

納豆の摂取はアレルギーの経皮感作を抑制するか？

近畿大学 農学部 応用生命化学科

森山 達哉

近年、食物アレルギーは、食物抗原が経皮感作して IgE 抗体を産生し、感作されることが明らかにされてきた(1)。従って、食物アレルギーの予防のためには、皮膚からの食物抗原の侵入と感作を抑制する必要がある。そのためには、スキンケアなどの皮膚への直接的なアプローチの他にも、体内での免疫バランスを適正化することで、経皮感作を抑制する方策も考えられる。一般に発酵食品の摂取は、小腸だけでなく、全身の免疫機能に影響を与え、Th1 と Th2 のバランスを是正しうることが示唆されている。これらの免疫機能に対する発酵食品としては、乳酸菌に関して広く研究されているが、それ以外の発酵食品、特に納豆や味噌などの発酵大豆食品が免疫機能を是正し、経皮感作を抑制するかどうかという点に関しては、まったく研究が行われていない。そこで、本研究では、次の2つの研究を行った。

1. 納豆が低アレルゲン食品であることを網羅的な大豆アレルゲン抗体を用いて実証する
2. 卵白アレルゲンであるオボアルブミン（OVA）をマウスに経皮感作させる際に、発酵大豆食品である納豆を経口摂取させることで OVA による感作を抑制しうるかどうか？

という2点について検討した。

これらの研究によって、納豆が低アレルゲン食品であることを実証するとともに、発酵大豆食品である納豆の摂取は、食物アレルギーの引き金である食品タンパク質の経皮感作を抑制するかどうか、卵白アレルゲンである OVA を用いて検証を行うことを試みた。

## 実験方法

### 1. 納豆の低アレルゲン性の検証

納豆のアレルギー抑制活性を検証するためには、納豆そのものが低アレルゲン性であることをあらかじめ実証することが望ましい。そこで、市販納豆（大粒、中粒、小粒、挽き割り）における大豆アレルゲンレベルを生大豆や水煮大豆と比較した。比較のためには、これまでに大豆や大豆加工食品のアレルゲン性評価に使用してきた各種大豆アレルゲン抗体（すでに当研究室が所有しているもの）を用いてイムノブロットィングや ELISA にて検証した。検出した大豆アレルゲンは、Gly m 3, Gly m 4, Gly m 5, Gly m 6, Gly m 7, Gly m TI, Gly m Bd 30K である。

### 2. 納豆食による OVA の経皮感作が抑制されるかどうか？の検証

1 週間の予備飼育後、7 週齢の雌性 Balb/c マウスを 4 群に群分けし、空白群（SDS のみ塗布）、コントロール群（カゼイン群・OVA/SDS 塗布）、大豆添加群（カゼイン+大豆食群・OVA/SDS 塗布）、納豆添加群（カゼイン+納豆食群・OVA/SDS 塗布）を設定する。経口免疫寛容が生じないように、卵白（OVA）フリーの餌を作成した。飼料組成は表に示す。なお、大豆または納豆は 10%（w/w）加え、飼料全体の主要栄養成分が同一になるように調整した。飼育期間に、各群のマウスの背部をバリカンで剃毛し、週 5 回、SDS とともに OVA を塗布した。この経皮感作のプロトコールは、当研究室の既報と同様の

手法を用いた (2-5)。動物実験のプロトコールは図 1 に示す。

塗布条件は、週 5 回×5 週間塗布を行い、部分採血を 1 週間に 1 回行った。5 週間目で全採血を行うとともに塗布部位の皮膚を回収した。全血から遠心分離によって血清を採取し、OVA 特異的 IgE、IgG1 レベルを ELISA にて測定した。この血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1 レベルを OVA の経皮感作の指標として評価した。

さらに、皮膚における炎症や皮膚アレルギーの指標となるサイトカイン (TSLP、TARC) をそれぞれ市販 ELISA キット (R&D、mouse DuoKit) にて測定した。

