

2022 年度研究助成事業

成果報告会 要旨集



ニッポンハム
食の未来財団

2023 年 10 月 10 日（火）

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2022年度研究助成事業 成果報告会
第一部 個人研究助成 ポスター報告会 プログラム

日 時：2023年10月10日（火）13時30分から14時30分

場 所：AP品川アネックス 1階 Dルーム

発表者：2022年度研究助成事業 個人研究採択者

コアタイム：偶数演題番号13時30分～14時00分、奇数演題番号14時00分～14時30分

演題番号	課題名	所属機関・氏名	頁
01	機能性大麦を用いた腸内細菌叢を標的とする新たな食物アレルギー治療法の開発	関西医科大学 医学部 小児科学講座 講師 赤川 翔平	5
02	経皮感作による食物アレルギー発症の新規病態機序の解明	順天堂大学大学院 医学研究科アトピー疾患研究センター 助教 安藤 智暁	6
03	食物アレルギーのアウトグローにおける抗原特異的 IgD の役割	福井大学医学部附属病院 総合周産期母子総合医療センター 特命助教 伊藤 尚弘	7
04	経口免疫寛容を強力に誘導する新規 Treg 標的バイオロジクスの創製	神戸学院大学 薬学部 助教 井上 雅己	8
05	食物アレルギー予防・治療を目指した核内受容体リガンドによる制御性 T 細胞分化制御解析	島根大学 医学部医学科 免疫学講座 講師 小谷 仁司	9
06	D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドによる持続的な抗アナフィラキシー効果の検証	医療創生大学 薬学部 衛生薬学部門 准教授 佐藤 陽	10
07	発酵を利用した低アレルゲン化エビ調味料開発の試み	北海道大学大学院 水産科学研究院 技術専門職員 清水 裕	11
08	母乳中 micro RNA が食物アレルギー発症に及ぼす影響	千葉大学医学部附属病院 小児科 助教 中野 泰至	12
09	加工食品の輸出拡大を目指したコーデックス指定アレルゲンならびにアレルゲン様化学物質の網羅的検出法の基盤的検討	国立医薬品食品衛生研究所 食品部第五室 室長 中村 公亮	13
10	胃食道逆流に注目した牛乳アレルギーモデルマウスの免疫機序の解明	名古屋市立大学大学院 医学研究科 新生児・小児医学 講師 野村 孝泰	14
11	鶏卵アレルギー小児の長期的観察による食物アレルギー寛容誘導機序の解明	京都大学大学院医学研究科 客員研究員 田中 孝之	15
12	経口免疫寛容における粘膜組織樹状細胞と腸内細菌叢との相互作用の役割の解明	宮崎大学 医学部医学科 感染症学講座免疫学分野 助教 深谷 知宏	16
13	固形食物による消化管アレルギーの予後予測因子についての研究	自治医科大学附属さいたま医療センター 小児科 講師 牧田 英士	17
14	LGG 乳酸菌を併用して行う経口免疫療法の有効性を検証する研究	独立行政法人国立病院機構相模原病院 小児科 レジデント 三浦 陽子	18
15	低アレルゲン化小麦の交差反応を利用した安全性の高い小麦アレルギーの予防法と治療法の開発	広島大学大学院 医系科学研究科（薬） 准教授 横大路 智治	19
16	Food protein induced enterocolitis syndrome の診断における血清 TARC 値の有用性に関する研究	杏林大学医学部附属病院 小児科学教室 助教 濱野 翔	20

※敬称略

2022年度研究助成事業 成果報告会

第二部 共同研究助成 口頭成果報告会 プログラム

日 時：2023年10月10日（火） 15時00分より
場 所：AP品川アネックス 1階 A+Bルーム
発表者：2022年度研究助成事業 共同研究採択者

15:00 開会挨拶

15:10～15:30

唾液の次世代プロテオーム解析による、非侵襲的な食物蛋白誘発胃腸炎の診断・症状誘発予測マーカー
の開発・・ 22

井上 祐三朗

千葉大学大学院 医学研究院総合医科学 特任准教授

15:30～15:50

食物アレルギー児におけるレジリエンス尺度の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26

今井 孝成

昭和大学 医学部小児科学講座 教授

15:50～16:10

食品の味覚成分を利用した食物アレルギー制御法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

神沼 修

広島大学原爆放射線医科学研究所 疾患モデル解析研究分野 教授

-----（休憩）16:10 から 16:25-----

16:25～16:45

アレルゲンコンポーネントを活用した乳児期の食物アレルゲン感作に関する研究・・・・・・・・ 41

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 部長

16:45～17:05

新規アレルギー抑制分子 Ly6G によるマスト細胞の機能制御と創薬への応用・・・・・・・・ 49

鈴木 亮

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 教授

17:05～17:25

モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群における経口免疫治療の確立と機序解明・・・・ 57

藤枝 重治

福井大学学術研究院 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

17:25 閉会挨拶

17:30 写真撮影

※敬称略

評議員・役員・研究助成委員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・64

当財団案内・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・66

2022年度研究助成事業 個人研究助成

〈ポスター報告〉

要旨

※報告書全文は当財団Webサイトに掲載予定

研究課題名	【演題番号 01】 機能性大麦を用いた腸内細菌叢を標的とする新たな食物アレルギー治療法の開発
フリガナ	アカガワ ショウヘイ
代表者名	赤川 翔平
所属機関（機関名） （役職名）	関西医科大学医学部 小児科学講座 講師
本助成金による発表 論文, 学会発表	第 71 回日本アレルギー学会学術大会（2022 年 10 月 7 日、東京） シンポジウム 6: Microbiome を考える 「食物アレルギーと microbiome」 演者：赤川翔平、金子一成 第 126 回日本小児科学会学術集会（2023 年 4 月 15 日、東京） 分野別シンポジウム 7：アレルギー疾患の予防 「食物アレルギー発症予防と microbiome」 演者：赤川翔平、金子一成

研究結果要約

アレルギー疾患の患者において腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) が認められることが相次いで報告されている¹⁻⁸。申請者らは、小児の鶏卵アレルギー患者では酪酸産生菌の減少に特徴づけられる dysbiosis を来していることを明らかにした⁹。酪酸は腸管において、過剰な免疫応答を抑制する役割を担う制御性 T 細胞の分化・誘導を促進するため、dysbiosis の是正が食物アレルギーの新たな治療標的となり得る。一方で、申請者らは食物繊維を豊富に含んだ機能性大麦の継続摂取が酪酸産生菌を増加させることを報告した¹⁰。本研究では、申請者らが過去に取り組んだ小児腸内細菌叢の解析手法をもとに、「機能性大麦の継続的な摂取が、食物アレルギー患者の酪酸産生菌減少に特徴づけられる dysbiosis を是正し、食物アレルギーの新たな治療法になり得る」という仮説をプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験を用いて検証することを目的とした。対象は 1 歳から 8 歳の鶏卵アレルギー患者 50 名とし、機能性大麦（またはプラセボとして米粉）を 3g 含んだクッキーを 16 週間摂取し、腸内細菌叢の変化および経口負荷試験での鶏卵摂取閾値を 2 群で比較することとした。2023 年 3 月末時点で、8 名のリクルートが完了したが、4 名が脱落し、試験を完遂できたのは機能性大麦群 1 名、プラセボ群 3 名の 4 名のみであり、進捗に大幅に遅延が生じている。そのため、今後は近畿食物チャレンジネットワークを通じた多施設共同研究に変更し、本研究の完遂を目指す。

研究課題名	【演題番号 02】 経皮感作による食物アレルギー発症の新規病態機序の解明
フリガナ	アンドウ トモアキ
代表者名	安藤 智暁
所属機関（機関名） （役職名）	順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター 助教
本助成金による発表論文，学会発表	Frontiers in Immunology (Front Immunol) に論文投稿中 (in revision) であり、論文が受理され次第、ニッポンハム食の未来財団へ報告する。

研究結果要約

食物アレルギーは食物抗原に対する特異的 IgE の産生（感作）に始まる。近年、経皮感作の重要性が示されている。また、黄色ブドウ球菌毒素 δ -toxin は感作に関与する可能性が指摘されている。一方、これまでの経皮感作モデルで行われてきた皮膚の tape-stripping はそれ自体、腸管の免疫系に影響を及ぼすので、tape-stripping を使用しないモデルの解析が必要である。本研究の目的は、tape-stripping を使用しないマウスモデルを利用し、皮膚における黄色ブドウ球菌毒素の存在が食物アレルギーに与える影響を明確にすることである。マウスの皮膚に δ -toxin の存在下・非存在下で卵白アルブミン(OVA)を塗布した後、OVA を経胃管投与すると、 δ -toxin が存在する場合だけ、OVA 特異的 IgE 値の上昇とともに食物アレルギーが発症した。 δ -toxin はケラチノサイトに作用して IL-1 α の産生を促し、IL-1 α 依存的な皮膚の樹状細胞の活性化（OVA の取り込みと所属リンパ節への移動）を介して、感作とその後の食物アレルギーを誘導することが明らかになった。この結果は、皮膚に黄色ブドウ球菌毒素 α -toxin が存在するだけで、食物抗原に対する感作が誘導されることを示した。従って、本研究成果は、食物アレルギーに対する画期的な予防法の開発につながる可能性を秘めており、大きな意義を有する。

研究課題名	【演題番号 03】 食物アレルギーのアウトグローにおける抗原特異的 IgD の役割
フリガナ	イトウ ナオヒロ
代表者名	伊藤 尚弘
所属機関（機関名） （役職名）	福井大学医学部附属病院 総合周産期母子医療センター 特命助教
本助成金による発表 論文，学会発表	1. The dual aspects of IgD in the development of tolerance and the pathogenesis of allergic diseases. <u>Itoh N</u> , Ohshima Y. Allergol Int. 2023;72:227-233.

研究結果要約

【背景】食物アレルギー患者数は年々増加しているが、有効な治療法がなく、原因食物の除去が基本である。しかし、誤食によるアナフィラキシーのリスクがあり、その対応には十分に注意を払う必要がある。治療を目指して、経口免疫療法が研究段階的に行われているが、その効果は不十分で、更には好酸球性消化管疾患の合併の可能性もある。

【目的・方法】本研究は食物アレルギーの耐性獲得の誘導による食物アレルギーの治療、好酸球性消化管疾患の発生機序の解明を目的として行う。具体的には、近年食物アレルギーとの関連が明らかとなっている抗原特異的 IgD を検討することで、抗原特異的 IgD がどのように病態に関わっているかを明らかにする。

【結果】マウスでは、好酸球性消化管疾患を誘導した経皮感作食物アレルギーモデルマウスが抗原特異的 IgD は増加していない一方で、免疫療法モデルマウスでは増加したことを明らかにした。ヒトでは、当初予定していた経口免疫療法を行っている検体数が十分収集できず、横断研究を行い、食物アレルギーの重症度に応じて抗原特異的 IgD が増加傾向にあることを明らかにした。

【今後の予定】今後は、マウスでは免疫グロブリンの再現性を確認すると共に、サイトカインや腸管組織の解析を追加で行う。ヒトでは、引き続き経口免疫療法の検体を収集する予定である。データが十分揃った時点で英文誌に投稿するとともに国内外の学会で発表する。

研究課題名	【演題番号 04】 経口免疫寛容を強力に誘導する新規 Treg 標的バイオリジクスの創製
フリガナ	イノウエ マサキ
代表者名	井上 雅己
所属機関（機関名） （役職名）	神戸学院大学 薬学部 助教
本助成金による発表 論文，学会発表	井上雅己, TNFR2 を標的に制御性 T 細胞を増殖するバイオリジクス, イノベーション・ジャパン 2022—大学見本市—（オンライン）, 2022. 10. 4-31. 井上雅己, 制御性 T 細胞の増幅を目指した 2 型 TNF 受容体アゴニストタンパク質の創製, BioJapan 2022（横浜）, 2022. 10. 12-14. 柴田紗弥, 井上雅己, 屋田萌生, 角田慎一. 2 型 TNF 受容体シグナルを介した Treg 制御による食物アレルギー抑制効果, 日本薬学会第 143 年会（札幌）, 2023. 3. 26.

研究結果要約

制御性 T 細胞（Treg）は、末梢性免疫寛容の中心を担うリンパ球であり、腸管粘膜固有層に多く存在する。近年、食物アレルギー患者では Treg の機能不全が認められ、アレルギー発症との関連が注目されている。これは、Treg の機能を適正にコントロールする方法、とりわけ Treg を特異的に活性化する方法を確立できれば、食物アレルギーの予防や治療に有効となる可能性を示唆する。我々は、これまで、2 型 TNF 受容体（TNFR2）シグナルが Treg の制御に重要な役割をもつことを見出しており、高い TNFR2 刺激活性と生体内安定性を有し、生体内で Treg 機能を増強することで過剰な免疫応答を抑制するための新規タンパク質分子として、独自の TNFR2 アゴニスト TNF 変異体にヒト IgG-Fc を融合した「scR2agoTNF-Fc」を創製してきた。本研究では、scR2agoTNF-Fc の生体内外での Treg 増幅効率を調べるとともに、オボアルブミン（OVA）誘導食物アレルギーマウスにおける scR2agoTNF-Fc の病態抑制効果を検証した。scR2agoTNF-Fc は、他のリンパ球に対して Treg を優先的に増幅し、Treg の免疫抑制活性にも寄与した。また、食物アレルギーマウスにおいて、scR2agoTNF-Fc は OVA 摂取後の下痢症状を改善し、リンパ節中の CD4+Foxp3+ Treg を増加させたことから、アレルギー病態の抑制に有用であると考えられた。したがって、TNFR2 を標的とした Treg 増幅は、免疫寛容を強化できる新たな食物アレルギー治療薬の開発に繋がると期待された。

研究課題名	【演題番号 05】 食物アレルギー予防・治療を目指した核内受容体リガンドによる制御性 T 細胞分化制御解析
フリガナ	コタニ ヒトシ
代表者名	小谷 仁司
所属機関（機関名） （役職名）	島根大学医学部医学科 免疫学講座 講師
本助成金による発表 論文，学会発表	日本薬学会 第 143 年会(札幌)でのポスター発表 28P1-am1-065 「T 細胞分化制御活性を有する天然化合物の解析」

研究結果要約

本研究では、健康で幸せな食生活を営み、多くの人々が食を楽しむことを可能とすることを目的として、食物アレルギーの予防・治療に有用な新たな機序の医薬品開発に繋がる研究を行うこととした。制御性 T 細胞の分化制御をする核内受容体 NR4A2/RXR ヘテロダイマーをターゲットとして、制御性 T 細胞の分化促進する化合物を探索してきた。特に、核内受容体 NR4A2 はリガンドポケットを持たず、リガンド開発が難しいため、RXR とのヘテロダイマーとして間接的に活性化するリガンドとして、honokiol とプレニルフラボノイドに関して、ヘテロダイマーの選択性の検討および、他のヘテロダイマーを介した副作用の有無などを調べるとともに、食物アレルギーモデルによる有用性の検討を評価した。その結果、これらの化合物は NR4A2 に対して RXR を介して転写活性化を示すことを明らかにした。また、他の核内受容体を介した副作用の有無などをマウスに honokiol を投与した結果、LXR/RXR を介した脂肪肝は起きないことが確認された。さらに、通常時の honokiol の経口投与では、脾臓における制御性 T 細胞の割合が増加することはなく、予想に反し若干であるが減少傾向が確認された。また、食物アレルギーモデルを利用した honokiol による予防・治療効果に関しては、残念ながらモデル動物の症状も弱く、honokiol の効果が確認できなかった。

研究課題名	【演題番号 06】 D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドによる持続的な抗アナフィラキシー効果の検証
フリガナ	サトウ アキラ
代表者名	佐藤 陽
所属機関（機関名） （役職名）	医療創生大学 薬学部 衛生薬学部門 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	1. Akira Sato, Takahiro Fukase, Keiichi Ebina, Biotinylated peptides substituted with D-amino acids with high stability as anti-anaphylactic agents targeting platelet-activating factor, J. Pept. Sci. 2023; 28; e3412. 2. 大平 慎, 佐藤 元汰, 小川 裕大, 根本 妃奈, 矢吹 彩乃, 蝦名 敬一, 松本 司, 佐藤 陽, D-アミノ酸含有ビオチン化ヘプタペプチドの抗アレルギー薬としての有用性, 日本薬学会第 143 年会, 2023 年 3 月 27 日, 札幌.

研究結果要約

血小板活性化因子（PAF）は、アナフィラキシーの発症に関わる生理活性脂質として知られており、その活性を阻害することで致死的なアナフィラキシーを改善できる。最近私達は、生体内安定性に優れ、PAF との特異的結合能を有しその活性を抑制する D-アミノ酸含有ビオチニル化ヘプタペプチドを見出した。本研究では、このペプチドのアナフィラキシー治療薬としての開発・実用化を目指して、疾患モデル動物を用いてペプチドの有効性を検証した。その結果、今回用いた 3 種類のペプチド（peptide 1～3）のうち、N 末端側のアミノ酸（1 個）を D 体化した peptide 2 は、L 体アミノ酸のみからなる peptide 1、N 末端側 C 末端側の両アミノ酸（計 2 個）を D 体化した peptide 3 と異なり、アナフィラキシーによる体温低下を劇的かつ持続的に抑制した。さらに、peptide 2 は、アナフィラキシーの病態形成に関わるマスト細胞における IgE 依存および非依存性の脱顆粒やロイコトリエン遊離を劇的に抑制に関与した。以上の結果から、今回用いたペプチドのうち、peptide 2 は、PAF 活性阻害のみならず、マスト細胞の作用を抑制することにより持続的な抗アナフィラキシー効果を示すと考えられた。今後はこの抗アナフィラキシー効果のさらなる作用機序を解明していく予定である。

研究課題名	【演題番号 07】 発酵を利用した低アレルギー化エビ調味料開発の試み
フリガナ	シミズ ユタカ
代表者名	清水 裕
所属機関（機関名） （役職名）	北海道大学 大学院水産科学研究院 技術専門職員
本助成金による発表論文，学会発表	学会発表： Ulfah Amalia、清水 裕、渡辺 一彦、佐伯 宏樹。 発酵スターターの使用によるエビ発酵調味料 TERASI の潜在的アレルギー性低減化の試み。 第 77 回日本栄養・食糧学会大会，2023 年，2D306c。 発表論文： Ulfah A, Shimizu Y, Saeki H. Food safety evaluation of commercial Terasi, Indonesian fermented shrimp paste, from the viewpoint of food allergy. Fisheries Science. 2023;89:253-61.

研究結果要約

本研究では、インドネシアの伝統的な小エビ発酵食品である TERASI をモデル食品とした、低アレルギー性エビ発酵調味料の製造について検討した。まず、インドネシアにて市販される TERASI を 20 種類調査したところ、市販 TERASI の多くにアレルギー性が残存していることが判明した。次に、日本近海で漁獲された 2 種の小エビ（アキアミ、イサザアミ）に、種々のスターターを添加して TERASI を調製し、それに含まれるエビの主要アレルギー（トロポミオシン、TM）の IgE 結合能を、エビアレルギー患者血清を用いて調査した。スターターには、市販あるいは自作した TERASI、または米麹を用いた。その結果、原料をアキアミとした場合は、市販 TERASI の一部、および米麹を用いた TERASI において、一部の患者で IgE 結合能の低下が見られたが、他のスターターでは明確な IgE 結合能の低下は確認できなかった。一方で、イサザアミを原料とし、アキアミからスターターを使用せずに調製した TERASI または市販の TERASI をスターターとした TERASI は、供した全ての患者において、スターター不使用の物よりも大幅な IgE 結合能の低下が観られた。以上の結果は、原料とスターターを適切に組み合わせることで、製造工程における TM の分解を促進し、最終製品のアレルギー性を低減できることを示している。

研究課題名	【演題番号 08】 母乳中 micro RNA が食物アレルギー発症に及ぼす影響
フリガナ	ナカノ タイジ
代表者名	中野 泰至
所属機関（機関名） （役職名）	千葉大学医学部附属病院 小児科 助教
本助成金による発表 論文，学会発表	なし

研究結果要約

我々はハイリスク出生コホート研究（CHIBA study）において 4 か月までの母乳栄養が 1 歳時点での卵白感作のリスク因子となることを報告した（Nakano et al. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020）。母乳中には様々な免疫活性物質の他に microRNA (miRNA) も豊富に存在しており、免疫に関わる miRNA も豊富に存在していることが分かっている。母乳中 miRNA は消化管の中でも安定に存在することも分かっており、母乳を介して児に影響を与えている可能性が高い。しかし、母乳中 miRNA が乳児期の食物アレルギー発症に関わっているかは未だ明らかにされていない。そこで本研究では母乳中 miRNA が食物アレルギーにどのように関わっているかを検討することを目的として本研究を立案した。我々の出生コホート研究の母乳サンプルを用いて 3D-Gene® Human miRNA Oligo chip を用いて miRNA の発現解析を行った。母乳中には 2283 個の miRNA が検出された。1 歳時点で卵白感作の有無で比較すると miR-342-5p, 551b-5p, 3192-5p が卵白感作群で 8 倍以上発現が低下していた。この中で miR-342-5p は VEGF, TGF β signaling に関わっており卵白感作に関わっている可能性が示唆された。

研究課題名	【演題番号 09】 加工食品の輸出拡大を目指したコーデックス指定アレルゲンならびにアレルゲン様化学物質の網羅的検出法の基盤的検討
フリガナ	ナカムラ コウスケ
代表者名	中村 公亮
所属機関（機関名） （役職名）	国立医薬品食品衛生研究所 食品部第五室 室長
本助成金による発表論文，学会発表	【発表論文】 なし 【学会発表】 なし

研究結果要約

近年、食物アレルギーの発症の報告は世界的に増加傾向にある。発症の抑制には、食品への「アレルギー表示」が有効な方法の一つである。しかしながら、アレルギー表示対象の食品は国や地域で異なっており、食品の国際貿易という観点から、食物アレルギー対応食品を保証できるようなアレルゲンを網羅して検知する有用な方法は示されていないことが問題となっている。そこで本研究では、食品の食物アレルギー表示の適正さを確認するための分析法として、液体クロマトグラフ質量分析計 LC-MS/MS を用いた亜硫酸塩類の誘導体化物とアレルゲンタンパク質由来のペプチドを同時に検出する方法を開発した。本研究より、第 3 級アミノ基とオクタデシル基を有するカラムを使用し、移動相にギ酸を含む水/アセトニトリルを用いてグラジエント溶出を行うことで、ヒドロキシメタンスルホン酸および特定原材料 8 品目（小麦、そば、乳、卵、甲殻類[えび・かに]、落花生、くるみ）の指標ペプチドの同時分析が可能であることが示唆された。すなわち、添加回収試験では回収率、併行精度、室内再現精度はいずれも良好な結果が得られ、また 10 種類の市販加工食品の測定において各原材料表示と本分析法により検出結果が一致したことから、本研究で開発した方法は、食品に含まれる亜硫酸塩類およびアレルゲンタンパク質の同時検出が可能であることが示唆された。

研究課題名	【演題番号 10】 胃食道逆流に注目した牛乳アレルギーモデルマウスの免疫機序の解明
フリガナ	ノムラ タカヤス
代表者名	野村 孝泰
所属機関（機関名） （役職名）	名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学 講師
本助成金による発表 論文，学会発表	なし

研究結果要約

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。本研究では、乳児期の胃食道逆流による経気道感作が牛乳アレルギーの発症機序の一端を担っていると仮説を立て、動物モデルを用いた解析を行った。2020 年度の実験で、牛乳と酸の混合物（牛乳＋酸）の気道感作による牛乳アレルギーモデルマウスを確立した。2021 年度の実験で、本モデルが TLR4 依存的な反応であることが明らかになった。

モデルは確立したものの、その免疫機序の詳細は不明である。我々は初期の自然免疫の反応に注目し、網羅的な解析を駆使することでその機序を明らかにする。本年度は、肺胞マクロファージの RNA-seq、肺のサイトカインのマルチプレックス解析などを計画したが、結果的にはより強力な解析手法である、肺の single cell RNA-seq 解析を行うことができた。

また、TLR4 依存性を認めたが、牛乳と酸の感作に特異的な反応であるか確認するため、他の感作モデルでの TLR4 依存性を確認する必要があると考えた。

研究課題名	【演題番号 11】 鶏卵アレルギー小児の長期的観察による食物アレルギー寛容誘導機序の解明
フリガナ	タナカ タカユキ
代表者名	田中 孝之
所属機関（機関名） （役職名）	京都大学大学院医学研究科 客員研究員
本助成金による発表 論文，学会発表	今年度は、なし

研究結果要約

わが国の即時型食物アレルギーの原因食物として最も頻度が高いのは鶏卵であり、特異的 IgE 抗体測定や食物経口負荷試験を用いた通常の診療で耐性獲得に至る患者も多いが、IgE 低値でも症状誘発が見られる症例や耐性獲得が進まない症例など、問題も残っている。今回我々は鶏卵アレルギー患者をリクルートしてコホートを作成し、経口食物負荷試験と同時に免疫学的な解析を行うことにより、実臨床の中で 1：鶏卵への耐性獲得例・そうでない例の免疫学的な違いを明らかにし、2：鶏卵除去指導の指標として食物負荷試験の補助となるバイオマーカーを同定することを目的に研究を進めている。

2021 年 2 月より症例のリクルートを開始し、2023 年 3 月末時点までに 232 症例が参加した。各症例はリクルート時の鶏卵摂取量でグループ分けしていて、卵白摂取不可の「持続群」が 98 人と最も多く、加熱卵白 1 g 以上、10 g 未満「段階増量群」が 37 人、加熱卵白 10 g 以上摂取可の「耐性獲得群」が 61 人、鶏卵アレルギーの既往のない「コントロール群」が 36 人となっている。初回のおよび 2 回目の検体提供時に PBMC を凍結保存しており、これらの解析を通じて次年度以降、

- 1, 食物負荷試験結果と相関するバイオマーカーの探索
- 2, 低リスク群と高リスク群患者の間で有意に差のある指標の同定
- 3, 上記の指標が耐性獲得の中でどのように変化するかを追跡

の 3 点の解明を引き続き進めていく。

研究課題名	【演題番号 12】 経口免疫寛容における粘膜組織樹状細胞と腸内細菌叢との相互作用の役割の解明
フリガナ	フカヤ トモヒロ
代表者名	深谷 知宏
所属機関（機関名） （役職名）	宮崎大学医学部医学科感染症学講座免疫学分野 助教
本助成金による発表 論文，学会発表	1 深谷知宏、宇都倫史、富永萌、佐藤克明. Gut dysbiosis abrogates the establishment of oral tolerance through the dysregulation of the crosstalk between CD103+ conventional dendritic cells and innate lymphoid cells in mesenteric lymph nodes. 第 51 回日本免疫学会総会・熊本・2022

研究結果要約

近年、アレルギー疾患発症の低年齢化が指摘されており、乳児期での抗生剤の使用とその後のアレルギー疾患の発症増加との関連が報告されている。一方、消化管は外来抗原に常に曝されており、病原微生物には防御免疫反応を惹起し、食物抗原には経口免疫寛容として知られる不応答性を成立させバランスを保っている。また、食物アレルギーや炎症性腸疾患ではこのバランスの破綻が関与すると考えられている。さらに、宿主と腸内細菌叢との共生“Symbiosis”が粘膜免疫バランスに影響を与えることが明らかになりつつあり、その喪失の一因として腸内細菌叢の多様性の低下“Dysbiosis”が考えられている。現在までに、“経口免疫寛容の破綻”と“Dysbiosis”との関連が指摘され、抗生剤曝露によるアレルギー疾患発症リスクの増加への関与が推察されているが、その作用機序について不明な点が多く残されている。

本研究では、幼若期の抗生剤曝露によるアレルギー疾患を導く経口免疫寛容の破綻機構の解明を目的として、その作用機序について免疫応答の司令塔として作用する樹状細胞と腸内細菌叢の相互作用に着眼し検討を行った。その結果、抗生剤曝露により消化管粘膜組織樹状細胞の腸内細菌叢との相互作用に基づく免疫寛容誘導能の喪失が関与し、結果的に経口免疫寛容の破綻を誘発することにより、アレルギー疾患の発症・増悪を導くことが明らかとなった。

研究課題名	【演題番号 13】 固形食物による消化管アレルギーの予後予測因子についての研究
フリガナ	マキタ エイシ
代表者名	牧田 英士
所属機関（機関名） （役職名）	自治医科大学附属さいたま医療センター小児科 講師
本助成金による発表 論文，学会発表	牧田英士、黒田早恵、板橋佳恵、菅原大輔、市橋光：卵黄 FPIES の短期予後予測における血清 TARC 値の有用性、第 71 回日本アレルギー学会学術大会、2022 年 10 月 7-9 日、東京

研究結果要約

消化管アレルギー Food protein induced enterocolitis syndrome (FPIES) は特定の食物を摂取した後に嘔吐などの消化器症状のみを呈するアレルギー性疾患であるが、診断や予後予測のためのバイオマーカーは確立されていない。本研究では固形食物 FPIES の予後予測に有用なバイオマーカーについて検討した。まず、FPIES の急性期に上昇するバイオマーカーの探索のために、TARC、MMP3、SCCA2、プロカルシトニン(PCT)を候補に挙げ負荷試験陽性症例の症状出現前後で測定したところ、TARC、MMP3、PCT が有意に上昇していた。次に、TARC、MMP3、PCT が FPIES の疾患特異的なマーカーであるか、他疾患との鑑別に有用であるかを調べるために、FPIES 群と対照群(感染性胃腸炎・敗血症)で比較検討を行った。結果はいずれも FPIES 群で有意に高値だったが、ROC 解析により特に TARC と MMP3 が有用であることがわかった。これらの結果を基に、FPIES の急性期の TARC、MMP3、PCT と次回(約 1 年後)の負荷試験結果(寛解の有無)との関連を調査したところ、次回負荷試験陽性群は陰性群よりも TARC は有意に高値で、MMP3 と PCT は統計学的有意差を認めないものの次回負荷試験陽性群の方が高値であった。今後、症例集積を継続し、長期予後についても検討を行う方針である。FPIES の診断や予後予測に有用なバイオマーカーの確立により、診療の向上が期待される。

研究課題名	【演題番号 14】 LGG 乳酸菌を併用して行う経口免疫療法の有効性を検証する研究
フリガナ	ミウラ ヨウコ
代表者名	三浦 陽子
所属機関（機関名） （役職名）	独立行政法人 国立病院機構 相模原病院 医師
本助成金による発表 論文, 学会発表	第 59 回 日本小児アレルギー学会学術大会 APAPARI2022 合同開催

研究結果要約

(目的) 症状誘発閾値が低い重症なピーナッツ・鶏卵・小麦アレルギー児に対し、乳酸菌を併用した少量を目標とした経口免疫療法(OIT)の効果を検証した。

(方法) 少量 OIT に乳酸菌を併用し(介入群)、12 ヶ月後に 2 週間除去後の中等量の食物経口負荷試験を実施し、中等量耐性獲得の有無を乳酸菌併用なしの OIT(対照群)と比較した。介入群で、開始時、1 ヶ月後、12 ヶ月後の腸内細菌叢の変化を測定した。

(結果) 中等量を耐性獲得したのは、ピーナッツ OIT で介入群 21%(4/19) vs 対照群 11%(2/19)、鶏卵 OIT で 0%(0/18) vs 6%(1/16)、小麦 OIT で 0%(0/12) vs 0%(0/11)であり有意差は認めなかった。ピーナッツ OIT では、*Lactobacillus* 属は開始時と比較して 1 ヶ月後と 12 ヶ月後に増加した(p=0.03、0.08)。また、*Lactobacillus* 属と酪酸産生菌の *Subdoligranulum* 属は、中等量耐性獲得群の方が未獲得群よりも、開始時と比較して 12 ヶ月後に有意に定着した (p=0.01、0.02)。

(結語) ピーナッツの乳酸菌併用 OIT では、アレルギー反応抑制反応が誘導される可能性が示唆された。OIT の有効性に関しては、今後の症例集積後の検証が望まれる。

研究課題名	【演題番号 15】 低アレルゲン化小麦の交差反応を利用した安全性の高い小麦アレルギーの予防法と治療法の開発
フリガナ	ヨコオオジ トモハル
代表者名	横大路 智治
所属機関（機関名） （役職名）	広島大学大学院医系科学研究科（薬） 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	（発表論文） Yamada Y, Yokooji T, Kunimoto K, Inoguchi K, Ogino R, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Hypoallergenic Wheat Line (1BS-18H) Lacking ω 5-Gliadin Induces Oral Tolerance to Wheat Gluten Proteins in a Rat Model of Wheat Allergy. Foods. 2022;11(15):2181. （学会発表） 猪口紘生，山田行徳，國本恭平，横大路智治，荻野龍平，埜越崇範，森田栄伸，松尾裕彰．小麦アレルギーラットモデルを用いた低アレルゲン化小麦による経口免疫寛容誘導の解析，日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会第 61 回 中国四国支部学術大会，2022 年 11 月

研究結果要約

早期の食物摂取は免疫寛容を誘導し，食物アレルギーの発症を予防する。一方，積極的な食物摂取は感作を誘導し，食物アレルギーの発症リスクを高める可能性もある。これまでに我々は，小麦アレルギーの原因抗原である ω 5-グリアジンに欠失した低アレルゲン化ホクシン小麦 (1BS-18H) の作出に成功し，1BS-18H の ω 5-グリアジンに対する感作能が市販の小麦よりも低いことをラットモデルで明らかにしている。本研究では，1BS-18H グルテンの経口投与で市販の小麦グルテンや ω 5-グリアジンに対する免疫寛容が誘導できるのかをラットモデルで解析し，小麦アレルギーの発症予防における 1BS-18H の有用性を評価した。

グルテンや ω 5-グリアジンの感作前にホクシンや 1BS-18H 由来のグルテンを経口投与した群では，溶媒のみを投与した群よりも各特異 IgE 抗体価が低かった。さらに，溶媒投与群に各抗原を静脈内負荷した群では直腸温の低下が認められたが，ホクシンや 1BS-18H グルテン投与群では抗原負荷による直腸温の低下が認められなかった。以上の結果は，1BS-18H の摂取が市販の小麦よりも安全に小麦アレルギーの発症を予防することができる可能性を示唆するものである。今後，ヒト臨床研究で 1BS-18H の安全性と経口免疫寛容誘導能を解明することで 1BS-18H を用いた小麦アレルギーの発症予防・減感作療法の開発に繋げたい。

研究課題名	【演題番号 16】 Food protein induced enterocolitis syndrome 診断における血清 TARC 値の有用性に関する研究
フリガナ	ハマノ ショウ
代表者名	濱野 翔
所属機関 (機関名) (役職名)	杏林大学医学部小児科学教室 任期助教
本助成金による発表 論文, 学会発表	2023 年日本小児アレルギー学会 (予定)

研究結果要約

食物蛋白誘発胃腸症 (Food protein induced enterocolitis syndrome : FPIES) は原因食物摂取後に数時間してから嘔吐や活気不良を呈する疾患であり、近年国内外で報告数が急増している。FPIES は症状が非特異的であり、診断に有用なバイオマーカーがないため、その診断は難渋し、他疾患鑑別のために過剰な検査がなされることも多い。本研究は FPIES 診断のためのバイオマーカーを探索することを目的とした。方法は食物経口負荷試験で診断された FPIES 群と感染性胃腸炎や腸重積症といった疾患により嘔吐を呈した非 FPIES 群の嘔吐出現前後のサイトカイン推移を比較検討した。結果は FPIES 群 12 例 (月齢中央値 16 か月)、非 FPIES 群 12 例 (月齢中央値 25 か月) であり、非 FPIES 群は感染性胃腸炎 7 例 (ノロウイルス 6 例、アデノウイルス 1 例)、腸重積症 7 例であった (一部重複例あり)。嘔吐 4 時間後では IL-8 (p=0.0029)、TNF- α (p=0.03) が FPIES 群で高く、嘔吐 24 時間後では TARC (p<0.0001) が FPIES 群で高値であった。またアトピー性皮膚炎患者で TARC と同様に上昇する MDC は FPIES では上昇しなかった。この結果より、嘔吐 4 時間後は IL-8 が、24 時間後は TARC が FPIES の診断バイオマーカーになると考えられる。

2022年度研究助成事業 共同研究助成

〈口頭成果報告〉

要旨

研究結果要約

研究目的

研究計画及び研究手法

結果と考察

今後の研究活動について

参考文献

研究課題名	唾液の次世代プロテオーム解析による、非侵襲的な食物蛋白誘発胃腸炎の診断・症状誘発予測マーカーの開発		
フリガナ	イノウエ ユウザブロウ		
代表者名	井上 祐三朗		
所属機関 (機関名) (役職名)	千葉大学大学院医学研究院 総合医科学 特任准教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	山田 佳之 (ヤマダ ヨシユキ)	東海大学医学部 総合診療学系 小児科学 教授	臨床検体収集
	川島 祐介 (カワシマ ユウスケ)	かずさDNA研究所 ゲノム事業推進部 ユニットリーダー	プロテオーム解析
本助成金による発表論文, 学会発表	なし		

研究結果要約

食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES: Food protein - induced enterocolitis syndrome)は、食物アレルギー摂取後に嘔吐・下痢・下血などの消化器症状を来す非IgE依存性食物アレルギーの一つである。FPIESの診断や耐性獲得の確認には、食物経口負荷試験(OFC)が有用であるが、IgE依存性食物アレルギーと異なり、症状誘発を予測可能なバイオマーカーがないため、時に誘発症状が重篤となることが問題である。非侵襲的に評価可能であり、診断や症状誘発予測に有用なバイオマーカーが確立されれば、より安全かつ簡便な診断・評価が可能となることが期待される。

そこで本研究では、唾液の次世代プロテオーム解析により、非侵襲的な FPIES の診断・症状誘発予測マーカーを確立することを目的とし、卵黄 FPIES 患者を対象とした OFC において採取された唾液および血液の次世代プロテオーム解析により、FPIES の診断・症状誘発予測マーカーとなりうるタンパク質の同定を目指している。

2023年8月末までに、OFC陽性例6例(血液採取症例3例を含む)とOFC陰性例9例(血液採取症例5例を含む)より臨床検体が採取され、プロテオーム解析に十分な検体数に達したため、2023年9月より解析を開始する予定である。

(2024年3月末まで計画延長課題のため途中状況として記載)

研究目的

食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES: Food protein - induced enterocolitis syndrome)は、食物アレルギー摂取後に嘔吐・下痢・下血などの消化器症状を来す非 IgE 依存性食物アレルギーの一つである。FPIES の多くは、原因食物に対する特異的 IgE 抗体が陰性であるため、抗原特異的リンパ球刺激試験や便粘液好酸球検査などが、診断補助的に施行されるが、その特異性は高くない。また、内視鏡検査・病理検査は侵襲的であり、専門施設以外で施行することは困難である。FPIES の診断や耐性獲得の確認には、食物経口負荷試験(OFC)が有用であるが、IgE 依存性食物アレルギーと異なり、症状誘発を予測可能なバイオマーカーがないため、時に誘発症状が重篤となることが問題である。非侵襲的に評価可能であり、診断や症状誘発予測に有用なバイオマーカーが確立されれば、より安全かつ簡便な診断・評価が可能となることが期待される。

近年、乳幼児における卵黄による FPIES(EY-FPIES)の報告が増加している。食物アレルギーの発症予防の観点から、授乳・離乳の支援ガイド(2019年改訂版)では、生後5-6か月から固ゆで卵黄の摂取が勧められている一方で、少数であっても加熱卵黄摂取で重篤な誘発症状を認める EY-FPIES 患者の増加は、乳児期における「安全な卵黄摂取の開始」に課題を投げかけている。

EY-FPIES が増加している原因は不明であり、病態解析はあまりされていない。しかし、卵黄 FPIES は、牛乳 FPIES と比較して罹病期間が高いため、除去による QOL 低下がより問題となる

ため、EY-FPIES の病態を解明し、その予防や早期の寛解誘導へのアプローチを検討することは重要である。

そこで本研究では、唾液の次世代プロテオーム解析により、非侵襲的な FPIES の診断・症状誘発予測マーカーを確立することを目的とし、卵黄 FPIES 患者を対象とした OFC において採取された唾液および血液の次世代プロテオーム解析により、FPIES の診断・症状誘発予測マーカーとなりうるタンパク質の同定を目指す。

研究計画及び研究手法

<研究対象者>

千葉大学医学部附属病院または共同研究機関において、下記選択基準を満たし、除外基準に該当しない、診療上必要な卵黄 OFC を施行する予定の患者に対して、承認の得られた同意説明文書を保護者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、十分理解を得たうえで自由意志に基づく文書による同意を得た。

選択基準

以下の基準にすべて該当する患者

1. 同意取得時に6か月以上6歳未満の患者
2. 病歴あるいは過去の加熱卵黄を用いた OFC から卵黄 FPIES と診断され、卵黄の完全除去を継続している患者
3. 卵黄 FPIES 診断時の卵黄に対する特異的 IgE 抗体が、全て Class 2 以下である患者
4. 保護者から本研究参加に対するインフォームドコンセントを得た患者
5. 保護者が医師・看護師などとの意思疎通が

可能である患者

除外基準

以下の基準のいずれかに該当する患者

1. アトピー性皮膚炎・乳幼児喘息の合併を認める患者
2. 心疾患、肝疾患、腎疾患などの、アレルギー疾患以外の基礎疾患の既往歴があり、現在治療中の患者
3. 卵黄 FPIES 診断時に、卵黄に対する特異的 IgE 抗体のいずれかが Class 3 以上(3.5 UA/mL 以上)、または測定されていない患者
4. その他、医師が不適当と判断した患者

<卵黄 OFC・臨床検体採取>

卵黄 OFC (5 g の加熱卵黄 単回摂取) 前後において、下記の臨床検体を採取した。

唾液採取

以下の時点で、自然分泌唾液 1mL をシリンジに採取し、ろ紙に滴下後乾燥 (あるいは滅菌チューブに保管) させ、-30°C で凍結保存する。

- 卵黄 OFC 開始 30 分前
- 卵黄摂取 1~1.5 時間後
- 卵黄摂取 2.5~3 時間後 (すでに症状誘発を認める場合は省略)

食事摂取から 30 分以上空けてから唾液採取をおこなう。また、唾液採取 5 分前に、水あるいは白湯を適量摂取あるいは「うがい」をおこない、口腔内をできるだけ洗浄する。

血液採取

末梢静脈ルートを留置した場合には、以下の時

点で、全血 0.5ml を採取 (逆流採血) し、血清を -30°C で凍結保存する。

- 卵黄摂取 1 時間後
- 卵黄摂取 2.5 時間後
- 可能であれば、症状誘発時
- 末梢静脈ルートを留置せず卵黄 OFC を施行したが、症状誘発への対応のために末梢静脈ルートを確保する場合には、可能であれば、同時に全血 0.5ml を採取する。

<プロテオーム解析>

凍結保存された唾液および血清のプロテオーム解析は、共同研究機関のかずさ DNA 研究所に測定を依頼し解析を行う。最新鋭のデータ非依存性解析 (DIA) ベースの質量分析計 (Q-Exactive HF-X, Thermo Fisher Scientific 社あるいは Orbitrap Exploris 480 MS, Thermo Fisher Scientific 社) を使用し、高深度プロテオーム解析をおこなう。得られたタンパク定量値は、Perseus ソフトウェア (MaxQuant 社) を用いてデータ処理、統計解析を行い、発現変動タンパクの同定や機能解析を行う。また、バイオマーカー候補タンパク測定の検証実験は ELISA 法を用いる。測定されたタンパク濃度については、JMP15 ソフトウェアを用いて多重比較検定を行う ($p < 0.05$ を有意とする)。また、ロジスティック回帰分析による ROC 曲線から、診断の有用性についても検討を行う。

結果と考察及び今後の研究活動について

研究代表者である井上が、2022 年 4 月に千葉大に異動したため、異動後に研究計画倫理審査を

開始した。コロナ禍のため倫理審査が遅れ、7月の倫理審査委員会の承認が得られた。その後、共同研究施設の実施承諾が得られ、研究開始は2022年9月からとなった。

なお、以下の共同研究施設において、臨床検体を採取している。

1. 千葉大学医学部附属病院 小児科
2. 東海大学医学部総合診療学系 小児科学
3. 千葉県こども病院 アレルギー・膠原病科
4. 亀田総合病院 小児科
5. 慶應義塾大学病院 小児科
6. 神奈川県警友会けいゆう病院 小児科
7. 群馬県立小児医療センター アレルギー・リウマチ科
8. 佐久医療センター 小児科

9. 東千葉メディカルセンター 小児科

新型コロナ第7波、第8波では、小児のコロナ感染者が多かったため、診療制限のため卵黄FPIESの負荷試験の施行が困難であったが、2022年12月頃より、臨床検体収集が可能となった。

2023年8月末までに、下記の臨床検体が採取され、プロテオーム解析に十分な検体数に達したため、2023年9月より、プロテオーム解析を開始する予定である。

1. OFC 陽性例 6例 (血液採取症例 3例を含む)
2. OFC 陰性例 9例 (血液採取症例 5例を含む)

研究課題名	食物アレルギー児におけるレジリエンス尺度の開発		
フリガナ	イマイ タカノリ		
代表者名	今井 孝成		
所属機関 (機関名) (役職名)	昭和大学 医学部小児科学講座 教授		
共同研究者	氏 名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	清水 美恵 (シミズ ヨシエ)	岐阜協立大学看護学部 准教授	質問票作成・解析
	相良 順子 (サガラ ジュンコ)	聖徳大学教育学部児童学科 教授	質問票作成・解析助言
本助成金による発表論文, 学会発表	1. 発表論文 清水美恵, 今井孝成, 松本勉, 野々村和男, 神谷太郎, 岡田祐樹, 本多愛子, 思春期アレルギー児のレジリエンス尺度開発, 日本小児アレルギー学会誌, 36, 499-507, 2022. 2. 学会発表 清水美恵, 今井孝成, 松本勉, 本多愛子, 岡田祐樹, 神谷太郎, 野々村和男, 思春期アレルギー児レジリエンス尺度の因子モデルの検討, 第回日本アレルギー学会学術大会, 2022.		

研究結果要約

研究目的 : アレルギー児と食物アレルギー児の保護者のレジリエンス尺度の開発と信頼性と妥当性を明らかにすること

方法 昭和大学病院および協力施設に受診中のアレルギー児 (小学4年から中学3年) およびその保護者を対象にアンケート調査を行なった。アレルギー児調査は用紙調査、保護者調査はWEB調査とした。それぞれ背景因子およびレジリエンスに関する質問項目に対して回答を求めた。両調査とも昭和大学の倫理委員会の承認を得た。

結果 アレルギー児対象調査は有効回答 179 人を解析した。対象の平均年齢は 11.6 歳(SD1.66)、男児 60.9%であった。アレルギー児レジリエンス 28 項目を対象に探索的因子分析(最尤法、プロマックス回転)を行った結果、4 因子 15 項目 (問題解決志向、探求志向、他者とのつながり、ネガティブ感情の共有) が構成された。食物アレルギー児の保護者調査は 359 人を解析した。平均年齢 40 歳 (SD5.6 歳)、母親が 87.5%であった。アレルギー児の保護者レジリエンス 46 項目を対象に探索的因子分析(最尤法、プロマックス回転)を行った結果、5 因子 20 項目が構成された(問題解決志向、看護師の支え、他者と感情の共有、家族の支え、医師の支え)が構成された。両尺度も確認的因子分析を行い、十分に適合していることを確認した。

考察 アレルギー児と食物アレルギー児の保護者のレジリエンス尺度を開発した。本項目を活用することで、レジリエンスの弱い患児や保護者への効率的なサポートが可能となる。

研究目的

研究目的: アレルギー児レジリエンス尺度の開発
と食物アレルギー児の保護者のレジリエンス
調査、その信頼性と妥当性を明らかにすること

レジリエンスとは“困難な状況であるにもかかわらずうまく適応する過程・能力・結果”や“重篤なストレス状況下で一時的には落ち込みながらも、そこから立ち直っていく過程や結果であり、適応的な機能を維持しようとする、深刻な状況に対する個人の抵抗力などと定義され、病気や病気によるリスクを受けながらも健康を維持する概念として注目されている。

これまでにレジリエンスの個人差を測定する尺度がさまざま開発され(心臓病患者の BRS 尺度)、その尺度に基づく疾患ごとのレジリエンス研究が行われてきた。しかし、食物アレルギーを含むアレルギー疾患をもつ思春期児のレジリエンス研究が非常に少なく、これはアレルギー疾患児固有のレジリエンスの個人差をとらえる尺度が存在しない点が原因の一つである。アレルギー疾患を有する児のレジリエンス尺度を評価する先行研究としては、慢性疾患児のレジリエンス尺度を用いて、アトピー性皮膚炎をもつ児童のレジリエンスと攻撃行動との関連が検討された。しかし、この尺度は、気管支喘息、I 型糖尿病、ネフローゼ症候群児を対象として作成されているため、アトピー性皮膚炎児のレジリエンス定義に合致していない可能性がある。

またアレルギー疾患の中でも特に食物アレルギーは日々の食生活の管理とアナフィラキシー

リスク管理が必要であり、保護者の負担や不安がとて大きい。こうしたなか児と同様に疾患に対するレジリエンスの個人差は保護者自身のみならず児の生活にも影響を与えうる。しかしこれまで食物アレルギー児の保護者を対象としたレジリエンス研究はない。

以上のことから、食物アレルギーを含めたアレルギー児および食物アレルギー児の保護者のレジリエンスの個人差を精緻に捉えるために、レジリエンス尺度の開発が必要であり、意義深い。

研究計画及び研究手法

A. 調査

ア)調査1(アレルギー児のレジリエンス尺度の開発)

- 1)研究デザイン: 横断的観察研究
- 2)調査セッティング: 昭和大学病院、まつもと小児アレルギークリニック、済生会守山市民病院小児科、なかむらこどもクリニック、なないろこどもとアレルギーのクリニック、旗の台アレルギー・こどもクリニック、すずか小児科・皮膚科クリニック、遊座医院

3)調査対象者:

- (1)アレルギー専門医に診断されたアレルギー疾患(食物アレルギー、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎のいずれか)を有する
- (2)小学4年生から中学3年生
- (3)調査依頼時点でアレルギー疾患に関して継続受診している

4)調査対象除外基準:

- (1)精神運動発達遅滞等があり設問の回答が困難と判断される対象
 (2)医師が調査に不適格と判断する対象
 5)調査方法: 外来受診時に調査票を手渡し、家庭等で回答し郵送返却してもらう。

▶調査項目

- (1)属性(年齢、学年、性別、疾患名、疾患の重症度(重症度はいずれも関連ガイドラインの指標に基づく))尚、疾患名、疾患の重症度に対しては、保護者に回答を求める。
 (2)レジリエンス尺度 レジリエンスの構成要素である、「よい学校環境」、「自己統制」、「計画性」、「大人とのよい関係」、「個人ない要素(内的強さと問題解決スキル)」、「環境要素としての外的サポート」に関して、自尊感情尺度(眞榮城・菅原・酒井・菅原, 2007)、学校生活享受感尺度(古市・玉木, 1994)、精神的健康を測定する尺度(岡安・由地・高山, 1998)を用いて調査する。

イ)調査2(アレルギー児のレジリエンス尺度の妥当性の検証とストレス反応)

- 1)研究デザイン: 横断的観察研究
 2)調査セッティング: 昭和大学病院、まつもと小児アレルギークリニック、済生会守山市民病院小児科、なかむらこどもクリニック、なないろこどもとアレルギーのクリニック、旗の台アレルギー・こどもクリニック、すずか小児科・皮膚科クリニック、遊座医院
 3)調査対象者:
 (1)アレルギー専門医に診断されたアレルギー

疾患(食物アレルギー、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎のいずれか)を有する

- (2)小学4年生から中学3年生
 (3)調査依頼時点でアレルギー疾患に関して継続受診している

4)調査対象除外基準:

- (1)精神運動発達遅滞等があり設問の回答が困難と判断される対象
 (2)医師が調査に不適格と判断する対象

- 5)調査方法: 外来受診時に調査票を手渡し、家庭等で回答し郵送返却してもらう。

▶調査項目

- (1)属性(年齢、学年、性別、疾患名、疾患の重症度(重症度はいずれも関連ガイドラインの指標に基づく))尚、疾患名、疾患の重症度に対しては、保護者に回答を求める。
 (2)調査1で抽出されたレジリエンス尺度(4因子15項目)
 (3)ストレス尺度として、a.学校生活享受感尺度から10項目、b.児童用メンタルヘルスチェックリストから4因子12項目を抽出して使用した。

ウ)調査3(食物アレルギー児の保護者のレジリエンス調査)

- 1)研究デザイン: 疫学研究
 2)調査セッティング: 昭和大学病院
 3)調査対象者:
 アレルギー専門医に診断された食物アレルギー児の保護者

4)調査対象除外基準：

医師が調査に不適格と判断する対象

5)調査方法：WEB 調査。外来受診時に調査にアクセスできる QR コードを示し、家庭等で回答してもらう。

▶調査項目

(1)属性(年齢、性別、学歴、同居家族、子どもの数とアレルギー疾患の有無、食物アレルギーやアナフィラキシーに関する理解度や負担度、不安度)

(2)レジリエンス尺度として、a.育児関連レジリエンス、b.ストレス反応、c.保護者の重要な他者との関係、d.保護者のこどもに対する将来指向性を調査する。それぞれ既存の尺度から本調査に向けて抽出等をして作成した。

B. 解析

解析には SPSS Ver. 22.0(IBM)と Amos Ver.22.0(IBM)を用いた。

レジリエンス尺度の記述統計を算出し、因子解析を行う。抽出された因子は Cronbach の α 係数を算出し、下位尺度の相関係数を算出する。各尺度の記述統計(平均、標準偏差、 α 係数)を算出する。調査 2 においては、アレルギー児レジリエンス尺度と各尺度との相関係数を算出し、共分散構造分析を用いてモデルの適合度を確認する。

結果と考察

ア)調査 1(アレルギー児のレジリエンス尺度の開発)

結果：回収は 183 人(回収率 29.5%)、うち有効回

答 179 人を解析対象とした。対象の平均年齢は 11.6 歳(SD1.66)、男児 60.9%であった。アレルギー疾患は、アトピー性皮膚炎 9 名(5.0%)、食物アレルギー18 名 (10.1%)、気管支喘息 65 名 (36.3%)、アトピー性皮膚炎と食物アレルギー16 名(8.9%)、アトピー性皮膚炎と気管支喘息 22 名 (12.3%)、食物アレルギーと気管支喘息 16 名 (8.9%)、アトピー性皮膚炎と食物アレルギーと気管支喘息 33 名(19.7%)であった。

アレルギー児レジリエンス 28 項目の天井効果と床効果を確認し、7 項目に天井効果を認めたため分析から除外した。21 項目を対象に探索的因子分析(最尤法、プロマックス回転)を行った結果、4 因子 15 項目(問題解決志向、探求志向、他者とのつながり、ネガティブ感情の共有)が構成された(Table 1)。続いて、確認的因子分析を行い、適合度指標は $\chi^2 = 117.88$ 、 $df = 84$ 、 $GFI = .92$ 、 $AGFI = .89$ 、 $CFI = .95$ 、 $RMSEA = .05$ 、 $AIC = 189.88$ であり、データは十分に適合しているといえた。信頼性の内的整合性は、 α 係数算出と I-T 相関分析を行い確認した。第 3 因子の α 係数 ($\alpha = .65$)と第 4 因子の α 係数($\alpha = .65$)の値が低い、項目数の少なさを考慮すると許容できる範囲であり、I-T 相関の値からも十分な信頼性が確保された。構成概念妥当性については、外的な側面の証拠として「自尊感情」「コーピング方略」「小学生用レジリエンス」を用いて、アレルギー児レジリエンス尺度との相関関係を検討した(Table 2)。結果、概ね中程度の相関が得られた。一方、アレルギー児レジリエンス尺度の「ネガティブ感情の共有」と「全体的自己価値観」、「俯瞰

食物アレルギー児におけるレジリエンス尺度の開発 (2022)

Table 1 因子分析 (最尤法 プロマックス回転) $n=179$

項目内容	M	SD	因子負荷量				共通性	I-T相関
			1	2	3	4		
第1因子 問題解決志向 ($\alpha=.78$)								
21 失敗してもあきらめずにもう一度挑戦する	2.94	0.95	.78	-.06	.12	-.08	.68	.81
4 やり始めたことは最後までやる	2.99	0.77	.68	.07	.04	.01	.54	.77
19 いやなことでもがまんできると思う	2.99	0.87	.59	.01	-.23	.05	.26	.61
25 むずかしいことでもできる方法を考える	3.09	0.72	.58	.18	-.07	-.07	.40	.69
11 決めても実行しないことが多い	2.60	0.82	.50	-.10	.10	.01	.27	.63
7 なにごともよい方向に考えようとしている	2.98	0.86	.48	-.01	.19	.15	.42	.68
第2因子 探究志向 ($\alpha=.74$)								
10 人の考えをきいてアレルギーのことを知りたいと思う	2.65	0.94	-.08	.86	.06	-.09	.67	.84
9 アレルギーを治すために、いろいろな方法を考える	2.63	0.89	.16	.62	-.10	.03	.46	.80
28 まわりの人の意見はアレルギーに役立つと思う	2.91	0.93	.02	.60	-.01	.03	.38	.79
第3因子 他者とのつながり ($\alpha=.65$)								
2 自分の本当の気持ちを人に話そうと思わない	2.77	0.94	-.07	.01	.75	-.03	.51	.78
14 アレルギーのことを知りたいときでも人に聞きたいと思わない	3.03	0.90	-.07	.12	.54	-.10	.30	.68
5 これから先、自分には悪いことばかりが起こると思う	3.16	0.82	.11	-.10	.51	-.05	.29	.64
20 秘密や悩みをだれかに話したいと思わない	2.64	0.96	-.01	-.03	.50	.17	.29	.70
第4因子 ネガティブ感情の共有 ($\alpha=.65$)								
12 アレルギーがあるために起こるつらい気持ちをだれかに話したいと思う	2.30	1.02	.02	-.05	-.07	.92	.80	.85
3 アレルギーが原因で悲しいことがあったとき、自分の気持ちをだれかに聞いてもらいたいと思う	2.56	1.07	-.06	.34	.13	.41	.45	.87
因子間相関			1	2	3	4		
			1	-.44	.55	.15		
			2		-.45	.40		
			3			.23		
			4					

Table 2 各尺度の記述統計ならびにアレルギー児レジリエンス尺度との相関係数 ($n=179$)

	M	SD	α 係数	アレルギー児レジリエンス			
				問題解決志向	探究志向	他者とのつながり	ネガティブ感情の共有
				r	r	r	r
自尊感情							
「全体的自己価値観」	2.90	0.74	.86	.45**	.19*	.45**	.03
コーピング方略							
「問題解決」	3.03	0.73	.61	.53**	.43**	.29**	.19*
「サポート希求」	2.85	0.82	.79	.40**	.38**	.43**	.26**
レジリエンス							
「俯瞰力」	4.07	0.68	.63	.52**	.35**	.19*	.14
「援助要請力」	3.89	0.98	.79	.46**	.32**	.54**	.27**

** $p < .01$ * $p < .05$

力」との間に有意な相関が示されなかった。これは、ネガティブ感情の共有は、アレルギーによるネガティブな感情を他者と共有したいということを示すものであり、ネガティブ感情の共有には、相手の心情や状況を深く洞察することや自己に

対する評価に左右されるという要素はない。そのため「ネガティブ感情の共有」と「全体的自己価値観」「俯瞰力」との間に有意な関連がみられなかったと考えられる。本研究は概ね予測と一致しており、本尺度の構成概念妥当性が確保された。

イ)調査 2(思春期アレルギー児のレジリエンスモデルの検討)

結果：237 人を解析した(回収率 38.2%)。平均年齢 11 歳、男子 61.5%であった。アレルギー疾患は食物アレルギーが 72%、気管支喘息が 63%、アトピー性皮膚炎が 51%罹患していた。このうちそれぞれ重症が 7.8%、3.4%、2.5%であった。

調査 1 で作成したアレルギー時のレジリエンス尺度を用いたレジリエンスモデルと、学校生活享受感尺度および児童用メンタルヘルスチェックリストに関して共分散構造分析を行った (Table 3)。

結果、レジリエンスモデルにおける各適合度の

指標 は、GFI=0.94、AGFI=0.89、CFI=0.92、RMSEA=0.09 であり、十分な値といえなかった。モデルの修正では、相関係数 $r > 0.40$ を基準に問題解決志向と無力感 (e1 と e8)、探究志向とネガティブ感情の共有 (e2 と e3) の誤差変数間に共分散を仮定し、さらにネガティブ感情の共有と自然体志向との間の相関係数は $r = 0.32$ であったが、両者は人に伝えたい傾向という点で共通しており、ネガティブ感情の共有と自然体志向 (e3 と e4) の誤差変数間に共分散を仮定し検証を行った。モデルの適合度は、GFI=0.97、AGFI=0.94、CFI=0.98、RMSEA=0.05 であり、基準に満たしたモデルが示された (Figure 1)。

Table 3 各尺度の相関係数と平均値、標準偏差 (n=233)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mean	SD	α
レジリエンス												
1.問題解決志向	—									2.76	0.52	.73
2.探究志向	.30**	—								2.50	0.88	.71
3.ネガティブ感情の共有	.32**	.46**	—							2.28	0.93	.71
4.自然体志向	.51**	.20**	.32**	—						2.58	0.77	.57
ストレス反応												
5.身体反応	-.26**	-.12	-.06	-.22**	—					1.91	0.82	.74
6.抑うつ・不安感情	-.31**	-.09	-.03	-.18**	.60**	—				1.68	0.77	.78
7.不機嫌・怒り感情	-.38**	-.24**	-.11	-.17**	.49**	.48**	—			1.86	0.85	.85
8.無力感	-.41**	-.13*	-.16*	-.22**	.54**	.53**	.47**	—		1.77	0.73	.71
9.学校生活享受感	.42**	.27**	.15*	.31**	-.30**	-.41**	-.34**	-.32**	—	3.60	0.91	.90

** $p < .01$ * $p < .05$

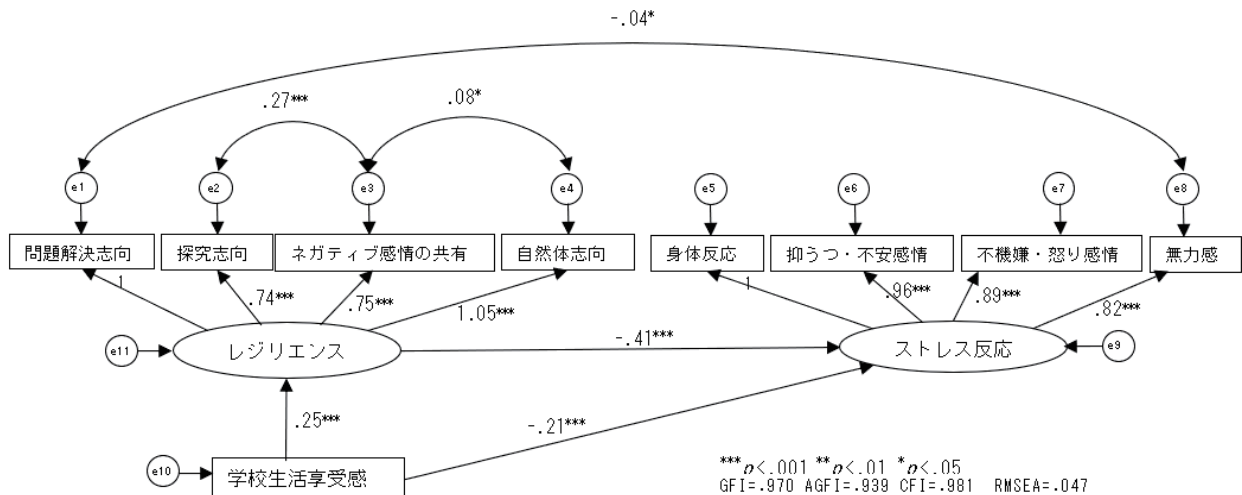


Figure 1 思春期アレルギー児レジリエンスモデルの共分散構造分析

ウ)調査3(食物アレルギー児の保護者のレジリエンス尺度の開発)

結果：359人を解析した(回収率89.8%)。平均年齢40歳(SD5.6歳)、母親が87.5%であった。最終学歴は大学・短大が67.7%、高校・専門学校が21.4%、大学院が10.0%であった。正規職員が51.0%、専業主婦が22.0%、パート・アルバイト・派遣職員が19.8%であった。同居家族に配偶者なしが18人であった。子供の数は、一人っ子が34.3%、二人兄弟が49.0%、三人兄弟が16.4%、四人兄弟が1人であった。

アレルギー児の保護者レジリエンス46項目の天井効果と床効果を確認し、6項目に天井効果を認めため分析から除外した。40項目を対象に探索的因子分析(最尤法、プロマックス回転)を行った。共通性が低い項目や因子負荷量が0.4以下、また複数項目に渡って因子負荷量が0.5以上の項目を削除した結果、5因子20項目が構成された(Table 4)。

続いて、確認的因子分析を行い、適合度指標は $\chi^2 = 301.495$ 、 $AIC=101.495$ 、 $BIC=-287.945$ 、 $TLI=0.9$ 、 $RMSE=0.075$ であり、データは十分に適合しているといえた。信頼性の内的整合性は、 α 係数算出を行ったがいずれの因子も十分な信頼性が確保された。

第1因子は総じて困ったときに対策を講じて実行する項目が含まれていたため、「問題解決志向」と命名した。第2因子は看護師の支援に関する項目で構成されていたため、「看護師の支え」と命名した。第3因子は第三者にイベントや感情を聞いてもらいたい、話したい項目で構成されていたため「他者に共感を求める志向」と命名した。第4因子は家族の支援に関する項目で構成されていたため、「家族の支え」と命名した。第5因子は医師の支援に関する項目で構成されていたため「医師の支え」と命名した。

第1因子である問題解決志向の平均値を境に2群に分割して、対象の背景因子を比較した。結

項目内容	平均	SD	因子負荷量					共通性	
			因子1	因子2	因子3	因子4	因子5		
第1因子 問題解決志向($\alpha=0.82$)									
A06 困ったとき、ふさぎ込まないで次の手を考える	2.88	0.75	0.82	0.05	-0.08	-0.06	0.02	0.64	
A09 失敗してもあきらめずにもう一度挑戦する	2.81	0.74	0.73	0.05	0.06	-0.03	-0.07	0.53	
A07 困ったとき、自分ができるところをまずやる	3.17	0.66	0.65	-0.10	0.07	-0.01	0.10	0.46	
A17 困ったことが起きてても、良い方向にもっていく	2.72	0.71	0.61	-0.05	0.04	0.01	0.09	0.41	
A11 困ったとき、考えるだけで考えたらもう悩まない	2.22	0.88	0.56	0.01	-0.15	0.11	-0.03	0.34	
A10 決めたら必ず実行する	2.75	0.81	0.54	0.04	0.12	0.04	-0.08	0.34	
A16 何かを考えると、さまざまな角度から考える	2.92	0.72	0.46	-0.01	0.05	0.03	-0.01	0.24	
第2因子 看護師の支え($\alpha=0.91$)									
A32 看護師は私を支えてくれている	2.43	0.85	0.02	0.93	0.02	-0.02	0.02	0.89	
A33 私が不安なとき看護師に話を聞いてもらおうと安心する	2.52	0.87	-0.03	0.86	0.05	0.01	-0.02	0.74	
A31 看護師にならいつでも相談できる	2.37	0.85	0.01	0.73	-0.06	0.01	0.20	0.73	
第3因子 他者に共感を求める($\alpha=0.84$)									
A06 寂しいときや悲しいときは、自分の気持ちをだれかに聞いてもらいたいと思う	2.76	0.85	-0.02	-0.02	0.90	-0.03	0.02	0.77	
A02 つらいときや悩んでいるときは、自分の気持ちをだれかに聞いてもらいたいと思う	2.92	0.83	-0.02	-0.06	0.78	0.02	0.06	0.61	
A12 自分の考えを人に聞いてもらいたい	2.73	0.8	0.04	0.08	0.73	-0.03	-0.02	0.58	
A15 うれしくてたまらないときは、自分の気持ちを人に話したいと思う	3.14	0.76	0.07	0.05	0.54	0.09	-0.07	0.36	
第4因子 家族の支え($\alpha=0.88$)									
A21 私が不安なとき、家族に話を聞いてもらおうと安心する	3.01	0.86	-0.03	0.01	0.10	0.85	-0.04	0.75	
A20 家族は私を支えてくれている	3.21	0.78	0.03	0.01	-0.05	0.83	0.05	0.72	
A19 家族になら、いつでも相談できると感じる	2.95	0.86	0.06	-0.01	0.00	0.80	0.02	0.70	
第5因子 医師の支え($\alpha=0.84$)									
A29 医師は私を支えてくれている	2.7	0.77	-0.02	0.17	0.00	-0.03	0.76	0.74	
A28 医師ならいつでも相談できると感じる	2.57	0.83	0.09	0.06	-0.05	0.02	0.73	0.63	
A30 私が不安なとき、医師に話を聞いてもらおうと安心する	2.86	0.83	-0.08	0.23	0.07	0.05	0.59	0.60	
			寄与率	30.50	14.00	11.30	7.92	4.33	
			累積寄与率	30.50	44.5	55.8	63.7	68.1	

Table 4 因子分析(最尤法、プロマックス回転)

果年齢、性別、学歴職業等に群間差は認めなかった。一方で食物アレルギーの病気のメカニズムに関する知識の習熟度($p < 0.001$)や除去に関する知識の習熟度($p = 0.001$)、誘発症状に対応する力の習熟度($p = 0.01$)は問題解決志向の高い群の方が有意に習熟度は高かった。一方で食物アレルギーの食生活の準備の負担度や誤食への不安度、アナフィラキシー誘発への不安度などは群間差を認めなかった。第2因子である看護師の支えの平均値を境に2群に分割して、対象の背景因子を比較した。結果年齢が低いほうが看護師の支えを要する傾向を認めた($p = 0.046$)。これ以外に性別、学歴、職業、子どもの数、食物アレルギーに関する知識や習熟度、不安、負担感等には群間差を認めなかった。第3因子である他者への共感を求めることの平均値を境に2群に分割して、対象の背景因子を比較した。結果年齢が低いほうが他者への共感を求める傾向を認めた。また食生活の準備等の負担感($p = 0.02$)、誤食させることへの不安($p = 0.012$)、アナフィラキシー誘発の不安($p = 0.013$)は、他者への共感を求める群のほうが有意な高かった。第4因子である家族の支えの平均値を境に2群に分割して、対象の背景因子を比較した。結果年齢の低いほうが家族の支えを要する傾向を認めた($p = 0.009$)。家族の理解が得られず負担でない方が、家族の支えを要する傾向を認めた($p < 0.001$)。これ以外に性別、学歴、職業、子どもの数、食物アレルギーに関する知識や習熟度、不安、負担感等には群間差を認めなかった。第5因子である医師の支えの平均値を境に2群に分割して、対象の背景因子を比較した。結果年

齢、性別、学歴職業等に群間差は認めなかった。一方で食物アレルギーの病気のメカニズムに関する知識の習熟度($p = 0.0069$)や除去に関する知識の習熟度($p = 0.0042$)、誘発症状に対応する力の習熟度($p = 0.0322$)は医師の支えを要する群の方が有意に習熟度は高かった。一方で食物アレルギーの食生活の準備の負担度や誤食への不安度、アナフィラキシー誘発への不安度などは群間差を認めなかった。

今後の研究活動について

本研究によって、アレルギー児および食物アレルギー保護者のレジリエンス尺度を提示することができた。

今後は研究3では一部解析したが、レジリエンスの個人差に影響を与える背景因子等を探索すること。また前向きにこの尺度を利用することで、レジリエンスの弱いもしくは高い患児および保護者を選別することができる。この個別性を把握した上で、医療従事者等が指導など介入していくことで、より充実したアレルギー診療および日々の生活を送ることができるのかを評価することが求められる。

参考文献

- 1) 溝口剛, 兼武明理. アトピー性皮膚炎患児のディストレスについての研究—児童期から思春期におけるディストレスの変化に着目して— . 大分大学教育福祉科学部研究紀要 2015;37:75-88.
- 2) 岡田恵利, 他. 思春期に至った食物アレルギー

- 患者の食生活・社会生活に関する意識調査. 小児保健研究 2019;78:142-149.
- 3) 細野恵子, 渡辺愛苗. 気管支喘息キャリアオーバー患者の病気や治療に対するとらえ. 名寄市立病院医誌 2013;21:31-36.
- 4) 石毛みどり, 無藤 隆. 中学生のレジリエンスとパーソナリティとの関連. パーソナリティ研究 2006;14:266-280.
- 5) 平野真理. レジリエンスの資質的要因・獲得的要因の分類の試み—二次元レジリエンス要因尺度 (BRS)の作成. パーソナリティ研究 2010;19:94-106.
- 6) 外山美樹. 子ども用楽観・悲観性尺度の作成および信頼性・妥当性の検討. 教育心理学研究 2016;64: 317-326.
- 7) 武蔵由佳. 児童生徒の友人・仲間関係に対する欲求の検討. 早稲田大学大学院教育学研究科紀要 2014;21:83-92.
- 8) 宮野遊子, 藤本美穂, 山田純子, 藤原千恵子. 育児関連レジリエンス尺度. 日本小児看護学会誌. 2014;23(1):1-7.
- 9) 山上寛子, 相良順子. 中学生向け将来志向性尺度の作成. 青年心理学研究. 2019;30:141-151.
- 10) 鈴木伸一, 嶋田洋徳, 三浦正江, 片柳弘司, 右馬埜力也, 坂野雄二. 新しい心理的ストレス反応尺度(SRS-18)の開発と信頼性・妥当性の検討. 行動医学研究. 1998;4(1):22-29.
- 11) 秋鹿都子, 伊東美佐江, 山本八千代. 食物アレルギーを有する乳幼児を養育する母親の「食物アレルギー対応力」尺度の検討. 川崎医療福祉学会誌. 2014;23(2):277-283.
- 12) 清水美恵. アレルギー疾患をもつ思春期にある子どものレジリエンスと信頼感との関連. 日本小児看護学会誌. 2019;28:139-147.
- 13) 清水美恵, 今井孝成, 松本勉, 野々村和男, 神谷太郎, 岡田祐樹, 本多愛子. 思春期アレルギー児のレジリエンス尺度開発. 日本小児アレルギー学会誌. 2022;36(5):499-507.

研究課題名	食品の味覚成分を利用した食物アレルギー制御法		
フリガナ	カミヌマ オサム		
代表者名	神沼 修		
所属機関 (機関名) (役職名)	広島大学原爆放射線医科学研究所 疾患モデル解析研究分野 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	後藤 穰 (ゴトウ ミノル)	日本医科大学耳鼻咽喉科 准教授	臨床検体解析
本助成金による発表論文, 学会発表	Uda N, Ogata S, Yamasaki N, Miura S, Hosomi N, Mori A, Gotoh M, Kaminuma O. Re-evaluation of over-the-counter histamine H1-receptor antagonists based on their effects on murine models of allergen-induced nasal hyperresponsiveness. J Pharmacol Sci, 150:275-278, 2022.		

研究結果要約

食物が、味覚受容体を介して T 細胞に影響を与える可能性を示した独自成果を基盤として、T 細胞における各種味覚受容体の発現と、その機能的役割を明らかにすることを目指した。マウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞から各種 T 細胞サブセットを分化誘導し、それらに発現する味覚受容体を RNA-seq で網羅的に解析し、定量 RT-PCR 法で検証した。ヒト T 細胞と異なり、マウス T 細胞には Taste 2 receptor 遺伝子 (Tas2r) は殆ど発現していなかった。一方、各種 T 細胞が、Tas1r を異なるパターンで発現することを見いだした。また、T 細胞が重要な役割を果たすマウスアレルギー性鼻炎モデルに対する効果を検討したところ、TAS2R アンタゴニスト GIV3727 が、抗原誘発即時型鼻炎反応および鼻粘膜好酸球浸潤を有意に抑制した。味覚受容体に作用することによって、アレルギー病態を制御できる可能性が示された。各種免疫細胞における味覚受容体の発現と機能の全容解明と、独自のゲノム編集技術や T 細胞クローンマウス等を用いたさらなる解析を進めることによって、食物の味覚成分を介した T 細胞機能制御が、アレルギーの予防・治療法開発の端緒となるか見極めると共に、食の健康機能に与える新たな付加価値の検証と、食品関連産業の活性化にも結びつけてゆきたい。

研究目的

食物アレルギーは、近年の患者数増加に伴い、通常給食を摂取できない児童が1割を越える等、大きな社会問題となっている。食物アレルギーを含めたアレルギー疾患の治療法は、基本的に対症療法が主体となるが、特にアレルギー性鼻炎領域では、経皮免疫療法 (SCIT) および舌下免疫療法 (SLIT) がいち早く実用化され、唯一本疾患の根治が目指せる治療法として注目されている。食物アレルギー領域でも、経口免疫療法 (OIT) が奏功する事例が多く報告されている。しかしその実際は、専門医の指導の元、統一されたプロトコールで原因抗原を経口摂取させ、症状出現時の救急対応に万全を期した上で慎重に取り組む必要がある等、いまだその普及に至るまでの障壁は大きい。また、免疫療法の治療効果に至る分子メカニズムも十分に解明されておらず、このことが、食物アレルギー治療におけるブレイクスルーを阻む大きな問題となっている。

研究代表者と共同研究者は最近、スギ花粉症患者に対する SLIT の臨床研究を実施する中で、AIT の新たなメカニズムを示唆する研究成果を得た。すなわち、本療法が効果を示した患者群と無効であった患者群間で、CD4 陽性 T 細胞に発現する遺伝子を網羅的に比較解析したところ、いくつかの味覚受容体 Taste 2 receptor (TAS2R) の発現が、両軍間で有意に異なることを見いだした。さらに、TAS2R の作用薬をヒト T 細胞に作用させると、活性化に伴うサイトカイン発現量が変化したことから、T 細胞に発現する味覚受容体は機能的であることが示された (図1) ¹⁾。SLIT

の治療効果に、抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) 刺激を起点とする T 細胞応答だけでなく、TAS2R を介した T 細胞機能への影響が関わる可能性が初めて明らかになった。

そこで本研究は、これら共同研究グループの独自成果に立脚し、それぞれが専門とする臨床検体解析法や、免疫学および実験動物学的解析法を活用して、T 細胞に発現する味覚受容体を介した T 細胞機能制御法を樹立することにより、全く新しいコンセプトの食物アレルギー治療法を開発することを目的として実施した。

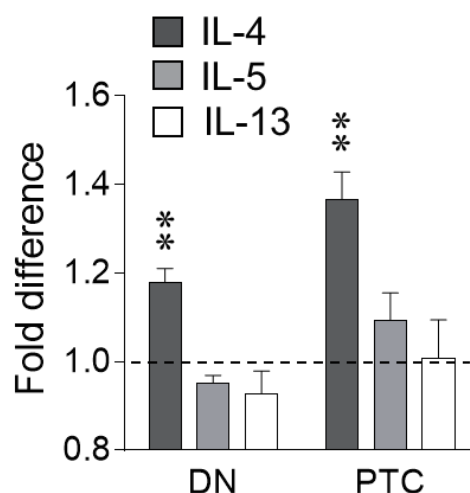


図1. スギ花粉症患者 T 細胞に対する TAS2R アゴニストの作用

スギ花粉症患者 CD4 陽性 T 細胞を、TAS2R アゴニスト denatonium (DN)、phenylthiocarbamide (PTC) 存在下で抗 CD3/CD28 抗体により刺激培養し、サイトカイン mRNA 発現を定量 RT-PCR で解析した。TAS2R アゴニスト添加により、IL-4 発現が特異的に増強された。

研究計画及び研究手法

1) T 細胞に発現する味覚受容体の解析
マウス脾臓よりナイーブ T 細胞を分取し、抗 CD3/CD28 抗体ビーズおよび各サブセット分化

に必要なサイトカイン／抗サイトカイン抗体類と共培養することにより、各種 T 細胞サブセットを得た。mRNA を抽出して RNA-seq 解析に供し、各種味覚受容体の発現を網羅的に解析した。発現が検出された受容体については、リアルタイム RT-PCR 法により、発現レベルを定量的に解析して比較検討した。

2) マウスアレルギー性鼻炎モデルに対する味覚受容体作用薬の効果

ヒト T 細胞における TAS2R の発現を見いだした共同研究グループの先行研究¹⁾に基づき、当初 TAS2R 作用薬の効果を実験で検証する実験を計画した。しかし、結果的にマウス T 細胞における TAS2R の発現が検出されなかったことから、研究計画を一部変更した。まず、T 細胞だけでなく、それ以外の各種免疫細胞も病態に関与するアレルギー疾患モデルを用い、in vivo での検討を行うこととした。また、当初計画した食物アレルギーモデルを用いた解析を行った場合、口腔内をはじめとする消化管粘膜上の味覚受容体を介する影響と、免疫細胞細胞に対する影響の区別が困難と判断した。そこで、申請者らが樹立した、消化管以外が標的臓器となって発症する、マウスのアレルギー性鼻炎を用いた検討を行うこととした。

申請者らの先行研究²⁾に従い、BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) + アジュバント (Alum) を腹腔内投与することにより感作した。最終感作の 2 週間後から、OVA を一日一回、5 日間連日点鼻チャレンジした。4 回目のチャレンジ直後に

しゃみ反応を計測し、即時型鼻炎反応 (immediate nasal response : INR) を評価した。最終チャレンジの 6 時間後にヒスタミンを点鼻投与してくしゃみ反応を惹起し、鼻粘膜過敏性亢進 (nasal hyperresponsiveness : NHR) の程度を評価した。その直後に安楽死処置を行って鼻腔洗浄を行い、鼻腔洗浄液 (nasal lavage fluid : NALF) 中の炎症細胞数を計数して、鼻粘膜炎症細胞浸潤を評価した。TAS2R アンタゴニスト GIV3727 は、1~4 回目の抗原チャレンジ実施 30 分前に 50 mg/kg を皮下投与した。

結果と考察

1) 結果

分化誘導した Th1、Th2、Th9、Th17 および iTreg 細胞において、各サブセットに特異的なサイトカインまたは転写因子の遺伝子発現が確認できた (図 2)。それらいずれの遺伝子発現も低レベルであったナイーブ T 細胞と、各 T 細胞サブセットにおける味覚受容体の発現を、RNAseq 法で網羅的に解析した。検討した 35 種類の Tas2r については、いずれのサブセットでも明らかな発

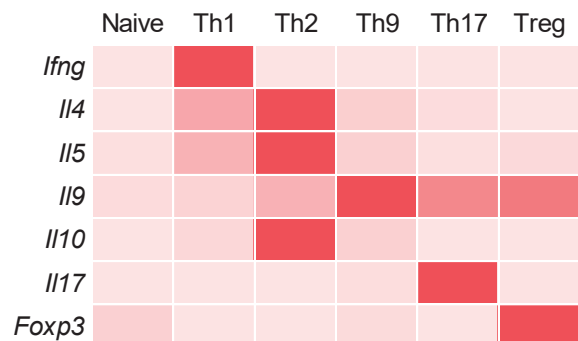


図 2. マウス T 細胞サブセットの分化

ナイーブ T 細胞および分化誘導した T 細胞サブセットにおける特異的なサイトカインおよび転写因子の遺伝子発現を比較解析した。

現は認められなかった。一方、Tas1r は各 T 細胞において異なるレベルの発現がみられた。そこで、各サブセットにおける TAS1R 遺伝子の発現を、リアルタイム RT-PCR 法で定量的に検証した。ナイーブおよび分化した各 T 細胞サブセットは、Tas1r を一定レベル発現していた。Tas1r3 の発現は、ナイーブ T 細胞に比較的高発現する一方、いずれのサブセットでも分化に伴う発現低下が認められた。Tas1r2 もサブセット間で異なる発現が確認できたが、その発現レベルは Tas1r1 および Tas1r3 と比較して著しく低かった。

次に、申請者らが樹立した、T 細胞依存性に発症するマウスのアレルギー性鼻炎モデルを用い、GIV3727 の効果を検討した。感作マウスに抗原を点鼻チャレンジすると、INR および NHR の発症が確認された (図 4)。GIV3727 の投与によって、抗原誘発 INR は有意に抑制された一方、NHR は影響を受けなかった。また抗原チャレンジに伴い、鼻粘膜への好酸球や好中球等の炎症細胞浸潤が惹起された。GIV3727 は、好酸球浸潤を有意に抑制し、好中球浸潤については抑制傾向を示した。

2) 考察

本助成研究の成果として、各種 T 細胞サブセットが、複数の味覚受容体を異なるパターンで発現しており、その受容体に作用することによって、アレルギー病態を制御できる可能性が示された。TAS2R 遺伝子については、ヒトおよびマウスでそれぞれ 25 および 35 種類程度の存在が知られる。申請者の先行研究において、ヒト CD4 陽性 T 細胞のマイクロアレイ解析で複数種が検出さ

れた TAS2R 遺伝子が 1)、マウス T 細胞の RNAseq 解析では殆ど検出されなかった理由は明らかではないが、今回検出できなかった TAS2R 類についても、定量 PCR 法等を用いた解析や、ヒト/マウス間の相違も含め、今後さらに詳細な解析が必要と考えられた。

一方 TAS1R は、各細胞において異なるレベルの遺伝子発現がみられ、特にナイーブ細胞は、ヘテロダイマーとしてうま味受容体を構成する TAS1R1 および TAS1R3 を比較的高発現していた。本研究をさらに発展させ、T 細胞やその他の免疫細胞に発現する味覚受容体の機能に関する研究も進める必要がある。

マウス TAS2R に対する GIV3727 の作用が検討された報告は乏しいが、25 μ M の GIV3727 を作用させると、少なくとも 6 種類のヒト TAS2R が有意に阻害されることが報告されている³⁾。今回、TAS2R がマウス T 細胞に殆ど発現していなかったにも関わらず、GIV3727 がマウスアレルギー性鼻炎モデルにおける一部の症状に有効性を示したことは興味深い。申請者らは、感作マウスにおける抗原誘発 NHR および鼻粘膜好酸球浸潤反応に対し、IgE/マスト細胞の役割は比較的小さい一方、抗原特異的 T 細胞が強く関与していることを明らかにしている⁴⁾。従って、抗原誘発 NHR に対する GIV3727 の抑制作用が認められなかったことは、マウス T 細胞に TAS2R が発現していなかった結果と合致すると共に、GIV3727 が好酸球の局所浸潤反応に直接影響を与えた可能性が示唆された。

一方 GIV3727 は、感作マウスにおける INR、

すなわち抗原誘発くしゃみ反応を強く抑制した。アレルギー性のくしゃみ反応は、細胞表面に結合した IgE が抗原によって架橋されてマスト細胞の脱顆粒が惹起され、細胞外に放出されたヒスタミン等のケミカルメディエーターの作用により起こることが知られる。少なくともヒトマスト細胞で、TAS2R の発現が確認されていることから⁵⁾、GIV3727 は、マスト細胞の脱顆粒反応に直接影響を与えた可能性が考えられた。

今後、これら好酸球やマスト細胞に加え、GIV3727 の投与によって抑制傾向がみられた好中球等も含め、味覚受容体を介する細胞機能への影響やその細胞間の相違に加え、それがアレルギー病態に与える影響に関し、さらに詳細な解析を進める必要がある。

今後の研究活動について

今後は、解析対象とする免疫細胞種も拡大し、1細胞解析法等の最新技術も駆使することによって、各種免疫細胞における味覚受容体の発現と機能の全容解明を目指した研究展開をはかりたいと考えている。それらに加え、申請者が独自に開発した新たなゲノム編集技術や⁶⁾、抗原特異的 T 細胞由来のクローンマウス⁷⁾等を活用した研究を進展させることによって、食物の健康影響における新たなメカニズムを、確固たる科学的根拠と共に実証してゆきたい。

その成果に基づき、特定の味覚受容体を介して T 細胞他の免疫機能を制御することが、食物アレルギーの予防・治療に結びつくか見極めることを目指したいと考えている。それらの研究活動によ

ってもたらされる成果は、アレルギー治療を目指す医薬品開発動向に新たな潮流を生むだけでなく、食がもたらす健康機能にも新たな付加価値を与えうることから、将来的には、食習慣や食育、各種食品における味覚に基づく差別化や、食品産業における商品開発動向等、人々の健康生活に様々な形で影響を与えることが期待される。

参考文献

- 1) Gotoh M, Kaminuma O, Nakaya A, Katayama K, Watanabe N, Saeki M, et al. Involvement of taste receptors in the effectiveness of sublingual immunotherapy. *Allergol Int.* 2018; 67: 421-424.
- 2) Kaminuma O, Nishimura T, Saeki M, Yamasaki N, Ogata S, Fujita T, et al. L-type amino acid transporter 1 (LAT1)-specific inhibitor is effective against T cell-mediated nasal hyperresponsiveness. *Allergol Int.* 2020; 69: 455-458.
- 3) Slack JP, Brockhoff A, Batram C, Menzel S, Sonnabend C, Born S, et al. Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr Biol.* 2010; 20: 1104-1109.
- 4) Nishimura T, Kaminuma O, Saeki M, Kitamura N, Matsuoka K, Yonekawa H, et al. Essential contribution of CD4+ T cells to antigen-induced nasal hyperresponsiveness in experimental allergic rhinitis. *PLoS One.* 2016; 11: e0146686.
- 5) Ekoff M, Choi JH, James A, Dahlén B, Nilsson G, Dahlén SE. Bitter taste recep

- tor (TAS2R) agonists inhibit IgE-dependent mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134: 475-478.
- 6) Miura K, Ogura A, Kobatake K, Honda H, Kaminuma O. Progress of genome editing technology and developmental biology useful for radiation research. *J Radiat Res.* 2021; 62: i53-i63.
- 7) Kaminuma O, Katayama K, Inoue K, Sasaki M, Nishimura T, Kitamura N, et al. Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific CD4⁺ T cells. *EMBO Rep.* 2017; 18: 885-893.

アレルギーコンポーネントを活用した乳児期の食物アレルギー感作に関する研究（2022）

研究課題名	アレルギーコンポーネントを活用した乳児期の食物アレルギー感作に関する研究		
フリガナ	サトウ サクラ		
代表者名	佐藤 さくら		
所属機関（機関名） （役職名）	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター アレルギー疾患研究部 部長		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	伊藤 嘉浩 （イトウ ヨシヒロ）	国立研究開発法人理化学研究所 主任研究員	検体測定
	高橋 亨平 （タカハシ キョウヘイ）	国立病院機構相模原病院 小児科 医師	アドバイザー 症例登録
	緒方 美佳 （オガタ ミカ）	国立病院機構熊本医療センター 小児科 副部長	症例登録
	小池 由美 （コイケ ユミ）	長野県立こども病院 アレルギー科 部長	症例登録
	谷口 裕章 （タニグチ ヒロアキ）	甲南医療センター 小児科 医長	症例登録
	藤田 英寿 （フジタ ヒデトシ）	愛和病院 小児科 副院長	症例登録
本助成金による発表論文，学会発表			

研究結果要約

乳幼児期の食物アレルギーでは、食物アレルギーへの感作の程度や複数のアレルギーへの感作パターン、発症時期、原因食物、症状誘発の閾値、重症度などの組み合わせにより、多様な臨床像を呈する。本研究はアレルギーコンポーネントを活用した潜在クラス分析により多様な乳幼児の食物アレルギーの臨床像を明らかにすることを目的とする。

食物アレルギーへの感作を認める 4-8 ヶ月の乳児を対象に、食物アレルギーに関する臨床情報およびアレルギー特異的 IgE 抗体検査（Drop Screen A-1、ImmunoCAP ISAC）を行い、集積したデータを用いて潜在クラス分析を行う。2022 年度は対象症例の保存血清を用い、Drop Screen A-1 にて 41 種類のアレルギー特異的 IgE 抗体価を網羅的に測定した。

対象は 93 例（月齢中央値：6.7 ヶ月）で、90%に湿疹を認め、95%は 1 抗原以上の食物除去を指示されて、63%は 1 抗原以上の即時型食物アレルギーを認めた。食物アレルギーの感作率は、卵白が 91%、ミルクが 82%、小麦が 65%、大豆が 44%、ピーナッツが 41%の順であった。感作率は 1 歳 6 ヶ月時には、卵白が 95%、小麦が 71%、大豆が 61%、ピーナッツが 67%と上昇し、ミルクが 73%と低下した。

今年度の研究で、生後 6 ヶ月前後の乳児が鶏卵、牛乳、小麦への感作だけでなく、ピーナッツ感作を認め、1 歳 6 ヶ月では感作率は上昇することが明らかになった。今後、目標症例数を登録し、アレルギーコンポーネント特異的 IgE 抗体価の結果および臨床情報を用い、潜在クラス分析を行う予定である。

研究目的

【研究背景】

1) 食物アレルギーの有病率

食物アレルギーの有病率は増加傾向である。本邦では乳幼児の10%前後が食物アレルギーを発症し、ここ10年程度で3歳児は約2倍、学童は約1.7倍に増加している¹。医療・栄養・教育など多分野で人的資源や金銭的資源を要するなど食物アレルギーは社会的な問題となっている。

2) 食物アレルギーの発症予防

乳幼児期の食物アレルギーでは、鶏卵やピーナッツの早期摂取による発症予防の可能性が示唆されている^{2,3}。人工乳については、摂取時期により牛乳アレルギーの発症を抑制する場合と増加する場合が報告されている^{4,6}。しかしながら、食物アレルギーへの感作(特異的IgE抗体陽性)のみで発症しない場合や、発症する時期、重症度など症例により異なることから、発症予防のために介入すべき対象・時期・方法は現時点で確立されていない。

3) 多様な食物アレルギーの臨床像

乳幼児期の食物アレルギーでは、食物アレルギーへの感作の程度や複数のアレルギーへの感作パターン、発症時期、原因食物、症状誘発の閾値、重症度などの組み合わせにより、多様な臨床像を呈する⁷。また多くは加齢とともに耐性獲得するが、耐性獲得のし易さや時期は患者に

より異なるだけでなく、一人の患者でも原因食物により異なる。これまで単一の食物抗原に関する自然歴は報告されているが、感作の程度、感作パターン、原因食物の組み合わせなど臨床像別の予後は明らかではない。

4) アレルギーコンポーネントへの感作と臨床像

近年、多くのアレルギーコンポーネント(IgE抗体結合能のあるタンパク質分子)に対する特異的IgE抗体が測定可能となった。診断有用性の高い特異的アレルギーコンポーネント(鶏卵のオボムコイド、小麦のω5グリアジン、ピーナッツのAra h 2など)への感作例は全身性の症状誘発の可能性が高く、交差抗原性に関与しているアレルギーコンポーネント

(Pathogenesis-related protein (PR)-10、プロフィリンなど)への感作は、軽微な症状のみの可能性が高いことが報告されている⁸。アレルギーコンポーネントへの感作の程度は予後と関連し、臨床像により経年的な変化が異なることも報告されている⁹⁻¹²。

【研究目的】

アレルギーコンポーネントを活用した潜在クラス分析により多様な乳幼児の食物アレルギーの臨床像を明らかにすることを目的とする。

研究計画及び研究手法

【研究デザイン】

後ろ向きおよび前向きコホート研究(多施設共

同研究)

性皮膚炎の有無・重症度、気管支喘息の有無等

【研究方法】

本研究は、後ろ向きコホート研究(研究1)と前向きコホート研究(研究2)で構成される。

②血液検査

項目：血算、総 IgE、アレルギー特異的 IgE、アレルギーコンポーネント特異的 IgE、TARC
測定ポイント：生後 6±2 か月、12±2 か月、18±2 か月

<研究1>

③即時型食物アレルギー^{※2}の有無

対象

研究対象患者のうち、選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない患者を対象とする。

評価時期：生後 6±2 か月、12±2 か月、18±2 か月

・選択基準

- ①生後4-8か月にアレルギー疾患を疑われて当院を受診した患者
- ②血液検査を行い1つ以上のアレルギーに感作^{※1}を認めた患者
- ③残血清の「研究利用に同意し、血清が保存されている患者

※2即時型食物アレルギーの診断基準

- (1)原因食物に対する感作陽性(特異的IgE抗体価0.1kU/ml以上、SPT陽性)、かつ
- (2)原因食物摂取によるアレルギー症状(問診または食物経口負荷試験に基づく)

・除外基準

- ①研究責任者が研究対象者として不適当と判断した患者

<特異的IgE抗体価の測定>

保存されている血清検体を用いる。

・粗抗原の特異的IgE抗体価測定

血清を理化学研究所に送付し、Drop Screen A-1(日本ケミファ(株))を用いて41項目のアレルギーについて測定する。主な測定項目はランパク、ミルク、小麦、ヤケヒョウヒダニ、スギなど。

・アレルギーコンポーネントの特異的IgE抗体価測定

※1食物アレルギー特異的IgE抗体価0.1kU/ml以上

ImmunoCAP ISAC(サーモフィッシャーダイアグノスティックス社)にて112項目のアレルギーコンポーネントについて測定する。測定項目は卵白(Gal d 1, 2, 3, 4, 5)、小麦(Tri a 14, Tri a 19)、大豆(Gly m 4, 5, 6)、ピーナッツ(Ara h

研究・調査項目

<調査項目>

研究対象者について、下記の臨床情報を診療録より取得する。

①背景因子

性別、生年月日、栄養方法、家族歴、アトピー

1, 2, 3, 6, 8, 9) など。

<研究2・3>

対象

研究対象患者のうち、選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない患者を対象とする。

・選択基準

- ①生後4-8か月にアレルギー疾患を疑われて当院を受診した患者
- ②血液検査を行い1つ以上のアレルギーに感作^{*1}を認めた患者

・除外基準

- ①研究責任者が研究対象者として不適当と判断した患者

^{*1}食物アレルギー特異的IgE抗体価0.1kU/ml以上

研究・調査項目

研究1に準ずる

【評価項目】

主要評価項目：各クラスターの即時型食物アレルギーの割合

副次評価項目：各クラスターの6、12、18か月のアレルギーコンポーネントIgE抗体価、各クラスターの食物アレルギーの原因食物、重症度、予後

【統計的事項】

目標症例数

研究1：250例

研究2・3：250例(暫定値)

統計解析の方法

集積したデータを用いて潜在クラス分析を行い、症例のクラス分類を行う。「鶏卵アレルギーで早期に寛解する」や「感作は認めるが、症状なく経過する」などの複数のクラスを同定し、各クラスの特異的IgE抗体価や臨床的特徴について分析を行う。ウォード法による階層クラスター分析を行う。

潜在クラス分析において、必要な症例数を定める決められた方法はなく、検出力はクラスがどの程度分離されているかに大きく依存している。そのため、事前の検出力分析は必ずしも必要ないと考えられている。ただし、目安として最低でも250症例が解析の必要症例数として使用されることがあり、研究1：後方視的解析はこの症例数を目標とする。その解析結果を用い、研究2：前方視的研究で必要とされる症例の数を算出して調整する。また、同データを用いて、1歳時点でのプロファイルを用いて症例がどのクラスターに所属するかを分類する精度について併せて検討を行う(研究3)。

結果と考察

【結果】

2022年度は、主に研究1について実施した。研究2については、研究分担施設での研究実施許可をもらい、症例登録を開始した。

<研究1>

・患者背景

対象は93例で、月齢の中央値が6.7ヵ月、男児が63例(68%)、すべての症例に喘鳴の既往はなく、湿疹を84例(90%)に認めた。1抗原以上の食物除去を指示されていたのは88例(95%)、1抗原以上の即時型食物アレルギーを認めたのは59例(63%)であった(表1)。

即時型食物アレルギーの内訳は、鶏卵29例、牛乳29例、小麦17例、大豆2例、ピーナッツ・魚・エビ・バナナが各1例であった。

対象93例の保存血清を用い、Drop Screen A-1にて41種類のアレルゲン特異的IgE抗体価を網羅的に測定した(図1、2)。

全体的に吸入アレルゲンより食物関連アレルゲンへの感作率が高かった。感作率が20%以上であったアレルゲンについて、感作率が高かったのは、粗抗原の食物アレルゲンでは、卵白が最も高く、次いでミルク、小麦、大豆、ピーナッツ、牛肉、ゴマ、鶏肉の順であった。吸入アレルゲンでは、ハウスダスト、イヌ皮屑、ヤケヒョウヒダニの順

であった(図3)。尚、アレルギーコンポーネント特異的IgE抗体価については、現在、ISACにて測定中である。

・臨床経過

1歳6ヵ月時点で、喘鳴の既往を認めたのは3例(3%)、1抗原以上の即時型食物アレルギーは67例(72%)であった。その内訳は、鶏卵37例、牛乳31例、小麦18例、大豆・魚2例、ピーナッツ・エビ・イカ・バナナが各1例であった。

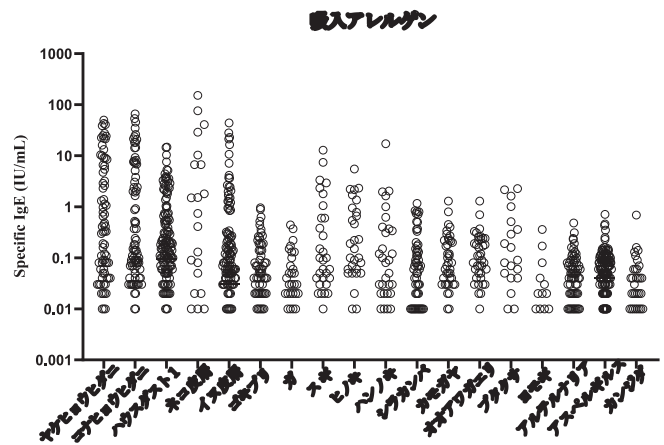


図1 登録時の吸入アレルゲン特異的IgE抗体価の分布

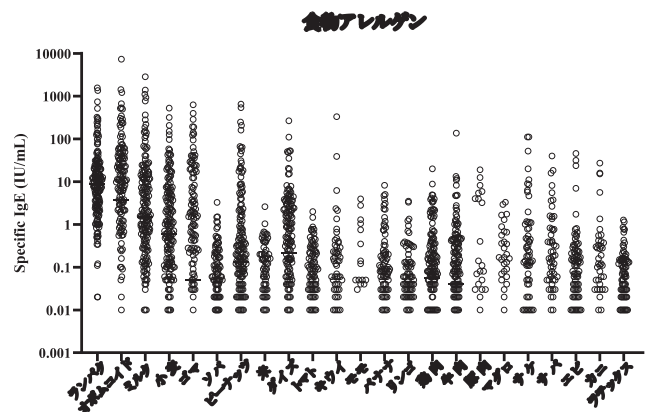


図2 登録時の食物アレルゲン特異的IgE抗体価の分布

表1 登録時の患者背景

症例数	93例
月齢(ヵ月)	6.7(5.7-7.8)
男児	63(68%)
帝王切開	9(10%)
喘鳴の既往	0(0%)
湿疹の合併	84(90%)
1抗原以上の食物除去	88(95%)
1抗原以上の即時型食物アレルギー	59(63%)

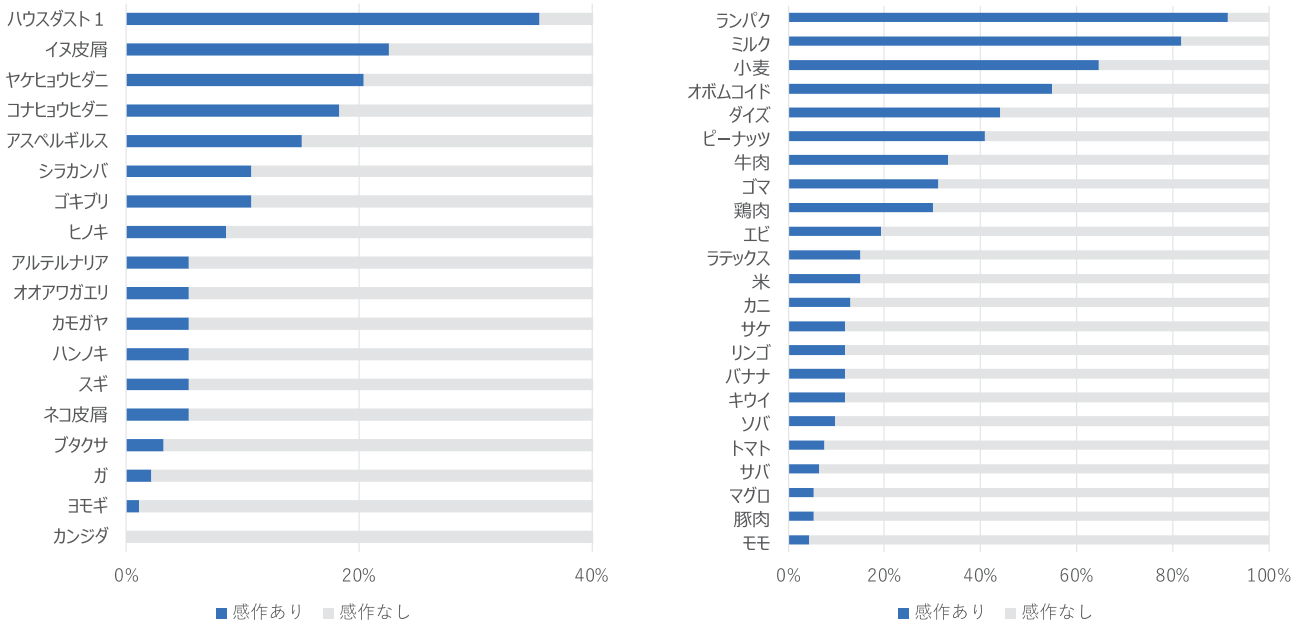


図3 登録時のアレルギー感作状況

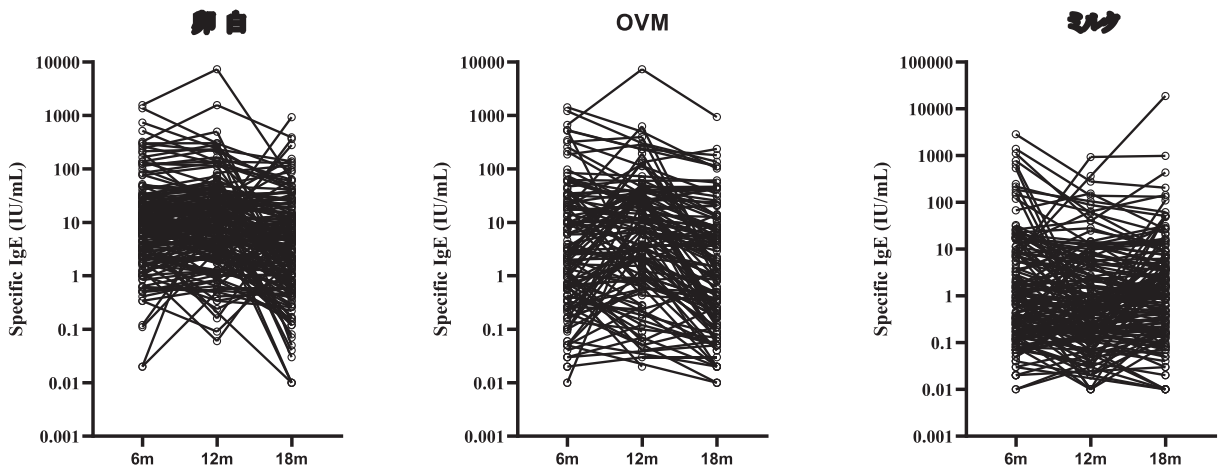


図4A アレルギー特異的IgE抗体価の推移

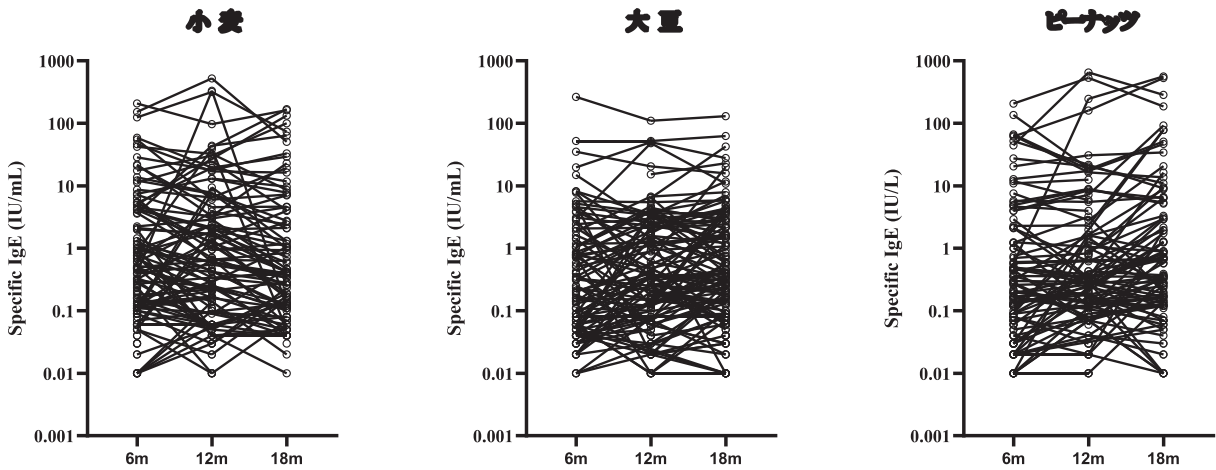


図4B アレルギー特異的IgE抗体価の推移

・食物アレルギー特異的 IgE 抗体価および感作率の推移

感作率が上位 5 番目までの食物アレルギーに対する特異的 IgE 抗体価の推移を図 4A・B に示す。登録時、12 ヶ月時、18 ヶ月時の特異的 IgE 抗体価 (IU/mL) の中央値は、卵白では 8.7、8.0、3.1、オボムコイドは 0.67、2.2、0.25、ミルクは 0.63、0.12、0.82、小麦は 0.11、<0.1、<0.1、大豆は<0.1、<0.1、0.15、ピーナッツは<0.1、<0.1、<0.1 であった。登録時、12 ヶ月時、18 ヶ月時の感作率 (%) については、卵白が 91、96、95、オボムコイドが 55、81、85、ミルクが 82、76、73、小麦が 65、71、71、大豆が 44、67、61、ピーナッツが 41、63、67 であった。

<研究 2・3>

2023 年 3 月時点で登録症例は 21 例であった。当初の見込みより対象症例が少ないため、2024 年度は研究協力施設を増やし、症例登録を進める予定である。

【考察】

現時点までに、乳児期の食物アレルギー、吸入アレルギーへの感作状況が明らかになった。乳児期に多い鶏卵、牛乳、小麦のアレルギーへの感作だけでなく、ピーナッツ感作を約 40% に認めており、食物アレルギー発症のリスクがある乳児では、これらの食物を離乳食に導入する際には注意が必要と考えられた。今後、アレルギーコンポーネ

ント特異的 IgE 抗体価の結果と合わせて、評価する必要がある。

本研究では、集積したデータを用いて潜在クラス分析を行い、複数のクラスを同定し、各クラスの特異的 IgE 抗体価や臨床的特徴について分析を行う予定である。2022 年度は個人情報保護法の改訂に伴う国立病院機構内における臨床研究の取り扱いが変更され、当院倫理委員会での審議が大幅に遅れた。本研究においても、その影響により研究開始が遅くなり、当初の研究スケジュールに遅れを生じた。また<研究 1>の選択基準を満たす症例が想定より少なかったため、<研究 2>の前向きコホートを解析対象に組み入れ、最終的に目標症例数への到達を目指すこととした。このため現時点で主要評価項目についての評価は実施できていないが、2023 年度以降も症例登録を継続し、研究を完遂する予定である。

今後の研究活動について

本研究により、乳児期の食物アレルギーへの感作状況が明らかになり、離乳食を早期に導入するのに最適な対象の感作パターンや、感作パターンから食物アレルギーの発症リスクの高い対象が明らかになることで、発症予防法の開発に寄与し、感作パターン別の最適な治療介入方法を確立する上で、貴重なデータとなると考えられる。研究で得られた成果を確認するために、今後、別のコホート集団による解析が必要になる。

参考文献

- 1.海老澤元宏, 伊藤浩明, 藤澤隆夫. 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会「食物アレルギー診療ガイドライン 2021」. 2021.
- 2.Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, et al. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017;389:276-286.
- 3.Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, et al. Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N Engl J Med*. 2015;372:803-813.
- 4.Urashima M, Mezawa H, Okuyama M, et al. Primary Prevention of Cow's Milk Sensitization and Food Allergy by Avoiding Supplementation With Cow's Milk Formula at Birth: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr*. 2019.
- 5.Sakihara T, Otsuji K, Arakaki Y, Hamada K, Sugiura S, Ito K. Randomized trial of early infant formula introduction to prevent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147:224-232 e228.
- 6.Sakihara T, Otsuji K, Arakaki Y, Hamada K, Sugiura S, Ito K. Early Discontinuation of Cow's Milk Protein Ingestion Is Associated with the Development of Cow's Milk Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021.
- 7.Takahashi K, Yanagida N, Itonaga T, et al. Phenotyping of immediate-type food allergies based on 10 years of research: A latent class analysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2022;33:e13873.
- 8.Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, et al. EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27 Suppl 23:1-250.
- 9.Koike Y, Yanagida N, Sato S, et al. Predictors of Persistent Wheat Allergy in Children: A Retrospective Cohort Study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018;176:1-6.
- 10.Koike Y, Sato S, Yanagida N, et al. Predictors of Persistent Milk Allergy in Children: A Retrospective Cohort Study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018;175:177-180.
- 11.Ohtani K, Sato S, Syukuya A, et al. Natural history of immediate-type hen's egg allergy in Japanese children. *Allergol Int*. 2016;65:153-157.
- 12.Taniguchi H, Ogura K, Sato S, Ebisawa M, Yanagida N. Natural History of Allergy to Hen's Egg: A Prospective Study in Children Aged 6 to 12 Years. *Int Arch Allergy Immunol*. 2022;183:14-24.

研究課題名	新規アレルギー抑制分子 Ly6G によるマスト細胞の機能制御と創薬への応用		
フリガナ	スズキ リョウ		
代表者名	鈴木 亮		
所属機関 (機関名) (役職名)	金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	平嶋 尚英 (ヒラシマ ナオヒデ)	名古屋市立大学医薬学総合 研究院 (薬学) 教授	Ly6G 改変細胞・DDS 治療 の研究
	中村 亮介 (ナカムラ リョウスケ)	国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部・第3室長	EXiLE 法を用いたアレルギー 疾患転写制御機構解析
本助成金による発表論文、学会発表			

研究結果要約

アレルギー疾患(食物アレルギー等)は、世界的患者数の増加や新型コロナワクチン摂取に伴う副反応(アナフィラキシー等)など、重大かつ身近な問題として注目されている。アレルギー疾患は、多様な疾患症状を示すため、予防や根治が難しく対症療法が中心となっているのが現状である。そのため、アレルギー(マスト細胞)応答を制御する新たなアレルギー制御因子の解明が期待されている。我々は、マスト細胞によるアレルギー応答の多様性の制御機構を追究する過程で、アレルゲンと IgE の親和性が浸潤細胞の種類に違いを生じさせ、アレルギー炎症を調節していることを明らかにした。本研究では、アレルギー応答制御における、マスト細胞と好中球の相互作用をはじめ、好中球に特異的に発現する蛋白質 (Ly6G) の機能を明らかにすることを試みた。その結果、好中球に特異的に発現する Ly6G 蛋白質は、マスト細胞への結合能や分泌反応調節作用を有していることが明らかになった。更に、疾患モデルを用いた研究においても、Ly6G 蛋白質がアレルギー炎症を調節している可能性が示唆された。

研究目的

アレルギー疾患（食物アレルギー、アナフィラキシーショック等）は、世界的患者数の増加や新型コロナウイルスワクチン摂取に伴う副反応（アナフィラキシー等）など、これまで以上に重大かつ身近な問題として注目されている。また、最近の国会答弁でもアレルギー疾患が取り上げられるなど、益々社会問題化しているのが現状である。アレルギー疾患は、多様な疾患症状（発症部位、病態、重症度、加齢変化等）を示すため、予防や根治が難しく、疾患の複雑化・慢性化、更には患者 QOL (quality of life) の低下を招くなど、解決すべき課題である。

この様なアレルギー疾患に対する予防や治療については、疾患原因（アレルゲン）への曝露除去をはじめ、抗アレルギー薬や抗炎症薬など、医薬品による対症療法が中心である。また、根治療法として期待されているアレルゲン特異的免疫療法についても、長期に渡る治療期間の問題や治療にアレルゲンを摂取するため、危険を伴うのが現状である。そのため、アレルギー（マスト細胞）応答を調節する新たなアレルギー制御因子の解明が期待されている。

様々なアレルギー疾患の発症には、マスト細胞が重要な役割を担っており、アレルゲン（食物、花粉、医薬品等）が IgE 受容体を活性化すると、ヒスタミンをはじめとする炎症性メディエータが分泌され、疾患が惹起される。その結果、アレルギー炎症組織では、マスト細胞と様々な免疫細胞が相互作用し、治癒や増悪などアレルギー疾患

症状の調節が行われていると考えられている¹⁾。

我々は、マスト細胞によるアレルギー応答の多様性の制御機構を追究する過程で、アレルギー疾患モデルを用いた研究から、アレルゲンと IgE の親和性が浸潤細胞の種類に大きな違いを生じさせ、アレルギー炎症を調節していることを明らかにした²⁾。特に、高親和性アレルゲンによるマスト細胞の活性化によって、アレルギー炎症を誘導した組織では、炎症組織に浸潤する好中球の数が有意に増加しており、更に、マスト細胞と好中球が相互作用している様子が観察された。これまで、自然免疫において重要な役割を有する好中球が、アレルギー応答において、どの様な役割を担っているのかなど、好中球によるアレルギー応答の調節機構を追究してきた。その過程で、*in vitro* 共存培養系を用いた研究からも、脱顆粒したマスト細胞と好中球が接着している様子が観察されており、これらの接着を介した相互作用によって、アレルギー炎症の病態を調節している可能性が示唆された。更に、マスト細胞と好中球の接着部位では、好中球に特異的に発現する蛋白質 Ly6G が³⁾、マスト細胞と好中球の接着部位で移動していることを見出した。本研究では、アレルギー応答制御における、マスト細胞と好中球の相互作用をはじめ、好中球に特異的に発現する蛋白質 Ly6G の機能を明らかにすることを試みた。

研究計画及び研究手法

マスト細胞と好中球の相互作用及び両者の相互作用を介した好中球蛋白質 Ly6G の機能解析

を行うため、マスト細胞には骨髄由来マスト細胞を用い、好中球には骨髄単離好中球を用いた。骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞を採取し、Interleukin-3 及び Stem cell factor 存在下で 1 か月間培養し、マスト細胞に分化したものをを用いた。骨髄単離好中球は、骨髄細胞を採取し、精製キットを用いたネガティブセレクション法により単離した。分化・精製率の確認には、各種マーカー蛋白質（骨髄由来マスト細胞：Fc ϵ RI、CD117）及び（骨髄単離好中球：Ly6G）を用いて行った。これらの骨髄由来マスト細胞や骨髄単離好中球を用いて、マスト細胞と好中球の相互作用における好中球蛋白質 Ly6G によるアレルギー応答調節機構を明らかにすることを試みた。そのため、マウス骨髄由来マスト細胞と骨髄単離好中球をマトリゲルコートしたガラスボトムディッシュ上で培養する共存系を確立し、アレルギーによる特異的刺激応答に伴うマスト細胞と好中球の接着を伴う相互作用、好中球蛋白質 Ly6G の培養上清中への遊離、及び近傍のマスト細胞への移動について定量・定性的な解析を行った。

次に、Ly6G 及び Ly6 ファミリー蛋白質によるアレルギー応答制御機構を追究するため、各種リコンビナント蛋白質の作製を行なった。リコンビナント蛋白質は、研究目的や用途に応じて、大腸菌発現系 (BL21 (DE3)、ClearColi BL21 (DE3) 等) やヒト細胞発現系 (HEK 293 細胞等) を用いた。リコンビナント蛋白質の培養・精製条件の最適化をはじめ、これらの発現系を用いてリコンビナント Ly6G 蛋白質を作製した。また Ly6G 蛋

白質の機能を詳細に追究するため、Ly6G 以外の Ly6 ファミリー蛋白質に関しても、各種組織から遺伝子の取得と各種プラスミドの作製、及び各種リコンビナント蛋白質の作製・精製を行った。リコンビナント蛋白質の発現及び精製の確認には、電気泳動による CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色法やウエスタンブロッティング法を用いて、各種特異的抗体により行った。また、マスト細胞上の結合分子を同定する前段階の実験として、作製した各種リコンビナント蛋白質を用いて、マスト細胞上に Ly6G に対する結合分子が存在するのかなどについて、フローサイトメータを用いた結合実験を行った。マスト細胞を各種リコンビナント蛋白質で処理後、マスト細胞上に結合しているリコンビナント Ly6G 蛋白質を抗 Ly6G 抗体や抗 His-tag 抗体を用い、フローサイトメータによって検出した。更に、プルダウン法やファーウエスタン法を用いて、マスト細胞に発現する Ly6G 結合分子について追究した。

先に作製・精製したリコンビナント蛋白質や Ly6G ペプチドを用いて、マスト細胞の各種炎症性メディエータの分泌反応やシグナル伝達調節機構に及ぼす影響について追究した。分泌反応の解析には、マスト細胞を各種リコンビナント蛋白質や Ly6G ペプチド処理後、アレルギーの刺激応答に伴う、分泌顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) の定量や各種炎症性サイトカイン (TNF α 等) やケモカイン (CCL2 等) について ELISA 法を用いて定量した。また Ly6G 蛋白質によるマスト細胞シグナル伝達調節機構については、各種シグナ

ル分子や転写調節因子の活性化状態について追究した。また、IgE 非依存的刺激によるアレルギー応答への Ly6G 蛋白質の機能を明らかにするため、IgE 非依存的刺激として、ATP、Mastoparan、Compound48/80 を用い、刺激応答に伴う分泌顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) や各種炎症性サイトカイン (TNF α 等) やケモカイン (CCL2 等) について mRNA 発現量の定量的 PCR 及び ELISA 法を用いた定量解析を行った。

最後に、アレルギー疾患モデルを用いた解析を実施した。疾患モデルとして、マスト細胞依存的なモデルとして使用されるアレルギー疾患モデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いた。マウスの両耳にアレルギー特異的 IgE を皮内投与により受動的に感作した。翌日、アレルギーを投与し、アレルギーモデルを作製した。また、アレルギー炎症反応の測定には、Evans Blue 色素を用いた血管透過性を指標に定量した。

結果と考察

我々は、これまでアレルギー応答の多様性の制御機構について追究してきた。そして、アレルギーと IgE の親和性に着目した研究から、高親和性アレルギーによって誘導されたアレルギー炎症組織では、マスト細胞と好中球が相互作用することによって、アレルギー応答を調節している可能性を見出した (図 1)。また、マスト細胞と好中球の共存培養系を用いた実験から、アレルギーによってマスト細胞を特異的に活性化するとマスト細胞と好中球が接着している様子が観察された。

そこで、両者の接着を介した相互作用を更に詳細に解析するため、マスト細胞のアレルゲン刺激応答に伴う好中球との相互作用についてライブイメージング法を用いて追究した。その結果、マスト細胞を活性化すると、マスト細胞の分泌反応に伴い好中球の形態が球状から紡錘形に変化し、マスト細胞方向に遊走し、両者が接着し相互作用している様子が観察された (図 2)。そこで、好中球に特異的に発現する Ly6G 蛋白質を染色したと

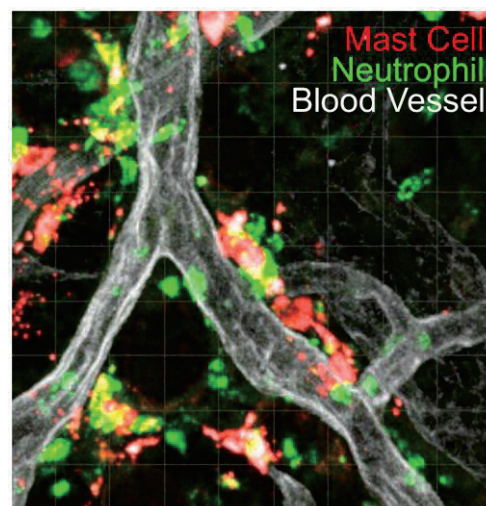


図 1 アレルギー炎症組織でのマスト細胞と好中球

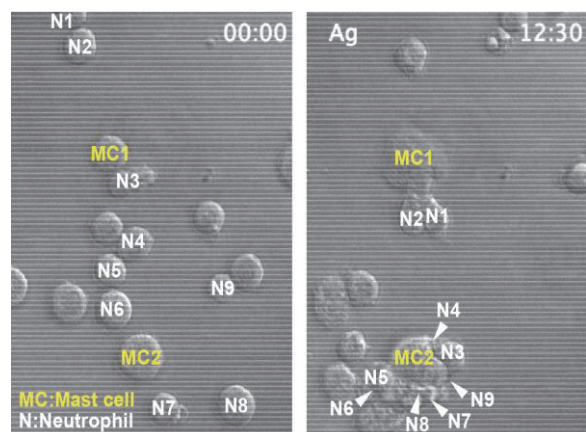


図 2 マスト細胞の活性化による好中球の遊走と相互作用

ころ、Ly6G 蛋白質が好中球からマスト細胞の細胞膜へ移動していることが明らかになった。そこで、好中球からマスト細胞へ移動した Ly6G 蛋白質について定量解析を行なったところ、アレルギー刺激に伴って、接着している部分で Ly6G 蛋白質の移動が顕著に起こっていることが分かった。また、マスト細胞と好中球の接着部位では、細胞骨格蛋白質 (F-actin) の集積も観察されており、両細胞は接着することによって情報交換や機能調節を行っている可能性が示唆された。

次に、好中球からマスト細胞への Ly6G 蛋白質の移動メカニズムを明らかにするために、マスト細胞と好中球の共存培養系を用いて、好中球からの Ly6G 蛋白質の遊離過程について追究した。マスト細胞と好中球を共存培養した後、マスト細胞をアレルギーで刺激し、培養上清中の Ly6G 蛋白質をウエスタンブロッティング法で定量解析したところ、アレルギー刺激 1 時間後の培養上清において Ly6G 蛋白質量が増加し、刺激後 3~6 時間では減少している様子が観察された。このことから、アレルギー刺激によるマスト細胞の活性化に伴って、マスト細胞の分泌顆粒内に含有しているプロテアーゼなどが⁴⁾、相互作用 (接着) 部位の局所で高濃度に分泌され、好中球の Ly6G 蛋白質が切断されることによって、培養上清中に遊離し、近傍のマスト細胞に移動したのではないかと考えられた。

次に、マスト細胞の活性化に伴って培養上清中に切断された Ly6G 蛋白質のマスト細胞への結合能について解析した。そのため本研究では、大

腸菌発現系やヒト細胞発現系の最適化を行うと伴にリコンビナント蛋白質 (Ly6G 及び Ly6 ファミリー) を作製し、マスト細胞への結合量をフローサイトメータで解析した。その結果、未刺激状態では Ly6G 蛋白質が約 20% 程度のマスト細胞で結合していた。一方、アレルギー刺激を行なったマスト細胞では、Ly6G 蛋白質の結合率が増加している様子が観察された。このことから、マスト細胞の細胞膜上には Ly6G 蛋白質に対する結合因子が存在すると推察され、その結合因子が、Ly6G 蛋白質によるマスト細胞の機能調節を行っている可能性が示唆された。また、Ly6G 以外の Ly6 ファミリー蛋白質についても、マスト細胞への結合能を有することも確認した。そのため、プルダウン法やファーウエスタン法を用いて、マスト細胞に発現する Ly6G 結合分子について確認を試みた。しかし現時点において、Ly6G 蛋白質に結合するマスト細胞上の分子の同定には至っていない。そのため現在は、各種条件の最適化を行っている状況である。

また先の実験から、マスト細胞の活性化に伴って好中球に発現する Ly6G 蛋白質が好中球から切断されマスト細胞表面に移動・結合することが明らかになった。そこで、Ly6G 蛋白質によるマスト細胞応答調節機構を明らかにするため、Ly6G 蛋白質による炎症性メディエータ分泌反応への影響について解析した。はじめに、ヒスタミン分泌 (脱顆粒反応) の指標として用いられる分泌顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) の定量を行なった。その結果、Ly6G 蛋白質処理によりアレ

ルゲン刺激に伴う脱顆粒反応が有意に抑制されており、また、その抑制効果は Ly6G 蛋白質の濃度依存的であることも明らかになった (図 3)。次に、各種炎症性サイトカイン (TNF α 等) やケモカイン (CCL2 等) について ELISA 法を用いて定量解析を行なったところ、予想に反して、Ly6G 蛋白質を処理した細胞では、有意に分泌反応が増強していることが分かった (図 3)。そこで、Ly6G 蛋白質の分泌機能配列を明らかにするため、Ly6G 蛋白質を断片化した Ly6G ペプチドを用いて、マスト細胞の脱顆粒反応 (β -hexosaminidase) の定量解析を行なった。その結果、未処理の細胞と比較して、Ly6G ペプチド#4 及び#9 処理によりマスト細胞のアレルゲン刺激に伴う脱顆粒量が有意に減少していた。さらに、Ly6G ペプチドによるマスト細胞のサイトカイン (TNF α) 及びケモカイン (CCL2) 分泌への影響を解析したところ、未処理の細胞と比較して Ly6G ペプチド#4 処理により抗原刺激に伴う TNF α や CCL2 の分泌量が増加している様子が

観察された。更に、IgE 非依存的刺激 (ATP、Mastoparan、Compound48/80) の場合には、分泌顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) の分泌について、アレルゲンとは異なる細胞応答を示す可能性が存在することが分かり、現在、分子メカニズムについて追究している。これらのことから、Ly6G 蛋白質にはマスト細胞の分泌反応を調節する機能配列が存在する可能性が示唆された。

次に、Ly6G 蛋白質によるシグナル調節機構の解析を行った。マスト細胞に発現する重要シグナル分子 (キナーゼ等) について、ウエスタンブロット法を用いた蛋白質の活性化を指標に追究した⁵⁾。特に、マスト細胞の脱顆粒反応に重要である Lyn、Syk、LAT、PLC γ をはじめ、MAPK (Erk、p38、JNK) などの転写調節因子などについて解析を行なったところ、Ly6G 処理した細胞ではアレルゲン刺激に伴って幾つかのシグナル分子 (Syk、LAT、PLC γ 、Akt、Erk、p38 など) において活性化状態が持続している傾向が観られた。

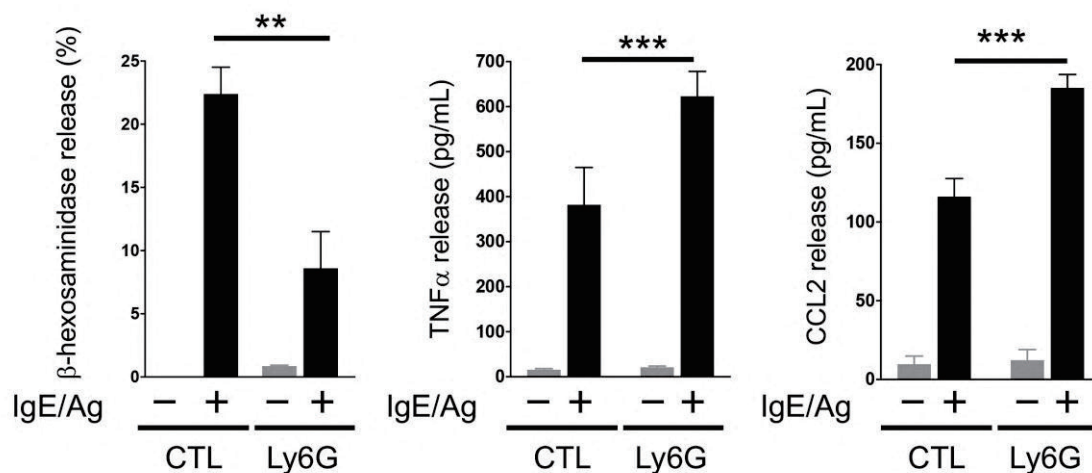


図 3 Ly6G によるマスト細胞の分泌制御

最後に、Ly6G 蛋白質による生体レベルでのアレルギー応答調節の可能性について検討した。そのため、マスト細胞依存的なモデルとして多くの研究で使用されているアレルギー疾患モデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いて、アレルギー応答調節機構の解析を行なった²⁾。その結果、Ly6G 蛋白質を投与したマウスでは、マスト細胞の活性化に伴う炎症応答の指標として用いた血管透過性 (Evans Blue 色素の組織内浸潤) が、未処理の場合と比較して有意に抑制されていることが分かった (図 4)。このことから、Ly6G 蛋白質は生体レベルでもアレルギー応答を調節している可能性が示唆された。

今後の研究活動について

本研究で実施した、*in vitro* 及び *in vivo* での研究成果から、Ly6G 蛋白質が、アレルゲン刺激応答に伴うマスト細胞の機能調節作用を有している可能性が示唆された。これらの研究成果は、機能ほとんど明らかになっていない Ly6G 蛋白質

質をはじめ Ly6 ファミリー分子が、マスト細胞上の Ly6 ファミリー結合分子を介して、マスト細胞の機能調節を行なっていることを示唆しており、新たなアレルギー調節因子としての可能性が期待される。また、Ly6G 蛋白質は、各種炎症性メディエータ (脱顆粒反応やサイトカイン・ケモカイン分泌) の分泌反応において、相反するマスト細胞 (分泌) 応答を誘導するなど、改めてマスト細胞の分泌調節機構の複雑さが明らかになった。そのため、アレルギー反応を誘導する各種炎症性メディエータの分泌反応について、単一顆粒レベルでより詳細に解析する必要があると考えられる。生体レベルでの調節作用に関しても、他のアレルギー疾患モデルでの研究が実施されることによって、Ly6 ファミリー分子による機能調節作用の実体が明らかになるものと期待される。この様に、Ly6G によるマスト細胞の機能調節メカニズムが明らかになれば、新たなアレルギー制御メカニズムが解明され、アレルギー応答の機能調節因子として、アレルギー疾患治療に向け

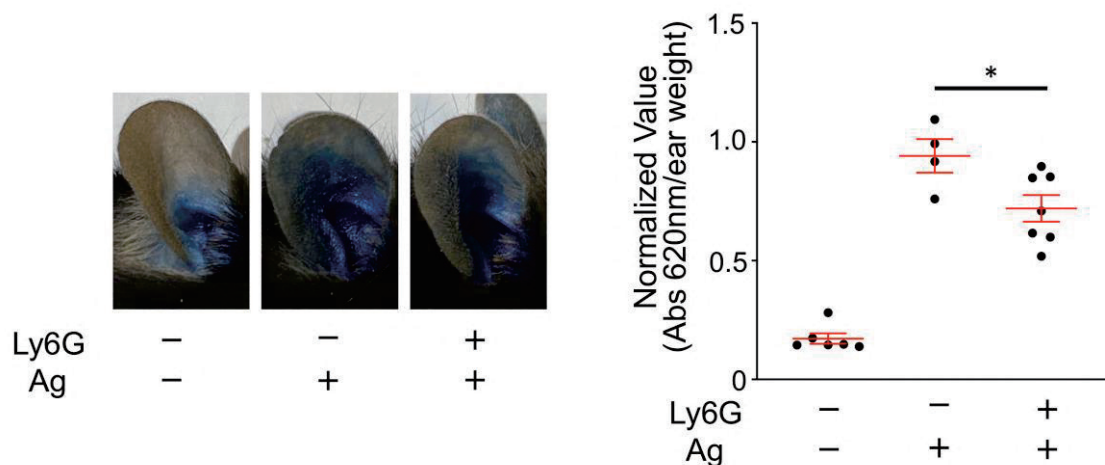


図 4 Ly6G によるアレルギーモデルでのマスト細胞活性調節

た新たな展開が期待される。

参考文献

- 1) Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020 Jun;58(3):342-365.
- 2) Suzuki R, Leach S, Liu W, Ralston E, Scheffel J, Zhang W, Lowell CA, Rivera J. Molecular editing of cellular responses by the high-affinity receptor for IgE. *Science.* 2014 Feb 28;343(6174):1021-5.
- 3) Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol.* 2013 Oct;94(4):585-94.
- 4) Caughey GH. Mast cell proteases as pharmacological targets. *Eur J Pharmacol.* 2016 May 5;778:44-55.
- 5) Blank U, Huang H, Kawakami T. The high affinity IgE receptor: a signaling update. *Curr Opin Immunol.* 2021 Oct;72:51-58.

研究課題名	モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群における経口免疫治療の確立と機序解明		
フリガナ	フジエダ シゲハル		
代表者名	藤枝 重治		
所属機関 (機関名) (役職名)	福井大学学術研究院 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	三浦 謙治 (ミウラ ケンジ)	筑波大学生命環境系 生物科学 専攻 分子細胞生物学分野 植 物分子生物細胞学研究室 教授	Bet v 1 作製、供給
	宮寺 浩子 (ミヤデラ ヒロコ)	筑波大学 医療医学系遺伝医学 助教	細胞分析
本助成金による発 表論文、学会発表	1.モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明と治療戦略 加藤幸宣 第 35 回 日本口腔咽頭科学会 シンポジウム 2.新規モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明 加藤幸宣、加藤永一、森川太洋、吉田加奈子、意元義政、坂下雅文、大澤陽子、 高林哲司、藤枝重治 第 71 回日本アレルギー学会学術大会 一般演題		

研究結果要約

花粉-食物アレルギー症候群 (Pollen-Food Allergy Syndrome : PFAS) は、近年増加傾向にあるが、有効な治療法がなく、社会問題となっている。研究代表者は、シラカンバ花粉で全身感作させたマウスにリンゴエキスを経口投与することで、これまでに全く報告例のない新規 PFAS モデルマウスの作製に成功した。アレルギー免疫療法は、アレルギー疾患に対する根治治療として近年注目されている治療法である。特に、口腔粘膜を利用した舌下免疫療法 (sublingual immunotherapy ; SLIT) は、スギやダニアレルギーに対して大変有用かつ安全に行うことができる方法であり、アレルギー性鼻炎に対する治療法として広く行われている。一方で、PFAS に対する免疫治療はまだ一般的ではなく、研究段階である。研究代表者は、PFAS の根治治療に着目し、抗原の舌下投与による免疫治療の確立を目的とした研究を行っている。本研究において、recombinant Bet v 1 を用いた舌下免疫療法が PFAS モデルマウスにおけるロカキ回数の減少に有効であることが示された。新規 PFAS モデルマウスにおける舌下免疫療法を用いたアレルギー免疫療法 (PFAS-SLIT モデルマウス) の確立と作用機序の解明により、舌下免疫療法が PFAS における根治治療の新規治療戦略となる可能性を追求し、原因食物の摂取が可能となることが期待できる。

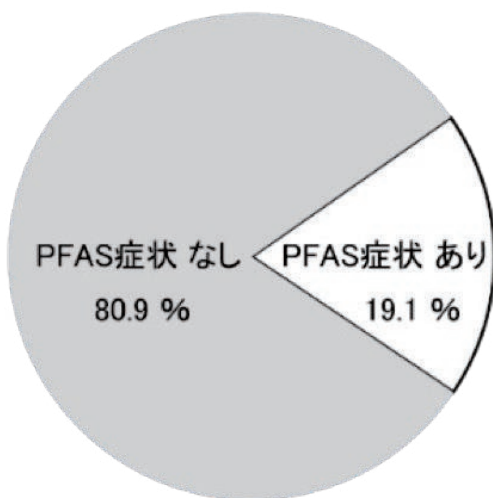
研究目的

花粉-食物アレルギー症候群 (Pollen-Food Allergy Syndrome : PFAS) は原因食物摂取後、数分以内に口唇・口腔の搔痒感、しびれ、粘膜浮腫をきたす疾患である。時に消化器症状、呼吸器症状をきたすことや、重症例ではアナフィラキシーを生じることもある。近年罹患率は上昇傾向にあり、生活の質に多大な影響を与えることから注目されている。申請者は2016年福井大学医学部附属病院に所属する職員に対して、PFASに関する疫学調査を行った。PFAS症状を有する人は、1328人中258人であり、19.1%と高い割合を示していた (図1)。

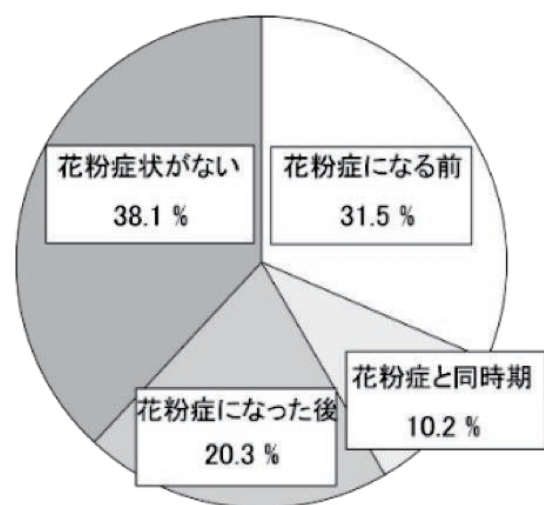
PFASは、食物抗原により口腔粘膜症状を呈するIgE依存性即時型アレルギーであるが、感作抗原と誘発抗原が同一である食物アレルギーとは異なり、花粉抗原感作陽性者において食物アレルゲンが交差反応することで惹起される。欧米では、シラカンバ花粉 (感作抗原) 感作陽性者の約半数が、リンゴ (誘発抗原) を食べるとPFAS症状を認めると言われる。この反応は、シラカンバ花粉

の主要抗原であるBet v 1とリンゴに含まれるMal d 1との交差反応である。一方で、シラカンバ花粉症患者の半数はリンゴを食べても無症状である。また、PFAS症状を認めてもリンゴ特異的IgEが陰性となる症例も存在する。申請者が行った疫学調査では、花粉症に先行してPFAS症状を認める人が31.5%存在した (図2)。つまり花粉症が感作未発症でもPFASを発症し得る。花粉症の感作発症とPFASの発症は必ずしも同期せず、様々なケースが存在するため、アレルギー疾患の中でもPFASの病態は複雑である。

PFASに関する基礎的研究は、他のアレルギー疾患に比べて報告が乏しい。アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎、気管支喘息、食物アレルギーといった種々のアレルギー疾患ではモデルマウスが存在し、マウスによる様々な報告がなされている。一方、PFASに関するモデルマウスは存在しない。そのためにPFASの研究は他のアレルギー疾患の分野に比べて、未解明で遅れをとっている部分が多い。発症を防ぐには原因食物摂取の回避が唯一の方法というのが現状であり、これは複



(図1) PFAS症状を有する人の割合



(図2) 花粉症状とPFAS症状の発症時期

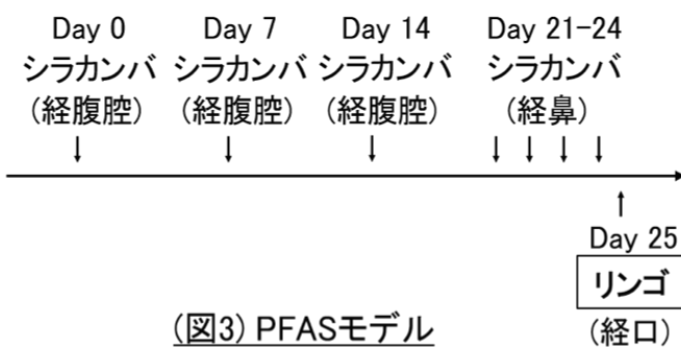
数の食物摂取が制限される PFAS 患者にとっては深刻な問題である。PFAS モデルマウスを作製してその発症機序を解明することは、非常に重要な課題である。PFAS の病態が解明されれば、PFAS の原因食物の特定法や花粉症患者に対する PFAS 発症予防策、PFAS 患者に対する治療方法を確立することが期待される。申請者は、新規 PFAS モデルマウスを作製し、モデルマウスを用いて PFAS の病態解明を行ってきた。本研究では、PFAS の治療方法、予防策に着目し、経口免疫治療の確立、作用機序の解明を行う。

研究計画及び研究手法

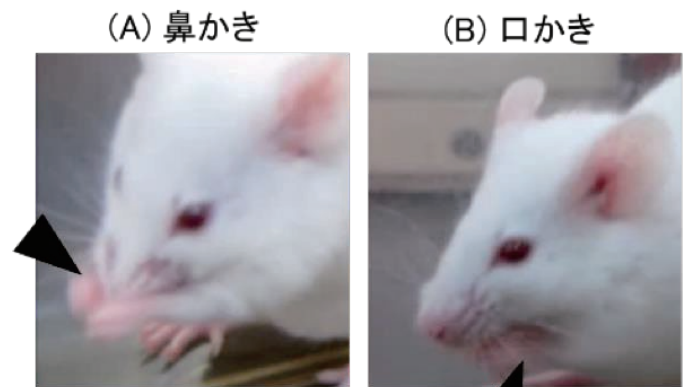
PFAS は、近年注目されている疾患であるが、比較的新しい概念であり、基礎研究の報告が大変少なく、これまでモデルマウスは存在しなかった。しかし、アレルギー疾患の病態解明・治療開発においてモデルマウスの作製は必須である。研究代表者はアレルギー疾患モデルマウスの作製・研究に精通しており、ブタクサ花粉症モデルマウスを用いた論文を発表した¹⁾。

研究代表者が新たに作製した PFAS モデルマウスでは、シラカンバ花粉 (100 µg / mice) の腹腔内投与による全身感作後に同抗原 (1 mg / mice) を経鼻感作させる。その後、リンゴエキス (50 µl / mice) を経口投与する (図 3)。

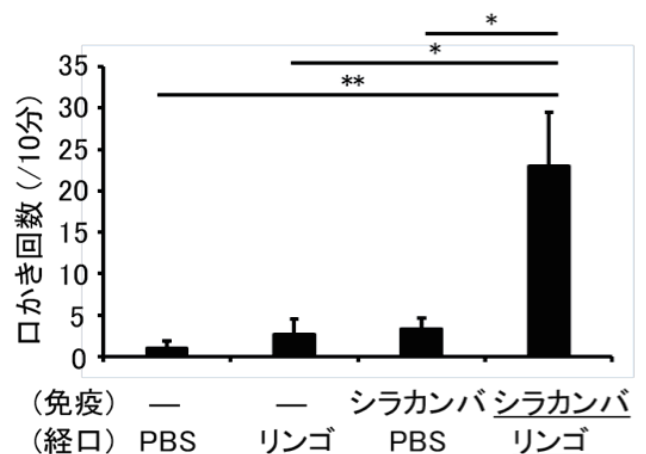
リンゴはシラカンバ花粉と交差反応を示す代表的な食物である。PFAS モデルマウスではリンゴエキス経口投与後に、アレルギー性鼻炎モデルでみられる鼻かき (図 4A) とは全く異なる口かき動作 (図 4B) を認める。リンゴエキス経口投与後 10 分間の口かき回数では、「シラカンバ免疫+



(図3) PFASモデル



(図4) 鼻かきと口かきの違い



(図5) 口かき回数

*P < 0.05
 **P < 0.01

リンゴエキス経口投与群」のみ、明らかに口かき回数が上昇する (図 5)。

口かき動作は PFAS 症状と酷似しており、ナイーブマウスにリンゴを投与しても決して認められない。シラカンバ感作陽性マウスに、リンゴエキスを耳介注射すると、耳介の発赤・耳介厚上昇を認め、血管が透見できなくなる (図 6)。食物ブリックテスト陽性所見は PFAS 診断基準の一つであり、PFAS モデルマウスはこれを満たしている。

研究代表者は新規 PFAS モデルマウスに関する英語論文を発表した²⁾。Bet v 1 との関連、IgE/肥満細胞/好塩基球の関与、上皮由来サイトカインとの関連、ILC2s の関与、頸部・鼻・口腔粘膜における局所 Th2/好酸球性炎症について検証し、PFAS の病態解明を行った。交差反応を標的とした PFAS モデルマウスは世界初であり、画期的なモデルである。シラカンバ花粉やリンゴをマウスに適用することは実臨床に即しており、また PFAS 症状として口かき動作を評価することは正確、かつ明快な検証方法である。この方法は、シラカンバ・モモ、ブタクサ・メロンといった、他

の花粉-食物にも応用できる。また、感作抗原・誘発抗原を様々に設定することで、未知の花粉-食物アレルギーを見出すことも可能となる。

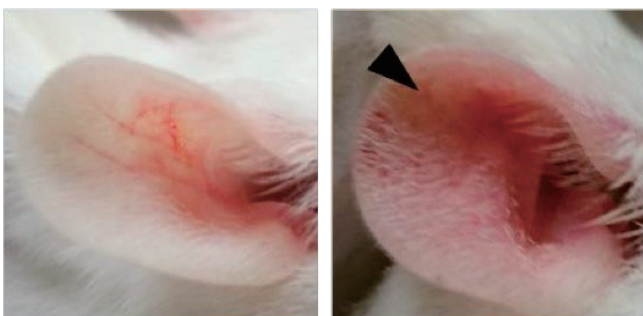
本研究では、PFAS の根治治療としての免疫治療を追求するために、PFAS モデルマウスを用いてシラカンバ-リンゴを対象とした SLIT の確立を計画した。

結果と考察

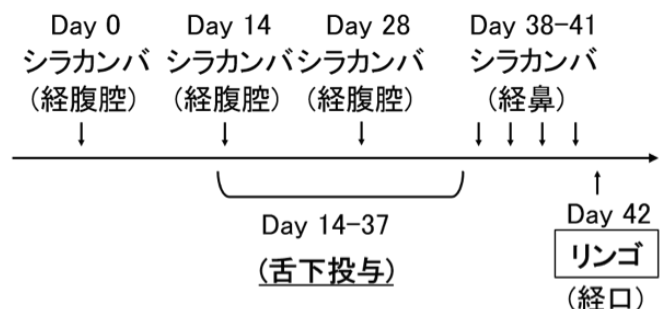
・PFAS モデルマウスにおける SLIT を用いたアレルギー免疫療法 (PFAS-SLIT モデル) の確立

Day 0、14、28 にシラカンバ花粉 (100ug/mice) の腹腔内投与による全身感作を行い、その後 Day 38-41 に同抗原 (1mg/mice) を経鼻感作させる。舌下免疫療法として Day 14-37 にかけて毎日舌下投与を行う。舌下投与は無麻酔で舌下に試薬を 1 分間保持した後飲み込む。その後、Day 42 にリンゴエキス (50ul/mice) を経口投与する。リンゴエキス経口投与後の口かき回数を 10 分間カウントする (図 7)。この方法により、舌下免疫療法による減感作の効果を検証した。

(A) ナイーブマウス (B) シラカンバ感作マウス



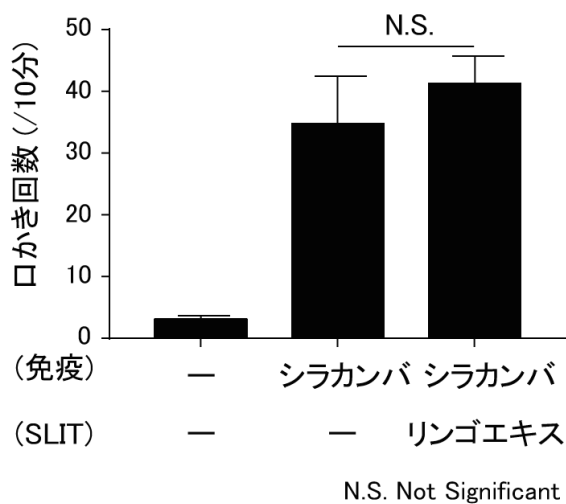
(図6) リンゴ耳介注射後の反応



(図7) PFAS-SLITモデル

舌下投与に用いる試薬として、① リンゴエキス (10 ul / mice)、② recombinant Mal d 1 (r Mal d 1) (0.03 mg / 10 ul / mice)、③ r Mal d 1 (0.30 mg / 10 ul / mice)、④ シラカンバエキス (10 ul / mice)、⑤ recombinant Bet v 1 (r Bet v 1) (0.03 mg / 10 ul / mice)、⑥ r Bet v 1 (0.30 mg / 10 ul / mice)を用いる計画を予定した。感作抗原と誘発抗原それぞれのエキス、低濃度コンポーネント、高濃度コンポーネントで比較検証し、最も効果的な試薬を判定することとした。

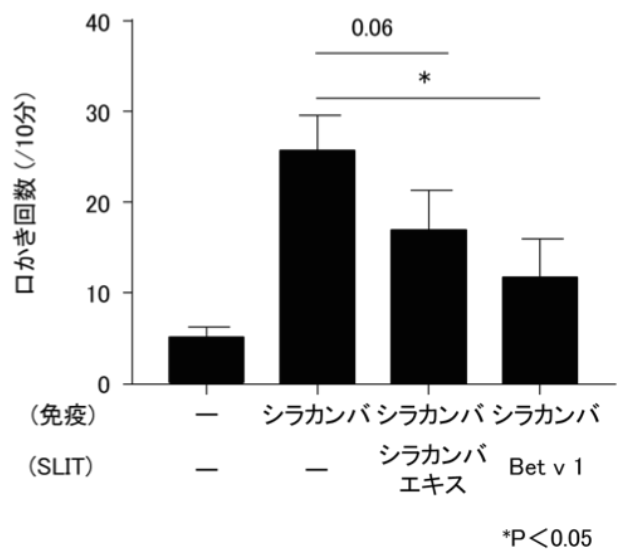
舌下免疫の試薬としてリンゴエキス (10 μl / mice) を用いた場合、リンゴエキス経口投与後の口かき回数は、SLIT を行わなかった群とほぼ同等であった。つまり、リンゴエキスの連日舌下投与では免疫療法としての効果は得られなかった (図 8)。



(図8) リンゴを用いたSLIT

舌下免疫の試薬としてシラカンバエキス (10 ul / mice) を用いた場合、リンゴエキス経口投与後の口かき回数は、SLIT を行わなかった群に比べて、減少する傾向にあった (図 9)。更に、高濃度 r Bet v 1 (0.30 mg / 10 μl / mice) を用いた群では、SLIT を行わなかった群に比べて、有意に口かき回数が減少した (図 9)。従って、PFAS-SLIT モデルマウスにおいては、高濃度の r Bet v 1 が最も SLIT としての効果が得られることが明らかとなった。

共同研究者である三浦謙治先生により、精製度の高い r Bet v 1、r Mal d 1 の抽出に成功した。研究代表者は効果的な舌下免疫の試薬としてコンポーネント (Bet v 1、Mal d 1) の使用が鍵であると考えている。本研究により、PFAS-SLIT モデルマウスにおいて r Bet v 1 を用いた舌下免疫治療が有効性を示した。リンゴエキス舌下投与に



(図9) シラカンバを用いたSLIT

関しては免疫療法としての効果は得られなかったが、コンポーネントである Mal d 1 が効果的となる可能性がある。

今後、三浦先生より譲受した r Mal d 1 を舌下免疫として使用し、コンポーネントによるアレルギー免疫療法の効果検証を進める。

本研究結果は、日本口腔咽頭科学会、日本アレルギー学会で成果発表を行った。更に得られた結果を解析し、論文の執筆・投稿準備を進める。

今後の研究課題として、確立させた PFAS-SLIT モデルマウスを用いて、PFAS に対するアレルギー免疫療法に関わる因子を同定し、発症機序を解明する。具体的には、舌下免疫療法による血清 IgE や活性化 T 細胞の変化を検証する。制御性 T 細胞や制御性 B 細胞はアレルギー免疫応答を抑制する代表的な細胞である。また、IL-10 は炎症反応の抑制性サイトカインであり、制御性 T 細胞や制御性 B 細胞から放出され、抗原特異的免疫反応の抑制に関与する。PFAS-SLIT モデルマウスにおいて、これらの免疫応答抑制因子の関与を解析することが重要な課題であると考えている。

今後の研究活動について

アレルギー免疫療法は、アレルギー疾患に対する根治治療として近年注目されている治療法である。口腔粘膜を利用した舌下免疫療法 (SLIT) は、スギやダニアレルギーに大変有用であり、また安全に行うことができる治療法として広く行われている。一方で、PFAS に対する免疫治療はまだ一般的ではなく、研究段階である。ヒトを対

象とした研究報告では、シラカンバ・リンゴの PFAS に対して Bet v 1 を用いた SLIT の効果は 0-90% と様々であり、一定していない。また、リンゴエキスを使用した SLIT の効果に関しては良い結果が得られていない。

PFAS に対する免疫治療の確立が遅れているのは、動物実験が不十分であることに原因がある。様々なアレルギー疾患と同様に、研究を円滑に進めるためにマウスを用いた実験が必須である。そこで、我々は、PFAS モデルマウスを新たに作製し、モデルマウスを用いて PFAS の病態を解明してきた。本研究では、更に PFAS の根治治療としての免疫治療を追求している。我々の研究により、r Bet v 1 を用いた SLIT が PFAS モデルマウスにおける口かき回数の減少に有効であることが示された。今後の研究活動においては、PFAS-SLIT モデルマウスを用いて、舌下免疫治療の確立、制御性 T 細胞を中心とした作用機序の解明を行うことを目的とする。研究終了時には、PFAS モデルマウスにおけるシラカンバ・リンゴを対象としたアレルギー免疫治療が確立される。また、制御性 T 細胞を中心としたメカニズムを明らかにすることができる。

これまで PFAS 患者は、発症を防ぐためには原因食物摂取の回避が唯一の方法であった。本研究で確立された PFAS モデルマウスに対する経口免疫治療をヒトに応用することによって、PFAS に対する新たな治療戦略を供給できる。そして、シラカンバ・リンゴを対象とした PFAS 患者が、

リンゴをはじめ原因果物を摂取することが可能となる。更に、シラカンバ花粉感作陽性者において PFAS を有する患者は、リンゴ以外にモモやサクランボといった他の果物にも口腔アレルギー症状を呈しうる。本研究で得られる免疫治療は、これらの果物に対しても有効的と考えている。

また全国的に生息しているブタクサ花粉やカモガヤ花粉はウリ科（メロン、スイカなど）と交差反応を示す。全人口の約 3 分の 1 が発症しているスギ花粉症はトマトによる PFAS が報告されている。日本全土に PFAS 患者は存在する。研究代表者が作製した PFAS モデルマウスは、シラカンバ-リンゴのみではなく、様々な花粉-食物に応用できる。ブタクサ花粉症モデルマウスにメロンエキスを経口投与すると、口かき回数が上昇することは既に確認している。つまり、申請者の作成した新規モデルマウスを利用することで様々なタイプの PFAS に対する免疫治療を研究することが可能である。そして二次予防として、感作された個人に対する PFAS 発症を予防する。従って、PFAS の根治治療・発症予防策に大いに貢献することが期待できる。

参考文献

- 1) Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, Fujieda S, Matsushita K, Yoshimoto T. Nasal Sensitization with Ragweed Pollen Induces Local-Allergic-Rhinitis-Like Symptoms in Mice. *PLoS One*. 2014 Aug 13;9(8):e103540.
- 2) Kato Y, Morikawa T, Kato E, Yoshida K, Imoto Y, Sakashita M, Osawa Y, Takabayashi T, Kubo M, Miura K, Noguchi E, Fujieda S. Involvement of activation of mast cells via IgE signaling and epithelial cell-derived cytokines in the pathogenesis of pollen-food allergy syndrome in a novel murine model. *J Immunol*. 2021 Jun 15;206(12):2791-2802.
- 3) Yamada Y, Kidoguchi M, Yata A, Nakamura T, Yoshida H, Kato Y, Masuko H, Hizawa N, Fujieda S, Noguchi E, Miura K. High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*. 2020 Apr 2;11:344.

役員・評議員・研究助成審査委員名簿

(2023年9月29日現在)

1. 役員

理事長	井手 弘	常勤	元日本ハム北海道ファクトリー（株）代表取締役社長
副理事長	岩間 清	非常勤	日本ハム（株）中央研究所 所長
専務理事	沖浦智紀	常勤	日本ハム（株）中央研究所より出向
理事	一色賢司	非常勤	（一財）日本食品分析センター 学術顧問 北海道大学名誉教授
	伊藤節子	非常勤	同志社女子大学名誉教授
	宇理須厚雄	非常勤	藤田医科大学 医学部 客員教授
	大社啓二	非常勤	社会福祉法人大寿庵 理事長
	高松伸枝	非常勤	別府大学 食物栄養科学部 教授
	畑江敬子	非常勤	お茶の水女子大学名誉教授
	村田容常	非常勤	東京農業大学 教授
監事	岸田周平	非常勤	日本ハム（株）経理財務部 次長

2. 評議員

評議員	荒川 隆	非常勤	（一財）食品産業センター 理事長
	井川伸久	非常勤	日本ハム（株）代表取締役社長
	大石泰之	非常勤	日本ハム（株）執行役員 品質保証部長、お客様志向推進部、ライフスタイル研究室、中央研究所担当
	大谷敏郎	非常勤	（公財）日本植物調節剤研究協会 理事長
	菊田行紘	非常勤	TMI 総合法律事務所 弁護士
	河野陽一	非常勤	（地独）東金九十九里地域医療センター 理事長 千葉大学名誉教授
	柴田瑠美子	非常勤	国立病院機構福岡病院アレルギーセンター 顧問・非常勤医師（小児科）
	清水 誠	非常勤	東京大学名誉教授 東京農業大学客員教授

3. 研究助成審査委員

委員長	村田容常	東京農業大学 教授
副委員長	一色賢司	(一財) 日本食品分析センター 学術顧問 北海道大学名誉教授
委員	穂山 浩	星薬科大学 薬学部 教授
	五十部誠一郎	日本大学 生産工学部 特任教授
	伊藤浩明	あいち小児保健医療総合センター センター長
	川村 理	香川大学 農学部 教授
	楠 隆	龍谷大学 農学部 教授
	倉園久生	元徳島大学 研究支援・産官学連携センター 教授
	下条直樹	千葉大学予防医学センター 特任教授
	白川 仁	東北大学大学院農学研究科 教授
	立花宏文	九州大学大学院農学研究院 主幹教授
	鍋谷浩志	東京家政大学 栄養学部 栄養学科 教授
	藤澤隆夫	国立病院機構三重病院 名誉院長
	松本健治	国立成育医療研究センター研究所 部長
	三橋富子	元日本大学短期大学部 教授
	森山達哉	近畿大学 農学部 学部長
好田 正	東京農工大学大学院農学研究院 教授	

2022 年度事業の審査は以下の委員にもご担当いただきました。

駒井三千夫	東北大学名誉教授
柘植郁哉	藤田医科大学 医学部 客員教授

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 案内

1. 目的

食物アレルギーや食品分野における研究、研究支援及び啓発活動を行い、もって世界の人々においしさの感動と健康の喜びを提供することを目的とする。

2. 事業内容

本法人は、前条の目的を達成するため、次の事業を行います。

- (1) 食物アレルギーや食品分野に関する講演会等の開催
- (2) 食物アレルギーや食品分野に関する印刷物の刊行及び広報活動
- (3) 食物アレルギーや食品分野に関する試験研究及び調査
- (4) 食物アレルギーや食品分野に関する研究を行う者に対する助成
- (5) 食物アレルギーや食品分野に関する指導者の育成及び啓発活動への支援
- (6) 食物アレルギーや食品分野に関する研究及び啓発活動に関し功績のある者の表彰
- (7) その他この法人の目的を達成するために必要な事業

3. 沿革

2015年1月27日に日本ハム株式会社により「一般財団法人ニッポンハム食の未来財団」として設立されました。

内閣総理大臣より公益認定を受け、2017年4月1日より「公益財団法人ニッポンハム食の未来財団」として活動しています。

4. 情報公開等

Website ; <https://www.miraizaidan.or.jp/>

X(旧Twitter) ; <https://twitter.com/syokunomirai/>

Instagram ; <https://www.instagram.com/syokunomiraizaidan/>

YouTube ; <https://www.youtube.com/channel/UCnJDGexmLgLr6betsgvYKUQ>

5. 2023年度主な事業活動

- ・2023年度研究助成の実施、2024年度研究助成の公募 及び 2022年度研究助成の成果報告会の実施
- ・第9回食物アレルギー対応食 料理コンテストの実施
- ・主催セミナー(「栄養士・食従事者向け」及び「保育者向け」)の実施
- ・2023年度団体活動支援助成の公募及び実施
- ・当財団 Web サイトからの情報発信

以上

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2023年 9月 29日発行

〒305-0047 茨城県つくば市千現 2-1-6

つくば研究支援センターA-24

TEL 029-893-4466

FAX 029-893-4360

E-mail info@miraizaidan.or.jp

Website <https://www.miraizaidan.or.jp/>

X(旧Twitter) <https://twitter.com/syokunomirai/>

Instagram <https://www.instagram.com/syokunomiraizaidan/>

YouTube <https://www.youtube.com/channel/UCnJDGexmLgLr6betsgvYKUQ>