

表2 調理条件によるハンバーグ中の抗原量の変化

調理条件	ハンバーグ1g中の抗原量		ハンバーグ1個中**の抗原量	
	OA*1	OM*2	OA*1	OM*2
生地(未加熱)	19 mg	12 mg	1,430 mg	900 mg
フライパンで両面蒸し焼き10分	12 μg	750 μg	691 μg	43 mg
両面蒸し焼き10分+煮込み15分	1.6 μg	230 μg	90 μg	13 mg

測定法 \*1 モリナガ卵測定キット(卵白アルブミン)  
\*2 モリナガ卵測定キット(オボムコイド)  
\*\*原材料として全卵5g、牛肉50g、炒めタマネギ16.5g、パン粉2.5g含む

表3 加熱条件によるクッキーの卵白抗原量の変化

加熱条件	OA(μg/g)*1	OM(μg/g)*2	FASPEK(μg/g)*3
生地	25,000	23,000	12,000
160°C10分	3,510	2,560	11,120
170°C10分	3,440	2,640	10,580
180°C10分	2,410	1,080	8,300
160°C20分**	530	430	4,030
170°C20分**	280	270	3,330
180°C20分**	20	50	1,430
160°C30分	<0.4	1	28
170°C30分	<0.4	<0.4	8
180°C30分	<0.4	<0.4	2

測定法 \*1 モリナガ卵測定キット(卵白アルブミン) \*\*摂食に適する加熱条件  
\*2 モリナガ卵測定キット(オボムコイド)  
\*3 モリナガFASPEK卵測定キット(卵白アルブミン)

## 2) 卵特異的 IgG および IgG4 抗体の臨床的意義についての検討

卵特異的 IgG 抗体は両群ともに除去中に比べて摂取開始後に上昇していたが、寛解群において有意差 (p<0.01) が見られた。卵特異的 IgG4 抗体についても同様に寛解群において除去中に比べて有意に (p<0.01) 上昇していた (図1)。

## D. 考察

卵特異的 IgG 抗体は抗原曝露の状態をよく反映するため、耐性獲得の有無にかかわらず摂取開始すれば上昇するが、卵特異的 IgG4 抗体は寛解群で著明に上昇しており、臨床経過も合わせて考えると単に抗原曝露の結果を示すばかりではなく、寛解誘導成功のパラメーターとなると考えられた。単なる指標であるのか blocking antibody として働いているのかについては現在さらに検討中である。

卵を用いた料理の調理条件による抗原量を定量することにより寛解誘導のための食事指導を適切に行うことが可能となった。

## E. 結論

重篤なアナフィラキシー反応を経験した症例でも一定期間の食品除去後に積極的に微量の抗原を含む調理した食品を摂取し続けることにより寛解を誘導することが可能であった。この方法の実施には調理法別の抗原量定量結果の利用が有用であり、抗原特異的 IgG4 抗体は寛解の有用なパラメーターとなりうると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

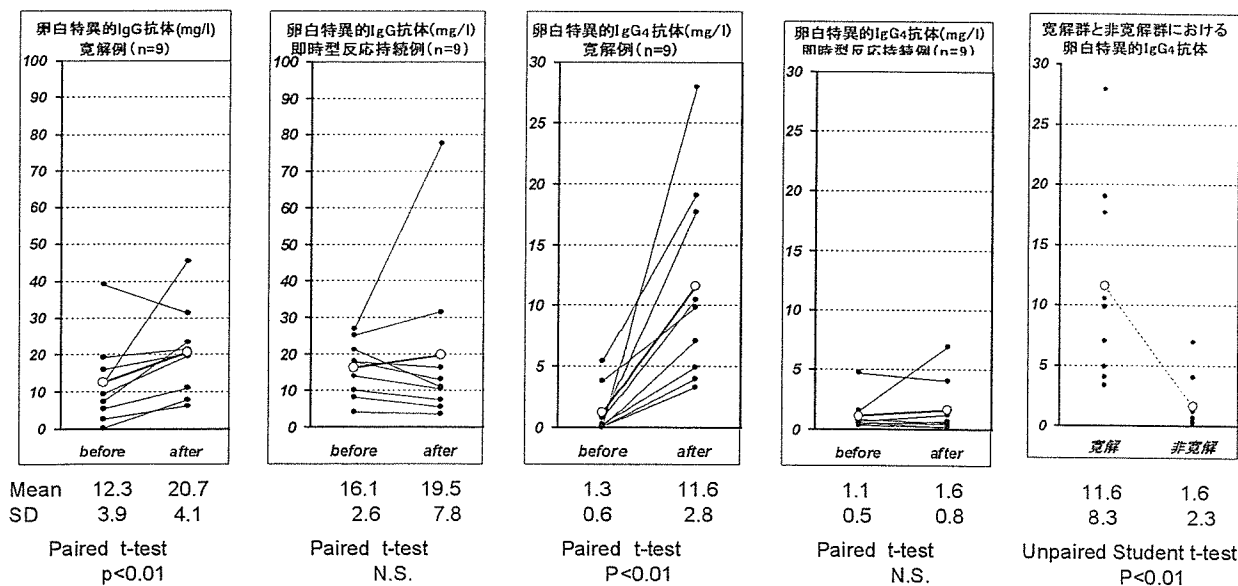


図1 卵アレルギー寛解群と非寛解群における卵特異的IgGおよびIgG4抗体測定結果

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 伊藤節子：アレルギー除去食療法と解除の仕方，小児看護 2006;29(4):428-434
- 2) 伊藤節子：加工食品中微量アレルギー物質，アレルギーの臨床 2006;26(6):441-444
- 3) 伊藤節子：食物アレルギーの治療：食事療法，小児科臨床 2006;59(suppl):1377-1384
- 4) 向山徳子，西間三馨，有田昌彦，伊藤節子，宇理須厚雄，海老沢元宏，小倉英郎，河野陽一，近藤直実，柴田瑠美子，古庄巻史，眞弓光文：食物アレルギー診療ガイドライン，日本小児科学会雑誌 2006;110(7):901-911
- 5) 伊藤節子：食物アレルギーにおける食事療法，アレルギー・免疫 2006;13(12):1702-1707
- 6) 伊藤節子，近藤直実：食物アレルギーの診断，日本小児アレルギー学会誌 2006;20(5):526-530
- 7) 伊藤節子：食物アレルギーの診断と治療の標準化，アレルギー 2006;55(12):1491-1496
- 8) 富川盛光，鈴木直仁，宇理須厚雄，粒来宗博，伊藤節子，柴田瑠美子，伊藤浩明，海老沢元宏：日本における小児から成人のエビアレルギーの臨床像に関する検討，アレルギー 2006;5(129):1536-1542
- 9) 神奈川芳行，伊藤節子，明石真未，太田裕見，本庄勉，森松文毅，高畑能久，武内澄子，今村知明：ファーストフード等の店頭販売品に含まれるアレルギー物質調査，日本小児アレルギー学会誌 2006;20(5):476-484

### 2. 学会発表

- 1) 伊藤節子：食物アレルギー～診断と治療の標準化（教育講演4）第18回日本アレルギー学会春季臨床大会，東京都，2006.5.30
- 2) 伊藤節子，明石真未，本庄勉：特定原材料測定キットによる抗原定量の臨床的意義，ミニシンポジウム2-1「食物アレルギー1」，第18回日本アレルギー学会春季臨床大会，東京都，2006.5.30
- 3) 伊藤節子：食物アレルギーの診断と治療～診療ガイドライン2005を基に～，滋賀小児科医科会・学術講演会（特別講演），草津市，2006.6.24
- 4) 伊藤節子：食物アレルギーの診療の実際，第48回静岡小児アレルギー研究会（特別講演），静岡市，2006.7.1

- 5) 伊藤節子：乳幼児アトピー性皮膚炎における食物アレルギーの関与，シンポジウム8「アトピー性皮膚炎の増悪因子と合併症」，第56回日本アレルギー学会秋季学術大会，東京都，2006.11.4
- 6) 伊藤節子，明石真未：アナフィラキシー反応症例における誤食時の摂取抗原量を参考に行った寛解誘導についての検討，ワークショップ1「食物アレルギーの寛解」第43回日本小児アレルギー学会，千葉市，2006.11.25
- 7) 伊藤節子：食物アレルギーと栄養，第7回食物アレルギー研究会（教育講演），東京都，2007.1.27
- 8) 伊藤節子：乳幼児における食物アレルギーの関与したアトピー性皮膚炎への対応，第4回北九州アトピー研究会（特別講演），北九州市，2007.2.7
- 9) 伊藤節子：食物アレルギー診療ガイドラインに関するアンケート集計結果について，第10回京都小児喘息・アレルギー研究会，京都市，2007.2.10

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

食物アレルギーの病態解明と診断・治療の開発に関する研究  
—鶏卵アレルギーの経口免疫療法とアレルギー特異的T細胞応答のトランスクリプトーム解析—

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  
研究協力者 柘植 郁哉 藤田保健衛生大学医学部小児科  
近藤 康人 藤田保健衛生大学医学部小児科  
中島 陽一 藤田保健衛生大学医学部小児科

研究要旨

鶏卵アレルギー児に対して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行い48.3%の寛解を得た。経口免疫療法の前後でサイトカイン産生を比較すると、凍結乾燥卵白が陰性化した群ではIL-4とIFN- $\gamma$ 両者の産生能が低下していた。また、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 microarrayを用いて行い、非アレルギー児と比較し、鶏卵アレルギー児で抗原刺激後に発現が有意に増加するcytokine inducible SH2-containing protein(CISH)を選択した。CISHの蛋白レベルでの発現をFlow-cytometryにて行い、mRNA同様、鶏卵アレルギー児では刺激後の反応が有意に増強していることを示した。

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 microarray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. 経口免疫療法

二重盲検プラセボコントロール食物負荷試験で、加熱卵白または凍結乾燥卵白が陽性の児58名を対象に、経口免疫療法を行った。患者は加熱脱オボムコイド卵白クッキー2枚を毎日、4週間摂取し、その後負荷試験で寛解の有無を判定した。

2. アレルギー特異的サイトカイン産生能の解析

経口免疫療法の前・後で、患者末梢血単核球(PBMC)を鶏卵白抗原存在下に7日間培養した後、上清中のIL-4、IFN- $\gamma$ をELISAにて測定した。

3. MicroarrayとReal-time PCRによる解析

鶏卵アレルギー児と非アレルギー児のPBMCを鶏卵白抗原存在下16時間培養した後Magnetic cell sorterを用いてCD4陽性細胞を分取した。CD4陽性細胞からtotalRNAを抽出し、増幅・標識後にAgilent Human Whole Genome Arrayとハイブリダイズし解析した。Microarray解析で選択した遺伝子発現の定量性はReal-timePCRにて確認した。

4. Flow-cytometryによる解析

鶏卵アレルギー児、非鶏卵アレルギー児のPBMCを鶏卵白存在下7日間培養した後に、PE-CD4、PC-5-CD25で染色した。さらにfixation、permeabilization処理後にFITC標識CISHのポリクローナル抗体で染色しFACS Caliburにて解析した。

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。

5. 統計検討

サイトカイン産生能、Real-timePCRでのmRNA発現、Flow-cytometry解析の統計学的検討は、Stimulation index(SI)(抗原刺激後/非刺激)を用いてMann-WhitneyのU検定にて行った。

C. 研究結果

1. 経口免疫療法

経口免疫療法を行った58人中、28人(48.3%)で加熱卵白あるいは凍結乾燥卵白の負荷試験で陰性化を示した。

2. アレルギー特異的サイトカイン産生能の解析

加熱卵白陽性群または凍結乾燥卵白陽性群では、免疫療法後に陰性化した群で、IL-4産生能が有意に低下したが、非陰性化群では低下しなかった。一方、IFN- $\gamma$ は加熱卵白が陰性化した群と非陰性化群の両者で有意な上昇を示したが、凍結乾燥卵白まで陰性化した群では上昇がみられな

かった。

### 3. Microarray と Real-time PCR による解析

Microarray で選択した遺伝子の発現をより定量的に検討するため、鶏卵アレルギー患者 22 名と非アレルギー対照 7 名で Real-time PCR を行った。鶏卵アレルギー患者と非アレルギー対照を比較すると、CISH の SI 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。

### 4. Flow-cytometry による解析

Flow-cytometry を用いて、CISH の蛋白レベルでの発現を鶏卵アレルギー児 12 名と非鶏卵アレルギー児 7 名で比較した。CD4 陽性細胞中の CD25 陽性・CISH 陽性細胞は鶏卵抗原刺激後に、非鶏卵アレルギー児と比較し鶏卵アレルギー児において有意に発現が増加していた。(図 1)

## D. 考察

### 1. 経口免疫療法とサイトカイン産生の検討

低アレルゲン化した鶏卵白による経口免疫療法前後でのサイトカイン産生能の検討の結果、凍結乾燥卵白が陰性化した群では IL-4 の有意な低下があり、IFN- $\gamma$  が上昇がみられなくなった。このことから経口免疫療法の寛解のメカニズムとして IL-4、IFN- $\gamma$  の両者を抑制する因子の関与が考えられた。(図 2)

### 2. 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

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、Th1、Th2、Treg など T 細胞の亜群における CISH の動態を解析し、鶏卵アレルギーの病態形成に果たす CISH の役割について検討する必要があるが、こうした知見が、食物アレルギーの病態の理解に役立つと共に、CISH 自体が新たな診断のマーカーとして臨床応用する可能性がある。

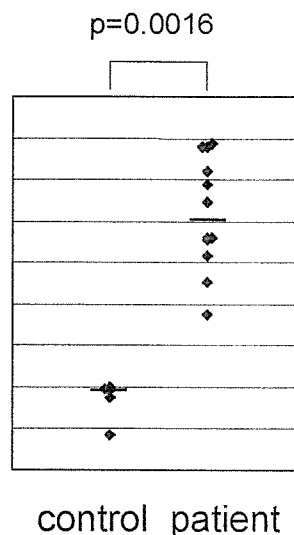


図1: CD4陽性細胞中のCD25陽性・CISH陽性細胞の比較

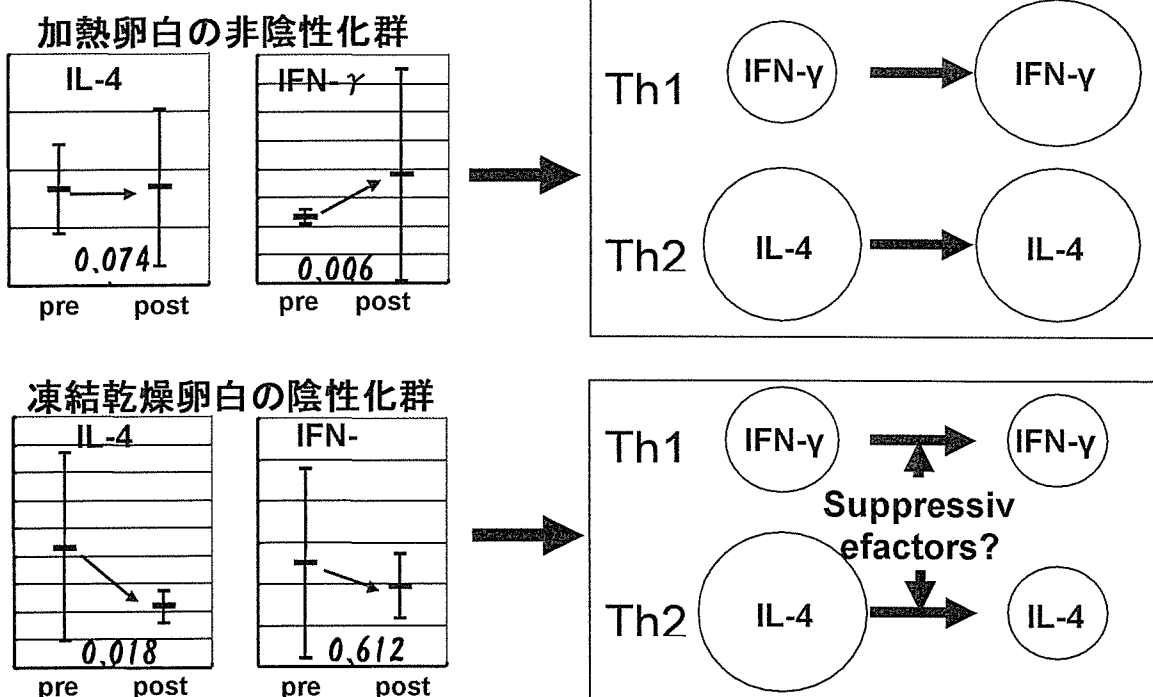


図2 経口免疫療法前後におけるIL-4、IFN- $\gamma$ の産生能の比較

## E. 結論

1. 加熱脱オボムコイド卵白を用いた経口免疫療法は、鶏卵アレルギーに対する有望な治療法となりうる。
2. CISH は鶏卵アレルギー児 CD4 陽性細胞で、卵白抗原刺激後に有意に発現が増加した。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, Komatsubara R, Nakajima Y, Yasuda T, Kakami M, Tsuge I, Urisu A. Parvalbumin is not responsible for cross-reactivity between tuna and marlin: A case report. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:1382-3.
- 2) Tsuge I, Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Yamada K, Urisu A. Allergen-specific helper T cell response in patients with cow's milk allergy: Simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Clin Exp Allergy.* 2006; 36:1538-45.
- 3) Koyama H, Kakami M, Kawamura M, Tokuda R, Kondo Y, tsugei, yamadak, Yasuda T, Urisu A; Grades of 43 Fish Species in Japan Based on ige-binding Activity. *Allergology International.* 2006, 55, 311-316.

### 2. 学会発表

- 1) 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、浅野喜造；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 109 回 日本小児科学会学術集会、金沢 平 18 年 4 月
- 2) 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、松山温子、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 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京 平 18 年 5 月

- 3) Nakajima, Y、Tsuge, I、Komatsubara, R、Hirata, N, Kawamura, M, Kakami, M, Matsuyama, H, Kondo, Y, Urisu, A: Transcriptome analysis of allergen specific T cells in hen's egg allergy、XXV Congress of the European Academy of allergology and Clinical Immunology, Vienna, Austria, 10-14 June 2006
- 4) Urisu A, Nakajima Y, Komatsubara R, Hirata N, Kawamura M, Matsuyama H, Kakami M, Kondo Y, Tsuge I, Yamada K, Kimura M, Seki A Oral immunotherapy by heated and ovomucoid-depleted egg white to children with hen's egg hypersensitivity, XXV Congress of the European Academy of allergology and Clinical Immunology、Vienna, Austria, 10-14, 2006.
- 5) 山田一恵、中島陽一、河村牧子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、木村 守、鳥居新平：加熱脱オボムコイド卵白クッキーによる鶏卵アレルギー児に対する経口免疫療法、第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、平 18 年 11 月
- 6) 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、松山温子、宇理須厚雄：鶏卵アレルギーにおける卵白抗原特異的な CISH 発現の flow cytometry 解析、第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、平 18 年 11 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 食品成分による食物アレルギーの制御に関する研究

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 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  
酒井 信夫 国立医薬品食品衛生研究所 食品部

**研究要旨** (1) 実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究  $\alpha$ -カロテン摂取群は標準粉末飼料を摂取させた対照群と比較して、IgE、IgG1 抗体価の抑制傾向が認められ、 $\beta$ -カロテン摂取群では対照群と比較して IgE、IgG1 抗体価が有意に抑制された。 $\alpha$ -カロテン摂取群、 $\beta$ -カロテン摂取群ともに ASA 誘導後の大きな体温低下は認められなかった。また、血清中ヒスタミン濃度は、 $\alpha$ -カロテン摂取群、 $\beta$ -カロテン摂取群ともに対照群と比較して抑制が認められ、 $\beta$ -カロテン摂取群は対照群と比較して有意に低い値であった。(2) 魚卵抗原解析 イクラ(シロザケ卵)、ニジマス卵、イトウ卵中に、同一の患者血清と反応する主要抗原 18 kDa(イクラについては 16 kDa 成分あり)を確認した。イクラの反応成分は、N 末端配列から  $\beta'$  コンポーネントと呼ばれるピテロジェニン断片であることを確認した。3 種の魚卵に含まれる主要抗原の N 末端配列の 1-10 及び 12-19 残基は、完全に一致した。イクラ  $\beta'$  コンポーネントのアミノ酸配列のうち、N 末端 1-21、50-62、80-102、105-114 及び 137-146 番目は、ニジマス・ピテロゲニンのアミノ酸配列とほぼ一致(相同性 92%)した。(3) その他の食品抗原解析 豆乳: 花粉症と関連するクラス 2 食物アレルギーに属し、シラカバ属抗原 Bet v 1 のホモログの関与を明らかにした。ゴボウ: アレルゲンとして、35 kDa のリグニン生成関連ペルオキシダーゼ(PR-9 ファミリー)と 18 kDa の SOD と同定した。果物: リンゴ以外にも病害被害を受けたサクランボやモモにおいても同様にアレルゲンタンパク質の増大傾向が認められた。トマトと大豆: 育種的に低アレルゲン化された品種の評価を行った。大豆: クロモグリケート酸(インタール)によって腸管からのアレルゲン吸収が抑制されることを明らかにした。ローヤルゼリー: 数例のアナフィラキシーの症例があり、MRJP1 や 2 が抗原として関与していることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究では、オボアルブミン(OVA)経口連続投与で感作誘導できる B10A マウスを用いてカロテン経口摂取の食物アレルギー発症抑制への影響について検討した。また魚卵、果実等の食物アレルゲンの解析についても検討した。またイクラは表示奨励品目でありながら、その抗原性に関する情報はきわめて少ない。そこで本研究は魚卵(イクラ)アレルギーの発症機構とその免疫交差性を検討するための基本情報として、主要抗原タンパク質の一次構造解析を進めた。

### B. 研究方法

#### (1) 実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究

B10A マウスに OVA (1 mg)を 9 週間連日経口投与し、9 週後に血清中 OVA 特異的抗体価(IgE, IgG1, IgG2a, IgA)を測定した。その後、腹腔内惹起により能動的全身性アナフィラキシーショック(ASA)を誘導して体温変化を測定した。また、血清中ヒスタミン濃度の測定、小腸上皮細胞間リンパ球(IEL)の表面抗原組成の解析を行った。 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテンは標準粉末飼料に混合(2 mg/100 g)して経口投与を開始する 2 週間前より自由摂取させた。

#### (2) 魚卵抗原解析

(1) 3 種のサケ科魚類の卵黄タンパク質から、イクラアレルギー患者血清中の特異 IgE 抗体と反応するタンパク質を探索・精製し、その N 末端の一次構造配列を決定した。(2) イクラ  $\beta'$  コンポーネントを酵素限定分解し、得られたペプチドを既に報告のあるニジマス・ピテロゲニンのアミノ酸配列と比較した。

#### (3) その他の食品抗原解析

(1) 豆乳特異的に発症する重篤なアナフィラキシー、OAS 患者血清を収集し、臨床像とともに花粉抗原との交差性を解析した。原因抗原に対するペプチド抗体を作成し、その諸性質を調べた。

(2) ゴボウ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キング法とエドマン分析法を用いた。

(3) バナナアレルゲンとして IgE 結合性を指標にしたイムノブロッキング法にて見出した複数の抗原をエドマン分析によって同定した。

(4) ローヤルゼリーに対する患者血清を 2 名分収集しイムノブロッキング法にて原因抗原を探索した。

(5) 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、リンゴ以外にもサクランボやモモに病害虫被害を与えアレルゲンタンパク質の変動をイムノブロッキング法を用いて解析した。

## C. 研究結果

### (1) 実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究

IgE, IgG1 抗体価において $\alpha$ -カロテン摂取群は標準粉末のみを摂取させた対照群と比較して抑制傾向が認められ、 $\beta$ -カロテン摂取群では有意に抑制された。 $\alpha$ -カロテン摂取群、 $\beta$ -カロテン摂取群ともに ASA 誘導後の大きな体温低下は認められなかった。また、血清中ヒスタミン濃度において、 $\alpha$ -カロテン摂取群、 $\beta$ -カロテン摂取群ともに対照群と比較して抑制が認められ、 $\beta$ -カロテン摂取群は対照群に比べ有意に低い値であった。

### (2) 魚卵抗原解析

イクラ(シロザケ卵)、ニジマス卵、イトウ卵中に、同一の患者血清と反応する主要抗原 18 kDa(イクラについては 16 kDa 成分あり)を確認した。イクラの反応成分は、N 末端配列から $\beta'$ コンポーネントと呼ばれるピテロジェニン断片であることを確認した。3 種の魚卵に含まれる主要抗原の N 末端配列の 1-10 及び 12-19 残基は、完全に一致した。イクラ $\beta'$ コンポーネントのアミノ酸配列のうち、N 末端 1-21, 50-62, 80-102, 105-114 及び 137-146 番目は、ニジマス・ピテロジェニンのアミノ酸配列とほぼ一致(相同性 92%)した。

### (3) その他の食品抗原解析

- (1) 豆乳特異的アレルギーは、シラカバ・ハンノキ属花粉症と併発する例が多く、原因抗原としては、16 kDa (大豆 Bet v 1 ホモログ: Gly m 4) が関与していることを見出した。本抗原に対する抗体を作製し、種々の豆乳中の存在レベルを評価したところ、濃厚タイプや無調整タイプの豆乳に多く含まれていることが明らかとなった。
- (2) ゴボウアレルギーとして、35 kDa と 18 kDa の 2 つの抗原を見出した。これらはそれぞれリグニン生成関連ペルオキシダーゼ(PR-9 ファミリー)と SOD(スーパーオキシドジスムターゼ)であった。
- (3) バナナ中の患者血清 IgE 結合タンパク質を複数同定したところ、33 kDa 付近のキチナーゼや 20 kDa のソーマチンライクプロテインであった。
- (4) 近年健康食品として人気の高いローヤルゼリーについて、アレルギー発症例が散見され、その原因抗原として、50 kDa 付近の MRJP1 や MRJP2 が推定された。
- (5) リンゴ以外にも病害被害を受けた果物(サクランボやモモなど)でも、PR タンパク質と思われるアレルギータンパク質が増加する傾向がみられた。また、リンゴに関しては果肉よりも果皮にアレルギータンパク質が多いことが示唆された。

## D. 考察

### (1) 実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究

$\beta$ -カロテン摂取は抗原経口感作を抑制し、食物アレルギー発症抑制する作用が示唆された。来年度、Treg 細胞への影響、培養脾臓細胞を用いた Th1/Th2 バランスへの影響、関連サイトカインや転写因子の mRNA の定量的解析を行い、 $\beta$ -カロテン摂取の経口感作抑制のメカニズムについて解析を検討する予定である。

### (2) 魚卵抗原解析

イクラの主要抗原である $\beta'$ コンポーネントについて検討したところ、ニジマスやイトウ卵中の主要抗原とアミノ酸配列の相同性が高いことが判明した。この事実は、サケ科魚卵間の交差性の存在を示すこれまでの実験結果と一致していた。すなわち、 $\beta'$ コンポーネントは、サケ科卵共通の主要抗原である可能性が高い。

### (3) その他の食品抗原解析

- (1) 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大豆中に含まれるシラカバ・ハンノキ花粉抗原の Bet v 1 のホモログ(PR-10 ファミリー)が交差反応によって症例を引き起こす可能性が示唆された。濃厚タイプ豆乳ではその存在レベルが多いことが判った。これらの花粉症の強いヒトでは濃厚タイプの豆乳摂取には注意が必要であると考えられた。
- (2) ゴボウはわが国でしか食されない食材であるので、そのアレルギーはわが国固有であると思われた。原因抗原は PR-9 ファミリーに属するペルオキシダーゼと SOD であった。これらは感染やストレスによって発現が増大するタンパク質のファミリーに属し、ゴボウにおいてもストレス関連タンパク質がアレルギーになりやすいことが示唆された。
- (3) バナナアレルギー候補分子としてキチナーゼは既知であるが、バナナのソーマチンライクプロテインの検出例は初めてであると思われた。この分子も病害被害を受けた果実において発現増大が認められる PR-5 ファミリーに属する。

## E. 結論

### (1) 実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究

母親が $\beta$ -カロテン摂取を強化し、乳児の母乳中からの $\beta$ -カロテン摂取強化は、乳児における食物アレルギーの経口感作を抑制し、食物アレルギー発症を抑制する可能性が示唆された。

### (2) 魚卵抗原解析

イクラの主要抗原である $\beta'$ コンポーネントは、サケ科魚卵間で一次配列相同性がきわめて高い。この事実は、サケ科魚卵間の交差性の存

在を示す従来の実験結果を指示している。

### (3) その他の食品抗原解析

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, Bet v 1 ホモログが主要抗原と思われる。ゴボウなどの根菜類によるアレルギーは珍しいが, の場合も PR タンパク質が抗原となっていた。バナナにおいてもソーマチンライクプロテインと呼ばれる PR タンパク質(PR-5 ファミリー)が抗原となっている可能性が高い。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.*, 140, 36-42 (2006).
- 2) 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. *J. AOAC Int.*, 89, 1600-1608 (2006).
- 3) Amano H, Akiyama H, Bienenstock J. Effects of stress upon tracheal epithelium of two strains of flinders rats. *Clinical and Experimental Allergy*, revised.
- 4) Weangsripanaval T, Murota K, Murakami Y, Kominami M, Kusudo T, Moriyama T, Ogawa T, Kawada T. Sodium cromoglycate inhibits absorption of the major soybean allergen, Gly m Bd 30K, in mice and human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr.*, 136, 2874-2880. (2006).
- 5) Kitagawa M, Moriyama T, Ito H, Ozasa S, Adachi A, Yasuda J, Ookura T, Inakuma T, Kasumi T, Ishiguro Y, Ito Y. Reduction of allergenic proteins by the effect of the ripening inhibitor (rin) mutant gene in an F1 hybrid of the rin mutant tomato. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1227-1233 (2006).
- 6) 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.*, 351, 290-297 (2006).
- 7) 穂山浩, 佐伯宏樹, 渡辺一彦, 宇理須厚雄. 食物アレルギー (ヒナツ, 魚卵), 臨床免疫・アレルギー科, 46, 588-595 (2006).
- 8) 穂山浩, 酒井信夫, 佐伯宏樹, 渡辺一彦, 赤澤晃, 宇理須厚雄. アレルギンの交差反応性. 小児内科, 39, in press
- 9) 久保友和, 渡辺一彦, 原彰彦, 清水裕, 佐伯宏樹. シカ卵卵に含まれる主要アレルギンの探索. 北大水産彙報, 56, 55-56, (2005).
- 10) 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. 皮膚科の臨床, 48, 777-780 (2006).
- 11) 加賀谷早織, 角田孝彦, 森山達哉. フェノールによる口腔アレルギー-症候群の 2 例. 日本皮膚科学会雑誌, 116, 331-334 (2006).
- 12) 足立厚子, 森山達哉, 下浦真一, 佐々木祥人, 清水秀樹, 井口佳代, 福永淳, 堀川達弥. カルバマズイおよびライイによる口腔アレルギー-症候群からアナフィラキシーに至った 1 例. 日本皮膚科学会雑誌, 116, 2212-2217 (2006).
- 13) 森山達哉, 小川正. 食品のアレルギン性評価の研究動向. (食品検査とリスク回避のための防御技術) p. 148-159. 2006 年 2 月発行 CMC 出版

### 2. 学会発表

- 1) 小池修一郎, 清水裕, 中村厚, 渡辺一彦, 原彰彦, 佐伯宏樹, 魚卵アレルギーにおけるイクラと他魚種卵との免疫学的交差性, 平成 18 年度日本水産学会大会 (2006, 4. 東京)
- 2) 堀川達弥, 足立厚子, 森山達哉, 錦織千佳子. 蕁麻疹に

関する新しい食物抗原について. 第 36 回日本皮膚アレルギー学会総会・第 31 回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会 (2006, 7. 兵庫)

- 3) 原田晋, 中村晶子, 松永亜紀子, 飯島摩耶, 吉崎仁胤, 斎藤研二, 足立厚子, 森山達哉. 豆乳アレルギーの 3 例. 第 36 回日本皮膚アレルギー学会総会・第 31 回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会 (2006, 7. 兵庫)
- 4) 福田恭子, 落合豊子, 相川美和, 富田康之, 森山達哉. 豆乳による口腔アレルギー-症候群の 5 例. 第 36 回日本皮膚アレルギー学会総会・第 31 回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会 (2006, 7. 兵庫)
- 5) 足立厚子, 森山達哉, 羽鹿牧太, 小川正, 清水秀樹, 福永淳, 堀川達弥. 大豆アレルギー-患者における市販および 7S 不完全・完全欠失大豆由来豆乳の皮膚テスト・ヒスタミン遊離試験. 第 36 回日本皮膚アレルギー学会総会・第 31 回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会 (2006, 7. 兵庫)
- 6) 松田聡子, 藤原進, 堀川達弥, 錦織千佳子, 森山達哉. キルによる Oral Allergy Syndrome を合併した物皮膚炎の 1 例. 第 36 回日本皮膚アレルギー学会総会・第 31 回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会 (2006, 7. 兵庫)
- 7) 飯島茂子, 二藤部弘暁, 森山達哉. サラシホおよびメロンでの口腔アレルギー-症候群の 2 例-免疫プロット法を用いた抗原の検索を加えて-. 第 36 回日本皮膚アレルギー学会総会・第 31 回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会 (2006, 7. 兵庫)
- 8) 石川博康, 熊野高行, 森山達哉. 桃とメロンの OAS 患者に見られたコボウアレルギー-の 1 例. 第 36 回日本皮膚アレルギー学会総会・第 31 回日本接触皮膚炎学会総会合同学術大会 (2006, 7. 兵庫)
- 9) 水谷陽子, 長澤智佳子, 渋谷佳直, 清島真理子, 森山達哉. コーヤレリ錠内服後に生じたアナフィラキシーの 1 例. 日本皮膚科学会 第 237 回東海地方会 (2006, 9. 愛知)
- 10) 杉山陽香, 福田恭子, 落合豊子, 足立厚子, 原田晋, 小川正, 高橋浩司, 羽鹿牧太, 森山達哉, 河村幸雄. 豆乳特異的アレルギー-の原因アレルギンの解析. 第 45 回日本栄養食糧学会近畿支部大会 (2006, 10. 兵庫)
- 11) 光山英由, 矢野えりか, 牧野泰子, 橋田和美, 川本伸一, 森山達哉, 河村幸雄. アレルギンタンパク質の近赤外蛍光検出. 第 45 回日本栄養食糧学会近畿支部大会 (2006, 10. 兵庫)
- 12) 森山達哉, 矢野えりか, 石川博康, 角田孝彦, 河村幸雄. コボウアレルギー-の同定. 第 45 回日本栄養食糧学会近畿支部大会 (2006, 10. 兵庫)
- 13) 森山達哉. 大豆アレルギンの多様性. 第 3 回ガイズ研究会 (2006, 12. 東京)
- 14) 森山達哉. 食物アレルギー-の謎に挑む-原因抗原の探索から低アレルギン食品の開発まで-. 第 17 回大和アレルギン研究会特別講演 (2006, 12. 奈良)
- 15) 飯島茂子, 佐藤哲也, 森山達哉. サラシホによる口腔アレルギー-症候群の 3 例 ~ 免疫プロット法を用いたメロン, スイカおよび各種花粉抗原との交差反応性に関する考察. 第 12 回茨城皮膚アレルギー-懇話会 (2007, 2. 茨城)
- 16) 森山達哉, 杉山陽香, 福田恭子, 落合豊子, 足立厚子, 原田晋, 小川正, 高橋浩司, 羽鹿牧太, 河村幸雄. 豆乳特異的アレルギー-の原因アレルギンの解析. 日本農芸化学学会 2007 大会 (2007, 3. 東京)
- 17) 大羽美香, 海老原光湖, 森山達哉, 橋田和美, 川本伸一. コボウアレルギー-抗体の作製と評価. 日本農芸化学学会 2007 大会 (2007, 3. 東京)
- 18) 山本美由紀, 間崎剛, 山田千佳子, 藁島良一, 森山達哉, 小川正, 松田幹, 和泉秀彦. 発芽に伴う大豆種子中の貯蔵タンパク質 (アレルギン) の分解. 日本農芸化学学会 2007 大会 (2007, 3. 東京)
- 19) 矢野えりか, 光山英由, 大羽美香, 橋田和美, 川本伸一, 穂山浩, 森山達哉, 河村幸雄. 近赤外蛍光によるアレルギンタンパク質の検出. 日本農芸化学学会 2007 大会 (2007, 3. 東京)
- 20) Moriyama T, Kominami Y, Kawada T, Kawamura Y, Ogawa T, Chino Y, Uchida M. Increase of pathogenesis-related allergens in fruits made by organic culture and prevention of its increase by pesticide treatment 11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry Kobe, (Japan) August 6-11, 2006.

## 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学的制御に関する研究

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経口トレランスを誘導することでアウトグローを計る方法の可能性を検証するため、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) を用いて OVA 感作が成立した状態から経口トレランスを誘導する方法の基礎的検討を行った。OVA を腹腔感作し、OVA の経口投与で即時型アレルギー性下痢症状を呈する OVA-TCR-tg に、OVA 感作を行った野生型マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞を輸注すると即時型アレルギー症状の発症が抑制され、消化管粘膜局所への肥満細胞、好酸球浸潤を抑制することが可能であった。CD8 陽性 T 細胞の輸注により、腸管膜リンパ節の IL-10 mRNA 発現が増強し、腸管膜リンパ節から分離した単核細胞の抗原特異的 IL-10 産生能が亢進していたことから、腸管膜リンパ節における抗原特異的 IL-10 産生が抑制機序に関与している可能性が示唆された。抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を介し、IL-10 産生を誘導することで即時型食物アレルギーのアウトグローを誘導する方法を検討することが有用と考えられた。

### A. 研究目的

乳幼児期の食物アレルギー患者の多く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。このアウトグロー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と考えられている。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、原因食物の誤食に危険性や、食事制限による患儿や家族への負担が問題となる。そこで、食事制限に代わる治療手段として経口トレランスを誘導することで食物アレルギーのアウトグローを導く方法が期待される。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経口トレランスを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投与の反復によりクローン除去、アナジー誘導、TGF- $\beta$  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として応用するための基礎的の検討を行った。

### 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。その後で OVA を隔日で経口投与し即時型下痢症状の発現と、アナフィラキシー症状による低体温の発現の有無を観察した。

OVA-TCR-tg マウスの呈するアレルギー症状は野生型マウスに比べ軽いことから、OVA-TCR-tg マウスで欠損している CD8 陽性 T 細胞が食物アレルギー症状発現・増悪に関与すると考えられた。そこで、野生型マウスの脾臓から CD8 陽 T 細胞を分離し、OVA 感作が成立している OVA-TCR-tg マウスに輸注し、輸注 24 時間後から、OVA 経口負荷投与を行い、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、腸管組織のサイトカイン mRNA の発現、腸管膜リンパ球の 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承認を受けた上で実施した。

