

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標とした「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。

研究目的

牛乳アレルギーは、本邦において特に乳幼児期には 2 番目に多い食物アレルギーとして重要な位置を占める。現代の食生活において多くの食品に牛乳ないし乳成分が使用されており、牛乳アレル

ギーで牛乳の摂取ができない場合には、生活の質の低下も顕著である。¹⁾ また、特に牛乳においては、重要なカルシウム源であり、牛乳 100ml あたり 100mg 程度のカルシウムが摂取できる。したがって、長期に牛乳除去を行った患者において、身長²⁾や骨塩密度³⁾への影響の報告もある。これらのことから、牛乳アレルギーの早期寛解への誘導は重要であると考えられる。

われわれは、岐阜大学の長年のアレルギー研究の成果として IgE の反応性を低下させ、かつ T 細胞反応性を残すことで、IgE によるアレルギー反応を減らし、かつ、T 細胞からの刺激で寛解を誘導する、「食べて治す食品」ができると考えて抗原改変のβラクトグロブリン^{4),5)} とカゼイン⁶⁾を作成し、牛乳アレルギー患者の経口免疫療法に用いてきた。抗原改変カゼインを用いた試験では、13 人中、10 人で天然型のカゼインの症状誘発閾値が上昇し、良好な成績を示した。

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となってきているが、対象が乳幼児であり、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。先述の抗原改変カゼインの経口免疫療法において多くの患者において順調に経口免疫療法がすすんだが、一部に経口免疫療法中に抗原改変食品でアナフィラキシーを起こしたり、口腔違和感を訴えたりする例がみられた。この反応性の違いは個人の IgE 反応性の違いによるのではないかと考えて、各個人の IgE 反応性の違いを示す目的で研究を進めた。この成果は抗原改変カゼインの安全性の向上という面で重要な意義を持つと考えている。

研究計画及び研究手法

本研究では、先行した 4 歳以上を対象とした臨床研究において、数例において口腔違和感やアナフィラキシーが出現しており、安全性を高めるためにこれを予測できる方法を検討することとした。アナフィラキシーや口腔違和感には IgE の反応性が影響を与えていると考えられるため、これを検出する手法を中心に、安全性を上げるための技術開発を目標に検討を行った。具体的には (A) IgE-Western Blot 法による患者血清を中 IgE 抗体の抗原改変カゼインへの反応性の検討と (B) ELISA 法を用いた抗原改変カゼインと患者血清 IgE との反応性の定量をおこなった。

(A) IgE-Western Blot には抗原改変カゼイン、天然型カゼインを電気泳動した上で、メンブレンに転写した上で患者血清を添加、のちに抗 IgE 抗体を用いて抗原改変カゼイン、天然型カゼインとの IgE 反応性を確認した。SDS-PAGE と IgE-Western Blot 法はこれまでの我々の報告で用いた方法⁷⁾を一部変更して、以下の方法で行った。カゼイン(20-80 μg)と抗原改変カゼイン(50-200 μg)を 2-メルカプトエタノールを用いて還元した上で 16.5%のトリス-トリシンプレキャストゲルを用いて行った。タンパク質量マーカーと一緒に泳動し、クマシーブルー染色と IgE-Western Blot 法で検出した。Western Blot 法においては、タンパク質ないしペプチドは PVDF メンブレンに転写し、Protein G ビーズにて IgG の除去を行った患者の血清と反応した。その後、HRP 標識したヤギ抗ヒト IgE 抗

