

# 原著論文

## 食物アレルギーモデルラット作製における アレルゲン感作条件の検討

菊地 優子<sup>1)\*</sup>, 外村 彩夏<sup>2)</sup>, 宮崎 守<sup>2)</sup>, 唐渡 龍平<sup>2)3)</sup>,  
古田 美咲<sup>1)</sup>, 吉村 亮二<sup>4)</sup>, 熊井まどか<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 長崎国際大学 健康管理学部, (<sup>2)</sup> 東海大学 農学部, (<sup>3)</sup> 熊本県立大学大学院 環境共生学研究科,

<sup>4)</sup> 高知学園大学 健康科学部, \*連絡対応著者)

## Comparison of methods for allergen sensitization in food allergy model.

Yuko KIKUCHI<sup>1)\*</sup>, Ayaka HOKAMURA<sup>2)</sup>, Mamoru MIYAZAKI<sup>2)</sup>,  
Ryuhei KARATO<sup>2)3)</sup>, Misaki FURUTA<sup>1)</sup>, Ryoji YOSHIMURA<sup>4)</sup> and  
Madoka KUMAI<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> Faculty of Health Management, Nagasaki International University,

<sup>2)</sup> School of Agriculture, Tokai University,

<sup>3)</sup> Graduate School of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto,

<sup>4)</sup> Faculty of Health Sciences, Kochi Gakuen University, \*Corresponding author)

### Abstract

Sensitization is a pre-allergy state in which there is an increase in the production for allergen specific IgE. In this study, we have evaluated changes in immunoglobulin concentration and cytokine expression by different sensitization methods, for producing food allergy rat models. 4-week-old male BN rats were divided into four groups. 1) control group, 2) administration intraperitoneally of 0.5 mg ovalbumin (OVA) once a week, 3) administration orally of 1 mg OVA daily, 4) administration orally of 2 mg OVA every 2 days. After 35 days, plasma OVA-specific IgE levels were found to be increased significantly only in the intraperitoneal group, indicating sensitization to OVA. In addition, the expression level of IL-4/IL-2 in the spleen was elevated in the intraperitoneally administered group. This suggests that the Th1/Th2 balance may be tilted toward Th2. This may have resulted in excessive humoral immunity and increased OVA-specific IgE. On the other hand, oral administration of allergens may induce oral tolerance, our results suggest that sensitization by intraperitoneal administration may be more efficient.

### Key words

Food allergy, Sensitization, Oral tolerance

### 要 旨

食物抗原に対する特異的IgEが産生され、アレルギー発症の準備段階となる状態を「感作」という。本研究では、感作条件の違いによる免疫グロブリン濃度、サイトカイン発現量の変化を検討し、食物アレルギーモデルラット作製条件の検討を行った。4週齢雄性BNラットを対照群、食物アレルゲンとしてオボアルブミン (OVA) 0.5 mgを週に1回腹腔内投与する群、OVA 1 mgを毎日経口投与する群、OVA 2 mgを2日に1回経口投与する群に分けた。各条件で35日間飼育した結果、血漿OVA特異的IgE濃度は腹腔内投与群でのみ有意に上昇し、OVAへの感作が認められた。また、腹腔内投与群において、脾臓IL-4/IL-2の上昇がみられ、Th1/Th2バランスがTh2にバランスが傾いている可能性が示唆された。その結果、過剰な体液性免疫が生じ、OVA特異的IgEが増加したと考えられる。また、アレルゲンの経口投与では、経口免疫寛容が誘導される可能性もあることから、腹腔内投与による感作が効率的であると考えられる。

### キーワード

食物アレルギー、抗原感作、経口免疫寛容

## I. 緒言

食物アレルギー (FA) は、「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫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>1)</sup>。2020年に行われた即時型アレルギーによる健康被害に関する全国実態調査によると、報告数は6080例と2017年度調査の4851例から大きく増加しており、その年齢分布は6歳までに79.5%を占め、18歳までに89.3%を占めている<sup>2)</sup>。原因食物は前回調査では鶏卵・牛乳・小麦が上位3品目であったのに対し、くるみ等の木の実類の報告が急増し、今回の調査では鶏卵・牛乳・木の実類が上位3品目となった<sup>2)</sup>。このことから、令和5年3月より、特定原材料に「くるみ」が追加され、表示が義務付けられた<sup>3)</sup>。

食物抗原に対する特異的IgEが産生され、その食物抗原が再び侵入するとアレルギー症状を発症する状態になる。これを「感作」といい、感作経路には、胎内感作、経皮感作、経消化管感作、経気道感作などがある<sup>1)</sup>。また、近年、花粉-食物アレルギー症候群やラテックス-フルーツ症候群といった食物由来以外の物質（環境抗原など）が原因で起こるアレルギーの報告も増えており、患者数の増加に加えて原因食物や発症機序の多様化が問題となっている<sup>4)</sup>。しかしながら、FAの第一の治療法は原因食品の除去であり、完治させる方法や予防法については不明な点も多い<sup>5)</sup>。

FAの実験モデルとしては、日本クレア株式会社のOVA-IgE/Jclマウスや遺伝子改変マウスを用いたものがあるが、いずれも高価であることから、現在でもアレルゲンを飲水に混ぜたり、経口または腹腔内投与したりすることで感作させる方法が広く用いられている<sup>6-10)</sup>。しかしながら感作経路や感作期間等の条件は様々であり、長期間の投与が必要となることから、実験者にも実験動物にも負担となる。そこで本研究では、感作経路および感作条件の違いによる免疫グロブリン (Ig) 濃

度、アレルギー関連サイトカインの変化を検討し、FAモデルラット作製条件の検討を行った。

## II. 方法

### 1. 食物アレルギーモデルラットの作製

実験には日本エスエルシー株式会社より入手した4週齢雄性BNラットを用い、12時間の明暗サイクルの飼育室で個別ケージにて飼育を行なった。飼料にはAIN-93G（日本クレア）を用い、自由摂食、自由飲水とし、1日おきに体重と摂食量を測定した。なお、本研究の実施にあたっては、長崎国際大学健康管理学部研究等倫理委員会および長崎国際大学実験動物委員会の承認（19A06-2）を得たのち、長崎国際大学実験動物に関する規定を遵守して行った。

先行研究におけるFAモデル作製条件を参考に、ラットを対照（Cont）群、腹腔内投与（IP）群、経口投与1 mg（PO 1 mg）群、経口投与2 mg（PO 2 mg）群の4群に分けた<sup>8, 9, 11, 12)</sup>。IP群には生理食塩水とImject® Alum（Thermo Fisher）の等量混合液にOVAを溶解させた溶液をOVA 0.5 mgとなるように週に1回腹腔内に投与した。経口投与群では、PO 1 mg群ではOVA 1 mgを毎日経口投与し、PO 2 mg群ではOVA 2 mgを2日に1回経口投与した。Cont群には生理食塩水とImject® Alumの等量混合液を週に1回腹腔内投与した。各条件で35日間飼育し、解剖時に血漿、脾臓を得た。

### 2. 血漿Ig濃度の測定

血漿IgG濃度、IgE濃度は、IgG（Rat）ELISA Kit（Abnova）および、Rat IgE EIA kit（TaKaRa）を用いて測定した。また、OVA特異的IgE濃度はRat OVA sIgE ELISA Kit（Fine Test®）を用いて測定した。

### 3. IL-2およびIL-4のmRNA発現

RNeasy® Plus Universal Mini Kit (QIAGEN) のプロトコルに基づいて脾臓よりmRNAを抽出し、Rever Tra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いてcDNAを合成した。その後、SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) を用いたリアルタイムPCR法により、IL-2およびIL-4のmRNA発現量を測定した。リファレンス遺伝子に $\beta$ -actinを使用し、相対定量を行い、群間を比較した。

### 4. 統計解析

血漿Ig濃度は一元配置分散分析の後、

Dunnett T3検定またはBonferroniの多重比較検定により比較した。IL-2、IL-4についてはKruskal-Wallis検定を行った。測定値は全て平均 $\pm$ 標準偏差で示し、有意水準5%未満とした。

## Ⅲ. 結果

### 1. 体重および摂食量

飼育期間中のラットの体重および摂食量の変化を図1a、bに示した。体重、摂食量ともに群間に差はみられなかった。

### 2. 血漿Ig濃度

血漿IgG濃度はIP群において他の3群に比べ、有意に高い値を示した。IgE濃度はPO 1

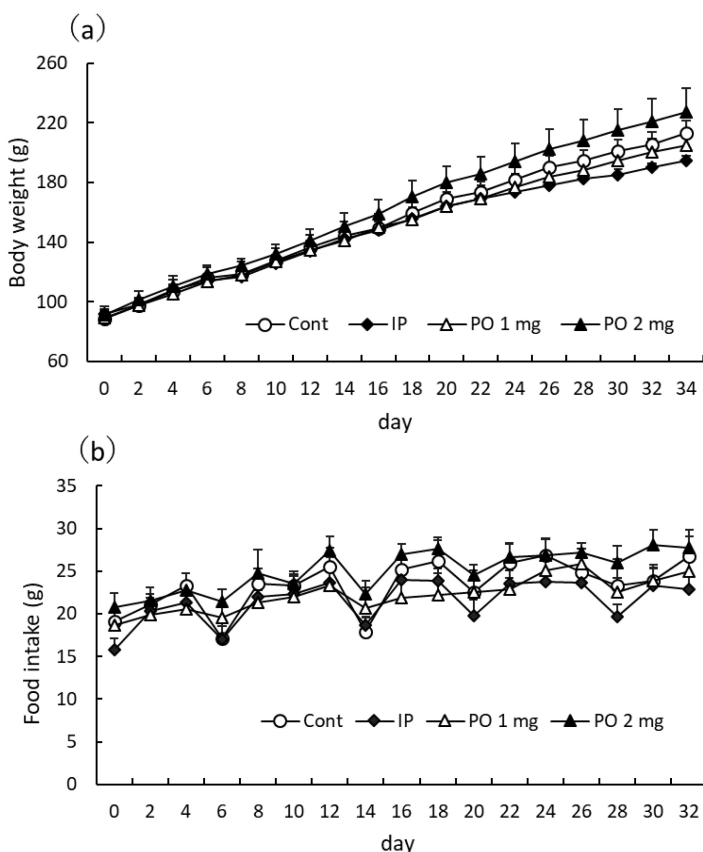


図1 体重および摂食量

飼育期間中の体重 (a) および摂食量 (b) を示した。いずれの群においても体重および摂食量に差はみられなかった。(平均 $\pm$ SD)

mg群とPO 2 mg群においてCont群と比べ、有意に低い値を示した(図2a、b)。OVA特異的IgE濃度はIP群において他の3群に比べ、有意に高い値を示した。また、Cont群、PO 1 mg群では検出限界以下のものもあった(図2c)。

### 3. 脾臓におけるIL-2、IL-4発現量

リアルタイムPCRにより測定したIL-2およびIL-4の発現量を対照群の発現量を1とし、相対比較を行った。IL-2発現量はIP群に比べ、PO 1 mg群で低い値を示し、IL-4はIP群に比べてPO 1 mg群、PO 2 mg群で有意に低い値を示した(図3a、b)。また、Cont群と比べ、PO 2 mg群で有意に低い値を示した。IL-4/IL-2はPO 2 mg群に比べ、IP群で高い値を示した(図3c)。

## IV. 考察

本研究では、FAモデルラット作製のために、OVAをアレルゲンとして、投与経路や投与回数によるアレルゲン感作の違いを検討した。OVAは卵白に含まれるタンパク質であり、卵タンパクの54%を占める卵アレルギーの主要なアレルゲンである<sup>13)</sup>。そのため、アレルギーの動物実験において感作に広く用いられており、本研究でもアレルゲンとしてOVAを使用した。飼育期間中の体重および摂食量は群間に有意差はみられなかった。このことから、各条件におけるOVA投与は成長や摂食に影響を与えなかったと考えられる。

体液性免疫では通常、B細胞から形質細胞に分化する際に表面のIgMがIgGにクラススイッチされるが、アレルギーではIgEへのクラススイッチが生じる。血漿IgG濃度はIP群において高い値を示し、IgE濃度は経口投与を行った2群において低い値となった。今回実験に用いたBNラットは、高いIgE抗体産生能を有し、ヒトのアナフィラキシーに類似した過敏症の反応を示すため、アレルギー等

の免疫研究で広く用いられている<sup>14, 15)</sup>。そのため、OVA感作を行っていないCont群でもIgE濃度が高くなったことが示唆される。しかし、OVA特異的IgEは、IP群においてのみ上昇したことから、本研究の条件においてFAモデルが成立したのは腹腔内投与時のみであると考えられる。

細胞性免疫を司るTh1と体液性免疫を司るTh2は通常、互いに抑制し合い、適度なバラ

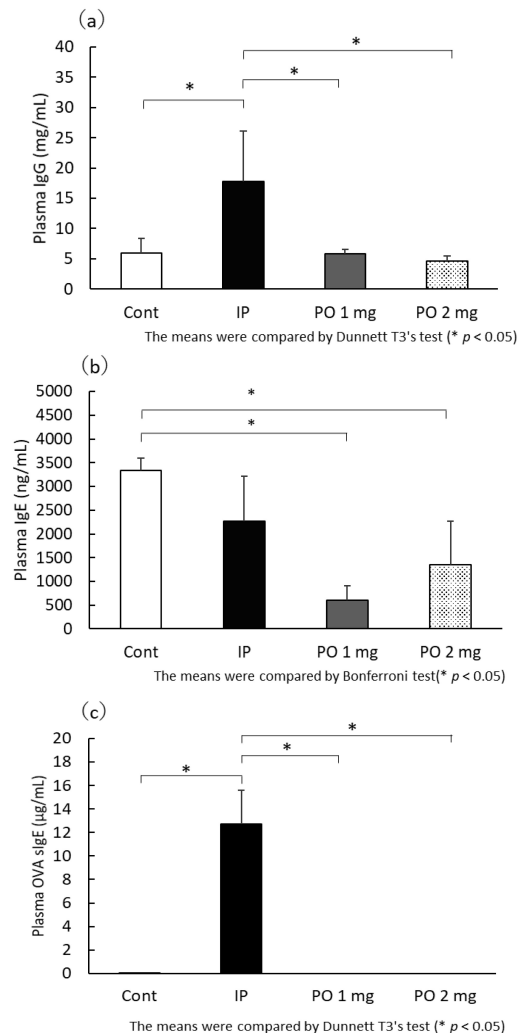


図2 血漿免疫グロブリン (Ig) 濃度

35日間感作後の血漿IgG濃度 (a)、IgE濃度 (b) およびOVA特異的IgE濃度 (c) を示した。IgG濃度はIP群において他の3群に比べ、有意に高く、IgE濃度はPO 1 mg群とPO 2 mg群においてCont群と比べ、有意に低い値を示した。OVA特異的IgE濃度はIP群において他の3群に比べ、有意に高い値を示した。(平均±SD, \* $P < 0.05$ )

ンスをとっているが、なんらかの要因でそのバランスが崩れると様々な炎症性の疾患につながる。食物アレルギーではTh2に偏った結果、過剰な体液性免疫によりIgEへのクラススイッチが生じると考えられている<sup>16)</sup>。そのため、本研究では、脾臓におけるTh1系の代表的なサイトカインであるIL-2とTh2系のサ

イトカインであるIL-4の発現量を測定し、Th1とTh2のバランスを評価した。IL-2、IL-4発現量は、IP群において、いずれも高くなったが、IL-4/IL-2の上昇がみられたことから、Th2にバランスが傾いている可能性が示唆された。しかし、経口投与の群では、Cont群と比べIL-4/IL-2に差がなかったことから、Th1とTh2バランスは変化していないと考えられる。以上の結果から、OVAを腹腔内投与した群ではTh2への偏りがみられ、OVAへの感作が成立し、食物アレルギーモデルが作製されたと考えられる。一方、経口投与した群ではどちらの条件でもTh1とTh2バランスは変化せず、OVAに感作されなかったことが示唆された。免疫系には外来抗原に対して免疫反応が抑制される免疫寛容という反応が備わっている<sup>17)</sup>。経口的に摂取する食物抗原は外来抗原ではあるが、生体にとって必要なものであり、日常的に摂取するものであることから、免疫応答の抑制機構が働いており（経口免疫寛容）、経口免疫寛容の破綻が食物アレルギー発症に関与するといわれている<sup>16, 18)</sup>。また、経皮的なアレルゲンへの接触はアレルギー反応を促進するが、経口的にアレルゲンを摂取した場合、免疫寛容が誘導されるという二重抗原曝露仮説が2008年に提唱されている<sup>19, 20)</sup>。これまでの研究において抗原を大量（50-100 mg）に単回経口投与または少量（0.5-1 mg）を5-7日間連続経口投与することで免疫寛容が誘導されることが報告されている<sup>18)</sup>。本実験においても、35日間毎日または2日に1回OVAを経口投与し続けたことにより、経口免疫寛容が誘導されたことが示唆される。また、経口投与を毎日、ラットに長期間継続することはラットにとって大きなストレスとなる。よって感作成立の点だけでなく、実験動物への負担の点からも腹腔内投与による感作法が効率的であると考えられる。

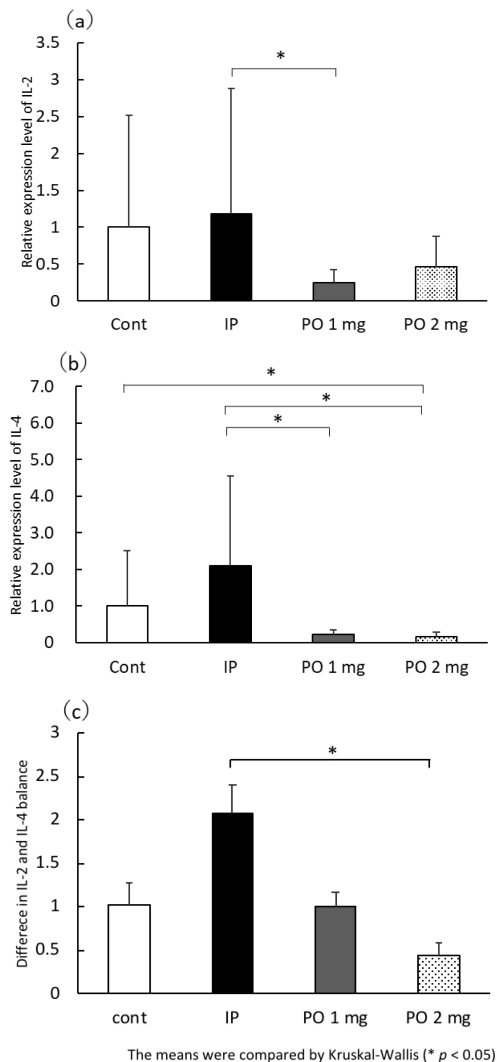


図3 IL-2およびIL-4発現量

脾臓におけるIL-2およびIL-4の発現量を測定した。リファレンス遺伝子に $\beta$ -actinを使用し、相対定量を行った。IL-2発現量 (a) はIP群に比べ、PO 1 mg群で低い値を示し、IL-4発現量 (b) はIP群に比べてPO 1 mg群、PO 2 mg群で有意に低い値を示した。また、Cont群と比べ、PO 2 mg群で有意に低い値を示した。IL-4/IL-2 (c) はPO 2 mg群に比べ、IP群で高い値を示した。(平均 $\pm$ SD、\* $P < 0.05$ )



## V. 謝辞

本研究はJSPS科研費JP22K13605の助成を受けたものです。

## 参考文献

- 1) 海老澤元宏, 伊藤浩明, 藤澤隆夫 (2021)『食物アレルギー診療ガイドライン2021』株式会社協和企画.
- 2) 消費者庁 (2022)「令和3年度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 報告書」[https://www.caa.go.jp/policies/policy/food\\_labeling/food\\_sanitation/allergy/assets/food\\_labeling\\_cms204\\_220601\\_01.pdf](https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_sanitation/allergy/assets/food_labeling_cms204_220601_01.pdf) (2023年10月24日閲覧)
- 3) 消費者庁 (2023)「くるみの特定原材料への追加及びその他の木の実類の取扱いについて(令和5年3月9日事務連絡)」[https://www.caa.go.jp/policies/policy/food\\_labeling/food\\_sanitation/allergy/assets/food\\_labeling\\_cms204\\_230309\\_03.pdf](https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_sanitation/allergy/assets/food_labeling_cms204_230309_03.pdf) (2023年10月24日閲覧)
- 4) 中島陽一, 猪又直子, 大久保公裕 (2023)「ガイドライン解説: 食物アレルギー診療ガイドライン2021第14章 食物以外の抗原感作による食物アレルギー」『小児アレルギー学会誌』第37巻2号, 181-187頁.
- 5) 食物アレルギー研究会 (2022)「食物アレルギーの栄養食事指導の手引き2022」<https://www.foodallergy.jp/2022-nutrition-dietary-guidelines> (2023年10月24日閲覧)
- 6) 日本クレア株式会社「遺伝子改変動物 OVA-IgE JcI」[https://www.clea-japan.com/products/genetically\\_modified/item\\_a0230](https://www.clea-japan.com/products/genetically_modified/item_a0230) (2023年10月24日閲覧)
- 7) Omata, N., Ohshima, Y., Yasutomi, M., et al. (2005) 'Ovalbumin-specific IgE modulates ovalbumin-specific T-cell response after repetitive oral antigen administration' *The Journal of allergy and clinical immunology* 115 (4), PP. 822-827.
- 8) Knippels, L.M., Penninks, A.H., Spanhaak, S., et al. (1998) 'Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model.' *Clinical & Experimental Allergy* 28, PP.368-375.
- 9) Zhu, Q., Li, F., Wang, J., et al. (2017) 'Upregulation of calprotectin in mild IgE-mediated ovalbumin hypersensitivity.' *Oncotarget* 8 (23), PP. 37342-37354.
- 10) Schülke, S., Albrecht, M. (2019) 'Mouse Models for Food Allergies: Where Do We Stand?' *Cells* 8 (6), PP. 546.
- 11) Yokooji T., Matsuo H. (2015) 'Sodium Cromoglycate Prevents Exacerbation of IgE-Mediated Food-Allergic Reaction Induced by Aspirin in a Rat Model of Egg Allergy.' *International archives of allergy and immunology* 167 (3), PP. 193-202.
- 12) 吉田 英生, 坂本 泰寿, 飯倉 洋治 (1998)「食物アレルギーモデルラットの作成と基礎的研究—第2報食物アレルギーと腸管, 肝臓に関する研究—」『昭和医学会雑誌』第58巻2号, 143-149頁.
- 13) 中村晋, 飯倉洋治 (2002)『最新 食物アレルギー』株式会社永井書店.
- 14) Bellou, A., Saint-Laudy, J., Knippels, L., et al. (2003) 'Brown Norway rat ovalbumin-specific immunoglobulin E antibodies increase the human basophil expression of CD63 marker.' *Scandinavian journal of immunology* 57 (3), PP. 271-278.
- 15) Zhu Q., Wang J., Ma J., et al. (2021) 'Changes in inflammatory factors in the Brown Norway rat model of food allergy.' *BMC immunology* 22 (1), PP. 8.
- 16) 矢田純一 (2001)「食物アレルギーと免疫機構」『腸内細菌学雑誌』第14巻, 61-66頁.
- 17) 上野川修一 (2010)「免疫寛容とアレルギー」『アレルギー』第59巻1号, 20-24頁.
- 18) 大野博司 (2020)「専門医のためのアレルギー学講座 39. 粘膜免疫と免疫寛容2. 経口免疫寛容」『アレルギー』第69巻8号, 637-643頁.
- 19) Lack, G. (2008) 'Epidemiologic risks for food allergy.' *The Journal of allergy and clinical immunology* 121 (6), PP. 1331-1336.
- 20) 善本知広 (2017)「経皮感作食物アレルギーの分子メカニズム: 二重抗原曝露仮説の実験的エビデンス」『アレルギー』第66巻10号, 1224-1229頁.