

2019 年度研究助成事業

成果報告会 要旨集



2020 年 10 月 13 日（火）

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2019年度研究助成事業 成果報告会

第一部 個人研究助成 成果報告会 プログラム

報告者：2019年度研究助成事業 個人研究採択者

報告資料のWeb公開：2020年10月9日（金）より

Web会議：13時45分～14時45分（報告者がWeb上で質疑応答、情報交換を行う時間）

Web 会議 番号	課題名	所属機関・氏名	要旨 集頁
2019 _01	HACCP 導入に向けた抗体精密整列化技術による食物アレルギーの超高度検出法の開発	東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科 准教授 飯嶋益巳	5
2019 _02	工場内におけるアレルギー感作評価が可能なペプチドビーズを用いた簡易検査法の開発	甲南大学フロンティアサイエンス 学部 准教授 臼井健二	6
2019 _03	血清 microRNA を用いた好酸球性食道炎の新規バイオマーカーの確立	国立病院機構 浜田医療センター 消化器内科 医長 大嶋直樹	7
2019 _04	食物アレルギー対応食品製造のための新しい高圧噴霧技術の開発	東北大学大学院環境科学研究科 准教授 大田昌樹	8
2019 _05	水溶解メラニンによるアナフィラキシー応答制御と作用機序の解明	中部大学 准教授 川本善之	9
2019 _06	家塵中の鶏卵抗原と鶏卵アレルギー発症の関連の解明	山梨大学大学院 総合研究部医学 域 社会医学講座 助教 小島令嗣	10
2019 _07	3 型自然リンパ球を利用した新規食物アレルギー予防法の開発	九州大学 生体防御医学研究所 システム免疫学統合研究センター 粘膜防御学分野 教授 澤 新一郎	11
2019 _08	メイラード反応が甲殻類アレルギーの消化・吸収性へ及ぼす影響の解明	北海道大学 大学院水産科学研究 院 技術専門職員 清水裕	12
2019 _09	食物アレルギーに対するカンナデンプンの予防効果	中部大学応用生物学部食品栄養科 学科 講師 田中 守	13
2019 _10	花粉-食物アレルギー症候群に対するシラカバ花粉免疫療法の有効性と安全性の検証	神奈川県立こども医療センター アレルギー科 医長 津曲俊太郎	14
2019 _11	LC-MS/MS を用いた特定原材料のアレルギーおよび品種判別同時分析法に関する研究	岐阜県保健環境研究所 専門研究員 永井宏幸	15
2019 _12	重症鶏卵アレルギー児に対する経口免疫療法ランダム化比較試験：炒り卵 vs 加熱卵粉末	国立病院機構相模原病院小児科 医師 永倉顕一	16
2019 _13	低アレルギー化食品を用いた魚アレルギーに対する新規治療法の開発	藤田医科大学医学部小児科 講師 中島陽一	17
2019 _14	乳児期のビタミン D 投与によるアレルギー予防に関する研究開発	千葉大学医学部附属病院 小児科 助教 中野泰至	18
2019 _15	鶏卵アレルギー除去卵の作出	北海道大学大学院理学院 生物科学部門 助教 水島秀成	19
2019 _16	重症消化管アレルギーの病態解明	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 室長 森田英明	20

※50 音順・敬称略

2019年度研究助成事業 成果報告会

第二部 共同研究助成 口頭成果報告会 プログラム

日時：2020年10月13日（火） 15時00分より

場所：AP品川アネックス 1階 A+B ルーム

報告者：2019年度研究助成事業 共同研究採択者

15:00 開会挨拶

15:05～15:25

食物アレルギーにおける免疫記憶の機序解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
安達 貴弘
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 准教授

15:25～15:45

重症食物アレルギーに対する経皮免疫療法の実用化に向けた非臨床・臨床 POC データセットの取得・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
岡田 直貴
大阪大学大学院 薬学研究科 教授

15:45～16:05

ソバアレルギーの特性改変に効果的な手法の探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45
佐藤 里絵
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

-----（休憩） 16：05 から 16：20-----

16:20～16:40

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51
水野 雅史
神戸大学大学院 農学研究科 教授

16:40～17:00

食物アレルギー診断技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 60
村田 幸久
東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 准教授

17:00～17:20

ω -5 グリアジン欠損食用小麦の開発： ω -5 グリアジン感作型小麦アレルギーの根絶に向けて・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 67
森田 栄伸
島根大学 医学部 皮膚科学講座 教授

17:20 閉会挨拶

17:25 写真撮影

評議員・役員・研究助成委員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・75

当財団案内・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・77

2019年度研究助成事業 個人研究助成

〈Webサイト上での報告〉

要旨

※報告書全文は当財団Webサイトに掲載予定

研究課題名	【Web 会議番号 2019_01】 HACCP 導入に向けた抗体精密整列化技術による食物アレルギーの超高感度検出法の開発
フリガナ	イイジマ マスミ
代表者名	飯嶋 益巳
所属機関（機関名） （役職名）	東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	日本農芸化学会 2019 年度大会（2 件）

研究結果要約

食品製造現場等において HACCP（Hazard Analysis and Critical Control Point）の導入が義務化され、食物アレルギーなどの様々な危害因子を、誰でも簡単に、迅速に、感度良く測定できる技術が求められている。特に enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)は広く利用されるが¹⁾、一般的に抗体は希少で高価なものも多いため、使用量を可能な限り少なくし、無駄なく抗原抗体反応に供して高感度化を図る技術開発が急がれる^{2,3)}。近年我々は、B 型肝炎ウイルス外皮 L タンパク質の N 末端領域の一部を、protein A 由来 IgG-Fc 結合ドメイン 2 量体に置換した ZZ-L タンパク質とリン脂質二重膜から形成される直径約 30 nm の ZZ タグ提示型バイオナノカプセル(ZZ-BNC)を作製した²⁾。そして ZZ-BNC が、抗体および Fc 融合受容体のクラスター化と精密整列化を同時に達成できる足場分子であり、各種バイオアッセイの感度を著しく上昇できることを報告した²⁻¹⁰⁾。本研究は、ZZ-BNC の特性を用いて極微量の食物アレルギーをワンステップで超高感度に、安価に検出可能な新規の測定法を開発し、HACCP の迅速化、低コスト化を目指した。まず、市販の食物アレルギー検出 ELISA キットに ZZ-BNC を添加するだけで、従来法の高感度化および抗体使用量の低減を可能にした。さらに、固相化食物アレルギーを検出するイムノスティック法を構築し、ZZ-BNC を使用すると発色強度が増幅し、約 1 時間での簡易検査法として有効なことを示した。今後は、本法を様々な抗原の高感度及び簡易検出技術として展開し、食品分野のブレイクスルーを目指していきたい。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_02】 工場内におけるアレルギー感作評価が可能なペプチドビーズを用いた簡易検査法の開発
フリガナ	ウスイ ケンジ
代表者名	臼井 健二
所属機関（機関名） （役職名）	甲南大学フロンティアサイエンス学部 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	[学会発表] 「官能基指示薬とペプチド固定化マイクロビーズを用いた皮膚感作性検出システムの確立」日本動物実験代替法学会第 32 回大会，つくば市(2019.11.20-22) 「A chromophore-immobilized peptide binding assay for assessing skin sensitization in vitro」第 56 回ペプチド討論会，東京(2019.10.23-25) 他 2 件 [論文発表] "Development of a chromophore-solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) for assessing skin sensitization in vitro", Analyst, 2020, 145, 3211-3216 ※中裏表紙掲載 他 1 報投稿中

研究結果要約

食の安全が重要視されている現在、工場内における生産機器、容器、食品添加物、食品開発段階の材料などによるアレルギー発症や、アレルギー悪化リスクの防止は、開発・生産において重大課題となる。開発・生産におけるアレルギー感作試験においては、動物実験に頼らざるを得ないのが現状であるが、倫理的観点、コスト、簡便さなどから動物実験代替法が求められつつある。皮膚感作性試験代替法の一つである、DPRA 法は食品開発・生産分野においても極めて有効な手法であると考えられる。しかしながら、油性物質などの難水溶性物質を評価できない、操作が煩雑などの問題点も多い。そこで我々はこれまで、分光技術とペプチド工学技術を融合させた様々な物質、物体の簡便な感作性試験法（C-SPRA 法）の構築を行ってきた。本助成研究では、未だ基礎的なシーズである本感作性試験法を食品業界に幅広く適用できる汎用性の高い手法へと発展させることを目指した。具体的には、より簡便な方法として磁性ビーズを用いた本手法の改良法の確立、微量吸光測定によるさらなる高効率手法の検討、本システムの工場内使用へ向けた研究を行うための具体的な計画立案を行った。今後は、企業や他分野研究者と共同し、実際の器材、部品を使った付着物の回収、濃縮、測定手法の確立、ロボットによる自動化を行い、実用化・商品化・適用範囲の拡大をさらに進めていきたい。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_03】 血清 microRNA を用いた好酸球性食道炎の新規バイオマーカーの確立
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）	国立病院機構 浜田医療センター 消化器内科 医長
本助成金による発表論文，学会発表	2019/06 第 97 回日本消化器内視鏡学会 ワークショップ 7：消化器内視鏡診療におけるトランスレーショナルリサーチ 「 microRNA の網羅的解析を用いた好酸球性食道炎のバイオマーカーの探索」 他 1 報投稿中

研究結果要約

好酸球性食道炎（EoE）は遅延型食物アレルギーの一つであり、食道粘膜に多数の好酸球が浸潤し慢性炎症が惹起される病態である。近年、患者数は急激に増加傾向であるが、診断、治療に関しては未だ確立されていない部分が多い。これまでに、我々は食道粘膜局所における **microRNA**（**miRNA**）に着目し、内視鏡下に生検した食道粘膜の網羅的解析を行うことによって、欧米との発現プロファイルの相違やどのように病態形成に関与しているのかを明らかにしてきた。

そこで、本研究では未治療の EoE 患者を対象に、血清 **miRNA** 発現を網羅的に解析し、非侵襲的なバイオマーカーになり得るのかを検討した。その結果、粘膜局所と同様に血清においても EoE 患者とコントロールの間で明確な **miRNA** 発現パターンの相違を認め、**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、本邦と欧米で人種差はなく同一の機序である可能性を示すものであった。加えて、特定の **miRNA** は EoE の診断や治療における非侵襲的なバイオマーカーの候補となり得るものであった。しかしながら、食道粘膜での **miRNA** 発現プロファイルとの類似性は認めなかった。以上の結果から、本研究により EoE 患者における血清 **miRNA** 発現の意義を示すことができた。

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団
2019 年度研究助成事業 個人研究助成 成果報告要旨

研究課題名	【Web 会議番号 2019_04】 食物アレルギー対応食品製造のための新しい高圧噴霧技術の開発
フリガナ	オオタ マサキ
代表者名	大田 昌樹
所属機関（機関名） （役職名）	東北大学大学院環境科学研究科 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	[1] 大田昌樹*，天然物抽出分離のための高圧二酸化炭素の応用，化学工学会東北支部ニュースレター, (2020) 印刷中 [2] 大田昌樹*，自然環境に順応する化学工学テクノロジーの創製，東北大学大学院環境科学研究科ニュースレター, 21 (2020).印刷中 [3] 大田昌樹*，自然環境に順応する化学工学テクノロジーの創製，東北大学大学院環境科学研究科アクティビティレポート 2019, (2020).印刷中

研究結果要約

食物アレルギー対応食品への消費者のニーズは高く、これに応えるべくアレルギー低減化食品、ひいてはアレルギー除去食品の開発に期待が高まっている。このようなニーズに応えるべく合目的な方法論の開拓を目指し、本申請では、高圧流体を用いた噴霧技術によるせん断力を応用した新しい工学的アプローチを採用し、特に液体試料（牛乳）の低アレルギー化ないしアレルギー除去に挑戦した。

まず、合目的な機能を保持する高圧二酸化炭素を用いた噴霧実験装置の開発に着手した。当該装置の構成は、高圧二酸化炭素供給部、牛乳などを想定した液体原料供給部、さらにはこれらの流体を混合する混合部、さらには急減圧を可能とする背圧弁システムとした。このとき、混合流体の温度制御も可能とする仕様とした。トラップは室温で保持し、背圧弁から連続的に吐出される仕組みを採用した。結果として、高圧二酸化炭素噴霧によるせん断場の付与に成功し、25℃にて牛乳中ガゼインを約 10%低減することができた。さらに低温での噴霧を採用することにより噴霧時の氷結効果が予想され、これによるアレルギー物質のさらなる低分子断片化効果の獲得が期待できる。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_05】 水溶解メラニンによるアナフィラキシー応答制御と作用機序の解明
フリガナ	カワモト ヨシユキ
代表者名	川本 善之
所属機関（機関名） （役職名）	中部大学 准教授
本助成金による発表論文、学会発表	現在、国際誌への論文投稿準備中である。

研究結果要約

天然化合物であるメラニンは、あらゆる溶媒に不溶であることが知られているが、申請者は水溶性のメラニン合成法を独自に開発し、これがマスト細胞の脱顆粒反応を強力に抑制することを初めて見出した。メラニンは食材にも使われるイカ墨色素の主成分でもあり、自然界にありふれた色素性物質である。抗原特異的 IgE 抗体を腹腔内投与して強制的に感作したマウスに対し、水溶解メラニンをゾンデ投与により服用させた後に抗原を腹腔内投与したところ、全身性アナフィラキシー応答が有意に抑制される知見を得た。このように、水溶解メラニンは新規の抗アレルギー剤として利用できる可能性があると考えられた。そこで本研究は、水溶解メラニンによる食物アレルギー応答の重症化軽減およびアレルギー感作予防の効果の有無を検証し、そのメカニズムの解析と解明を目的として研究を進めた。

オボアルブミンによる食物アレルギーモデルに対して、水溶解メラニンを 1. 抗原感作期間のみ 2. 抗原負荷期間のみ 3. 抗原感作および負荷期間 に投与した群を作成し、比較した。その結果、水溶解メラニンを抗原負荷期間のみに投与した群で有意なアナフィラキシーの抑制効果が見られた。今回の検討で、水溶解メラニンは抗原負荷時における免疫応答を負に制御し、食物アレルギーの重症化抑制に寄与する可能性が示唆された。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_06】 家塵中の鶏卵抗原と鶏卵アレルギー発症の関連の解明
フリガナ	コジマ レイジ
代表者名	小島 令嗣
所属機関（機関名） （役職名）	山梨大学大学院 総合研究部医学域 社会医学講座 助教
本助成金による発表論文，学会発表	未

研究結果要約

近年、食物アレルギーの発症に関して二重抗原曝露仮説が発表され、「食物抗原の経皮感作は食物アレルギー発症につながる」可能性がある。本研究は家塵中鶏卵抗原量の予測因子を明らかにし、また家塵中鶏卵抗原量が鶏卵アレルギーの発症と関連しているかを明らかにすることを目的とする。山梨県のエコチル調査の 6 歳時詳細調査に参加する児を対象とし、屋内の清掃頻度や鶏卵摂取頻度に関する質問票調査を実施した。さらに 2 週間の家塵中の鶏卵抗原を ELISA 法で測定し、家塵中の鶏卵抗原量の予測式を作成した。2020 年 4 月現在、102 名から同意が得られ、その内 98 名から家塵の回収し、87 名に対し ELISA 法による鶏卵抗原量測定が完了した。総鶏卵抗原量 (μg) の中央値は、1882.1 (範囲 10.1～31294.0) であった。87 名の内、6 歳現在も鶏卵アレルギーがある者は 2 名、過去に鶏卵アレルギーがあった者は 11 名であった。重回帰分析の結果、統計学的有意差はつかなかったものの、総鶏卵抗原量の予測要因として、卵摂取頻度と同居人数が関連している傾向がみられ、卵摂取頻度が多い場合や同居人数が多い場合に、総鶏卵抗原量が多い傾向がみられた。6 歳児の詳細調査の完了 (2020 年 10 月) を待って最終的な鶏卵抗原量を予測するモデルを構築し、その予測式を用いて乳幼児期の家塵中の鶏卵抗原量を予測し、それが鶏卵アレルギーの発症と関連しているかを検証する予定である。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_07】 3 型自然リンパ球を利用した新規食物アレルギー予防法の開発
フリガナ	サワ シンイチロウ
代表者名	澤 新一郎
所属機関（機関名） （役職名）	九州大学生体防御医学研究所 教授
本助成金による発表論文，学会発表	

研究結果要約

腸管制御性 T 細胞（Treg）の維持は腸管免疫寛容の成立と食物アレルギーの予防に極めて重要であるが、腸管 Treg の分化、維持を担う分子基盤は完全には解明されていない。近年、腸管内に同定された 3 型自然リンパ球（ILC3）による腸管免疫恒常性維持機構が注目されている。Csf2 遺伝子にコードされたサイトカイン、GM-CSF は腸管において ILC3 や Th17 細胞から分泌され、骨髄球系細胞の分化を介して腸管 Treg の維持に重要な役割を果たすことが報告されている。

本研究では、ILC3 が産生する GM-CSF の役割を解明するために、① ILC3 特異的な GM-CSF 欠損マウスの作成を試み、②腸管免疫寛容の成立に果たす ILC3 由来 GM-CSF の役割を検討し、③食物アレルギーの予防への GM-CSF の利用可能性を計画した。

これらの研究目標を達成するため、まずゲノム編集により作成した Csf2^{flox} マウスおよび KLRp1bCre-P2A-EBFP2/+ ノックインマウスを用いて ILC3 特異的に GM-CSF 発現を欠損する KLRp1b-ΔCsf2 マウスを作成した。若齢の KLRp1b-ΔCsf2 マウスは対象群同様の体重増加が観察されたが、20 週齢以上の加齢マウスにおいては対象群の 25%に相当する体重減少が観察された。一方、8 週齢の KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおいて、Th17 細胞の減少が観察され始め、20 週齢においてより顕著な減少を認めた。一方、予想に反し、大腸、小腸ともに KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおける Treg 数の低下は観察されなかった。

現在、GM-CSF 欠損による Th17 細胞の低下が腸管バリア機能を低下させ、腸管 Dysbiosis を引き起こすのではないかと仮説を立て、加齢 KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおける体重減少の原因解明を骨髄球系細胞分化と腸管細菌叢の変容という観点から引き続き解析を行っている。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_08】 メイラード反応が甲殻類アレルゲンの消化・吸収性へ及ぼす影響の解明
フリガナ	シミズ ユタカ
代表者名	清水 裕
所属機関（機関名） （役職名）	北海道大学 大学院水産科学研究院 技術専門職員
本助成金による発表論文，学会発表	令和 2 年度日本水産学会春季大会 （ただし、COVID-19 の影響により大会が中止となったため、要旨掲載のみ）

研究結果要約

本研究グループでは、水産甲殻類（カニ・エビ）の主要アレルゲンであるトロポミオシン（TM）のアレルゲン性に及ぼすメイラード反応（タンパク質と還元糖との縮合反応、調理加工中に頻繁に起こる）の影響について、消化・吸収性の観点から検証を進めている。本研究では、メイラード反応が TM の吸収性に及ぼす影響について、マウスを用いた動物実験によって検証した。

まず、精製した TM からグルコースとのメイラード反応物（TM-G）を調製した。次に、TM と TM-G をマウスへ経口投与した後、尾部静脈から継時的に採血し、TM と TM-G の血漿中濃度を定量することで、メイラード反応が TM の吸収性に与える影響について検討した。その結果、TM 投与後 15 分で 74.8 ± 61.5 ng/ml、30 分で 36.0 ± 20.2 ng/ml (n=6) の TM が検出された。同様に TM-G でも、15 分で 11.1 ± 14.8 ng/ml、30 分で 4.26 ± 2.77 ng/ml (n=6) が検出された。両者間の有意差は確認できなかったが、TM の吸収量が TM-G よりも多くなる傾向が見られた。また、同じ血清をイムノブロットに供したところ、TM 投与個体では未消化の TM が確認されたが、TM-G 投与個体からは未消化の TM-G は確認できなかった。以上の結果から、TM は未消化状態で吸収されるが、その吸収はメイラード反応によって阻害される事が唆された。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_09】 食物アレルギーに対するカンナデンプンの予防効果
フリガナ	タナカ マモル
代表者名	田中 守
所属機関（機関名） （役職名）	中部大学応用生物学部食品栄養科学科 講師
本助成金による発表論文，学会発表	現時点ではなし。

研究結果要約

これまでに私は食用カンナデンプンの摂取がマウスの消化管においてムチンや IgA を増加させること、盲腸中の乳酸や酪酸、酢酸など短鎖脂肪酸の産生を増加させることを明らかにしてきた。これらの結果は、大腸の制御性 T 細胞の誘導を促す可能性が示唆され、I 型アレルギーの予防・改善に有効であることが期待される。本研究では、I 型アレルギーモデルマウスを用いて、食物アレルギーに対するカンナデンプンの予防効果を明らかにすることを目的とした。5 週齢の BALB/c 雌マウスを Control 群、OVA 群、OVA-Canna 群の 3 群に分け、OVA-Canna 群には 10% のカンナデンプンを添加した AIN-93G を 5 週間摂取させた。また、OVA 群、OVA-Canna 群には OVA を含むアジュバントを腹腔内に投与し、感作マウスを作製した。評価項目としては、アナフィラキシー症状、アレルゲン吸収量、全身性免疫の指標として血清中の抗体産生能、消化管免疫の指標として糞中の IgA およびムチン含量、腸内環境の指標として盲腸内容物中有機酸を評価した。結果、カンナデンプンの継続摂取は、マウスのアナフィラキシー症状を抑制することが明らかとなった。アレルゲン吸収量、血清中抗体産生能、盲腸内容物中有機酸に差は認められなかったものの、糞中の抗原特異 IgA やムチン含量の増加が認められた。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_10】 花粉・食物アレルギー症候群に対するシラカバ花粉免疫療法の有効性と安全性の検証
フリガナ	ツマガリ シュンタロウ
代表者名	津曲 俊太郎
所属機関（機関名） （役職名）	神奈川県立こども医療センター アレルギー科 医長
本助成金による発表論文，学会発表	・ KAAACI-KAPARD-WPAS-INTERASMA Joint Congress 2019.5.10-11 ソウル 「 Evaluation of the dose effect of birch pollen-based subcutaneous immunotherapy for apple allergy. 」 ・ 第 68 回日本アレルギー学会学術大会 2019.6.14-16 東京 「花粉・食物アレルギー症候群に対するシラカバ花粉皮下免疫療法におけるアレルゲン投与量の検討」

研究結果要約

カバノキ花粉などによって誘発される花粉・食物アレルギー症候群(pollen-food allergy syndrome; PFAS)では、果物摂取に伴う口腔内症状を呈し、患者数も増加している。花粉抗原を用いたアレルゲン免疫療法で PFAS の改善も期待できると理論的には考えられるが、治療効果はまだ明らかではない。さらに、治療効果の長期予後も明確でない。我々は先行研究でシラカバ花粉皮下免疫療法の 1 年後における有効性を報告したが、本研究ではその長期的な予後因子を探索し、特にアレルゲン維持投与量と臨床症状の改善および免疫学的パラメータとの関連性について評価することでより適切な治療プロトコルを確立することを目的とした。

本助成研究期間内に 20 名の患者について治療開始 2 年経過時点での評価を行った。アレルゲン投与量により高用量群(1:200 w/v 0.15ml 以上)8 名と低用量群(1:200 w/v 0.15ml 未満)12 名の 2 群で比較検討した。臨床症状の変化は両群で差は認めなかったが、シラカバ花粉およびリンゴの特異的 IgG4 値は高用量群のほうが高い傾向を示した。このことは、アレルゲン免疫療法において主な IgE 阻害因子として作用すると考えられている特異的 IgG4 抗体が高用量で治療したほうがより有効に産生されることを示唆しており、免疫学的には 1:200 w/v 0.15ml 以上がアレルゲン投与量として適切であると考えられた。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_11】 LC-MS/MS を用いた特定原材料のアレルゲンおよび品種判別同時分析法に関する研究
フリガナ	ナガイ ヒロユキ
代表者名	永井 宏幸
所属機関（機関名） （役職名）	岐阜県保健環境研究所 専門研究員
本助成金による発表論文、学会発表	第 56 回全国衛生化学技術協議会年会 「安定同位体標識合成ペプチドを活用したアレルギー物質の LC-MS 分析法の開発」

研究結果要約

甲殻類アレルゲンについて、甲殻類トロポミオシンに共有して存在する ADTLEQQNK、SLSDEER、FLAEEADR らをマーカーペプチドとして LC-MS/MS で分析したところ、ほぼ全ての甲殻類でピークを検出することができた。また、食物アレルゲン検査法としての確立を目指して、感度が高く安定して検出される FLAEEADR の合成ペプチドと比較して分析したところ、抽出タンパク質と同じリテンションタイムにピークが検出され、食物アレルゲンについて合成ペプチドを標準品とした分析法が可能であることが示唆された。また、食物アレルゲンの規制対象にないシャコに特異的なペプチド A、ペプチド B、食材偽装に使われたクルマエビに特異的なペプチド C を見出し、合成品を標準として、各種甲殻類抽出液を比較分析したところ、ペプチド A についてはシャコとオキアミ、ペプチド B についてはシャコと同じ配列を有するイセエビのみ、ペプチド C についてはクルマエビおよびシバエビから検出され、オキアミとシバエビ以外はデータベース配列の理論通りに検出できることが分かった。同様の手法でアーモンド、カシューナッツ、ブラジルナッツなど種実類についても特異的ペプチドを見出し、合成ペプチドを標準品とした分析手法を作成した。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_12】 重症鶏卵アレルギー児に対する経口免疫療法ランダム化比較試験：炒り卵 vs 加熱卵粉末
フリガナ	ナガクラ ケンイチ
代表者名	永倉 顕一
所属機関（機関名） （役職名）	国立病院機構相模原病院小児科 医師
本助成金による発表論文，学会発表	当初の計画通りに研究開始 12 ヶ月時までのフォローを実施して評価完了後は、日本アレルギー学会、日本小児アレルギー学会、世界アレルギー学会、ヨーロッパアレルギー学会での学会発表、Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice、Pediatric Allergy and Immunology、Allergology International への論文投稿を予定している。

研究結果要約

<背景>

重症鶏卵アレルギー児は耐性獲得しにくく、既存の経口免疫療法(OIT)より安全な OIT の確立が望まれている。

<目的・方法>

安全かつ効率的な OIT の確立を目的として「加熱鶏卵粉末を用いた OIT で脱感作へ導入しその後炒り卵を用いた OIT へ変更すると、より安全かつ効率的に耐性獲得へ誘導できる」と仮説を立てた。対象を炒り卵群 or 鶏卵粉末群に無作為に分け、主要評価項目を 12 ヶ月時の耐性獲得とした。

<結果>

2019 年 6 月までに研究体制の整備、倫理委員会の承認、UMIN 登録を終了し、2019 年 7 月から症例登録を開始した。2020 年 4 月時点で 13 例（炒り卵群：6 例、鶏卵粉末群 7 例）を登録しフォロー中（フォロー期間 0-6 ヶ月）である。研究開始時の年齢（炒り卵群 vs 鶏卵粉末群、以下中央値）は 7.8 歳 vs 8.8 歳、鶏卵アナフィラキシーの既往は 100% vs 71%、卵白/卵黄/オボムコイド特異的 IgE 値は 38.9/17.5/21.0 kUA/L vs 12.1/5.4/9.2 kUA/L であった。炒り卵群は全例が炒り卵の初回摂取を無症状で完了した。現時点でフォロー出来ている範囲での自宅での副反応の頻度は、中等症は 1.3% vs 0%、重症は 0%であった。重篤な有害事象、脱落は両群ともに 0 例であった。

<今後の予定>

当初の計画通りに研究継続し、目標症例(46 例)に向けて新規登録を継続する。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_13】 低アレルゲン化食品を用いた魚アレルギーに対する新規治療法の開発
フリガナ	ナカジマ ヨウイチ
代表者名	中島 陽一
所属機関（機関名） （役職名）	藤田医科大学医学部小児科学 講師
本助成金による発表 論文，学会発表	未

研究結果要約

複数の魚に症状をきたす魚アレルギー患者では魚全般の除去を指示される場合もある。魚はビタミン D の主要な供給源であり、魚アレルギー患者が摂取可能な魚種を増やすことは栄養面で重要と考えられる。魚アレルギーは卵や小麦、乳などと比べて自然耐性を獲得しにくいとされており、多魚種にアレルギーがある重症な患者では治療的介入が必要と考えている。

食物アレルギーの治療である経口免疫療法は、有効であるが安全性の問題が解決されていない。より安全な治療をめざし、世界に先がけて独自の酵素処理で低アレルゲン化した魚肉粉末を開発した。魚アレルギー患者 7 名に使用し安全で有効な結果を得ている。本研究ではこの治療を用いた多施設共同ランダム化プラセボ比較試験を行い、安全で有効な魚アレルギー治療法であることを証明することを目的とした。我々の治療法は、日々の予想外の副反応の危険を恐れながら経口免疫療法を行っている食物アレルギー患者にとって、患者・家族の負担を減らす画期的な方法である。また、アレルゲンの交差性からサケによる治療にて、他の魚の摂取も可能となりうる。

全国の 10 施設で患者登録がされ、治療が開始されたのが 8 例で、2 例が 6 か月のランダム化比較試験を終了した。1 例は味の好みの問題で治療継続を中止したが、ほか 7 例は大きな副反応を起こすことなく治療が継続できている。治療効果については比較試験の途中であるためまだ公表できない。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_14】 乳児期のビタミン D 投与による食物アレルギー予防に関する研究
フリガナ	ナカノ タイジ
代表者名	中野 泰至
所属機関（機関名） （役職名）	千葉大学医学部附属病院小児科 助教
本助成金による発表 論文，学会発表	Risk factors of pediatric allergic diseases. Insights from birth cohort study in Chiba, Japan. Taiji Nakano DGAKI-JSA Joint Meeting, November 29 – 30, 2019, Frankfurt, Germany MicroRNA in pediatric allergic diseases. Taiji Nakano Annual Congress of Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease (KAPARD). Special Lecture (KAPARD-JSPACI Speaker-Exchange Program) Oct, 25, 2019, Seoul, Korea

研究結果要約

国内外の疫学調査から母体・乳児のビタミン D(VD)欠乏の頻度が多く、VD 低値が食物アレルギー感作及び食物アレルギー発症に深く関与する可能性が示唆されている。そこで本研究では出生早期から乳児に VD を経口的に摂取してもらい、VD が感作・アレルギーを予防できるかを検証することを目的として、VD シロップ及びプラセボを用いた無作為ランダム化比較試験を計画した。各グループ 150 名ずつ合計 300 名を予定としている。2018 年 10 月中旬からリクルートを開始し、2020 年 8 月時点で千葉メディカルセンター 125 名、千葉大学医学部附属病院 93 名で合計 218 名のリクルートを完了した。COVID19 の影響でややリクルート数は減っているが順調にリクルート者数は増えている。6 か月健診、1 歳健診まで終了したのはそれぞれ 86 名、53 名である。6 か月での血液検査ではコナヒョウヒダニ、牛乳、卵白、オボムコイドの感作率（クラス 1 以上を陽性）はそれぞれ 0%、5.8%、18.6%、5.8%だった。1 歳時点での感作率（クラス 1 以上を陽性）はそれぞれ 5.7%、20.8%、39.6%、17.0%だった。全ての症例が終了するまで VD 群かプラセボ群かオープンできないため、VD の効果について今年度はまだ評価できていない。今後 2020 年度末までに 300 名までリクルート数を集める予定である。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_15】 鶏卵アレルゲン除去卵の作出
フリガナ	ミズシマ シュウセイ
代表者名	水島 秀成
所属機関（機関名） （役職名）	北海道大学大学院理学研究院生物科学部門 助教
本助成金による発表論文，学会発表	学会発表 The role of inositol-trisphosphate receptors during egg activation in Japanese quail. The 2nd International Conference on Tropical Animal Science and Production 2019. July 9-12, 2019. Suranaree University of Technology, Thailand. * Award for the best poster presentation to S. Mizushima.

研究結果要約

本研究課題では、鶏卵アレルゲン物質であるオボアルブミン、オボムコイド、オボトランスフェリンを欠損したノックアウトウズラを CRISPR/Cas9 システムを用いて創出することを目的とした。

それぞれの遺伝子の翻訳開始地点近傍に gRNA を設計し、in vitro 転写システムによりそれぞれの gRNA ならびに Cas9 mRNA を合成した。排卵直後のウズラ卵に精子を直接注入（顕微授精）することにより、または自然交配により卵管から得られた 1 細胞期受精卵に、3 つの遺伝子を標的とした gRNA および Cas9 mRNA を顕微注入し、卵培養を行った。一部の初期胚から DNA を注入し、塩基配列の編集を確認したところ、同一個体の全ての遺伝子に 1-5 塩基の欠損が確認され、更にはホモでゲノム編集が施されていた。しかしながら、全ての個体が孵化直前で死亡する結果となった。コントロール群と比較して、死亡した胚の重量は約 5 割減少しており、特に頭部および胸筋の形成に異常が生じていた。またコントロール胚の脳および筋肉における mRNA 発現を解析した結果、オボアルブミンとオボトランスフェリンが両方に、オボムコイドは脳において発現していることが判明した。本研究から、オボアルブミン、オボムコイド、オボトランスフェリンは、脳や筋肉の形成・発達に必要な遺伝子であり、3 つの遺伝子をノックアウトしたウズラ個体は致死になることが分かった。

研究課題名	【Web 会議番号 2019_16】 重症消化管アレルギーの病態解明
フリガナ	モリタ ヒデアキ
代表者名	森田 英明
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 室長
本助成金による発表論文，学会発表	Orimo K et al, Allergy Asthma Immunol Res. 2020 in press. 第 48 回日本免疫学会学術集会 シンポジウム, Morita H. Role of innate immunity in the development of allergic diseases. 浜松 2019 年 12 月

研究結果要約

近年、本邦において新生児・乳児消化管アレルギー（以下、消化管アレルギー）の症例報告が急激に増加している。消化管アレルギーは食物アレルギーの一種であるが、一般的な食物アレルギーとは病態が異なると考えられている。一般的な食物アレルギーとは異なり、消化管アレルギーは IgE 抗体を介さない機序（非 IgE 依存型アレルギー）が想定されている¹⁾が、その病態の詳細はほとんど明らかになっていない。消化管アレルギーには、複数の亜型が存在することが知られているが、その中でも特に血便や嘔吐を認めない疾患群は、重篤な成長障害を認めることが多いこと、原因抗原の同定が困難な症例が多いことから、病態の解明及び新たな治療法の開発が期待されている。

そこで本研究では、消化管アレルギーの中でも、重篤な成長障害を認めることが多い、血便や嘔吐を伴わない乳児の消化管アレルギーに焦点を絞り、病態に関与する因子の同定を目的とし、胃および S 状結腸組織での遺伝子発現解析の比較検討を行なった。その結果、消化管アレルギーでは消化管局所で主に免疫細胞遊走に関与する遺伝子群が発現増強していること、これらは臓器毎に異なるパターンを示す可能性が明らかとなった。

2019年度研究助成事業 共同研究助成

〈口頭成果報告〉

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	食物アレルギーにおける免疫記憶の機序解明		
フリガナ	アダチ タカヒロ		
代表者名	安達 貴弘		
所属機関（機関名） （役職名）	東京医科歯科大学難治疾患研究所 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
	戸村道夫 （トムラミチオ）	大阪大谷大学・教授	免疫細胞のプロファイルイン グ
	中村公則 （ナカムラキミノリ）	北海道大学 准教授	腸管バリア機能の解析
本助成金による発 表論文，学会発表	食物アレルギー及び自己免疫疾患における IgA の影響 小竹 久仁彦, 安達 貴弘 日本食品免疫学会設立 15 周年記念学術大会 2019 年 11 月 19 日 IgA deficiency causes spontaneous enteritis 安達貴弘、渡部太郎、永石宇司、渡邊 守、烏山 一、吉川宗一郎 第 48 回日本免疫学会学術集会、浜松 2019 年 12 月 13 日		

研究結果要約

食物アレルギーにおける抗原特異的 IgE 産生機序を明らかにすることを目的とした。IgE を過剰に産生する IgE ノックインマウスおよび腸管バリア機能に重要な IgA を欠損したマウスを用いて、食物アレルギーモデルを検討し、IgA 欠損マウスにおいて食物アレルギーが C57BL/6 のバックグラウンドでも起こることを明らかにした。一方、IgE を高産生する IgE ノックインマウスでは一時的なアナフィラキシーは見られるが、IgA へのクラススイッチが起こり、トレランスが誘導された。これらの結果は IgA が食物アレルギーの回避に重要なことを強く示唆している。また、その腸内細菌を解析したところ、正常マウスと比べ、変化していることを明らかにした。IgA 欠損マウスでは、野生型マウスに比べ、抗原感作によってより多くの抗原特異的 IgE 産生細胞が誘導されることを見出した。カルシウムバイオセンサーを発現するマウスより 3 次元培養系エンテロイドを作製し、生体外にて腸管上皮細胞の細胞内カルシウム動態を可視化できる再構築系を樹立した。さらに、カルシウムバイオセンサーマウスに食物アレルギーを誘導し、その時のパイエル板の B 細胞の活性化の様子を生体イメージングにより経時的に可視化し、経時変化を明らかにした。以上のように食物アレルギーにおける抗原特異的 IgE 産生を詳細に調べる基盤が確立された。

研究目的

食物アレルギーは食物抗原に一旦感作されて免疫記憶が成立してしまうと抗原を摂取するたびにアレルギー症状が惹起されてしまう。しかし、その治療方法としては、私がコメアレルギーを研究していた 25 年前から今日に至るまで、アレルギーの原因となる食物を避けるといった対処療法が、いまだ主流である。少量の抗原を投与する減感作療法も行われているが、根本的な解決には至っていない。食物アレルギーによる死亡事故も毎年のように、数件起きている。先日、厚生労働省がアレルギー疾患に対する戦略を策定し、“革新的治療の実現”や“防ぎ得た死をゼロに”を目標に掲げ、本格的な対策が求められている。通常は、食物抗原により制御性 T 細胞が誘導され¹⁾、経口免疫寛容がされる。しかし、腸管のバリア機能が破綻すると、食物が体内に侵入し、免疫反応が惹起され、アレルギーを発症すると考えられている。我々は、免疫細胞の動態のみならず、活性化、さらには細胞標識までの可視化できる 6D 生体イメージングを確立し^{2,3)}、さらに免疫記憶の成立する機序の一端を解明している(論文投稿中、論文準備中)。これを基盤として、食物アレルギーにおける免疫記憶の機序を詳細に解明できれば、そこを標的として食物抗原特異的に免疫記憶をリセットする根本的な治療法の開発ができるのではないかと考えた。”免疫記憶”という言葉は免疫の一つの特徴としてよく知られているが、実はその実体についてはよくわかっていないことも多い。そこで本研究では、食物アレルギーにおいて免疫記憶が成立および維持される機序を

一細胞レベルの解析で明らかにし、食物抗原特異的に免疫記憶をリセットする根本的な治療法開発を目的とする。

研究計画及び研究手法

食物アレルギーモデルの構築

これまでは Blb/c のバックグランドのマウスがアレルギーの研究にはよく使われてきたが、C57BL/6 のバックグランドのマウスでは遺伝子改変マウスが多数存在し、詳細な機能解析が可能となるので、まずは、C57BL/6 を使って、食物アレルギーのモデル系の構築を試みた。食物アレルギーの検出系として、IgE を過剰に産生する IgE ノックインマウス⁴⁾をドイツ・マルブルグ大学 Yu 博士より供与していただき、腸管バリア機能に重要な IgA を欠損したマウスは CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法で IgA 重鎖の定常領域を欠失したマウスを独自に樹立した(論文投稿中)。これら 2 系統の遺伝子組換えマウスを用いて、食物アレルギー誘導の実験を行った。IgE ノックインマウスにおいては、さらに鶏オボアルブミン(OVA)に特異的な T 細胞受容体を持つ OT-2 マウスと交配し、OVA による免疫応答を高めたマウスを用いた。OVA (50 μ g) を抗原として水酸化アルミニウム (alum) アジュバンドでゲル化したものを 0.3ml のリン酸バッファーに懸濁して、マウス腹腔に免疫し、2週間後にさらに追加免疫を行った。さらに1週間後に、ゾンデでリン酸化バッファーに溶解した OVA (30 μ g) 投与、あるいは5%OVAを含む餌を自由摂取させ、体温の低下、糞便の様子などを経時的に観察した。

IgE 産生細胞の検出系の確立

食物アレルギー誘導時に、感作された抗原特異的な IgE 産生細胞を特定する目的で、IgA 欠損マウスを用いて、OVA/alum で抗原感作を行い、抗原特異的 IgE 産生細胞がどの程度誘導されているか、フローサイトメトリーにより IgE 陽性細胞を、さらに Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) アッセイにより、抗原特異的 IgE 産生プラズマ細胞を調べた。そこで、沢山の抗原特異的 IgE 産生細胞を誘導できる IgA 欠損マウスの優位性を生かして、IgE 産生細胞の生体内動態の解明と生体内動態情報に基づく IgE 産生細胞の性状の詳細解析によりアレルギー発症の本体に迫るために、IgA 欠損マウスと生体内の臓器連関、免疫細胞移動を可視化して細胞動態を追跡できる光変換蛍光タンパク質 KikGR マウス⁵⁾を掛け合わせて IgA 欠損 KikGR マウスを取得することにした。また、取得した細胞の詳細解析のために、単細胞遺伝子発現解析系の導入確立と、免疫細胞のプロファイルリングのためにマサイトメトリーCyTOF 評価系の確立を行った。

食物アレルギーの可視化解析

これまでに独自に樹立した細胞系譜特異的カルシウムバイオセンサーYellow Cameleon 3.60 (YC3.60) 発現マウスを用いた 5 D(x、y、z、時間、カルシウムシグナル)生体イメージングシステムを構築しており、腸管のリンパ組織であるパイエル板や腸管上皮での生体イメージングを確立してきた⁶⁾。YC3.60 は一分子内に CFP (シアン蛍光タンパク質) と Venus (YFP:黄色蛍光タン

パク質の円順列変異体) とその間に存在するカルモジュリンのカルシウム結合部位からなり、カルシウムイオンと結合することにより構造変化し、CFP のみを励起した場合、カルシウムイオンに依存して 2 つの蛍光タンパク質が隣接することにより、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) によりが起こり、シアンから黄色に、色の変化が起こる(図 1 を参照)。これを利用して細胞内カルシウムイオン濃度変化をモニターできる。B 細胞特異的にカルシウムバイオセンサーを発現させた CD19-Cre/YC3.60 マウスを用いて、食物アレルギーが起こっているときに、生体内でどのように免疫細胞の活性化が起きているか、共焦点レーザー顕微鏡にて、可視化解析を行った。アレルギーは上記で確立した方法を用いて、OVA/alum で免疫後、ゾンデで OVA を投与し、458nm のレーザーで励起し、YFP と CFP の蛍光の画像を取得し、YFP/CFP の ratio でカルシウムシグナリングをモニターした。また、取得した画像の解析にはニコンの NisElements を用いた。

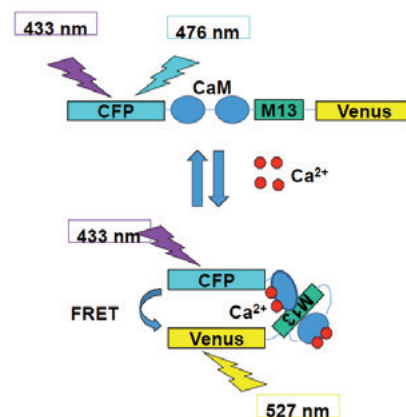


図1. カルシウムセンサーYellow Cameleon 3.60 (YC3.60) の構造
CFPとYFPの蛍光蛋白質の間にカルモジュリンのカルシウム結合部位を持っている。カルシウムの有無により構造変化を伴い、カルシウム結合状態ではCFPとYFPが隣接し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こり、励起波長433nm付近を用いた場合、蛍光がシアンから黄色にシフトする。この蛍光波長の変化を測定することにより、細胞内カルシウムイオン濃度をモニターすることができる。

食物アレルギー発症における腸管ネットワークのニッチとしての解析

申請に先立って、腸管上皮、免疫細胞、の生体イメージング系はこれまでに構築されていたが^{3,6)}、腸管神経系については不明な点も多かった。そこで、まずは腸管の神経細胞について神経細胞特異的にカルシウムバイオセンサーを発現する *Nestin-Cre/YC3.60* マウスを作出し、腸管神経叢であるアウエルバッハ神経叢、マイスナー神経叢、さらには腸管上皮近傍の神経終末の可視化を行い、さらにはそれらの生体イメージング系の構築を行ってきた⁷⁾。腸管の知覚神経の細胞体は、脊髄の後根神経節に存在し、また腸管上皮の1つである腸管内分泌細胞と直接シナプス様結合する迷走神経の知覚神経細胞体は下神経節に存在しているので、これらの神経細胞を調製して、*in vitro* の細胞培養系の構築を行った⁸⁾。

腸管オルガノイドを用いた再構築系の確立

食物アレルギーによる神経-免疫-上皮の腸管ネットワークの異常を生体外で可視化解析するために、腸管オルガノイドを用いた再構築系の樹立を目指した。まず、カルシウムバイオセンサーを発現するマウスから小腸を摘出し、オルガノイドを作成後、神経伝達物質であるアセチルコリンのアナログ体であるカルバミルコリン(CCh)刺激により、腸管上皮細胞内のカルシウム濃度がイメージングにより解析できるかを検討した。

IgA 欠損マウスにおける腸内細菌叢の解析

IgA 欠損マウスが腸内細菌叢に与える影響を

解析するために、野生型マウスおよび IgA 欠損マウスより糞便を採取し、便サンプルから細菌由来のゲノム DNA を抽出し、16SrRNA シーケンスにて腸内細菌叢組成を解析した。

抗原性特異的な記憶細胞の欠失方法の開発を予定していたが、解析手法の確立に本年度はとどまり、免疫記憶をリセットする方法の開発には着手できなかった。

結果と考察

食物アレルギーモデルの構築

OVA 特異的な T 細胞抗原受容体を持つ OT-2 と交配した IgE ノックインマウスでは予想に反し、OVA/alum で免疫したにもかかわらず、全く IgE 抗体価の上昇が見られなかった。このマウスの系では免疫応答が Th1 優位に傾き、Th2 応答がほとんど起こらなかったためであると考えられる。また、OVA 特異的な T 細胞抗原受容体のトランスジェニックマウスである OT-2 のバックグラウンドを持たない IgE ノックインマウスにおいても同様の実験を行い、免疫後、ゾンデで OVA を1日おきに継続的に投与したが、体温の低下が見られたのは初回のみで、アナフィラキシー反応が見られたが、以後はそのような反応は見られなくなった。継続的に採取した血清の抗体価を測定したところ、OVA 免疫により OVA 特異的 IgE 抗体価の上昇は検出されたが、ゾンデによる経口投与後、OVA 特異的 IgE 抗体価は低下し、IgA 抗体の産生の上昇が見られた。このことは、経口投与により OVA 特異的な抗体が IgE クラスから

IgA クラスへクラススイッチすることにより、トランスが誘導されたことを強く示唆している。一方、IgA 欠損マウスでは野生型のマウスと比べ、OVA/alum で免疫後、IgE ノックインマウスほどではないが、IgE クラスの特異抗体が野生型のマウスより高く検出された(図 2)。さらに OVA の経口投与により、体温の低下が見られ、野生型や IgE ノックインマウスと比べ、食物アレルギーが効率よく起きていることを示している。IgA 欠損マウスは C57BL/6 バックグラウンドマウスでも、食物アレルギーのモデル系として高感度に食物アレルギーが検出できることが判明した。

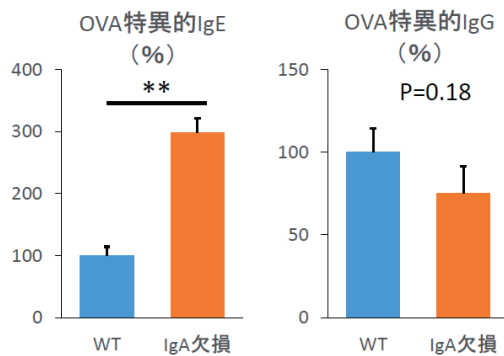


図2. OVA/alumを2週間の間隔で二度腹腔内投与し、抗原に感作したマウスの解析結果。免疫したWTマウス及びIgA欠損マウスのOVA特異的IgE及びOVA特異的IgG。*: $p<0.01$ 、エラーバーは平均値±標準偏差を表す。

IgE 産生細胞の検出系の確立

IgE 抗体産生細胞は短命であることや、検出出来る抗原特異的 IgE 産生細胞数が少ないことが、食物アレルギーを起こす中心的な役割を果たす IgE 産生細胞の性状解明を困難にしている。上記の IgE ノックインマウスによる検討から IgE 産生細胞は持続的な抗原刺激により IgA 産生細胞に容易にクラススイッチしてしまう可能性が考えられる。翻ると IgA 欠損マウスでは、IgE 産生細胞にクラススイッチできずに IgE 産生細胞が

野生型マウスよりも多数検出出来る可能性がある。実際、IgA 欠損マウスでは野生型のマウスと比べ、OVA/alum で免疫後には高い IgE 産生が認められた(図)。また、骨髄に移行した IgA 産生細胞が長期の IgA 産生を担うことはよく知られているが、我々は腸管組織で誘導された IgA 産生細胞が骨髄に移行することを光変換蛍光タンパク質 KikGR マウスの腸管組織の細胞を赤色にマーキングして追跡することで直接証明し報告している⁹⁾。そこで我々は、IgE 産生細胞も IgA 産生細胞と同様骨髄に移行することが、血中 IgE の維持に貢献している可能性を考えた。そしてその証明を行うために、抗原特異的 IgE 産生細胞が効率的に誘導できる事が期待できる IgA 欠損マウスの優位性を生かし、さらに、IgE 産生細胞の生体内動態の解明と生体内動態情報に基づいて取得した IgE 産生細胞の性状の詳細解析によりアレルギー発症の本体に迫るために、IgA 欠損マウスと KikGR マウスとの掛け合わせを行い、IgA 欠損のバックグラウンドで KikGR を発現するマウスを取得した。そして、IgA 欠損のバックグラウンドで KikGR を発現するマウスでの解析を進めるために、IgA 欠損マウスに OVA/Alum を 2 回感作した後に解析し、腸管、腸間膜リンパ節、脾臓、骨髄で IgE 産生形質細胞前駆細胞が誘導されることをフローサイトメトリーにより確認した。また、ELISPOT アッセイによる検出により、脾臓では 107 細胞当たり全 IgE 産生細胞は 400 個、OVA 特異的 IgE 産生細胞は 30 個、全 IgG 産生細胞は 2917 個、OVA 特異的 IgG 産生細胞は 248 個検出できた。以上の様に、IgA 欠損バックグラ

ウンドでの IgE 産生細胞の生体内細胞動態解析のためのマウスの取得し検出系を確立した。

また、取得した細胞の詳細解析のために、単細胞遺伝子発現解析系の導入確立と、マスマイトメトリーCyTOF 評価系の確立を行った。添付の図のようにマウスの免疫細胞をプロファイリングすることを可能にした(図 3)。

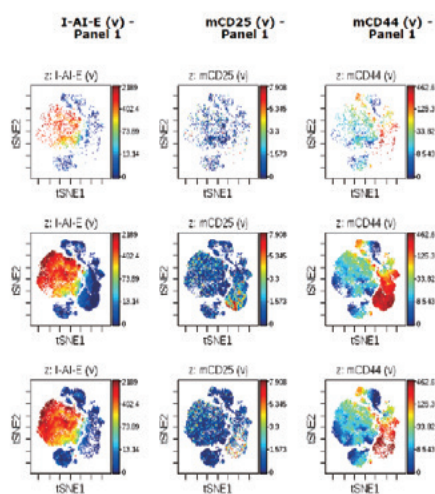


図3. シングル細胞レベルでの細胞表面抗原の網羅的な解析
マスマイトメトリー (Cytometry by Time-of-Flight: CyTOF) を用いて解析の各マーカーに対してシングル細胞レベルでの細胞表面抗原の網羅的な発現プロファイルの例

食物アレルギーの可視化解析

また B 細胞のみを可視化する CD19-Cre/YC3.60 マウスに OVA を免疫後、OVA を経口投与して食物アレルギーを誘導後、経時的に生体イメージングにより小腸パイエル板の B 細胞を観察したところ、直後ではあまり変化は見られなかったが、投与 2 日後に、細胞内カルシウム濃度が亢進している B 細胞が著しく増加していることが明らかになった(図 4)。これは B 細胞が活性化され、IgA へのクラススイッチが効率よく起きているためであると推測された。

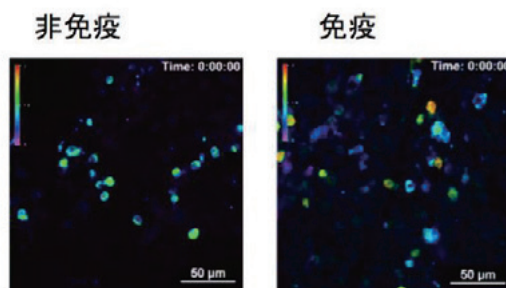


図4. 食物アレルギーの可視化解析
免疫したCD19陽性可視化マウスに5%OVA 0.3mlを強制経口投与し、その2日後のパイエル板のイメージング画像。

食物アレルギー発症における腸管ネットワークのニッチとしての解析

腸管神経叢であるアウエルバッハ神経叢、マイスナー神経叢、腸管上皮近傍の神経終末で、神経特異的にカルシウムバイオセンサーを発現するマウスを用いた生体イメージングを行い、それぞれの部位で、神経細胞の活性化を可視化することに成功した(図 5)。また腸管上皮に多くの神経終末が存在していることが明らかとなり、これらが腸管内容物をセンシングしていることが推測された。

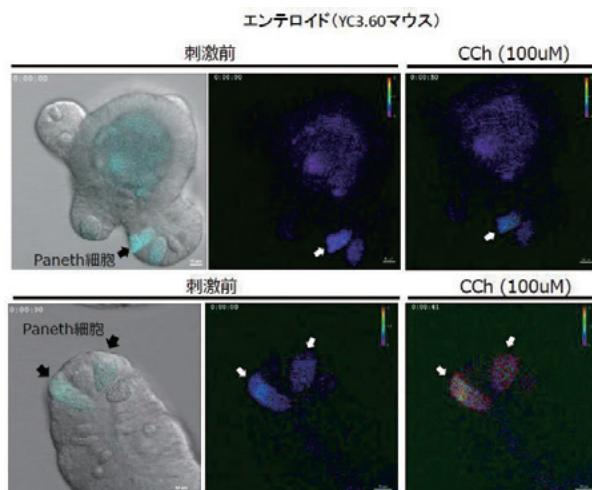


図5. カルシウムセンサーYC3.60発現マウスより構築したエンテロイド
全身性のYC3.60発現マウスの腸管を用いて、腸管エンテロイドを作製し、CCh刺激によるパネート細胞のカルシウムシグナルを測定した。刺激に応答して、細胞内カルシウムの上昇が見られた。

エンテロイド培養液中に $10\mu\text{M}$ を加えたところ、数秒で細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。また、カルシウム濃度の上昇に伴い、抗菌ペプチド α ディフェンシンを含む顆粒を豊富に持つ Paneth 細胞の顆粒が分泌することを確認した。この結果は、今後、エンテロイドと腸神経細胞およびリンパ球などの免疫細胞との共培養を可能とすることで、神経—免疫—上皮の腸管ネットワークへの食物の関与が分子レベルで解析できる可能性を示した。

IgA 欠損マウスにおける腸内細菌叢の解析

16SrRNA シークエンス腸内細菌叢組成解析の結果、 β 多様性において IgA 欠損マウス群は、野生型と比較して異なる細菌叢組成を示し、また α 多様性の減少傾向と Parabacteroides、Ruminococcus 存在率の増加、Helicobacter 存在率の減少を示した。このことから IgA 欠損マウスは腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) を誘導することが明らかとなった。これらの結果は、IgA が腸内細菌叢の制御に重要なことを示しており、食物アレルギーにおいても影響を及ぼすことが推測された。

今後の課題

IgA 欠損マウスを用いることにより食物アレルギーが効率的に誘導できる系ができ、また IgE 陽性細胞も、フローサイトメーターで検出できるようになり、抗原特異的な IgE 陽性細胞が特定できるようになった。さらには ELISPOT アッセイにより、抗原特異的な IgE 産生細胞も高頻度で検

出できるようになった。さらに生体イメージングにより、食物アレルギー誘導時の B 細胞の活性化の経時的経過も明らかとなった。これらの細胞を指標として、食物アレルギーの詳細な機序解明、および、それらをターゲットにした抑制方法の開発が必要である。

学会や論文発表等の予定

Taro Watabe, Kunihiro Kotake, Toshihiko Kumazawa, Tomomi Aida, Kohichi Tanaka, Ryuichi Ono, Fumitoshi Ishino, Takako Usami, Takamasa Miura, Hiroko Kawasaki, Naoya Tsugawa, Daiki Yamada, Kazuhiro Hirayama, Soichiro Yoshikawa, Hajime Karasuyama, Mamoru Watanabe, Richard S. Blumberg, Takashi Nagaishi, and Takahiro Adachi.

Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.論文投稿中

今後の研究活動について

食物アレルギーの発症機序が解明できれば、そこを標的として根本的な治療法の開発ができるのではないかと考え、本研究では、一細胞レベルの時空間的な解析で、食物アレルギーにおいて免疫記憶が成立および維持される機序を明らかにすること、それをもとにした抗原特異的な免疫記憶およびクラススイッチの制御法の確立を目的とした研究を行う。2019 年度の研究で、感作された抗原特異的な IgE 産生細胞が検出できるようになったので、CyTOF による解析、あるいはその細胞を単離し、詳細に解析することで、その

細胞の特徴を突き止める。IgA 欠損のバックグラウンドで KikGR を発現するマウスに OVA/Alum を 2 回感作した後に、腸管組織の細胞を赤色にマーキングした後、腸間膜リンパ節、脾臓、骨髄で赤色にマーキングされた IgE 産生形質細胞前駆細胞、あるいは IgE 産生形質細胞を検出することで IgE 産生細胞の生体内動態を明らかにする。また、骨髄の細胞を赤色にマーキングすることで、骨髄で長期間生存する細胞を同定する事が可能である。この検討により今まで不明であった IgE 産生細胞の生体内動態が明らかになる。さらに、赤色にマーキングされた細胞が検出された組織(骨髄と脾臓を想定)から分取した赤色の細胞を ELISPOT アッセイし、腸管から移行した抗原特異的 IgE 産生細胞を同定する。また食物アレルギーが誘導、あるいはトレランスが誘導されて回避されている状況で、生体イメージングにより生理条件下での細胞の活性化を可視化し、クラススイッチの時空間的解析により、その機序を明らかにする。またこれらの知見を基盤に、トレランスを誘導する食品成分、あるいは医薬品の開発を行い、食物アレルギーの予防法、治療法の開発に努める。

参考文献

- 1) Kim KS, Hong SW, Han D, Yi J, Jung J, Yang BG, Lee JY, Lee M, Surh CD. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* 2016 Feb 19;351(6275):858-63.
- 2) Adachi T, Tsubata T. FRET-based Ca²⁺ measurement in B lymphocyte by flow cytometry and confocal microscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 7;367(2):377-82.
- 3) Yoshikawa S, Takako Usami T, Kikuta J, Ishii M, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T, Nakasho E, Takayanagi H, Tedder TF, Karasuyama H, Miyawaki A, Adachi T. Intravital imaging of Ca²⁺ signals in lymphocytes of Ca²⁺ biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci Rep.* 2016; 6: 18738.
- 4) Lubben W, Turqueti-Neves A, Okhrimenko A, Stoberl C, Schmidt V, et al. IgE knock-in mice suggest a role for high levels of IgE in basophil-mediated active systemic anaphylaxis. *Eur J Immunol* 2013 43: 1231-1242.
- 5) Futamura K, Sekino M, Hata A, Ikebuchi R, Nakanishi Y, Egawa G, Kabashima K, Watanabe T, Furuki M, Tomura M. Novel full - spectral flow cytometry with multiple spectrally - adjacent fluorescent proteins and fluorochromes and visualization of in vivo cellular movement. *Cytometry A.* 2015 Sep; 87(9): 830–842.
- 6) Adachi T, Kakuta S, Aihara Y, Kamiya T, Watanabe Y, Osakabe N, Hazato N, Miyawaki A, Yoshikawa S, Usami T, Karasuyama H, Kimoto-Nira H, Hirayama K, M.-Tsuji N. Visualization of probiotic-mediated Ca²⁺ signaling in

- intestinal epithelial cells in vivo. *Front Immunol.* 2016; 7: 601.
- 7) Aihara Y, Fukuda Y, Osakabe N, Aida T, Tanaka K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Adachi T. Visualization of mechanical stress-mediated Ca²⁺ signaling in the gut using intravital imaging. *Biosci Microbiota Food Health.* 2020 in press.
- 8) Nishimura Y, Fukuda Y, Okonogi T, Yoshikawa S, Karasuyama H, Osakabe N, Ikegaya Y, Sasaki T, *Adachi T. Dual real-time in vivo monitoring system of the brain-gut axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Apr 2;524(2):340-345.
- 9) Rojas OL, Pröbstel AK, Porfilio EA, Wang AA, Charabati M, Sun T, Lee DSW, Galicia G, Ramaglia V, Ward LA, Leung LYT, Najafi G, Khaleghi K, Garcillán B, Li A, Besla R, Naouar I, Cao EY, Chiaranunt P, Burrows K, Robinson HG, Allanach JR, Yam J, Luck H, Campbell DJ, Allman D, Brooks DG, Tomura M, Baumann R, Zamvil SS, Bar-Or A, Horwitz MS, Winer DA, Mortha A, Mackay F, Prat A, Osborne LC, Robbins C, Baranzini SE, Gommerman JL. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell.* 2019 Apr;177(2):492-493.

研究課題名	重症食物アレルギーに対する経皮免疫療法の実用化に向けた非臨床・臨床 POC データセットの取得		
フリガナ	オカダ ナオキ		
代表者名	岡田 直貴		
所属機関（機関名） （役職名）	大阪大学大学院薬学研究科 教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	藤澤隆夫 （フジサワタカオ）	国立病院機構三重病院・院長	経皮免疫療法の治療効果判定 マーカーの探索
	神山文男 （カミヤマフミオ）	コスメディ製薬株式会社・代表取締役社長	経皮免疫デバイスの製造・供給
本助成金による発表論文、学会発表	1. Ito S., <i>et al.</i> : Pharm. Res. 37(3): 35 (2020) 2. Kuwabara Y., <i>et al.</i> : JSA/WAO Joint Congress 2020 [Online Meeting, September 17-20, 2020] 3. Kuwabara Y., <i>et al.</i> : EAACI Annual Congress 2020 [Online Meeting, June 6-10, 2020] 4. 山下 凌ら: 日本薬学会第 140 年会 [誌上開催, 2020 年 3 月 26-28 日] 5. Yamashita R., <i>et al.</i> : 第 48 回日本免疫学会学術総会 [静岡県（浜松市）, 2019 年 12 月 11-13 日]		

研究結果要約

アレルギー疾患における唯一の根治療法である免疫療法が食物アレルギーに対しても積極的に導入されるようになってきた。しかし、現行の免疫療法はアレルゲンを皮下注射法により頻回投与するものであり、注射針による疼痛があること、長期に定期的な通院が必要なこと、頻度は低いもののアナフィラキシーショックなどの重篤な副作用の危険性があることから患者側、医療側の双方にとって容易に施行できる治療法とはいえない。本研究では、皮膚を傷つけることなく微量のアレルゲンを皮膚内に浸透させることのできる親水性ゲルパッチ（HG）を活用し、小児食物アレルギーに対する新規経皮免疫療法（EPIT）の開発に取り組んだ。マウスモデル実験において、アレルゲン装填 HG を用いた EPIT が特異的 IgG 抗体（アレルゲン中和抗体）の産生を誘導し、従来の皮下注射免疫と比較して特異的 IgE 抗体（アレルギー誘発抗体）の産生を低減できることを示した。これらの前臨床結果に基づいて、重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索的臨床研究を実施したところ、牛乳アレルゲン装填 HG を適用した被験者 8 例のうち 4 例で症状誘発閾値が顕著に上昇し、経口免疫療法への移行を可能とした。また、奏効した患児においては血中特異的 IgE 抗体価の減少傾向と血中特異的 IgG4 抗体価の上昇傾向も認められ、HG を応用した EPIT が食物アレルギーに対する簡便な根治療法の確立に貢献できる治療戦略であることを実証した。

研究目的

食物アレルギーの診断および管理法の進歩により患者の生活の質 (quality of life; QOL) は改善しつつあるが未だ十分ではなく、なによりも根治に至る治療法が存在しないことが問題である。通常、小児の食物アレルギーは多くが成長と共に寛解するが、最近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。そこで本研究では、ニーズの高い牛乳・鶏卵アレルギーに対する安全で有効性の高い経皮アレルギー特異的免疫療法 (epicutaneous immunotherapy; EPIT) の確立を最終目標とする。

将来的な医師主導治験への道筋をつけるために、本研究では EPIT の安全性・有効性に関する非臨床・臨床 POC データセットの収集を推進した。また、ここ数年来、免疫学ではアジュバントに関する数多くの分子レベルの知見が蓄積され、その免疫反応における重要性がクローズアップされてきている。アレルギー疾患に対する免疫療法においてもアレルギーにアジュバント効果をもつ物質を加えることで、より免疫療法の効果を上げ、同時にアレルギー量を減らすことで副作用の危険性を回避できる可能性がある。そこで、EPIT に適用可能な経皮アジュバント候補物質の探索を行った。さらに、免疫療法はアレルギー治療のなかで唯一根治が期待できる治療法であるにもかかわらず、その奏効機序はいまだ十分に理解されていない。その結果、免疫療法を行う際に、アレルギー量や継続期間の妥当性などを評価するようなバイオマーカーがなく、十分な科学的根

拠に基づいて治療を行っているとはいえない面がある。そこで、EPIT の有効性評価および奏効機序解析に有用なアレルギー特異的免疫療法モデルの作出に取り組んだ。

食物アレルギーに対する EPIT は、従来の皮下注射法 (subcutaneous immunotherapy; SCIT)、舌下法 (sublingual immunotherapy; SLIT)、経口免疫療法 (oral immunotherapy; OIT)、などと比較して簡便で全身性の症状誘発リスクが低い方法として期待されており、特に、OIT や SLIT が実施できない重篤な食物アレルギー患児などに選択されるべき治療法と考えられる。本研究は、食物アレルギーに対する新たな治療・予防・診断法の創出に繋がるトランスレーショナルリサーチとして、その成果が日本発・世界初の EPIT 用貼付剤の上市・臨床応用へと昇華されることを目指している。

研究計画及び研究手法

A. アレルギー装填親水性ゲルパッチ (hydrophilic gel patch; HG) の作製および長期安定性試験

1) HG の作製

アクリレーツ/ビニルピロリドン共重合体、ヒアルロン酸ナトリウム、乳酸オクチルドデシル、グリセリンを 100 : 45 : 30 : 0.2 の重量配合比率で酢酸エチル/アセトンに溶解し、ポリエチレンテレフタレート離型フィルムに厚さ 200 μm で塗工した。塗工シートを室温 30 分間、80°C、15 分間静置して有機溶媒を蒸発除去することで HG を得た。

2) アレルゲン装填 HG の作製

無菌条件（クリーンベンチ内）で低エンドトキシン（ <1 EU/mg）ovalbumin (OVA)、 ovomucoid (OVM)、Milk protein concentrate (MPC)、あるいは AF647 標識 OVA を滅菌蒸留水に溶解し、HG（直径 1 cm の円形）の粘着面に 70 μ L ずつ滴下した。液滴が HG に吸収されるまでクリーンベンチ内に静置し、OVA-HG、OVM-HG、MPC-HG、あるいは AF647/OVA-HG とした。臨床研究用のアレルゲン装填 HG は粘着面をタンパク質低吸着性離型フィルムで覆ったのち、アルミラミネートパックに入れて密封した（Fig. 1）。

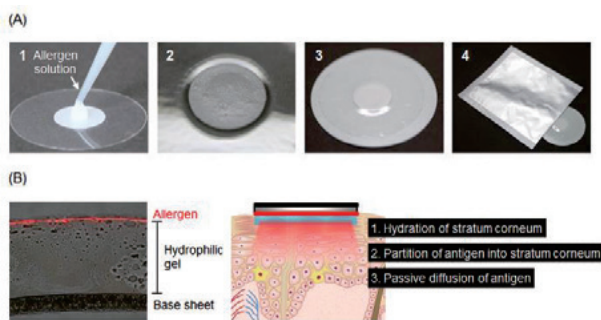


Fig. 1. Preparation of allergen loaded HG and epicutaneous allergen delivery manner. (A) Allergen solution was added as a drop to a 1-cm diameter HG (1) and allowed to dry for a few hours (2). The HG was covered with low protein adsorptive film (3), sealed with aluminum laminate (4), and stored at 4°C. (B) The HG formulation immersed in the allergen solution formed a concentrated allergen layer on its surface and accelerated the epicutaneous penetration of allergen proteins by maintaining a high concentration of allergens on the skin surface.

3) 臨床研究用 OVM-HG および MPC-HG の長期安定性試験

臨床研究用 OVM-HG および MPC-HG を 4°C で保存し、経時的に HG からの OVM または MPC 溶出量を測定した。また、1 年間保存した臨床研究用 MPC-HG からの溶出液を DBA/2 マウスの背部に 100 μ g/100 μ L で皮下投与し、用時調製 MPC 溶液を同様に投与した場合と血清中 MPC 特異的抗体価を比較することで保存後の MPC の免疫原性を確認した。

B. OVA-HG の安全性試験

Hartley モルモットの左右の耳に交互に OVA-HG (1 mg OVA/patch) を 2 週間連日貼付し（貼付 12 時間/日）、皮膚局所反応を観察した。また経時的に血清中 OVA 特異的 IgG, IgE 抗体価を測定した。さらにこれらのモルモットに OVA 溶液を 2 mg/kg で静脈内投与し、直腸温測定によりアナフィラキシー反応を評価した。なお対照群のモルモットには、背部皮膚に OVA 溶液を 100 μ g/100 μ L/head で皮下注射した。

C. HG を用いた EPIT の免疫応答特性

1) OVM-HG を用いた経皮免疫応答解析

BALB/c マウスの除毛背部皮膚に OVM-HG (1 mg/patch) を 24 時間貼付した。対照群には OVM 溶液 (100 μ g/100 μ L) を皮下注射した。これらの免疫操作を 1 週間隔で 4 回実施し、経時的に血清中 OVM 特異的 IgG, IgE 抗体価を測定した。最終免疫 1 週間後に所属リンパ節 (dLN) を摘出し、調製した細胞懸濁液を OVM (1 mg/mL) で再刺激した。48 時間培養後の上清中 IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17、IFN- γ および TNF- α を Bio-Plex マウスサイトカインアッセイを用いて定量した。

2) HG 貼付に伴う抗原提示細胞 (APC) の動態解析

BALB/c マウスの除毛背部皮膚に OVA-HG (200 μ g/patch) あるいは HG を貼付した。対照群には PBS を皮下注射した。24 時間後にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、各種蛍光標識抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー解析

した。APC は、ランゲルハンス細胞 (LC; CD11c⁺, B220⁻, CD8α⁻, CD205⁺, CD207⁺, CD326⁺)、CD207⁺ 真皮樹状細胞 (dDC; CD11c⁺, B220⁻, CD8α⁻, CD205⁺, CD207⁺, CD326⁻)、CD207⁻ dDC (CD11c⁺, B220⁻, CD8α⁻, CD205⁺, CD207⁻)、CD8α⁺ DC (CD11c⁺, B220⁻, CD8α⁺)、形質細胞様 DC (pDC; CD11c⁺, B220⁺)、単球およびマクロファージを含むその他の CD11c⁺ 細胞 (CD11c⁺, B220⁻, CD8α⁻, CD205⁻, CD207⁻, CD326⁻) に分画した。

3) HG により皮膚内送達された OVA のプロセッシング経路解析

BALB/c マウスの除毛背部皮膚に AF647/OVA-HG (200 μg/patch) を貼付した。対照群には AF647/OVA 溶液 (10 μg/100 μL) を皮下注射した。経時的にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、各種蛍光標識抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー解析した。APC を上記 2) と同様に分画し、各種サブセットにおける AF647⁺ cells の細胞数を算出した。

4) OVA-HG 貼付に伴う OVA 特異的 T 細胞への抗原提示解析

OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである OT-I マウスから CD8⁺ T 細胞 (OT-I 細胞) を、OT-II マウスから CD4⁺ T 細胞 (OT-II 細胞) をそれぞれ単離し、eFluor 670 にて蛍光標識した後、C57BL/6 マウスに移入した。これらマウスの除毛背部皮膚に OVA-HG (200 μg or 1 mg/patch) を貼付した。対照群には OVA 溶液 (20 μg/100 μL) を皮下注射した。3, 4, 5 日後にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、フローサ

イトメトリー解析により移入した OT-I 細胞および OT-II 細胞の分裂増殖および活性化を解析した。

D. 重症牛乳アレルギー患児に対する MPC-HG を用いた経皮免疫療法

本臨床研究は、国立病院機構三重病院倫理審査委員会の審査・承認を受けて実施した。

1) 対象

経口負荷試験閾値が牛乳 1 mL 未満の重症牛乳アレルギー患児 8 名 (3 歳~8 歳の男女)

(組み入れ基準)

- ・経口負荷試験で確定診断され、寛解傾向のない牛乳アレルギー患者
- ・経口負荷試験による閾値 (総負荷量) が牛乳 3 mL 以下の患者
- ・法的保護者の文書による同意を得られ、かつ本人の意思確認ができた者

(除外基準)

- ・牛乳摂取状況が直近の 3 ヶ月間に大きく変化している者
- ・牛乳の経口免疫療法を中止してから 6 ヶ月以内の者
- ・何らかの免疫療法を行っている者
- ・心疾患、肝疾患、腎疾患などがあり、現在治療中の者
- ・気管支喘息、アトピー性皮膚炎があり、現在コントロール不良の者

2) 経皮免疫療法

組み入れ基準を満たした患者に、1 mg MPC-HG を夕刻の入浴後から翌朝起床後までの 12 時

間、健常皮膚に連日貼付した。貼付スケジュールは、1 mg MPC-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 8 週毎に貼付部位の状態を観察、二重盲検プラセボ対照負荷試験 (DBPCPC)、採血を行った。治療は閾値レベルの上昇が確認されたときに完了とし、重大な有害事象が発生した場合、牛乳またはカゼインに特異的な IgE の急激な上昇が認められた場合、あるいは 24~48 週間以上の治療後に閾値レベルの上昇が達成されなかった場合、は治療を中断した。閾値上昇に成功した被験者は、閾値に従って牛乳の経口摂取を開始した。

(主要評価項目)

- ・治療前後における経口負荷試験閾値の変化
- ・安全性および有害事象

(副次評価項目)

- ・治療前後における特異的 IgE, IgG, IgG4 抗体価

E. 重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法における治療反応性予測マーカーの探索

2017-18 年度に貴財団研究助成を受けて実施した重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法のランダム化プラセボ対照比較試験 (パイロット試験) では 22 名が登録され、11 名に OVM-HG、11 名にプラセボ (PL) HG が割り付けられ、24 週間の治療が行われた。その結果、24 週の時点で経口負荷試験閾値の変化量 (上昇) は

OVM-HG 群のほうが PL-HG 群より有意に大きかった。この試験において保存されていた治療前、治療後 12 週、24 週、36 週、48 週における血清検体を用いて、Th2 マーカーである TARC および高感度の特異的抗体測定法である DCP チップ法による OVM 特異的 IgE, IgG1, IgG4 抗体を測定した。

F. 経皮アジュバント候補物質のスクリーニング

1) 皮膚細胞における Toll-like receptor (TLR) の発現解析

マウス除毛背部皮膚と耳介皮膚から酵素処理によって表皮細胞懸濁液および真皮細胞懸濁液を調製した。各種蛍光標識抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー解析した。

2) 経皮アジュバント活性の評価

C57BL/6 および BALB/c マウスの除毛背部皮膚に OVA (100 µg) と各種アジュバント候補物質 (Table 1) の混合溶液を装填した HG を 2 週間隔で 3 回貼付した。本実験で用いたアジュバント候補物質の用量は、感染症ワクチンやがんワクチンの基礎研究で用いられている投与量を参考に設定した。経時的に血清中 OVA 特異的 IgG, IgG1, IgG2a, IgG2c, IgE 抗体価を測定した。

Table 1. TLR ligands as adjuvant candidate applicable for EPIT using HG.

TLR ligand	Description	M.W.	Dose	Target TLR
Pam3CSK4	Synthetic mimic of bacterial lipopeptide	1500 Da	20 µg	TLR1/2
LTA-SA	Lipoteichoic acid from <i>Staphylococcus aureus</i>	4000 – 8000 Da	100 µg	TLR2
Poly I:C	Synthetic analogue of double stranded RNA	1500 – 8000 Da	50 µg	TLR3
Imiquimod	Small molecule agonist	240 Da	100 µg	TLR7
K3	Synthetic CpG-oligodeoxyribonucleotide	6300 Da	20 µg	TLR9

G. OVA アレルギーモデルマウスと HG を用いた経皮免疫療法治療モデル

OVA 特異的 IgE トランスジェニック (Tg) マウスの耳介皮膚に、片耳ずつ交互に 3 日間隔で 2 ヶ月間免疫治療した。EPIT 群では OVA 10 µg を装填した HG を 6 時間貼付し、SCIT 群では OVA 0.1 µg を皮下注射した。経時的に血清中 OVA 特異的 IgG および IgE 抗体価を ELISA にて測定するとともに、耳介皮膚の局所反応および厚さを評価した。背部皮膚を除毛した BALB/c に免疫治療後の血清を 10 倍希釈して皮内投与し、1% Evans Blue と 1 mg OVA の混合溶液を静脈内投与することで、受動的皮膚アナフィラキシー (PCA) 誘発試験を実施した。また、治療後 OVA-IgE Tg マウスに 100 µg OVA を静脈内投与することによるアナフィラキシー誘発試験を実施した。

H. 新規 HG の探索・開発

1) 基剤の選択

親水性アクリル粘着剤 2 種 (MAS683 と MASCOS10) を用いて、グリセリンおよび界面活性剤を添加して 2 種の新規 HG を作製した。MAS683 は親水性モノマーとしてビニルピロリドンを含む。一方 MASCOS10 は親水性モノマーとしてアクリル酸を含む。

2) 添加剤の選択

粘着物性を損なわない範囲でより水吸収性と水拡散性を向上させるため、各種親水性物質の添加を検討した。

3) 新規 HG の作製

MAS683、グリセリン、界面活性剤、低分子量ポリビニルピロリドン、を混合均一化し、乾燥後の厚さが 150 µm となるよう PET フィルム上に塗布して 80°C、30 分乾燥させた。

4) 高分子物質および低分子物質の新規 HG 表面での挙動評価

分子量 10,000 の FD10 (FITC 標識デキストラン) の水溶液を粘着層表面に滴下し、24 時間後、HG 断面の蛍光顕微鏡浸透性を評価した。また、分子量 829 の食用赤色色素 14 号の水溶液を粘着層表面に滴下し、24 時間後、HG 断面の光学顕微鏡観察を行った。

5) 吸水率測定

現行 HG と新規 HG を湿度 100% の環境に 24 時間放置した後、重量変化を測定してパッチの吸水性を評価した。

結果と考察

A. アレルゲン装填 HG の作製および長期安定性試験

HG は、皮膚を傷つけることなく微量のアレルゲンを皮膚内に送達し、アレルゲン特異的な免疫応答を誘導できる画期的なパッチ製剤である¹⁾ (Fig. 1)。親水性アクリル系粘着剤をベースに、医薬品や化粧品などで使用されている安全性の高い基剤を混合して作製されており、厚さが約 200 µm と薄く柔軟であるため皮膚表面に密着・追従することができる。HG の皮膚粘着面にアレルゲン溶液を滴下すると、水は蒸発あるいはゲル内部に浸透し、高分子のアレルゲンが HG 表面に濃縮される。これを皮膚に貼付するだけで角質層が水

和・膨潤し、アレルゲンが角質層下へと徐々に送達される²⁾。

EPIT において継続的に使用するアレルゲン装填 HG には長期間保存した際の品質安定性が求められる。臨床研究用 OVM-HG (1 mg あるいは 0.1 mg OVM/patch) は、保存 1 ヶ月後までは安定に OVM を溶出できたが、さらに保存を続けると OVM 溶出率が徐々に低下するとともに離型フィルム側への OVM 吸着が認められた (Fig. 2)。したがって、現状の臨床研究用 OVM-HG は 1 ヶ月以上の保存が難しく、さらなる長期保存を可能とするには HG 構成基剤あるいは OVM 装填方法の最適化が必要と考えられた。

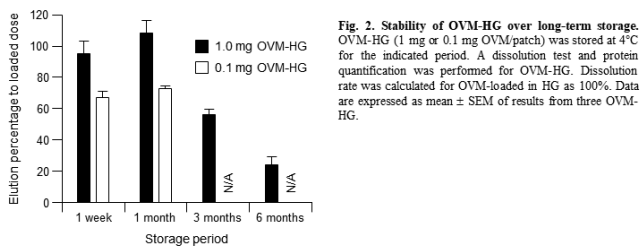


Fig. 2. Stability of OVM-HG over long-term storage. OVM-HG (1 mg or 0.1 mg OVM/patch) was stored at 4°C for the indicated period. A dissolution test and protein quantification was performed for OVM-HG. Dissolution rate was calculated for OVM-loaded in HG as 100%. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of results from three OVM-HG.

臨床研究用 MPC-HG (1 mg MPC/patch) は、保存 1 年後まではほぼ 100% の MPC 溶出率を示した (Fig. 3A)。また 1 年保存した MPC-HG からの溶出液は、マウスにおいて用時調製した MPC 溶液と同等の MPC 特異的抗体価を誘導できた (Fig. 3B)。これらの結果から、臨床研究用 MPC-HG は少なくとも作製から 1 年後までは MPC の免疫原性を維持したまま安定に保存できる製剤であることが確認された。

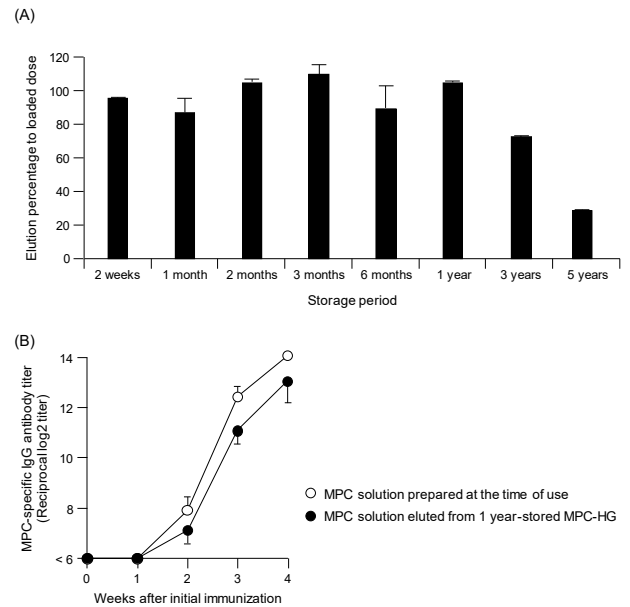


Fig. 3. Stability of MPC-containing HG over long-term storage. (A) A dissolution test and protein quantification was performed for MPC-HG. Dissolution rate was calculated for MPC-loaded in HG as 100%. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of results from three MPC-HG. (B) Solution eluted from the MPC-HG stored for 1 year was used to subcutaneously immunize DBA/2 mice at 100 μ g/100 μ l. As a control, DBA/2 mice were similarly immunized with MPC solution prepared at the time of use. MPC-specific IgG titer in serum samples were measured by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of results from three mice.

B. OVA-HG の安全性試験

モルモットは皮膚炎を起こしやすくアレルギー一誘発率が高い実験動物として知られている。

Placebo HG を連日貼付したモルモットにおいては、投与 14 日目まで貼付部位の耳介皮膚に目立った外観所見は認められなかった。一方、OVA-HG を貼付したモルモットは耳介皮膚を掻き篋り、貼付 5 日目から徐々に赤く腫上がり糜爛した。OVA-HG 貼付群の 14 日目における血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価は、連日 OVA を皮下投与した群と同等の誘導が認められたのに対し、OVA 特異的 IgE 抗体価は皮下投与群と比較して OVA-HG 貼付群では明らかな低値を示した。これらのモルモットに OVA 溶液を静脈内曝露したところ直腸温度が速やかに低下し、皮下投与群においては 4 匹中 2 匹が、OVA-HG 貼付群では 3 匹中 2 匹が死亡した。これらの結果から、ア

レルゲン装填 HG を同一部位に貼付し続ける、あるいは傷害された皮膚に貼付することで、アレルギーを皮下注射し続けた場合と同様にアレルギー感作に至ることが示された。したがって、アレルギー装填 HG を用いた EPIT のヒトへの適用においては、安全性に配慮した貼付部位の選択とスキンケアの併用が重要であると考えられた。

C. HG を用いた EPIT の免疫応答特性

OVM-HG を貼付したマウスの血清中 OVM 特異的 IgG 抗体価は、皮下注射群と同様に免疫回数の増加に伴って上昇した。皮下注射群においては免疫 3 回後に OVM 特異的 IgE 抗体価が急激に上昇したのに対して、OVM-HG 群では緩やかな上昇を認めたのみであり、IgG 抗体価に対する IgE 抗体価の比は一定に保たれていた。また、これらのマウスから調製した dLN 細胞を OVM で再刺激したところ、皮下注射群では IL-2、IL-10、IL-13 といったサイトカイン産生が検出されたのに対して、OVM-HG 群においてはいずれも低値あるいは検出限界以下を示した。これらの結果をまとめると、バリア機能が保たれた皮膚への HG を用いたアレルギー投与は、皮下注射法と比較してアレルギー特異的 IgE 抗体や Th2 型サイトカインの産生を低く抑えることが可能であり、免疫療法における副反応誘発リスクを低減できると考えられた。

OVA-HG による経皮免疫は、dLN におけるリンパ節常在性 APC サブセット (CD8α⁺ DC, pDC, その他の CD11c⁺ cells) のポピュレーション比に

影響を与えなかったが、皮膚常在性 APC サブセット (LC、CD207⁺ dDC、CD207⁻ dDC) のポピュレーション比を有意に増大させた。これらの現象は、OVA を装填していない HG を貼付したマウスでも同様に認められた。一方、皮下注射免疫したマウスにおいてはいずれの APC サブセットもポピュレーション比に変動を認めなかった。したがって、HG を用いた EPIT は、SCIT と比較して皮膚常在性 APC サブセットの dLN への遊走を亢進することが明らかとなった。

AF647/OVA-HG を貼付したマウスの dLN においては、6 時間後から 12 時間後にかけて AF647/OVA を捕捉した皮膚常在性 APC サブセットである LC、CD207⁺ dDC、および CD207⁻ dDC の増加が認められた。また、リンパ節常在性 APC サブセットにおいても AF647/OVA 捕捉細胞数の増加が検出された。一方、AF647/OVA を皮内注射したマウスでは、dLN における AF647/OVA 捕捉 APC サブセットは 2 時間後には増加しており、その後減少するプロファイルを示した。皮下注射投与群では dLN におけるいずれの APC サブセットにおいても AF647/OVA 捕捉細胞数の顕著な増加は認められなかった。これらの結果から、EPIT に伴う免疫反応においては、dLN においてアレルギーを捕捉した APC が惹起する免疫イベントの寄与が SCIT による免疫反応よりも大きいことが示唆された。さらに HG によって皮膚内送達されたアレルギーのプロセッシング経路は、① 皮膚組織においてアレルギーを捕捉した皮膚常在性 APC サブセットが dLN へと遊走し、その後リンパ節常在性 APC サブセッ

トにアレルゲンを受け渡している可能性、あるいは② 輸入リンパ管を通して皮膚から dLN に流れ込んできたアレルゲンを各種 APC サブセットが捕捉している可能性、が考えられた。これら二つの可能性のうち寄与の大きな経路を同定するため、各 APC サブセットを枯渇できる遺伝子改変マウスを用いた検討を計画している。

OT-I 細胞を移入したマウスに OVA-HG を貼付したところ、OT-I 細胞の OVA 特異的分裂増殖は OVA 皮下注射群と同様にほとんど認められなかった。一方、OVA-HG を貼付した OT-II 細胞移入マウスでは、OVA を皮下注射した群と比較して移入 OT-II 細胞の分裂増殖が亢進しており、EPIT が SCIT よりも抗原特異的 CD4⁺ T 細胞への抗原提示と活性化を促進することが示唆された。

D. 重症牛乳アレルギー患児に対する MPC-HG を用いた経皮免疫療法

本邦において牛乳アレルギーは、鶏卵に次いで罹患者数が 2 番目に多く、乳幼児期に最も発症率が高い。牛乳アレルギーは、牛乳タンパク質に含まれるカゼインが主要アレルゲンであり、これは加熱処理をしてもアレルゲン免疫原性は変化しない。チーズやヨーグルトの発酵食品であってもカゼインの免疫原性は変化しないため、牛乳アレルギー患児は多くの乳製品を摂取することができない。牛乳アレルギーは、乳幼児期 (0 歳) に発症率が高く、その後加齢に伴い自然寛解するケースが多いものの、牛乳アレルギー患児のカルシウム摂取量は健常児の半分以下であり、最も体が

発達する乳幼児期においてカルシウム不足は、骨や歯の成長に影響が大きい³⁾。牛乳アレルギー患児を持つ親は、代替食により不足栄養素を補っているものの、時間的・身体的・費用的な問題もあり親の QOL 低下を招きかねない。

本研究では、ヒトにおける EPIT の安全性・有用性を評価するため、重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索的臨床研究を実施した。試験開始時における患児の臨床的特徴を Table 2 に示した。MPC-HG 貼付に伴い、蕁麻疹や発赤など局所の皮膚症状は認められたものの、アナフィラキシーショックなど重篤な副反応は全例において認めなかった。さらに EPIT 実施により、8 例中 4 例においてアレルギー症状誘発閾値が上昇し、牛乳 3 mL 以上を経口摂取することが可能となった (Fig. 4)。これは、タンパク量で牛乳 3 mL に相当するバターを摂取できることを示し、バターの含まれる多くの食品を経口摂取できるようになったことから大幅な QOL 改善につながったと考えられ、EPIT の有効性が示された。これらの患児においては、OIT に移行し継続的に治療を続けたところ、100 mL 近くの牛乳を飲むことが可能となった。さらに milk、 α -lactalbumin (ALA)、 β -lactoglobulin (BLG)、casein 特異的 IgE 抗体価は、EPIT 実施後緩やかに低下傾向を示し、一方、ALA、BLG、casein 特異的 IgG 抗体価およびブロック抗体として機能する IgG4 抗体価の上昇傾向が認められた。したがって EPIT は OIT が困難な重症アレルギー患児への導入部分としても非常に効果的であり、OIT への移行を可能にする手段であると考えられる。

Table 2. Demographic and clinical characteristic at the start of the studies.

Participants (n = 8)	
Gender (male:female)	5:3
Age (years); median (range)	6 (3-8)
Atopic dermatitis; number (%)	8 (100)
Asthma; number (%)	2 (25)
MILK-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	116.5 (3.88-206)
ALA-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	10.5 (0.1-77.3)
BLG-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	9.3 (0.1-45.2)
Casein-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	124.5 (4.81-227)
Threshold dose at DBPCFC (mL); median (range)	0.5 (0.5-1)

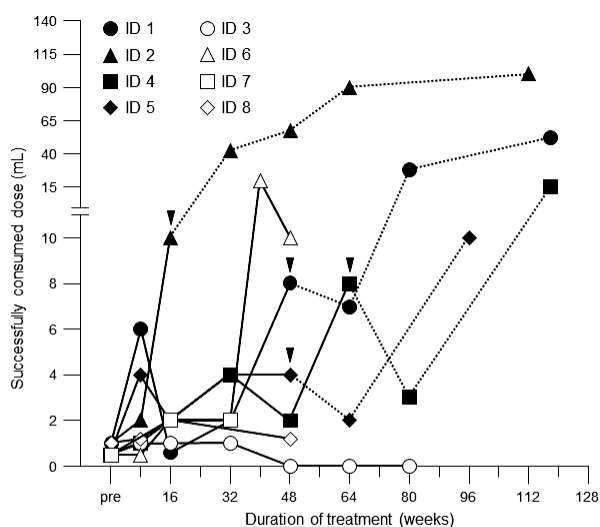


Fig. 4. Effect of EPIT using the MPC-HG on the dose of milk successfully consumed by patients with severe milk allergy. The OFC test was carried out in children suffering milk allergy after they had initiated EPIT. Black symbols (●, ▲, ■, and ◆) indicate patients that were able to drink milk without experiencing allergy symptoms and were able to switch to OIT; white symbols (○, △, □, and ◇) indicate patients for whom EPIT terminated; and ▼ shows the time point at which patients switched to OIT, and the subsequent change in the cumulative amount is indicated by a dotted line.

残念ながら 32 週目において特異的 IgE 抗体価に著しい上昇が認められた 2 例 (ID 3, ID 7)、MPC-HG 貼付部位の蕁麻疹が頻回となった 1 例 (ID 6)、閾値の改善効果が得られなかった 1 例 (ID 8) において本試験を中止した。milk および casein 特異的 IgE 抗体価が急上昇した症例においては、試験中止後特異的 IgE 抗体価の速やかな減少を示した。以上のことから、EPIT の実施により局所の皮膚反応やアレルギー特異的抗体価の上昇などの副反応が生じることも明らかとなり、HG の使用を中止することでその症状は速や

かに正常状態に戻ることが示された。

これらの探索的臨床研究のデータは、HG を応用した EPIT が簡便な食物アレルギー根治療法として非常に有望であることを示唆するとともに、試験中止につながった副反応を軽減するアプローチを導入することができれば、本療法の恩恵にあずかる食物アレルギー患児を大幅に拡大できる可能性を示唆した。

E. 重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法における治療反応性予測マーカーの探索

24 週の治療後に負荷試験閾値が卵白 2 g 以上となった 7 例と 2 g を越えなかった 15 例で比較すると、12 週と 24 週の血清 TARC 値は閾値上昇群で有意に高値であった。TARC の変動と閾値の間では有意な関連はみられなかった。本試験では試験期間中、アトピー性皮膚炎コントロールのためステロイド外用剤のプロアクティブ療法を行い、皮疹がほとんどない状態を維持できていたことより、血清 TARC 高値はアトピー性皮膚炎の状態を示さず、免疫療法による個体の免疫応答を反映している可能性が考えられた。

次に、高感度の DCP チップ法で特異的抗体を測定したところ、特異的 IgE は有意な変動を示さなかったが、特異的 IgG および IgG4 はそれぞれ 12 週、24 週に有意に上昇した。しかし、治療後の負荷試験の閾値上昇の程度と IgG1、IgG4 抗体の変化には明らかな関連は認められず、治療反応性のマーカーとしては、さらなる検討が必要と考えられた。

F. 経皮アジュバント候補物質のスクリーニング

アレルギー免疫療法は、治療が長期間に及ぶとともに時にアナフィラキシーショックなど重篤な副反応を誘発するなど、患者負担の大きな治療法であり、アレルギー用量・投与回数・投与期間の低減と安定した免疫応答の保証が望まれている。これらの問題を解決する方策として、免疫応答を増強・修飾できるアジュバントの併用が挙げられる。アジュバントを適用した HG 製剤の開発には、経皮投与によってアジュバント活性を発揮できる候補物質を新たに探索・同定し、得られた候補物質の安全性・有効性評価と活性機序の解明を図る必要がある。本研究では経皮アジュバント候補物質として、自然免疫と獲得免疫のクロストークに重要な TLR を標的とするリガンド分子に着目した^{4),5)}。

まず、マウス皮膚細胞における TLR の発現を解析したところ、APC として機能する LC および dDC には TLR1 から TLR9 まで全ての TLR 発現が確認された (Fig. 5)。ケラチノサイトにおいては TLR3、7、8、9 の僅かな発現が認められた。皮膚は病原体の侵入を防ぐ物理的バリアを構築しているだけではなく、病原体を排除する免疫学的バリアも備えており、皮膚に存在するこれらの細胞が TLR を介して病原体の侵入を迅速に察知し、自然免疫の誘導を促していると考えられる。したがって、今回発現が認められた TLR に対するリガンドを HG 製剤に適用することで、経皮アジュバント効果が発揮されるものと予想された。

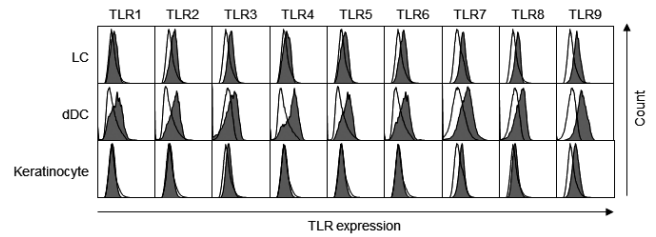


Fig. 5. Expression analysis of TLRs in skin cells. Epidermal cells and dermal cells were analyzed for the expression of TLRs by FCM. Open histogram represents isotype control group, and filled histogram represents staining group.

C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスに各種アジュバント候補物質を併用した OVA-HG を用いて経皮投与すると、OVA 特異的 IgG 抗体価はすべてのアジュバント併用群において OVA 単独群よりも高値を示し、またマウス系統間での差異は認められなかった。これら OVA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析を行ったところ、OVA 単独群は IgG1 抗体 (Th2 型 IgG サブクラス) のみが検出されたのに対して、Poly I:C 併用群と Imiquimod 併用群では BALB/c マウスにおいて Th1 型 IgG サブクラスの IgG2a が検出され、K3 併用群では両マウス系統において Th1 型 IgG サブクラス (IgG2c および IgG2a) の抗体価上昇が認められた。さらに OVA 特異的 IgE 抗体価は、Pam3CSK4 併用群、LTA-SA 併用群、Imiquimod 併用群において OVA 単独群よりも高値を示し、Poly I:C 併用群および K3 併用群では OVA 単独群と同レベルであった。以上の結果をまとめると、Poly I:C (TLR3 ligand) および K3 (TLR9 ligand) は、HG を応用した EPIT におけるアレルギー用量・投与回数・投与期間の低減が見込めるのみならず、アレルギー患者の Th2 型に傾いた免疫応答を Th1 型に偏向できる可能性をも有するアジュバントとして有望であると考えられた。

G. OVA アレルギーモデルマウスと HG を用いた経皮免疫療法治療モデル

OVA-IgE Tg マウスに EPIT および SCIT を実施したところ、SCIT 群の OVA-IgE Tg マウスでは血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価が 3 週間で上昇し始めたのに対し、EPIT 群では 4 週間後から抗体価の上昇が認められた。一方、OVA 特異的 IgE 抗体価は両群ともに治療による影響を受けなかった。また、Th2 サイトカインである血中 IL-4 濃度は SCIT 群・EPIT 群ともに無治療群と比較して低下が認められた。SCIT 群では、頻回の OVA 注射投与により耳介皮膚の炎症や肥厚が観察されたのに対し、EPIT 群では皮膚刺激性・傷害性は認められなかった。以上の結果から、HG はアレルギー特異的 IgE 抗体価が高値に維持された状態でも貼付部位皮膚に重篤な局所反応を誘発することなく、SCIT と同様にアレルギー特異的 IgG 抗体の産生を誘導することが示された。免疫治療後の血清を回収して PCA 試験を実施したところ、血清 10 倍希釈での Evans Blue 漏出面積は SCIT 群で増加し、EPIT 群では減少が認められた。免疫治療を実施した OVA-IgE Tg マウスに 100 µg OVA を静脈内投与すると、無治療群および EPIT 群と比較して SCIT 群では直腸温のより大きな低下が認められた。これら OVA-IgE Tg マウスを活用した免疫治療モデルの結果から、HG を用いた EPIT は従来の SCIT と比較して安全性に優れる新規アレルギー特異的免疫療法として有望であることが示された。今後、本モデルの最適化検討を進めるとともに、HG を用いた EPIT の奏効機序の解析へと展開する予定である。

H. 新規 HG の探索・開発

現行の HG は親水性アクリル樹脂を主剤とし、グリセリンその他の低分子化合物を含むものである。アレルギーの表面濃縮に優れ、食物アレルギーに対する経皮免疫療法用デバイスとして多くの薬理試験および臨床研究の用途に供されてきたが、本経皮免疫療法の臨床試験第 I 相への進展をスムーズにサポートするためには以下の課題に対する解決が望まれる。

- (1) 現行の HG ではアレルギー水溶液を塗布して乾燥させるまでの時間が長く、自動化および大量生産のためには改良が必要である。
 - (2) 現行の HG の支持体、離型フィルムを含めた全体仕様は、クリーンブースでの手作業を意識したものであり、大量生産のためにはよりふさわしい仕様とすることが必要である。
 - (3) 組成物として医薬品経皮投与実績を有する添加剤のみからなる新しい親水性ゲルとすることにより、近い将来予想される正式の臨床試験第 I 相への進展をよりスムーズにする。
- そこで今回、これらの条件を具備した臨床試験用 HG の大量安定供給を見据えた新たな HG の開発に取り組んだ。

親水性アクリル粘着剤 2 種 (MAS683 と MASCOS10) のいずれを用いた新規 HG も粘着物性は良好であった。HG を水中に浸漬して吸水率を測定したところ MAS683 のほうが優れていたため、以降の検討で MAS683 を基剤として使用することとした。また添加剤としては、グリセリンおよび界面活性剤以外に低分子量ポリビニルピロリドンを含む組成がバランスの取れ

た粘着剤となることを見出し、新規 HG 組成物とした。

新規 HG は、高分子物質である FD10 を粘着層の表面に濃縮することができ、低分子物質である色素は粘着層の表面から全体に浸透させることができた。また、現行 HG とほぼ同等の吸水性能を有しており、物性的にも近似していた。今後、薬理的評価を含めてさらに性能評価を行い、臨床試験用の最終製剤へと完成させる予定である。

今後の研究活動について

(1) 食物アレルギーモデルマウスにおける HG を用いた EPIT の有効性評価

食物アレルギーモデルマウスの作成条件の最適化を継続するとともに、本モデルにおけるアレルギー装填 HG を用いた EPIT による有効性を血中 sIgG/sIgE タイター比測定、経口負荷試験におけるアナフィラキシー誘発閾値評価（体温変化、糞便観察）、経口負荷後の各種免疫学的パラメーター解析（血中ヒスタミン値変化、血中 TARC 値変化、肥満細胞・好塩基球の頻度・活性化状態、制御性 T 細胞の頻度、など）に基づいて検証する。また、EPIT の有効性に対するアレルギー用量ならびに貼付スケジュールについても検討する。ヒト食物アレルギーに近いモデルを確立することで前臨床研究をさらに推進し、早期の GLP 試験への展開を目指す。

(2) HG を用いた EPIT の奏効機序解明

食物アレルギーモデルマウスにアレルギー装填 HG を貼付した際の貼付部位皮膚につい

て、遺伝子発現変動を RNA-seq 解析により、アレルギーの動態・局在・捕捉細胞を Flow cytometry 解析あるいは蛍光イメージングにより精査する。また、dLN 中における免疫イベントを健常マウスにアレルギー装填 HG を貼付した場合と比較検討する。これらの結果から EPIT による減感作・脱感作に寄与すると考えられる免疫細胞あるいは免疫機能分子について、各種遺伝子改変マウスを用いた手法を組み合わせることでより詳細な機能解明を進める。

(3) HG を用いた EPIT の大規模臨床研究

本研究では重症牛乳患児に対するパイロット試験において、摂取閾値上昇の効果およびブロッ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。また、重症鶏卵アレルギーに対するパイロット試験においても同様の有効性が認められている。これらの結果は、HG を応用した EPIT の大規模臨床試験を実施する妥当性を示しており、今後は臨床研究法に則った特定臨床研究として多施設でより多数例の実施が望まれる。大規模臨床研究を行うためには、アレルギー装填 HG の大量生産体制の確立や総合賠償責任保険・普通傷害保険などに多額の費用を要するため、十分な研究費を獲得する必要がある。

参考文献

- 1) Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan Y-S, Kamiyama F, Fujita T, Yamamoto A, Nakagawa S, Okada N. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial

- infection. *J. Control. Release* 2008 Oct; 131(2): 113-20.
- 2) Matsuo K, Ishii Y, Kawai Y, Saiba Y, Quan Y-S, Kamiyama F, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Analysis of transcutaneous antigenic protein delivery by a hydrogel patch formulation. *J. Pharm. Sci.* 2013 Jun; 102(6): 1936-47.
- 3) Dupont C, Chouraqui JP, Linglart A, Bocquet A, Darmaun D, Feillet F, Frelut ML, Girardet JP, Hankard R, Rozé JC, Simeoni U, Briand A. Nutritional management of cow's milk allergy in children: An update. *Arch. Pediatr.* 2018 Apr; 25(3): 236-43.
- 4) Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 Mar; 7(3): 179-90.
- 5) Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2004 Oct; 5(10): 987-9.

研究課題名	ソバアレルギーの特性改変に効果的な手法の探索		
フリガナ	サトウ リエ		
代表者名	佐藤 里絵		
所属機関（機関名） （役職名）	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 上級研究員		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	近藤康人 （コンドウヤスト）	学校法人 藤田学園 藤田 医科大学 ばんだね病院 小児科 教授	ソバアレルギー患者の診断・ 問診、収集した血清の抗体価 の調査
	手島玲子 （テシマレイコ）	学校法人 加計学園 岡山 理科大学 獣医学科 食品 衛生講座 教授	ソバアレルギーコンポーネン トの消化性試験
本助成金による発 表論文，学会発表	国際誌への投稿に向け準備中である。		

研究結果要約

ソバ（*Fagopyrum esculentum* Moench）はアミノ酸バランスの良い（アミノ酸スコア 100）タンパク質や、脂質、食物繊維、ビタミン、および抗酸化作用等を持つルチンの豊富な作物である。一方でソバは、ごく微量でアナフィラキシーなど重篤な症状を引き起こすことから、日本では特定原材料として加工食品への表示義務が課されている。ソバは日本だけでなく世界各地で食べられている食品であり、ソバアレルギーの低減は重要な課題である。ソバアレルギーの原因物質であるソバアレルギーはすでに複数同定されている。我々はアナフィラキシーの原因アレルギーであるとの報告のある **Fag e 2** について解析を進めてきており、一部のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換すると消化耐性が低下することを示すとともに、エピトープ配列の同定を行ってきた。本研究では、ソバアレルギーと、症状およびソバ特異的 IgE 抗体価との関連性を調査し、**Fag e 2** と BW10kDa との両方に結合活性を示す患者血清は、比較的高いソバ特異的 IgE 抗体価および重篤な症状を示すものであることがわかった。また、そば乾麺を調理した際、調理後のアレルギーの消化性が変化する可能性を示した。今後、これらのアレルギーのアレルギー誘発性を明らかにすることで、ソバアレルギーのより正確な診断や低アレルギー食品の開発、ならびに低アレルギー品種の作出に貢献したい。

研究目的

現在、患者が食物アレルギーを引き起こさないようにする方法は、原因食品の摂食を避けること、である。我々が避けるべき原因食品を知るためには、正確な診断が必要とされる。近年、食物アレルギーの原因物質である食物アレルギーに関し、1種類の原因食品には複数のアレルギーが含まれること、患者によって反応するアレルギーが異なること、および、どのアレルギーに反応するかによって症状に差異が生じることがあること、などが明らかになってきた。そこで、個々のアレルギー（アレルギーコンポーネント）を同定することと、それぞれがどのような症状の原因アレルギーであるか関連付けることが、より正確な診断に繋がると期待され、症状と関連付けられたアレルギーコンポーネントに対する特異的 IgE 抗体価を測定する食物アレルギー検査である **Component Resolved Diagnosis (CRD)** の確立が進んでいる。実際、小児に症例の多い乳や、重篤な症状で知られる小麦や落花生で CRD を実施し、従来の検査法の場合と比べ、さらに正確な診断を行うことができることが示されてきている。また、CRD による検査結果を踏まえ、アレルギーコンポーネントを低減できる加工・調理法の確立やテラーメイド低アレルギー食品の開発、またアレルギーコンポーネントを欠失・低減した作物品種の育成に対するニーズも高まっている。

ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) はタデ科ソバ属に属する作物で、アミノ酸バランスの良い（アミノ酸スコア 100）タンパク質を含み、脂質や食物繊維、ビタミン、および抗酸化作用等

を持つルチンも豊富な食品である。一方でソバは、ごく微量でアナフィラキシーなど重篤な症状を引き起こすことから、日本では特定原材料として加工食品への表示義務が課されている。また、ソバアレルギーは寛解されにくいことが知られている。

ソバアレルギーはすでに複数同定されており¹⁾、**Fag e 2** はアナフィラキシーの原因アレルギーであるとの報告がある³⁾。我々は **Fag e 2** について解析を進めてきており、一部のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換すると消化耐性が低下することを明らかにするとともに、エピトープ配列の同定を行ってきた^{4, 5)}。本研究では、①ソバアレルギーと症状およびソバ特異的 IgE 抗体価との関連性、②調理加工等がソバアレルギーの消化性に及ぼす影響、③**Fag e 2** における変異が消化性・アレルギー誘発性に及ぼす影響、を解明し、ソバアレルギー改変を目指す。本研究で得られる成果は、ソバアレルギーの CRD の確立や低アレルギー食品の開発、低アレルギーソバ品種の作出に貢献すると期待される。

研究計画及び研究手法

① ソバアレルギーと症状との関連性

症状の履歴やソバ特異的 IgE 抗体価の明確な血清を用い、ソバアレルギーの中でも **Fag e 2**、**BW10kDa**、および **Fag e 4** に注目し、これらアレルギーと症状およびソバ特異的 IgE 抗体価との関連を調査する。方法としては、これまでにソバアレルギーに関連して我々が収集した血清と、ソバから抽出したタンパク質画分とを用いたウ

ウェスタンブロットにより、各患者血清とソバタンパク質画分中のタンパク質との反応性を確認する。

② 調理加工等がソバアレルゲンの消化性に及ぼす影響

アレルゲンは分子量や含有量、消化性などの性質がそれぞれ異なる。また、消化性は熱や圧により変化する場合がある。そこで、ソバアレルゲンとしてすでに報告されているもののうち、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 に注目し、調理加工等の処理前後で消化性が変化するかどうかを調査する。検出は、市販されているそば麺から抽出したタンパク質画分と、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 の 3 種類のソバアレルゲンに対する特異的抗体とを用いたウェスタンブロットにて行う。

③ Fag e 2 における変異が消化性・アレルギー誘発性に及ぼす影響

Fag e 2 は消化耐性を示すアレルゲンである³⁾が、Fag e 2 を構成するアミノ酸残基のうち、一部のシステイン残基を他のアミノ酸残基に置換すると、消化耐性が低下（消化性が向上）することを我々はすでに報告している⁴⁾。また、我々はすでに Fag e 2 のエピトープ配列を同定している⁵⁾。そこで、本研究では、Fag e 2 の IgE エピトープ配列を他のアミノ酸残基に置換すると消化性やアレルギー誘発性が変化するかを調査する。アレルギー誘発性の調査に用いる EXiLE (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression)

法はヒト Fc ϵ RI を発現させたラット培養マスト細胞株 (RS-ATL8) の転写因子 (NF- κ B) 活性化をルシフェラーゼアッセイにて検出する in vitro 試験法で、高感度・高特異性で、より臨床に近い形で Fc ϵ RI の架橋によるマスト細胞活性化を測定できる。本研究では、-80℃で保存可能な患者血清中 IgE と、Fag e 2 変異体との反応性を EXiLE 法で検出し、Fag e 2 のエピトープのどのアミノ酸残基がアレルギー反応の惹起に影響するか調査する。

結果と考察

1) ソバアレルゲンと症状との関連性

現在、一般に栽培・流通しているソバは、他殖性品種である。他殖性品種では、種子 1 粒ごとに遺伝的背景が異なっている。本研究では、その他殖性品種の 1 つであるキタワセソバ (Fagopyrum esculentum Moench cv. Kitawase-soba) を材料として用いた。キタワセソバの種子複数粒を粉碎し、得られた粉末に milli Q で 2 倍希釈した 2×Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD) を加え、Rotator を用いて 4℃にて転倒攪拌することで、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は遠心し上清を取り分け、フィルターを用いてろ過後、ソバタンパク質画分とした。得られたタンパク質画分のタンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) を用いて測定し決定した。得られたタンパク質画分は電気泳動にて分離し、分離したタンパク質は PVDF 膜に転写した。転写後の膜は我々が作成した Fag e 2、BW10kDa、あるいは Fag e

4 特異的抗体を用いてウェスタンブロットに供した。その結果、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 特異的抗体との結合活性を示すバンドが観察されたことから、材料として用いたキタワセソバから抽出したソバタンパク質画分は、今回の検出対象である Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 を含んでいることがわかった。次に、この膜と、我々がソバアレルギーに関連して収集した血清とを用いたウェスタンブロットを行った。その結果、各患者血清とソバタンパク質画分中のタンパク質との反応性はそれぞれ異なっていた。Fag e 2 および BW10kDa に結合活性を示す患者血清は複数見られたが、Fag e 4 に結合活性を示す血清は見当たらなかった。Fag e 4 との結合活性を示す患者血清を見つけることができなかった理由の 1 つに、Fag e 4 の分子量が小さく、検出がうまくできていない可能性があることが挙げられる。次に、この結合活性と、各患者の症状およびソバ特異的 IgE 抗体価を比較したところ、Fag e 2 と BW10kDa との両方に結合活性を示す患者血清は、比較的高いソバ特異的 IgE 抗体価を示し、重篤な症状を示すものである可能性が示唆された。

2) 調理加工等がソバアレルギーの消化性に及ぼす影響

消化耐性についてすでに報告されている Fag e 2 のほか、消化性などの性質が不明な BW10kDa や Fag e 4 に注目し、調理加工等の処理前後で消化性が変化するかどうかを調査した。材料として、市販のそば乾麺を用い、(i)調理する前のそば乾麺、

(ii)商品に記載されている調理法に従い茹でたもの（通常調理）、および、(iii)圧力鍋を用いて茹でたもの（高圧調理）、の 3 種類を準備した。通常調理および高圧調理のそば麺は、凍結乾燥後、粉碎し、粉末とした。粉末からのタンパク質画分の抽出は①と同様に行った。得られたタンパク質画分は Takagi et al. (2003)⁶⁾の方法に従い、消化試験に供した。消化試験後のサンプルは電気泳動にて分離後、ゲルを coomassie brilliant blue 染色および銀染色にて可視化するとともに、PVDF 膜に転写し、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 の 3 種類のソバアレルギー特異的抗体を用いたウェスタンブロットにて、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 を検出した。その結果、Fag e 4 については、ほとんど検出できなかった。この原因として、①の結果と同様、Fag e 4 の分子量が小さく、検出がうまくできていない可能性があり、検出系の改善の必要がある。また、Fag e 2 は、乾麺と比べ、通常調理により消化性が高まる傾向が見られたのに対し、BW10kDa は、通常調理では消化性が変化しない傾向が見られた。このことは、BW10kDa は比較的高い消化耐性の高いアレルギーである可能性を示している。

3) Fag e 2 における変異が消化性・アレルギー誘発性に及ぼす影響

①において、Fag e 2 と結合活性を示すことがわかった患者血清を用い、EXiLE 法にてアレルギー誘発性評価を行った。EXiLE 法は Nakamura et al. (2010)⁷⁾に従い行った。予備試験として、キタワセソバから抽出したタンパク質

画分を EXiLE 法に供した。その結果、健常者血清と比較して、ソバアレルギー患者血清の中に、キタワセソバタンパク質の濃度依存的に反応性を示す血清があることがわかった。次に、キタワセソバタンパク質画分の代わりにリコンビナント Fag e 2 野生型を用いて同様の実験を行ったところ、濃度依存的にリコンビナント Fag e 2 野生型と反応性を示す血清は見られなかった。したがって、本研究の目的である、Fag e 2 における変異がアレルギー誘発性に及ぼす影響を評価することができなかった。

今後の研究活動について

Fag e 4 については、はっきりとした検出結果を得ることができなかった。これについては、検出に用いるタンパク質濃度の改善や、検出系の検討・改良を行い、追試を行う予定である。また、リコンビナント Fag e 2 を用いた Fag e 2 のアレルギー誘発性評価ができなかった点については、今回解析に用いた患者血清が Fag e 2 以外のアレルゲンに結合することによりアレルギー誘発性に関与している可能性、および、リコンビナント Fag e 2 が native の Fag e 2 とは異なる立体構造を取っている可能性が考えられ、さらなる検討が必要である。また、ソバは他殖性作物であり、ある 1 つのソバ品種であっても、その中には複数の遺伝的背景、すなわち変異を含んでいる可能性がある。したがって、今回解析に用いたリコンビナント Fag e 2 が、今回解析に用いた患者血清の結合できる配列を持っているかどうかについても検討し、Fag e 2 のアレルギー誘発性に関する解

析を進めて行きたいと考えている。

参考文献

- 1) 近藤康人、宇理須厚雄、和田映子、鶴田光敏、矢崎雄彦、山田一恵、増田進、森田豊. そば主要アレルゲンの Immunoblotting 法による検討. アレルギー. 1993; 42(2): 142-148.
- 2) Urisu A, Kondo Y, Morita Y, Wada E, Tsuruta M, Yasaki T, Yamada K, Kuzaya H, Suzuki M, Titani K, Kurosawa K. Identification of a major allergen of buckwheat seeds by immunoblotting methods. Allergy Clin Immunol News. 1994; 6: 151-155.
- 3) Tanaka K, Matsumoto K, Akasawa A, Nakajima T, Nagasu T, Iikura Y, Saito H. Pepsin-resistant 16-kD buckwheat protein is associated with immediate hypersensitivity reaction in patients with buckwheat allergy. Int Arch Allergy Immunol. 2002; 129(1): 49-56.
- 4) Satoh R, Koyano S, Takagi K, Nakamura R, Teshima R, Sawada J. Immunological characterization and mutational analysis of the recombinant protein BWp16, a major allergen in buckwheat. Biol Pharm Bull. 2008; 31(6): 1079-1085.
- 5) Satoh R, Koyano S, Takagi K, Nakamura R, Teshima R. Identification of an IgE-binding epitope of a major buckwheat allergen, BWp16, by SPOTs assay and mimotope screening. Int Arch Allergy Immunol. 2010; 153(2): 133-140.

- 6) Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. Biol Pharm Bull. 2003; 26(7): 969-973.
- 7) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R. A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. Allergy. 2010; 65(10): 1266-1273.

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン 9 分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

研究課題名	ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン 9 分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防		
フリガナ	ミズノ マサシ		
代表者名	水野 雅史		
所属機関（機関名） （役職名）	神戸大学大学院農学研究科 教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	榊原 啓之 （サカキバラ ヒロユキ）	宮崎大学農学部	食品中の活性物質の分析と 同定
本助成金による発表論文，学会発表	該当なし		

研究結果要約

近年、我が国において花粉症を始めとする I 型アレルギーの発症率は、年々増加の一途をたどっている。これまでにマコンブに含まれるフコイダンを経口摂取した時にのみ IgE との親和性が高いガレクチン 9 (Gal9) が血中に分泌され I 型アレルギーが抑制されることを明らかにした。しかしながら、コンブには健康被害を及ぼすヒ素（乾物重当たり約 53mg）が含まれており、過剰にコンブを摂取することは健康面からすると問題である。そこで本研究では、フコイダンと同時に摂取することでアレルギー抑制効果を増強させる食品を探索し、それに含まれる有効成分をポリフェノール類を中心に同定することでアレルギー予防が期待できるポリフェノールカクテルを選定し、I 型アレルギー予防に貢献できる食品の食べ合わせを提唱していくことを目的とした。その結果、野菜類ではネギおよびタマネギに、藻類ではノリからの抽出物に増強効果が認められた。そこで活性が認められた野菜とそうでない野菜類中の各ポリフェノール類を比較したところ、ポリフェノールカクテルの候補としてはケルセチンやケンフェロールなどのフラボノール類が見出され、それらを豊富に含んでいる豆苗やオクラが列挙された。一方、ノリ抽出物にも同様の相乗効果を示すことが本研究の一環から見出されたが、フコイダンとは全く違った抑制機構を介することによって抗アレルギー効果を相乗効果に示していることが明らかとなった。

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

研究目的

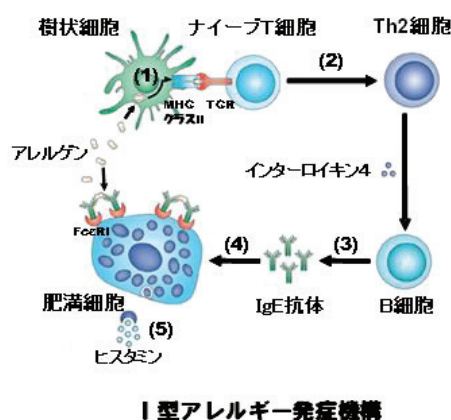
I型アレルギーモデルである受動皮膚アナフラキシー（PCA）において、フコイダン経口摂取が耳介の浮腫を抑制すること、またその作用機序はアレルギー発症において重要な働きをしているIgEとの親和性が高いガレクチン9（Gal9）が血中に分泌され、その結果肥満細胞とIgEとの結合が阻害されるためであることを明らかにしたり。また、オボアルブミン（OVA）により感作されたマウスにおいてもフコイダン経口投与によりアレルギーが抑制されることも明らかにしてきた。一般に花粉症や食物アレルギーに代表されるI型アレルギー発症には、（1）樹状細胞によるアレルゲン認識、（2）ナイーブT細胞から2型ヘルパーT細胞（Th2）への分化誘導、（3）B細胞のIgE産生へのクラススイッチ、（4）IgEと肥満細胞の結合といった一連の反応系、いわゆる感作状態、（5）再度のアレルゲン曝露による脱顆粒によりアレルギーが発症すると言われている（下図参照）。このような発症経路の中で、OVA感作によるフコイダンの抗アレルギー効果については、（4）の部分に阻害するという新規のアレ

ルギー抑制機構を提唱した。さらにフコイダンは感作後のマウスに対してもアレルギーを抑制できる事も明らかにし、これまで報告されているTh1/Th2バランスを調整することでアレルギーを抑制する食品因子とは異なった機能を備えた食品因子として意義のある物質であることを明らかにしてきた²⁾。このようにフコイダンを豊富に含むコンブを摂取することは、アレルギー発症の抑制あるいは予防において非常に有意義なことに思われる。しかしながら、コンブには蓄積すると健康被害を及ぼすヒ素が含まれており、アレルギー予防を目的にコンブ摂取によって十分量のGal9分泌促すことは健康の面からすると問題が生じる。そこで本研究では、フコイダンと同時に摂取することでアレルギー抑制効果を増強させる食品を探索し、その食品に共通に含まれる成分を同定することでアレルギー予防が期待できるポリフェノールカクテルの構築を目的とした。

研究計画及び研究方法

研究計画

フコイダンを経口摂取すると血中にGal9が分泌され、このGal9がIgEと結合することでアレルギーを抑制すること、経口摂取した場合のみアレルギーが抑制されること、アレルゲンに感作された後からフコイダンを摂取してもアレルギーが抑制されることなど、食事から摂取するのに適した機能性素材であることをこれまでに明らかにしてきた。しかしながら、その一方で人体に影響が懸念されるヒ素を含んでいるため大量に摂



ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

取することは好ましくないとされている。そこで本研究では、コンブとの食べ合わせにより、抗アレルギー作用の相乗効果が期待できるポリフェノールカクテルを構築することを目的とした。そのため以下の①と②の実験を計画した。

① PCA 試験を用いてフコイダンによる Gal9 分泌を促進する食品素材の探索

5 週齢、雌の BALB/c マウスに抗アレルギー効果を示さない濃度（これまでの経験から 100 $\mu\text{g/ml}$ 以下であることが判明¹⁾）のフコイダンと共に青果物のホモジネートを同時に 4 日間、毎日胃内強制投与した後、抗 DNP-IgE を尾静脈より投与し、その 30 分後に最初の耳介厚を測定した。さらに、その直後抗原 (Ag) である DNP を耳介に塗布し、2 時間後に再び耳介厚を測定した。この刺激前後の耳介厚の差を IgE/Ag による浮腫とし、その差の増加度合いで抗アレルギー効果を判断した。また、血中の Gal9 分泌量については抗 IgE 抗体を用いて免疫沈降法で IgE 画分を調整し、その上で抗 Gal9 抗体を用いたウェスタンブロット法で検出して、組み合わせによる Gal9 分泌促進効果を確認する。これらの結果から、候補となる青果物を選抜する。共同研究者によって明らかとなったポリフェノール類から、一つずつ化合物を除いて同様の実験を行い、必要最小限のポリフェノール類を明らかにする。

② ポリフェノールカクテルの構築

実験①で効果のあった青果物エキスとなかつ

たものをポリフェノール分析システム (HPLC-PDA) に供し、構築したポリフェノールライブラリーから活性物質を想定し、ポリフェノールカクテル候補リストを作成する。この時、候補化合物が未知成分である場合は、LC-MS/MS、NMR などの分析技術を駆使してその構造を同定する。また必要に応じて、HPLC を用いた候補化合物の単離・精製を行い、十分量の化合物を調整しカクテル用試薬として準備する。最後に、実験①から明らかとなったポリフェノールカクテルを理想的に含んでいる青果物を見出す。

研究手法

1. フコイダン画分の抽出

基本的には Tanino ら¹⁾の方法に従った。具体的には、液体窒素と共に乾燥マコンブをワーニングブレンダーを用いて粉碎した後、凍結乾燥機を用いて凍結乾燥物を得た。次に凍結乾燥物に対して 20 倍量の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) を加えて、4℃で一昼夜攪拌抽出した。その後遠心分離 (3,500 rpm、10 分)により、上清を採取し容量の半分になるまで減圧濃縮を行った。この濃縮液に 2 倍量のアルコールを加え再び一昼夜 4℃で保存した後、遠心分離により残渣を回収しフコイダン画分とした。

2. 各野菜抽出物の調整

野菜中に含まれるポリフェノール類画分を抽出する方法は常法にしたがって抽出した³⁾。市販されている新鮮な各野菜を包丁で細かく刻み、液

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

体室素で凍らせて乳鉢で粉末状に砕いた。その後、凍結乾燥機を用いて乾燥させた。得られた凍結乾燥物に対して、20倍量の80%エタノールを加えて25℃で一晩振盪した。懸濁液を吸引ろ過して得られたろ液を減圧濃縮してエタノールを完全に蒸発させ、これを再び凍結乾燥させたものを野菜抽出物とした。

また、野菜中に含まれるポリフェノールを同定するために、加水分解を実施した。具体的には、野菜の凍結乾燥物(50mg)を塩酸加水分解した後、酢酸エチル抽出した。

3. ノリ多糖画分の抽出

凍結乾燥機を用いて乾燥ナラワスサビノリを乾燥させた後、ビーズショッカーで粉碎(3,000rpm×10秒)した。この乾燥粉末1gに対して25mlの蒸留水を加え室温で一晩攪拌抽出した後、遠心分離(3,500rpm×10分)して沈殿を回収した。この沈殿物に1回目と同量の蒸留水を加えて室温で1時間攪拌した後、再び同条件で遠心分離して沈殿を回収した。この沈殿を凍結乾燥し、50倍量の0.2%酢酸水溶液を加えて50℃で一晩静置し、遠心分離(3,500rpm、10分)によって上清を回収した。回収液は、1M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7に調整した後、2倍量の100%エタノールを加えて4℃で一晩遠攪拌した後、遠心分離(3,500rpm×10分)した後沈殿を回収し、100%エタノールで2回洗浄した。これを蒸留水に溶解して、室温で一晩透析して脱塩に供した。この溶液を凍結乾燥し、ナラワスサ

ビノリ多糖画分とした。

4. 陰イオン交換クロマトグラフィー

研究手法1で調整した画分を陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。交換体としてはToyopearl-DEAE 650Mを用い、溶離液としては0.05M Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)に0.5Mおよび1.0M NaClのステップワイズ方で溶出した。それぞれの画分は、フェノール硫酸法によって糖含量を測定した。検量線には、フコースを標準物質として作成し、フコース当量で算出した。

5. 受動的アナフラキシー(PCA)反応

5週齢、雌のBALB/cマウスに抗アレルギー効果を示さない濃度(これまでの経験から100μg/ml以下)のフコイダンと共に青果物のホモジネートを同時に4日間、毎日胃内強制投与した後、抗DNP-IgEを尾静脈より投与し、その30分後に最初の耳介厚を測定した。さらに、その直後抗原(Ag)であるDNP-BSAを耳介に塗布し、2時間後に再び耳介厚を測定した。この刺激前後の耳介厚の差をIgE/Agによる浮腫とし、その差の増加度合いで抗アレルギー効果を判断した。Gal9あるいは各種サイトカインの中和抗体による耳介浮腫への影響を確認する際には、抗DNP-IgEを尾静脈から注射する1時間あるいは2時間前に、それぞれの中和抗体を1μgあるいは10μg尾静脈から投与した後、上述と同様にPCA反応を行った。

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

6. HPLC 分析

上記 2 で調整した野菜抽出物および加水分解物を 0.5%トリフルオロ酢酸含有メタノールに溶解後、メンブレンフィルターろ過したものを次の条件で HPLC に供した: HPLC システム JASCO system control program (LC-NetII/ADC)、カラム: CAPCEL PAK C18 UG120, S5, 3 μ m, 3.0 mm I.D. $\times$ 150 mm (大阪ソーダ) 移動相: 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.3) とメタノールの低圧グラジェント。定量は、加水分解物の測定結果より、野菜中に含まれるフラボノイドアグリコンの有無を確認した。次に、アグリコンの存在を確認できた野菜抽出物を HPLC に供し、溶出時間と吸収スペクトルがライブラリ内のデータと一致した場合は、その標準物質の検量線から含有量を求めた。溶出位置と吸収スペクトルがライブラリ内のデータと一致しなかったが、そのスペクトル情報から、フラボノイド等のポリフェノール類の種別できた場合は、類似した骨格を有する標準品の検量線を用いて含量を求めた。

結果と考察

1. 野菜抽出物の共投与でのアレルギー抑制作用

ポリフェノールを多く含む野菜について、その抽出物がフコイダンのアレルギー抑制作用を増強するかどうか検討した。ポリフェノールである

ルテオリンについては、400 μ g の4日連続経口投与が PCA 反応においてアレルギー抑制作用を示すことが分かっている⁴⁾。そこでルテオリン単独では抗アレルギー効果を示さない濃度を検討した結果、200 μ g 以下であることが分かった。この 200 μ g は Hostetler ら⁵⁾の報告によると、ルテオリンを多く含む赤ピーマンの新鮮重2.33 g 相当だと算出された。そこで、これを基準量として他の野菜抽出物についても新鮮物換算で2.33g 相当の凍結乾燥物を一日の投与量とした。一方フコイダン投与量は、既報から一日100 μ g とした¹⁾。フコイダンと野菜抽出物の共投与による耳介浮腫の抑制効果を図1に示した。抗原・抗体反応によって誘導された耳介浮腫は、200 μ g フコイダン投与によって有意に抑制されたが、100 μ g 投与では抑制は認められなかった。しかしながら、タマネギあるいはネギ抽出物とフコイダンの共投与によって耳介浮腫は有意に抑制され、その効果はほぼ200 μ g フコイダン投与と同等の抑制率を示した。一方、赤ピーマンおよびショウガとの共投与では効果は認められなかった。これ以外の野菜抽出物についても検討したが、有意に抑制を示す野菜は認められなかった。これらの結果から、フコイダンの共投与によって抗アレルギー効果を増強させる野菜としてタマネギおよびネギが有効であることが明らかとなったが、摂取量に関してはフコイダン単独の約半分程度であった。

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

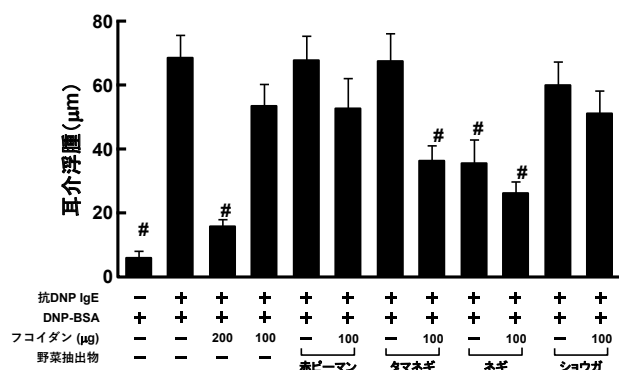


図1. PCA反応試験におけるフコイタンと野菜抽出物との共投与における耳介浮腫抑制効果

#: 抗体/抗原反応区と比較して有意差があることを示す ($p < 0.05$)。Tukey-Kramer test。平均値 ± SE。

2. HPLC 分析によるアレルギー抑制効果を増強させるポリフェノール類の検討

上記1の試験で効果が見られた抽出物と効果が見られなかった抽出物を HPLC に供した結果を表1に示した。効果が見られた2つの野菜(タマネギ、ネギ)と効果が見られなかった2つの野菜(赤ピーマン、ショウガ)を比較すると、効果が見られた野菜にはケルセチン(タマネギ)やケンフェロール(ネギ)が豊富に含まれていることがわかった。一方、効果が見られなかった野菜では、ルテオリン(赤ピーマン)やフェノール酸(ショウガ)が豊富であった。これらの結果から、フコイタンとの共投与によって抗アレルギー効果を増強させる成分は、フラボノール類(ケルセチンやケンフェロール)であることが分かった。一方、フラボン類(ルテオリン)やフェノール酸などのポリフェノール類の増強効果は弱いことも示された。

次に、日本人が日常的に摂取する野菜や果物、茶類53種88部位を分析に供し、フラボノール類を豊富に含む野菜や果物を探索した。その結果、

表1. 各野菜抽出物に含まれるポリフェノール類含有量

	フラボノイド類	フェノール酸類		
	μg/g抽出物			
タマネギ	quercetin-7-O-glucoside	4.81	—	
	quercetin-3,4'-di O-glucoside	0.20		
	rutin	0.07		
	quercetin	0.07		
	quercetin glycosides	6.41		
ネギ	kaempferol glycosides	3.37	cinnamic acids	3.44
	quercitrin	0.82		
赤ピーマン	luteolin glycosides	2.76	cinnamic acids	0.43
	methoxy flavone	0.78		
ショウガ	—		cinnamic acids	67.51

ケンフェロールを豊富に含む野菜として、ブロッコリー、小ネギ、豆苗、アボガド(皮)、カイワレ、小松菜(葉)、菜の花、ソラマメ(皮)が、またケルセチンを豊富に含む野菜として、スナップエンドウ(皮)、フリルレタス、オクラ、グリーンピース(皮)を見出した。

3. コイダンとノリ多糖画分との共投与でのアレルギー抑制作用

フコイタンとナラワスサビノリ多糖画分のそれぞれ単体ではアレルギー抑制作用を示さない量での共投与によって、アレルギー抑制作用が発揮されるかについて検討した。そのためまずノリ多糖類の投与量を検討した結果、図3に示すとおりノリ多糖画分500 μgまたは250 μgの経口投与では耳介浮腫の抑制は認められなかった。そこで既に抗アレルギー効果を示さないことが明らかとなっている100 μgと共投与した場合の耳介浮腫に対する効果を検討した。その結果、フコイタン100 μg投与区ではノリ由来多糖画分は250 μg以上で耳介浮腫の抑制が認められた。さらにフコイタン50 μg投与区ではノリ由来多糖画

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

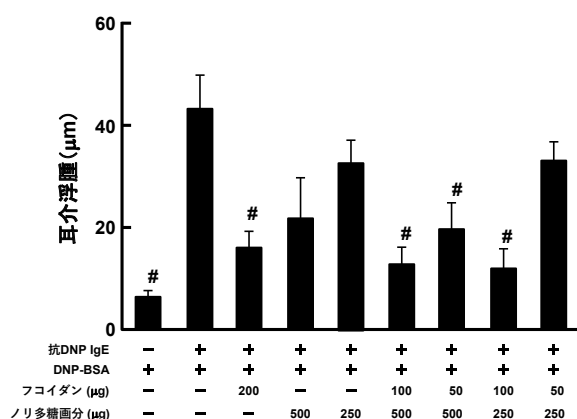


図3. PCA反応試験におけるフコイダンとナラウスサビノリ多糖画分との共投与による耳介浮腫抑制効果
#: 抗体/抗原反応区と比較して有意差があることを示す ($p<0.05$)。Tukey-Kramer test。平均値±SE。

分 500 μg 投与で抑制が認められ、フコイダン単独で抑制効果を示す量の 4 分の 1 まで投与量を削減させることができることが明らかとなった。ポリフェノール類の結果に比べると、さらに半分量までフコイダンの摂取量を削減できることが示唆された。

4. フコイダンとノリ多糖画分のアレルギー抑制機構の相違

今までに研究でフコイダンの抗アレルギー効果は、経口投与した場合のみに認められることと、その作用機序は血中に Gal9 が分泌されることを明らかにしてきた¹⁾。一方、ノリ多糖画分についてはその作用機構についてはよく分かっていないので、サイトカインに着目しそれぞれの中和抗体を用いて PCA 実験を行った。その結果、Gal9 以外に IL-10 中和抗体を抗 DNP-IgE を尾静脈から注射する前に尾静脈注射したときに、フコイダンとノリ多糖画分による耳介浮腫抑制が解消された(図4)。これらのことより、フコイダンとノリ多糖によるアレルギー抑制機構は異なった機

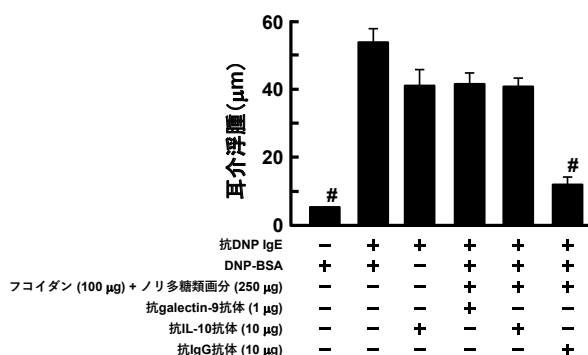


図4. フコイダンとナラウスサビノリ多糖画分との共投与による耳介浮腫抑制効果に対する各中和抗体の影響
#: 抗体/抗原反応区と比較して有意差があることを示す ($p<0.05$)。Tukey-Kramer test。平均値±SE。

構により相乗的に効果を発揮していることが明らかとなった。Liua ら⁶⁾は、紅藻類を経口摂取することで血中に IL-10 が分泌されることを報告している。また、Norton ら⁷⁾は、IL-10 が肥満細胞に発現している IgE に高親和性を示す FcεRI の発現を抑制することを報告している。これらの報告を総合すると、ノリ多糖類の経口投与によって血中に IL-10 が分泌されることによって肥満細胞上の FcεRI 発現が抑制されるため、IgE の肥満細胞が抑制されるためにアレルギー発症が抑制されたと考えられた。

当初予定していた研究計画の内、フコイダン摂取量を削減できる食品の候補としては、赤ピーマンとショウガが見出された。またこれらの中に含まれるポリフェノール類と候補に挙げられなかった食品中のポリフェノールを HPLC 分析で比較すると、ケルセチンやケンフェロール骨格を有するフラボノール類が活性を有する候補化合物として見つかった。また、これらの成分を豊富に含む野菜としてブロッコリー、豆苗、小松菜(葉)

およびオクラを見出した。今後は、この情報を元にフコイダンが有する抗アレルギー効果を増強できるポリフェノールカクテルの構築を視野に入れた研究が可能になると考えられる。一方、今回の研究から紅藻類であるナラワスサビノリに含まれる多糖画分にもフコイダンと共投与することで、抗アレルギー効果画像今日できることを見いだせたことは、予定していた研究以外の成果と判断できる。しかもその抑制機構は、フコイダン投与による Gal9 分泌増強を促すのではなく、抗炎症性のサイトカインである IL-10 分泌促進によることを見いだすことができた。

今後の研究活動について

今回得られた結果を基に、当初予定していたフコイダンとの共摂取により抗アレルギー効果を高めるポリフェノールカクテルの構築を目指していくのが、直近のやるべきことと考えている。そのためには、我々の研究室で開発した腸上皮細胞である Caco-2 と肥満細胞である RBL-2H3 との共培養系を用いて、適切な組み合わせを選抜してから PCA 反応へと展開するのも一案かと考えている。また、ノリ由来多糖画分による抗アレルギー効果がフコイダンの場合とは異なることから、血中 IL-10 分泌を促進する食品を選抜することで、新たなアレルギー抑制を視野に入れた食品の探索に利用できないかを模索しているところである。

参考文献

- 1) Tanino Y, Hashimoto T, Ojima T, Mizuno, M. F-fucoidan from *Saccharina japonica* is a novel inducer of galectin-9 and exhibits anti-allergic activity. J Clin Biochem Nutr. 2016;59(1):25–30.
- 2) Mizuno M, Sakaguchi K, Sakane, I. Oral administration of fucoidan can exert anti-allergic activity after allergen sensitization by enhancement of galectin-9 secretion in blood. Biomolecules. 2020;10(2):258; <https://doi.org/10.3390/biom10020258>.
- 3) Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. J Agric Food Chem. 2003;51:571–581.
- 4) Yamashita S, Yokoyama Y, Hashimoto T, Mizuno, M. A novel *in vitro* co-culture model comprised of Caco-2/RBL-2H3 cells to evaluate anti-allergic effects of food factors through the intestine. J Immunol Meth. 2016;435:1–6.
- 5) Hostetler GL, Ralston RA, Schwartz

- SJ. Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Adv Nutr.* 2017;8:423–435.
- 6) Liua QM, Xu SS, Li L, Pan TM, Shi CL, Liu H, Cao MJ, Su WJ, Liu GM. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*, *Carbohydr Polym.* 2017;165:189–196.
- 7) Norton SK, Barnstein B, Brenzovich J, Bailey DP, Kashyap M, Speiran K, Ford J, Conrad D, Watowich S, Moralle MR, Kepley CL, Murray PJ, Ryan JJ. IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. *J Immunol.*, 2008;180: 2848–2854.

研究課題名	食物アレルギー診断技術の開発		
フリガナ	ムラタ タカヒサ		
代表者名	村田 幸久		
所属機関（機関名） （役職名）	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 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
	大矢 幸弘 （オオヤユキヒロ）	国立成育医療研究センター・ アレルギーセンター長	患者の診断と採尿を行う。
本助成金による発表論文、学会発表	発表論文 • Epithelial cell-derived prostaglandin D₂ inhibits chronic allergic lung inflammation in mice. Maehara T, Nakamura T, Maeda S, Aritake K, Nakamura M, *Murata T. <i>FASEB J</i>. fj201802817R. 2019. • Comparison of urine and blood as a convenient and practical sample for estimating the contamination level of live cattle with radioactive cesium. Sato I, Sasaki J, Satoh H, Natsuhori M, Murata T, Okada K. <i>Animal Science Journal</i>. 90(8):1090-1095. 2019. • L-PGDS-derived PGD₂ attenuates acute lung injury by enhancing endothelial barrier formation. #Horikami D, #Toya N, Kobayashi K, Omori K, Nagata N, *Murata T. <i>J Pathol</i>. 248(3):280-290. 2019. 次ページへ続く		

研究結果要約

食物アレルギーを診断するためには、医師が患者に抗原を食べさせて症状の有無を評価する「経口抗原負荷試験」を行うが、この方法は大変な手間がかかる。治療法として知られる免疫療法では、症状が出ない少量の抗原を毎日食べることで、食べられる量を増やしていく。この方法も、大変な手間がかかり、治るまでに数年を要す。また途中で症状が出てしまうケースもある。安全かつ適切な食物アレルギーの診断や治療を実現するには、症状を常にモニタリングできる病態マーカーを見つける必要がある。申請者は子供からでも採取が簡単な尿の中に、アレルギー反応をおこす細胞として知られる肥満細胞が産生した PGD₂ の代謝産物 PGDM が排泄されることを発見した。このマーカーを用いれば、血液を採取することなく、小さな子供でも安全かつ的確に、食物アレルギーの診断が可能となる。しかし、PGDM の濃度測定には質量分析装置を用いる必要があり、高い費用と時間がかかる、また、症状が認められても、尿中 PGDM 濃度が上昇していない偽陰性が少数ある、などの、解決すべき課題も見えてきた。本提案では、①尿中 PGDM の抽出や測定方法の、高速化と最適化を行い、安く、早く、適切に PGDM 濃度測定が行えるように研究開発を行った。また、②症状がでていても PGDM が反応しない偽陰性が出る原因を明らかにするとともに、偽陰性の場合に応用できる、代替診断マーカーの探索も行った。

本助成金による発表論文，学会発表の続き

- Therapeutic potential of D prostanoid receptor 1 signal enhancement in a murine model of food allergy. #Nakamura T and #Hirai R, Tachibana Y, Masuko S, Nagata N, *Murata T. *J Allergy Clin Immunol*. 143(6):2290-2293. 2019.
- Hematopoietic prostaglandin D synthase-derived prostaglandin D₂ ameliorates adjuvant-induced joint inflammation in mice. Tsubosaka Y, Maehara T, Imai D, Nakamura T, Kobayashi K, Nagata N, Fujii W, *Murata T. *FASEB J*. fj201802153R. 2019.
- Urinary PGDM, a prostaglandin D₂ metabolite, is a novel biomarker for objectively detecting allergic reactions of food allergy. Inagaki S, Maeda S, Narita M, Nakamura T, Shimosawa T, *Murata T and *Ohya Y. *J Allergy Clin Immunol*. S0091-6749(18)30995-3.2018.
- 5,6-DiHETE attenuates vascular hyperpermeability by inhibiting Ca²⁺ elevation in endothelial cells. Hamabata T, Nakamura T, Tachibana Y, Horikami D, *Murata T. *J Lipid Res*. 59(10). 1864-1870. 2018.

学会発表

- 質量分析を用いたアレルギー診断マーカーの探索、村田幸久、日本化学会第 100 回春季大会 2020/3/22
- The role of Prostaglandin D₂ synthase in retinal angiogenesis、堰八英里香、大森啓介、小林幸司、永田奈々恵、中村達朗、倉田薫里、植村明嘉、村田幸久、第 93 回日本薬理学会年会 2020/3/16
- プロスタグランジン D₂ を毒仮説から考える、中村達朗、藤原祐樹、木田美聖、村田幸久、第 2 回比較薬理学・毒性学会春季研究会 2020/1/25
- 疾患における生理活性脂質の役割の解明と応用、大森啓介、前原都有子、藤原祐樹、宮崎悠介、藤井省太、堀上大貴、山崎愛理沙、今井大貴、橘侑里、益子櫻、林亜佳音、濱崎雄太、木田美聖、小林唯、宮田佳奈、山本晃子、竹ノ内晋也、原口大雅、芦名功平、小林幸司、中村達朗、永田奈々恵、村田幸久、第 2 回比較薬理学・毒性学会春季研究会 2020/1/25
- アトピー性皮膚炎モデルマウス及び患者における尿中脂質プロファイルの解析、永田奈々恵、濱崎雄大、稲垣真一郎、中村達朗、堀上大貴、山本貴和子、犬塚祐介、下澤達雄、橘侑里、成田雅美、大矢幸弘、村田幸久、第 2 回比較薬理学・毒性学会春季研究会 2020/1/25
- PGDM as a Specific Marker of Food Allergy, Takahisa Murata, Food Allergy Gordon Research Conference 2020/1/7
- The profiling of lipid metabolites in the nasal lavage fluid of a murine model of allergic rhinitis, Yuri Tachibana, Tatsuro Nakamura. Takahisa Murata, World Allergy Congress 2019,

2019/12/14

- The role of prostaglandin D₂ in food allergy, Takahisa Murata, The 1st ToBEST symposium, 2019/11/15

- DBPCFC with N of 1 RCT and PGDM improve diagnostic accuracy of food allergies in a 9-year-old boy. Yusuke Inuzuka, Kiwako Yamamoto-Hanada, Motoko iwama, Kenji Toyokuni, Koji Nishimura, Makoto Irahara, Fumi Ishikawa, Makiko Miyata, Miori Sato, Yumiko Miyaji, Mayako Saito, Tatsuki Fukuie, Masami Narita, Ichiro Nomura, Tatsuro Nakamura, Tatsuo Shimosawa, Takahisa Murata, Yukihiro Ohya, Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM) 2019, 2019/10/17

- アレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻汁における脂質メディエーターの産生量の変化、橘侑里、中村達朗、荒井美乃、曾根正好、村田幸久、第162回日本獣医学会学術集会、2019/9/10

- Mediator Lipidomics: Towards Comprehensive Metabolic Profiling of Eicosanoids and Related Fatty Acids, Atsuhiko Toyama, Tatsuro Nakamura, Takahisa Murata, The Omics Revolution: Beyond Genomics, 2019/9/8

Lipid profiling in nasal lavage fluid of a murine model of allergic rhinitis, Tatsuro Nakamura, Yuri Tachibana, Takahisa Murata, The 68th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology, 2019/6/15

研究目的

食物アレルギーを確定診断するには、医師が患者に抗原を食べさせて症状の有無を評価する「経口抗原負荷試験」行う必要があり、手間がかかる。唯一の治療法と言える免疫療法では、確定診断により決定された可食量以下の抗原を、毎日食することでその量を増やしていく。この方法も医師の経験と勘によるところが大きく、寛解に数年を要す。また途中症状を誘発するリスクも伴う。**安全かつ適切な食物アレルギーの診断や治療を実現するには、指標となる病態マーカーの存在が必須である。**

申請者は、小さな子供からでも採取が簡単な尿の中に、肥満細胞が多く産生する PGD₂ の代謝産物 PGDM が食物アレルギーに特異的かつ症状の程度に比例して排泄されることをマウスモデルを用いて発見した¹⁾。さらにこのマーカーがヒトの経口抗原負荷試験の有用な診断指標になることも証明した²⁾。しかし、①現在行っている質量分析装置を用いた PGDM の濃度測定には、高い費用と時間がかかる、また、②臨床症状が認められても、尿中 PGDM 濃度が上昇していない偽陰性が少数ある(約 9%)、など本検査の実用化に向けて、解決すべき課題も見えてきた。

本提案では、食物アレルギーの診断法の標準化と実用化を目標に掲げ、**①尿中 PGDM の高速・安価測定法の確立、②偽陰性となる根拠の解明、**を目的として研究を行った。

研究計画及び研究手法

① 尿中 PGDM の高速・安価測定法の確立

1. 尿の精製における、固相抽出カラムの素材の開発と、充填容器の選択、吸着・洗浄・再溶出過程を最適化する。可能な限り、特殊な機器（大型遠心機や減圧器）を要することなく精製できるキット形態をデザインする。
2. 質量分析装置の測定メソッドの最適化とアプリケーション作製を同時に行う。

② 偽陰性となる根拠の解明

1. 成育医療研究センターにて経口抗原負荷試験を行い、診断と尿中 PGDM 濃度測定を行う。
2. 負荷開始と発症のタイミング、発現部位と強度に分けて詳細に評価して、回帰分析を行う。これにより、尿中 PGDM 濃度がどの臨床症状を大きく反映し、どの症状を反映しないか、を明らかにし、偽陰性がでる根拠を明らかにする。
3. 他のアレルギー疾患患者の尿中 PGDM 濃度を測定し、特異性を改めて評価する。

③ 代替診断法の開発

1. 尿以外の他の体液中の PGD₂ 代謝産物濃度を測定する。採取した標本の採取方法やタイミング、測定対象物質を再探索し、4 時間後の尿中 PGDM 濃度が反映できない臨床症状を検出できる診断法を探す。

結果と考察

本助成研究の結果

① 尿中 PGDM の高速・安価測定法の確立

1. 尿中 PGDM 測定に特化したカラム素材の選択と容器の選択を行い、抽出条件の最適化を進めた。具体的には、尿の希釈率、希釈溶媒、内部標準物質選択と添加量調整、pH 整、溶出液の選択、カラム充填剤の選択、容量決定、などを行った。

既存の市販品を用いた場合、前抽出に約 3 時間を要し、PGDM の回収率は 1.4% と低かった。新たに開発した方法では、尿 20 標本を 3 ステップ、15 分で質量分析装置へアプライできる。また、PGDM 回収率は 80% に大幅に改善することができた。また、回収率の向上に伴い、測定に必要となる尿量も 0.1 ml で可能となった。これらの成果により、将来実用化できるキット構成を決定することができた。

2. 抽出工程に加えて、測定に感度向上と高速化を進めた。質量分析内のラインと測定プロトコルをすべて見直し、洗浄工程を含めて、1 標本約 5 分で測定できるプロトコルを確立した。また、測定から結果、解析までを自動で行えるプログラム（マクロ）を作成した。

上記方法の改善やアプリケーションの確立により、測定条件の決定や、対象脂質の抽出、測定、解析に知識と技術を要する質量分析装置を用いて、誰でも容易に尿中の PGDM 濃

度を測定できるようにした。

3. 上記方法の validation を行った。具体的には尿への PGDM 添加回収試験を行い。測定の日差変動、日内変動を計算した。また PGDM の尿中保存安定性評価を行い、-20℃もしくは 4℃条件下であれば、1 週間再現性高く、尿を保存して PGDM の測定に供することができることを明らかにした。さらに、PGDM 濃度測定に干渉する可能性がある尿中に排泄される主要脂質の濃度測定も行った。

② 偽陰性となる根拠の解明

1. 国立成育医療研究センターにて、経口抗原負荷試験を行い診断と採尿を行い、東京大学にて、質量分析装置を用いた PGDM 濃度測定を行った。その結果従来得られていた、測定レンジ 1.14~17.7 ng/mg Cre とカットオフ値 2.25 ng/mg Cre を再確認した。
2. 各患者の症状とタイミング等を勘案しながら、尿中 PGDM 濃度との回帰分析を行った。その結果、尿中 PGDM 濃度に反映されやすい症状の順として、消化器（係数 6.9）、呼吸器（係数 6.0）、皮膚（係数 4.8）が挙げられた。これらに比べて口腔症状の係数が小さかった。口腔のみに症状がでる患者に対して、尿中 PGDM が偽陰性となる可能性が考えられた。本計算の重相関係数は 0.51、自由度調整済決定係数は 0.24 であった。
3. 偽陰性となった患者（症状あり、尿中 PGDM

濃度が 2 ng/mg 以下) の患者の尿を用いて、偽陰性の原因を探るべく、他脂質の網羅的な濃度測定を行った (158 種類)。その結果、一部の患者では、PGD₂ やその代謝産物以外の脂質濃度の上昇が観察された。現在その理由を解析中である。

4. 尿中 PGDM の食物アレルギー特異性を評価する目的で、アトピー性皮膚炎患者の診断と採尿を行い、尿中 PGDM 濃度を測定した。その結果、アトピー性皮膚炎の患者では PGDM 濃度の上昇は怒らないことを確認できた。

③ 代替診断法の開発

1. 上記結果で、口内症状のみが出た患者では、尿中 PGDM 濃度の上昇が確認されないケースが多かったため、唾液中の脂質濃度測定を試みた。まず、唾液からの脂質抽出条件を改めて検討した。その後、20 名の患者の唾液を対象に、質量分析装置を用いた網羅的な脂質濃度測定を行った。その結果、唾液中に排泄される複数の脂質濃度の上昇を確認することができた。今後再現性の確認を急ぐとともに、引き続き、標本採取方法や抽出方法、測定条件の検討、標的となる脂質の選択を進めていく。

所期の結果は得られたか。また残された課題

提案した実験は、ほぼ予定通りに行うことができた。尿中 PGDM を用いた食物アレルギー診断技術の実用化に向けたデータの取得や技術革新

に成功した。唾液を用いた脂質の検出に関しては、引き続き検討を行っていく必要がある。

学会や論文発表等の予定

アトピー性皮膚炎の尿中 PGDM 濃度の推移に関しては、現在論文を投稿中である。またさらなる脂質探索に関しても、論文投稿準備を進めている。

今後の研究活動について

今後も、尿中 PGDM を用いた食物アレルギー検査技術の実用化を目指して研究を進めていく。今後の課題として以下を挙げる。

○PGDM の検査項目としての validation

- これまでは自立排尿が可能な子供を対象として診断と採尿を行ってきたが、乳幼児や大人の経口抗原負荷試験の尿中 PGDM データを集める必要がある。
- 動物モデルや一部疾患の患者の尿を用いた、特異性評価は進めてきた。今後もこれを継続する必要がある。
- また、経口抗原負荷試験のみならず、免疫療法中の尿中 PGDM 濃度測定を行いたい。症状が出ない抗原の負荷量で、PGDM 濃度上昇を確認することができれば、非常に有用な指標になると期待している。

○測定キットの開発

- 本研究において、尿の前処理や質量分析装置を用いた測定の最適化や高速化に成功した。しかしより広く検査を広げるために、抗体を

用いた検査キットの開発が必要である、

- また、上記の様に乳幼児から尿を採取して検査に用いるために、オムツからの PGDM 抽出キットの作製を進める。

参考文献

- 1) Prostaglandin D₂ metabolite in urine is an index of food allergy. Maeda S, Nakamura T, Harada H,

Tachibana Y, Aritake K, Shimosawa T, Yatomi Y, *Murata T. *Scientific Reports*. 7(1):17687.2017.

- 2) Urinary PGDM, a prostaglandin D₂ metabolite, is a novel biomarker for objectively detecting allergic reactions of food allergy. Inagaki S, Maeda S, Narita M, Nakamura T, Shimosawa T, *Murata T and *Ohya Y. *J Allergy Clin Immunol*. S0091-6749(18)30995-3.2018.

研究課題名	ω-5 グリアジン欠損食用小麦の開発：ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの根絶に向けて		
フリガナ	モリタ エイシン		
代表者名	森田 栄伸		
所属機関（機関名） （役職名）	島根大学医学部皮膚科学講座 教授		
共同研究	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	遠藤 隆 （エンドウタカシ）	龍谷大学農学部教授	ω-5 グリアジン欠損小麦新品種の開発
	松尾裕彰 （マツオヒロアキ）	広島大学薬学部教授	ω-5 グリアジン欠損小麦の動物モデルによる評価
	籠橋有紀子 （カゴハシユキコ）	島根県立大学准教授	ω-5 グリアジン欠損小麦の食品開発
	松本正人 （マツモトマサト）	株式会社メディカル工笑	ω-5 グリアジン欠損小麦の実用化栽培および食品加工
本助成金による発表論文，学会発表	1. Yamada Y, Yokooji T, Ninomiya N, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Evaluation of the allergenicity of ω5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model. Biochem Biophys Rep. 2019 Nov 1;20:100702. 2. 河野邦江，塩飽邦憲：低アレルギー化小麦 1BS-18 を用いた ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギー対策．第 68 回日本農村医学会学術総会．北海道，2019 年 10 月 18 日		

研究結果要約

食物アレルギーの対策は感作予防と感作後の治療である。本共同研究では、小麦アレルギーの主要抗原である ω-5 グリアジンの遺伝子座を欠損した 1BS-18 小麦系統を活用して、小麦アレルギーの感作予防と感作後の治療の 2 つの観点から、根本的な小麦アレルギー対策を講じることを試みた。1BS-18 食用小麦系統（1BS-18 ホクシン）の感作予防効果をアレルギーモデルラットを用いて評価し、感作予防法の確立に資するエビデンスを得た。また、1BS-18 系統小麦の社会実装を視野に入れ、継続的に 1BS-18 系統小麦を市場流通させるために、顕微鏡下戻し交配技術（特許出願中）を用いて様々な栽培特性を有する数種の新規 1BS-18 食用小麦系統の育成を行った。そして、島根県西部にて新規 1BS-18 系統小麦の栽培実験を行うとともに、収穫した小麦の加工特性を継続的に評価した。さらに、既存小麦品種との差別化を行うため、「小麦アレルギーの主要抗原である ω-5 グリアジンを遺伝子的に含まない」という 1BS-18 小麦系統の付加価値を前面に押し出し、「しまね夢こむぎ」と命名し登録商標を申請、6 次産業化に向けたブランド戦略を構築した。治療法の確立に関しては、小麦アレルギー患者を対象とした「低アレルギー化小麦 1BS-18 ホクシンの臨床応用に関する多施設共同第 II 相臨床試験」を実施した（UMIN: UMIN000024951）。

研究目的

小麦は世界各国で主食とされ、本邦でも多くの市場流通食品に含まれる。小麦アレルギー患者は、日常の食事に常に気を配る必要があるため QOL が低下する。新生児から乳幼児期に発症する小麦アレルギーの多くは学童期までに治癒するが、成人の小麦アレルギーは比較的治癒しにくい¹⁾。成人期以降の小麦アレルギーは、摂食に加えて運動や薬剤、アルコール、ストレス等の二次的要因が組み合わさることで症状をきたす、食物依存性運動誘発アナフィラキシーとして発症する。申請者らはこれまで、成人小麦アレルギー患者の約 95% は主として小麦 ω-5 グリアジンに感作されており、ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの有病率は国内成人で約 0.2% であることを明らかにしてきた^{2,3)}。国内では数万人の小麦アレルギー患者が存在すると推定される。また、小麦 1B 染色体上の ω-5 グリアジン遺伝子座を部分欠損した 1BS-18 小麦系統を見出し、モルモットアレルギーモデルで経口摂取による感作が成立しにくいことを証明してきた⁴⁾。このことは、1BS-18 小麦系統を普及させることにより、小麦アレルギーの発症予防が可能であることを示唆している。さらに、1BS-18 小麦系統を食用小麦系統ホクシンと戻し交配して 1BS-18 食用小麦系統(1BS-18 ホクシン)を樹立した。1BS-18 ホクシンは、ω-5 グリアジンを含有しないことから、小麦アレルギー患者でも摂取できる可能性がある。また、小麦アレルギー患者が 1BS-18 ホクシンを継続摂取することで、減感作が成立する可能性もある。さらに 1BS-18 小麦系統が市場に流通すれば、小麦ア

レルギー患者の数が激減すると考えられる。

目的 1. 感作予防

本研究は、アレルギーモデルラットを用いて 1BS-18 ホクシンの感作能を評価する事を目的とした。また、市場流通を前提として実用品種に戻し交配することにより、様々な栽培・加工特性を有する ω-5 グリアジン欠損食用小麦系統を確立することを目的とした。

目的 2. 治療法の確立（医師主導の臨床研究）

ω-5 グリアジン感作型成人小麦アレルギー患者に対して、ω-5 グリアジン欠損小麦系統 1BS-18 ホクシンから作製したパン（1BS-18 ホクシンパン）の摂取可能量を確認すること、1BS-18 ホクシンパンの継続摂取による減感作療法の有効性を確認することを目的とした。

研究計画及び研究手法

本共同研究は、成人小麦アレルギーの病態解析、疫学調査、予防法・治療法の確立を目的として 2007 年に発足し、島根大学を中心とした共同研究により小麦アレルギーに関する多くの研究成果を発表して現在に至っている。2019 年度は、医学・薬学（島根大学、広島大学）、農学（龍谷大学）、食品科学（島根県立大学）、産業（メディカル工笑）が共同連携して ω-5 グリアジン欠損食用小麦系統の特性の検証と 6 次化産業化を行い、本小麦系統を広く流通させることで小麦アレルギーの根絶化を目指すものである。

島根大学

研究統括機関として研究会の開催、研究進捗の管理、共同研究機関および連携機関との連絡調整

を行った。具体的には、2019 年度は年 3 回の研究会の開催を予定し、研究目的の共有と意見交換の場の提供を通して共同研究が円滑に推進されるよう努めた。「しまね夢こむぎ」の継続的な市場流通を通じて、自治体や地域事業者らの目標に沿った仕組みづくりを行い、尚且つ、持続可能な開発目標（SDGs）の実現が可能となるよう社会貢献を行うことを目指した。具体的には、地域事業者や食品改善推進員等に対して「しまね夢こむぎ」の試食会や食物アレルギーの勉強会を行い、本取り組みの認知度を高める試みを行った。さらに、ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギー患者に

おける ω-5 グリアジン欠損小麦の摂取可能量の判定、治療可能性を明らかにするために次に示す臨床研究を継続した（表 1）。なお、本研究では臨床研究に用いる小麦の確保が最優先課題であり、小規模環境での製粉方法・製パン性の検討、1BS-18 ホクシンパンを継続的に提供できる体制準備も併せて行った。島根大学地域未来協創本部との連携により、ω-5 グリアジン欠損小麦シリーズを「しまね夢こむぎ」と命名して商標登録手続きを行い、実用化に向けたブランド戦略により付加価値の明確化と価値の創出を図った。

表 1.低アレルギー化小麦 1BS-18 ホクシンの臨床応用に関する多施設共同第 II 相臨床試験の概要

研究対象：ω-5 グリアジン感作型の成人小麦アレルギー患者 20 名
研究形態：多施設共同研究（研究代表機関：島根大学、共同研究機関：国立病院機構福岡病院、広島大学、神戸大学、大阪大学等）
島根大学医の倫理委員会承認番号：20160823-3
UMIN 登録番号：UMIN000024951
本研究で明らかにすること 1BS-18 ホクシンパンの摂取可能量 2. 1BS-18 ホクシンパンを継続摂取することにより減感作療法が成立するか否か 3. 治療前後の、通常のパン小麦および 1BS-18 ホクシン由来のグルテンに対する患者由来の末梢血好塩基球の反応性
研究方法：ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギー患者に対して 1BS-18 ホクシンパンの摂取の安全性および継続摂取による減感作療法の有用性を確認する臨床研究を実施する。ステップ 1 では、摂取可能量を評価するために 1BS-18 ホクシンパンの段階的摂取（1BS-18 ホクシンパンの摂取を 10 グラムより開始し、段階的に 60 グラムまで摂取）を行い、アレルギー症状の有無にて評価する。ステップ 2 では、ステップ 1 の摂取可能量の評価に基づいて安全な摂取量を定め、3 カ月継続して摂取し、開始前後の好塩基球活性化試験により判定する。

龍谷大学

1BS-18 ホクシンに日本の春まき小麦 4 品種（ミナミノカオリ、ハルユタカ、はるきらり、春よ恋）を交配して得た F1 雑種を制御植物培養室で世代促進栽培し、それぞれの品種について 1 回の戻し交配と自家受精 1 回を行った。各交配の自家受精子孫から 1BS-18 がホモ接合になった個体を選抜・栽培し、出穂が早く、稔性の良い系統を 2~4 個体選び、それらの自家受精子孫合計 14 系統（ミナミノカオリ 1BS-18 :2 系統、春よ恋 1BS-18 :4 系統、はるきらり 1BS-18 :4 系統、ハルユタカ 1BS-18 :4 系統）を 12 個体ずつ圃場で栽培し形質調査を行った。さらに、これら 14 系統から最も優良な個体を 1 個体ずつ選び、それぞれの自家受精子孫 160 個体ずつを圃場に栽培した。2020 年夏にこれらの系統の収量調査を行う予定である。

広島大学

1BS-18 ホクシンの小麦タンパク質に対する感作予防効果を経口免疫寛容の点から評価する動物モデルの作製を目的に、通常小麦グルテンを用いた経口免疫寛容モデルラットを作製した。経口免疫寛容モデルは、あらかじめ溶媒または通常小麦グルテン（東京化成）を 5 日間経口摂取させた 4 週齢の Brown Norway ラットに、同グルテンを単回皮下感作することで作製した。経口免疫寛容の誘導は、血清中のグルテンおよびグリアジン特異 IgE 抗体価やグルテンを静脈内投与した際の直腸温の低下を指標として評価した。

中山間地域研究センター

2018 年度および 2019 年度に収穫された 1BS-

18 ホクシンを用いた食品の開発を産学連携により試みた。開発した食品については、アンケートを用いて、風味・甘味・硬さ・舌ざわり・外観・総合点について評価をまとめるとともに、嗜好意欲尺度にて試食品の評価を行い、開発者に対するフィードバックを行った。さらに、島根県内の食品改善推進員を対象とした勉強および試食会において、1BS-18 ホクシン小麦粉の活用方法に関する提案を行うとともに、試食会にて全粒粉うどんの新たな魅力について評価を行った。

メディカル工笑

2018 年 11 月に播種した 1BS-18 ホクシンおよび 2019 年 7 月に収穫し、脱穀・乾燥・異物除去を行い専用の保冷库に保存して実用化検討に向けて準備を行った。製粉は用事調製とした。2019 年 6 月には、2018 年度産の 1BS-18 ホクシンを用いた全粒粉うどんの試作および試食会を担当した。2019 年度産の 1BS-18 ホクシンについては、地域事業者と連携して、食パンおよびサンドイッチの試作を行った。2019 年 11 月に 1BS-18 ホクシンおよび新たに 1BS-18 ミナミノカオリを播種し、試験栽培を開始した。その際、積極的に地元企業と連携して「しまね夢こむぎ」の付加価値を高めるため、中山間地域の棚田を活用することを発案した。

結果と考察

島根大学

2019 年度は、2019 年 6 月 21 日（島根県出雲市@島根大学）、2019 年 12 月 6 日（島根県出雲市@島根大学）に 2 回の低アレルギー化小麦研究

会を開催し、2020年3月14日（島根県出雲市@島根大学）に小麦アレルギー研究会を開催して1BS-18 ホクシンに関する多施設共同臨床研究に関する討議を行った。また、低アレルゲン化小麦の事業化を念頭に、島根県西部の浜田市役所三隅支所長および益田市長と意見交換を行った（2019年2月10日及び2月11日）。さらに、低アレルゲン化小麦事業の地域への浸透を目的として食品改善推進員を対象とした勉強会兼試食会を主催した〔2019年6月28日@益田市（山陰中央新報掲載、資料1）、2020年1月10日@雲南市〕。

臨床研究は、全体で成人患者20例の登録を予定した中で、2020年3月1日時点で14例が臨床研究に登録して試験を実施しており、概ね所期の計画通り実施出来ている。課題として、本臨床研究の評価は、20症例全員の試験が終了した後に、1BS-18 ホクシンパンの摂取可能量、臨床的なアレルギー症状、好塩基球活性化試験の結果を総合的に解釈して行う予定である。本研究に使用する1BS-18 ホクシンは、小麦アレルギーの主要抗原であるω-5 グリアジンを遺伝的に欠損するという特徴を持つ。由来は、1BS-18(ナショナルバイオリソースプロジェクト KOMUGI が保有する約12,000種類の小麦系統より選抜した研究用小麦品種チャイニーズスプリングの染色体部分欠損系統)3) とホクシン（一般流通小麦品種）の交配によるものである。1BS-18 ホクシンは、ω-5 グリアジン遺伝子を欠損したことでアレルギー症状発症に強く寄与する主要抗原が除去されたが、その類似タンパク質が残存するため抗原性

は保持しており、減感作療法に有用な小麦系統であると考えている（2019年10月17日、第68回農村医学会にて発表、日本農業新聞一面記事、資料2）。

1BS-18 ホクシンパンについては、パンのふくらみに影響するグルテンの性質が気候条件の影響を受けて年度ごとに異なるものの、安定的な膨らみは維持されている。また、各年度におけるグルテンの抗原性についてもウエスタンブロット法を用いて確認し、変化が無いことを証明している。一方で、気候条件によりグルテンの粘弾性が変化したり、梅雨時期の穂発芽の影響により澱粉質の変化が生じたりすることが課題であるが、龍谷大学での出穂期と収穫期がより早期で稔性の良い系統の育成により対処する予定である。

資料1. 山陰中央新報掲載記事（2019年7月25日）



資料2. 日本農業新聞一面掲載（2019年10月17日）



龍谷大学（新規 1BS-18 品種の開発）

1BS-18 ホクシンと春まき小麦 4 品種（ミナミノカオリ、ハルユタカ、はるきらり、春よ恋）との交配および戻し交配子孫を 3 回の自家受精子と選抜で 14 系統を得た。現在これら 14 系統を 160 個体ずつ（合計 2240 個体）を収量調査のため圃場で栽培している（写真 1）。これらの系統の中から農業形質が純系品種と同等に近い 1BS-18 品種が育成されることを確信している。



写真1 1BS-18ホモ接合系統の栽培状況（龍谷大学 2020年3月撮影）

広島大学（ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの感作と症状惹起予防に対する 1BS-18 の有用性の検討）

昨年度までの解析により、1BS-18 ホクシンは通常ホクシンよりも ω-5 グリアジンに対する感作能やアレルギー症状の惹起能が低いことを明らかにした（Yamada Y et al, Biochem Biophys Rep. 2019, 図 1）。これらの結果から、1BS-18 ホクシンは通常小麦よりも安全に ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの発症予防と減感作の誘導に利用できる可能性が示唆された。

本年度は、1BS-18 ホクシンの小麦タンパク質に対する感作予防効果を経口免疫寛容の点から評価する動物モデルの作製を目的に、小麦グルテ

ンを用いた経口免疫寛容モデルラットの作製を試みた。グルテンの感作のみを行った群では感作開始 2 週間後よりグルテンおよびグリアジン特異 IgE 抗体価の上昇が確認された。一方、あらかじめグルテンを連日経口投与した群の両抗体価は、4 週目で感作のみを行った群よりも有意に低い値を示した。さらに各群にグルテンを負荷した際のアナフィラキシー症状の惹起を確認するため、感作開始 5 週目のラットにグルテンを静脈内負荷して直腸温度の変化を測定した。その結果、グルテン感作群ではグルテン負荷により体温が有意に低下したが、感作前にグルテンを経口投与した群においてはグルテン負荷を行っても体温の変化が認められなかった。以上の結果から小麦グルテンを感作前に連日経口投与することにより免疫寛容が誘導できた。これらの結果は、本手法にて小麦の免疫寛容を評価することが可能であることを示すものであり、今後、同手法にて 1BS-18 ホクシンによる経口免疫寛容モデルラットを作製し、1BS-18 ホクシンの免疫寛容における有用性を評価することを予定している。

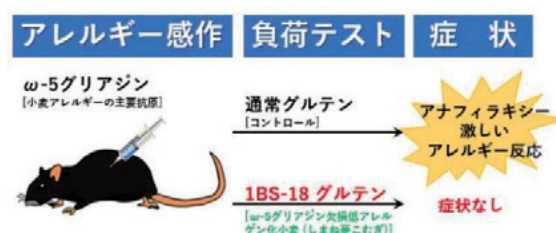


図1 1BS-18ホクシンより抽出したグルテンの低アレルギー性の評価（広島大学）

島根県立大学（商品化検討）

2018 年度および 2019 年度に収穫された 1BS-18 ホクシンを用いた食品の開発を試みた。県内企業プチレストランクルトン等との共同開発に

より、シフォンケーキ、パンおよびクッキー5種類を作成し、1BS-18 ホクシン小麦粉の活用において、その可能性を検討した（写真 2）。また、1BS-18 ホクシンの生産量が十分ではないことや、販売商品の価格帯の検討の一環で、酒米の精米時にでて廃棄されることの多い未利用素材（酒米粉）を活用したクッキーの作成を行った。米粉の配合割合により、様々な食感の展開が可能となることが示唆された。メディカル工笑より、評価依頼を受けた試作クッキーについて、食味試験による評価を行い、結果に関するフィードバックを行った。今後は、商品化に向けた試作品の官能評価および物性評価を予定している。



写真2 試作クッキー（島根県立大学）

メディカル工笑（島根県西部におけるホクシン1BS-18 の栽培適性の検討と6次化アイテムの開発）

2019年7月に収穫した2019年度産1BS-18ホクシン（浜田市）は、2か所合計13.5aの畑より約200kg収量が得られた。昨年度課題であった、野鳥被害対策として、耕作農地を変更することにより被害の軽減を試みた。2019年度には、収穫時期に気候条件に恵まれてグルテンの粘弾性が高く、製パン性に優れた1BS-18ホクシンが収穫された。地域事業者（益田市）と連携して試作した食パンは膨らみも良くサンドイッチにも加工

可能であり、また、クリームパン等の菓子パンの製造も可能であった（写真3）。しかし、費用の面でネックが残り、打開策として栽培面積を増やすこと、ブランド戦略により低アレルゲン化による付加価値ついて認知度を十分に高めることなど、ビジネスを行う上での工夫が求められる。2019年9月より、新たな打開策として、地域事業者や行政と協力して棚田を活用した小麦栽培の検討を行っている（写真4）。近年、棚田における稲作は、収入の低迷により後継者が不足し、年々耕作放棄地が増している。島根県中山間地域では、全国第一位の面積を誇る室谷の棚田（島根県浜田市）が存在したが、現在そのほとんどが耕作放棄地となっているのが現状である。本事業では、こうした地域の課題解決を率先して行いたいと考える地元事業者と連携し、行政を巻き込みながら、「しまね夢こむぎ」栽培から6次産業化までを視野に入れた地産地消低アレルゲン化小麦ビジネスモデル考案の試みを続けている。

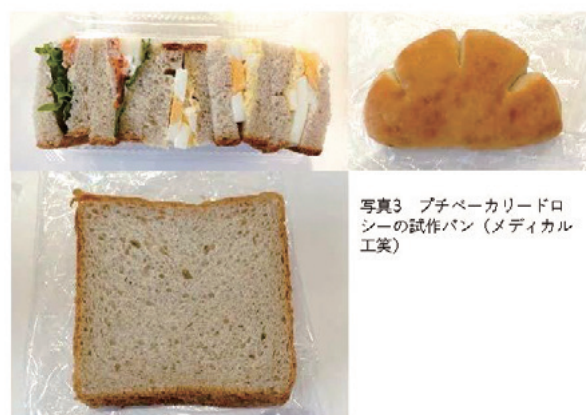


写真3 プチベーカリードロシーの試作パン（メディカル工笑）

今後の研究活動について

申請者らの研究グループは2007年に共同研究体制を確立して、低アレルゲン化小麦の研究事業

を推進してきた。2017 年度、研究の節目を迎え、本研究の将来的なアウトカムを研究成果の社会実装（事業化）に定めた。2018 年度はこれに加え、島根県中山間地域の活性化に資する仕組みづくりに関する基礎的検討を開始した。2019 年度は、引き続き小麦アレルギー治療法の確立のため、「低アレルゲン化小麦 1BS-18 ホクシンの臨床応用に関する多施設共同第 II 相臨床試験」を実施し、小麦アレルギー患者の低アレルゲン化小麦 1BS-18 ホクシンパンの摂取量の確認および継続摂取による減感作療法の確立の可能性を評価している段階にある。今後は、治療法の確立のため、大規模臨床試験も必要と考えている。また、小麦アレルギー予防法の確立のため、アレルギーモデルラットを用いて経口免疫寛容の評価系を完成させた。今後は、予防法について得られた評価系を活用して詳細な検討を進めたいと考えている。

低アレルゲン化小麦 1BS-18 系統小麦の普及により新たな小麦アレルギー患者の発症が抑制される可能性が高いことから、1BS-18 系統小麦製品販売の実現準備、製粉、保管施設の設立が必要と考え、準備を進めている。今年度は、島根県益田市および浜田市において、新たに地域事業者からの協力と行政の参画が得られつつある。今後は、さらにこの体制を柔軟に促進させ、キラリと光る

地方大学の試みとして、多くの購買層、特に小麦アレルギー患者および関心を持つ層の目に留まるよう努力していきたい。

参考文献

- 1) Hamada Y, Chinuki Y, Fukutomi Y, Nakatani E, Yagami A, Matsunaga K, Oda Y, Fukunaga A, Adachi A, Hiragun M, Hide M, Morita E. Long-term dynamics of omega-5 gliadin-specific IgE levels in patients with adult-onset wheat allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020; 8(3): 1149-1151.
- 2) Morita E, Matsuo H, Chinuki Y, Takahashi H, Dahlström J, Tanaka A. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis-Importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis- *Allergol Int.* 2009 ; 58(4): 493-498.
- 3) Morita E, Chinuki Y, Takahashi H, Nabika T, Yamasaki M, Shiwaku K. Prevalence of wheat allergy in Japanese adults. *Allergol Int.* 2012; 61(1): 101-105.
- 4) Kohno K, Takahashi H, Endo T, Matsuo H, Shiwaku K, Morita E. Characterization of a hypoallergenic wheat line lacking ω-5 gliadin. *Allergol Int.* 2016; 65(4): 400-405.

役員・評議員・研究助成審査委員名簿

（2020年9月30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	岩間 清	非常勤	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 学術顧問、 北海道大学名誉教授
	伊藤節子	非常勤	同志社女子大学 生活科学部 特任教授
	宇理須厚雄	非常勤	藤田医科大学 医学部 客員教授
	大社啓二	非常勤	日本ハム（株） 相談役
	畑江敬子	非常勤	お茶の水女子大学名誉教授
	村田容常	非常勤	お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系 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	（公財）日本植物調節剤研究協会 理事長
	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 名誉院長 千葉大学名誉教授
	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	東京大学名誉教授 東京農業大学客員教授
	畑 佳秀	非常勤	日本ハム（株）代表取締役社長
	前田文男	非常勤	日本ハム(株)取締役 常務執行役員 経営企画本部長、 中央研究所担当

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 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
	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 センター長
	川村 理	香川大学 農学部 教授
	楠 隆	龍谷大学 農学部 教授
	倉園久生	徳島大学 副理事(研究支援担当)・教授 研究支援・産官学連携センター 副センター長
	駒井三千夫	東北大学 名誉教授
	下条直樹	千葉大学予防医学センター 特任教授
	立花宏文	九州大学大学院農学研究院 主幹教授
	柘植郁哉	藤田医科大学医学部 客員教授
	鍋谷浩志	東京家政大学 短期大学部栄養科 教授
	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
	好田 正	東京農工大学大学院農学研究院 教授

2019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。

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
------	--------------------------

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する。

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

2015 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、2017 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. 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/>

5. 2020 年度主な事業活動

- ・2020 年度研究助成の実施、2021 年度研究助成の公募 及び 2019 年度研究助成の成果報告会の実施
- ・第 6 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
- ・2020 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

以上

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2020 年 9 月 30 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>