

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。

研究計画及び研究方法

< 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°C 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 NH₄H₂PO₄ (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 NH₄H₂PO₄ (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

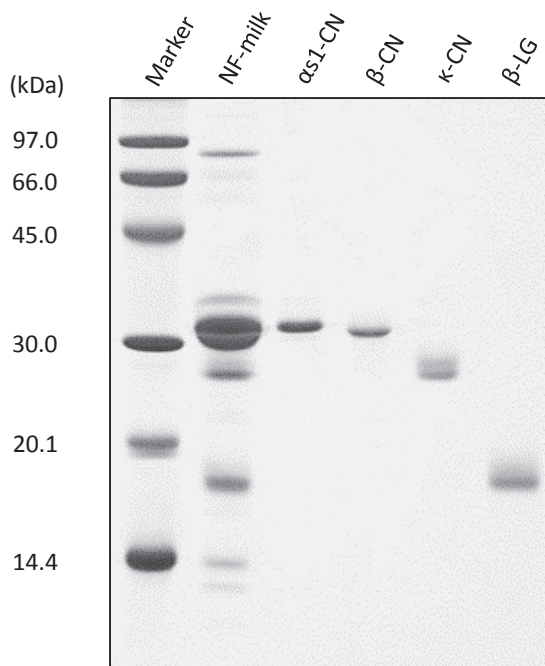


Figure 1 Purification of αS1-casein

< 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°C 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、または軽度な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)。

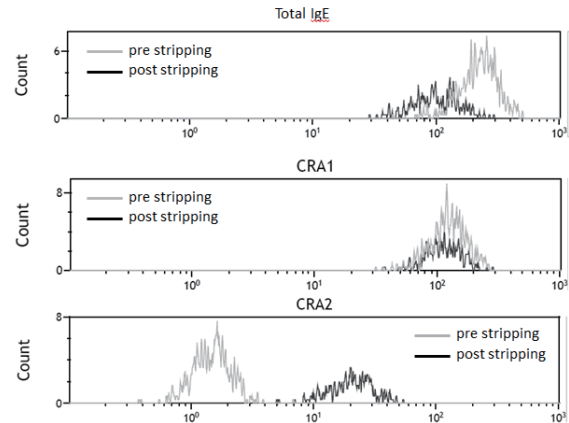


Figure2 Confirmation of stripping of IgEs from basophils

・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℃ で一晚培養することで、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°C 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)。

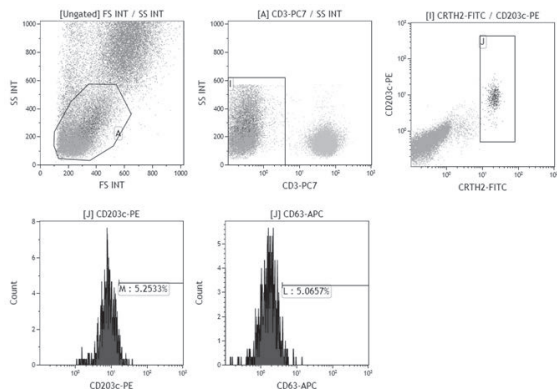


Figure3 Gating of basophils

・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°C 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 カ月、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)。

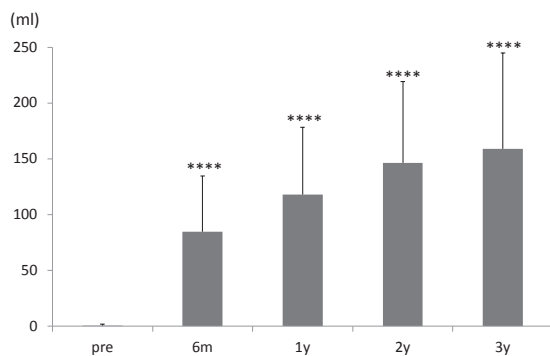


Figure 4 Change of tolerated amount of cow's milk after oral immunotherapy n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. **** p<0.001

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)。

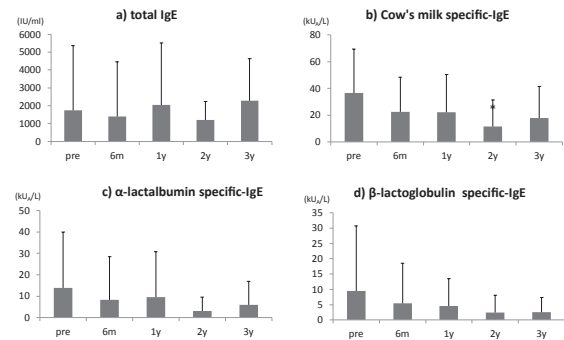


Figure 5 Change of IgEs after oral immunotherapy n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. * p<0.05

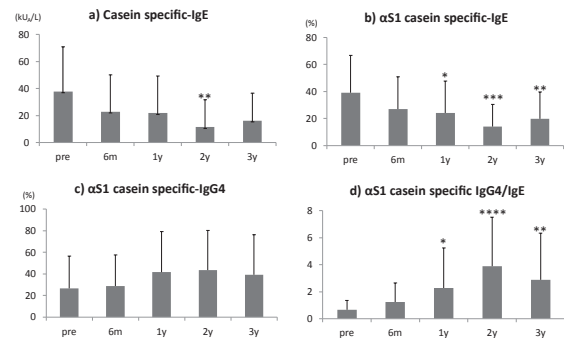


Figure 6 Change of casein specific Immunoglobulins after immunotherapy n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, **** p<0.001

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 高発現な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。

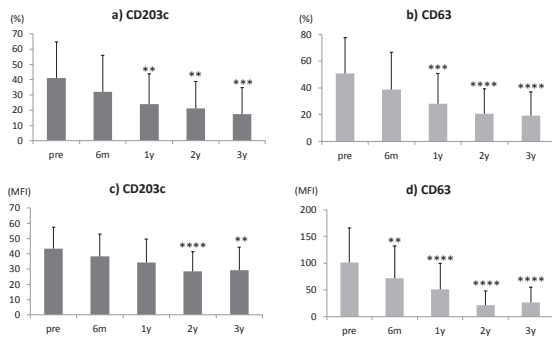


Figure 7 Change of basophil activation stimulated by αs1 casein after immunotherapy n=39 Dunnett's tests compared to pre were applied. **p<0.01, ***p<0.005, **** p<0.001

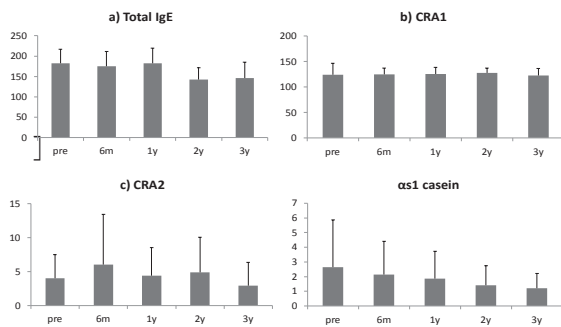


Figure 8 Change of basophil surface antigens stimulated by αS1 casein after immunotherapy n=39 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

<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	-0.042 - -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)。

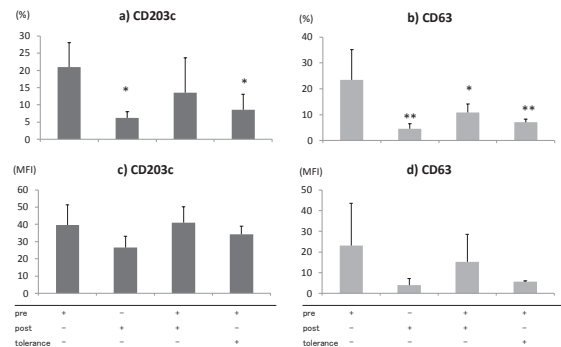


Figure 9 Suppression of basophil activation stimulated by αs1-casein n=4 Dunnett's tests compared to pre were applied. * p<0.05,**p<0.01

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)。

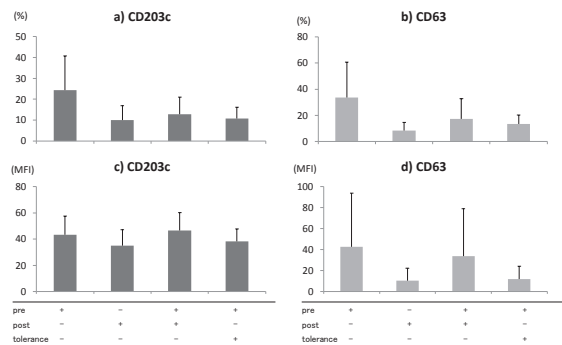


Figure 10 Suppression of basophil activation stimulated by αs1-casein afterwashing supernatant n=4 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

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。

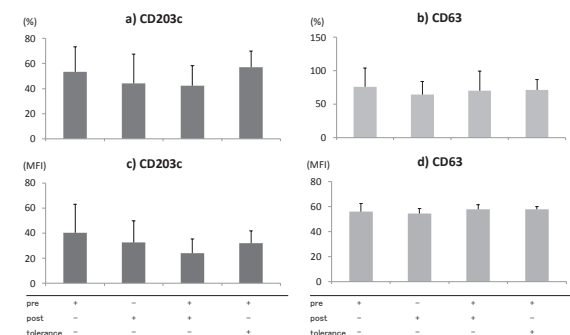


Figure 11 Suppression of basophil activation stimulated by anti-IgE antibody n=4 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

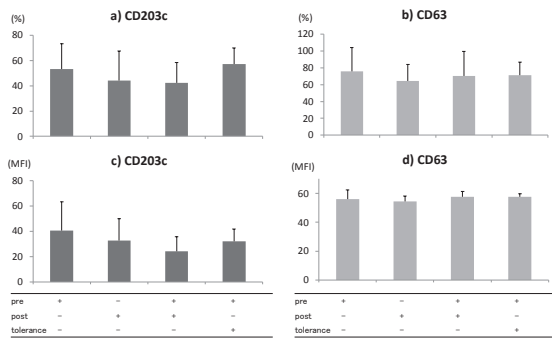


Figure 12 Suppression of basophil activation stimulated by anti-IgE antibody after washing supernatant n=4 one-way ANOVA tests compared to pre were applied.

<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.