

イヌの食物アレルギーにおける免疫学的解析および
免疫療法に関する研究

Study on immunological analysis and immunotherapy for
canine food allergy.

2016年 9月

麻布大学大学院 獣医学研究科
獣医学専攻 博士課程
疾病制御学
DV1203 島倉 秀勝

要旨

イヌの食物アレルギーは重要なアレルギー疾患の一つである。食物アレルギーは環境要因と遺伝要因の両方が発症に関与していると言われている。ヒトでは衛生環境の清浄化がアレルギー疾患の増加の一因だと考えられており、「衛生仮説」が提唱されている。近年、イヌもヒトと同じ環境で生活するようになっており、衛生環境の清浄化がイヌの食物アレルギーの発症にも影響を与えていると考えられる。また、食物アレルギーを発症しやすい犬種が報告されていることから、遺伝要因が食物アレルギーの発症に関わっていることも推測される。食物アレルギーの病態は大きくIgE依存性とIgE非依存性に分けられる。これらの病態が複雑に影響していることがアレルギーの機序の解明や診断方法・治療法の確立を困難にしている。現在、食物アレルギーの治療は原因食物の摂取を回避することが一般的に行われている。しかしながら、確立された根本的な治療法はない。イヌの食物アレルギーを正確に把握し、有効な根治療法を適用できるようになれば、獣医療にとって大きなメリットがあると思われる。本研究の目的はイヌの食物アレルギーの免疫学的な解析を行い、それに対する治療法の研究開発を行うことである。

第1章では高い頻度で食物アレルギーを発症する家系のイヌを調査した。単一遺伝子疾患を仮定した場合、本家系における食物アレルギーは常染色体優位性遺伝が推定された。全ての食物アレルギーのイヌはIgE非依存性の食物アレルギーを示した。一部の食物アレルギーのイヌに対して食物負荷試験を実施し、食物負荷試験の前後で抗原特異的リンパ球の増殖能を検討したところ、3頭中2頭は原因食物アレルギー特異的リンパ球の活性化が認められた。IgE非依存性食物アレルギーの免疫学的機序は未だ

に不明な点が多い。IgE非依存性食物アレルギーについての研究を行う上で、モデル動物として本家系のイヌを用いることは意義があると考えられる。

第2章ではIgE依存性の食物アレルギーのイヌの血清学的解析を行った。一般的な食物アレルゲンである卵白の粗抗原に対するIgEを測定したところ、食物有害反応犬82頭中8頭(9.8%)が陽性を示した。ヒトにおいて調べられている4つの卵白精製抗原に対するIgE反応性を卵白粗抗原特異的IgE陽性を示した8頭のイヌで調べた結果、8頭中6頭(75.0%)はオボムコイドとオボアルブミンに陽性を示し、8頭中3頭(37.5%)はオボトランスフェリンに陽性を示した。オボトランスフェリンは直鎖状エпитープを持たないことが示唆され、食物アレルギーのアレルゲンとしては重要性が低いと考えられた。本研究において、オボムコイドとオボアルブミンがイヌの主要な卵白精製抗原だと考えられ、今後のIgE依存性食物アレルギーの研究を行う上で重要な基礎データを得ることができた。

第3章ではマウスを用いて、アレルゲン発現組換え乳酸菌の経口免疫療法の基礎的検討を行った。食物アレルギーの根治療法の候補として研究されている経口免疫療法のさらなる治療効果向上を目的として、プロバイオティクスとして注目されている乳酸菌をアレルゲンの輸送担体として用いて実験を行った。卵白精製抗原であるオボアルブミンを発現した*Lactobacillus casei*をマウスに経口投与し、オボアルブミン発現*L. casei*の抗アレルギー効果を検討した。オボアルブミン発現*L. casei*を投与した群のアナフィラキシー反応や血清中IgEの結果は他の群と比較して違いがなく、抗アレルギー効果は認められなかった。今後、経口免疫寛容誘導に必要な抗原量の検討を行い、それらの情報を基にアレルゲン発現*L. casei*の改良を行う必要があると考えられる。

本研究では、IgE依存性ならびに非依存性の食物アレルギーの免疫学的な解析を行った。イヌの食物アレルギーの根治療法として、アレルゲン発現組換え乳酸菌を用いた経口免疫療法の基礎的な研究を行ったが、その抗アレルギー効果は確認できなかった。今後さらなる研究を行い、イヌの食物アレルギーの免疫学的な病態を明らかにし、有効な根治療法の開発をしていく予定である。

Abstract

Canine food allergy is an important allergic disease, which is caused by environmental and genetic factors. In humans, improvement of environmental hygiene is a factor of increasing allergic diseases, and it is called “hygiene hypothesis”. Recently, dogs have been living in the same environment as humans. Thus, the canine food allergy could be caused by the improvement of environmental hygiene as well as humans. On the other hand, genetic factors are associated with the development of canine food allergy because dogs of certain breeds frequently develop the canine food allergy. The pathology of canine food allergy is classified into IgE-mediated and non-IgE-mediated, which are intricately associated with the development of canine food allergy. Therefore, it is difficult to elucidate a mechanism of canine food allergy and establish efficient diagnoses and treatments. At present, food elimination therapy is used as common treatment for the canine food allergy. However, curative therapy for the canine food allergy has still not been established in veterinary medicine. If the curative therapy can be established, it will be a benefit for veterinary medicine. This study aimed to perform immunological analysis of canine food allergy and develop the curative therapy.

First, pedigree dogs that have a high prevalence rate of the canine food allergy were examined. In case of single gene disorder, inheritance pattern in the pedigree was supposed to be autosomal dominant inheritance. All the dogs with canine food allergy exhibited non-IgE-mediated food allergy. Causative food allergens in three of the dogs with canine food allergy were determined by food provocation test. Two of the three dogs showed proliferation of causative food allergen-specific lymphocyte in lymphocyte proliferation test. The immunological mechanism of non-IgE-mediated food allergy is still not well understood. The dogs in this pedigree is useful as a model animal of non-IgE-mediated food allergy.

Second, serological analysis was performed in dogs with IgE-mediated food allergy. Levels of specific IgE to crude egg white allergen which is common food allergen were measured.

Eight of 82 dogs with cutaneous adverse food reaction showed IgE reactivity to crude egg white allergen. Moreover, IgE reactivity to four purified egg white allergens which are characterized in human studies was investigated in the eight dogs with IgE reactivity to crude egg white allergen. Six of the eight dogs showed IgE reactivity to ovomucoid and ovalbumin, and three of the eight dogs showed IgE reactivity to ovotransferrin. Additionally, the result indicated that ovotransferrin did not have a linear epitope. Thus, it can be considered that ovotransferrin is less important as food allergen. In this study, ovomucoid and ovalbumin appear to be major purified egg white allergens in dogs, and these results provided important data for study on IgE-mediated canine food allergy.

Third, a basis examination of oral immunotherapy using allergen-expressing recombinant lactic acid bacteria was performed in a mouse model. To improve the therapeutic effect of oral immunotherapy as a candidate of curative therapy for food allergy, lactic acid bacteria were used as a transport carrier of allergens in this experiments. Ovalbumin-expressing *Lactobacillus casei* was orally administrated to mice, and anti-allergic effects of ovalbumin-expressing *L. casei* were examined. There were no differences in anaphylactic reaction and serum ovalbumin specific IgE levels between ovalbumin-expressing *L. casei* administration group and other groups. Thus, anti-allergic effect of ovalbumin-expressing *L. casei* was not confirmed. Further study is needed to develop allergen-expressing *L. casei* which could demonstrate sufficient anti-allergic effects.

In conclusion, the immunological analysis of IgE-mediated and non-IgE-mediated canine food allergy were performed in this study. Oral immunotherapy using allergen-expressing lactic acid bacteria as a curative therapy for canine food allergy was examined. However, the anti-allergic effect of allergen-expressing recombinant lactic acid bacteria could not be confirmed. Further studies will be needed to identify the immune pathology of canine food allergy and to develop effective and curative therapy for canine food allergy.

目次

要旨	2
目次	7
略号	8
緒言	9
第1章 家族性のIgE非依存性食物アレルギー犬の臨床的・免疫学的解析	16
緒言	16
材料と方法	18
結果	22
考察	24
第2章 IgE依存性食物アレルギー犬の臨床的・免疫学的解析	28
緒言	28
材料と方法	30
結果	33
考察	36
第3章 マウスにおける組換え乳酸菌の経口免疫療法の基礎的検討	40
緒言	40
材料と方法	41
結果	48
考察	51
総括	54
謝辞	57
引用文献	58
図表	68

略号

Alum	Aluminum hydroxide	水酸化アルミニウム
CAFR	Cutaneous adverse food reaction	皮膚型食物有害反応
CFU	Colony forming unit	コロニー形成単位
FcεR	Fc epsilon receptor	IgE受容体
FCS	Fetal calf serum	牛胎児血清
FU	Fluorescence units	蛍光単位
HLA	Human leukocyte antigen	ヒト白血球抗原
i.g.	Intragastric	胃内
i.p.	Intraperitoneal	腹腔内
i.v.	Intravenous	静脈内
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	Interleukin	インターロイキン
LY	Lysozyme	リゾチーム
MHC	Major histocompatibility complex	主要組織適合抗原
OD	Optical density	光学濃度
OM	Ovomucoid	オボムコイド
OT	Ovotransferrin	オボトランスフェリン
OVA	Ovoalbumin	オボアルブミン
SD	Standard deviation	標準偏差
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine	胸腺および活性化制御ケモカイン
Th1	Type 1 helper T cell	1型ヘルパーT細胞
Th2	Type 2 helper T cell	2型ヘルパーT細胞
TLR	Toll like receptor	Toll様受容体
Treg	Regulatory T cell	制御性T細胞
QOL	Quality of life	生活の質

緒言

食物アレルギーとは、抗原である食物タンパク質に対する免疫の過剰反応であり、原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が誘発される現象である。食物アレルギーは食物有害反応のうちの一つで、食物有害反応は食物アレルギーの他に食物不耐症と食中毒が含まれる。免疫学的機序を介さない食物不耐症は魚の干物に含まれるヒスタミンや食品添加物のような薬理活性物質によって引き起こされる反応や乳糖不耐症のような生体側の代謝異常によって引き起こされる異常である。主な食物アレルギーの症状は蕁麻疹・発赤・紅斑・浮腫・湿疹などの皮膚症状や喘息発作・咳嗽などの呼吸困難、悪心、動悸があり、重篤な場合はアナフィラキシーが起きる¹。ヒトの食物アレルギー患者数は先進国において年々増加しており、大きな問題となっている²。特に小児の食物アレルギーの罹患率は大幅に上昇している。加えて、多くの食物アレルギーの子供は重篤なアレルギー反応を起こした経験を持っている³。また、少ないながらも食物アレルゲンの誤食によるヒトの死亡例も報告されている⁴。イヌの食物アレルギーの割合は正確な統計がないため不明だが、ヒト同様に一般的な疾患であると言われている。食物アレルギーのイヌでは、強い皮膚の痒みで寝れなかったり、腸管の炎症による消化機能の低下で栄養失調に陥る蛋白漏出性腸症を起こしてしまったりといったQOLの低下が問題となる⁵。また、重度の食物アレルギー犬は命の危険に関わるアナフィラキシーショックを起こす可能性もある⁶。治療期間が長期に及ぶ場合が多いため、イヌの飼い主にとっては治療費や通院の手間が大きな負担となっている。

食物アレルギーは環境要因と遺伝要因の相互作用によって発症する多因子疾患であると考えられている。環境要因の一つとして衛生面が挙げられる。衛生面の改善に

より細菌やウイルス感染が減少し、そのためにTh1細胞が活性化される機会が減少したことにより、Th2優位になりアレルギーを起こしやすくなっていると考えられている（衛生仮説）⁷。実際、アレルギー疾患の割合は発展途上国よりも清浄化した発展国の方が高いと考えられている。東西ドイツ時代の東ドイツは西ドイツに比べて、アレルギー疾患の罹患率が低かったが、1990年の東西ドイツ統一後、旧東ドイツ地域は経済発展にともなって衛生環境が改善し、それに伴ってアレルギー疾患の発症率が増加し、結果的に旧西ドイツ地域と同程度のアレルギー疾患の罹患率まで上昇した^{8,9}。衛生仮説の要因は多様であるが、その大きな要因の一つとして微生物が挙げられる。生体と密に接する微生物の一つである腸内細菌叢を解析した研究では、腸内細菌叢の違いがアレルギーの成立に影響を及ぼすことが示唆された¹⁰。

環境要因の報告に対して、アレルギー疾患の多発する家系の存在や双子研究より、アレルギー疾患に遺伝要因も深く関わっていることが推測されている^{11,12}。1960年代にHLAが発見されてからはアレルギー疾患とHLAの統計学的相関解析が行われ、スギ花粉症とHLA-DP5の相関やセリアック病とHLA-DQ2・HLA-DQ8の相関が報告されてきた^{13,14}。また、IL-4産生に関わる遺伝子や高親和性IgE受容体に関わる遺伝子などがアレルギー関連遺伝子候補として報告されている^{15,16}。このように環境要因・遺伝要因が複数あり、複雑に絡み合っていることがアレルギーの機序の解明や診断方法・治療法の確立を困難にしている。

IgEを介するアレルギーはI型過敏症に分類される即時型の過敏反応である。アレルギーが体内に侵入すると、抗原提示細胞がアレルギーを取り込み、プロセッシングしたのちに、ナイーブT細胞にペプチド断片を抗原提示する。抗原提示を受けたナイーブT細胞はIL-4存在下でTh2細胞へと分化する。Th2細胞がさらに産生するIL-4の作

用によりIgM産生B細胞にクラススイッチが起こり、IgE抗体を産生するようになる。IgEは肥満細胞や好塩基球の細胞膜上のFcεRIに結合する。細胞膜上において、複数のIgEと抗原が結合して架橋形成が起きると、これらの細胞は活性化し、すでに細胞内顆粒として貯蔵されているヒスタミンや細胞膜脂質より産生される種々のロイコトリエンを細胞外へ放出する。これらのケミカルメディエーターが血管透過性亢進、粘液腺分泌亢進、平滑筋収縮などの反応を惹起することでIgE依存性アレルギーの症状が引き起こされる。IgE依存性アレルギーは抗原摂取から発症までの時間が短く、15分から20分で最高に達し、1時間程度で消失する。ヒトのIgE依存性アレルギーの代表的な疾患はアナフィラキシーや気管支喘息、アレルギー性鼻炎、蕁麻疹などであり、食物アレルギーの中では特にピーナッツアレルギーが挙げられる。イヌではスギ花粉による花粉症やダニなどの環境アレルゲンによるアトピー性皮膚炎においてIgEを介することが報告されている^{17,18}。抗原によってIgEの親和性や結合数が変わり、アレルギー症状の重症度が異なるため、各種抗原に対するIgE反応性を詳細に解析することは重要である。

IgE依存性が即時型の反応であるのに対して、抗原を摂取してから数時間後に症状が発現してくる遅延性の食物アレルギーはIgE非依存性であると考えられている。IgE非依存性食物アレルギーは、摂取した感作抗原が腸粘膜において細胞性免疫を介する反応を引き起こすことによって起きる。ヒトではアレルギー性好酸球性食道炎・胃腸炎やセリアック病は細胞性の過敏反応によって起こるIgE非依存性アレルギーだと言われている。近年、イヌのIgE非依存性食物アレルギーについても次第に分かってきた¹⁹⁻²²。2004年、石田らは血清中IgE濃度が低い食物アレルギーのイヌが存在し、それらのイヌでは食物抗原に対する末梢血リンパ球の増殖能が高くなっていること

を報告した¹⁹。イヌのIgE非依存性食物アレルギーの病態は、TARCなどのケモカインが産生された皮膚病変などにCCR4⁺CD4⁺T細胞が浸潤し、そこに腸管から吸収された抗原が到達すると、集まっているCCR4⁺CD4⁺T細胞が抗原に反応して、アレルギー性炎症を引き起こすと考えられている²³⁻²⁶。イヌの食物アレルギーにおいてはIgE非依存性の割合が多く、食物抗原によって皮膚症状を示すイヌの約80%が細胞性免疫を介した食物アレルギーだと推測されている^{19, 27}。

上記のように食物アレルギーには複数の病態があり、単独もしくは混合で食物アレルギーが発症すると考えられている。したがって、診断する際には病態に合わせた検査方法を選択する必要がある。まずは、詳細な問診から食物摂取と臨床症状の因果関係を把握することが一番大事である。食物アレルギー診断のゴールドスタンダードは食物除去試験ならびに食物負荷試験である。食物除去試験では、食事歴から疑わしい原因食品を推定し、その食品が含まれる食事を回避することによって食物アレルギーの症状が軽減もしくは消失することを確認する。食物除去試験によって症状が軽減・消失した場合、原因食品を特定するために食物負荷試験を行う。食物除去試験で除いた食品を試験的に給餌し、即時型もしくは遅延型のアレルギー症状の再発が認められれば、食物アレルギーと確定することができる。食物負荷試験は標準化された方法はなく、報告ごとに方法は様々である。それゆえ、食物の負荷量や期間によって症状の出現時期や誘発の有無が左右され、判定が難しいこともある²⁸。

IgE依存性の免疫反応を反映した試験として血清中アレルギー特異的IgEの測定や皮内反応、IgE非依存性食物アレルギーを反映した試験としてリンパ球増殖試験が使用されている。イヌの食物アレルギーにおける皮内反応の診断精度は感度10.3-33.0%，特異度50.5-95.6%である²⁹。血清中食物アレルギー特異的IgE検査の感度・

特異度は環境アレルゲンと比較して相対的に低く、30-50%と報告されている³⁰。リンパ球増殖試験は2004年の石田らの報告以来、イヌのIgE非依存性食物アレルギーの診断に使用されるようになってきた。ヒトにおいては1990年代からリンパ球増殖試験の有効性が報告されてきたが³¹⁻³⁴、イヌの食物アレルギーにおけるリンパ球増殖試験の有効性についての報告はまだ少なく、その診断意義についてはまだ最終的な結論が得られていない。それぞれの検査法は標準的なプロトコールはなく、測定方法の違いや使用する抗原濃度の違いが結果に影響を及ぼす^{35, 36}。有効な検査方法を確立することはイヌの食物アレルギーの理解に寄与すると考えられる。

食物アレルギーと診断されると、原因となる食物を摂取しないで発症を防ぐ、いわゆる除去食療法を行うことが治療の基本である。しかし、厳格な除去食療法は栄養障害を引き起こすことから、適切な栄養指導のもとで行われなくてはならない。また、原因食物の除去をしても、将来的に治るわけではない³⁷。対症療法である免疫抑制剤の投与はアレルギー症状を抑えることは可能だが、食物アレルギーの根本的な治療にはならないため、投与が長期に及ぶ可能性が高く、副作用を考慮する必要がある。近年、食物アレルギーの新たな根治療法として経口免疫療法が研究されている。経口免疫療法は次のような手順で治療を行う。まず、少量の原因食品を経口摂取して安全を確認したのちに、次第に摂取量を増やしていく（増量期）。それに続いて、一定の食品量を摂取することによって脱感作状態を維持する（維持期）。最終的に一定の食品量を摂取しなくても免疫寛容状態を維持できれば完治したことになる（耐性化）。しかしながら、ほとんどの症例は一定量の食品摂取を中止すると食物アレルギーが再発してしまう一時的な治癒である（脱感作）。経口免疫療法の研究が進んでいるヒトでは、脱感作状態に至る患者の割合は36-84%³⁷⁻⁴³、耐性化に至る割合は28%と報告され

ており⁴³、治療が成功する割合は低いと考えられる。さらに、経口免疫療法実施中には軽度から中程度のアレルギー症状が出現し、これらの有害反応によって経口免疫療法を中止してしまう患者が8-35%の割合で存在する³⁷⁻⁴³。これらの問題のために、経口免疫療法は未だにヒトの食物アレルギーの一般的な治療法となっていない。イヌでは、一部の研究で経口免疫療法が行われているが⁴⁴、一般的には行われていない。

経口免疫療法の改良の一つとして、アレルゲンを発現させた組換え乳酸菌を経口的に投与して免疫寛容を誘導する方法が研究されている。乳酸菌はそれ自体に免疫賦活作用があり、乳酸菌の菌体のみを経口投与するだけでも抗アレルギー効果を示す⁴⁵。乳酸菌の免疫賦活作用のメカニズムは完全に明らかになってないが、メカニズムの一つとして菌体のリポタイコ酸の作用が挙げられる。リポタイコ酸が抗原提示細胞膜上のTLR2を刺激してIL-12などのサイトカインの産生を促進することによって、Th1を誘導すると推測されている⁴⁶。アレルゲンを発現させた乳酸菌を経口免疫療法に用いることで、経口免疫療法の治療効果に乳酸菌の抗アレルギー効果を付加して、より効果的で安全な経口免疫療法が可能だと推測される。マウスを用いた基礎的な研究では、様々な食物抗原や環境抗原を発現した組換え乳酸菌をアレルギーモデルマウスに経口投与すると、抗原特異的IgEの低下やアレルギー反応の軽減などが認められることが報告されている⁴⁷⁻⁵¹。乳酸菌の免疫賦活作用は投与経路や投与量、菌種や菌株によって異なるため、それらの要素が治療効果に影響を及ぼすことが分かっている^{51,52}。アレルゲン発現組換え乳酸菌を利用した経口免疫療法は将来的なアレルギーの治療法として有望であるが、臨床応用するためには投与条件の検討を行い、さらに治療効果を向上させる必要があると考えられる。また、組換え乳酸菌を臨床応用するためには、抗生物質耐性遺伝子が環境中へ水平伝播するのを防ぐ必要があり、そのためには

発現ベクターから抗生物質耐性遺伝子を除去する、もしくは抗生物質耐性遺伝子に頼らない栄養要求性に基づいたセレクションシステムを使って乳酸菌の選択培養をするなどの対策を講じる必要があると考えられる⁵³。

本研究では、イヌの食物アレルギーの病態を明らかにし、それに対する治療法の研究開発を行った（図0-1）。第1章では遺伝的な関与が疑われるIgE非依存性食物アレルギーの家系のイヌの解析を行った。第2章ではIgE依存性の食物アレルギーのイヌの血清学的解析を行った。第3章ではマウスを用いて、アレルゲン発現組換え乳酸菌の経口免疫療法の基礎的検討を行った。

第1章 家族性のIgE非依存性食物アレルギー犬の臨床的・免疫学的解析

緒言

イヌの食物アレルギーは一般的な免疫性疾患である⁵⁴。明確な性差や好発犬種、好発年齢はないと言われている⁵⁵。しかしながら、ボクサー、スプリングー・コッカー・スパニエル、コリー、ダルメシアン、ジャーマン・シェパード、ラサアプソ、ミニチュア・シュナウザー、レトリバー、シャーペイ、ソフトコーテッド・ウィートン・テリア、ダックスフンド、ウェスト・ハイランド・ホワイト・テリアなどが食物アレルギーのよくみられる犬種と言われている⁵⁵。また、日本における研究では、フレンチブルドックとシーズーは食物アレルギーの好発犬種の候補であると報告している¹⁹。食物アレルギーのイヌは皮膚症状または嘔吐や下痢といった消化器症状を示す⁵⁶。臨床症状の表現型は犬種によって異なる傾向を示している⁵⁷。

食物アレルギーは免疫学的にIgE依存性とIgE非依存性の2種類に大別される。即時型のIgE依存性食物アレルギーは皮内反応や血清中IgEの測定によって診断できるが、IgE非依存性食物アレルギーには有効な免疫学的な診断方法がなかった。しかしながら、近年、IgE非依存性の食物アレルギーの診断方法が開発された¹⁹。医療分野では、IgE非依存性食物アレルギーの一つである新生児-乳児消化管アレルギーの診断にリンパ球増殖試験が利用されている⁵⁸⁻⁶⁰。ただし、厚生労働省の出している診断治療指針では、LPSが除去されている食物抗原を用いたリンパ球増殖試験を用いるべきであるとしている。食物抗原中にLPSが含まれていると、リンパ球が非特異的な増殖をしまい、特異度の低下につながるためである。また、リンパ球の培養にIL-2を添加する方が無添加に比べて測定感度が上昇することが報告されている^{32, 61}。IL-2を添加せず、アレルゲンの刺激のみでリンパ球増殖試験を行った場合、アレルゲンの種類に

よって、感作Tリンパ球の反応が小さいことがあり、ほとんど検出できないことがある。この原因としては特異抗原に反応するリンパ球の数が極めて少数であることが考えられる。ヒトの末梢血単核球を用いた研究では、4-5日間アレルゲンと共培養した末梢血単核球にさらにIL-2を添加して3日間培養すると、添加抗原特異的な細胞増殖が認められると報告している^{32, 61}。リンパ球増殖試験に対して否定的な報告もあるが³⁴、上記のことを考慮したリンパ球増殖試験はIgE非依存性食物アレルギーの診断として十分に利用できると考えられる^{33, 62, 63}。獣医療分野では、IL-2を添加する方法のリンパ球増殖試験が日本において商業的に利用可能となっており、食物アレルギーの検査として利用されている（動物アレルギー検査株式会社、相模原、日本）。イヌの食物アレルギーの治療法を念頭に置いて研究を進めるにあたり、治療法の評価系を確立することは重要である。

本研究では、食物アレルギーを呈する一家系に属するイヌの臨床的・免疫学的解析を行った。まず、食物除去試験を行い、食物除去試験に反応したイヌについては内視鏡検査ならびに食物負荷試験を行い、臨床的な特徴を解析した。また、免疫学的な解析として、血清中抗原特異的IgEの測定と抗原特異的リンパ球増殖の測定を行った。

材料と方法

食物アレルギー犬の診断

本研究では、浦安中央動物病院（浦安、日本）に来院したパピヨンについて調査した（図1-1）。食物アレルギーの診断は以下の手順に従って行った。慢性下痢を示すイヌに対して糞便検査を実施した。糞便中の細菌が観察された場合、少なくとも2週間の経口的な抗生物質（エリスロマイシン:15mg/kgを1日に2回、アンピシリン:30mg/kgを1日に3回）の投薬を行った。臨床的改善が観察されなかった場合、細菌性腸炎の可能性を排除して、さらなる検査に進んだ。経口プレドニゾロン（1 mg/kg/日）、メトロニダゾール（15 mg/kgを1日に2回）、ブチルスコポラミン臭化物（0.5 mg/kgを1日に2回）、メトクロプラミド（0.3 mg/kgを1日に2回）及びファモチジン（0.5 mg/kgを1日に2回）を少なくとも2週間投与した。食物アレルギーの診断は食物除去試験・食物負荷試験によって行った。また、血清中の抗原特異的IgE濃度測定ならびにリンパ球増殖試験を行った。

食物除去試験と食物負荷試験

本研究の食物除去試験では、市販の単一タンパク源のドックフード（ドクターズケア・アミノプロテクトケア、日本農産工業（株）、横浜、日本）を用いて行った⁶⁴。この除去食はジャガイモ由来のタンパク質のみから製造されている。食物アレルギー疑いのイヌが以前にジャガイモタンパク質を摂取していないことを確認した上で、この除去食を与えた。除去食は6-8週間給餌した。食物除去試験によって臨床症状が治まったイヌは食物負荷試験を行った。食物負荷試験は7日間を1サイクルとして行った。負荷食品を計量し、1日目5 g、2日目10 g、3日目20 g、4日目40 g、5日目80 g、

6・7日目100 gと漸増させて給餌した。アレルギー症状再発時には食物負荷試験を中止し、対症療法を行った。

内視鏡検査

内視鏡検査は事前に16-24時間の絶食を行った後に行った。胃十二指腸鏡検査は、麻酔下にてフレキシブルビデオ内視鏡を用いて行った。生検鉗子を用いて十二指腸下行部および屈曲部より複数の十二指腸粘膜の組織サンプルを採取した。組織サンプルは直ちに10%中性緩衝ホルマリンに入れて固定した。組織学的検査のため、生検標本は緩衝4%ホルマリン溶液に移したのち、パラフィン包埋した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色した。すべての病理組織標本は、同一の病理学者（高崎病理センター、高崎、日本）によって評価した。

ELISAによる抗原特異的IgEの測定

イヌにおける定量的抗原特異的IgEの測定は、以前に報告された方法を参考にして動物アレルギー検査株式会社にて行った⁶⁵。18種類の食物抗原抽出液はGREER社（Lenoir, NC, USA）より購入した（表1-1）。10～20 μ g/mlに希釈した食物抗原溶液を96ウェルプレートのウェルに固相化した。洗浄後、1%ゼラチン添加PBSをウェルに加えて2時間ブロッキングした。血清を1%ゼラチン添加PBS-Tで1000倍希釈してウェルに加えて、4°Cで一晩インキュベートした。洗浄後、ビオチン標識抗マウス×イヌIgE抗体（0.5 μ g/ml）をウェルに加えて室温で2時間インキュベートした。ストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ（Roche Applied Science, Penzberg, Germany）をウェルに加えたのち、室温で2時間インキュベートし、洗浄したのち、4-メチルウ

ンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) をバッファーAで希釈してウェルに加えた。室温で1時間インキュベートしたのちに 0.25 M 炭酸ナトリウムをウェルに100 μ L加えて反応を停止した。マイクロプレートリーダーPowerscan MX (励起光:355 nm, 蛍光:460 nm、DSファーマバイオメディカル株式会社、吹田、日本) によって蛍光単位 (Fluorescence units, FU) を測定した。検量線作成のためのウェルには、ラット抗マウスIgE抗体 (Clone R35-72; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を固相化したのち、既知の濃度の精製マウスIgE (Clone C38-2; Becton Dickinson) を加えた。バックグラウンド反応を補正するため、BALB/cマウスの正常マウスのプール血清ならびに健康なビーグル犬のプール血清のFU値を測定し、それぞれのFU値を用いて検量線、検体のFU値を補正した。検体の測定結果は、検量線に基づいて算出し、ng/mlで表した。健常犬を使った以前の研究より、100 ng/ml以上を示す検体は陽性として扱った²⁰。

抗原特異的リンパ球増殖試験

リンパ球増殖試験は以前に報告された方法を用いて動物アレルギー検査会社にて行った (図1-2) ^{20, 22, 64}。自家末梢血単核球は5 μ g/mlの食物抗原を添加した10%FCS添加RPMI-1640培地 (Sigma-Aldrich) を用いて37°C 5%CO₂下で培養した。4日後、ヒトIL-2 (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) を5 ng/mlで添加して、さらに3日間培養した。ConA (Sigma-Aldrich) を5 μ g/mlで加えて刺激した細胞を陽性コントロールとした。

培養後、細胞をAlexa 647標識抗マウスCD4抗体 (Serotec Ltd., Oxford, UK) とフィコエリトリン標識抗ヒトCD25抗体ACT-1 (DAKO, Glostrup, Denmark) で染色した。ま

た、アイソタイプコントロールとして、Alexa647標識ラットIgG2aとフィコエリトリン標識マウスIgG1 (Serotec) による染色も行った。Propidium iodid (Becton Dickinson) の染色によって死細胞を除去したのちに、FACS CantoII (Becton Dickinson) とFACSDivaソフトウェア (Becton Dickinson) によってCD4⁺細胞集団の解析を行った。活性化リンパ球であるCD4⁺CD25^{low}細胞を検出し、CD4⁺細胞に占める割合を算出した。健常犬を用いた以前の研究では、活性化抗原特異的リンパ球の割合のカットオフ値を1.2%としている²⁰。

結果

食物アレルギー犬の臨床的特徴

一つの家系に属するパピヨン19頭のアレルギー発症についての情報を得た（図1-1）。単一遺伝子変異による食物アレルギーの発症を仮定した場合、常染色体性優性遺伝の遺伝様式が推定された。これらのイヌのうち、7頭については飼い主より譲渡を受け、さらに詳細な検査を行った（表1-2）。7頭中5頭で消化器症状が認められた。No. 5と6の2頭は腹水の貯留、低アルブミン血症を示した。アレルギー症状が認められた5頭はステロイドによる免疫抑制に反応し、消化器症状が改善した。また食物除去試験を行ったところ、5頭全てで消化器症状の改善が認められた。

No. 5～7の3頭については内視鏡検査ならびに病理組織検査を実施した（図1-3）。十二指腸粘膜には浮腫・肥厚が認められた。腸管粘膜には多数のリンパ球ならびに少数の形質細胞の浸潤が認められた。これらの3頭はリンパ球形質細胞性腸炎と診断された（表1-2）。

網羅的な食物抗原特異的IgEの測定

消化器症状を示した5頭は、ドックフードの原材料に一般的に使用されている18種類（肉類6種、魚類4種、穀物5種、その他3種）の食物抗原に対する血清中特異的IgEをELISA法によって測定した（表1-1）。5頭全てで全ての抗原に対してカットオフ（100 ng/ml）未満の値を示し、陰性だった（表1-2）。

食物負荷試験による抗原特異的リンパ球増殖能の変化

アレルギー症状を示した5頭のうち、症状が重篤だった1頭（No. 5）を除いた4頭で食物負荷試験を実施した（表1-3）。負荷する食品は過去に給餌していた餌に含まれる成分を参考にして選択した。4頭中3頭は食物負荷によってアレルギー症状を引き起こし、No. 1はサケ、No. 6とNo. 7はラム肉が原因アレルゲンであった。No. 3はアレルギー症状を誘発することは出来なかった。アレルギー症状再発がみられて3頭については、食物負荷試験の直前とアレルギー症状再発後2週間の時点（負荷試験後）で末梢血単核球を採取し、リンパ球増殖試験を行った（図1-4）。ラム肉に反応したNo. 5とNo. 6のイヌでは、負荷試験後にラム肉特異的な活性化リンパ球の割合の上昇が認められた。しかしながら、サケによってアレルギー症状が誘発されたNo. 1についてはサケ特異的な活性化リンパ球の割合に変化はみられなかった。

考察

本章では、常染色体優位性遺伝が推定される家族性の食物アレルギーの集団を調査し、IgE非依存性の免疫学的機序の一端を解明した。経時的に抗原特異的リンパ球増殖試験を実施した3頭中2頭はアレルギー症状の再発と相関して抗原特異的リンパ球の活性化が認められ、IgE非依存性食物アレルギーにおけるリンパ球増殖試験の有効性が示唆された。

純血種のイヌでは、犬種を確立する際の近親交配によって遺伝的な多様性が制限されており⁶⁶、疾患に関連する遺伝子変異を犬種内で高確率に保有している可能性がある。食物アレルギーの好発犬種や家系の犬を用いて食物アレルギーの原因遺伝子変異を探索すれば、原因遺伝子の検出力は非常に高いと考えられる。ただし、イヌを使った原因遺伝子探索をする際にいくつかの留意点がある。アトピー性皮膚炎のイヌのゲノムを網羅的に解析した以前の研究では、疾患への関連が疑われる遺伝子領域は犬種によって異なっていると報告されている⁶⁷。したがって、犬種ごとに原因となる疾患関連遺伝子が異なっていることが考えられ、原因遺伝子の網羅的解析は特定の犬種に絞って行った方がよいと考えられる。さらに、地域を考慮して原因遺伝子を探索した方がよいと思われる。例えば、欧米で確立された純犬種を日本で繁殖する際、極端に遺伝的多様性が制限される恐れがある。なぜなら日本は島国であり、動物の移動は制限されるため、一部の優秀な雄を起源とした近親交配が進んでいると考えられる。したがって、日本の純血種のイヌが持つ原因遺伝子は他国の純血種のイヌでは見られない独自の遺伝子変異の可能性があると思われる。

ヒトのアレルギー関連候補遺伝子は複数報告されている。ヒトの喘息・鼻炎患者では染色体11q13近傍にアレルギー関連遺伝子が存在すること、さらにFcεRIβ鎖分子

をコードする遺伝子のきわめて近傍にあることがわかっている¹⁶。さらにFcεRIβ鎖をコードしている遺伝子の第6エクソンでアミノ酸置換が認められるヒトのアトピー家系が報告されている⁶⁸。またIL-4受容体αサブユニット遺伝子の1902番目の一塩基置換¹⁵やIL-13遺伝子の変異⁶⁹とヒトのアトピー性皮膚炎の関連も報告されている。しかしながら、これらの候補遺伝子に対して否定的な結果も報告されている^{70,71}。一方、1856人のアトピー性皮膚炎患者と7021人の健常なヒトを対象にした大規模な全ゲノム関連解析で8つの原因遺伝子 (*IL1RL1-IL18R1-IL18RAP*, MHC region, *OR10A3-NLRP10*, *GLB1*, *CCDC80*, *CARD11*, *ZNF365*, *CYP24A1-PFDN4*) の候補が報告されているが、明らかな原因遺伝子の特定には至っていない⁷²。これらの様々な研究を行ってもアレルギーの原因遺伝子が特定出来ない理由として、複雑な機序によって起こるアレルギーには複数の原因遺伝子が存在し、それぞれの原因遺伝子は表現型に対する影響が小さいことが考えられる。もう一つの理由として、ヒトは遺伝的多様性に富んでいるため、疾患とは関係ない遺伝子変異を誤って検出してしまう恐れがある。本研究で解析したパピヨンの家系はスウェーデンの数頭の雄を起源とし、日本国内のみで繁殖されている。この家系では、近交系数が高くなるような交配が行われており、影響力の強い疾患関連遺伝子が受け継がれている可能性がある。また、純血種のイヌは遺伝的背景がヒトに比べて均一であることが考えられる⁷³。これらの理由から、本家系のイヌは食物アレルギーの原因遺伝子変異の探索研究に適していると考えられる。

アレルギー疾患モデル犬としては2つの報告がある^{74,75}。これらのモデル犬は、IgEの産生能が高い個体を選び出して、それらを交配することで、高IgE産生犬のコロニーを作出することによって作られた。これらのアレルギー疾患モデル犬はダニ抗原を経皮的もしくは皮下に投与することで皮膚炎を引き起こし、アトピー性皮膚炎様の病

態を示す。Hammerbergらが報告しているアレルギー疾患モデル犬はトウモロコシ、大豆、ピーナッツ、鶏肉を食べることで掻痒感や耳炎などの皮膚症状や消化器症状を発症する^{28,74}。しかしながら、IgE非依存性の食物アレルギーモデル犬の報告はない。2004年に石田らによってIgE非依存性食物アレルギーの報告がされて以来¹⁹、いくつかのIgE非依存性の食物アレルギーの報告がされてきた^{20,21}。それらの報告では、食物アレルギーのイヌの約80%がIgE非依存食物アレルギーであるとしている。本研究で解析したIgE非依存性の食物アレルギーの家系のイヌを疾患モデルとして確立できれば、今まで不明な点が多かったIgE非依存性食物アレルギーの病態解明や治療法開発に大いに役立つと考えられる。ヒトにおいてもIgE非依存性食物アレルギーの患者は多いため、IgE非依存性食物アレルギーのモデル動物を確立することは、医療分野においても重要な意味を持つ^{76,77}。現在、コロニー化を目的として、この家系のイヌを使った交配を行っている。

リンパ球増殖試験は細胞性免疫を反映し、遅延型の食物アレルギーに対して用いられる検査である³¹。アトピー様皮膚炎を示すイヌの88.2-90.7%はリンパ球増殖試験で陽性を示すことが報告されており、アトピー様皮膚炎を示す多くのイヌが細胞性免疫を介して食物抗原に感作されていることがわかっている^{21,22}。また、食物除去試験によって症状が改善すると、活性化した食物抗原特異的リンパ球の割合が有意に減少すると報告されている^{19,20}。しかしながら、イヌにおいて食物負荷試験の前後でリンパ球増殖試験を行った報告はない。本研究では、食物負荷試験後、アレルギー症状が認められた3頭中2頭は活性化抗原特異的リンパ球の割合が増加した。本研究の症例数は少ないため、プレリミナリーな結果ではあるが、リンパ球増殖試験はIgE非依存性食物アレルギーの発症をリアルタイムに反映している可能性がある。今後、リンパ球

増殖試験の有用性をさらに検証するため、多くの症例を用いて研究を行う必要があると考えられる。

第2章 IgE依存性食物アレルギー犬の臨床的・免疫学的解析

緒言

IgE依存性食物アレルギーはIgEを介して肥満細胞や好塩基球がケミカルメディエーターの脱顆粒を起こす事によって引き起こされる。血清中の抗原特異的IgEを測定することはIgE依存性食物アレルギーの診断に重要である⁷⁸。加えて、粗抗原中に含まれる種々の精製抗原に対するIgE反応性を詳細に解析することは食物アレルギーの診断や治療に役立つことがヒトで分かっている。精製抗原特異的IgEの反応性を知る利点として、その食物アレルギー患者の予後を予測することが可能になることが挙げられる^{79,80}。精製抗原はそれぞれ様々な特徴を持っている。その中でも耐消化性の精製抗原は、発達した消化機能を持つ成人の消化管であっても、アレルゲン性を保持したまま腸管に到達する⁸¹。そのため、耐消化性の抗原に対する特異的IgEを持つ小児患者は、成長して消化機能が発達したとしても、食物アレルギーが治らず、持続しやすい傾向にある^{82,83}。他の利点として、アレルギー反応を起こす可能性がある食品・薬品を予測することができることが挙げられる^{79,84}。異なる食物であっても、相同な精製抗原が含まれる場合がある。相同な精製抗原を持つ食物間では、IgEの交差反応が認められる可能性が高く、片方の食物に感作された患者は、もう一方の食品の摂取でアレルギー症状を引き起こす恐れがある。例えば、卵アレルギーのヒトは鶏肉の摂取やインフルエンザワクチン（鶏卵を使用して製造）の接種でアレルギー症状が出る恐れがある⁸⁵。従って、精製抗原特異的IgEの交差性の情報を得ることは除去食の選択をする際に有用であると考えられる。

本研究では、イヌのIgE依存性の食物アレルギーの病態の一端を解明するため、食物有害反応を示すイヌの集団の血清を用いて、血清中の食物抗原特異的IgEを測定し

た。まず、主要な食物抗原である卵白粗抗原に対するIgEの反応性をELISA法により測定した。卵白粗抗原特異的IgEを持つイヌについては犬種、性別、発症年齢、症状を調べ、食物負荷試験によって原因食品の特定を行った。また、ヒトにおいて卵白粗抗原中には4つの主要な精製抗原があると報告されているが、イヌにおける報告はない。これらの精製抗原に対するIgE反応性を明らかにすることはイヌの食物アレルギーの新たな治療法開発において重要な役割を果たすと考えられるため、血清中の卵白精製抗原特異的IgEをELISA法ならびにウェスタンブロット法によって解析した。

材料と方法

卵白アレルギー

卵白粗抗原はAlpha Diagnostic International (Chicken whole egg white proteins; San Antonio, TX, USA) より購入した。卵白精製抗原であるオボムコイド (OM), オボトランスフェリン (OT), リゾチーム (LY) はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した (表2-1)。オボアルブミン (OVA) は、Everbergらの方法で卵白粗抗原より精製された物を用いた⁸⁶。

食物有害反応犬の診断

ふじむら動物病院 (箕面、日本) に来院した非季節性の慢性掻痒を示すイヌのうち、イヌアトピー性皮膚炎の臨床的診断基準 (Prélaudの診断基準⁸⁷: 「ステロイド反応性の掻痒がある」「耳介に紅斑が認められる」「両前肢に紅斑性の皮膚炎がある」「口唇炎がある」「発症年齢が6ヶ月齢から3歳齢の間である」の5項目のうち3項目以上に当てはまる症例) を満たした症例を用いて研究を行った。細菌や真菌に感染したイヌは、この研究から除外した。イヌアトピー性皮膚炎のイヌのうち、食物によって症状が引き起こされているイヌ (皮膚型食物有害反応犬 (CAFR犬)) を診断するために、食物除去試験を6~8週間行った²⁰。食物除去試験によって皮膚症状が改善し、CAFRと診断されたイヌは82頭だった。さらに、ペットの飼い主から了解を得た一部の症例は1週間の食物負荷試験を行った。CAFR犬の血清を採取して本研究に使用した。卵を含まない餌を給餌されている20頭の健康なイヌから得られた血清を陰性対照として使用した。

ELISA法による抗原特異的IgE抗体の測定

卵白粗抗原及び卵白精製抗原に対する抗原特異的IgE抗体を蛍光ELISA法によって測定した⁸⁸。96穴マイクロプレート（NUNC-Immuno Plate Maxisorp F96; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark）のウェルにPBS(-)で溶解した卵白粗抗原（10 μ g/ml）及び卵白精製抗原（1 μ g/ml）を加え、4℃で一晩固相化した。洗浄後、10倍希釈した血清をウェルに加えて室温で3時間反応させた。再度洗浄し、マウス抗イヌIgEモノクローナル抗体（Clone D9, 0.5 μ g/ml）⁸⁹を加えて4℃で一晩反応させた。洗浄後、ビオチン標識ラット抗マウスIgG1抗体（Invitrogen, San Francisco, CA, USA）をウェルに加えて、室温で1時間反応させた。再度洗浄し、ストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ（Roche Applied Science, Penzberg, Germany）をウェルに加えて、室温で1時間反応させた。その後、最後の洗浄を行い0.1 mM 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド（Sigma-Aldrich）をウェルに加えて、37℃で2時間反応させた。反応停止液として0.1 Mグリシン水酸化ナトリウム緩衝液（pH 10.2）をウェルに加えた後、マイクロプレートリーダーPowerscan MX（励起光:355 nm, 蛍光:460 nm、DSファーマバイオメディカル株式会社、吹田、日本）を用いて蛍光単位（FU）を測定した。健常犬20例のFU値の平均+3 \times SDをカットオフ値とした。カットオフ値よりも高いIgE反応性を示した検体を陽性とした。

ウェスタンブロット法による抗原特異的IgEの検出

各種アレルゲンのIgE解析は、SDS-PAGE電気泳動によりアレルゲンを分子量で分離した後、メンブレンに転写し、抗原抗体反応を利用したウェスタンブロット法によって行った。詳細な方法は以下の通りである。卵白粗抗原及びOM、OVA、OTを2-メルカ

プトエタノール (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 添加SDS-PAGEサンプルバッファー (Bio-Rad Laboratories) に1:1で加え95℃で5分間加熱した。ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories) の各レーンに粗抗原5 μ g、精製抗原2.5 μ gずつ加え、200V30分間電気泳動した。泳動したゲルをフッ化ポリビニリデン膜 (Bio-Rad Laboratories) に15Vで30分間転写した。転写されたフッ化ポリビニリデン膜は0.05% Tween 20添加TBS (TBS-T) で洗浄後、5% スキムミルク (Sigma-Aldrich) 添加TBS-Tを用いて、室温で1時間ブロッキングを行った。同様にTBS-Tで洗浄した後、Screener Blotter Mini 10 (サンブラテック、大阪、日本) を用いて、TBS-Tで10倍希釈した血清を加えて、室温で1時間反応させた。再度洗浄し、TBS-Tで0.5 μ g/mlに希釈したマウス抗イヌIgEモノクローナル抗体⁸⁹を加え、4℃で一晩反応させた。洗浄後、5% スキムミルク添加TBS-Tで50 ng/mlに希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Bio-Rad Laboratories) を加え、室温で45分間反応させた。最後の洗浄を行い、IgE抗体が結合した膜上のタンパク質を化学発光検出試薬 (ECL; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) で検出した。陰性対照には健常犬20頭のプール血清を用いた。

結果

CAFR犬の特徴

82頭のイヌを対象に研究を行った。犬種の内訳は柴犬（8頭）、フレンチ・ブルドッグ（8頭）、シーズー（8頭）、ミニチュア・ダックスフンド（8頭）、トイ・プードル（6頭）、ゴールデン・レトリバー（5頭）、雑種（5頭）、チワワ（4頭）、ウェスト・ハイランド・ホワイト・テリア（4頭）、アメリカン・コッカー・スパニエル（2頭）、ケアン・テリア（2頭）、ジャーマン・シェパード（2頭）、ブル・テリア（2頭）、ポメラニアン（2頭）、ラブラドル・レトリバー（2頭）、秋田犬（1頭）、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル（1頭）、スコティッシュ・テリア（1頭）、日本テリア（1頭）、パグ（1頭）、バセット・ハウンド（1頭）、パピヨン（1頭）、ビーグル（1頭）、ボーダー・コリー（1頭）、マルチーズ（1頭）、ミニチュア・シュナウザー（1頭）、ミニチュア・ピンシャー（1頭）、ヨークシャー・テリア（1頭）、ワイヤー・フォックス・テリア（1頭）だった。CAFRのイヌの平均年齢は3.5歳齢（SD、2.5歳）で、43.9%がオスだった。

ELISA法による卵白粗抗原に対するIgE反応性

ELISA法を用いてCAFRのイヌの卵白粗抗原特異的IgE反応性を測定した（図2-1）。陰性対照群のFU値に基づいてカットオフ値を193 FUと設定した。（平均； 109 FU、SD； 28 FU）。9.8%のイヌ（82頭のうち8頭）が卵白粗抗原特異的IgE陽性だった。陽性だったイヌの卵白粗抗原特異的IgEの値は447-6593 FUの範囲だった。卵白粗抗原特異的IgE陽性を示した8頭のイヌのうち5頭に対して、卵を含む食品で食物負荷試験を行い、全頭で皮膚症状が誘発された（表2-2）。これらの5頭のうち、4頭はゆで卵、2頭は卵

を含むドッグフード（エッグアンドライス、日本ヒルズ・コルゲート株式会社、東京、日本）を摂取した時に皮膚症状が再発した。

ELISA法による卵白精製抗原に対するIgE反応性

卵白粗抗原に対するIgE反応性を有する8頭のイヌの血清を用いて、ヒトで報告されている4つの主要卵白精製アレルゲン（OM、OVA、OT、およびLY）のIgE反応性パターンをELISA法によって調べた（図2-2、表2-3）。まず、陰性対照群の測定値に基づいて、OM、OVA、OT、およびLYのカットオフ値をそれぞれ69 FU、142 FU、132 FU、および110 FUとした。OM、OVA、およびOTに対して陽性を示したイヌの特異的IgE値の範囲はそれぞれ155-5966 FU（平均±SD、2431±2375 FU）、334-6275 FU（平均±SD、2434±2330 FU）、および148-371 FU（平均±SD、288±122 FU）だった（図2-2）。OMもしくはOVAに対するIgE反応性は、ともに8頭中6頭（75.0%）で認められた（表2-3）。また、OTに対するIgE反応性は、8頭中3頭（37.5%）で認められた。LYにIgE反応性はいずれのイヌでも認められなかった。

ウェスタンブロット法による卵白抗原に対する特異的IgE反応性

上記のELISA法で得られた結果の検証のため、ウェスタンブロット法を行った。ウェスタンブロットには卵白粗抗原に対する特異的IgE値が高かった3頭のイヌの血清を用いた（No. 1-3）。卵白粗抗原を用いたウェスタンブロットにおいて、No. 1では28 kDa付近のバンド、No. 2と3では28 kDa付近と45 kDa付近のバンドが検出された（図2-3 a）。28 kDa付近と45 kDa付近のバンドは分子量よりOMとOVAに相当するバンドだと推測された。また28 kDa付近と45 kDa付近のバンド以外にも不鮮明な薄いバンドが

認められた。卵白精製抗原を用いたウェスタンブロットにおいて、全てのイヌでOM特異的IgEとOVA特異的IgEが検出された（図2-3 b, c）。一方、OTのウェスタンブロットでは全てのイヌでバンドが検出されなかった（図2-3 d）。ウェスタンブロット法とELISA法より得られた結果を合わせて考えると、CAFRのイヌにとってOMとOVAが重要な卵白精製抗原だと考えられた。

考察

本研究における卵白粗抗原特異的IgEの陽性率（9.8%）は、イヌにおける以前の研究で示された陽性率（7.1-7.7%）と同程度だった^{18,90}。イヌにおける卵白粗抗原特異的IgEの陽性率はヒトにおける卵白粗抗原特異的IgEの陽性率（70%）⁹¹と比較すると低い。イヌとヒトにおける陽性率が異なる理由として、食生活の違いが考えられる。ヒトにおいて卵は非常に一般的な食品であり、ほとんどのヒトが卵を摂取している。それに対して、イヌは卵を摂取することが一般的ではない。近年、イヌはドックフードで飼育される場合が多くなっており、ドックフードに含まれるタンパク質だけを毎日摂取することが多くなっている。Jeffersらの研究では、市販されているドックフードのうち卵を使用して製造されているものは33%（89/269種類）だったと報告している⁹²。これらの食生活の違いにより、ヒトに比べてイヌの卵白粗抗原特異的IgEの陽性率が低くなったと推測される。

卵白精製抗原に対するIgEの反応性は、イヌでは報告がないが、ヒトでは報告されている^{86,93,94}。OM, OVA, OT, LYに対する特異的IgEの陽性率は卵白粗抗原に感作されたヒトにおいてそれぞれ72%, 87%, 58%, 69%だった⁸⁶。他の研究では、OM, OVA, OT, LYに対する特異的IgEの陽性率は88%、76%、48%、24%と報告しており、OMとOVAの陽性率はOTやLYに比べて高い傾向にあった⁹³。さらにOTやLYに比べてOMやOVAの陽性率が高い傾向は他の研究においても示されている⁹⁴。本研究において、卵白粗抗原特異的IgEを持つイヌは高い割合でOMとOVAに対するIgE反応性を示した。それに対して、OTとLYに対するIgE反応率は低いか全く認められなかった。OTに対するIgE反応性はELISA法とウェスタンブロッティング法で異なっていた（図2-2、図2-3）。その理由としては、OTのほとんどのエピトープは立体構造エピトープであることが挙げられ

る^{82, 95}。ウェスタンブロット法では抗原に2-メルカプトエタノール添加SDS-PAGEサンプルバッファーを加えて熱処理したために、立体構造が壊れてしまったが⁹⁶⁻⁹⁸、ELISA法では抗原をPBS(-)で溶解しており、立体構造を保持したまま抗原性が保たれていたと考えられる。食物アレルギーは消化を受けて立体構造が壊されてしまうため、OTは食物アレルギーとしてはあまり重要ではないのかもしれない。LYに対するIgE反応性が確認できなかった理由としては、ヒトとイヌでIgEの反応性が異なることが考えられる。スギ花粉症のイヌでは、スギ花粉の精製抗原であるCry j 1とCry j 3が主なアレルギーとなる⁹⁹。それに対して、ヒトではCry j 1とCry j 2が主要なアレルギーとなり¹⁰⁰、Cry j 3に対するIgE陽性率は低い¹⁰¹。これらの結果は動物種間での抗原認識の違いによって起きることが考えられる。それゆえ、LYはヒトでは卵白の主要精製抗原であるが、イヌでは主要な卵白精製抗原ではないかもしれない。以上の結果より、陽性率の高かったOMとOVAはイヌにおける主要な卵白精製抗原であると推測された。

ヒトにおいて、予後を推測するために卵白精製抗原に対するIgE反応性が調べられている。OM特異的IgEを持つ子供は成長しても持続的に卵アレルギーの状態であるが、OVA特異的IgEを持つ子供は大人になった時に免疫寛容が誘導されやすい⁷⁹。他の研究でも、OMのエピトープに対するIgEを持つヒトのアレルギー患者は持続的な卵アレルギーを示すことが報告されている⁸²。通常、幼少期は消化機能が未発達だが、成長に伴って、消化機能が発達し、多くの食物抗原(OVAなど)はアレルギー性を失うようになる。しかし、耐消化性の特徴を持つ精製抗原は、発達した成人の消化を受けてもアレルギー性を失わずに腸管に到達する。OMは消化されてもIgE結合能を保持しており、アレルギー性を失わない⁸¹。さらに、大人になっても卵アレルギーが治らなかったヒトの患者は実験的にペプシンで消化したOMに対して高いIgE反応性を示すことはOMが

耐消化性であることを支持している⁸³。耐消化性の精製抗原に対するIgE反応性を詳細に調べる事は予後の推定に重要な情報をもたらすと考えられるが、イヌにおいては研究が進んでいない。本研究では、卵白精製抗原に対するIgE反応性を明らかにしたが、予後の追跡調査まで行っておらず、イヌにおける卵白精製抗原特異的IgEと予後の相関については不明のままである。イヌにおいて精製抗原特異的IgE反応性の情報を活用するためには、今後、追跡調査などの研究をさらに行う必要があると思われる。

卵アレルギーのイヌは卵以外の食品の摂取や特定のワクチン接種でもアレルギー症状を引き起す可能性がある。OTとLYは牛乳中のラクトフェリンと α ラクトアルブミンにそれぞれ相同性を示し、IgEの交差反応性を有しているため¹⁰²、OTやLYに対するIgEを持つイヌは牛乳成分を含んだ食品の摂取を避けたほうが良いと考えれる。また、卵由来のたんぱく質がワクチンに混入している可能性もある。ヒトで使われているMMRワクチン（はしか（Measles）、おたふく風邪（Mumps）、風しん（Rubella）の3疾病を一度に予防する混合ワクチン）はニワトリ胚初代培養細胞を使って製造されており、このワクチンを卵アレルギーのヒトに接種すると、まれに重篤なアレルギー反応が起こることがあると報告されている¹⁰³。イヌにおいても、ワクチン接種による有害事象が問題となっており¹⁰⁴⁻¹⁰⁶、ウシ血清アルブミンやウシIgGなどのワクチン混入物によって有害事象が引き起こされると報告されている^{107, 108}。卵アレルギーとワクチン接種による有害事象の関連性はわかっていないが、一部のイヌジステンパーワクチンはニワトリ胚初代培養細胞を用いて製造されていることから、卵白粗抗原特異的IgEを持つ食物アレルギーのイヌにこれらのワクチンを接種する際はワクチン接種によるアレルギー反応を警戒する必要があるかもしれない。抗原特異的IgEの反応性を調べることで、アレルギー反応を起こす可能性のある食品や薬品をあらかじめ予測して

危険を回避することでき、食物アレルギーのイヌがより安全に生活を送ることができると考えられる。

本研究の結果から、OMとOVAはイヌの主要な卵白精製抗原であり、イヌの卵アレルギーの予後を予測する上で重要な情報となる精製抗原特異的IgE反応性の基礎データを得た。卵白精製抗原特異的IgEをイヌの食物アレルギーの新たな治療法の効果判定基準の一つとして活用できると考えられた。

第3章 マウスにおける組換え乳酸菌の経口免疫療法の基礎的検討

緒言

食物アレルギーの治療は免疫抑制剤の投与や原因食品の除去によって行われているが、長期的な免疫抑制剤の投与による副作用や原因食品の誤った摂取によるアナフィラキシーショックなどの事故の問題点があり、根治的な治療法の開発が望まれている。近年、新たな食物アレルギーの治療法として原因食物を少量ずつ摂取し、耐性化を誘導する経口免疫療法が研究されている。しかしながら、ヒトにおける経口免疫療法の耐性化に至る割合は20%程度と低い³⁷⁻⁴³。さらには、治療中に30～50%の患者で副作用が起きてしまい、安全面において問題がある³⁷⁻⁴³。これらの問題を改善するために、乳酸菌をアレルゲンの輸送担体として用いた経口免疫療法がマウスモデルで試みられている。乳酸菌の菌体には免疫賦活作用があり、乳酸菌単独の投与でもアトピー性皮膚炎の発症が抑制されるという報告がある⁴⁵。アレルゲンを発現するように遺伝子組換えした乳酸菌をアレルギーモデルマウスに経口投与することによって、抗アレルギー効果があることが報告されている^{47-51, 109-111}。

イヌの食物アレルギーの根治療法として組換え乳酸菌を用いた経口免疫療法を確立することを目指して、本研究ではマウスを用いて組換え乳酸菌の抗アレルギー効果の基礎研究を行った。卵白精製抗原であるOVAを菌体表面に発現する組換え乳酸菌の抗アレルギー効果の基礎的な検討を行った。まず、OVA特異的IgEを主な指標としてマウスの最適なOVA感作条件を検討した。次にOVAを発現した組換え乳酸菌をマウスに経口投与し、アナフィラキシー反応、血清中イムノグロブリン濃度、脾細胞中の制御性T細胞（Treg）の割合を測定し、抗アレルギー効果を評価した。

材料と方法

大腸菌および乳酸菌の培養方法

大腸菌は*Escherichia coli* JM109（ニッポンジーン、富山、日本）を使用した。*E. coli* JM109の培養にはLB（Miller）寒天培地またはLB（Miller）培地（ともにナカライテスク、京都、日本）を使用した。乳酸菌は*Lactobacillus casei* IGM393（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部五十君静信先生より供与）を使用した^{112, 113}。*L. casei*の培養には2種類の培地を用いた。単離・継代用にはMRS平板培地（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA）を用いた。また、組換えタンパク質発現用には1%マンニトール添加LCM培地を用いた。1 Lの1%マンニトール添加LCM培地は次のように調整した。Trypticase peptone（Becton Dickinson）10 g、Yeast extract（Becton Dickinson）5 g、Tryptose（Becton Dickinson）3 g、リン酸水素二カリウム（和光純薬工業、大阪、日本）3 g、リン酸二水素カリウム（関東化学、東京、日本）3 g、クエン酸三アンモニウム（和光純薬工業）2 g、Tween 80（関東化学）1 g、酢酸ナトリウム三水和物（関東化学）1 g、システイン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）0.2 g、硫酸マグネシウム七水和物（和光純薬工業）0.575 g、硫酸鉄（Ⅱ）七水和物（和光純薬工業）0.084 g、硫酸マンガン五水和物（和光純薬工業）0.155 gを混和して蒸留水900 mlに溶解後（pH 6.8）、高圧蒸気滅菌した（121℃、15分間）。その後、ろ過滅菌したD（-）マンニトール溶液（和光純薬工業）とエリスロマイシン（和光純薬工業）を最終濃度がそれぞれ1%、5 μ g/mlになるように加えた。組換えタンパク質発現のために*L. casei*を1%マンニトール添加LCM培地で培養する際は、37℃の好気条件下で12～16時間静置培養し、OD600=1.0となった時点で4℃に一時保存し、その後の実験に用いた。

プラスミドベクターとOVA発現組換え乳酸菌の作製

*L. casei*における組換えタンパク質発現にはpLP401Tプラスミドベクターを用いた¹¹⁴。pLP401Tプラスミドベクターに組込む*ova*遺伝子は以下のように用意した。あらかじめ*ova*遺伝子が組込まれたクローニング用プラスミドベクターpBluescript SK II (+) (慈恵医科大学分子免疫学研究部斎藤三郎先生より供与) を鋳型としてPCRを行い*ova*遺伝子の増幅した。PCRにはPCR試薬PrimSTAR MaxDNA Polymerase (タカラバイオ (株)、草津、日本) とプライマーセット (フォワードプライマー: 5' - GATCGGATCCGATGGGCTCCATCGGCGCAGC-3'、リバープライマー: 5' - CCGCTCGAGAGGGGAAACACATCTGCCAA-3') を使用した。PCRの温度条件は、変性98℃ 10秒、アニーリング55℃ 5秒、伸長反応72℃ 7秒とし、このサイクルを計30サイクル行った。増幅して得られた*ova*遺伝子断片および組換えタンパク質発現用プラスミドベクターpLP401T¹¹⁴を制限酵素BamHI、XhoIで処理し、ライゲーション後、*E. coli* JM109を形質転換した。*ova*遺伝子を組込んだプラスミドベクターをpLP401::*ova*とし (図3-1)、*ova*遺伝子を組込まなかったプラスミドベクターをpLPemptyとした。

乳酸菌の形質転換は以下のようにして行った。組換え*E. coli* JM109をLB培地で培養後、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Fitchburg, WI, USA) を用いて組換えタンパク質発現用プラスミドベクターを抽出した。このプラスミドベクターを制限酵素NotIで処理後、セルフライゲーションし、*L. casei* IGM393を形質転換した。pLP401::*ova*が持つ発現プロモーター*P_{amy}*はマンニトールもしくはガラクトース存在下で働くプロモーターのため、組換えタンパク質を発現誘導するために1%マンニトール添加LCM培地を用いた (図3-1)。本研究の組換え実験は麻布大学組換えDNA実験安全委員会の承認を受けて行った (承認番号: 組13-8)。

フローサイトメトリー法による菌体表層OVA抗原の検出

1%マンニトール添加LCM培地で培養後、培養液1 mlを10000 rpm 1分間遠心して集菌した。上清を捨てた後、沈殿物に1 mlのPBS (-) を加えて10000 rpm 1分間遠心し上清を除いて洗浄を行った。細菌懸濁液に500 μ lのウサギIgG抗OVAポリクローナル抗体 (Polysciences, Warrington, PA, USA) を加え攪拌し、60分間 室温でインキュベートした。洗浄後、500 μ lのAlexa Fluor 488標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L) 抗体 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を加え攪拌し、遮光した状態で1時間 4℃でインキュベートした。洗浄後、1 mlのPBS (-) に懸濁し、フローサイトメーターFACS Aria III (Becton Dickinson) により測定を行った。専用解析ソフトFACSDivaソフトウェア (Becton Dickinson) で解析を行った。

マウス

BALB/cマウス (6週齢、メス) は日本クレア株式会社 (東京、日本) より購入し、麻布大学附属生物科学総合研究所にて飼育した。飼育室は温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ で12時間の明暗サイクルで維持した。全ての実験は麻布大学実験動物委員会より承認を受け (承認番号: 140130)、ガイドラインに従って取り扱った。

マウスのOVA感作条件の検討

1週間の馴化期間の後、マウスを無作為に様々な条件のOVA感作群 (0.1 μ g/匹, 1 μ g/匹, 10 μ g/匹, 100 μ g/匹の4群) と対照群 (水酸化アルミニウムのみ、もしくはPBS (-) のみの2群) の計6群に分け、各群4匹で実験を行った (表3-1)。0日目、14日

目に様々な濃度のOVA (Sigma-Aldrich) と水酸化アルミニウム 2 mg (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) をマウスに腹腔内投与して免疫した (図3-2)。0日目、21日目に血清中イムノグロブリン測定のための血清を採取した。24日目にOVAを静脈内投与 (1 mg/匹) して、アナフィラキシー反応を誘発するチャレンジを行った。

マウスに対するOVA発現組換え乳酸菌の経口投与

1週間の馴化期間後、マウスを無作為にOVA発現組換え*L. casei*投与群、OVA非発現組換え*L. casei*投与群、OVA投与群、生理食塩水投与群の計4群に分け、各群6匹で実験を行った (表3-2)。OVA投与群のOVA投与量は以前の研究を参考にして決定した^{50, 110}。0, 1, 2, 7, 8, 9日目に組換え*L. casei* (5×10^9 CFU/匹)、OVA (1 μ g/匹) またはPBS(-) を胃内投与した (図3-3)。16日目と28日目にOVA 10 μ gと水酸化アルミニウム 2 mgの混合液を腹腔内投与してマウスを免疫した。マウスの感作状態を評価するため、乳酸菌投与後の14日目とOVA感作後の35日目で血清ならびに糞の採取を行い、それらに含まれる抗原特異的イムノグロブリン濃度の測定を行った。38日目にOVA 1 mg/匹を静脈内投与し、アナフィラキシー反応を誘発し、評価した。アナフィラキシー反応評価後、頸椎脱臼により安楽殺し、Tregの測定のために無菌的に脾臓を採取した。

マウスの血清中のOVA特異的イムノグロブリンの測定

抗原特異的IgE濃度の測定は以下の方法で行った。10 μ g/ml BSA添加0.05 M 炭酸一重炭酸緩衝液 (pH 9.5) で抗マウスIgEモノクローナル抗体 (Clone RIE4) を6.8 μ g/mlに調製して、96ウェルプレート (グライナー・ジャパン株式会社、東京、日本)

のウェルに100 μ l加えた。室温で4.5時間静置後、洗浄液(0.05% Tween 20添加PBS)で3回洗浄し、マウス血清を希釈液(1% BSA添加PBS-T)で20倍希釈して100 μ l加え、4°Cで一晩インキュベートした。その後、3回洗浄し、希釈液でビオチン標識OVAを1 μ g/mlに調整し、すべてのウェルに100 μ l加えた。室温で1時間振盪後、3回洗浄し、ストレプトアビジン- β ガラクトシダーゼ (Life Technologies) を希釈液で3,000倍希釈して、各ウェルに100 μ l加えた。室温で1時間振盪後、3回洗浄し、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド (0.2 mM) をバッファーAで2倍希釈して各ウェルに100 μ l加えた。バッファーAは0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に0.1 M NaCl、1 mM MgCl₂、0.1% BSA、0.1% NaN₃を加えて調整した。37°Cで2時間、遮光で静置した。反応停止である0.1 Mグリシン水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 10.2) を各ウェルに100 μ lずつ加えた後、蛍光を測定した。測定にはマイクロプレートリーダーPowerscan MX (励起光: 355 nm, 蛍光: 460 nm, DSファーマバイオメディカル株式会社、吹田、日本) を用いた。OVA特異的IgE濃度が既知の血清 (42983 ng/ml) を用いて検量線を作成し、それぞれのサンプルのOVA特異的IgE濃度を算出した。

抗原特異的IgG1, IgG2a, IgAの濃度測定は以下の方法で行った。OVAを0.05 M 炭酸一重炭酸緩衝液 (pH 9.5) で10 μ g/mlに調製し、96ウェルプレート (MaxiSorp microtiter plates, NUNC, Roskilde, Denmark) の各ウェルに100 μ l加えて、4°Cで一晩インキュベートした。洗浄液で3回洗浄したのち、ブロッキングバッファー(1% BSA添加PBS) を各ウェルに200 μ lずつ加えて、室温で1時間振盪した。3回洗浄した後、希釈液でそれぞれの濃度に希釈した血清を100 μ lずつ添加し、37°Cで2時間静置した。3回洗浄した後、それぞれHRP標識ラット抗マウスIgG1モノクローナル抗体、HRP標識ラット抗マウスIgG2aモノクローナル抗体、HRP標識ラット抗マウスIgAモノクロー

ーナル抗体（すべてSouthern Biotechnologies, Birmingham, AL, USA）を希釈液で10,000倍に希釈して、100 μ lずつ加え、室温で30分暗所に静置した。反応停止液である4 N 硫化水素を100 μ lずつ加えた後、吸光度を測定した。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダーPowerscan MX（DSファーマバイオメディカル株式会社、主波長492 nm、副波長630 nm）を使用した。以前、マウスを免疫して得られたプール血清を基準血清とし、この基準血清の抗原特異的イムノグロブリン濃度を10000 U/mlと設定した。基準血清を用いて検量線を作成し、それぞれのサンプルのOVA特異的IgGまたはIgAの濃度を算出した。

マウスのアナフィラキシー反応の測定

直腸温を測定してアナフィラキシー反応を評価した。直腸温度の測定にはデジタルサーモメーター（芝浦電子、さいたま、日本）を用い、OVAの静脈内投与（1 mg/匹）の投与前、5分後、10分後、20分後、30分後、45分後、1時間後の直腸温度を記録した。

マウスの脾細胞の分離・培養

金属メッシュで脾臓を濾し、脾細胞を分離した。プレセパレーションフィルター（Miltenyi Biotec、東京、日本）を用いて細胞塊や結合組織を取り除いた後、300×g、4℃で5分間で遠心した。上清を吸引除去した後、2 mlの赤血球溶血バッファー（Becton Dickinson）を加えてよく攪拌し、15分間室温でインキュベートした。冷やしたPBS（-）で2回洗浄した後、1 mlの10% FCS添加RPMI-1640培地（Life Technologies）に懸濁し、Tali イメージベースサイトメーター（Life Technologies）によって細胞数を計測した。細胞濃度が 2.5×10^6 個/mlになるように10% FCS添加RPMI-1640培地で調整

し、4 mlずつ6ウェルプレート (Corning, New York, NY, USA) の各ウェルに分注した。OVAで刺激するため、最終濃度が10 μ g/mlになるようにOVAを培地に添加した。培養は37°C、5%CO₂存在下で48時間培養した。

制御性T細胞 (Treg) の測定

脾細胞 1×10^6 個を5 mlチューブに加えて、洗浄液 (1%FCS、0.1%アジ化ナトリウムPBS) を用いて洗浄した。死細胞を染色するため、Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用説明書に従って使用した。死細胞染色後、洗浄液で2回洗浄した。細胞表面抗原に対する抗体を各チューブに加えて、遮光で4°C、45分間インキュベーションした。使用した抗体の一覧を表3-3に示した。洗浄後、Transcription factor buffer set (Becton Dickinson) を用いて細胞の固定・透過処理した。固定・透過処理については使用説明書に従って行った。固定・透過処理後、細胞内抗原に対する抗体を各チューブに加えて、遮光で4°C、45分間インキュベートした。洗浄後、細胞を500 μ Lの洗浄液に懸濁し、フローサイトメーターFACS AriaIII (Becton Dickinson) により測定を行った。専用解析ソフトFACSDivaソフトウェア (Becton Dickinson) で解析を行った。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞をTregとして扱った。

統計解析

2群の比較にはStudent's t-test、3群以上の比較にはTwo-way ANOVAを行った後にDunnett法によって有意差の検定を行った。p<0.05を有意差ありとした。統計処理にはGraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。

結果

組換え乳酸菌の菌体表層におけるOVAの発現確認

OVA発現プラスミドベクターを導入した組換え*L. casei*のOVA発現量をフローサイトメーターによって測定した。OVA発現プラスミドベクターは、*ova*配列の5'側に分泌シグナル (*ssamy*)、3'側にアンカー配列 (*anchor*) を挿入して構築しており (図3-1)、産生されたOVAは菌体外に輸送されるが、アンカーを持つため菌体膜で固定されるようになっている。菌体表層に発現してるOVAはAlexa Fluor 488標識OVA特異抗体を用いて検出した。OVA発現量を測定するため、OVA発現*L. casei*とOVA非発現*L. casei*を比較したところ、OVA発現*L. casei*の75.9%は菌体表層にOVAを発現していた (図3-4)。このOVA発現組換え*L. casei*とOVA非発現組換え*L. casei*を用いて、マウスのin vivo実験を行った。

マウスにおけるOVA感作条件の最適化

OVA感作量を変えてマウスを免疫したところ、OVA投与量依存的に血清中IgEならびにアナフィラキシー反応が誘導された (図3-5、図3-6)。OVA 10 μ g処置群と100 μ g処置群の両方でOVA特異的IgE, IgG1, IgG2a, IgAの上昇が認められた (図3-5)。OVA 100 μ g処置群と比較して、OVA 10 μ g処置群はIgEの値が高く、IgG1, IgG2a, IgAの値が低い傾向であった。また、アナフィラキシー反応の指標として直腸温の変化を測定した (図3-6)。OVA 0.1 μ g処置群はPBS群と比較して、有意な直腸温の低下は認められなかった。OVA 1 μ g処置群では、一時的な直腸温の低下は認められたが、60分後には直腸温が回復した。また、OVA 1 μ g処置群は個体間で直腸温の低下にバラつきがあった。OVA 10 μ g処置群と100 μ g処置群はPBS群と比較して有意な直腸温低下

が認められ、安定した結果を得ることができた。食物アレルギーの病態はTh2優位の状態であり、モデルマウスの作製条件としては、IgEの上昇・アナフィラキシー反応の誘発が必要であると考えられる。本実験結果よりOVA 10 μ gを用いて感作することで十分に食物アレルギー状態を模したモデルマウスを作製できることが明らかになった。以降のin vivo実験は、OVA 10 μ gによる感作条件を用いて実験を行った。

OVA発現組換え乳酸菌投与の抗アレルギー効果の検討

組換え乳酸菌またはOVAやPBSを前処置として経口投与したのち、OVAとAlumを腹腔内投与して感作し、38日目にアナフィラキシー反応の評価と脾細胞の採取を行った(図3-3)。OVA発現*L. casei*投与群6匹のうち3匹は投与実験を行っている途中で死亡したため、最後まで実験を完了した3匹の結果だけを解析した。全ての群で血清中IgE濃度の上昇が認められ、統計的な有意差は見られなかった(図3-7)。また、感作後において、各群の血清中IgG1、IgG2a、IgAや糞中IgAの値には有意な違いはみられなかった。アナフィラキシー反応では全ての群で直腸温の低下が認められ、OVA発現*L. casei*投与群のみ30分以降に直腸温の回復が認められた(図3-8)。しかしながら、OVA発現*L. casei*投与群の直腸温の回復は3匹中1匹の直腸温が上昇したことによるものであり、OVA発現*L. casei*投与群と他の群を比較しても有意な差はみられなかった。血清中OVA特異的IgEやアナフィラキシー反応において、OVA発現*L. casei*投与群とOVA非発現*L. casei*投与群を比較しても、有意な違いは見られないことから、菌体表層に発現させた組換えアレルゲンの効果はなかったと考えられる。また、OVA非発現*L. casei*投与群とPBS群を比較しても、有意な違いはなかったことから乳酸菌の抗アレルギー効果は認められなかったと考えられる。

OVA発現組換え乳酸菌によるTreg誘導能の検討

38日目に各群のマウスより採取した脾細胞をOVA添加・非添加培地で48時間培養した。OVA非添加で培養した脾細胞と比較して、OVAと共培養した脾細胞のTregの細胞数は全ての群で変わらなかった（図3-9）。本実験の結果より、OVA発現*L. casei*の抗原特異的Tregを介した免疫寛容誘導能は認められなかった。

考察

免疫寛容のメカニズムはTregによる能動的抑制、抗原特異的T細胞の消失、不応答化（アナジー）の3つが考えられている。低用量の抗原を経口的に摂取した場合はTregが誘導される^{38, 41, 115, 116}。TregはIL-10、TGF- β を産生して過剰な免疫応答を抑制することで抗アレルギー作用を示す¹¹⁷。IL-10は抗原提示細胞のCD80/86やMHC class IIの発現や種々のサイトカイン産生の抑制を通して、T細胞の活性化・増殖を抑制する。TGF- β はB細胞の産生する抗体をIgAにクラススイッチさせる。IgAは二量体を形成して腸管内腔に分泌され、アレルギーが体内へ侵入するのを防いで抗アレルギー効果を発揮する。低用量でTregが誘導されるのに対して、高用量の抗原を経口的に投与した場合は抗原特異的T細胞の消失やアナジーが起こる¹¹⁵。Friedmanらは、低用量の抗原の経口投与では能動的抑制が起きて抑制性サイトカインTGF- β が分泌されるのに対して、高用量ではアナジーが誘導されると報告している¹¹⁸。本研究において、OVA発現*L. casei*投与群は他の群と比較して血清中イムノグロブリン濃度やアレルギー反応で違いは見られなかった。また、OVA発現*L. casei*投与群はOVA特異的Tregの誘導が認められなかった。組換え*L. casei*におけるOVAの発現はフローサイトメーターで半定量的に確認しただけであり、経口免疫寛容を誘導するのに十分な抗原量が発現していたかは不明である。今後、OVA発現*L. casei*のOVA発現量を定量する必要があると思われる。さらに、OVA 1 μ gを投与した群でも抗アレルギー効果が確認できなかった。今後は経口免疫寛容を誘導する最適なOVAの投与量を検討する必要があると考えられる。

乳酸菌のアレルギー抑制効果には、Th1/Th2バランスの制御が挙げられる。*Lactobacillus*属を中心に多くの乳酸菌がTh1/Th2バランスを改善し、IgE産生抑制効果やアレルギー抑制効果を示すことがアレルギーモデルマウスで報告されている。OVAを

特異的に認識するT細胞レセプターの遺伝子を導入したトランスジェニックマウスより調整したT細胞を、抗原提示細胞存在下でOVA刺激してヘルパーT細胞の各サブセットへ分化誘導する際、*Lactobacillus casei* YIT 9029や*Lactobacillus paracasei* KW 3110と共培養すると、Th1への分化が誘導される^{119, 120}。また、これらの菌株は、マクロファージ細胞株や脾臓中のCD11b⁺細胞からのIL-12産生を強く増強する。OVAで感作したBALB/cマウスを用いた研究でも同様に、乳酸菌によってTh1サイトカインであるIL-12産生が強く誘導され、IgE産生が抑制されると報告されている¹²¹。Th1/Th2バランスの制御に働くIL-12の産生能は乳酸菌の菌株によって様々であり、IL-12を強く誘導する株として*Lactobacillus casei* YIT 9029や*Lactobacillus paracasei* KW 3110、*Lactobacillus gasseri* OLL2809、*Lactobacillus pentosus* SBC 8803、*Tetragenococcus halophilus* Th221等が挙げられる¹²²。

また、菌株によってはTregを誘導して抗アレルギー効果を示す菌株もある^{123, 124}。Tregの誘導を介した乳酸菌の抗アレルギー効果はパイエル板や腸間膜リンパ節の樹状細胞の働きによって起きることが示唆されている^{125, 126}。腸間膜リンパ節の樹状細胞はレチノイン酸産生を通してTregの分化誘導を促進することが報告されている¹²⁷。レチノイン酸産生はRALDHという酵素に依存しており、このRALDHは腸間膜リンパ節とパイエル板の樹状細胞のみに特異的に発現しており、これらの細胞がレチノイン酸産生能を持つことが示されている¹²⁸。Tregの誘導能に関しても、乳酸菌の菌株ごとでまちまちである^{121, 129}。本研究で使用した*Lactobacillus casei* IGM393はTh1サイトカインを生じてIgGの産生を誘導することはわかっているが^{112, 113}、Tregの誘導については検討していない。*Lactobacillus casei* IGM393株のTreg誘導能を明らかにし、他の菌株と比

較することは、組換え乳酸菌を使用した経口免疫療法を開発していく上で必要であると考えられる。

乳酸菌の投与量によって抗アレルギー効果は異なってくる¹³⁰。過去の研究を参考に^{110, 111}、本研究では1匹のマウスあたり 5×10^9 CFUの*L. casei* IGM393を複数回経口投与した。しかしながら、乳酸菌の免疫賦活作用が菌株により様々である点を考慮すると、今後、*L. casei* IGM393に最適な投与菌数のさらなる検討が必要であると考えられる。

本研究では、OVA発現*L. casei*の明確な抗アレルギー効果は確認できなかった。今後、経口免疫寛容誘導に必要な抗原量の検討を行う必要があると考えられる。それらの情報を基に組換え*L. casei*の改良を行い、将来的に組換え乳酸菌を用いた経口免疫療法を実用化したいと考えている。

総括

ヒトと同じ環境で生活しているイヌは、ヒト同様、食物アレルギーの患者の割合が増加していると推測される。現在、食物アレルギーのイヌは原因食品の摂取を回避しつつ、対症療法でアレルギー症状を抑えるしか治療がなく、食物アレルギーの根治療法の開発が望まれている。本研究では、イヌの食物アレルギーの根治療法開発を最終的な目標として、イヌの食物アレルギーの病態の臨床的・免疫学的解析や組換え乳酸菌を用いた経口免疫療法の基礎的検討を行った。

第1章において、家族性の食物アレルギーを呈するイヌの臨床的・免疫学的解析を行った。この家系における食物アレルギー発症の有無を解析すると、常染色体性優性遺伝の可能性が示唆された。また、この家系の発症犬はIgE非依存性消化器型食物アレルギーであった。一部のイヌでは食物負荷試験の前後で、アレルギー症状の発現と抗原特異的リンパ球の増殖能の変化が相関していた。IgE非依存性食物アレルギーに対する抗原特異的リンパ球増殖試験の有用性については議論の余地があるとされているが、本研究の結果はイヌにおけるIgE非依存性食物アレルギーの診断における抗原特異的リンパ球増殖試験の有用性を支持していた。また、他のイヌの研究では、食物除去療法を行いアレルギー症状の消失に伴って、抗原特異的リンパ球の増殖能が減弱したと報告している^{19, 20}。今後、イヌのIgE非依存性食物アレルギーに対する根治療法を評価する際、抗原特異的リンパ球増殖試験は役立つと考えられる。

第2章では、イヌの食物アレルギーのもう一つの病態であるIgE依存性について、臨床的・免疫学的解析を行った。食物有害反応のイヌにおいて、代表的な食物アレルゲンである卵白アレルゲンに対するIgE反応性を確認した。また卵白粗抗原特異的IgE反応性を示したイヌのうち、食物負荷試験を行った全頭は卵アレルギーであった。卵白

粗抗原に含まれる主要な精製抗原であるオボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、リゾチームに対するIgE反応性を検討したところ、イヌではオボムコイド、オボアルブミンが重要なアレルゲンであることが示唆された。食物精製抗原特異的IgE反応性の情報は、イヌのIgE依存性食物アレルギーの予後の予測や除去食の選択に役立つ可能性がある。さらに、精製抗原特異的IgE反応性の情報に基づいて食物精製抗原を用いた経口免疫療法を実現できれば、食物粗抗原を用いるよりも的確で効果的な治療を実現できる可能性がある。

第3章では确实性の高い抗原特異的経口免疫療法の開発を目的として、マウスを使って、卵白の精製抗原であるOVAを発現する組換え乳酸菌の抗アレルギー効果の基礎的検討を行った。まず、最適なOVAの感作条件を決定し、モデルマウスを確立した。作製したOVAを菌体表層に発現する組換え*Lactobacillus casei* IGM393の抗アレルギー効果は認められなかった。今後、経口免疫寛容誘導に必要な抗原量の検討ならびに組換え*Lactobacillus casei* IGM393のさらなる改良を行う必要があると思われる。

第1章、第2章において、イヌの食物アレルギーの根治療法を開発する際の評価方法に目処をつけた。リンパ球増殖試験では症例数が少ないこと、精製抗原特異的IgE検査では卵白抗原しか調べていないことなど問題点もあるが、今後それぞれの研究を進めて、さらに知見を蓄積していきたい。組換え乳酸菌を用いた経口免疫療法のマウス実験では抗アレルギー効果を確認できなかった。今後、臨床応用するためには安全かつ確実な治療効果を持つ経口免疫療法の方法を確立していかなければいけない。今後は基礎研究を重ねて、臨床応用可能なイヌの食物アレルギーの根治療法を開発していく予定である。

本論文の一部は、以下に公表した。

1. Shimakura, H., Uchiyama, J., Saito, T., Miyaji, K., Fujimura, M., Masuda, K., Okamoto, N., DeBoer, DJ., Sakaguchi, M.: IgE reactivity to hen egg white allergens in dogs with cutaneous adverse food reactions. *Veterinary immunology and immunopathology*, 177: 52-57, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.06.003>.

謝辞

本学位論文を作成するにあたり、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました麻布大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻 微生物学第一研究室教授 阪口雅弘博士に深く感謝いたします。論文執筆に際して、研究のまとめ方について貴重なご助言を賜りました同研究室講師 内山淳平博士に深く感謝いたします。研究を進めるにあたって、実験手法の基礎的技術から実験の進め方、また時には相談相手になっていただいた、同研究室 岡本憲明博士、宮地一樹博士、高瀬有加里博士に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、懇切なる御指導と乳酸菌についての貴重なご助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部部長 五十君静信博士に深く感謝いたします。本研究を行う上で貴重な研究材料である臨床材料を提供して下さった理化学研究所 人工ワクチン研究チームリーダー 増田健一博士、ふじむら動物病院院長 藤村正人先生に心より厚く御礼申し上げます。

最後に、常に研究生活を影ながら支えてくれた家族に心より感謝の意を表します。

引用文献

1. 海老澤 元宏. アナフィラキシーガイドライン：初期対応と再発予防の重要性(ガイドラインのワンポイント解説). *アレルギー*. 2015;64:24-31.
2. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002;296:490-494.
3. Gupta RS, Springston EE, Warrier MR, et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*. 2011;128:e9-e17.
4. Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Flabbee J, Beaudouin E, Kanny G. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy*. 2005;60:443-451.
5. Vaden SL, Hammerberg B, Davenport DJ, et al. Food hypersensitivity reactions in Soft Coated Wheaten Terriers with protein-losing enteropathy or protein-losing nephropathy or both: gastroscopic food sensitivity testing, dietary provocation, and fecal immunoglobulin E. *J Vet Intern Med*. 2000;14:60-67.
6. Shmuel DL, Cortes Y. Anaphylaxis in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2013;23:377-394.
7. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299:1259-1260.
8. Mutius von E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:358-364.
9. Krämer U, Oppermann H, Ranft U, Schäfer T, Ring J, Behrendt H. Differences in allergy trends between East and West Germany and possible explanations. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:289-298.
10. Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:129-134.
11. Tsai HJ, Kumar R, Pongracic J, et al. Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:101-109.
12. Sicherer SH, Furlong TJ, Maes HH, Desnick RJ, Sampson HA, Gelb BD. Genetics of peanut allergy: a twin study. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:53-56.
13. Hori T, Kamikawaji N, Kimura A, et al. Japanese cedar pollinosis and HLA-DP5. *Tissue Antigens*. 1996;47:485-491.
14. Stepniak D, Koning F. Celiac disease-sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2006;67:460-468.

15. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*. 1997;337:1720-1725.
16. Cookson WCM, Faux J, Sharp P, Hopkin J. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet*. 1989;333:1292-1295.
17. Masuda K, Sakaguchi M, Saito S, et al. Seasonal atopic dermatitis in dogs sensitive to a major allergen of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Vet Dermatol*. 2002;13:53-59.
18. Masuda K, Sakaguchi M, Fujiwara S, et al. Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000;73:193-204.
19. Ishida R, Masuda K, Kurata K, Ohno K, Tsujimoto H. Lymphocyte Blastogenic Responses to Inciting Food Allergens in Dogs with Food Hypersensitivity. *J Vet Intern Med*. 2004;18:25-30.
20. Fujimura M, Masuda K, Hayashiya M, Okayama T. Flow cytometric analysis of lymphocyte proliferative responses to food allergens in dogs with food allergy. *J Vet Med Sci*. 2011;73:1309-1317.
21. Kawano K, Oumi K, Ashida Y, Horiuchi Y, Mizuno T. The prevalence of dogs with lymphocyte proliferative responses to food allergens in canine allergic dermatitis. *Pol J Vet Sci*. 2013;16:735-739.
22. Suto A, Suto Y, Onohara N, et al. Food allergens inducing a lymphocyte-mediated immunological reaction in canine atopic-like dermatitis. *J Vet Med Sci*. 2014;77:251-254.
23. Alexander HL, Shirley K, Allen D. The route of ingested egg white to the systemic circulation. *J Clin Invest*. 1936;15:163-167.
24. Maeda S, Okayama T, Omori K, et al. Expression of CC chemokine receptor 4 (CCR4) mRNA in canine atopic skin lesion. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;90:145-154.
25. Maeda S, Tsukui T, Saze KI, et al. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;103:83-92.
26. Maeda S, Ohmori K, Yasuda N, et al. Increase of CC chemokine receptor 4-positive cells in the peripheral CD4⁺ cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1467-1473.
27. Suto A, Suto Y, Onohara N, Okayama T, Masuda K. Survey of IgE and lymphocyte reactivity to environmental and food allergens in 319 dogs suspected to have allergic skin diseases. *Vet Dermatol*. 2012;23:56.
28. Jackson HA, Jackson MW, Coblenz L, Hammerberg B. Evaluation of the clinical and allergen specific serum immunoglobulin E responses to oral challenge with cornstarch,

- corn, soy and a soy hydrolysate diet in dogs with spontaneous food allergy. *Vet Dermatol.* 2003;14:181-187.
29. Hillier A, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;81:289-304.
 30. DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy” tests. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;81:277-287.
 31. Kondo N, Agata H, Fukutomi O, Motoyoshi F, Orii T. Lymphocyte responses to food antigens in patients with atopic dermatitis who are sensitive to foods. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;86:253-260.
 32. Noma T, Yoshizawa I, Kou K, et al. Pattern of cytokine production by T cells from adolescents with asthma in remission, after stimulation with *Dermatophagoides farinae* antigen. *Pediatr Res.* 1995;38:187-193.
 33. Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T. Correlation of house dust mite-specific lymphocyte proliferation with IL-5 production, eosinophilia, and the severity of symptoms in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:84-89.
 34. Shek LPC, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy.* 2005;60:912-919.
 35. Hensel P, Austel M, Medleau L, Zhao Y, Vidyashankar A. Determination of threshold concentrations of allergens and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. *Vet Dermatol.* 2004;15:304-308.
 36. 藤村 正人. 犬のアトピー性皮膚炎における皮内反応試験と血清特異的IgE検査の比較. *獣医臨床皮膚科.* 2005;11:189-192.
 37. Longo G, Barbi E, Berti I, et al. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:343-347.
 38. Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:654-660.
 39. Pajno GB, Caminiti L, Ruggeri P, et al. Oral immunotherapy for cow's milk allergy with a weekly up-dosing regimen: a randomized single-blind controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010;105:376-381.
 40. Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, et al. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:83-91.
 41. Jones SM, Pons L, Roberts JL, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:292-300.

42. Skripak JM, Nash SD, Rowley H, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:1154-1160.
43. Burks AW, Jones SM, Wood RA, et al. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med.* 2012;367:233-243.
44. Zemann B, Schwaerzler C, Griot-Wenk M, et al. Oral administration of specific antigens to allergy-prone infant dogs induces IL-10 and TGF-beta expression and prevents allergy in adult life. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:1069-1075.
45. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001;357:1076-1079.
46. Lee B, Yin X, Griffey SM, Marco ML. Attenuation of colitis by *Lactobacillus casei* BL23 is dependent on the dairy delivery matrix. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:6425-6435.
47. Minic R, Gavrovic-Jankulovic M, Petrusic V, et al. Effects of orally applied Fes p1-displaying *L. plantarum* WCFS1 on Fes p1 induced allergy in mice. *J Biotechnol.* 2015;199C:23-28.
48. Ai C, Zhang Q, Ding J, et al. Mucosal delivery of allergen peptides expressed by *Lactococcus lactis* inhibit allergic responses in a BALB/c mouse model. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:1915-1924.
49. Ai C, Zhang Q, Ren C, et al. Genetically engineered *Lactococcus lactis* protect against house dust mite allergy in a BALB/c mouse model. *PLoS ONE.* 2014;9:e109461.
50. Adel-Patient K, Ah-Leung S, Creminon C, et al. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:539-546.
51. Hazebrouck S, Przybylski-Nicaise L, Ah-Leung S, et al. Influence of the route of administration on immunomodulatory properties of bovine beta-lactoglobulin-producing *Lactobacillus casei*. *Vaccine.* 2009;27:5800-5805.
52. Schabussova I, Hufnagl K, Wild C, et al. Distinctive anti-allergy properties of two probiotic bacterial strains in a mouse model of allergic poly-sensitization. *Vaccine.* 2011;29:1981-1990.
53. Bower DM, Prather KLJ. Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;82:805-813.
54. Reedy LM, Miller WH. *Allergic Skin Diseases of Dogs and Cats*. 2nd ed. (Willemse T, ed.). Philadelphia: W.B. Saunders; 1997:173-178.
55. Verlinden A, Hesta M, Millet S, Janssens GPJ. Food allergy in dogs and cats: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46:259-273.

56. Paterson S. Food hypersensitivity in 20 dogs with skin and gastrointestinal signs. *J Small Anim Pract.* 1995;36:529-534.
57. Wilhem S, Kovalik M, Favrot C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2011;22:143-149.
58. Kimura M, Oh S, Narabayashi S, Taguchi T. Usefulness of lymphocyte stimulation test for the diagnosis of intestinal cow's milk allergy in infants. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;157:58-64.
59. Morita H, Nomura I, Orihara K, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Milk Protein-specific Cytokine Secretion Profiles in Infant Patients with Fpries and Proctocolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:AB216-AB216.
60. Morita H, Nomura I, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H. Food protein-specific lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:AB90.
61. Noma T, Yoshizawa I, Maeda K, Baba M, Yata J. Initial events and T cell activation in lymphokine-mediated allergic responses in patients with hen egg allergy. *Ann Allergy.* 1994;73:76-84.
62. Kimura M, Obi M. Ovalbumin-Induced IL-4, IL-5 and IFN- γ Production in Infants with Atopic Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;137:134-140.
63. Kimura M, Obi M, Saito M. Japanese cedar pollen-specific interleukin-4 production develops immediately after the first exposure to pollens in infants with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2004;34:1032-1036.
64. Olivry T, Kurata K, Paps JS, Masuda K. A blinded randomized controlled trial evaluating the usefulness of a novel diet (aminoprotect care) in dogs with spontaneous food allergy. *J Vet Med Sci.* 2007;69:1025-1031.
65. Okayama T, Matsuno Y, Yasuda N, et al. Establishment of a quantitative ELISA for the measurement of allergen-specific IgE in dogs using anti-IgE antibody cross-reactive to mouse and dog IgE. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;139:99-106.
66. Parker HG, Kim LV, Sutter NB, et al. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science.* 2004;304:1160-1164.
67. Wood SH, Ke X, Nuttall T, McEwan N, Ollier WE, Carter SD. Genome-wide association analysis of canine atopic dermatitis and identification of disease related SNPs. *Immunogenetics.* 2009;61:765-772.
68. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, et al. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet.* 1994;7:125-129.
69. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today.* 2000;21:60-64.

70. Fukao T, Kaneko H, Teramoto T, Tashita H, Kondo N. Association between Fc epsilon RI beta and atopic disorder in Japanese population? *Lancet*. 1996;348:407.
71. Fujii H, Kondo N, Agata H, et al. Genetic analysis of IgE and the *IGHE*, *IGHEP1* and *IGHEP2* genes in atopic families. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;106:62-68.
72. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012;44:1222-1226.
73. Ke X, Kennedy LJ, Short AD, et al. Assessment of the functionality of genome-wide canine SNP arrays and implications for canine disease association studies. *Animal Genetics*. 2011;42:181-190.
74. Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T, Dunston SM, Hammerberg B. Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:667-679.
75. Marsella R, Olivry T, Nicklin C, Lopez J. Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Vet Dermatol*. 2006;17:24-35.
76. Powell GK. Milk- and soy-induced enterocolitis of infancy. Clinical features and standardization of challenge. *J Pediatr*. 1978;93:553-560.
77. Sicherer SH, Eigenmann PA, Sampson HA. Clinical features of food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Pediatr*. 1998;133:214-219.
78. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:444-451.
79. Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RZ, Sampson HA. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;93:1047-1059.
80. Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J-I. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol Pharm Bull*. 2003;26:969-973.
81. Kovacs-Nolan J, Zhang JW, Hayakawa S, Mine Y. Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *J Agric Food Chem*. 2000;48:6261-6266.
82. Järvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy*. 2007;62:758-765.

83. Urisu A, Yamada K, Tokuda R, et al. Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;120:192-198.
84. Walsh BJ, Elliott C, Baker RS, et al. Allergenic cross-reactivity of egg-white and egg-yolk proteins. An in vitro study. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1987;84:228-232.
85. Clark AT, Skypala I, Leech SC, et al. British Society for Allergy and Clinical Immunology guidelines for the management of egg allergy. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:1116-1129.
86. Everberg H, Brostedt P, Öman H, Bohman S, Movérare R. Affinity purification of egg-white allergens for improved component-resolved diagnostics. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154:33-41.
87. Prélaud P, Guaguere E, Alhaidari Z, Faivre N. Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. *Rev Med Vet*. 1998;149:1057-1064.
88. Sakaguchi M, Nakano T, Tsujimoto H, Sasaki Y. Specificity of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Dog Ige Antibody to Japanese Cedar (*Cryptomeria Japonica*) Pollen. *Allergol Int*. 1997;46:207-212.
89. DeBoer DJ, Ewing KM, Schultz KT. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies directed against canine IgE and IgG. *Vet Immunol Immunopathol*. 1993;37:183-199.
90. Jeffers JG, Shanley KJ, Meyer EK. Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. *J Am Vet Med Assoc*. 1991;198:245-250.
91. de Benedictis FM, Franceschini F, Hill D, et al. The allergic sensitization in infants with atopic eczema from different countries. *Allergy*. 2009;64:295-303.
92. Jeffers JG, Meyer EK. Responses of dogs with food allergies to single-ingredient dietary provocation. *J Am Vet Med Assoc*. 1996;209:608-611.
93. Egger M, Alessandri C, Wallner M, et al. Is aboriginal food less allergenic? Comparing IgE-reactivity of eggs from modern and ancient chicken breeds in a cohort of allergic children. *PLoS ONE*. 2011;6:e19062.
94. Ott H, Weißmantel S, Kennes LN, Merk HF, Baron JM, Fölster-Holst R. Molecular microarray analysis reveals allergen- and exotoxin-specific IgE repertoires in children with atopic dermatitis. *JEADV*. 2014;28:100-107.
95. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int*. 2015;64:332-343.
96. Stevens L. Egg white proteins. *Comp Biochem Physiol, B*. 1991;100:1-9.
97. Urisu A, Ando H, Morita Y, et al. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:171-176.

98. Martos G, López-Fandiño R, Molina E. Immunoreactivity of hen egg allergens: Influence on in vitro gastrointestinal digestion of the presence of other egg white proteins and of egg yolk. *Food Chem.* 2013;136:775-781.
99. Kubota S, Miyaji K, Shimo Y, et al. IgE reactivity to a Cry j 3, an allergen of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen in dogs with canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;149:132-135.
100. Hashimoto M, Nigi H, Sakaguchi M, et al. Sensitivity to two major allergens (Cry j I and Cry j II) in patients with Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollinosis. *Clin Exp Allergy.* 1995;25:848-852.
101. Fujimura T, Futamura N, Midoro-Horiuti T, et al. Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy.* 2007;62:547-553.
102. Burks W, James J, Eigenmann P. *Food Allergy.* Elsevier Health Sciences; 2011.
103. Lavi S, Zimmerman B, Koren G, Gold R. Administration of measles, mumps, and rubella virus vaccine (live) to egg-allergic children. *JAMA.* 1990;10:80-82.
104. Gaskell RM, Gettinby G, Graham SJ, Skilton D. Veterinary Products Committee working group report on feline and canine vaccination. *Vet Rec.* 2002;150:126-134.
105. Moore GE, Guptill LF, Ward MP, et al. Adverse events diagnosed within three days of vaccine administration in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:1102-1108.
106. Miyaji K, Suzuki A, Shimakura H, et al. Large-scale survey of adverse reactions to canine non-rabies combined vaccines in Japan. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;145:447-452.
107. Ohmori K, Masuda K, Maeda S, et al. IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic reactions after vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;104:249-256.
108. Ohmori K, Masuda K, Deboer DJ, Sakaguchi M, Tsujimoto H. Immunoblot analysis for IgE-reactive components of fetal calf serum in dogs that developed allergic reactions after non-rabies vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115:166-171.
109. Charng YC, Lin CC, Hsu CH. Inhibition of allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity by recombinant lactic-acid bacteria. *Vaccine.* 2006;24:5931-5936.
110. Rigaux P, Daniel C, Hisbergues M, et al. Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy.* 2009;64:406-414.
111. Daniel C, Repa A, Wild C, et al. Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy.* 2006;61:812-819.

112. Kajikawa A, Igimi S. Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine*. 2010;28:3409-3415.
113. Kajikawa A, Masuda K, Katoh M, Igimi S. Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1beta. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:43-48.
114. Pouwels PH, Vriesema A, Martinez B, et al. Lactobacilli as vehicles for targeting antigens to mucosal tissues by surface exposition of foreign antigens. *Meth Enzymol*. 2001;336:369-389.
115. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and infection*. 2001;3:947-954.
116. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1255-1261.
117. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺ CD8⁺ TCRlo thymocytes in vivo. *Science*. 1990;250:1720-1723.
118. Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6688-6692.
119. Shida K, Makino K, Morishita A, et al. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;115:278-287.
120. Ichikawa S, Miyake M, Fujii R, Konishi Y. Orally administered *Lactobacillus paracasei* KW3110 induces in vivo IL-12 production. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73:1561-1565.
121. Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H, Fujii T. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135:205-215.
122. Sashihara T, Sueki N, Ikegami S. An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J Dairy Sci*. 2006;89:2846-2855.
123. Feleszko W, Jaworska J, Rha R-D, et al. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:498-505.
124. Yang J, Ren F, Zhang H, Jiang L, Hao Y, Luo X. Induction of regulatory dendritic cells by *Lactobacillus paracasei* L9 prevents allergic sensitization to bovine β -lactoglobulin in mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25:1687-1696.
125. Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*. 1999;190:229-239.

126. Fukaya T, Takagi H, Sato Y, et al. Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood*. 2010;116:2266-2276.
127. Iwata M. The roles of retinoic acid in lymphocyte differentiation. *Seminars in Immunology*. 2009;21:1.
128. 岩田 誠. 腸管免疫におけるビタミン A の役割. *腸内細菌学雑誌*. 2007;4:297-304.
129. Noguchi S, Hattori M, Sugiyama H, Hanaoka A, Okada S, Yoshida T. *Lactobacillus plantarum* NRIC1832 enhances IL-10 production from CD4⁺ T cells in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76:1925-1931.
130. Shida K, Takahashi R, Iwadata E, et al. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:563-570.

図表

表1-1 血清中アレルギー特異的IgE検査で測定したアレルギー

肉類	魚類	穀物	その他
牛	シャケ	小麦	卵白
豚	タラ	大豆	卵黄
羊	ナマズ	トウモロコシ	牛乳
鶏	ししゃも	ジャガイモ	
七面鳥		米	
カモ			

表1-2 家族性の食物アレルギー犬の個体情報

イヌ No.	性別	診断時の年齢	消化器症状	ステロイド投与 による症状の改善	食物抗原特異的IgE	除去食による 治療結果
<u>アレルギー症状あり</u>						
1	雄	1歳10ヶ月齢	下痢	改善	全ての抗原で陰性	症状改善
3	雌	9歳齢	下痢	改善	全ての抗原で陰性	症状改善
5	雄	6ヶ月齢	下痢、リンパ球形質細胞性腸炎、 腹水、低アルブミン血症	改善	全ての抗原で陰性	症状改善
6	雄	6ヶ月齢	下痢、リンパ球形質細胞性腸炎、 腹水、低アルブミン血症	改善	全ての抗原で陰性	症状改善
7	雄	6ヶ月齢	下痢、リンパ球形質細胞性腸炎	改善	全ての抗原で陰性	症状改善
<u>アレルギー症状なし</u>						
4	雄	6歳3ヶ月齢	なし	未実施	未実施	未実施
2	雌	1歳4ヶ月齢	なし	未実施	未実施	未実施

表1-3 食物アレルギー犬における負荷食品

イヌ No.	反応した食品	反応しなかった食品
1	サケ	牛肉、トウモロコシ、ポーク、 ナマズ、ししゃも、卵、米
3	なし	卵白、米
5	重篤なため未実施	
6	ラム肉	なし
7	ラム肉	なし

※過去に給餌していた餌の成分を参考に負荷食品を選択

表2-1 卵白に含まれる精製アレルゲン

アレルゲン名	一般名	卵白に占める 割合 (%)	分子量 (kDa)
Gal d 1	オボムコイド	11	28
Gal d 2	オボアルブミン	54	45
Gal d 3	オボトランスフェリン	12	77
Gal d 4	リゾチーム	3	14

表2-2 卵白粗抗原特異的IgE陽性の犬の特徴

イヌ No.	犬種	性別	発症年齢	症状	負荷試験に使用した卵食品	負荷試験 結果
1	フレンチブルドック	雌	1歳齢	掻痒、紅斑、 顔面腫脹	茹で卵	+
2	チャウチャウ	雄	1歳10ヶ月齢	蕁麻疹、掻痒	茹で卵、 エッグアンドライス（ヒルズ）	+
3	フレンチブルドック	雌	1歳5ヶ月齢	掻痒	NT	N/A
4	ミニチュアダックス	雌	4ヶ月齢	掻痒、湿疹	エッグアンドライス（ヒルズ）	+
5	ビーグル	雌	5歳齢	掻痒、口唇炎、耳炎	NT	N/A
6	トイプードル	雄	1歳6ヶ月齢	掻痒、紅斑	茹で卵	+
7	ヨークシャーテリア	雌	3歳齢	掻痒、紅斑、 脱毛、耳炎	NT	N/A
8	ワイアフォックステリア	雄	2歳齢	掻痒、湿疹、紅斑、 脱毛	茹で卵	+

NT，実施せず

＋，再発；N/A，該当なし

表2-3 卵白粗抗原特異的IgE陽性の犬の卵白精製抗原に対するIgE反応性

イヌ No.	IgE 反応性:			
	OM	OVA	OT	LY
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	-	-
5	-	-	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	-	-	-	-

+, 陽性; -, 陰性

表3-1 マウスの感作条件検討におけるアレルゲン量

群	匹数	アレルゲン	アジュバント
		OVA	水酸化アルミニウム
OVA 0.1 μ g群	4	0.1 μ g	2mg
OVA 1 μ g群	4	1 μ g	2mg
OVA 10 μ g群	4	10 μ g	2mg
OVA 100 μ g群	4	100 μ g	2mg
Alum群	4	—	2mg
PBS群	4	—	—

表3-2 マウスへの乳酸菌経口投与実験における各群の前処置とアレルギー感作

群	匹数	前処置 ¹	アレルギー感作 ¹
OVA発現 <i>L. casei</i> 群	6	OVA発現 <i>L. casei</i> 5×10^9 CFU	OVA 10 μ g + Alum 2 mg
OVA非発現 <i>L. casei</i> 群	6	OVA非発現 <i>L. casei</i> 5×10^9 CFU	OVA 10 μ g + Alum 2 mg
OVA群	6	OVA 1 μ g	OVA 10 μ g + Alum 2 mg
PBS群	6	PBS (-)	OVA 10 μ g + Alum 2 mg

¹, 一匹あたりの投与量

表3-3 マウスのTreg測定に用いたフローサイトメトリー用抗体の一覧

抗体名	免疫動物	蛍光色素	製造元
anti-mouse CD4	rat	FITC	Becton Dickinson Pharmingen
anti-mouse CD25	rat	APC	Becton Dickinson Pharmingen
anti-mouse Foxp3	rat	BV421	Becton Dickinson Horizon

研究計画

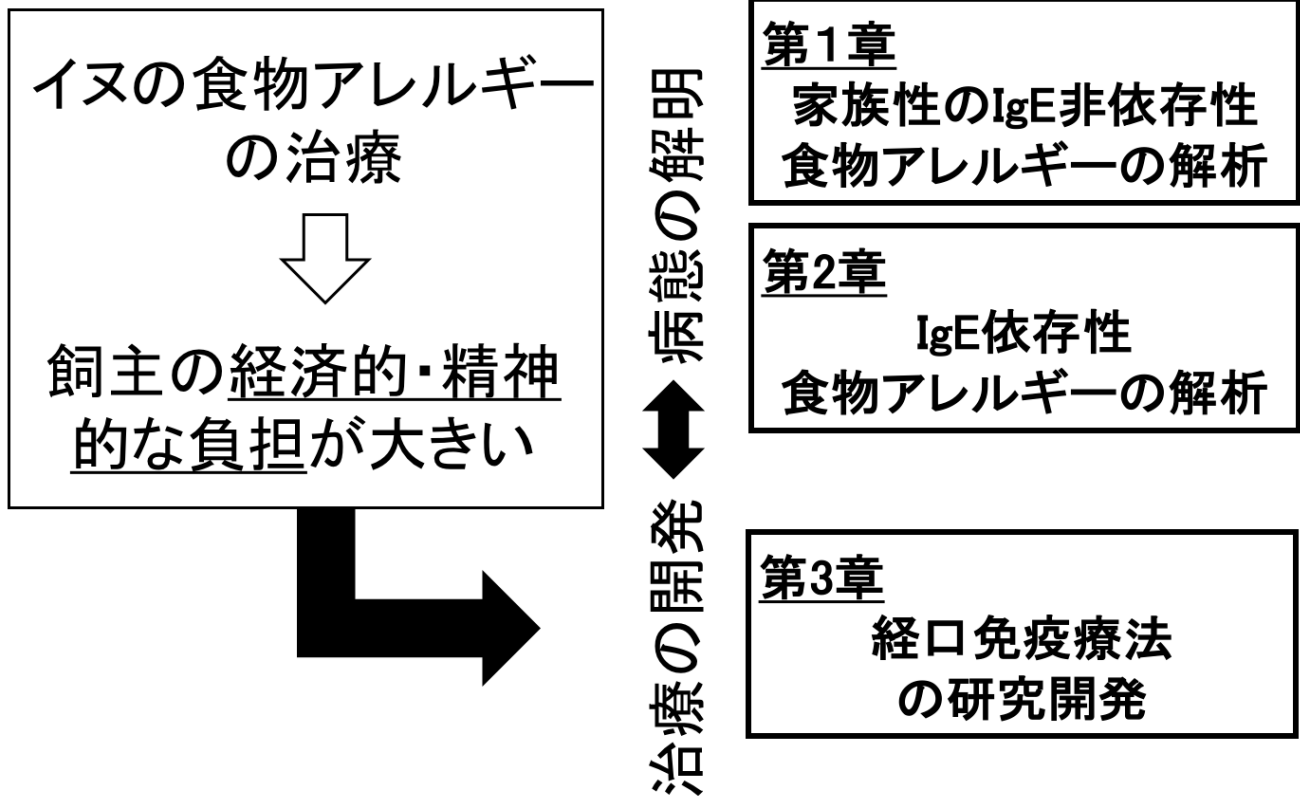


図0-1 本研究の概要

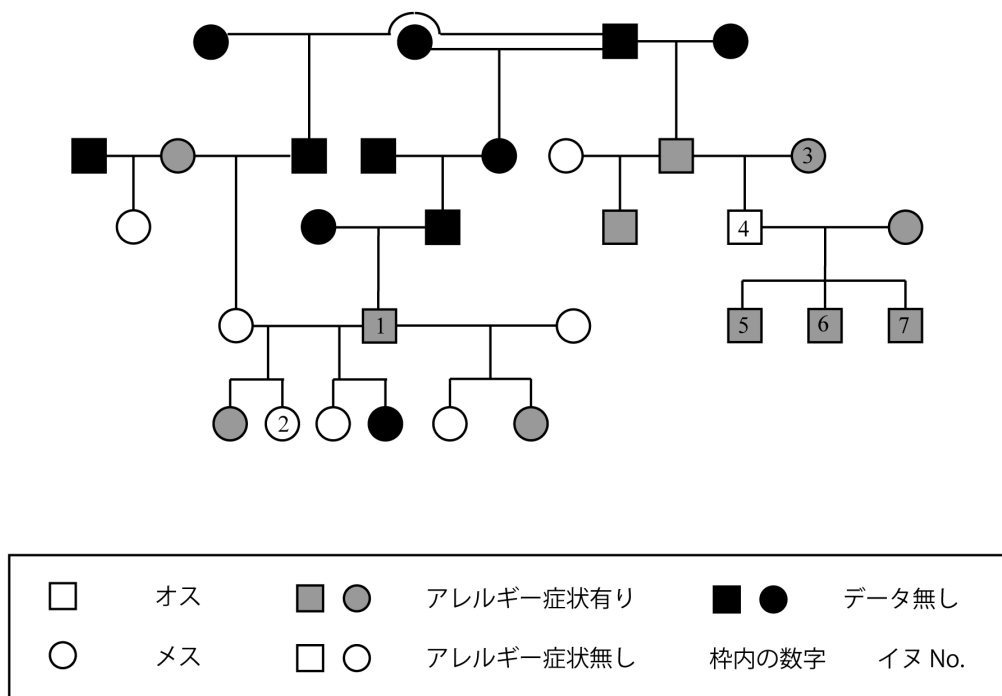


図 1-1 食物アレルギーを示す犬の家系図

食物アレルギーを示すパピヨンの家族関係を調べ、各個体のアレルギー情報を記載した。

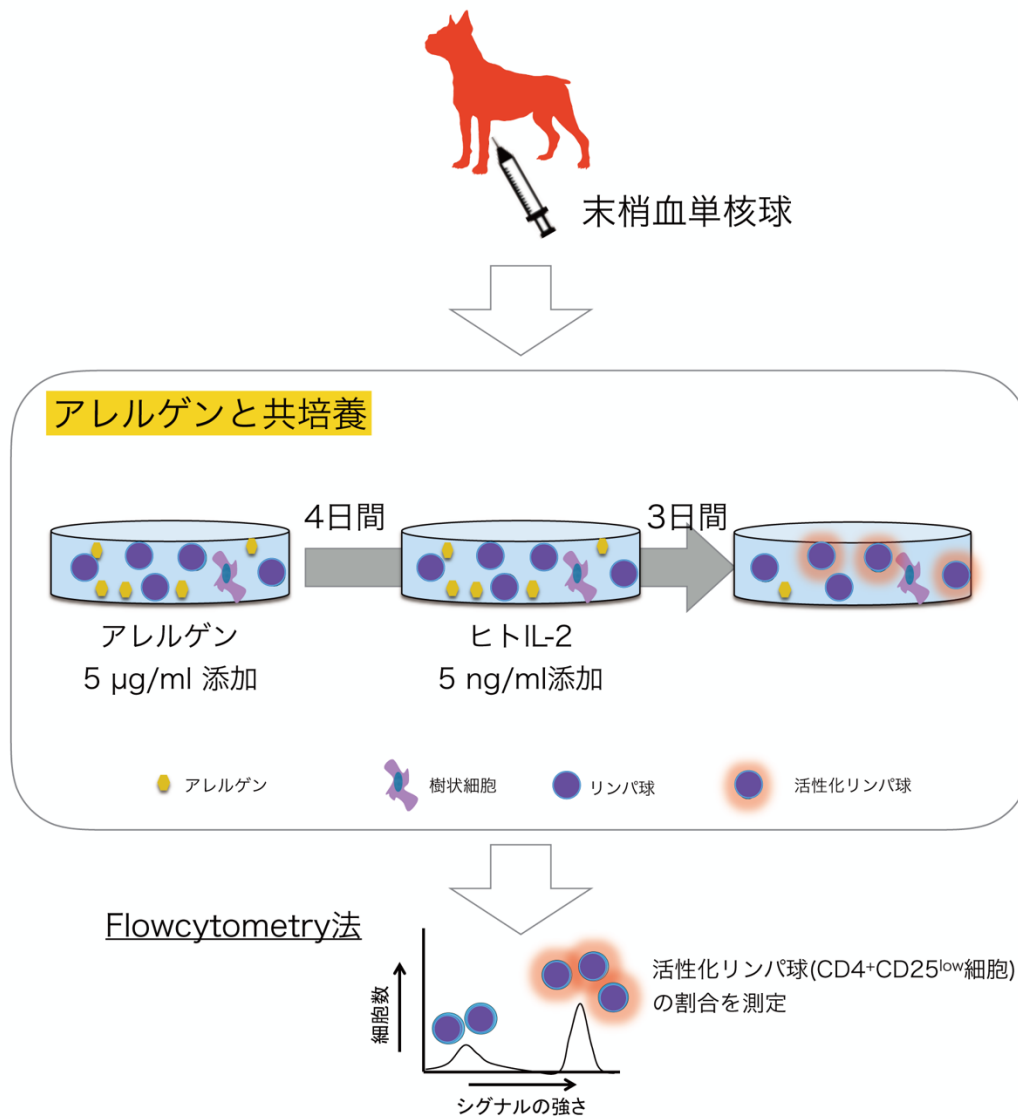
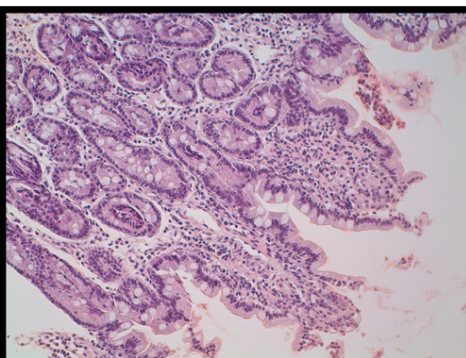


図 1-2 リンパ球増殖試験の概要

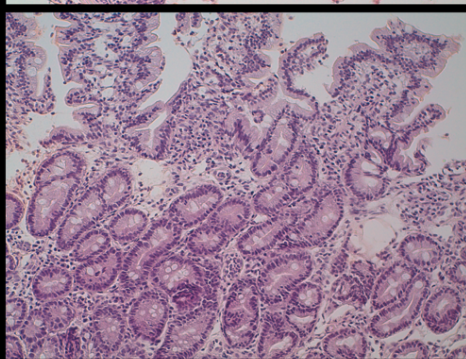
内視鏡画像

十二指腸組織像

No. 5



No. 6



No. 7

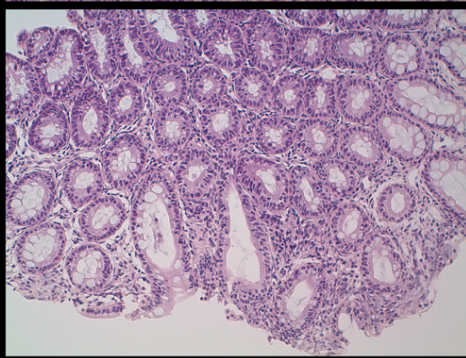
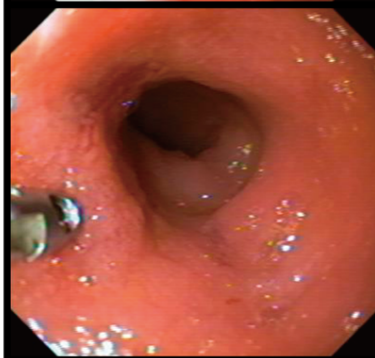


図 1-3 食物アレルギー犬の十二指腸内の内視鏡画像と病理組織像

内視鏡検査を実施した3頭（No. 5-7）の十二指腸の肉眼的所見と病理組織所見。十二指腸内腔はびらんしており、腸粘膜にはリンパ球の浸潤と軽度な形質細胞の浸潤が認められた。

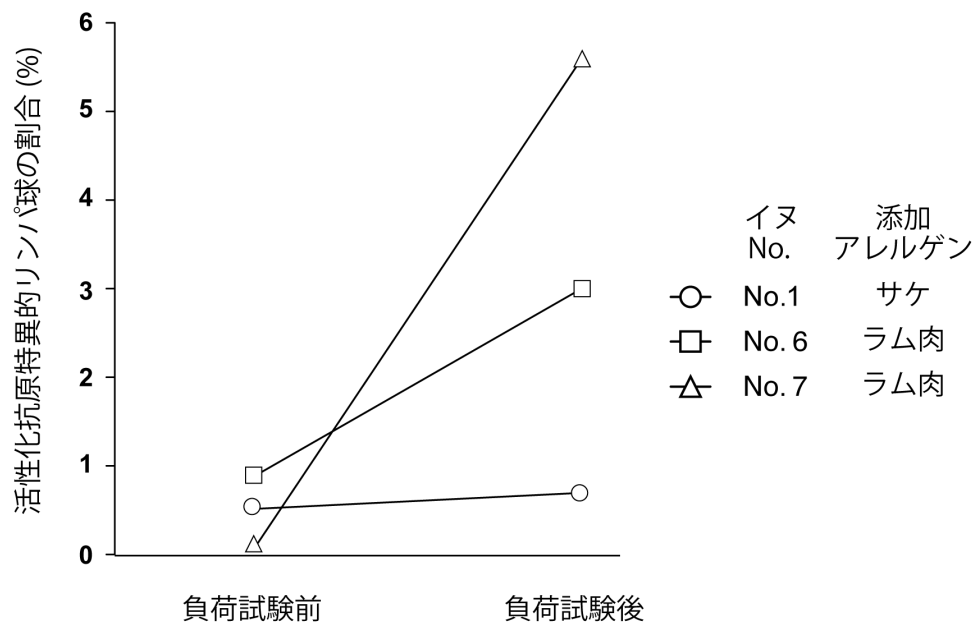


図 1-4 食物負荷試験前後における抗原特異的リンパ球の割合の変化

食物負荷試験直前とアレルギー症状再発 2 週間後に採血を行い、血中の末梢血単核球と負荷食品のタンパク質を共培養した。培養後、活性化したリンパ球をフローサイトメーターによって測定した。

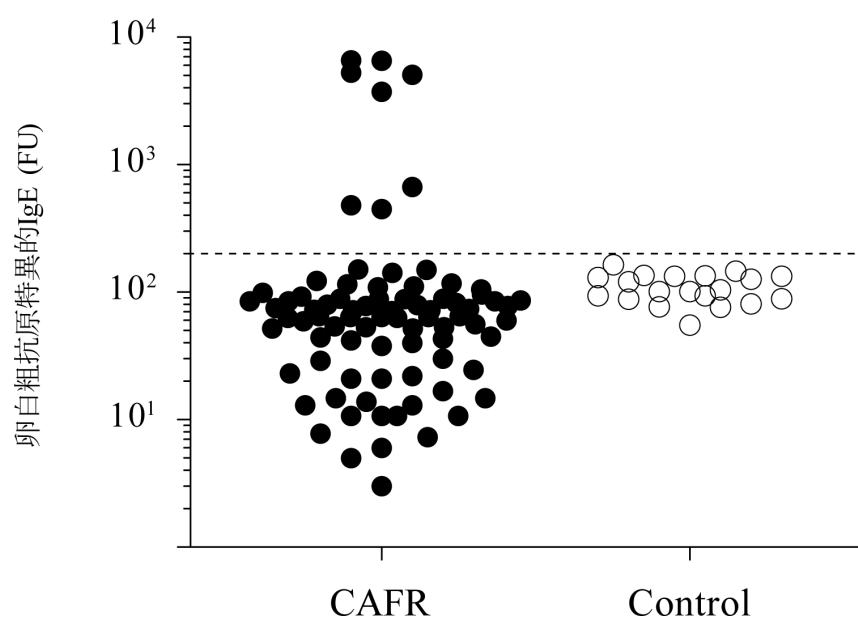


図 2-1 ELISA 法による卵白粗抗原に対する IgE 反応性

カットオフ（破線）以上の IgE 反応性を示した 8 頭を陽性とした。独立した 3 回の実験を行い、代表的な結果を示した。CAFR, 皮膚型食物有害反応犬；Control, 健常犬。

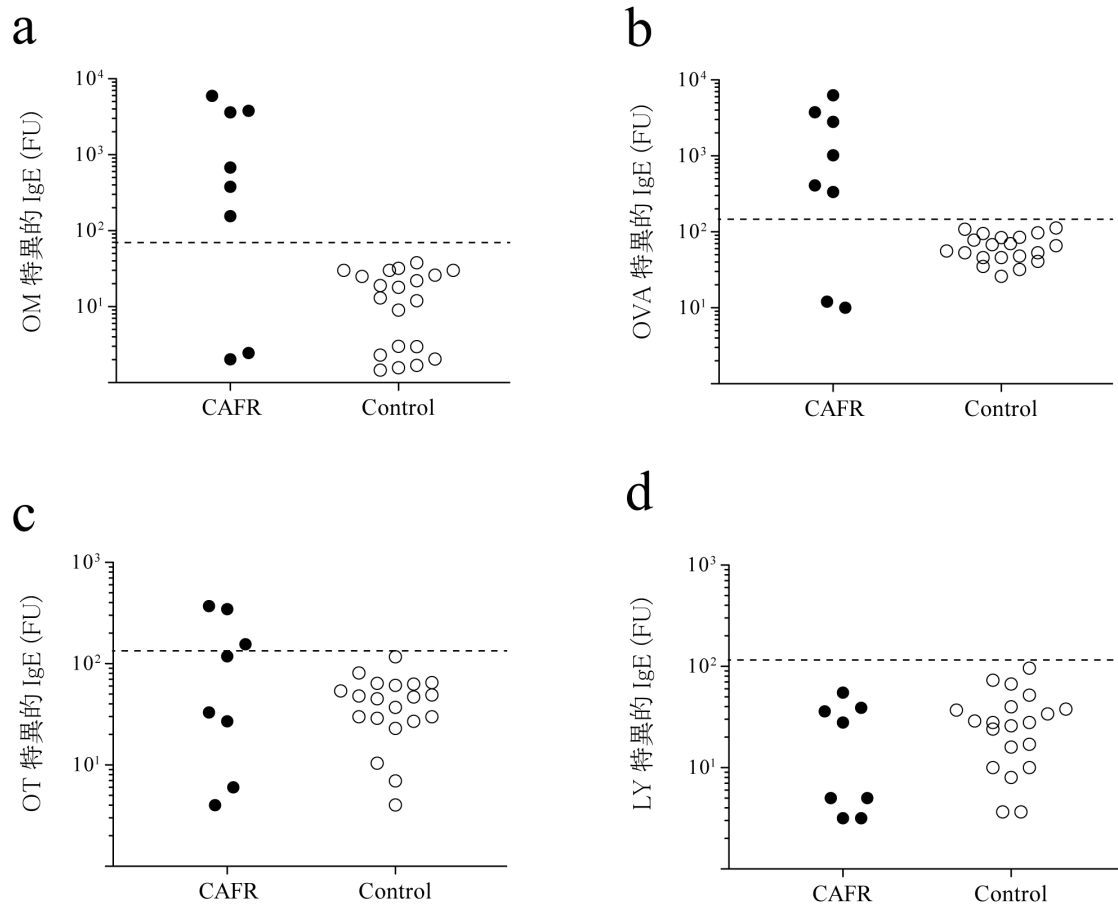
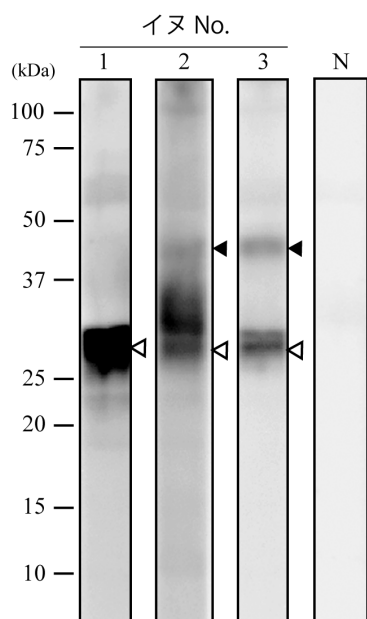


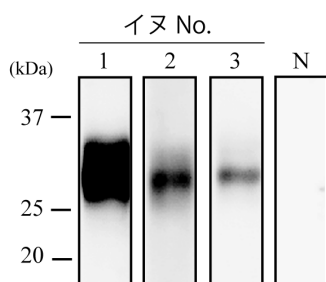
図 2-2 ELISA 法による卵白精製抗原に対する IgE 反応性

卵白粗抗原特異的 IgE を持つ 8 頭の犬で (a) OM, (b) OVA, (c) OT, and (d) LY に対する特異的 IgE 反応性を測定した。カットオフ (破線) より高値だった場合に陽性とした。3 回の独立した実験を行い、代表的な結果を示した。CAFR, 皮膚型食物有害反応犬; Control, 健常犬。

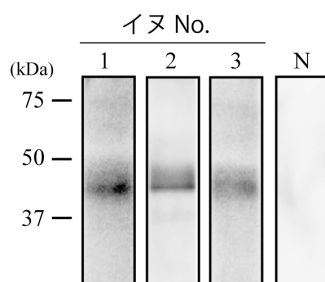
a 卵白粗抗原



b OM



c OVA



d OT

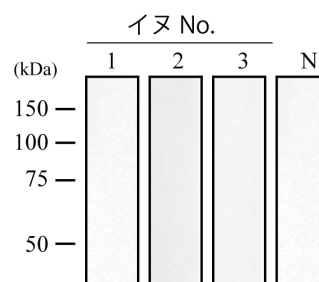


図 2-3 ウェスタブロット法による 卵白抗原特異的 IgE の検出

(a) 粗抗原 (b) OM, (c) OVA, (d) OT。イヌ No. は 表 2-2 に対応している。健常犬 20 頭のプール血清を用いた陰性対照は“N”で示した。OVA と OM だと考えられる 28kDa と 45 kDa の特異的バンドを矢頭で示した。

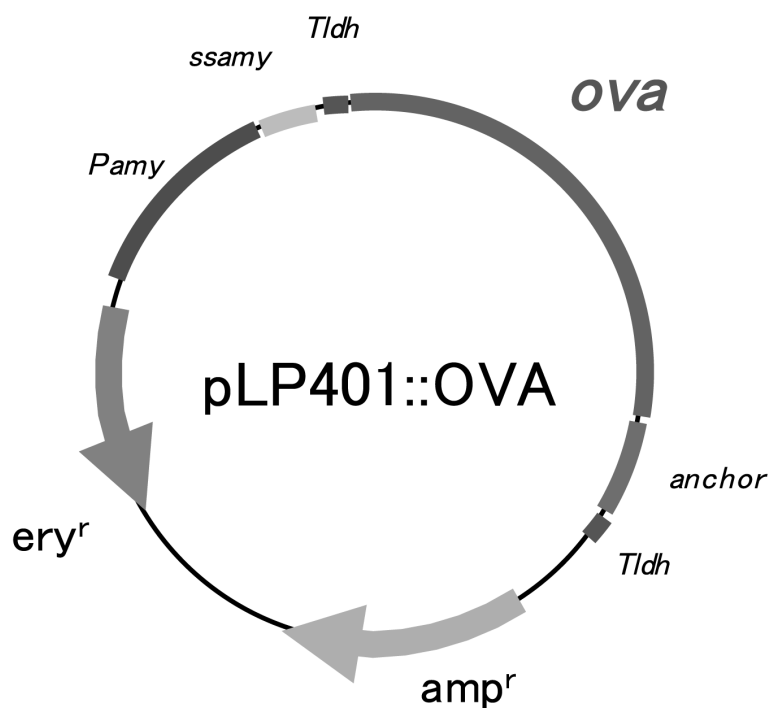


図 3-1 OVA 発現に用いたプラスミドベクター

pLP401 プラスミドベクターはエリスロマイシン耐性遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子を持つ (*eryr*、*amp^r*)。OVA の全長配列 (*ova*) が組み入れられており、 α アミラーゼプロモーター (*Pamy*) によって OVA は発現する。分泌シグナル (*ssamy*) とアンカー配列 (*anchor*) によって OVA は菌体表面に発現・固定される。

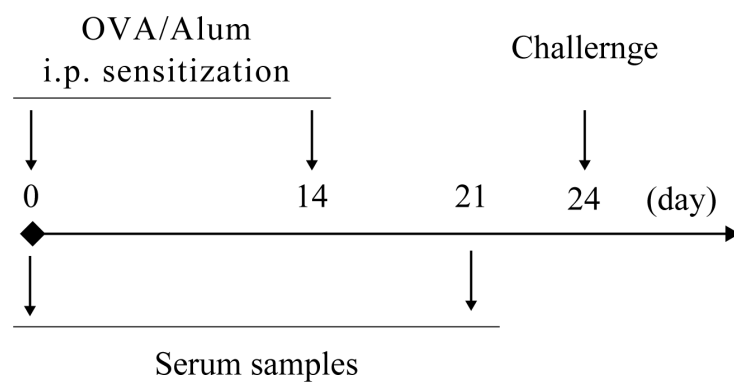


図 3-2 マウスの OVA 感作条件検討実験スケジュール

0、14 日目に OVA をマウスの腹腔内に投与して免疫した。0、28 日目に血清を採取し OVA 特異的イムノグロブリンを測定した。24 日目に OVA を静脈内投与しアナフィラキシー反応を誘発した。

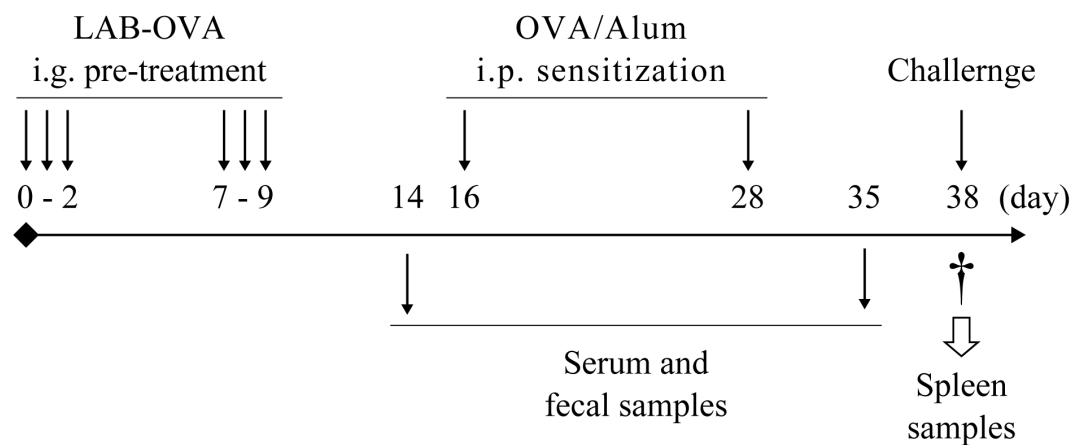


図 3-3 マウスに対する組換え乳酸菌経口投与の in vivo 実験スケジュール

3日間連続でBALB/cマウスに乳酸菌（LAB-OVA）を経口投与した。1週間後に再び3日間連続で乳酸菌を経口投与した。16、28日目にOVAを腹腔内投与して免疫した。14、35日目に血清、糞便を採取しOVA特異的イムノグロブリンを測定した。38日目にOVA 1 mgを静脈内投与して、アナフィラキシー反応を起こしたのち、脾臓を採取してTregの測定を行った。

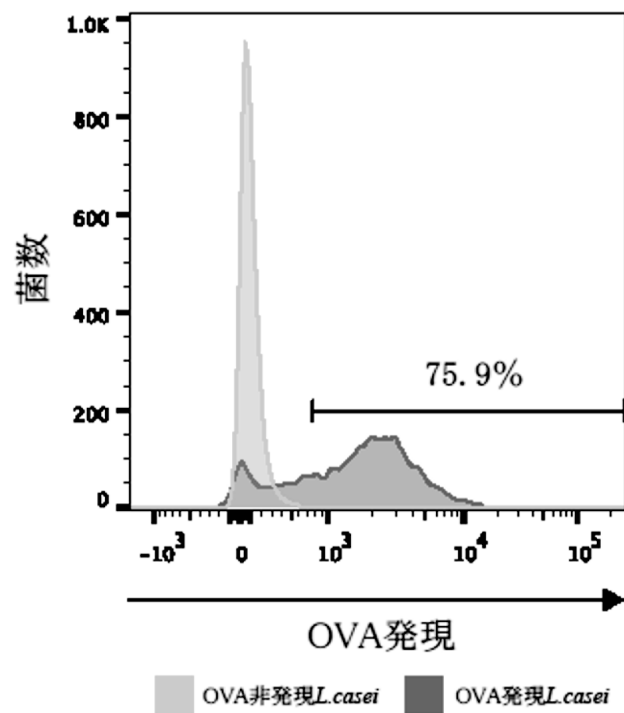


図 3-4 組換え乳酸菌の菌体表面における OVA の発現解析

Alexa Fluor 488 標識抗 OVA 抗体を用いて OVA 発現 *L. casei* と OVA 非発現 *L. casei* の菌体表面の OVA 発現をフローサイトメーターによって測定した。

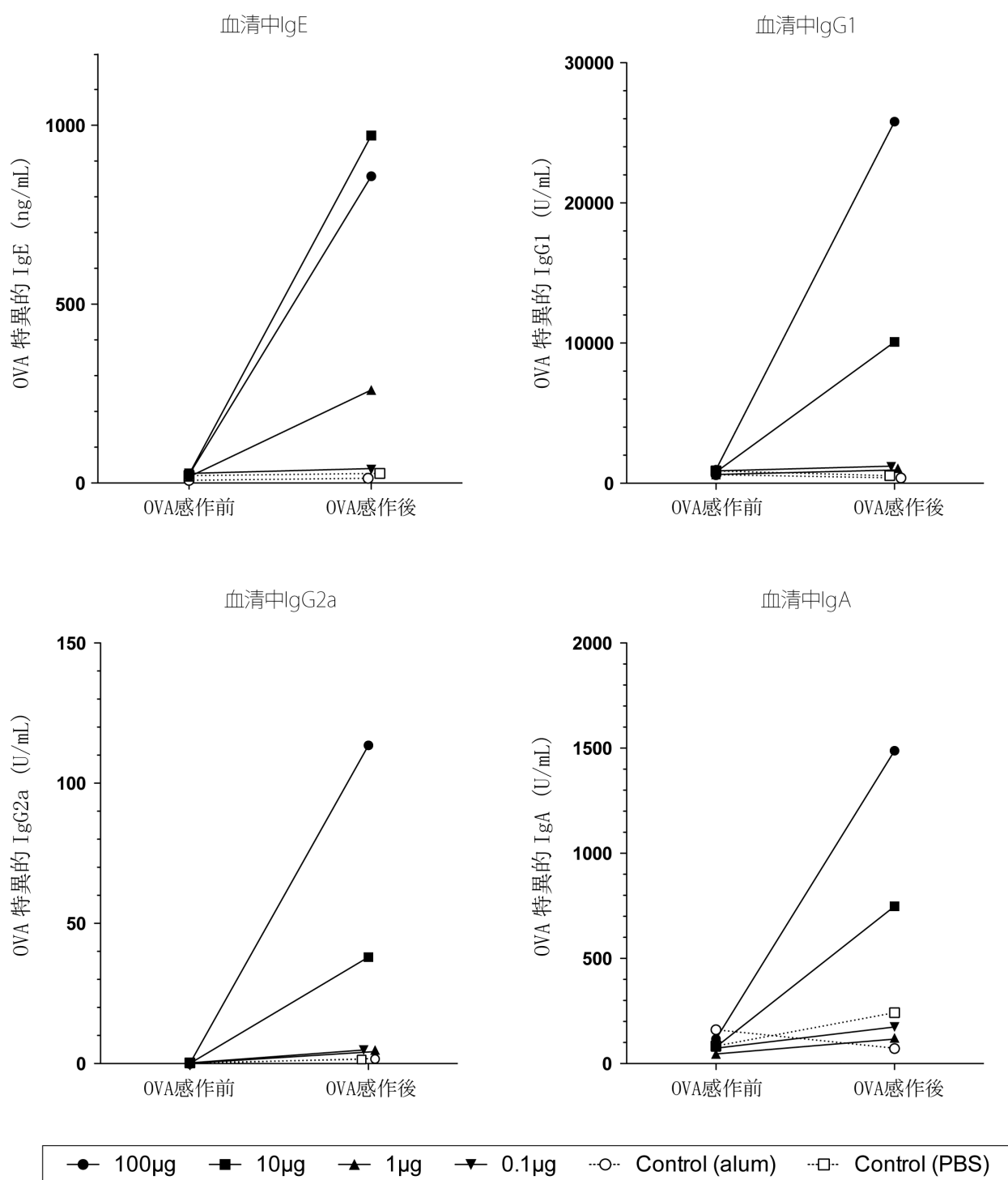


図 3-5 様々な感作条件における血清中イムノグロブリン濃度

感作前 (Day 0) と感作後 (Day 21) に感作マウスより血清を採取し、血清中イムノグロブリン濃度を測定した。統計解析はTwo-way ANOVAの後、Dunnett法にて行った。 $p < 0.05 (*)$ を有意差ありとした。

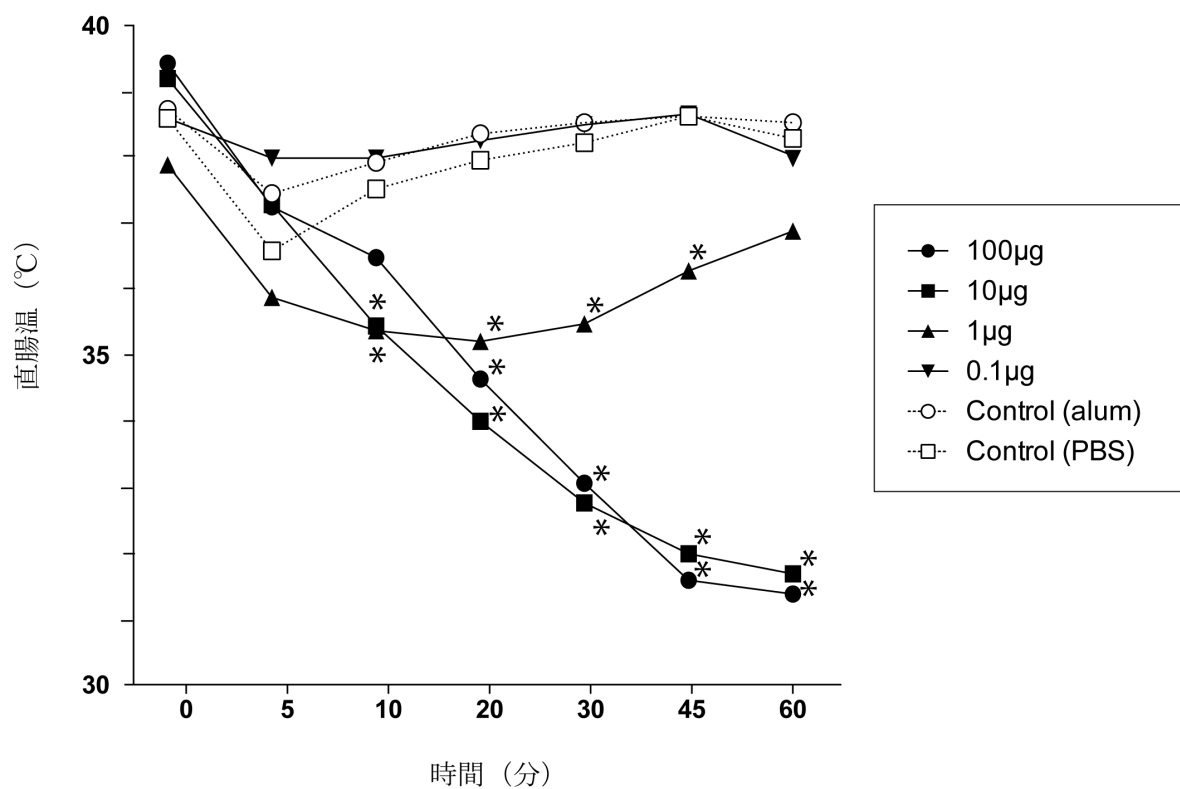


図 3-6 様々な感作条件のマウスにおけるアナフィラキシー反応

表 3-1 に従って作製した様々な感作条件のマウスに OVA 1 mg を静脈内投与したのち、経時的に直腸温を測定した。PBS 群と比較して、有意に直腸温が低下した群は*で示した。統計解析は Two-way ANOVA の後、Dunnett 法にて行った。p<0.05(*) を有意差ありとした。

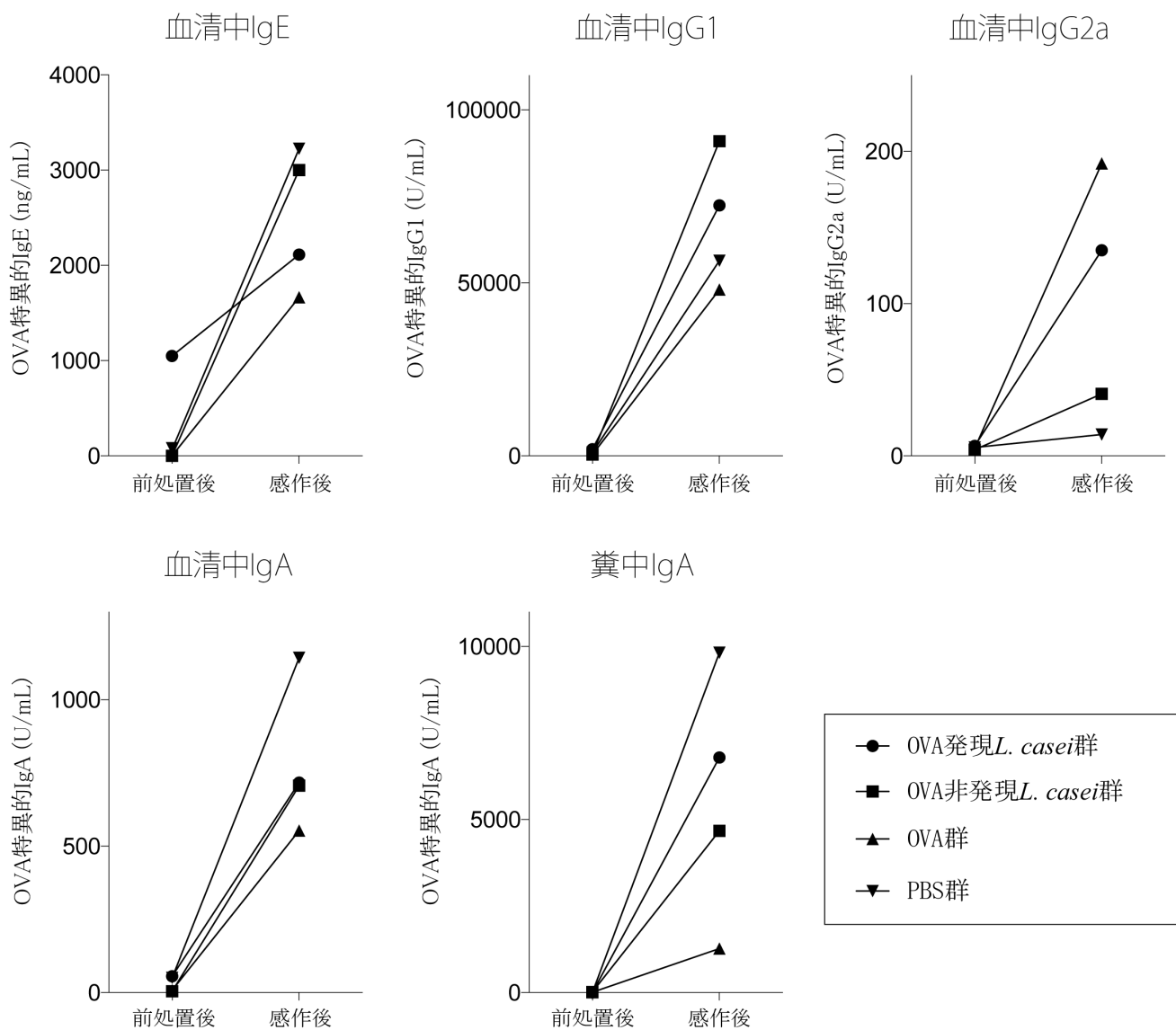


図 3-7 組換え *L. casei* を投与したマウスの OVA 特異的イムノグロブリンの変化

前処置後 (Day 14) と OVA 感作後 (Day 35) の血清中、糞中のイムノグロブリン濃度を測定した。統計解析は Two-way ANOVA の後、Dunnett 法にて行った。p<0.05(*) を有意差ありとした。

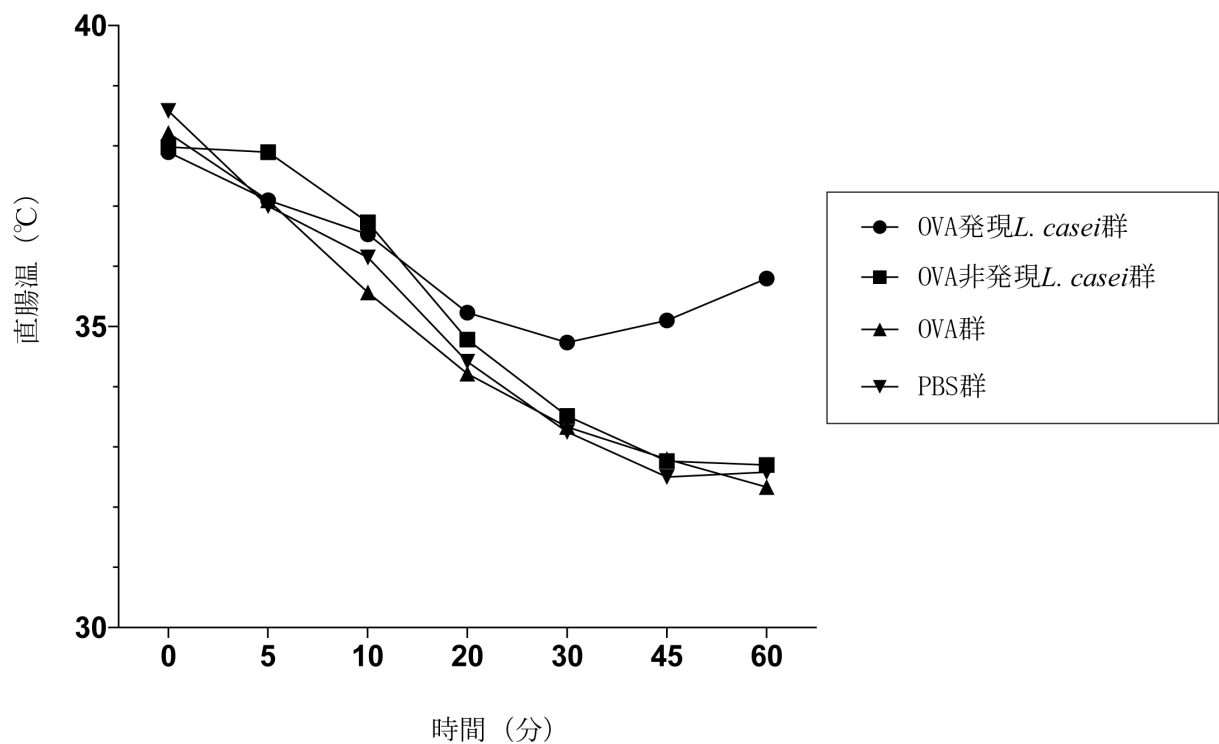


図 3-8 組換え乳酸菌を投与したマウスのアナフィラキシー反応

組換え *L. casei* を投与したマウスにアナフィラキシー反応を起こし、経時的に直腸温を測定した。PBS 群と比較して、有意に直腸温が低下した場合は*で示した。統計解析は Two-way ANOVA の後、Dunnett 法にて行った。p<0.05(*) を有意差ありとした。

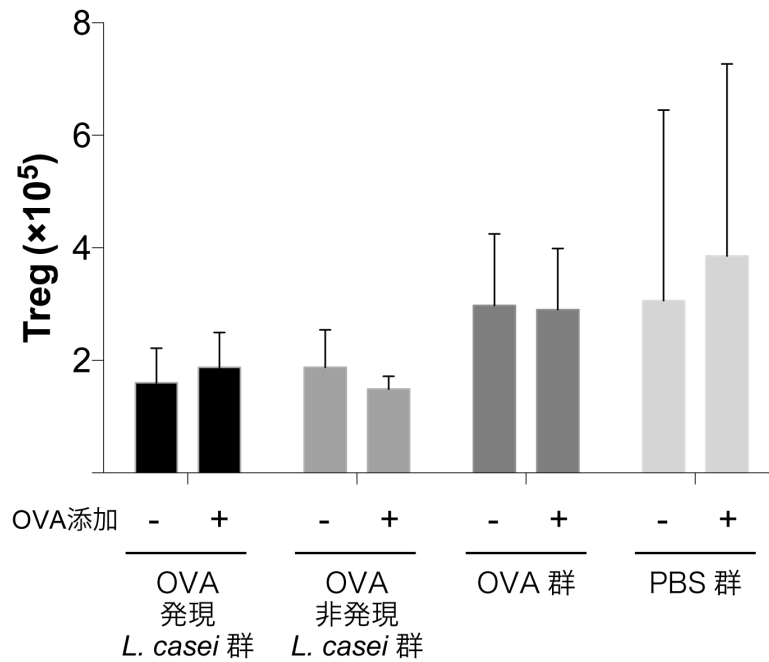


図 3-9 組換え *L. casei* を投与したマウスの脾細胞中の OVA 特異的 Treg

組換え乳酸菌を投与したマウスの脾細胞を OVA (10 μ g/ml) と 48 時間共培養し、培養後の Treg の細胞数を測定した。OVA 非添加条件と比較して OVA 添加条件での Treg の増加を OVA 特異的 Treg とした。統計解析は Student's t-test を行った。p<0.05(*) を有意差ありとした。