

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) を対象として検討した。

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、発生しうる副反応など説明した後、同意書を文書で得た。

3. 血清総 IgE 値

4. 特異的 IgE 抗体価; 卵白、OM、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 (ファルマシア) で測定。

5. 特異的 IgA、IgG、IgG4; 卵白抗原を用いた ELISA 法で測定。

6. 負荷試験点数を「陽性点数×症状点数」の計算式で求めた。なお、陽性点数は「鶏卵 1 個分量÷負荷試験が陽性となった最終負荷抗原量」で求め、症状点数は Bock らの方法に準じて計算した。

7. 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) を用いた重層法で単核球を分離採集した。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 $100 \mu\text{l}$ と細胞浮遊液 $100 \mu\text{l}$ 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 OM を最終抗原濃度として 10、100、1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し、 37°C 、 CO_2 培養器で 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 0°C で保存した。

DNA マイクロアレイや Real time PCR 用には約 16 時間培養した。

8. サイトカインの測定

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

9. 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 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。

10. 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。

11. 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、 ΔCt 値を求めて、刺激後の遺伝子発現を定量した。

12. 統計検討

培養上清中の IL-4、IFN- 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。

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-timePCR 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. 加熱脱 OM 卵白による経口免疫療法で経口負荷試験の結果は、凍結乾燥卵白陽性群は 23 例中 12 例 (52.1%)、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、32 例中 17 例 (53.1%) で陰性化したことになる。しかも、負荷試験点数でみると非陰性化群でも有意に ($p=0.045$) 低下 (改善) していた。

連日摂取前後で測定した種々のパラメーターをみると、血清総 IgE 値、特異的 IgE 抗体価 (卵白、OM、ヤケヒョウヒダニ、牛乳、小麦) は有意な変動を示さなかった。卵白特異的 IgA、IgG も有意な変化はみられなかった。一方、卵白特異的 IgG4 は非陰性化群 (負荷前; mean=12.3、m-SD=9.79、m+SD=14.8、負荷後 mean=12.3、m-SD=9.76、m+SD=14.8; $p>0.05$) では変動はみられなかったが、陰性化群 (負荷前; mean=12.1、m-SD=9.51、

m+SD=14.8、負荷後 m=12.6、m-SD=10.2、m+SD=15.0；p=0.044)だけが、連日摂取後、有意に上昇した。

陰性化群と非陰性化群と間で背景因子を検討した結果、①年齢では差がみられなかった、②連日摂取前の経口負荷試験の症状点数には差がなかった、③負荷試験が陽性となる最終抗原量が陰性化群は非陰性化群と比べると有意に高値(P=0.041)であった、④2週間で陰性化しなかった1例に2週間、4週間で陰性化しなかった2例に8週間追加摂取した結果、陰性化した。

2. 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±SD=0.63±0.44)が非陰性化群(M±SD 1.46±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。

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。

3. 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。

4. 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。

D. 考察

加熱脱OM卵白含有クッキーの連日摂取によって、経口負荷試験が陰性化する率は約50%であった。卵白特異的抗体の中ではIgG4抗体の有意な上昇が陰性化群で観察された。陰性化の背景因子としては連日投与前に行った経口負荷試験が陽性となる最終抗原量が陰性化群で有意に高値であったことから、寛解に近づいている患者の方が陰性化しやすいことが示唆された。

非陰性化群でも連日摂取後に負荷試験点数が有意に低下(改善)したことから、陰性化は達成できなくても寛解に近づけられることが示唆され、これらの症例でもさらに摂取期間を延長すれば陰性化が可能であることが推測された。

これは、2週間あるいは4週間では陰性化できなかった症例でも、摂取期間を延長することによって陰性化できた3症例によって支持された。

加熱脱OM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IFN- γ も産生能が低下する傾向があることが判明した。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。加熱脱OM卵白による免疫療法ではIgG4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 を産生する制御性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。

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る。

E. 結論

寛解に近い症例ほど陰性化しやすく、また、2

～4週間連日摂取によって陰性化できない症例でも、摂取期間を延長することによって寛解誘導が可能であることが示唆された。

加熱脱 OM 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を抑制する機序の存在が示唆された。

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, 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.
- 2) 徳田玲子、藪田憲治、各務美智子、松山温子、宇理須厚雄、河村牧子、川口博史、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵；加熱脱オボムコイド卵白を用いた寛解導入の試み、日小児アレルギー会誌、18, 1, 75-79, 2004.
- 3) 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, 761-767, 2004.
- 4) 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.
- 5) 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 International. 54:317-323, 2005.

2. 学会発表

- 1) 河村牧子、川口博史、各務美智子、近藤康人、柘植郁哉、徳田玲子、宇理須厚雄、山田一恵；鶏卵アレルギー児における ovomucoid 刺激による末梢血単核球の IL-4, IL-13, IFN- γ 産生能の意義、第 15 回、日本アレルギー学会春季臨床集会、平成 15 年、5 月。
- 2) 徳田玲子、藪田憲治、松山温子、各務美智子、宇理須寛恭、河村牧子、川口博史、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、木村 守、食物アレルギーの発

症機序からみた現在の治療；加熱脱オボムコイド卵白を用いた寛解導入の試み、第 40 回、日本小児アレルギー学会、岐阜、平成 15、10 月。

- 3) 徳田玲子、藪田憲治、河村牧子、川口博史、松山温子、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；加熱脱オボムコイド卵白を用いた寛解導入の試み、第 53 回、日本アレルギー学会総会、岐阜、平成 15 年、10 月。
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 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-22 日
- 10) 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ギー特異的 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

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名とも寛解に至った。免疫寛容誘導に調節性 T 細胞の関与が推測された。牛乳アレルギーを対象にしてβ-ラクトグロブリン(BLG) 特異的 T 細胞クローンを樹立し、T 細胞エピトープ p102-112(YLLFCMENSAE)を同定した。B 細胞エピトープの評価に inhibition ELISA を確立した。この情報をもとに、B 細胞エピトープが破壊され T 細胞エピトープが残存している BLG ペプチドを調整した。このペプチドは 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 細胞レ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。今後、臨床応用を行うとともに、投与前後の免疫能を詳細に検討し寛容誘導について検討する予定である。

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、免疫誘導可能なペプチドを探索し、ペプチド抗原エピトープを修飾した牛乳ペプチドを作製、in vitro, in vivo での反応を検討した。

B. 研究方法

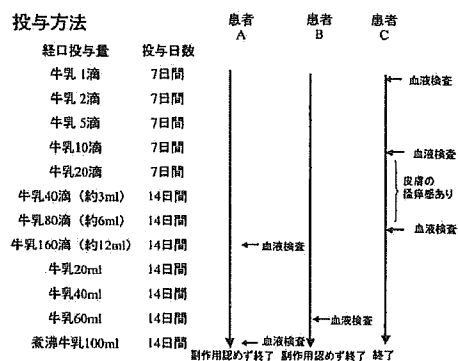
牛乳アレルギー患者3名に1滴から牛乳を開始し、約4ヶ月かけて100mlまで徐々に増量した。減感作開始前後で、サイトカインの産生、CD4、CD25 陽性細胞等について検討した。牛乳アレルギー患者からβ-ラクトグロブリン(BLG)に反応するT細胞クローンを樹立しT細胞エピトープを解析した。さらに、患者血清を用いた免疫ブロットまたは inhibition ELISA 法にてB細胞エピトープの解析を、またリンパ球刺激試験にてT細胞エピトープの評価を行った。

(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。

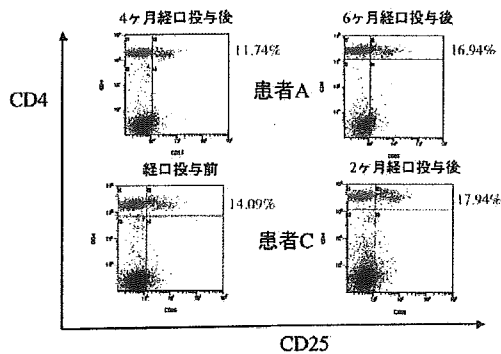
C. 研究結果

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い、3名とも最終的100mlの牛乳摂取が可能になった(図1)。



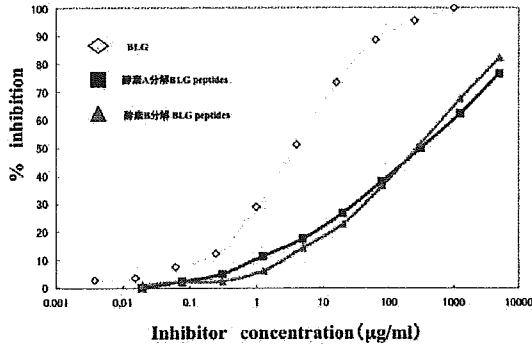
(図1) 経口減感作のプロトコール

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

細胞増殖反応を検討した結果、BLG 特異的 T 細胞クローンのコア配列は p102-112 (YLLFCMENS AE) であった。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。調整したペプチドは牛乳アレルギー患者血清を用いた IgE ドットプロット法、inhibition ELISA 法にて B 細胞エпитープが減弱していることを確認した。(図 3)



(図 3) inhibition ELISA

またリンパ球刺激試験により T 細胞エпитープが残存しているペプチドを探索したところ、該当するペプチド候補が見つかった。現在、臨床応用にむけて、ペプチドの大量調整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пит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питープを保存したまま、B 細胞エпитープを破壊した BLG 分解物を調整した。この抗原エпит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) 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. 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.
- 6) Fukao T, Fukutomi O, Hirayama K, Teramoto T,

- Kaneko H, Kondo M, Matsui E, Kondo N.
Questionnaire-based study on the relationship
between pet-keeping and allergic diseases in
young children in Japan. *Allergol Int*. 2005; 54:
521-526
- 7) Kaneko H, Kawamoto N, Asano T, Mabuchi Y,
Horikosi H, Teramoto T, JIN-RONG, Matsui E, Kondo
M, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Leaky phenotype
of X-linked agammaglobulinaemia in a Japanese
family. *Clin Exp Immunol*. 2005;140:520-523.
- 8) Tatebayasi K, Matsui E, Kaneko H, Fukao T,
Kasahara K, Kondo N. IL-12B promoter polymorphism
associated with asthma and IL-12B
transcriptional activity. *Allergology
International*. 2005; 54: 345-349.
- 9) Yoshikawa K, Matsui E, Kaneko H, Fukao T,
Inoue R, Teramoto T, Shinoda S, Fukutomi O,
Aoki M, Kasahara K, Kondo N. A novel
single-nucleotide substitution, Glu 4 Lys, in the
leukotriene C4 synthase gene associated with
allergic diseases. *Int J Mol Med*. 2005; 16:
827-831.
- 10) Kondo M, Fukao T, Teramoto T, Kaneko H, Takahashi
Y, Okamoto H, Kondo N. A common variable
immunodeficient patient who developed acute
disseminated encephalomyelitis followed by the
Lennox-Gastaut syndrome. *Pediatr Allergy
Immunol*. 2005;16:357-360.
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) Kaneko H, Matsui E, Aoki M, Kawamoto N, Asano
T, Kondo N: Fellow-in-Training1-2: Immine
responses to viral infections and allergy.
APAPARI KAPARD Joint Congress 2005 (2005 年 4
月 7 日, 韓国)
- 3) Kawamoto N, Kondo N, Kasahara K, Takemura M,
Kaneko H: Free Paper2-1: Age related changes in
intercellular cytokine production of T cell.
APAPARI KAPARD Joint Congress 2005 (2005 年 4
月 8 日, 韓国)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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
総合同学術大会 (第 30 回) (2005 年 7 月 16 日,
横浜)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 近藤直実: 特別講演 1: 座長: 目で見る小児皮
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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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: 食物アレルゲンの抗原認
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 —食品低アレルゲン化法の開発による食物アレルギー治療—

分担研究者 大嶋 勇成 福井大学医学部付属病院小児科講師

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対する経口トレランス誘導法を検討するため、トランスジェニックマウスを用いて抗原特異的 IgE 存在下での経口トレランス誘導の可能性を検証した。その結果、抗原特異的 IgE の存在下でも抗原の反復経口投与によりクローン除去に加え、TGF- β 産生細胞が関与した T 細胞のトレランスを誘導出来た。さらに、OVA 感作を行った場合、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、下痢症状は軽く、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。OVA 感作を行った野生型マウスの CD8 陽性 T 細胞の輸注により 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の変化が関与していると考えられた。抗原感作成立後でも 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形の低アレルゲン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。このアウトグロウの機序として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。

そこで、抗原特異的 IgE や抗原特異的 Th2 細胞が存在する状況で、経口トレランスを誘導しようとす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

1) 食物アレルギー患者で認められる様に抗原特異的 IgE 産生が持続する状況下での、抗原特異的

T 細胞の挙動を解析するため、OVA 特異的 IgE 産生トランスジェニックマウス (東京医科歯科大学 烏山一先生より供与) と OVA 特異的 TCR のトランスジェニックマウスを交配させ、OVA 特異的 IgE と OVA 特異的 TCR のダブルトランスジェニックマウス (OVA-TCR/IgE-Tg) と OVA 特異的 IgE に関しては野生型で OVA 特異的 TCR がトランスジェニックであるマウス (OVA-TCR-Tg) を用意した。Marth T ら (Eur J Immunol 2000) の方法に準じ 250 mg の OVA または 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た。分離した細胞の表面マーカーを測定し、*in vitro* で OVA による再刺激を行い、細胞増殖、サイトカインを測定した。

2) 次に抗原特異的 Th2 細胞が存在し、即時型症状の発症機序が IgE 依存性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、野生型マウスと OVA-TCR-tg に OVA をアラムと共に腹腔免疫した後、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 マウスと野生型マウスに誘発される症状の差が OVA-TCR-tg マウスで欠損している CD8 陽性 T 細胞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 細胞を分離し、OVA-TCR-tg マウスに輸注した。輸注 24 時間後から、OVA 経口投与を開始し、症状の変化を

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

1) OVA の経口投与により、TCR/IgE-Tg 群、TCR-Tg 群の両群とも脾細胞の OVA 特異的 T 細胞の割合の減少が認められた。また、脾細胞の OVA 再刺激による細胞増殖や、IL-4、IFN- γ 産生は OVA の経口投与により低下していたが、TGF- β 産生は逆に両群で増強していた。一方、IL-10 産生に関しては、PBS 投与では TCR/IgE-Tg 群が TCR-Tg 群より高値を示し、OVA の経口投与により TCR/IgE-Tg 群では IL-10 産生が低下したのに対し、TCR-Tg 群では逆に増強していた。in vitro での OVA 再刺激時に抗 IL-10 中和抗体を加えると、PBS 投与の OVA-TCR/IgE-Tg 群の細胞増殖は増強したが、PBS 投与の OVA-IgE-Tg 群および OVA 経口投与後の OVA-TCR/IgE-Tg 群と OVA-IgE-Tg 群の両群では細胞増殖に変化を認めなかった。一方、抗 TGF- β 中和抗体の存在下での OVA 再刺激では OVA 経口投与をした両群で細胞増殖の増強を認めた。

2) OVA 感作を行った後には OVA-TCR-tg マウスでは野生型に比べ OVA 特異的 IgE が高値を示したが、OVA 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なのに対し、野生型マウスは激しい下痢症状に加えアナフィラキシーを呈した。OVA 感作野生型マウスから分離した CD8 陽性 T 細胞を OVA-TCR-tg マウスに輸注した場合、OVA-TCR-tg マウスの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

抗原特異的 IgE の存在下においても抗原の経口大量投与を反復することにより脾細胞のトレランスが誘導されると考えられた。また、この際の経口トレランスの成立には一部クローン除去が関与すると共に、TGF- β 産生細胞の誘導が関与していると考えられた。また、今回の実験系では IL-10 は OVA-TCR/IgE-Tg 群の細胞増殖において内因性の細胞増殖抑制因子として作用していることが示唆されたが、IL-10 の産生自体は経口トレランスの成立には重要とは考えられなかった。

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では、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と考えられた。また、OVA 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 CD8T 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

食物抗原特異的 IgE 抗体が陽性の食物アレルギー患者においても、抗原の経口大量投与が可能であれば経口トレランスを誘導することが出来ると考えられた。また、経口トレランスの誘導にはクローン除去と TGF- β 産生細胞の誘導が重要と考えられた。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ギー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) Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, et al. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 72: 2509-2516 (2003)
- 2) Higa S, Hirano T, Mayumi M, Hiraoka M, Ohshima Y, et al. Association between interleukin-18 gene polymorphism 105A/C and asthma. *Clin Exp Allergy* 33:1097-1102 (2003)
- 3) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi M, Mayumi M. The role of dendritic cells in Th1/Th2 balance: A novel therapeutic target of allergic diseases. *Allergology Int* 53:219-226(2004)
- 4) Jian MZ, Tsukahara H, Ohshima Y, et al. Effects of antioxidant and nitric oxide on chemokine production on TNF- α -induced adhesion molecule expression and NF- κ B activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Sci* 75:1159-1170 (2004)
- 5) 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 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 115:822-827 (2005)
- 6) 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)
- 7) Todoroki Y, Tsukahara H, Ohshima Y, et al. Concentrations of thioredoxin, a redox-regulating protein, in umbilical cord blood and breast milk *Free Radic Res* 39:291-7 (2005)
- 8) Jiang MZ, Tsukahara H, Hayakawa K, Todoroki Y,

Tamura S, Ohshima Y, et al. Effects of antioxidant and NO on TNF- α -induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Respir Med* 99:580-591 (2005)

2. 学会発表

- 1) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi M, Mayumi M. MCP-1 selectively inhibits the acquisition of CD40L-dependent IL-12 producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. 2003 Keystone symposia : Dendritic cells: Interfaces with immunobiology and medicine. 2003 March 3-8, 2003 Keystone, CO
- 2) Omata N, Yasutomi M, Ohshima Y, Mayumi M. MCP-1 selectively inhibits the acquisition of CD40L-dependent IL-12 producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. 2003 American Association of Immunologist meeting. 2003 May 6-10, 2003 Denver CO
- 3) Ohshima Y. Roles of dendritic cells in allergic inflammation; new therapeutic target for bronchial asthma. 1st Japan-China-Korea Pediatric Forum. February 4-6, 2004 Tokyo
- 4) Omata N, Ohshima Y, Yasutomi N, Yamada A, Karasuyama H, Mayumi M. Antigen-specific IgE modulates antigen-specific T cell response after repetitive oral antigen administration: induction of oral tolerance in IgE-transgenic mice. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology October 4-7, 2004, Tokyo
- 5) Yasutomi M, Ohshima Y, Omata N, Yamada A, Mayumi M. Erythromycin differentially inhibits LPS-, or poly (I:C)-induced but not peptidoglycan-induced activation of human monocyte-derived dendritic cells. 12th International Congress of Immunology and 4th annual conference of FOCIS 2004 July 18-22, 2004, Montreal, Canada
- 6) Baba N, Nakajima T, Kashiwakura H, Hieshima K, Ohshima Y, Shimzu H, Yoshie O, Saito H. Induction of liver and activation-regulated chemokine/CCL20 by activated human CD4+ T lymphocytes. 12th International Congress of Immunology and 4th annual conference of FOCIS 2004 July 18-22, 2004, Montreal, Canada
- 7) 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.

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 小児科医長
研究協力者 田辺 創一 広島大学生物圏科学研究科
橘田 和美 食品総合研究所食品衛生対策チーム
伊藤 典之 オーム乳業株式会社商品開発チーム
中村 洋 国際農林水産業研究センター 主任研究官

研究要旨

牛肉および小麦による誘発症状とペプチドおよび主要蛋白との関連について蛋白解析、特異 IgE 抗体測定を行い、過敏性持続と耐性化に関わる蛋白アレルゲンを検討した。牛肉で BSA バンドの強度増加と 28 kDa、15 kDa 蛋白を検出した。BSA アミノ酸合成ペプチドとの結合試験、阻害試験から、338-341 ペプチド EYAV が主な B 細胞エピトープと考えられた。小麦では、酵素分解アレルゲン低減化小麦負荷試験による過敏性群で特異 IgE 抗体の高値持続、小麦グリアジン I g E 抗体陽性がみられ、後者は耐性化判断に有用であった。小麦アレルゲン蛋白は 40kd に多くのバンドがあり 15kd にもみられた。

A. 研究目的

アナフィラキシー誘発食品によっては、食品加熱処理などによるアレルゲン性の減弱のみられるもの、小麦のように減弱しないものがある。食物アレルゲンにはアナフィラキシー耐性化に影響するアレルゲンペプチド、エピトープがあるとされる。本研究では食物アレルギーの耐性化に関与する食品のアレルゲン性を明らかにするために、加熱および酵素分解食品による食物アレルギーの誘発・非誘発例の臨床背景、IgE 結合性の差異、耐性化機序の検討を牛肉と小麦について行った。

B. 研究方法

1) 平成 15 年度：食肉の中でもアレルギー誘発率が高い牛肉アレルギー児における、アレルゲン性の牛肉加熱によるプリックテストの影響、血清 IgE 抗体反応性とアレルゲン蛋白解析を行った。
2) 平成 16～17 年度：小麦は加熱などによる抗原性の低下がみられないため、酵素分解によるアレルゲン低減化小麦蛋白を材料とするペプチパウンドケーキ HAWC（オーム乳業）による経口負荷試験を行い、過敏性を判断、陰性例にうどん負荷までの定期的な負荷を行った。早期耐性化例と非耐性化例尾臨床背景、小麦 IgE 抗体の推移、 ω -5 グリアジン、ペプチド A、BIgE 抗体との関連を検討した。患者血清を用い低アレルゲン小麦および国内産主要品種のホクシンを用いたアレルゲン蛋白解析を行った。小麦アレルギー患者血清

(RAST スコア 3～5)を用い、イムノブロッティングを行い患者血清中の IgE が認識するタンパク質を化学発光法 (ECLplus) により検出した。検出されたタンパク質について分子量 (MW)、等電点 (pI) を 2 次元電気泳動像解析ソフトにより算出した。また低アレルゲン小麦に残存する小麦蛋白の解析も行った。

C. 研究結果

1) 平成 15 年度：牛肉のプリックテストはトリイエキスで全例強陽性を示し、加圧エキスでも同様の強陽性であった。加熱エキスでは、全体に非加熱エキスより膨疹径が減弱していたが、陰性化した例は 3 例であり、牛肉による誘発症状のある例ではプリック反応の陰性化がみられず、BSA 以外に熱耐性のアレルゲンがあると考えられた。イムノプロットによる牛肉蛋白に対する反応ではアレルギー児の有症状例で牛肉 BSA バンドの強度の増加がみられ、BSA バンド以外に 28 kDa、15 kDa の蛋白バンドがみられた。IgE イムノプロットでの血清 BSA 反応の強い血清を用いた、BSA アミノ酸合成ペプチドとの結合試験から、338-341 ペプチド EYAV がほとんどの症例で IgE 結合性を有しており、B 細胞エピトープと考えられた。
2) 平成 16～17 年度：低アレルゲン小麦による負荷試験の陽性、陰性群の臨床所見では、平均月齢、IgE 値、多種食物アレルギーでは差がみられなかったが、陽性群で小麦特異 IgE 抗体値が高く、

喘息合併が多い傾向がみられた。負荷試験陰性群はさらに6ヵ月～1年後の再度のうどん負荷により、うどん負荷試験陽性例も6ヵ月～2年で陰性化し、3歳以下では100%うどん負荷試験陰性となった。再負荷でも陽性の5例は、2～3年以降も負荷陽性で耐性化が見られておらず、小麦IgE抗体もCAP4～6が続いており、経年的な低下がみられなかった。小麦アナフィラキシー、喘鳴例では、 ω -5-グリアジンIgE抗体が高く、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。

小麦アレルギー児9例における小麦蛋白の解析では、血清と反応性のあるタンパク質は主としてMW40kDa、pI8付近を中心とする一群のタンパク質とMW15kDa、pI7付近を中心とするタンパク質であった。小麦アレルギーの完全耐性化、非耐性例の経過中のアレゲン蛋白反応に差異はあきらかでなかった。低アレ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(24)のアミノ酸配列(aa6-15)と一致した。

D. 考案

食物アレルギーでは完全除去よりも少量のアレゲン食品を摂取することにより耐性化が促進することが期待されている。しかし小麦によるアナフィラキシーは、症状の重症例ほど負荷試験の施行が困難であり、長期間の除去になることが多いアレゲン低減化食品を用いた負荷試験は過敏性の確認に有用であり、これらの食品の摂取により耐性化が早まることが期待される。一方、低アレゲン小麦に過敏性を示し耐性化が困難な例が存在しこれらの症例は小麦IgE抗体高値が持続し、小麦ペプチド、 ω -5グリアジンIgEが高く、微量の小麦でアナフィラキシーを起こしやすい群であると判断された。耐性化により ω -5グリアジンIgEが低下したことは、予後評価に有用と思われた。

E. 結語

小麦アナフィラキシーにおける耐性化の確認にHAWCによる負荷試験と経過中の特異IgE抗体値の検査は有用である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 柴田瑠美子：コントロールしにくい極めて頻度の多い食物アレルギー 小麦アレルギーアレルギー・免疫 10：33-37, 2003.
- 2) 柴田瑠美子：食物アレゲン 総合臨床 52：500-506, 2003.
- 3) Hamada Y, Nagashima Y, shiomi K, Shimojyo N, Kohno Y, Shibata R, Nishima S, Ohsuna H, Ikezawa Z: Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. *Allergol International* 52:139-147, 2003.
- 4) 柴田瑠美子 アレルギーの考え方と栄養指導 助産雑誌 58：118-124, 2004.
- 5) 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.
- 6) 柴田瑠美子 アナフィラキシー型食物アレルギー 臨床麻酔 28：1545-1550, 2004.
- 7) 柴田瑠美子、宇理須厚雄、有田昌彦 他. 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 18：217-219, 2004.
- 8) 柴田瑠美子 アトピー性皮膚炎と食物アレルギー アレルギー科 17：542-548, 2004.
- 9) 柴田瑠美子 アレルギーの考え方と栄養指導 助産雑誌 58：118-124, 2004.
- 10) 柴田瑠美子 アナフィラキシーへの対応 食物アレルギー研究会会誌 4：33-37, 2004
- 11) 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. 学会発表

- 1) Shibata R, Nishima S ; Measurement of serum specific IgE antibodies to fish and mollusks in children with seafood allergy. J Allergy Clin Immunol 116:s316-317, 2004 AAAAI 2004, 3.19-24(San Francisco)
- 2) Takahata Y, Kamiya K, Mastumoto T, Sato T, Shibata R, Morimatu F; Development of rapid and simple diagnostic kit for food allergens by immunochromatography. J Allergy Clin Immunol 113:s237, 2004. AAAAI 2004, 3.19-24(San Francisco)
- 3) 柴田瑠美子 アトピー性皮膚炎の治療と患者への指導：正しい食物アレルギーの指導 第 21 回日本難治喘息・アレルギー研究会 2004. 6.19-20、宇都宮.
- 4) 柴田瑠美子 食物アレルギーの解決されるべき課題：医療上の問題点（負荷試験、栄養指導等の保健適応、指示書等） 2004. 11.26-27、東京.
- 5) Shibata R, Tezuka J, Ide K, Odajima H. Utility of hypo-allergenic dairy products in the IgE-mediated cows milks allergy. APAPARI 2005 (Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory & Immunology) 2005 (Seoul, Korea)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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ギー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.

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及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
	小川 正	関西福祉科学大学
	佐伯 宏樹	北海道大学大学院水産科学研究科
	田辺 創一	広島大学生物生産学部)
	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
	高畑 能久	日本ハム株式会社中央研究所
	森松 文毅	日本ハム株式会社中央研究所

研究要旨

食肉：鶏肉の主要アレルギーとして chicken serum albumin を見出した。魚類：①マサバリコン（リコンビナントパルブアルブミン (PA)）は天然 PA と同等のアレルギー性を有すること、血合筋のアレルギー性は普通筋より弱いことを見出した。②ニジマスコラーゲン $\alpha 2$ 鎖の主要 IgE 結合エpiteope の絞込みに成功した。甲殻類：①甲殻類及び軟体動物のアレルギーは、トロポミオシン (TM) であることが判明した。②甲殻類 TM 特異的抗体の作製に成功した。③甲殻類アレルギー患者の一部はアルギニンキナーゼの他に 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。貝類・軟体動物：メイラード反応が海産無脊椎動物 TM のアレルギー性に及ぼす影響が、生物種によって著しく異なる事が示された。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得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つの抗原を見出した。果物：①チェリー30kDa タンパク質を Thaumatin like protein (Pru a 2)、スイカ 60kDa タンパク質 (Cit 1 Bd 60K) をヒートショックプロテイン 60 (HSP60) と同定した。②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：加熱処理によりアレルギー性が変化し、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) 食肉：食肉アレルギー患者血清を用い、イムノブロッティングを行った。
- 2) 魚類：①マサバリコンリコンビナントパルブアルブミン (PA) と 6 種魚類から精製した PA との抗原交差性を魚類アレルギー患者血清を用いた阻害 ELISA で調べた。マサバの血合筋、マアジの普通筋・血合筋の PA をコードする cDNA を、クローニングした。②ニジマスコラーゲン $\alpha 2$ 鎖の cDNA 配列を元に、成熟領域をカバーする 5 種類のオーバーラップタンパク質 (P1-P5) を大腸菌で発現し、IgE 結合能をイムノブロッティングで評価した。
- 3) 甲殻類：①甲殻類のフジツボ類 2 種、オキアミ類 2 種、エビ類 5 種、カニ類 7 種、軟体動物の多板類 1 種、巻貝 2 種、二枚貝 4 種の筋肉から加熱抽出液を調製し、ELISA に供して IgE 反応性を調

- べた。更に、甲殻類 10 種、軟体動物 5 種の加熱抽出液については、患者血清を用いたイムノブロッティングによりアレルギーを検索した。②アメリカンロブスターの尾肉から部分精製したトロポミオシン (TM) を BALB/c マウスに免疫し、常法によりモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体と各種甲殻類および軟体動物 TM との反応性はイムノブロッティングにより調べた。③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% 硫酸飽和分画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。
- 4) 寄生虫：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。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。
- 5) 貝類・軟体動物：スルメイカの体側筋及びホタテガイ貝柱から TM を精製し、還元性単糖類と

混合することでメイラード反応を進行させた。TMのアレルゲン性に及ぼすメイラード反応の影響を、貝およびイカアレルギー患者の血清を用いたイムブロットティングと競争ELISAにより判断した。更に、ペプシン消化しアレルゲン性変化を調べた。

6) 豆乳：アレルギー患者血清を収集した。

7) ふきのとう：アレルギー患者血清を収集した。抗原同定には主にイムブロットティング法を用いた。

8) 果物：①スイカ、チェリー、バナナに対してアレルギー反応を示す患者血清を用いて、チェリー、スイカ、バナナ中に含まれるアレルゲンの検索・同定を試みた。②果実の病害虫被害によるアレルゲン性変化を評価するため、リンゴにすず斑病菌を接種し、アレルゲンタンパク質の変動をイムブロットティング法を用いて解析した。

9) 大豆：種々の食餌成分とダイズアレルゲンタンパク質を同時にマウスに摂取することで、アレルゲン性発現に影響を及ぼす食餌成分について検討した。マウス血中の未消化アレルゲンの検出・定量にはサンドイッチELISA法を用いた。

10) ピーナッツ：主要アレルゲン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。

11) そば：加熱処理によるアレルゲン性変化を検討する為、そば加熱抽出液、非加熱抽出液を調製し、患者血清にてイムブロットティングを行い、IgE抗体により認識されるアレルゲン候補物質の変化を検討した。また、加熱後のペプシン消化性についても検討した。

C. 研究結果

1) 食肉：イムブロットティングの結果、CSA (chicken serum albumin)、GAPDH、FBPAなど数本のバンドが確認された。

2) 魚類：①マサバリコンビナントPAと各種魚類PAは抗原交差性を示し、阻害効果はマサバ天然PAと同等であった。cDNAクローニングの結果、マサバ及びマアジの血合筋に含まれるPAは普通筋のPAと同一で、血合筋のPA含量は普通筋に比し著しく低かった。②大腸菌で発現した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。イムブロットティングにより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。

3) 甲殻類：①調べた甲殻類・軟体動物は、種類により強弱はあるが全て甲殻類アレルギー患者の血清IgEと陽性反応を示した。また一部をイム

ブロットティングに供したが、共通して35-40 kDa付近のタンパク質(TM)に陽性反応が認められた。②アメリカンロブスターの速筋TMに対するモノクローナル抗体を作製できた。反応性の強い2種類のモノクローナル抗体(2A7H6および5G5E1)のうち、2A7H6抗体は甲殻類及び軟体動物のTMと反応したが、5G5E1抗体は甲殻類TMに特異的であった。③ブラックタイガー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、イムブロット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。

4) 寄生虫：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。

5) 貝類・軟体動物：ホタテガイTMの患者血清中特異IgEに対する反応性はグルコース、リボースのいずれの糖と反応させた場合でも高いことが示された。一方、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た。またスルメイカTMをペプシン消化後、そのアレルゲン性変化をネイティブTMと比較した結果、同程度の消化時間ではメイラード反応後のTM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、メイラード反応後のTM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。

6) 豆乳：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。

7) 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。

8) 果物：①各果物タンパク抽出液をイムブロットで解析した結果、チェリーでは、患者血清が30kDa付近のタンパク質を特異的に認識した。このタンパク質をシークエンスした結果、N末配列

はチェリーの Thaumatin like protein と完全に一致した。スイカでは、患者血清が複数のタンパク質バンドを特異的に認識した。その中で特に結合が強かった、60kDa のタンパク質を精製・同定したところ、カボチャなどの HSP60 と高い相同性を示した。また、チェリー、メロンにおいて 30kDa 付近のアレルゲンの交差反応性を確認した。②リンゴにすす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。

9) 大豆：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。

10) ピーナッツ：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。

11) そば：加熱処理により SDS-PAGE でのバンドパターンに大きな変化が認められた。また、患者血清を用いたイムブロット解析においても、非加熱・加熱処理抽出液では異なる蛋白質バンドを認識したことから、加熱処理で患者血清により認識されるアレルゲンが変化することが示唆された。また、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) 食肉：CSA は鶏肉の主要アレルゲンであることが明らかとなった。

2) 魚類：①マサバリコンビナント PA は天然 PA と同等の IgE 反応性を示すと考えられた。血合筋と普通筋の PA は同一であること、血合筋の PA 含量は普通筋より低いことから、血合筋のアレルゲン性は普通筋より弱いと判断された。②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、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。

3) 甲殻類：①甲殻類・軟体動物は種によらずアレルゲン性を示し、主要アレルゲンは TM と考えられた。②5G5E1 抗体は甲殻類 TM を特異的に認識すると判断された。③各種無脊椎動物のアレルギーニキナーゼの 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レルギーニ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。

4) 寄生虫：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 結合能を保持していると考えられた。

5) 貝類・軟体動物：メイラード反応の進行によりホタテガイ TM のアレルゲン性が増大する可能性が示唆された。一方で、スルメイカ TM のアレルゲン性は軽減する可能性が示唆された。

6) 豆乳：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ブーム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。

7) ふきのとう：今後抗原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。

8) 果物：①チェリーの 30kDa の分子量のタンパク質 (Thaumatin like protein) は、PR-5 に属するチェリーアレルゲン Pru a 2 としてすでに報告されていた。スイカの 60kDa の分子量のタンパク質 (Cit l Bd 60K) は、様々な HSP60 と高い相同性を示したことから、スイカの HSP60 であると考えられた。また、チェリーとメロンの 30kDa 付近のタンパク質は交差性があることが確認された。チェリーの 30kDa タンパク質は PR-5 であることから、メロンの 30kDa タンパク質はメロンの PR-5 である可能性が示唆された。②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。

9) 大豆：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。

10) 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。

11) そばアレルゲンは加熱処理により変化することが示唆された。現在、精製及び同定を進めている。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) 食肉：鶏肉主要アレルゲンとして CSA を見出した。

2) 魚類：①マサバリコンビナント PA は魚類アレルギーの診断・治療に応用可能である。魚類アレルギーの研究では、少なくとも PA に関しては普通筋のみを対象として進めて問題ない。②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。

3) 甲殻類：①甲殻類および軟体動物のアレルゲンは、欧米の患者だけでなく日本の患者においても TM である。②5G5E1 抗体は甲殻類 TM の特異的

検知法への応用が期待できる。③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も 20 kDa の新規アレルゲンを認識する。

4) 寄生虫：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。

5) 貝類・軟体動物：メイラード反応が海産無脊椎動物 TM のアレルゲン性に及ぼす影響が、生物種によって著しく異なる事が示された。

6) 豆乳：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。

7) 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。

8) 果物：①フルーツアレルギー患者血清を用いて、チェリーアレルゲン Pru a 2、スイカアレルゲン Cit 1 Bd 60K を同定した。チェリーとメロンの 30kDa 付近のタンパク質 (Thaumatococcus protein) の免疫交差性を確認した。②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。

9) 大豆：アレルゲン発症を抑制・亢進させる「食べ合わせ」が存在する可能性が示唆される。

10) ピーナッツ：Ara h1 の結晶を得た。

11) そば：加熱処理によりアレルゲンが変化することが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Hamada Y et al. *Food Chem Toxicol.* 41, 1149-1156 (2003)
- [2] Hamada Y et al. *Allergol Int.* 52, 139-147 (2003)
- [3] Weangsripanaval T et al. *Biosci Biotech Biochem.* 67, 1299-1304 (2003)
- [4] Shimakura K et al. *Mol Biochem Parasitol.* 135, 69-75 (2004)
- [5] Hamada Y et al. *Allergol Int.* 53, 271-278 (2004)
- [6] Hamada Y et al. *Fish Sci.* 70, 1137-1143 (2004)
- [7] Lu Y et al. *Hybridoma and Hybridomics.* 23, 357-361 (2004)
- [8] Akiyama H et al. *Biochemical J.* 302, 269-278 (2004)
- [9] Shimakura K et al. *Food Chem.* 91, 247-253 (2005)
- [10] Nakamura A et al. *J Agric Food Chem.* 53, 7559-7564 (2005)
- [11] Weangsripanaval T et al. *J Nutr.* 135, 1738-1744 (2005)
- [12] Moriyama T et al. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51, 34-39 (2005)
- [13] Iijima S et al. *J Environmental Dermatology.* 12, 184-191 (2005)
- [14] Akiyama H et al. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 318-324 (2005)
- [15] Akiyama H et al. *FEBS letters.* 579, 4485-4491 (2005)
- [16] Teshima R et al. *Allergology International.* 55, 43-48 (2006)
- [17] Kobayashi A et al. *Allergy.* 61, 357-363 (2006)
- [18] Lu Y et al. *Food Chem.* (in press)
- [19] Watanabe T et al. *J Food Biochemistry.* (in press)
- [20] Akiyama H et al. *Int Arch Allergy Immunol.* (in press)
- [21] Kitta K et al. *Anal Biochem.* (in press)
- [22] Motoyama K et al. *Food Chem Toxicol.* (in submission)
- [23] Matsuda R et al. *JAAC.* (in submission)
- [24] Yoshioka Y et al. *GUT.* (in submission)
- [25] Amano H et al. *Allergy.* (in submission)
- [26] 濱田友貴ら. *食物アレルギー研究会誌.*

- [27] 中尾朱美ら. *Japanese J Food Chem.* 11, 75-80 (2004)
- [28] 穂山浩ら. *小児科診.* 7, 43-49 (2004)
- [29] 塩見一雄ら. *食品と開発.* 40, 7-10 (2005)
- [30] 加賀谷早織ら. *日本ラテックスアレルギー研究会誌.* 9, 84-87 (2005)
- [31] 穂山浩ら. *免疫4食物アレルギー. 最新医学社.* 45-56 (2005)
- [32] 塩見一雄ら. *アレルギー・免疫* (印刷中)
- [33] 塩見一雄ら. *食品工業* (印刷中)

2. 学会発表

- [1] 田辺創一ら：日本農芸化学会 2003 年度大会 (横浜、2003 年 3 月)
- [2] 佐藤綾子ら：平成 15 年度日本水産学会 (東京、2003 年 4 月)
- [3] 濱田友貴ら：日本水産学会 (東京、2003 年 4 月)
- [4] 池田 薫ら：日本水産学会 (東京、2003 年 4 月)
- [5] 小林征洋ら：日本水産学会 (東京、2003 年 4 月)
- [6] 濱田友貴ら：第 53 回アレルギー学会総会 (岐阜、2003 年 10 月)
- [7] 中村 厚ら：日本水産学会 (東京、2003 年 4 月)
- [8] 高畑能久ら：第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (横浜、2003 年 5 月)
- [9] 柴田瑠美子ら：第 53 回日本アレルギー学会総会 (岐阜、2003 年 10 月)
- [10] Weangsripanaval T ら：第 42 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (大阪、2003 年 10 月)
- [11] 穂山 浩：食物アレルギー研究会 (東京、2004 年 1 月)
- [12] 嶋倉邦嘉ら：平成 16 年度日本水産学会大会 (2004 年)
- [13] 元山かん奈ら：平成 16 年度日本水産学会大会 (2004 年)
- [14] 佐藤綾子ら：第 6 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2004 年)
- [15] 小林征洋ら：第 54 回日本アレルギー学会総会 (2004 年)
- [16] 中村 厚ら：平成 16 年度日本水産学会春季大会 (2004 年)
- [17] 小川正ら：第 58 回日本栄養・食糧学会大会 (仙台、2004 年 5 月)
- [18] 小南優ら：第 43 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (滋賀、2004 年 10 月)
- [19] 元山かん奈ら：平成 17 年度日本水産学会大会 (2005 年 4 月、東京)
- [20] 須磨洋太ら：平成 17 年度日本水産学会大会 (2005 年 4 月、東京)
- [21] 金森真紀ら：平成 17 年度日本水産学会大会 (2005 年 4 月、東京)
- [22] 小林綾子ら：平成 17 年度日本水産学会大会 (2005 年 4 月、東京)
- [23] 小林征洋ら：第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2005 年 6 月、岡山)
- [24] 小林征洋ら：第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2005 年 10 月、盛岡)
- [25] 塩見一雄ら：第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2005 年 10 月、盛岡)
- [26] 中村 厚ら：平成 17 年度日本水産学会大会 (2005 年 4 月、東京)
- [27] 小南優ら：第 59 回日本栄養・食糧学会大会 (2005 年 5 月、東京)
- [28] 小笹清香ら：第 59 回日本栄養・食糧学会大会 (2005 年 5 月、東京)
- [29] Thanakorn W ら：第 59 回日本栄養・食糧学会大会 (2005 年 5 月、東京)
- [30] 井戸敏子ら：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)
- [31] 森山達哉ら：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)
- [32] 加賀谷早織ら：第 10 回日本ラテックスアレルギー研究会 (2005 年 7 月、神戸)
- [33] 森山達哉：日本豆乳協会研修会特別講演会 (2005 年 7 月、東京)
- [34] 森山達哉：農研機構作物研究所セミナー (2005 年 11 月、筑波)
- [35] 橋田和美ら：日本農芸化学会 2006 大会 (2006 年 3 月、京都)
- [36] 山田千佳子ら：日本農芸化学会 2006 大会 (2006 年 3 月、京都)
- [37] 森山達哉ら：日本農芸化学会 2006 大会 (2006 年 3 月、京都)
- [38] Nakamura A ら：International symposium on Fisheries Science and Technology for the academic exchange between Japan and Korea (2004)
- [39] Weangsripanaval T ら：International Cytokine Society Conference 2005 (Seoul), October 27-31, 2005.
- [40] Matsuda R ら：119th AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.
- [41] Akiyama H ら：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

食物アレルゲンの抗原解析・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

神谷 太郎	同総合診療部小児期診療科	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	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
河原 秀俊	同総合診療部小児期診療科	青田 明子	同第1専門診療部アレルギー科
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
田中 和子	同研究所免疫アレルギー研究部アレルギー研究室		
松本 健治	同研究所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20品目の原材料表示が実施されているが、多くのアレルゲンには交叉反応性が存在する。イクラとサケでは、10%以上の交叉反応性が50%の患者血清で認められ、タラコとイクラでは、10%以上の交叉反応性が63%に、ピーナツとアーモンドでは、10%以上の交叉反応性が59%に認められた。食物アレルギー患者が自らのアレルゲン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が必要であり、こうした情報を更に正確に検討して提供する必要があることがわかった。

A. 研究目的

食品間には、その発生的近縁性からアレルゲン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。平成13年に施行された「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19品目（現在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。

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患者から研究実施の説明同意のもとに採血を実施した。

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 抗体が陽性的の場合に、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 抗体が陽性的の場合に、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 抗体が陽性的の場合に、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 抗体が陽性的の場合に、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 抗体が陽性的の場合に、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

(4) 牛乳と山羊乳

①牛乳と山羊乳、綿羊牛の乳の交叉反応性の検討

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、採取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. 特異IgE抗体測定方法

①ユニキャップで測定する項目

鶏卵白、鶏卵黄、イクラ、タラコ、サケ、落花生

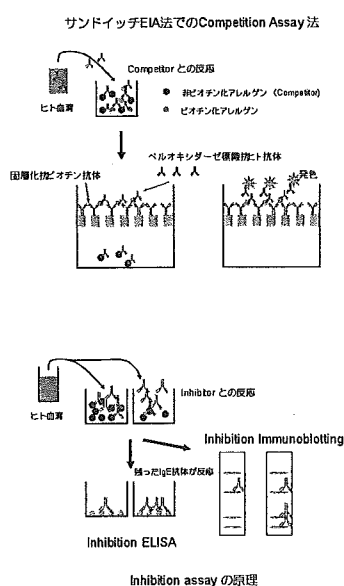
②ELISA法で測定する項目

山羊乳、綿羊乳特異IgE抗体

4. 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で測定した。

必要に応じて確認のため、inhibition blotting法をおこなう。



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

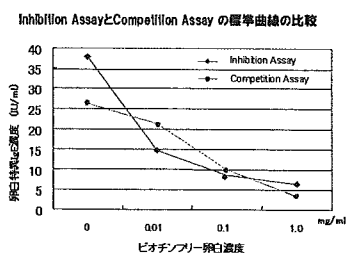
個人の検査結果を、患者さんが外来受診時に報告する。一部の検査は、時間がかかることを了解してもらい（年度内に報告予定）。

（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

Inhibition assay と competition assay の比較では、液相法である competition assay は従来のELISA法のinhibition assayとほぼ同様の結果が得られることがわかった。



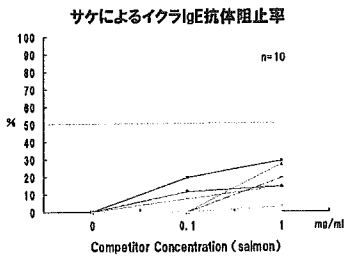
(1) 鶏卵とイクラの交叉反応性

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。

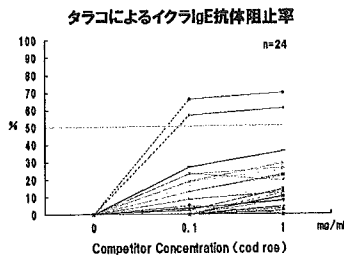
(2) イクラとサケの交叉反応性

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。

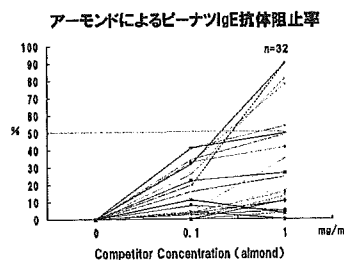
蛋白質相互が 80 アミノ酸のうち 35%の相同性が



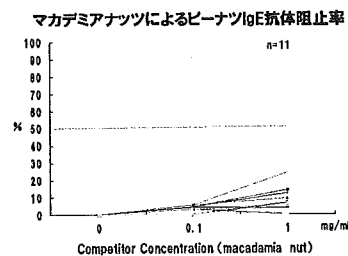
(3) イクラとタラコの交叉反応性
イクラ IgE 抗体陽性 24 名について検討した。
10%交叉反応が 63%に認められた。



(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。



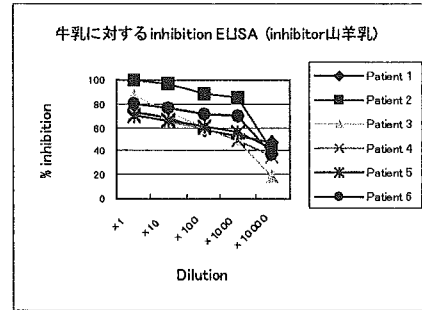
(5) ピーナツとマカデミアの交叉反応性
ピーナツ IgE 抗体陽性 11 名について検討した。
10%交叉が 27%、20%交叉が 9%に認められた。



(6) ピーナツとマカデミアの交叉反応性
6 名の牛乳アレルギー患者血清(牛乳 I g E クラス 4 から 6) を用いて、山羊乳、綿羊乳との交叉反応性を inhibition assay で検討した。全ての患者において、山羊乳、綿羊乳ともに牛乳と高い交叉反応性を示した。

D. 考察

交叉反応性は、植物間、動物間で観察される。



あるとき、連続する 6 個以上の同一アミノ酸配列がある場合におこりやすい。これまでも魚肉、魚卵、種実類、甲殻類、果実などで報告があった。しかし、どの程度の頻度で存在するかは有用な情報であるが十分な報告は無かった。今回の検討で、IgE 抗体レベルでの交叉反応性の頻度を調べることができ、魚卵間、魚肉間、ナッツ類で交叉反応性の頻度がわかった。今後は IgE 抗体レベルの交叉反応の程度が症状に関連しているかを検討する必要がある。しかし、IgE 抗体レベルの交叉反応性があることがわかっていることは、食品表示をより深く理解する上で大切な情報であるといえる。

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、現時点で交叉反応があるので注意喚起をしていく必要があると考える。

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