

食物アレルギー患者の管理の改善に関する研究
—食物アレルギーの管理及び患者の QOL 向上に寄与する研究—

研究分担者 今井 孝成 国立病院機構相模原病院小児科
研究協力者 海老澤 元宏 国立病院機構相模原病院臨床研究センター
佐藤 美紀 国立病院機構相模原病院小児科
小倉 聖剛 国立病院機構相模原病院小児科

研究要旨

目的：従来食物アレルギーには積極的に治癒に導く手法や薬剤がなく、自然耐性の獲得を待つしか無かった。しかし最近、世界的に経口免疫療法（以下 OIT）の研究が進み、一定の効果が報告されている。今回は、本来自然耐性が得られやすい学童期以下の児を対象に、対照群を設けて OIT の効果を検証することを目的とした。

方法：対象は経口負荷試験で、重篤でない症状で負荷試験陽性と判定された鶏卵、牛乳、小麦アレルギーの児とした。重篤症状誘発例と極少量で陽性症状誘発例を除外した。尚、年齢、他覚的検査所見やアナフィラキシー既往などは除外項目としなかった。対象は無作為に抗ヒスタミン薬内服群(AH(+))と、内服ない群(AH(-))に分け、OIT を実施しない対照群(Ctrl)を設けた。OIT は、摂取レベルを 10 段階に分割し、自宅で連日行い、連続 3 日間症状の誘発を認めないことを条件に徐々に増量していった。レベル 10 に到達した以降は目標量を連日摂取し、3 ヶ月間誘発症状を連続で認めなかった場合、14 日間の完全除去の上で耐性獲得確認の負荷試験を実施して評価した。

結果：OIT 群と Ctrl 群で患者背景に大きな有意差を認めなかった。また OIT 導入前の検査所見、事前の負荷試験の結果に群間での有意差は概ね認めなかった。OIT は各抗原ともに比較的順調に経過した。一部の症例で経過中に強い誘発症状を認めた。確認試験が陽性となる症例があり、小麦は OIT 群と Ctrl 群に有意差を認めてその有用性が示されたが、鶏卵と牛乳は耐性獲得に関しては 2 群間での有意差は認められなかった。

結論： OIT で減感作 (desensitization) は得られ易いが、耐性獲得 (tolerance) は必ずしも容易でなく、Ctrl 群と耐性化率で有意差が得られたのは小麦だけであった。また OIT 経過中に中には重篤なアナフィラキシー症状が惹起される場合があり、その実施は専門医の元で、十分な医療バックアップ体制を整えた上で慎重に実施されるべきと考える。

A. 研究目的

食物アレルギーは乳幼児期にその多くが発症し、必要最小限の除去食を行いながら、耐性の獲得を待つのが診療の基本である。耐性は主要原因食物である鶏卵、牛乳、小麦や大豆は 3 歳までに約 50%、6 歳までに 80-90%が自然に獲得すると考えられている。しかし主要原因食物以外の自然耐性化率は高くなく、また主要原因食物も裏を返せば、6 歳でも 10-20%は自然耐性を獲得でき無いということになる。

これまで医師は食物アレルギーの治癒（耐性の獲得）へ向けて積極的な手法や薬剤を持っておらず、ただただ自然経過に身を委ねさせるしかなかった。しかしここ数年間の間に、世界的に食物アレルギーにおける経口免疫療法（以下 OIT : Oral Immuno Therapy）の研究が進み、一定の効果が報告されるようになってきた。当院でも先駆けて学

童期以降の重症な主要抗原（鶏卵、牛乳、小麦）アレルギー児に対して入院 OIT（超急速法）を 3 年前から実施し始め、良好な成績をおさめてきている。

当院における OIT は学童期以下を対象としなかったのは、年少児は自然耐性の可能性があるからである。しかし、学童期以下の児でも OIT で、自然耐性よりも早期に耐性を誘導出来る可能性はこれまで検証されていない。そこで本研究は、年齢制限を設けずにアナフィラキシーリスクの高くない症例群に対し、外来診療において OIT を実施し、耐性を誘導できる可能性を検証する。これにより食物アレルギーの管理の改善に寄与することが出来る。

B. 研究方法

対象は当院で経口負荷試験を実施し、重篤でない中等症状以下の明らかな陽性症状を認めた鶏卵、牛乳、小麦アレルギーの児とした。重篤な症状とは、ショックはもちろんのこと、呼吸不全や強い呼吸器症状、また消化機能不全や強い消化器症状などもその範疇に含めた。更にごく少量（鶏卵 1/16 個以下、牛乳 3ml 以下、うどん 6g 以下）で何らかの陽性症状を認め負荷試験を陽性と判断したものを除外対象とした。尚、年齢や性別、血液や皮膚検査所見やアナフィラキシー症状の既往などは除外項目とはしなかった。

対象の保護者に対しては OIT の説明を書面で十分にいき、同意を得たうえで実施した。尚、当研究は本院倫理委員会の承認を得ている。

OIT 実施対象は無作為に経過中抗ヒスタミン薬を内服する群(AH(+))としない群(AH(-))に分けた。OIT 実施を希望しない患者群は対照群(Ctrl)として、負荷試験前の除去レベルで臨床経過を追った。尚、牛乳は Ctrl 群と年齢構成を均一化するために4歳以上のOIT患者を分析対象とした。

OITの手法は、鶏卵は加熱卵1個、牛乳は200ml、小麦はうどん100gを目標量とし、摂取レベルを10段階に分割した上で、事前の経口負荷試験の陽性閾値の25%レベルから摂取を開始した。摂取は開始時から自宅で連日行い、連続3日間症状の誘発を認めなかった場合にレベルを1つ上げ、レベル10を目指した。これを増量期とする。レベル10を7回連続で症状なく経過した場合、増量期を終了として維持期に入らせた。

維持期は目標量を連日摂取するものとした。維持期を中等症以上の症状を3ヶ月間連続で認めなかった場合、毎日の摂食を中止し、14日間の完全除去を再度行い、その上で耐性獲得確認の経口負荷試験(確認試験)を実施した。尚 Ctrl 群の経口負荷試験は前の負荷試験から6ヶ月後を目安に実施した。

C. 研究結果

1) 患者背景

OIT 群と Ctrl 群で患者背景（年齢、性別、発症病型、原因抗原に対するアナフィラキシー既往歴など）に大きな有意差を認めなかった。また OIT 導入前の検査所見（総 IgE 値、抗原特異的 IgE 値、SPT 膨疹径など）に群間で有意差はなく、ま

た事前の負荷試験の結果（陽性閾値、誘発症状、加療率など）にも群間での有意差は概ね認めなかった。

2) OIT 結果(表 1)

各抗原ともに比較的順調な OIT の経過であったが、軽症 (G1) を中心に、中等症 (G2) の誘発は一定の割合で認められた。また一部の症例で経過中に強い誘発症状 (G3) を認め、アドレナリンの投与が必要であった児も認められた。抗ヒスタミン薬の有無で OIT 経過の違いは認めなかった。

3) 確認試験の結果 (表 2)

減感作が得られても必ずしも耐性獲得を得られていなかった。小麦は OIT 群と Ctrl 群に有意差を認めてその有用性が示されたが、鶏卵と牛乳は耐性獲得に関しては2群間での有意差は認められなかった。

D. 考察, E. 結論

OIT を実施することによって各抗原とも概ね減感作 (desensitization) を得ることは可能であったが、確認試験の結果から、耐性獲得率 (tolerance) は必ずしも高くなく、Ctrl 群と耐性化率で有意差が得られたのは小麦だけであった。

また OIT 群は経過中に多くは軽症の症状が誘発されていた。更に中には重篤なアナフィラキシー症状が惹起される場合もあり、その実施は専門医の元で、十分な医療バックアップ体制を整えた上で慎重に実施されるべきであると考え。リスクと労力を伴う OIT に関して、今後プロトコルの改良や症例を積み重ねて行く中で、中等症以下の症例に対して OIT の有用性を明らかにしていく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 緒方美香, 宿谷明紀, 杉崎千鶴子, 池松かおり, 今井孝成, 田知本寛, 海老澤元宏: 乳児アトピー性皮膚炎における Bifurcated needle を用いた皮膚プリックテストの食物アレルギーの診断における有用性 (第 2 報) - 牛乳アレルギー-, アレルギー. 59(7);839-846. 2010

2. 学会発表

- 1) N. Yanagida, T. Utsunomiya, S. Sato, M. Iguchi, T. Komata, T. Imai, M. Tomikawa, M. Ebisawa : Treatment of Hen's Egg- and Cow's Milk-induced Anaphylaxis by Rash Oral Immunotherapy, 2010 AAAAI Annual Meeting. 2010.2.26-3.2. New Orleans, LA
- 2) Ebisawa M, Yanagida N, Sato S, Imai T : Rush oral immunotherapy for the treatment of hen's egg- and cow's milk-induced

anaphylaxis , 28th Symposium Collegium Internationale Allergologicm. 2010.4.29. Ischia, Italy