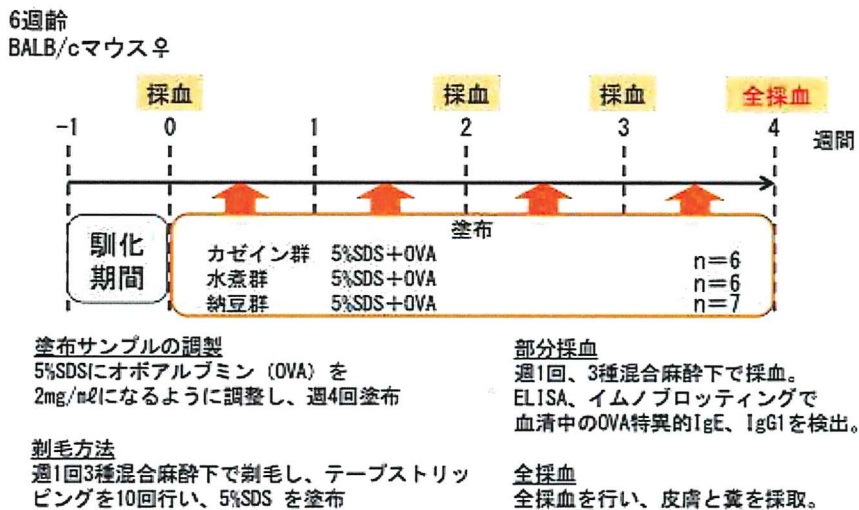


図 1. 経皮感作実験の動物実験プロトコール

## 実験結果

### <納豆の低アレルギー性の検討>

当研究室でこれまでに作成し、検証してきた大豆の主要アレルギーに対する抗体を用いたウェスタンブロットィングによって、大豆、水煮、納豆 4 種における各種アレルギーレベルを半定量した。花粉症に関連する大豆アレルギーである Gly m 3, Gly m 4、そして、主要な貯蔵タンパク質である 7S グロブリン、11S グロブリンに相当する Gly m 5、Gly m 6 の 4 種類に関しては、いずれも大豆、水煮では明瞭なアレルギーの検出ができたが、いずれの納豆でもほとんど検出することができなかった。よってこれらのアレルギーは納豆においては分解が進んでいるものと考

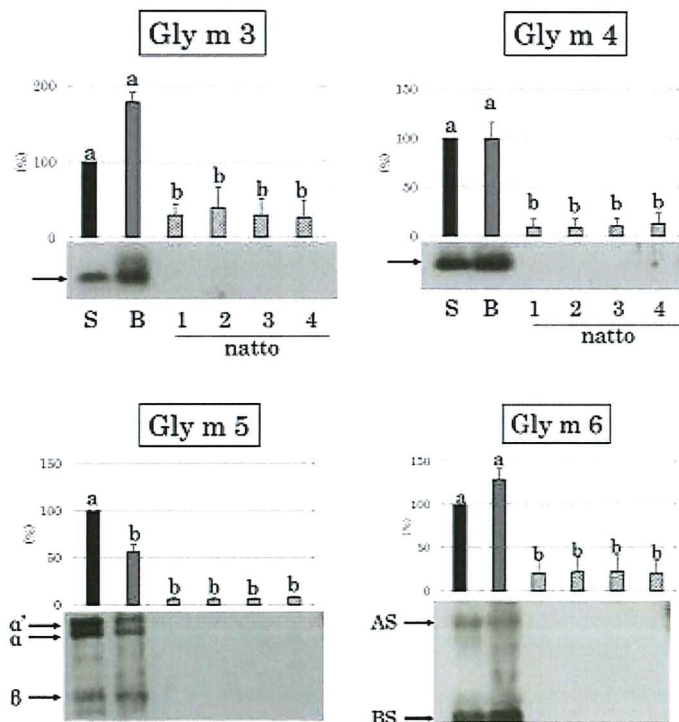


図 2. 大豆 (S)、水煮大豆 (B)、納豆 (1-4) におけるアレルギーレベルの半定量 (1)

えられた (図 2)。

次に、比較的最近発見されたアレルギーであり、ビオチン結合タンパク質というユニークな性質を有する Gly m 7 や、小児における主要な大豆アレルギーとして古くから知られている Gly m Bd 30K、クニツツ型トリプシンインヒビターとして知られている Gly m TI についても、同様に納豆ではほとんど検出出来なかった。しかし、Gly m TI に関しては、長時間露光によって、分解物と思われるバンドが複数検出された。その分解物の濃さは、納豆の粒径に依存して変化し、粒径が小さいほど少ないことが判明した (図 3)。

次に、抗原固相化の条件で、ELISA にて各種アレルギーレベルも半定量した。この場合も、ウェスタンブロッティングと同様の結果が得られた。

この場合もトリプシンインヒビターなどでは粒径の小さい納豆ほど低アレルギー化が進んでいることが判明した (データ省略)。さらに患者血清 IgE の結合性についても、納豆では有意な低減化が確認された (データ省略)。

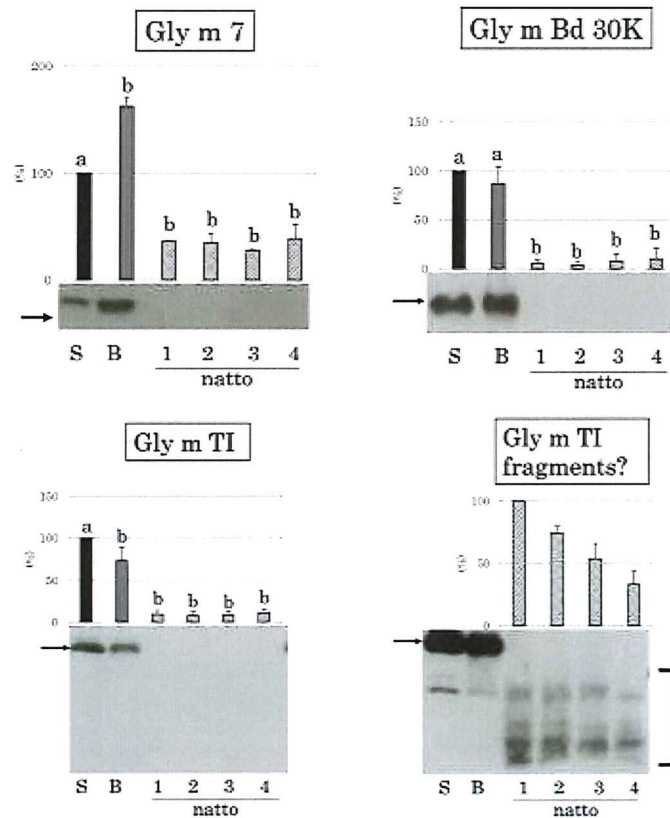
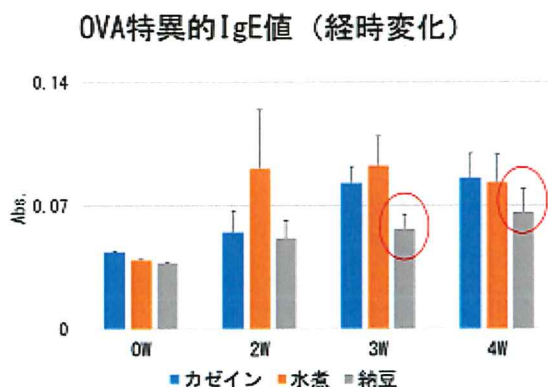


図 3. 大豆 (S)、水煮大豆 (B)、納豆 (1-4) におけるアレルギーレベルの半定量 (2)

### <経皮感作に及ぼす納豆食の影響>

次に、本研究課題の中心的な研究内容として、納豆食による OVA の経皮感作への効果について調べた。カゼイン食、大豆水煮食、納豆食を与えたマウスにおいて、皮膚に OVA を経時的に塗布したところ、OVA 特異的 IgE に関しては、カゼイン食群と水煮群では 0 週目と比較して 4 週目で有意に増加し、IgE 抗体の有意な産生が確認された。一方、納豆食群では、0 週目と比較して 4 週目では増加傾向を示したが、有意ではなかった。



3w, 4w血清において、カゼイン群、水煮群に対して、納豆群では低値傾向を示した。(有意差は無し)

Tukey-Kramer testにおいて有意差は見られなかった

図 4. OVA を経皮塗布した際の、OVA 特異的 IgE レベルの経時変化 (0~4w)

4週目におけるOVA特異的IgEレベルは、納豆食群では他の2群と比べて低値傾向を示した(図4、図5)。

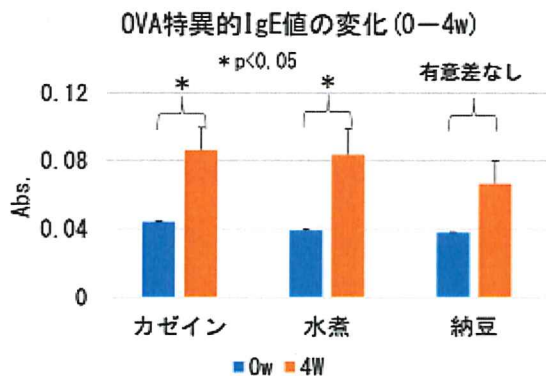


図5. OVAを経皮塗布した際の、OVA特異的IgEレベルの変化(0~4w)

OVA特異的IgG1レベルも類似の結果が得られ、4週目におけるOVA特異的IgG1レベルは、納豆食群では他の2群と比べて低値傾向を示した(図6)。このような現象に関連するメカニズムを検証するために、経皮感作に関与する皮膚における局所的な炎症に関わるTSLPやTh2細胞の遊走促進に関与するTARCといったサイトカインについて、塗布した皮膚における存在レベルをELISAにて測定した。その結果、これらの2種類のサイトカイン濃度には3群間に有意な差はなく、納豆食が局所的な皮膚における炎症やTh2型免疫細胞の遊走などとは異なる機序でTh2型抗体産生の抑制(傾向)効果を発揮することが示唆された(図7)。

