

食物アレルギーの小児期発症機序（非即時型）の解明に関する研究 —覆面型食物アレルギーの機序について—

分担研究者 小倉 英郎 国立高知病院小児科
分担研究者 小倉 由紀子 国立高知病院アレルギー科（小児科）

研究要旨

覆面型食物アレルギーの病態解明のために、成人アトピー性皮膚炎 3 例を対象に経口誘発試験を行なった。負荷前、負荷 2 時間後、4 時間後に採血を行い、リンパ球表面抗原および細胞内サイトカイン産生細胞の陽性細胞の陽性率を比較検討した。経口誘発試験は 6 回実施され、内 3 回が陽性（即時型；大豆 1 例、非即時型；牛乳、鶏卵各 1 例）、残り 3 回が陰性（牛乳 2 例、小麦 1 例）であった。リンパ球表面抗原陽性細胞の比率は負荷前後で一定の傾向は見られなかった。IFN- γ 陽性細胞の比率は誘発試験の結果にかかわらず、一定の傾向は認められなかった。IL-2 陽性細胞は誘発試験の結果にかかわらず、著しく増加する症例が 1 例見られた。一方、IL-4 陽性細胞は、誘発試験陽性の場合、負荷前に比べて負荷後増加する傾向が見られ、誘発試験陰性の場合、負荷後減少する傾向が認められた。

食物アレルゲンに対するリンパ球の反応については遅延型反応以外はあまり知られていないが、負荷後 2~4 時間から、Th2 細胞の活性化が見られることが示唆された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は小児および成人を通じて比較的頻度の高いアレルギー疾患である。また、近年、成人重症アトピー性皮膚炎の増加が社会問題化している。われわれは Rinkel が提唱する覆面型食物アレルギーの概念に基づいて、経口誘発試験を実施し、本症の 90.5% に一種以上の食物アレルギーが関与していることを報告した¹⁾。しかし、覆面型食物アレルギーの概念に基づいた経口誘発試験が広く普及するには至っていないため、本症のアレルゲン診断は、殆ど確信には行われていないのが現状である。この理由として、覆面型食物アレルギーの概念が難解であることおよびこの現象には何らかの免疫学的機序が関与していると考えられるが、殆ど解明されていない事があげられる。そこで、本研究では、アレルゲン除去後の過敏性亢進期に誘発試験を行い、その前後でリンパ球の細胞表面抗原およびサイトカイン陽性細胞の比較検討を試み、本症の病態に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

アレルゲン診断のため当科に入院した成人重症アトピー性皮膚炎 3 例（20 歳女性、32 歳男性、27 歳女性）において、小麦、牛乳、鶏卵および大豆の誘発試験を行い、負荷前、負荷 2 時間後

および負荷 4 時間後のリンパ球表面抗原（CD3、CD4、CD8、CD19）および CD4 陽性細胞中の IFN- γ 、IL-2、IL-4 陽性細胞の比率を比較検討した。細胞内サイトカインの検出は、PMA（50ng/ml）およびイオノマイシン（500ng/ml）で細胞を活性化し、37℃、4 時間培養後、プレフェルディン A（10 μ g/ml）を添加、サイトカインを細胞内に蓄積させた。4%ホルムアルデヒドで細胞を固定後、0.5%サポニン含有バッファー処理で、細胞膜の透過性を高めた後、細胞内サイトカインを染色し、フローサイトメトリーで蛍光強度を解析した。

なお、細胞内サイトカイン陽性細胞、負荷前の陽性率を 1 とする指数でグラフ化し、負荷後と比較した。

（倫理面への配慮）

経口誘発試験、特異 IgE 抗体測定、プリックテストは臨床検査として、従来から、日常的に患者の了解のもとに実施している。誘発試験前後の採血については、研究の意義を説明して患者の了解を得た。

C. 研究結果

1) 経口誘発試験（表）

経口誘発試験は 6 回行われ、内 3 回が陽性（即時型；大豆 1 例、非即時型；牛乳、鶏卵各 1 例）、残り 3 回が陰性（牛乳 2 例、小麦 1 例）であっ

た。

表 経口誘発試験の結果

負荷食物	症例1	症例2	症例3
鶏卵	非即時 (0)	N D	N D
牛乳	非即時 (0)	陰性 (0)	陰性 (0)
大豆	N D	N D	即時 (3)
小麦	陰性 (1)	N D	N D

(): RASTスコア

2) リンパ球表面マーカー

CD3、CD4、CD8、CD19 陽性細胞の比率は、負荷後、明らかな変化を認めなかった。

3) 細胞内サイトカイン陽性細胞の推移 (図 1、2)

負荷後の細胞内 IFN- γ 陽性細胞の比率は、誘発陽性あるいは陰性にかかわらず一定の傾向はなかった。IL-2 陽性細胞の比率も同様であったが、著しく高率となる例もあった。

一方、負荷後の IL-4 陽性細胞の比率は、負荷前に比べて、誘発試験陽性例においては、3例とも著明に増加し、誘発試験陰性例においては、低下する傾向があった。

D. 考察

以上から、Th1 細胞は、経口誘発試験の結果にかかわらず、食物負荷後、活性化される場合があることが推測された。一方、Th2 細胞は、経口誘発試験陽性の場合には、著明に活性化され、陰性の場合には活性化されない可能性が示唆された。今後、症例を増やして検討する必要があるが、食物アレルギー負荷後、かなり早期にリンパ球の反応が認められたことは覆面型食物アレルギーの病態を解明する上において、重要な所見と考えられた。

フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカインの検出は、細胞外に分泌されたサイトカインを測定している訳ではないが、個々の細胞のサイトカインを同定できるので、少数細胞が分泌するサイトカインを検出できる利点がある。PMA 等で細胞を活性化しているので、血中の産生細胞の分布の変化を見ていると考えるのが一般的であるが、実際に観察してみると、蛍光強度の高い細胞や低い細胞まで、様々の細胞が含まれており、個々の細胞の活性化の程度を反映している可能性も考えられた。

E. 結論

経口誘発試験陽性の場合、負荷 2～4 時間後から Th2 細胞の活性化が見られることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

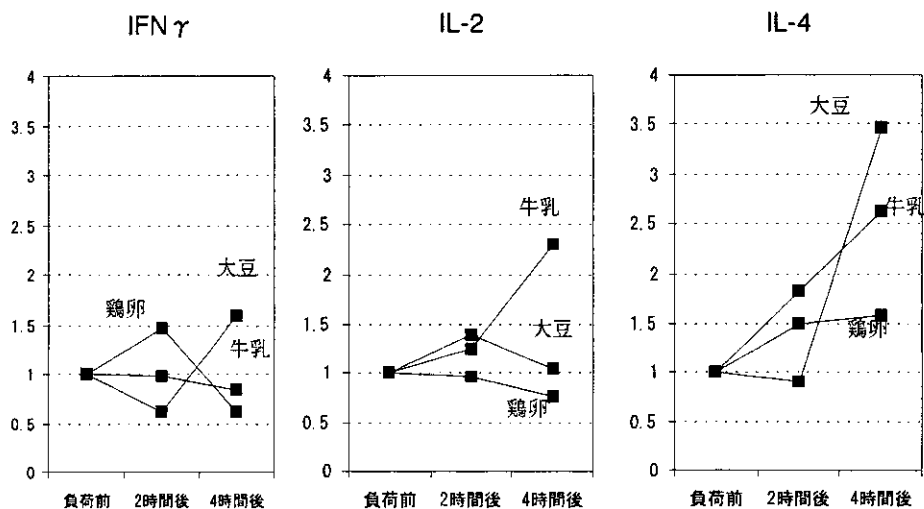


図 1 誘発試験陽性例における細胞内サイトカイン陽性細胞の推移

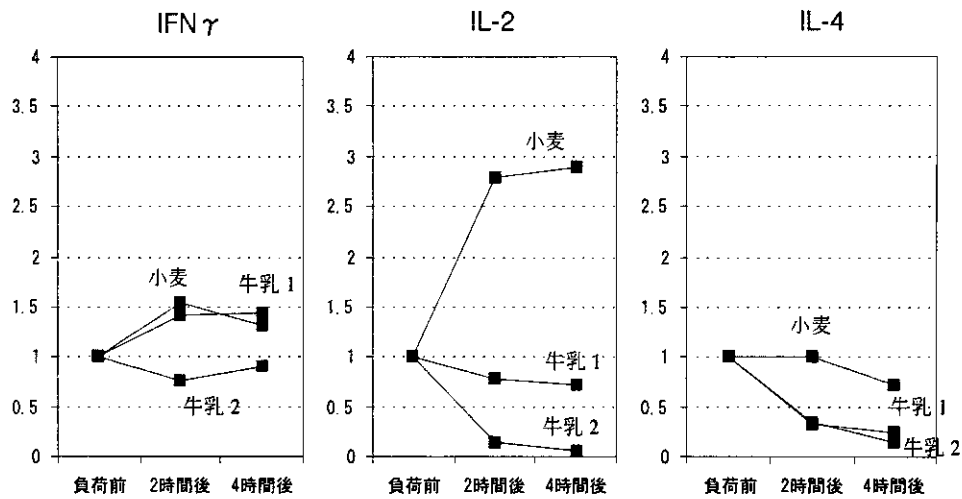


図2 誘発試験陰性例における細胞内サイトカイン陽性細胞の推移

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小倉由紀子、小倉英郎、厨子徳子：アレル
ギー-50：621-628,2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの小児期発症機序（即時型）の解明に関する研究