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

(表1) 抗原別群別経過中の症状誘発および加療率

抗原		鶏卵		牛乳		小麦		
抗ヒスタミン剤 有無		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
参加人数		20	8	18	10	15	10	
増量期	症状誘発率(%)	G1	22.0	19.6	17.6	8.3	8.4	7.3
		G2	2.9	0.5	2.0	1.2	0.3	1.2
		G3	0.0	0.0	0.8	0.3	0.2	0.0
	加療率(%)	5.5	1.0	17.2	7.1	2.0	3.2	
維持期	症状誘発率(%)	G1	5.9	4.0	2.3	0.5	1.1	0.7
		G2	0.4	0.4	0.7	0.0	0.0	0.0
		G3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	加療率(%)	0.7	0.7	2.1	0.0	0.0	0.2	

(表2) 抗原別確認試験の結果

抗原	鶏卵		牛乳		小麦	
群	OIT	Ctrl	OIT	Ctrl	OIT	Ctrl
確認試験数	16	8	9	9	10	8
陽性/陰性	4/12	3/5	4/5	1/8	2/8	8/4
耐性化率(%)	25	38	44	13	80	33
p	0.647		0.294		0.043	

食物アレルギーの耐性化と食事指導に関する研究
—食物負荷試験の結果に基づいた具体的な摂取指導方法の評価—

研究分担者 伊藤 浩明 あいち小児保健医療総合センター アレルギー科
 研究協力者 漢人 直之 あいち小児保健医療総合センター アレルギー科
 小林 貴江 あいち小児保健医療総合センター アレルギー科

研究要旨

「正しい診断に基づいた必要最小限の食物除去」を実施するためには、食物経口負荷試験の結果に基づいた食事指導が求められる。本研究では、負荷陰性者のみならず、陽性者に対しても安全性を確保した摂取を進めるための食事指導を確立することを目的とした。ゆで卵白、牛乳、小麦（うどん）経口負荷試験（微量、1、2、5、10、20g 漸増法）の結果に基づき、症状誘発閾値量と症状グレードによって摂取指示量を決定した。鶏卵は調理法を指示した卵料理、牛乳・小麦はタンパク量換算による乳・小麦製品の摂取を指導した。鶏卵、牛乳、小麦の合計 74 例に対して、1～2 か月後の外来受診までに 10 回以上の摂取を目標として摂取記録を評価した。ほとんどの患者は指導した摂取が実施でき、延べ 950 摂取の中で 51 件の軽微な誘発症状が報告されたが、抗ヒスタミン薬を内服したのは 3 件のみであった。現在、各食品 50 症例を目指して指導を続けており、指導後 6 か月時の摂取量増加までフォローアップする計画で進行中である。

A. 研究目的

食物アレルギーに対する食事指導の原則が「正しい診断に基づいた必要最小限の食物除去」であることは、本研究班のこれまでの成果として広く我が国の医療に定着してきた。そのために必要な食物経口負荷試験(OFC)もガイドラインが整備され、実施施設は着実に増加している。

しかし、OFCの結果に基づいて実施する食事指導、中でも負荷陽性者に対して一定の安全域を見込んだ摂取を進める指導について、エビデンスを持った方法が確立していない。一方で、緩徐な免疫療法としてアレルゲン食品を少量から摂取しはじめ、次第に漸増する方法が多くの医療機関で模索されている。

本研究では、OFCの結果に基づいて陰性者のみならず、陽性者に対しても定量的に摂取指導を行い、その指導方法の実行可能性と安全性について評価した。

B. 研究方法

当科における鶏卵（ゆで卵白）、牛乳、小麦（うどん）経口負荷試験の漸増パターン（1、2、5、10、20g）に基づき、負荷陰性であれば総負荷量の1/2量を、陽性者では症状グレード1、2、3に応じて、それぞれ総負荷量の1/4、1/8、1/16量からの摂取を指導した。摂取許容量の最小は2gとして、それ以下の場合は完全除去の継続を原則とした（図1）。

図1 負荷試験結果に基づく摂取指導プラン

誘発症状 総負荷量	負荷試験後の摂取量				
	陰性	グレード1	グレード2	グレード3	グレード4
38 g	20 g	10 g	5 g	2 g	
18 g	10 g	5 g	2 g		
8 g	5 g	2 g	完全除去の継続		
3 g	2 g				

実際の摂取方法として、鶏卵はゆで卵、炒り卵、薄焼き卵で十分加熱調理できる方法を具体的に指導した。牛乳はそのもの、小麦はうどんの重量を基本とし、ヨーグルトやパスタ・パンといった乳・小麦製品はタンパク含有量から摂取量を決定した。いずれも具体的な摂取量を示す資料を作成し、管理栄養士が直接指導にあたった。

摂取回数は週3回を目標として、指示量を摂取した回数や誘発症状の有無を食物日誌に記入して、1～2か月後の外来受診時に評価した。

対象食品は鶏卵・牛乳・小麦で、それぞれ摂取指導を行う症例50例を目標としているが、本報告書作成までに集計された症例数で中間報告を行う。

C. 研究結果

鶏卵は、負荷試験実施61例中23例が完全除去となり、残る負荷陽性13例、負荷陰性25例に摂取指導を行った。同様に牛乳は33負荷試験中15例が完全除去で、負荷陽性6例、陰性12例に指導を行った。小麦は28負荷試験中10例が完全除

去で、負荷陽性 14 例、陰性 4 例に指導を行った。

それぞれの食品について対象者と結果の概要を表 1～表 3 に示す。全体として負荷陰性者はその後の摂取指示量が 10～20g と多く、負荷陽性者に対する摂取指示量は 2～10g が多い。

表 1 鶏卵・負荷試験後の指導結果

負荷試験結果	陽性 n=13	陰性 n=25	合計 n=38
平均年齢	3.1 歳	3.4 歳	3.3 歳
男:女	11:2	10:15	21:17
総IgE (IU/ml)	547.4	317.1	400.3
卵白/OM IgE (UA/ml)	22.8 / 17.5	10.5 / 3.4	14.8 / 8.4
症状重症度	グレード 1: 5人 グレード 2: 8人		
指示量別 人数 (総人数)	1/2 個 0 1/4 個 0 1/8 個 5 1/20 個 8 (1)	8 12 5 (1) 0	8 12 10 (1) 8 (1)
指示量摂取回数	175 回 (11.2 回/月)	283 回 (9.3 回/月)	458 回 (9.9 回/月)
症状出現回数(率)	14 回 (8.0%)	16 回 (5.7%)	30 回 (6.5%)
治療・受診	なし	抗ヒ剤内服 2 回	抗ヒ剤内服 2 回

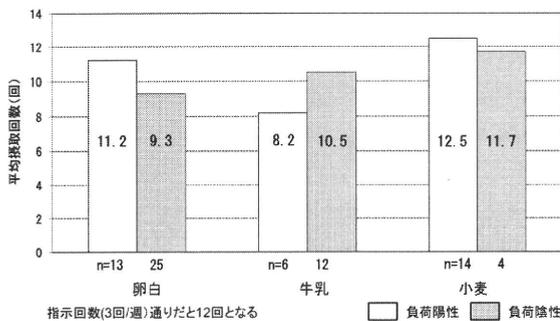
表 2 牛乳・負荷試験後の指導結果

負荷試験結果	陽性 n=6	陰性 n=12	合計 n=18
平均年齢	4.2 歳	4.6 歳	4.5 歳
男:女	4:2	8:4	12:6
総IgE (IU/ml)	524.2	1021.5	866.1
牛乳 IgE (UA/ml)	4.96	8.3	7.2
症状重症度	グレード 1: 4人 グレード 2: 1人 グレード 3: 1人		
指示量別 人数 (総人数)	30 ml 0 20 ml 0 10 ml 4 5 ml 0 2 ml 2	2 9 0 1 0	2 9 4 1 2
指示量摂取回数	73 回 (8.2 回/月)	141 回 (10.5 回/月)	214 回 (9.9 回/月)
症状出現回数(率)	5 回 (6.8%)	7 回 (5.0%)	12 回 (5.6%)
治療・受診	なし	抗ヒ剤内服 1 回	抗ヒ剤内服 1 回

表 3 小麦・負荷試験後の指導結果

負荷試験結果	陽性 n=14	陰性 n=4	合計 n=18
平均年齢	3.3 歳	1.5 歳	2.9 歳
男:女	11:3	4:0	15:3
総IgE (IU/ml)	775.0	354.5	1311.4
小麦 IgE (UA/ml)	27.7	34.4	29.1
症状重症度	グレード 1: 5人 グレード 2: 9人		
うどん摂取 指示量別 人数	20 g 0 10 g 3 5 g 5 2 g 6	3 1 0 1 0	3 4 5 6
指示量摂取回数	228 回 (12.5 回/月)	50 回 (11.7 回/月)	278 回 (12.3 回/月)
症状出現回数(率)	7 回 (3.0%)	2 回 (4.0%)	9 回 (3.2%)
治療・受診	なし	なし	なし

図 2 1人あたりの平均摂取回数 (回/月)

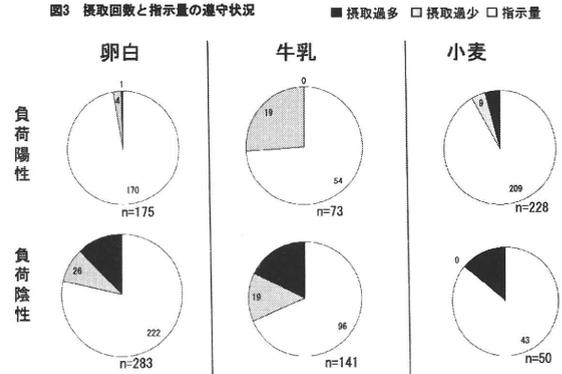


全食品を合計して、外来受診までに全 950 回の摂取が行われた。多くの患者が指示回数を守って

摂取できたが、牛乳では摂取回数が指示回数を下回る傾向があった (図 2)。

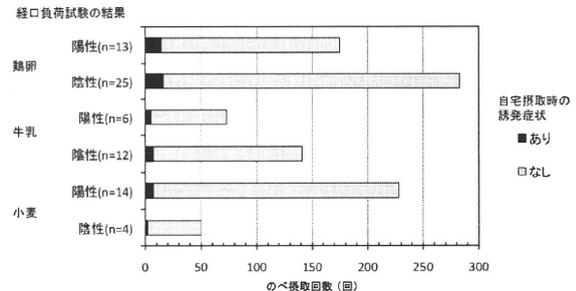
1 回摂取量も概ね遵守されたが、牛乳では特に負荷陽性者において指示量以下の摂取が多く認められた。一方負荷陰性者では、指示量を上回って摂取した記録も見られた (図 3)。

図 3 摂取回数と指示量の遵守状況



すべての摂取記録のうち、何らかの症状誘発が 51 回 (5.4%) 報告された。その頻度は食品間に差がなく、負荷陽性者・陰性者でも差を認めなかった。いずれの症状も軽微であり、そのために抗ヒスタミン薬を服用した記録が 3 件のみ、いずれも負荷陰性者であった。誘発症状のために病院に緊急受診した症例は見られなかった (図 4)。

図 4 総摂取回数に占める症状報告回数の割合



D. 考察

従来、加工食品に含まれる鶏卵や牛乳のアレルゲン量や加工による低アレルゲン化を推定して、可能な食品を摂取させる食事指導が検討されている。しかし、加工食品のアレルゲン含有量の情報が非常に不安定なこと、卵・牛乳・小麦の複数アレルゲンが含まれるために使用できない症例が多いこと、数種類の食品だけでは摂取を継続することが困難など、多くの問題があった。牛乳や小麦についても様々な加工食品を検討したが、指導に使用可能なものが見いだされなかった。

こうした検討を積み重ねて、本研究では卵、牛乳、小麦を純粋に含む食品を用いて摂取指導を行

うことにした。さらに、正確な調理や計量を行うために様々な資料を作成して、栄養士が直接指導に当たることとした。

その結果、指導を受けた患者の多くはそれに従った摂取を進めることができた。その結果報告された症状はいずれも軽微なものであり、一部には呼吸器症状が含まれるものの、抗ヒスタミン薬を内服したものは3件のみであった。しかもそれは負荷陰性者で、指示量を超えて摂取したことで誘発されたものも含まれていた。

従って今回の摂取指導は、負荷陽性者に対しても陰性者に解除を進めるのと同程度の安全性が確認された。一方で、負荷陰性者に対しても安易に解除を指示するのではなく、摂取方法を具体的に指導することの必要性も確認された。

今回指導した量を安全に摂取できた症例に対しては、摂取量を約20~50%ずつ増加させていく指導を継続しており、来年度に向けて約6か月後までの摂取量を評価する計画が進行している。これは、いわゆる緩徐な経口免疫療法と定義すべき指導方法ともいえる。

今回の検討では安全な摂取指導が困難と判断して完全除去を指示した症例に対しても、緩徐な経口免疫療法として摂取指導が可能か、一定期間の入院を伴う急速経口免疫療法の適応を考えていくべきか、今後の検討課題になると考えている。

E. 結論

経口負荷試験の結果に基づいて、負荷陽性者に対しても一定の安全域を見込んだ摂取指導は可能であり、その安全性も評価された。今後、当初計画した各食品50症例まで症例を増やして、最終報告を行う予定である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤浩明 食物アレルギー経口負荷試験ガイドライン2009解説 資料1~7. 日本小児アレルギー学会誌 24(3), 365-368, 2010.
- 2) Torii S, Torii A, Itoh K, Urisu A, Terada A, Fujisawa T, Yamada K, Suzuki H, Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, Sawada D, Nonaka A, Hatanaka M, Fujiwara S. Effects of Oral Administration of Lactobacillus

acidophilus L-92 on the Symptoms and Serum Markers of Atopic Dermatitis in Children. Int Arch Allergy Immunol. 154(3), 236-245, 2010.

- 3) 高岡有理、二村昌樹、坂本龍雄、伊藤浩明 遷延する牛乳アレルギーの予後に関連する因子の検討. アレルギー 59(11), 1562-1571, 2010.

2. 学会発表

- 1) 伊藤浩明. 年代別の食物アレルギーとアトピー性皮膚炎の考え方. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会ミニシンポジウム. 京都, 2010, 5月.
- 2) 伊藤浩明. 食物アレルギー. 第34回日本小児皮膚科学会シンポジウム. 松山, 2010, 7月.
- 3) 伊藤浩明、漢人直之、安井正宏、小林貴江、田中昭. 小麦アレルギーの耐性化予測因子としての ω -5 グリアジン IgE 抗体検査. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010, 11月.
- 4) 漢人直之、尾辻健太、武田将典、伊藤浩明. 当科における食物アレルギーに対する急速経口免疫療法の経験. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 2010, 11月.
- 5) 伊藤浩明. 食物アレルゲンの知識と食物アレルギーの診断. 第47回日本小児アレルギー学会. 横浜, 2010, 12月.
- 6) 小林貴江、漢人直之、安井正宏、伊藤浩明、梅村春江、小田奈穂、近藤亜子. 経口負荷試験後の食事指導と自宅での摂取状況について. 第59回東海小児アレルギー談話会, 名古屋, 2011, 2月.
- 7) 山本道子、小林貴江、安井正宏、漢人直之、伊藤浩明. 急速経口免疫療法中のアレルギー症状の評価について. 第251回日本小児科学会東海地方会, 名古屋, 2011, 2月.
- 8) K Ito. Soy & Milk allergen components - diagnostic tools to help identify patients at risk. Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2011. Venice, 2011, 2月.
- 9) 榎村春江、伊藤浩明. 食物経口負荷試験の結果に基づいた摂取指導方法の開発. 第11回食物アレルギー研究会, 東京, 2011, 2月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの感作発症予知と免疫療法の開発

—特に、経口免疫寛容誘導—

研究分担者 近藤 直実 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授
研究協力者 松井 永子 岐阜大学医学部附属病院小児科 臨床准教授
金子 英雄 岐阜大学大学院医学系研究科地域医療医学センター小児系分野 教授
大西 秀典 岐阜大学医学部附属病院小児科 臨床講師
加藤 善一郎 岐阜大学医学部附属病院小児科 准教授

研究要旨

食物アレルギーの感作発症予知と経口免疫寛容誘導の開発を進め、食物アレルギーの予防と治療を独創的に進める。昨年度に引き続き、食物アレルギーの感作発症と遺伝子多型などについての関連を追跡中である。平成 22 年度は、特に、免疫療法（経口免疫寛容誘導）のうち、牛乳アレルギーに対する経口免疫寛容誘導改変食品（抗原エピトープを修飾した新規食材）を作成して、これを用いて牛乳アレルギー患児に投与し、一部で良好な結果が見られ、一定の成績を得た。今後は、牛乳アレルギー患児の多くがカゼインに対しても反応していることから、 β ラクトグロブリンのみでなく、カゼインを用いた経口免疫寛容誘導改変食品（抗原エピトープを修飾した新規食材）を作成し、使用することも進める必要がある。

A. 研究目的

食物アレルギーの感作発症予知と経口免疫寛容誘導の開発を進め、食物アレルギーの予防と治療を独創的に進める。

B. 研究方法

(1) 食物アレルギーの感作発症予知

出生コホート研究で追跡して食物感作状況と食物アレルギー発症の有無について調査する。臍帯血、その後の採血を用いて特異的 IgE 抗体および各種の遺伝子を検索し、関連を調査する。

(2) 免疫療法（経口免疫寛容誘導）の開発

食物アレルギーに対する免疫療法を開発する。この方法は経口免疫寛容を誘導する免疫療法である。①原因食品（ミルクなど）少量投与法および②経口免疫寛容誘導改変食品（抗原エピトープを修飾した新規食材）を投与して、その前後の臨床データと経過を追跡する。

（倫理面への配慮）

本研究は倫理審査委員会において承認を得て、十分に個人情報保護などに配慮して行った。

C. 研究結果

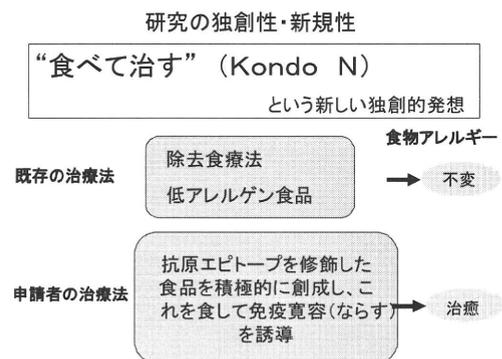
(1) 食物アレルギーの感作発症予知

昨年度に引き続き、食物アレルギーの感作発症

と遺伝子多型などについての関連を追跡中である。

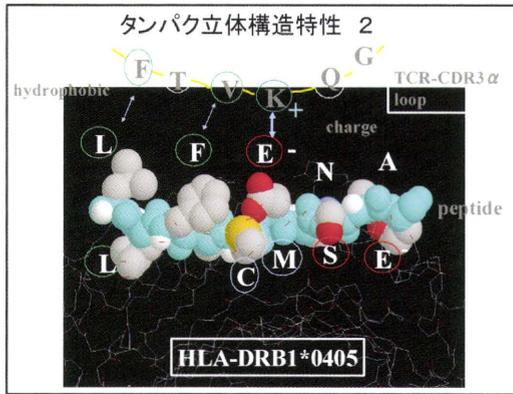
(2) 免疫療法（経口免疫寛容誘導）の開発

経口免疫寛容誘導の方法のうち平成 22 年度は、②経口免疫寛容誘導改変食品（抗原エピトープを修飾した新規食材）を投与して経過を追った（図 1）。



（図 1）

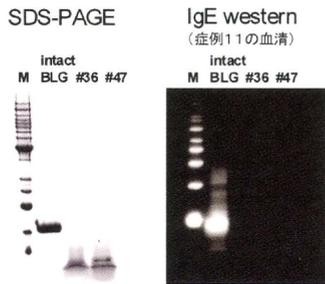
当該食品の作成については、1. 牛乳アレルギー患児の末梢リンパ球から β ラクトグロブリンに反応する T 細胞クローンを樹立し、 β ラクトグロブリンオーバーラップペプチド刺激に対する反応及びアラニンスキャンなどを行うことにより、 β ラクトグロブリンタンパクの T 細胞エピトープを決定した（図 2）。



(図 2)

2. この結果をもとにして、T細胞エピトープを温存し、B細胞 (IgE) エピトープを分解するように、βラクトグロブリンを酵素で処理して作成した。3. この食品のT細胞反応の温存と IgE 反応の消失または減弱 (図 3) を確認し、かつ安全性を確認した。(以上既報)

#47に対する患者血清IgEの反応



抗原改変BLGでは患者血清IgEの反応性が消失していた

(図3)

4. 本食品を、牛乳アレルギー患児に一定のプロトコル (図 4) に従って投与し、経過を追った。

BLG(#47)経口免疫寛容誘導プロトコル



- ・対象は牛乳に即時型のアレルギー反応の既往を有し、寛解していない症例とする。
- ・投与前に書面でのインフォームドコンセントを得る。
- ・BLG負荷試験を行なう。牛乳40ml相当のintact BLGパウダーを20mlの水に溶解し、15分おきに 1ml→2ml → 4ml → 8ml → (5ml) の順に増量し、total 40mlのintact BLG負荷を行なう。
 - (0) (15分) (30分) (45分) (60分) 最終投与後1時間観察。
- ・2回 (3回) の採血を行なう (矢印)。
- ・末梢血一般、血液像、IgE、RAST (牛乳、α-ラクトグロブリン、BLG、カゼイン、卵白)
- ・Th1/Th2、CD4/CD25の測定
- ・BLGを水20ml (外来では注射用蒸留水) で希釈したもの1mlの摂取 (牛乳0.25ml相当BLG) から開始する。
- ・毎日、規定量を午前中にのんでいただく。
- ・1週間毎に負荷する量を増量する。
- ・最終的に牛乳40mlに相当するBLG#47を摂取していただく。
- ・プロトコル終了後、再度intact BLG負荷試験を行う。
- ・BLGが摂取できた場合は牛乳の負荷試験を行う。

(図 4)

5. その結果、現在までに 17 名の患児に投与し (図 5)、3 例では βラクトグロブリンに対する反応もなく、かつ一定量の牛乳に対してもアレルギー反応を示さなくなった。2 例では症状出現のた

め、中止した。その他の症例は現在進行中である。

抗原改変BLG投与前の Intact BLG負荷試験の結果

症例	年齢	性別	#47投与前のBLG負荷試験(投与量・牛乳相当)
症例1	1	男	1ml 口唇周囲に皮疹
症例2	1	女	30ml 目の周りに皮疹
症例3	1	男	2ml 口唇周囲皮疹
症例4	1	男	2ml 口唇の腫脹
症例5	1	男	2ml 体幹に紅斑
症例6	2	男	2ml 口唇周囲皮疹
症例7	2	男	30ml 咳、嘔気
症例8	3	女	0.2ml 咳、皮疹
症例9	3	男	40ml 症状なし、母の希望により投与
症例10	3	男	0.2ml 口唇周囲皮疹
症例11	3	女	6ml 腸管の発赤、嘔吐
症例12	4	男	6ml 口唇周囲皮疹
症例13	5	男	2ml 咳、皮疹
症例14	6	男	2ml 口唇周囲の皮疹
症例15	6	男	30ml 口唇周囲皮疹
症例16	7	女	2ml 咳、咽頭腫脹感
症例17	7	男	6ml 咳、咽頭腫脹感

Intact BLG負荷試験での誘発症状は顔面の皮疹が多く、呼吸器症状、消化器症状の順であった。閾値は牛乳0.2ml相当から30mlまでに分布していた。

(図 5)

D. 考察

平成 22 年度は、特に、免疫療法 (経口免疫寛容誘導) のうち、牛乳アレルギーに対する経口免疫寛容誘導改変食品 (抗原エピトープを修飾した新規食材) を作成して、これを用いて牛乳アレルギー患児に投与し、一部で良好な結果が見られ、一定の成績を得た。今後は、牛乳アレルギー患児の多くがカゼインに対しても反応していることから、βラクトグロブリンのみでなく、カゼインを用いた経口免疫寛容誘導改変食品 (抗原エピトープを修飾した新規食材) を作成し、使用することも進める必要がある。

E. 結論

食物アレルギーの感作発症予知と経口免疫寛容誘導の開発について検討を進め、いずれも良好な成果が得られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo N, Matsui E, Nishimura A, Kaneko H: Pharmacogenetics of asthma in children. Allergy Asthma Immunol Res 2:14-19 (2010)
- 2) Matsui E, Shinoda S, Fukutomi O, Kaneko H, Fukao T, Kondo N: Relationship between the benefits of suplatast tosilate, a Th2 cytokine inhibitor, and gene polymorphisms in children with bronchial asthma.

Experimental and Therapeutic Medicine
1:977-982 (2010)

- 3) Kaneko H, Teramoto T, Kondo M, Morita H, Ohnishi H, Orii K, Matsui E, Kondo N: Efficacy of the Slow Dose-up Method for Specific Oral Tolerance Induction in Children With Cow's Milk Allergy: Comparison With Reported Protocols. J Invest Allerg Clin Immunol 20:538-539 (2010)
- 4) Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M:(1)H, (13)C, and (15)N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. Biomol NMR Assign 4:123-125 (2010)
- 5) 近藤直実:第6章 腸管粘膜免疫とアレルギーの制御. 上野川修一 監修. 免疫異能性食品の基礎と応用, シーエムシー出版 (2010)
- 6) 近藤直実, 金子英雄:母乳とアレルギー. 小児科 51, 923-928 (2010)
- 7) 近藤直実, 松井永子, 金子英雄, 加藤善一郎, 折戸万紀子: I. 遺伝子診断 (Genetic Diagnosis) B. 各論 疾患群の遺伝学的検査 (Genetic Testing) と遺伝子検査 (Gene-Based Testing) アレルギー疾患. 遺伝子診療学(第2版) - 遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望 -. 日本臨床 68, 388-396 (2010)

2. 学会発表

- 1) 近藤直実:講演:喘息・アレルギーのテーラード医療とその開発. 日本アレルギー学会春季臨床大会(第22回)(2010年5月9日, 京都)
- 2) 大西秀典, 加藤善一郎, 木村 豪, 久保田一生, 金子英雄, 近藤直実:一般演題:自然免疫異常症の構造生物学的解析. 中部日本小児科学会(第46回)(2010年8月22日, 金沢)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

低アレルゲン化食品を用いた免疫療法の開発
—オボムコイド減量加熱全卵による経口免疫療法—

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が、安全性や効果の永続性など解決すべき課題は多い。我々は、より安全な経口免疫療法を目指して、加熱し、かつオボムコイドを減量することにより低アレルゲン化した鶏卵を用いた免疫療法のプラセボコントロール試験を行った。

エントリーした鶏卵アレルギー患者の 77.5%が治療に用いる低アレルゲン化鶏卵を全量摂取でき、その後の免疫療法の全経過を通じて副反応を認めなかったことから、低アレルゲン化鶏卵の安全性が確認された。また、低アレルゲン化鶏卵の全量摂取が困難であった症例も、減量して開始し漸増しうる場合があった。3ヵ月治療した時点での負荷試験陰性化率は、全量摂取群で70%、減量群を含めた全体では55.3%であった。

併せて、各種免疫学的検討を行い、免疫療法の継続に伴い、①オボムコイド特異的 IgG4 の増加、②卵白刺激により誘導される患者末梢血単核球の IFN- γ 、IL-4 両者の産生の低下と、TGF- β 、IL-10 産生の増加、③好塩基球活性化試験での反応の低下の傾向をみとめた。

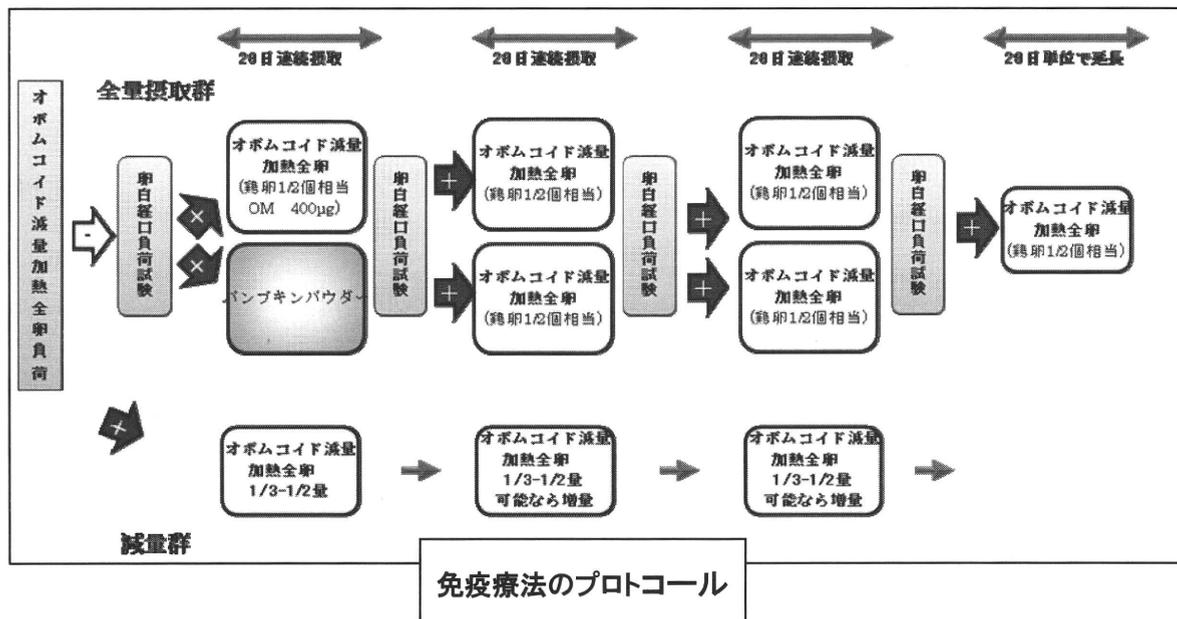
さらに症例を増やし、治療期間の延長も考慮して陰性化率の向上を目指すとともに、耐性化の永続性やその判定法などを含め、さらに検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

食物アレルギーの有効な根治療法は確立していないが、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、キューピー株式会社研究所との共同研究により低アレルゲン化されたオボムコイド減量加熱卵白を開発し、これを用いた1ヵ月間の経口免疫療法により、約50%の症例で卵白経口負荷試験の陰性化を認めた。さらなる改良が求められる

が、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、したがって理論な根拠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、併せて、治療前後で各種免疫学的パラメータを解析して、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。

- ①90°C15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ピー株式会社により、鶏卵を90°C60分加熱後、布袋に入れ、水で洗浄することによって作製され、提供された。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プキンパウダーを混ぜ込んだ白粥を、4週間を1クールとして連日摂取する(全量摂取群)。オボムコイド減量加熱全卵を、1個相当では陽性反応を示した18症例の中で、希望した9名はオボムコイド減量加熱全卵を1/8個相当あるいは1/4個相当から開始し、2週ごとに漸増し、1/2個相当に到達後、同量で免疫療法を行った。(漸増群)。

3) 経口負荷試験

オボムコイド減量加熱全卵の4週間連日摂取後に、90°C15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) 免疫学的パラメーターの検討

15分加熱全卵負荷試験施行前には毎回採血し、血漿中総IgE、卵白及びオボムコイド特異的IgG、IgG4、IgEの測定、卵白及びオボムコイドによる好塩基球活性化試験、卵白刺激末梢血単核球(PBMC)のサイトカイン産生を検討した。卵白存在下16時間培養したPBMCでは、QuantiGene Plex(Panomics)を用いたcytokine関連33遺伝子発現の同時定量を行った。卵白存在下7日間培養したPBMCでは、培養上清はProcarta Cytokine Assay kit(Panomics)を用いた36cytokineの同時定量を行い、かつ、CFSE dilution assayを用いて、細胞質内7サイトカインの検討を行った。

統計解析はSPSS(SPSS Inc.)を用い、Kruskal Wallisの検定で行った。

C. 研究結果

1) 負荷試験陰性化率

80名(男児43名、女児37名、年齢4-19歳、平均8.2歳)が研究に参加した。うち18名は免疫療法に用いるオボムコイド減量加熱全卵の負荷試験で陽性反応を示したため、除外したが、その中で希望した9名はオボムコイド減量加熱全卵による漸増法で免疫療法を行った(漸増群)。また、8名は15分加熱卵白負荷試験で陰性であったため、除外した。残る51名は封筒法により無作為に、25名は実薬群、26名は偽薬群に割り振り、28日間の連続摂取を行った。これまでのまとめでは、実薬群の累積陰性化率は、1ヵ月で9/45(20.0%)、2ヵ月で13/38(34.2%)、3ヵ月で23/27(85.2%)であり、偽薬群では1/25(4.0%)であった。3ヵ月治療した時点での負荷試験陰性化率は、全量摂取群で70%、漸増群を含めた全体では55.3%であった。耐性の得られなかった6例については、可能であれば28日単位で免疫療法を継続した。以下の各種免疫パラメーターの検討には一部延長後の結果が含まれる。

2) 特異的IgG, G4, A, E及び総IgE

免疫療法に伴う特異的IgG、G4、A、E及び総IgEの検討では、卵白およびオボムコイド特異的IgGとIgG4が、免疫療法前の継続により増加する傾向が認められ、特にオボムコイド特異的IgG4は、3ヵ月間の免疫療法により、有意に増加していた。

3) 卵白及びオボムコイドによる好塩基球活性化

治療後の鶏卵負荷試験陽性者と陰性者を比較すると、負荷試験陰性者ではCD203cの最大陽性%が有意に低下していた。同様に、負荷試験陰性者ではCD63のアレルゲン希釈域値が有意に低下していた。

4) 卵白刺激により誘導されるサイトカインの変化

卵白刺激により誘導されるサイトカインについて、培養16時間後のmRNA、培養7日後の培養上清中たんぱく量および卵白刺激により増殖したCD4陽性細胞中の細胞質内サイトカイン陽性細胞(%)の3つの指標を検討した。

INF- γ は、細胞質内サイトカイン陽性細胞(%)が、治療前に比べ治療1ヵ月後、2ヵ月後で低下する傾向を認めた。またIL-4も、mRNA発現が治療後3ヵ月で低下する傾向が認められた。

抑制性サイトカインでは、卵白特異的IL-10産生が、負荷試験陽性群で有意に増加し、また、TGF- β mRNAも治療後1ヵ月に比較して、治療後3ヵ月で増加する傾向が認められた。

D. 考察

我々はこれまでオボムコイド減量加熱卵白を含有するクッキーを用いて鶏卵アレルギーに対する免疫療法を行い、加熱卵の負荷試験陰性化率 51.6%の成績を得てきた。今回は、この免疫療法の有効性を向上させる目的で、残存するオボムコイドの含有量をやや増加させた加熱鶏卵を用いた新たな免疫療法を試みた。つまり、オボムコイド投与量を従来の2倍に増量するとともに、小麦と共存するとアレルギー性が弱まるとされるため、クッキーへの混入は避けることとした。

新たな免疫療法での実薬群の累積陰性化率は、1ヵ月で9/45 (20.0%)、2ヵ月で13/38 (34.2%)、3ヵ月で23/27 (85.2%)であり、偽薬群では1/25 (4.0%)であった。低アレルギー化したオボムコイド減量加熱全卵1個相当が摂取不能な重症者についても、減量して開始し漸増することを試み(漸増群)、3ヵ月治療した時点での負荷試験陰性化率は、全量摂取群で70%、漸増群を含めた全体では55.3%であった。重症者を負荷試験陰性に導くには、長期間の連続摂取が必要であったが、なお、抵抗性の症例も認められ、今後の検討課題である。

現在の治療法を改善するためには、臨床試験に基礎的な検討を加え、耐性化の機序を解明していくことが不可欠と考え、各種免疫学的パラメータを検討した。我々は従来の検討から、免疫療法により耐性化すると、卵白特異的IgEは変化が見られないが、治特異的IgG4が増加すること、サイトカインの検討からは、免疫療法の初期にはTh1へのシフトが起きるが、次第にTh1とTh2ともに抑制されることを示してきた。今回の検討でも、卵白及びオボムコイド特異的IgG4が増加する傾向が確認された。また、Th1とTh2の両者の抑制が見られ、抑制性サイトカインでは、IL-10、TGF- β が増加する傾向を認め、本治療法でのTh1とTh2の両者の抑制に、これら抑制性サイトカインが関与する可能性が示唆された。

今回新たに、卵白およびオボムコイドによる好塩基球活性化試験を検討し、免疫療法による好塩基球反応性の抑制作用が示唆されたが、顕著ではなく、好塩基球活性化試験により、負荷試験の陰性化を予測することは困難と考えられた。また、免疫療法により得られた負荷試験陰性化が、不断の摂取に依存しない真の耐性化か否かも問題となるが、簡便な予測法の確立を含め今後の課題である。

E. 結論

オボムコイド減量加熱全卵を用いた鶏卵アレルギーに対するアレルギー特異的免疫療法のプラセボ対照試験をおこない、安全かつ良好な結果を得た。併せて治療前後で各種免疫学的パラメータを解析し、興味深い結果を得たが、今後症例を増やしてさらに検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taguchi H, Watanabe S, Urisu A, et al. Differential Detection of Shrimp and Crab for Food Labeling Using Polymerase Chain Reaction. *J Agric Food Chem*. In press.
- 2) Sakai Y, Ishihata K, Urisu A, et al. Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem*. 2010; 58:8145-8151.
- 3) Nakamura R, Uchida Y, Urisu A, et al. Convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy*. 2010; 65: 1266-1273.
- 4) Sakai S, Adachi R, Urisu A. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay kit for the determination of soybean protein in processed foods: interlaboratory evaluation. *J AOAC Int*. 2010; 93:243-248.
- 5) Kondo N, Nishimuta T, Urisu A, et al. Japanese pediatric guidelines for the treatment management of bronchial asthma 2008. *Pediatr Int*. 2010; 52:319.
- 6) Benhamou AH, Caubet JC, Urisu A. et al. State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy*. 2010; 65: 283-289.
- 7) Tsuge I, Kondo Y, Nakajima Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Urisu A, Hyper IgM syndrome and complement Clq

deficiency in an individual with systemic lupus erythematosus-like disease, *Clinical and Experimental Rheumatology* 2010; 28: 558-560.

- 8) Torii S, Torii A, Itoh K, Urisu A, Terada A, Fujisawa T, Yamada K, Suzuki H, Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, Sawada D, Nonaka A, Hatanaka M, Fujiwara S, Effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the symptoms and serum markers of atopic dermatitis in children., *Int Arch Allergy Immunol* 2010;154: 236-245.

2. 学会発表

- 1) 柘植郁哉, 近藤康人, 宇理須厚雄等 : 低アレルギー化鶏卵を用いた経口免疫療法の検討 : 第22回日本アレルギー学会春季学術大会 2010年5月(京都)
- 2) 柘植郁哉, 近藤康人, 宇理須厚雄等 : シンポジウム 食物アレルギーをめぐる新たな進展 経口免疫療法の今後の方向性 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

加工食品中の原因抗原量と耐性化に関する研究

—寛解誘導を目指した食事指導に応用可能な食品の抗原性の評価と低減化に関する研究—

研究分担者 伊藤 節子 同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科

研究協力者 明石 真未 同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科

研究要旨

食物アレルギーの治療の目的は、正しい抗原診断に基づく食事療法により耐性を獲得して、症状を起こさずに「食べる」ことである。食品中の生体が反応しやすい抗原のコンポーネントを明らかにし、食品中の抗原性の評価および食品の低アレルゲン化のターゲットを絞り、適切な食事指導により寛解誘導を行うことは極めて重要である。卵については調理条件と副材料の選定により抗原コンポーネントレベルで調整可能となり、卵アレルギー児の寛解誘導に成果を上げている。

小麦の主要抗原コンポーネントとされているグリアジンの低アレルゲン化には加熱による効果が期待できないため、果実中のプロテアーゼによる分解を試み、抗原性の評価を行った。パイナップルとキウイフルーツ果汁のプロテアーゼは強力なグリアジン加水分解効果を示し、これらの果汁処理小麦を使用したマフィンやクッキー中のグリアジンは極めて低濃度になった。グリアジン以外の抗原性も検討した上で、寛解誘導を目指した食事指導に応用可能であると考えられた。

A. 研究目的

乳児期発症の食物アレルギーの原因抗原は食物アレルギーの関与するアトピー性皮膚炎においても即時型反応においても最も頻度の高いのは卵であり、牛乳、小麦がそれに続く。これらの食品中の生体が反応しやすい抗原コンポーネントを明らかにし、食品の抗原性の評価および食品の低アレルゲン化のターゲットを絞り、適切な食事指導により早期の寛解誘導を図ることは臨床で極めて重要である。実際に卵の抗原性は加熱調理により自由に設定することができるようになり、重症卵アレルギー児でも摂取可能な抗原コンポーネント量から開始することにより、早期の除去解除と寛解誘導に成果を上げている。

小麦の抗原コンポーネントとしてグリアジンが注目され、加工食品中のアレルギー物質の検知法においても小麦抗原の検出の指標となっている。グリアジンも加熱により抗原性は若干低下するが、重症小麦アレルギー児が摂取可能なレベルにまで抗原性を低下させることは困難である。そこで家庭で調理できる小麦の低アレルゲン化をめざして果物中のプロテアーゼによるグリアジンの低アレルゲン化を試みた。パイロットスタディにてグリアジン量を容器包装された加工食品中の特定原材料の表示義務濃度以下にまで低減させた食品でも軽度ではあるが時型反応が誘発されることが明らかとなった。

そこでグリアジン以外の抗原コンポーネント

の評価も含めて小麦の抗原性の再評価を行い、寛解誘導を目指した食事指導に用いることのできる小麦を主原料とした低アレルゲン化食品の開発を試みた。

B. 研究方法

小麦粉をパイナップル果汁またはキウイフルーツ果汁と反応させ、小麦タンパク質およびそのコンポーネントを SDS-PAGE および免疫染色により検出した。グリアジン量はモリナガ FASPEK 小麦測定キット(グリアジン)* (森永生科学研究所)により定量し、グリアジンを指標として低アレルゲン化のための至適条件を決定した。小麦粉加水分解産物および調理食品中のグリアジンの抗原性はウサギ抗グリアジン抗体 IgG 分画 (SIGMA) による免疫染色により検討した。さらに一部のサンプルについては小麦アレルギー患者血清中の特異的 IgE 抗体との反応性および HRT シオノギ* 変法による好塩基球ヒスタミン遊離試験により抗原性の評価を行った。

C. 研究結果

小麦粉を等重量のパイナップル果汁またはキウイフルーツ果汁と 39~40℃にて 2 時間反応させた後、モリナガ FASPEK 小麦測定キット(グリアジン)*にてグリアジン量を定量するといずれも測定感度以下になった。図 1 にパイナップル果汁と反応させた小麦の PBS 抽出液の CBB 染色と抗グ

リアジン抗体を用いた免疫染色の結果を示すが、小麦タンパク質の低分子化とグリアジンの抗原性の低減化が確認できた。

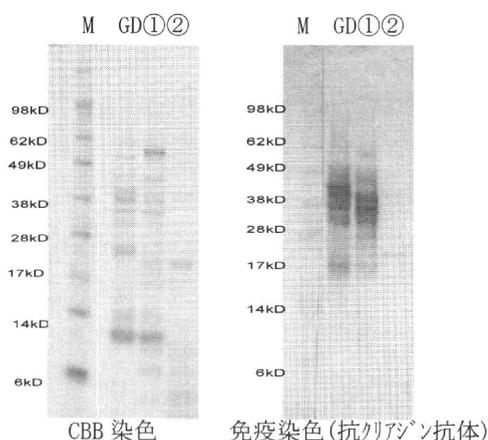


図1 パイナップル果汁による小麦の加水分解
M:マーカー GD:グリアジン、①小麦+水②小麦+パイナップル果汁

ここにはデータは示さないがキウイフルーツ果汁によっても同様の結果が得られた。

次にそれぞれの果汁と反応させて作製した小麦バター生地を用いてマフィン(160℃、25分間)とクッキー(170℃、20分間)を作製した。コントロールまたは果汁処理のマフィンとクッキー1g中のグリアジン量を表1、2に示す。

表1 パイナップルマフィン中のグリアジン量

	パイナップル果汁処理	コントロール
生地	<0.31 μg/g	294mg/g
マフィン	1.03 μg/g	237mg/g

表2 キウイフルーツクッキー中のグリアジン量

	キウイフルーツ果汁処理	コントロール
生地	<0.31 μg/g	60mg/g
クッキー	2.1 μg/g	150mg/g

パイナップル果汁またはキウイフルーツ果汁と反応させた小麦バターを主原料としたマフィンあるいはクッキーの生地中のグリアジン量は測定感度以下であり、焼成後のマフィン、クッキー中のグリアジン量も10 μg/g未満であった。これは容器包装された加工食品中のグリアジン量の表示義務濃度以下の濃度である。

コントロールおよびパイナップル果汁処理小麦バターを用いて焼成時間を変えて作製したマフィン抽出液のCBB染色と抗グリアジン抗体を用いた免疫染色の結果を図2に示す。CBB染色

ではパイナップル果汁によりマフィン生地中小麦タンパク質のみならずFASPEK抽出液中BSAも18時間の抽出操作中に加水分解されていた。抗グリアジン抗体を用いた免疫染色ではマフィンの生地、焼成後ともにグリアジンがほとんど検出されなくなったことが確認できた。ここにはデータは示さないが、キウイフルーツ果汁処理小麦を用いたクッキーでも同様の結果が得られた。

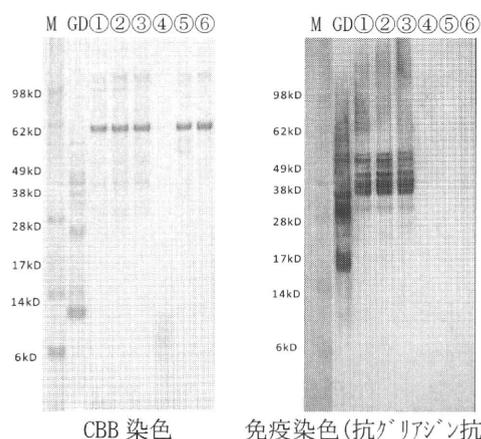


図2 パイナップル果汁処理小麦マフィンのCBBおよび免疫染色
M:分子量マーカー、GD:グリアジン、①～③コントロールマフィン(①生地②焼成時間25分③焼成時間60分)、④～⑥パイナップル果汁処理マフィン(①生地②焼成時間25分③焼成時間60分)

これらの果汁処理小麦から得られた加水分解物の小麦アレルギー患者における抗原性をみるためにImmunoCAPクラス6の小麦特異的IgE抗体を有する患者3名からインフォームドコンセントを得て検査時に残った血清を-30℃にて凍結保存しておいたものを用い、二次抗体として抗ヒトIgE抗体を用いて免疫染色を行うと、3例ともコントロールの小麦抽出液では、グリアジンの39kDaを中心に種々のタンパク質と反応した。

パイナップル果汁による処理を行った小麦抽出液は抗グリアジン抗体とは反応しなかった(図1)が、小麦アレルギー患者血清を用いると3例とも9kDa付近に濃く染色されるバンドが認められ、2例では12kDa付近にもバンドが認められた。さらに、パイナップル果汁と小麦を反応させた上清を用いてヒスタミン遊離試験を行うと、タンパク質濃度として0.5~5ng/mlをピークとしてヒスタミン遊離がおこり症例によっては小麦抗原そのものよりも高いヒスタミン遊離率が認められ、強い抗原性を有することが明らかとなった。

一方、キウイフルーツ果汁処理小麦抽出液は

39kDa付近で血清中IgE抗体と極わずかに反応したが、低分子領域における反応はみられなかった。キウイフルーツ果汁処理小麦抽出液の末梢血好塩基球からのヒスタミン遊離効果についてはこれから検討予定である。

D. 考察

パイナップル中のプロテアーゼはグリアジンの低アレルゲン化には有用であるが、ヒスタミン遊離を惹起する性質が残っており、グリアジン以外の別の抗原コンポーネントについての検討が必要であると考えられた。

一方、キウイフルーツ中のプロテアーゼはパイナップル中のプロテアーゼよりも小麦中のグリアジンを強力に加水分解する力をもち、小麦の低アレルゲン化食品が作製可能である可能性が示唆された。今後、グリアジン以外の抗原コンポーネントについての検討と小麦アレルギー患者の寛解誘導のための治療への応用について検討が必要であると考えられる。

E. 結論

小麦に関しても卵と同様に抗原コンポーネント別に抗原性と生体との反応性を検討し、それを調理食品として応用することにより寛解誘導に有用な食事指導を行うことが可能である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤節子. 食物アレルギーの発症機構. 上野川修一監修. 免疫機能食品の基礎と応用. 東京:シーエムシー出版 2010:51-59
- 2) 伊藤節子. 食物アレルギー対応食の基礎と応用. 中村丁次編. 食物アレルギーA to Z. 東京:第一出版 2010:249-253
- 3) 伊藤節子. 専門医のためのアレルギー学講座:患者の視点で考えるアレルギー診療:食物アレルギー. アレルギー2010;59:497-506
- 4) 伊藤節子. 食物アレルギーの自然史. アレルギー・免疫. 2010;17:1004-12
- 5) 伊藤節子. 食物アレルギー最新情報:栄養指導と代替食. 小児科診療 2010;73:1217-23
- 6) 伊藤節子. 食物アレルギーと治療. 小児科

2011;52:175-82

- 7) 伊藤節子. 「食べる」側から見た食品の抗原性の評価と調理による低アレルゲン化:抗原コンポーネントレベルにおける検討と臨床応用. 日小ア誌 2011;25(1) in press

2. 学会発表

- 1) 伊藤節子. 食品の抗原性の評価に基づく卵アレルギー児に対する負荷食品の選定と食事指導への応用. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会(京都)2010年5月8日
- 2) Ito S. A list of egg exchange based on the quantitative evaluation of egg antigen in cooked and processed food for the clinical use in the management of egg allergy. 30th Congress of EAACI (London) 2010年6月7日
- 3) 伊藤節子. シンポジウム「アレルゲンとしての食品」:「食べる」側からみた食品の抗原性の評価と調理による低アレルゲン化. 第47回日本小児アレルギー学会(横浜)2010年12月4日
- 4) 伊藤節子. 京都市内保育園の給食における食品除去の実態調査:16年前の調査結果との比較検討. 第47回日本小児アレルギー学会(横浜)2010年12月4日
- 5) 伊藤節子. テーラーメイドダイエットを目指した診断と治療. 第19回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会(京都)2011年2月12日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

遺伝子多型を用いた食物アレルギー関連遺伝子の同定 —食物アレルギーの遺伝素因に関する症例対照相関解析—

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 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

研究要旨

本研究は遺伝子多型解析により食物アレルギー関連遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通してより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。近年、ゲノムワイド関連解析により食物アレルギーを呈する好酸球性食道炎の関連遺伝子として TSLP が報告された。我々は TSLP の遺伝子多型と食物アレルギーとの関連を検討した結果、rs2416258 と食物誘発アナフィラキシーとの間に関連 ($P=0.0012$) を認めた。我々は食物アレルギーのゲノムワイド関連解析も行った。1 次解析の結果、食物アレルギーとの関連が $P \text{ value} < 10^{-4}$ を示した 63 個の SNP について、2 次解析を行なっている。

A. 研究目的

近年、食物アレルギーは増加しており、特にアナフィラキシーは生命に関わる症状を呈する事もあることから、科学的病態解明による予防法や治療法の開発が待たれる疾患である。遺伝子多型の情報基盤の整備や高速大量タイピング法の確立など最近のゲノム解析技術の進歩は目覚ましく、ゲノムワイド関連解析 (GWAS; Genome-wide association study) により様々な疾患において遺伝要因の解明が急速に進んでいる。本研究は遺伝子多型を用いた関連解析により、食物アレルギーの病態に関連する遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

食物負荷試験により診断された食物アレルギー患者 339 名 (うちアナフィラキシー発症 98 名)、アレルギー症状未経験の健常対照児 241 例を用い、ゲノムワイド関連解析を実施した。遺伝子型タイピングは、Illumina HumanHap550K (=約 55 万 SNPs を解析) を用いた。集団の構造化についての検討 (PCA 解析) を行い、outlier を除去し、GWAS を行なった。

2010 年食物アレルギー関連疾患である好酸球性食道炎について GWAS が行なわれ、TSLP 遺伝子に存在する rs3806932 が発症と発症との有意な関連が報告された (Nat Genet. 2010;42:289-91)。TSLP について、周辺の新規 SNP の探索し、食物アレルギーとの関連を検討した。これらの遺伝子型のタイピングには TaqMan 法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研

究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

C. 研究結果

GWAS が終了し、食物アレルギー (minimum $P=1.8 \times 10^{-6}$ 、63 SNPs < 0.0001) 食物誘発アナフィラキシー (minimum $P=3.3 \times 10^{-6}$ 、40 SNPs < 0.0001)、アトピー性皮膚炎合併食物アレルギー (minimum $P=9.9 \times 10^{-7}$ 、55 SNPs < 0.0001) における 1 次解析結果が得られた。本年度は 2 次解析用の食物アレルギー症例、130 サンプルを収集し、現在 2 次解析を行なっている。

TSLP 遺伝子多型については、白人の好酸球性食道炎の GWAS で報告された SNP とは連鎖不平衡が弱い ($r^2=0.32$) の SNP、rs2416258 と食物誘発アナフィラキシーとの間に関連 ($P=0.0012$) を認めた。

D. 考察

1 次解析の結果を独立に収集した複数の集団で検証する必要がある。GWAS において食物アナフィラキシーと $P < 0.0001$ の関連を認めた 40SNPs についてアスピリン喘息との関連を検証したが、関連は認められなかった。また、現在アトピー性皮膚炎合併食物アレルギーの GWAS で $P < 0.0001$ の関連を認めた 55SNPs についてアトピー性皮膚炎のサンプルで関連の検証を行っており、これまで CCR6 に存在する多型で関連が検証された。現在、第 3 集団での関連の検討や周辺の SNP での詳細な検討を行なっている。

E. 結論

GWAS を用いて食物アレルギーの関連解析を行った。1次解析は終了し、現在、2次解析が進行中である。今後は他の人種（米国との共同研究を予定）においても関連の検証を進めていく。

食物誘発アナフィラキシーと TSLP 遺伝子多型 (rs2416258) との間に関連を認めた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichia R, Tsunoda T, Osawa Y, Kojima A, Okamoto M, Suzuki D, Kubo S, Imoto Y, Nakamura Y, Tamari M, Fujieda S. Prevalence of Allergic Rhinitis and Sensitization to Common Aeroallergens in a Japanese Population *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;151(3):255-261
- 2) Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Oct 124(4):779-85.
- 3) Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Dec 1;180(11):1048-55.
- 4) Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, Harada M, Maeda Y, Hattori T, Takahashi A, Nishimura M. A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. *J Hum Genet.* 2010 Mar;55(3):167-74.
- 5) Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2):498-500.
- 6) Undarmaa S, Mashimo Y, Hattori S, Shimojo N, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Kohno Y, Okamoto Y, Hirota T, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Replication of genetic association studies in asthma and related phenotypes. *J Hum Genet.* 2010 Jun;55(6):342-9.
- 7) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 in press.
- 8) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美 遺伝子多型とアレルギー疾患 アレルギーの臨床 30:164-167, 2010
- 9) 玉利真由美、広田朝光 基礎医学とのダイアログ、SNP 解析を用いた稀少疾患の解明 THE LUNG perspectives 18:164-168, 2010
- 10) 玉利真由美、広田朝光 Topic/Science、慢性好酸球性肺炎の病態研究の現況 ヒューマンサイエンス誌 31:18-21, 2010
- 11) 玉利真由美、広田朝光 呼吸器疾患感受性-遺伝的背景- 気管支喘息、日本胸部臨床 69:687-694, 2010
- 12) 広田朝光、富田かおり、玉利真由美 特集:アレルギー疾患に対するオーダーメイド医療、I. アレルギー疾患の遺伝子と遺伝学、アレルギー・免疫 17:1652-1660, 2010
- 13) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 III. 診断の進歩、ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患、Annual Review 呼吸器 2011 140-146
- 14) 広田朝光、富田かおり、玉利真由美 特集:小児アレルギー疾患の治療・管理の新しい展開、I. 基礎研究の進歩 2. アレルギー疾患と遺伝子多型、小児科臨床 第 63:2409-2415, 2010

2. 学会発表

- 1) 玉利真由美、広田朝光:特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 愛媛県 ENT 臨床セミナー 2010年1月松山全日空ホテル
- 2) 玉利真由美、広田朝光:特別講演 遺伝子解析を用いた気管支喘息および COPD の病態の解明 第 42 回北陸呼吸器シンポジウム (FITs) 2010年2月 金沢都ホテル

- 3) 玉利真由美、広田朝光：ランチョンセミナー I アレルギー疾患と遺伝子 遺伝子多型と機能解析 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2010 年 2 月 福井 AOSSA
- 4) 玉利真由美、広田朝光：アレルギー疾患の病態解析 遺伝子解析を中心に 第 1 回 新都市心呼吸器セミナー 2010 年 4 月 新宿ハイアットリージェンシー
- 5) 玉利真由美、広田朝光：アレルギー疾患の環境と遺伝のトピックス 第 62 回 関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 2010 年 4 月 大阪薬業年金会館
- 6) 玉利真由美、広田朝光：シンポジウム「アレルギー疾患のオーダーメイド治療」研究者からの発信 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010 年 5 月 国立京都国際会館
- 7) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり：ランチョンセミナー 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 第 20 回 日本耳科学会総会 学術講演会 2010 年 10 月 松山 ひめぎんホール
- 8) 竹内和秀、真下陽一、服部聡、下條直樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、佐藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星岡明、山出晶子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一：小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型 日本人類遺伝学会第 55 回大会 2010 年 10 月 大宮ソニックシティ
- 9) 広田朝光、玉利真由美、佐伯秀久、常深祐一郎、中村祐輔、鎌谷直之：CCL22 遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連解析 日本人類遺伝学会第 55 回大会 2010 年 10 月 大宮ソニックシティ
- 10) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり：シンポジウム 11 食物アレルギーをめぐる新たな進展「食物アレルギーの遺伝子多型解析」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京国際フォーラム
- 11) 竹内和秀、真下陽一、服部聡、下條直樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、佐藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星岡明、山出晶子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一：MW3-5 「小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京国際フォーラム
- 12) 広田朝光、佐伯秀久、玉利真由美：MW6-3 「CCL22 遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連解析」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京国際フォーラム
- 13) 中村豊、長島広相、佐藤温子、佐々木信人、似内郊雄、中館俊英、小林仁、宮本孝行、菅野祐幸、澤井高志、出原賢治、玉利真由美、広田朝光、井上洋西、山内広平：一般演題 「気管支喘息患者の IL-13 遺伝子多型と気道リモデリング関連分子」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京国際フォーラム
- 14) 坂下雅文、広田朝光、富田かおり、扇和弘、伊藤有未、岡本昌之、大澤陽子、山田武千代、玉利真由美、藤枝重治：一般演題 「小児気管支喘息関連領域 17q21 の SNPs とアレルギー性鼻炎との関連解析」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京国際フォーラム
- 15) 増子裕典、金子美子、飯島弘晃、内藤隆志、坂本透、広田朝光、玉利真由美、檜澤伸之：一般演題 「健康成人の呼吸機能における TSLP 遺伝子多型の検討」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京国際フォーラム
- 16) 飯島弘晃、増子裕典、金子美子、坂本透、内藤隆志、広田朝光、玉利真由美、檜澤伸之：一般演題 「血清総 IgE 値、吸入抗原特異的 IgE 抗体 (MAST) を用いた感作パターンの解析」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京国際フォーラム
- 17) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり：シンポジウム 3 皮膚アレルギー学の未来 アレルギー疾患の遺伝子多型解析の現況 第 40 回日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会総会・学術大会 2010 年 12 月 広島国際会議場 2010/12/11

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

新生児ミルクアレルギーの前方視的検討
—新生児ミルクアレルギーの診断・治療に関する全国調査—

研究分担者 板橋 家頭夫 昭和大学小児科主任教授

研究協力者

宮沢 篤生 昭和大学小児科助教

大塚 宜一 順天堂大学医学部小児科先任准教授

今井 孝成 国立病院機構相模原病院小児科

山本 善規 BML(株)学術営業課課長

木村 光明 静岡県立こども病院 感染免疫アレルギー科科長

野間 芳弘 BML(株)細胞検査課課長

橋口 明彦 BML(株)細胞検査課主任

研究要旨

全国のNICU施設を対象に「新生児ミルクアレルギー疑診時の診療の手引き」ならびに前年度研究で作成した抗原負荷試験プロトコールにもとづく新生児ミルクアレルギーの前方視的疫学的調査を実施した。

調査票の回収された新生児ミルクアレルギー疑い49例の患者背景、発症日齢、臨床症状、各検査所見、抗原負荷試験の結果について検討した。早産、低出生体重児での発症例も多く、発症の中央値は日齢7であり、全例で何らかの消化器症状を認めた。中等症以上の症例では体重増加不良、活気・哺乳不良などの全身症状や敗血症様の症状を伴う頻度も高かった。アレルギー検査では、全例で臨床検査会社によるリンパ球刺激試験(antigen specific lymphocyte stimulation test; ALST)が実施され、陽性率は67.3%であった。牛乳抗原特異的IgE、便粘液中好酸球の陽性率は従前の報告より低く、それぞれ6.7%、27.5%であった。

抗原負荷試験は23例に対して実施され、11例で陽性症状が認められた。陽性症状はいずれも軽症の消化器症状が中心であり、治療乳を再開することで速やかに消失した。抗原負荷試験の結果をもとに各検査の検査効率を算出すると、ALSTの感度は72.7%、特異度は41.7%、牛乳抗原特異的IgEの感度は0%、特異度は91.7%、便粘液中好酸球の感度は11.1%、特異度は63.6%であった。

抗原負荷試験による診断確定は新生児・乳児期の適切な栄養管理をすすめる上でも重要であり、今後さらなる有用性・安全性の検討が必要である。

A. 研究目的

平成18～20年度厚生労働科学研究今井班の分担研究として、我々は新生児診療施設を対象とした本邦で初の新生児ミルクアレルギーに関する後方視的な全国調査を実施した。最終年度にはその結果をもとに「ハイリスク新生児入院施設における新生児ミルクアレルギー疑診時の診療の手引き」(以下診療の手引き)を作成、配布した。しかし、同調査の結果では抗原負荷試験に基づく診断症例は1/4程度に過ぎず、この結果は必ずしも本疾患の病態を正確に反映したものではない可能性がある。

新生児医療の現場において抗原負荷試験の実施が敬遠されている背景として、重篤な症状が誘発されるリスクが過剰に懸念されていること、新生児に対して適応可能な負荷試験プロトコール、ならびに負荷試験の実施基準が定められていないことが考えられる。そこで前年度研究で我々は新生児に安全に実施しうる抗原負荷試験のプロ

トコールと適応基準を考案した。本年度は「診療の手引き」ならびに標準化された抗原負荷試験による正確な診断に基づいた症例の前方視的な疫学的調査を行い、本疾患のより正確な病態を明らかにするとともに、診断・治療方法の標準化に寄与したいと考えている。

B. 研究方法

日本周産期新生児医学会の専門医研修施設(基幹施設124、指定施設154)ならびに関東圏内のNICUを有する総合・地域周産期母子医療センターを対象に研究協力施設を募集した。対象患者は、研究協力で同意の得られた施設に平成22年4月以降に入院した新生児で、生後1か月以内(在胎37週未満の早産児では修正1か月以内)に消化器症状をはじめとするミルクアレルギーを疑う症状があり、スクリーニング検査として牛乳特異的IgE値、食物抗原特異的リンパ球刺激試験(antigen specific lymphocyte stimulation