

201229007A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩田 力

平成25（2013）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. 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） の臨床的効果		
藤澤 隆夫	-----	1 1
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 7
3. 経口免疫療法の安全性確立		
荒川 浩一	-----	2 3
4. 免疫アジュバンドを用いた新規経口免疫療法および免疫療法における調節性T細胞の 解析		
下条 直樹	-----	2 7
5. 食物アレルギー児におけるアナフィラキシー予知マーカーの開発		
吉原 重美	-----	3 1
6. 経口免疫療法による好塩基球反応性の変化		
伊藤 節子	-----	3 7
7. 経口免疫療法の動物モデルの開発		
北中 幸子	-----	4 1
8. 急速経口免疫療法を受けた児の保護者の生活の質（QOL）の変化についての検討		
北林 耐	-----	4 5
9. 経口免疫療法による特異抗体の変化：アレルゲンコンポーネントの解析		
松田 幹	-----	4 9
10. 新規アレルゲン特異的抗体測定法の開発		
木戸 博	-----	5 3
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	5 9
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	6 3

I. 総括研究報告書

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

研究代表者 岩田 力 国立病院機構三重病院 研究員／東京家政大学家政学部 教授

研究要旨

近年、自然寛解しない小児の食物アレルギーが増加している。これら患者と家族はアナフィラキシーの恐怖や不自由な除去食など長期にわたって大きな疾病負担を負う。経口免疫療法の有効性が報告されて注目を集めているが、方法の未確立や副反応の多発などの問題により、一般に普及できる標準治療とはなっていない。しかし、根本的治療法の確立はまさに切望されているところであり、アレルギー医療分野でも最優先課題といえる。そこで、本研究では食物アレルギーに対する経口免疫療法の確立と奏功機序の解明をめざして、ニーズの高い鶏卵と牛乳アレルギーに対して、急速経口免疫療法(rush oral immunotherapy: rush OIT)の多施設共同ランダム化比較試験を実施、包括的な免疫学的解析を行った。本年度は、牛乳アレルギー患者に対する治療である。二重盲検食物負荷試験で症状誘発閾値が牛乳 10 ml 以下の 5 歳～15 歳の牛乳アレルギー患者を登録し、治療群 (rush OIT 群)、対照群 (除去食群) にランダム割付した。治療群では直ちに入院し、閾値より少ない量から連日最大 3 回漸増した牛乳を摂取し、目標維持量への到達を目指す rush OIT を行った (急速免疫療法期)。目標維持量は牛乳 200 ml とした。その後、自宅にて同量の維持量摂取を続けた (維持期)。対照群は除去食を継続し、割付 3 ヶ月後に治療群との比較を行った後 (delayed control)、同様に rush OIT を行い、維持期に移行した。登録時から維持期開始後 12 ヶ月まで、定期的に検体採取、QOL 調査、負荷試験等を行った。維持期開始後 12 ヶ月では再度 2 週間以上の牛乳完全除去期間において負荷試験を行い、耐性獲得か脱感作か、を判定した。32 例 (年齢平均 7 歳、登録時負荷試験 症状誘発閾値 1~3 ml、症状重症度 grade 3、牛乳特異的 IgE 56.1 UA/mL、目標症例数 40 例) が登録され、治療群 16 例、対照群 16 例にランダム割付された。その結果、割付け 3 ヶ月後に、治療群でのみ閾値の有意な上昇を認めた。対照群はその後に治療を開始したが、全体として 86%は急速免疫療法期に牛乳 200 ml 以上の摂取が可能となり、その所要日数は 34 日であった。急速免疫療法期の副反応は、Grade 3 : 46%、Grade 4 : 14%、Grade 5 : 4% (1 例) で、副反応で試験中止を余儀なくされた症例は 2 例 (アナフィラキシーショック 1 例、副反応による増量困難 1 例) であった。現在、試験は進行中で、19 例が 1 年間の維持期を終了、耐性獲得の判定を行ったがしたが、閾値低下しなかったのは 16%にとどまり、軽度低下が 52%、明らかな低下が 32%であった。すなわち、臨床効果としては本治療により多くの例で脱感作状態を誘導できたが、維持療法 1 年間では耐性獲得は少数であった。

そこで、経口免疫療法の安全性と有効性を高めることを目的に、Th1 アジュバント活性を有する KW 乳酸菌 3110 株の牛乳急速経口免疫療法における効果の解析を二重盲検プラセボ対照試験で開始した。まずパイロットスタディとして 9 名の患者を登録、すべて急速期を終了し、全員が KW 乳酸菌 3110 株あるいはプラセボ口腔内崩壊錠によると考えられる副作用なく維持期へと移行している。今後キーオープンされたのち、有効性が認められるならば、大規模試験に移行する予定である。

安全性の確保のためには副反応リスクの高い症例を事前に同定することが求められる。そこで治療前の血清中トリプターゼを検討すると、重篤なアレルギー症状が発現した症例の中で症状発現閾値が低かった群、急速免疫療法期において抗原摂取目標量に到達できなかった群では、血清中トリプターゼが高値であることを見いだした。

免疫学的メカニズム解明のための研究では治療後にアレルギー特異的 IgG4 の IgE に対する量比および抗体親和性が上昇すること、Th2 亜群の機能上昇に関与する遺伝子の発現が抑制される可能性を明らかにした。ヒスタミン遊離反応のみた好塩基球の反応性も著効群で低下することを見いだした。特異抗体 (IgE、IgG4、IgA) 価の変動を高感度アレルギーマイクロアレイ (DLC チップ) 法によっても検証した。

(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
北中幸子 東京大学大学院医学系研究科小児医学講座准教授
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 国立病院機構下志津病院小児科
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

A. 研究目的

食物アレルギーは小児の約5%と頻度の高い疾患であるが、患者と家族は連日の除去食という不自

由に加え、微量の誤摂取によるアナフィラキシー誘発の危険を抱えており、毎日の生活における負担には多大なものがある。しかし、未だ根本的治療法は確立されていない。

近年、国内外で食物アレルギーに対する新規治療法として経口免疫療法が試みられているが、これら研究の多くは対照のない試験であり、エビデンスレベルは高くない。さらに適応基準や治療方法が不確かで、重篤な全身性副反応もみられるなど、一般的な治療法となるための課題は山積している。今後、標準治療として確立するには、科学性を担保したランダム化比較試験を行うこと、かつ安全性を確保するための綿密な治療スケジュール調整が必要である。そして、治療の根拠となる免疫学的奏効機序の解明も必須である。

本研究では、わが国初のランダム化比較試験を、多施設共同で十分な症例数を確保して実施、最もニーズの高い鶏卵、牛乳アレルギーに対する本療法の有効性と安全性を客観的に評価するものである。さらに、治療前後で患者検体の免疫学的解析を行い、臨床症状と治療効果との相関解析によって、経口免疫寛容機構を解明するとともに、治療反応性と副反応を予測する新規マーカーを開発して、本治療法のさらなる発展に貢献することを目的とした。

24年度は、鶏卵試験の安全性情報を元にプロトコル改訂の上、牛乳アレルギーを対象とした試験を行った。さらに、より安全で効果的な免疫療法の開発のため、Th1 アジュバンド効果が *in vitro*、動物実験で確かめられ、ヒトにおける安全性も確立している KW 乳酸菌 3110 株を牛乳の急速免疫療法に併用するパイロット研究にも着手した。免疫学的メカニズム解明のための検討も進めた。

B. 研究方法

1. 牛乳アレルギーに対する急速経口免疫療法 (全体研究)

(対象)

- 1) 同意取得時に5歳以上15歳以下の男女。
- 2) 牛乳アレルギーを持つ者。
- 3) 牛乳アレルギーの寛解傾向がない者。
- 4) アレルギー症状誘発閾値が牛乳10ml以下の者。
- 5) 医師・看護師などとの意思疎通が可能で入院・通院治療が可能なる者。
- 6) 法的保護者の同意を得られ、かつ、本人の意思が確認できた者。

除外基準は以下の通りであった。

- 1) 大豆アレルギーを持つ者（プラセボ食品に大豆を含むため）。
- 2) 急速経口免疫療法の既往がある者。
- 3) 今回の対象食品の摂取状況が直近の3ヵ月間に変化している者。
- 4) 心疾患、肝疾患、腎疾患などの既往歴があり、現在治療中の者。
- 5) 気管支喘息、アトピー性皮膚炎があり、現在コントロール不良の者。
- 6) HIV、HBV、HCV等の重篤な感染症が疑われる者。
- 7) その他、施設責任医師または研究担当医師が不適格と判断した者。

（試験デザインと臨床評価）

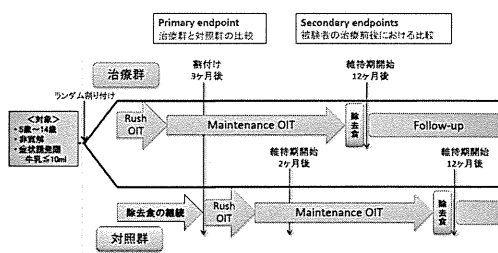
食物アレルギーは、自然寛解が認められるため、対照群を設定する必要がある。このため、治療群と対照群の2群にランダムに割り付けるランダム化比較試験とした。また、本研究で行う急速経口免疫療法は、治療中に重篤なアレルギー反応を起こす危険性があることから、急速期（急速経口免疫療法期）には入院加療が必須である。しかし、対照群に割り付けられた患者が入院加療にてプラセボ食品を摂取するデザインとすることは倫理的に難しいと考えられたため、原因食物の除去を続ける群を対照群として設定した。また、本研究に参加する全ての患者の利益を考えて、Delayed Control Trialとした。

試験対象者に対して、文書による説明を行い、同意を得た後、二重盲検経口負荷試験を行い、誘発閾値を決定、閾値が10ml以下で、上記基準を満たす例を1:1にランダム化割り付けした。割り付け調整因子は以下の通りとした。

- 1) 同意取得時年齢（5～6歳/7～15歳）
- 2) 性別（男性/女性）
- 3) 特異的IgE抗体価（17.5 UA/mL未満/17.5 UA/mL以上100 UA/mL未満/100 UA/mL以上）
（割付日から1年未満の直近のデータを用いる）
- 4) 食物負荷試験における症状誘発閾値（全8段階摂取のうち前半の5段階/後半の3段階）
- 5) 誘発症状 grade（grade2以下で他覚的に明らかなのは皮膚症状のみ/grade3以上）
- 6) 治療実施医療機関
- 7) アレルギー原因食品の摂取状況（完全除去食

（一定量まで摂取可能）

急速経口免疫療法（Rush OIT）は入院にて行った。負荷試験で判明した症状誘発閾値の約100分の1以下を初回量の目安とし、1日最大3回、摂取間隔を30分以上とし、最大20%ずつの増量を行いながら摂取を続け、目標量は1回摂取量として牛乳200mlとした。誘発症状予防のために、抗ヒスタミン薬エピナスチンの内服も継続した。毎回の摂取時は最低30分は医師が待機して、症状出現時には、抗ヒスタミン薬、気管支拡張薬、アドレナリン筋注など必要な処置を迅速に行うこととした。また、プロトコルには誘発症状のグレード分類と推奨される治療を明記した。目標量到達後、退院前には医師の観察下において、摂取後30分に日常生活で行う程度の運動や入浴などの負荷を行い、その影響の確認を行った。症状誘発に備え、患者の近くに、アドレナリンなどの薬剤を準備した後に運動や入浴等の負荷を行った。



割付け3ヶ月後、二重盲検経口負荷試験を行い、閾値を2群間で比較した（主要評価項目）。

その後、対照群もRush OITを開始した。

維持期（maintenance OIT）は自宅で急速期に到達し得た量を、維持期開始後1ヵ月間は連日1回、2ヵ月目より最低2日に1回以上、7ヵ月目より最低3日に1回以上、12ヵ月後まで定期的に摂取した。誘発症状出現時、胃腸炎などの体調不良時は摂取量を減量、再度、増量する場合は病院で医師の指導の下に行った。

維持期2ヶ月後、12ヶ月後に二重盲検経口負荷試験を行い、閾値を測定した。また、12ヶ月ではアレルギー原因食物を2週間以上除去した後に負荷試験を行い、脱感作状態（摂取継続している場合は症状が誘発されないが、摂取を中止すると閾値が低下する）か、耐性獲得（摂取中止しても、閾値の低下がない）か、を確認した。

免疫学的マーカー検索のために、登録時、割付

3ヶ月後(対照群のみ)、治療開始前(規定の期間内であれば不要)、急速期開始7日目前後、急速期終了時(目標量到達後2日目以降より2週間以内)、維持期開始2ヵ月後、12ヵ月後に採血を行い、特異IgE抗体、IgG4抗体、抗原による好塩基球活性化(CD203c発現、ヒスタミン遊離)を測定するとともに、血液中の有核細胞を分離、凍結保存し、後日、免疫学的解析を行うこととした。

唾液と糞便も、登録時、割付3ヵ月後(対照群のみ)、治療開始前(規定の期間内であれば不要)、急速期終了時(目標量到達後2日目以降より2週間以内)、維持期開始2ヵ月後、12ヵ月後に採取し、後日の免疫学的解析のために凍結保存した。

2. 乳酸菌 KW3110 併用牛乳急速経口免疫療法(下条)

二重盲検プラセボ対照試験として、牛乳の経口免疫療法に乳酸菌 KW3110 の併用効果を検証する。口腔内崩壊錠1錠あたり、試験薬は不活化KW乳酸菌50mg(菌量として5x10⁹)を含有、プラセボはデキストリン50mgを含むものを用い、被験者は経口免疫療法開始後1日2錠の試験薬またはプラセボを1年間摂取することとした。KW乳酸菌の有効性の主要判定項目は、登録時と維持期開始後2ヵ月後の時点での食物負荷試験における症状誘発閾値の変化率である。また、副次評価項目として、登録時と維持期開始12ヵ月後の時点での食物負荷試験における症状誘発閾値の変化率、経過中の静脈血及、唾液、便採取、皮膚プリック検査の変化率とした。

3. 免疫学的メカニズム解明(竹森、木戸、松田、伊藤)

免疫学的奏功機序解明のため、以下の研究を行った。

- 1) Capture 法を用いた血漿中アレルギー特異的IgE, IgG抗体量の定量
- 2) Biacore T200 (GE Healthcare)を用いたアレルギー特異的IgE/IgG抗体の親和性測定
- 3) RNAsequence 法によるアレルギー反応免疫細胞発現遺伝子の解析
- 4) ダイヤモンドライクカーボン(DLC)でガラス基板をコートしたチップ(DLCチップ)を用いた高感度測定法によるアレルギー特異的IgE, IgG4, IgA抗体の測定
- 5) 好塩基球の抗原特異的ヒスタミン遊離反応
- 6) アレルギーコンポーネント(オボムコイドメイン3)に対するIgE抗体測定

4. 副反応の解析と予測マーカーの探索(吉原、荒川)

治療開始前の血清トリプターゼ値とその後の治療反応性、副作用発現との関連を解析した

C. 研究結果

1. 牛乳アレルギーに対する急速経口免疫療法

32例がランダム化割り付けされた。誘発閾値の中央値は牛乳1mlで、誘発症状の重症度の中央値がgrade3、牛乳特異的IgE抗体は50UA/ml程度と、重症例が登録された(表1)

表1 登録症例の臨床的背景

	年齢	男: 女	症状誘発閾値 (ml)					牛乳IgE (UA/ml)
			0.1	0.3	1	3	10	
治療群 (n=16)	7.3 (5-11)	3:1	-	-	7	4	5	50.2
対照群 (n=15)	8.0 (5-12)	4:1	3	1	4	1	6	56.5

主要評価項目である割付け3ヶ月後の負荷試験閾値は、治療群では治療前から治療後に有意な上昇が認められたのに対して、対照群では有意な変化はなかった。

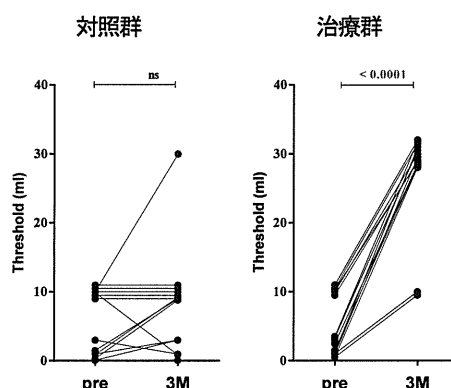


図2 割付け2ヶ月後の負荷試験閾値

上記負荷試験の後、治療を開始した対照群を含めた全症例で到達し得た維持量は牛乳200ml以上が27例(84%)、50ml以上が24例(88%)であった。また、到達までに要した日数は平均34日であった。

現在のところ、19例が維持期12ヶ月を経過し

て、耐性獲得判定のための、除去後の負荷試験を行った。その結果、19例中、閾値が低下しなかった(=耐性)のは3例(16%)で、10例(52%)は軽度の閾値低下、6例(32%)は明らかな閾値低下(治療前レベル)を認めた。

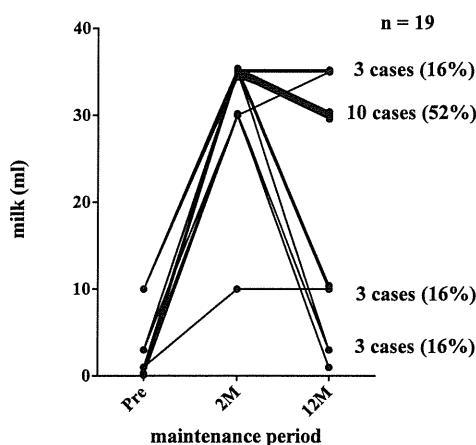


図3 維持12ヶ月での除去後の負荷試験閾値

急速期における副反応はGrade3が14例(44%)、Grade4が5例(16%)、Grade5が1例(3%)であった。(Gradeの判定は表2を参照)

表2 誘発症状のグレード(囲みの部分は、負荷試験時に客観的症候として陽性判定する基準)

Grade	皮膚	消化管	呼吸器	心血管系	神経系
1	Grade 1a: 接触性の反応	のどの違和感など 軽微な自覚症状のみ	くしゃみ 鼻水		
	Grade 1b: 非接触性で全身への 拡大局所的ない疹、腫脹				
2	全身への拡大傾向のある 皮疹、腫脹	フェイススケール0-2 腹痛、嘔気など (自覚症状のみ)	咽喉の違和感・閉塞感 局所的な数回の咳		
3		フェイススケール 3以上の腹痛 急性下痢、一時的な嘔吐	持続する咳、喘鳴		
4		嘔吐 繰り返す急性下痢	呼吸困難を伴う咳、増悪 チアノーゼ	血圧低下 (収縮期血圧が15%以上、 20 mmHg以上低下)	
5		排便 コントロール不能	呼吸停止	徐脈、心停止	意識消失

維持期2ヶ月後までは、副反応により減量を余儀なくされた症例は10例(37%)、副反応による受診は11例(39%)、アドレナリン注射を要したのは6例(21%)であった。

また、退院時に行った運動負荷試験では症状が誘発されなかったのは48%で、残りは何らかの症状が誘発された(表3)

表3 運動負荷試験による誘発症状

誘発症状 Grade	症例数 (%)
症状なし	14 (48%)
1	4 (14%)
2	2 (7%)
3	4 (14%)
4	5 (17%)
5	0 (0%)
合計	29

2. KW3110 併用試験

パイロット試験では9名の患者が急速期を終了し、全員が口腔内崩壊錠によると考えられる副作用なく維持期へと移行した。1年の試験期間終了後にキーオープンされるよいである。

3. 免疫学的メカニズムの検討

Capture法、DLCチップ法ともに、治療によりアレルゲン特異的IgG4抗体が著明に上昇して、その高値が持続して維持された。IgA抗体も同様の動きをとった。一方で、アレルゲン特異的IgE抗体はゆっくりと低下する傾向にあった。

抗体の親和性を検討したところ、治療によく反応した症例では、アレルゲン特異的IgG4抗体の親和性が著しく上昇したのに対して、閾値があまり上昇しなかった症例では親和性の上昇がみられないことが観察された。

遺伝子発現を網羅的に検出するRNA sequence法では基礎検討として、数例の代表例を解析したところ、抗原刺激により著しく上昇する遺伝子と低下する遺伝子を同定した。Th2免疫応答や免疫制御に関わるものであった。

好塩基球の反応では治療により経時的に抗原刺激に対する反応性が低下していくことを見いだした。細胞レベルでの脱感作と考えられた。

4. 副反応の予測と予防

重篤な副反応を生じた症例の臨床経過を詳細に検討して、副反応を防ぐための留意点を整理した(分担研究報告(荒川)参照)。また、副反応を生じやすい症例では治療前の負荷試験閾値が低い傾向にあるが、これらの症

例では治療前の血清トリプターゼ値が有意に高値であることを見いだした。すなわち、血清トリプターゼにより負荷試験結果ならびに関連する副作用発現が予測できる可能性がある。

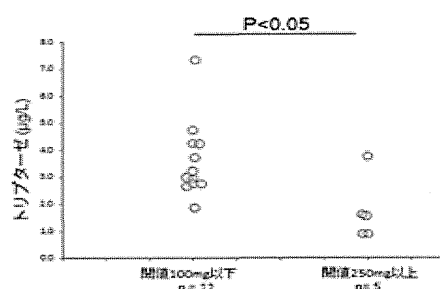


図4 血清トリプターゼと負荷試験閾値

D. 考察

本研究では、自然寛解が望めない牛乳アレルギー患者に対して、科学性と倫理性を担保した Delayed controlによるランダム化比較試験を行い、急速免疫療法により牛乳の摂取閾値が上昇することを証明した。治療前の閾値の中央値1mlであった患者のうち、88%は200ml摂取可能となる画期的な効果を認めた。急速免疫療法が牛乳アレルギーを改善させるものであることが明確に示された。

しかしながら、維持期1年後に再度の牛乳除去後に負荷試験を行うと16%を除いて、閾値が低下することも明らかになった。この事実は、本治療法により脱感作は誘導することができるが、耐性誘導までには至らないことを示している。また、維持療法中に副反応によって維持量の減量を余儀なくされた例もあり、脱感作状態の維持も容易ではないことも明らかとなった。

さらに、アドレナリン注射を含めて、治療を要する副反応も少なからず認められること、安静時には誘発症状がない例でも運動負荷により症状が誘発されることがあることなど、本治療の困難さが浮き彫りにされた。

昨年度までの研究における鶏卵試験と比較すると、副反応の頻度、獲得した摂取量を維持する例の比率、1年後の耐性獲得例ともに低く、抗原により治療効果が異なる可能性も示された。

現時点の治療効果および副反応頻度を考慮すると、一般化することは困難と考えられるので、今後は Th2反応を抑制して、Th1, Treg反応を誘導しやすい免疫アジュバンドの併用、経皮的な抗原の微量投

与など新たな治療戦略を考える必要があろう。

その意味で、今年度にパイロット研究として開始した免疫アジュバンドとしての乳酸菌KW3110併用の二重盲検プラセボ対照試験の結果が期待される。この乳酸菌株はTh1反応を誘導しやすいことが報告されており、副反応を軽減するとともに、耐性誘導を進める可能性が予測される。

免疫学的メカニズムについては、これまでも報告されている特異IgE抗体の低下と特異IgG4抗体の上昇、さらに好塩基球反応性の低下を確認したが、それらの現象を誘導する根本的なメカニズムについて基礎検討を進めることができた。すなわち、抗体の親和性変化、治療によって変動する新規遺伝子などである。これらの検討はまだ探索的レベルにあるが、本研究ではランダム化試験の経過中、すべての症例において、確実に検体を採取保存しており、新規の解析技術が確立した時点で、網羅的に解析を進めることができる。次のステップとして期待できるものである。

また、副反応と治療反応性の予測についても、今回の試験で得られた豊富な臨床的体験をもとに、実用的なガイドラインの基礎となるデータを得た。さらに、血清トリプターゼなど新規マーカーも見いだしたので、今後の安全な経口免疫療法プロトコールに生かせるものとなるはずである。

E. 結論

牛乳アレルギーに対する経口免疫療法について科学性と倫理性を担保して、delayed controlによるランダム化比較試験を行い、本治療が負荷試験閾値を有意に上昇させ、日常生活で摂取可能な牛乳も多く例で著しく増加させることができることを証明した。しかしながら、真の耐性獲得率は低く、治療中の副反応も少なからず認められたことより、今後の治療法の改善が必要である。

一方、本研究においては、安全な免疫療法確立のために必要な免疫学的メカニズム解明、新たな治療法の開発、新たな予測マーカーの開発に一定の成果を得ており、今後の発展の基礎を築いたと考ええる。

F. 研究発表

分担研究報告書参照

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

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）の臨床的効果

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
研究協力者	伊藤 直香	東京大学医学部小児科	大学院生
		理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター	研修生
	長尾みづほ	国立病院機構三重病院	臨床研究部

研究要旨

食物アレルギーの根本的治療法となりえる急速経口免疫療法（rush oral immunotherapy: rush OIT）の多施設共同ランダム化比較試験を牛乳アレルギー患者に対して行った。二重盲検食物負荷試験で症状誘発閾値が牛乳 10 ml 以下の 5 歳～15 歳の牛乳アレルギー患者を登録し、治療群（rush OIT 群）、対照群（除去食群）にランダム割付した。治療群では直ちに入院し、閾値より少ない量から連日最大 3 回漸増した牛乳を摂取し、目標維持量への到達を目指す rush OIT を行った（急速免疫療法期）。目標維持量は牛乳 200 ml とした。牛乳では運動による誘発症状が起こりやすいとの報告があるため、維持量到達後に病院内で医師の監視の下、牛乳摂取後に運動負荷試験を行い、退院後の安全性を確保するよう努めた。その後退院し、自宅にて同量の維持量摂取を続けた（維持期）。対照群は除去食を継続し、割付 3 ヶ月後に治療群との比較を行った後（delayed control）、同様に rush OIT を行い、維持期に移行した。登録時から維持期開始後 12 ヶ月まで、定期的に検体採取、QOL 調査、負荷試験等を行った。維持期開始後 12 ヶ月では再度 2 週間以上の牛乳完全除去期間において負荷試験を行い、耐性獲得か脱感作か、を判定した。32 例（年齢平均 7 歳、登録時負荷試験 症状誘発閾値 1-3 ml、症状重症度 grade 3、牛乳特異的 IgE 56.1 UA/mL、目標症例数 40 例）が登録され、治療群 16 例、対照群 16 例にランダム割付された。その結果、割付け 3 ヶ月後に、治療群でのみ閾値の有意な上昇を認めた。対照群はその後に治療を開始したが、全体として 86%は急速免疫療法期に牛乳 200 ml 以上の摂取が可能となり、その所要日数は 34 日であった。急速免疫療法期の副反応は、Grade 3：46%、Grade 4：14%、Grade 5：4%（1 例）で、副反応で試験中止を余儀なくされた症例は 2 例（アナフィラキシーショック 1 例、副反応による増量困難 1 例）であった。現在、試験は進行中で、19 例が 1 年間の維持期を終了、耐性獲得の判定を行ったがしたが、閾値低下しなかったのは 16%にとどまり、軽度低下が 52%、明らかな低下が 32%であった。以上、牛乳アレルギー患者に rush OIT を行い、多くの例で脱感作状態を誘導できたが、維持療法 1 年間では耐性獲得は少数であった。

A. 研究目的

食物アレルギーは小児の約 5%と頻度の高い疾患であるが、患者と家族は連日の除去食という不自由に加え、微量の誤摂取によるアナフィラキシー誘発の危険を抱えており、毎日の生活における負担には多大なものがある。しかし、未だ根本的治療法は確立されていない。

近年、国内外で食物アレルギーに対する新規治療法として経口免疫療法が試みられているが、これら研究の多くは対照のない試験であり、エビデンスレベルは高くない。さらに適応基準や治療方法が不確かで、重篤な全身性副反応もみられるなど、普遍的な治療法となるための課題は山積して

いる。今後、標準治療として確立するには、科学性を担保したランダム化比較試験を行うこと、かつ安全性を確保するための綿密な治療スケジュール調整が必要である。そして、治療の根拠となる免疫学的奏効機序の解明も必須である。

本研究では、わが国初のランダム化比較試験を、多施設共同で十分な症例数を確保して実施、最もニーズの高い鶏卵、牛乳アレルギーに対する本療法の有効性と安全性を客観的に評価するものである。さらに、治療前後で患者検体の免疫学的解析を行い、臨床症状と治療効果との相関解析によって、経口免疫寛容機構を解明するとともに、治療反応性と副反応を予測する新規マーカーを開発して、本治療法のさらなる発展に貢献することを目

的とした。

22年度は、鶏卵アレルギーに対する試験を行なったので、23年度より鶏卵試験の安全性情報を元にプロトコール改訂の上、牛乳アレルギーを対象とした試験を行った。

B. 研究方法

1. 対象

以下の症例を対象とした。

- 1) 同意取得時に5歳以上15歳以下の男女。
- 2) 牛乳アレルギーを持つ者。
- 3) 牛乳アレルギーの寛解傾向がない者。
- 4) アレルギー症状誘発閾値が牛乳10ml以下の者。
- 5) 医師・看護師などとの意思疎通が可能で入院・通院治療が可能な者。
- 6) 法的保護者の同意を得られ、かつ、本人の意思が確認できた者。

除外基準は以下の通りであった。

- 1) 大豆アレルギーを持つ者（プラセボ食品に大豆を含むため）。
- 2) 急速経口免疫療法の既往がある者。
- 3) 今回の対象食品の摂取状況が直近の3ヵ月間に変化している者。
- 4) 心疾患、肝疾患、腎疾患などの既往歴があり、現在治療中の者。
- 5) 気管支喘息、アトピー性皮膚炎があり、現在コントロール不良の者。
- 6) HIV、HBV、HCV等の重篤な感染症が疑われる者。
- 7) その他、施設責任医師または研究担当医師が不適格と判断した者。

2. 試験デザイン

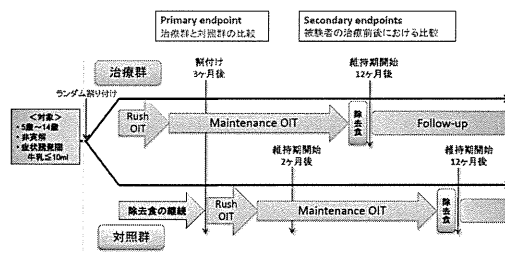
食物アレルギーは、自然寛解が認められるため、対照群を設定する必要がある。このため、治療群と対照群の2群にランダムに割り付けるランダム化比較試験とした。また、本研究で行う急速経口免疫療法は、治療中に重篤なアレルギー反応を起こす危険性があることから、急速期（急速経口免疫療法期）には入院加療が必須である。しかし、対照群に割り付けられた患者が入院加療にてプラセボ食品を摂取するデザインとすることは倫理的に難しいと考えられたため、原因食物の除去を続行する群を対照群として設定した。また、本研究に参加する全ての患者の利益を考えて、Delayed Control Trialとした。

試験対象者に対して、文書による説明を行い、同

意を得た後、二重盲検経口負荷試験を行い、誘発閾値を決定、閾値が10ml以下で、上記基準を満たす例を1:1にランダム化割り付けした。割り付け調整因子は以下の通りとした。

- 1) 同意取得時年齢（5～6歳/7～15歳）
- 2) 性別（男性/女性）
- 3) 特異的IgE抗体価（17.5 UA/mL未満/17.5 UA/mL以上100 UA/mL未満/100 UA/mL以上）
（割付日から1年未満の直近のデータを用いる）
- 4) 食物負荷試験における症状誘発閾値（全8段階摂取のうち前半の5段階/後半の3段階）
- 5) 誘発症状 grade（grade2以下で他覚的に明らかなのは皮膚症状のみ/grade3以上）
- 6) 治療実施医療機関
- 7) アレルギー原因食品の摂取状況（完全除去食/一定量まで摂取可能）

急速経口免疫療法（Rush OIT）は入院にて行った。負荷試験で判明した症状誘発閾値の約10分の1以下を初回量の目安とし、1日最大3回、摂取間隔を30分以上とし、最大20%ずつの増量を行いながら摂取を続け、目標量は1回摂取量として牛乳200mlとした。誘発症状予防のために、抗ヒスタミン薬エピナスチンの内服も継続した。毎回の摂取時は最低30分は医師が待機して、症状出現時には、抗ヒスタミン薬、気管支拡張薬、アドレナリン筋注など必要な処置を迅速に行うこととした。また、プロトコールには誘発症状のグレード分類と推奨される治療を明記した。目標量到達後、退院前には医師の観察下において、摂取後30分に日常生活で行う程度の運動や入浴などの負荷を行い、その影響の確認を行った。症状誘発に備え、患者の近くに、アドレナリンなどの薬剤を準備した後に運動や入浴等の負荷を行った。



割付け3ヶ月後、二重盲検経口負荷試験を行い、閾値を2群間で比較した（主要評価項目）。

その後、対照群も Rush OIT を開始した。

維持期 (maintenance OIT) は自宅で急速期に到達し得た量を、維持期開始後 1 ヶ月間は連日 1 回、2 ヶ月目より最低 2 日に 1 回以上、7 ヶ月目より最低 3 日に 1 回以上、12 ヶ月後まで定期的に摂取した。誘発症状出現時、胃腸炎などの体調不良時は摂取量を減量、再度、増量する場合は病院で医師の指導の下に行った。

維持期 2 ヶ月後、12 ヶ月後に二重盲検経口負荷試験を行い、閾値を測定した。また、12 ヶ月ではアレルギー原因食物を 2 週間以上除去した後に負荷試験を行い、脱感作状態 (摂取継続している場合は症状が誘発されないが、摂取を中止すると閾値が低下する) か、耐性獲得 (摂取中止しても、閾値の低下がない) か、を確認した。

免疫学的マーカー検索のために、登録時、割付 3 ヶ月後 (対照群のみ)、治療開始前 (規定の期間内であれば不要)、急速期開始 7 日目前後、急速期終了時 (目標量到達後 2 日目以降より 2 週間以内)、維持期開始 2 ヶ月後、12 ヶ月後に採血を行い、特異 IgE 抗体、IgG4 抗体、抗原による好塩基球活性化 (CD203c 発現、ヒスタミン遊離) を測定するとともに、血液中の有核細胞を分離、凍結保存し、後日、免疫学的解析を行うこととした。

唾液と糞便も、登録時、割付 3 ヶ月後 (対照群のみ)、治療開始前 (規定の期間内であれば不要)、急速期終了時 (目標量到達後 2 日目以降より 2 週間以内)、維持期開始 2 ヶ月後、12 ヶ月後に採取し、後日の免疫学的解析のために凍結保存した。

C. 研究結果

1. 対象の背景

32 例がランダム化割り付けされた。誘発閾値の中央値は牛乳 1 ml で、誘発症状の重症度の中央値が grade3、牛乳特異的 IgE 抗体は 50UA/ml 程度と、重症例が登録された (表 1)

表 1 登録症例の臨床的背景

	年齢	男: 女	症状誘発閾値 (ml)					牛乳 IgE (UA/mL)
			0.1	0.3	1	3	10	
治療群 (n=16)	7.3 (5-11)	3:1	-	-	7	4	5	50.2
対照群 (n=15)	8.0 (5-12)	4:1	3	1	4	1	6	56.5

2. 免疫療法の効果: 主要評価項目

主要評価項目である割付け 3 ヶ月後の負荷試験閾値は、治療群では治療前から治療後に有意な上昇が認められたのに対して、対照群では有意な変化はなかった。

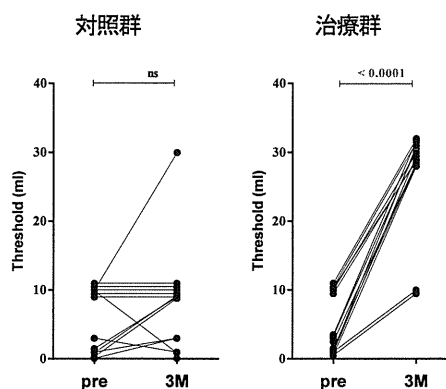


図 2 割付け 2 ヶ月後の負荷試験閾値

上記負荷試験の後、治療を開始した対照群を含めた全症例で到達し得た維持量は牛乳 200 ml 以上が 27 例 (84%)、50 ml 以上が 24 例 (88%) であった。また、到達までに要した日数は平均 34 日であった。

3. 耐性獲得の判定

現在のところ、19 例が維持期 12 ヶ月を経過して、耐性獲得判定のための、除去後の負荷試験を行った。その結果、19 例中、閾値が低下しなかった (=耐性) のは 3 例 (16%) で、10 例 (52%) は軽度の閾値低下、6 例 (32%) は明らかな閾値低下 (治療前レベル) を認めた。

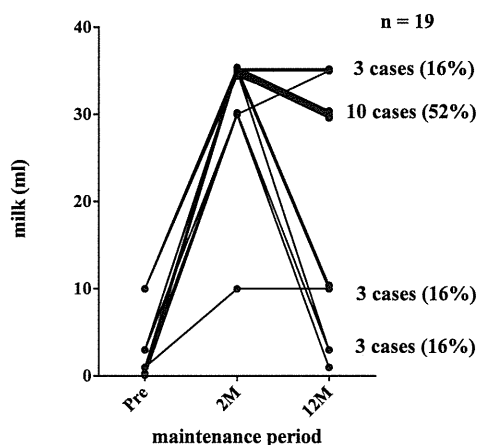


図3 維持12ヶ月での除去後の負荷試験閾値

4. 副反応

急速期における副反応はGrade3が14例(44%)、Grade4が5例(16%)、Grade5が1例(3%)であった。(Gradeの判定は表2を参照)

表2 誘発症状のグレード(囲みの部分は、負荷試験時に客観的的症状として陽性判定する基準)

Grade	皮膚	消化管	呼吸器	心血管系	神経系
1	Grade 1a: 局所的な反応	のどの違和感など 軽い自覚症状のみ	くしゃみ 鼻水		
	Grade 1b: 非線形性で全身への 拡大傾向のない発疹、腫脹				
2	全身への拡大傾向のある 発疹、腫脹	フェイススケール0-2 腹痛、嘔気など (自覚症状のみ)	呼吸の違和感・閉塞感 間欠的な数回の咳		
3		フェイススケール 3以上の腫脹 急性下痢、一時的な嘔吐	持続する咳、喘鳴		
4		嘔吐 繰り返す急性下痢	呼吸困難を伴う咳、喘鳴 チアノーゼ	血圧低下 (収縮期血圧が15%以上、 20 mmHg以上低下)	
5		痙攣 コントロール不能	呼吸停止	物厥、心停止	意識消失

維持期2ヶ月後までは、副反応により減量を余儀なくされた症例は10例(37%)、副反応による受診は11例(39%)、アドレナリン注射を要したのは6例(21%)であった。

また、退院時に行った運動負荷試験では症状が誘発されなかったのは48%で、残りは何らかの症状が誘発された(表3)

表3 運動負荷試験による誘発症状

誘発症状 Grade	症例数 (%)
症状なし	14 (48%)
1	4 (14%)
2	2 (7%)
3	4 (14%)
4	5 (17%)
5	0 (0%)
合計	29

