

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)

1 4) 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

1 5) 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

1 6) 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

1 7) 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

1 8) 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

食物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）における 免疫学的パラメーターの変化

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
		免疫記憶研究グループ	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

経口免疫療法の免疫学的奏功機序を明らかにするため、鶏卵および牛乳に対するランダム化比較試験において、免疫学的パラメーターの測定を行った。治療前後における皮膚反応、経時的に得られた血清及び血液をもちいて抗原特異的 IgE、IgG4、IgA 抗体の変化および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 (CD203c 発現) を測定した。

その結果、皮膚反応は治療群で、有意に低下、対照群では変化を認めなかった。特異的 IgG4 抗体および IgA 抗体は割付け 3 ヶ月後に治療群で有意に上昇したが、対照群では変化がなかった。好塩基球 CD203c 発現も治療群で有意に低下、対照群では有意な変化が認められなかった。その後、対照群も治療を行い、維持期 1 年後までの変化を全体で検討すると、特異的 IgE 抗体は維持期 1 年で治療前より有意に低下、抗原特異的 IgG4 抗体は治療前から治療後 3 ヶ月、1 年と持続的に上昇を続けた。好塩基球 CD203c 発現も低下を続けた。以上より、経口免疫療法により、皮膚反応、IgE 抗体、好塩基球の反応性が低下し、抗原特異的 IgG4 抗体が上昇することが証明され、免疫療法奏功機序の一部であると考えられた。

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 IgE 抗体、阻止抗体と言われる IgG4 抗体、また炎症の抑制に働くと考えられる IgA 抗体、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。とくに、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こと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。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。

本研究では、経口免疫療法で経時的に採取した検体を用いて、抗原特異的抗体を ImmunoCAP 法で、抗原特異的な末梢血好塩基球活性化をフローサイトメトリーによる CD203c 発現定量で検討した。また、これらアレルギー反応を *in vivo* で評価する皮膚テストも治療前後で行った。

B. 研究方法

免疫学的マーカー検索のために、登録時、割付け 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、IgA 抗体を ImmunoCAP 法により測定した。抗原による好塩基球活性化は Allergenicity kit を用いて、抗原刺激後の CD203c 発現定量で評価した。

また、治療前後にアレルギーエキシによるプリックテストを行った。

C. 研究結果

1. プリックテスト

鶏卵試験において、登録時と割付け 3 ヶ月後にそれぞれ卵白アレルギーによる皮膚プリックテストを行うと、治療群では膨疹、紅斑ともに有意に低下したのに対して、対照群では変化がみられなかった。

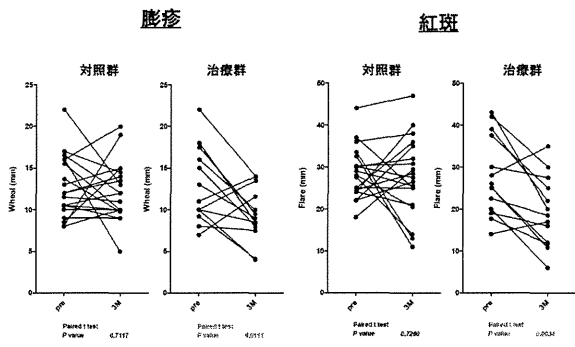


図1 皮膚プリックテストの変化

卵白特異的 IgG4 抗体と卵白特異的 IgA 抗体は割付け3ヶ月後に、治療群で有意に上昇、対照群では変化を認めなかった。

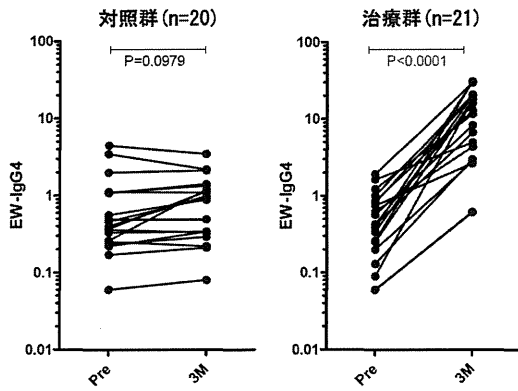


図2 卵白特異的 IgG4 抗体の変化

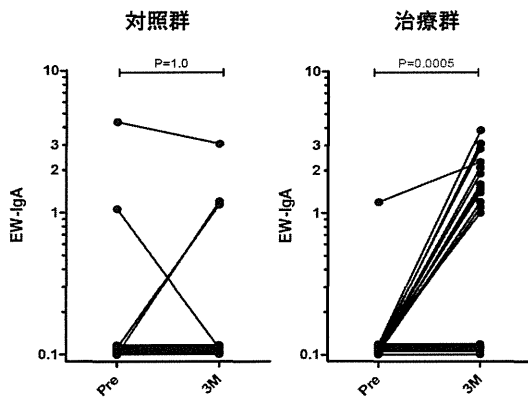


図3 卵白特異的 IgA 抗体の変化

一方、特異的 IgE 抗体は治療群、対照群ともに割付け3ヶ月後にわずかに低下したが、治療群でその変化が大きかった。

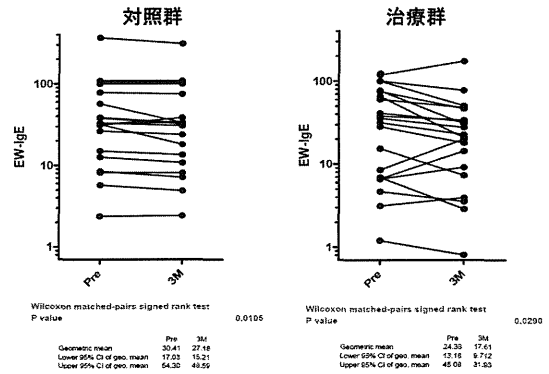


図4 卵白特異的 IgE 抗体の変化

好塩基球活性化についても、オボムコイド刺激による CD203c 発現は治療群で割付け3ヶ月後に有意に低下したのに対して、対照群では有意な変化は認められなかった。

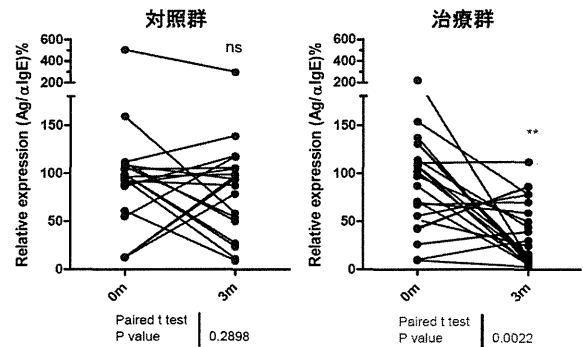


図5 オボムコイド刺激による好塩基球 CD203c 発現の変化

牛乳試験においても、抗原 (牛乳、βラクトグロブリン、αラクトアルブミン、カゼイン) による好塩基球 CD203c 発現は、治療群でのみ割付け3ヶ月後に有意に低下した。

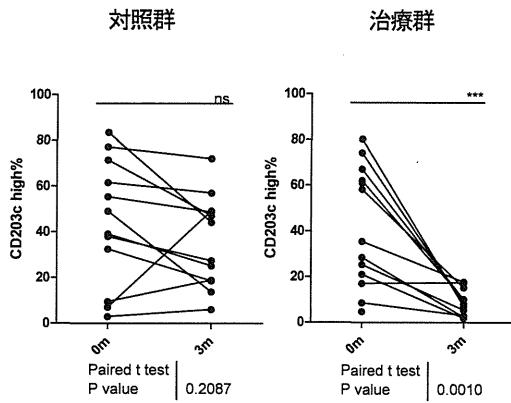


図6 牛乳抗原刺激による好塩基球CD203c発現の変化

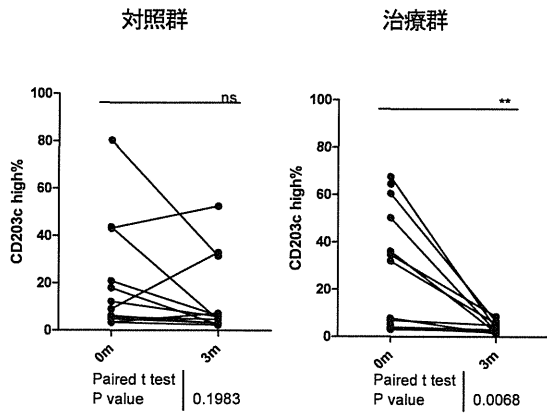


図7 BLG 抗原刺激による好塩基球 CD203c 発現の変化(BLG;βラクトグロブリン)

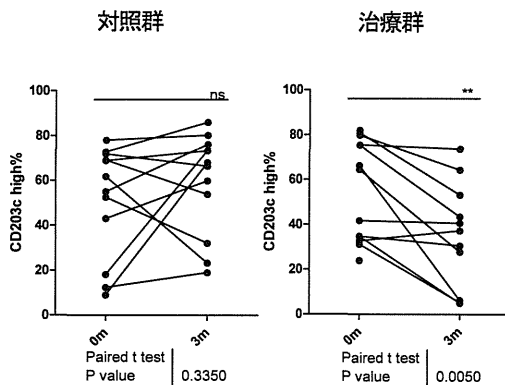


図8 カゼイン抗原刺激による好塩基球 CD203c 発現の変化

次に、さらに長期の変化を検討すると、急速期から維持期1年後までの変化で、特異IgE抗体はゆっくりと低下して、1年後に治療前と比較して有意な変化となった。一方、抗原特異的IgG4抗体は3ヶ月後に著しく上昇した後も持続的に1年後まで上昇を続けた。

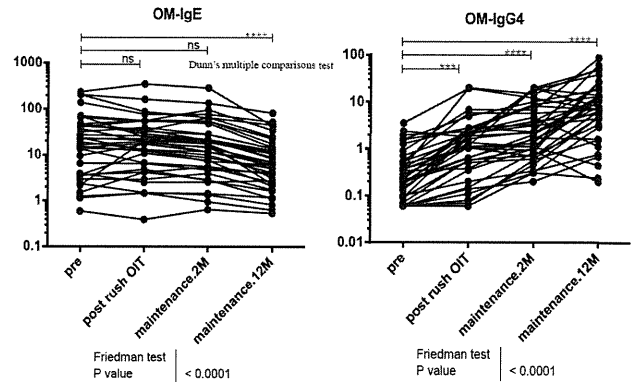


図9 オボムコイド特異的IgE抗体とIgG4抗体の変化

好塩基球活性化反応も同様に治療開始後1年まで有意に低下した。

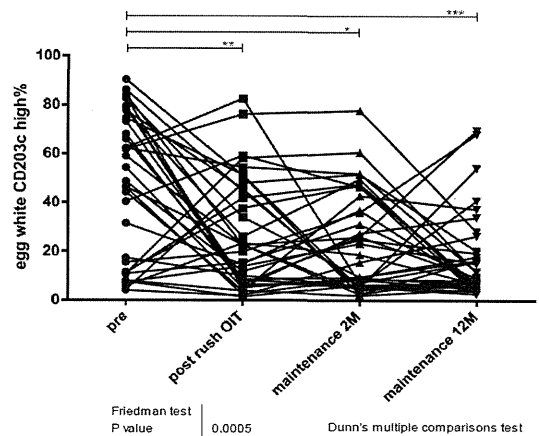


図9 オボムコイド刺激によるCD203c発現の変化

D. 考察

本研究では経口免疫療法の免疫学的マーカーとして、皮膚反応、抗原特異的IgE、IgG4、IgA抗体と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発現を検討した。その結果、即時型アレルギー反応に抑制的に働くと考えられるIgG4抗体とIgA抗体が上昇し、それらの変化にほぼ一致

して皮膚反応と好塩基球の反応が低下した。IgE抗体も低下したが、その時間経過はかなり遅れていた。これらの事実は、急速免疫療法で比較的短期間のうちに（3ヶ月）で摂取できる量が大きく増加することが、IgE抗体の低下によるものではなく、早期に上昇するIgG4抗体によるものである可能性を示すと考えられる。アレルゲン食物の摂取による症状誘発のin vivoおよびin vitroのマーカーである皮膚反応と好塩基球の反応低下がこの抗体の変化と一致した時間経過で変動したこともこの仮説を裏付けるものである。

また、今回、牛乳における検討で、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ことに注目したい。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一方、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のである。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、牛乳にもっとも多く含まれるアレルゲン蛋白質はカゼインであることと関連している可能性がある。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、新しい治療反応性予測マーカーとして利用できるかもしれない

E. 結論

経口免疫療法に伴う免疫学的マーカーの変化を検討して、即時型反応を抑制するIgG4抗体の上昇、その結果と推定される皮膚反応、好塩基球活性化反応の低下が治療早期に認められた。抗原特異的IgE抗体も低下したが、その時間経過はゆっくりしたものであった。これらの免疫学的変化は経口免疫療法の奏功機序の少なくとも一部は説明するものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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（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

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、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
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
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

共通プロトコールに基づき食物アレルギー免疫療法を実施している各医療施設より免疫療法開始前、免疫療法7日目、免疫治療終了時、免疫治療維持期2ヶ月および12ヶ月の患者末梢血検体から血漿、有核細胞をRCAIで分離精製し一括保管した。この検体を用いて、免疫動態の解析を行なった。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

(1) 共通プロトコールに基づき食物アレルギー免疫療法を実施している各医療施設より免疫療法開始前、免疫療法7日目、免疫治療終了時、免疫治療維持期2ヶ月および12ヶ月の患者検体（末梢血、有核細胞）をRCAIで一括保管する。

(2) この検体を用いて、Microarray, RNAseq等によるバイオマーカーの検索等を用いて免疫動態の解析を行う。得られた検体解析結果と臨床症状・治療効果を照らし合わせた相関解析を行うことにより、未だ明らかでない食物アレルギーの発症・治癒・予後に関わる因子や、経口免疫寛容機構の解明を目指す。

B. 研究方法

1. アレルゲン特異的抗体の解析。

(1) capture法の確立

血漿中アレルゲン特異的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ゲンを反応させてアレルゲン特異的IgEおよびIgG4を測定した。標識抗原として、Biotinで標識されたOvalbumin(OVA, US Biological社)、およびOvomcoid(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。測定に際しアレルゲン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。

(2) Capture 法を用いて血漿中 OMC 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 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 の量を計測するための standard 抗体を以下の方法で作成した。すなわち、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。

(3) 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(ovomucoid : 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康人・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) T 細胞免疫反応の測定
MABTECH 社 ELISpot^{PLUS} を用いて IL4、IL5、IL10、IFN γ の測定を行った。抗原として低 LPS

OVA である EndoGrade Ovalbumin100 μ g/ml、10 μ g/ml、1 μ g/ml を用い、コントロールは PHA (phytohemagglutinin)1 μ 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。

(2) T 細胞のサイトカイン産生能
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 μ g/ml、10 μ g/ml、1 μ g/ml とし、コントロールは PHA (phytohemagglutinin)1 μ 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。

(3) 急速飽和療法開始前、開始後維持期に到達した患者検体 T 細胞における網羅的発現遺伝子の解析

静止期 T 細胞発現遺伝子を明らかにする目的で制御性 T 細胞 (Treg) と Th2 細胞の分離を行なった。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。

(4) RNAseq によるアレルゲン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。

(1) 各機関より送付された末梢血検体より血漿、有核細胞をパーコール法を用い分離し細胞数を測定した後、3 群にわけ窒素タンクで保管する。

(2) 保管された 3 群のうち 1 群の細胞を対象に、食物アレルゲン添加、非添加の条件で細胞培養を

行い mRNA を抽出した後、免疫療法前、初期、後期、維持期、長期維持期における網羅的遺伝子の変動を Microarray あるいは RNAseq により解析する。得られた情報からクラスター解析をおこない食物アレルギーの発症・治癒・予後に関わる遺伝子群の同定を行う。また培養上清における抗体を含む免疫因

子の測定を免疫学的方法を用いて行う。適切な Microarray の解析条件を得るため、健康人検体を対象として、抗原刺激方法、培養条件等の検討を行い、その後保存有核細胞の一斉解析を行う。

C. 研究結果

1. 急速飽和療法後、長期維持に達した患者では OMC 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

我々が確立した定量的 capture 法を用い、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 倍以下でとなることが明らかとなった。さらに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 T 細胞のサイトカイン産生

卵アレルギー患者末梢血中の有核細胞をアレルギーである OVA あるいは OMC で刺激培養し、産生される cytokine の解析をおこなった。

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。しかし、ELISPOT 法を用いたサイトカイン産生の測定では、OMC, OVA いずれの抗原刺激においても産生細胞は検出されなかった。

3. 急速飽和療法により CD4 陽性 Th2 細胞の機能亢進に関わる遺伝子発現が抑制される。

また、Th2 細胞はアレルギー反応を促進し、すると考えられ、制御性 T 細胞 (Treg) はアレルギー反応制御において重要な役割を果たすと考えられている。急速飽和療法に置けるアレルギー患者のこれら主要 T 細胞における機能変動を明らかにする目的で、純化精製されたこれら T 細胞亜群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。興味深いことに、同定された遺伝子の約半数が、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過去に報告されている。

4. OMC 刺激による末梢血細胞での発現遺伝子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、急速飽和療法の biomarker 候補になるか今後の検討が期待される。

D. 考察

本研究において、アレルギー特異的 IgE および IgG 抗体の量を正確に測定することが可能な capture 法を確立した。この方法を用い、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示唆された。治療後の、OMC 特異的 IgG4 の経時的な量的および親和性の増加は、急速飽和療法に伴う抗原特異的 B 細胞の増殖と胚中心に置ける体細胞変異の頻繁な挿入が予想されるが、今後の検討が必要である。OMC 特異的 IgE 抗体は一見アレルギー刺激非依存性に一定レベルで維持され、かつ親和性の増加が認められない。IgE 抗体の半減期は極めて短く、この現象は急速飽和過程で確立された免疫反応後のアレルギー特異的記憶 B 細胞の動態に依存する可能性もあり今後の検討課題となる。

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 R1IB 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 Kolfshoten 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、継続した、かつ段階的に増量するアレルギーの刺激は何らかのプロセスで T 細胞の不応答性を誘導する可能性が推察される。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癒に至る細胞免疫系の biomarker を今後確定したい。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ことから、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。

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ギー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ギー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。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究に関わるもの、なし

2. 学会発表

本研究に関わるもの、なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (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。

食物アレルギーにおける経口免疫療法の確立と治療メカニズムの解明に関する研究

「治療スケジュール立案と妥当性」と「経口免疫療法の安全性確立」に関する研究

研究分担者 荒川 浩一 （群馬大学大学院医学系研究科小児科学分野教授）
研究協力者 小山晴美、八木久子、滝沢琢己
（群馬大学大学院医学系研究科小児科学分野）

研究要旨

食物アレルギーを持つ小児に対し、1) 急速経口免疫療法の安全性・有効性の評価を行うこと、2) 本療法中における臨床検体を採取し、本治療法による治療メカニズムの解明や、耐性獲得の指標となる新規免疫学的マーカーの開発、3) 本治療法の適応基準の確立を目指した臨床解析を行う。平成 22 年度は鶏卵急速免疫療法治療スケジュール立案と妥当性について検討し、平成 23 と 24 年度は、それぞれ鶏卵・牛乳経口免疫療法中に生じた副反応に注目し、安全性確立について検討した。二重盲検負荷試験、急速免疫療法期、維持期のすべてにおいて副反応の出現を考慮した事前の対応や体調不良時の対処を重視する必要性が示唆された。さらに各症例によって経過は様々であること、また不測の事態が生じる可能性を常に認識することが重要と考えられた。将来的には、どの症例にでも普遍的に行える安全な治療法を開発を目指すことが最終目標である。

事項について考察した。

A. 研究目的

食物アレルギーを持つ小児に対し 1) 本経口免疫療法の有効性・安全性の評価を行うこと 2) 本療法中における臨床検体より本治療法における治療メカニズムの解明や耐性獲得の指標となる新規免疫学的マーカーの開発、3) 本治療法の適応基準の確立を目指した臨床解析を行う。急速免疫療法治療スケジュール立案と妥当性の検討、および経口免疫療法の副反応を調査し安全性確立について検討する。

本治療法は、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）やヘルシンキ宣言（2008 年改訂）、各臨床施設の規則を遵守し、各臨床施設において事前に倫理審査委員会または IRB（Institutional Review Board: 機関審査委員会）にて承認を得た後に実施している。

