

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4834819号
(P4834819)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl. F 1
GO 1 N 33/50 (2006.01) GO 1 N 33/50 Z

請求項の数 3 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2006-12224 (P2006-12224)	(73) 特許権者	501203344
(22) 出願日	平成18年1月20日 (2006.1.20)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(65) 公開番号	特開2006-227000 (P2006-227000A)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(43) 公開日	平成18年8月31日 (2006.8.31)	(74) 代理人	110000327
審査請求日	平成21年1月8日 (2009.1.8)		特許業務法人 クラスター
(31) 優先権主張番号	特願2005-13879 (P2005-13879)	(74) 代理人	100086221
(32) 優先日	平成17年1月21日 (2005.1.21)		弁理士 矢野 裕也
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	後藤 真生
			茨城県つくば市竹園1-13-2-803-205
		(72) 発明者	石川 祐子
			茨城県つくば市春日2-35-11
		審査官	廣田 健介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー重症度のインデックス化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルの血管透過性測定に基づくことを特徴とするアレルギー重症度のインデックス化方法であって、蛍光標準物質を該非ヒト哺乳動物の血中に投与し、その漏出を蛍光測定器を用いて該非ヒト哺乳動物モデルを個体のまま測定することで、血漿漏出量を算出することを特徴とする方法。

【請求項2】

前記アレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルが、抗原特異的リンパ球レセプター遺伝子導入動物に特異抗原を断続的に経口摂取させる方法である請求項1に記載のアレルギー重症度のインデックス化方法。

【請求項3】

抗アレルギー薬ないしアレルギー予防薬をスクリーニングに用いる請求項1または2に記載のアレルギー重症度のインデックス化方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルを用いたアレルギー重症度のインデックス化方法に関する。

【背景技術】

【0002】

食品中に含まれる物質や大気中に浮遊する物質等がアレルゲンとなって、蕁麻疹、喘息、アトピーなどのアレルギー疾患を起こすことが知られており、特にアナフィラキシーショックと呼ばれる重篤なアレルギーを引き起こした場合には死に至る場合もある。

【 0 0 0 3 】

アレルギーの重症度をインデックス化することで、既知または未知の物質がアレルギーに及ぼす影響を定量化することは、アレルギーの発症を避けるために、また、抗アレルギー剤、アレルギー予防薬のスクリーニングを行う上で重要である。

【 0 0 0 4 】

従来、アレルギーの重症度のインデックス化は、実験動物の腹腔内にアジュバント（免疫増強剤）とともに抗原を免疫し抗原感作の後、血清中抗原特異的イムノグロブリン（IgE）抗体を測定すること（非特許文献1）、または抗血清や抗体、抗体産生細胞株を移入して受動感作を誘導し、これらの特異的応答の重篤度を観察によって行うこと（非特許文献2）、または抗体を高産生するトランスジェニックマウスを免疫して耳介浮腫を観察すること（非特許文献3）、または、抗原特異的T細胞レセプタートランスジェニックマウスに抗原を経口摂取させ、感作成立後、抗原を注射して誘導したアナフィラキシーショックの重篤度を目視によってスコア化するもの（非特許文献4）があった。

10

【 0 0 0 5 】

しかしながらこれらの方法は測定の際に抗体測定、または動物の長期観察が必要とされ、測定には免疫学に熟知する必要があり、高い熟練が必要とされる。

【 0 0 0 6 】

さらにヒトのアレルギー発症は、アレルゲンとの自然な接触（抗原の吸入・摂食）によるアレルゲン感作によるものであるため、特殊なアジュバント（免疫増強剤）を用いた免疫法や、培養細胞や抗体などの移入によるアレルギーモデルとは感作・発症メカニズムが異なり、従来の方法で得られるアレルギー重症度のインデックスを用いて抗アレルギー剤やアレルギー予防薬の薬効を決定しても、実際にヒトに投与する効果とは一致しない場合が多い。

20

【 0 0 0 7 】

また、血清中の抗原特異的IgE量など、アレルギーのリスクファクターとされる物質の測定も、実際のアレルギー症状の重症度とは必ずしも一致しないことが明らかにされ、これらに基づいたインデックスも抗アレルギー剤やアレルギー予防薬の薬効を決定しても、実際にヒトに投与する効果とは一致しない場合が多い。

30

【 0 0 0 8 】

さらに、アナフィラキシーショックの重篤度を観察する方法では、感作に4週間を必要とし、実験動物一匹につき一つの抗原濃度に対する応答しか測定できず実験効率が悪い。

【 0 0 0 9 】

また、アナフィラキシー観察による重篤度の定量化はマウスの行動を目視によってスコア化するため、症状の差が小さい場合には検出精度が不十分であり、動物個体差によるばらつきが大きい。

【 0 0 1 0 】

一方、蛍光標準物質を血中投与しておき、皮膚への血漿漏出量を、蛍光測定器を用い、皮膚を直接測定する方法（非特許文献5）が開示されているが、これら文献では、皮膚への血漿漏出がアレルギー重症度のインデックス化に用いられる可能性があることについては開示も示唆もない。

40

【 0 0 1 1 】

【非特許文献1】Toxicology. 2004 Apr 1; 197 (1):1-13. Differential immunogenic and neurogenic inflammatory responses in an allergic mouse model exposed to low levels of formaldehyde. Fujimaki H, Kurokawa H, Kunugita N, Kikuchi M, Sato F, Arashidani K.

【非特許文献2】Pediatr Res. 1998 Nov; 44(5):791-7. Chronic oral antigen exposure induces lymphocyte migration in anaphylactic mouse intestine. Ohtsuka Y, Suz

50

uki R, Nagata S, Oguchi S, Shimizu T, Yamashiro Y, Okumura K, Ra C.

【非特許文献3】J Allergy Clin Immunol. 2003 Jan;111(1):143-8. Chronic inflammation of the skin can be induced in IgE transgenic mice by means of a single challenge of multivalent antigen. Sato E, Hirahara K, Wada Y, Yoshitomi T, Azuma T, Matsuoka K, Kubo S, Taya C, Yonekawa H, Karasuyama H, Shiraishi A.

【非特許文献4】Clin Exp Allergy. 2002 32: 563-570 Lactobacillus casei strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. Shida K, Takahashi E, Iwadate K, Takamizawa H, Yasui T, Sato S, Habu S, Hachimura S, Kaminogawa S.

【非特許文献5】J Pharmacological and Toxicological Method. 2002 48: 81-85 An improved method for measuring vascular permeability in rat and mouse skin. Yamaki K, Takano-Ishikawa Y, Goto M, Kobori M, Tsushida T.

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は熟練を必要とせず、実際の人間の感作メカニズムに近く、感作期間を短縮化し、さらに、抗原濃度依存的なアレルギー重症度を短時間でかつ高精度に効率よく測定可能である方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

20

本願発明者らは、鋭意研究の結果、アレルギー重症度を血管透過性、すなわち血管透過性の変化に伴う皮膚への血漿漏出量に基づいて、インデックス化すれば、熟練を必要とせずにアレルギー重症度のインデックス化ができることを見出し、本発明を完成した。ここでアレルギー重症度のインデックス化とは、アレルギー重症度を指標化して表すことをいう。本願発明者らは、鋭意研究の結果、アレルギー重症度を皮膚への血漿漏出量に基づいて、インデックス化すれば、熟練を必要とせずにアレルギー重症度のインデックス化ができることを見出し、本発明を完成した。

【0014】

本発明はアレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルの血管透過性測定に基づくアレルギー重症度のインデックス化方法を提供する。

30

また、本発明は、前記血管透過性測定が、血漿漏出量に基づく測定を用いるアレルギー重症度のインデックス化方法を提供する。

また、本発明は抗原特異的リンパ球レセプター遺伝子導入動物をアレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルとして用い、特異抗原を断続的に経口摂取させる方法で疾患を誘導し、この血管透過性、または血漿漏出量に基づくアレルギー重症度のインデックス化方法を提供する。

また、本発明は、抗アレルギー薬ないしアレルギー予防薬をスクリーニングの際に用いる、上記アレルギー重症度インデックス化方法を提供する。

【発明の効果】

【0015】

40

本発明により、抗体測定、長期に渡る観察などの、熟練を必要とする実験を一切必要としない、極めて簡便なアレルギー重症度のインデックス化が初めて提供された。

【0016】

本発明の方法により、抗アレルギー剤やアレルギー予防薬の薬効の評価が極めて簡便、迅速になされ、薬剤のスクリーニングなどに大いに貢献するものと期待される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明では、血漿漏出量に基づいてアレルギー重症度をインデックス化する。この方法によれば、血漿漏出量の測定は、蛍光などの標識を施した標準物質を血中投与しておき、アレルギーを発症させたときの皮膚への血漿漏出量を、例えば個体のまま蛍光測定器を用

50

いて、または皮膚切片を用いて行うことによりなされる。

【0018】

このような方法は上記の通り公知であるが、下記実施例において、具体的に示されるように、アレルギー重症度のインデックス化に有用に用いられることは知られていなかった。

【0019】

なお、アレルギー重症度のインデックス化の際は、実際の血漿量（体積）をアレルギー重症度を示すスコアとして用いても良いし、例えば標準物質として蛍光標識したものをを用い、漏出した蛍光標準物質の蛍光強度を用いても良い。また、単に、漏出した蛍光標準物質を蛍光励起して得られる蛍光イメージをカメラなどを通じ、または目視によってこの強度を観察し、これを指標（＝インデックス）としてもよい。また、標準物質の標識は蛍光に限られることはなく、例えば、化学発光、吸光、電気化学応答などによる標識を用いても良いし、抗原抗体反応、酵素基質反応、化学反応などを用いて標準物質を測定してもよい。何を持ってアレルギー重症度を示すスコアとするかは、実験者により適宜定義される。

10

【0020】

血漿漏出量の測定を、標準物質を血中投与しておき、皮膚切片上での血漿の漏出を行う場合、動物を直接操作する場面は標準物質の血中投与と起炎物質の皮内投与、皮膚切片の採取のみであり、これは動物を扱うものであれば容易になされることであり、免疫学的手法に特有の熟練は全く不要である。

【0021】

また、驚くべきことに、血漿漏出量の測定を、蛍光標識を施した標準物質を血中投与しておき、皮膚への血漿漏出量を、例えば蛍光測定器（例：NIGHTOWL LB981ベルトールドテクノロジー社製）を用いて行えば、動物を直接操作する場面は標準物質の血中投与と起炎物質の皮内投与のみであり、これは動物を扱うものであれば容易になされることであり、免疫学的手法に特有の熟練は全く不要である。

20

【0022】

さらに、この方法を用いれば、動物に与えるダメージを最小限に、生きたまま、ごく短時間（数秒）で結果を得ることが可能である。

【0023】

さらに、前記アレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルとして、例えば、抗原特異的リンパ球レセプター遺伝子導入動物が有効に用いられ、この場合、アレルギーの発症自体は、動物にアレルゲンを含有する食餌を自由摂取させるのみでなされ、実験の全工程を通じ、全く熟練が不要であり、有効に用いられる。

30

【0024】

また、上記抗原特異的リンパ球レセプター遺伝子導入動物を用いた場合、実際の人間の感作メカニズムに非常に近く、抗アレルギー剤、アレルギー予防薬に用いられる場合に信頼性の高い結果が得られる。

【0025】

さらに本願発明者らは、鋭意研究の結果、抗原特異的リンパ球レセプター遺伝子導入動物に食餌抗原を摂取させることにより本方法を行う場合は、抗原を含有する食餌を投与する期間とそうでない期間を断続的に設けることにより、個体間の差を著しく軽減する（発症を観察することのできないマウスの発生率は連続的に投与すると40%であるところ、断続的な投与により10%程度にまで減らすことができる）ことを見出している。

40

【0026】

なお、抗原特異的リンパ球レセプター遺伝子導入動物はジャクソン研究所などで市販されている。

【0027】

また、本発明のアレルギー重症度インデックス化方法は、アレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルに、抗アレルギー薬ないしアレルギー予防薬を経口投与、静脈注射、または塗布などすることにより、これらのスクリーニングのために有効に用いられる。すなわち、候

50

補となる抗アレルギー薬をアレルギー疾患非ヒト哺乳動物モデルに、経口投与、静脈注射、または塗布などした群と、対照となる群とを設け、本発明によるインデックス化方法により、それぞれにおけるアレルギー重症度を比較することで、候補となる抗アレルギー薬ないしアレルギー予防薬の有効性を比較することができる。抗アレルギー薬ないしアレルギー予防薬の投与方法、投与の時期は、適宜、実施する者により選択されることはいうまでもない。また、本発明のアレルギー重症度インデックス化方法は、アレルギーを誘導するアレルゲン物質のスクリーニングのために用いられる。

【0028】

以下、本発明を実施例に基づき、より具体的に説明する。しかしながら、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0029】

D011.10マウスに経口で抗原を投与した。投与方法は、2%卵白アルブミン水溶液を3日間、通常の水を4日間を自由摂取、または20%卵白含有食餌を4日間、通常餌を3日間を自由摂取、これらを2クール投与を行った。その後、蛍光色素(FITC: Fluorescein isothiocyanate)でラベルした牛血清アルブミン3mg/匹を尾静脈より投与し、背部皮膚に濃度を変えた卵白アルブミン抗原またはヒスタミン10 μ g/mlおよびコントロールとしてのTyrode溶液を0.05ml/site皮内投与する。30分後、屠殺し、抗原およびヒスタミンを投与した部分の皮膚を直径10mmから15mmの皮膚切片として24穴プレートに採取し、これに1mlのホルムアミドを加え、さらに皮膚切片とは別のウェルに50 μ lのマウス血清を入れ、0.95mlのホルムアミドを加えた。50 $^{\circ}$ Cで2-6時間加熱した後、蛍光プレートリーダー(ARVOsx-1420, Wallac)を用いて485nm励起で535nmにおける蛍光強度を測定し、血漿漏出量を算出した。

【0030】

ヒスタミン10 μ g/mlによって誘導された血漿漏出量を100%とし、抗原各濃度によって誘導された血漿漏出量を動物ごとにインデックス化した。

【0031】

蛍光強度の測定1時間前に、アレルギー抑制効果をもつ茶として知られる、'べにふうき'を経口投与する群と投与しない群を設けると、'べにふうき'の投与群では、アレルギーが抑制されることが観察された(図2)。

【実施例2】

【0032】

D011.10マウスに経口で抗原を投与した。投与方法は、2%卵白アルブミン水溶液を3日間、通常の水を4日間を自由摂取、これらを2クール投与を行った。その後、蛍光色素(FITC: Fluorescein isothiocyanate)でラベルした牛血清アルブミン3mg/匹を尾静脈より投与し、背部皮膚に濃度を変えた卵白アルブミン抗原またはヒスタミン10 μ g/mlおよびコントロールとしてのTyrode溶液を0.05ml/site皮内投与する。30分後、抗原およびヒスタミンを投与した背部を、バイオイメージング装置(Nightowl LB981, BERT HOLD TECHNOLOGIES)を用いて485nm励起で535nmにおける蛍光強度を観察した。その結果を図3に示す。また、これを画像解析して得られる蛍光強度の結果を図4に示す。また、さらにイメージングを行った後に、屠殺し、切除した皮膚切片を蛍光プレートリーダー(ARVOsx-1420, Wallac)で485nm励起で535nmにおける蛍光強度を測定し、この値から漏出した血漿の体積を算出した。結果を図5に示す。

【0033】

イメージングの結果からは、画像で確認される順番に、ヒスタミン投与群、0.5 μ M OVA投与群、0.1 μ M OVA投与群、タイロード投与群、の順にアレルギー重症度が高いことが指標として得られる。また、この画像から得られた蛍光強度をそのままアレルギー重症度を示すスコアとして用いて、ヒスタミン投与群、0.5 μ M OVA投与群、0.1 μ M OVA投与群、タイロード投与群、のアレルギー重症度をそれぞれ50000、30000、20000、0のように決定してもよい。また、同じくアレルギー重症度として、

10

20

30

40

50

実際に漏出した血漿の量に基づいてヒスタミン投与群、0.5 μM OVA投与群、0.1 μM OVA投与群、タイロード投与群、のアレルギー重症度を示すスコアをそれぞれ14、10、8、4のように決定して指標として用いることもできる。また、以上の値をなんらかの計算式などにより算出される値をアレルギー重症度を示すスコアとして用いてもよいことはいうまでもない。前述のように、何を持ってアレルギー重症度を示すスコアとするかは、実験者により適宜定義される。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】本発明の実施例1における方法を図式化して示す図である。

【図2】本発明の実施例1において、本発明に基づく方法により、'べにふうき'のアレルギー抑制効果が確認された結果を示す図である。

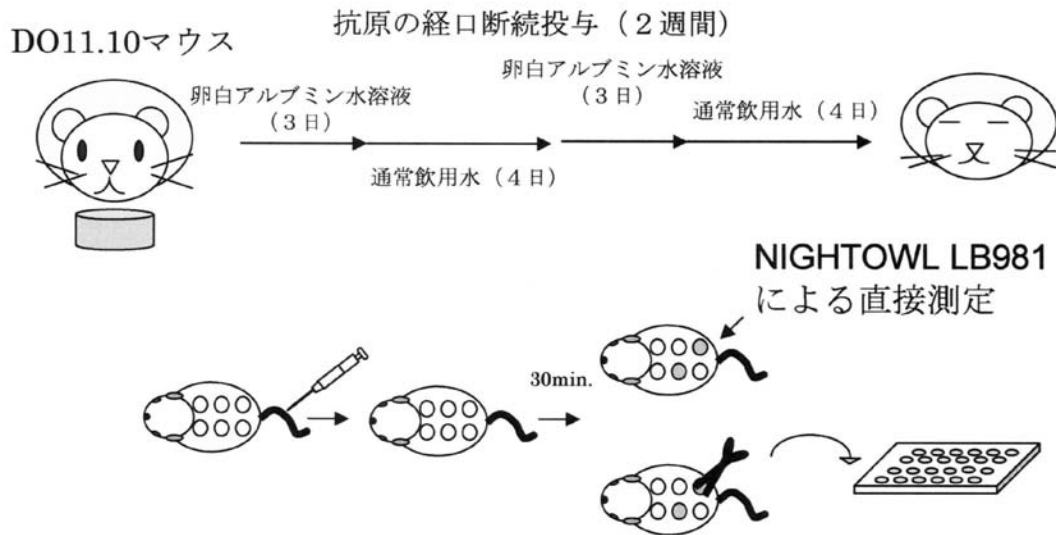
10

【図3】本発明の実施例2におけるイメージングの結果を示す図である。それぞれのスポットは上左：タイロード、上中：ヒスタミン、上右：0.5 μM OVA、下左：0.5 μM OVA、下中：0.1 μM OVA、下右：0.1 μM OVAを投与したものである。

【図4】本発明の実施例2におけるイメージング蛍光強度を示す図である。

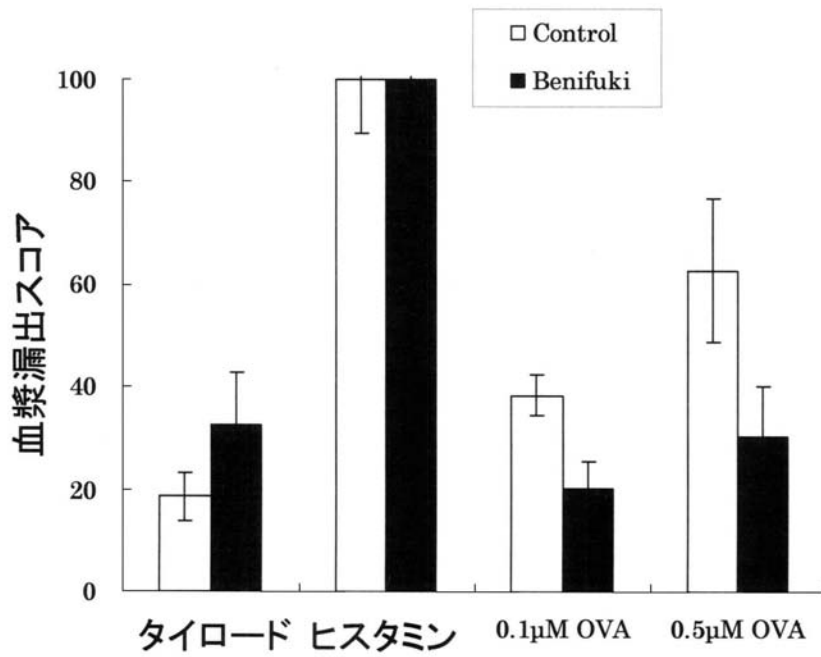
【図5】本発明の実施例2における血漿漏出量を示す図である。

【図1】



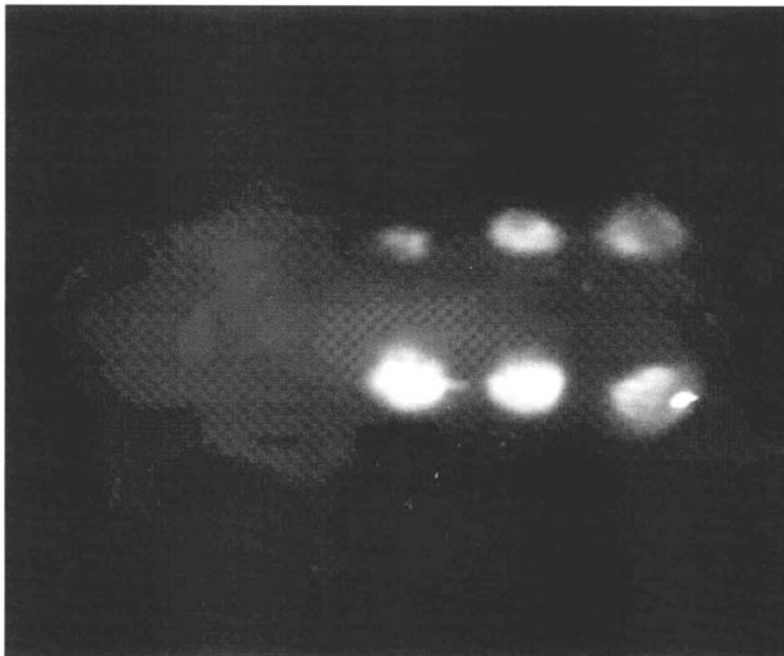
1. DO11.10マウスに卵白含有食餌、もしくは卵白アルブミン水溶液を断続的に二週間経口投与する。
2. FITCラベルした牛血清アルブミンを尾静脈より投与する。
3. あらかじめ剃毛しておいた背部皮内にヒスタミン、各濃度の抗原を接種する。
4. 30分後に接種部位を蛍光測定器（Nightowl LB981）で直接測定、蛍光値から血漿漏出を測定する。

【図2】



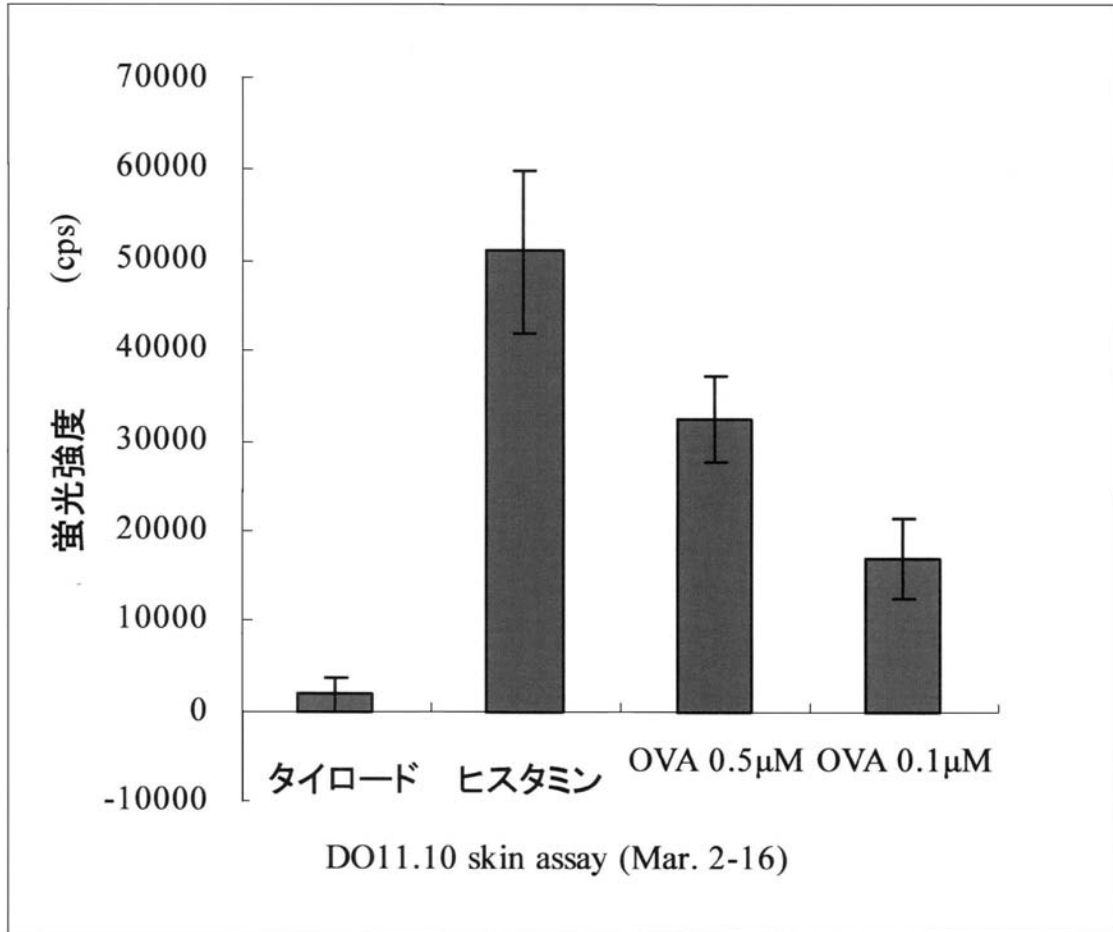
ヒスタミン投与群を100%としたときのそれぞれの物質を加えたときのアレルギー重症度のインデックス

【図3】

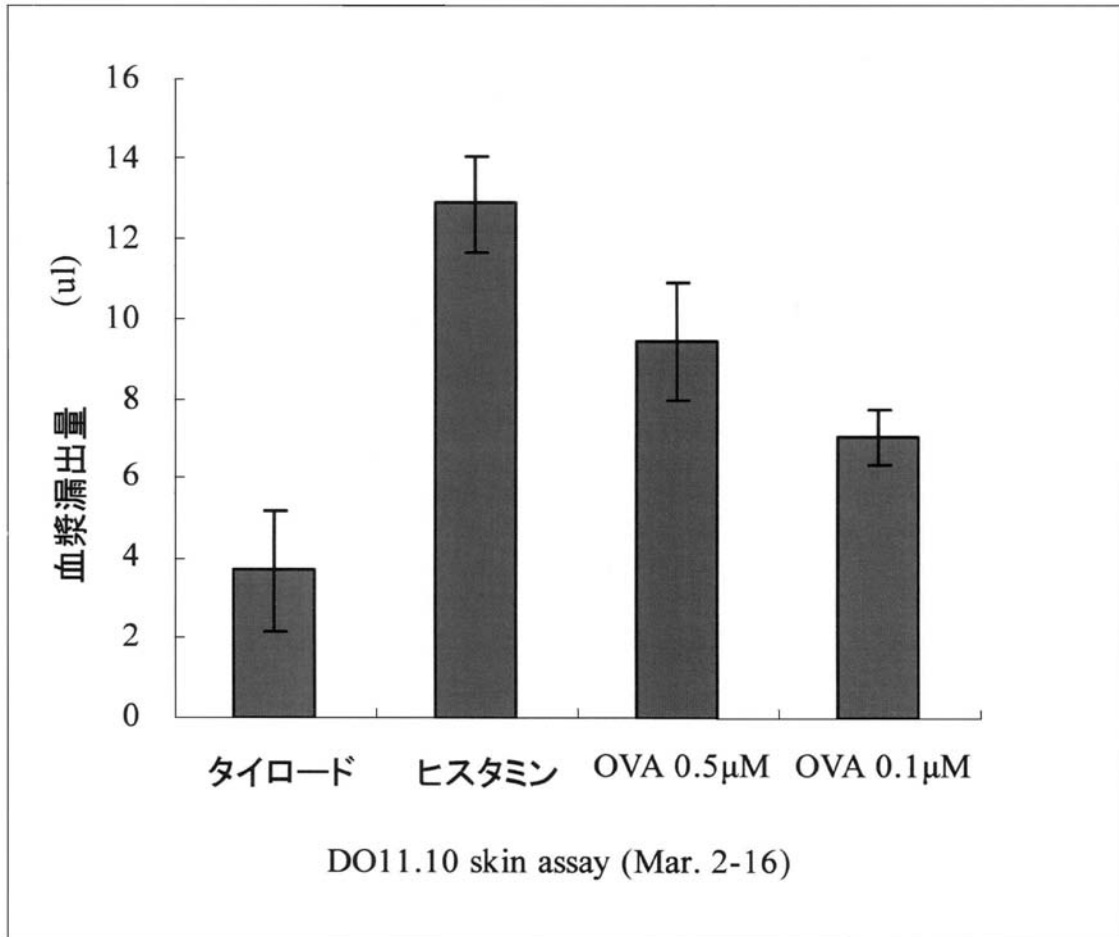


バイオイメージング装置による皮膚の直接測定

【 図 4 】



【図5】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2000-316575(JP,A)
特開2005-055344(JP,A)
後藤 他1名, 齧歯類(ラット・マウス)の皮膚を用いて炎症の強さを迅速・高感度に測る, 食
総研ニュース, 2004年, No. 10, 2-3
大津, ヒスタミンによる感染やアレルギー反応の制御, 炎症と免疫, 2002年, Vol. 10, No.
6, 613-620
Cristiane M. S. Conde et al., Inhibition of ischemia/reperfusion induced plasma leakage by
-tocopherol, trolox, and a shark cartilage preparation with anti-oxidant properties, Nutrition Research, 2001年10月, Volume 21, Issue 10, 1363-1371

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

G01N 33/15

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)