

ンの間の抗原量を基に作成したアレルギー物質抗原量食品交換表を表1から表3に示す。

表1 KKFC-Eと固ゆで卵の抗原量を基にした食品交換表

KKFC-E量	OA, OM量	固ゆで卵摂取可能量	OA, OM含有量
1/20	OA 44mg OM 32mg	固ゆで卵白(12分) 1g (1/32個)	OA 38 μ g OM 31.5mg
1/10	OA 88mg OM 64mg	固ゆで卵白(12分) 2g (1/16個)	OA 76 μ g OM 63mg
1/5	OA 176mg OM 128mg	固ゆで卵白(12分) 4g (1/8個)	OA 152 μ g OM 126mg
3/10	OA 264mg OM 192mg	固ゆで卵白(12分) 5.3g (1/6個)	OA 228 μ g OM 189mg
全量	OA 880mg OM 640mg	固ゆで卵白(12分) 20g (5/8個)	OA 760 μ g OM 630mg

表2 KKFC-Mと牛乳の抗原量を基にした食品交換表

KKFC-M量	抗原含有量	摂取可能量	抗原含有量
1/20	β -LG 0.72mg カゼイン 45mg	牛乳 0.9ml	β -LG 0.71mg カゼイン 30.6mg
		育児用調整 粉乳 1.4ml	β -LG 0.69mg カゼイン 23.8mg
		加熱牛乳 1ml	β -LG 0.046mg カゼイン 45mg
1/10	β -LG 1.44mg カゼイン 90mg	牛乳 1.8ml	β -LG 1.42mg カゼイン 61.2mg
1/5	β -LG 2.88mg カゼイン 180mg	牛乳 3.6ml	β -LG 2.84mg カゼイン 122.4mg
3/10	β -LG 4.32mg カゼイン 270mg	牛乳 5.4ml	β -LG 4.27mg カゼイン 184mg
全量	β -LG 14.4mg カゼイン 900mg	牛乳 18ml	β -LG 14.2mg カゼイン 612mg

表3 KKFC-Wとうどん、パンの抗原量を基にした食品交換表

KKFC-W量	クワリフシンの量 (mg)	摂取可能なうどんの量	摂取可能なパンの量
1/20	4.8	0.7~1.0 g	0.5~0.9 g
1/10	9.5	1.5~2.0 g	1.0~1.8 g
1/5	19.1	3.0~4.0 g	2.0~3.5 g
3/10	28.6	4.5~6.0 g	3.0~5.3 g
全量	95.4	15.1~20.0 g	9.9~17.7 g

卵に関してはKKFC-Eが生卵であるため、固ゆで卵およびハンバーグなどの調理食品においては、オボムコイドの抗原量が問題となった。焼菓子では卵白アルブミンとオボムコイドの抗原性の低減化がほぼ同等におこり、短時間加熱の焼き菓子ではオボムコイドの抗原性の残存が問題となったが、長時間加熱の焼き菓子では、これまでいわれてきたこととは逆に、卵白アルブミンの抗原性の残存の方が問題となった。

牛乳に関しては加熱による抗原性の低減化はほとんど認められず、ヨーグルト中にも牛乳中とほぼ同等の抗原量が含まれていた。焼菓子中においてもカゼインの抗原性の低減化は認められなかったが、 β -ラクトグロブリンの抗原性の低減化が認められた。

小麦は生で摂取することはないため、代表的な小麦製品であるうどんとパンについて検討した。パン中の卵や牛乳の有無による小麦の抗原性への影響はほとんど問題にならず、うどん、パンともに抗原量が一定の範囲内におさまることが明らかとなった。

D. 考察

Pilot studyではあるが、従来法による抗原量測定により数mg以下の抗原量を含む食品の誤食により即時型反応をおこした症例では抗原濃度が1-10ng/mlという低濃度の抗原刺激により好塩基球が活性化されることがわかり、低濃度域における好塩基球の活性化の評価が臨床的に有用であることが明らかとなった。

食物経口負荷試験を安全に行うためには、抗原特異的IgE抗体の測定のみならず、現行の保険診療において検査可能なHRTシオノギの結果がクラス4の中でも最低濃度におけるヒスタミン遊離率が20%を越える症例においては抗原診断のための食物経口負荷試験を行わずに治療にすすみ、食品除去中の場合には耐性はまだ獲得されていないと判断できることが示唆された。

厚生労働科学研究班による二重盲検食物負荷試験用食品を基準とした抗原量に対比させた食品中のアレルギー物質抗原量食品換算表は、加工や調理による抗原の低減化を反映させることができ、負荷試験の結果を食事指導に反映させる有用な指標となり、食物アレルギー児および家族のQOLの向上に大きく寄与するものと考えられる。

E. 結論

抗原量という視点から、生体側の反応と食品側の抗原性についての検討を行った。

1-10ng/ml という微量の抗原により *in vitro* において好塩基球が活性化される場合には数 mg 相当の該当抗原を含む食品を摂取することにより即時型反応が惹起されることが予測できるため、安全性のために抗原診断あるいは耐性獲得の確認のための負荷試験を行わずに食事療法の開始あるいは継続することが望ましいと考える。

食品中の抗原量を標準品の抗原量と対比させたアレルギー物質抗原量食品交換表を作成することにより、食物負荷試験の結果および誤食時の情報を食事指導に生かすことが可能となり、食物アレルギー児の QOL の向上に大きく貢献できると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤節子, 宇理須厚雄, 各務美智子他: 自動分析装置によるヒスタミン遊離試験の臨床的有用性の検討. 医学と薬学 2008;59(5):917-24
- 2) 伊藤節子: 食物アレルギー. 「小児科学第3版」(大関武彦, 近藤直実編) p.962-5, 医学書院, 2008
- 3) 伊藤節子: おもなアレルギーとその対策 1. 卵. 「食物アレルギーの治療と管理 改訂第2版」(小林陽之助, 金子一成編) p.123-32, 診断と治療社, 2008
- 4) 伊藤節子: 栄養指導. 小児科臨床ピクシス5 「年代別アレルギー疾患への対応」(五十嵐隆, 海老澤元宏編) p.240-3, 中山書店, 2009
- 5) Aska Eda, Kazuko Sugai, Hiromi Shioya, Asako Fujitsuka, Setsuko Ito, Tsutomu Iwata, Tetsunori Funabiki: Acute allergic reaction due to milk proteins containing lactose added to corticosteroid for injection. Allergology International 2009;58:137-9

2. 学会発表

- 1) 伊藤節子: 調理・加熱等による食品中のアレルギー性の変化について, シンポジウム「食

物アレルギー研究の最近の進歩」, 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2008年6月13日, 東京)

- 2) 伊藤節子: アレルギー・酸化ストレスのレドックス制御-食物アレルギーとチオレドキシン. 第8回バイオストレスを考える会(2008年7月22日, 京都)
- 3) 伊藤節子: 調理の食物アレルギー抑制への貢献, シンポジウム「調理の役割」日本調理科学学会平成20年度大会(2008年8月31日, 名古屋)
- 4) 伊藤節子, 明石真未: 診断と治療の標準化を目指した食品中のアレルギー性の臨床的評価: 卵についての検討. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会(2008年11月27日, 東京)
- 5) 伊藤節子: 日本のアレルギー性疾患における食事療法-食物アレルギーと魚の話題を中心に- 2008 第6回釜山国際水産貿易 EXPO 栄養士学術セミナー (2008年11月14日, 釜山, 韓国)
- 6) 伊藤節子: 食べることを目指した食物アレルギーへの対応. 第7回横浜アレルギー研究会 (2009年1月21日, 横浜)
- 7) 伊藤節子, 明石真未, 伊東祐美, 本庄勉: 食品中のアレルギー物質測定の実用応用: アレルギー交換表の作成 (2009年2月14日, 東京)
- 8) 伊藤節子: 調理・加工による食物アレルギーの変化を踏まえた食事指導. 第1回食物アレルギーセミナー・あいち (2009年3月28日, 名古屋)