分担研究者 柴田瑠美子 国立療養所南福岡病院小児科医長

研究要旨

食物アレルギーによる即時症状誘発と HRT ヒスタミン遊離試験によるヒスタミン遊離状況を比較し、即時発症の予測の有用性を検討した。乳幼児食物アレルギーでは、抗 IgE 抗体によるヒスタミン遊離のない non-responder が 20%にみられ、サイトカインの補助を要する例があった。食物特異 IgE 抗体は感度 100%近くであったが、特異度は低く、卵、牛乳、小麦 HRT の特異度では 80~90%と良好であった。食品や薬品中のアレルギー物質による食物アレルギー児の HRT は、誘発物質関与確認の検査として臨床的に有用と考えられた。

A. 研究目的

食物アレルギーにおける過敏性の判断には食物負荷試験が必要であるが、乳幼児ではアナフィラキシー症状が誘発されることも少なくない。アレルギー特異的な即時型食物アレルギーの *in vitro* 検査としてのヒスタミン遊離試験 HRT が臨床的に 2 種類の方法で検査可能になっており、即時型食物アレルギー児の除去指導、解除指導での有用性が報告されている。しかし、乳幼児における HRT では、抗 IgE 抗体によるヒスタミン遊離のみられない Non-responder 例が多いことが指摘されており、即時型食物アレルギー児における HRT 検査の有用性と Non-responder 例の背景を検討した。また、食物アナフィラキシーが誘発された食品成分のアレルギー混入の確認における HRT の有用性も検討した。

B. 研究方法

対象は、9 カ月~9 歳の 1 食物以上に即時型食物アレルギーを有する 100 例。オープン負荷誘発の 64 例はルシカとシオノギ HRT 両者で測定を行い比較検討した。特異 IgE 抗体は CAP-FEIA（ファルマシア）にて測定した。抗 IgE コントロール陰性の non-responder と responder について月齢、総 IgE 値、各アレルギー CAP 値、ヒスタミン遊離状況の差異を検討した。non-responder 7 例について、サイトカインによる補助効果を HRT 測定前に IL-3 を 30ng/ml 添加 (37°C 10 分) して検討した。和風食品および抗生剤、下痢止め中のアレルギー物質によると思われるアナフィラキシーを呈した 3 例では、それらの試料による HRT ルシカをそれぞれの患児で行った。

C. 研究結果

卵、牛乳、小麦の食物アレルギー誘発症状の重症度と HRT スコアの関連については、アナフィラキシー症状の重症例ほど HRT スコアも高い傾向がみられた。食物誘発児における 2 種類の HRT の感度と特異度は、卵でそれぞれルシカ 66%と 100%、シオノギ 80%と 92%、牛乳でルシカ 70%と 94%、シオノギ 74%と 100%であり、小麦でルシカ 53%と 81%、シオノギ 69%と 81%、大豆でルシカ 50%と 81%、シオノギ 83%と 61%であった。CAP による感度は、ほぼ 100%であり、特異度は 21~47%であった（表 1）。シオノギ HRT による抗 IgE コントロール陰性の non-responder が 20%にみられ、non-responder では、responder に比して総 IgE 値が低値であり、自然遊離ヒスタミンが有意に少なかった。また食物アレルギー児でのルシカによる HRT 陰性例と陽性例の臨床背景では、無反応例が低年齢、総 IgE および好酸球数が陽性に比して有意に低値であった。

臨床的に誘発例で HRT 陰性の 7 例の IL-3 前添加による HRT の補助効果は、陽性レベルまでのヒスタミン遊離増強作用が 7 例中 2 例でみられた。内 1 例を図 1 で示した。アナフィラキシー誘発食品（油脂）、および薬品（抗生剤メイアクトおよびタンナルビン）はカゼインが関与しており、3 例では牛乳と同様の HRT を示した。粉末油脂に混入したカゼインによるアナフィラキシー 2 例では、油脂の希釈濃度 6ng/ml まで患児の血球からヒスタミンが遊離された（図 2）。

D. 考察

食物アレルギーでは、特異 IgE 抗体による感作の確認と経口負荷試験による確定診断が行わ

れるが、負荷試験での誘発はアナフィラキシーを伴うことも少なくない。即時型食物アレルギー誘発時には、血中にヒスタミンやトリプターゼが放出されており、試験管での患児血球を用いた HRT は、検査の危険性がなく、食物過敏症の検査として利用され、また、ヒスタミン遊離状況はその強度もスコア化により知ることができる。しかし、乳幼児の食物アレルギーでは、HRT 反応としてとらえられない例があり、抗 IgE によるヒスタミン遊離のない non-responder の機序は明らかでない。RAST や皮膚テストは、感度 100%とすぐれているが特異性は低く、HRT では特異性が高いため両者を合わせた検査が有用である。乳幼児の食物アレルギーの中には、non-responder が多く、HRT での抗 IgE を用いた反応性を同時に検査できるシオノギがこれらの確認には適している。一部にサイトカインの補助を要する例や好塩基球のヒスタミン自然遊離状況が影響するなど、生体内では抗原によるヒスタミン遊離にさらに複雑な機序がかかわっている可能性がある。アレルゲンの食品混入による症状誘発への関与も、これらの試料と患児血球による HRT が参考になると思われ、検査手順上はルシカの方がシオノギより容易である。即時反応の指標として HRT は臨床的に抗体とともにスコアの高い例では、有用であるが、低 IgE、RAST 低値の食物アレルギーでは HRT 反応としてとらえられないことが多く、負荷試験導入にあたっては注意が必要である。

E.結論

ヒスタミン遊離試験 HRT は、RAST に比して特異性が高く、スコア高値例では、即時型食物アレルギーでの誘発の予測に有用と思われる。乳幼児の食物アレルギーの中には、non-responder が多く、食物アレルゲンによる HRT では抗 IgE 抗体による反応性の検査を同時に行う必要がある。

アレルゲン食品の混入が疑われる試料による HRT は患者の即時反応への影響を知る上で有用である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) 柴田瑠美子 アトピー性皮膚炎における食物アレルギーの実態 皮膚 43 (S p23) 15-17、2001.
- 2) 柴田瑠美子 即時型食物アレルギーの臨床アレルギー・免疫 8:30-35、2001.
- 3) 柴田瑠美子 食物アレルギーから気道アレルギーへ 日本小児アレルギー学会誌 14:78-81、2000.

2.学会発表

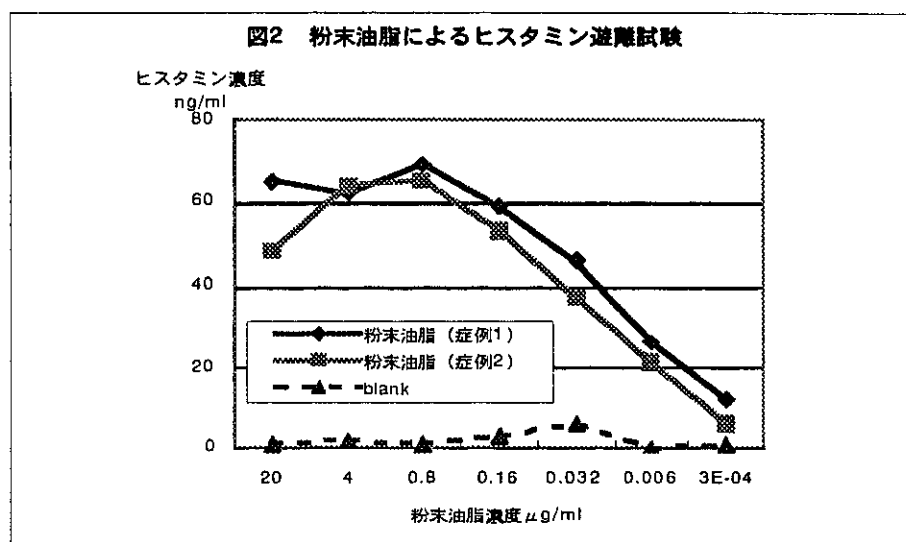
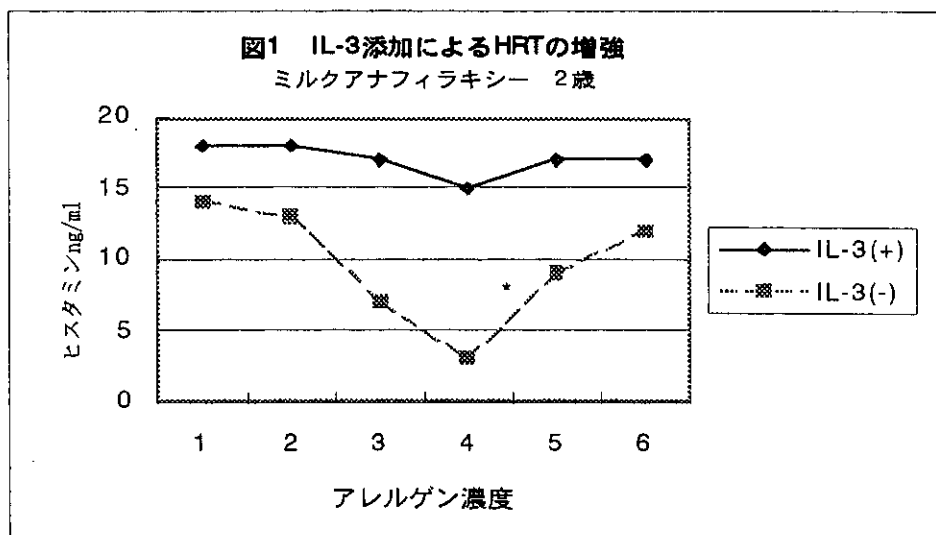
- 1) 柴田瑠美子 アナフィラキシー型食物アレルギーの予後について 第38回日本小児アレルギー学会 平成13年
- 2) 柴田瑠美子 西間三馨 食物負荷試験導入におけるヒスタミン遊離試験HRT (ルシカ、シオノギ) の有用性 第51回日本アレルギー学会 平成13年
- 3) 清水宗茂 高畑能久 森末文毅 栗崎純一 柴田瑠美子 食物アレルギー患者のIgE抗体反応を指標とした食肉加工品中のアレルゲン検出法 第13回アレルギー学会春期臨床大会 平成13年
- 4) 柴田瑠美子 乳幼児の食物アレルギー 第56回国立病院療養所学会 平成13年

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 HRTシオノギ、ルシカ、CAPでの感度・特異度

		HRTシオノギ		ルシカ	CAP
		クラス2以上を陽性 Non-responder		クラス2 以上を	クラス2 以上を
		含む	除く	陽性	陽性
卵白	感度 (%)	76.5	88.4	58.0	100
	51/64 特異度 (%)	92.3	90.0	100	21.4
牛乳	感度 (%)	67.4	80.0	61.0	88.4
	43/64 特異度 (%)	100	100	94.1	47.6
小麦	感度 (%)	68.8	84.6	40.0	87.5
	16/64 特異度 (%)	87.5	85.0	93.0	45.8
全体	感度 (%)	72.5	84.2	53.4	94.1
	特異度 (%)	85.1	81.4	88.1	47.7



食物アレルギー的見地からの発症機序の解明に関する研究

分担研究者 赤澤 晃 国立小児病院アレルギー科医長

研究要旨

食物アレルギー患者にとって原材料が表示されることは有益であるがその含有量についての情報も必要となっている。含有量測定に関して、ヒト IgE 抗体を使用した測定方法の開発をおこない測定できることがわかり今後市販される測定キットとの相関を検討する必要がある。また、アワビと誤認したアワビとよく似た食材でのアナフィラキシーショックをおこした患者血清での交差抗原性について検討した。

A. 研究目的

特定原材料の表示が行われ、食物アレルギー患者は、その食品の含有原材料の情報を幅広く知ることができるようになってきたが、一つの食品に関してその主原料から微量に含まれる原料までが表示されるようになり厳格な除去食が必要な患者には非常に重要な表示であるが、ある程度許容する患者には表示されている原材料が「いったいどのくらい含有されているのか」という疑問が生じている。

特定原材料の含有量の検出に関しては、ヒト以外の抗 IgG 抗体を使用した方法が検討されているが、実際に反応をおこす患者血清プールの特異 IgE 抗体を使用することによって免疫的にはより現実的な反応を反映すると考えその測定方法の確率と、実際に行われるヒト以外の IgG 抗体での測定法との相関について検討を行う。

特定原材料として選出された食品中には消費者が他の原料と誤認しやすい食品も含まれている。今回、形態的にまた食感ともにアワビとよく似たラパス貝をアワビと違って食べてアナフィラキシーショックを起こした患者血清での交差抗原性について検討した。

B. 研究方法

(1) 食品中に含有するアレルギーの定量方法に関する検討

食品中に含有する、鶏卵に関してそのアレルギー含有量を患者血清によるプール IgE 抗体により inhibition あるいは competition immunoassay により定量化し 2 方法の検討を行った。

(倫理面への配慮)

患者からの血清提供は、病院倫理委員会により承諾された説明書・同意書を使用した。

(2) 食品中に含有する卵アレルギーの定量

抗原の抽出

① キューピー食物負荷試験用鶏卵粉末

ジエチルエーテルで脱脂

脱脂鶏卵 2 g + Coca 液 20 ml

② ウィンナソーセージ (伊藤ハム あらびきグルメウィンナ)

ウィンナ 3.15 g + Coca 液 15 ml

③ クッキー (ブルボンルマンド)

クッキー 3.15 g + Coca 液 31.5 ml

④ はんぺん (味丸)

はんぺん 2 g + Coca 液 10 ml

いずれも 4℃ で一晩振とう後 13000rpm で 30 分遠心

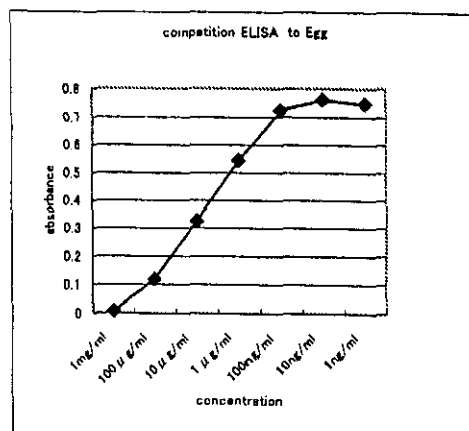
上清を PBS にて透析後蛋白定量を行った。

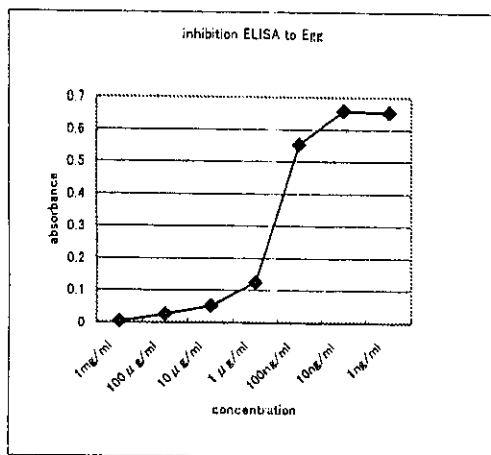
(3) 食物間の交叉抗原性に関する研究

輸入食材であるラパス貝は、アワビとよく似た形態、食感から近年利用が急増しているが、即時型アレルギーをおこすことも報告されている。アワビと思いこみラパス貝を摂取してアナフィラキシーショックをおこした患者の IgE 抗体についてその交叉抗原性を検討した。

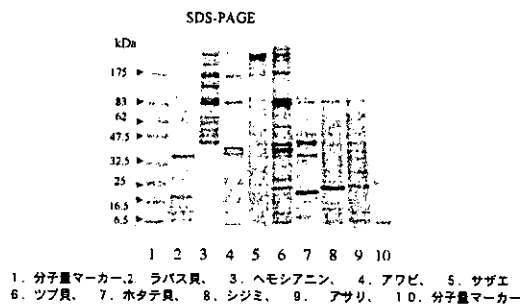
C. 研究結果

(1) inhibition assay と competition assay の比較



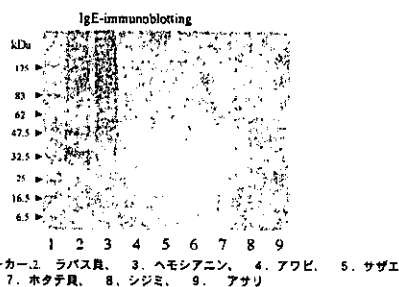


貝類 SDS-PAGE と IgE-immunoblotting



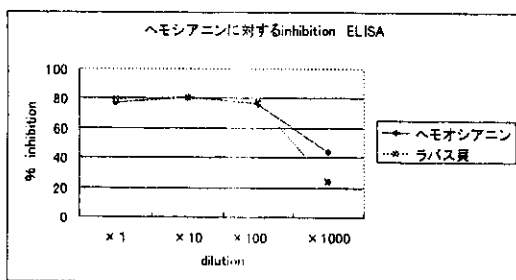
(2)食品抽出液からの抗原量の測定

食品	タンパク量 mg/ml	鶏卵抗原量 μg/ml
キューピー食 物負荷試験用 鶏卵粉末	7.68	
ウインナソー セージ (伊藤ハム あらびきグル メウイナ)	0.265	30
クッキー (ブルボンル マンド)	1.05	1
はんぺん (味丸)	0.228	30



(3) 食物間の交叉抗原性に関する研究

患者血清 IgE 抗体は、アワビ抗原とはほとんど反応せず、ラパス貝エキスとその主要抗原と考えられるヘモシアニンと強く反応した。



D.考察

特定原材料の表示が行われるようになり食物アレルギー患者は、その情報から接種可能な食品を選択できるようになるが、その原材料の含有量に関しては表示されないため厳格な食物除去をしていない多くの食物アレルギー患者にとっては含有量表示の要望がある。抗原量を測定するキットが開発されているがヒト以外の IgG 抗体によるキットであるため認識する抗原決定基が同じかどうかの検討はされていない。今回実際の食物アレルギー患者血清中の抗原特異 IgE 抗体を使用して抗原量測定が可能かどうかの検討を行い、測定することが可能であることがわかった。しかし継続的に多量に測定するためには患者血清プールの作成等の問題があり実用化は難しい。今後、メーカーが開発する IgG 抗体による測定キットとの相関をみることによってキットの質的コントロールの方法を考えるべきである。

表示義務のあるアワビに関しては、患者がアワビと思いこんでいるアワビとよく似た食材が存在することがわかった。このよく似た食材の一つとしてラパス貝がありその交差抗原性について検討したところアワビとは交差抗原性はあ

まり認められなかった。今後の調査にあたってこうした食材への注意が必要である。

E. 結論

今後特定原材料の含有量の表示が重要な課題である。また、アワビなど原材料を誤認する食品については十分な注意が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) R. Hashida, K. Ogawa, M. Miyagawa, Y. Sugita, K. Matsumoto, A. Akasawa and H. Saito: Gene expression accompanied by differentiation of cord blood-derived CD34+ cells to eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 125(Suppl 1): 2-6., 2001
- 2) Nomura, T. Katsunuma, K. Matsumoto, M. Iida, H. Tomita, M. Tomikawa, H. Kawahara, A. Akasawa, R. Pawankar and H. Saito: Human mast cell progenitors in peripheral blood from atopic subjects with high IgE levels. *Clin Exp Allergy* 31(9): 1424-1431., 2001
- 3) Y. Ohya, H. Williams, A. Steptoe, H. Saito, Y. Iikura, R. Anderson and A. Akasawa: Psychosocial factors and adherence to treatment advice in childhood atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 117(4): 852-857., 2001
- 4) 赤澤 晃：ラテックスアレルギーと交叉抗原性. *日本小児アレルギー学会誌* 15(1): 34-38, 2001.
- 5) 田中和子、赤澤 晃、飯倉洋治、斎藤博久：天然ゴム製品におけるラテックス抗原の解析. *日本家政学会誌* 52(4):335-342, 2001
- 6) 飯倉洋治、馬場 実、三河春樹、森川昭廣、荒川浩一、市村登寿、鳥羽 剛、永山洋子、椿 俊和、向山徳子、赤澤 晃、坂口直哉、河原秀俊、有田昌彦、松本 勉、小島信行、恩田威文、中村弘典、海老澤元宏、栗原和幸、五藤和子、高増哲也、中村凱次、渡辺基信、吉田隆實、近藤直美、伊上良輔、井口光正、藤沢隆夫、寺田明彦、伊藤節子、佐々木聖、四宮敬介、豊島脇一郎、古川 漸、田代紀陸、西川 清、平場一美、浜崎雄平、市丸智浩、小田島 博：小児気管支喘息に対する fluticasone propionate

連用式吸入用散剤(SN411MD)の臨床評価—長期投与試験—. *アレルギー* 7(5): 107-123, 2001.

- 7) 赤澤 晃：アレルギー性疾患に多い原因抗原について. *小児科診療 Q&A* 33: 1206-1207, 2001
- 8) 須田友子、赤澤 晃：抗アレルギー薬・免疫抑制薬と小児気管支喘息. *小児科診療*. 64(9) : 1339-1345, 2001.

2. 学会発表

- 1) Akasawa A, Matumoto K, Tomikawa M, Tsujimoto G, Eto Y, Saito H: Prevalence and gene expression screening of atopic subjects among medical students in Japan. 57th Annual Meeting of American Academy of Allergy & Immunology, New Orleans. Louisiana USA. Mar.16- 21, 2001.
- 2) 赤澤 晃：食物アレルギー 5. 第13回日本アレルギー学会春季臨床大会、横浜、2001.5
- 3) 赤澤 晃：ロイコトリエン受容体拮抗薬による気管支喘息の治療戦略. 第38回日本小児アレルギー学会、小倉、2001.10.6
- 4) 赤澤 晃：気管支喘息 病態生理 I. 第51回日本アレルギー学会総会、福岡、2001.10.29

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食品中アレルギー誘発物質とアレルギー性疾患に関する文献調査

分担研究者 橋本 勉 和歌山医科大学公衆衛生学教室教授
研究協力者 玉置淳子 北海道大学医学部公衆衛生学教室助手

研究要旨

我が国の、食物アレルギーによる死亡例と食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーについて既存資料の把握を目的とした。我が国の死亡例について外国の医学誌に関しては PubMed を用い過去 27 年間について、国内の医学誌に関しては医学中央雑誌を用い過去 15 年間について検索した結果、ソバアレルギーによるアナフィラキシーショック死亡が 1 例、ソバによる食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーによる死亡が推測された報告が 1 例あった。人口動態統計によると有害食物反応によるアナフィラキシーショックによる死亡例は 1995 年～1999 年で計 15 例発生しており、文献収集のみでは我が国の食物アレルギーによる死亡例の把握が不十分と考える。尚、昨年度報告した医学誌 2 誌を用いた調査で、食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーは、17 例あった。原因抗原としては、小麦、エビが各 5 例で最も多く、ついでイカ 3 例で計 15 種あり。このうち魚介類は 9 種あった。原因抗原が複数の症例は 5 例あり、そのいずれも魚介類であった。食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーで報告の多かった小麦と魚介類については、新しいタイプの食物アレルギーの原因抗原として今後も疫学調査が必要と考える。

A.研究目的

昨年度は我が国の重篤なアレルギー反応を誘発する原材料に焦点をあて文献調査を行った。本年度は重症度の観点から食物アレルギーにより死亡に至った症例について検討した。また、我が国で最近報告された新しいタイプの食物アレルギーである食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーについて、昨年度の悉皆的な文献調査に検討項目を追加しとりまとめた。

B.研究方法

我が国の食物アレルギーによる死亡例を、外国の医学誌に関しては PubMed (Web) を用い、Food Hypersensitivity、Mortality、death、および Japan をキーワードとして検索した。国内の医学誌に関しては医学中央雑誌 (CdRom 版) を用い、食物アレルギー、過敏症—食品性、アナフィラキシー、死亡をキーワードとして検索した。検索期間は、PubMed で 1975 年から 2001 年 10 月現在、医学中央雑誌では CdRom に収録されている 1987 年から 2001 年 11 月までとした。昨年度調査した 1980 年から 1999 年の『アレルギー (日本アレルギー学会)』および、1987 年から 1999 年までの『日本小児アレルギー学会誌』については食物アレルギーによる死亡例報告の有無に関し、すべての論文と学会発表抄録について悉皆的に調査した。

平成 12 年度で収集した症例報告の食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーについて、あらたに運動負荷試験および食餌運動負荷試験の実施の有無と検査結果について調査した。

C.研究結果

1987 年から 2001 年 11 月までの医学中央雑誌による検索で、食物アレルギーによる死亡 1 例と、食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーが原因と推測された症例が 1 例あった (表 1)。症例 1 は既往歴として気管支喘息があり、以前よりソバアレルギーが指摘されていた。初発症状出現より 20 分後には倒れているのを発見され救急蘇生に反応せず死亡している。症例 2 は既往歴としてアトピー性皮膚炎、気管支喘息があり、初発症状出現より 10 分後心呼吸停止となっており 12 日目に死亡している。

PubMed を用いた外国の文献検索では該当する論文はなかった。検索は始めに「我が国における食物アレルギーによる死亡」に対応する複数のキーワードを掛け合わせて行い、その結果該当論文がなかったため、「食物アレルギーによる死亡 (mortality、death)」に該当した 23 件と 46 件について抄録から我が国の症例がないことを確認した。医学中央雑誌でも「食物アレルギーによる死亡」に対応する論文がなかった。食物アレルギーとアナフィラキシーの 2 つのキーワ

表1 食物よるまたはそれが原因と推測された死亡症例（1987-2001年）

	症例1 ^{*1}	症例2 ^{*2}
性・年齢	男・11歳	女・8歳
原因食品	ソバ	ソバ
摂取後初発症状発現時間	20分後	30分後
初発症状	口周囲蕁麻疹	腹痛、嘔吐、咳ソウ 胸内苦悶
検査所見	記載なし	・IgE-RIST 2840IU/ml ・ソバRASTスコア 3 ・ブリックテスト 陰性
死因	アナフィラキシーショック	食物依存性運動誘発性 アナフィラキシーショックが推測

*1 渡辺ら「そばアレルギー37例の臨床的検討」小児科臨床1997年50巻9号p2029-2034

*2 金子ら「ソバアレルギーの関与が推測された来院時深呼吸停止状態の気管支喘息の一例」アレルギー1993年42(3-2)p459

ードをもつ181件についてタイトル、キーワード、抄録のあるものについては抄録から該当論文の有無をしらべ、上記の1例を抽出した。症例2は、昨年度の文献を再度調査し抽出した。

悉皆調査し抽出した症例のうち食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーは17例あった。（平成12年度で原因抗原が魚類とまでしか特定できなかった症例を今回は除いた。）このうち原因抗原が複数の症例は5例あり、すべて魚介類であった。原因抗原としては、小麦5例、エビ5例、ついでイカ3例が多く、計15種であった。このうち、9種は魚介類であった。原因抗原がそばであったのは1例で、上述の死亡に至った症例である。食餌依存性運動誘発性アナフィラキシー症例のべ症状は111例で、呼吸困難が20例で最も多く、ついで蕁麻疹、意識障害が各15例であった。原因抗原又は食品別に症状をみると、ショック症状が9種の抗原で認められていた。尚、ショック症状(10例)としては、血圧低下が4例、チアノーゼが4例であった。また、ソバとピーナッツを除き全ての原因抗原で神経系の症状(18例)が報告されていた。尚、血圧低下、意識消失または痙攣のいずれかの重篤な症状を呈していたのはのべ25例中、22例であった。

のべ25症例について、検査の実施率を以下に

示す。皮膚試験50%（11例/22例）、RASTスコア陽性80%（20例/25例）、食物負荷試験8%（2例/24例）、運動負荷試験58%（14例/24例）、食物運動負荷試験29%（7例/24例）であった。また、検査の陽性率は、皮膚試験91%、RASTスコア陽性85%、食物負荷試験0%、運動負荷試験14%、食物運動負荷試験57%であった。

D.考察

過去15年間の国内の医学誌と過去27年間の外国の医学誌を用い、我が国の食物アレルギーによる死亡例報告を検索した。その結果、食物アレルギーによる死亡例は1例、食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーによる死亡が推測された報告が1例であった。人口動態統計によると有害食物反応によるアナフィラキシーショック(T78.0)による死亡例が1995年～1999年の5年間で計15例発生しており（表2）、文献収集のみでは我が国の食物アレルギーによる死亡例の把握が不十分と考える。

検索過程で抄録を検討した限りでは、諸外国の食物アレルギーによる死亡に関する論文を4編抽出した。このうち2編は、1993年から3年間スエーデンのすべての臨床医を対象にした研究で、5例の死亡例を報告していた。1994年か

表2 食物アレルギーによる死亡（人口動態統計 1995-1999年）

	'95	'96	'97	'98	'99	合計
有害食物反応による						
アナフィラキシーショック(T78.0)	4	2	2	4	3	15
その他の有害食物反応						
他に分類されないもの(T78.1)	1	0	0	0	0	1

(中村好一らの表を一部改変)

ら 6 年間のアメリカ合衆国の調査では the American Academy of Allergy and Anaphylaxis Network 等で設立された登録制度より 32 例の死亡例を報告していた。しかしこの調査は、臨床医、メディア、および上述の組織が登録した症例から死亡例を抽出したものであり、全死亡数を把握したものではない。他の 1 編は魚介類による 2 例の死亡例報告であった。死亡例の状況把握には、上述の様なサーベイランスまたは正確な死亡数の把握について考慮された登録システムが必要と考えられる。

食餌依存性運動誘発性アナフィラキシーでは、食物運動負荷試験の実施していた症例が 29%と低かった。これには重篤な症状を示した症例が多かったことも関与していると思われる。報告が多かった原因抗原である小麦と魚介類については、新しいタイプの食物アレルギーの原因として今後も疫学調査が必要と考える。

E.結論

今回の調査で食物アレルギーによる死亡例が 1 例、食餌依存性運動誘発アナフィラキシーによる死亡が推測された報告が 1 例あった。食餌依存性

運動誘発性アナフィラキシーでは、小麦と、イカ、エビをはじめ魚介類が原因抗原として多かった。今後、死亡例の把握には人口動態統計の活用が有用と考えられる。

F.健康危険情報
特になし

G.研究発表
2.学会発表

玉置淳子 「文献的見地からみた我が国の食物アレルギー」第38回日本小児アレルギー学会 2001

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

原因食品中アレルギー誘発物質の解明に関する研究

分担研究者	豊田 正武	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
研究協力者	高畑 能久、森松文毅	日本ハム株式会社中央研究所
	田辺 創一	広島大学生物生産学部
	宇理須厚雄	藤田保健衛生大学医学部小児科
	松田 幹	名古屋大学大学院生命農学研究科
	小川 正	京都大学食糧科学研究所
	穉山 浩、五十鈴川和人	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食肉：患者 IgE 抗体結合タンパク質は、クレアチンキナーゼ及びフルクトースビスリン酸アルドラーゼと同定された。100℃、120℃の加熱処理を施した牛肉モデルソーセージ抽出液に対する患者 IgE 抗体反応性は有意に低値を示した。**小麦：**植物タンパク質中の Asn 残基に結合する糖鎖がアレルギーおよびその交叉性に関与する可能性が指摘されていることから、小麦粉の塩可溶成分中の IgE-結合性糖鎖タンパク質について解析を行った。その結果、小麦ペルオキシダーゼおよび α -アミラーゼインヒビターが糖鎖を有するアレルゲンタンパク質として同定された。**果実：**トマト抗原とスギ抗原との間に交差反応性があることを RAST inhibition で証明した。交差反応性にかかわるタンパク質は、トマトでは PG2A、 β -fructofuranosidase、superoxide dismutase、pectinesterase の4つで、スギでは Cry j 1 と Cry j 2 であった。これらタンパク質間の相互抑制のパターンは症例によって異なっていた。**穀類：**コメ 33kDa アレルゲンと免疫交差性を示すタンパク質をコードする cDNA をサトウキビよりクローニングし、その組換えタンパク質を調製した。コメ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ 33kDa タンパク質のアミノ酸配列は類似性が高く、それらの組換えタンパク質は免疫交差性を示した。さらに、いずれもグリオキサラーゼ I 活性を示した。**その他：**大豆によるアナフラキシーを観察した患者より、新規アレルゲンとしてグリシニンの酸性サブユニット成分 A3 を同定した。一方、多種多様な植物性食品素材に反応する複数のアトピー性皮膚炎患者の血清を用いて、ジャガイモより 28kDa のアレルゲンタンパク質を単離し、GSH-dependent ascorbic acid reductase と同定した。患者の本アレルゲンに特異的な IgE 抗体はピーマン、リンゴ由来の本タンパク質と交差することを明らかにした。また、本研究におけるアレルゲン検索法として、複数試料を簡便にかつ微量の患者血清で同時に検定するマルチプロット法を確立した。

A. 研究目的

食物アレルギーを惹起する成分は食品を構成する多種多様な成分の中でもある特定の成分が関与していると推定される。本研究では、食物アレルギーを誘発する食品成分を患者血清中の IgE 抗体をプローブとして、IgE 結合性成分を検索・同定し、その分子構造・タンパク質化学的性質を解明すると共に、食品間の交叉反応性（相同性）を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

- 1) 食肉：食肉アレルギー患者血清 10 例（牛肉・鶏肉キャップクラス 2 以上）を用いたウエスタンブロットイング、N 末端側アミノ酸配列解析により鶏肉抽出液中の患者 IgE 抗体結合タンパク質を同定した。
- 2) 小麦：小麦粉の塩可溶成分を SDS-PAGE により分離し、抗ペルオキシダーゼ型糖鎖抗体（POD 抗体）およびアレルギー患者血清を用いる western 解析に供した。

3) 果実：交叉抗原性の証明には、RAST inhibition と immunoblot inhibition 法を用いた。

4) 穀類：サトウキビ葉の全 RNA から RT-PCR により 33kDa アレルゲン相同物 cDNA を単離した。またコメ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビの 33kDa アレルゲンを組換えタンパク質として大腸菌発現系 (pET) を用いて大量調製した。

5) その他：大豆、ジャガイモ等のアレルゲンを単離後、western 解析、アミノ酸シーケンス解析によりホモロジー検索を行って既知相同タンパク質への帰属を行う。ソバに関して電気泳動法・ウエスタンブロット法によりソバアレルギー患者血清中の特異 IgE 抗体と反応する新規タンパク質を検出する。

（倫理面への配慮）

本研究に供した患者血清は、本研究の目的と内容を提供者が理解した上で提供されたものであり、文書によるインフォームドコンセントが得られている。研究

遂行にあたっては個人情報の漏洩防止に配慮し、提供者に不利益が生じないように注意している。従って、倫理面の問題は無いもの考えられる。

C. 研究結果

1) 食肉：患者 IgE 抗体結合タンパク質は、クレアチンキナーゼ (CK) 及びフルクトースビスリン酸アルドラーゼ (FBPA) と同定された。100℃、120℃の加熱処理を施した牛肉モデルソーセージ抽出液に対する患者 IgE 抗体反応性は有意に低値を示した。

2) 小麦：約 60kDa および 40kDa の位置に POD 抗体および患者血清ともに認識されるタンパク質を確認した。このうち 40kDa のものは小麦ペルオキシダーゼと同定された。

3) 果実：トマト抗原とスギ花粉抗原を用いた RAST inhibition によって両者間に有意な抑制をみた。また、固相と同一抗原を inhibitor として用いた場合、異なる抗原を inhibitor とした場合よりも強く IgE 結合能の抑制が観察された。immunoblot inhibition 法では複数のタンパクバンドでお互いに抑制が見られた。

4) 穀類：4 種 (コメ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ) の cDNA 塩基配列と推定アミノ酸配列の比較から、コメとコムギ、トウモロコシとサトウキビの間での相同性が高いこと、また、両グループ間ではやや低いことが明らかとなった。精製した 3 種の穀物 33kDa 組換えタンパク質は、いずれも天然のコメ 33kDa アレルゲンに対する特異抗体と反応性を示した。Western blot 解析では、コメ、コムギに比べて、トウモロコシ、サトウキビのタンパク質は明らかに低い反応性を示した。また、メチルグリオキサールを基質として酵素活性を測定すると、いずれの組換えタンパク質もグリオキサラーゼ I 活性を示し、種間での大きな差は認められなかった。

5) その他：成人の大豆アレルギー患者 (アナフラキシーを経験) 血清及び大豆抽出タンパク質を用いて、新規なアレルゲン (IgE 結合性タンパク質) を特定した。単離後 N-末端アミノ酸分析を行い、その結果をコンピューター検索することにより、グリシニンの酸性サブユニット A3 成分と同定した。複合食物アレルギー患者血清より、ジャガイモの 28kDa タンパク質成分に強く反応する IgE 抗体の存在を認め、この成分を単離し、glutathion-dependent ascorbic acid reductase と同定した。血清量を出来るだけ節約し、患者に負担をかけずに、微量血清で簡便かつ多試料をスクリーニング出来る方法 (マルチプロット法) を構築した。ソバアレルゲンに関しては報告されているタンパク質よりも分子量の大きい 111 kDa のタン

パク質が IgE 抗体と強く反応することを明らかにした。

D. 考察

1) 食肉：ニワトリ CK は新規の鶏肉アレルゲンであり、100℃及び 120℃の加熱処理は牛肉の低アレルゲン化に有効であると考えられた。

2) 小麦：小麦粉より IgE-結合性糖鎖タンパク質を 3 種確認したが、糖鎖そのものが患者における抗原認識に直接的に関与しているかは、今後検討が必要と考えられる。

3) 果実：両者の IgE の結合性でみた共通アレルゲン性にはアミノ酸の 1 次構造だけではなく、糖鎖も関与している可能性がある。

4) 穀類：4 種の 33kDa タンパク質は共通のエピトープを持つと推定され、穀物アレルギーにおける交差性アレルゲンである可能性が示唆された。また、これらの 33kDa タンパク質は、構造と活性いずれにおいても種間で良く保存されており、穀物の単なる貯蔵タンパク質ではなく細胞内での酵素としての重要な役割を持つと推定された。

5) その他：大豆アレルギー患者血清による本アレルゲンの認識率 (検出率) は非常に低く、約 1%前後と考えられる。ジャガイモのアレルゲンは、問題となっている植物間に共通して存在する感染特異的タンパク質 (防御タンパク質) グループに属し、パンアレルゲンとして交差反応性持つアレルゲン成分であることが示唆された。ソバに関しては 111kDa のタンパク質のエピトープ解析を行うことが重篤な症状を示すソバアレルギーの症状改善に役立つ可能性がある。

E. 結論

1) 食肉：鶏肉の新規アレルゲンとして CK が同定され、100℃以上の加熱処理は牛肉の低アレルゲン化に有効である。

2) 小麦：小麦粉より IgE-結合性糖鎖タンパク質を 3 種確認し、うち 2 つを小麦ペルオキシダーゼおよび α -アミラーゼインヒビターと同定した。

3) 果実：RAST inhibition によって、トマト果実とスギ花粉との間には共通抗原性が存在することが判明し、トマト果実とスギ花粉との間の共通抗原性に関与するタンパク質はスギ花粉抗原では Cry j 1、Cry j 2 であり、トマト果実抗原では、polygalacturonase 2A (PG2A)、 β -galacturonase (B-FF)、pectinesterase (PE) であった。

4) 穀類：4 種の穀物 (コメ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ) の 33kDa タンパク質のアミノ酸配列には高い同一性が見られ、大腸菌を用いて大量に調製した組換えタンパク質は、高い免疫交差反応性を示した

ことから、穀物の交差アレルゲンの一つと推定された。さらに、いずれもグリオキサラーゼ I 活性を示したことから、穀物種子あるいは組織において生理的に重要な役割を持つタンパク質であることが示唆された。

5)その他：植物性食品素材の相同なアレルゲンタンパク質は、植物分類学上の類縁関係に関わりなく、タンパク質の種類やグループといった分類における相同性に依存することが明らかになってきた。従って、食品素材を同時に比較してプロットする手法は、交差性のあるアレルゲンタンパク質をスクリーニングできる唯一の方法である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Watanabe J., Tanabe S., Watanabe M., Kasai T., and Sonoyama K. Consumption of Hypoallergenic Flour Prevents Gluten-induced Airway Inflammation in Brown Norway Rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 65 (8): 1729-1735, 2001.
- 2) Watanabe J., Tanabe S., Sonoyama K., Kuroda M., and Watanabe M. IgE Reactive 60kDa Glycoprotein Occurring in Wheat Flour *Biosci. Biotech. Biochem.*, 65 (9): 2102-2105, 2001.
- 3) 田辺創一、渡辺純、園山慶、渡辺道子 難治性の小麦アレルギーに挑む化学と生物, 39: 368-375, 2001.
- 4) Tanabe S. Identification of Wheat Allergens Internet Symposium on Food Allergens 3 (4): 163-170, 2001.
- 5) 田辺創一 食物アレルギー日本調理科学会誌, 34(4): 418-423, 2001.
- 6) 田辺創一、渡辺道子 低アレルゲン化小麦粉食品の開発 日本食品科学工学会誌, 48: 948-951, 2001.
- 7) Kondo Y, Urisu A, Tokuda R; Identification and characterisation of allergens of tomato fruit by immunoblotting. *Int Arch Allergy immunol* 126: 294-299, 2001.
- 8) 近藤康人、徳田玲子、各務美智子、川口博史、宇理須厚雄; トマトによる口腔アレルギー症候群(oral allergy syndrome)とトマトアレルゲン.日本小児アレルギー学会誌 15 (1): 39-46, 2001.
- 9) Kondo Y, Urisu A, Tokuda R, Matsuda T; Assessment of cross-reactivity between Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and tomato fruit extracts by RAST inhibition and immunoblot inhibition. *Clin Exp Allergy* (in press).
- 10) Usui, Y., Nakase, M., Hotta, H., Urisu, A., Aoki, N., Kitajima, K., and Matsuda, T.: A 33 kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. Japonica): cDNA cloning, expression and identification as a novel glyoxalase I. *J. Biol. Chem.* 2001. 276, 11376-11381
- 11) Kato, Y., Oozawa, E., and 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.* 2001. 49, 3661-3665
- 12) C. Fujita, T. Moriyama and T. Ogawa: Identification of cyclophilin as an IgE-binding protein in carrot (2001) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125, 44-50
- 13) S. Arai, T. Osawa, H. Ohigashi, M. Yoshikawa. S.

Kaminogawa, M. Watanabe, T. Ogawa K. Okubo, S. Watanabe, H. Nishino, K. Shinohara, T. Esashi, nad T. Hirahara: A mainstay of functional food science in Japan - History, present status, and future outlook (2001), *Biosci. Biotech Biochem.*, 65, 1-13

- 14) 小川正、森山達哉、藤田千鶴子、富田響子(2001): 大豆たん白質糖作特異的 IgE 抗体の存在と植物性食品の交差反応性、大豆たん白研究、4、45-51. 15) 小川正(2001): 低アレルゲン化豆乳、豆腐の開発、デリーフーズ、2001/7、44-49.

2.学会発表

- 1) 谷内昇一郎、田辺創一、伊藤典之、山本明美、笹井みさ、小島崇嗣、小林陽之助 低アレルゲン化小麦による減感作療法を施行した重症小麦アレルギーの1症例 2001年 日本アレルギー学会(福岡)講演要旨集 p.1014
- 2) 高橋良輔、梅田文子、臼井由美子、中瀬昌之、内海成、高岩文雄、松田幹：遺伝子導入によるイネ種子内因性アレルゲンの発現変動：第2報、日本農芸化学会 2001年度大会一般講演(講演要旨集 3M2a3) 2001. 3. 26
- 3) 松田幹、二宮憲子、青木直人：小腸内プロテアーゼ活性の低下がアレルゲンの消化と経口感作能に及ぼす影響、第55回日本栄養・食糧学会大会一般講演(講演要旨集 3H-05p) 2001. 5. 8
- 4) 矢野博己、田口久美子、野村明子、松田幹、加藤保子：食物依存性運動アナフィラキシーモデルマウス作成の試み、第55回日本栄養・食糧学会大会一般講演(講演要旨集 3H-07p) 2001. 5. 8
- 5) 草加一帆、矢野博己、松田幹、加藤保子：急性運動負荷による消化管内のアレルゲンの消長と腸管粘膜上皮細胞傷害、第55回日本栄養・食糧学会大会一般講演(講演要旨集 3H-08p) 2001. 5. 8
- 6) 上杉太郎他：IgE結合性クリ種子24kDaタンパク質の同定及びその性質、日本農芸化学会 2001年度大会(2001年3月26日、京都)
- 7) 藤田千鶴子他：ジャガイモより見いだされた18kDa IgE結合性タンパク質の同定およびその性質、第55回日本栄養・食糧学会(2001年5月8日、京都)
- 8) 小川正他：大豆アレルギー患者血清中のアスハラギン-N結合型踏査特異的IgE抗体のRASTへの影響、第55回日本栄養・食糧学会(2001年5月8日、京都)
- 9) 山村孝子他：患者血清を用いるアレルゲンの多食品同時検出法の構築とその応用、日本栄養・食糧学会 21C 記念、近畿、中国・四国支部合同大会(2001年10月21日、神戸)
- 10) 野村紀子他：アレルギー患者血清 IgE 抗体が認識する新規なポテト 28kDa タンパク質の同定、日本栄養・食糧学会 21C 記念、近畿、中国・四国支部合同大会(2001年10月21日、神戸)
- 11) 西泰宏他：脂肪酸刺激によるラット好塩基球白血球細胞からのケミカルメディエーターの放出について、日本栄養・食糧学会 21C 記念、近畿、中国・四国支部合同大会(2001年10月21日、神戸)

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

食品低アレルゲン化法の開発による食物アレルギー治療に関する研究

分担研究者 眞弓 光文 福井医科大学医学部小児科・教授

研究協力者 大嶋 勇成 福井医科大学医学部小児科・助手

研究要旨

卵の主要抗原であるオボアルブミン(OVA)、オボムコイド(OM)は、生体内レドックス制御蛋白であるチオレドキシニンによる還元処理を加えると、消化酵素による易消化性の亢進と IgE 結合エピトープに変化が生じ、低アレルゲン化される。チオレドキシニン処理を行った卵白アレルゲンを卵アレルギー患者の治療に使用する場合の安全性と有効性を解析するため、OVA 特異 IgE トランスジェニックマウスを用いて食物アレルギー動物モデルの作成を試みた。OVA の経口投与を反復した後の脾細胞の OVA に対する増殖反応が、OVA 特異 IgE トランスジェニックマウスが野生型に比べ増強しており、抗原特異的 IgE の存在が T 細胞の抗原感作にも影響を与えることが示唆された。食物アレルギーの即時型反応および非即時型反応を解析し、食物アレルギー患者のアウトグローの機構を解析するうえで有用と考えられた。

A.研究目的

食物アレルギーの治療としては原因食物の除去が基本となるが、これに代わる手段として食物アレルギー患者でも安全に摂取できるように食品を低アレルゲン化する方法が考えられる。食物抗原の多くは分子内S—S結合(intramolecular disulfide bond)を有し、この結合が蛋白立体構造の安定化や加熱、消化酵素に対する抵抗性に関係していることから、生体内の生理的レドックス制御蛋白であるチオレドキシニン(TRX)の還元能を利用して食物抗原分子内のS—S結合を切断する方法の食品低アレルゲン化への適応を検討してきた。その結果、食物アレルギーの原因食物として最も頻度が高い卵の主要抗原であるオボムコイド、オボアルブミンは、チオレドキシニン処理により加熱調理や消化酵素に対する感受性が増加し、IgE 抗体への結合性が低下して、低アレルゲン化されることを明らかにしてきた。

一方、乳幼児の食物アレルギーのかなりの部分にアウトグローがみられることが知られている。アウトグローの機構として、消化能力の発達により原因食物のアレルゲン性が速やかに消化分解される可能性に加え、経口トレランスの関与が示唆されている。そこで、チオレドキシニン処理を行った食物抗原を投与した場合どのような免疫応答が誘導されるのかを明らかにすることが必要となる。本研究ではチオレドキシニン処理抗原の *in vivo* 投与がトレランス誘導に重要とされる T 細胞の免疫応答にどのような影響を与えるかを解析し、臨床応用への基礎的検討を

行う。

B.研究方法

経口トレランスの実験モデルでは、抗原感作を行う前に大量の抗原を経口投与してトレランスを誘導する方法が用いられている。しかし、実際の食物アレルギーがアウトグローする患者では、食物抗原特異 IgE が既に存在し、抗原感作成立後に耐性が獲得されている。一方、マウスを抗原感作し、抗原特異的 IgE 産生を誘導してから経口トレランスを誘導する方法は、抗原の経口投与がなくても IgE 産生が徐々に低下するため経口トレランスが誘導できたかどうかの評価が困難であり、また、低アレルゲン化などの修飾をうけていない抗原でも経口トレランスが成立してしまうため、修飾抗原の効果の判定が困難である。従って、実際の患者の様に抗原特異的 IgE 産生が持続する状態で、耐性誘導効果を解析できる動物モデルの作成が必要となる。

そこで、我々は OVA 特異 T 細胞レセプターのトランスジェニックマウスと、烏山らにより樹立された OVA 特異 IgE トランスジェニックマウスを用いて、抗原特異的 IgE 存在下での抗原特異的 T 細胞の免疫応答の解析を行なう。今年度は、OVA の経口投与量、投与回数、投与開始時期を変え、アレルギー症状の出現の有無や、脾細胞の OVA に対する増殖反応とサイトカイン産生能を測定し、OVA の至適投与条件を検討した。

C.研究結果

OVA 特異 IgE トランスジェニックマウスに OVA を大量に投与するとアナフィラキシーが生じ単回投与で死亡する。一方、少量投与では軽度のアナフィラキシー症状が出現するが数時間で回復する。しかし、少量隔日投与を反復していくと6~7回目の投与以降、死亡するマウスが出現した。

OVA の経口投与開始前のマウスから脾細胞を分離し OVA に対する細胞増殖反応を測定しても、OVA 特異 IgE トランスジェニックマウスと野生型マウスの両方とも OVA に対する増殖反応はほとんど認められなかった。しかし、少量隔日反復投与後に分離した脾細胞の OVA に対する細胞増殖は、野生型ではほとんど検出できないのに対して、OVA 特異トランスジェニックマウスでは増殖反応の亢進がみられた。現在、OVA 刺激による脾臓細胞からのサイトカイン産生を測定中である。また、消化管粘膜組織の病理学的変化を解析している。

D.考察

アレルギー特異 IgE が存在している場合、大量のアレルゲン投与ではアナフィラキシーショックにより死亡してしまうが、少量のアレルゲン反復投与ではアレルギー特異的 T 細胞応答が誘導されたと考えられる。少量反復投与による死因に T 細胞の免疫応答が関与しているかどうかは、現時点では解明できていないが、抗原特異的 IgE の存在が T 細胞の抗原感作成立に重要な影響を与えていることが示唆される。今回の結果は、抗原特異的 IgE が存在しない野生型でも T 細胞の感作が生じたが、その後すぐに経口トランスが誘導されている可能性も考えられる。従って、この両者の反応の差が生じた原因を明らかにすることで、食物アレルギー患者の病態における抗原特異的 IgE と抗原特異的 T 細胞の役割を解明することが可能と考えられる。

E.結論

OVA 特異 IgE トランスジェニックマウスに OVA を経口投与するシステムは食物アレルギーにおける抗原特異的 IgE の役割を解明する方法として有用であることが示された。また、この動物モデルを用いることで、チオレドキシニン処理を行った OVA を卵アレルギー患者に投与した

場合に生じる免疫反応を検討することが可能である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M: Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69:223-228(2001)
- 2) Ohshima Y, Yasutomi M, Omata N, Yamada A, Fujisawa K, Kasuga K, Hiraoka M, Mayumi M: Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* (in press)
- 3) Iio J, Katamura K, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Ohshima Y, Nakahata T: Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol* (in press)
- 4) Yamada A, Ohshima Y, Tsukahara H, Hiraoka M, Kimura I, Kawamitsu T, Kimura K, Mayumi M: Two cases of anaphylactic reaction to gelatin induced by chloral hydrate suppository. *Pediatr Int* (in press)
- 5) Ohshima Y: Roles of dendritic cells in the pathogenesis of allergic inflammation. *Pediatric allergy and clinical immunology* 2000 (in press)
- 6) 大嶋勇成: アレルギー性炎症と樹状細胞. *日本小児アレルギー学会誌* 14: 81-86 (2001)
- 7) 眞弓光文. 食物アレルギーの最近の動向. 特集・アレルギー疾患の診断と治療—内科医のためのガイドライン. *内科* 87(3): 525-528, 2001.
- 8) 眞弓光文. 食物アレルギーはどこまで関与しているか. 特集 アトピー性皮膚炎—最新情報. *日本医師会雑誌* 126(1): 21, 2001.
- 9) 眞弓光文. 小児アトピー性皮膚炎と食物アレルギー —小児科医の立場から—. *日本皮膚アレルギー学会雑誌* 9(3): 60-65, 2001.

2.学会発表

- 1) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi Y, Yamada A, Fujisawa K, Mayumi M: Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4 T cells is associated with the subsequent development of atopoid dermatitis. *Experimental Biology* 2001 Orland FL March 31-April 4, 2001
- 2) 安富素子、小俣合歓子、大嶋勇成、眞弓光文：臍帯血 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能と IL-13 遺伝子多型との関係。第 13 日本アレルギー学会春季大会 2001/5/ 横浜
- 3) 大嶋勇成：シンポジウム アレルギーと T 細胞：小児アレルギーと T 細胞。第 13 日本アレルギー学会春季大会 2001/5/ 横浜
- 4) 大嶋勇成：シンポジウム ヒト樹状細胞の性状と免疫細胞療法：TNF/TNFR ファミリーと樹状細胞の分化と機能。第 41 回日本リンパ網内系学会総会 2001/5/31,6/1 秋田
- 5) 塚原宏一、野入英世、江米足、大嶋勇成、平岡政弘、眞弓光文：一酸化窒素 (NO) によるヒト肺微小血管内皮細胞接着の制御 第 10 回 Airway Club in Sendai 2001/9/7,8 仙台
- 6) 小俣合歓子、安富素子、大嶋勇成、眞弓光文：MCP-1 による樹状細胞の IL-12 産生能の変化 第 51 回日本アレルギー学会総会 2001/10/29-31 博多
- 7) 大嶋勇成：シンポジウム 免疫学的治療・発症予防の展望：抗原提示細胞制御 第 5 回小児気道アレルギー研究会 2001.11.11 大阪

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

食物アレルギーのアウトグロウの機序の解明と寛容誘導

分担研究者 宇理須厚雄 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科医学部小児科 助教授
研究協力者 山田一恵 山田医院 小児科

研究要旨

鶏卵アレルギーは IgE 抗体が関与する I 型アレルギーであることから、Th2 優位なアレルギーであると予想される。また、乳幼児期に好発し、加齢とともに寛解、すなわちアウトグロウする。このアウトグロウの機序として種々の報告があるが不明な点が多い。今年度は、Th1・Th2 サイトカイン産生能の観点から、末梢血単核球を ovomucoid(OM)で 7 日間刺激した後の培養上清中 IL-4 (Th2 サイトカイン)、INF- γ (Th1 サイトカイン)を測定することによってアウトグロウの機序を検討した。OM 刺激によって、上清中 IL-4 は非寛解群で有意に上昇したが、INF- γ は寛解群で上昇した。鶏卵アレルギー非寛解時は Th2 優位にあり、アウトグロウすると Th1 優位の状態へ偏倚することが示唆された。

A.研究目的

鶏卵アレルギーは乳幼児期に好発し、加齢とともに寛解、すなわち、アウトグロウしていく。鶏卵アレルギー患者の末梢血単核球は鶏卵中の主要アレルゲンの 1 つであるオボムコイド (OM) の刺激によるサイトカインの産生パターンは Th2 サイトカインである IL-4 の産生が Th1 サイトカインである INF- γ の産生よりも優位である。本研究の目的は、鶏卵アレルギー患者を対象として、アウトグロウの機序をサイトカイン産生の観点から検討することである。

B.研究方法

(1)末梢血単核細胞の分離と培養ならびに培養上清中のサイトカイン (IL-4、INF- γ) の測定

鶏卵アレルギー児の末梢血単核細胞を比重遠心法にて分離、採取した。培養には 96 穴プラスチックプレートを用いた。最終細胞数を 1×10^6 個/ml となるように調整し 10%非働化胎児牛血清 (FCS) 加 RPMI 1640 培養液に浮遊した。Ovomucoid(OM)を最終濃度として 0.1 ~ 1000 μ g/ml の濃度で添加し、37°C、5%、CO₂ 培養器内で 7 日間培養した。培養終了後、上清を回収した。上清中の IL-4、INF- γ を高感度 Immunoassay-kit (Cytoscreen Immunoassay kit)を用いて測定した。最小検出感度は 0.49 pg/ml であった (最小検出感度は INF- γ と IL-4 とで同じ値ですか)。

(2)対象

鶏卵アレルギー児に凍結乾燥卵白抗原経口負荷試験の結果で、患児を非寛解群 8 例 (年令 7.5 ± 2.8

歳)と寛解群 4 例 (年令 12 ± 1.6 歳) とに分けた。食物アレルギーがない 4 例 (年令 11 ± 5.9 歳)を対照とした。

(3)統計処理

統計処理は、ANOVA、Fisher's Protected Least Significant Difference で行った。

C.研究結果

鶏卵アレルギー非寛解群は、ovomucoid 刺激によって非刺激時と比べると上清中 IL-4 は有意に上昇したが、寛解群では有意な上昇を認めなかった (Fig.1)。一方、INF- γ は寛解群で ovomucoid 刺激によって有意な上昇をみたが、非寛解群ではみられなかった。

上清中の IL-4 は ovomucoid 非刺激時では非寛解群と寛解群との間で有意差はなかったが、刺激時では非寛解群の方が寛解群よりも有意に高値であった。一方、INF- γ は ovomucoid 非刺激時も刺激時も寛解群の方が有意に高値であった (Fig.2)。

Ovomucoid 刺激時の IL-4 /INF- γ 比を検討すると寛解群と対照群との間では有意差がなかったが、非寛解群は寛解群よりも有意に高値であった。

D.考察

鶏卵アレルギー非寛解児の末梢血単核細胞を ovomucoid で刺激すると、その上清中には Th2 サイトカインである IL-4 が Th1 サイトカインである INF- γ と比べると優位に産生された。IgE 抗体が主たる役割を果たす鶏卵アレルギーは Th2 優位であると予想されるが、今回の検討で

もそれを支持する結果であった。鶏卵アレルギーは乳幼児期に多い食物アレルギーの1つである。さらに、加齢とともに寛解していく、いわゆるアウトグロウしやすい食物アレルギーである。予想通りアウトグロウした児の ovomucoid 刺激による末梢血単核細胞のサイトカイン産生パターンは Th1 側へ正常化していた。その Th1/Th2 比率の正常化は Th1 サイトカインである INF- γ の産生が増加することによる。しかし、その INF- γ 産生の増加がどのような機序で起きるかは不明であり、今後の解明が必要である。

E. 結論

鶏卵アレルギー非寛解期は Th2 優位にあり、寛解すると Th1/Th2 バランスが Th1 側に移動し、正常に近づくことが示唆された。

F. 追加報告

(1) ウズラ、アヒル、ニワトリの各卵白間の交叉反応性に関する検討

方法；鶏卵白をポリビニールプレートに固相化し、ウズラ、アヒル、ニワトリの各々の卵白を、2、20、200 μ g/ml の濃度で inhibitor として RAST inhibition を実施した。鶏卵アレルギーの確認できた患児5名の血清。%binding 値が 25%および 50%以上抑制される場合を有意と考え、その inhibitor の濃度を算出した。

結果；5人の鶏卵アレルギー患者の血清の中で1例の血清でアヒルやウズラ卵白抗原で有意な抑制がかかった(Fig.3)。

結論；鶏卵アレルギー患者の一部にはニワトリ、アヒル、ウズラの卵白の間の交叉反応性の部位を認識する患者が存在した。

(2) ベニサケとヒメマスとの間の交叉反応性
方法；ヒメマスアレルギー患者血清を用いてヒメマス抗原を固相とし、ベニサケとヒメマス抗原を inhibitor として RAST inhibition を行った。

結果；固相抗原と同じ抗原であるヒメマス抗原を inhibitor とした時とほぼ同様の抑制がかかった(Fig.4)。

結論；ベニサケとヒメマスは両者ともサケ目、サケ科、サケ属に属する。両者間には交叉反応性が存在する。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Urisu A ; Progress in diagnosis and treatment of food allergy. Pediatric Allergy and Respiratory Disease (Korea), 10, Supple 2, S91-S92, 2000.
- 2) 徳田玲子、近藤康人、川口博史、各務美智子、宇理須厚雄、浅野喜造；トマト果実による口腔アレルギー症候群患者におけるトマト果実とスギ花粉の共通アレルゲン性の検討。小児科臨床, 54, 25-30, 2001.
- 3) Besler M, Tanabe S, Urisu A; Allergen data collection- Update: Rice (*Oryza sativa*) Internet Symposium on Food Allergens, 3, (Supple 2) 1-7, 2001.
- 4) 近藤康人、徳田玲子、各務美智子、川口博史、宇理須厚雄；トマトによる口腔アレルギー症候群 (oral allergy syndrome) とトマトアレルゲン、日小児アレルギー会誌 15, 1, 39-46, 2001.
- 5) Usui U, Nakase M, Hotta H, Urisu A, Aoki N, Kitajima K, Matsuda T; A 33-kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. Japonica), J Biological Chemistry, 276, 14, 11376-11381, 2001.
- 6) 宇理須厚雄；除去食中止の目安、編集；森田寛、永倉俊和、宮地良樹、岡本美孝、アレルギーナビゲーター、メディカルレビュー社、112-113, 2001.
- 7) 山田一恵、森田豊、宇理須厚雄、徳田玲子、近藤康人、和田映子、鳥居新平；低アレルゲン化卵白である加熱脱 ovomucoid 卵白の簡便な作製法の検討、日小児アレルギー会誌、15, 1, 106-111, 2001.
- 8) 山田一恵、宇理須厚雄；食物アレルギーの治療 (アウトグロウ)、小児科診療、9, 119, 1383-1388, 2001.
- 9) Kondo Y, Urisu A, Tokuda R, Ishida N, Yasuda T; Molecular characterization of a 24-kDa buckwheat protein, one of the major allergens of buckwheat seed. Fagopyrum, 18, 21-25, 2001.
- 10) Kondo Y, Urisu A, Tokuda R; Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. Int. Arch. Allergy Immunol. 126, 294-299, 2001.

2. 学会発表

- 1) 山田一恵、宇理須厚雄、各務美智子、森田