

We thank all mothers and their babies, as well as the nursing staff, obstetricians, and pediatricians at the Health Insurance Naruto Hospital, JFE Kenpo Kawatetsu Chiba Hospital, and Chiba University Hospital, who participated in this study. We also thank all field workers who were involved in data collection.

Clinical implications: There is evidence for intrauterine sensitization of allergen-specific IgE in cord blood analyzed by a highly sensitive new allergen diagnosis microarray.

REFERENCES

- Scirica CV, Gold DR, Ryan L, Abulkerim H, Celedon JC, Platts-Mills TA, et al. Predictors of cord blood IgE levels in children at risk for asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:81-8.
- Ege MJ, Herzum I, Büchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Roponen M, et al. Protection Against Allergy Study in Rural Environments (PASTURE) Study group. Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:407-12.
- Peters JL, Suglia SF, Platts-Mills TA, Hosen J, Gold DR, Wright RJ. Relationships among prenatal aeroallergen exposure and maternal and cord blood IgE: project ACCESS. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1041-6.
- Halonen M, Stern D, Lyle S, Wright A, Taussig L, Martinez FD. Relationship of total serum IgE levels in cord and 9-month sera of infants. *Clin Exp Allergy* 1991;21:235-41.
- Lilja G, Dannaeus A, Falth-Magnusson K, Graff-Lonnevig V, Johansson SG, Kjellman NI, et al. Immune response of the atopic woman and foetus: effects of high- and low-dose food allergen intake during late pregnancy. *Clin Allergy* 1988;18:131-42.
- Pfefferle PI, Sel S, Ege MJ, Büchele G, Blümer N, Krauss-Etschmann S, et al. Cord blood allergen-specific IgE is associated with reduced IFN- γ production by cord blood cells: the Protection against Allergy-Study in Rural Environments (PASTURE) Study. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:711-6.
- Nambu M, Shintaku N, Ohta S. Relationship between cord blood level of IgE specific for *Dermatophagoides pteronyssius* and allergic manifestations in infancy. *Biol Neonate* 2003;83:102-6.
- Hagendorens MM, Ebo DG, Bridts CH, Van de Walter L, De Clerck LS, Stevens WJ. Prenatal exposure to house dust mite allergen (Der p 1), cord blood T cell phenotype and cytokine production and atopic dermatitis during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:308-15.
- Piastra M, Stabile A, Fioravanti G, Castagnola M, Pani G, Ria F. Cord blood mononuclear cell responsiveness to beta-lactoglobulin: T-cell activity in "atopy-prone" and "non-atopy-prone" newborns. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;104:358-65.
- Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999;353:196-200.
- Bønnelykke K, Pipper CB, Bisgaard H. Transfer of maternal IgE can be a common cause of increased IgE levels in cord blood. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:657-63.
- Rowe J, Kusel M, Holt BJ, Suriyaarachchi D, Serralha M, Hollams E, et al. Prenatal versus postnatal sensitization to environmental allergens in a high-risk birth cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1164-73.
- Miller DL, Hiravonen T, Gitlin D. Synthesis of IgE by the human conceptus. *J Allergy Clin Immunol* 1973;52:182-8.
- Lima JO, Zhang L, Atkinson TP, Philips J, Dasanayake AP, Schroeder HW Jr. Early expression of Iepsilon, CD23 (FepsilonRII), IL-4Ralpha, and IgE in the human fetus. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:911-7.
- Suzuki K, Hiyoshi M, Tada H, Bando M, Ichioka T, Kamemura N, et al. Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins. *Anal Chim Acta* 2011;706:321-7.
- Ewan PW, Coote D. Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 1990;45:22-9.
- Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21:3365-9.
- Ownby DR, McCullough J, Johnson CC, Peterson EL. Evaluation of IgA measurements as a method for detecting maternal blood contamination of cord blood samples. *Pediatr Allergy Immunol* 1996;7:125-9.
- Heinrich J, Bolte G, Holscher B, Douwes J, Lehmann I, Fahlbusch B, et al. Allergens and endotoxin on mothers' mattresses and total immunoglobulin E in cord blood of neonates. *Eur Respir J* 2002;20:617-23.
- Karmaus W, Arshad H, Mattes J. Does the sibling effect have its origin in utero? Investigating birth order, cord blood immunoglobulin E concentration, and allergic sensitization at age 4 years. *Am J Epidemiol* 2001;154:909-15.
- Sadeghnejad A, Karmaus W, Davis S, Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Arshad SH. Raised cord serum immunoglobulin E increases the risk of allergen sensitization at ages 4 and 10 and asthma at age 10. *Thorax* 2004;59:936-42.
- Vance GHS, Lewis SA, Grimshaw KEC, Wood PJ, Briggs RA, Thornton CA, et al. Exposure of the fetus and infant to hens' egg ovalbumin via the placenta and breast milk in relation to maternal intake of dietary egg. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1318-26.
- Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaidis KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996;36:248-55.
- Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Rev Reprod* 1999;4:81-9.
- Jennmalm MC, Björkstén B. Cord blood levels of immunoglobulin G subclass antibodies to food and inhalant allergens in relation to maternal atopy and the development of atopic disease during the first 8 years of life. *Clin Exp Allergy* 2000;30:34-40.
- Loibichler C, Pichler J, Gerstmayr M, Bohle B, Kiss H, Urbanek R, et al. Maternofetal passage of nutritive and inhalant allergens across placentas of term and preterm deliveries perfused *in vitro*. *Clin Exp Allergy* 2001;32:1546-51.
- Szépfalusi Z, Loibichler C, Hänel-Dekan S, Dehlink E, Gerstmayr M, Pichler J, et al. Most of diaplacentally transferred allergen is retained in the placenta. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1130-7.
- Holloway JA, Warner JO, Vance GH, Diaper ND, Warner JA, Jones CA. Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet* 2000;356:1900-2.
- Avrech OM, Samra Z, Lazarovich Z, Caspi E, Jacobovich A, Sompolinsky D. Efficacy of the placental barrier for immunoglobulins: correlations between maternal, paternal and fetal immunoglobulin levels. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;103:160-5.
- Eysink PE, De Jong MH, Bindels PJ, Scharp-Van Der Linden VT, De Groot CJ, Stapel SO, et al. Relation between IgG antibodies to foods and IgE antibodies to milk, egg, cat, dog and/or mite in a cross-sectional study. *Clin Exp Allergy* 1999;29:604-10.
- Bønnelykke K, Pipper CB, Bisgaard H. Sensitization does not develop *in utero*. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:646-51.

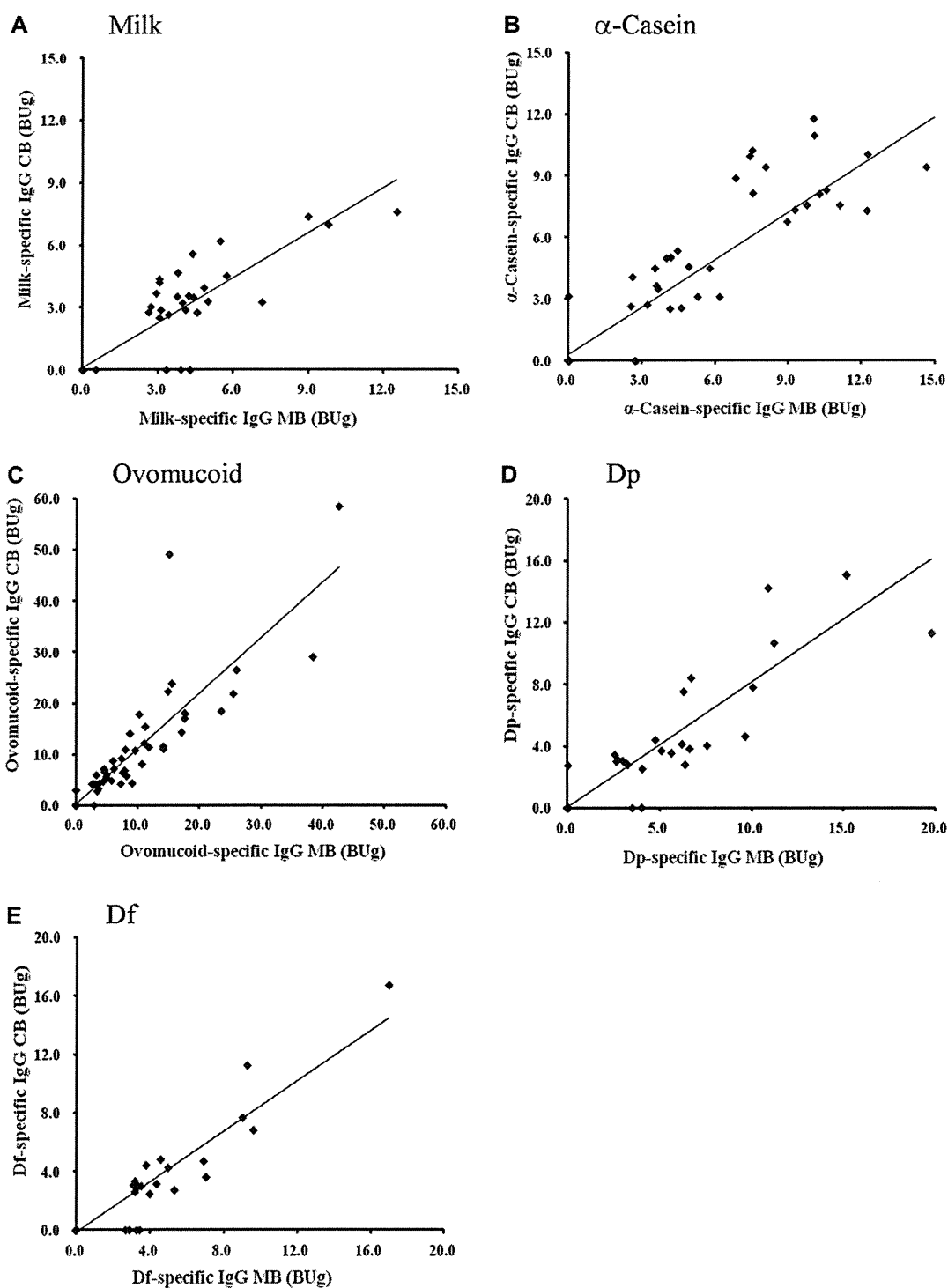


FIG E1. Comparison of allergen-specific IgG levels in CB and MB analyzed by the DLC chip. Allergen-specific IgG levels in paired samples of CB and MB ($n = 92$) depicted in BUg. The cutoff value was 2.50 BUg. **A**, Milk. **B**, α -Casein. **C**, Ovomuroid. **D**, Dp. **E**, Df. Spearman's rank correlation test was used to assess the relation between CB and MB. *Df*, *Dermatophagoides farinae*; *Dp*, *Dermatophagoides pteronyssinus*.

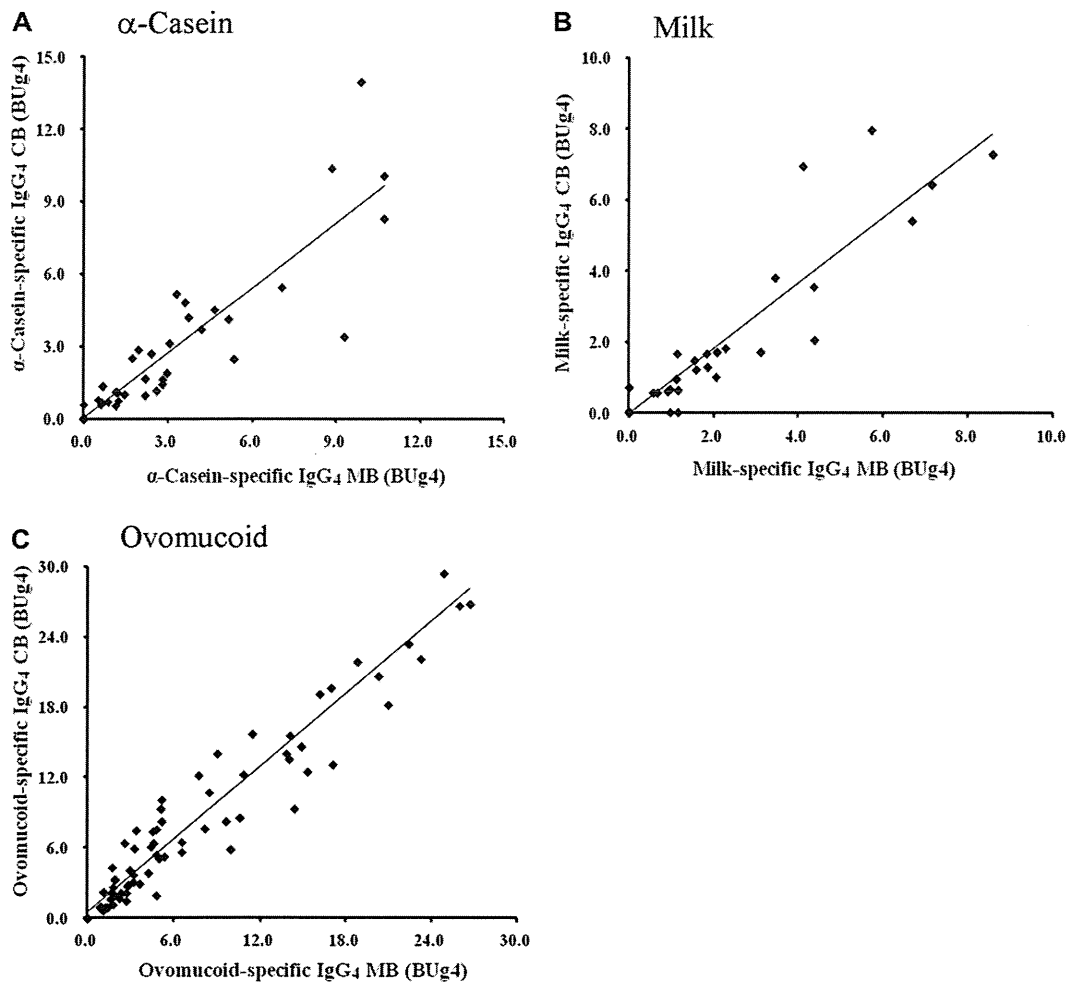


FIG E2. Comparison of allergen-specific IgG₄ levels in CB and MB analyzed by the DLC chip. Allergen-specific IgG₄ levels in paired samples of CB and MB ($n = 92$) depicted in BUg₄. The cutoff value was 0.53 BUg₄. **A**, α -Casein. **B**, Milk. **C**, Ovomuroid. Spearman's rank correlation test was used to assess the relation between CB and MB.

「アレルギーの臨床」に寄せる -617-

低侵襲性高感度マルチ抗原アレルギー診断チップの開発

Development of the multi-antigen allergy diagnostic chip with low invasiveness and high sensitivity

- 1) 応用酵素医学研究所株式会社
2) 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

すずき	こういち	かめむら	のりお
鈴木	宏一 ¹⁾	亀村	典生 ²⁾
ただ	ひとみ	くぼた	けんじ
多田	仁美 ²⁾	窪田	賢司 ¹⁾
さわぶち	たかこ	きど	ひろし
澤淵	貴子 ²⁾	木戸	博 ²⁾

鈴木 宏一
2002年北海道大学理学部卒業。08年徳島大学大学院医学教育学部
修士課程終了。09年徳島大学疾患酵素学研究センター研究員、10
年応用酵素医学研究所株式会社起業。代表取締役社長兼任。研究
テーマ：低侵襲性アレルギー診断チップの開発研究。趣味：ドラ
イブ。

Key words：蛋白チップ、アレルゲンスクリーニング、
多項目アレルゲン特異的抗体検出法、DLC、臍帯血

はじめに

Abstract

近未来のアレルゲン同定法の一つとして、ハイスループットの多項目アレルゲン特異的抗体検出法が挙げられる。我が国ではこれまでもMAST、イムファストチェックなどの測定法が知られているが、新たにカルボキシル化Diamond-Like Carbon(DLC)を基板に高密度抗原濃縮を達成した蛋白チップによる多抗原の検出法が開発されている。この方法では、1-2マイクロリッターの血液や体液で様々の多項目抗原に対する抗体価を測定し、UniCAPの測定限界をさらに1/4-1/8にまで下げた高感度化と広い測定域、高い特異性が達成され、アレルギー診断の新技术として注目されている。また、非特異的吸着を抑えたDLCチップでは、これまで測定することができなかった臍帯血中の抗原特異的抗体を測定することが可能となった。

タイプIアレルギー患者の治療方針を医師が立てる際に最初に行う検査が、診療ガイドライン¹⁾などに示された方法で行うアレルゲン検査である。これまで、安全性や簡便さの点から、UniCAPのような血清中の特異的IgE検査が広く用いられてきた。しかし、近年では、これまで実施されてきたアレルゲンの検査法の改良に向けた技術革新が始まっている。改良を促す現行検査法の問題点に、抗原特異的IgEレベルと患者のアレルギーの症状とが必ずしも相関しない例が、見過ごせない程度患者に見られることが挙げられる。その原因追究と検査法の見直しの中で浮かび上がってきたことに、これまで検査に用いられてきたアレルゲン抽出溶液への疑問がある。アレルギー原因物質からアレルゲン抽出液が調整され、これを抗原とした特異抗体の検出キットが作成されているが、アレルゲンの抽出溶液の調整法についての検証と改良の必要性が認識されつつある。医師とキット製造メ

カルボキシル化DLCの作成手順

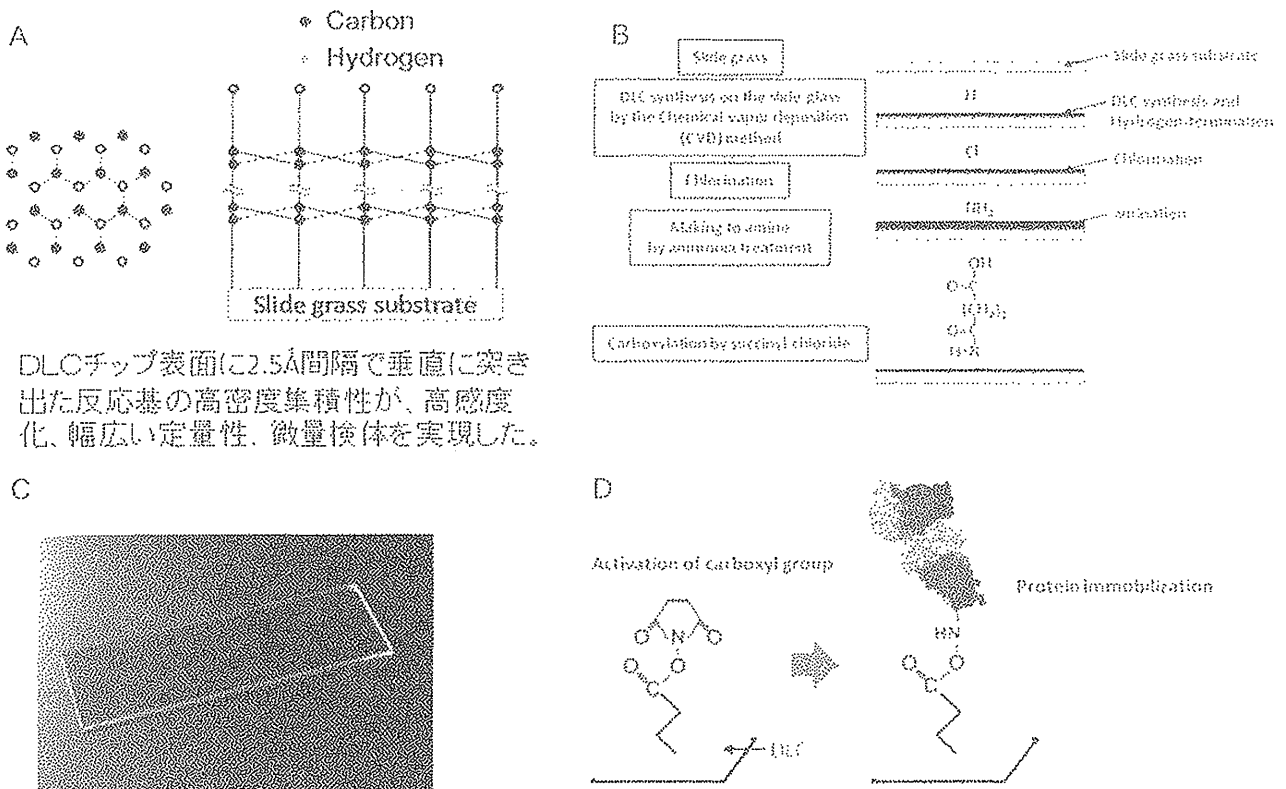


図1 カルボキシル化DLCチップの高密度抗原集積性の原理

一カは、協力してこの問題に取り組む必要がある。例えば現在使用されているアレルギー抽出溶液は、アレルギーの全てが十分抽出されているわけではなく、患者の中には抽出溶液に含まれていない抗原や微量成分が原因となったアレルギーのために、検査結果に表れてこない例が少なからずあると推定される。

同様の問題が、アレルギー免疫療法に用いられる標準アレルギーエキスの調整にも見られる。これからのアレルギー検査は、精度の上昇した抗原抽出方法によるハイスループット診断が望まれる。世界のアレルギー診断は、同時多項目アレルギー診断の方向に進みつつある。検査する項目が多くなるにつれ必要とする血液量が多くなり、乳幼児や小児の場合を考えると、出来るだけ少量の血液による多項目測定が望まれる。

さらに、数分間から1時間以内の患者の待ち時間に検査結果が出る迅速性や、アレルギー状態を反映するIgE以外のIgAやIgG、IgG4等他の抗体量の測定やサイトカイン量の測定等、IgEを取り巻く多くの指標を取り入れた総合的判断の必要性が強く認識されてきている。さらに、アレルギー負荷試験の適否の判定指標、アレルギー治療の適否の判定指標、アレルギーの予防に向けた指標等、新たな検査方法の開発が望まれている。

上記の問題解決に向けた検査方法改良の一つが、多項目アレルギー特異的抗体検査法である。現在我々が開発しているアレルギー蛋白チップ検査法を含め、現状を紹介したい。

1. 多項目アレルギー特異的IgE測定法の現状

アレルギー患者は、単一のアレルギー感作から始まっても、時を経るに従って複数の抗

表1 DLCチップとUniCAPを使用した食物抗原及び吸入抗原に
対するアレルギー特異的IgE抗体の検出感度の比較
NDはUniCAPによる検査で<0.35

Allergen	臍帯血(希釈率 1:1)		母体血(希釈率 1:1)	
	DLCチップ (Bue/mL)	UniCAP (PRU)	DLCチップ (Bue/mL)	UniCAP (PRU)
食物抗原				
卵白	30.35	ND	77.41	0.545
	11.02	ND	23.65	ND
オボムコイド	180.0	ND	134.8	0.960
	84.89	ND	64.66	ND
	13.30	ND	23.15	ND
牛乳	221.4	ND	182.7	1.095
	30.90	ND	61.71	0.540
	18.05	ND	23.15	ND
吸入抗原				
スギ花粉	55.55	ND	90.98	0.960
	21.78	ND	32.20	ND
コナヒョウヒダニ	54.01	ND	80.76	1.275
	47.38	ND	25.53	ND
ヤケヒョウヒダニ	63.04	ND	215.6	2.950
	26.48	ND	60.70	ND

原に感作されてしまうアレルギーマーチと呼ばれる現象が見られることが多い²⁾。あるいは食物アレルギーに見られるように、血液中にその痕跡を残しながら卵やミルクアレルギーが治癒した後で、新たな抗原に感作されてしまうケースが見られる。そのため、医師は患者が反応するアレルギーを多項目に渡り判定する必要がある。その場合、単項目アレルギー測定よりは、多項目同時測定のアレルギー検査がより正確な情報を与える。我が国の臨床現場で使用されている多項目同時測定系では、MAST³⁾、イムノファストチェック⁴⁾などがある。海外では、内部標準としてIgEスタンダードを搭載して測定の精度を高めたImmuno Solid-phase Allergen Chip (ImmunoCAP ISAC)⁵⁾がある。我が国では、抗原の高密度集積能において優れた基板であるカルボキシル化Diamond-Like Carbon (DLC)を用い⁶⁾、内部標準IgEスタンダードと多項

目抗原を搭載した蛋白チップが、体外診断用医薬品申請の準備に入っている。このような新たな検出技術の革新と、アレルギー抽出法の改良が同調して発展することが望まれる。

2. カルボキシル化DLCチップを基板にした多項目特異的抗体測定Allergen Chipの概要

アレルギー診断に低侵襲性、検体の微量化、迅速性、高感度化、多項目検出を実現するために我々が選んだ方法は、DLCチップ(図1C)を基板にした多項目特異的抗体測定Allergen Chip法である。DLCチップは、図1Aに示すように、2.5Å間隔で表面からほぼ垂直に突き出した反応基(カルボキシル基)の高密度集積性が、高感度化、幅広い定量性、迅速性、微量の検体を実現する基本要素となっている。現在この技術により、1mm²あたり(0.94-7.82)×10⁶分子と高密度に抗原蛋白質をDLCチップ基板上に固定化することが

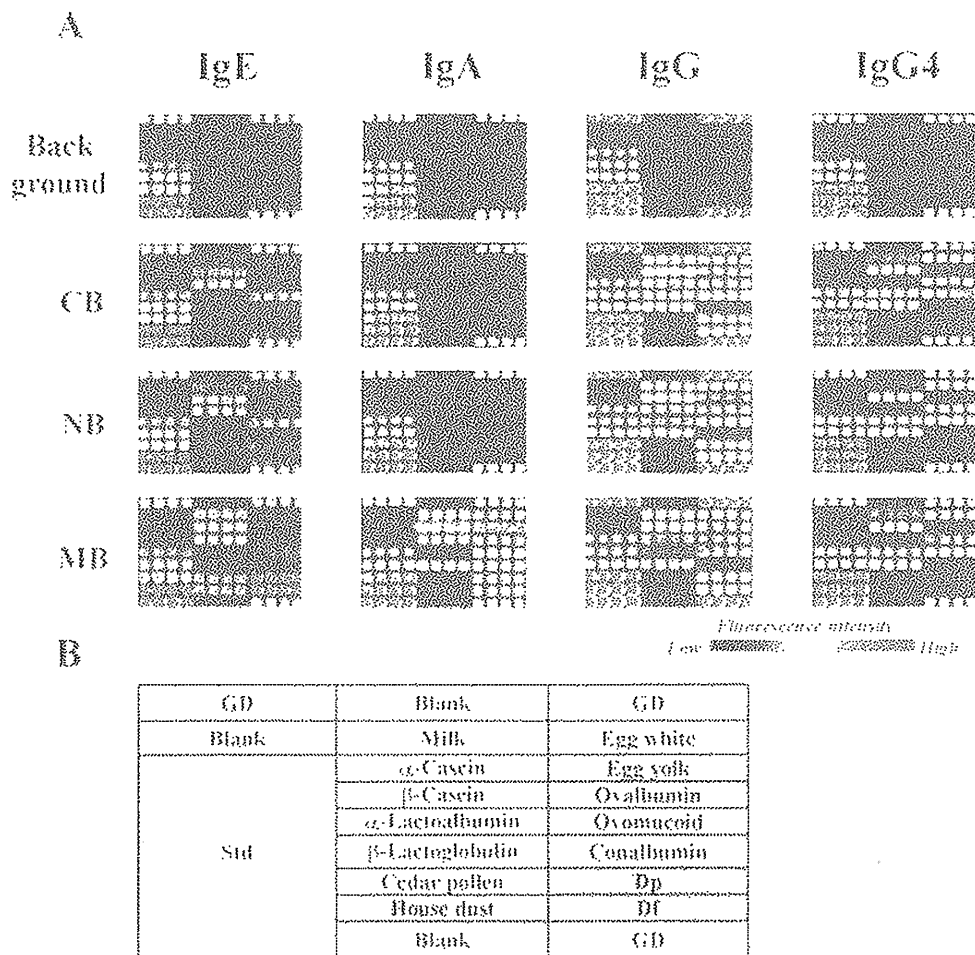


図2 臍帯血(CB)新生児血(NB)母体血(MB)中の抗原特異的抗体反応パターン(A)とDLCチップの抗原搭載レイアウト(B)

可能となっている⁹⁾。検出は化学発光酵素免疫測定法を用いている。DLCチップでは高密度集積性の反面、非特異的吸着性も高いため、ブロッキングと洗浄工程での工夫が重要となる。一般にマイクロアレイでは、アレイ間のデータのばらつきが問題になることがあるが、これを最小限に留め安定したデータを得るために、この高密度集積性が重要な役割を果たしている。現在、DLC基板素材の検討と化学発光の検出波長の検討、及び最適なブロッキング試薬による非特異的吸着の抑制が進んで低バックグラウンド化が実現され、これに伴い高感度化が進んでいる。内部標準としてIgEを搭載してデータの再現性を高め、1-2マイクロリッターの血液や体液で様々の

多項目抗原に対する抗体価が測定可能となっている。測定感度では、UniCAP[®]の測定限界をさらに1/4-1/8にまで下げた高感度化が達成されている。具体例を以下に紹介する。

非特異的IgE含有量の多い臍帯血ではその中に微量に含まれる抗原特異的IgEを選択的に測定することは、これまでの測定方法では困難であった。表ではこれまでの方法では測定不可能であった臍帯血中の特異的抗体を正確に測定できる出来ることが示されている¹⁰⁾。これらの技術により、従来測定が不可能であった胎児の抗体産生の検証や、唾液、鼻汁中のアレルギー特異的抗体の測定を可能にし、アレルギー状態をより詳細に解析することができるようになった。図2にはDLCチ

ップによる臍帯血(CB), 新生児血(NB), 母体血(MB)の抗原特異的抗体の反応パターンが示されている。母体血では吸入抗原のダニに特異的なIgEが検出されているが, 臍帯血, 新生児血にはこれらの吸入抗原に対するIgE抗体は検出されず, 主に食物アレルギーに対するIgE抗体が検出されている。このように特異的IgAの臍帯血と母体血の反応性の違い, 及び食物抗原と吸入抗原の臍帯血と母体血における特異的IgE反応パターンの違いにより, 臍帯血中に検出されるIgE抗体が胎児由来であること, またIgA抗体は母子移行しないことが示された¹⁰⁾。

3. アレルギー診断法のこれから

アレルギーの患者数は年々増加し, 国民のおよそ30%が何らかのアレルギー症状を持ち, アレルギーが国民病として位置付けられている今日, 臨床現場では, より患者負担が少なく, 精度の高い診断方法が望まれている。アレルギーの原因物質の同定だけでなく, アレルギーの治療の指針を示したり, 臍帯血診断を始めとする予防にも貢献する検査方法が期待されている。また, IgE以外の抗原特異的IgA, IgG4, IgG抗体量の正確な同時測定が可能となり, 減感作療法のためのBiomarkerとしての詳細な検証が始まっている。このような新たな試みが, 多項目抗原特異的抗体測定Allergen Chipの延長線上に企画されているが, その第一歩が, 高感度化, 幅広い定量性, 迅速性, 微量検体を実現した多項目特異的IgE測定であった。この方法を, 血液以外の体液診断にも拡大, IgA, IgG, IgG4等のIgE以外の抗体価測定への拡充, それらの測定結果を評価する際の各データの重み付けのため, データの集積が必要となっている。一方, 診断薬製造メーカーも, 精度の高い測定に向け

たアレルギー抽出方法の再検討と改良, 大気等の環境因子による抗原のニトロ化, 酸化, 硫酸化等の化学修飾に対応した抗原の調整が必要となってきた。

おわりに

世界のアレルギー診断の方向性は, 多項目の抗原特異的抗体測定に舵を切りつつある。それと共に, アレルギー疾患の様々なコホート研究が計画されている。技術革新が現場の診療と研究に大きな影響を及ぼすことは, これまで幾度か経験してきたが, アレルギー診断の領域にも新たな技術革新が到来しつつあると予感する。その一つが, アレルギー診断の原点に帰った抗原からのアレルギーの抽出方法の見直しで, より網羅的な多項目抗原特異的抗体の測定の可能性が示されつつある。更に, 単なるアレルギー原因物質の特定だけでなく, 減感作療法のためのBiomarkerの探索や臍帯血検査等, より積極的な治療や予防のための診断に発展する方向に向かっている。

文献

- 1) 奥田稔, 他: 鼻アレルギー診療ガイドライン 2009年版: 18-31, 2008
- 2) 増田敬祐: アレルギーの臨床, 29(8), 17-20, 2009
- 3) 中川武正 「ガイドラインに沿った抗アレルギー薬の用い方の詳細」 中外医学社, 東京, 2000
- 4) 井川達也: アレルギーの臨床, 29(8), 50-55, 2009
- 5) Ono T, Kawamura M, Arai S, *et al*: J. Immunol. Methods 272(1-2): 211-218, 2003
- 6) Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, *et al*: Methods 32: 249-254, 2004
- 7) 新田麗子, 他: IEICE Tech Report 105: 21-23, 2005
- 8) Suzuki K, Hiyoshi M, Tada H, *et al*: Anal Chim Acta. 2011 Nov 14;706(2):321-7.
- 9) 奥平博一, 他: アレルギー 40: 544-554, 1991
- 10) Kamemura N, Tada H, Shimojo N, *et al*: J Allergy Clin Immunol. 2012 Mar 29. (In Press. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.023)

唾液を用いたアレルギー診断の新技术と今後の展望

Future Prospects of Allergen Determination of Saliva by a New Protein-chip Technology

木戸 博^{*1} 亀村典生^{*2}鈴木宏一^{*3} 多田仁美^{*4} 日吉峰麗^{*5}

アレルギー特異抗体定量用の高感度ハイスループット蛋白チップが開発された。Diamond-Like Carbon (DLC) 基板に高密度にアレルギーを固定化することで、これまでにない高感度測定法が確立された。血液はもとより唾液を含む各種体液の抗体価測定が可能であるが、唾液の測定では血液と違って注意しなければならない事項があり、これらの点と今後の展望を紹介したい。

1. はじめに

医師がアレルギー患者の治療方針を立てる際に最初に行う検査が、診療ガイドライン¹⁾などに示された方法で行うアレルギー検査である。しかし抗原特異的IgEレベルと患者のアレルギーの症状とが必ずしも相関しない例や、UniCAPの定量性の問題で比較的高い値(特に100Uaを超える場合)の定量性に問題点が浮かび上がってきており、これらの問題を解決する試みが行われている。本稿では、微量検体(数マイクロリッター)で、高感度でしかも幅広い範囲で測定可能な新測定法のDLCアレルギーチップについて紹介すると共に、このチップを用いた唾液のアレルギー診断について紹介したい。

2. DLC多項目アレルギー特異抗体測定法

微量の検体で一度に多項目のアレルギー特異抗体価を定量する方法が望まれている。これまで市場に出ている多項目アレルギー特異抗体IgEの測定系には、MAST²⁾、イムノファストチェック³⁾などが、海外では内部標準としてIgEスタンダードを搭載したISAC社のImmuno Solid-phase Allergen Chip⁴⁾がある。従来の蛋白チップは、単位面積当たりの抗原の固定化量が比較的小さいため、Molecular AllergenのようなRecombinant抗原を搭載する場合は抗体価の測定が可能であったが、卵白、牛乳、花粉、小麦などその成分内に複数の抗原が混在する場合には、正確な測定ができない欠点があった。この欠点を克服して、複数の抗原が内在する場合でも、また単一抗原の場合でも、共に幅広い範囲で測定できるようになった

^{*1}Hiroshi Kido 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

^{*2}Norio Kamemura 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 助教

^{*3}Koichi Suzuki 応用酵素医学研究所 (AMERIC) (株) 代表取締役社長

^{*4}Hitomi Tada 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

^{*5}Mineyoshi Hiyoshi 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 助教

新システムが、DLC多項目アレルギー特異抗体測定法である^{5,6)}。

DLCチップは図1に示すように、ガラス基板の表面をChemical vapor deposition法による人工合成ダイヤモンド薄膜で被覆し、その表面に図1Bに示す手順で化学修飾を加え、最後にSuccinyl chlorideで化学修飾することで、ほぼ2.5Å間隔でガラス表面から突き出た炭素鎖3個のリンカー末端にカルボキシル基(合計4個の炭素鎖)を高密度に集積したチップである。アミノ基を持つ蛋白質やDNAを化学結合で安定固定化できる。蛋白質の表面に出ているアミノ基と反応してチップ表面に固定化するが、文献上これまでで最も高濃度に蛋白質を固定化できる方法である⁵⁾。チップとアレルギー蛋白質との間を繋ぐリンカーの長さは様々に変えることが可能で、抗原間の相互作用による立体構造障害が考えられる場合は、長いリンカーで抗原間の間隔を開けて抗原抗体反応の最適化を図ることが可能である。これまでの検討では、リンカーの炭素鎖を12個まで伸ばして抗原・抗体反応の反応性を検討したが、炭素鎖4個のSuccinyl chlorideの場合と有意な差が見られないことから通常は炭素鎖4個のシステムを採用

している。DLC基板にアレルギーを固定化した後、従来法のEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)をDLC基板上の反応に最適化することで、これまでにない高感度化と幅広い測定範囲を実現した⁵⁾。

図2は血液検体を用いた抗原特異的IgEの測定例で抗体価をレインボー表示している。測定に必要な血清量は1-2マイクロリッターで、左端に濃度の異なるIgEスタンダードを、右端に様々なアレルギーを搭載している。図2Bはアレルギーのないボランティアの血清例で、アレルギーと反応する抗体は検出されなかった。図2Cはアレルギー患者の例で牛乳と卵の両方にアレルギーのある患者であった。DLCチップでの測定方法は、このようにアレルギーの認識パターンを示すと共に、搭載した内部標準IgEから各々のアレルギーに対する抗体価を正確に定量することができる。

図3に、同一人血清中のIgE, IgG, IgG1, IgG4, IgAと唾液の分泌型IgAのアレルギーパターンを示している。体内に侵入したアレルギーに対して生体はIgE, IgG, IgG1, IgG4, IgA抗体を作るが、図に示すように各々の抗体は、反応

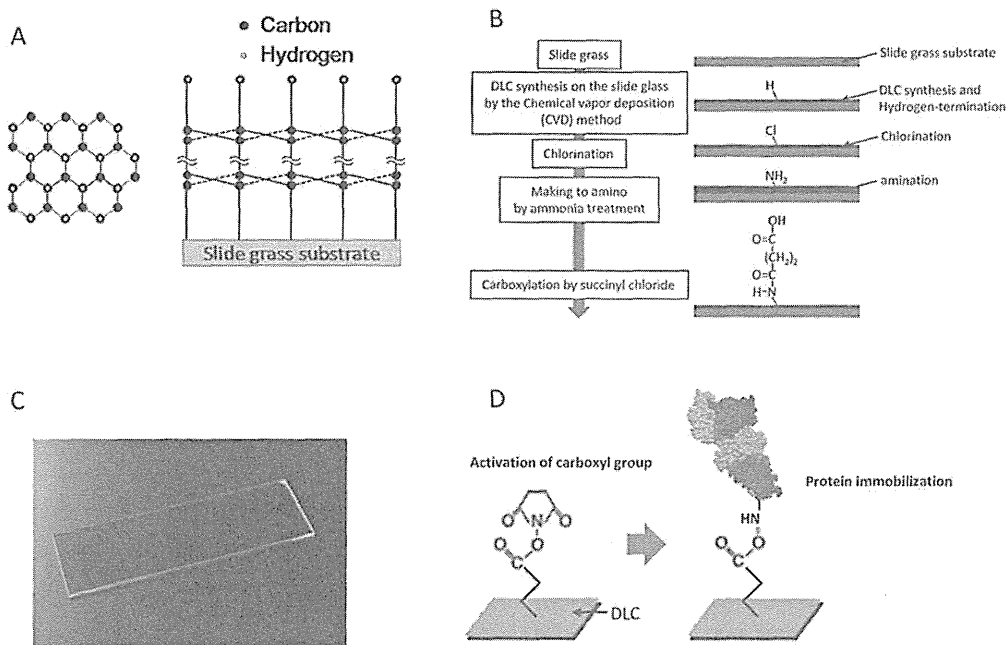


図1 カルボキシル化DLCチップの高密度抗原集積性の原理

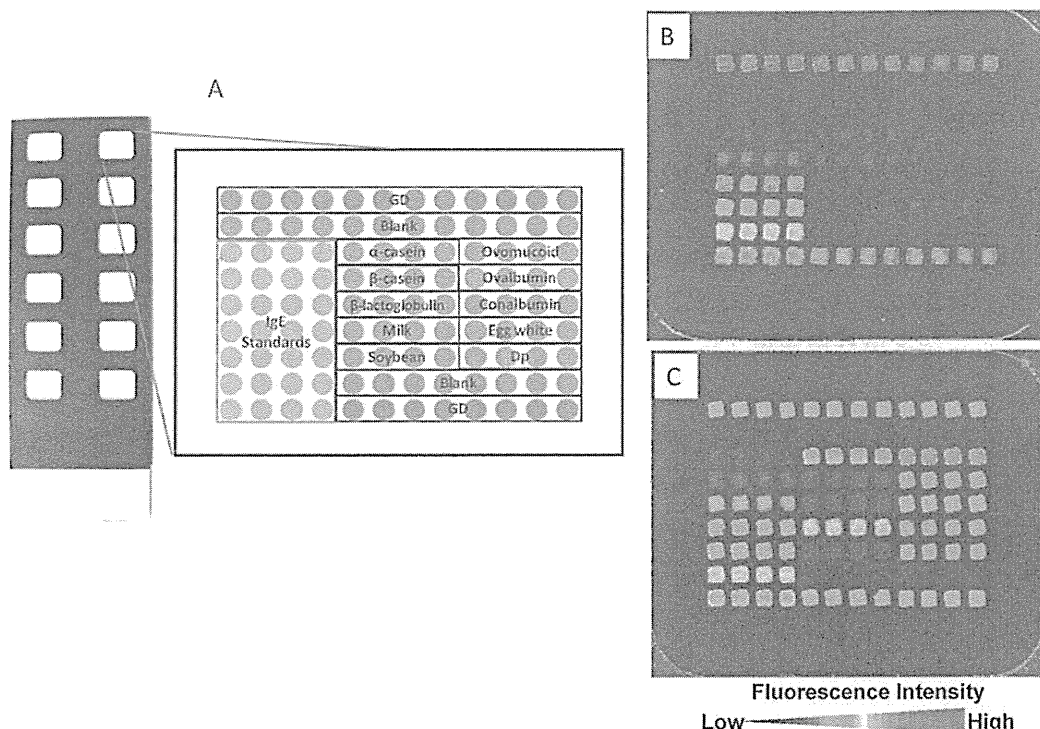


図2 カルボキシル化 DLC チップを用いたアレルギー患者血液のアレルゲン特異的 IgE 抗体の測定例
 A：アレルゲンと内部標準 IgE 抗体搭載のレイアウト図。B：アレルギー既往歴のない健常ボランティア血液の場合。C：アレルギー患者血液 IgE のアレルゲンプロファイリング。
 図中 GD：センサーチップの位置決めをするためのガイドラインスポット
 蛍光強度をレインボー表示している。

する抗原の種類、反応強度がばらばらで、同じパターンを示す抗体はない。即ち生体のアレルギー状態は、常に変動を続けるそれぞれの抗体の総和と言えるが、それぞれの抗体はそれぞれの役割の中で絶えず変動していることがわかる。しかし現状では、アレルギー状態におけるそれぞれの抗体の役割が明確になっておらず、その解析途上にある。これまで IgE はアレルギーの発症に、IgG4 はアレルギーの抑制に働いていることを示す根拠データを得ているが、他の抗原特異的抗体については解析データの蓄積が始まったところで、その意義については未だ明確でない。唾液中の抗体は、分泌型 IgA がその約 90% を占めて最も多く、次いで IgG が続き、わずかに IgE が検出されるが、一般にアレルゲン特異的抗体は血清に比べて検出されにくくまた検出されるアレルゲンパターンも血清の場合と異なる。アレルギーにおける唾液の分泌型 IgA の診断的意義はまだ明確に証明されているとは言えない。DLC チップによる検

出感度の向上と共に、唾液のアレルゲン特異的 IgE が検出される例が出ているが、血清の抗アレルゲン抗体の検出に唾液の検出が代われるわけではない。即ち全身免疫状態を示す血清のデータと局所免疫状態を反映する唾液のデータは、病態医学的意義解明において相互に補い合う関係にある。

3. 唾液の抗アレルゲン抗体測定

唾液は耳下腺、顎下腺、舌下腺から分泌されるが、その濃度には日内変動や分泌腺による濃度の違いも知られている。また年齢による分泌量の違いもあることからアレルゲン特異的 IgA の測定は、Total IgA を分母にしてその中に含まれるアレルゲン特異的 IgA 量を定量することで解析データの再現性の向上と相互比較を可能にしている。さらに唾液には食物残渣が含まれることが多く、これがアレルゲン特異的 IgA の測定を攪乱するため、口をすすいだ後で採取する必要がある

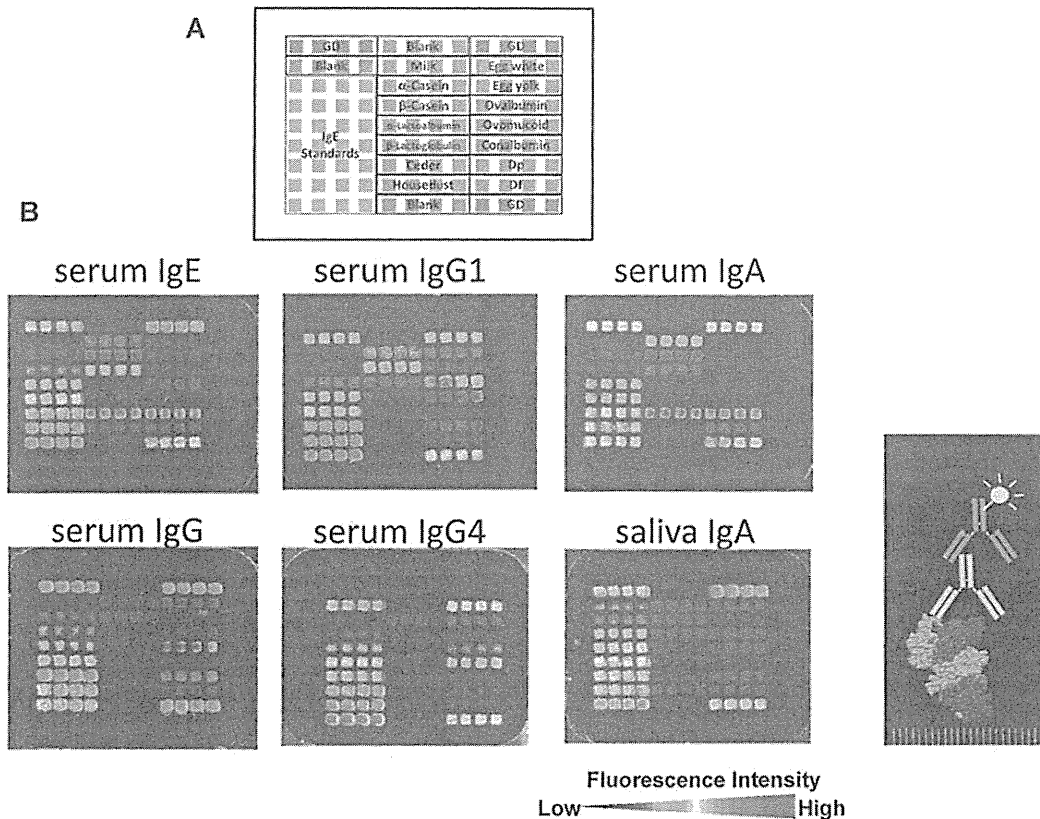


図3 アレルギー患者血液中のIgE, IgG, IgG1, IgG4, IgA, 唾液のIgAのアレルゲンプロファイリング
A: アレルゲンと内部標準IgE抗体搭載のレイアウト。B: アレルギー患者血液中のIgE, IgG, IgG1, IgG4, IgA, 唾液のIgAのアレルゲンプロファイリング。

る。加えて口腔内の細菌叢が出すプロテアーゼによる抗体の分解も、採取後の保存方法や保存時間によっては無視できなくなる。唾液の中には leukocyte protease inhibitor^{7,8)}が含まれていることから、trypsin-typeのプロテアーゼ群への阻害効果があるため、唾液採取後に速やかに残存食物残渣や細菌を遠心除去して-20℃以下に保存すれば、アレルゲン特異的IgAの値に影響することはない。

唾液中の分泌型IgAの測定意義については、病原性細菌を含む外来異物の侵入口である粘膜における防御抗体としての意義が知られているが、実際のアレルギーの発症と治癒の病態にどのように関係しているかについては解析が始まったところである。これまで解析が進んでいなかった大きな理由は、測定法の感度限界、測定機材の入手の困難さ、網羅的な解析ができなかったため測定値の意義付けが困難であったこと等によると推定さ

れる。

唾液以外の体液の抗アレルゲン抗体測定も有用で、鼻汁、涙液、腸管分泌液中に含まれるIgA, IgG, IgE抗体の検出方法の開発も合わせて進んでいる。花粉症やダニ抗原のように経気道に侵入するアレルゲンの場合、炎症局所となる鼻粘膜が分泌する鼻汁、涙液の抗アレルゲン抗体の測定がより直接的な意味を持つ。図4に同一人から採取した血清、唾液、鼻汁の抗アレルゲンIgA抗体のパターンを示す。唾液より鼻汁の方がより感度良く抗アレルゲン抗体を検出することができる例となっているが、血清と鼻汁でアレルゲンパターンが異なっており、それぞれの免疫系の違いを反映したもので、今後それぞれの意義付けと相互関係の解析が待たれる。

腸管アレルギーの現場である腸粘膜が分泌する各種抗体を正確に把握することがこれまで困難であった。その理由は、便中に大量に含まれる大腸

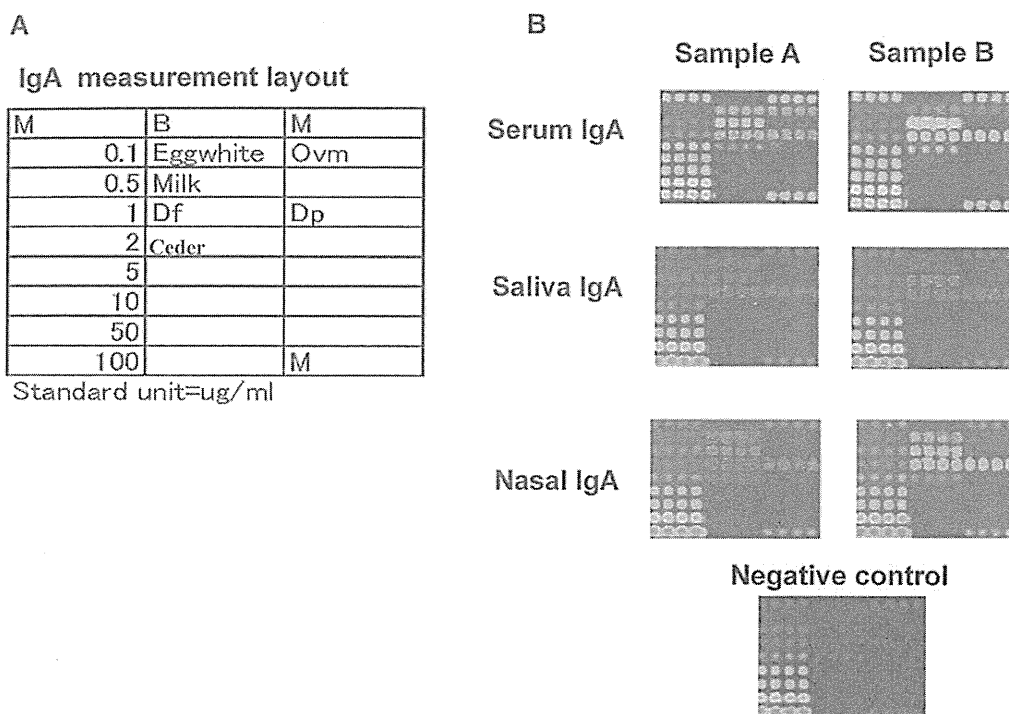


図4 アレルギー患者AとBの血液と唾液、鼻汁のIgAのアレルゲンプロファイリング
A：アレルゲンと内部標準IgA抗体搭載のレイアウト。B：アレルギー患者の血液と唾液、鼻汁のIgAのアレルゲンプロファイリング。

菌が分泌する各種プロテアーゼによって抗体やサイトカインが速やかに分解されてしまい、その痕跡が僅かに見えるか全く検出できなくなるからである。この問題を解決するための各年齢層の便の大腸菌が分泌するプロテアーゼとその阻害剤の解析、阻害剤の最適化が進み、採取直後の新鮮便を保存する保存液が平成24年度に開発・市販されるに至った。この便や体液の溶解保存液で、今まで見えなかった腸管粘膜の抗アレルゲン抗体やサイトカインの安定測定が可能になってきた。

4. おわりに

唾液を用いたアレルギー診断は、非侵襲性で幼児でも容易に採取できることからその測定は強く期待されている。しかし全身のアレルギー状態を唾液に含まれる抗体がどの程度、どのように反映しているかについての詳細な解析は未だ成されていない。全身免疫系と局所免疫系は相互に影響しながらそれぞれが独自性を持った反応のパターンであることから、唾液を用いたアレルギー診断

は、血清を用いたアレルギー診断に代わるものではない。血液、唾液、鼻汁、涙液等の抗アレルゲン抗体の測定結果を総合的に判断することで、アレルギー病態を正確に把握できることになる。現状ではこのような目的に向かって、患者の協力を得ながらのコホート研究や減感作療法研究での詳細なデータを積み重ねている段階である。DLCチップの多項目アレルゲン特異抗体測定法の技術革新がもたらす新情報が、現場の診療と研究に大きな影響を及ぼしつつある。

文 献

- 1) 奥田稔ほか、鼻アレルギー診療ガイドライン2009年版, 18-31 (2008)
- 2) 井川達也, アレルギーの臨床, 29, 50 (2009)
- 3) Ono T *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 272, 211 (2003)

4) Deinhofer K *et al.*, *Methods*, 32, 249 (2004)
 5) Suzuki K *et al.*, *Anal. Chim. Acta.*, 706, 321 (2011)
 6) Kamemura N *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 130,

113 (2012)
 7) Kido H *et al.*, *Biopolymers*, 51, 79 (1999)
 8) Beppu Y *et al.*, *J. Biochem.*, 121, 309 (1997)

ものづくり技術からみる再生医療 —細胞研究・創薬・治療—

監修：田畑泰彦（京都大学）

- ★ 再生医療の実現のために必要不可欠なのは、日本が誇る「ものづくり技術」だった!
- ★ 細胞を支える“家”と“食べ物”—生体材料や生理活性物質の研究が治療へと繋がる!
- ★ 基本的な“材料”と“技術”，そして“臨床応用”事例から“産業化”への課題まで、再生医療分野参入へのヒントがここに!

**HIGH TECHNOLOGY
 INFORMATION**

序論	ものづくり技術からみる再生医療	第10章	細胞の評価技術
【第1編：再生医療に必要な“材料”とは】		【第3編	ものづくり技術を生かした再生医療の臨床応用】
第1章	細胞 (ES細胞・iPS細胞)	第1章	再生誘導スペース確保のためのバイオマテリアル— 歯周組織再生誘導法 (GTR 法)
第2章	細胞 (その他の幹細胞など)	第2章	再生治療に必要なドラッグデリバリーシステムとバ イオマテリアル技術
第3章	再生医療のための培養器材	第3章	細胞増殖因子徐放化ハイドロゲルを応用した血管新 生誘導
第4章	ものづくりに役立つ細胞外マトリックス	第4章	足場材料による骨欠損再生—眼窩下壁骨折に試用し たバイオマテリアルの骨形成能とその長期成績—
第5章	細胞増殖因子・成長因子	第5章	足場材料と bFGF を用いた難治性皮膚潰瘍治療
第6章	生理活性物質ケモカイン	第6章	細胞と細胞増殖因子を用いた難治性皮膚潰瘍治療
第7章	生体吸収性および非吸収性高分子	第7章	細胞と足場材料を用いた関節軟骨再生治療
第8章	金属とセラミックス	第8章	多血小板血漿と足場材料を用いた骨再生治療
第9章	DDS・徐放化技術	第9章	角膜再生治療と足場材料 大家義則, 西田幸二
【第2編：再生医療に必要な“技術”とは】		第10章	セラチンハイドロゲルによる IGF-1 徐放を用いた 難聴治療
第1章	バイオマテリアル足場技術と細胞の三次元化	第11章	bFGF 徐放化ハイドロゲルを用いた鼓膜再生治療
第2章	ものづくりとしての細胞シート工学	【第4編：再生医学から再生医療へ—産業化に向けて—】	
第3章	ES/iPS 細胞の増殖・分化・組織構築を制御する人 工マトリックスの設計	第1章	再生医療の産業化と課題解決に向けた努力
第4章	細胞の遺伝子改変技術	第2章	ものづくり特許戦略
第5章	生体材料-細胞間の相互作用	第3章	現行規制の観点からみた再生医療技術開発戦略用
第6章	再生医療用バイオマテリアルの表面修飾・ナノ・ミ クロ・マクロ構造制御技術	第4章	バイオマテリアルを用いた再生医療の臨床応用への 規制, ガイドライン
第7章	バイオマテリアルの生体適合性の評価		
第8章	再生医療のための研究に有用な培養装置・実験器具 の開発		
第9章	幹細胞を用いた創薬研究技術		

■ 体裁/B5判・282頁 ■ 発行/2011年11月 ■ 定価/73,500円 (本体70,000円+税5%)

申込 FAX: 03(3293)2069 <http://www.cmcbooks.co.jp/> シーエムシー出版

Letter to the Editor

Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T_H2*To the Editor:*

IgE-mediated allergy is triggered by cross-linking of antigen-specific IgE antibodies on the cell surfaces of mast cells and basophils, followed by local accumulation and activation of inflammatory cells, including eosinophils and T_H2 cells. T_H2 cells produce such cytokines as IL-4, IL-5, and IL-13, which promote IgE production and eosinophilopoiesis and play central roles in the development of chronic allergic inflammation. On the other hand, non-IgE-mediated allergies, such as hypersensitivity pneumonitis, are considered mediated by cellular immunity, which has not been thought to involve antigen-specific T_H2 cells because IgE antibody would be detected if T_H2 cells were activated. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies include food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES), food protein-induced proctocolitis, and food protein-induced enteropathy. The precise underlying mechanisms are almost unknown, except for a fundamental role of TNF- α ,¹ presumably because this disease entity is relatively rare in incidence and is encountered during infancy in human subjects but not seen in experimental animals. Here, for the first time, we were able to detect antigen-specific T_H2 cell responses in infants with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies by analyzing 89 blood samples collected from all over Japan.

The antigen-specific lymphocyte stimulation test is a classic method for investigating antigen-specific T-cell proliferation and theoretically should be applicable to the study of gastrointestinal food allergies. However, a couple of previous studies demonstrated that the antigen-specific lymphocyte stimulation test was useful, whereas another study found no such usefulness.² We hypothesized that this controversy was due to contamination of the antigen preparations with LPS and tested this hypothesis. The limulus amebocyte lysate assay detected high concentrations of LPS in commercially available milk protein preparations, as previously reported (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).³ In addition, significant lymphoproliferative responses were found in the presence of as little as 10 pg/mL LPS (see Fig E1, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org), and PBMCs from younger children showed more pronounced lymphoproliferation in response to LPS (see Fig E1, B). Therefore we attempted to remove contaminating LPS from milk protein preparations by passing them through a prepacked endotoxin affinity column. However, a high LPS concentration was detected even after that treatment (see Table E1), and therefore we obtained a special β -lactoglobulin preparation with very low contaminating LPS levels (kindly provided by Bean Stalk Snow, Tokyo, Japan). Further studies were performed by using these milk protein preparations, which contained LPS at a final concentration of less than 5 pg/mL.

Next, to elucidate what types of antigen-specific immune responses are induced in patients with gastrointestinal food allergies, we cultured PBMCs from patients and control subjects in the presence and absence of LPS-depleted milk component proteins. The study enrolled 65 patients with gastrointestinal food allergies, 12 patients with IgE-mediated cow's milk allergy (CMA) who showed only nongastrointestinal symptoms on

TABLE I. Demographic characteristics of the patients

	IgE-mediated CMA		Gastrointestinal food allergies	
	No.		No.	
Age (mo)	12	38.0 (26.5-60.0)	65	2.0 (1.0-4.0)
Male/female sex	12	7/5	65	40/25
Day of onset	12	—	65	32.5 (7.0-115.5)
Symptoms at onset				
Vomiting	12	0% (0/12)	65	53.8% (35/65)
Bloody stool	12	0% (0/12)	65	47.7% (31/65)
Diarrhea	12	0% (0/12)	65	47.7% (31/65)
Failure to thrive	12	0% (0/12)	65	38.4% (22/65)
Lethargy	12	0% (0/12)	65	38.4% (22/65)
Fever	12	0% (0/12)	65	18.5% (12/65)
Eczema	12	100% (12/12)	65	7.7% (5/65)
Wheeze	12	33.3% (3/12)	65	0% (0/65)
Laboratory data				
Milk-specific IgE (IU/mL)	12	56.95 (11.74-90.8)	65	<0.34 (<0.34)
Peripheral blood eosinophils (%)		Not examined	53	7.7 (3.6-13.5)

Data are expressed as medians (interquartile ranges). The inclusion criteria were as follows: (1) gastrointestinal symptoms were present more than 2 hours after ingestion of milk and (2) 3 of Powell's criteria were fulfilled,⁴ including (a) switch to therapeutic milk leading to resolution of symptoms, (b) differential diagnosis from other disorders, and (c) verified body weight gain. A definitive diagnosis based on the results of oral food challenge tests that were performed after complete resolution of the initial symptoms was achieved in 19 patients. Patients with gastrointestinal symptoms within 2 hours after ingestion of milk were excluded. On the basis of such symptoms as vomiting, diarrhea, and failure to thrive, the patient group (n = 65) consists of 34 patients with FPIES, 4 patients with food protein-induced enteropathy syndrome (enteropathy), and 27 patients with food protein-induced proctocolitis syndrome (proctocolitis). A definitive diagnosis based on the results of oral food challenge tests was achieved in 13 and 6 patients with FPIES and proctocolitis, respectively. None of the patients underwent endoscopic biopsy.

ingestion of milk, and 12 control subjects who showed absolutely no symptoms on ingestion of milk. Table 1⁴ summarizes the clinical symptoms, clinical diagnosis, and demographic data for the 2 patient groups. None of the patients with gastrointestinal food allergies had detectable levels of IgE against milk proteins in sera. We were unable to recruit infants with IgE-mediated CMA who were age matched with the infants with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies. This study was approved by regional ethics committees, and written informed consent was obtained from the guardians of all patients and control subjects.

The details of the lymphoproliferation test and cytokine production assay are described in the Methods section in this article's Online Repository at www.jacionline.org. In brief, PBMCs from heparinized peripheral blood were suspended at a cell density of 1×10^6 /mL in AIM-V medium (Gibco, Grand Island, NY) without serum. Lymphoproliferation was measured by using tritiated thymidine uptake during a 16-hour period after a 5-day stimulation with 100 μ g/mL of each LPS-depleted milk protein preparation (α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and α -, β - and κ -caseins). PBMCs were suspended at 1×10^6 /mL in RPMI 1640 medium supplemented with 5% autologous plasma to investigate the antigen-specific cytokine production profiles. Culture supernatants were harvested at day 6 after stimulation with 100 μ g/mL of each LPS-depleted milk protein preparation,

TABLE II. Antigen-specific lymphoproliferation and cytokine production profiles in patients with gastrointestinal food allergies, patients with IgE-mediated allergy, and control subjects

	Control subjects		IgE-mediated CMA		Gastrointestinal food allergies		P value†	P value‡
	No.		No.		No.			
Proliferation (SI)*	20	1.290 (0.830-1.738)	9	3.077 (2.484-3.492)	65	2.894 (2.004-7.147)	<.01	<.001
Cytokine (pg/mL)								
TNF- α	12	74.69 (58.44-144.8)	10	77.78 (58.04-141.4)	65	241.0 (89.21-729.6)	NS	<.05
IL-6	12	79.24 (36.36-193.8)	10	337.9 (57.43-1021)	65	1151 (157.0-4802)	NS	<.01
IL-1 β	11	26.02 (6.880-46.47)	10	27.49 (6.548-65.04)	64	48.75 (11.7-136.1)	NS	NS
IL-2	12	4.15 (0.0-10.04)	10	12.31 (7.23-17.58)	58	16.32 (7.760-39.49)	NS	<.01
IL-3	12	0.0 (0.0-0.38)	10	0.40 (0.0-3.61)	62	4.22 (0.0-29.49)	NS	<.05
IL-4§	12	5.365 (2.895-6.358)	10	3.795 (2.033-7.788)	65	5.670 (2.775-12.06)	NS	NS
IL-5	12	2.080 (0.0-19.56)	10	46.59 (4.663-173.5)	65	63.66 (7.360-310.4)	NS	<.01
IL-10	12	9.285 (3.075-15.71)	10	56.17 (18.74-76.91)	65	57.92 (12.61-198.8)	NS	<.05
IL-13	12	21.61 (0.270-65.04)	10	82.56 (16.28-555.3)	65	291.7 (22.10-1417)	NS	<.01
IFN- γ	11	3.910 (0.0-67.06)	10	31.91 (3.635-102.0)	65	71.86 (5.49-303.4)	NS	NS
IL-17	12	0.0 (0.0-2.350)	10	7.635 (1.710-39.63)	65	7.150 (0.0-17.83)	NS	NS

PBMCs from each patient were stimulated separately with each of 5 different milk protein preparations, and the data show the highest concentration of each cytokine detected in response to the 5 different stimuli. Data are expressed as medians (interquartile ranges).

*The stimulation index (SI) was calculated as milk protein-specific tritiated thymidine uptake (cpm)/vehicle-induced tritiated thymidine uptake (cpm).

†Nonparametric test to compare control subjects and patients with IgE-mediated CMA.

‡Nonparametric test to compare control subjects and patients with gastrointestinal food allergies.

§According to the standard curve, the minimal detection limit was 5.88 pg/mL.

and the cytokine production profiles were investigated by using the Luminex multiplex cytokine analysis kits (Millipore, Bedford, Mass) and ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minn).

In the first series of experiments, we investigated milk protein-specific lymphoproliferation in the control subjects, patients with IgE-mediated CMA, and patients with gastrointestinal food allergies. The lymphoproliferation level was similar in the patients with IgE-mediated CMA and those with gastrointestinal food allergies. Unlike in previous studies, however, the control subjects showed almost no proliferation (Table II). We presume that this was due to the extensive depletion of LPS contaminating the antigen preparations and the use of serum-free medium.

In the next experiments we investigated the cytokine production profiles in these subjects. TNF- α concentrations in the culture supernatants of milk protein-stimulated PBMCs from patients with gastrointestinal food allergies were significantly greater than those seen in patients with IgE-mediated CMA or control subjects. However, TNF- α levels in supernatants from patients with IgE-mediated CMA and control subjects were similar (Table II). Significantly higher concentrations of another proinflammatory cytokine, IL-6, were also seen only in the patients with gastrointestinal food allergies.

The concentrations of 3 T_H2 cytokines, IL-3, IL-5, and IL-13, in the supernatants of milk protein-stimulated PBMCs from patients with IgE-mediated CMA tended to be higher than those in the control subjects, but the differences did not reach statistical significance. In contrast, statistically significant and much higher concentrations of these T_H2 cytokines were found for the patients with gastrointestinal food allergies. Another T_H2 cytokine, IL-4, was undetectable in almost all subjects, and there were no differences among the 3 groups.

Concentrations of the T_H1 cytokine IFN- γ and the T_H17 cytokine IL-17 did not show statistically significant differences between any 2 groups.

The milk component that caused the most prominent tritiated thymidine uptake or the most prominent IL-2 or TNF- α

production varied among the patients (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org), suggesting that the lymphoproliferation and cytokine production observed in these assays were indeed antigen specific. In addition, the IL-5 concentration in the culture supernatant of cow's milk protein-stimulated PBMCs from patients with gastrointestinal food allergies correlated significantly with the peripheral blood eosinophil ratio at disease onset (see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org), suggesting that our *in vitro* assay reflects the *in vivo* conditions in these patients.

Collectively, T_H2 cytokines, including IL-3, IL-5, and IL-13, but not the T_H1 cytokine IFN- γ or the T_H17 cytokine IL-17 were significantly produced *in vitro* by milk protein-stimulated PBMCs from patients with gastrointestinal food allergies. The findings that tritiated thymidine uptake correlated significantly with IL-13 production (data not shown) along with the absence of milk-specific IgE antibody strongly suggest that the IL-13 detected in our assay was not produced by basophils in the PBMC fraction. IL-13 is a well-established mediator of intestinal epithelial cell damage in patients with injuries and inflammatory diseases through activation of the tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-fibroblast growth factor-inducible molecule 14 (TWEAK-Fn14) axis.⁵ Thus in addition to the previously known TNF- α , IL-13 might play a crucial role in the pathogenesis of gastrointestinal food allergies.

In conclusion, antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T_H2. It remains unclear why antigen-specific IgE antibodies were not detected in these patients. Possible explanations are that neonatal B cells scarcely express IL-4/IL-13 receptors⁶ or that production of IgE antibodies had just started but was still undetectable. This question warrants further study.

We express our sincere gratitude to all the members of the Japanese Research Group for Neonatal Infantile Allergic Disorders. We also thank all the doctors, nurses, and technicians, especially Ms Nao Aida from the Division

of Allergy, Gastroenterology, Pathology, Surgery, Interdisciplinary Medicine and Neonatology of the National Center for Child Health and Development, for their hard work and valuable comments. We also thank Professor Mitsuaki Kimura (Department of Allergy and Clinical Immunology, Shizuoka Children's Hospital) for his valuable suggestions.

Hideaki Morita, MD, PhD^{a,b}

Ichiro Nomura, MD, PhD^{a,c}

Kanami Orihara, PhD^a

Koichi Yoshida, MD^{c,d}

Akira Akasawa, MD, PhD^{c,d}

Hiroshi Tachimoto, MD, PhD^e

Yoshikazu Ohtsuka, MD, PhD^f

Yoshiyuki Namai, MD^g

Masaki Futamura, MD, PhD^c

Tetsuo Shoda, MD^{a,c}

Akio Matsuda, PhD^a

Norio Kamemura, MSc^h

Hiroshi Kido, MD, PhD^h

Takao Takahashi, MD, PhD^b

Yukihiro Ohya, MD, PhD^c

Hirohisa Saito, MD, PhD^d

Kenji Matsumoto, MD, PhD^d

From ^athe Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan; ^bthe Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; ^cthe Division of Allergy, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan; ^dthe Department of Allergy, Tokyo Metropolitan Children's Medical Center, Tokyo, Japan; ^ethe Department of Pediatrics, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; ^fthe Department of Pediatrics and Adolescence Medicine, Juntendo University Graduate School of

Medicine, Tokyo, Japan; ^gthe Department of Pediatrics, Ohta Nishinouchi Hospital, Koriyama, Japan; and ^hthe Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, University of Tokushima, Tokushima, Japan. E-mail: nomura-i@ncchd.go.jp. Or: matsumoto-k@ncchd.go.jp.

Supported in part by Health and Labour Sciences Research Grants, Research on Intractable Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and a Grant-in-Aid for Clinical Research from the National Hospital Organization of Japan.

Disclosure of potential conflict of interest: I. Nomura has received support from the Ministry of Health, Labor, and Welfare. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

1. Chung HL, Hwang JB, Park JJ, Kim SG. Expression of transforming growth factor beta1, transforming growth factor type I and II receptors, and TNF-alpha in the mucosa of the small intestine in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:150-4.
2. Giavi S, Megremis S, Papadopoulos NG. Lymphocyte stimulation test for the diagnosis of non-IgE-mediated cow's milk allergy: a step closer to a noninvasive diagnostic tool? *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157:1-2.
3. Brix S, Bovetto L, Fritsché R, Barkholt V, Frøkiær H. Immunostimulatory potential of beta-lactoglobulin preparations: effects caused by endotoxin contamination. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1216-22.
4. Powell GK. Food protein-induced enterocolitis of infancy: differential diagnosis and management. *Compr Ther* 1986;12:28-37.
5. Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, et al. Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice—a pathway associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;141:2119-29.
6. Tian C, Kron GK, Dischert KM, Higginbotham JN, Crowe JE Jr. Low expression of the interleukin (IL)-4 receptor alpha chain and reduced signalling via the IL-4 receptor complex in human neonatal B cells. *Immunology* 2006;119:54-62.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.09.005>

METHODS

Heparinized blood samples were stored at room temperature and transferred to the National Research Institute for Child Health and Development in Tokyo. The following procedures were performed no later than 24 hours after phlebotomy. PBMCs were obtained from peripheral blood by using Ficoll-Hypaque gradient sedimentation (Lymphocyte Separation Medium; ICN Biochemicals, Aurora, Ohio). The viability determined by using trypan blue dye exclusion (Sigma, St Louis, Mo) always exceeded 95%. PBMCs were suspended at a cell density of 1×10^6 /mL in AIM-V medium (Gibco) without serum for lymphoproliferation, and in RPMI 1640 medium (GIBCO/Life Technologies, Gaithersburg, Md) in the presence of 5% autologous plasma for cytokine production assays.

Lymphoproliferation was measured based on tritiated thymidine (Amersham, Tokyo, Japan) uptake during a 16-hour period after 5 days of stimulation with 100 μ g/mL of each LPS-depleted milk protein preparation (α -lactalbumin, Sigma; β -lactoglobulin, Bean Stalk Snow;

and α -, β -, and κ -caseins, Sigma) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Incorporated tritiated thymidine was counted with a liquid scintillation counter (TopCount NXT; PerkinElmer Life Sciences, Boston, Mass). The stimulation index was calculated as milk protein-specific tritiated thymidine uptake (cpm)/vehicle-induced tritiated thymidine uptake (cpm).

Culture supernatants were harvested at day 6, and the cytokine production profiles were investigated by using Luminex multiplex cytokine analysis kits (Millipore) and ELISA (R&D Systems).

The lymphoproliferation assays and cytokine production assays were performed in duplicates and triplicates, respectively.

There was a significant positive correlation between the IL-2 concentration in the PBMC culture supernatant and lymphoproliferation (stimulation index) after stimulation with κ -casein ($r = 0.269$, $P = .025$; see Fig E2). Similar tendencies were also found when PBMCs were stimulated with other milk protein preparations (data not shown).

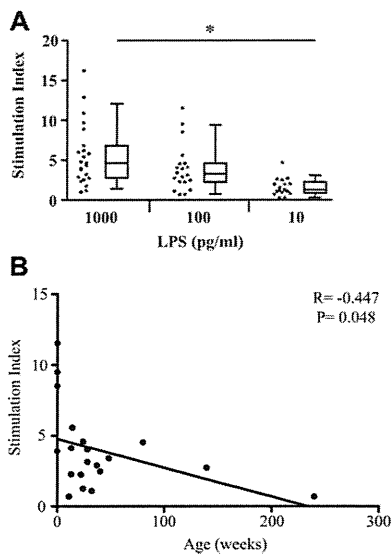


FIG E1. A, LPS at as little as 10 pg/mL can induce lymphoproliferation. PBMCs from young children ($n = 60$, 0-60 months of age) were stimulated with various concentrations of LPS (Sigma) for 5 days. Lymphoproliferation was measured by using tritiated thymidine uptake. The stimulation index was calculated as milk protein-specific tritiated thymidine uptake (cpm)/vehicle-induced tritiated thymidine uptake (cpm). $*P < .05$. **B**, LPS-induced lymphoproliferation was inversely associated with age. PBMCs from young children ($n = 21$, 0-240 weeks of age) were stimulated with 100 pg/mL LPS (Sigma) for 5 days. Lymphoproliferation was measured by using tritiated thymidine uptake. The stimulation index was calculated as milk protein-specific tritiated thymidine uptake (cpm)/vehicle-induced tritiated thymidine uptake (cpm).

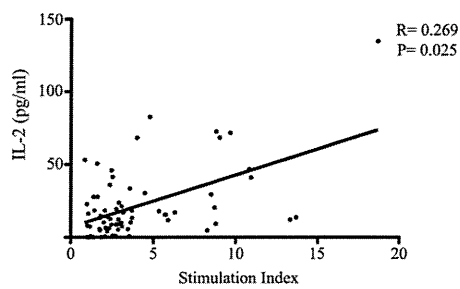


FIG E2. IL-2 concentrations in culture supernatant of cow's milk protein-stimulated PBMCs correlated significantly with antigen-specific lymphoproliferation. PBMCs from children with gastrointestinal food allergies were stimulated separately with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each of 5 LPS-depleted milk protein preparations in the absence of serum for the antigen-specific lymphoproliferation assay and in the presence of 5% autologous plasma for the IL-2 production assay. The stimulation index was calculated as milk protein-specific tritiated thymidine uptake (cpm)/vehicle-induced tritiated thymidine uptake (cpm), and the highest stimulation index shown among the 5 tested protein preparations was used as that patient's data in the plot. Even under slightly different culture conditions, antigen-specific lymphoproliferation and antigen-specific IL-2 production were significantly correlated ($r = 0.269$, $P = .025$).