

博士学位論文

性状が異なる鶏卵オボムコイドの
アレルゲン性解析

2026年2月

名古屋学芸大学大学院

栄養科学研究科

富岡 敏彦

目次

第1章 序論	1
第2章 性状変化オボムコイドの消化性解析 (<i>in vitro</i>)	
2-1 目的	4
2-2 方法	5
2-3 結果	12
2-4 考察	21
第3章 性状変化オボムコイドの消化・吸収性とアレルギー症状誘発の解析 (<i>in vivo</i>)	
3-1 目的	23
3-2 方法	24
3-3 結果	28
3-4 考察	33
第4章 不溶化オボムコイドの経口免疫療法に対する有効性の解析	
4-1 目的	35
4-2 方法	36
4-3 結果	40
4-4 考察	44
第5章 総合考察	46
参考文献	49
謝辞	56

第1章 序論

食物アレルギーは「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義されており (Boyce ら, 2011)、I 型アレルギーに分類される (Gell と Coombs, 1963)。日本における食物アレルギーの主要な原因食品は、鶏卵、木の実類、牛乳、小麦、落花生、甲殻類 (エビやカニなど)、およびそばがあげられる (杉崎ら, 2025)。その中で、鶏卵アレルギーは患者全体の中で最も多い 26.7% を占め、特に乳幼児に多くみられる食物アレルギーである (杉崎ら, 2025)。

鶏卵の主要アレルゲンには、オボアルブミン (Ovalbumin, OVA)、リゾチーム (Lysozyme, LY)、オボトランスフェリン (Ovotransferrin, OT)、およびオボムコイド (Ovomucoid, OM) があげられ、そのほとんどが卵白に存在する (Hoffman, 1983; Langeland, 1983; Holen と Elsayed, 1990)。OVA は卵白タンパク質の約 54% を占め、385 個のアミノ酸から構成される分子量 45000 のタンパク質であり、1 本の糖鎖を含んでいる。また、1 分子あたり SS 結合 1 つと遊離 SH 基を 4 つ含んでおり、この遊離 SH 基は卵白タンパク質で唯一 OVA のみが持っている。SS 結合が 1 つであるため加熱による熱変性を受けやすいことに加え、遊離 SH 基同士が結合するなどの要因によって凝集しやすい特性を持つ。LY は卵白タンパク質の約 3.4% を占め、129 個のアミノ酸から構成される分子量 14300 のタンパク質であり、OT は卵白タンパク質の約 12% を占め、686 個のアミノ酸から構成される分子量 77800 のタンパク質である。この LY と OT は、OVA と同様に加熱による熱変性を受けやすい特性を持つ。そして OM は、卵白タンパク質の約 11% を占め、186 個のアミノ酸から構成される分子量 28000 のタンパク質であり、4~5 本の糖鎖を含んでいる。さらに、遊離 SH 基は存在しないが 1 分子内に 9 つの SS 結合が存在し、分子は 3 つのドメインを形成している。OM は前述のような独特な分子構造を持つため、OVA、LY、および OT と比較して、熱処理や化学処理に対する安定性が極めて高い。そのため、OM は他の鶏卵主要アレルゲンとは異なり、熱処理により凝集しない特性を持つ (大津ら, 2024)。さらに、OM は鶏卵アレルゲンの中で、最もアレルゲン性が高いとされている (Bernhisel-Broadbent ら, 1994; Urisu ら, 1997)。Urisu ら (1997) は、凍結乾燥卵白、加熱卵白、および OM 除去加熱卵白を用いた経口負荷試験を行い、凍結乾燥卵白および加熱卵白に陽性反応を示した被験者の約 95% が OM 除去加熱卵白に対して陰性反応を示し、OM のアレルゲン性が高いことを報告している。

OM は IgE 抗体が認識するエピトープ部位の解析も進んでおり、多くのエピトープが報告されている (Cooke と Sampson, 1997; Holen ら, 2001; Mine と Zhang, 2002; Jarvinen ら, 2007; Botas ら, 2013)。Cooke と Sampson (1997) は、10 残基重複する 12 残基のペプチドを用いたエピトープマッピングを行い、ドメイン I、ドメイン II、およびドメイン III において IgE 抗体が結合したことを報告しており、OM は全体的に幅広く IgE エピトープ部位が存在することが明らかとなっている。

タンパク質は、熱変性によって官能基が露出した場合、そこに様々な化合物が結合する。その中で、SH-SS 交換反応は、タンパク質間で SS 結合を形成し、タンパク質の凝集と不溶化をもたらす。しかし、OM は先述の通り特有の構造を持ち、熱に耐性があるため、鶏卵を加熱しても塩溶性を保持している (Jainxin ら, 1986; 小澤と加藤, 2002; Nowak-Wegrzyn と Fiocchi, 2009; 大津ら, 2024)。小澤と加藤 (2002) は、阻害 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて加工卵製品中の塩溶性 OM 量を比較し、生卵と加熱卵 (オムレツやスクランブルエッグなど) では同程度の量が確認され、小麦粉を用いたベイクドエッグでは生卵や加熱卵より減少したことを報告している。また、このベイクドエッグ中のタンパク質の溶解性と組成を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) およびイムノブロットで解析したところ、不溶性画分に OM が検出されたことも報告されている (Kato ら, 2001; Shin ら, 2013)。このように、鶏卵単体での加熱で不溶化しない OM も、小麦粉とともに混捏・焼成したベイクドエッグ中では不溶化していることが示された。また、このベイクドエッグは、低アレルゲン化していることが報告されている (Lemon-Mulé ら, 2008; Lieberman ら, 2012)。Lieberman ら (2012) は、生卵やゆで卵に対してアレルギー症状を呈し鶏卵アレルギーと診断された患者 100 名を対象に、ベイクドエッグであるマフィンを用いた経口負荷試験を行い、約 70%の患者がアレルギー症状を誘発せずに摂取可能であることを報告した。先行研究において、OM の性状 (立体構造や溶解性) が変化することで症状誘発に違いが生じることは報告されているが、その機序については明らかにされておらず、低アレルゲン化製品の製造に役立てるには、この機序を解明する必要がある。

また、食物アレルギーの治療法の 1 つとして、経口免疫療法 (Oral immunotherapy、OIT) が用いられている。OIT は、「自然経過では早期に耐性獲得が期待できない症例に対して、事前の食物経口負荷試験で症状誘発閾値を確認した後に原因食物を医師の指導のもとで継続的に経口摂取させ、脱感作状態や持続的無反応の状態とした上で、究極的には耐性

獲得を目指す治療」と定義されている（日本小児アレルギー学会, 2021）。この OIT は食物アレルギーの摂取を通じて耐性を獲得していく治療法であるが、アレルギー摂取によるアレルギー症状誘発のリスクが高いため、日本食物アレルギー診療ガイドラインでは一般的な治療法として推奨されていない。実際に、乾燥卵白粉末、ゆで卵、およびスクランブルエッグを用いた OIT が実施されており、鶏卵アレルギー患者の一部で耐性獲得が達成された一方で、治療中にアレルギー症状が誘発され（アナフィラキシーを含む）、アドレナリン注射が投与されたという報告もある（Sugimoto ら, 2016; Itoh-Nagato ら, 2018; Sasamoto ら, 2022）。したがって、OIT は鶏卵アレルギー患者に対して治療効果を示しているが、アナフィラキシーなどのアレルギー症状を誘発するリスクを伴う治療法である。しかし、OIT にアレルギー性が低下したバイクドエッグを用いることで、アレルギー症状誘発リスクを低減した治療の実施が期待できる。

本研究では、*in vitro* および *in vivo* 試験での性状が異なる OM の消化・吸収性の解析を行い、アレルギー症状誘発との関連性を検討した。また、*in vivo* 試験におけるバイクドエッグの OIT への有効性についても検討した。

第2章 性状変化オボムコイドの消化性解析 (*in vitro*)

2.1 目的

鶏卵アレルギー患者は、一般的に生卵やゆで卵を摂取した際にアレルギー症状が誘発される。しかし、鶏卵アレルギー患者に対して、ベイクドエッグであるマフィンまたはワッフルを用いた経口負荷試験（2時間おきに連続摂取）を実施した結果、70%の患者がアレルギー症状を誘発しなかったことが報告されている（Lemon-Muléら, 2008）。さらにこのベイクドエッグは、鶏卵の主要アレルゲンである OM が不溶化しており、生卵やゆで卵とアレルゲンの性状が異なることが分かっている（Katoら, 2001; Shinら, 2013）。OM の性状の変化によって、アレルギー症状の誘発に影響を与えている可能性が考えられるが、この機序の詳細は明らかにされていない。この機序の仮説として、性状が変化した OM は消化・吸収性も変化することで、その後のアレルギー症状誘発に影響を与えていると考えた。

Jiménez-Saizら（2011）は、精製した OM と加熱した OM を消化処理し、その後の抗体結合能を ELISA にて評価したが、精製した OM と加熱した OM の IgG 抗体の結合能は変化しないことを報告している。また Takagiら（2005）は、ペプシン消化後の OM のヒト IgE 抗体結合能をイムノブロットにより評価したが、分解断片に反応を示し分解後も IgE エピトープが残存していることを報告した。このように、精製した OM と加熱した OM は、消化後も抗体が認識するエピトープが残存する。一方で、小麦タンパク質と相互作用し不溶化した OM の消化性は明らかではない。本研究では、この不溶化した OM は小麦タンパク質とともに大きな凝集体を形成しているために、消化酵素による影響を受けにくく、不溶化した状態で排泄されると仮説を立てた。そのため、吸収量が少なくなり、アレルギー症状を誘発しにくいと考えられる。

そこで本章では、機序解明の第一段階として *in vitro* での消化性の解析（単一酵素による消化および胃・小腸モデル消化）を行い、性状が異なる OM の消化性を明らかにすることを目的とした。

2.2 方法

2.2.1 材料

OM は本研究室で精製したものを使用し（手順は方法の OM の分離精製に記載）、小麦粉は市販の強力粉（日清製粉ウェルナ株式会社）を使用した。

本研究に用いたペプシン（E.C.3.4.23.1、ブタ胃由来、2500 units/mg）、トリプシン（E.C.3.4.21.4、ブタ膵臓由来、4907 units/mg）、 α -キモトリプシン（E.C.3.4.21.1、ウシ膵臓由来、1000 units/mg）、 α -アミラーゼ（E.C.3.2.1.1、300 units/mg）、リパーゼ（E.C.3.1.1.3）は富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。

未変性の OM の構造的エピトープを認識する anti-OM 5C mouse IgG monoclonal antibody（anti-OM 5C）、熱変性した OM の連続性エピトープを認識する anti-OM 6H mouse IgG monoclonal antibody（anti-OM 6H）、未変性の OM および熱変性した OM どちらも認識する biotin-linked anti-OM 7D mouse IgG monoclonal antibody（biotin-linked anti-OM 7D）は、株式会社森永生科学研究所より供与していただいた（Hirose ら, 2004; Hirose ら, 2005）。Horseradish peroxidase (HRP) -linked anti-rabbit IgG (Goat) antibody は Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) より購入した。Peroxidase (POD) -conjugate streptavidin は Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) より購入した。また、精製した OM を用いて anti-OM rabbit IgG polyclonal antibody（anti-OM IgG poly）の作製をコスモ・バイオ株式会社に外注した。

2.2.2 OM の分離精製

OM は Fredericq と Deutsch (1949) の方法を一部改良し、市販の鶏卵から分離精製した。市販の鶏卵を卵白と卵黄に分離した後、卵白を濾し器で 3 回濾した。その後、卵白 500 mL に 1 N 硫酸を加え pH 3.5 に調整した。pH 3.5 に調整後、同量の 10% トリクロロ酢酸を攪拌しながら滴下した。その後、遠心分離（9100×g、4℃、10 分）し、上清を回収した。回収した上清は、6 N 水酸化ナトリウムで pH 6.0 に調整した。その後、2 倍量の 95% エタノールを攪拌しながら加え、2 時間以上静置した。静置後、上清は破棄し、残渣は純水 250 mL に溶解した。溶解後のタンパク質溶液は 3 日以上純水で透析した。透析後、遠心分離（9100×g、4℃、10 分）し上清を回収し、凍結乾燥させたものを精製 OM とした。

2.2.3 性状の異なる OM 試料の作製

試料は Fig. 1 のように作製した。精製 OM を純水で 1 mg/mL に溶解後、沸騰水中で 60 分間加熱処理したものを加熱試料とした（加熱 OM）。OM の構造（変性状態）は、サンドイッチ ELISA にて確認した。また、精製 OM、小麦粉、および純水を 1 : 2 : 1 (w/w) の割合で 20 分間混捏し、180°C で 7 分間オープンにて焼成後、凍結乾燥させ粉末化したものを焼成試料とした（焼成 OM）。また、混捏まで行い焼成していないものを未焼成試料とした（未焼成 OM）。この未焼成および焼成試料中の OM の溶解性は、SDS-PAGE およびイムノブロットにて確認し、焼成前後で比較した。

消化実験にあたっては実験条件を揃えるため、精製 OM および加熱 OM にも焼成した小麦粉を 1 : 2 (w/w) の割合となるように加えた。焼成した小麦粉は、小麦粉と純水を 2 : 1 (w/w) の割合で 20 分間混捏し、180°C で 7 分間オープンにて焼成後、凍結乾燥させ粉末化することで作製した。

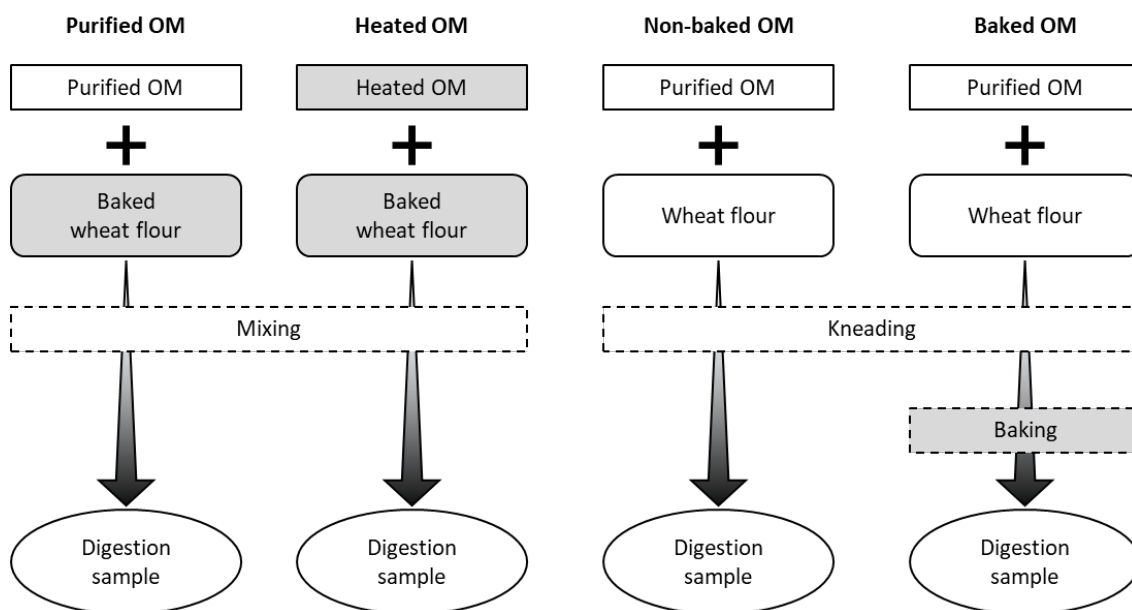


Fig. 1. Preparation of digested samples.

Baked wheat flour was prepared by kneading for 20 minutes and baking in oven (180°C, 7min). Purified OM and heated OM were prepared by mixing each OM with baked wheat flour. Non-baked OM was prepared by kneading purified OM and wheat flour for 20 minutes. Baked OM was prepared by kneading purified OM and wheat flour and baking in oven (180°C, 7min).

2.2.4 サンドイッチ ELISA

先行研究 (Hirose ら, 2004) を参考に、96 穴マイクロプレート (Nunc-Immuno Plate、Thermo Fisher Scientific、Roskilde、Denmark) に anti-OM 5C または anti-OM 6H (それぞれ phosphate-buffered saline (PBS) で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整) を各ウェルに 100 μL 加え、4°C で一晩固相化した。PBS に 0.05% Tween20 を含む溶液 (PBST) にて 3 回洗浄後、1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBST (1% BSA/PBST) を各ウェルに 200 μL 加え、室温で 1 時間静置した。静置後、精製 OM または加熱 OM を各ウェルに 100 μL 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、biotin-linked anti-OM 7D (1% BSA/PBST で 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整) を各ウェルに 100 μL 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、POD-conjugate streptavidin (1% BSA/PBST で 5000 倍希釈) を各ウェルに 100 μL 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で 2 回、次いで PBS で 2 回洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB、SeraCare Life Sciences Inc.、Milford、USA) を各ウェルに 100 μL 加え発色させた。発色後 1 N 塩酸を各ウェルに 100 μL 加え反応を停止した。その後、Microplate reader MTP-650FA (コロナ電気株式会社) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2.2.5 阻害 ELISA

PBS で 1 mg/mL から 6 段階 10 倍希釈した精製 OM または加熱 OM に、anti-OM IgG poly (1% BSA/PBST で 50000 倍希釈) を同量加えて混合し、4°C で一晩反応させた。同時に、96 穴マイクロプレートに、精製 OM (PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整) を各ウェルに 100 μL 加え、4°C で一晩固相化した。プレートを PBST で 3 回洗浄後、1% BSA/PBST を各ウェルに 200 μL 加え、室温で 1 時間静置した。その後、一晩精製 OM または加熱 OM と反応させた anti-OM IgG poly を各ウェルに 100 μL 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、HRP-linked anti-rabbit IgG (Goat) antibody (1% BSA/PBST で 50000 倍希釈) を各ウェルに 100 μL 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で 2 回、次いで PBS で 2 回洗浄後、TMB を各ウェルに 100 μL 加え発色させた。発色後 1 N 塩酸を各ウェルに 100 μL 加え反応を停止した。その後、Microplate reader MTP-650FA を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2.2.6 タンパク質の抽出

タンパク質の抽出は、Naitoら（2020）の方法を一部変更して行った。理論値で OM 10 mg に相当する試料を量り取り、PBS を 10 mL 加え 4°C で一晩振とうした。遠心分離（9100 ×g、4°C、10 分）後上清を回収し、残渣に PBS を 10 mL 加え、1 時間振とうした。この 1 時間振とうの抽出は 2 回繰り返した。その後、残渣に 4% SDS および 6 mol/L 尿素を含む tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) -HCl (pH 6.8) 溶液 (SDS+urea 溶液) を加え、PBS と同様に抽出を 3 回行った。その後、残渣に SDS+urea 溶液に 5% 2-mercaptoethanol (2-ME) を含む溶液 (2-ME 溶液) を加え、同様の操作を行った。

PBS では塩溶性タンパク質を抽出し、SDS+urea 溶液および 2-ME 溶液では不溶性タンパク質を抽出した。得られた上清は抽出液ごとに 10 mL に調整した。

2.2.7 単一酵素による消化

先行研究による消化実験の条件（Yamada ら, 2006; Martos ら, 2010; Wang ら, 2018）を参考に、単一酵素による消化実験を行った。ペプシン消化は、以下のように行った。理論値で OM 10 mg に相当する試料を量り取り、35 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液 (pH 1.2、12 N 塩酸にて調整) を 7.5 mL 加え 37°C で 15 分振とうし、予備加温した。その後、35 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液 (pH 1.2、12 N 塩酸にて調整) に溶解させたペプシン溶液を加え、37°C で 0、10、30、60、および 120 分振とうした。ペプシン溶液は、ペプシンと試料中の粗タンパク質が、1 : 20 (w/w) となるように 0.5 mL 加えた。反応後、160 mmol/L 炭酸ナトリウム水溶液を 2 mL 加え反応を停止させた。この時点で OM の終濃度が 1 mg/mL となるようにした。その後遠心分離（9100 ×g、4°C、10 分）し、上清を回収した。これを上清試料 (supernatant、Sup.) とした。

トリプシンおよび α -キモトリプシン消化は以下のように行った。理論値で OM 10 mg に相当する試料を量り取り、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) を 9.5 mL 加え 37°C で 15 分振とうし、予備加温した。その後、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) に溶解させたトリプシンまたは α -キモトリプシン溶液を加え、37°C で 0、10、30、60、および 120 分振とうした。トリプシンおよび α -キモトリプシン溶液は、トリプシンまたは α -キモトリプシンと粗タンパク質が、それぞれ 1 : 400、1 : 100 (w/w) となるように 0.5 mL 加えた。反応後、5 分間沸騰水中で加熱し反応を停止させた。この時点で OM の終濃度が 1 mg/mL となるようにした。その後遠心分離（9100 ×g、4°C、10 分）し、上清を回収し Sup. とした。

いずれの消化処理においても、Sup.回収後の残渣に 2-ME 溶液を 10 mL 加え不溶性タン

パク質を抽出した。これを残渣試料 (precipitate、Ppt.) とした。

2.2.8 胃・小腸モデル消化

先行研究による消化実験の条件 (Moreno ら, 2005; Benedé ら, 2013; Martos ら, 2013) を参考に、胃・小腸モデル消化実験を行った。胃消化は、以下のように行った。理論値で OM 5 mg に相当する試料を量り取り、35 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液 (pH 2.0、12 N 塩酸にて調整) を 0.75 mL 加え、37°C で 15 分間振とうし、予備加温した。その後、35 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液 (pH 2.0、12 N 塩酸にて調整) に溶解させたペプシン溶液を加え、37°C で 0、10、30、60、および 120 分振とうした。ペプシン溶液は、ペプシンと試料中の粗タンパク質が 172 unit : 1 mg となるように 0.05 mL 加えた。反応後、160 mmol/L 炭酸ナトリウム水溶液を加え pH 8.0 に調整し反応を停止させた。その後、35 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液 (pH 8.0、160 mmol/L 炭酸ナトリウム水溶液にて調整) で OM の終濃度が 5 mg/mL となるようにした。その後遠心分離 (9100×g、4°C、10 分) し、上清を回収し Sup. とした。

小腸消化は、pH 8.0 に調整した 10 および 60 分間の胃消化物を用いた。10 分消化試料は胃消化が不十分であり、60 分消化試料は十分な胃消化を受けていると判断し、胃消化の程度が異なる小腸消化も比較した。胃消化物 0.2 mL に塩化カルシウム (終濃度: 7.6 mmol/L)、Bis-Tris (終濃度: 20.3 mmol/L)、タウロコール酸ナトリウム (終濃度: 6.15 mmol/L)、およびグリコデオキシコール酸 (終濃度: 6.15 mmol/L) が溶解した 35 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液 (pH 8.0、160 mmol/L 炭酸ナトリウム水溶液にて調整) を 0.7 mL 加え、37°C で 15 分間振とうし、予備加温した。その後、トリプシン、 α -キモトリプシン、 α -アミラーゼ、およびリパーゼが溶解した 35 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液 (pH 8.0、160 mmol/L 炭酸ナトリウム水溶液にて調整) を 0.1 mL 加え、37°C で 0、10、30、60、および 120 分振とうした。各酵素は、酵素と粗タンパク質が以下の割合になるよう加えた; 40 unit : 1 mg (トリプシン)、0.5 unit : 1 mg (α -キモトリプシン)、10.2 unit : 1 mg (α -アミラーゼ)、1 mg : 895 mg (リパーゼ)。反応後、沸騰水中で 3 分間加熱し反応を停止させた。この時点で OM の終濃度が 1 mg/mL となるようにした。その後、遠心分離 (9100×g、4°C、10 分) し、上清を回収し Sup. とした。

いずれの消化処理においても、Sup.回収後の残渣に、2-ME 溶液を 1 mL 加え不溶性タンパク質を抽出した。これを Ppt. とした。

2.2.9 Lowry 法

Lowry 法は Lowry ら (1951) の方法に従い行った。希釈した Sup. 0.5 mL とアルカリ性銅液 (2% 炭酸ナトリウム/0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液と 0.5% 硫酸銅 (II) 五水和物/1% 酒石酸ナトリウム水溶液を 50 : 1 の割合で混合) 5 mL を加えて 30°C の恒温槽にて 10 分静置した。その後、希釈フェノールを 0.5 mL 加え、30°C の恒温槽にて 20 分以上静置後、750 nm の吸光度を UV-VIS Spectrophotometer UV-1280 (株式会社島津アクセス) で測定した。検量線には BSA 溶液を用いた。

2.2.10 SDS-PAGE

試料は、単一酵素による消化物 (原液)、胃消化物 (5 倍希釈)、および胃・小腸消化物 (原液) 20 μ L に SDS-PAGE sample buffer (5% SDS、5% 2-ME、30% グリセロール、および 0.06% bromophenol blue を含む Tris-HCl (pH 6.8)) を 5 μ L 加え、5 分間沸騰水中で加熱したものを使用した。調整した試料を Laemmli (1970) の方法に従って、15% ポリアクリルアミドゲルで解析した。胃および小腸消化試料は 5 μ L/レーンずつ供し、単一酵素による消化物は 10 μ L/レーンずつ供した。分離したタンパク質は coomassie brilliant blue R-250 (CBB) にて染色した。ゲルの撮影はプリントグラフ (アトー株式会社) を使用した。

2.2.11 イムノブロット

分離したタンパク質が転写された polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (アトー株式会社) を用いて、Towbin ら (1979) の方法に従い標的タンパク質を検出した。膜を tris buffered saline (TBS) に 0.1% Tween20 を含む溶液 (TBST) で 1 回洗浄後、0.3% スキムミルクを含む TBST (0.3% スキムミルク/TBST) 中で室温にて 1 時間振とうした。その後、anti-OM IgG poly (0.3% スキムミルク/TBST で 50000 倍希釈) と室温で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、HRP-linked anti-rabbit IgG (Goat) antibody (0.3% スキムミルク/TBST で 50000 倍希釈) と室温で 1 時間振とうした。TBST で 2 回、次いで TBS で 2 回洗浄後、TMB (EzWestBlue、アトー株式会社) を加えて発色させた。その後、純水ですすいで発色を停止させた。撮影はプリントグラフを使用した。また、コントロールには精製 OM (5 μ g/レーン) を用いた。

2.2.12 統計解析

統計解析は EZR version 1.54 (Kanda, 2013) を用いて行い、測定値はすべて平均値±標準誤差で示した。平均値の差の検定には一元配置分散分析を行い、その後の Post-hoc 検定は Tukey 法を使用した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

2.3 結果

2.3.1 作製 OM 試料の性状確認

精製 OM および加熱 OM の性状は、サンドイッチ ELISA にて解析した。精製 OM は anti-OM 5C に反応し、加熱 OM は anti-OM 6H に反応した (Fig. 2A, B)。したがって、精製 OM および加熱 OM は、それぞれ未変性および変性の状態であると判断した。また、作製した anti-OM IgG poly は、精製 OM および加熱 OM に反応したため (Fig. 2C)、anti-OM IgG poly は、未変性および変性の状態の OM に反応すると判断した。以降の実験の OM 検出には、anti-OM IgG poly を使用した。

焼成前後の試料の溶解性は、SDS-PAGE およびイムノブロットにて解析した。その結果、未焼成 OM ではほとんどの OM が PBS 画分にて検出されたが、焼成 OM では OM が 2-ME 溶液画分にて検出された (Fig. 3)。また、焼成 OM においては、高分子化合物も検出された。このことから、焼成 OM 中の OM は、凝集・不溶化した状態であると判断した。

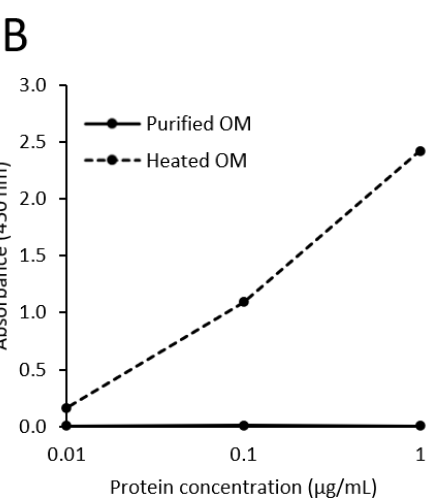
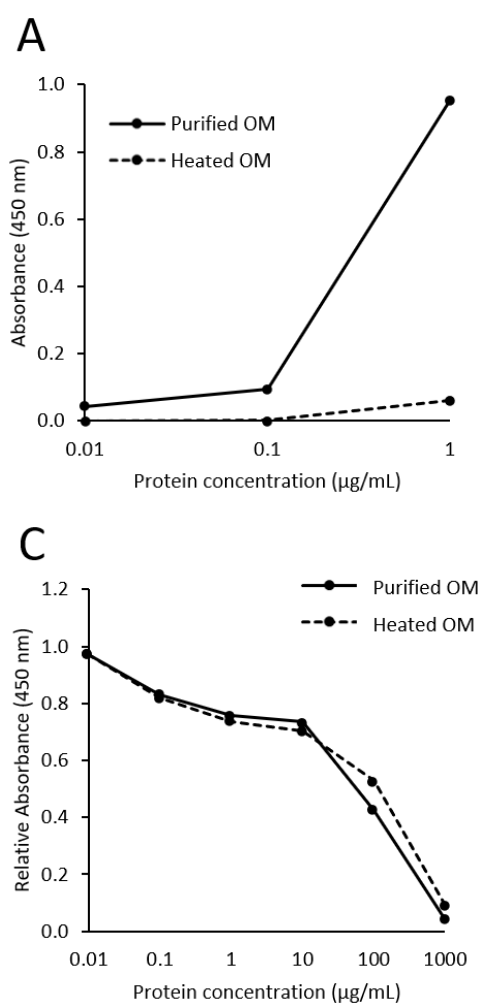


Fig. 2. Property analysis of prepared samples by ELISA.

The property of purified and heated OM samples were evaluated by sandwich ELISA using Anti-OM 5C (A) and Anti-OM 6H (B). The reaction of the produced polyclonal antibodies to purified and heated OM was evaluated by inhibition ELISA (C).

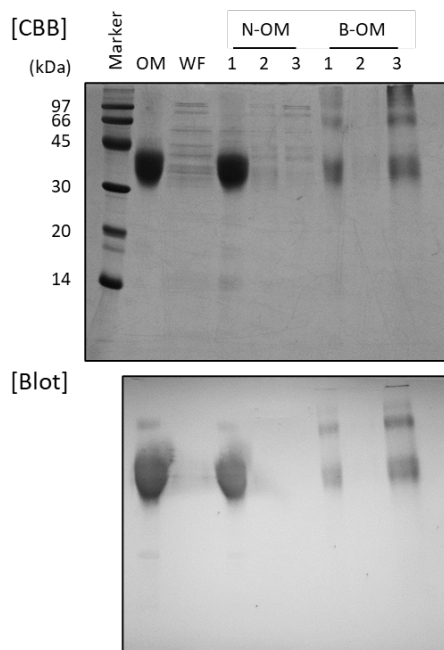


Fig. 3. Property analysis of prepared samples by SDS-PAGE.

The solubility of the baked OM samples was evaluated by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting.

Marker, molecular weight marker; OM, ovomucoid; WF, wheat flour total protein; N-OM, non-baked OM; B-OM, baked OM; 1, PBS extract fraction; 2, SDS+urea solution extract fraction; 3, 2-ME solution extract fraction.

2.2.2 単一酵素消化後のタンパク質濃度

Sup.のタンパク質濃度は、Lowry 法にて定量した。いずれの酵素を用いた消化においても、消化 0 分では精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM より焼成 OM の方が有意に低値を示した。

ペプシン消化において (Fig. 4A)、精製 OM では、消化 0 分 (0.78 ± 0.05 mg/mL) から消化 30 分 (0.93 ± 0.08 mg/mL) で有意差がみられたが ($p < 0.05$)、増加率は 19.2%にとどまり、その後 120 分まで変化しなかった。加熱 OM では、消化 0 分 (0.80 ± 0.05 mg/mL) から消化 120 分 (0.81 ± 0.05 mg/mL) まで有意な差はみられなかった。未焼成 OM では、消化 0 分 (0.81 ± 0.01 mg/mL) と消化 60 分 (0.89 ± 0.01 mg/mL) で有意差がみられたが ($p < 0.05$)、増加率は 9.8%にとどまり、消化 120 分まで変化しなかった。一方で、焼成 OM では、消化 0 分 (0.34 ± 0.01 mg/mL) から消化 30 分 (0.85 ± 0.05 mg/mL) まで有意に増加した (増加率 150.0%)。その後も僅かに増加したが、消化 30 分の時点で精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM と同程度のタンパク質濃度まで達した。

キモトリプシン消化において (Fig. 4B)、精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM のタンパク質濃度は消化後ほとんど変化しなかったが、焼成 OM のタンパク質濃度は経時的に有意に増加した。そして、消化 60 分の時点で、 1.07 ± 0.03 mg/mL (精製 OM)、 1.05 ± 0.04 mg/mL (加熱 OM)、 1.00 ± 0.01 mg/mL (未焼成 OM)、 1.03 ± 0.04 mg/mL (焼成 OM) と有意な差はみられなかった。

トリプシン消化において (Fig. 4C)、精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM のタンパク質濃度は、ペプシンおよびキモトリプシン消化と同様にほとんど変化しなかった。一方で、焼成 OM のタンパク質濃度も、消化 0 分 (0.58 ± 0.02 mg/mL) から消化 120 分 (0.64 ± 0.03 mg/mL) まで有意な変化はなかった。

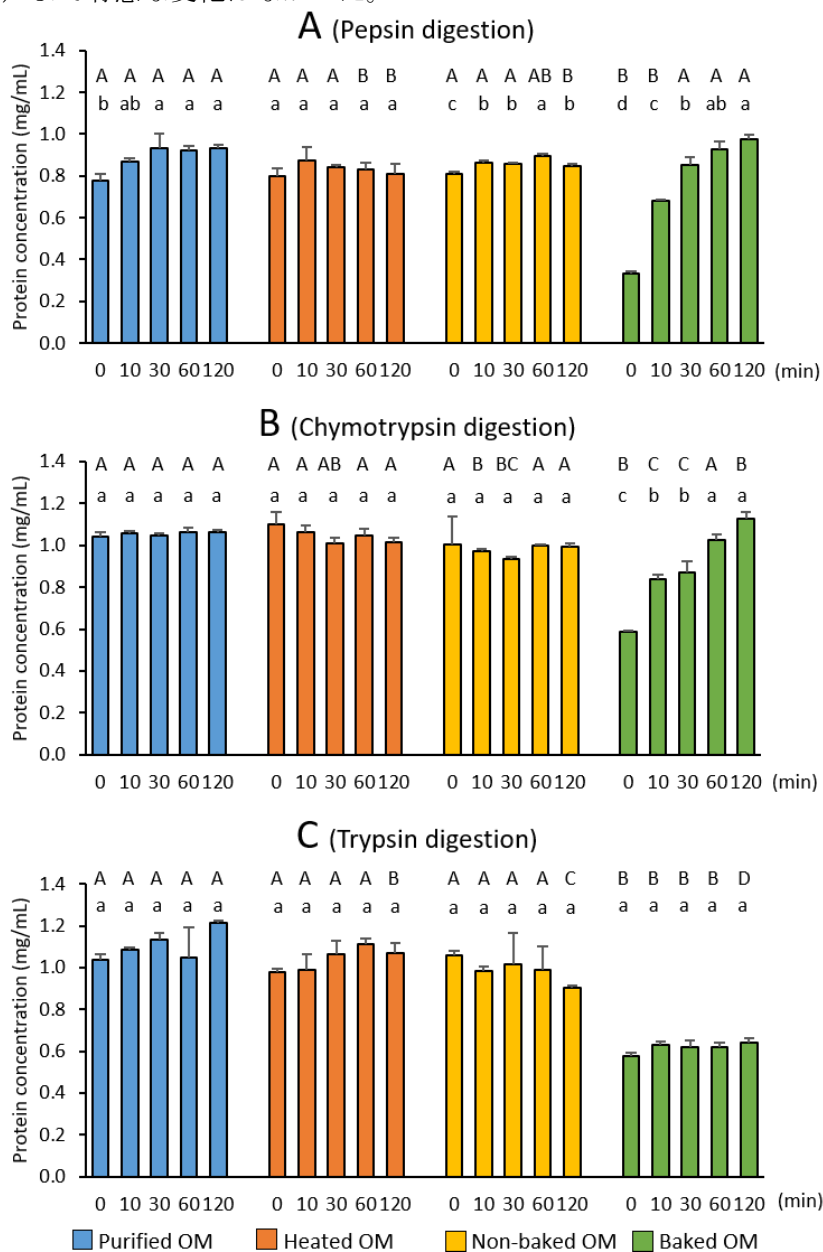


Fig. 4. Protein concentrations in Sup. after digestion.

Protein concentrations in Sup. after pepsin digestion (A), chymotrypsin digestion (B), and trypsin digestion (C) were determined by the Lowry method. Data are presented as mean \pm SE. Significant differences in protein concentrations were determined by the Tukey method of one-way ANOVA. Significant differences between samples ($p < 0.05$) are indicated by different capital letters (A, B, C and D), and significant differences within samples ($p < 0.05$) by different small letters (a, b, c and d).

Sup., supernatant.

2.3.3 単一酵素消化後のタンパク質組成と分解断片

各消化酵素による消化性は、SDS-PAGE およびイムノブロットにて解析した。試料は、未消化の消化 0 分、消化直後の消化 10 分、Sup.の塩溶性タンパク質濃度が同等となった消化 60 分を用いた。ペプシン消化では (Fig. 5A)、全ての Sup.のタンパク質が消化 10 分で分解され、20~30 kDa および低分子領域 (20 kDa 以下) でバンドが検出された。その後消化 60 分では、20~30 kDa のバンドはほとんど検出されず、低分子領域のバンドが検出された。イムノブロットの結果を比較すると、精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM では、SDS-PAGE にて確認されたほとんどの分解断片が検出された。一方焼成 OM では、消化 60 分でタンパク質濃度が他の試料と同程度となったが、イムノブロットにおけるバンドは薄く検出された。特に、低分子領域の分解断片は、焼成 OM ではほとんど検出されなかった。また、焼成 OM における Ppt.では、未分解物が検出されたが、Sup.と同様に経時的に薄くなった (Fig. 5B)。

キモトリプシン消化では (Fig. 6A)、全ての Sup.のタンパク質がペプシン消化と同様に消化 10 分で分解され始めたが、ペプシン消化と異なり未分解物が検出された。Sup.の結果を比較すると、ペプシン消化と同様に、焼成 OM では低分子領域の分解断片がほとんど検出されなかった。また焼成 OM は、ペプシン消化と同様に Ppt.で未分解物が検出されたが、経時的に分解された (Fig. 6B)。

トリプシン消化では、全ての Sup.および Ppt.のバンドパターンは消化 0 分から変化がなかった (Fig. 7A, B)。

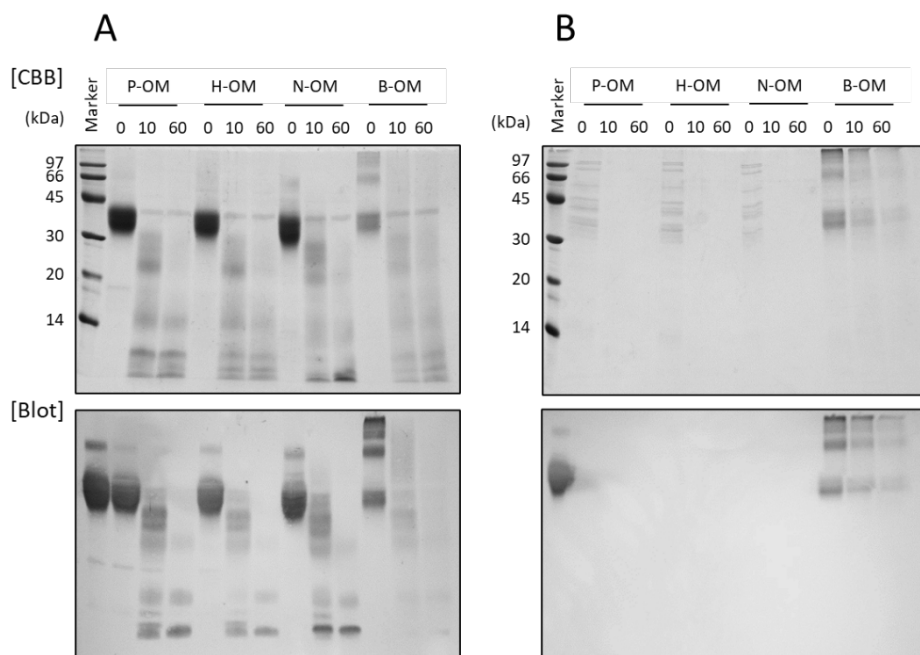


Fig. 5. Digestibility of OM in samples after pepsin digestion.

Digestibility by pepsin in Sup. (A) and Ppt. (B) of each sample was evaluated by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting.

Marker, molecular weight marker (CBB) or OM (blot); P-OM, purified OM; H-OM, heated OM; N-OM, non-baked OM; B-OM, baked OM; 0, 10, 60, digestion time (min); Sup., supernatant; Ppt., precipitate.

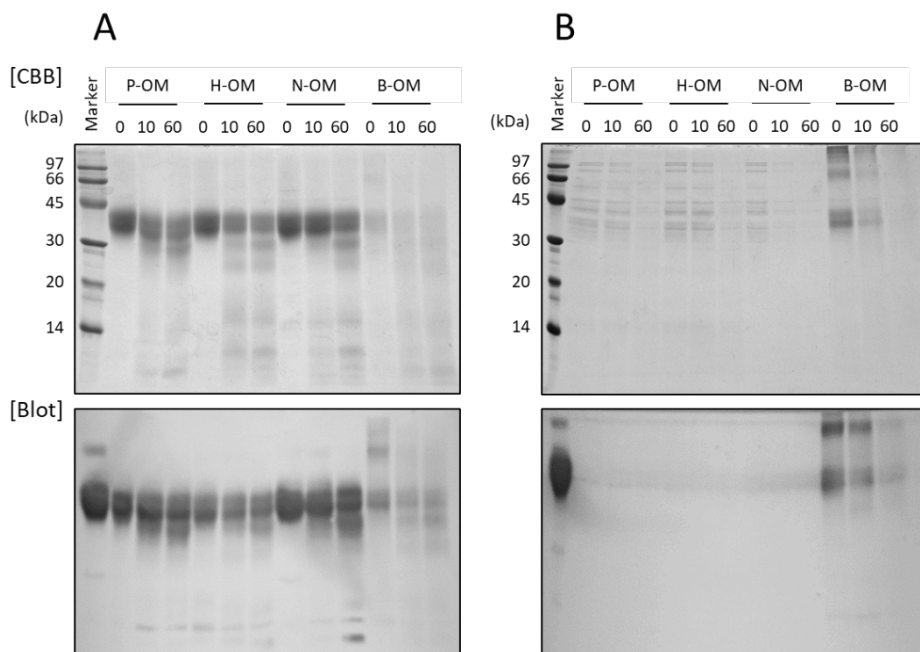


Fig. 6. Digestibility of OM in samples after chymotrypsin digestion.

Digestibility by chymotrypsin in Sup. (A) and Ppt. (B) of each sample was evaluated by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting.

Marker, molecular weight marker (CBB) or OM (blot); P-OM, purified OM; H-OM, heated OM; N-OM, non-baked OM; B-OM, baked OM; 0, 10, 60, digestion time (min); Sup., supernatant; Ppt., precipitate.

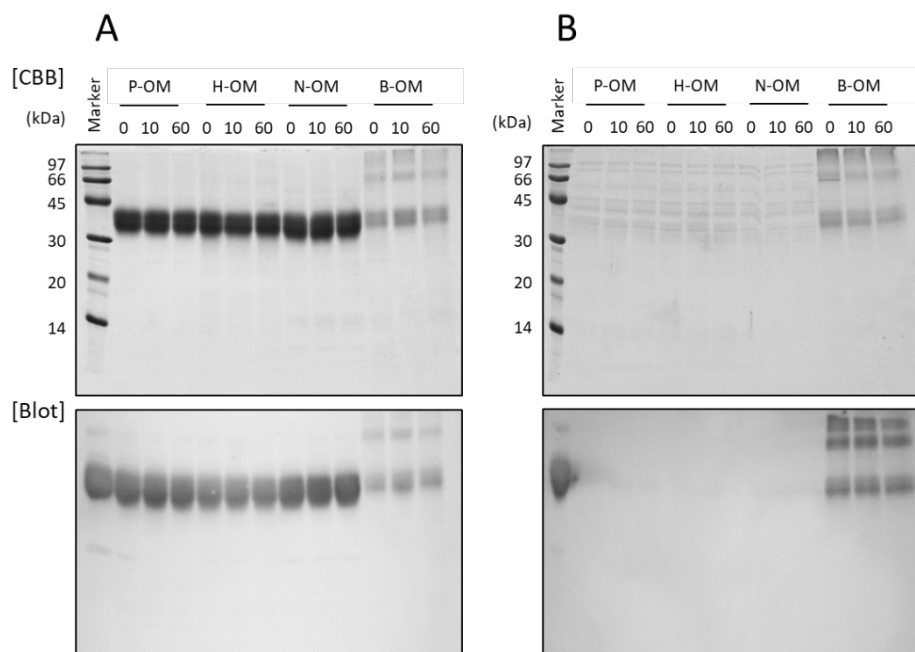


Fig. 7. Digestibility of OM in samples after trypsin digestion.

Digestibility by trypsin in Sup. (A) and Ppt. (B) of each sample was evaluated by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting.

Marker, molecular weight marker (CBB) or OM (blot); P-OM, purified OM; HOM, heated OM; N-OM, non-baked OM; B-OM, baked OM; 0, 10, 60, digestion time (min); Sup., supernatant; Ppt., precipitate.

2.3.4 胃・小腸モデル消化後のタンパク質濃度

Sup.のタンパク質濃度をLowry法にて定量した。胃消化において (Fig. 8A)、精製 OM では、消化 0 分 (4.51 ± 0.12 mg/mL) から消化 10 分 (6.21 ± 0.06 mg/mL) で有意差がみられたが ($p < 0.05$)、増加率は 37.7%であり、その後消化 120 分まで変化しなかった。加熱 OM および未焼成 OM においても、同様の傾向が確認された。一方で、焼成 OM では、消化 0 分 (0.89 ± 0.04 mg/mL) から消化 60 分 (5.91 ± 0.10 mg/mL) にかけて有意に増加し ($p < 0.05$)、増加率は 567%であった。その後も増加したが、消化 60 分の時点で他の試料と同程度のタンパク質濃度まで達した。

胃 10 分消化物を用いた小腸消化において (Fig. 8B)、精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM は、ほとんど経時的な変化はみられなかった。一方で、焼成 OM は消化 0 分 (0.64 ± 0.01 mg/mL) から消化 120 分 (0.74 ± 0.01 mg/mL) にかけて有意に増加した (増加率 15.6%、 $p < 0.05$)。

胃 60 分消化物を用いた小腸消化において (Fig. 8C)、精製 OM、加熱 OM、および未焼

成 OM は、ほとんど経時的な変化はみられなかった。一方で、焼成 OM は消化 0 分 (0.94 ± 0.01 mg/mL) から消化 120 分 (1.01 ± 0.01 mg/mL) にかけて有意に増加した (増加率 7.4%、 $p < 0.05$)。

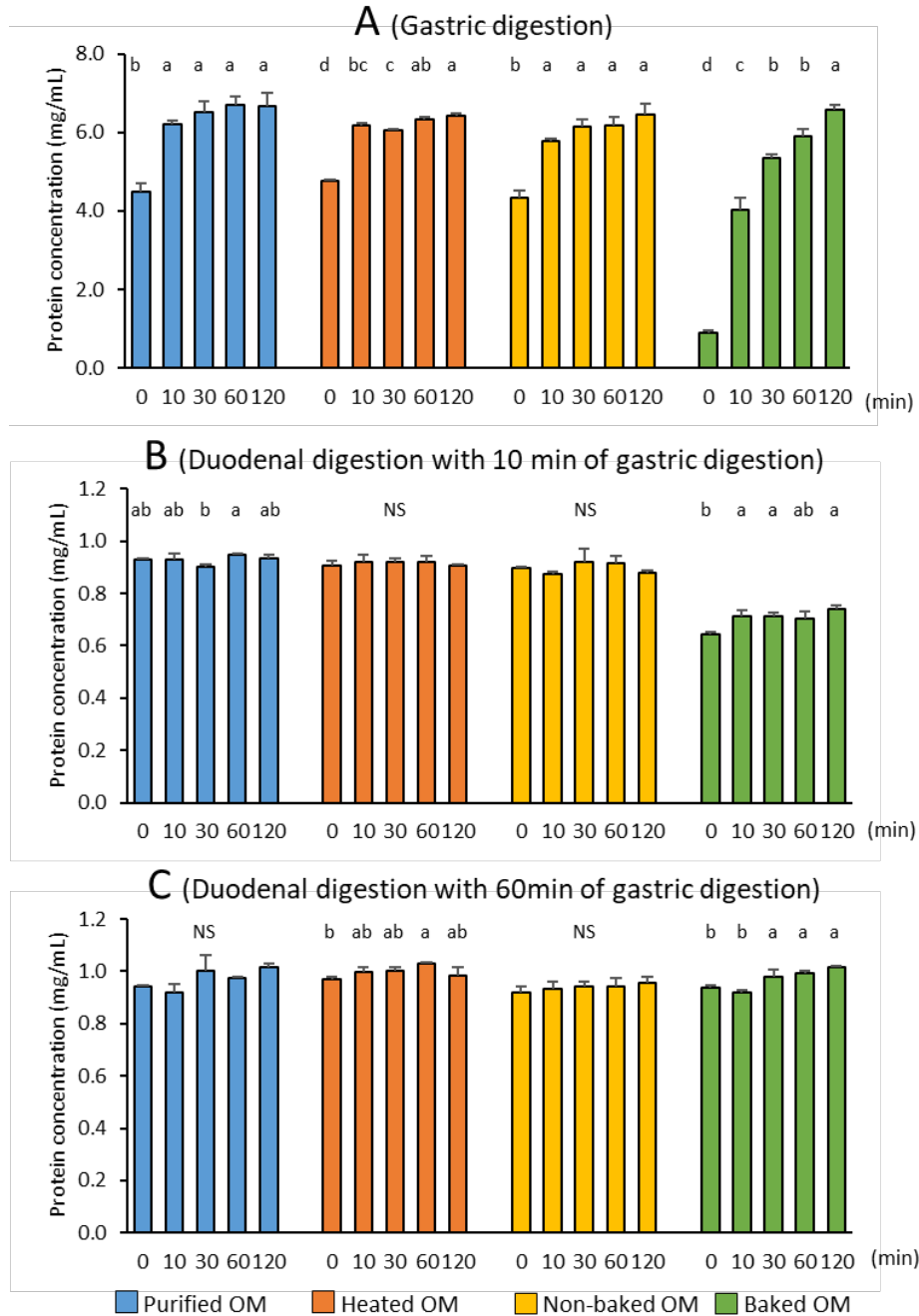


Fig. 8. Protein concentrations in Sup. after gastric and duodenal digestion.

Protein concentrations in the Sup after gastric digestion model and duodenal model were determined using the Lowry method. Results are presented as mean \pm SE. Significant differences were analyzed using Tukey's method of one-way ANOVA. Significant inter sample differences ($p < 0.05$) are indicated by different lowercase letters (a, b, c, and d).

OM, ovomucoid; Sup., supernatant.

2.3.5 胃・小腸モデル消化後のタンパク質組成と分解断片

胃・小腸モデルによる消化性は、SDS-PAGE およびイムノブロットにて解析した。胃消化では (Fig. 9A)、Sup.のタンパク質が消化 10 分の時点で分解され、20~30 kDa および低分子領域 (20 kDa 以下) でバンドが検出された。その後消化 60 分では、20~30 kDa のバンドはほとんど検出されなかった。イムノブロットの結果を比較すると、精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM では、SDS-PAGE にて確認されたほとんどの分解断片が検出された。一方、焼成 OM では、20~30 kDa の分解断片は検出されたが、低分子領域の分解断片は検出されなかった。また、焼成 OM においては、Ppt.に未分解物が検出されたが、Sup.と同様に経時的に分解されていた。

胃 10 分消化物を用いた小腸消化では (Fig. 9B)、Sup.および Ppt.で小腸消化 120 分まで胃消化 10 分の分解断片と同様のバンドパターンが検出された。しかし、焼成 OM においては、Ppt.の未分解物が 120 分の時点では薄く検出された。また、イムノブロットの結果において、胃消化と同様に、焼成 OM では 20~30 kDa の分解断片は検出されたが、低分子領域の分解断片がほとんど検出されなかった。

胃 60 分消化物を用いた腸消化では (Fig. 9C)、胃 10 分消化物と同様に、小腸消化 120 分まで胃消化 60 分の分解断片と同様のバンドパターンが検出された。イムノブロットの結果において、精製 OM、加熱 OM、および未焼成 OM では分解断片が検出された。一方、焼成 OM では分解断片がほとんど検出されなかった。

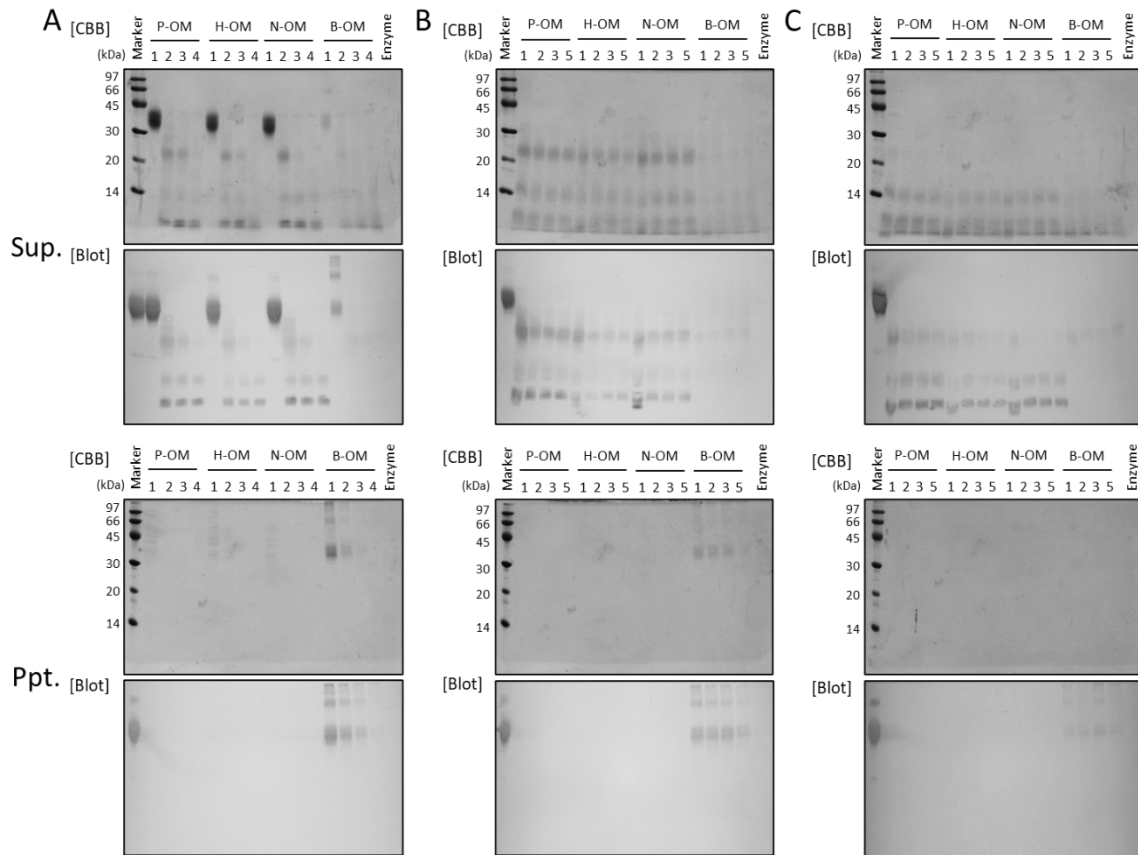


Fig. 9. Digestibility of OM in samples after gastric and duodenal digestion.

Digestibility in gastric digestion (A) and duodenal digestion with 10 min (B) and 60 min (C) of gastric was evaluated by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting. SDS-PAGE and blotting at the top of each result indicate the Sup., and SDS-PAGE and blotting at the bottom indicate the Ppt..

Marker, molecular weight marker (CBB) or OM (blot); P-OM, purified OM; H-OM, heated OM; N-OM, non-baked OM; B-OM, baked OM; 1, 0 min digestion; 2, 10 min digestion; 3, 30 min digestion; 4, 60 min digestion; 5, 120 min digestion; Sup., supernatant; Ppt., precipitate.

2.4 考察

これまでの研究で、OM が不溶化しているベイクドエッグのアレルゲン性は、生卵やゆで卵より低いことが明らかになっている (Lemon-Mulé ら, 2008; Lieberman ら, 2012)。この機序として、不溶化した OM は小麦タンパク質とともに大きな凝集体を形成しているために、消化酵素による影響を受けにくく、不溶化した状態で排泄されると考え、本章では、性状が変化した OM の消化性を単一酵素による消化および胃・小腸モデル消化実験で解析した。

単一消化酵素による消化および胃・小腸モデル消化にて消化性を解析した結果、焼成 OM における Sup.のタンパク質濃度が、その他の試料と同程度となり、不溶化した OM は経時的に可溶化した。したがって、仮説とは反対に、不溶化した OM は消化酵素による影響を受け、経時的に可溶化し吸収されている可能性が考えられた。一方で、Sup.のタンパク質濃度が同程度であったが、焼成 OM 試料から検出された OM の分解断片は他の試料より少なく、抗体結合能が低下することが明らかとなった。以上の結果から、小麦タンパク質と OM 間で SH-SS 交換反応を主とする相互作用をとることで精製 OM や加熱 OM と異なる立体構造をとり、消化酵素の影響を受けやすく、より低分子化され可溶化したと考えられる。しかし、消化後も未分解の OM が焼成 OM の Ppt.から一部検出された。これは、焼成 OM は精製 OM および加熱 OM に比べ、最終的に低分子化するが、それまでの消化に時間を要する可能性がある。前述した小麦タンパク質と OM 間の相互作用により、焼成 OM は不溶化の過程で OM が小麦タンパク質中に取り込まれている可能性があり、それにより周りの小麦タンパク質が先に消化されることで、OM の消化が遅くなったと考えられる。したがって、経時的に可溶化し吸収される可能性に加え、一部は不溶化した状態で吸収されずに、体外に排出される可能性も考えられる。

単一消化酵素消化において、60 分後の消化酵素による分解の程度に差がみられ、ペプシン処理では未分解物が検出されず、キモトリプシン処理では消化されているが未分解物が残存し、トリプシン処理では全く分解されないという特徴がみられた。トリプシン処理では、OM が全く分解されなかったが、OM はトリプシンと結合して不活性複合体を形成し、トリプシンを阻害するトリプシンインヒビターとして作用することが報告されている (Zhou ら, 1989)。その作用によってトリプシンが不活性化され、OM が消化されなかったと考えられる。また、マメ科植物のタンパク質にもトリプシンインヒビターの作用があることがわかっているが、加熱処理によってトリプシンインヒビター活性部位が破壊され阻害活性が低下

することが明らかとなっている (Kagam ら, 1987)。焼成 OM も加熱による性状変化によりトリプシンインヒビター活性部位が破壊され、阻害活性が低下することを期待したが同様の効果は得られなかった。ペプシンは疎水性アミノ酸の N 末端側および芳香族アミノ酸の C 末端側、キモトリプシンは芳香族アミノ酸の C 末端側を選択的に加水分解する特徴を持つ。また、トリプシンインヒビター作用によって、キモトリプシンの活性が低下する可能性も報告されている (池中と小出, 1970)。加水分解部位の違いやトリプシンインヒビター作用の干渉によって、ペプシンとキモトリプシン処理による消化度合いの違いが起きたと推察される。また、胃・小腸モデル消化でも似た結果が得られ、胃消化では経時的に消化されていたが、小腸消化ではバンドパターンに変化がみられず消化されていなかった。これらのことから、胃消化の段階で消化されなかった OM は小腸消化では消化されにくいことが考えられ、胃での消化が不十分だった場合 OM のアレルゲン性が保持される可能性が考えられる。

本章の結果から、焼成することで不溶化した OM は、消化性が向上し（分解断片の低分子化）抗体結合能が低下することが明らかとなった。また、分解断片は低分子化するが、消化後も一部は不溶化した状態で残存することも明らかとなった。しかし、本章の結果のみでは、吸収性の検討を行うことはできない。したがって次章では、動物実験により試料投与後の経時的な血中 OM 量、消化管および糞中 OM、並びにアレルギー症状の解析を行い、消化性の変化および吸収性の変化がアレルギー症状誘発に寄与しているか検討した。

第3章 性状変化オボムコイドの消化・吸収性とアレルギー症状誘発の解析 (*in vivo*)

3.1 目的

OM が不溶化しているベイクドエッグはアレルゲン性が低下するが、このアレルゲン性低下の機序に関しては明らかになっていない。第2章では性状の異なる OM の消化性に焦点を当て解析を行った。その結果、焼成により不溶化した OM は、消化を受けることで経時的に可溶化したことに加えて、消化性が向上し（分解断片の低分子化）、抗体結合能が低下することが明らかとなった。また、焼成 OM は消化性が向上していたが、一部は不溶化した状態で残存し、消化に時間を要することも明らかとなった。したがって、不溶化した OM は経時的に可溶化し、不溶化していない OM よりも少しずつ体内へ吸収されることに加え、吸収後の分解断片をアレルギー症状誘発に関与する抗体が認識しにくいことで、アレルギー症状誘発が抑制される可能性がある。また、一部は不溶化したまま残存することで体外に排泄され、症状誘発閾値まで達しないことで、アレルギー症状誘発が抑制される可能性が考えられた。しかし現段階では、この消化性の変化が症状誘発に影響を与えているか、その後の吸収性の違いが影響を与えているか不明である。

そこで本章では、OM アレルギーモデルマウスを用いた *in vivo* 試験により、試料投与後の経時的な血中 OM 量、消化管および糞中 OM の状態を解析し、焼成 OM の消化・吸収性を明らかにすることを目的とした。

3.2 方法

3.2.1 材料

実験動物の飼料には、固形 CE-2（日本クレア株式会社）を使用した。感作のために使用した水酸化アルミニウムゲル（Aluminium hydroxide gel、Alum）は、富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。

HRP-linked anti-mouse IgE は Bethyl Laboratories（Montgomery, TX, USA）から購入した。

3.2.2 OM 試料

第 2 章で作製したものを使用した。

3.2.3 動物実験

本研究の動物実験は、名古屋学芸大学動物実験委員会により承認され（承認番号 140 および 140-1）、名古屋学芸大学動物実験規定に従い行った。実験動物は、温度 $23.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ で湿度 $50 \pm 5\%$ に保たれた部屋で、12 時間の明暗サイクル（8:00-20:00）にて飼育した。また、水と CE-2 は自由摂取であった。

本研究では、6 週齢の雌 BALB/c マウス（ $n=38$ ）を日本エスエルシー株式会社から購入し、Fig. 10 のように実験を行った。アレルギー群のマウス（ $n=30$ ）は、5 mg OM/PBS 100 μL と alum 100 μL を 2 週間おきに 3 回腹腔内投与することで OM に感作させた。また、非アレルギー群（ $n=8$ ）には、PBS 100 μL と alum 100 μL を腹腔内投与した。OM に対する感作は、間接 ELISA 法を用いて血清 OM 特異的 IgE（sIgE）抗体価を測定し評価した（Fig. 11）。OM 試料の経口負荷試験前、マウスは 12 時間絶食（水は自由摂取）させた。経口負荷試験として PBS、精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 試料（60 mg）を経口投与し、アレルギー症状の評価と OM の消化・吸収性を解析した。

アレルギー症状は、直腸温測定（0、30、60、90、および 120 分）およびアレルギー症状スコア評価（0、30、60、90、および 120 分）にて評価した。直腸温は、PBS、精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM の経口投与前と投与後 30、60、90、および 120 分で測定し、投与前後の直腸温の変化量で評価した。アレルギー症状スコアの詳細は、Table 1 に示した（Li ら、2000）。また経口負荷試験時に、血液採取（0、30、60、90、および 120 分）、糞便採取（120 分間）、腸管内容物採取（120 分）を行った。腸管内容物は、イソフルラン

麻酔下で全血採取のための心臓穿刺（安楽死）後に、マウスから腸管を切除して採取した。腸管は胃、小腸、盲腸、および大腸に区分し、小腸は6分割、大腸は2分割した。腸管内容物はPBSで洗浄して回収し、遠心分離（10000×g、4℃、10分）後上清を回収しSup.とした。さらに、残渣に2-ME溶液を加えて不溶性タンパク質を抽出しPpt.とした。本研究では、経口投与後120分以内に死亡したマウス（精製OM群2匹）は解析対象から除外した。

さらに同様のプロトコールで実験を行い（n=40）、投与後60分の腸管内容物および糞便も解析した。

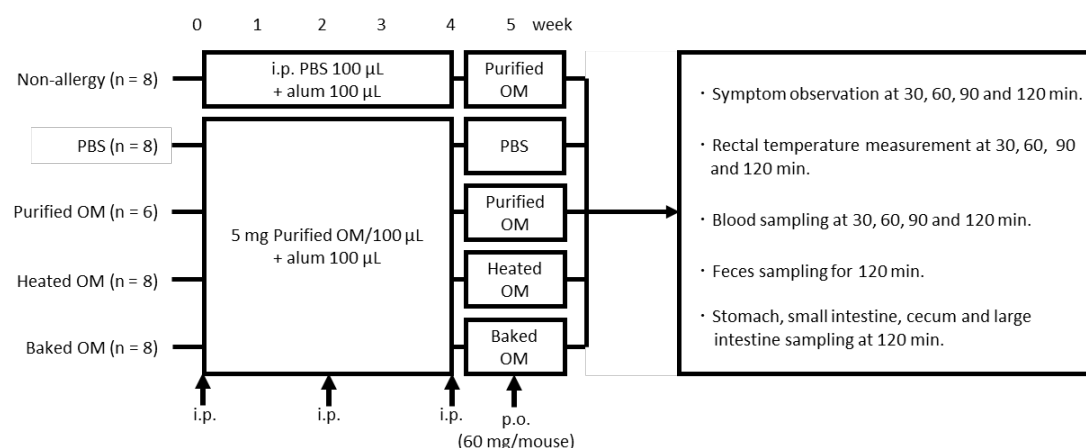


Fig. 10. Animal experiment protocol.

Intraperitoneal administration (purified OM 5 mg) was performed at 0, 2, and 4 weeks (i.p.). Oral administration (purified, heated, and baked OM 60 mg) for allergy evaluation was performed at 5 weeks (p.o.). Each OM sample was orally administered to the mice, followed by a measurement of rectal temperature (at 30, 60, 90, and 120 min), an assessment of allergic symptom scores (at 30, 60, 90, and 120 min), and the collection of blood (at 30, 60, 90, and 120 min), fecal (for 120 min), and intestinal contents (at 120 min). PBS, phosphate-buffered saline; i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration; OM, ovomucoid.

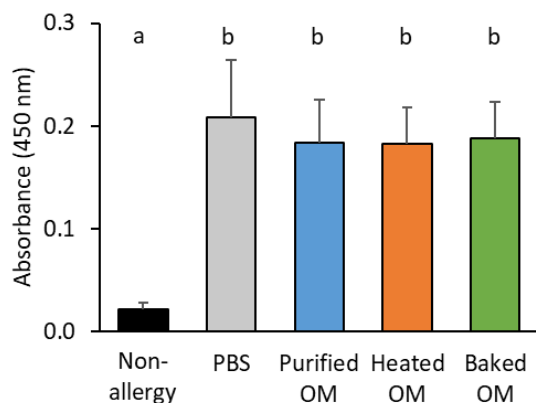


Fig. 11. OM-sIgE levels in the mouse model of OM allergy.

Results are presented as mean ± SE. Significant differences were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different lowercase letters (a, b).

Table 1. Allergy symptoms

Score	Symptoms
0	no symptoms
1	scratching and rubbing around the nose and head
2	puffiness around the eyes and mouth, diarrhea, pilar erecti, reduced activity and decreased activity with increased respiratory rate
3	wheezing, labored respiration and cyanosis around the mouth and the tail
4	no activity after prodding or tremor and convulsion
5	death

3.2.4 間接 ELISA

96 穴マイクロプレートに、精製 OM (PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整) を各ウェルに 100 μL 加え、4°C で一晩固相化した。PBST で 3 回洗浄後、1% BSA/PBST を各ウェルに 200 μL 加え、室温で 1 時間静置した。静置後、マウス血清 (PBS で 10 倍希釈) を各ウェルに 100 μL 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、HRP-linked anti-mouse IgE (1% BSA/PBST で 1000 倍希釈) を各ウェルに 100 μL 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で 2 回、次いで PBS で 2 回洗浄後、TMB を各ウェルに 100 μL 加え発色させた。発色後 1 N 塩酸を各ウェルに 100 μL 加え反応を停止させた。その後、450 nm の吸光度を測定した。

3.2.5 SDS-PAGE

第 2 章と同様に行った。本章では、各抽出試料は希釈せずに使用した。試料は 5 μL /レーンずつ供した。

3.2.6 イムノブロット

第 2 章と同様に行った。

3.2.7 サンドイッチ ELISA

第 2 章と同様に行った。本章では、PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した anti-OM IgG poly を用いて固相化した。試料には、検量線に収まる範囲で希釈したマウス血清を用いた。また検量線には、精製 OM 溶液を用いた。その後の工程では、1% BSA/PBST で 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した biotin-linked anti-OM 7D および 1% BSA/PBS で 10000 倍希釈した POD-conjugate

streptavidin を使用した。

3.2.8 統計解析

統計解析は EZR version 1.54 (Kanda, 2013) を用いて行い、測定値はすべて平均値 ±標準誤差で示した。平均値の差の検定には Kruskal-Wallis を行い、その後の Post-hoc 検定は Steel-Dwass を使用した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3.3 結果

3.3.1 OM 試料のアレルゲン性解析

OM アレルギーモデルマウスに OM 試料を経口投与後、120 分まで直腸温の測定およびアレルギー症状の評価を行った。30 分後の直腸温の変化量は、精製 OM 群で $-1.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、加熱 OM 群で $-1.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ となり、非アレルギー群 ($0.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) より有意に大きく低下した (Fig. 12A; $p < 0.05$)。また、60 分後においても、精製 OM 群で $-1.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、加熱 OM 群で $-0.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ となり、非アレルギー群 ($0.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) と比較して有意に大きく低下した (Fig. 12A; $p < 0.05$)。一方、焼成 OM 群においても直腸温は低下したが (30 分: $-0.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、60 分: $-0.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$)、非アレルギー群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 12A)。

30 分後のアレルギー症状スコアは、精製 OM 群で 2.6 ± 0.4 、加熱 OM 群で 2.3 ± 0.2 となり、非アレルギー群 (0.0 ± 0.0) より有意に高値を示した (Fig. 12B; $p < 0.05$)。また、60 分後は精製 OM 群で 2.4 ± 0.3 、加熱 OM 群で 1.9 ± 0.1 、90 分後は精製 OM 群で 1.9 ± 0.6 、加熱 OM 群で 0.8 ± 0.2 となり、90 分後まで非アレルギー群 (60 分: 0.0 ± 0.0 、90 分: 0.0 ± 0.0) より有意に高値を示した (Fig. 12B; $p < 0.05$)。一方、焼成 OM 群のアレルギー症状スコアも上昇したが (30 分: 0.9 ± 0.3 、60 分: 0.9 ± 0.3 、90 分: 0.3 ± 0.2)、非アレルギー群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 12B)。

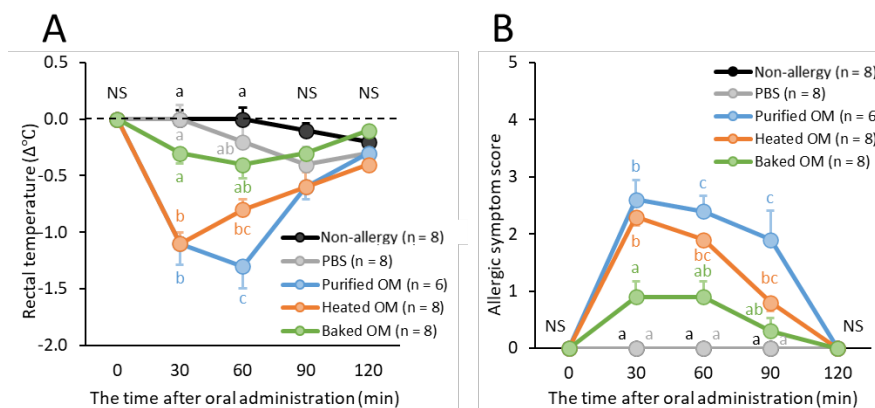


Fig. 12. Changes in rectal temperature and allergic symptom score.

Rectal temperature change (A) and allergic symptom score (B) were evaluated for 120 min. The allergic symptom scores were as follows: 0, no symptoms; 1, scratching around the nose and head; 2, diarrhea, pilar erecti, and reduced activity; 3, wheezing and cyanosis around the mouth and tail; 4, no activity after prodding; and 5, death. Results are presented as mean \pm SE. Significant differences were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Significant inter group differences ($p < 0.05$) are indicated by different lowercase letters (a, b, and c). The values in Fig.5 (0, 10, 30, 60, and 120) indicate the time after oral administration (min).

PBS, phosphate-buffered saline; OM, ovomucoid.

3.3.2 *In vivo*における消化性解析

OM アレルギーモデルマウスに OM 試料を経口投与し、60 および 120 分時点の消化管内容物、ならびに 120 分まで採取した糞を SDS-PAGE およびイムノブロットにて解析した。60 分の消化管内容物を解析した結果、精製 OM および加熱 OM 群は、小腸の Sup.に OM が分解断片として検出された (Fig. 13A, B)。一方、焼成 OM 群は、精製 OM および加熱 OM と同様に小腸の Sup.にわずかに分解断片が検出されたが、Ppt.から未分解の OM が検出された (Fig. 13C)。120 分の消化管内容物を解析した結果、すべての群において Sup.および Ppt.から OM は検出されなかった (Fig. 14)。

また糞中の OM も消化管内容物と同様に解析したが、すべての群において Sup.および Ppt.から OM は検出されなかった (Fig. 15)。

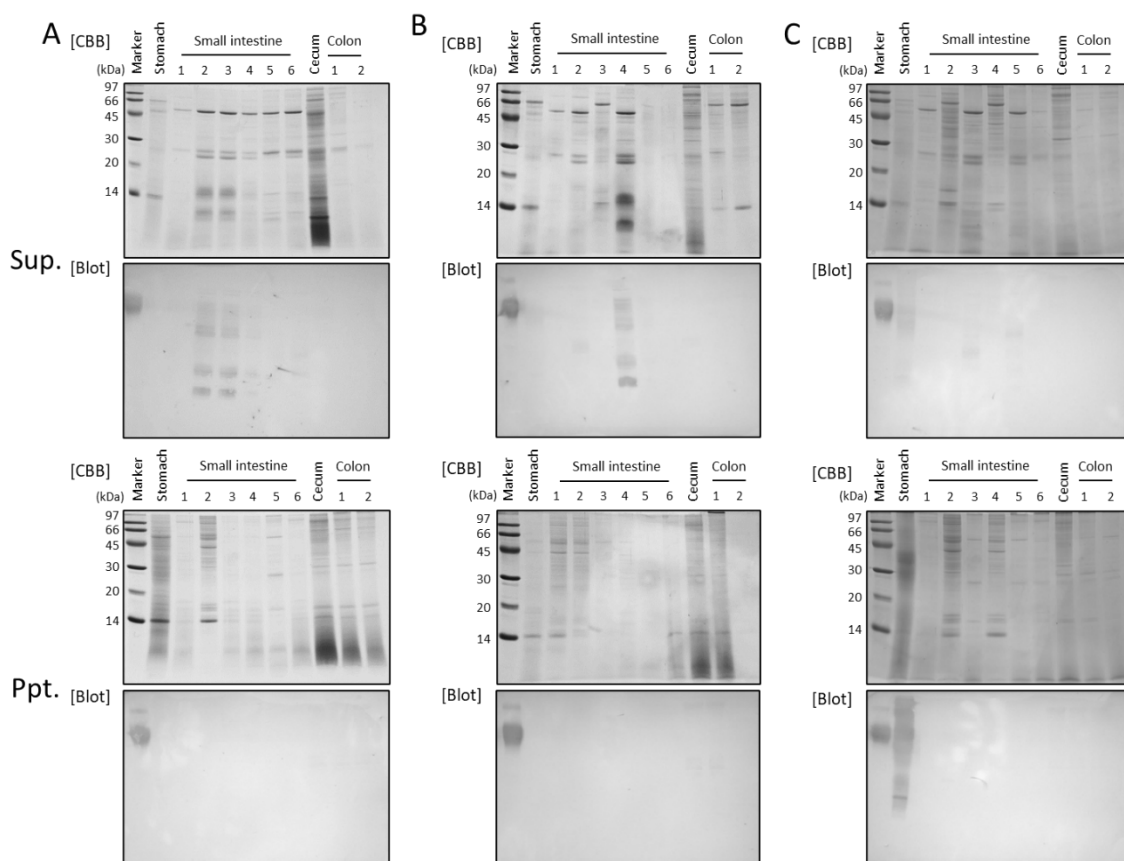


Fig. 13. *In vivo* digestibility of OM at 60 min.

The digestibility of purified OM (A), heated OM (B), and baked OM (C) at 60 min was evaluated using SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting. SDS-PAGE and blotting at the top of each result indicate the Sup, and SDS-PAGE and blotting at the bottom indicates the Ppt. The value of lanes (1-6) indicates the part of the intestine, lower values indicate the upper part of the intestine.

Marker, molecular weight marker (CBB) or OM (blot); Sup., supernatant; Ppt., precipitate.

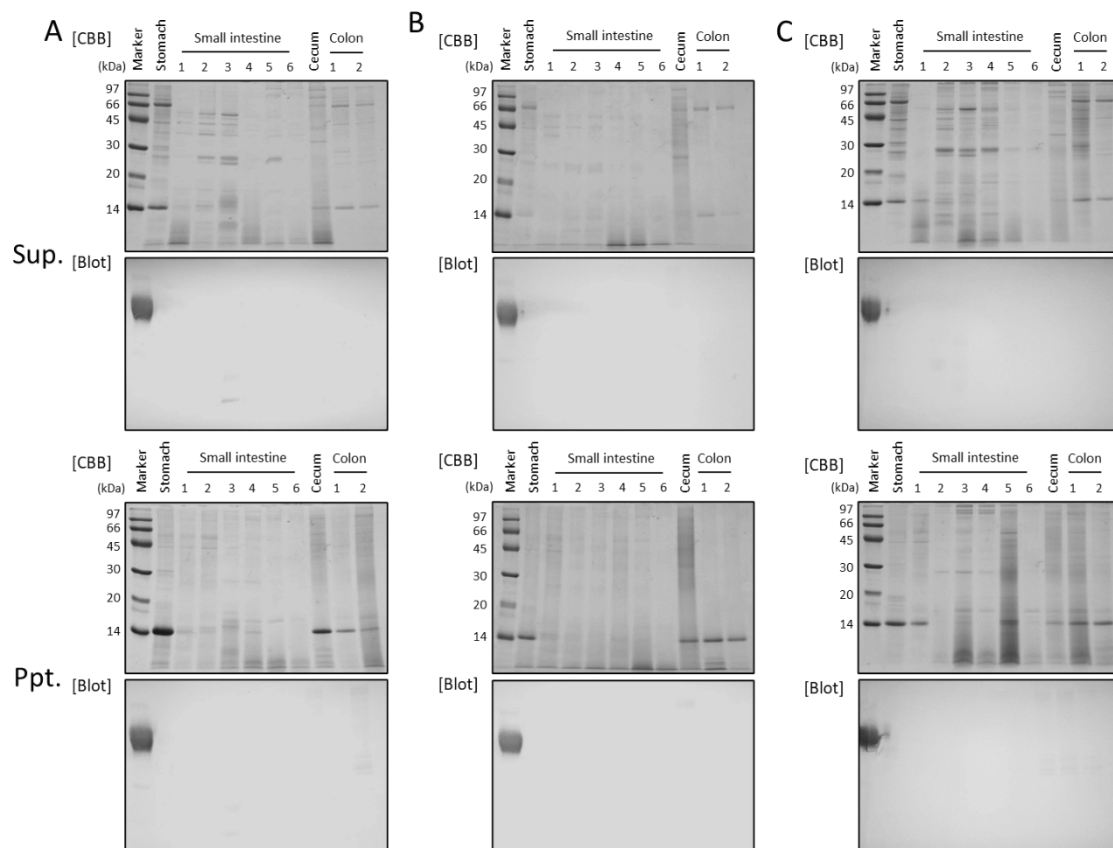


Fig. 14. *In vivo* digestibility of OM at 120 min.

The digestibility of purified OM (A), heated OM (B), and baked OM (C) at 120 min was evaluated using SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting. SDS-PAGE and blotting at the top of each result indicate the Sup, and SDS-PAGE and blotting at the bottom indicates the Ppt. The value of lanes (1-6) indicates the part of the intestine, lower values indicate the upper part of the intestine.

Marker, molecular weight marker (CBB) or OM (blot); Sup., supernatant; Ppt., precipitate.

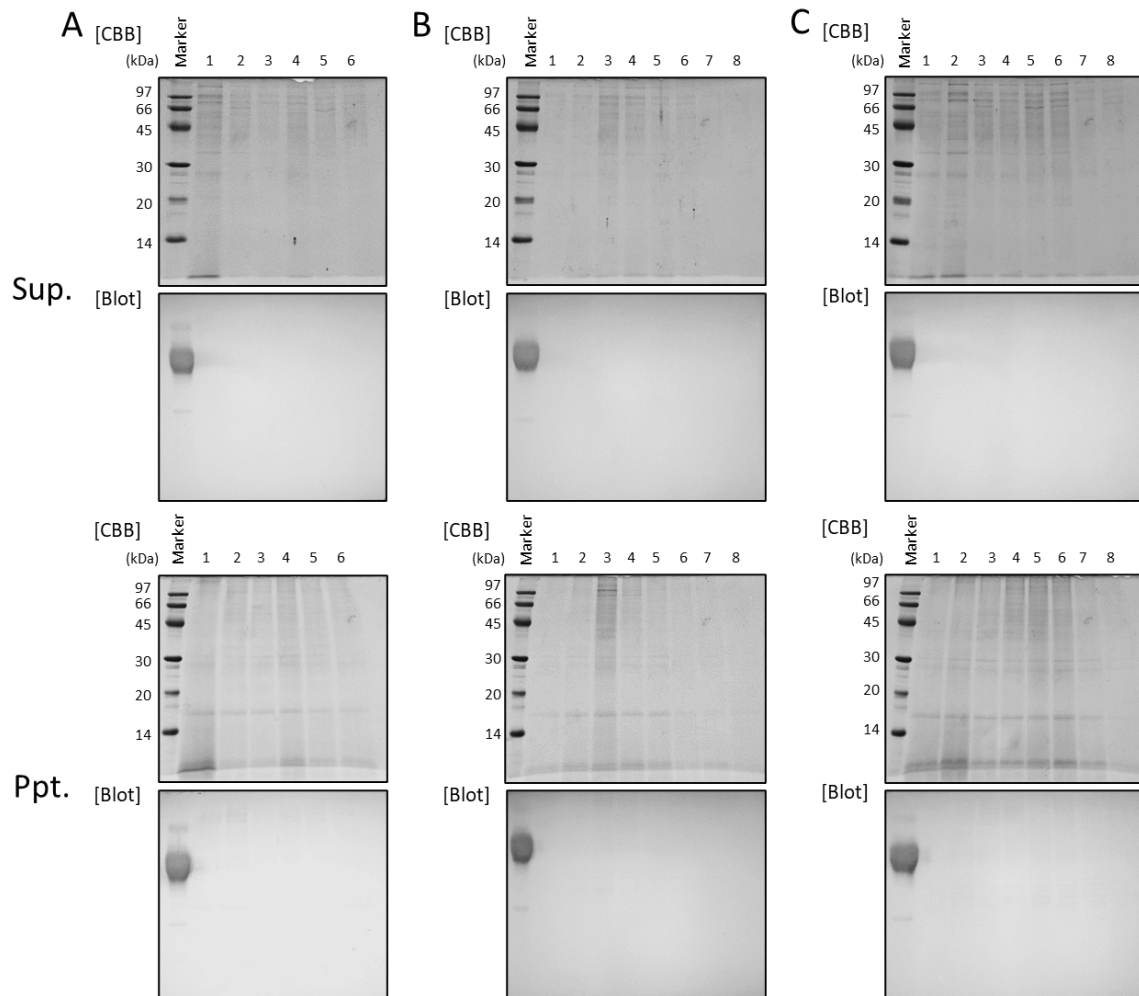


Fig. 15. Detection of OM in feces.

Feces from the purified OM group (A), heated OM group (B), and baked OM group (C) were evaluated using SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and immunoblotting. SDS-PAGE and blotting at the top of each result indicate the Sup, and SDS-PAGE and blotting at the bottom indicate the Ppt. The value of lanes (1-8) indicates the different mice.

Marker, molecular weight marker (CBB) or OM (blot); Sup, supernatant; Ppt, precipitate.

3.3.3 *In vivo*における吸収性解析

120分まで採取した血清中のOM濃度は、サンドイッチELISAにて定量した。血中OM濃度を定量した結果、OMを投与した精製OM、加熱OM、および焼成OM群において30分以降の血中OM濃度が増加した (Fig. 16)。その中で焼成OM群がほとんどの採血時点で最も低値を示した。また、area under the curve (AUC) を比較した結果、精製OMで 90.7 ± 36.3 、加熱OMで 52.4 ± 34.2 、焼成OM群で 12.6 ± 8.6 となり、焼成OM群が最も低値を示した。しかし、各群間で有意な差はみられなかった。

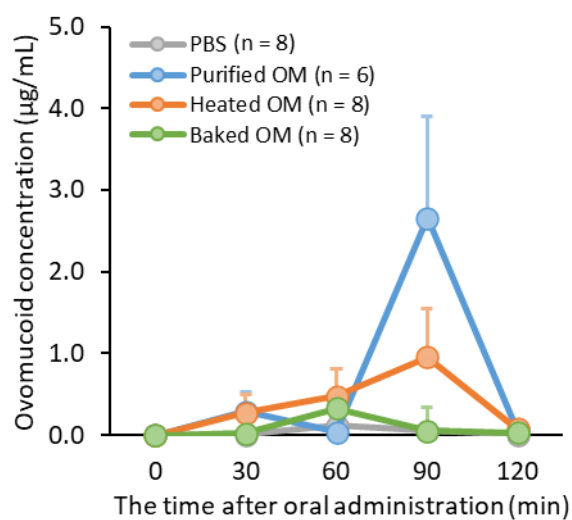


Fig. 16. *In vivo* absorptivity of OM.

The absorptivity of OM was evaluated by sandwich ELISA using the serum of mice with OM allergy. The values in Fig.16 (0, 10, 30, 60, and 120) indicate the time after oral administration (min).

PBS, phosphate-buffered saline; OM, ovomucoid.

3.4 考察

第2章の結果より、不溶化した OM は経時的に可溶化することが明らかとなり、この時、次の2つがアレルギー症状誘発の抑制に関与していると考えられた。1つ目は、消化性が向上し、抗体に認識されないほどの分子量にまで消化され吸収されること、2つ目は消化に時間を要し、少しずつ体内へ吸収され、一部は不溶化した状態で体外へ排泄されることである。そこで本章では、*in vivo* 試験で性状が異なる OM の消化・吸収性を解析した。

OM アレルギーモデルマウスを用いて精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM のアレルギー性を解析した結果、精製 OM および加熱 OM 群で有意な直腸温の低下およびアレルギー症状スコアの上昇がみられた。一方、焼成 OM 群でも直腸温の低下およびアレルギー症状スコアの上昇がみられたが、有意な差はみられなかった。これらのことから、焼成 OM はアレルギー症状が抑制されており、これまでの臨床研究と同様の結果が得られた (Lemon-Mulé ら, 2008; Lieberman ら, 2012)。

In vivo 試験にて精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM の消化性を解析した結果、消化60分の精製 OM および加熱 OM 群は、小腸の Sup. に OM が分解断片として検出された。一方、焼成 OM 群も精製 OM および加熱 OM と同様に小腸の Sup. で分解断片が検出されたが、Ppt. から未分解の OM が検出された。また、消化120分では、全群で OM は消化管内で検出されず、糞中からも OM は検出されなかった。これらのことより、焼成 OM は消化に時間を要するが、精製 OM および加熱 OM と同様に消化されることが明らかとなった。

吸収性を解析した結果、OM 投与群において30分以降の血中 OM 濃度が増加した。アレルギー症状は30分でピークに達し、OM 吸収量は90分でピークを示した。しかし、30分時点でも血中から OM が検出されており、これによりピークは異なるがアレルギー症状が誘発されたと考えられる。またこれらの結果は、アレルギー症状のピークと吸収のピークが完全には一致しない可能性を示唆している。また、AUC を比較した結果、焼成 OM 群が最も低値を示し、各 OM 試料は消化され吸収されていたが血中 OM 濃度に差がみられた。一方で、全群で消化120分の消化管内および糞中から OM が検出されなかったことから、OM は体内へ吸収されたと考えられる。しかし、抗体で認識できない分解断片の状態、体外へ排泄された可能性も考えられる。Matsuoka ら (2017) は、ラットにおける生卵とゆで卵の正味タンパク質利用率 (NPU) が100%に近い数値であることを報告している。このことから、精製 OM および加熱 OM より消化性が向上している焼成 OM が吸収されていない可能性は低く、低分子化による抗体結合能の低下が血中 OM 濃度の見かけ上の低下を引き起

こした可能性がある。したがって、焼成 OM は精製 OM および加熱 OM と異なる分解断片となっており、吸収された OM に IgE 抗体が結合しにくくなっている可能性が考えられる。また、焼成 OM も血中で検出されたことから、一部の焼成 OM は低分子化（抗体結合能が低下）していない状態で吸収されている。しかし、消化・吸収に時間がかかることで、少しずつ体内に取り込まれ症状誘発の閾値まで達することがなく、アレルギー症状誘発には至らない可能性が考えられる。

本章の結果から、精製 OM および加熱 OM は、消化されるが一定の分解断片が残存した状態で血中に吸収され、それらに IgE 抗体が結合することでアレルギー症状を誘発している可能性が示唆された。一方、焼成 OM は、消化に時間を要するが低分子の分解断片（抗体結合能が低下）まで消化された状態で吸収され、その分解断片に IgE 抗体が結合しにくいことでアレルギー症状が抑制されている可能性が示唆された。

本研究より、不溶化した OM は、消化性が変化し低分子化しやすくなることで、アレルギー症状誘発の抑制につながる可能性が示唆された。

第4章 不溶化オボムコイドの経口免疫療法に対する有効性の解析

4.1 目的

鶏卵アレルギーの OIT のほとんどは固ゆで卵白を用いているが、先に述べたようにアレルギー症状誘発のリスクがある。しかし、アレルゲン性が低下しているベイクドエッグを OIT に用いることで、リスクを低減した OIT を実施できる可能性がある。第3章より不溶化した OM は、大部分が抗体に認識されない分解断片として、一部は抗体に認識される分解断片として体内に吸収されており、OIT で重要な抗原刺激も起こることが考えられる。また鶏卵アレルギー患者は、症状誘発の経験から鶏卵自体や鶏卵の臭いを拒絶し、治療を中断してしまう患者も存在する。しかし、ベイクドエッグは鶏卵としての形状は無くなり、臭いもマスキングされており、そのような患者も治療を継続できる可能性があり、アレルギー症状誘発リスクの低減以外にも利点を有する。

性状が異なる OM を用いた OIT の比較に関する研究はほとんどない。Leonard ら (2012) は、OM アレルギーモデルマウスを用いた *in vivo* 試験において、精製 OM および加熱 OM を用いた OIT を実施した。その結果、精製 OM および加熱 OM とともに直腸温が低下せず、アレルギー症状が抑制されたことを報告している。しかしながら、全身性アナフィラキシーや肥満細胞の脱顆粒を抑制する IgA 抗体 (Strait ら, 2011)、Th2 応答を反映する IgG1 抗体および Th1 応答を反映する IgG2a 抗体 (Castan ら, 2020) の変動については解析されていない。また、それら T 細胞由来のサイトカインについても解析されておらず、精製 OM および加熱 OM を用いた OIT は、症状の抑制はみられたが詳細は不明である。また、ベイクドエッグモデルのような OM が不溶している試料を用いた OIT の研究はなく、症状抑制効果がみられるかどうか不明である。

そこで本章では、OM アレルギーモデルマウスに対して OM が不溶化している焼成 OM を用いた OIT を行い、低アレルゲン化したベイクドエッグを用いた OIT が有効か検討した。また、各種抗体価およびサイトカインの解析も行い、免疫応答についても検討した。

4.2 方法

4.2.1 材料

HRP-linked anti-mouse IgA、IgG1、および IgG2a は Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) より購入した。

4.2.2 OM 試料作製

第 2 章で作製したものを使用した。

4.2.3 動物実験

本研究の動物実験は、名古屋学芸大学動物実験委員会により承認され（承認番号 156）、名古屋学芸大学動物実験規定に従い実施した。実験動物の飼育環境は、第 3 章と同様である。

本研究では、6 週齢の雌 BALB/c マウス ($n = 35$) を日本エスエルシー株式会社から購入し、Fig. 17 のように実験を行った。アレルギー群のマウス ($n = 27$) は、5 mg OM/PBS 100 μ L と alum 100 μ L を 2 週間おきに 3 回腹腔内投与することで OM に感作させた。また、非アレルギー群 ($n = 8$) には、PBS 100 μ L と alum 100 μ L を腹腔内投与した。OM に対する感作は、間接 ELISA 法を用いて血清 OM-sIgE 抗体価を測定し評価した (Fig. 18)。最終腹腔内投与の 1 週間後から、毎日 1 回の OIT を 4 週間行った。一般的に用いられている OIT が抗原投与量を漸増させる手法であるため、5 週から 9 週にかけて徐々に抗原投与量を増加させた (1、2、および 5 mg)。経口投与量は、精製 OM を用いて事前に有効性が確認された量に基づいて決定した。また OIT には、PBS、精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM を用いた。OIT の有効性は、アレルギー評価、抗体価の変動、および小腸細胞の遺伝子発現量で評価した。

アレルギー評価は、5 週、7 週、および 10 週時に精製 OM (20 mg) をマウスに経口投与し、30 分後の直腸温およびアレルギー症状スコア (Table1、Li ら, 2000) にて評価した。直腸温は、精製 OM の経口投与前と投与後 30 分の差で評価した。また 5 週、7 週、および 10 週時に尾静脈から採血し、間接 ELISA にて OM-特異的 IgA (sIgA)、sIgE、特異的 IgG1 (sIgG1)、特異的 IgG2a (sIgG2a) を測定した。10 週時の経口投与 30 分後のアレルギー症状評価後に、回腸を採取しそこからパイエル板を採取した。また、小腸試料には回腸を用いた。サンプリングは、イソフルラン麻酔下で全血採取のための心臓穿刺 (安楽

死) 後に実施した。採取したパイエル板および回腸は、リアルタイム PCR に使用した。本研究では、10 週まで生存したマウスを分析対象とした。

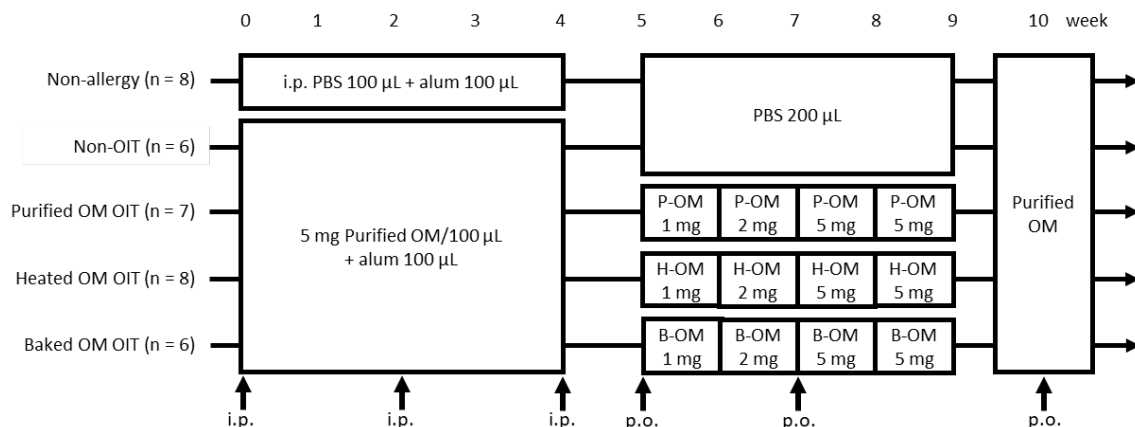


Fig. 17. Animal experiment protocol (OIT).

Intraperitoneal administration (purified OM 5 mg) was performed at 0, 2, and 4 weeks (i.p.). Oral administration (purified OM 20 mg) for allergy evaluation was performed at 5, 7, and 10 weeks (p.o.), while oral administration (OM samples 1, 2, and 5 mg) for OIT was performed daily.

PBS, phosphate-buffered saline; i.p., intraperitoneal administration; p.o., oral administration; P-OM, purified OM; H-OM, heated OM; B-OM, baked OM

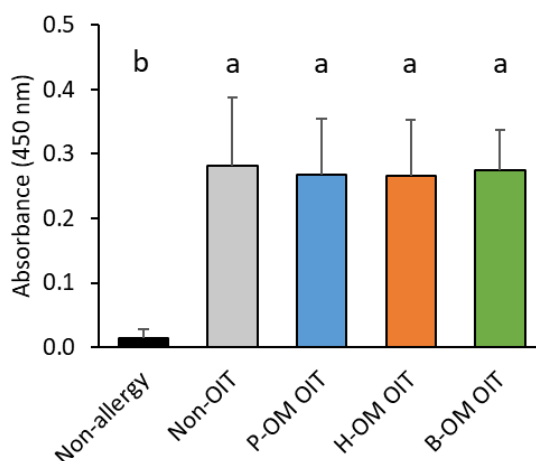


Fig. 18. OM-sIgE levels in the mouse model of OM allergy (OIT).

Results are presented as mean \pm SE. Significant differences were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different lowercase letters (a, b).

P-OM, purified OM; H-OM, heated OM; B-OM, baked OM

4.2.4 間接 ELISA

第3章と同様に行った。本章では、試料に PBS で希釈したマウス血清を用いた (IgE 解析 1:10、IgA・IgG1・IgG2a 解析 1:100)。その後の工程では、1% BSA/PBST で希釈した HRP-linked anti-mouse IgA、IgE、IgG1、および IgG2a を用いた (IgE 解析 1:1000、IgA・IgG2a 解析 1:5000、IgG1 解析 1:20000)。本試験では、感作確認時に OM-sIgE 抗体価が最も高かったマウス血清を、各測定のパジティブコントロールとして使用した。

4.2.5 遺伝子発現の比較

RNA は、BioMasher® II (関東化学株式会社) にて組織を粉碎後、RNeasy® Mini Kit (Qiagen、Venlo、Netherlands) を使用してパイエル板および小腸組織から抽出した。RNA 濃度は、Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific、Roskilde、Denmark) を使用して定量した。その後抽出した RNA は、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific、Roskilde、Denmark) を使用して逆転写した。リアルタイム PCR は、PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific、Roskilde、Denmark) を用いて Thermal Cycler Dice® Real-Time System Lite (タカラバイオ株式会社) にて行った。プライマーは β -actin、IL-10、IL-13、MUC2、および Claudin-2 を使用し、配列は Table 2 に示した (Cardoso ら, 2009; Shigemura ら, 2014; Volynets ら, 2016; Liu ら, 2020; Pérez-Rodríguez ら, 2020)。ハウスキーピング遺伝子には、 β -actin を用いた。増幅サイクルプロトコールは、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間保持した後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分のサイクルを 50 サイクル繰り返した。相対的遺伝子発現量の比較は、 $\Delta \Delta Ct$ 法にて行った。

Table 2. Primers used for real-time PCR.

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Reference
β -actin	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT	Cardoso <i>et al.</i> (2009)
IL-10	CTGCTATGCTGCCTGCTTACTG	ATGTGGCTCTGGCCGACTGG	Liu <i>et al.</i> (2020)
IL-13	CATGGCCTCTGTAACCGCAA	CCTCATTAGAAGGGGCGGTG	Pérez-Rodríguez <i>et al.</i> (2020)
Muc2	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	AATGAGGTGGCAGACAGGAGAC	Shigemura <i>et al.</i> (2014)
Claudin-2	GTCATCGCCCATCAGAAGAT	ACTGTTGGACAGGAACCCAG	Volynets <i>et al.</i> (2016)

4.2.6 統計解析

統計解析は EZR version 1.54 (Kanda, 2013) を用いて行った。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。動物実験の群間の平均値の差の検定には Kruskal-Wallis を行い、その後の Post-hoc 検定は Steel-Dwass を使用した。また経時的な平均値の検定には Friedman を行

い、その後の Post-hoc 検定は Bonferroni を使用した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4.3 結果

4.3.1 各 OM を用いた OIT の影響

精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 試料を 4 週間経口投与することで、アレルギー症状が改善するか確認するために、5 週、7 週、および 10 週時に精製 OM を用いた経口負荷試験を行った。5 週時のアレルギー群（非 OIT、精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 群）のアレルギー症状スコアは、非アレルギー群と比較して有意なスコアの上昇がみられた（Fig. 19A; $p < 0.05$ ）。また、直腸温は、非 OIT 群で $-1.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、精製 OM 群で $-0.9 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、加熱 OM 群で $-1.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、焼成 OM 群で $-0.9 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ となり、非アレルギー群（ $-0.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ）と比較して有意に大きく低下した（Fig. 19A; $p < 0.05$ ）。しかし、アレルギー群間では、有意な差はみられなかった。また、症状スコアは、7 週および 10 週時でも同様の傾向を示した（Fig. 19B, C）。

10 週時における直腸温では、非 OIT 群で $-1.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、精製 OM 群で $-0.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、加熱 OM 群で $-0.3 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、焼成 OM 群で $-0.1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ となり、非 OIT 群は他のアレルギー群と比較して有意に大きく低下した（Fig. 19C; $p < 0.05$ ）。また、精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 群では、5 週目と比較して直腸温の変化幅が小さかったが、3 群間で有意な差はみられなかった。

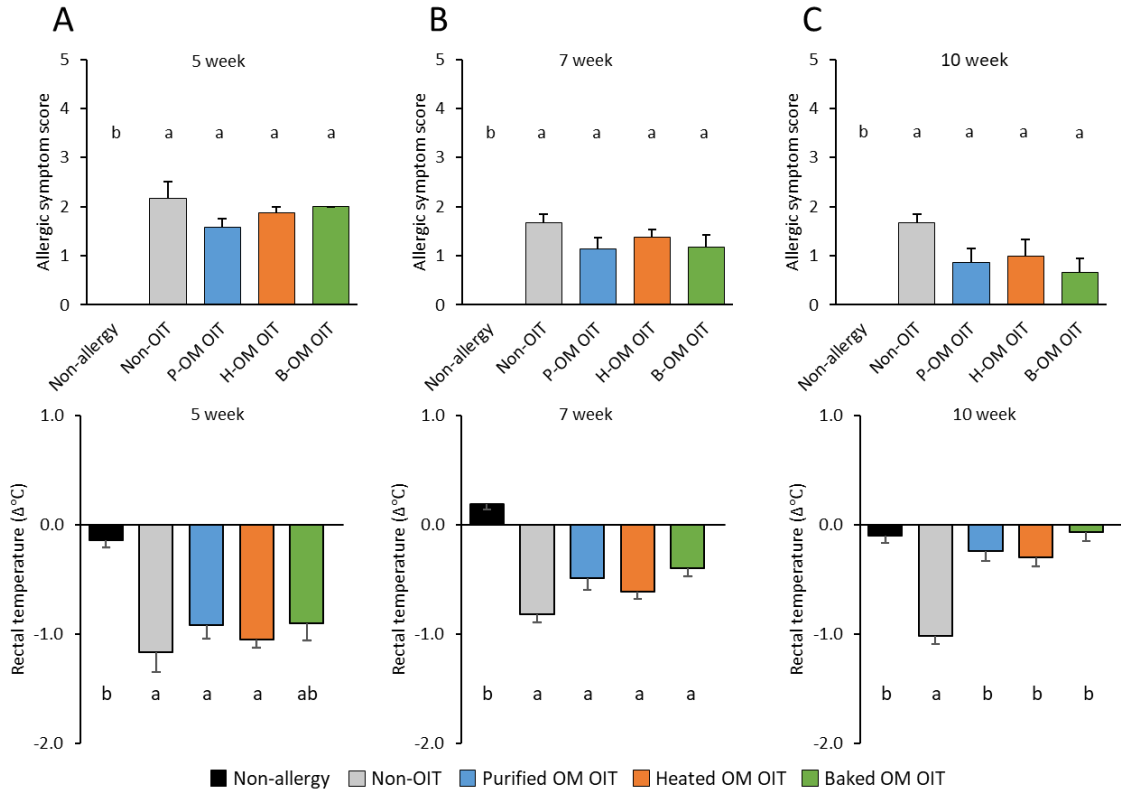


Fig. 19. Evaluation of Allergic Symptoms.

Allergic symptoms were evaluated by allergic symptom scores and rectal temperatures at 5 (A and D), 7 (B and E), and 10 weeks (C and F). Results are presented as mean \pm SE. Significant differences were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Steel-Dwass. Significant inter group differences ($p < 0.05$) are indicated by different lowercase letters (a and b).

P-OM, purified OM; H-OM, heated OM; B-OM, baked OM.

4.3.2 各 OM を用いた OIT が抗体に与える影響

OIT による抗体価の変動を間接 ELISA にて評価した。非 OIT 群の抗体価は、5 週、7 週、および 10 週のすべてで有意な差はみられなかった。IgE は (Fig. 20A)、精製 OM 群において、7 週で有意に増加したが ($p < 0.05$)、他のアレルギー群では有意差は認められなかった。IgA は (Fig. 20B)、OIT 群 (精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 群) において、5 週から 10 週時にかけて有意に増加した ($p < 0.05$)。一方で、非 OIT 群では有意な差はみられなかった。IgG1 は (Fig. 20C)、精製 OM および加熱 OM 群で 7 週時に有意に減少し ($p < 0.05$)、焼成 OM 群で減少傾向を示した ($p = 0.094$)。IgG2a は (Fig. 20D)、精製および加熱 OM 群で 7 週時に有意に増加し ($p < 0.05$)、焼成 OM 群は増加傾向を示した ($p = 0.090$)。また、アレルギー群間で IgA、IgE、IgG1、および IgG2a 抗体価を比較したが、OIT 群の IgA 抗体価は、7 週目と 10 週目で非 OIT 群より有意に高値を示したが ($p < 0.05$)、それ以外では有意な差はみられなかった。

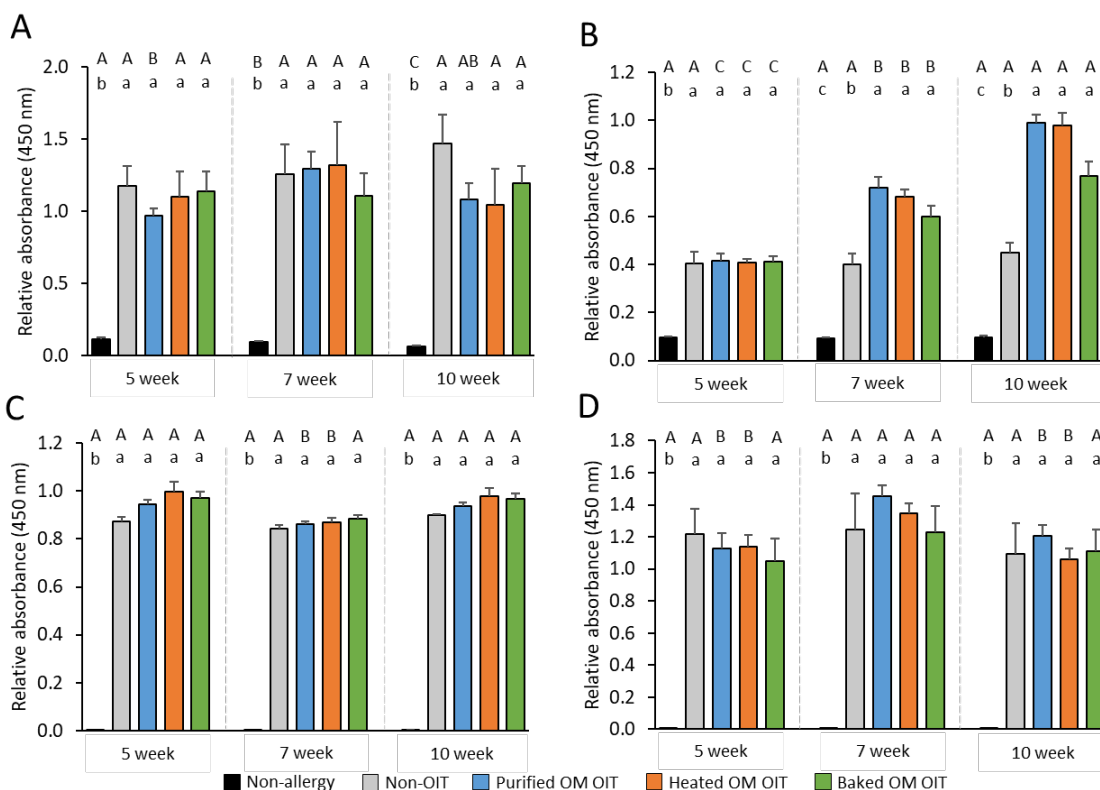


Fig. 20. Changes in IgE, IgA, IgG1, and IgG2a.

IgE (A), IgA (B), IgG1 (C), and IgG2a (D) levels were measured by indirect ELISA. Results are presented as mean \pm SE. Significant differences were analyzed using the Kruskal-Wallis test to compare between groups, followed by the Steel-Dwass, and using the Friedman test to compare change over time, followed by the Bonferroni. Significant differences between groups ($p < 0.05$) are indicated by different lowercase letters (a, b, and c) and significant differences changes over time ($p < 0.05$) are indicated by different uppercase letters (A, B, and C).

4.3.3 パイエル板および小腸における遺伝子発現量

アレルギー症状誘発に関与する IL-10 および IL-13、腸管のバリア機能に関与する MUC2 および Claudin-2 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR にて比較した。パイエル板の IL-10 および IL-13 の比較では、OIT 群で IL-10 および IL-13 ともに非 OIT 群よりも発現量が多かったが、有意な差はみられなかった (Fig. 21A, B)。

小腸の MUC2 および Claudin-2 の比較では、OIT の有無により腸管のバリア機能に変化がみられるか解析したが、群間で有意な差はみられず IL-10 および IL-13 のような特徴的な変化も得られなかった (Fig. 21C, D)。

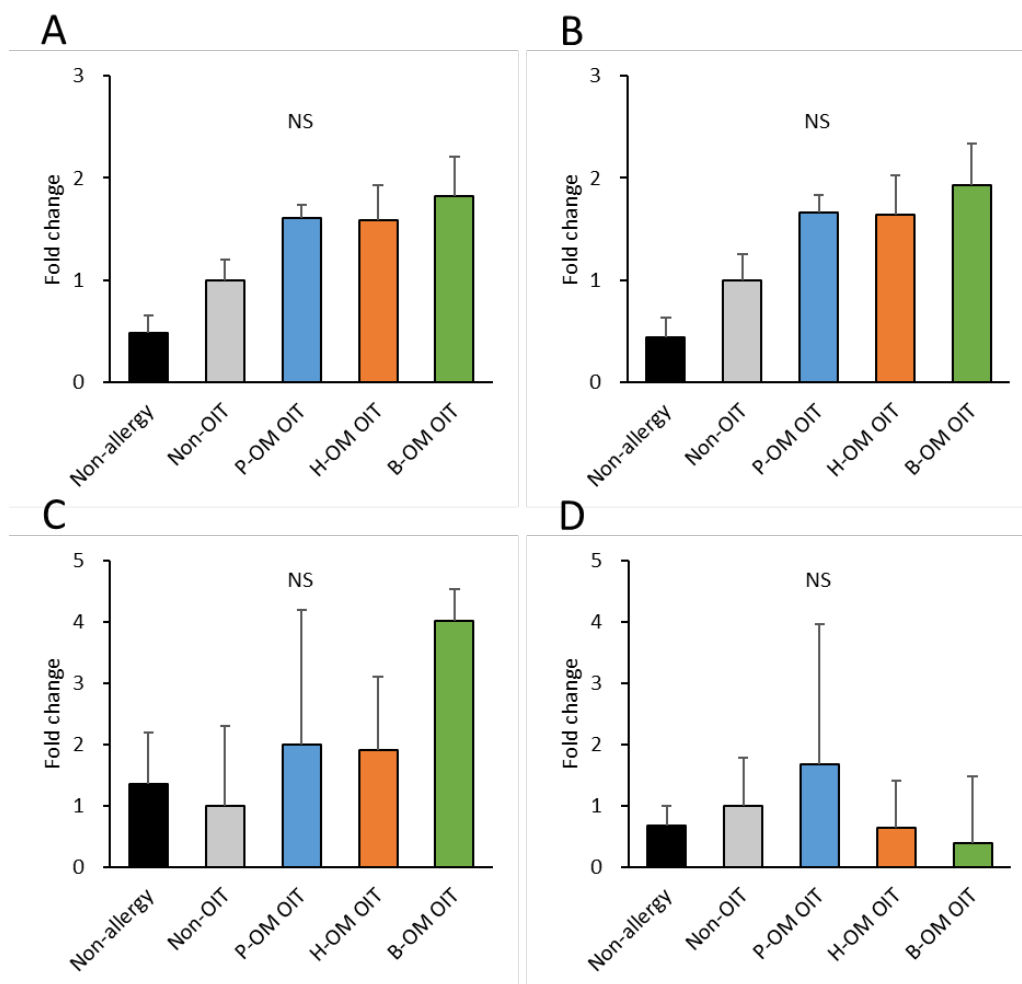


Fig. 21. Comparison of gene expression levels.

Gene expression levels of IL-10 (A) and IL-13 (B) in the Peyer's patches, and MUC2 (C) and Claudin-2 (D) in the small intestine were compared by real-time PCR. The gene expression levels of IL-10, IL-13, MUC2, and Claudin-2 were corrected with β -actin and then compared with the non-OIT group. Significant differences were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Steel–Dwass. Results are presented as mean \pm SE.

4.4 考察

本章では、アレルギー性が低下しているベイクトエッグを OIT に用いることで、アレルギー症状誘発リスクを低減した状態で治療することができると考え、OM アレルギーモデルマウスに対して焼成 OM を用いた OIT を行い治療の有効性を検討した。

5 週 (OIT 開始前)、7 週 (OIT 中)、および 10 週 (OIT 終了後) 目に、精製 OM を経口投与しアレルギー症状スコアおよび直腸温にてアレルギー状態を評価した。その結果、アレルギー群のアレルギー症状スコアは、5 週、7 週、および 10 週時において非アレルギー群より有意に高かった。5 週時のアレルギー群の直腸温は、非アレルギー群より低値を示したが、アレルギー群間では有意な差はみられなかった。しかし 10 週時では、非 OIT 群の直腸温が他のアレルギー群 (精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 群) より有意に低値を示した。また、精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 群は 5 週時と比較して、直腸温変化量が小さかった。これらのことから、精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 群はアレルギー症状が抑制されており、OM が不溶化した焼成 OM を含めこれらの試料は、OIT に有効であることが明らかとなった。したがって、アレルギー性が低下したベイクトエッグ (OM が不溶化している) を用いた OIT は、治療効果を発揮する可能性が示唆された。

先行研究で、血中 OVA-sIgA 抗体価や peanut-sIgA 抗体価が、非 OIT 群よりも OIT 群の方が高くなることが報告されている (Kulis ら, 2012; Leonard ら, 2012)。また、血中 sIgA 抗体が IgE による全身性アナフィラキシーや肥満細胞の脱顆粒を抑制することも報告されている (Strait ら, 2011)。本研究においても、OIT 群 (精製 OM、加熱 OM、および焼成 OM 群) の OM-sIgA 抗体価は、5 週から 10 週にかけて経時的に増加した。これらのことから、血中の OM-sIgA 抗体の増加によって、アレルギー症状が抑制された可能性がある。また、Th2 応答を反映する IgG1 および Th1 応答を反映する IgG2a も解析した。しかし、7 週時に有意な変化がみられたが、10 週時には変化がみられなかった。このことから、継続的ではなかったが少なくとも OIT 期間中は抗原による免疫応答が起きていたと推察される。また、OIT 群間に有意な差はみられなかったことから、性状が異なる OM 試料を用いても同様の免疫応答を誘発する可能性が示唆された。

IL-10 は、制御性 T 細胞由来のサイトカインでありアレルギー症状の抑制に関与する抗炎症性サイトカインである (Boonpiyathad ら, 2019; Neumann ら, 2019)。また、IL-13 は Th2 由来のサイトカインであり、B 細胞、好酸球、および好塩基球に作用してアレルギー性炎症を誘導する (Iwaszko ら, 2021)。これらを踏まえ、アレルギー症状の抑制に伴い IL-10

が増加し、IL-13 が減少すると予測したが、本研究では OIT 群と非 OIT 群の間で IL-10 および IL-13 の発現量に有意差はみられなかった。Maeta ら (2018) は、卵白を用いた固定用量の OIT において、IL-10 が有意に増加したことを報告している。さらに Yang ら (2009) は、酵素加水分解卵白を用いた固定用量の OIT において、IL-13 が有意に減少したことを報告している。本研究の OIT 期間は前述の研究とほぼ同等であったが、抗原投与方法として非酵素加水分解抗原を用いた漸増投与方法を使用しており、抗原投与方法が先行研究と異なっていた。この抗原投与方法の違いが免疫応答に影響を与えた可能性があり、漸増投与方法では、治療初期に十分な持続的抗原曝露が得られず、制御性 T 細胞や IL-10 分泌の強力な誘導を妨げた可能性が考えられる。

タイトジャンクションとムチンは腸管バリア機能に関与するが、食物アレルギー患者の小腸組織ではタイトジャンクションの発現が低下することが報告されている (Yu, 2012)。また、Kim ら (2020) は、OIT によりムチン分泌が減少することを報告している。これらは治療前のアレルゲン摂取による炎症によってタイトジャンクションは減少し、OIT による腸管バリア機能の改善によってムチン分泌量は減少すると推察される。先行研究より、OIT の実施によってムチンは減少し、タイトジャンクションは増加すると予測し、本研究ではムチンである MUC2 とタイトジャンクションの Claudin-2 の発現量を比較した。しかし、MUC2 と Claudin-2 の発現量に有意な差はみられず OIT による変化もみられなかった。これは IL-10 や IL-13 と同様に、漸増投与方法では十分な抗原曝露が得られなかった可能性がある。さらに、本研究の実験モデルでは、腸管バリアが損傷を受けていなかった可能性も考えられる。しかし、本研究では、腸管の損傷度合いを評価する実験を実施していないため、実際の損傷程度は不明であり、本研究の限界である。

第5章 総合考察

本研究では、OMの焼成による性状の変化が消化・吸収性およびアレルギー症状誘発に与える影響、さらにそれを応用したOITの有効性について *in vitro* および *in vivo* 試験により検討を行った。

第2章の *in vitro* 解析では、焼成OMは精製OMや加熱OMと比較して、抗体で認識される分解断片が少なく、抗体結合能が低下していることが明らかとなった。また第3章のアレルギーモデルマウスを用いた *in vivo* 解析では、焼成OM群は、アレルギー症状が抑制されており、投与後120分後には消化管および糞中からOMは検出されず血中から検出されていた。これらの結果を基に、消化・吸収性とアレルギー誘発の関連性を Fig. 22 に示した。精製OMおよび加熱OMは、消化により分解されるが一定の大きさの分解断片が残存する。一方で、焼成OMは小麦タンパク質が先に消化を受けることでOMの消化に時間を要するが、小麦タンパク質との相互作用により消化酵素の影響を受けやすい状態になることで消化性が向上し、精製OMおよび加熱OMよりも低分子の分解断片へ消化されることが示唆された。このような状態の分解断片が吸収されることで、一定の大きさの分解断片が残存する精製OMおよび加熱OMは、IgE抗体が結合しアレルギー症状を誘発した可能性がある。しかし、焼成OMは、より低分子化したことにより、IgE抗体が分解断片を認識できなくなりアレルギー症状を誘発しなかった可能性がある。このように、消化性の向上（分解断片の低分子化）がバイクドエッグの低アレルゲン化に寄与していると考えられる。卵白タンパク質と小麦タンパク質は、混合して加熱することでSH-SS交換反応によりSS結合を形成し、タンパク質の構造が変化する（Luoら, 2016）。本研究の焼成OMも小麦タンパク質と混捏・焼成しており、タンパク質間のSH-SS交換反応によりOMの構造が変化し凝集・不溶化したと推察される。タンパク質構造の変化に伴い、精製OMおよび加熱OMより消化酵素の分解部位が表面へ露出されることで、より低分子の分解断片まで分解されたと考えられる。また、鶏卵ではなく牛乳を用いたバイクドミルクでも、牛乳アレルギー患者は症状誘発なく摂取できることが報告されており（Kimら, 2011）、このバイクドミルク中のアレルゲンも不溶化している（Naitoら, 2020）。これらのことから、食品の低アレルゲン化には、食物アレルゲンの不溶化が重要であると考えられる。しかし、本研究では不溶化したOMの消化・吸収性しか解析できていないため、食物アレルゲン全体に当てはまるかは不明であり、今後の検討課題である。

食物アレルギーの治療法として OIT が用いられているが、抗原を摂取するためアナフィラキシーなどのアレルギー症状誘発リスクを伴う (Sugimoto ら, 2016; Itoh-Nagato ら, 2018; Sasamoto ら, 2022)。そのため、近年は緩徐微量経口免疫療法 (slow low dose oral immunotherapy, SLOIT) という方法が注目されている。この SLOIT は、従来の OIT よりも抗原の摂取量を少なくさせることで、アレルギー症状誘発のリスクを低減化させるために行われている手法である。実際に Sugiura ら (2020) は、鶏卵、小麦、および牛乳アレルギー児を対象に SLOIT を 1 年間実施し、アレルギー症状誘発頻度を評価した。その結果、抗原の総摂取回数が 48486 回であったが、アドレナリン注射を必要とする重症度の高い症状は一度も確認されなかった。しかし、アレルギー症状は確認されており (有害事象 280 回/総摂取回数 48486 回)、全くアレルギー症状誘発がないというわけではなかった。このことから、抗原の摂取量を少なくすることで重症度の高い症状は抑制できる可能性はあるが、ある程度のアレルギー症状誘発リスクが残る。したがって、同じ抗原量を摂取する場合に、ベイクドエッグのような低アレルゲン化された食品を用いることで、より症状誘発のリスクを低減した治療の実施が期待できる。また前述の通り、鶏卵アレルギー患者の中には、鶏卵自体や鶏卵の臭いを拒絶し治療を中断してしまう患者も存在するが、ベイクドエッグは鶏卵としての形状は無くなり、臭いもマスキングされるため治療を継続できる可能性がある。このように、OIT にベイクドエッグを用いることは、治療で一番問題視されているアレルギー症状誘発リスクの低減や患者の治療継続など利点が多い。第 3 章より不溶化した OM は大部分が抗体の認識できない分解断片、また一部は抗体が認識できる分解断片として体内に吸収されており、免疫システムへの抗原刺激が引き起こされている可能性がある。実際に、第 4 章では OIT 終了後、焼成 OM 群の直腸温は低下せずアレルギー症状が抑制され、治療中のアレルギー症状誘発リスクを低減した治療法として有効な選択肢となる可能性が示唆された。また OIT により、抗体価、サイトカイン、および腸管バリア機能の変化が誘導されることが報告されている (Yang ら, 2009; Kulis ら, 2012; Leonard ら, 2012; Maeta ら, 2018)。本研究でも焼成 OM による免疫応答系や腸管バリア機能の変化を明らかにするために、抗体価、サイトカイン、および腸管バリア機能の解析を行ったが、IgA 抗体の有意な変化がみられたのみで詳細な変化は不明であった。OIT における詳細な免疫応答の変化や腸管バリア機能の変化を解明することは、治療法のエビデンスレベルの増強に繋がるため今後の課題である。

総じて、本研究により、焼成処理によって不溶化した OM は消化性が変化し、抗体結合

能が低下することが明らかとなり、これがベイクドエッグの低アレルゲン化に寄与している可能性が示唆された。また、焼成 OM を用いた OIT は治療の有効性が確認でき、ベイクドエッグを用いた OIT は、症状誘発リスクを低減した治療法となる可能性を見出した。本研究の成果は、低アレルゲン化食品の開発やより安全で効果的なアレルギー治療法の確立のための一助となると考える。

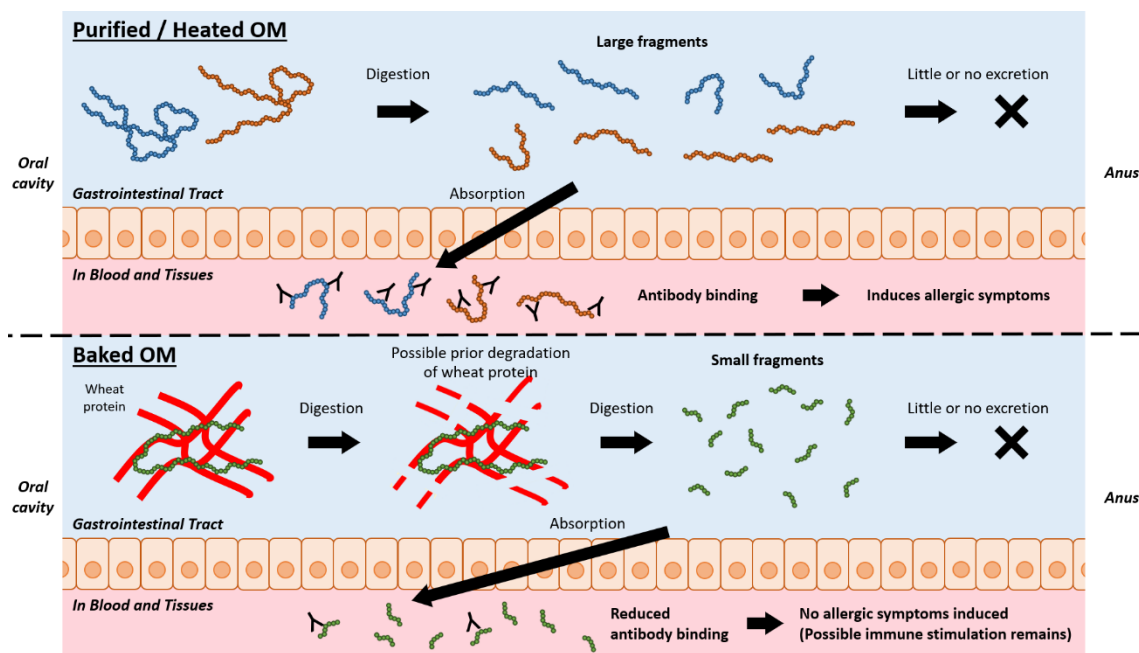


Fig. 22. Relationships of digestibility and absorptivity with the allergenicity of ovomucoids with different properties

While purified (blue protein) and heated OM (orange protein) are degraded through digestion, large fragments remain. Moreover, OM is absorbed rather than removed from the body. It is possible that purified and heated OM are absorbed into the blood as fragments that bind to antibodies and thereby induce allergic symptoms. However, baked OM (green protein) takes longer to be digested but is digested into small fragments and absorbed. It is possible that baked OM is absorbed as small fragments that bind less to antibodies and thereby do not induce allergic symptoms.

参考文献

- 池中徳治, 小出武比古. トリプシンインヒビターの化学. 化学と生物, 8: 1–13 (1970).
- 大津亜衣, 内藤宙大, 岩脇由希子, 松井照明, 伊藤浩明, 和泉秀彦. ゆで時間の異なるゆで卵中の卵白タンパク質の溶解性と IgE 結合能の解析. 日本小児アレルギー学会誌, 38: 169–177 (2024).
- 小澤慶子, 加藤保子. 卵料理および加工品中の塩溶性オボムコイド量から求めたアレルギー活性. 日本食品科学工学会誌, 49: 145–154 (2002).
- 杉崎千鶴子, 高橋亨平, 佐藤さくら, 柳田紀之, 海老澤元宏. 消費者庁「食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業」令和 5 (2023) 年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査結果報告. アレルギー, 74: 167–172 (2025).
- 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会. 食物アレルギー診療ガイドライン 2021. 協和企画, (2021).
- Benedé S, López-Fandiño R, Reche M, Molina E, López-Expósito I. Influence of the carbohydrate moieties on the immunoreactivity and digestibility of the egg allergen ovomucoid. *PLOS ONE*, 8: e80810 (2013).
- Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RZ, Sampson HA. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 93: 1047–1059 (1994).
- Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, Akdis M, Akdis CA. Il-10 producing T and B cells in allergy. *Semin. Immunol.*, 44: 101326 (2019).
- Botas JM, Cerecedo I, Zamora J, Vlaicu C, Dieguez MC, Coronado DG, Dios V, Terrados S, Hoz B. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of ovomucoid with a peptide microarray immunoassay. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 161: 11–20 (2013).
- Boyce JA, Assaad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Bredbenner CB, Camargo CA Jr, Eichenfield L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons ER, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in

- the United States: summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel report. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 64: 175–192 (2011).
- Cardoso CR, Provinciatio PR, Godoi DF, Ferreira BR, Teixeira G, Rossi MA., Cunha FQ, Silva JS. IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 296: 593–600 (2009).
- Castan L, Bøgh KL, Maryniak NZ, Epstein MM, Kazemi S, O'Mahony L, Bodinier M, Smit JJ, van Bilsen JHM, Blanchard C, Głogowski R, Kozáková H, Schwarzer M, Noti M, de Wit N, Bouchaud G, Bastiaan-Net S. Overview of in vivo and ex vivo endpoints in murine food allergy models: Suitable for evaluation of the sensitizing capacity of novel proteins? *Allergy*. 75: 289–301 (2020).
- Cooke SK, Sampson HA. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J. Immunol.*, 159: 2026–2032 (1997).
- Fredericq E, Deutsch HF. Studies on ovomucoid. *J. Biol. Chem.*, 181: 499–510 (1949).
- Gell PGH, Coombs RRA. The classification of allergic reactions underlying disease. *Clin. Aspects Immunol.*, 317–337 (1963).
- Hirose J, Kitabatake N, Kimura A, Narita H. Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 2490–2497 (2004).
- Hirose J, Murakami-Yamaguchi Y, Ikeda M, Kitabatake N, Narita H. Oligoclonal enzyme-linked immunosorbent assay capable of determining the major food allergen, ovomucoid, irrespective of the degree of heat denaturation. *Cytotechnology*, 47: 145–149 (2005).
- Hoffman DR. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 71: 481–486 (1983).
- Holen E, Elsayed S. Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 91: 136–141 (1990).
- Holen E, Bolann B, Elsayed S. Novel B and T cell epitopes of chicken ovomucoid (Gal d 1) induce T cell secretion of IL-6, IL-13, and IFN- γ . *Clin Exp Allergy*. 31: 952–964

- (2001).
- Itoh-Nagato N, Inoue Y, Nagao M, Fujisawa T, Shimojo N, Iwata T. Desensitization to a whole egg by rush oral immunotherapy improves the quality of life of guardians: a multicenter, randomized, parallel-group, delayed-start design study. *Allergol. Int.*, 67: 209–216 (2018).
- Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K. Significance of interleukin (IL)-4 and IL-13 in inflammatory arthritis. *Cells*, 10: 3000 (2021).
- Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy*. 62: 758–765 (2007).
- Jainxin G, Matsuda T, Nakamura R. Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shell eggs. *J. Food Sci.*, 51: 1448–1450 (1986).
- Jiménez-Saiz R, Belloque J, Molina E, López-Fandiño R. Human immunoglobulin E (IgE) binding to heated and glycated ovalbumin and ovomucoid before and after in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 10044–10051 (2011).
- Kagam S, Smithard R. Effects of heat treatments on trypsin inhibitor and hemagglutinating activities in winged bean. *Plant Food For Hum. Nutr.*, 37: 151–159 (1987).
- Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.*, 48: 452–458 (2013).
- Kato Y, Oozawa E, Matsuda T. Decrease in antigenic and allergenic potentials of ovomucoid by heating in the presence of wheat flour: dependence on wheat variety and intermolecular disulfide bridges. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3661–3665 (2001).
- Kim BG, Kim JN, Jang AS, Shin M. Combined effects of lactobacillus rhamnosus and egg oral immunotherapy in a mouse model of egg allergy. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 12: 701–711 (2020).
- Kim JS, Nowak-Węgrzyn A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Sampson HA. Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 128: 125–131.e2 (2011).
- Kulis M, Saba K, Kim EH, Bird JA, Kamilaris N, Vickery BP, Staats H, Burks AW.

- Increased peanut-specific IgA levels in saliva correlate with food challenge outcomes after peanut sublingual immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 129: 1159–1162 (2012).
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685 (1970).
- Langeland T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. I. A clinical study of egg allergy. *Clin. Allergy*, 13: 371–382 (1983).
- Lemon-Mulé H, Sampson HA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Nowak-Węgrzyn A. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 122: 977–983.e1 (2008).
- Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 129: 1579–1587 (2012).
- Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106: 150–158 (2000).
- Lieberman JA, Huang FR, Sampson HA, Nowak-Węgrzyn AN. Outcomes of 100 consecutive open, baked-egg oral food challenges in the allergy office. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 129: 1682–1684 (2012).
- Liu T, Chen P, Munir M, Liu L. HMOs modulate immunoregulation and gut microbiota in a β -lactoglobulin-induced allergic mice model. *J. Functional Foods*, 70: 103993 (2020).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275 (1951).
- Luo Y, Li M, Zhu KX, Guo XN, Peng W, Zhou HM. Heat-induced interaction between egg white protein and wheat gluten. *Food Chem.*, 15: 699–708 (2016).
- Maeta A, Matsushima M, Katahira R, Sakamoto N, Takahashi K. Diets supplemented with 1% egg white induce oral desensitization and immune tolerance in an egg white-specific allergic mouse model. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 176: 205–214

- (2018).
- Martos G, Contreras P, Molina E, Fandino RL. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 5640–5648 (2010).
- Martos G, López-Fandiño R, Molina E. Immunoreactivity of hen egg allergens: influence on in vitro gastrointestinal digestion of the presence of other egg white proteins and of egg yolk. *Food Chem.*, 136: 775–781 (2013).
- Matsuoka R, Takahashi Y, Kimura M, Masuda Y, Kunou M. Heating has no effect on the net protein utilisation from egg whites in rats. *Scientific World Journal*, 2017: 6817196 (2017).
- Mine Y, Zhang JW. Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun.*, 12: 1070–1074 (2002).
- Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MS, Bottrill AR, Mills EN. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal*, 272: 341–352 (2005).
- Naito M, Yamada C, Matsuda T, Izumi H. Changes in solubility, allergenicity, and digestibility of cow's milk proteins in baked milk. *Food Sci. Tech. Res.*, 26: 129–138 (2020).
- Neumann C, Scheffold A, Rutz S. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. *Semin. Immunol.*, 44: 101344 (2019).
- Nowak-Wegrzyn AN, Fiocchi A. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 9: 234–237 (2009).
- Pérez-Rodríguez L, Martínez-Blanco M, Lozano-Ojalvo D, Molina E, López-Fandiño R. Egg yolk augments type 2 immunity by activating innate cells. *Eur. J. Nutr.*, 59: 3245–3256 (2020).
- Sasamoto K, Yanagida N, Nagakura K, Nishino M, Sato S, Ebisawa M. Long-term outcomes of oral immunotherapy for anaphylactic egg allergy in children. *J. Allergy Clin. Immunol. Glob.*, 1: 138–144 (2022).
- Shigemura H, Ishiguro N, Inoshima Y. Up-regulation of MUC2 mucin expression by serum amyloid A3 protein in mouse colonic epithelial cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 76:

- 985–991 (2014).
- Shin M, Lee J, Ahn K, Lee SI, Han Y. The influence of the presence of wheat flour on the antigenic activities of egg white proteins. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 5: 42–47 (2013).
- Strait RT, Mahler A, Hogan S, Khodoun M, Shibuya A, Finkelman FD. Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 127: 982–989 (2011).
- Sugimoto M, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, Kido H. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 27: 276–282 (2016).
- Sugiura S, Kitamura K, Makino A, Matsui T, Furuta T, Takasato Y, Kando N, Ito K. Slow low-dose oral immunotherapy: threshold and immunological change. *Allergol. Int.*, 69: 601–609 (2020).
- Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136: 23–32 (2005).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 4350–4354 (1979).
- Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K, Komada K, Torii S, Goto M, Wakamatsu T. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100: 171–176 (1997).
- Volynets V, Rings A, Bárdos G, Ostaff MJ, Wehkamp J, Bischoff SC. Intestinal barrier analysis by assessment of mucins, tight junctions, and α -defensins in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Tissue Barriers*, 4: e1208468 (2016).
- Wang X, Qiu N, Liu Y. Effect of different heat treatments on in vitro digestion of egg white proteins and identification of bioactive peptides in digested products. *J. Food Sci.*, 83: 1140–1148 (2018).
- Yamada C, Yamashita Y, Seki R, Izumi H, Matsuda T, Kato Y. Digestion and

- gastrointestinal absorption of the 14-16-kDa rice allergens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1890–1897 (2006).
- Yang M, Yang C, Nau F, Pasco M, Juneja LR, Okubo T, Mine Y. Immunomodulatory effects of egg white enzymatic hydrolysates containing immunodominant epitopes in a BALB/c mouse model of egg allergy. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 2241–2248 (2009).
- Yu LC. Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. *J. Allergy (Cairo)*, 2012: 596081 (2012).
- Zhou JM, Liu C, Tsou CL. Kinetics of trypsin inhibition by its specific inhibitors. *Biochem*, 28: 1070–1076 (1989).

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP21K02141（研究代表者：和泉秀彦）の助成を受けたものである。

本研究を遂行するにあたり、終始、熱意をもってご指導ご鞭撻をいただきました、本学 学部長 和泉秀彦教授に心より感謝致します。和泉教授には、4年時より研究の発想から実行に至るまで、今後の研究人生で必要な多くのことをご教授いただきました。改めて厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、審査並びにご指導いただきました近畿大学 森山達哉教授、本学 井澤一郎教授、小林美里教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行、結果考察並びに論文執筆にあたり、根気よく手厚い指導をいただきました、本学 内藤宙大助教に心より感謝致します。内藤助教には、研究室配属から今日に至るまで、多くの実験手技をご教授いただきました。改めて厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、抗体を分与していただきました、株式会社森永生科学研究所、並びに京都女子大学 成田宏史教授、門間敬子教授、廣瀬潤子教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、PCR についてご教授いただきました、本学 岸本満教授、安藤恵助手に心より感謝申し上げます。

そして共に研究生活を過ごし、研究を通じて活発な議論にお付き合い頂いた食品学研究室の皆様にも心より感謝致します。

最後になりましたが、皆様の今後のご活躍をお祈り申し上げます。