

氏名	富岡 敏彦
学位の種類	博士(栄養科学)
学位番号	第23号
学位授与年月日	令和8年3月20日
学位論文名	性状が異なる鶏卵オボムコイドのアレルゲン性解析
論文審査委員	主査 教授 井澤 一郎 副査 森山 達哉 副査 教授 小林 美里 副査 教授 和泉 秀彦

論文内容の要旨

【背景】 鶏卵の主要アレルゲンであるオボムコイド (OM) は熱耐性を有するが、バイクドエッグ (BE) 中では凝集・不溶化している。この BE のアレルゲン性は低いが、その原因は明らかではない。そこで消化・吸収性の変化に焦点を当て、研究 1 及び 2 において、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で性状が異なる 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、食物アレルギーの治療法である経口免疫療法 (OIT) は、アレルゲンを摂取するためアレルギー症状誘発リスクを有しているが、低アレルゲン化した BE を用いることで、リスクを低減した治療の実施が期待できる。そこで研究 3 では、OM アレルギーモデルマウスを用いた OIT に対する BE の有効性を検討した。

研究 1 性状が異なるオボムコイドの消化性解析 (*in vitro*)

【目的】 性状が異なる OM の消化性を *in vitro* 試験にて明らかにする。

【方法】 OM は鶏卵白から分離精製した (精製 OM)。加熱 OM は精製 OM を加熱処理 (沸騰水中 60 分) して作製した。焼成 OM は精製 OM、小麦粉、及び純水を 1:2:1 (w/w) の割合で混捏・焼成して作製した。また、焼成していないものを未焼成 OM とした。その後、ペプシン、トリプシン、及びキモトリプシンを用いた単一酵素による消化または胃・小腸モデル消化処理を経時的に行った。消化処理後、遠心分離にて上清を回収し塩溶性画分試料 (Sup.) とした。また、残渣に 2-メルカプトエタノール (2-ME) 溶液を加え、不溶性タンパク質を抽出し不溶性画分試料 (Ppt.) とした。その後、SDS-PAGE 及びイムノブロットにて消化性を解析し、Lowry 法にて Sup. の塩溶性タンパク質量を定量した。

【結果】 トリプシン処理では、全ての試料で OM は消化されなかった。ペプシン及びキモトリプシン処理では、焼成 OM 以外は経時的に消化されたが、Sup. のタンパク質量に変化はなかった。一方、焼成 OM は経時的に消化され Sup. のタンパク質量が経時的に増加したが、抗体で検出された Sup. の消化断片は他の試料より少なかった。また、消化後も Ppt. に未分解の OM が検出され、一部の OM が不溶化したまま残存した。胃・小腸モデル消化の結果、焼成 OM は経時的に消化され Sup. のタンパク質量が経時的に増加したが、抗体で検出された消化断片は他の試料より少なかった。また、Ppt. から未分解の OM が検出された。以上のことから、焼成 OM は消化後も一部不溶化したまま残存すること、消化されても抗体に認識されにくい断片で可溶化することが明らかとなった。

研究 2 性状が異なるオボムコイドの消化・吸収性解析 (*in vivo*)

【目的】性状が異なる OM の消化・吸収性とアレルギー症状誘発の関連性を *in vivo* 試験にて検討する。

【方法】BALB/c マウスに、OM を Alum とともに腹腔内投与しアレルギーを誘発した。OM アレルギーモデルマウスは、IgE 抗体価の上昇を確認し、PBS 群、精製 OM 群、加熱 OM 群、及び焼成 OM 群に分けた。また、非アレルギー群も実験に用いた。各 OM 試料 (OM が 20 mg 相当) を経口投与し、投与後 120 分まで経時的に直腸温及び症状スコアを評価した。また、採血及び採糞も行った。投与後 60 及び 120 分において腸管内容物を採取した。腸管内容物及び糞から PBS にて塩溶性タンパク質を抽出し (Sup.)、その残渣から 2-ME 溶液にて不溶性タンパク質を抽出した (Ppt.)。Sup. 及び Ppt. は、SDS-PAGE 及びイムノブロットにて解析した。また、サンドイッチ ELISA にて血中 OM を定量した。

【結果】投与後 30 及び 60 分の直腸温において、精製 OM 及び加熱 OM 群は非アレルギー群より有意に低下したが、焼成 OM 群では有意な差はなかった。腸管内容物の解析の結果、投与後 60 分では、全ての群で OM が小腸の Sup. に分解断片として検出された。一方、焼成 OM では Ppt. からも未分解の OM が検出された。しかし投与後 120 分では、全ての群で OM が検出されなかった。また、糞中からも OM は検出されなかった。血中 OM 濃度は、OM 投与群において 30 分以降増加した。血中濃度の曲線下面積を比較した結果、焼成 OM 群が最も低値を示したが、有意な差はなかった。

【考察】研究 1 及び 2 より焼成 OM は消化に時間がかかるが、精製及び加熱 OM より低分子の分解断片まで消化されている可能性が考えられた。また、120 分時点で腸管及び糞中から OM が検出されなかったことから、より低分子化した状態で体内に吸収されている可能性がある。その結果 OM が体内に吸収されたとしても、IgE 抗体が OM に反応を示さず、アレルギー症状誘発を抑制したと考える。

研究 3 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

【目的】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、不溶化した OM の OIT に対する有効性を検討する。

【方法】OM アレルギーモデルマウスを非 OIT 群、精製 OM 群、加熱 OM 群、及び焼成 OM 群に分け、4 週間 PBS、精製 OM、加熱 OM、及び焼成 OM を用いた OIT を実施した。また、非アレルギー群も実験に用いた。OIT の有効性は、5 週、7 週、及び 10 週目に精製 OM 20 mg の経口負荷試験を行い、その時の誘発症状により評価した。また、同時に採血も行い、IgA、IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体価を測定した。10 週時のアレルギー症状評価後に、小腸 (回腸) 及びパイエル板を採取した。採取した組織は、リアルタイム PCR にて IL-10、IL-13、MUC2、及び Claudin-2 発現量を比較した。

【結果】OIT 後、非 OIT 群の直腸温は、OIT 群 (精製、加熱、及び焼成 OM 群) より有意に低値を示した。IgA 抗体価は、OIT 群において、OIT 前から OIT 後にかけて有意に増加したが、非 OIT 群では有意な差はなかった。また、IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体価は、OIT 前後で有意な変化はなかった。IL-10 及び IL-13 発現量は、OIT 群で非 OIT 群よりも多かったが、有意な差はなかった。また MUC2 及び Claudin-2 でも有意な差はみられず、IL-10 及び IL-13 のような特徴的な変化もなかった。

【考察】本研究より、焼成 OM を用いた OIT がアレルギー症状を軽減することが示唆された。ま

た、IgA 抗体が経時的に増加した。このことから、血中の IgA 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。以上のことから、低アレルゲン化した BE を用いた OIT は、鶏卵アレルギー患者の治療法として有効な選択肢となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

食物アレルギーの原因食品として最も多いのは、鶏卵によるものである。生卵あるいはゆで卵の摂取により症状が誘発される鶏卵アレルギー患者のうち多く(約70%)が、ベイクドエッグ(BE)であるマフィンに摂取できるという報告があり、BE のアレルゲン性は低いことは明らかにされているが、その原因(作用機序)は明らかにされていない。また、食物アレルギーの治療法の1つとして、耐性獲得を目指す経口免疫療法(OIT)が行われているが、重篤なアレルギー症状を誘発するリスクが大きな課題となっている。

鶏卵による食物アレルギーの原因抗原のなかで、最も重要なものはオボムコイド(OM)である。富岡敏彦氏は、この鶏卵における主要なアレルゲンである OM を題材に、加熱や小麦粉との焼成(BE)等の加工によって性状が異なることで、アレルゲン性がどのように変化するかという課題に対して、*in vitro* での消化実験や、マウスモデルを用いた *in vivo* 試験、さらに、この BE を用いた OIT モデルでの *in vivo* 評価という、以下に示す3つの研究によって解析した。

研究1. 性状が異なる OM の消化性解析 (*in vitro*)

精製 OM や加熱 OM、焼成 OM などを調製し、複数の消化酵素単独、または胃消化と腸消化の組み合わせなどの様々な条件下で反応させたのちに、可溶性(上清)と不溶性沈殿に分けて解析し、これらの各種 OM の消化性を詳細に調べた。その結果、焼成 OM は、消化後も一部不溶化したまま残存すること、及び、その後の消化によって抗体に認識されにくい短い断片として可溶化されることを明らかにした。これらの解析結果は、焼成の過程で OM が小麦タンパク質と相互作用し不溶化することで、消化酵素の影響を受けやすい状態へと構造が変化したことを示唆する。

研究2. 性状が異なる OM の消化・吸収性解析 (*in vivo*)

OM によって感作させた OM アレルギーモデルマウスを用いて、各種 OM の消化性やアナフィラキシー惹起能、血中での OM の移行量などを詳細に解析した。その結果、焼成 OM は、経口惹起試験によるアナフィラキシーを有意に軽減した。その機序としては、消化に時間がかかるが、いったん腸に移行すると他の OM と比べてより低分子化した状態で体内へ吸収されることが示唆され、それ故に IgE 結合能が低下していることを示唆した。また、糞中への OM の排出も検出されなかった。これらの結果より、焼成処理により不溶化した OM の消化性の向上と抗体結合能の低下が、BE の低アレルゲン化に寄与している可能性が示された。

研究 3. 不溶化 OM の経口免疫療法 (OIT) に対する有効性の解析

OM アレルギーモデルマウスに対して焼成 OM を含む各種 OM を用いて OIT を試みた。その結果、焼成 OM を用いた OIT 群では、他の OM と同様にアレルギー応答を抑制しうることを示した。また、その際に、OM 特異的 IgA の有意な増加を観察し、IgA 抗体の産生増加がアレルギー発症抑制に関与している可能性を示した。これらのことより、焼成 OM を用いた OIT が、治療中のアレルギー症状 (アナフィラキシー等) の誘発リスクを低減しつつ、治療効果を維持できる可能性をマウスモデルで示した。

本学の博士学位論文審査基準に照らして行った本博士論文の評価は、以下のとおりである。

- ① これまで所属研究室が行ってきた研究を十分に理解し、解明すべき点を的確に把握して進められている。本研究は、鶏卵アレルゲンの一つである OM の性状変化に焦点をあてて、その消化性・吸収性および経口免疫療法への有用性について解析したものであり、一貫したテーマでの研究になっている。
- ② BE の消化吸収性とアレルギー誘発を関連付ける論文は少ない現状の中、小麦粉と焼成して得られた BE がヒト患者での摂食許容性が高いという報告に対して、その機序の解明に踏み込んだ研究であり、その機序に対して有力な仮説を示すことができた点に高い新規性・独創性が認められる。
- ③ さらに特記すべき点として、この BE がアレルギー発症リスクを下げつつ、OIT 誘導に対して他の OM と同等の有効性を示すことができた点が挙げられ、非常に大きな社会的有用性をもつと評価できる。
- ④ 本研究は、研究目的に対して適切な手技・実験法を選択し解析され、得られた結果は科学的に解釈され、そして論理的に考察できており、博士論文としての体裁も整っている。
- ⑤ 研究内容は当該研究分野において世界的なレベルにあり、英文誌にも掲載され、英語の語学力も満足のいくレベルであると考えられる。
- ⑥ 本審査過程における発表・質疑応答でも丁寧な回答を行うなど極めて良好であり、博士の学位にふさわしい幅広い栄養学的学識と考察力を備えていることを確認した。

以上のように、博士論文の内容、栄養科学の研究能力、豊かな学識、英語語学力等を総合的に判断し、博士の学位を与えるのに適切であると判断した。