

- 58) Urisu A, Ebisawa M, Mukoyama Tet al. Japanese Society of Allergology. Japanese guideline for food allergy. Allergol Int. 2011;60:221.
- 59) Caubet JC, Kondo Y, Urisu A, Urisu A et al. Molecular diagnosis of egg allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011;11:210.
- 60) 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. 2011 ; 59:3510.
- 61) Torii S, Torii A, Urisu A et al. Effects of oral administration of Lactobacillus acidophilus L-92 on the symptoms and serum markers of atopic dermatitis in children. Int Arch Allergy Immunol. 2011;154:236.
- 62) Sicherer SH, Urisu A, Natural History and Prevention, Food Allergy, Ed; John M James, Wesley Burks and Philippe Eigenmann, Pub ;ELSEVIER, 251-264, 2011.

2. 学会発表

- 39) 宇理須厚雄, 成瀬徳彦, 小松原亮, 平田典子, 鈴木聖子, 安藤仁志, 安在根, 湯川牧子, 近藤康人, 柘植郁哉, 山田一恵, 小林幸子, 木村守 小児アレルギー研究の方向性を探る 食物アレルギー 経口免疫療法の今後 第 46 回日本小児アレルギー学会 (2009.10)
- 40) 柘植郁哉, 安在根, 湯川牧子, 近藤康人, 成瀬徳彦, 小松原亮, 平田典子, 鈴木聖子, 安藤仁志, 宇理須厚雄, 山田一恵, 小林幸子, 木村守 食物アレルギー 診断と治療の標準化に向けての軌道設計 経口免疫療法の標準化のために解決すべき課題 第 46 回日本小児アレルギー学会 (2009.10)
- 41) 山田一恵, 成瀬徳彦, 安在根, 中島陽一, 小松原亮, 河村牧子, 各務美智子, 平田典子, 近藤康人, 柘植郁哉, 宇理須厚雄, 木村守, 鳥居新平 食物アレルギーの治療(特に経口免疫療法) 鶏卵アレルギー低アレルゲン化オボムコイド減量加熱卵白による長期間経口免疫療法 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2009.04)
- 42) 柘植郁哉, 近藤康人, 宇理須厚雄等: 低アレルゲン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(2010.5)
- 43) 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 (2010.11)
- 44) 成瀬徳彦, 小倉和郎, 小松原亮, 平田典子, 安藤仁志, 宇理須厚雄, 田中健一, 犬尾千聡, 湯川牧子, 近藤康人, 柘植郁哉, 小林幸子, 木村守 食物アレルギー 低アレルゲン化オボムコイド減量加熱全卵を用いた経口免疫療法の検討 第 23 回第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2011.5)
- 45) 成瀬徳彦, 小倉和郎, 平田典子, 鈴木聖子, 安藤仁志, 近藤康人, 宇理須厚雄, 田中健一, 中島陽一, 犬尾千聡, 柘植郁哉 食物(鶏卵、牛乳、小麦)アレルギーに対する緩徐漸増経口免疫療法の検討 第 48 回日本小児アレルギー学会 (2011.1)
- 46) 柘植郁哉, 田中健一, 野村孝泰, 犬尾千聡, 湯

川牧子, 高松伸枝, 小倉和郎, 成瀬徳彦, 平田典子, 鈴木聖子, 安藤仁志, 近藤康人, 宇理須厚雄, 山田一恵, 小林幸子, 木村守食物アレルギーの経口免疫療法 ;オボムコイド減量加熱全卵を用いた経口免疫療法の免疫学的検討 第 6 1 回日本アレルギー学会秋季学術大会(2011.11 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

加工食品中の原因抗原量と耐性化に関する研究

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 臨床栄養学研究室
矢寺 路代 同志社女子大学 臨床栄養学研究室

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、過敏な状態に陥った症例では100 μ g から1mg 程度の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食品中の抗原量の測定結果をもとに、安全かつ適切な食事指導を行い耐性獲得を図るために必要な条件を明らかにすることを目的とした。抗原性の評価は食品中の抗原量の定量により行い、個々の患児の反応の閾値の関係については、HRT シオノギ®の変法により抗原コンポーネントレベルで評価した。その結果、卵に関しては最重症例でも長時間かけて摂取抗原量を漸増することにより安全に耐性獲得を図ることが可能であった。この方法は安全性が高いばかりでなく、単なる減感作ではなく耐性獲得を目指したものである。抗原コンポーネントレベルにおける食品の低アレルギー化と摂取抗原量をもとに行う食事指導により、安全に耐性の獲得を図ることが可能である。

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、過敏な状態に陥った症例では100 μ g から1mg 程度の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食品中の抗原量の測定結果をもとに、安全かつ適切な食事指導を行い耐性獲得を図るために必要な条件を明らかにすることを目的とした。

小麦に関しては食品中のプロテアーゼを用いた低分子化による低アレルギー化についての検討を行った。

B. 研究方法

食品の抗原性の検討としては「食べる」側からみた抗原量の評価が可能な方法として報告してきた従来法を用いて卵を原材料とした加工・調理食品中の卵抗原量を加熱条件のみならず調理法や副材料の違いも含めて検討した。卵の低アレルギー化は加熱・調理により行い、抗原性の評価は従来法による特定原材料測定キットを用いて卵白主要抗原である卵白アルブミン（以下 OVA）とオボムコイド（以下 OM）の定量をおこなった。

さらに卵を含む食品の抗原性と抗原量および個々の患児の反応の閾値の関係について抗原コンポーネントレベルで評価した。生体側の反応としては抗原特異的 IgE 抗体の測定のみならず、抗原コンポーネントタンパク質の刺激によるヒス

タミン遊離試験を HRT シオノギ®の変法により検討した。

抗原の低アレルギー化と生体側の反応性を検討した結果をもとに症状発現の抗原閾値濃度が低い重症の卵アレルギー児について安全性を最優先にして、超微量の抗原量の摂取から開始し、重篤な症状を惹起することなく耐性獲得を目指した治療が可能かどうかを検討した。イムノキャップ®クラス 6、HRT クラス 4 が1年以上続いており、自然経過としての耐性獲得が困難であると判断し、数年かけた漸増法を行うことについてインフォームドコンセントの得られた15例を対象とし、OVA、OMの抗原量にもとづいて症状を発現しない範囲内の超微量漸増法による食事療法を行い経過を検討した。

小麦の低アレルギー化はフルーツに含まれるプロテアーゼを用い、モリナガ FASPEK 小麦測定キット（グリアジン）による定量と抗グリアジン抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。

C. 研究結果

卵白中の主要抗原である OVA と OM の加熱による抗原性の低下の程度は、加熱条件のみならず、調理法や副材料により受ける影響が大きく異なっていた。1例をあげると“加熱卵料理”である固ゆで卵と炒り卵では OM 量はほぼ同等であるが、OVA 量は1,000倍近く異なっていた。抗原量定量

の結果、OVA の抗原性が OM に比較して著明に低下するもの（固ゆで卵やハンバーグなど）と OVA と OM の抗原性がほぼ同等に低減化するもの（炒り卵、焼き菓子類など）があることが明らかとなった。このことを踏まえて調理食品中の OVA と OM の抗原量に基づく食事指導表の作成ができ、負荷試験パス後の食事指導に生かすことが可能となった。

これらの知見を踏まえ、イムノキャップ®クラス 6、HRT クラス 4 が 1 年以上続いていた 15 例に対し、負荷試験、誤食時のデータを分析し、各症例に発現する症状がアナフィラキシーのグレード分類（食物アレルギー診療ガイドライン 2012）によるグレード 1 またはヒスタミン H1 受容体拮抗薬の有効な腹痛までの症状出現にとどまる摂取量を決定することができた。

卵抗原コンポーネントに対する免疫学的反応をイムノキャップ®で検討すると全例 OVA 特異的 IgE 抗体 100UA/mL 以上を対象としているため、OM 特異的 IgE 抗体も 100UA/mL を超えていた 3 例を除いた 12 例で OVA に対する抗体価の方が含有量の少ない OM に対する抗体価より高かった。HRT では OVA と OM に対してほぼ同等、低濃度域では OM に対してより高い反応性が認められ、加熱抗原による刺激では OM に対してのみ反応する症例がさらに多くなった。

そこで初期摂取量は OVA、OM ともに 20 μ g 以下に設定し、より低抗原濃度域で反応する OM の耐性誘導を先に図ることにし、OM 摂取量を先に漸増し、摂取可能量が OM 抗原量として 14mg を超えてから OVA 量の漸増を開始することにした。増量が 4 週間に 1 回の外来受診時に行うことを原則としたが、種々の理由により間隔が 8 週間まであることもあり、転居例では 6 ヶ月に 1 回となった。

3 歳未満に初診の 9 例では全例順調に摂取量を増やしていくことができ、20~39 ヶ月間かけて OM は 14mg~320mg 摂取可能となった。一部の症例では OVA の摂取量も漸増し、この時点で OVA の摂取量は 100 μ g~245mg であった。いずれも摂取を嫌がることなく決められた量の卵含有食品を摂取することが可能となった。治療中に Grade1 または軽度の腹痛が出現した症例はあったが、いずれの場合もヒスタミン H1 受容体拮抗薬が有効であった。

3 歳以降初診の 6 例中 4 例の摂取可能量は OM については 14~41mg と比較的順調に漸増できた

が、OVA はまだ 1mg 未満であった。途中で転居した 2 例は進み方が遅く、OM を漸増している段階である。

15 例とも誤食時を除いて医療機関受診を必要とするような症状を起こしたことはなかった。このことから抗原量に基づく食事指導は安全性が高く、4 週間に一度の通院の通院ができれば実施可能であることが明らかとなった。

食事指導により安全に耐性獲得ができつつある症例を分析すると、OM の耐性獲得を先に誘導し、その後に OVA の耐性獲得を図ると耐性誘導しやすいことが明らかとなった。

小麦に関しても同様の検討を行うために食品中のプロテアーゼを用いた検討を行い、主要抗原とされるグリアジンの低分子化は達成されたが、水溶性画分の抗原性は残っており、さらに検討中である。

D. 考察

最重症の食物アレルギー児でも卵に関しては抗原コンポーネント別抗原量に基づいて摂取開始することが可能で、長時間かけて摂取抗原量を漸増することにより耐性獲得を図ることが可能であることを示唆するデータを得ることができた。この方法は安全性が高いばかりでなく、単なる減感作ではなく耐性獲得の可能性がある。さらに治療を続け、免疫学的パラメータの変化と合わせて検討することは耐性獲得のメカニズムの解明にもつながると考える。

この方法では「食べる」側からみた抗原性の評価と様々な段階の抗原性を有する調理食品を用意することが重要な役割を担っている。

卵の抗原性は加熱・調理により変化させることができるが、加熱の影響を受けにくい小麦の低アレルギー化にはプロテアーゼの活用が有効であると考えられる。

E. 結論

重症の食物アレルギー児の耐性獲得を目指した治療を安全に行うためには、「食べる」側からみた抗原量に基づく時間をかけた漸増法が有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 63) 伊藤節子. 調理・加熱による食品中のアレルゲンの変化. 臨床免疫・アレルギー科. 2009;51:383-8
 - 64) 伊藤節子, 明石真未, 伊東祐美, 本庄勉. 食品中のアレルギー物質測定の実用性: アレルゲン交換表の作成. 食物アレルギー研究会会誌 2009;9:48-50
 - 65) 伊藤節子. 食物アレルギーの患者指導の実践. アレルギー 2009;58:1490-6
 - 66) 伊藤節子: 食物アレルギーの栄養指導の今後のあり方 日小ア誌 2010;24:31-8
 - 67) 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
 - 68) 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
 - 69) 伊藤節子, 伊東祐美, 明石真未. 焼成条件を変えて作成したカップケーキの抗原量の変化について. 食物アレルギー研究会誌 2010;10:23-4
 - 70) 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;25:63-7
 - 71) 伊藤節子. 食物アレルギーと治療. 小児科 2011;52:175-82
 - 72) 伊藤節子. 食物アレルギー: 治療の基本と早期治療介入の重要性. アレルギー2011;60:1495-503
 - 73) 伊藤節子. IgE-mediated food allergy の原因抗原診断におけるピットフォール. 日小ア誌 2011;25:665-73
 - 74) 伊藤節子. 乳汁栄養は将来のアレルギー疾患発症に関連するか? 周産期医学 2011;41:633-7
- ### 2. 学会発表
- 47) 伊藤節子. 家庭・園・学校における食事対応—栄養指導の必要性—, シンポジウム1「食物アレルギーの正しい理解と対応—食物アレルギーの克服に向けて」, 第26回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会(福岡). 2009. 5. 30
 - 48) 伊藤節子. 栄養学的見地からみた食物アレルギーの治療. シンポジウム「食物アレルギーの患者に優しい医療」, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会(岐阜) 2009. 6. 4
 - 49) Ito S. Clinical usefulness of quantitative evaluation of egg antigen in food and egg specific IgG4 antibody in serum. The XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (Warsaw, Poland) 2009. 6. 8
 - 50) 伊藤節子. 食物アレルギーの栄養指導の今後の方向性. シンポジウム1「食物アレルギー: 診断と治療の標準化に向けての軌道設計」, 第46回日本小児アレルギー学会(福岡市) 2009. 12. 5
 - 51) 伊藤節子, 平井博之. 好塩基球活性化の指標である CD203c 発現解析における反応閾値についての検討—HRT シオノギとの比較検討—第46回日本小児アレルギー学会(福岡市) 2009. 12. 6
 - 52) 伊藤節子, 明石真未, 伊東祐美, 矢寺路代, 本庄勉. 食品中のアレルギー物質の測定の臨床応用: 食品アレルゲン交換表の作成 第46回日本小児アレルギー学会(福岡市) 2009. 12. 6

- 53) 伊藤節子, 明石真未. 除去食療法のコツ. ハンズオンセミナー3. 第18回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会(四日市) 2010. 1. 31
- 54) 伊藤節子, 伊東祐美, 明石真未, 矢寺路代. 焼成条件を変えて作製したカップケーキの抗原量の変化について. 第10回食物アレルギー研究会(東京都) 2010. 2. 13
- 55) 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. 6. 7
- 56) 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. 5. 8
- 57) 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. 12. 4
- 58) 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. 12. 4
- 59) 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. 2. 12
- 60) 伊藤節子. 食品中のアレルゲン評価システム. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 テーマ館セミナー(千葉) 2011. 5. 15
- 61) Ito S. Evaluation of modified basophil histamine release test at the antigen component level in the management of patients with egg allergy. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2011, 2011. 6. 4 Istanbul, Turkey
- 62) 伊藤節子. 食物アレルギーの栄養指導の方向性～食品のアレルゲン交換表の活用を含めて～第114回日本小児科学会学術集会分野別シンポジウム「食物アレルギー」(東京) 2011. 8. 12
- 63) 伊藤節子. 耐性獲得を目指した治療における卵抗原量に基づく食事療法の有用性と安全性: 卵白 Immuno CAP クラス6の卵アレルギー児における検討. 第48回日本小児アレルギー学会(福岡) 2011. 10. 30
- 64) 伊藤節子. 「食べる」側からみた食物アレルギーの治療における好塩基球ヒスタミン遊離試験の活用. イブニングシンポジウム「I型アレルギーとアレルギー検査(ヒスタミン遊離試験を中心に)」, 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2011. 11. 10
- 65) 伊藤節子. 抗原量に基づく漸増法による食事療法の安全性と耐性獲得からみた有用性: 重症卵アレルギー児における検討. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2011. 11. 12
- 66) 伊藤節子. 食物アレルギーの治療. 第12回食物アレルギー研究会(東京) 2012. 2. 18

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

本研究は遺伝子多型を用いた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てより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。我々は inflammasome の構成成分である NALP3 に注目し、その遺伝子多型と食物誘発アナフィラキシー発症との関連 (リスクアレル=gain of function) を報告した (JACI 2009; 124(4):779-85)。さらに好酸球性食道炎の関連遺伝子 TSLP の遺伝子多型 rs2416258 と食物誘発アナフィラキシーとの関連 ($P=0.0012$) を見いだした。さらに近年の大規模な 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 ($P=0.0092$), RORA ($P=0.015$), TSLP ($P=0.022$) との間に弱い関連を認め、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 ($P=4.9 \times 10^{-6}$)。今後これらについては結果の検証を進めて行く。

A. 研究目的

様々な疾患において症例対照関連解析による遺伝的要因の解明が進んでいる。我々は inflammasome の構成成分である NALP3 に注目し、その遺伝子多型と食物誘発アナフィラキシー発症との関連を検討した。一方、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の遺伝的要因の解明が急速に進んでいる。好酸球性食道炎の GWAS が行なわれ、その関連遺伝子として TSLP が同定された。我々は TSLP の遺伝子多型と食物誘発アナフィラキシー発症との関連を検討した。また、アレルギーマーチとは遺伝的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。我々はそれらに共通する遺伝的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討を行なった。

B. 研究方法

日本人集団の HapMap database より NLRP3 遺伝子の 15 個の Tag SNPs を抽出し TaqMan 法を用いて遺伝子多型のタイピングを実施した。有意な関連を示した SNP については周辺の新規 SNP の探索後、発症への影響が予想される SNP の機能解析を併せて実施した。

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。

気管支喘息大規模 GWAS の関連領域で対象とした 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 21SNPs 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。

(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

NLRP3 の遺伝子多型と食物アナフィラキシー

発症との強い関連を見いだした (rs4612666、 $P=0.00086$ および rs10754558、 $P=0.00068$)。リスクアレルは NLRP3 遺伝子の mRNA の転写活性を増強する方向に作用していた。ヒト単球系細胞である THP-1 を用いた Luciferase assay の結果、関連を示した rs4612666 および rs10754558 のリスクアレルは NLRP3 遺伝子の mRNA の転写活性を増強する方向に作用していた (Gain of function)。EMSA (Electrophoretic mobility shift assays) において rs4612666 のリスクアレルを含む領域に何らかの核タンパクとの結合が認められた。さらに rs10754558 について ASTQ (アレル特異的発現解析) を行なったところ、リスクアレルの方の転写が有意に高い事が明らかとなった。

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。

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)。この関連におけるリスクアレルの方向性は一致していた。

D. 考察

NLRP3 遺伝子多型は NLRP3 発現量に影響を与え、より強い inflammasome の活性化を通して食物アナフィラキシー発症に関与する可能性が示唆された。さらにこの遺伝子多型はアスピリン喘息の発症とも強い関連を認めた (リスクアレルの方向性も一致)。NLRP3 がその遺伝子多型を通して重篤な即時型全身性アレルギー反応に関与する可能性が考えられた。

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。この結果を今後、独立に収集したサンプルで検証していく予定である。

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 多型において食物アレルギー発症との強い関連が認められた。この rs1295686 (Arg110Gln) はこれまでカナダ人集団において、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、アレルギーマーチを説明する 1 つの遺伝要因と考えられた。

E. 結論

NLRP3 遺伝子多型と食物アナフィラキシー発症との間に強い関連を認めた。機能解析の結果を含め論文にまとめ報告した (JACI 2009; 124(4):779-85)。

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。この結果については今後の検証が必要である。

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。今後も食物アレルギーの遺伝要因の探索を進めて行く。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 75) Tamari M, Harada M, Hirota T, Nakamura Y. Host defense molecular mechanisms against Chlamydomonas pneumoniae and genetic studies of immune-response-related genes in asthma. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery. 2009;3:17-35
- 76) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Functional analysis of the polymorphisms of the TSLP gene in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;40:368-74
- 77) 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;124:779-85.
- 78) 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;180:1048-55.
- 79) 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;151:255-261
- 80) 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;180:1048-55.
- 81) 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;125:498-500.
- 82) 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.
- 83) Tamari M, Tomita K, Hirota T. Genome- Wide Association Studies of Asthma. *Allergol Int*. 2011; 60(3):247-52.
- 84) 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, Wittman 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.
- 85) Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A, Litonjua AA, Himes BE, Lange C, Lazarus R, Sylvia J, Klanderman B, Duan QL, Qiu W, Hirota T, Martinez FD, Mauger D, Sorkness C, Szeffler 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
- 86) 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;7(7):e1002170.
- 87) 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.
- 88) 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.
- 89) 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.
- 90) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基: アレルギー疾患関連遺伝子の全ゲノム解析. 最新医学, 64:894-898, 2009
- 91) 人見祐基、原田通成、広田朝光、玉利真由美: 成人喘息の関連遺伝子. アレルギーの臨床, 29:216-220, 2009
- 92) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美: 遺伝とアレルギー. 小児科診療, 72:123-1243, 2009
- 93) 広田朝光、原田通成、人見祐基、坂下雅文、玉利真由美: 日本人における気管支喘息関連遺伝子. 呼吸, 28:603-608, 2009
- 94) 広田朝光、原田通成、人見祐基、玉利真由美: 小児呼吸器疾患とゲノム解析 小児科, 50:861-866, 2009
- 95) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基、気管支喘息の病態と自然免疫関連遺伝子 アレルギー. 58:766-771, 2009
- 96) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美 小児気管支喘息と遺伝子多型 喘息. 22:154-158, 2009

- 97) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美 アレルギーの遺伝要因 実験医学 羊土社 増刊 27:3360-3371, 2009
- 98) 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
- 99) 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
- 100) 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
- 101) 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
- 102) 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
- 103) 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
- 104) 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
- 105) 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
- 106) 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
- 107) 玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集: 気管支喘息包囲網-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
- 67) 第8回 Kinki Hokuriku Airway disease Conference (KIHAC) 2009年4月 リーガロイヤルホテル大阪 上気道・下気道リレーショナルシッ わかりやすい遺伝子研究の最先端 感染とアレルギーの謎に迫る 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 68) 独立行政法人理化学研究所「ゲノム医科学研究センター」/文部科学省「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」SNP から疾患遺伝子解明へ 2009年4月 品川インターシティーホール 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 69) 第21回 日本アレルギー学会春季臨床大会 2009年6月 岐阜都ホテル シンポジウム7 アレルギー免疫における分子生物学、分子遺伝学の臨床応用 Translational Research TSLP とアレルギー疾患 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 70) 第8回愛知免疫アレルギーを語る会 2009年7月 ホテルキャッスルプラザ 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 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 71) 第54回大分耳鼻咽喉科臨床研究会 2009年9月 大分東洋ホテル 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 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 72) 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月 秋田ビューホテル 教育セミナー10 ウイルス感染による喘息増悪の機序と SFC の作用 遺伝子研究の立場から 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 73) MS39-#5 NLR family 遺伝子多型と食物アナフィラキシーとの関連解析 人見祐基、海老澤元宏、富川盛光、今井孝成、小俣貴嗣、広田朝光、原田通成、鈴木洋一、下条直樹、河野陽一、玉利真由美
- 74) 第54回山口アレルギー疾患研究会 2009年11月 宇部全日空ホテル 特別講演 1 気管支喘息と COPD の病因病態について 疾患遺伝子の観点より 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 75) アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2009年11月 ベルサール西新宿 II. シンポジウム: 喘息の難治化機序を考える 2) 喘息難治化に関与する遺伝子 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基
- 76) アレルギー・気道上皮細胞研究会 第13回学術大会 2009年12月 シェーンバッハ・サボー 特別講演 気管支喘息の遺伝子解析-SNP 解析と発現解析、気道上皮細胞を中心に 玉利真由美 原田通成 広田朝光
- 77) The 17th Symposium of Asthma in Tokyo 2009年12月 千代田放送会館 2階ホール プレナリーシンポジウム「喘息サブタイプ」 1. 喘息サブタイプと遺伝子多型 玉利真由美 原田通成 広田朝光
- 78) 愛媛県 ENT 臨床セミナー 2010年1月 松山全日空ホテル 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 玉利真由美、広田朝光
- 79) 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 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 玉利真由美、広田朝光
- 80) 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 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 玉利真由美、広田朝光
- 81) 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 アレルギー疾患の環境と遺伝のトピックス 玉利真由美、広田朝光
- 82) 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 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 玉利真由美、広田朝光
- 83) 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 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 玉利真由美、広田朝光、富田かおり
- 84) 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 (1)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」 玉利真由美、広田朝光、富田かおり

- 85) 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
- 86) 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
- 87) 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
- 88) 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
- 89) Open Speech in University 2011年9月
Kaohsiung Medical University, Taiwan Effects
of genetic polymorphisms in allergic diseases
Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota.
- 90) 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
- 91) 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
- 92) 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 (1)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
- 93) 第1回重症喘息研究フォーラム SARF 2011年
10月 経団連会館 基調講演 I 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 前任准教授
	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

平成 21 年度研究では新生児に安全に実施可能な新生児ミルクアレルギーの診断を目的とした抗原負荷試験プロトコールを作成した。負荷試験の適応はミルクアレルギーの重症度のみならず、児が持つ基礎疾患や合併症の有無についても配慮した。このプロトコールは本研究班によるコンセンサスに基づいたものであり、必ずしも十分なエビデンスに基づいた標準的方法とは言えないため、今後症例の集積による有用性・安全性の検証が必要である。

平成 22 年度・23 年度は本プロトコールを含む標準化された診断・治療指針に基づく前方視的全国調査を実施し、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。アレルギー検査では、全例でリンパ球刺激試験(antigen specific lymphocyte stimulation test; ALST)が実施された。

抗原負荷試験は 52 例に実施され、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。また抗原特異的 IgE の感度は 0%、特異度は 93%、便中好酸球の感度は 42%、特異度は 54%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とあり、改めて診断の Gold Standard は抗原負荷試験である事が示された。軽症例に対する抗原負荷試験は安全に実施可能と考えられる。負荷試験による正確な診断は新生児・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、本邦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、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。同調査の結果、新生児入院施設における発症頻度は 0.21%であったが、診断の Gold Standard である食物経口負荷試験(以下負荷試験)に基づく診断症例は全症例の 1/4 に過ぎなかった。

本疾患の診断に負荷試験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、負荷試験の実施方法、実施基準が標準化されていないことなどが考えられる。本研究班は、新生児に対して安全に実施可能な負荷試験のプロトコールの作成、ならびにこのプロトコールと「診療の手引き」に基づく前方視的な症例集積を実施し、より正確な病態を明らかにするとともに、診断・治療方法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

[平成 21 年度研究]

負荷試験の実施基準と実施スケジュールは、平成 21 年度に新生児科、小児アレルギー科、小児消化器病科を専門とする研究者による検討委員会を立ち上げ、研究班会議ならびに電子メールを用いた意見交換により作成した。

[平成 22 年度・23 年度研究]

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、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 1 項目以上が行われた児とした。

調査項目は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ならびに各調査医療施設の倫理委員会の承認を得ているとともに、症例登録、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。

C. 研究結果

[平成 21 年度研究]

C-1 抗原負荷試験の適応と実施スケジュール

NICU をはじめとする新生児診療施設において本疾患を発症する新生児は、特有の基礎疾患や合併症を有していることが多いため、負荷試験実施の適応を考える際には発症時のアレルギー症状の程度だけではなく、個々の基礎疾患や合併症の重症度にも配慮した。負荷試験の適応基準を表 1、実施スケジュールを表 2 に示す。

[平成 22 年度・23 年度研究]

C-2 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）

表 1 抗原負荷試験の適応基準

- ① 重症度が Grade I、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。

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	6日目	...
授乳時間(例)					全量	全量	全量	
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	全量	
19時			全量	全量	全量	全量	全量	
22時			全量	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	●	●	●	●	●	●	●	●

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-3 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-4 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。

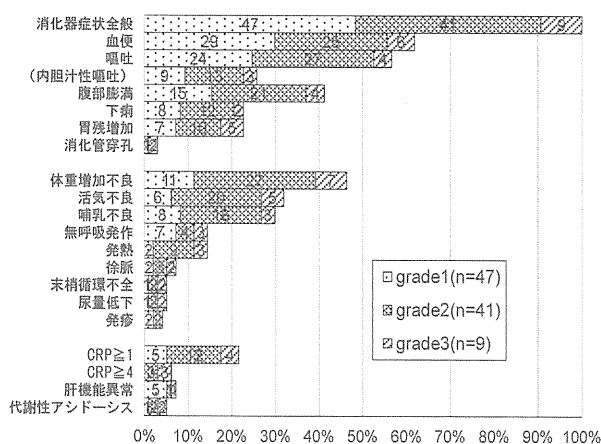


図1 症状・検査異常の出現頻度

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。

C-5 アレルギー関連検査と抗原負荷試験

全症例に対してALSTは実施され、cut off値に基か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。

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。

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 K-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)

抗原負荷試験の結果をもとに算出した結果、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。また抗原特異的IgEの感度は0%、特異度は93%、便中好酸球の感度は42%、特異度は54%であった。

D. 考察

[平成21年度研究]

新生児ミルクアレルギーは既存の血液、糞便検査だけでは診断が困難であるが、唯一の確定診断方法である抗原負荷試験はほとんど実施されてこなかった。抗原負荷試験を新生児医療の現場に広く浸透させていくためには、負荷試験の安全性が担保されていること、実施方法が簡潔であること、負荷試験を実施することにより入院期間を長期化させないことが重要な要件である。本研究班で作成した負荷試験のプロトコールは新生児科、小児アレルギー科、小児消化器疾患科からなる検討委員会の意見を集約したものであり、必ずしもエビデンスに基づいた標準的方法とは言えない。今後症例を蓄積していくことでこのプロトコールの有用性、安全性を評価していく必要がある。

[平成22年・23年度研究]

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くなかった。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、負荷試験実施例に基づく偽陽性が 4 割程度認められており、検査効率はよくない。このため ALST の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。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。また牛乳抗原特異的 IgE や便粘液中好酸球や末梢血好酸球数もそれ以上に検査効率は良くなかった。これら結果より、新生児牛乳アレルギーの診断には、改めて負荷試験の重要性が指摘される。

その負荷試験は約半数の症例に対して実施された。しかし本来実施されるべき軽症例であっても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、負荷試験が児の状態を悪化させるリスクが高いとする考え方が根強いこと、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、負荷試験で陽性症状が認められたものは約半数であり、陰性例では速やか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、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る。

新生児科医が本負荷試験プロトコールの正しいリスク評価をして、加水分解乳による児の栄養学的不利益の大きさと保護者の負担を知ること、自ずと入院が長引いても負荷試験を実施して診断を明らかにするべきであると考えられるように、今後さらなる有用性・安全性の検討が必要である。

E. 結論

新生児ミルクアレルギーの診断を目的とした抗原負荷試験のプロトコールを作成し、それに基づく症例の前方視的な症例集積を行った。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、改めて負荷試験が唯一の確定診断の Gold Standard であることが示された。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。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である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 108) T Miyazawa, K Itabashi, T Imai: Management of neonatal cow's milk allergy in high-risk neonates. *Pediatrics International* 51-4:554-547, 2009
- 109) 宮沢篤生, 今井孝成, 板橋家頭夫: 消化器外科疾患に多い? ミルクアレルギー. *Neonatal Care* 23-11:1118-1125, 2010
- 110) 宮沢篤生, 今井孝成, 板橋家頭夫: アレルギー診療の新しい展開 食物アレルギー 新生児消化器症状型. *小児科臨床* 63-12: 2451-2460, 2010
- 111) 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

- 94) 宮沢篤生, 板橋家頭夫, 今井孝成, 木村光明, 大塚宜一: 「新生児ミルクアレルギー疑診時の診療の手引き」について. 第 54 回日本未熟児新生児学会学術集会. 横浜. 2009. 12
- 95) 宮沢篤生, 板橋家頭夫, 今井孝成, 木村光明, 大塚宜一: 新生児乳児消化管アレルギー 最近の動向 新生児科の立場から. 第 47 回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2010. 12
- 96) 木村光明, 田口智英, 榊林成之, 王茂治, 宮沢篤生, 板橋家頭夫, 橋口明彦: 臨床検査会社による牛乳蛋白特異的リンパ球刺激試験 (ALST) 測定. 第 47 回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2010. 12
- 97) 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
- 98) 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
- 99) 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
- 100) 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 β -カロテン摂取により、腸管免疫系において卵白アルブミン (OVA) 投与後の CD11c⁺B7-H1⁺細胞を誘導し、その細胞によって OVA 特異的制御性 T 細胞が誘導され、全身免疫系に OVA に対する免疫寛容作用が伝達される可能性が示唆された。

魚卵解析 本研究では、リポビテリン (Lv) が β' -コンポーネント (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、これらの上に交差反応性が成立している可能性を示唆した。

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 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。しかし、一次構造や IgE エピトープ等の諸性質が明らかとなっている β' -c と異なり、アレルゲンとしての Lv に関する詳細な情報は報告されていない。そこで本研究では、Lv の消化性調査、一次構造解析および IgE エピトープ探索を行った。

果実解析 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等について検討した。

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、腸管膜リンパ節 (MLN)、パイエル板 (PP) を採取した。細胞表面抗原のポピュレーションをフローサイトメーターにより解析した。また、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 (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 など) を測定した。

魚卵解析 生鮮シロザケ卵より Lv を精製し、 β' -c との IgE 交差性とペプシン-トリプシン耐性を調べた。次に、近縁種であるニジマスの卵黄前駆タンパク質 (ピテロジェニン) の一次配列を参考に cDNA クローニングを行い、Lv 軽鎖の一次構造を決定した。さらに、この一次構造を網羅する合成ペプチドを用いて IgE エピトープを探索した。以上の検討には Lv に対する特異 IgE を含むいくらアレルギー患者の血清を用いた。

果実解析 モモ、化粧品用モモ葉エキス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ゲンが存在する

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。

C. 研究結果

発症抑制 脾臓において、 β -カロテン摂取+OVA 投与 3 時間は OVA 投与 3 時間群と比べて、KJ1-26⁺CD4⁺Foxp3⁺T 細胞 (OVA 特異的 Treg) の割合が増加した。PP において、 β -カロテン摂取+OVA 投与 1 時間群は OVA 投与 1 時間群と比べて Treg を誘導する樹状細胞として報告されている CD11c⁺B7-H1⁺細胞 (樹状細胞) の割合が増加した。また、脾臓において、 β -カロテン摂取のみで CD11c⁺B7-H1⁺細胞の割合は対照群と比べて有意に増加した。共培養 24 時間後の培地において、OVA 刺激によって全身免疫担当細胞である脾臓細胞から産生される TGF- β 量について、 β -カロテン摂取+OVA 投与群は OVA 投与群よりも高かった。

魚卵解析 (1) 競争 ELISA によって Lv と β' -c の IgE 反応には交差性が無いことを確認した。(2) β' -c と比べると、Lv の消化耐性は低く、ペプシン-トリプシンによって短時間で分解されることが判った。(3) cDNA クローニングによって 201 アミノ酸残基からなる 2 種類の Lv 軽鎖配列を演繹決定した。(4) 同定した Lv 軽鎖配列中に、患者血清中の IgE が反応する部位を 2カ所見いだした。これらは 10 アミノ酸残基からなっており、IgE エピトープを含むと判断した。

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。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。

D. 考察

発症抑制 β -カロテン強化食は腸管免疫系において、OVA 投与後の CD11c⁺B7-H1⁺細胞を誘導し、その細胞によって OVA 特異的 Treg が誘導され、全身免疫系に OVA に対する免疫寛容作用が伝達される可能性が示唆された。

魚卵解析 イムノブロットによる調査で

は、Lv に感作を受けたいくらアレルギー患者のほとんどが β' -c にも感作を受けていたが、本研究の結果から、両タンパク質に関する感作は独立して成立したものと判断できる。卵黄中の Lv 濃度が β' -c の 10 倍程度であるにもかかわらず Lv に感作している患者数は β' -c のそれよりも極めて少ない。Lv の消化耐性が β' -c ほど高くないことが両者のアレルギー性の差異に関与しているかもしれない。本研究では、一次構造情報に基づく合成ペプチドを用いて Lv 軽鎖上に 2 種類の IgE エピトープを見いだした。

果実解析 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。

E. 結論

発症抑制 β -カロテン強化食が腸管免疫系における制御性 T 細胞の分化誘導に影響を及ぼし、OVA 経口摂取後短時間で OVA の免疫寛容作用を誘導する可能性が示唆された。

魚卵解析 イムノブロットによる調査では、Lv に感作を受けたいくらアレルギー患者のほとんどが β' -c にも感作を受けていたが、本研究の結果から、両タンパク質に関する感作は独立して成立したものと判断できる。卵黄中の Lv 濃度が β' -c の 10 倍程度であるにもかかわらず Lv に感作している患者数は β' -c のそれよりも極めて少ない。Lv の消化耐性が β' -c ほど高くないことが両者のアレルギー性の差異に関与しているかもしれない。本研究では、一次構造情報に基づく合成ペプチドを用いて Lv 軽鎖上に 2 種類の IgE エピトープを見いだした。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 112) 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.*, 123, 1157-1162 (2009)
- 113) 穂山浩, 安達玲子, 手島玲子, 食物アレルギーについて, *都薬雑誌*, 31, 18-22 (2009)
- 114) Shimizu Y, Nakamura A, Kishimura H, Hara A, Watanabe K, Saeki H. Major allergen and its IgE cross-reactivity among salmonid fish roe allergy. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2314-2319 (2008)
- 115) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Morishita N, Matsumoto T, Urisu A, Enzyme-linked Immunosorbent assay kit for the determination of soybean protein in processed foods: interlaboratory evaluation, *J. AOAC int.*, 93, 243-248 (2010)
- 116) Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Teshima R. Japanese regulations and buckwheat detection, [Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists] edited by Bert Popping, John Wiley & Sons, Inc. (2010)
- 117) Sato Y., Akiyama H., Matsuoka H., Sakata K., Nakamura R., Ishikawa S., Inakuma T., Totsuka M., Sugita-Konishi Y., Ebisawa M., Teshima R., *J Agric Food Chem.*, 58, 7180-7186 (2010)
- 118) Abbott M., Hayward S., Ross W., Godefroy S.B, Ulberth F., Van Hengel A.J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeung J.M, Wehling P, Taylor S.L, Poms R.E, Delahaut P., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices, *J. AOAC Int.*, 93, 442-450 (2010)
- 119) 清木興介, 織田浩司, 柴原裕亮, 蒲生玲子, 有馬優美, 酒井信夫, 中村厚, 安達玲子, 塩見一雄, 穂山浩, 手島玲子, 加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討, *食品衛生学雑誌*, 51, 133-138 (2010)
- 120) Sakai S., Adachi R., Akiyama H., Teshima R., Doi H., Shibata H., Determination of walnut protein in processed foods by enzyme-linked immunosorbent assay interlaboratory study, *J AOAC Int.*, 93, 1255-1261 (2010)
- 121) Sakai Y., Ishihata K., Nakano S., Yamada T., Yano T., Uchida K., Nakao Y., Urisu A., Adachi R., Teshima R., Akiyama H., Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction, *J Agric Food Chem.*, 58, 8145-8151 (2010)
- 122) Nakamura K., Fujioka S., Fukumoto S., Inoue N., Sakamoto K., Hirata H., Kido Y., Yabu Y., Suzuki T., Watanabe Y., Saimoto H., Akiyama H., Kita K., Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies, *Parasitology International*, 59, 560-564 (2010)
- 123) Akiyama H., Imai T., Ebisawa M., Japan Food Allergen Labeling Regulation - History and Evaluation, *Adv. Food Nutr. Res.*, 62, 139-171 (2011)
- 124) 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)
- 125) 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)
- 126) 前田修子, 猪又直子, 守田亜希子, 桐野実緒, 森山達哉, 池澤善郎, 「モモの ImmunoCAP が陰性であった, モモによるアナフィラキシーの2例: rPru p 1, 3, 4 を含めた抗原解析」 *アレルギー*, 58, 140-147 (2009)
- 127) 福本 毅, 足立厚子, 上野充彦, 西谷奈生, 藤原規広, 佐々木祥人, 薄木晶子, 日下部圭吾, 田中 昭, 森山達哉 「モモアレルギー原因抗原の検討: モモによるアナフィラキシーショック例とモモを含む多種の果物に対する口腔アレルギー症候群例との比較」 *Journal of environmental dermatology and cutaneous allergology*, 3, 23-31 (2009)
- 128) 石川博康, 熊野高行, 角田孝彦, 森山達哉 「牛蒡アレルギーの同定」 *日本皮膚科学会雑誌* 120, 2219-2222 (2010)
- 129) 小川 正, 森山達哉 「食物アレルギーの現状と対策-大豆アレルギー除去食品の創出と流通機構の構築」 *生活衛生*, 54, 93-105 (2010)
- 130) 森山達哉, 小川 正 「食物アレルギーの多様性とそのリスク低減化戦略」 *食品工業*, 53, 75-87 (2010)
- 131) 森山達哉 「最新の食物アレルギー事情とその多様性-新規な食物アレルギーを中心に」 *食品と科学*, 53, 65-71 (2011)
- 132) 森山達哉, 小川 正 「低アレルギー化大豆加工食品の開発」 (免疫機能性食品の基礎と応用) シーエムシー出版 (2010)
- 133) 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)
- 134) 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)
- 135) 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)
- 136) 森山達哉「大豆アレルゲンの多様性と味噌の低アレルゲン性の検証」日本醸造協会誌 (Journal of the Brewing society of Japan), 106, 645-655 (2011)
- 137) 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)
- 138) 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)
- 139) 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会誌, 15, 70-75 (2011)
- 140) 森山達哉, 「各種大豆加工食品のアレルゲンリスク評価」, フードジャーナル, 2012 年 1 月号, p. 55 (2012)
- 141) シロザケ卵アレルゲンタンパク質間の抗原交差性, 前田絢子, 清水 裕, 岸村栄毅, 渡辺一彦, 原彰彦佐伯宏樹, 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 講演要旨集 p. 90 (2010)
2. 学会発表
- 101) Akiyama H., The Regulatory Situation in Japan - Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food -, Sixth Workshop on Food Allergen Methodologies (2010. 5)
- 102) Akiyama, H., Japanese Food Allergen Labeling, Seminar on Food Allergen : Opportunities and Challenges for Thai Food Industries (2010. 11)
- 103) 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)
- 104) 森山達哉「食物アレルギーの謎に挑む～抗原解析から低アレルゲン食品の開発まで～」東海皮膚アレルギー研究会特別講演 (名古屋) (2009. 2)
- 105) 原田 晋, 森山達哉, 田中 昭, 「おぼろ豆腐や湯葉摂取時のみ症状を認めた豆腐アレルギーの 1 例 : 豆腐と豆乳の抗原性に関する考察と共に」(MS3 アレルギー性疾患に関する症例報告等(救急医療も含む), ミニシンポジウム 3, 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会) (岐阜) (2009. 5)
- 106) 森山達哉「最近の食物アレルギー事情～花粉症などとの交差反応性に伴う食物アレルギーとアレルゲンを中心に～」(社)大阪生活衛生協会 公開講座 (大阪) (2009. 10)
- 107) 末森祐輔, 中村麻里子, 矢野えりか, 森山達哉, 河村幸雄「大豆中の花粉症関連アレルゲン (Glym3, Glym4) のクローニングと特性解析」2009 年度第 48 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (京都) (2009. 1 1)
- 108) 森山達哉「OAS を中心とした食物アレルギーについて～原因抗原の探索からリスク低減化戦略まで～」第 12 回岐阜臨床皮膚科懇話会 (岐阜) (2010. 1)
- 109) 森山達哉「OAS を中心とした食物アレルギーについて～原因抗原の探索からリスク低減化戦略まで～」第 9 回愛知免疫アレルギーを語る会 (名古屋) (2010. 2)
- 110) 末森祐輔, 中村麻里子, 矢野えりか, 森山達哉, 河村幸雄「大豆中の花粉症関連食物アレルゲン Glym3, Glym4 のクローニングと特性解析」日本農芸化学会 2010 年大会 (東京) (2010. 3)
- 111) 足立厚子, 井上友介, 金澤典子, 松尾正文, 佐々木祥人, 森山達哉「大豆アレルギーにおける大豆プロフィリン Gly m 3 の関与について」第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (京都) (2010. 4)
- 112) 原田 晋, 森山 達哉, 柳原 美弥子, 田中 昭「初回摂取時に症状発現を認めたローヤルゼリーアレルギーの 2 例」第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (京都) (2010. 4)
- 113) 末森祐輔, 近重順帆, 矢野えりか, 村瀬 浩, 水野雅敏, 森山達哉, 河村幸雄「大豆クラス 2 食物アレルゲン Glym3 の多様性と特性解析」2010 年度 日本農芸化学会 関西支部大会 (奈良) (2010. 10)
- 114) 森山達哉「味噌の低アレルゲン性と健康機能性の実証—発酵大豆食品の優れた健康効果の最新の研究結果—」みそ健康づくり委員会 第 32 回マスコミセミナー (東京) (2010. 11)
- 115) 森山達哉「食物アレルギー最新事情」(「食育」について考えるセミナー「いま、捉え直す食育」) 日本栄養士会等主催 (大阪) (2011. 2)
- 116) 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)
- 117) 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)
- 118) 森山達哉 : 日本醸造協会主催 醸造調味食品研究会「醸造食品の低アレルゲン性の検証 穀物アレルギーの最近の話題も含めて」(東京) (2011. 7)
- 119) 松井佐起, 北場 俊, 荒瀬則子, 室田浩之, 片山一朗, 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)
- 120) 末森祐輔, 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 : 「新規大豆アレルゲン 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
- 1) Lv 軽鎖遺伝子の DDBJ 登録. Accession No. : AB698505 および AB698506
- 2) 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リポソームに 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。食物抗原をオリゴマンノースを結合させたリポソームに封入して経鼻粘膜投与する方法は、調節作用を持つ CD8 陽性 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。

A. 研究目的

乳幼児期の食物アレルギーの多くは成長とともにアウトグロウすることが知られている。こ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が試みられている。

我々のこれまでの研究から、抗原感作が成立した状態でも、即時型下痢症状を抑制する CD8 陽性 T 細胞が、抗原感作マウスの脾臓中に存在すると考えられた。そこで、この抑制機能を持つ CD8 陽性 T 細胞を *in vivo* で誘導する食物アレルギーの新規治療法を検討した。

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) の方法に準じ 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。

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、抗原が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 OVA を封入し、投与する方法を検討した。

抗原感作マウスに OVA-OML を 5 日間連続鼻腔粘膜投与し、最終投与 3 日目から OVA 経口チャレンジを行い誘発される即時型下痢症状を観察した。OVA-OML 投与による抗原特異的 Ig 値の変化、腸管洗浄液中の抗原特異的 IgA 値、腸間膜リンパ球の発現マーカーを解析した。また、OVA-OML を点鼻投与後、OVA 経口チャレンジを行ったマウスの腸管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、経口チャレンジにより誘発される即時型下痢症状を検討した。

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 投与の抑制効果

OVA-OML 非投与群では、OVA 経口チャレンジ 2 回目から即時型下痢症状を呈するようになるが、OVA-OML 点鼻群では、即時型下痢症状の発現が抑制された。OVA の代わりにオボムコイドに対する感作を成立させたマウスに OVA-OML 点鼻投与を行った後、オボムコイドを経口チャレンジした場合には即時型下痢症状は抑制されなかった。

一方、OVA-OML を皮下、あるいは腹腔投与した場合には即時型下痢症状の抑制効果は認められなかった。

OVA をオリゴマンノース非標識のリポソームに封入した場合や、OVA をリポソームに封入せず

に PBS 溶液として点鼻投与した場合には、抑制効果は認められなかった。

2) OVA 特異的抗体価に及ぼす影響

OVA 経口チャレンジ前の OVA 特異的 IgE、IgG1、IgG2a 抗体価は、OVA-OML 点鼻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 特異的 IgE、IgG1、IgG2a 抗体価は両群とも上昇したが、OVA-OML 点鼻群では非投与群に比べ OVA 特異的 IgE の上昇が抑制されるのに対し、OVA 特異的 IgG1 の上昇は亢進していた。また、腸管洗浄液中の OVA 特異的 IgA 値が、OVA-OML 点鼻群で高値を示した。

2) OVA 特異的抗体価に及ぼす影響

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

3) 腸間膜リンパ節リンパ球分画に及ぼす影響

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間膜リンパ節単核細胞を分離し、制御性 T 細胞のマーカーの発現を解析した。その結果、OVA-OML 点鼻群では 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。CD122 陽性 CD8 陽性 T 細胞や CD103 陽性 CD4 陽性細胞の割合には有意な差を認めなかった。

4) 腸管膜リンパ節 CD8 陽性 T 細胞輸注による即時型下痢症状の抑制効果

OVA-OML 点鼻マウスから分離した CD8 陽性 T 細胞を輸注した群では即時型下痢症状が抑制されたが、非投与マウスから分離した CD8 陽性 T 細胞を輸注した群では抑制効果は認めなかった。OVA 経口チャレンジによる OVA 特異的 IgE 値の上昇は、CD8 陽性 T 細胞の輸注によっても抑制されたが、腸管洗浄液中の OVA 特異的 IgA 値の有意な上昇は認められなかった。

OVA-OML 点鼻群から分離した CD8 陽性 CD28 陽性と CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞を感作マウスに輸注すると、CD8 陽性 CD28 陰性 T 細胞輸注群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 陽性 T 細胞輸注群には、抑制傾向をわずかに認めるのみだった。

D. 考察

OML 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。

OML に封入した抗原以外の抗原に対しては、抑制効果が認められなかったことより治療効果は抗原特異的であると考えられた。また、抑制効果の獲得にはマンノース標識を加えることと、その投与経路が重要と考えられた。

OML 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。腸間膜リンパ節中に増加した 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、OML 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に機能していると考えられた。

E. 結論

抗原封入マンノース結合リポソ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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 142) 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)
- 143) 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)
- 144) 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)
- 145) 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)
- 146) 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)

- 147) 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 31:381-385 (2011)
- 148) 大嶋勇成 抗アレルギー薬 新薬展望 2011 47:241-246(2011)
- 149) 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)
- 150) Ohshima Y Roles of regulatory T cells in oral tolerance and food allergy. Regulatory T cells edited by Hayashi RS (2011)
- 151) 大嶋勇成 食物アレルギーと腸管免疫 小児科診療 73:1093-1098 (2010)
- 152) 大嶋勇成 食物アレルギーの治癒機序 アレルギー・免疫 17:1023-1028 (2010)
- 153) 安富素子、大嶋勇成、眞弓光文 内分泌攪乱物質とアレルギー臨床免疫・アレルギー科 53:69-73 (2010)
- 154) Yamada A, Ohshima Y, Yasutomi M, Ogura K, Tokuriki S, Naiki H, Mayumi M. Antigen-primed splenic CD8+ T cells impede the development of oral antigen-induced allergic diarrhea. J Allergy Clin Immunol 123:888-94 (2009)
- 155) 大嶋勇成 衛生仮説 2009 小児科診療 72:1219-1224 (2009)
2. 学会発表
- 121) 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 Respiriology and Immunology 2011.10.28-30 Fukuoka
- 122) 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
- 123) 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
- 124) 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
- 125) 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 2011.5.14-15 幕張
- 126) Ohshima Y, Yasutomi M, Shirasaki H, Kawakita A, Mayumi M Intranasal administration of antigen entrapped into oligomannose-coated liposome impedes development of oral antigen-induced allergic diarrhea. 14th International Congress of Immunology 2010.8.22-27 Kobe
- 127) 大嶋勇成、安富素子 ワークショップ:動物モデルによる病態解明の進歩:食物アレルギーモデルを用いた食物アレルギー耐性獲得機序の解析 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010.11.25-27 東京
- 128) 大嶋勇成 食物アレルギーの耐性獲得機序と免疫療法の今後 第 19 回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 2011.2.12
- 129) 大嶋勇成 食物アレルギーの耐性獲得機序と耐性誘導の試み 第 7 回京都臨床アレルギー研究会 2011.3.8 京都
- 130) 大嶋勇成 シンポジウム IgE を介した即時型反応の意義 再考 調節性 T 細胞と即時型反応 第 46 回日本小児アレルギー学会 2009.12.5,6 福岡
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし