

## 学 位 論 文 要 旨

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

Establishment of mouse basophil activation test and its application  
to the immunological evaluations of cow's milk protein hydrolysates

岩本 洋

Hiroshi Iwamoto

食物アレルギーは「食の安全」を脅かす重大な脅威であり、食物アレルゲンの新規評価法の開発や、それによる食品の免疫学的特性の多角的評価は、その克服に向けた重要な取り組みである。タンパク質加水分解物のような低アレルゲン化食品のアレルゲン性評価では、モルモットやマウスを用いたアナフィラキシー試験の実績が高い。このアナフィラキシー試験は、感作させた実験動物にアレルゲンを投与することで生体のアレルギー反応を包括的に評価できる優れた方法であるが、一測定に実験動物一個体を必要とするなど、コスト的また動物福祉的に課題が多く、代替法も望まれる。そこで本研究では、ヒトの食物アレルギーの診療で注目されている好塩基球活性化試験（BAT）を実験動物であるマウスにおいて確立し、アナフィラキシー試験に代わる新規なアレルゲン性評価法としての有用性を検討することを目的とした。食物アレルギー患者の末梢血中の好塩基球は、細胞表面上の受容体を介してアレルゲン特異的 IgE を結合しており、これにアレルゲンが結合すると架橋により活性化する。マウスでは好塩基球が活性化すると細胞表面上の CD200R1 の発現が上昇することが報告されていることから、本研究ではこれをマーカーとしてマウス BAT の確立を試みた。その過程で、 $\beta$ -ラクトグロブリン（ $\beta$ -LG）を感作させたマウスの末梢血好塩基球を  $\beta$ -LG で刺激すると、CD200R1 の発現上昇と共に CD200R3 の発現低下も認められた。ナイーブマウスの好塩基球に対する抗 IgE 抗体の刺激によって CD200R1 の発現上昇がみられたのに対し、CD200R3 の発現低下は IgG 受容体への刺激によってみられたこと、選択的に IgG1 を除去した抗  $\beta$ -LG 血清で受動感作させた好塩基球を  $\beta$ -LG で刺激しても CD200R3 の発現低下がみられ

なかったこと、から、この CD200R3 発現低下は IgG1 依存的な好塩基球の活性化マーカーとなり得ることが示された。この好塩基球の CD200R3 発現低下は、*in vivo* で IgG 受容体を刺激することによっても、全身性のアナフィラキシー反応に伴って認められた。

CD200R1 と CD200R3 を活性化マーカーとしたマウス BAT によってタンパク質加水分解乳を含む各種の育児用ミルクのアレルゲン性を評価したところ、その結果はアナフィラキシー試験の結果とよく一致し、マウス BAT がアナフィラキシー試験の代替となり得ることが示された。特に IgG1 が関与する腹腔内免疫・経静脈負荷によるアナフィラキシーモデルに対しては、CD200R3 をマーカーとした BAT による代替が有用と考えられた。

BAT の反応性は被検動物の感作状態を反映することから、低アレルゲン化食品の免疫原性の評価や、経口免疫寛容の評価における、マウス BAT の有用性も検討した。テープストリッピングしたマウス背部皮膚に乳清タンパク質を暴露すると、血中の  $\beta$ -LG 特異的 IgE、IgG1 が上昇し、 $\beta$ -LG の経口負荷によるアナフィラキシー反応が惹起されたが、乳清タンパク質軽度分解物の経皮暴露ではそれらが有意に抑えられていた。これは乳清タンパク質軽度分解物の経皮免疫原性が低減していることを示すものであるが、これら被検試料を経皮暴露したマウスの BAT の結果もそれを裏付けるものであった。また、カゼインや乳清タンパク質、またはそれらの軽度分解物を飲水に混合して摂取させたマウスでは、その後の牛乳アレルゲンの経皮暴露による血中抗原特異的 IgE、IgG1 の上昇、リンパ組織の T 細胞活性化やサイトカイン産生、アレルゲン負荷によるアナフィラキシー反応が抑えられており、経口免疫寛容の誘導が認められた。また、これらのマウスでは BAT の反応性も同様に抑えられており、マウス BAT による経口免疫寛容の評価が可能であった。一方、乳清タンパク質高度分解物を飲水に混合して摂取させたマウスでは、アレルゲン負荷によるアナフィラキシー反応は抑えられていたが、BAT の反応性は飲水のみを摂取させた対照群のマウスと差が認められなかった。血中抗原特異的 IgE、IgG1 やリンパ組織における検討の結果は BAT の結果を支持するものであったことから、この乳清タンパク質高度分解物を摂取させたマウスにおけるアナフィラキシー反応の抑制は、経口免疫寛容とは異なる機序によるものであることが示唆された。

マウス BAT は *in vitro* 試験ながら ELISA のような抗体との親和性のみを指標する手法よりも生理的条件に近く、アナフィラキシー試験の代替としてタンパク質加水分解物のような低アレルゲン化食品の評価に有用であった。また、マウス BAT はアナフィラキシー試験を補完し、タンパク質分解物などの免疫学的特性の解析においても有用性が示唆された。マウス BAT が食物アレルギーの研究や低アレルゲン化食品の開発に利用され、食物アレルギーに関わる「食の安全」に貢献することが望まれる。