D. 考察

本研究では、自然寛解が望めない牛乳アレルギー患者に対して、科学性と倫理性を担保したDelayed controlによるランダム化比較試験を行い、急速免疫療法により牛乳の摂取閾値が上昇することを証明した。治療前の閾値の中央値1mlであった患者のうち、88%は200ml摂取可能となる画期的な効果を認めた。急速免疫療法が牛乳アレルギー

一を改善させるものであることが明確に示された。

しかしながら、維持期1年後に再度の牛乳除去後に負荷試験を行うと16%を除いて、閾値が低下することも明らかになった。この事実は、本治療法により脱感作は誘導することができるが、耐性誘導までには至らないことを示している。また、維持療法中に副反応によって維持量の減量を余儀なくされた例もあり、脱感作状態の維持も容易ではないことも明らかとなった。

さらに、アドレナリン注射を含めて、治療を要する副反応も少なからず認められること、安静時には誘発症状がない例でも運動負荷により症状が誘発されることがあることなど、本治療の困難さが浮き彫りにされた。

昨年度までの研究における鶏卵試験と比較すると、副反応の頻度、獲得した摂取量を維持する例の比率、1年後の耐性獲得例ともに低く、抗原により治療効果が異なる可能性も示された。現時点の治療効果および副反応頻度を考慮すると、一般化することは困難と考えられるので、今後はTh2反応を抑制して、Th1,Treg反応を誘導しやすい免疫アジュバンドの併用、経皮的な抗原の微量投与など新たな治療戦略を考える必要がある。

E. 結論

牛乳アレルギーに対する経口免疫療法について科学性と倫理性を担保して、delayed controlによるランダム化比較試験を行い、本治療が負荷試験閾値を有意に上昇させ、日常生活で摂取可能な牛乳も多く例で著しく増加させることができることを証明した。しかしながら、真の耐性獲得率は低く、治療中の副反応も少なからず認められたことより、今後の治療法の改善が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itoh N, Itagaki Y, Kurihara K. Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. Allergol Int. 59; 43-51: 2010.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 伊藤直香. 食物アレルギーに対する根本的治療法、経口免疫療法について. 第5回栃木小児ア

レルギー疾患懇話会、2010年9月8日(招待講演)

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力、J-OIT 研究グループ. 鶏卵アレルギーに対する多施設 RCT による経口免疫療法1年後の経過. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会、2012年5月13日

8) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力、J-OIT 研究グループ. 牛乳アレルギーに対する急速経口免疫療法(多施設 RCT). 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会、2012年5月13日

9) 矢島裕子、高岡有理、鶴珠緒、池岡美根子、錦戸知喜、吉田之範、亀田誠、土居悟、伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力、J-OIT 研究グループ. 急速経口免疫療法を受けた児の保護者の生活の質(QOL)について. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会、2012年5月13日

10) 伊藤直香. 食物アレルギーに対する経口免疫療法とメカニズムの解明. 第29回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会、2012年6月17日(招待講演)

11) 伊藤直香. 食物アレルギーの現状と新しい根本的治療法「経口免疫療法」について. 第13回小児アレルギーAGORA 東京セントラル講演会、2012年7月4日(招待講演)

12) 伊藤直香. 急速経口免疫療法～多施設共同 RCT の結果からの考察～. 第5回愛知アレルギー・免疫療法研究会、2012年9月8日(招待講演)

13) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力、J-OIT 研究グループ. 追加発言: 鶏卵アレルギーに対する 多施設共同 RCT による急速経口免疫療法について. 第49回日本小児アレルギー学会、2012年9月15-16日(シンポジスト依頼)

14) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力、J-OIT 研究グループ. 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. 第49回日本小児アレルギー学会、2012年9月15-16日

15) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力. 鶏卵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経過について. 第40回日本臨床免疫学会、2012年9月27日

16) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力. 鶏卵アレルギーに対する急速経口免疫療法多施設 RCT の1年後経過. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012年12月1日

17) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力. 急速経口免疫療法の効果と副反応: 治療抗原による比較. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012年12月1日

18) 長門(伊藤)直香. 食物アレルギーに対する急速経口免疫療法の効果と副作用～多施設共同ランダム化比較試験の結果から～. 東京小児アレルギーフォーラム 2013、2013年2月23日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患
等予防・治療研究事業））分担研究報告書
食物アレルギーにおける経口免疫療法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	理研免疫アレルギー総合科学研究センター(RCAI) 免疫記憶研究グループ
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
	櫻井友里	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
	石戸晶子	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 収	RCAI 免疫ゲノミクス研究グループ
	谷口 克	RCAI センター長
	保坂俊彰	理研生命分子システム基盤研究領域 (SSBC)
	松田 幹	名古屋大学
	長尾みづほ	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

本研究班で行なわれている急速免疫療法によるアレルギー抑制機構を明らかにする目的で、治療経過における被験者サンプルを用いて免疫学的動態を解析した。すなわち、Capture 法によるアレルゲン特異的抗体量の測定、アレルゲンに対する抗体親和性の測定を行い、さらに治療前、治療後における被験者免疫細胞の発現遺伝子のプロファイルを RNAseq により解析した。その結果、急速飽和療法での維持期到達成功例では、アレルゲン特異的 IgG4 の IgE に対する量比および抗体親和性が上昇すること、また Th2 亜群の機能上昇に関与する遺伝子の発現が抑制状態にあることを明らかにし、食物アレルギー発症・治療マーカーとなり得ることが期待される。

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、急速飽和療法の科学的根拠を抽出するとともに、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

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液体窒素タンクに保管した。これらの検体を用い、以下の解析をおこなった。

1. アレルゲン特異的抗体の解析。

(1) Capture 法を用いて血漿中アレルゲン特異的 IgE, IgG 抗体量を測定した。すなわち、抗ヒト IgE または IgG4 (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 OMC を反応させて特異的 IgE および IgG4 を測定した。測定に際し IgE および IgG4 の量を計測する目的で、抗 OMC-IgG 抗体を産生するハイブリドーマより、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 および IgG4 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後培養液を回収し、His タグによる抗体精製を行った。

精製した抗体は生化学的解析により評価した。

(2) アレルゲン特異的抗体親和性の測定。

血清中に存在するオボムコイド (ovomuroid : OVM) に対する抗体と OVM への分子間相互作用反応を、Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて解析した。

すなわち抗ヒト IgG4 抗体もしくは抗ヒト IgE 抗体 (1 次抗体) をアミンカップリングで、センサーチップ表面に結合・固定化した。次に不溶性分画を除去した健常人・患者の血清を約 500 μ l 流し、血清中に含まれる IgG4 / IgE をセンサーチップに 1 次抗体を介して固定化した。ここから、buffer で非特異的吸着分子などを洗い流した後、系列希釈した精製 OVM を流し反応させ、相互作用を解析した。

2. 細胞性免疫の解析

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。これらの検体を対象としたバイオマーカー検索のパイロット実験として、国立病院機構三重病院において施行された急速飽和療法の前および後の維持期に達した患者検体を対象として以下の解析をおこなった。

(1) 発現遺伝子解析のための制御性 T 細胞 (Treg) と Th2 細胞の分離

Treg はアレルギーの疾患制御において重要な役割を果たすと考えられ、また、Th2 細胞はアレルギー反応を促進すると考えられている。アレルギー患者に置けるこれら主要 T 細胞における治療前および治療後の定常状態を明らかにする目的でこれら T 細胞亜群の精製を行なった。すなわち Treg として CD4⁺CD25⁺CD127^{low} の表現型を示す末梢白血球を、Th2 細胞としてプロスタグランジン D₂ のレセプターである CRTH2 を用いて、CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺CRTH2⁺細胞群を FACS にて精製分離した。分離した細胞についての系列を確認する目的で精製細胞より RNA を抽出後、GATA3 および Foxp3 発現遺伝子の発現を解析し、各細胞群が高度に (> 90%) 純化精製されていることを確認した。

(2) RNAseq によるアレルギー反応免疫細胞発現遺伝子の解析

定常状態の T 細胞、あるいは抗原刺激を受けた末梢血 CD4 陽性 T 細胞における発現遺伝子の網羅的解析を行った。抗原として低 LPS 化 OVM を用い、対照群は抗原なしとした。対象は免疫療法前および後の卵アレルギー児、対象とした喘息児の凍結末梢血単核細胞 (PBMC) を用い、46 時間の抗原刺激培養後、PBMC と Miltenyi Biotec 社 CD4⁺Tcell アイソレーションキット II を用いた CD4⁺Tcell より RNA 抽出を

行い、解析した。

C. 研究結果：

1. 急速飽和療法によりアレルギー特異的 IgG4 の量および親和性が IgE と比較して著明に上昇する

これまでの解析から、急速飽和療法維持期到達例では、OMC 特異的 IgG4 抗体量は IgE 抗体量と比較して 10 倍以上の高値で維持される一方、急速飽和療法に抵抗を示した患者での IgG4/IgE 抗体の量比は 10 倍以下であった。本年度、産生された抗体の親和性を測定すると、維持期到達例では OMC 特異的 IgG4 抗体の親和性は IgE 抗体と比較して約 10 倍高いことが示唆された。しかし、維持期に到達出来なかった患者 2 例では OMC 特異的 IgG4 抗体の親和性は IgE 抗体と比較して低いことが明らかとなった。興味あることに、卵アレルギー症状は認められないが、OMC 特異的 IgE 抗体の量が高い成人においても、OMC 特異的 IgG4 抗体の親和性は IgE 抗体と比較して約 10 倍高いことが示された。

2. 急速飽和療法により CD4 陽性 Th2 細胞における発現遺伝子の変動。

急速飽和療法前および治療を得て維持期に到達した患者末梢血から純化精製した CD4 陽性 Th2 細胞で発現する遺伝子を RNAseq 法により解析した。

その結果治療後に治療前と比較してそのコピー数が優位に上昇する9個の遺伝子が同定された。これら遺伝子の内の半数が、T細胞あるいはTh2細胞の活性化を制御する遺伝子として報告されている。

3. OMC 刺激末梢血細胞における発現遺伝子変動

急速飽和療法前および治療を得て維持期に到達した患者の免疫細胞の変動を解析する目的で、末梢血を OVM で刺激し、刺激後48hで発現する遺伝子をRNAseqにより解析した。その結果治療後に治療前と比較してそのコピー数が優位に上昇する6個の遺伝子が同定された。これらの遺伝子一部は樹状細胞に発現し免疫反応の制御に関わることが報告されている。同時に、維持期到達後、発現が抑制される遺伝子5個が同定された。特に維持期において約1/100に発現が抑制された特定のケモカインは、これまでにTh2細胞や、好酸球に作用し、アレルギーとの関連が報告されていることから興味深い。

D.考察：

本研究において、急速飽和療法成功例では OMC 特異的 IgG4 抗体量および親和性は同じ個体で産生される IgE 抗体よりも高いことが明確に示唆され

た。これまでに種々のアレルギー性疾患で高いレベルの IgG4 抗体はアレルギー反応の軽減に関与する可能性が報告されている。しかし、この作用が IgG による IgE の抗原結合阻害かあるいは IgG の Fc γ RIIB 結合を介した IgE によるマスト細胞、あるいは Basophil の活性阻害に起因するか不明で (Malbec and Daeron, Immunol. Rev. 217, 206, 2007)、今後の我々の検討課題の一つである。一方 IgG4 は他の IgGFab-Fc とのキメラを構築し二相性の特異性を獲得することが知られている (Fab-arm exchange, van der Neut Kofschoten et al. Science, 1554, 2007; abrijn et al. Nature Biotechnol. 767, 2009)、この形質が抗炎症性反応に関与する可能性も報告され興味深い。

我々は急速飽和療法にともない Th2 細胞内で変動する遺伝子、あるいはアレルギー刺激に伴い発現が上昇あるいは減少する遺伝子が急速飽和療法に伴いそのパターンが変動することを見いだした。これら変動する遺伝子のうちの多くが免疫制御に関連することが文献から示唆されていることから、このような複数の発現遺伝子の動態をさらに治療開始から維持期に至る時系列に沿って蓄積された検体を対象に、より正確な方法で測定し治療に至る細胞免疫系の biomarker を確定したい。またアレルギー反応の制御に

は制御性 T 細胞(Treg)の関与も推測されている事から、我々が分画した治療前後での Treg で変動する遺伝子の動態も早急に解析したい。

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

E 結論：

急速飽和療法に伴う細胞免疫系の動態を反映する biomarker の検索を行なった。この結果急速飽和療法にともないアレルゲンに対して親和性の高い IgG4 抗体が IgE 抗体の量の 10 倍以上産生されることを明らかにした。また急速飽和療法に伴い Th2 細胞で発現が上昇する一群の遺伝子を同定した。さらに、試験管内における末梢血のアレルゲン刺激により急速飽和療法後に発現が上昇あるいは発現が抑制される複数の遺伝子を同定した。今後の解析により、これら複数の発現遺伝子の動態が食物アレルギーと急速飽和療法での免疫動態を示唆する biomarker として評価されることが期待される。

D. 研究発表

1.論文発表
なし

2.学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況