

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
—鶏卵アレルギー児におけるアレルゲン特異的T細胞応答のトランスクリプトーム解析—

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 柘植 郁哉 藤田保健衛生大学医学部小児科 助教授
中島 陽一 藤田保健衛生大学医学部小児科 大学院生

研究要旨

鶏卵アレルギー患者を対象として、卵白抗原刺激による CD4 陽性細胞応答のトランスクリプトーム解析を、DNA マイクロアレイを用いて行った。卵白抗原刺激の有無による転写量の違いに着目し、抗原刺激により鶏卵アレルギー患者で発現が 1.5 倍以上に増加し、非アレルギー対照では増加しない遺伝子を 43 個選択した。これらの遺伝子の発現を Real-time PCR を用いて検証したところ、cytokine inducible SH2-containing protein(CISH)など 3 遺伝子が抗原刺激後の有意な増加 ($p < 0.01$) を示した。このうち抗原刺激後の CISH の反応は、鶏卵アレルギー患者で、非アレルギー対照に比べて、有意 ($p < 0.01$) に強く認められた。

A. 研究目的

鶏卵白アレルギーの発症、寛解に関与する遺伝子の網羅的な検討を DNA マイクロアレイを用いて行い、病態の把握、治療反応性の予知に有用なマーカー遺伝子の探索を試みた。さらに、いまだ不明な点の多い発症・寛解の機序を明らかにすることで、より有効な治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 対象

卵白特異的 IgE クラス 3 以上の鶏卵アレルギー患者 3 名 (年齢は 7 ヶ月、13 ヶ月、34 ヶ月、男:女=1:2) と、鶏卵アレルギーの病歴のない非アレルギー対照 2 名 (年齢は 2 名とも 55 ヶ月、男:女=0:2) でマイクロアレイを用いて解析を行った。Real-time PCR は鶏卵アレルギー児 20 名 (男:女=15:5) と非アレルギー対照 7 名 (男:女=2:5) で検討した。すべての患者あるいはその保護者から本研究の目的、方法を説明した後、同意書を文書で得ている。

2. 末梢血単核球の培養

対象児の末梢血を比重遠心法にて末梢血単核球を分離し、鶏卵白の抗原を添加して約 16 時間培養した。

3. CD4 陽性細胞の分離

卵白特異的 T 細胞の発現に注目するため、培養後の細胞を Magnetic cell sorting (MACS) を用いて、CD4 陽性細胞に分離し、その純度はフローサイトメトリーで確認した。

4. RNA 抽出、マイクロアレイ

分離した CD4 陽性細胞から RNeasy Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。非刺激の CD4 陽性細胞の RNA と、鶏卵白抗原刺激後の CD4 陽性細胞の RNA をそれぞれ Cyanine3/Cyanine5 を用いてラベル化した。非刺激のラベル化 cRNA と、抗原刺激後のラベル cRNA を、Human Whole Genome Oligo DNA Microarray (Agilent) と 17 時間ハイブリダイゼーション後、スキャンし解析した。

5. Real-time PCR

Real-time PCR は TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) を用いて行った。内在性コントロールとして GAPDH を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 値を求めて、刺激後の遺伝子発現を定量した。

6. 統計検討

マイクロアレイにおいては、読み取ったシグナル強度を 81 個の house keeping gene を用いて Z 補正を行い、非刺激と卵白抗原刺激後のシグナル強度の違いを検討した。

Real-time PCR の結果において、遺伝子発現の刺激後での変化は Wilcoxon signed-ranks test を用いて検討した。患者と非アレルギー対照における Stimulation index (SI) (抗原刺激/非刺激) は、Mann-Whitney の U 検定にて比較した。

C. 研究結果

1. マイクロアレイの実験結果

卵白抗原刺激の有無による転写量の変化に着目し、非アレルギー対照では変化せず、鶏卵アレルギー患者において 1.5 倍以上に発現が増加す

る遺伝子は160個であった。さらに、マイクロアレイで、抗原刺激後のシグナル強度が150以下と低いものは除外し、43個を選択した。

2. Real-time PCRの結果

マイクロアレイで選択した遺伝子の発現を定量的に検討するため、鶏卵アレルギー患者20名と非アレルギー対照7名でReal-time PCRを行った。Cytokine inducible SH2 containing protein(CISH)、nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor Z(NFKBIZ)、B-cell CLL/lymphoma 2(BCL2)の3つの遺伝子が、鶏卵アレルギー患者において、卵白抗原刺激後に有意な増加($p < 0.01$)を認めた。(図1) Real-time PCRの結果からSIを求め、鶏卵アレルギー患者20名と非アレルギー対照7名で比較すると、CISHのみが非アレルギー対照と比べ、鶏卵アレルギー患者で有意に高値($p < 0.01$)であった。(図2)

D. 考察

CISHは suppressor of cytokine signaling (SOCS) protein familyに属し、STATを介したサイトカインシグナル伝達の負の調節因子として働いている。今後、鶏卵アレルギー児でCISHの反応が増強するという知見が、鶏卵特異的T細胞の数の違いの反映か、質的な違いが存在するのかを直接特異的T細胞を分離して検討する必要があるが、この知見が、食物アレルギーの病態の理解に役立つと共に、新たな診断のマーカーとなる可能性がある。今後症例を増やし他のアレルギー性疾患でも検討して診断マーカーとしての臨床応用の可能性を迫及する。

E. 結論

CISHは非アレルギー対照と比べ、鶏卵アレルギー患者で、卵白抗原刺激後に有意に発現が増加した。今後、CISHは食物アレルギーの診断のマーカーとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo Y, Kakami M, Koyama H, Yasuda T, Nakajima Y, Kawamura M, Tokuda R, Tsuge I,

Urisu A. IgE Cross-reactivity between Fish Roe (Salmon, Herring and Pollock) and Chicken Egg in Patients Anaphylactic to Salmon Roe. *Allergology Int.* 54:317-323, 2005.

- 2) 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, 23-32, 2005.
- 3) 宇理須厚雄; 食物アレルギー; 食物アレルギーの免疫療法、最新医学、新しい診断と治療のABC, 免疫4、26, 167-173, 2005.
- 4) 宇理須厚雄; 食物アレルギーに対する免疫療法: 経口減感作療法、感染・炎症・免疫、医薬の門社 35, 2, 167-169, 2005.
- 5) 宇理須厚雄、低アレルギー化療法、*Current Therapy*, 23, 11, 50-54, 2005.

2. 学会発表

- 1) 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、浅野喜造; 鶏卵アレルギーお加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法、第108回、日本小児科学会学術集会、東京、2005.4月。
- 2) 宇理須厚雄、平田典子、松山温子、各務美智子、徳田玲子、中島陽一、河村牧子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、木村守、食物アレルギーの新しい治療の試み、第17回、日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、平成17年、6月。
- 3) 山田一恵、中島陽一、河村牧子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、木村守、柳原行義、鳥居新平、加熱脱オボムコイド卵白を用いた免疫療法の末梢血単核球のIL-4・IL-13・IFN- γ 産生能への影響、第17回、日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、平成17年、6月。
- 4) 関亜希子、木村守、宇理須厚雄、卵白感作マウスに対する加熱脱オボムコイド卵白の影響、第55回、日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005.10月20日、21日、22日、
- 5) 中島陽一、柘植郁哉、河村牧子、近藤康人、小松原亮、平田典子、各務美智子、宇理須厚

雄；鶏卵アレルギー児におけるアレルゲン特異的T細胞応答のトランスクリプトーム解析、第55回 日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡 平 17、10月

雄、Forkhead box p3 (FOXP3) 遺伝子多型と食物アレルギーとの関連、第 55 回、日本アレルギー学会総会、盛岡市、2006、10月。

- 6) 柘植郁哉、中島陽一、河村牧子、近藤康人、小松原亮、平田典子、各務美智子、宇理須厚

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

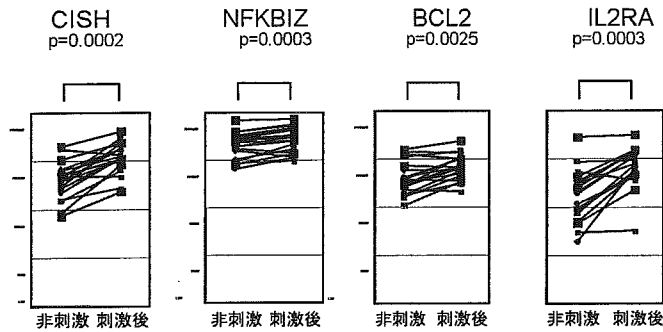


図1; 鶏卵アレルギー患者20名でのReal-Time PCRにて抗原刺激後に発現が有意に増加する遺伝子

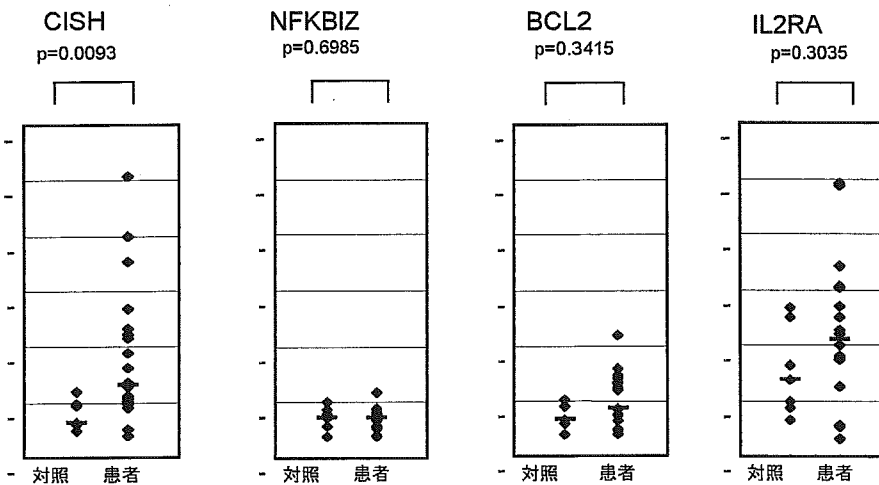


図2; 非アレルギー対照7名と患者20名でのstimulation index(抗原刺激後/非刺激)の比較

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 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学教授
 研究協力者 金子 英雄 岐阜大学医学部附属病院小児科講師
 近藤 應 岐阜大学医学部附属病院小児科医員
 深尾 敏幸 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学助教授
 篠田 紳司 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学非常勤講師
 加藤 善一郎 岐阜大学医学部附属病院小児科講師
 青木 美奈子 岐阜大学医学部附属病院小児科助手
 川本 典生 岐阜大学医学部附属病院小児科医員

研究要旨

食物アレルギーの免疫応答の解明の視点から、経口減感作療法、ペプチド療法を通じて免疫寛容誘導および耐性獲得の機序の解明を試みた。経口減感作を3名の牛乳アレルギー患者に行い、アレルギー症状の悪化を認めることなく3名とも最終的に1回100mlの牛乳摂取まで可能になった。それに伴い、調節性T細胞の増加傾向を認め、免疫寛容誘導に調節性T細胞の関与が推測された。さらに、T細胞エピトープが破壊され、B細胞エピトープは保たれているβ-ラクトグロブリンの分解物を調整した。この分解物はB細胞エピトープが破壊されているので、アナフィラキシーは誘導されにくく、T細胞リセプターからの刺激が免疫寛容を誘導させる可能性が示唆された。

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、経口減感作療法、ペプチド療法を通して積極的に免疫寛容を誘導させる治療法の確立ならびに、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、牛乳アレルギー患者に対して少量から開始する減感作療法のプロトコルの確立と耐性獲得の機序の解明を行う。さらに、抗原エピトープを修飾した牛乳ペプチドを作製し、in vitro, in vivoでの反応を検討した。

B. 研究方法

牛乳アレルギー患者3名に1滴から牛乳を開始し、約4ヶ月かけて100mlまで徐々に増量した。減感作開始前後で、サイトカインの産生、CD4、CD25陽性細胞等について検討した。牛乳アレルギー患者からβ-ラクトグロブリン(BLG)に反応するT細胞クローンを樹立しT細胞エピトープを解析した。さらに、患者血清を用いたインプロットまたはinhibition ELISA法にてB細胞エピトープの解析を行った。

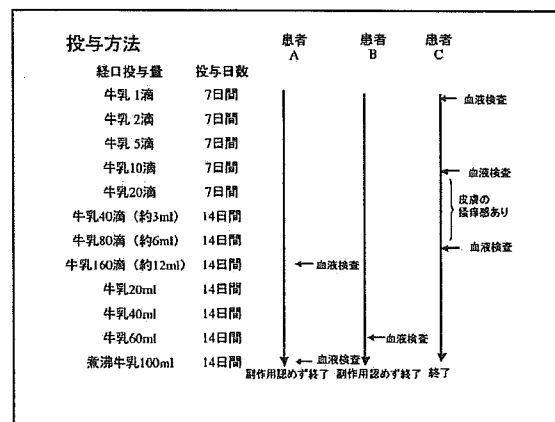
(倫理面への配慮)

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(インホームドコンセント)を得た上で採血が行われた。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ていることから問題がないと判断された。

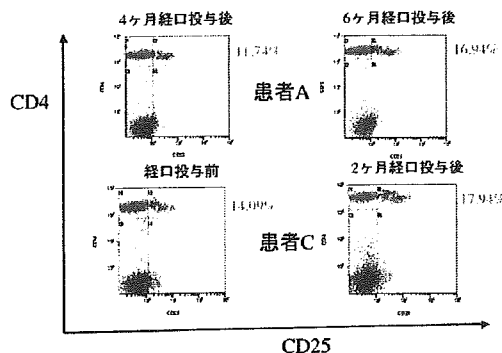
C. 研究結果

寛解に至っていない牛乳アレルギー患者3名に経口減感作を行った。軽度の皮膚症状が1名に出現したが、3名とも最終的に100mlの牛乳摂取が可能になった(図1)。



(図1) 経口減感作のプロトコール

経口減感作開始前に比較し開始後はCD4CD25陽性T細胞の割合が増加している傾向があった。(図2)。



(図2) CD4CD25 陽性 T 細胞の割合変化

BLG を各種のエンド型酵素で分解し、温度、PH 等の分解条件を検討した。調整したペプチドのうちいくつかは、理論上の切断点から検討すると T 細胞エピトープは保たれているが、B 細胞エピトープを破壊されているものが存在した。実際に *in vitro* でこれらのペプチドを解析すると T 細胞の反応性は保たれているが B 細胞エピトープの反応性は著しく減弱しており、経口免疫寛容誘導のための牛乳ペプチドの候補と考えられた。現在、臨床応用をすすめるために、ペプチドの大量調整のための準備をすすめている。

D. 考察

経口減感作を行い、耐性の獲得を誘導できた。この耐性誘導には CD4CD25 陽性の調節性 T 細胞の関与が推測された。今後、さらに症例数を増やしてどのような症例に適応できるかを検討する。また、減感作療法が適応でない症例には抗原エピトープを修飾した牛乳ペプチドを用いた免疫寛容誘導が有望と考えられる。これらの症例の投与前後の免疫能を詳細に解析することで、免疫寛容獲得の機序の解明をめざしたい。

E. 結論

牛乳アレルギー患者に経口減感作をおこない、最終的に寛解を誘導することが可能であった。寛解誘導には調節性 T 細胞の関与が考えられた。T 細胞エピトープを保存したまま、B 細胞エピトープを破壊した BLG 分解物を調整した。この抗原エピトープを修飾したペプチドは牛乳アレルギーに対して免疫寛容を誘導する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo N, Kraft M, Kaminogawa S: Hygiene Hypothesis-Significance and Verification in Asthma/Allergy-, International Review of Asthma. 2005 ; 7: 8-25.
- 2) Kondo N, Kato Z, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Aoki M, Kawamoto N, Kondo M, Omoya K, Tatebayashi K, Matsukuma E, Kasahara K, Kuwabara M, Mabichi Y, Horikoshi H. Molecular explanation of hygiene hypothesis. Allergology International. in press.
- 3) 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 Investig Allergol Clin Immunol. 2005;15 :107-111.
- 4) Uehara R, Peng G, Nakamura Y, Matsuura N, Kondo N, Tada H. Human milk survey for dioxins in the general population in Japan. Chemosphere. in press.
- 5) Kawamoto N, Kaneko H, Takemura M, Seishima M, Sakurai S, Fukao T, Kasahara K, Iwasa S, Kondo N. Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children. Pediatric Allergy and Immunology. in press.

2. 学会発表

- 1) Kondo N : 国際学会シンポジウム : Symposium 1 : The hygiene hypothesis: true or false? (衛生仮説). APAPARI KAPARD Joint Congress 2005 (2005年4月7日, 韓国)
- 2) 近藤直実 : シンポジウム : 座長 : 『アレルギー克服へ向けての新たな治療薬開発への展望』. 小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 (第13回) (2005年2月20日, 群馬)
- 3) 近藤直実 : シンポジウム : 座長 : 『アレルギー疾患の発症と重症化を防ぐために』. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第17回) (2005年6月3日, 岡山)
- 4) 近藤直実, 松井永子, 篠田紳司, 寺本貴英, 深尾敏幸, 金子英雄, 加藤善一郎, 川本典生, 平山耕一郎 : イブニングシンポジウム 2 : 講

