

外来緩徐経口免疫療法（含む多施設経口免疫療法）の研究

研究分担者 今井 孝成 昭和大学 小児科
研究協力者 小倉 聖剛 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
海老澤 元宏 国立病院機構相模原病院臨床研究センター
近藤 直実 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学講座
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
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

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(FA)児に対し、無介入群を設け外来診療における緩徐経口免疫療法(OIT)の効果を検証した。事前の食物経口負荷試験(OFC)で明らかな症状を認めた鶏卵、牛乳、小麦FA児を対象とし、重篤な症状を認めたものは除外した。対象は保護者の希望によりOITを実施する群、または無介入群に分けた。OITは自宅で摂取量を漸増し、目標量到達後に維持期間を設けた。耐性獲得は、原因食物を14日間完全除去した上でのOFC(確認試験)で判定した。

これまでに緩徐OITの適応と判定した児は265名(鶏卵103名、牛乳85名、小麦77名)であった。そのうち194名(鶏卵75名、牛乳64名、小麦55名)に緩徐OITを実施した。一方、無介入群71名(鶏卵28名、牛乳21名、小麦22名)は自然経過での耐性獲得を評価した。OIT群における中等症以上の症状出現率は、鶏卵1.3%、牛乳2.2%、小麦0.9%で、摂取回数辺りのアドレナリン投与率は、鶏卵0.01%、牛乳0.03%、小麦0.00%であった。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、開始2年で鶏卵83.0%、牛乳66.7%、小麦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%、開始2年で鶏卵73.6%、牛乳54.2%、小麦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名、牛乳26名、小麦23名)では、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FA児に対する緩徐OITは、中等症以上の副反応発生頻度も低く、多くの症例で概ね安全に脱感作状態へ誘導可能であり、誤食対策として有効と考えられた。また、確認試験陰性となった児の多くが本来の原因食物を日常生活で自由に摂取でき、食生活が改善した。しかし、脱感作(食べていれば症状が出ない状態)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することも分かった。抗原別では、牛乳OIT中の症状誘発率が他よりやや高く、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であった。稀ではあるが治療中に強い全身症状が誘発されることもあり、OITの実施は専門施設での十分な管理下で救急医療機関と連携して実施するべきと考えられた。

【多施設共同研究】

本経験に基づき、2013年1月より緩徐OITを多施設共同研究(全国9施設)にて開始した。特に、自宅でのOIT目標量(25%群、100%群)と耐性獲得率を関連付けて解析することで、本邦における質の高い診療法の確立を目指す。2014年3月現在、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ている。

A. 研究目的

中等症以下の鶏卵、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) の効果を検証する。

B. 研究方法

食物経口負荷試験 (OFC) 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 は緩徐法で行った (図 1)。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自宅で摂取量を漸増し、目標量到達後は一定期間の継続摂取を経て、症状安定を条件に、確認試験 (抗原を 2 週間完全除去した後の OFC) を行って耐性獲得の有無を評価した。

症状出現時の対応は、保護者に事前の指導をした上で近隣医療機関と連携した。また、対症薬の事前処方も行った。自宅での摂取量、副反応の有無、投薬状況などを日誌に記録させ経過を解析した。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

これまでに緩徐 OIT 適応と判定した児は延べ 265 名 (鶏卵 103 名、牛乳 85 名、小麦 77 名) であった。このうち 71 名は OIT の希望は無く、対照 (Ctrl 群) として同意を得て自然な耐性獲得状況を評価した。現在までに解析対象となった延べ 194 名 (鶏卵 75 名、牛乳 64 名、小麦 55 名) の患者背景を表 1 に示す。

表 1: 患者背景

	鶏卵		牛乳		小麦	
	OIT	Ctrl	OIT	Ctrl	OIT	Ctrl
対象者数 (名)	75	28	64	21	55	22
平均年齢 (歳)	7.3	4.3	6.8	4.2	5.1	4.2
アナフィラキシー既往 (回)	0.57	0.17	0.78	0.42	0.75	0.41
合併症						
気管支喘息 (%)	37.3	38.1	50.8	41.2	33.3	21.7
アトピー性皮膚炎 (%)	53.7	33.3	54.8	52.9	48.1	69.6
抗原特異的 IgE 値 (Ua/ml) (卵白/牛乳/小麦)	24.7	20.0	20.8	11.9	26.2	11.2
初発症状誘発閾値 (g)	15.4	17.1	24.1	14.0	18.6	15.6
客観症状誘発閾値 (g)	30.1	24.0	46.3	26.4	29.7	25.6

(1) 鶏卵

総摂取回数 7236 回のうち、中等症以上の症状出現率は 1.3% であった。治療は抗ヒスタミン薬投与 (以下 AH) が 3.1%、気管支拡張薬吸入 (以下吸入) 0.1%、ステロイド投与 (以下ステロイド) 0.4%、アドレナリン筋肉注射 (以下 ADR) が 0.01% であった。

OIT 群では脱感作状態と耐性獲得を合わせた到達率が 1 年後で 85.3% (64/75 名)、2 年後で 83.0% (44/53 名) であり、耐性獲得のみに限定した場合が 1 年後で 61.3% (46/75 名)、2 年後で 73.6% (39/53 名) であった。しかし、Ctrl 群 (1 年目 28 名、2 年目 23 名) との比較では、1 年後の脱感作状態と耐性獲得を合わせた到達率に関してのみ、2 群間で有意差を認めた。また、OIT 終了後の長期経過を追跡した児 42 名では、自宅での摂取制限を解除して平均 7.1 ヶ月後に 88.1% (n=37) が園・学校での除去解除となった。

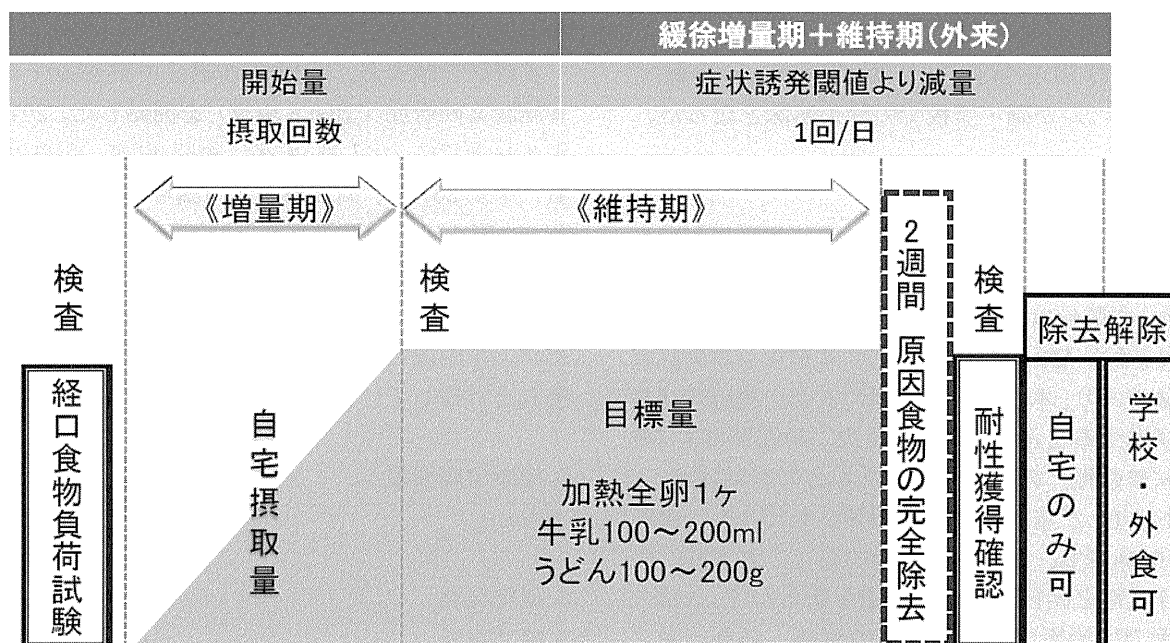


図 1: 緩徐法のプロトコール

(2) 牛乳

総摂取回数 9341 回のうち、中等症以上の症状出現率は 2.2%であった。治療状況は AH;5.8%、吸入; 1.7%、ステロイド; 1.0%、ADR; 0.03%であった。

OIT 群では脱感作状態と耐性獲得を合わせた到達率が 1 年後で 73.4%(47/64 名)、2 年後で 66.7%(32/48 名)であり、耐性獲得のみに限定した場合が 1 年後で 25.0%(16/64 名)、2 年後で 54.2%(26/48 名)であった。しかし、Ctrl 群(1 年目 21 名、2 年目 17 名)との比較では、1 年後および 2 年後の脱感作状態と耐性獲得を合わせた到達率に関してのみ、2 群間で有意差を認めた。また、OIT 終了後の長期経過を追跡した児 26 名では、自宅での摂取制限を解除して平均 7.5 ヶ月後に 80.7%(n=21)が園・学校での除去解除となった。

(3) 小麦

総摂取回数 7127 回のうち、中等症以上の症状出現率は 0.9%であった。治療状況は AH;1.9%、吸入; 1.0%、ステロイド; 0.2%、ADR; 0.00%であった。

OIT 群では脱感作状態と耐性獲得を合わせた到達率が 1 年後で 85.5%(47/55 名)、2 年後で 91.9%(34/37 名)であり、耐性獲得のみに限定した場合が 1 年後で 49.1%(27/55 名)、2 年後で 64.9%(24/37 名)であった。Ctrl 群(1 年目 22 名、2 年目 15 名)との比較では、1 年後、2 年後ともに脱感作状態と耐性獲得を合わせた到達率、および耐性獲得率のみに限定した場合のいずれに関しても、2 群間で有意差を認めた。また、OIT 終了後の長期経過を追跡した児 23 名では、自宅での摂取制限を解除して平均 4.0 ヶ月後に 95.7%(n=22)が園・学校での除去解除となった。

D. 考察

OIT 介入は鶏卵、牛乳、小麦のいずれにおいても 1-2 年の経過で約 7-8 割の症例が目標量に到達した。中等症以上の副反応については発生頻度も低く、また ADR 投与を必要とする重篤な誘発症状も稀であり、本法において概ね安全に脱感作状態へ誘導することが可能と言えた。耐性獲得率(確認試験陰性)のみに限定した場合の有効性は、1 年および 2 年の経過で鶏卵 61.3-73.6%、牛乳 25.0-54.2%、小麦 49.1-64.9%にとどまり、脱感作状態と耐性獲得状態の差が明らかで、一部の症例では治癒までに年単位の治療が必要と考え

られた。OIT が終了した児では 8-9 割が一定の観察期間を経た後、学校・園で摂取制限を解除できており、OIT による耐性獲得誘導が FA 児の食の QOL を改善する可能性が示された。

抗原別の比較に関しては、牛乳では OIT 群・Ctrl 群ともに耐性獲得率が他の抗原より低く、OIT 群の誘発症状に対する ADR の投与率も他の抗原と比べて高かった。一方、小麦では Ctrl 群と比較して OIT 群での耐性獲得率が有意に高く、小麦の FA に対する OIT は他の抗原より有効である可能性が示唆された。

E. 結論

従来であれば除去継続を指示される中等症以下の FA 患者に対して緩徐 OIT を実施し、概ね安全に耐性獲得および脱感作状態へ誘導できる可能性が示された。しかし、稀に重篤な症状を誘発する可能性が否定できないため注意が必要である。脱感作状態と確認試験陰性(暫定的な耐性獲得状態)は臨床的には異なり、必ず安全性の検証を経てから除去解除が指示されるべきである。今後、不適切な手法による OIT が安易に臨床の場で実施されることに注意喚起を促し、アナフィラキシー事故が起きないように注意すべきである。

他の考察としては、鶏卵と牛乳に関して Ctrl 群と比較した OIT 群の耐性獲得率に統計学的な差が認められなかったことがあげられる。今回の検討では保護者の意志によって OIT 群または Ctrl 群が割り付けられたために患者背景として 2 群間に年齢差が存在する。よって今後は解析対象を増やした上での詳細な検証が求められる。

本経験を踏まえ、2013 年 1 月より外来 OIT の多施設共同研究(全国 9 施設)を開始した。2014 年 3 月までに、OIT 群 96 名(鶏卵 48 名、牛乳 25 名、小麦 23 名)、対照群 9 名(鶏卵 6 名、牛乳 2 名、小麦 1 名)が登録されている。この多施設研究では、OIT の有効性・安全性を多施設で検証することに加えて、特に OIT 目標量の違いと耐性獲得率とを関連付けて解析し、より効果的な手法の確立を目指していく。

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

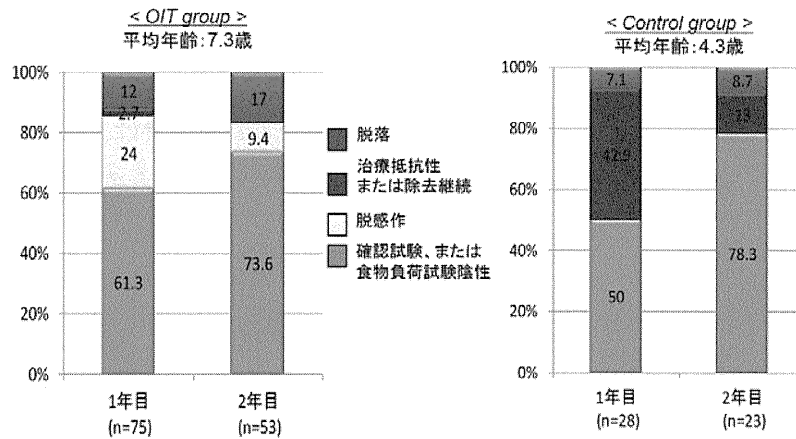


図2-1 治療経過 (鶏卵)

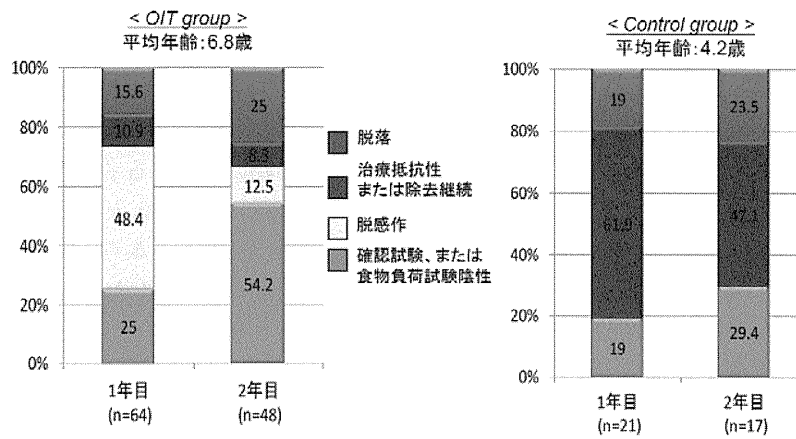


図2-2 治療経過 (牛乳)

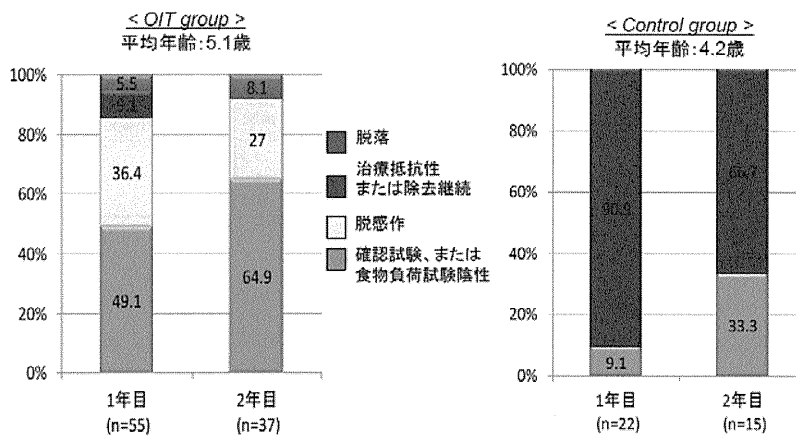


図2-3 治療経過 (小麦)

診断・治療の標準化に関する研究

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）経口負荷試験の結果に基づいて、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。

A. 研究目的

乳幼児の食物アレルギー患者の多くは、成長と共に耐性獲得して除去の解除が進む。その過程においては、偶然の摂取や食物経口負荷試験によって症状が誘発されない摂取量を経験し、それを次第に増量することで解除に至っている。しかし、食物アレルギー診療ガイドライン2012には、食物アレルギー患者を耐性獲得まで導く食事指導の方法について、エビデンスに基づいた記載がない。それは、医療機関における食事指導が、「微量の加工食品から少しずつ増やす」といった定量性に乏しい曖昧なものであり、その指導成績を評価することができないことが理由と思われる。

本研究では、食物経口負荷試験の結果に基づいて摂取開始量を設定し、家庭での摂取量を定量的に評価しながら解除に導く食事指導の方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

本研究は当センターの倫理委員会の承認を受け、調査対象となる保護者から文書による説明同意を得て実施した。

経口負荷試験は、沸騰後20分加熱したゆで卵白、生の牛乳、ゆでたうどんを負荷食品として、微量、1、2、5、10、20gを20分ごとに漸増摂取することを基本とした。摂取開始量は、症状を誘発した最終負荷量から、誘発されたグレードに応じて1～3段階減量した2g、5g、10gと設定した(表1)。

表1. 経口負荷試験の結果に基づく摂取開始量の設定

最終負荷量	摂取を開始する量				
	陰性	グレード1	グレード2	グレード3	グレード4
20g	20g	10g	5g	2g	
10g	10g	5g	2g		
5g	5g	2g	除去の継続		
2g	増量負荷				

検討対象者は、当科でゆで卵白、牛乳、うどん経口負荷試験を受けて陽性であった患者のうち、上記の基準に該当する者とした。人数は鶏卵、牛乳、小麦あわせて106人で、同時期に経口負荷試験を実施した634人から、完全除去288人、負荷陰性213人、保留27人を除く16.7%に相当した(表2)。

表2. 対象者の背景

食品 人数	ゆで卵白 40人	牛乳 31人	うどん 35人
月齢 中央値(幅)	35.5 (14-114)	45 (12-118)	24 (11-128)
総IgE値 IU/ml	346 (6-16000)	285 (49-6555)	181 (20-544)
特異的IgE抗体価 中央値(UA/ml)	卵白 11.5 オボムコイド 5.7 (1.0-100)	牛乳 5.0 (0.64-100)	小麦 7.2 (0.43-85.8)
合併食物アレルギー	なし 22人 あり 18人 (45%) 内訳 牛乳16・小麦2	6人 25人 (80%) 鶏卵23・小麦5	8人 27人 (77%) 鶏卵 24・牛乳15
摂取開始指示量	2g 23人 5g 13人 10g 4人	16人 4人 11人	15人 14人 6人

自宅での摂取は、負荷試験と同じ食品そのものを定量的に摂取することを原則として、5～10回症状なく摂取できれば10～20%ずつ増量するものとした。患者及び保護者は、指示量の摂取とそ

れに伴う誘発症状の有無を食事日誌に記録して、主治医及び管理栄養士が受診時に評価した。

定量的な摂取は、ゆで卵白又は加熱手順を定めたいり卵・薄焼き卵、牛乳又はヨーグルト、うどん又はその他の麺類又はパン・クラッカーとした。牛乳と小麦製品の摂取量は、たんぱく質含有量によって換算した。

ゆで卵白 2g、牛乳 30ml、うどん 30g 相当を安定して食べられることが確認できれば、含有量がそれを超えない範囲での加工食品や調理への使用を許可した。

この指導法の有効性を評価するためのコントロール群として、本法を開始する前の1年間における経口負荷試験陽性者から、最終負荷量と症状グレードを今回の対象者とマッチさせた 107 人を抽出した (表 3)。対象者及びコントロール群について、負荷試験から1年後に自宅で摂取しているアレルゲン食品の量を評価した。

表 3 コントロール群の背景

食品	人数	ゆで卵白 39人	牛乳 31人	うどん 37人
月齢	中央値 (幅)	35 (15-118)	43.6 (13-131)	37.6 (11-116)
総IgE値	IU/ml	276 (8-3437)	391 (17-3739)	607(23-10993)
特異的IgE抗体価	UA/ml	卵白 11.9 オボムコイド 5.0 (0.34-100)	牛乳 4.0 (0.34-83.6)	小麦 10.6 (0.37-100)
合併食物アレルギー	なしあり内訳	22人 17人 (44%) 牛乳12・小麦10	3人 28人 (90%) 鶏卵26・小麦11	4人 33人 (89%) 鶏卵 31・牛乳26
摂取開始指示量	2g 5g 10g	21人 13人 5人	15人 5人 11人	16人 14人 7人

C. 研究結果

対象者は、鶏卵で脱落した2名を除いて1年後までフォローされた。鶏卵では33人(87%)が1/4個以上を摂取していた。牛乳は11人(35.5%)が50mlを越え、うどんは15人(42.9%)が100g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 (図 1)。

牛乳は摂取到達量の少ない者が多かったが、その理由は症状誘発によるものではなくて、乳製品の味が好まずに食べたくない、ということが多く認められた。

コントロール群では、負荷試験から1年経過した時点でも、完全除去に近い鶏卵 1/20 個以下、牛乳やうどん 5g 相当以下の摂取量に留まってい

る者が多く認められた。一方、鶏卵 1/2 個以上、牛乳 200ml、うどん 200g まで解除された人数は、対象者と差を認めなかった (図 2)。

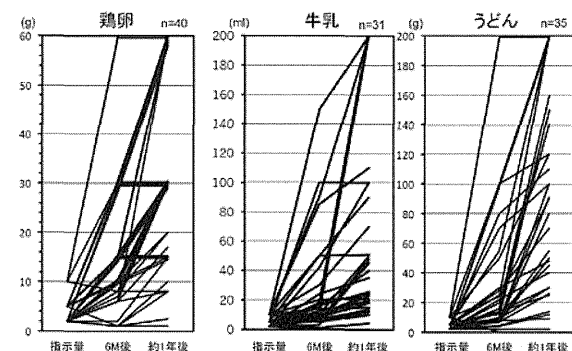


図 1. 1年後の摂取量の推移

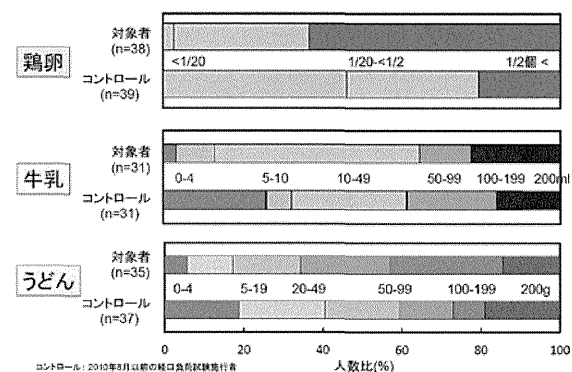


図 2. 1年後摂取量のコントロール群との比較

D. 考察

この食事指導のポイントは、負荷試験によって設定された摂取開始量について、アレルゲン量が明らかに計量できる食品そのものを用いて直接摂取することを基本としていることにある。加工食品や料理については、安全が確認された量を超えない範囲で、具体的な摂取範囲を示しながら指導する (図 3)。

食事指導を進めるにあたり、管理栄養士が負荷試験後及び毎回の外来受診時に摂取状況を問診し、診察の結果主治医が指示した摂取量や増量プランに基づいて具体的な摂取方法を再度保護者に指導するといった、チーム医療が有効であった。摂取量の設定について医師が責任を持つことで、管理栄養士はその範囲内での摂取方法を指導することに安心して力を発揮できた。

この食事指導は、摂取量を定量的に示してそれを増量するという点で、経口免疫療法との異同が問題となる。我々は、本法の対象者が従来「少しずつ食べる」指導を行って解除を進めている者という意味で、食事指導と位置づけている。

定量基準	全粒穀類	定量基準を満たせば食べて良い加工食品
40g (4.5g)	1個	板加糖料定 蒸餃煎し フリン たまごスープ マヨネーズ 遠征加糖料定 餅焼き オムレツ 餅三葉き
20g (2.3g)	1/2個	カステラ 1切れ パウムケーキ 1/2個 シフォンケーキ 1切れ ショートケーキ 1カット
10g (1.3g)	1/4個	とんかつ 1枚 ホットケーキ 1枚 ドーナツ 1個 ハンバーグ 1個
5g (0.6g)	1/8個	うずら卵 1個 コロッケ 1個 中巻餅 1玉 から揚げ 3個
2g (0.2g)	1/20個	クッキー1枚 ビスケット1枚 ロールパン1巻 かまぼこ3切れ ハム1枚 ワインナー1本 ちくわ1本 スティックパン1本

※医師・栄養士の指導のもとで利用して下さい。

図3 鶏卵の定量摂取量と加工食品の指導表

E. 結論

経口負荷試験から解除を進める食事指導の方法について、1つのモデルを提案した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito K: Diagnosis of food allergies: the impact of oral food challenge testing, Asia Pacific Allergy, 3, 59-69, 2013
- 2) Ebisawa M, Brostedt P, Sjolander S, Sato S, Borres M, Ito K: Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children. J Allergy Clin Immunol, 132(4), 976-978, 2013
- 3) 小林貴江、漢人直之、羽根田泰宏、安井正宏、前田徹、榎村春江、小田奈穂、伊藤浩明: 食物経口負荷試験の結果に基づくアレルギー食品摂取指導 (第1報), 日本小児アレルギー学会誌, 27(2), 179-187, 2013
- 4) 日野明日香、前田徹、安井正弘、漢人直之、

伊藤浩明: 食物経口負荷試験における新たなスコアリングシート” Anaphylaxis Scoring Aichi (ASCA)” の提案と検討, アレルギー, 62(8), 968-979, 2013

- 5) 海老澤元宏、伊藤浩明: ピーナッツアレルギー診断における Ara h 2 特異的 IgE 抗体測定 の意義, 日本小児アレルギー学会誌, 27(4), 621-628, 2013
- 6) 小林貴江、漢人直之、羽根田泰宏、安井正宏、前田徹、日野明日香、榎村春江、小田奈穂、伊藤浩明: 鶏卵経口負荷試験陽性者に対する除去解除を目指した食事指導 (第2報). 日本小児アレルギー学会誌, 27(5), 692-700, 2013
- 7) 小田奈穂、榎村春江、小林貴江、漢人直之、伊藤浩明: 牛乳アレルギーにおける除去解除のための食事指導 (第3報). 日本小児アレルギー学会誌, 27(5), 701-709, 2013
- 8) 榎村春江、小田奈穂、小林貴江、漢人直之、和泉秀彦、伊藤浩明: タンパク質換算を用いた小麦アレルギー患者への除去解除指導 (第4報). 日本小児アレルギー学会誌, 27(5), 710-720, 2013
- 9) Sugiura S, Kondo Y, Ito K, Hashiguchi A, Takeuchi M, Koyama N. A case of anaphylaxis to erythritol diagnosed by CD203c expression-based basophil activation test. Ann Allergy Asthma Immunol. 111, 222-223, 2013.

2. 学会発表

- 1) Ito K, Kando N, Nakayama S, Tanaka A, Borres MP. Component-resolved diagnostics of peanut allergy in Japanese children. EAACI-WAO 2013, Milan, 2013. 6. 22-26
- 2) Ito K Improved management of food allergy - what is relevant? EAACI-WAO 2013, Milan, 2013. 6. 22-26.
- 3) Ito K. Oral Immunotherapy for Food Allergy. 2013 APCAACI. Taipei, 2013. 11. 17.
- 4) Nakagawa T, Kando N, Ito K, Sato S, Ebisawa M, Maruyama N. Component-resolved diagnostics of Japanese children with sesame allergy. 2013 APCAACI. Taipei, 2013. 11. 17.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 名誉教授 / 平成医療短期大学 学長
 研究協力者 川本 典生 岐阜大学医学部附属病院小児科 助教
 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

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防と治療を独創的に進める。昨年度に引き続き、食物アレルギーの感作発症に関連する家族歴等の項目を検討した。平成 25 年度は、特に、経口免疫療法のうち、牛乳アレルギーに対する抗原改変食品（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た。参加を表明した 9 人のうち 7 人にプロトコルを実施し、6 人で一定期間後に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、その経口免疫療法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。

A. 研究目的

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を確立することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 食物アレルギーの感作発症予知

市町村の健診の参加者を対象に、追跡して食物アレルギー発症の有無について調査し、家族歴と食物アレルギーの関係を検討した。

(2) 免疫療法（経口免疫寛容誘導）の開発

食物アレルギーの免疫学的改変食品による治療法の確立につき進めた。すなわち免疫学的改変食品を用いて、食物アレルギーに対して経口免疫寛容を誘導する免疫療法を検討した。牛乳の β ラクトグロブリンおよびカゼインについて、抗原エピトープを修飾した新規食材を作成して、牛乳アレルギー患者に投与して、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で承認を得て、患者あるいは保護者の同意を得、個人情報保護などに十分配慮して行った。

C. 研究結果

1) 食物アレルギーの感作発症予知

昨年度に引き続き、食物アレルギーに関連する家族歴の項目を検討した。3 歳の食物アレルギー

に関連する項目は、表 1 の通りであった。

表 1 家族歴と 3 歳の FA の関係

診察 FA 有 vs 無_3Y	アレ歴	BA 歴	AD 歴	FA 歴	AR 歴
家族	/	/	○	○	/
父母	○	○	○	○	/
父		/	○	○	/
母		/	○	○	/
兄弟		/	/	○	/
祖父母		/	○	/	/
父母兄弟		/	○	○	/
父母祖父母		○	○	○	/
父 and 母		/	○	○	/

○：有意に関連有り /：有意な関連なし

FA の発症には AD, AR, FA の家族歴が関係する。

(2) 免疫療法（経口免疫療法）の開発

経口免疫療法の方法のうち平成 25 年度は、免疫学的改変食品（抗原エピトープを修飾した新規食材）を投与して経過を追った。当該食品の作成については、

1. 牛乳アレルギー患児の末梢リンパ球から β ラクトグロブリンに反応する T 細胞クローンを樹立し、 β ラクトグロブリンタンパクの T 細胞エピトープを決定した。
2. この結果をもとにして、T 細胞エピトープを温存し、B 細胞 (IgE) エピトープを分解するように、 β ラクトグロブリンを酵素で処理して作成

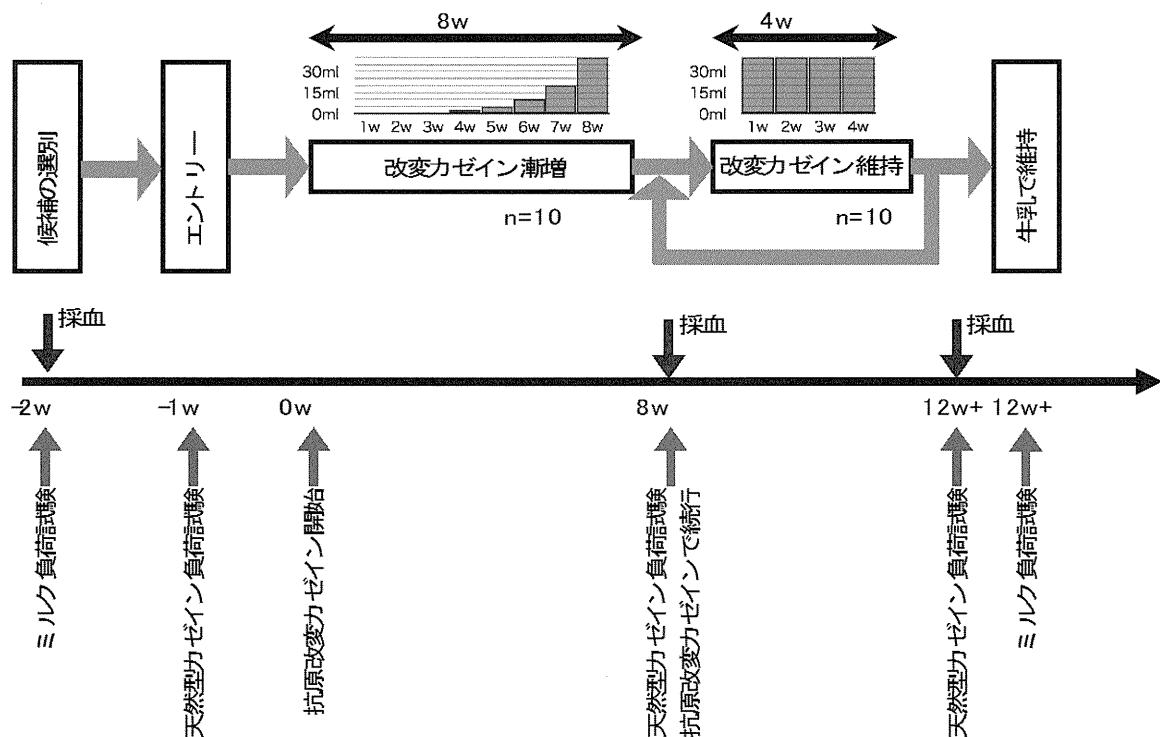


図1 研究のプロトコル

し、安全性を確認した。

3. 本食品を、牛乳アレルギー患児に一定のプロトコルに従って投与し、経過を追ったところ、多くの症例で、 β ラクトグロブリンの症状誘発閾値が上昇した。

4. β ラクトグロブリンの免疫学的改変食品の作成方法を応用して、カゼインの免疫学的改変食品が作成できた。すなわち、B細胞反応性を検証し、反応しないもののうち、T細胞の反応が強いものを作成した。 β ラクトグロブリンと同様に臨床検討を進めた。(図1)

5. 現在のところ9例に使用を開始し、現時点で、6例でカゼイン負荷の閾値が上昇している。(表2) また、5例では、その後、負荷を継続することができ、多くの場合、ミルクに切り替えて継続が出来る。

6. 検査では、Treg, Th1, Th2, IgE, IgG4、好酸球数などを投与前後で測定しているが、現在のところ、投与開始前に比して、漸増期の後または維持期の後では、4例でTregの増加、Th1の増加、の傾向がみられた。好酸球数は減少を示す症例が多かった。CD19は漸増している人が多く、一部では、特異的IgEが低下したり、特異的IgG4が上昇したりした。(図2)

D. 考察, E. 結論

平成25年度は、特に、免疫療法(経口免疫寛容誘導)として、牛乳アレルギーに対して、 β ラクトグロブリンとカゼインそれぞれの免疫学的改変食品(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、一定の成績を得ている。制御性T細胞は、アレルギー免疫療法による生体の免疫系の改善の一つの重要な指標とされていることから、カゼインの免疫学的改変食品の漸増期の後または維持期の後に制御性T細胞の一つの重要な指標であるTregの比率や、Th1が増加傾向を示した症例があったこと、好酸球数が減少傾向を示したことなどは免疫寛容誘導の点から重要な意味を持つ。さらに症例を増やして解析を進めている。

表 2 研究参加者の背景と現在の状況

ID	開始時年齢	治療前閾値 (天然型)	IgE	Milk RAST	Milk RAST class	8週間の 漸増期	8週後の 閾値	改変カゼインの量	現在の閾値	コメント
1	6 y.o.	0.75ml	1520	31.5	4	済み	>5ml	>45ml	>45ml Milk 50ml	
2	4 y.o.	>45ml	125	0.73	2	カゼインが全量飲め、その後牛乳も十分量飲めたため参加中止				
3	4 y.o.	0.75ml	685	45.2	4	済み	>5ml	>45ml	>45ml, Milk 50ml	牛乳50ml負荷試験陰性制限解除
4	5 y.o.	3.75ml	869	6.75	3	済み	>11ml	>45ml	>45ml, Milk 50ml	牛乳50ml負荷試験陰性制限解除
5	4 y.o.	0.75ml	8120	>=100	6	済み	>7ml	>40ml	>40ml, Milk 20ml	第2子出産のため、スロースタート
6	4 y.o.	11ml	1420	34.4	4	済み	11ml			
7	5 y.o.	<0.25ml	804	88.4	5	改変カゼイン (ミルク0.25ml相当) でも症状あり参加中止				
8	4 y.o.	1.75ml	387	4.68	3	済み	2.0ml	>40ml	>40ml Milk 5ml	ミルク5mlで口腔違和感→消失
9	6 y.o.	1.0ml	920	5.18	3	済み	16週後 2.0ml		2.0ml	咽頭違和感強く開始4ヶ月で断念

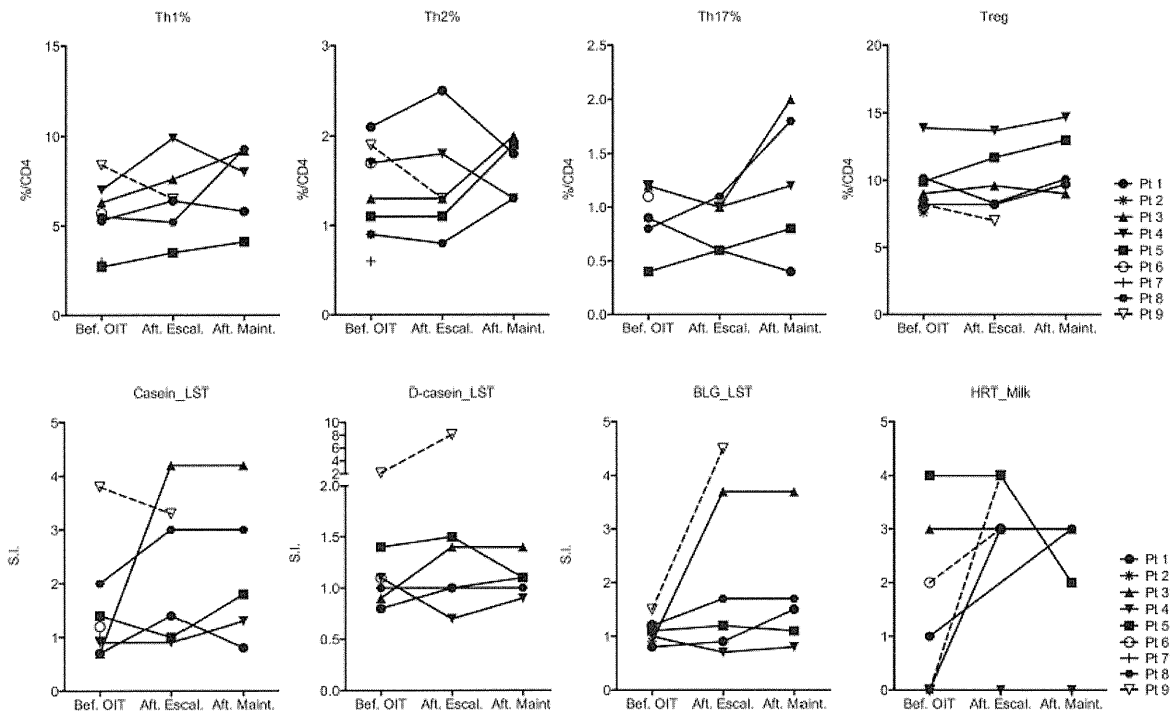


図 2 OITに伴った Th 細胞分画、LST、HRT の変化

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Yamamoto, N. Tsutsumi, H. Tochio, H. Ohnishi, K. Kubota, Z. Kato, M. Shirakawa, and N. Kondo: Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Mol Immunol* 2014; 58: 66-76.
- 2) N. Kawamoto, T. Fukao, H. Kaneko, K. Hirayama, S. Sakurai, T. Arai, M. Kondo, M. Kawamoto, E. Matsui, K. Orii, K. Kasahara, M. Takemura, M. Seishima, M. Shiraki, S. Iwasa, and N. Kondo: Total IgE at 6 months predicts remittance or persistence of atopic dermatitis at 14 months. *Allergy Asthma Proc* 2013; 34: 362-369.
- 3) K. Kubota, H. Ohnishi, T. Teramoto, E. Matsui, K. Murase, H. Kanoh, Z. Kato, H. Kaneko, M. Seishima, and N. Kondo: In vitro analysis of the functional effects of an NLRP3 G809S variant with the co-existence of MEFV haplotype variants in atypical autoinflammatory syndrome. *J Clin Immunol* 2013; 33: 325-334.
- 4) N. Kawamoto, T. Fukao, H. Kaneko, K. Hirayama, S. Sakurai, T. Arai, M. Kondo, M. Kawamoto, E. Matsui, T. Teramoto, K. Kasahara, C. Bai, G. Zhang, K. Omoya, E. Matsukuma, M. Morimoto, H. Suzuki, Y. Aoki, T. Kimura, M. Nada, H. Morita, T. Tokumi, M. Takemura, M. Seishima, M. Shiraki, S. Iwasa, and N. Kondo: Risk factors for infantile atopic dermatitis and recurrent wheezing. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22: 116-125.
- 5) 近藤直実: IgE 抗体産生のメカニズム : 遺伝素因と環境の影響 (特集 アレルギー疾患における特異抗体の意義) -- (免疫学的側面). *アレルギー・免疫* 2013; 20: 14-23.
- 6) 金子英雄, 近藤直実: 特別掲載 食物アレルギーにおける経口免疫療法. *小児科診療* 2013; 76: 857-861.
- 7) 近藤直実: アレルギー疾患に対する免疫療法の基礎的背景 (特集 アレルギー疾患に対する免疫療法の効果と展望). *臨床免疫・アレルギー科* 2013; 60: 161-168.
- 8) 近藤直実, 小玉ひとみ, 熊田ますみ: 食物アレルギーの現状 (特集 日常生活とアレルギー). *公衆衛生* 2013; 77: 790-795.

2. 学会発表

- 1) Kawamoto N, Ohnishi H, Kondo N, Strominger JL:

(Immunotherapy II 399) The Role of Murine Myeloid Cells On Stimulation with Amino Acid Copolymers. AAAAI annual meeting 2013 2013年2月22日~26日 (サンアントニオ、米国)

- 2) 松井永子: S1-4. アレルギー発症のテラーメイド予知予防. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013年5月11日~12日 (横浜)
- 3) 近藤直実: SS7-2. 小児喘息の治癒を目指した新たな戦略一根治療法と対症療法の両輪療法. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013年5月11日~12日 (横浜)
- 4) 松井永子: ES2-1. 発症予防の遺伝子ターゲット. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013年5月11日~12日 (横浜)
- 5) 金子英雄, 大西秀典, 川本典生, 寺本貴英, 松井永子, 加藤善一郎, 森田秀行, 加藤晴彦, 中埜拓, 近藤直実: P/0-203. 牛乳アレルギーにおける抗原改変β-ラクトグロブリン作製と臨床応用の試み. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013年5月11日~12日 (横浜)
- 6) 川本典生, 桑原秀次, 大西秀典, 松井永子, 寺本貴英, 加藤善一郎, 金子英雄, 上野 宏, 中埜拓, 近藤直実: P/0-204. 抗原改変カゼインの, 安全性に配慮した緩徐な寛解誘導療法の開発とその検討. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013年5月11日~12日 (横浜)
- 7) 近藤直実: 喘息・アレルギーのテラーメイド医療. 第30回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 2013年6月8日~9日 (つくば市)
- 8) 川本典生, 金子英雄, 大西秀典, 松井永子, 寺本貴英, 加藤善一郎, 上野 宏, 中埜拓, 近藤直実: S5-4. 「食べて治す」免疫学的抗原改変食品の開発と治療法の確立. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28日~30日 (東京)
- 9) 川本典生, 金子英雄, 桑原秀次, 大西秀典, 松井永子, 寺本貴英, 加藤善一郎, 上野 宏, 中埜拓, 近藤直実: MS15-4. 抗原改変カゼインを用いた牛乳アレルギーに対する経口免疫療法の免疫学的解析. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28日~30日 (東京)
- 10) 川本典生, 金子英雄, 桑原秀次, 大西秀典, 松井永子, 寺本貴英, 加藤善一郎, 上野 宏, 中埜拓, 近藤直実. 0-90 牛乳アレルギーににおける, 抗原改変カゼインを用いた緩徐な経口免疫療法の開発その検討. 第50回日本小児アレルギー学会 2013年10月19日~20日 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

低アレルゲン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ゲン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、低アレルゲン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、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負荷試験を行って、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) を用いた免疫療法を続行中であるが、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免疫療法の改良を試み安全性を確認したが、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ゲン特異的寛容を誘導することを目的に、以下①～③の低アレルゲン化食品の経口摂取による免疫療法を試みる。

- ① 鶏卵アレルギーに対するオボムコイド減量加熱鶏卵
- ② 牛乳アレルギーに対する、ペプチドミルク (E 赤ちゃん)
- ③ 魚アレルギーに対する、酵素処理魚エキス併せて、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。

B. 研究方法

- ① 鶏卵アレルギーに対するオボムコイド減量加熱鶏卵を用いた免疫療法

本年度は、乳児におけるオボムコイド減量加熱鶏卵の鶏卵アレルギー発症予防効果を検討する前段階として、以下の方法で、ハイリスク乳児における安全性を確認した。

対象は、卵白未摂取で生後 9 ヶ月以降のアトピー性皮膚炎罹患乳幼児 51 名 (月齢 9-21 月中央値 11.5 月) を用いた。使用するベビーフードは、

オボムコイド減量加熱全卵を含有する「すきやき風雑炊」(キューピー株式会社) を使用した。経口負荷試験はオープン法で、30 分毎に増量し、判定は、Sampson のグレード分類を使用した。

- ② 牛乳アレルギーに対する、ペプチドミルク (E 赤ちゃん) を用いた免疫療法

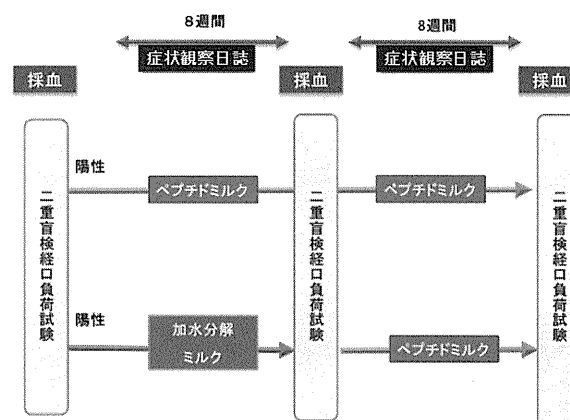


図 1 鶏卵アレルギー治療プロトコール

本年度は、1 歳以上の、牛乳により即時反応が誘発される症例を対象に、加水分解乳 (MA-mi) をプラセボとする RTC を行った。(図 1)

- ③ 魚アレルギーに対する、酵素処理魚エキスをを用いた免疫療法

魚肉の誘発域値が 20 g 以下の魚アレルギー患者を対象に、12 週間単位の酵素処理魚エキス 1 g の連続摂取を行い、安全性、有効性を確認する。

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。

研究は藤田保健衛生大学倫理審査委員会で承認され、文書で同意を得て行った。

C. 研究結果

① 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の確認

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負荷試験を行った。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。

② 牛乳アレルギーに対する、ペプチドミルク (E 赤ちゃん) を用いた免疫療法

9 例 (男/女比 ; 7/2、年齢 ; 1-6 歳、中央値 4 歳) がエントリーし、調乳用ミルク (はぐくみ)、ペプチドミルク (E 赤ちゃん)、加水分解ミルク (MA-mi) を用いた 2 重盲検プラセボ対照負荷試験をおこなったところ、1 例は調乳用ミルクを目標量 (20ml) 摂取可能であったため除外した。残る 8 例の調乳用ミルク、ペプチドミルクの安全積算量はそれぞれ、0.35-9 (中央値 2.9)、0.5-20 (中央値 14.25) で、全例加水分解ミルク (MA-mi) は 20ml 摂取可能であった。現在、ペプチドミルクの安全積算量を用いた免疫療法を続行中である。

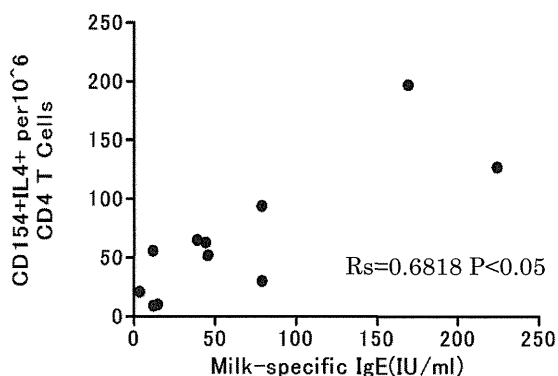


図2 ミルク特異的 IL-4 産生細胞いと特異的 IgE との相関

免疫学的な解析では、活性化マーカー CD154 を用いた牛乳特異的 T 細胞の細胞質内サイトカイン産生を検討し、IL-4 産生細胞と牛乳特異的 IgE との相関を認め、現在免疫療法による推移を検討中である (図 2)。

③ 魚アレルギーに対する、酵素処理魚エキスを用いた免疫療法

これまでに 4 例が免疫療法を終了し、5-12 か月の継続摂取により、目標量の魚肉 20 g 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。

D. 考察

食物アレルギーの経口免疫療法は、通常、アレルギー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、徐々に増量しても、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、低アレルギー化した鶏卵による免疫療法を行い、安全性、有効性を示してきたが、重症例での有効性に課題を残していた。

本年度は、乳児におけるオボムコイド減量加熱鶏卵の鶏卵アレルギー発症予防効果を検討する前段階として、以ハイリスク乳児における安全性を確認した。

また、1 昨年度より、治療対象とするアレルギーを牛乳、魚肉に拡大した。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、低アレルギー化食品を用いた免疫療法の安全性は明らかで、有効性も大いに期待できる結果であった。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とともに、免疫学的な解析を進める予定である。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inuo C, Kondo Y, Itagaki Y, Kurihara K,

- Tsuge I, Yoshikawa T, Urisu A. Anaphylactic reaction to dietary oats. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;110:305-6.
- 2) Nomura T, Tsuge I, Inuo C, Nakajima Y, Tanaka K, Naruse N, Suzuki S, Ando H, Kondo Y, Saitoh S, Urisu A. Effect of Japanese cedar specific immunotherapy on allergen-specific T(H)2 cells in peripheral blood. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;110:380-385.
 - 3) Nomura T, Tsuge I, Inuo C, Nakajima Y, Kondo Y, Sugiura S, Murata H, Iguchi T, Terada A, Saitoh S, Hashimoto S, Urisu A. Food sensitization in Japanese infants is associated with a common Filaggrin variant. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013; 110:388-390.
 - 4) Hirano K, Hino S, Oshima K, Okajima T, Nadano D, Urisu A, Takaiwa F, Matsuda T. Allergenic potential of rice-pollen proteins: expression, immuno-cross reactivity and IgE-binding. *J Biochem.* 2013;154:195-205.
 - 5) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 132:1436-8.
 - 6) Tsuge I, Ito K, Ohye T, Kando N, Kondo Y, Nakajima Y, Inuo C, Kurahashi H, Urisu A. Acute eosinophilic pneumonia occurring in a dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficient patient. *Pediatr Pulmonol.* 2014 49:E52-5.
2. 学会発表
- 1) 宇理須厚雄, 総合アレルギー医育成コースー食物アレルギーガイドラインー, 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会;横浜, 2013.
 - 2) 田中健一、成瀬徳彦、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、小松原亮、百日咳を契機に発症したと考えられた咳喘息の 1 例, 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会;横浜, 2013.
 - 3) 中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達 玲子、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子、小麦グルテンはトランスグルタミナーゼ処理により酸加水分解小麦と同様の IgE 反応性を獲得する, 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会;横浜, 2013.
 - 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、近藤智彦、中村厚、筏島克裕、板垣康治、低アレルゲン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の試み, 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会;横浜, 2013.
 - 5) 犬尾千聡、近藤康人、田中健一、中島陽一、山脇一夫、大久保悠里子、柘植郁哉、鈴木聖子、宇理須厚雄、スギ花粉症児の花粉シーズン暴露による末梢血好塩基球活性化の変化, 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会;横浜, 2013.
 - 6) 宇理須厚雄, 食物アレルギーの最近の話題, 第 18 回日本ラテックスアレルギー研究会ラテックス・OAS フォーラム 2013;横浜
 - 7) 高松伸枝、近藤康人、成瀬徳彦、田中健一、犬尾千聡、柘植郁哉、宇理須厚雄、小林東、矢上晶子、松永佳世子、小野倫太郎、村上洋子、本村千華子、小田嶋 博、高岡有理、亀田誠、柑橘類アレルギーの抗原交差性, 第 18 回日本ラテックスアレルギー研究会ラテックス・OAS フォーラム 2013;横浜
 - 8) 田中健一、森 雄司、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、ウニアレルギー抗原解析と交差反応性の検討, 第 49 回中部日本小児科学会;津, 2013
 - 9) 宇理須厚雄, 園・学校における食物アレルギーへの対応ー食物アレルギーの基礎知識ー, 第 60 回日本小児保健協会学術集会;東京, 2013
 - 10) 宇理須厚雄, 子どもの食物アレルギーUO TO DATE, 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会;名古屋, 2013
- 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
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
伊藤 浩明 あいち小児保健医療総合センター
中川 朋子 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、アレルギーコンポーネントに対する臨床診断における評価を実施し、新規な診断法の開発に寄与することを目的としている。本年度は、昨年度に引き続き、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。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。また、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。

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、それらを用いた臨床診断における評価を実施する。本年度は、ゴマおよびソバのアレルギーコンポーネントについて、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. ゴマのコンポーネントの調製

脱脂したゴマ種子からタンパク質を抽出し、クロマトグラフィーにより 11S グロブリン、7S グロブリン、2S アルブミンを精製した(nSes i 11S, nSes i 7S, nSes i 2S)。また、大腸菌発現系を用いてゴマ 2S アルブミンの分子種に対するリコンビナントタンパク質を調製した(rSes i 1 および rSes i 2)。

2. ソバのコンポーネントの調製

ソバ種子からの抽出液をゲル濾過クロマトグ

ラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより分画し、解析に用いた。

3. 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 抗体値を測定した。ImmunoCAP 法での IgE 抗体値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 ImmunoCAP 法での抗体値に換算し、評価した。rSes i 1 については、ビオチン化タンパク質も調製し、ストレプトアビジン CAP 法による特異的 IgE 値の測定を行った。

C. 研究結果

1. ゴマのコンポーネントの解析

ゴマについて経口負荷試験を行った小児の患者血清（経口負荷試験における陽性群 19 検体および陰性群 21 検体、表 1）について各コンポーネントに対する特異的 IgE 抗体価を測定した。陽性および陰性群間での特異的 IgE 抗体値の比較では、nSes i 11S の特異的 IgE 抗体値は陽性群と陰性群で有意な違いが見られなかった(表 2)。一方、nSes i 7S および nSes i 2S では、ともに陽性群の方が陰性群よりも有意に高い値を示した。ROC(receiver-operating characteristic)分析からの AUC(area under curve)値の比較では、nSes i 2S > nSes i 7S > nSes i 11S の順に高

表1 本研究に用いた検体の臨床データ

Patient Characteristics	Symptomatic group	Asymptomatic group	P-value
Number of patients	19	21	
Sex, no of boys (%)	10 (52.6%)	15 (71.4%)	
Age, median (range)	5.9 (3.1-11.1)	4.0 (1.0-11.7)	0.078
Diagnosis of sesame allergy OFC	19	21	
OFC total dose, g, median (range)	3 (0.1-10)	10 (3-10)	
Total IgE (kU _A /L)	20-4,802	122-11,409	0.688
Specific IgE(kU _A /L) for sesame (range)	5.2-482	4.1-1,008	0.915
Allergic complications, no (%)			
Atopic dermatitis, no (%)	18 (94.7%)	18 (85.7%)	
Bronchial Asthma, no (%)	8 (42.1%)	11 (52.4%)	
Other food allergy, no (%)	17 (89.5%)	19 (90.5%)	
Peanut allergy, no (%)	16(84.2)	1(4.8)	
Soybean allergy, no (%)	2(10.5)	8(38.1)	

表2 ゴマコンポーネントの特異的IgE値

Component	Symptomatic group	Asymptomatic group	P value
Extract	average	27.4	0.376
	median (range)	27.7 (8.9-75.6)	
nSes i 11S	average	20.1	0.592
	median (range)	14.0 (1.4-55.2)	
nSes i 7S	average	23.4	0.003
	median (range)	23.2 (0.7-49.3)	
nSes i 2S	average	27.8	<0.001
	median (range)	24.0 (0.1-74.4)	

い値を示し、2S アルブミンに対する特異的 IgE 抗体値の測定が臨床診断に有効であることが示唆された。さらに、2S アルブミンの分子種である Ses i 1 と Ses i 2 についてリコンビナントタンパク質を調製し、それらの特異的 IgE 値の比較を行った。両分子種に対する特異的 IgE 抗体値は大きく異なり、rSes i 1 の陽性群および陰性群における平均の特異的 IgE 値は 20.9 kUA/L、5.2 kUA/L であり、rSes i 2 の陽性群および陰性群における平均の特異的 IgE 値は 2.5 kUA/L、1.9 kUA/L であった。また、ROC 解析からの AUC 値では、rSes i 1 が rSes i 2 よりも高い値を示した。このことは同じ 2S アルブミンであっても分子種によって患者における感作は異なるとともに、Ses i 1の方が Ses i 2 よりも診断において有効なコンポーネントであることを示唆している。さらに、rSes i 1 についてビオチン化タンパク質を調製し、ストレプトアビジン CAP に結合させ、特異的 IgE 抗体値を測定し、臨床に利用されているゴマの ImmunoCAP 法での特異的 IgE 値との比較を行った(図 1)。ELISA 法での結果と同様に、rSes i の特異的 IgE 抗体値は陽性群で高く、陰性群で低い傾向を示した。ROC 解析からの最適な cut off 値は 3.96 kUA/L であり、この値を用いて感度および特異度を求めると、ともに 80.0%以上であった。ゴマの ImmunoCAP 法での特異的 IgE 値を用い

た診断では、一般的に感度は高いものの特異度が非常に低く、本研究での検体においても同様の傾向を示した。それに対し、Ses i 1 のストレプトアビジン CAP での特異的 IgE 値では AUC 値 0.8 以上の値を示した。以上の結果から、ゴマの 2S アルブミンである Ses i 1 が臨床診断に非常に有効であることが示唆された。

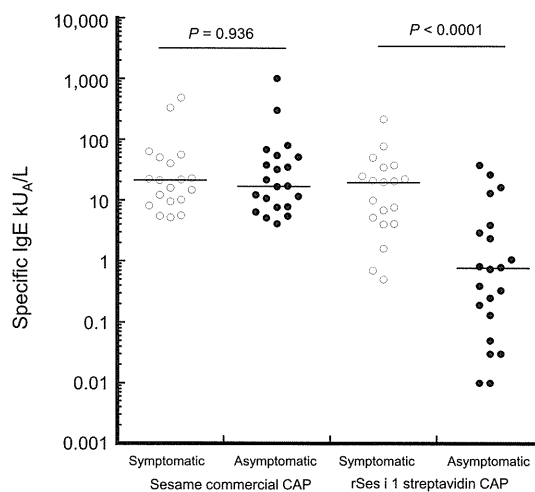


図1 ゴマImmunoCAPおよびSes i 1ストレプトアビジン ImmunoCAPを用いた特異的IgE抗体値

2. ソバのコンポーネントの解析

ソバについて経口負荷試験を行った小児の患者血清（経口負荷試験における陽性群 21 検体および陰性群 25 検体）について特異的 IgE 抗体値を測定した。ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、ソバ種子抽出液を分画し、高分子量画分(11S グロブリン)および低分子量画分(2S アルブミンなど)を調製し、特異的 IgE 抗体値を測定した。ROC 解析による AUC 値では、低分子量画分が高分子量画分よりも高い傾向を示した。そこで、低分子量画分について、さらに分子量に基づいて細かく分けた分画物について同様に解析を行ったところ、低分子側の分画物がより AUC 値が高くなる傾向が見られた。最も高い AUC 値を示した分画物について、さらにイオン交換クロマトグラフィーにより分画し、最終的に AUC 値 0.8 以上を示す画分を調製した(図 2、次頁)。臨床診断に有効なコンポーネントを見出すために、この画分に含まれるタンパク質の同定を進めている。

D. 考察

ELISA およびストレプトアビジン CAP によるゴマコンポーネントに対する特異的 IgE 値の比較から、ゴマアレルギー患者の臨床診断にゴマ 2S

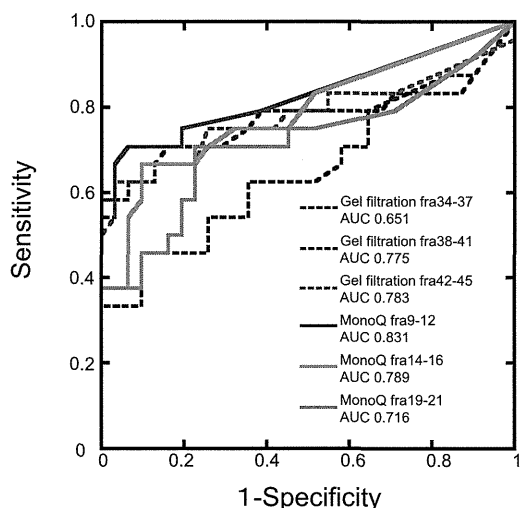


図2 ソバ分画物のROC解析

アルブミンに対する特異的 IgE 抗体値測定の有効性が示唆された。さらに、2S アルブミンの分子種の *Ses i 1* と *Ses i 2* において特異的 IgE 抗体値が大きく異なり、臨床診断への有効性も異なっていた。今後、この要因について検討することが、臨床診断に有効なコンポーネントの効率的な同定に寄与するものと思われる。

E. 結論

ゴマの種子から調製した 2S アルブミンおよびリコンビナントコンポーネントである *Ses i 1* に対する特異的 IgE 抗体値の測定が臨床診断において非常に有効であることが示唆された。今後、このコンポーネントの ImmunoCAP を用いた多施設での評価が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Prak K, Mikami B, Itoh T, Fukuda T, Maruyama N, Utsumi S: Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the soybean mature glycinin A1bB2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2013; 30: 937-41.

2. 学会発表

1) 丸山 伸之、Cabanos Cerrone, 澤田 真千子、田中 昭、伊藤 浩明、佐藤 さくら、海老澤 元宏: 大豆アレルギー臨床診断に有効なコンポーネントの探索, 第 25 回日本ア

レルギー学会春季臨床大会, 横浜 2013. 5. 12

2) 丸山 伸之: 立体構造に立脚した種子タンパク質の分子食品学的研究, 第 2 回 三島海雲学術賞受賞講演, 東京 2013. 7. 5.

3) 丸山 伸之、Cabanos Cerrone, 澤田 真千子、田中 昭、中山 哲、中川 朋子、伊藤 浩明、佐藤 さくら、海老澤 元宏: ゴマ 2S アルブミンのアレルギー臨床診断における評価, 第 50 回日本小児アレルギー学会, 横浜 2013. 10. 18.

4) Nakagawa T, Kando N, Ito K, Sato S, Ebisawa M, Maruyama N: Component-resolved diagnostics of Japanese children with sesame allergy. *Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology, and Immunology Congress, Taipei, Taiwan* 2013. 10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 統合生命医科学研究センター 呼吸器・アレルギー疾患研究チーム チームリーダー
研究協力者 広田 朝光 理化学研究所 統合生命医科学研究センター 呼吸器・アレルギー疾患研究チーム 研究員

研究要旨

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 は活性化 T 細胞、好塩基球、好酸球から分泌される Th2 サイトカインであり、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、コントロール 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。

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、この 10~20 年増加傾向にある。アレルギーマーチはアトピー素因のある患者さんに、アレルギー疾患が年齢とともに次々と発症していく現象であるが、食物アレルギーはそれらの初期に出現する疾患である。近年、アトピー性皮膚炎および気管支喘息において大規模なゲノムワイド関連解析が行われ、それらの遺伝要因が明らかとなり、両疾患において IL13 遺伝子を含む領域 (5q31) が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、IL13 遺伝子多型との関連を検討し、ヒト食物アレルギーにおける IL13 多型の発症に与える影響を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

食物アレルギー患者 603 名、コントロール 938 名について、IL13 遺伝子多型 (rs1295686) 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 (340 例)、気管支喘息合併症例 (182 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 Invader 法を用いて行い、関連解析は χ^2 検定 (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

IL13 遺伝子上の遺伝子多型 rs1295686 において食物アレルギー発症との強い関連を認めた ($P = 4.7 \times 10^{-5}$, OR 1.34)。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 ($P = 2.5 \times 10^{-5}$, OR 1.48)、気管支喘息合併症例 ($P = 8.1 \times 10^{-6}$, OR 1.68) においても強い関連を認めた。

D. 考察

日本人において IL13 遺伝子多型と食物アレルギー発症との間に有意な関連を認めた。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。IL13 においては、アミノ酸の変化を伴う遺伝子多型 rs20541 (Gln144Arg) とアトピー性皮膚炎、および気管支喘息発症との関連がすでに様々な人種で報告されている。rs20541 (Gln144Arg) と今回、関連を認めた SNP とは $r^2 = 1.0$ と連鎖不平衡の状態にあり、rs20541 (Gln144Arg) 多型が病態に影響している可能性もある。IL13 は活性化 T 細胞、好塩基球、好酸球から分泌される Th2 サイトカインであり、B 細胞の分化・成熟、IgE へのクラススイッチや気道上皮細胞からのペリオスチンなどの細胞外マトリックス分子の産生に関与する。喘息では気道リモデリングに関与することが明らか

かとなり、喘息に対する抗 IL-13 抗体は臨床試験中である。食物アレルギーにおいて IL-13 の病態への寄与を明らかにすることにより、治療への応用につながる可能性がある。

E. 結論

日本人において、IL13 遺伝子多型 (rs1295686) と食物アレルギー発症との強い関連が示された。気管支喘息合併食物アレルギー症例に絞り込むとより強い関連を認めた。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Park HW, Dahlin A, Tse S, et al. Genetic predictors associated with improvement of asthma symptoms in response to inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:664-669.
- 2) Hayashi M, Hirota T, Saeki H, et al. Genetic polymorphism in the TRAF3IP2 gene is associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci.* 2014;73:264-5.
- 3) Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, et al. Inhaled corticosteroid treatment modulates ZNF432 gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:723-728.
- 4) Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, et al. Lung functions of Japanese patients with chronic rhinosinusitis who underwent endoscopic sinus surgery. *Allergol Int.* 2014;63:27-35.
- 5) Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, et al. Genome-wide association study for levels of total serum IgE identifies HLA-C in a Japanese population. *PLoS One.* 2013;8:e80941.
- 6) Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients

- receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:305-12.
- 7) Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza-Gordillo J, et al. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2013;45:808-12.
 - 8) Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, et al. Genetic polymorphisms in the IL22 gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci.* 2013;71:148-50.
 - 9) Himes BE, Sheppard K, Berndt A, et al. Integration of mouse and human genome-wide association data identifies KCNIP4 as an asthma gene. *PLoS One.* 2013;8:e56179.
 - 10) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, et al. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy.* 2013;68:92-100.
 - 11) Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, et al. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphopoietin (TSLP) genotype. *Allergol Int.* 2013;62:123-30.
 - 12) Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int.* 2013;62:21-28.
 - 13) Tamari M, Hirota T. Genome-wide association studies of atopic dermatitis. *J Dermatology.* 2013 in press.
 - 14) 玉利真由美, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器疾患 別冊 医学のあゆみ 呼吸器疾患, 61-63, 2013.
 - 15) 広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: 私は思う 遺伝子解析の現在の問題点と今後の展望. アレルギーの臨床, 33(6), 571-574, 2013.
 - 16) 広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: アレルギー疾患発症関連遺伝子のトピックス 喘息, 26(1), 13-16, 2013.
 - 17) 広田朝光, 玉利真由美: ゲノム研究から見たバイオマーカー(専門医のためのアレルギー学講座) アレルギー, 62(5), 532-538, 2013.
 - 18) 広田朝光, 玉利真由美: 疾患概念と病因

- 論：ゲノム解析 最新医学(最新医学社) 68(6), 1072-1078, 2013.
- 19) 広田朝光, 玉利真由美: 喘息の全ゲノム関連解析 GWAS の解説 -日本の報告と世界の報告- 呼吸器疾患最新の治療 2013-2015(南江堂) 32-38, 2013.
- 20) 玉利真由美, 田中翔太, 角大治朗, 広田朝光: III. 診断の進歩 ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患 呼吸, 32(3), 274-284, 2013.
2. 学会発表
- 1) アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析-アトピー関連領域と成人喘息関連領域-, 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 閉塞性肺疾患の多様性とフェノタイプ 2013, 有楽町 東京. 玉利真由美
- 2) Genetic Study of Allergic Diseases, Taiwan-Japan Joint Symposium on BioBank and Genomic Medicine in Academia Sinica 2013, 台北 台湾. Mayumi Tamari
- 3) ゲノムワイド関連解析によるアトピー性皮膚炎関連遺伝子の同定, 第 112 回日本皮膚科学会総会 教育講演 23 アトピー性皮膚炎: バリア障害による表皮と免疫のクロストーク 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美
- 4) Genomics in Allergic Disease, Symposium 24 World Allergy Forum, Omics in Allergic Disease, European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, ミラノ イタリア. Mayumi Tamari
- 5) アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析, 第 34 回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 4 炎症性疾患の再生のゲノム・エピゲノム解析の現状と展望 2013, 宝ヶ池 京都. 玉利真由美
- 6) アトピー性皮膚炎のゲノム解析の現状, 特別講演 九州大学皮膚科学教室 かゆみ研究会 2013, 博多 福岡. 玉利真由美
- 7) Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, 8th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013, Interface between Immune System and Environment 2013, 横浜 神奈川. Mayumi Tamari
- 8) アレルギー疾患の遺伝要因 ゲノムワイド関連解析を中心に, 第 64 回東海小児アレルギー談話会 特別講演 2013, 名古屋 愛知. 玉利真由美
- 9) Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, Plenary Lecture 1 第 50 回日本小児アレルギー学会 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし