

表1 ガラクトマンナン化 $\alpha$ -カゼインの皮膚テストによるアレルギー性の検討

番号	性別 (M/F)	牛乳RAST 値	PC (ヒスタミン)	NC (対照液)	牛乳	$\alpha$ カゼイン	$\alpha$ -カゼイン・ガラクトマンナン
1	M	846	6/8	0/2	15/25	12/15	5/10
2	M	24.2	5/7	0/0	8/15	7/9	2/3
3	M	2.16	10/12	0/2	20/25	5/10	1/2
4	M	50.3	5/10	0/2	9/15	8/10	10/15
5	M	35.1	5/16	0/2	10/22	5/12	7/9

図2 急速期初回症状量と閾値の関係(1)

初回症状出現時の1回量/負荷試験閾値

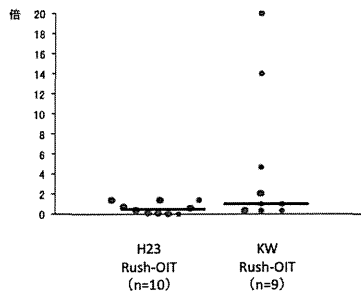


図3 急速期初回症状量と閾値の関係(2)

初回症状出現時の積算量/負荷試験閾値時の積算量

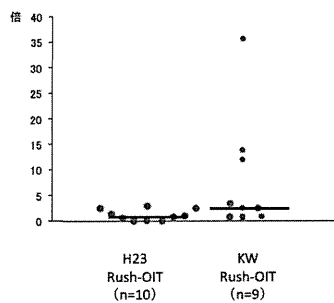


図4 Rush OITによるnTreg比率の変化

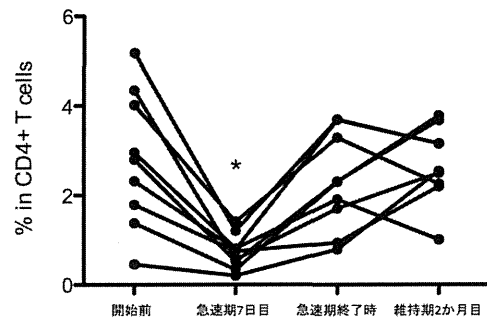


図5 Rush OITによるiTreg比率の変化

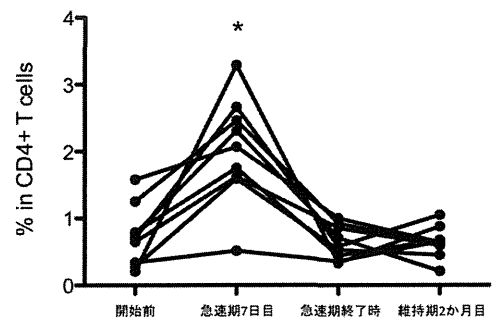
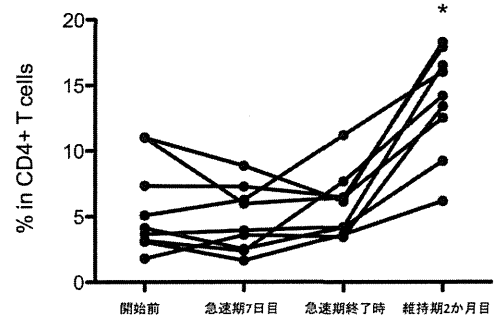


図6 Rush OITによるCD25<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞比率の変化



H22～H 24 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））総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

（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）

- 1) 食物（鶏卵）アレルギーにおける耐性獲得の指標に関する臨床検討
- 2) 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

研究分担者 吉原 重美（獨協医科大学医学部小児科学）

研究協力者 福島啓太郎（獨協医科大学医学部小児科学）

福田 啓伸（獨協医科大学医学部小児科学）

山田 裕美（土屋小児病院小児科）

研究要旨：

- 1) 卵アレルギー群、卵摂取可能群、非卵アレルギー群および対照群を対象として、卵白、OA、OM、CA および Lys に対する特異抗体価を比較した。卵アレルギー群では、各コンポーネントに対する特異 IgE 抗体価が卵摂取可能群に比較して高値を示した。卵摂取可能群および非卵アレルギー群の各コンポーネントに対する特異 IgG4 抗体価は、卵アレルギー群および対照群に比較して高値を示した。したがって、これらは、卵耐性獲得の判定の指標になると考えられ、急速経口免疫療法(rush-OIT)による耐性化機序の解明ならびに本治療の導入すべき患児の選択にも役立つと考えられた。
- 2) 鶏卵摂取時に2臓器以上でアレルギー症状が発現したアナフィラキシー群と症状が発現しなかった群を対象として、鶏卵摂取前24時間以内に採血を行い血清中トリプターゼ値およびECP値を比較した。アナフィラキシー群ではトリプターゼ値が症状を発現しなかった群に比較して高値を示した。また、鶏卵に対する急速経口免疫療法を実施した20症例を対象に、登録時二重盲検食物負荷試験(DBPCFC)前に20症例のトリプターゼを測定し、重症度、症状発現閾値、急速免疫療法期での到達維持量、退院日数との関連について検討を行った。重篤なアレルギー症状の発現した症例で、症状発現閾値が低かった群では、高かった群と比較し、負荷前のトリプターゼが高値を示した。rush-OIT期において抗原摂取目標量に到達できなかった群では、到達できた群と比較し、トリプターゼが高値を示した。以上より、鶏卵摂取前のトリプターゼ量の測定をすることにより、アナフィラキシー症状発現の予想が可能であることが示唆され、rush-OITにおけるトリプターゼの高値は、Grade3以上の重篤なアレルギー症状誘発やその誘発閾値が低いことを反映することが示唆された。

## A. 研究目的

- 1) 卵アレルギーの症例は3歳頃までに耐性化することが多いが、5歳以降でも原因食物が摂取できない食物アレルギー児が10~20%程度あり、これら患児が、経口免疫療法(OIT)の対象となる。OIT、とくに急速法は、患児に身体的負担も多く、また、医療機関においても手間および時間を要し、OITの適応および効果判定の指標が望まれる。卵白中のオボムコイド(OM)に対する特異IgE抗体の高値は、持続する卵アレルギーの指標となることが報告されているが、他の卵白コンポーネントに関する報告はない。また、卵または牛乳に対する特異IgG4抗体の高値が、これら食物の耐性獲得と関連するとの報告がある。卵アレルギーおよび加熱卵摂取可能となった患児を対象にして、卵白のコンポーネントであるオボアルブミン(OA)、OM、コンアルブミン(CA)およびリゾチーム(Lys)に対する特異IgE抗体、特異IgA抗体および特異IgG4抗体を測定して、これら特異抗体が卵摂取の可否の指標になるかを検討した。
- 2) 近年実施されている急速経口免疫療法(rush-OIT)は、顕著な有効性が脚光を浴びているが、特殊な治療法であり、患者にも治療側にも多大な労力と緊張を強いものである。解決すべき課題として、適応患者の選定、有効性の改善と副反応軽減、脱感作と真の耐性獲得の判別などがある。これらの課題を解決すべく、肥満細胞の顆粒に含まれるタンパク分解酵素であるトリプ

ターゼおよび好酸球に含まれる強い組織障害作用を持つECPが免疫療法の適応患児の選択や副反応として問題とされるアナフィラキシーの予知に有用であるかを検討した。

## B. 研究方法

### 対象

- 1) 固ゆで卵白負荷試験または問診により卵摂取で明らかな即時型反応を呈した患児5例(卵アレルギー群:平均3.5歳)、卵アレルギーの既往があり、負荷試験または問診で加熱卵が摂取可能であった患児8例(卵摂取可能群:平均6.1歳)、アレルギー疾患で、卵アレルギーの既往がない患児6例(非卵アレルギー群:平均5.5歳)およびアレルギー疾患、すべてのアレルギーのいずれもない3例(対照:平均3.0歳)を対象とした。
- 2) 鶏卵摂取時に2臓器以上でアレルギー症状が発現したアナフィラキシー5症例(症状内訳:皮膚・呼吸器症状3名、皮膚・胃腸症状1名、皮膚・呼吸器・胃腸症状1名)と症状が発現しなかった18症例において、鶏卵摂取前24時間以内に採血を行い、その検体の血清中トリプターゼおよびECPの測定を行った。また、鶏卵のrush-OIT開始前から経時的に観察できた症例を対象に、鶏卵摂取時の症状の有無と血清中トリプターゼ、ECPの関連性を検討した。また、追加検討として、鶏卵に対するrush-OITを実施した20症例を対象とした。登録時二重盲検食物負荷試験(DBPCFC)前に20症例の血清中トリプターゼおよ

ECP を測定し、重症度、症状発現閾値、急速免疫療法期での到達維持量、退院日数との関連性について検討した。

#### 方法

上記 1)2)とも、上記対象から得た血清中の卵白および 4 種のコンポーネントに対する特異 IgE 抗体、特異 IgA 抗体、特異 IgG4 抗体、トリプターゼおよび ECP は、ImmunoCAP(酵素免疫測定法、Phadia AB, Uppsala, Sweden)を用いて測定した。なお、統計的解析法は、Mann-Whitney の U 検定により行い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

#### 倫理面への配慮

本研究は、「ヘルシンキ宣言 ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」の精神に基づき、「臨床研究に関する倫理指針」(平成 15 年 7 月 30 日、厚生労働省取りまとめ)及びその他の関連法規、指針等を遵守して実施した。検査、各種データおよび評価結果などの個人情報であり、この情報によって個人への不利益が派生することがないように取り扱いと管理を厳重に行う。個人を識別できる情報は削除し、解析する前にコード番号をつけ、その番号によって管理する。得られた成果は学会や論文に発表されるが、個人情報が発表されることはない。また、本研究は、通常の診療の範囲を超えるものではなく、これに伴う新たな苦痛、危険はないが、本研究は、研究者と対象者が治療をする側とされる側という特殊性があるため研究への参加及び結果の解析への利用と公表への同意は自由意志で行った。また協力、同意をしないからといって不利益な扱いを受けないことなど十分なインフォームド・コンセントを行った。本研究の対象患

者が小児であることから、被験者本人が十分な判断能力又は判断が困難であることが予想されるため、保護者に対して説明、同意(代諾)を頂いた。本研究の代表者及び研究協力者が、患者説明文書などを用いて本研究の目的と概要、プライバシーの保護と人権の尊重を詳細に説明した。同意(代諾)も同様に、同意(代諾)文書に署名をして頂くことで同意を得た。

#### B. 研究結果

1) 各コンポーネントに対する特異 IgE 抗体陽性数は、卵アレルギー群で 3.8 個、卵摂取可能群で 2.1 個、非卵アレルギー群で 1.0 および対照で 0.3 個であった。コンポーネント特異 IgE 抗体価は Lys を除いて、卵アレルギー群の卵白コンポーネントに対する特異 IgE 抗体価は、他の群に比較して高値を示した。コンポーネントに対する特異 IgG4 抗体価は、卵摂取可能群および非卵アレルギー群において、卵アレルギー群および対照群に比較して高値を示す傾向が認められた。とくに、卵摂取可能群の 4 例および非卵アレルギー群の 1 例では、少なくとも 1 個以上のコンポーネントに対する特異 IgG4 抗体が、測定範囲(30mgA/L)を超える高値であった。卵白および各コンポーネントに対する特異 IgA 抗体はほとんど検出されなかった(図 1~5)。また、卵白 rush-OIT 実施例における rush-OIT 実施前、開始後 7 日および終了時の各コンポーネントに対する特異抗体価の推移を検討したところ、特異 IgE 抗体および特異 IgA 抗体価は、この期間では

変動は見られなかったが、特異 IgG4 抗体価は、終了時に Lys を除いて、いずれのコンポーネントにおいても、わずかではあるが上昇した。

- 2) 鶏卵摂取後にアナフィラキシー症状が呈したアナフィラキシー群では、症状を発現しなかったコントロール群に比べ、有意差をもって鶏卵摂取前の血清中トリプターゼ量が高い傾向が認められた (アナフィラキシー群 中央値  $4.16 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $2.92\text{-}4.40 \mu\text{g/L}$ 、コントロール群 中央値  $2.34 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $1.07\text{-}4.29 \mu\text{g/L}$ ,  $P=0.017$ ) (図 6)。ECP については両群間で有意差は認められなかった (アナフィラキシー群 中央値  $21.6 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $7.81\text{-}49.1 \mu\text{g/L}$ 、コントロール群 中央値  $12.35 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $4.21\text{-}53.3 \mu\text{g/L}$ ) (図 7)。免疫療法を実施した同一症例において、アナフィラキシー症状発現時にトリプターゼが高値を認めたが、ECP は高値を示さなかった。

非加熱粉末卵白による DBPCFC において Sampson らの Grade3 以上の症状を呈した 17 症例 (症状内訳: 消化器症状 15 例、呼吸器症状 2 例) の中で、症状発現閾値が  $100\text{mg}$  以下であった群 (12 例) では、症状誘発閾値が  $250\text{mg}$  以上であった群 (5 例) と比較し、有意差をもって負荷前の血清中トリプターゼが高値を示した (閾値  $100\text{mg}$  以下 中央値  $3.11 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $1.86\text{-}7.34 \mu\text{g/L}$ 、閾値  $250\text{mg}$  以上の群 中央値  $1.56 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $0.9\text{-}3.78 \mu\text{g/L}$ ,  $P<0.05$ ) (図 8)。また、rush-OIT 登録時の DBPCFC における血清中トリプ

ターゼと rush-OIT 期における抗原到達目標量 (鶏卵 1 個  $60\text{g}$ ) の検討では、目標量に到達できなかった群 (3 例) では目標量に到達できた群 (17 例) と比較し、血清中トリプターゼが高値を示した (目標量達成 中央値  $2.66 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $0.9\text{-}4.75 \mu\text{g/L}$ 、目標量未到達 中央値  $4.25 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $3.75\text{-}7.34 \mu\text{g/L}$ ,  $P<0.05$ ) (図 9)。なお、目標量に到達できなかった 3 例中 2 例では急速免疫療法期に Grade2 以上の症状が頻回に認められた。また、登録時 DBPCFC における血清中トリプターゼと急速期の退院までの日数についての検討では、14 日以内に退院できた群 (3 例) と比較し、退院までに 14 日以上要した群 (17 例) では血清中トリプターゼが高値を示した (14 日以内 中央値  $1.56 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $0.9\text{-}1.61 \mu\text{g/L}$ 、14 日以上 中央値  $2.94 \mu\text{g/L}$ ; 範囲  $0.9\text{-}7.34 \mu\text{g/L}$ ,  $P<0.05$ ) (図 10)。14 日以内に退院できた 3 例では、登録時の DBPCFC における症状発現閾値が  $250\text{mg}$  以上であり、急速免疫療法期における Grade3 以上の症状発現も 1 日のみと少なかった。

#### D. 考察

- 1) 卵アレルギー群において、1 例をのぞいていずれの卵白コンポーネントに対する特異 IgE 抗体は陽性を示し、とくに、OA および OM に対する抗体価が高く、これら 2 種のコンポーネントが主要な感作コンポーネントであった。また、卵摂取可能群に比較して各コンポーネントに対する特異 IgE 抗体価は

高値を示した。卵アレルギーにおいて、卵アレルギーが持続する例は、OM に対する特異 IgE 抗体が耐性獲得例と比較して有意に高値を示し、OA では両群間で特異 IgE 抗体価に差を認めなかったと報告 (Bernhisel et al. *J Allergy Clin Immunol* 1994)、また、卵白に対する特異 IgE 抗体価が高い例では耐性獲得に要する期間が長いと報告がある (Tomicic et al. *Pediatr Allergy Immunol* 2008)。今回の結果においても既報と同様な結果であったが、コンポーネントによる卵アレルギー群と卵摂取可能群の鑑別における違いは認められなかった。一方、卵摂取可能群および非卵アレルギー群において、各コンポーネントに対する特異 IgG4 抗体価は卵アレルギー群および対照群に比較して高値を示した。また、1 例であるが、rush-OIT 終了時に Lys を除くすべてのコンポーネントに対する特異 IgG4 抗体が検出されるようになった。食物アレルギーにおいて、特異 IgG4 抗体は、食物アレルギー持続例に比較して耐性獲得例において高値を示し、OIT 実施中に上昇することが知られ、今回の結果と一致した。さらに、非卵アレルギー群においても卵アレルギー群および対照群に比較して高値を示したことから、アレルギー素因を持つ例において経口的なアレルギー刺激により特異 IgG4 抗体の産生される可能性も考えられた。

- 2) 鶏卵摂取後にアナフィラキシー症状を呈した群では、症状を発現しなかった群に比べて摂取前 24 時間以内の血清

トリプターゼ値が有意差をもって高かった。また、鶏卵免疫療法を実施した同一症例におけるアナフィラキシー症状発現と鶏卵摂取前の血清トリプターゼ値を検討したところ、摂取前の血清トリプターゼ値が上昇している時期において症状発現が認められた。また、鶏卵に対する rush-OIT を実施した 20 症例の登録時 DBPCFC 前の血清中トリプターゼ値は重篤な副反応の症状発現閾値、急速免疫療法期での到達維持量、退院日数と関連性があった。

上記の結果は、ハチ毒アレルギーにおいて、ベースラインの血清中トリプターゼ値と副反応の重篤度は正相関するとの報告 (Haeberli G et al. *Clin Exp Allergy* 2003;33,1216-1220) やベースラインの血清中トリプターゼ値が 10  $\mu$ g/L 以上の場合、ハチ毒アレルギーの原因となるアレルギーの刺激によって重篤な副反応を引き起こすリスクファクターになるという報告 (Kucharewicz I et al. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17,65-69)、また食物アレルギー患者の負荷試験前と負荷試験後の血清中トリプターゼ値を比較したところ、アナフィラキシー群では負荷試験後にトリプターゼ値の上昇がみられたという報告 (第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会抄録) がある。以上より、ベースラインの血清中トリプターゼ値とアナフィラキシー症状発現について、過去の報告と一致する結果になった。本研究において、安全な rush-OIT を実施する上で、実施前のトリプターゼ

測定値が役に立つと考えられた。

#### E. 結論

- 1) 今回の検討では各群の症例数が少なかったが、卵白コンポーネントに対する特異 IgE 抗体および特異 IgG4 抗体の測定は、rush-OIT による耐性化機序の解明ならびに本治療の導入すべき患児の選択にも役立つと考えられた。
- 2) 鶏卵摂取前に採血した血清中のトリプターゼ量の測定をすることにより、アナフィラキシー症状発現の予想が可能であることが示唆され、rush-OIT における血清中トリプターゼの高値は、Grade3 以上の重篤なアレルギー症状誘発とその誘発閾値が低いことの両者を反映することが示唆された。これにより、血清中トリプターゼは、アナフィラキシーの発現予知マーカーとして有用であり、安全な食物負荷試験や経口免疫療法実施を実施するための重要な検査のひとつになることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究

##### 論文

- 1) Yoshihara S, Ono M, Yamada Y, Fukuda H, Abe T, Arisaka O: Supplast tosilate for prophylaxis of pediatric allergy. Atopic dermatitis, Edited by Esparza-Gordillo et al, InTech, 289-298, 2012.
- 2) 吉原重美: 学校給食における食物アレルギー

ギーの現状と対応, 学校給食, 63, 26-32, 2012.

- 3) 吉原重美: アレルゲンコンポーネント検査の意義, 小児内科, 44(12), 2047-2050, 2012

##### 発表

- 1) 福島啓太郎, 吉原重美, 金子堅太郎, 渡部弥栄子, 福田啓伸, 山田裕美, 有阪 治: 急速経口免疫療法を試みたが中断せざるを得なかった卵アレルギー症例の検討. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 2012, 5.
- 2) 福田典正, 福田由紀美, 廣田直子, 高野清美, 今村祥美, 田村佳津江, 吉原重美: 加熱卵制限解除後に生卵負荷試験を施行した症例の解析. 第 29 回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会, 大阪, 2012, 6.
- 3) 福田啓伸, 吉原重美, 福島啓太郎, 金子堅太郎, 渡部弥栄子, 山田裕美, 有阪 治: 急速経口免疫療法の副反応としてのアナフィラキシー発現予知マーカーに関する検討. 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 2012, 9.
- 4) 福田啓伸, 吉原重美, 福島啓太郎, 金子堅太郎, 渡部弥栄子, 山田裕美, 有阪 治: アナフィラキシー発現予知マーカーとしての血清中トリプターゼの有用性について. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012, 11.
- 5) 福田典正, 吉原重美: 加熱卵制限解除後に非加熱卵(卵白)負荷試験を施行した 118 例の解析. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012, 11.

- 6) 福島啓太郎, 吉原重美, 金子堅太郎,  
福田啓伸, 山田裕美, 有阪 治: 卵白  
コンポーネントに対する特異抗体価  
による鶏卵アレルギー耐性獲得の指  
標に関する検討 第 61 回日本アレル  
ギー学会秋季学術大会, 東京, 2011,  
11.



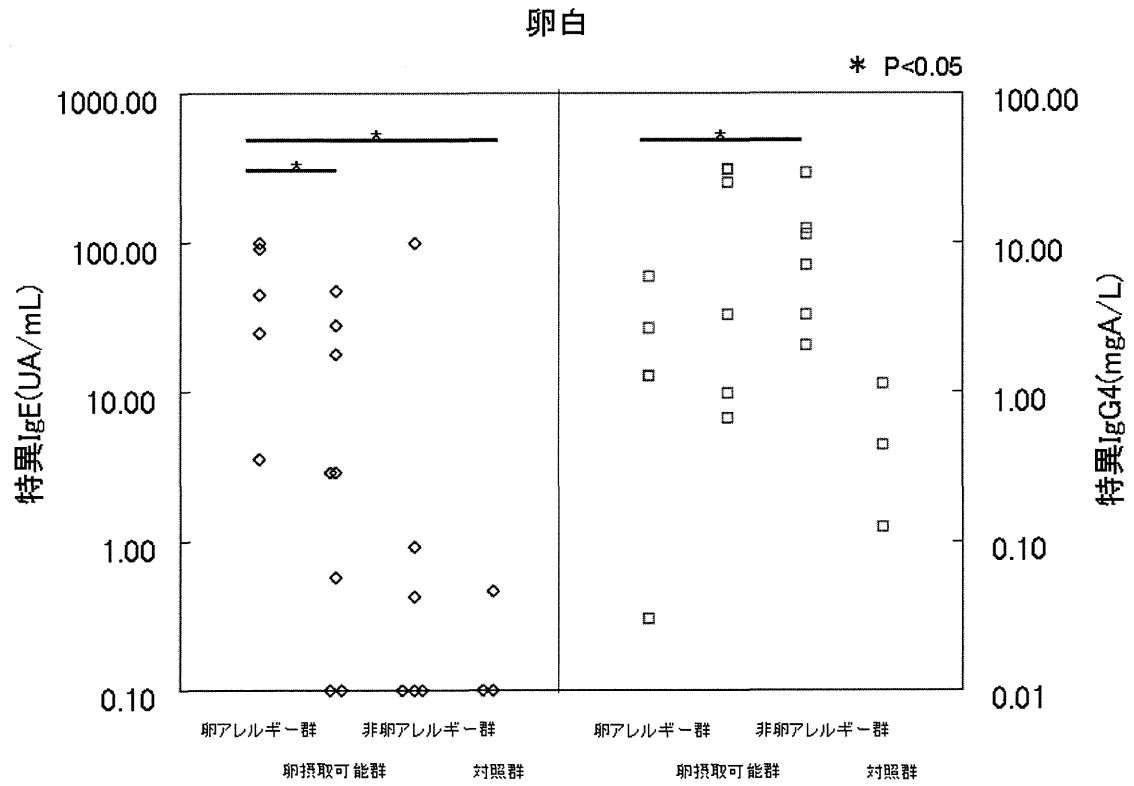


図1 卵白に対する抗体価比較

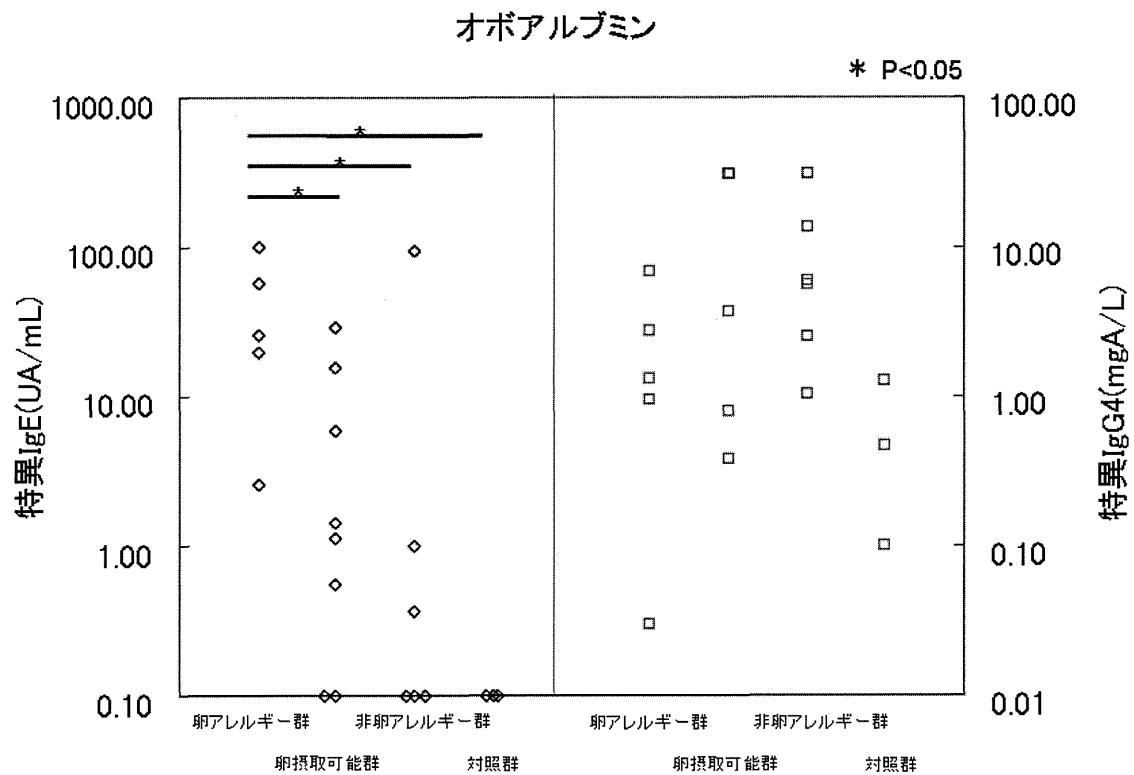


図2 OAに対する抗体価比較

オボムコイド

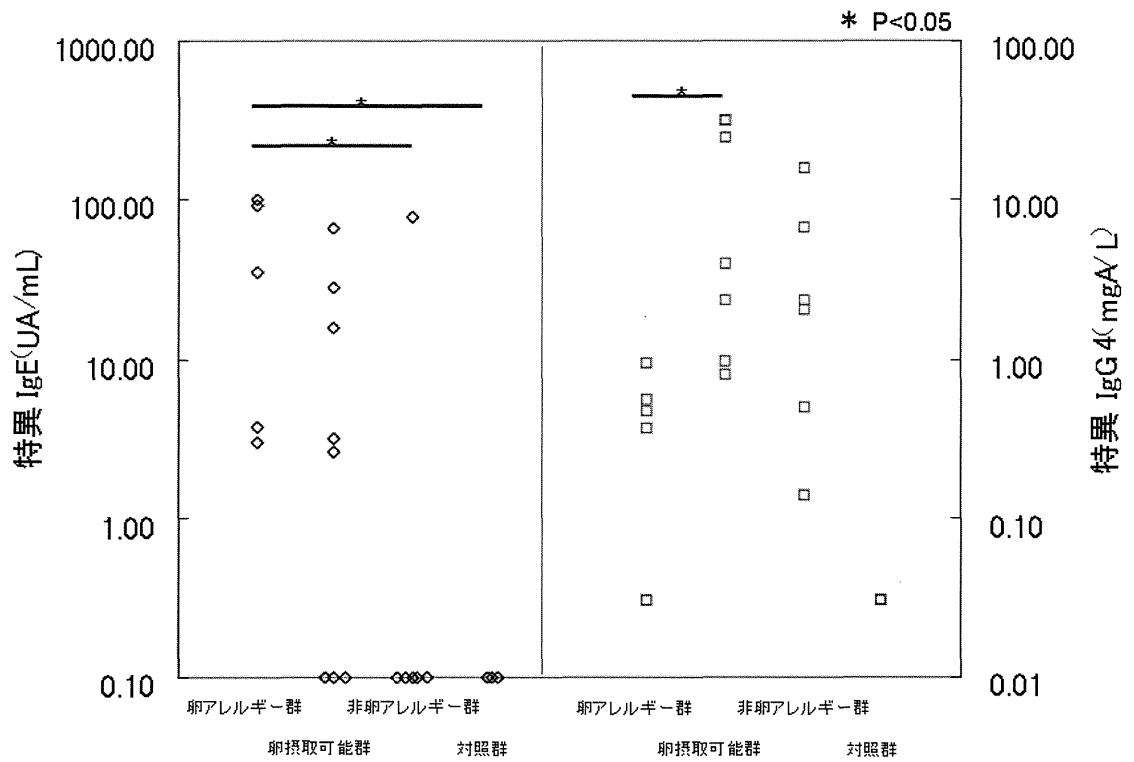


図3 OMに対する抗体価比較

コンアルブミン

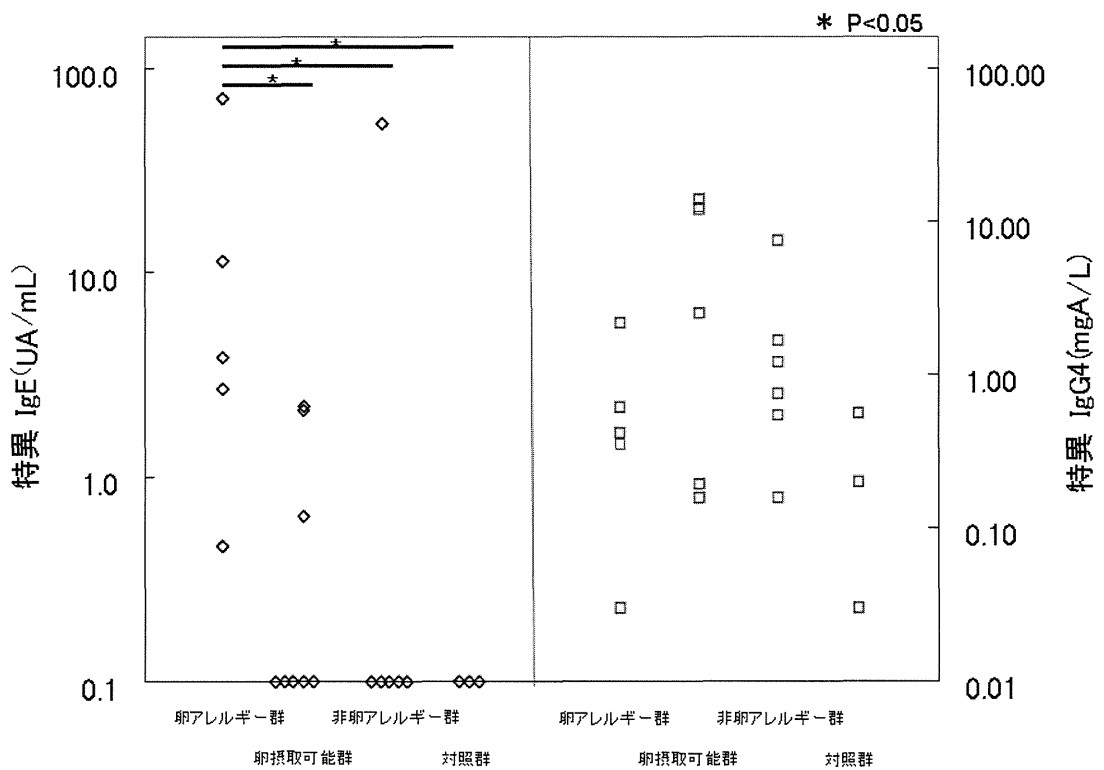


図4 CAに対する抗体価比較

リゾチーム

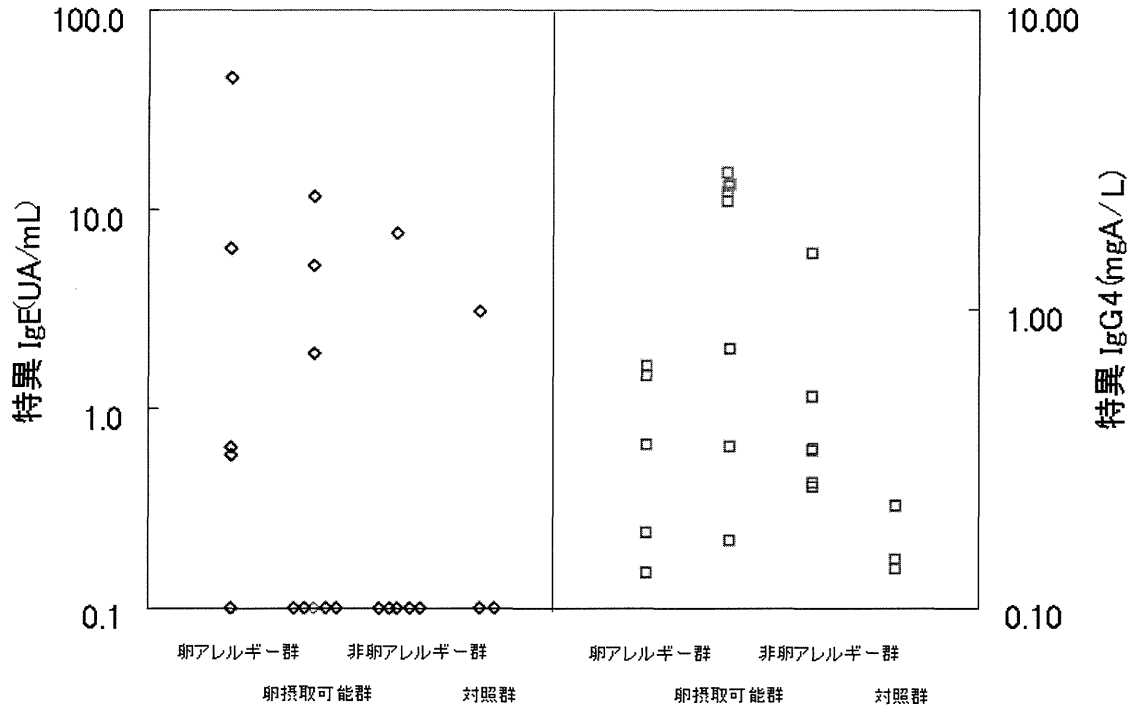


図5 Lys に対する抗体価比較

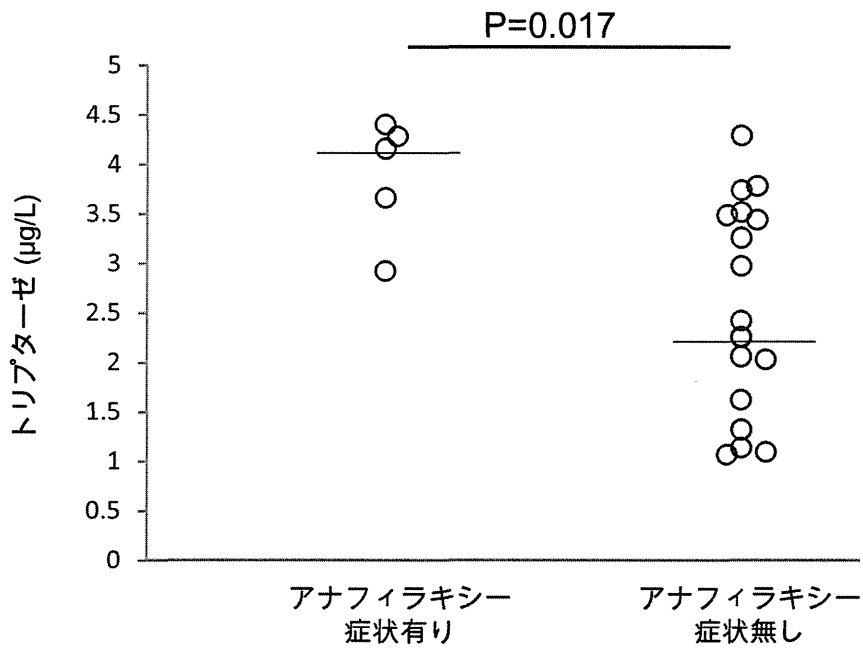


図 6 アナフィラキシー症状発現とトリプターゼ値の関係

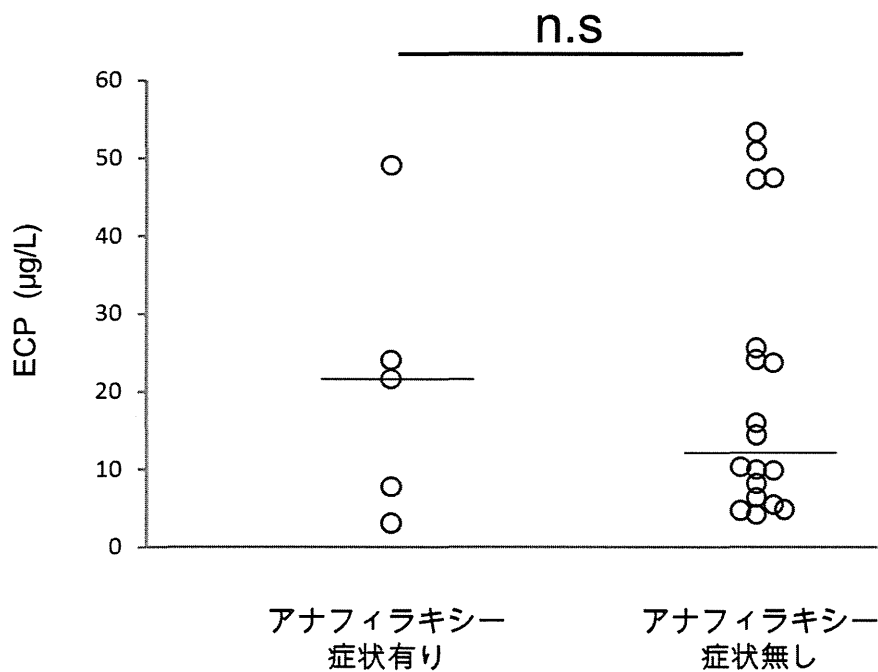


図 7 アナフィラキシー症状発現と ECP 値の関係

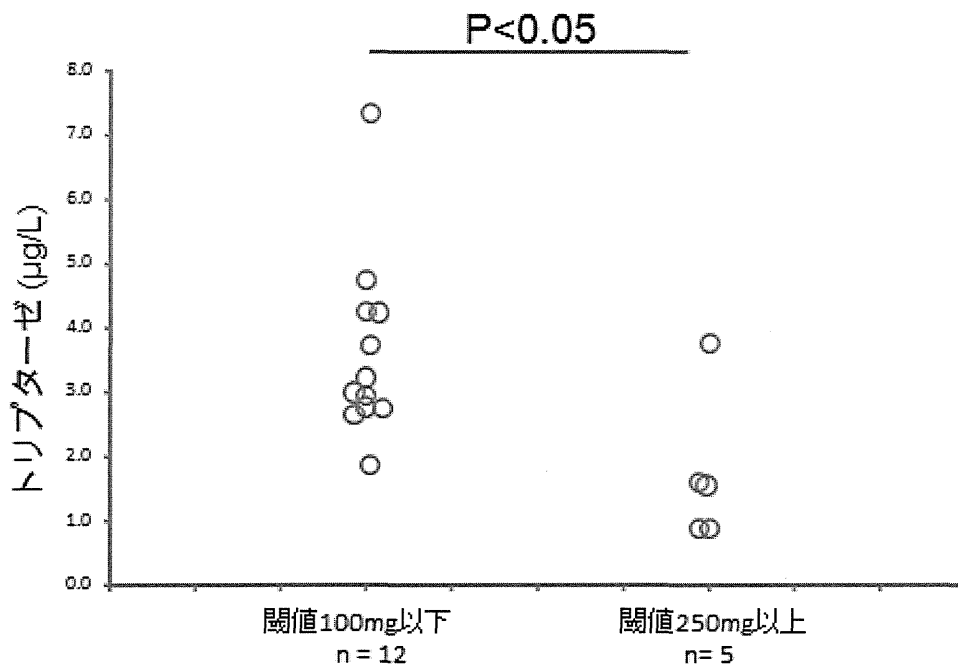


図8 Grade3以上の症状発現閾値とトリプターゼ値の関係

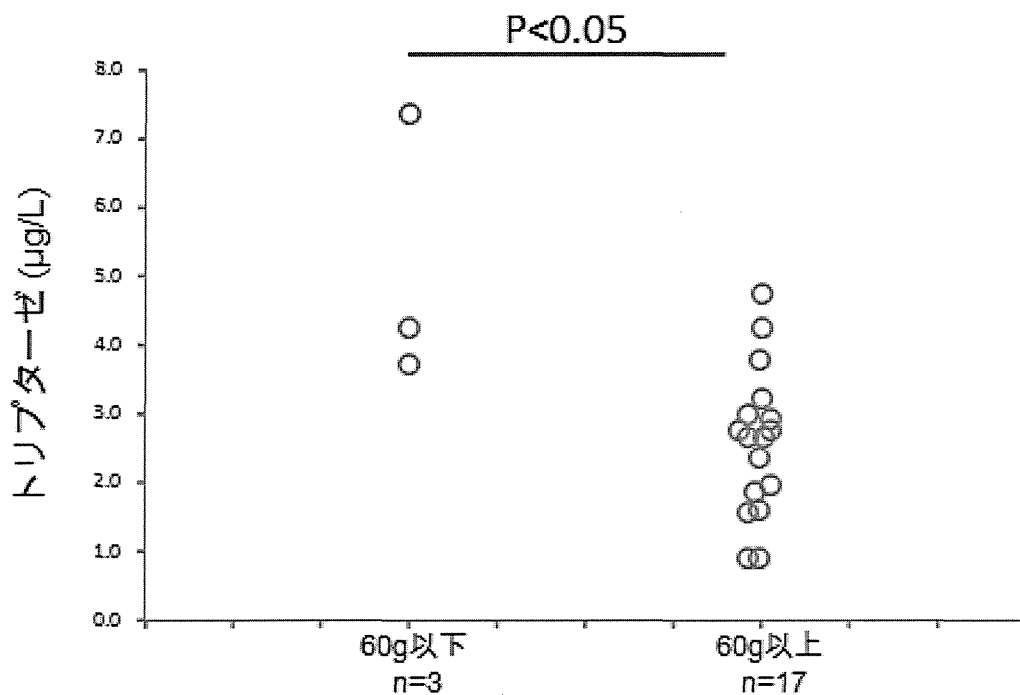


図9 抗原到達目標量とトリプターゼ値の関係

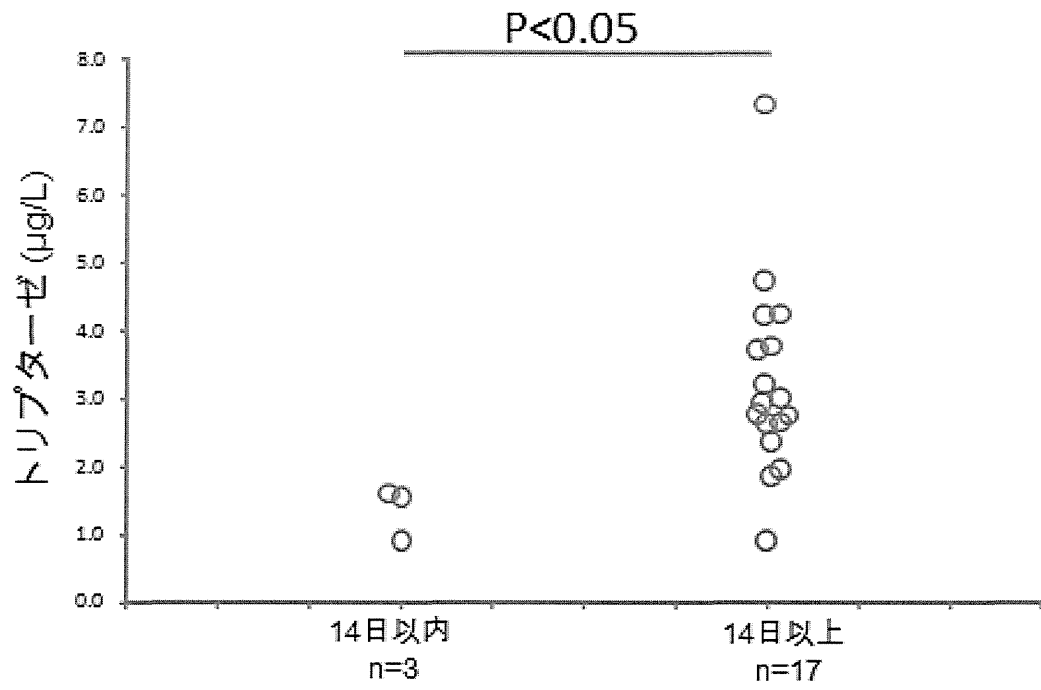


図 10 急速期の退院までの日数とトリプターゼ値の関係

### 経口免疫療法による好塩基球反応性の変化

研究分担者 伊藤節子 同志社女子大学 生活科学部 食物栄養科学科 教授  
研究協力者 矢寺路代 同志社女子大学 臨床栄養学研究室  
明石真未 同志社女子大学 臨床栄養学研究室

#### 研究要旨

食物アレルギーの治療としての急速経口免疫療法の有用性が報告されている一方で、重篤な副作用も起こっている。そのため治療の適応と経過の評価に有用なバイオマーカーが求められている。好塩基球ヒスタミン遊離試験（以下 HRT）は *in vitro* の検査でありながら生体内のアレルギー反応を最もよく示す臨床検査としてその適切な活用が期待されている。

本研究では牛乳アレルギー児の急速経口免疫療法の経過中における HRT を経時的に測定することにより、ヒスタミン遊離曲線の変化から HRT が牛乳急速経口免疫療法における耐性の獲得の指標となりうるかどうかを検討し、耐性の獲得のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

経時的に HRT を検討することにより経口免疫療法により脱感作がおり、やがて耐性の獲得に至る可能性を示すことができた。これらのデータから HRT は急速経口免疫療法を安全に行なうための適応の決定や耐性の獲得の指標となりうることを示唆された。

#### A. 研究目的

食物アレルギーの治療としての急速経口免疫療法の有用性が報告されている一方で、重篤な副作用も起こっている。そのため治療の適応と経過の評価に有用なバイオマーカーが求められている。好塩基球ヒスタミン遊離試験（以下 HRT）は *in vitro* の検査でありながら生体内のアレルギー反応を最もよく示す臨床検査として期待されている。

本研究では牛乳アレルギー児の急速経口免疫療法の経過中における HRT を経時的に測定することにより、ヒスタミン遊離曲線の変化から HRT が牛乳急速経口免疫療法における耐性の獲得の指標となりうるかどうかを検討し、耐性の獲得のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

末梢血中好塩基球からのヒスタミン遊離試験は、HRT シオノギ®のキットを利用し、一部方法を変えて行った。抗白血球モノクローナル抗体 BA312 をつけたマグネットビーズと磁石を用いて末梢血から好塩基球を取り出し、アビジンプレート上で抗原と反応させ、遊離したヒスタミンを競合 ELISA 法にて測定した。HRT シオノギ®では抗原があらかじめセットされているが、今回行っ

た変法では用意した抗原をマニュアルでアビジンプレートの各ウェルに入れることにより抗原が自由に選択できるという点が相違点であり、検査の原理は HRT シオノギ®と同じである。抗原としては牛乳（HRT シオノギ®）の他、牛乳の主要抗原コンポーネントタンパク質と考えられている  $\beta$ -ラクトグロブリン（以下  $\beta$ -LG、Sigma 社）、カゼイン（三重病院よりの供与）を用いた。分離した好塩基球を各抗原を 10 倍希釈系列により作製した 5 濃度（0.4, 4, 40, 400, 4000ng/mL）の抗原液で刺激した。

結果は、各抗原濃度別に以下に示す計算式によりヒスタミン遊離率を算出し、横軸に抗原濃度を縦軸にヒスタミン遊離率にとったヒスタミン遊離曲線で表した。

$$\text{ヒスタミン遊離率(\%)} = \left\{ \frac{(\text{抗原特異的ヒスタミン遊離量} - \text{非特異的ヒスタミン遊離量})}{(\text{総ヒスタミン量} - \text{非特異的ヒスタミン遊離量})} \right\} \times 100$$

採血は治療群では、①登録時または①'治療開始前（急速期の開始が割付日より 4 週間以上あいた場合のみ）、②急速期 7 日目前後、③急速期終了時、④維持期 2 ヶ月後、⑤維持期 12 ヶ月後の 5 回（条件によっては 6 回）、対照群ではこれに割付 3 ヶ月後が加わるため、6 回（条件によっては

7回)となる。検体は採血後輸送され、翌朝10時より検査を行った。

### C. 研究結果

基礎検討として、HRT シオノギ®の変法によりヒスタミン遊離が評価できることを確認した。

抗原濃度4~40ng/mLにヒスタミン遊離率のピークがある症例が最も多く、400~4,000ng/mLでは同等または低下する傾向が認められた。このことから血中の抗原濃度として起こりうる濃度(数ng/mL)をピークとして牛乳および抗原コンポーネントタンパク質であるβ-LGとカゼインが末梢血好塩基球からヒスタミンを遊離することが明らかとなった。ただし、総ヒスタミン量と非特異的ヒスタミン遊離量の差が少ないときにはヒスタミン遊離率ではなく、ヒスタミン遊離量の絶対値で評価する必要があった。

抗原別に見るとカゼインによるヒスタミン遊離曲線のパターンは牛乳抗原と同様であり、カゼインが牛乳タンパク質の80%を占めていることを反映していると考えられた。β-LGとカゼインによるヒスタミン遊離曲線を比較すると、β-LGもカゼインと同じパターンを示すが、カゼインよりも全体にヒスタミン遊離率が高い症例やより低濃度域に反応のピークがある症例が認められた。

2011年8月より検討を開始し、2013年3月10日までに18例について維持期開始後12ヵ月終了時まで5ポイント(治療群)あるいは6ポイント(対照群)においての検査を行うことができた。

経時的に行ったHRTの結果から判断すると4例は経過良好で耐性の獲得につながることを示唆された。牛乳および抗原コンポーネントタンパク質のヒスタミン遊離曲線はいずれも経時的に下方移動し、各抗原濃度におけるヒスタミン遊離率が経時的に低下していった。β-LGとカゼインによるヒスタミン遊離曲線のパターンは異なりβ-LGのヒスタミン遊離率のピークはカゼインに比べてより低濃度域にあったが、遊離率自体はカゼインに比べて低かった。維持期12ヵ月後の好塩基球中の総ヒスタミン量も高く、症状が安定していることを反映していた。4例とも登録時の牛乳の閾値が10mLと高いこと、HRTでは低濃度域におけるカゼインに対する反応性が低いことが共通していた。3例は急速期終了後は200mL摂取を続けていたが、1例は2ヵ月以降50mLを維持量としていた。

13例では維持期12ヵ月後のヒスタミン遊離曲線が維持期2ヵ月後よりも上方移動していた。これは2週間の中止期間により脱感作状態が解除されたことを*in vitro*で示していると考えられた。これらの症例は耐性の獲得には至っておらず、脱感作の状態であると判定できる。本研究では負荷試験の総負荷量が約45mLであるため、多くの症例で負荷試験が陰性であった。このことは脱感作状態であると確認された症例ではより時間をかけて摂取することにより耐性を獲得していく可能性を示唆している。とくに総ヒスタミン量が高く、症状も安定していた症例ではより長期の治療により耐性を獲得する可能性があると考えられた。

一方、脱感作状態であるが総ヒスタミン量が低く、不安定であった4例では、維持量の減量により耐性獲得が得られる可能性があると考えられた。

好酸球性胃腸炎で摂取中止した1例は、経過中1~2mLしか摂取できず、維持期開始後2ヵ月の時点ですでに各濃度におけるヒスタミン遊離率が登録時より高く、治療困難が予測されていた。

### D. 考察

経時的にHRTを検討することにより経口免疫療法により脱感作がおり、やがて耐性の獲得に至る可能性を示すことができた。これらのデータからHRTは急速経口免疫療法を安全に行なうための適応の決定や耐性の獲得の指標となりうることを示唆された。また、好塩基球の反応性を詳細に検討することは個々の症例における経口免疫療法の維持量の決定と食事指導への応用につながると思われる。

### E. 結論

経時的に行うHRTの結果の解析は、食物アレルギーにおける経口免疫療法を安全に行うための指標および耐性の獲得のメカニズムを明らかにするための有用な情報を提供すると考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 伊藤節子. 「食べる」側から見た食品の抗原



性の評価と調理による低アレルゲン化：抗原コンポーネントレベルにおける検討と臨床応用. 日小ア誌 2011;25:63-7

- 2) 伊藤節子. 食物アレルギーと治療. 小児科 2011;52:175-82
- 3) 伊藤節子. 食物アレルギー：治療の基本と早期治療介入の重要性. アレルギー 2011;60:1495-503
- 4) 伊藤節子. IgE-mediated food allergy の原因抗原診断におけるピットフォール. 日小ア誌 2011;25:665-73
- 5) 伊藤節子. 乳汁栄養は将来のアレルギー疾患発症に関連するか? 周産期医学 2011;41:633-7
- 6) 伊藤節子. 卵アレルギー. 小林陽之助監修「保護者と学校の先生に伝えたい食物アレルギーの基礎知識」p.11-14 診断と治療社、東京、2011年4月
- 7) 伊藤節子. 食物経口負荷試験により適切な診断・食事療法を行うことができた小児食物アレルギー症例. 田中清、松末智、本田佳子編「ケースで学ぶ栄養管理の思考プロセス第4巻」p.59-69、文光堂、東京、2011年6月
- 8) 伊藤節子. 乳幼児の食物アレルギー. 診断と治療社、東京、2012年9月
- 9) 伊藤節子. 食物アレルギーの早期診断と治療の重要性—アレルギーマーチの予防も含めて. 小児内科. 2012;44:2055-2059
- 10) 伊藤節子. アレルゲン（抗原）特異的 IgG 4 抗体. アレルギー・免疫 2013;20:84-92

## 2. 学会発表

- 1) 伊藤節子. アナフィラキシーの病態から見た予防と対策. 第8回京都小児救急疾患研究会. 京都国際ホテル、2011年5月14日
- 2) 伊藤節子. 食品中のアレルゲン評価システム. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会テーマ館セミナー. 幕張メッセ国際会議場 2011年5月15日
- 3) Ito S. Evaluation of modified basophil histamine release test at the antigen component level in the management of patients with egg allergy. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2011, 2011/6/14 Istanbul, Turkey
- 4) 伊藤節子. 食物アレルギーの栄養指導の方向性～食品のアレルゲン交換表の活用を含めて～第114回日本小児科学会学術集会分野別シンポジウム「食物アレルギー」、グランドプリンスホテル新高輪、2011年8月12日
- 5) 伊藤節子. 耐性獲得を目指した治療における卵抗原量に基づく食事療法の有用性と安全性：卵白 Immuno CAP クラス6の卵アレルギー児における検討. 第48回日本小児アレルギー学会、福岡国際会議場、2011年10月30日
- 6) 伊藤節子. 「食べること」を目指した食物アレルギーの治療における好塩基球ヒスタミン遊離試験の活用. イブニングシンポジウム「I型アレルギーとアレルギー検査(ヒスタミン遊離試験を中心に)」. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、グランドプリンスホテル新高輪、2011年11月10日
- 7) 伊藤節子. 抗原量に基づく漸増法による食事療法の安全性と耐性獲得からみた有用性：重症卵アレルギー児における検討. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、グランドプリンスホテル新高輪、2011年11月12日
- 8) 伊藤節子. 食物アレルギーの治療. 第12回食物アレルギー研究会. 昭和大学上條講堂. 2012年2月18日
- 9) 伊藤節子. 食物アレルギーの治療管理の実際と問題点. 第115回日本小児科学会学術集会分野別シンポジウム「食物アレルギーの日常管理と問題点」2012年4月20日(福岡市)
- 10) Setsuko Ito. A list of cow's milk allergen exchange based on the quantitative evaluation of milk protein at antigen component level in cooked food. EAACI 2012 Geneva. 2012年6月18日(Geneva, Switzerland)
- 11) 伊藤節子. 「食べる」ことを目指す食物アレルギーの診断と治療. 第49回日本小児アレルギー学会 教育講演 2012年9月15日(大阪市)
- 12) 伊藤節子. 乳幼児の食物アレルギーにおける食事指導の基本. 第34回日本臨床栄養学会パネルディスカッション「小児の食物アレルギーへの対応 Up to Date」2012年10月6日(東京都)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 経口免疫療法の動物モデルの開発

研究分担者 北中 幸子 東京大学医学部小児科 准教授  
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

### 研究要旨

食物アレルギーは小児の約5%を占める重要な疾患であるが、未だその発症・治癒メカニズムは不明であり、根治療法も確立されていない。また、ヒト臨床研究では得られる検体が限られるためメカニズム解明が難しい一方、モデル動物ではヒトと差異が生じてしまうという問題がある。そこで、従来のマウスと比べ、ヒトでの発症機序に近いモデルとなる可能性がある、アジュバントを用いずに経皮感作させることで作製した新しい食物アレルギーモデルマウスを開発し、ヒトとの差異の縮小を目指したうえで、そのモデルマウスを使用して、食物アレルギーの発症メカニズム、および、食物アレルギーに対する急速経口免疫療法（rush OIT）の奏功メカニズムの解析を行うこととした。新しく経皮感作により作製した卵白アルブミン（OVA）アレルギーマウスでは、血清OVA特異的IgE抗体価の上昇を認め、OVAの経口摂取により下痢症状を呈し、大腸組織において炎症所見を認めた。また、rush OITは本モデルマウスにも有効であり、本療法により、症状誘発閾値の上昇、下痢症状の消失、特異的IgE抗体価の低下、大腸組織炎症所見の改善を認めた。本療法経過中の特異的IgE抗体価の変動は、ヒトにおいてみられる変動と同様の傾向を示し、本モデルマウスはヒトに近い食物アレルギーモデル動物として有用であると思われる。

### A. 研究目的

食物アレルギーは小児の約5%を占める重要な疾患であるが、未だその発症・治癒メカニズムは不明で、根治療法も確立されていない。また、ヒト臨床研究では得られる検体が限られるため、メカニズム解明が難しいという問題があり、モデル動物による研究も必要となるが、モデル動物による研究はヒトと差異が生じるという問題がある。既に報告されているマウスによる研究では、コレラトキシンをアジュバントとしてアレルギーとともに摂取させる方法やアレルギーをアジュバントとともに皮下注射する方法等により免疫をつけたマウスを使用している。しかし、実際の重症食物アレルギー患児は乳児期にアトピー性皮膚炎やドライスキンなどの皮膚バリア損傷を認めていた症例が多く、アレルギーの皮膚への塗布によりそのアレルギーに対する食物アレルギーの発症率が増加するという出生コホート研究の報告もみられており、ヒトでの感作経路は経皮感作が主である場合もあると考えられた。よって、従来のマウスと比べ、ヒトでの発症機序に近いモデルとなる可能性が高い、アジュバントを用いずに経皮感作により作製した食物アレルギーモデルマウスを新たに開発し、マウスモデルが持つヒトとの差異を

縮小し、そのマウスに急速経口免疫療法（rush oral immunotherapy: rush OIT）を行うことで、未だ明らかでない食物アレルギーの発症メカニズム、および、食物アレルギーに対する rush OIT の奏功メカニズムの解析を行うこととした。

### B. 研究方法

#### 1. 経皮感作による食物アレルギーマウスモデルの作製

7週齢のBALB/cマウス（雌）の背部の毛を剃り、その部位にアレルギーとして卵白アルブミン（Ovalbumin : OVA）溶液を含ませた綿をパッチした。アジュバントは用いなかった。コントロールとしてはPBS溶液を用いた。パッチは1週間後に外し、1週間の間隔をおいて、合計3回パッチを行った。その後、週に3回、OVAを経口投与して下痢症状を誘発し、下痢症状が安定して出現することを確認した後、OVA経口投与による症状誘発閾値の判定を行った。

#### 2. 経皮感作食物アレルギーマウスモデルを用いた急速経口免疫療法(rush OIT)とメカニズム解析

経皮感作食物アレルギーモデルマウスを作製後、ヒトにおけるrush OITと同様に、閾値より少ない量から、連日漸増したOVAを経口投与していくこ

とで、本マウスにrush OITを行った。コントロールにはPBSを使用した。その後、症状誘発閾値の判定を再度行い、閾値の変化を調べ、このマウスにおけるrush OITの方法と有効性についての確認を行った。

解析は、経皮感作前、経皮感作終了時、OVA 経口投与後下痢症状誘発時（rush OIT開始前）、rush OIT施行中、rush OIT施行後のそれぞれの時点で、小腸、大腸、パイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓の組織採取と採血、採便を行い、フローサイトメトリーや組織染色、ELISA法による抗体価測定などにより解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）および研究施設における倫理規定等を遵守し、倫理審査委員会の承認を得た後に実施した。

## C. 研究結果

### 1. 経皮感作による食物アレルギーマウスモデルの作製

ヒトにおけるアレルギー発症機序を模倣した、経皮的に感作させた食物アレルギーモデルマウスの作製を試みた。

3回の皮膚パッチ終了直後の解析結果では、OVA 特異的IgE抗体価はOVA群（OVAパッチ群）でのみ上昇を認め、コントロール群（PBSパッチ群）では変化を認めなかった。また、大腸の組織像では、OVA群とコントロール群で明らかな違いを認めなかった（図1）。

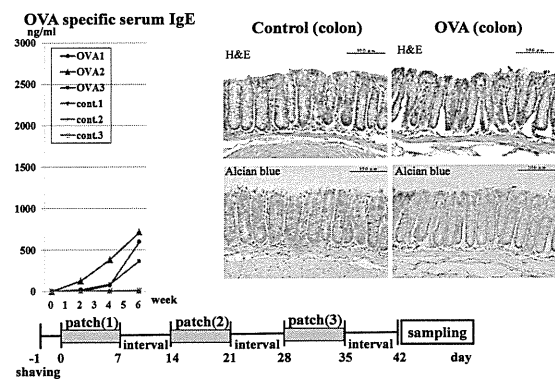


図1 経皮感作終了直後での解析結果

次に、パッチ終了後にOVAの経口投与を繰り返すと、コントロール群では下痢症状は認めなかつたものの、OVA群では下痢症状、体重減少を認めた。OVA特異的IgE抗体価はOVA群でのみ、さらに上昇を認めた。大腸の組織像では、コントロール群と比べ、OVA群ではcryptの伸長とムチン産生の増加を認めた（図2）。

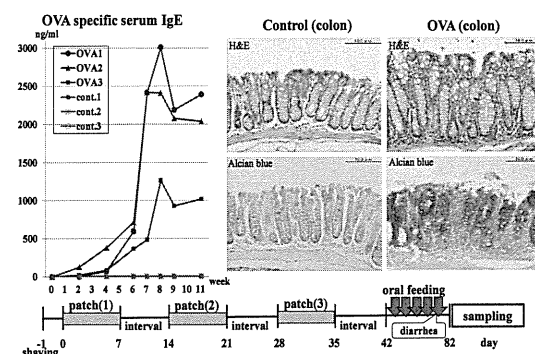


図2 OVA 経口投与後の解析結果

症状誘発閾値の判定は下痢症状で評価し、OVA群は2~20mgで下痢症状の誘発を認め、コントロール群では60mg以上においても下痢症状を認めなかった。

これらの結果から、OVAの経口摂取によりアレルギー性炎症が生じていると考えられ、食物アレルギーの経皮感作モデルマウスができたと考えて、この後、本モデルマウスにヒトと同様の方法で、rush OITを試みた。

**2. 経皮感作食物アレルギーマウスモデルを用いた急速経口免疫療法(rush OIT)とメカニズム解析**  
作製したマウスに、rush OIT開始前の症状誘発閾値よりも少ない量から連日、少しずつ増量しながらOVAを経口摂取させていったところ、症状誘発閾値の上昇をみた。OVAパッチ群であっても、OVAを摂取せず、PBSを摂取し続けたマウスでは、閾値の変化はみられなかった。本モデルマウスにおいても、ヒトと同様に、rush OITは有効であることが確認された。

rush OIT施行中と施行後の解析結果では、OVA特異的IgE抗体価は一旦、rush OIT開始前よりも上昇したが、その後、低下傾向を認めた。このIgEの動向はヒトにおいてみられる動きと同様であった。また、大腸の組織像において認められたcryptの伸長は、rush OIT開始前と比べて改善を認めていた（図3）。フローサイトメトリーによる各組織の解析では、各時点において、リンパ球CD4/CD8比、制御性T細胞、肥満細胞などについて解析し、まだ解析途中であるが、現時点までに有意差を得

ている結果は、大腸における rush OIT 後の肥満細胞増加などとなっている。

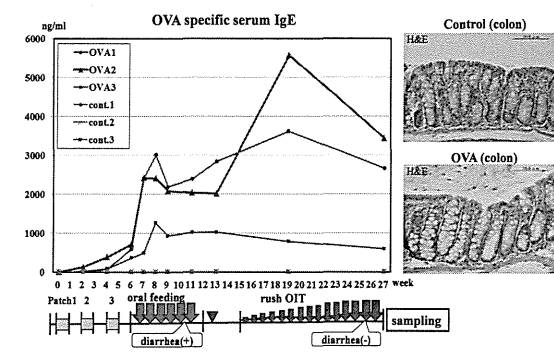


図3 rush OIT 施行後の解析結果

#### D. 考察

従来により免疫したマウスは、ヒトにおける発症過程と異なる可能性があり、よりヒトに近いモデルを作製する必要があると考え、アジュバントを用いずに経皮感作にて作製した食物アレルギーモデルマウスを新しいモデルとして確立した。これまで、食物アレルギーの原因は、消化管における感作が中心であると考えられてきており、そのため、除去食が治療の中心となり、マウス研究においてもアジュバントを用いながら全身感作や消化管感作をさせることで作製したマウスが使用されていた。しかし、重症食物アレルギー患児は乳児期に皮膚バリア損傷を認めていた症例が多く、ピーナツオイルの皮膚塗布によりピーナツアレルギー発症率が増加するという報告もあり、臨床現場での経験からも、ヒトでの感作経路は経皮感作が主となっている症例も多いのではないかと考えた。この経皮感作食物アレルギーモデルマウスの実験は2009年春より開始していたが、その後、「茶のしずく」石鹸により、経皮感作による食物アレルギー発症がヒトにおいても実際に起きることが明らかとなり、この仮説は正しかったと思われた。

新しく作製した経皮感作 OVA アレルギーマウスでは、OVA 特異的 IgE 抗体価の上昇を認め、OVA の経口摂取により下痢症状を呈し、大腸組織において炎症所見を認めた。また、rush OIT は本モデルマウスにも有効であり、本療法により症状誘発閾値の上昇、下痢症状の消失、OVA 特異的 IgE 抗体価の低下を認め、同時に、大腸組織の炎症所見の改善を認めた。本療法経過中の OVA 特異的 IgE 抗体価の変動はヒトにおいてみられる変動と

同様の傾向を示した。これらの結果から、本モデルマウスはヒトに近い発症機序による食物アレルギーモデルとして、食物アレルギーの発症・治癒メカニズム解明のために有用なモデル動物であると考えられた。

これらのマウスの実験から、皮膚・粘膜バリア機能を改善してアレルゲンの皮膚・粘膜からの侵入を抑えつつ、アレルゲンを経口摂取していくことが、食物アレルギー治癒（発症予防）につながりやすいことが考えられた。

今後も本モデルマウスを用いながらメカニズムの解析を進め、得られた結果をヒト臨床検体における解析結果と照らし合わせることにより、最終的にはヒトにおけるメカニズムの解明を目指したいと考えている。

#### E. 結論

ヒトに近い発症機序によると思われる新しい食物アレルギーモデル動物を確立した。本モデルマウスにおいても rush OIT は有効であり、本モデルマウスはヒトにおける食物アレルギーの発症・治癒メカニズム解明のために有用であると考えられた。

#### 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,