

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質

(アレルゲン)の確定、予防・予知法の確立に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 海老澤 元宏

平成17(2005)年3月

—目次—

I. 総括研究報告書

食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質（アレルゲン）の確定、予防・予知法の確立に関する研究（研究総括）

海老澤 元宏.....1

II. 分担研究報告

1. 食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質（アレルゲン）の確定、予防・予知法の確立に関する研究

海老澤 元宏.....4

2. 食物依存性運動誘発性アナフィラキシーに関する研究

相原 雄幸.....7

3. 食物等によるアナフィラキシーによる死亡例に関する研究

玉置 淳子.....10

4. 食物等によるアナフィラキシーの予防・寛解誘導に関する研究

—低アレルゲン化加熱脱オボムコイド卵白を用いた鶏卵アレルギー経口免疫療法—

宇理須 厚雄.....12

5. 食物アレルゲンの免疫応答および非即時型反応に関する研究

近藤 直実.....15

6. 食物アレルギー実験モデルにおける予防・寛解誘導に関する研究

大嶋 勇成.....18

7. 食物等によるアナフィラキシーの原因物質・予後に関する研究

—アナフィラキシー誘発食品のアレルゲン性と耐性化に関する研究—

柴田 瑠美子.....21

8. 食物アレルゲンの抗原解析およびその低減化に関する研究

穂山 浩.....24

9. 食物アレルゲンの抗原解析・交叉反応性に関する研究

赤澤 晃.....27

食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質（アレルゲン）の確定、予防・予知法の確立に関する研究

主任研究者 海老澤元宏

国立病院機構相模原病院臨床研究センターアレルギー性疾患研究部長

研究要旨

1) 我が国におけるアナフィラキシータイプも含む食物アレルギーの診療の手引きのドラフトを作成し平成17年度に臨床系分担研究者に外部委員を加えた検討委員会を設け討議し最終版を公開予定である。2) 食物アレルギー全国モニタリング調査で得られた3822例のデータを元に食品表示が見直されバナナの推奨項目への追加、甲殻類の義務化への検討がなされた。3) 全国負荷試験ネットワークにて累計948例の負荷試験症例を集積し負荷試験の有用性が示された。4) 鶏卵、乳製品、小麦、大豆の4抗原に関してIgECAPRASTのプロバビリティカーブを作成し鶏卵・乳製品に関して診断に用いる指標としての有用性が示された。5) 平成17年1月から全国モニタリングシステムの活用による即時型食物アレルギーの疫学調査を開始した。6) 全国食物アレルギーの31の患者会を対象にした重篤例・死亡例の調査を開始し、入院115例、死亡2例が判明した。7) 食物依存性運動誘発性アナフィラキシーの小学生での疫学調査を施行し、有病率0.005%で中学生が最も有病率が高いことが判明した。8) 甲殻類をはじめとする抗原解析を行い、甲殻類特異的抗体の作成に成功した。9) 食物アレルギーへの積極的な治療の可能性として経口免疫学的寛容状態に導く卵アレルギーでの臨床的方法と試験管内・実験動物レベルでの解析が進んだ。10) IgE抗体レベルでの交差抗原性に関して5種類の抗原において検討された。

分担研究者

相原 雄幸	横浜市立大市民総合医療センター 小児科 助教授
玉置 淳子	近畿大学医学部 公衆衛生学教室 講師
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
近藤 直実	岐阜大学大学院医学研究科 小児病態学 教授
大嶋 勇成	福井大学医学部病態制御医学講座 小児科 助手
柴田瑠美子	国立病院機構福岡病院小児科 医長
稲山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 食品室長
赤澤 晃	国立成育医療センター総合診療部

小児から成人までの食物アレルギーの診療の指針として「厚生労働省・食物アレルギー研究班による食物アレルギー診療の手引き」を研究班として作成することを目指し、平成16年度第2回班会議（公開）と共同開催した第5回食物アレルギー研究会にて研究会参加者も参加して討議しドラフトを作成した。その策定の方向性は第1回研究班会議において討議し、1) 食物アレルギーは人種・食生活にて著しい相異がありわが国の実状を反映するためには欧米学術誌のEBMのみでは限界があり厚生労働省の科学研究で積み重ねたデータを活用する。2) 食物アレルギーの診療現場での実状（小児アトピー性皮膚炎関連での混乱・医師の対応の多様性など）を考えると詳細な記述は避け、不適切治療の排除・不適切診断の回避を目的として食物アレルギー診療の基本原則を呈示し食物アレルギー患者の生活の質の向上を目指す。3) 研究班員のみならず食物アレルギー診療に関わる多くの方からの意見を求め、最終的には研究班員を中心に内科医・皮膚科医・耳鼻科医の参加を求め委員会を設け討議した上で一般に公開する。4) 簡潔・明瞭な記載を原則として数頁程度の配付資料かホームページからPDFファイルなどでダウンロードできるボリュームとする。

2) 食物によるアナフィラキシーの原因物質の確定、予防・予知法の確立に関する研究（海老澤）

1. 平成16年度までに食物負荷試験ネットワーク参加施設の全国28施設において累計948例の食物負荷試験が行われた。（詳細は分担研究報告書参照）

A. 研究目的：本研究の目的は、1) 食物等によるアナフィラキシー（食物依存性運動誘発性アナフィラキシーも含む）などの食物アレルギーの疫学等調査に基づいた適切な施策・対処法の確立と原因物質を確定する診断方法の確立、2) 食物アレルギーの発症・寛解機序の解明による予知・予防法の確立、3) 原因物質の抗原解析によるアレルゲンの交差抗原性の解明と原因物質の低減化に関する研究である。全体研究としては我が国におけるアナフィラキシーも含めた食物アレルギーの診療のためのガイドラインの作成を行う。

B. 方法, C. 結果, D. 考察：

1) 食物等によるアナフィラキシーの原因物質の確定、予防・予知法の確立に関する研究

（全体研究：「厚生労働省食物アレルギー研究班による食物アレルギーの診療の手引き」の作成）

2. 食物抗原特異的 IgE CAPRAST の臨床診断における有用性に関して (詳細は分担研究報告書参照)

3. 平成17年食物アレルギー全国モニタリング調査:平成13-14年の調査に準じて全国調査予定中。

3) 食物依存性運動誘発性アナフィラキシーに関する研究 (相原)

1. FEIAn の疫学調査:横浜市立全小学校の疫学調査を実施し、352校中337校(95.7%)から回答があり173,812名(男:女=89,169:83,860)中、FEIAnが疑われた生徒は8名(男:女=7:1)有病率0.005%であった。中・高校生の調査結果と比較すると小学生のFEIAnの有病率は低値であった。8名の発症時の運動は球技3名、ランニング2名、体操2名、遊んでいて1名であった。原因食物は小麦製品2名、甲殻類4名、果物1名でショックも1例に認められた。

2. FEIAn 診断のための誘発試験の標準化に関する検討は、海外におけるFEIAnの報告症例を集め2003年までに28論文84症例の報告に関して検討した。(詳細は分担研究報告書参照)

4) 食物等によるアナフィラキシーによる死亡例に関する研究 (玉置)

昨年度は日本救急医学会の指定医、認定医、専門医を対象に、過去5年間の食物アレルギーによるアナフィラキシーでの死亡例の調査を行い、4例の該当症例があり医療機関搬送時に心肺機能停止の状態、発症からエピネフィリン投与までの時間はいずれも30分以上経過していた。本年度は食物アレルギーによるアナフィラキシーの入院加療例と死亡例を41の食物アレルギー患者会に調査を依頼し31団体2475名に調査票を送付し803件の回答を得て入院例115例、死亡例2例の報告があった。次年度は該当症例の担当病院主治医に対して調査を予定している。

5) 食物等によるアナフィラキシーの予防・寛解誘導に関する研究 (宇理須)

凍結乾燥卵白または加熱卵白による負荷試験陽性で加熱脱オボムコイド卵白による負荷試験が陰性の鶏卵アレルギー患児24例を対象に寛解導入用抗原として加熱脱オボムコイド卵白クッキー4枚を28日間連日摂取してもらい、投与前後で鶏卵の負荷試験を実施した。28日間の摂取後の負荷試験で、加熱卵白陽性例は10例中4例が陰性化、凍乾末陽性例は14例中4例が陰性化した。末梢血単核球を 1×10^6 個/mlとなるように調整し、卵白抗原あるいはオボムコイド(抗原濃度0.1~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加して7日間培養し培養上清を得た。上清中のサイトカインをELISA法で測定したところ、経口免疫療法によって非陰性化群ではIL-4だけではなくIFN- γ が上昇する症例がみられた。陰性化群では軽度上昇する症例は観察されたが、著明に上昇す

る症例はみられなかった。その結果、免疫療法の前後でのサイトカイン産生能の変化率を求めると、卵白抗原刺激でのIL-4変化率は、陰性化群(mean \pm SD=0.63 \pm 0.46)が非陰性化群(1.63 \pm 1.42)に比べて有意($p=0.02$)に低値であった。IFN- γ の変化率は、陰性化群(1.06 \pm 1.04)と非陰性化群(6.36 \pm 9.15)との間に、有意差はなかったが、陰性化群は非陰性化群と比べて低値の傾向($p=0.08$)が見られた。

6) 食物アレルギーの免疫応答および非即時型反応に関する研究 (近藤)

ミルクアレルギー患者よりBLG特異T細胞クローンを樹立し細胞増殖反応を検討した結果、BLG特異的TCCのコア配列は、p102-112(YLLFCMENSAAE)であった。BLGを各種の酵素処理を施したものは、ミルクアレルギー患者血清を用いたIgEドットプロット法にてB細胞抗原性が減弱していることを確認した。リンパ球刺激試験は、患者ごとに反応が異なっており、その中にはT細胞抗原性が維持されている患者も含まれていた。経口減感作療法を行っている患者のうち、1名では寛解が得られ、そのほかの患者でも皮膚搔痒感以外の症状の変化は認めていない。投与前に比較し、2ヶ月間の投与後では末梢血CD4中のTregの割合が増加していた。

