

食品に対する乳児期のアレルギー性反応獲得メカニズムと発症リスク評価



木戸 博 (きど ひろし)

国立大学法人徳島大学 先端酵素学研究所 特任教授

1973年 3月 弘前大学医学部卒業
1977年12月 徳島大学大学院医学研究科博士課程修了
医学博士 (徳島大学)
1979年 1月 ロッシュ分子生物学研究所研究員
1981年 2月 徳島大学助手
1989年 5月 徳島大学助教授
1993年 7月 徳島大学教授
2013年 4月 徳島大学先端酵素学研究所 生体防御・感染症病態代謝研究部門
寄附講座特任教授 (現職)


(その他兼務等)

徳島大学疾患酵素学研究センター長 (2007-2011年)、全国附置研究所・センター長会議 第二部長 (2010-2011年)、International Proteolysis Society (President 2009-2011年、Vice President 2001-2005年)、日本生化学会 評議員、日本病態プロテアーゼ学会 理事、評議員、日本界面医学会 理事、評議員

<研究成果概要>

本研究では、IgEの抗原親和性測定法、母乳、血液、環境中のアレルゲン定量法、乳児食物アレルギーの発症機序の解析研究が実施された。研究には、微量検体で定量解析が可能なdensely carboxylated protein (DCP) アレイが用いられた。

IgEのアレルゲン親和性解析では、抗原の競合的結合阻害によるIC50値で親和性を表す方法が選択された。他の抗原親和性解析方法として、蛋白質の立体構造修飾試薬を用いる方法が知られているが、IgE抗体以外に抗原の立体構造にも影響するため、適切な方法ではないと判定した。母乳や環境中のアレルゲン濃度測定は、DCPアレイを用いたELISA法が確立された。しかし、血清中のアレルゲンは、IgGとの複合体形成が強固でアレルゲンの解離が困難なため定量測定が困難であった。食物アレルギーの発症機序解析では、2013 -2014年に生まれた乳児84名がプロジェクトに参加した。これらの乳児を対象に、卵白 (EW) や牛乳 (CM) 抗原に対する抗体産生を出生時から生後6か月まで、イムノグロブリンクラススイッチの視点で解析した。その結果、出生後から大量のCM抗原を摂取する人工栄養児では、生後2か月の早期にCM特異的IgG1とIgAの高濃度増加と、生後4か月のIgEとIgG2の増加を特徴とするクラススイッチ成熟過程 (Type1) が観察された。Type1では、低いIgE/IgG1比とIgG2産生を伴う低親和性IgE産生をバイオマーカーとして、経口免疫寛容に進むと示唆された。一方、母乳に微量に含まれるEWの感作を受ける母乳栄養児の場合、多くはゆっくりとしたクラススイッチ成熟でType1が進むが、IgG1増加が不十分な時に一部の乳児で湿疹による経皮感作を受けると、IgG2産生を伴わない高親和性IgE産生のクラススイッチ成熟過程 (Type2) が観察され、高いIgE/IgG1比と高抗原親和性IgEバイオマーカーとした食物アレルギーへのハイリスク者と推定された。



食品に対する乳幼児期のアレルギー性反応獲得 メカニズムと発症リスク評価

(課題番号: 1505)

徳島大学疾患酵素学研究センター
木戸 博

国立成育医療研究センター
大矢幸弘

**平成29年度食品健康影響評価技術
研究成果発表会
CO I 開示**

発表者名： 木戸 博

発表に関連し、開示すべきCO I 関係にある企業などありません。

(背景)

国民病としてのアレルギーを取り巻く現状と対策

現状

乳児の約20%に食物アレルギーやアトピーが見られ、中には小児期の喘息に発展する患者が見られる。成人の花粉症を含めると国民の約30%が何らかのアレルギーに罹患していることから、国民病とされている。

対策

(行政) アレルギー疾患対策基本法(H26年6月20日)

予防

1. アレルギー性反応獲得のメカニズムに関する研究と、予防と治療に関する最近の研究の目覚ましい進展

治療

2. アレルギー治療のための新規診断法が求められており、減感作療法の有効例と無効例を判別する早期診断が可能となった。

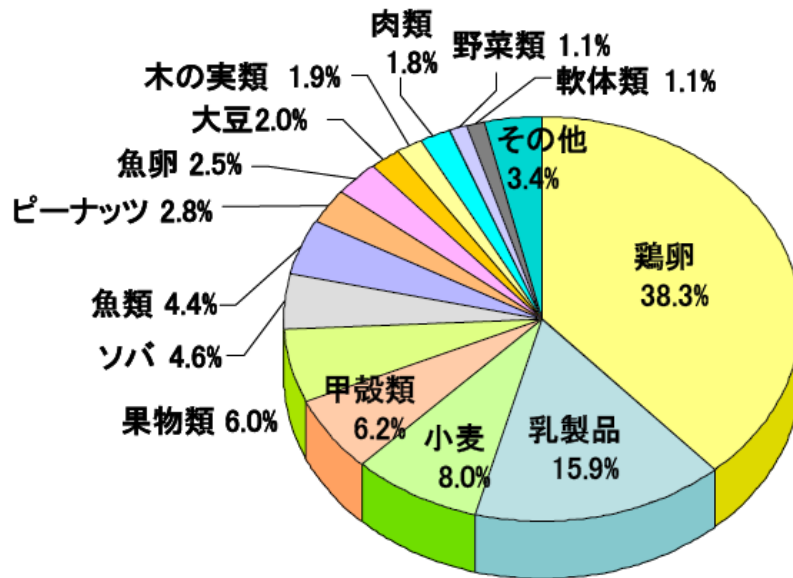
食物アレルギーの原因食品

特定原材料等
(表示義務)

卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに

(食品表示法)

《全年齢における原因食物》



(平成15年度厚生労働科学研究報告書より)

《年齢別主な原因食物》

	0歳 n=1270	1歳 n=699	2,3歳 n=594	4-6歳 n=454	7-19歳 n=499	20歳以上 n=366
No.1	鶏卵 62%	鶏卵 45%	鶏卵 30%	鶏卵 23%	甲殻類 16%	甲殻類 18%
No.2	乳製品 20%	乳製品 16%	乳製品 20%	乳製品 19%	鶏卵 15%	小麦 15%
No.3	小麦 7%	小麦 7%	小麦 8%	甲殻類 9%	そば 11%	果物類 13%
No.4		魚卵 7%	そば 8%	果物類 9%	小麦 10%	魚類 11%
No.5		魚類 5%	魚卵 5%	ピーナッツ 6%	果物類 9%	そば 7%
小計	89%	80%	71%	66%	61%	64%

[調査対象]

食物摂食後60分以内に何らかの症状が出現し、かつ医療機関を受診した患者

(今井孝成、海老澤元宏:平成14年・17年度厚生労働科学研究報告書より一部改変、
<http://www.allergy-ijp/kayumi/food-allergy/allergy-book/basic-02.html>)

“食品の安全確保”における現状と問題点

食の安全確保のために、食品衛生法関連法令(平成13年施行)



表示義務品目(7品目)	小麦、そば、卵、乳、落花生、えび、かに
表示推奨品目(20品目)	あわび、いか、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、やまいも、りんご、バナナ、いくら、カシューナッツ、ごま、もも、まつたけ、オレンジ、ゼラチン

現行の食品検査法(2段階検査)

検査法	判定	所要日数(例)
スクリーニング検査 (ELISA法)	定量	6(至急)~21営業日
確認検査 (ウエスタンブロット法) (PCR法)	定性	} 6~13日間
	定性	



ELISA法による検査

{(1例)(財)日本食品分析センター、<http://www.jfri.or.jp/item/allergens/allergens1.html>}

アレルギー医療革命

花粉症も食物アレルギーも治せる時代に!

NHKスペシャル取材班

アレルギーは
とにかく排除する?

予防のために
離乳食を遅らせる?

これらの“常識”は
すべて間違いでした!

妊娠中、授乳中の
母の食事が原因?

ほんとうのカギは免疫細胞Tレグ
予防と完治の
トビラが開いた!



文藝春秋刊
定価(本体1300円+税)

アレルギー医療革命、
その診断と治療を支える検査

1. クラススイッチのモニター
2. 抗原親和性の測定:
Low affinity IgE
High affinity gE

Natsume O, et al., Two-step egg introduction for preventing egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIR study): a double-blind, placebo-controlled, parallel-group randomized clinical trial.

Lancet 2017; 389: 276-286

講演の要点

1. 食物アレルギーの発症機序と経口免疫寛容の機序が解明されつつあり、食物アレルギーの予防法と治療法が明らかになってきた。
2. 高感度、低侵襲性の新しいアレルゲン検査法の開発によって、これまで明らかになっていなかった食物アレルギーと経口免疫寛容の違いが、具体的なバイオマーカーによって論ずることができるようになってきた。
3. 従来の血清学的アレルギー診断法は、アレルギーの原因物質の検索であったが、新規検査法の開発により、アレルギーの予防と治療のための診断法が明らかになってきた。



(問題提起)

大多数の乳幼児が獲得する経口免疫寛容と、一部の乳幼児に発症する食物アレルギーは、何がこの違いの原因になっているのだろうか。

(解決方法)

出生直後から授乳期の間食物アレルギーに対する体内免疫動態調査

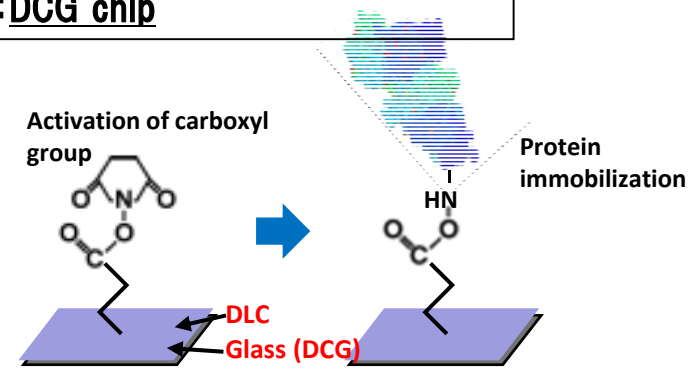
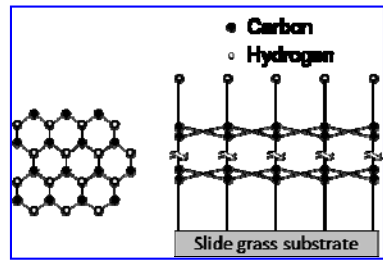
1. 高性能タンパクチップ: Densely Carboxylated Protein (DCP) Chip
2. イムノグロブリンクラススイッチから見た乳児期の経口免疫寛容と、アレルギー反応獲得のメカニズムと発症リスク評価

イムノグロブリンクラススイッチを
モニターする高性能タンパクチップ

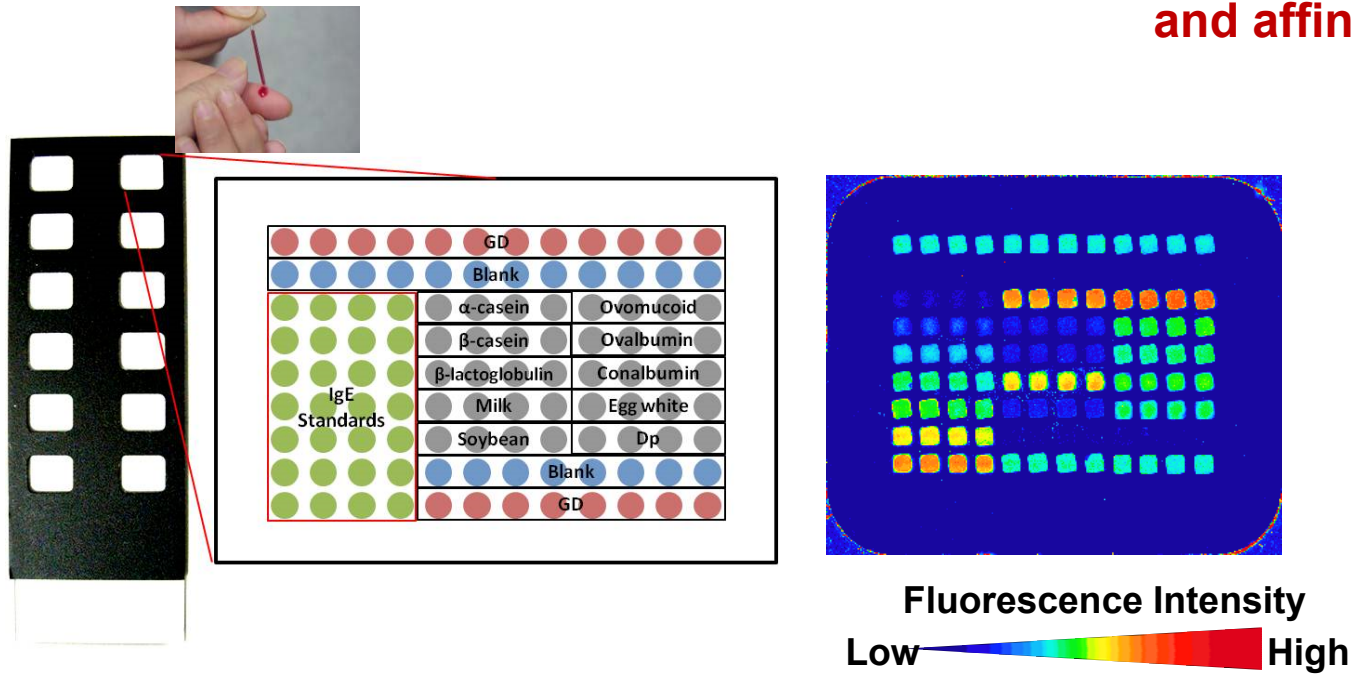
高性能タンパクチップとは？

Densely carboxylated protein chip: DCP chip

- Diamond-like carbon (DLC) coated and carboxylated chip : DLC chip
- Densely carboxylated glass slide chip: DCG chip



(B) Small amount of specimen (10-20 μ L) for multiple assays (class switching and affinity assays)



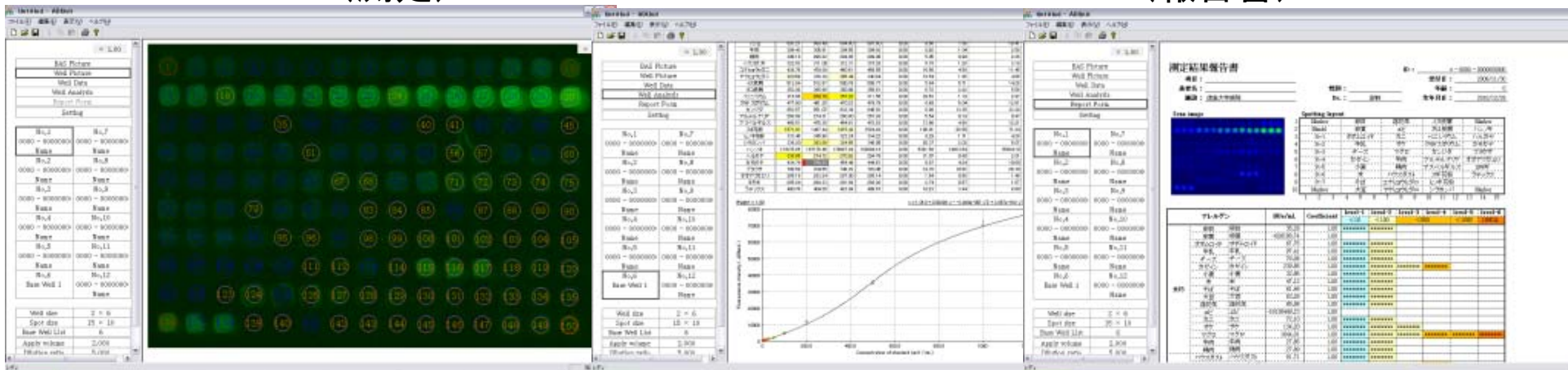
DCPアレルギー診断チップ



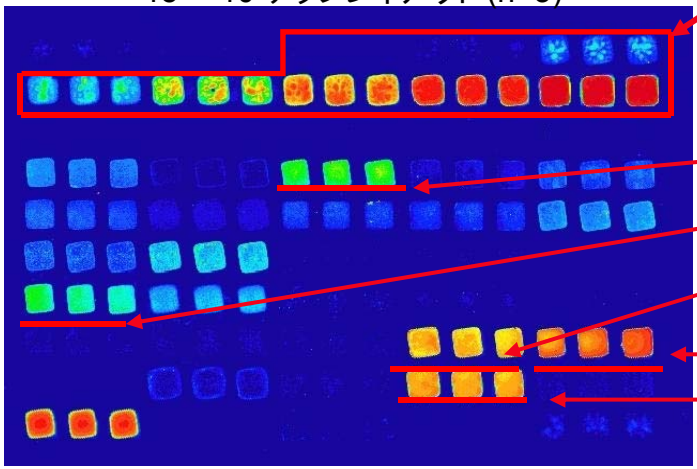
(測定)

(報告書)

Report



15 × 10 チップレイアウト (n=3)



- Human IgE Standard
50 ~ 20000 IU/mL
- 大豆
- 小麦
- オオアワガエリ
- 卵白
- 落花生

Marker	Buffer	St-1	St-2	St-3
St-4	St-5	St-6	St-7	St-8
カゼイン	サケ	大豆	マグロ	卵黄
牛乳	米	エビ	カニ	ハウスダスト
コナヒョウヒダニ	ヤケヒョウヒダニ	イヌ皮膚	ネコ皮膚	β-ラクトグロブリン
小麦	グルテン	グリアジン	スギ花粉	ヒノキ花粉
ハルガヤ	カモガヤ	ブタクサ	オオアワガエリ	卵白
	オボムコイド	そば	落花生	
Total IgE				Marker

DCPアレルギー診断チップの特徴

微量(低侵襲性)

多項目

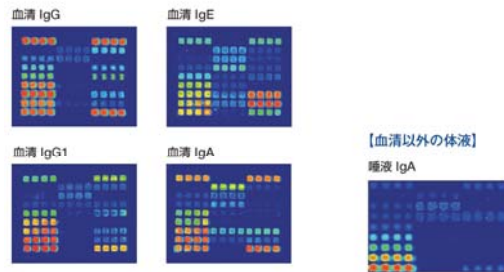
臍帯血にも対応できる高感度化

超微量検体測定



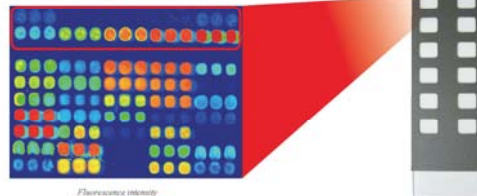
10-20 μL の血清で

アレルギー特異的抗体(IgE, IgA, IgG, IgG1, IgG4)の
全測定が可能
1抗体検査当たり 15 μL (再検査分を含む)



臨床研究(試験研究用)に最適化

インターナルスタンダード



Marker	Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
Eggwhite	Wheat	Strawberry	Don't know	Crab	Cider
Egg yolk	Chicken	Crab	Don't know	Strawberry	Don't know
Orchard grass	Chickpea	Sesame	Don't know	Don't know	Don't know
Milk	Rice	Tritic	Don't know	Don't know	Don't know
Casein	Beckhoof	Meat	Cat dander	Stagnant	Don't know
Chickpea	Sesame	Don't know	Don't know	Don't know	Don't know
Marker	Positve	Don't know	Marker	Don't know	Marker

変動するアレルギーパターン情報の採取

食物抗原・吸入抗原・
Molecular Allergen(精製抗原)の
38抗原の同時搭載可能

検査項目

食物抗原	吸入抗原	Molecular Allergen(精製抗原)
卵白	ハウスダスト	オボムコイド
卵黄	コナヒョウヒダニ	オボアルブミン
牛乳	ヤケヒョウヒダニ	カゼイン
小麦	イヌ皮膚	α -カゼイン
コム	ネコ皮膚	β -カゼイン
ソバ	スギ	β -ラクトグロブリン
大豆	ヒノキ	Alt a1
ピーナッツ	シラカバ	Alt a6
エビ	ハンノキ	グルテン
カニ	ハルガヤ	グリアジン
サケ	カモガヤ	Alt a8
マグロ	ブタクサ	Cla h8
	オオアワガエリ	Ara h1
		Asp r1

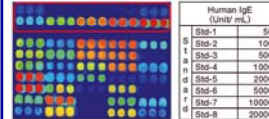
高感度測定

内部標準を同時搭載した高感度で正確な測定

Analytica Chimica Acta 706 (2011) Pages 321-327

Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins
Koichi Suzuki*, Mineyoshi Hiyoshi*, Hitomi Tada*, Miwa Bando*, Takao Ichioka*, Norio Kamemura*, Hiroshi Kido**

インターナルスタンダード



Human IgE (Unit/mL)
S Std-1
S Std-2
S Std-3
S Std-4
S Std-5
S Std-6
S Std-7
S Std-8

血清濃度	本検査 (fluorescence units)				従来品			
	牛乳	卵白	鶏卵	オボムコイド	牛乳	卵白	鶏卵	オボムコイド
1.5	>1500	>1500	>1500	>1500	36.1	49.2	33.3	33.9
1.10	>1500	>1500	1366	1382	17.3	26.3	16.5	17.0
1.50	445.6	633.2	527.5	295.6	3.96	5.55	3.49	3.17
1.100	191.0	306.3	290.7	121.2	1.96	2.69	1.81	1.67
1.200	99.16	161.8	148.1	78.16	1.36	1.42	0.940	0.960
1.800	61.71	84.22	71.33	28.17	0.640	0.710	0.530	0.440
1.600	38.88	66.67	48.64	23.62	0.390	0.500	ND*	ND*
1.1200	21.80	41.56	25.06	12.59	ND*	ND*	ND*	ND*
1.2400	10.63	25.17	19.07	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
1.4800	ND*	24.44	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
1.9600	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*

従来品に比べ、4-8倍の高感度化を達成。

臍帯血中アレルギー特異抗体のスクリーニング例

Journal of Allergy and Clinical Immunology Volume 120, Issue 1, July 2012, Pages 113-121.e2

Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray

Norio Kamemura, MSc,* Hitomi Tada, MSc,* Naoki Shimojo, MD, PhD,* Yoshinori Morita, MD, PhD,* Yoichi Kohno, MD, PhD,* Takao Ichioka, MD,* Koichi Suzuki, MSc,* Kenji Kubota, MSc,* Mineyoshi Hiyoshi, PhD,* and Hiroshi Kido, MD, PhD*

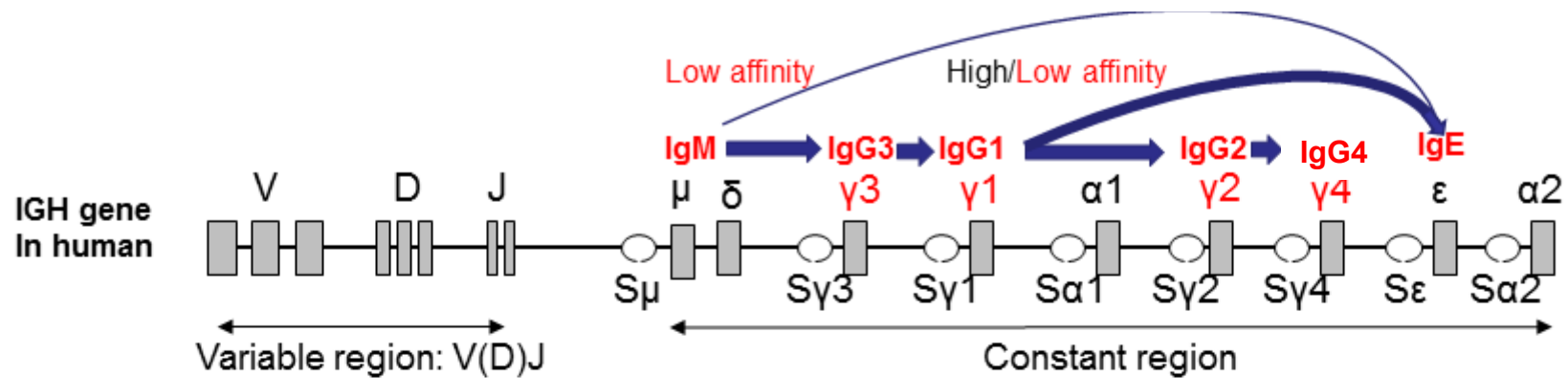
Low affinity IgE
の検出が可能

IgE抗体産生の初発段階に産生される Low affinity IgE の検出が可能で、アレルギー、アトピーの発症に関与する Low から High への変換をモニターできる。

予防に向けたバイオマーカーの可能性

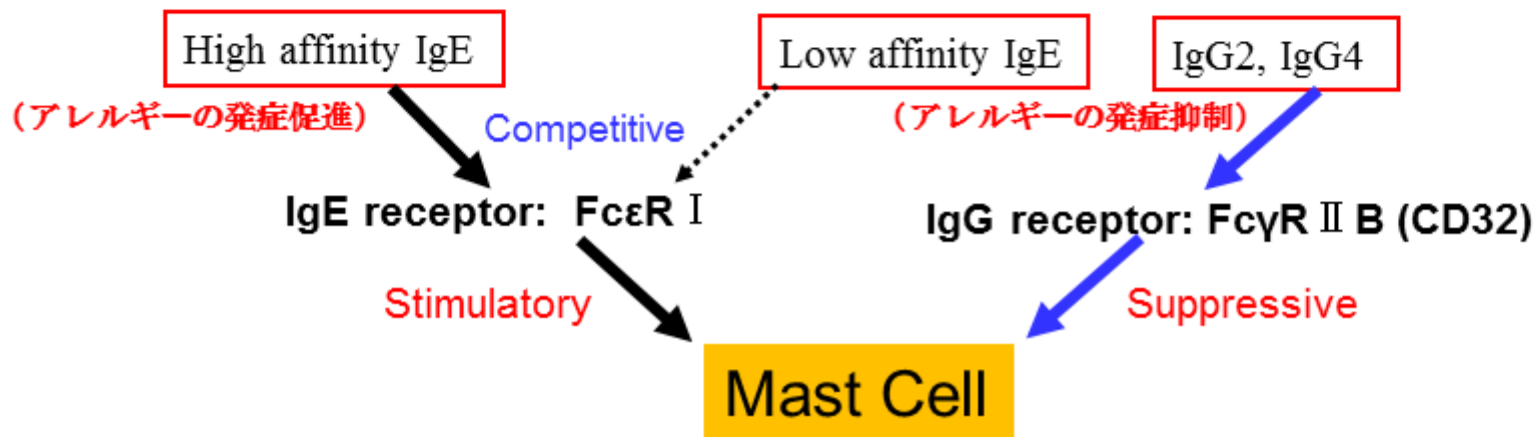
Ref: Kamemura N, et al. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J. Allergy Clin. Immunol.* Doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.034, 2013

イムノグロブリンクラススイッチとは？



(時間軸に沿ってクラススイッチが進む：次のeventを予測できる)

Sequential class switching and affinity maturation	IgM	IgG3	IgG1	IgG2	IgG4
Repeated antigen stimulation	→				
Somatic hyper Mutation (SHM)	+	++	+++	+++	++++
Affinity maturation	+	++	+++	+++	++++



授乳期の食物アレルギーに対する 免疫動態調査

食物アレルギーと経口免疫寛容の違いが、**具体的なバイオマーカー**によって論ずることができるようになってきた。

対象乳児の背景

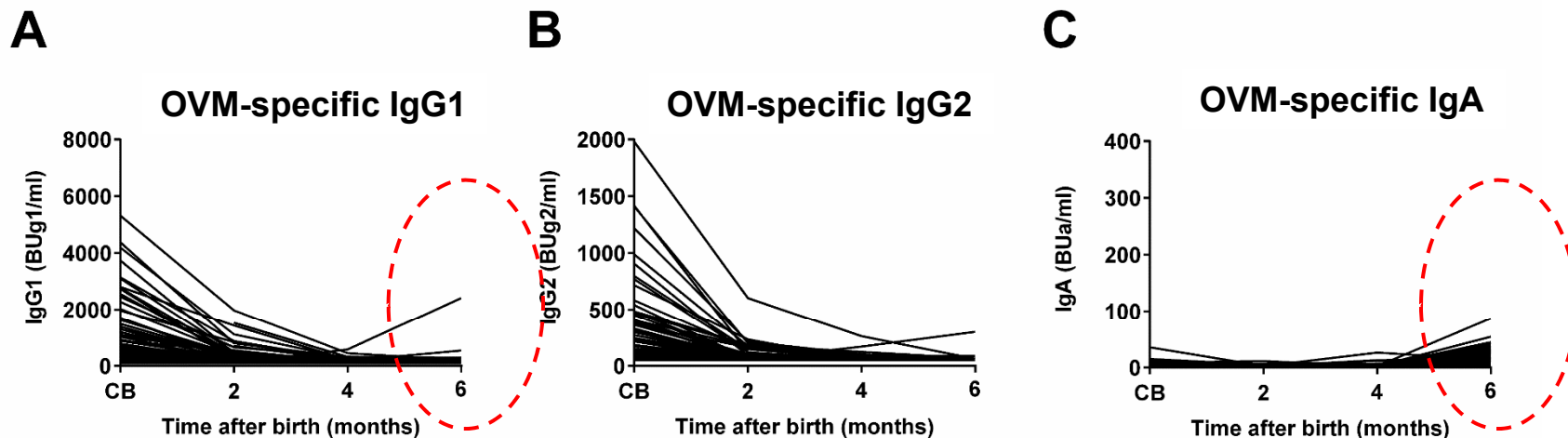
検体採取：臍帯血、2ヶ月齢、4ヶ月齢、6ヶ月齢

調査項目：卵、ミルク抗原特異的 IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4値とクラススイッチ

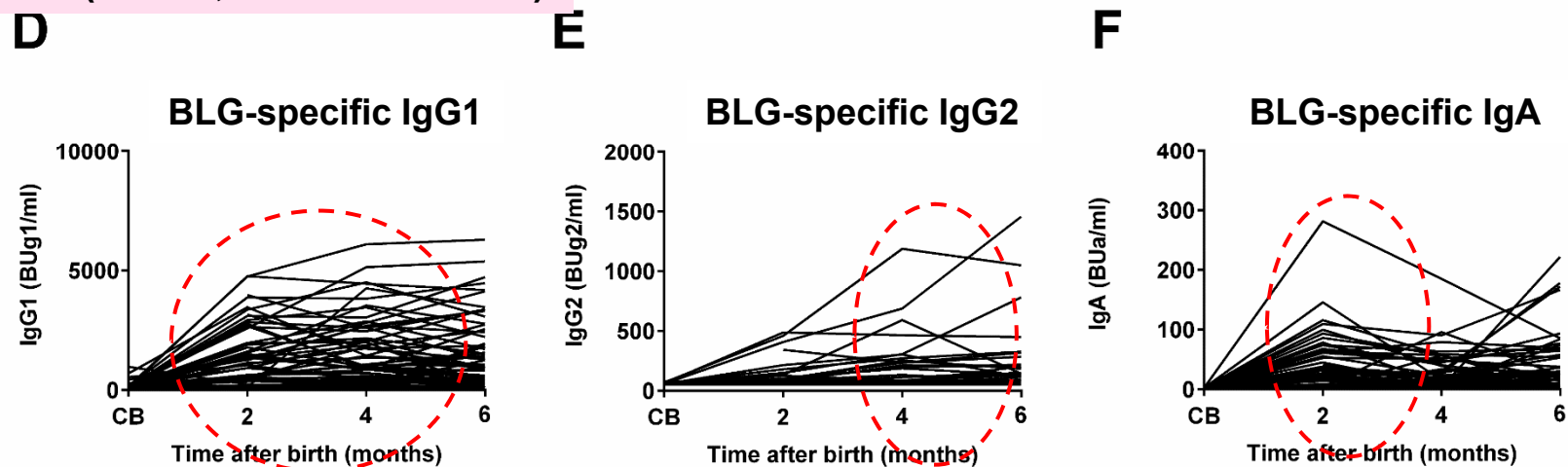
対象者	84人
性別	男児 42人 (50%)
	女児 42人 (50%)
栄養法	母乳栄養 31人 (37%) 鶏卵アレルギー
	ミルクアレルギー 混合栄養 47人 (56%) 鶏卵アレルギー
	ミルクアレルギー 人工栄養 6人 (7%)
6カ月までの湿疹の有無	湿疹あり 42人 (50%)
	湿疹なし 42人 (50%)
両親のアレルギー疾患の有無	両方あり 29人 (35%)
	父のみ 20人 (24%)
	母のみ 20人 (24%)
	両方なし 11人 (13%)
	いずれかの回答なし 4人 (5%)

母乳栄養と人工栄養で大きく異なるイムグロブリンクラススイッチのパターン

母乳栄養 ($n = 78$, 鶏卵アレルギー)



人工栄養 ($n = 53$, ミルクアレルギー)

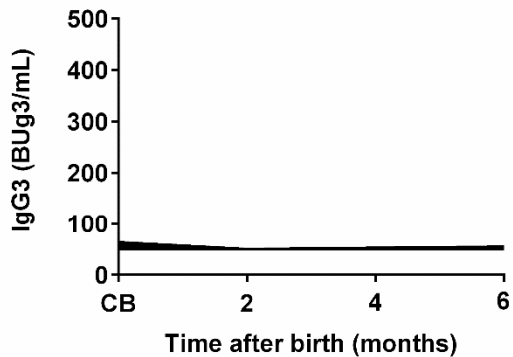


母乳栄養と人工栄養で大きく異なるイムグロブリンクラススイッチのパターン

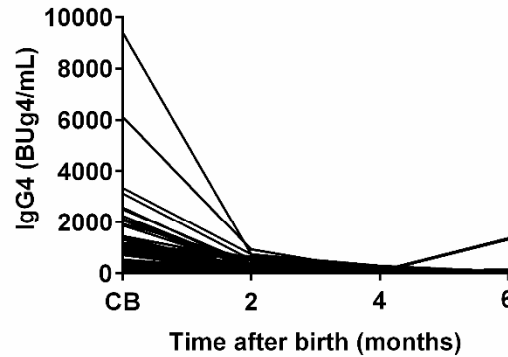


母乳栄養 (n = 78, 鶏卵アレルギー)

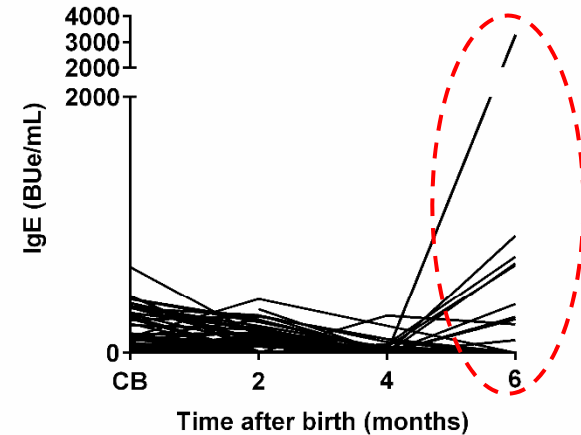
A OVM-specific IgG3



B OVM-specific IgG4

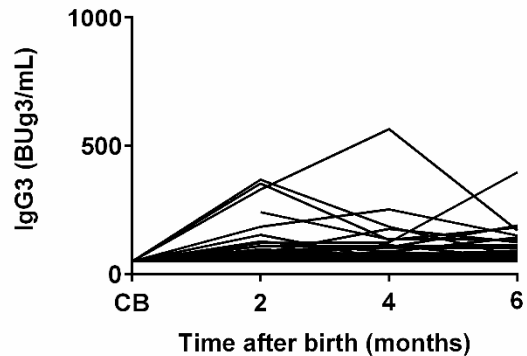


C OVM-specific IgE

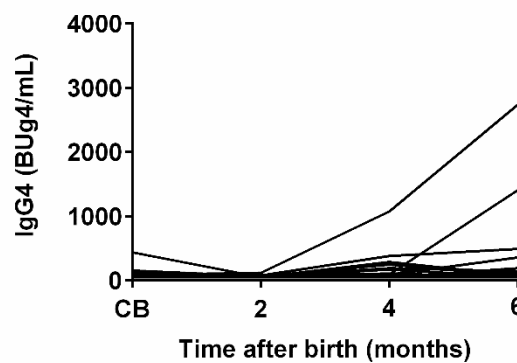


人工栄養 (n = 53, ミルクアレルギー)

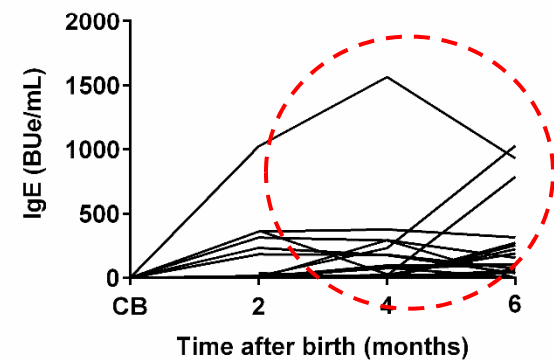
D BLG-specific IgG3



E BLG-specific IgG4

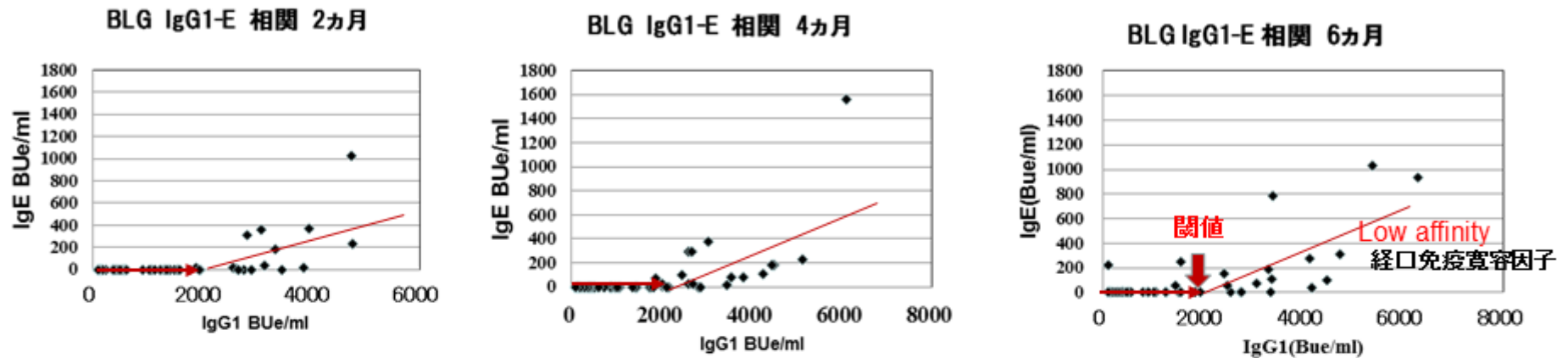


F BLG-specific IgE

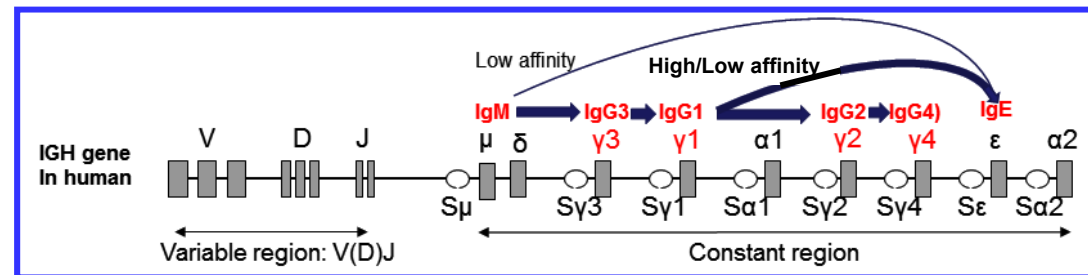
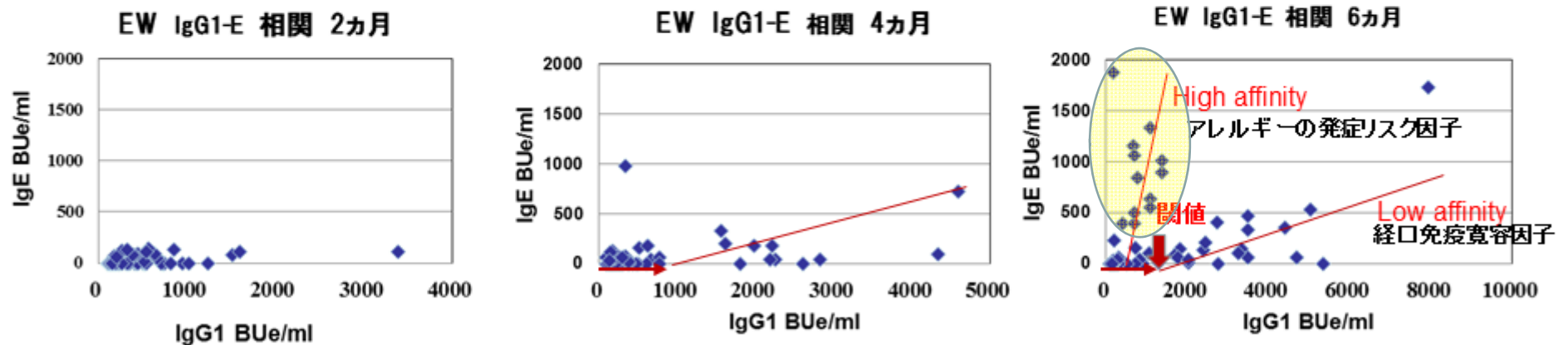


生後6ヶ月までに明らかになる鶏卵、ミルクアレルギーの経口免疫寛容とアレルギー発症因子

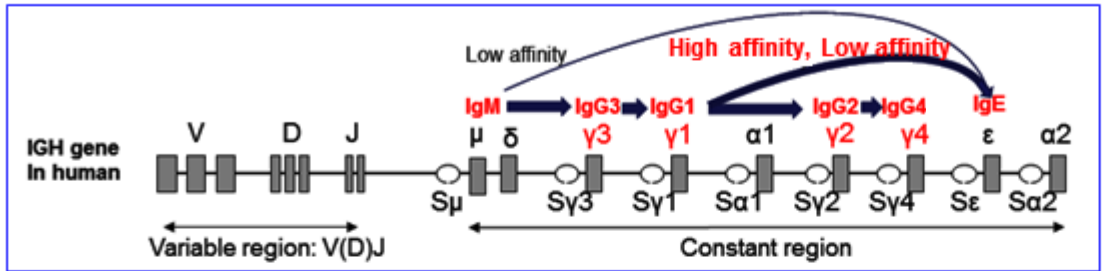
(BLG, beta-lactoglobulin: 人工乳由来)



(EW, egg white: 母乳由来)

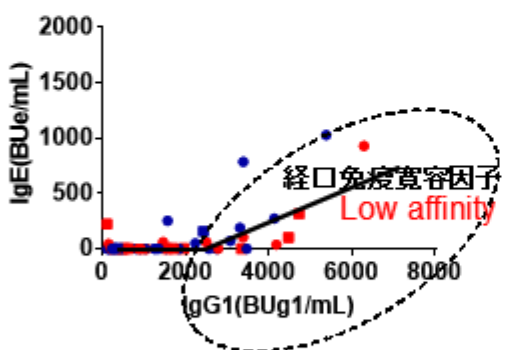


IgG1→IgE, IgG1→IgG2 クラススイッチと閾値

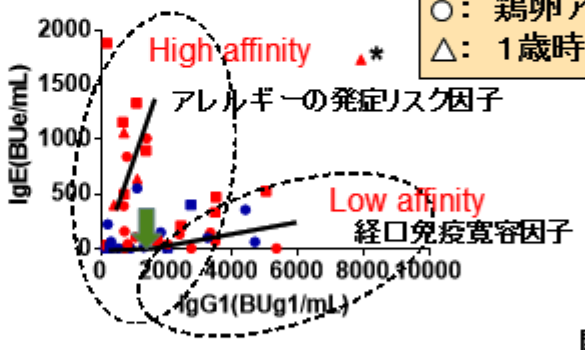


(生後6ヶ月時点でのデータ)

(A) IgG1/IgE class switching of beta-lactoglobulin

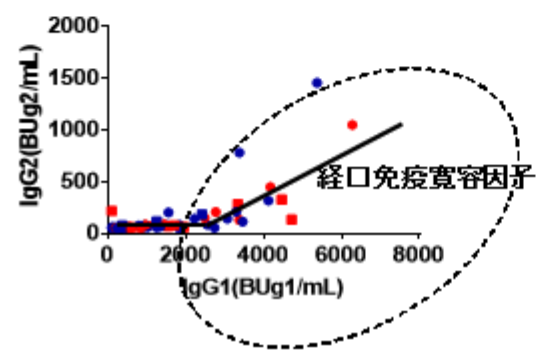


(C) IgG1/IgE class switching of Egg white

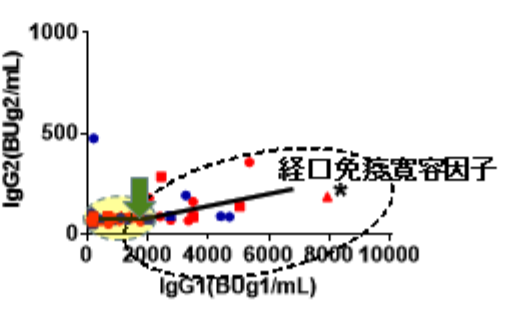


赤: 湿疹あり
 青: 湿疹なし
 □: 1歳時に鶏卵アレルギー無し
 ○: 鶏卵アレルギーなし
 △: 1歳時に鶏卵アレルギーと診断

(B) IgG1/IgG2 class switching of beta-lactoglobulin

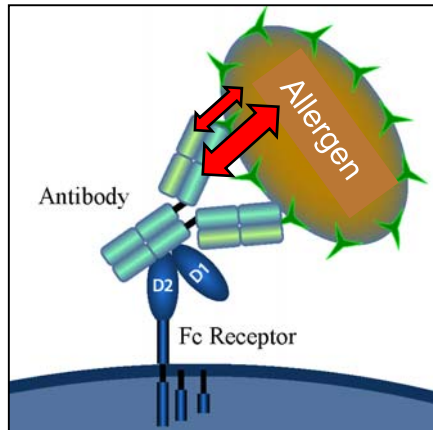


(D) IgG1/IgG2 class switching of Egg white

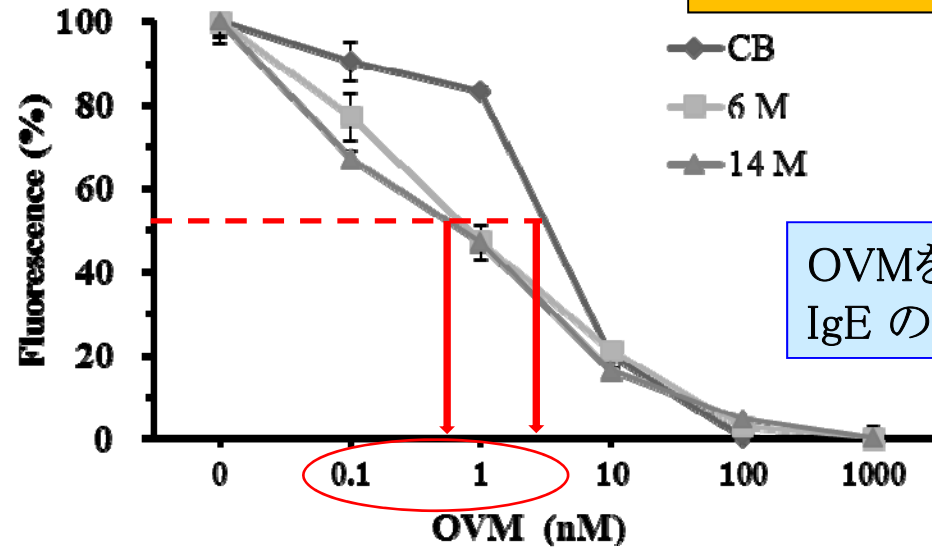


閾値
 ↓

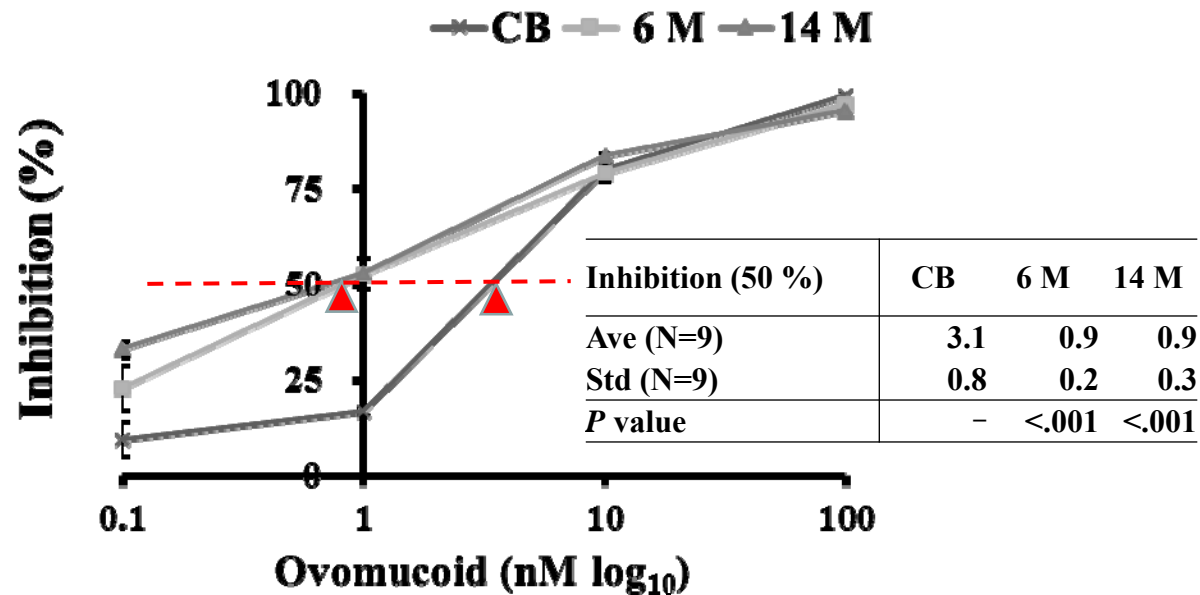
抗原特異的IgE親和性 (Affinity/Avidity) の測定



抗原による競合的結合阻害効果

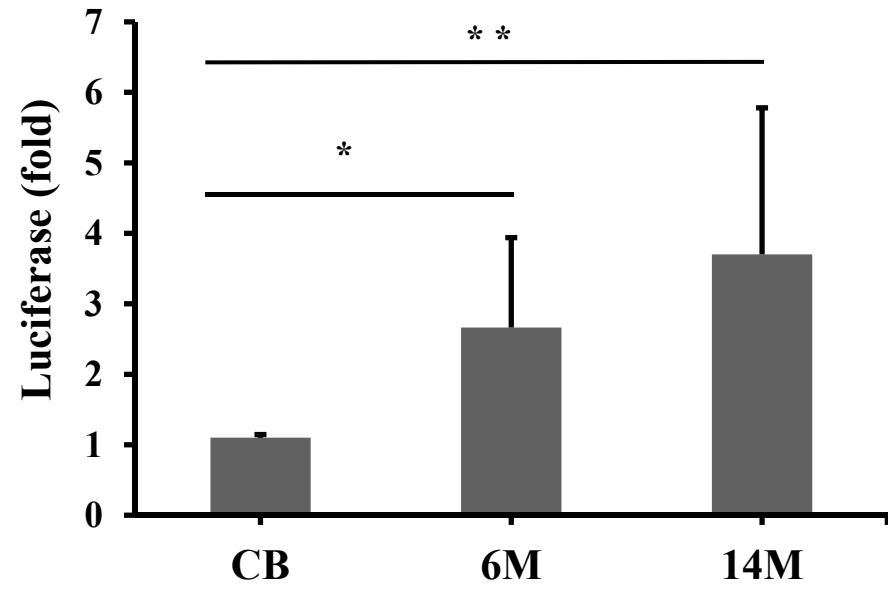
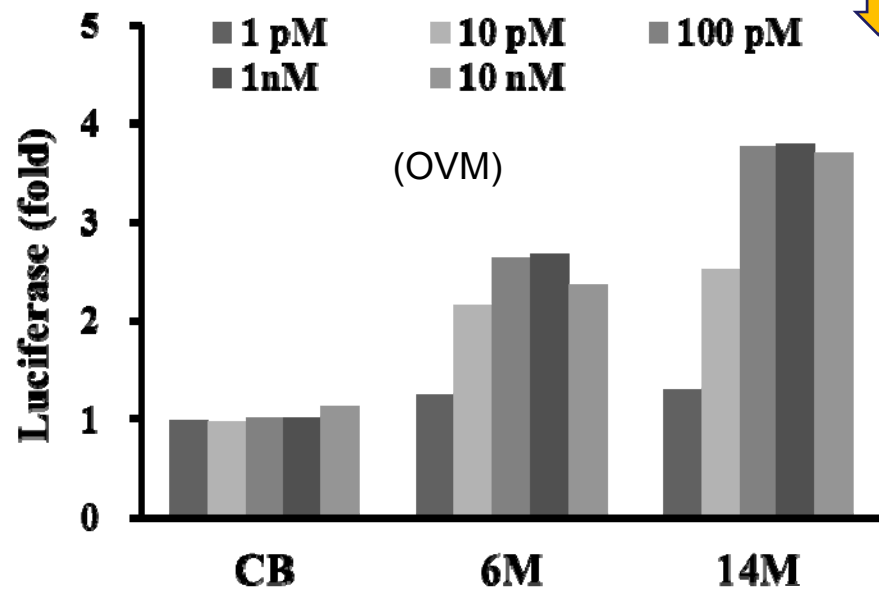
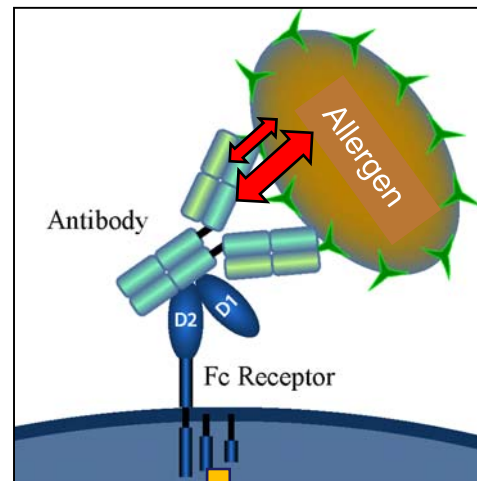


OVMを用いたAnti-OVM IgE のチップ結合競合阻害



Avidity Index ではなく、Avidityを定量的に示すallergenのIC50値 (nM) で評価

臍帯血のIgEは Low affinity IgE で、ヒスタミン遊離反応を引き起こさない。

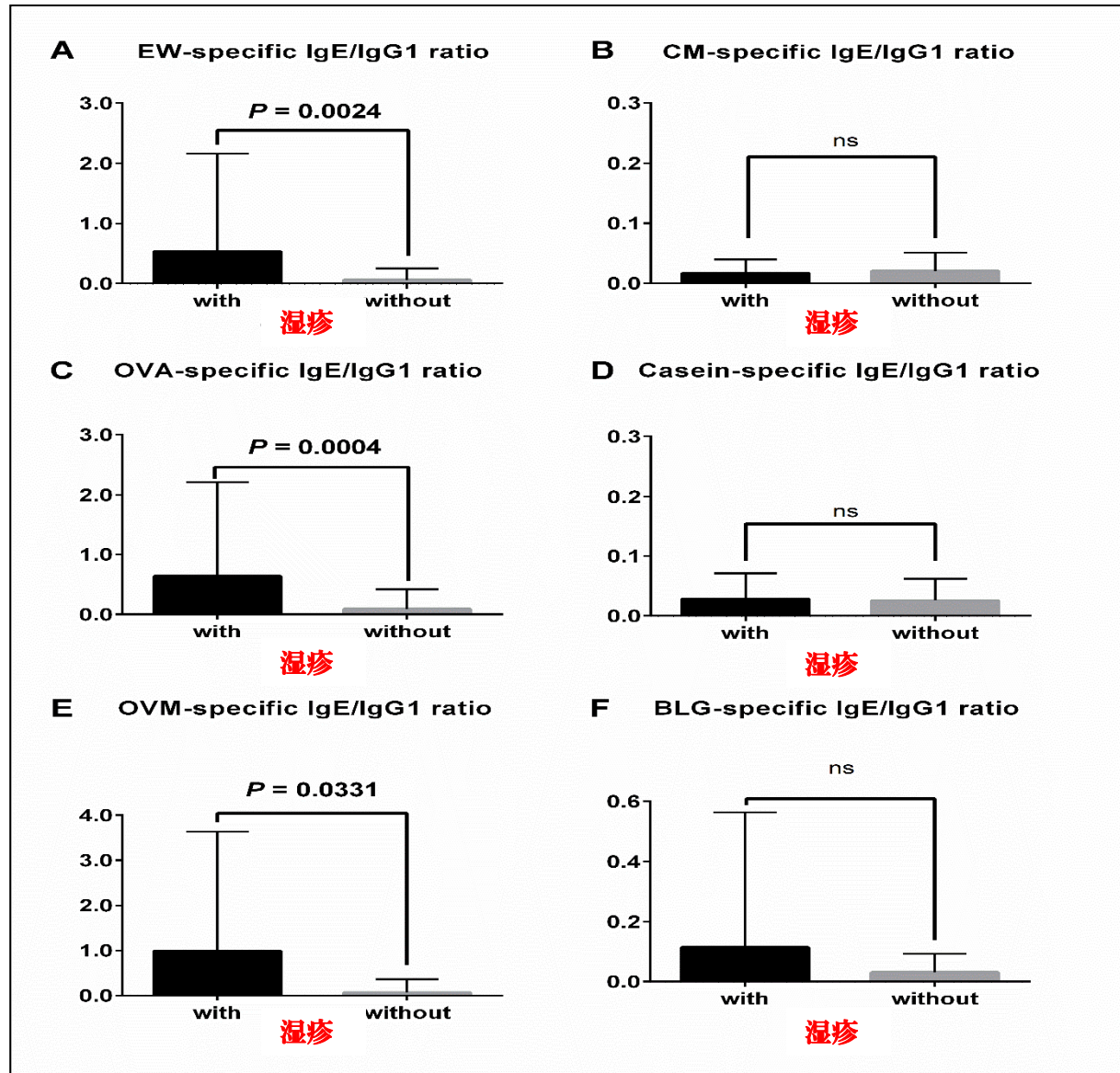


(アレルギー体質が決まる時期)

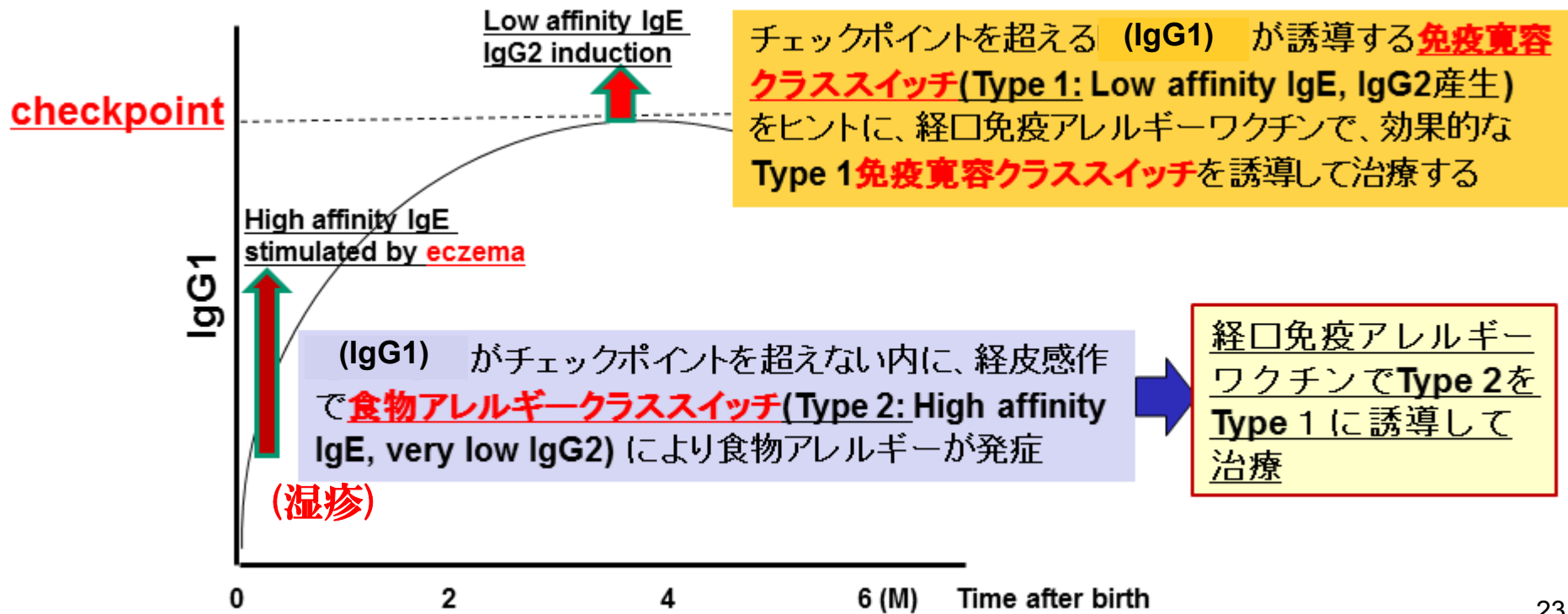
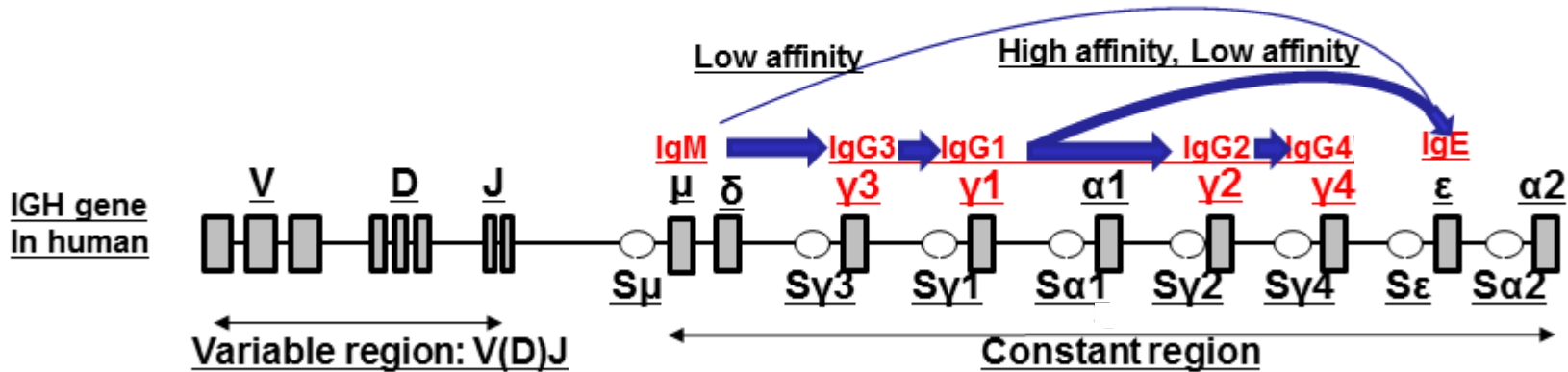
湿疹によるアレルゲンの経皮感作が左右する食物アレルギーの発症リスク

卵白アレルゲン

ミルクアレルゲン



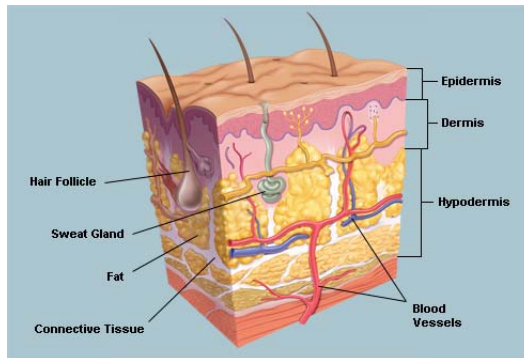
経口免疫寛容と食物アレルギー発症のクラススイッチの違いが導いた 経口免疫アレルギーワクチン療法の仮説



感作アレルゲン量の定量

(母乳、皮膚、食品、環境中)

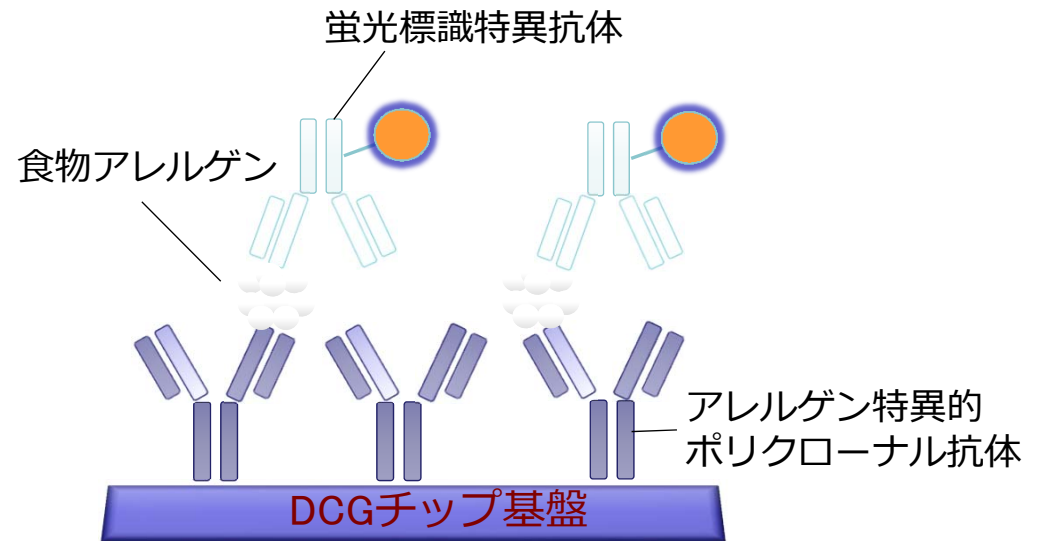
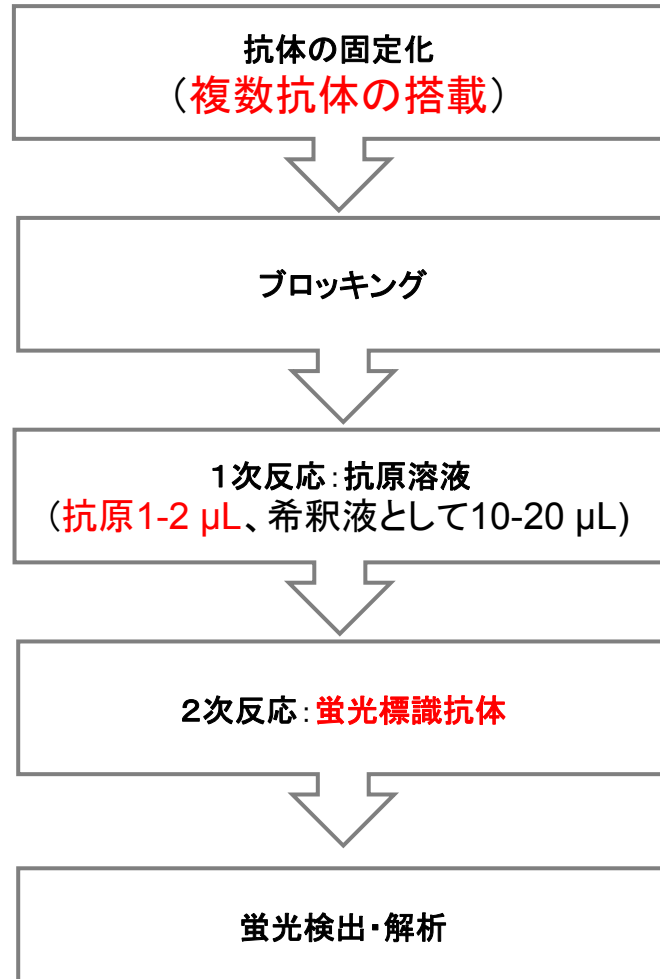
(経皮膚)



(消化管粘膜)



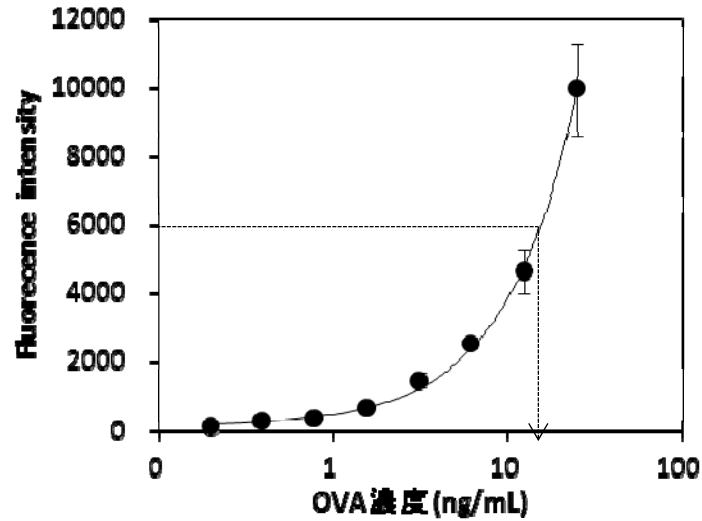
抗体固定化DCGチップでのアレルギー検出



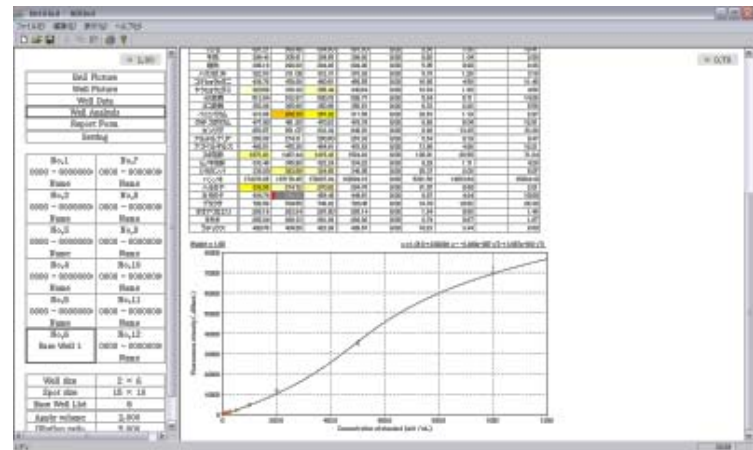
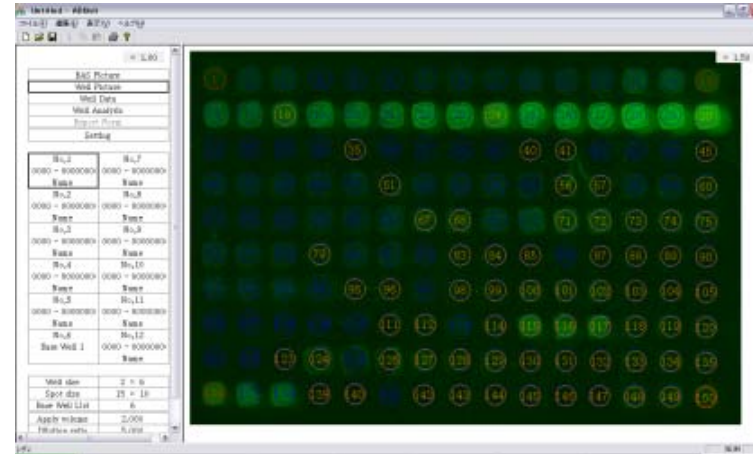
- 1次反応から解析まで、所要時間は約3.5時間

抗体固定化DCGチップでの解析方法

OVA抗体搭載チップ検量線



<解析専用ソフト>



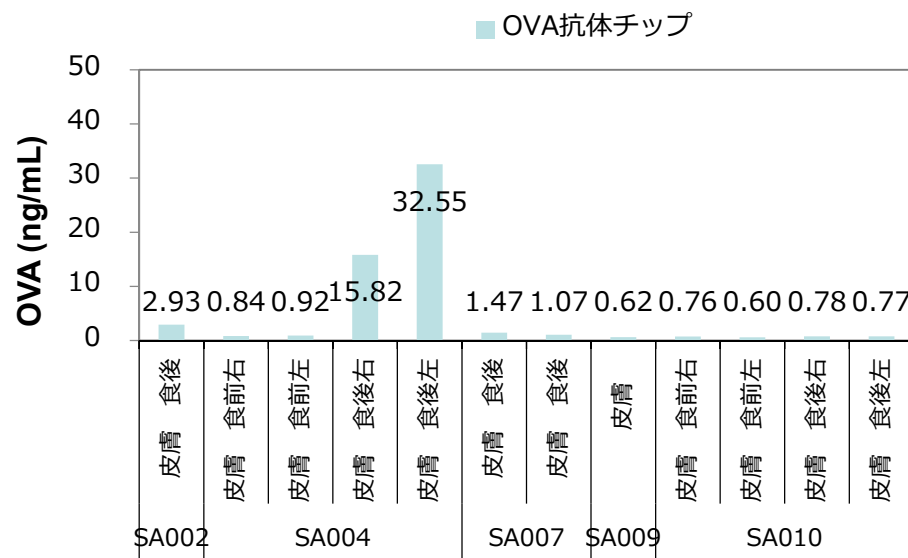
テープ法による抽出検体のアレルギー量の測定

乳児の頬からテープ法で採取した抽出液に含まれるアレルギーをOVA抗体チップとモリナガFASPEK II 卵白アルブミンELISAキットで測定した値の比較



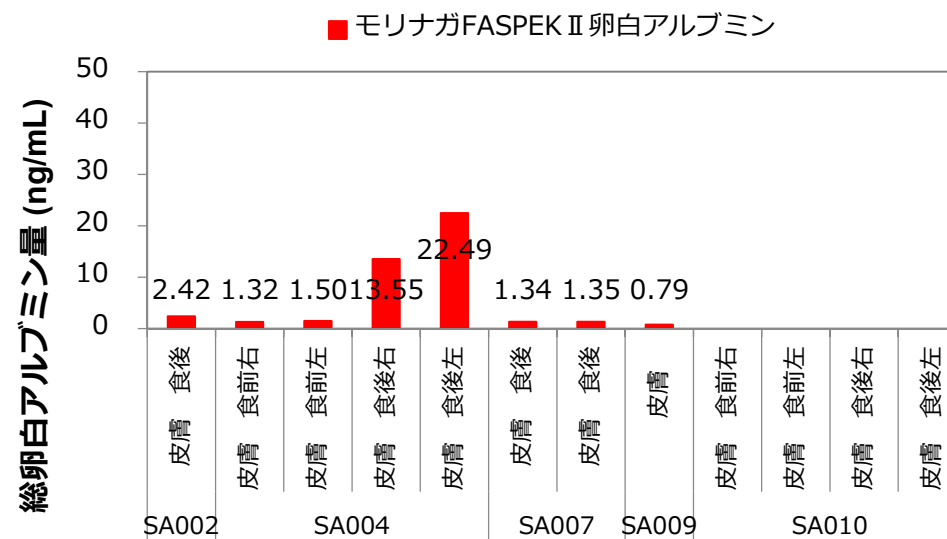
(湿疹)

OVA抗体チップ



検体

ELISA



検体

食物アレルギーの治療 に役立つ検査法

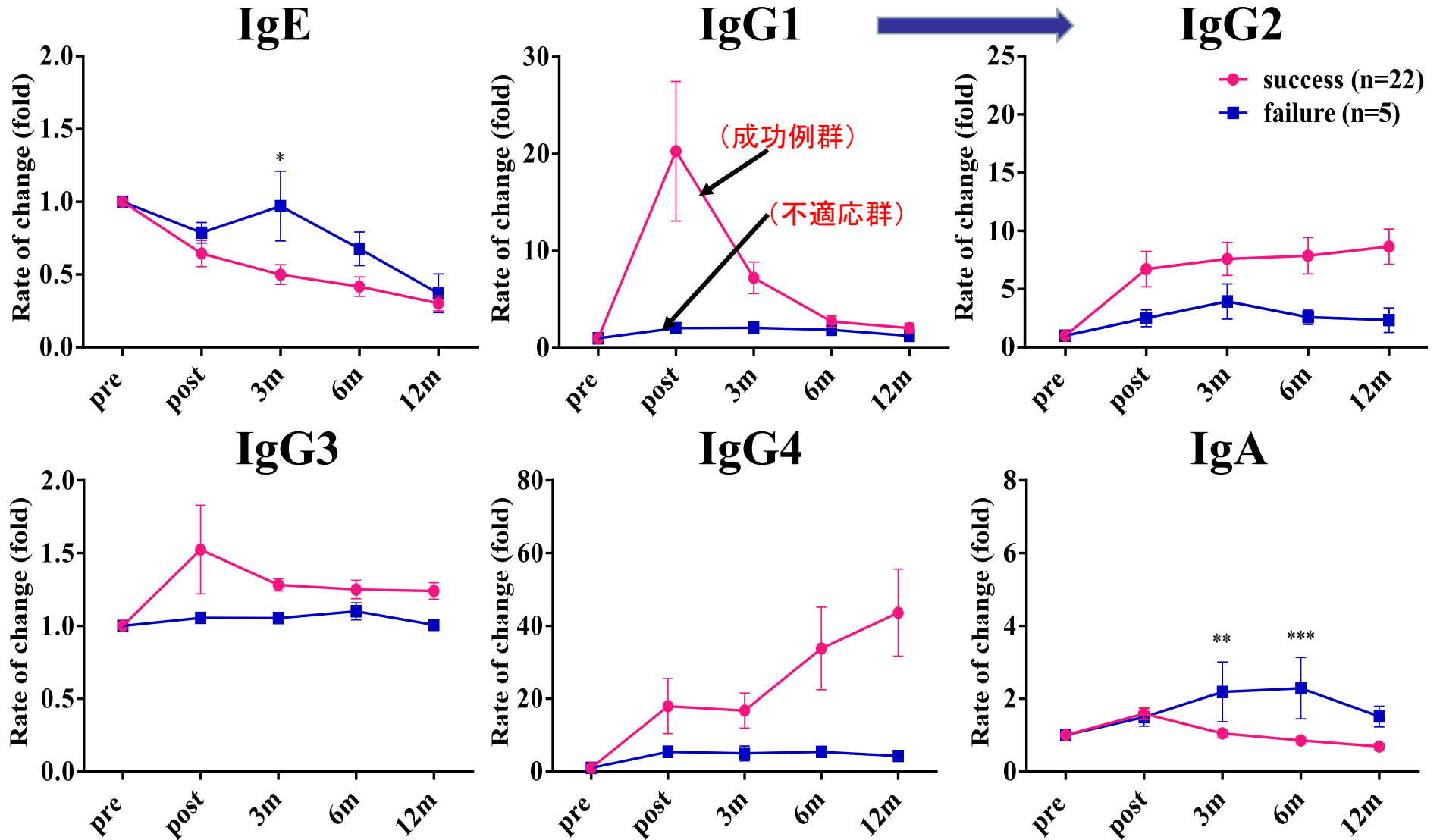
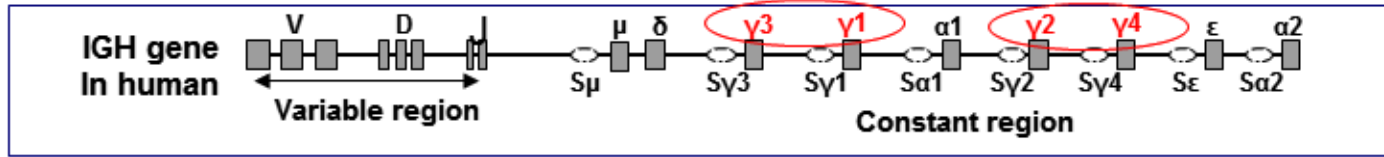
急速減感作療法の予後の判定に役立つ
イムノグロブリンクラススイッチ

急速減感作療法とクラススイッチ

患者背景 (n=27)

性別 男:女	17:10
年齢 median (range)	7.5 (5-12)
アナフィラキシーの既往あり % (n)	100 (27)
DBPCFCの症状誘発閾値 (g) median (range)	0.47 (0.15-15)
維持量到達までの日数 median (range)	34 (19-58)
増量期の加熱卵1個への到達率 % (n)	100 (27)
増量期の半熟卵1個への到達率 % (n)	92.6 (25)
1年後における加熱卵1個の維持摂取率 % (n)	81.5 (22)
1年後における半熟卵1個の維持摂取率 % (n)	51.9 (14)

EW



Sidak's multiple comparisons test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

講演のまとめ

1. 食物アレルギーの発症機序と経口免疫寛容の機序が解明されつつあり、食物アレルギーの予防法と治療法が明らかになってきた。
2. 高感度、低侵襲性の新しいアレルゲン検査法の開発によって、これまで明らかになっていなかった食物アレルギーと経口免疫寛容の違いが、具体的なバイオマーカーによって論ずることができるようになってきた。Low affinity IgEの発見とその経口免疫寛容への関与が、アレルギーにおけるIgEのパラダイムシフトを起している。
3. 従来の血清学的アレルギー診断法は、アレルギーの原因物質の検索であったが、新規検査法の開発により、アレルギーの予防と治療のための診断法が明らかになってきた。

Thanks !