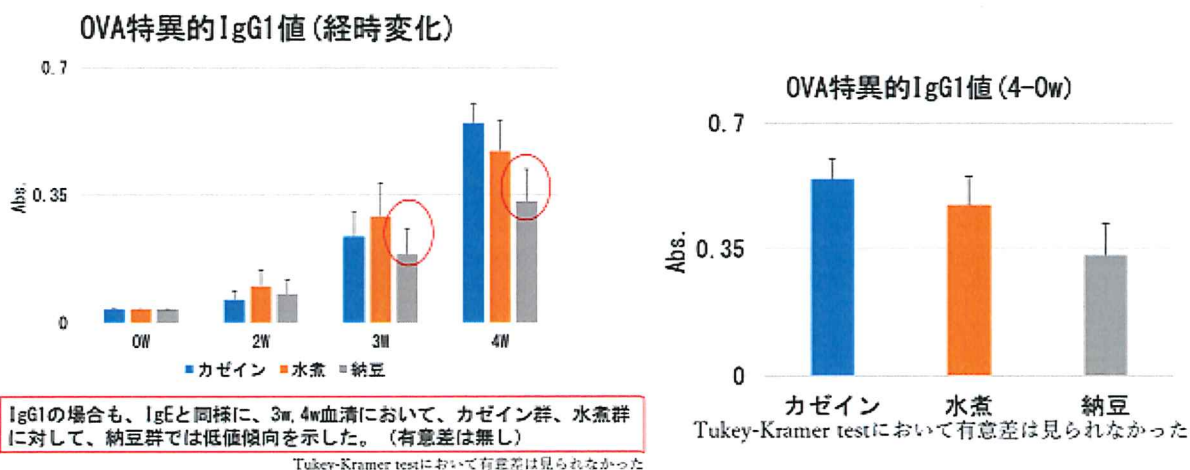


図6. OVAを経皮塗布した際の、OVA特異的IgG1レベルの経時変化(0~4w)(左グラフ)と、4wと0wとの差(右グラフ)。

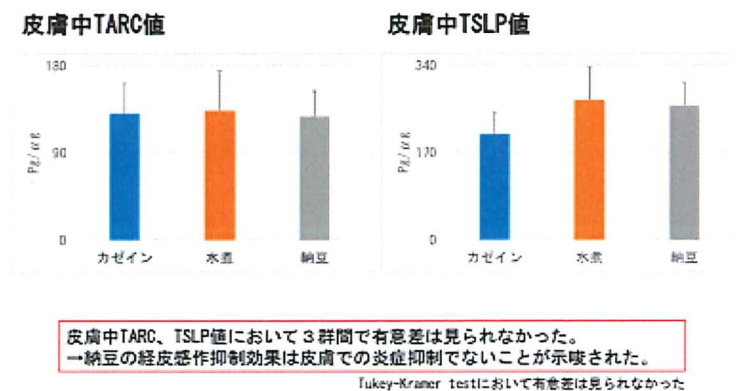


図7. カゼイン群、水煮群、納豆群における皮膚中のTARC濃度、TSLP濃度(市販ELISAにて測定)

## 考察

### <納豆の低アレルギー性の検討>

大豆中には多くの種類のアレルゲンタンパク質が存在する。大豆にはさまざまな加工食品が存在するため、加工方法によってこれらの複数のアレルゲンが多様に変化する可能性が考えられるが、実際にそのような大豆アレルゲンの網羅的な変動解析を行った研究は少ない。私たちはこれまでに、多くの大豆アレルゲンに対する抗体を作成し、ガンマ線照射 (6)、虫害被害 (7)、GM大豆 (8)、などにおいて複数の大豆アレルゲンの変動解析を報告した。加工法に関しては、大豆の発酵食品である味噌における大豆アレルゲンの網羅的な検出を報告し、味噌の種類によって各種アレルゲンレベルが異なって低下することを示した (9)。本研究では、もう一つの代表的な大豆由来発酵食品である納豆に関して、各種アレルゲンレベルを解析した。

納豆は、蒸した大豆に納豆菌を接種し、発酵させた発酵食品である。そのため、比較対象としては、生大豆のみならず、加熱した大豆（水煮大豆）を用いた。今回の実験では、CBB染色でのタンパク質プロファイルは小粒や挽き割り納豆が大粒納豆と比べて低分子化している傾向が見られた。アレルゲンに関しても、Gly m TIなどが、粒径が小さいほうが、より低減化している傾向が見られた。ただし、今回使用している市販納豆は、使用している品種や詳細な製造方法が不明であり、粒径の異なる大豆は同じ品種ではないため、アレルゲンレベルの差異は、品種間や製造方法の差異を反映している可能性は残されるが、粒径が小さいほど、納豆菌による発酵、タンパク質分解が効率的に進み、より低アレルギー化されている可能性がある。しかしながら、今回調べたアレルゲンでは、いずれも納豆類では有意な低減が確認され、納豆の低アレルギー性が改めて確認された。なお、今回データは示していないが、ELISAではいずれのアレルゲンにおいても、アレルゲンレベルは大豆>水煮大豆>納豆となり、特に花粉症関連のアレルゲンである Gly m 4、Gly m 3 は大豆と水煮大豆での差が大きく、加熱による低減化が示唆された。その他のアレルゲンでは、水煮大豆と納豆との間で大きな差異が見られ、この場合は、発酵過程での寄与が大きいと考えられた。以上の結果から、納豆の製造工程において、各種アレルゲンは加熱と発酵過程の2段階で低減が進み、主なアレルゲンでは後者の効果がより大きいことが示唆された。また、発酵分解過程に抵抗性があるアレルゲンも無く、納豆菌は強力な大豆アレルゲン分解活性を有する事が示された。発酵大豆食品である納豆は、味噌と同様に、低アレルギー性が期待される大豆加工食品として認識される。

ヒトが摂食後、消化酵素によってさらに分解が進むため、消化管内での大豆アレルゲンの抗原性はさらに低下すると推測され、納豆のアレルゲンリスクは通常の大豆食品と比較して低いと考えられた。ただし、実際の大豆アレルギー患者の場合は、閾値の問題から、低減化した納豆でも発症するリスクは考えられるので、臨床的な応用に関しては今後もさらなる慎重な解析が求められる。

### <経皮感作に及ぼす納豆食の影響>

発酵食品である納豆を摂食することで、全身の免疫に影響を及ぼし、アレルゲンの経皮感作が抑制されるかどうか、検討を行った。私たちが確立したマウス経皮感作モデル系を用いて、食餌組成の異なる3群（カゼイン食群、大豆水煮食群、納豆食群）において、卵白

アレルギーである OVA を経皮的に塗布した。なお、試験食では、コントロール群であるカゼイン群でのカゼインタンパク質の半分を大豆水煮、納豆由来タンパク質にそれぞれ置き換えた。データは示していないが、摂餌量や体重には 3 群間で有意な差はなかった。この条件で、OVA 塗布 4 週目まで、経時的に部分採血を行い、OVA 特異的 IgE、IgG1 レベルを測定した。血清 OVA 特異的 IgE 値の 0 週から 4 週目までの増加分を検討したところ、カゼイン食群、水煮食群では有意に IgE 抗体価が増加し、OVA の経皮感作が確認されたが、納豆食群においては有意な増加が見られず（図 5）、IgE 値の増加を指標にした OVA の経皮感作が抑制された。また、4 週目の OVA 特異的 IgG1、IgE 抗体価を比較したところ、いずれも納豆食群では低値傾向を示した（図 4、図 6）。この場合、統計解析の結果、残念ながら有意差（ $p < 0.05$ ）は見られなかったが、IgE でも IgG1 でも同様の傾向を示したことから、納豆食が OVA の経皮感作を抑制する可能性が示唆された。今回、実験では各群 6 匹と少ないマウスを使用したため、統計的な有意差が見られなかったことが考えられる。現在、マウスの n 数を増やして再度試験を計画している。

興味深いことに、このような OVA 特異的 IgE、IgG1 の産生抑制効果は、水煮大豆群ではほとんど見られなかった。従って、大豆から納豆菌によって発酵させることが本抑制効果にとって重要であることが示唆され、改めて発酵食品としての納豆の効果がクローズアップされた。

今回の現象に関連する機序を調べるために、経皮感作関連サイトカインである TLSP や TARC の皮膚での測定の結果、いずれの群間でも有意な差は見られなかった。よって、納豆食は皮膚における局所的な炎症や Th2 細胞の遊走等とは異なる作用点において免疫系を調節して Th2 型抗体の産生を抑制し、経皮感作を抑制しうる効果が示唆された。また、現在、Th1 型の抗体である OVA 特異的 IgG2a の産生に関しても検討を進めている。さらに、腸内細菌叢の変化が関与している可能性も視野に、今回のマウスの腸内細菌叢の解析も進めている。

## 要約

本研究では、納豆食がアレルギーの経皮感作を抑制するかどうか検討した。本試験の前に、納豆食そのものが低アレルギー化されていることを検証した。

複数の大豆アレルギーに対する抗体を用いて、納豆が大豆や水煮大豆と比べて低アレルギー化されていることを網羅的なアレルギーの変動解析によって明らかにした。納豆の製造工程において、各種アレルギーは加熱と発酵過程の 2 段階で低減が進み、主なアレルギーでは後者の効果がより大きいことが示唆された。また、発酵分解過程に抵抗性があるアレルギーも無く、納豆菌は強力な大豆アレルギー分解活性を有する事が示された。発酵大豆食品である納豆は、味噌と同様に、低アレルギー性が期待される大豆加工食品として認識された（現在、原著論文として投稿準備中）。

次に、本試験として、マウスモデル系を用いて OVA を経皮的に塗布し、納豆食が OVA の経皮感作を抑制するかどうか検討した。その結果、4 週目の OVA 特異的 IgE、IgG1 レベルとともに、納豆食群ではカゼイン食群、大豆水煮群と比べて低値傾向を示し、IgE に関しては 0-4 週での抗体価の増加に有意な差がなく、OVA の経皮感作を抑制することが実証された。その機序に関しては今後の課題であるが、経皮感作に深く関与する皮膚における

局所的な TSLP や TARC などのサイトカインレベルには差異は見られず、別の作用点で経皮感作を抑制する可能性が示唆された（学会発表予定）。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 タカノ農芸化学研究助成財団さまの多大なご援助やサポートを頂きました。心より感謝いたします。また、共同で実験を担当して頂きました当研究室スタッフの矢野えりかさん、大学院生の畠田力也君に感謝いたします。

## 文献

- 1) Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**;121: 1331–1336
- 2) Murakami H, Ogawa T, Takafuta A, Yano E, Zaima N, Moriyama T. Identification of the 7S and 11S globulins as percutaneously sensitizing soybean allergens as demonstrated through epidermal application of crude soybean extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2018**; 82:1408–1416.
- 3) Murakami, H., Ogawa, T., Takafuta, A., Yano, E., Zaima, N., and Moriyama, T: Percutaneous sensitization to soybean proteins is attenuated by oral tolerance. *J. Nutr. Sci. and Vitaminol.* **2018**; 64, 683-686.
- 4) Izumi, E.; Hidaka, S.; Hiroi, A.; Kinugasa, S.; Yano, E.; Zaima, N.; Moriyama, T.: Thaumatin-Like Protein (Pru av 2) Is a Cherry Allergen That Triggers Percutaneous Sensitization in Mice. *Foods*, **2021**;10, 134.
- 5) Kinugasa, S., Hidaka, S., Tanaka, S., Izumi, E., Zaima, N., Moriyama, T: Kiwifruit defense protein, kiwellin (Act d 5) percutaneously sensitizes mouse models through the epidermal application of crude kiwifruit extract, *Food & Nutr. Res*, **2021**; 65: 7610.
- 6) Moriyama T, Yano E, Kitta K, Kawamoto S-I, Kawamura Y, Todoriki S. Effect of Gamma-Irradiation on Soybean Allergen Levels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2013**; 77, 2371-2377.
- 7) Hanafusa, K., Murakami, H., Ueda, T., Yano, E., Zaima, N., Moriyama, T: Worm wounding increases levels of pollen-related food allergens in soybean (*Glycine max*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**; 82, 1207-1215.
- 8) Matsuo A, Matsushita K, Fukuzumi A, Tokumasu N, Yano E, Zaima N and Moriyama T : Comparison of Various Soybean Allergen Levels in Genetically and Non-Genetically Modified Soybeans, *Foods*, **2020**; 9, 522.
- 9) Moriyama, T., Yano, E., Suemori, Y., Nakano, K., Zaima, N., Kawamura, Y: Hypoallergenicity of various miso pastes manufactured in Japan/ *J. Nutr Sci Vitaminol.* **2013**; 59, 462-469.