

表1 経口誘発試験の結果

負荷食物	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5	症例6
鶏卵	非即時 (0)	ND	ND	ND	非即時 (2)	ND
牛乳	非即時 (0)	陰性 (0)	陰性 (0)	非即時 (0)	ND	非即時 (1)
大豆	ND	ND	即時 (3)	ND	ND	ND
小麦	陰性 (1)	ND	ND	ND	非即時 (5)	ND

ND: リンパ球機能検査未実施

2) リンパ球表面マーカー

CD3、CD4、CD8、CD19 陽性細胞の比率は、経口誘発試験陽性例、陰性例とも、負荷後、明らかな変化は認めなかった。

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、誘発陽性の場合、7例中4例が増加し、誘発陰性の場合、3例とも著明な変化は認めなかった。

IL-2 陽性細胞の比率は、誘発陽性の場合、7例中3例が増加し、誘発陰性の場合、2例が低下し、1例が著明に増加した。

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、7例中6例が増加し、1例は著明な変化を認めなかった。誘発試験陰性例においては、2例が低下し、1例は著明な変化を認めなかった。

D. 考察

以上の結果から、Th1 細胞は誘発試験陽性の場合、約半数の例において活性化されるが、陰性の場合においても活性化されることのあることが示唆された。一方、Th2 細胞は、経口誘発試験陽性の場合、ほとんどの例において活性化され、陰性の場合には活性化されないと考えられた。なお、誘発陽性にもかかわらず、IL-4 の陽性細胞の増加を認めなかった1例は、小麦の3日間連続負荷により、3日目に皮膚症状を呈した症例であった。このような症例の場合は1~2日後の採血が必要と考えられた。

今後、症例を増やして検討する必要があるが、食物アレルゲン負荷後、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ため、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。

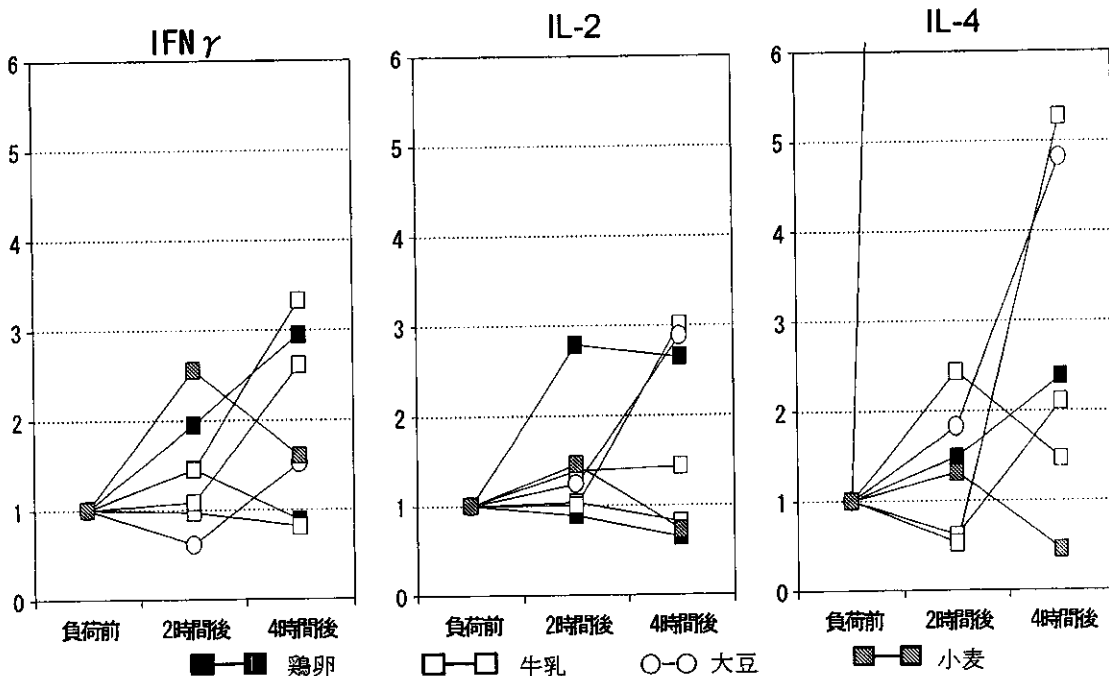


図1 誘発試験陽性例における細胞内サイトカイン陽性細胞の推移

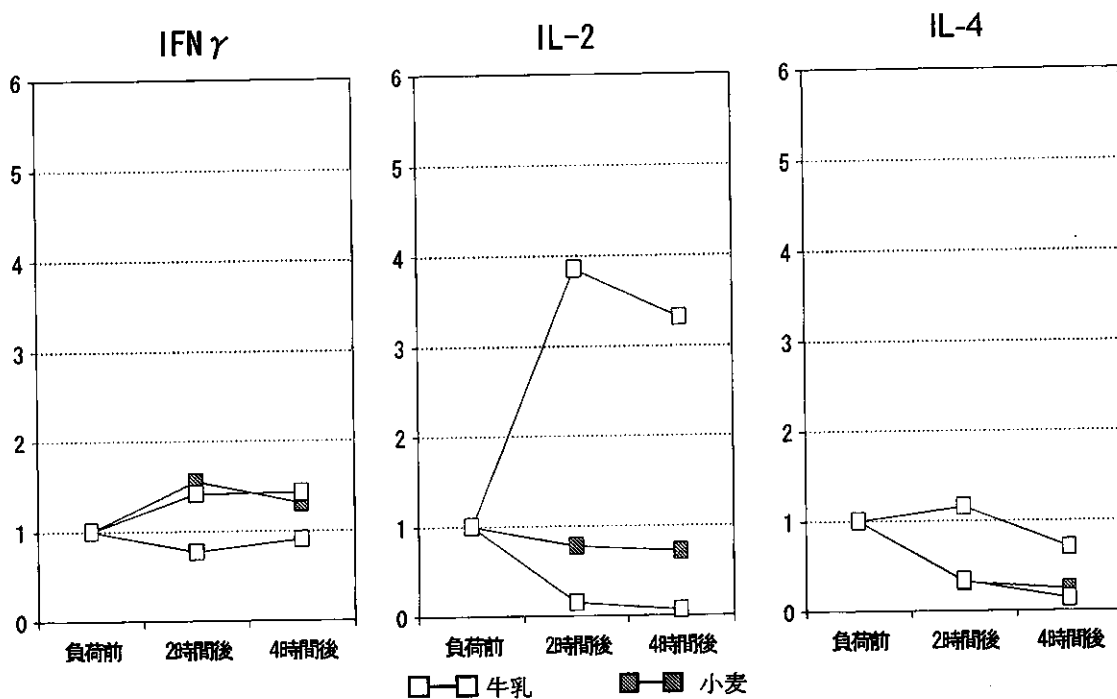


図2 誘発試験陰性例における細胞内サイトカイン陽性細胞の推移

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

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アナフィラキシー誘発例では、耐性化の判断のための負荷試験の施行が家族の不安も大きく施行しにくい。卵、牛乳、小麦による食物アレルギー児に低アレルギー化食品を利用した負荷試験を検討した。負荷食品のアレルゲン濃度をアレルゲン測定キットで測定し、アレルゲンの低減した食品ほど誘発率が低く、より安全に過敏性の検討が施行できた。完全耐性までの期間、これらの食品を日常利用できることで食物アレルギー児の QOL 向上にも役立つと思われた。

A.研究目的

小児期の即時型食物アレルギーでは、卵、牛乳、小麦のアナフィラキシーが多く、その3年経過後の耐性化予後は、重症例では30%から50%程度と低い。これらの症例では、特異IgE抗体は経年的に低下しにくく、喘息合併、他の食物7アレルギー合併などが多いことが、早期耐性、非耐性群の検討で明らかになった。アナフィラキシー例では、微量のアレルゲンにより症状が誘発されやすいため、耐性確認のための負荷試験は家族の不安も大きく、とくに完全除去中は容易ではない。本年度は、これらの重症例における卵、牛乳、小麦における低アレルギー化食品を用いた負荷試験を行い、解除に向けた食品摂取の進め方を検討した。

B.研究方法

負荷試験として、日常利用しやすい低アレルギー化傾向のある食品を用いた。卵アレルギーでは、卵黄より、焼菓子・ムーンライト（森永：乳不使用）、カステラ（小麦アレルギーなし）、牛乳アレルギーでは、ペプティクッキー（オーム乳業：）、マリービスケ（森永：卵なし）、ペプティヨーグルト（オーム乳業：卵、小麦なし）、小麦アレルギーでは、低アレルギー小麦によるケーキ（オーム乳業：卵、牛乳なし）を利用した。

