

2021 年度研究助成事業

成果報告会 要旨集



2022 年 10 月 11 日（火）

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2021年度研究助成事業 成果報告会
第一部 個人研究助成 質疑応答会 プログラム

■10月11日（火）13時15分～13時30分

Zoom ルーム	課題名	所属機関・氏名	頁
A	小児の食物アレルギーと腸内細菌叢の 関連	関西医科大学医学部 小児科学講座 助教 赤川 翔平	6
B	脂質を認識するペア型免疫受容体による 食物アレルギーの病態制御機序の解明と 予防・治療法開発	順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター 助教 伊沢 久未	7
C	高度不飽和脂肪酸欠乏による食物アレル ギー応答の制御変化と機序の解明	お茶の水女子大学基幹研究院 准教授 市 育代	8
D	食物アレルギー診断技術向上と抗原改変 食品作成を目標とした IgE の構造エピト ープ・線形エピトープの解析	岐阜大学医学部附属病院 小児科 講師 川本 典生	9

■10月11日（火）13時35分～13時50分

Zoom ルーム	課題名	所属機関・氏名	頁
A	甲殻類アレルゲンの消化性と消化管吸収 動態に及ぼすメイラード反応の影響	北海道大学大学院水産科学研究院 技術専門職員 清水 裕	10
B	固形物による食物誘発性胃腸症 (FPIES) の機序解明	あいち小児保健医療総合センター 医長 高里 良宏	11
C	鶏卵アレルギー小児の長期的観察による 食物アレルギー寛容誘導機序の解明	京都大学大学院医学研究科 客員研究員 田中 孝之	12
D	食物アレルギーに対する舌下免疫療法の 効果増強法の開発	東北大学 助教 田中 志典	13

■10月11日（火）13時55分～14時10分

Zoom ルーム	課題名	所属機関・氏名	頁
A	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
B	魚油由来脂肪酸による食物アレルギー予防効果の実証と、そのメカニズムの解明	国立大学法人愛媛大学 准教授 西 甲介	15
C	胃食堂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 助教 野村 孝泰	16
D	ピーナッツ経口免疫療法の維持期における最適な維持方法の探索	神奈川県立こども医療センター アレルギー科 シニアレジデント 藤田 真弓	17

■10月11日（火）14時15分～14時30分

Zoom ルーム	課題名	所属機関・氏名	頁
A	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
B	食物抗原に対する経口免疫寛容の誘導における腸管常在好酸球の役割の解明	千葉大学医学部附属病院 総合医療教育研修センター 特任助教 横田 雅也	19
C	膜透過ペプチドを側鎖に持つ高分子のアレルギー根治療法への展開	摂南大学 特任助教 鶴川 真実	20
D	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	琉球大学医学研究科 薬理学講座 准教授 山下 弘高	21
計画 延長	Food protein induced enterocolitis syndrome の診断における血清 TARC 値の有用性に関する研究	杏林大学医学部附属病院 小児科学教室 助教 濱野 翔	22

※原則 50 音順・敬称略

2021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：2022年10月11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：2021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 未病制御学 准教授

15:25～15:45

鶏卵アレルギー児に対する経口免疫寛容を誘導するための安全性の高い摂取法の開発 - ランダム化比較試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36
大矢 幸弘
国立成育医療研究センター アレルギーセンター センター長

15:45～16:05

Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA)法を用いた食物アレルギーの新規検査法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41
松尾 裕彰
国立大学法人 広島大学 病院薬剤部 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・50
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

「花粉症関連食物アレルギー症候群」における原因抗原のエピトープ構造解析と低アレルゲン化食品の開発基盤・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・56
丸山 伸之
京都大学大学院農学研究科 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 62

当財団案内・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64

2021年度研究助成事業 個人研究助成

〈オンデマンド配信による報告＋質疑応答会〉

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	小児の食物アレルギーと腸内細菌叢の関連
フリガナ	アカガワ ショウヘイ
代表者名	赤川 翔平
所属機関（機関名） （役職名）	関西医科大学医学部 小児科学講座 講師
本助成金による発表論文、学会発表	<p><学会発表> タイトル：卵アレルギーの小児における腸内細菌叢の検討 発表者：山岸満、赤川翔平、赤川友布子、中井陽子、山口正、辻章志、金子一成 発表学会：第 124 回日本小児科学会学術大会</p> <p><論文> タイトル：Decreased butyric acid-producing bacteria in gut microbiota of children with egg allergy 著者：Mitsuru Yamagishi*, Shohei Akagawa*, Yuko Akagawa, Yoko Nakai, Sohsaku Yamanouchi, Takahisa Kimata, Masaki Hashiyada, Atsushi Akane, Shoji Tsuji, Kazunari Kaneko. (* equally contributed) 掲載誌情報：Allergy. 76 巻 7 号 2279-2282 ページ. 2021 年</p> <p><受賞> 賞タイトル：第 17 回日本アレルギー学会学術大会賞 受賞者：赤川翔平 受賞課題：Decreased butyric acid-producing bacteria in the gut microbiome of children with egg allergy</p>

研究結果要約

【背景】短鎖脂肪酸を始めとする腸内細菌の代謝産物は、制御性 T 細胞の分化誘導などを介して免疫寛容に重要な役割を担っている。したがって、腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)がアレルギーの発症に関与している可能性がある。

【目的】卵アレルギー患者の腸内細菌叢の特徴を明らかにする。

【方法】卵アレルギー患者 18 例（FA 群：男児 13 例、年齢中央値 3.1 歳[四分位範囲 1.5-5.5]）と健康小児 22 例（HC 群:男児 12 例、年齢 4.0 歳[2.9-6.1]）から便を採取し、16S rRNA 遺伝子解析を実施した。腸内細菌叢の α 多様性、構成菌目、酪酸産生菌割合について比較した。

【結果】①年齢、性別は 2 群間で差はなかった。② α 多様性は FA 群において有意に低かった。③構成菌目は FA 群において Enterobacteriales 目の割合が高く(17.0% [9.5-22.3] vs. 1.8% [0.9-10.9], $p=0.029$)、Lactobacillales 目の割合が低かった(7.1% [3.6-10.1] vs. 11.5% [7.5-18.5], $p=0.012$)。④種レベルでの酪酸産生菌割合は FA 群において有意に低かった (2.3% [1.0-5.2] vs. 6.9% [2.5-9.6], $p=0.013$)。

【結語】EA 患者の腸内細菌叢は、酪酸産生菌の減少に特徴づけられる dysbiosis を来していた。dysbiosis の是正は食物アレルギーの新たな予防や治療につながる可能性がある。

研究課題名	脂質を認識するペア型免疫受容体による食物アレルギーの病態制御機序の解明と予防・治療法開発
フリガナ	イザワ クミ
代表者名	伊沢 久未
所属機関（機関名） （役職名）	順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター 助教
本助成金による発表論文，学会発表	現時点で、なし。

研究結果要約

食物アレルギーの発症・増悪は食物アレルギー特異的 IgE の産生及び小腸マスト細胞の増加・脱顆粒による。高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) が食物アレルギーと特異的 IgE により架橋刺激されると、小腸マスト細胞は脱顆粒して食物アレルギー症状を引き起こす。抑制型 CD300f はセラミドを認識して小腸マスト細胞の FcεRI シグナルを抑制して脱顆粒を抑える。しかし、活性化型 CD300b やマスト細胞以外の免疫細胞に発現する CD300f が食物アレルギーの病態形成に果たす役割は不明であった。本助成研究の目的は、CD300b 欠損マウスや細胞特異的な CD300f 欠損マウスの食物アレルギーモデルを解析し、CD300b や CD300f の働きを明確にすることである。また、CD300f を標的とするセラミドリポソームの経胃管投与が食物アレルギーの発症を抑えるかを検証することである。本助成研究の意義は、食物アレルギーの病態形成機序の解明と安全で有効な予防・治療法の開発が期待される点にある。本研究により、CD300b や小腸の Tuft 細胞に発現する CD300f は食物アレルギーの病態形成に関与しないこと、樹状細胞系に発現する CD300f は食物アレルギーの病態形成を少し抑えることが示された。重要なことに、セラミドリポソームの経胃管投与は小腸組織の一部のセラミド種を増加させて食物アレルギーの症状を抑えることが明らかになった。

研究課題名	高度不飽和脂肪酸欠乏による食物アレルギー応答の制御変化と機序の解明
フリガナ	イチ イクヨ
代表者名	市 育代
所属機関（機関名） （役職名）	お茶の水女子大学基幹研究院 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	<ul style="list-style-type: none"> ・ 第 68 回脂質生化学会 シンポジウム「脂質生化学とビタミン学の接点」 多価不飽和脂肪酸欠乏による代償的な脂質代謝の制御 市 育代 ・ 第 76 回日本栄養・食糧学会大会 FADS2 欠損による高度不飽和脂肪酸欠乏が食物アレルギーの病態に及ぼす影響 神野有紀、藤原葉子、市 育代

研究結果要約

多価不飽和脂肪酸（PUFA）のうち炭素数 20 以上のアラキドン酸や EPA、DHA などの高度不飽和脂肪酸は、免疫応答など生体の恒常性維持に必要な脂質である。高度不飽和脂肪酸に関して食物アレルギーの病態について検討した報告は多くあるが、欠乏が食物アレルギーの病態に及ぼす影響は不明である。高度不飽和脂肪酸は食事だけでなく、生体内で炭素数 18 の PUFA から生合成され、その産生酵素に FADS2（Fatty acid desaturase 2）がある。我々はこれまで、FADS2 の欠損マウスに PUFA 欠乏食を与えると、高度不飽和脂肪酸の減少が顕著であることを明らかにしている（FEBS letter, 2021）。そこで本研究では、FADS2 欠損による高度不飽和脂肪酸の欠乏が卵白アルブミン（OVA）による食物アレルギーの病態に及ぼす影響を調べた。

OVA 感作の PUFA 欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスは、OVA 感作の野生型マウスに比べて、血漿や小腸の高度不飽和脂肪酸が著しく減少した。そして、OVA 感作の FADS2 欠損マウスでは脾臓重量が有意に増加した。また、このマウスでは OVA 特異的 IgE と脱顆粒の指標である MCPT-1 の血中濃度が増加し、トルイジンブルー染色の結果から小腸においてマスト細胞の浸潤が確認できた。以上の結果より、高度不飽和脂肪酸の欠乏は OVA による食物アレルギーの病態を悪化させる可能性が示唆された。

研究課題名	食物アレルギー診断技術向上と抗原改変食品作成を目標とした IgE の構造エピトープ・線形エピトープの解析
フリガナ	カワモト ノリオ
代表者名	川本 典生
所属機関（機関名） （役職名）	岐阜大学医学部附属病院 小児科 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	<p>関連の内容の一部を以下の学会で発表した、ないし発表予定である</p> <p>1) 熊谷千紗，川本典生，金山朋子，川本美奈子，大西秀典. エピトープ解析を旨としたカゼインのオーバーラッピングペプチドの作成の試み. 東海小児アレルギー談話会(第 81 回)(2022 年 2 月 26 日 名古屋市/オンライン)</p> <p>2) 熊谷千紗，川本典生，三輪友紀，金山朋子，川本美奈子，大西秀典. カゼイン IgE エピトープを定量的に評価する手法の確立. 日本アレルギー学会(第 71 回)(2022 年 10 月 7-9 日 東京/オンライン)</p> <p>また、その他の内容については、さらに検討を加えて学会発表を行っていく予定である。</p>

研究結果要約

我々は、IgE の結合部位（エピトープ）を破壊してアレルギー反応を抑制しつつ、一定の T 細胞エピトープを残すことで「食べて治す」抗原改変食品の開発を行い、これによる経口免疫療法を実施してその有効性や安全性を検証してきた。最近、IgE エピトープの研究の一環として、オーバーラッピングペプチドを大腸菌により大量に作成し、実験を行ってきた。従来合成によるペプチドより、比較的多くペプチドを取得できるため、様々な応用が考えられた。この一環として、IgE 抗体の立体構造エピトープと線形エピトープの認識の仕組みを解明するため、オーバーラッピングペプチドを用いて、血清中の線形エピトープを低減し、その処理後にアレルゲンへの結合量に変化するかを評価し、立体構造および線形エピトープの反応の検出を試みた。オーバーラッピングペプチド-GST 融合体を大腸菌で培養後精製し、グルタチオン磁気ビーズに固相化し、ペプチドに結合する血清中の IgE 抗体を除去した。α_{s1}カゼインを用いた検討では、除去の処理後に特異的 IgE 抗体の測定値は 8 割以上低下した。立体構造をとらないとされる α_{s1}カゼインでは、立体構造エピトープはあまり多くないと推察された。今回、立体構造エピトープと線形エピトープを比較する手法は概ね確立できたと考えられたため、今後、立体構造をとる事がわかっているその他の蛋白質で同様の実験を行い、比較検討していく予定である。

研究課題名	甲殻類アレルギーの消化性と消化管吸収動態に及ぼすメイラード反応の影響
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	該当なし

研究結果要約

代表者らは、マウスを用いた経口投与試験において、カニ主要アレルギーであるトロポミオシン(TM)をグルコースとメイラード反応させたもの(TM-G)は、その血中への移行量がTMよりも減少する事を見出した。これを踏まえて本研究では、TMの吸収部位と吸収経路の特定と、メイラード反応によるTM吸収抑制の機序の解明を目指し、マウス消化管ループ(胃および腸)への投与試験を行った。その結果、(1)腸管ループでは、TM-Gの血液への移行量がTMよりも減少する傾向があるが、その差異は経口投与試験時よりも小さくなること、(2)TM、TM-G共に腸管上皮細胞の細胞質内を經由して血中に移行すること、(3)TM-Gの腸管の上流から下流への移動度がTMよりも小さい傾向があることを明らかにした。以上の結果は、メイラード反応はTMの腸管での吸収を抑制するが、これは腸管上皮細胞の吸収機構を直接阻害するのではなく、TMの流動性あるいは腸管蠕動運動を低下させて吸収部位との接触機会を減少させる等の間接的阻害によって上皮細胞での吸収を抑制することを示唆している。加えて、(4)胃ループに投与したTMが、腸管ループよりも少量ではあるが血液へと移行していた。この結果は、腸管を介さず胃から直接血中へとタンパク質が移行する経路の存在を示唆するが、これは即時型アレルギーの発症機構に関わる新たな知見であり、詳細な調査が必要である。

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団
2021 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	固形物による食物誘発性胃腸症（FPIES）の機序解明
フリガナ	タカサト ヨシヒロ
代表者名	高里 良宏
所属機関（機関名） （役職名）	あいち小児保健医療総合センター アレルギー科 医長
本助成金による発表 論文，学会発表	現時点で決定ではありませんが 2023 年度日本アレルギー学会または日本小児アレルギー学会で 発表予定です。

研究結果要約

目的：近年増加している固形物による消化管アレルギー（固形物 FPIES）の機序は不明な点が多く、有用な補助診断法も確立していない。本研究は固形物 FPIES 患者に対して皮膚プリックテスト（SPT），特異的 IgE 評価，好塩基球活性化試験（BAT），皮膚パッチテスト（PP），リンパ球刺激試験（LST）に同一抗原を用いて実施，解析することで検査の有用性及び限界を明らかにすることとした。

結果：全体として 23 件（卵黄 13 件〔陽性 9 件，陰性 4 件〕，小麦 7 件〔陽性 2 件，陰性 4 件〕，大豆 3 件〔陽性 1 件，陰性 2 件〕）の解析を行った。全体を対象とすると特異的抗体価（UA/mL）の中央値（四分位）は陽性群（P 群）：陰性群（n 群）で 0.1（0.1-0.19）：0.1（0.1-0.29）であった。SPT 陽性者は p 群 8 名中 0 名，n 群 10 名中で 1 名/10 名，BAT 陽性者は p 群 10 名中 1 名，n 群 10 名中 2 名であった。PP 陽性者は p 群 9 名中 1 名，n 群 11 名中 1 名であった。LST 陽性者は p 群 12 名中 10 名，n 群 9 名中 8 名であった。今回実施した 5 つの検査はすべてに両群での有意差はなく，抗原別に解析を行った場合にも傾向に変化はなかった。

考察，結論：塩可溶性抗原を用いた今回の解析では診断補助に有用な検査は見られなかった。症例数が不足している抗原もあることから，更なる症例集積が必要である。また塩不溶性抗原の抽出及び臨床応用も課題として挙げられる。

研究課題名	鶏卵アレルギー小児の長期的観察による食物アレルギー寛容誘導機序の解明
フリガナ	タナカ タカユキ
代表者名	田中 孝之
所属機関(機関名) (役職名)	京都大学大学院医学研究科 客員研究員
本助成金による発表 論文, 学会発表	今年度は、なし

研究結果要約

わが国の即時型食物アレルギーの原因食物として最も頻度が高いのは鶏卵であり、特異的 IgE 抗体測定や食物経口負荷試験を用いた通常の診療で耐性獲得に至る患者も多いが、IgE 低値でも症状誘発が見られる症例や耐性獲得が進まない症例など、問題も残っている。今回我々は鶏卵アレルギー患者をリクルートしてコホートを作成し、経口食物負荷試験と同時に免疫学的な解析を行うことにより、実臨床の中で 1：鶏卵への耐性獲得例・そうでない例の免疫学的な違いを明らかにし、2：鶏卵除去指導の指標として食物負荷試験の補助となるバイオマーカーを同定することを目的に研究を進めている。

2021年2月より症例のリクルートを開始し、2022年3月末時点までに80症例を目標としていたが、実際には130症例が参加した。内訳は、鶏卵アレルギーのない0群が10例、卵白10g以上を摂取可能なI群が27例、卵白は未摂取だが、アナフィラキシー既往のないII群が53例、少量卵白でアナフィラキシー既往のあるIII群が15例だった。初回の検体提供時にPBMCを凍結保存しており、これらの解析を通じて次年度以降、

- 1, 食物負荷試験結果と相関するバイオマーカーの探索
 - 2, 低リスク群と高リスク群患者の間で有意に差のある指標の同定
 - 3, 上記の指標が耐性獲得の中でどのように変化するかの追跡
- の3点の解明を引き続き進めていく。

研究課題名	食物アレルギーに対する舌下免疫療法の効果増強法の開発
フリガナ	タナカ ユキノリ
代表者名	田中 志典
所属機関（機関名） （役職名）	東北大学 講師
本助成金による発表論文、学会発表	該当なし 今後結果がまとまり次第、論文として投稿予定

研究結果要約

舌下免疫療法は抗原を舌下粘膜から吸収させ、体質の改善を図る簡易かつ有効なアレルギー治療法であり、アレルギー性鼻炎に対する一般的な治療法として普及している。しかし、食物アレルギーに対する治療効果は限定的で、最終的な耐性獲得は困難である。本研究ではマウス実験により、口腔粘膜の樹状細胞を標的とし、腸管指向性の制御性 T 細胞を効率的に誘導し、舌下免疫療法の食物アレルギーに対する治療効果を増強する方法の開発を目指した。

まず、抗原舌下投与後の抗原特異的制御性 T 細胞の体内分布について検討したところ、制御性 T 細胞の誘導が起こる顎下リンパ節だけでなく、腸管膜リンパ節や、数は少ないが小腸粘膜固有層でも抗原特異的制御性 T 細胞が検出された。この結果は、舌下免疫療法により腸管指向性の制御性 T 細胞が誘導される可能性を示唆する。

レチノイン酸やナイアシン、酪酸は、樹状細胞に作用し制御性 T 細胞誘導を促進することが報告されている。特にレチノイン酸は活性化 T 細胞に腸管指向性受容体の発現を誘導することが知られている。そこで、舌下免疫療法による食物アレルギーの治療プロトコルにおいて、これらの生理活性物質を舌下液へ添加することにより、治療効果の増強を試みた。しかし、現在のところ治療効果増強法の確立には至っておらず、今後さらなる検討が必要である。

研究課題名	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	ビタミン D によるアレルギー発症予防の可能性 第 58 回日本小児アレルギー学会 シンポジウム 2

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 歳健診が終了したため、データの固定後に解析を開始する予定である。

研究課題名	魚油由来脂肪酸による食物アレルギー予防効果の実証と、そのメカニズムの解明
フリガナ	ニシ コウスケ
代表者名	西 甲介
所属機関（機関名） （役職名）	愛媛大学大学院農学研究科 生命機能学専攻 准教授
本助成金による発表 論文，学会発表	本助成金による研究成果について、2022 年度中に学会発表をする予定である。また、実験結果の解析がまとまり、必要な追加実験を行った後に、速やかに学術論文として発表する予定である。

研究結果要約

複数の先行研究において、青魚に豊富に含まれるドコサヘキサエン酸（DHA）にアレルギー症状を緩和する効果があることが報告されている。また、DHA がアレルギー疾患の発症に対して予防的に機能する可能性についても示唆されている。しかし、食物アレルギー発症に対する DHA の予防効果を実証した報告はない。本研究では、DHA を継続的に摂取させたマウスに食物アレルギーの発症を誘導し、食物アレルギーの一次予防に対する DHA 摂取の有効性について検証した。実験を実施した結果、DHA の摂取量を 200 mg/kg/day とした場合、食物アレルギーの一次予防に対する DHA 摂取の有効性は認められなかった。一方、DHA の摂取量を 800 mg/kg/day とした場合、DHA 摂取の有効性が認められた。食物アレルギーを発症したマウスにアレルゲンを経口投与すると、直腸温度が低下し続け、下痢の症状が認められた。一方、DHA を継続的に摂取し、食物アレルギーの発症を誘導したマウスでは、アレルゲンの経口投与直後に直腸温度が一時的に低下したが、間もなく回復した。血液分析の結果、DHA 摂取マウスではアレルゲンに対する IgE 抗体の産生量が非摂取のマウスと比べて統計学的に有意に低下していた。したがって、アレルゲンに対する IgE 抗体の産生を DHA が阻害することによって食物アレルギーの一次予防効果を発揮する可能性が示唆された。

研究課題名	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 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。2020 年度の実験で、牛乳と酸の混合物（牛乳＋酸）の気道感作による牛乳アレルギーモデルマウスを確立した。

本年度は、疫学的に関与が報告されるビタミン D 欠乏が本モデルの食物アレルギー発症促進に関与するか解析をすすめた。マウスに対して生後 3 週から低ビタミン食を与え、生後 8 週から牛乳の感作を開始した。しかし、感作後の牛乳抗原全身投与ではアナフィラキシーの促進効果を認めなかった。また、酸のアジュバント効果は肺胞マクロファージあるいは気道上皮のような自然免疫が機序の一端を担っていると考えられ、肺胞マクロファージのトランスクリプトーム解析を行った。ミルク投与群と酸＋ミルク投与群で mRNA 発現に大きな違いは認めず、肺胞マクロファージの本モデルでの役割は乏しいと考えた。

一方で、自然免疫系で重要な役割を果たす受容体のスクリーニングを進め、Toll 様受容体ノックアウトマウスに対して感作を行ったところ、野生型にくらべてノックアウトマウスではアナフィラキシーを認めず、牛乳＋酸の気道感作で、Toll 様受容体が重要な役割を担っていることを明らかになった。

研究課題名	ピーナッツ経口免疫療法の維持期における最適な維持方法の探索
フリガナ	フジタ マユミ
代表者名	藤田 真弓
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 シニアレジデント
本助成金による発表 論文，学会発表	

研究結果要約

ピーナッツの経口免疫療法（oral immunotherapy : OIT）の有用性が報告されているが、維持期に継続的な摂取が必要であり、ピーナッツに対する嗜好などからアドヒアランスが低下し、摂取を中断する例もある。このため、免疫学的な変化を維持できる摂取量と摂取間隔を検討する目的で本検討を実施した。対象となった患者は 41 人であり、そのうち経過を追えた 31 人のデータを解析した。2022 年 3 月時点での rush OIT 後の維持期のピーナッツの 1 回摂取量は 4g（中央値）、1 か月の摂取回数は 4 回（中央値）、1 か月の摂取量は 24g（中央値）であった。OIT 開始前と維持期でのピーナッツ特異的 IgE 値は、1 回にピーナッツ 3g 以上を摂取していた児で有意に低下しており、3g 未満では有意差は認められなかった。月の摂取回数や月の摂取量では量によらず、ピーナッツ IgE 値は有意に低下していた。Ara h 2 特異的 IgE 値は有意差は認められなかったが、全例で低下していた。維持期でのピーナッツ特異的 IgG4 値と Ara h 1・Ara h 2・Ara h 3・Ara h 6 特異的 IgG4 値については、いずれも 1 回摂取量や月の摂取回数、月の摂取量での有意差は認められなかった。ピーナッツおよび Ara h 2・Ara h 6 特異的 IgG4 値は Ara h 1・Ara h 3 特異的 IgG4 値に比べて維持期で上昇していた。

本検討では月の摂取量や摂取回数よりも 1 回の摂取量がピーナッツ IgE 値の変化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後はさらに細かく摂取量を分けて検討していく必要がある。

研究課題名	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	Akashi M et al. J Allergy Clin Immunol Pract. 2022;10:1110-1112.

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、確立した重症消化管アレルギーの動物モデルを用いて、炎症惹起メカニズムの解析を行った。その結果、組織局所には強い好酸球浸潤を認めること、また炎症及び体重増加不良の誘導には自然リンパ球が関与している可能性を見出した。また、消化管アレルギーのうち、近年、鶏卵が原因の食物蛋白誘発胃腸炎が急激に増加していることを明らかにした。

研究課題名	食物抗原に対する経口免疫寛容の誘導における腸管常在好酸球の役割の解明
フリガナ	ヨコタ マサヤ
代表者名	横田 雅也
所属機関（機関名） （役職名）	千葉大学医学部附属病院総合医療教育研修センター 特任助教
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

成人食物アレルギーでは、生涯にわたり原因食物の除去を要することが多く、誤食はアナフィラキシーなどの重篤な病態をきたし生命を脅かす。小児食物アレルギーの一部の患者では、様々なプロトコールの経口免疫療法が試みられ長期に寛解を維持する例がみられるが、治療中断による再燃や治療によるアナフィラキシーのリスクを伴う。成人の食物アレルギーでは、効果的な免疫療法は存在せず、患者は生涯に渡る原因食物の除去を強いられる。すなわち、食物アレルギーには大きなアンメットニーズが存在し、新たな治療戦略の確立は急務である。

多くの研究により、食物アレルギーの発症には腸管の恒常性の破綻が関与することが示唆されている。生体内に存在する好酸球の多くは腸管粘膜固有層に常在し、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。本研究では、これまでアレルギー炎症におけるエフェクター細胞であると考えられてきた好酸球の組織恒常性維持機能に着目し、アレルギー発症抑制につながる経口免疫寛容の誘導における役割の解明を目指した。食物アレルギーモデルの解析で、好酸球欠損マウスでは、抗原感作後の特異的 IgE 産生が事前の抗原経口投与により抑制されず、抗原チャレンジにより強いアナフィラキシーショックを起こした。このことから、好酸球は経口免疫寛容の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究課題名	膜透過ペプチドを側鎖に持つ高分子のアレルギー根治療法への展開
フリガナ	ウカワ マサミ
代表者名	鶴川 真実
所属機関（機関名） （役職名）	摂南大学 特任助教
本助成金による発表 論文，学会発表	なし

研究結果要約

我々はこれまで、本研究室で開発した膜透過ペプチドを側鎖に持つ高分子を薬物と混合した製剤用い、経鼻や舌下などからの吸収効率を大幅に向上させることに成功してきた。また、本製剤は経鼻ワクチンとしても有用であることを明らかにしている。

一方、アレルギー反応とは異なる免疫反応を意図的に引き起こし、アレルギー反応を「上書き」するというアレルギー治療戦略が提唱されている。そこで本研究では、本高分子の経鼻ワクチンとしての効果を用いてアレルギーを抑制することを目的とした。

アレルギーモデルマウスに本高分子と抗原（アレルゲン）の混合物を投与したところ、経鼻投与ではアレルギー抑制効果がなく、舌下投与では効果がみられた。しかしながら、抗原のみを舌下投与する従来型の治療法と比較して治療効果に有意な差はみられなかった。一方、非アレルギー性の免疫反応は本高分子投与群のみで検出されたため、「本高分子によって非アレルギー性の免疫反応は引き起こされていたが、アレルギー抑制効果の強化にはつながらなかった」ということが示唆された。

そこで、本高分子の吸収促進効果を活かし、アレルギー抑制効果が知られている薬との混合投与を試みたが、これらの物質は水溶性が低く、本高分子や抗原との混合で固化してしまうという問題点が判明した。そこで、助成期間終了後も製剤的な検討を行い、より優れたアレルギー治療用製剤の開発を目指して研究を進める。

研究課題名	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 ヒロタカ
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 マウス食物アレルギーモデルを用いた経口免疫寛容に対する経皮的な食物抗原暴露の影響 第74回日本薬理学会西南部会、久留米、2021.11.20. マウス食物アレルギーモデルを用いた食物アレルギーの発症における経口免疫寛容と経皮的な抗原負荷のバランスの解析 第95回日本薬理学会年会、福岡、2022. 3. 7-9. 発表論文 Journal of Functional Foods. 85 (2021) 104643. Impact of orally-administered oligosaccharides in a murine model of food allergy. Hirotaka Yamashita, Akari Shigemori, Misato Murata, Hiroyuki Tanaka, Naoki Inagaki, Masato Tsutsui, Mariko Kimura

研究結果要約

食物アレルギーでは、食物抗原に対する経口免疫寛容が獲得できなかった、もしくは、獲得した免疫寛容が破たんすることで、食べた物に対してアレルギーが生じていると考えられる。そこで本研究では、経口免疫寛容の獲得が阻害される機序の解明や、獲得した免疫寛容が破たんする条件の解析を行った。

これまでに私たちは、マウス食物アレルギーモデルと経口免疫寛容モデルを作製した。また、経口免疫寛容モデルにおいて、経口免疫寛容の獲得操作時に食品添加物を大量に摂取させると、免疫寛容の獲得が阻害される結果を報告している。そして、マイクロアレイ解析の結果から、経口免疫寛容のマウスでは、セリンプロテアーゼの遺伝子発現が上昇している結果を得ていた。そこで、セリンプロテアーゼ阻害剤として、アプロチニンを投与し、経口免疫寛容の獲得と阻害に対する作用を検討した。しかしながら、アプロチニンは、経口免疫寛容の獲得や阻害に対して、顕著な作用は確認できなかった。

一方で、経皮的な抗原の暴露による獲得した免疫寛容の破たんについて検討した。これまでに、経皮感作によって経口免疫寛容の一部が破たんし、抗原特異的 IgE 値が上昇することを報告していた。今回、抗原を皮内注射することで、より安定的に免疫寛容を破たんさせることを確認した。また、破たんの機序として、経皮的な抗原の反復暴露により炎症性樹状細胞の遊走が促進することが考えられた。

研究課題名	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	未発表

研究結果要約

Food protein induced enterocolitis syndrome: FPIES は診断に有用なバイオマーカーがなく、確定診断を行うためには食物経口負荷試験が必須である。本研究は FPIES の症例では嘔吐出現後に血清 TARC 値が上昇すること示し、血清 TARC 値が FPIES の診断に有用であることを確認することを目的とした臨床研究である。当該研究は 2020 年 5 月に当院倫理委員会の承認を得て、開始した。目標症例数は疾患群 18 例、対照群 18 例であったが、現時点で疾患群 12 例、対照群 12 例が登録できている。この 2 群間の嘔吐後の血清 TARC 値の上昇率を比較したところ、疾患群で有意に血清 TARC 値が上昇していた。現在は FPIES が疑われた、または以前に食物負荷試験により FPIES と診断された症例で新たに食物負荷試験を行い、消化器症状を認めることがなかった負荷試験陰性群を加えた検討を予定している。3 群の症例数が揃った時点で、他の Th1 系、Th2 系、Th17 系のサイトカインも測定し、3 群間での比較検討を追加する予定である (2022 年 12 月末まで計画延長課題のため途中状況として記載)。

2021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解明およびその制御法の開発

研究課題名	食物アレルギーにおける免疫記憶の解明およびその制御法の開発		
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 未病制御学 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 specif- ically in the ileum. Gut. 2022 Mar;71(3):487-496. doi: 10.1136/gutjnl-2020- 322873. Adachi, T. IgA-deficiency breaks immunological and neurological homeostasis. 第 50 回日本免疫学会学術集会 2021. 12.		

研究結果要約

食物アレルギーは腸管バリア機能の低下による食物抗原の侵入が原因と考えられていたが、皮膚からの抗原の侵入が原因となっていることが明らかになってきている。食物アレルギーモデルでは腸管バリア機能に重要な免疫グロブリン A (IgA) がアレルギーの回避に重要であることを示してきた。IgE から IgA にクラススイッチすることで寛容が成立すると考えられ、食物アレルギーを発症しない場合は、継続的な経口投与により腸内細菌に対する IgA と同様に、IgA 抗体価が持続することを見出し、食物抗原に対する免疫寛容の機序となっていると考えられた。また、樹立した IgA 産生細胞可視化マウスを用いて、IgA 産生細胞の腸管および脾臓での動態を可視化した。さらに、樹状細胞可視化マウスを用いて、小腸、大腸、パイエル板、脾臓での動態を明らかにした。一方、昨年度樹立した皮膚感作アレルギーモデルでは、皮膚感作により所属リンパ節で感作された IgE 陽性細胞が脾臓、骨髄や他のリンパ節に移動していることを明らかにし、IgE 陽性細胞の動態が明らかとなった。IgA がアレルギーのみならず発達異常に関わっていることが示唆されていたので、その関連についても解析し、IgA 欠損マウスでは脳にも異常がみられることを明らかにした。以上のように、食物抗原への免疫寛容、アレルギー反応に対する機序の一端を明らかにした。

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、独自に腸管あるいは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確立し、IgA が IgE 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。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こと、さらには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

経口免疫寛容における IgA 抗体産生の解析

マウスに鶏卵オボアルブミン (OVA) を alum アジュバンドを用いて腹腔に投与して免疫し、2 週間後に追加免疫後、さらに 1 週間後から経口投与すると、IgA 欠損 C57BL/6 マウスでは強いアナフィラキシー反応が起こるが、IgE を過剰に発現するノックインマウスでは初回はアナフィラキシーが起こるが、2 回目の経口投与ではアナフィラキシー反応が見られなくなる。また、野生型や腸管バリア機能の低下している IL-22 欠損マウスに投与してもアナフィラキシー反応は誘導されない。アナフィラキシー反応が誘導されなくなった IgE 過剰産生マウスでは OVA 特異的な IgE 産生が OVA 経口投与後は低下し、逆に IgA 産生が増えていた。抗原の継続的な投与が IgA 産生を増強、あるいは維持させ、そのために OVA に対する免疫寛容が維持されていると考えられる。また、食物アレルギーの治療法に脱感作療法があるが、その作用機序にもなっているのではないかと考えられる。これらの仮説を証明するために、OVA/alum で免疫後、継続的な OVA の経口投与で IgA 産生が持続するかを調べることにした。

IgA 産生細胞の動態解析

IgA 産生細胞を可視化するマウスの作製に成功していることはすでに一昨年、報告している。腸管での IgA 産生細胞の動態を明らかにするこ

とを目的として、カルシウムバイオセンサー yellow cameleon 3.60 (YC3.60)¹⁾ を IgA 産生細胞特異的に発現するマウス²⁾ を利用し、マウスを 4%パラホルムアルデヒドで固定後、小腸、大腸、パイエル板、脾臓についてビブラトームにて、50 μm の切片を作製した。ライカ社製の蛍光顕微鏡にてそれぞれの切片の YC3.60 の黄色蛍光を検出した。また、腸管での B 細胞の活性化には樹状細胞から抗原が提供されているので、樹状細胞の可視化マウスを用いて、それぞれの腸管組織で局在を検討した。

免疫記憶は記憶 B 細胞と長寿命形質細胞によって担われているとされているが、IgA クラスの抗体は抗原刺激がないと抗体価が下がってしまう。特に、骨髄に移行して長寿命形質細胞が免疫記憶として持続する抗体産生の実態であると考えられるが、IgA クラスの抗体では抗原がないと特異的な抗体価は下がってしまう。そこで、IgA 抗体産生可視化マウスを用いて、骨髄での IgA 産生細胞をフローサイトメーターにて検討した。

IgA 欠損マウスにおける皮膚感作 I 型アレルギーモデルにおける IgE 産生の解析

申請者は C57BL/6 系 IgA 欠損マウス³⁾ の OVA/alum 感作モデルでは野生型マウスよりも IgE 産生が増強することを見出している。そこで、抗原を反復塗布する皮膚感作 I 型アレルギーモデルにおいても同様の結果が得られることを期待して昨年度検討した。しかし、IgA 欠損 C57BL/6 マウスでは血中抗 OVA IgE 抗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。さらに Enzyme-Linked ImmunoSpot (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。この結果から我々は皮膚感作 I 型アレルギーモデルでは、野生型に比べ IgA 欠損マウスでは IgE 産生誘導が低下している可能性を考えた。そこで今年度は、C57BL/6 系野生型マウスと IgA 欠損マウスに皮膚感作 I 型アレルギーモデルを適用し、抗原特異的 IgE 産生を検討した。

皮膚感作 I 型アレルギーモデルを用いた IgE 陽性細胞の生体内動態解析

本テーマでは、食物アレルギーを含む I 型アレルギー発症要因である抗原特異的 IgE を産生する抗原特異的 IgE 産生形質細胞およびその前駆細胞の生体内動態を明らかにし、IgE 産生形質細胞の誘導および維持機構を明らかにすることで、IgE 産生の制御を目的している。従来、胚中心でクラススイッチした IgE 産生形質細胞あるいはその前駆細胞である形質芽細胞は脾臓あるいは骨髄に移動し、short-lived、あるいは long-lived IgE 産生形質細胞として IgE を持続的に産生し続けると考えられている。しかし、胚中心が存在するリンパ組織から骨髄や脾臓への IgE 産生形質細胞あるいはその前駆細胞移動の直接証明は実はなされていない。そこで昨年度までの検討で、野生型に比べ高い IgE が産生される IgA 欠損 C57BL/6 マウス³⁾ に OVA/Alum 感作モデルを適用し、フローサイトメトリーによる IgE 産生細胞分化過程の詳細解析法と、ELISPOT アッセイに

よる抗原特異的 IgE 産生形質細胞の検出法を確立した。そしてさらに、IgA 欠損マウスと光変換蛍光タンパク質 KikGR を発現する KikGR マウス⁴⁾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⁺細胞を誘導後、腸間膜リンパ節を照射して細胞を赤色にマークし、抗原特異的 CD19⁺ IgE⁺細胞、および IgE⁺形質芽細胞(CD19⁻細胞表面 IgE⁺)が、腸間膜リンパ節から骨髄および脾臓に移動していることを国内外で初めて直接検出した。この結果から我々は、頻度は低い IgE 産生細胞は持続的に所属リンパ節から、脾臓、骨髄に移動していると考えている。

一方で、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、維持されるメカニズム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。OVA/Alum 感作モデルは、誘導された抗原特異的 IgE 産生細胞の解析にはとても有用なツールであるが、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 誘導モデルが必要である。そこで昨年度、抗原を反復塗布する皮膚感作 I 型アレルギーモデルを樹立した。その過程で、上述のように C57BL/6 系 IgA 欠損マウスでは IgE 産生誘導が安定しないため、皮膚感作 I 型アレルギーモデルでは BALB/c マ

ウスを用いる必要が有ることを示し、さらに、KikGR マウス(C57BL/6 バックグラウンド)を BALB/c マウスと交配し、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 BALB /c マウスの作成を完了した。そこで今年度は KikGR 発現 BALB /c マウスにて皮膚感作 I 型アレルギーを誘導し、皮膚所属リンパ節から、脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節における IgE⁺形質芽細胞の移行と局在を明らかにすることにした。

腸管バリア機能を欠くマウスにおける脳、行動学解析

IgA 欠損マウスの解析から、ヒトの自閉症と関連のある細菌が増えていること、さらにはヒトで IgA とアレルギー、IgA と自閉症に関連があることが示されている^{5,6)}。昨年度報告したが、IgA 欠損マウスでは不安行動が増強しており、行動学異常がみられることがわかっている。IgA 欠損マウスでは不安行動が亢進していたので、マウスを固定後、脳の凍結切片を作製し、マイクログリア、炎症性サイトカイン IL-1 の産生の免疫染色を行った。

IL-22 は腸管からの抗菌ペプチドの分泌に重要なことや、上皮の修復に関わっており、腸管バリア機能に重要であることが知られている。腸管のバリア機能に重要な IgA とともに、IgA/IL-22 の 2 重欠損マウスを作製し、さらなる行動異常がみられるかを不安様行動がみられるかを評価するオープンフィールドテストで検討した。オープンフィールドテストでは約 40 cm 四方の箱にマウス

1匹を置き、10分間の行動を調べた。箱の中央へのアプローチの回数、中央での滞在時間、総移動距離を測定した⁷⁾。

結果と考察

経口免疫寛容におけるIgA抗体産生の解析

野生型 C57BL/6 マウスにリン酸緩衝液 (PBS) で OVA/alum (OVA 50 μ g) を懸濁した 300 μ l を腹腔投与し、3週間後に、同様の方法で追加免疫をした。さらに3週間後から、1%OVA/PBS、300 μ l を1週間ごとに経口投与を行った。経口投与時に採血を行い、その血清について ELISA で OVA 特異的な IgA を測定した。その結果、コントロールとして PBS のみを投与したマウスでは追加免疫の3週間後では OVA 特異的な IgA の抗体価は低くなっているが、OVA を経口投与した群では、顕著に高い OVA 特異的抗体が検出された (図1)。腸管には非常に多くの共生細菌が存在しているが、その多くは IgA 抗体と結合していることが知られている⁸⁾。IgA がないと、特に小腸で腸内細菌叢のバランスが崩れ、免疫系を過剰に刺激して

回腸炎を起こすことを IgA 欠損マウスを使って証明してきた³⁾。このことは IgA が腸内細菌による過剰な免疫応答を制御していることを示しており、腸内細菌のみならず、日常的に摂取する食物に対して同様に働いていることが強く示唆される。これまで経口免疫寛容は制御性 T 細胞で説明されてきたが、制御性 T 細胞による過剰な免疫反応の抑制のみならず、抗原特異的な IgA も過剰な免疫応答の抑制に働き免疫寛容に寄与していることが示された。

IgA 産生細胞の動態解析

IgA 可視化 (IgA-Cre/YC3.60) マウス²⁾ について 4%PFA により固定後、それぞれの組織を摘出し、作製した切片標本について蛍光観察をした。パイエル板では B 細胞濾胞内の 2 次濾胞に集積していることが明らかとなった (図2)。またパイエル板の基底側近傍にも多く存在していた。腸管基底側で M 細胞を介して取り込まれた抗原は近接するドーム下領域 (sub-epithelial dome: SED) に分布する樹状細胞によって B 細胞が抗原刺激を受け、IgA にクラススイッチするとされている。

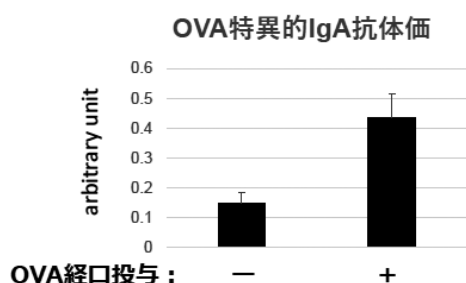


図1 OVAの経口投与におけるIgA産生
OVA/alumを腹腔投与し、3週間後に追加免疫を行い、さらに3週間後とその時から経口投与を毎週1回開始した4週間後の血清のOVA特異的IgA

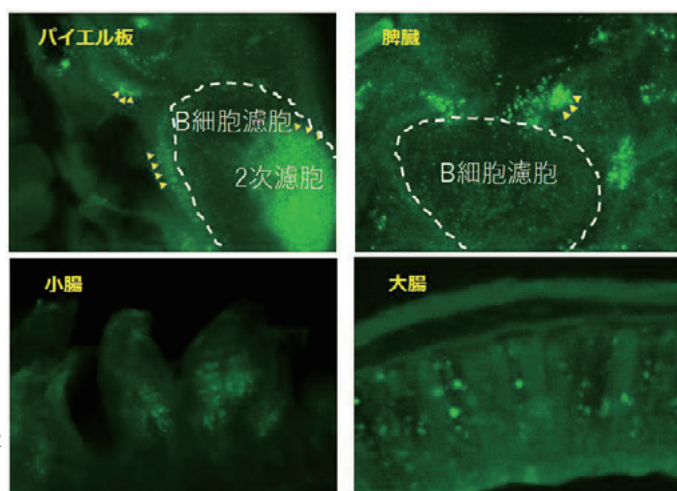


図2. IgA産生細胞の動態
IgA-Cre/YC3.60マウスの各種組織でのYC3.60細胞 (IgA産生細胞)

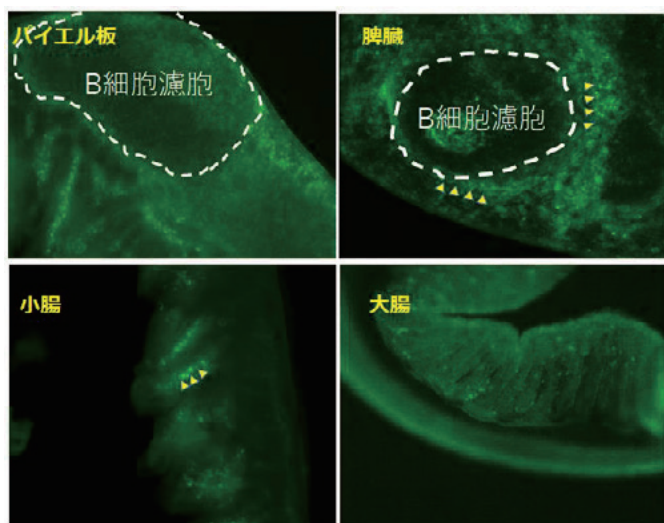


図3. 樹状細胞の動態
CD11c-Cre/YC3.60マウスの各種組織でのYC3.60発現細胞(樹状細胞)

観察された IgA 産生細胞はクラススイッチした直後のものであると考えられる。パイエル板近傍の粘膜固有層では柔毛内でも数多くの IgA 産生細胞が検出されている。大腸では IgA 産生細胞は多数見られるが、これまでの報告のとおり、小腸の方が多くみられている。一方、樹状細胞を可視化するために、CD11c の発現を可視化した CD11c-Cre/YC3.60 マウス⁹⁾のパイエル板では SED 近傍に多く見られた(図3)。小腸の粘膜固有層に多数存在していることが確認された。

IgA-Cre/YC3.60 マウスの骨髄細胞を調べると、CD138 陽性の IgA 産生細胞が存在している(図4)。また、この細胞は CD93 陽性で、長寿命形質細胞であることを強く示唆している。このことは、IgA クラスの抗体でも、長寿命細胞による恒常的な産生が可能であると考えられ、長寿命形質細胞が誘導できれば、長期間の免疫寛容の誘導も可能ではないかと推測される。

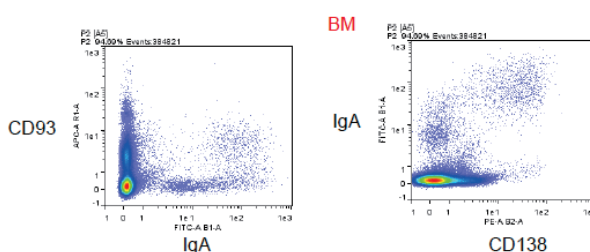


図4. 骨髄のIgA産生細胞

IgA-Cre/YC3.60マウスの骨髄細胞を形質細胞のマーカである CD138 と長寿命形質細胞のマーカである CD93 で染色した。IgA 産生細胞は YC3.60 (黄色蛍光タンパク質) の発現を指標とした。

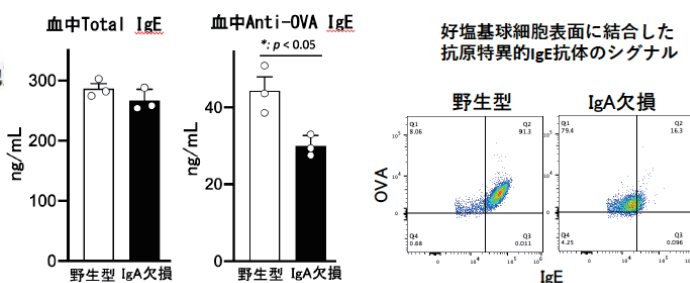


図5. 皮膚感作I型アレルギーモデルにおける、IgA欠損マウスの感作抗原特異的IgE産生の低下

IgA 欠損マウスにおける皮膚感作I型アレルギーモデルにおける IgE 産生の解析

C57BL/6系野生型マウスとIgA欠損マウスに、腹部皮膚をテープストリッピング後、OVAを週に1回塗布感作を、1回/週×3回実施して3日後、および1回/週×4回実施して3日後に、血中IgEを測定した。その結果、IgA欠損マウス血中の抗原特異的IgE濃度は野生型マウスよりも低かった。また、生体内のIgEが、細胞表面に発現する高親和性IgE受容体FcεR1に結合して、IgE+細胞として検出される好塩基球(CD45^{dull}で同定)のIgEシグナルおよびOVAシグナルは、IgA欠損マウスの方が低かった(図5)。

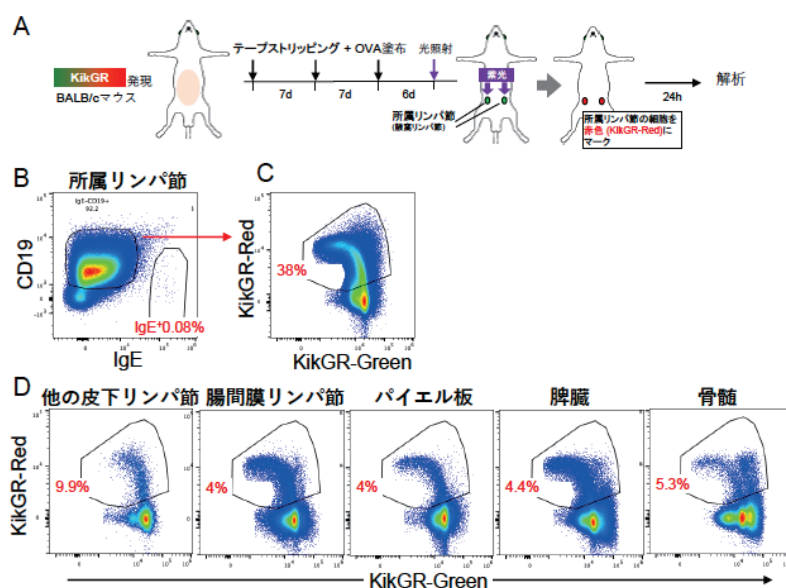


図6. 皮膚感作 I 型アレルギーモデルを用いた所属リンパ節から骨髄への細胞移動の検出

A) 実験スキーム。B) 所属リンパ節のT細胞除去画分のCD19, IgEのフローサイトメトリープロット。C, D) 所属リンパ節を照射して24時間後の各組織のCD19⁺IgE⁺細胞のKikGRシグナルのフローサイトメトリープロット。

しかし、IgA 欠損マウスでも皮膚感作回数を増やすと FcεR1 発現細胞の IgE および OVA シグナルは増加することから、IgA 欠損マウスも抗原の感作回数や強さに依存して抗原特異的 IgE 産生も増加すると考えられた。IgA 欠損マウスへの OVA/alum 感作では野生型に比べ IgE 産生が増強したのに対し、皮膚感作では IgE 産生が低下していた理由として、OVA/alum のような強い感作条件では IgE 産生細胞が容易に誘導された後、IgA 欠損によって IgE から IgA へのクラススイッチが出来ないことにより IgE 産生増強が認められた。それに対して、より生理的な皮膚感作による IgE 誘導条件下では、IgA 欠損によって腸内環境のディスバイオーシスにより、抗原特異的な IgE 産生誘導自体が抑制された可能性を考えている。

皮膚感作 I 型アレルギーモデルを用いた IgE 陽性細胞の生体内動態解析

KikGR 発現 BALB/c マウス⁴⁾の腹部皮膚をテープストリッピング後、OVA を週に 1 回塗布感作を 1 回/週 × 4 回実施して 6 日後に、所属リンパ節である鼠径リンパ節を照射して細胞を赤色(KikGR-Red)にマークした。そして、24 時間後に皮膚所属リンパ節、脾臓、骨髄、そして、腸間膜リンパ節の細胞を分離してフローサイトメトリーで解析した(図 6A)。当検討では、B220 の代わりに CD19 を使用した。

最初に、所属リンパ節から他の臓器への免疫細胞の移行について確認した。コントロールとして IgE-B220⁺B 細胞を例にみても、照射した所属リンパ節では、38%の細胞が KikGR-Red であり、62%の細胞が KikGR-Green 細胞であった(図 6C)。照射時には所属リンパ節の 100%の細

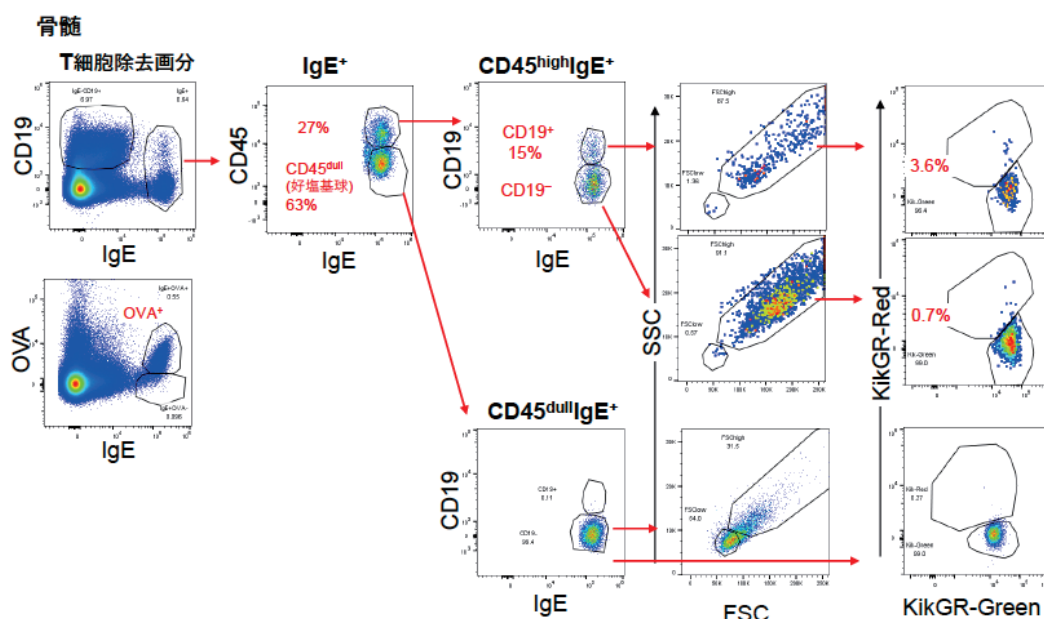


図7. 皮膚感作I型アレルギーモデルを用いた所属リンパ節から骨髄へのIgE⁺細胞移動
所属リンパ節を照射して24時間後の骨髄細胞のフローサイトメトリープロット。

胞を KikGR-Red にマークしているので、この結果は 38%の細胞は照射時から所属リンパ節に留まっており、62%の細胞は照射後 24 時間に入れ替わったことを示している。そして、所属リンパ節から移出した細胞は他の臓器に移行し、各臓器の IgE-B220⁺B 細胞画分で KikGR-Red が、皮下リンパ節では 9.9%、腸間膜リンパ節、およびパイエル板では 4%、脾臓では 4.4%、骨髄では 5.3%検出された(図 6D)。これらの結果は照射した所属リンパ節から他の検出した臓器への細胞移動をきちんと検出出来ていることを示している。

次に骨髄細胞の結果を用い、IgE⁺細胞についてフローサイトメトリーの解析ゲートを設定した(図 7)。死細胞・T細胞除去画分を、IgE と CD19 で展開すると、IgE⁺細胞が分画され CD19⁻と CD19⁺細胞が認められた(図 7左)。また同じ細胞を IgE と OVA で展開するとほとんどの IgE⁺細胞が OVA⁺であることから、感作抗原特異的であ

ることがわかった。IgE⁺細胞をゲートして、CD45^{high} と CD45^{dull} に分離した。このうち CD45^{dull} 細胞は前述の好塩基球であり、ネガティブコントロールとして以下でも比較対照として用いた。CD45^{high} 細胞を、CD19⁺と CD19⁻に分けた。これらの細胞を FSC と SSC で展開してみると、ほぼ全ての細胞が FSChigh でナイーブ B 細胞等に比べて大きな細胞であり(図 3 中)、これらの細胞は胚中心で増殖したためサイズが大きくなっていると考えている。これらの結果をもとに、IgE⁺CD45^{high}CD19⁺細胞を IgE⁺産生細胞にコミット直後の「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」、IgE⁺CD45^{high}CD19⁻細胞を「IgE⁺形質芽細胞」として、それぞれ検出した。

所属リンパ節では IgE⁺細胞がわずかに検出され(図 6B)、CD19⁺ および CD19⁻細胞が約半分ずつ含まれたが、いずれも FSChigh のサイズの大きい細胞が認められた(結果は示さず)。この結果から、

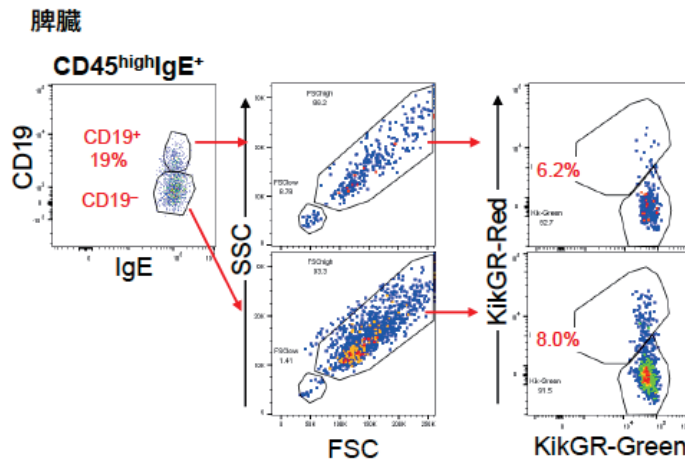


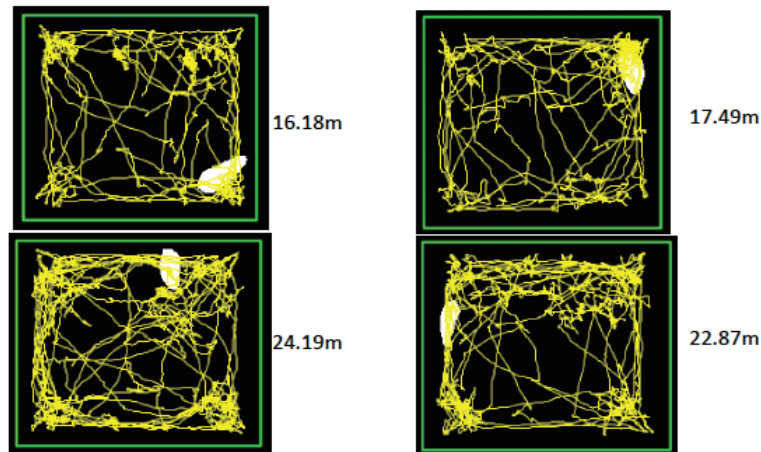
図8. 皮膚感作I型アレルギーモデルを用いた所属リンパ節から脾臓へのIgE⁺細胞移動
所属リンパ節を光照射して24時間後の脾臓細胞のフローサイトメトリープロット。

IgE⁺産生細胞にコミット直後の「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」あるいは「IgE⁺形質芽細胞」は所属リンパ節で生成後直ぐに所属リンパ節を移出すると考えられた。また、他の皮下リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル版ではIgE産生細胞はわずかに検出されたのみで、赤色にマークされたIgE⁺細胞も検出されなかったため、これらの臓器はIgE産生細胞の維持への関与は少ないと考えられた(結果は示さず)。そこで次に、骨髄のIgE⁺細胞をみてみると、前述の様にIgE⁺産生細胞にコミット直後の「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」あるいは「IgE⁺形質芽細胞」が検出され、それぞれ、3.6%と0.7%のKikGR-Red細胞が検出された(図7右)。一方、脾臓ではIgE⁺プラズマ前駆細胞にコミット直後の細胞では6.2%、IgE⁺プラズマ細胞では8.3%、KikGR-Red細胞が検出された(図8)。脾臓のIgE⁺CD45^{high}CD19⁻分画には、IgE陽性のマスト細胞(細胞表面にFcεR1を発現し好塩基球同様IgE⁺細胞として検出される。c-kithigh細胞として同定)が10%程度含まれるが、所属リンパ節においてIgE陽性のマスト細胞は検出出来なかった(別の実験で確認)ことから、骨髄および脾

臓で検出されたIgE⁺CD45^{high}CD19⁻分画のKikGR-Red細胞は、所属リンパ節から移行した「IgE⁺形質芽細胞」であると考えている。

脾臓あるいは骨髄で、IgE⁺産生細胞にコミット直後の「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」あるいは「IgE⁺形質芽細胞」の両方でKikGR-Red細胞が検出された。この結果から、両細胞が所属リンパ節から移動している可能性、あるいは、CD19⁺IgE⁺細胞が脾臓あるいは骨髄に移行後、CD19-IgE⁺プラズマブラスト細胞に分化した可能性が考えられるが、我々は、所属リンパ節でCD19-IgE⁺とCD19⁺IgE⁺細胞の両方(いずれもFSC^{high})が数は少ないながらも検出されることから、前者と後者の両方の経路が存在する可能性を考えている。

骨髄および脾臓での「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」のKikGR-Red細胞の割合は、3.6% vs. 6.2%と大きく変わらないのに対し、「IgE⁺形質芽細胞」画分のそれは、0.7% vs. 8.3%と大きく異なる。一般的にある細胞画分の細胞数が大きく変化しない場合、移入してきたKikGR-Red細胞の割合は入れ替わり速度に比例する。従って、脾臓の「IgE⁺形質芽細胞」の入れ替わり速度は、骨髄のそれよ



	Entries times	Central Zone time (分)
No.50 2M	9	0:25
No.50 3M	8	0:15
No.50 4M	12	0:24
No.50 5M	8	0:29

図9. IgA/IL-22欠損マウスのオープンフィールドテスト
 16週令のIgA/IL-22欠損マウス（4匹）を10分間の観察し、移動軌跡および総移動距離（上）および中央へのエントリー数とそこでの総時間を測定した。

りも 10 倍程度早いことが想定される。この結果は、胚中心でクラススイッチした IgE 産生細胞は脾臓および骨髄に移行し、脾臓では short-lived 形質細胞として、骨髄では long-lived 形質細胞として維持されるという知見と一致する。

前年度の検討で、細胞内 IgE 陽性細胞のうちの 99%が細胞外陽性であり、細胞外 IgE 陰性細胞は細胞内 IgE 陽性細胞の 1%程度しか検出されなかったことを考えると、今回の結果は、ほぼ IgE 産生細胞の生体内動態を検出出来ている可能性が高いと考えている。

以上の様に、我々は、所属リンパ節から脾臓、骨髄への IgE+細胞移動の詳細を明らかにした。これらの知見は、食物アレルギーを含む I 型アレルギー発症要因である抗原特異的 IgE が持続的に産生されるメカニズムの解明に繋がる。

腸管バリア機能を欠くマウスにおける脳および行動学解析

IgA 欠損マウスでは不安行動が亢進していたので、マウスの脳の調べたところ、マイクログリアが増加しており、炎症性サイトカイン IL-1 の産生の亢進が見られた。このことは脳でも、炎症が亢進していることが明らかとなった。IgA がいないことにより、生体内での各所に炎症があり、それがアレルギーのみならず、他の疾患にも影響していると考えられる。さらに、IgA/IL-22 の 2 重欠損マウスについてオープンフィールドテストを行った。正常マウスに比べ IgA 欠損マウスでは不安様行動が増加しており、腸管バリア機能に重要な IL-22 を欠くことでさらに症状が悪化すると予測したが、16 週令の IgA/IL-22 の 2 重欠損マウスでは IgA 欠損マウスとの差異は見られなかった（図 9 を参照）。IL-22 欠損は腸炎のリス

ク因子であるが、16週令のIgA欠損マウスでは顕著な病態を示すほどの影響がないことが示唆された。老齡マウスやIgA欠損マウスより病態の悪いマウスモデルを用いれば、IL-22の欠損の影響がみられるのではないかと考えられる。

今後の研究活動について

YC3.60 マウスを使うと細胞の動態のみならず活性化もモニターできる¹⁾。IgA産生細胞を可視化し、小腸パイエル板での細胞の動態が明らかになってきたので、この細胞の動態や活性化を骨髄での長寿命形質細胞も同定できるようになったので、食物アレルギーや、経口免疫寛容が起きている状態で、生体イメージングによりIgAの動態および活性化を可視化することで、その機序の詳細の解明が可能であると考えられる。また、IgAクラスの長寿命形質細胞が十分検出できるので、OVAなどの抗原特異的な細胞について、動態を明らかにし、食物アレルギーを回避するメカニズムについて調べる予定である。

IgE⁺細胞の生体内動態解析については、今後、IgE産生細胞を確実に検出出来る細胞内IgE染色を当研究で確立したKikGR発現BALB/cマウスを用いた皮膚感作I型アレルギーモデルによる細胞動態解析に組み合わせることで、「IgE⁺形質細胞」(B220⁻細胞内IgE⁺細胞外IgE⁻)も含め、局在と生体内移行についてさらに詳細に明らかにできると考えている。また、従来のIgE⁺形質芽細胞あるいは形質細胞の研究は、強い抗原感作や寄生虫感染などで大量に誘導されたIgE産生細胞を脾臓や骨髄で検出する解析がほとんどで

ある。しかし、前述の様にIgE産生を誘導する日常的な抗原感作は皮膚を介しているが、当研究でも確立した皮膚感作マウスモデルではIgE⁺細胞は誘導されるもその数が少なく、さらにBALB/cマウスでの解析が望ましいという状況のため研究が進んでいない。さらに、皮膚感作後のどのタイミング(感作後の日数など)でIgE産生細胞が所属リンパ節で誘導され脾臓、骨髄に移動していくのかの詳細も不明である。しかし、これらの情報は、長期に抗原特異的IgEが産生されるメカニズムの解明に繋がり重要である。当研究で確立したKikGR発現BALB/cマウスを用いた皮膚感作I型アレルギーモデルを用いる事で、抗原の皮膚感作によって誘導されるIgE産生細胞の時空間的な生体内動態を明らかにしていけると考えている。

また、IgM⁺B細胞からのクラススイッチでは、low affinity IgE産生形質細胞が誘導されるのに対し、IgG1⁺B細胞からのsequentialクラススイッチでは、high affinity IgE産生形質細胞が誘導されると考えられている。当研究で検出したIgE⁺細胞は、high affinity IgE産生形質細胞であると考えている。そこで現在、当研究で確立したKikGR発現BALB/cマウスを用いた皮膚感作I型アレルギーモデルの所属リンパ節について、high affinity IgE産生細胞の供給源となる抗原特異的IgG1⁺B細胞についてmemory Bと胚中心B細胞も区別して検出した解析を進めている。これら所属リンパ節における抗原特異的IgG1⁺B細胞の生成と維持と、抗原特異的IgE⁺細胞の脾臓、骨髄への移動を組み合わせて明らかにすること

で、特に皮膚感作における IgE 産生誘導過程を明らかにできると考えている。

食物アレルギーと他の疾患の関連についても、行動学解析を中心に、病態連関の全容が明らかにできるような総合的な解析方法を見出し、効率的な疾病の発見、早期治療法の確立に貢献できるような研究を目指す予定である。

参考文献

- 1) 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
- 2) Gao P, Adachi T, Okai S, Morita N, Kitamura D, Shinkura R. Integrin CD11b provides a new marker of pre-germinal center IgA⁺ B cells in murine Peyer's patches. *Int Immunol* 2022. 34: 249-62
- 3) 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* 2022. 71: 487-96
- 4) 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
- 5) Hand TW, Reboldi A. Production and Function of Immunoglobulin A. *Annu Rev Immunol* 2021. 39: 695-718
- 6) Breedveld A, van Egmond M. IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Immunol* 2019. 10: 553
- 7) Fujii K, Koshidaka Y, Adachi M, Takao K. Effects of chronic fentanyl administration on behavioral characteristics of mice. *Neuropsychopharmacol Rep* 2019. 39: 17-35
- 8) Bunker JJ, Flynn TM, Koval JC, Shaw DG, Meisel M, McDonald BD, Ishizuka IE, Dent AL, Wilson PC, Jabri B, Antonopoulos DA, Bendelac A. Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* 2015. 43: 541-53
- 9) Adachi T, Yoshikawa S, Tezuka H, Tsuji NM, Ohteki T, Karasuyama H, Kumazawa T. Propolis induces Ca(2+) signaling in immune cells. *Biosci Microbiota Food Health* 2019. 38: 141-9

研究課題名	鶏卵アレルギー児に対する経口免疫寛容を誘導するための安全性の高い摂取法の開発・ランダム化比較試験		
フリガナ	オオヤ ユキヒロ		
代表者名	大矢 幸弘		
所属機関 (機関名) (役職名)	国立成育医療研究センター アレルギーセンター・センター長		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	井上永介 (イノウエ エイスケ)	昭和大学 統括研究推進センター 教授	統計学的評価
	菊地佳代子 (キクチ カヨコ)	国立成育医療研究センター 臨床研究センタープロジェクト マネジメント ユニット長	研究の立案に係る助言
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

申請者らは、本研究に先立って、カルテ調査から食物経口負荷試験で症状誘発閾値を確認後、閾値に対し微量の食物の摂取を開始し少量で維持する方法（微量開始法）で、重篤な有害事象なく耐性を獲得できる可能性を見いだした。これらの知見をもとに、将来微量開始低用量維持による経口免疫療法の有効性と安全性を第三相試験で検証するために、試験治療法（微量開始法）が対照療法：最小限の除去（標準的最低除去療法）に対して安全であるか、また、有効であるかを探索するために第二相二重盲検ランダム化比較試験を実施した。

2021年4月より本試験への参加者登録が開始され20名が参加登録した。開始から11か月で本試験は試験食の安全な供給体制への懸念が生じたためやむを得ず中止となったが、観察期間中に参加者には本試験と関連した重篤な有害事象の発生はなく、本試験は安全に実施することができた。

試験開始から24週を終了した参加者の一部においては、開始時と24週後に計2回の経口鶏卵負荷試験を実施した。これからデータ固定および生物統計家による統計解析を実施する。二重盲検ランダム化比較試験というエビデンスレベルの高い手法を用いた研究が実施できたことには大変意義があると考えられ、今後の食物アレルギー治療に参考となるデータが得られることが期待できる。

研究目的

本研究の目的は、小児期の食物アレルギーを寛解に導くための、経口免疫療法における安全な食物摂取の導入、実施方法をランダム化比較試験にて検討することであった。

小児期の食物アレルギー診療においては、経口免疫寛容のメカニズムに基づいた観点から原因食物を導入、開始後、計画的に摂取し耐性獲得を誘導することが根本的治療法として期待されている¹⁾²⁾。しかし、重症食物アレルギー患者に対する安全な食物摂取の導入、開始法は確率されていない。世界的に開発が進められてきた経口免疫療法は症状誘発閾値量を越えた量を目標量とし、日常の摂取量を増量するため、増量時や体調不良時等の閾値低下時に重篤な副作用が誘発される頻度が高く、致死症例も報告されている。現在世界的に安全な摂取法の開発が急務とされている^{3,4)}。

申請者らはこれまでに、食物経口負荷試験で症状誘発閾値を確認後、閾値に対し微量の食物の摂取を開始し少量で維持する方法(微量開始法)で、重篤な副作用なく耐性を獲得できる可能性をPilot研究で見いだした。そこで、本研究においてさらに安全な食物摂取の導入、開始法を確立するため、二重盲検ランダム化比較試験を実施した。この試験の目的は、試験治療法(微量開始法)の対照療法:最小限の除去(標準的最小除去療法)に対する安全性、有効性を検討することとした。試験治療法の安全性、有効性が示されれば、重症鶏卵アレルギー患者を含めた鶏卵アレルギー患者に対する安全性の高い経口免疫寛容を誘導する

ための標準治療法を実現することができ、研究の成果がガイドライン等を通じて普及できれば、鶏卵アレルギー患者の改善に寄与することに意義がある。

研究計画及び研究手法

上に述べた微量開始法の安全性と有効性を検討するため、我々は食物経口負荷試験の結果に基づき微量から鶏卵摂取を開始する方法(微量開始法)を試験治療法とし、累積耐量から鶏卵摂取を開始する方法(標準的最小除去療法)を対照治療法とする二重盲検ランダム化並行群間比較試験を計画した(図1)。

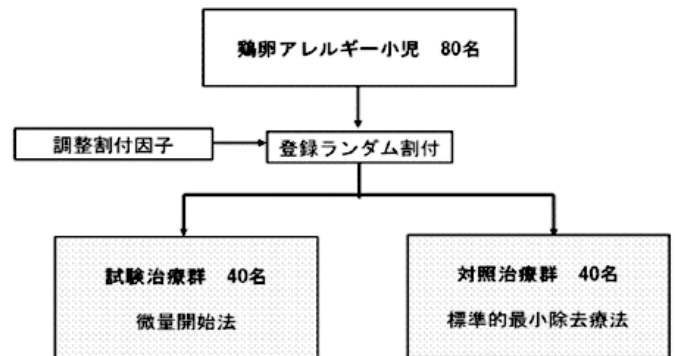


図1 研究の概要

本試験では、

- (1)登録日から24週前までの血液検査で卵白特異的IgE抗体価 $\geq 0.35\text{kUA/L}$ であり、計10g以下の鶏卵経口負荷試験でIgE依存性即時型鶏卵アレルギーと診断された者
- (2)鶏卵経口負荷試験で累積耐量(注2)の設定ができた者
- (3)同意取得時において年齢が1歳以上~18歳以下の者

(4)本試験の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、代諾者の自由意思による文書同意（参加者が16歳以上の場合は、参加者本人からも文書による同意を取得）が得られた者を対象者とし、二重盲検化にて試験治療として試験食を摂取することとした。両群とも凍結クックドエッグパウダーを使用した蒸しパンを試験食とした。微量開始法（試験治療群）では、累積耐量の1/50量の鶏卵（全卵）を含む試験食を開始し、段階的に累積耐量と同量の鶏卵（全卵）を含む試験食まで増量した上で、計48週間摂取することとした。標準的最小除去療法（対照治療群）では累積耐量と同量の鶏卵（全卵）を含む試験食を開始し、計48週間摂取することとした（図2）。

主要評価項目は試験食を開始後、初回のIgE依存性即時型鶏卵アレルギー反応出現までの期間とした。

本試験は、目標参加者数を80症例（試験治療群：微量開始法40例、対照治療群：標準的最小除去療法40例）とした。当初の登録期間は2021年10月ごろまでを見込み、観察期間は48週とした。試験全体の実施期間は試験開始から約3年を予定していた。

（注2） IgE依存性即時型アレルギー症状が出現した反应用量（Reactive dose）を除く累積量（Cumulative tolerated dose）を累積耐量とした。

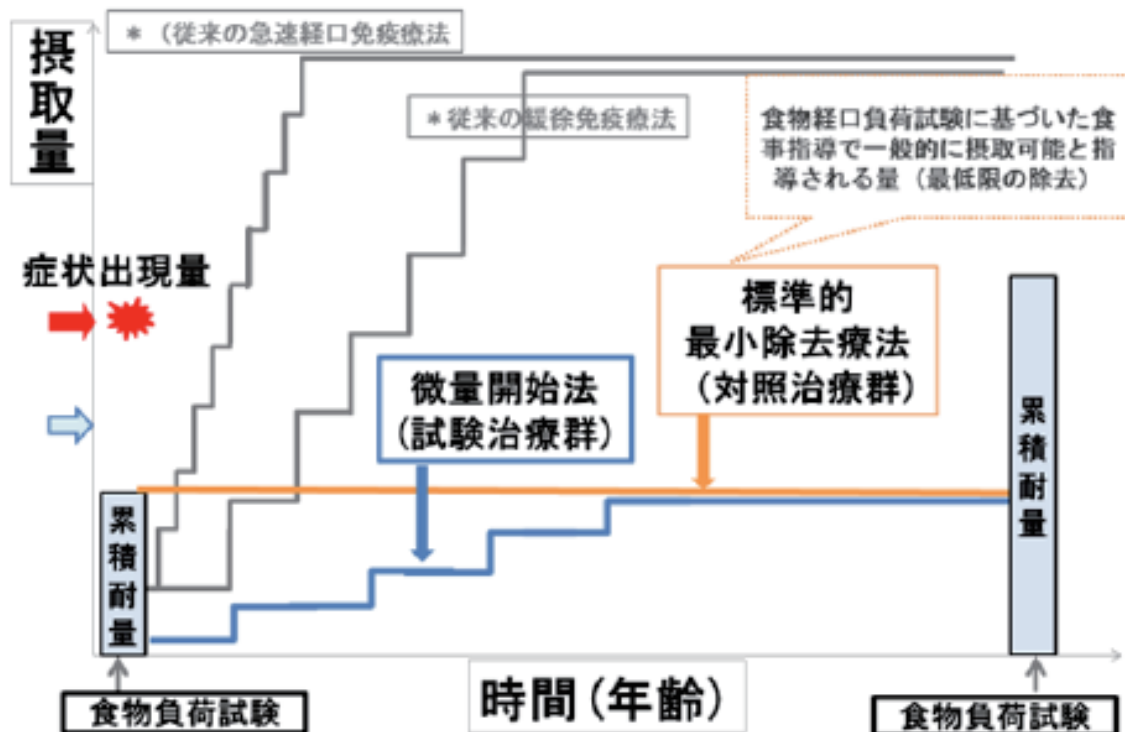


図2 本研究における試験治療と対照治療

結果と考察

2021年4月より参加者の仮登録を開始した。44名が順次仮登録となり、うち鶏卵経口負荷試験で累積耐量の設定ができた20名が本登録となった。

しかし、試験開始後、試験食の安全かつ正確な供給体制に懸念が示され、申請者らは試験食製造者とともに製造工程や配送工程の確認作業を厳重にするなど対応策を検討した。参加者にこれらの問題と関連した有害事象はなかったが、これ以上参加者の登録が進んだ場合、安全に試験食の供給を継続することが困難である可能性があるため、参加者の安全性を最優先とし、本研究は2022年3月で試験全体を中止した。

本研究の結果については、現在データ確認中であり、これから解析および論文作成を開始するところである。最初の参加者が試験治療を開始してからほぼ1年が経過していたため、数名の参加者はほぼ所定の研究期間を終了していた。試験期間中、参加者に本試験と関連した重篤な有害事象がなく安全に実施することができていたことは、試験治療および対照治療の安全性を示していると考えられた。

現在、データ固定および解析が完了していないため最終結果を示すことができないが、二重盲検ランダム化比較試験というエビデンスレベルの高い研究が実施できたことには大変意義があると考えられ、今後の食物アレルギー治療に参考となるデータが得られることが期待できる。

今後の研究活動について

本研究で得られた結果から、よりよい鶏卵経口免疫療法の実施および普及に貢献する。参加者からは、経口免疫療法においては治療食を準備することがときに家族の負担になることがあり、安全かつ有効に治療を行える経口免疫療法用の食品の供給ができることが期待された。食物アレルギーの重症度は個人差があり、その病態に合わせた個別の量や食形態を検討する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol.* 2005 Jan;62(1):112-6.
- 2) Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, Yamamoto-Hanada K, Narita M, Kondo M, Saito M, Kishino A, Takimoto T, Inoue E, Tang J, Kido H, Wong GW, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y; PETIT Study Team. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2017 Jan 21;389(10066):276-286.
- 3) Miyagi Y, Yamamoto-Hanada K, Ogita H, Kiguchi T, Inuzuka Y, Toyokuni K, Nishimura K, Irahara M, Ishikawa F, Sato M, Saito-Abe M, Miyaji Y, Kabashima S, Fukui T, Nomura I, Ohya Y. Avoidance of hen's egg based on IgE levels should be avoided for children with hen's egg allergy. *Front Pediatr.* 2021 Jan 15;8:583224.

- 4) Arasi S, Castagnoli R, Pajno GB. Oral immunotherapy in pediatrics. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020 Feb;31 Suppl 24:51-53.

研究課題名	Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA)法を用いた食物アレルギーの新規検査法の開発		
フリガナ	マツオ ヒロアキ		
代表者名	松尾 裕彰		
所属機関 (機関名) (役職名)	国立大学法人 広島大学 病院薬剤部 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	千貫 祐子 (チヌキ ユウコ)	島根大学医学部 皮膚科学講座 准教授	新規検査法の臨床的検討
	高萩 俊輔 (タカハギ シュンスケ)	広島大学大学院医系科学 研究科皮膚科学 講師	新規検査法の臨床的検討
本助成金による発表論文, 学会発表	(発表論文) Koga Y, Yokooji T, Ogino R, Taogoshi T, Takahagi S, Ishii K, Chinuki Y, Morita E, Hide M, Matsuo H. A novel detection method for cross-linking of IgE-receptors by autoantibodies in chronic spontaneous urticaria. Allergol Int. 2022;71(1):94-102 (学会発表) 古賀祐基, 横大路智治, 荻野龍平, 埜越崇範, 高萩俊輔, 石井香, 千貫祐子, 森田栄伸, 秀道広, 松尾裕彰. 高親和性 IgE 受容体の架橋検出による自己免疫性蕁麻疹の新規検査法の有用性. 第 23 回ヒスタミン学会. 京都. 2022 年 1 月		

研究結果要約

現在、食物アレルギーの原因検索にはアレルゲン特異 IgE 抗体検査が広く臨床使用されているが、陽性と判定されても実際にはアレルギー症状をきたさない場合が多い。これは、症状惹起に必要な高親和性 IgE 受容体 (FcεRI 受容体) を架橋できないアレルゲン特異 IgE 抗体も検出されるためである。したがって、精度の高い食物アレルギーの検査法が求められている。本共同研究では、Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA) 法を利用して、FcεRI 受容体の架橋能を有するアレルゲンに対する特異 IgE を検出する高精度食物アレルギー検査法の確立を試みた。

FcεRI 受容体 α 鎖を標識した ALPHA ドナービーズとアクセプタービーズに小麦アレルギー患者血清を添加した後、抗ヒト IgE 抗体にて FcεRI α 鎖に結合した IgE 抗体を架橋すると、各ビーズが近接し ALPHA シグナルが得られた。この結果から、ALPHA 法により FcεRI 受容体の架橋が検出できることを明らかにした。さらに、アレルゲンに患者の IgE 抗体を予め結合させたアレルゲン-IgE 複合体を分離した後、FcεRI α 鎖標識ビーズを添加する方法により、アレルゲンによる FcεRI 受容体の架橋を検出できることを示した。今後、既存の検査法との検査精度の比較、および本検査法を利用した低アレルゲン化小麦のアレルゲン性評価を実施する。

研究目的

現在、食物アレルギーの検査として、血清中の食物アレルギー特異 IgE 抗体の測定が広く行われている¹⁾。この方法は、アレルギーを支持体に固相化し、患者血清と反応後にアレルギーに結合した特異 IgE 抗体を酵素標識 2 次抗体を用いて定量する酵素抗体法である。アレルギー症状を惹起するためには、肥満細胞や好塩基球表面でアレルギー特異 IgE 抗体が結合した 2 分子の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI 受容体) が、1 分子のアレルギーを介して架橋される必要がある。現行のアレルギー特異 IgE 抗体検査は、架橋能のないアレルギーに結合する IgE 抗体も検出されるため、偽陽性を生じることがあるなど検査精度は良くない。また、患者末梢血中の好塩基球を利用したヒスタミン遊離試験も臨床使用されているが、採血後の好塩基球の劣化が結果に影響するなどの問題がある。本研究では、Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA) 法を利用して、FcεRI 受容体の架橋を形成できるアレルギー特異 IgE 抗体の検査法を開発すること、お

よび、開発した新規検査法を応用した低アレルギー化小麦のアレルギー性を評価することを目的とした。

目的 1) ALPHA 法を利用した新規アレルギー特異 IgE 抗体検査法の構築

ALPHA 法は、ドナービーズとアクセプタービーズが 200 nm 以内に近接すると、680 nm の励起光照射により 615 nm の発光が認められる、分子間の近接を検出する方法である²⁾。肥満細胞や好塩基球の活性化に必要な FcεRI 受容体のアレルギーによる架橋を、ALPHA 法を用いて試験管内で模倣することによる新規アレルギー特異 IgE 抗体検査法を確立する (図 1)。本研究で開発する新規検査法では、FcεRI 受容体架橋能を持つ抗原に対する IgE 抗体のみを検出することが出来るため、現行法で見られる偽陽性が除外され、検査精度の飛躍的な向上が期待される。

目的 2) 低アレルギー化小麦製品の個々の患者に対するアレルギー性の評価

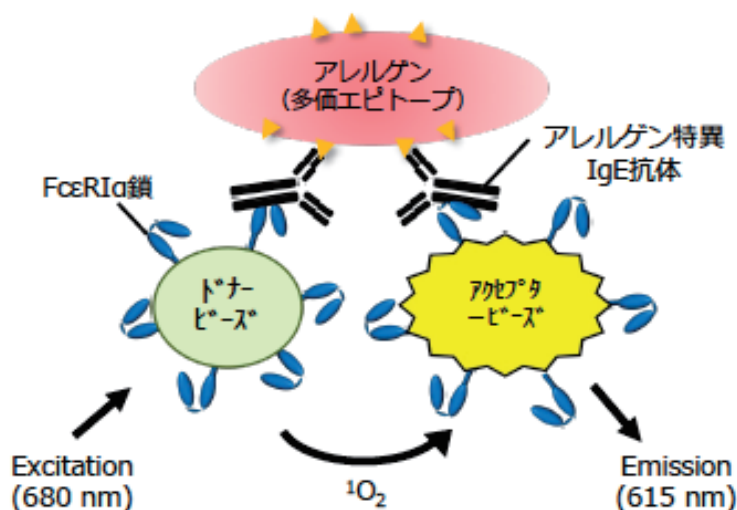


図 1. ALPHA法によるIgE受容体架橋能を有するアレルギー特異IgEの検出

重篤な症状を引き起こす小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) 患者の主要抗原は、 ω 5-グリアジンや高分子量グルテニンであるが、個々の患者でエピトープとなる部位や個数が異なることが報告されている³⁾。また、他の小麦タンパク質を原因とする WDEIA 患者も存在する。したがって、様々な技術を利用して作製された低アレルゲン化小麦製品が、患者にとって安全に摂取できるかどうかは個別に検査する必要がある。本研究で開発する ALPHA 法による検査を応用し、小麦アレルギー患者の血清を用いて、種々の低アレルゲン化小麦製品のアレルゲン性を評価する方法を確立する。これにより、患者別に安全な低アレルゲン化小麦製品を提案できるようになる。

研究計画及び研究手法

研究計画及び手法の概要

共同研究機関である島根大学医学部皮膚科および広島大学大学院医系科学研究科皮膚科学において、アレルゲン特異 IgE 抗体検査、ヒスタミン遊離試験、好塩基球活性化試験あるいは食物負荷試験により確定診断された食物アレルギー患者血清を収集する。患者血清を利用して、広島大学病院薬剤部で FcεRI α 鎖を標識した ALPHA ドナービーズおよびアクセプタービーズを用いた FcεRI 受容体架橋を検出する新しい食物アレルギー検査法を構築する。構築した新規検査法の検査感度や特異度を解析することにより既存の検査法に対する有益性を明らかにする。

さらに、小麦アレルギー患者血清を利用して

ALPHA 法により低アレルゲン化小麦製品のアレルゲン性を評価する。低アレルゲン化小麦製品として、我々の研究グループが開発した低アレルゲン小麦⁴⁾ (1BS-18 ホクシンおよび 1BS-18 ミナミノカオリ)、血清として ω 5-グリアジンが原因抗原の小麦アレルギー患者血清を用いてモデル実験を実施する。抗 ω 5-グリアジン IgE 抗体を介した受容体の架橋強度を ALPHA ビーズ発光シグナルとして検出し、低アレルゲン化小麦のアレルゲン性の低下率を評価する。

これら研究計画の内、2021 年度は ALPHA ビーズを利用してアレルゲンタンパク質による FcεRI 受容体 α 鎖の架橋を検出できることを明らかにし、低アレルゲン化小麦製品の評価に関しては、 ω 5-グリアジン欠損低アレルゲン小麦粉を取得した。

広島大学病院薬剤部

ALPHA 法を用いて、アレルゲンによる患者血清 IgE 抗体の架橋に伴う FcεRI 受容体の架橋反応を検出できるか否かを評価するために、予備実験として、アレルゲンの代わりに抗ヒト IgE 抗体により患者血清 IgE を介して FcεRI 受容体を架橋した時に、ALPHA シグナルが検出可能か否かを調べた (図 2A)。リコンビナントヒト FcεRI α 鎖を ALPHA ドナービーズおよびアクセプタービーズ (PerkinElmer 社) に標識し、両ビーズと血清を AlphaPlate™ (PerkinElmer 社) 内で混合した。その後、抗ヒト IgE 抗体 (終濃度 1 μg/mL, Dako 社) を添加し、6 時間反応後にプレートリーダー (Enspire™, PerkinElmer 社)

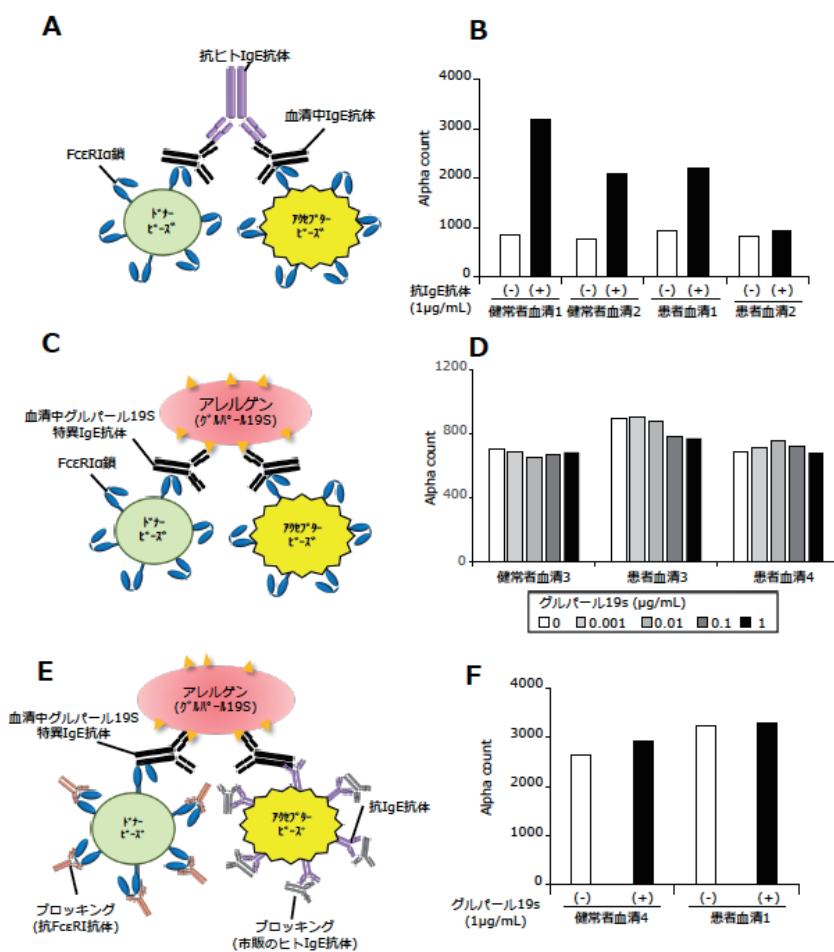


図2. ALPHA法によるIgE受容体架橋の検出結果

- A: 抗IgE抗体によるFcεRI受容体の架橋
- B: 抗IgE抗体添加6時間後のカウント
- C: グルパール19SによるFcεRI受容体の架橋 (FcεRIα鎖標識アクセプタービーズ)
- D: グルパール19S添加6時間後のカウント
- E: グルパール19SによるFcεRI受容体の架橋 (抗IgE抗体標識アクセプタービーズ)
- F: グルパール19S添加6時間後のカウント

を用いて 680 nm の励起光を照射し 615 nm の発光を測定した。混合するビーズの比率、血清濃度、反応時間等の条件検討を行った。

次に、実際のアレルゲンと患者血清を用いて FcεRI の架橋反応が検出可能か否かを評価した (図 2C)。本研究の最終目標は、ALPHA 法を用いた小麦アレルギー患者における低アレルゲン化小麦食品の適応性の評価であること、また、血清検体数が多いことから加水分解コムギ (グルパール 19S) 含有石鹼の使用により WDEIA を発症

した患者血清を用いた。AlphaPlate™ ウェル内で FcεRI α 鎖標識 ALPHA ドナービーズ、アクセプタービーズおよび患者血清を混合した後、グルパール 19S (終濃度 0.001-1 µg/mL) を添加した。室温でインキュベーションした後、発光をプレートリーダーにて測定した。しかし、この方法では架橋の検出が困難であったため、アクセプタービーズを抗ヒト IgE 抗体標識へ変更、さらに、バックグラウンドのシグナルを低下させるためにドナービーズに標識されている FcεRI α 鎖の

ブロッキング剤として抗ヒト FcεRI α 抗体 (CRA2, Bio Academia 社)、アクセプタービーズ上の抗ヒト IgE 抗体のブロッキング剤として精製ヒト IgE 抗体を使用した手順についても評価した (図 2E)。

FcεRI α 鎖標識ドナービーズや抗ヒト IgE 抗体標識アクセプタービーズを用いた方法で検討を行ったが、架橋の検出には至らなかった。そのためアレルギー-IgE 抗体複合体を濃縮するステップを導入した方法による検出を試みた。アレルギー-IgE 抗体複合体溶液に、FcεRI α 鎖標識ドナービーズおよびアクセプタービーズを添加し、インキュベーション後にプレートリーダーにて測定した。

島根大学皮膚科

島根大学医学部附属病院皮膚科を受診し、臨床症状、アレルギー特異 IgE 抗体検査、食物負荷試験、好塩基球活性化試験等により確定診断された食物アレルギー患者血清を収集した。患者の血液を採取し、現病歴から推測されたアレルギーを添加した後、Allergenicity キット (Beckman Coulter 社) を用いて、フローサイトメーターで好塩基球をゲーティングし、好塩基球表面に特異的に発現している CD203c マーカーの発現上昇を評価することにより、原因アレルギーを確定した。

また、我々の研究グループがこれまでの研究で開発した ω 5-グリアジンを欠失した低アレルギー小麦 1BS-18 ホクシンおよび 1BS-18 ミナミノカオリのアレルギー性を患者血清を用いて評価するために、島根県の中山間地域で栽培し収穫さ

れた種苗用の各低アレルギー小麦を購入し、製粉機による挽砕後、篩をかけて全粒粉を調製した。

広島大学皮膚科

広島大学病院皮膚科を受診し、臨床症状、アレルギー特異 IgE 抗体検査、食物負荷試験、ヒスタミン遊離試験等により確定診断された食物アレルギー患者血清を収集した。アレルギーを確定するためのヒスタミン遊離試験は以下の方法で実施した。食物アレルギー患者より血液を採取し、1%メチルセルロース溶液を加えて静置後、好塩基球を含む上清を分離した。好塩基球画分にアレルギーを添加し、遊離したヒスタミンを高速液体クロマトグラフィーを利用して定量した。好塩基球を破壊した溶液のヒスタミンを全量として、5%以上ヒスタミンが遊離した場合をアレルギーに対する反応が陽性であると判定した。

結果と考察

1) 患者血清の収集 (島根大学皮膚科、広島大学皮膚科学)

島根大学および広島大学皮膚科にて、小麦アレルギー患者 41 名の血清を収集した。その内訳は、通常の即時型小麦アレルギー 1 名、加水分解コムギが原因の即時型小麦アレルギー 3 名、従来型小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) 10 名、加水分解コムギが原因の WDEIA 19 名、イネ科花粉症が原因の小麦アレルギー 8 名であった。

通常的小麦アレルギー患者は、小麦製品摂取後 2 時間以内に蕁麻疹等のアレルギー症状が発症す

る。従来型 WDEIA 患者は、 ω 5-グリアジンや高分子量グルテニンが主要原因抗原であり、小麦製品接種後に運動負荷や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の服用によりアレルギー症状が誘発される³⁾。加水分解コムギが原因の WDEIA は、加水分解コムギ (グルパール 19S) 含有石鹼の使用により経皮感作され発症した WDEIA であり、グルパール 19S 特異 IgE 抗体が主に γ -グリアジンに含まれる QPQQPFPQ エピトープに交差反応することにより症状が誘発されると考えられている⁵⁾。イネ科花粉症が原因の小麦アレルギーは、花粉-食物アレルギー症候群 (PFAS) と呼ばれ、イネ科花粉タンパク質により感作され、小麦製品を摂取することによりアレルギー症状が誘発される。その原因抗原として、ペルオキシダーゼ-1 や β -グルコシダーゼが同定されている⁶⁾。

この様に、小麦アレルギーの病型により原因アレルギーが異なっていることから、本研究で構築する新規診断法の検討に利用する患者血清について、原因アレルギーおよび Fc ϵ RI 受容体を架橋できるアレルギーに対する特異 IgE 抗体を保有するか否かを明らかにしておく必要がある。そこで、これらの小麦アレルギー患者の好塩基球上の Fc ϵ RI 受容体に結合した IgE 抗体が、 ω 5-グリアジン、グルパール 19S、あるいは花粉タンパク質により架橋され好塩基球が活性化されることを、好塩基球活性化試験および好塩基球ヒスタミン遊離試験によって確認した。

本年度に 41 名の好塩基球活性化能を有するアレルギー特異 IgE 抗体を有する患者血清を収集できた。既存の特異 IgE 抗体検査との比較を行う

ためには、100 例程度必要であるため、血清の収集は引き続き実施する。

2) ALPHA 法を利用した新規アレルギー特異 IgE 検査法の構築

① 抗ヒト IgE 抗体による Fc ϵ RI 受容体架橋状態の検出 (広島大学病院薬剤部)

はじめに、Fc ϵ RI α 鎖を標識した ALPHA ビーズに血清 IgE 抗体を反応させ、アレルギーの代わりに抗ヒト IgE 抗体により IgE を架橋した時に、ALPHA シグナルが検出可能であることを確認した (図 2A)。リコンビナントヒト Fc ϵ RI α 鎖タンパク質を ALPHA 測定用ドナービーズとアクセプタービーズに標識した。両ビーズと血清をウェル内で混合した後、抗ヒト IgE 抗体を添加することにより Fc ϵ RI α 鎖を架橋し、ALPHA シグナル値を測定した。抗ヒト IgE 抗体を添加した場合の ALPHA シグナル値は健常者および患者のいずれの場合においても、未添加の ALPHA シグナル値より増加した (図 2B)。この結果から、抗ヒト IgE 抗体により受容体が架橋され、ドナーおよびアクセプタービーズが近接していることが分かり、ALPHA 法により架橋状態が検出可能であることが示された。

抗ヒト IgE 抗体による架橋検出の至適条件を調べた結果、混合液のインキュベーション時間は 6 時間、ドナービーズおよびアクセプタービーズの混合比は 1:4、添加血清の終濃度は 5%であることを明らかにした。さらに、発光強度 (ALPHA シグナル値) は、添加した抗ヒト IgE 抗体の濃度依存的に増加したことから、定量的に架橋が検出

できると示唆された。この研究結果の一部は論文報告した⁷⁾。

② アレルゲンによる FcεRI 受容体架橋状態の検出 (広島大学病院薬剤部)

次に、実際のアレルゲンと患者血清を用いて IgE 受容体の架橋状態の検出を試みた (図 2C)。本実験では、患者数が多いグルパール 19S 含有石鹸の使用により WDEIA を発症した患者血清を用いた。ウェル内にヒト FcεRI α 鎖標識 ALPHA ドナービーズおよびアクセプタービーズ、グルパール 19S で好塩基球ヒスタミン遊離活性が認められた患者血清を混合し、グルパール 19S を終濃度 0.001-1 μg/mL になるように添加し、インキュベーションした後に ALPHA シグナルを測定した。その結果、患者および健常者のいずれの場合においても、アレルゲンであるグルパール 19S 濃度の増加に伴う ALPHA シグナル値の上昇は認められなかった (図 2D)。

次に、アクセプタービーズを抗ヒト IgE 抗体で標識したものに變更し、同様の操作によりグルパール 19S による IgE 受容体の架橋の検出を試みた。その結果、グルパール 19S 非添加時のバックグラウンドのシグナル値が高く、また、グルパール 19S 添加による ALPHA シグナル値の上昇は認められなかった。バックグラウンドのシグナル値が高い原因として、患者血清中 IgE 抗体と結合していない抗ヒト IgE 抗体標識アクセプタービーズが、ドナービーズ上の FcεRI α 鎖に結合している患者血清 IgE に直接反応している可能性が考えられた。そこで、アクセプタービーズ上の抗

ヒト IgE 抗体を市販のヒト IgE 抗体でブロッキング、ドナービーズ上の FcεRI α 鎖を抗 FcεRI α 鎖抗体 (CRA2) でブロッキングした後に、グルパール 19S を添加する方法を検討した (図 2E)。しかしながら、バックグラウンドのシグナル値の低下は認められず、また、グルパール 19S 添加による ALPHA シグナルの上昇も認められなかった。ALPHA シグナルが検出できない原因として、血中の抗原特異 IgE 抗体量が少ないこと、血中に多量に存在するアルブミンやグロブリンなどのタンパク質がシグナル値の上昇を阻害すること、抗 FcεRI やヒト IgE 抗体によるブロッキングが不十分で、ビーズ同士の直接的な結合が起きていることなどが推察された。

そこでアレルゲンと IgE 抗体の複合体を分離し、血清の夾雑物質が少ない状態で架橋を形成させる方法でのシグナルの検出を試みた。この方法により、健常者とグルパール 19S 感作小麦アレルギー患者の血清を用いて予備的に解析した結果、患者血清を添加してグルパール 19S-IgE 抗体複合体と両ビーズが結合した場合にのみ、ALPHA カウントの上昇が認められた。この結果から、アレルゲン-IgE 抗体複合体を分離する操作を加えることで ALPHA 法による架橋能を有するアレルゲン特異 IgE を測定できることが示唆された。

今回の研究期間内に、計画していた既存のアレルゲン特異 IgE 抗体検査との検査精度の比較研究は実施できなかった。今後の課題として、至適測定条件の決定、グルパール 19S 以外のアレルゲンの測定系の構築、既存のアレルゲン特異 IgE

検査との精度の比較が挙げられる。

3) 低アレルゲン小麦製品のアレルゲン性評価 (広島大学病院薬剤部、島根大学皮膚科)

低アレルゲン化小麦製品は様々な方法で作成されるため、低下するアレルゲンの種類や低下率は製品によって異なる。また、小麦アレルギー患者は個々に感作されているアレルゲンが異なるため、低アレルゲン化小麦を患者が安全に摂取できるか否かは個別に評価する必要がある。本研究では ALPHA 法による特異 IgE 検出系を利用して、FcεRI 受容体の架橋能の違いによるアレルゲン性の評価を試みる。

評価する低アレルゲン小麦として、我々の研究グループが開発した ω5-グリアジン欠失小麦である 1BS-18 ホクシンおよび 1BS-18 ミナミノカオリを選択した。今回、島根県の中山間地域で種苗用に栽培し収穫された小麦を購入し、製粉機による挽砕後、篩をかけて全粒粉を調製した。ω5-グリアジンが原因抗原である従来型 WDEIA 患者血清を利用して、得られた小麦粉から抽出したタンパク質を抗原として、個々の患者の IgE 受容体架橋能を ALPHA 法にて測定する予定であったが、ALPHA 法の構築に時間を要したため、評価には至らなかった。今後、ALPHA 法による架橋検出方法を確立次第、ω5-グリアジン欠失小麦のアレルゲン性の評価を実施する。

今後の研究活動について

現行のアレルゲン特異 IgE 検査には偽陽性が多いという課題を解決するため、ALPHA 法を利用して FcεRI 受容体を架橋できるアレルゲン特

異 IgE の検出による精度の高い検査法の確立を目指して本助成研究を実施した。その結果、ALPHA 法を利用して食物アレルギー患者血清中の IgE 受容体架橋能を有するアレルゲン特異 IgE 抗体を検出できることを明らかにした。この新しい方法は、I 型アレルギーの原因となる IgE 受容体の架橋をヒトの好塩基球を使用せずに測定できること、侵襲性が少なく血清があれば検査可能であり患者にとって負担が少ないことが特徴である。今後、既存のアレルゲン特異 IgE 検査との診断的有用性を比較し、臨床診断薬として開発したい。

ALPHA 法による検査は血清と食物抽出タンパク質があれば、タンパク質が患者の IgE 受容体を架橋するか否かを簡単に測定することができる。すなわち、本検査結果は食物アレルギーの負荷試験結果の予測や、食物アレルギー患者にとって安全に摂取可能か否かの判断が難しい低アレルゲン化製品の評価に利用できる可能性が高い。特に小麦のように多種のアレルゲンを含む食品の個々の患者に対するアレルゲン性の評価は重要であるため、アレルゲン性の評価研究は今後も継続して実施する。本研究で得られた、食物アレルギー検査や低アレルゲン製品の評価方法に関する成果は、学会・論文発表を行うとともに、臨床診断薬や食品関連企業との連携により実用化を図る。

参考文献

- 1) Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T; Committee for Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy, The Japanese Society of Ped

- iatric Allergy and Clinical Immunology; Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for food allergy 2020. *Allergol Int.* 2020 Jul;69(3):370-386.
- 2) Bielefeld-Sevigny M. AlphaLISA immunoassay platform- the "no-wash" high-throughput alternative to ELISA. *Assay Drug Dev Technol.* 2009 Feb;7(1):90-2.
- 3) Morita E, Matsuo H, Chinuki Y, Takahashi H, Dahlström J, Tanaka A. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis -importance of omega-5 gliadin and HMW-gliutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis-. *Allergol Int.* 2009 Dec;58(4):493-8.
- 4) Yamada Y, Yokooji T, Ninomiya N, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Evaluation of the allergenicity of ω 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Nov 1;20:100702.
- 5) Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, Harada S, Ishii K, Hiragun M, Hide M, Matsuo H. Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int.* 2013 Dec;62(4):435-45.
- 6) Ogino R, Chinuki Y, Yokooji T, Takizawa D, Matsuo H, Morita E. Identification of peroxidase-1 and beta-glucosidase as cross-reactive wheat allergens in grass pollen-related wheat allergy. *Allergol Int.* 2021 Apr;70(2):215-222.
- 7) Koga Y, Yokooji T, Ogino R, Taogoshi T, Takahagi S, Ishii K, Chinuki Y, Morita E, Hide M, Matsuo H. A novel detection method for cross-linking of IgE-receptors by autoantibodies in chronic spontaneous urticaria. *Allergol Int.* 2022 Jan;71(1):94-102.

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

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	第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会において発表され、 「好酸球性胃腸炎の病態解明および臨床応用への基盤確立」(松岡 諒, 森田 英明, 松本 健治) 2021 年度 日本小児栄養消化器肝臓学会 若手優秀演題賞を獲得した		

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 Tuft 細胞を活性化して IL-25 を産生誘導することが知られている succinate (100 mM) を混入して 7 日間自由飲水させると、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 を含む飲水を最大 5 週間行い、2 週目からは胃内に ovalbumin (OVA) を 3 日おきに合計 11 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。
- 5 週間投与時点でのマウス血清中の抗 OVA-IgE 抗体価や、腸間膜リンパ節由来単核細胞を in vitro で OVA 刺激した際の培養上清中の IL-5 産生の誘導は認められなかった。
- さらに、腸管 Tuft 細胞のコハク酸受容体 (SUCNR1) 以外の味覚受容体の ligand (添加物 A) を飲水中に混入し 3 週間自由飲水させたが、空腸における IL-25 の mRNA 発現、組織学的な Tuft 細胞数や好酸球数には全く影響が認められなかった。

以上から、自然免疫系の活性化 (IL-25 の産生誘導を認める) による好酸球性腸管炎症モデルでは、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ず、経口的に摂取された抗原に対する感作に IL-25 は関与していない可能性が強く示唆された。

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ミ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¹⁾。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、もし経腸管感作が誘導されるとしても、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。実際に経口的に接種した抗原に対する IgE 抗体を産生させる動物モデルとしては Cholera toxin の同時投与²⁾と黄色ブドウ球菌の再生する Superantigen の同時投与³⁾しか知られて居ない。

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⁴⁾。また、IL-25 は直接に樹状細胞を活性化する。

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ような役割を演じているかを検証する。

特に本年度は、Tuft 細胞におけるコハク酸受容体以外の味覚受容体に着目し、検討する。

研究計画及び研究手法

① Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群の同定

収集した消化管アレルギー患者／好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織の Tuft 細胞の免疫染色を行う。また現在、これらの組織標本と同一

患者の生検組織から total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を開始する予定である。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⁵⁾。

② IL-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 Taste receptor type 2 (TAS2R) やコハク酸受容体(SUCNR1)、TRPM5 などを用いている。これらの遺伝子は family を形成しており、TAS2 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。特に、Tuft 細胞に特徴的に発現している遺伝子として DCLK1 や Pou2F3 の発現に相関する遺伝子群に注目して解析を行う。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。

特に本年度は、Tuft 細胞におけるコハク酸受容体以外の味覚受容体に注目し、検討した。

③ IL-25 を介した経腸感作モデルの樹立

6 週齢の C57BL/6j マウスの飲水中にコハク酸を添加して 7 日間経口的に投与したところ、体重増加不良と腸管における IL-25 の mRNA の有意な発現増強が認められた。これらのことから、IL-25 を介した経腸炎症モデルが樹立されたと判断できる。今後は、この系に経胃管的に OVA を投与して、OVA に対する感作が成立するかを検討する。具体的には、コハク酸を投与したマウスの腸管リンパ節細胞もしくは脾細胞を採取し、OVA 刺激を行って、T 細胞の増殖やサイトカイン産生を評価する。

また、TAS2R 等の受容体の agonist 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

① Tuft 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、マウスモデルでは 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（Immunity. 2018;49:33-41）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) を混入して 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 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 を含む飲水を最大 5 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 週間行った 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、Succinate を含む飲水を行った群においても、OVA 抗原特異的な IL-5 の誘導は認められなかった。

5. 6 週齢の C57B6N および C57B6J マウスに対して、腸管 Tuft 細胞のコハク酸受容体 (SUCNR1)

以外の味覚受容体の ligand である添加物 A (10, 20 30 mM) を飲水中に混入し 3 週間自由飲水させ、胃体部および噴門部における T2 サイトカインである IL-13 や IL-25 の mRNA 発現や組織学的な検討を行った。その結果、添加物 A の投与は IL-13 や、IL-25 など Tuft 細胞関連遺伝子群の mRNA 発現、好酸球数には全く影響が認められなかった。

以上から、自然免疫系の活性化 (IL-25 の産生誘導を認める) による好酸球性腸管炎症モデルでは、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ず、経口的に摂取された抗原に対する感作に IL-25 は関与していない可能性が強く示唆された。

なお、本研究の前半部分は、第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会において発表され、「好酸球性胃腸炎の病態解明および臨床応用への基盤確立」(松岡 諒, 森田 英明, 松本 健治) 2021 年度 日本小児栄養消化器肝臓学会 若手優秀演題賞を獲得した。

今後の研究活動について

これまでにアレルギー感作が成立するためには、自然免疫系の活性化による IL-33 や TSLP の産生放出が抗原提示細胞である樹状細胞を活性化して、Naïve T 細胞に抗原提示する際に Th2 細胞への分化を誘導する経路が最も重要であるとされて来た。一方、これまで全くと言って良いほ

ど不明であった経腸感作の誘導経路と仮説を立てた IL-25 に関して今回行った一連の実験の結果は、IL-25 が腸管感作には全く関与していない事を強く示唆しており、これ以外の免疫応答を介している可能性が示唆される。

その一方で、味覚受容体は 40 種類以上が同定されており、それらの発現分布などについては不明な点が多く残されている。今回は特に小腸に分布する Tuft 細胞を標的とした検討を行ったが、それ以外の消化管部位の Tuft 細胞についての検討を加えてゆく予定である。

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) 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
- 3) 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
- 4) Nadjisombati 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
- 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

研究課題名	「花粉関連食物アレルギー症候群」における原因抗原のエピトープ構造解析と低アレルギー化食品の開発基盤		
フリガナ	マルヤマ ノブユキ		
代表者名	丸山 伸之		
所属機関（機関名） （役職名）	京都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
	福富 友馬 (フクトミ ユウマ)	国立病院機構相模原病院 室長	患者血清の収集と臨床評価
本助成金による発表論文、学会発表	1) 日本農芸化学会 2021 年度大会 2021 年 3 月 21 日 花粉関連食物アレルギー症候群における gibberellin-regulated protein の交差要因の解析 蕭喬丹, Cabanos Cerrone, 福富友馬, 丸山伸之 2) 日本農芸化学会近畿支部第 519 回講演会 2022 年 2 月 5 日 スギ花粉との交差反応に関与するモモ gibberellin-regulated protein のエピトープ解析 蕭喬丹, 石井翠, Cabanos Cerrone, 福富友馬, 丸山伸之		

研究結果要約

大規模に収集した果物類アレルギー患者の血清から gibberellin-regulated protein (GRP) 陽性を示す患者を選抜し、本研究に使用した。スギ及びヒノキ花粉中に GRP に対するウサギ抗血清と反応するタンパク質を検出し、スギおよびヒノキ花粉中に GRP が存在していることを示した。Cry j 7 (スギ GRP) と Pru p 7 (モモ GRP) の交差反応性を検討するために、組換え型 Pru p 7 および組換え型 Cry j 7 を調製し、競合的に ELISA を行った。Cry j 7 で患者血清に対し前処理を行うことにより、Pru p 7 に対する患者血清中の IgE 抗体結合性が低下したことから、Cry j 7 と Pru p 7 は交差反応する可能性が示唆された。さらに、Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応に影響を及ぼすアミノ酸残基を同定するため、Cry j 7 と Pru p 7 との間で共通するアミノ酸残基をアラニン残基に置換した変異型 Pru p 7 を作製した。それらの患者血清中の IgE 抗体との結合性を野生型と比較したところ、IgE 結合性が低下した複数の変異体が見出された。また、還元条件下での熱変性処理により、Pru p 7 の血清中の IgE 抗体との結合性が低下した。以上のことから、ヒノキ科花粉と果物類との交差に関わる GRP のアミノ酸残基を特定するとともに、GRP の高次構造がエピトープ形成に影響することを示した。

研究目的

「花粉食物アレルギー症候群」は、花粉と食物のアレルゲン間での交差反応によって起こるアレルギーである。花粉が一次感作源とされており、生の野菜や果物を摂取した際に症状が出る頻度が高い。口腔アレルギーを示すことが多いが、全身症状を示すこともある。「花粉食物アレルギー症候群」の原因となる代表的なアレルゲンは感染特異的タンパク質-10(pathogenesis-related protein: PR-10)やプロフィリンである。PR-10 やプロフィリンは一次構造の保存性が高いことから植物間で立体構造が類似し、交差反応しやすいとされている¹⁾。最近、GRP が「花粉食物アレルギー症候群」の原因アレルゲンである可能性が指摘されている²⁾。GRP は snakin/GASA プロテインファミリーに属する抗菌ペプチドで、植物において病原菌に対する防御などに寄与するとされる³⁾。GRP は分子量 7-8kDa であり、12 個のシステイン残基から成る 6 個のジスルフィド結合をもつ²⁾。これらのジスルフィド結合によって GRP は熱や消化酵素に対する耐性を持つ²⁾。モモ(Pru p 7)、ウメ(Pru m 7)、オレンジ(Cit s 7)、ザクロ(Pun g 7)の GRP が果物類のアレルゲンと報告されている。これらの GRP 間におけるアミノ酸配列同一性は非常に高く、Pru p 7 は Pru m 7 と同一のアミノ酸配列をもつ⁴⁾。さらに、スギ花粉においても Cry j 7 が報告され⁵⁾、アミノ酸配列の類似性から、ヒノキ科花粉と果物の GRP 間で交差反応し「花粉食物アレルギー症候群」を引き起こす可能性が考えられている⁶⁾。

本研究では、大規模に収集した果物類アレルギー一患者血清を対象に GRP に感作されている陽性検体を選抜する。また、スギ及びヒノキ花粉に含まれる GRP に対する抗ウサギ血清を作製し、そられの花粉中での存在について検討し、比較する。さらに、スギ・ヒノキ花粉と果物類アレルギーでの GRP の交差反応を検証するために、それぞれの組換えタンパク質を作製するとともに、選抜する GRP 陽性検体を用いて、スギ及びヒノキ花粉と果物類の GRP の交差反応を解析する。交差反応に関与する可能性があるアミノ酸残基への変異導入や、構造変化による血清との反応性への影響について解析する。

上記により、「花粉食物アレルギー症候群」における交差反応の原因となる GRP の抗原性の要因やエピトープを解明することを目的とする。

研究計画及び研究手法

項目 1. 果物類アレルギー患者の原因抗原の解析

100 名以上の果物類アレルギーの確定診断がなされた患者の血清を保存している。これらの患者血清について、GRP 感作を示す果物類アレルギー患者を選抜する。測定には、酵素標識したヒト IgE 抗体に対するモノクローナル抗体と蛍光基質を用いた酵素結合免疫吸着法を用いる。

項目 2. スギ及びヒノキ花粉 GRP の解析

Cry j 7 をウサギに免疫して、Cry j 7 に対する抗血清を調製している。スギ及びヒノキ花粉よりタンパク質を抽出し、等量の抽出液に対して

GRP に対するウサギ抗血清を用いてウェスタンブロットを行い、スギ及びヒノキ花粉中の GRP 量を検証する。

また、GRP に対するウサギ抗血清との反応性を指標に花粉からの粗抽出液についてカラムクロマトグラフィーを行い、GRP を精製する。精製物に対して質量分析を行い、花粉中の GRP であることを確認する。

項目 3. 果物類 GRP 陽性患者における果物及び花粉 GRP の交差反応の解析

Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応性を検証するために精製した Cry j 7 と Pru p 7 を用いて競合 ELISA 試験を行う。そのため、Cry j 7 と Pru p 7 をメタノール資化性酵母により発現させ、クロマトグラフィーにより精製する。Pru p 7 陽性患者血清に対し Cry j 7 を用いて前処理した血清と未処理の血清について ELISA 法により特異的 IgE 抗体価測定を行い、Pru p 7 に対する IgE 結合性の違いを比較する。

項目 4. 「花粉食物アレルギー症候群」における GRP の交差エピトープ構造解析

交差反応には、果物類 GRP とスギ・ヒノキ花粉 GRP 間で共通性の高いエピトープが存在する必要がある。両 GRP についてアライメント上で一致するアミノ酸残基を置換した様々な組換えタンパク質(変異体)を調製し、それらに対して GRP 陽性患者血清中の特異的 IgE 抗体量を測定する。結合量が減少する変異体において置換した

アミノ酸残基を指標にして、IgE 抗体との結合および交差反応に関わる GRP のアミノ酸残基を同定する。類似タンパク質の立体構造データに基づいて GRP のホモロジーモデルを作製し、交差反応に寄与するエピトープの構造を特定する。

項目 5. 交差エピトープ構造を破壊するための加工・調理条件に関する基盤解析

果物類は、未加熱で食するとともに、加熱処理や酸処理などを行うことも多い。果物類 GRP の加熱処理において、果物類 GRP が構造変化を起こす条件を明確にする。さらに、その条件下で構造変化と果物類アレルギーの患者血清中の IgE 抗体との結合能について解析することにより、抗原性と加工・調理との関係について基礎的知見を得る。

結果と考察

項目 1. 果物類アレルギー患者の原因抗原の解析

100 名以上の果物アレルギー患者血清を用いて GRP に対する特異的 IgE 抗体を測定し、20-30 名の患者に特異的 IgE 抗体を検出した。これらの血清を本研究に使用した。

項目 2. スギ及びヒノキ花粉 GRP の解析

ヒノキ花粉およびスギ花粉より陽イオン交換カラムを用いて GRP を部分精製し、ウサギ抗 GRP 血清を用いたウェスタンブロッティングにおいてスギ及びヒノキ花粉の分画物からウサギ抗血清と反応するバンドを検出した。さらに、陽

イオン交換カラムからの溶出分画をゲル濾過カラムによって精製した。溶出画分に対してウェスタンブロッティングを行い、GRP と予想される SDS-PAGE でのバンドについて質量分析を行ったところ、ヒノキ科花粉の GRP である Cup s 7 および Jun a 7 に含まれる配列を同定した。また、Cry j 7 にも類似した配列が含まれていた。このことは、ヒノキ花粉にも他のヒノキ科 GRP と類似した一次構造をもつ GRP が含まれていることを示している。

項目 3. 果物類 GRP 陽性患者における果物類及びスギ花粉 GRP の交差反応の解析

組換え型 Cry j 7 及び Pru p 7 をメタノール資化性酵母により発現させた。発現タンパク質はイオン交換カラム及びゲル濾過カラムを用いて精製した。精製タンパク質について質量分析により Cry j 7 と Pru p 7 であることを確認した。精製した Cry j 7 及び Pru p 7 についてゲル濾過クロマトグラフィーでの溶出時間を比較したところ、共に分子量より予想される時間に溶出され、単量体として溶液中に存在していることが示唆された。Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応性を検証するために精製した競合 ELISA 試験を行った。Pru p 7 陽性を示す果物アレルギー患者血清に Cry j 7 を加えて 4°C で一晚インキュベートした。処理した血清および未処理血清(コントロール)を用いて ELISA 試験を行い、Pru p 7 に対する血清中の IgE 抗体の結合性の比較を行った。その結果、前処理した血清では未処理血清よりも IgE 結合

性が低下していた。このことは、Cry j 7 が患者血清中の GRP 特異的 IgE 抗体と結合することにより、Pru p 7 の血清中の IgE 抗体への結合が阻害されたことを示している。以上のことから、Cry j 7 と Pru p 7 は血清学的に交差反応する可能性が考えられた。

項目 4. 「花粉食物アレルギー症候群」における GRP の交差エピトープ構造解析

Cry j 7 と Pru p 7 の交差反応に影響を及ぼすアミノ酸残基を調べるために、Cry j 7 と Pru p 7 の共通アミノ酸残基を一残基ずつアラニン残基に置換した変異型 Pru p 7 を約 20 種類設計した。それらについて野生型と同様の方法により組換えタンパク質を発現及び精製した。精製した全ての変異型は SDS-PAGE において野生型とほぼ同じ位置にバンドを示し、ウェスタンブロッティングにおいても野生型と同様に発色した。会合状態の確認のために変異型 Pru p 7 についてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、野生型との比較を行った。3 種類の変異型は野生型とほぼ同じ時間に溶出されたが、その他の多くの変異型は野生型よりも少し早く溶出された。変異型 Pru p 7 の二次構造を比較するために円偏光 2 色性測定を行った。8 種類の変異型は野生型とほぼ同じスペクトルを示したが、それ以外の変異型は野生型とは異なるスペクトルを示した。変異型 Pru p 7 について果物アレルギー患者血清を用いた ELISA 測定を行い、野生型と比較した。いくつかの変異型は野生型と比べて IgE 抗体結合性が著しく低下し

ていた。IgE 抗体結合性が低下した変異型は患者によって異なっており、IgE 抗体結合に寄与するアミノ酸残基が患者間で異なっていることが示唆された。野生型と比較した変異型の平均 IgE 抗体結合率を算出した。野生型と比較して IgE 抗体結合率が約 60-80%を示す変異型、IgE 抗体結合率が大きく低下した変異型が複数見出された。これらの変異型のアミノ酸残基は Cry j 7 と Pru p 7 について交差反応に寄与すると考えられる。また、これらのアミノ酸残基は Pru m 7、Pun g 7、Cit s 7 にも保存されていたことから、GRP の抗原性に重要な残基であることが示唆された。特定されたアミノ酸残基は Cry j 7 と Pru p 7 だけでなく、ヒノキ科花粉 GRP と果物 GRP の交差反応に寄与するエピトープである可能性が示唆された。

項目 5. 交差エピトープ構造を破壊するための加工・調理条件に関する解析

加工や調理によりタンパク質は変性し、構造が変化すると考えられる。変性によりアレルゲンの抗原性が変化する可能性があるため、Pru p 7 が変性することにより IgE 結合性にどのような影響を及ぼすのかを検討した。Pru p 7 には多くのジスルフィド結合が存在することから、ジスルフィド結合を還元するメルカプトエタノール存在下において 90℃で 30 分間熱処理した。その後、熱処理した Pru p 7 と未処理 Pru p 7(コントロール)を用いて、Pru p 7 陽性を示す果物アレルギー患者血清中の IgE 抗体に対する結合性を比較し

た。還元条件下で熱処理した Pru p 7 では未処理 Pru p 7 と比較して血清中の IgE 抗体への結合性が著しく低下した。このことから、Pru p 7 の IgE 抗体結合性には高次構造形成が大きく影響しており、加熱などの加工などの条件によっては GRP の抗原性を低下できる可能性が示唆された。

上記の GRP のエピトープの解析結果について、必要に応じて変異体を追加して専門誌への論文投稿を検討している。

今後の研究活動について

本研究により、スギ・ヒノキ花粉と果物 GRP 間の交差反応に関わるエピトープに寄与するアミノ酸残基を概ね同定できたため、所期の成果は達成したと考えている。

今後の課題の一つとして、GRP の関与する「花粉関連食物アレルギー症候群」について明らかにするために、一次感作に関するスギ・ヒノキ花粉に対する抗原解析が必要であると考えている。また、加工・調理の条件と GRP の抗原性についても重要な課題であり、さらに解析が必要であると考える。加工による GRP の変性・巻き戻りの分子機構やジスルフィド結合の寄与などを解析することにより、GRP の抗原性を失活させる調理や加工条件を精密に制御することが可能になると考えている。

以上のように、本課題は引き続き必要性の高い重要な研究課題であると考えている。

参考文献

- 1) Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016; 27: 1–250
- 2) Tuppo L, Alessandri C, Pomponi D, Picone D, Tamburrini M, Ferrara R, et al. Peamaclein – A new peach allergenic protein: similarities, differences and misleading features compared to Pru p 3. *Clin. Exp. Allergy* 2013; 43: 128-140
- 3) Nahirñak V, Rivarola M, Almasia N, Barón M, Hopp H, Vile D, et al. Snakin-1 affects reactive oxygen species and ascorbic acid levels and hormone balance in Potato. *PLoS One* 2019; 14(3): e0214165
- 4) Inomata N Gibberellin-regulated protein allergy: Clinical features and cross-reactivity. *Allergol. Int.* 2020; 69: 11-18
- 5) Ehrenberg A, Klingebiel C, Östling J, Larsson H, Mattsson L, Vitte J, et al. Characterization of a 7 kDa pollen allergen belonging to the gibberellin-regulated protein family from three Cupressaceae species. *Clin. Exp. Allergy* 2020; 50(8): 964-972
- 6) Klingebiel C, Chantran Y, Arif-Lusson R, Ehrenberg A, Östling J, Poisson A, et al. Pru p 7 sensitization is a predominant cause of severe, cypress pollen-associated peach allergy *Clin. Exp. Allergy* 2019; 49(4): 526-536

役員・評議員・研究助成審査委員名簿

（2022年9月30日現在）

1. 役員

理事長	井手 弘	常勤	元日本ハム北海道ファクトリー（株）代表取締役社長
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
	高松伸枝	非常勤	別府大学 食物栄養科学部 教授
	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	荒川 隆	非常勤	（一財）食品産業センター 理事長
	井川伸久	非常勤	日本ハム（株）代表取締役副社長 経営企画本部長、中央研究所担当、 新規事業推進担当、北海道プロジェクト推進担当
	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	（地独）東金九十九里地域医療センター 理事長、 千葉大学名誉教授
	柴田瑠美子	非常勤	国立病院機構福岡病院アレルギーセンター 顧問・非常勤医師（小児科）
	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

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 学術顧問 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	元徳島大学 研究支援・産学官連携センター 教授
	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 栄養学科 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	

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

Website	https://www.miraizaidan.or.jp/
Twitter	https://twitter.com/syokunomirai/
Instagram	https://www.instagram.com/syokunomiraizaidan/
YouTube	https://www.youtube.com/channel/UCnJDGexmLgLr6betsgvYKUQ

5. 2022年度主な事業活動

- ・2022年度研究助成の実施、2023年度研究助成の公募及び2021年度研究助成の成果報告会の実施
- ・第8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
- ・2022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

2022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

TEL 029-893-4466

FAX 029-893-4360

E-mail info@miraizaidan.or.jp

Website <https://www.miraizaidan.or.jp/>

Twitter <https://twitter.com/syokunomirai/>

Instagram <https://www.instagram.com/syokunomiraizaidan/>