

2020 年度研究助成事業

成果報告会 要旨集



2021 年 10 月 12 日（火）

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2020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

スケジュール：第1班：12時30分～13時10分，第2班：13時15分～13時55分，第3班：14時00分～14時40分

班	Web 会議 番号	課題名	所属機関・氏名	頁
1	2020 _01	消化管上皮細胞のタイトジャンクションの人為的強化法の開発	九州大学 大学院理学研究院 教授 池ノ内 順一	5
	2020 _02	腸内細菌由来の代謝物による経口免疫寛容誘導機構の解析	大阪大学医学系研究科 免疫制御学 准教授 梅本 英司	6
	2020 _03	小麦アレルギー経口免疫療法における維持期の摂取回数と耐性獲得との関係	昭和大学医学部小児科学講座 講師 岡田 祐樹	7
	2020 _04	経皮感作食物アレルギーモデル確立と脂肪酸摂取によるアレルギー制御	広島大学大学院医科系科学研究科 免疫学 大学院生 河原 隆浩	8
	2020 _05	制御性 T 細胞の分化制御に関わる核内受容体に作用する食品由来成分の探索と有効性解析	島根大学医学部医学科 免疫学講座 講師 小谷 仁司	9
2	2020 _06	心因性食物アレルギー形成の解明と寛解プログラムの作成 -食物アレルギーの真の寛解へ-	国立成育医療研究センター研究所 研究員 小西 瑞穂	10
	2020 _07	コモンマーマセットを用いた食物アレルギーモデルの確立と前臨床評価系への応用	公益財団法人実験動物中央研究所 マーマセット医学生物学研究部 研究員 佐藤 賢哉	11
	2020 _08	メイラード反応が魚肉アレルギーの消化・吸収性に及ぼす影響の解明	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
	2020 _09	複数の重症食物アレルギーを有する児に対する同時緩徐微量経口免疫療法 Simultaneously slow low dose oral immunotherapy: SSLOIT (wSLOIT)	あいち小児保健医療総合センター アレルギー科医長 杉浦 至郎	13
	2020 _10	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	14
3	2020 _11	胃食道逆流に注目した牛乳アレルギーモデルマウスの免疫機序の解明	名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学 病院助教 野村 孝泰	15
	2020 _12	少量経口負荷試験による食物アレルギー児の保護者の不安軽減効果の検討	自治医科大学附属さいたま医療センター小児科 助教 牧田 英士	16
	2020 _13	温度感受性 TRPV4 チャネル制御による食物アレルギー予防方法の検討	京都薬科大学 准教授 松本 健次郎	17
	2020 _14	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	18
	2020 _15	重症果物アレルギーの感作機序に関する研究	藤田医科大学 ばんだね病院 小児科 助教 森 雄司	19
	2020 _16	食物アレルギーにおける経皮感作と経口免疫寛容のバランスの解明	岐阜薬科大学薬理学研究室 講師 山下 弘高	20
	2020 _17	食物アレルギー予防を目指した食品成分による腸内環境制御法の開発	京都府立医科大学消化器内科 助教 春里 暁人	21
	計画延長	Food protein induced enterocolitis syndrome 診断における血清 TARC 値の有用性に関する研究	杏林大学医学部小児科学教室 任期助教 濱野 翔	22

※50 音順・敬称略

2020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：2021年10月12日（火） 15時00分より

場所：AP品川アネックス 地下1階 Iルーム

報告者：2020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およびその制御法の開発・・・・・・・・・・24
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

主要アレルゲン Mal d 1 の日本産リンゴ品種における定量および経口負荷試験結果を基にした食事指導への展開・・・・・・・・・・34
沖嶋 直子
松本大学 人間健康学部健康栄養学科 専任講師

15:45～16:05

小麦アレルギーの包括的ゲノム関連解析と T 細胞エピトープの同定・・・・・・・・・・42
野口 恵美子
筑波大学医学医療系 教授

-----（休憩） 16：05 から 16：20-----

16:20～16:40

食物に対する経消化管感作の機序、特に IL-25 の役割の解明・・・・・・・・・・49
松本 健治
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 部長

16:40～17:00

給食施設での調理時の小麦アレルギー混入リスクに関する研究・・・・・・・・・・54
橋本 博行
三重短期大学 教授

17:00 閉会挨拶

17:05 写真撮影

※敬称略

評議員・役員・研究助成委員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・64

当財団案内・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・66

2020年度研究助成事業 個人研究助成

〈Web会議システム上での報告〉

要旨

※報告書全文は後日当財団Webサイトに掲載予定

研究課題名	【Web 会議番号 2020_01】 消化管上皮細胞のタイトジャンクションの人為的強化法の開発
フリガナ	イケノウチ ジュンイチ
代表者名	池ノ内 順一
所属機関（機関名） （役職名）	九州大学 大学院理学研究院 教授
本助成金による発表論文，学会発表	<ul style="list-style-type: none"> ・第 72 回日本細胞生物学会 池ノ内順一 「上皮細胞の接着形成過程におけるアドヘレンスジャンクションとタイトジャンクションの相互制御」 ・第 72 回日本細胞生物学会 長 佑磨、池ノ内順一 「上皮細胞における Tricellular Tight Junction の形成機構」

研究結果要約

消化管の上皮細胞は、食物中の糖やアミノ酸を吸収するという役割に加えて、腸管の細菌や食事に由来する抗原性の高いタンパク質の侵入を防ぐバリアとしての重要な役割を担っています。上皮細胞のバリア機能を担う構造は、タイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着装置です。タイトジャンクションの機能の低下は、潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の病態を引き起こします。また、乳児が卵などの食べ物を早期に摂取すると、食物アレルギーを発症するのは、乳児の腸管上皮細胞のタイトジャンクションが未成熟であることが原因だと考えられています。このように上皮細胞のタイトジャンクションは、食物アレルギーを予防する上で重要な細胞膜構造ですが、タイトジャンクションのバリア機能がどのように調節されているかについては、殆ど明らかになっていません。

タイトジャンクションを構成する主要な細胞接着分子は、クローディンと呼ばれる 4 回膜貫通タンパク質です。私たちの研究室では、クローディンのリン酸化の役割 (Shiomi et al. *Sci Rep* 2015) やタイトジャンクション領域に豊富に存在する脂質、コレステロールの役割 (Shigetomi et al. *J Cell Biol* 2018) など、タイトジャンクションのバリア機能の制御に関わる新たな分子機構の解析を進めてきました。本研究では、食物アレルギーを予防する上で重要なタイトジャンクションのバリア機能の制御機構の解明を行いました。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_02】 腸内細菌由来の代謝物による経口免疫寛容誘導機構の解析
フリガナ	ウメモト エイジ
代表者名	梅本 英司
所属機関（機関名） （役職名）	静岡県立大学薬学部・免疫微生物学 教授
本助成金による発表論文，学会発表	投稿準備中

研究結果要約

小腸粘膜固有層に存在する CX3CR1⁺ 貪食細胞は腸管上皮細胞間から樹状突起を伸長することで腸管腔内の細菌を効率的に取り込む。申請者らは、これまでに腸内細菌由来の代謝産物であるピルビン酸および乳酸が小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞上の G 蛋白質共役型受容体 GPR31 に作用することで、小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞の樹状突起伸長を誘導することを見出している。小腸 CX3CR1⁺ 貪食細胞は経口免疫寛容の成立に重要な役割を果たすことから、本研究課題では、ピルビン酸、乳酸が GPR31 を介して経口免疫寛容の誘導に寄与する可能性を検討した。

遅延型過敏反応 (DTH) を指標にした実験系で経口免疫寛容を評価したところ、野生型マウスでは耳介腫脹が抑制されたのに対して、GPR31 欠損マウスでは CX3CR1 欠損マウスと同様に耳介が腫脹し、経口免疫寛容が誘導されなかった。また、ピルビン酸をあらかじめ経口投与すると、GPR31 シグナル依存的に経口免疫寛容の増強が認められた。小腸粘膜固有層における免疫細胞を解析したところ、GPR31 欠損マウスにおいて選択的に特定の制御性 T 細胞数集団が減少したことから、GPR31 を介したシグナルは小腸 Treg の分化を誘導する可能性が考えられた。以上のように、腸内細菌由来の代謝産物であるピルビン酸は GPR31 シグナルを介して、経口免疫寛容を誘導することが示唆された。現在、GPR31 欠損マウスで経口免疫寛容が誘導される分子メカニズムについてさらに解析を行っている。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_03】 小麦アレルギー経口免疫療法の耐性誘導における維持期の摂取回数に関するランダム化比較試験
フリガナ	オカダ ユウキ
代表者名	岡田 祐樹
所属機関（機関名） （役職名）	昭和大学医学部小児科学講座 講師
本助成金による発表論文，学会発表	発表予定だが具体的な学会名や論文投稿先については未定

研究結果要約

＜背景＞経口免疫療法(OIT)において、SU(sustained unresponsiveness)を達成のための最適な維持期の摂取回数については分かっていない。

＜目的＞本研究の目的は、自然耐性を獲得する事が難しいと思われる小麦アレルギー患者を対象に維持期の長さを 2 群に分けて OIT を実施し、維持期の週数の違いがもたらす耐性化獲得の効果を検証することである。

＜方法＞2020 年 4 月から 2023 年 3 月にかけて、小麦アレルギーがあり当院通院中の 2 歳以上の児を対象とした。24 g 以下の小麦負荷試験で陽性が確認できた症例に対し、維持期 12 週群及び 36 週群にランダム化割り付けを行った。ゆでうどん 24 g まで増量後に 12 週もしくは 36 週の維持期を行った。その後、脱感作及び SU 確認のための負荷試験をそれぞれ行った。

＜結果＞2021 年 3 月末時点での中間結果の報告である。2021 年 3 月末時点で適格基準を満たした症例は 11 名いた。年齢は中央値（四分位）5（3-5）歳、男児 8 名（72.7%）であった。アナフィラキシー歴のある児は 9 名（81.8%）いた。負荷試験の陽性閾値はゆでうどん 1 g 以下：6 名、ゆでうどん 3 g：2 名、ゆでうどん 24 g：3 名であった。OIT 開始時の検査数値は総 IgE 811(397-1645)IU/mL、小麦 101 (19.6-101) Ua/mL、 ω 5 グリアジン 5.5 (1.7-26.2) Ua/mL であった。脱落した児はおらず、増量期の児は 8 名、維持期に到達した児は 3 名、確認試験に到達した児は 1 名であった。

＜結語＞1 年目終了時点で目標症例登録数よりやや少ないが、登録症例に関してはプロトコル通りに進んでおり順調である。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_04】 経皮感作食物アレルギーモデル確立と脂肪酸摂取によるアレルギー制御
フリガナ	カワハラ タカヒロ
代表者名	河原 隆浩
所属機関（機関名） （役職名）	広島大学大学院医科系科学研究科免疫学 大学院生
本助成金による発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

ヒトは、乳幼児期の湿疹を始まりとし、続いて食物アレルギー (FA) が出現する「アレルギーマーチ」が臨床学的に知られている。FA 児は、時に誤食などによりアナフィラキシーショックを引き起こし生命の危機に直面するため、その発症メカニズムを明らかにすることは FA 発症や FA 治療の開発につながる事が期待される。

私たちは、マウスの実験系において、卵白抗原を用いた食物アレルギーモデルマウスを作成した。卵白抗原に感作されたマウスは、卵白特異的 IgE 抗体を産生するようになり、卵白抗原を経口投与すると深部温の低下(アナフィラキシー反応)が見られるようになる。この感作の状態からアナフィラキシー反応を起こすようになる状態への移行において、各種リンパ組織や腸管内の T 細胞や B 細胞、自然リンパ球が免疫学的、組織細胞学的にどのように関与しているか検討を行った。

今回の財団支援により確立した FA モデルマウスを用いたアナフィラキシーへの移行時において、小腸の粘膜固有層において IL-17 を産生する Th17 細胞や 3 型自然リンパ球 (ILC3) が著明に認められた。そこで、IL-17 ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行うと、卵白特異的 IgE 抗体産生の低下やアナフィラキシー反応の減弱を認めた。従って、食物アレルギーによるアナフィラキシー反応には小腸の粘膜固有層から産生される IL-17 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_05】 制御性 T 細胞の分化制御に関わる核内受容体に作用する食品由来成分の探索と有効性解析
フリガナ	コタニ ヒトシ
代表者名	小谷 仁司
所属機関 (機関名) (役職名)	島根大学医学部医学科 免疫学講座 講師
本助成金による発表論文, 学会発表	発表論文、学会発表ともになし

研究結果要約

本研究では、健康で幸せな食生活を営み、多くの人々が食を楽しむことを可能とすることを目的として、食物アレルギーの予防・治療に有効な食品成分の探索研究を行うこととした。腸管における免疫寛容を担う免疫細胞である制御性 T 細胞を分化制御する核内受容体 NR4A2/RXR をターゲットとして、これらに作用する食品由来成分の探索をおこなった。まず、奄美・沖縄由来の植物エキスを作成し、1200種類ほどのエキスを作成した。これらと食品由来の素材を多く含む生薬エキスライブラリー150種類について、作成した NR4A2/RXR の活性化評価系でスクリーニングした。その結果、いくつかのエキスを NR4A2/RXR の活性化を見出した。その中で、これまでの研究から RXR に作用する成分を見出しているホウノキの樹皮コウボクと、マメ科植物の根茎サンズコンに活性があることから、それらの成分に関して評価をおこない、ホーノキオールおよびプレニルフラボノイド 3 種類にアゴニスト活性が確認された。さらに、ナイーブ T 細胞を用いた制御性 T 細胞への分化促進を評価したところ、ホーノキオールおよびプレニルフラボノイド 2 種類に分化促進効果が見られたが、プレニルフラボノイドの 1 種類に関しては逆に抑制効果が確認された。今後、実験動物を用いた有効性の評価や、これら以外の食品由来素材の持つ詳細な有用性についても評価していきたいと考えている。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_06】 心因性食物アレルギー形成の解明と寛解プログラムの作成 -食物アレルギーの真の寛解へ
フリガナ	コニシ ミズホ
代表者名	小西 瑞穂
所属機関（機関名） （役職名）	国立成育医療研究センター 研究員
本助成金による発表論文、学会発表	<p>発表論文 Mizuho Konishi, Junko Kamoshida, Hisako Ogasawara, Mieko Takahashi, Yukihiro Ohya. 2019 Tentative development of a psychoeducational program for alleviating psychological burden of mothers of young children with milk allergy. <i>Journal of Health Psychology Research</i>. 31(2),183-193.</p> <p>学会発表 Konishi, M., Kamoshida, J., Takahashi, M., Ohya, Y. 2021 A Psychoeducational Program for Relieving Psychological Burden of Mothers of Toddlers with Milk Allergy. 32st International Congress of Psychology. Prague, Czech Republic. 7.20(7.18-23).</p>

研究結果要約

食物アレルギーの患者は長期間に渡って、原因物質をほとんど摂取しない生活を送る。特に幼児期から学童期にかけて徐々に耐性獲得をしていく子どもが、これまで除去をしていた原因物質の味や食感などに慣れなかったり、アレルギー症状の発症への不安から原因食物自体への拒否感が強まって摂取できなくなることが臨床場面で散見される。

本研究では食物アレルギーの治療経過中に生じる心理的要因により、寛解後も原因食物を摂取できない食物アレルギーを心因性食物アレルギーとし、その形成過程を明らかにし、その治療プログラムの作成を目的とした。そこで、食物アレルギー患者の保護者 287 名を対象に、各原因食物別の心理面に与える影響について質問調査を行った。その結果、卵と牛乳が原因食物の場合、アレルギー症状を起こした経験回数が多く、原因食物を摂取することへの恐怖感も大きかった。牛乳に関しては、子どもが食物アレルギーであると保護者が気づく前に牛乳を嫌がる子どもが一定数いることも明らかとなり、心因性食物アレルギーが形成されやすい可能性が示唆された。一方、原因食物が小麦の場合は子どもたちの小麦への拒否感が低いことが見いだされた。さらに、就学前後の 4 歳～7 歳頃に食物アレルギーに対するネガティブな気持ちが子どもたちに生じ始めることが明らかになった。以上より、4～7 歳の卵と牛乳アレルギーを持つ子どもを対象とし、心因性食物アレルギーの形成の予防を目的に全 8 回のプログラムと各回に対応したワークブックの作成を行った。

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団
2020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 2020_07】 コモンマーモセットを用いた食物アレルギーモデルの確立と前臨床評価系への応用
フリガナ	サトウ ケンヤ
代表者名	佐藤 賢哉
所属機関（機関名） （役職名）	公益財団法人実験動物中央研究所 研究員
本助成金による発表論文，学会発表	研究終了後に論文投稿予定。

研究結果要約

食物アレルギーを克服するために現在も様々な新薬の研究開発が行われているが、ヒトへの外挿性が高い非ヒト霊長類の疾患モデルを用いた前臨床研究の実施例はこれまでに無い。そこで本研究では、非ヒト霊長類の実験動物であるコモンマーモセットを対象として、卵アレルギーの原因物質であるオボアルブミン（OVA）を用いた食物アレルギーモデルマーモセットの作出および検証を行った。

食物アレルギーモデルマーモセットの作出検討では、血中ヒスタミン濃度とアナフィラキシー症状の一つである体温低下を指標として作出条件を探り、OVA の投与期間および投与回数の最適条件を見出した。次に、作出したモデルに対してヒトのアレルギー医薬品であるオマリズマブを投与したところ、OVA 投与後の血中ヒスタミン濃度の上昇が抑えられ、体温低下も起こらないことが解った。さらに、現在は免疫寛容の誘導と抑制性免疫細胞の解析を目的とした OVA 減感作実験を実施している。

これまでの結果では、OVA によりマーモセットに食物アレルギー様症状を起こすことが可能であり、オマリズマブがヒトと同じ薬効を示すことが解った。

以上により、このモデルマーモセットはアレルギーの基礎研究および前臨床研究に貢献し得るものと考えられた。

※9月末まで研究計画を延長している課題であるため、一部を途中状況として記載した。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_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	2020 年度日本農芸化学会北海道支部/第 50 回日本栄養・食糧学会北海道支部合同 学術講演会.

研究結果要約

本研究では、魚肉の主要アレルゲンであるパルブアルブミン (PA) のアレルゲン性におよぼすメイラード反応の影響について、消化・吸収性の視点から調査した。まず、対象魚種としてシロザケを用い、その筋肉から粗精製 PA、およびそれをグルコースとメイラード反応させた PA-G を調製した。そして、これらをマウスに体重 1 kg あたり 69 mg 経口投与した後、経時的に尾部静脈から採血、あるいは投与から 15 分または 60 分後に開腹して肝門脈から採血し、PA と PA-G の濃度を比較した。その結果、PA 投与群では投与 15 分後に痕跡量から 236.25 ng/ml の範囲 (n=10) で PA が検出されたが、その後は検出量が大きく低下した。一方、PA-G 投与群では、投与 15 分後には PA-G が痕跡量程度しか検出されず、その後 60 分まで観察したが PA-G 濃度の増加は見られなかった。なお、試料投与後 15 分の時点では、どちらの PA 投与マウスにおいても腸内に一定量の PA が観察されたが、肝門脈血中では、投与後の経過時間に依らず、いずれの PA 試料でも痕跡量程度しか検出されなかった。以上の結果は、グルコースとのメイラード反応が PA の腸管吸収性を損なう事を示唆している。さらに、PA が肝門脈に依存しない経路で末梢血まで移行した可能性も示唆された。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_09】 複数の重症食物アレルギーを有する児に対する同時緩徐微量経口免疫療法 Simultaneously slow low dose oral immunotherapy: double-S LOIT (wSLOIT)
フリガナ	スギウラ シロウ
代表者名	杉浦 至郎
所属機関 (機関名) (役職名)	あいち小児保健医療総合センター アレルギー科医長 兼 保健室長
本助成金による発表論文, 学会発表	なし

研究結果要約

我々はこれまでに 1 種類の抗原を対象とした緩徐微量経口免疫療法 (slow low dose oral immunotherapy: SLOIT) の高い安全性と十分な効果を報告している (Allergology International 2020)。今回は複数の重症食物アレルギーを有する児を対象に複数抗原同時 SLOIT の効果と安全性を評価する臨床研究を行った。

本研究の対象はそれぞれの食物経口負荷試験 (OFC) により鶏卵・牛乳・小麦のうち 2 つ以上に対して重症アレルギーを有すると診断された児であり、2020 年 8 月から 2021 年 7 月の間に 9 人が参加した。対象者の原因抗原の内訳は鶏卵 8 人、牛乳 7 人、小麦 3 人 (全て延べ数) であり、OFC での総摂取量 (茹で卵白、牛乳、茹でうどん) は 1.5g [or mL] (interquartile range: 0.7-1.7) であった。

院内調整抗原ミックス粉 (一定量の鶏卵、牛乳、小麦を含む) を用いた米粉クッキーの作成は全ての保護者が可能であった。病院でのクッキー初回摂取における症状誘発は認められず、自宅では延べ 1132 回 (摂取予定の 96.0%) の摂取が行われ、症状誘発は 5 回 (0.44%)、薬物を必要とする症状誘発は 2 回 (0.18%) 認められた。1 例が症状誘発後 (咳と蕁麻疹) の本人の摂取拒否により治療を中断したが、誘発された全て症状は自宅で改善し、病院受診やアドレナリン自己注射器の使用は認められなかった。現在のところ研究実施、安全性に大きな問題は認められないと判断しており、治療群 20 症例を目標にエントリーを継続、治療開始から 1 年経過後の採血と OFC により、免疫学的な変化 (特異的 IgE、IgG4) 及び症状の改善を評価、単抗原 SLOIT との比較を行う予定である。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_10】 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
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	Breastfeeding is a risk factor of egg white sensitization in two independent birth cohort in Japan Taiji Nakano, Fumiya Yamaide, Naoki Shimojo Department of Pediatrics, Graduate school of medicine, Chiba University, Japan, JSA-WAO Joint Congress 2020

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 名を予定とした。COVID19 の影響により一時期リクルートが停滞したため、2021 年 8 月出産までのリクルートとした。2018 年 10 月中旬からリクルートを開始し、2021 年 8 月時点で千葉メディカルセンター172 名、千葉大学医学部附属病院 93 名の合計 265 名でリクルートを完了した。6 か月健診、1 歳健診まで終了したのはそれぞれ 192 名、159 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 1.0%、4.5%、24.2%、5.6%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 5.4%、14.3%、38.1%、13.7%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 2022 年 8 月に全ての症例の 1 歳健診が終了予定であるのでそこで解析を行う予定である

研究課題名	【Web 会議番号 2020_11】 胃食道逆流に注目した牛乳アレルギーモデルマウスの免疫機序の解明
フリガナ	ノムラ タカヤス
代表者名	野村 孝泰
所属機関（機関名） （役職名）	名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学 病院助教
本助成金による発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。本研究では、乳児期の胃食道逆流による経気道感作が牛乳アレルギーの発症機序の一端を担っていると仮説を立て、動物モデルを用いた解析を行った。

まず、市販の牛乳と塩酸の混合物をマウスに気道投与することで、牛乳特異的 IgG1/IgE を産生し、牛乳抗原の全身チャレンジでアナフィラキシー症状を呈する、牛乳アレルギーモデルマウスを確立した。そのアジュバント効果は、少なくともその一部を酸が担っていることが疑われた。感作の詳細な細胞分子機序の解明は今後の課題であるが、気道上皮や肺胞マクロファージなどの自然免疫細胞、気道透過性の亢進、濾胞性 T 細胞の関与などについて解析予定である。

本研究では、これまでほとんど注目されてこなかった、牛乳アレルギーの気道感作の可能性を明らかにした。乳児期の胃食道逆流が牛乳アレルギー発症に関与することを示唆している。引き続き、動物モデルを用いて詳細な細胞分子機序を明らかにすることで、発症機序の解明とともに、治療法の開発や疾患発症の予防方法の確立に取り組んでいく。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_12】 少量経口負荷試験による食物アレルギー児の保護者の不安軽減効果の検討
フリガナ	マキタ エイシ
代表者名	牧田 英士
所属機関（機関名） （役職名）	自治医科大学附属さいたま医療センター小児科 助教
本助成金による発表 論文，学会発表	第 57 回日本小児アレルギー学会学術大会(2020年10月31日-11月13日、Web 開催) 「少量経口負荷試験による保護者の不安軽減効果の検討」

研究結果要約

海外では食物経口負荷試験(OFC)による保護者の quality of life の改善や不安軽減効果の報告があるが、抗原や負荷量によっては効果がないという報告もある。今回我々は本邦で広く行われている少量負荷の OFC による保護者の不安軽減効果を検討した。

地域の開業医から当科を紹介受診し、即時型反応の既往があり、初めて少量 OFC を行う予定の乳幼児 60 例(抗原は鶏卵 32 例、牛乳 22 例、小麦 6 例)とその母親を対象とした。母親に、(1)初診前、(2)初診後、(3)OFC 終了時、(4)OFC の 1 か月後、の 4 つの時点での不安の強さをアンケート調査した。不安軽減効果と不安が残るリスク因子について検討した。

対象の年齢の中央値は 1.2 歳(範囲 0.9-6.2)で、OFC 陽性例は 15 例(33%)で、アナフィラキシーの症例はなかった。(1)から(4)の各時点での不安の強さは、経時的に低下しており、OFC 陽性、陰性ともに OFC 前後で有意な軽減を認めた。最終的な不安が強く残るリスク因子は OFC 陽性のみであり、他にリスクとなる背景因子はなかった。

少量 OFC は重度の症状は出現しにくく、OFC 結果にかかわらず保護者の不安軽減効果があるため、より積極的な施行が望まれる。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_13】 温度感受性 TRPV4 チャンネル制御による食物アレルギー予防方法の検討
フリガナ	マツモト ケンジロウ
代表者名	松本 健次郎
所属機関（機関名） （役職名）	京都薬科大学 薬物治療学分野 准教授
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

食物アレルギーは乳幼児に特に多い疾患であるが、近年全年齢でも増加しており、社会的問題となっているため食物アレルギーに対する効果的な予防・治療法が社会から切望されている。温度感受性 TRPV4 は、機械、圧刺激やアラキドン酸の代謝物などにより活性化される多刺激反応受容体である。TRPV4 は、腸上皮細胞に発現し、大腸炎の進行に関与することが報告されている¹⁾。本研究では、卵白アルブミン（OVA）誘発マウス食物アレルギー性腸炎の病態における TRPV4 の関与について TRPV4 遺伝子欠損動物（KO）と野生型動物（WT）を用いて検討した。

OVA 慢性投与により、WT では、体重減少、搔痒行動、うずくまり、ならびに下痢などのアレルギー関連症状を惹起した。これらの症状は、いずれも KO マウスにおいて有意に増悪した。OVA 慢性投与による、OVA 特異的 IgG、IgA、IgE の増大は、WT と比べ、KO で有意に増大した。マウス大腸、小腸において、TRPV4 は、上皮細胞に発現していることが確認された。KO では病態時における腸管透過性の亢進、および上皮細胞から放出される IL-33 が WT とくらべて有意に増大していることが示唆された。さらに KO の大腸粘膜では、病態時において、抗原提示細胞である樹状細胞の顕著な増大が観察された。よって TRPV4 は、OVA 誘発食物アレルギーの病態において、上皮細胞のアレルゲン透過性を制御することで、病態の進行に対し抑制的に機能していることが示唆された。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_14】 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	Toyama Y et al. J Allergy Clin Immunol Pract. 2021;9:547-549.

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。消化管アレルギーは、重篤な成長障害を認める症例が存在すること、原因抗原の同定が困難な症例が多いことから、その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、重症消化管アレルギー病態を明らかにすることを目的として、重症消化管アレルギーの動物モデルの作成と、原因抗原の検討を行った。その結果、2つの方法を用いて、体重増加不良や組織への異常好酸球浸潤を認める消化管アレルギー様の動物モデルを確立することに成功した。また、消化管アレルギーを誘発する食物の成分は、一般的な食物アレルギーとは異なる可能性を見出した。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_15】 重症果物アレルギーの感作機序に関する研究
フリガナ	モリ ユウジ
代表者名	森 雄司
所属機関（機関名） （役職名）	藤田医科大学 助教
本助成金による発表論文，学会発表	【学会発表】 JSA/WAO Joint Congress 2020 小児耳鼻科学会 【論文】 投稿中

研究結果要約

花粉-食物アレルギー症候群（PFAS）は、通常、新鮮な果物や野菜を食べた直後に、口や喉のかゆみを感じる症状として現れる。しかし、PFAS 患者の中には、アナフィラキシーを含む全身症状を呈する者もいる。ヨーロッパでは、ヒノキの **gibberellin-regulated protein (GRP)** にアレルギー性があることが指摘されており、モモ GRP との交差反応性が認められている。スギはヒノキ科に分類され、日本ではスギ花粉が環境アレルギーの主要な原因物質となっている。しかし、スギ花粉症患者における GRP 感作の有病率に関する研究は、これまでのところ不足している。本研究は、スギ花粉症患者における GRP 感作の有病率を検討することを目的とした。方法は春季に軽度から重度の鼻炎を発症し、スギ花粉特異的 IgE 値が 0.7 UA/mL 以上であった 52 名の患者（中央値 10.5 歳，範囲 5～65 歳，女性 26 名）を登録した。モモ GRP は、モノクローナル抗体カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。モモ GRP に対する特異的 IgE 値は、ELISA で測定した。陰性コントロールの平均値に 3SD を加えた値以上のサンプルを陽性とした。また、重症の桃アレルギー患者 2 名の血清を陽性コントロールとした。結果。スギ花粉症患者 52 名のうち、11 名の血清がモモ GRP に陽性であった。結論 スギ花粉症患者の 20% がモモ GRP に感作されていた。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_16】 食物アレルギーにおける経皮感作と経口免疫寛容のバランスの解明
フリガナ	ヤマシタ タカヒロ
代表者名	山下 弘高
所属機関（機関名） （役職名）	琉球大学大学院医学研究科薬理学講座 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	学会発表 マウスモデルを用いた食物アレルギーの発症に及ぼす食品添加物の影響についての検討 第73回日本薬理学会西南部会，熊本，2020，11，21

研究結果要約

食物アレルギーの発症において、食物の皮膚への接触が感作の主要な経路であり、腸管から吸収は、むしろ、免疫抑制にはたらくと考えられている。しかしながら、食物アレルギーの発症における皮膚と消化管の関係は不明な点が多い。本研究では、経口免疫寛容と経皮感作を組み合わせたマウス食物アレルギーモデルを用いることで、食物アレルギーにおける皮膚と消化管の役割を明らかにしたい。腹腔感作による食物アレルギーモデルでは、経口免疫寛容を誘導すると、抗原特異的 IgE が全く上昇しないことを報告している。そこで、経皮感作モデルにおいて経口免疫寛容を誘導した。経口免疫寛容状態での経皮感作では、食物アレルギー症状はほとんど観察されなかったが、抗原特異的 IgE が少し上昇した。そこで、経皮的な負荷を強めるため、感作過程において LPS や黄色ブドウ球菌毒素を皮内注射した。しかしながら、これらの毒素の免疫アジュバント効果は確認できなかった。次に、IL-33 や TSLP の免疫アジュバント効果を評価した。その結果、IL-33 は強力に IgE 産生を促す可能性が示唆された。しかしながら、血中 IgE 値が高値であっても、食物アレルギー症状は軽微であった。IL-33 の作用機序を明確にするため、マイクロアレイ解析を行ったが、IL-33 に関連する因子の変動はほとんど認められなかった。今後は、マイクロアレイ解析の対象を広げて再解析する予定である。

研究課題名	【Web 会議番号 2020_17】 食物アレルギー予防を目指した食品成分による腸内環境制御法の開発
フリガナ	ハルサト アキヒト
代表者名	春里 暁人
所属機関（機関名） （役職名）	京都府立医科大学消化器内科 助教
本助成金による発表論文，学会発表	Dietary Emulsifier Polysorbate-80 Increases Expressions of Colonic Th2 Cytokines and Exacerbates Experimental Food Allergy by Modulating Microbiota Composition Cell Symposia: Infection Biology in the Age of the Microbiome (2020年12月発表予定であったがコロナ禍により2023年6月に延期)

研究結果要約

戦後、本邦では高度経済成長に伴う食糧の輸入増加による大量消費が可能となり、我々は「欧米化」した食生活を享受している。一方、我が国における疾病構造は変化し、自己免疫疾患、アレルギー疾患に加えて生活習慣病やがんといった疾病の罹患数は増加の一途である。

食品乳化剤は欧米を中心にアイスクリームやチョコレートなど多くの食品に添加されているが、これらが腸内細菌叢に影響し腸管粘液層を破壊することにより、結果として腸炎やメタボリックシンドロームを促進することが報告されている。本研究では、食品乳化剤が食物アレルギーに及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにするための検討を行った。

本研究では OVA アルブミン感作による食物アレルギーマウスモデルを用いて、出生後早期からの食品乳化剤摂取により食物アレルギーが有意に増悪し、腸管において IL-4、IL-13 といった Th2 サイトカインの遺伝子発現が亢進することを見出した。16s rRNA sequencing を用いた腸内細菌叢の解析では、食品乳化剤投与群においてコントロール群と比較して腸内細菌叢構成の変化が明瞭に観察された。今後は、宿主側の因子について腸管組織の網羅的遺伝子解析を用いた検討を追加する予定である(2021年11月末まで計画延長課題のため途中状況として記載)。

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団
2020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	【計画延長課題（Web 会議報告は次回以降）】 Food protein induced enterocolitis syndrome 診断における血清 TARC 値の有用性に関する研究
フリガナ	ハマノ ショウ
代表者名	濱野 翔
所属機関（機関名） （役職名）	杏林大学医学部小児科学教室 任期助教
本助成金による発表論文，学会発表	なし

研究結果要約（中間報告）

当該研究は 2020 年 5 月に当院倫理審査委員会の承認を得て、臨床研究を開始した。しかしながら COVID-19 感染症流行の影響が強く、目標症例数が疾患群 18 例、対照群 18 例のところ、現時点で疾患群 5 例、対照群 6 例となっている。疾患群は病棟事情や保護者の判断により経口食物負荷試験を避ける傾向にあること、対照群は嘔吐を呈する疾患を含めた一般入院数が減少していることが目標症例数に到達していない要因と考えられる。COVID-19 感染症流行については今後の見通しが立たないため、現在のペースでの症例集積が続く可能性もあり、今後は協力施設を増やすことで症例集積のペースアップを図る。今後の見通しとしては、1 年 6 か月以内に目標症例数に到達し、TARC 値などの測定、測定結果の解析を行う予定である。

2020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

食物アレルギーにおける免疫記憶の機序解明

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
	高雄 啓三 (タカオ ケイゾウ)	富山大学 教授	行動学解析
本助成金による発 表論文, 学会発表	Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum. Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, Ono R, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T. Gut. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322873. Online ahead of print. PMID: 33963042		

研究結果要約

食物アレルギーの原因の1つは腸管バリア機能の低下 (leaky gut) といわれており、腸管バリア機能に重要な IL-22 および IgA に着目し、食物抗原特異的な IgE 産生機序との関連についての研究を行った。2019 年度の研究助成の成果として、IgA が食物アレルギーに深く関わっていることを示唆する結果を得ており、独自に樹立した IgA 欠損マウスを用いて、IgA の機能のさらなる解析を行った。IgA 欠損マウスでは腸内細菌のゆがみに依存して回腸炎が起こるが、これにはグラム陽性、陰性の腸内細菌とも関与していること、また、炎症は回腸の上皮陰窩に起因していることを見出した。この微細な異常は、食物アレルギーの予防や診断をするうえで超早期の標的になると考えられる。さらに IgA 産生細胞の動態を詳細に解析するために、IgA 産生細胞可視化マウスを作製し、脾臓や小腸で検出できることを確認した。また、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 抗体が誘導されることを昨年度報告したが、皮膚感作アレルギーモデルで IgE 抗体産生細胞の検出方法を確認し、リンパ節に IgE 産生細胞が存在していることをつきとめた。一方、IL-22 に関しては、IL-22 欠損マウスを樹立し、腸管バリア機能の低下を確認後、食物アレルギーモデルで評価をしたが、それだけでは食物アレルギーは誘導できず、他の要因の関与が示唆された。

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、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。通常は、食物抗原により、制御性 T 細胞が誘導されて経口免疫寛容がされるが、腸管や皮膚など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る。これまでの研究から、独自に腸管、皮膚のバリア機能を低下させた食物アレルギーモデル系を複数構築し、IgA が Ig E の産生を抑制することを、IgA あるいは IgE を制御する食品成分も見出している。また、図 1 に示すとおり、IgA を欠損させると免疫細胞の過剰な活性化が起こり、回腸に炎症がみられることを明らかにしてきた¹⁾。

これらを基盤として、食物アレルギーにおける免疫記憶、さらには免疫グロブリンのクラススイッチを標的として食物抗原特異的に免疫記憶を

制御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る。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機序を明らかにするとともにその制御法の確立を目的とした。またアレルギーと発達障害の関連も指摘されており、アレルギー疾患と神経性疾患との因果関係についても多角的に調べ、アレルギーの治療による他の疾患の制御の可能性についても検討することとした。このことが解明されれば、アレルギー疾患にとどまらず、新たな医療の枠組みを創生する画期的なことである。

研究計画及び研究手法

腸管・皮膚のバリア機能に重要な IL-22 欠損マウスにおける食物アレルギーの解析

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により IL-22 欠損マウスを作製し、正常マウスとの交配により IL-22 欠損マウスのライン化を行い、IL-22 遺伝子部分の欠失をシーケンスにより確認した。腸管および皮膚のバリア機能を、皮膚については、経皮水分蒸散量 (transepidermal water loss; TEWL) により評価した²⁾。また腸管バリア機能は FITC 標識したデキストランを経口投与し、小腸での透過性を血液中の FITC の蛍光を測定することによって評価した。

昨年度、確立した C57BL/6 マウスを用いた食物アレルギーモデル系を用い、IL-22 欠損マウスにニワトリオボアルブミン (OVA) 50 µg を抗原として水酸化アルミニウムをアジュバンドとし

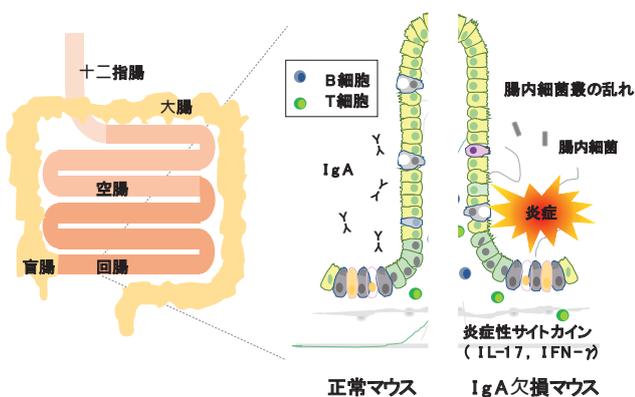


図1. IgA欠損による回腸での炎症
小腸は上部から十二指腸、空腸、および回腸からなるが(左)、IgA欠損により特に回腸での腸内細菌叢の歪みが大きく、それに応じてT細胞からの炎症の原因となるサイトカインの分泌が増え、炎症が起こることにより回腸の組織が損傷を受ける(右)。

てゲル化したもの (OVA/Alum) を腹腔に投与して免疫した。2 週間後に追加免疫した後、さらに 1 週間後にゾンデにより 30 μ g の OVA を 0.3ml のリン酸化バッファーに溶解したものを投与した。投与後の体温測定を行い、アナフィラキシー反応を検討した。また、IgA 欠損マウスと比較した。腸管のバリア機能に重要な IgA あるいは IL-22 を欠失したマウスの糞便より腸内細菌叢について、DNA を抽出し、16S rRNA の次世代シーケンズ解析により調べた。

IgA 産生細胞の動態の可視化解析

IgA のクラススイッチを機序、さらに IgA 産生細胞の動態を解明するために、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により IgA 産生細胞可視化マウスの構築を行った。IgA 産生細胞で、同時に Cre リコンビナーゼを発現させ、これまでに確立してきた LoxP によるカルシウムバイオセンサー YC3.60 マウス^{3, 4)}との交配により IgA 産生細胞特異的に YC3.60 を発現するマウスを用いた生体イメージングにより IgA 産生細胞の動態を明らかにすることにした。

IgE 産生プラズマ細胞分化の詳細な検出系の確立

光変換蛍光タンパク質 KikGR を発現する KikGR マウス⁵⁾を用い、IgE 産生プラズマ細胞、および抗原特異的 IgE 産生プラズマ細胞の前駆細胞の生体内動態を明らかにすることで、IgE 産生プラズマ細胞の誘導および維持機構を明らかにすることを目指した。前年度には、IgA 欠損マウス

ウス⁶⁾では IgE 産生が増強される特徴を生かし、OVA/Alum 感作した IgA 欠損 B6 マウスを用い、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 産生プラズマ細胞の検出法を確立した。プラズマ細胞分化では、B220 (あるいは CD19 など)⁺ 細胞表面 Ig⁻ \rightarrow B220⁺ 細胞表面 Ig⁺ \rightarrow B220⁻ 細胞表面 Ig⁺ \rightarrow B220⁻ 細胞表面 Ig⁻ (形質細胞) と、分化が進むにつれて細胞表面 Ig が陰性となる。そこで、今年度は、OVA/Alum 感作 KikGR 発現 IgA 欠損 C57BL/6 マウスを用いて、細胞内および細胞表面 IgE を分けて同時に分けて染色して検出し、IgE 産生細胞分化過程の詳細を、フローサイトメトリー解析による B220⁻ 細胞表面 IgE⁻ (形質細胞) 検出と同時に ELISPOT アッセイによる抗原特異的 IgE 産生細胞検出により明らかにすることにした。

IgE 陽性細胞の生体内動態解析

昨年度に報告したように、IgA 欠損 C57BL/6 マウスへの OVA/Alum 感作により、血液中 IgE 上昇と OVA 特異的 IgE⁺ 形質芽細胞の誘導を確認出来た。そこで、今年度は IgA 欠損マウスと KikGR マウスとを掛け合わせて作製した KikGR IgA 欠損 C57BL/6 マウスに OVA/Alum 感作して IgE⁺ 細胞を誘導し、IgE⁺ 細胞の生体内動態を検出することにした。

皮膚感作 I 型アレルギーモデルの確立と解析

小麦加水分解物を含む石鹼による小麦粉アレ

ルギーや英国の乳児へのピーナッツオイル塗布によるピーナッツアレルギーなどが典型的な例として挙げられるが、食物アレルギーは皮膚感作により誘導された食物と同一抗原に対する抗 IgE 状態下における食物摂取により惹起される。従って、皮膚感作時に誘導される IgE 産生細胞の誘導メカニズムの解明、特に、皮膚感作により誘導された IgE 産生細胞にコミットした細胞の検出と臓器間移動、そして、皮膚からの再感作および食物アレルギー惹起時における IgE 産生細胞にコミットした細胞から IgE 産生細胞への分化誘導と生体内動態の解明は、食物アレルギーの感作機序の解明を大きく推し進める。しかし、皮膚感作時に IgE 産生細胞がどの臓器でコミットし、その後、骨髄などに移動するののかについては、ほとんど分かっていない。

昨年度確立した OVA/Alum 感作による食物アレルギーモデルは、誘導された抗原特異的 IgE 産生細胞と食物アレルギーの発症解析にはとても有用なツールであるが、前述の生体内での IgE 産生細胞誘導過程の解明には、抗原皮膚感作 IgE 誘導モデルが必須である。そこで本年度は、C57BL/6 系 IgA 欠損マウス、および皮膚持続感作によるアトピー性皮膚炎モデルとして用いられる BALB/c 系マウスを用いて、腹部皮膚をテープストリッピング後、OVA 塗布感作を繰り返す、抗原反復塗布感作アトピー性皮膚炎モデルの確立を試みた。

腸管バリア機能低下モデルマウスにおける行動異常の解析

腸管バリア機能に重要な IgA を欠失させた IgA 欠損マウス¹⁾において網羅的な行動学解析を行い⁶⁾、脳について組織切片を染色し、病理解析を行った。

結果と考察

腸管・皮膚のバリア機能に重要な IL-22 欠損、IgA 欠損マウス、IgE 過剰発現マウスにおける食物アレルギーの解析

CRISPR/Cas9 により IL-22 を欠損したマウスを作製し、IL-22 を欠失した複数の系統を樹立した。そのうちの 1 系統について皮膚、腸管のバリア機能を評価したところ、経皮での TWEL が亢進しており、また FITC-デキストランの腸管での透過性の更新も見られ、それぞれの機能に低下があることが確認された。この IL-22 欠損マウス、IgA 欠損マウス、IgE 過剰発現マウスを用いて OVA で免疫後、OVA を経口投与した食物アレルギーモデルにおいて、OVA に対する特異抗体価を評価したところ、IL-22 欠損マウスでは腸管の透過性が上がっているにもかかわらず、正常マウスに比べて、明らかな差異は見られなかった(図 2)。IL-22 欠損マウスについて、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、制御性 T 細胞、濾胞性ヘルパー T 細胞、B 細胞などの免疫細胞についても、正常マウスと比較したがいずれも明らかな差異はなかった。糞便による腸内細菌叢の解析では、正常マウスと異なっていることが明らかとなった(図 3)。

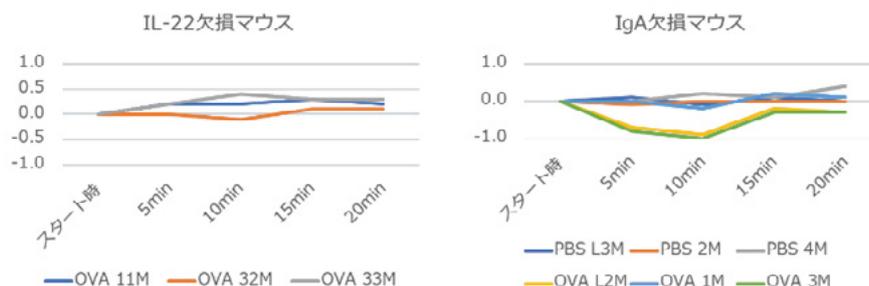


図2. IL-22欠損マウスにおける食物アレルギーの評価
 IL-22欠損マウスをOVAで免疫後、OVAを経口投与した食物アレルギーモデル系で、アナフィラキシー反応について評価した。OVA投与後の体温を測定した（左）。（右）IgA欠損マウスについて免疫後、OVAを投与、あるいはコントロールとしてPBSのみを投与後、体温を測定した。

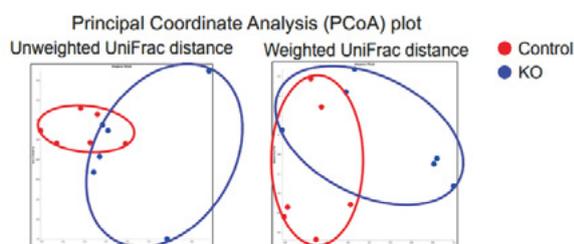


図3. IL-22欠損マウスの腸内細菌叢の解析
 IL-22欠損マウス（青）と正常マウス（赤）の糞便の腸内細菌叢について16S RNAの配列を基にしたベータ多様性解析の結果を示す。

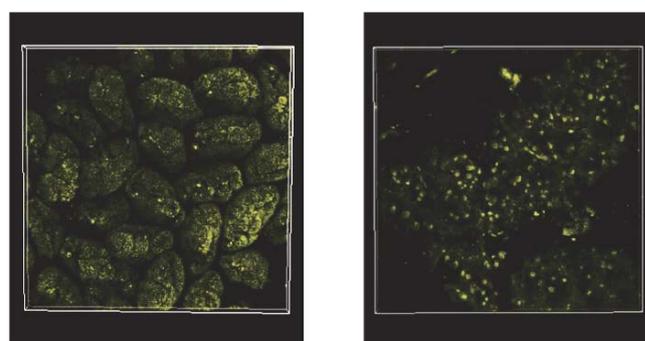


図4. IgA産生細胞可視化マウスにおける腸管のIgA陽性細胞
 IgA-Cre/YC3.60マウスの小腸（左）および大腸（右）におけるIgA産生細胞。

IgA 産生細胞可視化マウスの動態解析

CRISPR/Cas9 の系を用いて IgA の H 鎖の遺伝子座に Cre リコンビナーゼ遺伝子を導入し、IgA を産生する細胞で Cre リコンビナーゼを発現するマウスを作製した。Cre リコンビナーゼにより発現誘導できる細胞系譜特異的カルシウムバイオセンサー (YC3.60) マウスとの交配により、IgA を産生する細胞を可視化できるマウスを樹立した。このマウスについて生体イメージングにより IgA 産生細胞の動態を解析したところ、脾臓では、広く散在していたが、小腸パイエル板では 2 次濾胞に集積していることが明らかになった（図 4）。

腸管での IgA の機能解析

IgA 欠損マウスの腸管の切片を調製し、HE 染色したところ、小腸の陰窩の上皮細胞に異常があることがわかった。この結果は小腸炎のモデルマウスで、小腸での炎症は陰窩のパネート細胞の異常から始まるという結果⁷⁾とよく一致しており、食物アレルギーにおいても陰窩の小腸上皮に異常がある可能性が示され、食物アレルギーにおける下痢などの原因となっていると推測された。

IgE 産生プラズマ細胞分化の詳細な検出系の確立

IgA 欠損 C57BL/6 マウスに 1 週間感覚で OVA/Alum を 4 回感作して IgE⁺細胞を誘導した。脾臓細胞について、B220、Alexa647-OVA および細胞表面 IgE を Phycoerythrin 標識抗 IgE 抗体で染色後、permeabilize し細胞内 IgE を Brilliant Violet241 標識抗 IgE 抗体で染色して検出した。そして、細胞内 IgE⁺細胞(細胞内 IgE は、細胞内および細胞表面 IgE⁺細胞で陽性のため)、さらに Alexa647-OVA⁺細胞(OVA に結合する抗体を産生している)に gating した。そして、B220⁺、B220⁻細胞について調べてみると、いずれの細胞でも細胞表面 IgE 細胞は、1%程度であった(図5)。

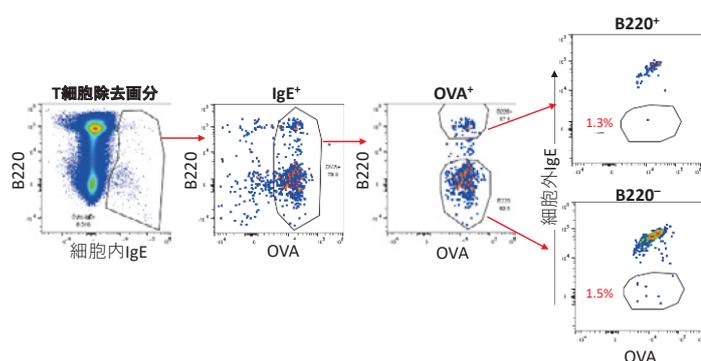


図5. 感作抗原特異的IgE産生プラズマ細胞分化過程の検出

また、他の染色パネルでも再現のある結果が得られた。また、脾臓細胞 100 万個当たり CD19⁻細胞表面 IgE⁻ (形質細胞)は約 4 個であった。一方、ELISPOT アッセイで、同じサンプルについて解析すると、OVA 特異的 IgE 産生細胞は 100 万個当たり約 5.5 個であった。フローサイトメトリと ELISPOT 評価系では検出感度の差を考える必要もあるが、ほぼ同数との結果が得られた。以上の結果をまとめると、当モデルでの IgE 産生

プラズマ細胞分化は、B220⁺細胞表面 IgE⁻細胞 → B220⁺細胞表面 IgE⁺細胞 → B220⁻細胞表面 IgE⁺ → CD19⁻細胞表面 IgE⁻ (形質細胞)と進行するが、B220⁻細胞表面 IgE⁺細胞に比べて、CD19⁻細胞表面 IgE⁻ (形質細胞)の割合が当初想定していた頻度よりも低かった。これは、B220⁻細胞表面 IgE⁺細胞のうちごく一部の細胞が CD19⁻細胞表面 IgE⁻ (形質細胞)に分化していく、あるいは、CD19⁻細胞表面 IgE⁻ (形質細胞)の寿命が B220⁻細胞表面 IgE⁺細胞に比べてとても短いためである可能性を考えている。

食物抗原摂取時における腸間膜リンパ節、脾臓、骨髄での B220⁺細胞表面 IgE⁺細胞、B220⁻細胞表面 IgE⁺細胞、CD19⁻細胞表面 IgE⁻ (形質細胞)の頻度変化の解析は、食物抗原による IgE 産生細胞分化のタイミングと分化臓器、そして分化の場を明らかにするための有用な情報となると考えている。

IgE 陽性細胞の生体内動態解析

当研究の IgE 産生プラズマ細胞の生成を、その前駆細胞の生成と維持機構を解明して制御するという目的から、IgE⁺プラズマプラスト細胞(B220⁻細胞表面 IgE⁺)、およびその前駆細胞で IgE⁺細胞にコミット直後の B220⁺細胞表面 IgE⁺細胞の臓器間移行について解析した。昨年度の OVA/Alum 感作 IgA 欠損 B6 マウスの検討において、腸間膜リンパ節、脾臓、骨髄で IgE⁺細胞を検出出来ている。そこでまず、OVA 特異的 IgE⁺細胞の腸間膜リンパ節から脾臓、骨髄への移動を解析した。KikGR 発現 IgA 欠損 B6 マウスに

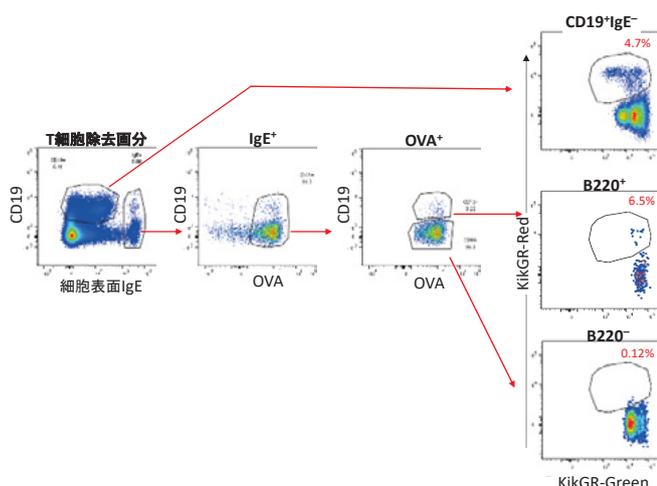


図6. 腸間膜リンパ節から骨髄への抗原特異的IgE⁺細胞の移動

OVA/Alum を感作して 3 回感作して 1 週間日後に、腸間膜リンパ節に紫色光を照射して腸間膜リンパ節に存在する細胞を赤色(KikGR-Red)にマークした。24 時間後に骨髄および脾臓細胞を分離して解析した。当検討では、B220 の代わりに CD19 を使用した。腸間膜リンパ節から 24 時間の間に移動してきた KikGR-Red の CD19⁺ IgE⁺ 細胞、および IgE⁺ プラズマブラスト(CD19⁺ 細胞表面 IgE⁺)は、それぞれ骨髄では 6.1%と 0.06%、脾臓では 2.4%と 0.17%であった(図 6)。

この結果から我々は、頻度は低い、細胞表面 IgE⁺ 産生細胞は腸間膜リンパ節、脾臓、骨髄間を移動していると考えている。IgE 産生にコミットして直後の CD19⁺ IgE⁺ 細胞が骨髄および脾臓に移動して IgE⁺ 形質芽細胞(IgE⁺ CD19⁻)に分化し、IgE⁺ 形質芽細胞に分化後は、その臓器からほとんど動かずにいる可能性を考えている。今後、脾臓、あるいは、骨髄を光照射して解析する事で、生体内動態が明らかになると考えている。

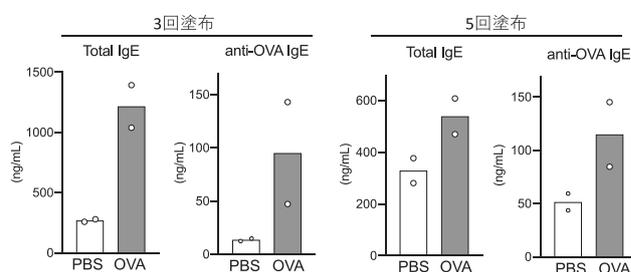


図7. IgA欠損C57BL/6マウスにおけるOVA皮膚感作による抗原特異的IgE誘導

皮膚感作 I 型アレルギーモデルの確立と解析

C57BL/6 系 IgA 欠損マウス、および皮膚持続感作によるアトピー性皮膚炎モデルとして用いられる BALB/c 系マウスを用いて、腹部皮膚をテープストリッピング後 OVA あるいは PBS を週に 1 回塗布感作して繰り返す、抗原反復塗布感作アトピー性皮膚炎モデルの確立を試みた。

1 回/週 × 3 回実施して 3 日後、および 1 回/週 × 5 回実施して 3 日後に、血中 IgE を測定しところ、n=2 であるが OVA 感作群では PBS 群に比べ、血中総 IgE および抗 OVA IgE 抗体濃度が増加していた(図 7)。

そこで ELISPOT アッセイにて OVA 特異的 IgE 産生細胞の検出を試みたが皮膚感作 3 回および 5 回のいずれでも骨髄細胞、脾臓細胞でも OVA 特異的 IgE 産生細胞を検出出来なかった。そこでさらに、IgA 欠損 C57BL/6 マウスと、IgE が誘導されやすい BALB/c マウスを用いて、腹部皮膚をテープストリッピング後 OVA 塗布/1 回/週 × 3 回、および 5 回で追加実験を実施した。その結果、IgA 欠損 C57BL/6 マウスでは血中抗 OVA IgE 抗

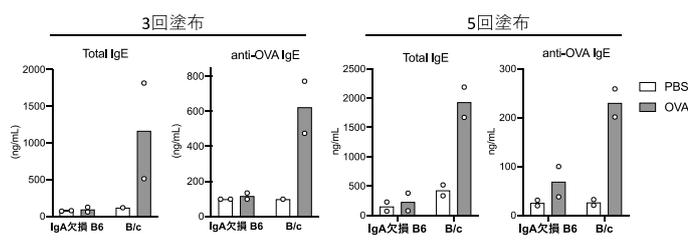


図8. IgA欠損C57BL/6マウスとBALB/cマウスにおけるOVA皮膚感作による抗原特異的IgE誘導
B6: C57BL/6, B/c: BALB/c

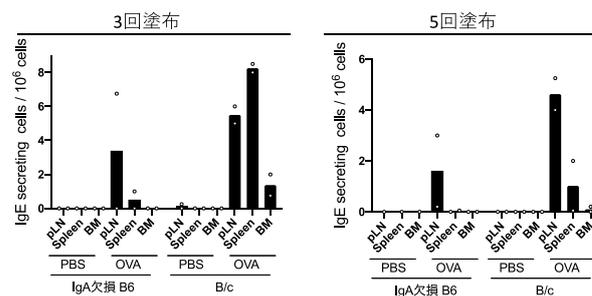


図9. IgA欠損C57BL/6マウスとBALB/cマウスにおけるOVA皮膚感作によるOVA特異的IgE産生細胞誘導
B6: C57BL/6, B/c: BALB/c

体誘導は検出される個体も認められたが不確実であり、誘導された濃度も低値に留まった。それに対し、BALB/cマウスでは、総IgEと抗OVA IgE抗体が有意に誘導された(図8)。ELISPOTアッセイによるOVA特異的IgE産生細胞の検出においてもIgA欠損C57BL/6マウスでは誘導は安定しなかったがBALB/cマウスでは安定して検出された(図9)。以上の結果から、皮膚感作I型アレルギーモデルでは、IgA欠損C57BL/6マウスによる解析は難しく、BALB/cマウスバックグラウンドであることが必要であることが分かった。そこで、皮膚感作I型アレルギーモデルにおいて、IgE⁺細胞の生体内動態を解析するために、KikGRマウス(C57BL/6バックグラウンド)をBALB/cマウスと交配し、現在、ほぼBALB/cバックグラウンドに置き換わるとされる6世代目のKikGR発現B/cマウスを作成した。今後、OVAの経口摂取により食物アレルギーの発症の有無を確認する。さらに、KikGR発現B/cマウスにて皮膚感作I型アレルギーを誘導し、皮膚所属リンパ節、脾臓、骨髄、そして、腸間膜リンパ節間のIgE⁺細胞の動態と、IgE⁺プラズマ細胞の局在を明らかにしていく。

さらにBALB/cマウスを用いて検討を進めると、OVA感作した皮膚の所属リンパ節では

CD19-OVA⁺IgE⁺産生細胞は検出されなかったが、ELISPOTアッセイではOVA特異的IgE産生細胞検出されたことから、所属リンパ節では形質細胞のみが存在している可能性がある。以上の結果から、所属リンパ節はIgE産生細胞分化の場というよりもむしろ産生の場として機能している可能性を我々は考えている。

皮膚感作時および経口摂取時における骨髄および脾臓に存在するB220⁺IgE⁺細胞およびIgE⁺プラズマ細胞の生体内動態変化と、IgE産生プラズマ細胞の局在の詳細の解明は、IgE産生プラズマ細胞の誘導と維持のメカニズム解明に繋がると考えている。

腸管バリア機能低下モデルマウスにおける行動異常の解析

IgA欠損マウスにおいて網羅的な行動学解析を行い、オープンフィールドテストで不安行動の増加が見られた。腸管に炎症があると行動にも異常が見られ、食物アレルギーを発症した状態では脳神経にも影響を及ぼすことが示唆された。

今後の研究活動について

IgA欠損マウスではIgE陽性細胞が増えていることが明らかになり、IgE抗体産生細胞の局在

については一部明らかとなったが、それらの局在性、維持に関する機序については、まだまだ不明である。また、本年度の研究から、マウスのバックグランドを BALB/c にした方が、実験の検出感度が上がり、より詳細な解析が可能であることも明らかとなった。このことより IgA 欠損マウス、および IL-22 欠損マウスについても C57BL/6 のバックグランドのものを BALB/c に戻し交配させ、食物アレルギーにおける IgE 陽性細胞の検出感度を上げたシステムを取り入れる予定である。これらのマウスを利用して、IgE 陽性細胞の動態、活性化、抗体産生細胞への分化についてさらなる解析を行い、食物アレルギー発症時の IgE を継続的に供給するメカニズムの解明が必要である。アナフィラキシー反応の検出には C57BL/6 バックグランドの IgA 欠損マウスでも十分に高い感度で検出できるので、このマウスに IgA 抗体の投与や IgA 産生細胞を移入するなど、食物アレルギーが回避できるか、確かめる必要がある。また、IgA 産生細胞可視化マウスが樹立されたので、食物アレルギー誘導時の、クラススイッチ、また IgA 産生細胞への活性化・維持についての動態を詳細に調べ、トレランスの誘導機序を明らかにする。IgA の産生を高めるプロバイオティクスなどが実際に食物抗原による IgA の産生を高め、トレランスに寄与するか、またそれが食物アレルギーの抑制効果を発揮するか、検討する。これらのことが検証できれば、食物アレルギーにおける治療の標的を突止め、具体的な治療法が確立できると考えられる。

食物アレルギー誘導系での行動学解析につい

ては継続中であり、食物アレルギー発症時の脳の炎症や海馬でのニューロン新生を調べることや、腸脳相関⁸⁾を調べることにより神経性疾患への影響を明らかにすることができると考えられる。

参考文献

- 1) Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, Ono R, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T. Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum. *Gut* 2021
- 2) Kumazawa T, Kotake K, Nishimura A, Asai N, Ugajin T, Yokozeki H, Adachi T. Isolation of food-derived bacteria inducing interleukin-22 in B cells. *Biosci Microbiota Food Health* 2020 39:1-9,
- 3) Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101:10554-9,
- 4) Yoshikawa S, 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 Ca(2+) signals in lymphocytes of Ca(2+) biosensor

- transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci Rep* 2016 6:18738,
- 5) Tomura M. New Tools for Imaging of Immune Systems: Visualization of Cell Cycle, Cell Death, and Cell Movement by Using the Mice Lines Expressing Fucci, SCAT3.1, and Kaede and KikGR. *Methods Mol Biol* 2018 1763:165-74,
- 6) Fujii K, Koshidaka Y, Adachi M, Takao K. Effects of chronic fentanyl administration on behavioral characteristics of mice. *Neuropsychopharmacol Rep* 2019 39:17-35,
- 7) Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, Ko HJ, Bock J, Martinez-Naves E, Glickman JN, Tschurtschenthaler M, Hartwig J, Hosomi S, Flak MB, Cusick JL, Kohno K, Iwawaki T, Billmann-Born S, Raine T, Bharti R, Lucius R, Kweon MN, Marciniak SJ, Choi A, Hagen SJ, Schreiber S, Rosenstiel P, Kaser A, Blumberg RS. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 2013 503:272-6,
- 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 524:340-5,

研究課題名	主要アレルゲン Mal d 1 の日本産リンゴ品種における定量および経口負荷試験結果を基にした食事指導への展開		
フリガナ	オキシマ ナオコ		
代表者名	沖嶋 直子		
所属機関 (機関名) (役職名)	松本大学人間健康学部健康栄養学科准教授 専任講師		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	小池 由美 (コイケ ユミ)	長野県立こども病院 アレルギー科長	経口負荷試験、Mal d 1 定量
	小林 克彦 (コバヤシ カツヒコ)	小林耳鼻咽喉科医院	経口負荷試験
	近藤 康人 (コンドウ ヤスト)	藤田医科大学	経口負荷試験
本助成金による発表論文, 学会発表	第 70 回日本アレルギー学会学術大会 (ELISA のみ)		

研究結果要約

日本において、リンゴ PFAS の原因となる主要なアレルゲンコンポーネントは PR-10 に属する Mal d 1 である。研究代表者がこれまで明らかにしてきたウェスタンブロット (WB) による Mal d 1 発現量をもとに、Mal d 1 低発現リンゴと日本で生産、消費量が圧倒的に多いサンふじを用いて経口負荷試験および ELISA による定量を実施した。

市販されている抗体を用いて Mal d 1 を定量できる ELISA を構築し、WB で分析済みの試料を定量することでその性能を評価した。その結果、WB にて Mal d 1 低発現だった多くの品種では WB と ELISA の結果が相関していた。次いで経口負荷試験に用いたリンゴ品種に含まれる Mal d 1 を ELISA にて定量した。その結果、サンふじは他品種よりも高い定量値を示す傾向にあった。経口負荷試験では、Mal d 1 量の少ない品種であっても VAS では陽性だった品種があったにも関わらず、Mal d 1 量が多いサンふじでは経口負荷試験が実施できた 2 名中 1 名が陰性であった。

本研究の遂行途中に Mal d 1 量や口腔症状の起こしやすさへの Flavan-3-ols の関与が Romer M.らにより発表された。今回の結果から、Mal d 1 量が少なくても口腔症状を示す品種があったり、サンふじのように Mal d 1 量が高くても全ての被験者が症状を示したりするわけではなかった理由の一つとして考えられ、今後の検討課題となった。

研究目的

近年花粉・食物アレルギー症候群（以下 PFAS）によるバラ科果物アレルギー患者が増加している。一旦 PFAS と診断されると原因食材の除去以外に治療法はなく、その食品を好む患者にとっては食関連 QOL が低下する。また、果物の産地では消費量の低迷にもつながりかねない。欧州ではリンゴ主要アレルゲン Mal d 1 の定量や経口負荷試験結果から、PFAS を起こしにくい品種が明らかとなっているが、日本では欧州と大半の栽培品種が異なることから日本産品種のアレルゲン性は不明であった。研究代表者は、これまでに長野県産リンゴ 28 品種の Mal d 1 量をウェスタンブロット(以下 WB)法により分析し、日本での生産・消費量が最も多く、PFAS を発症しやすいと考えられているサンふじと比較して、Mal d 1 量が有意に少ない品種を 14 品種見出した。

本研究では、WB 結果をもとに Mal d 1 低発現リンゴの経口負荷試験を実施するとともに、ELISA を構築して Mal d 1 低発現リンゴにおけるアレルゲンタンパク質量を定量すること、さらに、これらの結果を統合することで、リンゴ PFAS 患者が症状を示す Mal d 1 量の閾値を求め、リンゴ PFAS 患者への食事指導に活用することを目的とした。

本研究の進展により、Mal d 1 の定量結果から、経口負荷試験を行わなくても PFAS の起こしやすさを推定することができるようになる。さらに、Mal d 1 低発現リンゴ品種の情報は、リンゴの育種にも活用できることが期待される。これは、日本におけるリンゴ消費量が伸び悩む中、新たな訴

求点として「アレルギーを起こしにくいリンゴ」品種の開発にもつなげていけることが期待される。

研究計画及び研究手法

1. Mal d 1 特異的サンドイッチ ELISA の構築

Mal d 1 に対するモノクローナル抗体は販売されていなかったため、Mal d 1 と交差する市販の抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体と抗 Mal d 1 ポリクローナル抗体を組み合わせて、Mal d 1 を測定するサンドイッチ ELISA を構築した。

初めに、抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体 (BV16, Absolute Antibody, Wilton, UK) が Mal d 1 と交差することを確認するために、WB にて分析した。その結果、レコンビナント Mal d 1 (以下 rMal d 1, CUSABIO, Wuhan, China) や Mal d 1 高発現品種であるホワイトスイートの抽出液が抗 Mal d 1 ウサギポリクローナル抗体を用いて検出した結果と同様に検出できたため、交差性ありと判断した。

抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体をキャプチャー抗体に、抗 Mal d 1 ウサギポリクローナル抗体 (CUSABIO) を検出抗体に用い、HRP 標識抗ウサギ IgG (CeraCare, MA, USA)、基質は TMB (CeraCare) を用い、マイクロプレートリーダー (SH-1300Lab, コロナ電気株式会社, 茨城) にて検出した。標準品として rMal d 1 を用いてダイナミックレンジおよび測定上限および下限を求めた。各実験条件は、平均値および標準偏差、さらにそこから求められる変動係数を用い、感度良くかつ変動係数が小さくなる条件、かつ標

準品各濃度を用いた検量線を求め、MBL が無償提供している 4 パラメータロジスティック解析を行える Excel シートにて、標準品各濃度のデータを推定モデルの差異が最小となる条件を検討した。

構築した ELISA を用いて、WB にて分析済みの検体を ELISA にて定量し、WB と ELISA とで結果を比較した。詳細な方法を図 1 に示す。

2. 経口負荷試験

WB 結果から Mal d 1 が低発現であった品種のうち、2020 年度秋季に入手することができた 9 品種、およびサンふじを試料とした経口負荷試験を実施した。

試験食には、Hansen らによる二重盲検法の試料の検討結果²⁾のうち、モデル II(リンゴとキャベツを刻んでピタパンにはさんだもの)を参考として、小麦アレルギー患者でも参加できるよう、ピタパンを使わない、リンゴとキャベツのスムージーを考案した。1 品種あたり、皮と芯を除いた可食部 1 切れ相当(大きな果実であれば 8 等分、

小さ目の果実であれば 6 等分)である 25g を負荷した。そのレシピを表 1 に示す。

経口負荷試験に用いたリンゴ各品種は、長野県松本市及びその周辺地域の小売店ならびに JA 等の直売所にて 1 品種あたり 5 個以上購入し、その中から傷が少なく果皮や果肉に異常のないものを選択し、1 品種当たり 5 個を用いた。

スムージーの調理については、以下の通りであった。

リンゴは傷や果皮の異常がない部分を選んで用いて 2 cm 程度まで刻み、キャベツも同様の大きさに刻んで市販のリンゴジュース(クリアアップル, 原田乳業株式会社, 新潟)とともにブレンダー(クイジナート, パワーブレンダー, SPB-650J, Stanford, CT, USA) に固形物がなくなるまでかけ、試料を調製した。調製したスムージーは、速やかに 1 回投与量ずつ耐冷性プラスチックカップに分注し、ラップで口を覆い使用するまで-60°Cで保存した。残りは ELISA 用の抽出を行うまで-80°Cで保存した。なお、プラセボには加熱滅菌され Mal d 1 が失活していることを WB にて

表1 試験食のレシピならびに調製法

	プラセボ	試験食
キャベツ	55	50
リンゴ果実	0	25
加熱滅菌済みリンゴジュース	55	35
レモン果汁	2.5	2.5

吸着抗体の添加(抗Bet v 1マウスモノクローナル抗体をTris-HCl, pH 8.0 にて1 μg / mLになるよう希釈
120 μL / ウェル, 4°C, 一夜)
↓
ブロッキング(1%BSA, 200 μL / ウェル, 室温, 1時間)
↓
試料添加(100 μL / ウェル, 4°C, 一夜)
↓
洗浄5回(KPL wash solutionを1×に希釈)
↓
1次抗体添加(抗Mal d 1ウサギポリクローナル抗体, 0.8 μg / mL, 100 μL / ウェル, 室温, 1時間)
↓
洗浄5回(KPL wash solutionを1×に希釈)
↓
2次抗体添加(HRP標識抗ウサギIgG抗体, 0.25 μg / mL, 100 μL / ウェル, 室温, 1時間)
↓
洗浄5回(KPL wash solutionを1×に希釈)
↓
基質添加(TMB, 100 μL / ウェル, 室温, 15分)
↓
停止液添加(Stop sol., 100 μL / ウェル)
↓
吸光度測定(450nm)

図1 ELISAの方法

確認した市販のリンゴジュースを用いることで、食味を似せた。

試料は経口負荷試験実施前日の夜から冷蔵庫で解凍し、投与するまで氷冷するなど低温を保った。1回の試験につき3~5回の投与を行い、各回に1個以上のプラセボを混ぜて実施した。投与順は被験者によって変え、投与順や同じ被験食を投与することでの症状の有無への周囲の影響を排除した。投与間隔は30分とし、投与後25分でVASにより主観的症状の評価を、口腔内の診察と写真撮影にて客観的評価を行った。なお、申請時には松本大学で実施予定だった経口負荷試験を、安全性を期すため小林耳鼻咽喉科医院での実施に変更した。

リンゴに対して口腔症状に限局したPFASの既往のある患者を対象とした。申請時には、ImmunoCapにてMal d 1陽性、Mal d 3陰性を被験者の条件としていたが、サーモフィッシャーダイアグノスティックス社の分析サービスが受付停止をしていたことから、松本大学実施分および藤田医科大学実施分は、藤田医科大学にて分析した結果から被験者を選定し、長野県立こども病院では病歴から判断して被験者とした。

各施設で最大10名ずつ計30人の被験者を想定していたが、新型コロナ感染症の蔓延により、長野県立こども病院1名、松本大学2名、藤田医科大学1名、計4名の実施に留まった。

2019年秋季に経口負荷試験とプリックテストを行った結果、この2つの検査の間の相関性が低く、経口負荷試験陽性でもプリックテスト陰性、またはその逆となる品種が見受けられた。そこで、

被験者の負担や苦痛減のため、プリックテストの実施を取りやめ、経口負荷試験のみに変更した。

3. 経口負荷試験に用いたリンゴ品種を試料とした Mal d 1 の ELISA による定量

項目1で構築したサンドイッチ ELISA を用いて、経口負荷試験に用いたリンゴ各品種の Mal d 1 を定量した。

試料からの Mal d 1 の抽出は、L.S.Hsieh らの方法¹⁾にて抽出した。試料2gに対し氷冷した抽出バッファー(1 mmol/L ショ糖, 2% PVPP, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Diethyldithiocarbamic acid) 3mL を添加し、氷冷した状態でホモジナイザー (ULTRA-TURRAX, IKA-WERKE, Merck, Darmstadt, Germany) で果実の塊が目視できなくなるまで1~3分均一化した。次いで医療用ガーゼでろ過し、ろ液を21,100×g, 4°C, 1時間遠心分離し、上清を取った。この上清をそのまま、あるいは Amicon-Ultra10K (Merck, Darmstadt, Germany) にて10~20倍濃縮し、1.3%BSA 溶液で4倍希釈して ELISA 定量用の試料とした。これを項目1にて示した ELISA で定量した。

結果と考察

1. Mal d 1 特異的サンドイッチ ELISA の構築

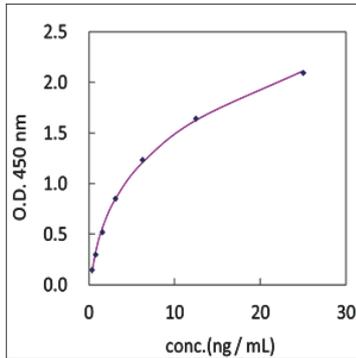
rMal d 1 の希釈系列を用いて抗体濃度、反応時間と温度を複数条件検討した。一般的な ELISA キットにおいては、1日で分析が終わるよう、各反応条件を室温1時間などに設定されていることが多いが、今回の分析はで最大感度を得、かつノイズを低くすることを目的とし、サンプル添加

後の反応時間を室温1時間から6時間、4℃一夜、抗体との反応時間を室温1時間から4時間と複数条件にて検討した。

その結果、方法で示した条件（図1）で最大感度を得、かつ変動係数を最小にでき、4パラメータロジスティック解析にて各濃度の実測値とモデル値の差を最小にすることができた。標準品としてSUMO-His tagged rMal d 1 (CUSABIO)の希釈系列を用いて定量した結果の例を図2に示す。

続いて、このELISAを実際の検体にて評価するため、WBで分析が終了している試料中のMal d 1を定量した。定量結果を図3に示すが、サンふじを対照として他品種全てが有意に低い結果となった。この結果は、WBではジョナゴールド、こうとく、ホワイトスイートはサンふじと有意差なしの同レベルの定量値であったことと矛盾したが、WBにてサンふじと比較して有意に低かった14品種は、その順序に差異はあったが、有意に低かった中でもとくに低い範囲にあるものが

A) 検量線



B) 4パラメトリック解析結果

		Sum of Squares	0.003908
conc.	O.D.	Predicted	Squares D
25	2.097	2.114018288	0.00029
12.5	1.644	1.627078472	0.000275
6.25	1.234	1.207129868	0.000722
3.13	0.852	0.852139141	1.94E-08
1.56	0.519	0.557105008	0.001427
0.78	0.297	0.315337911	0.000324
0.39	0.149	0.119502049	0.00087

C) 標準品(n=3)の分析結果

標準品濃度 (ng / mL)	吸光度 (O.D. 450nm)		変動係数 (%)
	平均値	標準偏差	
25.000	2.097	0.026	1.218
12.500	1.644	0.063	3.812
6.250	1.234	0.012	0.955
3.125	0.852	0.015	1.705
1.563	0.519	0.018	3.557
0.781	0.297	0.014	4.591
0.391	0.149	0.006	4.082

図2 検量線の例と、その数値データ

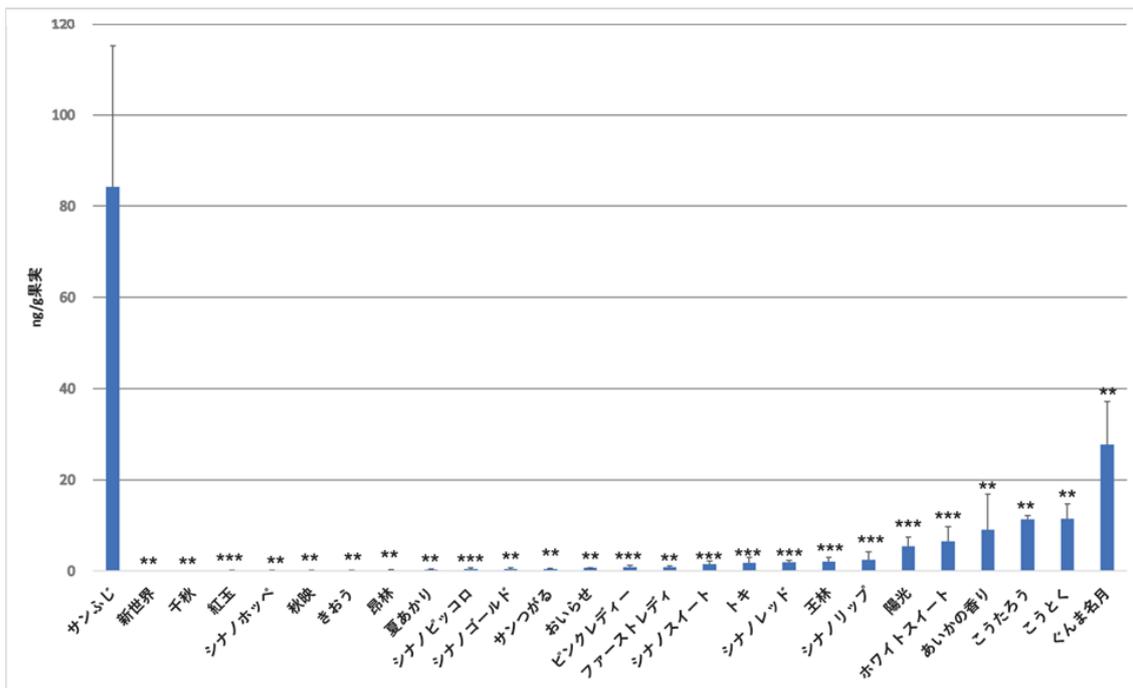


図3 既存のサンプルの定量結果

大半であった。

WB においては、Mal d 1 量の少ない検体も確実に検出できるよう、HRP の基質に ECL Prime を用い、ImageQuantLAS4000 にて High resolution にて 1 分という高感度な条件で検出していたため、サンふじの分析結果は化学発光の強度がプラトーになっていた可能性が今回 ELISA にて定量した結果から明らかとなり、今回のような結果が得られた理由の主なものと考えられた。その他、WB では抗 Mal d 1 ウサギポリクローナル抗体 1 種で検出していたのに対し、ELISA では吸着抗体に抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体を使用しており、Mal d 1 のサブタイプによりこのモノクローナル抗体との親和性に差があったため結果に差異が出た可能性も考えられた。

2. 経口負荷試験

9/15 現在で集計が終わった結果について表 2 に示す。全ての結果が出そろっているわけではないが、松本大学(小林耳鼻咽喉科医院)2 名(被験者 ID 21M-04 および 05)、長野県立こども病院

1 名(同 21C-01)の結果から、Mal d 1 高発現品種であるサンふじにおいて、VAS の結果が 0 あるいは低い結果となった。これは、2019 年度秋季に実施した結果と同様であり(経口負荷試験を実施した 6 名全員が VAS 陰性で、プリックテストは 1 名のみ陽性)、2019 年度は台風の長野県通過に伴い収穫期を早めたことによる Mal d 1 量の低減が理由であったと考えていたが、2020 年度は気候も良く熟した状態で収穫されていたと考えられたことから、それ以外の理由があることが示唆された。さらに、シナノプッチやシナノスイートのように Mal d 1 量が少ないにも関わらず全員あるいは過半数が VAS 陽性である品種もあった。

本研究遂行中に Romer らにより Flavan-3-ols が多い品種では Mal d 1 量が多くても症状が出にくいことが示され³⁾、これが、サンふじが Mal d 1 量が多いにも関わらず、経口負荷試験結果が陰性や陽性であっても VAS の数値が低かったり、Mal d 1 量が少なくても VAS 陽性者が多くなったりした理由であると考えられ、今後の課題となった。

表2 経口負荷試験結果および試料のMal d 1定量値

品種	サンふじ	シナノ プッチ	シナノ スイート	あいかの香り	紅玉	
定量値 (ng/g果実)	11.80±9.77	0.33±0.03	0.48±0.11	0.63±0.42	1.96±0.07	
V A S	21M-04	0	2	25	0	10
	21M-05	5	10	10	0	5
	21C-01	実験できず	3	0	0	0
品種	千秋	王林	シナノ ゴールド	サンつがる	トキ	
定量値 (ng/g果実)	1.98±0.06	1.98±0.34	2.05±0.19	3.76±1.62	9.17±5.22	
V A S	21M-04	12	0	0	9	0
	21M-05	31	0	0	4	31
	21C-01	5	0	0	0	0

3. ELISA 法による、Mal d 1 の定量

上述した ELISA にて、経口負荷試験に用いたリンゴ品種の Mal d 1 を定量した結果、シナノプッチが $0.33 \pm 0.03 \text{ ng/g}$ が最小値で、サンふじの $11.8 \pm 9.77 \text{ ng/g}$ が最大であった。これまでの分析で Mal d 1 量が少ないとされていたトキに関しては、今回はサンふじと近い $9.17 \pm 5.11 \text{ ng/g}$ であったが、その理由は不明であった。

今後の発表予定

国内で開催される学会では、日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会 (2022 年 6 月頃、開催地不明)、第 76 回日本栄養・食糧学会大会 (2022 年 6 月、西宮)、第 69 回日本栄養改善学会学術総会 (2022 年 9 月、倉敷) 第 71 回日本アレルギー学会学術大会 (2022 年 10 月、東京)、第 22 回国際栄養学会議 (2022 年 12 月、東京) に、国際学会では WAC2022 (2022 年 11 月、イスタンブール) あるいは 2023 Hawaii Symposium (2023 年 5 月、ハワイ) への発表を予定している。

今後も 2021 年秋季に調製し、 -60°C で保存している検体を使い切るまでは経口負荷試験を継続し、結果を取りまとめて Allergol.Int. 他国際誌へ投稿する。

今後の研究活動について

結果と考察で示したように、Mal d 1 高発現品種であるサンふじにおいて、VAS の結果が 0 あるいは低い結果となった。これは、2019 年度秋季に実施した結果と同様であり (経口負荷試験を実施した 6 名全員が VAS 陰性で、プリックテス

トは 1 名のみ陽性)、2021 年度に経口負荷試験を実施するまでは、千曲川が決壊し長野県に多大な被害をもたらした台風 19 号の通過に伴い、収穫期を早めたことによる Mal d 1 量の低減が理由と考えられていたが、それ以外の理由があることが示唆された。

本研究遂行中の 2020 年に、Romer らにより Mal d 1 量と t flavan-3-ols 量が正の相関を示すこと、Flavan-3-ols が多い品種では Mal d 1 量が多くても口腔症状が出にくいことが明らかとなった³⁾。これが、サンふじが Mal d 1 発現量が高いにも関わらず、経口負荷試験結果が陰性や陽性であっても VAS の数値が低かったこと、シナノプッチのように Mal d 1 量は低くても被験者全員が VAS 陽性であったことの原因であると考えられ、今後 Mal d 1 だけでなく Flavan-3-ols の定量が必要であることが判明した。そこで、新たに星薬科大学教授である穂山浩先生にも本研究に参画いただき、次年度以降 Mal d 1 および Flavan-3-ols の定量、および経口負荷試験を行い、リンゴ PFAS の症状の軽重への Flavan-3-ols の関与について研究を進めていきたい。

さらに、研究期間を過ぎてしまうが、9 月末より 2 名が小林耳鼻咽喉科医院での経口負荷試験を予定している。被験食は 2020 年秋季のリンゴの収穫期に購入後速やかに調製後、 -60°C で凍結保存しており、各施設で希望者が出次第、本申請における研究期間終了後も経口負荷試験を続ける予定である。

参考文献

- 1) Hsieh LS, Moos M, and Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1995;96:960-70
- 2) Skamtrup-Hansen K, Vestergaad H, Stahl-Skov P, Khinti MS, Vieths S, Poulsen LK, Bindslev-Jensen C. Double-blind, placebo-controlled food challenge with apple. *Allergy* 2001;56:109-17
- 3) Romer M, Chebib S, Bergmann KC, Plate K, Becker S, Ludwig C, Meng C, Fisher T, Dierend W, Schwab W. Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Sci. Rep.* 2020;10:9144

小麦アレルギーの包括的ゲノム関連解析と T 細胞エピトープの同定

研究課題名	小麦アレルギーの包括的ゲノム関連解析と T 細胞エピトープの同定		
フリガナ	ノグチ エミコ		
代表者名	野口 恵美子		
所属機関 (機関名) (役職名)	筑波大学医学医療系 教授		
共同研究者	氏 名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	矢上 晶子 (ヤガミ アキコ)	藤田医科大学ばんだね病院総合アレルギー科・教授	患者サンプルを使用した免疫応答性解析
本助成金による発表論文, 学会発表	Fukunaga K, Chinuki Y, Hamada Y, Fukutomi Y, Sugiyama A, Kishikawa R, Fukunaga A, Oda Y, Ugajin T, Yokozeki H, Harada N, Suehiro M, Hide M, Nakagawa Y, Noguchi E, Nakamura M, Matsunaga K, Yagami A, Morita E, Mushiroda T. Genome-wide association study reveals an association between the HLA-DPB1*02:01:02 allele and wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. <i>Am J Hum Genet</i> , 2021 DOI: 10.1016/j.ajhg.2021.06.017		

研究結果要約

我々はこれまで、国内多施設共同研究により世界初となる経皮感作加水分解小麦アレルギーの疾患感受性遺伝子を HLA-DQ 領域と RBFOX1 の 2 遺伝子座に同定した(Noguchi et al, J Allergy Clin Immunol, 2019)。さらに、非加水分解型の成人小麦アレルギーについても網羅的遺伝要因の探索を行った。非加水分解型小麦アレルギー遺伝要因の研究の国内多施設共同研究に参加し、非加水分解型小麦アレルギーのリスクアレルとして HLA-DPA1*01:02-DPB1*02:01 ハプロタイプ、抵抗性と関連するハプロタイプとして HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01 を検出した。本研究ではさらに、非加水分解型小麦アレルギーの易罹患性と抵抗性に関連する HLA アレル情報と、in vitro assay である HLA クラス II 結合ペプチド探索法を組み合わせた解析法を用いて小麦アレルゲンの T 細胞エピトープ領域の探索を行い小麦アレルギー感受性 HLA が提示しうる領域を検出した。

研究目的

小麦は食物アレルギーの原因として鶏卵、牛乳に次ぎ第 3 位であり、小麦の消費量の増加にともない増加傾向にある。欧米では小麦に対する不耐症であるセリアック病や非セリアックグルテン感受性疾患の罹患率が高く、小麦タンパク質主成分であるグルテンの除去食材や啓蒙活動なども盛んにおこなわれている。本邦における食物依存性運動誘発アナフィラキシーの約 60%が小麦によるものであり、また、マスメディアの影響で医学的必要性のないと思われる人々にもグルテンフリーダイエットが人気となっていることから、小麦に対する不耐性を生じうる個人を同定すること、エビデンスに基づいた適切な治療法を提供することが求められている。

これらの背景から、本研究では、小麦アレルギー及び関連形質のゲノム解析による包括的な疾患関連遺伝子を同定すること、また、非加水分解型の一般的な小麦アレルギーの主要小麦アレルギーの T 細胞エピトープを同定することを目的として研究を行った。ヒト遺伝要因の探索と、小麦アレルギー上の抗原領域の情報を統合することで、食物のアレルゲンとヒト免疫系との相互作用をこれまでにならぬ形で俯瞰することが可能となり、新しい治療薬・免疫療法アプローチの開発につながると期待される。これらの研究により、将来的には小麦アレルギーの免疫療法開発への基盤となると期待される。

研究計画及び研究手法

1-1各種小麦アレルギーに対する HLA class II 領

域を含む全ゲノム関連解析による疾患感受性・抵抗性アレルの探索(野口)

1-1 非加水分解型小麦アレルギーのゲノム解析

非加水分解型小麦アレルギー患者検体の収集は藤田医科大学病院および関連施設で行った。本研究に参加同意を得られた患者から血液サンプルを収集し、抽出した DNA を使用して SNP アレイによる遺伝子型決定を行った。SNP アレイはイルミナ社の Asian Screening Array (ASA) を使用した。コントロールは自施設で保有する一般健康人サンプルを使用した。本研究は筑波大学、藤田医科大学、および関連施設の倫理委員会の承認を経て行われた。HLA 領域および HLA アレルの推定については SNP2HLA¹⁾を用いた HLA インピュテーションにより行った。

1-2 小麦アレルギー感作のゲノム解析

臨床症状とゲノム情報を統合させたバイオバンクである東北メディカルメガバンク機構²⁾において蓄積されているデータを用いて、小麦特異的 IgE 陽性に関連するゲノム領域を解析した。筑波大学倫理委員会の承認後に東北メディカルメガバンク機構にデータ利用申請を行った。データ利用申請承認後に分譲されたデータを使用して、小麦アレルギー感作と関連する遺伝子型の検出を行った。小麦特異的 IgE については多項目アレルギー特異的 IgE 測定法である MAST-33 により得られたデータから小麦特異的 IgE について抽出し、ルミカウント 2.78 以上を感作陽性、2.77 以下を感作陰性とした。分譲された遺伝子型情報と小麦アレルギー感作について関連解析をロジ

スティック回帰分析により行った。

[2] HLA アレル型の関連解析情報と HLA ペプチド結合アッセイを用いて免疫原性ペプチドを検出する (野口)

抗原提示細胞に取り込まれた食物アレルゲンはペプチドに分解され、自己の HLA class II とともに T 細胞へ提示され、免疫応答が開始される。HLA class II は個人間での多様性が大きく、保有する HLA クラス II アリルにより、抗原提示しやすいペプチドが個人間で異なる。そのため、食物アレルゲンの T 細胞エピトープを同定することは免疫療法などの脱感作を目指す治療法開発の第一歩となる。本研究では、ゲノム解析で得られた疾患感受性・抵抗性 HLA アレル情報を基に、研究協力者である宮寺が開発した HLA 発現系を利用した結合アッセイ法を用いて小麦アレルゲンコンポーネントの T 細胞エピトープ候補の探索を行った。オメガ 5 グリアジンを含む、複数の小麦コンポーネントを対象として、以下の方法で免疫原性ペプチド候補領域のスクリーニングを行った。

2-1: HLA 結合領域候補の絞り込み

候補となる小麦抗原は高分子タンパク質であるため、これらのすべての領域を対象として HLA 結合測定を実施することは現実的ではない。そこで、まずドッキング・シミュレーションによる HLA 結合領域探索を行った。ドッキング・シミュレーションソフトウェア MOE (MOLSYS Inc.) に搭載された HLA の立体構造予測用ソフトウェア HLA modeler³⁾ 及び HLA とペプチドの

結合親和性を予測するソフトウェア HLA-BAP⁴⁾ を用いて、小麦アレルギー感受性と関連する HLA クラス II アレルに強く結合しうる領域を対象抗原中に探索した。また、近年、結合予測アルゴリズムの開発が進展し、特定の HLA アリルについては比較的高精度に結合ペプチドを予測しうる事が明らかになりつつある。そこで本研究では代表的な結合予測アルゴリズム (NetMHCIIpan4.0)⁵⁾ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>) を用いて、小麦アレルギー感受性 HLA クラス II が結合しうる領域を対象抗原中に探索した。

2-2: HLA と小麦抗原の結合アッセイ

上記で予測した HLA 結合領域および、非加水分解小麦アレルギーの研究において関連が示唆されている抗原部位を対象として、HLA 結合アッセイを行った。HLA 結合アッセイは研究協力者の宮寺が確立した HLA 発現アッセイを用いて行った。この測定系では HLA クラス II β 鎖と、解析対象となる抗原ペプチドとの融合タンパク質を作成し、培養細胞株での表面発現量を定量する⁶⁾。HLA class II α 鎖の安定発現株に候補ペプチドと HLA class II β 鎖のトランスフェクションを行い⁷⁾、小麦抗原に含まれるペプチドと疾患感受性・中立性・抵抗性アレルとの結合実験を実施した。この HLA 結合アッセイ法では、従来の HLA-ペプチド相互作用解析で測定困難な疎水性領域の結合解析も可能である。小麦アレルゲンは疎水性アミノ酸残基を多く含み、同一のアミノ酸残基の繰り返し配列から構成されるため、合成ペプチドを用いた従来の HLA 結合アッセイの実施

は困難であり、本手法では従来法で検出が難しい T 細胞エピトープを見出せる可能性がある。

[3]患者サンプルの収集と非加水分解小麦アレルギーの免疫応答性の解析 (矢上)

非加水分解型の成人小麦アレルギーの免疫原性の解析のため、患者血清を用いた小麦の 2D-Western Blotting を施行するとともに、小麦由来リコンビナントアレルゲンを ELISA と好塩基球活性化試験で評価した。

結果と考察

[1]各種小麦アレルギーに対する HLA class II 領域を含む全ゲノム関連解析による疾患感受性・抵抗性アレルの探索(野口)

1-1 非加水型小麦アレルギーのゲノム解析

非加水分解型の成人小麦アレルギー患者サンプルを使用して全ゲノム関連解析と HLA imputation を行い、疾患感受性アレルとして DPB1*02:01 を検出した。非加水分解型小麦アレルギーは罹患者の少ない希少疾患であり、単独施設による解析では限界があることを考慮して国内多施設共同研究に参加した。リスクアレルとして HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 ハプロタイプ、抵抗性と関連するハプロタイプとして HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01 が検出された⁸⁾。

1-2 小麦アレルゲン感作のゲノム解析

解析対象となった 18,755 例のうち、MAST-33 小麦 IgE 陽性例は 615 例、陰性例は 18,140 例であった。年齢別、性別による特徴としては、男性

に多く、さらに男性では 40 代以降に感作率が上昇する傾向が観察された。全ゲノム関連解析では有意水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たす関連については検出されなかった。

[2] HLA アレル型の関連解析情報と HLA ペプチド結合アッセイを用いて免疫原性ペプチドを検出する (野口)

2-1: HLA 結合領域候補の絞り込み

ドッキング・シミュレーションおよび、結合予測 ア ル ゴ リ ズ ム (NetMHCIIpan4.0)⁹⁾(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>)を用いて、小麦アレルゲン結合候補領域を予測した。1-1 で明らかになった、小麦アレルギー感受性・抵抗性と関連する HLA クラス II (リスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01、抵抗性アレル HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01) および、東アジア集団に高頻度に存在し、小麦アレルギーとは関連しない中立性アレル (HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01) を解析対象とした。リスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 に強く結合することが予測された上位 11 種類のペプチドについて結合解析を行うこととした。

2-2: HLA と小麦抗原の 結合アッセイ

2-1 で選択した 11 種類の小麦アレルゲンペプチドのうち、6 本のペプチドについて結合解析を実施した。まず、ペプチドに相当する部分につい

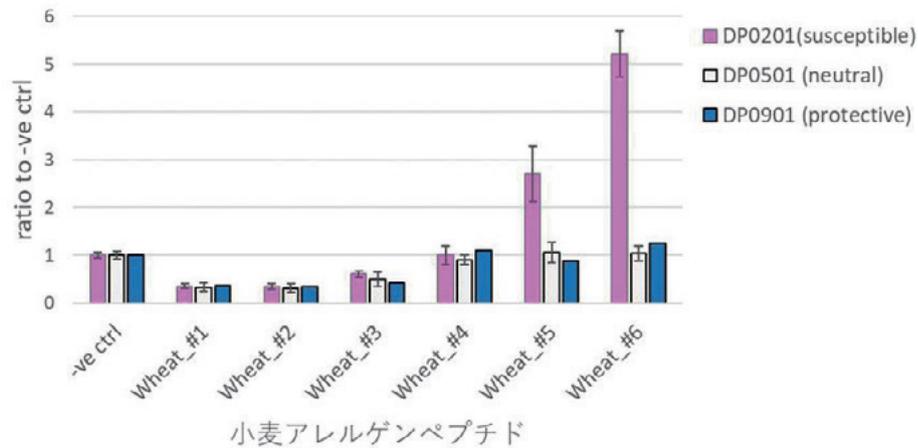


図1 HLA と小麦アレルゲンペプチドの結合解析

ゲノム解析により同定した小麦アレルギーリスクアレル(DP0201 (HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01)) 中立性アレル (DP0501 (HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01)) , 抵抗性アレル(DP0901 (HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01))について、小麦アレルゲン中のペプチド(#1-6)の結合能を測定した (mean±SD, n ≥ 3 (DP0201, DP0501), n ≤ 2 (DP0901))。

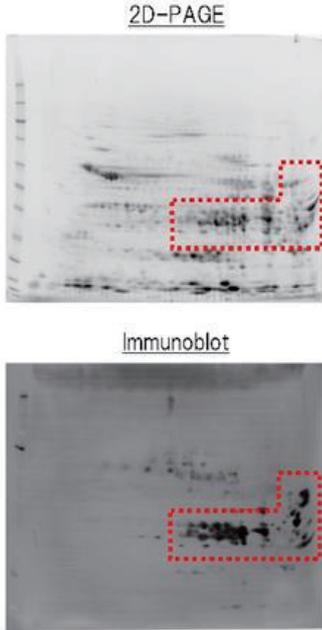
て一本鎖 DNA を外部委託により合成した。次に、一本鎖 DNA を鋳型として PCR を行い、DP β 鎖をコードする発現用プラスミドに挿入した。構築した発現プラスミドを用いて、HLA-DPα 鎖安定発現株に導入し、HLA の表面発現量を測定した。6 種類のペプチドのうち、2 本がリスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 と強く結合した。これらの 2 本は抵抗性アレル (HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01)、中立性アレル(HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01) とは強い結合を示さなかった(添付資料 図1)。一方、6 種類のペプチドのうち、3 種類は結合予測上位であったにも関わらず、リスクアレル HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 を含むいずれのアレルについても結合が認められず、ネガティブコントロール(g9 ペプチド:GGGGGGGGG)よりも低値を示した。そのため、これらのペプチド(#1-3)は HLA との結合能を持たない、もしくは、ペプチドに含まれる配列が HLA の正常なフォールディングを妨げ

ている可能性が示唆された。結合が認められたペプチドのうち、最も強く結合したペプチド(#6)は、ネガティブコントロール(g9 ペプチド:GGGGGGGGG) および抵抗性アレル (HLA-DPA1*02:01-DPB1*09:01)、中立性アレル(HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01) と比較して約 4 倍の細胞表面発現量を示した(図1)。以上の結果から、ペプチド#4 が DP0201 拘束性 T 細胞エピトープである可能性が示唆された。

上記に示すように本研究では 6 種類の候補ペプチド中、2 種類が HLA-DPA1*01:03-DPB1*02:01 と強く結合することを見出した。今回、解析対象としたペプチド領域は小麦アレルゲン中のごく一部である。そのため今後、より多くの候補ペプチドについて解析を行うことにより、T 細胞エピトープ候補領域を多数、見出すことが出来る可能性がある。

① IgE 抗原の探索・評価

2-D Immunoblotting



② 抗原性の評価

好塩基球活性化試験

タンパク質A(大腸菌リコンビナント)

	抗原濃度 (ng/ml)					
	10000	1000	100	10	1	0.1
症例 1	28.6%	17.1%	5.2%	1.3%	2.4%	1.5%
症例 2	4.1%	0.8%	0.4%	0.8%	0.6%	1.4%
症例 3	43.7%	28.1%	19.2%	4.7%	2.2%	3.7%
症例 4	24.4%	5.9%	2.1%	4.2%	3.2%	1.8%
コントロール 1	2.8%	2.8%	1.7%	2.5%	1.9%	2.4%
コントロール 2	9.4%	2.8%	1.5%	3.3%	2.7%	2.1%
コントロール 3	7.9%	1.3%	1.4%	1.1%	0.9%	0.8%
コントロール 4	11.7%	2.3%	0.8%	2.2%	1.1%	1.9%

小麦(粗製グリアジン)

	抗原濃度 (ng/ml)			
	100	10	1	0.1
症例 1	38.1%	30.2%	7.9%	4.6%
症例 2	18.7%	21.0%	5.3%	2.0%
症例 3	43.8%	59.3%	63.5%	6.0%
症例 4	21.0%	17.7%	5.8%	1.6%
コントロール 1	2.2%	1.2%	1.7%	2.5%
コントロール 2	3.1%	4.1%	2.3%	3.6%
コントロール 3	0.7%	0.8%	0.6%	1.3%
コントロール 4	1.9%	2.3%	1.7%	2.3%

ω-5 グリアジン(大腸菌リコンビナント)

	抗原濃度 (ng/ml)					
	10000	1000	100	10	1	0.1
症例 1	6.6%	25.3%	30.4%	38.9%	36.2%	18.3%
症例 2	1.0%	16.9%	22.0%	22.0%	25.3%	12.8%
症例 3	9.1%	45.2%	43.6%	44.9%	48.7%	69.1%
症例 4	2.7%	10.9%	19.0%	20.8%	22.0%	9.6%
コントロール 1	1.7%	2.0%	2.0%	1.5%	2.0%	2.2%
コントロール 2	2.2%	3.5%	1.5%	4.1%	1.1%	2.3%
コントロール 3	1.4%	1.1%	0.8%	1.5%	1.5%	1.7%
コントロール 4	2.2%	2.1%	3.1%	1.0%	1.7%	2.1%

小麦(可溶性画分)

	抗原濃度 (ng/ml)			
	100	10	1	0.1
症例 1	24.0%	6.9%	2.6%	2.0%
症例 2	21.1%	3.9%	0.6%	1.2%
症例 3	54.5%	70.9%	15.6%	2.0%
症例 4	12.0%	2.2%	2.6%	2.1%
コントロール 1	2.1%	1.3%	1.9%	2.3%
コントロール 2	2.5%	4.0%	1.9%	2.5%
コントロール 3	2.1%	1.3%	1.3%	1.5%
コントロール 4	4.9%	3.2%	1.9%	4.6%

赤字:ネガコンの活性化率+10%以上
青棒:ポジコンの活性化率を100%としたときの相対スケール

	ネガコン	ポジコン
症例 1	2.0%	39.0%
症例 2	1.0%	83.8%
症例 3	2.8%	74.4%
症例 4	2.1%	68.5%
コントロール 1	3.0%	39.1%
コントロール 2	2.9%	78.6%
コントロール 3	1.9%	64.3%
コントロール 4	2.5%	41.3%

図 2 小麦の免疫ブロットと小麦タンパク質の免疫原性の解析

免疫ブロットで複数例に共通の IgE 抗原タンパク質を同定し、精製抗原を用いた ELISA 法で IgE 結合性が評価された。好塩基球活性化試験を行い、タンパク質 A 及びオメガ 5 グリアジンの抗原性が確認された。

[3]患者サンプルの収集と非加水分解小麦アレルギ-の免疫応答性の解析 (矢上)

2D-Western Blotting で複数例に共通して IgE 抗体が結合したタンパク質の ELISA では、非加水分解小麦アレルギー症例に特異的な IgE 抗体の反応が認められた。また、好塩基球活性化試験の結果、当該タンパク質およびオメガ 5 グリアジンは複数例において活性化 (CD203c の発現) を認めた。これにより、当該タンパク質が小麦アレルギー症状の誘発に関与していることが強く示唆された(図 2)。

今後の研究活動について

T 細胞エピトープは脱感作を誘導するうえで重要であり、小麦アレルギーに対する T 細胞エピトープが同定されれば難治性の成人発症小麦アレルギーに対して将来的なアレルゲンペプチド免疫療法等への展開が期待できる。本研究では、小麦アレルゲン中に HLA 結合領域を高確率で見出すことができた。今後、さらに広範囲の領域について同様の解析を行うことで、多数の HLA 提示領域を同定できる可能性がある。ヒト個体では複数種類の HLA アレルが発現されているため、病態の分子機序をさらに突き止めるためには、多様な研究手法により研究を展開する必要がある。例えば、特定の抗原領域によりアレルギーが誘発

される分子機序を解明するためには、患者検体を用いた T 細胞解析や、特定の HLA を発現するマウスモデルの開発などが必要である。また、免疫解析により B 細胞エピトープ、T 細胞エピトープが明らかになれば、これらの知見を基に、植物のバイオテクノロジー技術を応用しエピトープ部位を改変した新たな食物資源の開発や、リコンビナントアレルゲンなどの医薬品開発など、実用性の高い新規治療・予防戦略の開発が可能になることが期待される。

参考文献

- 1) Jia X, Han B, Onengut-Gumuscu S, Chen W M, Concannon P J, Rich S S, Raychaudhuri S, de Bakker P I. Imputing amino acid polymorphisms in human leukocyte antigens. *PLoS One*, 2013 (8): e64683.
- 2) Fuse N, Sakurai-Yageta M, Katsuoka F, Danjoh I, Shimizu R, Tamiya G, Nagami F, Kawame H, Higuchi S, Kinoshita K, Kure S, Yamamoto M. Establishment of Integrated Biobank for Precision Medicine and Personalized Healthcare: The Tohoku Medical Megabank Project. *JMA J*, 2019 (2): 113-122.
- 3) Amari S, Kataoka R, Ikegami T, Hirayama N. HLA-Modeler: Automated Homology Modeling of Human Leukocyte Antigens. *Int J Med Chem*, 2013 (2013): 690513.
- 4) Kataoka R, Amari S, Ikegami T, Hirayama N. HLABAP: HLA Class I-Binding Antigenic Peptide Predictor. *Chem-Bio Informatics Journal*, 2020 (20): 1-4.
- 5) Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand W H, Peters B, Nielsen M. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. *J Proteome Res*, 2020 (19): 2304-2315.
- 6) 宮寺浩子, 野口恵美子, 溝上雅史, 徳永勝士. HLA クラス II 結合ペプチドの探索・同定法の開発. *日本臨床免疫学会会誌*, 2017 (40): 35-39.
- 7) Miyadera H, Ohashi J, Lernmark A, Kitamura T, Tokunaga K. Cell-surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. *J Clin Invest*, 2015 (125): 275-91.
- 8) Fukunaga K, Chinuki Y, Hamada Y, Fukutomi Y, Sugiyama A, Kishikawa R, Fukunaga A, Oda Y, Ugajin T, Yokozeki H, Harada N, Suehiro M, Hide M, Nakagawa Y, Noguchi E, Nakamura M, Matsunaga K, Yagami A, Morita E, Mushiroda T. Genome-wide association study reveals an association between the HLA-DPB1(*)02:01:02 allele and wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Am J Hum Genet*, 2021

本研究の一部は東北メディカルメガバンク
といわてメディカルメガバンクよりデータ分
譲を受けて行われました (2018-0040)

1) 研究課題名	食物に対する経消化管感作の機序、特に IL-25 の役割の解明		
フリガナ	マツモト ケンジ		
代表者名	松本 健治		
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 部長		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	久保 輝文 (クボ テルフミ)	札幌医科大学 医学部 病理学第一講座 助教	Tuft 細胞の免疫組織学的検討
本助成金による発表論文, 学会発表	なし		

研究結果要約

食物に対する経腸管感作の機序を検討することを目的として基礎的検討を行った。

- 6 週齢の C57BL/6J マウスの飲水中に IL-25 を産生誘導することが知られている succinate (100 mM) を混入し 7 日間自由飲水させ、腸管における Tuft 細胞関連遺伝子群の発現を検討した所、空腸において IL-25 の mRNA が誘導され、組織学的にも Tuft 細胞数の増加が認められた。
- 上記の系で succinate を含む飲水を 3 週間行い、2 週目からは胃内に 50 mg の ovalbumin (OVA) を 3 日おきに 5 回投与したが、空腸における Th2 cytokine や IL-25 の mRNA 発現、Tuft 細胞数や体重増加を含めた症状について、OVA 追加投与の影響は認められなかった。
- succinate を含む飲水を 5 週間行い、2 週目からは胃内に OVA を 3 日おきに 11 回投与したが、全く同様の結果であった。
- さらに、5 週間投与プロトコールのマウス血清中の抗 OVA-IgE 抗体産生や、腸間膜リンパ節由来単核細胞を in vitro で OVA 刺激した際の IL-5 産生の誘導は認められなかった。

以上から、IL-25 の産生誘導を認める腸管炎症モデルにおいて、同時に経口的に投与された抗原に対する特異的な IgE 抗体産生や Type 2 免疫応答は誘導されないことが明らかとなった。

研究目的

免疫応答は抗原特異的な獲得免疫応答と、抗原非特異的な自然免疫応答に分類される。アレルギー疾患は抗原（アレルゲン）に特異的な IgE 抗体の架橋によるマスト細胞の活性化や抗原特異的な Th2 細胞の活性化を介して症状を発現することから、その病態形成には獲得免疫系が主として働くと考えられている。一方、自然免疫応答は、古くは病原微生物に対する免疫応答として知られていたが、近年は生体が傷害された際に放出されるアラームインによって惹起される免疫応答も含まれ、特に活性化/障害された上皮細胞から放出される IL-25 や IL-33、TSLP は自然リンパ球や炎症細胞を直接活性化して慢性好酸球性炎症の形成に深く関与することが知られてきている。また、IL-33、TSLP は抗原提示細胞を活性化して Naive T 細胞の分化を Th2 にシフトさせることから、自然免疫応答は獲得免疫応答の Th1/Th2/Th17/Treg への分化を制御するとされている。

IgE 依存性食物アレルギーの約 9 割の小児では湿疹/アトピー性皮膚炎が先行して、湿疹面への食物抗原曝露が IgE 抗体産生を誘導することが明らかとなっている。一方、残る 1 割の IgE 依存性食物アレルギー患者や、IgE 非依存性食物アレルギー（消化管アレルギー）患者の感作経路は経腸管感作が疑われているが、一般に経口摂取した食物抗原に対する免疫応答は寛容誘導であり、経腸管感作の機序については全く不明である。また、小腸や大腸には IL-33、

TSLP は定常状態では高発現していないことから、経皮感作とは全く異なる感作機序である可能性が強く示唆される。

近年、腸管上皮には IL-25 を産生・貯蔵した Tuft 細胞が存在し、味覚受容体やコハク酸受容体等を介して寄生虫や原虫を認識し IL-25 を放出する事が明らかとなった。また、私達は IL-25 が直接に樹状細胞を活性化することを最近報告した (J Allergy Clin Immunol 2018;141:300-10)。

以上のことから、私達は食物に対する経腸管感作に Tuft 細胞から産生放出される IL-25 が関与しているとの仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証するため、消化管アレルギー患者由来組織の網羅的な遺伝子発現解析などを用いて腸管局所の情報を検討すると共に、マウスモデルを用いて IL-25 が経腸管感作モデルにおいてどの様な役割を演じているかを検証する。

研究計画及び研究方法

①Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群の同定

約 20 症例の消化管アレルギー患者もしくは好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織の網羅的な遺伝子発現解析と Tuft 細胞の免疫染色を行い、腸管上皮内の Tuft 細胞の数に相関する特異的な遺伝子発現パターン (Tuft 細胞関連遺伝子群) を抽出する。検出された Tuft 細胞関連遺伝子群の相互関係や上流解析を Ingenuity pathway analysis によって行い、Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群や転写因子などの同定を試みる。

②IL-25 の産生放出に関連する遺伝子群の同定

これまでに知られている Tuft 細胞からの IL-25 の放出刺激は Bitter taste receptor (TAS2R) やコハク酸受容体 (SUCNR1)、TRPM5 などを紹介している。これらの遺伝子は family を形成しており、Taste receptor type 2 のみで 22 種類、他の type を含めると 40 種類以上の分子が存在する。こうした受容体群は、その ligand と結合すると発現が増強する物が多い事から、これらの分子群のうち、どの分子が消化管アレルギー患者や好酸球性消化管疾患患者の腸管で発現増強しているかを検討して、患者の病態形成に関与する Tuft 細胞活性化誘導遺伝子群の同定を試みる。さらに、刺激受容体が特定された場合には、その分子の agonist や antagonist を用いて、*in vitro* もしくはマウスモデルで、その分子の agonist や antagonist による誘導遺伝子を検索する。

③IL-25 を介した経腸感作モデルの樹立

TAS2R の agonist である (サッカリンやクロロキン、denatonium など) を OVA と共に投与し、OVA に対する IgE 抗体の産生あるいは消化管アレルギーの発症を検討する。また、感作が成立したマウスの腸管を採取し、網羅的な遺伝子発現解析で Tuft 細胞関連遺伝子群の発現量を検討し、腸管由来 IL-25 が経腸管感作において果たす役割を検討する。

結果と考察

①Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群の同定

既に収集されていた消化管アレルギー患者もしくは好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織の網羅的な遺伝子発現解析を行ったが、IL-25 の mRNA の発現増強や Tuft 細胞の増多を示す遺伝子群の高発現は認められなかった。その理由として、Succinate 投与によって IL-25 の mRNA の発現亢進が認められている腸管の部位は空腸であった。一方、これまでに収集している消化管アレルギー患者もしくは好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織には空腸はほとんど含まれて居らず (内視鏡で到達しにくい)、採取部位の差がこの結果に大きく関与している可能性が示唆された。そのため、ヒト検体を用いた②の解析は中止した。

③食物に対する経腸管感作の機序を検討することを目的として、マウスを用いた基礎的検討を行った。腸管においては、IL-33 や TSLP の定常状態での発現が極めて低いことから、上皮細胞由来サイトカインとして IL-25 が経腸管感作に関与すると仮説を立て、その検証を行った。

1. まず、IL-25 の産生誘導が惹起されることが既に報告されている論文²⁾に従い、6 週齢の C57BL/6J の飲水中に IL-25 を産生誘導することが知られている succinate (100 mM) もしくは対照として同 mol となる食塩 (300 mM) を混入し、7 日間自由飲水させて、腸管における Tuft 細胞関連遺伝子群の発現を qPCR にて検討した。その

結果、空腸において IL-25 の mRNA が誘導され、組織的にも Tuft 細胞数の増加が認められた。

2. 上記の系で succinate を含む飲水を 3 週間行い、2 週目からは胃内に 50 mg の ovalbumin (OVA) を 3 日おきに 5 回投与した。3 週目に sacrifice し、空腸における Th2 cytokine や IL-25 の発現を qPCR にて測定したところ、OVA 追加投与群と succinate 単独群の間に有意な差は認められなかった。また、Tuft 細胞数や体重増加を含めた症状についても OVA 追加投与の影響は認められなかった。

3. succinate を含む飲水を 5 週間行い、2 週目からは胃内に 50 mg の OVA を 3 日おきに 11 回投与した。5 週目に sacrifice し、空腸における Th2 cytokine や IL-25 の発現を qPCR にて測定したところ、OVA 追加投与群と succinate 単独群の間に有意な差は認められなかった。また、Tuft 細胞数や体重増加を含めた症状についても OVA 追加投与の影響は認められなかった。

4. succinate を含む飲水を 5 週間行い OVA 追加投与群の血清中の抗 OVA-IgE 抗体価は対照群および Succinate 単独群との間に差がなかった。さらに、腸間膜リンパ節から単核細胞を分離し、*in vitro* で OVA 刺激を行い、72 時間後の上清中の IL-5 濃度を ELISA にて測定したが、抗原特異的な IL-5 の誘導は認められなかった。

以上から、IL-25 の産生誘導を認める腸管炎症モデルにおいて、同時に経口的に投与された抗原に対する特異的な IgE 抗体産生や Type 2 免疫応答は誘導されないことが明らかとなった。

これまでに経腸管的に投与された抗原に対する IgE 抗体産生をモデルマウスに誘導する方法は Cholera toxin³⁾ もしくは Staphylococcus enterotoxin B (SEB) を投与する方法⁴⁾ しかない。Cholera toxin は腸管透過性だけでなく抗原提示細胞にも働きかけて IgE 抗体を誘導すると考えられている。また、SEB は特定のレパトアを有する T 細胞を強く活性化することによって特異的な免疫応答を誘導していると考えられるが、これらのモデルマウスは、ヒトの経腸管感作のモデルとは到底呼べない。

今回の私達は、貝類由来のうま味成分である Succinate に着目し、IL-25 の産生誘導が確実に起こることが報告されているモデルを用い、実際に空腸で IL-25 の mRNA 発現が亢進していることを確認した。このモデルに OVA を投与しても OVA に対する IgE 抗体産生も T2 サイトカイン (IL-5) 産生も誘導されなかった。

このことは、少なくとも IL-25 の空腸での産生は抗原特異的な IgE 感作、もしくは非 IgE 依存性消化管アレルギーの発症に関与すると想定される non-IgE 感作 (T2 type)⁵⁾ の誘導には関与していないことを強く示唆している。

今後の研究活動について

今後は更に強力に腸管における 2 型炎症を惹起する系を用いて、経腸管感作に与える影響を検討する予定である。

参考文献

- 1) Matsumoto K, Saito H. Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases - per-"eczema"tous sensitization drives the allergy march. *Allergol Int.* 2013;62(3):291-6
- 2) Nadsombati MS, McGinty JW, Lyons-Cohen MR, Jaffe JB, DiPeso L, Schneider C, Miller CN, Pollack JL, Nagana Gowda GA, Fontana MF, Erle DJ, Anderson MS, Locksley RM, Raftery D, von Moltke J. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity.* 2018;49(1):33-41
- 3) Tamura S, Shoji Y, Hasiguchi K, Aizawa C, Kurata T. Effects of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine.* 1994;12(13):1238-40
- 4) Yang PC, Wang CS, An ZY. A murine model of ulcerative colitis: induced with sinusitis-derived superantigen and food allergen. *BMC Gastroenterol.* 2005;5:6
- 5) Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):590-2

給食施設での調理時の小麦アレルギー混入リスクに関する研究

研究課題名	給食施設での調理時の小麦アレルギー混入リスクに関する研究		
フリガナ	ハシモト ヒロユキ		
代表者名	橋本 博行		
所属機関（機関名） （役職名）	三重短期大学 教授		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	吉光 真人 （ヨシミツ マサト）	大阪健康安全基盤研究所	ELISAによる定量等
	池田 達哉 （イケダ タツヤ）	農研機構 西日本農業研究 センター	付着小麦成分の微細構造観 察
	山内 朝夫 （ヤマウチ アサオ）	大阪産業技術研究所	接触角測定、洗浄実験等
本助成金による発表論文、学会発表	発表論文：①「小麦アレルギーの二次汚染」論文の投稿準備中 ②「小麦アレルギーの洗浄特性」論文作成中		

研究結果要約

給食施設において、食物アレルギー対応食の調理時における衛生管理は重要である。しかし、微生物的な衛生管理と比較して、食物アレルギーの衛生管理に関する知見は限られている。そこで、本助成研究では、水に溶けにくい小麦アレルギーについて給食施設の調理過程での混入リスクを明らかにする目的で研究を行った。研究の結果、バター液を塗布したボウルを洗浄したスポンジたわしを介して別の未使用ボウルへ、小麦アレルギーが陽性率約80%で二次汚染することが明らかとなった。この状態のスポンジたわしに対してすすぎ条件を追加したが、小麦アレルギーの完全除去は困難であった。スポンジたわしへのバター液の残留状態は、グルテン等のタンパク質と小麦デンプンがスポンジたわしのウレタン部分に付着していた。付着バターの除去のために、バター液を付着させたスポンジたわしの洗浄実験を行った。洗浄液として陰イオン・非イオン界面活性剤、アルカリ剤、食器洗浄機用洗浄剤、弱酸、そしてプロテアーゼを用いて洗浄したところ、酢酸、食器洗浄機用洗浄剤、アルカリプロテアーゼでの洗浄性が高かった。しかし、スポンジたわしから小麦アレルギーの完全除去は困難であった。純水による洗浄実験を行ったところ、洗浄液中に各種グリアジンや低分子量グルテニンの溶出が確認された。以上の結果より、小麦を使用した調理器具の洗浄にスポンジたわしを使用する場合は、小麦アレルギーの二次汚染のリスクがあることがわかった。

研究目的

（研究目的）本助成研究に先立ち、材質の異なるボウルに残存するバター液について、スポンジたわしによる洗浄後の残留性比較実験¹⁾を行った結果、小麦アレルギーはスポンジたわしによる洗浄後も高い確率でボウルに残存することを確認した。小麦粉中には、水に可溶性のアレルギーとともに、水に溶けにくいアレルギー(α/β 、 γ 、 ω -1、-2、-5)の各グリアジンと、高分子量(HMW)グルテニンと低分子量(LMW)グルテニンが含まれている。したがって、小麦アレルギーは他の水溶性アレルギーと比較して、調理器具、食器、そしてスポンジたわし等の洗浄器具への残留性は高いと考えられる。一方、学校や保育園等の給食施設での食物アレルギー対応食の調理時は、意図しないアレルギーの混入防止のために、専用の調理器具や食器を使用して調理、配膳されている。しかし、小麦アレルギーの調理器具や洗浄器具等への残留性や二次汚染に関する研究報告²⁾³⁾はほとんどなく、混入リスクを評価するための情報が限られているのが現状である。本助成研究では、バター中の小麦アレルギーの調理器具、食器、そして洗浄器具への残留性についてスポンジたわしを中心に検討し、スポンジたわしを介した調理器具等への二次汚染の可能性について調査した。また、スポンジたわしへのバター成分の付着特性や付着したバター成分の洗浄性について検討した。以上の研究により、給食施設において、小麦粉をバターとして使用した際の調理器具や洗浄器具への残留性について検討し、小麦アレルギーの混入リスクに関する知見を得るこ

とを目的とした。

〈研究の意義〉小麦アレルギーは、乳幼児の症例数のうち第3位に位置する主要な食物アレルギーである。また、小麦を原因とするアレルギーは小麦摂取後の即時型症例、小麦摂取後の運動による食物依存性運動誘発性アナフィラキシー、そして小麦粉末により気道感作されて発症するbaker's asthma等が知られている。したがって、小麦アレルギーを持つ園児や児童等にアレルギー対応食の提供をおこなう給食施設において、小麦アレルギーの混入リスクに関する知見を収集することは非常に重要であると考えられる。本助成研究の第1の目的である、バター中の小麦アレルギーのスポンジたわしを介した他の調理器具への二次汚染に関する知見は、食物アレルギー対応食を調理提供する担当者にとって具体的な対策の根拠になると考えられる。たとえば、小麦粉を使用した調理器具の洗浄には小麦専用のスポンジたわしを準備し、他の食物アレルギー原因食材を使用した調理器具や食器等の洗浄との区別の必要性に関する基礎的データとして活用できる。さらに、第2目的であるバター中の小麦アレルギーの付着性や洗浄特性、そして溶出成分に関する知見は、食物アレルギーの衛生管理において重要な知見になると考えている。

研究計画及び研究手法

〈研究計画〉本助成研究は、小麦アレルギーの二次汚染に関する確認実験と小麦アレルギーの洗浄除去に関する研究の2つの研究を計画した。

実験1. 小麦アレルギーのスポンジたわしを介した二次汚染に関する調査

給食施設での小麦粉を使用した調理過程を想定した実験を実施する。ボウルに小麦粉を1.5倍加水したバター液を塗布後、スポンジたわしによる洗剤洗浄を行う。洗剤洗浄後のスポンジたわしをすすぎ後、未使用のボウルの洗剤洗浄を行う。その後、未使用のボウルに対し、拭き取り-イムノクロマト法、ELISA法を用いてスポンジたわしを介した小麦アレルギー汚染の移行を確認する。また、スポンジたわしのポリウレタンフォームやボウルへのバター液の付着状態をデジタルマイクロスコップ、蛍光顕微鏡、そして走査電子顕微鏡により詳細に観察する。

実験2. スポンジたわしへのグルテン付着性の解析と付着バター洗浄条件の検討

付着したグルテンの洗浄特性については、スライドガラスにバター液やグルテン等を付着させ、代表的なアルカリ剤や界面活性剤の溶液中で「JIS K 3362:2008 家庭用合成洗剤試験方法」に準じた方法で洗浄実験を行い、グルテン除去に効果的な洗浄剤や洗浄条件を検討する。また、スポンジたわしへのグルテン等のバター成分の付着性を評価するために、スポンジたわしの主要な材質であるポリウレタンフォーム等の薄板と、グルテン等の表面について、水とジヨードメタンの接触角測定を行う。測定した接触角より付着仕事 (mJ/m^2) を算出して、グルテンの材質別の付着力の評価を行う。スポンジたわしに付着したアレルギーについて、抗グリアジン抗体による可視化

検出を試みる。

(研究方法: 当初の計画通りに実施できた内容)

実験1. 小麦アレルギーのスポンジたわしを介した二次汚染に関する調査

(1) スポンジたわしによるバターの洗浄ならびにすすぎ後の未使用ボウルの洗浄実験

実験に使用したボウルとスポンジたわしを図1に示す。

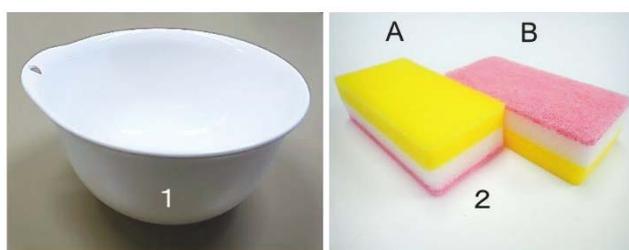


図1. 使用した材料

1) 調理ボウル 2) スポンジたわし A) ポリウレタンフォーム面、B) 不織布面

薄力粉に対して1.5倍重量の精製水(25℃)を加え、均一になるまでかくはんしバター液を調製した。ボウル底面にバター液を塗布し、バター液が残ったボウルの洗浄を想定して、すすぎ水として37℃の水道水250 mLを注ぎ入れ、洗剤を含ませたスポンジたわしにより、ボウル内面全体を洗浄するように5往復洗浄した。洗浄後のスポンジたわしから、付着物や洗剤成分等を除去するために、37℃の5Lの水道水での計10往復移動させ、スポンジたわしをすすいだ。すすぎ操作後のスポンジたわしの過剰な水分を除去後、洗剤を滴下し、別途用意した未使用の同じボウル内面全体を計5往復洗浄した。洗浄後のボウルは、37℃、500 mLの水道水で2回すすいだ。すすぎ後のボウルの拭き取りは、拭き取り検査キットを

使用してスワブ法によりボウル内面を拭き取った。拭き取りキット容器に綿棒を収納して水平方向に約1分間振り静置後、小麦アレルギーのイムノクロマトによる定性分析に供した。バター液10gを塗布して得られた拭き取り溶液については、分注して小麦アレルギーのELISA定量分析まで-30℃で保管した。小麦アレルギーの定性測定は、複合抗原認識抗体を利用したイムノクロマト法（FASTKIT スリム小麦、検出下限値 25 ng/mL、日本ハム株式会社）を使用して行った。拭き取り溶液と浸出溶液は希釈せずに、3滴（1滴 40-50 μL）をテストストリップの試料滴下部に滴下し、テストラインを目視確認することで結果を判定した。小麦アレルギーの定量は、複合抗原認識抗体を利用したELISA法（FASTKIT エライザ Ver. III小麦、測定範囲 0.78-50 ng/mL、日本ハム株式会社）を使用して行った。拭き取り溶液および浸出溶液 475 μL にキット付属の検体抽出液 25 μL を添加して試料溶液を調製し、測定に供した。

（2）スポンジたわしに残留したバター液の確認

スポンジたわしへのバターの付着量は 50℃で乾燥後、重量測定にて行った。スポンジ番号は図2に示す。バター付着状態の確認は、塗布バター洗剤洗浄後のもの：#3、洗剤洗浄後、すすいだもの：#4すすぎ後、未使用ボウルを洗剤洗浄したもの：#7の3種類の試料について、目視ならびにVH-Z20Rズームレンズを装着したデジタルマイクロスコープ（VHX-2000、株式会社キー

エンス）を使用し、100倍の観察倍率に設定してスポンジ面のバター液付着部分を観察した。付着バターの蛍光顕微鏡による観察は#3、4、7のスポンジたわしの長辺端側のバター液付着部分より、約30×10×5mmの切片を作製した。タンパク質染色用に酸性フクシン、デンプン粒染色用にフルオレセインをそれぞれ使用し、タンパク質およびデンプン粒を染色した。蛍光顕微鏡による画像撮影は、倒立型リサーチ顕微鏡（IX71、オリンパス株式会社）を使用し、顕微鏡に装着した高感度冷却CCDカメラ（VB-7010、株式会社キーエンス）にて動画撮影し深度合成して取得した。デンプン粒子等のフルオレセイン染色とタンパク質の酸性フクシン染色の蛍光観察は、励起波長530-550nm、蛍光波長575nm以上の条件で撮影を行った。走査電子顕微鏡による観察は、蛍光観察で使用した#7の切片について、染色部分を除いたバター液付着部分を約5×10×5mmの大きさに切り出した。切片の洗浄面の任意の3箇所を選択し、走査電子顕微鏡（S-3400N、株式会社日立ハイテクノロジーズ）を使用し、低真空条件80Pa、8kv、無蒸着で反射電子画像を取得した。

実験2. スポンジたわしへのグルテン付着性の解析と付着バター洗浄条件の検討

（1）付着バターの洗浄実験

スポンジたわしへ付着したバターの洗浄実験については、「JIS K 3362:2008 家庭用合成洗剤試験方法」の試験法では評価が困難であったため、独自にスポンジたわしの洗浄試験法を開発し、

スポンジたわしの付着物の除去に関する洗浄実験を行った。

まず、1.5倍重量の25℃精製水を加え、プラスチックスプーンで3分かしくは均一な液状としたものをバター液とした。まな板に5.7gのバター液を滴下し、スポンジたわしのウレタン面を下にしてバター液塗布面の上に乗せバター液をスポンジたわしに付着させた。バター付着量が、 $5\text{ g} \pm 0.15\text{ g}$ であったものを以下の洗浄実験に使用した。洗浄器具は、パッキン付きタッパーの上蓋内面に面ファスナーを貼り付けたものを準備し、スポンジたわしの不織布部分を押し付けてバター付着スポンジたわしを上蓋に固定した。37℃、400 mLの洗浄液をタッパーに加えた後、上蓋で蓋をし、取り付けたスポンジたわしのスポンジ面を浸漬した。30 mmの振幅、1分間に60往復の振盪条件で、10分間、洗浄を行った。洗浄後、スポンジたわしを50℃、48時間、乾燥し、重量測定を行い、バター残存率(%)を計算した。

(2) 接触角測定によるバター成分の付着力評価

スポンジたわしのスポンジ部分へのバター成分の付着性を評価する目的で、ポリウレタンフォーム、グルテン、グリアジン、そして小麦デンプンの各接触角の測定を行った。測定方法は、プローブ液体として、水とジヨードメタンの2種類を使用して、着液後32 msでの接触角を測定した。表面自由エネルギーはOWRK法を用い、各試料の接触角より求めた。ポリウレタンフォーム

は発泡体であり面部分がないため、200℃で圧着したものを試料切片とした。グルテン、グリアジン、そして小麦デンプンは、スライドガラス上に純水に溶解した各試料を付着させたものを試料とした。

(3) 電気泳動によるスポンジたわしの洗浄溶出物の確認

5gバター付着スポンジたわしを洗浄実験と同様に洗浄し、純水洗浄溶出物のSDS-PAGEおよび二次元ゲル電気泳動(等電点電気泳動IEF×SDS-PAGE)を行った。IEFは、Protean IEF Cell(バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)を使用して行った。SDS-PAGEは、トリス-グリシン緩衝液(pH8.5)を含む分離ゲル(アクリルアミドおよびビス-アクリルアミドの全濃度10%、15 cm × 13 cm × 1 mm)を用いて行った。

(計画通りには実施できなかった内容)

蛍光標識抗グリアジン抗体によるバター付着スポンジたわしのグリアジン付着部分の蛍光検出を試みたが、蛍光の検出条件が設定できず、付着アレルゲンの可視化が困難であった。また、ポリプロピレン、ステンレス、ガラス等の他の素材に対するバター成分の付着力の評価については、未実施である。以上、2点の内容は継続して検討する予定である。

結果と考察

実験1. 小麦アレルゲンのスポンジたわしを介し

た二次汚染に関する調査

(1) スポンジたわしによるバター液の洗浄ならびにすすぎ後の未使用ボウルの洗浄実験

ボウル底面にバター液を塗布し、スポンジたわしにより洗剤洗浄、すすぎ操作後、同じスポンジたわしで、別の未使用ボウルを洗剤洗浄した。そのボウルをすすぎ洗浄後、拭き取りを行い、拭き取り液に含まれる小麦アレルギーの測定を行った。その結果を表1に示した。イムノクロマト法による測定結果は、ボウルにバター液 5 g を塗布した場合、試行数 23 で陽性率は 48%であった。バター液 10 g を塗布した場合、試行数 23 で陽性率は 78%となり、バター液 5 g と比較して陽性率が約 1.7 倍高くなった。さらに、バター液 10 g を塗布した場合の拭き取り溶液を ELISA

法により測定した。その結果、陽性率は 87%となり、イムノクロマト法の結果と同程度であった。この結果をもとに、ボウルに残留した小麦アレルギーのリスク評価を行った。ELISA 法の定量上限値 50 ng/mL を拭き取り溶液中の小麦アレルギー量に換算すると 0.526 µg となる。同程度の二次汚染が発生したボウルで 100 g の食品を調理し、アレルギーが食品にすべて移行したとすると、食品中の小麦アレルギー濃度は 0.526 µg/100 g = 0.00526 µg/g となり、アレルギー物質を含む食品検査の基準値である 10 µg/g を大きく下回る。一方、本研究の使用量よりも大量のバター液を使用する調理が行われる場合には、二次汚染への十分な注意が必要と考えられた。以上から、研究計画で調査対象であった、天ぷら等でバター液を使用する調理において、器具等に残ったバター

表1. バター洗浄スポンジたわしによる未使用ボウルの洗浄後のボウル中の小麦アレルギーの検出結果

	イムノクロマト法		ELISA法	
	基準	結果数	基準 (ng/mL)	結果数
5 g ¹⁾	+ ²⁾	2		
	+W ²⁾	9		
	- ²⁾	12		
	陽性率 (%)	11/23 (48%)		N.A.
10 g ¹⁾	+	2	50<	2
			1-50	0
			N.D. ³⁾	0
	+W	16	50<	7
			1-50	9
			N.D. ³⁾	0
	-	5	50<	0
1-50			2	
N.D. ³⁾			3	
陽性率 (%)	18/23 (78%)		20/23 (87%)	

ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay ; N.A. 該当なし; N.D. 未検出

1) ボウルへのバター塗布重量.

2) イムノクロマト法による定性結果: + 陽性, +W 弱陽性 - 陰性. 検出下限値: 20 ng/mL.

3) 0.78 ng/mL 未満の検出は N.D.と表記

液の洗浄にスポンジたわしを使用することは、スポンジたわしを介した小麦アレルゲンの未使用器具に対する二次汚染リスクとなることが明らかとなった。

バター洗浄後のスポンジたわしのすすぎ洗浄には、握り洗いや揉み洗い等の洗い方も想定されたため、すすぎ操作について往復回数を増やし、握り洗いを追加した検討を行った。その際の、スポンジたわしからの小麦アレルゲンの溶出結果を表 2 に示した。その結果、アレルゲン濃度は、すべて 50 ng/mL を超過した。したがって、一度、バター液が残存したボウルの洗浄に使用したスポンジたわしは、バター液残留物の完全除去が困難であり、小麦アレルゲンの溶出が起こる状態であることが明らかとなった。

(2) スポンジたわしに残留したバター液の確認

スポンジたわしへのバター付着量を確認したところ。バター液を 5 g および 10 g 塗布した場合、残留率はそれぞれ約 25%、約 21%であった。スポンジたわしのポリウレタンフォームは、発泡時の個々の気泡が接した面に生じる膜状構造がほとんど無く、気泡の骨格部分（以下、セル骨格）のみが残った連続気泡構造であった。スポンジ裏面の不織布部分は、ナイロン繊維を接着したものであった。スポンジたわしのバター液残留物の付着状態をデジタルマイクロスコープにより撮影した画像を図 2 に示した。スポンジ表面では、バター液残留物がセル骨格へ付着した状態およびセルに蓋をしたような状態が観察され

た。さらに、スポンジたわし#3、4、7 では、白色付着物と透明粒子が観察され、透明粒子はすすぎ操作後のスポンジたわし#4、7 においても確認された。小麦粉の成分を考慮すると、白色付着物や透明粒子はグルテンやデンプン粒等であることが推定された。

そこで、蛍光染色液を使用して蛍光顕微鏡による観察を行った。タンパク質の染色に酸性フクシン、デンプン粒の染色にフルオレセインをそれぞれ使用して、#3、4、7 のスポンジたわしにおけるバター液の付着物の蛍光画像を撮影した。蛍光画像のすべてにおいて、グルテン等のタンパク質と考えられる赤色箇所がバター液付着物の周辺部分のセル骨格に確認された。また、デンプン粒と考えられる黄緑色箇所は、バター液付着物に囲まれるように広がっていた。すすぎ操作後の#4、7 蛍光画像では、バター液付着物の内側に黄緑色箇所が確認され、また、洗浄操作やすすぎ操作の後もデンプン粒が残留したと考えられた。また、バター液付着物の周辺部分では、赤色箇所が目立って観察された。一般に、デンプン粒のみでは水洗等で容易に除去され、デンプン粒同士の付着はほとんど無いとされている。したがって、デンプン粒は多くは洗い流され、グルテン等のタンパク質に付着したデンプン粒のみが残留したと考えられた。

次に、#7 のスポンジたわしについて、走査電子顕微鏡で、タンパク質やデンプン等のセル骨格への付着状態を電子顕微鏡で撮影した。画像では、バター液残留物が薄く伸展して張り付いた状態で、乾燥の影響と考えられるひび割れが一部に

表2. 各すすぎ条件後のスポンジたわしでの小麦アレルゲン残留物の検出結果

洗浄条件	Results	
	ICA	ELISA (ng/mL)
10往復すすぎ洗浄	+ ¹⁾	50<
	+W ¹⁾	50<
	+W	50<
	+W	50<
20往復すすぎ洗浄	+W	50<
	+W	50<
	+W	50<
10往復握りすすぎ洗浄	+	50<
	+W	50<
	+W	50<
20往復握りすすぎ洗浄	+	50<
	+W	50<
	+W	50<

ICA- Immunochromatography assay

1) ICAによる定性結果: + 陽性, +W 弱陽性

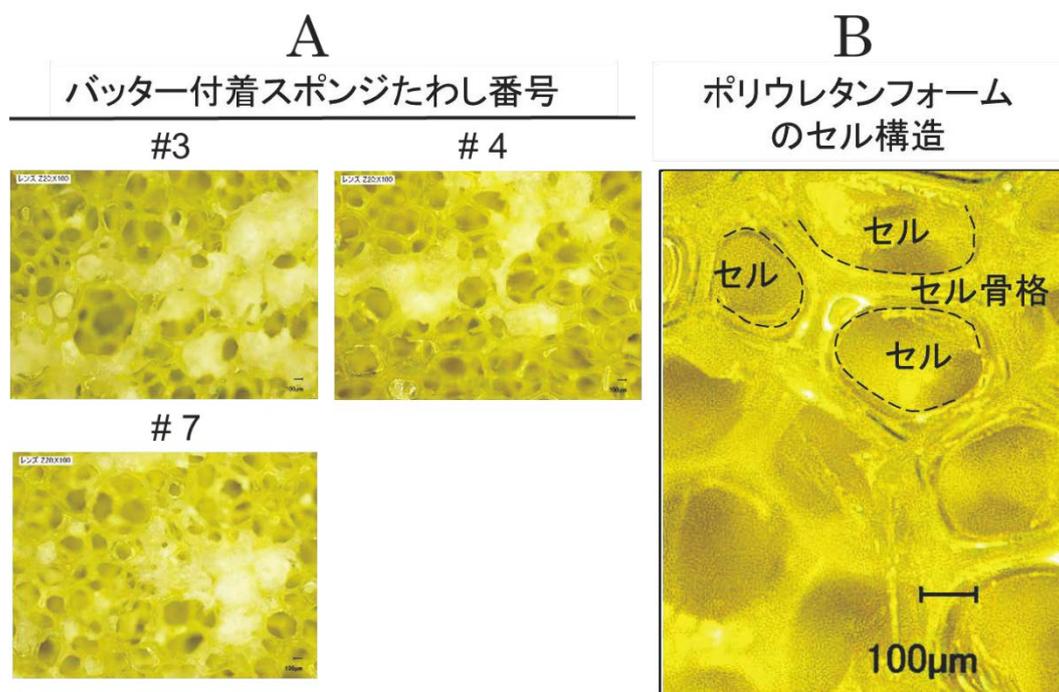


図2. デジタル画像顕微鏡を使用したスポンジたわしのポリウレタンフォーム表面のバター残留物の観察

A; #3: バター塗布ボウルを洗浄後のスポンジたわし。 #4: バター塗布ボウルを洗浄し、水ですすいだ後のスポンジたわし。 #7: バター塗布ボウルを洗浄し、水ですすぎ、新しいボウルを洗浄後のスポンジたわし。画像は100倍。B: ポリウレタンフォームのセルとセル骨格

生じていた。この付着物は、グルテン等のタンパク質と考えられた。また、大きさが異なる数十個のデンプン粒が観察され、それらは伸展して張り付いたタンパク質に付着して存在することが認できた。さらに、バターが付着したスポンジたわしで洗浄した未使用ボウルの内面を酸性フクシンで染色してデジタルカメラで撮影した。その結果、ボウル内面の底面部分において、薄い染色部分が長径 30 mm 程度の三日月状に確認された。これは、スポンジたわしに残留したグルテン等のタンパク質が未使用ボウル洗浄時のこすり洗いにより付着したものと考えられた。以上の結果より、薄力粉に 1.5 倍加水したバター液をスポンジたわしで洗浄する場合、スポンジたわしの表面にグルテン等のタンパク質が付着・残留し、二次汚染リスクが生じることが明らかとなった。したがって、グルテン形成を伴う天ぷら等のバター液の調製に使用した調理器具を洗浄する場合、スポンジたわしは、小麦を使用した食品調理器具の洗浄用に専用化することが望ましいと考える。

実験 2. スポンジたわしへのグルテン付着性の解析と付着バター洗浄条件の検討

(1) 付着バターの洗浄実験

スポンジたわしへ 5 g のバターを付着させた後、各種の洗浄液で洗浄実験を行った。洗浄液の成分として陰イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、アルカリ剤、食器洗浄機用洗浄剤、酢酸、中性プロテアーゼ、そしてアルカリ性プロテアーゼの 7 種類を使用した。純水による洗浄実験と比較して、陰イオン界面活性剤、非イオン界面活性

剤、アルカリ剤、中性プロテアーゼでの洗浄実験について、洗浄効果は低かった。一方、酢酸、食器洗浄機用洗浄剤、アルカリプロテアーゼの洗浄効果は高かった。洗浄効果の高かった酢酸の濃度について検討したところ、0.01% の希酢酸でもバターの溶解が観察された。同様に食酢による洗浄実験を行ったところ、1% 程度の希薄な食酢で洗浄効果が高かった。1% の食酢による浸漬ならびに握り洗いを行ったところ、大部分のバターは除去できたが、完全に除去することは困難であった。

(2) バター成分の接触角測定による付着力評価

スポンジたわしのスポンジ部分に対する、バター成分の付着性を評価する目的で、ポリウレタンフォーム、グルテン、グリアジン、そして小麦デンプンの各接触角の測定を行い、OWRK 法を用いて表面自由エネルギー成分を求めた。その結果、ポリウレタンフォームに対する、グルテン、グリアジン、そして小麦デンプンのそれぞれの付着仕事 W_a は、30.5、36.8、そして 26.8 mJ/m^2 であった。したがって、スポンジたわしへのグルテン、グリアジン、小麦デンプンの付着力は、グリアジン > グルテン > 小麦デンプンの順であることが示唆された。この結果は、デジタルマイクロスコープや走査電子顕微鏡による小麦成分の付着状態の観察結果と一致した。

(3) スポンジたわしの洗浄溶出物の電気泳動による確認

洗浄実験と同様に5gバター付着スポンジたわしを400mLの純水で4回洗浄し、各洗浄液に溶出するタンパク質成分について、SDS-PAGEおよび二次元ゲル電気泳動により確認した。その結果、各種グリアジンと低分子量グルテニンの溶出が確認できた。さらに、1回目の洗浄操作で溶出量が最大となるが、2回目以降の溶出成分の顕著な減少はなく4回目でも各成分の溶出が起ることが確認された。

以上の結果より、小麦成分の付着したスポンジたわしから小麦成分を完全に除去することは困難であり、また、小麦成分の付着後に洗浄したスポンジたわしから小麦アレルギーの溶出が起ることが確認された。これらの結果が得られたことより、当初、計画した結果の多くが得られたと考えている。

(残された課題)

給食施設で使用される調理器具等の素材であるポリプロピレン、ステンレス、ガラス等の接触角測定によるバター成分の付着力の評価については、実施できておらず、今後、研究を進めている課題である。

(論文発表の予定)

実験1については、現在、論文投稿のための原稿の作成が終了している。実験2については、論文投稿の原稿の作成中である。

今後の研究活動について

本助成研究では、給食施設での小麦アレルギーの管理方法として、スポンジたわしを介した二次

汚染や洗浄特性について研究を行った。しかし、本助成研究の範囲では、スポンジたわしに付着した小麦アレルギーの洗浄除去は困難であった。したがって、今後は洗浄条件のさらなる検討を行い、スポンジたわしについて、小麦アレルギーの二次汚染防止の手法を確立する必要がある。また、今回の実験で、使用後のバター液の洗浄時に、流しのステンレス板や排水溝への小麦成分の付着残留が確認された。このことは、給食施設のみならず、アレルギー対応食の提供が必要な家庭での小麦アレルギーの管理にとって、確認が必要な課題であると考えられる。本助成研究で実施できなかった、バター成分の調理器具等の素材のポリプロピレン、ガラス等、そして流しの素材のステンレス等に対するバター成分の付着力の評価や洗浄特性について研究を進める予定である。さらに、付着小麦アレルギーの可視化についても継続して研究を進める。

参考文献

- 1) 橋本博行, 吉光真人, 清田恭平. ボウルの材質3種類における小麦アレルギー残留性の比較. 日本家政学会誌. 2019;70(11):756-61
- 2) 原正美, 長谷川俊史, 山口公一, 勝又紀子, 山本実里, 古川漸. 食器および調理器具に残存する食物アレルギーの検討. 小児保健研究. 2011;70(6):744-52
- 3) 新井和恵, 廣島愛弓, 福田博保, 白石晶子, 雑賀絢. 食物アレルギー事故対策の推進. 食品衛生研究, 2020;70(3):53-8

役員・評議員・研究助成審査委員名簿

(2021年9月30日現在)

1. 役員

理事長	岩間 清	常勤	日本ハム（株）中央研究所 所長
副理事長	井手 弘	非常勤	前 日本ハム北海道ファクトリー（株）代表取締役社長
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	同志社女子大学名誉教授
	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	社会福祉法人大寿庵 理事長
	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	東京農業大学 教授

監事	岸田周平	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、北海道プロジェクト推進担当

3. 研究助成審査委員

委員長	村田容常	東京農業大学 教授
副委員長	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	星薬科大学 薬学部 教授
	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 家政学部 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	

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. 2021年度主な事業活動

- ・2021年度研究助成の実施、2022年度研究助成の公募 及び 2020年度研究助成の成果報告会の実施
- ・第7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(「栄養士・食従事者向け」及び「保育者向け」)の実施
- ・2021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火腿食の未来財団

2021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>