

食物アレルギー診断技術の開発

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	<p>発表論文</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Epithelial cell-derived prostaglandin D<sub>2</sub> 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.</li> <li>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.</li> <li>L-PGDS-derived PGD<sub>2</sub> 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.</li> </ul> <p>次ページへ続く</p>		

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 PGD<sub>2</sub> 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 D<sub>2</sub> 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 D<sub>2</sub> 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 Ca<sup>2+</sup> 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 D<sub>2</sub> 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 D<sub>2</sub> 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 020/1/25
- 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 Maker 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 D<sub>2</sub> 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」を行う必要があり、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 PGD<sub>2</sub> 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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 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 PGD<sub>2</sub> 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、 $-20^{\circ}\text{C}$  もしくは  $4^{\circ}\text{C}$  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  $1.14\sim 17.7\text{ ng/mg Cre}$  とカットオフ値  $2.25\text{ ng/mg Cre}$  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、PGD<sub>2</sub> 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 D<sub>2</sub> 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 D<sub>2</sub> 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.