体と培養し、Amersham ECL Prime reagent をもちいて可視化した。添加する患者血清を増やすなど様々な条件検討を行い、高感度化を目指した。

(B) また、抗原改変カゼイン特異的 IgE 抗体を測定するための手法の開発を行った。当初は、この抗原改変カゼインへの IgE 抗体の反応を検出する手法として以下の2つの方法を考えていた。(B-1) 間接 ELISA 法による抗原改変カゼイン特異的 IgE 測定システムの開発：抗原改変カゼインを固相化した ELISA プレートに患者血清を添加し、血清中の IgE を抗 IgE 抗体で検出する方法。至適固相化抗原濃度、至適検出抗体濃度などについて開発を進める予定であった。(B-2) 競合 ELISA 法による抗原改変カゼイン特異的 IgE 測定システムの開発：天然型カゼインを固相化した ELISA プレートにあらかじめ抗原改変カゼインを添加した患者血清を添加し、血清中の天然型カゼインに反応する IgE 抗体を、抗ヒト IgE 抗体を用いて検出し、抗原改変カゼインを添加して減衰した分を決めることで抗原改変カゼインに反応する IgE 抗体の量を測定する方法。これらの2種類の方法を計画していたが、抗原改変カゼインは分子量が比較的低いため、ELISA プレートへの固相化の効率が低い可能性が考えられ、(B-1) よりも (B-2) が有利であると考えた。実際に進めるにあたって、通常のカゼイン特異的 IgE を計測する系をまず開発した。その後 (B-1) については、やはりプレートへの固相化効率がペプチドと粗抗原で異なることから直接の比較検討は困難であると考えたため、最終的に (B-2) に的を絞って検討を進めた。また、抗原改変カゼインは水溶性であったが、カゼインは PBS や蒸留水などの溶媒への溶解性が非常に悪く、安定して溶解できる条件の検討が必要であった。

(A) と (B) に想定外の技術的な障壁もあり計画を行なっていた Luminex を用いて測定予定であった抗原改変カゼイン刺激による PBMCs の培養上清中のサイトカイン (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ) の濃度については期限内に検討に至らなかったが、早急に体制を整えて検討を行いたいと考えている。

結果と考察

(A) IgE-Western Blot 法による患者血清中 IgE 抗体の抗原改変カゼインへの反応性の検討
IgE-Western Blot 法は当科で過去に行っていた方法を用いて実施した。過去にもこの方法を用いて報告を行っており^{4,7)}、さらに最近、本研究開始前に、抗原改変カゼインの開発の一環として行なった実験についても報告している⁸⁾。これらの方法を改良して、今回の対象者についても検討を進めた。図1左、右は今回のプロジェクトの前に行ったデータであるが、カゼイン特異的 IgE 抗体が高い症例においては、天然型のカゼインのバンドが綺麗に検出できている。一方今回の検討の中で実施した図1右の例のように、カゼイン特異的 IgE 抗体がさほど高くない検体においては、添加する血清量を増やすなどのいくつかの条件検討を行ったものの、天然型のカゼインのバンドの描

出が困難な検体もみられた。また、この方法は定性的な検査であり、IgE の反応性がどの程度落ちているのかという定量性にも課題があった。

(B) ELISA 法を用いた抗原改変カゼインと患者血清 IgE との反応性の定量

最初にかゼイン特異的 IgE 抗体を検出するための直接 ELISA 法の開発を行った。牛乳のカゼインは、「 α s1 カゼイン」「 α s2 カゼイン」「 β カゼイン」「 κ カゼイン」などからなるが、牛乳中では通常「カゼインミセル」を形成しており、pH4.6 以下にすることで牛乳から析出することが知られている。このカゼインは、水には難溶性で、アルカリには容易に溶解することが知られている。

ELISA プレートへの固相化には一般的に、PBS または Bicarbonate buffer に溶解した上で、ELISA プレートに添加し、4°C で Overnight または 37°C で 30 分反応させる方法がよく用いられている。さらに今回の実験目的として、Inhibition ELISA を行う予定であり、濃度を振ったカゼインの溶液と患者血清を混和して実験を行うことを想定している。したがって、今回は ELISA プレートへの固相化と Inhibition ELISA としてカゼインを培養上清に添加することも考慮し、PBS への溶解を試みた。尚、抗原改変カゼインは、比較的高濃度にしても容易に PBS に溶解できた。当初、蒸留水や 1x PBS(-)そのものへの溶解を試みたが、長時間振盪したり、加温したりしても溶解が困難であった。そこで様々な条件検討を行い、1x PBS の組成に着目し、PBS の組成のうち一部の物質のみを添加した液(P-1 と呼ぶ)とその残りの物質を添加した液(P-2 と呼ぶ)を 1:1 で合わせた時に PBS (-)の組成になる溶媒を用いて溶解を試みた。P-1 液と P-2 液の組成を表 1 に示す。(P-1 液 50mL と P-2 液 50mL を混合すると 10x PBS (-) 100mL となる。) 水に溶解した時に酸性になる溶液とアルカリ性になる溶液を作成し、当初アルカリ性の溶液で溶解した上で、酸性の溶液を加えて最終的に 1x PBS(-)の組成とすることを目標とした。この P-1 液を用いて 80°C に加温しながらカゼインを溶解し、最後に P-2 液を加えたのちにメスアップして 10 mg/mL のカゼインの Stock solution を作成した。P-1 液は pH 9.04, P-2 液は pH 3.76 で、P-1 と P-2 を等量混合した液(10x PBS(-))は pH 6.87 であったが、1x PBS (-)にメスアップした場合 pH 7.65 と概ね良好な pH であった。これによりカゼインの溶解性が一気に上がり、実験が容易になった。

次に、カゼインに対する直接 ELISA 法の開発を行った。カゼインを固相化した上で、一定の患者血清を加えた上で、ビオチン標識抗 IgE 抗体、Streptavidin-HRP、TMB を用いて検出する系の開発を行った。条件検討の上、10 μ g/mL の 1x PBS に溶解したカゼイン液を 100 μ L/well 添加し、固相化してプレートを得た。300 μ L の 2%BSA-PBS でブロッキングを行なった上で、患者血清を 20 倍希釈して添加、反応後洗浄し、ビオチン標識抗ヒト IgE 抗体(mouse clone MHE-18)と、HRP-streptavidin を用いて標識し、TMB substrate を用いて検出した。TMB については検討の末、高感度用の試薬を用いた方が良好な結果を示した。カゼイン特異的 IgE 抗体が高い人から低い人まで横に並べた上で、最高濃度から縦に血清を 2 倍の希釈系列を作ったところ良好に検査が

行える状況が確認できるようになった。(図2) 条件検討の末、ImmunoCAP®法による特異的 IgE 抗体価が概ね 100 kU_A/L 程度までの範囲で測定できる状況であった。

この条件を用いて、Inhibition ELISA 法を試みた。天然型のカゼインと、抗原改変カゼイン用いて希釈系列を作成し、患者血清と混合した上でカゼインを固相化したプレートに添加した。添加した抗原の濃度が高いほど上清中の抗原と競合的に結合し、結果としてプレートに固相化したカゼインとの結合は濃度依存的に低下した。概ね良好なカーブを描いた。また、混合した抗原として抗原改変カゼインは天然型のカゼインに比べて競合するのにより高い濃度が必要であった。この結果として、抗原改変カゼインは患者血清との IgE 結合性が低下していることが示唆された。(図3)

つづいて、このカーブについて、IC₅₀(50%の競合が得られる濃度)を求めた。上図の例では、Pt 5 においては、天然型のカゼインの IC₅₀ が 3.29 μg/mL で、抗原改変カゼインの IC₅₀ が 5768.7 μg/mL であり、1751.4 倍 IC₅₀ が低下していることがわかった。同様に、Pt 7 においては、天然型カゼインの IC₅₀ が 0.14 μg/mL であり、抗原改変カゼインでは 239.6 μg/mL であり、1718.2 倍 IC₅₀ が低下していることが判明した。

この後、他の患者さんについても同様の検討を行ったが、特にカゼイン特異的 IgE 抗体が 50 kU_A/L 以下の比較的低い患者さんにおいては、競合がかかっていない時の吸光度がそもそも低いために、競合させた場合の吸光度の値が、検出限界に近づくためか、ばらつきが高い傾向にあった。そこで、ELISA 法の高感度化を試みた。一定のカゼイン特異的 IgE 値の血清を、希釈系列を用いて低濃度側にどこまで測定できるのかについて検証した。高感度用 TMB 試薬と通常の化学発光試薬を比較したが、化学発光法の試薬がやや感度で勝るものの、ほぼ同等の感度と考えられた。(図4) ビオチンに対して複数の HRP が結合する PolyHRP と通常の HRP に加えて、通常の化学発光試薬、さらに高感度用の化学発光試薬(Femto)を用いて比較検討を行った。PolyHRP に通常の化学発光試薬を用いたものと、PolyHRP に高感度用の化学発光試薬を用いたものは通常の HRP を用いたものに比べて低濃度でのシグナルが強い傾向にあったことから、非特異的な結合が増加する傾向(図5)があると判断した。通常の Streptavidin-HRP に高感度の化学発光試薬を用いた場合には、通常の化学発光試薬と比べて直線性は良好で、かつ比較的明るいシグナルが得られることがわかり、最も良い条件であると考えられた。したがって、TMB で IC₅₀ の測定が困難であるカゼイン特異的 IgE が 50 を下回る検体においては、この条件を用いて実験を進め、IC₅₀ を求めた。また、一部の検体において TMB で求めた IC₅₀ と高感度用の化学発光試薬で求めた IC₅₀ は比較的類似の値をとることがわかったため、特異的 IgE の値により、層別化して実験を行うこととした。最終的に表2に示すように、多くの患者さんで IC₅₀ を求めることができた。検査が施行できた全ての患者さんにおいて IC₅₀ が 37 倍から 7503 倍までの範囲で概ね顕著に低下しており、IgE 反応性が低下していることが示された。この、IC₅₀ の違いは個体差によるものと考えられ、テーラー

メイド医療などへの発展も期待される。特に測定できた中ではほとんどが 1000 倍を超えるような顕著な IC50 の低下を認めており、この抗原改変食品の安全性が示されたと考えている。

今後の研究活動について

今回は IgE の反応性について抗原改変カゼインと天然型のカゼインの比較検討を行い、抗原改変カゼインの IgE 反応性の低下を確認した。牛乳アレルギーの乳児が飲むための「アレルゲン除去食品」として、高度加水分解乳が国内で数種類¹⁾販売されている。この「アレルゲン除去食品」のアレルゲン性が低下していることの証明には、マウスカゼイン特異的 IgG 抗体などを用いた ELISA 法が用いられている。今回の手法を用いることで、実際のヒト血清で IgE 反応性が低下することを示すことができたことは、今後その他の食品についても同様に反応性が低下しているかどうかなどの検証に利用できる技術となると考えられる。

IgE 抗体は様々な技術で証明が可能であるが、今回の検討の中で細胞の反応性については検証が十分に行われていない。臨床試験においてヒスタミン遊離試験を用いて検証を開始していたものの、検査途中から自動化されたヒスタミン遊離試験に切り替わったため、データの直接比較が困難であった。今後の課題としては、患者血清中の IgE 抗体を培養細胞に感作させた上で架橋、脱顆粒などを検証する系の開発が求められる。現在、ラットマスト細胞株 RBL-2H3 を用いた脱顆粒の検査が比較的広く行われているが、ヒト細胞株を用いたものは、技術的障壁があり現時点では十分に開発されていない。今後その課題をクリアした上で、ヒト細胞での IgE 反応性を検証する系を開発して安全性を検証し、ひいては新たな臨床研究につなげて行きたいと考えている。

参考文献

- 1) 川本 典生, B. 牛乳アレルギー. 伊藤浩明, 食物アレルギーのすべて 基礎から臨床・社会的対応まで 診断と治療社, 東京, 2016;149-155.
- 2) Mukaida K, et al.: The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. *Allergol Int* 2010; 59: 369-374.
- 3) Nachshon L, et al.: Decreased bone mineral density in young adult IgE-mediated cow's milk-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 134: 1108-1113; 2014.
- 4) Ueno H. M., Kato T., Ohnishi H., Kawamoto N., Kato Z., Kaneko H., Kondo N., Nakano T.: T-cell epitope-containing hypoallergenic beta-lactoglobulin for oral immunotherapy in milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(8): 818-824.
- 5) 金子 英雄, 大西 秀典, 近藤 直実 食物アレルギーに対する抗原改変牛乳による経口免疫療法. 「最新 アレルギー疾患の免疫療法と分子標的治療—理論と実践—」. 近藤 直実 編. 診断と

治療社. 東京, 2013; 100-104.

- 6) Ueno HM, Kato T, Ohnishi H, Kawamoto N, Kato Z, Kaneko H, Kondo N, Nakano T. Hypoallergenic casein hydrolysate for peptide-based oral immunotherapy in cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2018 in press
- 7) Kondo M, Fukao T, Shinoda S, Kawamoto N, Kaneko H, Kato Z, et al. Lymphocyte responses to chymotrypsin- or Trypsin V-digested beta-lactoglobulin in patients with cow's milk allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2007; 3: 1-9.

以上