### C. 研究結果

OVA 腹腔感作をした OVA 特異的 TCR 発現トランスジェニックマウスに OVA 感作をした野性型マウスの脾臓から分離した CD8 陽性細胞を輸注すると、OVA 経口負荷を反復することにより誘発される即時型下痢症状とアナフィラキシーに伴う体温低下の発現は抑制された。一方、OVA 感作を行っていないマウスの脾臓由来 CD8 細胞を輸注した場合には、OVA 経口負荷により下痢症状が誘発されるようになるまでに要する OVA の投与回数が多くなり、症状発現時期を遅らせる効果を認められたものの、発症そのものは抑制されなかった。

OVA 負荷投与を反復することで血清中の OVA 特異的 IgG1, IgG2, IgE 値は上昇したが、その上昇の程度は、非輸注群と OVA 感作マウス由来 CD8 細胞輸注群とでは差がなく、OVA 非感作マウス由来 CD8 細胞輸注群では弱かった。

OVA 負荷投与を反復した後に分離した腸間膜リンパ節単核球の *in vitro* での OVA 再刺激による OVA 特異的サイトカイン産生能は、OVA 感作マウス由来の CD8 細胞の輸注により、非輸注群に比べ IL-4 産生能の抑制、IFN- $\gamma$ 、IL-10 産生能の増強がみられた。OVA 非感作マウス由来の CD8 陽性細胞の輸注でも、IL-4 産生能の抑制と IFN- $\gamma$  産生能の増強効果は認められ、OVA 感作マウス由来 CD8 細胞を輸注した場合よりむしろ強かった。一方、IL-10 産生能は OVA 感作マウス由来 CD8 細胞を輸注した場合の方が、非感作マウス由来 CD8 細胞を輸注した場合より強かった。

OVA 負荷投与後の腸間膜リンパ節のサイトカイン mRNA 発現を比較した場合、OVA 感作 CD8 細胞の輸注により、非輸注群に比べ IL-4, IFN- $\gamma$  の mRNA 発現は共に減少に対し、IL-10 の mRNA の発現は増加し、TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現量には変化を認めなかった。一方、小腸粘膜局所でのサイトカイン mRNA の発現は IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ 1 いずれも非輸注群に比べ減少していた。

OVA 感作マウス由来の CD8 細胞を輸注したマウスの腸管膜リンパ節中の CD8 陽性細胞は CD122 を発現していた。

### D. 考察

OVA 感作野生型マウスの脾臓 CD8 陽性 T 細胞分画には抗原特異的に免疫寛容を誘導するサブセットが存在することが示唆された。また、OVA

特異的 IgE 値の上昇には OVA 感作マウス由来の CD8 陽性 T 細胞輸注の有無により有意の差を認めなかったことから、OVA 感作 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。

経口免疫寛容の成立には腸管膜リンパ節が重要な役割を持つと報告されていることから、OVA 感作 CD8 陽性 T 細胞による腸間膜リンパ節での、OVA 特異的 IL-10 産生の増強が経口免疫寛容誘導に関与している可能性が考えられた。一方、粘膜局所では OVA 感作 CD8 陽性 T 細胞の輸注によって IL-4, IFN- $\gamma$  だけでなく IL-10 mRNA 発現も低下していたことより、粘膜局所での即時型反応の抑制には腸管膜リンパ節とは別の機序が関与していると考えられた。

調節性 T 細胞としては CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞などが知られているが、近年、CD8 陽性 T 細胞のなかの CD122 陽性 CD8 陽性 T 細胞も調節機能を持つことが報告されている。OVA 感作マウス由来の CD8 陽性細胞を輸注したマウスの腸管膜リンパ節中に認められた CD8 陽性 T 細胞の CD122 発現が、CD8 陽性 CD8 陽性の調節性 T 細胞の選択的ホーミングを反映したものか、OVA 経口負荷刺激により局所で CD8 陽性 T 細胞が活性化した結果によるものかを検証する必要があると考えられた。

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 細胞が認識する抗原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方法が考えられる。

### 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た。また、腸間膜リンパ節における抗原特異的 IL-10 産生

が増強するように、調節性 CD8 陽性 T 細胞の選択的活性化方法を検討していくことが、食物アレルギーの治療として期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohshima Y, Yamada A, Tokuriki S, Yasutomi M, Omata N, Mayumi M. Transmaternal exposure to bisphenol A modulates the development of oral tolerance. *Pediatr Res* (in press)
- 2) 大嶋勇成 アレルギー性炎症の発症機序 日本小児科学会誌 111:16-22(2007)
- 3) 大嶋勇成 食物アレルギーの免疫療法の現状と展望 小児科臨床 59:1409-1415(2006)
- 4) 大嶋勇成 小児喘息における ICS の有用性と位置付け 臨床免疫・アレルギー 46:48-52(2006)
- 5) 大嶋勇成 胎内感作とアトピー素因 臨床免疫・アレルギー科 46:262-266(2006)
- 6) CoQ10 の臨床的研究：小児疾患と CpQ10 徳力周子、塚原宏一、大嶋勇成、古畑律代、塚原康代、谷崎崇、太田徳仁、西井学、関根恭一、眞弓光文 機能性食品と薬理栄 3:241-248(2006)
- 7) 衛生仮説の妥当性と矛盾点 大嶋勇成 小児アレルギーシリーズ：喘息 218-220(2006) 斉藤博久監修、勝沼俊雄編 診断と治療社

##### 2. 学会発表

- 1) Ohshima Y et al. Roles of dendritic cells in allergic inflammation; a new therapeutic target for bronchial asthma. Korean Academy Pediatric Allergy Respiratory Diseases 2006. Seoul, Korea, Oct. 21 2006
- 2) 大嶋勇成 シンポジウム：乳幼児気管支喘息治療の早期介入 アレルギー性炎症の発症機序 第109回日本小児科学科学術集会 金沢 Apr. 21-23, 2006
- 3) 山田彰子、大嶋勇成、小俣合歓子、安富素子、徳力周子、眞弓光文 CD8+ T 細胞による即時型食物アレルギー症状抑制効果の検討 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京

May 30-Jun. 1, 2006

- 4) 大嶋勇成、山田彰子、安富素子、小俣合歓子、徳力周子、眞弓光文 母体を介する Bisphenol A への暴露が経口トレランスに及ぼす影響 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 May 30-Jun. 1, 2006
- 5) 安富素子、金谷由宇子、山田彰子、大嶋勇成、眞弓光文 呼吸困難、喘鳴を主訴に初回入院となった患児の予後因子の検討 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 May 30-Jun. 1, 2006
- 6) 大嶋勇成 シンポジウム：Th1/Th2 パラダイムの再評価—マウスからヒトへ— 樹状細胞と T 細胞のクロストークからみたアレルギー性炎症制御の可能性 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 Nov. 2-4, 2006
- 7) 徳力周子、山田彰子、大嶋勇成、眞弓光文 エンドセリン1 刺激による肺線維芽細胞の機能的変化に及ぼすロイコトリエン D4 の作用 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会東京 Nov. 2-4, 2006
- 8) 山田彰子、大嶋勇成、小俣合歓子、安富素子、徳力周子、眞弓光文 CD8+ T 細胞による即時型食物アレルギー症状抑制効果の検討 第43回日本小児アレルギー学会 幕張 Nov. 25-26, 2006
- 9) Nakajima T, Baba N, Hieshima K, Ohshima Y, Yoshie O, Saito H. Human CCR6+CD4+ T lymphocytes produce a large amount of CCL20 upon immunological stimulation. 第36回日本免疫学会 大阪 Dec. 11-13, 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アレルギー性疾患発症と自然免疫に関する研究  
—アレルギー疾患における自然免疫関連遺伝子多型の検討—

分担研究者 玉利 真由美 理化学研究所遺伝子多型研究センターアレルギー体質関連遺伝子研究チーム  
研究協力者 広田 朝光 理化学研究所遺伝子多型研究センターアレルギー体質関連遺伝子研究チーム

研究要旨

アレルギー性疾患の発症・重症化因子を明らかにするために、自然免疫の TLR signaling に関連した遺伝子多型について症例対照相関解析を行った。エクソン周辺 100bp を含む領域について遺伝子多型を同定し、Haploview を用いて連鎖不平衡マップを作成、Tag SNPs を選定した。コントロール(非喘息 745 例)、小児喘息 548 例、成人喘息 468 例を用いて相関解析を行った。IL-13 遺伝子上に R110Q の遺伝子多型とは連鎖不平衡にない、プロモーター領域の遺伝子多型が 8 個同定された。R110Q は小児喘息の IgE 値と相関を認め、プロモーター領域の SNP は成人喘息重症度と相関を認めた。IRF3 遺伝子上に 15 個の遺伝子多型を認めた。小児喘息において IRF3 のプロモーター領域及びイントロン 6 の遺伝子多型と小児喘息重症度、血清 IgE 値との相関が認められた。さらにこれらの多型の機能解析を進めて行く。

A. 研究目的

アレルギー発症進展重症化に関与する体質要因について遺伝子多型を用いた症例対照相関解析を用いて明らかにする。特に自然免疫の TLR signaling に関連した遺伝子多型について症例対照相関解析を行い、さらに相関の認められた遺伝子については機能解析を行い、遺伝子多型が病態に及ぼす影響について検討し、分子レベルでの病態解明を行う。

B. 研究方法

検討対象は TLR ファミリーと下流の Adaptor molecule (MyD88, TRIF, TRAM 等) さらに IL-6、IL-13、TNF  $\alpha$ 、IFN  $\beta$  である。データベースより各候補遺伝子のゲノム構造を入手し、エクソン周辺 100bp を含む領域について喘息患者 24 名において塩基配列を決定し、遺伝子多型を同定する。それらを Haploview を用いて連鎖不平衡マップを作成し、Tag SNPs の選定を行う。選定された遺伝子については TaqMan 法、及び Invader 法を用いてタイピングを行い、相関解析を行う。用いるサンプルはコントロール (非喘息 745 例)、小児喘息 548 例、成人喘息 468 例である。さらに広い範囲に存在する遺伝子については HapMap project による LDmap による遺伝子多型情報より intron 部分の TagSNP の選出も合わせて行う。

C. 研究結果

IL-13 遺伝子上に 15 個の遺伝子多型を認めた。

これまでに多くの報告のある R110Q の遺伝子多型とは連鎖不平衡にない、プロモーター領域の遺伝子多型 8 個同定され、頻度が 10%以上、連鎖不平衡を加味し、R110Q を含む 3 つの SNPs で検討した結果、R110Q は小児喘息の IgE 値と相関を認め、プロモーター領域の SNP は成人喘息重症度と相関を認めた。IRF3 遺伝子上に 15 個の遺伝子多型を認めた。小児喘息において IRF3 のプロモーター領域及びイントロン 6 の遺伝子多型と小児喘息重症度、血清 IgE 値との相関が認められた。

D. 考察

IL-13 は気道リモデリングに重要な役割を果たすと考えられている。今回、成人気管支喘息重症度に関連するこれまで検討されていない IL-13 の遺伝子多型が同定されたことにより、その多型の機能を検討し、重症化のメカニズムの一端を解明することが重要と考えられた。IRF3 は TLR3、及び TLR4 のシグナル伝達において IFN- $\beta$  の転写を誘導する転写因子である。さらに IRF3 は p65 と複合体を形成し、TLR4 経路からの IFN- $\beta$  の転写を誘導すると考えられており、グルココルチコイドはこの経路を特異的に抑制すると報告されている。小児重症喘息との相関が認められたことから、遺伝子多型の IRF3 の転写調節機構への影響についての検討が必要と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsuda A, et al. Genetic polymorphisms in the promoter of the interferon gamma receptor 1 gene are associated with atopic cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 ;48(2):583-9.
  - 2) Onouchi Y, Tamari M, Takahashi A, Tsunoda T, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H, Wakui K, Fukushima Y, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A. A genomewide linkage analysis of Kawasaki disease: evidence for linkage to chromosome 12. *J Hum Genet.* 2007;52(2):179-90.
  - 3) Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 in press
  - 4) Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T, Shibasaki M, Noguchi E. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. *J Hum Genet.* 51:677-85, 2006
  - 5) Hirota T, Hasegawa K, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Shirakawa T, Doi S, Fujita K, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. Association between ADAM33 polymorphisms and adult asthma in the Japanese population. *Clin Exp Allergy.* 36:884-91, 2006
  - 6) Nakashima K, Hirota T, Obara K, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshihara S, Ebisawa M, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in MMP-9 is associated with childhood atopic asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 26;344:300-7, 2006
  - 7) Nakashima K, Hirota T, Obara K, Shimizu M, Jodo A, Kameda M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Kishi F, Yoshihara S, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. An association study of asthma and related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway. *J Hum Genet.* 51:284-91, 2006
  - 8) Nakashima K, Hirota T, Suzuki Y, Matsuda A, Akahoshi M, Shimizu M, Jodo A, Doi S, Fujita K, Ebisawa M, Yoshihara S, Enomoto T, Shirakawa T, Kishi F, Nakamura Y, Tamari M. Association of the RIP2 gene with childhood atopic asthma. *Allergology International* 55: 77-83, 2006
  - 9) Cheng L, Hirota T, Enomoto T, Tamari M, Akahoshi M, Matsuda A, Shimizu M, Takahashi N, Enomoto K, Yamasaki A, Mao XQ, Hopkin JM, Shirakawa T. Lack of Association between the IL13 Variant Arg110Gln and Susceptibility to Cedar Pollinosis in a Japanese Population. *Int Arch Allergy Immunol.* 139: 25-30, 2006.
- ### 2. 学会発表
- 1) 「Functional Haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma.」 Keystone symposia Allergy, Allergic Inflammation and Asthma April6-11, 2006. Breckenridge, Colorado, 4/7/2006
  - 2) 「アレルギーはなぜ増えたのか ゲノムからのアプローチ」立川ロータリークラブ 講演立川パレスホテル, 4/14/2006
  - 3) 「遺伝子多型を用いた解析喘息になりやすい体質と感染症」大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター医局セミナー 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 2 階会議室, 5/25/2006
  - 4) 「ヒトゲノム研究からオーダーメイド医療へ アレルギー疾患のゲノム解析」お茶の水女子大学 化学・生物総合管理の再教育講座お茶の水女子大学, 5/27/2006
  - 5) 「自然免疫関連遺伝子多型と気管支喘息」第 46 回日本呼吸器学会学術講演会 日本呼吸器学会, 6/3/2006
  - 6) 「アレルギー疾患と遺伝要因」第 57 回臨床アレルギー研究会 富国生命ビル会議室,

6/17/2006

- 7) 「遺伝子多型を用いた気道アレルギーのメカニズムの解明」第49回関東耳鼻咽喉科アレルギー懇話会 日本教育会館 日本臓器製薬, 9/3/2006
- 8) 「喘息と感染症；遺伝子多型を用いた病態解析」第58回臨床アレルギー研究会(関西) 特別講演 I ラマダホテル大阪(旧:東洋ホテル) 2F 桜の間, 10/14/2006
- 9) 「微生物感染が原因増悪因子となる疾患についての最近の話題 気管支喘息と感染症；遺伝子多型を用いた病態解析」第43回日本細菌学会中部支部総会 岐阜県岐阜市 ばるるホール (ばるるプラザ2階) シンポジウム, 10/19/2006
- 10) 「気管支喘息の遺伝要因と薬剤の効果について」第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 教育セミナー9 東京国際フォーラム第5会場 HallD7, 11/3/2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

TSLP 遺伝子の多型に基づく免疫疾患の検査法  
整理番号P-C61134  
国際特許分類G01N 33/50

## アレルギー性疾患の発症と環境アレルゲンに関する研究

分担研究者 安枝 浩 国立病院機構相模原病院臨床研究センター室長  
研究協力者 西岡 謙二 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
齋藤 明美 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
永井 智 花王株式会社ハウスホールド研究所

### 研究要旨

アレルゲン曝露の実態を正しく反映する室内環境アレルゲンの測定法を確立することを目的として、従来からある掃除機法以外のサンプリング方法について検討を加え、その有用性について評価した。鼻腔内に装着した不織布製のフィルターによる鼻サンプリング法、医療用粘着テープをヒトの皮膚表面に貼付するテープ法、シャーレを一定期間室内に放置した後に回収するシャーレ法である。このうち、テープ法とシャーレ法によって得られたダニアレルゲン Der 1 量は、日常生活中におけるダニアレルゲン曝露の実態を正しく反映している可能性が示された。両方法ともに簡便で、患者にかける負担がきわめて少ないサンプリング法であるため、ダニアレルゲン曝露の指標としてさまざまな疫学調査への応用が期待される。

### A. 研究目的

アレルギー性疾患における感作、発症、増悪には環境アレルゲンに対する曝露が密接に関わっている。これまで、室内環境アレルゲン曝露の指標には、掃除機法で集めた室内塵中のアレルゲン量が主に用いられてきた。しかし、室内環境アレルゲンは吸入性アレルゲンであり、空気中に浮遊しているアレルゲン粒子が気道を介して体内に入ってくる。特にダニアレルゲンの場合には、発生源である室内塵中の汚染量が曝露量(空気中濃度)を正確に反映しているとは限らないということが明らかにされている。アレルゲン曝露の実態を正しく反映する室内環境アレルゲンの測定法を確立することを目的として、掃除機法以外のサンプリング方法について検討を加え、その有用性について評価した。

### B. 研究方法

3種類のサンプリング方法について検討した。不織布製の円錐状フィルター(鼻サンプラー)を鼻腔内に装着、捕集する鼻サンプリング法、医療用粘着テープ(テガダーム、6 cm x 7 cm)をヒトの皮膚表面に貼付するテープ法、直径 84 mm のシャーレを一定期間(1週間-3ヶ月)室内のタンス上などに放置した後に回収するシャーレ法(Petri dish法)である。鼻サンプリング法では、3人の成人ボランティアを対象に鼻サンプラーを装着してさまざまな家事行動、就寝を行い、行動と捕集ダニアレルゲン(Der 1)量の関係を

解析した。また、同時に実施した通常のポンプを用いてのエアサンプリング法による捕集 Der 1 量との関係を解析した。テープ法では、アトピー性皮膚炎乳児を対象に体表 5 部位からサンプリングを行い、各部位の皮膚表面 Der 1 量を比較した。また、成人ボランティアを対象に就寝前後の頬表面 Der 1 量を比較した。シャーレ法では、寝室、居間に3ヶ月間放置したシャーレに堆積した Der 1 量と掃除機法 Der 1 量や各種室内環境因子との関係を解析した。一部の住居においては、シャーレ設置時に一定の条件で寝具から発塵をさせ、そのときのエアサンプリング法による捕集 Der 1 量とシャーレ法 Der 1 量との相関も調べた。

サンプリングした試料中の Der 1 量は、掃除機法によるものは比色法 ELISA で、鼻サンプリング法、エアサンプリング法、テープ法、シャーレ法によるものは高感度蛍光 ELISA で測定した。

### C. 研究結果

鼻サンプリング法では、曝露が想定される家事行動中に鼻サンプラー、エアサンプラーで3分間、または15分間サンプリングをしたが、3家庭での合計39測定中、両方法でともに ELISA での検出下限値(4 pg/sample)以上の Der 1 が検出されたのはわずか5測定のみであった。しかし、この5測定では両方法での捕集 Der 1 量に良好な相関が認められた。一方、睡眠中(6時間)の両方法での捕集 Der 1 量には一定の関係は見いだせなかった。

テープ法により乳児の頬部、胸腹部、背部、肘窩、膝窩の5部位の皮膚表面 Der 1 量を測定した結果、Der 1 量の平均値、検出率ともに頬部が最高値であった(表 1)。また、ダニ感作例の頬表面 Der 1 量は非感作例よりも有意に高値であった(図 1)。成人ボランティア起床直後の頬表面 Der 1 量は就寝前に比べて有意に高値を示した。

表 1 乳児皮膚表面 Der 1 の検出量と検出率 (n = 70)

	平均値 (ng/m <sup>2</sup> )	検出率 (%)
頬部	2.36	80.0
胸腹部	1.29	69.6
背部	0.92	44.3
肘窩	1.13	57.1
膝窩	1.32	64.3

・ 0.5 ng/m<sup>2</sup>

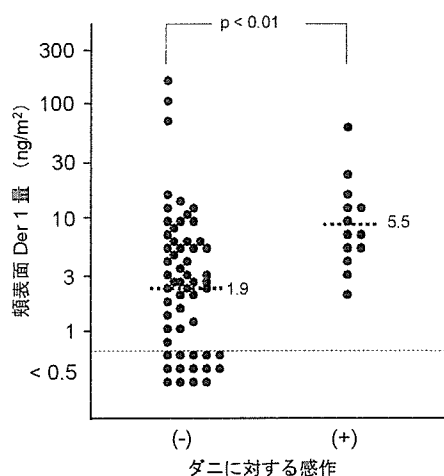


図 1 テープ法による頬表面 Der 1 量とダニに対する感作

一般家庭 52 軒の寝室にシャーレを 3 ヶ月間放置して、そこに堆積した Der 1 量と掃除機法で集めた寝具塵中 Der 1 量との関係をみたところ、両者の間には全く相関は認められなかった(図 2)。そこで、一定の条件で寝具から発塵させた時にエアサンプリングを実施した 11 軒の家庭について、シャーレ法による Der 1 量と寝具塵中 Der 1 量、エアサンプリング法による捕集 Der 1 量との関係を調べた。シャーレ法による Der 1 量は、図 2 と同様に、寝具塵中 Der 1 量とは相関しなかったが、エアサンプリング法による捕集 Der 1 量、すなわち空気中の Der 1 濃度ときわめて良好に相関した(図 3)。

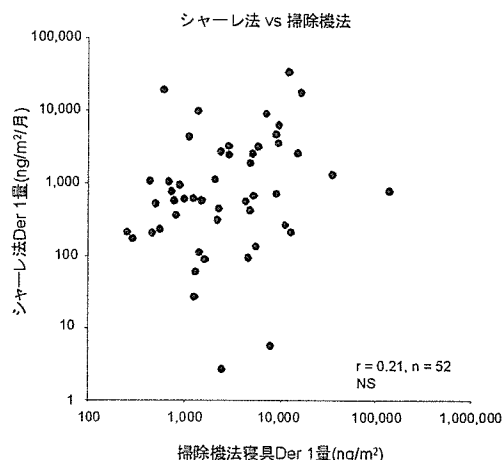


図 2 シャーレ法による寝室内落下塵中 Der 1 量と寝具塵中 Der 1 量との関係

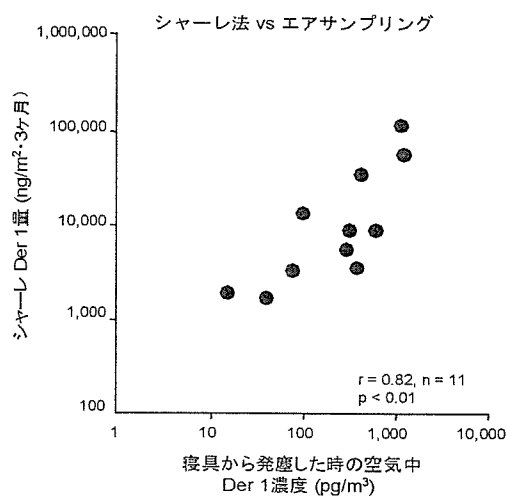


図 3 シャーレ法による寝室内落下塵中 Der 1 量と寝具から発塵した時の室内空気中 Der 1 濃度との関係

#### D. 考察

鼻サンプリング法では体内に取り込まれるアレルギー量そのもの、すなわち曝露量を直接測定、評価することができる。しかし、この方法を患者を対象にした実態調査に適用することには無理があり、その使用目的は研究者やボランティアによるモデル実験に限定される。今回の検討において、5 または 15 分間のサンプリングでは家事行動中にダニアレルギーが検出される頻度は非常に低く、家事行動中の曝露量を評価するにはより長時間のサンプリングが必要であった。また、睡眠中のサンプリングでは、鼻サンプリング法による測定値はエアサンプリング法に比べて、精度、再現性に乏しかった。その理由として、鼻腔間隙からの漏れ、あるいは口呼吸などが考



えられ、サンプラーの改良も含めて再検討の必要性が示された。

テープ法では、これまでは主に肘窩からのサンプリングを実施していたが、頬部のほうが捕集Der 1量、検出率ともに高まることが明らかになった。乳幼児の場合には頬部からサンプリングすることに問題はないが、成人の特に女性の場合には頬部からのサンプリングが常に可能であるとは限らない。頬部に代わりうる部位からのサンプリングについても検討する必要がある。ダニ感作例のほうが皮膚表面Der 1量が有意に高値であったという図1のデータは、テープ法での測定値が乳児期におけるダニアレルゲン曝露の指標として有用であることを強く支持している。

シャーレ法はもともとPetri dish法として欧米で古くから行われているサンプリング方法で、一般的なELISAの検出感度では日常生活中にエアサンプリングをした試料中のダニアレルゲンが全く検出できないために、その代替法として実施されてきたものである。そのため、シャーレ法での測定値と室内空気中のダニアレルゲン濃度との関係については全く不明であった。今回の評価によって、3ヶ月間寝室内に放置したシャーレに堆積したDer 1量は、寝具塵中Der 1量とは相関せず、スポットで実施した寝具からの発塵試験における空気中Der 1濃度ときわめてよく相関するという興味深い結果が得られた。このことは、シャーレ法での測定値も日常生活におけるダニアレルゲン曝露量の指標になりうる可能性を強く示唆している。

#### E. 結論

テープ法、シャーレ法はいずれも簡便で、患者にかける負担がきわめて少ないサンプリング法である。乳幼児を対象にしたコホート研究において、ダニアレルゲン曝露の指標としての有用性が期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 2) Nishioka K, Saito A, Akiyama K, Yasueda H. Effect of home environment control on children with atopic or non-atopic asthma.

Allergol Int 55: 141-148, 2006.

- 3) 高橋佑輔, 鈴木政宏, 伴武, 高野勝幸, 永井智, 横須賀道夫, 榎本雅夫, 安枝浩. 室内環境整備技術の開発 スギ花粉の室内への侵入挙動及びその分布. アレルギーの臨床 26: 67-71, 2006.

##### 2. 学会発表

- 1) 安枝浩. 教育講演 小児アレルギー疾患と室内環境アレルゲン. 第43回日本小児アレルギー学会 2006. 11. 25. 幕張
- 2) 高橋佑輔, 永井智, 高野勝幸, 鈴木政宏, 横須賀道夫, 榎本雅夫, 齋藤明美, 安枝浩. 室内環境整備技術の開発 XIII. 屋外で曝露した繊維製品に付着する花粉量. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 2006. 11. 3. 東京
- 3) 永井智, 高野勝幸, 鈴木政宏, 高橋佑輔, 横須賀道夫, 榎本雅夫, 齋藤明美, 安枝浩. 室内環境整備技術の開発 XIV. 寝具に付着した花粉の就寝時吸入量. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 2006. 11. 3. 東京
- 4) 高野勝幸, 鈴木政宏, 高橋佑輔, 永井智, 齋藤明美, 安枝浩, 榎本雅夫. 住居内へのスギ花粉侵入に関する実態および対策. 日本花粉学会第47回大会 2006. 10. 14. 和歌山
- 5) 渡辺利沙, 村上周三, 加藤信介, 吉川翠, 安枝浩, 大森敏明, 広瀬将光. 室内環境におけるダニアレルゲンの飛散に関する研究 実大居室型チャンバーにおける暖房稼働時の床面堆積粒子の飛散実験. 平成18年度空気調和・衛生工学会大会 2006. 9. 27. 長野
- 6) 齋藤明美, 鈴木政宏, 高橋佑輔, 永井智, 横須賀道夫, 安枝浩, 秋山一男. 鼻サンプラーによる捕集スギ花粉アレルゲン量の評価. 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 2006. 5. 30. 東京
- 7) 鈴木政宏, 高野勝幸, 高橋佑輔, 永井智, 横須賀道夫, 榎本雅夫, 齋藤明美, 安枝浩. 室内環境整備技術の開発 XII. 空間中ダニアレルゲンの指標としての堆積塵中ダニアレルゲン. 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 2006. 5. 30. 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## RS ウイルス感染と小児気管支喘息発症に関する研究

分担研究者 下条 直樹 千葉大学大学院医学研究院小児病態学助教授  
研究協力者 富板 美奈子 千葉大学大学院医学研究院小児病態学助手  
有馬 孝恭 千葉大学大学院医学研究院小児病態学  
井上 祐三朗 千葉大学大学院医学研究院小児病態学  
酒巻 建夫 国立病院機構千葉東病院研究検査科長  
勝木 利行 JFE 川鉄千葉病院小児科部長

### 研究要旨

1) 成人の気道アレルギー患者、非アトピー健康成人の末梢血単核球からそれぞれ 32 株、29 株の RSV 特異的 CD4 陽性 T 細胞株を樹立した。RSV 刺激による T 細胞株の増殖能にはアレルギー患者由来 T 細胞株と健康人由来 T 細胞株の間に差異はなかったが、培養上清中の IL-4/IFN- $\gamma$  は有意にアレルギー患者由来 T 細胞株が健康人由来 T 細胞株に比して高値であった。これらの T 細胞株中で RSV の F または G タンパクを認識する T 細胞株のサイトカイン産生を調べた。その結果、F タンパク反応性 T 細胞株の F タンパク刺激での培養上清中の IL-4/IFN- $\gamma$  はアレルギー患者由来 T 細胞株と健康人由来 T 細胞株間で差を認めなかったのに対し、G タンパク反応性 T 細胞株の G タンパク刺激での培養上清中の IL-4/IFN- $\gamma$  はアレルギー患者由来 T 細胞株で健康人由来 T 細胞株に比較して有意に高値であった。以上から RSV G タンパクを認識する CD4T 陽性 T 細胞の機能が気道アレルギー患者と健康人の間で異なる可能性が示唆された。

2) RSV の G タンパクは 298 残基のアミノ酸からなる。これをカバーする 16mer の overlapping ペプチドの刺激に対する末梢血単核球からの IFN- $\gamma$  産生を指標にして CD4 陽性 T 細胞が認識するエピトープを検討した。その結果、複数の RSV G タンパクの T 細胞エピトープが同定された。その中から、さらに抗 HLA 抗体による阻害実験などから HLA DRB1\*0405 拘束性の T 細胞エピトープを同定した。

### A. 研究目的

乳児の細気管支炎は Respiratory syncytial virus (RSV) を主要原因ウイルスとする下気道感染症で、反復性喘鳴、喘息発症のリスクを高めることが知られている。一方、ほとんどすべての小児は 3 歳までに RSV に罹患するとされているが大部分の感染は上気道感染で終息して下気道感染には進展しない。以上から RSV に対する応答性には個体差が存在することが示唆されるがその詳細は明らかになっていない。本研究では RSV に対する自然免疫、獲得免疫能の解析をもとに RSV 感染と小児気管支喘息発症の関連を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

1) RSV 特異的 CD4 陽性 T 細胞株を気道アレルギー患者および非アトピー健康人末梢血単核球から樹立して、そのサイトカイン産生能を検討することにより、アレルギー患者と非アトピー健康人での RSV に対する T 細胞免疫応答の差異を解析す

る。さらに、RSV に対する生体防御上重要な F および G タンパクに対する免疫応答を気道アレルギー患者および非アトピー健康人から樹立した T 細胞株を用いて比較解析して RSV F または G タンパクに対する応答性と個体差の関連を明らかにする。

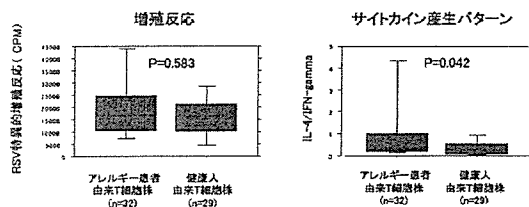
2) RSV G タンパクの一次構造をもとに作成した合成ペプチドに対する末梢血リンパ球のサイトカイン産生能をもとに、CD4 陽性 T 細胞が認識する RSV G タンパクの抗原決定基を同定する。RSV F, G タンパクは WHO から供与されたものを用いた。

### C. 研究結果

1) 3 名の成人の気道アレルギー患者と 3 名の非アトピー健康成人の末梢血単核球を IL-2 存在下に不活化 RSV 抗原で刺激して、RSV 特異的 T 細胞株を樹立した。抗原特異性は増殖反応により確認された。アレルギー患者からは 32 株、非アトピー健康人からは 29 株の RSV 特異的 T 細胞株が樹立された。これらの T 細胞株はすべてフローサイト

メトリーにより CD4 陽性細胞株であった(結果は示さず)。RSV 刺激による T 細胞株の増殖能にはアレルギー患者由来 T 細胞株と健康人由来 T 細胞株の間に差異はなかったが(図 1、 $p=0.583$ )、培養上清中の IL-4/IFN- $\gamma$  は有意にアレルギー患者由来 T 細胞株で高値であった(図 1、 $p=0.042$ )。

図1 不活化RSV抗原に対するT細胞株の応答性



ついでこれらの T 細胞株中で F または G タンパクを認識する T 細胞株のサイトカイン産生を調べた。その結果、F タンパク反応性 T 細胞株の F タンパク刺激での培養上清中の IL-4/IFN- $\gamma$  はアレルギー患者由来 T 細胞株と健康人由来 T 細胞株間で差を認めなかったのに対し(図 2、 $p=0.787$ )、G タンパク反応性 T 細胞株の G タンパク刺激での培養上清中の IL-4/IFN- $\gamma$  はアレルギー患者由来 T 細胞株では健康人由来 T 細胞株に比較して有意に高値であった(図 2、 $p=0.016$ )。RSV F および G タンパクに反応する T 細胞株の割合はアレルギー患者と健康人に間に差はなかった(表 1)

図2 F反応性およびG反応性T細胞株の抗原刺激によるサイトカイン産生パターン

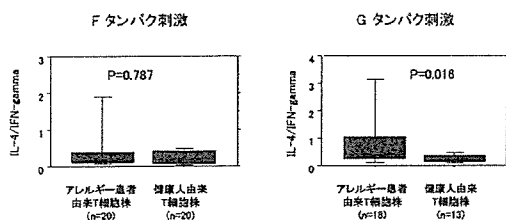


表1 RSV特異的T細胞株の抗原特異性と細胞株数

	抗原特異性			
	F タンパク	G タンパク	Fおよび G タンパク	F、G以外
アレルギー患者由来 T 細胞株 (32)	5*	3	15	9
健康人由来 T 細胞株 (29)	9	2	11	7

\* 応答性を示した T 細胞株の数

2) RSV の G タンパクは 298 残基のアミノ酸からなる。これをカバーする 16mer の overlapping ペプチドの刺激に対する末梢血単核球からの IFN- $\gamma$  産生を指標にして CD4 陽性 T 細胞が認識するエピトープを検討した(図 3)。その結果、複数の RSV G タンパクの T 細胞エピトープが同定された。その中から、さらに抗 HLA 抗体による阻害実験などから HLA DRB1\*0405 拘束性の T 細胞エピトープが G タンパクのアミノ酸残基 163-178 のペプチドに含まれることが明らかとなった(表 2)。

図3 CD4+T細胞エピトープ解析のためのRSV Gタンパク全アミノ酸をカバーする合成ペプチドの作成

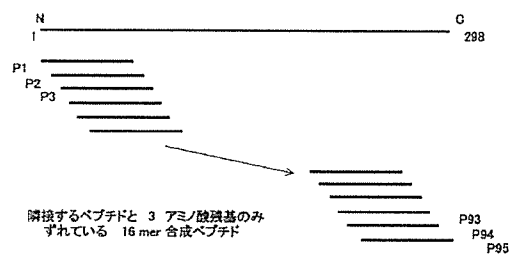


表2 CD4+T細胞が認識するRSV Gタンパクのエピトープ

ドナー	HLA-DRB1*	主要エピトープが存在するペプチド
1	0405, 0901	P55
2	0405, 1202	P55
3	0405, 1501	P14, P55
4	0406, 1201	P55, P59
5	1401, 1502	P52, P61
6	0901, 1101	P60

P55: Gタンパク アミノ酸残基163-178

#### D. 考察

本研究によりアレルギーの有無で RSV に対する獲得免疫の機能に差があることが示唆された。さらにこの差異は RSV 感染免疫において重要なタンパクである F、G タンパクのうち G タンパクに対してのみ観察された。すなわちアレルギー患者では RSV の G タンパクに対する CD4 陽性 T 細胞の認識機構が健康人のそれと異なると考えられた。この結果はアレルギー疾患を起こしやすい BALB/C マウスでの RSV 感染モデルにおいて、F タンパクは Th1 型の反応を誘導するのに対し、G タンパクは Th2 型の反応を誘導するという結果と一致して興味深い。これは、個体側の素因が RSV の特定のタンパクに対する免疫応答の

規定に関与することを示唆する。G タンパクに対する免疫応答が小児の気道アレルギー患者と健康児で質的に異なるか否かは RSV 感染と喘息の関連においてきわめて重要であり、RSV による下気道感染症を発症しやすい小児期を対象として同様の研究を行う必要がある。しかし、今回の研究のように小児から RSV 特異的 T 細胞株を樹立して解析を行うことは容易ではない。

そこで大量の採血が困難な小児で G タンパクに対する免疫応答をエピトープレベルで解析するために ELISPOT 法を用いることにした。RSV G タンパクの全領域をカバーする overlapping peptide を作成して末梢血単核球中の IFN- $\gamma$  産生細胞を検出したところ、特定のペプチドに反応する細胞を検出した。本研究では複数の成人検体を用いて、日本人に多い HLA DRB1\*0405 拘束性の G タンパクの CD4 陽性 T 細胞エピトープを同定した。これにより HLA DRB1\*0405 を有する気道アレルギー、非アレルギー患者を対象としてアレルギーの有無と RSV G タンパクの同一エピトープへの免疫応答の関連を明らかにすることが可能と考えられる。しかしながら HLA DRB1\*0405 を有する個体は日本人全体の 30%程度であり、必ずしも全ての気道アレルギー患者に対して検討を行えるわけではない。また RSV G タンパクの特定のエピトープがアレルギーに関連するか否かもヒトではまだ明らかではない。RSV G タンパクを大量に精製することは容易ではないので、今後は RSV G タンパクの全領域をカバーする overlapping peptide の mixture に対する末梢血単核球の Th1/Th2 サイトカイン産生能を検討することで RSV 細気管支炎患者、RSV 上気道感染患者、気道アレルギー患者での RSV G タンパクに対する免疫応答の特性を解析する予定である。さらに、これらの対象で HLA クラス 2 分子のタイピングを行なうことにより、RSV G タンパクに対する免疫応答に特定の HLA 分子が関連しているかを検討する。さらに十分な細胞数が得られれば、RSV G タンパク overlapping peptide mixture のみでなく特定のエピトープと Th1/Th2 バランスが関連しているかを明らかにしたい。これにより RSV に対する免疫応答の個体差と RSV 細気管支炎、気道アレルギー発症の機構が解明されることが期待される。

#### E. 結論

- 1) RSV G タンパクに対する獲得免疫応答がアレルギー患者で正常人と異なっている可能性が示された。
- 2) G タンパクの CD4 陽性 T 細胞エピトープを同定した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし