

論文題目

牛乳アレルギーにおけるカゼイン成分の関与に関する免疫化学的研究

氏名

櫻井 那央

主論文の要約

牛乳アレルギーは他の食物アレルギーと比較して、乳幼児など幼若年齢期に多く、成長とともに自然寛解(耐性獲得)する例が多いが、学童期以降も寛解しない難治性の症例もある。牛乳アレルギーに関して臨床、動物モデル共に多数の研究報告があるが、経口的に摂取した牛乳中のタンパク質が引き起こすアレルギーの詳細なメカニズムはほとんど解明されていない。本学位論文により、牛乳アレルギーにおいて牛乳タンパク質中のカゼイン (CN) の重要性を示すとともに、その成分である α s1-CN の関与が大きいことを明らかにした。また、新たな牛乳アレルギーマウスモデルの特性を明らかにし、培養細胞腸上皮モデルを用いて、カゼイン (CN) およびそのペプチドの腸上皮層による取り込みと輸送機構を示した。これらの得られた研究成果を、第二章「難治性牛乳アレルギー患者における原因抗原タンパク質としてのカゼイン成分」、第三章「牛乳アレルギーマウスモデルにおけるカゼインの摂取によるアレルギー症状の誘発」および第四章「ヒト腸上皮様細胞モデル系におけるカゼインの経細胞輸送と細胞内消化耐性ペプチド」にまとめた。研究の概要を以下に記す。

第 2 章では、難治性牛乳アレルギーにおいて産生される IgE 抗体の牛乳タンパク質に対する抗原特異性の特徴を調べるため、経口負荷試験陽性の患者血清中の特異 IgE 抗体価を、ELISA 法を用いて測定した。その結果、CN に対する特異 IgE 抗体価が、乳清タンパク質である β -LG および α -LA と比較して有意に高値であった。さらに、分離した CN の主要成分タンパク質 (α s1-CN、 β -CN、 κ -CN) を用いた特異 IgE 抗体価測定結果は、抗体価が高い方から α s1-CN > β -CN >> κ -CN となった。これらの結果より、難治性牛乳アレルギー患者において CN に対する特異 IgE 抗体価は牛乳除去治療中でも高値に検出されたため、牛乳アレルギー診断における免疫学的検査として CN に対する血中特異 IgE 抗体価測定が有用であると考えられた。また CN 成分の中でも特に重要な抗原成分が α s1-CN であることが明らかとなった。

食物アレルギーの診断や治療には、主にマウスやラットなどの動物モデルを用いた実験研究を行い、その結果を基に臨床研究が行われている。

そこで第3章では、牛乳アレルギーの診断・治療・予防の研究に用いるための動物モデル系の確立を目的として、CNを抗原とした経口感作および腹腔内感作マウスを作製し、血中IgEおよびIgG1抗体のCN成分に対する抗原特異性解析、CN抗原に対する摂取行動の比較、およびCN投与によるアナフィラキシー様症状の誘発試験を行った。その結果、経口感作群と腹腔内感作群の間で、CN成分に対する特異IgE抗体産生に差が見られ、経口感作群では α s1-CNに対する特異IgE抗体価が上昇し、腹腔感作群では α s1-CN、 β -CN、 κ -CNの全ての成分に対する特異IgE抗体価が上昇することが明らかとなった。また、CN摂取行動を、20%CN飼料の摂餌量を指標として評価した結果、腹腔感作群でのみCNを忌避する傾向が見られた。さらに4 mgのCNを胃内投与し、投与後の直腸温の測定によりアナフィラキシー様症状の惹起を評価した。その結果、コントロール群ではCN投与の有無に関わらず投与後直腸温の低下は観察されなかったが、経口感作群および腹腔感作群では共にCN投与後に一部の個体で直腸温が顕著に低下し、アナフィラキシー様症状が惹起されたと考えられた。しかし、経口感作群では個体差が大きく、統計的有意差は腹腔感作群でのみ認められた。これらのことから、よりヒトに近い条件で作製した経口感作群はCNによる感作が成立し、CN成分特異IgE抗体産生が難治性牛乳アレルギー患者に類似している事、また個体によっては多量のCNを胃内に投与する事でアナフィラキシー様症状を惹起できることが明らかとなり牛乳アレルギーモデルとして有用であると考えられた。アレルギーが引き起こされるためには、抗原として認識された未分解タンパク質や抗原性のペプチドによって免疫応答が誘発されることが必要であるが、そのメカニズムの詳細は未だ明らかではない。しかし、実験的および臨床的研究により、免疫学的に有意なレベルの食物タンパク質抗原およびその断片が腸上皮を介して吸収され、末梢血に到達することが示されている。

第4章では、CNの上皮細胞層の頂端側から基底側への取り込みと輸送、および細胞内分解を示す実験的証拠を得ることを目的とした。腸上皮モデルとしてヒトCaco-2細胞単層を用いて、基底側培地に輸送されたCNタンパク質および分解ペプチドを共焦点顕微鏡法および質量分析法により免疫細胞学および生化学的に分析した。CN成分特異的抗体を用いた共焦点顕微鏡観察では、 α s1-CN抗原が頂端側の細胞質においてドット状のシグナルとして検出され、数時間内に基底側の細胞質に到達し、時間依存的に増加することを示した。このような細胞内CNシグナルは、他の食物抗原タンパク質、

β -LG および OVA よりも顕著であり、初期エンドソームマーカータンパク質 EEA-1 と部分的に共局在した。また、Caco-2 細胞の基底側培地中のタンパク質画分のトリプシン分解ペプチドを LC-MS 分析した結果、ポリペプチドの N-末端領域を含む α s1-CN 断片および中央部分を含む α s2-CN 断片が 1 ウェル（膜面積 0.3 cm²）当たり 100~1000 fmol で同定、検出された。さらに、 β -CN の C 末端重複ペプチドは、基底側培地の 10kDa 未満のペプチド画分において同定された。これらの結果は、Caco-2 細胞によって取り込まれた CN の一部がリソソーム分解を免れて、免疫学的な活性を保持した CN フラグメントが細胞単層の基底側に放出されることを示唆した。