

食物アレルギーの予防・治療における新たな可能性の探索

申請代表者	稲垣 直樹	岐阜薬科大学薬理学研究室	教授
所外共同研究者	山下 弘高	岐阜薬科大学薬理学研究室	助教
所外共同研究者	松井 照明	岐阜薬科大学薬理学研究室 (名古屋大学医学部)	特別研究学生 (大学院生)
所内共同研究者	山本 武	消化管生理学分野	助教

【報告セミナー要旨】

【背景・目的】

食物アレルギー (FA) の一般的な治療方法は現時点では存在せず、原因食物の除去を行い、自然寛解を待つしかない。一部の専門施設では、少量から漸増し一定量を食べられるようにする経口減感作療法などが行われているが、副反応はほぼ必発であり、アナフィラシーを生じる危険性もあることから、新たな治療薬が切望されている。近年、漢方薬の一種である Food Allergy Herbal formula (FAHF) や葛根湯の、食物アレルギーに対する治療効果が報告されており、その他の漢方薬についても効果が期待される。当研究室で作製したマウス食物アレルギーモデルを用い、18種類の漢方薬の治療可能性の探索を行った。

【方法】

雌性 BALB/c マウスに、卵白アルブミン (OVA) と水酸化アルミニウムを1週間間隔で2回腹腔内投与 (i.p.) することで感作し、その1週間後から 10 mg OVA を週3回の頻度で4回経口投与 (p.o.) することで食物アレルギーを誘導した。さらに1週間後に 50 mg OVA を p.o. することで、食物アレルギー症状を惹起した。治療薬として、i.p. 当日から、症状惹起前日まで、黄耆建中湯、小建中湯、当帰建中湯、大建中湯、桂枝加芍薬湯、十全大補湯、人參養榮湯、補中益気湯、四君子湯、六君子湯、啓脾湯、清暑益気湯、柴胡清肝湯、越脾加朮湯、荊芥連翹湯、滋陰降火湯、黄連解毒湯、黄連湯 (株式会社ツムラ) 20 mg/day を p.o. した。治療薬投与期間に溶媒のみを p.o. した陽性対照群と、以下の比較検討を行った。①アレルギー感作の評価として、初回10mg OVA p.o. 前日と 50 mg OVA p.o. 前日の OVA 特異的 IgE 値を測定した。②アレルギー症状の評価として、50 mg OVA p.o. 1時間後の直腸温変化と下痢症状を観察した。③アレルギー症状の評価後に腸間膜リンパ節と、脾臓を回収し、IL-4、IFN- γ 、IL-10、TGF- β の mRNA レベルを測定した。

【結果】

清暑益気湯は OVA 特異的 IgE の上昇の抑制を認め、体温低下と下痢症状にも抑制傾向を認めた。桂枝加芍薬湯は体温低下を抑制した。四君子湯、柴胡清肝湯、越脾加朮湯は下痢症状を抑制した。陽性対照群と比較して、桂枝加芍薬湯、越脾加朮湯、四君子湯の IL-4 の mRNA レベルが低く、清暑益気湯の TGF- β mRNA レベルが高く、柴胡清肝湯、四君子湯、越脾加朮湯の IL-10 の mRNA レベルが高い傾向が認められた。

【考察】

食物アレルギーに対する治療効果を有する可能性のある新たな漢方薬を複数同定し得た。その機序として Th1/Th2 バランスの調整や、抑制性サイトカインの増加が関与している可能性が示唆された。

■背景・目的

食物アレルギーは、主に乳幼児期に発症するアレルギー疾患である。乳幼児の有病率は10%程度であり、その罹患率は増加傾向にある [1]。食物アレルギーの主要食品は小麦、卵、牛乳であり、これらの除去は子供の発育に悪影響を及ぼす。また、加工食品に頻繁に含まれる食材であり、食制限は quality of life を大きく損ねている [2]。また、現在、食物アレルギーの治療としては、原因となる食物の摂取を控える除去食療法が行われており、自然寛解を待つしかない。研究的に行われている減感作療法は、治療中にアナフィラキシーが起こるリスクがあり、専門スタッフの厳密な管理環境が必要である。また、仮に減感作に成功しても、減感作状態がどの程度続くかは不確定である。実際、減感作状態の維持には、定期的に一定量の原因食品抗原を摂取する必要がある、そのことが患者の負担となっている [3]。食物アレルギーは、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎の発症と関連することが指摘されており、食物アレルギーの予防は、これらのアレルギーの発症にも影響を及ぼすと考えられるが、これまでのところ、確実な予防法も存在しない [4]。