- 演：小児気管支喘息の QOL と評価. 日本アレルギー学会春季臨床大会（第 17 回）（2005 年 6 月 2 日，岡山）
- 5) 近藤直実：イブニング教育セミナー①：講演：2. ヒトの食物アレルギーとその対策. 日本皮膚アレルギー学会総会（第 35 回）・日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会（第 30 回）（2005 年 7 月 16 日，横浜）
 - 6) 近藤直実：特別講演 1：『トランスレーショナルリサーチの基づくアレルギー臨床の展開』. 呼吸器・免疫シンポジウム（第 23 回）（2005 年 10 月 8 日，東京）
 - 7) 近藤直実：特別講演：『21 世紀のアレルギー診療』. 小児気管支喘息座談会（第 4 回）（2005 年 10 月 15 日，大阪）
 - 8) 近藤直実：シンポジウム 15：司会：自己免疫疾患およびアレルギー疾患の診断・治療の最前線（-ゲノム解析を基盤にして-）. 日本アレルギー学会秋季学術大会（第 55 回）（2005 年 10 月 22 日，盛岡）
 - 9) 近藤直実：特別講演 1：座長：目で見ると小児皮膚アレルギー疾患とその治療. 日本小児アレルギー学会（第 42 回）（2005 年 11 月 19 日，福井）
 - 10) 近藤直実：シンポジウム 4：アレルギー疾患の予知・予防は可能か. 日本小児アレルギー学会（第 42 回）（2005 年 11 月 20 日，福井）
 - 11) 近藤直実：セッション 1：アレルギーの診療 3 -トランスレーショナルリサーチからみた現在と将来-. 東日本小児科学会（第 30 回）（2005 年 11 月 27 日，静岡）

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
—食品低アレルギー化法の開発による食物アレルギー治療—

分担研究者 大嶋 勇成 福井大学医学部附属病院小児科講師
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ギー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 OVA 感作成立後の経口トレランス誘導の可能性を検証した。OVA 感作により OVA 特異的 IgE は 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高値を示したが、下痢症状は軽く、即時型アレルギー症状は抗原特異的 IgE 値のみで規定されないと考えられた。また、OVA 感作を行った野生型マウスの脾臓の CD8 陽性細胞を輸注することで OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスに誘導される即時型アレルギー症状は抑制された。この抑制機序は抗原特異的 IgE 産生の抑制でなく、T 細胞のサイトカイン産生能の変化が関与していることが示唆された。抗原特異的 IgE 値が高値でも抗原特異的 T 細胞を制御することで即時型アレルギー症状を調節できる可能性が示唆され、食物アレルギーの治療に調節性 CD8 陽性 T 細胞の選択的活性化能を保持した低アレルギー化食品の開発が有用と考えられた。

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ギー化し、低アレルギー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- α -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よう

な抗原投与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

IgE 依存性の即時型下痢症状を呈する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、野生型マウスと OVA 特異的 T 細胞レセプター発現トランスジェニックマウス (OVA-TCR-tg) 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 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。

OVA-TCR-tg マウスの呈する症状が野生型マウスに比べ軽かったことから、症状の差が OVA-TCR-tg マウスで CD8 陽性 T 細胞が欠損していることに起因するものかを検討するため、OVA 感作を行った野生型マウスの脾臓から CD8 陽 T 細胞を Auto MACS を用いて分離し、OVA-TCR-tg マウスに輸注した。輸注 24 時間後がから、OVA 経口投与を開始し、症状がどの様に変化するかを観察した。あわせて、OVA 投与反復に伴う抗原特異的 IgE 値、IgG1、IgG2a の変化と、腸間膜リンパ節リンパ球の OVA 特異的サイトカイン産生能を測定した。

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。

C. 研究結果

OVA をアラムと共に腹腔感作すると OVA-TCR-tg マウスでは野生型に比べ OVA 特異的 IgE が高値を示した。OVA の経口投与により誘発される症状は OVA-TCR-tg マウスでは下痢症状のみで、活動性の低下や低体温は認めなかったが、野生型マウスは激しい下痢に加え活動性の低下、低体温といったアナフィラキシー症状を呈した。

次に、OVA-TCR-tg マウスで欠損している CD8 陽性 T 細胞が即時型下痢症状の発症に関与しているかを明らかにするため、OVA 感作をした野生型マウスから分離した CD8 陽性 T 細胞を OVA-TCR-tg マウスに輸注し、OVA 経口投与を行なった。その結果、CD8 陽性 T 細胞を輸注した場合、下痢症状は誘発されず、組織学的にも、空腸・回腸粘膜への好酸球、肥満細胞浸潤が減少していた。また、CD8T 細胞の輸注により腸間膜リンパ節の OVA 特異的サイトカイン産生は IL-4 産生の低下、IFN- γ 、IL-10 の産生増強が観察された。一方、OVA 感作を行っていないマウスの CD8 陽性 T 細胞による CD8 陽性 T 細胞分画の再構築では症状の抑制は認められなかった。CD8T 細胞の輸注は抗原特異的 IgE 値の変化や抗原特異的 IgG1, IgG2a 値に有意の影響を与えなかった。

D. 考察

IgE と肥満細胞が発症に重要とされる即時型アレルギー性腸炎モデルを用いたにもかかわらず、OVA 特異的 IgE が高値を示す OVA-TCR-tg マウスの方が野生型マウスより症状が軽かったことから、即時型反応といえども抗原特異的 IgE の値のみで症状が規定されないことが明らかとなった。また、OVA を感作をした野生型マウスの脾臓中 CD8 陽性 T 細胞分画には、OVA 経口投与による消化管粘膜局所への好酸球・肥満細胞の浸潤を抑制し、即時型下痢症状を抑制する機能を有する細胞群が存在することが示唆された。この CD8T 細胞の抑制機能は抗原特異的である可能性が考えられたが、OVA 経口投与後に観察される OVA 特異的 IgE 値の上昇には CD8 陽性 T 細胞輸注の有無による有意の差を認めなかったことから、CD8 陽性 T 細胞による下痢症状の抑制は抗原特異的 IgE 産生抑制を介するものではないと

考えられた。一方、腸間膜リンパ節の OVA 特異的サイトカイン産生パターンは、Th2 細胞のエフェクター機能に対し抑制的に作用する IFN- γ 、IL-10 産生が CD8 陽性 T 細胞の輸注により増強していたことから、T 細胞のサイトカイン産生能の制御が関与していることが示唆された。

実験性アレルギー性脳炎に対する経口トレランスの誘導には CD8 陽性調節性 T 細胞の関与が報告されている。この際の、CD8 陽性調節性 T 細胞が認識するエピトープは組織障害に関与する T 細胞が認識するエピトープと異なることが報告されている。今回観察された抑制機能を担う CD8 T 細胞が認識するエピトープが下痢症状に関与する CD4 陽性 T 細胞のエピトープと異なるようであれば、食物アレルギーの治療として、調節性 CD8 陽性 T 細胞が認識するエピトープを利用して調節性 CD8 陽性 T 細胞を選択的に活性化させ、抗原感作成立後でも経口免疫寛容を誘導することが期待される。

E. 結論

食物アレルギーの症状を制御するためには単に抗原特異的 IgE を標的とするだけでなく抗原特異的 T 細胞の反応性を考慮することが必要と考えられる。また、抗原特異的 IgE 値が高値でも抗原特異的 T 細胞を制御することで即時型アレルギー症状を調節できる可能性が示唆され、調節性 CD8 陽性 T 細胞の選択的活性化を保持した形での低アレルゲン化食品の開発を検討することが有用と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Omata N, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Karasuyama H, Mayumi M. Ovalbumin-specific IgE modulates ovalbumin-specific T cell response after repetitive oral antigen administration dermatitis. J Allergy Clin Immunol 115:822-827 (2005)
- 2) Yasutomi M, Ohshima Y, Omata N, Yamada A, Iwasaki H, Urasaki Y, Mayumi M. Erythromycin differentially inhibits LPS- or poly (I:C)-induced but not

- peptidoglycan-induced activation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 175: 8069-8076 (2005)
- 3) Todoroki Y, Tsukahara H, Ohshima Y, Shukunami K, Nishijima K, Kotsuji F, Hata A, Kasuga K, Sekine K, Nakamura H, Yodoi J, Mayumi M Concentrations of thioredoxin, a redox-regulating protein, in umbilical cord blood and breast milk *Free Radic Res* 39:291-7(2005)
 - 4) Jiang MZ, Tsukahara H, Hayakawa K, Todoroki Y, Tamura S, Ohshima Y, Hiraoka M, Mayumi M. Effects of antioxidant and NO on TNF- α -induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Respir Med* 99:580-591(2005)
 - 5) 大嶋勇成 Th1/Th2 バランス 58:457-460 (2005)
 - 6) 大嶋勇成 免疫アレルギー検査、サイトカイン Th1 系 (IL-1, IFN- γ), Th2 系 (IL-4, IL-5), IL-6, IL-10, IL-12, TGF- β 小児内科 37:s301-306(2005)
 - 7) 大嶋勇成 I 型アレルギーにおける樹状細胞の役割 *臨床免疫* 46:717-721(2005)
 - 8) 大嶋勇成 アレルギーマーチと IgE アレルギー科 20:486-490(2005)
 - 9) 大嶋勇成 小児喘息における気道リモデリング アレルギーの臨床 25:158(2005)
 - 10) 大嶋勇成 喘息と患者教育: Educational Aspect 乳幼児の吸入療法と保護者への教育 *Int Rev Asthma* 7:54-60(2005)
 - 11) 塚原宏一、大嶋勇成 ペプチド分解乳で牛乳アレルギーの予防ができるのか? 母乳はアトピー性皮膚炎に良くないのか? *小児内科* 37:677(2005)
2. 学会発表
- 1) Mayumi M, Ohshima Y et al. Ovalbumin-specific IgE modulates ovalbumin-specific T cell response after repetitive oral antigen administration. *World Allergy Congress 2005, Munchen, June 2005.*
 - 2) 大嶋勇成 シンポジウム: 食物アレルギーの現状と対策: 動物モデルを用いた食物アレルギーの解析 第 17 回日本アレルギー学会 春季臨床大会 岡山 June 2-5, 2005
 - 3) 大嶋勇成 シンポジウム: 乳幼児の免疫機構とアレルギー疾患: 胎内感作とアトピー素因-胎内感作によってアレルギー性疾患の発症が規定せれるか- 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 盛岡 Oct 20-22, 2005
 - 4) 大嶋勇成 シンポジウム: シンポジウム: 食物アレルギーガイドライン 経口免疫寛容の可能性 第 42 回日本小児アレルギー学会 Nov. 19-20, 2005
 - 5) 大嶋勇成 シンポジウム: シンポジウム: 食物アレルギーモデルによる病態解析とその治療戦略 日本薬学会 第 126 年会 2006 March 29-31
 - 6) 大嶋勇成 特別講演: 環境ホルモン問題とアレルギーの接点 第 15 回奈良小児アレルギーカンファレンス 奈良 May 20, 2005
 - 7) 大嶋勇成 特別講演: 特別講演: 臨床的事実からみた衛生仮説の適否 第 9 回神奈川免疫アレルギー同好会 横浜 May 25, 2005
 - 8) 小俣合歓子、山田彰子、佐藤周子、大嶋勇成、眞弓光文 当院で経験した新生児期発症のミルクアレルギー 10 例の検討 第 41 回中部日本小児科学会 名古屋 Aug 28, 2005
 - 9) 小俣合歓子、山田彰子、佐藤周子、大嶋勇成、木村宏輝、眞弓光文 病原性大腸菌 O6 がミルクアレルギー発症に関与したと思われる新生児例 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 盛岡 Oct 20-22, 2005
- 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—

分担研究者 柴田 瑠美子 国立病院機構福岡病院小児科
研究協力者 伊藤 典之 オーム乳業株式会社商品開発チーム
田辺 創一 広島大学生物圏科学研究科

研究要旨

乳幼児期の即時型小麦アレルギーにおいて低アレルゲン小麦負荷試験による過敏性確認と継続負荷試験による耐性化への影響を検討した。2歳以下の負荷陽性率が低く、その後の耐性化率が高かった。小麦アレルゲン蛋白の一つとしてプロテイン Z が確認された。小麦アナフィラキシー群で ω -5 グリアジン IgE 抗体陽性率が高く、耐性化により同抗体の陰性化がみられ、臨床的に過敏性、耐性化判断に有用であった。

A. 研究目的

小麦は、ナッツなどと同様に加熱による抗原性の低下がみられず、日常食品中のアレルゲンによるアナフィラキシーを起こしやすい。小児の小麦アレルギーではアナフィラキシーが誘発されやすい過敏症例、耐性化しにくい症例がみられ、負荷試験による耐性化の確認も困難なことが多い。小麦の酵素分解による低抗原化した小麦蛋白による負荷試験で過敏性、耐性化を判断し、継続ふかによる耐性化を検討してきた。また小麦のアレルゲン蛋白は、40 kDa および 15 kDa を中心とする卵白に IgE 反応性がみとめられたが、症状による差異や耐性化にともなう変化はあきらかでなかった。本年度は、低アレルゲン小麦負荷試験の年齢の影響を検討し、低アレルゲン小麦残存蛋白の検討、アナフィラキシーと小麦各種アレルゲン蛋白 IgE 抗体との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

低アレルゲン小麦（ペプティパウンドケーキ）による負荷試験を行った小麦即時アレルギー児を年齢別に誘発率および予後を検討した。対象は、1歳以下4例、1歳33例、2～3歳26例、4歳以上20例。

低アレルゲン小麦蛋白の分析（SDS-PAGE）、および患者血清を用いた western 解析からえられた主要蛋白の検討、N末端アミノ酸配列解析を行った。

小麦アレルギー児および耐性化後の小麦特異 IgE 抗体、小麦ペプチド、グリアジン、 ω -5 グリアジン IgE 抗体を CAP 法により測定した。

C. 研究結果

1) 年齢別の低アレルゲン小麦負荷試験陽性率は、CAP-RAST の IgE 抗体高値を含め、1歳～3歳で陽性率が低く、うどん負荷まで施行可能例が多く、小麦耐性化率も高かった。負荷年齢が4歳以上群では60%で陽性であり、過敏性が続く例が多く、IgE 抗体高値が持続し、耐性化のための負荷試験を施行できた17例中耐性は4例のみで完全耐性化率も低かった（表1）。

2) 低アレルゲン小麦の残存蛋白は60と40kDaが主で40kDaが多かった。患者血清のIgE抗体反応はおもに40kDa陽性で、このバンドのN末端側のアミノ酸配列はホモロジー検索の結果、大麦胚乳アルブミン画分に含まれるプロテインZ（Z4）のアミノ酸配列（aa6-15）と一致した。

3) CAP-RAST 小麦 IgE 抗体陽性で小麦アレルギー誘発例および陰性例ではともにグルテン IgE 抗体は100%陽性であったが、 ω -5 グリアジン IgE 抗体は誘発重症例で高い傾向を示した。とくに低アレルゲン小麦誘発で確認した小麦アナフィラキシー、喘鳴例では、 ω 5-グリアジン IgE 抗体が高かった（図1）。小麦完全耐性化とともに ω -5 グリアジン IgE 抗体は低下し75%は陰性化していた。小麦およびグルテン IgE 抗体も低下したが、多くはスコア3以上陽性の範囲であった。ペプチドA特異 IgE は ω -5 グリアジンと同様に耐性化例で低下する例がみられたが、ペプチドB特異 IgE は、ほとんど陰性であった（図2）。

D. 考案

小麦アレルギー児や小麦抗体が高値の症例で

は、低アレルゲン小麦による過敏性、耐性化を年齢早期に検討することのより、その後の小麦負荷、耐性化の判断に有用であると思われた。最近、小麦による運動誘発アナフィラキシーや小麦即時反応を示す症例で、小麦グリアジン IgE 抗体が検出され臨床症状との関連が指摘されている。乳幼児発症の小麦アナフィラキシー児でも小麦ペプチド A、グリアジン IgE 抗体と症状との関連がみられており、今回の検討によりアナフィラキシーの予測だけでなく、耐性化の判断にも役立つ可能性があると思われた。

E. 結語

乳幼児の小麦アナフィラキシーにおける早期からの低アレルゲン小麦による過敏性確認、負荷継続は小麦耐性化率を高める可能性がある。小麦 ω -5 グリアジン IgE 抗体はアナフィラキシーで検出され、耐性化とともに陰性化し臨床的な指標になると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 1. Tanabe S, Shibata R, Nishimura T. Hypoallergenic and T cell reactive analogue peptides of bovine serum albumin, the major beef allergen. *Mol Immunol*. 41(9):885-90. 2004.
- 2) 2. Tanaka T, Takada H, Nomura A, Ohga S, Shibata R, Hara T. Distinct gene expression patterns of peripheral blood cells in hyper-IgE syndrome. *Clin Exp Immunol*. 140:524-31, 2005. 3.
- 3) 柴田瑠美子. 食物負荷試験 新しい診断と治療の ABC 最新医学 (別冊) 113-119、2005.
- 4) 柴田瑠美子 食物アレルギーと栄養指導 臨床栄養 106 : 467-473、2005.
- 5) 柴田瑠美子 正しい食物アレルギーの治療 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌. 3 : 29-30. 2005.

2. 学会発表

- 1) Shibata R, Tezuka J, Ide K, Odajima H. Utility of hypo-allergenic dairy products

in the IgE-mediated cows mils allergy. APAPARI 2005 (Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory & Immunology) 2005 (Seoul, Korea)

- 2) Rumiko Shibata, Sankei Nishima, Utility of hypoallergenic wheat product and wheat-specific IgE concentration in childhood wheat hypersensitivity for a diagnosis of tolerance. World Allergy Organization Congress XIX 2005、(Munche n)
- 3) 柴田瑠美子、児玉秀子、江口珠美、池本美智子. 食物経口負荷試験の検査入院システムについて 日本難治性喘息・アレルギー学会 2005、(大阪)
- 4) 柴田瑠美子、西間三馨、伊藤典之. 即時型小麦アレルギー児における低アレルゲン小麦による経口負荷試験と耐性化予後 日本アレルギー学会 2005、(盛岡)
- 5) 柴田瑠美子 久保田典里子 西間三馨 ラテックス陽性を示したフルーツアレルギー小児の臨床背景 第 10 回日本ラテックスアレルギー研究会 2005 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 小麦アナフィラキシー児の低アレルゲン小麦負荷試験施行月齢と負荷陽性率およびその後の耐性化率

負荷試験月齢	件数	小麦 CAP U _A /mL	陽性数 率 (%)	耐性化 例数 (率)
<12m (6~11m)	4	3~6 47	2 (50)	4 (100)
12~23m	33	2~6 31	12 (36)	33 (100)
24~47m	26	3~6 24	6 (23)	23 (88)
≥48 (平均6 Y)	20	2~6 34	11 (60)	4/17 (24)

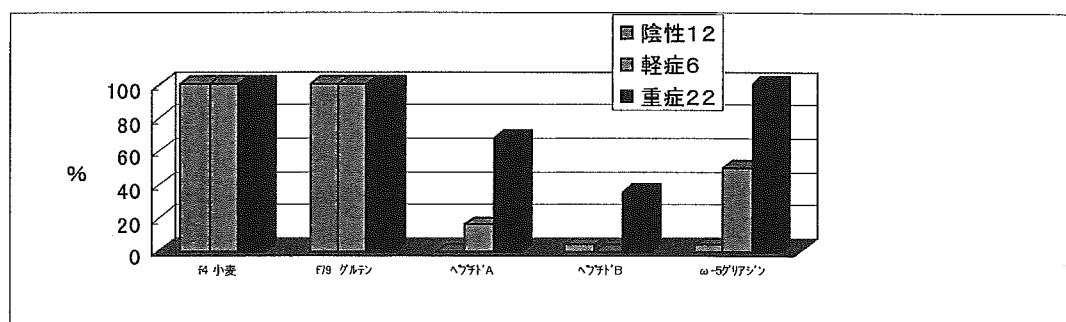


図2 小麦による誘発状況と小麦および小麦蛋白成分の特異 IgE 抗体陽性率 (小麦、グルテン、ペプチド A、ペプチド B、ω-5 グリアジン)

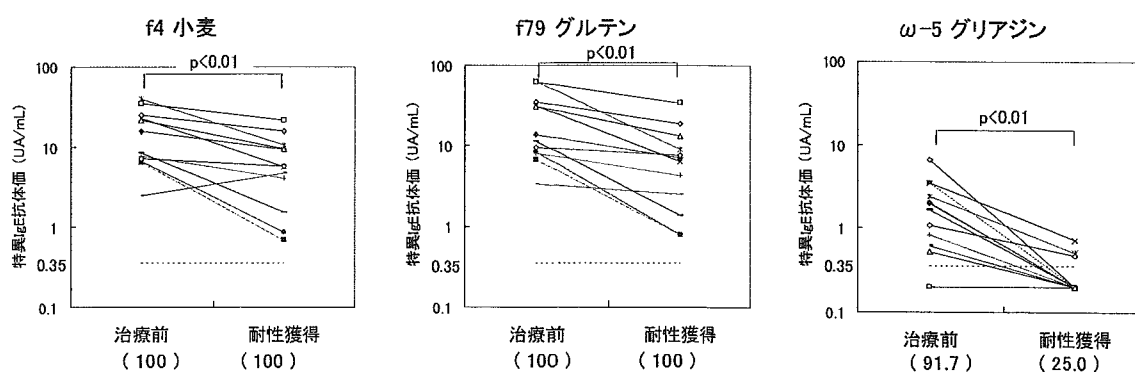


図3 小麦アレルギー耐性化と小麦、グルテン、ω-5 グリアジン特異 IgE 抗体の推移

食物アレルギーの抗原解析およびその低減化に関する研究

分担研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部
研究協力者	塩見 一雄	東京海洋大学海洋科学部海洋食品科学科
	佐伯 宏樹	北海道大学大学院水産科学研究科
	森山 達哉	近畿大学農学部応用生命化学科
	吉岡 靖雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部
	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨

魚類：ニジマスコラーゲン $\alpha 2$ 鎖の主要な IgE 結合エピトープの絞込みに成功した。**甲殻類**：甲殻類アレルギー患者の一部はアルギニンキナーゼのほかに 20 kDa の新規アレルギーを認識した。**寄生虫**：アニサキス新規アレルギーを同定し、そのリコンビナント体がアニサキスアレルギーの診断・治療に応用可能であることが示唆された。**海産無脊椎動物**：スルメイカ・トロポミオシンはメイラード反応の進行に伴って、ペプシン消化性が低減した。しかし、メイラード反応によって起こったアレルギー性の低下は、ペプシンによる TM の消化後も維持されていた。**豆乳**：花粉症と関連するクラス 2 食物アレルギーに属し、果物アレルギーとも交差しうることが明らかになった。**ふきのとう**：アレルギーとして、22kDa と 10kDa の 2 つの強い抗原を見出した。**果物**：病害被害を受けたリンゴにおいてアレルギータンパク質の増大が認められた。**大豆**：油脂や乳化剤の存在下で、腸管からのアレルギー吸収が著しく増加し、反対に食物繊維存在下で抑制されることが明らかとなった。**ピーナッツ**：主要アレルギー Ara h1 の立体構造解明を目的に、リコンビナント体を大腸菌で作製し、結晶を得た。**そば**：加熱処理によりペプシン消化性が低下することが判明した。

A. 研究目的

重篤なアナフィラキシー症状を呈した食品中のアレルギー誘発物質を特定すると共に、それら誘発物質の低減化を目的とする。

B. 研究方法

- 1) ニジマスコラーゲン $\alpha 2$ 鎖をコードする cDNA の塩基配列をもとに、成熟領域 (N 末ペプチド+三重らせん領域+C 末ペプチド; アミノ酸 1041 残基) をカバーする 5 種類のオーバーラップタンパク質 (P1-P5) を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現し、発現タンパク質の IgE 結合能を患者血清を用いたイムノブロッティングで評価した。
- 2) ウシエビ (ブラックタイガー) の筋肉から調製したバッファー抽出液を硫酸分画に供し、70-90%硫酸飽和画分にアルギニンキナーゼを回収した。この画分の IgE 反応性を ELISA、イムノブロッティングにより調べ、陰イオン交換 HPLC によりアルギニンキナーゼの精製を試みた。
- 3) アニサキスから構築した cDNA ライブラリーをアニサキスアレルギー患者の血清 IgE との反応性を指標にスクリーニングし、アレルギーをコードする cDNA を単離した。得られた cDNA の塩基配列、演繹アミノ酸配列を解析した。アレルギー cDNA を大腸菌で発現し、得られたリコンビナント体の IgE 反応性を ELISA で調べた。
- 4) スルメイカの体側筋からトロポミオシン (TM) を精製した。これを 50mM NaCl 中で 10 mM リボース (生体内レベル) と混合し、TM とリボース間でメイラード反応を進行させた。その後、TM のアレルギー性に及ぼすメイラード反応の影響を、5名のイカアレルギー患者の血清を用いた競争 ELISA によって判断した。次に、トロポミオシン (Native-TM) とメイラード反応トロポミオシン (TM-ribose) をペプシン消化し、アレルギー性変化を調べた。
- 5) 豆乳アレルギー患者約 10 名程度の患者血清を収集し

た。

- 6) ふきのとうアレルギーに関しては 2名の患者血清を収集した。抗原の同定には主にイムノブロッティング法を用いた。
- 7) 果実の病害虫被害によるアレルギー性変化を評価するため、リンゴにすす斑病菌を接種し、アレルギータンパク質の変動をイムノブロッティング法を用いて解析した。
- 8) 種々の食餌成分とダイズのアレルギータンパク質を同時にマウスに摂取することで、アレルギー発現に影響を及ぼす食餌成分について検討した。マウス血清中の未消化アレルギーの検出・定量にはサンドイッチ ELISA 法を用いた。
- 9) ピーナッツ主要アレルギー Ara h1 の立体構造解明を目的に、リコンビナント体を大腸菌で作製し、結晶化を行った。
- 10) 加熱したそばより蛋白質を抽出し、ペプシン消化し、非加熱状態のものと比較した。

C. 研究結果

- 1) 大腸菌で GST 融合体として発現した P1-P5 の 5 種類のタンパク質のうち、P1 は封入体として、その他は可溶部に得られた。イムノブロッティングにより IgE 反応性を評価した結果、C 末端領域に相当する P5 はいずれの患者血清とも陽性反応を示したが、P3 も P5 と同程度に反応する血清、P3・P4・P5 と同程度に反応する血清、P5 より P3・P4 と強く反応する血清がみられ、主要な IgE 結合エピトープは患者によって異なると考えられた。
- 2) ブラックタイガーの筋肉抽出液の硫酸分画により、アルギニンキナーゼは 70-90%硫酸飽和画分に定量的に回収できた。70-90%硫酸飽和画分の ELISA では甲殻類アレルギー患者 23 名中 8 名の血清 IgE と反応したが、イムノブロッティングによりアルギニンキナーゼの他に 20 kDa のタンパク質も IgE 反応性を示すことが新たに判明した。アルギニンキナーゼと 20 kDa のタンパク質は陰イオン交換

HPLC で分離できることも確認した。

3) アニサキスの 4 種類の新規アレルゲン (アレルゲン A-D) をコードする cDNA を単離し、全塩基配列および演繹アミノ酸配列を明らかにした。アレルゲン A (29,970 Da) は線虫 *Clonorchis sinensis* の antigen Cs44 と 34%、アレルゲン B (16,585 Da) は線虫 *Ascaris suum* の AS16 protein と 55%、アレルゲン C (15,497 Da) は線虫 *Ascaris suum* の AS14 protein と 60%、アレルゲン D (9739 Da) はミツバチの chymotrypsin inhibitor と 40% の配列相同性を示した。アレルゲン A、B および D については大腸菌で発現したリコンビナント体を用いて、それぞれ複数の患者の血清 IgE と反応することを確認した。また、アレルゲン D については chymotrypsin 阻害活性もあわせて確認した。

4) スルメイカ TM はリボースとの反応が進行するに伴って、患者血清中の特異 IgE に対する反応性が低下し、競争 ELISA における 50% 阻害濃度が 10 倍以上増加した。この傾向は昨年度の実験結果と同様であった。この TM をペプシン消化後、そのアレルゲン性変化を Native-TM と比較した結果、同程度の消化時間では TM-ribose のほうがペプシン消化を受けにくかった。しかし、消化 180 分後の断片を競走 ELISA に供した結果、TM-ribose におけるアレルゲン性の低下傾向はそのまま維持されていた。

5) 豆乳アレルギーは、成人女性の発症例が多く、また RAST 値が大豆では陰性または低値であり、逆に果実 (リンゴ) や花粉に対する RAST 値が高い例が多かった。原因抗原としては、24kDa (オレオシン) や 16kDa (大豆 Betv1 ホモログ) が関与している可能性が示唆された。

6) ふきのとうアレルゲンとして、22kDa と 10kDa (以下) の 2 つの強い抗原を見出した。

7) リンゴにすず斑病菌を接種させた結果、PR タンパク質と思われる患者血清 IgE が認識するアレルゲンタンパク質バンドが増大した。

8) 油脂や乳化剤の存在下にてアレルゲンの吸収が著しく増加し、反対に食物繊維にて抑制されることが明らかとなった。また一般的な食品加工用のプロテアーゼ処理の他に、発芽処理などによっても低減化可能であることが示唆された。さらに、育種的に低減化された作物 (ダイズやトマト) の評価の結果、一部のアレルゲン分子の消失が認められ、低アレルゲン作物としての応用の可能性が示唆された。

9) Ara h1 のリコンビナント体は、生ピーナッツ由来の Ara h1 と同様の CD スペクトル像を示した。結晶化条件を検索した結果、針状結晶を示す条件を見出した。

10) 競合 ELISA の結果、加熱したそばは、非加熱状態よりもペプシン抵抗性であることが示唆された。

D. 考察

1) ニジマスコラーゲン $\alpha 2$ 鎖をカバーする P1-P5 のタンパク質のうち、P1 と P2 は IgE 反応性を示さず、P5 は調べた全ての患者血清と反応した。P3 と P4 は P5 より強く患者血清と反応するケースも見られた。今後、P3-P5 の領域

について、哺乳類コラーゲンのアミノ酸配列と変異の大きい部分を探索し、合成ペプチドを用いた IgE 反応性の検討により IgE 結合エピトープを絞り込む必要がある。

2) 各種無脊椎動物のアルギニンキナーゼの IgE 反応性および交差性を明らかにすることはできなかったが、ウシエビ筋肉中にアルギニンキナーゼとは異なる 20 kDa の新規アレルゲンが存在することを示した。今後、アルギニンキナーゼとあわせて本アレルゲンの性状を明らかにすることが望まれる。

3) cDNA クローニングにより同定された 4 種類のアニサキスアレルゲンはいずれも新規アレルゲンであった。大腸菌で発現したリコンビナント体は IgE 結合能を十分に保持していると考えられた。

4) メイラード反応がスルメイカ TM の消化性を低下させることが示された。一般にタンパク質の消化性の低下は、生体内におけるタンパク質のアレルゲン性を増強させるおそれが考えられるが、メイラード反応によって起きたアレルゲン性の低下は、TM の消化過程でもそのまま維持されていた。この事実は、メイラード反応がエピトープ部位あるいはその近傍の構造に直接関与して TM のアレルゲン性低下をもたらした可能性を示唆している。

5) 成人におけるアナフィラキシーを伴う豆乳アレルギーは花粉症と関連するクラス 2 食物アレルギーに属すると考えられた。花粉症が増加していることや豆乳がブームになっていることなどから今後も本症例が増加する可能性が大きいと思われる。

6) ふきのとうの抗原は未同定なので、今後同定を進める必要がある。フキノトウ (キク科) のアレルギー患者はキク科花粉症を併発していたので、花粉症との交差反応抗原の関与が疑われる。

7) 病害被害を受けた果実においてアレルゲンタンパク質の増大が認められことから、農作物の栽培状況によってアレルゲン性が増減することが示唆された。

8) 摂取する食品成分により食物アレルゲンのアレルゲン性が変化することが示された。今後より詳細な作用機構を検討することで、食物アレルギー発症予防に貢献可能と考えられた。

9) より精度の高い結晶作製条件の探索を行うとともに、X線照射の予定である。

10) 加熱・非加熱によるアレルゲン性変化を、in vivo においても比較すると共に、加熱状態におけるアレルゲンを探索する必要があると考えられた。

E. 結論

1) ニジマスコラーゲン $\alpha 2$ 鎖の主要な IgE 結合エピトープは P3-P5 の領域に存在する。

2) 甲殻類アレルギー患者の一部はアルギニンキナーゼのほかに 20 kDa の新規アレルゲンを認識する。

3) アニサキス新規アレルゲンのリコンビナント体は、アニサキスアレルギーの診断・治療に応用可能である。

4) スルメイカ筋肉の主要アレルゲンである TM は、還元糖

類(単糖)とメイラード反応を起こすと消化性が低下した。しかし、メイラード反応によって起こったアレルギー性の低下は、ペプシンによるTMの消化後も維持されていた。

5) 成人におけるアナフィラキシーを伴う豆乳アレルギーは花粉症と関連するクラス2食物アレルギーに属し、果物アレルギーとも交差しうることが明らかになった。原因抗原は複数存在すると思われた。

6) 地域性を反映して発症する「山菜アレルギー」も臨床例は多いようであるが、詳細な研究例は少なく、今後調べていく必要がある。

7) 農作物の栽培状況によってアレルギー性が増減することが示唆された。

8) アレルギー発症を抑制・亢進させる「食べ合わせ」が存在する可能性が示唆される。

9) Ara h1 の結晶を得た。

10) 加熱によりそばのアレルギー性は変化する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinakura K, Tonomura Y, Hamada Y, Nagashima Y and Shiomi K. Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion. *Food Chem.* 91, 247-253 (2005)
- 2) Kobayashi A, Tanaka H, Hamada Y, Ishizaki S, Nagashima Y and Shiomi K. Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy* 61, 357-363 (2006)
- 3) Lu Y, Ohshima T, Ushio H, Hamada Y and Shiomi K. Immunological characteristics of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. *Food Chem.* (in press)
- 4) Motoyama K, Ishizaki S, Nagashima Y and Shiomi K. Cephalopod tropomyosins: identification as major allergens and molecular cloning. *Food Chem Toxicol.* (in submission)
- 5) Nakamura A, Watanabe K, Ojima T, Dong-Hyun Ahn, and Saeki H. Effect of Maillard Reaction on Allergenicity of Scallop Tropomyosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53, 7559-7564 (2005)
- 6) Weangsripanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T, and Kawada T. Dietary Fat and an Exogenous Emulsifier Increase the Gastrointestinal Absorption of a Major Soybean Allergen, Gly m Bd 30K, in Mice. *J Nutr.* 135, 1738-1744 (2005)
- 7) Moriyama T, Machidori M, Ozasa S, Maebuchi M, Urade R, Takahashi K, Ogawa T, and Maruyama N. A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification of Soybean β -Conglycinin, a Major Soybean Storage Protein, in Soybean and Soybean Food Products. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51, 34-39 (2005)
- 8) Iijima S, Moriyama T, Ogawa T. A case of anaphylaxis due to soy milk: Trial of detection of IgE-binding soybean proteins. *J Environmental Dermatology.* 12, 184-191 (2005)
- 9) Kitta K, Ohnishi-Kameyama M, Moriyama T, Ogawa T, and Kawamoto S. Detection of low molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem.* (in press)
- 10) Akiyama H, Amano H, Bienenstock J. Rat tracheal epithelial responses to water avoidance stress. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 318-324 (2005)
- 11) Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, Yoshioka Y, Shoji T, Kanda T, Yamada K, Totsuka M, Teshima R, Goda Y, Sawada J, Maitani T. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergy in murine model. *FEBS letters.* 579, 4485-4491 (2005)
- 12) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W mice. *Allergology International.* 55, 43-48 (2006)
- 13) Watanabe T and Akiyama H et al., A Specific Qualitative Detection Method for Peanut (*Arachis hypogaea*) in Foods using Polymerase Chain Reaction. *J Food Biochemistry,* in press.
- 14) Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R, Sawada J and Maitani T. Profile analysis and allergenicity of wheat protein hydrolysates. *Int Arch Allergy Immunol.* (in press)
- 15) Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Aburatani K, Watanabe Y, Matsumoto T, Morishita N, Sato H, Mishima T, Gamo R, Kihira Y and Maitani T. Interlaboratory evaluation of two kinds of ELISA kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods. (in submission)

- 16) Yoshioka Y, Akiyama H, Nakano M, Shouji T, Kanda T, Takita T, Matsuda R, Maitani T. Orally administered apple condensed tannin protect against experimental inflammatory bowel disease in mice. (in submission)
- 17) Effects of stress upon tracheal epithelium of two strains of flinders rats. Amano H, Akiyama H, Bienenstock J. *Allergy.* submitted. (in submission)
- 18) 塩見一雄. 魚介類アレルギーの現状と表示の課題. *食品と開発* 40, 7-10 (2005)
- 19) 塩見一雄. 魚介類のアレルゲン. *アレルギー・免疫* (印刷中)
- 20) 塩見一雄. 水産物によるアレルギー. *食品工業* (印刷中)
- 21) 加賀谷早織, 角田孝彦, 森山達哉. フキノトウによる OAS (oral allergy syndrome) の2例. *日本ラテックスアレルギー研究会誌* 9, 84-87 (2005)
- 22) 穂山浩, 吉岡靖雄, 松田りえ子, 米谷民雄. 食物アレルギー 食物アレルギー. 最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 26, 45-56.

2. 学会発表

- 1) 元山かん奈, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 長島裕二, 塩見一雄: 数種甲殻類の主要アレルゲン(トロポミオシン)の一次構造特性. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月, 東京)
- 2) 須藤洋太, 濱田友貴, 嶋倉邦嘉, 長島裕二, 塩見一雄: アメリカンロブスターの遡筋および選筋に含まれるトロポミオシンのアレルゲン性評価. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月, 東京)
- 3) 金森真紀, 濱田友貴, 嶋倉邦嘉, 長島裕二, 塩見一雄: 魚類アレルゲンのイムノブロット分析. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月, 東京)
- 4) 小林綾子, 濱田友貴, 田中洋行, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 長島裕二, 塩見一雄: 魚類普通肉および血合肉のアレルゲン性およびアレルゲンの比較. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月, 東京)
- 5) 小林征洋, 嶋倉邦嘉, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: アニサキス新規16kDaアレルゲンのcDNAクローニングおよび大腸菌における発現. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(2005年6月, 岡山)
- 6) 小林征洋, 池田 薫, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 長島裕二, 塩見一雄: アニサキス新規アレルゲンDnaJ様タンパク質のcDNAクローニングおよび発現. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(2005年10月, 盛岡)
- 7) 塩見一雄, 元山かん奈, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 長島裕二: 頭足類の主要アレルゲンとして同定されたトロポミオシンの一次構造解析. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(2005年10月, 盛岡)
- 8) 中村 厚, 佐々木文, 逢坂祐太, 渡辺一彦, 尾島孝男, 安 東賢, 佐伯宏樹: メイラード反応がスルメイカ・トロポミオシンのアレルゲン性におよぼす影響. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月, 東京)
- 9) 小南優, 小笹清香, 森山達哉, 小川 正, 河田照雄: フルーツアレルギーの単離・同定と、その特性解析. 第59回日本栄養・食糧学会大会(2005年5月, 東京)
- 10) 小笹清香, 森山達哉, 室下真裕美, 小川正, 河田照雄, 飯島茂子, 足立厚子, 清水秀樹, 橋田和美, 川本伸一: 新規なダイズアレルゲンの検索とダイズアレルゲンの網羅的検出・定量法の試み. 第59回日本栄養・食糧学会大会(2005年5月, 東京)
- 11) Thanakorn W, 森山達哉, 小川正, 河田照雄: ダイズ主要アレルゲン (Glym Bd30K) のマウス腸管吸収に及ぼす食品成分の影響. 第59回日本栄養・食糧学会大会(2005年5月, 東京)
- 12) 井戸敏子, 若原真美, 徳力篤, 長谷川美紀, 清原隆宏, 熊切正信, 森山達哉: 豆乳摂取後にアナフィラキシーを生じた2例. 第35回日本皮膚アレルギー学会総会・第30回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会(2005年7月, 横浜)
- 13) 森山達哉, 飯島茂子, 井戸敏子, 足立厚子, 橋田和美, 川本伸一: 豆乳アレルギーとの関連が疑われる新規大豆アレルゲンの同定. 第35回日本皮膚アレルギー学会総会・第30回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会(2005年7月, 横浜)
- 14) 加賀谷早織, 角田孝彦, 森山達哉: フキノトウによる OAS (oral allergy syndrome) の2例. 第10回日本ラテックスアレルギー研究会(2005年7月, 神戸)
- 15) 森山達哉: 新しいタイプの豆乳アレルギーについて. 日本豆乳協会研修会特別講演会(2005年7月, 東京)
- 16) 森山達哉: 野菜・果実・豆類等の植物性アレルゲンに関する最近の話題. 農研機構作物研究所セミナー(2005年11月, 筑波)
- 17) 橋田和美, 亀山真由美, 森山達哉, 小川正, 川本伸一: 酸性尿素ゲルを用いた2次元電気泳動による低分子量アレルゲンタンパク質の検出. 日本農芸化学会2006大会(2006年3月, 京都)
- 18) 山田千佳子, 和泉秀彦, 森山達哉, 小川正, 松田幹, 加藤保子: 発芽に伴う大豆種子中のアレルゲンタンパク質の分解. 日本農芸化学会2006大会(2006年3月, 京都)
- 19) 森山達哉, 小南優, 河田照雄, 小川正, 松中謙次郎, 河村幸雄: 病害被害による果物アレルギーの増大と防除による抑制(第2報) 日本農芸化学会2006大会(2006年3月, 京都)
- 20) Weangsripanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T, Kawada T. Effect of dietary fat and an exogenous emulsifier on the gastrointestinal absorption of a soybean allergen, Gly m Bd 30K, in mice. *International Cytokine Society Conference 2005* (Seoul), October 27-31, 2005.
- 21) Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Maitani T, Gamo R, Kihira Y, Honjoh T, Takahata Y, Sato Y. Preparation and specification of the calibration standards for the test kits for 5 allergenic foods. 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.
- 22) Akiyama H, Matsuda R, Maitani T. Issues and challenges of Japan NIHS validation protocols. 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの抗原解析・交叉反応性に関する研究

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

井上 徳浩	同第1専門診療部アレルギー科	斎藤 暁美	同第1専門診療部アレルギー科
青田 明子	同第1専門診療部アレルギー科	明石 真幸	同第1専門診療部アレルギー科
石井 徹仁	同総合診療部小児期診療科	大矢 幸弘	同第1専門診療部アレルギー科医長
須田 友子	同第1専門診療部アレルギー科	成田 雅美	同第1専門診療部アレルギー科
野村 伊知郎	同第1専門診療部アレルギー科	二村 昌樹	同第1専門診療部アレルギー科

研究要旨

法定5品目、奨励20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、鶏卵と魚卵、魚卵と魚肉、ナッツ類の交叉反応性に関して検討をおこない、タラコとイクラ、ピーナツとアーモンドで比較的高い交叉反応性があることがわかった。今後交叉反応性を認識して原材料表示を利用することの必要性を喚起する。

A. 研究目的

食品間には、その発生学的近縁性からアレルギー蛋白質のアミノ酸配列の相同性が存在する。このため異なる食品間でも交叉反応性が存在している。食物アレルギーのある人が、特定の食品に関してアレルギーがあることがわかりそれを除去するように食生活に気をつけていてもその食品と交叉反応性を有する食品を摂取した場合にアレルギー反応を起こす可能性がある。食品間の交叉反応性を知ることにより交叉反応によるアレルギー反応を防ぐことが可能である。

「遺伝子組み換え食品及びアレルギー物質を含む食品に関する表示」に関する法律において表示義務5品目と表示推奨20品目が定められた。これまでの研究で、鶏卵とイクラ、イクラと他の魚卵、魚肉、落花生と他の種実類、ヤマイモとジャガイモ、サツマイモの交叉反応性の症例を検討してきた。本研究では交叉反応性の頻度を明らかにすることで摂取者により安全な表示を提供できることを目的とする。これまでに症例を集積しピーナツとアーモンド、ピーナツとマカデミアナッツ、イクラとサケ、イクラとタラコについてその交叉反応性の頻度を検討した。

B. 研究方法

交叉反応性の有無の頻度を算出するために各調査項目別に一定数患者から研究実施の説明同意のもとに採血を実施する。各項目の実施数は以下のとおりである。

1. 対象患者数

(1) 鶏卵アレルギー患者

①イクラとの交叉反応性の検討

鶏卵 IgE 抗体が陽性の場合に、イクラの competition 試験で交叉反応性を測定する。
対象患者数 24 名。

(2) イクラアレルギー患者

①サケとの交叉反応性の検討

イクラ IgE 抗体が陽性の場合に、サケの competition 試験で交叉反応性を測定する。
対象患者数：10 名

②タラコとの交叉反応性の検討

イクラ IgE 抗体が陽性の場合に、タラコの competition 試験で交叉反応性を測定する。
対象患者数：24 名

(3) 落花生アレルギー患者

①アーモンドとの交叉反応性の検討

ピーナツ IgE 抗体が陽性の場合に、アーモンドの competition 試験で交叉反応性を測定する。
対象患者数：32 名

②マカデミアナッツとの交叉反応性の検討

ピーナツ IgE 抗体が陽性の場合に、マカデミアナッツの competition 試験で交叉反応性を測定する。
対象患者数：11 名

2. 患者さんからの血清の採取

外来診療に必要なアレルギー血液検査実施時に、本研究の説明を行い任意に同意をもらい通常の採血と同時に必要血液を採取する。

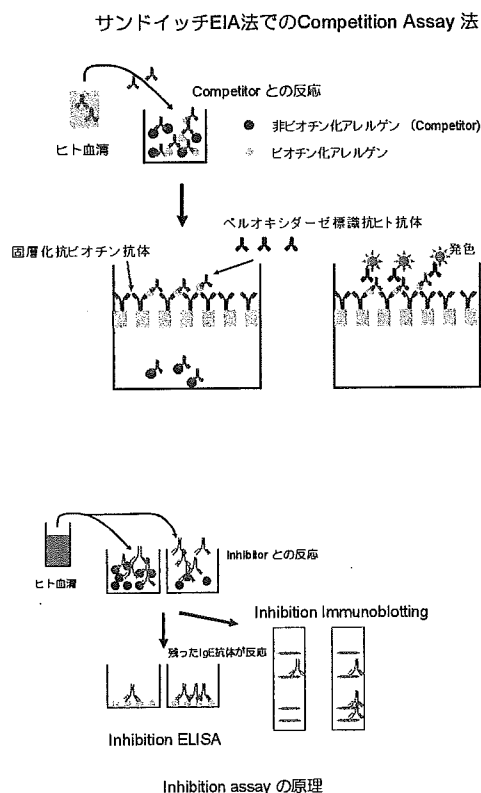
必要血液は、各項目で全血で3ml（血清2ml）である。検討項目が重複する場合は、採血量を年齢に応じて考慮する。

最大採血量の目安として（この研究のために追加する採血量）

- ① 1歳まで 全血3ml
- ② 1歳から6歳まで 全血5ml
- ③ 6歳以上 全血10ml

3. 交叉反応性の測定方法

IgE 競合試験は、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（競合試験）で測定した。



4. 患者さんへの説明・同意

①患者さんへの説明

食物アレルギーを有する患者さんに、説明文書と口頭で説明をおこなう。

- 協力の任意性
- 研究の目的・必要性
- 検査項目
- 採血量
- 保険外検査の検査費用の負担の無いこと
- 結果を説明すること
- 検査結果は、統計的に処理され個人情報保護されていること

- 結果を厚生労働科学研究の報告書に報告すること、および関係学会等で公開すること

②同意取得

同意書を作成し、電子カルテとして病院で保存する。

③結果の説明

個人の検査結果を、患者さんが外来受診時に報告する。一部の検査は、時間がかかることを了解してもらう（年度内に報告予定）。

（倫理面への配慮）

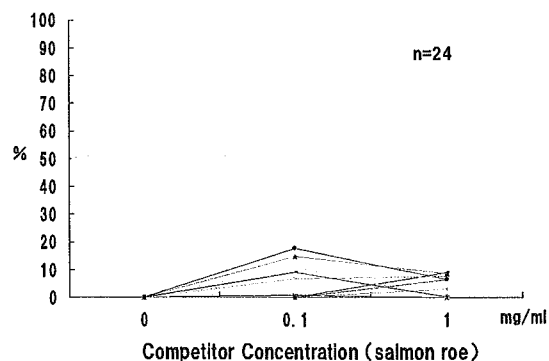
患者からの血清提供に関して、説明書、同意書を作成し国立成育医療センター倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) 鶏卵とイクラの交叉反応性

鶏卵陽性の24名について検討した。交叉反応性は認められなかった。

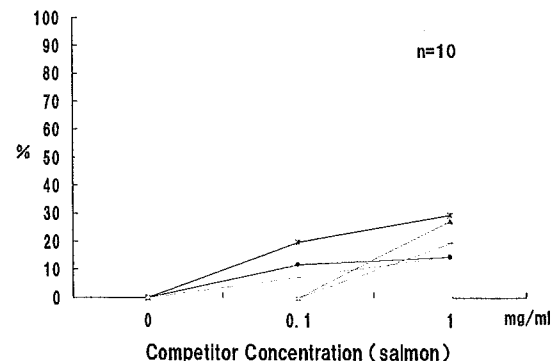
イクラによる鶏卵白IgE抗体阻止率



(2) イクラとサケの交叉反応性

イクラ IgE 抗体陽性 10 名について検討した。10% 交叉反応が 50% に認められた。

サケによるイクラIgE抗体阻止率

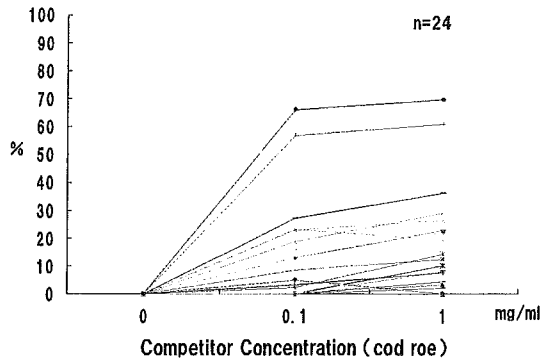


(3) イクラとタラコの交叉反応性

イクラ IgE 抗体陽性 24 名について検討した。

10%交叉反応が63%に認められた。

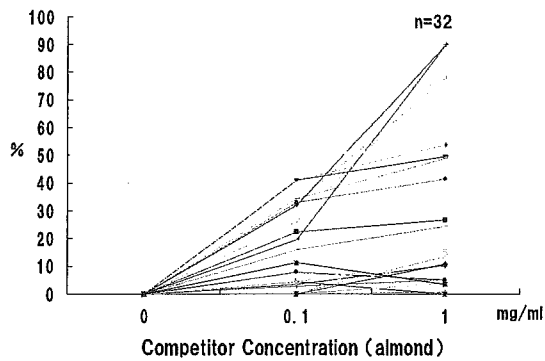
タラコによるイクラIgE抗体阻止率



(4) ピーナツとアーモンドの交叉反応性

ピーナツ IgE 抗体陽性 32 名について検討した。
10% 交叉が 59%、40% 交叉が 25% に認められた。

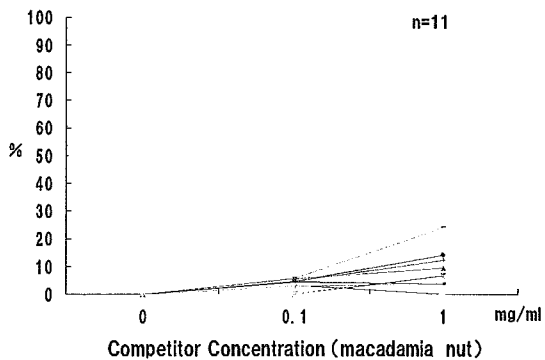
アーモンドによるピーナツIgE抗体阻止率



(5) ピーナツとマカデミアの交叉反応性

ピーナツ IgE 抗体陽性 11 名について検討した。
10% 交叉が 27%、20% 交叉が 9% に認められた。

マカデミアナッツによるピーナツIgE抗体阻止率



D. 考察

鶏卵・イクラ間に交叉反応性は認めず、種を超えての交叉反応性の可能性はなかった。一般的には、鶏卵アレルギーがあると、同じ卵であるという理由からしばしば魚卵も制限している

場合がある。この結果を踏まえ、鶏卵に対しアレルギーのある患者にそれだけでイクラを制限することの必要性はないと考えられる。

魚卵と魚肉の交叉反応性に関しては、サケとイクラで検討したところ、交叉性が 10% 程度示す人が 50% であった。10% の交叉反応性がどれだけ症状を誘発するかは今回の調査ではわからない。魚肉と魚卵間とは異なり魚卵間の検討では、イクラとタラコでは比較的高い交叉反応性が観察された。約半数で 10% 以上の交叉反応性があるので、症状がでる可能性があると考えられる。

ナッツ類では、ピーナツとアーモンドで 40% 以上の交叉反応が 25% に認められるという結果であり、注意が必要であろう。ピーナツとマカデミアナッツは、10% 以上の交叉反応が 27% に認められているので高くはないが注意は必要であろう。

E. 結論

これまで一般的に言われていたように、魚卵間、ナッツ類では、比較的高い交叉反応性があることが IgE 抗体レベルで証明された。実際の症状の出現性に関しては今後更に検討の必要があるが、交叉反応があるので注意喚起は必要であると考え

F. 健康危険情報

特定原材料表示をしている 20 品目の食品中に他の食品との交叉反応性を示す食品があるので注意を喚起する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 赤澤 晃、田中和子：食物アレルギーにおける食物抗原の交叉反応性の意義. アレルギーの臨床 24(7)：526-530, 2004.
- 2) 赤澤 晃、神谷太郎：食物アレルギー 食物抗原の交叉抗原性. 小児科診療 67(7)：1071-1074, 2004.
- 3) 赤澤 晃：ラテックス・フルーツ症候群. 日本内科学会雑誌 93(10)：2149-2152, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし