

ニッポンハム食の未来財団 2021 年度個人研究助成 研究完了報告書

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	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。

研究目的

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アレルギーである（食物アレルギー診療ガイドライン 2021）。臨床経過から鶏卵アレルギーが疑われると、特異的 IgE (specific IgE: sIgE) 抗体測定の後、食物経口負荷試験 (oral food challenge: OFC) 陽性で診断が確定する。鶏卵除去の期間の後、一般的には sIgE が低下してきた症例では OFC でも誘発症状がなく解除が進みやすい一方、sIgE 高値のままだと OFC でも症状が誘発されやすい。しかし実際には sIgE 高値で摂食可能となる症例や、sIgE 低値でも摂食できない症例もあり、sIgE 値はあくまで参考として手探りで OFC が行われており、その過程で副反応が起きることも少なくない。耐性獲得を予想するためのバイオマーカーの同定が望まれている。

解決の糸口の 1 つとして、ピーナッツアレルギーで OFC と相関するバイオマーカーとして好塩基球活性化試験の有用性が報告されたが¹⁾、鶏卵アレルギーでの有用性は確立されていない。もう一つのアプローチとして、我々は濾胞ヘルパー T 細胞 (follicular helper T cell: TFH) に注目した。T 細胞の中でも TFH は B 細胞からの抗体産生を助ける働きを果たすことが知られていたが、近年、TFH13 と呼ばれる、IL-13 産生能を持つ TFH の一群が、抗原特異的 IgE 抗体産生や IgE 抗体を介したアナフィラキシー反応に必須であることが明らかにされた²⁾。実際に手術で摘出した扁桃組織での検討で、ハウスダストに感作されている小児では、TFH の比率が増加しており、IL-4 産生能などの機能も亢進していた³⁾。食物アレルギー患者における TFH や濾胞制御性 T 細胞 (follicular regulatory T cell: TFR) の経時的変化の報告はない。耐性獲得などの臨床的な変化と T 細胞サブセットの関連を解析し、経過の予測に有用かを明らかにする。他に臨床経過と相関するバイオマーカーとして、鶏卵特異的 IgE の avidity⁴⁾ や IgD 値⁵⁾ が有用である、という報告もあるが、各研究では 1 つのパラメータを評価しており、同一コホートでの比較検討は行われていない。

今回われわれは、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、OFC 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 OFC の補助となるバイオマーカーを同定して、各患者に対する個別的対応、即ち精密医療 (precision medicine) の確立を目指す。

研究計画及び研究手法

2021 年 2 月より鶏卵アレルギー患者の研究参加リクルートを開始した。1 年間で 80 症例の登録を目標として進めていたが、実際には 130 症例がエントリーしている。

各群の定義についてまず記載する。当初の計画になかった 0 群として、鶏卵アレルギーの既往がない症例を対象に加えた。喘息やアレルギー性鼻炎など、他のアレルギー疾患を持つ場合はある。強い鶏卵アレルギー患者と比較し、どの免疫学的パラメータに差があるかを評価する。当初の計画通り、I 群として卵白 10g 以上を摂取可能となった耐性獲得しつつある患者、および研究期間中に耐性獲得が期待される間もなく少量卵白摂取を開始する見込みの II 群の患者をリクルートしている。III 群として当初、鶏卵摂取の進まない患者を一括りにしてリクルートすることを計画していたが、単に家族や紹介元開業医の希望で除去が継続になっている患者や、少量鶏卵摂取でアナフィラキシーを呈し、専門医の判断で除去されている患者など、症例の臨床像にばらつきが見られた。そこで、III 群としては、少量の鶏卵摂取でアナフィラキシーを呈した病歴のある患者、と再定義してリクルートを進めている。

加熱卵摂取開始後の進め方は当初の計画通りである。II 群、III 群患者のうち、卵黄摂取可となった児にはまず、加熱卵 1 g 負荷試験を行い、症状誘発のあった児には、全卵入り加工品（多くはホットケーキ）摂取を継続する。その後、全卵 5 g まで摂取可能となったのちに、加熱卵 1 g の負荷試験を再度行う。各群の患者より、1 年間に 1 回、卵白特異的 IgE 検査目的の血液検査に合わせて、免疫セット解析を行う。また卵白少量負荷試験を行う患者では、その際に追加で免疫セット解析の検体を採取し負荷試験の結果と相関するバイオマーカーの探索を行う。

* 免疫セット解析

- ・保険適応の検査である sIgE 測定は通常どおりに行う。
- ・抗原特異的好塩基球活性化試験は採血当日に株式会社 BML で活性化マーカー CD203c を測定する。

・リンパ球サブセット及び機能の解析については京都大学大学院免疫細胞生物学（上野英樹教授）研究室で行う。各施設で採取した血液を当日に発送し、上野研究室で PBMC 分離して冷凍保存し、後日解析する。卵白およびオボムコイド特異的 CD4+ T 細胞と B 細胞の解析法は下記の通り。

1) フローサイトメトリー (FCM) を用いた解析

①上野研究室では、抗原特異的 CD4+ T 細胞、B 細胞を解析する方法をすでに確立している。超高感度、低ノイズで抗原特異的 CD4+ T 細胞を検出するために、上野が開発した IRF4 アッセイを 5 レーザー FCM Cytex Aurora を用いて行う。簡潔には末梢血単核球をオボムコイド（鳥居薬品）で 24 時間刺激し、活性化されてくるオボムコイド特異的 CD4+ T 細胞を、IRF4 を含む 4 種の活性化マーカー陽性細胞として検出する。Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg, CD4-CTL のマーカーを含んだ 32 色 FCM パネルにより、マーカー発現を基にオボムコイド特異的 CD4+ T 細胞集団のサブセット構成を解明する。CXCR5+CCR4+ Tfh2 細胞の検出も TIGIT^{hi}CTLA4^{hi}FoxP3⁺ Treg 細胞の検出も可能である。

②抗原刺激 6 時間によって CD4+ T 細胞から発現されるサイトカイン（11 種類, IL-2, IL-4, IL-13, IL-10, IL-21, IL-17A, TNF, IFN- γ など含む）を表面マーカー（CXCR5, ICOS, CCR4, CCR6 など）と共に FCM で解析する。

③オボムコイド特異的 B 細胞サブセットを解析する。オボムコイドを PE と APC で標識し、末梢血単核球中に含まれる B 細胞からオボムコイド標識細胞を PE+APC+CD19⁺細胞として検出し、サブセット（スイッチメモリー, ABC 細胞, CD21 陰性分画など）を 16 色 FCM パネルで解析する。

2) シングルセル遺伝子解析

上記方法で検出されるオボムコイド特異的 CD4+ T 細胞（CD25⁺Ox40⁺など）と B 細胞（PE+APC+CD19⁺）をソートし、5'シングルセル RNA シークエンスと TCR シークエンス、

BCR シークエンス(10X Genomics と NovaSeq6000)を用いて、トランスクリプトーム、クローン解析からアレルゲン特異的 T 細胞、B 細胞集団を単細胞レベルで多元的に解析する。

比較に用いる検体：当初は 0-I 群 10 例、III 群 10 例ずつの比較を行い、鶏卵アレルギーの重症度でどのパラメータに有意な差が見られるかを明らかにする。その後、II 群の経時的解析を行い、耐性獲得の臨床像と、上記で同定されたパラメータの相関を評価する。

結果と考察

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。II 群の患者のうち 20 例で卵白少量負荷試験と同時に検体採取を行っており、そのうち半数が負荷試験陽性だった。130 症例中、105 例が上記のいずれかの群に入っており、残り 25 例は含まれなかった。年齢が 11 歳以上の患者、または鶏卵摂取の経過が独特で、どの群の定義にも該当しない、が主な除外理由であった。11 歳以上の患者は耐性獲得が進みにくいことや、患者数が少ないことから、主たる解析対象とはしないが、10 歳以下の患者と、11 歳以上の患者で免疫学的にかなり違っているかの評価に寄与するため、経時的検体の採取は続ける。

研究費の支出として、委託費が高くなった。初回研究用採血を行った 130 症例に加えて、2 回目の採血を行った 20 例を含めて、150 検体の採取を行った。採血ごとに好塩基球活性化試験を BML 社で行ったために、当初の 2 倍に近い金額が委託検査費として必要となった。そこで検体の運搬を搬送業者へ委託せず、片道 1 時間程度かけて自家用車で運搬することで運搬費の支出を削減した。2021 年度は初年度の臨床検体の収集が主な研究内容であり、フローサイトメトリーを用いた表面抗原の解析を行わず、消耗品費を節約した。

残された課題として、

- 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, 0-I 群と III 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 点がある。

1 については、好塩基球活性化試験とリンパ球サブセット解析で負荷試験結果との相関を評価する。2 については、0-I 群および III 群それぞれ 10 例の PBMC を使用してリンパ球サブセット解析を行い、有意に差のある指標の同定を目指す。既報の情報からは、想定される指標の候補としては、III 群(高リスク群)では①オボムコイド特異的 Th2 細胞、Tfh2 細胞の頻度が高い、②オボムコイド特異的 IL-10 産生 Treg の頻度が低い、③オボムコイド特異的 IgG1+ メモリー B 細胞頻度が高い、などがある。

3 については、「2」で確立された低リスク群と高リスク群の間で差のある指標が、II 群患者で経時的にどのように変化するか、また鶏卵に対する耐性獲得の臨床的变化とどのように相関するかを評価する。

「1」「2」については継続中の 2022 年度の研究期間内に成果を出すことを目標とする。「3」については 2021 年度に初回採血した患者の、1 年後、2 年後の検体が必要となるため、2023 年度での成果となることを目標として進める。

2022 年 4 月より本研究に専念できる大学院生が 1 人、研究チームへ加わったため、いずれの研究項目についても、2021 年度より進捗が加速することが期待される。

現時点で、学会や論文発表は現時点で予定はないが、最終的に「1」「2」「3」の成果が確定した段階で、国内学会では日本アレルギー学会などの全国学会へ、論文としては査読のある国際誌へ投稿予定である。

今後の研究活動について

本研究の残された課題として、

- 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, 0-I 群と III 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 点がある。

「1」「2」については継続中の 2022 年度の研究期間内に成果を出すことを目標とする。「3」については 2021 年度に初回採血した患者の、1 年後、2 年後の検体が必要となるため、2023 年度での成果となることを目標として進める。

2022 年 4 月より本研究に専念できる大学院生が 1 人、研究チームへ加わったため、いずれの研究項目についても、2021 年度より進捗が加速することが期待される。

本研究が成功して耐性獲得機序が解明され、鶏卵アレルギーの食物負荷試験結果と相関するバイオマーカーが同定できた場合には、同様の手法を次に患者数の多い、牛乳アレルギー、小麦アレルギーなどへ応用することが期待される。

参考文献

- 1) Santos AF, Douiri A, Bécares N, Wu SY, Stephens A, Radulovic S, Chan SM, Fox AT, Du Toit G, Turcanu V, Lack G.J. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *Allergy Clin Immunol.* 2014 Sep;134(3):645-52.
- 2) Gowthaman U, Chen JS, Zhang B, Flynn WF, Lu Y, Song W, Joseph J, Gertie JA, Xu L, Collet MA, Grassmann JDS, Simoneau T, Chiang D, Berin MC, Craft JE, Weinstein JS, Williams A, Eisenbarth SC. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science.* 2019 Aug 30;365(6456):eaaw6433.
- 3) Foster WS, Grime CJ, Tan HL, Williams GS, Robinson MJ, Carlesso G, Saglani S, Lloyd CM, Harker JA. Enhanced frequency and function of follicular T cells in the tonsils of house dust mite-sensitized children. *Allergy.* 2020 May;75(5):1240-1243.
- 4) Sato M, Yamamoto-Hanada K, Tada H, Irahara M, Saito-Abe M, Matsumoto K, Pak K, Kido

H, Ohya Y. Diagnostic performance of IgE avidity for hen's egg allergy in young infants. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020 Jul-Aug;8(7):2417-2420.e6.

- 5) Palosuo K, Karisola P, Savinko T, Fyhrquist N, Alenius H, Mäkelä MJ. A Randomized, Open-Label Trial of Hen's Egg Oral Immunotherapy: Efficacy and Humoral Immune Responses in 50 Children. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 May;9(5):1892-1901.e1.

以上