

マウス好塩基球活性化試験の確立と  
牛乳タンパク質加水分解物の免疫学的評価への応用

2020.09

岩本 洋

## 目次

第1章	序章	1
1.1	「食の安全」と食物アレルギー	1
1.2	食物アレルギーとは、その機序・症状・疫学	3
1.3	牛乳アレルギーとタンパク質加水分解乳	5
1.4	食物アレルギーの診断・評価において注目される好塩基球活性化試験	6
1.5	本研究の目的、実験動物であるマウスにおいて好塩基球活性化試験を 確立し牛乳タンパク質加水分解物の評価に応用することの意義	7
第2章	マウス好塩基球活性化試験の確立	9
2.1	序	9
2.2	材料と方法	10
2.2.1	動物	10
2.2.2	抗原	10
2.2.3	マウスの免疫と抗血清	10
2.2.4	フローサイトメーターによる好塩基球活性化の測定	10
2.2.5	好塩基球の受動感作と抗原刺激	11
2.2.6	マウス抗 $\beta$ -LG 血清からの IgG の除去	11
2.2.7	マウス抗 $\beta$ -LG 血清からの IgG 各サブクラスの除去	12
2.2.8	IgG 受容体への <i>in vivo</i> 刺激によるアナフィラキシーの惹起	13
2.2.9	統計解析	13
2.3	結果	13
2.3.1	$\beta$ -LG 免疫マウスの好塩基球に対する抗原刺激に伴う CD200R1 と CD200R3 の発現量の変化	13
2.3.2	IgG 受容体への刺激に伴う好塩基球 CD200R3 の発現変化	15
2.3.3	好塩基球活性化に伴う CD200R3 発現変化の時間依存性	16
2.3.4	好塩基球活性化に伴う CD200R3 発現変化の刺激用量依存性	18

2.3.5	マウス抗 $\beta$ -LG 血清からの IgG 除去が好塩基球上の CD200R3 の 発現変化に及ぼす影響	19
2.3.6	マウス抗 $\beta$ -LG 血清からの各 IgG サブクラスの除去が好塩基球上の CD200R3 の発現変化に及ぼす影響	20
2.3.7	IgG 依存性全身性アナフィラキシー惹起と好塩基球 CD200R3 発現 変化の相関	22
2.4	考察	23
2.5	小括	24
第3章	マウス好塩基球活性化試験を用いた牛乳タンパク質加水分解物の 抗原性の評価に関する検討	26
3.1	序	26
3.2	材料と方法	27
3.2.1	被検試料	27
3.2.2	動物	29
3.2.3	マウスの免疫	29
3.2.4	好塩基球活性化試験	30
3.2.5	アナフィラキシー試験	30
3.2.6	統計解析	30
3.3	結果	30
3.3.1	アナフィラキシー試験	30
3.3.2	好塩基球活性化試験	32
3.4	考察	35
3.5	小括	36
第4章	マウス好塩基球活性化試験を用いた牛乳タンパク質加水分解物の 経皮免疫原性の評価に関する検討	37
4.1	序	37

4.2	材料と方法	38
4.2.1	被検試料	38
4.2.2	動物	39
4.2.3	被検試料の経皮暴露	39
4.2.4	マウス血中の $\beta$ -LG 特異的 IgE 及び IgG1 の測定	40
4.2.5	好塩基球活性化試験	40
4.2.6	アナフィラキシー試験	41
4.2.7	統計解析	41
4.3	結果	41
4.3.1	マウス血中の $\beta$ -LG 特異的 IgE 及び IgG1	41
4.3.2	アナフィラキシー試験	42
4.3.3	好塩基球活性化試験	43
4.4	考察	44
4.5	小括	44
第5章	マウス好塩基球活性化試験を用いた牛乳タンパク質加水分解物の 経口免疫寛容誘導能の評価に関する検討	45
5.1	序	45
5.2	材料と方法	46
5.2.1	被検試料	46
5.2.2	動物	47
5.2.3	被検試料の経口摂取による免疫寛容の誘導	47
5.2.4	抗原の経皮暴露	47
5.2.5	マウス血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 の測定	47
5.2.6	好塩基球活性化試験	49
5.2.7	アナフィラキシー試験	49
5.2.8	リンパ組織における制御性 T 細胞及び活性化 T 細胞の解析	49

5.2.9	抗原刺激後のリンパ組織における制御性 T 細胞及び活性化 T 細胞の解析	49
5.2.10	リンパ組織への抗原刺激によるサイトカイン産生の検討	50
5.2.11	統計解析	50
5.3	結果	50
5.3.1	血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1	50
5.3.2	アナフィラキシー試験	52
5.3.3	リンパ組織における制御性 T 細胞及び活性化 T 細胞の解析	56
5.3.4	抗原刺激後のリンパ組織における制御性 T 細胞及び活性化 T 細胞の解析	56
5.3.5	リンパ組織への抗原刺激によるサイトカイン産生	57
5.3.6	好塩基球活性化試験	60
5.4	考察	62
5.5	小括	64
第6章	総括	65
6.1	まとめ	65
6.2	今後の展望	68
	引用文献	70
	謝辞	82

## 略語一覧

ACK :	ammonium-chloride-potassium (lysing buffer) (アンモニウム-塩素-カリウム (溶血緩衝液))
$\alpha$ -LA :	alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -ラクトアルブミン)
APC :	allophycocyanin (アロフィコシアニン)
AUC :	area under the curve (曲線下面積)
BAT :	basophil activation test (好塩基球活性化試験)
BSA :	bovine serum albumine (ウシ血清アルブミン)
$\beta$ -LG :	beta-lactoglobulin ( $\beta$ -ラクトグロブリン)
CAP :	capsulated hydrophilic carrier polymer (蛍光酵素免疫測定法による抗原特異的 IgE 測定用のアレルゲンを吸着させた小型のプラスチックカプセル)
CD :	cluster of differentiation (分化抗原)
CN :	casein (カゼイン)
CNH :	casein hydrolysate (カゼイン分解物)
CMF :	cow's milk based infant formula (牛乳を原料とした通常の育児用ミルク)
DAP12 :	DNAX activating protein of 12kDa (分子量 12,000 の DNAX 活性化タンパク質)
EDTA :	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
EHF :	extensively hydrolysed formula (高度加水分解乳、完全加水分解乳)
ELISA :	enzyme-linked immuno sorbent assay (酵素免疫測定法)
EWH :	extensively whey protein hydrolysate (乳清タンパク質高度分解物)
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations (国際連合食糧農業機関)
Fc $\epsilon$ R :	Fc epsilon reseptor (Fc $\epsilon$ 受容体)
Fc $\gamma$ R :	Fc gamma receptor (Fc $\gamma$ 受容体)
FITC :	fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)
FSC :	forward scatter (前方散乱光)

HRT :	histamine release test (ヒスタミン遊離試験)
HPLC :	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
ICOS :	Inducible T-cell co-stimulator (T 細胞上の共刺激分子)
Ig :	immunoglobulin (免疫グロブリン)
IL :	interleukin (インターロイキン)
mAb :	monoclonal antibody (モノクロナル抗体)
MLN :	mesenteric lymph node (腸間膜リンパ節)
mMPC :	mouse mast cell protease (マウス マスト細胞プロテアーゼ)
OVA :	ovoalbumine (卵白アルブミン)
PAF :	platelet-activating factor (血小板活性化因子)
PBS-HS :	phosphate buffered saline-house serum (ウマ血清添加リン酸緩衝生理食塩水)
PBS-T :	phosphate buffered saline-0.05% Tween20 (0.05%Tween20 添加リン酸緩衝生理食塩水)
PCR :	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PE :	phycoerythrin (フィコエリスリン)
PerCP/Cy5.5 :	peri dinin chlorophyll protein / cyanin 5.5 (ペリジニクロロフィルタンパク質 / シアニン 5.5)
PHF :	partially hydrolysed formula (軽度加水分解乳、部分加水分解乳)
PWH :	partially whey protein hydrolysate (乳清タンパク質軽度分解物)
QOL :	quality of life (生活の質)
SPF :	specific pathogen free (特定の微生物及び寄生虫に感染していない動物及びその飼育環境)
SSC :	side scatter (側方散乱光)
WHO :	World Health Organization (世界保健機構)
WPC :	whey protein concentlate (乳清タンパク質濃縮物)

## 第1章 序章

### 1.1 「食の安全」と食物アレルギー

「食」は生物である人類にとって絶対的に必要不可欠なものであり、飢餓や貧困によりそれが十分に得られない状況は確かに存在するものの、日々当たり前のこととしてそれを口にしている。人類はその長い歴史の中で自然界から口にできるものを探し出し、有害なものを取り除き、食味や栄養価、保存性を高めるための工夫を凝らしながら現在の「食」を築き上げてきた。そのような長い経験に裏打ちされた現在の「食」は、安全で無害なものであることが前提であり、だからこそ人類は日々当たり前のこととしてそれを口にしている。しかしながら実際には食品中には様々な危害要因（ハザード）が存在し、世界保健機構（WHO）が2015年に発表した統計によれば、世界で毎年少なくとも6億人が食中毒にかかり42万人が死亡している。衛生環境が整った我が国においても、平成30年（2018年）には1,330件の食中毒が報告され、3名が亡くなっている<sup>1)</sup>。一方、「食の安全」とは、「予期された方法や意図された方法で作ったり食べたりした場合に、その食品を食べた人に害を与えないという保証」<sup>2)</sup>であり、これは科学的根拠に基づいたものでなくてはならない。微生物学や分析化学の進歩、感受性の高い動物実験系や細胞実験系の開発によって、現在では様々な有害物質や有害微生物が極めて高感度で検出できるようになっており、科学的根拠に基づいた「食の安全」を支えている。

食品による有害事象で忘れてはならないものとして食物アレルギーが挙げられる。食物アレルギーは、古代ギリシャのルクレティウス（BC94頃～BC55頃）が「ある人にとっての食物はある人にとっての毒になる」と記したように、通常は安全でむしろ必要なものとして多くの人が口にする食品成分が危害要因になるという点で、上記のような食中毒とは大きく性格が異なる。FAO/WHO 合同食品規格委員会（コーデックス委員会）では、その危害要因となることが知られる8種のアレルゲン（グルテンを含む穀物、甲殻類、卵、魚介類、ピーナッツや大豆、乳、木の実、亜硫酸塩）について、これらを含む包装食品はその旨を表示することを求めている<sup>3)</sup>。これを受けて我が国でも2001年4月、当時の食品衛生法関連法規の施行規則の一部改正により「アレルギー物質を含む食品の表示」制度が導入された。これは特定のアレルギー物質を微量以上（概



ね 10 ppm 以上) 含む容器包装された加工食品・食品添加物においては、それを含む旨の表示を義務づける、あるいは推奨するというものであり、2020年3月現在で表示義務7品目、表示推奨21品目 (Table 1) が規定されている<sup>4,5)</sup>。我が国のアレルギー表示制度で特筆されるべきは 10 ppm という表示閾値を定めたことで、コーデックスも含めて諸外国の制度ではこのような定量値は盛り込まれていない (化学物質である亜硫酸塩は例外)。これには、我が国において高感度で定量性に優れたアレルギー検知法 (ELISA 法) が確立できたことが大きく貢献している<sup>6)</sup>。さらに、検証されたウェスタンブロット法や PCR 法による定性検査の規定<sup>6)</sup>も相まって、我が国のアレルギー表示制度は非常に高いレベルで消費者の「食の安全」に貢献していると言えよう。しかしながらその一方で、我が国においても食物アレルギーによる事故は無くなってはいない。その多くは誤食によるものではあるものの、中には意図しないアレルギーが混入した加工食品が流通して回収に至ったり<sup>7,8)</sup>、それによる健康被害も報告されている<sup>9)</sup>。食品事業者としては現状のアレルギー管理システムや分析検査技術に満足することなく、さらにこれを高める研究に取り組むことが必要である。従来になかった新しいアレルギー検知法の開発は科学的根拠の精度を高め、「食の安全」をより確かなものにすることが期待される。また、これまでとは異なる視点から製

**Table 1 Specified ingredients, etc. in Japanese food labeling regulation (as of March, 2020).**

Names of specified ingredients, etc.		Reason	labelling requirement
Specified ingredients	Shrimp, Crab, Wheat, Buckwheat, Egg, Dairy products, and Peanut	Items with high need for labelling based on the number of cases and severity	labelling is mandatory
Items equivalent to specified ingredients	Almond, Abalone, Squid, Salmon roe, orange, Cashew nut, Kiwi fruit, Beef, Walnut, Sesame, Salmon, Mackerel, Soybean, Chicken, Banana, Pork, Matsutake mushroom, Peach, Yam, Apple, and Gelatin	Items with a considerable number of cases and patients with severe symptoms on a continuous basis but not as much as the specified Ingredients	labelling is recommended (voluntary labelling)

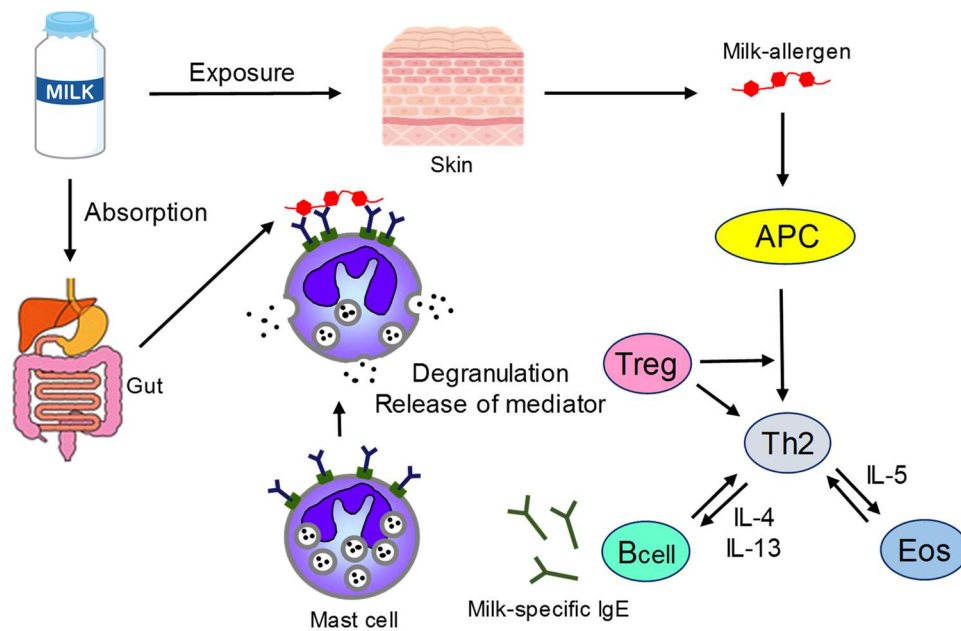
品の免疫学的特性を評価することは、単にアレルゲンを「含む」か「含まない」かによって健康被害の発生を防止するのに留まらず、より広い意味で食物アレルギー患者の健康増進にも貢献できる可能性がある。

## 1.2 食物アレルギーとは、その機序・症状・疫学

食物アレルギーとは「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」と定義される<sup>10)</sup>。抗原（アレルゲン）となる食物成分は、経口的に摂取したものに限定されず、皮膚や呼吸器を介して暴露した場合も含まれる。食物アレルギーにおける免疫学的機序には、抗原特異的 IgE 依存性反応と IgE 非依存性反応とがあり、IgE 依存性反応は一般に抗原暴露の直後から 2 時間以内という短時間で症状が惹起されることから、即時型アレルギーとも呼ばれている。一方、細胞性免疫が関与する IgE 非依存性反応は抗原暴露の数時間から 48 時間後に症状が現れるため、遅延型アレルギーとも呼ばれている。

食物アレルギーで典型的なのは即時型アレルギーであり、通常、食物アレルギー患者の血液中には抗原特異的 IgE が検出される。生体に侵入した食物成分を抗原として認識した免疫細胞群によって産生された IgE が、マスト細胞上の受容体に結合した状態で再び生体内に侵入してきた食物成分と結合・架橋すると、マスト細胞の脱顆粒を引き起こし、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターを放出させる。さらに、マスト細胞上ではアラキドン酸の代謝（アラキドン酸カスケード）が亢進し、プロスタグランジンやロイコトリエン、血小板活性化因子（Platelet-activating factor : PAF）などを産生、遊離する。これらマスト細胞から放出、遊離した各種因子が食物アレルギーの様々な症状を引き起こす（**Fig. 1**）。

食物アレルギーの症状は、皮膚症状、粘膜症状、消化器症状、呼吸器症状など様々なものがある。我が国の調査では皮膚症状の出現頻度が 92.0%と最も高く、次いで呼吸器症状 33.6%、粘膜症状 28.0%、消化器症状 18.6%と報告されている<sup>11)</sup>。さらに、複数の臓器にわたって全身的に症状が惹起される状態をアナフィラキシーといい、これに意識障害や血圧低下が伴うとアナフィラキシーショックとして生命に危険が及ぶ状況となる。



**Figure 1 The mechanisms involved in IgE mediated food allergy.**

**APC: antigen presenting cells; Eos: eosinophils; IL: interleukin; Treg: regulatory T cells; Th2: type 2 helper T cells.**

食物アレルギーの有病率については、診断基準や調査方法、対象とする母集団の違いなどによって様々な数値が報告されている。欧州からの報告では、患者（あるいはその保護者）の自己申告に基づくものでは、牛乳、鶏卵、ピーナッツ、魚介類のいずれかに対する食物アレルギーの有病率は3～35%であるが、これをさらに特異 IgE が血中に確認できたものに限定すると有病率は2～5%に低減する<sup>12)</sup>。アメリカでおこなわれたメタアナリシスでも、自己申告に基づく牛乳、鶏卵、ピーナッツ、魚介類に対するアレルギーがそれぞれ3.5%、1.3%、0.75%、1.1%であるのに対し、これを血中特異 IgE や経口負荷試験で確認できたものに限定するとそれぞれ0.6～0.9%、0.3～0.9%、0.75%、0.6%となり、全体として食物アレルギーの罹患率は少なくとも1～2%、多くて10%程度と見積もられている<sup>13)</sup>。我が国でも乳児期の5～10%<sup>14)</sup>、学童期の4.9%<sup>15)</sup>、小学生から高校生のうち医師による診断があるもの2.3%<sup>16)</sup>、などと報告されている。

食物アレルギーの原因食品は、我が国の調査によると鶏卵、牛乳、小麦の頻度が最も高く、次いでピーナッツ、果実類、魚介類となっている<sup>11)</sup>。特に小児期において鶏卵、牛乳の頻度が高いのは、諸外国でも同様の傾向である<sup>17)</sup>。

### 1.3 牛乳アレルギーとタンパク質加水分解乳

牛乳中には主なものでも 20 種類以上のタンパク質が含まれるといわれており、代表的なアレルギーとしては $\alpha$ -ラクトアルブミン ( $\alpha$ -LA)、 $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -LG)、ウシ血清アルブミン (BSA)、免疫グロブリン (Ig)、及びカゼインが知られている<sup>10)</sup>。前節の通り牛乳は食物アレルギーの代表的な原因食物であり、小児の場合は特にその頻度が高い。しかしながら牛乳は良質なタンパク質と豊富なカルシウムを含み、成長期の小児にとっては栄養価の高い優れた食品である。特に、何らかの理由で十分な母乳が得られない混合・人工栄養の乳児にとっては、牛乳を主原料とする乳児用調製乳（育児用ミルク）は不可欠な食品であり、牛乳アレルギーのためにそれが摂取できないことは生命を脅かす重大な問題となる。そのため、牛乳アレルギーの乳児のために、牛乳アレルギーを含まない、あるいは低減・消失させたアレルギー用ミルクが開発されている。牛乳タンパク質の低アレルギー化には加水分解が有効かつ現実的な手段であり<sup>18,19)</sup>、牛乳のカゼインあるいは乳清タンパク質を高度なプロテアーゼ処理によって低分子化したタンパク質加水分解乳は、高度分解乳あるいは完全加水分解乳 (Extensively hydrolysed formula) と呼ばれ、牛乳アレルギー患児の栄養管理に広く使用されている<sup>20,21)</sup>。このような製品は、アナフィラキシーを発症するような重症の牛乳アレルギー患児も摂取することが想定されるため、その免疫学的安全性については開発段階から慎重かつ徹底的な評価が必要となる。牛乳タンパク質に対する特異抗体との親和性を指標とする ELISA 法は簡便な *in vitro* 試験であり<sup>18,22)</sup>、配合原材料のスクリーニングや工程の確認から実製造での日常的な品質管理まで、広く利用されている。前臨床的な *in vivo* 試験ではモルモットなどの実験動物を用いた評価がおこなわれ<sup>23,24)</sup>、欧州連合の指針では実験動物に対して感作性を示さないことがアレルギー用ミルクの要件として定められている<sup>25)</sup>。最終的には牛乳アレルギー患者に対する経口負荷試験もおこなわれ<sup>20,26)</sup>、欧米では信頼区間 95% で負荷試験陰性率が 90%以上であることが求められている<sup>25,27)</sup>。アレルギー用ミルクとしての高度分解乳には既に 70 年以上の使用実績があり、牛乳アレルギー児の栄養管理と治療に多大な貢献をしてきたが、プロテアーゼ処理で発生する苦味やアミノ酸臭などの風味、あるいはコストの点では未だ課題も残されている。

一方、牛乳タンパク質に対して風味に大きく影響しない程度の限定的な酵素処理を施した育児用ミルクも存在し、軽度分解乳あるいは部分加水分解乳（Partially hydrolysed formula）と呼ばれている。軽度分解乳は、家族歴などからアレルギー発症リスクが高いと判断される乳児向けに牛乳タンパク質の感作性（免疫原性）を低減した製品であり<sup>28)</sup>、これまでにアトピー性皮膚炎の発症率低減なども報告されている<sup>29,30)</sup>。現在、この軽度分解乳のアレルギー発症リスク低減効果については肯定的な報告<sup>31)</sup>と否定的な報告<sup>32)</sup>が混在し明確ではないが、高度分解乳ほどではないものの低アレルゲン化されており風味も比較的良好という特徴を活かして、むしろ既に牛乳アレルギーを発症した児に対する治療用途での有用性が注目されている。我が国の報告では、牛乳アレルギー患児 53 名中で 40 名（75%）は何ら症状をきたすことなく市販の軽度分解乳を摂取できたとされている<sup>33)</sup>。また、同じ軽度分解乳製品を用いた牛乳アレルギー患児に対する経口負荷試験においても、通常の育児用ミルクより陽性率が低く、現れる症状も軽微であったと報告されている<sup>34)</sup>。高度分解乳に比べて風味が良好で低コストの軽度分解乳が安全に摂取できるのであれば、牛乳アレルギー患児やその家族の QOL 向上につながり社会的にも意義のあることである。さらに、軽度分解乳はそのアレルゲン性が完全には消失していないことから免疫寛容の誘導が期待でき、アミノ酸調製乳や高度分解乳による完全除去よりも寛解に有利である可能性も考えられる。実際、軽度分解乳を用いた牛乳アレルギーの経口免疫療法の事例も報告されている<sup>35,36)</sup>。

#### 1.4 食物アレルギーの診断・評価において注目される好塩基球活性化試験

食物アレルギーの診断は、特定の食物摂取によって症状が惹起されるという因果性の確認と、それを惹起する免疫学的機序の確認によって成立する<sup>10)</sup>。即時型アレルギーの免疫学的機序の確認では血中に特異 IgE 抗体の存在を証明することになるが、これは CAP 法等の血液検査や皮膚プリック試験によって可能である<sup>10)</sup>。しかしながら、血中特異 IgE が陽性でも何ら症状を起こさずに当該の食品を摂取できることは少なくなく、因果性の確認が十分でないまま不必要な食事制限をおこなって栄養状態や QOL の悪化をきたす事例もしばしば報告されている<sup>37,38)</sup>。正しい診断には因果性の確認が重要であり、詳細な問診や食事日誌等の記録による病歴の把握のうえ、最終的には経口食物負荷試験によって確定診断がなされる。

経口食物負荷試験は我が国では保険診療にも収載されており、原因食物の同定<sup>39,40)</sup>、反応誘発閾値の推定<sup>34)</sup>、耐性獲得の確認<sup>41)</sup>などの目的で多くの医療機関で実施されている。ただし、この経口食物負荷試験は患者に重篤な症状を引き起こすことがあり、慎重な適応が必須となる。そのため、経口負荷試験の結果を事前に予測する方法も検討されている。血中の特異 IgE 値から症状誘発の確率をロジスティック回帰により算出したプロバビリティーカーブは臨床的にも汎用されているが<sup>10,42)</sup>、算出に用いた被験者の母集団によって予測が異なるため注意が必要である。

一方、経口負荷試験との相関では末梢血中の好塩基球を用いた検査法が注目されている<sup>43)</sup>。好塩基球は細胞膜上の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) を介して IgE 抗体を結合しており、これに抗原が結合すると FcεRI の架橋刺激により組織中のマスト細胞と同様に活性化して脱顆粒する。この好塩基球の反応は *in vitro* でも再現でき、ヒスタミン遊離試験 (Histamine release test : HRT) や好塩基球活性化試験 (Basophil activation test : BAT) として知られている。ヒスタミン遊離試験は、被験者から採取した末梢血好塩基球を *in vitro* で抗原刺激し、遊離したヒスタミンを ELISA 法で測定する検査法である。BAT は抗原刺激によって好塩基球に発現する CD63 や CD203c といった活性化マーカー分子をフローサイトメーターで定量する検査法である。これら末梢血好塩基球を用いた検査は、*in vitro* ながら生体の影響を受けているため、血中 IgE 値の測定以上に被験者のアレルギー状態を反映するとされ<sup>44)</sup>、特に BAT は経口食物負荷試験の結果予測に有用であることが多数報告されている<sup>45-47)</sup>。食物アレルギー患者の寛解予測<sup>48)</sup>や、免疫療法の効果検証<sup>49,50)</sup>を少量の末梢血液で安全に実施できる BAT の臨床的な意義は、非常に高いと考えられる。

## 1.5 本研究の目的、実験動物であるマウスにおいて好塩基球活性化試験を確立し、タンパク質加水分解物の評価に応用することの意義

1.3 節で述べたように、現在、タンパク質加水分解乳は牛乳アレルギー患児の栄養管理や治療において非常に重要な役割を担っている。そのため、それら製品の安全性や品質の保持は不可欠であり、特に免疫学的な品質については多角的な評価とそれに基づく高度な管理が求められる。タンパク質加水分解乳やその原料である牛乳タンパク質加水分解物の免疫学的評価では、ELISA

法などの *in vitro* 試験と共に、モルモットなどの実験動物を用いたアナフィラキシー試験の実績が高い<sup>24,51,52)</sup>。これは、感作した実験動物に抗原を負荷して現れるアナフィラキシー反応を、症状のスコア化やそれに伴う体温低下、顆粒物質の血中濃度上昇などによって評価するもので、タンパク質加水分解乳を負荷抗原に用いればその反応惹起性が、逆に感作抗原にタンパク質加水分解乳を用いればその免疫原性が評価できる。ELISA 法のような *in vitro* の評価ではアレルギー患者の生体内の状態を必ずしも反映しているとは言えないことから、このような動物モデルによる生理的な評価は重要である。しかしながら、このアナフィラキシー試験は一測定あたり動物一個体を要するという経済的あるいは動物福祉的な課題もあることから、代替法の開発も求められている。そこで本研究では、そのような課題への取組みとして、ヒトの臨床において注目されている BAT を実験動物に応用することを着想した。ヒトの BAT が食物アレルギー患者の経口負荷試験の結果と高い相関を示すように、実験動物でも好塩基球の反応性が全身のアレルギー反応と相関するのであれば、BAT によってアナフィラキシー試験を代替できる可能性が考えられる。BAT は *in vitro* 試験ながら ELISA 法などよりも生理的条件に近く、少量の末梢血液で多検体の測定が可能のため経済的に、また 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の観点から動物福祉的にも優位性がある。さらに、マウス BAT を新たに加えてタンパク質加水分解乳やその原料である牛乳タンパク質加水分解物の免疫学的特性を多角的に明らかにしていくことは、それら製品の改良や、より安全で効果的な使用につながることも期待できる。タンパク質加水分解乳、特に軽度分解乳ではその免疫寛容誘導能も注目されており、その検討に BAT を応用することで、これまでにない新たな知見が得られる可能性もある。そこで本研究では、実験動物であるマウスにおいて BAT を確立すると共に、タンパク質加水分解乳やその原材料である各種牛乳タンパク質分解物の免疫学的特性の評価にマウス BAT を応用することで、その有用性を検討することを目的とした。このような取り組みは、タンパク質加水分解乳における「食の安全」をさらに高め、牛乳アレルギー患者の QOL 向上にも寄与するものである。また、ヒト臨床において有用な BAT を実験動物であるマウスに導入できれば、アレルギーの様々な病態における機序解明や予防、治療につながる基礎研究への寄与も期待できる。

## 第2章 マウス好塩基球活性化試験の確立

### 2.1 序

抗原抗体反応を介した高親和性 IgE 受容体 FcεRI の架橋による刺激で好塩基球が活性化すると、ヒトではその細胞表面上で CD11b、CD13、CD63、CD69、CD107a、CD107b、CD164、CD203c といった分子の発現が増加する<sup>44,53,54</sup>。このうち CD63 と CD203c の発現変化は、即時型アレルギー反応の検査法である BAT の市販キットでも活性化マーカーとして活用されている。一方、マウスでは好塩基球上の FcεRI の架橋により細胞表面上の CD200R1<sup>55</sup>や CD41<sup>56</sup>の発現が増加することが報告されている。そこで本研究では、まずこの CD200R1 をマーカーとしてマウス好塩基球の活性化をフローサイトメーターで検知することを試みた。この際、抗原刺激によって感作好塩基球を活性化させると、CD200R1 の発現増加と共に、マウス好塩基球の同定マーカーのひとつである CD200R3 の発現が減少することを見出した。CD200R1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する免疫調節分子 CD200 の受容体分子であり<sup>57</sup>、抑制的な免疫調節作用を有する<sup>58,59</sup>。一方、CD200R3 は CD200R ファミリーに属するものの、CD200 をリガンドとするという報告<sup>57</sup>とそれに否定的な報告<sup>60</sup>があり、IL-4 産生増強やアナフィラキシー誘導など亢進的な免疫調節作用を有している<sup>60</sup>。

抗原刺激による活性化に伴う CD200R1 発現増加と CD200R3 発現減少の挙動がマウスの個体によって異なることや、感作好塩基球を得るための免疫では IgE だけでなく IgG も産生されることなどから、CD200R1 が IgE 依存的な活性化マーカーであるのに対して、CD200R3 は IgG 依存的な好塩基球の活性化マーカーであるとの仮説を立てた。マウスの IgG は IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 と 4 種のサブクラスが存在し、その受容体も反応亢進的な FcγRI、FcγRIII、FcγRIV と反応抑制的な FcγRIIb の 4 種が知られている<sup>61</sup>。本章では、好塩基球活性化に伴う CD200R3 の発現減少がサブクラス同定も含めて IgG 刺激依存であることを検証し、IgE 刺激依存的な CD200R1 の発現増加と併せてこの両者を活性化マーカーとしたマウス BAT の系確立を試みた。



## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 動物

3 週齢、8 週齢あるいは 10 週齢の Specific-Pathogen-Free (SPF) グレード雌性 BALB/c 系マウスを日本クレアより購入し、いずれも 1 週間以上馴化させた後、実験に供した。22±2°C、12 時間明暗サイクルの SPF 環境下で飼育し、牛乳タンパク質を原料として含まない飼料（ラボ MR ストック、日本農産工業社製）と水道水は自由摂取とした。なお、本研究の全ての動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（法律第 105 号）、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（環境省告示第 82 号）等に則り作成され、公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団の認証を受けた「森永乳業株式会社動物実験実施規定」に従って実施した。

### 2.2.2 抗原

マウスの免疫、及び感作好塩基球の刺激に用いる抗原には、Yoshida の方法<sup>62)</sup>に従って生乳より調製したβ-LG を使用した。

### 2.2.3 マウスの免疫と抗血清

4 週齢のマウスに対してβ-LG 10 μg をアジュバント（水酸化アルミニウム（ナカライテスク社製）4 mg）と共に腹腔内投与し、これを 2 週間間隔で 2 回あるいは 3 回繰り返した。

抗血清は、最終免疫時から 1 週間後にペントバルビタール（共立製薬社製）麻酔下で下大静脈より採血、分離して調製し、使用時まで−80°Cで保管した。

### 2.2.4 フローサイトメーターによる好塩基球活性化の測定

未処理（ナイーブ）あるいはβ-LG を 3 回腹腔内免疫したマウス（11~22 週齢相当）の尾静脈より血液を採取しヘパリン（ナカライテスク社製）で処理した。

ナイーブマウスの血液検体は一旦プールしたものをマイクロチューブに 50 μL ずつ分注し、37°Cで 15 分保持した後、ヤギ抗マウス IgE（Bethyl Laboratories 社製、アメリカ合衆国）、及び抗マウス FcγRIII/II モノクロナル抗体（mAb）（clone 2.4G2、ラット IgG2b、κ、BD Bioscience

社製、アメリカ合衆国)あるいはそのアイソタイプコントロール抗体(clone A95-1、ラット IgG2b、 $\kappa$ 、BD Bioscience 社製)と共に、1%のウマ血清(HyClone、GE Healthcare 社製、アメリカ合衆国)を含む同量(50  $\mu$ L)のリン酸緩衝生理食塩水(PBS-HS)と混合し、37°Cで2時間反応させた。20mM EDTAの添加(10  $\mu$ L)と氷冷(10分)によって反応を停止させた後、遠心(500 $\times$ g、5分、4°C)によって血球細胞を沈殿させ上清を除去した。沈殿した血球細胞は、15%ウマ血清を含むPBSでブロッキング(氷冷下、30分)した後、APC標識抗マウスIgE(Columbia Bioscience 社製、アメリカ合衆国)、PerCP/Cy5.5標識抗マウスCD49b、PE標識抗マウスCD200R1(どちらもBioLegend社製、アメリカ合衆国)及びFITC標識抗マウスCD200R3(Hycult Biotech社製、オランダ)を加えて標識(氷冷下、30分)した。さらにACK溶血緩衝液(155 mM NH<sub>4</sub>Cl、10 mM KHCO<sub>3</sub>、0.1 mM EDTA)で赤血球を溶血させ、PBS-HSで3回洗浄した後に、解析ソフトウェアFACSDiveを搭載したFACSCanto IIフローサイトメーター(BD Bioscience 社製)で分析した。

$\beta$ -LGを腹腔内免疫したマウスより得た血液検体は、 $\beta$ -LGを含むPBS-HSと混合して37°Cで2時間反応させた後、上記のナイーブマウスの検体と同様に染色、調製し、フローサイトメーターで分析した。

CD200R1及びCD200R3について、非刺激下に対する刺激下での発現量の比(Relative expression level)を評価した。

### 2.2.5 好塩基球の受動感作と抗原刺激

ナイーブマウスより得た血液検体(ヘパリン処理全血)を50  $\mu$ Lずつマイクロチューブに分注し、段階希釈したマウス抗 $\beta$ -LG血清(2.2.3に前述)を含むPBS-HS 50  $\mu$ Lと混合して37°Cで2時間反応させることで受動感作させた。その後、 $\beta$ -LG(1 mg/mL)を加えてさらに反応させ、前記2.2.4と同様に染色、調製、分析をおこなった。

### 2.2.6 マウス抗 $\beta$ -LG血清からのIgGの除去

マウス抗 $\beta$ -LG血清をPBS-HSで10倍希釈した後、当量のProtein G Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare 社製)と混合し、室温で2時間穏やかに振とう反応させた。その後、遠心(500 $\times$ g、

5分、室温)により樹脂を沈殿させ、上清を回収し IgG 除去抗血清とした。対照として Sepharose 4B (Sigma-Aldrich 社製、アメリカ合衆国) を用いてマウス抗 $\beta$ -LG 血清を同様に処理したのもも調製した。IgG が除去されていることは、以下の通り ELISA によって確認した。まず 1  $\mu$ g/100  $\mu$ L/well の $\beta$ -LG (Sigma-Aldrich 社製) 溶液でコーティングした 96 穴マイクロプレートに 10,000 倍希釈した抗血清を添加し、37°C で 2 時間保持後、0.05% の Tween20 (Sigma-Aldrich 社製) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) で洗浄した。次にアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (Cappel 社製、アメリカ合衆国、5,000 倍希釈) を添加して 37°C で 1 時間保持した。PBS-T にてプレート洗浄後、ジエタノールアミン緩衝液 (10 mM diethanolamine (Sigma-Aldrich 社製)、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 9.8) に溶解した基質試薬 (4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate、Sigma-Aldrich 社製、0.1 mg/100  $\mu$ L/well) を添加して 30 分間反応させ、20  $\mu$ L/well の 5N NaOH で反応停止させてから 405 nm (対照 550 nm) の吸光度を測定した。

#### 2.2.7 マウス抗 $\beta$ -LG 血清からの IgG 各サブクラスの除去

ビオチン化ラット抗マウス IgG1 mAb (clone A85-1、IgG1、 $\kappa$ )、同抗マウス IgG2a mAb (clone R19-15、IgG1、 $\kappa$ )、同抗マウス IgG2b mAb (clone R12-3、IgG2a、 $\kappa$ )、同抗マウス IgG3 mAb (clone R40-82、IgG2a、 $\kappa$ 、いずれも BD Bioscience 社製)、ビオチン化ラット IgG1 アイソタイプコントロール mAb (clone RTK2071) あるいは同 IgG2a アイソタイプコントロール mAb (clone RTK2758、いずれも BioLegend 社製) のいずれかを 50 mg/mL で調製し、その 1/2 容量のストレプトアビジン Sepharose High Performance (GE Healthcare 社製) と混合、抗体結合ビーズを調製した。

マウス抗 $\beta$ -LG 血清を PBS-HS で 10 倍希釈した後、上記の各抗体結合ビーズと混合し、室温で 2 時間穏やかに振とう反応させた。その後、遠心 (500 $\times$ g、5 分、室温) により樹脂を沈殿させ、上清を回収し IgG 各サブクラス除去抗血清とした。各サブクラスの IgG が除去されていることは、以下の通り ELISA で確認した。まず 1  $\mu$ g/100  $\mu$ L/well の $\beta$ -LG (Sigma-Aldrich 社製) 溶液でコーティングした 96 穴マイクロプレートに希釈した抗血清を添加し、37°C で 2 時間保持後、PBS-T で洗浄した。次に、各サブクラスの吸着除去処理に用いたのと同じビオチン化抗マウス

IgG1 mAb (10,000 倍希釈)、あるいはビオチン化抗マウス IgG2a mAb (1,000 倍希釈)、あるいはビオチン化抗マウス IgG2b mAb (3,000 倍希釈)、あるいはビオチン化抗マウス IgG3 mAb (1,000 倍希釈) を添加して 37°C で 1 時間保持した。PBS-T にてプレート洗浄後、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Streptavidin-POD Conjugate、Roche Diagnostics 社製、アメリカ合衆国) を添加して 37°C で 1 時間保持し、さらに基質試薬 (SIGMAFAST-OPD、Sigma-Aldrich 社製) を加えて反応させ、30  $\mu$ L/well の 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応停止させてから 492 nm (対照 630 nm) の吸光度を測定した。抗血清の希釈率は IgG1 の測定で 100,000 倍、IgG2a と IgG2b の測定で 1,000 倍、IgG3 の測定で 100 倍とした。基質試薬の反応時間は IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 の測定でそれぞれ 5 分、15 分、30 分、60 分とした。

### 2.2.8 IgG 受容体への *in vivo* 刺激による全身性アナフィラキシーの惹起

抗マウス Fc $\gamma$ R1/II mAb (2.4G2) あるいはそのアイソタイプコントロール抗体 (clone A95-1、ラット IgG2b、 $\kappa$ 、BD Bioscience 社製) を 100  $\mu$ g 含む PBS 200  $\mu$ L をマウス尾静脈より注入した。抗体、試薬はいずれも防腐剤を含まない低エンドトキシンググレードのものを使用した。全身性アナフィラキシー反応は、デジタル温度計 (TD-300、芝浦電子社製) を用いて直腸体温を計測することで評価した。

### 2.2.9 統計解析

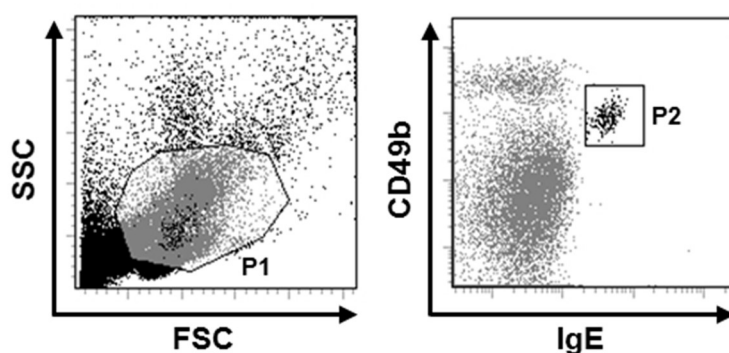
統計解析ソフトウェア (JMP ver.13.9、SAS Institute 社製、アメリカ合衆国) を用い、Students の対応のある両側 t 検定で検定した。p 値 0.05 未満を有意とした。

## 2.3 結果

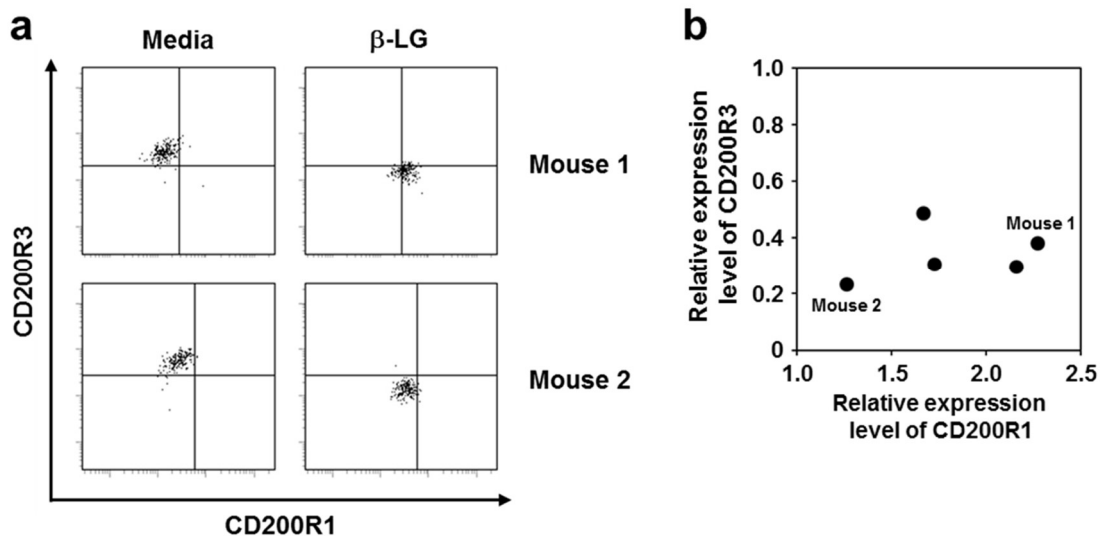
### 2.3.1 $\beta$ -LG 免疫マウスの好塩基球に対する抗原刺激に伴う CD200R1 と CD200R3 の発現量の変化

卵白アルブミン (OVA) 感作マウスの好塩基球に対する特異抗原 (OVA) 刺激によって、細胞表面上の CD200R1 の発現が増加することが報告されている<sup>55)</sup>。本研究ではまずその報告をミル

クアレルギーモデルマウス ( $\beta$ -LG 免疫マウス) を用いて追試した。この際、マウス好塩基球の特異的認識抗体として樹立されたモノクロナル抗体 Ba103<sup>63)</sup>の標的分子である CD200R3<sup>60)</sup>を好塩基球の同定マーカーのひとつとして検討した。ところが CD200R3 と CD49b (ナチュラルキラー細胞と好塩基球に発現) を同定マーカーとして好塩基球の活性化測定を試みたところ、好塩基球の同定が困難だったことから、改めて CD49b と IgE (ナイーブな状態でも好塩基球上の Fc $\epsilon$ RI にはある程度の IgE が結合している) をマーカーとして好塩基球を同定 (**Fig. 2**) し、活性化に伴う CD200R1 の発現変化と、併せて CD200R3 についても測定をおこなった。すると $\beta$ -LG 免疫マウスの好塩基球では、特異抗原 ( $\beta$ -LG) の刺激によって CD200R1 の発現が増加すると共に、CD200R3 の発現減少が認められた (**Fig. 3a**)。興味深いことに CD200R3 の発現減少は $\beta$ -LG 免疫マウスの全個体で明確に認められたのに対し、CD200R1 の発現増加の程度は個体によって様々であり、増加しない個体も認められた (**Fig. 3b**)。



**Figure 2** Gating strategy for identification of basophils by flow cytometry. Peripheral white blood cells were initially gated based on forward scatter and side scatter (region P1). Region P1 was further gated based on CD49b and IgE (region P2), and the cells in region P2 were deemed to be basophils.



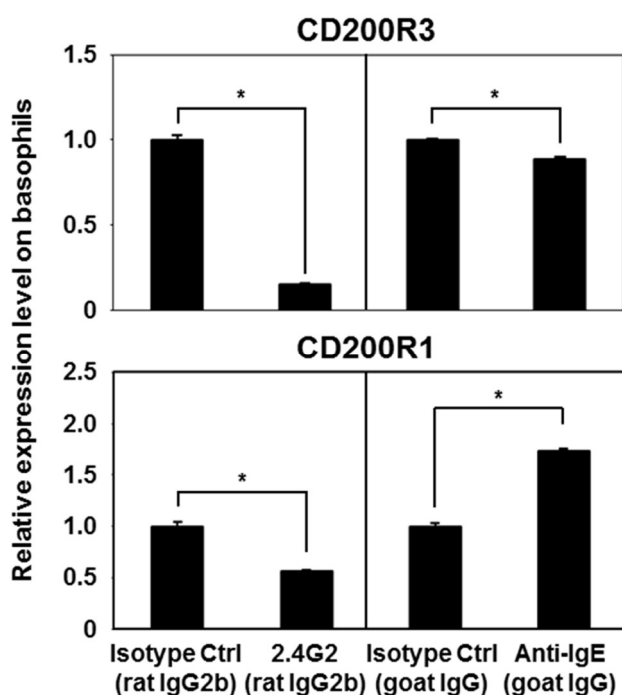
**Figure 3** Changes in expression levels of CD200R1 and CD200R3 on blood basophils of  $\beta$ -LG-immunized mice following antigen stimulation. Five BALB/c mice were immunized with  $\beta$ -LG. Peripheral blood was incubated with or without  $\beta$ -LG at 37°C for 2 h. (a) Representative dot plots showing the expression of CD200R1 and CD200R3 on basophils following stimulation with (right) or without (left)  $\beta$ -LG. (b) Scatter plots graph showing the relative expression levels of CD200R1 and CD200R3 following stimulation with  $\beta$ -LG. All of the experimental data (five mice) are shown.

### 2.3.2 IgG 受容体への刺激に伴う好塩基球 CD200R3 の発現変化

2.3.1 に記したように、抗原刺激に伴う好塩基球上の CD200R3 の発現減少の程度が必ずしも CD200R1 の発現増加の程度と一致しないことと、アジュバントに水酸化アルミニウムを使用した腹腔内免疫では特異 IgE よりも特異 IgG の産生が優位との報告<sup>64)</sup>があることから、この抗原刺激に伴う CD200R3 の発現変化が IgG を介した好塩基球の活性化によるとの仮説を立てた。

マウス好塩基球はナイーブな状態でも抗 IgE 抗体による刺激で活性化することが報告されている<sup>55)</sup>。本研究では、ナイーブマウスより得た血液検体を抗マウス IgE 抗体の他、抗マウス IgG 受容体 mAb (2.4G2) やこれらのアイソタイプコントロール抗体でも刺激し、好塩基球上の

CD200R1 と CD200R3 の発現変化を調べた。その結果、抗 IgE 抗体刺激による CD200R1 の発現上昇と、2.4G2 刺激による CD200R3 の発現減少が認められた (Fig. 4)。その一方で、抗 IgE 抗体刺激による CD200R3 発現減少と 2.4G2 刺激による CD200R1 の発現減少も、僅かではあるが有意に認められた (Fig. 4)。



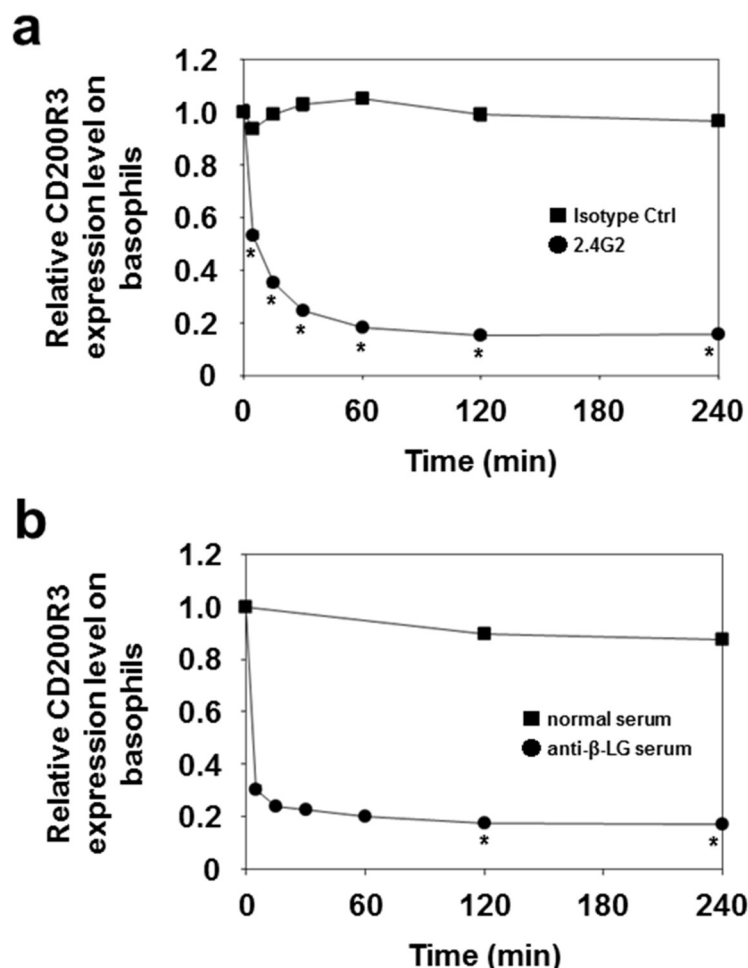
**Figure 4** Increased expression of CD200R1 and decreased expression of CD200R3 on basophils in response to IgE and IgG receptor-mediated activation, respectively. Peripheral blood was incubated at 37°C for 2 h with 100 ng/mL anti-mouse Fc $\gamma$ RIII/II (2.4G2), 300 ng/mL goat anti-mouse IgE, or the respective isotype control antibody. Relative expression levels of CD200R1 and CD200R3 on basophils are shown. Data are represented as means  $\pm$  SDs (n = 3). Asterisks indicate significant differences.

### 2.3.3 好塩基球活性化に伴う CD200R3 発現変化の時間依存性

好塩基球の活性化に伴う CD200R3 発現減少の時間依存性を検討するために、マウス好塩基球を 2.4G2 または  $\beta$ -LG で刺激し、好塩基球上の CD200R3 の発現変化を経時的に測定した。

ナイーブマウスより得た血液検体を 2.4G2 で刺激すると、好塩基球上の CD200R3 の発現は速やかに減少し、少なくとも 4 時間は保持されていた (Fig. 5a)。

抗 $\beta$ -LG 血清で受動感作させたマウス血液検体を $\beta$ -LG で刺激した場合も同様で、好塩基球上の CD200R3 の発現は速やかに減少し、少なくとも 4 時間は保持されていた (Fig. 5b)。

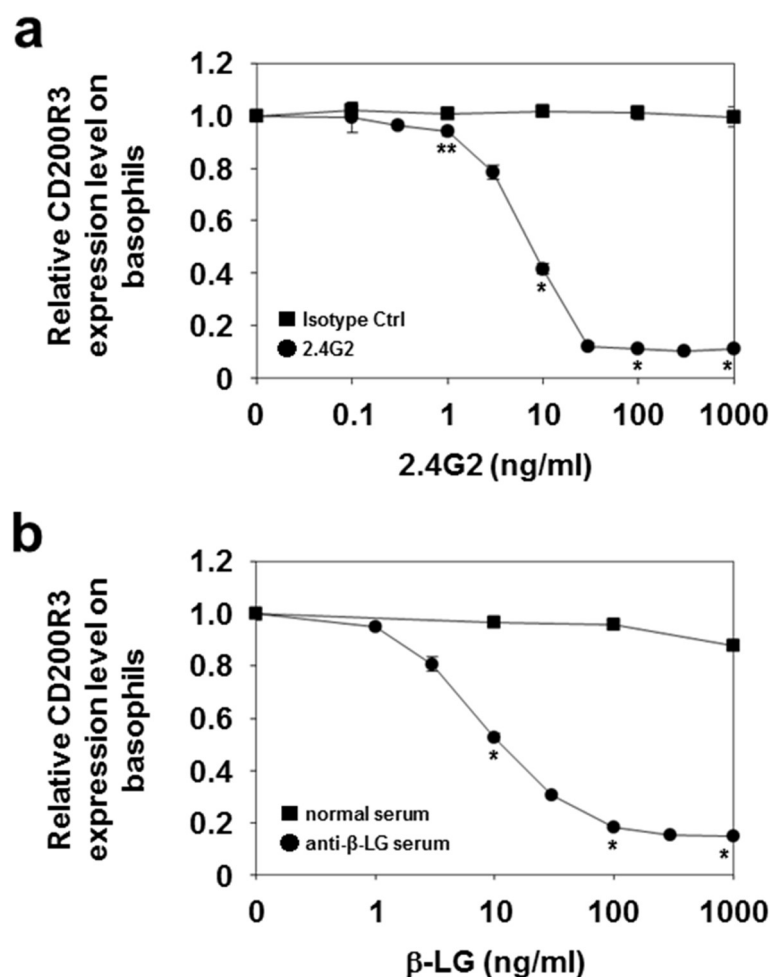


**Figure 5** Reduced surface expression of CD200R3 on basophils in a time-dependent manner after stimulation. (a) Peripheral blood was incubated with 100 ng/mL anti-mouse Fc $\gamma$ R111/II (2.4G2) or isotype control. (b) Peripheral blood was passively sensitized with mouse anti- $\beta$ -LG serum or normal serum, corresponding to one-twentieth of the blood sample volume. Following sensitization, samples were incubated with 1  $\mu$ g/mL  $\beta$ -LG. The expression of CD200R3 on basophils after stimulation was analyzed by flow cytometry and is shown as relative expression levels. Data are represented as means  $\pm$  SDs (n = 3). Asterisks indicate significant differences between the two groups at each time point.



### 2.3.4 好塩基球活性化に伴う CD200R3 発現変化の刺激用量依存性

好塩基球の活性化に伴う CD200R3 発現減少の刺激用量依存性を検討するために、段階稀釈した 2.4G2 または  $\beta$ -LG でマウス好塩基球を 2 時間刺激し、CD200R3 の発現変化を測定した。



**Figure 6** Reduced surface expression of CD200R3 on basophils in a dose-dependent manner after stimulation. (a) Peripheral blood was incubated with various concentrations of anti-mouse Fc $\gamma$ RIII/II (2.4G2) or isotype control for 2 h. (b) Peripheral blood was passively sensitized with mouse anti- $\beta$ -LG serum or normal serum, corresponding to one-twentieth of the blood sample volume. Following sensitization, samples were incubated with various quantities of  $\beta$ -LG for 2 h. The expression of CD200R3 on basophils after stimulation was analyzed by flow cytometry and is shown as relative expression levels. Data are represented as means  $\pm$  SDs ( $n = 3$ ). Asterisks indicate significant differences compared to media alone (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

ナイーブマウスより得た血液検体を段階稀釈した 2.4G2 で刺激したところ、濃度 1 ng/mL より好塩基球上の CD200R3 の発現が有意に減少し、2.4G2 による刺激用量依存性が認められた (**Fig. 6a**)。

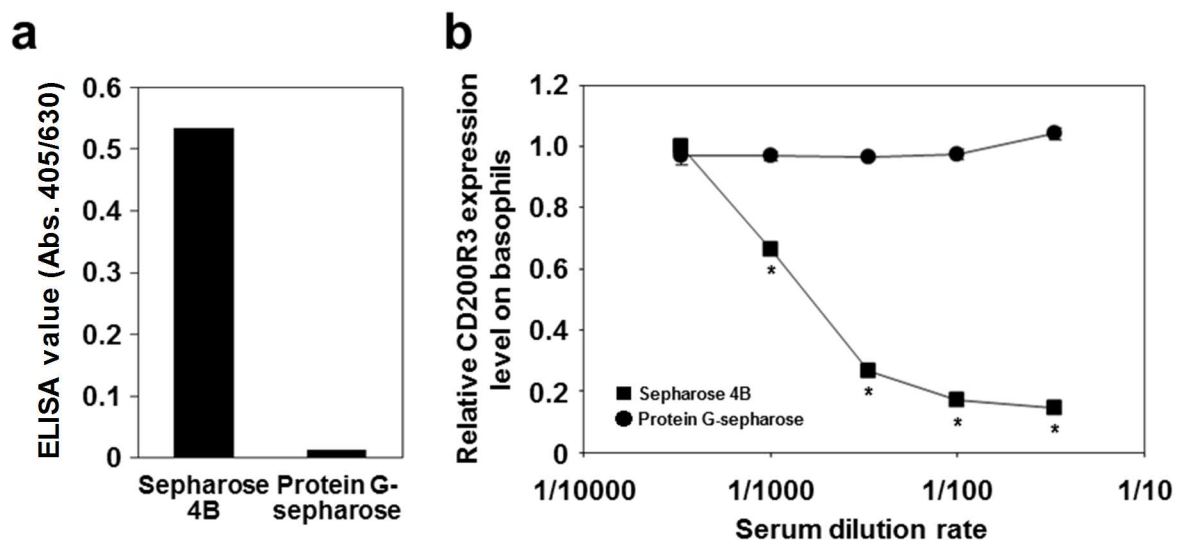
抗 $\beta$ -LG 血清で受動感作させたマウス血液検体の場合でも、少なくとも 10 ng/mL 以上の $\beta$ -LG 刺激によって好塩基球上の CD200R3 の有意な発現減少が認められ、特異抗原 ( $\beta$ -LG) による刺激用量依存性が認められた (**Fig. 6b**)。

### 2.3.5 マウス抗 $\beta$ -LG 血清からの IgG 除去が好塩基球上の CD200R3 の発現変化に及ぼす影響

好塩基球上の CD200R3 発現減少が IgG を介した刺激に依存することを検証するために、抗 $\beta$ -LG 血清から IgG を除去したものでマウス血液を受動感作させ、 $\beta$ -LG 刺激による好塩基球上の CD200R3 の発現変化を測定した。

マウス抗 $\beta$ -LG 血清を Protein G Sepharose あるいは Sepharose 4B で処理し、抗 $\beta$ -LG 特異 IgG 抗体価を ELISA で測定したところ、Protein G Sepharose で処理した抗血清では顕著に抗体価が低下しており、IgG が除去されていることが確認された (**Fig. 7a**)。

次にこの IgG 除去抗血清 (Protein G Sepharose 処理) あるいは対照抗血清 (Sepharose 4B 処理) を段階稀釈したものでマウス血液検体を受動感作させ、 $\beta$ -LG で刺激したところ、対照抗血清では抗血清濃度依存的に好塩基球上の CD200R3 の発現減少が認められたのに対して、IgG 除去抗血清では好塩基球上の CD200R3 発現減少は認められなかった (**Fig. 7b**)。



**Figure 7 Basophil CD200R3 expression levels following IgG-specific depletion from antiserum used for passive sensitization. (a) Mouse antiserum was treated with either Protein G Sepharose 4FF or Sepharose 4B and  $\beta$ -LG-specific IgG were measured by ELISA. (b) Mouse peripheral blood was sensitized with antiserum treated with either Protein G Sepharose 4FF or Sepharose 4B, followed by antigen challenge with  $1\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -LG for 2 h. The expression level of CD200R3 was analyzed by flow cytometry and is given as relative expression level. Data are represented as means  $\pm$  SDs (n = 3). Asterisks indicate significant differences between groups.**

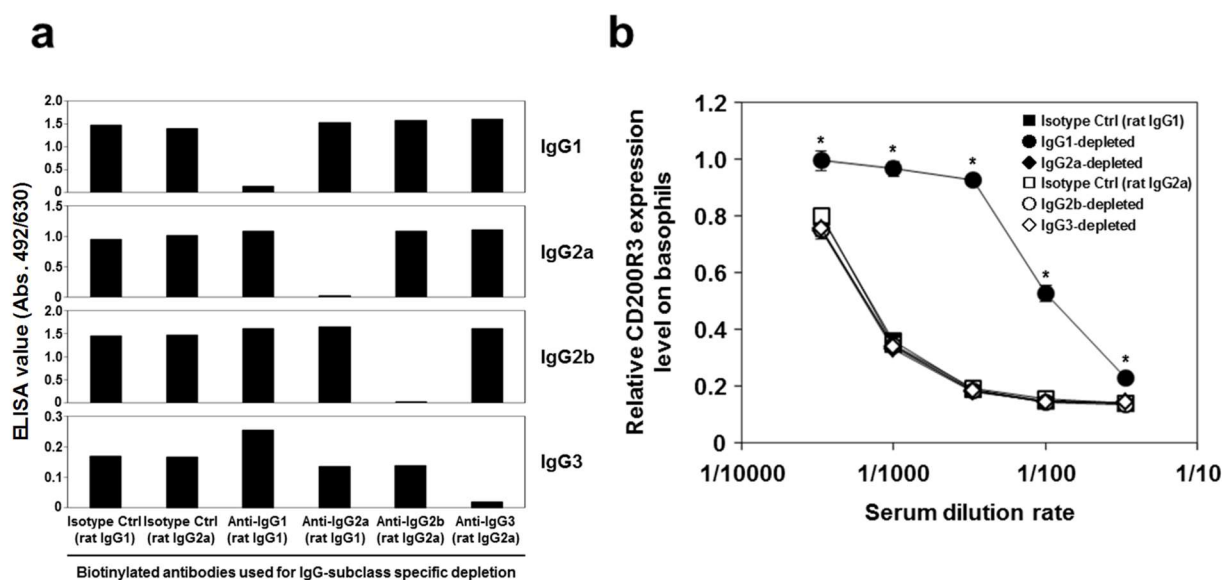
### 2.3.6 マウス抗 $\beta$ -LG血清からの各IgGサブクラスの除去が好塩基球上のCD200R3の発現変化に及ぼす影響

好塩基球上のCD200R3の発現変化がIgGのどのサブクラスによる刺激に依存するのかを検討するために、各IgGサブクラスを選択的に除去した抗 $\beta$ -LG血清でマウス血液を受動感作させ、 $\beta$ -LG刺激による好塩基球上のCD200R3の発現変化を測定した。

抗マウスIgG1抗体結合ビーズ、抗マウスIgG2a抗体結合ビーズ、抗マウスIgG2b抗体結合ビーズ、抗マウスIgG3抗体結合ビーズ、あるいはこれらのアイソタイプコントロール抗体結合ビーズで処理したマウス抗 $\beta$ -LG血清について、各IgGサブクラスの抗 $\beta$ -LG抗体価をELISAで測定したところ、相当するサブクラスの抗体価は顕著に低下しており、各サブクラスのIgGが選

択的に除去されていることが確認された (Fig. 8a)。

次にこれらの各 IgG サブクラス選択的除去抗血清あるいはアイソタイプコントロール抗体結合ビーズ処理抗血清を段階稀釈したものでマウス血液検体を受動感作させ、 $\beta$ -LG で刺激したところ、IgG1 選択的除去抗血清で受動感作させた場合のみ好塩基球上の CD200R3 発現減少が顕著に抑制されていた (Fig. 8b)。即ち、好塩基球の活性化に伴う CD200R3 の発現減少は IgG1 の刺激に依存することが明らかとなった。

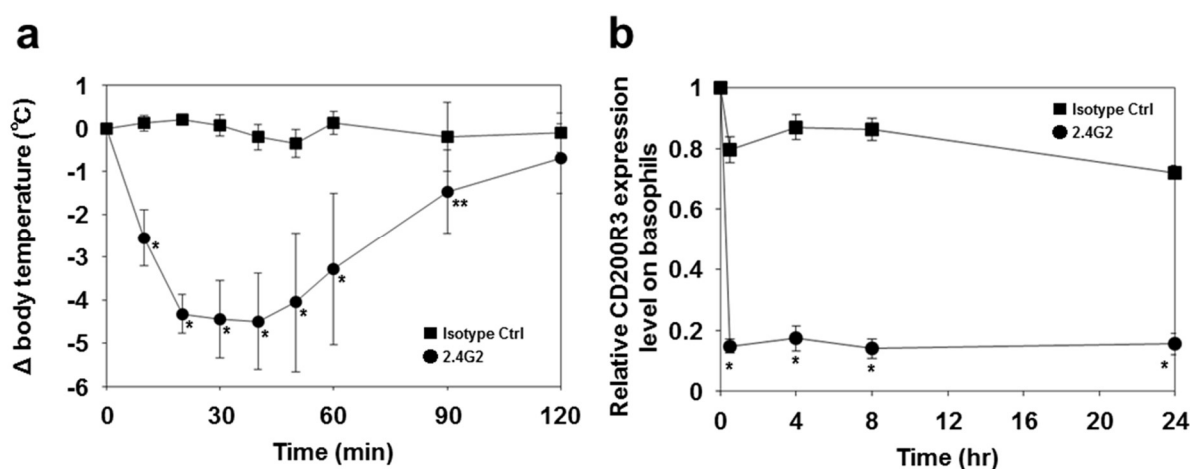


**Figure 8 Basophil CD200R3 expression following depletion of specific IgG subclasses from antiserum used for passive sensitization. Each IgG subclass was depleted from mouse anti- $\beta$ -LG serum using biotinylated antibodies specific to IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, or corresponding isotype controls. (a) IgG subclass-specific depletion from antiserum was confirmed by ELISA. (b) Mouse peripheral blood was sensitized with various dilutions of the depleted antisera, followed by antigen challenge with 1 $\mu$ g/mL  $\beta$ -LG for 2 h. The expression level of CD200R3 was analyzed by flow cytometry and is given as relative expression level. Asterisks indicate significant differences compared to the isotype control group.**

### 2.3.7 IgG 依存全身性アナフィラキシー惹起と好塩基球 CD200R3 発現変化の相関

マウスに 2.4G2 を静脈投与して *in vivo* で FcγRIII/II を架橋させると全身性アナフィラキシーが惹起されることが報告されている<sup>65,66</sup>。好塩基球上の CD200R3 の発現変化が IgG 依存全身性アナフィラキシー反応と相関することを確認するため、*in vivo* で IgG 受容体を架橋させて全身性アナフィラキシーを惹起すると共に、末梢血好塩基球の CD200R3 の発現変化を測定した。

マウス尾静脈より 2.4G2 を注入すると全身性アナフィラキシーに伴う直腸体温の降下が認められた (Fig. 9a)。2.4G2 注入後 30 分より経時的に尾静脈より採取した血液でも好塩基球上の CD200R3 の発現低下が認められた (Fig. 9b)。即ち、IgG 依存全身性アナフィラキシーの惹起に伴って *in vivo* でも好塩基球上の CD200R3 の発現が低下することが明らかとなった。しかしながら、アナフィラキシー反応に伴う直腸体温の降下は 2.4G2 注入後 30~40 分をピークに回復し 120 分ではほぼ注入前の体温に戻ったのに対し、CD200R3 の発現減少は少なくとも 2.4G2 注入後 24 時間まで持続していた (Fig. 9a, b)。



**Figure 9** Decreased basophilic surface CD200R3 expression after induction of IgG-mediated anaphylaxis. (a) Mice were injected intravenously with 2.4G2 or isotype control, and rectal temperatures were monitored. Four mice per injection group were used. (b) The mice were then bled before injection (0 h), and 0.5, 4, 8, and 24 h afterwards. Basophil CD200R3 expression was subsequently evaluated. Data are represented as means  $\pm$  SDs ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between the two groups at each time point (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

## 2.4 考察

マウスの感作好塩基球を特異抗原で刺激すると、既に報告されている CD200R1 の発現増加だけでなく、CD200R3 の発現減少も起こることが示された。CD200R3 の発現減少の程度が必ずしも CD200R1 の発現増加の程度と一致しないことから、CD200R3 の発現減少は FcεRI を介した刺激によるものではないことが示唆された。マウスでは IgE だけでなく IgG によっても即時型アレルギー反応が見られること<sup>67-71)</sup>から、CD200R3 の発現低下が IgG と IgG 受容体の反応を介したものの仮説を立て、検討をおこなった。この仮説は、①IgG を除去した抗血清で受動感作させた好塩基球では抗原刺激しても CD200R3 の発現減少は認められないこと (Fig. 7b)、②IgG 受容体 FcγRIII/II に対するモノクロナル抗体 2.4G2 でナイーブな好塩基球を刺激すると CD200R3 の発現減少が認められること (Fig. 4、Fig. 5a)、③各サブクラスを選択的に除去処理した抗血清を用いた実験より好塩基球上の CD200R3 発現減少は IgG1 に依存すること (Fig. 8b)、から強く支持された。

本検討では抗 IgE 抗体による刺激でも僅かに CD200R3 の発現減少が認められたが (Fig. 4)、マウスの IgE は IgG 受容体である FcγRIIB と FcγRIII にもある程度結合することが報告されている<sup>72)</sup>ことから、抗 IgE 抗体が IgE を介して IgG 受容体の架橋を引き起こした可能性が考えられる。一方、抗 FcγRIII/II モノクロナル抗体である 2.4G2 による刺激では CD200R1 の有意な発現減少も認められたが (Fig. 4)、これは 2.4G2 が抑制性 IgG 受容体である FcγRIIB を刺激したことにより、好塩基球の活性化が抑制されたためと説明できよう。

IgG の各サブクラスを選択的に除去した抗血清を用いた受動感作好塩基球の実験から、IgG1 に依存した刺激が CD200R3 の発現減少をもたらすことが明らかとなった。マウスでは IgG1、IgG2a、及び IgG2b が IgG 受容体を介したアナフィラキシーに関与し<sup>73,74)</sup>、このうち IgG1 は FcγRIII を、IgG2a は FcγRIV をそれぞれ介してアナフィラキシーを惹起する<sup>73)</sup>。好中球では FcγRIII と FcγRIV の両方が発現しているが、好塩基球やマスト細胞では FcγRIII の発現はあるが FcγRIV は発現していない。従って好塩基球上では抗原と抗原特異的 IgG1 の複合体が FcγRIII を架橋し、活性化が起こっているのであろう。

マウスのアナフィラキシーは大きく二つの機序が知られており、一つは IgE 依存的に主にマスト細胞から放出されるヒスタミンによるもの (classical pathway) で、もう一つは IgG 依存的にマクロファージから放出される血小板活性化因子 (PAF) によるもの (alternative pathway) である<sup>69)</sup>。Tujimura 等はマウスの好塩基球も抗原-抗原特異 IgG1 のコンプレックスで刺激すると PAF を放出し、PAF の静脈内投与はマウスにアナフィラキシーを惹起することを報告している<sup>70)</sup>。本研究では、2.4G2 によって *in vivo* で FcγR を刺激するとアナフィラキシー反応と共に末梢血好塩基球上の CD200R3 発現減少が認められたが、この際に好塩基球を粗精製して放出される PAF の検出を試みたものの検出はできなかった。これは恐らく好塩基球の細胞数が絶対的に少なかったためと考えられる。生体内でも好塩基球は細胞数自体が非常に少ないため、アナフィラキシー反応にどの程度関与しているか不明であるが、恐らくは PAF を放出し、CD200R3 の発現減少を起こしているであろう。つまりこのことは、好塩基球の CD200R3 発現減少がマウスにおける IgG アナフィラキシーのマーカーとして利用できることを示している。

CD200R3 は CD200R ファミリーに属し、活性化アダプター分子である DAP12 (DNAX activating protein of 12kDa) と相互作用<sup>60,75,76)</sup>しながらマウスのマスト細胞と好塩基球に発現している。そのため CD200R3 を介した刺激はマスト細胞の脱顆粒、好塩基球における IL-4 産生、さらに局所及び全身のアナフィラキシーを引き起こす<sup>60)</sup>。一方 CD200R1 は逆に抑制性のレセプターであり、CD200R1 の発現増加は好塩基球の活性化に対するネガティブフィードバックと考えられている<sup>55)</sup>。好塩基球活性化に伴う CD200R3 の発現減少の生理的な意義は明らかでないが、CD200R1 の発現増加と同様に、過剰な免疫反応に対する制御機構のひとつと考えることもできる。

## 2.5 小括

マウス BAT の確立にあたり、本研究ではまず CD200R1 をマーカーとした系の立ち上げを試みたが、その過程で、好塩基球の活性化に伴って CD200R1 の発現が増加するだけでなく、CD200R3 の発現が減少することを見出した。CD63 や CD203c をマーカーとしたヒトの BAT と同じように、これら CD200R1 と CD200R3 をマーカーとして好塩基球の活性化をフローサイト

メーターで分析することにより、マウスにおいても BAT の系を確立することができた。また、新たに見出した活性化マーカーである CD200R3 の発現減少は、IgE 受容体を介した刺激で発現が増加する CD200R1 と異なり、IgG 受容体を介した刺激によって引き起こされることも明らかとなった。即ち、CD200R1 と CD200R3 の両方をマーカーとすることで、マウス BAT では IgE 依存的反応と IgG 依存的反応をそれぞれ区別しながら同時に評価することも可能である。ヒトの食物アレルギーでは血中の抗原特異的 IgE 値が必ずしもアレルギー反応と一致せず、より生理的な BAT が有用であるように、マウスでも BAT は血中の抗原特異的 IgE、IgG 測定以上の有用性が期待できるかもしれない。本研究では次章以下、新たに立ち上げたマウス BAT を牛乳タンパク質加水分解物の免疫学的特性の評価に用いることによって、このマウス BAT の有用性を検討した。



### 第3章 マウス好塩基球活性化試験を用いた牛乳タンパク質加水分解物の抗原性の評価に関する検討

#### 3.1 序

食物アレルギーの有効な治療法は確立されておらず、アレルゲンを摂取して寛容誘導を期待する免疫療法も未だ研究段階であり一般臨床では推奨されていない<sup>10)</sup>。従って現状では「アレルゲンを食べない」除去食療法がその治療の中心であるが、原因となるアレルゲンが栄養学的に重要な場合、適切な代替食品が必要になる。特に乳幼児の牛乳アレルギーでは、何らかの理由で十分な母乳摂取ができない場合、牛乳を原料とした育児用ミルクに代わる人工乳が必須となる。牛乳アレルギー児向けの代替人工乳として、牛乳タンパク質を酵素消化により低分子化した加水分解乳<sup>20,21)</sup>、アミノ酸調製乳<sup>77)</sup>、大豆乳<sup>78)</sup>、また近年ではコメ分解乳<sup>79)</sup>などのアレルギー用ミルクが開発されている。これらアレルギー用ミルクは、牛乳アレルゲンに感作された患児でも安全に摂取できる低抗原性が必須であり、それを担保するために様々な *in vitro*・*in vivo* の評価や検証が求められる。*In vitro* では、我が国の場合、ELISA 法によって牛乳アレルゲンが検出されないことが必要である<sup>80)</sup>。*In vivo* では、「牛乳アレルギー患者に対する経口負荷試験において信頼区間 95%で 90%以上の陰性率を示すこと」と欧米のガイドラインで求められているが<sup>25,27)</sup>、製品の開発段階や配合原材料のスクリーニングでは、実験動物を用いた前臨床的な評価がおこなわれる。牛乳タンパク質に感作させたモルモットやマウスなどに被検試料を負荷して惹起されるアレルギー症状を観察するアナフィラキシー試験がその代表であり、アレルギー用ミルクやその配合原料である牛乳タンパク質分解物の評価が多数報告されている<sup>24,51,52)</sup>。このアナフィラキシー試験は実績の高い優れた評価法であるが、実験動物一頭につき通常は被検試料一種、しかも単回しか実施することができず、コストの掛かる試験である。ヒトの臨床において BAT が負荷試験の結果予測に有用なように、マウスにおいても BAT がアナフィラキシー試験と相関を示すのであれば、マウス BAT は前臨床的な抗原性評価における有用な手法になると考えられる。少量の末梢血液で多数の被検検体の抗原性が評価できるマウス BAT は、経済的コストだけでなく、3R (Replacement、Reduction、Refinement) の点から動物福祉的にも好ましい。本章では、アレル

ギー用ミルクや各種育児用ミルクを被検試料としてマウスのアナフィラキシー試験と BAT をおこない、抗原性評価手法としてのマウス BAT の有用性を検討した。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 被検試料

様々な牛乳タンパク質加水分解物の抗原性を評価するにあたり、本検討ではこれら分解物を原料として配合した以下のミルクを被検試料として使用した（1種は対照として未分解の牛乳タンパク質を配合したミルク）。いずれも森永乳業株式会社（東京都港区）が製造販売する製品である。

被検試料① CMF（通常の育児用ミルク、商品名『はぐくみ』、カゼイン・乳清タンパク質配合）

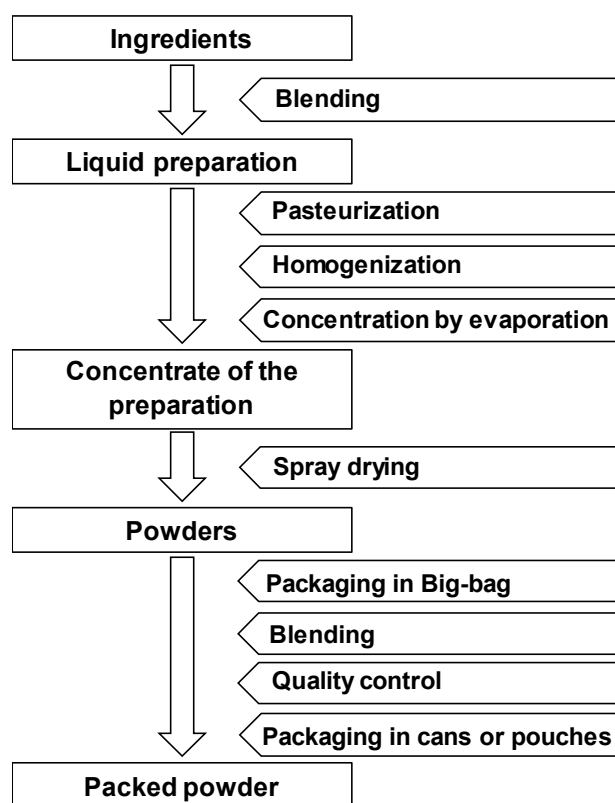
被検試料② PHF（軽度分解乳、商品名『E 赤ちゃん』、カゼイン軽度分解物・乳清タンパク質軽度分解物配合）

被検試料③ EHF1（高度分解乳、商品名『ニューMA-1』、カゼイン高度分解物配合）

被検試料④ EHF2（高度分解乳、商品名『MA-mi』、カゼイン高度分解物・乳清タンパク質高度分解物配合）

EHF1 と EHF2 は消費者庁より「病者用食品（アレルゲン除去食品）」<sup>80)</sup>としての表示許可を取得したアレルギー用ミルクであり、高度な酵素消化と限外ろ過処理によって抗原性を ELISA 法の検出限界以下にまで低減したカゼイン高度分解物と乳清タンパク質高度分解物を原料として配合している（EHF1 はカゼイン高度分解物のみ配合）。PHF に配合されたカゼイン軽度分解物と乳清タンパク質軽度分解物は、牛乳のカゼインや乳清タンパク質に対して風味悪化をおこさない程度の軽度な酵素消化処理を施したものである。PHF は軽度分解物を配合することによって低アレルゲン化されたミルクではあるが、消費者庁の表示許可制度上の分類は CMF と同じ「乳児用調製粉乳」<sup>80)</sup>である。これらアレルギー用ミルクや乳児用調製粉乳など、乳幼児用ミルク製品の製造方法は Fig. 10 に示す通りである。また、各被検試料について、市販 ELISA キット（FASPEC II、森永生化学研究所社製）で測定した被検試料中のカゼイン及びβ-LG の抗原性を Table 2 に、

HPLC で測定した分子量分布を **Fig. 11** に示す。なお、ELISA はキット添付の手順書に従って実施し、HPLC は poly-hydroxyethyl aspartamide カラム (PolyLC 社製、アメリカ合衆国) を装着した LC-20AD (島津製作所社製) を使用した。

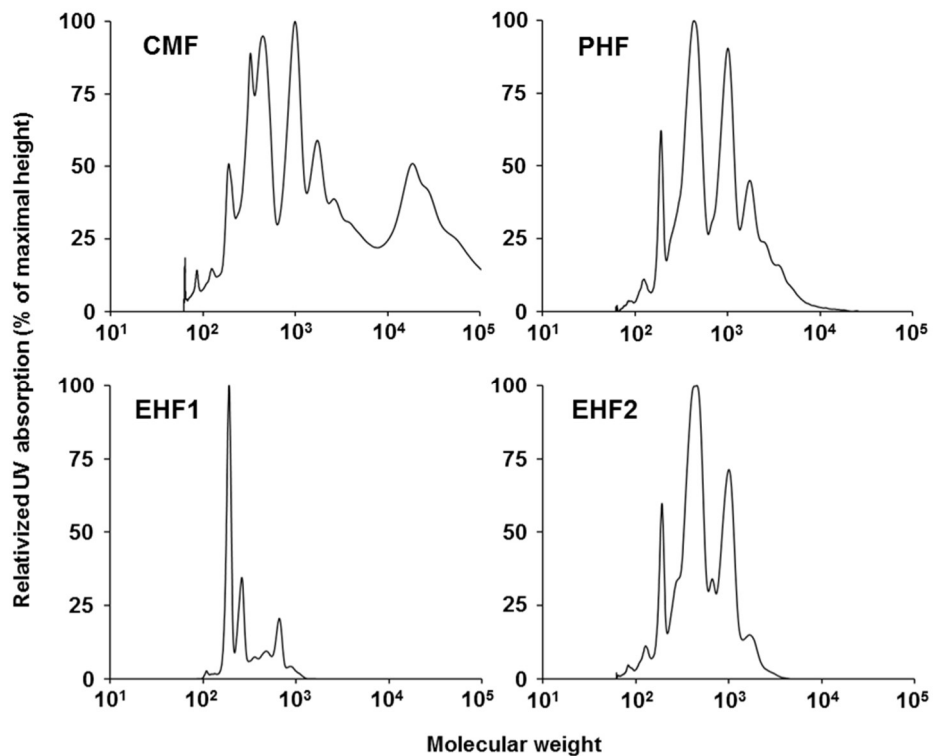


**Figure 10** The manufacturing process of powdered infant formulae.

**Table 2** Milk formulas evaluated in this study.

	Product name	Classification	Detected milk antigen* [ppm]	
			CN	β-LG
CMF	Hagukumi <sup>®</sup>	Conventional infant formula	$4.7 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$
PHF	E-akachan <sup>®</sup>	Partially hydrolyzed formula	1.7	$1.1 \times 10^2$
EHF1	New MA-1 <sup>®</sup>	Extensively hydrolyzed formula	< 0.5	< 0.5
EHF2	MA-mi <sup>®</sup>	Extensively hydrolyzed formula	< 0.5	< 0.5

\* Data are expressed as part per million of antigenic equivalent protein in powdered formula products.



**Figure 11 Molecular weight distribution of milk formulas. Defatted formula samples were analyzed by HPLC. Vertical axis indicates the percentage of maximal peak height of UV215 nm absorption.**

### 3.2.2 動物

3 週齢の SPF グレード雌性 BALB/c 系マウスを日本クレアより購入した。飼育環境、飼料・飲水は 2.2.1 に前記した通り。

### 3.2.3 マウスの免疫

免疫用抗原である $\beta$ -LG とカゼイン（三回酸沈殿カゼイン）はそれぞれ既報<sup>62,81)</sup>に従って生乳より調製した。

搬入後 1 週間馴化させたマウス（4 週齢）に対し、10  $\mu$ g の $\beta$ -LG あるいはカゼインを、いずれも 4 mg の水酸化アルミニウムと共に 2 週間間隔で計 2 回、腹腔内投与して免疫をおこなった。

### 3.2.4 好塩基球活性化試験

2 回目の腹腔内投与の 1 週間後、 $\beta$ -LG 免疫マウスとカゼイン免疫マウスのそれぞれについて尾静脈より採取した血液をプールし、BAT をおこなった。BAT は第 2 章に記した手順に従い、刺激用抗原には生乳から調製した $\beta$ -LG あるいはカゼイン（いずれも 0.01~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、あるいは各種被検試料（CMF、PHF、EHF1、EHF2；いずれも 0.1~10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を使用した。

### 3.2.5 アナフィラキシー試験

BAT の 2 日あるいは 3 日後、 $\beta$ -LG 免疫マウスとカゼイン免疫マウスのそれぞれに対して各種被検試料 20 mg を水溶液（日本薬局方注射用蒸留水（大塚製薬工場社製）で 100 mg/mL 濃度に調製したもの）で尾静脈投与し、アナフィラキシー試験を実施した。全身性のアナフィラキシー反応は、デジタル温度計を用いて直腸体温を計測することで評価した。アナフィラキシー試験は、 $\beta$ -LG 免疫マウスとカゼイン免疫マウスのそれぞれに対し、各種被検試料ごとに  $n=4\sim 6$  で実施した。

### 3.2.6 統計解析

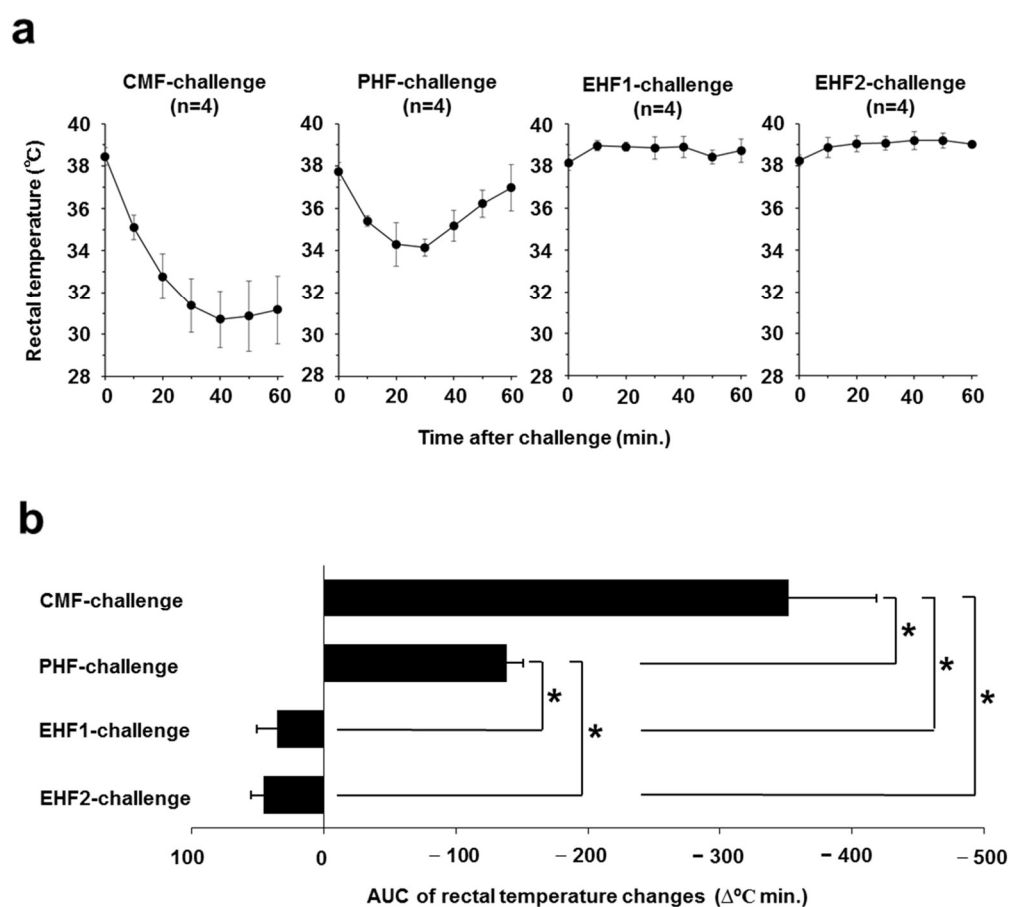
全身性のアナフィラキシー反応は被検試料の尾静脈投与から 60 分間における直腸体温変化の曲線下面積（AUC）を求め、一元配置分散分析のうへ Tukey の多重検定をおこなった。統計解析ソフトウェアは JMP ver.13.0（SAS Institute 社製）を用い、 $p$  値 0.05 未満を有意とした。

## 3.3 結果

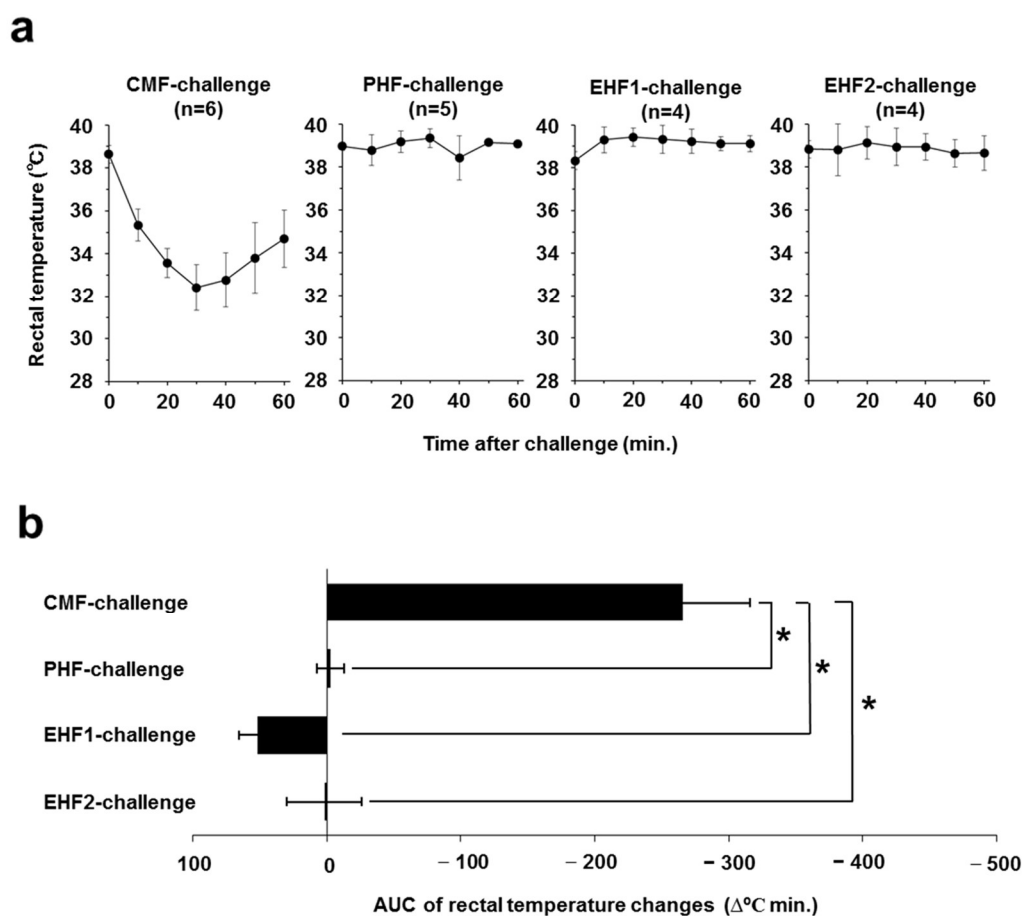
### 3.3.1 アナフィラキシー試験

牛乳タンパク質で免疫したマウスの *in vivo* 反応性を確認するため、アナフィラキシー試験をおこなった。 $\beta$ -LG 免疫マウスに対して CMF を尾静脈投与したところ、アナフィラキシー反応に伴う著明な直腸体温の低下が認められた（Fig. 12）。同様にカゼイン免疫マウスに対する CMF の尾静脈投与でも、直腸体温の低下が認められた（Fig. 13）。一方、EHF1 あるいは EHF2 の尾静脈投与では、 $\beta$ -LG 免疫マウスとカゼイン免疫マウスのいずれにおいても直腸体温は変化せず、ア

ナフィラキシー反応は認められなかった (Fig. 12、Fig. 13)。PHF を尾静脈投与した場合、 $\beta$ -LG 免疫マウスに対しては明確な直腸体温の低下を引き起こしたが、投与後 60 分間における直腸体温低下の AUC は CMF 投与群における AUC より有意に低値であった (Fig. 12b)。カゼイン免疫マウスに対する PHF 投与では直腸体温低下は認められなかった (Fig. 13)。



**Figure 12 Rectal temperature changes in  $\beta$ -LG-sensitized mice after challenge with milk formulas. Powdered milk formulas were dissolved in sterile water and injected intravenously (20 mg/0.2 mL/mouse). Rectal temperature was measured every 10 min. Data are represented as mean $\pm$ SDs. (a) Time points data. (b) AUCs during 60 min post challenge. Asterisks indicate significant differences between the two groups.**

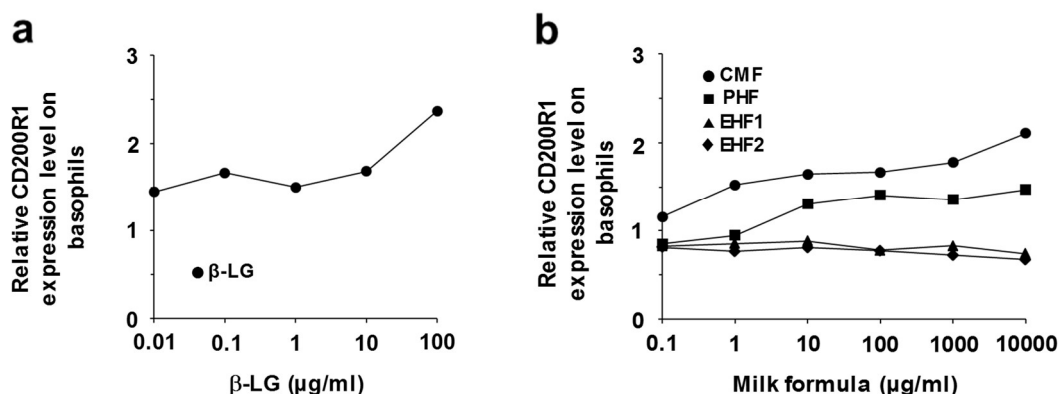


**Figure 13 Rectal temperature changes in casein-sensitized mice after challenge with milk formulas. Powdered milk formulas were dissolved in sterile water and injected intravenously (20 mg/0.2 mL/mouse). Rectal temperature was measured every 10 min. Data are represented as mean $\pm$ SDs. (a) Time points data. (b) AUCs during 60 min post challenge. Asterisks indicate significant differences between the two groups.**

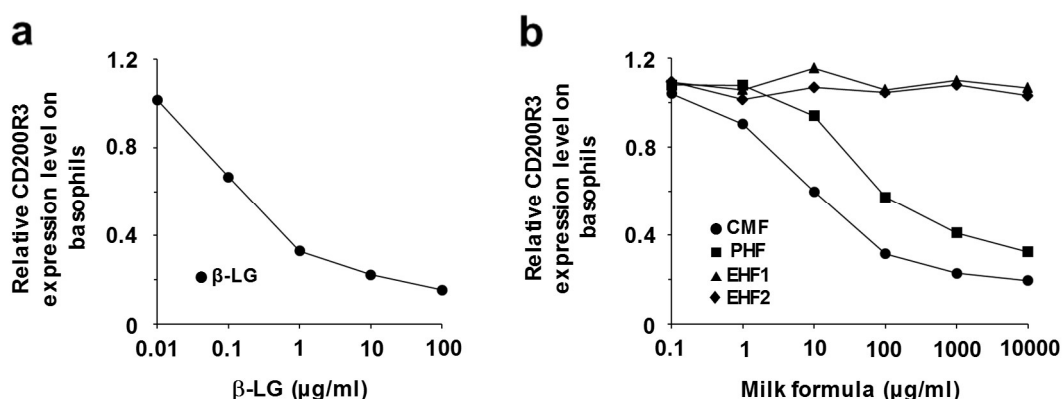
### 3.3.2 好塩基球活性化試験

牛乳タンパク質で免疫したマウスの好塩基球の反応性を調べるため、BATをおこなった。 $\beta$ -LG 免疫マウスの血液を $\beta$ -LG で刺激したところ、 $\beta$ -LG の濃度依存的に好塩基球の活性化に伴う CD200R1 の発現上昇と CD200R3 の発現減少が認められた (Fig. 14a、Fig. 15a)。同様にカゼイン免疫マウスの血液をカゼインで刺激しても CD200R1 発現上昇と CD200R3 発現低下が認めら

れた (Fig. 16a、Fig. 17a)。被検試料 CMF による刺激では、 $\beta$ -LG 免疫マウスとカゼイン免疫マウスのいずれにおいても CMF 濃度依存的な CD200R1 の発現上昇と CD200R3 の発現低下が認められた。一方、EHF1 あるいは EHF2 による刺激では、 $\beta$ -LG 免疫マウスとカゼイン免疫マウスのいずれにおいても CD200R1、CD200R3 の発現は変化せず、好塩基球の活性化は認められな



**Figure 14** Changes in CD200R1 expression on  $\beta$ -LG-sensitized mouse basophils post stimulation. Pooled mice ( $n = 16$ ) peripheral blood was incubated with milk formulas or corresponding antigen ( $\beta$ -LG) for 2 h. Relative expression levels of CD200R1 on basophils after incubation with various concentrations of  $\beta$ -LG (a) or milk formulas (b).



**Figure 15** Changes in CD200R3 expression on  $\beta$ -LG-sensitized mouse basophils post stimulation. Pooled mice ( $n = 16$ ) peripheral blood was incubated with milk formulas or corresponding antigen ( $\beta$ -LG) for 2 h. Relative expression levels of CD200R3 on basophils after incubation with various concentrations of  $\beta$ -LG (a) or milk formulas (b).



かった。PHF による刺激では、 $\beta$ -LG 免疫マウスに対して CD200R1、CD200R3 共に PHF 濃度依存的な発現変化が見られたが、CMF が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度以下で明確に好塩基球を活性化したのに対し、PHF では少なくとも 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度の刺激が好塩基球の活性化に必要であった (Fig. 14b、Fig. 15b)。カゼイン免疫マウスに対する PHF の刺激では、CD200R1 は PHF 濃度依存的な発現上昇が認められたが (Fig. 16b)、CD200R3 は 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度においても明確な発現変化は認められなかった (Fig. 17b)。

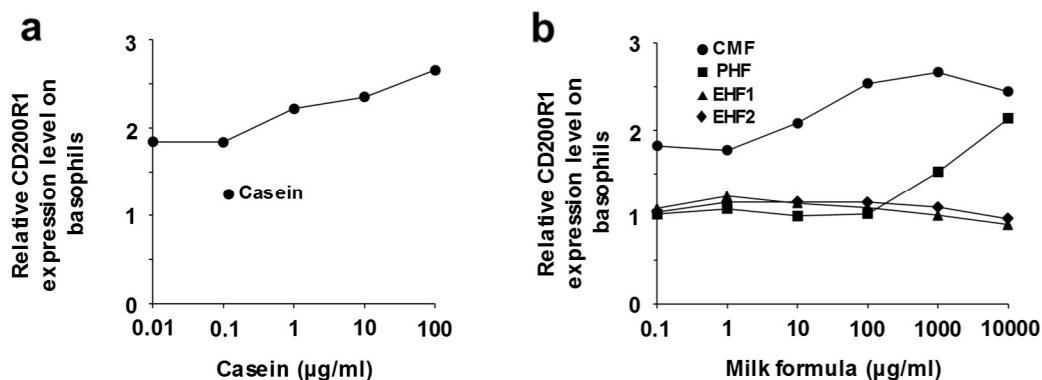


Figure 16 Changes in CD200R1 expression on casein-sensitized mouse basophils post stimulation. Pooled mice ( $n = 19$ ) peripheral blood was incubated with milk formulas or corresponding antigen (casein) for 2 h. Relative expression levels of CD200R1 on basophils after incubation with various concentrations of casein (a) or milk formulas (b).

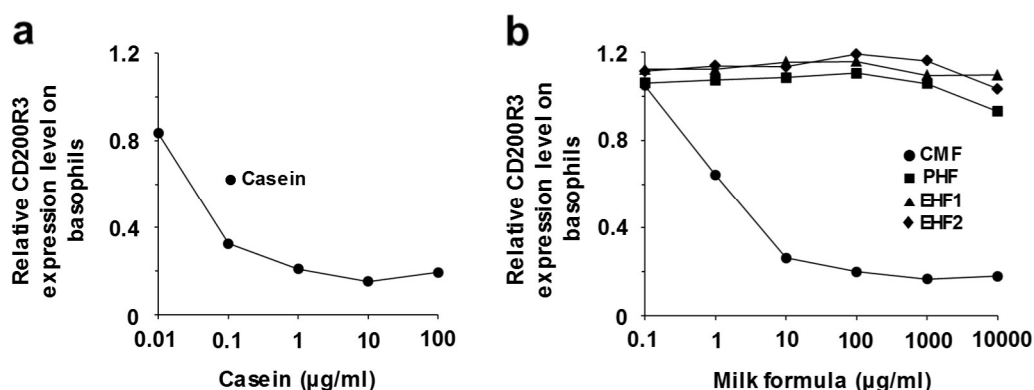


Figure 17 Changes in CD200R3 expression on casein-sensitized mouse basophils post stimulation. Pooled mice ( $n = 19$ ) peripheral blood was incubated with milk formulas or corresponding antigen (casein) for 2 h. Relative expression levels of CD200R3 on basophils after incubation with various concentrations of casein (a) or milk formulas (b).

### 3.4 考察

$\beta$ -LG あるいはカゼインで免疫したマウスにおいて、CMF がアナフィラキシー反応と好塩基球の活性化を明確に誘導したのに対し、EHF1 と EHF2 ではアナフィラキシー反応も好塩基球活性化も認められなかった (Fig. 12、Fig. 13、Fig. 14b、Fig. 15b、Fig. 16b、Fig. 17b)。即ち、 $\beta$ -LG やカゼインを腹腔内免疫して作成したアレルギーモデルマウスに対する CMF、EHF1、EHF2 の反応性は、アナフィラキシー試験と BAT で完全に一致した。EHF1、EHF2 はいずれも消費者庁の「特別用途食品 病者用食品 (アレルギー除去食品)」の表示許可<sup>80)</sup>を取得したアレルギー用ミルクであり、重症例も含めた牛乳アレルギー患児に対する高い使用実績のある製品である。このようなアレルギー用ミルクやその配合原料である牛乳タンパク質分解物の前臨床的な免疫学的安全性の評価では、実験動物を用いたアナフィラキシー試験<sup>24,51,52)</sup>が有用であることは前述の通りであるが、本検討の結果はマウス BAT がアナフィラキシー試験と同様にアレルギー用ミルクの評価に有用であることを示唆するものである。

軽度分解乳 PHF について、 $\beta$ -LG 免疫マウスに対してはアナフィラキシーを惹起したがカゼイン免疫マウスに対してはアナフィラキシーを惹起しなかった (Fig. 12、Fig. 13)。これは PHF に残存するカゼインのアレルゲン量 (1.7 ppm) が $\beta$ -LG のアレルゲン量 ( $1.1 \times 10^2$  ppm) よりも低値 (Table. 2) であったことに起因していると考えられる。BAT においては、PHF は $\beta$ -LG 免疫マウスに対して CD200R1 発現増加と CD200R3 発現減少を引き起こしたが、その程度は CMF によって引き起こされるものより軽度であり (Fig. 12b、Fig. 13b)、アナフィラキシー試験における直腸体温低下の程度が CMF 負荷群より PHF 負荷群で軽度であったことと一致した。一方、カゼイン免疫マウスに対して PHF の刺激は CD200R1 の軽度な発現増加は引き起こしたが (Fig. 16b)、CD200R3 の発現変化は見られなかった (Fig. 17b)。マウスのアナフィラキシーには IgE 依存的 (classical pathway) なものと IgG1 依存的 (alternative pathway) なものが存在することが知られている<sup>69,70)</sup>。このうち、腹腔内免疫・経静脈負荷によるアナフィラキシーモデルは IgG1 依存的な反応であることが報告されている<sup>67)</sup>。本検討においてカゼイン免疫マウスに対して PHF がアナフィラキシーによる体温低下も CD200R3 の発現変化も引き起こさなかったことは、い

れも IgG1 依存的な反応であることを鑑みると興味深く、併せて CD200R1 と CD200R3 をマーカーとしたマウス BAT がアレルギー反応の機序考察の上でも有用であることを示すものである。

### 3.5 小括

$\beta$ -LG あるいはカゼインを免疫したマウスに対する通常育児用ミルク (CMF)、軽度分解乳 (PHF)、高度分解乳 (EHF1、EHF2) の BAT の結果はアナフィラキシー試験の結果とよく一致し、分解程度の異なる様々なタンパク質加水分解乳 (及びその配合原料である牛乳タンパク質分解物) の免疫学的安全性の評価にマウス BAT がアナフィラキシー試験と同様に有用であることが示された。また、CD200R1 と CD200R3 をマーカーとしたマウス BAT では IgE 依存的な反応と IgG1 依存的な反応を区別して評価することが可能であり、特に腹腔内免疫・経静脈負荷によるマウスのアナフィラキシー試験の代替としては、CD200R3 の発現変化をマーカーとした BAT が有用と考えられた。

## 第4章 マウス好塩基球活性化試験を用いた牛乳タンパク質加水分解物の経皮免疫原性の評価に関する検討

### 4.1 序

タンパク質加水分解乳のうち軽度分解乳に分類される製品は、家族歴などからアレルギーリスクが高いと予想される乳児のために、その免疫原性を低減させた育児用ミルクとして1980年代に開発されたものである<sup>28)</sup>。現在、軽度分解乳のアレルギー予防に関する臨床的根拠は必ずしも十分ではないが<sup>32)</sup>、ミルクに含まれる牛乳タンパク質を風味に大きく影響しない程度に加水分解することで、その感作リスクの低減が図られている。軽度分解乳やその原料である牛乳タンパク質軽度分解物の免疫原性の検討については多数の報告があり、特に経口投与だけで容易に感作されるモルモットを使ったアナフィラキシー試験の報告が多い<sup>24,51,52)</sup>。本研究で確立したマウスBATは被検動物の感作状態を反映しアナフィラキシー試験の結果と良く相関することから、このような免疫原性の検討においても有用な手法となる可能性がある。

近年、食物アレルギーにおける感作メカニズムの理解において劇的な変化がみられた。従来、食物アレルギーの感作は食事として経口的に摂取したアレルゲンタンパク質が未消化のまま消化管から吸収されることで生じると考えられていた。牛乳タンパク質加水分解乳や配合分解物の免疫原性の検討にモルモット経口感作モデルが多用されてきたのも、そのような考え方に基づくものである。ところが現在では、食物アレルゲンの感作は主に皮膚の炎症部位を介して起こり（経皮感作）、経口的に摂取したアレルゲンに対してはむしろ不応答化する（経口免疫寛容）ことが明らかとなっている<sup>82,83)</sup>。その一方で、タンパク質加水分解乳やその原料である牛乳タンパク質分解物の経皮免疫原性を検討した報告は見当たらない。

そこで本章では、軽度分解乳に配合される乳清タンパク質軽度分解物の免疫原性をマウス経皮感作モデルによって検討するなかで、マウスBATがこのような食品アレルゲンの免疫原性の評価における有用な手法であることの検証をおこなった。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 被検試料

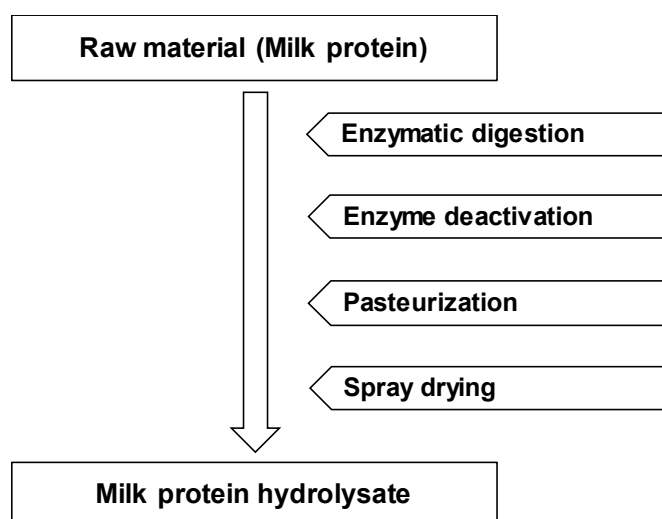
被検試料として以下を使用した。

被検試料① 乳清タンパク質軽度分解物 (PWH1、森永乳業株式会社より入手)

被検試料② 乳清タンパク質軽度分解物 (PWH2、森永乳業株式会社より入手)

被検試料③ 乳清タンパク質濃縮物 (WPC、Milei Gmnh 社製、ドイツ)

PWH1 と PWH2 はいずれも流通する軽度分解乳に、WPC は通常の育児用ミルクに、それぞれ原料として配合されているものである。牛乳タンパク質加水分解物の一般的な製造方法は Fig. 18 に示す通りであるが、PWH2 が微生物由来及び植物性のプロテアーゼに加えてブタの消化酵素を用いて調製されているのに対し、PWH1 は宗教的な要求性からブタ由来酵素を用いずに調製されている。これら被検試料の分子量分布と $\beta$ -LG の抗原性、及びタンパク質分解物についてはその原料と使用した消化酵素の由来を **Table 3** に示す。なお、分子量分布と $\beta$ -LG の抗原性の測定は 3.2.1 に前記した通り。



**Figure 18** The manufacturing process of the milk protein hydrolysates.

**Table 3 Characteristics of test materials in this study.**

	PWH1	PWH2	WPC
Row material	WPC	WPC	—
Source of digestive enzymes	Microbial	Microbial, Botanical, Porcine	—
Molecular weight <sup>a</sup>			
< 200	12	8	0
200-500	36	36	4
500-1,000	22	20	0
1,000-2,000	18	22	0
2,000-5,000	10	10	1
5,000-10,000	1	2	3
10,000 <	1	2	92
Detected milk antigen <sup>b</sup>			
β-LG	2.5 × 10 <sup>3</sup>	2.1 × 10 <sup>3</sup>	3.3 × 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> Samples were analyzed by HPLC. Data are expressed as the percentage of total protein or peptides.

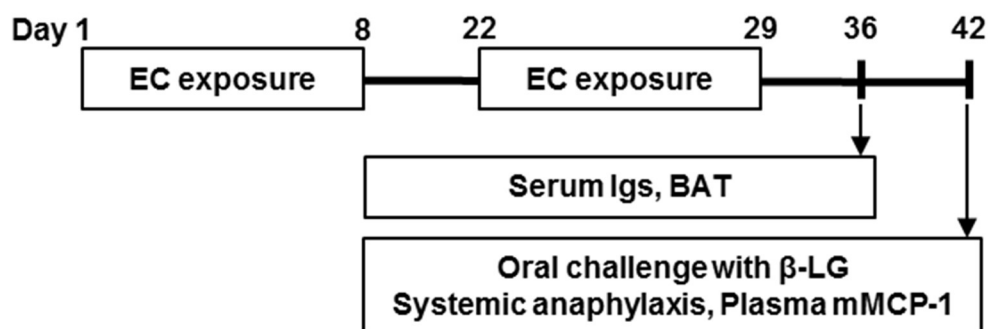
<sup>b</sup> Data are expressed as parts per million of antigenic equivalent β-LG in powder. Commercial ELISA kit was used.

#### 4.2.2 動物

3週齢のSPFグレード雌性BALB/c系マウスを日本クレアより購入した。飼育環境、飼料・飲水は2.2.1に前記した通り。

#### 4.2.3 被検試料の経皮暴露

イソフルラン（日本薬局方、ファイザー社製）麻酔下でマウス（各群 n=8）背部を剃毛し、セロハンテープ（セロテープ、ニチバン社製）による貼剥を6回繰り返したのち、被検試料 3 μg を含む生理食塩水 200 μL を浸み込ませた滅菌ガーゼ（1 cm×1 cm）をマウス 1 匹当たり 2 枚貼付けて医療用ドレッシング材（テガダーム、3M 社製、アメリカ合衆国）で1週間固定した。シヤム群のマウスには、被検試料を含まない生理食塩水を浸み込ませた滅菌ガーゼを同様に貼付け固定した。この操作を2週間間隔で2回実施した。経皮暴露とそれに続く実験操作のスケジュールを Fig. 19 に示す。



**Figure 19 Schematic representation of the experimental design. Mice were exposed to test materials epicutaneously twice at two-week intervals followed by analysis as described in the diagrams. BAT, basophil activation test; EC exposure, epicutaneous exposure.**

#### 4.2.4 マウス血中の $\beta$ -LG 特異的 IgE 及び IgG1 の測定

血清は IgE 測定用として 1/10 に、IgG1 測定用として 1/1,000 にそれぞれ希釈し、1  $\mu$ g/100  $\mu$ L/well の $\beta$ -LG (Sigma-Aldrich 社製) 溶液でコーティングした 96 穴マイクロプレートに添加して 37°C で 1.5 時間保持した。プレートを洗浄後、ビオチン化抗マウス IgE (BD Bioscience 社製; 100 倍希釈) あるいはビオチン化抗マウス IgG1 (同; 10,000 倍希釈) を添加して 37°C でさらに 1.5 時間保持した。プレートを洗浄後、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Streptavidin-POD Conjugate、Roche Diagnostics 社製) を添加して 37°C で 1 時間保持し、さらに基質試薬 (SIGMAFAST-OPD、Sigma-Aldrich 社製) を加えて反応させ、492 nm (対照 630 nm) の吸光度を測定した。

#### 4.2.5 好塩基球活性化試験

BAT は 100 ng/mL の $\beta$ -LG (Sigma-Aldrich 社製) を刺激用抗原とし、第 2 章に記した手順に従って実施した。

#### 4.2.6 アナフィラキシー試験

50 mg の $\beta$ -LG（既報<sup>62)</sup>に従って調製）を溶解させた PBS 200  $\mu$ L をゾンデにて胃内投与し、デジタル温度計で直腸体温を計測することでアナフィラキシー反応を評価した。また、抗原の経口負荷から 60 分後に尾静脈より採血し、血漿中の mouse mast cell protease (mMCP)-1 を市販 ELISA キット（Thermo Fisher Scientific 社製、アメリカ合衆国）を用いて定量した。

#### 4.2.7 統計解析

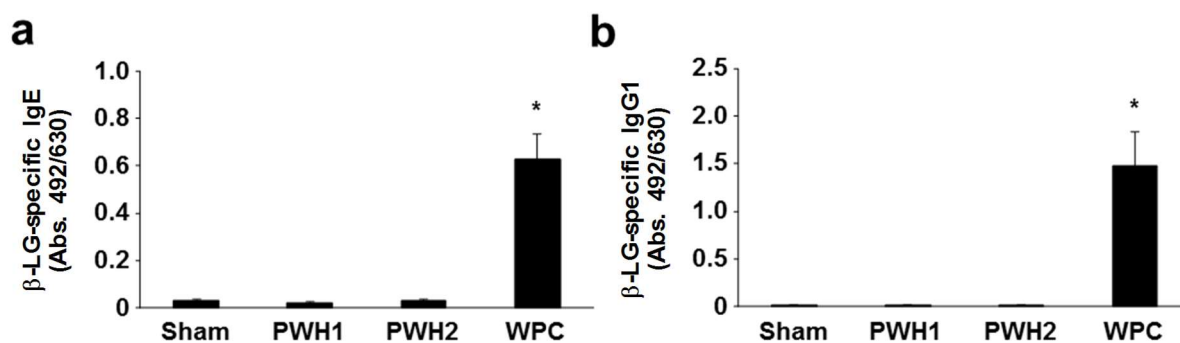
統計解析ソフトウェア（JMP ver.13.0、SAS Institute 社製）を用い、一元配置分散分析のうえ Tukey の多重検定をおこなった。 $p$  値 0.05 未満を有意とした。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 マウス血中の $\beta$ -LG 特異的 IgE 及び IgG1

被検試料を経皮暴露させたマウスの感作状態を調べるため、2 回目の経皮暴露から 7 日後にマウス尾静脈より採血し、血中の $\beta$ -LG 特異的 IgE 及び IgG1 を測定した。

WPC を経皮暴露させたマウス血中では、 $\beta$ -LG 特異的 IgE 及び IgG1 の著明な上昇が認められた。一方、PWH1 あるいは PWH2 を経皮暴露したマウスでは、シャム群と比較して有意な $\beta$ -LG 特異的 IgE 及び IgG1 の上昇は認められなかった。（Fig. 20）



**Figure 20** Production of antigen-specific antibodies in epicutaneously exposed mice.

One week after the second exposure, blood samples were collected and the serum levels of  $\beta$ -LG-specific IgE (a) and IgG1 (b) were measured by ELISA.

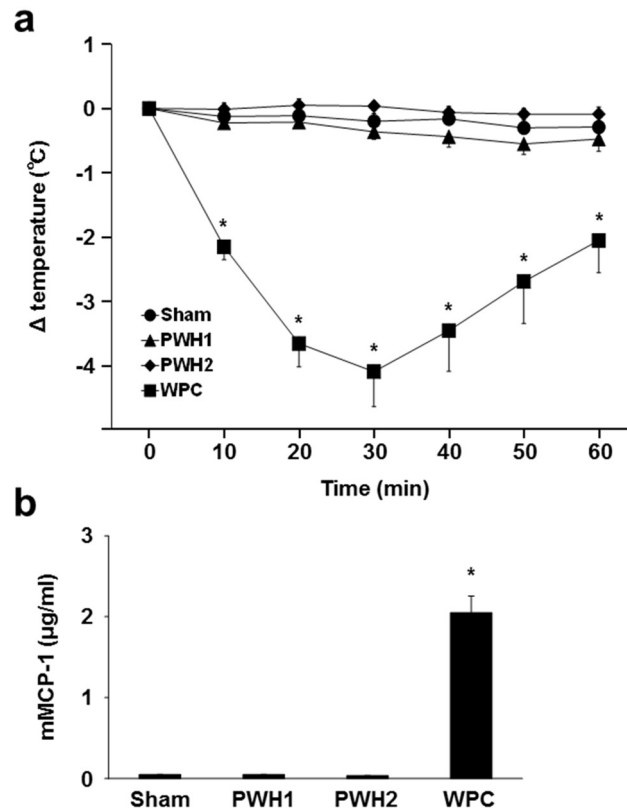
Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Asterisks indicate significant differences compared to the Sham group.



#### 4.3.2 アナフィラキシー試験

被検試料を経皮暴露させたマウスの感作状態を調べるため、2 回目の経皮暴露から 13 日後のマウスに抗原を経口負荷し、アナフィラキシー試験をおこなった。

WPC を経皮暴露させたマウスでは、 $\beta$ -LG の経口負荷によって直腸体温が著明に低下し全身性のアナフィラキシー反応が認められた。それに伴い、 $\beta$ -LG 経口負荷 60 分後に採取した血中には、マスト細胞の脱顆粒を示す mMCP-1 の著明な上昇も認められた。一方、PWH1 あるいは PWH2 を経皮暴露させたマウスでは、シャム群と比較して有意な直腸体温低下や血中 mMCP-1 上昇は認められなかった。(Fig. 21)

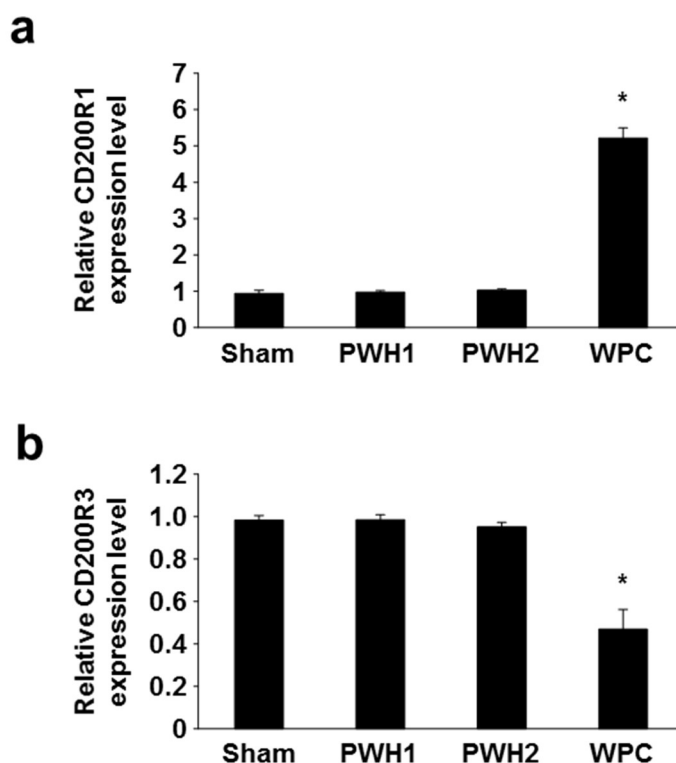


**Figure 21** Anaphylactic reaction in mice induced by  $\beta$ -LG oral challenge after the second epicutaneous exposure to test materials. (a) Rectal temperature changes in mice after challenge with 50 mg of  $\beta$ -LG were analyzed. Asterisks indicate significant differences at each time point compared to Sham group. (b) Plasma concentrations of mMCP-1 at 60 min after oral challenge. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Asterisk indicates significant difference compared to the Sham group.

#### 4.3.3 好塩基球活性化試験

血中 $\beta$ -LG 特異的 IgE、IgG1 抗体価、及びアナフィラキシー試験との相関を調べるため、2 回目の経皮暴露から 7 日後にマウス尾静脈より採血し、BAT をおこなった。

WPC を経皮暴露させたマウスでは、 $\beta$ -LG の刺激によって好塩基球上の CD200R1 の発現上昇と CD200R3 の発現低下が認められた。一方、PWH1 あるいは PWH2 を経皮暴露したマウスでは、シャム群と比較して CD200R1 及び CD200R3 の有意な発現変化は認められなかった。(Fig. 22)



**Figure 22 Basophil activation response in epicutaneously exposed mice. One week after the second exposure, surface expression of CD200R1 (a) and CD200R3 (b) on basophils from heparinized blood was analyzed by flow cytometry after incubation with or without 100 ng/mL  $\beta$ -LG and presented as relative expression levels. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Asterisks indicate significant differences compared to the Sham group.**

#### 4.4 考察

テープストリッピングと WPC の経皮暴露によってマウスは $\beta$ -LG に感作され、抗原特異的な IgE 及び IgG1 の上昇 (Fig. 20)、抗原負荷によるアナフィラキシー反応 (Fig. 21) が認められたのに対し、PWH1 あるいは PWH2 の経皮暴露ではそれらが認められず、これら乳清タンパク質軽度分解物の経皮免疫原性が著明に低減していることが確認された。BAT の結果も血中特異 IgE・IgG1 抗体価やアナフィラキシー反応性と完全に一致し、PWH1 や PWH2 の経皮免疫原性が低いことを示していた (Fig. 22)。即ち、BAT は抗体価測定やアナフィラキシー試験と同様にマウスの感作状態をよく反映し、被検試料のような食品素材の免疫原性評価に有用であることが確かめられた。

さらにマウス BAT は、①抗体価測定よりも生体反応に近い評価であること、②アナフィラキシー試験と異なり被検動物に与えるインパクトが小さく同一個体に対して繰り返し実施できる可能性があること、から、これら二つの従来の評価方法よりも有用性が高いとも考えられる。一方で、本研究では被検試料の経皮暴露量を一用量 ( $6\ \mu\text{g} \times 2$  回) しか設定しておらず、用量依存性が確認できていない。そのため各評価法の感度については比較ができておらず、その点は今後の課題である。

#### 4.5 小括

乳清タンパク質 (WPC) やその分解物 (PWH1、PWH2) を経皮暴露したマウスの BAT の結果は、血中の抗原特異的抗体価測定やアナフィラキシー試験の結果とよく一致し、マウス BAT がこのような食品素材の免疫原性の評価に有用であることが示された。

## 第 5 章 マウス好塩基球活性化試験を用いた牛乳タンパク質加水分解物の経口免疫寛容誘導能の評価に関する検討

### 5.1 序

食物アレルギーは経口免疫寛容が破綻または欠如した状態ということができる。近年、乳児期の適切な段階でアレルゲンに暴露されることが、その暴露を遅らせることよりも食物アレルギーの発症を抑えることが明らかとなってきたが<sup>84-86</sup>、このような知見も経口免疫寛容の誘導が食物アレルギーを防ぐ上で重要であることを示すものである。さらには、従来はアレルゲンを除去しながら自然寛解を待つ（除去食療法）以外になかった食物アレルギーでも、積極的にアレルゲンを摂取して寛容を誘導する経口免疫療法が試みられ、その効果や安全性に課題は残るものの、盛んに取り組まれている<sup>87-89</sup>。

このように食物アレルギーの予防、治療に大きく関与する経口免疫寛容が、アレルゲン性を低減させた加水分解乳の摂取によっても誘導されるか否かは極めて興味深い問題である。軽度分解乳はアレルギーリスクの高い乳児が摂取しても感作され難いよう免疫原性が低減されており、そのことは本研究の第 4 章でも確かめられているが、低免疫原性であるだけでなく、適切に経口免疫寛容を誘導できることがその後の牛乳アレルギー発症を防ぐ上で重要と考えられる。また、牛乳アレルギーの除去食療法で用いられる高度分解乳（アレルギー用ミルク）においては、症状を抑えながら寛容を誘導できるのであれば、治療上極めて有用と考えられる。

そこで本章では、高度分解乳に配合される乳清タンパク質高度分解物、及び軽度分解乳に配合される乳清タンパク質軽度分解物について、それらの経口免疫寛容誘導能をマウス経皮感作モデルを用いて検討した。さらに、臨床的には牛乳アレルギーの原因は乳清タンパク質よりもカゼインによることが多いと報告されていることから<sup>90,91</sup>、カゼイン軽度分解物についても同様に検討をおこなった。これらの検討のなかで、マウス BAT がこのような食品素材の免疫寛容誘導能の評価においても有用な手法であることを検証した。

## 5.2 材料と方法

### 5.2.1 被検試料

被検試料として以下を使用した。

被検試料① 乳清タンパク質高度分解物 (EWH、森永乳業株式会社より入手)

被検試料② 乳清タンパク質軽度分解物 (PWH1、森永乳業株式会社より入手)

被検試料③ 乳清タンパク質軽度分解物 (PWH2、森永乳業株式会社より入手)

被検試料④ 乳清タンパク質濃縮物 (WPC、Milei Gmnh 社製、ドイツ)

被検試料⑤ カゼイン軽度分解物 (CNH、森永乳業株式会社より入手)

被検試料⑥ カゼインナトリウム (CN、Tatua 社製、ニュージーランド)

EWH は消費者庁より「特別用途食品 病者用食品 (アレルゲン除去食品)」の表示許可<sup>80)</sup>を得てアレルギー用ミルクとして流通する製品に配合されたものである。PWH1、PWH2、WPC は第4章の被検試料と同じものを使用した。CNH は流通する軽度分解乳に、CN は通常の育児用ミルクに、それぞれ原料として配合されたものである。これら被検試料のうち、各種分解物について

**Table 4 Characteristics of cow's milk protein hydrolysates in this study.**

	Whey protein hydrolysate			CN hydrolysate
	EWH	PWH1	PWH2	CNH
Row material	WPC	WPC	WPC	Casein
Source of digestive enzymes	Microbial, Porcine	Microbial	Microbial, Botanical, Porcine	Microbial
Molecular weight <sup>a</sup>				
< 200	12	12	8	14
200-500	45	36	36	48
500-1,000	25	22	20	20
1,000-2,000	15	18	22	13
2,000-5,000	3	10	10	5
5,000-10,000	0	1	2	0
10,000 <	0	1	2	0
Detected milk antigen <sup>b</sup>				
β-LG	< 0.5	2.5 × 10 <sup>3</sup>	2.1 × 10 <sup>3</sup>	n.d.
CN	n.d.	n.d.	n.d.	5.2 × 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> Samples were analyzed by HPLC. Data are expressed as the percentage of total peptides.

<sup>b</sup> Data are expressed as parts per million of antigenic equivalent proteins in powder. Commercial ELISA kits were used. n.d.; no data.

はその原料と使用した消化酵素の由来、分子量分布及び残存抗原性を **Table 4** に示す。なお、分子量分布と残存抗原性の測定は 3.2.1 に前記した通り。

## 5.2.2 動物

4 週齢の SPF グレード雌性 BALB/c 系マウスを日本クレアより購入した。飼育環境、飼料・飲水は 2.2.1 に前記した通り。

## 5.2.3 被検試料の経口摂取による免疫寛容の誘導

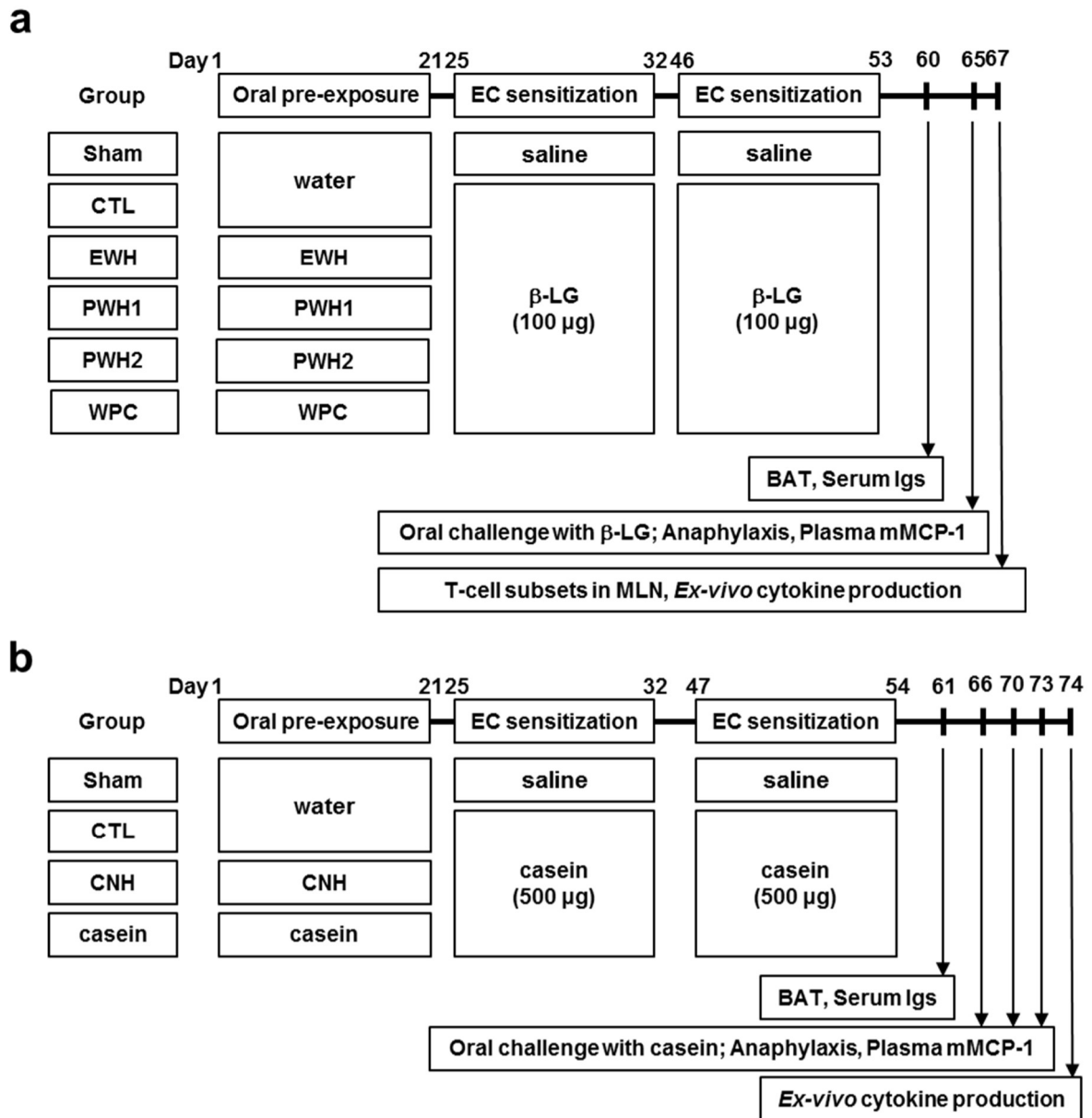
1 週間の予備飼育後、各群 8 匹のマウス（5 週齢）に対して各種被検試料の 6%（w/v）水溶液を飲水として 21 日間自由摂取させた。シャム群及び対照群（各 8 匹）のマウスには、飲水として水道水のみを自由摂取させた。固形飼料には牛乳成分を含まないラボ MR ストックを継続して自由摂取させた。被検試料の経口投与を含めて一連の実験スケジュールを **Fig. 23** に示す。

## 5.2.4 抗原の経皮暴露

被検試料の自由摂取終了 4 日後（25 日目）から、シャム群を除く全てのマウスに対して 4.2.3 に記した手順に従って $\beta$ -LG あるいはカゼイン（いずれも既報<sup>62) 81)</sup>に従って生乳より調製）を経皮暴露させた。なお暴露量は、予備検討の上、 $\beta$ -LG が 1 回 100  $\mu$ g / 匹、カゼインが 1 回 500  $\mu$ g / 匹とした。シャム群のマウスには、抗原を含まない生理食塩水を用いて同様に操作した。

## 5.2.5 マウス血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 の測定

2 回目の経皮暴露から 7 日後（60 あるいは 61 日目）にマウス尾静脈より採血し、血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 を ELISA 法により測定した。ELISA は 4.2.4 に記した通りおこなったが、カゼインを経皮暴露したマウスでは、血清の希釈を IgE 測定用で 1/30、IgG1 測定用で 1/5,000 とし、1  $\mu$ g/100  $\mu$ L/well のカゼイン（生乳より調製<sup>81)</sup>）溶液でコーティングした 96 穴マイクロプレートを使用した。



**Figure 23 Schematic representation of the experimental design for whey protein hydrolysates (a) and that for casein hydrolysate (b). Mice were given water alone (Sham and CTL group) or test materials in the water to induce oral tolerance followed by epicutaneous sensitization. Parameters were analyzed as described in the diagram. BAT, basophil activation test; CTL, control; EC sensitization, epicutaneous sensitization; MLN, mesenteric lymph node; Sham, Sham-sensitized.**

### 5.2.6 好塩基球活性化試験

2回目の経皮暴露から7日後（60あるいは61日目）にマウス尾静脈より採血し、第2章に記した手順に従ってBATをおこなった。好塩基球の活性化は、 $\beta$ -LG暴露マウスに対しては100 ng/mLの $\beta$ -LG（Sigma-Aldrich社製）を、カゼイン暴露マウスに対しては300 ng/mLのカゼイン（生乳より調製<sup>81)</sup>）をそれぞれ用いた。

### 5.2.7 アナフィラキシー試験

2回目の経皮暴露から12日後（65あるいは66日目）に抗原を経口負荷し、前記4.2.6の手順に従ってアナフィラキシー試験をおこなった。ただしカゼインを経皮暴露したマウスに対しては、初回（66日目）25 mg、その後3~4日毎（70、73日目）に50 mgずつ、計3回のカゼイン負荷をおこなった。

### 5.2.8 リンパ組織における制御性T細胞及び活性化T細胞の解析

$\beta$ -LG暴露マウスでは2回目の経皮暴露から14日後（67日目）にマウスを安楽死させ、腸間膜リンパ節（mesenteric lymph node ; MLN）を採取した。カゼイン暴露マウスでは2回目の経皮暴露から20日後（74日目）に同様に脾臓とMLNを採取した。それぞれ組織を氷冷下RPMI1640培地（Thermo Fisher Scientific社製）中でほぐした後、70  $\mu$ mセルストレイナー（Corning社製、アメリカ合衆国）でろ過し、さらに脾臓細胞についてはACK溶血緩衝液（155 mM NH<sub>4</sub>Cl、10 mM KHCO<sub>3</sub>、0.1 mM EDTA）を用いて赤血球を溶血させた。10%ウマ血清を含むRPMI1640培地中で細胞をFITC標識抗マウスCD4（clone RM4-5）、PE標識抗マウスCD25（clone PC61、どちらもBD Bioscience社製）、及びPerCP/Cy5.5標識抗ヒト/マウス/ラットICOS（clone C398.4A、Biolegend社製）によって染色した。さらにFoxp3 staining buffer set（Thermo Fisher Scientific社製）を用いてAPC標識抗Foxp3（clone FJK-16、BD Bioscience社製）で染色、固定し、フローサイトメーター（FACSCanto II、BD Bioscience社製）で測定した。

### 5.2.9 抗原刺激後のリンパ組織における制御性T細胞及び活性化T細胞の解析

前記5.2.8のリンパ組織T細胞の解析において、 $\beta$ -LG暴露マウスのMLNについては、一部



の細胞を 1 mg/mL の $\beta$ -LG 有無の条件で 24 時間培養し、同様に染色、固定してフローサイトメーターで測定する検討もおこなった。

#### 5.2.10 リンパ組織への抗原刺激によるサイトカイン産生の検討

前記 5.2.8 の通り得たリンパ組織細胞の一部を、10%ウマ血清と 2 mM L-グルタミン (Sigma-Aldrich 社製)、100 IU/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン (いずれも Meiji Seika ファルマ社製) を含む RPMI1640 培地中で  $4 \times 10^5$  cells/well に調製した。これを、 $\beta$ -LG 暴露マウスでは 1 mg/mL の $\beta$ -LG 有無の条件で 60 時間、カゼイン暴露マウスでは 5 mg/mL のカゼイン有無の条件で 96 時間、それぞれ培養し、上清中のサイトカインをマルチプレックス法で測定した。マルチプレックスキットは、 $\beta$ -LG 暴露マウスに対しては Magnetic Luminex Assay (R&D Systems 社製、アメリカ合衆国) を、カゼイン暴露マウスに対しては Milliplex<sup>®</sup> Map Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck KGaA 社製、ドイツ) をそれぞれ使用し、添付の手順書に従って解析用ソフトウェア Bio-Plex<sup>®</sup> Manager Software 5.0 を搭載した Bio-Plex<sup>®</sup> 200 System (BIO-RAD 社製、アメリカ合衆国) で測定した。ただし、マルチプレックス法の検出限界を下回った一部のサイトカインでは、市販 ELISA キット (Biolegend 社製、あるいは Thermo Fisher Scientific 社製) を使用した。

#### 5.2.11 統計解析

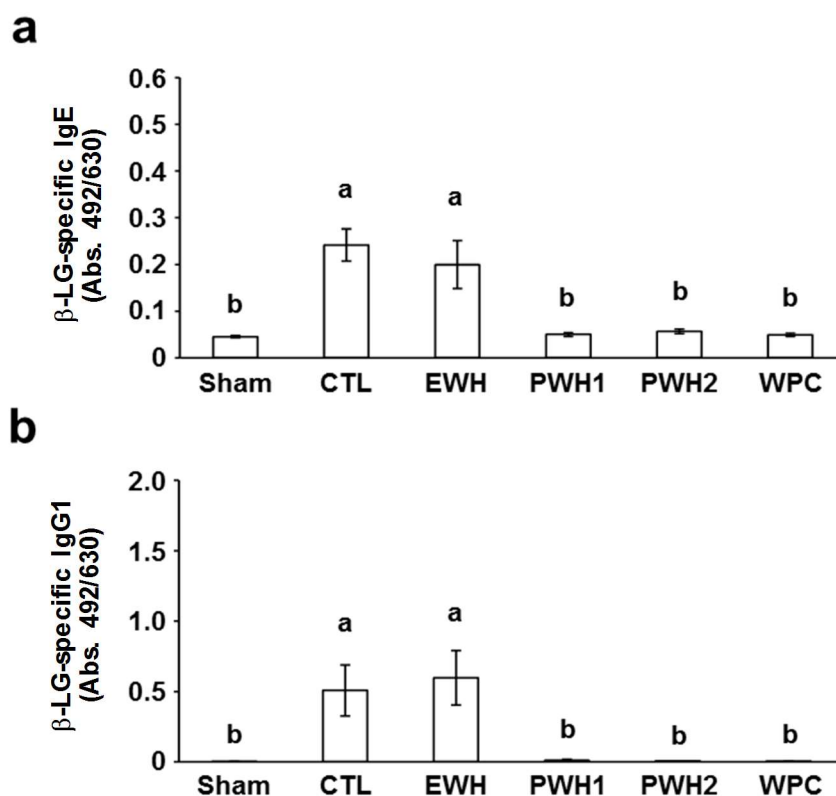
統計解析ソフトウェア (JMP ver.13.0) を用い、 $p$  値 0.05 未満を有意とした。

### 5.3 結果

#### 5.3.1 血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1

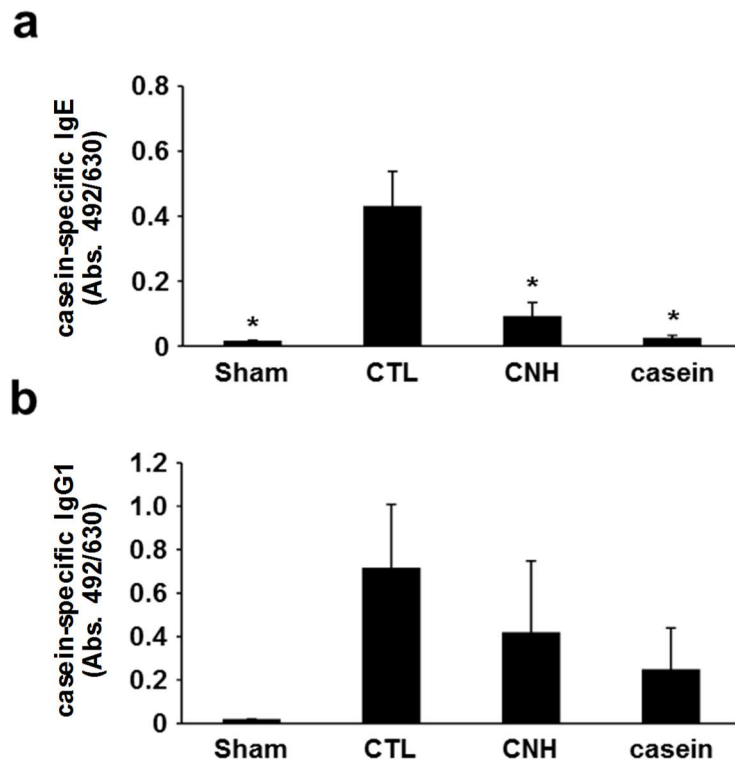
マウスの感作状態から経口免疫寛容が誘導されたか否かを検討するため、血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 を測定した。まず $\beta$ -LG 暴露マウスについて、対照群で見られた $\beta$ -LG 特異的 IgE、IgG1 の有意な上昇が WPC を飲水として摂取させた群では認められなかった。PWH1 あるいは PWH2 の摂取群でも、WPC 摂取群と同様に $\beta$ -LG 特異的 IgE、IgG1 の上昇が抑えられていた。

一方 EWH 摂取群では、対照群と同様に $\beta$ -LG 特異的 IgE、IgG1 の上昇が認められた (Fig. 24)。



**Figure 24** Effect of EWH, PWH1, PWH2, or WPC feeding prior to epicutaneous sensitization on specific antibodies. The levels of  $\beta$ -LG-specific IgE (a) and IgG1 (b) were measured by ELISA. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test. Means without a common letter differ significantly.

次にカゼイン暴露マウスでも、カゼインあるは CNH を飲水として経口摂取させたマウスでは、対照群マウスに比べてカゼイン特異的 IgE の上昇が有意に抑えられていた。しかしながら、カゼイン特異的 IgG1 では有意な差は認められなかった。(Fig. 25)

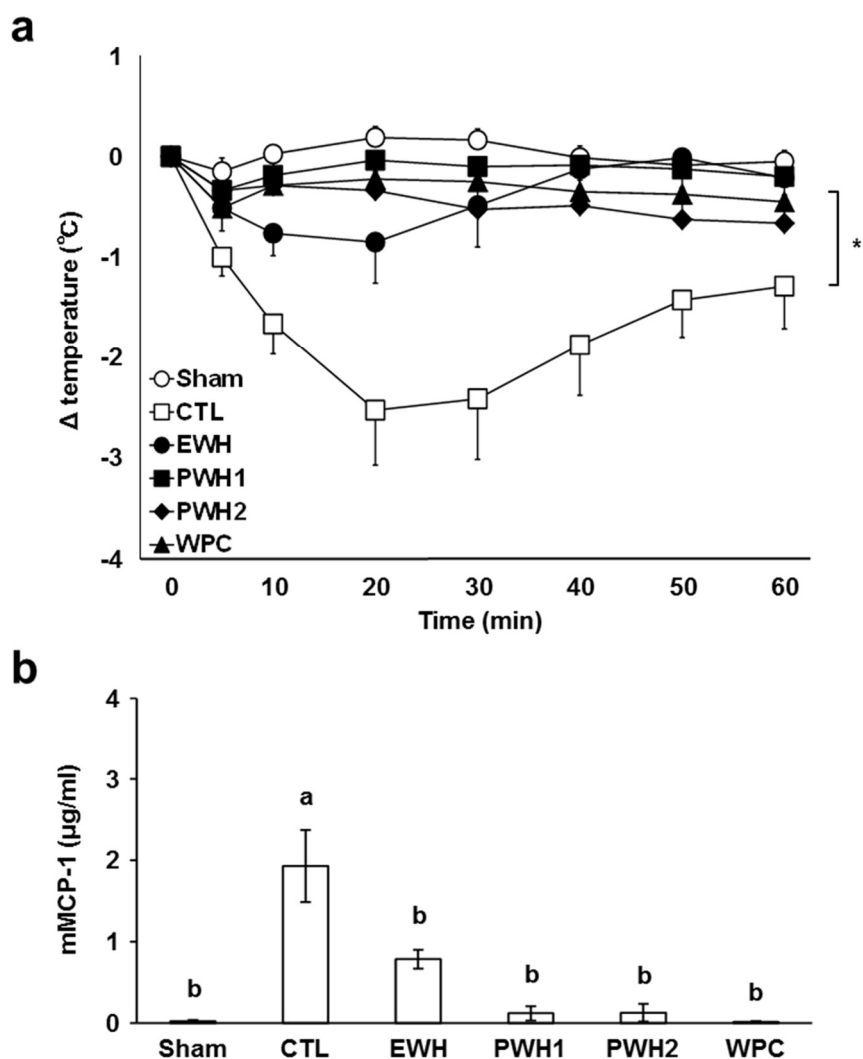


**Figure 25** Effect of CNH or casein feeding prior to epicutaneous sensitization on specific antibodies. The levels of casein-specific IgE (a) and IgG1 (b) were measured by ELISA. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Comparisons to CTL mice were analyzed by Dunnett's test. Asterisks indicate significant differences.

### 5.3.2 アナフィラキシー試験

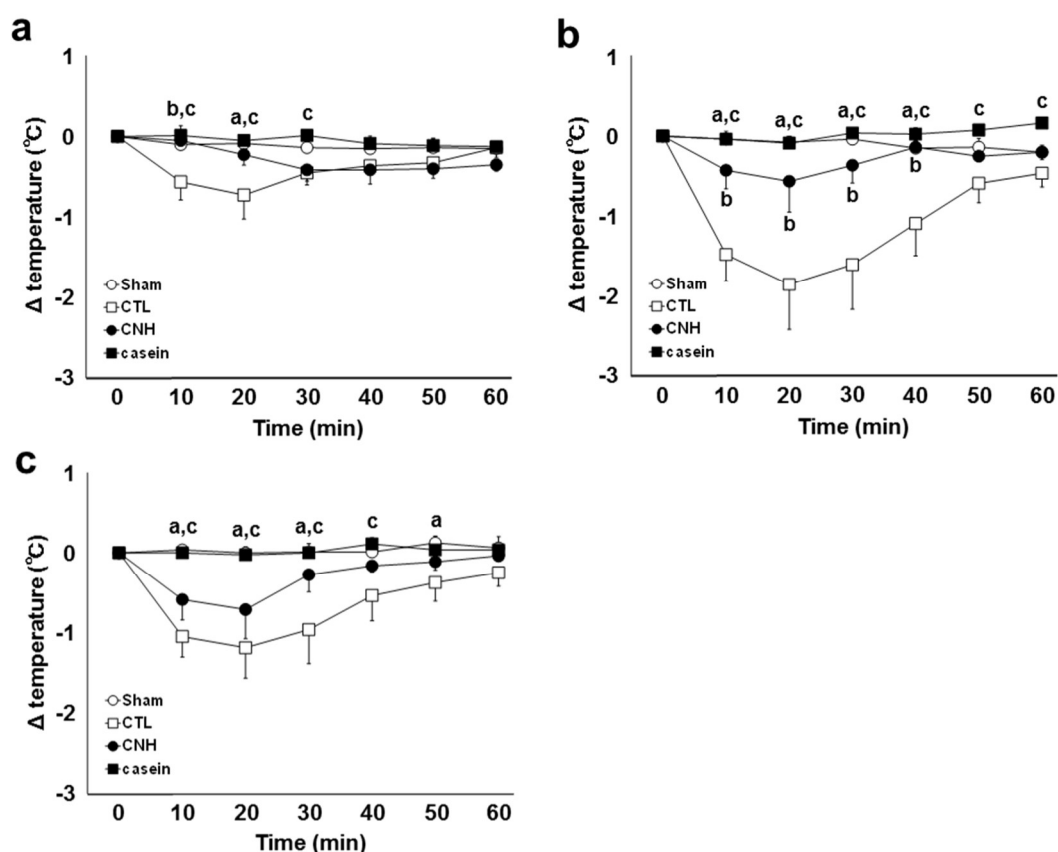
マウスのアレルギー反応から経口免疫寛容が誘導されたか否かを検討するため、アナフィラキシー試験をおこなった。まず $\beta$ -LG 暴露マウスについて、50 mg の $\beta$ -LG 負荷により対照群では直腸体温の著明な低下を認めたが、WPC を飲水として摂取させた群ではそれが抑えられていた。PWH1 あるいは PWH2 の摂取群でも、WPC 摂取群と同様に直腸体温の低下は抑えられていた。EWH 摂取群では、抗原負荷 10~20 分後の時点で僅かに直腸体温が低下したが全体的に抑えられており、シャム群との間に有意な差は認められなかった (**Fig. 26a**)。

血中 mMCP-1 の値も直腸体温低下と同様な傾向であり、WPC、PWH1、PWH2 摂取群では対照群のような有意な上昇は見られなかった。EWH 摂取群も平均値ではやや高かったものの、シヤム群に比して有意な上昇は認められなかった (Fig. 26b)。



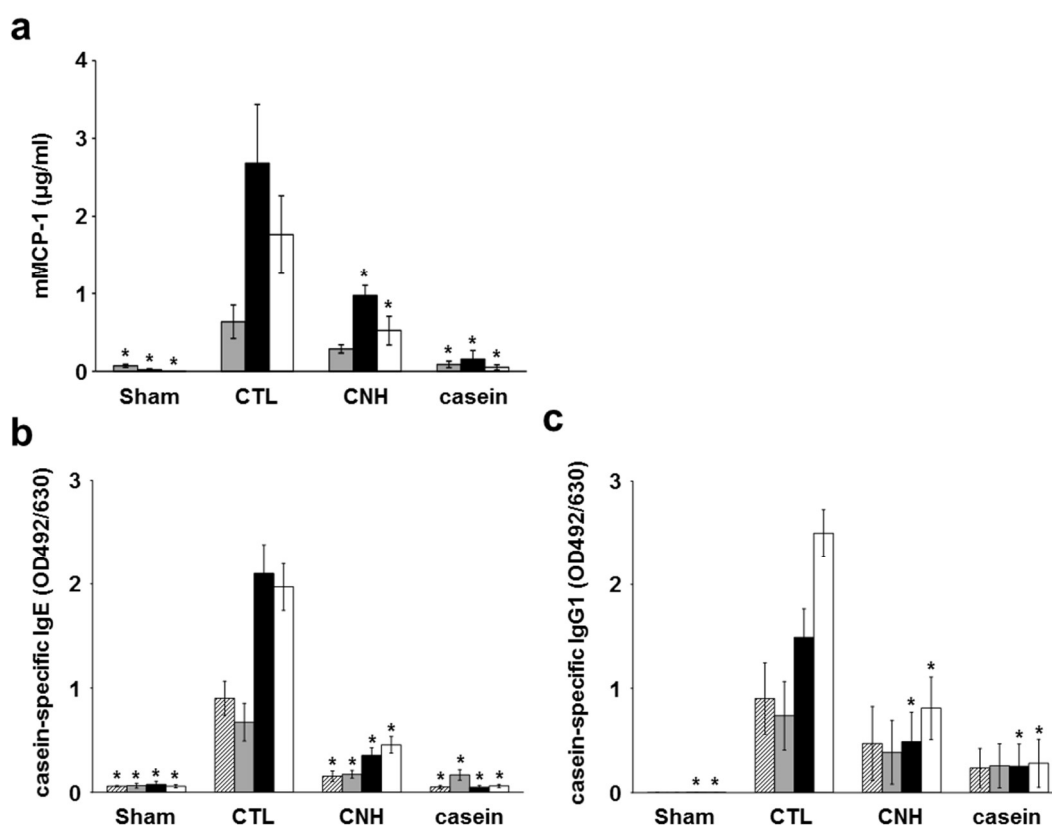
**Figure 26** Effect of EWH, PWH1, PWH2, or WPC feeding prior to epicutaneous sensitization on allergic response to  $\beta$ -LG after oral challenge. (a) Rectal temperature changes in mice after challenge with 50 mg of  $\beta$ -LG were analyzed. Asterisk indicates significant difference compared to the CTL group in each time point between 10 and 40 min. (b) Plasma concentrations of mMCP-1 at 60 min after oral challenge. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Means without a common letter differ significantly.

次にカゼイン暴露マウスでも、カゼイン 25 mg を負荷した 1 回目のアナフィラキシー試験 (66 日目) において、対照群では直腸体温の低下が認められ、カゼインあるいは CNH を飲水として摂取させた群ではそれが抑えられていることが確認できた (Fig. 27a)。しかしながら直腸体温低下の程度が対照群においても僅かであったことから、カゼインの負荷量を 50 mg に倍増して 2 回目 (70 日目)、3 回目 (73 日目) のアナフィラキシー試験をおこなった。その結果、2 回目の負荷では対照群における著明な直腸体温低下を認めた一方で、カゼインあるいは CNH の摂取群における直腸体温低下の有意な抑制は維持されていた (Fig. 27b)。しかしながら 3 回目の負荷では逆に直腸体温低下の程度は減弱し、CNH 摂取群と対照群との間に有意差が見られなくなった (Fig. 27c)。



**Figure 27** Effect of CNH or casein feeding prior to epicutaneous sensitization on allergic response to casein after oral challenge. (a) Rectal temperature changes in mice after the first challenge with 25 mg of casein. (b, c) Rectal temperature changes after the second and third challenges with 50 mg casein, respectively. Letters indicate significant differences: a, sham vs. CTL; b, CNH vs. CTL; c, casein vs. CTL.

血中 mMCP-1 も、対照群では 3 回全てのカゼイン負荷において著明な上昇が認められたのに対し、カゼインあるいは CNH の摂取群では、CNH 摂取群の 1 回目負荷時を除き、いずれもその上昇が有意に抑えられていた (Fig. 28a)。mMCP-1 測定用に採取した血漿中のカゼイン特異的 IgE 抗体価も、カゼインあるいは CNH を摂取させた両群で、3 回全てにおいて対照群より有意に低値であった (Fig. 28b)。2 回目と 3 回目の負荷時にはカゼイン特異的 IgG1 抗体価も有意に低値であった (Fig. 28c)。



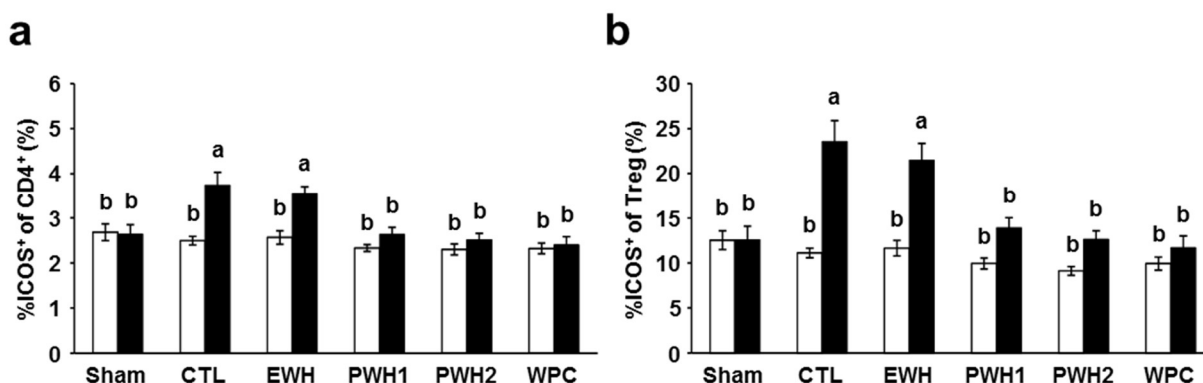
**Figure 28** Effect of CNH or casein feeding prior to epicutaneous sensitization on allergic response to casein after oral challenge. Mice were challenged with 25 mg (first challenge) or 50 mg (second and third challenge) of casein. Plasma concentration of mMCP-1 (a), and the levels of casein-specific IgE (b), and IgG1 (c) at 60 min after the first (gray bars), second (black bars), and third (white bars) oral challenge. Hatched bars in (b) and (c) indicate serum sample of casein-specific IgE and IgG1, respectively. The serum samples are the same as those in Fig. 23 and were reanalyzed with the plasma samples. Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Comparisons to CTL mice were analyzed by Dunnett's test. Asterisks indicate significant differences.

### 5.3.3 リンパ組織における制御性 T 細胞及び活性化 T 細胞の解析

免疫寛容の誘導をより詳細に検討するため、リンパ組織における制御性 T 細胞と活性化 T 細胞のポピュレーションを解析した。CD4 陽性細胞中に占める CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞（制御性 T 細胞）と ICOS 陽性細胞（活性化 T 細胞）の割合は、 $\beta$ -LG 暴露マウス、カゼイン暴露マウス共に、対照群と各被検試料摂取群で差を認めなかった（データ省略）。

### 5.3.4 抗原刺激後のリンパ組織における制御性 T 細胞及び活性化 T 細胞の解析

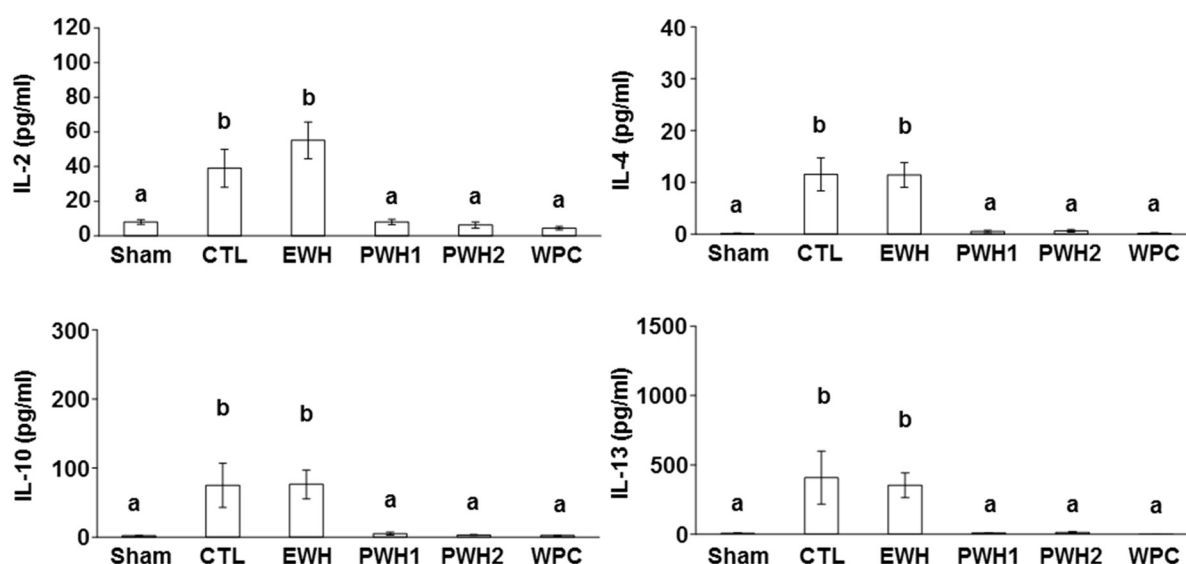
免疫寛容の誘導をより詳細に検討するため、 $\beta$ -LG 暴露マウスから採取した MLN 細胞を $\beta$ -LG で刺激培養し、制御性 T 細胞と活性化 T 細胞のポピュレーションを解析した。対照群の MLN では、24 時間の $\beta$ -LG 刺激によって CD4 陽性細胞中の ICOS 陽性細胞（活性化 T 細胞）の割合、CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞中の ICOS 陽性細胞（制御性 T 細胞の活性化）の割合がそれぞれ上昇したが、WPC、PWH1 あるいは PWH2 を摂取させた群ではそれらが抑えられていた。一方、EWH 摂取群では対照群と同様に $\beta$ -LG 刺激による制御性 T 細胞も含めた T 細胞の活性化が認められた（Fig. 29）。



**Figure 29** Effect of EWH, PWH1, PWH2, or WPC feeding prior to epicutaneous sensitization on ex vivo T-cell activation. MLN cells were incubated with or without  $\beta$ -LG for 24 h. The percentages of ICOS<sup>+</sup> cells in both CD4<sup>+</sup> lymphocytes (a) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells (b) incubated with (black bar) or without (white bar)  $\beta$ -LG were determined. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of n = 7 in Sham and CTL groups and n = 8 in the other groups. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test. Means without a common letter differ significantly.

### 5.3.5 リンパ組織への抗原刺激によるサイトカイン産生

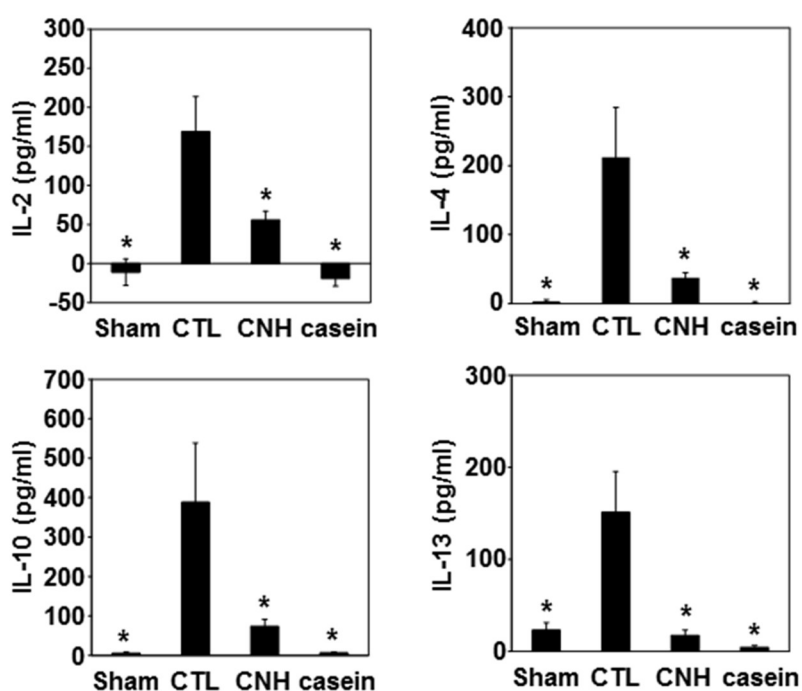
免疫寛容の誘導をより詳細に検討するため、採取したリンパ組織を抗原で刺激し、培養上清中に産生されたサイトカインを解析した。まず $\beta$ -LG 暴露マウスの MLN では、対照群で認められた各種サイトカインの著明な上昇が WPC、PWH1 あるいは PWH2 を摂取させた群では抑えられていた。一方、EWH 摂取群では対照群と同様に $\beta$ -LG 刺激によって各種サイトカインの有意な上昇が認められた。IL-2、IL-4、IL-10 及び IL-13 の結果について **Fig. 30** に示す。



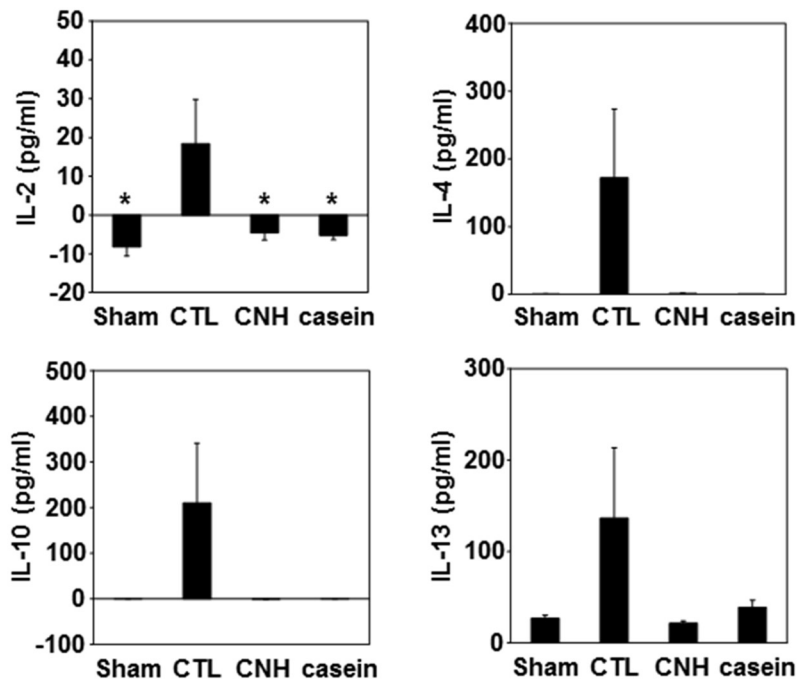
**Figure 30** Effect of EWH, PWH1, PWH2, or WPC feeding prior to epicutaneous sensitization on ex vivo cytokine production. MLN cells were incubated with or without  $\beta$ -LG for 60 h. After subtracting the background cytokine levels, data are shown as the mean  $\pm$  SEM of  $n = 7$  in CTL group and  $n = 8$  in the other groups. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test. Means without a common letter differ significantly.



次にカゼイン暴露マウスでも、脾臓、MLN からの各種サイトカイン産生は、カゼインあるいは CNH の摂取群で抑えられていた (Fig. 31、Fig. 32)。



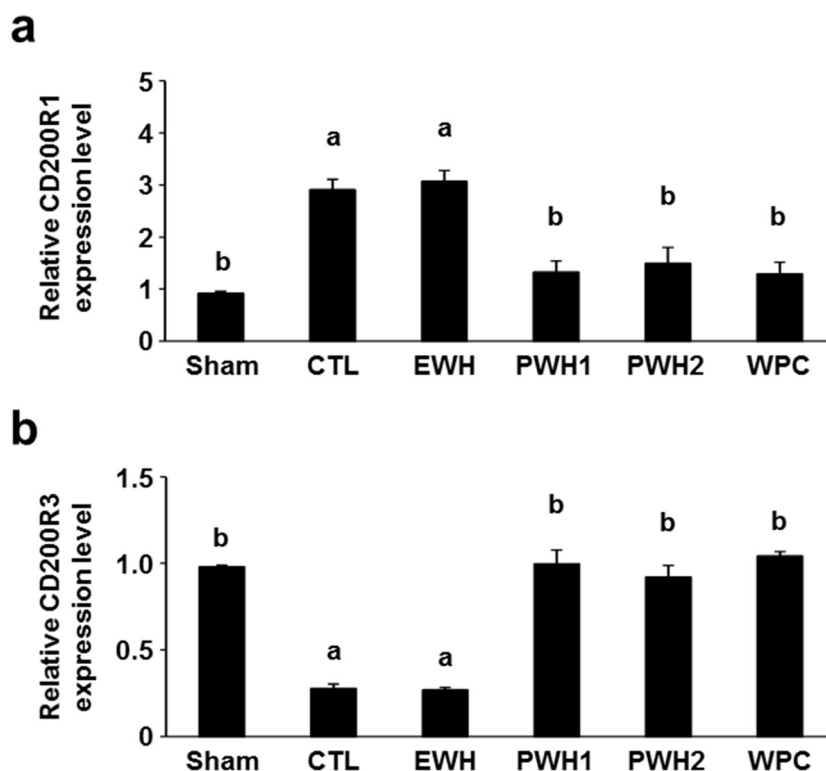
**Figure 31** Effect of CNH or casein feeding prior to epicutaneous sensitization on ex vivo cytokine production. Spleen cells were incubated with or without casein for 96 h. After subtracting the background cytokine levels, data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Comparisons to CTL mice were analyzed by Dunnett's test. Asterisks indicate significant differences.



**Figure 32** Effect of CNH or casein feeding prior to epicutaneous sensitization on ex vivo cytokine production. MLN cells were incubated with or without casein for 96 h. After subtracting the background cytokine levels, data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Comparisons to CTL mice were analyzed by Dunnett's test. Asterisks indicate significant differences.

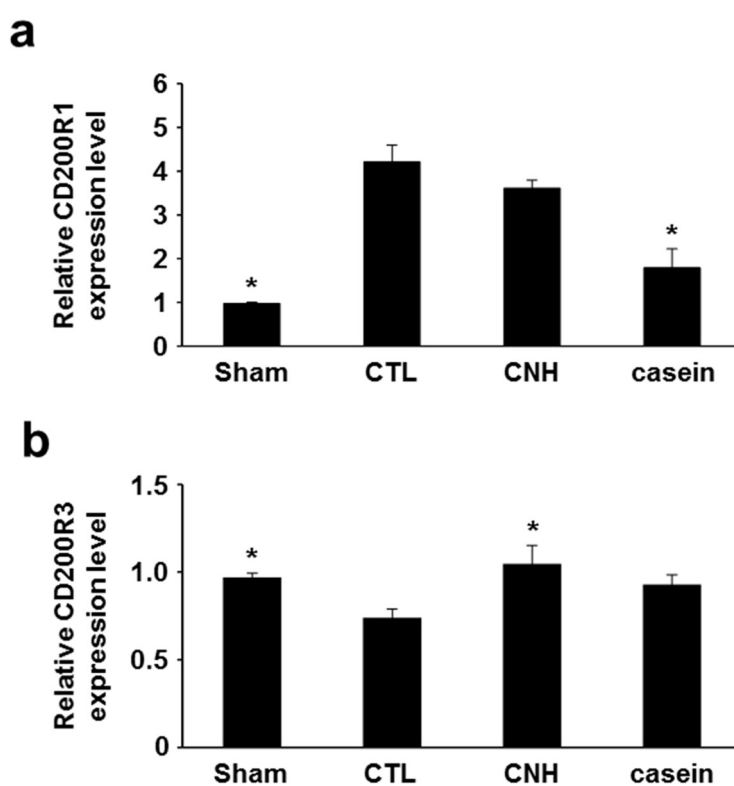
### 5.3.6 好塩基球活性化試験

抗原特異的抗体価やアナフィラキシー試験、リンパ組織の解析から得られたマウスの免疫寛容状態に関わるデータとの相関を調べるため、BAT を実施した。まず $\beta$ -LG 暴露マウスについて、 $\beta$ -LG の刺激によって対照群で好塩基球上の CD200R1 の発現上昇と CD200R3 の発現低下が認められたが、WPC を経口摂取させたマウスではいずれの変化も認められなかった。PWH1 あるいは PWH2 を経口摂取させたマウスでも、WPC 摂取群と同様に、シャム群と比較して有意な CD200R1、CD200R3 の発現変化は認められなかった。一方、EWH 摂取群では、対照群と同様に CD200R1 の発現上昇と CD200R3 の発現低下が認められた (Fig. 33)。



**Figure 33** Effect of EWH, PWH1, PWH2, or WPC feeding prior to epicutaneous sensitization on basophil activation response. Surface expression of CD200R1 (a) and CD200R3 (b) on basophils from heparinized whole blood incubated with or without  $\beta$ -LG analyzed flow cytometry and presented as relative expression levels. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test. Means without a common letter differ significantly.

カゼイン暴露マウスについても、対照群で見られたカゼイン刺激による好塩基球上の CD200R1 の発現上昇はカゼイン摂取群では有意に抑えられていたが、CNH 摂取群では対照群との間に有意差を認めなかった (Fig. 34a)。また、対照群で見られた好塩基球上の CD200R3 の発現低下は、CNH 摂取群では有意に抑えられていたが、カゼイン摂取群では対照群との間に有意差を認めなかった。(Fig. 34b)



**Figure 34** Effect of CNH or casein feeding prior to epicutaneous sensitization on basophil activation response. Surface expression of CD200R1 (a) and CD200R3 (b) on basophils from heparinized whole blood incubated with or without casein analyzed flow cytometry and presented as relative expression levels. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Comparisons to CTL mice were analyzed by Dunnett's test. Asterisks indicate significant differences.

## 5.4 考察

$\beta$ -LG 暴露マウスの検討において、血中の抗原特異的 IgE や IgG1 (Fig. 24)、アナフィラキシー試験での直腸体温の変化やそれに伴う血中 mMCP-1 値のデータ (Fig. 26) は、WPC だけでなくその軽度分解物である PWH1 や PWH2 の摂取によっても $\beta$ -LG に対する経口免疫寛容が誘導されたことを示している。経口免疫寛容には制御性 T 細胞によるもの (active suppression) と不応答化 (anergy) の大きく二つの機序が知られているが<sup>92)</sup>、①リンパ組織において制御性 T 細胞 (CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性) のポピュレーションに群間差が見られなかったこと、②抗原刺激によって MLN に誘導された T 細胞の活性化が免疫寛容によって一様に (制御性 T 細胞の活性化も含めて) 抑えられたこと (Fig. 29)、③抗原刺激による MLN からのサイトカイン産生が Th1 サイトカイン (IL-2)、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13)、抑制性サイトカイン (IL-10) の区別なく抑えられたこと (Fig. 30)、から本検討で見られた経口免疫寛容では不応答化の寄与が考えられる。BAT でも、 $\beta$ -LG 刺激による CD200R1 や CD200R3 の発現変化が WPC 摂取群だけでなく PWH1 や PWH2 の摂取群でも抑えられており (Fig. 32)、抗原特異的抗体価やアナフィラキシー試験の結果とよく一致し、マウス BAT がこのような食品素材の経口免疫寛容誘導能の評価に有用であることが示された。その一方で、EWH を摂取させたマウスでは BAT とアナフィラキシー試験の結果に乖離が見られた。アナフィラキシー試験では、抗原負荷による直腸体温低下とそれに伴う血中 mMCP-1 の上昇は EWH の摂取によって著明に抑制されたが (Fig. 26)、好塩基球上の CD200R1 と CD200R3 の発現変化は EWH 摂取群と対照群で差を認めなかった (Fig. 33)。 $\beta$ -LG 特異的抗体価の上昇や MLN 細胞からのサイトカイン産生上昇は EWH 摂取群でも対照群と同様に認められ、このことはアナフィラキシー試験よりも BAT の結果と一致した。乳清タンパク質の分解物や $\beta$ -LG のペプチドフラグメントの経口投与が抗原特異的 IgE 産生とは関連なくマウスの即時型アレルギーの症状を抑えるという報告<sup>93,94)</sup>もあることから、本検討における EWH 摂取群でのアナフィラキシー反応の抑制は、機序は明らかでないが何らかの非特異的な免疫抑制による可能性もある。BAT はアナフィラキシー反応を *in vitro* で再現したものと言うこともできるが、本検討のように *in vivo* と *in vitro* で結果に相違があることは、抗原特異的な脱顆粒反応に

対して局所的に作用する何らかの因子の関与を示唆するものである。EWH 摂取マウスで見られたアナフィラキシー反応抑制の機序解明には今後のさらなる検討が必要である。

次にカゼイン暴露マウスにおける検討で、血清中の抗原特異的 IgE 値 (Fig. 25a)、アナフィラキシー試験における直腸体温低下 (Fig. 27) やそれに伴う血中 mMCP-1 上昇 (Fig. 28a)、リンパ組織細胞からのサイトカイン産生のデータ (Fig. 31、Fig.32) は、カゼインの摂取だけでなく、CNH の摂取によってもカゼインに対する経口免疫寛容が誘導されたことを示している。しかしながら直腸体温の変化の程度や血中 mMCP-1 の値から、CNH の経口免疫寛容誘導能は未分解カゼインのそれよりも弱いことが示唆される。BAT における CD200R1 の発現変化をみても、カゼイン摂取群では対照群に比較して有意な上昇抑制が認められたのに対して、CNH 摂取群では有意差を認めておらず (Fig. 34a)、CNH の寛容誘導能がカゼインより弱いことと矛盾しない。一方、血中のカゼイン特異的 IgG1 をみると、経皮暴露直後 (61 日目) では対照群に対して有意に低値を示す群は無かったが、その後 2 回目、3 回目のアナフィラキシー試験に伴う採血ではカゼイン摂取群、CNH 摂取群共に対照群に対して有意に低値を示していた (Fig. 28c)。これはアナフィラキシー試験による抗原負荷が刺激となって対照群ではカゼイン特異 IgG1 が上昇したのに対し、カゼイン摂取群と CNH 摂取群では経口免疫寛容が誘導されていたためにそれが抑制されたと考えられることができる。IgG 受容体を介した好塩基球活性化のマーカーである CD200R3 をみると、CNH 摂取群では発現低下が抑えられていたものの、逆にカゼイン摂取群では対照群に比較して有意な発現低下の抑制は認められなかった (Fig. 34b)。BAT を実施した時点 (61 日目) では対照群でも血中のカゼイン特異的 IgG1 抗体価の上昇が十分でなかったことから、CNH 摂取群で見られた CD200R3 発現低下の抑制は、カゼイン特異的 IgE による抑制型 IgG 受容体 FcγRIIB への刺激<sup>72)</sup> が影響した可能性もあるが、CNH 摂取群でもその後の特異的 IgG1 上昇を抑える免疫寛容が誘導されていたことは間違いないことから、それを示唆している可能性もある。そうであれば、BAT における CD200R3 の発現変化は、血中の抗原特異的 IgG1 値の変化に先行するものとして興味深く、今後さらに検討が求められる課題である。なお、カゼイン暴露マウスに対する本検討では一匹のマウスに対して計 3 回のアナフィラキシー試験を実施したが、わずか 3 日の間隔でおこなった同量の抗原負荷 (2 回目と 3 回目、50 mg/回) でも直腸体温の変化や血中 mMCP-1 の値は

大きく変動した。また、抗原負荷毎に血中のカゼイン特異的 IgE、IgG1 値も変化していった。これは抗原負荷の刺激によってマウスの免疫状態が変化したことによるものであり、このような抗原負荷刺激を伴うアナフィラキシー試験は一個体のマウスに繰り返し実施してその免疫状態を経時的に評価するには適していないことを示している。それに対して BAT は少量の採血だけで実施できることから個体の免疫状態への影響はごく限定的であると予想される。同一個体に対する繰り返しの実施も可能と思われ、今後の課題としたい。

## 5.5 小括

乳清タンパク質分解物やカゼイン分解物の経口免疫寛容誘導能の評価において、マウス BAT は、血中の抗原特異的抗体価測定やアナフィラキシー試験の結果を補完する有用な手法であると考えられた。乳清タンパク質高度分解物 EWH の経口摂取によって $\beta$ -LG 経皮暴露マウスのアナフィラキシー反応が抑制されたが、これは抗原非特異的な免疫抑制によるものである可能性が考えられ、そのことは BAT の結果によっても支持された。またマウス BAT は、血中抗体価の上昇に先行して変化が見られる可能性や、被検動物の免疫状態に大きな影響を及ぼさずに繰り返し実施できる可能性もあり、これらの点については今後のさらなる検討が必要である。

## 第6章 総括

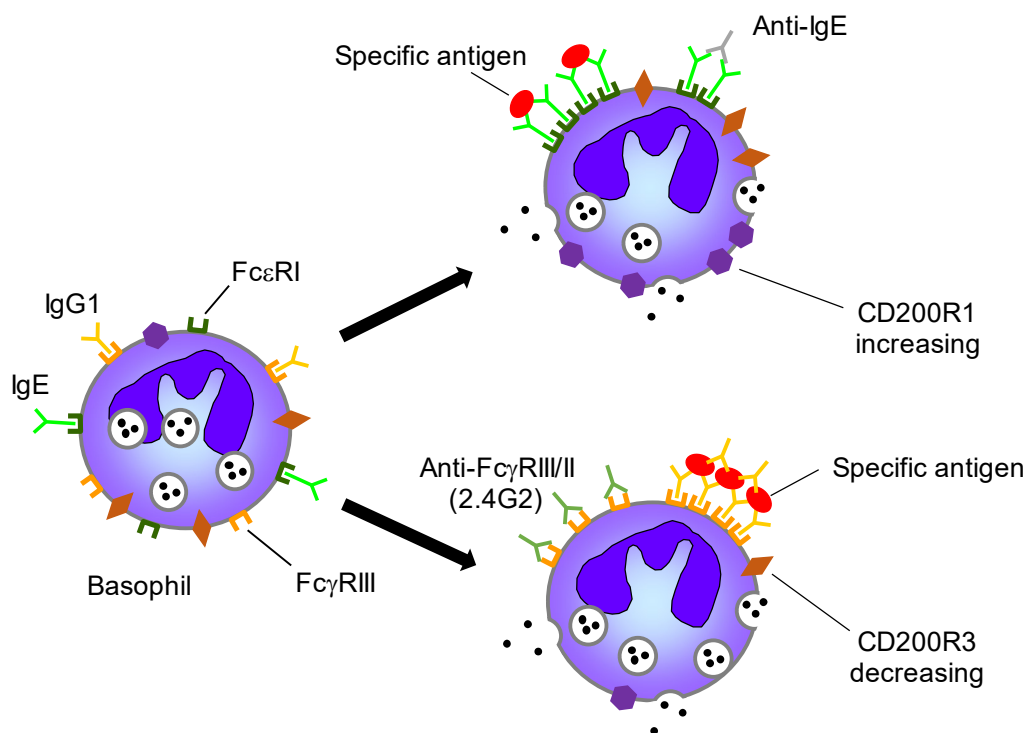
### 6.1 まとめ

本研究は、アレルギー疾患の診療で注目されている BAT を実験動物であるマウスにおいて確立し、このマウス BAT によって加水分解乳やタンパク質分解物の免疫学的特性を評価することで、その有用性を検証することを目的におこなった。BAT はヒトの食物アレルギーにおいて食物負荷試験の結果予測に有効であり、原因抗原の同定や患者の寛解予測などで高い有用性が報告されている<sup>44-50</sup>。これをマウスに導入することは、食物アレルギーの研究領域に対して新しい動物評価モデルを提供することであり、これによって様々な食品のアレルゲン性や免疫学的特性を新たな視点から評価検討することで、食物アレルギー患者のより一層の「食の安全」につながるものと期待される。

ヒト好塩基球はその活性化によって細胞表面上の CD63 や CD203c の発現上昇が見られるが、マウスでは CD200R1 の発現が上昇することが報告されていた<sup>55</sup>。そこで本研究ではまずこの CD200R1 をマーカーとして BAT の確立を試みたところ、その過程でマウス好塩基球の活性化では CD200R1 の発現上昇だけでなく CD200R3 の発現低下も起こることを新たに見出した。さらに、CD200R1 の発現上昇が FcεRI を介した IgE 刺激によるのに対し、CD200R3 の発現低下が FcγRIII を介した IgG1 刺激によるものであることも明らかにした (**Fig. 35**)。CD200R3 は活性化アダプター分子 DAP12 と相互作用しながらマウスのマスト細胞と好塩基球に発現しており<sup>60,75,76</sup>、それへの刺激はマスト細胞の脱顆粒や好塩基球における IL-4 産生を促し、さらには局所及び全身のアナフィラキシー反応を引き起こす<sup>60</sup>。従って好塩基球の活性化に伴う CD200R3 の発現低下は過剰な免疫反応を抑制するためのネガティブフィードバックである可能性が考えられた。

マウスのアナフィラキシー反応は、IgE 依存的にマスト細胞から放出されるヒスタミンによるもの (classical pathway) の他、IgG 依存的にマクロファージから放出される PAF によるもの (alternative pathway) が知られているが<sup>69,70</sup>、*in vivo*での IgG 受容体への刺激はマウスの全身性アナフィラキシー反応と同時に末梢血好塩基球における CD200R3 発現低下を惹起した。即





**Figure 35 Increased expression of CD200R1 and decreased expression of CD200R3 on mouse basophils stimulated via Fc receptors.**

ち、CD200R3 をマーカーとしたマウス BAT は IgG 刺激による全身性アナフィラキシーと良く相関し、さらには CD200R1 と CD200R3 の両方を活性化マーカーとして BAT をおこなうことによって、マウスのアナフィラキシー反応を IgE 依存的なものとして IgG 依存的なものに区別して評価できることが示唆された。

このマウス BAT は *in vitro* 試験ながら ELISA 法のような抗体との親和性のみを指標とする手法よりも生理的条件に近く、低アレルゲン化食品やその原料となる食品素材（タンパク質加水分解物など）の抗原性評価において有用な手法になると考えられた。本研究において、アレルギー用ミルクを含む各種育児用ミルクの抗原性をマウス BAT によって評価したところ、その結果はアナフィラキシー試験の結果と良く一致し、特に CD200R3 をマーカーとした場合にその一致度が高かった。本検討で用いた腹腔内免疫・経静脈負荷によるアナフィラキシーモデルは IgG1 依存的な反応との報告<sup>67)</sup>があることから、IgG1 依存的な好塩基球活性化マーカーである CD200R3 の発現変化とアナフィラキシー反応の相関は、それを裏付けるものとしても興味深い。本研究によ

ってマウス BAT はアナフィラキシー試験を補完、代替しうるものであることが示されたが、実施コストや動物福祉の点では BAT は従来のアナフィラキシー試験よりも優位性がある。今後、マウス BAT がアナフィラキシー試験に代わる抗原性試験として広く利用されることを期待したい。

次に本研究では、食品アレルゲンの免疫原性評価におけるマウス BAT の有用性を検討した。ここでは、食物アレルギーを引き起こす食品アレルゲンの感作は主に皮膚の炎症部を介して起こるという近年の考え方にに基づき<sup>82,83)</sup>、テープストリッピング法によるマウスの経皮感作モデルを採用した。乳清タンパク質あるいはその軽度分解物を経皮暴露したマウスに対して、血中の $\beta$ -LG 特異的抗体価測定やアナフィラキシー試験と共に BAT をおこなったところ、BAT の結果は特異抗体価やアナフィラキシー試験の結果と一致し、このような食品素材の免疫原性評価におけるマウス BAT の有用性が示された。

抗原負荷で惹起されるアナフィラキシー反応と同様に、BAT の反応性は被検動物の感作状態をよく反映していることから、マウスモデルを用いた免疫寛容の研究でも BAT は有用な手法になると思われた。そこで本研究では、加水分解乳に配合される牛乳タンパク質分解物の経口免疫寛容能を検討する中で、マウス BAT をその評価系のひとつとして実施した。乳清タンパク質分解物やカゼイン分解物を被検試料としてマウスに経口摂取させた上で、アレルゲンとして $\beta$ -LG やカゼインを経皮暴露し、マウスの感作状態から各被検試料の免疫寛容誘導能を検討した。血中の抗原特異的抗体価測定、アナフィラキシー試験、及びリンパ組織の T 細胞活性化とサイトカイン産生の評価から、未分解の乳清タンパク質やカゼインだけでなく、その軽度分解物にも経口免疫寛容の誘導能が残存することが確認された。BAT のデータもこれら従来の評価法の結果を裏付けるものであり、マウス BAT が経口免疫寛容の評価に有用であることが示された。その一方で、本検討では従来の評価法と BAT との間でいくつかの興味深い乖離も認められた。ひとつは、乳清タンパク質高度分解物 (EWH) を経口摂取させたマウスでは $\beta$ -LG の経口負荷によるアナフィラキシー反応が抑えられており免疫寛容が誘導されたかのような挙動を示したが、BAT の反応性は EWH 摂取群と対照群で違いを認めなかった点である。血中の $\beta$ -LG 特異的抗体価やリンパ組織における検討の結果は EWH による免疫寛容の誘導を否定するものであり、BAT の結果と一致した。即ち、EWH によるアナフィラキシー反応の抑制は、乳清タンパク質分解物に由来する何らかの非特異

的免疫抑制によるものである可能性<sup>93,94</sup>が考えられる。この乳清タンパク質分解物の免疫抑制作用は、末梢血におけるBATの反応性に影響を及ぼさなかったことから、局所における脱顆粒反応にのみ関与している可能性が高く、その機序を考える上でもマウスBATという新規な評価法を導入する意義は大きかったと言える。もうひとつは、カゼインあるいはその分解物(CNH)の免疫寛容誘導能を検討する中で、血中のカゼイン特異的IgE、IgG1抗体価とBATのデータに一部不一致が見られた点である。その原因としてカゼインの経皮免疫原性が $\beta$ -LGのそれほど高くはないことや、CNHの免疫寛容誘導能が弱かったことなどが挙げられるが、注目すべきは血中のカゼイン特異的IgG1に有意な変化が認められない時点でもBATではCD200R3の有意な発現変化を認めた点である。感作を受けて産生されたIgEやIgG1は血流を介して全身に運ばれ、組織中のマスト細胞や末梢血中の好塩基球に発現するFc受容体に結合するが、この受容体との親和性が高ければIgEやIgG1は血中での濃度上昇に優先して受容体に結合するだろう。そのため、BATは血中での抗体価上昇に先行し、かつ高感度に個体の感作状態を示し得るかも知れない。

## 6.2 今後の展望

本研究では実験動物であるマウスにおいてBATを確立することに成功し、このマウスBATが牛乳タンパク質加水分解物の抗原性評価や、その免疫学的特性の解析に有用であることを示したが、その一方で新たな課題も明らかとなった。前述したようにBATの反応性の変化は血中の特抗体価上昇よりも早い段階から検出できるかも知れず、もしそうだとすればマウスBATは免疫・アレルギー学における研究手法としてこれまでにない高い有用性を持つことになる。本研究のなかでは、同一個体に対してBATと抗体価測定を繰り返しおこないながらその経時的変化を検討することまでには至らなかったが、今後この点は早急に検証する必要がある。

IgG依存的なマウス好塩基球活性化マーカーとしてCD200R3を見出したが、マウスBATを免疫・アレルギー学の研究手法と考えた場合、このCD200R3をマーカーとしたマウスBATはアレルギーの病態におけるIgGの関与を検討する上で貴重な手段になることが期待される。ヒトの場合、マウスとは異なり即時型アレルギー反応におけるIgGの関与(alternative pathway)は明らかではないが、ある種の生物学的製剤(インヒリキシマブ)<sup>95,96</sup>や麻酔薬(神経筋遮断薬)<sup>97</sup>の

使用において IgE の関与が証明できない重篤なアナフィラキシーの副作用事例が報告されており、ヒトにおいても IgG の関与するアナフィラキシーの存在が示唆されている<sup>98)</sup>。また、IgG 反応が併発することで IgE によるアナフィラキシーが重篤化するとも言われている<sup>97)</sup>。即時型食物アレルギーにおいて IgG が関与する明確な事例は知られていないが、ある程度以上の量のアレルゲンが血中に移行することがあれば食物アレルギーでも上記のような薬剤アナフィラキシーと同じ状況が起こる可能性はあり<sup>99)</sup>、IgG もまた「食の安全」を脅かす脅威になるかも知れない。いずれにしてもヒトの IgG アレルギーについてはまだ不明な点が少なくなく、今後それを解明する基礎的研究においてマウス BAT が役立つことを期待したい。

本研究では牛乳アレルギーをモデルとし、加水分解乳や牛乳タンパク質分解物の免疫学的特性の検討をおこなったが、マウス BAT は牛乳以外の食物アレルゲンに対しても応用が可能である。牛乳アレルギーに対しては加水分解乳のような低アレルゲン化食品が開発されており、臨床的な実績もある。本研究のなかでも、その低アレルゲン性や低免疫原性を改めて確認した。一方、鶏卵や小麦、ソバなど牛乳以外の食品については、高品質で安全な低アレルゲン化食品は未だ実用化に至っていない。牛乳と同様に栄養価の高い鶏卵や、我々の主食にもなる小麦やソバなどの穀類においても高品質で安全な低アレルゲン化食品が開発されれば、より多くの食物アレルギー患者に恩恵をもたらすであろう。そのような低アレルゲン化食品の開発やその品質の向上にマウス BAT が活用され、食物アレルギーに苦しむ人々の「食の安全」に貢献することができれば、本研究の最大の成果である。

## 引用文献

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoushokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/04.html)
- 2) Codex Alimentarius: Code of Practice, General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969
- 3) Codex Alimentarius: General Standard for the Labelling of Prepacked Foods. CODEX STAN1-1985
- 4) 平成 27 年 3 月 30 日 消食表第 139 号 消費者庁次長通知 食品表示基準について。別添アレルゲンを含む食品に関する表示。
- 5) 令和元年 9 月 19 日 消食表第 322 号 消費者庁次長通知 アレルゲンを含む食品の表示について。
- 6) 平成 27 年 3 月 30 日 消食表第 139 号 消費者庁次長通知 食品表示基準について。別添アレルゲンを含む食品の検査方法。
- 7) 赤城智美：食物アレルギーを取り巻く現状。食品衛生研究，**67**，15-24（2017）
- 8) 温泉川肇彦：食物アレルギーと食品アレルゲン管理について。食品衛生研究，**69**，17-30（2019）
- 9) 清田恭平，藤原有佳，足立和人，亀田誠，阿久津和彦，梶村計志：乳清分が非意図的に混入した学校給食パンによる乳アレルギー発症事例における混入経路の検証。アレルギー，**63**，787-793（2014）
- 10) 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会：食物アレルギー診療ガイドライン 2016。共和企画，東京。2016。
- 11) 今井孝成，杉崎千鶴子，海老澤元宏：消費者庁「食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業」平成 23 年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査結果報告。アレルギー，**65**，942-946（2016）
- 12) Rona R. J., Keil T., Summers C., Gislason D., Zuidmmer L., Sodergren E.,

- Sigurdardottir S. T., Lindner T., Goldhahn K., Dahlstrom J., McBride D. and Madsen C.: The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*, **120**, 638-646 (2007)
- 13) Chafen J. J. S., Newberry S. J., Riedl M. A., Bravata D. M., Maglione M., Suttorp M. J., Sundaram V., Paige N. M., Towfige A., Hulley B. J. and Shekelle P. G.: Diagnosing and managing common food allergies. A systematic review. *JAMA*, **303**, 1848-1856 (2010)
- 14) Ebisawa M. and Sugizaki C.: Prevalence of pediatric allergic diseases in the first 5 years of life. *J Allergy Clin Immunol*, **121**, S237 (2008)
- 15) 日本学校保健会:平成 25 年度 学校生活における健康管理に関する調査事業報告書. 2014.
- 16) 日本学校保健会 : 平成 26 年度 児童生徒の健康状態サーベイランス事業報告書. 2016.
- 17) Ebisawa M., Ikematsu K., Imai T. and Tachimoto H.: Food allergy in Japan. *Allergy Clin Immunol Int*, **15**, 214-217 (2003)
- 18) 川瀬興三, 御子神隆 : 酵素免疫測定法 (ELISA) 抑制試験を用いたアレルギー用ミルク, ウシカゼインとその酵素分解産物の抗原性の検討. 東邦医学会雑誌, **35**, 509-561 (1989)
- 19) Ena J. M., Beresteijn E. C. H. V., Robben A. J. P. M. and Schmidt D. G.: Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatin combination. *J Food Sci*, **60**, 104-116 (1995)
- 20) Esteban M. M., Ara M. C. G., Molas M. B., Martinez M. T. B., Muñoz F. M. and Pena J. M. D., Evaluation of an extensively hydrolyzed casein-whey protein formula in cow's milk protein hypersensitivity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **26**, 398-401 (1998)
- 21) Muraro A., Hoekstra M. O., Meijer Y., Lifschitz C., Wampler J. L., Harris C. and Scalabrin D. M. F.: Extensively htdrolysed casein formula supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* GG maintains hypoallergenic status: randomized double-blind, placebo-controlled crossover trial. *BMJ Open*, **2**, e000637 (2012)
- 22) Docena G., Rozenfeld P., Fernández and Fossati C. A.: Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy*, **57**, 83-

- 91 (2002)
- 23) Cordle C. T., Mahmoud M. I. and Moore V.: Immunogenicity evaluation of protein hydrolysates for hypoallergenic infant formulae. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **13**, 270-276 (1991)
  - 24) Boner A. L., Benedetti M., Spezia E., Piacentini G. L. and Bellanti J. A.: Evaluation of the allergenicity of infant formulas in a guinea pig model. *Ann Allergy*, **68**, 404-406 (1992)
  - 25) COMMISSION DIRECTIVE 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC
  - 26) Halcken S., Høst A., Hansen L. G. and Østerballe O.: Safety of a new, ultrafiltrated whey hydrolysate formula in children with cow milk allergy: a clinical investigation. *Pediatr Allergy Immunol*, **4**, 53-59 (1993)
  - 27) American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics*, **106**, 346-349 (2000)
  - 28) Vandenas Y., Hausr B., Van den Borre C., Clybouw C., Mahler T., Hachimi-Idrissi S., Deraeve L., Malfroot A. and Dab I.: The long-term effect of partial whey hydrolysate formula on the prophylaxis of atopic disease. *Eur J Pediatr*, **154**, 488-494 (1995)
  - 29) Exl B. M., Deland U., Secretin M. C., Preysch U., Wall M. and Shmerling D. H.: Improved general health status in an unselected infant population following an allergen-reduced dietary intervention programme: the ZUFF-STUDY-PROGRAMME. Part II: infant growth and health status to age 6 months. *Eur J Nutr*, **39**, 145-156 (2000)
  - 30) Berg A. V., Filipiak-Pittroff B., Krämer U., Hoffmann B., Link E., Beckmann C., Hoffmann U., Reinhardt D., Grübl A., Heinrich J., Wichmann H. E., Bauer C. P., Koletzko S. and Berdel D.: Allergies in high-risk schoolchildren after early intervention with cow's milk protein hydrolysates: 10-year results from the German Infant Nutritional Intervention (GINI) study. *J Allergy Clin Immunol*, **131**, 1565-1573 (2013)

- 31) Szajewska H. and Horvath A.: A partially hydrolyzed 100% whey formula and risk of eczema and allergy: an updated meta-analysis. *WAO Journal*, **10**, 27-37 (2017)
- 32) Boyle R., Ierodiakonou D., Khan T., Chivinge J., Robinson Z., Geoghegan N., Jarrold K., Afxentiou T., Reeves T., Cunha S., Trivella M., Garcia-Larsen V. and Leonardi-Bee J.: Hydrolysed formula and risk of allergic or autoimmune disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, **352**, i974 (2016)
- 33) Kido J., Nishi N., Sakaguchi M. and Matsumoto T.: Most cases of cow's milk allergy are able to ingest a partially hydrolyzed formula. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **115**, 330-331 (2015)
- 34) Inuo C., Tanaka K., Nakajima Y., Yamakawa K., Matsubara T., Iwamoto H., Tsuge I., Urisu A, and Kondo Y.: Tolerability of partially and extensively hydrolysed milk formulas in children with cow's milk allergy. *Asia Pac J Clin Nutr*, **28**, 49-56 (2019)
- 35) 犬尾千聡, 伊藤直香, 高増哲也, 栗原和幸: 牛乳経口耐性誘導療法の 1 例. *小児科臨床*, **63**, 999-1003 (2010)
- 36) Inuo C., Tanaka K., Suzuki S., Nakajima Y., Yamakawa K., Tsuge I., Uris A. and Kondo Y.: Oral immunotherapy using partially hydrolyzed formula for cow's milk protein allergy: a randomized, controlled trial. *Int Arch Allergy Immunol*, **177**, 259-268 (2018)
- 37) Isolauri E., Sütas Y., Salo M. K., Isosomppi R. and Kaila M.: Elimination diet in cow's milk allergy: risk for impaired growth in young children. *J Pediatr*, **132**, 1004-1009 (1998)
- 38) 長谷川実穂, 今井孝成, 林典子, 柳田紀之, 小俣貴嗣, 佐藤さくら, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏: 不適切な食物除去が食物アレルギー患者と保護者に与える影響. *日本小児アレルギー学会誌*, **25**, 163-173 (2011)
- 39) 小俣貴嗣, 宿谷明紀, 今井孝成, 田知本寛, 海老澤元宏: ブラインド法乾燥食品粉末食物負荷試験に関する検討 (第 1 報) - 非加熱全卵・卵黄負荷試験 -. *アレルギー*, **58**, 524-536 (2009)



- 40) 小俣貴嗣, 宿谷明紀, 今井孝成, 田知本寛, 海老澤元宏: ブラインド法乾燥食品粉末食物負荷試験に関する検討 (第 2 報) - 牛乳負荷試験 -. *アレルギー*, **58**, 779-789 (2009)
- 41) Ohtani K., Sato S., Sykuya A., Asaumi T., Ogura K., Koike Y., Iikura K., Yanagida N., Imai T. and Ebisawa M.: Natural history of immediate-type hen's egg allergy in Japanese children. *Allergol Int*, **65**, 153-157 (2016)
- 42) Sato S., Ogura K., Takahashi K., Sato Y., Yanagida N. and Ebisawa M.: Usefulness of antigen-specific IgE probability curves derived from the 3gallergy assay in diagnosing egg, cow's milk, and wheat allergies. *Allergol Int*, **66**, 296-301 (2017)
- 43) 佐藤さくら, 海老澤元宏: 末梢血好塩基球を用いた食物アレルギーの診断. *小児科臨床*, **63**, 2489-2496 (2010)
- 44) Hemmings O., Kwok M., McKendry R. and Santos A. F.: Basophil activation test: old and new applications in allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*, **18**, 77-89 (2018)
- 45) Sato S., Tachimoto H., Shukuya A., Kurosaka N., Yanagida N., Utsunomiya T., Iguchi M., Komata T., Imai T., Tomikawa M. and Ebisawa M.: Basophil activation marker CD203c is useful in the diagnosis of hen's egg and cow's milk allergies in children. *Int Arch Allergy Immunol*, **152**, 54-61 (2010)
- 46) Rubio A., Vivinus-Nébot M., Bourrier T., Saggio B., Albertini M. and Bernard A.: Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*, **66**, 92-100 (2011)
- 47) Hoffmann H. J., Santos A. F., Mayorga C., Nopp A., Eberlein B., Ferrer M., Rouzair P., Ebo D. G., Sabato V., Sanz M. L., Pecaric-Petkovic T., Patil S. U., Hausmann O. V., Shreffler W. G., Korosec P. and Knol E. F.: The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, **70**, 1393-1405 (2015)
- 48) Wanich N., Nowak-Wegrzyn A., Sampson H. A. and Shreffler W. G.: Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients with milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **123**, 789-794 (2009)

- 49) Nucera E., Pecora V., Buonomo A., Rizzi A., Aruanno A., Pascolini L., Ricci A. G., Rienzo A. D., Mezzacappa S., Ferraironi M., Patriarca G., Gasbarrini G. and Schiavino D.: Utility of basophil activation test for monitoring the acquisition of clinical tolerance after oral desensitization to cow's milk: pilot study. *United Eur Gastroenterol J*, **3**, 272-276 (2015)
- 50) Nilsson C., Nordvall L., Johansson S. G. O. and Nopp A.: Successful management of severe cow's milk allergy with omalizumab treatment and CD-sens monitoring. *Asia Pac Allergy*, **4**, 257-260 (2014)
- 51) McLaughlan P., Anderson K. J. and Coombs R. R. A.: An oral screening procedure to determine the sensitizing capacity of infant feeding formulae. *Clin Allergy*, **11**, 311-318 (1981)
- 52) Piacentini G. L., Bertolini E., Spezia E., Piscione T. and Boner A. L.: Ability of new infant formula prepared from partially hydrolyzed bovine whey to induce anaphylactic sensitization: evaluation in a guinea pig model. *Allergy*, **49**, 361-364 (1994)
- 53) Hennersdorf F., Florian S., Jakob A., Baumgärtner K., Sonneck K., Nordhein A., Bifdermann T., Valent P. and Bühring H.J.: Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell Research*, **15**, 325-335 (2005)
- 54) MacGlashan D. W.: Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunol*, **132**, 777-787 (2013)
- 55) Torrero M. N., Larson D., Hübner M. P. and Mitre E.: CD200R surface expression as a marker of murine basophil activation. *Clin Exp Allergy*, **39**, 361-369 (2009)
- 56) Bakocevic N., Claser C., Yoshikawa S., Jones L. A., Chew S., Goh C. C., Malleret B., Larbi A., Ginhoux F., Lafaille M. C. D., Karasuyama H., Renia L. and Ng L. G.: CD41 is a reliable identification and activation marker for murine basophils in the steady state and during helminth and malarial infections. *Eur J Immunol*, **44**, 1823-1834

- (2014)
- 57) Gorczynski R., Chen Z., Kai Y., Lee L., Wong S. and Marsden P. A.: CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. *J Immunol*, **172**, 7744-7749 (2004)
  - 58) Hoek R. M., Ruuls S. R., Murphy C. A., Wright G. J., Goddard R., Zurawski S. M., Blom B., Homola M. E., Streit W. J., Brown M. H., Barclay A. N. and Sedgwick J. D.: Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, **290**, 1768-1771 (2000)
  - 59) Zhang S., Cherwinski H., Sedgwick J. D. and Phillips J. H.: Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *J Immunol*, **173**, 6786-6793 (2004)
  - 60) Kojima T., Obata K., Mukai K., Sato S., Takai T., Minegishi Y. and Karasuyama H.: Mast cells and basophils are selectively activated in vitro and in vivo through CD200R3 in an IgE-independent manner. *J Immunol*, **179**, 7093-7100 (2007)
  - 61) Nimmerjahn F. and Ravetch J. V.: Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, **8**, 34-47 (2008)
  - 62) Yoshida S.: Isolation of β-Lactoglobulin and α-Lactalbumin by gel filtration using Sephacryl S-200 and purification by diethylaminoethyl ion-exchange chromatography. *J Dairy Sci*, **73**, 2292-2298 (1990)
  - 63) Obata K., Mukai K., Tsujimura Y., Ishiwata K., Kawano Y., Minegishi Y., Watanabe N. and Karasuyama H.: Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood*, **110**, 913-920 (2007)
  - 64) Ommen R. V., Vredendaal A. E. C. M., Gooyer M. D., Oudenaren A. V. and Savelkoul H. F. J.: The effect of IFN-γ, alum and complete Freund adjuvant on TNP-KLH induced IgG1, IgE and IgG2a responses in mice. *Mediators Inflamm*, **3**, 387-392 (1994)
  - 65) Khodoun, M. V., Kucuk Z. Y., Strait R.T., Krishnamurthy D., Janek K., Clay C. D., Morris S. C. and Finkelman F. D.: Rapid desensitization of mice with anti-

- FcgRIIb/FcgRIII mAb safely prevents IgG-mediated anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol*, **132**, 1375-1387 (2013)
- 66) Matsuoka K., Shitara H., Taya C., Kohno K., Kikkawa Y. and Yonekawa H.: Novel basophil- or eosinophil-depleted mouse models for functional analyses of allergic inflammation. *PLoS ONE*, **8**, e60958 (2013)
- 67) Lei H. Y., Lee S. H. and S. H. Leir S. H.: Antigen-induced anaphylactic death in mice. *Int Arch Allergy Immunol*, **109**, 407-412 (1996)
- 68) Miyajima I., Dombrowicz D., Martin T. R, Ravetch J. V., Kinet J. P. and Galli S. J.: Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and FcgRIII. *J Clin Invest*, **99**, 901-914 (1997)
- 69) Finkelman F. D.: Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol*, **120**, 506-515 (2007)
- 70) Tsujimura Y., Obata K., Mukai K., Shindou H., Yoshida M., Nishikado H., Kawano Y., Minegishi Y., Shimizu T. and Karasuyama H.: Basophils play a pivotal role in immuneoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*, **28**, 581-589 (2008)
- 71) Mukai K., Obata K., Tsujimura Y. and Karasuyama H.: New insights into the roles for basophils in acute and chronic allergy. *Allergol Int*, **58**, 11-19 (2009)
- 72) Mancardi D. A., Iannascoli B., Hoos S., England P., Daëron M. and Bruhns P.: Fc $\gamma$ RIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage Fc $\epsilon$ RI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest*, **118**, 3738-3750 (2008)
- 73) Jönsson F., Mancardi D. A., Kita Y., Karasuyama H., Iannascoli B, Rooijen N. V., Shimizu T., Daëron M. and Bruhns P.: Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*, **121**, 1484-1496 (2011)
- 74) Jiao D., Liu Y., Lu X., Pan Q., Zheng J., Liu B., Liu Y., Wang Y. and Fu N.: Characteristics of anaphylaxis inducing IgG immune complexes triggering murine

- passive systemic anaphylaxis. *Allergy*, **68**, 236-245 (2013)
- 75) Wright G. J., Cherwinski H., Foster-Cuevas M., Brooke G., Puklavec M. J., Bigler M., Song Y., Jenmalm M., Gorman T. McClanahan T., Liu M. R., Brown M. H., Sedgwick J. D., Phillips J. H. and Barclay A.: Characterization of the CD200 receptor family in mice and human and their interactions with CD200. *J Immunol*, **171**, 3034-3046 (2003)
- 76) Voehringer D., Rosen D. B., Lanier L. L. and Loeksler R. M.: CD200 receptor family members represent novel DAP12-associated activating receptors on basophils and mast cells. *J Biol Chem*, **52**, 54117-54123 (2004)
- 77) Sicherer S. H., Noone S. A., Koerner C. B., Christie L., Burks A. W. and Sampson H. A.: Hypoallergenicity and efficacy of an amino acid-based formula in children with cow's milk and multiple food hypersensitivities. *J Pediatr*, **138**, 688-693 (2001)
- 78) American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: Soy protein-based formulas: recommendation for Use in infant feeding. *Pediatrics*, **101**, 148-153
- 79) Fiocchi A., Restani P., Lucarelli S., Lombardi G., Magazzù G., Marseglia G. L., Pittschieler K., Tripodi S., Troncone R. and Ranzini C.: A hydrolysed rice-based formula is tolerated by children with cow's milk allergy: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy*, **36**, 311-316 (2006)
- 80) 令和元年9月9日 消食表第296号 消費者庁次長通知 「特別用途食品の表示許可等について」の全部改正について.
- 81) Mckenzie H. A.: Whole casein: isolation, properties, and zone electrophoresis, in "Milk Proteins Chemistry and Molecular Biology Vol.II", edited by Mckenzie H. A., Academic Press, New York and London, pages 87-116 (1971)
- 82) Lack G.: Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **121**, 1331-1336 (2013)
- 83) Natsume O. and Ohya Y.: Recent advancement to prevent the development of allergy and allergic diseases and therapeutic strategy in the perspective of barrier dysfunction.

- Allergol Int*, **67**, 24-31 (2018)
- 84) Katz Y., Rajuan N., Goldberg M. R., Eisenberg E., Heyman E., Cohen A. and Leshno M.: Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **126**, 77-82 (2010)
- 85) Koplin J.J., Osborn N. J., Wake M., Martin P. E., Gurrin L. C., Robinson M. N., Tey D., Slaa M., Thiele L., Miles L., Anderson D., Tan T., Dang T. D., Hill D. J., Lowe A. J., Matheson M. C., Ponsonby A. L., Tang M. L. K., Dharmage S. C. and Allen K. J.: Can early introduction of egg prevent egg allergy in infants? A population-based study. *J Allergy Clin Immunol*, **126**, 807-813 (2010)
- 86) Du Toit G., Roberts G., Sayre P. H., Bahnson H. T., Radulovic S., Santos A. F., Brough H. A., Phippard D., Basting M., Feeney M., Turcanu V., Sever M. L., Lorenzo M. G., Plaut M., Lack G. and the LEAP Study Team: Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N Engl J Med*, **378**, 803-813 (2015)
- 87) Skripak J. M., Nash S. D., Rowley H., Brereton N. H., Oh S., Hamilton R. G., Matsui E. C., Burks A. W. and Wood R. A.: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **122**, 1154-1160 (2008)
- 88) Buchanan A. D., Green T. D., Jones S. M., Scurlock A. M., Christie L., Althage K. A., Steele P. H., Pons L., Helm R. M., Lee L. A. and Burks A. W.: Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **119**, 199-205 (2007)
- 89) 海老澤元宏, 杉崎千鶴子, 林典子, 佐藤さくら, 今井孝成: わが国における経口免疫(減感作)療法の実態. 日本小児アレルギー学会誌, **26**, 156-166 (2012)
- 90) Shek L. P. C., Bardina L., Castro R., Sampson H. A. and Beyer K.: Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated non-IgE-mediated disorders. *Allergy*, **60**, 912-919 (2005)

- 91) Ito K., Futamura M., Movérare R., Tanaka A., Kawabe T., Sakamoto T. and Borres M. P.: The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clinical and Molecular Allergy*, **10**, 1 (2012)
- 92) Weiner H. L., du Cunha A. P., Quintana F., and Wu H.: Oral tolerance. *Immunol Rev*, **241**, 241-251 (2011)
- 93) van Esch B. C. A. M., Schouten B., de Kivit S., Hofman G. A., Knippels L. M. J., Willemsen L. E. M. and Garssen J.: 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*, **22**, 820-826 (2011)
- 94) Meulenbroek L. A. P. M., van Esch B. C. A. M., Hofman G. A., Jager C. F. D. H., Nauta A. J., Willemsen L. E. M., Bruijnzeel-Koomen C. A. F. M., Garssen J., van Hoffen E. and Knippels L. M. J.: Oral treatment with b-lactoglobulin peptides prevents clinical symptoms in a mouse model for cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, **24**, 656-664 (2013)
- 95) Cheifetz A., Smedley M., Martin S., Reiter M., Leone G., Mayer L. and Plevy S.: The incidence and management of infusion reaction to infliximab: a large center experience. *Am J Gastroenterol*, **98**, 1315-1324 (2003)
- 96) Kolho K. L., Ruuska T. and Savilahti E.: Severe adverse reactions to infliximab therapy are common in young children with inflammatory bowel disease. *Acta Pædiatr*, **96**, 128-134 (2007)
- 97) Jönsson F., de Chaisemartin L., Granger V., Gouel-Chéron A., Gillis C. M., Zhu Q., Did F., Nicaise-Roland P., Ganneau C., Hurtado-Nedelec M., Paugam-Burtz C., Necib S., Keita-Meyer H., Dorze M. L., Cholley B., Langeron O., Jacob L., Plaud B., Fischler M., Sauvan C., Guinépain M. T., Montravers P., Aubier M., Bay S., Neukirch C., Tubach F., Longrois D., Chollet-Martin S. and Bruhns P.: An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci Transl Med*, **11**, eaat1479

(2019)

- 98) Jönsson F., Mancardi D. A., Zhao W., Kita Y., Iannascoli B., Khun H., van Rooijen N., Shimizu T., Schwartz L. B., Daëron M. and Bruhns P.: Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood*, **119**, 2533-2544 (2012)
- 99) Jiménez-Saiz R.: Drug-induced IgG-neutrophil-mediated anaphylaxis in humans: Uncovered! *Allergy*, in press (2020)



## 謝辞

宇都宮大学 農学部 応用生命化学科の東 徳洋 教授には、本論文作成の機会を与えていただくと共に、論文の作成全般から審査も含めて終始ご懇切なるご指導とご高閲を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

東京農工大学 農学研究院 応用生命化学部門の服部 誠 教授、三浦 豊 教授、宇都宮大学 農学部 応用生命化学科の橋本 啓 教授、茨城大学 農学部 食生命科学科の上妻由章教授には、本論文をご審査いただくと共に、大変有益なご助言を多数いただきました。深く感謝申し上げます。

宇都宮大学 農学部 応用生命化学科の山田 潔 博士には、本論文をまとめるなかで様々なご示唆とご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

森永乳業株式会社 栄養科学研究所 蛋白研究室 室長(当時)の川瀬興三 博士、同(当時、元 常務取締役)高瀬光徳 博士には、本論文のテーマである食物アレルギーの研究に導いていただくと共に、研究者としての礎を作ってくださいました。深く感謝申し上げます。

同社 代表取締役副社長 大川禎一郎 博士、研究本部 食品開発研究所 執行役員 所長 武田安弘 博士には、本論文作成の機会を与えていただくと共に、終始温かい激励で最後まで背中を押していただきました。ここに心からの謝意を表します。

同社 研究本部 執行役員 本部長 阿部文明 博士、同 健康栄養科学研究所 宮地一裕 所長、難波和美 副所長には、本論文作成に対し深いご理解とご支援をいただきました。深く感謝申し上げます。

同社 研究本部 健康栄養科学研究所 副主任研究員 松原 毅 博士、中里友紀 氏(当時、現 フードソリューション研究所 研究員)には、本論文に関わる研究全般で、その推進に一方ならぬご支援をいただきました。さらに、同 岡本朋之 副主任研究員、吉川麻友 氏(当時、現 海外事業本部 アシスタントリーダー)、松本拓也 氏(当時、現 マーケティング統括部)には、本論文中の多くの実験でご協力をいただきました。ここに心からの謝意を表します。

他にも、ここにお名前を記すことのできなかつた多くの方々のご支援とご協力のもとで本研究

を実施し、本論文をまとめることができました。ご関係の皆様に変更して心から感謝申し上げます。

最後に、常に心の支えとなり応援してくれた家族に感謝いたします。

2020年9月 岩本 洋