近年、生薬製剤の食物アレルギーに対する効果が複数報告されるようになってきており、米国では中医処方ベースとしたFAHF2（霊芝、烏梅、花椒、黄連、黄柏、乾姜、桂枝、紅参、当帰） [5] が、日本においては、葛根湯 [6] 等が報告されている。当研究室では、食物アレルギーの発症機序の解析として、マウスモデルを作製し研究を行ってきた [7]。また、マウスアトピー性皮膚炎モデルなどで、漢方薬の薬効評価を行ってきた。

本研究では、当研究室で作製したマウス食物アレルギーモデルを用い、複数の漢方薬の食物アレルギーにおける有効性について検証することを目的とした。

■方法

○マウス食物アレルギーモデルの作製 (Fig.1)

マウスは6週齢の雌性BALB/cマウス (Japan SLC, Inc.) を用い、温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、12時間毎の明暗サイクル環境下で、自由給水および固形飼料 (CE-2, CLEA Japan) により飼育した。食物アレルギーの誘導は、卵白アルブミン (ovalbumin, OVA; Sigma-Aldrich) を用いた。

OVAと水酸化アルミニウム (Imject Alum, alum; Thermo SCIENTIFIC) を1週間間隔で2回腹腔内投与することで感作し、その1週間後から10 mg OVAを週3回の頻度で4回経口投与して食物アレルギーを誘導した。さらに1週間後に50 mg OVAを経口投与することで食物アレルギー症状を惹起した。alumのみを腹腔内投与した陰性対照群も設定した。

本実験は、岐阜薬科大学における動物実験の実施に関する規定、ならびに、関連省庁の定める規則を順守して行った。

○食物アレルギーの評価

食物アレルギーの発症は、OVA経口負荷1時間後の体温低下、およびアレルギー性下痢の誘導で評価した。体温は、肛門より体温測定センサー (KN-91, 夏目製作所) を挿入し、直腸温を計測した。アレルギー性下痢は、糞便中の水分量により0~3のスコアをつけ、スコア0を通常の固形便、スコア3を水様性下痢とした。また、初回10mgと50 mg OVAの経口投与の前日に麻酔下で約70 μL の採血を行い、分離した血清を用いてOVA-specific IgE値を測定した。また、50mg OVA経口投与による食物アレルギー症状の評価後に、腸間膜リンパ節と脾臓を採取し、IL-4、IFN- γ 、IL-10および

TGF- β の mRNA レベルを測定した。

○治療薬の投与 (Fig.1)

OVA / alum の腹腔内投与当日から 50mg OVA 経口投与前日まで、黄耆建中湯、小建中湯、当帰建中湯、大建中湯、桂枝加芍薬湯、十全大補湯、人参養栄湯、補中益気湯、四君子湯、六君子湯、啓脾湯、清暑益気湯、柴胡清肝湯、越脾加朮湯、荊芥連翹湯、滋陰降火湯、黄連解毒湯、黄連湯（株式会社ツムラ）20 mg / day を連日経口投与した。対照として、溶媒である Milli-Q[®]水 (Elix 5 kit, Merck Millipore) を経口投与した陽性対照群を設定した。

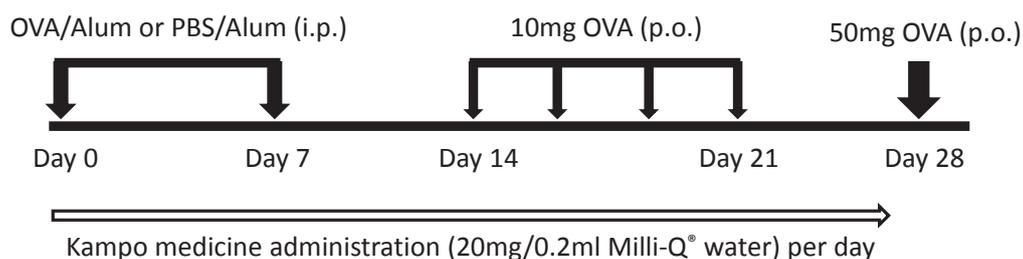


Figure.1 Experimental protocol

Female BALB/c mice were sensitized with two intraperitoneal (i.p.) injections of OVA with aluminum hydroxide gel (alum). Then, OVA in phosphate-buffered saline (PBS) was orally administered (p.o.) four times to induce food allergy. One week after the last administration, allergic responses were elicited through administration of 50mg OVA. Each kampo medicine at a dose of 20mg was orally administered through day 0 to day 27.

○抗原特異的 IgE の測定

抗原特異的 IgE は ELISA にて測定した。一次コートとして、5 μ g / mL の rat anti-mouse IgE antibody (MCA419, Serotec) を使い、biotin (PIERCE) で標識した OVA と peroxidase 結合 streptavidin (DAKO Cytomation) を順に結合させ、o-phenylenediamine (Sigma-Aldrich) を含む基質溶液で発色させた。H₂SO₄ で発色反応を停止させ、直ちに 492 nm における吸光度を immunoplate reader (Titek Multiscan MCC / 340, 大日本住友製薬) で測定した。

○サイトカイン mRNA の測定

腸間膜リンパ節及び脾臓の mRNA レベルは、リアルタイム RT-PCR 法を用いて測定した。各群における全マウスの cDNA を混合サンプルとし、Thermal Cycler Dice (タカラバイオ株式会社) を用いて各サイトカイン発現量を解析し、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH で補正を行った上で、陽性対照との比較を行った。

○治療薬の治療効果の評価

陽性対照群と各治療薬投与群間において、①食物アレルギー症状である、体温低下と下痢症状、② OVA-specific IgE 値、③腸間膜リンパ節及び脾臓における各サイトカイン mRNA レベルの比較検討を行った。

○統計処理

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計学的解析には、one-way ANOVA test を用い、有意差が認められた場合は、post hoc 検定として、陽性対照群を対照として Dunnett test を行った。両側分布、危険率 (p 値) 5% をもって有意差ありと判定した。

統計学的解析には、R (The R Foundation for statistical Computing, version 2.13.0) の graphical user interface である、EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター) を用いた。

■結果・考察

Experiment 1 から Experiment 4 まで 4 回の実験系に分けて、全 18 方剤の治療効果を検証した。

清暑益気湯 (SET) は OVA 特異的 IgE の上昇の抑制を認め (Fig.2, Fig.3)、アレルギー症状である体温低下も抑制した (Fig.3)。また下痢症状に対しても抑制傾向が認められた。桂枝加芍薬湯 (KKST) は体温低下を抑制した (Fig.3)。四君子湯 (ST) (Fig.4, Fig.5)、越脾加朮湯 (EJT) (Fig.4) および柴胡清肝湯 (SST) (Fig.5)、は下痢症状を抑制した。腸間膜リンパ節における mRNA レベルは、陽性対照群と比較して、SET では TGF-β と IL-10 が高く、ST では、IFN-γ と IL-10 が高く、EJT では IL-4 が低い傾向が認められた (Fig.6)。脾臓における mRNA レベルは、陽性対照群と比較して、SET、ST、KKST および SST で IL-4 が低い傾向が認められた (Fig.7)。

食物アレルギーに対する治療効果を有する可能性のある新たな漢方薬を複数同定し得た。有効性を認めた機序としては、特異的 IgE 産生の抑制、Th1/Th2 バランスの調整や、抑制性サイトカインの増加等が関与している可能性が示唆された。

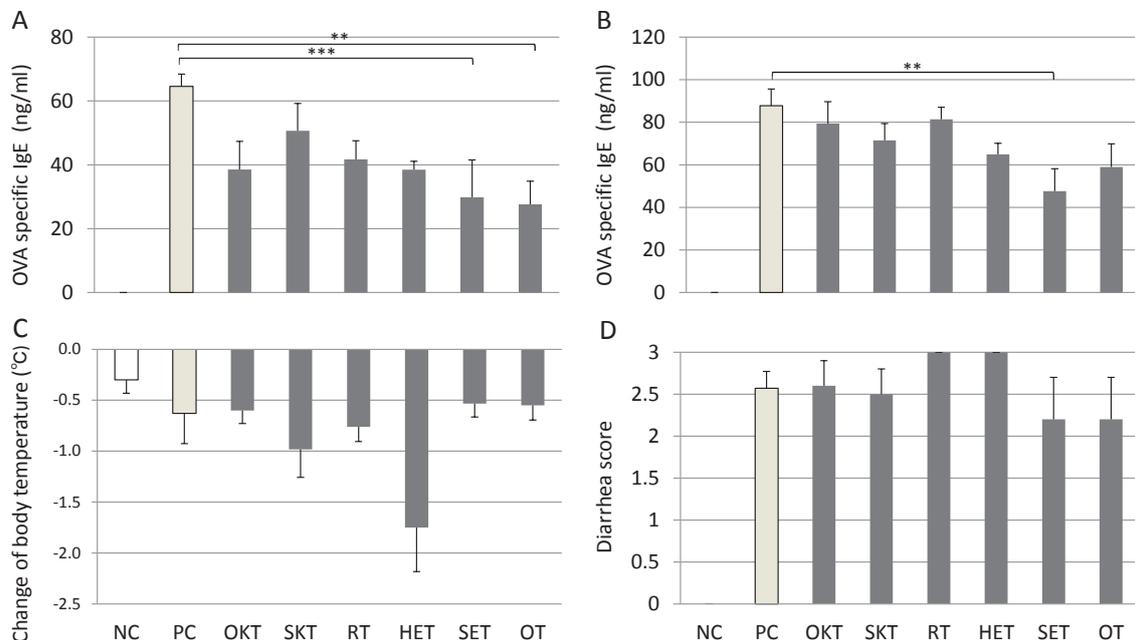


Figure.2 Results of experiment 1.

(A) OVA specific IgE at day 13 measured by ELISA. (B) OVA specific IgE at day 27 measured by ELISA.

(C) and (D) represents allergic symptoms 1 hour after the administration of 50 mg OVA at day 28. (C) Change of rectal temperature.

(D) Diarrhea was assessed by a severity score of fecal form from 0 to 3, 0; solid state, 1; funicular form, 2; slurry score, 3; watery state.

Each value represents the mean ± SEM of five to seven mice (*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.005 ****p < 0.001).

NC: negative control, PC: positive control, OKT: ogikenchuto, SKT: syokenchuto, RT: rikunshito, HET: hochuekkito, SET: seishoekkito, OT: orento

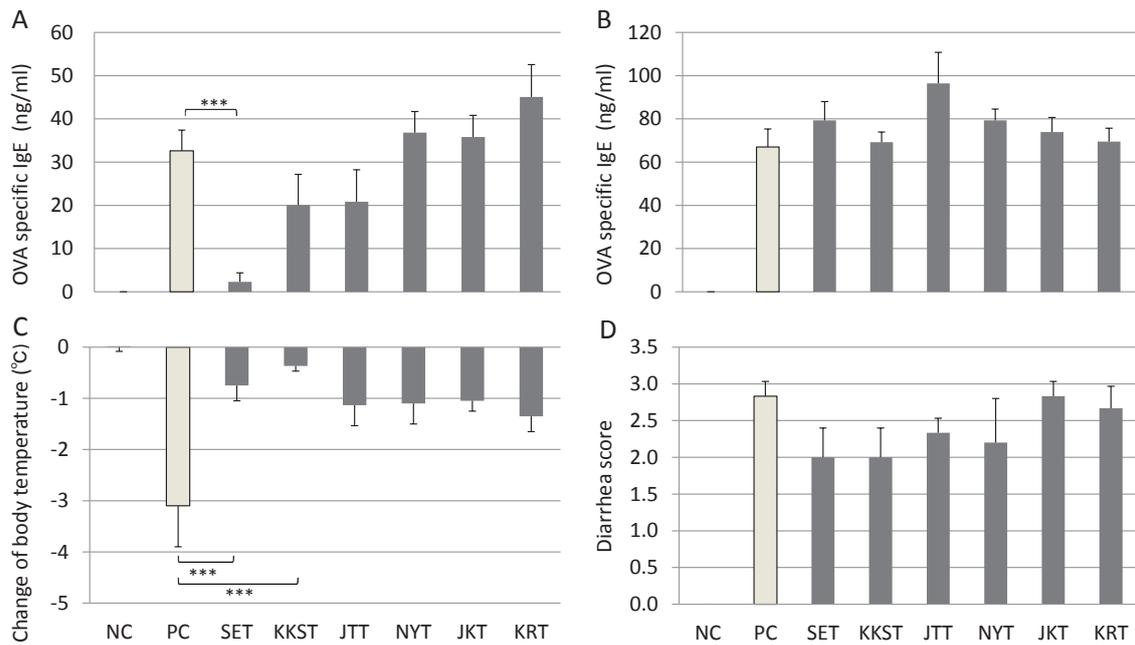


Figure.3 Results of experiment 2.

(A) OVA specific IgE at day 13 measured by ELISA. (B) OVA specific IgE at day27 measured by ELISA.

(C) and (D) represents allergic symptoms 1 hour after the administration of 50 mg OVA at day 28. (C) Change of rectal temperature.

(D) Diarrhea was assessed by a severity score of fecal form from 0 to 3, 0; solid state, 1; funicular form, 2; slurry score, 3; watery state.

Each value represents the mean \pm SEM of five to seven mice (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ **** $p < 0.001$).

NC: negative control, PC: positive control, SET: seishoekkito, KKST: keishikashakyakuto, JTT: juzentaihoto, NYT: ninjyoeito, JKT: jiinkokato, KRT: keigairengyoto

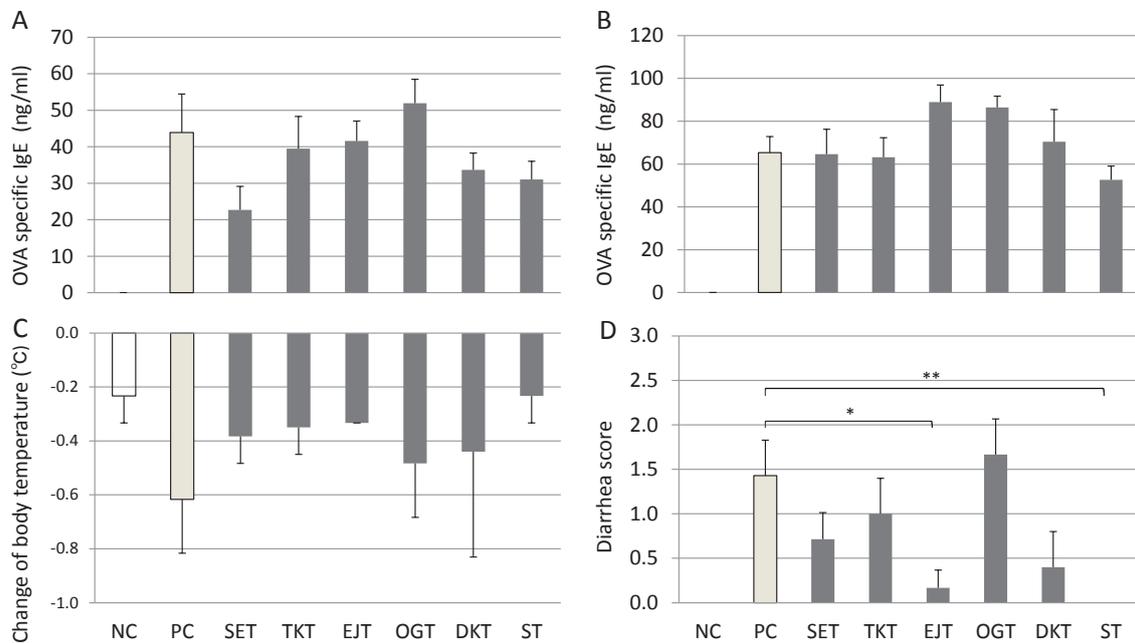


Figure.4 Results of experiment 3.

(A) OVA specific IgE at day 13 measured by ELISA. (B) OVA specific IgE at day27 measured by ELISA.

(C) and (D) represents allergic symptoms 1 hour after the administration of 50 mg OVA at day 28. (C) Change of rectal temperature.

(D) Diarrhea was assessed by a severity score of fecal form from 0 to 3, 0; solid state, 1; funicular form, 2; slurry score, 3; watery state.

Each value represents the mean \pm SEM of five to seven mice (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ **** $p < 0.001$).

NC: negative control, PC: positive control, SET: seishoekkito, TKT: tokikenchuto, EJT: eppikajutsuto, OGT: orengedokuto, DKT: daikenchuto, ST: shikunshito

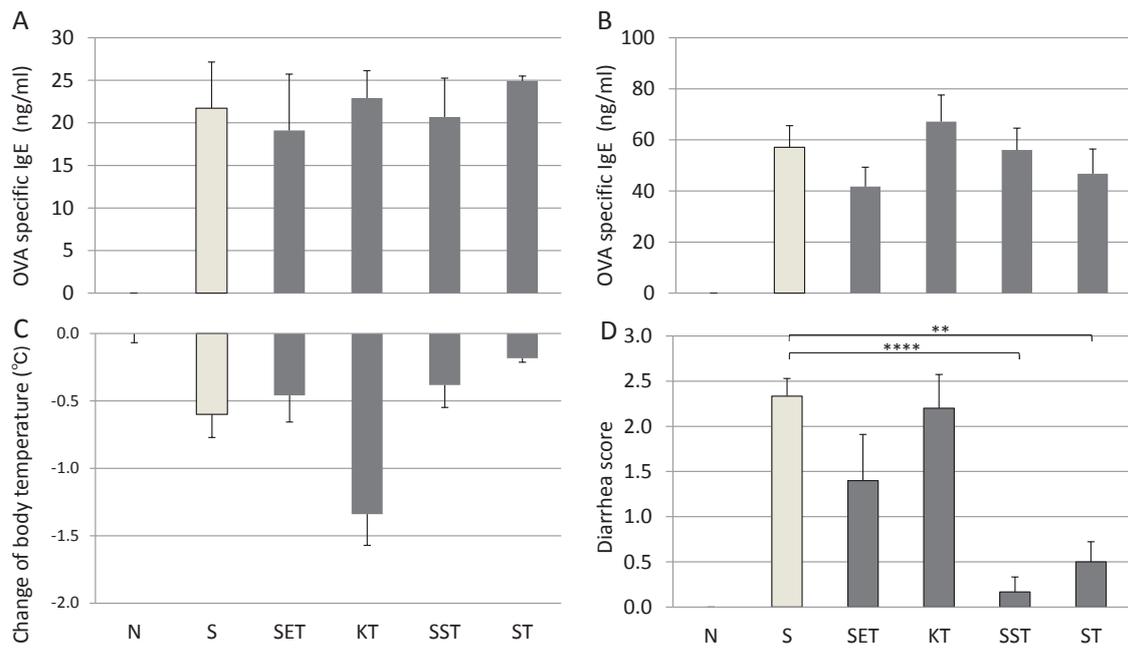


Figure.5 Results of experiment 4.

(A) OVA specific IgE at day 13 measured by ELISA. (B) OVA specific IgE at day 27 measured by ELISA.

(C) and (D) represents allergic symptoms 1 hour after the administration of 50 mg OVA at day 28. (C) Change of rectal temperature.

(D) Diarrhea was assessed by a severity score of fecal form from 0 to 3; 0; solid state, 1; funicular form, 2; slurry score, 3; watery state.

Each value represents the mean \pm SEM of five to seven mice (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ **** $p < 0.001$).

NC: negative control, PC: positive control, SET: seishoekkito, KT: keihito, SST: saikoseikanto, ST: shikunshito

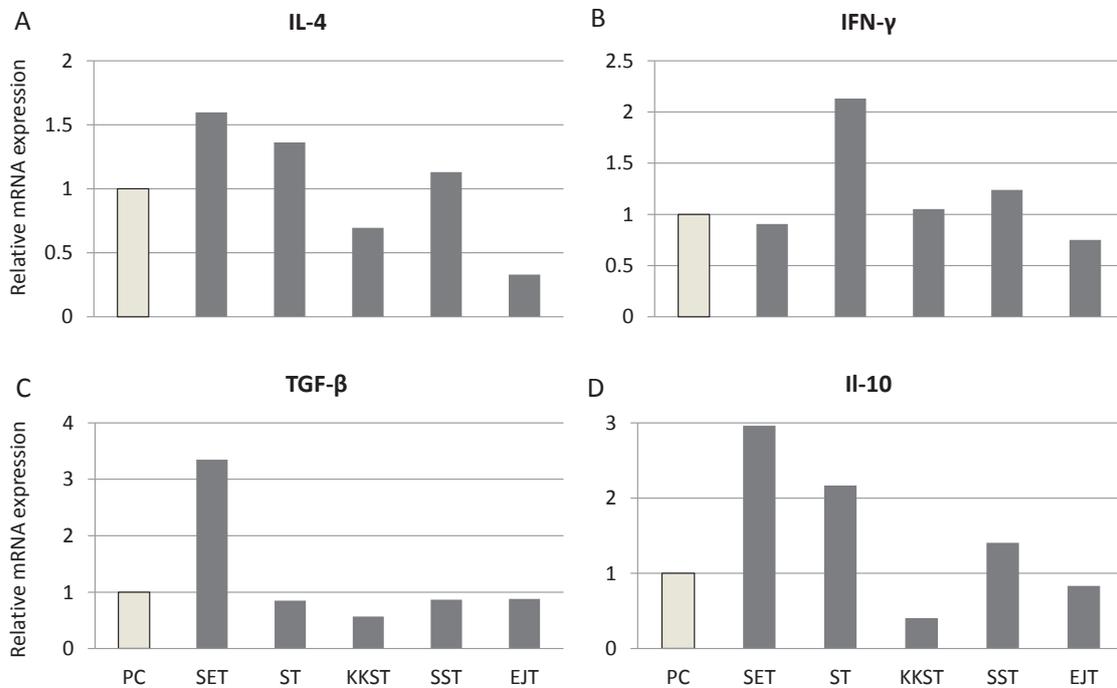


Figure.6 mRNA expressions in the mesenteric lymph node were measured by real time RT-PCR. (A) IL-4, (B) IFN- γ , (C) TGF- β , (D) IL-10.

Results were normalized to GAPDH, then compared to positive control as the reference, and each mRNA level represents that obtained from the collection of samples of 6-7 mice.

PC: positive control, SET: seishoekkito, ST: shikunshito, KKST: keishikasyakuyakuto, SST: saikoseikanto, EJT: eppikajutsuto

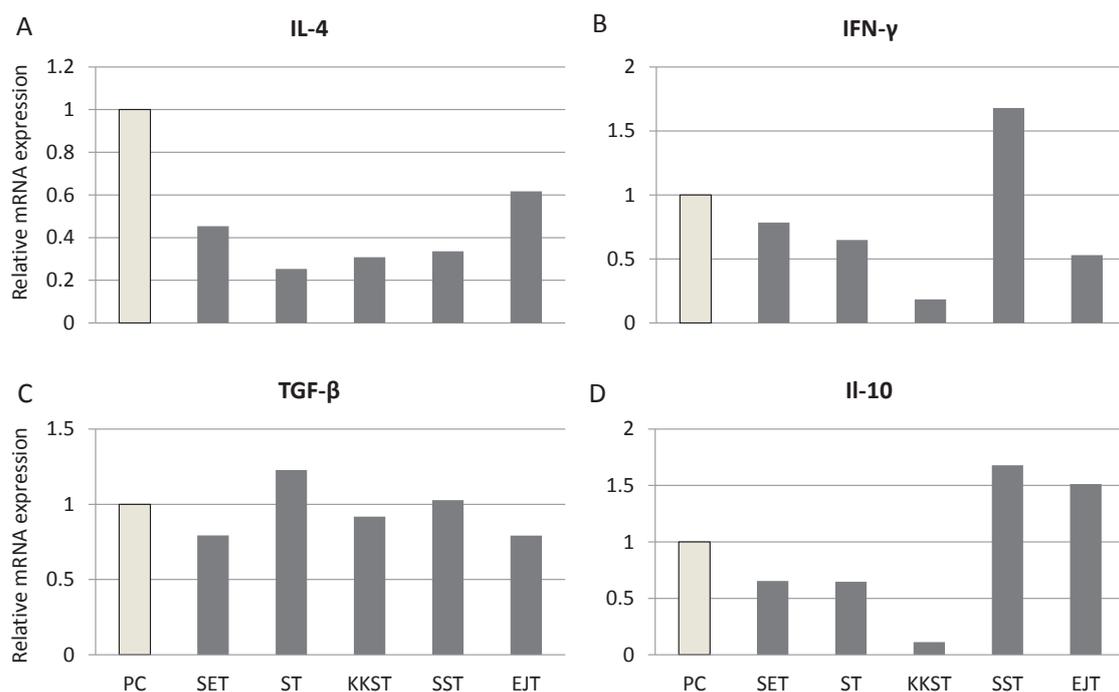


Figure.7 mRNA expressions in the mesenteric lymph node were measured by real time RT-PCR. (A) IL-4, (B) IFN- γ , (C) TGF- β , (D) IL-10. Results were normalized to GAPDH, then compared to positive control as the reference, and each mRNA level represents that obtained from the collection of samples of 6-7 mice.

PC: positive control, SET: seishoekkito, ST: shikunshito, KKST: keishikasyakuyakuto, SST: saikoseikanto, EJT: eppikajutsuto

■結論

合計 18 種類の漢方薬の、食物アレルギーモデルマウスに対する有効性を検証し、清暑益気湯、桂枝加芍薬湯、四君子湯、柴胡清肝湯、越脾加朮湯で治療効果が認められた。

■謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました富山大学和漢医薬学総合研究所に厚く感謝申し上げます。

■参考文献

1. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment*. J Allergy Clin Immunol, 2014. 133(2): p. 291-307; quiz 308.
2. Warren, C.M., et al., *Quality of Life Among Food Allergic Patients and Their Caregivers*. Curr Allergy Asthma Rep, 2016. 16(5): p. 38.
3. Jutel, M., et al., *International consensus on allergy immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2015. 136(3): p. 556-68.
4. Alduraywish, S.A., et al., *The march from early life food sensitization to allergic disease: a systematic review and meta-analyses of birth cohort studies*. Allergy, 2016. 71(1): p. 77-89.
5. Wang, J., et al., *Safety, tolerability, and immunologic effects of a food allergy herbal formula*

- in food allergic individuals: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose escalation, phase 1 study.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2010. 105(1): p. 75-84.
6. Yamamoto, T., et al., *Therapeutic effect of kakkonto in a mouse model of food allergy with gastrointestinal symptoms.* Int Arch Allergy Immunol, 2009. 148(3): p. 175-85.
7. Yamashita, H., et al., *Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model.* Allergy, 2012. 67(2): p. 201-9.