B. 研究方法

本研究の治療スケジュールは、既報告の治療スケジュールを参考にして立案した。その点からスケジュールの妥当性を検討する。

鶏卵急速免疫療法の安全性については、エントリーした 46 症例（男 33 : 女 13）を対象に、二重盲検負荷試験（DBPCFC）、急速免疫療法期（以下、急速期）及び維持期での副反応出現率とそれに伴う医療機関受診の有無、また脱落症例（登録時 3 例、急速期以降 5 例）について解析する。副反応については、Sampson のアナフィラキシー分類を参考にした。

牛乳急速免疫療法の安全性については、牛乳急速免疫療法に二次登録した 35 症例を対象に、DBPCFC、急速期および維持期での副反応、重篤な有害事象報告を集積し詳細に解析した。その結果から、経口免疫療法をより安全に施行するための注意

C. 結果

【鶏卵】

1. DBPCFC での副反応（対象 45 例）（図 1）
登録時 DBPCFC では、アナフィラキシー（以下 An grade（以下、G）5 が 2 例（4.4%）（アドレナリン筋注 4 回、持続注射→試験中止）、G4 が 5 例（11%）、G3 が 33 例（73.3%）、G2 が 7 例（15.6%）で認められた。維持期 2 ヶ月での DBPCFC で An G4 が 1 例（2.2%）に認められた。

2. 急速期の副反応（対象 44 例）（図 2）
皮膚 G2 : 28 例（63.6%）、消化管 G3 : 22 例（50%）、G2 : 10 例（22.7%）、呼吸器 G5 : 1 例（2.2%）（アドレナリン筋注、静注→試験中止）、G4 : 1 例、G3 : 13 例（29.5%）、G2 : 10 例（22.7%）、心血管系 G5 : 1 例（呼吸器 G5 と同じ症例→試験中止）で認められた。

3. 維持期の副反応（各評価時での副反応出現日数） （図3）

① 4週後(39例):皮膚:5.3±4.3日(19例:48.8%)、呼吸器:3.5±2.5日(15例:38.4%)、消化管:5.5±5.7日(17例:43.6%)。

② 2ヶ月後(39例):皮膚:5.5±6.0日(26例:66.7%)、呼吸器:3.3±3.1日(16例:41%)、消化管:6.1±6.9日(16例:41%)。

③ 6ヶ月後(35例):皮膚:4.0±3.5日(24例:68.6%)、呼吸器:5.9±3.4日(10例:28.6%)、消化管:5.1±4.0日(12例:34.3%)。

④ 12ヶ月後(11例):皮膚:7±4.0日(5例:45.5%)、呼吸器:18.3±6.4日(3例:27.3%)、消化管:4.8±1.7日(4例:36.4%)。

維持期4週～6ヶ月の間で皮膚・消化管・呼吸器などの副反応を認めなかったのは3例(8.1%)、副反応を認めたが医療機関受診を要さなかったのは24例(64.9%)、4週・2ヶ月・6ヶ月の間いずれかで受診したのは10例(27%)（皮膚G2、消化管G2,3、呼吸G2,3,4）であった。12ヶ月評価に到達した11例のうち、1例が12ヶ月評価時点で医療機関受診していた（皮膚G2、消化管G3、呼吸器G4）。（図4）

4. 脱落症例（登録時3例、急速期以降5例）（図5）

本試験より脱落したのは、登録時DBPCFCでAn G5を生じた2例（1例はアドレナリン筋注4回および持続注射を施行、1例はアドレナリン筋注）、急速期にAn G5を生じた1例（アドレナリン筋注・静注）、急速期にアレルギー腸炎を生じ全身ステロイド投与した1例、アレルギー性腸炎の疑い1例、急速期に少量で症状あり、入院期間が長期に及び被検者より中止希望のあった1例、維持期に誘発症状強くアドレナリン筋注、入院後減量摂取を試みるもG3の呼吸器症状あり試験中止した1例、同意撤回の1例の計8例である。

試験継続38例と急速期以降脱落した5例の間において、登録時年齢、登録時DBPCFCでのAn grade及び閾値では有意差を認めなかったが、登録時卵白特異的IgE抗体価には有意差が認められた（ $p=0.004$ 、それぞれ、中央値25.5UA/ml（IQR7.3-40.4）、86.4UA/ml（IQR69.9- ≥ 100 ））。（図6）

【牛乳】

急速免疫療法期間は39.3±15.2日、急速期達成時維持量192.6±37.2ml、急速期退院までの日数44.5±14.9日、急速期退院時維持量164±68.9ml、急速

期退院前運動負荷試験を実施した28例中15例が陽性であった。

1. 中止報告症例：牛乳急速免疫療法に二次登録した35症例中、平成24年11月までの観察期間内に、4例の中止報告がなされた。

中止理由としては、①急速期終了し退院後も頻回のアレルギー症状のため日常生活に支障をきたし本人及び保護者から試験の中止の希望があった。②急速期プロトコールに従って摂取後、Grade5の重度のアナフィラキシーが生じた。③急速期も頻回のアレルギー症状を認め安定した維持量摂取が不可能であった。④急速期の治療量増量に苦渋し目標維持量（200ml）より低い維持量で退院後、アレルギー症状が頻回となり減量を繰り返すも症状を認めたというものであった。

2. 重篤な有害事象：同様の期間内で、のべ18症例の重篤な有害事象報告がなされた。急速期のGrade5のアナフィラキシー（1例）、感染症・疲労など体調不良時のアレルギー症状誘発や減量（7例）、不測のアナフィラキシー（5例）、隔日摂取または隔日減量摂取時のアナフィラキシー（3例）、維持量+二次製品摂取によるアナフィラキシー（2例）が報告され、そのうち3例に複数回のアナフィラキシーが認められた。

D. 考察

【本治療スケジュールの妥当性】

鶏卵急速免疫療法の本治療スケジュールにおいて、開始量はDBPCFCで症状誘発閾値を求め、その約1/10としており、より安全な量からの少量開始となり妥当と考える。増量は入院中に行うものであって、他の報告（牛乳のSOTI:10日間入院し増量、その後は家で増量¹⁾⁻²⁾と比較して、安全かつ急速に増量でき、効果的と考える。症状出現時の同量、減量、中止については他の報告^{1)、3)、4)}と同様であり、妥当である。摂取の時間間隔や増量の程度においても他報告を比較して妥当と考える。

維持期に粉末と鶏卵を両方摂取するのは、確実に卵蛋白を摂取する点で有効と考えられた。

1) Longo G, Barbi E, Berti I, et al. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. J Allergy Clin Immunol. 2008;121:343-7.

2) Skripak JM, Nash SD, Rowley H, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk

allergy. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:1154-60.
3) 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. 2010;59: 43-51.
4) Buchanana AD, Green TD, Jones SM, et al. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg therapy. J Allergy Clin Immunol. 2007;119:199-205.

【安全性確立について】

鶏卵急速免疫療法において、DBPCFC では G4 以上の An が約 15%認められ、重篤な副反応が出現する可能性が示唆された。急速期の副反応は G2、G3 が約 20-60%と高頻度、G4、G5 は約 2%程度ではあるが副反応に対する十分な対応の必要性を確認した。また、即時型反応だけではなくアレルギー性腸炎の発症にも注意すべきである。

維持期（自宅での維持量鶏卵摂取）において副反応のために医療機関を受診したのは約 27%であり、体調不良時や副反応出現時の対応を被検者及び保護者に明確に指導することが必要である。限られた症例での解析ではあるが、登録時卵白特異的 IgE 抗体価は試験継続可能か否かを予想するのに有用である可能性が示唆された。

また、判断に難渋する他覚的な腹部症状の判定基準に、フェイススケールを設け（図 7）、副反応の判定が全施設で適格に施行できるようにプロコトールに追加した。

さらに、平成 24 年度は牛乳急速免疫療法における副反応の検討を行い、急速免疫療法をより安全に施行するため検討課題について考察し、以下に示す。

まず、DBPCFC および本治療を行うにあたって、合併症（気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など）のコントロールを十分に行う。接触性症状を回避するため摂取方法を工夫し、指導する。

1. 急速期

- ・ 症状出現後の同日摂取基準：Grade2 で治療を要する場合は中止も考慮する。
- ・ 症状出現時の活動基準：運動負荷による急激な血圧変動を避けるため、トイレなどにも十分注意する。
- ・ 急速期の到達維持量の基準：到達量が極端に低い場合は、退院後の通常生活での危険性が高いため治療中止を考慮する。
- ・ 病院外での症状出現時の対応：現行プロコトールにある対応カードの使用を啓発する。

2. 維持期

- ・ 摂取前後の日常生活への介入：摂取後の運動・入浴までの十分な時間の確約、空腹時の摂取の回避を徹底する。
- ・ 不測の事態発生の可能性認識：寝不足、疲労、軽微な感染などや、明らかな誘因がない場合でも症状が誘発される可能性を常時認識する。
- ・ 学校等との連携：担任教諭との面談、本治療の説明やエビペン指導、学校生活での注意点などを共有する。
- ・ 体調不良時の摂取基準：減量・中止の徹底、医師指導下（院内も含む）での増量・再開を行う。
- ・ 摂取間隔をあける際の注意：十分な観察期間、段階的な減量など個別に行う。
- ・ 複数回 An が起こる症例への対応：本治療の中止を含めた大幅な減量を検討する。
- ・ 維持量摂取に加えて二次製品摂取の際の注意：院内での摂取、1 日積算量の考慮などを行う。
- ・ 維持期 2 ヶ月での DBPCFC の方法変更の検討：現プロコトールでは、プラセボによる完全除去日が存在し An をおこす可能性がある。オープン法に変更するなど連日摂取を継続することも検討する。

E. 結論

重篤な副反応を含め、本試験において副反応は少なからず出現する。従って、安全に本試験を施行する為には、副反応に対する十分な準備（ベッドサイドの緊急薬剤準備・医療体制を始め、自宅での摂取に対する注意点の指導や医療機関との緊急連絡体制など）を行いながら、Sampson のアナフィラキシー分類や腹痛のフェイススケールなどを十分に活用し、副反応を冷静に判断し対応することが最重要である。

さらに、各症例によって経過は様々であること、また不測の事態が生じる可能性を常に認識することが重要である。将来的には、どの症例にでも普遍に行える安全な治療法の開発を目指すことが最終目標である。

F. 健康危険情報

鶏卵急速免疫療法においては、登録時 3 例（登録時 DBPCFC でアナフィラキシー grade5 を生じた 2 例を含む）、急速期以降 5 例（急速期のアナフィラキシー grade5 を生じた 1 例、アレルギー性腸炎 1 例・腸炎疑い 1 例を含む）の脱落症例が認められた。

牛乳急速免疫療法に二次登録した 35 症例中、平成 24 年 11 月までの観察期間内に、4 例の中止報告、およびのべ 18 症例の重篤な有害事象報告がなされた。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) 小山晴美、荒川浩一. 特集 周産期のアレルギー ー 一生後早期の問題と小児アレルギー疾患の発症 ー 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) N. G. Papadopoulos, H. Arakawa, K. H. Carlsen. et al., International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy.* 67(8) :976-97. 2012
- 7) Arakawa H, Yagi H, Koyama H, Nakajima N, Takizawa T. Characteristics and natural course of neonatal and infantile gastrointestinal milk allergy and the efficacy of oral immunotherapy. *Clinical & Experimental Allergy Reviews*, 12, 20-24 2012
- 8) 小柳貴人、荒川浩一. 小児気管支喘息. クリニカルスタディ 33 : 18-23. 2012
- 7) 荒川浩一. 研究の周辺から アレルギー疾患の予知、予防を目指して. 呼吸 31 : 99-100. 2012
- 9) 荒川浩一. 乳幼児期の喘鳴の鑑別診断と治療. 日本医事新報 4592 : 71-75. 2012
- 10) 荒川浩一. 食物アレルギー診療ガイドライン. 日本耳鼻咽喉科学会会報. 115 : 702-703. 2012
- 11) 荒川浩一. 【小児気管支喘息治療・管理ガイドライン 2012 について】 発症と増悪の危険因子とその対処 環境整備を含めて. アレルギー・免疫 19 :

696-702. 2012

- 12) 徳山研一, 荒川浩一, 乾宏行, 河野美幸, 小山晴美, 佐藤哲, 重田誠, 重田政樹, 高見暁, 戸所誠, 中嶋直樹, 西村秀子, 萩原里実, 前田昇三, 村松礼子, 水野隆久, 望月博之, 森川昭廣. 群馬県における気管支喘息児および保護者の QOL の実態 2001 年から 2008 年にかけての変遷 : 日本小児アレルギー学会誌 25 : 682-691. 2012
- 13) 荒川浩一. 特集 : 子どもへの負担を少なくするための画像検査の進め方 呼吸困難、嘔声、喘鳴. 小児科 53 : 845-852. 2012
- 14) 荒川浩一. 小児慢性呼吸器疾患. 小児保健研究 71 : 471-477. 2012
- 15) 小林靖子, 相澤明, 滝沢琢巳, 荒川浩一. 先端医学講座 アレルギー疾患とエピジェネティクス : 遺伝子の発現における環境因子の影響. アレルギーの臨床 32 : 1137-1142. 2012
- 16) 小田嶋 博, 田場直彦, 藤澤隆夫, 長尾みづほ, 荒川浩一, 八木久子, 秀 道広, 平郡真記子, 古江増隆, 竹内 聡, 江崎仁一, 宮本昭正. アラスタット 3gAllergy の臨床的有用性に関する検討ー第 2 報ー 多施設共同研究による評価 (小児科・皮膚科における検討). アレルギー・免疫 19 : 129-144. 2012
- 17) 荒川浩一. アレルギー疾患発症因子の解明 ー 出生コホートからエピジェネティクスまでー. *International Review of Asthma & COPD* 14:39-42. 2012
- 18) 荒川浩一. ガイドライン解説 小児気管支喘息治療・管理ガイドライン 2012 第 4 章 危険因子とその予防. 日本小児アレルギー学会 26 : 633-639. 2012