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ゲン特異的T細胞応答の解析—

研究分担者 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

研究要旨

近年、食物アレルギーに対するアレルゲン特異的免疫療法が注目され、有効性を示す報告が集積されつつある。我々もこれまで、低アレルゲン化された加熱脱オボムコイド卵白を用いた経口免疫療法を試み、約 50%の症例で卵白経口負荷試験の陰性化を認めている。本研究では、味、作製方法などの点で改良したオボムコイド減量加熱全卵を用いたアレルゲン特異的免疫療法を試み、併せて、治療前後でのアレルゲン特異的 T 細胞応答を解析して、寛容導入のメカニズムを検討した。これまでの行い得た症例は 8 例にとどまるが、4 例の寛解導入に成功し、安全に検討を遂行中である。アレルゲン特異的な T 細胞応答の解析では、preliminary ながら寛解導入に至った群と不応群で TH1/TH2 バランスや抑制性サイトカイン応答の相違を認めており、免疫療法の機序解明に寄与すると期待される。

A. 研究目的

食物アレルギーには有効な根治療法が確立していないが、近年アレルゲン特異的免疫療法が注目され、有効性を示す報告が集積されつつある。我々もこれまで、キュービー株式会社研究所との共同研究によって低アレルゲン化された加熱脱オボムコイド卵白の開発に成功し、これを用いた 1 ヶ月間の経口免疫療法を試み、約 50%の症例で卵白経口負荷試験の陰性化を認めている。しかしながら、アレルゲン特異的免疫療法の機序は必ずしも明らかではなく、したがって理論に基づいて免疫療法を改良することは困難な状況にある。

本研究では、味、作製方法などの点で改良したオボムコイド減量加熱全卵を用いたアレルゲン特異的免疫療法を試みる。併せて、治療前後でのアレルゲン特異的 T 細胞応答を解析して、寛容導入のメカニズムを検討し、免疫療法の改良に供する。

B. 研究方法

1) 対象

対象は下記の 4 項目すべてを満たす症例とする。

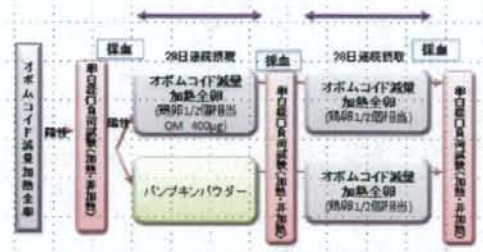
- ① 90℃15 分加熱全卵によって経口負荷試験が陽性。
- ② かぼちゃに対するアレルギーがない。
- ③ オボムコイド減量加熱全卵 (1 個相当) による経口負荷試験が陰性。
- ④ 年齢は 5 歳から 20 歳。

2) オボムコイド減量加熱全卵を用いた免疫療法の実施方法

オボムコイド減量加熱全卵はキュービー株式会社により、鶏卵を 90℃60 分加熱後、布袋に入れ、数回、水で洗浄することによって作製する。

オボムコイド減量加熱全卵 (鶏卵 1/2 個相当)) を混ぜ込んだ白粥あるいはプラセボであるパンキンパウダーを混ぜ込んだ白粥を 2 ヶ月間連日摂取する。

オボムコイド減量加熱全卵を用いた寛解導入



3) 経口負荷試験

オボムコイド減量加熱全卵の連日摂取前後に計 3 回 90℃15 分加熱鶏卵 (鶏卵 1 個相当) による経口負荷試験を実施する。

4) アレルゲン特異的 T 細胞応答の解析

免疫療法の前後で以下のごとくアレルゲン特異的 T 細胞応答の解析を行い、寛解導入の成否による、相違を検討する。

① アレルゲン特異的な T 細胞の増殖・サイトカイン産生の解析

末梢血単核球の細胞質内蛋白を CFSE 標識した後、アレルゲン存在下に培養する。特異的に増殖した T 細胞は分裂に伴い細胞質内の CFSE を娘細胞に分配するため蛍光強度が減弱する (CFSElow)。1 週間の培養の後、CD4 などの細胞表面マーカーや各種 cytokine (IFN- γ 、IL-4、IL-10、TGF- β など) に対する抗体と多重染色して flow cytometry 解析すると CD4 陽性で CFSElow の細胞即ちアレルゲン特異的なヘルパー T 細胞が産生する cytokine を同定する。同時に、培養上清中に産生される各種 cytokine を BioPlex を用いて 33 種同時に定量する。

② アレルゲン特異的な T 細胞に発現する SOCS family 遺伝子の解析をする。

対象から得た末梢血単核球を食物アレルゲン存在下に 16 時間培養する。細胞回収後 BioPlex を用いた QuantiGene システムにて、CISH, SOCS1, 3, 5 を含む 30 種目の mRNA を同時に測定する。

C. 研究結果

現在までに 90°C15 分加熱鶏卵負荷試験陽性で、オボムコイド減量加熱全卵の摂取可能な 8 名の免疫療法を施行した。初回の負荷試験では陰性でありながら、継続摂取により腹痛などの症状が出現し、免疫療法を続行できなかったもの 1 名、90°C15 分加熱鶏卵負荷試験が陰性化したもの 4 名、2 ヶ月後にも陽性にとどまったもの 3 名という結果であった。

アレルゲン特異的な T 細胞の解析を行い得た対象は、いまだ寛解誘導群 2 例、不応群 2 例にとどまるが、免疫療法により①アレルゲン特異的な CD4+IFN- γ +細胞が、寛解誘導群では増加していたが、不応群ではむしろ減少していた。②培養上清中の IL-13 が、寛解誘導群では減少していたが、不応群では変化が見られなかった。③培養上清中の IL-17F が、寛解誘導群では減少していたが、不応群では増加していた。④培養上清中の Eotaxin が、寛解誘導群では減少していたが、不応群では変化が見られなかった。⑤アレルゲン刺激で誘導される IL-10 mRNA が、不応群では減少していたが、寛解誘導群では変化が見られなかった。⑥アレルゲン刺激で誘導される SOCS-3 mRNA

が、不応群では減少していたが、寛解誘導群では増加していた。⑦アレルゲン刺激で誘導される TGFBI mRNA が、寛解誘導群では増加していたが、不応群では変化が見られなかった。

D. 考察

我々は従来加熱脱オボムコイド卵白を含むクッキーを用いた免疫療法を行い、約 40% の鶏卵アレルギー患者で寛解誘導に成功している。今回は、免疫療法の改善を目指して、オボムコイド含有量を 2 倍に増加させるとともに、クッキーに添加することで小麦タンパクにより低アレルゲン化されることを回避するため、低アレルゲン化全卵そのものの摂取による免疫療法を試みた。これまでのところ、大きな副作用はなく治療参加希望者も多いため、さらに症例を蓄積していきたい。

アレルゲン特異的な T 細胞応答の解析でも、未だ解析し得た症例数が少なく今後の検討を要するが、寛解導入し得た群と不応群では TH1/TH2 バランスや抑制性サイトカインに差がみられており、免疫療法の機序解明に寄与すると期待される。

E. 結論

加熱脱オボムコイド全卵を用いた鶏卵アレルギーに対するアレルゲン特異的な免疫療法のプラセボ対照試験を開始し、安全に遂行中である。併せて治療前後でアレルゲン特異的な T 細胞応答を解析し、preliminary ながら有望な結果を得た。今後症例を増やして検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai S, Matsuda R, Adachi R, Akiyama H, Maitani T, Ohno Y, Oka M, Abe A, Seiki K, Oda H, Shiomi K, Urisu A. Interlaboratory Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods, *J AOAC Int*, 91, 123-129, 2008.
- 2) Nakajima Y, Tsuge I, Kondo Y, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kato M, Kurahashi

大会, 東京、平成 19 年、6 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

- H, Urisu A, Asano Y, Up-regulated cytokine inducible SH2-containing protein expression in allergen-stimulated T cells from hen's egg-allergic patients. *Clinical and Experimental Allergy*, 2008 (38) 1493-1506.
- 3) Ando H, Movérare R, Kondo Y, Tsuge I, Tanaka A, Borres M, Urisu A, Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 122 (3) 583-588, 2008.
- 4) Doi H, Touhata Y, Shibata H, Sakai S, Urisu Akiyama H, Teshima R, Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of walnut proteins in processed foods, *J Agri Food Chem*, 56, 17, 7625-7630, 2008.
- 5) Morishita N, Kamiya K, Matsumoto T, Sakai S, Teshima R, Urisu A, Moriyama T, Ogawa T, Akiyama H, Morimatshu F, Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of soybean proteins in processed foods, *J. Agric. Food Chem.*, 56, (16), 6818-6824, 2008.
- 6) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakai S, Kondo K, Toyoda M, Urisu A, Teshima R, Specific detection of buckwheat residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci Biotechnol Biochem*, 72, (8), 2228-2231, 2008.

2. 学会発表

- 1) Urisu A, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kawada Yasusuke Nakajima Y, Yukawa M, Kondo Y, Tsuge I, Tokuda R, Yamada K, Kimura M, Oral immunotherapy by heated and ovomucoid-reduced egg white to children with hen's egg hypersensitivity, *Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, 2008. June.
- 2) 柘植郁哉、中島陽一、小松原亮、平田典子、湯川牧子、各務美智子、近藤康人、山田一恵、木村 守、宇理須厚雄、食物アレルギー研究の最近の進歩、食物アレルギーの寛容誘導法、第 20 回、日本アレルギー学会春季臨床

食品成分による食物アレルギーの制御に関する研究
—食物アレルギー発症抑制及び抗原解析に関する研究—

研究分担者 穉山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
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
安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所
手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所

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 α -カロテン摂取群、 β -カロテン摂取群では対照群と比較して IgE、IgG1 抗体価の有意な抑制が確認された。FCM を用いてパイエル版 (PP)、腸管膜リンパ節 (MLN) 中のリンパ球サブセット構成を調べたところ、 α -カロテン摂取群、 β -カロテン摂取群ともに Foxp3 陽性 α 4 β 7 インテグリン陽性細胞の割合に対照群と有意な差はみられなかった。

(2) 魚卵抗原解析 イクラ(シロザケ卵)の主要抗原であるピテロジェニン断片(いわゆる β' -c)のアミノ酸一次配列について、未決定領域を調査した。ニジマス-ピテロジェニン分子内の演繹アミノ酸配列を鋳型として、 β' -c の一次構造を検討したところ、分子量 16 kDa 成分の N 末端配列から 104-113、115-126、130-137 を明らかにした。これらの配列は、ニジマス・ピテロジェニンのアミノ酸内部配列とほぼ一致した。

(3) その他の食品抗原解析 モモでは昨年報告したように OAS 患者ではプロフィリンや Betv1 ホモログと思われる 14-18kDa 付近の多くのバンドが IgE 結合性を示したが、アナフィラキシー患者ではこれらのバンドはほとんど見られず、そのほかに 25kDa 付近やその他のバンドを検出した。セリ科スパイスアレルギーの原因抗原候補として 10-12kDa、20kDa、60kDa 付近のバンドを認めた。大豆(豆乳)の原因抗原と推定される Glym4 (Betv1 ホモログ)の発現に成功し、抗体も得られたのでサンドイッチ ELISA 定量系の構築を試みている。虫害被害を受けた大豆では Glym4 レベルが増加していた。コチニール色素主要アレルゲンの cDNA より予測されたタンパク質のアミノ酸一次構造は NCBI データベースには存在しないため新規であると考えられるが、ハチのアレルゲンであるホスホリパーゼと一部相同性を示した。

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が誘導可能な B10A マウスを用いて α -カロテン摂取群及び β -カロテン摂取群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、コチニール色素等の食物アレルゲンの解析についても検討した。魚卵のアレルゲン解析では、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、昨年に引き続いて主要抗原タンパク質の一次構造解析を進めた。果実・種実類のアレルゲン解析では、果実・種実・穀類等に含まれる主要な食物アレルゲンの探索及び変動について解析した。

B. 研究方法

[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/匹を 9 週間連日経口投

与し、9 週後に、血清中 OVA 特異的抗体価、ヒスタミン濃度、ASA 後の体温の測定を行った。また、MLN 中リンパ球のポピュレーションを FCM により解析した。CD4⁺T 細胞を脾臓より単離し RNA を抽出後、GATA3、T-bet 及び Foxp3 の mRNA を Real-Time PCR により定量した。 α -カロテン及び β -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 週間前から自由摂取させた。

[魚卵抗原解析]

シロザケの成熟卵より β' -c を精製し、37°C に保持して「1% (w/w) ペプシン消化 (pH 2.0)」および「ペプシン消化後直ちに 1% (w/w) トリプシン消化 (pH 8.0)」をおこない、トリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(T-SDS-PAGE)によって消化ペプチドの生成を経時的に観察した。次に、各消化処理を 3 時間おこなった β' -c 消化ペプチド群を、イクラアレルギー患者血清を用

いた競争 ELISA に供し、そのアレルゲン性の変化を検討した。この際、50%阻害率を呈する阻害抗原濃度を算出し、それを IC₅₀ (μg/ml) としてアレルゲン性変化の指標とした。

[その他の食品抗原解析]

モモ、大豆、各種スパイスからタンパク質を抽出し、患者血清を用いたイムノブロットング法及び ELISA 法によって原因抗原の探索を行った。大豆に関しては主要アレルゲンの一つである Glym4 をクローニングし、大腸菌にて発現させ、抗体作成や各種解析に用いた。また大豆に虫害を与え、Glym4 などのアレルゲンの変動を解析した。

コチニール色素を産生するエンジムシから RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、N 末配列情報と内部配列解析の結果から 5' -RACE と 3' -RACE の解析を行った。その後タンパク質をコードする cDNA をクローニングして発現タンパク質の同定を行った。

C. 研究結果

[実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究]

α-カロテン群、β-カロテン群共に CD4⁺T 細胞を単離し、Th1 及び Th2 の master regulator である GATA3 及び t-bet の mRNA を定量したところ、対照群に比べ低い値を示した。PP 及び MLN 中リンパ球のポピュレーション解析の結果、Foxp3 陽性・4・7 インテグリン陽性細胞の割合が対照群と有意な差がなかった。

[魚卵抗原解析]

T-SDS-PAGE 分析によると、β'-C はペプシン消化によって 8 成分程度の主要断片(分子量:3K-14K)に分解し、さらにトリプシン消化によって断片化が強く進行した。しかし両酵素で 3 時間ずつ消化を継続しても、4 成分程度の主要断片と殆ど分解されない微量な β'-C が残存した。4 名のアレルギー患者血清を用いた競争 ELISA によると、ペプシン消化とその後のトリプシン消化によって β'-C のアレルゲン性は低下したが、両消化処理による IC₅₀ の増加具合は、それぞれ 2-43 倍および 5-86 倍程度であった。また、阻害抗原濃度を 10 μg/ml 以上に増加させると、消化処理した β'-C の阻害率が 80% を超え、消化処理によるアレルゲン性の低減化は観察できなくなった。

[その他の食品抗原解析]

モモでは昨年報告したように OAS 患者ではプロフィリンや Betv1 ホモログと思われる 14-18kDa 付近の多くのバンドが IgE 結合性を示したが、アナフィラキシー患者ではこれらのバンドはほとんど見られず、そのほかに 25kDa 付近やその他のバンドを検出した。セリ科スパイスアレルギーの原因抗原候補として 10-12kDa、20kDa、60kDa 付近のバンドを認めた。大豆(豆乳)の原因抗原と推定される Glym4 (Betv1 ホモログ) の発現に成功し、抗体も得られたのでサンドイッチ ELISA 定量系の構築を試みている。虫害被害を受けた大豆では Glym4 レベルが増加していた。

コチニール色素の主要アレルゲンと思われる分子量約 38 kDa のタンパク質の cDNA をクローニングした。

D. 考察

[実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究]

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を抑制する作用が示唆された。そのメカニズムについては、昨年脾臓細胞由来 CD4⁺T 細胞の Th1 及び Th2 の master regulator の測定から、カロテノイド強化食によって抗原感作の抑制が示唆された。腸管においてカロテンの代謝産物であるレチノイン酸が MLN 中リンパ球の Foxp3 陽性 αβ7 インテグリン陽性細胞の分化を促進することによるアクティブサブプレッションによる抗原経口感作の抑制と考えられたが、α-カロテン群、β-カロテン群共に Foxp3 陽性 αβ7 インテグリン陽性細胞は対照群と有意な差がみられなかった。

[魚卵抗原解析]

β'-C は、長時間のペプシン-トリプシン処理によって低分子化された。しかしながら消化酵素処理の前後において、競争 ELISA における IC₅₀ の増加率が数-数十倍程度であることや、阻害抗原濃度を増加させるとアレルゲン性の低減化が認められなくなることから、消化ペプチド群中には IgE 結合エピトープがかなりの割合で残存しているものと思われる。以上の結果は、β'-C が強いアレルゲン性を保持したまま小腸に到達する可能性を示唆している。

[その他の食品抗原解析]

モモによるアナフィラキシーの症例が増加傾向を示しているが、LTP や Betv1 ホモロ

グ, Profirin などの既知の抗原以外の新規抗原または新規発症機序が関与している可能性が示唆された。セリ科スパイスアレルギーの臨床像や原因抗原にも多様性があり、複数の抗原が関与していることが示唆される。大豆(豆乳)アレルギーの原因抗原として有力な Glym4 の発現に成功したことから検出・定量系の構築が可能となり、リスク低減化の評価ツールとして使用可能である。虫害被害によっても大豆アレルゲン Glym4 が増加することが示された。これは感染特異的タンパク質であることから結果は妥当である。コチニール色素主要アレルゲンの cDNA より予測されたタンパク質のアミノ酸一次構造は NCBI データベースには存在しないため新規であると考えられるが、ハチのアレルゲンであるホスホリパーゼと一部相同性を示した。

E. 結論

[実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究]

近年、腸管免疫系の制御性 T 細胞の分化誘導において、レチノイン酸が重要な役割を担うことが報告されているが、今年度の結果ではカロテノイド強化食が腸管免疫系における制御性 T 細胞の分化誘導に及ぼす影響は観察されなかった。さらにメカニズム解析を継続する必要がある。

[魚卵抗原解析]

In vitro における検討の結果、β'-C のアレルゲン性は高い消化耐性を有していると思われる。

[その他の食品抗原解析]

近年のモモのアナフィラキシーの原因抗原や発症機序に関しては未だ不明であり、解明が急がれる。セリ科スパイスアレルギーの臨床像や原因抗原にも多様性があり、いくつかの候補タンパク質を見出した。大豆(豆乳)アレルギーの原因抗原 Glym4 の検出定量系を使用してリスク低減化の検討が可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirohito Yamakawa, Hiroshi Akiyama, Yumi Endo, Kiyoko Miyatake, Shinobu Sakai, Kazunari Kondo, Masatake Toyoda, Atsuo

Urisu, and Reiko Teshima, Specific Detection of Buckwheat Residues in Processed Foods by Polymerase Chain Reaction *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 312-316 (2008)

- 2) Morishita N, Kamiya K, Matsumoto T, Sakai S, Teshima R, Urisu A, Moriyama T, Ogawa T, Akiyama H, Morimatsu F, A Reliable Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay for Determination of Soybean Proteins in Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6818-6824 (2008).
- 3) Doi, H., Shibata, H., Shoji, M., Sakai, S., Akiyama, H. A Reliable Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay for the Determination of Walnut Proteins in Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7625-7630 (2008).
- 4) Ohgiya Y., Arakawa, F., Akiyama, H., Yoshioka, Y., Hayashi, Y., Sakai, S., Ito, S., Yamakawa, Y., Ohgiya, S., Ikezawa, Z and Teshima R., Molecular cloning, expression and characterization of a major 38 kDa cochineal allergen. *J. Allergy Clin Immunol.*, in press (2009)
- 5) 穂山浩、食べ物のアレルギーに対する効果とは? 「Q&A でわかるアレルギー疾患」 **4**, 327-329 (2008).
- 6) 安達玲子、酒井信夫、穂山浩、手島玲子、特定原材料表示の検査法～えび・かきの表示義務化～ *ジャパンプードサイエンス* **47**, 27-31 (2008).
- 7) 佐伯宏樹. 魚卵の抗原解析, アレルギーの臨床, **28**, 625-630, 2008.
- 8) Y. Shimizu, A. Nakamura, H. Kishimura, A. Hara, K. Watanabe, H. Saeki: Major allergen and its IgE cross-reactivity among the salmonid fish roe allergy. *J. Agric. Food Chem.*, in press (2009).
- 9) 森山達哉「即時型アレルギーの抗原解析 (in vitro) - イムノプロット法を中心に - 」 *Visual Dermatology*, Vol. **7**, No. **3**, p. 320-327 (2008)
- 10) 森山達哉「病害虫被害による農作物アレルゲンの増加と農薬防除による抑制～リンゴと大豆を例に～」 今月の農業 **9**月号,

- p. 46-52 (2008)
- 11) 原田 晋、松永亜紀子、森山達哉「スパイスアレルギーの4例-原因抗原に関する解析と共に-」日本ラテックスアレルギー研究会誌 Vol. 12, No. 1 p. 87-93 (2008)
 - 12) 森山達哉「食物アレルギーの多様性とその検出法及び変動解析」食品加工技術, 印刷中 (2009)
 - 13) Adachi, A., Horikawa, T., Shimizu, H., Sarayama, Y., Ogawa, T., Sjolander, S., Tanaka, A., and Moriyama, T., "Soybean β -conglycinin as the main allergen in a patient with food-dependent exercise-induced anaphylaxis by tofu: Food processing alters pepsin resistance" *Clinical & Experimental Allergy*, 39(1):167-73. (2009)
2. 学会発表
- 1) Hiroshi Akiyama, Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food, 122st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (2008. 9)
 - 2) 田口大夢、平尾宜司、穠山浩、酒井信夫、手島玲子 「PCR法を用いた食品中のエビおよびカニの識別検出法」日本食品衛生学会第95回学術大会 (2008. 5)
 - 3) 渡辺聡、平尾宜司、酒井信夫、安達玲子、穠山浩、手島玲子 「PCR法を用いた食品中のモモおよびリンゴの検出法について」日本食品衛生学会第95回学術大会 (2008. 5)
 - 4) 伊藤歌奈子、田中裕之、橋本博之、員壁祐樹、長谷川康行、佐二木順子、宮本文夫、穠山浩、手島玲子 「特定原材料(小麦)検査におけるELISA法とネステッドPCR法との比較」日本食品衛生学会第95回学術大会 (2008. 5)
 - 5) 田口大夢、平尾宜司、穠山浩、酒井信夫、坂田こずえ、手島玲子 「エビおよびカニの識別検出PCR法を用いた市販製品の分析」日本食品化学学会第14回学術大会 (2008. 5)
 - 6) 穠山浩 「検知法(アレルギー)の最近の進歩について」第20回日本アレルギー学会春季臨床総会(2008. 6)
 - 7) 安達玲子、穠山浩、手島玲子「アレルギー表示の現状と海外の表示制度について」第55回日本食品科学工学会シンポジウム (2008. 9)
 - 8) 佐伯宏樹「プロテアーゼ消化がシロザケ卵黄タンパク質のアレルゲン性に及ぼす影響」平成20年度日本水産学会 (2009. 3)
 - 9) 森山達哉、矢野えりか、中島加菜子、大羽美香、橋田和美、川本伸一、小南 優、河田照雄、小川 正、松中謙次郎、河村幸雄「病害・虫害被害を受けた農作物におけるアレルギーの増大」第33回日本農薬学会(奈良) (2008. 4)
 - 10) 森山達哉「新しい食物アレルギー:その発症機構と原因抗原の解析」日本食品科学工学会(京都)シンポジウム (2008. 9)
 - 11) 森山達哉「農作物アレルギーについて」日本園芸学会近畿支部大会(京都)シンポジウム (2008. 9)
 - 12) 森山達哉、矢野えりか、濱田哲次、河村幸雄、原田 晋「スパイスアレルギーの臨床像と原因抗原の解析」2008年度日本栄養・食糧学会近畿支部大会(奈良) (2008. 11)
 - 13) 中村麻里子、矢野えりか、高橋浩司、羽鹿牧太、森山達哉、河村幸雄「花粉症に関連する大豆クラス2アレルギー Glym4 の発現と抗体作成及び検出・定量系の構築」日本農芸化学会2009年大会(博多) (2009. 3)

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

研究分担者 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学 教授

研究要旨

経口トレランスの誘導により食物アレルギーのアウトグローを計る方法を検討するため、OVAの経口投与で即時型アレルギー性下痢症状を呈する食物アレルギーモデルを用い、抗原感作が既に成立状態からトレランスを誘導する方法を検討した。OVA感作マウスの脾臓中のCD8陽性T細胞を、OVA感作が成立したOVA特異的TCR発現トランスジェニックマウス(TCR-tg)に輸注するとアレルギー症状が抑制された。IL-10欠損CD8陽性T細胞の輸注では、抑制効果が部分的であったため、抑制機序にIL-10依存性の機序とIL-10非依存性の機序の関与が示唆された。また、CD8陽性T細胞輸注の代わりに抗原封入マンノース結合リポゾームの口腔粘膜投与を行うことで、OVA感作野生型マウスでもOVA経口投与によるアレルギー症状誘発を抑制することが可能であり、感作成立後の食物アレルギー患者の治療には抗原特異的調節性T細胞を誘導する方法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、誤食の危険性や、食事制限による患児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積極的に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。

昨年度までの本研究で、即時型アレルギー性下痢症状を引き起こす原因となる抗原特異的IgEとTh2細胞が存在する状況下でもアレルギー症状抑制する機能を持つCD8陽性T細胞が、抗原感作を行ったマウスの脾臓中に存在すること明らかにした。そこで、即時型アレルギー症状発症を抑制する機能をもつCD8陽性T細胞の表現型と作用機序を解析し、食物アレルギーの新規治療法として、調節性T細胞を誘導する方法の検討を行った。

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(OVA-TCR-tg)マウスにOVAをアラムと共に腹腔

免疫し、*in vivo*で抗原特異的IgEとTh2細胞を誘導した後、OVAを隔日経口投与して即時型アレルギー性下痢症状を誘発させる食物アレルギーモデルを用いた。昨年度までの本究において、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細胞を抗原感作成立後のOVA-TCR-tgマウスに輸注し、OVAの経口チャレンジを行なうと即時型症状が抑制されること、また、その際、腸間膜リンパ節におけるIL-10のmRNAの発現が増強していることを明らかにした。そこで、輸注したCD8陽性T細胞が腸管膜リンパ節に集積しているか否かをCSFEで標識したCD8陽性T細胞を輸注し、その動態を追跡した。また、IL-10ノックアウトマウスの脾臓より分離したCD8陽性T細胞を用いて、CD8陽性T細胞のIL-10産生能が抑制機序に関与しているか否かを検討した。

抗原特異的なCD8陽性T細胞を輸注する代わりに、*in vivo*において抗原特異的CD8陽性T細胞を誘導する目的で、抗原であるOVAをクロスプレゼンテーションさせるためOVA封入マンノース結合リポゾームを抗原感作が成立した野生型マウスに投与し、その後のOVA経口チャレンジによるアレルギー下痢症状が抑制されるかを検討した。

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

1) 輸注した CD8 陽性 T 細胞の動態

脾臓、腸管膜リンパ節、パイエル板の単核細胞を分離し、フローサイトメーターで解析すると、いずれのリンパ組織においても CSFE 標識 CD8 陽性 T 細胞が検出された。OVA のチャレンジなしでは、CSFE 標識 CD8 陽性 T 細胞の分裂はほとんど認められないのに対し、OVA 経口負荷後ではいずれのリンパ組織中においても分裂増殖した CD8 陽性 T 細胞が検出された。

2) IL-10 欠損 CD8 陽性 T 細胞輸注による即時型下痢症状抑制効果

IL-10 ノックアウトマウス由来の CD8 陽性 T 細胞の輸注でも、即時型下痢症状と低体温の出現率が抑制され、腸管局所での IL-4 mRNA 発現や活性化マスト細胞が発現する mmcp1 の mRNA 発現の増強が抑制されたが、その症状抑制効果は野生型マウス由来の CD8 陽性 T 細胞を輸注した場合に比べ減弱していた。

3) OVA 封入マンノース結合リポソーム投与による口腔粘膜投与

OVA 感作野生型マウスに 5 日間連日で OVA 封入マンノース結合リポソームを口腔粘膜に投与し、最終投与から 9 日目から OVA の経口チャレンジを行ったところ即時型アレルギー症状の発症は抑制された。リポソーム処理群の OVA 経口チャレンジ前の血清中 OVA 特異的 IgE、IgG1、IgG2a 値は無処理群と差を認めなかった。しかし、OVA 経口チャレンジに伴う血清中 OVA 特異的 IgE 値の上昇はリポソーム処理群で減弱し、OVA 特異的 IgG1 値の増加は充進していた。

一方、OVA 封入マンノース結合リポソームの皮下投与、腹腔投与では OVA 経口チャレンジによる即時型アレルギー症状の抑制効果は観察されなかった。

D. 考察

CSFE 標識 CD8 陽性 T 細胞の *in vivo* における動態から、輸注した CD8 陽性細胞は経口投与された OVA に反応して *in vivo* において増殖反応を示していた。また、食物アレルギー症状を惹起するエフェクター Th2 細胞が存在し、経口免疫寛容の成立にも重要な役割を果たすと報告されている腸管膜リンパ節にも、輸注した CD8 陽性 T 細胞がホーミングしていることが確認された。この結果は、輸注した CD8 陽性 T 細胞の一部の細

胞分画が腸管膜リンパ節にホーミングすることで即時型アレルギー症状抑制に作用している可能性が示唆された。腸管膜リンパ節にホーミングした CD8 陽性 T 細胞の細胞表面マーカーやその機能の解析を進めていくことは、調節性 CD8 陽性 T 細胞の特異的マーカーの同定やその抑制機序の解明につながると考えられた。

調節性 CD8 陽性 T 細胞の抑制機序として IL-10 などのサイトカイン産生、Fas リガンドやパーフォリンを介する細胞死誘導、抑制系シグナル伝達分子の発現などを介して、エフェクター T 細胞を直接、あるいは抗原提示細胞を介して間節的に抑制する機序が報告されている。今回の検討で、IL-10 欠損 CD8 陽性 T 細胞の輸注では、アレルギー症状の抑制効果が部分的であったことから、CD8 陽性 T 細胞自身の IL-10 産生と IL-10 非依存性の機序が即時型アレルギー性下痢症状の抑制に関与していると考えられた。

食物アレルギーの治療として、*in vivo* で抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導するためには外因性抗原をクロスプレゼンテーションさせる必要があることから、マンノースを結合させたリポソームを抗原投与に利用することでマンノースレセプターを介してクロスプレゼンテーションさせる方法を検討した。OVA 封入マンノース結合リポソームの腹腔内投与や皮下投与では、食物アレルギー症状の抑制効果は観察されなかったが、口腔粘膜投与では抑制効果が確認されたことより、免疫療法に応用するには投与経路が重要と考えられた。今回の検討では、口腔粘膜投与により調節機能を発揮する OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞が実際に誘導されたか否かに関しては更なる検証を要するが、アレルギー性下痢症状の抑制に有効な免疫療法となることが期待された。

E. 結論

即時型食物アレルギー症状の抑制には、IL-10 産生能を持つ CD8 陽性 T 細胞サブセットの関与が示唆された。また、抗原封入マンノース結合リポソームの口腔粘膜投与がアレルギー症状抑制に有用と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada A, Ohshima Y, Yasutomi M, Ogura K, Tokuriki S, Naiki H, Mayumi M. Antigen-primed splenic CD8+ T cells impede the development of oral antigen-induced allergic diarrhea. *J Allergy Clin Immunol* (in press)
 - 2) Omata N, Ohshima Y, Yamada A, Yasutomi M, Tokuriki S, Mayumi M. A case of milk-protein-induced enterocolitis associated with enterotoxigenic *E. coli* and MRSA infections. *Eur J Pediatr* 2008;167:683-684
 - 3) Kobata R, Tsukahara H, Ohshima Y, Ohta N, Tokuriki S, Tamura S, Mayumi M. High levels of growth factors in human breast milk. *Early Hum Dev.* 84:67-9 (2008)
 - 4) 足立雄一、村上巧啓、中村利美、谷内江昭宏、大嶋勇成、眞弓光文外来での簡単な問診票とチェック表を導入することによる喘息ガイドラインに即した治療推進の効果. *日本小児アレルギー学会誌* 22:369-378(2008)
 - 5) 大嶋勇成 アレルギーの発症予防. *小児科診療* 71:1085-1091(2008)
 - 6) 大嶋勇成 食物アレルギーのこどもへの対応. *小児科臨床* 61:1326-1332(2008)
 - 7) 安富素子、大嶋勇成、眞弓光文. 樹状細胞機能からみた自然免疫とアレルギー性炎症の接点. *日本小児アレルギー学会誌* 22:253-258(2008)
 - 8) 大嶋勇成 樹状細胞とアレルギー. *アレルギー* 57:1265-1269(2008)
 - 9) 大嶋勇成 小児アレルギー 喘息、湿疹、ポリシーが必要だ. *内科* (in press)
 - 10) 大嶋勇成 衛生仮説 2009 小児科診療 (in press)
 - 11) 大嶋勇成 食物アレルギーの診断と治療の問題点福井県小児科医会会報誌. 37:49-54(2008)
- ### 2. 学会発表
- 1) Yasutomi M, Ohshima Y, Mayumi M. Erythromycin inhibits IL-17 production through modulating monocyte-derived dendritic cell function. The 10th International Symposium on Dendritic

Cells 2008 Oct1-5 Kobe, Japan

- 2) 大嶋勇成, 安富素子 シンポジウム アレルギー病態の分子生物学的解明 感染とアレルギーとの接点における抗原提示細胞の役割 第45回日本小児アレルギー学会 横浜 2008.12
- 3) 板澤寿子, 足立雄一, 村上巧啓, 中村利美, 竹ノ内裕実, 津田英夫, 大嶋勇成, 谷内江昭宏, 眞弓光文, 宮脇利男 気管支喘息患児保護者における病態の理解度と治療目標に関する調査 第45回日本小児アレルギー学会 横浜市 2008.12
- 4) 山田彰子, 大嶋勇成, 眞弓光文 ミニシンポジウム 気管支喘息—動物モデル 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58回日本アレルギー学会秋季学術 東京 2008.11
- 5) 安富素子, 金谷由宇子, 大嶋勇成, 眞弓光文 ミニシンポジウム 抗原提示細胞 エリスロマイ大会シンは樹状細胞機能を介してメモリーT細胞の IL-17 産生を抑制する 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008.11
- 6) 安富素子, 大嶋勇成, 眞弓光文 シンポジウム アレルギー疾患と環境因子 内分泌攪乱物質とアレルギー疾患 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008.11
- 7) 大嶋勇成, 安富素子, 住本真一, 福井徹哉, 清益功浩, 樋垣泰伸, 南部光彦, 谷口義弘, 眞弓光文 ミニシンポジウム 小児喘息治療の進歩と残された課題 JPGL2005 の乳児喘息の診断基準の妥当性と問題点 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 2008.06
- 8) 大嶋勇成 教育講演 樹状細胞とアレルギー 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会東京 2008.06
- 9) 大嶋勇成 特別講演 食物アレルギーの診断と治療の問題点 福井県小児科医会学術講演会 福井市 2008.03
- 10) 大嶋勇成 特別講演 アレルギー、感染症への対応 第52回全国乳児院研修会 福井 2008.07.03

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

アレルギー性疾患発症と自然免疫に関する研究

研究分担者	玉利 真由美	理化学研究所ゲノム医科学研究センター チームリーダー
研究協力者	原田 通成	理化学研究所ゲノム医科学研究センター 研究員
	広田 朝光	理化学研究所ゲノム医科学研究センター リサーチアソシエイト
	人見 祐基	理化学研究所ゲノム医科学研究センター特別研究員

研究要旨

自然免疫に関連する遺伝子の多型とアレルギー性疾患の発症との相関を検討するため、本年度は polyI:C 刺激により気道上皮細胞から分泌される TSLP 遺伝子多型について検討し、TSLP 機能亢進に作用する遺伝子多型が小児気管支喘息発症と相関することを見いだした。

A. 研究目的

近年、自然免疫応答が様々な炎症性疾患において重要な働きを担うこと報告されている。アレルギー疾患においても、感染やダニなどのプロテアーゼ、ディーゼル粒子などの化学物質が Danger signal として免疫応答を惹起し、発症や進展に影響を及ぼすメカニズムが明らかになりつつある。本研究は自然免疫関連遺伝子群の多型とアレルギー疾患（特に気管支喘息と食物アレルギー）との関連を症例対照相関解析を用いて明らかにするものである。

B. 研究方法

polyI:C 刺激により気道上皮細胞から分泌される TSLP は、樹状細胞に作用して Th2 型の免疫応答を誘導する。これまでに気管支喘息の気道上皮細胞で強く誘導されること、また肺に過剰発現させたマウスでは喘息様の炎症を生じることが報告されている。我々は TSLP 遺伝子多型に注目し、それらと小児気管支喘息の発症、関連形質（IgE 値、重症度、末梢血好酸球数）との相関について検討を行なった。日本人気管支喘息患者 24 名のゲノムのシーケンスを行ない、TSLP 遺伝子上に 23 個の遺伝子多型を同定した。Haploview4.1 ソフトウェア (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) により 3 つの TagSNPs を選出した。小児気管支喘息 453 名、コントロール 717 名において、TaqMan 法を用いて genotyping を行ない、allele 頻度、genotype 頻度について症例対照相関解析を行った。

C. 研究結果

TSLP 遺伝子のプロモーターに存在する遺伝子多型-847C>T と小児気管支喘息発症との間に有

意な相関を認めた。(P=0.0060, OR 1.66, 95%CI 1.24-2.20)。(小児気管支喘息で T アレルをもつ頻度が高い)。この多型により AP1 結合配列が生じる事から、オリゴヌクレオチドを合成し、AP1 との結合親和性を免疫沈降法において確認したところ、T アレルでより強い結合を認めた。レポーターアッセイを行なったところ、T アレル (= 疾患関連アレル) を含む配列のほうが、C アレルを含む配列より有意に転写活性が高かった。血清総 IgE 値や好酸球数、重症度との相関は認めなかった。

D. 考察

小児気管支喘息に関連する TSLP 遺伝子上の多型は TSLP 遺伝子の機能亢進に働く可能性が示唆された。ウイルス感染が小児喘息の急性増悪に関連するという多数の臨床疫学報告があるが、本研究で得られた知見はそのメカニズムの 1 つと考えられた。近年、グルココルチコイドはこの polyI:C による気道上皮細胞での TSLP の誘導を強く抑制するという報告もあり、TSLP 誘導と他の既存の治療薬剤との関連についても検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

TSLP 遺伝子プロモーター上の AP-1 結合配列を生じる多型と小児気管支喘息発症との間に強い相関を認めた。AP1 は polyI:C 刺激時に誘導される転写因子であり、この多型がウイルス感染時の気道上皮において TSLP の発現増強につながる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice. Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. *Eur J Pharmacol.* 2008; 578: 87-96.
- 2) Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 769-770.
- 3) Hirose I, Tanaka H, Takahashi G, Wakahara K, Tamari M, Sakamoto T, Kojima S, Inagaki N, Nagai H. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147:6-16.
- 4) Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E. Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: a family and case-control study. *J Hum Genet.* 2008;53:615-21.
- 5) Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Shimojo N, Hasegawa K, Hirota T, Doi S, Kameda M, Miyatake A, Kohno Y, Okamoto Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Association study of the C3 gene with adult and childhood asthma. *J Hum Genet.* 2008;53:728-38.
- 6) Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Ohkubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K, Tamari M. Association of serum IL-33 level and the IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1875-1881.
- 7) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Functional analysis of the polymorphisms of the TSLP gene in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40:368-374.
- 8) Shimokawa N, Nishiyama C, Hirota T, Tamari M, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Functional analysis of a polymorphism in the promoter region of the IL-12/23p40 gene. *Clin Exp Allergy* 2009;39:228-235.
- 9) Matsumoto K, Tamari M, Saito H. Involvement of eosinophils in the onset of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 26-27.
- 10) Tamari M, Harada M, Hirota T, Nakamura Y. Host defense molecular mechanisms against *Chlamydomyces pneumoniae* and genetic studies of immune-response-related genes in asthma. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2009;3:17-25.
- 11) 玉利真由美, 広田朝光, 原田通成: 小児気管支喘息の遺伝子多型. *喘息*, 21:35-39, 2008.
- 12) 玉利真由美 ゲノム医学の進歩とアレルギー疾患の解明 アレルギー免疫, 15:881-883, 2008.

2. 学会発表

- 1) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Ziegler SF, Tamari M. Functional SNP in Promoter of TSLP Gene Is Associated with Susceptibility to Childhood Atopic Asthma, 23. ATS 2008 The American Thoracic Society's International Conference, 2008.3 Metro Toronto Convention Centre
- 2) Tamari M, Harada M, Hirota T, Miyatake A, Fujita K, Nakanishi K, Yoshimoto T, Nakamura Y. Polymorphisms in the IL-18 Gene Are Associated with Severity of Adult Asthma, 23. ATS 2008 The American Thoracic Society's International Conference,

2008.3 Metro Toronto Convention Centre

- 3) 玉利真由美、広田朝光、原田通成：中国地区上気道アレルギー研究会 特別講演 アレルギー疾患と感染症 2008年2月 リーガロイヤルホテル広島
- 4) 玉利真由美、広田朝光、原田通成：第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 スポンサーレクチャー 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 2008年2月 大阪、ホテル阪神
- 5) 玉利真由美、広田朝光、原田通成：日本アレルギー協会 アレルギー研修会 2008トピックス アレルギー関連遺伝子研究と創薬 2008年3月 市ヶ谷私学会館
- 6) 原田通成、広田朝光、玉利真由美 シンポジウム 3 ウイルス感染とアレルギー TSLP 遺伝子多型とウイルス感染による気管支喘息発症への関与機構 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 2008年6月
- 7) 玉利真由美、原田通成、広田朝光 シンポジウム 9 アレルギー疾患の遺伝子と分子生物学 遺伝子多型を用いた病態解析(気管支喘息を中心に) 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 2008年6月
- 8) 玉利真由美 原田通成 広田朝光 第8回喘息Early Intervention研究会 遺伝子多型-最近の話題 2008年6月東京ドームホテル
- 9) 玉利真由美 原田通成 広田朝光 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会/第19回日本生体防御学会学術総会/第45回補体シンポジウム シンポジウム 6 自然免疫と臨床疾患 II 成人気管支喘息重症度と IL-18 遺伝子多型の相関解析 2008年7月 北海道大学学術交流会館
- 10) 玉利真由美 原田通成 広田朝光 日本薬学会東海支部 特別講演 アレルギー体質の研究 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 適切な薬剤選択をめざして 2008年7月 岐阜薬科大学 大学院講義室
- 11) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基 IL-18 遺伝子多型の成人気管支喘息における相関解析 第53回日本人類遺伝学会 2008年9月パシフィコ横浜
- 12) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基 第9回愛宕小児アレルギー研究会 2008年10月 東京慈恵会医科大学 感染症と気管

支喘息、遺伝素因との関連

- 13) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基 教育講演 8 気管支喘息の病態と自然免疫関連遺伝子 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月 東京国際フォーラム
- 14) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基 特別シンポジウム アレルギー疾患に関連する遺伝子の解明 SS5-4 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月 東京国際フォーラム

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Respiratory syncytial virus (RSV) 感染と小児気管支喘息発症に関する研究

研究分担者	下条 直樹	千葉大学大学院医学研究院 小児病態学 准教授
研究協力者	鈴木 洋一	千葉大学大学院医学研究院 公衆衛生学 准教授
	上原 直毅	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
	玉利 真由美	理化学研究所 遺伝子多型研究センター チームリーダー

研究要旨

SV 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十分な解析がなされていない。

1) 昨年度は IL-17F His161Arg 多型が RSV 細気管支炎発症と関連することを見いだしたので、本年は日本人で報告されている IL-17E の 2 つの SNPs、IL-17RB の 8 つの SNPs、IL-18 の 3 つの SNPs について、RSV 細気管支炎患者 60 名と対照小児 197 名について解析した。3 つの遺伝子とも個々の SNPs ならびにハプロタイプ頻度に差異が認められなかった。

2) RSV 細気管支炎患者 HLA-DRB1 および DQB1 のタイピングを行ない、一般日本人の HLA 頻度と比較を行った。DRB1*0701, 1301 および DQB1*0201, 0603 の頻度が RSV 細気管支炎患者で一般日本人集団に比較して高かった。また、RSV 細気管支炎患者では DRB1, DQB1 ともホモ接合体の頻度が一般日本人集団に比べて有意に高かった。

3) 出生コホートにおける臍帯血 sCD14 値と RSV 細気管支炎発症の関連では、統計学的有意差はないが臍帯血 sCD14 は RSV 細気管支炎患者では健康児に比べて高値であった。

4) 成人に比較して、臍帯血 $\gamma 9 \delta 2T$ 細胞は IFN- γ 産生能が低下しており、それは IL-2 レセプター β 鎖低発現に基づくものであることが示唆された。その基盤に IL-12 レセプターの発現低値であることが示唆された。RSV 細気管支炎発症の予知マーカーとなるか今後の解析が必要である。

A. 研究目的

乳児の細気管支炎は 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。本年は以下の目的で研究を行った。1) 昨年度見いだした RSV 細気管支炎発症に関与する遺伝子多型以外の遺伝子多型ならびに HLA との関連を解析する、2) 出生時の自然免疫能と 1 歳までの RSV 細気管支炎の関連を解析する。

B. 研究方法

1) 遺伝子多型と RSV 細気管支炎発症：

RSV 細気管支炎患者は 2 才未満の RSV 抗原陽性の初回喘鳴児とし、低出生体重児、先天性心疾患などの先天性疾患を有する児は除外した。対照は乳幼児期に喘鳴を認めなかった千葉大学教育学部附属小学校児童である。RSV 細気管支炎患者と

対照の間に性別、出生体重、年長同胞数、集団生活の有無、受動喫煙、母乳栄養の頻度に差はない。マウスで RSV 感染において重要な役割を果たすことが示唆されている IL-17E (IL-25) と IL-17 レセプター β 鎖 (IL-17RB)、および IL-18 の多型について PCR 法にて検討した。HLA については HLA-DR および DQ について PCR 法にてタイピングを行ない、一般日本人集団での頻度と比較した。

2) 出生時自然免疫能と RSV 細気管支炎発症：

JFE 川鉄千葉病院産科にて出生した新生児 217 名の臍帯血中の可溶性 CD14 (sCD14) と 1 歳までの RSV 細気管支炎罹患との関連を検討した。RSV 細気管支炎の診断は保護者へのアンケートをもとに確定した。また RSV 感染免疫応答に重要であることが明らかとなっている $\gamma \delta T$ 細胞からの IFN- γ 産生に関する刺激について臍帯血 $\gamma 9 \delta 2T$ 細胞を用いて予備解析を行なった。

C. 研究結果、D. 考察

1) 日本人で報告されている IL-17E の 2 つの SNPs、IL-17RB の 8 つの SNPs、IL-18 の 3 つの SNPs について、RSV 細気管支炎患者 60 名と対照小児

197名について解析した。IL-17E、IL-17RB(表1)、IL-18とも個々のSNPsならびにハプロタイプ頻度に差異が認められなかった。以上からIL-17に関しては昨年の報告のIL-17F多型との関連がもっとも重要と考えられた。

2) RSV細気管支炎49名についてHLA-DRB1およびDQB1のタイピングを行ない、一般日本人のHLA頻度と比較を行った。解析対象数が多くないために統計学的検討はできなかったが、DRB1*0701, 1301の頻度はRSV細気管支炎患者で一般日本人集団に比較して高かった(図1)。1502は逆にRSV細気管支炎患者での頻度が低かった。DQB1*0201, 0603の頻度はRSV細気管支炎患者で高く(図1)、0601は低かった。興味深いことにRSV細気管支炎患者ではDRB1, DQB1ともホモ接合体の頻度が一般日本人集団に比べて有意に高かった(図2)(それぞれ、28.6% vs 7.6%および26.5% vs 11.1%)。HLAの偏りの原因は不明だが、RSV細気管支炎罹患には特定のHLAが関連することが示唆された。これらのDR, DQ分子により提示されるRSVのエピトープの解析が必要と考える。

3) JFE川鉄千葉病院産科にて出生した新生児217名のうち、199名について1歳まで追跡が可能であった。アンケート調査では18名がRSV細気管支炎に罹患していた。統計学的有意差はないが、臍帯血sCD14はRSV細気管支炎患者では経過中になんらかの症状等がなかった健康児116名のsCD14に比べて高値であった(平均値559.8ng/ml vs 531.3ng/ml)(図3)。この結果はsCD14値が高くなるCD14遺伝子多型(CD14-550CC)がRSV細気管支炎患者で多いという過去の我々の調査結果を支持するものである。

4) 以前我々はRSV細気管支炎患者では末梢血中 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- γ 産生が対照と比較して低下していることを明らかとした。この低下がRSV感染に先行して存在するの否かを解析するためには臍帯血中の $\gamma\delta$ T細胞のIFN- γ 産生とRSV細気管支炎発症を出生コホートで調査する必要がある。しかし、臍帯血 $\gamma\delta$ T細胞のIFN- γ 産生に関する情報がほとんどない。そこで今年度は予備実験を行なった。成人末梢血に比較して臍帯血中の $\gamma\delta$ 2T細胞は非常に少ないがT細胞レセプター発現は成人末梢血 $\gamma\delta$ 2T細胞と差異はなかった(図4)。臍帯血 $\gamma\delta$ 2T細胞は抗原であるIPP(isopentenyl pyrophosphate)とIL-2の刺激ではほとんどIFN- γ を産生せず、

TNF- α を加えたときのみIFN- γ 産生が上昇した。IL-12添加ではこのような効果は認められなかった(図5)。臍帯血 $\gamma\delta$ 2T細胞上のIL-2Rは成人に比較して β 鎖のみが低発現であり(図6a)、これはIL-12添加では上昇せず、TNF- α 添加で上昇した(図6b)。臍帯血 $\gamma\delta$ 2T細胞上でのIL-12レセプターはTNF- α レセプターに比べて発現が有意に低値であった(データ示さず)ことから、臍帯血 $\gamma\delta$ 2T細胞のIFN- γ 産生低下は、IL-2レセプター β 鎖発現低値、さらにその基盤にはIL-12レセプター発現低値があると考えられた。

E. 結論

RSV細気管支炎発症には、出生時の自然免疫能ならびに獲得免疫の両者が関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Campos E, Shimojo N, Aoyagi M, Kohno Y. Differential effects of TNF-alpha and IL-12 on IPP-stimulated IFN-gamma production by cord blood Vgamma9 T cells. Immunology in press.

2. 学会発表

- 1) 上原直毅, 下条直樹, Eduardo Campos, 鈴木修一, 中矢真裕子, 井上祐三朗, 有馬孝恭, 富板美奈子, 河野陽一. 臍帯血sCD14とアトピー性皮膚炎発症の関連 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2008年11月27-29日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 RSV細気管支炎患者におけるIL-17EとIL-17R多型

IL17E	Pearsonのχ ² 乗	Fisherの直接法
SNP1	.819	.797
SNP2	.752	.715

IL17RB	Pearsonのχ ² 乗	Fisherの直接法
SNP1	.913	.893
SNP2	.149	.142
SNP3	.547	.709
SNP4	.222	.212
SNP5	.344	.315
SNP6	.599	.587
SNP7	.111	.111
SNP8	.885	.861

図1 RSV細気管支炎患者のHLA解析:アレル頻度

DRB1	DRB1*14:01		DRB1*13:01	
	患者	一般	患者	一般
	21	0	14	14
	56	242	37	241
	77	242	51	242
	0.31	0.001	0.21	0.002
	2.43		5.45	
	Lower	Upper	Lower	Upper
	1.65	42.29	1.54	19.38

DQB1	DQB1*03:01		DQB1*06:01	
	患者	一般	患者	一般
	21	0	14	14
	89	242	47	241
	110	242	61	242
	0.014	0.001	0.017	0.001
	8.61		1.81	
	Lower	Upper	Lower	Upper
	1.22	26.21	1.17	15.79

図2 RSV細気管支炎患者のHLA解析:ホモ接合体の頻度

DRB1	患者		一般	
	ホモ	14	92	
ヘテロ	35	1124		
	0.00000196		0.00006	
	4.89		2.89	
	Lower	Upper	Lower	Upper
	2.54	9.41	1.50	5.59

図3 健康児とRSV下気道感染症児(1歳まで)の脾帯血sCD14

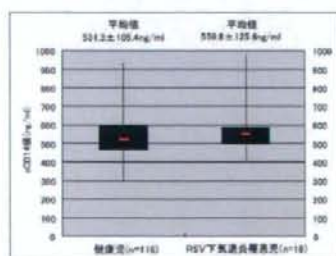


図4 脾帯血Vγ9Vδ2 T細胞解析の基礎的検討:細胞数とTCR発現

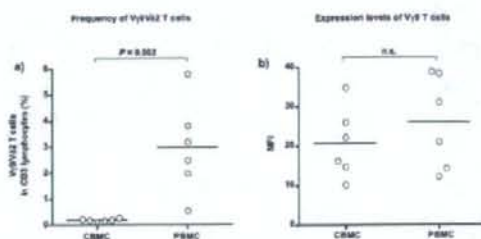


図5 脾帯血Vγ9Vδ2 T細胞のIFN-γ産生に対するIL-2, IL-12, TNF-αの効果

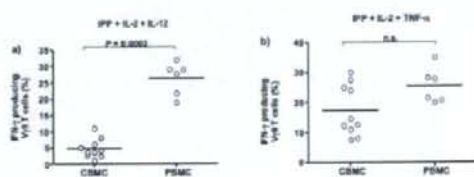


図6 脾帯血Vγ9Vδ2 T細胞のIL-2Rβ発現に対するIL-12, TNF-αの効果

