

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できれば、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)