

## 67. 経皮感作食物アレルギー発症機序の解明

善本 知広

\*兵庫医科大学 医学部 免疫学・医動物学講座

Key words : 食物アレルギー, 経皮感作, 経口免疫寛容, 好塩基球, IL-33

### 緒 言

食物アレルギーは、特定の食物を摂取した後にアレルギー反応を介して皮膚（じんましん、顔面紅潮）・呼吸器（喘鳴、呼吸困難）・消化器（腹痛、下痢、口唇の腫れ）あるいは全身性（アナフィラキシー症状；血圧低下、意識障害）に生じる症状のことをいう。2012年の報告では、わが国の食物アレルギー有病率は乳児で約5~10%、幼児で約5%、学童期以降が1.5~3%である。乳幼児期に多いことから、発症の要因は消化機能の未熟などが考えられた。そのため以前は母乳や胎盤を介してアレルギーに感作されると考えられ、欧米では婦人は妊娠中や授乳中の卵やピーナッツなどの摂取を制限し、乳児には乳製品、卵白やピーナッツなどを与えるべきではないと考えられていた。しかし、その後の疫学研究から、特定の食物摂取を制限しても子供の食物アレルギーは減少するどころか、むしろ増加していることが判明し、この考え方は完全に否定された。代わって2008年、「経皮的に食物アレルギーに曝露されると感作が成立し、適切な量とタイミングで経口摂取された食物は、むしろ免疫寛容を誘導する」という二重抗原曝露仮説がイギリスのLackによって提唱された<sup>1)</sup>。イギリスでは新生児の入浴後に皮膚にオイルを塗る習慣があるが、ピーナッツオイルを配合したスキンケア製品を使用すると乳児期のピーナッツアレルギーの発症が約8倍増加すると報告されている<sup>2)</sup>。また、乳児湿疹やアトピー性皮膚炎に伴う皮膚のバリア傷害もアレルギーの感作を促進する<sup>3)</sup>。このように、経皮的な抗原曝露がアレルギーの感作と、それに続く食物アレルギーの発症の引き金であるというのが最近の考え方である。しかし、経皮感作食物アレルギーの発症機序は未だ不明な点が多く、根本的な発症予防法は確立していない。

本研究では、「経皮感作食物アレルギーモデルマウス」を世界で初めて作製し、食物アレルギーの感作（誘導相）と発症（効果相）に関与する分子と細胞を検討した<sup>4)</sup>。

### 方 法

#### 1. 経皮感作食物アレルギーモデルマウスの作製

正常 BALB/c マウスの背中を2 cm 四方毛剃りした後、皮膚に4%界面活性剤（Sodium Dodecylsulphate: SDS）を塗布し、皮膚バリアを脆弱にした後、そこに卵白アルブミン（OVA）300 $\mu$ g を週3回、2週間塗布した。OVA 感作開始後3週間目にOVA 5 mg を経口投与し、食物アレルギー（全身性アナフィラキシー）の発症を判定した。経口免疫寛容の誘導実験では、マウスにOVA 1 mg を週3回、2週間経口投与した後、OVA を皮膚に感作した。

#### 2. 全身性アナフィラキシーの判定

直腸温測定と血漿漏出度測定の種類の方法で判定した。

直腸温測定：OVA 経口投与後、0、5、10、15、20、30、45、60分にMicroprobe Thermometerを用いて測定した。

血漿漏出度測定：OVA 経口投与直前にマウス尾静脈からエバンスブルー色素（20 mg/Kg）投与し、OVA 経口投与15分後にマウスを安楽死させた後、リン酸緩衝液（PBS）で全身血管内還流し残留色素を除去した。OVA 塗布部皮膚と腸管の血管外漏出した色素を定量した。

## 結果

### 1. 経皮感作食物アレルギーモデルの樹立と経口免疫寛容の誘導

正常 BALB/c マウスの皮膚に SDS を塗布し、皮膚バリアを脆弱にした後、そこに OVA を週 3 回、2 週間塗布すると、塗布後 14 日目から血清中に OVA 特異的 IgE 抗体が著明に増加した。同時に所属リンパ節に IL-4 産生 Th2 細胞が誘導された。更に、塗布後 21 日目に抗原 OVA をマウスに経口投与すると、投与直後数分以内に直腸温低下と皮膚と腸管粘膜への著明な血管透過性亢進（色素の漏れ）を伴ったアナフィラキシー症状を発症した（図 1）。

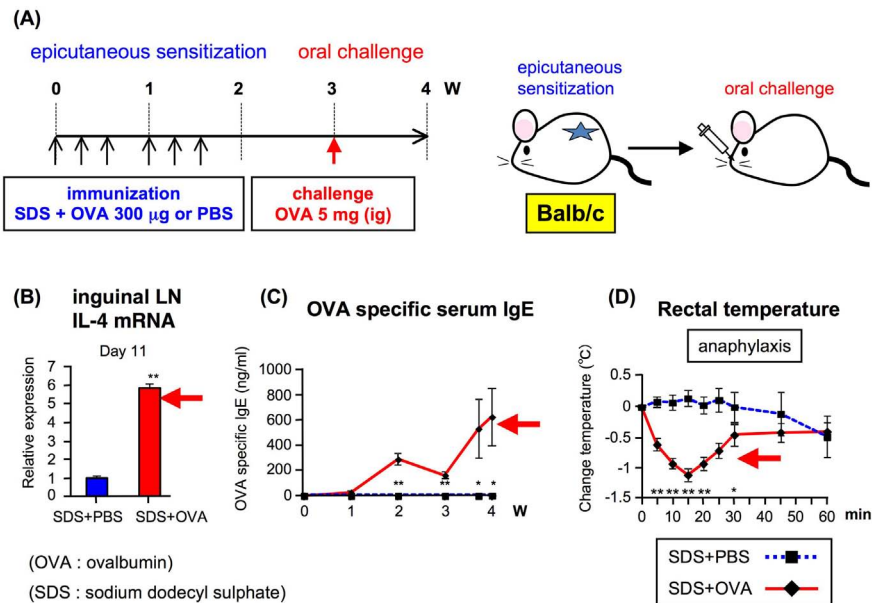


図 1. 経皮感作食物アレルギーモデルマウス

(A) プロトコル。(B) 経皮感作 11 日後の腸間膜リンパ節細胞の IL-4 mRNA 発現。(C) 経皮感作後の OVA 特異的血清 IgE 値。(D) OVA 経口投与後の直腸温。結果は平均値 + SEM（各実験 1 群 5 から 7 匹のマウスを用い、独立した 2 回の実験を実施）で示した。統計処理は analysis of variance (ANOVA) あるいは unpaired Student's t-tests を行った。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01。

一方、あらかじめ OVA を経口投与したマウスでは、皮膚に OVA を塗布しても IgE 抗体の上昇も、OVA の経口投与によるアナフィラキシー症状も全く発症しなかった。すなわち、免疫寛容が誘導された。実際、このマウスの所属リンパ節には、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞 (Treg) が増加していた（図 2）。

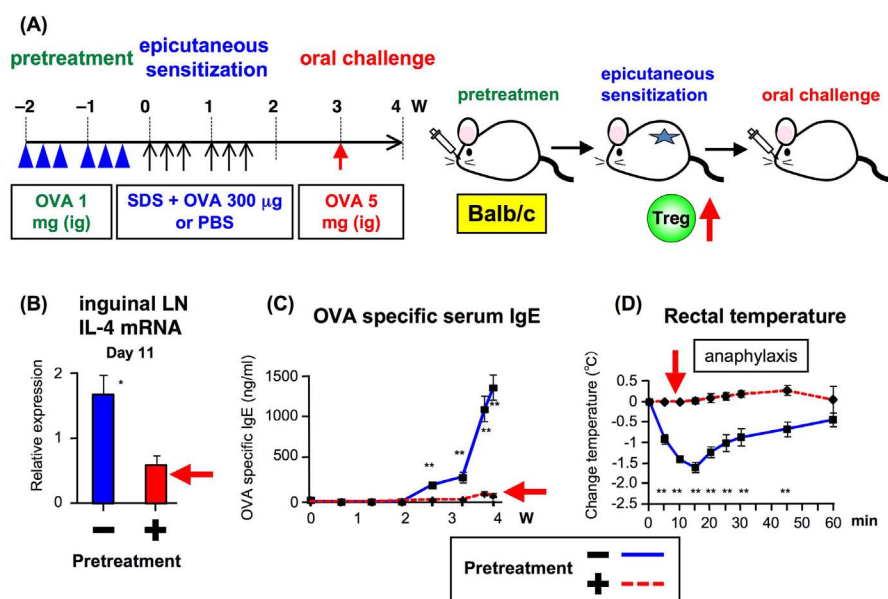


図2. OVA の経口前投与による制御性 T 細胞の誘導と免疫寛容

(A) プロトコル。(B) 経皮感作 11 日後の腸間膜リンパ節細胞の IL-4 mRNA 発現。(C) 経皮感作後の OVA 特異的血清 IgE 値。(D) OVA 経口投与後の直腸温。結果は平均値+SEM (各実験 1 群 3 から 8 匹のマウスを用い、独立した 2 回の実験を実施) で示した。統計処理は analysis of variance (ANOVA) あるいは unpaired Student's t-tests を行った。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。

本研究から、「経皮的に食物アレルゲンに曝露されると感作が成立し、経口摂取された食物はむしろ免疫寛容を誘導する」という二重抗原曝露仮説を動物モデルで証明することができた。

## 2. 経皮感作食物アレルギーと TSLP/好塩基球 (感作-誘導相)

上記の経皮感作食物アレルギーモデルマウスを用いて、「皮膚を介してどのような機序でアレルゲンに感作されるのか」を検討した。これまでの研究から、皮膚を介した抗原特異的 Th2 免疫応答の誘導に、皮膚上皮細胞から産生されるサイトカインの 1 つ Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) と好塩基球が重要な役割を果たしていることが知られていた<sup>5)</sup>。そこで、我々は TSLP と好塩基球に着目し、次の様な食物アレルギーの感作 (誘導相) 成立機序を明らかにした。

- 1) SDS で脆弱した皮膚に OVA を塗布すると、塗布後 11 日目をピークに経時的に皮膚と所属リンパ節に好塩基球が集積・増加し、
- 2) 所属リンパ節に IL-4 産生の Th2 細胞が増加する。一方、
- 3) 予め抗体を投与して好塩基球を除去したマウスでは、Th2 細胞も血清 IgE 抗体の上昇も全く認められない (図 3)。

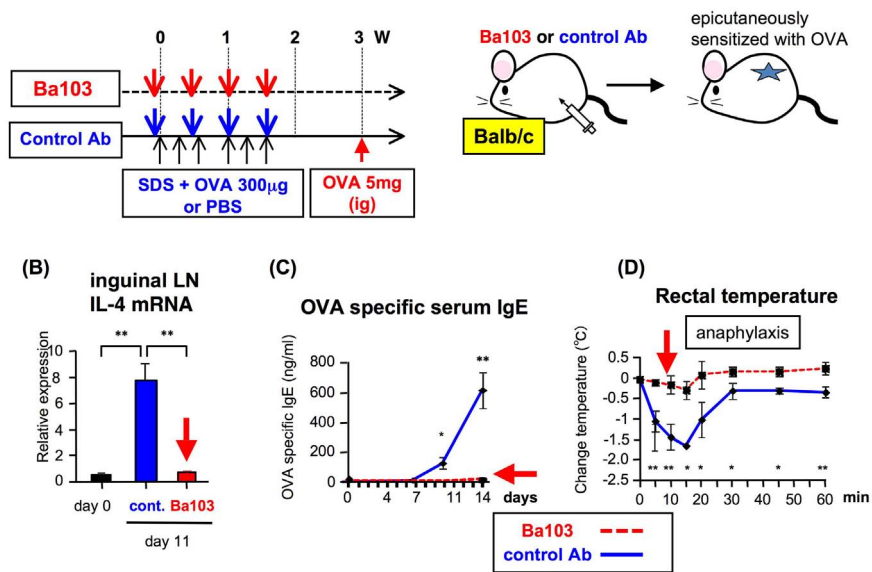


図3. 経皮感作食物アレルギーにおける好塩基球の役割

(A) プロトコル。(B) 経皮感作11日後の腸間膜リンパ節細胞のIL-4 mRNA 発現。(C) 経皮感作後のOVA特異的血清IgE値。(D) OVA経口投与後の直腸温。結果は平均値+SEM(各実験1群4匹のマウスを用い、独立した2回の実験を実施)で示した。統計処理はanalysis of variance(ANOVA)あるいはunpaired Student's t-testsを行った。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

さらに、

4) TSLP受容体欠損マウスの皮膚にOVAを塗布すると、好塩基球の集積・増加、Th2細胞の誘導、血清IgE抗体の上昇はいずれも全く認められなかった。

以上の結果から、アレルゲンに曝露した皮膚上皮細胞から産生されるTSLPによって好塩基球は皮膚局所に集積・活性化し、所属リンパ節に移行してIL-4産生抗原提示細胞として、T細胞をTh2細胞に誘導する結果、アレルゲンへの感作が成立すると推測された。これは、我々が以前明らかにした、「好塩基球は抗原提示細胞としてT細胞をアレルゲン特異的Th2細胞に分化誘導する」<sup>6)</sup>の結果を反映している。また、OVAを塗布した皮膚からTSLPが産生されること、リンパ節に移行した好塩基球はIL-4を産生していることも確認した。

### 3. 経皮感作食物アレルギーとIL-33(発症-効果相)

次に、OVA感作マウスにOVAを経口投与して起こるアナフィラキシー症状(速やかな直腸温低下と皮膚局所や腸管からの血漿漏出)の発症機序を検討した。その結果、食物アレルギーの発症に腸管から産生されるIL-33が必須の因子であることが明らかになった。

IL-33欠損マウスの皮膚にOVAを塗布すると、好塩基球の集積・増加、Th2細胞の誘導、血清IgE抗体の上昇はいずれも正常マウスと同様に認められる。すなわち、IL-33は食物アレルギーの感作(誘導相)には関与しない。一方、OVAを経皮感作したIL-33欠損マウスにOVAを経口投与しても、直腸温低下を伴ったアナフィラキシー症状は全く発症しなかった(図4)。

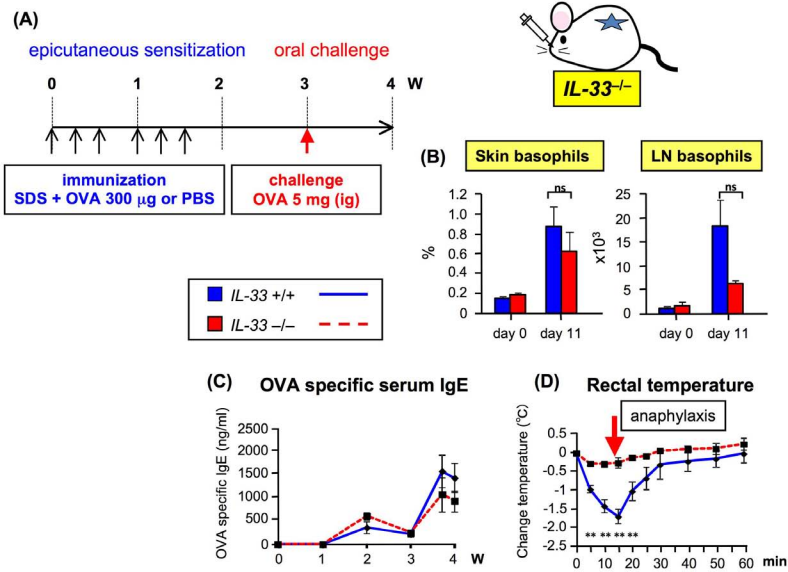


図4. 経皮感作食物アレルギーにおける IL-33 の役割

(A) プロトコル。(B) 経皮感作 11 日後の皮膚に浸潤した好塩基球の割合と腸間膜リンパ節細胞に浸潤した好塩基球数。(C) 経皮感作後の OVA 特異的の血清 IgE 値。(D) OVA 経口投与後の直腸温。結果は平均値+ SEM (各実験 1 群 5 から 6 匹のマウスを用い、独立した 2 回の実験を実施) で示した。統計処理は analysis of variance (ANOVA) あるいは unpaired Student's t-tests を行った。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ns, not significant。

さらに、OVA に感作した正常 BALB/c マウスでも OVA 経口投与の直前に IL-33 阻害剤を投与すると、アナフィラキシー症状の発症を完全に抑制することができた (図 5)。

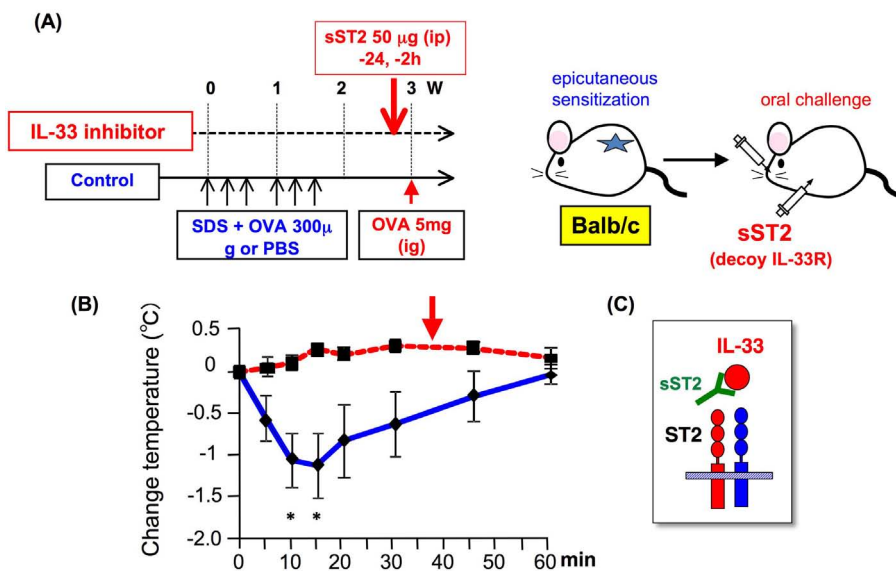


図5. IL-33 阻害剤による経皮感作食物アレルギーの抑制

(A) プロトコル。(B) OVA 経口投与後の直腸温。(C) IL-33 と IL-33 受容体 (ST2) および IL-33 阻害剤 (sST2) の模式図。結果は平均値+ SEM (1 群 3 から 8 匹のマウスを用いた) で示した。統計処理は analysis of variance (ANOVA) あるいは unpaired Student's t-tests を行った。\*P < 0.05。

IL-33 は TSLP と同様、上皮細胞から産生されるサイトカインである。実際、我々は OVA を塗布した皮膚から IL-33 が産生されること、OVA 経口投与後のマウス腸管内に IL-33 が産生されることを確認している。

IL-33 はアレルゲンと IgE 抗体で活性化されたマスト細胞に作用してヒスタミン産生を増強する<sup>7)</sup>。その結果、「IL-33-マスト細胞-ヒスタミン」を介した経路で、食物アレルギー-症状が発症すると考えられた。

## 考 察

以上の研究結果から、経皮感作食物アレルギーの感作（誘導相）には TSLP と好塩基球が、発症（効果相）には IL-33 が重要な因子・細胞として関与していることが明らかになった。今後、1) TSLP-好塩基球を標的とした阻害薬はアトピー性皮膚炎や乳児湿疹などアレルゲンに感作され易いヒトに対して、2) IL-33 を標的とした阻害薬は感作が成立したヒトに対して、それぞれ食物アレルギーの発症を予防する新しい治療法となる可能性があると考えられた。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、兵庫医科大学免疫学講座の福岡あゆみ、武藤太郎（現、愛知医科大学小児科学講座）および兵庫医科大学先端医学研究所の松下一史である。

## 文 献

- 1) Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jun;121(6):1331-6. doi: 10.1016/j.jaci.2008.04.032. Review. PubMed PMID: 18539191.
- 2) Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, Mesher D, Maleki SJ, Fisher HR, Fox AT, Turcanu V, Amir T, Zadik-Mnuhin G, Cohen A, Livne I, Lack G. Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Nov;122(5):984-91. doi: 10.1016/j.jaci.2008.08.039. PubMed PMID: 19000582.
- 3) Flohr C, Perkin M, Logan K, Marrs T, Radulovic S, Campbell LE, Maccallum SF, McLean WH, Lack G. Atopic dermatitis and disease severity are the main risk factors for food sensitization in exclusively breastfed infants. *J Invest Dermatol.* 2014 Feb;134(2):345-50. doi: 10.1038/jid.2013.298. PubMed PMID: 23867897; PubMed Central PMCID: PMC3912359.
- 4) Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, Yoshimoto T. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *Int Immunol.* 2014 Oct;26(10):539-49. doi: 10.1093/intimm/dxu058. PubMed PMID: 24860117.
- 5) Otsuka A, Nakajima S, Kubo M, Egawa G, Honda T, Kitoh A, Nomura T, Hanakawa S, Sagita Moniaga C, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Miyachi Y, Kabashima K. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nat Commun.* 2013;4:1739. doi: 10.1038/ncomms2740. PubMed PMID: 23612279; PubMed Central PMCID: PMC3644090.
- 6) Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, Nakanishi K. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):706-12. doi: 10.1038/ni.1737. PubMed PMID: 19465908.
- 7) Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jul;130(1):184-94.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.013. PubMed PMID: 22460070.