

# マウスモデルにおける経口食物アレルギーの発症機序： 抗原吸収に及ぼす媒体の影響

本橋寛子, 新藤智子, 桑形麻樹子

## Mechanism of oral food allergy in the mouse model : Effects of the medium on intestinal absorption of the allergenic antigen

Hiroko MOTOHASHI, Tomoko SHINDO, Makiko KUWAGATA

In this study, we aimed to investigate effects of the antigen medium (medium L: an emulsion mixed with linoleic acid, lecithin and physiological saline) used for sensitization in food allergy mouse model on intestinal absorption of allergenic antigen after oral administration. We examined the effect of medium L on the absorption of intact ovalbumin (OVA) from the small intestine into portal vein blood and the uptake of OVA into the small intestine. As a result, it was shown that the medium L increased the absorption of OVA into the portal vein from the small intestine, maintaining the OVA concentration in the blood until 60 mins after intrainestinal administration, and further increasing the uptake of OVA in the small intestine epithelium. From these results, it is considered that medium L may cause a change in immune response in the small intestine by promoting the absorption of OVA.

### 諸言

現在日本人のほぼ2人に1人が喘息, アトピー性皮膚炎, 花粉症や食物アレルギーなど何らかのアレルギー疾患を持つといわれている<sup>1)</sup>. その中でも, 食物アレルギーは命に関わる危険性のあるアナフィラキシーショックの要因となる割合が高い. 食物アレルギーの主要な感作経路は腸管であると考えられている. 腸管には腸管免疫系が存在し, 食物などに対しては, 経口免疫寛容という免疫抑制作用が働く. この様な機能が備わっているにも関わらず, なぜ感作成立に方向づけられるのかについては未だに明らかとなっていない.

著者らは, 近年, 食物アレルギーの患者数が増加していることから, 脂肪酸摂取量の増加や摂取時の性状などのヒトの食生活環境中で増加している何らかの因子が食物アレルギーの引き金になると考えた. いくつかの因子とアレルギー発症との関連を検討し, それらの因子を組み合わせた媒体を用いて食物抗原を経口投与することで, マウスに食物アレルギーを誘発させることに成功した<sup>2)</sup>. すなわち, 生理食塩水(媒体S)を媒体として代表的なアレルギー誘発抗原である卵白アルブミン

(OVA)をマウスに経口投与しても感作は成立しないが, 媒体としてリノール酸とレシチンのエマルジョン(媒体L)を用いてOVAを経口投与した場合には, 特異抗体を産生させ, 感作を成立させることができる. さらに, 感作されたマウスに多量のOVAを経口投与するとヒスタミンの遊離を伴った全身性アナフィラキシーを発症する.

腸管における免疫系は, 腸管から取り込まれた抗原により刺激を受けて反応すると考えられることから, 先に我々が開発したマウスモデルの食物アレルギー誘発条件より, 経口投与に使用する媒体の違いが, 取り込まれる段階の抗原の挙動に影響を及ぼすことが予想された. そこで, 本研究では投与直後の抗原の挙動と感作成立との関連を調べることを目的とし, 感作時の抗原の腸管からの吸収に媒体の違いが及ぼす影響を検討した.

### 材料および方法

#### 1. 動物

動物は日本チャールス・リバー株式会社から購入した7~8週齢のBALB/c雌マウスを使用した. 実験に際し, 16時間の絶食を行った. すべての動物実

験は「一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」に基づいて実施した(承認番号:1160100A, 1160303Aおよび1160349A).

## 2. 抗原および投与媒体

抗原としてOVA(Grade III, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)あるいはFITC(Fluorescein isothiocyanate)で標識したFITC標識OVAを用いた. また, 既報<sup>2)</sup>に基づき, 経口投与媒体として生理食塩水(媒体S)またはリノール酸とレシチンの混合液(リノール酸:レシチン=4:1)と生理食塩水を等量混合したエマルジョン(媒体L)を用いた. 投与時の抗原濃度および用量は, 食物アレルギーのマウスモデル実験における感作条件<sup>2)</sup>と同一の1 mg/mLおよび100  $\mu$ Lとした.

## 3. 実験方法

### 3.1. OVAの腸液内分解の経時変化(*in vitro*)

動物を用いたOVAの吸収実験を行う前に, 小腸におけるOVAの分解におよぼす媒体の直接的影響を, 人工腸液を用いた*in vitro*消化試験で調べた. 既報<sup>3)</sup>に準じて, 各媒体に溶解したOVAを人工腸液(10 mg/mL pancreatin, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH6.8)に添加し, 37°Cで5分から60分間反応させた. 反応液中のタンパク質をSDS-PAGEにて分画し, 抗OVA抗体を用いてウェスタンブロッティングにより未分解OVAおよびその分解物を検出した.

### 3.2 小腸から門脈血中に移行する

#### 未分解OVA量の測定

媒体の違いが小腸におけるOVAの吸収におよぼす影響を直接的に調べるため, 十二指腸にそれぞれの媒体に溶解したOVAを直接投与し, 小腸から吸収された物質の最短移行先である門脈血への移行を調べた. 吸入麻酔下でマウス(媒体Sおよび媒体L投与群:各群および各経過時間につき各6匹)の左腹部を切開し, 十二指腸を露出させた. 既報<sup>4)</sup>を参考に, 媒体Sあるいは媒体Lに溶解した1 mg/mL OVA溶液100  $\mu$ Lを十二指腸内に投与し, 37°C下5分から60分間経過後, 門脈血を採取した. 得られた血液を遠心分離後, 血清を回収し, 血清中未分解OVA濃度をサンドイッチELISAにて測定した.

### 3.3 小腸管腔内に残存するOVA量の測定

既報<sup>4)</sup>を参考に, 小腸管腔内に残存する

OVA量に媒体の違いがおよぼす影響を検討した. 3.2項において門脈血を採取後, 小腸を採取した. 採取した小腸を上部から6等分に分割した後, それぞれの管腔内をPBS 1 mLで洗浄し, 小腸管腔内に残存したOVAを回収した. 回収した洗浄液を遠心分離後, 得られた上清中のOVA量を直接ELISAにて測定した. さらに, 得られた結果から小腸管腔内に残存するOVA量の総量を算出した.

### 3.4 小腸組織中に取り込まれる

#### FITC標識OVA量

既報<sup>5)</sup>を参考に, 小腸管腔に直接抗原を注入し, 媒体の違いが小腸組織(小腸上皮およびパイエル板)に取り込まれるOVA量におよぼす影響を, FITC標識OVAを用いて検討した. 吸入麻酔下でマウス(媒体Sおよび媒体L投与群:各10匹)の左腹部を切開し小腸を露出させた. 小腸の2カ所を結紮することでパイエル板1個含む小腸の閉塞空間(以下ループ)を作製した. 同様に同じマウスの小腸において隣接したパイエル板を含むループをもう1つ作製した. それぞれのループに媒体Sあるいは媒体Lに溶解した1 mg/mL FITC標識OVA溶液100  $\mu$ Lを注入した後, 37°C下で2時間反応させた. 反応後, ループ部分の小腸をそれぞれ切り出して管腔内をPBSで洗浄した後, 小腸上皮とパイエル板に分け, それぞれの重量を測定した. 重量の9倍量の0.3%SDS溶液を加えホモジナイズし, 遠心分離後, 上清中の蛍光強度を測定した. 得られた蛍光強度から, それぞれの媒体で作成した検量線を用いて, 組織1 g当たりに取り込まれたFITC標識OVA量を求めた.

## 結果

### 1. OVAの腸液内分解の経時変化(*in vitro*)

*In vitro*消化試験における, それぞれの媒体によるOVA分解の経時変化を図1に示した. 媒体Sでは反応時間60分まで未分解OVAが残存しているが, 媒体Lでは反応時間30分を過ぎた後にOVAが分解された.

### 2. 小腸から門脈血中に移行する未分解OVA量

門脈血中の未分解OVAは, 媒体Lでは経腸投与後5分で媒体Sと比べ有意な高値を示し, 60分

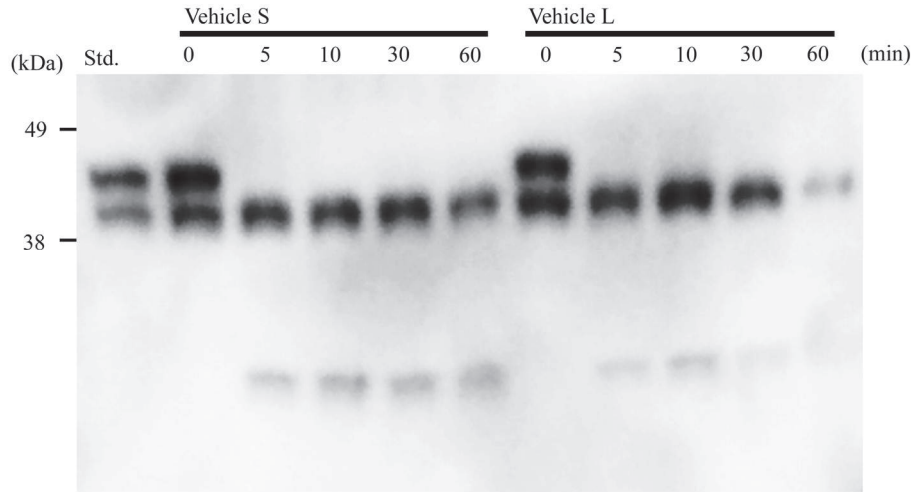


図1 OVAの腸液内分解の経時変化 (*in vitro*)  
Std. : Standard OVA

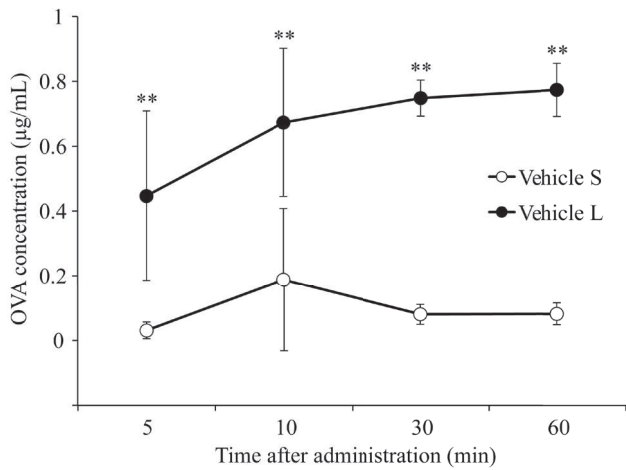


図2 小腸から門脈血中に移行する未分解OVA量  
\*\* 媒体Sと比較した有意差 ( $P < 0.01$ ) を示す。

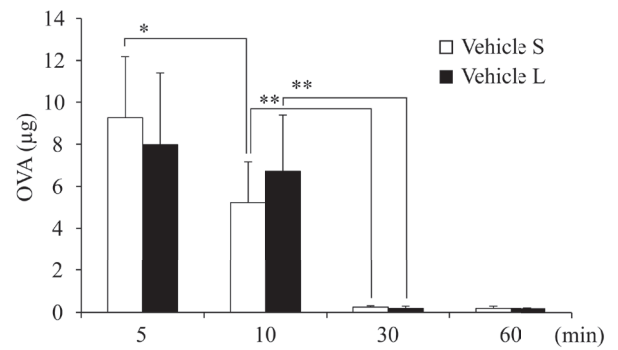


図3 小腸管腔内に残存するOVA量(総量)の経時変化  
\* 有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。  
\*\* 有意差 ( $P < 0.01$ ) を示す。

まで高値を維持した。一方、媒体Sでは、ほとんど上昇が認められなかった(図2)。

### 3. 小腸管腔内に残存するOVA量

小腸管腔内に残存するOVAの総量の経時変化を図3に示した。経腸投与後5分以降、媒体S、Lともに残存OVA量は減少し、特に媒体Sでは顕著で有意であった。また30分以降では両媒体ともに小腸にほとんど残存していなかった。

経腸投与後5分から60分の小腸部位ごとに残存するOVA量の経時変化を図4に示した。両媒体ともに5分から10分においては小腸上部 (Section 1-3) にOVAが残存していたが、いずれの経過時間および部位においても媒体間でOVA

の残存量に有意な差は認められなかった。

### 4. 小腸組織中に取り込まれるFITC標識OVA量

小腸上皮およびパイエル板いずれにおいても、媒体Sに比べて媒体Lを用いた時のFITC標識OVAの取り込み量が有意に高値を示した(図5)。さらに、媒体Lを用いた場合、パイエル板と比べ小腸上皮においてFITC標識OVAの取り込み量が有意に増加した。

### 考察

本研究では、抗原投与に用いる媒体の違いが経口投与直後の小腸における抗原の吸収に影響するかを検討した。

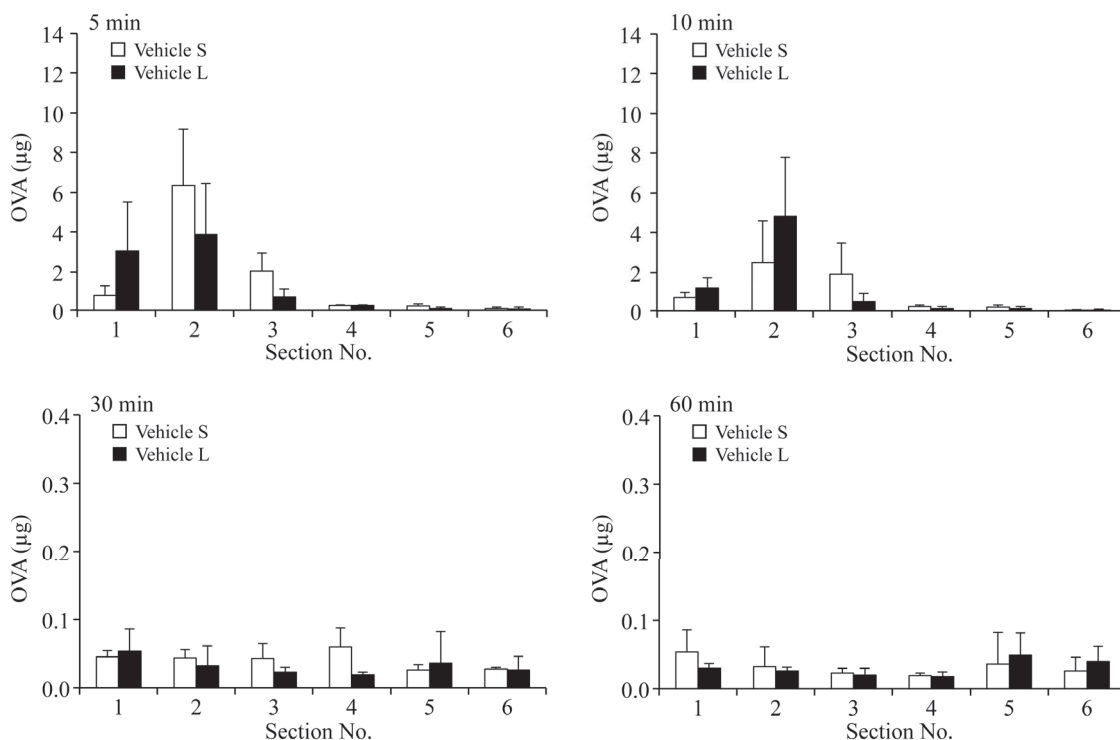


図4 小腸管腔内に残存するOVA量(部位別)の経時変化

Section 1-6: 小腸上部から下部まで1から順に番号を付した.

*In vitro*消化試験により反応時間5分から30分では小腸内でのOVA分解に媒体の違いによる影響がないことが確認されたことから、マウスを用いて、小腸からの門脈血中への未分解OVAの吸収を調べた。媒体Sを用いて経腸投与した際のOVA吸収量は、リン酸緩衝塩類溶液を媒体とし経口投与を行っている実験<sup>6)</sup>と同程度であったが、媒体Lでは明らかに高値を示し、媒体Lが小腸から門脈血中への未分解OVAの吸収を増加させることが明らかとなった。しかしながら、小腸管腔内のOVAの残存量やその経時変化に媒体間で明らかな差は認められず、媒体の違いが管腔内のOVAの動態を変化させることによって小腸での吸収を増加させることを示す結果は得られなかった。

近年では、腸管を介した免疫応答における抗原の取り込み口であるパイエル板だけでなく上皮細胞自体も抗原を取り込むことが報告されている<sup>7)</sup>。本研究において媒体Lは小腸上皮およびパイエル板ともにOVAの取り込み量を増加させたが、パイエル板に比べ小腸上皮からのOVA取り込み量が多いことが明らかになった。さらに、媒

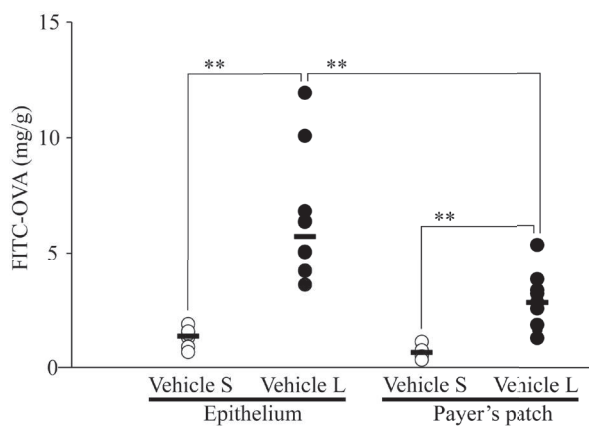


図5 小腸組織中に取り込まれたFITC標識OVA量

\*\* 有意差(P < 0.01)を示す。

体LにおけるOVAの経腸投与後5分から10分にかけては、小腸上部にのみOVAが残存し、経腸投与後5分ですでに門脈血中にOVAが検出されたことから、小腸上部の上皮組織が媒体LによるOVA吸収の主体となっていることが考えられた。また、媒体Lは、小腸内にOVAがほとんど残存していない経腸投与後60分においても門脈血中のOVA濃度を維持させることから、上皮組織中

に抗原を留まらせることが考えられた。

本研究において、媒体Lは小腸組織および門脈血中へのOVA吸収を増加させることが明らかとなり、これらの作用により、免疫系の反応に変化を生じさせる可能性が示唆された。我々は、媒体Lと同様にリノール酸を含みレシチンによりエマルジョン化された食品を日常的に摂取している。媒体Lと同様の食品と抗原を同時に摂取することで発症する食物アレルギーの感作成立の一因として、摂取後早期の小腸組織への抗原の取り込みが関与していることが示唆された。

#### 文献

- 1) 中尾篤人: アレルギー克服への期待と興奮. 実験医学, 2016; 34: 2968-2973
- 2) 新藤智子, 金澤由基子, 斎藤義明, 白見憲司, 小島幸一, 手島玲子: 経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル. *ImmnoTox Letter*, 2003; 8: 14-16
- 3) Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J: Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26: 969-973
- 4) Yamada C, Yamashita Y, Seki R, Izumi H, Matsuda T, Kato Y: Digestion and gastrointestinal absorption of the 14-16 kDa rice allergens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006; 70: 1890-1897
- 5) Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H, Williams IR: RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 2009; 183: 5738-5747
- 6) Matsubara T, Aoki A, Honjoh T, Mizumachi K, Kurisaki J, Okajima T, Nadano D, Matsuda T: Absorption migration and kinetics in peripheral blood of orally administered ovalbumin in a mouse model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008; 72: 2555-2565
- 7) Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC: Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2016; 137: 984-97