

201322021A

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 免疫アレルギー研究分野)

小児期の食物アレルギーの新しい診断法・管理法の確立と  
治療法の開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 海老澤 元宏

平成26(2014)年4月

—目次—

はじめに

I. 総括研究報告書

小児期の食物アレルギーの新しい診断法・管理法の確立と治療法の開発に関する研究  
海老澤 元宏..... 1

II. 分担研究報告

1. 食物アレルギーの診断と積極的治療に関する研究  
— 1. 急速経口免疫（減感作）療法の有効性と問題点の検討—..... 5  
— 2. 急速経口免疫（減感作）療法の作用機序の解明—..... 9  
海老澤 元宏

2. 経口免疫療法の応答性の遺伝子レベルでの解析  
松本 健治..... 12

3. 外来緩徐経口免疫療法（含む多施設経口免疫療法）の研究  
今井 孝成..... 16

4. 診断・治療の標準化に関する研究  
伊藤 浩明..... 20

5. 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  
近藤 直実..... 23

6. 低アレルゲン化食品による経口免疫療法の確立  
宇理須 厚雄..... 27

7. アレルゲンコンポーネントを用いた新規診断法の開発  
丸山 伸之..... 30

8. 食物アレルギーの疾患感受性遺伝子解析  
玉利 真由美..... 33

9. 食物アレルギーに対する新規免疫療法開発に関する研究  
藤澤 隆夫..... 36

はじめに

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 免疫アレルギー研究分野）「小児期の食物アレルギーの新しい診断法・管理法の確立と治療法の開発に関する研究」の3年計画の2年目にあたる平成25年度の報告書を研究分担者・研究協力者の先生方のご協力のもとにここにまとめることができた。

今年度から国内多施設共同研究として鶏卵・牛乳アレルギーに対する急速法での経口免疫療法（Oral immunotherapy: OIT）研究を主導されてこられた藤澤隆夫先生にご参加いただき、9名体制となった。相模原病院単独で行ってきた急速OITの長期成績と合わせてデータを解析し情報発信する責務があると受け止めている。いずれのグループのデータにおいても重篤な牛乳アレルギーに対する急速法でのOITは困難を伴い、相模原病院では目標量を大幅に下げた少量導入療法、藤澤先生は経皮免疫療法による新しいアプローチに取り組んでいる。さらに近藤先生はカゼインを免疫学的に改変したペプチドを用いて、宇理須先生は加水分解した低アレルゲン化ミルクを用いて重症牛乳アレルギーに対する治療に挑戦している。本研究班では研究テーマとして挙げたように“小児期の食物アレルギーの新しい診断法・管理法の確立と治療法の開発”を行うことを目的とし、診断と治療に関する多施設共同研究もデータが得られている。軽症から中等症を対象に緩徐法の国内9施設による鶏卵・牛乳・小麦の症例数は合計でOIT群96名（鶏卵48名、牛乳25名、小麦23名）、無介入群9名（鶏卵6名、牛乳2名、小麦1名）が解析対象として登録された。また、ゴマとソバのコンポーネントに関しても研究班の基礎と臨床がタイアップし、有用なコンポーネントを見つけることができた。最終年度に向け班研究で得られた情報の発信を進めていきたいと考えている。

平成25年度研究報告書を刊行するにあたり、研究分担者・研究協力者の皆様のご尽力に心より感謝する次第である。

平成26年4月

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長 海老澤 元宏

# I . 総括研究報告書

## 小児期の食物アレルギーの新しい診断法・管理法の確立と治療法の開発に関する研究

研究代表者 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長

### 研究要旨

食物アレルギーの治療法として前研究班から継続検討している経口免疫療法 (Oral Immunotherapy: OIT) で患者の多くは脱感作状態 (連日経口摂取していれば無症状) に誘導できるが、その安全性と有効性に関しては長期にわたる検証が必要である。H25 年度までに相模原病院単独でアナフィラキシーを呈する 327 名 (急速法: 鶏卵 87、牛乳 119、小麦 44、ピーナッツ 31、少量導入法: 鶏卵 13、牛乳 15、小麦 9、ピーナッツ 9) に OIT を実施し長期経過をフォロー中である。今年度から鶏卵と牛乳の急速法の国内多施設研究 (藤澤分担研究者) も当研究班に加わった。いずれの結果でも摂取出来ていれば脱感作状態に 8 割程度到達したが、牛乳では副作用に頻度が高く、1~2 年での耐性化率は高いとは言えなかった。OIT のメカニズムの検討では 2 週間摂取を中断しての確認試験やメディエーターの測定結果等よりマスト細胞・好塩基球の脱感作機構と制御性 T 細胞の誘導に伴う液性因子の変化 (IgE 抗体の低下と IgG4 抗体の上昇) が主と考えられた。重症例 (特に牛乳) に対するアナフィラキシー対策として短期間に目標量まで到達させる急速 OIT は患者に摂取や副作用の負担がかかり将来の OIT の選択肢とは考え難いので、相模原病院では急速法の問題点を改良した少量導入法を開始し、藤澤らは経皮免疫療法に関する検討も動物実験からデバイスを開発しヒトにおいて検討予定である。少量導入法 (目標量設定を下げ、加熱卵 3/128 個、牛乳 3ml、小麦 (うどん換算) 2g、ピーナッツ 0.5g) の 26 名 (鶏卵 6、牛乳 12、小麦 3、ピーナッツ 5) のエントリーを終了し経過観察中であるが、急速法に比較して安全性とコンプライアンスが著しく改善した。中等症以下の症例に対し有効で安全な OIT 手技を検証する為に外来で実施する緩徐 OIT (対象 3 歳以上、鶏卵・牛乳・小麦、目標量設定 100%・25% の 2 群) の多施設検討 (全国 9 施設) では、OIT 群 96 名 (鶏卵 48、牛乳 25、小麦 23)、無介入群 9 名 (鶏卵 6、牛乳 2、小麦 1) をエントリーした。次年度には結果の概要を報告可能と考えている。OIT との境界を明らかにすることが難しいが、食物経口負荷試験後の食事指導で摂取量を安全に増やせることも示された。免疫学的修飾 (乳カゼイン) ・アレルギー性低減食品 (鶏卵・乳・魚) を用いた OIT も進行中で、遺伝的背景を理研との共同研究にて GWAS により発症リスク、重症化リスクの遺伝子多型 (IL13 等) を解析中である。アレルギーコンポーネントを利用した新規診断技術の開発も多施設共同研究でゴマとソバに関して優れたコンポーネントが見つかった。

### 研究分担者

近藤 直実	岐阜大学名誉教授/平成医療短期大学学長
宇理須 厚雄	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科 教授
伊藤 浩明	あいち小児保健医療総合センター 内科部長
今井 孝成	昭和大学医学部小児科 講師
玉利 真由美	理化学研究所ゲノム医科学研究センター チームリーダー
松本 健治	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部 部長
丸山 伸之	京都大学大学院 農学研究科 准教授
藤澤 隆夫	国立病院機構三重病院 副院長

### A. 研究目的

小児の食物アレルギーの約 9 割は 1 歳未満に発症し、乳児の有病率は約 10%弱、幼児は約 5%、学童は約 2%に収斂する。小児の食物アレルギーは患者数も成人 (1%未満) に比べ圧倒的に多く、生活の質の悪化を招き、健全な発達や社会生活の障

害になる。小児の食物アレルギーの発症を抑え、アナフィラキシー (An) への進展等の重症化を防ぎ、自然寛解を加速させる対応が求められている。本研究班では研究テーマとして挙げたように“小児期の食物アレルギーの新しい診断法・管理法の確立と治療法の開発”を行うことを目的とし、3 年間で診断と治療に関する多施設共同研究も実施する。

B. 研究方法, C. 研究結果, D. 考察

◆新しい診断法・管理法の確立と治療法の開発に関する研究 (海老澤)

— 1. 急速 OIT の有効性と問題点の検討 —

An を起こす重症な食物アレルギー児への急速 OIT の有効性と問題点を検討し、重症例に対するより安全な OIT の開発を行った。事前の経口負荷

試験 (Oral food challenge: OFC) にて強い全身症状を呈した 5 歳以上の重症児を対象とした。OIT は入院管理で導入し、外来でフォローした。実施 OIT の方法は二通りで 2013 年 3 月までは急速法 (目標量設定は、鶏卵は加熱卵 1 個、牛乳は牛乳 200ml、小麦はうどん 200g またはパン 1 枚、ピーナッツは 3g)、同年 7 月からは急速法の問題点を改良した少量導入法 (目標量設定を低く、鶏卵: 加熱卵 3/128 個、牛乳: 牛乳 3ml、小麦: うどん 2g、ピーナッツ: ピーナッツ 0.5g) で施行している。2014 年 3 月までの OIT 施行患者数は合計 327 名 (急速法: 鶏卵 87 名、牛乳 119 名、小麦 44 名、ピーナッツ 31 名、少量導入法 (46 名): 鶏卵 13 名、牛乳 15 名、小麦 9 名、ピーナッツ 9 名) に達した。急速法では急速法中に 5 名、外来フォロー中に 13 名が治療中止となっている。2013 年 7 月から新たに開始した少量導入療法での入院中の中等症以上の症状誘発率 (%) は鶏卵 20.0、牛乳 19.5、小麦 21.4、ピーナッツ 8 で、アドレナリン使用例はなく、入院中に目標量に到達した症例 (%) は、鶏卵 25、牛乳 42.3、小麦 33.3、ピーナッツ 100、2 ヶ月後にはそれぞれ 50、58.3、33.3、100 が、6 ヶ月後にはそれぞれ 50、58.3、66.6、100 であった。外来フォロー中に中等症以上の症状出現はほとんど認めず、アドレナリンの投与は牛乳摂取後の運動により 1 例のみ認めた。少量導入療法は入院中の誘発症状は従来と変わらなかったが、外来での誘発症状は軽微な症状が多く従来の急速法に比べ安全性が著しく改善した。An を起こす重症児に対する OIT は、多くの症例で継続摂取出来れば脱感作状態へ誘導可能だが、目標量を最初から高く設定するのではなく導入開始 1 年間の目標量設定を大幅に下げることによって安全性・コンプライアンスが改善した。

## — 2. 急速 OIT の作用機序の解明 —

OIT の作用機序解明を目的として OIT を施行患者を対象に、皮膚テスト (SPT)、末梢血好酸球数、血清総 IgE 値、抗原特異的 IgE 値、IgG、IgG4 値、好塩基球ヒスタミン遊離試験 (HRT)、好塩基球 CD203c 発現量の測定を経時的に行った。一部の患者では、好塩基球の反応抑制と OIT 患者血漿成分の影響について検討した。

急速法: OIT 開始後 4 年以上経過した 46 名 (鶏卵 17、牛乳 29)、2 年以上経過した 31 名 (小麦 19、ピーナッツ 12) について抗原特異的 IgE 値の変化を解析した。抗原特異的 IgE 値は卵白では 1 年後に約 1/3、4 年後に 1/4、ミルクでは約 1/2

→1/4 と卵白・ミルクともに経年的に低下した。小麦・ピーナッツでは、OIT 開始後一過性に特異的 IgE 値は上昇したがその後低下に転じ、2 年後に小麦では約 1/2、ピーナッツでは約 1/5 に低下した。また、OIT 開始 1 年半後までに 2 週間摂取を止めた後の OFC で耐性化と判断された群 (耐性化群) では非耐性化群と比し、治療開始前の卵白・オボムコイド・ミルク・カゼイン特異的 IgE 値は有意に低かったが、小麦・ω5 グリアジン・ピーナッツではそのような結果を認めなかった。少量導入法: 2013 年夏に少量導入法を施行した 25 名 (鶏卵 5 名、牛乳 12 名、小麦 3 名、ピーナッツ 5 名) では、卵白・ミルク特異的 IgE 値は 1 ヶ月後に一時的に上昇した後に低下に転じ、好塩基球の CD203c 発現量は 1 ヶ月後にミルク刺激のみ有意に低下を認めた。

好塩基球の反応抑制と血漿成分の影響: 急速 OIT 開始後 12 ヶ月での CD203c 発現量は、IgG 除去血漿を添加した群では IgG 含有血漿より高値で、抑制性に働く液性因子の関与が示唆された。

昨年度までの検討と今回の結果より、急速法による OIT では、急速期にはマスト細胞や末梢血好塩基球の活性化抑制 (脱感作) が起こり、末梢血好塩基球の活性化抑制には血漿中の抗原特異的 IgG4 抗体関与の可能性も示唆された。OIT 継続により抗原特異的 IgE 値の長期間にわたる持続的な低下が誘導され IgG4 の上昇も認められるが、2 週間の治療中断により再び症状が誘発される症例が多いことから、そのような症例ではマスト細胞・抗塩基球レベルの脱感作機序により症状誘発が抑制されている可能性が考えられる。

## ◆急速 OIT の応答性の遺伝子レベルでの解析 (松本)

OIT の有効性を、治療開始前に見分けるマーカーとなる分子を探索する事を目的として OIT 施行前に末梢血単核細胞を採取し、特異抗原刺激によって末梢血単核細胞分画に発現する分子群を Microarray にて網羅的に検索し、OIT 有効例と無効例の遺伝子発現の差を検討した。国立相模原病院での OIT 開始 6 ヶ月後の経過から、A 群 (11 症例) は急速相でも維持相でも全く問題なく増量可、B 群 (16 症例) は急速相は問題なかったが維持相で負荷量低下、C 群 (10 症例) は急速相で上げられなかったが維持相で目標到達、D 群 (6 症例) は急速相でも緩徐法でも上げられなかった (脱落を除いた有効率 74.4%)。抗原刺激後 120 時間目の検体を用いて、A 群全員が上昇し、D 群であまり上昇しない 7 遺伝子が抽出された。今回

抽出された遺伝子群の中に OIT の有効性を事前に予測する事ができるマーカーが含まれている可能性が期待される。今後は症例数を増やして同様の検討をすると共に、qPCR による遺伝子発現量の確認、卵による傾向減感作療法例での再現性の検討などを行い、さらにこれらの分子群の機能解析を順次行う予定である。

#### ◆緩徐 OIT と栄養指導に関する研究 (今井)

##### 【緩徐 OIT 長期結果】

事前の OFC で明らかな症状を認めた鶏卵、牛乳、小麦の中等症以下の食物アレルギー児に対し、無介入群を設け外来診療における緩徐 OIT の効果を検討した。2012 年末までに緩徐 OIT の適応とした児は 265 名(鶏卵 103、牛乳 85、小麦 77)で、うち 194 名(鶏卵 75、牛乳 64、小麦 55)に緩徐 OIT を実施した。一方、無介入群 71 名(鶏卵 28、牛乳 21、小麦 22)は自然経過での経年耐性獲得を評価した。OIT 群の目標量到達率(%)は、開始 1 年で鶏卵 85.3、牛乳 73.4、小麦 85.5 で、2 年でそれぞれ 83.0、66.7、91.8 であった。確認試験による耐性獲得率(%)は、開始 1 年で鶏卵 61.3、牛乳 25.0、小麦 49.1、2 年でそれぞれ 73.6、54.2、64.8 であった。また、OIT 終了後に長期経過を追跡した 91 名(鶏卵 42、牛乳 26、小麦 23)では、終了後平均 6.4 ヶ月後に 86.8%が園・学校の解除、残り 13.2%が自宅解除であった。中等症以下の症例に対する緩徐 OIT は、多くの症例で概ね安全に脱感作状態へ誘導可能で、誤食対策・寛解促進手段として有効と考えられた。しかし、脱感作に至った症例のうち一部は耐性を獲得しておらず、年単位の治療期間を要していた。抗原別では、牛乳 OIT 中の症状誘発率が他より高く、耐性獲得に関しては小麦の OIT 群が対照群と比較して有意に高率であった。

