

capital. Fujiwara T, Kubzansky LD, Matsumoto K, Kawachi I. PLoS One. 7:e52018, 2012.

- 15) Role of Interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Allergology Int 62:13-20, 2013.
- 16) Pretreatment with low-levels of FcεRI-crosslinking stimulation enhances basophil mediator release. Koketsu R, Yamaguchi M, Suzukawa M, Arai H, Nagase H, Matsumoto K, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Ohta K. Int Arch Allergy Immunol 2013 In Press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

W003/000286 好酸球増多性疾患治療薬

特許公開 2010-207200 アトピー素因判定マーカー、アレルギー性皮膚疾患素因判定マーカー及びそれらの使用法

特許公開 2009-014524 アレルギー疾患推定マーカー及び治療効果判定マーカー、並びに、それらの利用方法

特許公開 2007-143544 乳酸菌のスクリーニング方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

緩徐経口免疫療法と栄養指導に関する研究

研究分担者	今井 孝成	昭和大学医学部 小児科
研究協力者	海老澤 元宏	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター
	佐藤 さくら	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター
	柳田 紀之	国立病院機構相模原病院 小児科
	近藤 直実	岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学
	伊藤 浩明	あいち小児保健医療総合センター アレルギー科
	藤澤 隆夫	国立病院機構三重病院 臨床研究部
	宇理須 厚雄	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院 小児科
	村上 洋子	国立病院機構福岡病院 小児科
	菅井 和子	国立病院機構横浜医療センター 小児科
	池田 政憲	国立病院機構福山医療センター 小児科
	小倉 聖剛	国立病院機構相模原病院 小児科

研究要旨

【外来経口免疫療法】

中等症以下の食物アレルギー児を対象に、対照群を設け外来経口免疫療法（以下、OIT）の効果を検証した。事前の食物経口負荷試験で明らかな誘発症状を認めた鶏卵、牛乳、小麦アレルギー児を対象とし、重篤な症状を認めたものは本研究から除外とした。対象は保護者の希望により経口免疫療法を実施する群（OIT）、または実施しない対照群（Ctrl）に分かれ経過を追った。OIT は自宅で連日行い、連続 3 日間無症状を条件に摂取量を漸増した。目標量到達後は、3 ヶ月連続無症状を条件に、原因食物を 14 日間完全除去の上で、耐性獲得確認のための食物負荷試験（確認試験）を実施した。

2012 年 11 月までに緩徐 OIT の適応ありと判定した児は延べ 216 名（鶏卵 83 名、牛乳 61 名、小麦 72 名）であった。その後、174 名（鶏卵 72 名、牛乳 53 名、小麦 49 名）に緩徐 OIT を実施した。一方、鶏卵 11 名、牛乳 8 名、小麦 23 名は OIT を希望されなかったため、対照群として自然経過での耐性獲得状況を評価した。OIT 群で解析対象となったのは、延べ 141 名（鶏卵 48 名、牛乳 44 名、小麦 49 名）で、外来フォロー中の中等症以上の症状出現率は、鶏卵 0.3%、牛乳 1.3%、小麦 0.3%であった。また、摂取回数辺りのアドレナリン投与率は、鶏卵 0.01%、牛乳 0.02%、小麦 0.0%であった。治療開始 1 年以降の目標量維持率は、OIT 群で鶏卵 78% (n=18)、牛乳 79% (n=36)、小麦 82% (n=33)、確認試験による耐性獲得率は、鶏卵 67%、牛乳 45%、小麦 64%であった。一方、対照群については、鶏卵 45%、牛乳 37%、小麦 23%であった。

中等症以下の食物アレルギー児に対する緩徐 OIT は、多くの症例で減感作状態へ誘導可能であり、誤食対策の観点からは有効な治療と考えられた。しかし、脱（減）感作状態（食べていれば症状が出ない状態）に至っても、耐性獲得した症例は一部にとどまり、耐性化には年単位の治療期間を要すると考えられた。また、稀ではあるが治療中に強い全身症状が誘発されることがあるため、OIT の実施は専門施設で十分な管理下で実施すべきと考えられた。

【多施設共同研究】

本経験に基づき有効性の高い統一された手法確立を目的として、2013 年 1 月より外来経口免疫療法を多施設共同研究（全国 9 施設）にて開始した。2013 年 3 月現在、OIT 群 13 名（鶏卵 5 名、牛乳 2 名、小麦 6 名）、対照群 5 名（鶏卵 4 名、小麦 1 例）がエントリーしている。今後、OIT の標準法確立および食物アレルギーの管理向上を目指して質の高い研究を継続する必要がある。

A. 研究目的

中等症以下の明らかな陽性症状を呈した鶏卵、牛乳、または小麦の食物アレルギー (FA) 児に対す

る緩徐経口免疫療法 (緩徐 OIT) の有効性、安全性を検証し、方法の確立を目指す。

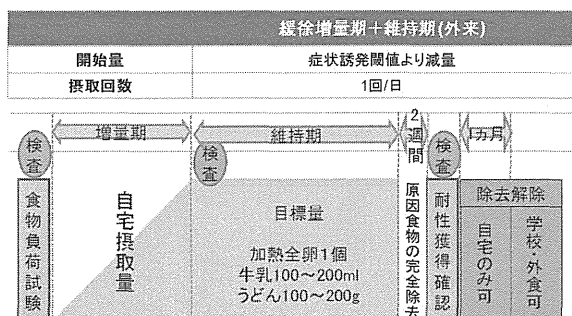
B. 研究方法

事前の食物負荷試験にて中等症以下の明らかな陽性症状を呈したFA児を対象にした。

OITは、図1のような緩徐法で行った。摂取目標量(加熱全卵1個、牛乳100-200ml、うどん100-200g)まで誘発症状に応じて、摂取量を自宅で漸増した。目標量到達後は同量を毎日維持継続摂取した。一定期間症状なく順調に経過した場合、病院で確認試験(抗原を2週間完全除去後に負荷試験)を施行し、耐性獲得の有無を評価した。

症状出現時は、保護者に症状グレード別に対応方法を事前に十分説明、理解してもらい対応した。必要な薬剤の事前投与も行った。

図1: 緩徐法のプロトコール



自宅での経過は、記録用日記を配布し、摂取量、副反応の有無、投薬状況等を毎日記載させ、外来受診時に回収し解析した。

また、OITは当院倫理委員会で承認され、本人・保護者に説明し、文書同意を得て施行した。

C. 研究結果

2012年11月までで緩徐OITの適応ありと判定された児は延べ216名(鶏卵83名、牛乳61名、小麦72名)であった。このうち42名はOITを希望されなかったため、コントロール群の同意を得て自然な耐性獲得状況を評価した。

緩徐OITの解析対象となったのは、延べ141名(鶏卵48名、牛乳44名、小麦49名)であった。患者背景を表1に示す。

表1: 患者背景

	鶏卵	牛乳	小麦
対象者数(名)	48	44	49
平均年齢(歳)	6.4	6.8	4.6
原因抗原によるアナフィラキシーの既往(%)	56.2	72.7	71.4
合併症			
気管支喘息	72.8	54.5	42.6
アトピー性皮膚炎	45.8	56.8	47.0
抗原特異的IgE値(Ua/ml)	27.1	16.1	21.6
負荷試験における客観症状誘発閾値(g)	36.1	47.4	39.0

また、1年以上の経過を解析し得たのはOIT群

87名(鶏卵18名、牛乳36名、小麦33名)とコントロール群42名(鶏卵11名、牛乳8名、小麦23名)であった。

表2: 1年以上経過した児の治療成績

	OIT群	コントロール群
鶏卵	(n=18) 除去継続 22% 減悪件 11% 67% 耐性獲得	(n=11) 除去継続 55% 45% 耐性獲得
	P値** 耐性化 0.438 除去継続 0.114	
牛乳	(n=36) 除去継続 21% 減悪件 34% 45% 耐性獲得	(n=8) 除去継続 37% 63% 耐性獲得
	P値** 耐性化 0.710 除去継続 0.037	
小麦	(n=33) 除去継続 18% 減悪件 18% 64% 耐性獲得	(n=23) 除去継続 23% 77% 耐性獲得
	P値** 耐性化 0.003 除去継続 0.000	

(**Fisher's exact test)

(1) 鶏卵

中等症以上の症状出現率は0.3%であった。治療は抗ヒスタミン薬投与(以下AH)が1.3%、気管支拡張薬吸入(以下吸入)0.2%、ステロイド投与(以下ステロイド)0.1%、アドレナリン筋肉注射(以下ADR)が0.01%であった。

1年以降の経過を解析し得た18名の目標量維持率はOIT群で78%、確認試験による耐性獲得率は67%であった。しかし、コントロール群(n=11)の耐性獲得率(45%)と比較して、2群間に有意差は認めなかった。

(2) 牛乳

中等症以上の症状出現率は1.3%であった。治療状況はAH;5.1%、吸入;1.7%、ステロイド;1.0%、ADR;0.02%であった。

1年以降の経過を解析し得た36名の目標量維持率はOIT群で79%、確認試験による耐性獲得率は45%であった。しかし、コントロール群(n=8)の耐性獲得率(37%)と比較して、2群間に有意差は認めなかった。

(3) 小麦

中等症以上の症状出現率は0.3%であった。治療状況はAH;0.04%、吸入;0.6%、ステロイド;0.3%、ADR;0.0%であった。

1年以降の経過を解析し得た33名の目標量維持率はOIT群で82%、確認試験による耐性獲得率は64%であった。コントロール群(n=23)の耐性獲得率(23%)と比較して、2群間に有意差が認められた。

D. 考察

OIT 介入は鶏卵、牛乳、小麦のいずれにおいても1年以降の経過で約8割の症例が目標量に到達していた。また副反応の発生頻度も低く、また重篤な誘発症状も稀であったことから、本法において概ね安全に減感作状態へ誘導することが可能であった。一方、耐性獲得率（確認試験陰性）に関しては、1年以降の経過で鶏卵67%、牛乳45%、小麦64%にとどまった。減感作状態と耐性獲得状態の差異が明らかになり、治療が年単位で必要と考えられた。また抗原毎に差を認めた。

E. 結論

従来であれば除去を指導していた食物経口負荷試験陽性患者に対して、緩徐 OIT を実施した結果、OIT は患児を耐性獲得状態または減感作状態へ誘導することが可能であることが示された。また副反応の誘発率から、本法が比較的安全に行えることも併せて示すことが出来た。

しかし、僅かながらも重篤な症状を誘発する症例、アドレナリン投与例がいることは強調する必要がある。また減感作状態と確認試験が陰性（耐性獲得状態）は明らかに臨床的に異なる状態にあることも重要な所見である。今後 OIT が安易に臨床の場で実施されることに注意喚起をする必要と、必ず確認試験のような耐性獲得の検証が必要であるといえる。確認試験を実施せずに原因食物の耐性獲得と判断すると、OIT がアナフィラキシー事故の温床となることを危惧する。

さらに強調すべきは、コントロール群と比較して、OIT 群の耐性獲得率に統計学的な差が認められなかった点である。重篤でない、中等症かつ幼児期の鶏卵、牛乳、小麦アレルギー児は自然耐性の可能性が残されており、OIT の介入がなくても結果（耐性獲得率）は変わらない可能性は、OIT の今後の方向性に大きな示唆を与える結果である。これらに関しては、今後規模を大きくして、多施設での検証が求められる。

本経験を踏まえ、有効性安全性の高い OIT 手法の確立、OIT そのものの是非を明らかにすることを目的として、2013 年 1 月より外来経口免疫療法を多施設共同研究（全国 9 施設）にて開始した。

対象は事前の経口食物負荷試験（Oral Food Challenge, OFC）にて中等症以下の明らかな誘発症状が確認された鶏卵、牛乳、または小麦アレルギーの 3 歳以上 15 歳以下の児とした。耐性獲得

の目標量は、加熱全卵 1 個、牛乳 100ml、うどん 100g とし、本研究の特色として自宅での最大摂取量を目標量の 100%群（A 群）と 25%群（B 群）の 2 群に設定した（図 2）。OIT を希望した患児は無作為に A 群または B 群に割り付けられ、希望しなかった患児は無介入群（N 群）とした。いずれの群も 1 年後に、2 週間の完全除去を経て確認試験を実施し、耐性獲得状況を評価する（図 3）。

図2: 多施設研究のデザイン

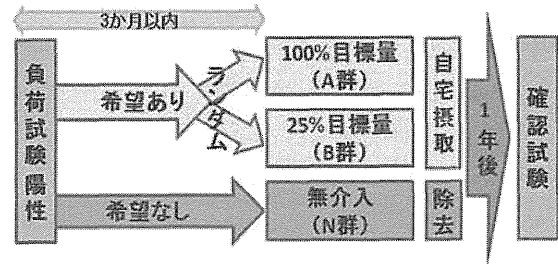
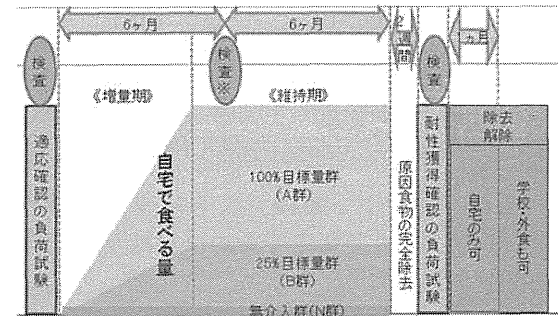


図3: 多施設研究のプロトコール



多施設研究では OIT 目標量の違いと耐性獲得率とを関連付けて解析することで、今後の食物アレルギー診療の管理向上に大きく寄与すると考えられる。2013 年 3 月現在、OIT 群 13 名（鶏卵 5 名、牛乳 2 名、小麦 6 名）、対照群 5 名（鶏卵 4 名、小麦 1 例）が、多施設研究にエントリーされている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebisawa M, Sato S, Utsunomiya T, Hayashi N, Imai T, Yanagida T: Rush oral immunotherapy for the treatment of hen's egg- and cow's milk-induced anaphylaxis, Translational Science: from Basic to Clinical Immunology and Allergy. 2012: 359-64
- 2) 海老澤元宏, 杉崎千鶴子, 林典子, 佐藤さくら, 今井孝成: わが国における経口免疫（減感作）療

法の実態，日本小児アレルギー学会誌，2012；
26(1)：158-66

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究分担者 伊藤 浩明 あいち小児保健医療総合センター アレルギー科

研究要旨

食物経口負荷試験や経口免疫療法中に観察される誘発症状を定量的に評価する新たなスコアリングシート Anaphylaxis Scoring Aichi (ASCA) を提唱し、当科の経口負荷試験において評価した。ASCA は誘発症状を 5 臓器に区分して、所見の重症度似応じて 1~60 点を配分し、その合計を総合スコア (最高 240 点) とした。経口負荷試験陽性 253 例の検討では、総合スコアは Sampson グレード分類 (改訂版) と相関するもののグレード 2 と 3 では点数のオーバーラップが多く、ASCA がより詳細に重症度を評価できることが示唆された。症例数を増やした負荷陽性 723 例の検討では、牛乳の総合スコアが鶏卵・小麦よりも低く、小麦では呼吸器スコアが高値を示すこと、総合スコアを累積負荷量 (タンパク質 g) で除した TS/Pro は特異的 IgE 抗体価と軽度の相関を認めるものの、抗体価はアレルギーの重症度を反映しないことが示された。以上のように、このスコアリングシステムは、食物アレルギーの臨床・研究における指標として利用できる可能性を確認した。

A. 研究目的

食物経口負荷試験や経口免疫療法において、誘発される症状の重症度を共通の指標で判定することは、多くの臨床・研究の場で求められている。現在わが国で広く用いられ、ガイドラインにも掲載されている Sampson によるグレード分類 (改訂版) は、最も重症度の高い臓器の症状によってグレードがつけられ、呼吸器症状の重症度の表現が非常に難しいこと、中間的なグレード 2 とグレード 3 の区分が観察者の主観に依存するなど、いくつかの問題点が残されている。また、評価の定量性がないために、症状の重症度を何らかの比較検討するための指標として不十分であった。

本研究では、誘発症状の重症度を定量的に評価する新たなスコアリングシート Anaphylaxis Scoring Aichi (ASCA) を開発し、当科における食物経口負荷試験の中で評価した。

B. 研究方法

ASCA は、誘発症状を呼吸器・皮膚粘膜・消化器・神経精神・循環器の 5 種類に区分して、それぞれの所見について重症度似応じたスコア 1~60 点を配分した。一連の誘発症状の経過において、最も高い点数に該当するスコアを合計して総合スコア (最高 240 点) とした (図 1)。

まず、当科で実施した食物経口負荷試験の陽性例 253 件 (鶏卵 112 件、牛乳 73 件、小麦 34 件、その他) について、ASCA 総合スコアと Sampson

グレード分類改訂版の重症度グレードを比較した。

次いで、より症例数を増やして鶏卵 374 例、牛乳 213 例、小麦 136 例について ASCA 総合スコアや臓器スコアを比較検討し、中でも 60 点以上の高い総合スコアを示す症例について、アドレナリン筋注の使用実績を評価した。

C. 研究結果

ASCA 総合スコアと Sampson グレード分類の関連を図 1 に示す。軽症のグレード 1 と、重症度の高いグレード 4 は、その中間とスコアがオーバーラップしないように配点してあるため、比較的一致した結果を示した。グレード 2 と 3 の間には、総合スコア中央値には有意差を認めるものの幅広い点数の重複が認められた。

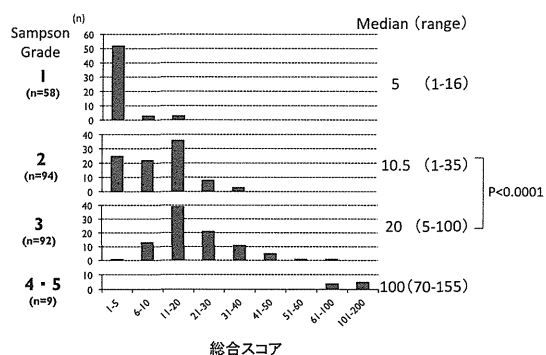


図 1 ASCA 総合スコアと Sampson グレード分類の関連

次に、負荷食品別に ASCA 総合スコアを検討すると、図2のように牛乳が有意にスコアが低値を示した。

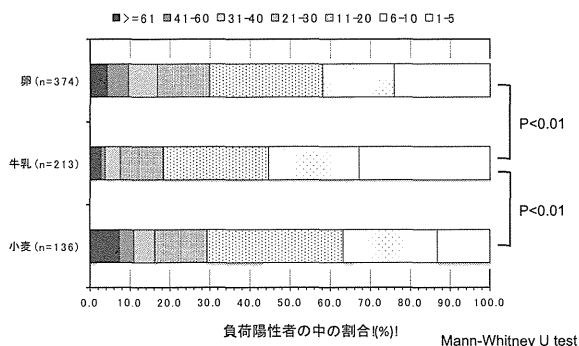


図2 負荷商品別 ASCA 総合スコア区分の割合

さらに症状を臓器別に見ると、小麦において卵や牛乳よりもより高率に呼吸器症状が出現することが観察された(図3)。同様に消化器症状は鶏卵に多く、皮膚症状は食品による差を認めなかった。

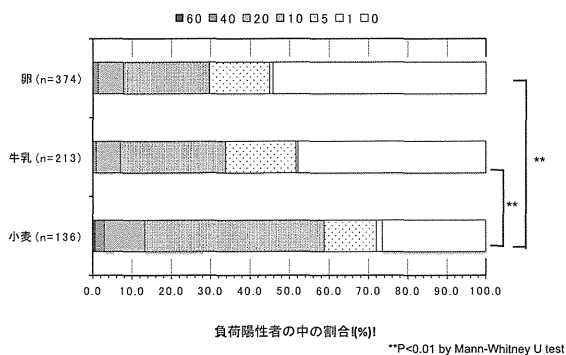


図3 呼吸器症状の出現率

症状の重症度を定量的に評価する1つの試みとして、総合スコアを、症状誘発までに摂取したアレルゲンの累積量(たんぱく重量g)で除したものを総合スコア/たんぱく比(TS/Pro)として表現し、特異的 IgE 抗体価と比較検討してみた。TS/Pro は卵白、オボムコイド特異的 IgE 抗体価と若干の相関関係を認めるものの、抗体価が重症度を反映しているとまでは言えなかった(図4)。

今回の経口負荷試験の中で、ASCA 総合スコア 60 点以上を示したものは鶏卵 20/374 件(5.3%)、牛乳 6/213 件(2.8%)、小麦 12/136 件(8.8%)と小麦に比較的多かった。そのうちアドレナリン筋肉注射を使用したものは鶏卵 10 件、牛乳 6 件、小麦 9 件であった。

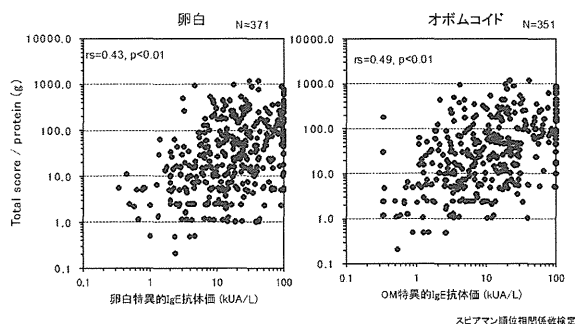


図4 鶏卵負荷試験における TS/Pro 比と特異的 IgE 抗体価

D. 考察

今回提案した ASCA は、臨床現場で比較的迷いなく採点でき、誘発症状の重症度を定量的に表現して各種の統計解析に使用できることが示唆された。今後は、これを多施設で共通に試用してその成績を比較検討するとともに、経口免疫療法施行中の誘発症状をモニターする手段としても検討を重ねていく予定である。

E. 結論

誘発症状の定量的スコアリングシステム ASCA は、広く食物アレルギーの診療・研究に利用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebisawa M, Shibata R, Sato S, Borres MP, Ito K. Clinical Utility of IgE Antibodies to ω -5 Gliadin in the Diagnosis of Wheat Allergy: A Pediatric Multicenter Challenge Study. *Int Arch Allergy Immunol* 158; 71-76, 2012.
- 2) Ito K, Futamura M, Moverare R, Tanaka A, Kawabe T, Sakamoto T, Borres MP: The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clinical and Molecular Allergy* 10; 1-7, 2012.
- 3) Y. Haneda, N. Kando, M. Yasui, T. Kobayashi, T. Maeda, A. Hino, S. Hasegawa, T. Ichiyama and K. Ito. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 129; 1681-2, 2012
- 4) Ito K. Diagnosis of food allergies: the impact of oral food challenge testing. *Asia Pacific Allergy* 3; 59-69, 2013.

2. 学会発表

- 1) Ito K, Hino A, Kando N, et al. Establishment of

食物アレルギーの新規予知診断法と免疫学的改変食品による治療法の確立

研究分担者 近藤 直実 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授
 研究協力者 松井 永子 岐阜大学医学部附属病院小児科 臨床准教授
 金子 英雄 国立病院機構長良医療センター臨床研究部 部長
 大西 秀典 岐阜大学医学部附属病院小児科 臨床講師
 加藤 善一郎 岐阜大学医学部附属病院小児科 准教授
 川本 典生 岐阜大学医学部附属病院小児科 助教

研究要旨

食物アレルギーの感作発症予知と経口免疫寛容誘導の開発を進め、食物アレルギーの予知と治療を独創的に進める。食物アレルギーの感作発症と遺伝子多型などについての関連を検討した。昨年度までに、免疫療法（経口免疫寛容誘導）のうち、牛乳アレルギーに対する経口免疫寛容誘導改変食品（ β ラクトグロブリンの抗原エピトープを修飾した新規食材）を作成して、これを用いて牛乳アレルギー患児に投与し、良好な結果が見られた。平成24年度には、牛乳アレルギー患児の多くが反応するカゼインを用いた経口免疫寛容誘導改変食品（抗原エピトープを修飾した新規食材）を作成し、臨床検討を進めたところ、多くの患者で、カゼインの閾値が上昇し、一部には牛乳そのものを飲むことができるようになった患者も存在し、一定の成果が得られた。

A. 研究目的

食物アレルギーの感作発症予知と経口免疫寛容誘導の開発を進め、独創的な方法で食物アレルギーの発症予知と治療の開発をすすめる。

多くが有意な関連を認めた。気管支喘息やアレルギー性鼻炎の家族歴は有意な関連を認めなかった。3歳の食物アレルギーについても同様の結果を示した。(図1)

○:有意に関連有り /:有意な関連なし

B. 研究方法

(1) 食物アレルギーの感作発症予知

出生コホート研究および健診で追跡して食物の感作状況と食物アレルギー発症の有無について調査する。臍帯血、その後の採血などを用いて各種の遺伝子多型を検索し、関連を調査した。

(2) 免疫療法（経口免疫寛容誘導）の開発

食物アレルギーに対する免疫療法を開発する。この方法は経口免疫寛容を誘導する免疫療法である。①原因食品（ミルクなど）少量投与方法および②経口免疫寛容誘導改変食品（抗原エピトープを修飾した新規食材）投与のうち、②の方法を用いて、その前後の臨床データと経過を追跡する。（倫理面への配慮）

本研究は倫理審査委員会において承認を得て、十分に個人情報保護などに配慮して行った。

C. 研究結果

(1) 食物アレルギーの感作発症予知

健診で家族歴について調査を行い、食物アレルギーの発症と家族歴の関係についてロジスティック解析を行った。1歳半の食物アレルギーには食物アレルギーとアトピー性皮膚炎の家族歴の

診察FA有/無,3Y	アレルギー,3Y	BA歴,3Y	AD歴,3Y	FA歴,3Y	AR歴,3Y
家族	/	/	○	○	/
父母	○	/	○	○	/
父	/	/	○	/	/
母	/	/	○	○	/
兄弟	/	/	/	○	/
祖父母	/	/	○	○	/
父母兄弟	/	/	○	○	/
父母祖父母	/	/	○	○	/
Grand母	/	/	○	/	/

FAの発症にはFAの家族歴と、ADの家族歴が関係する。

図1 家族歴と3歳の診察によるFA

(2) 免疫療法（経口免疫寛容誘導）の開発

食物アレルギーの原因となる食物のうち、主要なアレルゲンとしては、 β ラクトグロブリン、カゼインなどが挙げられる。今回は、このうち、IgEの反応するB細胞エピトープが分解されており、かつ、T細胞エピトープが残るように、適切な条件で加水分解されたカゼインを用いて研究を行った。

同意が得られた4歳以上の牛乳アレルギー児で、カゼインの負荷試験が陽性の患者を対象とした。少量の抗原改変カゼインから1週間毎に8週間かけて漸増し、前後で採血した。閾値が上がった人は最大量の抗原改変カゼインで維持し、1ヶ

月ごとに負荷試験を繰り返した。最大量のカゼインが飲めた後は牛乳の負荷試験を実施、飲めた場合には牛乳に切り替えて維持した。(図2)

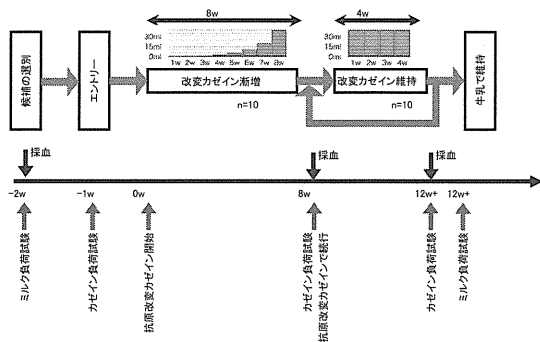


図2 研究のプロトコル

8例がエントリーし、そのうち1例はエントリー後に最大量のミルクが飲める事が判明して中断、もう1例は最低量の抗原改変カゼインでも軽度の反応を認めて中断となった。実際にプロトコルを実施した6例中1例は8週間後にカゼインの閾値が上昇しなかった。残りの5例は閾値が上昇し、症状はないか軽微なものであった。その後も継続し3例は既に牛乳へ移行できた。(図3)

ID	開始時年齢	治療前閾値(天然型)	8週間の漸増期	8週後の閾値	2013.1.1現在の週飲	改変カゼインの量	現在の閾値
1	6 y.o.	0.75ml	済み	>5ml	23	40ml	>45ml
2	4 y.o.	>45ml	カゼインが全量飲めた、その後牛乳も十分な量ためため参加を中止				
3	4 y.o.	0.75ml	済み	>5ml	22	40ml	>45ml
4	5 y.o.	3.75ml	済み	>11ml	23		>45ml, Milk 20ml
5	4 y.o.	0.75ml	済み	>7ml	22	牛乳 5ml	>45ml, Milk 5ml
6	4 y.o.	11ml	済み	11ml	中止		
7	5 y.o.	<0.25ml	改変カゼイン(ミルク0.25ml相当)でも症状あり参加を中止				
8	4 y.o.	1.75ml	済み	2.0ml	15	40ml	17ml

図3 研究参加者の背景と現在の状況

これらの5例の途中経過としては8週の治療前後で好酸球が低下傾向を示したが、白血球数や総IgE、特異的IgEは横ばいであった。

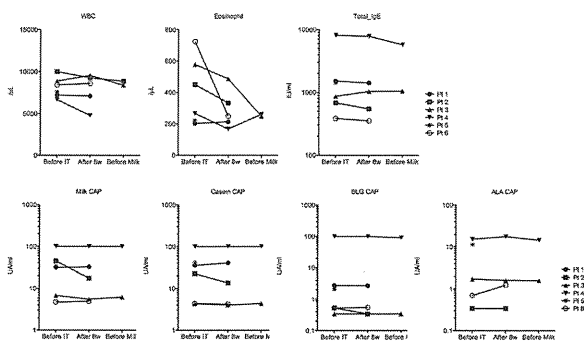


図4 治療に伴ったWBC, IgE, 特異的IgEの変化

D. 考察

平成24年度は、④健診でフォローアップした集団の食物アレルギーの発症と家族歴の関係についてと、⑥カゼインの抗原改変食品(「食べて治す」新規食材)の臨床的検討をすすめてきた。④では発症に関連する家族歴について一部の特徴を捉えることができた。また、⑥では、βラクトグロブリンのみでなく、カゼインの抗原改変食品においても良好な結果を認めたので、この免疫学的な変化について、検査をすすめていく必要があると考えている。

E. 結論

食物アレルギーの感作発症予知と経口免疫寛容誘導の開発について検討を進め、いずれも良好な成果が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Teramoto T, Matsui E, Fukao T, Sakai K, Yonezawa H, Kato Z, Ohnishi H, Kaneko H, Kondo N, Azuma J, Nishima S. Repeated-dose pharmacokinetics of inhaled ciclesonide (CIC-HFA) in Japanese children with bronchial asthma: a phase I study. *Allergol Int.* 2012 Dec;61(4):619-24.
- 2) Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Autosomal-Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis with STAT1-Mutation can be Complicated with Chronic Active Hepatitis and Hypothyroidism. *J Clin Immunol.* 2012 Dec;32(6):1213-20.
- 3) Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shirakawa M, Kondo N. TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. *PLoS One.* 2012;7(6):e38423.
- 4) Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari YO, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol.* 2012 Oct;52(3-4):108-16.
- 5) Kawamoto N, Fukao T, Kaneko H, Hirayama K, Sakurai S, Arai T, Kondo M, Kawamoto M, Matsui E, Teramoto T, Kasahara K, Bai C, Zhang G, Omoya K, Matsukuma E, Morimoto M, Suzuki H, Aoki Y, Kimura T, Nada M, Morita H, Tokumi T, Takemura M, Seishima M, Shiraki M, Iwasa S, Kondo N. Risk factors for infantile atopic dermatitis and recurrent wheezing. *J Investig Allergol Clin*

Immunol. 2012;22(2):116-25.

- 6) Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N. Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients. J Clin Immunol. 2012 Apr;32(2):221-9.
- 7) Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kubota K, Yamamoto T, Matsui E, Teramoto T, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. Int J Mol Med. 2012 Feb;29(2):153-8.

2. 学会発表

- 1) 金子 英雄, 大西 秀典, 森田 秀行, 山本 崇裕, 久保田 一生, 寺本 貴英, 加藤 善一郎, 松井 永子, 川本 典生, 加藤 晴彦, 中埜 拓, 近藤 直実. 食物アレルギーの日常管理と問題点(診断と治療) 食物アレルギーにおける抗原改変ペプチド作製と臨床応用の試み. 第 115 回日本小児科学会学術集会 (2012年4月20日~22日)
- 2) 金子 英雄, 大西 秀典, 森田 秀行, 近藤 直実. 食物アレルギー診療ガイドライン 食物アレルギーのメカニズム. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2012年5月12日~13日)
- 3) 川本 典生, 深尾 敏幸, 金子 英雄, 川本 美奈子, 松井 永子, 平山 耕一郎, 岩砂 眞一, 近藤 直実. 臍帯血を用いた出生コホート研究 3歳のアレルギー性鼻炎の発症に関わる因子の検討. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2012年5月12日~13日)
- 4) Hidenori Ohnishi, Naotaka Tsutsumi, Takahiro Yamamoto, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Masahiro Shirakawa and Naomi Kondo. The Functional Assessments of Mutational Effect of Human IRAK4 and MyD88 Gene Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology & Immunology 2012 (2012年10月19日~21日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

低アレルギー化食品による経口免疫療法の確立

研究分担者 宇理須 厚雄 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
 研究協力者 柘植 郁哉 藤田保健衛生大学医学部小児科
 近藤 康人 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科

研究要旨

近年、食物アレルギーに対するアレルギー特異的経口免疫療法が注目され、有効性を示す報告が集積されつつあるが、安全性や効果の永続性など解決すべき課題は多い。我々は、今年度も、より安全な経口免疫療法の確立を目指して、低アレルギー化食品を用いた経口免疫療法を試みるとともに、作用機序を明らかにして改良に役立てるべく、各種免疫学的解析を行った。

鶏卵アレルギーに対しては、8週間のオボムコイド減量加熱鶏卵継続摂取を行い、トシル酸スプラタスト（アイピーディ）併用の効果を、フマル酸ケトチフェン（ザジテン）併用と比較検討した。これまでの8例の検討では、トシル酸スプラタスト群の6例中6例、フマル酸ケトチフェン群の2例中1例が陽性にとどまったが、それぞれ安全閾値は低下していた。また、トシル酸スプラタスト単独に比し、免疫療法の併用により好塩基球活性化試験の有意な低下が認められた。

牛乳アレルギーに対しては、3例を対象として、加水分解乳（E赤ちゃん）を用いた緩徐漸増免疫療法を行い、制限解除には至らないものの閾値が上昇した。また、安全性は顕著で、重症者でも安全に家庭での継続が可能であった。

魚アレルギーに対しては、5例を対象に、12週間単位の酵素処理魚エキス継続摂取を行い、9ヵ月継続し得た1例では、魚肉の安全閾値が、0.3gから20gに増加した。特記すべき副反応は認められていない。

低アレルギー化食品を用いた免疫療法の改良を試み安全性を確認したが、本年度は、未だ症例数や観察期間が少なく、今後も更なる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

食物アレルギー患者に、安全かつ効率的にアレルギー特異的寛容を誘導することを目的に、低アレルギー化食品の経口摂取による免疫療法を試みる。併せて、治療前後での各種免疫学的パラメーターを解析して、寛容導入のメカニズムを検討し、その成果を免疫療法の改良に供する。

球活性化で見ると、1/10,000ほどアレルギー性が低下していたが（図2）、T細胞刺激能は残存していた。

上述した、各々の経口免疫療法施行前後には、①特異的IgG、IgG4、IgEの測定、②好塩基球活性化試験、③アレルギー特異的T細胞の細胞質内サイトカインの測定、により寛容導入のメカニズムを検討する。

B. 研究方法

低アレルギー化食品を用いた特異的免疫療法として

- ① 鶏卵アレルギーに対しては、8週間のオボムコイド減量加熱鶏卵継続摂取を行い、トシル酸スプラタスト（アイピーディ）併用の効果を、フマル酸ケトチフェン（ザジテン）併用と比較検討する（図1）。
- ② 牛乳アレルギーに対しては、加水分解乳（E赤ちゃん）を用いた緩徐漸増免疫療法を行い、安全性、有効性を確認する。
- ③ 魚アレルギーに対しては、12週間単位の酵素処理魚エキス継続摂取を行い、安全性、有効性を確認する。酵素処理魚エキスは、好塩基

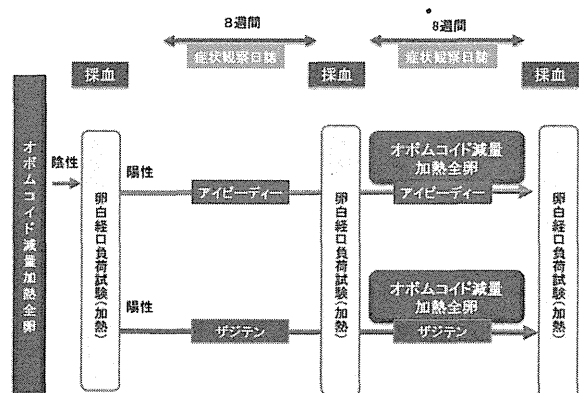


図1 鶏卵アレルギー治療プロトコール

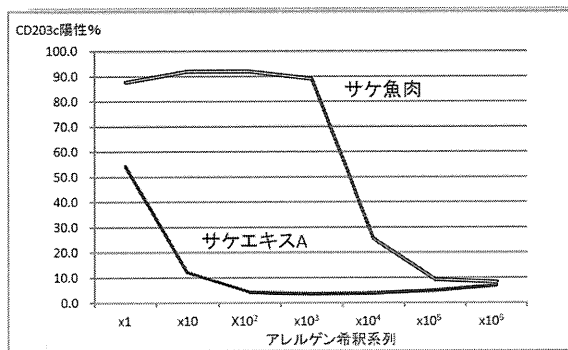


図2 酵素処理魚エキスによる好塩基球活性化

C. 研究結果

①鶏卵アレルギーの免疫療法では、8例（トシル酸プラタスト群6例、フマル酸ケトチフェン群2例）を対象に、8週間のオボムコイド減量加熱鶏卵継続摂取を行い、抗アレルギー薬併用の効果を検討した。8週間後の鶏卵負荷試験では、トシル酸プラタスト群6例、フマル酸ケトチフェン群1例が陽性にとどまったが、それぞれ安全閾値は低下していた。

免疫学的検討では、アレルゲン特異的T細胞応答の有意な変化は検出できなかったが、好塩基球活性化試験では、トシル酸プラタスト単独に比し、免疫療法の併用により有意な低下が認められた。

②牛乳アレルギーに対しては、3例を対象として、加水分解乳（E赤ちゃん）を用いた緩徐漸増免疫療法を行い、制限解除には至らないものの閾値が上昇した。また、安全性は顕著で、重症者でも安全に家庭での継続が可能であった。

③魚アレルギーに対しては、5例を対象に、12週間単位の酵素処理魚エキス継続摂取を行い、9ヵ月継続し得た1例（図2）では、治療に用いたサケの摂取可能積算量が、0.3gから20gに増加し、同時に、摂取していないにもかかわらず、アジに対する耐性の増大も認められた。特記すべき副反応は認められなかった。

D. 考察

食物アレルギーの経口免疫療法は、通常、アレルゲンをそのまま用いることが多く、副反応を避けるため少量より漸増させる方法がとられるが、緩徐に増量しても、稀ではあるが重篤な副反応を呈することがある。我々は従来、低アレルゲン化した鶏卵による免疫療法を行い、安全性、有効性

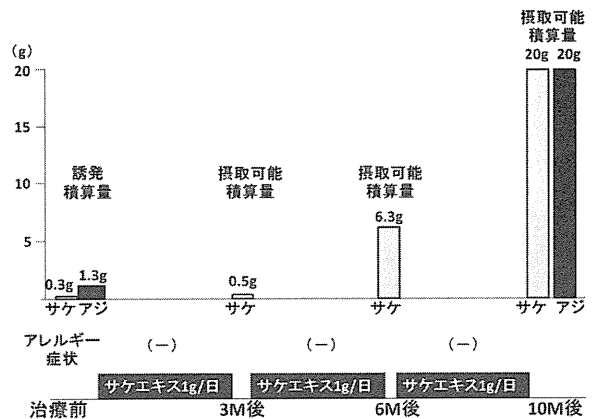


図3 酵素処理魚エキス摂取による耐性の増大

を示してきたが、重症例での有効性に課題を残していた。

本年度は、治療対象とするアレルゲンを牛乳、魚肉に拡大した。さらに、鶏卵アレルギーに対しては、安全性、有効性を高めることを目的とした免疫療法の修飾の第一歩として、抗アレルギー薬の併用を試みた。どの試みも、未だ症例数が少なく、有効性の証明には至っていないが、低アレルゲン化食品を用いた免疫療法の安全性はあきらかであった。今後さらに症例数を増やし、また、治療期間を延長して、有効性を立証していく予定である。

E. 結論

低アレルゲン化食品を用いた免疫療法の改良を試み安全性を確認したが、本年度は、未だ症例数や観察期間が少なく、今後も更なる検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura R, Ishiwatari A, Higuchi M, Uchida Y, Nakamura R, Kawakami H, Urisu A, Teshima R; Evaluation of the luciferase assay-based in vitro elicitation test for serum IgE. Allergol Int. 2012; 61: 431-7.
- 2) Watanabe S, Taguchi H, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Urisu A, Teshima R; Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction. J Agric Food Chem. 2012; 7: 2108-15.
- 3) Urisu A, Tanaka K, Ogura K, Naruse N, Hirata N, Nakajima Y, Inuo C, Suzuki S, Ando H, Kondo Y, Tsuge I, Yamada K, Kimura, M. New approach for

improving the safety of oral immunotherapy for food allergy. Clin Exp Allergy Rev 2012; 12:25-28.

- 4) Inuo C, Kondo Y, Itagaki Y, Kurihara K, Tsuge I, Yoshikawa T, Urisu A. Anaphylactic reaction to dietary oats. Ann Allergy Asthma Immunol 2013; in press.
- 5) Nomura T, Tsuge I, Inuo C, Nakajima Y, Kondo Y, Sugiura S, Murata H, Iguchi T, Terada A, Saitoh S, Hashimoto S, Atsuo Urisu A. Food sensitization in Japanese infants is associated with a common Filaggrin variant. Ann Allergy Asthma Immunol 2013; in press.
- 6) Nomura T, Tsuge I, Inuo C, Nakajima Y, Tanaka K, Naruse N, Suzuki S, Ando H, Kondo Y, Saitoh S, Urisu A. Japanese cedar-specific immunotherapy reduces allergen-specific Th2 cells in peripheral blood. Ann Allergy Asthma Immunol 2013; in press.

2. 学会発表

- 1) 小倉和郎、成瀬徳彦、平田典子、小松原亮、鈴木聖子、安藤仁志、近藤康人、宇理須厚雄、田中健一、中島陽一、犬尾千聡、柘植郁哉、漢人直之、伊藤浩明、エビアレルギーに対する経口負荷試験による検討. 第 24 回, 日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 平成 24 年 5 月 12 日 13 日.
- 2) 野村孝泰、柘植郁哉、高松伸枝、田中健一、犬尾千聡、中島陽一、小倉和郎、成瀬徳彦、鈴木聖子、安藤仁志、近藤康人、宇理須厚雄、活性化マーカー CD154 を指標とした牛乳アレルギー患者の抗原特異的 T 細胞解析. 第 24 回, 日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 平成 24 年 5 月 12 日 13 日.
- 3) 宇理須厚雄, 食物アレルギーの日常診療における特異的 IgE 検査の活用 食物アレルギーにおける抗原特異的 IgE 検査の種類と臨床応用. 第 24 回, 日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 平成 24 年 5 月 12 日 13 日.
- 4) 中島陽一、近藤康人、大久保悠里子、田中健一、山脇一夫、成瀬徳彦、犬尾千聡、平田典子、鈴木聖子、柘植郁哉、宇理須厚雄、高松伸枝、箆島克裕、近藤智彦、板垣康治, 低アレルギー化した鮭エキスをを用いた魚アレルギーの経口免疫療法を行った一例. 第 62 回, 日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 平成 24 年 11 月 29 日 30 日、12 月 1 日.
- 5) 成瀬徳彦、田中健一、平田典子、鈴木聖子、近藤康人、宇理須厚雄、大久保悠里子、山脇一夫、犬尾千聡、中島陽一、柘植郁哉、食物（鶏卵、牛乳、小麦、）アレルギーに対する緩除漸増経口免疫療法の誘発反応の検討. 第 62 回, 日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 平成 24 年 11 月 29 日 30 日、12 月 1 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アレルギーコンポーネントを用いた新規診断法の開発

研究分担者 丸山 伸之 京都大学大学院農学研究科
研究協力者 海老澤 元宏 国立病院機構相模原病院臨床研究センター アレルギー性疾患研究部
伊藤 浩明 あいち小児保健医療総合センター

研究要旨

食物アレルギー患者の生活の質の悪化を防ぐためには正確な診断に基づく適切な指導および治療が必要である。本課題では、既存の検査法にて診断に苦慮している食物アレルギーについて、臨床診断におけるアレルギーのコンポーネンに対する評価を多施設で実施し、新規な診断法を開発する。本年度は、ゴマ (rSes i 1, rSes i 2, rSes I LTP-1, rSes I LTP-2)、ソバ (rFag e 1, rFag e 2-10k, rFag e 2-16k)、コムギ (α/β -グリアジン、 γ -グリアジン、 $\omega 1/2$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン)、ナッツ類 (rJur r 1, rAna o 3) の調製を行った。ゴマおよびソバのコンポーネントについて負荷試験により診断がなされている患者血清を用いて評価を行ったところ、ゴマおよびソバの 2S アルブミンが臨床診断において有効なコンポーネントである可能性が示唆された。今後より多くの患者血清を用いて評価を行うとともに、包括的なコンポーネントの評価を進める。

A. 研究目的

食物アレルギーは患者の生活の質の悪化を招き、社会生活の障害になる。特に、小児におけるアレルギー患者の数は多いため、小児の食物アレルギー患者に対する適切な指導および治療が求められている。そのためには小児アレルギー患者に対する正確な診断が必要となる。本課題では、既存の検査法にて診断に苦慮している既知および新規な食物アレルギーのコンポーネントの調製を行い、それらを用いた多施設による臨床診断における評価を実施する。本年度は、ゴマ、ソバ、コムギなどのアレルギーのコンポーネントの調製を行い、負荷試験により確定診断がなされている患者血清を用いて解析を行った。

B. 研究方法

1. コンポーネントの調製

ゴマ、ソバ、コムギおよびナッツ類のアレルギーの組み換えタンパク質 (リコンビナントコンポーネント) を調製するために発現系の構築を行った。各コンポーネントに対する遺伝子について大腸菌発現用ベクターに導入し、緩衝液に可溶な状態で発現したものについてはクロマトグラフィーにより精製を行った。また、種子より主要な貯蔵タンパク質の画分を調製した。

2. コンポーネントの評価

ELISA 法により各コンポーネントに対する患者血清中の特異的 IgE 抗体価を測定した。イムノ

キャップ法での IgE 抗体価が既知である患者血清を用いて検量線を作製し、ELISA 法による測定値をイムノキャップ法での抗体価に換算し、評価した。

C. 研究結果

1. コンポーネントの調製

1-1. ゴマのコンポーネントの調製

ゴマの種子より主要な貯蔵タンパク質である 11S グロブリン、7S グロブリン、2S アルブミンの各画分について調製した。ゴマの完熟種子をヘキサンにより脱脂した。緩衝液により種子タンパク質を抽出し、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200pg) により分画し、11S グロブリン、7S グロブリン、2S アルブミンの画分を得た (Native 11S, Native 7S, Naïve 2S; 図 1)。2S アルブミン (Ses i 1, Ses i 2) および脂質輸送タンパク質 (Ses i LTP-1, Ses i LTP-2) についてはリコンビナントコンポーネントを調製した。まず、ゴマ登熟期種子より RNA を調製し、RT-PCR により各コンポーネントの cDNA を取得した。これら大腸菌発現ベクターである pGEX ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。発現のための宿主として BL21 株などを用いた。イソプロピル β -チオガラクトピラノシドによる発現誘導後、培養した大腸菌を回収し、緩衝液中で菌体を超音波破碎し可溶性画分を調製した。グルタチオンセファロースにより部分精製したのち、ゲル

濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製した各コンポーネントの純度は SDS-PAGE により確認した(図1)。

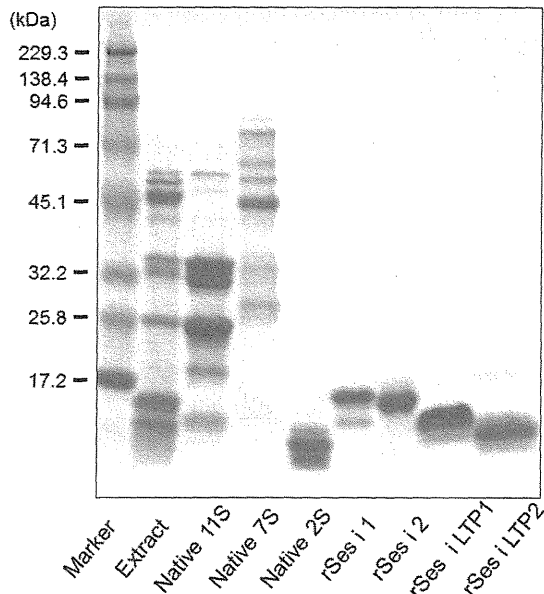


図1 ゴマアレルギーコンポーネント SDS-PAGE

1-2. ソバのコンポーネントの調製

ソバの種子より主要な貯蔵タンパク質である 11S グロブリン、2S アルブミンの各画分について調製した。ソバの完熟種子を破碎し、緩衝液により種子タンパク質を抽出したのち、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、11S グロブリン、2S アルブミンの画分を得た(Native 11S, Native 2S; 図2)。さらに、11S グロブリン(rFage 1)、2S アルブミン(rFage 2-10k, rFage 2-16k)についてリコンビナントコンポーネントを調製した。まず、ソバ登熟期種子より RNA を調製し、RT-PCRにより各コンポーネントの cDNA を取得した。これら大腸菌発現ベクターである pGEX あるいは pET ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。イソプロピルβ-チオガラクトピラノシドによる発現誘導後、培養した大腸菌を回収し、緩衝液中において菌体を超音波破碎し可溶性画分を調製した。可溶性画分を用いてグルタチオンセファロースカラムにより処理したのち、主要なフラクションについてゲル濾過クロマトグラフィーに供し、精製した。精製した各コンポーネントの純度は SDS-PAGE により確認した(図2)。

1-3. コムギのコンポーネントの調製

α/β-グリアジン、γ-グリアジン、ω1/2-グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニンのリ

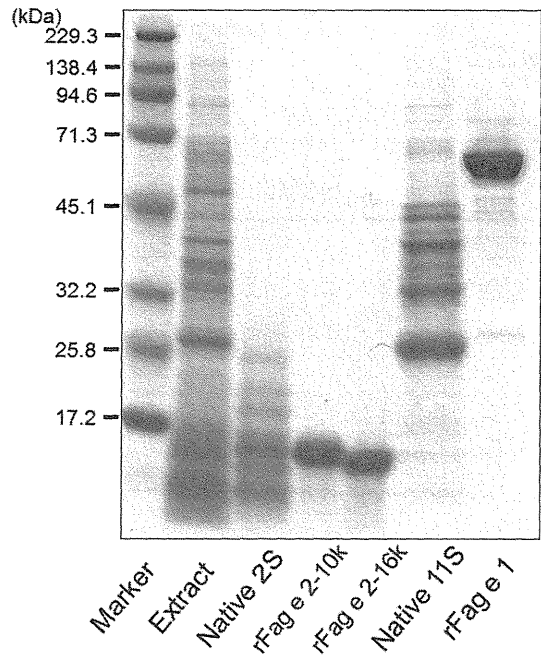


図2 ソバアレルギーコンポーネント SDS-PAGE

コンビナントコンポーネントを調製するために大腸菌発現系の構築を行った。α/β-グリアジンおよび LMW-グルテニンの cDNA についてはリソースセンターより入手した。また、ω1/2-グリアジンおよび ω5-グリアジンの cDNA については人工合成した。γ-グリアジンおよび HMW-グルテニンについては既に取得している cDNA を用いた(Eur. J. Biochem. 255, 739-745 (1998))。これらの cDNA をタグとなる配列とともに pET ベクターに組み込み、発現用プラスミドを構築した。ω1/2-グリアジン以外は不溶性として組換えタンパク質が得られたため、グアニジン塩酸塩により可溶化したのち、変性条件下においてアフィニティークロマトグラフィーで精製した。ω1/2-グリアジンは可溶性で得られたため、ゴマおよびソバのリコンビナントコンポーネントと同様にアフィニティークロマトグラフィーにより調製した。

1-4. ナッツ類のコンポーネントの調製

クルミ 2S アルブミン(Jur r 1)およびカシューナッツ 2S アルブミン(Ana o 3)に対する遺伝子配列を人工合成し、大腸菌発現プラスミドを構築した。精製は、アフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより行った。

2. コンポーネントの評価

本年度はゴマおよびソバのコンポーネントについて評価を行った。ゴマに対するアレルギー患者血清(20 検体)を用いてコンポーネントに対す

る特異的 IgE 抗体価を測定した。Native 11S および Native 7S においては陽性および陰性検体ともに多くの検体で高い抗体価を示した(図 3)。一方、Native 2S、rSesi 1 では多くの陽性検体について高い抗体価を示したが、陰性検体では低い値を示す検体も多く見られた。rSesi 2 については、陰性検体で高い値を示すものは Native 2S や rSesi 1 よりも少なかった。臨床的性能の比較においても rSesi 1 および rSesi 2 が感度および特異度ともに優れた値を示した。ソバにおいては 23 検体の血清を用いて評価を行った。ゴマと同様に Native 11S は陽性および陰性検体ともに高い値を示した。それに対して 2S アルブミンである rFage 2-16k および rFage 2-10k では、陰性検体で低い値を示し、陽性検体では高い値を示すものが見られた。これらのコンポーネントは臨床的性能においても高い特異度を示した。

図3 ゴマ アレルゲンコンポーネント ELISA data

	ゴマ陽性	Native 11S	Native 7S	Native 2S	rSesi 1	rSesi 2	rSesi LTP1	rSesi LTP2
P1	5.21陽性	7.18	1.70	8.15	3.55	4.03	1.83	0.09
P2	9.45陽性	6.15	4.72	21.71	14.20	0.25	0.12	1.87
P3	11.6陽性	5.09	5.72	23.10	21.69	0.27	1.68	0.13
P4	14.1陽性	11.77	13.04	35.14	20.95	0.48	0.07	0.09
P5	14.7陽性	25.43	16.60	22.19	15.12	1.82	0.11	0.12
P6	22.7陽性	7.28	9.04	46.50	48.68	0.49	0.08	0.09
P7	32陽性	26.76	8.46	42.44	33.16	31.07	0.08	0.09
P8	40.4陽性	9.69	5.59	15.45	6.34	0.16	0.33	0.21
P9	55.3陽性	12.35	25.14	24.01	2.85	15.27	0.16	0.26
P10	62.7陽性	22.44	35.82	53.04	55.52	0.80	0.85	0.72
P11	101陽性	60.54	22.55	48.78	44.27	1.39	0.44	0.40
P12	725陽性	81.26	48.20	64.25	76.02	74.72	0.10	0.21
N1	1.06陰性	0.10	2.33	0.07	0.08	0.07	0.06	0.08
N2	3.05陰性	2.41	1.97	9.01	7.77	0.09	0.18	0.15
N3	4.12陰性	6.39	0.47	0.21	0.08	0.08	0.07	0.09
N4	10.8陰性	12.83	1.23	1.04	0.14	0.15	0.18	0.27
N5	12.3陰性	14.94	0.69	0.16	0.12	0.16	0.17	0.12
N6	17.2陰性	0.53	7.70	2.14	0.08	0.82	0.08	0.11
N7	21.7陰性	21.37	6.52	19.15	13.44	0.27	0.12	0.10
N8	51.8陰性	40.27	9.97	45.70	31.09	0.36	0.36	0.30

class 1以下(<0.7) class 2(0.7-3.5) class 3(3.5-17.5)
class 4(17.5-50) class 5(>50)

D. 考察

臨床的に正確に診断がなされている患者血清を用いてゴマおよびソバのコンポーネントを評価した結果、ゴマおよびソバともに 2S アルブミンが臨床診断に有効である可能性が示唆された。今後、他のコンポーネントを含めて包括的に各コンポーネントの評価を行うとともに、ゴマおよびソバの 2S アルブミンについては多施設での臨床診断における評価を行う。

E. 結論

ゴマおよびソバの 2S アルブミンが臨床診断に有効なコンポーネントである可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebisawa M, Movérare M, Sato S, Maruyama N, Borres PM, Komata T: Measurement of Ara h 1, 2 and 3-specific IgE antibodies are useful in diagnosis of peanut allergy in Japanese children, *Pediatric Allergy and Immunol.* 2012;23:573-581
- 2) Cabanos C, Katayama H, Urabe H, Kuwata C, Murota Y, Abe T, Okumoto Y, Maruyama N: Heavy-ion beam irradiation is an effective technique to reduce major allergens in peanut seeds. *Molecular Breeding*, 2012;30: 1037-1044
- 3) Takahashi H, Matsuo H, Chinuki Y, Kohno K, Tanaka A, Maruyama N, Morita E: Recombinant high molecular weight-glutenin subunit-specific IgE detection is useful in identifying wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis complementary to recombinant omega-5 gliadin-specific IgE test. *Clin. Exp. Allergy*, 2012; 42:1293-1298
- 4) Tandang-Silvas, MR, Cabanos C, Carrasco-Pena L, Barba de la Rosa AP, Osuna-Castro JA, Utsumi S, Mikami B, Maruyama N: Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglubulin, from *Amaranthus hypochondriacus*: Insight into its physico-chemical properties, *Food Chem.* 012;135:819-826

2. 学会発表

- 1) 丸山 伸之: ダイズ種子タンパク質の構造と品質, 第 6 回ダイズ研究会. 佐賀 2012. 9. 20
- 2) 丸山 伸之: 種子貯蔵タンパク質を利用した疾病を予防する作物の開発, 第 12 回けいはんな地区植物科学懇談会. 奈良 2012. 11. 29
- 3) 平松 紘実, 坪内 文音, Cerrone Cabanos, 桑田 主税, 平野 智也, 阿部 知子, 奥本 裕, 裏出 令子, 丸山 伸之: 落花生種子貯蔵タンパク質 Ara h 3 の分子構造と特性の解析, 第 122 回 秋季日本育種学会. 京都 2012. 9. 15

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝子多型を用いた病態解析 —食物アレルギーの疾患感受性遺伝子解析—

研究分担者 玉利 真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・呼吸器疾患研究チーム チームリーダー
研究協力者 広田 朝光 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・呼吸器疾患研究チーム研究員

研究要旨

本研究は遺伝子多型解析により食物アレルギーの発症に関連する遺伝子群を同定し病態の科学的な解明を目指すものである。近年、食物アレルギーにおいて経皮感作の重要性が注目されている。今回、我々はピーナッツアレルギーとの関連が報告されているフィラグリン遺伝子変異について検討した。人種によりフィラグリン遺伝子上の頻度の高い変異部位は異なるが、今回、日本人においてフィラグリン遺伝子上の機能喪失変異 (S2889X) と食物アレルギー発症との間に有意な関連を認めた ($P=0.0042$)。この変異 (S2889X) については日本人においてアトピー性皮膚炎発症との関連がすでに報告されている。今後、独立した他集団において結果の検証が待たれる。

A. 研究目的

食物アレルギーは食物に対する抗原特異的な免疫学的機序を介し生体に不利益な症状が惹起される現象であり、食物アレルギー患者は高率にアトピー性皮膚炎を合併する。近年、アトピー性皮膚炎においてフィラグリン遺伝子変異が発見され、様々なアレルギー疾患においてフィラグリン遺伝子の変異や多型がそれらの遺伝要因として重要であることが示されている。本研究は食物アレルギー患者において、フィラグリン遺伝子変異の有無を検討し、食物アレルギーの機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。

B. 研究方法

食物アレルギー患者 532 名、非食物アレルギー患者 234 名について、これまで報告されているフィラグリン遺伝子の 8 つの変異 (R501X, 3321delA, S1695X, Q1701X, S2554X, S2889X, S3296X, K4022X) について症例対照関連解析を行なった。さらに食物アレルギー患者をアトピー性皮膚炎合併症例 (338 例)、気管支喘息合併症例 (180 例)、そしてアナフィラキシー合併症例 (218 例) に絞り込み、症例対照関連解析を行なった。タイピングは TaqMan 法および Invader 法を用いて行い、関連解析は Fisher's exact test (Allelic model) の手法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を

行っている。

C. 研究結果

フィラグリン遺伝子上の 7 つの変異 (R501X, 3321delA, S1695X, Q1701X, S2554X, S3296X, K4022X) において変異の頻度に統計学的有意差は認めなかった。S2889X については食物アレルギー疾患群での頻度は 0.033、コントロール群における頻度は 0.009 であり、変異の頻度に統計学的有意差 ($P=0.0042$, OR 3.94, 95%CI, 1.39-11.15) を認めた。さらに臨床情報に基づき食物アレルギー症例の絞り込みを行なったところ、アトピー性皮膚炎合併症例、気管支喘息合併症例、そしてアナフィラキシー合併症例における S2889X の変異アレルの頻度はそれぞれ 0.038, 0.039, 0.039 であり、コントロール群の頻度 (0.009) より高く、統計学的有意差を認めた (それぞれ、 $P=0.0020$, $P=0.0037$, $P=0.0032$)。

D. 考察

フィラグリンは角層細胞の細胞質内でケラチンを凝集させ、上層に移動すると天然保湿因子として働き皮膚バリア機能に重要な役割を果たす。皮膚バリア障害が起ると、食物アレルゲンが皮膚から侵入しやすくなり、皮膚で感作が成立しやすくなると考えられている。近年、ピーナッツアレルギーにおいて、カナダおよびヨーロッパにおいて頻度の高いフィラグリンの機能喪失変異 (カナダでは R501X, 2282del14, R2447X, S3247X ; ヨーロッパでは R501X, 2282del14) とピーナッツアレルギーとの関連が検討され、発症との有意な関連

が報告されている。人種によりフィラグリン遺伝子上の頻度の高い変異部位は異なるが、今回、日本人においてフィラグリン遺伝子上の機能喪失変異 (S2889X) と食物アレルギー発症との間に有意な関連を認めた。この変異 (S2889X) については日本人においてアトピー性皮膚炎発症との関連がすでに報告されている。今後、日本人において独立した他の集団においてこれらの結果の検証が待たれる。

E. 結論

日本人において、フィラグリン遺伝子の機能喪失変異 (S2889X) と食物アレルギー発症との関連が示された。日本人においてアトピー性皮膚炎と食物アレルギーに共通するフィラグリン遺伝子変異が存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinose D, Ogawa E, Hirota T, Ito I, Kudo M, Haruna A, Marumo S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Sakai H, Date H, Tamari M, Mishima M. A NOD2 gene polymorphism is associated with the prevalence and severity of chronic obstructive pulmonary disease in a Japanese population. *Respirology*. 2012;17:164-171.
- 2) Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Ezaki H, Takeuchi S, Furue M, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M. Variants of C-C motif Chemokine 22 (CCL22) are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. *PLoS One* 2011;6:e26987.
- 3) Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, His E, Hank Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M. ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One* 2012;7:e29387.
- 4) Himes BE, Jiang X, Hu R, Wu AC, Lasky-Su JA, Klanderman BJ, Ziniti J, Senter-Sylvia J, Lima JJ, Irvin CG, Peters SP, Meyers DA, Bleecker ER, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Szeffler SJ, Lemanske RF Jr, Zeiger RS, Strunk RC, Martinez FD, Hanrahan JP, Koppelman GH, Postma DS, Nieuwenhuis MA, Vonk JM, Panettieri RA Jr, Markezich A, Israel E, Carey VJ, Tantisira KG, Litonjua AA, Lu Q, Weiss ST. Genome-wide association analysis in asthma subjects identifies SPATS2L as a novel bronchodilator response gene. *PLoS Genet*. 2012 ;8:e1002824.
- 5) Yamaide F, Undarmaa S, Mashimo Y, Shimojo N, Arima T, Morita Y, Hirota T, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Sato K, Suzuki S, Nishimuta T, Watanabe H, Hoshioka A, Tomiita M, Yamaide A, Watanabe M, Okamoto Y, Kohno Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Association Study of Matrix Metalloproteinase-12 Gene Polymorphisms and Asthma in a Japanese Population. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;160:287-296.
- 6) Kumasaka N, Aoki M, Okada Y, Takahashi A, Ozaki K, Mushiroda T, Hirota T, Tamari M, Tanaka T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M. Haplotypes with Copy Number and Single Nucleotide Polymorphisms in CYP2A6 Locus Are Associated with Smoking Quantity in a Japanese Population. *PLoS One*. 2012;7:e44507.
- 7) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012;44:1222-1226.
- 8) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.
- 9) Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphopoietin genotype. *Allergol Int*. 2013 in press.
- 10) 田中翔太, 富田かおり, 広田朝光, 玉利真由美: 特集, 呼吸器病学 TOPICS 2012 2. アレルギー・免疫・炎症. 呼吸器疾患と自然免疫, 16:34-36, 2012.
- 11) 広田朝光, 富田かおり, 田中翔太, 玉利真由美: 遺伝・ゲノム学 日本人成人気管支喘息のゲノムワイド関連解析. 医学のあゆみ, 240:535-537, 2012.
- 12) 玉利真由美, 広田朝光: 遺伝子解析から考えるアレルギー疾患の治療戦略—アレルギー疾患は克服できるか?. 日本医事新報, 4592:81-85, 2012.
- 13) 広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: 解説(基礎) GWAS による疾患遺伝子の解明. 呼吸, 31(7):605-611, 2012.
- 14) 玉利真由美, 田中翔太, 広田朝光: 特集 多遺伝子疾患 呼吸器疾患のゲノムワイド関連解析. *BioClinica*, 27 (11) :1044-1048, 2012.

2. 学会発表

- 1) アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析. 第 85 回日本薬理学会年会, シンポジウム, アレルギー疾患の分子機構の新展開, 2012, 京都. 玉利真由美
- 2) Recent progress in the Pathogenesis and treatment of asthma Genetic factors for adult asthma and asthma severity. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, International symposium 3, 2012, 兵庫. 玉利真由美
- 3) 呼吸器疾患のゲノムワイド関連解析. 第 40 回箱根呼吸討論会, 呼吸器病学における新しいパラダイム New paradigm in the study of respiratory medicine, 2012, 滋賀. 玉利真由美
- 4) 好塩基球と皮膚アレルギー疾患 ゲノムワイド関連解析(GWAS)によるアレルギー関連遺伝子の同定と好塩基球. 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会総会学術大会, 2012, 長野. 玉利真由美
- 5) Genetic and Environmental Factors in Allergic Disorders Genome wide association study of aspirin-intolerant asthma in the Japanese population. 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, 2012, 韓国済州島. Mayumi Tamari
- 6) アレルギーの病態解析の現況—気管支喘息とアトピー性皮膚炎を中心に—, 東大医科研勉強会, 2012, 東京. 玉利真由美

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

一塩基多型に基づくアトピー性皮膚炎の検査方法 (アトピー性皮膚炎の罹患リスク検査方法)

2013. 8. 31

玉利真由美、広田朝光、久保充明 理化学研究所
特願 2012-192247

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし