

多様性でアレルギーを克服！～アレルギー患者急増の原因に迫る～

6年C組 阿久津 優衣

指導教員 櫻井 昭

1. 要約

先進国ではアレルギー患者の数が急速に増加している。私たちは過去と現在の環境変化に着目し、アレルギー病態の発症が抗原多様性や化学物質に関連していると仮説を立てた。そこで、抗原多様な環境と清潔な環境を模擬し、アレルギー反応において抗原と化学物質の影響を調査した。結果は、アレルギー反応は共抗原処理によって抑制され、共化学処理によって促進される可能性が示唆された。

キーワード：アレルギー、抗原多様性、IgE、IgG2a

2. 研究の背景・目的

近年、日本国内でアレルギー患者が急増しており(図1)、日本人の2人に1人が何らかのアレルギーを発症している状況にある。急増の原因について、衛生仮説^{*1}や化学物質説^{*2}などが提唱されている。しかし、化学物質説を例に挙げると、法律の制定により大気中の化学物質の濃度は近年減少傾向にあることから、アレルギー患者増加の唯一の根拠とは考えにくい。よって、本研究では、アレルギー患者の急増原因を

なかった。一方、大学から奈良県で生活するようになってから、衛生環境が劇的に改善された一方で、花粉症など各種アレルギーを発症した。この経験に基づいて、抗原種が過少な環境ではアレルギーを発症しやすいのではないかという仮説を考えた。抗原種過少の環境下では、免疫細胞がアレルゲンに集中して反応を起こす一方で、抗原多様な環境下では、免疫細胞が様々な抗原に対して一様に働きかけるためアレルギー反応が抑制されると考えた。

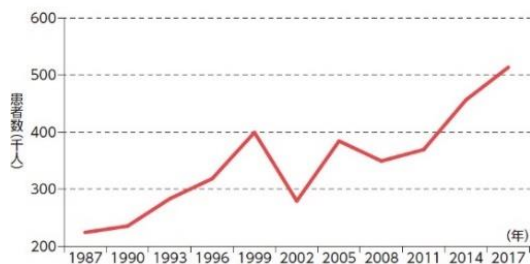


図1：アトピー性皮膚炎の患者数推移

参考：厚生労働省「平成29年患者調査」〔傷病分類編〕

明らかにすることを目的とする。

3. 仮説

父は和歌山県の田舎町で、薪の五右衛門風呂や井戸水を利用し、畑の草むしりを手伝い、水泳の授業は海で行うなど、虫や菌が身近に存在する抗原多様な環境で生活していた。その頃は家の前に杉の木が生えていたにも関わらず、花粉症などの症状は一切

3-1. 仮説検証の方針

抗原種過少説の検証を行うため、抗原投与や化学物質投与によるアレルギー反応を評価した。アレルギーを発症させるためNC/Ngaマウスにアレルゲンを投与した。また抗原多様な環境や大気汚染の環境を再現するため、抗原や化学物質を投与した。投与方法は、アレルギーの重症度を耳の腫れで評価するために、アレルゲン投与は耳の皮内に、抗原は首の皮下に投与した。投与後は、免疫機序を明らかにするため血液や脾臓、所属リンパ節の抗体価や免疫細胞数を測定した。

昨年度は抗原多様性がアレルギー反応を抑制することが明らかになったが、データの数や解析が不十分であり、抑制効果の機

序がクラススイッチの頻度や IgG2a など様々可能性が考えられ、不確かであった。そのため、今年度は信頼性を確保および統計処理を行うことで、アレルギー抑制の機序を明らかにすることを目的とした。さらに、父のアレルギー事情に着目し、抗原多様な環境から大気汚染の環境に変化させた後にアレルゲンを投与することで、田舎から都会に移住するモデルを作成した。

4. 研究方法

4-1. 使用した試料・器具・材料

マウス

生後 3 週齢および 6 週齢の雌 NC/Nga マウスを日本エスエルシーより購入した。通常のマウスでアレルギーを発症させるためには、投与期間を長くする必要があり困難だった。そのため、先行研究を参考にし、ダニにアレルギー反応を示しやすいノックアウトマウスを用いて実験を行った。また免疫形成前後の、アレルギー反応や抗原多様性の影響の違いを確認するため、2 種類の週齢で実験を行った。動物の倫理的取り扱いを確保するため実験は大阪大学の施設ガイドラインに従って行った。

試薬

抗原試薬として、アルテルナリア抽出物 (ITEA 社) とクロゴキブリ (ITEA 社) を、化学物質試薬として、都市廃棄粉塵 DEP (国立環境研究所) を用いた。また、アレルゲンとしてヤケヒョウダニ (Dp) (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いた。

投与

抗原投与の際は、首にテルモシリンジ (26G) で皮下投与を行った。また、Dp・DEP 投与の際は、ペントバルビタール (麻酔薬) をマイJECTA ータで腹腔内投与を行った後、耳の皮内に投与した。

4-2. 測定方法

測定

アレルギーの重症度を確認するために、耳の厚さをノギスで測定した。ノギスで測定する際、測定位置を耳の真ん中で固定するなど、ばらつきが出ないように工夫した。また、抗原多様性説の機序を解明するため、脾臓およびリンパ節における Th 細胞の割合をフローサイトメトリー法で測定した。さらに、血漿中の抗体 (IgG1, IgG2a, IgE) および耳組織中のサイトカイン (IL-4, IL-17, IFN- γ) を ELISA によって測定した。

血液サンプル

最後の投与から 24 時間後にマウスをイソフルラン麻酔下で解剖した。心採血により血液を採取した。次いで、血液を 3000 g 4°C で 15 分間遠心分離することによって血漿を収集した。血漿はアッセイまで 80°C で保存した。

ELISA

血漿中の IgE 抗体は、LBIS ELISA アッセイキット (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて製造者の指示に従って測定した。まずサンプルと標準試料をプレートに加えて室温にて 2 時間、または 4°C で一晩反応させた。その後、1×Biotinylated Anti-mouse IgE Antibody を加え、室温にて 2 時間反応させた。プレート洗浄後、さらに 1×HRP Conjugated Streptavidin を加え、室温で 2 時間反応させた。再度プレート洗浄後、Chromogen (TMB) を加え室温で約 5 分反応させ、反応停止液を添加した。測定はプレートリーダーを用いて、測定波長 450 nm における吸光度を測定した。IgG1 および IgG2a は、製造元の指示に従って ELISA キット (LS Bio) を使用して測定しました。まずサンプルと標準試料をプレートに加えて 37°C のインキュベーターにて 90 分間、または 4°C で一晩反応させた。その後、1×Biotinylated Detection Antibody を加え、37°C にて 1 時間反応させた。プレート洗浄後、さらに 1×HRP Conjugate を加え、37°C で 30 分反応させ

た。再度プレート洗浄後、TMB Substrate solution を加え 37°C で 15 分反応させ、反応停止液を添加した。測定はプレートリーダーを用いて、測定波長 450 nm における吸光度を測定した。耳のサイトカインを、メーカーの指示に従って ELISA キット (CUSABIO) を用いて測定した。耳を解剖はさみで細かく切り、RIPA と Halt protease の混合液と共にホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後 15 分静置し、18000g で 30 分遠心操作を行った。さらに上清を採取し、BCA キットでタンパク質量を測定した。ELISA の手法は LS bio と同様のため省略する。

フローサイトメトリー

リンパ節または脾臓を摘出し、RPMI-1640, 1xMEM 非必須アミノ酸溶液, 50 μM 2-ME, 1% Ab, 10% 非働化 FCS を含む培地中にて保存した。解剖終了後、70 μm セルストレーナー上で潰し、細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を 300 g 4°C で 10 分間遠心した。そして得られた細胞ペレットを NH₄Cl, KHCO₃, EDTA · 2Na · 2H₂O を含む ACK 3mL で 5 分間静置した。その後、5 mL の培地を加え、4°C 300 g で 10 min 遠心した。さらに、非活性化培地で再懸濁した後、細胞数を 1x10⁶ cells に調製し、300 g 4°C で 5 分間遠心した。そして、活性化培地 1mL で再懸濁し、5 時間インキュベーションを行った。その後、脾臓およびリンパ節の免疫細胞を BD Pharmingen™ マウス細胞内サイトカイン染色スターター キット (BD Biosciences) で染色し、MACSQuant® X フローサイトメーター (Miltenyi Biotech) を使用して分析した。

4-3. 分析手法

マウスは各群 5 匹用意し、同様の実験を 2 回行うことで、n=10 とした。データは、one-way ANOVA 法を用いて解析を行い、信頼度の検討を行った。

5. 実験結果・考察

4 種類の実験を行った。実験 I, II では抗原過少説の検証、実験 III, IV では父の経験をもとに移住モデルの検証を行った。具体的には、実験 I では幼児期、実験 II では成人期 (免疫形成後) における抗原過少説の検証を行い、実験 III では抗原多様な環境から抗原過少な環境に移住した場合のアレルギー反応、実験 IV では抗原多様な環境から大気汚染の環境に移住した場合のアレルギー反応を確認した。前年度は実験 I ~ III を行い、今年度は実験 IV 及び、I, II の n 数を増やす実験を行った。また、実験データの解析、及び新たな考察も行った。

5-1. 実験 I

(1) 実験条件

抗原投与の有無によるアレルギー反応の影響を確認するため、以下の 3 群を用いた。3 週齢のマウスに、1 週間抗原投与を行い、その後 2 週間は抗原投与に加え、2 日に 1 回 Dp (アレルゲン) を投与した。

	抗原投与 (/30 μℓ)		Dp 投与 (/20 μℓ)
	ゴキブリ (μg)	アルテルナリア (μg)	ダニ (μg)
PBS/PBS	-	-	-
PBS/Dp	-	-	0.75
Antigen/Dp	60	15	0.75

(2) 実験結果

Antigen/Dp 群は PBS/Dp 群に比べ、耳の腫れが有意に (p<0.0001) 抑制された (図 4-A)。一方で、IgE 抗体量は有意に (p=0.0131) 増加した (図 4-B)。IFN-γ はアレルゲン投与を行った Antigen/Dp と PBS/Dp 群は、PBS/PBS 群より増加傾向にあった。その他の測定対象はどの群間にも差は認められなかった (図 4-C, D, E, F, G)。

(3) 考察

従来の仮説では Th1 と Th2 の割合が、Th2 優位であるとアレルギーを発症しやすいと考えられていたため、抗原過少説も同様の機序を予想していた。しかし、抗原投与は Th1/Th2 バランスに影響を及ぼさなかつ

た。そのため、抗原過少説では異なる機序が働いていることがわかった。また、昨年度はIgG2aが抗原投与によって抑制傾向にあると捉えていたが、実験結果より有意差が見られず、アレルギー抑制に関与しないことがわかった。

一般的にIgE抗体量はアレルギー重症度の指標になっており、産生される抗体量が多いほどマスト細胞に多く結合し、炎症物質が放出されやすくなる。しかし、抗原多様な環境下では耳の腫れが抑制されたにも関わらずIgE抗体価が増加するという結果となった。そこで、抗原投与によりDpだけでなくゴキブリやアルテルナリアに特異的なIgE抗体も産生されていたと予測し、多様な特異的抗体が炎症を抑制したと考えた。抗原種が過少な場合、マスト細胞にアレルギーに対する抗体のみが結合した状態になり、隣接するIgE抗体がアレルギーと架橋しやすくなる。一方で、抗原多様な場合、マスト細胞には多様なIgE抗体が結合しており、アレルギーに特異的なIgE抗体が隣接している可能性が低く、架橋が阻害される。よって排出されるヒスタミン量が抑制され、炎症が抑制されたと考えられる(図2)。

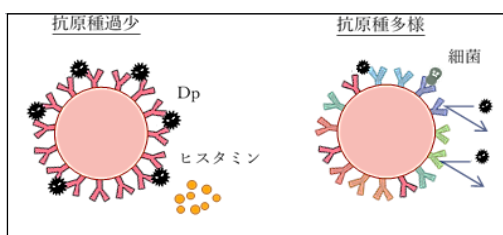


図2. マスト細胞のイメージ

5-2. 実験II

(1) 実験条件

抗原投与の有無によるアレルギー反応の影響を確認するため、以下の3群を用いた。6週齢のマウスに、1週間抗原投与を行い、その後2週間は抗原投与に加え、2日に1回Dp(アレルギー)を投与した。

	抗原投与(/50 μℓ)		Dp投与(/20 μℓ)
	ゴキブリ(μg)	アルテルナリア(μg)	ダニ(μg)
PBS/PBS	-	-	-
PBS/Dp	-	-	1.25
Antigen/Dp	100	25	1.25

(2) 実験結果

幼児期のマウスと同様に、抗原投与により、耳の腫れが有意に($p=0.0019$)抑制された(図5-A)。一方で、IgE抗体量は有意に($p=0.0306$)増加した(図5-B)。また、幼児期のマウスと違い、IL-17がアレルギー投与によって増加した。その他の測定対象はどの群間にも差は認められなかった(図5-C,D,E,F,G)。

(3) 考察

IL-17を産生するTh17細胞は、幼児期にはほとんど存在せず、成人になるにつれて増加することが知られている^{※3}。本実験でアレルギー投与により、3週齢のマウスではIL-17は増加しなかったが、6週齢のマウスでは増加したことから、3週齢は免疫が未熟な幼児期であり、6週齢は免疫形成後の成人マウスであると捉えられる。そのため抗原多様性の効果は、免疫形成後の大人であっても効果が認められることが示唆された。よって、近年は乳児に対するアレルギー予防についてよく講じられているが、抗原多様な環境で過ごすという対策は大人にも効果が認められる可能性が高い。

5-3. 実験III

(1) 実験条件

抗原事前投与の有無によるアレルギー反応の影響を確認するため、以下の3群を用いた。6週齢のマウスに、1週間抗原投与を行い、その後2週間に渡り2日に1回Dp(アレルギー)を投与した。

	抗原投与(/50 μℓ)		Dp投与(/20 μℓ)
	ゴキブリ(μg)	アルテルナリア(μg)	ダニ(μg)
PBS/PBS	-	-	-
PBS/Dp	-	-	1.25
Antigen/Dp	100	25	1.25

(2) 実験結果

耳の腫れと IgE 抗体量は PBS/PBS 群より、PBS/Dp と Antigen/Dp 群が有意に増加していたが(図 6-A,B)，PBS/Dp と Antigen/Dp の群間に差は認められなかった。その他の測定対象にはどの群間でも差が認められなかった(図 6-C,D,E,F,G)。

(3) 考察

抗原多様な環境から清潔な環境に移住した後、アレルゲンを投与するとアレルギーを発症したという結果は、父の田舎で育ち都会に移住したという経験と合致する。マスト細胞の寿命は 80-120 日と知られているため³，アレルゲン投与時も多様な抗体が結合したマスト細胞は生存していたと考えられる。しかし、同時にアレルゲンに特異的な抗体のみが結合したマスト細胞が増加したため、アレルギー反応が抑制されなかったと考えられる。

5-4. 実験IV

(1) 実験条件

化学物質の有無によるアレルギー反応の影響を確認するため、以下の3群を用いた。6週齢のマウスに、1週間抗原投与を行い、その後2週間に渡り2日に1回 Dp(アレルゲン)と DEP を投与した。

	抗原投与(/50 μl)		Dp 投与(/20 μl)	
	ゴキブリ (μg)	アルテルナリア (μg)	ダニ(μg)	DEP(μg)
PBS/PBS	-	-	-	-
PBS/Dp	-	-	1.25	-
PBS/Dp・DEP	-	-	1.25	250
Antigen/Dp	100	25	1.25	250

(2) 実験結果

PBS/Dp・DEP と Antigen/Dp・DEP は、事前に抗原投与を行ったか否かに関わらず、耳の表皮が硬化しており、掻きむしりが多く見受けられた(図 7-H)。アレルゲン投与を行った群 (PBS/Dp, PBS/Dp・DEP, Antigen/Dp・DEP)は耳の腫れと IgE 抗体量が PBS/PBS より有意に増加していた(図 7-A,B)。PBS/Dp と PBS/Dp・DEP 群間で、耳の腫れや IgE 抗体量に差は認められな

ったが、Th2 細胞が有意に($p=0.0009$)減少する結果となった(図 7-F)。また PBS/Dp と Antigen/Dp・DEP 群間でも同様に、耳の腫れや IgE 抗体量に差は認められなかったが、Th2 細胞が有意に($p=0.0001$)減少する結果となった(図 7-F)。

(3) 考察

DEP は炎症を重症化させたが、IgE や Th 細胞など免疫反応には影響を及ぼさなかった。先行研究により DEP は表皮細胞に酸化ストレスを与え、タイトジャンクションを切断する働きがあることが知られている⁴。タイトジャンクションの切断により、耳の表皮の水分が蒸発し、カサカサになることで痒みの感受性が向上したために、ひっかき傷が多くなったと考えられる。また、細胞間が広がることで周囲の細菌が侵入したことで、細菌の侵入によりマクロファージなど IFN- γ を産生する自然免疫が活発に働くため、Th2 細胞が IFN- γ によって抑制されたと考えられる(図 3)。

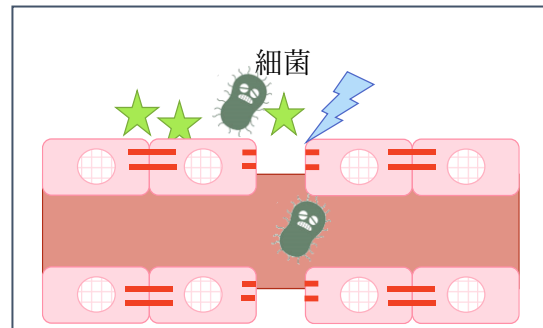


図 3. DEP による炎症悪化の機序

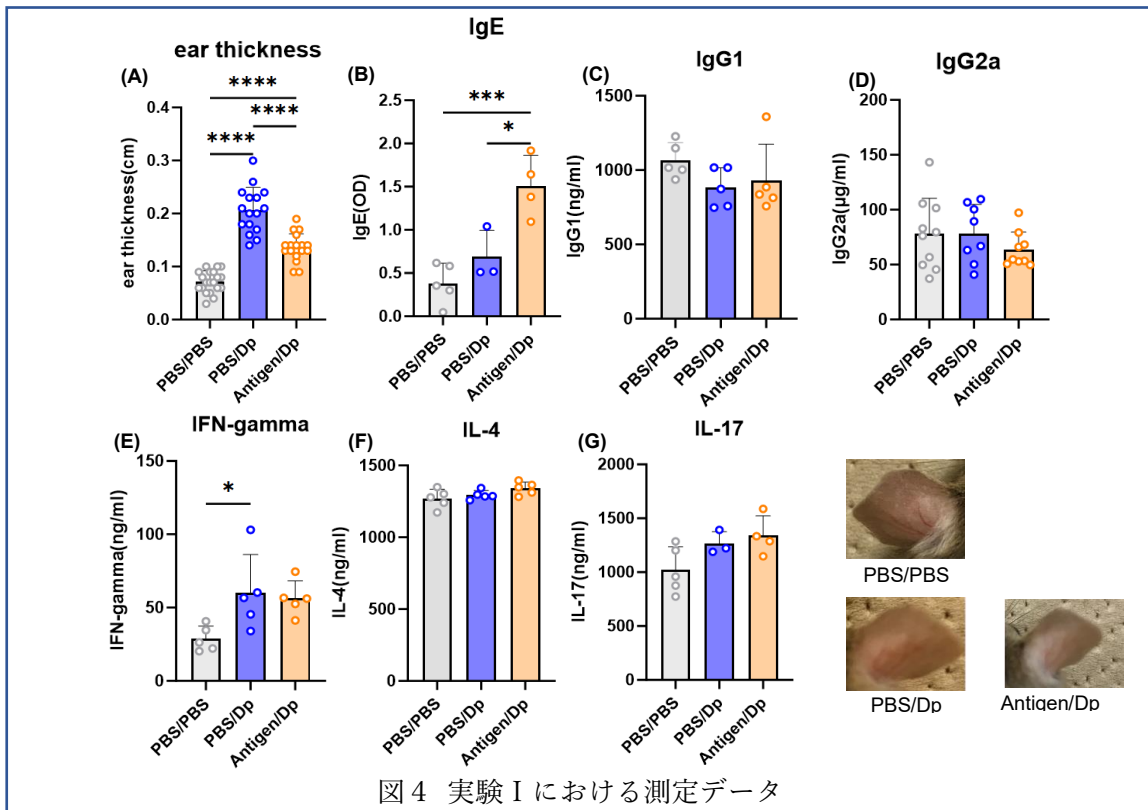


図4 実験Iにおける測定データ

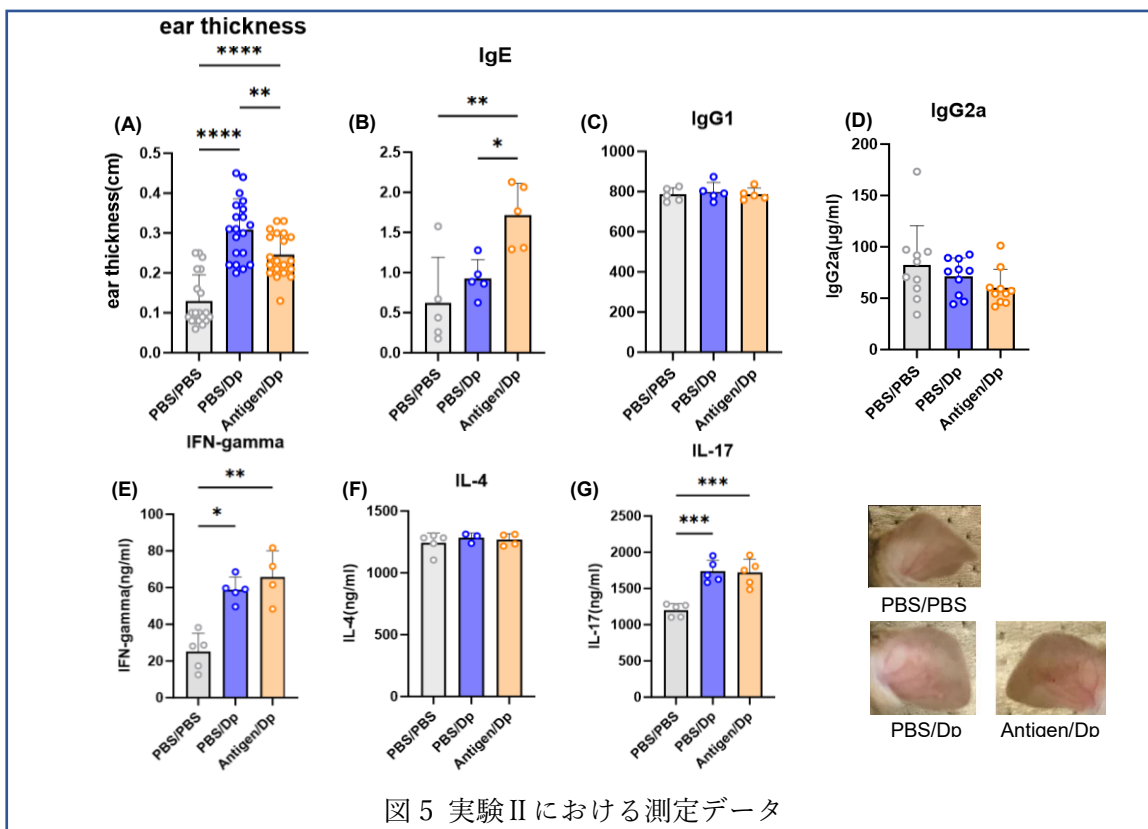


図5 実験IIにおける測定データ

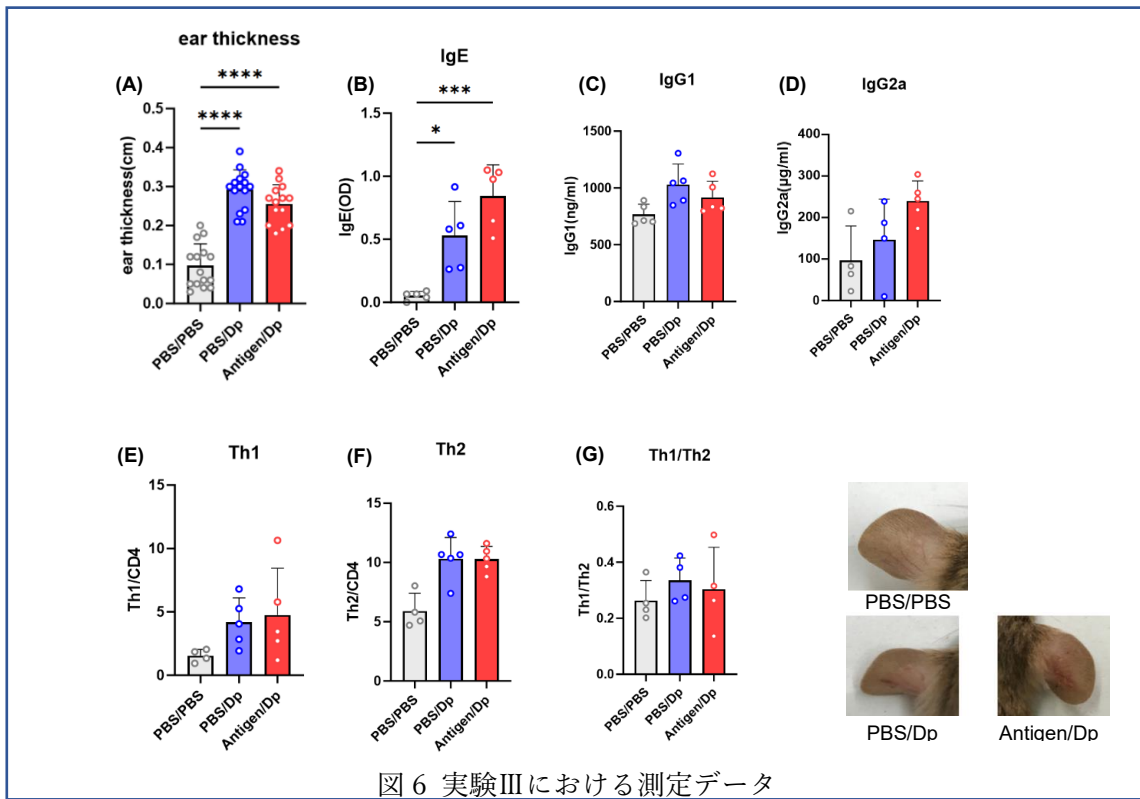


図6 実験IIIにおける測定データ

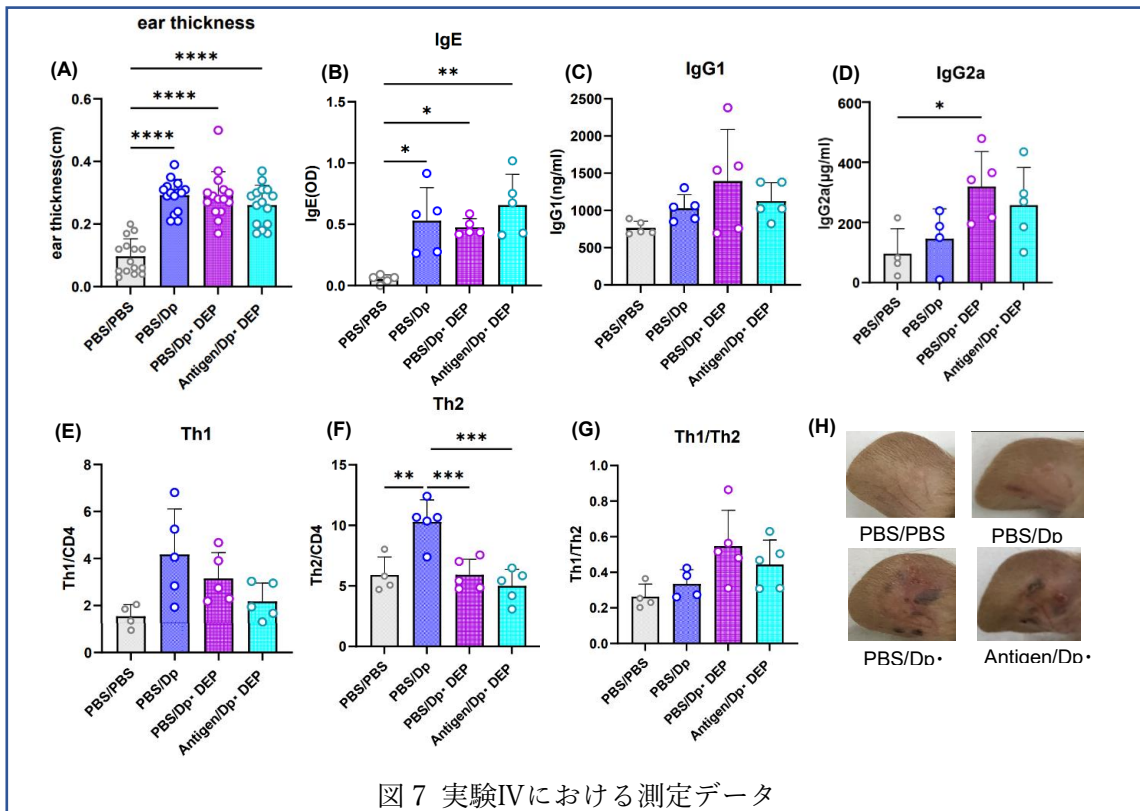


図7 実験IVにおける測定データ

6. 結論

本研究では、抗原種過少説を家族の経験や文献調査に基づいて新たに提唱した。抗原過少説を、マウスを用いて検証したところ、幼児期だけでなく成人期においても、抗原多様な環境下ではアレルギー反応が抑制された。抗原過少説の機序として、多様な抗原特異的抗体によりマスト細胞の架橋が抑制されることで、アレルギー反応が抑制されたと考えられる。一方、抗原過少な環境に移行すると、アレルギー反応が抑制されず、抗原多様性はメモリー効果がないことが明らかとなった。よって、アレルギー患者の急増は、現代の日本人が田舎のような抗原多様な環境から離れ、抗原過少な環境で生活していることが原因であると考えられる。また、大気汚染の環境に移行すると、アレルギー反応に影響はなかったが症状は悪化した。化学物質は皮膚の表面上のみで悪影響を及ぼすため、アレルギー患者の急増との関連性が低いと考えられる。

7. 実社会への応用

本研究はマウスを用いた実験を行い、抗原多様な環境でアレルギーが抑制されることが示唆された。一方でフィンランドでは、国民にアレルギー対策を教育するプログラムが行われ、アレルギーに関する治療費が大幅に減少したという成果が認められた^{※5}。教育内容は、発症予防のために自然との接触や禁煙を推奨し、発症後は早期治療や禁煙に努めるといったものである。本研究と比較すると、自然との接触は抗原多様な環境と、喫煙は大気汚染の環境と類似している。よって、今回のマウスによる結果が、人間に対しても妥当する可能性が高いといえる間接的証拠となると考えている。

また、日本で同様のプログラムを実施する際の案を提唱する。まず、アトピー性皮膚炎の重症化を防ぐため、化学物質を避けるよう注意喚起する。また、子供も大人も、発症前だけでなく発症後も、継続して自然との接触を行うことを推奨する。

8. 今後の展望

今後は、マスト細胞の培養実験(ex-vivo)や抗原特異的 IgE 抗体量の測定などにより、マスト細胞の架橋が抑制された機序を解明していきたい。また研究成果を元に、日本でもアレルギー患者を減らすための教育プログラムを実施したいと考えている。本研究は、アレルギーのテラーメイド予防薬の開発に役立つことが期待される。現在の抗アレルギー薬はヒスタミンがヒスタミン受容体への結合を阻害する抗ヒスタミン薬が主流であるが、眠気や抗コリン作用による副作用が表れる可能性が高いことが知られている^{※6}。

一方で、複数種類の細菌由来タンパク質を投与することでアレルギーを抑制することは、自然な免疫反応を促しているに過ぎないため、副作用が表れないと考えられる。また、肥満細胞に結合した IgE 抗体は半減期が 3 週間程のため、毎日薬を飲む必要がなくなり、患者の負担軽減に繋がる。

謝辞

堤康央先生には研究全般についての的確なアドバイスをしていただきありがとうございます。また、実験手法、器具、分析手法などの指導をしていただいた東阪和馬准教授、芳賀優弥助教、そして櫻井先生に感謝いたします。大阪大学大学院薬学研究所毒性学分野の皆様のご尽力に感謝いたします。本研究は SEEDs プログラムのご支援をいただいております。

参考文献

- [1] H Okada et.al, “The ‘hygiene hypotheses for autoimmune and allergic diseases” in 2010
- [2] 本田晶子 et.al, “環境化学物質とアレルギーに関する研究の進展” in 2014
- [3] Arie J. Stoppelenburg et.al, “Elevated Th17 Response in Infants Undergoing Respiratory Viral Infection” in 2014
- [4] Kenichi Azuma et.al, “Living environment and allergic disease: A surveillance study for the relevance in Saitama prefecture” in 2004
- [5] Tari Haahtela et.al, “The Finnish Allergy Program 2008-2018: Society-wide proactive program for change of management to mitigate allergy burden” in 2021
- [6] 谷内一彦 “薬理作用から見た理想的な抗ヒスタミン薬治療”, 第 120 回目日本耳鼻咽喉科学会総会ランチョンセミナー, p196-204, in 2020