##### 【多施設共同研究】

上記の経験に基づき、2013 年 1 月より緩徐 OIT を多施設共同研究(全国 9 施設)として開始し、2014 年 3 月末までに、OIT 群 96 名(鶏卵 48、牛乳 25、小麦 23)、無介入群 9 名(鶏卵 6、牛乳 2、小麦 1)が登録され経過をフォロー中で H26 年度報告書に概要を報告予定である。エンドポイントとして OIT 目標量(25%群 vs100%群)と耐性獲得率を関連付けて解析することで、OIT における用量依存性を検討する。

#### ◆診断・治療の標準化に関する研究 (伊藤)

食物アレルギーの除去解除を進めるための食事指導の方法について検討した。鶏卵(ゆで卵白)、

牛乳、小麦(うどん)OFC の結果に基づいて、最終負荷量と症状グレードから摂取開始量を設定した。指示量を家庭で継続的に摂取し、5~10 回無症状が確認できれば 10~20%ずつ増量した。摂取できた到達量に従って、それを越えない範囲で加工食品や様々な料理への応用を許可した。ゆで卵白、牛乳、うどんを 2g、5g、10g から摂取開始した 106 人を対象として指導を行い、1 年後の摂取到達量を評価した。その結果、鶏卵では 33 人(87%)が 1/4 個以上、牛乳は 11 人(35.5%)が 50ml 以上、うどんは 15 人(42.9%)が 100g 以上摂取まで到達していた。経過中には軽微な蕁麻疹や口周囲の紅斑、軽い咳などが認められていたが、緊急に病院を受診した者は体調不良時や摂取量を逸脱した場合を除いては認めなかった。この指導を受けた対象者は、本法を開始する前に食事指導を行ったコントロール群と比べても早期の解除が進んでいることが確認された。

#### ◆免疫学的改変食品による治療法の確立 (近藤)

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予防と新規治療開発を独創的に進める。今年度は、OIT のうち、牛乳アレルギーに対するカゼインの抗原改変食品(抗原エプ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た。参加を表明した 9 人のうち 7 人に抗原改変食品を用いた OIT を実施し、6 人で一定期間後にカゼインの閾値の上昇が確認でき、5 人が最大量の抗原改変食品を摂取できたため、ミルクに変更して継続している。さらに、その OIT 中の免疫学的因子の変化についても追跡し、一定の結果を得た。

#### ◆低アレルゲン化食品による治療法の確立 (宇理須)

低アレルゲン化食品を用いた OIT 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、アトピー性皮膚炎乳幼児 51 例を対象にオボムコイド減量ベビーフードによる OFC を行って、オボムコイド減量加熱鶏卵のハイリスク乳児における安全性を確認した。結果は、48 例(94%)が陰性で、陽性は 3 例(6%)であったが、陽性例はいずれも顔面に紅斑が 1 個出現したのみと軽症であり、3 か月以内の再検により陰性化を確認している。

牛乳アレルギーに対しては、現在 8 例を対象として、加水分解乳(E 赤ちゃん)を用いた OIT を続行中である。安全性は確認され、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、4例が5-12か月の継続摂取により、目標量の魚肉20g摂取に到達している。うち2例では酵素処理サケエキスをを用いた免疫療法により、アジの耐性も獲得しており、特筆される。低アレルゲン化食品を用いたOITの改良を試み安全性を確認したが、症例数や観察期間が少なく更なる検討が必要である。

#### ◆アレルゲンコンポーネントを用いた新規診断法の開発（丸山）

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ゲンについて、臨床診断におけるアレルゲンのコンポーネントに対する評価を多施設で実施し、新規診断法を開発する。本年度は、ゴマおよびソバのコンポーネントについてOFCにて診断がなされている患者血清を用いて評価を行った。ゴマについては種子より調製したコンポーネントの中で2Sアルブミンが負荷試験陽性群において陰性群よりも有意に高い特異的IgE値を示した。さらに、2SアルブミンのSes i 1のリコンビナントコンポーネントに対する特異的IgE値をストレプトアビジンCAP法により解析し、臨床診断において有効なコンポーネントである可能性を示した。ソバについても各種クロマトグラフィーを用いた分画物について解析を進めることにより、診断に有効なコンポーネントを絞り込むことができた。

#### ◆遺伝子多型を用いた病態解析（玉利）

食物アレルギー発症の科学的な病態解明を目的とし、遺伝子多型を用いた関連解析を行った。IL13を含む領域はゲノムワイド関連解析(GWAS)により気管支喘息およびアトピー性皮膚炎との強い関連(ゲノムワイド関連水準  $P < 5 \times 10^{-5}$ を満たす)が報告されている。本研究では食物アレルギー患者603名、対象938名について、IL13遺伝子多型(rs1295686)について関連解析を行ない、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(340例)、気管支喘息合併症例(182例)に絞り込み、関連解析を行なった。その結果、食物アレルギー発症との強い関連( $P = 4.7 \times 10^{-5}$ )。さらにアトピー性皮膚炎合併食物アレルギー( $P = 2.5 \times 10^{-5}$ )、気管支喘息合併食物アレルギー( $P = 8.1 \times 10^{-6}$ )においても強い関連を認めた。IL13の遺伝子多型はアレルギーマーチの病態形成に

関連する可能性が示唆された。

#### ◆食物アレルギーに対する新規免疫療法開発に関する研究（藤澤）

鶏卵および牛乳に対するランダム化比較試験によるOITの長期経過を解析し、そこから得られた課題に基づき、新規免疫療法開発に着手した。まず、OITの長期経過では、鶏卵は維持2年後に加熱卵1個以上の摂取ができている例は67.5%であり、多くは副反応なく一定の有効性は示された。牛乳は、維持2ヶ月の時点で副反応により維持量の減量が必要となった症例が多く、1年で200mlを維持できていたのは45%であった。維持1年後の除去後負荷試験の結果では閾値の低下がみられなかったのは27%しか存在せず、副反応への対策が必要であるとともに、真の耐性獲得には課題が残った。効果と安全性を高めることを目的に、KW乳酸菌3110株の摂取を牛乳の免疫療法に併用したOITを施行したが、試験を終了した9名の結果からは、安全性は証明されたが症状誘発閾値の変化率や維持期の副反応回数などに対する有効性は確認できなかった。新規免疫療法としてTGF- $\beta$ と経皮免疫療法に着目した。TGF- $\beta$ 高含有食品を開発し、プラセボとともに補助食品としての安全性を確認した。経皮免疫療法については、牛乳蛋白濃縮物を添加した親水性ゲルパッチを作成し、免疫誘導能をマウスモデルで検討した。ヒトにおいてはまずオープン法にて経皮免疫療法を開始し有効性と安全性への検討を行っている。

#### E. 結論

食物アレルギーの初期対応、管理、診断、治療に関する各分担研究は2年目も予定通り研究成果を得ることができた。多施設共同研究(緩徐OIT・アレルゲンコンポーネントを用いた新規診断法)に関しても症例のエントリーは終了し結果が出始めている。最終年度に研究成果を取り込んで“食物アレルギーの診療の手引き2014”として改訂することに向けて取り組んでいきたい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 分担研究報告書 参照

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし



## II. 分担研究報告

## 食物アレルギーの診断と積極的治療に関する研究

### — 1. 急速経口免疫（減感作）療法の有効性と問題点の検討 —

研究分担者 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長  
研究協力者 柳田 紀之 国立病院機構相模原病院 小児科  
飯倉 克人 国立病院機構相模原病院 小児科  
江村 重仁 国立病院機構相模原病院 小児科  
永倉 顕一 国立病院機構相模原病院 小児科  
佐藤 さくら 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

#### 研究要旨

【目的】食物アナフィラキシー(An)児への急速経口免疫療法(Rush OIT)の有効性と問題点を検討する。重症例に対するより安全な免疫療法を検討する。

【方法】<対象>事前の経口負荷試験にて強い全身症状を呈した5歳以上の重症食物アレルギー児を対象とした。OITは入院管理で導入しその後外来でフォローした。

2014年3月までのOIT施行患者数は計327名(急速法:鶏卵87名、牛乳119名、小麦44名、ピーナッツ31名、少量導入法:鶏卵13名、牛乳15名、小麦9名、ピーナッツ9名)である。OITの方法は前述のように二つあり2013年3月までは急速法、同年7月からは少量導入法で施行している。<急速法>従来の目標量は、鶏卵は加熱卵1個、牛乳は牛乳200ml、小麦はうどん200gまたはパン1枚、ピーナッツは3gとした。確認試験(2週間の抗原の完全除去後の負荷試験)を施行し耐性獲得の評価を行った。<少量導入療法>2013年7月から重症例に対して従来よりも少ない目標量(鶏卵:加熱卵3/128個、牛乳:牛乳3ml、小麦:うどん2g、ピーナッツ:ピーナッツ0.5g)に設定した少量導入療法を開始した。

【結果】急速法における中等症以上の症状出現率/アドレナリン投与率は、鶏卵9.6/1.4%、牛乳10.7/1.6%、小麦8.8/0.4%、ピーナッツ2.4/0.8%であった。外来ではそれぞれ、鶏卵1.7/0.1%、牛乳2.6/0.4%、小麦3.2/0.04%、ピーナッツ2.2/0%であった。確認試験による1/2年後の耐性獲得率は、鶏卵33.7/52.3%、牛乳7.7/22.1%、小麦18.2/46.7%、ピーナッツ16.1/66.7%であった。

少量導入療法は2013年夏に鶏卵6名、牛乳12名、小麦3名、ピーナッツ5名の計26名に対して行った。入院中の中等症以上の症状誘発率は鶏卵20.0%、牛乳19.5%、小麦21.4%、ピーナッツ8%で、アドレナリン使用例はなかった。入院中に鶏卵25%、牛乳42.3%、小麦33.3%、ピーナッツ100%が目標量に到達し、2ヵ月後にはそれぞれ50%、58.3%、33.3%、100%が目標量に到達し、6ヵ月後にはそれぞれ50%、58.3%、66.6%、100%であった。外来で中等症以上の症状の出現はほとんどなく、アドレナリンの投与は牛乳摂取後の激しい運動により1例認められた。

【結論】急速法ではOIT開始1年後の耐性獲得率は抗原間に差があり、ピーナッツ、小麦が比較的良好で、牛乳は不良であった。脱(減)感作状態(食べていけば症状が出ない状態)にある患者の管理を慎重に行っていく必要がある。急速法は入院中の誘発症状は従来と変わりなかったが、外来での誘発症状は軽微な症状が多かった。摂取直後の激しい運動により、1例のみアドレナリンの使用があった。遷延する重症食物アレルギー児に対するOITは、多くの症例で減感作状態へ誘導可能であり、An対策の観点からは有効な治療と考えられた。少量導入法は急速法に比べ外来での症状誘発を減らすことができ、より安全に施行可能であった。

#### A. 研究目的

遷延するアナフィラキシー(An)タイプの鶏卵、牛乳、小麦、ピーナッツの食物アレルギー(FA)児に対する急速経口免疫療法(OIT)の有効性、問題点を検証し、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強い全身症状を呈した5歳以上のFA児を対象にした。  
<急速法>

2013年6月までのOITは、急速法(入院5-12日間)と緩徐法(自宅)を組み合わせて行った(図)。入院3日前より抗ヒスタミン薬とロイコトリエン受容体拮抗薬の内服を開始し、入院中は目標量(加熱卵1個、牛乳200ml、うどん200g、ピーナッツ3g)まで誘発症状を参考にしながら、積極的に増量した。自宅では毎日1回の摂取とし、退院時に目標量に到達していない場合には緩徐に増量した。目標量到達後は同量を維持継続し、経過が順調であれば確認試験(2週間の抗原の完全除去後の負荷試験)を施行し、耐性獲得の有無を評価した。

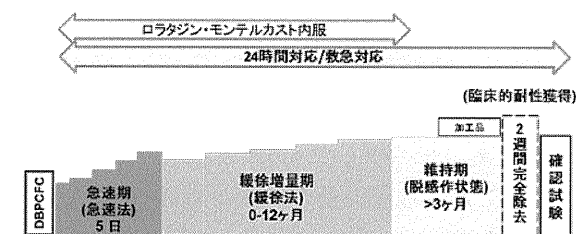
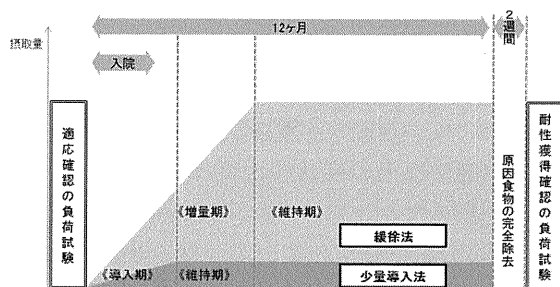


図1 経口免疫療法の方法

#### <少量導入療法>

2013年7月以降のOITは入院の上少量を導入する方法とした(新法)。より重症例に対して従来よりも少ない目標量(鶏卵:加熱卵3/128個、牛乳:牛乳3ml、小麦:うどん2g、ピーナッツ:ピーナッツ0.5g)に設定した少量導入療法を行った。



また、従来急速法で免疫療法を行っていた対象の多くは緩徐法による免疫療法を行った。(多施設免疫療法の頁参照)

急速法・少量導入療法とも自宅での経過に関しては、全員に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

急速法における入院中の中等症以上の症状出現率/アドレナリン投与率は、鶏卵 9.6/1.4%、牛乳 10.7/1.6%、小麦 8.8/0.4%、ピーナッツ 2.4/0.8%であった。外来ではそれぞれ、鶏卵 1.7/0.1%、牛乳 2.6/0.4%、小麦 3.2/0.04%、ピーナッツ 2.2/0%であった。確認試験による1/2年後の耐性獲得率は、鶏卵 33.7/52.3%、牛乳 7.7/22.1%、小麦 18.2/46.7%、ピーナッツ 16.1/66.7%であった。

少量導入療法は鶏卵6名、牛乳12名、小麦3名、ピーナッツ5名の計26名に対して行った。少量導入療法対象患者の背景を表1に示す。また出現症状の重症度の評価法を表2に示す。入院中の中等症以上の症状誘発率は鶏卵20.0%、牛乳19.5%、小麦21.4%、ピーナッツ8%で、アドレナリン使用例はなかった(表3)。入院中に鶏卵25%、牛乳42.3%、小麦33.3%、ピーナッツ100%が目標量に到達し、2ヵ月後にはそれぞれ50%、58.3%、33.3%、100%が目標量に到達し、6ヵ月後にはそれぞれ50%、58.3%、66.6%、100%であった。外来で中等症以上の症状の出現はほとんどなく、アドレナリンの投与は牛乳摂取後の激しい運動により1例認めた。

表1 少量導入療法対象および背景

	鶏卵	牛乳	小麦	ピーナッツ
対象者数(男/女)(名)	6(2/4)	12(6/6)	3(1/2)	5(0/5)
平均年齢(歳)	9.6	8.8	7.6	10.0
原因抗原によるアナフィラキシーの既往(回)	0.5	1.2	1.0	0.6
合併症				
気管支喘息	16.7%	50.0%	33.3%	40.0%
アトピー性皮膚炎	50.0%	50.0%	33.3%	60.0%
抗原特異的IgE値(Ua/ml)	81.2	38.2	386.0	107.2
負荷試験における全身症状誘発閾値(g)	1.2	2.0	1.33	0.4

表2 出現した症状の重症度の評価法

		グレード1	グレード2	グレード3
皮膚症状	紅斑、尋常性、腫疹	部分的	全身性	—
	掻痒	軽い掻痒(自刺内)	強い掻痒(自刺外)	—
粘膜症状	口唇・咽頭腫脹	部分的	顔全体の腫れ	—
	口唇内・咽頭違和感	口、のどのかゆみ、違和感	強い咽頭痛	持続付けられる感覚、嘔声、嘔下困難
消化器症状	腹痛	弱い腹痛	強い腹痛(自刺内)	持続する強い腹痛(自刺外)
	嘔吐、下痢	嘔気、単回の嘔吐、下痢	複数回の嘔吐・下痢	繰り返す嘔吐・便失禁
呼吸器症状	咳嗽、鼻汁、鼻閉、くしゃみ	間欠的な咳嗽、鼻汁、鼻閉、くしゃみ	持続的な咳嗽	持続する強い咳き込み、犬吠様咳嗽
	喘鳴、呼吸困難	—	聴診上の喘鳴、軽い息苦しき	明らかな喘鳴、呼吸困難、チアノーゼ、呼吸停止、SpO2<92%
循環器症状	脈拍、血圧	—	頻脈(+15回/分)、血圧軽度低下、蒼白	不整脈、血圧低下、重度徐脈、心停止
神経症状	意識状態	元気がない	眩暈、軽度頭痛、恐怖感	ぐったり、不穏、失禁、意識消失

表3 少量導入療法  
誘発症状およびアドレナリン投与

	鶏卵	牛乳	小麦	ピーナッツ	
対象者数 (男/女) (名)	6 (2/4)	12 (6/6)	3 (1/2)	5 (0/5)	
中等症以上の症状	入院	20.0%	19.5%	21.4%	8%
	外来	0.2%	0.31%	0.11%	0.1%
アドレナリン投与	入院	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	外来	0.0%	0.005%	0.0%	0.0%

摂取1回当たり

#### D. 考察, E. 結論

急速法ではOIT開始1年後の耐性獲得率は抗原間に差があり、ピーナッツ、小麦が比較的良好で、牛乳は不良であった。脱（減）感作状態（食べていけば症状が出ない状態）にある患者の管理を慎重に行っていく必要がある。少量導入療法は入院中の誘発症状は従来と変わりなかったが、外来での誘発症状は軽微な症状が多かった。摂取直後の激しい運動により、1例のみアドレナリンの使用があったが、それ以外は重篤な症状はなく、外来での中等症異常の症状の出現頻度は急速法の1/10程度と安全であった。重症例に対してはAn対策の観点からは極めて安全な治療と考えられた。少量導入法は急速法に比べ外来での症状誘発を減らすことができ、より安全に施行可能であった。長期経過に関しては今後検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ebisawa M, Brostedt P, Sjölander S, Sato S, Borres MP, Ito K. Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children. J Allergy Clin Immunol. 2013; 132(4): 976-978
- 2) M Ebisawa, S Nishima, H Ohnishi, N Kondo. Pediatric allergy and immunology in Japan. Pediatric Allergy and Immunology 2013; 24(7): 704-14
- 3) Shimizu Y, Kishimura H, Kanno G, Nakamura A, Adachi R, Akiyama H, Watanabe K, Hara A, Ebisawa M, Saeki H. Molecular and immunological characterization of  $\beta'$ -component (Onc k 5), a major IgE-binding protein in chum salmon roe. Int Immunol.

2013; [Epub ahead of print]:

- 4) F.E.R. Simons, L.R.F. Arduzzo, V. Dimov, M. Ebisawa et al. (for the World Allergy Organization) World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 Update of the Evidence Base. Int Arch Allergy Immunol. 2013;162:193-204
- 5) G.W. Canonica, (M. Ebisawa) et al. A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. WAO Journal. 2013;6:1-17
- 6) 海老澤元宏, 西間三馨, 秋山一男, ルビー・パワンカール. アナフィラキシー対策とエビペン®. アレルギー 2013; 62(2): 144-54
- 7) 海老澤元宏. 保育所(園)・学校における食物アレルギー対応. アレルギー 2013; 62(5): 540-7
- 8) 海老澤元宏. 保育所(園)・学校における食物アレルギー対応. 日本小児科学会雑誌 2013; 117(9): 1389-95

##### 2. 学会発表

- 1) Motohiro Ebisawa: Management of food allergy, EAACI - WAO World Allergy & Asthma Congress. Milan, Italy. 2013. 6. 22-26
- 2) Sakura Sato: Differences among food allergens, EAACI - WAO World Allergy & Asthma Congress. Milan, Italy. 2013. 6. 22-26
- 3) Sato S, Kutsuwada K, Ebisawa M: Utility of allergen specific IgE measurements for supporting the diagnosis of hen's egg and cow's milk allergy, EAACI - WAO World Allergy & Asthma Congress. Milan, Italy. 2013. 6. 22-26
- 4) Koike Y, Sato S, Yanagida N, Iikura K, Okada Y, Ogura K, Shukuya A, Ebisawa M: 3-year follow up after rush oral immunotherapy for cow's milk-induced anaphylaxis, EAACI - WAO World Allergy & Asthma Congress. Milan, Italy. 2013. 6. 22-26
- 5) Okada Y, Yanagida N, Sato S, Koike Y, Ogura K, Iikura K, Imai T, Shukuya A, Ebisawa M: Is partial intake of hen's egg associated with early tolerance of hen's egg allergy?, EAACI - WAO World Allergy & Asthma Congress. Milan, Italy. 2013. 6. 22-26
- 6) Asaumi T, Yanagida N, Iikura K, Koike Y,

- Okada Y, Ogura K, Shukuya A, Ebisawa M :  
Examination of 47 cases' provocation tests  
with food-dependent exercise -induced  
anaphylaxis, EAACI - WAO World Allergy &  
Asthma Congress. Milan, Italy. 2013. 6. 22-26
- 7) Sugizaki C, Ebisawa M : Food allergy  
prevalence and its sensitization from  
infancy to 7 years old in Japan, EAACI - WAO  
World Allergy & Asthma Congress. Milan,  
Italy. 2013. 6. 22-26
- 8) Sakura Sato, Noriyuki Yanagida, Motohiro  
Ebisawa : Changes of basophil activation  
test by oral immunotherapy for food allergy,  
The 2013 KAPARD-KAAACI & West Pacific  
Allergy Symposium Joint International  
Congress. Seoul, Korea. 2013. 5. 10-11
- 9) Motohiro Ebisawa : Oral Immunotherapy for  
Food Allergy, 7th International Summit on  
Allergic Diseases . Beijing, China .  
2013. 7. 27
- 10) Motohiro Ebisawa : Immunotherapy in  
respiratory allergy, APAPARI-AAIAT Joint  
Congress 2013 . Bangkok, Thailand .  
2013. 10. 2-4
- 11) Motohiro Ebisawa : Recent advance in food  
allergy diagnosis, APAPARI-AAIAT Joint  
Congress 2013 . Bangkok, Thailand .  
2013. 10. 2-4
- 12) Motohiro Ebisawa : Food allergen  
immunotherapy, can anyone develop  
tolerance?, APAPARI-AAIAT Joint Congress  
2013. Bangkok, Thailand. 2013. 10. 2-4
- 13) Motohiro Ebisawa : Use of Allergen  
Components: A New Era in Allergology, WAO  
Symposium on Immunotherapy and Biologics  
2013. Chicago, USA. 2013. 12. 13-14
- 14) Motohiro Ebisawa : Causes of Anaphylaxis,  
2014 AAAAI ANNUAL MEETING. San Diego, USA.  
2014. 2. 28-3. 4
- 15) Sakura Sato, Kiyotake Ogura, Yasunori Sato,  
Motohiro Ebisawa: Utility Of Probabiliry  
Curves Using 3gAllergy For Diagnosis Of  
Wheat Allergy, 2014 AAAAI ANNUAL MEETING.  
San Diego, USA. 2014. 2. 28-3. 4

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 食物アレルギーの診断と積極的治療に関する研究 — 2. 急速経口免疫（減感作）療法の作用機序の解明 —

研究分担者 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長  
研究協力者 佐藤 さくら 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  
柳田 紀之 国立病院機構相模原病院 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

【目的】食物アナフィラキシー(An)患者への経口免疫(減感作)療法(OIT)の作用機序を解明する。

【方法】OITを施行した患者を対象に、皮膚テスト(SPT)、末梢血好酸球数、血清総IgE値、抗原特異的IgE値、IgG、IgG4値、好塩基球ヒスタミン遊離試験(HRT)、好塩基球CD203c発現量の測定を経時的に行っている。一部の患者では、好塩基球の反応抑制とOIT患者血漿成分の影響について検討した。

【結果】急速法：2014年3月までのOIT施行患者数は計327名(急速法：鶏卵87名、牛乳119名、小麦44名、ピーナッツ31名、少量導入法：鶏卵13名、牛乳15名、小麦9名、ピーナッツ9名)である。OIT開始後4年以上経過した46名(鶏卵17名、牛乳29名)、2年以上経過した31名(小麦19名、ピーナッツ12名)について抗原特異的IgE値の変化を解析した。抗原特異的IgE値は卵白では1年後に約1/3、4年後に1/4、ミルクでは約1/2→1/4と卵白・ミルクともに経年的に低下した。小麦・ピーナッツでは、治療開始後に一時的に特異的IgE値は上昇したがその後低下し、2年後に小麦では約1/2、ピーナッツでは約1/5に低下した。また、OIT開始1年半後までに耐性化と判断された群(耐性化群)では非耐性化群と比し、治療開始前の卵白・オボムコイド・ミルク・カゼイン特異的IgE値は有意に低くかったが、小麦・ω5グリアジン・ピーナッツでは同様の結果は得られなかった。

少量導入法：少量導入法を施行した25名(鶏卵5名、牛乳12名、小麦3名、ピーナッツ5名)では、卵白・ミルク特異的IgE値は1ヶ月後に一時的に上昇した後に低下し、好塩基球のCD203c発現量は1ヵ月後にミルク刺激のみ有意に低下した。

好塩基球の反応抑制と血漿成分の影響：OIT開始後12ヵ月でのCD203c発現量は、IgG除去血漿を添加した群では非IgG除去血漿より高値であった。

【結論】昨年度までの検討と今回の結果より、急速法による経口免疫(減感作)療法(OIT)では、OIT急速期にはマスト細胞や末梢血好塩基球の活性化抑制(脱感作)が起こり、特に末梢血好塩基球の活性化抑制には抗原特異的IgG4抗体関与の可能性が示唆された。OITの継続により抗原特異的IgE値の長期間にわたる持続的な低下などの変化も誘導される。しかし、一時的な治療の中断により再び症状が誘発されることから、長期間の治療においても脱感作機序により症状誘発が抑制されている可能性が考えられる。

### A. 研究目的

食物アナフィラキシー(An)患者への経口免疫(減感作)療法(OIT)の作用機序を解明する。

### B. 方法

2014年3月までのOIT施行患者数は計327名(急速法：鶏卵87名、牛乳119名、小麦44名、ピーナッツ31名、少量導入法：鶏卵13名、牛乳15名、小麦9名、ピーナッツ9名)である。OITの方法は前述のように二つあり2013年3月までは急速法、同年7月からは少量導入法で施行して

いる。OITを施行した患者を対象に、皮膚テスト(SPT)、末梢血好酸球数、血清総IgE値、抗原特異的IgE値、IgG、IgG4値、好塩基球ヒスタミン遊離試験(HRT)、好塩基球CD203c発現量の測定を経時的に行っている。一部の患者では、好塩基球の反応抑制とOIT患者血漿成分の影響について検討した。血漿成分の影響は、EDTA 2Na処理したOIT患者の全血を用いて施行した。全血から血漿成分を回収し血球を洗浄後、①回収した血漿、②Medium、③ProteinA処理後の血漿(IgG除去血漿)を再び血球と混合し、抗原刺激後のCD203c

発現量を測定した。

### C. 研究結果

#### 1) 急速法による免疫学的な変化

OIT開始後4年以上経過した46名(鶏卵17名、牛乳29名)、2年以上経過した31名(小麦19名、ピーナッツ12名)について抗原特異的IgE値の変化を解析した。抗原特異的IgE値(Ua/ml)は卵白では23.3/13.3/8.0/6.9/5.0/6.0(OIT開始前/1ヵ月/1年/2年/3年/4年後)、ミルクでは28.8/30.3/14.6/9.5/8.6/4.9、小麦では80.0/204.0/57.0/47.6、ピーナッツでは15.0/21.0/7.0/3.2と経年的に低下していた。小麦・ピーナッツでは、治療開始後に一時的に特異的IgE値が有意に上昇し、その後低下する傾向が認められた。

OIT開始1年半以上を経過した211名(鶏卵66名、牛乳89名、小麦32名、ピーナッツ25名)を対象にOITの治療反応性と免疫学的パラメーターの関係について検討した。

OIT開始1年半後までに耐性化と判断された群(耐性化群)では非耐性化群と比し、治療開始前の卵白・オボムコイド・ミルク・カゼイン特異的IgE値は有意に低かったが(p=0.03)、小麦・ω5グリアジン・ピーナッツでは有意な差を認めなかった(図1)。

#### 2) 少量導入法による免疫学的な変化

2013年7月から治療を開始した25名(鶏卵5名、牛乳12名、小麦3名、ピーナッツ5名)では、卵白・ミルク特異的IgE値は1ヶ月後に一時的に上昇し、その後低下傾向となっていたが、小麦では有意な変化を認めなかった(卵白:81.2/93.7/69.7(OIT開始前/1ヶ月/3ヶ月後)、ミルク:38.2/53.8/33.1、小麦では386.0/322.0/360.0)。一方、OIT開始3ヵ月後までで、末梢血好塩基球のCD203c発現量は、卵白刺激では有意な変化を認めず、ミルク刺激では1ヵ月後に有意な低下を認めた。

#### 3) 好塩基球の反応抑制と血漿成分の影響

OITを施行した鶏卵アナフィラキシー患者14名(OIT開始前5名と開始12ヶ月後9名)を対象とした。OIT開始前では、卵白刺激10ng/mlによるCD203c発現量(Geometric mean fluorescence intensity)は①回収した血漿、②Medium、③ProteinA処理後の血漿の3群で有意な変化を認めなかった。OIT開始12ヶ月後では、CD203c発

現量は①66.9、②82.7、③128.0であり、IgG除去血漿を添加した群で有意に高値であった(図2)。

### D. 考察, E. 結論

昨年度までの検討と今回の結果を合わせると、食物アナフィラキシー(An)患者への急速法による経口免疫(減感作)療法(OIT)では、OIT急速期にはマスト細胞や末梢血好塩基球の活性化抑制(脱感作)が起こり、特に末梢血好塩基球の活性化抑制には抗原特異的IgG4抗体関与の可能性が示唆された。その後、OITの継続により抗原特異的IgE値の長期間にわたる持続的な低下などの変化が誘導される。しかし、一時的な治療の中断により再び症状が誘発されることから、長期間の治療においても脱感作機序により症状誘発が抑制抑されている可能性が考えられる。少量の抗原摂取においても、これらの免疫学的な変化が得られるのか、今後検討する予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

海老澤分担研究—1. 急速経口免疫(減感作)療法の有効性と問題点の検討— 参照

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

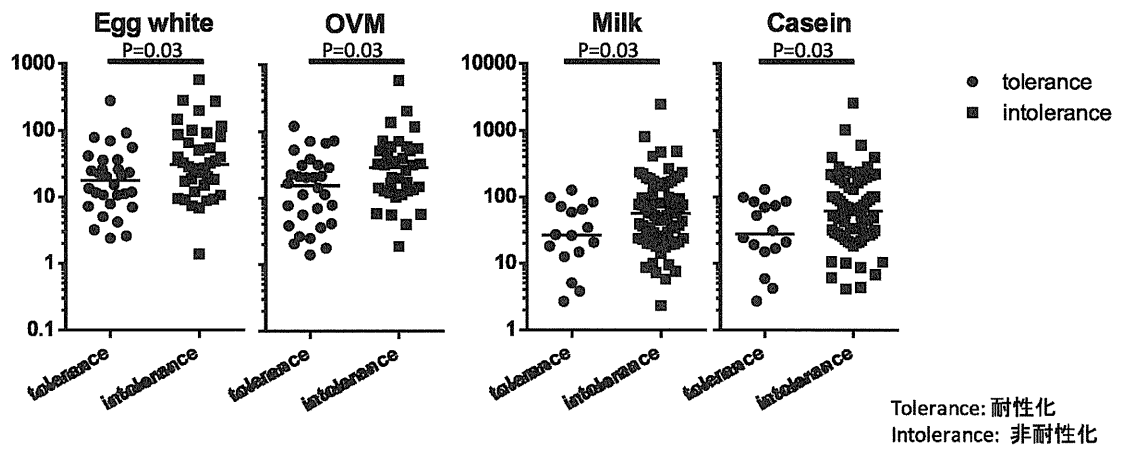


図1 抗原特異的IgE値と治療反応性の関係

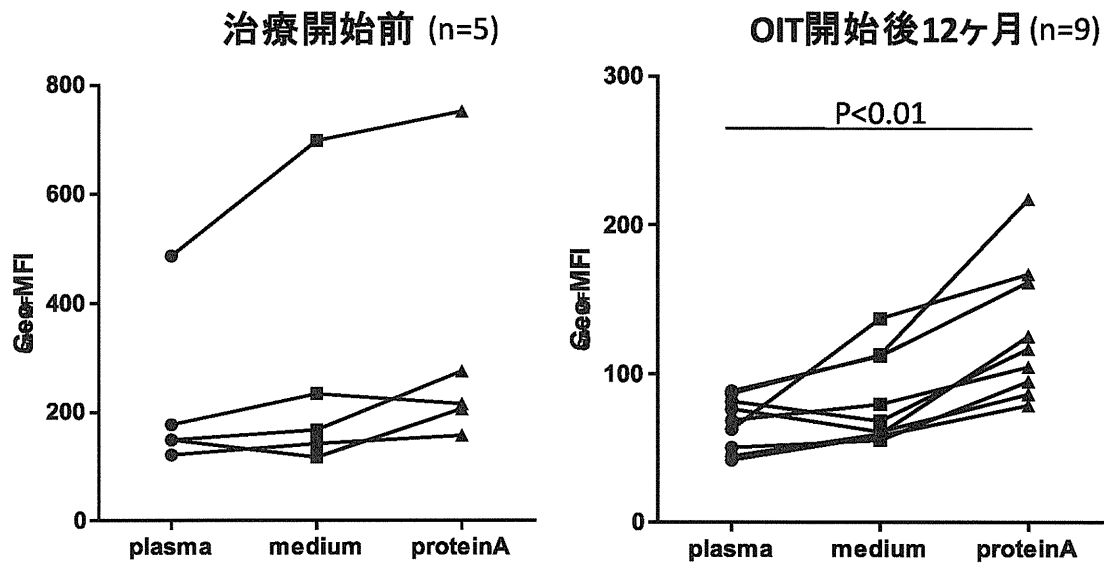


図2 好塩基球CD203c発現量と血漿成分の関係



## 経口免疫療法の応答性の遺伝子レベルでの解析

研究分担者	松本 健治	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
研究協力者	松田 明生	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
	森田 英明	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
	海野 浩寿	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
	正田 哲雄	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
	石川 良子	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部

### 研究要旨

食物アレルギー児に対する「経口免疫療法」は約8～9割の症例で有効である事が知られているが、残る1～2割の症例では、強い副反応のために経口的に摂取する食物抗原量の漸増が出来ない。この「不応例」を事前に予知することが出来れば、より効果的に「経口免疫療法」が行えるだけでなく、不必要な副反応のリスクを避けることが出来る可能性がある。本研究では経口減感作療法の有効性を、治療開始前に見分けるマーカーとなる分子を探索する事を目的として、経口免疫療法施行前に末梢血単核細胞を採取し、特異抗原刺激によって末梢血単核細胞分画に発現する分子群を Microarray を用いて網羅的に検索し、経口免疫療法有効例と無効例の遺伝子発現の差を検討している。国立相模原病院での経口免疫療法開始6カ月後の経過から、A群(11症例)は急速相でも維持相でも全く問題なく増量可、B群(16症例)は急速相は問題なかったが維持相で負荷量低下、C群(10症例)は急速相で上げられなかったが維持相で目標到達、D群(6症例)は急速相でも緩徐法でも上げられなかった(脱落を除いた有効率74.4%)。抗原刺激後120時間目の検体を用いて、A群(急速相で200MLに達し、維持期でも概ね200MLを維持できた者)全員が上昇し、D群(急速法でも緩徐法でも200MLに到達しない群)であまり上昇しない7遺伝子が抽出された。今回抽出された遺伝子群の中に経口免疫療法の有効性を事前に予測する事ができるマーカーが含まれている可能性が期待される。今後は症例数を増やして同様の検討をすると共に、qPCRによる遺伝子発現量の確認、卵による傾向減感作療法例での再現性の検討などを行い、さらにこれらの分子群の機能解析を順次行う予定である。

### A. 研究目的

近年、食物アレルギー児に対して、ごく微量の抗原食物を経口的に摂取させ、次第に漸増させることによって積極的に治療する、「経口免疫(減感作)療法」が行われており、これまでに約8～9割の症例で有効である事が知られてきている。しかし、残る1～2割の症例では、副反応(食物アレルギーの症状そのもの)のために、経口的に摂取する食物抗原量の漸増が困難である場合や、全く増量出来ない場合が認められる。この「不応例」を事前に予知することが出来れば、より効果的に「経口免疫療法」が行えるだけでなく、不必要な副反応のリスクを避けることが出来る可能性がある。本研究では経口免疫療法の有効性を、治療開始前に見分けるマーカーとなる分子を検索する事を目的として、抗原特異的に末梢血単核細胞分画に発現する分子群を Microarray を用いて網羅的に検索する。予備検討で決定した方法に基いて決定した刺激抗原の至適濃度、刺激時間お

よび培養条件(培養液、添加血清の種類、濃度)を用いて本実験を昨年開始しており、本年度は症例を増して、臨床経過の解析と、120時間後に誘導される遺伝子群の解析を行った。

### B. 研究方法

国立相模原病院を受診した経口免疫療法開始前の食物アレルギー症例(ミルク合計50症例)の末梢血単核細胞を自己血漿5%添加RPMI1640培地に浮遊させ、lipopolysaccharide(LPS)を除去したミルク抗原(200  $\mu$ g/ml)および卵白アルブミン抗原(200  $\mu$ g/ml)を添加し、24時間もしくは120時間培養した。培養後、細胞分画を回収してTotal RNAを抽出した。

次いで、国立相模原病院での経口免疫療法開始6カ月後の経過から、対象者を、急速期の増量の可否及び緩徐期の減量の有無で4群に分類した。

末梢血単核細胞のコントロール刺激(培養液単独)とミルク刺激120時間後の検体について網羅

的な遺伝子発現解析によって、抗原特異的に誘導された遺伝子群を抽出した。

### C. 研究結果

今回、2年間の合計で7例が何らかの原因で中途脱落し、結果43例の臨床経過が明らかとなった。臨床経過は4群に分類され、A群(11症例)は急速相でも維持相でも全く問題なく増量可、B群(16症例)は急速相は問題なかったが維持相で負荷量低下、C群(10症例)は急速相で上げられなかったが維持相で目標到達、D群(6症例)は急速相でも緩徐法でも上げられなかった(脱落を除いた有効率74.4%)。

現在これらのうちA群15例、B群16例、C群2例、D群3例のmicroarray結果が得られている。A群(急速相で200MLに達し、維持期でも概ね200MLを維持できた者)全員が上昇し、D群(急速法でも緩徐法でも200MLに到達しない群)であまり上昇しない遺伝子が7つ検出された。一方、D群(急速法でも緩徐法でも200MLに到達しない群)全員で2倍以上上昇し、確認試験で陰性の遺伝子群も7つ検出された。

### D. 考察

急速期および緩徐期の経過から、4群に分類された症例の経口免疫療法の作用機序として表1に示すマスト細胞/好塩基球の脱感作および制御性T細胞応答の誘導が推察された。

表1 牛乳摂取量の推移からみた患児の免疫応答性の分類

	急速相	緩徐相	脱感作	寛容
<b>A群</b>	○	○	○	○
<b>B群</b>	×	○	×	○
<b>C群</b>	○	×	○	×
<b>D群</b>	×	×	×	×

著効群でのみ誘導された遺伝子群には経口免疫療法の有効性を事前に予測する事ができるマーカーが含まれている可能性が期待される。今後は、全症例を対照にこれらの遺伝子の発現量をqPCR法を用いて定量し、その有用性を個別に検討すると同時に、有効性を決定する機序についても考察する予定である。

### E. 結論

経口免疫療法の有効性を事前に判定するマーカーの候補となる分子群を同定した。これらの分子群は臨床的に有用なマーカーとなるだけでなく、有効性を決定する機序の解明にも役立つ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) Inage E, Kasakura K, Yashiro T, Suzuki R, Baba Y, Hara M, Oboki K, Matsumoto K, Saito H, Niyonsaba F, Ohtsuka Y, Ogawa H, Okumura K, Shimizu T, Nishiyama C. Critical roles for PU.1, GATA1 and GATA2 in the expression and function of human FcεRI on mast cells. *J Immunol* 2014 Accepted
- 2) Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, Nonoyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS ONE* 2014;9:e86106.
- 3) Ando T, Xiao W, Gao P, Namiranian S, Matsumoto K, Tomimori Y, Hong H, Yamashita H, Kimura M, Kashiwakura J, Hata TR, Izuhara K, Gurish MF, Roers A, Rafaels NM, Barnes KC, Jamora C, Kawakami Y, Kawakami T. Critical role for mast cell stat5 activity in skin inflammation. *Cell Rep* 2014;6:366-376.
- 4) Kobayashi K, Mitsui K, Ichikawa H, Nakabayashi K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Iijima K, Ohtsubo K, Oboki K, Okita H, Yasuda K, Sakamoto H, Hata K, Yoshida Y, Matsumoto K, Kiyokawa N, Ohara A. ATF7IP as a novel PDGFRB fusion partner in acute lymphoblastic leukemia in children. *Brit J Haematol* 2014 Accepted.
- 5) Matsuda K, Narita M, Sera N, Maeda E, Yoshitomi H, Ohya H, Araki Y, Kakuma T, Fukuoh A, Matsumoto K. Gene and cytokine profile analysis of macrolide-resistant

- Myco- plasma pneumoniae infection in Fukuoka, Japan. *BMC Infect Dis* 2013;13:591.
- 6) Yoshikawa M, Wada K, Yoshimura T, Asaka D, Okada N, Matsumoto K, Moriyama H. Increased CXCL10 expression in nasal fibroblasts from patients with refractory chronic rhinosinusitis and asthma. *Allergol Int.* 2013;62:495-502.
  - 7) Masuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K, Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T. Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript. *Eur J Haematol.* 2013 Nov 11. doi: 10.1111/ejh.12234. [Epub ahead of print]
  - 8) Nei Y, Obata-Ninomiya K, Tsutsui H, Ishiwata K, Miyasaka M, Matsumoto K, Nakae S, Kanuka H, Inase N, Karasuyama K. GATA-1 regulates the generation and function of basophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:18620-5.
  - 9) Nakanishi W, Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, Kondo K, Suto H, Saito H, Matsumoto K, Yamasoba T, Nakae S. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis. *PLoS ONE* 2013;8:e78099.
  - 10) Shoda T, Futamura K, Fumio Kobayashi F, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Cell type-dependent effects of corticosteroid on periostin production by primary human tissue cells. *Allergy.* 2013;68:1467-70.
  - 11) Ando T, Matsumoto K, Namiranian S, Yamashita H, Glatthorn H, Kimura M, Dolan BR, Lee JJ, Galli SJ, Kawakami Y, Jamora C, Kawakami T: Mast cells are required for full expression of allergen/SEB-induced skin inflammation. *J Invest Dermatol.* 2013;133:2695-705.
  - 12) Ozeki N, Muneta T, Koga H, Katagiri H, Otabe K, Okuno M, Tsuji K, Kobayashi E, Matsumoto K, Saito H, Saito T, Sekiya I. Transplantation of Achilles tendon treated with BMP-7 promotes meniscus regeneration in a rat massive meniscus defect model. *Arthritis Rheum* 2013;65:2876-86.
  - 13) Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int* 2013;62:13-20.
  - 14) Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastro-intestinal food allergy are predominantly skewed to TH2. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:590-2.
  - 15) Morita H, Nomura I, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Gastrointestinal food allergy in infants. *Allergol Int* 2013;62:297-307.
  - 16) Matsumoto K, Saito H. Epicutaneous Immunity and Onset of Allergic Diseases - Per- "Eczema" tous Sensitization Drives the Allergy March. *Allergol Int* 2013;62:291-6.
  - 17) Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fcgamma receptor I and Fcgamma receptor II. *Arthritis Rheum* 2013;65:109-19.
  - 18) Koketsu R, Yamaguchi M, Suzukawa M, Tanaka Y, Tashimo H, Arai H, Nagase H, Matsumoto K, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Ohta K. Pretreatment with low levels of FcεRI-crosslinking stimulation enhances basophil mediator release. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161 Suppl 2:23-31.
  - 19) Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Salivary cortisol response to stress in young children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol* 2013;30:17-22.

- 20) Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Factors associated with steroid phobia in caregivers of children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol* 2013;30:29-35.
- 21) Fujishima H, Satake Y, Okada N, Kawashima S, Matsumoto K, Saito H. Effects of diesel exhaust particles on primary cultured healthy human conjunctival epithelium. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013;110:39-43.
- 22) Fujishima H, Fukagawa K, Okada N, Takano Y, Hirai H, Nagata K, Hashida R, Matsumoto K, Saito H. Chemotactic responses of peripheral blood eosinophils to prostaglandin D2 in atopic keratoconjunctivitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013;111:126-31.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし