

アレルギー疾患の発症因子の前方視的研究

研究分担者	荒川 浩一	群馬大学大学院小児科学 教授
研究協力者	森川 昭廣	群馬大学名誉教授
	杉山 幹雄	群馬大学大学院小児科学
	鈴木 僚子	群馬大学大学院小児科学
	只木 弘美	群馬大学大学院小児科学・横浜市立大学
	高見 暁	群馬大学大学院小児科学・新潟大学大学院

研究要旨

アレルギー疾患発症に関わる因子の解明を目的に出生コホート研究を行い、次の成果を得た。

- 1) 生後1年目の医師の診断による喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症頻度は16.4%、12.7%、7.0%であり、生後3年目は、それぞれ18.6%、16.7%、7.4%であった。
- 2) 1歳での食物アレルギー発症にはアトピー素因は関連せず、反対に父親のアレルギー疾患では有意に発症率は少なかった。妊娠中の細菌感染症の既往と関連し、出生後では兄弟の有無、アトピー性皮膚炎と有意な関連を認めた。臍帯血血清中サイトカインではIL-7は有意に低値であった。
- 3) 3歳でのアトピー性皮膚炎では生後1ヵ月の頬部の皮膚水分量と関連していた。臍帯血IL-6、IL-10、IL-12が関連した。
- 4) 3歳での喘息は、妊娠中の細菌・ウイルス感染症の既往と関連した。出生後では、兄弟の有無、下気道感染の既往、1歳での喘鳴やアトピー性皮膚炎の既往と関連していた。臍帯血サイトカインでは明らかな関連を認めなかった。

乳幼児期のアレルギー疾患発症には、疾患ごとに胎内および胎外因子で関与するものが異なり、同じアレルギー疾患でもその発症にはそれぞれ多様性があると考えられた。本研究では、臍帯血血清中サイトカインを網羅的に測定したことで胎児胎盤免疫機能とアレルギー疾患発症との関連を検討でき、非常に貴重なものとなった。

喘息の進展・重症化を予防する目的で、重症化を来す因子としてエオタキシンや粘液産生について基礎的研究を行った。

- 1) ウイルス感染における粘液の過剰分泌の機序を解明した。
- 2) ステロイド長期暴露により肺線維芽細胞からのエオタキシン産生亢進の機序を解明した。

A. 研究目的

アレルギー疾患は、その発症に、遺伝的な背景に加え、胎児期の環境（胎内因子）、出生後の栄養法、生活様式、感染（胎外因子）など多様な因子が関与するとされている。しかし、気管支喘息、アトピー性皮膚炎や食物アレルギーなど、疾患ごとに、どの因子の関与が大きいかなどは十分には解明されていない。また、世界では各国ごとに人種、気候、食生活、生活環境が異なるために、わが国特有の生活習慣や生活環境に基づいた様々な周産期・新生児期・乳児期の各種因子を明らかにする必要があり、その結果として我が国に特有の予防策を作成することで、このプロジェクトの最終目標であるアレルギー疾患の発症予防に結

びつきたい。

今回、乳幼児期のアレルギー疾患発症に係わる因子を解明する目的で、家族歴、妊娠中の母体感染症の有無、臍帯血血清中サイトカインの測定を行い、1歳および3歳時での各種アレルギー疾患発症に関わる因子を検討した。

また、気管支喘息の重症化を予防する目的で、重症化を来す因子である粘液産生と好酸球の活性化因子であるエオタキシンの産生について基礎的研究を行った。

B. 研究方法

(1) 対象は、開業産婦人科一施設で2002年6月から2003年5月までに出生した健康新生児

297名中、協力の同意が得られた269名である。性別は、男児140名、女児129名で、平均在胎週数39.2±1.6週、平均出生体重3051±399gであった。新生児仮死、新生児高ビリルビン血症などの病的新生児は、除外した。

【検討内容】

1) 家族歴に関しては、対象児の父または母全員に対し、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、食物アレルギーの有無について、出産時の入院滞り期間中に、アンケートあるいは問診により調査を実施した。

2) 胎内環境に関しては、母体カルテの記載をもとに、妊婦健診中の感染症罹患の有無(上気道炎、胃腸炎、B群溶血性連鎖球菌やクラミジアによる子宮付属器炎、尿路感染症)を調査した。

3) 臍帯血サイトカインに関しては、出生時に採血された臍帯血を、直ちに血清分離・凍結保存のうえ、バイオプレックス(バイオ・ラド)およびELISAキットにより28種類のサイトカイン、ケモカイン(IL-1RA, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, G-CSF, FGF, PDGF, VEGF, MCP-1, MIP-1a, MIP-1 β , MDC, TARC, Eotaxin, IP-10)を測定した。

4) 乳児期のアレルギー疾患発症に関しては、出生1年目と3年目に質問表を郵送し、返信ハガキに記入する方式で行った。回答が無かった家庭には、直接電話して回答を求めた。医師により診断された児をアレルギー疾患ありと判定した。また、発症に係わる出生後の諸因子として、兄弟数、喫煙者、ペットの飼育歴、保育園や託児所への通園、栄養法についてもアンケート調査した。

(2) 気管支喘息の重症化に際して、気道における粘液産生の機序を解析するため、NCI-H292細胞を用いてMUC5ACの遺伝子発現等を検討した。また、気道リモデリングに関連する肺線維芽細胞を用い、IL-4によるエオタキシン産生に対するデキサメサソンの影響を検討した。

C. 研究結果

生後1年目のアンケート回答が得られたのは269名中213名(回収率は79.2%)であった。また、3年目のアンケート回答が得られたのは269名中215名(回収率は80.0%)であった。生後1年目の医師の診断による喘息、アトピー性皮膚

炎、食物アレルギーの発症率は16.4%、12.7%、7.0%であり、3年目の診断は、それぞれ18.6%、16.7%、7.4%であった。

1) 食物アレルギー発症に関わる因子

1歳の食物アレルギーは、父親の花粉症($p=0.0437$)、あるいは父親で気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症のいずれかを持つと、その発症は有意に低かった($p=0.018$)。

胎内環境としては、母親の妊娠中の細菌感染症(B群溶連菌またはクラミジアによる子宮付属器炎、尿路感染症)とは有意な関連を認めなかった($p=0.040$)。胎外環境因子としては、一人っ子では食物アレルギーの発症は有意に高かった($p=0.0127$)。また、1歳ではアトピー性皮膚炎と有意な関連を認め、3歳では喘息($p=0.044$)やアトピー性皮膚炎(<0.001)と関連した。臍帯血サイトカインでは、1歳ではIL-7($p=0.028$)、3歳ではTARC($p=0.037$)が有意に関連していた。

2) アトピー性皮膚炎発症に関わる因子

1歳では母親のアトピー性皮膚炎と有意な関連を認め、父親の花粉症では負の関連を認めなかった。胎内・胎外環境では、1歳および3歳のアトピー性皮膚炎発症との関連は認められなかった。皮膚バリア機能では、生後1ヶ月時の顔面の皮膚水分量は非発症群と比較し有意に高値を示した。臍帯血サイトカインとの関連では、1歳での発症群ではMIP-1 β は有意に低値を示し、3歳ではIL-6は高く、IL-12とIL-10は有意に低かった。

3) 気管支喘息発症に関わる因子

3歳までの喘息発症には、家族歴には有意な関連を認めなかった。胎内環境との関連では、妊娠中のウイルス感染症(上気道炎、胃腸炎)($p=0.0033$)や細菌感染症(B群溶連菌またはクラミジアによる子宮付属器炎、尿路感染症)($p=0.024$)と有意な関連を認めなかった。胎外環境因子としては、一人っ子では喘息の発症は有意に低かった($p=0.004$)。妊娠中および出生後のペット飼育歴、喫煙者の有無とは関連を認めなかった。一方、保育園については1歳前よりの通園が関連する傾向であった($p=0.061$)。また、肺炎や気管支炎の既往とは強い関連を認めなかった($P<0.00001$)。臍帯血サイトカインとの関連については、1歳ではIL-8が喘息発症群は有意に高く、3歳では喘

息発症とは関連を認めなかった。一方、喘鳴群 (n=53 名) においては、IL-10、IL-15、IL-17、TNF- α 、GM-CSF が有意な関連を認めた。

4) 肺線維芽細胞を用いて、IL-4 によるエオタキシン産生へのデキサメサゾンの影響について *in vitro* の検討を行った。その結果、デキサメサゾンは肺線維芽細胞からのエオタキシン産生を増強させ、その機序として IL-4 受容体下流の stat6 活性化を負に制御する SOCS-1 の発現をデキサメサゾンが抑制することにより生じることを明らかにした。またウイルス感染モデルである ds-RNA (PolyI:C) を用いて TGF- α によるムチン産生がみられる否かを検討した。その結果、PolyI:C は TGF- α による MUC5AC の産生を増強することが判明した。この機序として、PolyI:C による MKP-3 の発現制御によることを明らかにした。

D. 考察

今回、乳幼児期のアレルギー疾患発症に関わる危険因子を明らかにする目的で前方視的検討を行った。その結果、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、気管支喘息の発症に関わる因子として、それぞれ疾患ごとに特異性があり、さらには、発症年齢により因子が異なる傾向が認められた。アレルギー疾患は、アトピー素因としての遺伝傾向が強いと考えられているが、今回の検討では、その傾向が明らかではない疾患が多かった。胎内環境因子としては、妊娠中の感染は特に気管支喘息の発症と関連し、その予防が重要な方策となりうると考えられた。一方、一次予防のなかで世界的に唯一推奨されているのは喫煙曝露を避けることとされているが、今回の検討では喫煙との関連を見いだせなかった。その理由として、わが国においては喫煙率が非常に高いことで差を見いだせなかった可能性も考えられた。

胎内環境因子としては、すべてのアレルギー疾患において栄養法との関連は見いだせなかった。一方、兄弟の有無と食物アレルギーや気管支喘息発症との関連では乖離した結果が見られ、その理由は不明であるが非常に興味もたれる。また、ペットの飼育歴、保育園あるいは託児所の通園に関しては、明らかな関連を見いだせなかった。これらは、環境衛生が良いほどアレルギー疾患が増

加するという衛生仮説に一致しない結果であった。気管支喘息については肺炎や気管支炎の既往とは非常に強い関連を認め、発症の引き金として重要と考えられた。

アトピー性皮膚炎に関しては、出生早期の皮膚生理機能には差を認めなかったが、生後1ヶ月の時点ではアトピー性皮膚炎発症群と非発症群では異なり、皮膚自体の先天的あるいは後天的な適応障害なども考慮された。

臍帯血清中のサイトカインに関しては、IL-7 や MIP-1 β 、TARC、IL-12 や IL-10 が有意に低値であった。IL-7 は、新生児期の T 細胞を CD4 や CD8 陽性細胞へ変移させる強力な刺激因子であり、MIP-1 β は T 細胞の Th1 への分化と関連する因子である。これらのサイトカインが低下しているという結果からは、T 細胞の分化に関わる免疫能の未熟性がアレルギー疾患発症に重要な要因と考えられる。今後、これらサイトカインによるアレルギー疾患発症の予測に向けた前方視的検討が必要と思われる。

気管支喘息の重症化に気道リモデリングは重要な要因と考えられているが、それに関与する肺線維芽細胞において、デキサメサゾンの長期曝露が IL-4 依存性エオタキシン産生を亢進させた。その機序として、SOCS-1 の産生制御を介しての stat6 の活性化増強によることを明らかにした。今後、臨床的な意義付けについて、さらに検討してゆくことが必要と思われる。一方、喘息重症発作において粘液産生は気道閉塞の重要な因子となる。臨床上、ウイルス感染がその大きなトリガーになっている。今回、ウイルス感染モデルである dsRNA (PolyI:C) が、TGF- α による MUC5AC の産生を増強した。その機序として PolyI:C による MKP3 の産生制御を介しての ERK の活性化増強によるものであることを明らかにした。このことは、今後の重症化対策の 1 つである粘液産生のコントロールへの足がかりになると思われた。

E. 結論

乳幼児期のアレルギー疾患発症に関しては、胎内・胎外因子が関与し、それぞれの疾患で関与する因子に相違が見られた。今後、6歳でのアンケート調査を行い、学童期以降のアレルギー疾患との関連を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) 荒川浩一、杉山幹雄、水野隆久、望月博之、徳山研一、森川昭廣. アレルギー疾患発症に關与する遺伝因子・環境因子 胎内・胎外因子 臍帯血サイトカインと皮膚生理機能. 日本小児アレルギー学会誌 21 (1): 86-91. 2007
- 2) Sugiyama M, Arakawa H, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A. Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year. *Pediatrics*. 119: 716-23. 2007
- 3) 村松礼子、望月博之、只木弘美、萩原里実、高見暁、水野隆久、荒川浩一、森川昭廣. 気道の非侵襲的評価法 IOS. 日本小児アレルギー学会誌 22: 73-79, 2008.
- 4) Tadaki H, Mochizuki H, Muramatsu R, Hagiwara S, Mizuno T, Arakawa H, Morikawa A. A flow- and pressure-controlled offline method of exhaled nitric oxide measurement in children. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 100: 308-13, 2008.
- 5) Suzuki T, Arakawa H, Mizuno T, Muramatsu K, Tadaki H, Takizawa T, Mochizuki H, Tokuyama K, Matsukura S, Morikawa A. Differential regulation of eotaxin expression by dexamethasone in normal human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 38: 707-14, 2008
- 6) Tadaki H, Arakawa H, Mizuno T, Suzuki T, Takeyama K, Mochizuki H, Tokuyama K, Yokota S, Morikawa A. Double-stranded RNA and TGF- α promote MUC5AC induction in respiratory cells. *J Immunol* 182:293-300, 2009
- 7) Tadaki H, Arakawa H, Sugiyama M, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A. Association of cord blood cytokine production with wheezy infants in the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2009 in press.

2. 学会発表

- 1) 荒川浩一、杉山幹雄、水野隆久、望月博之、

徳山研一、森川昭廣: 乳児反復性喘鳴発症に係わる因子の前方視的検討. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2006 年 5 月 30 日-6 月 1 日

- 2) 荒川浩一、杉山幹雄、森川昭廣: 乳児期におけるアレルギー性疾患発症予知. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2006 年 11 月 2-4 日
- 3) 荒川浩一、杉山幹雄、森川昭廣: 胎内・胎外因子: 臍帯血サイトカインと皮膚生理機能. 第 43 回日本小児アレルギー学会、千葉、2006 年 11 月 25-26 日
- 4) 荒川浩一: 小児慢性咳嗽の病態と神経ペプチド. 第 14 回ニューロペプチド研究会、千葉、2006 年 11 月 24 日
- 5) 荒川浩一、森川昭廣: 気管支喘息の早期治療介入. 第 109 回日本小児科学会学術集会、金沢、2006 年 4 月 21-23 日
- 6) 荒川浩一、杉山幹雄、水野隆久、只木弘美、望月博之、徳山研一、森川昭廣: 3 歳時での喘息発症に係わる因子の前方視的検討. 第 110 回日本小児科学会学術集会、京都、2007 年 4 月 20-22 日
- 7) 荒川浩一、杉山幹雄、水野隆久、只木弘美、望月博之、徳山研一、森川昭廣: アレルギー性鼻炎発症因子に関する前方視的検討. 第 44 回日本小児アレルギー学会、名古屋、2007 年 12 月 8-9 日
- 8) 荒川浩一、杉山幹雄、水野隆久、只木弘美、望月博之、森川昭廣: 3 歳時での喘息発症に係わる因子の前方視的検討. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2008 年 6 月 12-14 日
- 9) 荒川浩一: アレルギー疾患の一次予防の現状. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2008 年 11 月 27-29 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの発症・重症化の予防に関する研究

研究分担者 伊藤 節子 同志社女子大学生生活科学部食物栄養科学科
研究協力者 明石 真未 同志社女子大学生生活科学部食物栄養科学科
伊東 祐美 同志社女子大学生生活科学部食物栄養科学科

研究要旨

乳児期発症の食物アレルギーの経過は一般に良好であるが、一部の過敏な状態に陥った症例では微量の抗原を含む食品によりアナフィラキシー反応が惹起されることがある。このような重症例に対して適切な食事指導を行い寛解を誘導するためには、摂取する調理食品中の抗原量の評価と標準化が必要である。抗原抽出を生理学的条件下で行う従来法による定量結果は、臨床的な抗原性の強さを反映することが明らかとなり、調理による影響も加味した食品中のアレルギー物質の量を評価することが可能となった。

厚生労働科学研究班の二重盲検食物負荷試験用食品である全卵 KKFC-E、牛乳 KKFC-M、小麦 KKFC-W 中の抗原量を基準として、加熱条件を変えた卵、牛乳、小麦を含む食品中当該抗原の定量結果と対比させることにより食品中のアレルギー物質抗原量食品交換表を作成することができた。これを治療に応用した結果、抗原特異的 IgG4 抗体が寛解に関わる免疫学的指標となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

乳児期発症の食物アレルギーの経過は一般に良好であるが、一部の過敏な状態に陥った症例では微量の抗原を含む食品によりアナフィラキシー反応が惹起されることがある。このような重症例に対して適切な食事指導を行うことにより寛解を誘導するためには、摂取する調理食品中の抗原量の評価と標準化が必要である。

2006-2008 年度において①食品の抗原性の評価法の検討と、臨床的に有用性の高い測定系の確立、②測定した抗原量からアレルギー物質抗原量食品交換表の作成③食品中の抗原量をもとに食事療法を行った症例における寛解の指標となる免疫学的パラメーターについて検討した。

B. 研究方法

抗原性の適切な評価法の選定のために、加熱調理により抗原性の調整が可能な卵について検討した。卵白凍結乾燥末、加熱条件を変えた全卵、卵を用いた調理食品中の卵抗原量を抗原抽出液に界面活性剤と SH 還元剤を含む FASPEK 卵(卵白アルブミン)および塩水溶液で抽出する従来法の卵白アルブミン検出キット、オボムコイド検出キット(以下従来法 OA、従来法 OM とする)を用いて比較検討した。

牛乳(β -ラクトグロブリン、カゼイン)と小麦(グリアジン)についても同様の検討を行った。

卵によるアナフィラキシー反応既往例の卵特

異的 IgG および IgG4 抗体の測定はファディア社の卵抗原と抗ヒト IgG 抗体および抗ヒト IgG 4 抗体を用いた Immuno CAP 法にて行った。

C. 研究結果

いずれの抗原に関しても FASPEK は原材料中の抗原検出に優れた測定系であり、従来法は調理による抗原性の低減化を反映していた。特に加熱の影響を受けやすい卵においてこの傾向は顕著であった。加熱卵の従来法 OA による抗原量の低下は OA の凝固による見かけ上のものであり、凝固しにくい OM は従来法 OM にてもよく検出できた。実際の臨床現場における抗原性の強さは従来法による測定結果とよく一致し、食品中の卵の低アレルギー化の評価に用いることができると考えられた。

食品中の抗原量の標準品として、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である全卵 KKFC-E、牛乳 KKFC-M、小麦 KKFC-W 中の抗原量を測定し、その結果を、加熱条件を変えた卵、卵を含む食品、牛乳、乳成分を含む食品、うどん、パンの中の該当抗原の定量結果と対比させることにより食品中のアレルギー物質抗原量食品交換表を作成することができた。全卵 KKFC-E と固ゆで卵、牛乳 KKFC-M と牛乳および育児用粉乳、小麦 KKFC-W とうどんおよびパ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-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	クリアリン量 (mg)	摂取可能な うどんの量	摂取可能な パンの量
1/20	4.8	0.7~1.0g	0.5~0.9g
1/10	9.5	1.5~2.0g	1.0~1.8g
1/5	19.1	3.0~4.0g	2.0~3.5g
3/10	28.6	4.5~6.0g	3.0~5.3g
全量	95.4	15.1~20.0g	9.9~17.7g

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異なり、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、ヨーグルトにも牛乳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。

卵によるアナフィラキシー反応既往例において、従来法による食品中の抗原定量結果に基づいて除去解除を試みた結果、寛解群9例、非寛解群9例ともに、除去中に比べて卵特異的IgG抗体は摂取開始後に上昇したが、寛解群においてのみ有意差($p < 0.01$)が認められた。一方、卵特異的IgG4抗体は寛解群においてのみ上昇し($p < 0.01$)、非寛解群では上昇が認められなかった。

D. 考察

従来法による食品中の抗原量の測定結果は、食品を摂取する立場からみた抗原量を反映していると考えられる。加工や調理による抗原の低減化を反映した測定法による食品中の抗原定量結果を基に作成した卵、牛乳、小麦のアレルギー物質抗原量食品交換表は、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。

生体側の反応として抗原特異的IgG4抗体は、食物アレルギーの寛解に関わるパラメーターとなりうる可能性があると考えられた。

E. 結論

加工や調理による抗原の低減化を反映させた食品中のアレルギー物質抗原量食品交換表の作成により、負荷試験の結果を食事指導に反映させることが可能となり、食物アレルギー児のQOLの向上と早期の寛解誘導への応用が期待される。

生体側の寛解のパラメーターとして抗原特異IgG4を有力候補として挙げる事ができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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;55(12):1536-42
- 8) 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):476-84
- 9) 伊藤節子: アレルゲン除去食療法と解除の仕方, 小児看護 2006;29(4):428-34
- 10) 伊藤節子: 加工食品中微量アレルゲン物質, アレルギーの臨床 2006;26(6):441-4
- 11) 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):1377-84
- 12) 伊藤節子: 乳幼児が注意すべき食物とは. Q&A でわかるアレルギー疾患 2006;2(4):307-8
- 13) 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):1702-7
- 14) 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):526-30
- 15) 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):1491-6
- 16) 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):901-11
- 17) 伊藤節子: 食物アレルギーの治療と予防-除去食療法の実際-, 小児内科 2007;39(4):587-92
- 18) 伊藤節子: 食物アレルギーの診断手順, 治療 2007;89(5):1861-6
- 19) 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, 臨床免疫・アレルギー

科 2007;47(5):551-8

- 20) 伊藤節子: 食物アレルギーと栄養, 食物アレルギー研究会誌 2007;7(2):53-7
- 21) 伊藤節子: 消化管アレルギー, Topics in Atopy 2007;6(2):20-4
- 22) 伊藤節子: 乳児期発症の食物アレルギーの関与するアトピー性皮膚炎, 日本小児アレルギー学会誌 2007;21(5):649-56
- 23) 伊藤節子: 食物アレルギー診療ガイドライン 2005解説 第9章食物アレルギーの治療 4. アナフィラキシーショックへの対応, 日本小児アレルギー学会誌 2007;21(5):723-6
- 24) Tokuko Mukoyama, Sankei Nishima, Masahiko Arita, Setsuko Ito, Atsuo Urisu, Motohiro Ebisawa, Hideo Ogura, Yoichi Kohno, Naomi Kondo, Rumiko Shibata, Makifumi Hurusho, Mitsufumi Mayumi, Akihiro Morikawa and Food Allergy Committee, Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology: Guidelines for Diagnosis and Management of Pediatric Food Allergy in Japan Allergology International 2007;56(4):349-61
- 25) 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
- 26) 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: 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(2006年5月30日, 東京都)
- 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(2006年5月30日, 東京都)
- 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)(2006年6月

- 24日, 草津市)
- 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)(2006年7月1日, 静岡市)
 - 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(2006年11月4日, 東京都)
 - 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(2006年11月25日, 千葉)
 - 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)(2007年1月27日, 東京都)
 - 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)(2007年2月7日, 北九州市)
 - 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(2007年2月10日, 京都市)
 - 10) 伊藤節子: 教育講演「赤ちゃんとおどもの食物アレルギーと海外旅行」, 第6回日本旅行医学会(2007年4月15日, 東京都)
 - 11) 伊藤節子: ランチョンセミナー「食物アレルギーのガイドライン」, 第24回日本難治喘息・アレルギー疾患学会(2007年5月27日, 東京都)
 - 12) 伊藤節子: イブニングシンポジウム6 アレルギー疾患の患者参画型診療「食物アレルギー」, 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会(2007年6月11日, 横浜市)
 - 13) 伊藤節子: 食物アレルギーの治療, 第46回京滋臨床アレルギー懇話会(2007年7月28日, 京都市)
 - 14) 伊藤節子: 調理による卵抗原の低アレルギー化の評価と寛解誘導への臨床応用, イブニングシンポジウム7「食物アレルギーのNew Wave; 抗原分析その臨床応用」, 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会(2007年11月1日, 横浜市)
 - 15) 伊藤節子, 明石真未: アナフィラキシー反応を経験した食物アレルギー児の寛解誘導の試みと抗原特異的IgGおよびIgG4抗体の臨床的意義, 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会(2007年11月1日, 横浜市)
 - 16) Setsuko Ito: Pathogenesis, Prevention, and Management of Food Allergy: Clinical Point of View. International Conference on Food Factors for Health Promotion 2007 (2007/11/29, Kyoto, Japan)
 - 17) 伊藤節子, 明石真未, 水谷佳保里, 伊東祐美: 臨床応用を目指した食品のアレルゲン性の評価についての検討, 第11回京都小児喘息・アレルギー研究会(2008年2月9日, 京都市)
 - 18) 伊藤節子: 食物アレルギー: 診断と治療の最新動向 小児アレルギーフォーラム 2008 (2008年2月8日, 津市)
 - 19) 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, 東京都)
 - 20) 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, 名古屋市)
 - 21) 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評価の臨床的評価: 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, 東京都)
 - 22) 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, 横浜市)
 - 23) 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ための臨床応用: アレルゲン交換表の作成(2009年2月14日, 東京都)
 - 24) 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, 名古屋市)
- 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ギー特異的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ギー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、低アレルギー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、さらに味、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ギー特異的免疫療法を開始した。併せて、治療前後でのアレルギー特異的 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。DNA microarray を用いた検討では、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 cytokine inducible SH2-containing protein (CISH) が有意に増加することを示した。また、preliminaryながら寛容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、こうした検討が免疫療法の機序解明に寄与しうると期待された。

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、近年アレルギー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ギー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ヵ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、アレルギー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、低アレルギー化卵白を用いたアレルギー特異的免疫療法を試み、併せて、治療前後でのアレルギー特異的 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 加熱卵白によって経口負荷試験が陽性。
- ② 低アレルギー化鶏卵による経口負荷試験が陰性。
- ③ 年齢は5歳から20歳。

2) 低アレルギー化鶏卵を用いた免疫療法の実施方法

2007 年度までは加熱後、水で洗浄することによりオボムコイドを減量した卵白を添加したクッキーを、また、2008 年度は、鶏卵を 90°C60 分加熱後、水で洗浄することによって作製したオボムコイド減量加熱全卵を2ヵ月間連日摂取する。

3) Microarray を用いたアレルギー特異的 T 細胞応答の網羅的解析

① 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末梢血単核球 (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 total RNA 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-time PCR にて確認した。

② Flow-cytometry による CISH の発現解析

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。

③ Flow-cytometry を用いた CISH とサイトカイン産生能の検討

PBMC に卵白抗原および IL-4 を加えて 7 日間培養した後、brefeldin 存在下に phorbol myristate acetate と ionomycin により 6 時間活

性化した。その後、PC5 標識抗 CD4 抗体で染色後に、前述した方法で fixation と permeabilization 処理した後に、FITC 標識した CISH と、PE 標識した IL-4 を用いて染色し、同じく PE 標識 IFN- γ の Th1 細胞における CISH 発現と比較した。

4) 免疫療法におけるアレルギー特異的 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ギー特異的 T 細胞応答の解析をおこない、寛解導入の成否による、相違を検討する。

①アレルギー特異的な 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、アレルギー存在下に培養する。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。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アレルギー特異的な T 細胞に発現する SOCS family 遺伝子の解析

対象より得た末梢血単核球を食物アレルギー存在下に 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

1) Microarray を用いたアレルギー特異的 T 細胞応答の網羅的解析

①Microarray と Real-time PCR による解析

Microarray 解析により、非アレルギー児と比較して、抗原刺激後に、鶏卵アレルギー児で発現が 1.5 倍以上に増加する遺伝子を 43 個選択した。それらの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 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、cytokine inducible SH2-containing protein (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。

②Flow-cytometry による CISH の発現解析

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 陽性細胞は鶏卵白抗原刺激後に、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。

③Flow-cytometry を用いた CISH とサイトカイン産生能の検討

Th1、Th2 細胞における CISH の発現を比較するため、flow-cytometry を用いて、IFN- γ +細胞中の CISH+細胞と IL-4+細胞中の CISH+細胞の割合を比較検討した。鶏卵アレルギー児 7 名での検討にて、CISH の発現は IFN- γ +細胞 (median 26.9%, range 3.7-43.9%) よりも、IL-4+細胞 (median 49.3%, range 37.9-75.8%) で有意に増加していた。

2) オボムコイド減量加熱全卵を用いた新たな免疫療法

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 10 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 2 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 4 名という結果であった。

3) 免疫療法におけるアレルギー特異的 T 細胞応答の解析

アレルギー特異的な 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アレルギー特異的な 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アレルギー刺激で誘導される 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アレルギー刺激で誘導される 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アレルギー刺激で誘導される TGF β 1 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

我々は当初、加熱脱オボムコイド鶏卵を含むクッキーを用いた免疫療法を行い、約 50%の鶏卵アレルギー患者で寛解誘導に成功した。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ギー化されることを回避するため、低アレルギー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。

より有効な免疫療法を開発する目的でアレルギー特異的なT細胞応答を解析した。Microarrayを用いた網羅的解析からは、CISHに着目して解析した。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。CISHがTh2細胞優位に発現しているために、アレルギー特異的なT細胞での発現が亢進する機序と考えられた。こうした新知見が、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しうる可能性がある。

免疫療法前後アレルギー特異的な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Th-1/Th-2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

低アレルギー化鶏卵を用いた鶏卵アレルギーに対するアレルギー特異的な免疫療法をお子に良好な成績を得ている。アレルギー特異的なT細胞応答を解析し、アレルギー発症におけるCISHの役割や疾患マーカーとしての可能性を示した。今後さらに免疫療法の前でT細胞応答を解析し、免疫療法の改良に供する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. 36:1538-1545. 2006.

- 2) Koyama H, Kakami M, Kawamura M, Tokuda R, Kondo Y, Tsuge I, Yamada K, Yasuda T, Urisu A; Grades of 43 Fish Species in Japan Based on IgE-binding Activity Allergol Int 55; 311-6, 2006.
- 3) 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. 118:1382-3. 2006.
- 4) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Moriyama T, Urisu A, Maitani TA Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction. Biosci Biotechnol Biochem, 71; 269-72. 2007.
- 5) Yano T, Sakai Y, Uchida K, Nakao Y, Ishihata K, Nakano S, Yamada T, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Maitani T. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction. Biosci Biotechnol Biochem. 71:1793-6. 2007.
- 6) Mukoyama T, Nishima S, Arita M, Ito S, Urisu A, Ebisawa M, Ogura H, Kohno Y, Kondo N, Shibata R, Hurusho M, Mayumi M, Morikawa A. Guidelines for Diagnosis and Management of Pediatric Food Allergy in Japan. Allergol Int. 56; 349-61, 2007.
- 7) Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Watanabe T, Matsuda R, Urisu A, Maitani T. Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction. J Agric Food Chem. 55; 1649-55, 2007.
- 8) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Toyoda M, Urisu A. Specific detection of wheat residues in

- processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71: 2561-64, 2007.
- 9) Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Ohno Y. A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. *J Agric Food Chem.* 55: 9345-50, 2007.
 - 10) Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Urisu A. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxy fluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Allergol Int.* 56: 149-55, 2007.
 - 11) 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: 123-9, 2008.
 - 12) Nakajima Y, Tsuge I, Kondo Y, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kato M, Kurahashi H, Urisu A, Asano Y, Up-regulated cytokine inducible SH2-containing protein expression in allergen-stimulated T cells from hen's egg-allergic patients. *Clin Exp Allergy* 38; 1493-1506, 2008.
 - 13) 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; 583-8, 2008.
 - 14) 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, 7625-30, 2008.
 - 15) 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: 6818-24, 2008.
 - 16) 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.* 72:2228-31, 2008.
2. 学会発表
- 1) 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., 2006, June.
 - 2) 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. 2006, June.
 - 3) 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, Barcelona, Spain. 2008. June.
- 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
—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	穂山 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
	酒井信夫	国立医薬品食品衛生研究所
	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。カロテノイド投与群の脾臓細胞より CD4⁺T 細胞を単離し、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。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 主に成人における果実・種実類などの植物性食物アレルギーの原因抗原の探索を行った結果、成人における果実・種実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ことが多く、特に Bet v 1 ホモログや Bet v 2 ホモログ、ソーマチンライク蛋白質などの汎アレルギーが重要と考えられた。モモでは 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。大豆においてもこのクラス 2 が発症しており、新しいタイプの大豆(豆乳)アレルギーであると考えられた。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抗原の 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ギー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、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ギー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]

シロザケ卵(イクラ)より主要抗原であるピテロジェニン断片(β' -c)を生成し、これをメルカプトエタノール処理してSDS-PAGEに供し、16 kDaと18 kDa成分に分離した。16 kDaをSDS-PAGEゲルから切り出してトリプシン消化した後、逆相HPLCに供して複数のタンパク質断片を分取し、それぞれアミノ酸配列分析に供した。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、トリプシン-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、そのアレルギー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 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)としてアレルギー性変化の指標とした。

[その他の食品抗原解析]

バナナ、モモ、大豆(豆乳)などから抽出液を作製し、アレルギーを発症した患者の血清を用いて、イムノブロットング法やELISA法によって原因抗原の探索を行った。臨床に関しては治療の一環として行われた特異的IgE-RAST試験、ブリックテストやブリック・ブリックテスト等の結果を参考にした。花粉抗原はBet v 1、Bet v 2の組換え体やブリック用エキスをを用いた。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]

IgE、IgG1抗体価において α -カロテン摂取群はMF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、 β -カロテン摂取群では有意に抑制された。 α -カロテン摂取群、 β -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、 α -カロテン摂取群、 β -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、 β -カ

ロテン摂取群は対照群に比べ有意に低い値であった。 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 $\alpha 4\beta 7$ 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]

β' -cのトリプシン消化断片から、4種類の新規アミノ酸配列、「I: QKQGVGLYA」、「II: SHGLQEVYFDSN」、「III: IKVVDWMK」、「IV: SSVS」を得た。ニジマス-ピテロジェニンのc-DNA配列から得たアミノ酸内部配列を鋳型として、 β' -c中の配列を求めたところ、IはN末端104-113番目、IIは同115-126番目、IIIは同130-137番目、IVは同164-167番目であった。また別手法で調査していた同104-113番目(QQEGVGVYA)の配列を再確認した。これらの配列とニジマス-ピテロジェニン内部配列の相同性は92%と極めて高かった。

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のアレルギー性は低下したが、両消化処理による IC_{50} の増加度合いは、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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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ギー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]

バナナに反応する患者の血清を用いて解析したところ、30-33 kDa付近のバンドの他にも20 kDa付近のバンドにも反応が見られた。これらを同定したところ、前者はキチナーゼ、後者はバナナのソーマチンライクプロテインであった。モモでは14-18 kDa付近に多くのバンドがIgE結合性を示し、これらはプロフィリンやBet v 1ホモログであると推測される。豆乳に反応する患者は、シラカバ・ハンノキのRASTが有意に高く、かつほぼ全例でBet v 1に反応した。また、この反応

は豆乳によって阻害されたことから、豆乳のアナフィラキシーの原因抗原は大豆の Bet v 1 ホモログ (PR-10 ファミリー) であると推測された。

モモでは 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、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 α 4 β 7 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 α 4 β 7 インテグリン陽性細胞は対照群との有意な差はみられなかった。このことからレチノイン酸経路でなく、他のメカニズムが考えられた。

[魚卵抗原解析]

新たに β' -中の 34 個のアミノ酸配列を得た。この結果は、サケ科魚卵間で一次配列相同性がきわめて高いことを示す内容で、サケ科魚卵間のアレルゲン交差性が、アレルゲンタンパク質の一次構造の類似性に起因することを示唆している。

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]

成人における果実・種実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ことが多く、特に Bet v 1 ホモログ (PR-10 ファミリー) や Bet v 2 ホモログ (プロフィリン)、ソーマチンライクプロテインなどの汎アレルゲンが重要と考えられた。また果物以外にも、大豆においてもこのクラス 2 が発症しており、新しいタイプの大豆 (豆乳) アレルギーであると考えられた。従って、これらのアレルギーでは、花粉抗原に対する RAST やプロット、ELISA 等の結果によって、果物・種実でのアレルギー発症リスクを推測することも可能と思われる。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ことから、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を調査することが必要と考えられた。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) 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*, 38, 659-666 (2008).
- 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) 亀山浩, 佐伯宏樹, 渡辺一彦, 宇理須厚雄. 食物アレルギー(ピーナッツ, 魚卵), 臨床免疫・アレルギー科, 46, 588-595 (2006)
- 8) 亀山浩, 酒井信夫, 佐伯宏樹, 渡辺一彦, 赤澤晃, 宇理須厚雄. アレルゲンの交差反応性 小児内科 久保友和, 渡辺一彦, 原 彰彦, 清水 裕, 佐伯宏樹. シロサケ卵に含まれる主要アレルゲンの探索. 北大水産彙報, 56, 55-56, 2005
- 9) 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, (6), 777-780 (2006).
- 10) 加賀谷早織, 角田孝彦, 森山達哉 「フキノトウ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(3), 331-334 (2006).
- 11) 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, 「カレースパイスおよびライチ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(13), 2212-2217 (2006).
- 12) 森山達哉, 小川正 「食品のアレルゲ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
- 13) Yano, T., Sakai, Y., Uchida, K., Nakao, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., Maitani, T. Detection of walnuts residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71, 1793-1796 (2007).
- 14) 亀山浩, 酒井信夫, 安達玲子 “食物アレルギー表示における特定原材料等の検査法に関する最新動向と今後の展望について” FFI ジャーナル, 212, 1006-1015 (2007).
- 15) 亀山浩, 酒井信夫, 佐伯宏樹, 渡辺一彦, 赤澤晃, 宇理須厚雄, “アレルゲンの交差反応性” 小児内科, 39, 558-563 (2007).
- 16) Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K, Sakata, K., Sakai, S., Toyoda, M., Urisu, A., Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci, Biotechnol, and Biochem.* 71, 2561-2564 (2007).
- 17) Seiki K., Oda H., Yoshioka H., Sakai S., Urisu A., Akiyama H., Ohno Y., A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9345-9350 (2007).
- 18) 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. *Journal of AOAC International*, 91, 123-129 (2008).
- 19) Amano H, Negishi I, Akiyama H, Ishikawa O. Psychological Stress can Trigger Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice: An Inhibitory Effect of Corticotropin-Releasing Factor. *Neuropsychopharmacology.* 33, 566-573 (2008).
- 20) 森山達哉, 光山英由, 矢野えりか, 大羽美香, 橘田和美, 川本伸一, 亀山浩, 宇理須厚雄, 高橋浩司, 羽鹿牧太, 小川正, 河村幸雄 「食物アレル

- ゲンタンパク質の近赤外蛍光標識プローブによる検出」日本食品科学工学会誌, 54 巻, 11 号 468-476 (2007).
- 22) 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).
 - 23) 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).
 - 24) 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).
 - 25) 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).
 - 26) 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).
 - 27) 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へえび・かきの表示義務化へジャパンフードサイエンス 47, 27-31 (2008).
- ## 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 年 4 月, 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 年 7 月, 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 年 7 月, 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 年 7 月, 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 年 7 月, 兵庫)
 - 6) 松田聡子, 藤原進, 堀川達弥, 錦織千佳子, 森山達哉「キクによる Oral Allergy Syndrome を合併したキク皮膚炎の 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 年 7 月, 兵庫)
 - 7) 飯島茂子, 二藤部弘暁, 森山達哉「サクランボ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 年 7 月, 兵庫)
 - 8) 石川博康, 熊野高行, 森山達哉「桃とメロンの OAS 患者に見られたゴボウアレルギーの 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 年 7 月, 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「ローヤルゼリー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 年 9 月, 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ゲンの解析」第 45 回日本栄養食糧学会近畿支部大会 (2006 年 10 月, 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「アレルゲ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 年 10 月, 兵庫)
 - 12) 森山達哉, 矢野えりか, 石川博康, 角田孝彦, 河村幸雄「ゴボウアレルゲンの同定」第 45 回日本栄養食糧学会近畿支部大会 (2006 年 10 月, 兵庫)
 - 13) 森山達哉「大豆アレルゲンの多様性」第 3 回ダイズ研究会 (2006 年 12 月, 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ゲン食品の開発まで.-」第 17 回大和アレルギー研究会特別講演 (2006 年 12 月, 奈良)
 - 15) 飯島茂子, 佐藤哲也, 森山達哉「サクランボ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 年 2 月, 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ゲンの解析」日本農芸化学会 2007 大会 (2007 年 3 月, 東京)
 - 17) 大羽美香, 海老原光湖, 森山達哉, 橋田和美, 川本伸一「コメアレルゲン抗体の作製と評価」日本農芸化学会 2007 大会 (2007 年 3 月, 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(アレルゲン)の分解」日本農芸化学会 2007 大会 (2007 年 3 月,

東京)

- 19) 矢野えりか, 光山英由, 大羽美香, 橋田和美, 川本伸一, 穠山浩, 森山達哉, 河村幸雄 「近赤外蛍光によるアレルゲンタンパク質の検出」 日本農芸化学会 2007 大会 (2007 年 3 月, 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.
- 21) Akiyama, H. "Dietary apple procyanidins inhibit the development of oral sensitization and food allergies!" the 3rd International Conference on Polyphenols and Health ICPH2007 (2007, 11)
- 22) Akiyama, H. "Prevention of food allergy development by food factors" the International Conference on Food Factors for Health Promotion ICOFF2007 (2007, 11).
- 23) 穠山浩 「アレルゲン物質食品表示の現状と検出法」 第 44 回日本小児アレルギー学会総会 (2007, 12).
- 24) Doi, H., Shibata, H., Shoji, M., Sakai, S., Akiyama, H. "Innovative ELISA system for the detection of walnut protein in processed foods" 121st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (2007, 9)
- 25) 酒井裕美子, 矢野竹男, 内田浩二, 中尾義喜, 石畑公江, 仲野茂, 山田敏広, 酒井信夫, 穠山浩, 米谷民雄 「PCR 法を用いた食品中のクルミの検出法について」 日本食品化学学会第 13 回学術大会 (2007, 6).
- 26) 鈴木友紀子, 水谷友海, 中村幹彦, 伊藤敦, 穠山浩, 酒井信夫, 近藤一成, 米谷民雄, 加藤重城, 秋元政信 「水晶発振子(QCM)によるオパールブミンの検出について」 日本食品化学学会第 13 回学術大会 (2007, 6).
- 27) Sakai, S., Matsuda, R., Sato, Y., Adachi, R., Akiyama, H., Shiomi, K., Urisu, A., Maitani, T., Ohno, Y. "Interlaboratory evaluation of two kinds of ELISA kits for the determination of crustacean protein in processed foods" 121st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (2007, 9).
- 28) Hiroshi Akiyama, Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food, 122st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (2008, 9).
- 29) 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).
- 30) 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).
- 31) 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).
- 32) 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).
- 33) 穠山浩 「検出法(アレルゲン)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).
- 34) 安達玲子, 穠山浩 「アレルゲン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) 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)
- 35) 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ゲンの増大」 第 33 回日本農薬学会(奈良) (2008, 4)
- 36) 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)
- 37) 森山達哉「農作物アレルゲンについて」 日本園芸学会近畿支部大会(京都)シンポジウム (2008, 9)
- 38) 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)
- 39) 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 アレルゲン 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。その結果、OVA感作マウス脾臓中にはOVA経口投与による即時型下痢症状の発症を抑制し、好酸球や肥満細胞の腸管局所への集積を抑制する調節性CD8陽性T細胞が存在しており、その抑制機序はOVA特異的IgEの抑制によるものでなく、CD8陽性T細胞自身が産生するIL-10とIL-10非依存性の機序の両者が関与することが示唆された。また、CD8陽性T細胞を輸注する代わりにOVA抗原封入マンノース結合リポゾームの口腔粘膜投与により、OVA経口投与による即時型アレルギー性下痢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として抗原特異的調節性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。

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- β 産生細胞の誘導、CD4+CD25+T細胞の増加が生じ、経口トレランスが誘導されることを明らかにしてきた。そこで、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に加え、抗原特異的Th2細胞も存在する状況で、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CD8陽性T細胞が著減している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、両者の症状比較することで食物アレルギーの病態におけるCD8陽性T細胞の役割を検討した。次にOVA感作あるいは非感作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、CD8陽性T細胞分画の再構築により食物アレルギー症状の変化を比較検討した。

CD8陽性T細胞の輸注による症状変化が機序を明らかにするため、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。一部の実験では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産生能が食物アレルギー症状を規定する要因となっ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、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には、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) CD8 陽性 T 細胞輸注によるアレルギー下痢症状の抑制

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 マウスで減少している CD8 陽性 T 細胞が症状増悪に関与すると予測されたが、OVA 感作野生型マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞を OVA-TCR-tg マウスに輸注すると、OVA-TCR-tg マウスの下痢症状発症は抑制され、腸管局所への好酸球、肥満細胞の集積が抑制された。一方、非感作マウス由来の CD8 陽性 T 細胞輸注では下痢症状発症時期が遅れるものの発症そのものは抑制されなかった。

2) CD8 陽性 T 細胞による症状抑制機序の解析

OVA 経口負荷の回復で、CD8 陽性 T 細胞輸注群、非輸注群ともに血清中 OVA 特異的 IgG1, IgG2, IgE 値は上昇したが、両群間には上昇の程度に差がなかった。OVA 反復投与後に分離した腸間膜リンパ節単核球の *in vitro* での OVA 特異的サイトカイン産生能は、感作マウス由来 CD8 陽性 T 細胞の輸注群では、非輸注群に比べ IL-4 産生能の抑制、IL-10 産生能の増強がみられた。また、OVA 負荷投与後の腸間膜リンパ節のサイトカイン mRNA 発現は、感作 CD8 陽性 T 細胞の輸注により、非輸注群に比べ IL-4, IFN- γ の mRNA 発現は減少するのに対し、IL-10 の mRNA の発現は増加し、TGF- β 1 mRNA の発現量には変化を認めなかった。CD8 陽性 T 細胞を輸注するかわりに OVA 感作 OVA-TCR-tg マウスにリコンビナント IL-10 を腹腔内投与あるいは経静脈投与し、投与 2 時間後に OVA の経口チャレンジを行ったが即時型下痢症状の抑制効果は認められなかった。

3) 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 *mncp1* 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。

4) 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 値の増加は亢進していた。

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。この調節性 CD8 陽性 T 細胞による下痢症状の抑制機序は、抗原特異的 IgE 産生抑制や、Th1 反応の誘導によ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 細胞輸注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示唆された。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、IL-10 を抗原負荷前に投与することではアレルギー症状発現を抑制することは出来ないと考えられた。そこで、*in vivo* で抗原特異的調節性 CD8 T 細胞を誘導するため、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。その結果、OVA 封入マンノース結合リポソームの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、抑制効果が確認され、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。