

201126017A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療総合研究事業

食物アレルギーにおける経口免疫療法の確立と  
治癒メカニズムの解明に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩田 力

平成24（2012）年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 食物アレルギーにおける経口免疫療法の確立と治癒メカニズムの解明に関する研究  
岩田 力 \_\_\_\_\_ 3

### II. 分担研究報告

1. 経口免疫療法における好塩基球活性化反応の定量に関する研究  
藤澤 隆夫 \_\_\_\_\_ 1 5
2. 食物アレルギーにおける経口免疫療法の確立と治癒メカニズムの解明に関する研究  
竹森 利忠 \_\_\_\_\_ 1 9
3. 経口免疫療法の安全性確立  
荒川 浩一 \_\_\_\_\_ 2 3
4. ガラクトマンナン修飾による食物アレルギーの低アレルギー化に関する研究  
下条 直樹 \_\_\_\_\_ 2 9
5. 急速経口免疫療法の副反応としてのアナフィラキシー発現予知マーカーに関する検討  
吉原 重美 \_\_\_\_\_ 3 3
6. 牛乳急速経口免疫療法における好塩基球ヒスタミン遊離反応の解析  
伊藤 節子 \_\_\_\_\_ 3 7
7. 牛乳アレルギーに対する 急速経口免疫療法（多施設共同ランダム化比較試験）の  
プロトコールと症例登録状況  
五十嵐 隆 \_\_\_\_\_ 4 1
8. 口腔アレルギー症候群と考えられるピーナッツアレルギーのImmunoCAP ISACによる  
感作状況と交差反応性についての検討  
北林 耐 \_\_\_\_\_ 4 5
9. 免疫学的機序解明研究：鶏卵アレルギーにおける特異抗体解析  
松田 幹 \_\_\_\_\_ 4 9
10. 経口免疫療法における唾液、血液中の食物アレルギー特異免疫グロブリン測定の意義  
に関する研究  
木戸 博 \_\_\_\_\_ 5 3

# I. 総括研究報告書

# 食物アレルギーにおける経口免疫療法の確立と治癒メカニズムの解明に関する研究

## 総括研究報告書

### 研究代表者

岩田 力

国立病院機構三重病院臨床研究部研究員／東京家政大学家政学部児童学科教授

### 研究分担者

藤澤隆夫 国立病院機構三重病院臨床研究部長

下条直樹 千葉大学大学院医学研究院小児病態学准教授

竹森利忠 理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫記憶研究グループ  
グループディレクター

荒川浩一 群馬大学大学院医学系 研究科小児科学教授

吉原重美 獨協医科大学医学部小児科学准教授

伊藤節子 同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科教授

五十嵐 隆 東京大学大学院医学系研究科小児科学教授

北林 耐 国際医療福祉大学臨床医学研究センター教授、山王病院小児科部長

松田 幹 名古屋大学大学院生命農学研究科教授

木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター応用酵素疾患代謝研究部門教授

### 研究協力者

足立雄一 富山大学医学部小児科講師

亀田 誠 大阪府立呼吸器アレルギー医療センター小児科 部長

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 部長

星岡 明 千葉県こども病院 診療部長

鈴木修一 国立下志津病院小児科

井上祐三朗 千葉大学大学院医学研究院小児病態学医員

斎藤博久 成育医療センター研究所 副所長

伊藤 直香 東京大学医学部小児科 大学院生

長尾みづほ 国立病院機構三重病院臨床研究部

### 研究要旨

食物アレルギーの疾病負担は大きいですが、根本的治療法は確立されておらず、期待される経口免疫療法の報告も臨床試験としてのエビデンスレベルの低いものが多く、有効性と安全性は未確立である。本研究では我が国初のランダム化比較試験により経口免疫療法を安全性と有効性を兼ね備えた新規根本療法として確立すること、その機序の解明を目的とした。

鶏卵および牛乳アレルギー患者を対象に、二重盲検経口負荷試験で閾値確認後、当該食品を1日数回の摂取で、閾値以下の量から漸増、鶏卵1個、牛乳200mlまで到達させる急速

免疫療法と同量の摂取を継続する維持療法を行った。科学性担保のためランダム化比較試験としたが、倫理的配慮で除去食を継続の対照群は3ヶ月の時点で治療群と比較した後に治療開始するDelayed control形式をとった。主要評価項目は、割付け3ヶ月後の負荷試験における誘発閾値とした。二次評価項目は割付け3ヶ月後の皮膚反応、アレルゲン特異的IgE, IgG, IgG4, IgA抗体、好塩基球活性化、QOLとした。さらに、維持療法1年後で2週以上の除去期間において負荷試験を行い、耐性獲得の有無を判定した。免疫学的機序解明のため治療前後で有核細胞を凍結保存、T細胞のマイクロアレイ解析を行うこととした。

その結果、鶏卵試験は45例が登録された(治療群23例、対照群22例)。主要評価項目である3ヶ月後の負荷試験閾値は治療群で有意に上昇、対照群は不変であった。特異的IgG, IgG4, IgA抗体は治療群で有意に上昇、対照群は不変、特異IgE抗体、抗原刺激好塩基球活性化は治療群でのみ有意に低下した。QOLも治療群のみ有意に改善した。摂取閾値の上昇は経口免疫療法によって食物アレルギーを治癒の方向に導いたことを意味するが、これにともない実際にQOLも改善したことは意義深い。免疫学的パラメーターの変化も臨床効果を裏付けるものであった。1年後の耐性確認の負荷試験では51%で改善した閾値が維持された。すなわち、少なくとも半数には耐性誘導も可能であることが示された。一方、副反応による脱落例は5例であり、治療不応因子の解明が必要と考えられた。牛乳試験は26例まで登録、試験継続中である。

鶏卵アレルギーに対して我が国初のランダム化比較試験による経口免疫療法を行い、有効性と免疫学的機序の一部を明らかにした。しかし、副反応は存在するため、安全性の確立にはさらなる検討が必要である。

## A 研究目的

食物アレルギーは、小児において頻度が高く、近年、増加傾向にある。現在の治療管理の基本は正確な診断にもとづくアレルゲン除去食に加え、誤食で誘発されるアナフィラキシーの予防と適切な対症療法である。多くの例は学齢期までに寛解(耐性獲得)するが、最近では年長に至っても持続する例が増えている。食物アレルギーは、アレルゲン除去という困難な食事制限、不測のアナフィラキシーのリスクなど患者とその家族にとって少なからぬ身体的、精神的、経済的な負担となっている。このような疾患に対して、根本的な治療法の確立は急務の課題である。近年、散発的に、経口免疫療法が試みられ、一定の効果をあげるとの報告はあるが、エビデンスレベルの高いものは少なく、普遍的な治療法の確立には至っていない。本研究では、ランダム化比較試験(Randomized controlled trial: RCT)によって、急速経口免疫療法(rush oral immunotherapy: rush OIT)の有効性と安全性を科学的に検証するとともに、経

時的に得られる臨床検体の多面的解析で、食物アレルギーの治癒メカニズムを解明することを目的とした。

## B 研究方法

1. 鶏卵および牛乳アレルギーに対する急速経口免疫療法:多施設 RCT(岩田、藤澤、下条、五十嵐、臨床研究参加施設)

初年度は鶏卵アレルギーに対する試験を開始して、目標症例の登録を完了したので、本年度は鶏卵アレルギーの維持療法期の治療を継続するとともに、鶏卵アレルギー試験で得られた安全性情報に基づき、牛乳アレルギーに対する改訂プロトコルを作成、登録を開始した。

対象は、5歳以上15歳以下の鶏卵または牛乳アレルギー患者で、二重盲検負荷試験により確定診断を行ない、文書による説明で同意を得られた者である。

登録後、ランダム化割付にて、直ちに経口免疫療

法を行なう治療群と除去食を継続する対照群に分け、一次評価項目 (primary endpoint) は割付 3 ヶ月後の負荷試験閾値とした。対照群も一次評価ポイントの後に治療を開始する delayed control trial デザインをとったことより、二次評価項目は全例をあわせた治療前後の変化 (負荷試験閾値、皮膚反応、免疫学的パラメーター) とした。治療スケジュールは、まず入院にて閾値以下の量から連日 3~5 回、漸増して、鶏卵または牛乳を経口摂取、鶏卵は 1 個 60g、牛乳は 200ml の目標量に到達させる急速期、続いて自宅にて維持量の摂取を継続する維持期からなる。さらに、安全性の確立をめざして、負荷試験及び免疫療法中に起こったアナフィラキシーを含む副反応の臨床的解析を行なった。

さらに、維持療法 1 年後に 2 週間以上の再度の除去期間を設け、その後、二重盲検負荷試験を行うことにより、継続摂取により閾値が保たれている「減感作」と、継続摂取を中止しても閾値が変化しない「耐性」を判定した。(図 1)

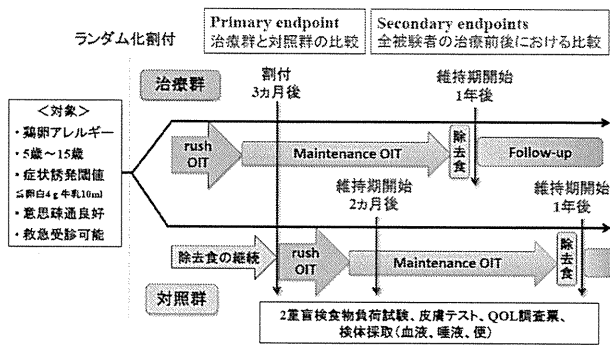


図 1 経口免疫療法プロトコール (RCT)

## 2. 免疫学的機序の解明

採取された臨床検体 (末梢血液 (血清・有核細胞)、唾液等) を用いて、以下の検討を行なった。

- 1) 特異抗体の解析 (木戸、下条、松田、藤澤、竹森、北林)
- 2) 好塩基球機能の解析 (藤澤、伊藤)
- 3) 細胞性免疫の解析 (竹森、下条)
- 4) アナフィラキシー発現予知マーカーの探索 (吉原)

## 3. より安全な経口免疫療法の確立に向けた検討

ガラクトマンナン修飾による食物アレルゲンの低アレルゲン化 (下条)

## C 研究結果

### 1. 鶏卵アレルギーに対する経口免疫療法

目標 40 例に対して、45 例を登録、23 例を治療群、22 例を対照群に割付、治療を開始した。3 ヶ月後、治療群は 20 例 (87%) が鶏卵 1 個 (60g) の維持摂取に到達 (3 例は副反応で中止)、負荷試験閾値は治療群ですべて上昇したのに対して、対照群 20 例 (1 例が同意撤回、1 例は負荷試験副反応で中止) では有意な変化が認められなかった。

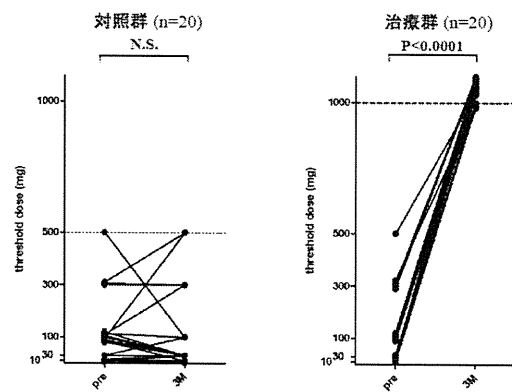


図 1 登録時と 3 ヶ月後の負荷試験閾値

皮膚反応も治療群で有意に低下、対照群では変化はなかった。血清中のアレルゲン特異 IgG、IgG4、IgA 抗体は治療群において有意に上昇、特異 IgE 抗体は低下した。その後、対照群も治療を行ない、全体として 39 例 (91%) が維持量に到達、平均所要日数は 16 日であった。到達した維持量は 60g 以上が 81%、40-50g が 9% であった。維持量到達後に 1 例が副反応で中止となったが、現在 38 例が治療継続中である。

急速期における副反応の頻度は全摂取回数 の平均 67 回に対して、平均 22 回 (30%) であった。多くは軽症で、適切な対症療法にて軽快した。各摂取に対する重症度別の頻度は、咽頭の違和感、軽度の蕁麻疹などの Grade 1 が 12.7%、広範囲の蕁麻疹、軽度の腹痛、咳などの Grade 2 が 14.3%、強めの腹痛、嘔吐、喘鳴などの Grade 3 は 2.6%、血圧低下などの Grade 4 は 0.1% で、意識消失をとまらぬ Grade 5 は 0.05% であった。

試験中止は、登録時の二重盲検負荷試験でGrade5のアナフィラキシーを起こした2例(いずれも後遺症なく回復)、急速期にGrade5を生じた1例(後遺症なく回復)、急速期にアレルギー腸炎を生じた2例、被検者より中止希望のあった1例、維持期に誘発症状を反復した1例、同意撤回の1例の計8例である。試験継続38例と副反応により中止した5例の間において、登録時年齢、登録時負荷試験誘発症状、閾値では差を認めなかったが、登録時卵白特異的IgE抗体価が中止例で有意に高値であった(中央値25.5 vs. 86.4UA/ml, p=0.004)。

ことによって、同様に改善が認められた(図8)。

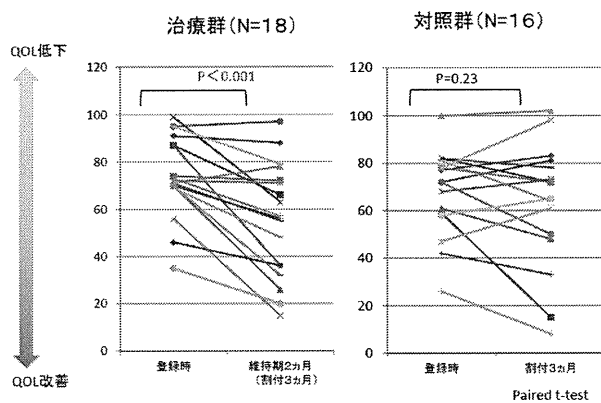


図7 登録時と割り付け3ヶ月後のQOLの変化

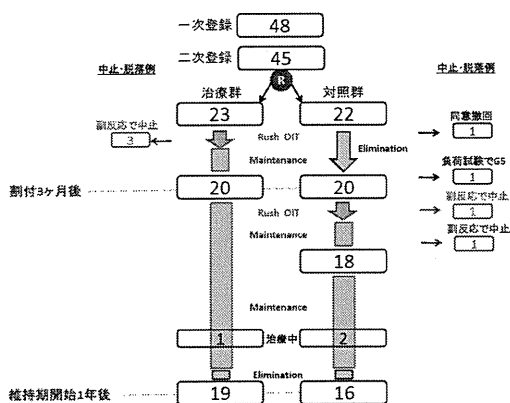


図3 鶏卵症例の治療経過

治療1年での耐性確認試験には35例が到達、うち18例(51%)は閾値の低下がなく、耐性獲得と判断された。

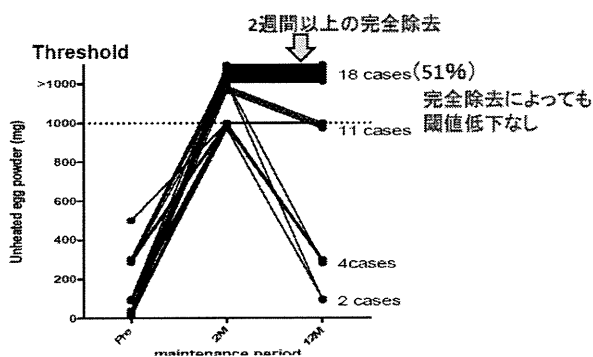


図4 登録時、維持2ヶ月後、1年後の負荷試験閾値(1年後の負荷試験前には2週間以上の除去期間あり)

QOLも免疫療法によって、治療群で有意に改善、対照群では有意に変化しないことが明らかとなった(図7)。対照群もその後治療を開始する

対照群(N=16)

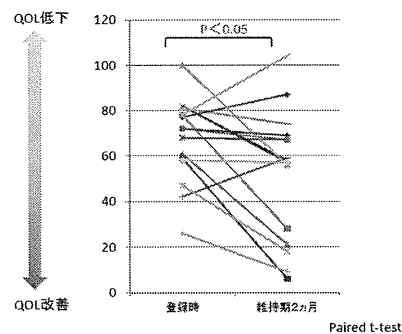


図8 対照群における治療前後のQOLの変化

## 2. 牛乳アレルギーに対する経口免疫療法

より安全な免疫療法確立のため、プロトコール改訂のために、まず牛乳アレルギーのリスクについての報告を収集した。また、鶏卵アレルギー本試験での、食物負荷試験、急速免疫療法期、維持期それぞれの誘発症状を解析した。その結果としてのプロトコール改訂点は以下の通りとなった。

- 1) 誘発症状の判定基準 (Grade1~5) をより具体的かつ広範囲にわたって記載するため、フェイススケールを新たに設けるなど、多彩な症状においても対応できることとした
- 2) 誘発症状のGradeに対する対応方法をより詳細に規定するとともに、24時間365日対応の連絡先を設け、アドレナリン使用時は研究本部へ報告を行うなど、いつでも早急に本部に直接連絡・相談して最適な対応を行うことのできるシステムとする
- 3) 1日の摂取回数や摂取量を減らし、1日の摂取回数を最大で3回までとし、1日の合計摂取量

の上限を 200 ml と規定した。 4) 牛乳アレルギーのリスクについての報告では、他の食品と比べ、食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FEIAn) などの重篤な誘発症状を生じやすいという報告が多くみられたことより、退院前には、病院内で医師の管理のもと、運動・入浴負荷試験を行い、自宅で FEIAn が起こるリスクを最小限とすることとした。これら改訂による牛乳アレルギー症例用プロトコールは 23 年 7 月に完成、23 年 7 月末より牛乳アレルギー症例のエントリーを開始した。

24 年 3 月現在、9 施設から症例登録され、二次登録症例数は 25 症例 (目標数 40 症例) に達し、13 症例が治療群に、12 症例が対照群に割り付けられた。現在も、順調に登録が進行中である。

## 2. 免疫学的奏功機序の検討

免疫学的メカニズムでは、免疫療法により、特異的 IgE 抗体は経時的に有意に低下、一方、抗原特異的 IgG4 抗体は急速免疫療法期直後より有意に上昇、その後も経時的に 1 年まで上昇を続けた (図 5)。

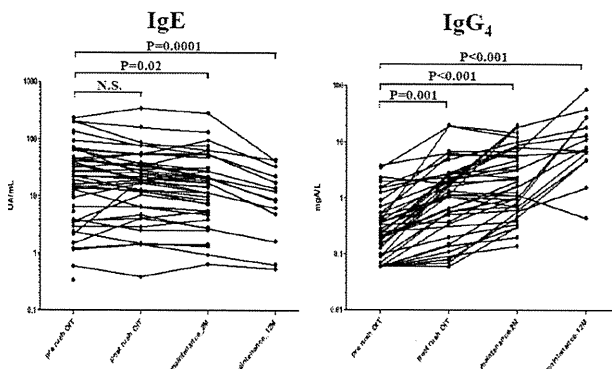


図 5 オボムコイド特異的 IgE および IgG4 抗体価推移

抗原刺激による好塩基球活性化マーカー CD203c の発現も経時的に有意に低下した (図 6)。

以上、免疫療法により、即時型反応経路である IgE と好塩基球反応が抑制され、耐性のメカニズムの一つと考えられる阻止抗体の IgG4 が誘導されることが明らかとなった。

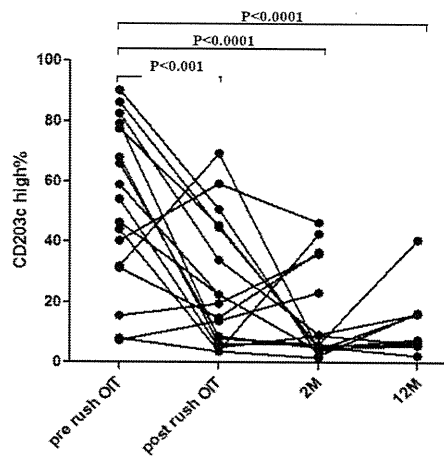


図 6 卵白抗原による好塩基球 CD203c 発現の変化

木戸らは diamond-like carbon (DLC)-chip による高感度の特異抗体検出法を開発、鶏卵アレルギーコンポーネント別の抗体変動を測定し、IgG4 抗体変化の程度が治療反応性と関連する可能性を示した。松田は オボムコイドの C-末端フラグメント (ドメイン 3) の分子解析を行い、糖鎖が付加された OM-D3-CHO と付加されていない OM-D3 に対する IgE 抗体価をそれぞれ測定、耐性獲得例は OM-D3 特異 IgE がより低値であり、耐性のマーカーとなりえるとした。さらに、竹森は従来法よりも正確に血中特異 IgE 抗体を測定できる capture 法を確立、卵白アルブミン特異 IgE 抗体が治療 1 年後の長期維持期で著明に低下することを見出した。Immuno Solid-phase Allergen Chip を用いたアレルギーコンポーネント抗体測定の有用性についても検討した (北林)。

もうひとつの好塩基球活性化評価指標として、既存の HRT シオノギ®キットを改良したヒスタミン遊離試験 (HRT) も開発した (伊藤)。基礎検討において、耐性獲得患者で有意に低下することを確認したので、牛乳アレルギーに対する経口免疫療法で治療反応性に一致した変化、すなわち、有効例における有意な反応性低下、治療不応例における反応の不変または上昇である。

細胞性免疫については、治療前後における末梢血中の調節性 T 細胞 (Treg) の動態を明らかにする目的で、末梢血を卵白アルブミンあるいはオボムコイドで刺激培養し、Treg の特徴である



IL10/TGFbeta 産生細胞の頻度を ELISPOT 法ならびに FACS で測定する系を作成した(竹森、下条)。今後、保存検体の解析を開始する予定である。

副反応の新規余地マーカーの探索では、鶏卵摂取後のアナフィラキシー発現の有無と血清中トリプターゼ及び ECP の値との関連を調べた。鶏卵摂取前の血清中トリプターゼ値は、アナフィラキシーを呈した群において症状を発現しなかった対照群に比較して有意に高値であった。ECP 値に差はなかった。同一症例においても、アナフィラキシー症状発現時は非発現時に比してトリプターゼが高値であった。血清中トリプターゼ値がアナフィラキシー予知マーカーとなり得ることが示唆された(吉原)。

#### D 考察

本研究では、鶏卵アレルギーに対する急速経口免疫療法が臨床的に有効であることをわが国では初めての RCT で証明した。最近、食物アレルギーに対する経口免疫療法の試みは各地で始まったが、エビデンスレベルの高い RCT は少なく、本研究成果は厚生労働科学研究としてたいへん価値が高いと考える。本研究に参加した多くの症例で、それまで除去を強いられていた食品を摂取することが可能になったが、実際にその有益性は QOL の改善として定量化して明らかにすることもできた。

さらに、治療効果のレベルは、連日摂取を続けることで閾値が維持される「脱感作」と一定期間の除去の後でも閾値が低下しない「耐性」に分類することができるが、多くの例で脱感作を、半数に耐性を誘導可能であることも示した。

免疫学的変化についても、治療によって皮膚反応減弱、特異 IgG 抗体上昇、特異 IgE 抗体低下、好塩基球反応性低下が誘導されることを確認、新しい抗体解析法の開発や制御性 T 細胞の解析なども進めている。

しかしながら、治療用食品摂取によるアレルギー誘発症状(副反応)は、これまでの報告と同様、どうしても避けられない面があり、さらなる安全性の確立が必要である。実際に、本試験での副反応の多くは軽症で、適切な対応によってすべて回復したが、ア

ナフィラキシーショックやアレルギー性腸炎発症のため治療中止を余儀なくされた症例があったことも事実である。そこで、我々は経験した副反応の解析に基づき、牛乳アレルギーに対するプロトコルを改訂し、副反応予測マーカーの検索も行なった。また、より安全な治療法開発のため、IgE エピトープを被覆した低アレルゲン化食品の基礎検討も進めている。今後、食物アレルギーの新しい治療法確立に向けて、臨床と基礎を融合させた研究をさらに進める予定である。同様の臨床研究推進のためにハンドブック「食物アレルギー経口免疫療法の臨床研究を安全に進めるために」を出版することも予定している。

#### E 結論

小児の重症食物アレルギー(鶏卵・牛乳)に対する経口免疫療法の臨床効果を RCT で検証、免疫学的機序を探求した。

#### F 研究発表

##### 論文

- 1) 藤澤隆夫 食物アレルギー 今日の治療指針 2011 年版(山口徹、北原光夫、福井次矢編) p711-13, 2011 医学書院
- 2) 藤澤隆夫 食物アレルギーが疑われるとき 小児科診療 74:206-211, 2011
- 3) Suzuki K, Hiyoshi M, Tada H, Bando M, Ichioka T, Kamemura N and Kido H. Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins. *Analytica Chimica Acta*706: 321-327, 2011.
- 4) Kamemura N, Tada H, Shimojo N, Morita Y, Kohno Y, Ichioka T, Suzuki K, Kubota K, Hiyoshi M and Kido H. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray. *J. Allergy Clin*

- Immunol.* 2011, in press.
- 5) 長尾みづほ、藤澤隆夫, 【食物アレルギーに対する経口免疫療法】 国立病院機構三重病院での取り組み. アレルギーの臨床, 31(9): p. 782-786, 2011.
  - 6) 藤澤隆夫, 【アレルギー入門-メカニズム・病態・検査法を整理する-】 アレルギーをとりまく因子 アウトグロウ. Medical Technology, 39(12): p. 1301. 2011.
  - 7) 藤澤隆夫, 【子どもの臨床検査 症候から診断・治療へ】 疾患からみる臨床検査の進めかた 食物アレルギーが疑われるとき. 小児科診療, 74(増刊): p. 206-212. 2011.
  - 8) 徳田玲子 and 藤澤隆夫, 先端医学講座 果物・野菜アレルギーの診断のための好塩基球活性化マーカーCD203c 発現定量法. アレルギーの臨床, 31(13): p. 1174-1179. 2011.
  - 9) 長尾みづほ チーム医療で対応するアレルギー疾患 入院によるアレルギー疾患 診断・治療コースのシステム化 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌(1348-1215)9巻1号 p52-54(2011.05) 2011
  - 10) Torii, S., 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, 154(3): p. 236-45. 2011.
  - 11) Hosoki, K., et al., An 8-year-old boy with hypereosinophilic syndrome. Int Arch Allergy Immunol, 155 Suppl 1: p. 117-22. 2011.
  - 12) Hiraguchi, Y., et al., Inhibition of eosinophil activation mediated by a Toll-like receptor 7 ligand with a combination of procaterol and budesonide. Int Arch Allergy Immunol, 155 Suppl 1: p. 85-9. 2011.
  - 13) Hosoki, K., et al., Staphylococcus aureus directly activates eosinophils via platelet-activating factor receptor. J Leukoc Biol, 2012.
  - 14) 伊藤直香. 食物アレルギーの発症予防・早期介入. アレルギーの臨床 31(5); 38-43, 2011.
  - 15) 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
  - 16) 伊藤節子. 食物アレルギーと治療. 小児科 2011;52:175-82
  - 17) 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
  - 18) 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
  - 19) 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
  - 20) 伊藤節子. 卵アレルギー. 小林陽之助監修「保護者と学校の先生に伝えたい食物アレルギーの基礎知識」p.11-14 診断と治療社, 2011年4月
  - 21) 伊藤節子. 食物経口負荷試験により適切な診断・食事療法を行うことができた小児食物アレルギー症例. 田中清、松末智、本田佳子編「ケースで学ぶ栄養管理の思考プロセス第4巻」p.59-69、文光堂、2011年6月
  - 22) 小山晴美、荒川浩一. 特集 周産期のアレルギー -生後早期の問題と小児アレルギー疾患の発症- アトピー素因を持つ両親から出生した児に対する対応方法. 周産期医学 2011, 41:625-627.
  - 23) 荒川浩一. シンポジウム10 気管支喘息の発症・増悪を修飾する因子. 日本小児アレルギー学会誌 2011. 25:75-80.
  - 24) 荒川浩一. 小児アレルギー疾患の最近の話題 ~気管支喘息の発症・増悪を修飾する因子~. 鼻アレルギーフロンティア 2011, 11:18-23.

- 25) Nakajima N, Mochizuki H, Muramatsu R, Hagiwara S, Mizuno T, Arakawa H. Relationship between exhaled nitric oxide and small airway lung function in normal and asthmatic children. *Allergol Int.* 2011 60:53-9.
- 26) 荒川浩一. 第 57 回日本小児保健学会ランチョンセミナー 喘息児の Quality of Life 向上を目指して 学校のアレルギー疾患に対する取り組みガイドラインを含む. *小児保健研究* 2011, 70 (2) : 221-224.
- 学会発表
- 1) 中村典子, 一尾ゆい, 伊藤由香, 大市恵利, 二之夕紗希, 伊藤光代, 坪井奈巳, 長尾みづほ, 藤澤隆夫, 井口光正 食物アレルギーの積極的治療とその援助 経口免疫療法入院患児への疾患教育の工夫. *日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会*. 横浜 2011年6月4-5日
- 2) 長尾みづほ, et al., 食物アレルギーの積極的治療とその援助 魚アレルギー患者に対する急速経口免疫療法の試み. *日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会*. 横浜 2011年6月4-5日
- 3) 長尾みづほ, 井口光正, 谷田寿志, 細木興亜, 藤澤隆夫, 急速経口免疫療法を行った食物アレルギー患者の長期経過. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2011年11月10-12日
- 4) 徳田玲子, et al., 経皮感作による発症が疑われた食物アレルギーの2例 好塩基球 CD203c発現測定の有用性. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会、幕張2011年5月14-15日
- 5) 徳田玲子, 谷田寿志, 細木興亜, 平口雪子, 長尾みづほ, 藤澤隆夫, 小児期の果物・野菜アレルギーにおけるPanallergen特異IgE測定の意義 成人との比較. 第48回日本小児アレルギー学会、福岡、2011年10月28-30日
- 6) 徳田玲子, 長尾みづほ, 細木興亜, 谷田寿志, 平口雪子, 千貫祐子, 森田栄伸, 松田幹 and 藤澤隆夫, 小麦アレルギーの臨床表現型と抗原反応性に関する検討. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2011年11月10-12日
- 7) 平口雪子, 谷田寿志, 細木興亜, 長尾みづほ, 徳田玲子, 藤澤隆夫., 活性型ビタミン D(1, 25-dihydroxyvitamin D3, calcitriol) が好酸球に及ぼす作用. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2011年11月10-12日
- 8) 平口雪子, 徳田玲子, 藤澤隆夫, 末廣豊., 好塩基球活性化マーカーCD203c測定が有用であったBee Pollenによるアナフィラキシー. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会、幕張2011年5月14-15日
- 9) 伊藤直香, 下条直樹, 藤澤隆夫, 岩田力, J-OIT 研究グループ. 食物アレルギーに対する急速経口免疫療法: 多施設RCTの経過. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会、2011年5月14日
- 10) 伊藤直香, 下条直樹, 藤澤隆夫, 岩田力, J-OIT 研究グループ. 食物アレルギーに対する急速経口免疫療法: 多施設RCTの経過. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、2011年11月12日
- 11) ITOH Naoka, KUNISAWA Jun, FUKUDA Shinji, KIYONO Hiroshi, OHNO Hiroshi. New food allergy model mice by cutaneous sensitization. 第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日
- 12) 伊藤直香. 食物アレルギーに対する経口免疫療法の確立と治癒メカニズムの解明. *日本臨床免疫学会 Midwinter Seminar 2012.* 2012年2月9日
- 13) 伊藤直香, 下条直樹, 藤澤隆夫, 岩田力, J-OIT 研究グループ. 多施設 RCT による急速経口免疫療法の検証. 第 12 回食物アレルギー研究会、2012年2月18日

- 14) 伊藤節子. アナフィラキシーの病態から見た予防と対策. 第8回京都小児救急疾患研究会. 京都国際ホテル, 2011年5月14日
- 15) 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. 幕張メッセ国際会議場 2011年5月15日
- 16) 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, 2011/6/14 Istanbul, Turkey
- 17) 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」、グランドプリンスホテル新高輪, 2011年8月12日
- 18) 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、福岡国際会議場, 2011年10月30日
- 19) 伊藤節子. 「食べること」を目指し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、グランドプリンスホテル新高輪, 2011年11月10日
- 20) 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、グランドプリンスホテル新高輪, 2011年11月12日
- 21) 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. 昭和大学上條講堂. 2012年2月18日
- 22) 荒川浩一. シンポジウム12 増加するアレルギー疾患への対策を考える 小児科医の立場から. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011年5月14～15日 千葉
- 23) 小山晴美、八木久子、石毛崇、荒川浩一、伊藤浩明、漢人直之、岩田力. ミニシンポジウム8-4 鶏卵の急速免疫療法中に腸管症状により治療継続困難となった2症例. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011年5月14～15日 千葉
- 24) 中嶋直樹、杉山幹雄、萩原里実、八木久子、村松礼子、小山晴美、森川昭廣、荒川浩一. ポスター5-7 6歳時のアトピー性皮膚炎発症に関わる因子の前方視的検討. 第48回日本小児アレルギー学会 2011年10月28～30日 福岡
- 25) 八木久子、小山晴美、中嶋直樹、石毛崇、萩原里実、小柳貴人、荒川浩一、金子真理、佐藤幸一郎. ポスター10-4 ミルクによる消化管アレルギーが蔓延した4歳女児に対する緩徐経口免疫療法. 第48回日本小児アレルギー学会 2011年10月28～30日 福岡
- 26) 石毛崇、龍城真衣子、宮沢麗子、八木久子、友政剛、荒川浩一. ポスター10-6 好酸球形胃腸炎に伴う十二指腸潰瘍の3小児例の検討. 第48回日本小児アレルギー学会 2011年10月28～30日 福岡
- 27) 村松礼子、萩原里実、荒川浩一. シンポジウム4-3 乳幼児喘息における呼気NO. 第48回日本小児アレルギー学会 2011年10月28～30日 福岡
- G 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
- 1 特許取得  
なし
  - 2 実用新案登録  
なし
  - 3 その他  
なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

# 食物アレルギーにおける経口免疫療法の確立と治癒メカニズムの解明に関する研究 分担研究報告書

## 経口免疫療法における好塩基球活性化反応の定量に関する研究

分担研究者 藤澤隆夫 (国立病院機構三重病院 臨床研究部長)

### 研究要旨

経口免疫療法の免疫学的奏功機序を明らかにするため、アレルギー反応の主要なエフェクター細胞である好塩基球の抗原特異的活性化反応を治療前後で測定した。活性化のマーカーとしては、抗原刺激による CD203c 発現を採用、フローサイトメトリーにて測定した。牛乳抽出抗原、主要アレルギーである  $\beta$ ラクトグロブリン、カゼインでそれぞれ刺激した。好塩基球 CD203c 発現はいずれの抗原においても免疫療法群で治療 3 ヶ月後に有意に低下、一方、対照群で有意な変化は認められなかった。以上より、好塩基球 CD203c 発現定量は経口免疫療法の治療反応性のマーカーとして有用であり、免疫療法奏功機序の一部であると考えられた。

### 研究協力者

長尾みづほ 国立病院機構三重病院臨床研究部

### A 研究目的

経口免疫療法の奏功機序については未だ不明の点が多いが、本治療の対象とする食物アレルギーは IgE を介する即時型反応を病態とするものであり、症状誘発に関わるエフェクター細胞である肥満細胞と好塩基球の変化が関与している可能性は高い。好塩基球は末梢血中での比率が少ないことから、これまでその機能についてはあまり知られていなかったが、最近では即時型アレルギー反応の中心的なエフェクターとして機能するのみならず、免疫反応の調節にも関わる事が明らかとされており、食物アレルギーにおいても中心的役割を果たすと考えられる。特に、経口免疫療法の奏効例ではアレルギー摂取により誘発される即時型反応が消失していることから、好塩基球の反応も低下していることは当然予想される。そこで、フローサイトメトリーを用いて、末梢血好塩基球を特異的にゲーティングして、抗原刺激により発現が増強する活性化分子 CD203c を定量、治療前後での変化を検討した。

### B 研究方法

対象：本研究に参加した牛乳アレルギー患者の内、登録時に加え、対照群であれば登録 3 ヶ月後、治療群であれば維持 2 ヶ月まで経過が進行している 23 名を対象とした。治療群は 11 名、対照群 12 名の採血結果を検討した。好塩基球 CD203c 発現定量：患者から得た EDTA 加全血に、牛乳抗原、主要アレルギーの蛋白と考えられているカゼイン、 $\beta$ ラクトグロブリンをそれぞれ添加、15 分間反応後、フローサイトメトリーで単核球中の CD3<sup>-</sup>, CRTH2<sup>+</sup> 分画を好塩基球として同定し、同分画の CD203c 発現を定量した。

### C 研究結果

それぞれの抗原刺激と陽性コントロールとした抗 IgE 抗体による CD203c 発現の治療前と 3 ヶ月後における変化を図 1, 2, 3, 4 に示す。

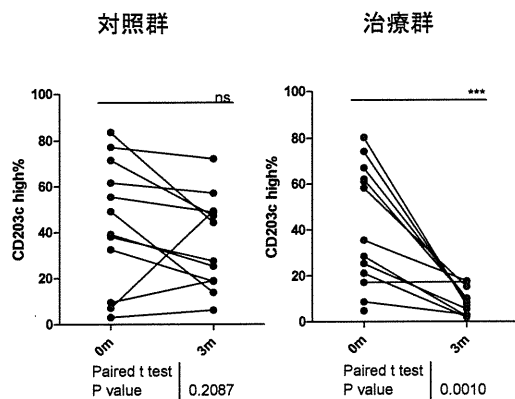


図1 牛乳抗原刺激による好塩基球 CD203c 発現 :治療前、治療3ヶ月後の比較

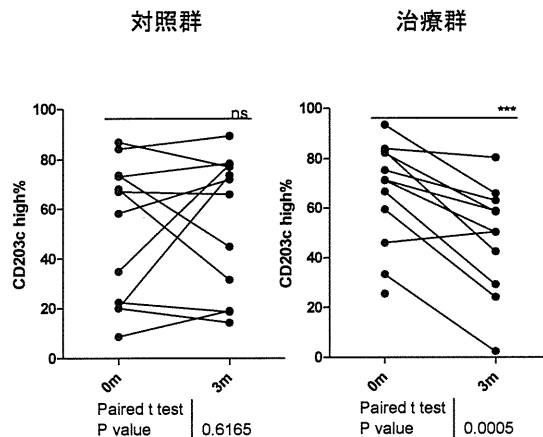


図4 抗IgE抗体刺激(陽性コントロール)による好塩基球 CD203c 発現:治療前、治療3ヶ月後の比較

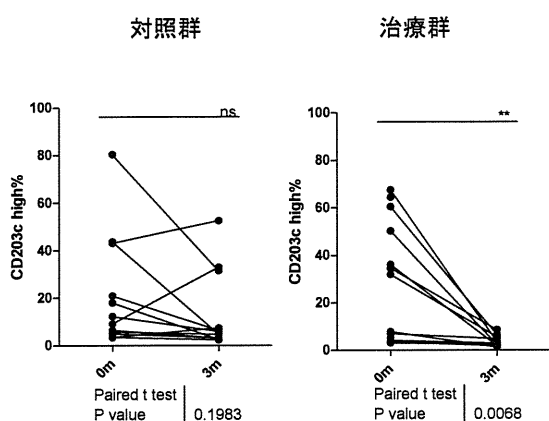


図2 BLG抗原刺激による好塩基球 CD203c 発現 :治療前、治療3ヶ月後の比較 (BLG;βラクトグロブリン)

図1に示すとおり、牛乳抗原によるCD203c発現は対照群では除去を継続した3ヶ月間の間に有意な変動はみられなかったが、治療群では治療前から3ヶ月後に有意に低下した。図2に示すβラクトグロブリン抗原によるCD203c発現も同様で、治療群のみで有意に低下した。図3にはカゼイン抗原刺激の反応を示すが、治療群で認められる3ヶ月後の低下は3抗原の中で有意差としては最も著明であったがβラクトグロブリンが3ヶ月で非常によく低下したのに比べ、カゼインでは低下はみられるものの、発現量としてはまだ高値であるものがみられた。図4には陽性コントロールである抗IgE抗体刺激の発現を示す。治療群では抗原特異的による反応と同様に治療前から3ヶ月後に有意に低下した。

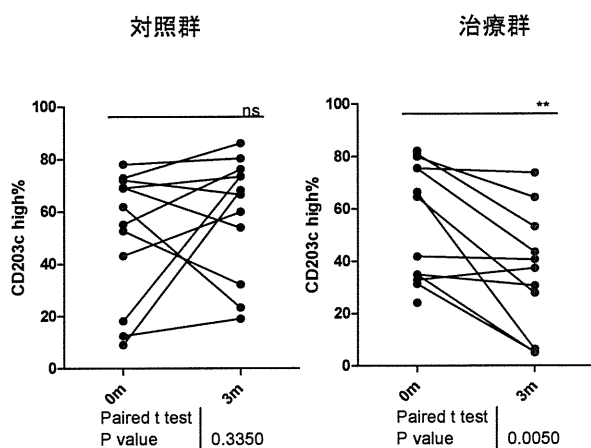


図3 カゼイン抗原刺激による好塩基球 CD203c 発現 :治療前、治療3ヶ月後の比較

#### D 考察

本研究では即時型反応の中心のエフェクターである好塩基球に着目して、抗原刺激で誘導される好塩基球特異的活性化マーカーCD203cをフローサイトメトリーによって定量した。その結果、抗原刺激後のCD203c発現は、治療により著明に低下することが明らかとなり、治療効果判定のマーカーとして応用できること、また経口免疫療法の治癒メカニズムの一部である可能性が示された。

CD203cは好塩基球に定常的に発現している分子であるが、アレルゲンによるIgE架橋に続く好

塩基球活性化のプロセスで、発現が増強される。私たちはこれまでCD203c発現定量が即時型食物アレルギーの診断に有用であることを報告してきた (Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kouno K, Morita E, Fujisawa T. Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int* 2009;58:193-199.)。すなわち、本テストにより経口負荷試験陽性を比較的高い感度、特異度で予測することが可能であるが、経口免疫療法において治療後に誘発症状が消失することとCD203c発現が低下することがよく一致すると言える。

また、今回、非特異的な抗IgE抗体の発現に関しても、治療群では有意に低下していることが明らかとなった。免疫療法の機序として、抗原非特異的な機序も関与していることが示唆された。

特異的抗原刺激では、βラクトグロブリンとカゼイン刺激の両方において有意に発現量の低下がみられたが、低下率には差がみられた。3ヶ月でβラクトグロブリンに関しては全例が10%未満の発現量までに低下したが、カゼインでは治療により低下しているものの発現量として高値であるものが多く存在した。牛乳の免疫療法は、鶏卵よりも急速期や維持期の誘発症状が多いことも示唆され、今後これらのコンポーネントの反応性の違いと予後との関係を検討していくことで、治療モニタリングの有用性が高まると考えられる。

## E 結論

抗原刺激と非特異的な刺激による好塩基球活性化 (CD203c 発現) は経口免疫療法後に有意に低下した。この反応は本治療の免疫学的モニタリングに有用であるとともに、奏功機序に示唆を与える有用な手法であると考えられた。

## F 研究発表

### 論文

1) 藤澤隆夫 食物アレルギー 今日の治療指

針 2011 年版 (山口徹、北原光夫、福井次矢編) p711-13, 2011 医学書院

- 2) 藤澤隆夫 食物アレルギーが疑われるとき 小児科診療 74:206-211, 2011
- 3) 長尾みづほ、藤澤隆夫, 【食物アレルギーに対する経口免疫療法】 国立病院機構三重病院での取り組み. アレルギーの臨床, 31(9): p. 782-786, 2011.
- 4) 藤澤隆夫, 【アレルギー入門・メカニズム・病態・検査法を整理する・】 アレルギーをとりまく因子 アウトグロー. Medical Technology, 39(12): p. 1301. 2011.
- 5) 藤澤隆夫, 【子どもの臨床検査 症候から診断・治療へ】 疾患からみる臨床検査の進めかた 食物アレルギーが疑われるとき. 小児科診療, 74(増刊): p. 206-212. 2011.
- 6) 徳田玲子 and 藤澤隆夫, 先端医学講座 果物・野菜アレルギーの診断のための好塩基球活性化マーカーCD203c 発現定量法. アレルギーの臨床, 31(13): p. 1174-1179. 2011.
- 7) 長尾みづほ チーム医療で対応するアレルギー疾患 入院によるアレルギー疾患 診断・治療コースのシステム化 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌(1348-1215)9 巻 1号 p52-54(2011.05) 2011
- 8) Torii, S., 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*, 154(3): p. 236-45. 2011.
- 9) Hosoki, K., et al., An 8-year-old boy with hypereosinophilic syndrome. *Int Arch Allergy Immunol*, 155 Suppl 1: p. 117-22. 2011.
- 10) Hiraguchi, Y., et al., Inhibition of eosinophil activation mediated by a Toll-like receptor 7 ligand with a combination of procaterol and budesonide. *Int Arch Allergy Immunol*, 155 Suppl 1: p. 85-9. 2011.
- 11) Hosoki, K., et al., *Staphylococcus aureus* directly activates eosinophils via platelet-activating factor receptor. *J Leukoc*



## 学会

- 1) 中村典子, 一尾ゆい, 伊藤由香, 大市恵利, 二之夕紗希, 伊藤光代, 坪井奈巳, 長尾みづほ, 藤澤隆夫, 井口光正 食物アレルギーの積極的治療とその援助 経口免疫療法入院患者への疾患教育の工夫. 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 .横浜 2011年6月4-5日
- 2) 長尾みづほ, et al., 食物アレルギーの積極的治療とその援助 魚アレルギー患者に対する急速経口免疫療法の試み. 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 .横浜 2011年6月4-5日
- 3) 長尾みづほ, 井口光正, 谷田寿志, 細木興亜, 藤澤隆夫, 急速経口免疫療法を行った食物アレルギー患者の長期経過. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2011年11月10-12日
- 4) 徳田玲子, et al., 経皮感作による発症が疑われた食物アレルギーの2例 好塩基球CD203c発現測定の有用性. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会、幕張2011年5月14-15日
- 5) 徳田玲子, 谷田寿志, 細木興亜, 平口雪子, 長尾みづほ, 藤澤隆夫, 小児期の果物・野菜アレルギーにおけるPanallergen特異IgE測定の意義 成人との比較. 第48回日本小児アレルギー学会、福岡、2011年10月28-30日
- 6) 徳田玲子, 長尾みづほ, 細木興亜, 谷田寿志, 平口雪子, 千貫祐子, 森田栄伸, 松田幹 and 藤澤隆夫, 小麦アレルギーの臨床表現型と抗原反応性に関する検討. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2011 年 11 月 10-12 日
- 7) 平口雪子, 谷田寿志, 細木興亜, 長尾みづほ, 徳田玲子, 藤澤隆夫., 活性型ビタミン D(1,25-dihydroxyvitamin D3, calcitriol)が好酸球に及ぼす作用. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2011年11月10-12日
- 8) 平口雪子, 徳田玲子, 藤澤隆夫, 末廣豊., 好塩基球活性化マーカーCD203c測定が有用であったBee Pollenによるアナフィラキシー. 第23回

## G 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

食物アレルギーにおける経口免疫療法の確立と治癒メカニズム  
の解明に関する研究

研究分担者	竹森 利忠	理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター(RCAI) 免疫記憶研究グループ グループディレクター
研究協力者	谷田 寿志	RCAI 免疫記憶研究グループ、国立病院機構三重病院
	加地 友弘	RCAI免疫記憶研究グループ
	伊藤 直香	RCAI免疫記憶研究グループ、東大小児科
	小林 夏木	RCAI 免疫記憶研究グループ
	永岡 咲子	RCAI 免疫記憶研究グループ
	石毛 晶子	RCAI 免疫記憶研究グループ
	土方 敦司	RCAI免疫ゲノミクス研究グループ
	渡邊 貴志	RCAI免疫ゲノミクス研究グループ
	小原 收	RCAI免疫ゲノミクス研究グループ
	谷口 克	RCAIセンター長
	松田 幹	名古屋大学
	長尾 みずほ	国立病院機構三重病院
	藤澤 隆夫	国立病院機構三重病院

研究要旨

アレルギー特異的抗体価を正確に同定出来る capture 法を用いて卵アレルギー急速飽和療法を受け維持期にある対象者のアレルギー特異的抗体を測定した。その結果 Ovalbumin (OVA)、および Ovomcoid (OMC)に対する IgE 抗体価は一定値を示し、その一方 IgG4a 抗体価は治療前から維持期に欠けて約 100 倍上昇した。この結果は食物アレルギー-患者での経時的かつ段階的に増量したアレルギーの投与により IgG 陽性 B 細胞は刺激され抗体産生細胞へ分化する可能性が示唆された。半減期が極めて短い IgE 抗体が一見アレルギー刺激非依存性に一定レベルで維持される機構は不明である。またアレルギー-症状のない被験者の一部に IgE レベルが高いことが認められたが抗原認識部位、親和性がアレルギー-発症者のそれと異なるか否か今後解析の価値がある。

急速飽和療法の過程での細胞免疫の動態を解析するのに必要なアレルギー-病態を反映する biomarker の検索を行なった。すなわち本年度は患者由来末梢血有核細胞あるいは CD4 陽性 T 細胞がアレルギー刺激で産生するサイトカイン、ケモカイン、および発現増強する遺伝子群の検索を行なった。

A. 研究目的

急速飽和療法によるアレルギー反応の抑制の原因となる免疫学的動態を明らかにし、アレルギー-発症の要因とその制御機構を明らかにする。

B. 研究方法

これまでに各施設から送付された末梢血から血漿と白血球を分離し保管した。これらの検体を用い、以下の解析をおこなった。

(1) 血漿中アレルギー特異的 IgE, IgG 抗体値を測定する目的で capture 法を確立した。すなわち、抗ヒト IgE または IgG4a (BD 社) を固相化したウエルに希釈した血漿を添加し、ビオチン標識したアレルギーを反応させて

アレルギー特異的 IgE および IgG4 を測定した。測定に際しアレルギーに対して強い反応を示す複数の患者由来血漿をプールしこれを standard 抗体として用いた。希釈された Standard 抗体および評価群の双方の結合曲線が平行となる範囲での希釈を比較し Standard 抗体にたいする倍率を計算し抗体ユニットとした。

各抗体は多数の市販抗体を評価し特異性の高い抗体を選択使用した。

固相化には、抗-ヒト IgE (Sigma-Aldrich 社) 腹水を HiTrap Protein G HP カラム (GE Healthcare 社) を用いて精製したものを使用した。

標識抗原として、Biotinで標識されたOvalbumin (OVA, US Biological社)、およびOvomucoid (OVC, 名古屋大松田教授より供与)をThermo scientific社由来Kitを用いてBiotin標識したものを使用した。結合阻害試験には高純度に精製したOVA-V, OMC (いずれも名古屋大松田教授より供与)を、無関係の対照としてKey hole Limpet Hemocyaninを用いて行った。

(2) ヒトマウスキメラ抗体の作製  
アレルギー特異的IgEを定量化するために、抗OMCヒトマウスキメラ抗体の作製を行った。抗OMC-IgG抗体を産生するハイブリドーマより(名古屋大松田教授より供与)、抗体遺伝子をクローニングし、H鎖とL鎖の可変領域のそれぞれをヒトIgEの定常領域と融合し、発現ベクターに組み込んだ。H鎖、L鎖のC末側には、精製のためにHisタグを付加した。構築した2種類のプラスミドベクターを、293-F細胞にコトランスフェクションした。トランスフェクション後6日目の培養液を回収し、遠心後の上清を抗Hisタグ抗体によるウェスタンブロットを行い、抗体の発現を確認した。抗OMC抗体の発現が確認できた培養上清より、Hisタグによる抗体精製を行った。精製した抗体はSDS-PAGE, CBB染色により確認した。

(3) T細胞免疫反応のELISPOT法を用いた測定  
事前検討として、MABTECH社 ELISpot PLUSを用いてIL4, IL5, IL10, IFN $\gamma$ の測定を行った。抗原として低LPS OVAであるEndoGrade Ovalbumin 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/mlを用い、コントロールはPHA (phytohemagglutinin) 1 $\mu$ g/mlと抗原なしを用いた。対象は、免疫療法前、免疫療法後4ヶ月安定、免疫療法後13ヶ月安定、喘息の患児の凍結PBMCを用いた。45時間の培養時間で検討を行った。

(4) T細胞免疫反応におけるサイトカイン産生能

事前検討として、Luminex社 human27-Plex Panelを用いて、27種のサイトカイン測定を行った。抗原として名古屋大学より提供頂いたOVMを低LPS化し、100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/mlとし、コントロールはPHA (phytohemagglutinin) 1 $\mu$ g/mlと抗原なしを用いた。対象は免疫療法前、喘息の患児の凍結PBMCを用いた。24時間、48時間、96時間、168時間の培養時間で検討を行った。

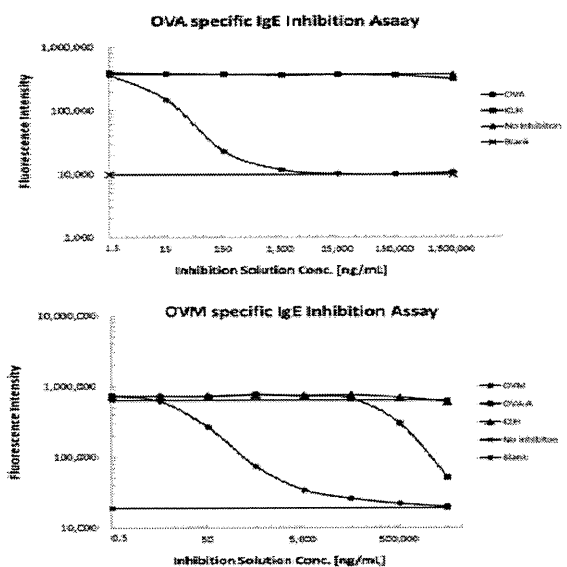
(5) アレルギー反応免疫細胞発現遺伝子の解析  
事前検討として、Affymetrix社 Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いて、転写産物や遺伝子解析を行った。抗原として名古屋大学より提供頂いたOVMを低LPS化し、20 $\mu$ g/mlとし、コントロールは抗原なしを用いた。対象は免疫療法前、喘息の患児の凍結PBMCを用い、20時間の抗原刺激培養後、PBMCとMiltenyi Biotec社 CD4<sup>+</sup>Tcellアイソレーションキットを用いてCD4<sup>+</sup>Tcellを精製しRNA抽出を行い、解析を行った。

## C. 研究成果

### 1. アレルギー特異的抗体産生とその抑制

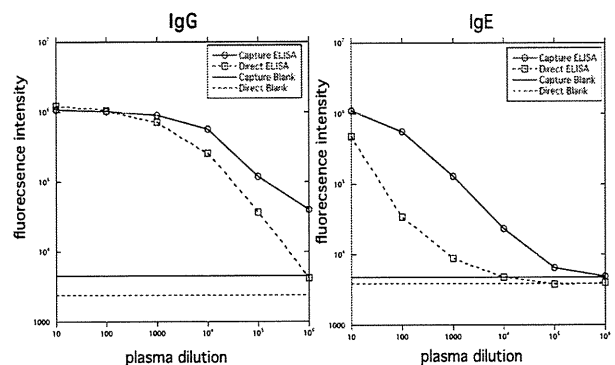
OVA および ovomucoid (OMC)は卵白アレルギーの主要抗原の一つであることから(Int. Arch. Allergy Immunol. 2011, 154, 33-41)、急速飽和療法の過程でのOVA, OMC 特異的IgE及びIgG4a抗体値の変動を解析した。IgE抗体のレベルはIgG抗体のそれと比較し極めて微量であることから、固着化した抗原に結合する抗体を測定する通常のELISA法では不正確な結果を招く恐れのあることからcapture法を確立した。抗原結合抑制反応(binding inhibition assay)によりこの系で抗原特異的反応が担保され(図1)、かつ我々が日常的に用いているELISAの系よりも高感度であることを確認した(図2)。

図1 Capture法に置ける抗原特異性



OMC, OVAに対する反応をそれぞれOMC, OVA及びアレルギーとは無関係の蛋白であるKLHによる阻害効果を観察した。

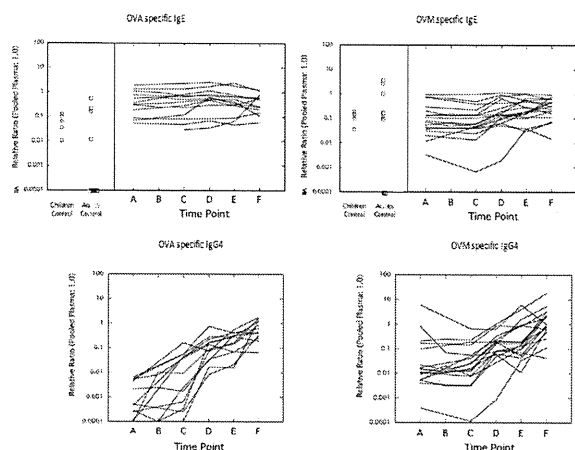
図2 ELISA法とCapture法におけるアレルギー特異的IgE, IgG4a抗体の結合感度の比較



複数の卵アレルギー患者由来血漿より作製されたスタンダード血漿を段階的に希釈に結合能を所定の方法で測定した。

そこで卵アレルギー急速飽和療法開始前から1年後の維持時期を経過した20名の対象者でのアレルゲン特異的抗体値を Capture 法により測定した。アレルギー-症状の既往のない健常人でのアレルゲン特異的 IgE 抗体価は大きくばらつき、一部が治療開始前の患者血漿中のレベルと同等であった (図3)。患者血漿中の OVA および OMC 特異的 IgE 抗体値は急速飽和療法開始前から維持期 (1年) にかけて大きな変動は認められないが (図3)、一方 IgG4 抗体値はその期間中で 10-100 倍の上昇が認められた (図3)。

図3 卵アレルギー急速飽和療法開始前、開始後に置くアレルゲン特異的 IgE, IgG4a 抗体価の推移



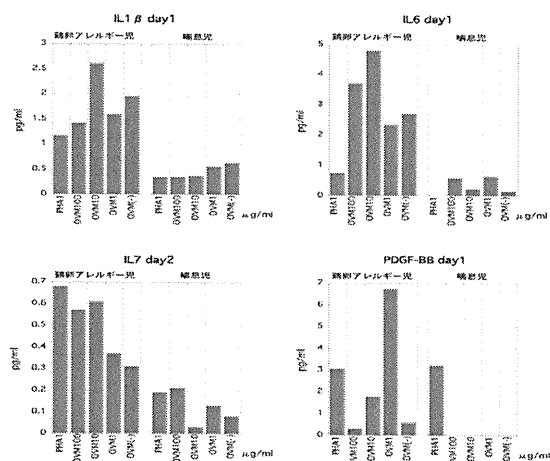
上図：左は非卵アレルギー学童期、成人、右はアレルギー急速飽和療法治療者に置くアレルゲン特異的 IgE 抗体価を示す。各値は standard 血漿の抗体価を 1 とした比較値である。下図：アレルギー急速飽和療法治療者に置くアレルゲン特異的 IgG4a 抗体価を示す。A:治療登録時、B:割り付け3ヶ月後、C:治療開始7日目、D:治療終了時、E:維持期2ヶ月後、F:維持期12ヶ月後

## 2. アレルギー-発症に置く免疫細胞動態の解析。

急速飽和療法開始前から治療およびアレルギー-発症抑制維持期における T 細胞免疫動態を明らかにする目的で、アレルギー-発症に関連する key となる biomarker の探索を行なった。すなわち、卵アレルギー患者末梢血中の有核細胞をアレルゲンである OVA あるいは OMC で刺激培養し、産生される cytokine を、および変動する発現遺伝子の網羅的解析をおこなった。

この結果、卵アレルギー患者由来の CD4T 細胞は OMC の刺激に対応し、対照群である喘息児由来 T 細胞と比較しより高いレベルの IL7, IL6, IL1, PDGF を産生することが推察された。一方 ELISPOT 法を用いアレルギー-反応の関与が示唆される Th2 サイトカインの産生を測定したが、OMC, OVA いずれの抗原刺激においても産生細胞は認められなかった (図4)。

図4 卵アレルギー-発症者由来末梢血有核細胞による免疫反応



in vitro で卵アレルギーおよびダニアレルギー-発症者由来 T 細胞を培養し OMC で刺激後に産生されるサイトカインを ruminex 法により測定した。

Microarray 解析でアレルゲン刺激により発現変動する遺伝子が幾つか同定されたが検討例はまだ一例であり、今後複数例の解析結果に対する統計処理を行なうことが必要とされている。

## D. 考察

アレルギー-疾患で産生されたアレルゲン特異的 IgE は皮膚のマスト細胞に結合し病態の進行に重要であるが、血清中に認められる IgE 抗体のレベルが病態と相関するか否か種々議論がある。これまで血清中 IgE 抗体は ELISA をベースとした方法で測定されて来たが、同一の抗原に特異性を有する他のアイソタイプ抗体の量が IgE のそれを凌駕することから、この方法で算出された値が正確な値を反映するか疑問が生じる。

本研究において、アレルゲン特異的 IgE および