

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	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、2023 年 3 月末時点までに 232 症例が参加した。各症例はリクルート時の鶏卵摂取量でグループ分けしていて、卵白摂取不可の「持続群」が 98 人と最も多く、加熱卵白 1 g 以上、10 g 未満「段階増量群」が 37 人、加熱卵白 10 g 以上摂取可の「耐性獲得群」が 61 人、鶏卵アレルギーの既往のない「コントロール群」が 36 人となっている。初回のおよび 2 回目の検体提供時に 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を追跡

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对応、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、1 年間で 130 症例がエントリーした。2022 年度は登録後の症例からの 1 年後の検体、および新規参加患者からの検体があり、研究開始時から合計 232 人の患者より、延べ 400 検体を採取した。

患者を 4 群に分けているので、各群の定義について記載する(図 1)。最も重症度が高いのが「持続群」で、加熱卵白除去中の患者が含まれ、全卵加工品のみ摂取中の患者も含まれる。次に、「段階増量群」は加熱卵白少量摂取可となった患者で、具体的には加熱卵白 1 g 以上、10 g 未満を摂取中の患者が該当する。加熱卵白 10 g 以上摂取している患者は、本研究では「耐性獲得群」と定義している。比較対象としての「コントロール群」は、鶏卵アレルギーの既往のない患者で構成されている。各症例はリクルート時の鶏卵摂取量でグループ分けしていて、「持続群」が 98 人と最も多く、「段階増量群」が 37 人、「耐性獲得群」が 61 人、「コントロール群」が 36 人となっている。

加熱卵白摂取開始後の進め方は当初の計画通りである。「持続群」の患者のうち卵黄摂取可となった児にはまず、加熱卵白 1 g 負荷試験を行った。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）摂取を継続し、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った。誘発のなかった児では、徐々に卵白摂取量を増量した。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っている。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関連するバイオマーカーの探索を行っている。

* 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った。
- ・抗原特異的好塩基球活性化試験は採血翌日に株式会社 BML で活性化マーカー CD203c を測定した。

・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）研究室で行っている。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、後日解析している。

上野研究室には 60 色パネルが可能な 5 レーザー FACS Aurora があり、CXCR5, CXCR3, CCR6, CCR7, PD-1, ICOS, CD25, FoxP3 などの発現によって、TFH, TFR 細胞及びそのサブセットの解析を行う。また、末梢血単核球を卵白抗原で 24 時間培養し、上清中サイトカイン（CXCL13, IL-13, IL-4, IL-5, IL-10, IL-21, TNF- α , IFN- γ ）を Bio-Rad BioPlex200 を用いて測定する。

結果と考察

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、1 年間で 130 症例がエントリーした。2022 年度は登録後の症例からの 1 年後の検体、および新規参加患者からの検体があり、研究開始時から合計 232 人の患者より、延べ 400 検体を採取した(図 1)。

卵白・卵黄・オボムコイド特異的 IgE 抗体価が、各群で差があるかを検討した(図 2)。「持続群」が特異的 IgE が最も多く、「段階増量群」、「耐性獲得群」、「コントロール群」の順に低下しており、臨床症状と合致する所見だった。また好塩基球活性化試験結果も、同様に「持続群」で最も多く、「段階増量群」、「耐性獲得群」、「コントロール群」の順に低下していた(図 3-1,2)。

またフローサイトメトリーを用いた解析については、健常者の検体を用いて、各細胞集団が検出されることを確認した、

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, 「持続群」と「耐性獲得群」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結果が、臨床的な負荷試験結果とどのように相関するかを評価する。2については、各群それぞれ30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、「持続群」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の頻度が低いなどがある。これら进行评估しつつ、新規に同定された指標の候補についても調べていく。

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に差のある指標が、「段階増量群」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2023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年度内に検体採取を完了し、2024年度に保存検体の解析を進めて成果を出すことを目標として進める。

当初の予定より研究協力患者数が増加したため、個々の解析は少し遅れているが、コホートが大きいほど最終的に有益な知見が得られる可能性が高いため、協力の意思がある患者には積極的に参加してもらっている。

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。

検体数の増加に伴い、研究費の支出として、委託費が高くなった。今年度に研究用採血を行った270症例の好塩基球活性化試験をBML社で行ったために、昨年の2倍に近い金額が委託検査費として必要となった。そこで京都大学小児科で獲得している免疫・アレルギー疾患を対象とする研究費を併用して、委託検査費を支払った。またフローサイトメトリーを用いた表面抗原の解析には、

上野研究室で別の研究目的に購入済みの抗体を使用し、消耗品費を節約した。

今後の研究活動について

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, 「持続群」と「耐性獲得群」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2023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年度内に検体採取を完了し、2024年度に保存検体の解析を進めて成果を出すことを目標として進める。

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) Itoh N, Yasutomi M, Kawasaki A, Murai H, Nomura E, Hagihara Y, Ogura K, Ohshima Y. Ovomucoid-specific IgD increases in children who naturally outgrow egg allergy in a cross-sectional study. *Allergy*. 2021 Aug;76(8):2607-2609.

以上