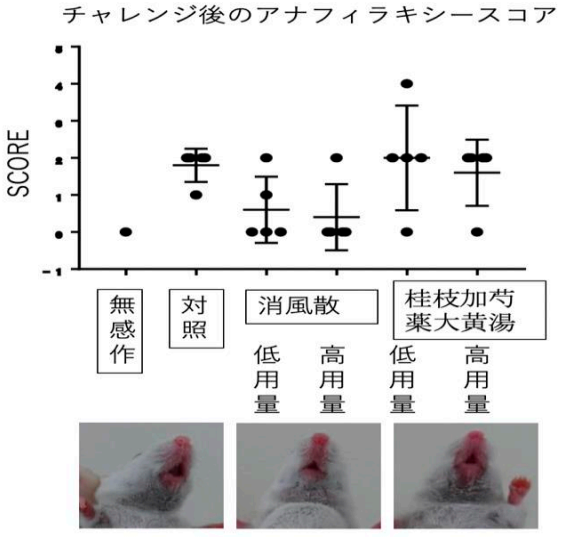
14　経皮感作食物アレルギーに対する東洋伝統薬物の有用性	常山　幸一

【目的】近年食物アレルギー患者は増加傾向にある。ミルクやそば、米などのアレルギーが多い小児患者のみならず、エビ、カニなどのアレルギーを有する成人患者も潜在的に増加しており、罹患患者は小児から成人までが食事という生の根幹において日々QOL が妨げられている。食物アレルギーの発症メカニズムには諸説があるが、近年、食物成分に含有されるアレルゲンが皮膚に接触して感作が成立するという経皮感作説が注目されている。我々は、漢方（中医学）やアーユルベーダ、ユナニ医学など 1,000 年以上に渡ってヒトへの投与が記録されている伝統医学に注目し、伝統医学で利用されている様々な生薬や伝統薬物の有用性の検討を続けている。これら伝統薬物は安全に長期間の摂取が可能なものが多く、食物アレルギーの予防・治療に有用性が高いと考えられる。本研究では、2 種類の経皮感作食物アレルギーモデル動物を用いて、東洋の知を集積した伝統薬物の中から、食物アレルギーの予防・治療能を有すると期待される 3 種類の生薬・伝統薬を選択し、その有効性を科学的に検証した。

【方法】8 週齢の雌の Balb/c マウスに 0.5 mg のオブアルブミン（OVA）を濾紙に染み込ませて背部に塗布し、感作を繰り返すことで OVA 経皮感作食物アレルギーモデルマウスを作製した。このマウスに、種々の濃度のモリンガを餌に混じて持続投与し、OVA を経口負荷（チャレンジ）した後に直腸温と血清 IgE 値を検討し、モリンガの食物アレルギー抑制効果を検証した。また、4 週齢の雌の Balb/c マウスに、0.1 mg のトロポミオシンを濾紙に染み込ませて背部に塗布し、感作を繰り返すことでトロポミオシン経皮感作食物アレルギーモデルマウスを作製した。このマウスに消風散や桂枝加芍薬大黄湯を低用量、あるいは高用量投与し、トロポミオシン経口投与（チャレンジ）した後に直腸温と血清 IgE 値、およびアナフィラキシースコアを検討し、消風散や桂枝加芍薬大黄湯の食物アレルギー抑制効果を検証した。

【結果】OVA 感作モデルマウスの実験では、モリンガ低用量投与群は、他の群に比してチャレンジ後の直腸温の減少が軽微であった。トロポミオシン感作モデルマウスの実験では、消風散高用量群で IgE 値の上昇が抑制されており、1 回目のチャレンジ後にアナフィラキシーを生じた個体は認められなかった。2 回目のチャレンジ後も消風散低用量群、高用量群はいずれもアナフィラキシースコアが低値であった。本研究では、検討した伝統薬物それぞれに食物アレルギー抑制効果が認められた。使用した実験系が異なるため、効能を単純に比較することはできないが、アーユルベーダ、ユナニ生薬の一つであるモリンガと、漢方方剤である消風散には食物アレルギーを抑制する作用があると考えられた。

伝統薬物投与におけるアナフィラキシーの改善効果



14. 経皮感作食物アレルギーに対する東洋伝統薬物の有用性

常山　幸一

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 疾患病理学分野

Key words：食物アレルギー，皮膚感作，エビトロポミオシン，消風散，モリンガ

緒　言

近年、食物アレルギー患者は増加傾向にあり、アナフィラキシーショックを起こすような重篤な症例から、粘膜症状にとどまる軽症例までを含めると、全人口の 3 割以上が罹患していると推測されている。乳幼児期に発症する食物アレルギーは年齢とともに寛解することが多い一方で、成人で生じた場合は耐性が獲得されにくく、発症後は著しく QOL を損なうこととなる。甲殻類アレルギーは小学生頃から増加して成人では最も頻度の高い食物アレルギーである。甲殻類アレルギーの主要アレルゲンであるトロポミオシンはイカスミなど甲殻類以外の食品にも含まれるため、気づかないうちにアレルゲンに曝露してしまう患者も多く、有効な治療法の開発が望まれている。食物アレルギーの発症メカニズムには諸説があるが、近年、食物成分が皮膚に接触してアレルゲンの感作が成立するという経皮感作説が注目されており、甲殻類の殻剥き加工場の労働者に甲殻類アレルギー患者が多いとの報告もある。

我々は、以前に The Chinese University of Hong Kong の小児科研究チームと共同で、甲殻類トロポミオシンを経口感作した食物アレルギーモデルマウスを報告した［1］。今回、上記モデルのトロポミオシン経口感作を経皮感作に変更し、アナフィラキシー症状と小腸病変を示し、IgE 値が著明に上昇する経皮感作甲殻類アレルギーモデルマウスの作製に成功した。本研究では、経皮感作食物アレルギーとして頻用されているオブアルブミン（OVA）感作モデル［2］と上記の甲殻類トロポミオシン感作モデルマウスを用いて、東洋の知を集積した新たな食物アレルギーの予防・治療法の開発に取り組む。我々は、台湾長庚祈念病院中医学の陳俊良博士と共同で、漢方（中医学）やアーユルベーダ、ユナニ医学など 1,000 年以上に渡ってヒトへの投与が記録されている伝統医学で利用されている様々な生薬や伝統薬物の有効性を種々の動物モデルを用いて科学的に検証してきた。先行研究では、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型である非アルコール性脂肪肝炎（NASH）モデルに有効性を示す伝統薬物や食成分をいくつか見出して報告している［3］。同じ NASH モデル動物で食成分が病態改善効果を示す際には短鎖脂肪酸の量と種類が増加していることから［4，5］、漢方薬や伝統薬物の作用点として、腸内環境の改善能が注目されている。

本研究では、経皮感作食物アレルギーに対する東洋伝統薬物の有用性を、2 種類の経皮感作食物アレルギーモデル動物を用いて検証した。解析する伝統薬物としては、国連で食糧難の救世主として注目されている高栄養植物であり、全身のアレルギー状態の抑制能が報告されているユナニ生薬（モリンガ）と、アレルゲン侵入門戸である皮膚の保護作用が報告されている漢方方剤（消風散）、及び腸内環境改善効果が期待される漢方方剤（桂枝加芍薬大黄湯）を用いた。解析の結果、モリンガ、および消風散に食物アレルギー予防効果が認められた。モリンガは食品として小児から成人までが安全安心に長期間摂取が可能な素材であり、特に小児の食物アレルギー予防に活用が期待できる。消風散は皮膚症状改善効果が知られていることから、現在、局所皮膚の性状を中心に病理組織学的、分子生物学的に作用機序の解明を進めている。

方　法

1.　OVA 経皮感作食物アレルギーモデルマウスの作製と実験方法（モリンガ投与）

8 週齢の雌の Balb/c マウスの背部の皮膚を除毛し、SDS 塗布法によって表皮に軽いダメージを与えた上で 6 回の

OVA 経皮感作を施行し、その後間隔を開けて 3 回の OVA の経口投与（チャレンジ）を行った。感作及びチャレンジから 24 時間後に採血を行い、血清を回収して ELISA 法にて血清 OVA 特異的 IgE 値を定量した。

経皮感作方法：0.5 mg の OVA を濾紙に染み込ませて塗布し、チャンバーで濾紙を 24 時間固定して感作を行った。

実験群：OVA 経皮感作食物アレルギーモデルマウスを 4～5 匹ずつ 3 群に分け、モリンガ非投与（Allergy）群、モリンガ低用量投与（Moriga-low）群、モリンガ高用量投与（Moringa-high）群とした。OVA の代わりに生理食塩水を皮膚に塗布した群を非感作（Non-sense）群として計 4 群で検討を行った。モリンガは餌に混じて持続投与することとし、血中 OVA 特異的 IgE 値の上昇確認後に 4 週間継続投与した。

検索事項：血清は実験期間内に 7 回採取し、食物アレルギーの程度は直腸温と血清 IgE 値で比較検討した。

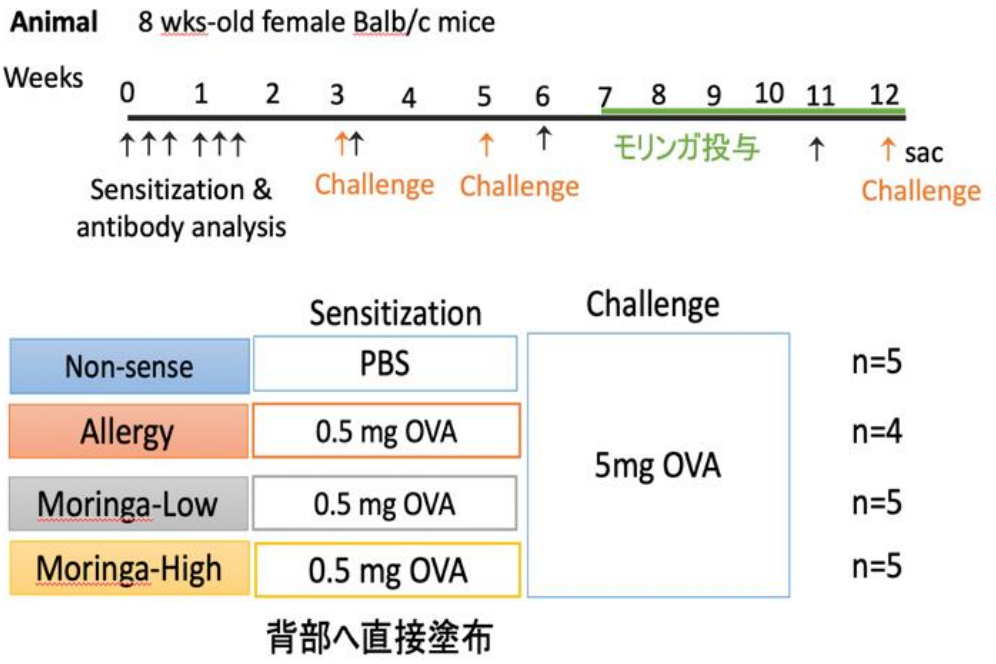


図 1. モリンガ投与実験のデザイン

上段）8 週齢から sacrifice（sac）までの経皮感作（Sensitization：黒矢印）、経口投与（Challenge：橙矢印）とモリンガ投与（緑）。

下段）実験に供した 4 群（Non-sense 群、Allergy 群、Moringa-Low 群、Moringa-High 群）の経皮感作方法と各群の個体数。

2. 甲殻類トロポミオシン経皮感作食物アレルギーモデルマウスの作製と実験方法（消風散、及び桂枝加芍薬（黄湯投与）

4 週齢の雌の Balb/c マウスの背部の皮膚を除毛し、テープストリッピング法によって表皮に軽いダメージを与えた上で 4 回のトロポミオシン経皮感作を施行し、その後期間を開けて 2 回のトロポミオシン経口投与（チャレンジ）を行った。

経皮感作方法：0.1 mg のトロポミオシンを濾紙に染み込ませて塗布し、チャンバーで濾紙を 24 時間固定して感作を行った。

実験群：トロポミオシン経皮感作食物アレルギーモデルマウスを 5 匹ずつ 5 群に分け、非投与（Control）群、消風散 0.1%投与（SFS low）群、消風散 1%投与（SFS high）群、桂枝加芍薬大黄湯 0.1%投与（KSD low）群、桂枝加芍薬大黄湯 1%投与（KSD high）群、とした。トロポミオシンの代わりに生理食塩水を皮膚に塗布した群を正常コントロール（Non-sense）群として 1 匹作製し、計 6 群で検討を行った。薬物は餌に混じて持続投与することとし、感作開始 7 日前から実験期間を通じて継続投与した。なお、摂餌量はすべての群で同じ程度であり、薬剤は一定量摂取されてい

ると考えられた。

検索事項：血清は感作後、及びチャレンジ後に計 5 回採取し、直腸温と血清 IgE 値で比較検討した。さらに本モデルでは初回チャレンジから強いアナフィラキシー症状が出現することから、チャレンジから 30～40 分後に “Assessment of systemic anaphylaxis and diarrhea” のスコアリングシステムに準拠して、スコア 0（no symptoms）、1（scratching and rubbing）、2（puffiness around eyes or reduced activity）、3（labored respiration）、4（no activity after prodding, tremor and convulsion）、5（death）の 5 段階でスコアリングして各群で比較検討した。

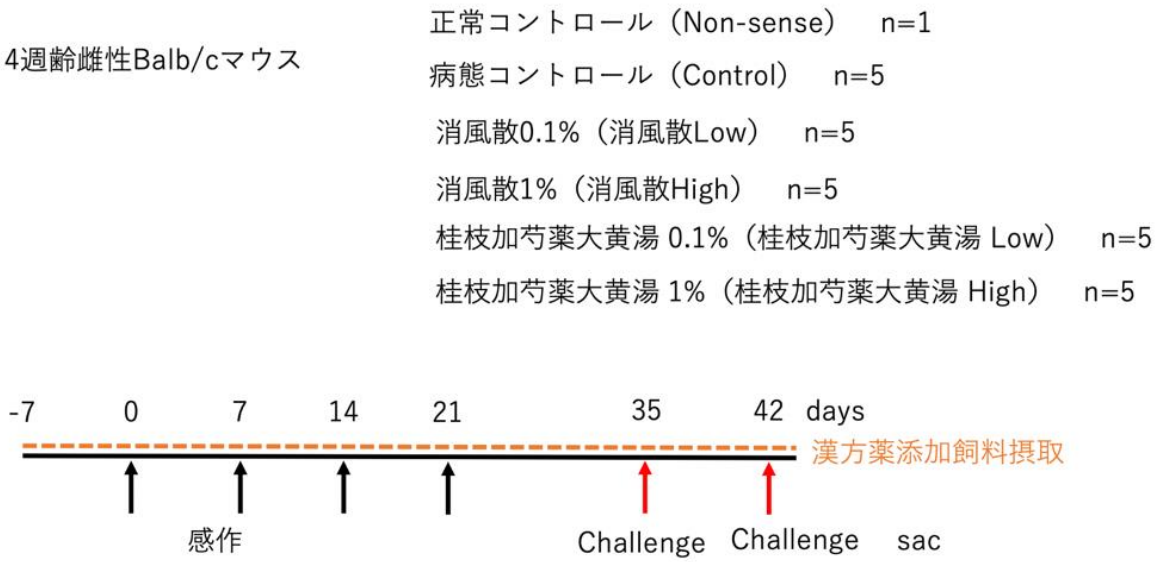


図 2. 消風散、桂枝加芍薬大黄湯投与実験のデザイン

実験に供した 6 群（正常コントロール 1 群とトロポミオシン経皮感作食物アレルギーモデルマウス 5 群）の飼料内容と各群の個体数。

実験開始 7 日前（ - 7）から被検飼料の投与を開始し、実験開始 0、7、14、21 日に経皮感作、35、42 日に経口投与（Challenge）施行。

結　果

1.　モリンガ投与群における食物アレルギー抑制効果

2 回目のチャレンジ後（⑤の時点）に OVA 経皮感作群はいずれも血清 IgE 値が上昇していた。血清 IgE 値はいずれの群も⑥の時点までに次第に低下したが、モリンガ低用量投与群ではモリンガ高用量投与群やモリンガ非投与群に比して血清 IgE 値の減少がより大きかった（図 3）。

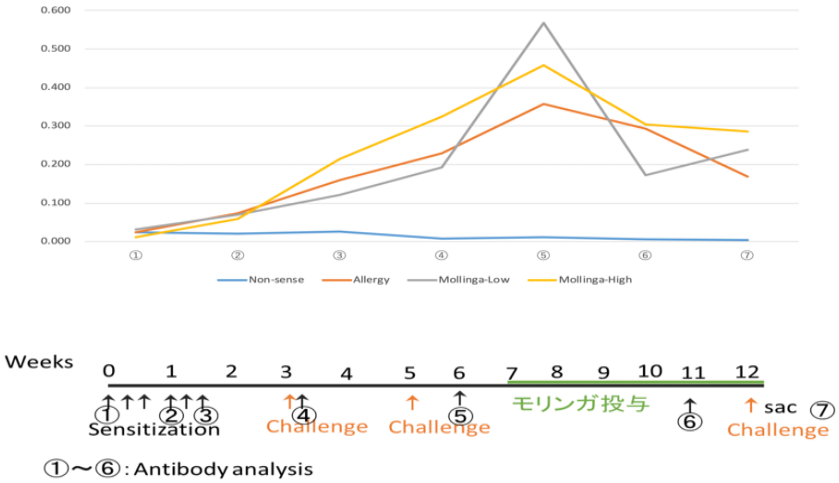


図 3. 血清 OVA 特異的 IgE 値の推移

上段）実験に供した 4 群の各測定時期（①～⑦）における血清 OVA 特異的 IgE 値。

下段）経皮感作（Sensitization）、経口投与（Challenge）、モリンガ投与と血清 IgE 測定時期（①～⑦）の関連。

3 回目のチャレンジ後に、モリンガ非投与群では直腸温の急激な低下が生じ、アナフィラキシー前段階と推測された。一方、モリンガ投与群では直腸温の減少は殆ど見られなかった（図 4）。

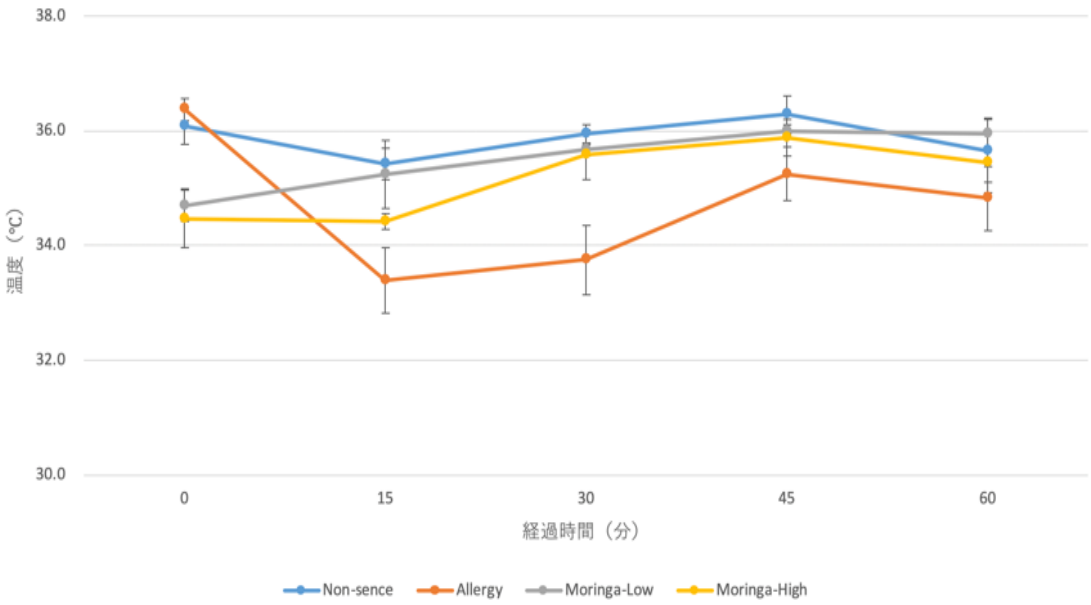


図 4. 3 回目のチャレンジ後の直腸温の変化

実験に供した 4 群の 3 回目の経口投与（チャレンジ）直後（0）、15 分後、30 分後、45 分後、60 分後の直腸温の推移。

2. 消風散、桂枝加芍薬大黄湯投与群における食物アレルギー抑制効果

消風散 1%投与群、および桂枝加芍薬大黄湯 0.1%投与群において、経過を通じて IgE 値の上昇が抑制される傾向が見られた（図 5）。

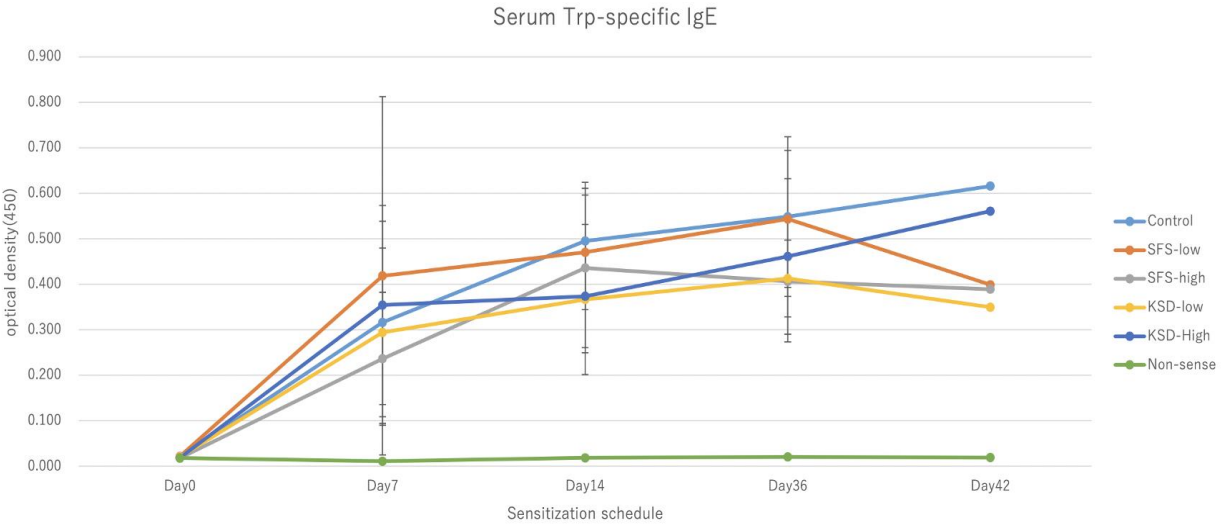


図 5. 血清トロポミオシン特異的 IgE 値の推移

実験に供した 6 群の実験開始から 0、7、14、36、42 日後（Day0、7、14、36、42）の血清トロポミオシン特異的 IgE 値の推移。

1 回目のチャレンジ後に、各群で直腸温の急激な低下が生じてアナフィラキシー状態を呈しているが、消風散 1%投与群では直腸温の減少は殆ど見られなかった（図 6）。

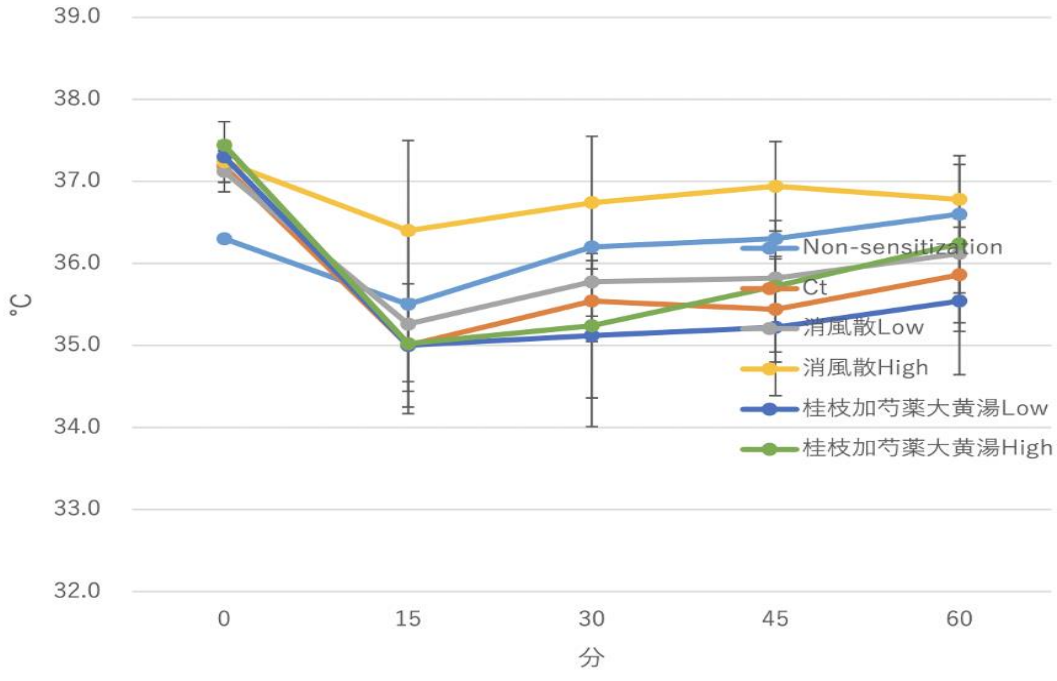


図 6. 1 回目のチャレンジ後の直腸温の変化

実験に供した 6 群の 1 回目の経口投与（チャレンジ）直後（0）、15 分後、30 分後、45 分後、60 分後の直腸温の推移。

1 回目のチャレンジ後には各群で種々の程度のアナフィラキシー状態が惹起されたが、消風散 1%投与群ではアナフィラキシーを生じた個体は認められなかった（図 7 左)。2 回目のチャレンジ後も各群で種々の程度のアナフィラキシー状態が惹起されたが、消風散 0.1%投与群、消風散 1%投与群のいずれにおいてもアナフィラキシースコアは低値であった（図 7 右)。

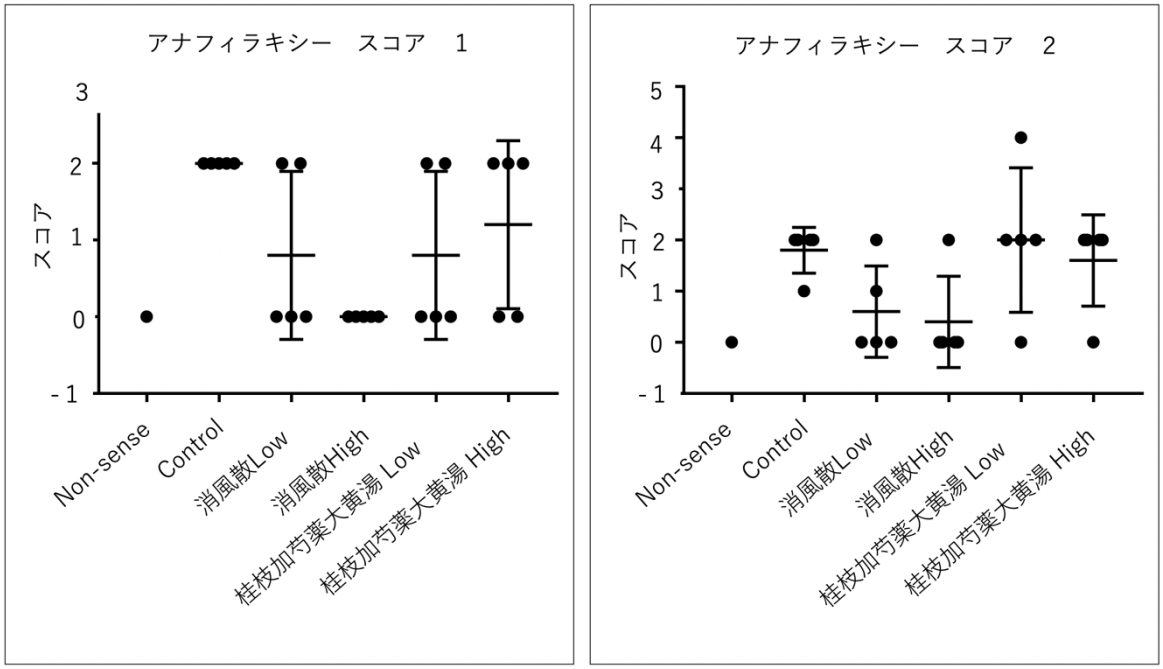


図 7. 1 回目（左）と 2 回目（右）のチャレンジ後のアナフィラキシースコア
実験に供した 6 群の 1 回目、2 回目の経口投与（チャレンジ）後のアナフィラキシースコア。
アナフィラキシースコアはチャレンジから 30～40 分後にスコア 0（no symptoms）～5（death）でスコアリング。

考　察

本研究では、使用した実験系が異なるため効能を単純に比較することはできないが、アーユルベーダ、ユナニ生薬の一つであるモリンガと、漢方方剤である消風散には食物アレルギーを抑制する作用が認められた。1,000 年以上にわたって使われ続けている伝統薬物・生薬はヒトに優しい薬物と考えられ、食物アレルギー患者の QOL 向上に寄与できると期待される。

モリンガは、北インド原産の植物であり、近年、その栄養価の高さと栽培の容易さから、栄養失調や貧困、環境問題に対すサステイナブルな解決策として脚光を浴びており、国連食糧農業機関でも栽培と利用が推奨されている［6]。日本でも健康食品として広く流通しており、入手も容易で安全に長期間摂取ができる食品である。小児から成年まで幅広い年齢層が食物アレルギー予防目的に長期間摂取するのに適している素材と考えられ、モリンガの食物アレルギー予防効果を証明することは意義が大きい。今回用いた OVA 経皮感作モデルでは十分なアナフィラキシー症状の誘導ができなかったことから、今後、トロポミオシン経皮感作モデルを用いてアナフィラキシー抑制効果を検討していく予定である。

消風散は日本では水虫やあせも、湿疹、蕁麻疹などの皮膚病状改善薬として主に用いられているが［7]、台湾ではアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の治療にもしばしば処方される漢方方剤である。今回使用したトロポミオシン経皮感作モデルでは、消風散の投与によってアナフィラキシーの発生がほぼ抑制されることがわかった。一方、腸内環境の改善能が高い桂枝加芍薬大黄湯では目立った効果が得られず、少なくとも今回使用した経皮感作食物アレルギーモデルに対しては、腸管を標的とするよりも皮膚を標的とする方が有効であると考えられた。消風散の作用機序としては、

皮膚の状態が改善し、結果として局所からの感作が弱められた可能性が第一に考えられる。各個体のアレルゲン感作部位の病理組織標本を作製して、表皮の厚さや真皮内単核細胞浸潤などを解析したが、各群で目立った変化が認められなかった。現在、アレルギー反応に関連する好酸球と肥満細胞の浸潤数をトルイジンブルー染色とルナ染色を追加して検討中である。今後は病理組織標本を作製した対側の皮膚を用いて、炎症性サイトカイン等の mRNA 値も検討し、消風散の食物アレルギー抑制効果の作用機序の解明を目指す予定である。また、皮膚における感作予防効果の作用機序を探るべく、ヒト表皮角化細胞 HaCaT を用いた検証も実施している。

共同研究者

本研究の共同研究者は徳島大学大学院医歯薬学研究部疾患病理学分野の清水真祐子、及び台湾長庚紀年病院中医学の陳俊良博士である。

文　献

1) Lam YF, Tong KK, Kwan KM, Tsuneyama K, Shu SA, Leung PS, Chu KH. Gastrointestinal Immune Response to the Shrimp Allergen Tropomyosin: Histological and Immunological Analysis in an Animal Model of Shrimp Tropomyosin Hypersensitivity. Int Arch Allergy Immunol. 2015;167(1):29-40. doi: 10.1159/000431228. Epub 2015 Jun 25. PMID: 26112225.
2) Koshiba R, Oba T, Fuwa A, Arai K, Sasaki N, Kitazawa G, Hattori M, Matsuda H, Yoshida T. Aggravation of Food Allergy by Skin Sensitization via Systemic Th2 Enhancement. Int Arch Allergy Immunol. 2021;182(4):292-300. doi: 10.1159/000511239. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33176320.
3) Fujimoto M, Tsuneyama K, Chen SY, Nishida T, Chen JL, Chen YC, Fujimoto T, Imura J, Shimada Y. Study of the effects of monacolin k and other constituents of red yeast rice on obesity, insulin-resistance, hyperlipidemia, and nonalcoholic steatohepatitis using a mouse model of metabolic syndrome. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:892697. doi: 10.1155/2012/892697. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23320041; PMCID: PMC3541547.
4) Nishitsuji K, Watanabe S, Xiao J, Nagatomo R, Ogawa H, Tsunematsu T, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K. Effect of coffee or coffee components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. Sci Rep. 2018 Nov 1;8(1):16173. doi: 10.1038/s41598-018-34571-9. PMID: 30385796; PMCID: PMC6212590.
5) Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. Sci Rep. 2017 Nov 20;7(1):15876. doi: 10.1038/s41598-017-16189-5. PMID: 29158587; PMCID: PMC5696507. Treatments and uses of Moringa oleifera seeds in human nutrition: A review.
6) Saa RW, Fombang EN, Ndjantou EB, Njintang NY. Treatments and uses of Moringa oleifera seeds in human nutrition: A review. Food Sci Nutr. 2019 May 7;7(6):1911-1919. doi: 10.1002/fsn3.1057. eCollection 2019 Jun. PMID: 31289640
7) Chen G, Zhao J, Chen T, Zhang Z, Huang C, Xu Z, Xu H. Efficacy and safety of Xiaofeng powder (xiao feng san) in treating urticaria: A protocol for a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Medicine (Baltimore). 2018 Nov;97(45):e13039. doi: 10.1097/MD.0000000000013039. PMID: 30407300