7) 食物アレルギー実験モデルにおける予防・寛解誘導に関する研究 (大嶋)

1) 抗原特異的IgE産生継続状態での抗原特異的Th2細胞の挙動を追跡してトレランスの誘導を解析するため、OVA特異的TCR発現トランスジェニックマウス(OVA-TCR-tg)の脾細胞からin vitroでTh2細胞を誘導し、誘導されたTh2細胞をOVA特異的IgE産生トランスジェニックマウス(OVA-IgE-tg)と野生型マウスに輸注し、OVAの経口投与反復による誘発症状の変化を検討した。脾細胞中のOVA特異的TCRのクロノタイプ陽性細胞数を測定し、in vitroで抗原特異的細胞増殖を測定することで、in vivoでの経口抗原刺激が抗原特異的Th2細胞応答に与える影響を解析した。OVA-IgE-tgにTh2細胞を輸注した場合、投与2~3回目で搔破行動を認め、投与を反復すると搔破行動が消失したが、野生型マウスでは投与5~6回目から搔破行動を認め、症状発現に時間的ずれが認められた。7回目の投与後では脾細胞中に輸注したクロノタイプ陽性細胞はほとんど認められず、in vitroでのOVAの再刺激でも有意の細胞増殖、サイトカイン産生を認めなかった。2) Brandtら(JCI112:1666)の方法に準じ、OVA-TCR-tgにOVAをアラムと共に腹腔感作し、抗原特異的IgEとTh2細胞を誘導した後、OVAの投与による臨床症状発現の有無とOVA特異的T細胞の反応性の変化を解析した。OVA-TCR-tgの方が野生型に比べOVA特異的IgE値が高値を示し、OVAの投与3回目から即時型の下痢症状

が出現し、野生型マウスでは投与の反復により下痢症状の増悪と活動性の低下を認めた。しかし、OVA-TCR-tg では下痢症状の出現を認めるものの程度は軽く、活動性の低下はほとんど認めなかった。さらに OVA 投与の反復により症状の軽快傾向を認めた。

8) 食物等によるアナフィラキシーの原因物質・予後に関する研究 (柴田)

小麦アレルギー患者を対象に低アレルゲン化小麦、うどん負荷を行い、うどん誘発 40 例中、低アレルゲン化小麦陰性は 25 例、陽性は 15 例であった。低アレルゲン化小麦陰性群は 6 ヶ月～1 年後の再度のうどん負荷により 80% でうどん負荷が陰性化し、低アレルゲン化小麦陽性 15 例の 6 ヶ月～1 年後の同食品負荷により 10 例が再負荷後陰性化し、これらの 8 例でうどん負荷も陰性化した。低アレルゲン化小麦再負荷でも陽性の 5 例は、2～3 年以降も耐性化が見られず、小麦 IgE 抗体価の低下も認められなかった。患者血清を用い低アレルゲン小麦の二次元電気泳動、Western blot による IgE 結合蛋白の抗原解析を行った。小麦アレルギー児で 25～40kDa の蛋白で極めて強い反応が認められたが、パターンとしては各血清間に大きな差異は見られず、二次元電気泳動で 40kDa 付近の数種の蛋白との反応が顕著であった。

9) 食物アレルゲンの抗原解析およびその低減化に関する研究 (穂山)

1) 甲殻類・軟体動物: ①11 種甲殻類・5 種軟体動物から抽出液を調製し、患者血清を用いた ELISA で抗原性を、Western blot で主要抗原を検索した。種により強弱はあるが ELISA 反応はすべて陽性で、共通して 35-40kDa にプロットが認められた。②アメリカンロブスターのトロポミオシン(TM)に対する mAb を作製し、抗体の 1 つは軟体動物 TM に反応せず甲殻類 TM 特異的であった。2) 寄生虫: アニサキス cDNA ライブラリーを用いた患者血清による抗体スクリーニング法にて、アニサキス主要抗原 cDNA を単離した。抗原は 266 残基の塩基性蛋白質で、リコンビナント体は患者 34 名中 14 名と反応した。3) 海産無脊椎動物: ①3 種類の還元糖(グルコース、マルトース、リボース)とメイラード反応させたホタテガイ TM では抗原性が增大するが、TNBS 修飾によって TM 中の 50% のリジン残基をブロックしても、その抗原性に変化はなかった。一方、キモトリプシン消化性を調べたところ TNBS 修飾した TM ではほとんど変化がないのに対し、上記還元糖とメイラード反応させた TM では消化性の低下と消化ペプチドパターンの変化が見られた。②スルメイカ TM をリボース修飾したところ、ホタテガイ TM で見られた抗原性低下は認めなかった。4) 果物: 果物アレルギー患者の血清を用いて、IgE 結合蛋白を検索しスイカでは 15、30、60kDa、チェリーでは 30kDa、メロンでは

15kDa、30kDa の IgE 結合蛋白が見出された。チェリーの 30kDa はソーマチン様蛋白質 (PR-5) と同定した。スイカの 60kDa はヒートショック蛋白質 (HSP60) と同定された。メロンに関しては 30kDa 付近の蛋白質の泳動位置がチェリーの 30kDa とほぼ同じ位置であったことから、メロンにおけるソーマチン様蛋白質と推定された。5) ソバ: 加熱・非加熱のソバより抽出液を調整し、ELISA、Western blot により加工処理による抗原性変化を評価した。加熱処理によっても ELISA による IgE 結合能には変化がないものの、Western blot では検出が不可能であった。6) ピーナッツ: 主要抗原 Ara h1、Ara h2 の立体構造解明を目的に、cDNA を単離し大腸菌発現系を構築した。

10) 食物アレルゲンの抗原解析・交差反応性に関する研究 (赤澤)

交差反応性の有無の頻度を算出するために食物アレルギー患者で CAP-RAST にて鶏卵とイクラともに陽性、ピーナッツとアーモンドともに陽性を対象として採血し血清を収集した。IgE 阻止試験は、液相抗原で IgE 抗体を測定するオリトン IgE (日本ケミファ) を使用し、competition assay で測定した。①イクラ特異 IgE 抗体陽性者において、鶏卵・イクラ間とイクラ・カズノコ間②ピーナッツ特異 IgE 抗体陽性者において、ピーナッツ・アーモンド間で交差反応性の有無について検討し、その頻度を検討した。9 例のイクラ陽性の患者 (平均年齢 4.4 歳 男女比 8:1) および 17 例のピーナッツ陽性の患者 (平均年齢 5.5 歳 男女比 14:3) について検討した。従来の inhibition assay と competition assay に関して、ビオチンフリーの抗原を用いた標準曲線を検討した結果濃度依存的に卵白特異 IgE を阻害することを確認している。①イクラと数の子の交差抗原性を認めた。(2/9) ②ピーナッツとアーモンドの間に交差抗原性を認めた。(6/17) ③イクラと鶏卵の間には交差反応性は認めなかった。(0/9)

E. 結論

「厚生労働省食物アレルギー研究班による食物アレルギーの診療の手引き」を作成する作業も順調に進み、各分担研究も確実に進んでおり最終年度に向けて目に見える形で成果をまとめていきたいと考えている。

F.健康危険情報 特になし

G.研究発表 分担研究報告書参照

H.知的財産権の出願・登録状況 特になし

食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質（アレルゲン）の確定、予防・予知法の確立に関する研究

分担研究者 海老澤元宏 国立相模原病院臨床研究センターアレルギー性疾患研究部長

研究協力者

河野陽一	千葉大学医学部小児病態学教授	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
西牟田敏之	国立病院機構下志津病院院長	眞弓光文	福井大学医学部小児科教授
吉原重美	獨協医科大学小児科助教授	相原雄幸	横浜市立大市民総合医療センター小児科助教
松原和代	山口大学医学部小児科助教授	藤沢隆夫	国立病院機構三重病院臨床研究部長
森川みき	J R 仙台病院小児科医長	赤澤 晃	国立成育医療センター総合診療部医長
野々村和男	守山市民病院小児科医長	椿 俊和	千葉こども病院アレルギー科医長
柴田瑠美子	国立病院機構福岡病院小児科医長	足立雄一	富山医科薬科大学小児科講師
北林 耐	昭和大学医学部小児科講師	木村光一	久留米大学附属病院小児科講師
篠原示和	高知医科大学小児科	田代 実	津軽保健生活協同組合健生病院小児科
渡辺博子	国立病院機構神奈川病院小児科	中園宏紀	東邦大学医学部小児科
佐藤さくら	宮崎大学医学部小児科	田知本寛	国立病院機構相模原病院小児科
小俣貴嗣	国立病院機構相模原病院小児科	今井孝成	国立病院機構相模原病院小児科
杉崎千鶴子	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	池田有希子	国立病院機構相模原病院臨床研究センター
増田泰伸	キュービー(株)研究所基盤研究部	松岡亮輔	キュービー(株)研究所基盤研究部

研究要旨

平成 13 年度より食物負荷試験の普及と標準的な食物負荷試験の確立を目的に食物負荷試験ネットワークを確立し全国 28 施設で共通のプロトコールで鶏卵（全卵・卵黄）・牛乳・小麦・大豆のシングルブラインドまたはダブルブラインドにて食物負荷試験が施行され累計件数は 948 例に達した。負荷試験陽性率は全体では 45%と IgECAPRAST 陽性率 81%に比べると低く負荷試験の重要性が確認され、陽性率は食物抗原ごとに異なり鶏卵（全卵）>牛乳>小麦>鶏卵（卵黄）>大豆の順であった。次に国立病院機構相模原病院小児科で卵白(1025 例)・牛乳(458 例)・小麦(437 例)・大豆(422 例)の初診時の IgECAPRAST 検査と被験者の各食物抗原に対する反応（確実なエピソード・食物負荷試験結果）を元にして各抗原の IgE 抗体価の診断的意義を Probability curve を作成し有用性に関して検討し、鶏卵・牛乳は IgE 抗体価が年齢を考慮すれば食物アレルギーの診断に有用であることが示されたが、小麦・大豆に関してはプロバビリティが 90%を越える抗体価は得られなかった。平成 17 年（調査期間：1 月～12 月）食物アレルギー全国モニタリング調査を平成 13-14 年調査と同じ方法にて開始し、調査協力依頼を 4198 名の医師に対して行い、1187 名の医師より協力の申し出を得た。今回の調査は加工食品のアレルギー物質を含む表示の適正化を目的として加工・調理形態に関しても調査し見直しに役立てる。

《その 1：食物負荷試験ネットワーク研究》

A. 研究目的

平成 13 年度より食物負荷試験の普及と標準的な食物負荷試験の確立を目的に食物負荷試験ネットワークを確立し共同研究を開始し、今年度で 4 年目を迎え累積結果を報告する。

B. 方法

キュービー食品研究所と共同開発した鶏卵（全卵・卵黄）・牛乳・小麦・大豆の乾燥食品粉末に酸化防止を施し、媒体としてイチゴピューレとセットとした負荷試験食を研究協力施設に提供し、文書同意を得た上で適応患者を対象にして共通プロトコールにて食物負荷試験を施行した。

C. 結果

平成 16 年 1 月～12 月に計 206 負荷試験が行

われた。その抗原別内訳は、鶏卵（全卵）：79 例、鶏卵（卵黄）：30 例、牛乳：60 例、小麦：27 例、大豆：10 例であった。累計の食物負荷試験の 948 例のデータを以下の表にまとめた。

	食物負荷試験	IgE CAPRAST	皮膚テスト
鶏卵 (全卵)	230/380 (61%)	308/368 (84%)	189/213 (89%)
鶏卵 (卵黄)	20/82 (24%)	65/80 (81%)	53/57 (93%)
牛乳	114/263 (43%)	193/258 (75%)	116/146 (79%)
小麦	47/141 (33%)	118/141 (84%)	59/77 (77%)
大豆	12/82 (15%)	62/77 (81%)	24/43 (56%)
合計	423/948 (45%)	746/924 (81%)	441/536 (82%)

D. 考察

全国 28 施設で共通のプロトコールで鶏卵（全卵・卵黄）・牛乳・小麦・大豆のシングルブラインドまたはダブルブラインドにて食物負荷試験が施行され累計件数は 948 例に達した。負荷試験陽性率は全体では 45%と IgECAPRAST 陽性率 81%に比べると低く負荷試験の重要性が確認され、陽性率は食物抗原ごとに異なり鶏卵（全卵）>牛乳>小麦>鶏卵（卵黄）>大豆の順であり、現在結果のより詳細な解析を進めている。

E. 結論

今後食物負荷試験の普及と標準化を目指し、食物負荷試験の適応を明確にした上で診断方法として確立し、専門施設において保険診療として認められるよう働きかけていく必要がある。

《その 2：食物抗原特異的 IgE 抗体価 (CAPRAST) の臨床診断における有用性に関して》

国立病院機構相模原病院小児科で卵白(1025 例)・牛乳(458 例)・小麦(437 例)・大豆(422 例)の初診時の IgECAPRAST 検査と被験者の各食物抗原に対する反応（確実なエピソード・食物負荷試験結果）を元にして各抗原の IgE 抗体価の診断的意義を Probability curve を作成し有用性に関して検討した。図 1 に各年齢区分ごとの抗原別の陽性患者数、図 2 にデータより解析した抗原別のプロバビリティーカーブを示す。

鶏卵・乳製品に関しては症状出現の可能性が 95%を越える特異的 IgE 抗体価が得られたが、小麦・大豆に関しては 90%を越える抗体価は得られなかった。図には示していないが鶏卵・牛乳とも低年齢ほど IgE 抗体価が低くても症状出現の可能性が高いことが示され、抗原の種類と年齢を考慮して抗原特異的 IgE 抗体は診断に用いるべきであると考えられた。

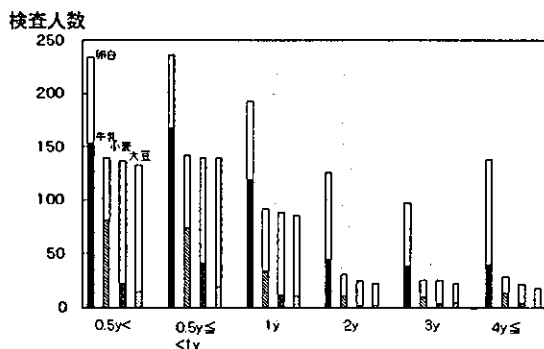


図 1：各年齢、抗原別の検査対象人数（症状陽性数、陰性数）

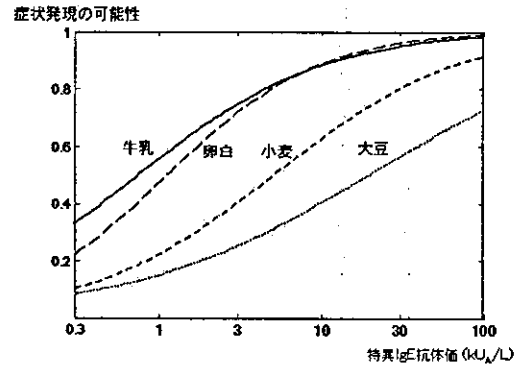


図 2：特異IgE抗体価と症状発現の可能性

《その 3：平成 17 年食物アレルギー全国モニタリング調査：平成 13-14 年調査と同じ方法にて実施中。》

調査協力依頼を 4198 名の医師に対して行い、1187 名の医師より協力の申し出を得た。今回の調査はアレルギー物質を含む表示の適正化を目的に加工・調理形態に関しても調査している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taylor SL, Hefle SL, Bindeslev-Jensen C, Atkins FM, Andre C, Brujinzeel-Koomen C, Burks AW, Bush RK, Ebisawa M, Eigenmann PA, Host A, Hourihane JO, Isolauri E, Hill DJ, Knulst A, Lack G, Sampson HA, Moneret-Vautrin DA, Rance F, Vadas PA, Yunginger JW, Zeiger RS, Salminen JW, Madsen C, Abbott P : A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much?, Clin Exp Allergy. 2004 May;34(5):689-95.
- 2) 海老澤元宏、池松かおり、杉井京子、池田有希子、田知本寛：食物アレルギーに対する現在の対応（食物負荷試験・口腔アレルギー症候群・将来の治療の展望）、日本小児アレルギー学会誌。2004；vol.18, No.1：68-74
- 3) 海老澤元宏：アナフィラキシーショックとエピベン、日本集中治療医学会雑誌。2004；vol.11, No.4：417-418
- 4) 海老澤元宏：特集 食物アレルギー I.総論 食物アレルギーとは、小児科診療。2004；67(7)：1045-1047
- 5) 海老澤元宏、井口正道、小俣貴嗣、田知本寛：食物アレルギーの診断、アレルギー科。2004;vol.17, No.6:592-595
- 6) 井口正道、海老澤元宏：治療のエビデンス 14.食物アレルギーにおける抗アレルギー薬の効用、小児内科。2004；vol.36, No.9：1492-1465
- 7) 今井孝成、海老澤元宏：特集 食物アレルギー I.総論 わが国の食物アレルギーの原因抗原、小児科診療。2004；67(7)：1056-1060
- 8) 池松かおり、海老澤元宏：特集 食物アレルギー II.診断と治療 食物アレルギーの耐性化、小児科診療。2004；

- 67(7):1107-1110
- 9) 杉井京子、海老澤元宏：特集 食物アレルギー II. 診断と治療 口腔アレルギー症候群，小児科診療，2004；67(7)：1125-1129
- 10) 田知本寛、海老澤元宏：特集 食物アレルギー II. 診断と治療 食物によるアナフィラキシーとその反応，小児科診療，2004；67(7)：1131-1135
- 11) 小倉英郎、古庄巻史、有田昌彦、伊藤節子、宇理須厚雄、海老澤元宏、河野陽一、近藤直実、柴田瑠美子、眞弓光史、向山徳子：食物アレルギー委員会報告第3報「食物アレルギーの症状および関与する疾患」，日本小児アレルギー学会誌，2004；vol.18, No.2：206-212
- 12) 伊藤節子、近藤直実、有田昌彦、宇理須厚雄、海老澤元宏、小倉英郎、河野陽一、柴田瑠美子、古庄巻史、眞弓光史、向山徳子：食物アレルギー委員会報告第3報「食物アレルギーの診断」，日本小児アレルギー学会誌，2004；vol.18, No.2：213-216
- 13) 柴田瑠美子、宇理須厚雄、有田昌彦、伊藤節子、海老澤元宏、小倉英郎、河野陽一、近藤直実、古庄巻史、眞弓光史、向山徳子：食物アレルギー委員会報告第3報「食物経口負荷試験」，日本小児アレルギー学会誌，2004；vol.18, No.2：217-219
- 14) 河野陽一、有田昌彦、伊藤節子、宇理須厚雄、海老澤元宏、小倉英郎、近藤直実、柴田瑠美子、古庄巻史、眞弓光史、向山徳子：食物アレルギー委員会報告第4報「食物アレルギー発症の予知と予防」，日本小児アレルギー学会誌，2004；vol.18, No.3：299-302
- 15) 向山徳子、有田昌彦、伊藤節子、宇理須厚雄、海老澤元宏、小倉英郎、河野陽一、近藤直実、柴田瑠美子、古庄巻史、眞弓光史：食物アレルギー委員会報告第4報「食物アレルギーとアレルギーマーチ」，日本小児アレルギー学会誌，2004；vol.18, No.3：303-305
- 16) 眞弓光史、有田昌彦、伊藤節子、宇理須厚雄、海老澤元宏、小倉英郎、河野陽一、近藤直実、柴田瑠美子、古庄巻史、向山徳子：食物アレルギー委員会報告第4報「食物アレルギーの治療」，日本小児アレルギー学会誌，2004；vol.18, No.3：306-310
2. 学会発表
- 1) T. Imai and M. Ebisawa: Food allergy in Japan. AAAAI 60th Anniversary meeting. San Francisco U.S.A. 2004.3.21
- 2) 田知本寛、杉崎千鶴子、池田有希子、井口正道、杉原桂、宿谷明紀、増田泰伸、海老澤元宏：当科における全卵・卵黄食物負荷試験，第16回日本アレルギー学会春季臨床大会，前橋市，2004.5.13
- 3) 井口正道、富久尾真帆、眞部哲治、杉原桂、田知本寛、鈴木誠、宿谷明紀、海老澤元宏：入院加療した乳児期の食物アレルギー合併アトピー性皮膚炎に関する検討，第16回日本アレルギー学会春季臨床大会，前橋市，2004.5.13
- 4) 海老澤元宏：食物アレルギーの診断と治療，第21回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会，宇都宮市，2004.6.19
- 5) 海老澤元宏：食物アレルギーの現状と対策（特別講演），第2回長崎アトピー性皮膚炎研究会，長崎市，2004.6.26
- 6) M. Ebisawa: Current Regulatory Approaches Session, "Food labeling system in Japan." Third FARRP scientific round table on thresholds. Mallorca, Spain. 2004.10.4
- 7) 海老澤元宏：アナフィラキシーに対する自己注射（エピネフリン投与の新たな展開），第32回日本救急医学会総会・学術集会，千葉市，2004.10.29
- 8) 海老澤元宏：子供をアレルギーによるショック（アナフィラキシーショック）から守るために一ハチ刺され、食物・薬剤摂取、予防接種等によるアレルギーの予防と対策（ランチョンセミナー），第51回日本小児保健学会，盛岡市，2004.10.30
- 9) 海老澤元宏、杉崎千鶴子、池田有希子、田知本寛：乳児期食物アレルギーの有病率に関する疫学調査（5 食物アレルギーの最前線），第54回日本アレルギー学会総会，横浜市，2004.11.4
- 10) 玉置淳子、島崎修次、海老澤元宏：我が国の食物によるアナフィラキシーの死亡例の検討・国際比較（5 食物アレルギーの最前線），第54回日本アレルギー学会総会，横浜市，2004.11.4
- 11) 井口正道、富久尾真帆、眞部哲治、田知本寛、杉原桂、小俣貴嗣、宿谷明紀、海老澤元宏：入院治療を要した食物アレルギー合併重症アトピー性皮膚炎乳児の予後について，第54回日本アレルギー学会総会，横浜市，2004.11.4
- 12) 小俣貴嗣、井口正道、杉原桂、田知本寛、宿谷明紀、海老澤元宏：牛乳・小麦・大豆特異的 IgE 抗体価の食物アレルギー診断における有用性，第54回日本アレルギー学会総会，横浜市，2004.11.4
- 13) M. Ebisawa: Food allergies: Diagnosis to treatment, Evening symposium-4, 10th Biennial Congress of the TPAIS. Mumbai, India. 2004.11.23
- 14) 杉崎千鶴子、池田有希子、田知本寛、海老澤元宏：乳児期食物アレルギーの有病率に関する疫学調査—第3報—，第54回日本アレルギー学会総会，横浜市，2004.11.5
- 15) 池田有希子、今井孝成、小俣貴嗣、富川盛光、田知本寛、宿谷明紀、海老澤元宏：低年齢児に対する外来食物負荷試験について，第41回日本小児アレルギー学会，千代田区，2004.11.27
- 16) 足立陽子、濱道美紀、岡部美恵、板澤寿子、尾上洋一、足立雄一、海老澤元宏、宮脇利男：外来における食物アレルギー児に対する食物負荷試験，第41回日本小児アレルギー学会，千代田区，2004.11.27
- 17) 杉崎千鶴子、池田有希子、田知本寛、海老澤元宏：乳児期の実態と問題点（相模原市における乳児期疫学調査より）（食物アレルギーの解決されるべき課題），第41回日本小児アレルギー学会，千代田区，2004.11.27
- 18) 向山徳子、有田昌彦、伊藤節子、宇理須厚雄、海老澤元宏、小倉英郎、河野陽一、近藤直実、柴田瑠美子、古庄巻史、眞弓光史：アナフィラキシー患者及び保護者による対応（日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会調査）（食物アレルギーの解決されるべき課題），第41回日本小児アレルギー学会，千代田区，2004.11.27
- 19) 海老澤元宏：食物アレルギーの診断および治療，第29回東日本小児科学会，千代田区，2004.11.28

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

食物依存性運動誘発性アナフィラキシーに関する研究

分担研究者 相原 雄幸 横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター小児科
 研究協力者 伊藤 玲子 横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター小児科

研究要旨

食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FEIAn) は、近年疾患の認識の高まりとともに報告数が増加している。しかしながら、いまだ一般医師や養護教諭などにおける認知度は高いとは言えない。そこで、以下のような FEIAn の疫学調査ならびに診断向上のための研究を実施している。

1. FEIAn の疫学調査については横浜市立全小学校 (352 校) を対象とした調査を実施した。その結果、352 校中 337 校(95.7%)から回答があった。生徒総数 173,812 名(男:女=89,169:83,860)の内、FEIAn が疑われた生徒は 8 名 (男:女=7:1) 有病率 0.005%であった。
2. FEIAn 診断のための誘発試験法の標準化のための基礎資料として、平成 15 年本邦報告例 (82 論文、163 症例) を調査した。平成 16 年度には欧米の報告例 (28 論文 84 症例) について調査した。特に、誘発試験についての解析を実施した。その結果、欧米においても負荷条件が一定でないことが明らかになった。今後、さらに検討し、最適な方法を確立する必要がある。

A.研究目的

食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FEIAn) については、近年疾患の認識が高まりつつあり、症例報告も増加してきている。しかしながら、われわれの調査からは養護教諭などにおける認知度は高いとは言えない。そこで、FEIAn の疫学についての調査を行い、同時に養護教諭に対してこの疾患の啓蒙を行う。さらに、FEIAn 診断のための誘発試験法の標準化を確立する。

B.研究方法

1) FEIAn の疫学調査 横浜市立全小学校生徒を対象とした養護教諭 (352 校) に対するアンケート調査を実施した。実施に際し、各関係機関との調整ならびにその了解を得て実施した。調査に当たっては、養護教諭に対して FEIAn に関する情報を提供した。また、養護教諭におけるこの疾患の認知度についての調査も同時に実施した。

2) FEIAn 診断のための誘発試験の標準化
 平成 15 年度：本邦における FEIAn の全報告症例を集積し、誘発試験について解析を実施する。さらに、誘発試験時の判定に有用なマーカーなどについても検討する。

(倫理面への配慮)

疫学調査にあたっては、該当症例の個人が特定されないように氏名の記載を行わないなどプライバシーに対する配慮を行った。

C.研究結果

1) FEIAn の疫学調査については、横浜市教育委員会の承諾が得られ、平成 15 年 12 月から平成 16 年 2 月末にかけて横浜市立全小学校養護教諭に対してアンケート調査を実施した。

その結果、352 校中 337 校(95.7%)から回答があった。生徒総数 173,812 名(男:女=89,169:83,860)の内、FEIAn が疑われた生徒は 8 名 (男:女=7:1) 有病率 0.005%、EIAN が疑われた生徒は 3 名(男:女=1:2)有病率 0.002%であった (表 1)。このようにこれまでの中学生や高校生の調査結果と比較すると小学生における FEIAn の有病率は低値であった。また、EIAN の有病率は FEIAn の有病率以上に低値であった。

表 1. FEIAnとEIANの頻度

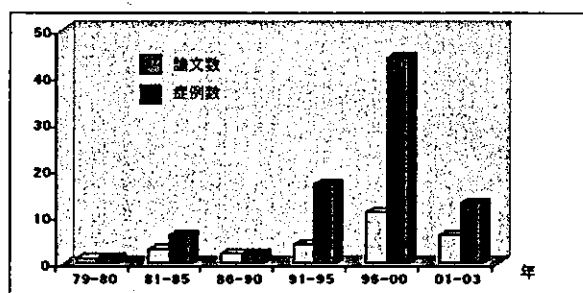
	小学生	中学生	高校生	合計
総生徒数	173,029	76,247	104,701	353,977
FEIAn				
有病生徒数	8	13	9	30
男:女	7:1	11:2	6:3	24:6
頻度 (%)	0.0046	0.017	0.0086	0.0085
	1/22,000	1/6,000	1/12,000	1/12,000
EIAN				
有病生徒数	3	24	17	44
男:女	1:2	12:12	9:8	22:22
頻度 (%)	0.0017	0.031	0.016	0.012

8 名における発症時の運動は球技 3 名、ランニング 2 名、体操 2 名、その他休み時間に遊ん

でいてなどであった。原因食物としては小麦製品 2 名、甲殻類 4 名、果物 1 名であった。ショックも 1 例に認められた。養護教諭の認知度は 60%と以前の調査に比較して向上していたが、依然として 15%の養護教諭は FEIAn を全く知らなかった。

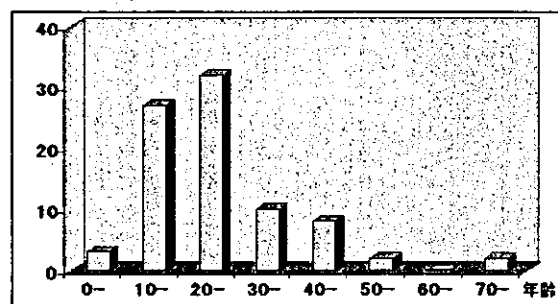
2) FEIAn 診断のための誘発試験の標準化については、本年度は海外における FEIAn の報告症例を集積した。その結果、海外では 1979 年に Maulitz らが初めての FEIAn 症例 (FEIAn という病名は用いていない) を報告し、調べえた範囲では 2003 年までに 28 論文 84 症例の報告があった (図 1)。

図 1. 海外における FEIAn 報告



症例の性別は男性 49 例、女性 35 例と男性が多く、女性の 1.4 倍であった。これについてはわが国と同様の結果であった。また、症例の平均年齢は 25.9 歳で、10 歳代から 20 歳代が最も多く、わが国の傾向と同様で比較的若年者に偏っていた。

図 2. 海外 FEIAn 症例の年齢分布



発症に関連した食品は、小麦製品が 29 例と最も多く、次いで野菜 24 例、ナッツ類 16 例の順で、わが国で頻度の高いエビ・カニなどの甲殻類 3 例と少数であった。その他果物 7 例、植物油 3 例、牛乳 2 例、魚 1 例などであった。わが国の報告と比較すると、野菜やナッツの頻度

が高く、甲殻類の頻度が低い。これはおそらくわが国と海外における食生活の違いを反映しているものと考えられた。

発症時の運動は、球技 39 例、ランニング 29 例、エアロビクス 7 例などで、比較的運動量の多い種目であった。運動の種目については、エアロビクスが海外で多かったことを除けば、わが国における報告と大きな違いはなかった。

表 2. 海外 FEIAn 症例における原因食物

食物	症例数	(%)
小麦製品	29	(38.2)
野菜	24	(31.6)
ナッツ	16	(21.1)
果物	7	(9.2)
植物油	4	(5.3)
甲殻類	3	(3.9)
その他	6	(7.9)

n=76

臨床症状については、皮膚症状が 62 例(86.7%)に認められ、呼吸器症状は 45 例(62.5%)、消化器症状は 14 例(19.4%)、粘膜症状は 11 例(15.3%)であった。ショックは 39 例(54.2%)に認められた。死亡例は認めらなかった。また、複数回の発作を 58 例(80.6%)に認めた。誘発試験は 38 例で実施され、29 例(76.3%)で陽性であった。

表 3. 海外 FEIAn 症例における関連した運動

運動種目	症例数	(%)
球技	39	(43.8)
ランニング	29	(32.6)
ダンス	7	(7.9)
水泳	4	(4.5)
エアロビクス	4	(4.5)
体操	2	(2.2)
その他	4	(4.5)

n=76

D. 考察

FEIAn 論文の解析から、海外においても誘発

試験の陽性率が高く陽性症例のみが報告された可能性が高いこと、さらに負荷条件が標準化されていないことが明らかになった。今後の標準化誘発試験における運動負荷は、食事量、アスピリンの前投与の有用性などの検討が必要である。今後原因食品別の試験法を含め、さらに誘発試験方法について検討を加える必要がある。

E. 結論

FEIAn の認識は高まりつつある。海外においても正しく診断されず、頻回発症例も少なくない。わが国においても今後さらに FEIAn について一般医を含め養護教諭や保健体育教諭などへの啓蒙も必要である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aihara Y, Ito S, Kobayashi Y, Aihara M. Stevens-Johnson syndrome associated with azithromycin followed by transient reactivation of herpes simplex virus infection. *Allergy*. 2004 59:118,2004.
- 2) Aihara M, Mitani N, Kakemizu N, Yamakawa Y, Inomata N, Ito N, Komatsu H, Aihara Y, Ikezawa Z. Human herpesvirus infection in drug-induced hypersensitivity syndrome, toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Allergology International*, 53:23-29, 2004.
- 3) Matsumoto R, Fujino K, Nagata Y, Hashiguchi S, Ito Y, Aihara Y, Takahashi Y, Maeda K, Sugimura K. Molecular characterization of a 10-kDa buckwheat molecule reactive to allergic patients' IgE. *Allergy*. 59:533-8,2004.
- 4) Miyamae T, Kurosawa R, Mori M, Aihara Y, Aihara M, Yokota S. An infant with γ -globulin-induced hypersensitivity syndrome who developed Evan's syndrome after a second γ -globulin treatment. *Mod Rheumatol* 14:314-319,2004.

- 5) 相原雄幸. 食物依存性運動誘発アナフィラキシー. *日本小児アレルギー学会誌*18:59-67,2004
- 6) 伊藤玲子、小林慈典、横田俊平、相原雄幸. 食物アレルギーが疑われた小児における魚卵、貝類に対するCAP-RAST®の有用性の検討. *日本小児アレルギー学会誌*18:199-205、2004.
- 7) 相原雄幸、伊藤玲子. 特集 食物アレルギー 食物依存性運動誘発アナフィラキシー. *小児科診療*67:1137-1142,2004.

2. 学会発表

- 1) 相原雄幸. イブニングシンポジウム9「アナフィラキシーショックの予防治療法」「食物依存性運動誘発アナフィラキシー」第54回日本アレルギー学会総会 2004.11.5 横浜
- 2) 伊藤玲子、石田 華、横田俊平、相原雄幸. 横浜市立小学校における食物依存性運動誘発アナフィラキシーと運動誘発アナフィラキシーの疫学調査. 第54回日本アレルギー学会総会、横浜、2004.11.5
- 3) 伊藤玲子、石田 華、横田俊平、相原雄幸. 横浜市内幼稚園における食物アレルギーの実態調査：保護者へのアンケート調査より. 第41回日本小児アレルギー学会、東京、2004.11.27

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

食物等によるアナフィラキシーによる死亡例に関する研究

分担研究者 玉置 淳子 近畿大学医学部公衆衛生学教室講師
研究協力者 武内 澄子 「食物アレルギーの子を持つ親の会」

研究要旨

食物アレルギーによるアナフィラキシーの死亡例および重篤例について、医療機関受診時の状況および経過などを調査し、死亡の発症予防の要因の検討を目的とした。対象として、食物アレルギーの患者組織を設定し、調査協力を得られた患者会を通じて「過去 10 年間で食物アレルギーによるアナフィラキシーの入院例、もしくは死亡例の該当例の有無に関する」郵送調査を行った。31 の協力の得られた患者会を通じて計 2475 人に調査票を送付した。803 件の返答を得てこのうち入院例の経験ありの回答は 115 例、入院経験なしが 679 例（外来治療経験あり 28 例を含む）、不幸にして死亡の転機とされた例が 2 例であった。今後調査を継続し、受診時心肺機能停止の有無、アナフィラキシーからエピネフリン投与まで時間経過、喘息の既往などの要因と転機との関連を検討し、重篤例及び死亡例の発症予防に有用な情報を提示し得ると考える。

A.研究目的

初年度は、救急医学会の調査協力の下、日本救急医学会の指定医、認定医、専門医を対象に、過去 5 年間の食物アレルギーによるアナフィラキシーでの死亡例の有無について調査し、食物アレルギーの関与が推測された 4 例の該当症例があった。成人の 3 症例で原因と考えられた食品はソバ、エビ、マグロで、わが国で成人の食物アレルギーの原因食品として多いソバ、魚、甲殻類に一致していた。4 症例とも、調査対象の医療機関搬送時に既に心肺機能停止の状態であったことが明らかとなった。また、死亡診断書の死因が確認できた 3 例のうち、1 例の死因はアナフィラキシーによる低酸素性脳障害であったが、いずれも記載された死因は食物アレルギーによるアナフィラキシーショックではなく、これらの症例は死因統計として含まれていなかった。本年度は食物アレルギーによるアナフィラキシーの死亡例とアナフィラキシーショックから蘇生した重篤例について調査し、医療機関受診時の状況、経過等の情報を集積し、予防対策の有用な情報となり得る死亡の発症予防の要因の検討を目的とした。

B.研究方法

食物アレルギーによるアナフィラキシーの死亡例と重篤例の調査対象として、本年度は食物アレルギーの患者組織を設定した。患者会に調査を依頼し、賛同していただいた患者会において行った。調査協力を得られた患者会を通じて

「過去 10 年間で食物アレルギーによるアナフィラキシーの入院例、もしくは死亡例の該当例の有無に関する」調査票を会より会員の方に郵送した。該当症例があった場合は、該当者本人もしくは、未成年の場合は、保護者および、未成年であっても調査参加についての決定に賛意を表することができる場合には本人の同意を文書で得られた例について、担当医師に、食物アレルギーによるアナフィラキシーショックの診断の有無、受診時の状況、その後の経過、原因食品、合併症の有無など詳細について調査票を送付する。尚、担当医師に依頼する調査票には情報の秘匿のため、本人氏名、住所などの記載をもとめず、個人を特定し得る情報は、対象者の性別と生年月日、受診年月日、原因食物摂取の月日の必要最低限に止めた。

C.研究結果およびD.考察

食物アレルギーの患者組織（44 の患者会）に本調査の協力を依頼し、31 の患者会から調査協力の承諾を得て、該当者なしにて協力不可との回答を 5 の患者会からいただいた。協力の得られた各会を通じて会員の方に計 2475 件の調査票を送付した。803 件の返答を得て、このうち過去 10 年間で食物アレルギーによる入院例の経験ありの回答は 115 例、入院経験なしが 679 例（入院しなかったが、外来治療経験あり 28 例を含む）、不幸にして死亡の転機とされた例が 2 例であった。担当医師に依頼する調査票からの情報収集に向けその後の作業を行って

る。

今回の調査は、食物アレルギーによるアナフィラキシーの重篤例、死亡例の医療機関受診時の状況および経過を把握することを目的としており、得られた例数から食物アレルギーにおけるアナフィラキシー重篤例、死亡例の発生頻度をもとめるものではない。しかし、今後調査を継続し、初年度の結果と併せ食物アレルギーによるアナフィラキシー重篤例及び死亡例の医療機関受診時の状況、エピネフリン投与時期との関連、原因食品等について検討し得ると考える。医療機関時の状況については、米国の食物アレルギーによる死亡例と蘇生例計 13 例を検討した調査で、蘇生例では意識消失から 5 分以内であったが、死亡例では反応なく、低血圧の状態であったと報告されている。また、エピネフリン投与時期については、蘇生例は死亡例に比較し、初発症状出現から 30 分以内で、呼吸困難や喘鳴などの重篤な症状出現以前の例が多かったことが指摘されている。今後調査を継続し、これらの点について我が国での状況を明らかにすることにより携帯用エピネフリンの有用性を含め食物アレルギーによるアナフィラキシーの重篤例及び死亡例の発症予防に有用な情報を提示し得ると考える。

E. 結論

本調査により、食物アレルギーによるアナフィラキシーの重篤例と死亡例の発生状況等について情報収集し、特に受診時心肺機能停止の有無、アナフィラキシーからエピネフリン投与まで時間経過、喘息の既往などの要因と転帰との関連を検討し、死亡にいたる要因を明らかにし得る可能性があると考えられる。

本研究の遂行にあたり、御協力を賜りました食物アレルギーの患者組織の方々に深謝申し上げます。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 玉置淳子、島崎修次、海老澤元宏：我が国の食物によるアナフィラキシーの死亡例の検討・国際比較、第 54 回日本アレルギー学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

食物等によるアナフィラキシーの予防・寛解誘導に関する研究
—低アレルゲン化加熱脱オボムコイド卵白を用いた鶏卵アレルギー経口免疫療法—

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

研究要旨

加熱脱オボムコイド卵白入りのクッキー4枚(卵白1個分相当を含む)を4週間摂取後、免疫療法前と同じ卵白抗原による負荷試験を実施し、負荷試験が陰性化するか検討した。陰性化群と非陰性化群とにわけ比較した結果、陰性化群では加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法によって、Th2 サイトカインである IL-4 だけではなく、Th1 サイトカインである INF- γ も産生能が低下する傾向があることが判明した。

A. 研究目的

食物アレルギーの基本的な治療は原因食物の除去食療法であるが、最近、食物抗原を用いた免疫療法が試みられている。

我々は、低アレルゲン化された加熱脱オボムコイド卵白クッキーを用いた経口免疫療法を試み、約50%の症例で卵白経口負荷試験で陰性化を認めた。本研究では、加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法の機序を解明するために、免疫療法による in vitro で卵白抗原刺激に対する末梢血単核球からの Th1 サイトカイン (INF- γ) と Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) の産生能への影響を検討した。

B. 研究方法

1. 免疫療法と対象

加熱脱オボムコイド卵白入りのクッキー4枚(卵白1個分相当を含む)を4週間摂取後、免疫療法前と同じ卵白抗原による負荷試験を実施し、負荷試験が陰性化するか検討した(図1)。対象は経口負荷試験で加熱卵白陽性12例(男:女=9:3, 年齢1歳6ヵ月~12歳, 平均4.2 \pm 2.7歳)と凍結乾燥卵白陽性16例(男:女=13:3, 年齢2歳~6歳, 平均3.8 \pm 1.3歳)を対象とした。経口免疫療法後の負荷試験で、加熱卵白陽性例は12例中6例が陰性化、凍結乾燥卵白陽性例16例中4例が陰性化した。すべての患者あるいはその保護者から本研究の目的、方法、発生しうる副反応など説明した後、同意書を文書で得ている。

2. 末梢血単核球の培養

鶏卵アレルギー児の末梢血を Lymphocytoseparation medium(LSM)に重層し、1400rpm、20 $^{\circ}$ C、30分遠心し、中間層から単核球を分離、

採取した。この分離単核球を Hank's balanced salt solution (w/o calcium chloride, w/o magnesium sulfate)で2回洗浄し、さらに2~3%胎仔牛血清(56%、30分間非働化 fetal calf serum 以下 FCS)加 RPMI1640 培養液で1回洗浄した。この最終細胞数を 1×10^6 個/ml になるよう調整後、10%FCS 加 RPMI1640 培養液に再浮遊した。培養は、培養液 100 μ l と細胞浮遊液 100 μ l を加え、プレート内で行った。培養には抗原を添加しない無刺激の場合と、卵白あるいはオボムコイドを最終抗原濃度として10、100、1000 μ g/ml の濃度で添加し、37 $^{\circ}$ C、CO $_2$ incubator で7日間培養を行い、サイトカインの測定のために培養後上清を-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

3. サイトカインの測定

IL-4、IL-13、INF- γ をそれぞれ、高感度 Immunoassay-kit を用いて測定した。

4. 統計検討

培養上清中の IL-4、INF- γ 、IL-13 の測定値から、抗原刺激時サイトカイン測定値/非刺激時サイトカイン測定値=stimulation index(SI)を求めた。SI を用いて、経口免疫療法前後におけるサイトカインの産生能の変化率を post-SI/pre-SI で求め、非陰性群と陰性群間との間で比較した。3群間の検討には、多重比較法の Fisher の PLSD、Scheffe、Bonferroni/Dunn を用いた。2項目の相関検討には、回帰統計、分散分析を行った。

C. 研究結果

1. 卵白抗原刺激による単核球サイトカイン産生能の変化率

IL-4 変化率は、陰性化群(M \pm SD=0.63 \pm 0.44)が非陰性化群 (M \pm SD 1.46 \pm 1.35)に比べて有意

($p=0.04$)に低値であった。変化率が1以上の例が、陰性化群では9例中2例、非陰性化群は18例中8例あり、陰性群が非陰性群よりも変化率が1以上に上昇する症例が少ない傾向であった。IL-13の変化率は、非陰性化群(1.09 ± 1.07)と陰性群(0.63 ± 0.35)との間において、有意差($p=0.503$)はなかった。変化率が1以上の例は、陰性群では9例中2例、非陰性化群18例中5例であり、非陰性群の方に上昇例が多くみられた。IFN- γ の変化率は、非陰性化群(5.91 ± 8.42)と陰性化群(0.99 ± 1.00)との間において、非陰性化群が陰性化群に比べて有意な($p=0.030$)上昇が見られた。変化率が1以上の例は、陰性化群では9例中4例、非陰性化群18例中13例あり、非陰性群の方に変化率の大きい上昇例が多くみられた。

2. オボムコイド刺激による単核球サイトカイン産生能の変化率

IL-4の変化率は、陰性化群の変化率(0.66 ± 0.30)は非陰性化群(1.38 ± 1.38)と比べると平均値は低値であったが統計的には $p=0.084$ で有意ではなかった。IL-4の変化率が1以上の例が、陰性化群では9例中2例、非陰性化群は18例中9例あり、卵白刺激時と同様に、陰性群が非陰性群よりも変化率の上昇例が少なかった。IL-13の変化率は、非陰性化群(1.00 ± 1.01)と陰性化群(0.75 ± 0.49)との間において有意差($p=0.310$)はなかった。変化率が1以上の例は、非陰性化群18例中6例、陰性化群では9例中2例あり、非陰性化群の方に上昇例が多くみられた。IFN- γ の変化率も、非陰性化群(7.25 ± 10.10)と陰性化群(1.25 ± 1.44)間で有意差($p=0.122$)は認められなかった。変化率が1以上の例は、非陰性化群18例中6例、陰性化群では9例中6例あり、卵白刺激時と同様に非陰性群の方に上昇例が多くみられた。

D. 考察

加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法によって、Th2 サイトカインである IL-4 だけではなく、Th1 サイトカインである INF- γ も産生能が低下する傾向があることが判明した。Th2 サイトカインである IL-13 でも統計的には有意ではなかったが同様の傾向がみられた。このサイトカイン産生能変化を引き起こす機序は不明である。前年度の報告では加熱脱オボムコイド卵白による免疫療法では IgG 4 が陰性化群

で有意に上昇する。こととあわせて考えると、IL-10 や TGF- β を産生する調節性 T 細胞や blocking antibody である IgG4 による IgE-B 細胞による T 細胞への抗原提示能の抑制などがある。今後の検討課題である。

E. 結論

加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法によって、Th2 サイトカインだけではなく、Th1 サイトカインの産生能が低下する傾向がみられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 各務美智子、河村牧子、川口博史、小山晴美、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、安田俊隆、宇理須厚雄; IgE 結合能に基づいた魚類の関係と生物学的分類、日小児アレルギー会誌、17,2,180,2003.
- 2) Yoshioka H, Ohmoto T, Urisu A, Mine Y, Adachi T; Expression and epitope analysis of the major allergenic protein Fag e 1 from buckwheat. J Plant Physiology, 161,761,2004.
- 3) Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. Int Arch Allergy Immunol, 136,1,23,2005.

2. 学会発表

- 1) Urisu A, Kakami M, Kawamura M, Kawaguchi H, Koyama H, Tokuda R, Kondo Y, Tsuge I, Yamada K, Yasuda T, Comparison of Relationship Based on the IgE-binding Activities and Taxonomical Classification of Fishes. XVIII, International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Vancouver, 2003, Sep t,
- 2) 山田一恵、中島陽一、河村牧子、各務美智子、松山温子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、木村守、柳原行義; 加熱脱オボムコイド卵白による経口減感作療法成功例の末梢血単核球からの Th1, Th2 サイトカイン産生能の検討、日本アレルギー学会春季臨床集会、平 16、5月
- 3) 河村牧子、中島陽一、近藤康人、柘植郁哉、各務美智子、松山温子、徳田玲子、宇理須厚雄、山田一恵、木村守; 加熱脱オボムコイド卵白による経口減感作療法の末梢血単核球 Th1, Th2 サイトカイン産生能に及ぼす影響、第 54 回、日本アレルギー学会総会、横浜、平 16、11月

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

経口負荷試験(前)

経口負荷試験(後)

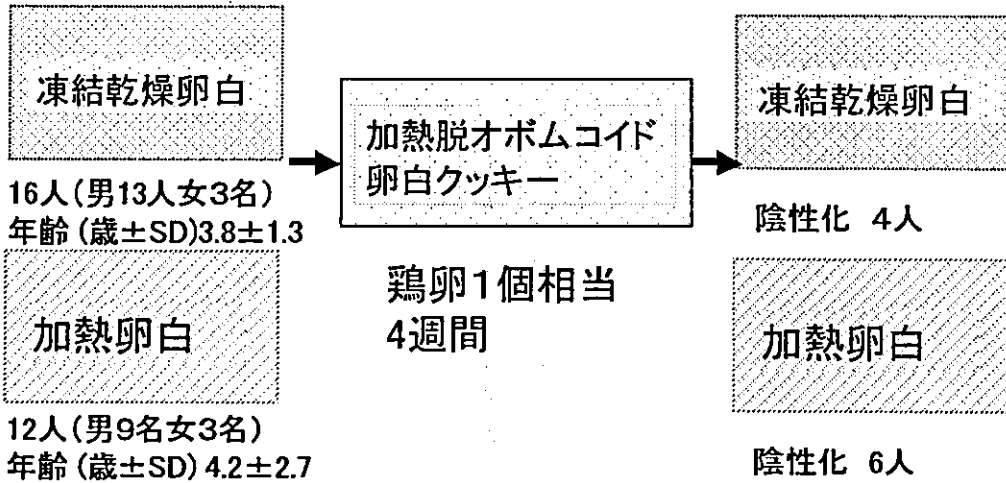


図1;加熱脱オボムコイド卵白クッキーの経口摂取による免疫療法

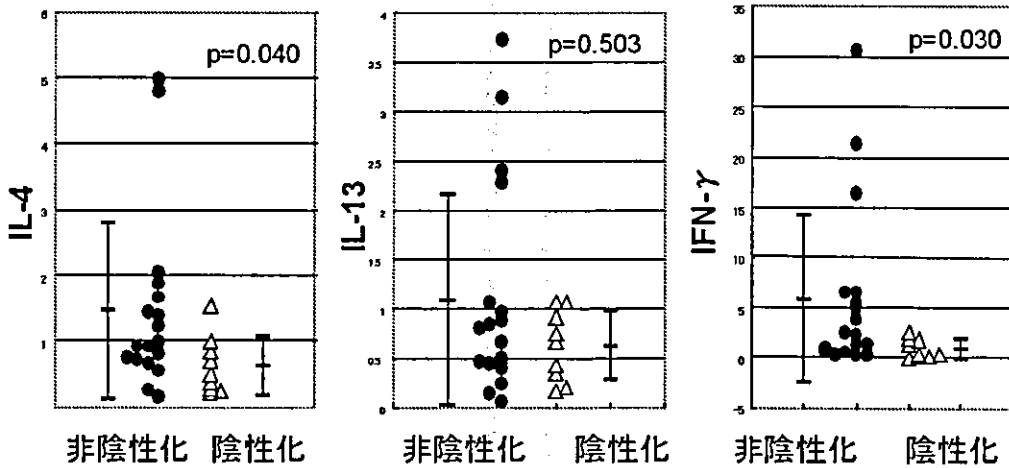


図2;免疫療法前後の単核球Th1・Th2サイトカイン産生能の
変化率 (卵白抗原刺激)

$$\text{変化率} = \text{免疫療法後SI} / \text{免疫療法前SI}$$

食物アレルギーの免疫応答および非即時型反応に関する研究

分担研究者	近藤 直実	岐阜大学医学部小児病態学 教授
研究協力者	近藤 應	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学医員
	深尾 敏幸	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学助教授
	篠田 紳司	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学非常勤講師
	加藤 善一郎	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学講師
	寺本 貴英	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学助手
	青木 美奈子	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学助手
	松隈 英治	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学医員
	川本 典生	岐阜大学大学院医学研究科小児病態学医員

研究要旨

食物アレルギーの免疫応答の解明の視点から、ペプチド療法、経口減感作療法を通じて免疫寛容誘導および耐性獲得の機序を解明した。免疫寛容を誘導する安全な治療用ミルクとしては、B細胞エピトープの破壊とT細胞エピトープの残存が必要であり、IgEドットプロット法にてこれらの酵素処理したペプチドのB細胞抗原性が減弱している点を考えると、投与後のアナフィラキシーは起こしにくいと推察された。またリンパ球刺激試験で、反応が残存するミルクアレルギー患者に対しては、このペプチドミルクを投与することで、免疫寛容を誘導可能と推測された。また経口減感作療法では、その耐性獲得にTregの関与が示唆された。

A.研究目的

食物アレルギーの免疫応答の解明の視点から、ペプチド療法、経口減感作療法を通じて免疫寛容誘導および耐性獲得の機序を解明する。すなわち、牛乳アレルギーを対象にして①T細胞エピトープのコア配列をもとに牛乳の主要抗原であるbeta-lactoglobulin (BLG)を各酵素にて特異的に切断し、そのペプチドのB細胞抗原性とT細胞抗原性を評価することによって、免疫寛容が誘導可能なペプチドを探索する。②また、経口減感作療法では、その有効性と耐性獲得機序の解明を目指す。

B.研究方法

①ミルクアレルギー患者よりBLG特異T細胞クローンを樹立し、T細胞エピトープのコア配列の同定を行った。そのエピトープが残存するようにBLGを各種の酵素で完全処理を施し、リンパ球刺激試験にてT細胞抗原性を、IgEドットプロット法にてB細胞抗原性を評価した。②また、経口減感作療法を行っているミルクアレルギー患者より投与前と投与後とのCD4CD25陽性制御性T細胞(Treg)の動向をフローサイトメトリーにて検討した。

(倫理面への配慮)

研究対象者には本研究の内容、方法および予

想される結果を十分に説明し理解(インフォームドコンセント)を得た上で採血・採尿が行われた。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから問題がないと判断された。

C.研究結果

①細胞増殖反応を検討した結果、BLG特異的T細胞クローンでのコア配列は、p102-112(YLLFCMENSAAE)であった(図1)。BLGを各種の酵素処理を施したものは、ミルクアレルギー患者血清を用いたIgEドットプロット法にてB細胞抗原性が減弱していることを確認した。リンパ球刺激試験は、患者ごとに反応が異なっており、その中にはT細胞抗原性が維持されている患者も含まれていた(図2)。②また、経口減感作療法を行っている患者のうち、1名では寛解が得られ、そのほかの患者でも皮膚搔痒感以外の症状の変化は認めていない。投与前に比較し、2ヶ月間の投与後では末梢血CD4中のTregの割合が増加していた(図3)。

D.考察

免疫寛容を誘導する安全な治療用ミルクとしては、B細胞エピトープの破壊とT細胞エピトープの残存が必要であり、IgEドットプロット

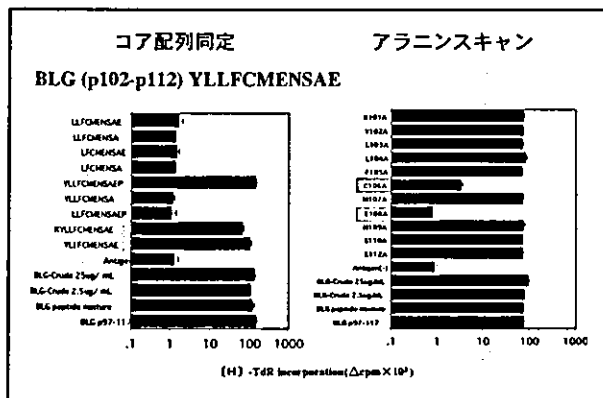


図 1

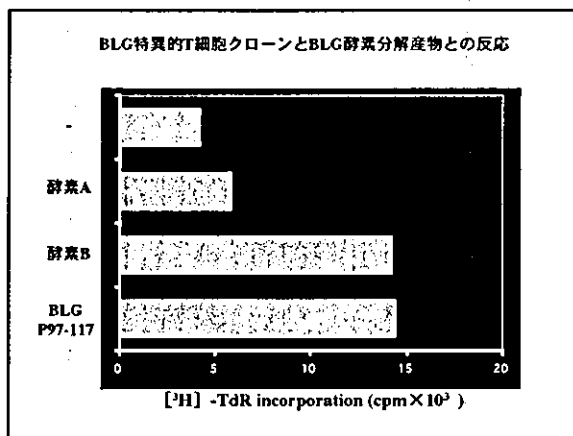


図 2 T細胞エピソードの評価

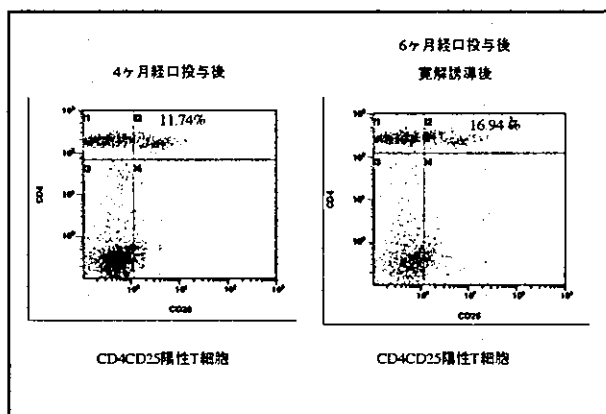


図3 減感作療法終了した患者A

法にてこれらの酵素処理したペプチドの B 細胞抗原性が減弱している点を考えると、投与後のアナフィラキシーは起こしにくいと推察された。またリンパ球刺激試験で、反応が残存するミルクアレルギー患者に対しては、このペプチドミルクを投与することで、免疫寛容を誘導可能と推測された。

また経口減感作療法では、その耐性獲得に Treg の関与が示唆された。

E. 結論

ペプチドの B 細胞抗原性、T 細胞抗原性を評価することで、免疫寛容誘導が可能と推測されるペプチドを得ることができた。今後、患者投与の安全性等さらなる解析を加え、経口減感作療法とともに新たなるアレルギー疾患の治療に結びつくよう検討したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo, N Matsui, E., Kaneko, H., Aoki, M., Kato, Z., Fukao, T., Kasahara, K., Morimoto, N. RNA editing of interleukin-12 receptor beta2, 2451 C-to-U (Ala 604 Val) conversion, associated with atopy. Clin Exp Allergy 34:363-368 (2004)
- 2) Kondo, N., Matsui, E., Kaneko, H., Kato, Z., Teramoto, T., Shikano, H., Aoki, M., Ohnishi, H., Tatebayashi, K., Omoya, K., Kondo, M., Matsukuma, E., Kasahara, K., Morimoto, N. Genetic defects in downregulation of IgE production and a new genetic classification of atopy. Allergy International. 53:77-85 (2004)
- 3) Yoshikawa K., Matsui, E., Inoue R., Kaneko H., Teramoto T., Aoki M., Kasahara K., Shinoda S., Fukutomi O., Kondo, N. Urinary leukotriene E4 and 11-dehydro-thromboxane B2 excretion in children with bronchial asthma. Allergy International. 53:127-134 (2004)
- 4) Yamamoto, Y., Kato, Z., Matsukuma, E., Li A, Omoya, K., Hashimoto, K., Ohnishi, H., Kondo, N. Generation of highly stable IL-18 based on a ligand-receptor complex structure. Biochem Biophys Res Commun. 317:181-186 (2004).
- 5) Omoya, K., Kato, Z., Kato, Z., Matsukuma, E., Li A., Hashimoto, K.,

Yamamoto, Y., Ohnishi, H., Kondo, N. Systematic optimization of active protein expression using GFP as a folding reporter. *Protein Expr Purif.* 36:327-332 (2004).

- 6) Asano T, Kaneko H, Terada T, Kasahara Y, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency. *Clin Exp Immunol.* 136:284-90. (2004)
- 7) Jiang, M., Tsukahara, H., Ohshima, Y., Zou, C., Ohta, N., Sato, S., Todoroki, Y., Hiraoka, M., Nambu, M., Tanaka, T., Yamaguchi, E., Kondo, N., Mayumi, M. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism in Patients with Bronchial Asthma. *International Medical Journal* 11. 119-123 (2004)
- 8) Kondo M., Suzuki K., Inoue R., Sakaguchi H., Matsukuma E., Kato Z., Kaneko H., Fukao T., Kondo, N. Characterization of T-cell clones specific to ovomucoid from patients with egg-white allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol*, (in press)
- 9) Tatebayashi K., Matui E., Kaneko H., Fukao T., Kasahara K., Kondo N. IL-12B promoter polymorphism associated with asthma and IL-12B transcriptional activity. *Allergology International* (in press)

2.学会発表

- 1) Kondo N : 国際学会シンポジウム : Main Symposium 1 : Molecular Explanation of Hygiene Hypothesis(衛生仮説). The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology (2004年10月4日, 東京)
- 2) 近藤直実 : イブニングシンポジウム 2 : ウイルス感染と喘息・アレルギー — 遺伝子生態医学の視点から —. 日本呼吸器学会学術講演会 (第44回) (2004年3月31日, 東京)
- 3) 松井永子, 金子英雄, 深尾敏幸, 加藤善一郎, 寺本貴英, 長尾みづほ, 青木美奈子, 吉

川かおり, 館林宏治, 近藤直実 : シンポジウム 2 : アレルギーにおけるゲノム解析と診断への応用—小児を中心に—. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第16回) (2004年5月12日, 群馬)

- 4) 近藤直実 : 小児気管支喘息の病態と治療—現状と将来— : セッション III 将来展望 : 遺伝からみた発症予知予防 小児気道アレルギー研究会 (第11回) (2004年10月24日, 宮崎)
- 5) 加藤善一郎, 大西秀典, 李愛蓮, 山本裕, 面家健太郎, 松隈英治, 近藤應, 深尾敏幸, 近藤直実 : シンポジウム 5 : アレルギーにおけるプロテオミクス解析. 日本アレルギー学会総会 (第54回) (2004年11月5日, 横浜)
- 6) 近藤應, 深尾敏幸, 加藤善一郎, 川本典生, 寺本貴英, 金子英雄, 篠田紳司, 近藤直実 : イブニングシンポジウム 5 : 食物アレルギーの抗原認識と耐性獲得のメカニズム. 日本アレルギー学会総会 (第54回) (2004年11月4日, 横浜)

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

食物アレルギー実験モデルにおける予防・寛解誘導に関する研究

分担研究者 大嶋 勇成 福井大学医学部病態制御医学講座小児科助手
研究協力者 眞弓 光文 福井大学医学部病態制御医学講座小児科教授

研究要旨

食物アレルギー患者において低アレルゲン化食品を用いての経口トレランス誘導の可能性を検討するため、トランスジェニックマウスを用いて抗原特異的 IgE と Th2 細胞存在下での経口トレランス誘導の可能性を検証した。Th2 細胞を輸注した場合、オボアルブミン (OVA) 特異的 IgE トランスジェニックマウスの方が野生型マウスより OVA 経口投与による搔破行動の出現は早いものの症状は軽く一過性であった。また、OVA 感作により OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスの方が野生型マウスより OVA 特異的 IgE は高値を示したが、アナフィラキシー症状は軽かった。以上よりアレルギー症状の出現には抗原特異的 IgE が高値であることよりも、IgE の認識するエピトープや抗原特異的 T 細胞の反応性が重要と考えられ、抗原特異的 IgE 値が高値である食物アレルギー患者でも抗原特異的 T 細胞の制御により即時型アレルギー症状を回避できる可能性が示唆された。

A.研究目的

乳幼児の食物アレルギー患者の多くの者は成長とともに原因食物を摂取しても症状が出なくなることが知られている。このアウトグロウの機序として消化能力の発達に加え、経口トレランスが関与していることが示唆されている。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、これに代わる治療手段として、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し、低アレルゲン化した食品を摂取することで積極的に経口トレランスを誘導する方法が期待される。しかしながら、従来の経口トレランスの実験モデルでは、大量の抗原を経口投与してあらかじめトレランスを誘導した後で抗原感作を行い、抗原特異的反応が誘導されないことを指標として解析している。そのため、実際の食物アレルギー患者の様に既に抗原特異的 T 細胞と抗原特異的 IgE が存在している状況下で抗原の経口投与によりトレランスが誘導することが可能か否かは明らかでない。

これまでの研究で、抗原特異的 IgE の存在下でも大量の抗原の経口反復投与によりクローン除去、アナジー誘導、TGF- β 産生細胞の誘導、CD4+CD25+T 細胞の増加が生じ、経口トレランスが誘導されることを明らかにしてきた。そこで、抗原特異的 IgE に加え、抗原特異的 Th2 細胞が存在する状況で、経口トレランスを誘導しうるような抗原投与方法を確立することが可能であるか否かを検証し、食物アレルギーの新規治療法の可能性を検討した。

B.研究方法

抗原特異的 IgE 産生が持続する状態での抗原経口投与によるトレランス誘導において、抗原特異的 Th2 細胞の役割を解析するために、OVA 特異的 Th2 細胞を輸注した後、OVA の経口投与を行い、アレルギー症状の出現の有無を解析した。TCR 発現トランスジェニックマウス (OVA-TCR-tg) の脾細胞から *in vitro* で Th2 細胞を分化誘導し、誘導された Th2 細胞を OVA 特異的 IgE 産生トランスジェニックマウス (OVA-IgE-tg) と野生型マウスに輸注した。輸注翌日から OVA を隔日で経口投与し症状発現の有無を観察し、経口投与反復による症状の変化を観察した。また、脾細胞中の OVA 特異的 TCR のクロノタイプ陽性細胞数を測定し、*in vitro* で抗原特異的細胞増殖を測定することで、*in vivo* での経口抗原刺激が抗原特異的 Th2 細胞応答にどのような影響を与えるかを解析した。

即時型の肥満細胞活性化を介しての食物アレルギーモデルとして報告された Brandt ら (JCI 112:1666) の方法に準じ、OVA-TCR-tg と野生型マウスに OVA をアラムと共に腹腔免疫し、*in vivo* で抗原特異的 IgE と Th2 細胞を誘導した後、OVA の経口投与による臨床症状発現の有無と OVA 特異的 T 細胞の反応性の変化を解析した。

実験動物の取り扱い、実験方法に関しては、福井大学医学部動物実験委員会での審査を受け許可を受けた後実施している。