

KIYONO Hiroshi, OHNO Hiroshi. New food allergy model mice by cutaneous sensitization. 第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日

5) 伊藤直香. 食物アレルギーに対する経口免疫療法の確立と治癒メカニズムの解明. 日本臨床免疫学会 Midwinter Seminar 2012、2012年2月9日

6) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力、J-OIT 研究グループ. 多施設 RCT による急速経口免疫療法の検証. 第12回食物アレルギー研究会、2012年2月18日

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

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

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

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

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

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

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

14) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力、J-OIT 研究グループ. 牛乳アレルギーに対する急速経口免疫療法多施設共同ランダム化比較試験. 第49回日本小児アレルギー学会、2012年9月15-16日

15) 伊藤直香、下条直樹、藤澤隆夫、岩田力. 鶏卵アレルギーに対する急速経口免疫療法多施設共同ランダム化比較試験の経過について. 第40回日本臨床免疫学会、2012年9月27日

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

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

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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（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（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） 分担研究報告書

（分担研究課題名）

Component Resolved Diagnostics (CRD) によるピーナッツアレルギーの検討  
（ピーナッツアレルギーの治療が難しいのはなぜか）

研究分担者 北林 耐 （所属）国際医療福祉大学三田病院小児科 教授

### 研究要旨

ピーナッツアレルギーはアナフィラキシーを起こしやすく、治りにくいとされてきた。その原因を探るために Component Resolved Diagnostics (CRD) を用いて、ピーナッツアレルギー患者 36 名のアレルゲンコンポーネントの感作状況を調査したところ、ピーナッツアレルギーには即時型症状を訴える群 (IM 群) と口腔アレルギー症状を訴える群 (OAS 群) の 2 つに大きく分かれることが判明した。即時型群では Ara h 2 の陽性率が高く、特異的 IgE が有意に高値を示した。これに対し OAS 群では Ara h 8、Ara h 9 の陽性率が高く、特異的 IgE も有意に高値を示した。ピーナッツ以外のアレルゲンコンポーネント (Bet v 1、Cor a 1、Cor a 8、Gly m 4) は、OAS 群や摂取可能群で検出されたが、IM 群ではほとんど検出されず、OAS 群では IM 群に比べ特異的 IgE が有意に高かった。また PR-10、LTP、貯蔵タンパク間の抗体価を検討したところ、Bet v 1 と他の PR-10 タンパク間で相関係数が 0.8 以上と強い相関がみられた。

OAS 症例について ISAC を使ってアレルゲンコンポーネントの交差反応性を調べてみると、OAS 群にも複数の型があることが判明した。Ara h 8 が関与している OAS ではプロフィリンとの重複感作が多かった。Ara h 9 は南欧や地中海地方のピーナッツアレルギーの主抗原とされており、PR-10 やプロフィリンと比べると耐熱性で、好塩基球からのヒスタミン遊離を引き起こしやすく重症化しやすいとされているが、今回日本においても LTP 単独陽性例が複数存在することが初めて確認された。今まで Ara h 2 陽性症例にアナフィラキシー症例が多く重症度と関係があるとされてきたが、LTP 単独感作で FDEIA をきたす症例があり、LTP は軽微な口腔症状だけでなく重篤な症状にも関与していることが示唆され注意が必要と思われた。

ピーナッツアレルギーの治療を難しくしているのは、様々なタイプのピーナッツアレルギーを同じように治療しようとしているところに問題があるように思われた。今後 IM 群ではピーナッツの経口減感作を、OAS 群では花粉に対する特異的減感作を行うなど、症例によって治療を変えていく必要があると考えられた。

ントの感作状況を検討することにした。

### A. 研究目的

ピーナッツアレルギーはソバアレルギーなどとともに、アナフィラキシー症状を起こしやすく、治りにくい食物アレルギーの代表的なものとしてきた。治療法に関しても確立されたものはなく、経口免疫療法においても緩徐法がよいのか急速法がよいのか意見の分かれるところであり、中には経口免疫療法自体まだ時期尚早という意見さえもある。今回我々はなぜピーナッツアレルギーの治療が難しいのか、その要因を探るために、Component Resolved Diagnostics (CRD) を用いて、ピーナッツアレルギー児のアレルゲンコンポーネ

### B. 研究方法

2010 年 7 月から 2012 年 8 月までの 2 年 1 ヶ月間に昭和大学病院小児科および山王病院小児科を受診し、ピーナッツアレルギーと診断された 36 名を対象に、病歴から即時型 (IM 群) と考えられた 21 例 (男 13 名、女 7 名、1 歳 6 ヶ月～15 歳 5 ヶ月) と口腔アレルギー症候群型 (OAS 群) と考えられた 15 例 (男 10 名、女 5 例、年齢 5 歳 8 ヶ月～20 歳 6 ヶ月) について、臨床症状および通常の IgE CAP RAST の他に、ImmunoCAP でシラカンバ、ピーナッツ、ヘーゼルナッツ、大豆のアレルゲン

コンポーネントである Bet v 1 (PR-10)、Ara h 1 (7S グロブリン)、Ara h 2 (コンゲルチン)、Ara h 3 (11S グロブリン)、Ara h 8 (PR-10)、Ara h 9 (LTP)、Cor a 1 (PR-10)、Cor a 8 (LTP)、Gly m 4 (PR-10) を検査し解析を行うとともに、ピーナッツ特異的 IgE は陽性であるが摂取可能であった症例 (摂取可能群) 8 例 (男 8 名、女 0 名、1 歳 7 ヶ月～10 歳 4 ヶ月) についても、アレルゲンコンポーネントの感作状況を同様に検査し、IM 群および OAS 群と比較検討した。

また OAS 型と考えられた症例については ImmunoCAP ISAC (ImmunoCAP Solid-Phase Allergen Chip) でもアレルゲンコンポーネントを測定し、感作状況と交差反応性について解析を行った。

### C. 研究結果

ピーナッツのアレルゲンコンポーネントを各群で比較したところ、IM 群ではピーナッツの貯蔵タンパク質である Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3 の陽性率が他群に比べ高く、OAS 群に比べ特異的 IgE 値が有意に高かった (表 1、図 1～3)。Ara h 1 の陽性率は IM 群 71.4%、OAS 群 26.7%、摂取可能群 62.5%であった。Ara h 2 の陽性率は IM 群 95.2%、OAS 群 73.3%、摂取可能群 87.5%と高く、IM 群は OAS 群、摂取可能群と比較して特異的 IgE の値が有意に高かった。Ara h 3 の陽性率は IM 群 57.1%、OAS 群 20.0%、摂取可能群 75.0%であり、IM 群、摂取可能群は、OAS 群に比べ有意に特異的 IgE が高かった。Ara h 8、Ara h 9 は IM 群において陰性だったが、OAS 群では陽性率が高く (46.7%、40.0%)、IM 群に比べ特異的 IgE 値も有意に高値を示した (図 4、5)。ピーナッツ以外のアレルゲンコンポーネント (Bet v 1、Cor a 1、Cor a 8、Gly m 4) は、OAS 群や摂取可能群で検出されたが、IM 群ではほとんど検出されず、OAS 群では IM 群に比べ特異的 IgE 値が有意に高かった (図 6～9)。また PR-10、LTP、貯蔵タンパク間の抗体価を検討したところ、Bet v 1 と他の PR-10 タンパク間で相関係数が 0.8 以上と強い相関を示した (図 10) が、LTP と貯蔵タンパク間では相関が認められなかった。

OAS 群 15 例について検討したところ、6 例が Ara h 9 陽性を示した。6 例中 2 例は Ara h 9 単独陽性であったが、4 例は複数のアレルゲンコンポーネントに対し陽性を示した。感作パターンを調べると、①LTP 単独感作パターン、②貯蔵タンパク

に PR-10 もしくは LTP が単独または重複感作しているパターン、③PR-10 単独感作パターン、④貯蔵タンパク単独感作パターンの 4 つに分類することができた (表 2)。ImmunoCAP ISAC を測定した 12 例でプロフィリンの陽性率を調べた結果、Bet v 2、Phl p 12 では 41.7%、Mer a 1、Hev b 8 では 50.0%、Ole e 2 では 16.7%であった。重複感作例・PR-10 単独感作例および貯蔵タンパク単独感作例についてはプロフィリンへの感作が確認されたが、LTP 単独感作例ではプロフィリンへの感作は確認されなかった。LTP 単独陽性例の 2 例において、1 例が食物依存性運動誘発性アナフィラキシー (FDEIA) を、そしてもう 1 例が運動誘発アナフィラキシーを合併していた。また LTP を含む複数のアレルゲンコンポーネントに陽性を示した 4 例でも 1 例にアナフィラキシーを認めた。PR-10 タンパクや LTP 陽性の OAS 群の中にもアナフィラキシーを起こすものがあり注意が必要と思われた。

### D. 考察

ピーナッツアレルギーにおいて Ara h 2 の陽性率は高く、Ara h 2 陽性例にアナフィラキシー症例を多く認めたことから、Ara h 2 高値の症例では治療に際し十分注意する必要があるように思われた。IM 型と OAS 型を判別するには、Ara h 8 や Ara h 9 を測定することが有用と思われた。OAS 群では、Bet v 1、Cor a 1、Cor a 8、Gly m 4 などのピーナッツ以外のアレルゲンコンポーネントが陽性になることが多く、これも IM 群と OAS 群を判別するのに参考になるように思われた。

ピーナッツの OAS 症例についてアレルゲンコンポーネントを調べてみると、OAS 群にも複数の型があることが判明した。Ara h 8 (PR-10) が関与している OAS ではプロフィリンとの重複感作が多かった。Ara h 9 (LTP) は南欧や地中海地方のピーナッツアレルギーの主抗原とされており、PR-10 やプロフィリンと比べると耐熱性で、好塩基球からのヒスタミン遊離を引き起こしやすく重症化しやすいといわれているが、今回日本においても複数存在することが初めて確認された。今まで Ara h 2 陽性症例にアナフィラキシー症例が多く、重症度と関係があるとされてきたが、LTP 単独感作で FDEIA をきたす症例があり、LTP は軽微な口腔症状だけでなく重篤な症状にも関与していることが示唆され注意が必要と思われた。

ピーナッツアレルギーといっても感作パターン

が色々あるため、臨床症状とアレルギーコンポーネントから IM 型か OAS 型か判別し、IM 群ではピーナッツの経口減感作を、OAS 群では花粉に対する特異的減感作を行うなど、治療法を変える必要があるように思われた。

## E. 結論

ピーナッツアレルギーは病型によって感作パターンや抗体価に特徴があるため、アレルギーコンポーネントに対する特異的 IgE を測定することにより、より精微な診断が可能になることが示唆された。

OAS 症例では PR-10 タンパクが関与している頻度が高く、プロフィリンとの合併例が多かったが、LTP 単独陽性のピーナッツアレルギーが日本においても複数例存在し、アナフィラキシーなどの重篤な症状に関与していることが確認された。

ピーナッツアレルギーの治療を難しくしているのは、様々なタイプのピーナッツアレルギーを同じように治療しようとしているところに問題があるように思われた。今後どのような症例にどのような治療をするのが適切なのか、十分検討していく必要があると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Inoue R, Tsukahara T, Ueno K, Kitabayashi I, Ushida K. : Possible link of a compositional change in intestinal microbiota with the anti-allergic effect of fructo-oligosaccharides in NC/jic mice. Laboratory of Animal Science, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan. Biosci Biotechnol Biochem. 2010;74(9):1947-50. Epub 2010 Sep 7.

2) 北林 耐, 矢川綾子, 藤谷しのぶ, 中村俊紀, 齋藤多賀子, 石川良子, 北條菜穂, 神谷太郎, 板橋家頭夫 : PR-10 related plant food allergy を合併したラテックスアレルギーの 1 例. 日本ラテックスアレルギー研究会会誌 2011;15:65-69.

### 2. 学会発表

1) 北林 耐, 齋藤多賀子, 伊藤良子, 北條菜穂,

板橋家頭夫 : Component Resolved Diagnostics (CRD)によるピーナッツアレルギーの検討. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (幕張, 2011. 5. 14.)

2) Kitabayashi, T, Fujitani, S, Nakamura, T, Saito, T, Ito, R, Hojo, N, Itahashi, K: Component sensitization patterns in children with peanut allergy. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (Istanbul, 2011. 6. 11.)

3) 北林 耐, 矢川綾子, 藤谷しのぶ, 中村俊紀, 齋藤多賀子, 石川良子, 北條菜穂, 神谷太郎, 板橋家頭夫 : PR-10 related plant food allergy を合併したラテックスアレルギーの 1 例. ラテックスアレルギー・OAS フォーラム 2011 第 16 回ラテックスアレルギー研究会 (名古屋, 2011. 7. 31.)

4) 北林 耐, 中村俊紀, 齋藤多賀子, 阿部祥英, 石川良子, 北條菜穂, 神谷太郎, 板橋家頭夫 : 嚥党性線維症の 1 例. 第 44 回日本小児呼吸器疾患学会 (宇都宮, 2011. 10. 15.)

5) 北林 耐, 矢川綾子, 藤谷しのぶ, 中村俊紀, 齋藤多賀子, 石川良子, 北條菜穂, 神谷太郎, 板橋家頭夫 : 口腔アレルギー症候群と考えられるピーナッツアレルギーの ISAC による感作状況と交差反応性についての検討. 第 48 回日本小児アレルギー学会 (福岡, 2011. 10. 29.)

6) 北林 耐, 齋藤多賀子, 石川良子, 北條菜穂, 保崎一郎, 板橋家頭夫 : LTP-related plant food allergy と考えられた 1 例. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術集会 (東京, 2011. 11. 10.)

7) 北林 耐 : バラのソフトクリームでアナフィラキシーを呈した OAS の 1 例. 第 68 回臨床アレルギー研究会 (東京, 2011. 11. 26.)

8) 佐伯葉子, 佐藤佐由里, 北林 耐, 佐伯秀久, 鷺崎久美子, 矢上晶子, 大槻マミ太郎 : コチニール色素によるアナフィラキシーの 1 例. 第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 (東京, 2012. 2. 19.)

9) 石川良子、矢川綾子、北條菜穂、今井孝成、  
北林 耐、板橋家頭夫：TARCは2歳未満のアトピー  
性皮膚炎の診断に利用できるか。第24回日本ア  
レルギー学会春季臨床大会（大阪, 2012. 5. 12.）

10) Kitabayashi, T, Yagawa, A, Fujitani, S,  
Nakamura, T, Saito, T, Ishikawa, R, Hojo, N,  
Kamiya, T, Itahashi, K : Component sensitization  
and cross-reactivity in children with peanut  
OAS. 31th Congress of the European Academy of  
Allergy and Clinical Immunology  
(Geneva, 2012. 6. 19.)

11) 北林 耐、中村俊紀、斎藤多賀子、石川良子、  
北條菜穂、神谷太郎、板橋家頭夫：口腔アレルギー  
ー症状を呈するピーナツアレルギー患児におけ  
るLTP（Lipid Transfer Protein）の関与につ  
いての検討。第49回日本小児アレルギー学会（大  
阪, 2012. 5. 16.）

12) 北林 耐、佐伯葉子、佐藤佐由里、足立 満：  
コチニールが原因と考えられたマカロンによるア  
ナフィラキシーの1例。第62回日本アレルギー学  
会秋季学術集会（大阪, 2012. 11. 30.）

13) 北林 耐、佐藤佐由里、足立 満：バラのソ  
フトクリームでアナフィラキシーを呈した  
Pollen Food Allergy Syndromeの1例。第13回  
食物アレルギー研究会（東京, 2013. 1. 27.）

#### 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  
なし

表1 各コンポーネントの陽性率

Type	Bet v 1 (PR-10)	Ara h 1 (7Sグロブリン)	Ara h 2 (コグルチン)	Ara h 3 (11Sグロブリン)	Ara h 8 (PR-10)	Ara h 9 (LTP)	Cor a 1 (PR-10)	Cor a 8 (LTP)	Gly m 4 (PR-10)
IM	14.3%	71.4%	95.2%	57.1%	0%	0%	14.3%	0%	0%
OAS	53.3%	26.7%	73.3%	20.0%	46.7%	40.0%	53.3%	33.3%	46.7%
摂取可能	25.0%	62.5%	87.5%	75.0%	25.0%	25.0%	25.0%	25.0%	25.0%

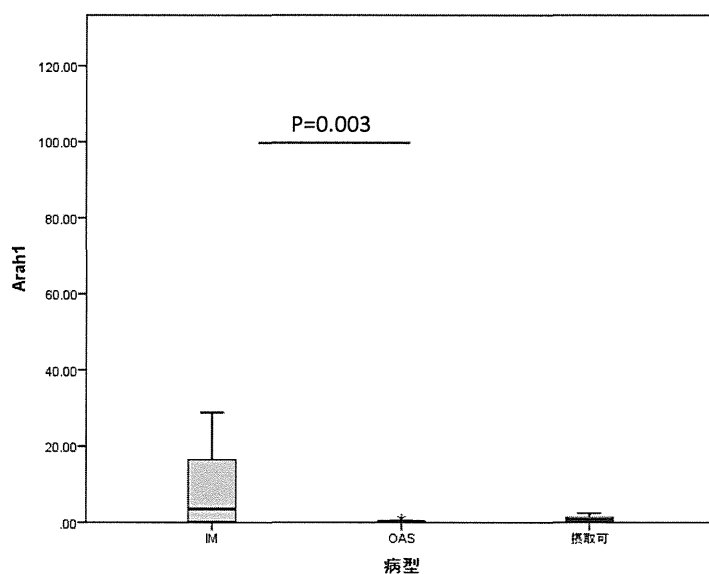
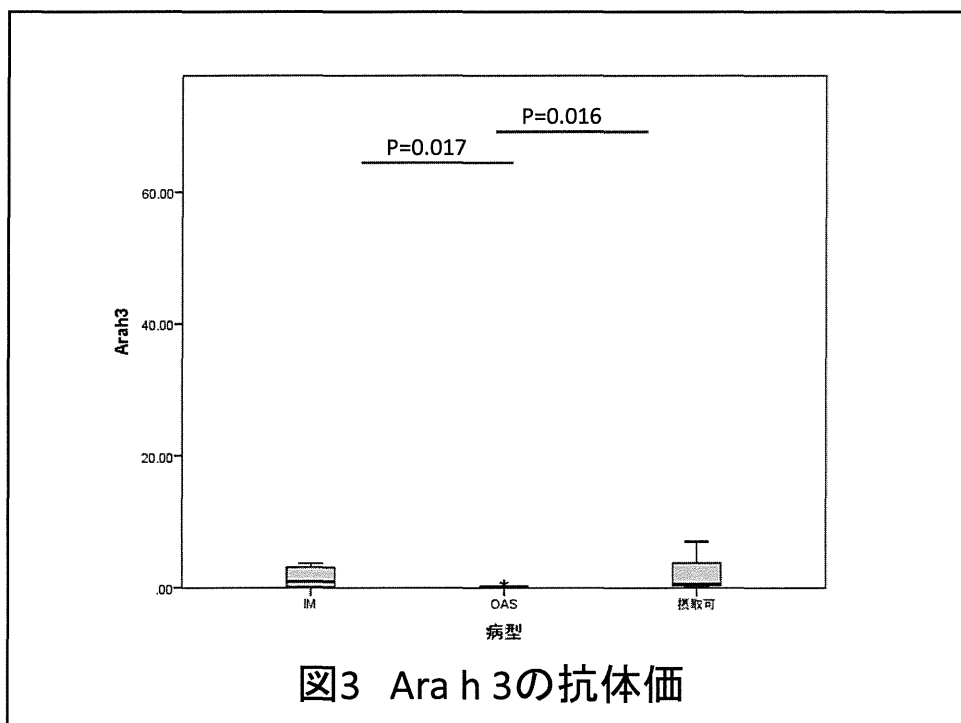
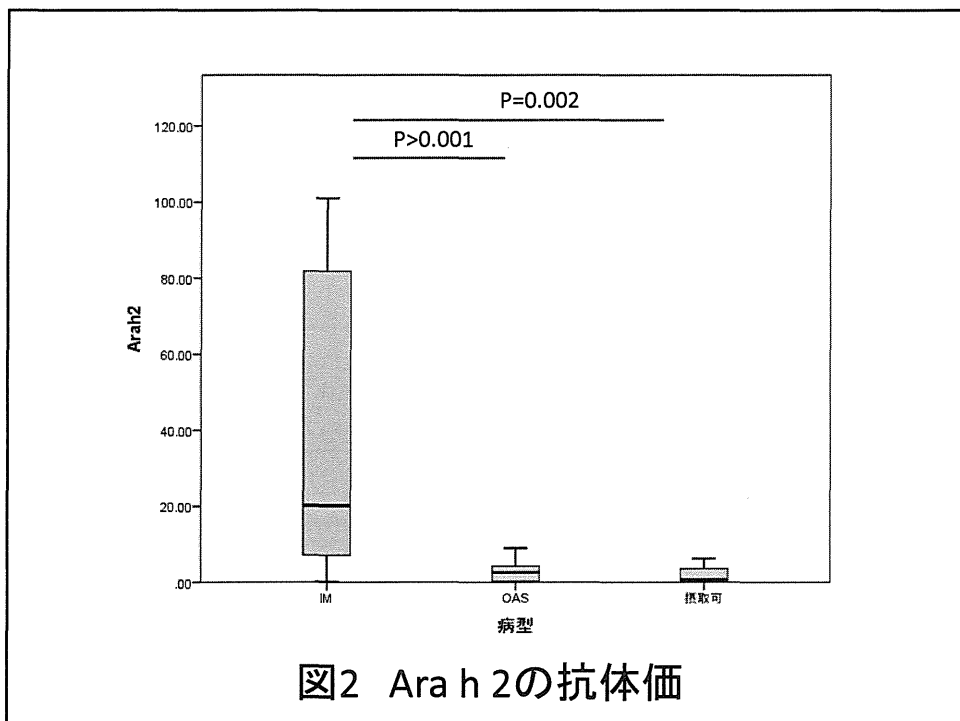
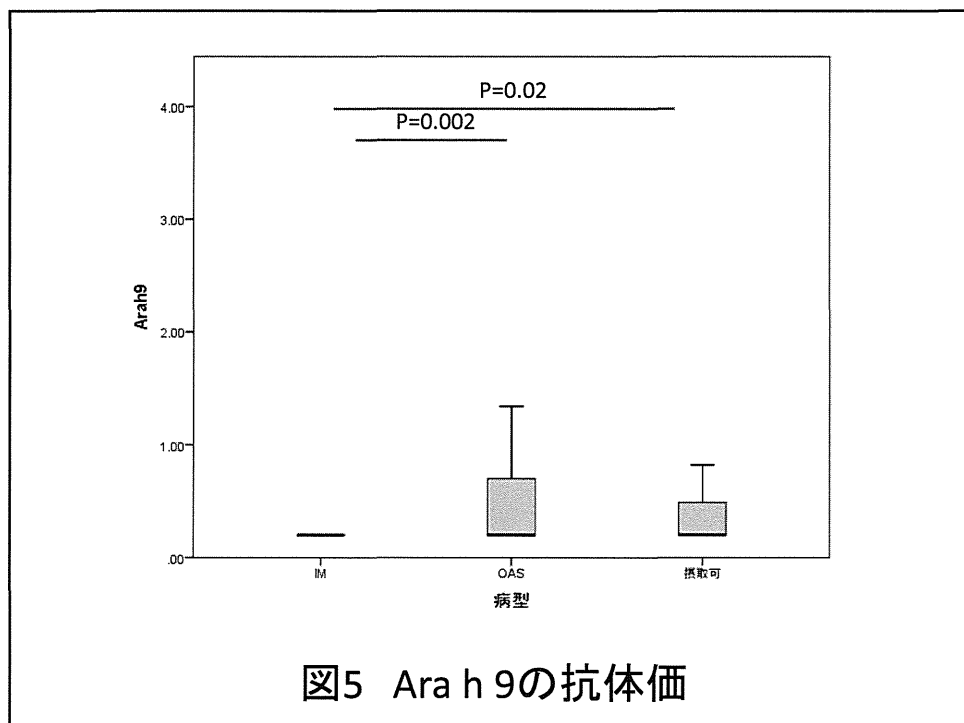
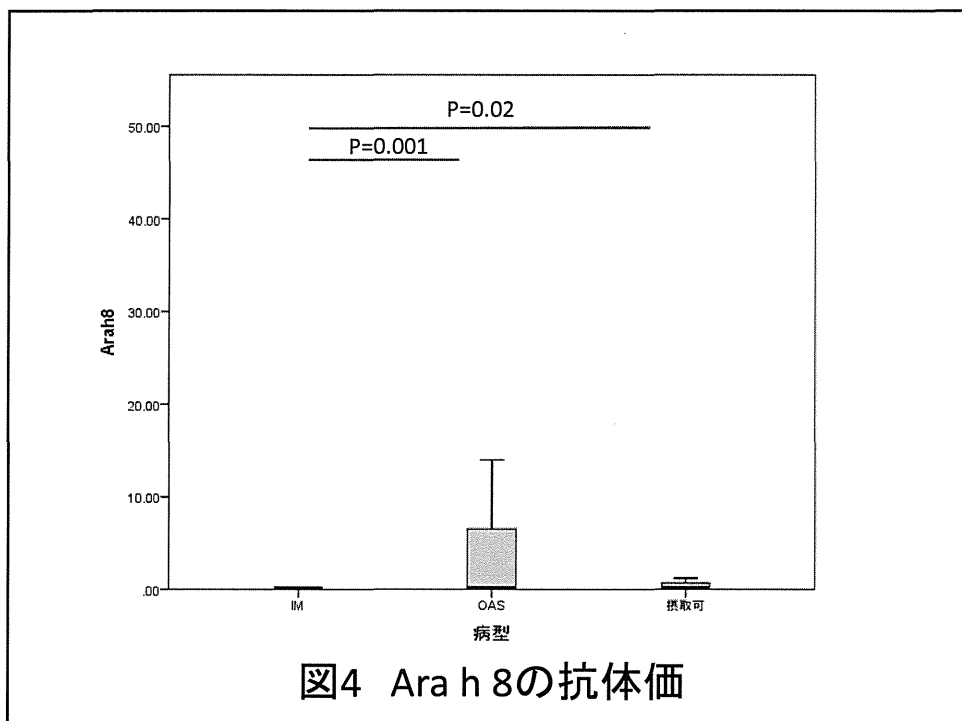
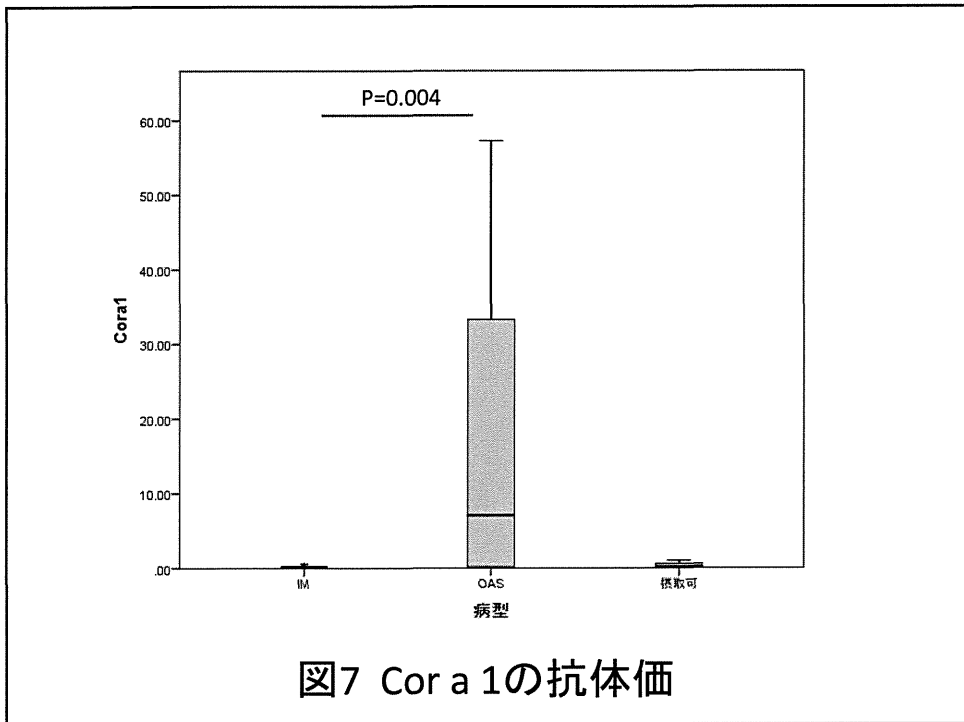
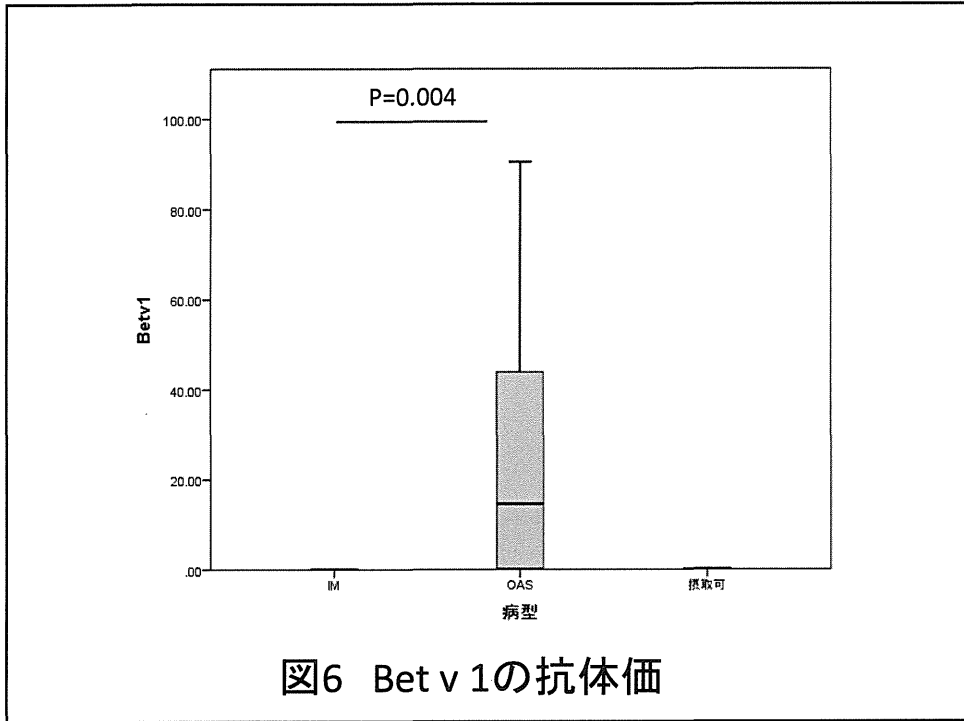


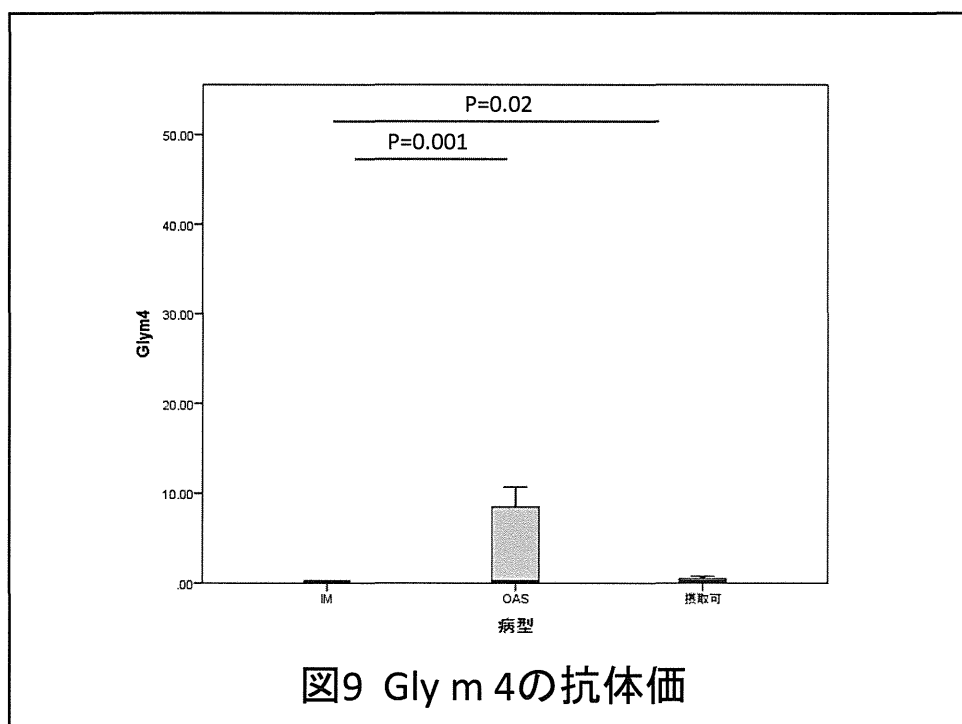
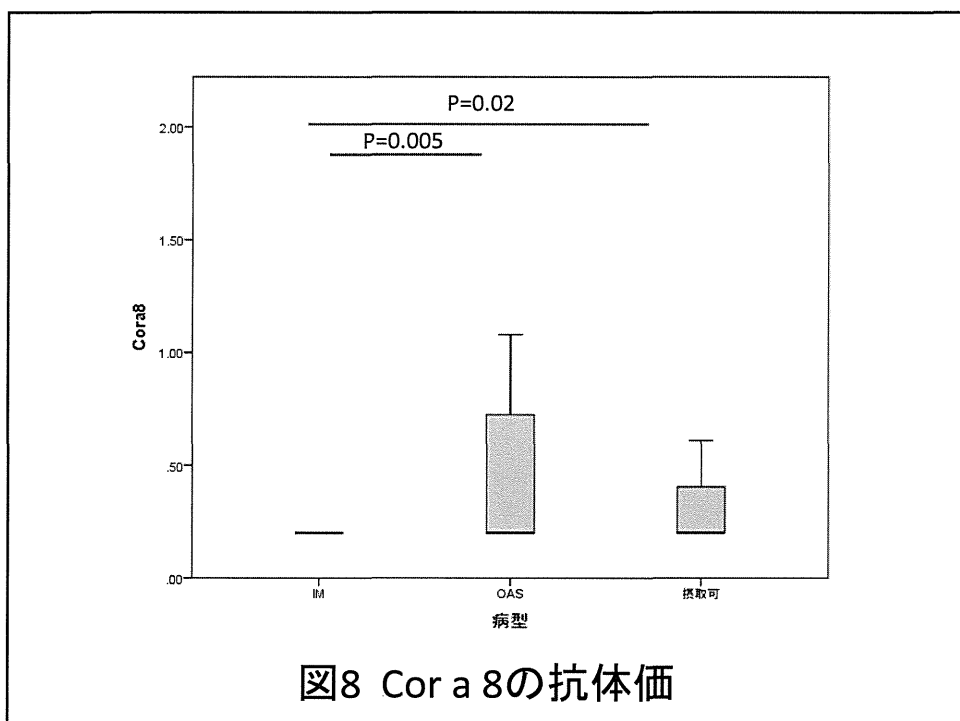
図1 Ara h 1の抗体価

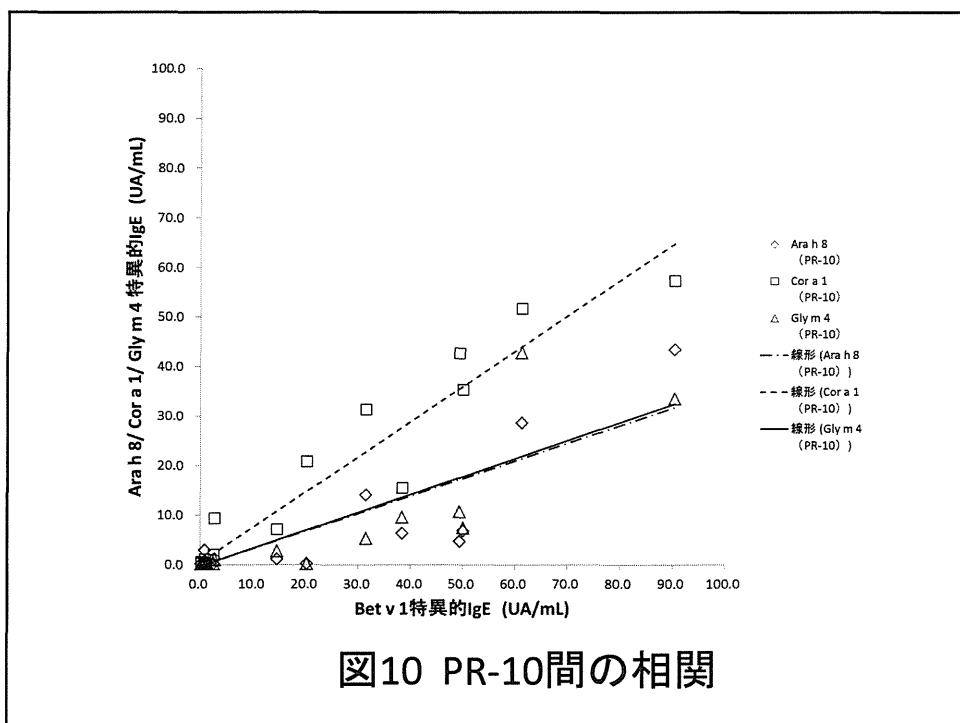












**表2 OAS群における感作パターン**

	Ara h 1 (7Sグロブリン)		Ara h 2 (コングルチン)		Ara h 3 (11Sグロブリン)		Ara h 8 (PR-10)		Ara h 9 (LTP)		Bet v 1 (PR-10)		Cor a 1 (PR-10)		Cor a 8 (LTP)		Gly m 4 (PR-10)	
	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス	濃度 (UA/mL)	クラス
1	<0.35	0	2.9	2	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0
2	<0.35	0	2.6	2	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0
3	<0.35	0	0.4	1	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0
4	0.5	1	4.88	3	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0
5	3.73	3	8.99	3	0.64	1	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0
6	<0.35	0	1.91	2	<0.35	0	6.79	3	<0.35	0	50.1	5	35.3	4	<0.35	0	7.41	3
7	5.72	3	73.0	5	5.08	3	4.70	3	<0.35	0	49.4	4	42.6	4	<0.35	0	10.7	3
8	<0.35	0	3.72	3	<0.35	0	28.6	4	3.07	2	61.4	5	51.7	5	0.53	1	42.8	4
9	<0.35	0	0.41	1	<0.35	0	6.27	3	0.49	1	38.4	4	15.5	3	0.54	2	9.57	3
10	1.14	2	4.63	3	0.63	1	14.0	3	1.19	2	31.5	4	31.3	4	0.92	2	5.23	3
11	<0.35	0	3.87	3	<0.35	0	<0.35	0	0.41	1	20.2	4	20.8	4	1.66	2	<0.35	0
12	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	1.08	2	<0.35	0	14.6	3	7.08	3	<0.35	0	2.67	2
13	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	43.38	4	<0.35	0	90.53	5	57.27	5	<0.35	0	33.45	4
14	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	1.34	2	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0
15	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	<0.35	0	0.91	2	<0.35	0	<0.35	0	1.08	2	<0.35	0

## 経口免疫療法による特異抗体の変化:アレルゲンコンポーネントの解析

研究分担者 松田 幹 名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命化学講座教授

### 研究要旨

本研究課題では、血清特異抗体のアレルゲン認識特異性を解析することにより、より簡便で患者への負担も少ない診断技術の開発と耐性獲得と特異抗体レパートリーとの関連を明らかにすることを目的とした。2年後においても鶏卵経口負荷試験陰性反応を示した群では、陽性反応の群に比べて、卵白タンパク質オボムコイドのドメインフラグメント(D3-CHO および D3) に対する IgE 抗体の低い ELISA 値を示した。1年後に耐性を獲得した群の多くは、D3-CHO および D3 に低値を示した。特に、糖鎖を持たない D3 に対する IgE 抗体価が低値の場合には、その後の耐性獲得の確立が高いと推定された。鶏卵アレルギーにおける急速経口免疫療法の実施前後とその後の OM 特異的 IgE 抗体の変動を予備的に解析し、症例により異なる変動様式が観察された。次に、OM に特異的な IgE 抗体および卵白総タンパク質に体する IgE 抗体について、基礎研究で用いられる精製オボムコイドを抗原とした ELISA 法と臨床検査で用いられているイムノキャップ法とで測定し比較解析し、両者での測定結果が必ずしも一致しないことが示された。一方、患者末梢白血球を用いた治癒メカニズムの解明研究に用いる高純度オボムコイドを新たに分離精製し大量調製した。さらに、牛乳アレルギーにおける IgE 抗体の分析に用いる牛乳カゼインコンポーネントを、大腸菌過剰発現系を用いて組換えタンパク質として大量に調製することを試みた。 $\alpha$ s1-カゼイン、 $\beta$ -カゼインおよび $\kappa$ -カゼインの各コンポーネントは正常に発現し、ヒスチジンタグを用いて高純度に精製することができた。

### A. 研究目的

経口免疫療法における耐性獲得の免疫学的機序の解明は幅広い臨床応用が期待できる。本研究課題では、血清特異抗体のアレルゲン認識特異性を解析することにより、より簡便で患者への負担も少ない診断技術の開発と耐性獲得と特異抗体レパートリーとの関連を明らかにすることを目的としている。鶏卵アレルギーに対する経口免疫療法において、治療により鶏卵の摂取への耐

性を獲得する症例もあれば、耐性が成立せず治療効果が見られない症例もあり、個人差が大きい。経口免疫療法では、症状誘発のリスクと、それによる患者への負担を伴うため、経口免疫療法を開始する前の血液検査等によって経口免疫療法の有効性を予測できる診断法が開発が望まれる。さらに、経口免疫療法における耐性獲得の免疫学的機序の解明は幅広い臨床応用が期待できる。

これまでに、藤澤らの研究により血液中の感作好塩基球におけるアレルゲン刺激による CD203c の発現誘導を指標にして、鶏卵アレルギー患者の主要アレルゲンであるオボムコイド (OM) の C-末端フラグメント (ドメイン 3) に対する応答性が、1 年後、2 年後に耐性が獲得される頻度と相関を示すことが明らかにされている。そこで、H23 年度には、分離精製したドメイン 3 を抗原に用いて特異 IgE 抗体の変動を解析し、卵白耐性獲得との関連を調べた。H24 年度には、鶏卵卵白の主要アレルゲンである OM とオボアルブミン (OVA)、および比較対象のために卵白総タンパク質のそれぞれに特異的な IgE 抗体について、主に基礎研究で用いられている精製 OM を抗原とした ELISA 法で測定し、臨床検査で用いられているイムノキャップ法による測定結果と比較解析した。

また、血清抗体分析と平行して、別の分担者グループにより患者末梢血白血球を用いた治療メカニズムの解明を目指した研究が進んでおり、その際に必要となる高純度 OM 票品が大量に必要となる。そこで、新鮮卵白より酸沈殿法とイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて分離精製することとした。さらに牛乳アレルギーにおいては、カゼインと乳清タンパク質のいずれもアレルゲンとして同定されている。カゼインは複数のコンポーネントから構成される複合体としてミセル構造をとって牛乳中に分散しており、どのような形態で体内に吸収されてアレルギー症状を誘発するかは明らかではない。このようなアレルギー誘発のメカニズムを詳細に研究するためには高純度のコンポーネントが必要となる。そ

こで、まずカゼインミセルの主要コンポーネントである  $\alpha$ s1-カゼイン、 $\beta$ -カゼインおよび  $\kappa$ -カゼインを調製することとした。カゼインミセルは塩溶液には不溶性であり、各コンポーネントを相互に夾雑しないように分離することは容易ではない。そこで、相互の夾雑の心配がない組換えタンパク質としてカゼインコンポーネントを調製することとした。

## B. 研究方法

鶏卵卵白からイオン交換クロマト法によりオボムコイドを精製し、限定酵素分解により糖鎖が付加された、あるいはされていないドメイン 3 (OM-D3-CHO, OM-D3) を調製し、分子篩クロマト法により精製した。これらのタンパク質を抗原として、またヒト血清アルブミン (HSA) を陰性対照として、以下の血清抗体分析に用いた。

鶏卵の摂取あるいは経口負荷試験に陽性反応を示した小児のアレルギー患者 (平均年齢約 3.5 歳) 91 名から採血し、血清を分離して凍結保存されていたサンプルを用いた。これらの患者については、試験開始から 1 年後および 2 年後に再度鶏卵の経口負荷試験を実施して耐性の獲得の有無が判定されている。

鶏卵の急速経口免疫療法を実施し、1 年後の経過が終了した患者 11 例について、登録時、維持量到達後、維持期 2 カ月後、維持期 12 ヶ月後に採血し、血清を分離して凍結保存されていたサンプルを用いた。血清中のオボムコイドに対する特異 IgE 抗体は、精製抗原をコートしたマイクロプレートに希釈血清を添加し、結合した抗体を酵素標識二次抗体により検出する標準的な

ELISA 法により測定した。また、抗体検査イムノキャップ法により測定したデータを東大病院小児科より入手し、比較解析した。

新鮮鶏卵より卵白を分離し、均質化した後、トリクロロ酢酸沈殿法により OVA 等を沈殿除去することにより OM を濃縮した。透析によりトリクロロ酢酸を除去し緩衝液で平衡化した後、SP-Sephadex C-50 によるイオン交換クロマトグラフィーにより OM を分離精製した。カラムからの溶出画分における OM の純度を SDS-PAGE により検定した。

牛乳カゼインの cDNA を泌乳期ウシ乳腺 cDNA プールから PCR 法により増幅し、大腸菌発現ベクターに挿入してチオレドキシン融合タンパク質として発現させた。発現したタンパク質を、抗カゼイン抗体を用いた免疫ブロット法で解析した。

### C. 研究結果

精製したオボムコイドを V8 プロテアーゼで限定分解し分子篩クロマトグラフィーで分離し、各画分に含まれる成分を電気泳動および OM-D3 に特異的な単クローン抗体を用いて純度を検証した結果、OM-D3-CHO および OM-D3 が高純度で調製できたことが示された (図 1)。これらのドメイン調製物を用いて血清 IgE 抗体との反応性を解析した。

調製した卵白抗原 (OM、OM-D3-CHO、OM-D3) および陰性対照の HSA に対する IgE 抗体価 (ELISA 値) は血清サンプルによって大きく変動したが、血清サンプルを、「2年後も負荷試験陽性の患者：耐性非獲得群 (グループ A)」「2年後あるいは1年後に負荷試験陰性に転じた患者：耐性獲得

群 2 (グループ B) および耐性獲得群 1 (グループ C)」という 2つのカテゴリーで分類して比較解析した結果、OM に対する IgE 抗体価では耐性獲得群でやや低い傾向があるが顕著な差異はないこと、一方、OM-D3 および OM-D3-CHO に対する IgE 抗体価に関しては耐性獲得群で低い傾向がみられ、特に耐性獲得群 1 での OM-D3 に対する IgE は陰性対照の HSA に対する値と同程度で、ほとんど産生されていないことが明らかとなった (図 2)。

鶏卵の急速経口免疫療法を実施した患者の血清では、OM に対する IgE 抗体価の変動では、症例間でバラツキが見られるが、2つの変動パターンに分類が可能であった (図 3)。11例中6例では、急速経口免疫療法実施前後で特異 IgE 抗体の上昇が見られ、目標量到達後の2カ月程度は上昇した抗体価が維持され、その後1年10カ月程度で暫減した。一方、4例では、急速免疫療法の実施により同様に特異 IgE 抗体が上昇するが、その後の維持期においても低下することなく、緩やかではあるが、さらに上昇した。また1例のみではあるが、急速経口免疫療法実施後に特異 IgE 抗体価が低下した例も見られた。

OM-D3-CHO および OM-D3 に対する IgE 抗体に関しては、11例中4例で両抗原に対する IgE 抗体が検出され、OM 特異的 IgE 抗体と類似の変動を示した。一方、残りの7例では OM-D3 に対する IgE 抗体がほとんど検出されず、OM-D3-CHO と OM-D3 を明確に識別していることが明らかとなった。

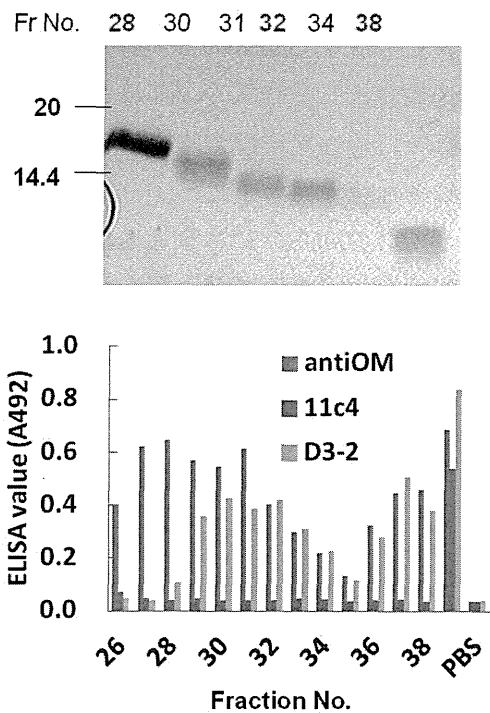


図1：オボムコイドのドメイン3の分離・精製

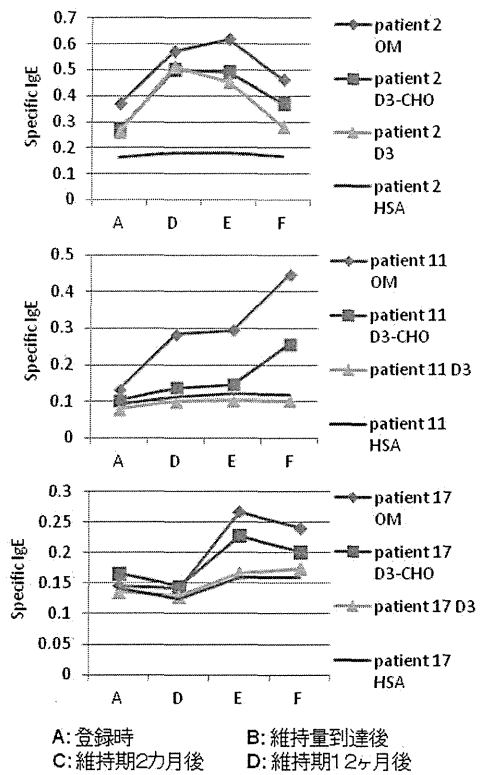


図3：OMおよびOM-D3に対するIgE抗体の変動

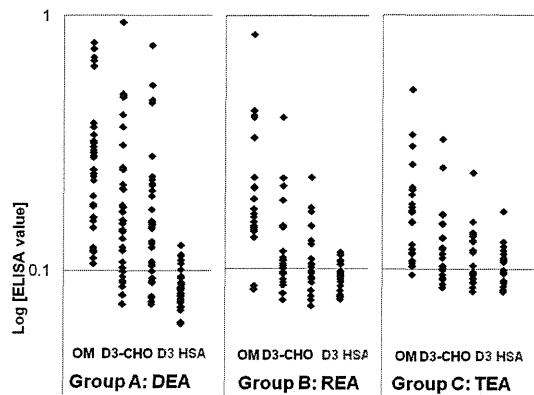


図2：IgE抗体のOM-D3との反応性の3群での比較

ELISA 法による血清抗 OM IgE 抗体価は、急速経口免疫療法開始前（登録時）では ELISA の吸光度として 0.03~0.3 程度であったが、維持量到達時には一例を除いて全て上昇し 6 例では 0.3~0.6 程度まで顕著に上昇した（図 4）。一方、イムノキャップ法では、7 例において、最も高い抗 OM IgE 抗体価が 20 UA/ml 以下で、その多くでは期間を通して大きな変動は見られなかった（図 5）。50~300UA/ml 程度の IgE 抗体価を示した症例では、維持量到達時に 2 例で上昇し別の 2 例では低下した。また、卵白総タンパク質を抗原として IgE 抗体を測定した場合においても、ELISA 法では治療後に明確に上昇していた血清に関して、イムノキャップ法では僅かな上昇や 12 ヶ月後に顕著に低下するなど、必ずしもイムノキャップ法での結果とは一致しなかった。

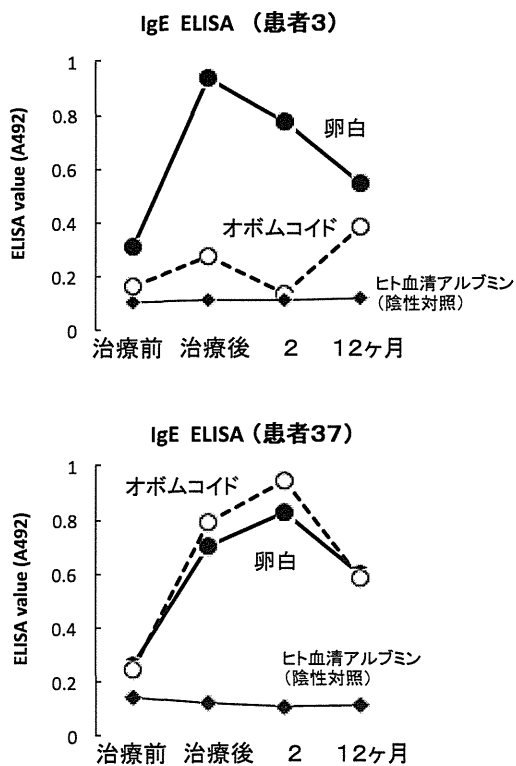


図 4 ELISA 法による血清 IgE 抗体の変動

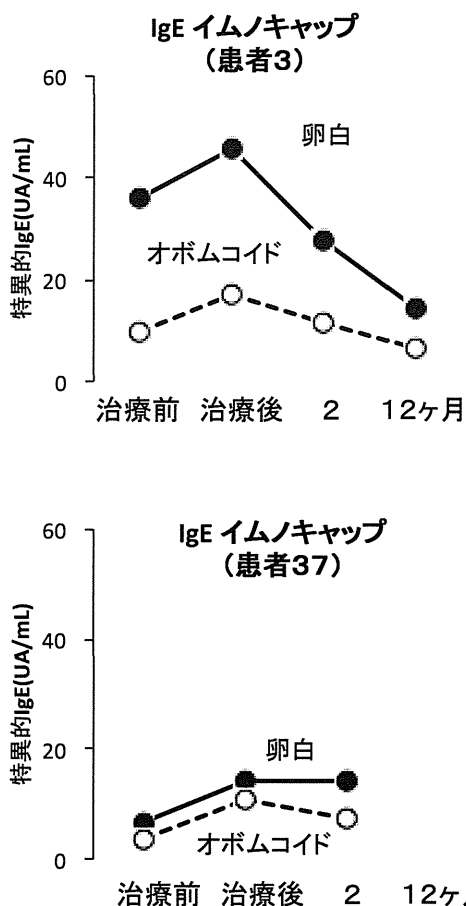


図 2 イムノキャップ法による血清 IgE 抗体の変動の解析例 卵白およびオボムコイドに対する、経口免疫療法治療前後とその後の血清特異 IgE 抗体の変動を測定した。

新鮮鶏卵卵白より分離精製した OM は SDS-PAGE により単一のバンド（糖鎖の不均一性による一群のバンド）として検出され、OVA や他の卵白タンパク質の混入は、CBB 染色のレベルでは検出されなかった。抗-OM 抗体を用いた免疫ブロット法によって、この一群のバンドは明確に染色されたことから、純度の高い OM が分離精製できたと判断された。



カゼインの3種のコンポーネントを大腸菌により融合タンパク質として発現させた。いずれのカゼインコンポーネントについても発現誘導処理によって、融合タンパク質の分子量とほぼ一致するタンパク質のバンド強度が明確に増強され、カゼインは大腸菌発現系において安定に発現することが明らかとなった。また、天然のカゼインコンポーネントに対して調製した抗カゼイン抗体を用いた免疫ブロットにより、 $\alpha$ s1-、 $\beta$ -、 $\kappa$ -カゼインの各抗原タンパク質が単一のバンドとして検出され、組換え型カゼインも天然のカゼインと同等の抗原性を示すことが示された。

#### D. 考察

オボムコイドの D3 を認識する IgE 抗体の血清抗体価の測定結果と耐性獲得との関係は、好塩基球での CD203c の発現誘導を指標にした D3 との反応性と耐性獲得との関係と良く対応しており、OM-D3 とくに糖鎖を持たない OM-D3 に対する IgE 抗体価が低値の場合には、除去食療法など通常の治療によるその後の耐性獲得の確立が高いと推定された。

鶏卵の急速経口免疫療法に伴う特異的 IgE 抗体の変動に関しては、治療前後およびその後の維持期での変動のパターンや OM-D3-CHO と OM-D3 の識別が、症例により明確に異なることから、今後、各症例の臨床症状や予後などとの関連性の解析を進めることで、診断や治療効果を予測する有効指標の一つになる可能性がある。

イムノキャップ法では 1 UA/ml 以下でほとんど検出されていない場合でも ELISA 法では明確に変動が測定できるなど、ELISA 法とイムノキャップ法で抗-OM

IgE 抗体および抗-卵白タンパク質 IgE 抗体の測定値に大きな差異が見られた。ポリスチレンプレート (ELISA) とセスローズ膜 (イムノキャップ) というアレルゲンを固相化する担体の違いや、固相化されているアレルゲン (OM や卵白タンパク質) の量や密度の違いが考えられるが、今後、さらに詳細に比較解析する必要がある。また、耐性獲得や症状の誘発などの臨床的知見と血清 IgE 抗体の変動との関連性を解析するような臨床基礎研究においても、できればイムノキャップ法と ELISA 法を併用して、より多くの基礎データを収集する必要があると思われる。

鶏卵卵白より高純度の OM を調製することができた。今後、脱塩、濃縮や、用途によっては脱 LPS 処理等を行い、患者末梢白血球を用いた治療メカニズムの解析に使用する予定である。

牛乳カゼインの3種のコンポーネントは特定の高次構造を持たず酵素分解を受けやすいため、大腸菌内で分解されることが懸念されたが、いずれも未分解の状態でも安定に発現させることが可能であった。 $\kappa$ -カゼインについては、他の2つのコンポーネントに比べて発現効率が低く、大量に調製するにはより良い発現条件の検討が必要である。天然の牛乳カゼインからの各コンポーネントの分離精製が容易ではないため、これらの組換え型カゼインコンポーネントは、抗体分析における標準抗原として有用であると考えられた。

#### E. 結論

通常の治療においては、オボムコイドおよびドメイン3に対する血清特異 IgE 抗体により、耐性獲得の期待値を予測できる

可能性がある。また、急速経口免疫療法においてもオボムコイドおよびドメイン3に対するIgE抗体価は、診断や治療効果予測の有効な指標になる可能性がある。

ELISA法とイムノキャップ法ではOM特異的IgEの測定値が大きく異なっており、両方の分析法を併用しつつ、抗体価の変動解析を進める必要がある。

カゼインの3種のコンポーネントを大腸菌により融合タンパク質として発現させ組換えアレルゲンを調製できることが明らかとなり、今後、牛乳アレルギーにおけるコンポーネント別の特異抗体解析を進めることが可能となった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

H22～24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））

分担研究報告書

新規アレルゲン特異的抗体測定法の開発

分担研究者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター教授  
研究協力者 多田 仁美 徳島大学疾患酵素学研究センター研究員  
亀村 典生 徳島大学疾患酵素学研究センター助教

研究要旨

鶏卵白と牛乳の急速経口免疫療法に伴う治療開始前後の生体内の各種免疫グロブリン価の変化、特に血液と唾液中の特異抗体 (IgE, IgG4, IgA) 価の変動を高感度アレルゲンマイクロレイ (DLCチップ) 法で検討して、以下の事が明らかとなった。①鶏卵の主要抗原である卵白、Ovomucoid、Ovalbumin、Egg yolkへのIgE価と、牛乳抗原 (Milk、 $\alpha$ -Casein) は、治療により低下傾向が見られたが、鶏卵の方がより著明な傾向にあった。IgEとは反対にIgG4、IgA価は、鶏卵白と牛乳で治療によって増加傾向が見られ、この効果は特にIgG4において著明で、IgAの増加の程度はIgG4に比べて軽度であった。唾液のIgAは極一部の患者で治療後に増加が確認された。②DLCチップ法とUniCAP法で抗体価の比較可能な抗原は卵白とOvomucoidで、これらについて相互比較を実施した。卵白抗原ではUniCAP法で飛びぬけて高値を示した1例を除けば、DLCチップ法とUniCAP法のIgE、IgG4値において概ね良い相関を示した。しかしOvomucoidのIgE測定値において、UniCAP値が70を超えて高値を示す場合、DLCチップ法では治療後に低下するにも関わらず、UniCAP法では逆に増加を示し、相関関係を示す直線性から大きくかけ離れており、高値を示すUniCAP法のOvomucoid IgE値に問題点が指摘された。

A. 研究目的

食物アレルギーの多くは自然寛解することから、基本的な治療方針はアレルゲン食品の除去をきちんと行って誤食の危険を避けて自然寛解を待つことである。しかしながら、学童期に入ってから自然寛解率は低くまた学童期以降は社会生活における不利益が大きいことから、積極的に寛容を誘導する方法として経口免疫療法が近年注目されてきている。臨床的にはこれらの治療法は一定の効果が認められるが、その方法は未だ確立された方法もなく、治療の機序も不明である。

この研究では、急速経口免疫療法に伴う各種抗原特異的抗体価 (IgE、IgG4、IgA) を、治療の前後で測定して、急速な治療に伴う各種抗体価の変動を血液と唾液で評価し、各抗体価の変動の意義を解析した。

B. 方法

1) 抗体価の測定に使用したアレルゲンチップは、ダイヤモンドライクカーボン (DLC) でガラス基板をコートしたチップ (DLCチップ) で<sup>1,2)</sup>、これま

でに使用されていたUniCAPに比べて抗原の種類によって違いがあるものの4-7倍高感度に測定ができ、しかも検体量が数 $\mu$ Lで数十種類の抗原に対する抗体価を定量することができる特色を持つ。

このシステムは、内部標準を搭載していることから、内部標準抗体の種類を変えることで容易に各種抗体価を測定できることから、IgE以外に各種抗原特異的IgG4、IgAを測定した。本研究では、鶏卵と牛乳の急速減感作療法であることから、卵の6抗原と牛乳の4抗原をチップに搭載して検証した。なお、DLCチップを用いてIgE、IgG4、IgA、saliva IgAを測定した抗原のレイアウトを図1に示す。同一抗原を3点プロットしており、3点の測定値の平均値を求めている。この測定から得られる値は、Binding Unit (BU) で表示し、IgE、IgG4、IgAをそれぞれBU<sub>E</sub>、BU<sub>G4</sub>、BU<sub>A</sub>として表した。今回の急速減感作療法のスケジュールを図2に示す。急速経口免疫療法開始前、免疫療法開始3か月後における血漿および唾液中のアレルゲン特異IgA、IgG4、IgEを測定した。なお、対照は無治療に割り付けられた患者群でエントリー時、エントリー3か月後

の唾液および血漿中の抗体を測定した。

### C. 研究結果

1) 鶏卵白と牛乳の急速経口免疫療法に伴う治療開始前後の生体内の各種免疫グロブリン価の変化を唾液と血液中の鶏卵と牛乳のアレルゲン成分特異抗体 (IgE, IgG4, IgA) 価を高感度アレルゲンマイクロアレイ (DLCチップ) 法でモニターした。図3にIgE抗体価の治療開始前後の変化を示す。

鶏卵の主要抗原である卵白、Ovomucoid、に対するIgE抗体価、Milk、 $\alpha$ -Casein、の抗体価は、治療によって低下傾向が見られたが、鶏卵成分に比べて牛乳成分では変化が軽度であった。一方、IgEとは反対にIgG4、IgAは、図4、5に示すように、治療で増加傾向が見られ、この効果は特にIgG4において著明で、IgAの増加の程度はIgG4に比べて軽度な傾向が見られた。なお、ここでも鶏卵成分に比べて牛乳成分では変化が軽度であった。唾液のIgAは、極一部の患者で治療後の増加が検出された。

2) DLCチップ法とUniCAP法で卵白とOvomucoidについて相互比較を実施した。図6に示すように、卵白抗原ではUniCAP法で飛びぬけて高値を示した1例を除けば、DLCチップ法とUniCAP法のIgE値において概ね良い相関を示した。しかしOvomucoidのIgE測定値において、UniCAP値が70を超えて高値を示す場合、DLCチップ法では治療後に低下するにも関わらず、UniCAP法では逆に増加を示し、相関関係を示す直線性から大きくかけ離れ、UniCAP法の問題点が指摘された。OvomucoidのIgG4の測定値においては、UniCAP法とDLCチップ法において相互に高い相関を示した。以上の結果から、UniCAP法が比較的高値を示す場合、測定値の直線性から外れる傾向があるが、DLCチップ法では広い範囲の測定値で直線性が良く保たれていることが判明した。なお図には示していないが、唾液のIgAは、極一部の検体しか測定できなかつた。

### D. 考察

鶏卵白牛乳の急速経口免疫療法によって、血液中の抗原特異的IgEは低下を示し、これに伴ってIgG4、IgAは増加傾向を示した。増加傾向を示す抗体の中でもIgAはその程度が軽度で、唾液のIgAでは、増加を示す例は稀であった。以上のことから、アレルギーを引き起こすIgE抗体は急速経口免疫療法で低下して、従来アレルギーの発症を抑

制することが示唆されていたIgG4は増加を示すことが明らかとなった。なお抗原特異的IgG全体の中でIgG4の占める割合は低く、IgG4以外のIgGサブクラスの増加がより著明に起こっていることが示唆された。またIgAもアレルギーの発症を抑制することが示唆されるが、その増加は軽度でしかもゆっくりと増加する可能性があり、今後の経過を観察する必要がある。

DLCチップ法とUniCAP法の測定値の比較において、UniCAP法の値が60-70以下の場合、DLCチップ法の値と良く相関した。しかし、UniCAP値が60-70以上の場合、あるいは100以上の測定限界を超えるために希釈して測定しなければならぬ場合において、DLCチップ法との相関は崩れて高値を示し、濃度変化の直線性から概想できる範囲から外れる傾向を示した。その理由の一つとして、血液検体の希釈により蛋白質量が低下することでブロッキング効果が減少して、IgEの非特異的吸着性が増加したことが考えられる。

### E. 結論

1) 血清及び唾液中の食物抗原特異的IgE、IgG4、IgAを高感度に定量するアレルゲンマイクロアレイの測定法を確立した。

2) 鶏卵白、牛乳の経口免疫療法開始3か月後、IgE抗体価は低下傾向を示したが、プラセボ群では大きな変化は無かつた。一方IgG4、IgA価は治療で増加傾向を示し、この効果はIgG4に著明で、IgAの増加の程度は軽度であった。唾液のIgAは極一部の患者で治療後に増加が検出された。

3) DLCチップ法とUniCAP法間の相互比較試験において、IgE、IgG4値において概ね高い相関を示した。しかしOvomucoidのIgE測定値において、UniCAP値が70を超えて高値を示す場合、DLCチップ法では治療後に低下するにも関わらず、UniCAP法では逆に増加を示し、濃度変化の直線性から概想できる範囲から外れて高い値を示す傾向を示した。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

論文発表

1. Suzuki K, Hiyoshi M, Tada H, Bando M, Ichioka T, Kamemura N and Kido H. Allergen