

ニッポンハム食の未来財団 平成 30 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	急速経口免疫療法後に残存する運動誘発症状の機序に関する検討 -生体内における好塩基球活性化の可能性-
フリガナ	スギウラ シロウ
代表者名	杉浦 至郎
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 アレルギー科 医長
本助成金による 発表論文, 学会発表	本研究の結果は平成 31 年 6 月に開催される第 68 回日本アレルギー学会学術大会において、「アレルゲン摂取後の運動誘発における生体内好塩基球活性化の検出に関する検討」の演題名で、代表者と同施設のスタッフが発表予定である。また英語論文の作成中である。

研究結果要約

[目的]

経口免疫療法後に抗原摂取のみでは症状が誘発されず、摂取後の運動により誘発されるアレルギー症状（運動誘発症状）及び食物依存性運動誘発アナフィラキシー (food-dependent exercise-induced anaphylaxis, FDEIA) は抗原摂取後に生体内で subclinical な好塩基球活性化が存在し、運動によってこれが顕性化することを仮説とし、これを検証することが本研究の目的である。本研究はこれらの疾患の病態解明の一助となると考えられる。

[方法]

経口免疫療法後の運動誘発症状 (n=20) もしくは FDEIA (n=3) が疑われる計 23 人の対象者（年齢 8.3 - 15.0 歳、抗原：卵・乳・小麦・ピーナッツ・ゴマ）に対して抗原摂取後の運動（運動誘発試験）を施行し、その前後で継時的に採血を行なった。運動誘発試験は十分量の抗原摂取 30 分後に 2km、20 分程度のランニングを行なった。抗原摂取前、摂取 30 分後、運動後、症状誘発時に末梢血全血を採取し、採取後は抗原刺激を加えず、Allergenicity kit®を用いて CD203c 及び CD63 を指標とした好塩基球の活性化を評価した。

[結果]

運動誘発試験陽性者は 11 人で、アナフィラキシーを 3 人に認めたがアナフィラキシーショックは認められなかった。運動誘発試験陽性者陰性者共に、抗原摂取前後において末梢血活性化好塩基球割合に有意な変化を認めなかった。また、FDEIA を含む運動誘発症状出現時の末梢血活性化好塩基球割合は症状出現前と比較し有意な変化を認めなかった。運動誘発症状及び FDEIA には末梢血好塩基球が関与していない可能性が示唆された。

研究目的

食物アレルギー児に対する経口免疫療法により脱感作状態に達した一部の患者で、抗原摂取のみでは症状が誘発されず、摂取後の運動により誘発されるアレルギー症状（以下運動誘発症状）¹⁾が残存することがある。この運動誘発症状は、治療後 3～5 年経過しても消失しないことが多く、患者の QOL 改善に大きな妨げとなっている。また、臨床的に運動誘発を診断するための食物+運動負荷試験（以下、運動誘発試験）は、しばしば重篤なアナフィラキシーを引き起こすことがあり、患者及び医療者側への負担が大きい。しかし、運動誘発症状を残す患者と残さない患者の病態の違い、あるいは食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) との病態の違いは明らかにされておらず、運動誘発試験以外に診断する臨床検査はないのが現状である。

好塩基球活性化試験（以下、BAT と略す）は、一般的には *in vitro* で末梢血を抗原刺激し、活性化した好塩基球を細胞表面 CD203c 又は CD63 の発現で検出する。一方、生体内ですでに活性化した好塩基球もこれらのマーカーを発現している可能性がある²⁾。

今回の研究はこのような運動誘発症状を BAT によって予測できるか、さらに、アレルギー摂取後、及び運動誘発症状出現後の末梢血で生体内における活性化好塩基球を検出できるかどうかを検討する。つまり運動誘発症状にはアレルギー摂取後に生体内で *subclinical* な好塩基球活性化が存在し、運動によってこれが顕性化することを仮説とし、それを検証することを目的とする。

運動誘発症状を医療者側にも患者家族側にも負担の大きい運動誘発試験以外の方法で予測することができれば、食物アレルギー診療に大きな恩恵となる。また、運動誘発症状及び FDEIA の病態生理を解明することに寄与することも期待される。

また、食物アレルギー児に対する食事指導が、どの程度その後の耐性獲得誘導に効果があるのか、についてもこれまで論文としての報告は少ないため、貴重なデータとなり得ると考えた。

研究計画及び研究手法

<対象患児>

2018 年 4 月 1 日から 2019 年 1 月 31 日の間に運動誘発症状もしくは FDEIA が疑われるため当科

で運動誘発試験を施行した児を対象とした。対象者及び保護者に書面を用いた研究説明を行い同意が得られた児に対し以下の検討を行なった。

<方法>

運動負荷試験前に前腕に留置針を留置し、その際に全血 6 mL を採取した (sample 1)。抗原摂取を行い、摂取 30 分後にアレルギー症状が誘発されていないことを確認し、全血 4 mL を採取した (Sample 2)。その後患児の負荷に合わせて 2km 程度以上、15 分間以上のランニング(心拍数が持続的に 180/min 以上となるように負荷を調整)を施行した。運動後、再度全血 4 mL を採取した (Sample 3)。さらに、運動誘発症状を認めた患児に対しては運動誘発症状が最も強く出現していると考えられるタイミングでさらに全血 4ml を採取した (Sample 4)。誘発症状の重症度評価は Anaphylaxis Scoring Aichi を用いて行った。

採血後、好塩基球の反応を停止させる為、速やかに EDTA-2K を加えた。BAT 及び全血球計算 (CBC) 用の検体は常温で保管し、12 時間以内に Allergenicity kit® を用いて CD203c 及び CD63 を指標とした好塩基球の活性化を評価した。Sample 1 のうち約 2 mL を用いて抗原刺激を加えた BAT を施行し、Sample 1, 2, 3, 4 のうち約 2 mL を用いて抗原刺激を加えない状態で BAT を施行した。また、残りの検体を用いて、全血球計算を施行した。血漿ヒスタミン及びトリプターゼの測定用の検体は速やかに氷冷し、血漿分離後は-30 度で冷凍保存し、後日血漿ヒスタミン及びトリプターゼの測定を行なった。

運動誘発症状が認められた患児と認められなかった患児における、Sample 1 及び Sample 2 における無刺激状態での活性化好塩基球割合の差を評価した。また、対象患者の一部は経口免疫療法開始直前に別の臨床研究計画に基づき BAT を施行しているため、その BAT 結果を Sample 1 に抗原刺激を加えた BAT の結果と、運動誘発症状の有無別に比較検討した。

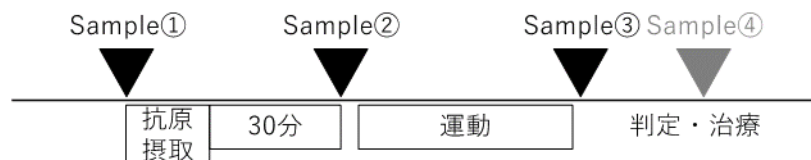
BAT は、代表者又は同施設のスタッフが藤田保健衛生大学の研究室で施行した。

本研究計画は、あいち小児保健医療総合センターの倫理委員会の承認後に実施された。

同意が得られる症例が当初の想定より少なく、また運動誘発試験陽性例も想定より少なかったが研究は概ね予定通りに行うことができた。

<研究のシェーマ>

Sample①: 抗原摂取前	: 全血 6mL採血(BAT, ヒスタミン, トリプターゼ, CBC)
Sample②: 抗原摂取終了30分後 (運動直前)	: 全血 4mL採血(BAT, ヒスタミン, トリプターゼ)
Sample③: 運動終了後(10分以内)	: 全血 4mL採血(BAT, ヒスタミン, トリプターゼ)
Sample④: 症状誘発時	: 全血 4mL採血(BAT, ヒスタミン, トリプターゼ)



<好塩基球活性化試験>

抗原刺激を加えた通常的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、各 sample 50 μ L に対し、活性化バッファー50 μ L、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)15 μ L、抗原液もしくは対照液 10 μ L を混和し 遮光下、37 $^{\circ}$ C で 15 分反応させた。抗原刺激は、卵 : QP15 (1000、10、0.1 μ g/ml)、牛乳 : スキムミルク (100、1、0.01 μ g/ml)、小麦 : Coca 抽出または PBS 抽出 (100、1、0.01 μ g/ml)、ピーナッツ (100、1、0.01 μ g/ml)、ゴマ (100、1、0.01 μ g/ml)の抗原濃度で行い、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 50 μ L を添加し反応を停止後、Fix and Lyse Solution 1mL 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 COULTERBeckman Coulter) で行い、その解析には Kaluza (BECKMAN COULTERBeckman 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 で同定した。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。

無刺激での活性化好塩基球の評価については、Sample 1 の陰性対照における CD203c 及び CD63 の上位 5%が活性化好塩基球となるような蛍光強度の基準を設定し、その基準を用いた Sample 2, 3, 4 における陰性対照の活性化好塩基球割合と比較することで評価した。

<抗原作成>

上記 BAT の抗原刺激で用いた抗原は以下のように作成した。

QP15：キューピー株式会社より提供を受けた QP15（15 分加熱卵白粉末）を 1.5mL テストチューブに 50mg ずつ分注。MCL1 とプロテアーゼのカクテル液を 1 本ずつ混和したものを各 1ml ずつ分注。振盪させて氷中で 15 分間反応させた。12,000G で 10 分遠心分離を行い、上清を集めたのちに、上清とエタノールを 9：1 の割合で混合し、-30℃で 1 日間静置した。その後上清は破棄し、しばらく蓋を開けてエタノールを気化させ、PBS に再浮遊させ、純水・PBS 各 2 日間での透析を行った。蛋白定量を行い 1.5mg/ml に調整したものを冷凍保存した。Skim Milk：精製水で溶解したものを蛋白定量し、精製水で 10mg/ml に調製して冷凍保存した。小麦（Coca 抽出）：小麦 1g と 50ml のジエチルエーテルを混和し、室温で 2 時間振盪。上清を破棄して得た脱脂小麦粉末 1g に対し Coca 液 10ml を混和し、室温で 48 時間攪拌した。（Coca 液：蒸留水 1L に対し、NaCl 5g、NaHCO₃ 2.75g、Phenol 4g を混合したもの）10,000G で 30 分遠心分離を行い、上清を集めたものをフィルターで分離し、PBS で透析、凍結乾燥したものを保存した。小麦（PBS 抽出）：小麦粉 0.5g を PBS10ml に溶解し、氷中に 2 時間静置した。その後遠心分離を行い、上清を集めたのちに蛋白定量を行い、PBS 抽出 0.86mg/ml に調整したものを冷凍保存した。ピーナッツ、ゴマ：乳鉢で擦ってバター状にした 50mg と MCL1 1ml を混和したものを氷中で 15 分間反応させた。12,000G で 10 分遠心分離を行い、上清を集めたのちに、上清とエタノールを 9：1 の割合で混合し、-30℃で 1 日間静置した。その後上清は破棄し、純水・PBS 各 2 日間での透析を行った。蛋白定量を行い 1.5mg/ml に調整したものを冷凍保存した。

<血漿ヒスタミン、トリプターゼ測定>

患者血液を採取後、すぐに氷冷した後に血漿を遠心分離し、-30℃で保存、後日株式会社 LSI メディエンスに委託し測定を行った。トリプターゼは 1.0µg/L が定量下限であり、1.0µg/L 未満については値を全て 1.0µg/L として扱った。血漿ヒスタミン及びトリプターゼの基準値は、それぞれ 0.15-1.23ng/mL、11.4µg/L 以下とした。既報³⁾に従い、ヒスタミンについては Sample 1 と比較して 180%以上の上昇を認めた場合に、トリプターゼは基準値以上となった場合に有意な上昇を認めたものと判定した。

<全血球計算>

全 23 人中 20 人に対して自動血球分析装置を用いた全血球計算を施行した。好塩基球数 150cells/µL 以上を好塩基球増多症と定義した⁴⁾

<急速経口免疫療法（ROIT）>

5 歳以上で、ROIT 開始前 6 ヶ月以内に、ゆで卵白 5g、牛乳 5ml、うどん 5g、ピーナッツ 3g、ゴ

マ 3g 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抗原摂取を開始し、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。ゆで卵白 40g、牛乳 200ml、うどん 200g、ピーナッツ 3g、ゴマ 3g を症状なく 3 か月以上摂取できた時点で、同量の抗原摂取後の運動誘発試験を行った。運動誘発試験陽性者は治療を継続し、1 年以上の間隔を開けて運動負荷試験を繰り返し行った。

結果と考察

<運動誘発試験結果>

2018 年 4 月 1 日から 2019 年 1 月 19 日に計 23 人を対象に摂取+運動誘発試験を施行した。試験施行の理由は ROIT 後 16 人、ROIT 以外の経口免疫療法後 4 人、FDEIA またはその疑いが 3 人であった。抗原は卵 2 人、牛乳 11 人、小麦 8 人、ピーナッツ・ゴマ各 1 人であった。試験時の抗原摂取量は、各抗原の日常摂取量（ゆで卵白 40g、牛乳 200ml、うどん 200g、ピーナッツ 3g、ゴマ 3g）であったものが、卵 2 人、牛乳 9 人、小麦 6 人、ピーナッツ 1 人、より大量に摂取したものが牛乳 2 人（350ml 1 人、400ml 1 人）、小麦 1 人（うどん 400g）、ゴマ 1 人（4g）であった。対象患児の年齢は、中央値 12.4 歳（範囲：8.3-15.0 歳）、性別は男児 19 人、女児 4 人であった。

運動誘発試験結果は、陽性 11 人（卵 2 人、牛乳 4 人、小麦 5 人）、陰性 12 人であった。陽性者 11 人の症状は、皮膚症状 8 人（72.7%）、呼吸器症状 6 人（54.5%）、消化器症状 1 人（0.91%）、神経症状 2 人（18.2%）であった。アナフィラキシーを 3 人（27.2%）に認めたが、アナフィラキシーショックを認めた児はいなかった。薬物治療を要した児は 5 人で、使用した薬剤は抗ヒスタミン薬 3 人、 β 刺激薬吸入 3 人、ステロイド内服 2 人、アドレナリン吸入 1 人であった。

<全血球計算>

Sample 1 と比較して Sample 3 では白血球数の増加が認められた。Sample 1 で好塩基球増多は認められず、Sample 1 と比較して Sample 2-4 において好塩基球数に明らかな変化を認めなかった。

<好塩基球活性化試験>

抗原刺激を行わない条件では、運動負荷試験陽性者陰性者共に Sample 1 と Sample 2 における活性化好塩基球割合の差、また平均蛍光強度 (MFI) の差に、有意な変化を認めなかった。Sample 1 と Sample 3、4 との比較においても同様であった。

ROIT 開始直前に別の臨床研究目的に BAT を施行していた本研究の対象患児は計 5 名 (牛乳 3 名、ピーナッツ 1 例、ゴマ 1 例) であった。全ての患児において抗原刺激による CD203c 及び CD63 発現量の低下を認めた。運動誘発試験結果は、陽性 1 人 (抗原: 牛乳)、陰性 4 人であったが、試験陽性者は ROIT 前と比べて好塩基球活性化割合が最も低下した児であった。

<血漿ヒスタミン、トリプターゼ>

Sample 1 におけるヒスタミン値の中央値は 1.76ng/mL で、21 人が摂取前の時点で基準値よりも高値であったが、運動誘発試験陽性者 (中央値 1.96ng/ml ; 範囲 0.93-2.94) と陰性者 (中央値 1.66ng/ml ; 範囲 0.89-2.82) とでは有意な差を認めなかった ($p=0.497$)。Sample 2 では、陽性者・陰性者ともに Sample 1 と比較して 180%以上の有意な上昇を認めた者はいなかった。Sample 3、4 では Sample 1 と比較して 180%以上の有意な上昇が 2 例に認められた。この 2 例は陽性者の中で誘発症状の重症度の最も高い症例と 3 番目に高い症例であった。

全対象者における Sample 1 におけるトリプターゼ値の中央値は $2.3 \mu\text{g/L}$ であり、運動誘発試験陽性者 (中央値 $2.65 \mu\text{g/l}$; 範囲 1.5-3.7) と陰性者 (中央値 $2.15 \mu\text{g/l}$; 範囲 1.0-4.5) との間に有意な差を認めなかった ($p=0.262$)。また Sample 1-4 の全ての検体で基準値以上のトリプターゼは検出されなかった。

<まとめと考察>

採血後に抗原刺激を行わない状態の末梢血好塩基球は、運動誘発症状を呈する患児でも抗原摂取後運動前の活性化は認められず、また運動誘発症出現時の活性化も認められなかった。これらのことから、運動誘発症状には末梢血好塩基球が関与しない可能性が考えられた。また急速経口免疫療法施行後の患児では、治療開始前と比較して全例において抗原刺激による好塩基球活性化割合の低下を認めたが、最も低下の程度が大きかった患児に運動誘発症状が認められた。このことから運動誘発症状には末梢血好塩基球を介さない機序が働いていることが示唆された。また BAT の結果は運動誘発症状の予測として有用ではないと考えられた。これらは新たな知見である。

BAT の他に検討を行った末梢血好塩基球数、血漿ヒスタミン値、血漿トリプターゼ値は運動誘発試験陽性者と陰性者との間に明らかな差を認めず、これらの結果も運動誘発症状の予測として有用ではないと考えられた。

全体の症例数（運動誘発試験陽性 11 例）が少ないこと、アナフィラキシーを認めた症例はさらに少ない（3 例）こと、重篤な症状を認めた症例に対して行ったステロイド投与の影響が否定できないこと等が今回の検討の限界である。

<残された課題>

既報 2) では、即時型反応出現時に末梢血好塩基球の活性化が認められる症例が多かったが、我々の方法において、即時型反応出現時にどの程度の割合の患児の末梢血好塩基球活性化を検出可能かという評価が不十分である。また研究参加症例数が想定より少なかったこともあり、重症例の評価が十分とは言えない。これらは今後の課題である。

また今回の検討から運動誘発症状に好塩基球が関与しない可能性、ヒスタミンやトリプターゼも大きく上昇しないことが示されたが、その他の病態生理に関しては検討ができていない。運動誘発症状の病態生理解明に関する検討は今後の大きな課題である。

<発表予定>

今回の検討結果は平成 31 年 6 月に開催される第 68 回日本アレルギー学会学術大会において、演題名「アレルゲン摂取後の運動誘発における生体内好塩基球活性化の検出に関する検討」で、代表者と同施設のスタッフが発表予定である。また現在、英語論文の執筆中である。

今後の研究活動について

運動誘発症状に関する臨床的な診断、検討は継続して行う予定である。病態生理の解明に関する検討には予算と人員が必要である為、現時点で研究予定はない。

参考文献

- 1) Manabe T, Oku N, Aihara Y. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis in Japanese elementary school children. *Pediatr Int. Apr*;60(4):329-333
- 2) Commins SP, James HR, Stevens W, Pochan SL, Land MH, King C, Mozzicato S, Platts-Mills TA. Delayed clinical and ex vivo response to mammalian meat in patients with IgE to galactose-alpha-1,3-galactose *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jul;134(1):108-15.
- 3) 相原雄幸. 食物依存性運動誘発アナフィラキシー. *アレルギー* 2007 ; 56 (5) :451-456.
- 4) 本間健一. 好塩基球増多, 単球増多, 単球欠損など. *小児内科* 2016 ; 48 (7) :979-983.

以上