これらの食品中のアレルゲン含有量は、FASTKIT（日本ハム）で測定した。

C.研究結果

アナフィラキシーおよびCAP抗体4以上6までの症例を中心に、それぞれ卵アレルギーで卵黄、牛乳アレルギーでペプティクッキー、小麦

アレルギーで低アレルギー小麦ケーキによる負荷を開始した。負荷に用いた食品中の1g中アレルゲン濃度は、牛乳用ではペプティクッキー（0.54 μ g）、マリービスケット（174 μ g）、ペプティヨーグルト（8.4 μ g）、卵用では、ムーンライトビスケット（177 μ g）、カステラ（1334 μ g）、小麦用では低アレルギー小麦パウンドケーキ（30 μ g、卵、牛乳抗原は感度以下）。それぞれの食品形態1個あたりの負荷アレルゲン量は、0.04mg程度の微量から負荷が可能であった。

重症例におけるこれらの食品による誘発率は、卵黄8%、ペプティクッキー15%、低アレルギー小麦34%であった（表）。誘発例における症状は、軽いものが多く、アナフィラキシー例でも比較的 safely に負荷導入が可能であった。市販の焼き菓子では、卵、牛乳のアレルゲンは比較的低アレルギー化されており、先の負荷食品について卵、牛乳焼き菓子、および低アレルギーヨーグルトで、25%~35%の誘発率で、アレルゲン抗体の高い程、誘発率は高かったが、RAST値の高い例でも7割以上が陰性であった（図）。RAST値以外では、低年齢ほど誘発率は高い傾向がみられた。

D.考察

アナフィラキシー症例における完全除去食をどの程度続けるべきかについては、Sampsonらの検討があるのみで、卵、牛乳で18ヵ月、ビーナッツ、魚で3年は除去が必要であると報告している。このようなアナフィラキシー児の完全耐性の判断には負荷試験による検査が必要であるが、それぞれの粉末化した食品を用いた検査では、1mg以下で誘発されることもあり、初

回負荷量の設定も国際的にも基準がない。卵、牛乳では、加熱によりアレルギー性の低下するものも多く、牛乳では分解乳による低アレルギー食品が開発され、さらに熱耐性の小麦では低アレルギー小麦が菓子類に利用されている。日常食品中のアレルギー含有量も測定が可能になり、低アレルギー食品による今回の検討では、臨床的にアナフィラキシー児の過敏性および耐性化の判断に、負荷食品として利用可能であり、アレルギー食物そのものの摂取が困難な例でも、症状誘発率の少ない食品数を増やすことで食生活での QOL を高め、各自の除去食解除の予測に役立つと思われる。低アレルギー食品を日常利用することで、完全除去より耐性化を早めるかについては、今後の検討が必要である。

E. 結論

1. 低アレルギー化食品、日常食品のアレルギー減弱化食品を用いた、即時型食物アレルギーでの負荷試験の有用性を検討した。
2. アレルギー濃度の測定から、よりアレルギーの低い食品では誘発率は低く、過敏性の程度の程度をより安全に知ることができた。
3. 低アレルギー化食品を利用は、食生活での QOL を高め、各自の除去食解除の予測に役立つと思われた。

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: アナフィラキシー型食物アレルギーの予後. 日児ア誌 16: 149-153, 2002.
- 2) 柴田瑠美子, 小田嶋博, 西間三馨; 不適切除去食、アトピービジネスにより発育障害をきたしたアトピー性皮膚炎乳児の2例. アレルギーの臨床 22: 634-637, 2002.
- 3) 柴田瑠美子: 多種食物アレルギー児の予後とアレルギーマーチ. 食物アレルギー研究会誌 2: 12-16, 2002
- 4) Tanabe S, Kobayashi Y, Takahata Y, Morimatsu F, Shibata R, Nishimura T.: Some human B and T cell epitopes of bovine serum albumin, the major beef antigen. Biochem Biophys Res Commun 293; 1348-1353, 2002.

5) 柴田瑠美子: アトピー性皮膚炎—診療と研究の現状と展望; 乳幼児の食物アレルギー 医療 56: 528-529, 2002.

6) 柴田瑠美子: 食とアレルギーの臨床、アレルギーの臨床 22: 447-451, 2002.

7) 柴田瑠美子: 食物アレルギー 畜産食品、中村晋、飯倉洋治編 食物アレルギー 258-264, 2002.

2. 学会発表

- 1) 柴田瑠美子, 中尾文也他. アレルギー除去食品によりアナフィラキシーが誘発された食物アレルギー児の3例: 食品中の混入アレルギー、小麦蛋白の検索、第52回日本アレルギー学会。2002.
- 2) 柴田瑠美子, 久保田典里子, 西間三馨. ラテックス・フルーツ症候群の小児6例。第39回日本小児アレルギー学会 2002.

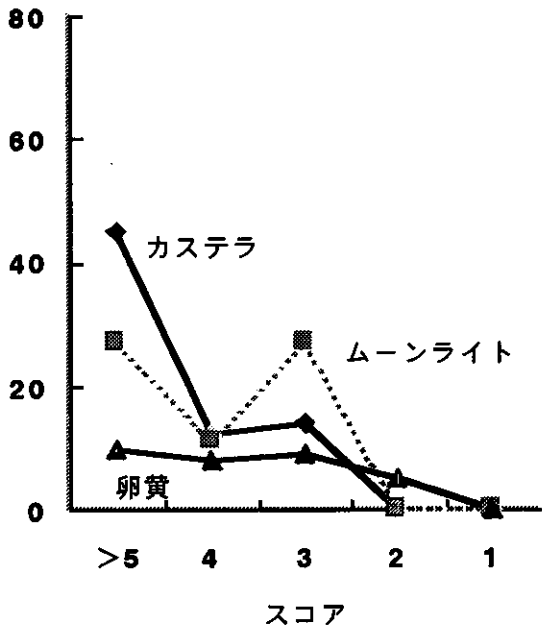
H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 卵、牛乳、小麦アレルギー児における低アレルゲン食品負荷誘発率

負荷食品 負荷誘発最低量	例数	陽性数	陽性率 %	誘発重症例 喘鳴・紅潮・嘔吐
ペプチクッキー 1枚 7mg	46	7	15	なし
マリービスケ 1/2枚 34mg	44	10	23	4例
ペプチヨーグルト 1sp 0.04mg	98	27	27	5例
低アレルゲン小麦 1/8個 0.05mg	52*	18	34	3例
卵黄 1/4	187	16	8	3例
ムーンライト	20	4	20	1例
カステラ	52	13	25	6例

卵アレルギーにおける低アレルゲン卵食品の負荷陽性率



ミルクアレルギーにおける低アレルゲン乳製品の負荷陽性率

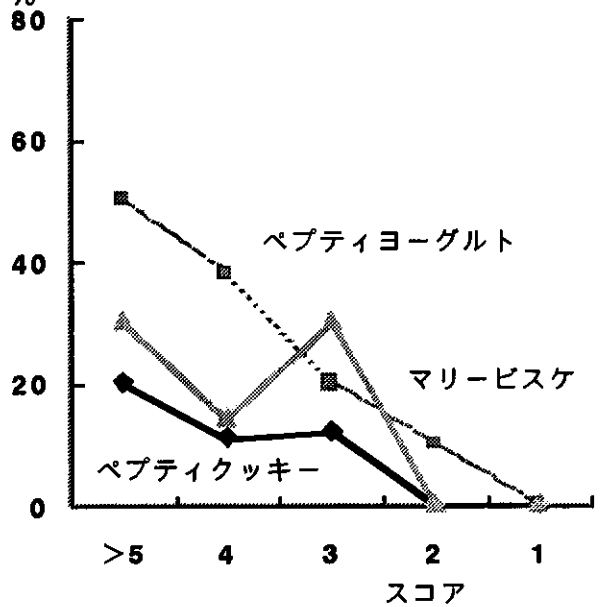


図 卵、牛乳アレルギー児におけるCAPスコアと低アレルゲン食品負荷誘発率

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 国立成育医療センター 総合診療部小児期診療科 医長
研究協力者 田中和子 国立成育医療センター免疫アレルギー研究部
アレルギー研究室研究員
松本健治 国立成育医療センター免疫アレルギー研究部
アレルギー研究室長

研究要旨

法定5品目、奨励19品目の原材料表示がはじまったが、さまざまな問題があり解決していかなくてはならない。これまで、分担研究として食物間の交差抗原性について検討をおこない、鶏卵と魚卵、魚卵と魚肉、イモ類の交差抗原性に関して報告し、食物アレルギー患者が自らのアレルギーに対する交差反応性について認識して原材料表示を利用することの必要性を検討してきた。今年度は、落花生に関する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。しかし、食物の多くは植物、動物由来のものでありその発生的に見ても全く独立したものでないことから、ある程度の相同性が存在する。すなわち同じ仲間の同じような物質ではその遺伝子配列が似ている可能性がありアミノ酸配列の相同性が存在している。このためにアレルギー反応をおこす特異IgE抗体の交差抗原性が存在する。

これまで、鶏卵と魚卵（いくらかも含めて）、イモ類（ヤマイモを含めて）、貝類、甲殻類、魚肉と魚卵等の交差抗原性について検討を行ってきた。今年度は、法定5品目の中の「落花生」と他のナッツ類の交差抗原性について検討を行った。

B.研究方法

(1)抗原エキスの調整

落花生、アーモンド、カシューナッツ、クルミ、マカデミアナッツ、松の実を粉碎器で粉碎後、エーテルで脱脂、Coca液にて蛋白質の抽出を行った。

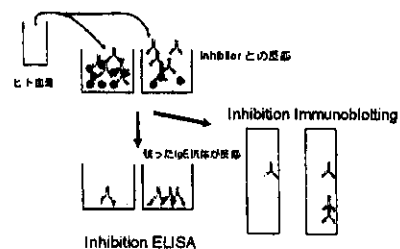
(2)患者血清

国立成育医療センター病院総合診療部、およびアレルギー科外来にて落花生アレルギーの疑われる患者の血液検査時に患者に説明・同意を取得し、カルテに記載し必要量の採血を追加した。

(3)inhibition immunoassay

交差抗原性を調べるため、inhibition immunoblotting法とinhibition ELISA法を実施した。

原理は図に示すように患者血清と交差抗原性の疑われる抗原(inhibitor)を先ず反応させ、その反応後の血清を、もとの抗原と反応させる。Inhibitorの量に応じて濃度依存性につぎの抗原との反応量が異なってくるのでその交差反応性の程度がわかる。



Inhibition assay の原理

(倫理面への配慮)

患者からの血清提供にかんして、現時点でナッツ関係の特異IgE抗体測定は、特定のものに限定されているので研究で幅広く測定し、患者へ結果の説明することができる。結果について匿名化して公表することの承諾を得ている。

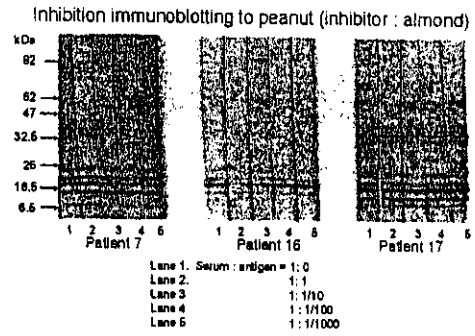
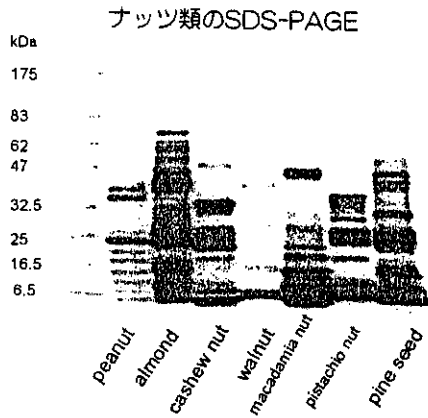
C.研究結果

(1)SDS-PAGEでのナッツ類の蛋白分布

ピーナツ、アーモンド、カシューナッツ、クルミ、マカデミアナッツ、松の実の抗原エキスをSDSPAGE法で展開すると、6kD以下から80kD

まで多くの蛋白質バンドが染色された。

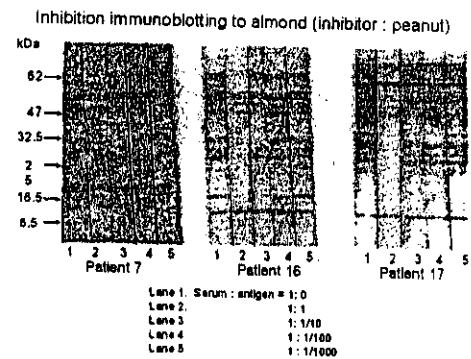
各ナッツ間で同等な蛋白質バンドの分布は見られなかった。



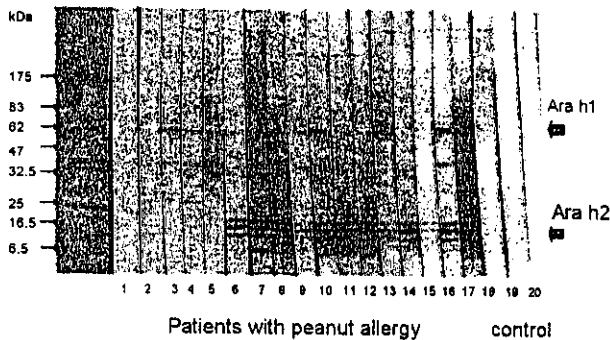
アーモンドに対してピーナツ、カシューナツに対してピーナツを inhibitor としてくわえると濃度依存性に抑制がかかった。

(2)患者血清による immunoblotting

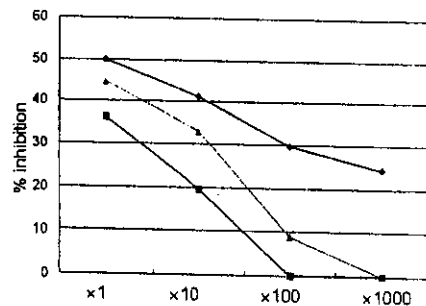
ピーナツアレルギーのある 17 名の患者血清 IgE 抗体でのピーナツに対する反応では、11 名の患者で主要抗原である Ara h1(分子量 63.5kD)に反応し、10 名の患者が Ara h2(分子量 17kD)に反応した。



IgE immunoblot of peanut



Inhibition ELISA to cashew nut (inhibitor : peanut)



(3)inhibition immunoblotting

3 名の患者血清を使用して inhibition immunoblotting をおこなった。ピーナツに対して inhibitor としてアーモンドを使用すると inhibition がかからなかった。カシューナツでも同様に抑制がかからなかった。

D.考察

落花生 (ピーナツ) は、特定原材料表示のうち、アナフィラキシーショックを起こす頻度が高いことから 5 品目に入れている。ピーナツアレルギーがある場合他の種実類にアレルギー症状を起こすことはしばしば経験される。この合併が独立して反応しているのかそれとも交差抗原性があるためのものかはまだ十分検討されていない。今回の検討ではまだ十分量の患者数について検査ができていないためその頻度

は出せないが、3名ではピーナツでの inhibition がわかり、交差抗原性があることがわかった。交差抗原性は個々の患者で異なるがその頻度を明らかにすることで落花生表示の際にはさらに関連性のあるナッツ類に関しても注意が必要であることを患者およびメーカーにもしめことができる。

E. 結論

落花生など特定の原材料に対する交差抗原性は個々の患者で異なるが一般でもその頻度がわかれば、メーカー、患者共により注意深い食品の表示、選択が可能となる。

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. Hikura, 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。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

食物アレルギーのアウトグロウの機序の解明と寛容誘導
—加熱脱オボムコイド卵白による鶏卵アレルギー寛解誘導の試み—

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 教授
研究協力者 徳田 玲子 藤田保健衛生大学 坂文種報徳會病院小児科

研究要旨

低アレルゲン化された加熱脱オボムコイド卵白は、1回の経口負荷試験で陰性を確認できた鶏卵アレルギー患児なら、2週間あるいは4週間の連日経口摂取しても安全であり、さらに、鶏卵アレルギー患児の過敏状態を改善する可能性が示された。その機序として卵白特異的 IgG4 が関与していることが推測された。

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を対象に、低アレルゲン化された加熱脱オボムコイド卵白の経口摂取によって寛解誘導が可能か検討する。

B.研究方法

1. 経口負荷試験用抗原ならびに寛解導入用抗原：経口負荷試験用卵白抗原として①凍結乾燥卵白（8g＝鶏卵白1個相当）、②加熱卵白を含むクッキー（クッキー1枚で鶏卵約1/4個相当の90℃、60分間、加熱処理を施した卵白を含む）4枚、③加熱脱オボムコイド卵白を含むクッキー（卵白含有量は加熱卵白と同様）4枚、④プラセボは卵白を含まないクッキー4枚を用いた。寛解導入用抗原としては加熱脱オボムコイド卵白クッキー4枚を用い、14日間あるいは28日間連日経口摂取してもらった。終了後、再度、投与前と同じ抗原で負荷試験を実施し、陰性化するかどうかを検討した。

さらに、経口負荷試験で陽性となった最終抗原量（陽性抗原濃度）とその症状点数（Bockらの方法に準拠）の積を求めた。

2. 対象：凍結乾燥卵白（男：女＝7：6、年齢 4.5 ± 2.7 歳）あるいは加熱卵白（男：女＝4：5、年齢 4.0 ± 1.6 歳）経口負荷試験陽性でしかも加熱脱オボムコイド卵白による経口負荷試験が陰性の鶏卵アレルギー患児22人。加熱脱オボムコイド卵白クッキー経口摂取は患者の保護者から同意書をとった後実施した。

3. 血中サイトカイン：IL-4、IL-5、IFN- γ 、TGF- β を高感度ELISA法で測定。

4. 血清総IgE値

5. 特異的IgE抗体価：卵白、オボムコイド、ヤケヒョウヒダニ、牛乳、小麦に対する特異的IgE抗体をCAP-FEIAで測定。

6. 特異的IgA、IgG、IgG4：卵白抗原を用いたELISA法で測定。

C.研究結果

加熱脱オボムコイド卵白連日摂取後の経口負荷試験の結果は、表1に示すように、凍結乾燥卵白陽性群は13例中8例（61.5%）、加熱卵白陽性群は9例中5例（55.6%）で陰性化した。全症例で検討すると、22例中13例（59.1%）で陰性化したことになる。

また、陽性抗原濃度と症状点数の積は経口負荷試験陰性化群で負荷前 11.2 ± 14.3 から負荷後0へと有意に低下しただけではなく、陰性化しなかった群でも負荷前 26.2 ± 34.2 から負荷後 2.1 ± 2.3 へと有意に低下した。

しかも、いずれの症例においてもアトピー性皮膚炎の悪化などの副作用はみられなかった。

連日摂取前後で測定した種々のパラメーターをみると、血中サイトカイン（IL-4、IL-5、IFN- γ 、TGF- β ）（表2）、血清総IgE値、特異的IgE抗体価（卵白、オボムコイド、ヤケヒョウヒダニ、牛乳、小麦）（図1）は有意な変動を示さなかった。

卵白特異的IgA、IgGも有意な変化はなかった。一方、卵白特異的IgG4は陰性化しなかった群（負荷前；mean=1.14、m-SD=0.29、m+SD=1.99、負荷後m=1.15、m-SD=0.58、m+SD=1.71；NS）では変動はみられなかったが、陰性化群（負荷前；mean=1.02、m-SD=0.69、m+SD=1.35、負荷後m=2.14、m-SD=1.5、m+SD=2.77；p=0.026）だけが、連日摂取後、有意に上昇した（図2）。

D. 考察

加熱脱オボムコイド卵白含有クッキーの連日摂取によって、約 6 割の患者で経口負荷試験が陰性化したことから、加熱脱オボムコイド卵白を用いた経口減感作療法の有用性が示唆された。負荷試験が陽性となる最終抗原負荷量とその時の過敏症状の積を求めてみると、陰性化しなかった群でもその点数は有意に低下していた。この結果は陰性化しなくても、加熱脱オボムコイド卵白連日摂取は卵白アレルギーの過敏性を軽減していることを意味している。

また、低アレルギー化された卵白抗原といえども、連日摂取によって即時型過敏症状の再発やアトピー皮膚炎の悪化のような非即時型過敏反応など有害事象が懸念されるが、今回の検討では 1 例も悪化は認められなかった。

今後、症例数を増やして有用性ならびに副作用の確認をする必要がある。

今回の加熱脱オボムコイド卵白連日摂取による陰性化率は約 60% であった。投与期間、投与量、年齢など陰性化に関与する因子の検討が、この成績を向上させることにつながる。今後の検討課題である。

血中サイトカインは IL-4、IL-5、IFN- γ 、TGF- β いずれも変動しなかった。しかし、抗原特異的なサイトカイン産生は変動する可能性はある。現在、卵白やオボムコイド刺激による末梢血単核球からのサイトカイン産生を検討している。

卵白やオボムコイド特異的 IgE、IgA、IgG は有意な変動をみなかったが、卵白特異的 IgG4 が陰性化群で有意に上昇した。陰性化群だけで上昇したことは、卵白抗原の経口摂取による単なる上昇ではなく、陰性化に関係がある現象と考えられた。

抗原特異的 IgG4 は家屋塵、ダニ、花粉など吸入性抗原による皮下あるいは皮内への注射による減感作療法でも上昇する抗体である。これらとの関連は興味深い。

E. 結論

低アレルギー化された加熱脱オボムコイド卵白は、1 回の経口負荷試験で陰性を確認できた鶏卵アレルギー患児なら、2 週間から 4 週間の連日摂取でも安全であり、さらに、加熱脱オボムコイド卵白の連日経口摂取は鶏卵アレルギーの寛解を導入できる可能性が示された。その機

序として卵白特異的 IgG4 が関与していることが推測された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 宇理須厚雄; 食物抗原、アレルギーの臨床、22,(6)432-436,2002
- 2) Kondo Y, Tokuda R, Urisu A, Matsuda T; Assesment of cross-reactivity between Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and tomato fruit extracts by RAST inhibition and immunoblot inhibition. Clin Exp Allergy 32,590-594,2002.
- 3) 宇理須厚雄; 食物抗原の診断と治療における修飾食物抗原の応用、日小児アレルギー会誌 16,154-158,2002.
- 4) Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawaguchi H, Urisu A; Oral allergy syndrome to tomato fruit: Identification of tomato allergens and demonstration of their cross-reactive with those from Japanese cedar pollen. Ed. By Akihiro Morikawa JOMO Newspaper Co., Ltd. Current advances in pediatric asthma and other allergic diseases. 71-80,2002.
- 5) 徳田玲子、宇理須厚雄; アレルギー疾患と食物、アレルギーの臨床、22,865-870,2002.
- 6) 徳田玲子、宇理須厚雄; アレルギー疾患と食物、アレルギーの臨床、22,11,865-870,2002.
- 7) 宇理須厚雄; 食物アレルギー小児内科、34、増刊号、1265-1270,2003.
- 8) 宇理須厚雄; 小児食物アレルギー、現代医学、50,311-316,2002.

2. 学会発表

- 1) 徳田玲子、川口博史、各務美智子、寺西映子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、木村 守、宇理須厚雄、2 週間連日負荷による加熱脱オボムコイド卵白のアレルギー性の検討、第 38 回、日本小児アレルギー学会、北九州市、2001 年、10 月 6 日 7 日。
- 2) 徳田玲子、川口博史、各務美智子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、宇理須厚雄、浅野喜造; 2 週間連日負荷による加熱脱オボムコイド卵白のアレルギー性の評価と寛解導入について、第 105 回、日本小児科学会学

表1;経口負荷試験結果

	positive	negative		
加熱脱OM卵白クッキー連日摂取	即時型反応 0/22	22/22		
	非即時型反応 0/22	22/22		
連日摂取直後に再度施行した負荷試験				
連日摂取前に陽性であった卵白				
加熱脱卵白①	6/18	6/18		
加熱卵白②	4/9	5/9		
total	9/22	19/22 (86.4%)		
試験前後での症状変化				
Total score (抗原量×症状点数)	pre	post	pre	post
mean ± SD	28.2 ± 84.2	2.1 ± 2.3	11.2 ± 14.3	0.0

- 術集会、名古屋、2002年4月19日～21日。
- 山田一恵、宇理須厚雄、各務美智子、森田豊、寺西映子、近藤康人、柘植郁哉、柳原行義、鳥居新平; 鶏卵アレルギー非寛解患児末梢血単核球からのPepsin処理Ovomucoidによるサイトカイン産生、第14回、日本アレルギー学会春季臨床集会、幕張、2002年3月21日～23日。
 - 宇理須厚雄; 食物アレルギーの診断と治療、第29回、日本小児栄養消化器肝臓学会、高崎、2002、9月22日。
 - Urisu A; Decision making tree for allergenic safety of GM-food, 5th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology and 7th West Pacific Allergy Symposium, Seoul, 2002, Oct. 12-15.
 - 徳田玲子、河村牧子、松山温子、川口博史、各務美智子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、木村守、宇理須厚雄; 連日摂取による加熱脱オボムコイド卵白のアレルゲン性の評価と寛解導入について、第52回、日本アレルギー学会総会、横浜、2002年11月28日～30日。
 - 木村守、関亜希子、平山修治、徳田玲子、山田一恵、宇理須厚雄; アレルゲン低減化卵白摂取によるモルモットでの食物アレルギー予防効果の検討、第52回、日本アレルギー学会総会、横浜、2002、11月28日～30日。
 - 山田一恵、宇理須厚雄、河村牧子、各務美智子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、柳原行義、鳥居新平; 鶏卵アレルギーの寛解とPepsin処理ovomucoidによる末梢血単核球のTh1・Th2サイトカイン産生能の関係、第52回、日本アレルギー学会総会、横浜、2002、11月28日～30日。

表2;加熱脱OM卵白連日摂取前後での検査結果

	連日摂取後の経口負荷試験 positive		連日摂取後の経口負荷試験 negative	
	pre	post	pre	post
IL-4 (pg/ml)	19.1 ± 14.8	22.0 ± 23.4	41.8 ± 74.5	29.5 ± 36.1
	NS		NS	
IL-5 (pg/ml)	5.3 ± 0.7	8.7 ± 0.1	6.26 ± 2.36	7.76 ± 3.91
	NS		NS	
INF-γ (pg/ml)	0.12 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.04
	NS		NS	
TGF-β1 (pg/ml)	29.3 ± 25.8	27.3 ± 14.8	11.4 ± 7.1	15.7 ± 12.0
	NS		NS	

各数値はmean±SDを示す。 NS: not significant

図1;加熱脱OM卵白連日摂取前後での検査結果

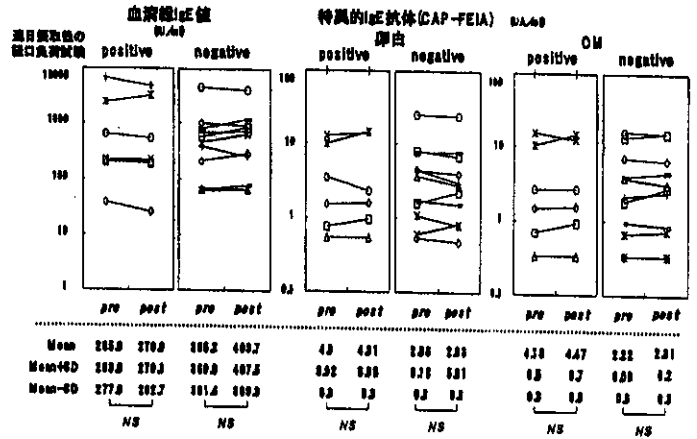
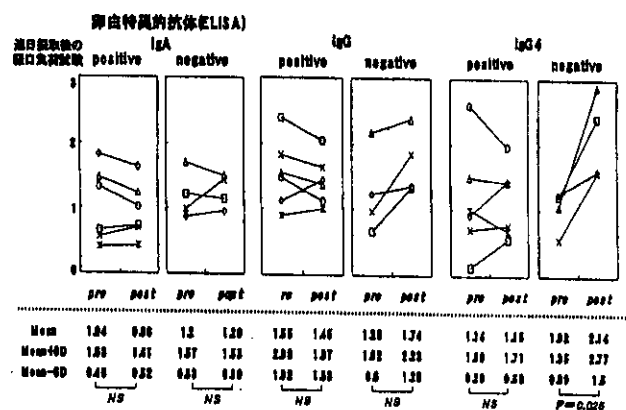


図2;加熱脱OM卵白連日摂取前後での検査結果



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疾患に関する文献調査研究

分担研究者 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

諸外国の食物アレルギーによる死亡例を文献学的に調査し、原因食品、既往歴、および食物アレルギーによる死亡例の登録システム等に関する情報の把握を目的とした。諸外国の食物アレルギーによる死亡例を、PubMed (Web) を用い 2002 年 10 月までの過去 20 年間について検索した結果、6 編あった。地域としてはアメリカ合衆国、英国、スウェーデンであった。今回の諸外国の食物アレルギーによる死亡例の調査では、疾病登録システムを利用したものが、6 編中 3 編であった。また、原因食品としては、ピーナッツ、そのほかのナッツ類、牛乳、魚介類、卵、大豆であった。わが国で食物アレルギーによる死亡を把握するための実現可能な研究デザインとしては、人口動態統計の活用もしくは医療機関ベースでの疾病登録制度が有用と思われる。

A.研究目的

過去 2 年間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、および発生頻度は低いが重症度の観点から鑑み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。本年度は、諸外国の食物アレルギーによる死亡例を文献学的に調査し、原因食品、既往歴、および食物アレルギーによる死亡例の登録システム等に関する情報の把握を目的とした。

B.研究方法

諸外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 PubMed (Web) を用い、Food Hypersensitivity、Mortality、death、および fatal- をキーワードとして検索した。検索期間は、PubMed で 2002 年 10 月までの過去 20 年間について検索した。

C.研究結果

諸外国の食物アレルギーによる死亡例報告に関する論文は、同一症例を扱っていると思われる論文を、調査年、方法と対象より同定し重複を除いたところ最終的に 6 編あった。地域としてはアメリカ合衆国、英国、スウェーデンであった。地域毎に結果の概説を以下に示す。また、症例報告 1 編を除いた 5 編の調査につき表に示す。

1) アメリカ合衆国

(Sampson, N Eng J Med 1992. Bock, J Allergy Clin Immunol 2001)

1992 年に 6 例の死亡例を確認し、原因食品はナッツ類が 4 例、卵、牛乳が各 1 例であった。いずれも既往歴として気管支喘息があった。調査法は、担当医、患者の親などから情報収集した。1994 年から 6 年間で 32 例の死亡例を報告していた。原因食品はピーナッツ 20 例、他のナッツ類 10 例、牛乳、魚が各 1 例であった。登録システムは the American Academy of Allergy and Anaphylaxis Network 等で設立され、臨床医、メディア、およびこの組織が登録した症例から死亡例を抽出した。

2) 英国

(Pumphrey, Clin Exp Allergy, 2000. Patel, Med Sci Law, 1998. Macdougall, Arch Dis Child, 2002)

1992 年から 5 年間に 39 例あった。原因食品はピーナッツ 10 例、他のナッツ類 16 例、魚介類 3 例、牛乳 2 例等であった。英国では 1992 年からすべてのアナフィラキシーショックによる死亡症例を死因より同定し、詳細な情報を収集する登録制度が設けられている。また、症例報告 2 例は、いずれも魚介類が原因食品であった。英国とアイルランドにおいて 1998 年から 2 年間前方視的に調査し 3 例を報告している。原因食品は牛乳が 2 例でいずれも気管支喘息を伴っていた。この前方視的調査は、British Paediatric Surveillance Unit が毎月すべての小児科専門医に疾病登録カードを配布し行われた。

表 食物アレルギーによる死亡症例調査

著者,発表年	調査年	調査方法	死亡例数	原因食品
(アメリカ合衆国)				
Sampson, 1992	1992年	担当医、患者の親から情報収集	6例	ナッツ類(4)、卵(1) 牛乳(1)
Bock, 2001	1994~2000年	登録システムより収集*1	32例	ピーナッツ(20) 他のナッツ類(10) 牛乳(1)、魚(1)
(英国)				
Pumphrey, 2000	1992~1998年	登録制度より収集*2	39例	ピーナッツ(10) 他のナッツ類(16) 魚介類(3)、牛乳(2)
(英国、アイルランド)				
Macdougall, 2002	1998~2000年	疾病登録制度*3	3例	牛乳(2)
(スウェーデン)				
Foucard, 1999	1993~1996年	全臨床医を対象にした調査	5例	大豆(3)、ピーナッツ(2)

*1 the American Academy of Allergy and Anaphylaxis Network等からなる登録システム

*2 アナフィラキシーショックによる全死亡症例を登録

*3 British Paediatric Surveillance Unitによる疾病登録制度

3) スウェーデン

(Foucard, Allergy 1999)

1993年から3年間すべての臨床医を対象にした調査で5例の死亡例を報告していた。2例がピーナッツ、3例が大豆によるものであった。いずれも気管支喘息を既往にもっていた。この調査は1992年にスウェーデンで初めて食物アレルギーによる死亡例が発生し報告されたため、その翌年から実施されたものである。

収集した文献の調査方法として、6編のうち、3編が何らかの登録システムを利用したものであった。また、原因食品としては、ピーナッツ、そのほかのナッツ類、牛乳、魚介類、卵、大豆であった。

D. 考察

諸外国の食物アレルギーによる死亡例報告を過去20年間の外国の医学誌を用い、文献学的に調査した。その結果、該当論文が6編あった。地域としてはアメリカ合衆国、英国、スウェーデンであった。諸外国の死亡例調査は、アナフィラキシーショックあるいは食物アレルギーの登録制度や臨床医への調査を活用したものであった。登録制度のうち、英国の制度は、死因がアナフィラキシーとされた症例についてその発生数および原因を詳細に把握できると考える。

死亡例の原因食品としてはピーナッツ、その他のナッツ類は多かった。これは報告がいずれも欧米であったためと推測される。わが国では過去14年間にソバによる食物アレルギーが推測された症例が2例報告されていた(平成13年度報告書)。食物アレルギーによる死亡の原因となり得る食品は、食文化や国により異なることが予想される。

今回の調査では、既往として気管支喘息をもった症例が多かった。わが国での該当症例2例も気管支喘息を既往にもっていた。このことは今後、わが国で重篤なもしくは死亡にいたる食物アレルギーの予防を考える際、気管支喘息の危険因子としての大きさを考慮にいれる必要があることを示唆すると考える。

わが国での一般的な疾病登録制度の現状や食物アレルギーによる死亡例数を考慮すると、わが国で食物アレルギーによる死亡を把握するための実現可能な研究デザインとしては、人口動態統計もしくは、医療機関ベースでの疾病登録制度の活用が有用と思われる。

E. 結論

今回の諸外国の食物アレルギーによる死亡例が調査では、疾病登録システムを利用したものが、6編中3編であった。また、原因食品とし

めの実現可能な研究デザインとしては、人口動態統計もしくは、医療機関ベースでの疾病登録制度の活用が有用と思われる。

E.結論

今回の諸外国の食物アレルギーによる死亡例が調査では、疾病登録システムを利用したものが、6編中3編であった。また、原因食品としては、ピーナッツ、そのほかのナッツ類、牛乳、魚介類、卵、大豆であった。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

玉置淳子、坂田清美、堀江 裕、海老澤元宏、橋本 勉「文献的見地からみた我が国の食物アレルギー」日本小児アレルギー学会誌 16:169-74,2002

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	穰山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 食品室長
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
	佐伯宏樹	北海道大学大学院水産科学研究科
	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
	豊田正武	実践女子大学生生活科学部
	米谷民雄	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食肉：豚肉抽出物中の 74kDa 成分が主要アレルゲンであることが示唆された。**小麦**：患者 IgE 抗体は小麦グルテン全画分に反応することが示された。これらグリアジン・グルテニン画分には QPQQP, QQQPP などが繰り返し配列の IgE-binding epitope であることが明らかとなった。**魚種**：相関係数 0.9 以上である魚種同士の組み合わせをまとめ、代表魚種を選択した。**穀類**：穀物の 33kDa アレルゲンは免疫交差反応性を示し、穀物アレルギーにおける共通のアレルゲンと考えられる。**魚卵**：In vivo において、ベータプライムコンポーネントがサケ魚卵の即時型アレルギーのアレルゲンである可能性が強く示された。**その他**：複合アレルギーが疑われる食物アレルギー患者血清を用い、マルチプロット法による植物性食品素材中の IgE 抗体認識タンパク質成分のスクリーニングを行った結果、種々の食品間にかなり多くのパンアレルゲンの存在・分布が認められた。

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：BSA と HSA（ヒト血清アルブミン）のアミノ酸配列が著しく異なる 16 領域をペプチド合成し、牛肉アレルギー患者の血清を用いた inhibition ELISA により IgE 結合能を測定した。さらに、豚肉アレルギー患者の血清を用いたウエスタンブロットにより豚肉 PBS 抽出物中の患者 IgE 抗体結合バンドを解析した。
- 2)小麦：小麦グルテンから total gliadin, α , β , γ , slow ω , fast ω の各グリアジンおよび HMW, LMW グルテニンを電気泳動法により分画した。また、エピトープの候補として PQQPF, QPQQP, QQPF, QQPGQ, QQQPP, および QQQQP を固相合成した。
- 3)魚種：対象は病歴から魚アレルギーが疑われた 41 症例(男:女=29:12)で、何らかの魚によって過敏症状を発現した既往があった。特異的 IgE 抗体価の測定

は、各種抗原を結合した paper disk、2 倍希釈した血清 50 μ l、²⁵¹I 標識抗ヒト IgE 抗体(Dinabot KK)50 μ l を用いて、paper disk に結合したアイソトープ量を γ カウンタで計測した。

4)穀類：大腸菌発現システム (pET) を用いて融合タンパク質を大量に発現させ、ニッケルキレートカラムを用いて精製し、さらにエンテロキナーゼ処理によってチオレドキシンを除去して組換えアレルゲンを調製した。

5)魚卵：まずシロザケ魚卵中のタンパク質成分をさまざまな塩濃度溶液で分画・精製した後、ウエスタンブロットと ELISA 法を用いて魚卵アレルギー患者 (6名) の血清中 IgE と反応するタンパク質成分を見いだす。

6)その他：トマト、ラッディッシュ等のアレルゲンを単離後、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。

(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：牛肉アレルギー患者の主要な IgE 結合エピトープは EYAV(338-341)および LILNR(453-457)等であった。また、EXXV の共通配列が 338-341 以外に 468-471 および 547-550 番目にも存在していた。一方、107-123 および 451-459 ペプチドにより、顕著にリンパ球増殖応答が亢進した。豚肉アレルギー患者 10 例中 6 例において IgE 結合バンドが一本のみ認められ、SDS-PAGE 上での分子量は 74kDa であった。

2)小麦：小麦グルテンを total gliadin, α , β , γ , slow ω , fast ω の各グリアジンおよび HMW, LMW グルテニンに分離し、各画分に対する ELISA を患者血清を用いて行った。その結果、患者 IgE 抗体は全画分に対し同程度反応することが示された。また、PQQP, QPQP, QQPF, QQPG, QQQP, および QQQP を inhibition ELISA に供したところ、QPQP が最も IgE 結合能が高く、QQPF, QQPG, QQQP がこれに続いた。

3)魚種：魚特異的 IgE 抗体価を魚種同士のすべての組み合わせで検討して、相関係数を求めた。硬骨魚綱に属する魚種同士の組み合わせは相関係数 0.41 から 0.95 に分布しており、いずれの危険率も 0.05 未満と有意な相関を認めた。次に、硬骨魚綱に属する魚種を相関係数 0.9 以上の組み合わせでまとめ、代表魚種を選択した。魚特異的 IgE 抗体価の相関係数が 0.9 以上である組み合わせが多い 8 魚種を代表魚種に選択した。

4)穀類：4種の穀物(コメ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ)の組換え 33kDa アレルゲンを調製し、それぞれ単一票品として数 mg 程度得られた。いずれの 33kDa アレルゲンもアレルギー患者血清 IgE 抗体との反応性を示し、それらは正の相関を示した。特に、コムギとコメの間で高い相関が見られた。

5)魚卵：水溶性タンパク質抽出画分と塩溶性タンパク質抽出画分中にすべての患者血清中 IgE と反応するタンパク質を見いだした。この成分は肝臓で生成される卵黄タンパク質の成分である「ベータ・プライム・コンポーネント(以下 β')」と同様の挙動を示した。さらに患者血清の反応性は、 β' との競争 ELISA によって強く阻害された。

6)その他：植物性食品素材、特に野菜類の抽出タンパク質について患者血清による予備スクリーニングの結果、トマトにアレルギー患者の約 14%が反応する分子量 46kDa、pI4.2 のタンパク質が見いだされた。単離したタンパク質の N-末端アミノ酸配列の解析、相同性の検索より、コルク質形成関連酸性ペルオキシダーゼ(suberization-associated anionic peroxidase)と同一化した。

D.考察

1)食肉：EXXV 配列が繰り返して出現することは、BSA により複数の IgE 抗体が架橋されるのに重要であると考えられた。また、豚肉の主要アレルゲンであることが強く示唆された 74kDa 成分を N-末端アミノ酸配列解析により同定する必要がある。

2)小麦：本研究により、小麦アレルギー患者 IgE 抗体はグリアジン・グルテニン全ての画分を認識することが明らかになった。これらに含まれる数アミノ酸をモチーフとする繰り返し配列のうち、出現頻度の上位 6 種を inhibition ELISA に供した。その結果、QPQP が最も IgE 結合能が高く、QQPF, QQPG, QQQP がこれに続いた。このような繰り返し配列が IgE-binding epitope であることは、抗原としてのグリアジン・グルテニンが、患者肥満細胞に結合している複数の IgE 抗体を架橋する上で重要な役割を担っていると考えられた。

3)魚種：生物学的分類に従ってアレルギーの原因魚種を予測することは不可能であると考えられた。そこで硬骨魚綱に属する魚種の IgE 結合能に基づいたグループ分けを行った。これは、相関関係が極めてよい組み合わせにおいて、一方の魚種に対する IgE 抗体価から、他方に対する IgE 抗体価を予測することを目的としている。このような見地から、相関係数 0.9 以上である魚種同士の組み合わせをまとめ、代表魚種を選択した。

4)穀類：4種の穀物 33kDa アレルゲンのアミノ酸配列の相同性と、特異抗体との高い免疫交差反応性から、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。

5)魚卵：上記の結果は、患者血清中に β' と反応する特異 IgE の存在を示唆している。

6)その他：同定されたタンパク質は植物感染特異的タンパク質(PR-P)に分類され PR-9 に属するタンパク質である。栽培時ストレスは PR-P の産生を誘導し、アレルゲン性を増加する原因となることが示唆された。

E.結論

1)食肉：BSA の主要 IgE 結合エピトープを 338-341/453-457、また、主要 T 細胞エピトープを 107-123/451-459 と同定した。豚肉抽出物中の 74kDa 成分が主要アレルゲンであることが示唆された。

2)小麦：小麦アレルギー患者 IgE 抗体は、 α , β , γ , slow ω , fast ω の各グリアジンおよび HMW, LMW グルテニン全ての画分を認識することを明らかにした。これらに含まれる数アミノ酸をモチーフとする繰り返し配列(QPQP など)が IgE-binding epitope であった。

3)魚種：相関係数が高い場合、一方の魚種に対する特異的 IgE 抗体価から他方に対する特異的 IgE 抗体価の予測が可能である。

4)穀類：穀物の 33kDa アレルゲンは免疫交差反応

性を示し、穀物アレルギーにおける共通のアレルゲンと考えられる。

5)魚卵：In vivo において、 β がサケ魚卵の即時型アレルギーのアレルゲンである可能性が強く示された。

6)その他：既に昨年度においても報告しているように、植物性食品素材中に見いだされた IgE 結合性タンパク質（アレルゲン成分）の多くがいわゆる PR-P に属するタンパク質に帰属されることが明らかになってきた。この事実は、食品素材植物の栽培条件によっては、ストレスの負荷によってはアレルゲン性も変化する可能性を強く示唆する物である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Soichi Tanabe, Yoko Kobayashi, Yoshihisa Takahata, Fumiki Morimatsu, Rumiko Shibata and Toshihide Nishimura: Some human B and T cell epitopes of bovine serum albumin, the major beef allergen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1348-1353, (2002).
- 2) Tesaki S., Watanabe J., Tanabe S., Sonoyama K., Fukushi E., Kawabata J., and Watanabe M., Inhibition of Allergen Absorption by Hypoallergenic Wheat Flour Produced by Enzymatic Modification *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66 (9): 1930-1935, (2002)
- 3) Tanabe S., Tesaki S., Watanabe J., Fukushi E., Sonoyama K., and Kawabata J. Isolation and Structural Elucidation of a Peptide Derived from Edam Cheese that Inhibits b-Lactoglobulin Transport, *J. Dairy Sci.*, 86(2): 464-468, (2003).
- 4) 田辺創一、西村敏英、中村洋、谷内昇一郎、抗原特異的ペプチド減感作療法のための酵素分解食品、*食品工業*, 45 (14):42-48, (2002)
- 5) 小川正、低アレルゲン大豆品種（ゆめみのり）の創出と加工食品の開発、*食品工業*, 45, 1-10 (2002)
- 6) 小川正、食品アレルギーを誘発する植物起源アレルゲン、*化学と生物* 40, 643-652 (2002)
- 7) 小川正、栄養とアレルギー、*日本栄養・食糧学会誌*, 55, 227-229 (2002)
- 8) 小川正、森山達哉、太田展生、福井貴也、低アレルゲン化加工食品提供患者の正確なスクリーニング法の構築、*大豆たん白質研究*, 5, 68-72 (2002)
- 9) Kondo, Y., Tokuda, R., Urisu, A., and Matsuda, T.: Cross reactivity between Japanese cedar pollen and tomato fruit extracts demonstrated using RAST-inhibition and immunoblot inhibition. *Clin. Exp. Allergy* 32(4), 590-594 (2002).
- 10) Deji, A., Sakakibara, H., Okumura, S., Matsuda, T., Ishida, Y., Yamada, S., Komari, T., Kubo, T., Yamaya, T. and Sugiyama, T.: Accumulation of maize response regulator proteins in mesophyll cells after cytokinin treatment.
- 11) *Biosci. Biotech. Biochem.* 66, 1853-1858 (2002)
- 12) Yano, H., Kato, Y., and Matsuda, T.: Acute exercise induced gastrointestinally induced leakage of allergen in lysozyme-sensitized mice. *Eur. J. Appl. Physiol.* 87, 358-364 (2002).

2.学会発表

- 1) 田辺創一、小林曜子、高畑能久、森松文毅、柴田瑠美子、西村敏英：牛肉主要アレルゲン Bovine serum albumin 中の IgE 結合領域、*日本農芸化学会 2002 年度春季大会要旨集*、田辺創一、小林曜子、高畑能久、森松文毅、柴田瑠美子、西村敏英：牛肉主要アレルゲン Bovine serum albumin (BSA) の低アレルゲン化、*日本畜産学会第 100 回大会*
- 2) 田辺創一、西村敏英、*日本生物工学会創立 80 周年記念大会、シンポジウム「21 世紀の生物工学—健康と環境創造を目指す生物工学の明日」、招待講演「アレルギー対応食品の製造技術」*
- 3) 西 泰宏、内山元子、森山達哉、小川正、2-アラキドノイルグリセロールによる抗原刺激依存的脱顆粒反応の抑制、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会*
- 4) Weangsripanaval Thanakom, 野村紀子、森山達哉、小川正、トマト 50kDa アレルゲンの精製とその性質、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会*
- 5) 野村紀子、森山達哉、小川正、栽培注のストレスが植物性食品素材のアレルゲン性に及ぼす影響について、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会*
- 6) 山村孝子、森山達哉、小川正、アレルゲンデータベース構築のためのプロテオーム解析（アレルゲノーム解析）、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会*
- 7) 蔭浦禎士、小林洋一、鈴木光政、西泰宏、森山達哉、小川正、乳酸菌による大豆はっ鉢産物の免疫増強作用、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会*
- 8) 亀山寛子、森山達哉、小川正、ソノ抽出液に存在する IgE 抗体結合性タンパク質について、*第 56 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会*
- 9) 小川正、アレルギー反応を惹起する食品タンパク質の網羅的解析と表示の必要性、*食品科学工学会関西支部第 34 回シンポジウム*
- 10) 和泉秀彦、岡田希和子、櫻尾一、水口彩、喜瀬光男、石渡健一、松田幹、中村良：「発芽玄米」のアレルゲンタンパク質含量：製造工程における低減化、*日本農芸化学会 2002 年度大会一般講演*
- 11) 市場愛子、青木直人、北島健、松田幹：ニワトリオボムコイドとウズラオボムコイドの免疫交差反応性—組み換えタンパク質の動物及びヒト抗体との反応性—、*日本農芸化学会 2002 年度大会一般講演*
- 12) 松原毅、青木直人、北島健、松田幹：経口投与とタンパク質の消化管から体内への移行—ELISA による門脈血及び末梢血からの未分解卵アルブミンの検出—、*日本農芸化学会 2002 年度大会一般講演*
- 13) 山田千佳子、青木直人、松田幹：タンパク質抗原の消化管内から門脈血注への移行—ビオチン化タンパク質抗原と高感度 ELISA を用いた解析—、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会一般講演*
- 14) 加藤保子、矢野博己、松田幹：アレルギー感作マウスへのアレルゲン経口投与と運動負荷による小腸上皮傷害の誘発—上皮粘膜の形態と抗原透過性からの検証—、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会一般講演*
- 15) 草加一帆、松田幹、加藤保子：中等度運動負荷による食物アレルギー感作の促進—経口投与とリゾチームに対する B10.A マウス・IgE 応答モデルを用いた解析—、*第 56 回日本栄養・食糧学会大会一般講演*

H.知的財産権の出願・登録状況

小麦粉低アレルゲン化方法と、低アレルゲン化小麦粉 特許第 3302872 号（登録日 2002 年 4 月 26 日）

食品の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

低アレルゲン化食品による食物アレルギーのアウトグローの積極的誘導法を検討するため、オボアルブミン(OVA)特異 TCR 発現マウス (TCR-Tg) と OVA 特異的 IgE を産生するマウス (IgE-Tg) を用いて、抗原特異的 IgE 存在下での経口トレランス成立機序を解析した。その結果、抗原特異的 IgE が存在しても経口トレランスは誘導されるが、IgE の存在下では脾細胞のトレランス成立への IL-10 の関与は否定的である一方、腸間膜リンパ節細胞の抗原特異的細胞増殖が著明に抑制された。従って、低アレルゲン食により経口トレランスを誘導する場合には IgE の影響を考慮する必要があり、OVA 特異的 TCR/IgE-Tg マウスは in vivo での低アレルゲン食の作用を検討する上で有用と考えられた。

A.研究目的

食物アレルギーへの対応としては原因食物の除去が基本となっており、積極的な食物アレルギー治療法は未だ明らかにされていない。一方、乳幼児の食物アレルギーのかなりの部分は成長とともに軽快・治癒し、その機序として、消化能力の発達に加え、経口トレランスの関与が示唆されている。食物アレルギー患者に経口トレランスを誘導して食物アレルギーを治癒させるためには、原因食物をそのまま経口負荷した場合にはアレルギー症状が出現してしまうため、食物の低アレルゲン化が必要であり、同時に、低アレルゲン化した食物抗原によっても経口トレランスが誘導されるのかどうかの検討が重要である。

一方、従来の経口トレランスの実験モデルは、抗原を経口投与してトレランスをあらかじめ誘導しておき、その後で感作を行っているため、実際の患者の様にすでに抗原特異的 T 細胞と IgE が存在している状況下で誘導される経口トレランスと同じ機序が関与しているかどうかは明らかでない。

本研究では、抗原特異的 IgE が存在する状況下で経口的に抗原投与を行った場合の抗原特異的 T 細胞の反応性を解析することにより、食物アレルギー患者において期待される経口トレランスの誘導機序を明らかにすることを目的とする。また、低アレルゲン化処理により IgE への結合性が変化した抗原でも経口トレランスの誘導を起こしうるかどうかを検討することで、低アレルゲン化食品による積極的経口トレランス

誘導による治療の可能性を評価する。

B.研究方法

マウスをアジュバンドを用いて免疫し、抗原特異的 IgE を産生する状態にしてから経口トレランスを誘導する方法では IgE 産生が短期間で低下するため、食物アレルギー患者の様に長期にわたり抗原特異的 IgE 産生が持続するような状況下で抗原特異的 T 細胞の挙動を追跡でき、トレランスの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、OVA 特異的 T 細胞レセプターのトランスジェニック (TCR-Tg) マウスと東京医科歯科大の鳥山一博士らにより樹立された OVA 特異的 IgE トランスジェニックマウスを用い、OVA 特異的 IgE と OVA 特異的 TCR の両者のトランスジェニック (TCR/IgE-Tg) マウスを作成し、抗原特異的 IgE 産生の持続している状況下での抗原特異的 T 細胞の性状が、アレルゲンの経口投与によりどのように変化するかを検討した。

TCR/IgE-Tg マウスと TCR-Tg マウスへの OVA の投与方法は、その機序が解析されている Marth Tら (Eur J Immunol 2000) の方法に準じ、250mg の OVA またはコントロールとして PBS を 7 回経口投与し、最終投与の 48 時間後に脾臓細胞と腸間膜リンパ節から単核細胞を分離し、in vitro で OVA による再刺激を行い、細胞増殖とサイトカイン産生を測定する。また、抗原特異的 T 細胞を TCR クロノタイプ特異的抗体で染色し、フローサイトメーターによりクローン除去が生じているかを検討した。

C.研究結果

OVA の high dose の経口投与を行った場合、TCR/IgE-Tg 群と TCR-Tg 群の両方において、脾細胞の OVA 特異的 T 細胞の増殖が PBS を投与した場合に比べ低下していた。また、脾細胞の OVA 特異的 TCR 発現 T 細胞の割合、OVA 特異的 IL-4、IFN- γ の産生も両群において減少していた。しかし、TCR-Tg 群では、OVA 投与により PBS 投与に比べ OVA 特異的 IL-10 産生の増強が認められたのに対し、TCR/IgE-Tg 群では、PBS 投与でも IL-10 産生が TCR-Tg 群より強く、OVA 経口投与による IL-10 の産生量の変化は認められなかった。

一方、腸間膜リンパ節細胞の検討では、OVA の経口投与を行った両群で腸管膜リンパ節のサイズが PBS 投与を行った場合に比べて大きい傾向が認められた。また、OVA 経口投与後の腸管膜リンパ節細胞の OVA 特異的細胞増殖は、TCR/IgE-Tg 群が TCR-Tg 群に比べて著明に低下していた。

D.考察

今回用いた Marth T による TCR-Tg マウスでの経口トレランスの誘導方法では、IL-10、TGF- β 産生の誘導による active suppression が生じると報告されている。我々の研究結果でも、彼らの結果と一致して、TCR-Tg では抗原の経口投与により clonal deletion に加え、IL-10 産生の増加が認められており、TGF- β がまだ測定できていないものの、同様の機序での経口トレランスが誘導されていると推測される。

一方、抗原特異的 IgE が高値を示す TCR/IgE-Tg においても、抗原の経口投与により脾細胞レベルにはトレランスが誘導されていると考えられる。しかし、TCR-Tg と異なり、抗原特異的 IL-10 産生は PBS 投与でも高値を示しており、抗原投与による産生増加が認められないことから、抗原特異的 IgE の存在下では経口トレランスの成立機序が異なる可能性が考えられる。また局所の腸管免疫系においては、抗原特異 IgE の存在がより強力なトレランスを誘導すると考えられた。

E.結論

抗原特異的 IgE の存在下でも経口トレランス

が誘導されるが、その成立機序は IgE による影響を受ける可能性があると考えられる。低アレルギー食による経口トレランスの誘導には IgE の影響を考慮する必要がある。OVA 特異的 TCR/IgE-Tg マウスは in vivo での低アレルギー食の作用を検討する上で有用と考えられる。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Ohshima Y, Yamada A, Hiraoka M, Katamura K, Ito S, Hirao T, Akutagawa H, Kondo K, Morikawa A, Mayumi M: Early sensitization to house dust mite is a major risk factor for subsequent development of bronchial asthma in Japanese infants with atopic dermatitis: Results of a 4-year follow-up study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89:265-270(2002)
- 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* 51:195-200(2002)
- 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* 127:217-225(2002)
- 4) Yamada A, Ohshima Y, Tukahara 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* 44:87-89 (2002)
- 5) Omata N, Yasutomi M, Yamada A, Iwasaki I, Mayumi M, Ohshima Y: Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol* 169:4861-4866(2002)
- 6) Tsukahara, H., T. Ishida, Y. M. Mayumi. Gas-phase oxidation and disproportionation of nitric

oxide. Methods In Enzymology Vol 359, Nitric Oxide Part D Nitric Oxide Detection, Mitochondria and Cell Function, and Peroxynitrite Reactions. (Edited by E. Cadenas, L. Packer). Academic Press. p168-179 (2002)

- 7) 眞弓光文. アレルギー体質の患者. 看護のための最新医学講座第28巻薬物療法日野原重明、井村裕夫監修、安原真人編集. 中山書店 p68-71(2002)
- 8) 大嶋勇成、眞弓光文: アレルギーの機構— Overview. 別冊・医学のあゆみ state of arts ver.2 235-239(2002)
- 9) 小俣合歓子、安富素子、大嶋勇成. 樹状細胞からのIL-12産生のケモカインによる制御. 臨床免疫 38:468-473(2002)
- 10) 大嶋勇成. アトピー性皮膚炎の増加と喘息の関係 日本小児科学会誌 106:1616-1621(2002)
- 11) 大嶋勇成、眞弓光文: 呼吸器疾患とサイトカイン・ケモカイン 小児科臨床 55:(2002)467-474
- 12) 大嶋勇成: アトピー性疾患発症の危険因子と予防的治療法の問題点 福井県小児科医会会報 31:48-51(2002)

2.学会発表

- 1) 大嶋勇成: 分野別シンポジウム; 乳児アレルギー性疾患の変遷: アトピー性皮膚炎の増加と喘息の関係 第105回日本小児科学会 2002/4/19 名古屋
- 2) 大嶋勇成: シンポジウム: 小児アレルギー性疾患における症状の変遷、アレルギーマーチの新しい意義: 皮膚症状とアレルギー性疾患の経過 第39回日本小児アレルギー学会 2002/11/1-2 盛岡
- 3) 大嶋勇成: シンポジウム: 小児アレルギー性疾患発症要因—最近の研究成果から: 素因2 抗原提示細胞かT細胞か 第52回日本アレルギー学会 2002/11/28 横浜

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし