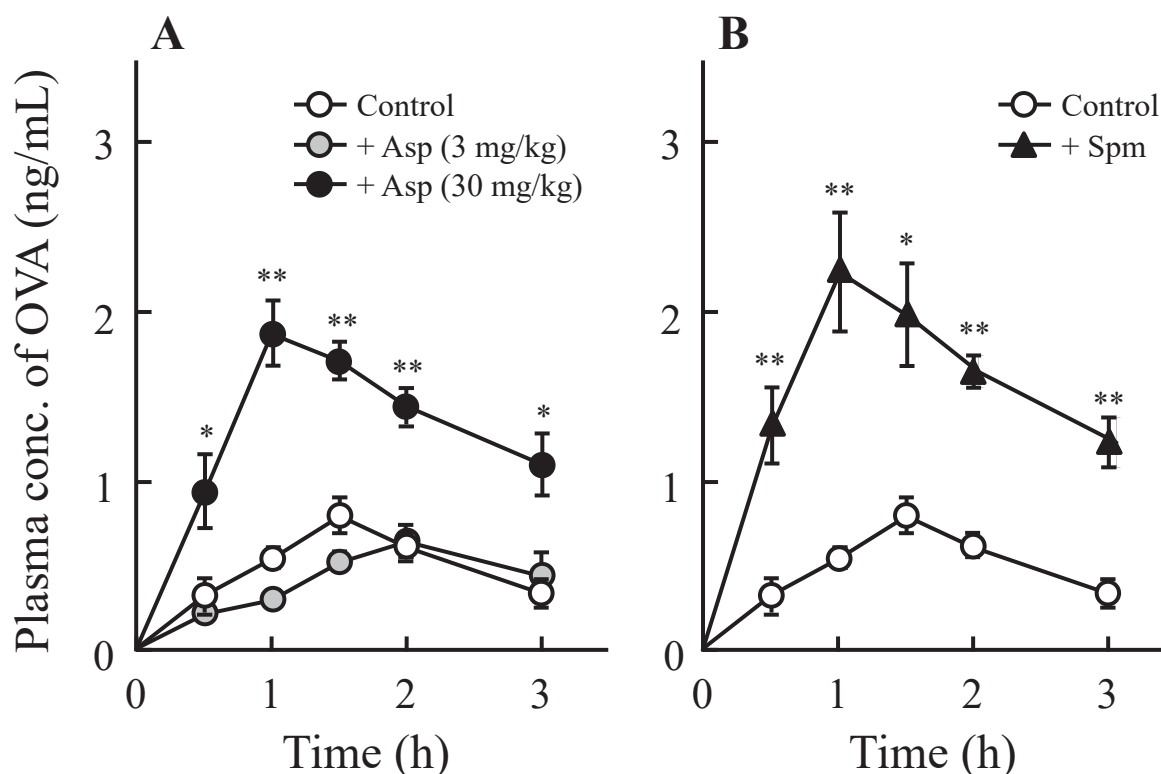


Fig. 9. Effects of aspirin (A) and spermine (B) on plasma concentrations of OVA after oral administration in rats. Vehicle alone [phosphate-buffered saline (pH 7.4), Control] or vehicle containing aspirin (Asp, 3 or 30 mg/kg) was administered 30 min before oral administration of OVA at a dose of 50 mg/kg. Spermine (Spm, 20 mg/kg) was orally administered with OVA (50 mg/kg) simultaneously. Each value represents the mean \pm S.E. of four rats. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the Control group.

Table 2. Effects of aspirin and spermine on absorption parameters of OVA after oral administration in rats.

	Control	Aspirin		Spermine
		3 mg/kg	30 mg/kg	
C_{\max} (ng/mL)	0.81 ± 0.09	0.61 ± 0.12	1.85 ± 0.19^a	2.23 ± 0.35^b
AUC _{0-3 h} (ng h/mL)	1.14 ± 0.13	1.17 ± 0.14	3.84 ± 0.22^b	4.61 ± 0.32^b

C_{\max} , peak plasma concentration; AUC, area under the plasma concentration–time curve. Vehicle alone [phosphate-buffered saline (pH 7.4), Control] or vehicle containing aspirin (3 or 30 mg/kg) was administered 30 min before oral administration of OVA at a dose of 50 mg/kg. Spermine (20 mg/kg) was orally administered with OVA (50 mg/kg) simultaneously. Each value represents the mean \pm S.E. of four rats. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ compared with the Control group.

1-3. 考察

アスピリンは臨床での用途によって用量が異なる。臨床で解熱鎮痛薬として用いられる用量（500–1500 mg）や抗血小板薬として用いられる用量（100–300 mg）を第1章と同様に体表面積でラットに換算した場合、その用量はそれぞれ 62–186 mg/kg および 12.4–37.2 mg/kg となる。本研究では、ラットに臨床で起こりうる濃度である 30 mg/kg および 3 mg/kg で投与した。

アスピリンは用量依存的に OVA の吸収を促進した (Fig. 9A)。本実験で OVA の血漿中濃度はグリアジンと同様に ELISA 法を用いて測定している。したがって、測定した OVA には未消化体だけでなく、一部消化された OVA を含んでいる可能性がある。しかし、プロテアーゼ阻害剤存在下で OVA の消化管灌流実験を行った場合、OVA は未消化体のまま小腸から吸収されることが明らかにされている [20]。また、アスピリンは OVA の経口負荷によるアレルギー症状を惹起・増悪したことが報告されている [27]。これらの報告は、アスピリンが少なくとも部分的に未消化体の OVA の経口吸収を促進することを示唆している。また、第1章で、アスピリンは細胞間隙経路を介したグリアジンの吸収を促進させた。前述のように、アスピリンは COX-1 阻害 [33] や酸化ストレス [34]、そして密着結合タンパク質の発現低下 [24,34] などを介して、細胞間隙経路を増加させることが報告されている。また、非選択的 COX-1/COX-2 阻害剤であるアスピリンやジクロフェナクがリゾチームの吸収を促進したのに対し、COX-2 選択的阻害剤であるメロキシカムは促進しなかったことや、アスピリン処置により増加したリゾチームの消化管吸収がミソプロストールの併用でコントロールと同程度まで抑制されたことが報告されている [12,13]。さらに Louis ら [36] や Isobe ら [37] は、COX-1 に対する阻害活性が強いインドメタシンの投与により OVA の吸収が促進されたことを報告している。これらの知見は、アスピリンが COX-1 の阻害による PG の産生を低下させることで OVA の吸収を促進する可能性を示すものである。

アスピリンと同様に、スペルミンは OVA の経口吸収を増加させた (Fig. 9B)。スペルミンが OVA の吸収を促進した機序は完全には解明されていない。Sugita らは、スペルミンが消化管の上皮細胞に傷害を与えることなく FD などの高分子化合物の経口吸収を増加させたことを報告している [32]。スペルミンによる高分子の吸収促進が正の電荷をもつスペルミンのアミノ基と負の電荷を有する上皮細胞膜の構成成分との相互作用により生じると推測している。このことは、アスピリンと

スペルミンによる OVA の吸収促進作用は異なった機序で起こることを示唆するものである。しかしながら、Sugita らは別の研究で、OVA 感作マウスに OVA とスペルミンを経口投与した場合、OVA を単独投与した群よりも OVA の吸収や血漿中ヒスタミン濃度が高い値を示したことを報告している [38]。したがって、スペルミンはアスピリンと同様に、少なくとも部分的に未消化体の OVA の吸収を促進すると推察される。

第2節 OVAの経口感作におよぼすNSAIDsの影響

2-1. 緒言

前節で高用量のアスピリンとスペルミンはいずれも OVA の経口吸収を促進することを明らかにした。本節では、両薬剤による OVA の吸収が OVA の経口感作に影響をおよぼすか否かについて解析した。抗原感作の指標には、血漿中の IgE や IgG₁、IgG_{2a} などのアレルゲン特異抗体価を測定する方法やアレルゲンを負荷することで惹起されるアナフィラキシー症状の重症度を評価する方法、摘出した脾臓などのリンパ組織におけるサイトカインの産生量を測定する方法などが用いられる。特に、アレルゲン特異 IgE や IgG₁、IgG_{2a} 抗体価を測定する方法は、簡便かつ、定量的にアレルゲンへの感作が評価できるため、感作の確認に汎用される。B 細胞はアレルゲンの刺激により、抗体産生細胞に変化して IgM を産生する。IgM はクラススイッチにより IgE や IgG に変化するが、IgE や IgG₁ へのクラススイッチは Th2 が産生するサイトカインである IL-4 に、IgG_{2a} は Th1 が産生するインターフェロン- γ (IFN- γ) によってそれぞれ調節される [39]。本研究では血漿中の OVA 特異 IgE と IgG₁ の抗体価を感作の指標とし、OVA の経口感作におよぼすアスピリンとスペルミンの影響について解析した。また、COX 阻害選択性の異なる NSAIDs として、ジクロフェナク、インドメタシン、およびメロキシカムを用いて、OVA 感作におよぼす各種 NSAIDs の影響を評価した。

2-2. 結果

OVAを隔日で8週間、経口投与した場合、血漿中のOVA特異IgE抗体価は感作開始2週間まで上昇し、その後経時的に低下した (Figs. 10A & 11A)。血漿中のOVA特異IgG₁抗体価は溶媒 (PBS) のみを処置した群でも上昇したが、上昇の程度はIgE抗体価よりも緩やかであった (Figs. 10B & 11B)。低用量アスピリン投与群におけるOVA特異IgE抗体価およびIgG₁抗体価は共にPBSのみを投与した群と同程度であった (Figs. 10)。一方、高用量アスピリン投与群では感作開始から8週目にOVA特異IgE抗体価の有意な上昇が認められた (Fig. 10A)。また、高用量のアスピリン投与群では6週目と8週目に血漿中OVA特異IgG₁抗体価の上昇傾向が確認された (Fig. 10B)。次に、アスピリンの投与によるOVAの経口感作の増強がOVAの消化管吸収の増加と関連するか否かを確認するため、アスピリ

ンと同様にOVAの消化管吸収を亢進させたスペルミンを用いて同様の検討を行った。その結果、解析した8週目までに血漿中OVA特異IgE抗体価およびIgG₁抗体価はいずれも有意な変化を示さなかった (Fig. 11)。

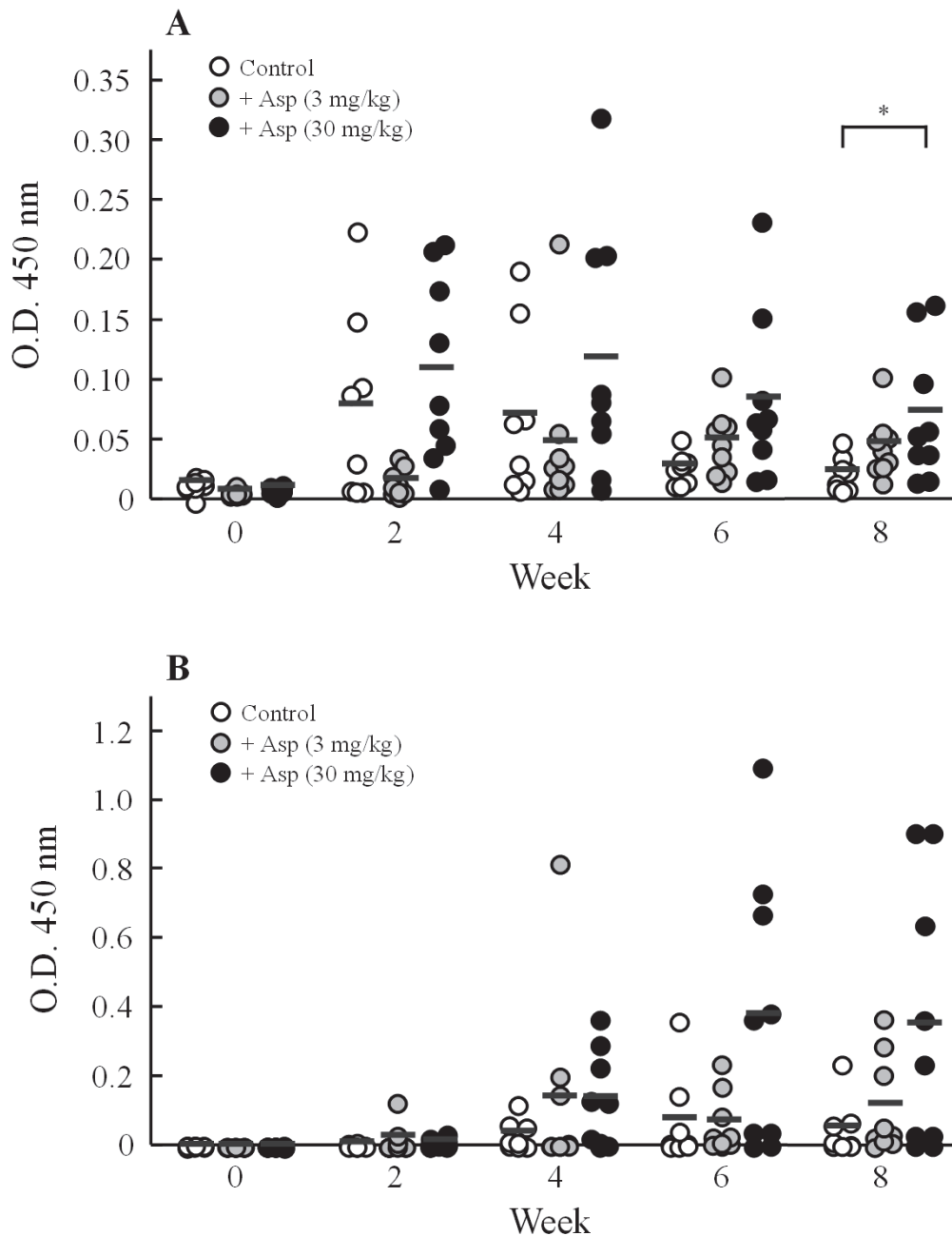


Fig. 10. Effects of aspirin on oral sensitization to OVA in rats. Vehicle alone [phosphate-buffered saline (pH 7.4), Control] or vehicle containing aspirin (Asp, 3 or 30 mg/kg) was administered 30 min before oral administration of OVA at a dose of 50 mg/animal. These oral immunizations were repeated every other day for 8 weeks. Plasma levels of OVA-specific IgE (A) and IgG₁ (B) Abs in rats were measured by ELISA. The optical densities measured at 450 nm in 10-fold- or 30,000-fold-diluted plasma are shown. Bars represent the mean values of eight to nine rats. *P < 0.05 compared with the Control group.

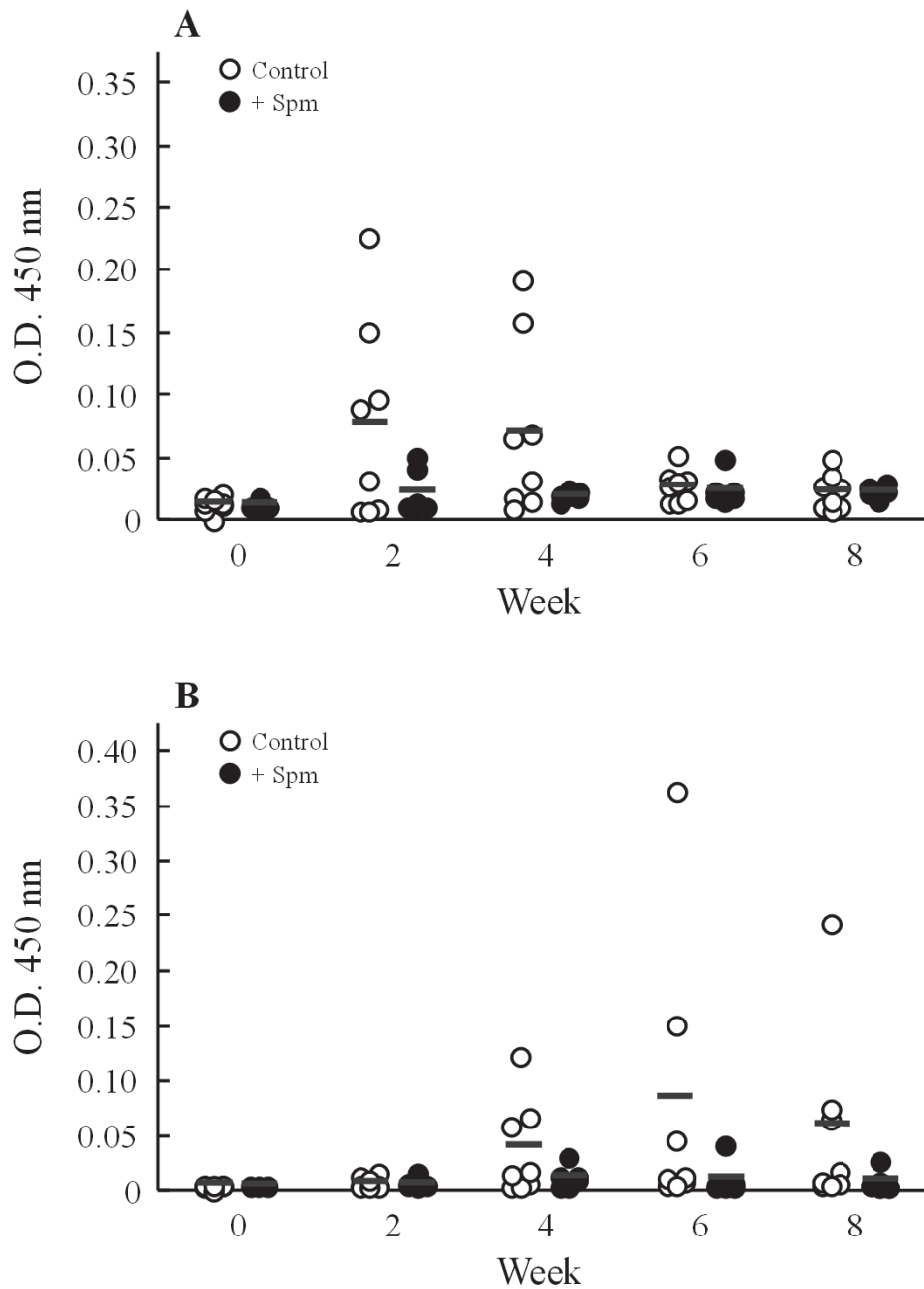


Fig. 11. Effects of spermine on oral sensitization to OVA in rats. Vehicle alone [phosphate-buffered saline (pH 7.4), Control] was administered 30 min before oral administration of OVA at a dose of 50 mg/animal. Spermine (Spm, 5 mg) was orally administered with OVA (50 mg/kg) simultaneously. These oral immunizations were repeated every other day for 8 weeks. Plasma levels of OVA-specific IgE (A) and IgG₁ (B) Abs in rats were measured by ELISA. The optical densities measured at 450 nm in 10-fold- or 30,000-fold-diluted plasma are shown. Bars represent the mean values of six to eight rats.

アスピリンによる OVA の経口感作増強に COX の活性阻害が関与するか否かを確認するため、OVA の経口感作におよぼす NSAIDs の影響を解析した (Fig. 12)。ジクロフェナク投与群では 8 週目にコントロール群より有意な OVA 特異的 IgE 抗体価の上昇を認め、IgG₁ 抗体価はコントロール群よりも高い傾向を示した。また、インドメタシン投与群ではコントロール群よりも有意に高い血漿中 OVA 特異 IgE 抗体価および IgG₁ 抗体価を示した。一方、メロキシカム投与群ではいずれの週においても抗体価の有意な変化が認められなかった。

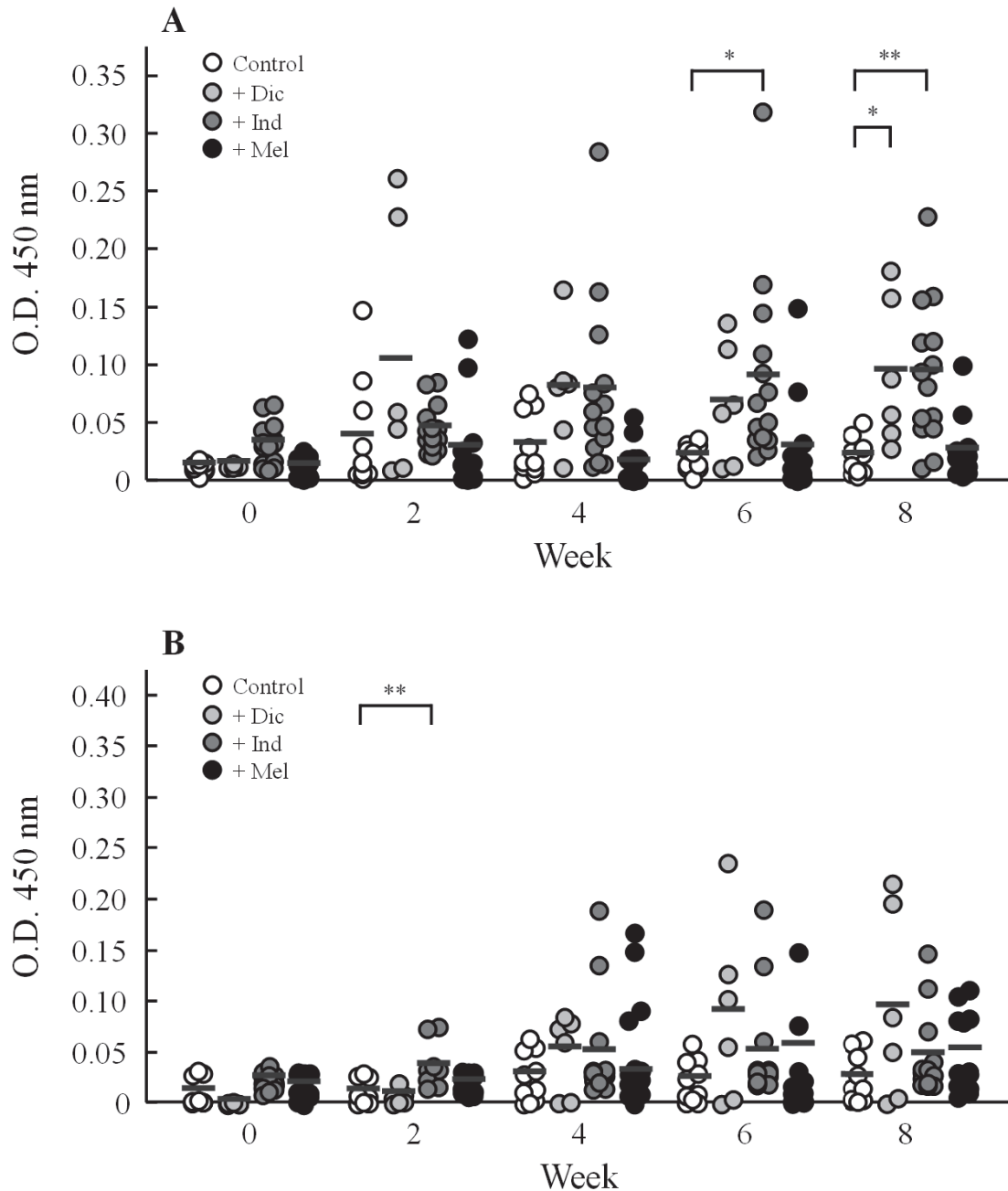


Fig. 12. Effects of various NSAIDs on oral sensitization to OVA in rats. Vehicle alone [phosphate-buffered saline (pH 7.4), Control] or vehicle containing diclofenac (Dic, 1.5 mg/kg), indomethacin (Ind, 3 mg/kg), or meloxicam (Mel, 0.3 mg/kg) was administered 30 min before oral administration of OVA at a dose of 50 mg/animal. These oral immunizations were repeated every other day for 8 weeks. Levels of OVA-specific IgE (A) and IgG₁ (B) Abs in the plasma of rats were measured by ELISA. The optical densities measured at 450 nm in 10-fold- or 30,000-fold-diluted plasma are shown. Bars represent the mean values of six to fourteen rats. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 with respect to the Control group.

2-3. 考察

前節でアスピリンとスペルミンは OVA の経口吸収を増加させた (Fig. 9)。一方、アスピリンは用量依存的に OVA の経口感作を亢進したが、スペルミンでは経口感作に対する有意な変化を示さなかった (Figs. 10 & 11)。これらの結果は、アスピリンによる OVA の経口感作の亢進が消化管からの OVA の吸収増加に起因しないことを示している。

アスピリンは COX-1 の阻害を介した消化管傷害を惹起する。本節では OVA の経口感作の亢進における COX-1 阻害の関与を明らかにするため、COX のアイソザイムに対して異なる選択性を有する複数の NSAIDs を用いて、同様に感作実験を行った。Table 1 で記したように、ジクロフェナクは非選択的 COX 阻害剤であるが、アスピリンとインドメタシンは COX-1 に対する阻害活性が強い薬剤である。一方、メロキシカムは COX-2 選択的阻害剤である。本実験でジクロフェナクやインドメタシン投与群では、コントロール群と比較して、OVA 特異 IgE 抗体価の有意な上昇が確認された (Fig. 12A)。しかし、メロキシカム投与群では、OVA 特異 IgE 抗体価の上昇は確認できなかった。これらの結果から、NSAIDs による OVA の経口感作の亢進機序に COX-1 の阻害が関与している可能性が考えられた。

本研究では、アスピリンによる経口感作の亢進機序の解明には至っていない。アスピリンはスペルミンと異なり COX-1 の阻害に起因する消化管傷害を惹起する。したがって、アスピリンによる OVA の経口感作亢進には、COX-1 の阻害やそれに起因する消化管傷害が関与している可能性が考えられる。例えば、Dhuban らは CD4⁺T 細胞のフローサイトメトリー解析により、食物アレルギーの患児は健常児よりも IL-17 産生 CD4⁺T 細胞 (Th17 細胞) の割合が低いことを報告している [40]。また、Moon らは、アスピリンが喘息モデルマウスの肺 T 細胞中の Th17 細胞の分極を抑制し、IL-17 の産生を阻害したことを報告している [41]。さらに、Boniface らは、PGE₂ がヒトやマウスの Th17 細胞の分化や炎症誘発作用を直接促進させる可能性があることを報告している [42]。これらの報告より、アスピリンは COX-1 の阻害による PG の産生を抑制し、Th17 細胞の分極障害を惹起することで、OVA の感作を亢進させた可能性が考えられる。近年、IL-17 に加えて、thymic stromal lymphopoietin (TSLP) や IL-33、IL-25 などのサイトカインが Th2 優位な反応を促進し、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を惹起することが報告されている [42,43]。これらのサイトカ

インはアレルギーやサイトカイン、プロテアーゼなどの刺激によって活性化された消化管や肺の上皮細胞およびケラチノサイトから分泌される [44,45]。アスピリンは消化管の上皮細胞に傷害を惹起することから、傷害を受けた上皮細胞からこれらのサイトカインが分泌され、OVA に対する経口感作を増強させた可能性が考えられる。さらに、システイニルロイコトリエン (LTs) や LTB₄、LTC₄ などの LTs は肺における IL-33 の産生を促進することでアレルギーに対する感作を誘発することが報告されている [47]。したがって、アスピリンが COX 阻害を介したロイコトリエンの産生の増加により OVA の感作を増強している可能性も考えられる。今後、アスピリンによる経口感作亢進に影響する因子の解明が必要であると考えられる。

ジクロフェナクの臨床投与量は1回25–50 mg、インドメタシンの臨床投与量は1回25–37.5 mg、メロキシカムの臨床投与量は1回10–15 mgである。第1章と同様の手法で、これらの用量をラットに対する投与量に換算した場合、それぞれ、3.1–6.2 mg/kg、3.1–4.65 mg/kgおよび1.24–1.86 mg/kgに相当する。本研究では、ジクロフェナク、インドメタシン、メロキシカムをそれぞれ1.5 mg/kg、3 mg/kg、および0.3 mg/kgの用量でラットに投与している。この投与量はほぼ臨床用量に相当するものであり、本研究で観察されたジクロフェナクやインドメタシンによる経口感作の亢進作用はヒトでも観察される可能性が高いと推察される。

第3節 OVAの経皮感作におよぼすNSAIDsの影響

3-1. 緒言

これまで、食物アレルゲンの主要感作経路は経口感作であると考えられていた。一方、近年では、アレルゲンに対して経皮的な感作を受けて食物アレルギーを発症する例が散見されるようになり、食物アレルギーの発症における経皮感作の重要性が明らかになりつつある。経皮感作による食物アレルギーの発症について、Lackは皮膚バリア機能が低下するアトピー性皮膚炎や湿疹を有する患児は離乳食を開始する前に環境中の食物抗原に経皮感作され、Th2優位な免疫応答によって食物アレルギーを発症すること、また、適切な量の食物を適切な時期に経口摂取した場合には制御性T細胞 (Treg) を介した免疫寛容が誘導され、食物アレルギーの発症を抑制するとした二重抗原曝露仮説を提唱している [48]。この説を裏付けるように、Du Toitらは、イギリスとイスラエルに在住するユダヤ人の小児を対象としたピーナッツアレルギーの有病率調査により、ピーナッツをほとんど摂取しないイギリス在住のユダヤ人の有病率 (1.85%) がピーナッツを生後早期より摂取するイスラエル在住のユダヤ人の有病率 (0.17%) よりも高いことを報告している [49]。また、乳児湿疹やアトピー性皮膚炎により皮膚のバリア機能が障害されることでアレルゲンの感作が促進することも報告されている [50]。

第2節の結果より、NSAIDsはCOX-1の阻害を介してOVAの経口感作を亢進した可能性を示した。本節では、NSAIDsによる感作の亢進作用が経口感作以外の感作経路でも認められるかを確認するため、OVAの経皮感作におよぼすNSAIDsの影響を解析した。

3-2. 結果

ラットの背部を一部剃毛した後、セロハンテープの貼剥を10回繰り返す方法で角質層を剥離した。その後、OVAをガーゼに染み込ませ、週3回の頻度で4週間貼付する方法で経皮感作モデルを作製した。その結果、OVA特異IgE抗体価は、コントロール群およびNSAIDs投与群の両群において、OVAの感作開始2週目より上昇が確認された (Fig. 13A)。このとき、コントロール群と比較してアスピリン (30 mg/kg) 投与群ではIgE抗体価の上昇傾向が確認されたが、アスピリン

以外の NSAIDs を投与した群ではコントロール群との差は認められなかった。さらに、OVA 特異 IgG₁ 抗体価については、コントロール群および NSAIDs 投与群の両群で 2 週目以降に増加が確認された。このとき、アスピリン投与群では IgG₁ 抗体価の上昇傾向が認められたが、アスピリン以外の NSAIDs はコントロール群と比較して抗体価の差は認められなかった (Fig. 13B)。

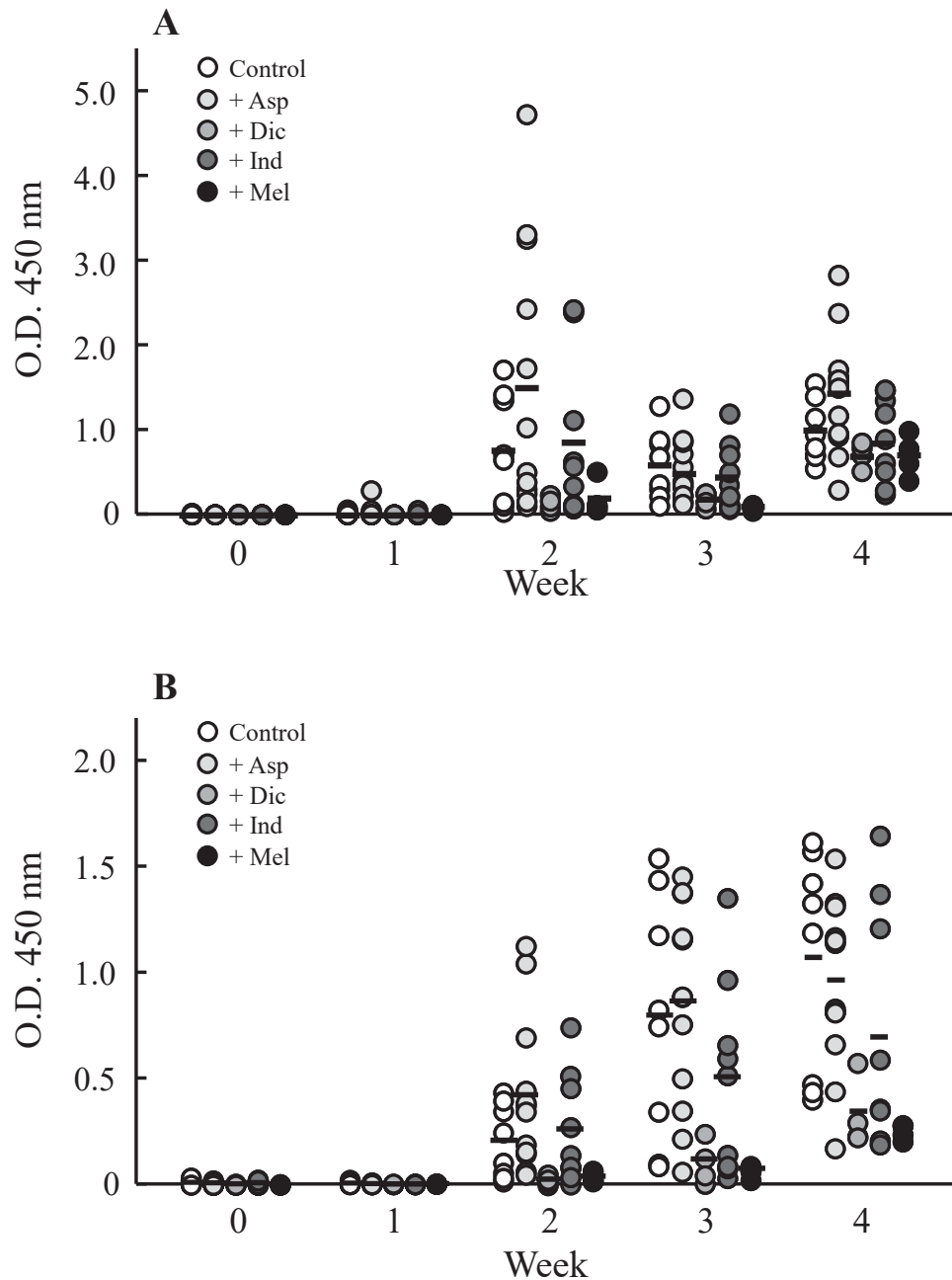


Fig. 13. Effects of various NSAIDs on percutaneous sensitization to OVA in rats. Vehicle alone [phosphate-buffered saline (pH 7.4), Control] or vehicle containing aspirin (Asp, 30 mg/kg), diclofenac (Dic, 1.5 mg/kg), indomethacin (Ind, 3 mg/kg), or meloxicam (Mel, 0.3 mg/kg) was administered 30 min before percutaneous administration of OVA at a dose of 1 mg/animal. These percutaneous immunizations were repeated every other day for 4 weeks. Levels of OVA-specific IgE (A) and IgG₁ (B) Abs in the plasma of rats were measured by ELISA. The optical densities measured at 450 nm in 50-fold- or 30,000-fold-diluted plasma are shown. Bars represent the mean values of four to twelve rats.

3-3. 考察

本節では、NSAIDs による OVA 感作の亢進作用が経口感作以外の感作経路でも認められるかを確認するため、OVA の経皮感作におよぼす NSAIDs の影響を解析した。高用量 (30 mg/kg) のアスピリンは OVA の経皮感作を亢進する傾向にあった (Fig. 13)。一方、経口感作の亢進作用を示したジクロフェナクやインドメタシンは経皮感作に影響を与えなかった。本実験で経口投与した NSAIDs が経皮感作時にアレルゲンの血中濃度に影響を与えるか否かは確認していない。前述のように、アスピリンは消化管の密着結合を形成する ZO-1 や claudin-7 などのタンパク質の発現を低下させることが報告されている [28]。また、ZOs や claudins は皮膚の密着結合の形成にも関与している [51]。これらの報告は、アスピリンが皮膚の密着結合タンパク質と相互作用し、経細胞経路を増加させる可能性を示唆するものである。しかしながら、これらの報告で用いられているアスピリンの濃度は 5–10 mM と高濃度である。アスピリンは投与後速やかに加水分解を受け、サリチル酸に代謝される。アスピリンのインタビューフォームによると、300 mg のアスピリンを服用した健康人のアスピリンおよびサリチル酸の最高血漿中濃度は、それぞれ 8.54 mg/L (47.4 μM) および 17.8 mg/L (128.9 μM) と報告されている。したがって、*in vitro* で報告されている ASP と密着結合タンパク質との相互作用が *in vivo* でアスピリンを経口投与した時の皮膚でも起こる可能性は低いと考えられる。このことから、アスピリンは OVA の曝露量を変化させることなく、OVA の経皮感作を増強させる可能性がある。この結果は、スペルミンが OVA の経口吸収を増強させるが、感作に影響しないという結果と一致している。

アスピリンと同様に消化管傷害を惹起するジクロフェナクやインドメタシンでは経皮感作の亢進傾向を示さなかった。この理由は不明であるが、今後、解析するラット数を増やすとともに、アスピリンによる経皮感作の亢進作用がアスピリンに特異的な反応によるものであるのか、また他のアレルゲンでも同様の現象が認められるのかについて、さらに解析を行う必要がある。

第4節 小括

本章では、OVAの経口感作と経皮感作におよぼすNSAIDsの影響をラットで解析した。

第1節では、臨床で解熱鎮痛薬に用いる投与量に相当するアスピリンがOVAの経口吸収を亢進することを示した。また、高分子化合物の消化管透過性を促進するスペルミンもアスピリンと同程度、OVAの経口吸収を促進することが示された。アスピリンはPGの産生を阻害することで消化管障害を惹起した結果、アレルゲンの消化管吸収を亢進すると考えられているが、スペルミンは本研究で使用した用量で消化管傷害を惹起しないことが報告されている。したがって、スペルミンはアスピリンと異なった機序でOVAの吸収を促進したと考える。

第2節では、COX選択性の異なるNSAIDsとスペルミンがOVAの経口感作に与える影響について解析した。その結果、COX非選択的阻害剤であるアスピリンやインドメタシン、ジクロフェナクはOVAの経口感作を亢進させたが、COX-2選択的なメロキシカムでは抗体価の上昇が確認されなかった。この結果から、COX-1阻害による消化管傷害がアレルゲンに対する経口感作の増強に寄与していることが推察された。また、アスピリンと同様にOVAの吸収を増加させたスペルミンはOVAの経口感作に影響しなかった。したがって、アスピリンを含む一部のNSAIDsによる経口感作亢進の作用はOVAの経口吸収の増加だけでは説明できない。NSAIDsによる経口感作の亢進機序には、COX-1の阻害によるTh17細胞の分極障害や小腸上皮細胞の傷害によるTSLPやIL-33、IL-25などのサイトカイン産生の亢進などが関与すると推察している。

第3節では、NSAIDsがOVAの経皮感作に与える影響について解析した。その結果、アスピリンはOVAの経皮感作を亢進する傾向を示したが、その他のNSAIDsは経皮感作に影響しなかった。アスピリンによる経皮感作の亢進作用が、アスピリンに特異的な反応によるものなのか、また他のアレルゲンでも同様の現象が認められるのかについて、今後さらに解析を行う必要がある。

結論

アレルギー特異 IgE 抗体が関与する I 型食物アレルギーは、“感作の成立”と“症状の惹起”の 2 つの段階を経て病態が形成される。これまでのヒトやラットの研究により、NSAIDs のひとつであるアスピリンの服用が小麦アレルギーの主要抗原であるグリアジンの消化管吸収を増加させ、アレルギー症状を惹起・増悪することが明らかにされている。一方、小麦グリアジンの消化管吸収特性やアスピリンによる消化管吸収亢進の機序は解明されていない。また、アスピリンの服用によるアレルギーの吸収増加が“感作の成立”に与える影響は解析されていない。本研究では、ラットを用いて小麦グリアジンの消化管吸収経路とアスピリンによるグリアジンの消化管吸収亢進の機序を明らかにすること、および食物アレルギーの感作におよぼすアスピリン処置の影響について評価することを目的として解析を行った。その結果、以下の知見を得た。

1. グリアジンの消化管吸収特性とアスピリンの影響について

- 1) 消化管上部におけるグリアジンの吸収には細胞間隙経路が主に関与している。
- 2) 臨床投与量に相当するアスピリンの服用は細胞間隙経路を介したグリアジンの吸収を促進する。
このとき、吸収されたグリアジンは大部分が未消化体の分子量やアレルギー活性を保持している。
- 3) グリアジンの消化管吸収やアスピリンによるグリアジンの吸収促進には、胃内でのグリアジン分子の修飾や低分子化による溶解度の亢進が関与している。

これらの知見は、食物アレルギーの分子量や溶解度などの物理化学的性質がアレルギーの吸収特性やアスピリンによる吸収促進作用の影響を決定づける重要な因子となり、アレルギー症状の誘発に深く関与することを示している。したがって、胃内 pH やタンパク質の溶解度を変える薬剤および食事などが食物アレルギーの吸収を変動させ、アレルギー症状の発症に関与する可能性がある。

2. OVA の経口感作におよぼすアスピリンの影響について

- 1) 非選択的 COX 阻害薬であるアスピリンやインドメタシン、ジクロフェナクの服用は臨床投与量で OVA の経口感作を増強するが、COX-2 選択的なメロキシカムは経口感作に影響しない。
- 2) アスピリンによる OVA の経口感作の亢進は、OVA の経口吸収の亢進に起因しない。
- 3) アスピリンの服用は OVA の経皮感作を亢進する可能性がある。

これらの知見は、アスピリンを含む一部 NSAIDs の服用が食物アレルギーに対する感作を亢進し、食物アレルギーの発症率を増加させる一因となる可能性を示している。アスピリンによる経口感作の亢進には、COX-1 の阻害による Th17 細胞の分極障害や小腸上皮細胞の傷害による TSLP や IL-33、IL-25 などのサイトカイン産生の亢進などが関与すると考えられる。今後、NSAIDs による経口感作の亢進にこれらの因子が関与するかを解析する必要がある。また、アスピリンの服用が OVA の経皮感作を増強する機序についても今後、解明する必要がある。

本研究の成果が、食物アレルギーの発症における病態生理学的な機序の解明と治療・予防法の開発に有用な知見となることを期待する。

実験方法

1. 第 1 章の実験の部

1.1. 使用した試薬

グリアジンおよびアスピリンは東京化成工業社および和光純薬工業社よりそれぞれ入手した。FITC、FD-40、ペプシンおよびエバンスブルーは Sigma-Aldrich 社より購入した。ウサギ抗小麦グリアジン抗体 (BYA2520-1) および西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (ALI3404) は Accurate Chemical and Scientific 社および BioSource International 社よりそれぞれ購入した。アラムアジュバント (Imject® Alum) は Thermo Fisher Scientific 社より入手した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

1.2. 実験動物

日本エスエルシー社より 7-8 週例の雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラットを購入した。ラットは通常飼育用の餌 (MF, オリエンタル酵母社) および水を常時摂取が可能な状態で飼育した。また、実験開始 12 時間サイクルの明暗条件下に設定した室温 23°C、相対湿度 50%の動物室で飼育し、試験前の 1 週間馴化させた。すべての実験は動物実験ガイドラインに従い、広島大学動物実験委員会の承認 (承認番号 A16-138) を得て実施した。

1.3. 経口投与方法によるグリアジンの吸収評価

一晩絶食したラットにペントバルビタール (30 mg/kg) (共立製薬) を腹腔内投与し、大腿動脈にポリエチレンチューブ (PE-50) を挿入した。コントロール群には PBS (pH 7.4; 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5 mM グルコース, 1.0 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂) のみ、またアスピリン投与群には PBS に溶解したアスピリン (30 mg/mL) を 1 mL/kg の投与量で経口ゾンデにより強制経口投与し、30 分後にオリーブ油に懸濁したグリアジン (100 mg/mL) 1 mL/kg を同様に経口投与した。その後、ヘパリン (共立製薬) を添加した大腿動脈カニューラから経時的 (グ

リジアジン投与開始を0分とし、15、30、60、90、120 および 180 分) に3時間まで血液 (250 μ L) を採取した。なお、0分の採血はグリアジンの投与直前に採取した。実験終了時 (開始3時間後)、血漿中グリアジンの分子量とアレルギー活性を評価するためにヘパリンを通じた注射シリンジを用いて腹大動脈より全血を採取した。採取した血液をインバータマイクロ冷却遠心機 (KUBOTA 社、ローター: RA-57J) にて 20°C で遠心分離 (10,000 rpm \times 10 分) することで血漿サンプルを得た。得られた血漿サンプルは実験に使用するまでマイクロチューブ中に -30°C で保存した。

1.4. 小腸閉塞ループ法によるグリアジンの吸収評価

一晩絶食したラットにペントバルビタール (30 mg/kg) を腹腔内投与し、大腿動脈に PE-50 を挿入した。ハサミで正中線に沿って開腹した後、胆管をシルクブレードで結紮した。胃の下部 10 cm の部位から 20 cm の小腸を露出した後、37°C で加温した生理食塩水で管腔側を十分洗浄した。洗浄後、小腸の両端をシルクブレードで結紮して閉塞ループを作製した。作成したループ内にコントロール群には PBS (pH7.4)、アスピリン投与群には PBS に溶解したアスピリン (30 mg/mL) をそれぞれ 1 mL/kg 体重の投与量で注射筒を用いて投与した。30 分後にオリーブ油に懸濁したグリアジン (100 mg/mL) を 1 mL/kg 体重の投与量で同様にループ内に投与した。その後、大腿動脈カニューラから経時的に1時間まで (グリアジン投与開始を0分とし、5、10、15、30 および 60 分) 血液 (250 μ L) を採取した。0分の採血はグリアジンの投与直前に採取した。なお、実験中はライトを当てることで、体温を 37°C に保った。血漿サンプルは 1.3 と同様の操作で採取し、実験に使用するまでマイクロチューブ中に -30°C で保存した。

1.5. ELISA 法によるグリアジンの定量

血漿中のグリアジン濃度は森永生科学研究所 FASPEK 小麦測定キット (グリアジン) を使用して定量した。検量線のサンプルは、キットに付属している小麦標準品を検体希釈液IIによって段階希釈することで作成した。予備的検討で、小麦標準品中のグリアジン含量は 63.9% と算出されたため、グリアジン濃度をこの値で補正した。各ウェルに検体希釈液 II で 2 倍に希釈した各血漿サンプルを 100 μ L 加え、室温で 1 時間インキュベートした。各ウェルを洗浄液 200 μ L で 6 回洗浄した後、

酵素標識グリアジン抗体溶液を 100 μ L ずつ加え、室温で 30 分インキュベートした。各ウェルを洗浄液で 6 回洗浄した後、遮光下で酵素基質溶液を 100 μ L 加えて 10 分間発色させた後、反応停止液 100 μ L で反応を停止させ、波長 450 nm の吸光度を測定した。グリアジンの測定範囲は 0.78–50 ng/mL であった。

1.6. FITC 標識グリアジンの調製

グリアジンの FITC 標識は Yokooji らの変法 [15]でおこなった。グリアジン 200 mg をエタノール 20 mL と 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 20 mL の混合液に溶解し、室温で 10 分間遠心分離 (3,000 \times g) した。上清を採取した後、マグネチックスターラーで攪拌しながら、0.1 M ホウ酸緩衝液に溶解した FITC 2 mg を滴下した。室温で攪拌しながら 2 時間反応させた後、0.1 M ホウ酸で pH 7.5 に調整した。調製した溶液をセルロースチューブ (SPECTRUMLABS, 3.5 kDa-カットオフ) に入れ、蒸留水につけて 4 $^{\circ}$ C で透析することによりグリアジンと結合していない FITC を除去した。蒸留水は 1 日に 2 回交換し、交換する際に蒸留水中の蛍光強度を測定した。外液中の蛍光強度が 500 以下になったときに透析を終了した。透析後の溶液を 100 mL ナスフラスコに分注し、遮光した状態で凍結乾燥した。凍結乾燥後、SDS-PAGE を行い、 α / β -、 γ -および ω 1,2-グリアジン (~30–50 kDa) に相当する分子量のバンドをクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色と蛍光イメージアナライザー (Typhoon FLA-7000, GE Healthcare) で検出した。得られた FITC-グリアジンは、実験に使用するまでマイクロチューブ中に -30 $^{\circ}$ C で保存した。

1.7. FITC-グリアジンのペプシン消化

グリアジンのペプシン消化は Kumagai らおよび Bodinier らの変法により行った[23][52]。0.1 M 塩酸 (pH 1.5) に溶解させた FITC-グリアジン (512 μ g/mL) 250 μ L をマイクロチューブに入れ、そこに 0.1 M 塩酸に溶かしたペプシン (474 IU/mL, 5.12 μ g/mL) 250 μ L を添加した。ペプシンを添加後、サンプルを 37 $^{\circ}$ C の湯浴につけ反応を開始した。この時間を 0 分とし、15、30、45 および 60 分後に反応を停止させるために 1 M NaOH を 50 μ L 加えた。1 M NaOH をあらかじめ加えた、ペプシンと FITC-グリアジンを混合したものを 0 分のサンプルとした。ペプシンによる FITC-グリアジン

の消化は 1.6 と同様に SDS-PAGE で確認した。なお、小腸連続灌流法には、ペプシンで 0.75 時間処理したグリアジンをペプシン処理グリアジンとして使用した。得られた FITC-グリアジンは凍結乾燥後、実験に使用するまでマイクロチューブ中に -30°C で保存した。

1.8. 小腸連続灌流法によるグリアジンの吸収評価

一晩絶食したラットにペントバルビタール (30 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔した。実験中はライトを当てることで、体温を 37°C に保った。ハサミで正中線に沿って開腹した後、胆管をシルクブレードで結紮した。胃の下部 10 cm の部位から 20 cm の小腸を露出した後、 37°C で加温した生理食塩水で管腔側を十分洗浄した。洗浄後、小腸の両端にシリコンチューブを挿入しシルクブレードで結紮した。シリコンチューブをペリスタポンプに接続し、コントロール群には 37°C に加温した PBS ($\text{pH } 6.5$; $6.3\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $20.4\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 129 mM NaCl , 1.5 mM KCl , 14 mM グルコース, 1.0 mM CaCl_2)、アスピリン投与群には 37°C に加温した PBS に溶解したアスピリン (3 mg/mL) 10 mL ずつを流速 2.0 mL/min の速度で 15 分間プレ灌流した。プレ灌流終了後、シリコンチューブおよび消化管腔内の溶液をすべて排出した。その後、コントロール群には 0.25% (最終濃度) エタノール含有 PBS に溶解した未消化またはペプシン消化 FITC-グリアジン ($12.8\text{ }\mu\text{g/mL}$)、アスピリン投与群には 0.25% (最終濃度) エタノール含有 PBS に溶解したアスピリン (3 mg/mL) と未消化またはペプシン消化 FITC-グリアジン ($12.8\text{ }\mu\text{g/mL}$) の混合液 10 mL をそれぞれ流速 2.0 mL/min の速度で灌流した。灌流開始を 0 分として、 $15, 30, 60$ および 90 分後に、 15 mL チューブ内の溶液 0.1 mL を採取した。採取したサンプルはあらかじめ 96 穴プレートのウェルに入れておいた $0.25\text{ M NaOH } 0.1\text{ mL}$ と混合して採取した直後に蛍光強度を測定した。 0 分のサンプルは FITC-グリアジンの灌流直前に採取して、検量線用の標準溶液と共に灌流前に測定した。サンプル中の FITC-グリアジン濃度は Microplate Fluorometer (PerkinElmer) を用いて、励起波長 500 nm 、検出波長 520 nm により定量した。なお、FD-40 ($0.4\text{ }\mu\text{M}$) の吸収についても、FITC-グリアジンと同様の方法で評価した。

1.9. Western blot 法による経口吸収後の血漿中グリアジンの分子量解析

1.3 で採取した血漿サンプル 2.5 mL に蒸留水 0.5 mL と無水エタノール 7 mL を添加した。1 分間振とうした後、20°C で 5 分間、遠心分離 (20,000×g) した。上清を新しいチューブに移し、溶媒を留去した。残渣物を 5%(w/v) の 2-メルカプトエタノールを含有するローディングバッファー 0.1 mL に溶解し、溶液 15 μL を 12.5%ポリアクリルアミドゲルの各レーンにアプライした。泳動後のタンパク質を PVDF 膜に転写し、一次抗体に 1000 倍に希釈したウサギ抗小麦グリアジン抗体、二次抗体に 30,000 倍に希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を使用して Western blot 解析を行った。タンパク質と結合したバンドは、化学発光検出液 (WesternLightning®Ultra, PerkinElmer) と LAS-4000mini (GE Healthcare) を使用して検出した。

1.10. 経口吸収後の血漿中グリアジンのアレルギー性の解析

経口吸収後の血漿中グリアジンのアレルギー活性を評価するため、エバンスブルーの血管外漏出を利用して、グリアジン感作ラットにおける皮内アレルギー反応試験を行った[27]。5 mM 酢酸-生理食塩液に懸濁させたグリアジン (1 mg/mL)、および Imject® Alum [10 mg Al(OH)₃, 10 mg Mg(OH)₂] を 1 mL の用量でラットに週 1 回の間隔で 6 週間腹腔内投与した。6 週間後、頸静脈から血液 (200 μL) を採取し、ELISA によりグリアジン特異 IgE 抗体価を確認した。皮内アレルギー試験にはグリアジン特異 IgE 抗体価が高いラットのみを使用した。本実験のグリアジン感作前および感作開始から 6 週間後のグリアジン特異 IgE 抗体価 (450 nm での吸光度) は、それぞれ 0.00 ± 0.00 および 0.06 ± 0.01 であった。グリアジン感作ラットの背部の毛を電気バリカン (Thrive 2100; 大東電気工業社) で剃毛した。剃毛から 24 時間後、創傷のないラットにペントバルビタール (30 mg/kg) を腹腔内投与し、大腿静脈に PE-50 を挿入した。未消化グリアジンを 150 ng/mL の濃度となるようにグリアジンを含まない血漿に添加したもの、および 1.3 で採取した血漿 (30 μL) から 1.9 と同様にグリアジンを抽出した。溶媒を留去後、残渣を 17.5 mM 酢酸 150 μL に溶解し、グリアジン感作ラットに 100 μL 皮内投与した。投与 30 分後、チューブを通じてエバンスブルー (5 mg) を静脈内投与した。ポジティブコントロール群には、100 μL の生理食塩水に溶解したヒスタミン (150 μg/mL) をエバンスブルー投与と同時に皮内投与した。投与から 30 分後、皮膚を採取して撮像した。サンプルを皮内投与した部位の皮膚組織は、4 mm のパンチ (デルマパンチ, マルホ社) で摘出して、エバンスブ

ルーの定量解析をおこなった。採取した皮膚サンプル (0.1 g) を 20°C で 24 時間、ホルムアミド (5 mL) に浸して、エバンスブルーを抽出した。さらに、皮膚サンプル (0.1 g) を別に採取し、60°C で 24 時間乾燥させて、重量を測定した。エバンスブルーの濃度は Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific 社) を使用して、620 nm の波長で測定し、乾燥組織重量当たりのエバンスブルー量 ($\mu\text{g/g}$) として算出した。

1.11. 統計解析

測定値は平均 \pm 標準誤差 (SE) で示した。群間の平均値の差は Kruskal-Wallis または ANOVA 検定を用いて評価し、その後、独立した 2 群の差の検定には Student の t 検定、独立した多群の差の検定には post hoc 検定として Tukey 検定を用いた。検定の結果は $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

2. 第 2 章の実験の部

2.1. 使用した試薬

OVA (grade V)、ジクロフェナクおよびメロキシカムは Sigma-Aldrich 社より購入した。アスピリンおよびインドメタシンは和光純薬工業社およびナカライテスク社よりそれぞれ入手した。アラムアジュバント (Imject® Alum) は Thermo Fisher Scientific 社より入手した。マウス抗ラット IgE 抗体 (MARE-1)、HRP 標識マウス抗ラット IgE 抗体 (MARE-1) および HRP 標識ヤギ抗ラット IgG₁ 抗体は GeneTex 社および Bethyl Laboratories 社からそれぞれ購入した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2.2. 実験動物

日本エスエルシー社より 4 週例の雄性 Brown Norway (BN) 系ラットを購入した。ラットの飼育は 1.2 と同様の条件で行った。すべての実験は動物実験ガイドラインに従い、広島大学動物実験委員会の承認 (承認番号 A16-44-3) を得て実施した。

2.3. OVA の経口吸収実験

一晩絶食したラットにペントバルビタール (30 mg/kg) を腹腔内投与し、大腿動脈に PE-50 を挿入した。コントロール群には PBS (pH 7.4) のみ、またアスピリン投与群には PBS に溶解したアスピリン (3 または 30 mg/mL) を 1 mL/kg 体重の投与量で経口ゾンデにより強制経口投与し、30 分後に PBS に溶解した OVA (50 mg/mL) 1 mL/kg を同様に経口投与した。スperlミン投与群ではスperlミン (20 mg/mL) と OVA (50 mg/mL) を PBS に溶解した混合液 1.0 mL/kg を経口ゾンデで強制経口投与した。OVA の投与後、ヘパリンを添加した大腿動脈カニューラから経時的 (OVA 投与開始を 0 分とし、15、30、60、90、120 および 180 分) に 3 時間まで血液 (250 μ L) を採取した。なお、0 分の採血は OVA の投与直前に採取した。採取した血液をインバータマイクロ冷却遠心機にて 20°C で遠心分離 (10,000 rpm \times 10 分) することで血漿サンプルを得た。得られた血漿サンプルは実験に使用するまでマイクロチューブ中に -30°C で保存した。

2.4. ELISA 法による OVA の定量

血漿中の OVA 濃度は FASPEK 卵測定キット (卵白アルブミン) を使用して定量した。各ウェルに検体希釈液 II で 2 倍に希釈した各血漿サンプルを 100 μ L 加え、室温で 1 時間インキュベートした。各ウェルを洗浄液 200 μ L で 6 回洗浄した後、酵素標識グリアジン抗体溶液を 100 μ L ずつ加え、室温で 30 分インキュベートした。各ウェルを洗浄液で 6 回洗浄した後、遮光下で酵素基質溶液を 100 μ L 加えて 10 分間発色させた後、反応停止液 100 μ L で反応を停止させ、波長 450 nm の吸光度を測定した。OVA の測定範囲は 2.2~556 ng/mL であった。経口投与後の AUC_{0-3 h} は台形法により算出した。

2.5. OVA の経口感作実験

OVA の経口感作は Proust らの方法 [53] をもとに、アジュバントを用いない OVA 経口感作ラットモデルに従って行った。アスピリンを 3 mg/mL もしくは 30 mg/mL、ジクロフェナク、インドメタシンまたはメロキシカムをそれぞれ 1.5 mg/mL、3 mg/mL、0.3 mg/mL の濃度となるように PBS (pH 7.4) に溶解した。また、OVA は 250 mg/mL の濃度となるように PBS に溶解した。コントロール群には PBS のみ、NSAIDs 投与群にはアスピリン、ジクロフェナク、インドメタシンま

たはメロキシカムの溶液をそれぞれ 1 mL/kg で経口投与した。PBS または NSAIDs の投与 30 分後に OVA 溶液を 1 回 0.2 mL 経口投与した。スペルミン投与群では、スペルミン (25 mg/mL) と OVA (250 mg/mL) を PBS に溶解した混合液 0.2 mL を経口投与した。各群について、この操作を週 3 回隔日で行った。OVA の投与を開始から 2 週間 (OVA の負荷開始を 0 週目とし、2、4、6 および 8 週目) に頸静脈より血液 (300 μ L) を採取した。なお、0 週目の採血は最初の OVA の投与直前に採取した。血漿サンプルは 2.3 と同様の操作で採取し、OVA 特異抗体価の測定に使用するまでマイクロチューブ中に -30°C で保存した。

2.6. 経口感作時の血漿中 OVA 特異抗体価の測定

OVA 特異 IgE および IgG₁ 抗体価の測定は、ELISA 法により行った。96 ウェルマイクロプレート (F8 MaxiSorp loose Nunc-Immuno™ Modules, Thermo Fisher Scientific 社) に PBS (pH 7.4) に溶解した OVA 溶液 100 μ L (IgE 測定, 10 μ g/mL; IgG₁ 測定, 1 μ g/mL) を注入した後、4°C で一晩静置した。各ウェルを 0.1% の Tween 20 を含む PBS (PBS-T) 200 μ L で 6 回洗浄し、1% ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル社) を加えて、室温で 2 時間ブロッキングした。PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄後、1% ブロックエースで希釈した各血漿サンプル (IgE 測定, 1:10; IgG₁ 測定, 1:30,000) を 100 μ L 加え、室温で 2 時間インキュベートした。各ウェルを PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄した後、二次抗体として 1,000 倍希釈した HRP 標識抗ラット IgE 抗体 (MARE-1) および 100,000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ラット IgG₁ 抗体を加えて、室温で 2 時間 (IgE 測定) または 1 時間 (IgG₁ 測定) インキュベートした。各ウェルを PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄した後、基質として 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 溶液 (KPL 社) を加えて 30 分間 (IgE 測定) 及び 20 分間 (IgG₁ 測定) 発色させた。その後、1 M リン酸で反応を停止させ、Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific 社) で波長 450 nm の吸光度を測定した。

2.6. OVA の経皮感作実験

ラットの背部を電気バリカン (Thrive 2100) で一部剃毛した後、セロハンテープの貼剥を 10 回繰り返す方法で角質層を剥離した。アスピリン、ジクロフェナク、インドメタシンまたはメロキシ

カムをそれぞれ 30 mg/mL、1.5 mg/mL、3 mg/mL、0.3 mg/mL の濃度となるように PBS (pH 7.4) に溶解した。剃毛から 24 時間後、創傷のないラットに PBS または NSAIDs を 1 mL/kg で経口投与し、30 分後に 0.5% SDS に溶解した OVA (20 mg/mL) 50 μ L をガーゼに染み込ませ、週 3 回の頻度で貼付した。OVA の負荷を開始した後、毎週 1 回、4 週目まで頸静脈より採血 (300 μ L) を行った。なお、0 週目の採血は最初の OVA の投与直前に採取した。血漿サンプルは 2.3. と同様の操作で採取し、OVA 特異抗体価の測定に使用するまでマイクロチューブ中に -30°C で保存した。

2.7. 経皮感作時の血漿中 OVA 特異抗体価の測定

OVA 特異 IgG₁ 抗体価の測定は、2.5 と同様の操作で行った。ビオチン標識 OVA は市販のビオチンラベル化キット (Biotin Labeling Kit-NH₂, Dojindo 社) を用いて、添付のマニュアルに従って作製した。OVA 特異 IgE 抗体価の測定は 96 ウェルマイクロプレート (F8 MaxiSorp loose Nunc-Immuno™ Modules) に 1 μ g/mL の濃度になるように PBS (pH 7.4) に溶解したマウス抗ラット IgE 抗体 (MARE-1) 溶液 100 μ L を注入した後、4°C で一晩静置した。各ウェルを PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄し、1% ブロックエースを加えて、室温で 1 時間ブロッキングした。PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄した後、1% ブロックエースで 500 倍に希釈したビオチン標識 OVA を 100 μ L 加え、室温で 1 時間インキュベートした。各ウェルを PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄した後、1% ブロックエースで 5,000 倍希釈した streptavidin-HRP (GeneTex) を 100 μ L 加え、室温で 1 時間インキュベートした。各ウェルを PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄した後、基質として TMB 溶液を加えて 20 分間発色させた。その後、1 M リン酸で反応を停止させ、Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific 社) で波長 450 nm の吸光度を測定した。

2.8. 統計解析

測定値は平均 \pm 標準誤差 (SE) で示した。群間の平均値の差は Kruskal-Wallis または ANOVA 検定を用いて評価し、その後、独立した 2 群の差の検定には Student の t 検定、独立した多群の差の検定には post hoc 検定として Tukey 検定および Scheffe's F test を用いた。検定の結果は $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

論文目録

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

1. Takahiro Fukushima, Tomoharu Yokooji, Taiki Hirano, Yuta Kataoka, Takanori Taogoshi, Hiroaki Matsuo : Aspirin enhances sensitization to the egg-white allergen ovalbumin in rats. PLOS ONE, 14(12):e0226165, 2019.
2. Tomoharu Yokooji, Takahiro Fukushima, Koh Hamura, Naoki Ninomiya, Ryo Ohashi, Takanori Taogoshi, Hiroaki Matsuo : Intestinal absorption of the wheat allergen gliadin in rats. Allergology International, 68(2):247-253, 2019.

参考文献

1. Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T. Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergol Int.* Elsevier B.V; 2017;66: 248–264. doi:10.1016/j.alit.2017.02.001
2. Sampson HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103: 717–728. doi:10.1016/s0091-6749(99)70411-2
3. Venter C, Pereira B, Voigt K, Grundy J, Clayton CB, Higgins B, et al. Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2008;63: 354–359. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01570.x
4. Aihara Y. Food-dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. *Arerugi.* 2007;56: 451–6.
5. Boyano Martínez T, García-Ara C, Díaz-Pena JM, Muñoz FM, García Sánchez G, Esteban MM. Validity of Specific IgE Antibodies in Children With Egg Allergy. *Clin Exp Allergy.* 2001;31: 1464–9. doi:10.1046/j.1365-2222.2001.01175.x
6. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Putte LB Van De, et al. Cyclooxygenase in Biology and Disease. *FASEB J.* 1998;12: 1063–73.
7. Kawai S. Cyclooxygenase selectivity and the risk of gastro-intestinal complications of various non-steroidal anti-inflammatory drugs: A clinical consideration. *Inflammation Research.* 1998. doi:10.1007/s000110050291
8. Matsuo H, Morimoto K, Akaki T, Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T, et al. Exercise and aspirin increase levels of circulating gliadin peptides in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.* 2005;35: 461–466. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02213.x
9. Aihara M, Miyazawa M, Osuna H, Tsubaki K, Ikebe T, Aihara Y, et al. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: Influence of concurrent aspirin administration on skin testing and provocation. *Br J Dermatol.* 2002;146: 466–472. doi:10.1046/j.1365-2133.2002.04601.x
10. Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs : investigation using human peripheral monocytes. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 1679–1685. doi:10.1211/0022357011778070
11. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. 1994;90: 11693–11697.
12. Matsuo H, Yokooji T, Morita H, Ooi M, Urata K, Ishii K, et al. Aspirin Augments IgE-Mediated Histamine Release from Human Peripheral Basophils via Syk Kinase Activation. *Allergol Int.* Elsevier Masson SAS; 2013;62: 503–511. doi:10.2332/allergolint.13-OA-0536
13. Kohno K, Matsuo H, Takahashi H, Niihara H, Chinuki Y, Kaneko S, et al. Serum gliadin monitoring extracts patients with false negative results in challenge tests for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergol Int.* Elsevier Masson SAS; 2013;62: 229–238. doi:10.2332/allergolint.12-OA-0495

14. Matsuo H, Kaneko S, Tsujino Y, Kohno K, Takahashi H, Mihara S, et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on serum allergen levels after wheat ingestion. *J Dermatol Sci.* 2009;53: 241–243.
15. Yokooji T, Hamura K, Matsuo H. Intestinal absorption of lysozyme, an egg-white allergen, in rats: Kinetics and effect of NSAIDs. *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc.; 2013;438: 61–65. doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.024
16. Perrier C, Thierry AC, Mercenier A, Corthésy B. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clin Exp Allergy.* 2010;40: 153–162. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03329.x
17. Tatham AS, Shewry PR. Allergens to Wheat and Related Cereals. *Clin Exp Allergy.* 2008;38: 1712–26. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x
18. Köhler P, Belitz HD, Wieser H. Disulphide Bonds in Wheat Gluten: Further Cystine Peptides From High Molecular Weight (HMW) and Low Molecular Weight (LMW) Subunits of Glutenin and From Gamma-Gliadins. *Z Leb Unters Forsch.* 1993;196: 239–247.
19. Morita E, Matsuo H, Mihara S, Morimoto K, Savage AWJ, Tatham AS. Fast Omega-Gliadin Is a Major Allergen in Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. *J Dermatol Sci.* 2003;33: 99–104.
20. Yokooji T, Nouma H, Matsuo H. Characterization of Ovalbumin Absorption Pathways in the Rat Intestine, Including the Effects of Aspirin. *Biol Pharm Bull.* 2014;37: 1359–1365. doi:10.1248/bpb.b14-00290
21. Takano M, Koyama Y, Nishikawa H, Murakami T, Yumoto R. Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine. *Eur J Pharmacol.* 2004;502: 149–155. doi:10.1016/j.ejphar.2004.08.041
22. Services H. Guidance for Industry: Estimating the maximum SSD in Initiql Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005; doi:10.1089/blr.2006.25.697
23. Kumagai H, Suda A, Sakurai H, Kumagai H, Arai S, Inomata N, et al. Improvement of digestibility, reduction in allergenicity, and induction of oral tolerance of wheat gliadin by deamidation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71: 977–985. doi:10.1271/bbb.60645
24. Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. Actinidin Enhances Gastric Protein Digestion As Assessed Using an in Vitro Gastric Digestion Model. *J Agric Food Chem.* 2010;58: 5068–73.
25. Palosuo K, Varjonen E, Nurkkala J, Kalkkinen N, Harvima R, Reunala T, et al. Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of ω -5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111: 1386–1392. doi:10.1067/mai.2003.1498
26. Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, et al. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132: 1436-1438.e4. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.017
27. Yokooji T, Matsuo H. Sodium cromoglycate prevents exacerbation of IgE-mediated food-allergic reaction induced by aspirin in a rat model of egg allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;

doi:10.1159/000437328

28. Oshima T, Miwa H, Joh T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2008;295: 800–806.
doi:10.1152/ajpcell.00157.2008
29. Hamarneh SR, Mohamed MMR, P.Economopoulos K, Morrison SA, Phupitakphol T. A Novel Approach to Maintain Gut Mucosal Integrity Using an Oral Enzyme Supplement. 2016;260: 706–715. doi:10.1097/SLA.0000000000000916.A
30. Kaur G, Kaur J, Mittal N, Sanyal SN. The effect of prostaglandin synthase inhibitor, aspirin on the rat intestinal membrane structure and function. *Nutr Hosp*. 2010;25: 290–298.
doi:10.3305/nh.2010.25.2.4598
31. Burley RW, Vadehra D V. *The Avian Egg: Chemistry and Biology*. 1989.
32. Sugita Y, Takao K, Toyama Y, Shirahata A. Enhancement of intestinal absorption of macromolecules by spermine in rats. *Amino Acids*. 2007;33: 253–260. doi:10.1007/s00726-007-0532-1
33. Makau L, Mark F. Age-related reductions in gastric mucosal prostaglandin levels increase susceptibility to aspirin-induced injury in rats. *Gastroenterology*. 1994;107: 1746–1750.
34. Naito Y, Yoshikawa T, Yagi N, Matsuyama K, Yoshida N, Seto K, et al. Effects of polaprezinc on lipid peroxidation, neutrophil accumulation, and TNF-alpha expression in rats with aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci*. 2001;46: 845–851.
35. Suzuki T, Yoshida N, Nakabe N, Isozaki Y, Kajikawa H, Takagi T, et al. Prophylactic effect of rebamipide on aspirin-induced gastric lesions and disruption of tight junctional protein zonula occludens-1 distribution. *J Pharmacol Sci*. Elsevier B.V.; 2008;106: 469–477.
doi:10.1254/jphs.FP0071422
36. Louis E, Franchimont D, Deprez M, Lamproye A, Schaaf N, Mahieu P, et al. Decrease in Systemic Tolerance to Fed Ovalbumin in Indomethacin-Treated Mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;109: 21–27.
37. Isobe N, Suzuki M, Oda M, Tanabe S. Enzyme-Modified Cheese Exerts Inhibitory Effects on Allergen Permeation in Rats Suffering from Indomethacin-Induced Intestinal Inflammation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; doi:10.1271/bbb.80042
38. Sugita Y, Takao K, Sugino Y, Kuwabara R, Shirahata A. Enhancement of gastrointestinal absorption of ovalbumin caused by spermine induces an increase in plasma histamine levels in mice sensitized to ovalbumin. *Biol Pharm Bull*. 2011;34: 415–9. doi:10.1248/bpb.34.415
39. Kaplan C, Valdez JC, Chandrasekaran R, Eibel H, Mikecz K, Glant TT, et al. Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res*. 2002;4: 54–58.
doi:10.1186/ar383
40. Dhuban K Bin, D’Hennezel E, Ben-Shoshan M, McCusker C, Clarke A, Fiset P, et al. Altered T helper 17 responses in children with food allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;
doi:10.1159/000354028
41. Moon HG, Kang CS, Choi JP, Choi DS, Choi H Il, Choi YW, et al. Acetyl salicylic acid inhibits Th17 airway inflammation via blockade of IL-6 and IL-17 positive feedback. *Exp Mol Med*. 2013;45.

doi:10.1038/emm.2013.10

42. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, et al. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med*. 2009;206: 535–548. doi:10.1084/jem.20082293
43. Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol*. 2009; doi:10.1371/journal.pbio.1000067
44. Magdalena P-G, Patrycja N-G, Małgorzata P, Rafał K. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on TSLP, IL-33 and IL-25 expression in respiratory epithelium. *Eur Cytokine Netw*. 2016;27: 54–62.
45. Yu HS, Angkasekwinai P, Chang SH, Chung Y, Dong C. Protease allergens induce the expression of IL-25 via Erk and p38 MAPK pathway. *J Korean Med Sci*. 2010; doi:10.3346/jkms.2010.25.6.829
46. Varricchi G, Pecoraro A, Marone G, Criscuolo G, Spadaro G, Genovese A, et al. Thymic stromal lymphopoietin isoforms, inflammatory disorders, and cancer. *Frontiers in Immunology*. 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.01595
47. Lund SJ, Portillo A, Cavagnero K, Baum RE, Naji LH, Badrani JH, et al. Leukotriene C4 Potentiates IL-33–Induced Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Lung Inflammation. *J Immunol*. 2017;199: 1096–1104. doi:10.4049/jimmunol.1601569
48. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121: 1331–1336. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.032
49. Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, Mesher D, Maleki SJ, Fisher HR, et al. Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. Elsevier Ltd; 2008;122: 984–991. doi:10.1016/j.jaci.2008.08.039
50. Flohr C, Perkin M, Logan K, Marrs T, Radulovic S, Campbell LE, et al. Atopic dermatitis and disease severity are the main risk factors for food sensitization in exclusively breastfed infants. *J Invest Dermatol*. Elsevier Masson SAS; 2014;134: 345–350. doi:10.1038/jid.2013.298
51. Kuo IH, Carpenter-Mendini A, Yoshida T, McGirt LY, Ivanov AI, Barnes KC, et al. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: Implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol*. Elsevier Masson SAS; 2013;133: 988–998. doi:10.1038/jid.2012.437
52. Bodinier M, Legoux MA, Pineau F, Triballeau S, Segain JP, Brossard C, et al. Intestinal translocation capabilities of wheat allergens using the Caco-2 cell line. *J Agric Food Chem*. 2007;55: 4576–4583. doi:10.1021/jf070187e
53. Barbara P, Catherine A, Sandrine J, Virginie O, Erwan M, Oliver R, et al. A single oral sensiuzaouon to peanut without adjuvant leads to anaphylaxis in mice. 2008. doi:10.1159/000115889