

平成 29 年度研究助成事業

成果報告会 講演要旨集



ニッポンハム
食の未来財団

期日 平成 30 年 10 月 15 日（月）

会場 A P 品川アネックス地下一階

東京都港区高輪 3 丁目 23-17

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 平成 29 年度研究助成事業 成果報告会 プログラム

日時：平成 30 年 10 月 15 日（月）15 時 00 分より

場所：AP 品川アネックス 地下一階 1 ルーム

15:00 挨拶

山田 良司

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 理事長

〈成果発表〉

（共同研究 -5 課題）

（敬称略）

15:05 ～ 15:25

「 α S1 カゼインのアレルゲン活性に対する免疫学的機序による制御に関する研究」・・・・・・・・・・ 5

座 長 鍋谷 浩志

農研機構 食品研究部門 部門長

講演者 伊藤 浩明

あいち小児保健医療総合センター 副センター長

15:25 ～ 15:45

「新生児早期の食事介入による即時型食物アレルギー発症予防効果の検証」・・・・・・・・・・ 16

座 長 川村 理

香川大学 農学部 教授

講演者 海老澤元宏

国立病院機構相模原病院臨床研究センター 副臨床研究センター長

15:45 ～ 16:05

「食物由来制御性ペプチドの探索に基づく食物アレルギー予防食品の開発」・・・・・・・・・・ 24

座 長 駒井三千夫

東北大学大学院農学研究科 教授

講演者 香月 康宏

-----（休憩）16:05 ～ 16:20-----

16:20 ～ 16:40

「重症鶏卵アレルギーに対する経皮免疫療法の有効性と安全性に関する研究」・・・・・・・・・・ 30

座 長 伊藤 節子
同志社女子大学生生活科学部 特任教授

講演者 藤澤 隆夫
国立病院機構三重病院 院長

16:40 ～ 17:00

「ヒスタミン遊離因子の阻害による食物アレルギー治療薬の開発」・・・・・・・・・・ 37

座 長 穂山 浩
国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長

講演者 松本 健治
国立成育医療研究センター研究所 部長

17:00 閉会挨拶

一色 賢司
一般財団法人日本食品分析センター 学術顧問
北海道大学名誉教授
公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 理事・研究助成審査委員長

17:05 写真撮影

個人研究助成 研究結果要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

評議員会・役員・研究助成審査委員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58

当財団案内・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 60

〈成果発表〉

講演要旨

〔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	αs1 カゼインのアレルゲン活性に対する免疫学的機序による制御に関する研究		
フリガナ	イトウ コウメイ		
代表者名	伊藤 浩明		
所属機関（機関名） （役職名）	あいち小児保健医療総合センター 副センター長 兼 総合診療科部長		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	和泉 秀彦（イズミ ヒデヒコ）	名古屋学芸大学管理栄養学科教授、学科長	抗原の精製、動物実験
	武藤 太一郎 （ムトウ タイチロウ）	愛知医科大学小児科助教	血清中の抗体測定
	近藤 康人（コンドウ ヤスト）	藤田保健衛生大学坂文種報徳会病院小児科教授	好塩基球活性化試験の実施・指導
本助成金による発表論文，学会発表	第 55 回日本小児アレルギー学会（2018 年 10 月）及び国際学会での発表、及び海外誌への論文投稿を予定している。		

研究結果要約

＜目的と意義＞牛乳アレルギーに対する経口免疫療法（OIT）の機序として、従来は牛乳粗抗原又は各種カゼイン混合物を用いた免疫学的検討が行われてきた。本研究では、牛乳の主要抗原である αs1 カゼイン特異的な液性因子について解析することを目的とした。

＜方法＞5 歳以上で牛乳アレルギーの急速 OIT を行った患児 39 名の経時的な血清を用いて、精製した αs1 カゼイン特異的 IgE、IgG4 抗体測定及び受動感作による好塩基球活性化（BAT）の変化を検討した。さらに、OIT 後又は自然耐性獲得した患児の血清（以下、耐性化血清）による受動感作 BAT の抑制を検討した。

＜研究から得られた新しい知見＞牛乳 OIT により、αs1 カゼイン特異的 IgE は低下したが、IgG4 の有意な増加は確認されなかった。OIT 前の血清では受動感作 BAT の活性化が認められたが、OIT 後には活性化が低下した。OIT 前の血清に耐性化血清を混和すると、受動感作 BAT は有意に抑制された。一方、混和した血清による受動感作後に上清を洗浄すると、有意な抑制が解除された。Protein G カラムを用いて IgG を除去した血清を混和した場合や、抗 FcγR 抗体で FcγRIIIb の機能を阻害した場合にも、この抑制は解除されなかった。以上より、牛乳 OIT の機序として、αs1 カゼイン特異的 IgG4 の寄与は少ないものの、何らかの液性因子が関与している可能性が示唆された。

研究目的

牛乳アレルギーにおける主要アレルゲンはカゼインである。牛乳カゼインの中でも、αs1、αs2、β、κ - カゼインがそれぞれアレルゲンとして同定されているが、αs1 カゼインには多くの IgE エピトープが存在し、最も強いアレルゲン活性を示す。

臨床的に牛乳は鶏卵に次いで頻度の高い食物アレルゲンであり、微量でもアナフィラキシーを誘発する重症者も少なからず存在する。自然耐性獲得が進む患者が存在する一方で、5 歳過ぎても耐性獲得できない患者も多い。さらにそうした患者を対象として経口免疫療法を行っても、鶏卵・小麦と比較して脱感作状態まで到達する成績が悪く、治療に難渋することが多い。

食物アレルゲンに対する脱感作状態、あるいは耐性獲得をもたらす要因として、特異的 IgG、IgG4 抗体をはじめとする液性の抑制性因子、マスト細胞・好塩基球の活性化を抑制する因子、さらに制御性 T 細胞による抗体産生やマスト細胞・好塩基球の活性化抑制などが想定されている。経口免疫療法の効果は、治療したアレルゲン特異的に得られること、治療後数週間で大幅な閾値上昇が認められる症例もあること、特異的 IgE 抗体が残存したまま脱感作状態に至ることから、特異的 IgG4 抗体など抗原特異的な因子が、マスト細胞や好塩基球の活性化を抑制することが最も中心的な機序であろうと推測される。しかし、経口免疫療法で得られる脱感作状態と、自然耐性獲得した状態との違いについて、十分に検討されていない。さらに、牛乳アレルギーの免疫学的検討は、乳清タンパクも含む牛乳粗抗原、あるいは各種カゼインの混合

物としか解析されておらず、真に抗原特異的な免疫学的制御に関する解析が十分ではない。

本研究では、5 歳以上になっても牛乳アナフィラキシーが残存する患児、自然耐性獲得した患児、経口免疫療法によって脱感作状態に至った患児、さらにそこに到達できなかった患児を対象として、高度に精製した αs1 カゼインに対する IgE、IgG4 抗体測定と、好塩基球活性化の抑制を検討する。好塩基球活性化試験において、患者の末梢血好塩基球のみでは抑制性因子に関する検討が十分行えないため、健常者の好塩基球を用いた受動感作による活性化試験を主な手段として、抑制性因子の同定を試みる。

研究計画及び研究手法

< αs1- カゼインの分離 >

αs1- カゼインの分離は、無脂肪乳を原材料として、Igarashi の方法¹⁾を一部改変し行った。初めに、無脂肪乳 120mL に 4M NaSCN 40ml、99.5% Ethanol (EtOH) 160mL および 0.75M CaCl₂ (50% EtOH) 80mL を加え、4℃で 30 分間攪拌後、遠心分離し得られた残渣を 4M urea, 0.04M NaCl, 0.03M EDTA (pH7.8) 200mL で溶解し、さらに 2-mercaptoethanol 2mL を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、0.2M Na₂HPO₄ 40mL および 2M CaCl₂ 10mL を交互に半量ずつ加え、遠心分離し得られた残渣を 4M urea, 0.03M EDTA (pH7.8) 20mL および 3.2M (NH₄)₂SO₄ (pH4.7) 20mL で溶解後、遠心分離し残渣を得た。残渣に純水 50mL と、99.5% EtOH 50mL を加え、遠心分離後の上清を pH4.7 に調製し、遠心分離し残渣を得た。

その残渣を 4M urea, 0.1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH7.8) 1mL で溶解し、純水 40mL を加え、pH4.7 に調整し、遠心分離によって残渣を得た。再びこの操作を繰り返し行い、得られた残渣を 4M urea, 0.1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH7.8) で溶解し 3 日間透析した。透析した溶液を凍結乾燥し、PBS で溶解しゲル濾過 SephadexG-50、及び Vivaspin 20 遠心濃縮チューブにより分画した。分画分取した溶液を 3 日間透析したものを αs1- カゼインとした。

< SDS-PAGE >

αs1 カゼインの精製は、Laemmli の方法²⁾による SDS-PAGE により確認した。解析には、15% ポリアクリルアミドゲルを用い、Coomassie Brilliant Blue R-250 にてタンパク質を染色した (Figure.1)。

SDS-PAGE

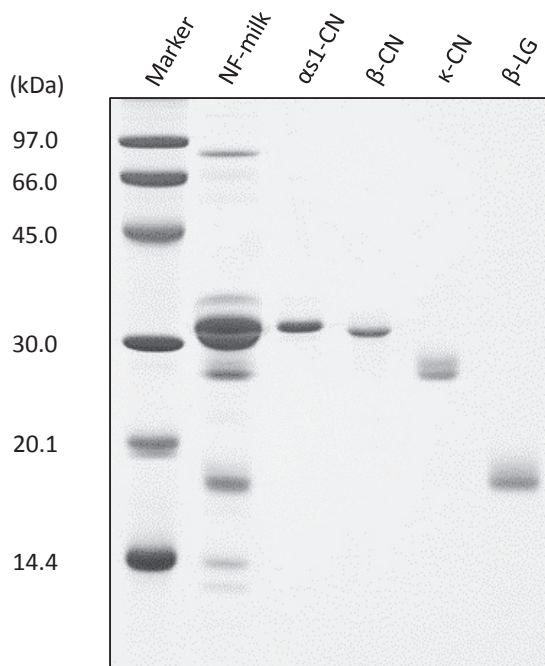


Figure 1 Purification of αS1-casein

< αs1-カゼイン特異的 IgE および IgG4 の測定 >

患者血清中の αs1- カゼイン特異的 IgE および IgG4 抗体は ELISA 法により測定した。αs1- カゼイン /PBS (10μg/mL) をマイクロタイタープレートにコーティングし、0.05% Tween 20 を含む Protein-Free Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific, PFBB-T) でブロッキングした。次いで、PFBB-T で 1:10 (IgE) または 1:200 (IgG4) に希釈した患者血清を 4℃で一晩反応させ、二次抗体として alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgE (BETHYL, 1:1000) または horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG4 (Thermo Fisher Scientific, 1:10000) を用い、発色基質として TMB (SeraCare Life Sciences, Inc) または PNPP (Thermo Fisher Scientific) で反応させた。測定された αs1- カゼイン特異的 IgE の吸光度が高かった免疫療法患者 1 名を対照 (100%) とした吸光度 (%) を測定結果として示した。

< 対象血清 >

急速経口免疫療法対象患者：2011 年 4 月～2017 年 3 月までに急速経口免疫療法 (ROIT) を施行し、ROIT 開始時と、ROIT 後 6 ヶ月・1 年・2 年・3 年後のいずれかの保存血清が得られた 39 名を対象とした。

牛乳アレルギー寛解患者：過去の明らかな即時型アレルギーの病歴、もしくは経口負荷試験陽性により、牛乳アレルギーの診断が確実であり、その後寛解が確認された後の保存血清が得られた 7 名を対象とした。

< 急速経口免疫療法 >

5 歳以上で、ROIT 開始前 6 ヶ月以内に、牛乳 5ml 以下を閾値とする明らかな即時型症状を

認める児に対し、12 日間の入院治療を行った。入院治療は、閾値量と誘発症状の重症度に応じて、閾値量またはそれ以下の量から牛乳摂取を開始し、最大 1 日 4 回、約 1.3 倍ずつ増量した。各摂取において無症状、または軽度の症状誘発であれば増量を継続、中等度の症状であれば同量の摂取または増量、重度の症状であれば一旦減量をし、症状を確認しながら摂取の増量を継続した。退院後は、入院で摂取可能となった摂取量を毎日継続し、最低 1 か月は同量を維持した後に、摂取量を次第に増量した。摂取に伴う誘発症状がみられた場合は、適宜摂取量を減量し治療を継続した。100ml まで摂取量を漸増した上で、約 1 年後を目途として牛乳 200ml 単回の経口負荷試験、又は牛乳 200ml まで摂取量の漸増を行った。200ml を症状なく 3 か月以上摂取できた時点で、摂取後の運動誘発試験を行って安定性を確認し、日常生活における牛乳を含む加工食品や料理の解除を進めた。

＜受身感作による好塩基球活性化試験＞

・血球表面の IgE の剥離

IgE の剥離は、Santos³⁾ らの報告に準じて行った。牛乳アレルギーのない成人男性由来全血を EDTA-2Na 採血管に採取した。全血 2ml に対し、4℃ 13ml HA buffer (0.3% ヒト血清アルブミン、10mM HEPES、140mM 塩化ナトリウム、塩化カリウム 5mM [pH7.4]) を加え懸濁し、遠心後にその上清を破棄した。得られた血球成分を 4℃ 13ml 乳酸バッファー (27.75mM 乳酸、140mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化カリウム [pH3.9]) で再懸濁し、氷中、5 分間静置し、IgE の剥離を行った。IgE 剥離後の血液は、4℃

13ml HA buffer で 2 回洗浄を行い中和した。細胞表面上の IgE の剥離が行われていることは、細胞表面上の IgE が減少し、FcεRIα の IgE 結合部位と結合する CRA2 が増加していることにより確認した (Figure 2)。

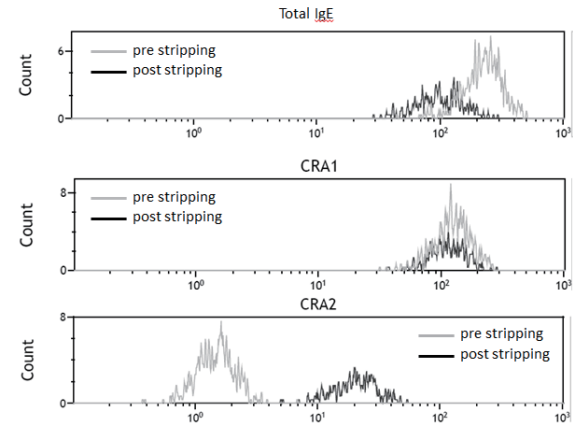


Figure2 Confirmation of stripping of IgEs from basophils

・好塩基球の受動感作

IgE を剥離した血球に対し、その 1/2 量の対象患者血清及び 1/2 量の PBS を加えて、37℃ で 1 時間培養した後、4℃ で一晩培養することで、受動感作を行った。免疫療法後 (post) の血清、もしくは寛解患者 (tolerance) 血清を加えた好塩基球活性化の抑制の検討時には、1/2 量の PBS に替えて、各対象血清を加えてその検討を行った。

・好塩基球活性化試験

好塩基球活性化試験 (BAT) は、Allergenecity kit (Beckman Coulter) と anti-CD63 抗体 (Anti-Hu CD63 APC (EXBIO)) を用いて、その説明書に準じて行った。まず、受動感作後の sample 50μL に対し、活性化バッファー 50μL、細胞表面抗体 (CD3-PC7/CRTH2-FITC/CD203c-PE と CD63-APC を 2:1 で混和した抗

体)15μL、抗原液 10μL を混和し 遮光下、37℃ で 15 分反応させた。抗原刺激はαs1 カゼイン (1mg/ml) で行い、陽性対照として付属の anti-IgE 抗体、陰性対照として PBS(-) を用いた。Stop solution 50μL を添加し反応を停止後、Fix and Lyse Solution1mLを加え、赤血球の溶血及び細胞の固定を行った。PBS(-) で洗浄した後、0.1% ホルムアルデヒド加 PBS(-) 溶液で再懸濁した。細胞表面上の、CD3、CRTH2、CD203c、CD63 の検出は、フローサイトメーター (Gallios, BECKMAN COULTER) で行い、その解析には Kaluza (BECKMAN COULTER) を使用した。好塩基球は Front scatter, side scatter から単核球を gating し、CD3 (+), CRTH2 (+) cells で同定し、好塩基球の活性化の評価は、好塩基球上に発現する CD203c もしくは CD63 の平均蛍光強度 (MFI), もしくは、陰性対照の CD203c 及び CD63 の蛍光強度が上位 5% に含まれ高発現な領域の細胞数割合で行った (Figure 3)。

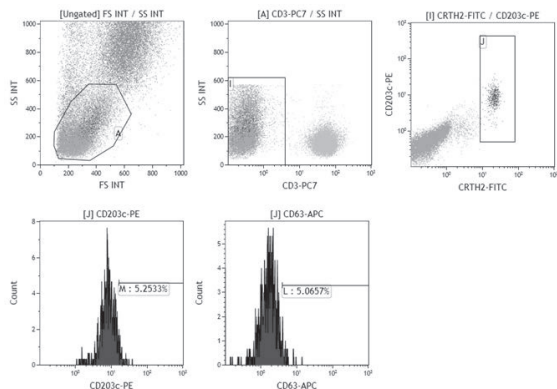


Figure3 Gating of basophils

・細胞表面抗原の評価

精製した αs1 カゼイン (10mg/ml) を、Biotin Labeling kit-NH2 (Dojindo Molecular Technologies) を用いてビオチン標識した。受動感作した試料 50μL を事前に PBS(-) 1ml と混和し、上清 1ml を破棄し洗浄した。得られた試料 50μL に対し、ビオチン標識した αs1 カゼインを 10μL 加え、氷中で 30 分間反応させた。好塩基球の細胞表面上に発現する IgE、CRA1、CRA2、CD3、CRTH2、αs1 カゼインを検出するため、PE anti-human IgE (Biolegend) 2.5μL、PE/Cy7 anti-human FcεRIα (Biolegend) 2.5μL、Anti-FcεRI α (human IgE receptor) monoclonal antibody (CRA2) FITC-labeled (BioAcademia) 1μL、CD3-APC-Alexa Flour 750 (Beckman Coulter)2.5μL、PerCP/Cy5.5 anti-human CD294 (Biolegend) 2.5μL、Brilliant violet 421 Streptavidin (Biolegend) 2μL を加え、4℃ 遮光下で 30 分間反応させた。Stop solution 50μL を添加し反応を停止後、Fix and Lyse Solution1mLを加え、赤血球の溶血及び細胞の固定を行った。PBS(-) で洗浄した後、0.1% ホルムアルデヒド加 PBS(-) 溶液で再懸濁し、フローサイトメーター (Gallios, BECKMAN COULTER) で検出した。

・液性因子による好塩基球活性化の抑制の検討

Post 血清、もしくは tolerance 血清による好塩基球活性化の抑制が、それらの液性因子によるものか評価を行うため、受動感作後の Sample 50μL に対して PBS(-)1mL を加えその血清成分を洗浄し、遠心後にその上清 1mL を除去した後に、好塩基球の活性化の評価を行った。

＜統計解析＞

各 Figure の結果は平均値 ± 標準偏差で示した。連続変数の解析には、one-way analysis of variance (one-way ANOVA) test を用い、有意差が認められた場合は post hoc 検定として、免疫療法開始時 (pre) を対照として Dunnett's test を行った。連続変数の相関係数の検定には、Pearson の積率相関係数を用いた。両側分布、危険率 (p 値) 5% をもって有意差ありと判定した。全ての統計学的解析は、EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター) を用いた。

結果と考察

＜免疫療法に伴う各パラメーターの推移＞

1. 牛乳摂取可能量

ROIT 開始時 (pre) と比較して、ROIT 後 6 ヶ月、1 年、2 年、3 年と経時的に牛乳摂取可能量は増加を認めた (Figure 4)。

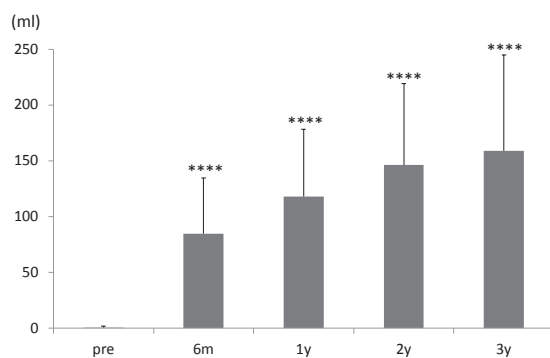


Figure 4 Change of tolerated amount of cow's milk after oral immunotherapy
n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. **** p<0.001

2. 免疫グロブリン

総 IgE、α ラクトアルブミン・β ラクトグロブリン特異的 IgE は免疫療法開始時と比較して、免疫療法開始後も変化しなかった (Figure 5a,

c, d) が、牛乳 (Figure 5b)・カゼイン (Figure 6a)・精製した αs1 カゼイン特異的 IgE は有意に減少を認めた (Figure 6b)。αs1 カゼイン特異的 IgG4 は明らかな増加を認めなかったが (Figure 6c)、αs1 カゼイン特異的 IgE との比は増加していた (Figure 6d)。

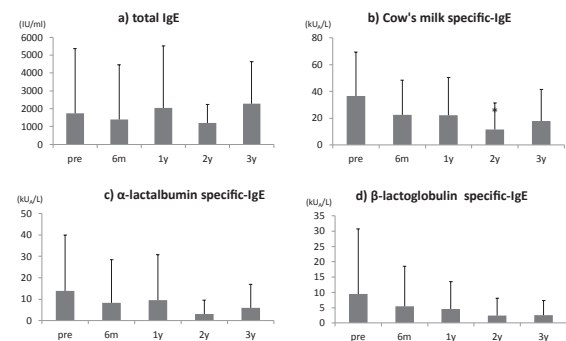


Figure 5 Change of IgEs after oral immunotherapy
n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. * p<0.05

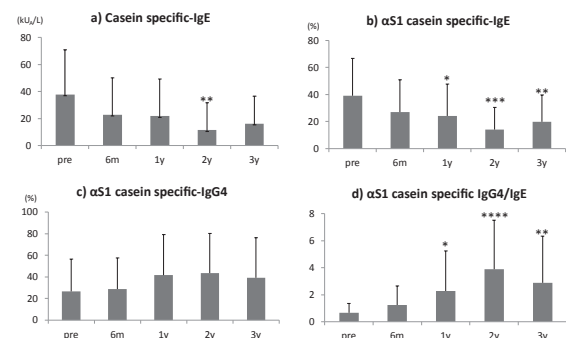


Figure 6 Change of casein specific Immunoglobulins after immunotherapy
n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, **** p<0.001

3. 好塩基球活性化

受動感作好塩基球における αs1 カゼイン刺激後の CD203c、及び CD63 高発現好塩基球細胞割合及び平均蛍光強度 (MFI) は、ROIT 開始時と比較し減少を認めた (Figure 7)。好塩基球細胞表面上の総 IgE (Figure 8a)、FCεRIα の IgE の結合部位以外の部位と結合

する CRA1 (Figure 8b)、FcεRIα の IgE 結合部位と結合する CRA2 (Figure 8c)、αs1 カゼイン (Figure 8d) は、ROIT による有意な変化を認めなかった。

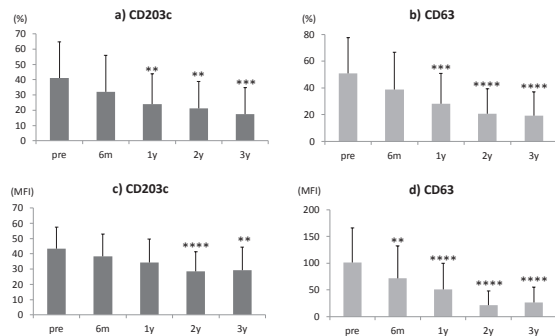


Figure 7 Change of basophil activation stimulated by αs1 casein after immunotherapy
n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. **p<0.01, ***p<0.005, **** p<0.001

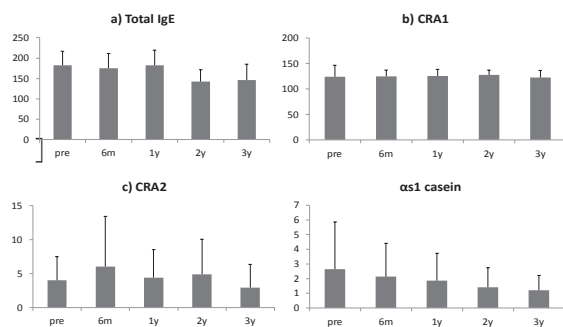


Figure 8 Change of basophil surface antigens stimulated by αs1 casein after immunotherapy
n=39 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

<牛乳摂取可能量と各パラメーターの関係>

1. 免疫グロブリン

全対象者の ROIT 前、ROIT 6 か月後、1 年後、2 年後、3 年後を全て対象とし、牛乳摂取可能量と各パラメーターとの相関関係を検定した。牛乳・カゼイン・αs1 カゼイン特異的 IgE とは逆相関を、αs1 カゼイン特異的 IgG4 / IgE とは正の相関を認めたが、αs1 カゼイン特異的

IgG4 とは有意な相関を認めなかった (Table 1)。

Table1 Correlations between Immunoglobulins and tolerated amount of cow's milk

	r	95% CI	p
Total IgE	0.044	-0.13 - 0.21	0.62
Cow's milk s-IgE	-0.42	-0.55 - -0.27	<0.001
Casein s-IgE	-0.44	-0.56 - -0.29	<0.001
α-lactalbumin s-IgE	-0.25	-0.42 - -0.071	0.0074
β-lactoglobulin s-IgE	-0.22	-0.38 - -0.31	0.018
αs1 casein s-IgE	-0.46	-0.58 - -0.31	<0.001
αs1 casein s-IgG4	0.078	-0.093 - 0.25	0.37
αs1 casein s-IgG4/IgE	0.42	0.27 - 0.55	<0.001

Pearson's product-moment correlations compared to tolerated amount of cow's milk were calculated.

2. 好塩基球活性化

牛乳摂取可能量と、αs1 カゼイン刺激後の CD203c、及び CD63 高発現な好塩基球細胞割合及び平均蛍光強度 (MFI) はそれぞれ逆相関を認めた (Table 2)。

Table2 Correlations between basophil activation and tolerated amount of cow's milk

	r	95% CI	p
CD63 (%)	-0.51	-0.63 - -0.37	<0.001
CD63 (MFI)	-0.58	-0.68 - -0.46	<0.001
CD203c (%)	-0.45	-0.57 - -0.30	<0.001
CD203c (MFI)	-0.49	-0.61 - -0.35	<0.001

Pearson's product-moment correlations compared to tolerated amount of cow's milk were calculated.

<αs1 カゼイン特異的 IgE・IgG4 と好塩基球活性化の相関関係>

αs1 カゼイン刺激後の CD203c 及び CD63 高発現な好塩基球細胞割合及び MFI は共に、αs1 カゼイン特異的 IgE と正の相関関係を認めたが、αs1 カゼイン特異的 IgG4 及び IgG4/IgE との相関関係は認められないか、非常に弱い相関関係しか認めなかった (Table 3)。

牛乳経口免疫療法により有意に牛乳摂取可能量は増加し、αs1 カゼイン特異的 IgE は減少することと、αs1 カゼイン刺激による受動感作好塩基球活性化は抑制されることが示された。

Table3 Correlations between basophil activation and αS1-casein specific Immunoglobulins

		r	95% CI		p
CD63 (%)	IgE	0.54	0.41- 0.65	0.65	<0.001
	IgG4	0.18	0.008 - 0.34	0.34	0.04
	IgG4/IgE	-0.23	-0.39 - -0.062	-0.062	0.0078
CD63 (MFI)	IgE	0.65	0.54 -0.74	0.74	<0.001
	IgG4	0.17	-0.0042 -0.32	0.32	0.056
	IgG4/IgE	-0.27	-0.42 - -0.1	-0.1	0.0019
CD203c (%)	IgE	0.48	0.33 - 0.6	0.6	<0.001
	IgG4	0.18	0.0049 - 0.34	0.34	0.044
	IgG4/IgE	-0.21	-0.37 - -0.045	-0.045	0.014
CD203c (MFI)	IgE	0.58	0.45 - 0.68	0.68	<0.001
	IgG4	0.083	-0.881 - -0.25	-0.25	0.34
	IgG4/IgE	-0.31	-0.46 - -0.15	-0.15	0.00023

Pearson's product-moment correlations compared to tolerated amount of cow's milk were calculated.

また、牛乳摂取可能量と αs1 カゼイン特異的 IgE、及び好塩基球活性化は、いずれも負の相関関係を認めた。

一方、αs1 カゼイン特異的 IgG4 は免疫療法による有意な増加が確認されず、牛乳摂取可能量とも有意な相関を示さなかった。また、αs1 カゼイン特異的 IgG4 は好塩基球活性化とも関連を認めなかった。

特異的 IgE の低下が免疫療法による牛乳摂取可能量の増加を可能にする機序に関与していることが示唆された。

< ROIT 後 (post) 血清あるいは寛解患者 (tolerance) 血清による好塩基球活性化の抑制 >

1. Post 血清あるいは tolerance 血清の混和による検討

αs1 カゼインによる抗原刺激による好塩基球活性化は ROIT 後に抑制されることが明らかになったため、この機序を解明するために、ROIT 前の患者血清に、同一患者由来の post 血清、

もしくは、tolerance 血清を混和して抑制がみられるかどうか検討した。その結果、post 血清、tolerance 血清を混和した場合、ROIT 前と比較して好塩基球活性化が抑制されることが示された (Figure 9a,9b)。

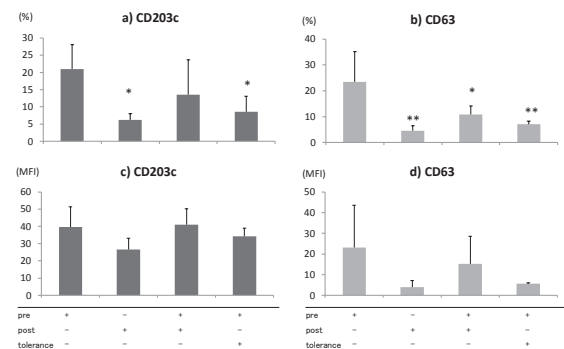


Figure 9 Suppression of basophil activation stimulated by αs1-casein

n=4 Dunnett's tests compared to pre were applied. * p<0.05,**p<0.01

2. 液性因子による好塩基球活性化抑制の検討

確認された好塩基球活性化の抑制機序が、混和した血清に由来する液性因子によるものか確認するために、受動感作後の上清を PBS (-) で洗浄した後に、αs1 カゼインによる抗原刺激

を行い、同様の抑制が確認されるか確認を行った。その結果、上清を洗浄した場合には、post 血清、tolerance 血清のいずれを混和しても、ROIT 前と比較して抑制傾向はみられたものの、統計学的には有意な好塩基球活性化の抑制は確認されなかった (Figure 10)。

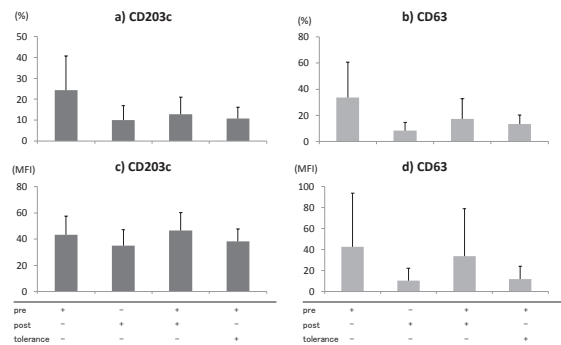


Figure 10 Suppression of basophil activation stimulated by αs1-casein after washing supernatant n=4 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

これらの結果から、上清中に存在する IgG4 等の何らかの液性因子が、好塩基球活性化に寄与している可能性が示唆された。

IgG4 が好塩基球活性化に関与しているか確かめるため、post 血清・tolerance 血清を事前にプロテイン G カラムで処理することで IgG を除去した sample を、pre 血清と混和し受動感作を行った。その結果、IgG を除去しない場合と比較して、好塩基球活性化の抑制は解除されなかった (data not shown)。

また、好塩基球細胞表面上の FcγRIIb を介した好塩基球活性化抑制機序⁴⁾の関与について確認するため、Santos らの方法³⁾に準じて、post 血清又は tolerance 血清を pre 血清と混和して受動感作する際に、抗 CD32 抗体 (抗 FcγR 抗体) を同時に加えた場合、抗体を加え

ない場合と比較して好塩基球活性化の抑制が解除されるかどうか検討したが、抑制は解除されなかった (data not shown)。

3. 抗原非特異的な因子による好塩基球活性化抑制の検討

好塩基球活性化の抑制機序が抗原特異的な IgG4 に起因しないことが示唆されたため、確認された好塩基球活性化の抑制機序が、抗原非特異的であるかどうか確認を行うため、pre 血清と、post 血清又は tolerance 血清の混和を行い受動感作することで、抗-IgE 抗体による、抗原非特異的な好塩基球の活性化が、pre 血清で受動感作した場合と比較して、抑制されるかどうか確認を行った。

その結果、post 血清及び tolerance 血清の混和は、受動感作後の上清の洗浄の有無に関わらず、抗-IgE 抗体による抗原非特異的な好塩基球の活性化を抑制しないことが示された (Figure 11, 12)。以上の結果から、post 血清及び tolerance 血清の混和による好塩基球活性化の抑制機序には、IgG4 以外の抗原特異的な液性因子が関与することが示唆された。

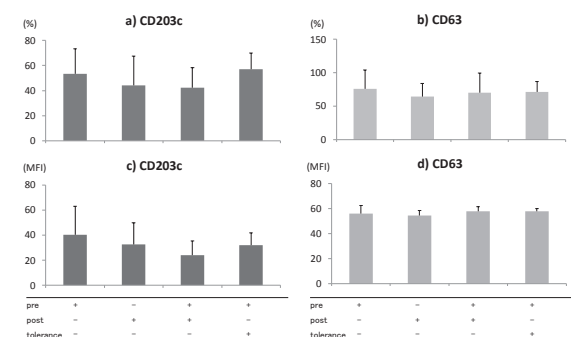


Figure 11 Suppression of basophil activation stimulated by anti-IgE antibody n=4 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

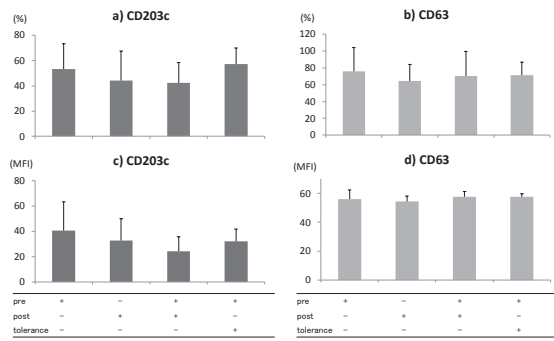


Figure 12 Suppression of basophil activation stimulated by anti-IgE antibody after washing supernatant n=4 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

＜残された課題及び発表予定＞

当初は、鶏卵やピーナッツで既報があるように、牛乳 ROIT 後に好塩基球活性化を抑制する主な液性因子は IgG4 抗体で、上清中の中和抗体活性と、FcγRII を介した抑制性シグナルが主な機序と想定していた。しかしその予想に反して IgG4 抗体の役割は限定的で、その他の液性因子による機序を解明する新たな課題が見つかった。ここまでの成果は、第 55 回日本小児アレルギー学会及びアレルギー関連の国際学会で発表した上で、国際誌への論文投稿をするべく準備を始めている。

今後の研究活動について

経口免疫療法の効果の一つとして、抗原特異的な IgG4 の増加が報告されていたが、今回の我々の研究からは、牛乳アレルゲンの中で最も抗原性が高いとされている、αs1 カゼイン特異的 IgG4 の関与は低いことが示唆された。αs1 カゼイン以外のコンポーネントに対する IgG4 の増加が寄与している可能性や、IgG4 以外の抗原特異的な液性因子が関与している可能性

があり、この検証を以下のように進める予定である。

① αs1 カゼイン以外の牛乳コンポーネントに対する特異的 IgE、IgG4 を測定し、免疫療法により IgE の低下がみられるか、また IgG4 の増加が確認されないかどうか確認を行う。

② 上記において、IgE の低下及び、IgG4 の増加を認めるコンポーネントが同定された場合、同コンポーネントによる好塩基球活性化と、抑制試験を行う。

③ 抗原非特異的な液性因子による好塩基球活性化抑制の可能性について検証するため、鶏卵や小麦等の牛乳以外の食物アレルギー児の患者血清で受動感作した好塩基球の抗原特異的な活性化が、牛乳免疫療法後の患者血清もしくは牛乳寛解患者血清を混和することで抑制されるかどうか検証を行う。

④ 受動感作における好塩基球上の FcεRI が、特異性の異なる IgE 抗体で占拠されることで活性化が抑制される可能性を検証するために、ヒト化した Der p 2 特異的モノクローナル IgE キメラ抗体等を用いた抑制試験を行う。

⑤ 可能であれば、健康者末梢血から IgE をストリッピングした好塩基球でなく、ヒトの肥満細胞株、又はヒト FcεRI を transfect した RBL 細胞などを用いて同様の検討を行う。

参考文献

- 1) Igarashi Y. Separation of caseins by chemical procedures. Int Dairy J. 1999 Mar;9(3):377-8.
- 2) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug;227(5259):680-5
- 3) Santos AF, James LK, Bahnson HT, et,al. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. J Allergy Clin Immunol. 2015 May; 135(5): 1249-56.
- 4) Burton OT, Longston SL, Zhou JS, et,al. Oral immunotherapy induces IgG antibodies that act through FcγRIIb to suppress IgE-mediated hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol. 2014 Dec; 134(6): 1310-1317.

研究課題名	新生児早期の食事介入による即時型食物アレルギーの発症予防効果の検証		
フリガナ	エビサワ モトヒロ		
代表者名	海老澤 元宏		
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 副臨床研究センター長 兼 アレルギー性疾患研究部長		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	佐藤 さくら （サトウ サクラ）	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部病因・病態研究室室長	統括、症例管理
	永倉 顕一 （ナガクラ ケンイチ）	国立病院機構相模原病院小児科医員	統括、症例管理
	浦島 充佳 （ウラシマ ミツヨシ）	東京慈恵会医科大学分子疫学研究室 教授	研究デザイン管理
	木戸 博 （キド ヒロシ）	徳島大学疾患酵素学研究中心 生体防御・感染症病態代謝研究部門 特任教授	食物抗原測定
	藤田 英寿 （フジタ ヒデトシ）	愛和病院 部長	症例登録
	谷口 裕章 （タニグチ ヒロアキ）	六甲アイランド甲南病院 医員	症例登録
本助成金による発表論文、学会発表	特になし		

研究結果要約

【背景】食物アレルギーの有病率は増加傾向で社会的な問題となっており、発症予防が大きな課題である。鶏卵アレルギーは本邦の食物アレルギーの約4割を占めている。これまで児の鶏卵摂取による二次予防、三次予防を目的とした研究がなされ、その有用性が示唆されているが、一次予防を目的として感作成立前に介入する研究の有用性は報告されていない。

【目的】鶏卵への感作が成立する前の新生児早期に母親が鶏卵を摂取することによる即時型鶏卵アレルギーの発症予防効果の有無を検証する。

【結果】2018年3月までに、研究参加への同意を取得した症例が計70例、児が出生して本登録へ至った症例が計60例、生後4ヶ月以上経過した症例が計25例であった。初乳中の鶏卵タンパク質量測定に関しては、鶏卵摂取群では2例/31例(6%)にオボアルブミンが検出され、9例/31例(39%)にオボムコイドを検出した。一方、鶏卵除去群でもオボアルブミンが4例/29例(14%)、オボムコイドが1例/29例(3%)に検出された。kineticsに関しては、個々の症例によりピークは異なり、一定の傾向を認めなかった。生後4ヶ月時の児の感作状況に関しては、鶏卵摂取群と除去群の比較では、卵白感作が3例/13例(23%) vs 4例/10例(40%)、オボムコイド感作が3例/13例(23%) vs 4例/10例(40%)に認めており、鶏卵摂取群の方が少ない傾向にあった。

【結論】全体で3年間の研究計画のうち1年までの結果を報告した。母の鶏卵摂取により初乳中に鶏卵タンパクを含む割合は高くなるが、摂取後のピークは症例により異なった。現時点では新生児早期に母が鶏卵を摂取した群の方が、生後4ヶ月時の児の卵白感作が少ない傾向であった。

研究目的

＜課題＞(1) 食物アレルギーの疾病負担

近年、食物アレルギーの有病率は増加傾向である。(1) 本邦では乳幼児の 10% 前後に発症し、過去 9 年で約 1.7 倍に増加した。(2) 医療・栄養・社会・園や学校など多分野で問題となっている。特に鶏卵アレルギーは本邦の食物アレルギーの原因食物で最も多く、今後の対応が急務である。

(2) 即時型鶏卵アレルギーに対する一次予防の必要性

二次予防については、乳児期早期から鶏卵を摂取した児は、鶏卵を除去した児と比較し 1 歳以降の鶏卵アレルギー発症率が有意に低いことが複数の研究で報告され(3,4)、乳児期早期からの鶏卵摂取による発症予防の可能性が示唆された。三次予防については、我々は乳幼児の即時型鶏卵アレルギー児が微量卵白を摂取することによる耐性獲得の促進を明らかにした。(5) しかしながら、一次予防を目的とした新生児早期の母の鶏卵摂取による有用性は報告されていない。

(3) 食物アレルギーにおける感作の成立時期

生後 3 ヶ月時点で卵白特異的 IgE 抗体が陽性となる児が多いことは知られているが(6)、上記の介入研究ではこのような児は対象から除外されている。感作の成立時期は明らかではないが、新生児早期の食物タンパクへの暴露がその後の感作と関連している可能性がある。感作が成立する前に何らかの介入をすることが一次予防に繋がる可能性が考えられるが、これまで新生児早期の介入に関する検討は報告されていない。

＜研究目的＞新生児早期の母の鶏卵摂取による即時型鶏卵アレルギーの発症予防効果の検証

鶏卵への感作が成立する前の新生児早期に母が鶏卵を摂取することで、即時型鶏卵アレルギーの発症を予防することを明らかにできれば、食物アレルギー診療および授乳中の栄養指導に極めて有益な情報となる可能性がある。

研究計画及び研究手法

【研究デザイン】 多施設でのランダム化比較介入試験。参加施設数は 6 施設程度を想定していたが、研究整備に時間が掛かり、今年度の参加施設数は 3 施設となった。

【対象】 ＜選択基準＞ ①食物アレルギーの発症リスクが高い児：両親のいずれかにアレルギー疾患（アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー結膜炎、気管支喘息、食物アレルギーのうち 1 つ以上）を有する児

②各参加施設の産科外来通院中に研究参加への同意を得た母親および児

＜除外基準＞ ①早産児

②出生体重 2300g 未満の児

③重症新生児仮死の児（5 分値の Apgar score 3 点以下）

④ NICU 入院が必要な児

⑤日齢 2 以降に母乳摂取が一切不可能な児

⑥主治医が試験の実行は不可能と判断した児

⑦母が鶏卵アレルギーである児

上記選択基準の①と②を満たし、除外基準の①－⑦のいずれにも該当しない症例を対象とした。

【介入・調査方法】

＜割り付け＞生後 0-5 日の間、母親が鶏卵を 1 日 1 個摂取する早期摂取群と鶏卵を除去する除去群にランダムに割り付けた。割付調整因子の層は施設毎として、置換ブロック法を用いてランダム化した。封筒法を用いてブラインド下に無作為に割付を行った。

＜入院中＞生後 0 日目に除外基準のいずれにも該当していないことを確認した。その場合を本登録とした。生後 4 日目に鶏卵摂取 1 時間後、3 時間後、6 時間後に母乳を 1ml 採取した。母乳検体を徳島大学に送付し、鶏卵タンパク量を測定した。

＜退院後＞母の自宅での鶏卵摂取に関しては特定の指導をせず自由に摂取可とした。

＜生後 1 ヶ月＞1 ヶ月時に皮膚のスキンケア指導を十分に行った。母親の鶏卵摂取状況についてアンケート調査を行った。母乳を 1ml 採取した。母乳検体を徳島大学に送付し、鶏卵タンパク量を測定した。

＜生後 4 ヶ月＞受診時に皮膚のスキンケア指導、母親の鶏卵摂取のアンケート調査に加えて血液検査を行い、鶏卵感作の有無などを評価した。

＜生後 5 ヶ月＞生後 5 ヶ月時から離乳食の摂取を指導した。血液検査で鶏卵への感作（卵白特異的 IgE 0.10UA/ml 以上）を認めなければ、自宅で児に鶏卵を食べ進めるよう指導した。感作を認めた際には、以下の内容で少量から段階別の食物経口負荷試験を行った。

生後 6-7 ヶ月時：全卵 1/32 個

生後 7-8 ヶ月時：全卵 1/8 個

生後 8-9 ヶ月時：全卵 1/2 個

生後 9-12 ヶ月時：全卵の炒り卵

自宅での児の鶏卵摂取で明らかな即時症状を呈して、その後のアレルギー専門医師の診察で即時型鶏卵アレルギーと診断した場合、および何れかの食物経口負荷試験で陽性と判断した場合を即時型鶏卵アレルギーと診断し、主要評価項目の発生と評価する。

＜生後 7 カ月、10 ヶ月＞自宅での鶏卵摂取に関するアンケートを郵送する。

＜生後 12 ヶ月時＞即時型鶏卵アレルギーの有無を評価する。

【母乳の解析方法】母乳検体を徳島大学に送付し、鶏卵タンパク量を測定した。徳島大学で作成した抗オボアルブミンおよび抗オボムコイドウサギポリクローナル IgG 抗体と母乳原液を反応させた後に蛍光標識した同一抗体で検出した。オボアルブミンに関しては、凍結乾燥により 5 倍濃縮で解析した。

①母乳中のオボアルブミン抗原量の測定について

Blank および検量線作成は検体と同様の処理を行った森永 E ミルク（0 ～ 1 歳用）を使用し測定した。測定可能範囲は 0.20 ng/mL-25 ng/mL であった。

②濃縮母乳中の OVA 抗原量の測定について

①での測定検出率が低かったため、凍結乾燥による濃縮で検出が可能かを検討した。Blank および検量線作成は検体と同様の処理を行った凍結乾燥した森永 E ミルク（0 ～ 1 歳用）を 5 倍濃縮になるように調整したものを使用し、測定を行った。測定可能範囲は 0.20 ng/mL-25 ng/mL であった。

③母乳中の OVM 抗原量の測定について

Blank および検量線作成は検体と同様の処理を行った森永 E ミルク (0 ~ 1 歳用) を使用し測定を行った。測定可能範囲は 0.78 ng/mL-25 ng/mL であった。

【目標症例数】当初は 400 例 (鶏卵摂取群 200 例、鶏卵除去群 200 例) を想定していたが、以下のように再度計算を実施した。

本研究では食物アレルギーの発症リスクの高い児のみを対象としており、鶏卵除去群での鶏卵アレルギーの発症率を 15% と仮定した。早期介入による予防効果を 6 割とし、鶏卵摂取群の有病率を 5% と仮定した。p=0.05、検出力 0.8 とした場合、1 群当り 140 例となった。脱落率を 2 割と仮定して、計 350 例となった。施設間の差を考慮して、必要症例数を計 380 例と設計した。

【評価項目】

＜主要評価項目＞1 歳台の即時型鶏卵アレルギーの有無

＜副次評価項目＞鶏卵への感作の有無、他の食物アレルギーの発症、湿疹の有無、母乳中の鶏卵タンパク量

【統計解析】即時型鶏卵アレルギーの有無、牛乳もしくは小麦アレルギーの有無、湿疹の有無はカイ 2 乗検定を用いて解析する。血液検査データ、母乳中の鶏卵タンパク量は Mann-Whitney の U 検定を用いて解析する。

【研究の進捗状況】当初より 3 年間の研究計画を立案しており、今回の報告書では開始 1 年時点での報告となった。今年度の目標登録症例数 80 例のうち、70 例を登録した。実際に研究分担施設では 2017 年 10 月からエントリーを開始しており、各施設とも研究開始後の症例登

録は順調であった。今後、研究を継続する予定であり、当初の予定通りに 3 年間の研究期間で目標数に到達可能と考えている。

結果と考察

【現時点の進捗状況】

2018 年 3 月 31 日時点での研究の進捗状況を図 1 に示す。2017 年 4 月より各施設での倫理申請と研究体制の整備、UMIN 登録を実施し、2017 年 7 月より当院で研究を開始し、10 月より六甲アイランド甲南病院と愛和病院でも研究を開始した。

2018 年 3 月時点で計 70 例より研究参加の同意を得た。内 60 例で児が既に出産し、除外基準のいずれにも該当しないことを確認 (本登録) した。内 25 例が生後 4 ヶ月まで経過している。

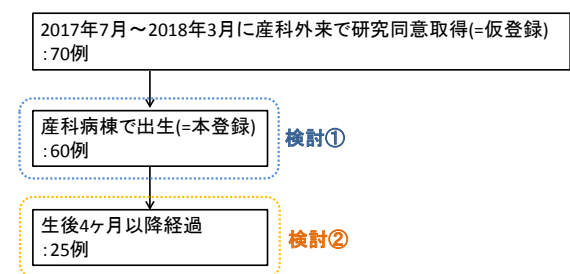


図 1. 2018 年 3 月 31 日時点の進捗状況

今回の報告書では、“本登録へ至った 60 例に関する検討”を検討①：母乳中抗原量の検討、“生後 4 ヶ月へ到達した 25 例”に関する検討を検討②：感作に関する検討として報告する。

【結果】

＜検討①：母乳中抗原量の検討＞

患者背景を表 1 に示す。鶏卵摂取群 31 名、

鶏卵除去群 29 名となった。母のアレルギー疾患の有無が、鶏卵摂取群での 23 例 /31 例 (74%) に対して、鶏卵除去群では 28 例 /29 例 (97%) と有意に多かった。その他の項目では両群で有意差は認めなかった。母の食事への介入は全例問題なく実施できた。

表 1. 検討①の患者背景

	鶏卵摂取群	鶏卵除去群	p =
人数	31名	29名	
男:女	18名:13名	20名:9名	0.38
帝王切開	6名 (19%)	5名 (17%)	0.83
同胞	同胞なし:18名 1人:11名 2人:2名 3人:0名 4人以上:0名	同胞なし:13名 1名:10名 2名:4名 3名:0名 4人以上:1名	0.30
父にアレルギー歴	24名 (77%)	18名 (62%)	0.19
母にアレルギー歴	23名 (74%)	28名 (97%)	0.01
介入に問題なし	14名 (100%)	11名 (100%)	-

生後 1 ヶ月時の定期診察の結果を表 2 に示す。生後 1 ヶ月時では、乳児湿疹を認めたのは鶏卵摂取群では 14 例 /31 例 (45%)、鶏卵

表 2. 検討①の 1 ヶ月時の結果

		鶏卵摂取群	鶏卵除去群	p =
人数		31名	29名	
乳児湿疹あり		14名 (45%)	9名 (31%)	0.26
母乳栄養	完全母乳	8名 (26%)	11名 (38%)	0.31
	混合	23名 (74%)	17名 (55%)	0.20
	人工栄養のみ	0名 (0%)	0名 (0%)	－
人工栄養の種類	ベプチドミルク	11名 (35%)	7名 (24%)	0.33
	普通ミルク	12名 (39%)	8名 (28%)	0.36
	なし	8名 (26%)	10名 (34%)	0.46
母の鶏卵摂取	1日1個	26名 (84%)	22名 (76%)	0.44
	1日半分	4名 (13%)	5名 (17%)	0.63
	1日1/4個未満	1名 (3%)	1名 (3%)	0.96
母乳中	OVA検出	6名 (19%)	6名 (21%)	0.32
	OVM検出	3名 (10%)	0名 (0%)	0.08

除去群では 9 例 /29 例 (31%) であった。乳児湿疹、母乳栄養の割合、人工栄養の割合、母の鶏卵摂取量に関しては、いずれも両群で有意差は認めなかった。

日齢 4 に採取した初乳中の鶏卵タンパク量の測定結果を図 2、図 3 に示す。初乳中のオボアルブミンは、鶏卵摂取群では 2 例 /31 例 (6%)、鶏卵除去群では 4 例 /29 例 (14%) で検出された (0.20ng/ml 以上) (図 2)。

初乳中のオボムコイドは、鶏卵摂取群では 9 例 /31 例 (39%)、鶏卵除去群では 1 例 /29 例 (3%) で検出された (0.78ng/ml 以上) (図 3)。両タンパク質ともに鶏卵を摂取してから 1 時間後、3 時間後、6 時間後といずれのタイミングでも検出され、ピークのタイミングは症例毎に異なっていた。

<検討②：感作に関する検討>

生後 4 ヶ月まで経過した 25 例の患者背景を表 3 に示す。父のアレルギー疾患の有無が鶏卵摂取群で有意に多く、母のアレルギー疾患の有無が鶏卵除去群で有意に多かったが、その他の項目や母の鶏卵の摂取頻度で有意差は認めなかった。血液検査では卵白感作を鶏卵摂取群 3 例 /13 例 (23%)、鶏卵除去群 4 例 /10 例 (40%) に認めた。オボムコイドの感作は鶏卵摂取群 0 例 /13 例 (0%)、鶏卵除去群 1 例 /10 例 (10%) に認めた。卵白・オボムコイドの感作の有無に関して両群で有意差は認めなかったが、鶏卵摂取群の方が少ない傾向であった。

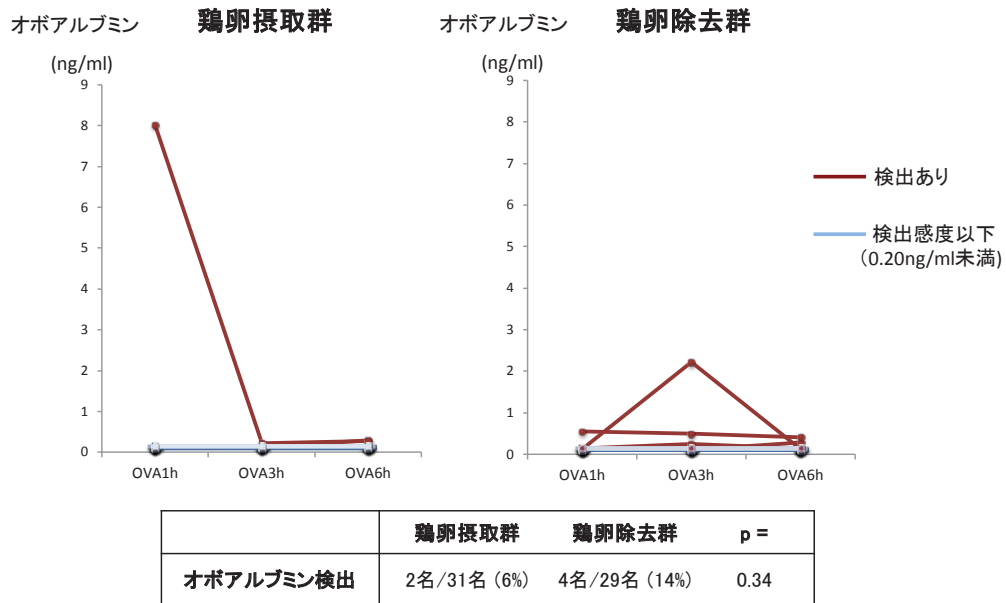


図 2. 初乳中のオボアルブミン

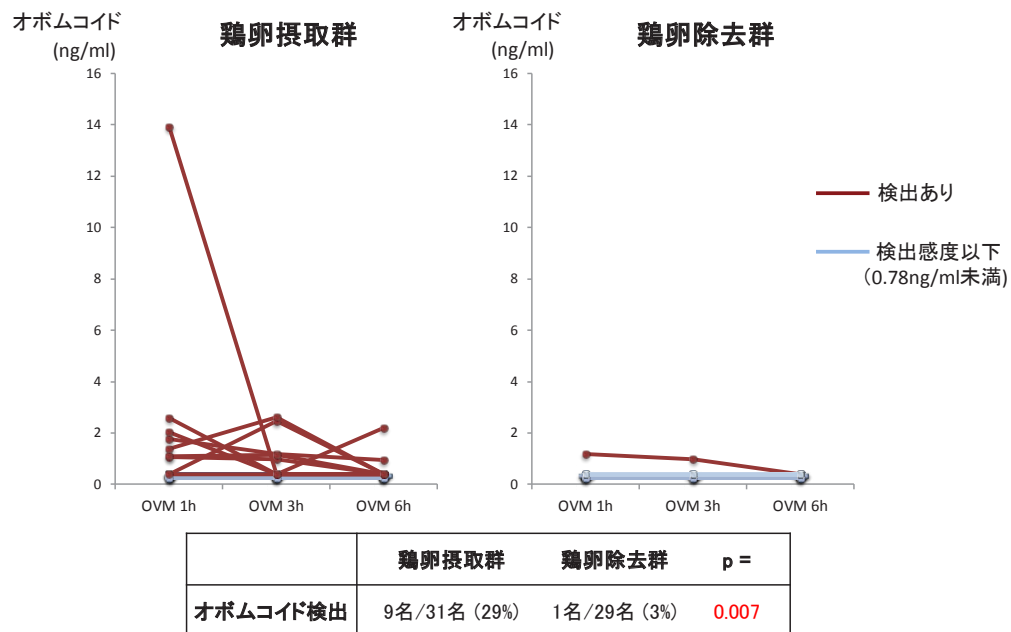


図 3. 初乳中のオボムコイド

表 3. 検討②の患者背景

	鶏卵摂取群	鶏卵除去群	p =
人数	14名	11名	
男:女	7名:7名	7名:4名	0.49
帝王切開	4名 (29%)	1名 (9%)	0.22
同胞	同胞なし:9名 1人:4名 2人:0名	同胞なし:5名 1人:4名 2人:1名	0.34
父にアレルギー歴	12名 (86%)	4名 (36%)	0.01
母にアレルギー歴	9名 (64%)	11名 (100%)	0.02
介入に問題なし	14名 (100%)	11名 (100%)	—

【考察】初乳中のオボアルブミンおよびオボムコイドが検出できたのは半数以下であった。成乳中のオボアルブミン測定に関しては、オーストラリアのグループが全卵を摂取してから2時間後から8時間後までに測定して31例/41例(76%)でオボアルブミンが検出されたと報告している。また我々もpilot研究で4例の成乳を本研究と同じ方法で測定し、全例で1-6時間に0.57 ng/mL - 4.91 ng/mLで検出されていた。ここまでの結果からは、初乳中にも鶏卵タンパクは含まれるが、成乳と比し、微量である可能性が考えられる。

児の感作状況に関しては、4ヶ月時の血液検査所見では、卵白感作を鶏卵摂取群 3例/13例(23%)、鶏卵除去群 4例/10例(40%)、オボムコイド感作は鶏卵摂取群 0例/13例(0%)、鶏卵除去群 1例/10例(10%)に認め、鶏卵摂取群では感作が少ない傾向にあった(表4)。今後、症例数を増やして更なる検討を行う。

表 4. 検討②の4ヶ月時の血液検査

	鶏卵摂取群	鶏卵除去群	p =
人数	13名	10名	
湿疹あり	7名 (54%)	7名 (70%)	0.43
総IgE 5.0以上	4名 (30%)	6名 (60%)	0.16
卵白感作あり	3名 (23%)	4名 (40%)	0.38
OVM感作あり	0名 (0%)	1名 (10%)	0.24
牛乳感作あり	1名 (8%)	1名 (10%)	0.84
カゼイン感作あり	1名 (8%)	1名 (10%)	0.84
小麦感作あり	0名 (0%)	0名 (0%)	—
ω5'リジン感作あり	0名 (0%)	0名 (0%)	—
好酸球 4.0%以上	5名 (38%)	5名 (50%)	0.58

今後の研究活動について

ここまでの結果では、新生児早期に母が鶏卵を摂取した群では、生後4ヶ月時の児の卵白・オボムコイド感作が低い傾向を認めた。3年計画の2年目以降も本研究を継続し、本研究の主要評価項目である即時型鶏卵アレルギーの発症の有無に影響するかを、登録症例数を増やしつつ食物経口負荷試験などで評価していく。

これらの結果により、即時型鶏卵アレルギーの一次予防へ繋げることができれば、今後の食物アレルギー診療および授乳中の栄養指導に関して極めて重要な情報となる。

参考文献

- 1) Sicherer SH. et al. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125:1322-6
- 2) 平成25年度 学校生活における健康管理に関する調査事業報告書 日本学校保健会
- 3) Perkin MR. et al N Engl J Med. Randomized Trial of Introduction of Allergenic Foods in

- Breast-Fed Infants. 2016; 372: 803-13.
- 4) Natsume O. 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*. 2016; 389: 276-286
- 5) Okada Y. et al. Heated egg yolk challenge predicts the natural course of hen's egg allergy: a retrospective study. *WAO J*. 2016; 9: 31
- 6) 池松かおり、他. 乳児期発症食物アレルギーに関する検討(第1報) - 乳児アトピー性皮膚炎と食物アレルギーの関係 - *アレルギー* 2006; 55: 140-150
- 7) Palmer DJ. et al. Effect of cooked and raw egg consumption on ovalbumin content of human milk: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Clin Exp Allergy*. 2005 Feb; 35(2):173-8.

研究課題名	食物由来抑制性ペプチドの探索に基づく食物アレルギー予防食品の開発		
フリガナ	カヅキ ヤスヒロ		
代表者名	香月 康宏		
所属機関（機関名） （役職名）	国立大学法人鳥取大学 染色体工学研究センター 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
	神沼 修（カミヌマ オサム）	山梨大学 総合分析実験センター・ 准教授	ヒト型免疫獲得マウスの作出 と抑制性エピトープの探索・ T 細胞依存性免疫、アレルギー研究を実施
	佐伯 真弓（サエキ マユミ）	東京都医学総合研究所 花粉症プロジェクト・ 主席研究員	抑制性エピトープの探索と 作用検証・アレルギー疾患 モデルと米を用いたアレルギー治療研究を実施
本助成金による発表論文、学会発表	1. 久郷裕之，宇野愛海，大平崇人，平塚正治， <u>香月康宏</u> ，押村光雄（2017 年 12 月 6 日 -9 日、神戸ポートアイランド、神戸）、染色体医工学技術を用いた疾患の原因究明、治療法の開発（口頭、ワークショップ / ポスター）、第 40 回日本分子生物学会年会 2. <u>香月康宏</u> 、（2017 年 10 月 24 日、オークラアクティビティホテル浜松、浜松市）最先端染色体工学技術の創薬研究への応用（招待講演）、薬物動態談話会第 40 年回		

研究結果要約

食物アレルギーは、国民の食生活向上や食品産業の発展に大きな障害となっている。食材中の各種タンパク／ペプチドと T 細胞受容体（TCR）および主要組織適合複合体（MHC / HLA）との結合が過度に強固または薄弱な場合は、細胞死や不応答、制御性 T 細胞（Treg）への分化が誘導される。そこで本研究は、ヒト TCR / HLA を介して Treg 誘導能を示す食材中のエピトープ探索を目指した。まず、ヒト TCR 遺伝子座導入マウスを作製するため、ヒト TCR α 鎖および β 鎖両遺伝子座を導入した人工染色体の作製に取り組む一方、マウス TCR^{-/-} マウス MHCII^{-/-} ヒト HLA + ヒト CD4 + マウスの交配を進めた。また、マウスをモデルケースとして卵白アルブミン蛋白（OVA）中の Treg 誘導性エピトープ探索を行ったところ、幾つかのペプチド領域が比較的高い Treg 誘導能を示した。さらに、同定した Treg 誘導性エピトープの作用を検証するための、新たな食物アレルギーモデルの樹立に取り組んだ。OVA 反応性 Th2 細胞を正常マウスに移入し、卵白含有食を連日経口投与することにより、IgE/IgG 産生を伴う消化管アレルギー症状が発症することを見いだした。最終的に、ヒト TCR 遺伝子座導入マウスを利用して抑制性エピトープを新たに見だし、食物アレルギー抑制薬または機能性食品として開発を進めることにより、食物アレルギーの根絶を目指したい。

研究目的

近年、食文化の大きな発展と並行して、乳児期から青年期の幅広い若年層で食物アレルギーの罹患率が急激に上昇してきた。食物アレルギーは、皮膚、呼吸器、粘膜や全身的な症状を引き起こすことから、国民の食生活向上や食品産業の発展に対する大きな障害となっている。その危険性が指摘された多くの食材に対して、アレルギー誘発エピトープに関する研究はこれまで盛んに行われてきた。一方、食材に含まれる各種タンパク／ペプチドの抗原性は、T細胞受容体（TCR）および主要組織適合複合体（MHC／HLA）との結合強度で規定されることが知られており、結合が過度に強固または薄弱な場合は、逆に細胞死や不応答、制御性T細胞（Treg）への分化等が誘導され、アレルギー反応は抑制されると見込まれる¹⁾。しかしながらこれまで、そのような抑制性エピトープに関する詳細な解析は行われていない。

TCR/MHCに対する抗原結合性およびそれに起因するT細胞反応の微妙な相違を解析する際、遺伝的に均一なマウスを用いるのが一般的であるが、それではヒトの免疫応答を完全には反映できない。そのため食物アレルギーに対する実用化研究を行う上では、ヒトTCR/HLAを介した実験系が不可欠といえる。しかしながら、ヒト臨床検体を用いた解析では、個体差や様々な環境要因に影響を受ける上、成果物の臨床的有効性を検証することも難しい。そこで本研究は、申請者が開発中のヒトTCR遺伝子座導入マウスを用いることにより、ヒトTCR／HLAを介してTreg誘導能を示す各種食材中のエピトープを詳細に探索することを目指した。さらに、

独自に開発した米の難消化性タンパク顆粒を用いた効率的消化管デリバリー法を利用して^{2,3)}、抑制性エピトープの抗アレルギー効果をヒト免疫システムで実証すると共に、その実用化に向けた開発研究の端緒を得ることを目的とした。

研究計画及び研究手法

1. ヒトTCR遺伝子座／HLA-Tgマウスの樹立（香月）

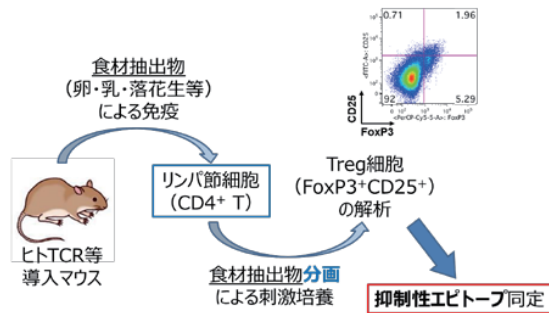
ヒトTCR α 鎖（Chr.14）および β 鎖（Chr.7）両遺伝子座全体を新規人工染色体（NAC）に導入した後、ES細胞に移入してキメラマウスを作製する。それをヒトHLA-Tgマウス、マウスMHCII-KOマウス、マウスTCR-KOマウスおよびヒトCD4-Tgマウス等と交配して、マウスTCR^{-/-}マウスMHCII^{-/-}ヒトHLA＋ヒトCD4＋ヒトTCR遺伝子座＋マウスを作出する。本マウスの体内では、マウス由来の免疫系は完全に遮断され、さまざまなアレルゲンに対するヒトTCR／HLAを介した認識・反応系が稼動することが期待される。ヒトTCR遺伝子座の人工染色体導入には時間を要しているため、交配によるマウスTCR^{-/-}マウスMHCII^{-/-}ヒトHLA＋ヒトCD4＋マウスの作製を先行した。

2. 食材成分中の抑制性エピトープの探索（香月・神沼・佐伯）

作出したマウスを卵、乳、落花生をはじめとするアレルギー誘発食材の抽出物で免疫後、リンパ節細胞を調整する。各食材抽出物の各種クロマトグラフィー分画成分で刺激培養後、分化したFoxP3⁺CD25⁺Tregの比率を比較することにより、Treg誘導能を示す粗精製画分を得る。

さらに数種類のクロマトグラフィーによって絞り込んだ後、質量分析を行って食材成分中の Treg 誘導性候補物質を同定する。次に、候補物質のリコンビナント蛋白からその部分蛋白、ペプチドを用いた絞り込み実験を行うことによって、最終的に Treg 誘導性エпитープをペプチドレベルで決定する。なお、ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスの樹立に時間を要したため、本実験については、アレルギー誘発食材である鶏卵中の卵白アルブミン (OVA) を対象とし、マウスを用いたモデルケース実験を実施した。

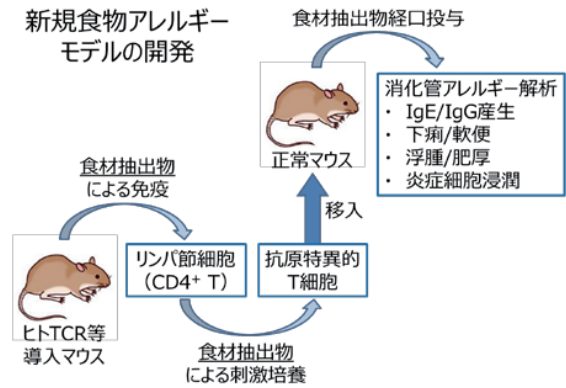
食材成分中の抑制性エピトープ探索



3. 新たな食物アレルギーモデルの開発 (神沼・佐伯)

作出したマウスを用いて、抑制性エピトープの効果を評価できる食物アレルギーモデルを開発する。2と同様にアレルギー誘発食材抽出物で免疫した後、リンパ節細胞を調整し、対応抗原で刺激培養して抗原特異的ヒト TCR を発現するマウス T 細胞を得る。それを移入した正常マウスに抗原を連日経口投与することにより、IgE/

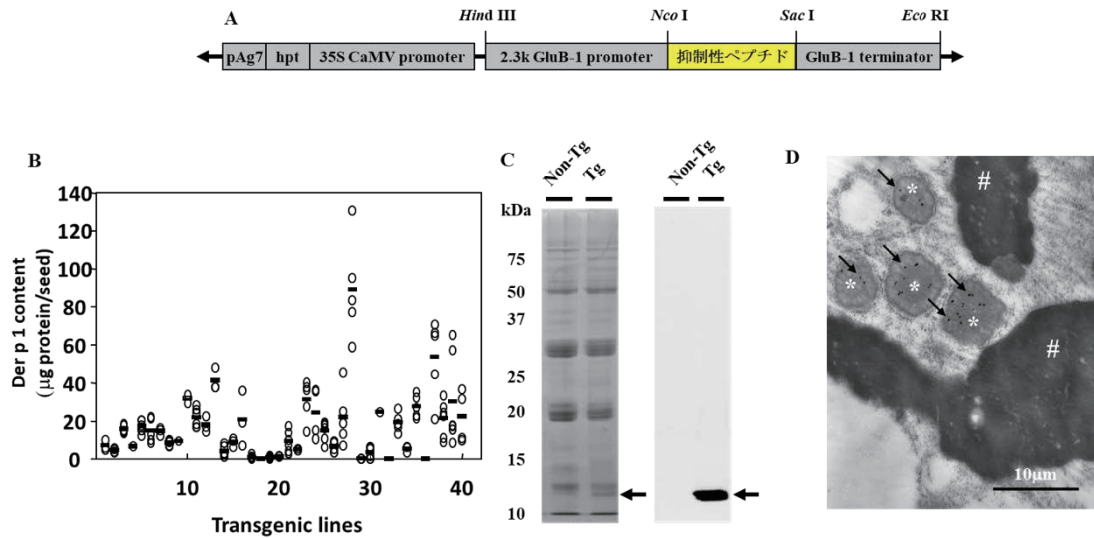
IgG 産生を伴う消化管アレルギーの発症を検討する。実際には、ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスの樹立に時間を要したため、マウス抗原特異的 Th2 細胞を移入したマウスを用いてモデルケース実験を行った。



4. Treg 誘導性エピトープのアレルギー抑制効果 (香月・神沼・佐伯)

ペプチドは通常、消化管内で消化分解を受けるため経口投与での有効性の確認は困難である。そこで、決定した Treg 誘導性エピトープを、独自に開発した効率的消化管デリバリーシステムである米タンパク顆粒に封入して Tg マウスに経口投与した後、各種食材成分で免疫する。その後、各食材を経口投与することによって誘導される消化管アレルギー症状を解析することにより、Treg 誘導性エピトープのアレルギー抑制効果を検討する。実際には、Treg エピトープを米タンパク顆粒に封入するまでは進めなかった。

米タンパク顆粒へのTreg誘導性エピトープ封入法



結果と考察

1. ヒト TCR 遺伝子座／HLA-Tg マウスの樹立 (香月)

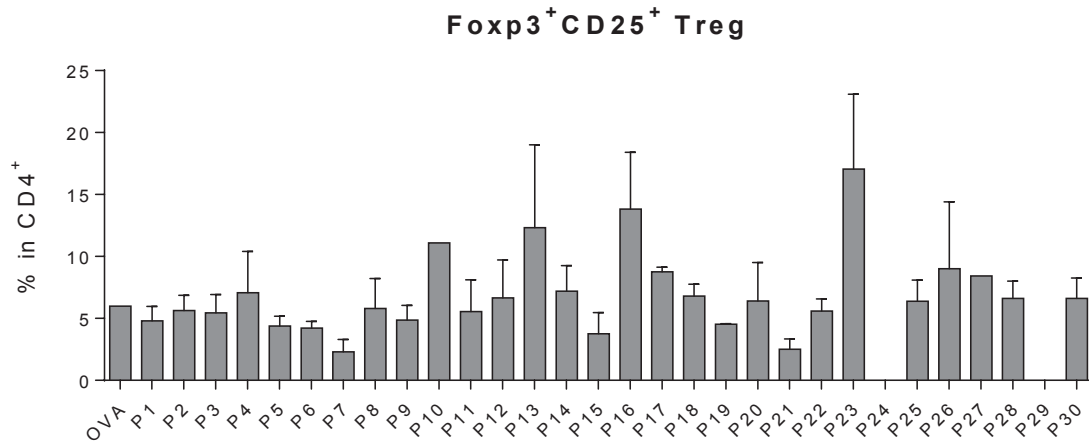
ヒト TCR 遺伝子座／HLA-Tg マウスを樹立するため、ヒト TCR α 鎖 (Chr.14) および β 鎖 (Chr.7) 両遺伝子座全体を導入した新規人工染色体 (NAC) の作製に着手し、Chr.14 の改変および Chr.7 の改変に成功した。今後、ヒト TCR α 鎖 (Chr.14) および β 鎖 (Chr.7) の全長が搭載されたヒト TCR α β -NAC を構築する予定である。

また、その NAC を導入したキメラマウスと交配するため、その他のマウスの導入、交配を先行して実施した。すなわち、ヒト HLA-Tg マウス、マウス MHCII-KO マウス、マウス TCR α ならびに β -KO マウスおよびヒト CD4-Tg マウスを交配し、全遺伝子をヘテロに持つマウスを作出できた。最終的に、ヒト TCR 遺伝子座の導入キメラマウスと交配後にその F1 マウスを得、全ての目的遺伝子がホモに導入されたマウスを作出し、今回モデルケースとして実施した以下の解

析を再現する計画である。

2. 食材成分中の抑制性エピトープの探索 (香月・神沼・佐伯)

マウスを用いたモデルケース実験として、OVA で免疫した BALB/c マウスよりリンパ節細胞を調整し、OVA の全長をカバーするリコンビナント部分ペプチドで刺激培養後、分化した FoxP3+CD25+Treg の比率をフローサイトメトリーで比較した。その結果、OVA による刺激培養によって約 6% の Treg 誘導能がみられたが、各 OVA 部分ペプチドで刺激培養した場合、平均 6.9% の CD4 陽性 T 細胞が Treg に分化誘導された。また、いくつかの部分ペプチドでは、OVA 刺激よりも高い Treg 誘導能がみられ、P23 で誘導された Treg は 17.1% にのぼることが明らかとなった (次頁上図)。各種アレルギー誘発食品成分に対し、ヒト TCR 遺伝子座／HLA-Tg マウスを用いて同様の解析を行うことにより、ヒト TCR／HLA を介して Treg 誘導能を示す各種食材中のエピトープを同定できる可能



性が示唆された。

3. 新たな食物アレルギーモデルの開発 (神沼・佐伯)

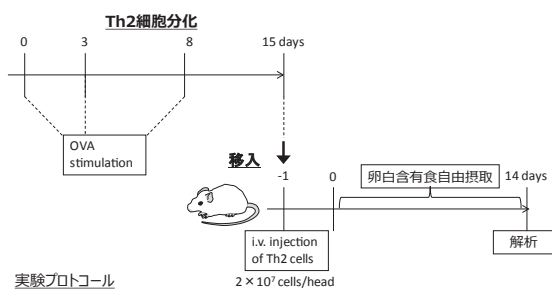
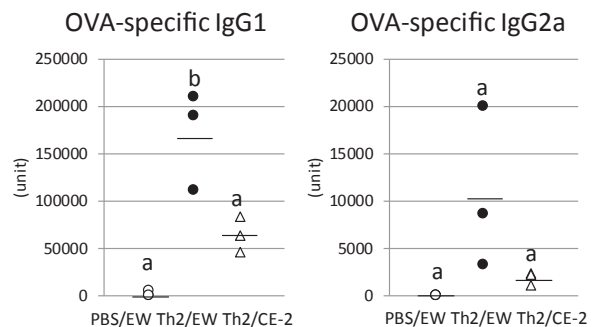
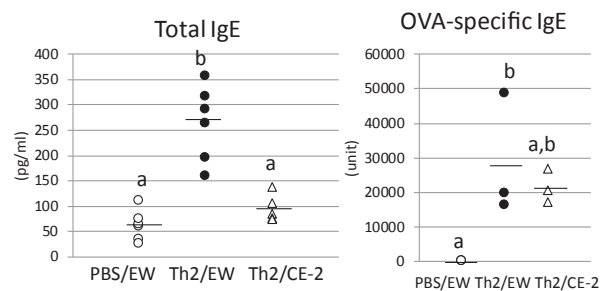
使用予定であった TCR 遺伝子座／HLA-Tg マウスの作出に時間を要したため、まずマウスを用い、抑制性エピトープの効果を評価できる食物アレルギーモデルの開発を行った。OVA 中の主要エピトープである OVA323-339 に反応する TCR を発現するトランスジェニックマウスである DO11.10 を、抗原ペプチド、IL-4 および抗 IL-12 抗体、および非動化した抗原提示細胞の存在下で刺激培養することにより抗原特異的 Th2 細胞を得た。正常マウスに Th2 細胞を移入後、卵白含有食 (EW) を2週間連日経口投与することにより、IgE/IgG 産生を伴う消化管アレルギーの発症を検討した (下図)。

その結果、Th2 細胞を移入して EW を摂取さ

せたマウスでは、通常食 (CE) を摂取させたマウスに比し、血中総 IgE ならびに抗原特異的 IgE, IgG1 および IgG2 の有意な上昇がみられた (下図)。

このマウスでは、明らかな体重減少や下痢等の臨床所見はみられなかったが、病理所見上では、Crypt の伸長や杯細胞の粘膜上皮への浸潤等、軽い炎症所見がみられた。

以上の結果から、抗原特異的 T 細胞による抗原認識が起点となり、IgE/IgG 産生を伴う消化管アレルギー症状が誘発されうることが明らかと



なった。今後、ヒト TCR 遺伝子座／HLA-Tg マウスが樹立出来次第、それを用いた病態モデルを確立し、Treg 誘導性エピトープにおけるアレルギー抑制効果の検討に利用してゆく計画である。

今後の研究活動について

ヒト免疫システムを用い、エピトープ探索から機能検証、実用化に向けた研究を行うことから、その最終成果物は、そのまま食物アレルギーを予防または治療する医薬品または機能性食品として開発できる可能性が高い。それを実現する上で、同定した抑制性エピトープを消化管免疫担当細胞にデリバリーする効率が鍵となるため、独自に開発した米の難消化性タンパク顆粒を用いたデリバリーシステムの効率を、今後正確に検証してゆく必要がある。さらに実用化に向け、安全性および経済性の両面において、他法に対する優位性を実証することが必要である。

最終的に食物アレルギー抑制薬または機能性食品として開発した抑制性エピトープを、乳児期より投薬または離乳食等として摂取させることで、アナフィラキシー反応等を起こさずに、体内における Treg 数の増加を促し、アレルギーの発症を抑止できると期待される。

食物アレルギーのみに止まらず、安全かつ有効性の高い経口免疫療法の実用化が望まれる他のアレルギー・免疫疾患に対しても同様の効果が期待できることから、今後は、ヒト TCR 遺伝子座／HLA-Tg マウスを用いてそれらのモデルも樹立し、抑制性ペプチドの有効性を検証

してゆくと共に、免疫寛容誘導機構の解析にも役立ててゆきたい。それらの発展的な研究展開により、通常給食を摂取できない就学児童が1割を超えるなど、深刻な社会問題となった食物アレルギーの根絶も可能にし、国民の食生活向上や食品産業の発展にも大きく役立つと考えている。

参考文献

- 1) Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology*. 2009 Feb;126(2):165-76.
- 2) Suzuki K, Kaminuma O, Yang L, Takai T, Mori A, Umezu-Goto M, Ohtomo T, Ohmachi Y, Noda Y, Hirose S, Okumura K, Ogawa H, Takada K, Hirasawa M, Hiroi T, Takaiwa F. Prevention of allergic asthma by vaccination with transgenic rice seed expressing mite allergen: induction of allergen-specific oral tolerance without bystander suppression. *Plant Biotechnol J*. 2011 Dec;9(9):982-90.
- 3) Wakasa Y, Takagi H, Hirose S, Yang L, Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, Hiroi T, Takaiwa F. Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructured Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis. *Plant Biotechnol J*. 2013 Jan;11(1):66-76.

研究課題名	重症鶏卵アレルギーに対する経皮免疫療法の有効性と安全性に関する研究		
フリガナ	フジサワ タカオ		
代表者名	藤澤 隆夫		
所属機関（機関名） （役職名）	国立病院機構三重病院 院長		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	岡田 直貴（オカダ ナオキ）	大阪大学薬学研究科	動物モデルでの検討
	神山文男（カミヤマフミオ）	コスメディ製薬株式会社	経皮免疫デバイス製造
本助成金による発表論文，学会発表	藤澤隆夫 What's new in food allergy 2017 APAPARI Workshop in Hanoi, 平成 29 年 4 月 29 日、ハノイ市（ベトナム）		

研究結果要約

食物アレルギーに対する治療として、現在は経口免疫療法が試みられているが、安全性の問題があるため標準治療とはされていない。本研究では、安全かつ効果的な治療法として、新規デバイスを用いた経皮免疫療法の開発を目指した。用いた治療デバイスは、効率的に経皮抗原送達が可能で親水性ゲルパッチ（Hydrogel patch: HG）で、これに卵白主要抗原であるオボムコイド（OM）を装填し、経皮免疫治療デバイス、OM-HG とした。対象は経口負荷試験閾値が低く寛解傾向がない重症鶏卵アレルギー患者（4 ～ 15 歳）で、OM-HG またはプラセボ HG 治療群に無作為割付して、1 日 12 時間の HG 貼付を 24 週間継続した（ランダム化比較試験）。主要評価項目は治療前後の経口負荷試験閾値の変化とした。その後、閾値が全卵 2g を越えた例は経口摂取を開始、その他は OM-HG でさらに 24 週間の治療を行い、閾値を評価した（長期試験）。33 名の一次登録があり、組み入れ基準を満たした 22 名に OM-HG（11 名）、プラセボ HG（11 名）の治療を行い、24 週で、それぞれ 5 名、2 名が経口摂取開始、残りの 6 名（1 名脱落）、8 名が長期試験を完了した。閾値上昇量は OM-HG 群がプラセボ HG 群より有意に高かった。アドヒアランスは良好で、OM-HG 群全例に軽度の局所反応を認めたが、重症の全身反応は認めなかった。OM 特異的 IgE は両群とも変化なかったが、OM 特異的 IgG4 抗体は OM-HG 群で有意に上昇した。以上より、OM-HG を用いた経皮免疫療法は重症の鶏卵アレルギーに対する安全かつ有効な治療となり得る。

研究目的

小児期発症の食物アレルギーの多くは成長とともに自然寛解するが、最近では、寛解困難でアナフィラキシーのリスクを抱えたまま持続する例が増えている。診療ガイドラインが整備され、患者のQOLは改善しつつあるものの、症状の予防あるいは根治に導く治療法が未だ存在しないことが問題である。現在、試みられている経口免疫療法も一定の効果は認められているが、治療に反応しがたい難治例が残るとともに、少なからぬ副反応のリスクがあることから、一般的治療とはなりがたい¹⁾。そこで本研究では、難治性食物アレルギーの新規治療として、より安全で有効性の高い経皮免疫療法の開発をめざし、とくに、食物アレルギーの中で最も頻度の高い鶏卵アレルギーを対象として臨床研究を行うこととした。

皮膚はランゲルハンス細胞など免疫細胞が豊富で、適切に抗原投与を行えば、効率的に耐性誘導できる可能性をもつ臓器である。これまで、いくつかのパイロット研究が行われ、その臨床的有効性も示唆されているところであるが、エビデンスは未だ十分ではない。さらに、免疫誘導物質（本研究では、卵白抗原）を安定して皮内に到達させる Drug Delivery System(DDS)も重要である。大阪大学とコスメディ製薬はいくつかのDDSを開発して、化粧品では実用化、ワクチンでも有効性・安全性の実証をしている²⁻⁴⁾。本研究では、このデバイスを用いて、重症鶏卵アレルギーに対する経皮免疫療法のパイロット研究を行い、今後の大規模臨床試験の基礎データを得ることを目的とした。また、食物アレルギーの動物モデルを作成

して、経皮免疫療法のメカニズムに関する免疫学的解析も行うこととした。

研究計画及び研究手法

A. オボムコイド装填ハイドロゲルパッチ (OM-HG)

1) 製法

オボムコイドを濃度 14.28mg/ml となるように滅菌水で溶解し、0.2 μ m フィルターで濾過。無菌条件（クリーンベンチ）でオボムコイド水溶液を 70 μ l 滴下した。（1mg パッチ）0.1mg パッチの場合は、オボムコイド水溶液を滅菌水で 10 倍希釈し、同様に 70 μ l 滴下した。液滴が親水性ゲルに吸収されるまで、クリーンベンチ内で約 4 時間静置、吸収後のハイドロゲルパッチを離型紙で覆ったのち、包装した。

2) 溶出試験

オボムコイド保持ハイドロゲルパッチの親水性ゲル／支持体部分を切り出し、PBS 1ml 中に入れ、室温下で振とうさせながら 1 時間溶出、溶出液を PBS で 20 倍希釈し、Lowry 法で蛋白定量を行った。（1mg パッチ）0.1mg パッチの場合は、溶出液を PBS で 2 倍希釈し、同様に Lowry 法で蛋白定量を行った。

B. 重症鶏卵アレルギー患者に対する親水性ゲルパッチを用いた経皮免疫療法：二重盲検プラセボ対照比較試験及び長期オープン試験

1) 対象：経口負荷試験閾値の低い鶏卵アレルギー児（4～15歳）

（組み入れ基準）

・二重盲検プラセボ対照負荷試験 (DBPCPC)

で摂取可能閾値が加熱全卵 2 g未満

・文書による同意が得られた者

(除外基準)

・合併するアトピー性皮膚炎及び喘息のコントロール不良

2) 方法 :

1. 二重盲検プラセボ対照ランダム化比較試験

組み入れ基準を満たした患者を無作為に OM-HG、プラセボ HG に割付け、毎日、入浴後から翌朝まで(12 時間)貼付、24 週間継続する治療スケジュールとした。治療による経皮感作を防ぐため、貼付予定部位にアトピー性皮膚炎に対するプロアクティブ療法(= 8 カ所に分けた貼付部位(胸部と背部)に、貼付 2 日前と 1 日前(2 日/8 日間)にステロイド外用薬を塗布する方法)を行い、湿疹をコントロールした。貼付スケジュールは、OM 0.1mg 装填 -HG (またはプラセボ HG) を医師観察下で 1 時間貼付、副反応がないことを確認後、自宅で 2 週間継続、その後、OM 1mg 装填 HG (またはプラセボ HG) を医師観察下で 1 時間貼付、副反応がないことを確認後、24 週まで自宅で貼付継続した。治療期間中は患者が日誌で貼付部位の皮膚状態、その他の症状を記録するとともに、医師が 2 週、4 週、以後 4 週毎に貼付部位の状態を観察、その他、副反応について評価した。治療 24 週で、DBPCFC を行い、摂取可能閾値を決定した。12 週と 24 週に、血清総 IgE、卵白、オボムコイド特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト、好塩基球活性化試験(CD203c)を行った。

主要評価項目：治療前後における負荷試験

閾値の変化 及び安全性(有害事象)

副次評価項目：治療前後における特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト膨疹径、CD203c 発現の変化

2. 長期オープン試験

上記ランダム化試験治療時の DBPCFC で摂取可能閾値が全卵 2g 以上となった患者は加熱鶏卵の経口摂取を開始した。閾値が全卵 2g 未満の患者には全例 OM-HG による経皮免疫療法をさらに 24 週間行った。ランダム化試験と同一のスケジュールで、0.1mg OM-HG 貼付 2 週後、1mg OM-HG を 24 週まで継続貼付した。治療 24 週で、DBPCFC を行い、摂取可能閾値を決定した。12 週と 24 週に、血清総 IgE、卵白、オボムコイド特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト、好塩基球活性化試験(CD203c)を行った。

主要評価項目：治療前後における負荷試験閾値の変化 及び安全性(有害事象)

副次評価項目：治療前後における特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト膨疹径、CD203c 発現の変化

C. 食物アレルギー動物モデルの作成

1) Alum を併用した OVA アレルギーモデルマウス

100 μ g オボアルブミン(ovalbumin; OVA)と 2 mg アルミニウム塩(Alum)を無菌条件下で混合し、BALB/c マウスの腹腔内に投与した。これらの操作を 2 週間隔で 2 回実施し、50 mg OVA 溶液を 2 日間隔で計 5 回経口投与した。下痢症状ならびに直腸温を観察するとともに、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗

体価・IgE 抗体価を ELISA にてモニタリングした。

2) OVA 特異的 IgE トランスジェニック (Tg) マウスを利用した OVA アレルギーモデルマウス
OVA-IgE Tg マウスから骨髄細胞および B 細胞を単離し、予めシクロフォスファミドを 2 mg/kg で投与した BALB/c マウスに各細胞を 5 x 10⁶ cells/head で静脈内投与した。細胞移入 7 日後に血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価を測定し、移入した細胞が生着していることを確認した。10 µg OVA 溶液を静脈内投与した際の下痢症状ならびに直腸温を観察するとともに、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価・IgE 抗体価を ELISA にてモニタリングした。

3) DSS 誘発腸炎を利用した食物アレルギーモデルマウス

2) のモデルマウスに対して、0.5% デキストラン硫酸ナトリウム (Sodium Dextran Sulfate; DDS) を溶解した飲用水を 7 日間自由摂取させた。その後、50 mg OVA 溶液を経口投与して、下痢症状ならびに直腸温を観察するとともに、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価・IgE 抗体価を ELISA にてモニタリングした。

D. HG を用いた経皮免疫療法治療モデル

作成したそれぞれのモデルに対して、OM-HG を除毛背部皮膚に 24 時間貼付を 3 日間行い、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価・IgE 抗体価を ELISA により測定した。また一定治療期間後に OVA 曝露 (10 µg OVA 静脈内投与あるいは 50 mg OVA 経口投与) によるアナフィラキシー誘発試験を

行った。

蛍光色素 AF647 あるいはエンドソーム内酸性条件下で蛍光を発する CypHer により標識した OVA を HG に無菌条件下で装填した。マウス除毛背部皮膚に貼付後、経時的に所属リンパ節を回収し、Staining buffer (0.5% FBS、0.05% NaN₃ を含む PBS) を用いて細胞懸濁液を調製した。Flow cytometer にて生細胞のみを解析し、CD11c⁺ 細胞を 6 つのサブセット形質細胞様樹状細胞、CD8⁺ 陽性樹状細胞、CD207⁺ 陰性真皮樹状細胞、CD207⁺ 陽性真皮樹状細胞、ランゲルハンス細胞、その他の CD11c⁺ 陽性細胞 (単球やマクロファージ) に分画した後、各種サブセットにおける AF647-OVA⁺ cells あるいは CypHer-OVA⁺ cells の細胞数を算出した。

結果と考察

A. オボムコイド装填ハイドロゲルパッチ (OM-HG)

臨床試験に用いた OM-HG を無作為抜き取り検査を行い、OM1mg-HG の OM 溶出量は 1.1mg/枚、CV2.4%, OM0.1mg-HG は 0.09mg/枚、CV 2.2% であることを確認した。

B. 重症鶏卵アレルギー患者に対する親水性ゲルパッチを用いた経皮免疫療法：二重盲検プラセボ対照比較試験及び長期オープン試験

一次登録患者は 36 名で、DBPCFC を行い、22 名が組み入れ基準 (閾値 < 全卵 2g) を満たして、無作為割り付けされた (プラセボ HG 群 11 名 (男 10, 女 1)、年齢 5.6 ± 1.6 才、

OM-HG 群 11 名（男 6, 女 5）、年齢 4.9 ± 0.5 才）。すべて 24 週の治療期間を完了して、DBPCFC を行ったところ、プラセボ HG 群で 2 名、OM-HG 群で 5 名が閾値が全卵 2g を越えて、鶏卵の経口摂取を開始した。その他の患者は OM-HG をさらに 24 週間継続して、それぞれ 8 名、6 名が試験を完了した。（図1）

主要評価項目である 24 週後の摂取可能閾値の変化は、OM-HG 群の閾値増加量がプラセボ HG 群に比べて有意に高値であった（図 2、3）。摂取可能総量も OM-HG 群で有意に高値であった。

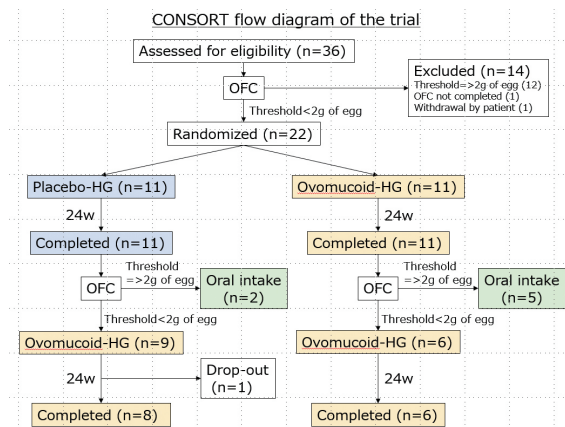


図 1 試験参加者のフロー

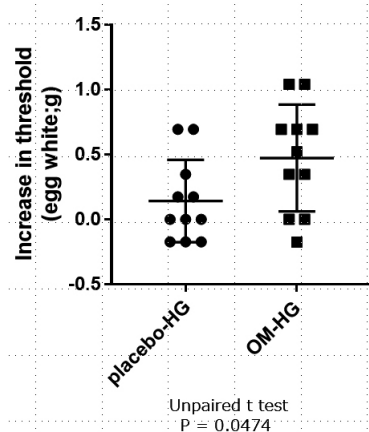


図 2 摂取可能閾値の変化

前後の DBPCFC で誘発された症状（ASCA スコア⁵⁾）も OM-HG 群で軽減される傾向が認められた（図4）。アドヒアランスは両群とも 99%以上で、良好であった。副反応は OM-HG 群で全例に貼付局所の発赤が認められたが、重大な全身副反応は認められなかった。免疫学的な変化では卵白、オボムコイド、卵黄に対する特異的 IgE は治療前後で有意な変化は認められなかったが、卵白、オボムコイドに対する特異的 IgG4 抗体は OM-HG 群で治療後に有意な上昇が認められた（図5）。皮膚プリックテスト、好塩基球活性化試験はいずれの群でも有意な変化が認められなかった。

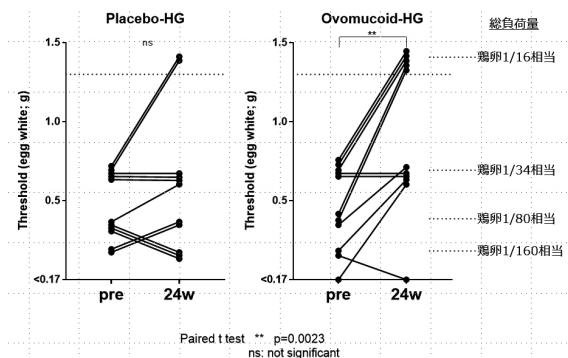


図 3 摂取可能閾値の変化（治療前後）

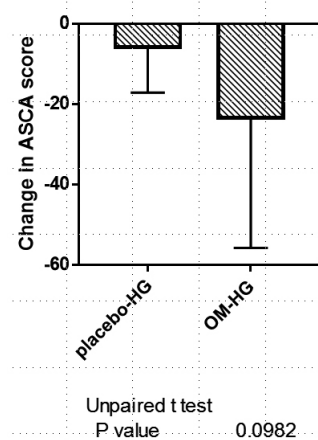


図 4 負荷試験による誘発症状の変化（ASCA スコア）

長期試験では、プラセボ対照試験の24週で摂取可能閾値が全卵2gを越えなかった8名（プラセボHG群）、5名（OM-HG群）がOM-HGの貼付をさらに24週間継続した。摂取可能閾値の変化を図6に示す。OM-HGにより閾値が上昇する例がそれぞれ認められたが、症例数が少ないため、統計学的には有意な変化ではなかった。至適治療期間が24週か48週かを結論づけることはできなかったため、今後、症例数を増やして検討すべきである。

以上より閾値の低い鶏卵アレルギー患者に対するOM-HGを用いた経皮免疫療法パイロット試験で、少数例ながら、摂取可能閾値が有意に上昇すること、特異的IgG4抗体が上昇することが確認されたことより、今後、多施設でより多数例の臨床試験を行うことが妥当と考えられた。

C. 食物アレルギー動物モデルの作成

Alumを併用したOVAアレルギーモデルマウスでは、一過性に血清中OVA特異的IgG抗体価およびIgE抗体価の上昇が確認されたが、感作処理から1ヶ月後には血清中OVA特異的IgE抗体価の低下が認められ、OVAに対する

アレルギーが自然寛解したことより、モデルとして不適と考えられた。OVA特異的IgE Tgマウスを利用したOVAアレルギーモデルマウスでは特異的IgE抗体は高値で維持されたが、静注による抗原チャレンジではアナフィラキシーが誘発されるものの、経口チャレンジでは誘発されなかったため、食物アレルギーモデルとして不適と考えられた。DSS誘発腸炎を利用した食物アレルギーモデルマウスでは特異的IgE抗体価の持続的上昇と経口チャレンジでの直腸温低下と運動量低下、軟便が認められ、モデルとして利用可能と考えられた。

D. 経皮免疫療法の治療モデルと免疫学的解析

AF647標識OVA装填HGを貼付したマウスの所属リンパ節においては、6時間後から12時間後にかけてAF647標識OVAを捕捉した皮膚常在性樹状細胞（ランゲルハンス細胞およびCD207陰性真皮樹状細胞）の割合が増加した。皮下投与ではこの現象はみられず、HGによる抗原投与で所属リンパ節で抗原が処理されることを確認できた。OVA-HGによる治療効果は現在、検討中である。

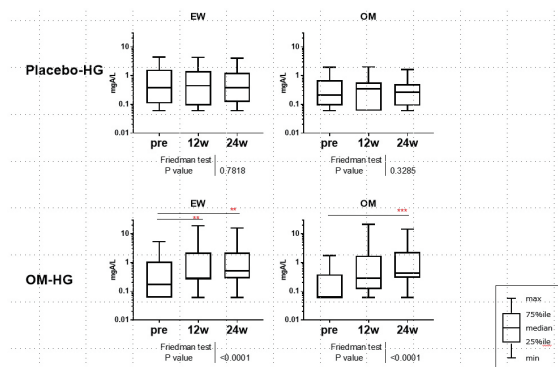


図5 特異的IgG4抗体の変化

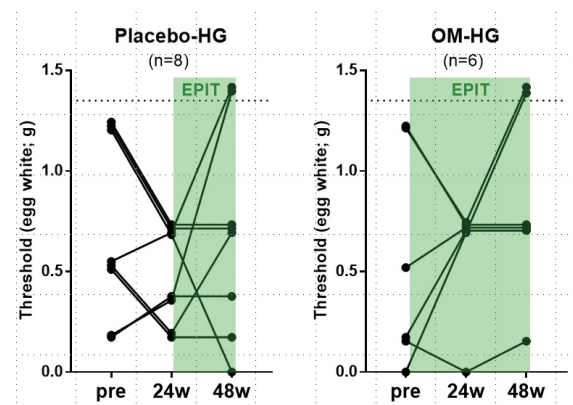


図6 長期試験における摂取可能域値の変化

今後の研究活動について

本研究は重症鶏卵アレルギーに対する新規免疫デバイスを用いた初めての臨床試験である。パイロット試験として、プラセボ対照で摂取閾値上昇の効果、およびこれに伴ってブロッキング抗体とされる特異的 IgG4 抗体の上昇効果を確認できたことより、さらに大規模な臨床試験を行うことの妥当性が確認されたと言える。今後は結果を十分に吟味した上で、プロトコルを改良して、多施設でより多数例の臨床研究を行うことをめざすが、臨床研究法に則った特定臨床研究としての実施が必要である。大規模臨床試験を行うためには、デバイス HG の大量生産体制の確立も必須となるが、多額の費用を要するため、十分な研究費を獲得する努力をしたい。

一方、困難とされている食物アレルギーの動物モデルについて、本研究では軽症の DSS 誘発腸炎を利用して、ヒトに近いモデルを確立することができた。今後は非臨床試験をさらに進めて、GLP 試験を実施して、医師主導治験を目指していきたい。

参考文献

- 1) Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T, Committee for Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy TJSoPA, Clinical Immunology TJSoA. Japanese guidelines for food allergy 2017. Allergol Int 2017; 66: 248-264. (わが国の食物アレルギー診療ガイドライン)
- 2) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, Kamiyama F, Asada H, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Compositional optimization and safety assessment of a hydrogel patch as a transcutaneous immunization device. Biol Pharm Bull 2011; 34: 1835-1840. (ハイドロゲルパッチの基礎的検討)
- 3) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, Kamiyama F, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Characterization of transcutaneous protein delivery by a hydrogel patch in animal, human, and tissue-engineered skin models. Biol Pharm Bull 2011; 34: 586-589. (ハイドロゲルパッチの基礎的検討)
- 4) Matsuo K, Ishii Y, Kawai Y, Saiba Y, Quan YS, Kamiyama F, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Analysis of transcutaneous antigenic protein delivery by a hydrogel patch formulation. J Pharm Sci 2013; 102: 1936-1947. (ハイドロゲルパッチの基礎的検討)
- 5) Sugiura S, Matsui T, Furuta T, Sasaki K, Kando N, Ito K. Development of a prediction model for severe wheat allergy. Pediatr Allergy Immunol 2017. (経口負荷試験の誘発症状評価)

研究課題名	ヒスタミン遊離因子の阻害による食物アレルギー治療薬の開発		
フリガナ	マツモト ケンジ		
代表者名	松本 健治		
所属機関（機関名） （役職名）	国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 部長		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	川上敏明（カワカミシヤキ）	La Jolla Institute for Allergy and Immunology, University of California San Diego, 教授	研究計画の立案と解析
本助成金による発表論文，学会発表	Ando T, Kashiwakura JI, Itoh-Nagato N, Yamashita H, Baba M, Kawakami Y, Tsai SH, Inagaki N, Takeda K, Iwata T, Shimojo N, Fujisawa T, Nagao M, Matsumoto K, Kawakami Y, Kawakami T. Histamine-releasing factor enhances food allergy. J Clin Invest. 2017 Dec 1;127(12):4541-4553 他、学会発表3件（後述）		

研究結果要約

食物アレルギーは、食物抗原を摂食後、即時型アレルギー反応を起こすケースが多く、時に生命の危険を来すアナフィラキシーが誘発される。食物アレルギーにはアレルゲンの除去および減感作療法以外には確立された治療法はなく、本研究はヒスタミン遊離因子 (HRF) の機能を抑制する治療法の開発を最終目標としている。HRF は IgE を介した免疫応答に対して、in vivo でマスト細胞表面で IgE や IgG に結合してマスト細胞の活性化を増幅し、結果的にマスト細胞の増殖を誘導して腸管の炎症を増悪させることが明らかとなった。また、マウスの IgE を介した免疫応答に HRF の結合を阻害する活性を有するペプチドを前投与することによって症状をほぼ完全に抑制し、また症状発現後に投与することでも約 70% の効果が得られることが明らかとなった。この結果は生体内で HRF が in vivo での IgE を介した反応を増幅しており、その阻害が IgE を介するアレルギー応答の治療薬として有用である事を示唆するものである。また、HRF はマスト細胞や好塩基球の遊走を起こさず、抗体をタンパク質分解酵素から守る機能はなく、腸管内細菌の成長に影響しなかった。さらに、経口免疫寛容の奏功機序の全貌は明らかとなっていないが、HRF 結合性 IgE の減少がその一部である可能性が示唆された。

研究目的

食物アレルギーは、近年患者数が増え、社会問題になっている。食物抗原を摂食後、即時型アレルギー反応を起こすケースが多く、時に生命の危険を来すアナフィラキシーがおこる。経口免疫療法による免疫寛容の成功例が報告されつつあるが、食物アレルギーには確立された治療法はなく、新規の治療法の開発は喫緊の研究課題である。IgE 依存性の食物アレルギーには、動物モデルの研究により、IgE とその受容体 $Fc \epsilon RI$ を介したマスト細胞の活性化が重要であることが知られている。ヒスタミン遊離因子 (HRF) は、N 末端の 19 アミノ酸と H3 ドメインの 2 箇所です約 30% の IgE 抗体 (IgG 抗体とも) と直接結合でき、2 量体として存在する HRF が IgE と結合した複数の $Fc \epsilon RI$ を会合させて、マスト細胞を活性化できることが、これまでに本申請者らによって明らかになった¹⁾。標準的なマウスの食物アレルギーモデルを用いて、HRF は、アレルギー症状の誘発期 (感作期ではなく) に炎症増悪作用があることが明らかにした。さらに、経口投与した HRF 阻害剤は特異的に小腸のマスト細胞に結合すること、HRF は腸管で細胞外マトリクスと同じような分布を示すことを明らかにした。また、急速経口免疫療法を施行後 1 年後に鶏卵アレルギーを克服できなかった患儿では、血中 HRF 反応性 IgE が増加すること (HRF 濃度や HRF 反応性 IgG は変わらない) も明らかにした。以上の結果に基づいて、本研究では、(I) HRF-IgE 間の結合を抑える HRF 阻害剤を、ヒト患者に使用することを最終目標として開発する。候補として、阻害効果の強い 3 種のペプチド由来阻害剤のうちどれが最大の予防・治療効

果を示すかをマウスモデルで検討する。(II) 腸管での HRF の定常状態における機能を解析する。(III) マウスの食物アレルギー誘発モデルと免疫寛容モデルを用いて、HRF と HRF 反応性抗体の変化を解析する。HRF 阻害剤は $Fc \epsilon RI$ と複数の IgG 受容体 ($Fc \epsilon Rs$) による活性化を抑えることから、 $Fc \epsilon RI$ による活性化だけを抑える Omalizumab (抗 IgE 抗体で食物アレルギーに効果あり) より高い治療効果が期待でき、かつ安価に製造できる。ペプチド由来の HRF 阻害剤は、アレルゲンを含む可能性のある食品を摂取する前に服用することで、食物アレルギーを未然に防ぐ、あるいは症状を軽減することが出来ると思われる。また、少なくとも、免疫療法施行時の抗原投与によるアナフィラキシーを防ぐことが期待できる。また、HRF 反応性 IgE 抗体価が免疫療法の治療効果の客観的指標となる可能性がある。

研究計画及び研究手法

I. 食物アレルギー治療に最適な HRF 阻害剤の選択

計画：抗原 ovalbumin (OVA) で ip 免疫したマウスに、同じ抗原を複数回経口投与して下痢を発症させる。HRF 阻害剤 (GST-N19 または HRF-2CA[HRF の単量体]) を抗原投与の直前に投与すると下痢の発症が抑えられることは、10 回以上の実験で確かめられている。下痢発症後に HRF 阻害剤を投与した場合も、下痢の発症頻度と重症度を 70% 以上低下させられる。ヒト患者に使用できる HRF 阻害剤として、阻害効果の強さから HRF の N 末端部分に由来する N19, N25, N32 が考えられる。これらのペプチド

をそのまま、または化学修飾（N 末端のアセチル化や PEG 化、C 末端のアミド化）して安定性と可溶性を高めて検討する。下痢症状を呈したマウスに2回の抗原投与前に HRF 阻害剤を種々の経路で投与し、下記①～⑥を指標として阻害剤の治療効果とその機序を検討する。

実施内容：

①下痢の重症度・直腸温。②最終抗原暴露後に腸管組織を染色。炎症度は、H&E 染色で、マスト細胞数は、chloroacetate esterase 染色で測定。③血中 HRF 濃度および HRF 反応性抗体価を ELISA 法で測定。④抗原暴露後、リンパ節を回収し、抗原で再刺激後、各種のサイトカイン産生を ELISA 法で測定。⑤ DNA microarray(または RNA-Seq) 法で腸管の網羅的な遺伝子発現解析。

II. 腸管での定常状態における HRF の機能解析計画

解析計画：共焦点蛍光顕微鏡により、HRF は小腸でコラーゲンなどの細胞外マトリクスと同じような分布を示すことが明らかになった。可能性がある HRF の機能を以下のように調べる。

実施内容：

①小腸の組織を抗 IgG、抗 IgE、抗 IgA 抗体で染めて共焦点蛍光顕微鏡で観察し、HRF 反応性抗体を保持する役割があるかを調べる。② HRF が HRF 反応性 IgE を細胞表面にもつマスト細胞や好塩基球を遊走させるかを Transwell を用いて調べる。③ IgG、IgE、IgA を小腸内のタンパク質分解酵素と HRF 存在下ないし非存在下で incubate してから SDS-PAGE で解析し、HRF が抗体をタンパク質分解酵素から守る機能があるか調べる。④腸管内細菌と HRF を

incubate してから細菌の成長を調べる。

III. 経口免疫寛容モデルにおける HRF と HRF 反応性抗体の変化の解析

Yamashita らの経口免疫寛容モデルを用いる (Allergy, 2012)。ip 免疫前に OVA を 3 日連続飲ませることで、上記の食物アレルギーとほぼ同じ OVA 感作と OVA 摂食による下痢の発症が抑えられる。経口免疫寛容モデルにおける HRF 反応性 IgE の変化が、鶏卵アレルギー患者に対する急速免疫療法の効果と相似であるならば、HRF 反応性 IgE が低下するはずである。

実施内容：

ip 免疫前に OVA を 3 日連続飲ませた場合と、この免疫寛容の操作をしない場合の2つのグループに OVA 感作と OVA 摂食をさせ、それによって下痢の発症程度や、他の炎症症状の変化、とくに、血中 HRF 濃度および HRF 反応性 IgE 抗体価を測定する。ついで、より臨床に近い条件で（はじめに食物アレルギーを発症させてから、比較的少量の OVA を摂食させることにより、脱感作させてから）HRF 反応性抗体の変化を解析する。

計画から外れて実施した内容：

抗原 ovalbumin (OVA) を i.p. 注射によって感作したマウスに、同じ抗原を複数回経口投与して下痢を発症させ、HRF 阻害剤 (GST-N19 または HRF-2CA[HRF の単量体]) を抗原投与の直前に投与すると下痢の発症が抑えられることは、理研でおこなった 10 回以上の実験で確かめられている。下痢発症後に HRF 阻害剤を投与した場合も、下痢の発症頻度と重症度を 70%

以上低下させられる。ところが、LJI では同じ条件でも安定的かつ客観的に下痢重症度が判定できず、より客観的な指標が必要だと結論された。この問題は、安価な温度計で多数のマウスの体温を短時間で測ることで解決できた。さらに、アナフィラキシーによる体温の低下が最も大きいのは3、4回目の抗原投与時であることが判明した。

結果と考察

I. 食物アレルギー治療に最適な HRF 阻害剤の選択

当初、LJI でのマウス実験が理研のときのように下痢の重症度の判定ができず進捗が遅れた。しかし、上述のように問題は解決した。

研究の結果：

実験系が安定した後に行った結果では、経口投与した HRF-2CA は特異的に小腸のマスト細胞表面に結合して、ex vivo での抗原や HRF によるマスト細胞の活性化を抑制した。また、胃内に OVA を反復投与することによって誘導される下痢や消化管のマスト細胞の増多は、Histamine-releasing factor (HRF) の IgE や IgG への結合を阻害するペプチド (GST-N19) や HRF 阻害剤 (HRF-2CA : HRF の単量体) の投与によって著明に阻害された。また、GST-N19 投与によって腸管上皮の IL-4 や IL-13 の mRNA 発現も著明に低下した。これらのことから、HRF にはアレルギー症状の誘発期（感作期ではなく）の炎症増悪作用があることが示唆された。

II. 腸管での定常状態における HRF の機能解

析

研究の結果： HRF はマスト細胞や好塩基球の遊走を起こさず、抗体をタンパク質分解酵素から守る機能はなく、腸管内細菌の成長に影響しなかった。

III. 経口免疫寛容モデルにおける HRF と HRF 反応性抗体の変化の解析

研究の結果：

ip 免疫前に OVA を3日連続飲ませてから OVA 感作と OVA 摂食をさせた場合（経口免疫療法）には、この免疫寛容の操作をしない場合に比して、下痢の発症程度や、他の炎症症状が有意に軽度であった。また、この変化につれて、経口免疫療法を行ったマウスでは HRF 結合性 IgE が減少した。

以上の研究成果から、HRF は IgE を介した免疫応答に対して、in vivo でマスト細胞表面で IgE や IgG に結合してマスト細胞の活性化を増幅し、結果的にマスト細胞の増殖を誘導して腸管の炎症を増悪させることが明らかとなった。また、この系に HRF の結合を阻害する活性を有するペプチドを前投与することによって下痢をほぼ完全に抑制し、また症状発現後に投与することでも約 70% の効果が得られることが明らかとなった。この結果は HRF が in vivo での IgE を介した反応を増幅しており、その阻害が IgE を介するアレルギー応答の治療薬として有用である事を示唆するものである。

また、経口免疫寛容の奏功機序の全貌は明らかとなっていないが、HRF 結合性 IgE の減少がその一部である可能性が示唆された。

論文発表

Ando T, Kashiwakura JI, Itoh-Nagato N, Yamashita H, Baba M, Kawakami Y, Tsai SH, Inagaki N, Takeda K, Iwata T, Shimojo N, Fujisawa T, Nagao M, **Matsumoto K**, Kawakami Y, **Kawakami T**.

Histamine-releasing factor enhances food allergy.

J Clin Invest. 2017 Dec 1;**127(12)**:4541-4553

学会発表

- 1 The 8th EMBRN International Mast Cell and Basophil Meeting, May 25-27, 2017, Prague, Czech Republic.
- 2 Johns Hopkins University Symposium, November 17, 2017, Baltimore, MD, USA
- 3 Gordon Research Conference on Food Allergy, January 7-12, 2018, Ventura, CA, USA

今後の研究活動について

HRF が食物アレルギーを始めとするアレルギー疾患の増悪に寄与していることは、疑う余地がないほどデータが蓄積してきております。また、HRF 阻害剤がヒトに応用できる可能性はまだ直接の証拠がないもののマウスでの Proof of concept (POC) はほぼ固まったと考えられます。今後、現在の候補群から最適な HRF 阻害剤を決定して、なるべく早く臨床試験に進むことを第一に考えております。しかし、さらに薬物製剤法の改良（たとえばコートする）や抗体の開発

などの第二世代の HRF 阻害剤の開発にも注力したいと思います。また、HRF の産生機序や、免疫療法が HRF の産生や IgE 抗体の HRF 結合性に与える影響のヒトでのデータなど、極めて重要な課題がこのされております。

本研究を更に強力に推進してゆきたいと考えております。今後もし指導ご鞭撻を宜しくお願い申し上げます。

参考文献

- 1) Kashiwakura J, Ando T, Matsumoto K, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, Macdonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *J. Clin. Invest.* 2012 Jan;**122(1)**:218-228.
- 2) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J. Clin. Invest.* 2003 Dec;**112(11)**:1666-177.
- 3) Yamashita H, Takahashi K, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy* 2012 Feb; **67(2)**:201-209.
- 4) Kawakami T, Blank U. From IgE to omalizumab. *J.Immunol.* 2016;**197**:4187-419

平成 29 年度研究助成事業 個人研究助成

〈研究結果要約〉

※報告書全文は当財団 Web サイトに掲載予定

		敬称略
研究課題名	所属機関・氏名	
ヒト化マウスを用いた食物アレルギーモデルマウスの開発とアナフィラキシー制御の研究	公益財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室室長代理 伊藤 亮治	44
食物アレルギー罹患児の血漿中におけるアレルギー関連 miRNA の発現プロファイル解析	国立研究開発法人 国立成育医療研究センター研究所研究員 五十嵐 ありさ	45
母親の腸内環境が胎児の出生後の食物アレルギー発症に及ぼす影響の解析	徳島大学 大学院医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野 特任助教 上番増 喬	46
microRNA の網羅的解析を用いた好酸球性消化管疾患のバイオマーカーの探索	島根大学医学部 第二内科 助教 大嶋 直樹	47
糖鎖生物学的アプローチによる果実のアレルゲン性発現メカニズムの解明	佐賀大学 医学部 分子生命科学講座 細胞生物学分野 助教 岡田 貴裕	48
免疫寛容誘導作用を有する低アレルゲン性蕎麦抗原ペプチドの創製と予防治療への応用	信州大学農学部 准教授 片山 茂	49
抗原改変カゼインを用いた乳幼児ミルクアレルギー患者への早期介入による、ミルクアレルギーへの治療効果に関する研究	岐阜大学医学部附属病院 小児科 講師 川本 典生	50
食物アレルギーの新規予防法の開発に向けた母子栄養・腸内因子とアレルギー疾患との相関解析	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 プロジェクトリーダー 國澤 純	51
妊婦の栄養摂取状況と子の食物アレルギー発症との関連：出生前コホート研究データを活用した解析	愛媛大学大学院医学系研究科疫学・予防医学講座 特任講師 田中 景子	52
食物アレルギー児の QOL に着目した予後に関する研究	国立病院機構三重病院 臨床研究部 アレルギー疾患治療開発研究室長 長尾 みづほ	53
革新的抗体作製技術を用いた食物アレルギー抗原同定法の開発	国立大学法人千葉大学・大学院薬学研究院 助教 平川 城太郎	54
うるち米デンプンとアレルゲンの共摂食による経口免疫寛容誘導の検討	広島大学 大学院先端物質科学研究科 特任助教 藤村 孝志	55
葛根湯の併用による経口免疫寛容の治療効率の向上及びその機序の解明	富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学 助教 山本 武	56
マカダミアナッツアレルゲンの交差反応についての解析	東京都立小児総合医療センター アレルギー科 医員 吉田 幸一	57
※所属、役職は平成 30 年 4 月 30 日時点		

研究課題名	ヒト化マウスを用いた食物アレルギーモデルマウスの開発とアナフィラキシー制御の研究
フリガナ	イトウ リョウジ
代表者名	伊藤 亮治
所属機関（機関名） （役職名）	（機関名） 公益財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室 （役職名） 研究員
本助成金による発表論文，学会発表	総説 1 報 Ito, R., Takahashi, T., Ito, M. (2017). Humanized mouse models: Application to human diseases. Journal of Cellular Physiology, 23(1), 149-6. 平成 30 年度中に論文投稿予定 平成 31 年度に国際学会発表予定

研究結果要約

我々は、ヒト化マウスを用いて牛乳由来アレルゲンである β -lactoglobulin (BLG) に対する食物アレルギーモデルを開発し、抗アレルギー治療薬の前臨床評価系確立を試みた。ヒト造血幹細胞移植によりヒト化した NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスへヒト抗 BLG-IgE 抗体を静脈内投与し、翌日に BLG 精製タンパクを経口投与して、全身性アナフィラキシーが誘導されるか検討した。その結果、NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスの約半数において、体温の低下およびヒトマスト細胞の活性化が認められ、アナフィラキシー様症状が観察された。しかしながら半数の個体は無症状であり、安定的な病態モデルの開発には誘導法の再検討が必要と考えられた。そこで我々は、抗 BLG 抗体投与後に、BLG タンパクを経口ではなく静脈内に投与し、全身性アナフィラキシーが誘導されるか検討した。その結果ほぼ全ての個体で体温の低下が認められ、血中へ大量のヒスタミンが放出されたことから、BLG 静脈内投与によって安定的にアナフィラキシー病態を誘導できることが示唆された。さらに、これらモデルへアナフィラキシー治療薬として使われているアドレナリン製剤を投与したところ、体温低下、死亡率、血中ヒスタミン量が顕著に抑制された。以上の結果から、当該モデルはヒトアナフィラキシー病態を標的とした創薬の前臨床試験系への応用が可能であることが示された。

研究課題名	食物アレルギー罹患児の 血漿中におけるアレルギー関連 miRNA の発現プロファイル解析
フリガナ	イガラシ アリサ
代表者名	五十嵐 ありさ
所属機関（機関名） （役職名）	国立研究開発法人 国立成育医療研究センター研究所 研究員
本助成金による発表論文，学会発表	特になし

研究結果要約

microRNA（miRNA）は、細胞内で遺伝子の発現を調節する non-coding RNA の一つであり、細胞間の情報伝達物質としても作用していると考えられている。そのため、近年新たなバイオマーカーや機能分子として様々な分野で研究が進められている。

本研究では、食物アレルギー罹患児の血漿中にアレルギー疾患との関連が報告されている miRNA がどの程度検出されるのか、また食物アレルギーを持たない健常児と比較して、miRNA のプロファイルに違いがあるのかを明らかにし、血漿 miRNA がアレルギー疾患の病態をどの程度反映するのか検証を行うことを目的とした。

健常児および食物アレルギー罹患児の血漿における miRNA の発現を調べた結果、これまでの研究でアレルギーとの関連が報告されている、miR-146、miR-155、miR-21、miR-375、miR-19a はすべて検出限界以下であった。

一方、食物アレルギー罹患児の血漿でコントロールと比較して明らかに発現差のある新たな miRNA が認められた。健常児と比較して食物アレルギー罹患児の血漿で有意に高い miRNA は 7 種類、有意に低い miRNA は 145 種類であった。

今後はこれら miRNA が発現する細胞、ターゲット遺伝子等を検証して食物アレルギーへの関与を明らかにするだけでなく、更なる検証によりバイオマーカーとしての有用性を検証したいと考えている。

研究課題名	母親の腸内環境が胎児の出生後の食物アレルギー発症に及ぼす影響の解析
フリガナ	ウエバンソウ タカシ
代表者名	上番増 喬
所属機関（機関名） （役職名）	徳島大学 大学院医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野 特任助教
本助成金による発表論文，学会発表	なし

研究結果要約（特許申請のため限定開示）

ヒトの腸内には、たくさんの腸内細菌が生息している。腸内細菌は摂取した食物を分解・利用する過程で様々な代謝産物を産生する。産生された代謝産物は、近隣の腸内細菌に作用するだけでなく、宿主にも影響を及ぼし、実際に様々な疾患に腸内細菌が関与している事が明らかになってきている。本研究では、母親の腸内環境の違いが、産まれてくる仔の将来の疾病リスクやそれに関与する遺伝子のメチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、近年、患者数が増加してきているアレルギー疾患を対象モデルとして検討した。母親に対して抗菌薬、またはビタミン B 群欠乏食を投与し、仔の遺伝子のグローバルなメチル化度合いを検討した結果、対象群と介入群には大きな違いは見られなかった。仔の遺伝子のグローバルなメチル化度合いは個体差が大きかったことから、仔だけでなく、孫やひ孫に及ぼす影響を検討することで、母親の腸内環境の違いが仔に及ぼす影響を評価することができると考えられる。一方で、腸管の免疫細胞における制御性 T 細胞の分化増殖に重要な FOXP3 遺伝子発現は、グローバルなメチル化度合いの高いマウスにおいて、メチル化度合いの低いマウスと比較して若干ではあるが高値を示した。このことは、グローバルなメチル化とローカルな遺伝子発現制御の関連性を示唆しており、今後、実際にアレルギー発症等に関与するかを含めて、詳細に検討する必要があると考えられる。

研究課題名	microRNA の網羅的解析を用いた好酸球性消化管疾患のバイオマーカーの探索
フリガナ	オオシマ ナオキ
代表者名	大嶋 直樹
所属機関（機関名） （役職名）	島根大学医学部 第二内科 助教
本助成金による発表論文，学会発表	平成 30 年度 発表予定

研究結果要約

好酸球性消化管疾患（EGID）は遅延型食物アレルギーの一つであり、消化管に多数の好酸球が浸潤し慢性炎症が起こる病態である。近年、患者数は急激に増加傾向であるが、診断方法、治療に関しては未だ確立されていない部分が多い。我々は、消化管粘膜局所における microRNA（miRNA）に着目し、どのように病態形成に関与しているのか、またバイオマーカーになり得るのかを明らかにすることを目的に研究を行った。

本研究では未治療の好酸球性食道炎（EoE）患者を対象に、内視鏡下生検における食道粘膜の miRNA、mRNA 発現を網羅的に解析し、逆流性食道炎（RE）患者との比較を行った。その結果、EoE 患者と RE 患者の間で明確な miRNA、mRNA 発現パターンの相違を認め、mRNA だけではなく miRNA の発現プロファイルも極めて欧米と類似していることが明らかになった。これは EoE の病態は RE とは異なる機序で成り立っており、本邦と欧米で同一であることを示唆するものであった。さらにプロトンポンプ阻害剤による治療の前後において、数種類の miRNA、mRNA 発現の変動を認めた。加えて、特定の miRNA は治療におけるバイオマーカーの候補となり得るものであった。以上の結果から、本研究により EoE 患者における食道粘膜の miRNA 発現の意義と今後の EGID 研究の展望を明確にすることができた。

研究課題名	糖鎖生物学的アプローチによる果実のアレルゲン性発現メカニズムの解明
フリガナ	オカダ タカヒロ
代表者名	岡田 貴裕
所属機関（機関名） （役職名）	佐賀大学 医学部 分子生命科学講座 細胞生物学分野 助教
本助成金による発表論文，学会発表	1. Okada T, Ihara H, Ito R, Ikeda Y. Molecular cloning and functional expression of Lewis type α 1,3/ α 1,4-fucosyltransferase cDNAs from <i>Mangifera indica</i> L. <i>Phytochemistry</i> , 144:98-105. 2017. 2. 岡田貴裕，井原秀之，伊東利津，池田義孝．マンゴー由来 α 1,3- フコース転移酵素遺伝子（ <i>MiFUT11</i> ）の同定・機能解析．2017 年度生命科学系学会合同年次大会．2017 年 12 月 6 日． 3. 岡田貴裕，池田義孝．マンゴー由来 β 1,2- キシロース転移酵素遺伝子の同定・機能解析．日本農芸化学会 2018 年度大会．2018 年 3 月 17 日．

研究結果要約

花粉症関連食物アレルギー症候群は花粉と食用植物との交差反応により発症する疾患であり、交差抗原の分子実体と発現機序の理解が重要な課題となっている。本課題では、植物の主要な交差抗原として知られるアスパラギン結合型糖鎖（N-glycan）に着目し、アーウィン種マンゴー果実をモデルとしてその生化学的基盤を調査した。

N-glycan のアレルゲン糖エпитープ（ α 1,3- フコース、 β 1,2- キシロース）修飾に関わる責任遺伝子として、新たに α 1,3- フコース転移酵素遺伝子（*MiFUT11*）、 β 1,2- キシロース転移酵素遺伝子（*MiXylT*）を見出し、これらが細胞レベルで機能することを明らかにした。また、ルイス a 構造の形成に関わり、交差反応性の低減化にはたらくと考えられる β 1,3- ガラクトース転移酵素遺伝子（*MiGALT1*）、 α 1,3/ α 1,4- フコース転移酵素遺伝子（*MiFUT13*）を見出した。さらに、登熟に伴い *MiFUT11*、*MiXylT* の発現が亢進する一方で、*MiFUT13* の発現活性は顕著に低下する傾向を見出した。以上の結果から、マンゴー果実は完熟に近づくにつれて交差反応性の高い N-glycan が増加し、アレルギーの発症リスクが高くなる可能性が考えられる。

研究課題名	免疫寛容誘導作用を有する低アレルゲン性蕎麦抗原ペプチドの創製と予防治療への応用
フリガナ	カタヤマ シゲル
代表者名	片山 茂
所属機関（機関名） （役職名）	信州大学農学部 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	1. 鈴木湧太、片山茂、山口大樹、三谷壘一、中村宗一郎、リン酸化 Fag e 1 及び Fag e 2 摂取によるソバアレルギー改善効果、第 77 回日本栄養・食糧学会大会、沖縄那覇市、平成 29 年 5 月 20 日 2. Shigeru Katayama、Takakazu Mitani、Soichiro Nakamura、Hypoallergenic phosphorylated buck wheat proteins inducing oral tolerance、ISNFF2017、群山セマングムコンベンションセンター（Gunsan, Korea）、平成 29 年 10 月 22 ～ 26 日

研究結果要約

アレルギー疾患の根本的な治療をめざして「食べて治す」という免疫寛容を利用した経口減感作療法の研究が行われている。しかし、アナフィラキシーショックなど重篤な副作用の危険もあるため、より安全性が高い手法の確立が求められている。そこで本研究では、リン酸化によりアレルゲンのエピトープ部位を修飾したアレルゲン性低減化抗原を作製し、これらの抗原ペプチドの免疫寛容誘導効果について感作マウスを用いて検証した。ソバ主要アレルゲンである Fag e 1 および Fag e 2 をドライヒーティング法によりリン酸化したところ、ペプシンに対する消化抵抗性は未修飾よりも低下することが明らかとなった。すなわち、ソバアレルゲンは消化酵素によりペプチド化しやすくなることが示された。さらに、リン酸化ソバアレルゲンペプチドは蕎麦アレルギー患者血清中の IgE 抗体との結合能が低下することが示された。次に、リン酸化 Fag e 1 ペプチドの経口摂取によるアレルギー改善効果を検証した。リン酸化 Fag e 1 ペプチドを Fag e 1 感作マウスに 4 週間摂取させたところ、アレルギー症状の軽減効果が認められた。このとき、リン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取群において、脾臓細胞での制御性 T 細胞（Treg）の分化誘導が促進されることが示された。本研究の結果より、リン酸化蕎麦アレルゲンペプチドの経口摂取は、Treg 分化誘導を介してアレルギー反応を抑制することが示唆された。

研究課題名	抗原改変カゼインを用いた乳幼児ミルクアレルギー患者への早期介入による、 ミルクアレルギーへの治療効果に関する研究
フリガナ	カワモト ノリオ
代表者名	川本 典生
所属機関（機関名） （役職名）	岐阜大学医学部附属病院 小児科 講師
本助成金による発表論文、学会発表	未発表 (2018年秋の小児アレルギー学会で発表予定)

研究結果要約

抗原を適切に加水分解し、IgE の反応性を低下させ、かつ、T 細胞からの刺激で寛解を誘導することを目指した「食べて治す」食品を開発している。牛乳の β ラクトグロブリンの検討を行い、さらに最近カゼインの抗原改変食品を用いて、4歳以上の食物アレルギー患者に経口免疫療法を行って高い成果を得た。今後乳幼児の牛乳アレルギー患者への早期介入を目指す段階で、より安全性に配慮する必要があると考え、IgE 抗体の抗原改変カゼインへの反応性について検討を行った。IgE-Western Blot 法により、天然型カゼインと抗原改変カゼインの IgE の反応性を比較検討した。カゼイン特異的 IgE 抗体 (ImmunoCAP[®] 法) が高値の例では天然型カゼインの検出が容易であったが、低値の例の中に天然型カゼインのバンドの検出が困難な場合があった。また、この方法には定量性についても課題があった。そこで、Inhibition ELISA 法を用いて検証を行った。濃度勾配をつけた天然型および抗原改変カゼインを患者血清と混合した上で、ELISA プレートに固相化したカゼインへの IgE の結合を検出した。当初 TMB による吸光度を測定したが、特異的 IgE 抗体が低い症例では検出困難で、高感度用の化学発光試薬を用いて測定し、感度の問題をクリアし、多くの患者において抗原改変カゼインの IgE 結合性が天然型カゼインに比べて低下していることが示された。

研究課題名	食物アレルギーの新規予防法の開発に向けた母子栄養・腸内因子とアレルギー疾患との相関解析
フリガナ	クニサワ ジュン
代表者名	國澤 純
所属機関（機関名） （役職名）	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 プロジェクトリーダー
本助成金による発表論文、学会発表	1. J Allergy Clin Immunol. 2017 Dec 27. [Epub ahead of print] 2. 食品薬学シンポジウム 3. 先進イメージング医学研究会 4. AMED-Leibniz Workshop in the Life Sciences

研究結果要約

現在、乳幼児の約半数は何らかのアレルギー疾患に罹患していると言われているが、既存のアレルギー疾患の治療法は対症療法のみで、根本的な予防・治療法は確立されておらず、また発症原因についてもほとんど明らかになっていない。最近の研究から、アレルギーの発症には腸内細菌や食事などの環境因子と宿主免疫系との相互作用が、重要な役割を担っていることが示されてきている。その中で、乳幼児アレルギーについては母乳の影響が一因として考えられている。本研究では食事や母乳とアレルギーについて脂質に着目した研究を行い、食事性脂質から産生される脂質メディエーターについて、母乳の観点も含めたアレルギーに関する研究を行った。その結果、 ω 3脂肪酸として知られる α リノレン酸を起点に形成される複数の脂肪酸代謝物が抗アレルギー活性を示すことが示され、皮膚炎についてはエイコサペンタエン酸の代謝物の一つが好中球に発現する GPR40 を介して遊走阻害することが作用点であることが示された。一方、母乳中にも ω 3脂肪酸代謝物が含まれ、乳幼児期のアレルギーと関連することが示された。これらの知見は近い将来、食物アレルギーに対する予防や発症予測診断法の開発につながるものと期待され、乳幼児アレルギー疾患の減少と家族を含めた QOL の向上、さらには患者数減少による医療経済の改善が期待され、社会的にも学術的にも多大な貢献ができると期待される。

研究課題名	妊婦の栄養摂取状況と子の食物アレルギー発症との関連： 出生前コホート研究データを活用した解析
フリガナ	タナカ ケイコ
代表者名	田中 景子
所属機関（機関名） （役職名）	愛媛大学大学院医学系研究科疫学・予防医学講座 特任講師
本助成金による発表論文，学会発表	無し

研究結果要約

妊娠中の母親の環境要因が胎児へ与える影響は大きい。特に、母親の食事・栄養摂取状況は、胎児の発育・発達だけでなく、様々な疾患発症との関連が指摘されている。今回、出生前開始前向きコホート研究の3歳時追跡調査までのデータを活用し、妊娠中の母親のカフェイン摂取と子の食物アレルギー発症リスクとの関連について解析した。

研究対象者は、1522組の母子である。母親の妊娠中の食習慣は、妥当性の検証された食事歴法質問調査票を用いて、過去1ヶ月の食事習慣を評価した。1歳、2歳、3歳時の追跡調査の質問票で、食物アレルギーに関する情報を得た。本研究では、食物摂食後、アレルギー症状が出現したという自己申告があった場合、及び医師による食物アレルギーの診断があった場合、食物アレルギーあり、と定義した。

母親の妊娠中のカフェイン摂取の第1三分位（T1）に比較して、第2三分位（T2）では、有意に食物アレルギー発症リスク増加と関連していた。一方、第3三分位（T3）では、統計学的に有意な関連を認めなかった。

今回の解析により、母親の妊娠中のカフェイン摂取は、子の食物アレルギー発症リスク上昇に関連があることが示唆された。今後、メカニズムの解明も含め、さらなる疫学研究が必要である。

研究課題名	食物アレルギー児の QOL に着目した予後に関する研究
フリガナ	ナガオ ミヅホ
代表者名	長尾 みづほ
所属機関（機関名） （役職名）	国立病院機構三重病院 臨床研究部 アレルギー疾患治療開発研究室長
本助成金による発表論文，学会発表	第 67 回日本アレルギー学会学術大会 (2018/6/22-24) で発表予定

研究結果要約

食物アレルギー診療の向上に伴い、積極的に食物経口負荷試験がなされ、その後に適切な栄養指導を行うことで、不必要な除去を減らし、必要最小限の除去となるように指導されている。しかし、病状として寛解傾向になることと、保護者や患児の QOL が改善することは必ずしも一致しない。そこで、本研究では経口負荷試験を受けた児の QOL について食物アレルギーの疾患特異的 QOL 質問紙である FAQLQ-PF を用いて調査した。その結果、4 歳以上の児は 3 歳以下の児よりも QOL 全体が低下しており、因子別にみると社会的・栄養的制限については年齢による影響はあまりみられなかったが、食物への不安や感情への影響は 4 歳以上で QOL が低下している傾向にあった。

また、栄養摂取頻度調査票から食物アレルギー児の栄養状態をみたところ、カルシウム、鉄、ビタミンなど多くの栄養素が充足していな児がみられた。これは必ずしも QOL や食物アレルギーの重症度とは関連しておらず、比較的軽症例でもみられたことから、食物アレルギー児の指導には栄養面からのより積極的な介入も必要と考えられた。

今後 QOL の経時的な変化を追うことで、QOL が低下している児、低下していきそうな児にどのような因子が関わっているのか検討し、早期介入することで QOL の向上を図れることを目指す。

研究課題名	革新的抗体作製技術を用いた食物アレルギー抗原同定法の開発
フリガナ	ヒラカワ ジョウタロウ
代表者名	平川 城太郎
所属機関（機関名） （役職名）	国立大学法人千葉大学・大学院薬学研究院 助教
本助成金による発表論文，学会発表	該当なし 2018 年度予定

研究結果要約

食物アレルギーはごく一部のヒトに起こるアレルギー疾患であるが、重篤な場合は循環器不全をもたらし死に至る。そのため臨床では、食物アレルギー患者がどのような食物アレルギーに反応するのかを知ることが極めて重要である。また食物アレルギーの研究を進めるうえでは、食物アレルギー特異的なモノクローナル抗体を作製し、どのような食物アレルギーが食物アレルギー発症に関与するかを明らかにすることが重要である。そこで本研究では、食物アレルギーを発現する細胞株を野生型マウスに過剰免疫し、食物アレルギー特異的な IgE 抗体を作製する「新規モノクローナル抗体作製法」を開発することを目指した。

本研究ではモデルアレルギーとして卵白アルブミン (OVA) を抗原として用い、幾つかの免疫プロトコルに従い OVA を発現する細胞株を野生型マウスに免疫することで、OVA 特異的モノクローナル抗体の樹立に成功した。抗体のクラスを解析すると多くがマウス IgM と IgG であり、OVA 過剰発現株を免疫するだけでは抗原特異的 IgE クローンを作製することは難しいことが明らかとなった。今後は本手法をさらに発展させることで、食物アレルギー特異的な IgE 抗体が簡便に作製され、食物アレルギー研究が推進されることが期待される。

研究課題名	うるち米デンプンとアレルゲンの共摂食による経口免疫寛容誘導の検討
フリガナ	フジムラ タカシ
代表者名	藤村 孝志
所属機関（機関名） （役職名）	広島大学 大学院先端物質科学研究科 特任助教
本助成金による発表論文，学会発表	2017 年度の発表実績なし

研究結果要約

食物アレルギーや花粉症をはじめとするアレルギー疾患は増加の一途を辿っており、深刻な社会問題となっている。アレルギー疾患の根治療法としてアレルゲン特異的免疫療法があげられるが、食物アレルギーでは効果が低くあまり実施されていない。本研究では、「低用量アレルゲンの予防投与により誘導される経口免疫寛容の効果がうるち米デンプン摂食により増強されるか？」を明らかにすることを目的とした。鶏卵白アルブミン（OVA）をモデルアレルゲンとして、食物アレルギーマウスにおける下痢症状を指標に治療効果を解析した。飼料中のコーンスターチをうるち米デンプンと全置換した餌を自由摂食させることで米デンプン投与を行い、低用量 OVA をゾンデにより予防投与した後、高用量 OVA の経口投与により下痢症状を誘導した。その結果、OVA を予防投与していない群では、米デンプン飼料、通常飼料のいずれにおいても 67%(4/6) が下痢症状を示したが、米デンプン飼料摂食下で低用量 OVA を予防投与した群では 67% が無症状であった。通常飼料摂食下で低用量 OVA を予防投与した群では 33% が無症状、50% が重度の下痢を示したことから、一部のマウスでは OVA の予防投与が逆に食物アレルギーの悪化に働いていると示唆された。以上の結果より、低用量アレルゲンの予防的投与により誘導される免疫療法の治療効果が米デンプンの共摂食により増強されることが示された。

研究課題名	葛根湯の併用による経口免疫寛容の治療効率の向上及びその機序の解明
フリガナ	ヤマモト タケシ
代表者名	山本 武
所属機関（機関名） （役職名）	富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学 助教
本助成金による発表論文，学会発表	1. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会，2017, 6, 16-18, 東京． 長田夕佳， 山本 武 ，門脇 真：食物アレルギー病態モデルに対する葛根湯と経口免疫療法との併用療法によるレチノイン酸代謝酵素抑制を介した制御性 T 細胞の誘導． 2. 第 34 回和漢医薬学会学術大会，2017, 8, 26-27, 福岡． 山本 武 ，長田夕佳，林美智慧，苟巧，門脇 真：経口免疫療法と葛根湯の併用療法による食物アレルギーの治療効果増加の機序の検討．

研究結果要約

食物アレルギーは患者数が増加しているにもかかわらず、未だ有効な治療法がない疾患である。近年、経口免疫療法は食物アレルギーを根本的に治癒する可能性がある治療法として考えられる様になってきた。しかし、経口免疫療法は、原因抗原の経口摂取により行なわれるため重篤な副作用を誘発する場合があること、長期の治療期間にもかかわらず治療成績は十分には高くないことなどから一般診療に推奨されていない。申請者らは、漢方薬がアレルギー疾患の治療に頻用されていることから、経口免疫療法による食物アレルギーの治療に漢方薬を併用することが経口免疫療法を安全にかつ効率的に行うために有効ではないかと考えた。そこで、食物アレルギーの発症を予防的に抑制すること明らかにしている葛根湯を経口免疫療法と併用し、その効果を明らかにするとともに治療機序を検討した。食物アレルギー病態モデルに臨床研究で行われている経口免疫療法と同様の経口免疫療法を行う経口免疫療法モデルを作製し、葛根湯の併用効果について検討した。葛根湯の併用は食物アレルギーの治療効率を増加し、その治療機序には腸管の制御性 T 細胞の増加が関与することを明らかにした。さらに、制御性 T 細胞の誘導には腸管粘膜のレチノイン酸量の増加が関与することを明らかにした。本研究は、食物アレルギーの治療への経口免疫療法と葛根湯の併用の有効性を示し、安全で効率的な治療法の確立の可能性を示唆した。

研究課題名	マカダミアナッツアレルゲンの交差反応についての解析
フリガナ	ヨシダ コウイチ
代表者名	吉田 幸一
所属機関（機関名） （役職名）	東京都立小児総合医療センター アレルギー科 医員
本助成金による発表論文，学会発表	Koichi Yoshida, Shoichiro Shirane, Kazue Kinoshita, et al. Clinical features and allergen analysis in five children with macadamia nut allergy. American Academy of Allergy and Immunology/World Allergy Organization Joint Congress 2018. 2-5 March 2018. Orlando, FL, USA.

研究結果要約

マカダミアナッツは現在広く摂取される食品となったが、そのアレルギーについてこれまで十分な検討がなされていない。そのため、交差反応についてもヘーゼルナッツとの可能性が症例報告レベルで示唆されるのみで、マカダミアナッツアレルギーがある場合どのナッツに注意すべきか明らかにできていなかったが、本研究により5名の即時型のマカダミアナッツアレルギーをもつ小児例（うちアナフィラキシーを経験した症例は2名）が集積できた。

我々はマカダミアナッツの粗タンパク質に対する特異的 IgE 抗体の検出系を確立し、Inhibition ELISA を4名の患者で実施した。その結果、4名中2名の患者の特異的 IgE 抗体は、クルミとヘーゼルナッツの粗タンパク質を吸収抗原とした時、濃度依存的に吸光値が減少し、これらの抗原に対し交差反応を示すことが明らかになった。残り2名ではヘーゼルナッツ、クルミ、ピーナッツ、アーモンド、カシューナッツ、ピスタチオ、まつのみ、ごま、そばとも全ての症例の IgE 抗体は交差反応性を示さなかった。今後、この結果の臨床的意義も含め今後マカダミアナッツのアレルゲン性について、解析中のコンポーネントの同定など更なる研究が必要である。

役員・評議員・研究助成審査委員名簿

（平成30年9月1日現在）

1. 役員

理事長	山田 良司	常勤	元 日本ハム（株）中央研究所 所長
副理事長	村上 博	非常勤	日本ハム（株）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 顧問
	宇理須 厚雄	非常勤	藤田保健衛生大学 医学部 客員教授
	畑江 敬子	非常勤	お茶の水女子大学 名誉教授

監事	久木田 勝	非常勤	日本ハム（株）経理財務部 次長
----	-------	-----	-----------------

2. 評議員

評議員	大谷 敏郎	非常勤	（国研）農研機構 理事（研究推進担当Ⅲ）
	川村 浩二	非常勤	日本ハム（株） 代表取締役専務執行役員
	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	（独）労働者健康安全機構 千葉労災病院 院長
	西藤 久三	非常勤	（一財）食品産業センター 顧問
	清水 誠	非常勤	東京農業大学 応用生物科学部 教授
	畑 佳秀	非常勤	日本ハム（株） 代表取締役社長
	服部 昭仁	非常勤	北海道大学 名誉教授

3. 研究助成審査委員

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	国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長
	新井克彦	東京農工大学農学部附属硬蛋白質利用研究施設 教授
	五十部誠一郎	日本大学 生産工学部 教授
	伊藤浩明	あいち小児保健医療総合センター 副センター長
	伊藤節子	同志社女子大学 生活科学部 特任教授
	川村 理	香川大学 農学部 教授
	倉園久生	帯広畜産大学 副学長・教授
	駒井三千夫	東北大学大学院農学研究科 教授
	下条直樹	千葉大学大学院医学研究院 教授
	立花宏文	九州大学大学院農学研究院 主幹教授
	柘植郁哉	藤田保健衛生大学医学部 客員教授
	鍋谷浩志	農研機構 食品研究部門 部門長
	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 教授

平成29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。

赤澤 晃	東京都立小児総合医療センター 部長
森松文毅	徳島大学 研究支援・産官学連携センター 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しています。

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

平成 27 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、平成 29 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. 役員等（平成 30 年 9 月 1 日時点）

評議員	大谷敏郎、川村浩二、菊田行紘、河野陽一 西藤久三、清水 誠、畑 佳秀、服部昭仁
理事	一色賢司、宇理須厚雄、沖浦智紀、畑江敬子、村上 博、山田良司
理事長	山田良司
副理事長	村上 博
監事	久木田 勝

5. 情報公開等

Web サイト： <https://www.miraizaidan.or.jp/>

Facebook： <https://www.facebook.com/miraizaidan>

Twitter： <https://twitter.com/syokunomirai/>

6. 平成 30 年度主な事業活動

- ・平成 30 年度研究助成の実施、2019 年度(平成 31 年度)研究助成の公募及び平成 29 年度研究助成の成果報告会の実施
- ・第 4 回食物アレルギー対応食料理コンテストの実施
- ・主催セミナーの実施
- ・平成 30 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

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

平成 30 年 9 月 21 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

電話 029-893-4466

FAX 029-893-4360

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

E-mail info@miraizaidan.or.jp

Facebook <https://www.facebook.com/miraizaidan>

Twitter <https://twitter.com/syokunomirai>