

ニッポンハム食の未来財団 2022 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	LGG 乳酸菌を併用して行う経口免疫療法の有効性を検証する研究
フリガナ	ミウラ ヨウコ
代表者名	三浦 陽子
所属機関 (機関名) (役職名)	独立行政法人 国立病院機構 相模原病院 医師
本助成金による 発表論文, 学会発表	第 59 回 日本小児アレルギー学会学術大会 APAPARI2022 合同開催

研究結果要約

(目的) 症状誘発閾値が低い重症なピーナッツ・鶏卵・小麦アレルギー児に対し、乳酸菌を併用した少量を目標とした経口免疫療法(OIT)の効果を検証した。

(方法) 少量 OIT に乳酸菌を併用し(介入群)、12 ヶ月後に 2 週間除去後の中等量の食物経口負荷試験を実施し、中等量耐性獲得の有無を乳酸菌併用なしの OIT(対照群)と比較した。介入群で、開始時、1 ヶ月後、12 ヶ月後の腸内細菌叢の変化を測定した。

(結果) 中等量を耐性獲得したのは、ピーナッツ OIT で介入群 21%(4/19) vs 対照群 11%(2/19)、鶏卵 OIT で 0%(0/18) vs 6%(1/16)、小麦 OIT で 0%(0/12) vs 0%(0/11)であり有意差は認めなかった。ピーナッツ OIT では、*Lactobacillus* 属は開始時と比較して 1 ヶ月後と 12 ヶ月後に増加した ($p = 0.03, 0.08$)。また、*Lactobacillus* 属と酪酸産生菌の *Subdoligranulum* 属は、中等量耐性獲得群の方が未獲得群よりも、開始時と比較して 12 ヶ月後に有意に定着した ($p = 0.01, 0.02$)。

(結語) ピーナッツの乳酸菌併用 OIT では、アレルギー反応抑制反応が誘導される可能性が示唆された。OIT の有効性に関しては、今後の症例集積後の検証が望まれる。

研究目的

<研究目的>

本研究では、耐性獲得が困難な症状誘発閾値の低い重症の食物アレルギー児に対して、少量を目標量とした OIT に乳酸菌を併用することにより、OIT の効果を向上させ、さらには腸内細菌叢と血中短鎖脂肪酸の経時的変化を明らかにする。

<意義>

1) 経口免疫療法(OIT)の効果の向上

OIT は、これまで治療の手段がなかった食物アレルギーに対して唯一根治を目指せる画期的な治療法であるが、重篤な症状を含む高頻度の副反応が課題であった。このため、当院では重症の食物アレルギー児に対して、目標量を少量（鶏卵 1/8 個、うどん 2g、ピーナッツ 0.5g）にした OIT を実施し、既存の OIT と比較して重篤な副反応が少なく、安全に原因食物を摂取できるようになった¹⁻³⁾。しかし、依然として予後不良である症状誘発閾値が低い重症な患者もいるため、OIT の効果の向上が求められている。本研究では、目標量を少量にした OIT を実施した患者をコントロールとし、乳酸菌を併用することによる OIT の有効性を向上する効果を明らかにすることができる。

2) OIT の有効性を向上させるメカニズムの解明

海外の研究では、ピーナッツアレルギー児に対し、プロバイオティクスの 1 種である *Lactobacillus rhamnosus* (乳酸菌) を併用した OIT の有効性が示された⁴⁾。また、牛乳アレルギーの乳児に対して加水分解乳に乳酸菌を併用することで、1 歳時点の牛乳アレルギーを減少させ⁵⁾、腸内細菌叢と血中短鎖脂肪酸の変化が起きることが示唆された⁶⁾。さらに、当院では、発酵食品を用いた腸内細菌叢への介入により OIT の効果を高めることが確認された（AMED 海老澤班 2020 年成果報告書）。しかしながら、プロバイオティクス（乳酸菌）を OIT に併用した際の腸内細菌叢や血中短鎖脂肪酸に関しては評価されておらず、経時的変化や有効性に関連する細菌叢は同定されていない。その背景として、腸内細菌叢が変化し、産生された代謝産物による免疫学的変化が起こることを明らかにすることができる。よって、本研究により OIT の効果の向上を促すメカニズムは明らかにすることが期待される。そして、少量を目標量とした OIT に乳酸菌を併用することにより、症状誘発閾値が低

い重症な食物アレルギー児に対する耐性獲得効果を高めることが期待される。

研究計画及び研究手法

研究デザイン:単施設で実施する、前向き・非ランダム化介入研究（予定通りに実施）。

研究対象者:下記 1-3 の全てを満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない患者を対象とした（予定通りに実施）。

1. 年齢：5 歳以上の児
 2. 当院で施行した食物経口負荷試験で、少量「鶏卵：全卵 1/32 個、小麦：うどん 2g、ピーナッツ：ピーナッツ 0.5g」のいずれか以下で客観的なアレルギー症状が誘発された児
 3. 本研究への参加に同意した児
- ・除外基準：研究責任者が研究対象者として不適当と判断した児

研究方法:＜試料の準備＞本研究では *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG 乳酸菌) という乳酸菌で、タカナシ乳業の「生きて腸まで届く乳酸菌（顆粒タイプ）」を用いた。食品として市場販売され小児も安全に摂取できる。LGG 乳酸菌はプロバイオティクスとして他の疾患への有用性があることが多数報告されており、実効性が高い（予定通り実施）。

＜方法＞2019 年 7 月～2020 年 3 月の間、選択基準を満たす食物アレルギー児を対象に、LGG 乳酸菌 (1 包/日) を 1 年間連日併用し、少量を目標量とした OIT を開始した。抗ヒスタミン薬内服下で、入院 3-5 日間で微量(全卵 1/256 個相当、うどん 0.2g、ピーナッツ 0.03g 以下)の摂取を開始した。その後、開始 1 ヶ月後までは増量せず、症状がなければ以降は 1 週間ごとに目標量(全卵 1/8 個相当、うどん 2g、ピーナッツ 0.5g)まで自宅で増量した。目標量を 1 ヶ月以上摂取したら抗ヒスタミン剤の内服を終了した。その後、無症状で 3 ヶ月間経過した場合に、2 週間除去後の中等量の食物経口負荷試験(鶏卵：全卵 1/2 個、小麦：うどん 25g、ピーナッツ 3g)を入院で実施した。方法に関しては予定通り実施した。

＜検査＞介入群とコントロール群で、血液検査は開始時、開始 1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後に実施した。12 ヶ月後に 2 週間除去後に中等量の食物経口負荷試験を実施した。治療中に

認めたアレルギー症状（副反応）を毎日日誌に記録した。介入群では、唾液検査・便検査は開始時、開始 1 ヶ月後、開始 12 カ月後に実施した。ダニまたはスギのアレルギー性鼻炎を合併する患者に対しては鼻炎症状アンケートを実施し（ダニは開始時から 1 カ月ごと、スギは開始時と 12 カ月後）、気管支喘息を合併する患者に対しては開始時、12 カ月後に肺機能検査を行った。OIT 開始時/1 ヶ月時/12 ヶ月時に便・唾液の細菌叢と血清短鎖脂肪酸の変化を測定した。

対照群：2018 年 7 月～2019 年 3 月に少量を目標量とした OIT(乳酸菌併用なし)を実施した患者を Historical control 群とし、1 年後に実施した中等量 of 食物経口負荷試験の成績/目標量の脱感作状態/脱落の割合を比較した。また、特異的 IgE 値の変化率を比較した。

症例数：介入群:49 例(鶏卵 18 例、小麦 12 例、ピーナッツ 19 例), Historical control 群: 48 例(鶏卵 16 例、小麦 11 例、ピーナッツ 19 例),

※介入群は目標症例数 60 例よりも 11 例少なく、Historical control 群は目標症例数 18 例よりも 41 例多くなった。

主要評価項目：12 か月後の中等量の耐性獲得の有無（中等量の負荷試験陰性後に自宅でも無症状で摂取可能であった場合を耐性獲得と定義した）

副次評価項目：介入群のみ：便・唾液中細菌叢（占有率 1%以上の菌株を解析対象とした）/血清短鎖脂肪酸（酢酸・iso-酪酸・n-酪酸・プロピオン酸・iso-吉草酸・n-吉草酸）の変化、アレルギー性鼻炎の症状の変化、呼吸機能の変化、治療中の副反応

介入群・コントロール群：脱感作状態・脱落の割合、特異的 IgE 値の変化

※1. 特異的 IgE 値は介入群と Historical control 群で低下率を追加で比較することとした。

※2. 特異的 IgG・IgG4 値を測定予定であったが、コロナウィルス感染症の拡大により、海外の検査機関での検体測定が困難となり、本研究での測定を中止した。

結果と考察

<患者背景>

介入群（ピーナッツ・鶏卵・小麦 OIT）の患者背景をお示しする。ピーナッツ（n = 19）/鶏卵(n =

18)/小麦(n = 12)OIT 実施者の年齢（中央値）は 6.8/8.2/6.9 歳、男児の割合は 37/50/67%、アナフィラキシー既往歴がある患者の割合は 63/56/75%であった。ピーナッツ/卵白/小麦特異的 IgE 値(中央値)は 24.8/26.4/160 kUA/L、Ara h 2/オボムコイド/omega-5 グリアジン特異的 IgE 値(中央値)は 22.2/18.2/8.9 kUA/L であり、事前の負荷試験の症状誘発閾値（タンパク量;中央値）は 25/7.5/13mg であった。

<主要評価項目>

・中等量耐性獲得の割合の比較

OIT 開始 12 ヶ月後に中等量の耐性獲得をしたのは、ピーナッツ OIT では、介入群で 21%(4/19 例)に対し、Historical control 群では 11% (2/19)だった ($p=0.66$)。鶏卵 OIT では 0% (0/18) vs 6% (1/16) ($p=0.47$)、小麦 OIT では 0% (0/12) vs 0% (0/11) ($p>0.99$)だった。

<副次評価項目>

・脱感作状態の割合の比較

また、目標量の脱感作状態を達成したのは、ピーナッツ OIT では 69% (13/19) vs 84% (16/19) ($p=0.45$)、鶏卵 OIT では 78%(14/18) vs 81% (13/16) ($p>0.99$)、小麦 OIT では 92% (11/12) vs 54% (6/11) ($p=0.07$)だった。脱落者はピーナッツ OIT では 11% (2/19) vs 6%(1/19)、鶏卵 OIT では 6%(1/18) vs 0% (1/16)、小麦 OIT では 8% (1/12) vs 0% (0/11)だった。

・腸内・唾液細菌叢の変化

介入群の腸内細菌叢の変化を抗原ごとに解析した。ピーナッツ OIT では開始時と比較して、12 ヶ月後には *Actinobacteria* 門が有意に減少($p=0.001$)、*Lactobacillus* 属は 1 ヶ月後に有意に増加し、12 ヶ月後も増加傾向であった ($p=0.03$ 、 0.08)(図 1)。酪酸産生菌である *Lachnospira* 属 12 ヶ月後に増加傾向であった ($p=0.029$)。鶏卵 OIT では開始時と比較して、*Lactobacillus* 属は 1 ヶ月後に有意に増加したが、12 ヶ月後は有意な変化は認めなかった ($p=0.01$ 、 0.25)。 *Lachnospira* 属は 12 ヶ月後に有意に増加した ($p=0.008$)。小麦 OIT では開始時と比較して、*Bacteroidetes* 門が有意に増加した ($p=0.002$)。 *Lactobacillus* 属は 1 ヶ月後と 12 ヶ月後は有意な変化は認めなかった。

また、ピーナッツ OIT(n = 16)で中等量耐性獲得を達成した群 (n = 4)と未達成群 (n = 12) で腸内細菌叢の比較をした。開始時は *Lactobacillus* 属の占有率に差を認めなかったが (p = 0.58)、開始 12 ヶ月後は、中等量耐性獲得達成群の方が未達成群よりも有意に高かった (p = 0.01)(図 1)。さらに、開始 12 ヶ月後は、中等量耐性獲得達成群の方が未達成群よりも酪酸細菌叢の *Subdoligranulum* 属の占有率が有意に高かった(p = 0.02)(図 2)。

唾液の細菌叢に関しては、ピーナッツ・鶏卵・小麦 OIT では、*Lactobacillus* 属は 1 ヶ月後と 12 ヶ月後は有意な変化は認めなかった。しかしながら、ピーナッツ OIT では、*Prevotella* 属は 1 ヶ月後に有意に増加し、12 ヶ月後にも増加傾向を認めた (p = 0.008、0.05)。

・血清短鎖脂肪酸値の変化

介入群の短鎖脂肪酸値の変化を抗原ごとに解析した。ピーナッツ OIT では開始時と比較して、12 ヶ月後にはプロピオン酸値が有意に低下した (p = 0.013) (図 3)。鶏卵 OIT では開始時と比較して、12 ヶ月後には 6 種類の短鎖脂肪酸値が有意に低下した (p = 0.01、0.03、0.01、0.02、0.04、0.03) (図 4)。小麦 OIT では開始時と比較して、12 ヶ月後には酢酸値が有意に低下した (p = 0.04) (図 5)。

また、ピーナッツ OIT(n = 16)で中等量耐性獲得を達成した群(n = 4)と未達成群 (n = 12) で短鎖脂肪酸値の変化の比較をしたが、6 種類の短鎖脂肪酸値の変化の違いを認めなかった。

・特異的 IgE 値の変化と低下率の比較

ピーナッツ・鶏卵・小麦 OIT において、介入群と Historical control 群のピーナッツ/卵白/小麦/Ara h 2/オボムコイド/omega-5 グリアジン特異的 IgE 値の変化と、低下率を比較した。

ピーナッツ OIT では、介入群と Historical control 群ではピーナッツ/Ara h 2 特異的 IgE 値は低下したが有意差は認めなかった (p = 0.40/0.35、0.14/0.08)。鶏卵 OIT では、介入群と Historical control 群では、卵白/オボムコイド特異的 IgE 値は共に有意に低下した (p = 0.0006/0.0003、共に p < 0.001)。小麦 OIT では、介入群では、小麦/omega-5 グリアジン特異的 IgE 値は低下したが有意差は認めなかった (p = 0.24/0.08)、Historical control 群では共に有意に低下した (共に p = 0.002)。また、ピーナッツ OIT では、ピーナッツ/Ara h 2 特異的 IgE 値の低下率は、介入群では 9/13%、

Historical control 群では 41/24%であった ($p = 0.02/0.39$)。鶏卵 OIT では、卵白/オボムコイド特異的 IgE 値の低下率は、介入群では 39/59%、Historical control 群では 45/46%であった ($p = 0.34/0.12$)。小麦 OIT では、小麦/ ω -5 グリアジン特異的 IgE 値の低下率は、介入群では 34/48%、Historical control 群では 31/58%であった ($p = 0.66/0.29$)

・治療中の副反応

介入群の OIT 中の副反応の頻度（摂取回数あたりの症状の頻度）は、ピーナッツ OIT では、総症状回数は 1.5% (1.5%)、中等症/重症症状の頻度は 0.2% (10/4384)/0%、消化器症状は 0.4% (41/4384)、皮膚症状は 0.2% (20/4384)、呼吸器症状は 0.2% (19/4384)であった。鶏卵 OIT では、総症状は 5.0% (236/4740)、中等症/重症症状の頻度は 0.2% (12/4740)/0%、消化器症状は 1.0% (88/4740)、皮膚症状は 0.4% (33/4740)、呼吸器症状は 0.1% (17/4740)であった。小麦 OIT では、総症状は 1.9% (51/2720)、中等症/重症症状の頻度は 0.6% (17/2720)/0%、消化器症状は 0.4% (20/2720)、皮膚症状は 0.2% (10/2720)、呼吸器症状は 0.3% (17/2720)であった。

・鼻炎症状と呼吸機能の変化

鼻炎がある患者に対する鼻炎スコアの変化と、気管支喘息を合併する患者に対する呼吸機能の変化は現在解析中である。

<考察>

・乳酸菌を併用することによる OIT の有効性の向上

ピーナッツアレルギー患者を対象に、乳酸菌併用 OIT/群/通常 OIT 群/コントロール群にランダム化した試験では、治療開始 1 年後に実施されたピーナッツを 8 週間完全除去後にピーナッツタンパク 4950mg の負荷試験が陰性だった患者の割合は 46%/51%/5%であった（乳酸菌併用 OIT vs OIT 群, $p = 0.52$ ）⁷⁾。本研究でも、ピーナッツ/鶏卵/小麦 OIT を実施した患者では、介入群と Historical control 群を比較して、OIT 開始 1 年後の中等量の耐性獲得を達成した患者割合に有意差は認めなかった($p = 0.66/0.47/>0.99$)。本研究は予定よりも介入群の症例数が少なくなったため、結果に影響した可能性がある。また、単施設での非ランダム化比較試験であり、更なる研究を実施し効果を検証

することが今後検討できる。

・腸内細菌叢の変化

ピーナッツ OIT を実施した成人患者 7 名の腸内細菌叢の変化を評価した研究では、*Clostridia* 綱の有意な増加を認めた⁸⁾。本研究の乳酸菌併用ピーナッツ OIT では *Lactobacillus* 属が 1 ヶ月後と 12 ヶ月後に増加傾向を認めた ($p = 0.03$ 、 0.08)。鶏卵 OIT では、*Lachnospira* 属が 12 ヶ月後に有意に増加した ($p = 0.008$)。本研究では、腸内細菌叢は Historical control 群と比較しておらず、乳酸菌併用による直接的効果は明らかではない。しかしながら、ピーナッツ OIT で増加した *Lactobacillus* 属は、腸管内のサイトカイン産生を抑制し食物アレルギーの耐性獲得を促進することが推測されている⁹⁾。鶏卵 OIT で増加した *Lachnospira* 属が産生する酪酸にはアレルギー発症を抑制する効果があることが示唆されている¹⁰⁾。従って、ピーナッツ・鶏卵の乳酸菌併用 OIT では耐性獲得を誘導する変化は起きている可能性が示唆された。今回は、抗原ごとに増加する細菌叢は異なっており、今後コントロール群を用いた腸内細菌叢の比較検証が必要である。また、ピーナッツ OIT では、中等量耐性獲得を達成した群は未達成群よりも *Lactobacillus* 属と *Subdoligranulum* 属が有意に定着した ($p = 0.01$ 、 0.02)。 *Subdoligranulum* 属は酪酸産生菌であり、TH2 細胞活性を抑制し、制御性 T 細胞に転写因子 ROR- γ t (食物アレルギーの乳幼児の細胞には欠損しているタンパク質) の発現を誘導することが明らかとなっている¹¹⁾。したがって、ピーナッツ OIT では乳酸菌を併用することによりアレルギー反応を抑制するメカニズムが誘導される可能性が示唆された。

・短鎖脂肪酸の変化

短鎖脂肪酸は腸内細菌叢の代謝産物であり、特に酪酸は様々な代謝経路を介して Treg 細胞を誘導すし、腸管免疫の恒常性を保つ IgA を産生する形質細胞の分化を誘導することが報告されている¹⁰⁾。鶏卵アレルギーの患者では、健常コントロールと比較して酪酸産生菌の占有率が有意に低かった¹²⁾。また、乳幼児期の便中の短鎖脂肪酸が多かった児はその後のアレルギー疾患の発症率が有意に低かった¹³⁾。従って、酪酸産生はアレルギー発症を抑制する効果があることが示唆されている。OIT 中の血清短鎖脂肪酸の変化は明らかになっていない。本研究では、OIT 開始時と比較して 12 ヶ月後

に、ピーナッツ OIT ではプロピオン酸が、小麦 OIT では酢酸が、鶏卵 OIT では 6 種類の短鎖脂肪酸が有意に低下した。一方で、文献 12 や 13 の文献では、血清ではなく腸管内の短鎖脂肪酸を測定していたため、本研究との比較検証は困難である。本研究の結果からは一定の見解は得られなかったため、血清短鎖脂肪酸の変化に関しては、症例集積と追加検証が必要である。

今後の研究活動について

今後、Historical control 群の腸内細菌叢を測定し比較検証することが検討できる。短鎖脂肪酸に関しては、OIT を実施していない食物アレルギー児の血清での測定が必要であり、有効性と安全性に関する評価に関しては、更なる症例集積が必要である。また、乳酸菌を併用した OIT の有効性を検証するため、多施設で実施する二重盲検ランダム化比較試験が開始された（独立行政法人国立病院機構ネットワーク研究）。今後、症例数を集積し十分な検証が実施されることが期待される。

参考文献

- 1) Miura Y et al. PAI. 2021;32:734–741,
- 2) Yanagida N et al. IAAI. 2016;171(3-4):265-8,
- 3) Nagakura KI et al. PAI. 2018;29(5):512-518,
- 4) Mimi L. K. Tang et al. JACI 2015;135:737-44,
- 5) Roberto Berni Canani et al. JACI. 2017;139:1906-13,
- 6) Roberto Berni Canani et al. J ISME 2016; 10:742-750.
- 7) Paxton Loke et al. Lancet Child Adolesc Health 2022;6:171-84
- 8) Ziyuan He et al.Allergy. 2021.76(3):927-930
- 9) Pohjavouri et al.J allergy Clin Immunol. 114(1):131-136
- 10) Hirota M et al. Luminacoids reserch.vol23;1(2019)
- 11) Azza Abdel-Gadir et al. Nat Med.25(7):1164-1174
- 12) Yamagishi M et al. Allergy.2021;76(7):2279-2282
- 13) Roduit C et al. Allergy.2019;74:799-809

以上