2.学会発症

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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

4) 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

5) 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 好酸球性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

6) 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

7) 荒川浩一. シンポジウム15 小児喘息における吸入ステロイド薬の位置づけと適切な使用. 第24

回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012年5月13日 大阪

8) 荒川浩一. 教育セミナー8 子どもの長引く咳嗽の鑑別と治療のknackとpitfall. 第49回日本小児アレルギー学会 2012年9月16日 大阪

9) 荒川浩一. イブニングシンポジウム2 アレルギー疾患の診断・治療における特異的IgE抗体の微量および高値測定の意義: 小児科領域における検討. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年11月29日 大阪

10) 荒川浩一. シンポジウム16 小児科領域におけるバイオマーカーの最新情報. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年12月1日 大阪

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

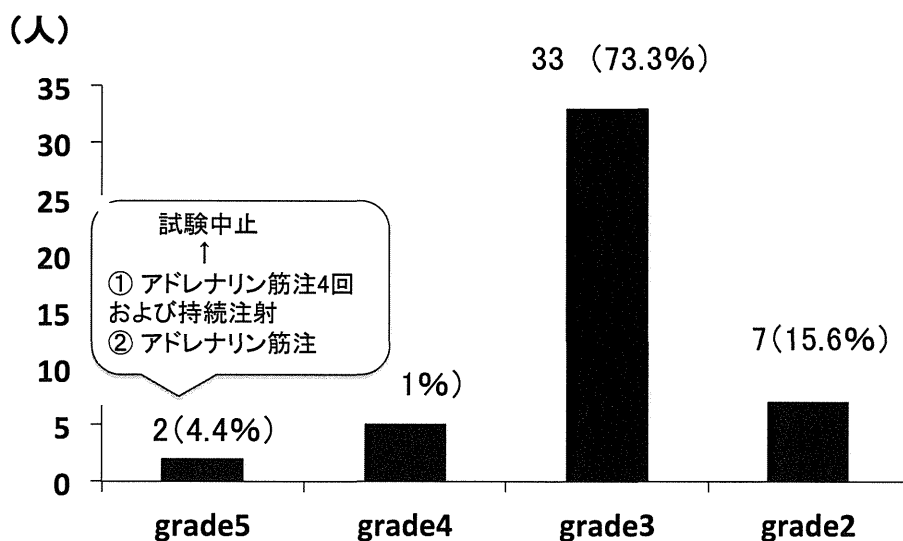


図1. DBPCFCでの副反応(対象45例)

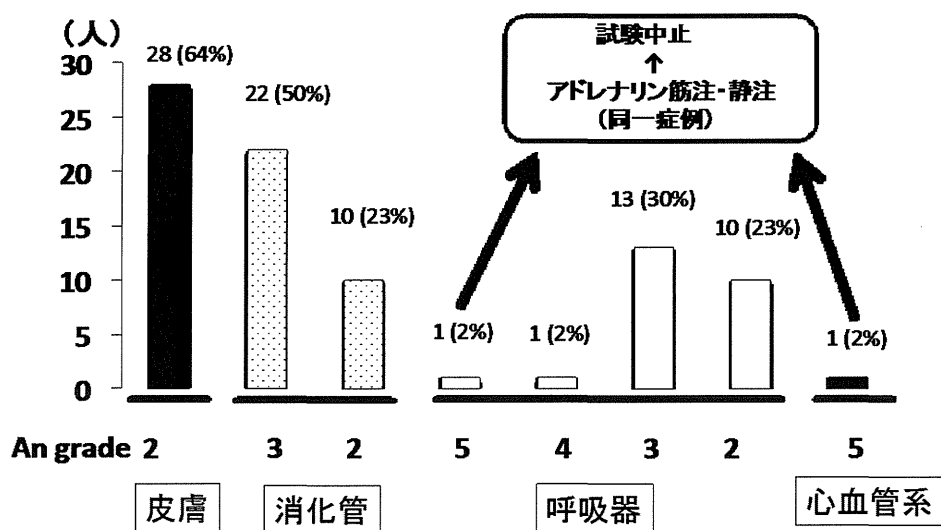


図2. 急速期の副反応(対象44症例)

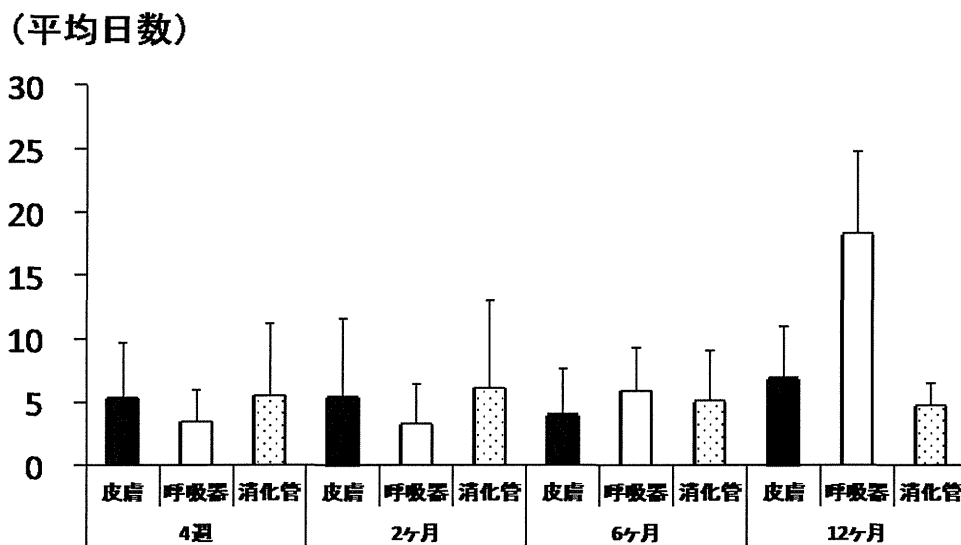
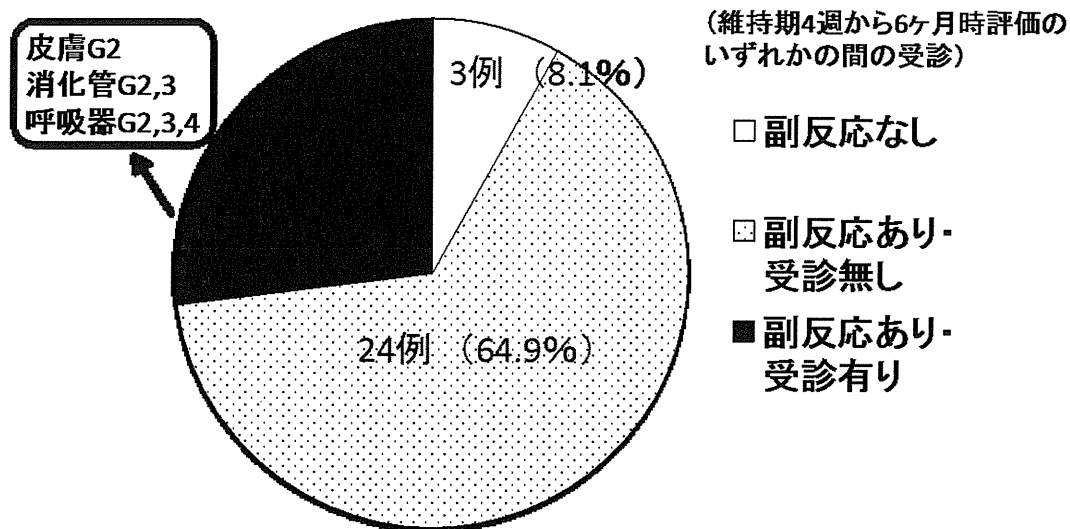


図3. 維持期での副反応



* 12ヶ月評価到達11例のうち、12ヶ月評価時点で1例が医療機関受診あり
(皮膚G2、消化管G3、呼吸器G4)

図4. 維持期副反応と医療機関受診

図5 脱落症例 (8例)

1. 登録時 DBPCFC で AnG5 (アドレナリン筋注4回・持続注射)
2. 登録時 DBPCFC で AnG5 (アドレナリン筋注)
3. 急速期に An G5 (アドレナリン筋注・静注)
4. 急速期にアレルギー性腸炎 (全身ステロイド投与)
5. 急速期にアレルギー性腸炎の疑い
6. 急速期に少量接種で誘発症状継続
7. 維持期に強い誘発症状ありアドレナリン筋注、入院し減量
摂取にても G3 の呼吸器症状あり
8. 同意撤回

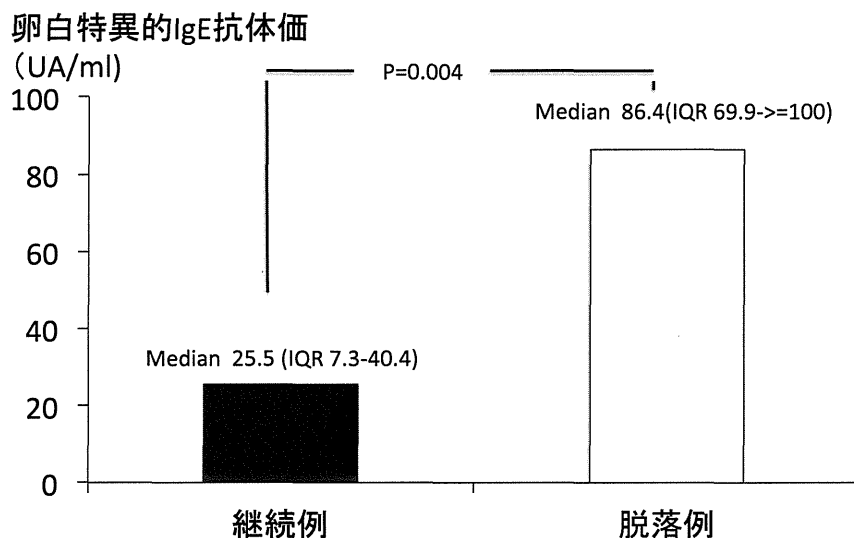


図6. 試験継続38症例と急速期以後脱落した5例の比較

腹痛の場合；下記のフェイススケール（0-5）を使用する。

下記の5の場合、または、4に理学的所見を伴う場合は、陽性と判定し、摂取を中止する。
3の場合は、60分間の観察時間を取った後に判断する。
摂取中止の目安となる理学的所見としては、グル音亢進、冷汗、顔色不良などとする。

【腹痛のフェイススケール】

いまのおなかのいたみについて おしえてください

0	1	2	3	4	5
いたくない	ちょっといたいけれどへいき	いたいけれどがまんできる	しんどいつらい	だいぶしんどいかなりつらい	もうがまんできない

図7. 腹痛のフェイススケール

新規経口免疫療法の開発および免疫療法における調節性 T 細胞の解析に関する研究

分担研究者 下条 直樹（千葉大学大学院医学研究院小児病態学准教授）

研究要旨

本研究班において、新規経口免疫療法の開発および免疫療法の機序の解明のために以下の研究を行った。

1) 牛乳アレルギーの主要なアレルゲンである α -カゼインをガラクトマンナンで被覆することにより IgE 抗体の結合能を低下させた低アレルゲン化 α -カゼインの調製を試みた。 α -カゼイン：ガラクトマンナン比 1：24 の混合比で得られた可溶性のガラクトマンナン化 α -カゼインは、牛乳アレルギー患者を対象とした皮膚プリックテストでカゼインに比較して膨疹径の有意な縮小が認められた。以上から、ガラクトマンナン化により α -カゼインの IgE 抗体結合性を低下させることが可能であることが示された。

2) 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ダブルブラインド法で開始した。9 名の患者が急速期を終了し、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。およそ半数が KW 乳酸菌摂取であるが、KW 乳酸菌を使用していない H23 年度と急速期での症状出現時の牛乳 1 回量、同日の牛乳積算量を負荷試験閾値が大きく異なる患者が複数名おり、全体では昨年度と比較して閾値が上がっている傾向が見られた。キーオープンは平成 25 年夏になるがその効果が期待される。

3) 急速経口免疫療法の機序を明らかにするために、開始前後でフローサイトメトリーを用いて調節性 T 細胞のサブセットの変化を解析した。その結果、Day7 において nTreg 比率は一過性の減少を認め、iTreg 比率は一過性の増加を認めたが、退院時以降は Day0 と同程度となった。一方、CD25-CD127-CD4+T 細胞比率は、経時的に有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。CD25-LAP+CD4+T 細胞、NKG2D+CD4+T 細胞には変動を認めなかった。以上から経口免疫療法の機序には特定の Treg が関与する可能性が示唆された。今後症例を増やしてモニタリングマーカーとしての有用性についても検討する予定である。

研究協力者

齊藤 章（和興フィルタテクノロジー（株）バイオ事業推進グループ）

井上祐三朗、森田慶紀、千葉浩輝、有馬孝恭、河野陽一（千葉大学大学院医学研究院小児病態学）

星岡 明、富板美奈子、山出晶子、加藤いづみ

（千葉県こども病院アレルギー・膠原病科）

鈴木修一（国立病院機構下志津病院小児科）

A. 研究目的

1) 本研究班では、経口免疫療法を安全性と有効性を兼ね備えた食物アレルギーに一般化できる新規根本的治療法として確立することを目的に、H22 年度に鶏卵、H23 年度には牛乳アレルギー小児を対象として多施設の小児アレルギー基幹病院で臨床試験を行った。その結果、鶏卵の免疫療法は比較的安全で有効性が高いことが明らかとなったが、牛乳では急

速期において強い副反応を認める患者も多く、より一層安全性の高い方法の確立が必要と考えられた。

そこで我々は2つの方法でより安全で有効性の高い牛乳に対する急速経口免疫療法を目指して研究を行った。ひとつには抗原性を保ちながら特異的 IgE 抗体の結合能が低下したアレルゲンの作成であり、もうひとつは Th1 あるいは Treg 細胞を誘導するアジュバントの使用である。

2) 急速経口免疫療法の有効性の機序は十分に明らかにされていないが、最近の報告では過剰な Th2 免疫反応を制御する調節性 T 細胞 (Treg) が誘導される可能性が示されている。Treg にはいくつかの種類があることが知られており、今回は牛乳に対する急速経口免疫療法における種々の制御性 T 細胞の変化を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 牛乳アレルギーの主要アレルゲンである α -カゼインの ϵ -アミノ基と多糖であるガラクトマンナンの還元末端カルボニル基をメイラード反応により共有結合をさせ、 α -カゼイン分子を複数のガラクトマンナン分子で被覆することにより低アレルゲン化を試みた。アレルゲン性については牛乳アレルギー患者における皮膚プリックテストの反応性により検討した。

2) Th1/Treg アジュバント効果が *in vitro*、動物実験で確かめられており、またヒトにおける安全性も報告されている KW 乳酸菌 3110 株の摂取を併用することで、より安全で有効性の高い牛乳急速経口免疫療法を施行できるか否かをダブルブラインド法によって検討した。

3) 牛乳急速免疫療法開始時 (Day0)、開始 7 日後 (Day7)、目標量到達約 1 週間後 (退院時) および維持期開始後 2 か月で末梢血中の各種 TReg 細胞亜群、すなわち、CD25^{high}Foxp3⁺Helios⁺CD4⁺T 細胞 (nTreg)、CD25^{high}Foxp3⁺Helios⁻CD4⁺T 細胞 (iTreg) CD25-LAP⁺CD4⁺T 細胞、NKG2D⁺CD4⁺T 細胞、CD25-CD127-CD4⁺T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では採血以外危険はなく、安全性には問題ないものと考えられる。

C. 研究結果

1) メイラード反応後、 α -カゼイン/ガラクトマンナン比 1 : 24 のモル比での反応物は可溶性であり、SDS-PAGE による解析が可能であった。図 1 に、左から、分子量マーカー、 α -カゼイン 3.4 μ g、2.6 μ g、1.8 μ g、1.0 μ g、0.2 μ g、ガラクトマンナン、モル比 1 : 24 サンプル、モル比 1 : 0 サンプルの SDS-PAGE 像を示す。モル比 1 : 24 サンプルはほとんど α -カゼインのバンドが検出されずカゼイン分子の大部分がガラクトマンナンで被覆されたものと考えられた (図 1)。 α -カゼインに対する SPT が陽性である 5 名の患者中 3 名の患者で明らかにガラクトマンナン化 α -カゼインによる膨疹径が α -カゼインに比して小さくなっていた (表 1)。

2) 平成 24 年度には 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ている。およそ半数が KW 投与群と予測されるが、牛乳 200ml までの到達日数、200ml までの症状出現日数の間には H23 年度 (10 名) と今年度で違いは認めなかった。一方、急速期での症状出現時の牛乳 1 回量、同日の牛乳積算量を負荷試験閾値と比較した場合、H23 年度と大きく異なる患者が複数名おり、全体では昨年度と比較して閾値が上がっている傾向が見られた (図 2 : 初回症状出現時の 1 回量/負荷試験閾値、図 3 : 初回症状出現時の積算量/負荷試験閾値時の積算量)。以上から不活化 KW 乳酸菌が急速期牛乳に対する免疫応答になんらかの影響を与えている可能性がある。

2) Day7 において nTreg 比率は一過性の減少を認め、iTreg 比率は一過性の増加を認めたが、退院時以降は Day0 と同程度となった (図 4、図 5)。一方、CD25-CD127-CD4⁺T 細胞比率は、経時的に有意な増加を認めた (* $p < 0.05$) (図 6)。CD25-LAP⁺CD4⁺T 細胞、NKG2D⁺CD4⁺T 細胞には変動

を認めなかった。

D. 考察

1) α -カゼインを主なアレルゲンとする牛乳アレルギー患者の皮膚テストによりガラクトマンナン化 α -カゼインの低アレルゲン性が明らかとなった。皮膚テストを行った患者は牛乳に対する強いアレルギー反応があり、厚労省研究班での経口免疫療法に参加した患者である。このような患者でも IgE 結合性が低下したことは、より軽度の牛乳アレルギー患者ではガラクトマンナン化 α -カゼインに対する反応性はより低い可能性がある。今後軽度の牛乳アレルギー患者も対象とした皮膚テストも行い、ガラクトマンナン化 α -カゼインの低アレルゲン性を評価したい。また今後、in vitro での T 細胞増殖能によりガラクトマンナン化 α -カゼインが T 細胞エピトープを保持することを確認する必要がある。

2) KW についての試験はダブルブラインドであるため、KW 摂取群とプラセボ群の割り付けは現在のところ不明である (H25 年夏季にはキーオープン予定)。しかしながら平成 23 年度での牛乳急速経口免疫療法と比較して、24 年度の KW 研究群では症状誘発閾値に違いのみられる例が存在しており、KW 摂取が閾値の上昇を誘導した可能性がある。有効性が示唆された場合は、今後大規模な RCT により検証を行う予定である。また、副反応の頻度、維持期 2 か月と 12 か月での経口負荷試験での経過を確認していく。

3) CD25-CD127-CD4+T 細胞は IL-10 産生能を有することが報告されている。今回の検討から経口免疫療法の有効性の機序には特定の Treg が関与する可能性が示唆された。今後症例を増やしてモニタリングマーカーとしての有用性についても検討する予定である。

E. 結論

1) IgE 抗体の結合性が低下したガラクトマンナン化 α -カゼインの作成に成功した。

2) 不活化 KW 乳酸菌投与により急速期の症状緩和に

期待できる可能性がある。維持期の副反応の回数、1 年後の負荷試験の経過を確認していく予定である。

3) CD25-CD127-CD4+T 細胞は急速経口免疫療法により誘導される制御性 T 細胞である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

井上祐三朗、ほか ガラクトマンナン修飾化による食物アレルゲンの低アレルゲン化の試み 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012 年 5 月 12, 13 日 大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況(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

図1 カゼインのガラクトマンナン化の SDS PAGE による解析

