

遺伝子多型を用いた食物アレルギー関連遺伝子の同定

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 呼吸器疾患研究チーム 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 呼吸器疾患研究チーム 研究員

研究要旨

本研究は症例対照関連解析により食物アレルギーに関連する遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通し新たな予防法、治療法の確立を目標とする。近年、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、様々なアレルギー疾患において遺伝要因の解明が進んでいる。近年の大規模な GWAS で関連の認められた SNPs について食物アレルギー発症との関連を検討した。その結果、食物アレルギーと SMAD3 (rs744910) ($P=0.0092$; OR 1.20), RORA (rs11071559) ($P=0.015$; OR 1.23), TSLP (rs1837253) ($P=0.022$; OR 1.18) との間に弱い関連を認めた。また、IL-13 のアミノ酸置換を伴う SNP (Arg110Gln, rs1295686) と食物アレルギーとの間に非常に強い関連を認めた ($P=4.9 \times 10^{-6}$, OR 1.39)。この関連のリスクアレルの方向性は一致していた。今後これらの結果を独立に収集した別の集団で検証していく。

A. 研究目的

近年のゲノム解析技術の進歩は目覚ましく、信頼性の高いゲノムワイド関連解析 (GWAS; Genome-wide association study) によりアレルギー疾患においても遺伝要因の解明が急速に進んでいる。アレルギーマーチとは遺伝要因としてアレルギーになりやすい素因をもつヒトが、年齢を経るごとにアレルギー性疾患が食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、気管支喘息と次々に発症してくる様を表した言葉である。食物アレルギーはアレルギーマーチの最初に認められ、その多くはアトピー性皮膚炎を合併し、やがて気管支喘息が生じる。本研究ではそれらに共通する遺伝要因の探索を目的とし、最近報告された気管支喘息の大規模 GWAS の関連領域の計 21 個の SNPs と食物アレルギーとの関連について検証を行なった。

B. 研究方法

今回対象とした SNPs は日本人成人気管支喘息で関連の認められた 5 つの SNPs (Hirota et al, Nat Genet 43:893, 2011), ヨーロッパにおける気管支喘息大規模メタ解析にて同定された 10 個の SNPs (Moffatt et al, NEJM 363:1211, 2010), 北米を中心としたコンソーシアムによる GWAS で関連が認められた 4 つの SNPs (Torgerson et al, Nat Genet 43:887, 2011), そしてオーストラリア人の集団を用いた GWAS で同定された 2 つの SNPs (Ferreira et al, Lancet 378:1006, 2011) の計 21 SNPs である。食物負荷試験により診断された食物アレルギー患者 532 名、コントロール群 (気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーと

診断されることがない成人症例) 1941 例を用い、症例対照関連解析を実施した。遺伝子型タイピングは、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

食物アレルギーと SMAD3 (rs744910) ($P=0.0092$; OR 1.20), RORA (rs11071559) ($P=0.015$; OR 1.23), TSLP (rs1837253) ($P=0.022$; OR 1.18) との間に弱い関連を認めた。また、IL-13 のアミノ酸置換を伴う SNP (Arg110Gln, rs1295686) と食物アレルギーとの間に非常に強い関連を認めた ($P=4.9 \times 10^{-6}$, OR 1.39)。この関連のリスクアレルの方向性は一致していた。

D. 考察

気管支喘息と食物アレルギーに共通の遺伝要因の存在が示唆された。特に IL-13 rs1295686 多型において強い関連が認められた。この rs1295686 (Arg110Gln) はこれまでカナダ人の集団において、アトピー性皮膚炎との関連も報告されている (Genes Immun. 4:385, 2003)。この多型は気管支喘息、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎のいずれにも関与することから、アレルギーマーチの現象を説明する 1 つの遺伝要因と考えられた。TSLP は近年、好酸球性食道炎の関連遺伝子としても報告されており (Rothenberg et al,

Nat Genet 42:289, 2010)、興味深い。アトピー性皮膚炎の大規模な GWAS やアレルギー性鼻炎の GWAS も報告されてきており、今後これらで同定された疾患関連領域についても検討していく予定である。

E. 結論

気管支喘息の大規模メタ解析で関連が報告された IL-13 の遺伝子多型 (rs2416258) と食物アレルギーとの間に非常に強い関連 ($P=4.9 \times 10^{-6}$) を認めた。今後もアトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、食物アレルギーに共通する遺伝的要因の探索を進めて行く。アレルギーマーチのメカニズムを遺伝的要因の上から明らかにし、症状の軽症化や予防へとつなげていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 42) 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*. 2011;44:787-93.
- 43) Tamari M, Tomita K, Hirota T. Genome-Wide Association Studies of Asthma. *Allergol Int*. 2011; 60(3):247-52.
- 44) Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. Lower FEV(1) in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV(1), total IgE levels, and TSLP genotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2011;6:181-9.
- 45) Okada Y, Hirota T, Kamatani Y, Takahashi A, Ohmiya H, Kumasaka N, Higasa K, Yamaguchi-Kabata Y, Hosono N, Nalls MA, Chen MH, van Rooij FJ, Smith AV, Tanaka T, Couper DJ, Zakai NA, Ferrucci L, Longo DL, Hernandez DG, Wittteman JCM, Harris TB, O'Donnell CJ, Santhi K, Ganesh SK, Koichi Matsuda K, Tsunoda T, Tanaka T, Kubo M,

Nakamura Y, Tamari M, Yamamoto K, Kamatani N. Identification of nine novel loci associated with white blood cell subtypes in a Japanese population. *PLoS Genet* 2011;7(6):e1002067.

- 46) Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A, Litonjua AA, Himes BE, Lange C, Lazarus R, Sylvia J, Klanderma B, Duan QL, Qiu W, Hirota T, Martinez FD, Mauger D, Sorkness C, Szefler S, Lazarus SC, Lemanske RF, Peters SP, Lima JJ, Nakamura Y, Tamari M, Weiss ST. Genome-wide association of GLCCI1 with asthma steroid treatment response. *N Engl J Med* 2011;365:1173-1183
- 47) Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai TK, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Soo-Jong Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Iwai N, Tomoike H, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet* 2011 Jul;7(7):e1002170.
- 48) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Doi S, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Miyagawa T, Adachi M, Tanaka H, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Taniguchi M, Lima JJ, C. G. Irvin, S. P. Peters, B. E. Himes, Litonjua AA, Tantisira KG, Weiss ST, Kamatani N, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nature Genetics* 2011;43(9):893-6.
- 49) Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. An interaction between Nrf2 polymorphisms and smoking status affects annual decline in FEV1: a longitudinal retrospective cohort study. *BMC Med Genet*. 2011;12(1):97.
- 50) Kinose D, Ogawa E, Hirota T, Ito I, Kudo M, Haruna A, Marumo S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Sakai H, Date H, Tamari M, Mishima M. NOD2 Gene Polymorphism was associated with prevalence and severity in Japanese COPD patients. *Respirology* 2012;17:164-71.
- 51) Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe

- K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Ezaki H, Takeuchi S, Furue M, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M. Variants of C-C motif Chemokine 22 (CCL22) are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. *PLoS One* 2011;6:e26987.
- 52) Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, His E, Hank Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M. ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One* 2012;7:e29387.
- 53) 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
- 54) 広田朝光、富田かおり、玉利真由美 特集：呼吸器疾患とエイジング、綜説 薬剤の効果と遺伝要因 呼吸と循環 59:597-604, 2011
- 55) 広田朝光、富田かおり、玉利真由美 特集 II：食物アレルギー研究の新たな展開、食物アレルギーの遺伝子多型 *臨床免疫・アレルギー科* 55:629-635, 2011
- 56) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集：インフラマソーム、インフラマソームの NLRP3 遺伝子多型とアレルギー疾患 *生体の科学* 62:233-236, 2011
- 57) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集：遺伝子解析からアレルギー疾患の治療戦略を考える、アレルギー疾患と大規模遺伝子解析 *小児科* 52:817-822, 2011
- 58) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 総説：他領域からのトピックス、アレルギー疾患の発症や重症化への遺伝子多型の関与 *日本耳鼻咽喉科学会会報* 114:477-484, 2011
- 59) 玉利真由美 特集：アトピー性疾患のゲノム研究 アップデート、序：アレルギー疾患の病態解明・遺伝要因からのアプローチの現況 *アレルギー・免疫* 18:1283-1285, 2011
- 60) 広田朝光、富田かおり、田中翔太、玉利真由美 特集：アトピー性疾患のゲノム研究 アップデート、VII：食物アレルギーのゲノム解明の現況 *アレルギー・免疫* 18:1330-1336, 2011
- 61) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集：気管支喘息包囲網ー喘息死ゼロへ向けた最後の10年へ、トピックス：自然免疫と気管支喘息 *内科* 108:485-488, 2011
2. 学会発表
- 42) アレルギー週間講演会 2011年2月 青山こどもの城 アレルギー最新研究情報 玉利真由美、広田朝光、富田かおり
- 43) 第16回免疫アレルギーアカデミー 2011年2月 愛知医科大学 アレルギー疾患、好酸球関連疾患の遺伝子解析研究の現況 玉利真由美、広田朝光、富田かおり
- 44) 第9回大阪 Zensoku 懇話会 2011年3月 リーガロイヤルホテル大阪 気管支喘息重症化のメカニズム 最新の知見から 玉利真由美、広田朝光、富田かおり
- 45) 第42回御堂筋アズマネットワーク勉強会 2011年3月 大日本住友製薬株式会社本社 気管支喘息の遺伝要因の研究最前線 玉利真由美、広田朝光、富田かおり
- 46) 第一回みんなで楽しく学ぼう！アレルギーっ子ライフ！ 2011年4月 大阪府立呼吸器アレルギー医療センター 玉利真由美、広田朝光、富田かおり
- 47) 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011年5月 千葉幕張メッセ テーマ館フリータイムプログラム 鼻アレルギーの新たな知見 アレルギー疾患と遺伝子 玉利真由美、広田朝光、富田かおり
- 48) 第2回次世代医療システム産業化フォーラム2011 2011年7月 シティプラザ大阪 アレルギー疾患関連遺伝子研究の現況 玉利真由美、広田朝光、富田かおり、田中翔太
- 49) 第31回六甲カンファレンス 2011年7月 ウェスティン都ホテル 喘息の修飾因子をめぐって 体質（遺伝）基礎 玉利真由美、広田朝光
- 50) Open Speech in University 2011年9月 Kaohsiung Medical University, Taiwan Effects of genetic polymorphisms in allergic diseases Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota.
- 51) 第29回呼吸器免疫シンポジウム 2011年10月 Top of the square アレルギー疾患関連遺伝子解析 玉利真由美、広田朝光
- 52) India-Japan Symposium on Global Challenges in Health and Environment 2011年10月 Indian Embassy Auditorium Genetic analysis of bronchial asthma Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota
- 53) 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール 教育講演9 アレルギー疾患関連遺伝子・ゲノムワイド関連解析を中心に 玉利真由美、広田朝光
- 54) 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月 グランドプリンスホテル新高

- 輪国際館パミール 健常者における1秒量の経年変化と Nrf2 遺伝子多型の検討 増子裕典、金子美子、飯島弘晃、内藤隆志、坂本透、野口恵美子、広田朝光、玉利真由美
- 55) 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011 年 11 月 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール 一般演題 アレルギー性鼻炎患者における ORMDL3(ORM1-like 3)の関連解析 富田かおり、坂下雅文、広田朝光、藤枝重治、玉利真由美
- 56) 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011 年 11 月 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール 一般演題 血清 IgE および吸入抗原特異的 IgE を用いた感作パターン解析—茨城県と北海道の比較— 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、今野哲、西村正治、檜澤伸之
- 57) 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011 年 11 月 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール 一般演題 ゲノムワイド関連解析による成人気管支喘息発症に関連する3つの新規ゲノム領域の同定 広田朝光、富田かおり、田中翔太、玉利真由美
- 58) 第 48 回日本小児アレルギー学会第 16 回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会合同学術大会 2011 年 10 月 福岡国際会議場)シンポジウム 3-1 アレルギー関連遺伝子と感染 玉利真由美、広田朝光
- 59) 第 48 回日本小児アレルギー学会第 16 回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会合同学術大会 2011 年 10 月 福岡国際会議場 ミニシンポジウム M2-1 日本人における喘息とマトリックスメタロプロテアーゼ 12 遺伝子多型との関連 山出史也、真下陽一、下条直樹、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、土居悟、岡本美孝、河野陽一、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一
- 60) 第 1 回重症喘息研究フォーラム SARF 2011 年 12 月 経団連会館 重症喘息のメカニズム TSLP を中心に 玉利真由美 広田朝光 富田かおり 田中翔太

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2011-151111(平成 23 年 7 月 7 日出願)

一塩基多型に基づく免疫疾患の検査方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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
	今井 孝成	国立病院機構相模原病院小児科 医長
	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
	大塚 宜一	順天堂大学医学部小児科 先任准教授
	山本 善規	BML(株)学術営業課 課長
	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」と標準化され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前年に引き続き実施した。

分析可能な新生児ミルクアレルギー疑い 97 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 6 であり、全例で何らかの消化器症状を認め、大部分は軽症例であった。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 κ カゼインが 45%、ラクトフェリンが 47%、2 抗原のいずれかが陽性であったものが 64%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 11%、33%であった。

抗原負荷試験は 52 例に対して実施され、23 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 ALST の検査効率を算出した結果、 κ カゼインの感度は 43%、特異度は 62%、ラクトフェリンの感度は 61%、特異度は 76%、2 抗原いずれか陽性の感度は 45%、特異度は 55%であった。ALST をはじめとするアレルギー検査は本疾患の補助診断として有用である可能性があるが、各検査の特徴と限界を十分に認識する必要がある。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、今後更なる検証が必要である。

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、我々は本邦で初となる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、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診断の Gold Standard である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。

本研究班では平成 22 年 4 月より「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前方視的な疫学的調査を行っており、平成 23 年度研究では昨年度に引き続き症例集積と調査結果の解析を行うことで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、研究協力を得られた施設に平成 22 年 4 月から平成 23 年 9 月の間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）に消化器症状などミルクアレルギーを疑う症状があった児のうち、加水分解乳などの治療乳が導入され、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 test; ALST)、便粘液中好酸球のうち少なくとも 1 項目以上が行われた児とした。ALST は κ カゼイン、ラクトフェリン、ヒト α ラクトアルブミンの 3 抗原について実施することとし、各施設からの検体回収、検査実施、結果報告は臨床検査会社 BML に委託し、検査手技を統一した。

臨床症状から重症度を評価し、軽症例と重症化リスク（極低出生体重児、チアノーゼ型心疾患、消化管の外科治療後、染色体異常などの重篤な基礎疾患）のない中等症例で表 1 の適応基準を満たす症例は抗原負荷試験による診断確定を原則的必須事項とした。

表 1 抗原負荷試験の適応基準

① 重症度が Grade 1、もしくは Grade II であっても重症化のリスク因子(出生体重 1500g 未満、チアノーゼ型心疾患、消化管手術後、染色体異常などの重篤な基礎疾患)がない。
② 治療乳により便性が正常化している。
③ 肝機能異常や敗血症様の白血球高値、CRP 上昇を伴う場合にはこれらの検査値が正常化している。
④ 治療乳で経腸栄養が確立し、少なくとも 1 週間以上良好な体重増加が得られている。
⑤ 牛乳特異的 IgE 抗体が 3.50 UA/ml 未満で即時型反応のエピソードがない。
⑥ 他の基礎疾患がない、もしくは病状が安定している。
⑦ 保護者のインフォームドコンセントが得られている。

負荷試験の実施スケジュールを表 2 に示す。主治医が必要と判断した場合には負荷量を更にゆっくと増量しても良いこととした。なお、特に下痢症状を主体とする児に対しては、乳糖不耐症を鑑別するため、負荷試験開始時には乳糖除去乳の使用を推奨した。

児が退院もしくは負荷試験が終了した時点で個別調査票を回収し、児の背景や発症時の状況、検査結果、負荷試験の有無と結果などを検討した。なお、本調査は昭和大学医学部医の倫理委員会、各調査医療施設での倫理委員会の承認を得てい

るとともに、症例登録ならびに負荷試験の実施にあたっては保護者からのインフォームドコンセントが得られている。

表 2 抗原負荷試験の実施スケジュール

負荷試験日数	試験前	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	……
授乳時間(例)	1時				全量	全量	全量
	4時				全量	全量	全量
	7時				全量	全量	全量
	10時	2ml/kg (1/10)	10ml/kg (1/2)	全量	全量	全量	全量
	13時	5ml/kg (1/4)	全量	全量	全量	全量	全量
	16時			全量	全量	全量	全量
	19時			全量	全量	全量	全量
	22時			全量	全量	全量	全量
負荷に用いる 調乳		乳糖除去乳			普通ミルク		
症状の評価	●	●	●	●	●	●	●

C. 研究結果

C-1 登録症例の背景

協力の得られた 126 施設から平成 24 年 9 月までに 114 例の登録があり、内 97 例(85%)の調査票を回収した。出生時在胎週数の中央値は 37.6 週(24.0-41.5)で、在胎 37 週未満の早産児が 49% を占めた。出生体重の中央値は 2770g(548-3710)であり、1000g 未満の児が 6 例、1000g~1500g 未満の児が 14 例で、低出生体重児(2500g 未満)の占める割合は 44%(43/97)であった。男女比は 54:43(1.3)で、若干男児に多い傾向がみられた。

消化器疾患の合併が 5 例(6%)で認められ、内 3 例(腸回転異常症、先天性十二指腸狭窄、原因不明の消化管穿孔)に対してはミルクアレルギーを発症する以前に消化管の開腹手術が実施されていた。

C-2 発症時の状況

発症日齢の中央値は日齢 6(0-46)で、日齢 3 までに 37 例(38%)、日齢 6 までに 50 例(52%)が発症していた。

発症時の栄養方法は人工乳単独が 56 例(58%)で最も多く、母乳と人工乳の混合栄養が 18 例(19%)、母乳での発症も 13 例(13%)認められた。極低出生体重児では母乳への強化パウダー添加後に発症したものが 8 例(8%)認められ、極低出生体重児 20 例中の 40%を占めた。

C-3 臨床症状(図 1)

重症度は grade1(軽症)47 例、grade2(中等症)41 例、grade3(重症)9 例であった。全例で

消化器症状を認め、特に血便と嘔吐の頻度が高かった。消化管穿孔が3例で認められたが、ミルクアレルギーとの因果関係は不明であった。

消化器症状以外では体重増加不良や活気不良、哺乳不良などの全身症状や無呼吸発作の頻度が高かった。感染症を思わせる発熱、CRP 上昇や肝機能異常を伴う例も認められた。明らかなショック症状の児はいなかったが、代謝性アシドーシスが5例で認められた。

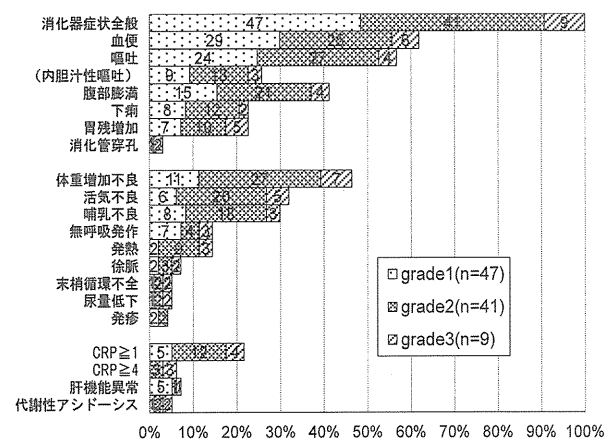


図1 症状・検査異常の出現頻度

C-4 アレルギー関連検査と抗原負荷試験

ALST は全症例に対して実施され陽性率はκカゼイン (cut off 値: S. I. 1.58) が45% (44/97)、ラクトフェリン (cut off 値: S. I. 2.62) が47% (46/97)、両者のいずれかが陽性であったものが64% (62/97)であった。牛乳抗原特異的 IgE 値、便粘液中好酸球の実施率は94%、80%であり、陽性率はそれぞれ11% (11/91)、33% (26/78)であった。

診断を目的とした抗原負荷試験が実施されたのは52例 (54%) で、負荷試験実施日齢の中央値は26 (3-122)、負荷試験実施までの日数の中央値は16日 (1-122)であった。23例 (44%) で陽性症状が認められたが、症状はいずれも軽症の消化器症状であり、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算出した各アレルギー関連検査の感度、特異度を表3に示す。

D. 考察

本研究は新生児ミルクアレルギーを対象に、抗原負荷試験をベースとした初めての前方視的疫学的調査である。ただし本調査の対象は症状などからミルクアレルギーが疑われた児であり、症例

表3 アレルギー関連検査の検査効率

	OFC実施	内OFC陽性 (感度)	内OFC陰性 (偽陽性)	p値	特異度
ALST κ-カゼイン (S.I. ≥ 1.58)	40% (21/52)	43% (10/23)	38% (11/29)	.779	62% (18/29)
ALST ラクトフェリン (S.I. ≥ 2.62)	40% (21/52)	61% (14/23)	24% (7/29)	.011	76% (22/29)
ALST κ-カゼイン and/or ラクトフェリン	58% (30/52)	74% (17/23)	45% (13/29)	.049	55% (16/29)
牛乳抗原特異的IgE (≥ 0.35UA/ml)	4% (2/48)	0% (0/20)	7% (2/28)	.504	93% (26/28)
便粘液中好酸球	42% (19/45)	38% (8/21)	46% (11/24)	.764	54% (13/24)
末梢血好酸球数 (≥ 700/μl)	25% (13/52)	17% (4/23)	31% (9/29)	.341	69% (20/29)
末梢血好酸球数 (≥ 2000/μl)	6% (3/52)	4% (1/23)	7% (2/29)	1.000	93% (27/29)

※OFC: oral food challenge (食物経口負荷試験)
ALST: allergen specific lymphocyte stimulation test (抗原特異的リンパ球刺激試験)

の背景や臨床症状などのデータは負荷試験が実施されていない症例も含めた集計であること、また抗原負荷試験が実施されていない重症例は各検査の感度・特異度に反映されていないことに留意する必要がある。

患者背景は従前の報告と同様の傾向で、男児に多く、早産・低出生体重児の発症が少なかった。また発症日齢は約半数が早期新生児期に発症し、その症状は100%消化器症状を伴っていた。重症度 grade2 (中等症) 以上では消化器症状以外の症状が稀ではなく、非特異的な全身症状や感染症を疑わせる発熱、CRP 値の上昇を認める頻度も高かった。

ALST は近年本疾患をはじめとする細胞性免疫依存性食物アレルギーの補助診断として注目されているが、一部の専門施設でのみ実施可能な検査であり、検査へのアクセスが課題となっていた。本研究では将来的な一般受託を見据え、臨床検査会社 BML に検査の実施を一括委託した。今回の調査では全例に対して ALST を実施したが、偽陽性が4割程度認められていることから、スクリーニング検査としての有用性には限界があることを認識する必要がある。

牛乳抗原特異的 IgE と便粘液中好酸球の陽性率は過去の後方視的調査と比べ陽性率が低かった。これは BML 社での ALST 検査には本研究への登録を必須条件としているため、抗原特異的 IgE が陰性であった症例では ALST を実施するために本研究に登録されやすくなり、抗原特異的 IgE 陽性例は ALST が実施されずに登録から漏れている可能性がある。また従来、抗原特異的 IgE が陰性であった時点でミルクアレルギーが否定されていた児が「診療の手引き」や ALST 検査の普及によって、ミルクアレルギー疑い例としてより多く認識されるようになった結果を反映しているのかもしれない。なお BML 社による ALST 検査は

平成 23 年 2 月より一般受託が開始されている。

抗原負荷試験は約半数の症例に対して実施されていたが、本来負荷試験が実施されるべき軽症例であっても負荷試験が実施されていない症例も多かった。背景として、実際の診療にあたる新生児科医にとって児の状態を悪化させるリスクの高い抗原負荷試験に対する抵抗が根強いこと、NICU への入院期間が長期化する可能性があること、保護者からの同意が得にくいことなどが考えられる。しかしながら、抗原負荷試験で陽性症状が認められたものは約半数であり、負荷試験陰性例では早期に不必要な治療乳を中止することが出来た。また陽性症状は軽症の消化器症状が中心であり、少なくとも軽症例に対する本調査の負荷試験プロトコールは新生児に対しても安全に実施することが可能であった。現在流通しているアレルギー治療用ミルクは必ずしも栄養学的に十分とは言えないことから、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。

E. 結論

今回の調査で新生児ミルクアレルギーの詳細な病態、臨床像が明らかとなった。ALST を含め、既存のアレルギー検査は食物アレルギーの補助診断に過ぎず、経口食物負荷試験が唯一の確定診断の Gold Standard である。本邦では重篤な誘発症状への懸念から新生児期、乳児期早期の負荷試験は敬遠される傾向にある。しかし、新生児期のミルクアレルギーではアナフィラキシーのリスクは低いと考えられ、軽症の血便や嘔吐などの消化器症状で発症した症例に対する負荷試験は十分に実施可能と考えられる。負荷試験陰性例は、治療乳を中止することが出来、栄養学的なメリットはもちろん、保護者の心理的また経済的負担を軽減できる。各症例の重症度や基礎疾患などのリスクを加味したうえで負荷試験の実施を考慮すべきと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

62) 宮沢篤生, 今井孝成, 板橋家頭夫: 新生児

のアレルギー. 周産期医学 41-5: 655-660, 2011

2. 学会発表

- 61) 宮沢篤生, 今井孝成, 板橋家頭夫, 木村光明, 大塚宜一: 抗原負荷試験に基づく新生児ミルクアレルギー (新生児消化器症状) 全国調査. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜. 2011. 5
- 62) 宮沢篤生, 板橋家頭夫, 今井孝成: 新生児ミルクアレルギー (消化管アレルギー) の診断と治療. 第 11 回新生児栄養フォーラム集中講義. 大阪. 2011. 6
- 63) 宮沢篤生, 板橋家頭夫, 今井孝成, 木村光明, 大塚宜一: 抗原負荷試験が実施された新生児ミルクアレルギー疑い 20 例の検討 - 新生児ミルクアレルギー全国調査より -. 第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会. 札幌. 2011. 7
- 64) T Miyazawa, T Imai, K Itabashi, M Kimura, Y Ohtsuka: Gastrointestinal Allergy in NICU Infants. APAPARI 2011 & 48th JSPACI. Fukuoka, Japan. 2011. 10

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 食品添加物部 部長
研究協力者 佐伯 宏樹 北海道大学 大学院水産科学研究院 教授
森山 達哉 近畿大学農学部 応用生命化学科 准教授

研究要旨

発症抑制 D011.10 マウスの CD4⁺T 細胞と Balb/c マウス由来骨髄樹状を卵白アルブミン(OVA)存在下で共培養を行った。培養上清中のサイトカイン量(TGF- β など)を測定した。OVA 刺激をした脾臓細胞から産生される TGF- β 産生量は、OVA 投与群に比べて β -カロテン摂取+OVA 投与群で高くなった。 β -カロテン強化摂取によって、全身免疫系における制御性 T 細胞が分化・誘導される可能性が示唆された。

魚卵解析 リポビテリン(Lv)は、重鎖と軽鎖からなるリポタンパク質で、魚卵の卵黄に最も多く含まれる。いくらアレルギー患者血中には、 β' -コンポーネント(β' -c)と同様、Lv に対する特異 IgE が含まれている。本研究では、Lv が β' -c と抗原交差性を持たない独立したアレルゲンであること、および β' -c と比較して消化耐性が低いことを明らかにした。また、cDNA クローニングによって、201 アミノ酸残基からなる Lv 軽鎖の一次構造を決定した。さらに、合成ペプチドを用いた検討により、少なくとも二種類の IgE エピトープの存在を明らかとした。

果実解析 化粧品用モモ葉エキス中の 10-15kDa 画分に、モモアレルギー患者血清 IgE が結合することが判明し、その原因抗原としてはプロフィリンや Lipid Transfer Protein(LTP)等の汎アレルゲンではないことが示唆された。このモモ葉エキスへの IgE 結合は一部、モモ果肉にて阻害されたことから、これらの間に交差反応性が成立している可能性を示唆した。他にも、初回摂取時に発症したローヤルゼリー(RJ)アレルギー患者の報告があり、実際に RJ 中の主要抗原に反応することが示された。RJ に関しても、化粧品やサプリメント、飲料や加工食品などに含まれていることから、本人が知らない間に経皮または経口感作されている可能性がある。このように、新しい感作・発症機構が疑われる多様な食物アレルギーが増加しつつあることが示唆された。

A. 研究目的

発症抑制 本研究では卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR Tg マウスである D011.10 マウスを用いて、 β -カロテン摂取による食物アレルギー発症抑制の影響について検討した。

魚卵解析 リポビテリン(Lv)は重鎖と軽鎖からなるリポタンパク質であり、 β' -コンポーネント(β' -c)と並ぶいくらのアレルゲンである。しかし、一次構造や IgE エピトープが明らかとなっていない β' -c と異なり、Lv 構造の詳細は不明である。また、イムノブロットングによると、いくらアレルギー患者の IgE は Lv 重鎖よりも Lv 軽鎖に反応する傾向がある。そこで本研究では、Lv 軽鎖の一次構造を解析し IgE エピトープを探索した。

果実解析 主に成人における果実・種類などの植物性食物アレルギーの抗原の特性解析を目的として、モモやモモエキスなどの対象サンプルからタンパク質を抽出し、患者血清や作製抗体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や変動解析の検討などを行った。特に近年、化粧品などに含まれる食品成分の経皮感作から発症する食物アレルギーが知られるようになり、その可能性のあるモモやローヤルゼリー(RJ)などについて検討した。

B. 研究方法

発症抑制 β -カロテン強化食を 1 週間自由摂取させた後、OVA を生理食塩水に調製し、7 週齢の D011.10 マウスに経口投与(OVA1 mg/匹)した。 β -カロテン強化食は標準粉末飼料に混合(20 mg/kg)した。OVA 投与後 1、3 時間後に解剖を行い、脾臓細胞を採取した。D011.10 マウスの脾臓から CD4⁺T 細胞を単離し、Balb/c マウスの骨髄由来樹状細胞と OVA(0、1 mg/ml)存在下で共培養を行った。培養上清中のサイトカイン(TGF- β 、IL-2 など)を測定した。

魚卵解析 ニジマス Vg を基に設計したプライマを用い、生鮮シロザケの肝臓から得た cDNA ライ

ブラリより Lv 軽鎖部分の PCR を行い、一次構造を決定した。次に、得られた Lv 軽鎖の全アミノ酸配列をもとに合成ペプチドを作製し、イクラアレルギー患者血清を用いて、IgE エピトープを探索した。

果実解析 モモ、化粧品用モモ葉エキス、RJ 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やウサギ等で作製した特異抗体を用いて、イムノブロットング法や ELISA 法によって原因抗原の探索や検出、IgE 結合性解析などを行った。特にモモ葉エキスに関しては濃縮後ゲルろ過 HPLC にて分画し、各フラクションの反応性を調べた。モモ葉エキス中に汎アレルギーが存在するかどうか調べるために、プロフィリンや Lipid Transfer Protein (LTP) の抗体を用いたイムノブロットにて検証した。モモ葉エキスへの血清 IgE の結合がモモ果肉によって阻害されるかどうか阻害 ELISA にて検証し、これらの間での交差反応性を検証した。モモ葉エキスへの血清 IgE の結合がモモ果肉によって阻害されるかどうか阻害 ELISA にて検証し、これらの間での交差反応性を検証した。臨床データに関しては診断・治療の一環として行われた特異的 IgE-RAST 試験、プリックテスト等の結果を参考にした。

C. 研究結果

発症抑制 共培養 24 時間後の培地において、OVA 刺激 (OVA1 mg/ml) によって産生される TGF- β 量と OVA 刺激 (OVA0 mg/ml) によって産生される TGF- β 量を比較すると、 β -カロテン摂取+OVA 投与群は OVA 投与群よりも OVA 刺激 (OVA1 mg/ml) によって産生される TGF- β 量が高かった。OVA 刺激 (OVA1 mg/ml) をした共培養 24 時間後の培地において、 β -カロテン摂取+OVA 投与群は OVA 投与群と比べて Th1 サイトカインの IL-2 産生量は高かった。OVA 刺激 (OVA1 mg/ml) をした脾臓細胞の培養 72 時間の培地において、 β -カロテン摂取+OVA 投与群は OVA 投与群と比べて Th2 サイトカインの IL-4 産生量は低かった。

魚卵解析 (1) cDNA クローニングにより、Lv 軽鎖をコードする 2 種類の塩基配列 (各 603 塩基) を得た。両演繹アミノ酸配列 (201 残基) 間の差異は、4 残基のみであった。これら塩基配列は DDBJ に登録した (AB698505 および AB698506) (2) 合成ペプチドを用いたスクリーニングにより、IgE 反応性を有する 2 種類のペプチド「PYYLADLVPM」お

よび「SMTDLSPFDD」を見出した。

果実解析 化粧品用のモモ葉エキスに対して患者血清 IgE の結合性の有無を ELISA にて検討した。その結果、複数のモモアナフィラキシーの患者血清がモモ葉エキスに対して健常人の場合と比べて有意に高い IgE 結合性を示した。そこで、このモモ葉エキスを限外ろ過膜にて濃縮後、ゲルろ過 HPLC カラムにて分画し、分画フラクションの IgE 反応性を調べた。その結果、分子サイズ 10-15kDa 付近に IgE 結合性を示した。この画分への IgE 結合性は一部、モモ果肉にて阻害された。また、濃縮モモ葉エキス中に、汎アレルギーであるプロフィリンや LTP が存在するかどうか検討したところ、有意な検出には至らなかった。初回摂取時に症例が発現した RJ アレルギー患者の報告が複数あり、血清 IgE の RJ タンパク質への反応性を調べたところ、主要な RJ タンパク質である MRJP1, 2, 3 への IgE 結合性を検出した。

D. 考察

発症抑制 脾臓細胞は全身免疫担当細胞として機能していることが知られている。OVA 刺激 (1 mg/ml) をした脾臓細胞から産生された TGF- β 量は、OVA 投与群に比べて β -カロテン強化摂取+OVA 投与群で高かった。また、制御性・細胞から TGF- β が産生されることから、 β -カロテン強化摂取は OVA 特異的な制御性 T 細胞の分化を誘導している可能性が示唆された。

魚卵解析 Lv 前駆体であるサケ科魚類ピテロジェニンには、多くのアイソフォームが報告されているので、今回見出した 2 種類の塩基配列も、Lv 軽鎖のアイソフォームであると判断した。また、本研究で決定した 2 種類の IgE エピトープ配列は、サケ科魚類のピテロジェニン中で保存性が高かったため、サケ科魚卵間の抗原交差性成立に関与していると思われる。

果実解析 近年、化粧品・石けんなどの医薬部外品に含まれる食品エキスによる感作と、それに続く該当食材の摂取時のアレルギー発症のケースが知られてきた。また、最近、モモ摂取によるアレルギーやアナフィラキシーが増えており、これまで主要抗原とされるモモ LTP 以外の抗原の関与が示唆される症例が多い。これらの背景から、化粧品・石けんなどの医薬部外品に含まれるモモエキス中の未知抗原が感作源となっている可能性が示された。実際、モモアレルギー患者の IgE

が化粧品原料であるモモ葉エキスに結合することを明らかにした。さらに、モモ葉エキス中の10-15kDaの成分にIgEが結合すること、その結合の一部はモモ果肉にて阻害された。以上のことから化粧品中のモモ葉エキス中の低分子タンパク質による感作がモモ摂取時のアレルギー発症を引き起こす可能性が否定できないことが判明した。また原因抗原としては汎アレルギーであるプロフィリンやLTPではない可能性が示唆された。RJに関しても、初回摂取でも発症する例があり、その原因として知らない間に経皮または経口感作されている可能性が示唆された。

E. 結論

発症抑制 β-カロテン強化摂取によって、全身免疫系でOVA特異的な制御性T細胞の分化が誘導される可能性が示唆された。

魚卵解析 魚卵解析 シロザケ Lv 軽鎖の一次構造を決定した。また、Lv 軽鎖中にはIgEエピトープが少なくとも2カ所存在する事を示した。

果実解析 近年のモモのアナフィラキシーの発症機序の一つの可能性として、化粧品等の医薬部外品に含まれるモモエキスが関与している可能性が示唆された。原因抗原はプロフィリンやLTP以外の10-15kDa成分であると推察される。RJに関しても、初回摂取でも発症する例があり、知らない間に経皮または経口感作されている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 63) Akiyama H., Imai T., Ebisawa M., Japan Food Allergen Labeling Regulation - History and Evaluation, Adv. Food Nutr. Res., 62, 139-171 (2011)
- 64) Sakai Y., Kotoura S., Yano T., Kurihara T., Uchida K., Miyake K., Akiyama H., and Tanabe S., Quantification of Pork, Chicken and Beef using a Novel Reference Molecule Biosci., Biotech. Biochem., 75, 1639-1643 (2011)
- 65) Suzuki A, Nguyen H.P.D., Nakamura K., Akiyama H., Kasahara Y., Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. Jpn. J. Food Chem. Safety., 18, 18-24 (2011)

- 66) Fujita S, Shimizu Y, Kishimura H, Watanabe K, Hara A, Saeki H. In vitro digestion of major allergen in salmon roe and its peptide portion with proteolytic resistance. Food Chemistry. 130, 644-650 (2012)
 - 67) Mizutani Y, Shibuya Y, Takahashi T, Tsunoda T, Moriyama T, Seishima M. Major royal jelly protein 3 as a possible allergen in royal jelly-induced anaphylaxis. J Dermatol., 38, 1079-1081 (2011)
 - 68) 原田 晋, 田中 功, 有津 崇, 田中 昭, 森山達哉「ピーナッツアレルギー：果物類のOAS および豆乳アレルギーとの合併例」 皮膚病診療, 33, 479-482 (2011)
 - 69) 原田 晋, 三好麻里, 森山達哉, 田中 昭, 「オオアワガエリとの交叉反応が疑われたライチ, ピスタチオアレルギーの1例」 皮膚臨床, 53, 421-425 (2011)
 - 70) 原田 晋, 森山達哉, 田中 昭, 「初回摂取時に症状が発現したローヤルゼリーアレルギーの2例」 アレルギー Japanese Journal of Allergology, 60, 708-713 (2011)
 - 71) 原田 晋, 森山達哉, 田中 功, 有津 崇, 田中 昭, 「ピーナッツ豆腐摂取後にアナフィラキシー症状をきたしたクラス2 ピーナッツアレルギーの1例」 日本ラテックスアレルギー研究会誌 15, 70-75 (2011)
 - 72) 山達哉「大豆アレルギーの多様性と味噌の低アレルギー性の検証」 日本醸造協会誌 (Journal of the Brewing society of Japan), 106, 645-655 (2011)
 - 73) 森山達哉「大豆アレルギーの多様性と味噌の低アレルギー性の検証」 日本醸造協会誌 Journal of the Brewing society of Japan, 106, 645-655 (2011)
 - 74) 飯島茂子, 森山達哉 「クラス1およびクラス2の両方が関与したと考えた豆乳によるアナフィラキシーの1例」 Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology, 5, 439-449 (2011)
 - 75) 森山達哉, 「各種大豆加工食品のアレルギーリスク評価」, フードジャーナル (2012年1月号), p. 55 (2012)
- ##### 2. 学会発表
- 65) 亀山浩, 食物アレルギーについて, 第6回健康長寿長野研究会シンポジウム (長野) (2012.1)
 - 66) シロザケ卵アレルギーのエピトープ同定, 清水 裕, 岸村栄毅, 渡辺一彦, 原 彰彦, 佐伯宏樹, 平成23年度日本水産学会春季大会 (東京) (2012)
 - 67) 加納宏行, 森山達哉, 守屋智枝, 坂 義経,

- 清島真理子,「豆腐による口腔アレルギー症候群の1例」第23回日本アレルギー学会春季臨床大会(千葉)(2011.5)
- 68) 森山達哉「免疫と栄養」,奈良県栄養士会 栄養士生涯学習研修会,帝塚山大学(奈良)(2011.7)
- 69) 森山達哉「醸造食品の低アレルギー性の検証(穀物アレルギーの最近の話題も含めて)」日本醸造協会主催 醸造調味食品研究会(東京)(2011.7)
- 70) 松井佐起,北場 俊,荒瀬則子,室田浩之,片山一郎,森山達哉 「花粉症患者における交叉反応性野菜・果物特異的IgEの検出:花粉症からOAS発症までの経過を追う」第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(ミニシンポジウム7 蕁麻疹)(東京)(2011.11)
- 71) 末森佑輔,矢野えりか,吉村征浩,財満信宏,等々力節子,森山達哉,河村幸雄「新規大豆アレルギーPM30のクローニングと変動解析」日本農芸化学会大会(京都)(2012.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許:特許第4841494号(特願2007-101121)清木興介、織田浩司、吉岡久史、亀山浩、米谷民雄
「食品中タンパク質の高感度検出法」

食物アレルギーの免疫療法の開発とその臨床応用 —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 病態制御医学講座小児科学 教授
研究協力者 眞弓 光文 福井大学 理事・副学長

研究要旨

オボアルブミン (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動物モデルを用い、抗原感作成立状態から免疫寛容を誘導する方法を検討した。オリゴマンノースを結合させたりポソームに OVA を封入 (OVA-OML) し、鼻腔粘膜投与を行うと、OVA 経口チャレンジにより惹起される即時型下痢症状は抑制された。OVA-OML 投与による症状抑制効果には、腸間膜リンパ節 CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞と CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞、OVA 特異的分泌型 IgA の誘導、OVA 特異的 IgE 産生抑制の関与が示唆された。また、SINGR1、CR3 が OVA-OML が作用する上で重要と考えられた。一方、OVA をビタミン D3 とデキサメサゾンと共に混合し皮膚塗布する方法では、むしろ誘発症状が増悪された。OML に抗原を封入し、経鼻粘膜投与する方法は、調節作用を持つ CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞を誘導し、食物アレルギーの新規治療法となる可能性が示唆された。皮膚塗布による免疫療法にはアジュバントを検討する必要があると考えられた。

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。このアウトグロウの機序として消化能力の発達に加え、経口免疫寛容の成立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免疫寛容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ウを導く方法が期待される。

これまでの我々の研究において、抗原感作が成立して抗原特異的 IgE と抗原特異的 Th2 細胞が存在する状態でも、アレルギー性下痢症状を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が明らかとなった。そこで、即時型アレルギー症状の発症を抑制する CD8 陽性 T 細胞を *in vivo* で誘導する免疫療法を開発することにより、食物アレルギーの新規治療法としての可能性を検討した。

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) が報告した方法に準じ Balb/c マウスにオボアルブミン (OVA) をアラムと共に腹腔免疫をした後、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。

1) オリゴマンノースを結合したリポソーム (OML) の鼻粘膜投与による免疫療法

食物抗原の様な外因性抗原に対する CD8 陽性 T 細胞の免疫応答を誘導するため、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れることを期待して、オリゴマンノースを結合したリポソーム (OML) に抗原となる OVA を封入し、投与する方法を検討した。

抗原感作が成立したマウスに OVA-OML を 5 日間連続で鼻腔粘膜投与し、最終投与 3 日目から OVA の経口チャレンジを行い、即時型下痢症状が抑制されるか否かを検討した。OVA-OML を点鼻投与した後、OVA 経口チャレンジを行ったマウスの腸間膜リンパ節からフローサイトメーターにより CD8 陽性 CD28 陽性 T 細胞と CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞を分離し、別の感作マウスに輸注した。輸注翌日から OVA 経口チャレンジを行い CD8 陽性 T 細胞サブセットが即時型下痢症状を抑制する機能を持つか否かを検討した。

2) ビタミン D3 とデキサメサゾンとの抗原混合物の皮膚塗布による免疫療法

表皮中のランゲルハンス細胞はクロスプレゼンテーションにより CD8 陽性 T 細胞を活性化しうること、ビタミン D3 とデキサメサゾン刺激により活性化された CD4 陽性 T 細胞から制御性 T 細胞が誘導されることが報告されている。そこで、

ビタミン D3 とデキサメサゾンと共に OVA を皮膚に 5 日間連続塗布する方法が免疫療法として有効か否かを検討した。

OVA 感作マウスに OVA を経口投与し、即時型下痢症状を発症するようにさせたマウスの耳介内側に、ビタミン D3 クリーム単独あるいは、ビタミン D3 クリームに OVA 水溶液を混合したもの、ビタミン D3 クリームにデキサメサゾンと OVA 水溶液混合したものを塗布、最終塗布から 9 日後に OVA の経口チャレンジを行った。

実験動物の取り扱いおよび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得た上で実施した。

C. 研究結果

1) OVA-OML 点鼻投与による免疫療法の効果

OVA-OML 非投与群では、OVA 感作マウスに OVA の経口チャレンジを行うと、チャレンジ 2 回目から即時型下痢症状を呈するようになるが、OVA-OML 点鼻投与群では、即時型下痢症状の発現が抑制された。

OVA 経口チャレンジ前の OVA 特異的 IgE、IgG1、IgG2a 抗体価は、OVA-OML 投与群と非投与群との間に有意な差を認めなかった。一方、OVA 経口チャレンジに伴い、血清中 OVA 特異抗体価は両群とも上昇したが、OVA-OML 投与群では非投与群に比べて OVA 特異的 IgE の上昇が抑制された。また、腸管洗浄液中の OVA 特異的 IgA 値は、OVA-OML 投与群の方が非投与群より高値を示した。

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ことが報告されていることから、OVA 経口チャレンジ後に腸管膜リンパ節 T 細胞の発現マーカーを解析した。その結果、OVA-OML 点鼻投与群では CD28 陰性 CD8 陽性 T 細胞と Foxp3 陽性 CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞の比率が非投与群より増加していた。

OVA-OML による免疫療法後、OVA 経口チャレンジしたマウスの腸管膜リンパ節から CD8 陽性 CD28 陽性と CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞をそれぞれ別の OVA 感作マウスに輸注すると、CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞を輸注したマウスでは弱いながらも即時型下痢症状が抑制された。一方、CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞を輸注した場合には、抑制傾向をわずかに認めるのみで有意ではなかった。

OVA-OML のマクロファージなどへの取り込みは SINGR1 と CR3 を介して行われることが報告さ

れている。そこで、OVA-OML 投与前に抗 SINGR1 抗体あるいは抗 CR3 抗体を投与すると、OVA-OML 投与による下痢症状抑制効果が減弱した。

2) ビタミン D3 とデキサメサゾンの混合物の皮膚塗布による免疫療法の効果

ビタミン D3 と OVA の混合塗布群とビタミン D3 とデキサメサゾン、OVA の混合塗布群には、ビタミン D3 単独群に比べより激しい下痢症状、低体温が誘発された。

OVA 特異的 IgE 値は、ビタミン D3 と OVA の混合塗布群とビタミン D3 とデキサメサゾン、OVA の混合塗布群でビタミン D3 単独群に比べ有意に上昇していた。

D. 考察

オリゴマンノース結合リポゾームに食物抗原を封入し口腔内に投与する方法は、即時型アレルギー下痢症状の発症を抑制する新たな免疫療法となる可能性が示唆された。

オリゴマンノース結合リポゾームを用いた免疫療法により、OVA 特異的 IgE 産生増強の抑制と分泌型 IgA 産生の増強、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞に加え CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞の腸間膜リンパ節での増加を認めた。免疫療法を行ったマウスの腸間膜リンパ節中の CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞は即時型下痢症状を抑制し、制御性 T 細胞としての機能を持つと考えられた。CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞は経口免疫寛容に関与することが指摘されており、オリゴマンノース結合リポゾームを用いた免疫療法では CD4 陽性調節性 T 細胞に加え CD8 陽性調節性 T 細胞が誘導されている可能性が示唆された。OVA 特異的抗体産生の変化も含め、複数の機序が協調して即時型下痢症状の抑制機能に関与していると考えられた。

近年、牛乳アレルギーの免疫療法として、牛乳を皮膚に塗布する免疫療法の試みが報告されている。今回の検討では、調節性 T 細胞の誘導効果を期待してビタミン D3 とステロイドに抗原を混合し皮膚塗布を行ったが、抗原特異的 IgE の産生がむしろ増強され、かえって誘発症状が増強される結果となった。抗原感作が既に成立した状況下で調節性 T 細胞を誘導するには、アジュバントを再検討することが必要と考えられた。

E. 結論

抗原封入マンノース結合リポゾームの鼻粘膜

投与は、即時型食物アレルギーに対する新たな免疫療法となる可能性が示唆された。皮膚への塗布を抗原投与経路とした免疫療法には、アジュバンドの検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

76) Kawakita A, Shirasaki H, Yasutomi M, Tokuriki S, Mayumi M, Naiki H, Ohshima Y Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model. *Allergy* 67:371-379 (2012)

77) 大嶋勇成 抗原感作とアレルギー疾患発症予防 アレルギー・免疫 19:9-10 (2012)

78) 大嶋勇成 アレルギー疾患の病態：免疫細胞の関与 小児内科 43:1825-29 (2011)

79) 白崎仁幸子, 河北亜希子, 吉川利英, 安富素子, 畑郁江, 重松陽介, 眞弓光文, 大嶋勇成 厳格な食物除去によりクレアチニンキナーゼ高値と低カルニチン血症を呈した食物アレルギーの1例 日本小児アレルギー学会誌 25:133-137 (2011)

80) 大嶋勇成 周産期の環境と小児アレルギー疾患発症のリスク 免疫反応の発達 周産期医学 41:605-607(2011)

81) 大嶋勇成 アレルギー疾患発症に関わる免疫システム アレルギーの臨床 31:381-385 (2011)

82) 大嶋勇成 抗アレルギー薬 新薬展望 2011 47:241-246(2011)

83) 大嶋勇成 食品免疫・アレルギーの事典 食品アレルギーの機序 朝倉書店 (2011)

84) Ohshima Y Roles of regulatory T cells in oral tolerance and food allergy. In "Regulatory T cells" ed by Hayashi RS (2011)

2. 学会発表

72) Ohshima Y, Yasutomi M, Hayashi H, Kawakita K, Naiki N, Mayumi M Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model The 16th Asian Pacific

Association of Pediatric Allergy Respirology and Immunology 2011.10.28-30 Fukuoka

73) 安富素子, 徳力周子, 林仁幸子, 岡崎新太郎, 河北亜希子, 畑郁江, 大嶋勇成, 重松陽介 新生児ミルクアレルギーの診断と治療における問題点(当院での経験) 第38回北陸アレルギー研究会 2011.12.4 金沢

74) 大嶋勇成, 知ってほしい食物アレルギーのすべて 平成23年度リウマチ・アレルギーシンポジウム in 金沢 2011.10.29 金沢

75) 大嶋勇成 食物アレルギーでの抗原除去は有用であるか? Proの立場から 第11回 Early Intervention 研究会 2011.10.2 東京

76) 大嶋勇成 小児アレルギー疾患の耐性獲得機序と免疫療法 第19回大分アレルギー研究会 2011.10.14 由布

77) 大嶋勇成 学校におけるアレルギーを持つ子どもたちへの対応とその注意点 平成23年度福井県学校保健会総会 2011.06 福井

78) 大嶋勇成 アレルギー疾患に用いられる薬物療法のトピックス 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011.05.14-15 幕張

79) 大嶋勇成 食物アレルギーを取り巻く諸問題 第47回福井県小児保健協会学術集会 食物アレルギーを取り巻く諸問題 2011.7.9 福井

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

