

博士論文

ω5-グリアジン欠損小麦を用いた
小麦アレルギー発症予防に関する研究

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 29 年度入学 山田 行徳

主指導教員 松尾 裕彰

目次

序論	1
本論	8
第1章 1BS-18Hのアレルギー症状惹起能とω5-グリアジンに対する感作能の評価	8
第1節 1BS-18Hグルテンのウェスタンブロット解析.....	9
1-1. 緒言	9
1-2. 結果	9
1-3. 考察	10
第2節 OVA感作ラットを用いたアレルギー症状惹起能評価系の確立.....	12
2-1. 緒言	12
2-2. 結果	12
2-3. 考察	13
第3節 1BS-18Hのアレルギー症状惹起能の評価.....	15
3-1. 緒言	15
3-2. 結果	15
3-3. 考察	17
第4節 1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対する感作能の評価.....	19
4-1. 緒言	19
4-2. 結果	19
4-3. 考察	20
第5節 小括.....	23
第2章 1BS-18Hの経口免疫寛容(OT)誘導能の評価	25
第1節 OVAを用いたOT誘導ラットモデルの作製.....	26
1-1. 緒言	26
1-2. 結果	26
1-3. 考察	28
第2節 グルテンを用いたOT誘導ラットモデルの作製.....	30
2-1. 緒言	30
2-2. 結果	30
2-3. 考察	32
第3節 1BS-18Hのグルテンに対するOT誘導能.....	34
3-1. 緒言	34
3-2. 結果	34
3-3. 考察	35
第4節 1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対するOT誘導能.....	37
4-1. 緒言	37
4-2. 結果	37
4-3. 考察	38

第4節 小括	41
結論	43
実験方法	45
論文目録	53
参考文献	54
謝辞	60

略語一覽

BN	Brown-Norway
Da	dalton
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	horseradish peroxidase
IL	Interleukin
Ig	immunoglobulin
O.D.	optical density
OT	oral tolerance
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline, Tween-20
PVDF	Polyvinyl
QOL	quality of life
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline, Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Th	Helper T cell
Treg	regulatory T cell
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween-20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
WDEIA	Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis
1BS-18H	ω 5-gliadin deficient Hokushin wheat

序論

食物アレルギーは、「食物によって引き起こされる抗原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]。食物アレルギーの有病率は、様々な国や地域で報告がなされている。我が国における食物アレルギーの有病率は、乳児の7.6-10%、2歳児の6.7%、3歳児の約5%、保育所児の4.0%、学童以降の1.3-4.5%と報告されており、全年齢の約1-2%が何らかの食物アレルギーに罹患していると推定されている[1,2]。近年、食物アレルギーの患者数は増加傾向にあり、食物アレルギーを有する小児が原因食物を誤食することによりアナフィラキシーを発症し、死亡した事例が報告されるなど重大な問題となっている。

食物アレルギーは、発症に関与する免疫学的機序によって、症状の惹起に immunoglobulin E (IgE) 抗体が関与する IgE 依存性食物アレルギーと IgE 抗体を介さずに症状が惹起される非 IgE 依存性（細胞依存性）食物アレルギーに大別される。IgE 依存性反応には、蕁麻疹やアナフィラキシー症状を呈する即時型食物アレルギーや食後に運動負荷などの二次的要因が加わることでアナフィラキシー症状を呈する食物依存性運動誘発アナフィラキシー、口腔アレルギー症候群などが挙げられる。これらの IgE 依存性食物アレルギーは、蕁麻疹や紅斑などの皮膚・粘膜症状だけでなく、呼吸器症状やショック症状などを合併し、致死的なアナフィラキシーを呈することも多く臨床的に大きな問題となっている。また、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血便、下痢などの消化器症状を呈する新生児・乳幼児食物タンパク誘発胃腸症などが挙げられる。非 IgE 依存性食物アレルギーの発症には T 細胞や好酸球の関与が示唆されているがその詳細は明らかになっていない。

IgE 依存性食物アレルギーは、感作の成立と症状の惹起という 2 つの段階を経て発症する。一般に、経口的もしくは経皮的に曝露された食物抗原の一部は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に貪食され、ナイーブ T 細胞へ提示される。抗原提示を受けたナイーブ T 細胞は 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) に分化し、インターロイキン (IL) -4 や IL-5 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 細胞を抗原特異的な IgE 抗体の産生能を持つ形質細胞へと分化誘

導する。形質細胞により産生された抗原特異 IgE 抗体の一部は、肥満細胞や好塩基球表面上の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に結合し感作が成立する。感作が成立した後に、再び同じ抗原に曝露されると、吸収された食物抗原やその一部が肥満細胞や好塩基球上の複数の IgE 抗体を架橋するように結合し脱顆粒反応が引き起こされる。脱顆粒時にはヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターや脂質メディエーターが放出され、血管透過性や粘液の分泌、好酸球の遊走亢進、気管支平滑筋の収縮作用により、蕁麻疹や喘息、血圧低下などのアレルギー症状が惹起される[1]。

我が国における即時型食物アレルギーの原因食物として、鶏卵や牛乳、小麦、甲殻類、そば、落花生、果物などが挙げられる (Fig. 1)。これらの原因食物のうち、鶏卵や牛乳、小麦の3つの食物は食物アレルギー全体の約 7 割を占めている[1]。また、エビやカニ、小麦、ソバ、鶏卵、牛乳、落花生の7品目については、アレルギー患者の罹患者数が多い、症状が重篤であるという観点から「特定原材料」に指定されており、一定量の総タンパク質を含む加工食品だけでなく消費者に直接販売されない食品の原材料についてもアレルギー表示が義務付けられている。

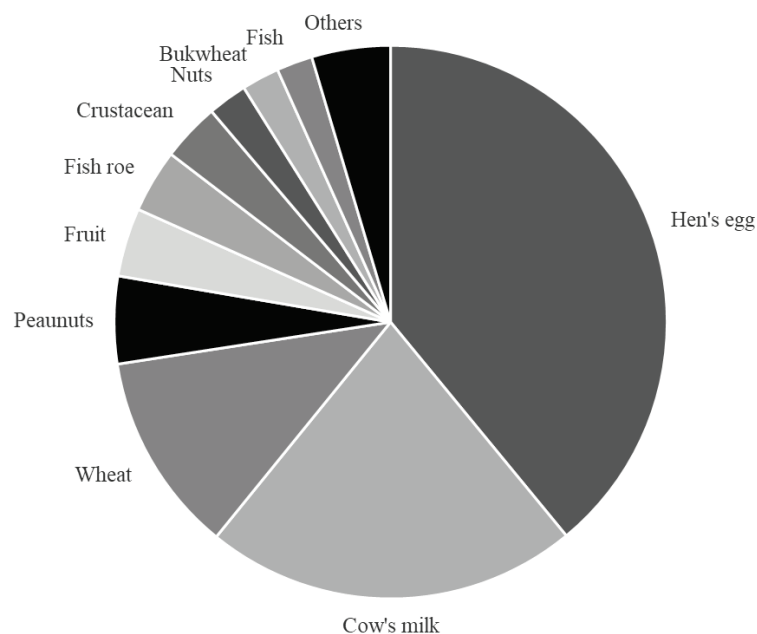


Fig. 1. Causative foods of immediate-type food allergy [1].

食物アレルギーは致死的な転機をたどる可能性のある疾患であるが、根本的な治療法は確立されておらず、発症時には抗ヒスタミン薬や抗アレルギー薬、アドレナリンの投与などの対症療法が実施される。また、食物アレルギー患者は発症を予防するために日々の食物から原因食物を除去する必要がある。除去食療法は食物アレルギーの発症を予防する確実な方法であるが、鶏卵や小麦など様々な加工食品の原材料として使用されている食物の除去は、患者の食事の自由を大きく妨げ、quality of life (QOL) を著しく低下させる[3]。また、前述のように、加工食品はアレルゲン表示が義務付けられているが、誤食や環境的な曝露によるアナフィラキシーの発症リスクを完全に排除することができない。したがって、食物アレルギーの根本的な治療方法の開発や患者の QOL を維持することができる予防方法の開発が求められている。

小麦は世界中で広く栽培されている穀物の一つであり、パンや麺などの食品だけでなく、化粧品など食品以外の製品にも汎用されている。一方で、小麦は即時型や接触性皮膚炎、小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA : wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis) など様々な臨床病型のアレルギーを引き起こす食物でもある[1,4]。小麦アレルギーの病型のうち、学童期以降の小麦アレルギー患者は抗原特異 IgE の関与する WDEIA の病型を呈することが多く、患者は小麦を摂取した後に球技やランニング、歩行などの運動負荷が加わることによってアナフィラキシー症状を呈する[5]。したがって、WDEIA の患者は症状惹起を予防するために小麦摂取後の運動や小麦の摂取を避ける必要がある[6]。

小麦には様々なタンパク質が含まれており、小麦粉の 8-15%はタンパク質で構成されている (Fig. 2)。小麦タンパク質のうち、塩/水可溶性のアルブミンやグロブリンが 10-15%、塩/水不溶性のグルテンが 85-90%を占めている[7]。グルテンは、アルコールへの溶解度によりさらに 2つに分類され、アルコールに可溶性グリアジンと不溶性グルテニンがそれぞれグルテンの 50%を占めている。これらのグルテンコンポーネントが、パンや麺などの作製に必要な小麦特有の粘弾性を担っている。また、グリアジンは一次構造や分子量の違いにより α/β -グリアジン、 γ -グリアジン、 ω 1,2-グリアジン、 ω 5-グリアジンに分類される。特に ω 5-グリアジンは、WDEIA 及び一部の即時型小麦アレルギーの主要抗原であり、血清中特異 IgE 検査で WDEIA 患者の約 8 割が陽性を示したと報告されている[8,9]。

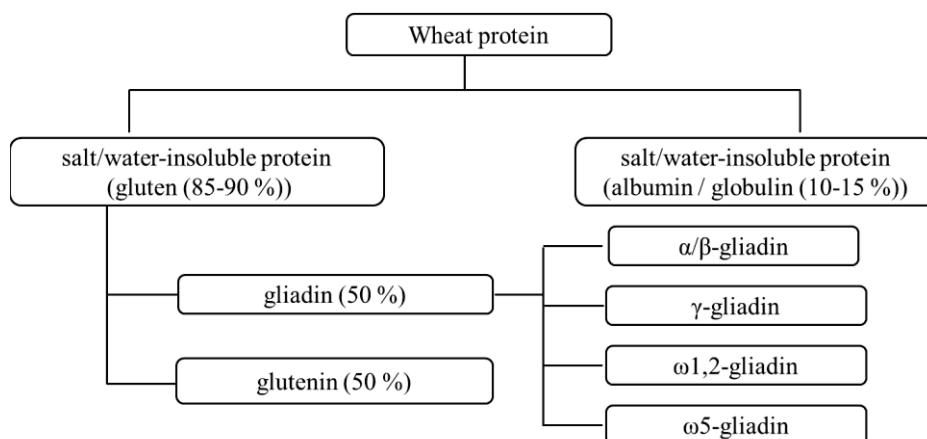


Fig. 2. Classification of wheat proteins and gluten components.

これまで、食物アレルギーの発症は主に原因抗原への経口曝露による経口感作で惹起すると考えられてきた。しかし、2003年に Lack らが報告したコホート研究で、乳幼児期にピーナッツオイル含有製品を使ったスキンケアを実施した児ではピーナッツアレルギーの有病率が高かったことを報告した[10]。この報告は、経皮的な抗原曝露が食物アレルギーの発症リスクを増加させたことを示唆するものである。さらに、同氏はこれまでの研究成果をまとめ、2008年に二重抗原曝露仮説（dual-allergen-exposure hypothesis）を提唱した[11]。この仮説では、湿疹やアトピー性皮膚炎など皮膚のバリア機能が低下する疾患を有する児は、経口摂取よりも前に環境中の食物抗原に感作され、Th2 優位な免疫応答の惹起により食物アレルギーを呈することが示されている。また、適切な時期に適切な量の食物抗原を経口摂取することで、regulatory T cell (Treg) などの制御性リンパ球を介した経口免疫寛容（OT）が誘導され食物アレルギーの発症が抑制されることも示されている（Fig. 3）。

近年、二重抗原曝露仮説の概念に基づき、早期に原因食物を摂取し OT を誘導することで食物アレルギーの発症予防を試みる研究が実施されている。Du Toit らは、2015年に乳幼児期の早期からピーナッツを摂取したイスラエル在住ユダヤ人のピーナッツアレルギー患者の有病率（0.17%）がピーナッツをほとんど摂取しないイギリス在住ユダヤ人の有病率（1.85%）よりも低かったことを報告した[12]。この報告は、ピーナッツの早期摂取が抗原に対する OT を誘導し、アレルギーの発症を予防したことを示唆している[12]。また、Perkin は 2016年に牛乳、ピーナッツ、鶏卵、ゴマ、魚、小麦などの食品を生後3か月から摂取させる経口免疫寛容誘導の無作為比較試験の結果を

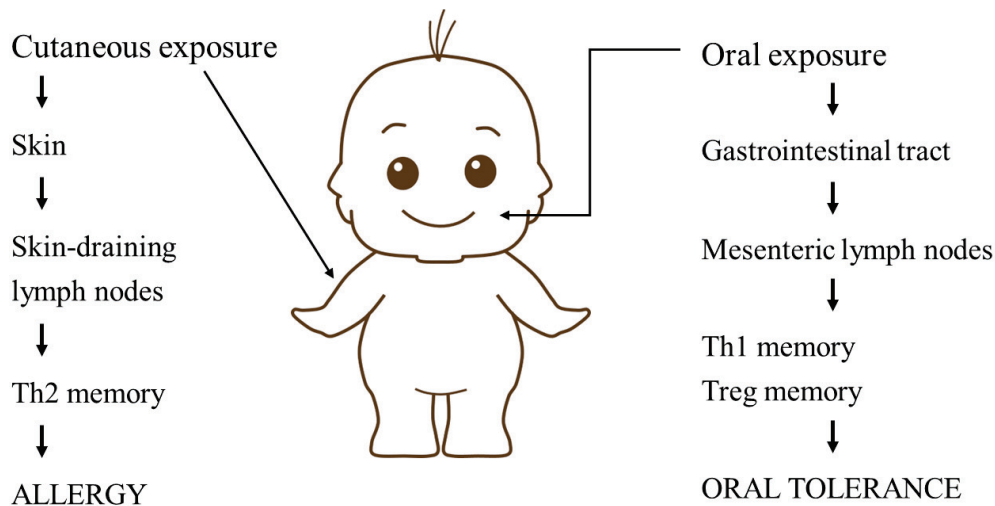


Fig. 3. Dual-allergen-exposure hypothesis for pathogenesis of food allergy.

報告し、ピーナッツ及び鶏卵の早期摂取がそれぞれの食品に対するアレルギーの有病率を有意に低下させたことを示した[13]。一方、皮膚炎や重度の湿疹などの皮膚疾患を有する乳幼児では経口摂取を開始する段階ですでに抗原に感作されており、初回の経口摂取の際にアナフィラキシーなどのアレルギー症状を発症した症例も報告されている[13]。また、アレルギー疾患の家族歴や喘息などのアレルギー疾患を呈する、すなわちアトピー素因を有する児やある種の HLA 遺伝子多型を呈する児では、原因食物の摂取による感作リスクが高い可能性がある。例えば、ピーナッツアレルギーを含む一部の食物アレルギーでは HLA の遺伝子多型とアレルギー発症率の相関が確認されている[14]。また、日本人 WDEIA 患者における genome-wide association study の結果では、HLA の DPB1*02:01:02 allele の保有率が健常者よりも高かったことが報告されている[15]。したがって、食物の経口摂取による OT の誘導には、アレルギー症状の惹起能や感作能が低い食物を使用することが望ましいと考えられる。

近年、食物アレルギー患者の QOL 向上を目的に、低アレルゲン化食物が開発されている。低アレルゲン化食物は、食物アレルギーの原因抗原の含有量や抗原性を様々な手法で欠失あるいは低減させた食物であり、食物アレルギーを発症した患者が安全に摂取することができる代替食として注目されている。Herman らは、遺伝子サイレンシング技術を用いて大豆アレルギーの主要抗原である Gly m Bd30K を欠損させた低アレルゲン大豆を開発している[16]。小麦については、Altenbach らが RNA 干渉技術を用いて ω 5-グリアジンの含有量を低減させたトランスジェニック小

麦を開発している[17-20]。これらの食物は遺伝子組換え食物と呼ばれ、遺伝子レベルで抗原含有量を低下させた有益な食物であるが、特にわが国においては、安全性などへの懸念から消費者に敬遠される傾向にある[21]。一方、遺伝子組換え技術を用いない方法も報告されている。例えば、Leeらは、ガンマ線照射により牛乳アレルギーの主要抗原である α -カゼインと β -ラクトグロブリンの抗原性を低下させた低アレルゲン牛乳を開発している[22]。また、酵素加水分解により抗原性を失活させる酵素処理法もあるが、使用した酵素や酵素産生に関連する微生物の安全性、非選択的なタンパク質の分解により食感や風味などが失われることなどが問題である[23-27]。さらに、陽イオン交換樹脂により小麦グリアジン中のグルタミンやアスパラギン残基を脱アミド化する方法もある。この方法はグルテンの抗原性を低下させるとともに、酵素処理法の問題であった酵素産生微生物の安全性を改善することができるが、グルテンの特性である粘弾性が失われることやコストがかかることが問題となる[28,29]。小麦タンパク質であるグリアジンやグルテニンアレルギーの原因抗原となるだけでなく、製パンや製麺時に重要な粘弾性を形成する上で重要なタンパク質である[7]。そのため、小麦の低アレルゲン化を目的にこれらのタンパク質を欠失させた場合、粘弾性の低下により実用性を妨げる可能性もある。このように、低アレルゲン化食物の開発では、抗原性を低下させることだけではなく食物の食感や風味、加工特性を維持することも重要である。

Kohnoらは、ナショナルバイオリソースプロジェクトコムギに登録された12,000株の小麦から ω 5-グリアジン遺伝子が座している染色体1Bの一部を欠失したChinese spring 1BS-18小麦系統(1BS-18)を見出し、モルモットモデルを用いた解析により1BS-18は ω 5-グリアジンに対する感作能が低いことを報告している[30]。しかしながら、 ω 5-グリアジン感作動物やWDEIA患者における1BS-18のアレルギー症状惹起能は明らかにされていない。また、1BS-18は通常の商品小麦に比べて粘弾性が低く、製パン性に乏しいことが知られている。当研究室では、1BS-18と日本国内で栽培している食用ホクシン小麦(Hokushin)とを戻し交配し、 ω 5-グリアジン遺伝子を欠失させたHokushin(1BS-18H)を樹立した(Fig. 4)。戻し交配とは、導入したい形質を持つ品種と形質を導入させたい品種をかけ合わせ操作を繰り返すことで、元の形質を維持したまま目的の形質を導入した品種を作製する手法である。作出した1BS-18Hは、商品小麦と同程度の水分やタンパク質、灰分などを含有し粘弾性を維持したまま ω 5-グリアジンを欠失している[31]。したがって、 ω 5-グリ

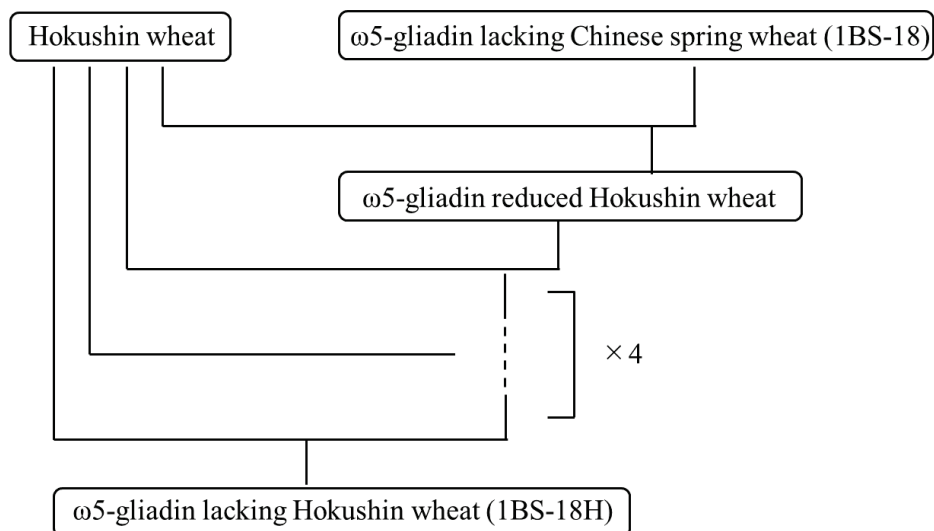


Fig. 4. Scheme of 1BS-18H production by repeated backcrossing of 1BS-18 line with Hokushin wheat.

アジンに感作している WDEIA 患者がアナフィラキシー症状を惹起することなく摂取することができる可能性や健常者における ω 5-グリアジンに対する感作能が低いことが期待される。しかしながら、1BS-18H の ω 5-グリアジン感作能やアレルギー症状惹起能は明らかになっていない。また、1BS-18H の ω 5-グリアジンに対する OT の誘導能は明らかになっていない。

本研究では、小麦アレルギーの発症予防における 1BS-18H の有用性を明らかにすることを目的とする。まず、アレルギー症状惹起能及び感作能を評価するラットモデルを作製し、アレルギー症状惹起能と ω 5-グリアジンに対する感作能の観点から 1BS-18H の安全性を評価した。次に、OT 誘導ラットモデルを作製し、1BS-18H グルテンの通常グルテン及び ω 5-グリアジンに対する OT 誘導能を評価した。

本論

第1章 1BS-18Hのアレルギー症状惹起能と ω 5-グリアジンに対する感作能の評価

1BS-18Hは、 ω 5-グリアジン遺伝子が座している1B染色体の一部を欠失したChinese spring (1BS-18)と食用のHokushinを繰り返し、戻し交配させる方法で作出した低アレルゲン化小麦である[30]。したがって、1BS-18Hには ω 5-グリアジンが含まれておらず、 ω 5-グリアジン特異IgE抗体を有するWDEIAなどの小麦アレルギー患者が1BS-18Hを摂取してもアレルギー症状を惹起しないと推察される。一方で、 ω 5-グリアジン特異IgE抗体が、アミノ酸配列が似ている他のグリアジンコンポーネントと交差反応を示し、アレルギー症状を惹起する可能性も考えられる。また、健康な人が1BS-18Hを摂取しても、 ω 5-グリアジンに感作されずWDEIAを発症しにくいことが期待される。本章では、 ω 5-グリアジン感作ラットモデルにおける1BS-18Hのアレルギー症状惹起能と正常ラットにおける1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対する感作能を評価した。

食物によるアナフィラキシー症状の惹起能や感作能を評価する方法には、ラット好塩基球白血球細胞 (RBL-2H3) やヒト好塩基球に食物抗原を添加した際のヒスタミン遊離量を測定する*in vitro*で評価法や、食物抗原に感作させた動物モデルを用いた*in vivo*での評価系がある。*In vivo*での評価系では主に血清中の抗原特異IgE抗体やIgG抗体を測定する方法や抗原を負荷した際に惹起されるアレルギー症状を観察する評価法がある。抗原負荷時に評価する項目には、体温や血圧の変化、血清中のヒスタミンやサイトカイン量の測定、便の形状、運動量の変化の観察、エバンスブルーなどの色素を用いた血管透過性の観察などがある[31–33]。

本章では、最初に1BS-18H中で ω 5-グリアジンが検出されないことをウェスタンブロット法で解析した。また、アレルギー研究で汎用されている卵白アルブミン (OVA) を用いて*in vivo*でのアレルギー症状の惹起能を評価することができるラットモデルの構築を試みた。さらに、構築した ω 5-グリアジン感作ラットにおける1BS-18Hのアレルギー症状惹起能を評価するとともに、正常ラットにおける1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対する感作能を評価した。

第1節 1BS-18H グルテンの ω 5-グリアジン量の評価

1-1. 緒言

ω 5-グリアジン IgE エピトープ抗体を用いた ELISA 法により 1BS-18H グルテン中の ω 5-グリアジン含有量を測定した結果、1BS-18H グルテン中の含有量が Hokushin グルテン中よりも低かったことを報告している[35]。しかしながら、1BS-18H は ω 5-グリアジンをコードする遺伝子座のある1B 染色体の一部を欠失しているため、本来 ω 5-グリアジンは検出されないと考えられる。したがって、ELISA 法で検出された ω 5-グリアジンは検出に使用した抗体が他のグリアジンコンポーネントと交差反応したためであると推察される。

食物中の抗原タンパク質を検出する方法には、ELISA 法やウェスタンブロット法がある。ウェスタンブロット法は、分子量の異なるタンパク質を区別して検出することができ、目的タンパク質の有無や使用した抗体の抗原特異性なども評価することができる。本節では、1BS-18H グルテン中に ω 5-グリアジンが含まれていないことを抗グリアジン抗体と抗 ω 5-グリアジン IgE エピトープ抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した。

1-2. 結果

Hokushin及び1BS-18Hから抽出したグルテンをそれぞれSDS-PAGEで分離した後、抗グリアジン抗体と抗 ω 5-グリアジン抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った (Fig. 5)。その結果、Hokushinと1BS-18Hにおいて、抗グリアジン抗体により α/β -グリアジン、 γ -グリアジン及び ω 1,2-グリアジンの分子サイズに相当する35–50 kDaのバンドが認められた。また、Hokushinグルテンにおいては、 ω 5-グリアジンの分子サイズに相当する (~60 kDa) のバンドがわずかに確認されたが、1BS-18Hグルテン中では確認できなかった。さらに、抗 ω 5-グリアジン抗体を用いて検出した結果、1BS-18Hグルテンでは、Hokushinグルテンで認められた ω 5-グリアジンのバンドが消失していることを確認した。この結果から、1BS-18Hグルテン中の ω 5-グリアジンは欠失していることが示された。

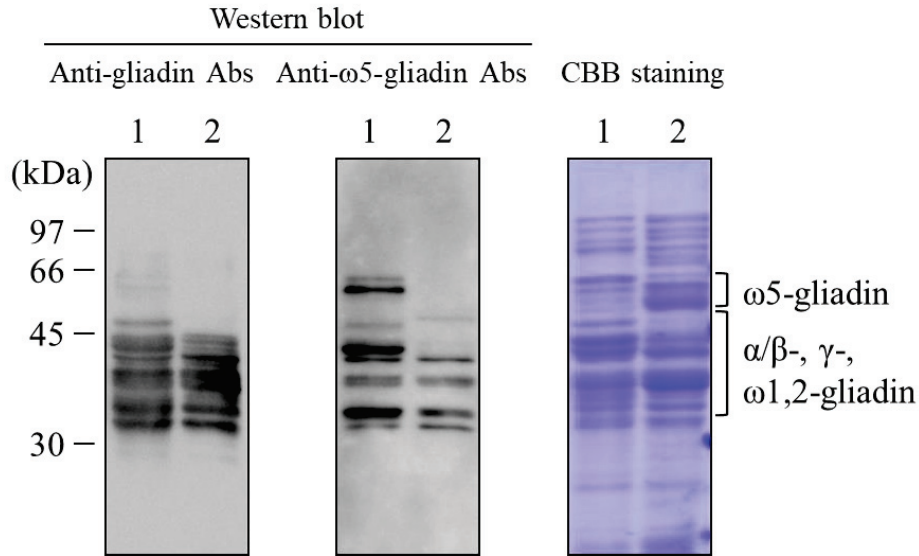


Fig. 5. Western blot analysis of the gluten from two wheat cultivars. Gluten (10 μ g) from Hokushin (lane 1) and 1BS-18H wheat (lane 2) was separated by SDS-PAGE and blotted onto a PVDF membrane. The membrane was incubated with anti-gliadin Abs and anti- ω 5-gliadin Abs. For CBB staining, 25 μ g of each gluten was loaded onto the gel.

1-3. 考察

本節では、ウェスタンブロット法により1BS-18Hグルテンが ω 5-グリアジンタンパク質を含んでいないことを明らかにした。当研究室における以前の研究で、1BS-18Hグルテン中の ω 5-グリアジン含量は1.21 mg/g、Hokushinグルテン中では5.17 mg/gがELISA法で検出されている[35]。この研究では、 ω 5-グリアジンの3つのIgE結合エピトープ配列、QQIPQQ、QQFPQQ、QQSPEQQを含むペプチドKQQSPEQQQFPQQIPQQQを用いて作製した抗 ω 5-グリアジン抗体が用いられている[30]。Cassidyらは、抗 ω 5-グリアジン抗体が結合する ω 5-グリアジン上のIgEエピトープ配列QX₁PX₂QQ配列 (X₁: L, F, S or I; X₂: Q, E or G) を他のグリアジンや低分子量グルテニンも有していることを報告している[36]。本研究において、過去にELISA法で使用した抗 ω 5-グリアジン抗体は、 ω 5-グリアジン以外の複数のグルテン成分とも強い結合が確認された (Fig. 5)。したがって、過去のELISA法で1BS-18Hグルテン中にわずかに検出された ω 5-グリアジンは、抗 ω 5-グリアジン抗体が他のグルテン成分と交差反応したことに起因すると考えられる。一方、Altenbachらは、1B染色体にコードされる主要な ω 5-グリアジンを欠失した変異小麦系統が1D染色体にコードされるマイナーな ω 5-グリ

アジタンパク質（推定分子量: 44.4 kDa）を有していること、1D染色体由来の ω 5-グリアジンがWDEIA患者のIgE結合エピトープを複数持っていることを報告している[18]。この報告は、1BS-18Hも1D染色体由来の ω 5-グリアジンを含んでいる可能性を示唆するものである。本研究では、1BS-18Hグルテンにおける1D染色体由来の ω 5-グリアジンの含有量を明らかにしていない。今後、二次元電気泳動と質量分析法により1BS-18グルテン中に1D染色体由来の ω 5-グリアジンが検出できるのかを明らかにする必要があると考えている。

第2節 OVA感作ラットを用いたアレルギー症状惹起能評価系の確立

2-1. 緒言

第1節で1BS-18Hには1B染色体由来の ω 5-グリアジンが含まれていないことを明らかにした。一方、1BS-18Hには、抗 ω 5-グリアジン抗体が交差反応するグリアジンコンポーネントの存在が確認された。この結果は、 ω 5-グリアジン特異IgE抗体を有する小麦アレルギー患者が1BS-18Hを摂取した場合、血清中 ω 5-グリアジン特異IgE抗体が1BS-18H中のグリアジンコンポーネントと交差反応し、アレルギー症状を呈する可能性を示唆するものである。また、健康な人が1BS-18Hを摂取した場合、1BS-18H中のグリアジンコンポーネントに対して産生された特異IgE抗体が、通常小麦中の ω 5-グリアジンと交差反応する可能性も考えられる。これらを明らかにするためには、食物アレルギー動物モデルを構築する必要がある。

鶏卵は、わが国で最も頻度の高い即時型食物アレルギーの原因食物である[1]。鶏卵アレルギー患者の罹患者数は乳幼児に多く、多くの患者は生後1年以内に寛解に至る。鶏卵のうち卵白が占める重量は56–61%であり、卵白の9–11%はOVAやリゾチーム、オボトランスフェリンなどのタンパク質で構成されている。これらのタンパク質のうち、最も含有量の多いタンパク質はOVAである。OVAはセリンプロテアーゼインヒビターに属している分子量45 kDaの糖タンパク質である。OVAは即時型鶏卵アレルギーの主要抗原であり、水への溶解性が高く、高い抗原性を有しているため、アレルギー動物モデルの作製に汎用されている。本節では、OVAを用いて食物抗原感作ラットモデルを作製し、OVAを負荷した際の直腸温の変化を指標としてアレルギー症状の惹起が評価できるのかを確認した。本研究においては、OVAの消化管吸収と消化の過程を排除し、確実にOVAの血中濃度を上昇させることができる静脈内負荷を用いた。

2-2. 結果

4週齢の雄性 Brown Norway (BN) ラットにOVAとImject® Alumの混合液を週1回4–8週間腹腔内投与する方法でOVA感作モデルを作製した。感作開始4–8週目に血清中のOVA特異IgE抗体価を測定した結果、非感作群ではOVA特異IgE抗体価の上昇が認められなかったが、OVA感作群

では IgE 抗体価の有意な上昇が認められた (Table 1)。この結果から、OVA を Alum アジュバントとともに腹腔内投与する方法により OVA への感作が成立したことを確認した。OVA 負荷実験では感作ラットを溶媒負荷群と OVA 負荷群に無作為に割り付けた。このとき、両群間で OVA 特異 IgE 抗体価には有意な差は認められなかった。次に、作製した OVA 感作ラットに OVA を静脈内負荷した際の直腸温の変化を測定した。その結果、非感作ラットに OVA を負荷した群と OVA 感作ラットに溶媒を負荷した群では直腸温の変化が認められなかった (Fig. 6)。一方、OVA 感作ラットに OVA を負荷した場合、非感作ラットや溶媒投与群と比較して、直腸温の有意な低下が認められた。以上の結果から、作製した OVA 感作モデルラットにて体温を指標にアレルギー症状の惹起を評価できることを確認した。

Table 1. Plasma levels of IgE Abs specific for OVA in rats.

Unsensitized	Sensitized	
	Vehicle	OVA
0.01 ± 0.00	1.00 ± 0.14**	1.35 ± 0.17**

Each value represents the mean ± SEM of five rats. ** $P < 0.01$: significantly different from unsensitized rats.

2-3. 考察

本節では、アレルギー症状を評価する動物モデルの作製を目的に、アレルギー動物モデルの作製で汎用される OVA を用いて感作ラットモデルを作製し、静脈負荷試験後の直腸温の変化を測定する方法でアレルギーモデルとしての妥当性を確認した。

アレルギー動物モデルにおける症状惹起の指標として抗原負荷後の直腸温の変化を測定する方法がある。抗原負荷後に認められる体温の低下は、肥満細胞や好塩基球の脱顆粒に伴うヒスタミンやロイコトリエンなどの放出に起因すると考えられている[37]。体内に吸収された抗原は、肥満細胞や好塩基球上の抗原特異 IgE 抗体と結合し脱顆粒を起こす。このとき、ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが放出される。これらの生理活性物質は血管拡張作用を有しており、血管の拡張に伴う放散熱の増加と血圧低下作用による循環血液量の低下を惹起する。

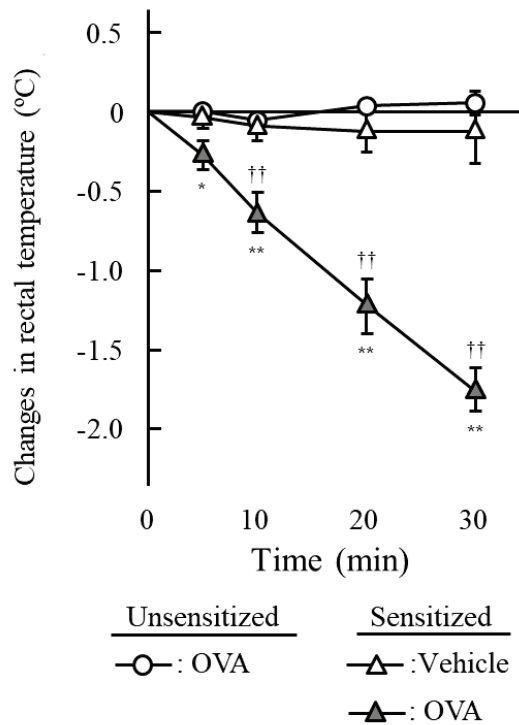


Fig 6. Changes in rectal temperature after intravenous administration of ovalbumin (OVA) in unsensitized or OVA-sensitized rats. Vehicle alone (1 ml/kg) or OVA (10 mg/kg) was challenged intravenously. Each value represents the mean \pm SEM for five rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: significantly different from unsensitized rats. †† $P < 0.01$: significantly different from vehicle-challenged rats sensitized with OVA.

これらの作用が協奏的に働くことで体温の低下が誘発されると考えられている。また、肥満細胞から放出される血小板活性化因子 (PAF) もアレルギー反応に伴う体温の低下に関与することが報告されている。例えば、Straitらは、BALB/cマウスを用いたアレルギー症状惹起の実験において、アレルギー症状惹起時には血中の PAF 濃度が上昇したこと、PAF 受容体拮抗薬を投与することで体温の低下が抑制されたことを報告している[38]。したがって、抗原負荷時に見られる直腸温の低下には、ヒスタミンや PAF を含む種々の生理活性物質の放出が複合的に関与すると考えられる。

本実験で OVA 感作ラットに対して OVA を静脈負荷した結果、直腸温の有意な低下が認められた。一方、非感作ラットに OVA を投与した群や感作ラットに溶媒のみを投与した群では直腸温の変化が認められなかった。この結果から、抗原負荷時の直腸温の変化はアレルギー症状によるものと考えられる。以上の結果から、OVA 感作モデルラットにて体温を指標にアレルギー症状の惹起を評価することができることを確認することができた。

第3節 1BS-18Hのアレルギー症状惹起能の評価

3-1. 緒言

前節で、OVAによるアレルギー症状の惹起を評価する系としてBNラットモデルの有用性が確認できた。しかし、 ω 5-グリアジンを用いた際にもOVAと同様にアレルギー症状が評価できるのかは不明である。本節では、OVAと同様の手法で ω 5-グリアジン感作ラットを作製し、 ω 5-グリアジンを静脈内負荷した場合に生じるアレルギー症状を直腸温の変化で評価できるのかを確認した。また、同 ω 5-グリアジン感作ラットに対して、1BS-18Hより抽出したグルテンを静脈内負荷し、直腸温の変化を測定する方法で1BS-18Hのアレルギー症状惹起能を評価した。本実験では、 ω 5-グリアジンを含有している1BS-18Hの親品種であるHokushin負荷群を陽性対照群とした。

3-2. 結果

4週齢の雄性BNラットに ω 5-グリアジンとImject®Alumを週1回8週間投与することで ω 5-グリアジン感作モデルを作製した。ELISA法により血漿中 ω 5-グリアジン特異IgE抗体価を測定した結果、 ω 5-グリアジン感作群では非感作群と比較して、 ω 5-グリアジン特異IgE抗体価の上昇傾向が認められた (Table 2)。この結果から、 ω 5-グリアジンへの感作が確認できた。1BS-18Hのアレルギー症状惹起能を評価する実験では、作製した ω 5-グリアジン感作ラットを ω 5-グリアジン負荷群、Hokushin抽出グルテン (Hokushinグルテン) 負荷群、1BS-18H抽出グルテン (1BS-18Hグルテン) 負荷群、溶媒投与群の4群に無作為に割り付けた。このとき、各群における血漿中 ω 5-グリアジン特異IgE抗体価は、群間で有意な差は認められなかった。続いて、作製した ω 5-グリアジン感作ラットに ω 5-グリアジンを静脈内負荷した。その結果、非感作ラットに ω 5-グリアジンを負荷した群

Table 2. Plasma levels of IgE Abs specific for ω 5-gliadin in rats.

Unsensitized	Sensitized			
	Vehicle	ω 5-gliadin	Hokushin	1BS-18H
0.01 \pm 0.01	0.11 \pm 0.09	0.09 \pm 0.04	0.08 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01

Each value represents the mean \pm SEM of five rats.

や ω 5グリアジン感作ラットに溶媒のみを負荷した群では、直腸温の変化は認められなかったが、 ω 5グリアジン感作ラットに ω 5グリアジンを負荷した群では非感作群や溶媒投与群と比較して有意な直腸温の低下が認められた (Fig. 7A)。以上の結果から、前節のOVAモデルと同様に ω 5-グリアジンでも静脈負荷後の直腸温の変化を指標にアレルギー症状惹起能を評価できることが確認できた。そこで、 ω 5-グリアジン感作ラットを用いて1BS-18Hのアレルギー症状惹起能の評価を行った。 ω 5-グリアジン感作ラットにHokushinグルテンを静脈内負荷した場合、 ω 5-グリアジンを静脈内負荷した場合と同様に、溶媒のみを負荷した群と比較して有意な直腸温の低下が認められた (Fig. 7B)。一方、1BS-18Hグルテンを静脈内負荷した場合には、非感作群や溶媒投与群と同様に直腸温の変動は認められなかった。

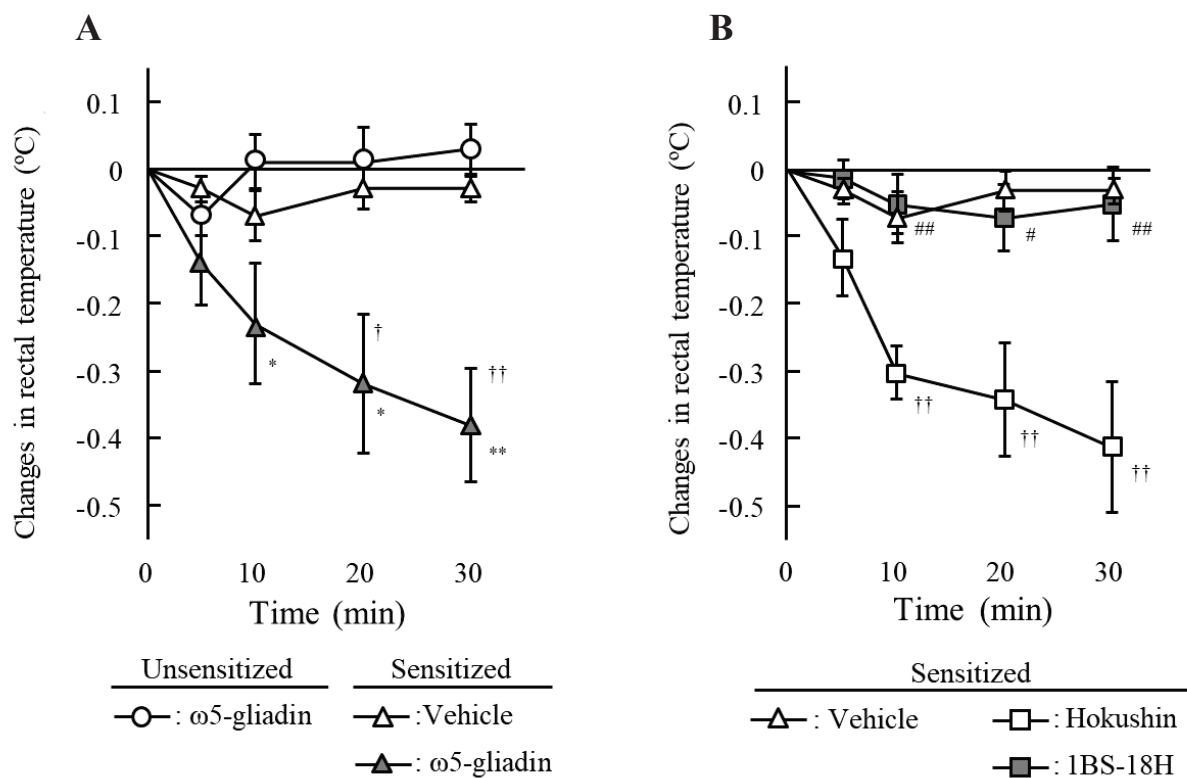


Fig 7. Changes in rectal temperature after intravenous administration of ω 5-gliadin (A) or gluten from Hokushin wheat or 1BS-18H wheat (B) in unsensitized or ω 5-gliadin-sensitized rats. Vehicle alone (1 ml/kg), ω 5-gliadin (10 mg/kg), Hokushin gluten (10 mg/kg) or 1BS-18H gluten (10 mg/kg) was challenged intravenously. Each value represents the mean \pm SEM for five rats. * P < 0.05, ** P < 0.01: significantly different from unsensitized rats. † P < 0.05, †† P < 0.01: significantly different from vehicle-challenged rats sensitized with ω 5-gliadin. # P < 0.05, ## P < 0.01: significantly different from Hokushin gluten-challenged rats sensitized with ω 5-gliadin.

3-3. 考察

本節では、雄性 BN ラットを用いて ω 5-グリアジン感作ラットモデルを作製し、 ω 5-グリアジンを静脈内負荷した後の直腸温の変化を測定することでアレルギー症状の評価系として妥当であることを確認した。また、作製した ω 5-グリアジン感作モデルを用いて IBS-18H のアレルギー症状惹起能についても評価を行った。

BN ラットに ω 5-グリアジンと Imject[®] Alum を週 1 回 8 週間投与した結果、 ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体は上昇傾向を示した (Table 2)。この結果から、本感作法により ω 5-グリアジンに対する感作が成立したと考えられる。一方、 ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価は、OVA を感作させた場合 (Table 1) と比較して低値であった。 ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価が低値を示した原因として、 ω 5-グリアジンの感作能が OVA と比べて低いことや ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体の検出に用いた ELISA 法の感度が低いことなどが考えられる。本節で用いた ELISA 法は固相化した抗原に結合した特異 IgE 抗体を検出しているが、固相化の際に特異 IgE 抗体の結合部位が固相によって阻害される可能性が報告されている[39]。また、血漿中の抗原特異 IgG 抗体が抗原と特異 IgE 抗体の結合を競合的に阻害し、IgE 抗体価を過小評価している可能性が考えられる。この競合的な干渉を排除し IgE 抗体の測定感度を上昇させるためには、試料中の IgE 抗体以外の抗体や夾雑物を除去した後に IgE 抗体価を測定する必要があると考えられる。具体的な方法として、抗ラット IgE 抗体をプレート上に固相化し、血漿中 IgE 抗体をプレート上に捕捉する方法が考えられる。この方法は、抗原と抗体の結合よりも前に固相化された抗ラット IgE 抗体と血漿中 IgE 抗体を結合させた後に IgG を含む血漿夾雑物を除去することができ、血漿中 IgE 抗体のみをプレート内に捕捉することができる。捕捉した抗原特異 IgE に酵素標識した抗原を添加することで IgG 抗体などによる測定の干渉を防ぐことができ、感度が上昇すると考えられる。

本章第 1 節において、OVA 感作ラットに対して OVA を静脈内負荷した場合、直腸温が約 1.5–2.0°C 低下したのに対し、 ω 5-グリアジンの静脈内投与では直腸温が約 0.5°C 有意に低下した (Figs. 6 及び 7A)。一方、非感作ラットに対して ω 5-グリアジンを静脈内負荷した場合には、直腸温の変化は認められなかった。これらの結果から、 ω 5-グリアジン感作ラットは、OVA 感作ラットよりもアレルギー反応の重症度は軽度であるが、 ω 5-グリアジンのアレルギー症状惹起能を評価できるこ

とが確認できた。

次に、作製したモデルを用いて、Hokushin 及び 1BS-18H のアレルギー症状惹起能を評価した。 ω 5-グリアジン含有している Hokushin グルテンを静脈内負荷した結果、 ω 5-グリアジン感作ラットの直腸温は有意に低下した (Fig. 7B)。一方で、1BS-18H グルテンを静脈内負荷した場合には直腸温の低下は認められなかった。グルテンやグリアジンは水溶性が低いため、本研究では高用量グルテンの直腸温への影響を評価できなかったが、これらの結果は、 ω 5-グリアジン感作ラットにおける 1BS-18H グルテンのアレルギー症状惹起能は Hokushin グルテンよりも低いことを示している。すなわち、1BS-18H は ω 5-グリアジンに感作している小麦アレルギー患者のアレルギー症状を惹起する危険性が低く、通常小麦の代替食として有用である可能性を示している。

本章第1節のウェスタンブロット解析の結果、ウサギ抗 ω 5-グリアジンポリクローナル抗体は 1BS-18H中の ω 5-グリアジン以外のコンポーネントに対して交差反応性を示すと考えられた。一方、本負荷試験では、1BS-18H投与による体温の変化は認められなかった。この理由は不明であるが、ラット血漿中の ω 5-グリアジン特異IgE抗体の ω 5-グリアジンに対する特異性が高く他のグリアジン類への交差反応しなかった、あるいは抗体価が低い可能性が考えられる。1BS-18Hは、1D染色体由来の ω 5-グリアジン含有している可能性が示唆されているが、本研究の結果は、1BS-18H中に含まれる1D染色体由来 ω 5-グリアジンがアレルギー症状の惹起には影響するほど含まれていないと示唆された。今後、1D染色体由来 ω 5-グリアジンが小麦アレルギーの発症にどの程度寄与しているのかを解明する必要があると考えている。

第4節 1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対する感作能の評価

4-1. 緒言

第3節の結果より、1BS-18Hは ω 5-グリアジン感作ラットにおいてアレルギー症状惹起能が低いことを明らかにした。このことは、通常の小麦の摂取によりアレルギー症状を呈する ω 5-グリアジンに感作している小麦アレルギー患者が、アレルギー症状を惹起することなく安全に1BS-18Hを摂取することができる可能性を示唆するものである。一方で、将来的な小麦アレルギーの根絶に向けて、 ω 5-グリアジンへの感作を予防することも重要である。特に、アトピー素因など食物アレルギーの発症リスクが高い児が継続的に ω 5-グリアジンを含む小麦を摂取した場合には、経口感作により ω 5-グリアジンに感作されWDEIAのような重篤な小麦アレルギーを引き起こす可能性も考えられる。そこで、本節では1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対する感作能をラットモデルで評価した。 ω 5-グリアジンに対する感作能は、健常ラットに対して1BS-18HグルテンあるいはHokushinグルテンをAlumアジュバントとともに複数回腹腔内投与した後に経日的に血漿中 ω 5-グリアジン特異IgE抗体価を測定するとともに、 ω 5-グリアジンを静脈内負荷した際の直腸温の変化を測定する方法で評価した。

4-2. 結果

4週齢の雄性BNラットにHokushinグルテン又は1BS-18HグルテンをImject®Alumnとともに週1回13週間投与した。ELISA法で血漿中 ω 5-グリアジン特異IgE抗体価を測定した結果、各グルテン感作群における ω 5-グリアジン特異IgE抗体は、非感作群よりも高い傾向を示した(Table 3)。この結果から、各小麦グルテンに対する感作が成立したことが確認できた。次に各グルテン感作ラットに対して、 ω 5-グリアジンを静脈内に負荷した後の直腸温の変化を測定した。その結果、非感作ラットでは直腸温の変化が認められなかったのに対して、Hokushinグルテン感作ラットでは直腸温の有意な低下が認められた(Fig. 8)。一方、1BS-18Hグルテン感作ラットでも ω 5-グリアジンの負荷により直腸温の低下傾向が観察されたが、その低下はHokushinグルテン感作ラットよりも軽度であった。

Table 3. Plasma levels of IgE Abs specific for ω 5-gliadin in rats.

Unsensitized	Sensitized	
	Hokushin	1BS-18H
0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01

Each value represents the mean \pm SEM of five rats.

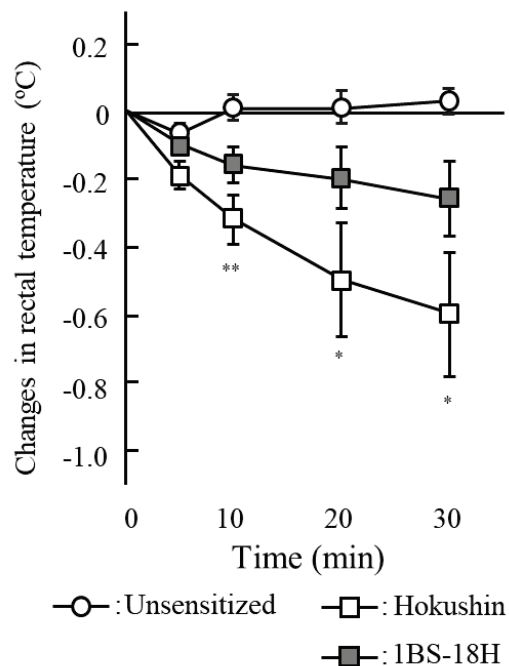


Fig. 8. Changes in rectal temperature after intravenous administration of ω 5-gliadin in unsensitized rats or rats sensitized with gluten from Hokushin or 1BS-18 wheat. ω 5-gliadin (10 mg/kg) was challenged intravenously to unsensitized rats or rats sensitized with gluten from Hokushin or 1BS-18 wheat. Each value represents the mean \pm SEM for five rats. * P < 0.05, ** P < 0.01: significantly different from unsensitized rats.

4-3. 考察

本節では、ラットモデルを用いて 1BS-18H グルテンが ω 5-グリアジンに対する感作を惹起するのかを評価した。1BS-18H グルテン及び Hokushin グルテンで免疫処置を行った際の血漿中 ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価は、非感作群と比べ上昇傾向を示した (Table 3)。また、Hokushin グルテ

ン感作ラットでは ω 5-グリアジンの負荷による直腸温の低下が認められたことから、検出された ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価は低いが ω 5-グリアジンに対する感作は成立しているものと考えられる (Fig. 8)。1BS-18H グルテンで免疫処置したラットに対して ω 5-グリアジンを静脈内負荷した結果、直腸温の低下傾向が認められたが、その程度は Hokushin グルテン感作ラットよりも軽度であった。これらの結果は、1BS-18H が Hokushin よりも ω 5-グリアジンに対する感作能が低いことを示している。 ω 5-グリアジンの負荷により直腸温の低下傾向が認められた理由として、ラットが 1BS-18H に含まれる ω 5-グリアジン以外のグリアジンコンポーネントに感作され、産生された特異 IgE 抗体が ω 5-グリアジンと交差反応を示した可能性が考えられる。Battais らの報告によると、WDEIA 患者の血清中特異 IgE 抗体は ω 5-グリアジンの繰り返し配列 QX₁PX₂QQ (X₁: L, F, S or I; X₂: Q, E or G) と結合すること、 α/β -グリアジンや γ -グリアジン、 ω 1,2-グリアジンにも同様の配列が存在し WDEIA 患者の IgE 抗体と結合することが示されている[34,35]。1BS-18H は ω 5-グリアジンを含有していない又は極微量の 1D 染色体由来 ω 5-グリアジンを含有している可能性があるが、他のグリアジンコンポーネントを Hokushin と同程度有している[42]。したがって、1BS-18H グルテン感作ラットの血漿中には、1BS-18H 中の ω 5-グリアジン以外のグリアジンへ感作されることにより産生された IgE 抗体が存在している可能性が考えられる。これらの IgE 抗体結合エピトープは上記の繰り返し配列と近似した配列であることが予想される。このことは、1BS-18H グルテン感作ラットで認められた ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価の上昇や ω 5-グリアジン静脈負荷後の直腸温の低下が、 ω 5-グリアジン以外のグリアジンコンポーネントに対する特異 IgE 抗体の交差反応により惹起された可能性を示唆するものである。また、1D 染色体由来の ω 5-グリアジンも WDEIA 患者の IgE 結合エピトープを複数持っていることから、1BS-18H 中の 1D 染色体由来 ω 5-グリアジンにより産生された ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体が反応した可能性も考えられる[18]。

本研究では、Hokushin グルテン感作ラットの直腸温の変化に対する 1BS-18H グルテン負荷の影響については解析していない。前述のように、1BS-18H グルテン中の γ -グリアジンを主とするグリアジン総量は、Hokushin グルテンとほぼ同じであることを報告している[42]。したがって、Hokushin グルテンをラットに免疫処置した場合には ω 5-グリアジンだけでなく、様々なグリアジンやグルテニンコンポーネントに対する特異 IgE 抗体が産生される。したがって、Hokushin グルテン

感作ラットに 1BS-18H グルテンを投与した場合には、アレルギー症状が誘発されると推察される。しかしながら、本研究において、 ω 5-グリアジン感作ラットでは、1BS-18 グルテンのアレルギー症状惹起能は Hokushin グルテンよりも低いことが示された。小麦アレルギーの主要な原因抗原は、臨床型によって異なることが報告されている。例えば、WDEIA 患者の多くは、 ω 5-グリアジンに対する特異 IgE 抗体を有している[8,9]。したがって、1BS-18H グルテンは WDEIA を含む ω 5-グリアジン感作型の小麦アレルギー患者のアナフィラキシーの罹患率や重症度を減少させることが期待できる。

第5節 小括

本章では、1BS-18Hのアレルギー症状惹起能と ω 5-グリアジンに対する感作能をラットモデルで解析した。

第1節では、ウェスタンブロット法により1BS-18Hグルテン中で ω 5-グリアジンタンパク質が検出されないことを確認した。その結果、抗グリアジン抗体と抗 ω 5-グリアジン抗体でHokushinグルテン中に認められた ω 5-グリアジンの分子サイズに相当する（~60 kDa）のバンドが1BS-18H中では消失していた。この結果から、1BS-18Hグルテン中の ω 5-グリアジンが欠失していることを確認することができた。

第2節では、食物アレルギー感作モデルの作製に汎用されているOVAを用いて、アレルギー症状の惹起を評価することができるラットモデルを作製した。BNラットに対してOVAをアジュバントとともに複数回腹腔内投与するとOVA特異IgE抗体の上昇が認められた。また、作製したOVA感作ラットに対して、OVAを静脈内負荷すると、非感作ラットで認められなかった直腸温の低下が認められた。これらの結果から、ラットモデルで体温低下を使用にする方法によりアレルギー症状が評価できることを確認した。

第3節では、第2節で構築したアレルギー症状の評価方法が、小麦アレルギーでも適応できるのかを ω 5-グリアジンを用いて検証した。OVAと同様の手法で、 ω 5-グリアジン感作ラットを作製した結果、 ω 5-グリアジン特異IgE抗体価の上昇傾向と ω 5-グリアジン負荷後の直腸温の低下が確認できた。この結果から、OVAと同様に ω 5-グリアジンでもアレルギー症状の評価ができることがわかった。作製した ω 5-グリアジン感作ラットに対して、Hokushinグルテン又は1BS-18Hグルテンを静脈内に負荷してアレルギー症状惹起能を評価した結果、 ω 5-グリアジンを含有するHokushinグルテンでは負荷により有意な直腸温の低下が認められたが、1BS-18Hグルテンでは直腸温の変化が認められなかった。よって、 ω 5-グリアジン感作ラットにおいて、1BS-18HはHokushinよりもアレルギー症状惹起能が低いことを明らかにした。

第4節では、1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対する感作能を評価した。Hokushinグルテン感作ラットに対して ω 5-グリアジンを静脈内負荷した結果、顕著な直腸温の低下が認められた。一方、

1BS-18H グルテン感作群では、 ω 5-グリアジンの負荷により直腸温の低下傾向が認められたが、その程度はHokushin グルテン感作群よりも軽度であった。 ω 5-グリアジンを欠失している1BS-18H グルテンで感作したラットにおいて、 ω 5-グリアジンの負荷により直腸温が低下した要因として、1BS-18Hに含まれる他のグリアジンコンポーネントに対する特異 IgE 抗体が ω 5-グリアジンと交差反応した可能性や 1D 染色体由来のマイナーな ω 5-グリアジンが感作に関与していることなどが考えられる。しかしながら、1BS-18H の ω 5-グリアジンに対する感作能は Hokushin よりも弱いことを明らかにすることができた。

以上、本章の結果から、1BS-18H は ω 5-グリアジン感作ラットにおけるアレルギー症状の惹起能と ω 5-グリアジンに対する感作能が低いことを明らかにした。これらの知見は、 ω 5-グリアジンに感作している小麦アレルギー患者がアレルギー症状を惹起することなく安全に 1BS-18H を摂取できるだけでなく、アトピー素因を有する児が ω 5-グリアジン感作型小麦アレルギーを発症することなく安全に 1BS-18H を摂取できる可能性を示唆するものである。

第2章 1BS-18Hの経口免疫寛容（OT）誘導能の評価

序論で述べたように、これまで乳幼児期にアレルギーの発症リスクが高い食物を摂取する事は経口感作を誘導し食物アレルギーの発症につながると考えられていた。しかし、二重抗原曝露仮説で幼児期からの食物の経口摂取がOTを誘導することが提唱され、この仮説に基づいて抗原となりうる食物を積極的に摂取することでOTを誘導しアレルギーを予防する臨床研究が実施されている。一方で、アレルギー性皮膚炎などの皮膚に基礎疾患を持つ児では、生後3ヶ月の時点で既に食物アレルギーを発症した症例も報告されており、このような児がアレルギーの原因となる食物を摂取した場合、アレルギー症状が惹起される可能性がある。また、アレルギー疾患の家族歴や皮膚疾患、遺伝子変異などのアトピー素因を有する児は食物アレルギーの発症リスクが高く、食物抗原の経口感作による食物アレルギーを発症する危険性を完全に否定することはできない[12,14,15]。したがって、早期の経口摂取により将来的な食物アレルギーを安全に予防するためには、アレルギー症状惹起能や抗原感作能を低減した低アレルゲン化食物を用いることが望ましいと考えられる。

第1章において、1BS-18Hはアレルギー症状の惹起能や ω 5-グリアジンに対する感作能がHokushinと比べて低いことを明らかにした。しかしながら、1BS-18Hグルテンが通常小麦のグルテンや ω 5-グリアジンに対するOT誘導能を示すのかは明らかになっていない。本章では、1BS-18Hを利用した小麦アレルギーの発症予防の有用性を明らかにすることを目的とし、小麦アレルギーに対するOT誘導モデルを作製し、1BS-18Hのグルテン及び ω 5-グリアジンに対するOT誘導能を評価した。

第1節 OVAを用いたOT誘導ラットモデルの作製

1-1. 緒言

本節では、ラットモデルがOTの誘導能を評価する系として適しているのかを明らかにすることを目的として、OVAに対するOT誘導ラットモデルの作製を試みた。

OT誘導モデル動物として、Paula-silvaらやHammershimidt-Kamperらにより、OVAに対するOT誘導マウスモデルが報告されている[43,44]。また、抗原としてOVA以外にもピーナッツに対するOT誘導マウスモデルや、牛乳アレルギーの主要抗原である β -ラクトグロブリンに対するOT誘導マウスモデルも報告されている[45,46]。小麦についてはKumagaiらにより、免疫処置前にグリアジンをラットに経口摂取させることでグリアジンへの感作が予防されたことが報告された[27]。本節では経時的な採血や抗原負荷後のアレルギー症状の評価が簡便なラットを用いて、Kumagaiらの方法を参考にOVAに対するOT誘導ラットモデルの作製を行った。

1-2. 結果

抗原に対するOTラットモデルを作製するためには、飼料中に抗原が含まれていない条件で実験を行う必要がある。現在、広島大学霞動物実験施設ではMF固形飼料（オリエンタル酵母工業）がラットの飼料として用いられているが、その配合組成に関する情報は開示されておらず、MF固形飼料中にOVAが含まれているかは不明である。したがって、最初にELISA法でMF固形飼料とMF粉末飼料のOVA濃度を測定した。その結果、MF粉末飼料のOVA含有量は7.09 $\mu\text{g/g}$ であり、コーンスターチ（6.43 $\mu\text{g/g}$ ）と同程度の値を示した。一方、MF固形飼料中のOVA含有量は59.3 $\mu\text{g/g}$ とMF粉末飼料やコーンスターチよりも高い値を示した。しかしながら、その含有量はごく微量であり、取り扱いが簡便であるため、本実験では飼育用飼料としてMF固形飼料を使用した。

次に、免疫処置前にOVAを複数回経口摂取させる方法によりOT誘導モデルの作製を試みた。4週齢の雌性BNラットに対してOVA又は溶媒を5日間連日強制経口投与する方法でOTを誘導し、OT誘導処置終了2日後に、不活化百日咳菌を腹腔内投与したラットに対してOVAとImject®Alumの混合液を皮下投与する方法で免疫処置を行った。その結果、溶媒のみを投与した非

OT ラットでは免疫処置後 3 週目で OVA 特異 IgE 抗体価及び IgG₁ 抗体価の上昇が認められた (Fig. 9)。一方、あらかじめ OVA を経口投与した OT ラットでも 3 週目で OVA 特異 IgE 抗体価及び IgG₁ 抗体価の上昇が確認できたが、その値はいずれも非 OT ラットよりも低かった。

さらに、OT ラットに対して OVA を静脈内負荷して直腸温の変化を測定した結果、非 OT 群では OVA の負荷により直腸温の顕著な低下が認められたが、OT 群では体温の低下が有意に抑制された (Fig. 10)。以上の結果から、免疫処置前に OVA を経口投与することで OVA に対する OT が誘導され、OVA に対する感作が抑制されることが示された。

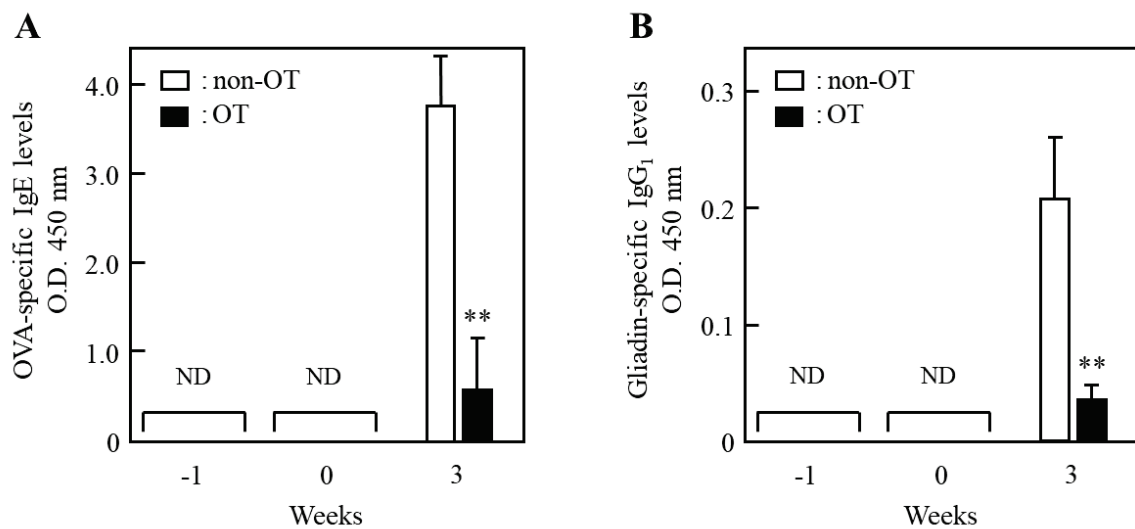


Fig. 9. The induction of OT to OVA in OVA-immunized rats. The levels of IgE (A) and IgG₁ (B) Abs specific for OVA in plasma were determined at weeks -1, 0, and 3 in rats immunized subcutaneously with OVA. Each value represents the mean \pm SD of four rats. ** $P < 0.01$: significantly different from non-OT rats. ND, not detected.

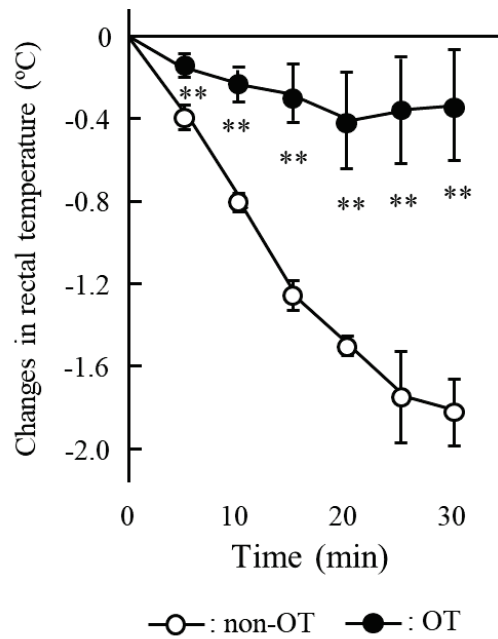


Fig. 10. Changes in rectal temperature were evaluated after the administration of OVA (2 mg/kg) intravenously at week 3. Each value represents the mean \pm SD of four rats. ** $P < 0.01$: significantly different from non-OT rats.

1-3. 考察

本節では、ラットモデルが OT の誘導能を評価する系として適しているのかを明らかにすることを目的として、OVA に対する OT 誘導ラットモデルの作製を試みた。

最初に、飼育飼料中に含まれる OVA の量を ELISA 法で測定した。その結果、MF 粉末試料中の OVA 含有量はコーンスターチとほぼ同程度であった。コーンスターチには OVA が含まれていないことから、この値は ELISA に使用した抗体が非特異的に結合することで生じた値であると考えられる。一方、MF 固形飼料の OVA 含有量は $59.30 \mu\text{g/g}$ と MF 粉末飼料やコーンスターチよりも高値を示した。MF 粉末飼料と同じ原料で作られている MF 固形飼料の OVA 含有量が高値となった原因は不明だが、MF 粉末飼料から固形に成形する際に使用した材料に OVA がわずかに混入していた可能性や、成形材料の成分が ELISA 時に使用した抗体と非特異的に反応した可能性が考えられる。食品中の抗原含有量に関する基準値は各国によって異なる。例えば、ドイツやフランスではグルテン含有量が $100 \mu\text{g/g}$ 以下を超低グルテン食品と定めており、超低グルテン食品は小麦アレルギーを惹起する可能性が極めて低いと考えられている。この基準では、MF 固形飼料は超低 OVA 含有飼料と判断することができ、MF 固形飼料で飼育を行ったとしても OVA の摂取量としてはほ

とんど影響がないと推察される。また、予備的検討において、固形 MF 飼料は粉末 MF 飼料よりもラットの成長（正常な体重の増加）に影響を与えないことが分かっている。したがって、本実験では MF 固形飼料を飼育飼料として使用した。

OVA を感作前に経口負荷したラットでは、溶媒のみを経口負荷したラットよりも免疫処置後の OVA 特異 IgE 抗体価や IgG₁ 抗体価の上昇が有意に抑制された (Fig. 9)。また、非 OT ラットでは OVA の静脈内負荷後に直腸温の低下が認められたが、OT 群では OVA 負荷後の直腸温の低下は軽度であった (Fig. 10)。以上の結果から、BN ラットに対して免疫処置前に OVA を 5 日間経口投与することで OVA に対する OT モデルラットが作製できたと考えられる。

第2節 グルテンを用いた OT 誘導ラットモデルの作製

2-1. 緒言

第1節では OVA 感作ラットモデルを用いて、血漿中の OVA 特異 IgE や IgG₁ 抗体価と OVA 静脈内負荷後の直腸温の変化を指標に OT 誘導能を評価する系を確立した。本節では、OVA で認められた OT の誘導が小麦グルテンでも認められるのかを確かめるため、第1節と同じ方法でグルテンに対する OT 誘導ラットモデルの作製を試みた。

2-2. 結果

OVA と同様、MF 飼料中に小麦タンパク質がどの程度含まれているのかは不明である。最初にモリナガ FASPEK エライザII小麦（グリアジン）キットを用いて、MF 粉末飼料中のグリアジン含有量を測定した。その結果、MF 粉末飼料中に含まれるグリアジンの量は 6.1 mg/g と高濃度含まれていることが明らかになった。そこで、小麦タンパク質を含んでいない AIN-93G 飼料を作製し、飼育飼料として使用した。AIN-93G 中のグリアジン含有量を測定した結果、その値は検出限界である 0.31 µg/g 以下であった。以上の結果から、OT 誘導実験に AIN-93G を使用することは妥当であると判断した。

次に、AIN-93G で飼育したラットを用いて、グルテンに対する OT 誘導ラットモデルの作製を試みた。OT の誘導は、OVA に対する OT 誘導の実験と同様の方法で行い、東京化成より購入したグルテン（TCIグルテン）を免疫処置前に5日間経口投与した。免疫処置は、経口投与終了2日後にTCIグルテンと Imject® Alum の混合液を皮下投与し、不活化百日咳菌懸濁液を腹腔内投与する方法で行った。TCIグルテンによる OT 処置が、グルテン特異 IgE 及び IgG₁ 抗体価に与える影響について解析した結果、非 OT ラットでは、グルテンの皮下免疫処置後4週目に血漿中グルテン特異 IgE 及び IgG₁ 抗体価が上昇した（Fig 11A 及び D）。一方、OT 処置ラットでは、非 OT ラットで認められたグルテン特異 IgE 及び IgG₁ 抗体価の上昇は抑制された。グルテン特異 IgE や IgG₁ 抗体価の抑制が特定のコンポーネントに対する特異抗体価の変化に由来するのかを確認するため、グルテン OT ラットにおけるグリアジン及びグルテニン特異抗体価を測定した。その結果、非寛容ラッ

トのグリアジン (Fig. 11B 及び E) やグルテニン (Fig. 11C 及び F) に対する特異 IgE と IgG₁ 抗体価は、グルテン特異 IgE 及び IgG₁ 抗体価と同様に、4 週目で上昇した。また、グリアジンやグルテニンに対する特異 IgE 及び IgG₁ 抗体価の上昇は、いずれも OT 処置により抑制された。

以上の結果から、OVA と同様、グルテンでも OT 誘導ラットモデルを作成することができた。また、グルテンの OT 処置によるグルテン特異抗体価の減少は、グルテンを構成するグリアジンとグルテニンに対する特異抗体価の低下に起因することを明らかにした。

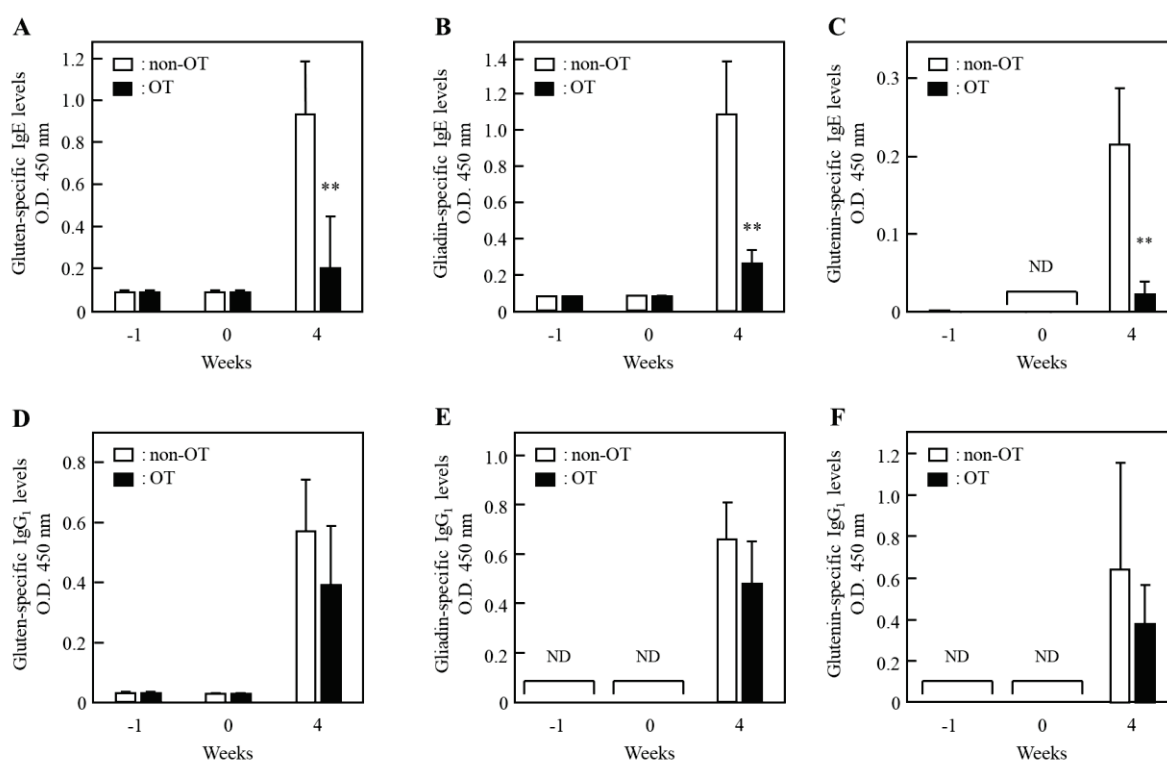


Fig. 11. The levels of IgE Abs specific for gluten (A), gliadin (B) and glutenin (C), and IgG₁ Abs specific for gluten (D), gliadin (E) and glutenin (F) in plasma were determined at weeks -1, 0, and 4 in rats immunized subcutaneously with gluten (week 0) following the oral administration of vehicle alone (50% ethanol, non-OT) or 10 mg of TCI gluten (OT) daily for 5 days. Each value represents the mean \pm SD of six rats. ** $P < 0.01$: significantly different from non-OT rats. ND, not detected.

グルテンによる OT ラットに対してグルテンを静脈内負荷した時の直腸温の変化を測定した。その結果、非 OT 処置ラットではグルテンの静脈内負荷により直腸温の低下が認められた (Fig. 12)。一方で、グルテン OT ラットではグルテン負荷後の直腸温の低下が有意に抑制された。以上の結果から、アレルギー症状惹起の観点からもグルテンを感作前に経口投与する方法により OT が

誘導され、グルテンに対する感作が抑制できることが確認できた。したがって、本 OT モデルが、1BS-18H の OT 誘導能を評価するための適切なモデルであることが確認できた。

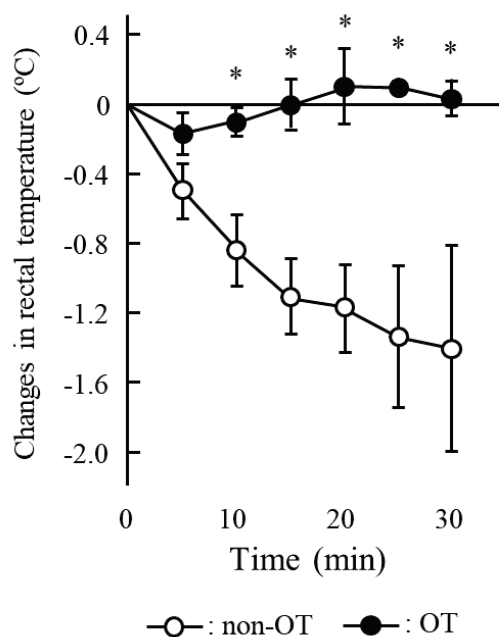


Fig. 12. Changes in rectal temperature were evaluated after the administration of gluten (2 mg/kg) intravenously at week 4. Each value represents the mean \pm SD of three rats. * $P < 0.05$: significantly different from non-OT rats.

2-3. 考察

本節では、第 1 節で構築した OVA に対する OT 誘導ラットモデルの作製法とアレルギー症状の評価法が、小麦グルテンの場合でも可能であるのかを確認した。

ラット MF 粉末飼料中のグリアジン含有量を測定した結果、MF 飼料中には 6.1 mg/g のグリアジンが含まれていた。我が国では食品表示法により、食品採取重量 1 g に特定原材料等由来のタンパク質を 10 μ g 以上含んでいる場合に「微量を超える特定原材料が混入している可能性がある」と定められている。したがって、MF 飼料は同法の基準において抗原を含むものと判定される。一方、AIN-93G 飼料におけるグリアジンの含有量は、モリナガ FASPEK エライザII小麦（グリアジン）キットの定量限界値である 0.31 μ g/g 以下の数値であった。前述のように、グルテンにはグリアジンが約 50%含有しているため、AIN-93G 中のグルテン含有量は 0.62 μ g/g 以下と概算される。したがって、AIN-93G はグルテンを含有しない飼料であると判定した。以上の結果から、本実験では

AIN-93G 飼料を用いることにした。

AIN-93G 飼料で飼育したラットに対して、グルテンを用いた OT 処置を行った結果、グルテン免疫処置によるグルテン特異 IgE 及び IgG₁ 抗体価の上昇は有意に抑制された (Fig. 11)。また、これらのラットでは、グルテンコンポーネントであるグリアジンやグルテニンに対する特異抗体価の上昇が抑制されていた。予備的検討において、グリアジンやグルテニンを各コンポーネントで免疫処置する前に経口投与した場合、血漿中の各コンポーネントに対する特異抗体価は抑制されることを確認している (data not shown)。以上の結果から、グルテンによる OT 誘導には、グルテン中のグリアジンやグルテニンに対する OT の誘導に起因するものであると考えられる。グルテン静脈内負荷試験の結果、非 OT ラットの直腸温は低下したが、グルテン OT ラットの直腸温は低下しなかった (Fig. 12)。これらの結果は、本研究で作製した小麦アレルギーラットモデルが、グルテンに対する OT の誘導を評価するのに適していることをしている。

OT の誘導機序に関する詳細は解明されていない。過去の報告では、OT の誘導機序として、T 細胞が抗原に対して不応状態になる anergy や抗原に反応する T 細胞がアポトーシスなどにより死滅する clonal depletion、抗原特異的な免疫反応を抑制する Treg の誘導などが報告されている[47]。また、OT の誘導機序は、抗原の投与経路や投与量、オマリズマブなど併用薬剤の有無などの条件によって異なることも報告されている[48-50]。前述の機序のうち、近年では Treg を介した OT の誘導が特に注目を集めている[51]。経口摂取された抗原は小腸で CD103 陽性樹状細胞により取り込まれる。抗原を取り込んだ CD103 陽性樹状細胞は腸間膜リンパ節に移行し、ナイーブ T 細胞への抗原提示と Treg への形質転換を誘導し免疫寛容を誘導すると考えられている[52]。したがって、本研究で作製した OT 誘導ラットモデルにおいても、Treg の関与が推測される。しかしながら、本研究では Treg の細胞数や Th1 及び Th2 関連サイトカインを測定していないため、具体的な OT の誘導機序を明らかにできていない。OT の誘導における Treg の関与を解析する方法には、腸間膜リンパ節や脾臓における Treg の細胞数をフローサイトメトリー法で直接測定する手法や、Treg 関連サイトカインである TGF- β 、IL-10 などのタンパク質又は mRNA の発現を ELISA 法や real-time PCR 法で測定する手法などがある。今後、これらの手法により本モデルにおける OT 誘導の機序を明らかにしたいと考えている。

第3節 1BS-18Hのグルテンに対するOT誘導能

3-1. 緒言

近年、OTの誘導を介した食物アレルギー予防の研究が注目を集めている。一方で前述のようにアレルギー性皮膚炎のある患児では生後3か月ですでに食物抗原に感作されていることも報告されており、OTの誘導を期待して早期から食物を摂取した場合でもアナフィラキシー症状などを呈する危険性が高いことを示唆している[13]。また、OTの誘導には食物抗原をある程度の期間継続的に摂取する事が必要となるが、アトピー素因を有する児では期待に反して経口感作が誘導され食物アレルギーを発症する危険性もある。したがって、低アレルゲン化食物を用いたOTの誘導は、アレルギー症状の惹起や原因抗原への感作の危険性が低く安全性が高いと考えられる。

1BS-18Hは ω 5-グリアジンをほとんど含んでいない低アレルゲン化小麦である[29,34]。第1章で、1BS-18Hは ω 5-グリアジン感作ラットにおけるアレルギー症状惹起能や ω 5-グリアジンに対する感作能が低いことを明らかにした。したがって、1BS-18Hの早期摂取によりグルテンに対するOTを安全に誘導することが期待される。しかしながら、1BS-18Hがグルテンに対するOT誘導能を示すか否かは不明である。本節では前節で作製したOT誘導ラットモデルを用いて、1BS-18Hのグルテンに対するOT誘導能について評価した。

3-2. 結果

第2節と同様に、Hokushinグルテン又は1BS-18Hグルテンを5日間連日経口投与した2日後に、TCIグルテンとImject®Alumの混合液を皮下投与、不活化百日咳菌を腹腔内投与することで免疫処置した。あらかじめHokushinグルテンを経口投与したOT群では、非OT群で認められたグルテン感作によるグルテン特異IgE抗体とIgG₁抗体の上昇が抑制される傾向を示した(Fig. 13)。また、1BS-18Hグルテンを経口投与したOT群でもHokushinグルテンの場合と同程度にグルテン特異IgE抗体とIgG₁抗体の上昇を抑制した。

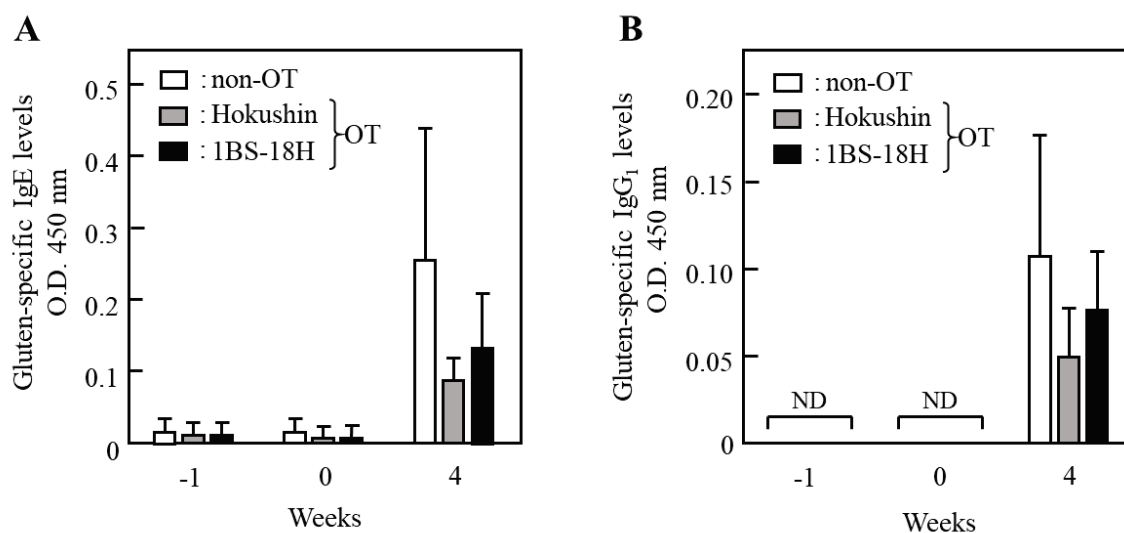


Fig. 13. The effects of the oral administration of 1BS-18H gluten on the levels of IgE (A) and IgG₁ (B) Abs specific for gluten in plasma were determined at weeks -1, 0, and 4 in rats immunized subcutaneously with gluten (week 0) following the oral administration of vehicle alone (50% ethanol, non-OT), gluten from Hokushin (10 mg, Hokushin), or gluten from 1BS-18H (10 mg, 1BS-18H) daily for 5 days. Each value represents the mean \pm SD of eight rats. ND, not detected.

次に、非 OT ラットと Hokushin グルテン又は 1BS-18H グルテン OT ラットに対して、グルテンを静脈内負荷した後の直腸温を測定した (Fig. 14)。非 OT ラットでは、グルテン負荷後に直腸温の低下が認められ、投与 10 分後で約 0.8°C 低下した。一方、Hokushin グルテンや 1BS-18H グルテンを投与した OT ラットでは、いずれもグルテン負荷による直腸温の変化が認められなかった。

以上の結果から、1BS-18H グルテンの複数回経口投与は、免疫処置前に通常のグルテンに対する OT を誘導することが明らかになった。

3-3. 考察

本節では、前節で作製したグルテン OT 誘導ラットモデルを用いて、1BS-18H のグルテンに対する OT 誘導能を評価した。その結果、1BS-18H グルテン OT ラットでは、Hokushin グルテン OT ラットと同様にグルテン免疫処置後のグルテン特異 IgE 抗体や IgG₁ 抗体価の上昇を抑制することが示された (Fig. 13)。また、1BS-18H グルテン OT ラットではグルテン負荷投与後の直腸温の変化

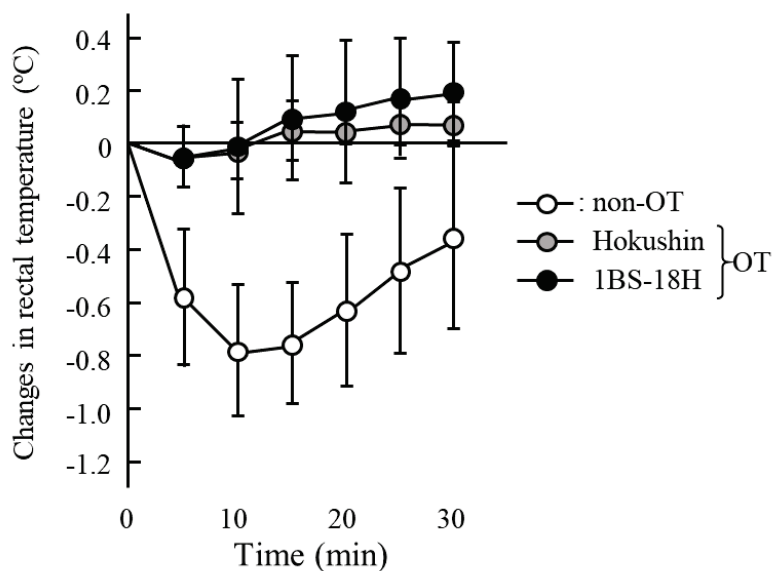


Fig. 14. The effects of the oral administration of 1BS-18H gluten on the changes in rectal temperature after the administration of gluten (2 mg/kg) intravenously at week 4. Each value represents the mean \pm SD of four rats.

についても、Hokushin グルテン OT ラットと同様に、直腸温の低下を抑制した (Fig. 14)。以上の結果から、1BS-18Hは通常のグルテンに対する OT 誘導能を有することが明らかになった。

アメリカ食品医薬品局 (FDA) のガイドラインでは、ラットへの化合物の投与量をヒトの投与量に換算する場合、各動物の体表面積に応じた HED (Human Equivalent Dose) 換算係数 6.2 を除すこと報告されている[53]。本実験で OT の誘導に用いたグルテンの投与量は 10 mg であり、ヒト幼児の体重を約 10 kg と仮定した場合、ヒトにおける投与量は 269 mg に相当する。小麦粉には約 10%のグルテンが含まれているため[7]、投与したグルテンを小麦粉量として概算すると、ヒトで約 2.7 g (食パンで約 5 g) を摂取することになる。したがって、本研究で実施した OT 誘導におけるグルテンの負荷量は、実生活に即した用量であると考えられる。

第4節 1BS-18Hの ω 5-グリアジンに対するOT誘導能

4-1. 緒言

低アレルゲン化食物を用いたOTの誘導は、アレルギー症状の惹起や原因抗原への感作の危険性が低く安全性が高いと考えられる。一方で、発症の原因となる抗原の量や抗原性を減弱させた低アレルゲン化食物は、抗原に対するOT誘導能が低い可能性も考えられる。1BS-18Hは、 ω 5-グリアジンが欠失した小麦品種であるが、 α / β -グリアジンや γ -グリアジン、 ω 1,2-グリアジンを含有しており、総グリアジンの含有量は通常小麦と同程度であることが報告されている[34]。また、これらのグリアジンコンポーネントは ω 5-グリアジンと類似した一次構造を有していること、 ω 5-グリアジン感作型小麦アレルギー患者のIgE結合エピトープのアミノ酸配列が ω 5-グリアジンだけでなく他のグリアジンコンポーネントにも存在していることが報告されている[8,40,41]。さらに、第1章の解析で、1BS-18H感作ラットに ω 5-グリアジンを負荷した場合にわずかに直腸温の低下が認められている。これらの知見は、 ω 5-グリアジンと他のグリアジンコンポーネントのT細胞エピトープも類似している可能性を示唆するものである。したがって、1BS-18Hを感作前に複数回経口投与した場合、 ω 5-グリアジンと他のグリアジンコンポーネント間の交差反応により ω 5-グリアジンに対するOTを誘導できる可能性が考えられる。本節では、1BS-18Hが ω 5-グリアジンに対するOTを誘導できるのかを評価した。

4-2. 結果

前節と同様にHokushinグルテン又は1BS-18Hグルテンを5日間連日経口投与する方法でOTを誘導した。予備的検討で、 ω 5-グリアジンの感作能がグルテンよりも弱かったため、 ω 5-グリアジンに対する免疫処置はOT処置2日後(0週目)と16日後(2週目)の2回行った。

非OTラットにおける血漿中 ω 5-グリアジン特異IgE抗体及びIgG₁抗体価は、感作3週目で上昇した。一方、Hokushinグルテン又は1BS-18Hグルテンで誘導されたOTラットでは、両抗体価の上昇が抑制された(Fig. 15)。

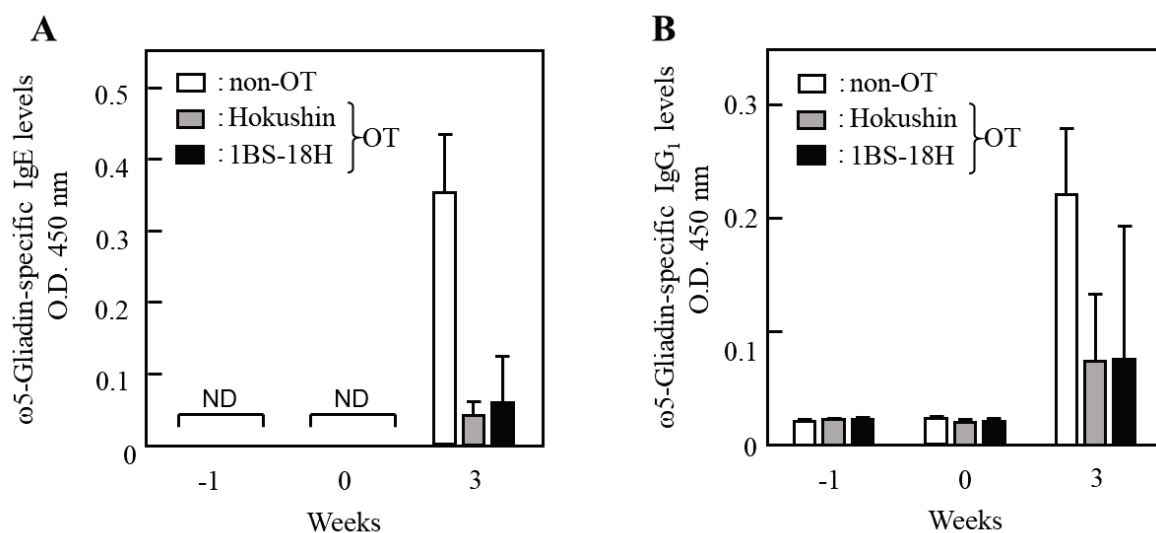


Fig. 15. The effects of the oral administration of 1BS-18H gluten on the levels of IgE (A) and IgG₁ (B) Abs specific for ω 5-gliadin in plasma were determined at weeks -1, 0, and 3 in rats immunized subcutaneously with ω 5-gliadin (weeks 0 and 2) following the oral administration of vehicle alone (50% ethanol, non-OT), gluten from Hokushin (10 mg, Hokushin), or gluten from 1BS-18H (10 mg, 1BS-18H) daily for 5 days. Each value represents the mean \pm SD of four rats. ND, not detected.

非 OT ラットに ω 5-グリアジン を静脈内負荷した場合、直腸温は負荷後 10 分で約 1.1°C 低下した (Fig. 16)。一方、Hokushin グルテンや 1BS-18H グルテンで誘導された OT ラットでは、 ω 5-グリアジンを負荷しても直腸温の変化が認められなかった。これらの結果は、1BS-18H グルテンが ω 5-グリアジンを含んでいないにもかかわらず、 ω 5-グリアジンに対する OT を誘導することができたことを示している。

4-3. 考察

本節では、1BS-18H が ω 5-グリアジン に対する OT を誘導できるのかを解析した。その結果、1BS-18H グルテンを複数回連日経口投与する方法で、 ω 5-グリアジン特異抗体価の上昇が抑制され (Fig. 15)、 ω 5-グリアジンを負荷した後の直腸温の低下も抑制された (Fig. 16)。以上の結果から、1BS-18H は、 ω 5-グリアジン に対する OT を誘導できることが明らかになった。

ω 5-グリアジン を含んでいない 1BS-18H がどのような機序で ω 5-グリアジン に対する OT を誘導するのかは不明であるが、その機序として、以下の 2 点が推察される。1 点目は、 ω 5-グリアジン と 1BS-18H 中の α/β -グリアジン、 γ -グリアジン、 ω 1,2-グリアジンのアミノ酸配列が類似してい

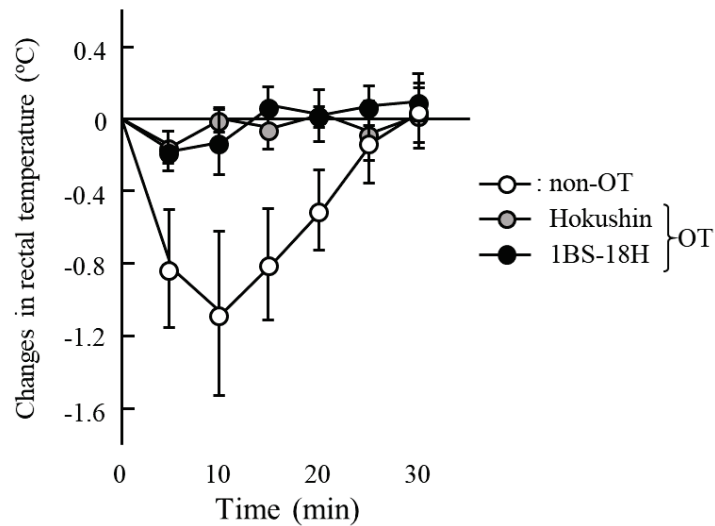


Fig. 16. The effects of the oral administration of 1BS-18H gluten on the changes in rectal temperature after the administration of ω 5-gliadin (2 mg/kg) intravenously at week 3. Each value represents the mean \pm SD of four rats.

ることに起因する交差反応性が ω 5-グリアジンに対する OT を誘導した可能性がある。前述のように、グリアジンコンポーネントは互いに類似したアミノ酸配列を有している。したがって、1BS-18Hに含まれる他のグリアジンの T 細胞エピトープで誘導された Treg が ω 5-グリアジンに対しても OT を誘導した可能性が推察される。本研究では ω 5-グリアジンに対する OT 誘導を惹起する T 細胞エピトープを解析しておらず、Treg の交差反応性を立証する根拠は得られていない。今後、グリアジンコンポーネント内の T 細胞エピトープのアミノ酸配列を明らかにし、T 細胞エピトープペプチドをラットに経口投与し、 ω 5-グリアジンに対する OT が誘導されれば交差反応性を立証できると考える。2 点目は、1BS-18H に含まれる微量の ω 5-グリアジンにより OT が誘導された可能性である。前述のように、1BS-18H は 1D 染色体に由来する微量の ω 5-グリアジンを含んでいる可能性がある。したがって、1BS-18H による ω 5-グリアジンに対する OT の誘導に 1D 染色体由来の ω 5-グリアジンが関与している可能性が考えられる。

本節では、正常ラットモデルを用いて、1BS-18H が感作前に ω 5-グリアジンやグルテンに対する OT を誘導し、感作を予防することを明らかにした。一方、小麦アレルギーラットモデルに対する OT の誘導を介した症状の軽減、すなわち経口免疫療法 (OIT: oral immunotherapy) における 1BS-18H の有用性は検討していない。OIT とは、食物アレルギー患者に食物抗原を少量ずつ徐々に増量して摂取させることで OT を誘導し食物抗原への過剰な免疫応答を抑制する治療方法である。

一方で OIT は食物アレルギーの症状緩和・根治が可能であるが、原因食物を摂取することでアレルギー症状を惹起する危険性がある[49]。第 1 章で、1BS-18H は ω 5-グリアジン感作ラットにおけるアレルギー症状を惹起しないことを示した。これらの知見は、1BS-18H が WDEIA を含む ω 5-グリアジン感作型小麦アレルギー患者に対して、アレルギー症状を惹起することなく安全に OIT を行う食物として有用であることを示唆する。今後、小麦アレルギーラットを用いて、OIT における 1BS-18H の有用性を明らかにし、ヒト臨床試験で 1BS-18H の安全性を評価することで、小麦アレルギーの発症予防や OIT における有用性を評価したいと考えている。

第4節 小括

本章では、グルテンや ω 5-グリアジンに対するOT誘導ラットモデルを作製し、1BS-18Hグルテンの通常グルテン及び ω 5-グリアジンに対するOT誘導能の評価を試みた。

第1節では、OVAを用いたOT誘導ラットモデルの作製を行い、ラットモデルがOTの誘導の評価する系として適切であるのかを明らかにした。最初に、ラット飼育MF飼料中にOVAが含有していないことをELISA法で確認した。また、感作前にOVAを5日間連日強制経口投与する方法で、OVA感作による血漿中OVA特異IgE抗体価やIgG₁抗体価の上昇とOVA負荷後の直腸温の低下を抑制できることを示した。これらの結果から、ラットモデルを用いた方法によりOTを評価することができた。

第2節では、第1節で構築したOVAに対するOT誘導ラットモデルの作製法とOTの評価法をもとにグルテンOT誘導ラットモデルを作製した。ELISA法でMF飼料中には小麦が含まれていることを確認したため、小麦を含んでいないAIN-93G飼料を用いた。OVAと同様、感作前にグルテンを5日間連日強制経口投与する方法で、グルテン感作による血漿中グルテン特異IgE抗体価やIgG₁抗体価の上昇とグルテン負荷後の直腸温の低下を抑制できることを示した。また、グルテンに対するOTの誘導は、グルテンコンポーネントであるグリアジンやグルテニンに対するOTの誘導に起因するものであることを明らかにした。

第3節では、第2節で作製したグルテンOTラットモデルを用いて、1BS-18Hグルテンによるグルテンに対するOT誘導能を評価した。感作前に1BS-18Hグルテンを5日間連日強制経口投与する方法で、グルテン感作による血漿中グルテン特異IgE抗体とIgG₁抗体価の上昇を抑制することができた。また、1BS-18Hグルテンの連続経口投与は、グルテンを負荷した際の直腸温の低下も抑制できた。以上の結果から、1BS-18Hはグルテンに対するOT誘導能を有していることを明らかにした。しかしながら、グルテンに対するOT誘導の機序を解明するには至っておらず、今後機序を解明したいと考えている。

第4節では、 ω 5-グリアジンを含んでいない1BS-18Hグルテンが、 ω 5-グリアジンに対するOTを誘導できるのかを評価した。その結果、感作前に1BS-18Hグルテンを5日間連日強制経口投与する

方法で、 ω 5-グリアジン感作による血漿中特異IgE抗体価の上昇を抑制し、 ω 5-グリアジンを負荷した際の直腸温の低下を抑制することができた。IBS-18Hによる ω 5-グリアジンに対するOTの誘導には、 ω 5-グリアジンとIBS-18H中のグリアジンコンポーネント間の構造類似性に起因する交差反応性が ω 5-グリアジンに対するOTを誘導した可能性や1D染色体由来の ω 5-グリアジンが ω 5-グリアジンに対するOTを誘導した可能性などが関与すると考えられる。

結論

Lack による二重抗原曝露仮説が提唱されて以降、多くの研究者が、離乳後早期に食物を摂取することで食物アレルギーの発症を予防することができるかと報告している。一方、離乳期にすでに感作している児やアレルギー疾患の発症リスクが高い児では、食物の摂取によるアレルギー症状の惹起や経口感作による食物アレルギーの危険性があることを否定できない。そのため、アレルギー症状の惹起能や感作能が低い低アレルゲン化食物を用いた OT の誘導が新たな食物アレルギーの予防法として期待される。我々は、WDEIA の主要抗原である ω 5-グリアジンに欠失した Chinese spring 小麦 1BS-18 系統と本邦で食用に栽培されている Hokushin 小麦を戻し交配する手法で、遺伝子組換え技術を使用することなく ω 5-グリアジンに欠損した 1BS-18H を作出した。しかしながら、1BS-18H のアレルギー症状惹起能や ω 5-グリアジンに対する感作能、グルテンや ω 5-グリアジンに対する OT 誘導能については明らかになっていない。本研究では、小麦アレルギーラットモデルと正常ラットモデルを用いて、1BS-18H のアレルギー症状惹起能や ω 5-グリアジンに対する感作能、グルテンや ω 5-グリアジンに対する OT 誘導能を評価した。その結果、以下の知見を得た。

1. 1BS-18H のアレルギー症状惹起能と ω 5-グリアジンに対する感作能について

- 1) ω 5-グリアジン感作ラットモデルにおいて、1BS-18H グルテンは、Hokushin グルテンよりもアレルギー症状惹起能が低かった。
- 2) 正常ラットモデルにおいて、1BS-18H グルテンは、Hokushin グルテンよりも ω 5-グリアジンに対する感作能が低かった。

これらの知見は、1BS-18H が ω 5-グリアジンに感作された小麦アレルギー患者に対する代替食として有用である可能性を示している。また、アトピー素因を有する児が 1BS-18H を摂取しても ω 5-グリアジンに感作される危険性が低い可能性を示している。

2. 1BS-18Hの小麦タンパク質に対するOT誘導能について

- 1) グルテン感作ラットモデルにおいて、1BS-18H グルテンは、通常グルテンに対する OT を誘導した。
- 2) ω 5-グリアジン感作ラットモデルにおいて、1BS-18H は、 ω 5-グリアジンに対する OT を誘導した。

これらの知見は、小麦タンパク質に感作される前の離乳早期に継続的に 1BS-18H を摂取することで、小麦アレルギーの発症を予防することができる可能性を示している。

本研究の成果が、安全で有効な食物アレルギーの予防・治療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

抗グリアジン抗体 (Rabbit antiwheat gliadin) 及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 (Carle Place, NY, USA) 及び BioSource International 社 (Camarillo, CA, USA) よりそれぞれ購入した。OVA (lyophilized powder \geq 98%) は Sigma-Aldrich 社 (St Louis, MO, USA) より購入した。Alum アジュバント (Imject® Alum) は Thermo Fisher Scientific 社 (Waltham, MA, USA) より入手した。HRP 標識マウス抗ラット IgE 抗体 (MARE-1) は GeneTex 社 (Irvine, CA, USA) から購入した。Hokushin は Koshoku 社 (Tokyo, Japan) から購入した。1BS-18H、Native ω 5-gliadin 及び抗ウサギ抗 ω 5-グリアジンポリクローナル抗体 (Anti- ω 5 rabbit IgG) は、島根大学医学部皮膚科より提供された[30]。その他の試薬は市販特級品を使用した。

1.2. グルテンの精製

Hokushin 又は 1BS-18H の小麦粉 200 g に水 120 mL を 3 回に分けて混合し、15 分間捏ねて塊状にした。捏ねた塊を水中に浸し、30 分間静置した後、そのまま水中でゆっくり捏ねた。水が白く濁る度に新しい水に交換し、この作業を 10–15 回繰り返した。残った塊を細断し一晩凍結乾燥した後、乳鉢で粉碎し、実験に使用するまで -30°C で保存した。

1.3. グルテンの SDS-PAGE

Hokushin グルテン又は 1BS-18H グルテンに 3.0% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) , 5% 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール及び 0.01% ブロモフェノールブルーを含む 65 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) を必要量添加し、攪拌後に沸騰水浴上で 5 分間加熱した。その後、試料を室温にて 12,000 g で 5 分間遠心し、得られた上清を泳動試料とした。分子量マーカーには、LMW Marker kit for SDS Electrophoresis (M.W. Range 14,400–94,000, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 及び Pre-

stained Protein Makers (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いた。12.5%(w/v) ポリアクリルアミドゲルを作成し、12 cm×10.2 cm 泳動プレートのミニスラブ電気泳動装置 (AE-6500 型ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽, ATTO, Tokyo, Japan) を用いて行った。泳動は、ゲル1枚当たり濃縮ゲル部分を定電流 20 mA、分離ゲル部分を定電流 40 mA で行った。SDS-PAGE 終了後、ゲルを固定液中で 10 分間振盪し、タンパク質をゲルに固定させた。続いて、クーマシーブリリアントブルー染色液中で 30 分間振盪し染色した。染色後、脱色液中でバックグラウンドの染色が抜けるまで脱色した。

1.4. グルテンのウェスタンブロッティング解析

1.3 の方法で Hokushin グルテン及び 1BS-18H グルテン (10 µg/lane) を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜 (Immobilon, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に 25 V、1 時間かけて転写した。転写後の膜を 5% (w/v) スキムミルクと 0.1% Tween-20 を含む Tris 緩衝生理食塩水 (TBS-T, pH 7.6) 中で 2 時間ブロッキングし、TBS-T で室温にて 10 分間ずつ 3 回洗浄した。ブロッキング後の膜を TBS-T で 1,000 倍に希釈した抗グリアジン抗体又は 10,000 倍に希釈した抗 ω 5-グリアジン抗体とともにそれぞれ、ハイブリダイゼーションバッグに入れて 4°C にて一晩反応させた。反応終了後、膜を TBS-T で 3 回洗浄 (10 分間の振盪洗浄を 1 回、5 分間の振盪洗浄を 2 回) した。洗浄後の膜と TBS-T で 30,000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を 1 時間振盪した。その後、再び膜を TBS-T で洗浄した後、膜上に Western Lightning Ultra (Pierce and Warriner, Waltham, MA, USA) を、満遍なく載せ、1 分間反応させた後、LAS-4000 mini (GE healthcare) で膜上の IgE 抗体と結合した小麦質を検出した。

1.5. 実験動物

日本 SLC 社 (Shizuoka, Japan) より 3 週齢の雄性 Brown-Norway (BN) ラットを購入した。ラットは通常飼育用の餌 (MF, Oriental Yeast 社, Tokyo, Japan) 及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 A16-44-3) を得て実施した。

1.6. OVA の腹腔内感作実験

OVA の免疫処置は、4 週齢の雄性 BN ラットに対し、PBS (pH 7.4) に溶解させた OVA (1 mg/mL) と Imject® Alum [10 mg/mL Al(OH)₃, 10 mg/mL Mg(OH)₂] を溶解させた溶液 1 mL を週 1 回 4 週間、腹腔内投与する方法で行った。また、溶媒コントロール群には PBS と Imject® Alum のみを投与した。免疫処置前 (0 週目) と感作 4 週目に頸静脈より血液 (300 µL) を採取した。採取した血液は、10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し血漿のみを取り出し、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。採取した血漿サンプルは ELISA 法で OVA 特異 IgE 抗体価を測定し、抗体価の上昇が認められなかったラットは追加で上記の免疫処置を 2 週間あるいは 4 週間行い、2 週間おきに血液を採取し、ELISA 法で OVA 特異 IgE 抗体価の上昇を確認した。

1.7. グルテンコンポーネントの腹腔内感作実験

ω5-gliadin の免疫処置は、4 週齢の雄性 BN ラットに対し、5 mM 酢酸に懸濁させた ω5-gliadin (1 mg/mL) と Imject® Alum [10 mg/mL Al(OH)₃, 10 mg/mL Mg(OH)₂] を用いて、1.6 と同様の方法で行った。また、溶媒コントロール群には 5 mM 酢酸と Imject® Alum のみを投与した。

各小麦グルテンの免疫処置は、4 週齢の雄性 BN ラットに対し、5 mM 酢酸に懸濁させた Hokushin グルテンあるいは IBS-18H グルテン (1 mg/mL) 及び Imject® Alum [10 mg/mL Al(OH)₃, 10 mg/mL Mg(OH)₂] を用いて、週 1 回 13 週間腹腔内投与を行った。免疫処置前 (0 週目) と感作 13 週目に頸静脈より血液 (300 µL) を採取し、1.6 と同様の操作で血漿サンプルを調製した。

1.8. OVA 又は ω5-gliadin に対する血漿中特異 IgE 抗体価の測定

OVA と ω5-gliadin に対する特異 IgE 抗体価は ELISA 法で測定した。PBS (pH 7.4) に溶解した OVA (10 µg/mL) 又は 0.1% 酢酸に溶解させた ω5-gliadin (20 µg/mL) を 96 ウェルマイクロプレート (F8 MaxiSorp loose Nunc-Immuno™ Modules, Thermo Fisher scientific 社) に 100 µL 加え、4°C で一晩固相化した。その後、各ウェルを 0.1% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) 200 µL で 6 回洗浄し、1% ブロックエース® (DS Pharma Biomedical 社, Osaka, Japan) を加えて、室温で 2 時間ブロッキングし

た。その後、PBS-Tで6回洗浄した後、1%ブロッカーエース®で10倍希釈した各血漿サンプルを100 μ L 加え、室温で2時間インキュベートした。PBS-T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抗体を加え、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、基質として3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 溶液 (KPL 社, Gaithersburg, MD, USA) 100 μ L を添加して15分間発色させた。その後、1 M リン酸 100 μ L を添加することで反応を停止させ、Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific 社) で波長 450 nm の吸光度を測定した。

1.9. OVA 及びグルテンコンポーネントの静脈内負荷実験

非感作もしくはOVA又は各グルテンコンポーネント (ω 5-gliadin, Hokushin グルテン又は1BS-18H グルテン) で感作した雄性 BN ラットの体重を測定し、3種混合麻酔薬 (メドトミジン 0.06 mg/mL, ミダゾラム 0.8 mg/mL, ブトルファノール 1 mg/mL) を 2.5 mL/kg の用量で腹腔内投与して麻酔を施した。固定台に仰臥位で固定し、デジタル式サーミスター温度計 (Shibaura Electronics 社, Saitama, Japan) を直腸に挿入した。体温が一定になった後、生理食塩水に溶解させたOVA又は0.1%酢酸に溶解したグルテンコンポーネント (ω 5-gliadin, Hokushin グルテン又は1BS-18H グルテン) を 10 mg/kg の用量で静脈内に投与し、投与時を0分として30分まで経時的に直腸温を測定した。また、ネガティブコントロール群として、各溶媒のみを投与した。

1.10. 統計解析

測定値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。群間の平均値の差は Kruskal-Wallis を用いて評価し、その後、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

グルテン、グリアジン及びグルテニン は Tokyo Chemical Industry 社 (Tokyo, Japan) より入手し

た。Biotin Labeling Kit-NH₂は Dojindo 社 (Tokyo, Japan) から購入した。MARE-1 及び HRP 標識ヤギ抗ラット IgG₁抗体は GeneTex 社 (Irvine, CA, USA) 及び Bethyl Laboratories 社 (Montgomery, TX, USA) からそれぞれ購入した。HRP 標識ストレプトアビジンは Proteintech Japan 社 (Tokyo, Japan) から購入した。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 SLC 社より 3 週齢の雌性 Brown-Norway (BN) ラットを購入した。OVA に対する OT 誘導試験に用いるラットは MF 固形飼料 (Oriental Yeast 社) を、グルテン又は ω 5-gliadin に対する OT 誘導試験に用いるラットは AIN-93G 粉末飼料 (Oriental Yeast 社) で飼育した。また、水は常時摂取が可能な状態で飼育した。さらに、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 A16-44-3) を得て実施した。

2.3. ラット飼育飼料中の OVA 及び gliadin 含有量の測定

ラット飼料中の OVA と gliadin 含有量は、モリナガ FASPEK エライザII卵 (卵白アルブミン) 又はモリナガ FASPEK エライザII小麦 (グリアジン) キット (Morinaga Institute of Biological Science 社, Kanagawa, Japan) を使用して定量した。各サンプルは、検体抽出液に各種飼料 1g を加え 12 時間振盪混和し作成した。各ウェルに検体希釈液IIで 2 倍に希釈した各サンプルを 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、Multiskan GO で波長 450 nm の吸光度を測定した。

2.4. OVA 及びグルテンコンポーネントに対する OT 誘導実験

OVA に対する OT 誘導実験は、生理食塩水に溶解した OVA (50 mg/mL) 0.2 mL を免疫処置の 1 週間前 (-1 週目) から 5 日間連日経口投与した。非 OT 処置群には生理食塩水のみを 0.2 mL 経口

投与した。最終経口投与より 2 日後 (0 週目)、これらのラットに対して PBS に溶解した OVA (2 mg/mL) と Imject® Alum [10 mg/mL Al(OH)₃, 10 mg/mL Mg(OH)₂] を混合した溶液 0.5 mL を皮下投与し、さらに PBS で溶解した不活化百日咳菌懸濁液 (3.0×10⁹ cells/mL) 0.2 mL を腹腔内投与した。

グルテンに対する OT 誘導実験では、50%エタノールに懸濁したグルテン (Tokyo Chemical Industry 社, TCI)、Hokushin グルテンあるいは IBS-18H グルテン (各 50 mg/mL) 0.2 mL を免疫処置の 1 週間前 (-1 週目) から 5 日間連日経口投与した。非 OT 処置群には 50%エタノールのみを 0.2 mL 経口投与した。グルテンの免疫処置では、最終経口投与より 2 日後 (0 週目)、これらのラットに対して 5 mM 酢酸に懸濁した TCI グルテン (2 mg/mL) と Imject® Alum [10 mg/mL Al(OH)₃, 10 mg/mL Mg(OH)₂] を混合した懸濁液 0.5 mL を皮下投与し、さらに PBS で溶解した不活化百日咳菌懸濁液 (3.0×10⁹ cells/mL) 0.2 mL を腹腔内投与した。また、ω5-グリアジンの免疫処置では、最終経口投与より 2 日後 (0 週目) と 16 日後 (2 週目)、これらのラットに対して 5 mM 酢酸に懸濁した ω5-グリアジン (10 mg/mL) と Imject® Alum [10 mg/mL Al(OH)₃, 10 mg/mL Mg(OH)₂] を混合した懸濁液 0.5 mL を皮下投与し、さらに PBS で溶解した不活化百日咳菌懸濁液 (3.0×10⁹ cells/mL) 0.2 mL を腹腔内投与した。

OVA 及び ω5-グリアジン感作ラットでは、OT 処置開始前 (-1 週目)、免疫処置前 (0 週目) 及び 3 週目、グルテン感作ラットでは、OT 処置開始前 (-1 週目)、免疫処置前 (0 週目) 及び 4 週目に頸静脈より血液 (300µL) を採取し、1.6 と同様の操作で血漿サンプルを調製した。

2.5. OVA 又はグルテンコンポーネントに対する血漿中特異 IgE 抗体価の測定

F8 MaxiSorp loose Nunc-Immuno™ Modules のウェルに PBS (pH 7.4) で希釈した 1 µg/mL 抗ラット IgE 抗体 (MARE-1) 100 µL を注入し 4°C にて一晩固相化した。各ウェルを PBS-T で 6 回洗浄した後、1%ブロックエース®を加えて 37°C にて 1 時間ブロッキングした。PBS-T で 6 回洗浄した後、1%ブロックエース®で 10 倍希釈した各血漿サンプルを 100 µL 加え、OVA 特異 IgE 抗体の測定は 1 時間、グルテンコンポーネントに対する特異 IgE 抗体の測定は 2 時間、37°C でインキュベートした。その後、PBS-T で 6 回洗浄し、Biotin Labeling Kit-NH₂ でビオチン標識した OVA (1%ブロックエース®で 500 倍希釈) 又はグルテンコンポーネント (グルテン、グリアジン、グルテニン及び

ω 5-グリアジン、1%ブロッカー[®]で 1,000 倍希釈) を加えて、37°Cで 1 時間インキュベートした。各ウェルを PBS-T で 6 回洗浄した後、1%ブロッカー[®]で 5,000 倍希釈した streptavidin-HRP を 100 μ L 加え、37°Cで 1 時間インキュベートした。PBS-T で 6 回洗浄した後、基質として TMB 溶液 100 μ L を加えて 15 分間発色させた。その後、1 M リン酸 100 μ L で反応を停止させ、Multiskan GO で波長 450 nm の吸光度を測定した。

2.6. OVA 又はグルテンコンポーネントに対する血漿中特異 IgG₁ 抗体価の測定

PBS (pH 7.4) に溶解した OVA (1 μ g/mL) 又は 0.02 M 酢酸に溶解した TCI グルテン、グリアジン、グルテニン (各 10 μ g/mL)、 ω 5-gliadin (20 μ g/mL) を F8 MaxiSorp loose Nunc-Immuno[™] Modules に 100 μ L 加え、4°Cで一晩固相化した。その後、各ウェルを PBS-T 200 μ L で 6 回洗浄し、1%ブロッカー[®]を加えて、室温で 2 時間ブロッキングした。その後、PBS-T で 6 回洗浄した後、1%ブロッカー[®]で 30,000 倍希釈した各血漿サンプルを 100 μ L 加え、室温で 2 時間インキュベートした。PBS-T で 6 回洗浄した後、二次抗体として 100,000 倍希釈した HRP 標識抗ラット IgG₁ 抗体を加え、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 (SeraCare Life Sciences 社, Gaithersburg, MD, USA) 100 μ L を添加して 15 分間発色させた。その後、1 M リン酸 100 μ L を添加することで反応を停止させ、Multiskan GO で波長 450 nm の吸光度を測定した。

2.5. OVA 及びグルテンコンポーネントの静脈内負荷実験

非 OT もしくは OVA 又は各グルテンコンポーネント (ω 5-gliadin, Hokushin グルテン又は 1BS-18H グルテン) で OT を誘導したラットに対する静脈内負荷実験は、1.9 と同様の方法で実施した。生理食塩水に溶解させた OVA 又は 0.1%酢酸に溶解した各グルテンコンポーネント (ω 5-gliadin 又は TCI グルテン) を 2 mg/kg の用量で静脈内に投与し、投与時を 0 分として 30 分まで経時的に直腸温を測定した。また、ネガティブコントロール群として、各溶媒のみを投与した。

2.6. 統計解析

測定値は平均 ± 標準偏差 (SD) で示した。群間の平均値の差は Mann-Whitney U test 又は Kruskal-Wallis を用いて評価し、その後、独立した多群の差の検定には post hoc 検定として nonparametric post hoc Steel-Dwass 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。

論文目録

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

1. Yamada Y, Yokooji T, Ninomiya N, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Evaluation of the allergenicity of ω 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model. *Biochem Biophys Rep* 2019;20:100702. doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100702.
2. Yamada Y, Yokooji T, Kunimoto K, Inoguchi K, Ogino R, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Hypoallergenic Wheat Line (1BS-18H) Lacking ω 5-Gliadin Induces Oral Tolerance to Wheat Gluten Proteins in a Rat Model of Wheat Allergy. *Foods* 2022;11(15):2181. doi: 10.3390/foods11152181.

参考文献

- [1] Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T, Aihara Y, Ito S, Imai T, et al. Japanese guidelines for food allergy 2020. *Allergol Int* 2020;69:370–86. doi:10.1016/j.alit.2020.03.004.
- [2] Yamamoto-Hanada K, Pak K, Saito-Abe M, Yang L, Sato M, Irahara M, et al. Allergy and immunology in young children of Japan: The JECS cohort. *World Allergy Organ J* 2020;13. doi:10.1016/j.waojou.2020.100479.
- [3] Cummings AJ, Knibb RC, King RM, Lucas JS. The psychosocial impact of food allergy and food hypersensitivity in children, adolescents and their families: a review. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2010;65:933–45. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02342.x.
- [4] Ogino R, Chinuki Y, Yokooji T, Takizawa D, Matsuo H, Morita E. Identification of peroxidase-1 and beta-glucosidase as cross-reactive wheat allergens in grass pollen-related wheat allergy. *Allergol Int* 2021;70:215–22. doi:10.1016/j.alit.2020.09.005.
- [5] Wölbing F, Fischer J, Köberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2013;68:1085–92. doi:10.1111/all.12193.
- [6] Morita E, Chinuki Y, Takahashi H. Recent advances of in vitro tests for the diagnosis of food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 2013;71:155–9. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.04.010.
- [7] Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 2007;24:115–9. doi:10.1016/j.fm.2006.07.004.
- [8] Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int* 2015;64:332–43. doi:10.1016/j.alit.2015.06.009.
- [9] Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, et al. Characterization of Causative Allergens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Proteins in Facial Soap. *Allergol Int* 2013. doi:10.2332/allergolint.13-oa-0561.
- [10] Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J; ALS of P and CST. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med* 2003;348:977–85. doi: 10.1056/NEJMoa013536.

- [11] Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1331–6. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.032.
- [12] Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, Bahnson HT, Radulovic S, Santos AF, et al. Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy. *N Engl J Med* 2015;372:803–13. doi:10.1056/nejmoa1414850.
- [13] Perkin M, Logan K, Tseng A, Raji B, Ayis S, Peacock J, et al. Randomized trial of introduction of allergenic foods in breast-fed infants. *Arch Argent Pediatr* 2016;114:e279–80. doi:10.1056/nejmoa1514210.
- [14] Kostara M, Chondrou V, Sgourou A, Douros K, Tsaouri S. HLA Polymorphisms and Food Allergy Predisposition. *J Pediatr Genet* 2020;09:77–86. doi:10.1055/s-0040-1708521.
- [15] Fukunaga K, Chinuki Y, Hamada Y, Fukutomi Y, Sugiyama A, Kishikawa R, et al. Genome-wide association study reveals an association between the HLA-DPB1*02:01:02 allele and wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Am J Hum Genet* 2021;108:1540–8. doi:10.1016/j.ajhg.2021.06.017.
- [16] Herman EM, Helm RM, Jung R, Kinney AJ. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol* 2003;132:36–43. doi:10.1104/pp.103.021865.
- [17] Altenbach SB, Tanaka CK, Seabourn BW. Silencing of omega-5 gliadins in transgenic wheat eliminates a major source of environmental variability and improves dough mixing properties of flour. *BMC Plant Biol* 2014;14. doi:10.1186/s12870-014-0393-1.
- [18] Altenbach SB, Chang HC, Simon-Buss A, Jang YR, Denery-Papini S, Pineau F, et al. Towards reducing the immunogenic potential of wheat flour: Omega gliadins encoded by the D genome of hexaploid wheat may also harbor epitopes for the serious food allergy WDEIA. *BMC Plant Biol* 2018;18:1–12. doi:10.1186/s12870-018-1506-z.
- [19] Altenbach SB, Allen P V. Transformation of the US bread wheat “Butte 86” and silencing of omega-5 gliadin genes. *GM Crops* 2011;2:66–73. doi:10.4161/gmcr.2.1.15884.
- [20] Altenbach SB, Tanaka CK, Pineau F, Lupi R, Drouet M, Beaudouin E, et al. Assessment of the Allergenic Potential of Transgenic Wheat (*Triticum aestivum*) with Reduced Levels of ω 5-Gliadins,

the Major Sensitizing Allergen in Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. *J Agric Food Chem* 2015;63:9323–32. doi:10.1021/acs.jafc.5b03557.

- [21] Komoto K, Okamoto S, Hamada M, Obana N, Samori M, Imamura T. Japanese Consumer Perceptions of Genetically Modified Food: Findings From an International Comparative Study. *Interact J Med Res* 2016;5:e23. doi:10.2196/ijmr.5850.
- [22] Lee JW, Kim JH, Yook HS, Kang KO, Lee SY, Hwang HJ, et al. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J Food Prot* 2001;64:272–6. doi:10.4315/0362-028X-64.2.272.
- [23] Tavano OL, Berenguer-Murcia A, Secundo F, Fernandez-Lafuente R. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2018;17:412–36. doi:10.1111/1541-4337.12326.
- [24] Ziegler F, Nitenberg G, Coudray-Lucas C, Lasser P, Giboudeau J, Cynober L. Pharmacokinetic assessment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. *Am J Clin Nutr* 1998;67:124–8. doi:10.1093/ajcn/67.1.124.
- [25] Zhou H, Wang C, Ye J, Tao R, Chen H, Cao F. Effects of Enzymatic Hydrolysis Assisted by High Hydrostatic Pressure Processing on the Hydrolysis and Allergenicity of Proteins from Ginkgo Seeds. *Food Bioprocess Technol* 2016;9:839–48. doi:10.1007/s11947-016-1676-3.
- [26] Watanabe M, Suzuki T, Ikezawa Z, Arai S. Controlled Enzymatic Treatment of Wheat Proteins for Production of Hypoallergenic Flour. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994;58:388–390.
- [27] 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;71:977–85. doi:10.1271/bbb.60645.
- [28] Xuyang L, Takuya M, Tomohiro T, Haruyo N-A, Masaru T, Satoshi H. Induction of Oral Tolerance by Pepsin-Digested Gliadin Retaining T Cell Reactivity in a Mouse Model of Wheat Allergy 2020;181:446–55.
- [29] Abe R, Shimizu S, Yasuda K, Sugai M, Okada Y, Chiba K, et al. Evaluation of reduced allergenicity

of deamidated gliadin in a mouse model of wheat-gliadin allergy using an antibody prepared by a peptide containing three epitopes. *J Agric Food Chem* 2014;62:2845–52. doi:10.1021/jf4034078.

- [30] Kohno K, Takahashi H, Endo TR, Matsuo H, Shiwaku K, Morita E. Characterization of a hypoallergenic wheat line lacking ω -5 gliadin. *Allergol Int* 2016;65:400–5. doi:10.1016/j.alit.2016.03.002.
- [31] Ma Y, Wu D, Guo L, Yao Y, Yao X, Wang Z, et al. Effects of Quinoa Flour on Wheat Dough Quality, Baking Quality, and in vitro Starch Digestibility of the Crispy Biscuits. *Front Nutr* 2022;9. doi:10.3389/fnut.2022.846808.
- [32] Abril-Gil M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Effect of a cocoa-enriched diet on immune response and anaphylaxis in a food allergy model in Brown Norway rats. *J Nutr Biochem* 2016;27:317–26. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.022.
- [33] Shin HS, Bae MJ, Jung SY, Shon DH. Preventive effects of skullcap (*Scutellaria baicalensis*) extract in a mouse model of food allergy. *J Ethnopharmacol* 2014;153:667–73. doi:10.1016/j.jep.2014.03.018.
- [34] Bellou A, Saint-Laudy J, Knippels L, Montémont C, Vauthier E, Gerard P, et al. Brown Norway rat ovalbumin-specific immunoglobulin E antibodies increase the human basophil expression of CD63 marker. *Scand J Immunol* 2003;57:271–8. doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01233.x.
- [35] Yokooji T, Nouma H, Ogino R, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Quantification of the ω 5- and γ -gliadin content in wheat flour and rat plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay using antibodies specific to their IgE-binding epitopes. *Allergol Int* 2018;4–5. doi:10.1016/j.alit.2018.04.012.
- [36] Cassidy BG, Dvorak J, Anderson OD. The wheat low-molecular-weight glutenin genes: Characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. *Theor Appl Genet* 1998;96:743–50. doi:10.1007/s001220050797.
- [37] Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT. Molecular mechanisms of anaphylaxis: Lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:449–57. doi:10.1016/j.jaci.2004.12.1125.
- [38] Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J*

Allergy Clin Immunol 2002;109:658–68. doi:10.1067/mai.2002.123302.

- [39] Furuya K, Nagao M, Sato Y, Ito S, Fujisawa T, Kainuma K, et al. Predictive values of egg-specific IgE by two commonly used assay systems for the diagnosis of egg allergy in young children: a prospective multicenter study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2016;71:1435–43. doi:10.1111/all.12912.
- [40] Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, et al. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2005;60:815–21. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00795.x.
- [41] Battais F, Pineau F, Popineau Y, Aparicio C, Kanny G, Guerin L, et al. Food allergy to wheat: Identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy* 2003;33:962–70. doi:10.1046/j.1365-2222.2003.01592.x.
- [42] 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;167:193–202. doi:10.1159/000437328.
- [43] Paula-Silva J, Santiago AF, Oliveira RP, Rosa MLP, Carvalho CR, Amaral JF, et al. Effect of a protein-free diet in the development of food allergy and oral tolerance in BALB/c mice. *Br J Nutr* 2015;113:935–43. doi:10.1017/S0007114515000173.
- [44] Hammerschmidt-Kamper C, Biljes D, Merches K, Steiner I, Daldrup T, Bol-Schoenmakers M, et al. Indole-3-carbinol, a plant nutrient and AhR-Ligand precursor, supports oral tolerance against OVA and improves peanut allergy symptoms in mice. *PLoS One* 2017;12:1–17. doi:10.1371/journal.pone.0180321.
- [45] Tunis MC, Dawicki W, Carson KR, Wang J, Marshall JS. Mast cells and IgE activation do not alter the development of oral tolerance in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:705-15.e1. doi:10.1016/j.jaci.2012.04.011.
- [46] van Esch BCAM, Schouten B, de Kivit S, Hofman GA, Knippels LMJ, Willemsen LEM, et al. Oral tolerance induction by partially hydrolyzed whey protein in mice is associated with enhanced numbers

of Foxp3 + regulatory T-cells in the mesenteric lymph nodes. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:820–6. doi:10.1111/j.1399-3038.2011.01205.x.

- [47] Kim KS, Hong SW, Han D, Yi J, Jung J, Yang BG, et al. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* 2016;351:858–63. doi:10.1126/science.aac5560.
- [48] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:41–58. doi:10.1016/j.jaci.2017.11.003.
- [49] Furuta T, Tanaka K, Tagami K, Matsui T, Sugiura S, Kando N, et al. Exercise-induced allergic reactions on desensitization to wheat after rush oral immunotherapy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2020;75:1414–22. doi:10.1111/all.14182.
- [50] Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;377:257. doi:10.1038/377257c0.
- [51] Bertolini TB, Biswas M, Terhorst C, Daniell H, Herzog RW, Piñeros AR. Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance. *Cell Immunol* 2021;359. doi:10.1016/j.cellimm.2020.104251.
- [52] Schiavi E, Smolinska S, O'mahony L. Intestinal dendritic cells. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:98–103. doi:10.1097/MOG.000000000000155.
- [53] Services H. Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious diseases. *Biotechnol Law Rep* 2006;25:697–723. doi:10.1089/blr.2006.25.697.

謝辞

本論文の執筆にあたり、研究の着想から、実験指導、論文執筆まで終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学病院薬剤部 松尾 裕彰 教授に衷心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なる御指導を頂き、学位論文の作成においては有益な御助言と御校閲を頂きました広島大学大学院医系科学研究科 高野 幹久 教授、広島大学大学院医系科学研究科 横大路 智治 准教授、広島大学病院薬剤部 埴越 崇範 助教に深謝致します。

論文の作成にあたり、有益な御助言と御校閲を頂きました広島大学大学院医系科学研究科 小澤 孝一郎 教授、同研究科 森川 則文 教授、同研究科 山野 幸子 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の実施に際して、多大なる御協力を頂きました病院薬剤学研究室の先輩方、同級生、後輩の皆様に心より感謝いたします。

最後に、これまでの学生生活において、お世話になった皆様に心より御礼申し上げますと共に、研究成果における哀歓を共にし、支え励ましてくださった両親に心より深謝いたします。

令和5年3月

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

病院薬剤学研究室

山田 行徳