

平成29～30年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	食物アレルギーと経口免疫寛容の成立機序の違いとアナフィラキシーの発生機序からみたリスク評価（課題番号：1705） (2 健康影響発現のメカニズムの解明 (3) 食品を介したアレルギー発症メカニズムに関する研究)
主任研究者	研究者名：木戸 博 所属機関：国立大学法人徳島大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間 2年間（平成29～30年度）

2 研究目的

食物アレルギーは、湿疹時の経皮抗原感作が誘導するhigh affinity IgEが関与し、経口免疫寛容は経口抗原感作によるlow affinity IgEが関与している事をこれまでの研究で明らかにしてきた。時に致死的となるアナフィラキシーの場合、反応を誘発しやすい食品（そば、ピーナツ、甲殻類）があり、これらの抗原によるhigh affinity IgEが発症に関与すると推定している。本プロジェクトは、このような抗原感作経路と抗原の種類による違いによるhighとlow affinity IgEの産生機序の違いを、in vitro、in vivoの実験系や臨床検体を用いて解析し、食物アレルギーと経口免疫寛容の成立機序の違いを明らかにする。さらに、アナフィラキシーの発生機序からみたリスク評価を以下に挙げる5項目で実施した。

- 1) 抗原提示細胞内での抗原タンパク消化に関わる因子の解析
- 2) 抗原提示細胞の活性化と Th2 細胞の分化誘導に関わる機序の解明
- 3) B細胞の somatic hypermutation (SHM)に関与する因子を解明
- 4) 臨床検体での SHM が IgG および IgE クラスで誘導されているかの検証
- 5) ノックアウトマウスを用いた動物実験の上記因子の検証

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
1. 食物アレルギーと経口免疫寛容の成立機序の違いとアナフィラキシーの発生機序からみたリスク評価	(1) 食物を介したアレルギー発症メカニズムと発症リスク評価（経口免疫寛容との違い）	木戸 博（徳島大学）
	(2) 生後6ヶ月以後の乳児において、卵白、牛乳以外の抗原に対する経口免疫寛容群と食物アレルギー発症	大矢 幸弘（国立成育医療研究センター）

	群のクラススイッチパターンの違いと、各種抗体の抗原親和性の違いの解析	
	(3) 動物モデルを用いた、クラススイッチ調節や、low affinity IgE 産生の調節因子、制御因子、制御性 T 細胞 (Treg) 関与の解析	木戸 博 (徳島大学)
2. 食物アレルギーによるアナフィラキシーの発症機序の解明	(1) 抗原提示細胞内での抗原タンパク消化に関わる因子を解析	松本健治 (国立成育医療研究センター) 斎藤博久 (国立成育医療研究センター)
	(2) 抗原提示細胞の活性化と Th2 細胞の分化誘導に関わる機序を解明	松本健治 (国立成育医療研究センター) 斎藤博久 (国立成育医療研究センター)
	(3) B 細胞の SHM に関与する因子を解明	松本健治 (国立成育医療研究センター) 斎藤博久 (国立成育医療研究センター)
	(4) SHM が IgG および IgE クラスで誘導されているかを臨床検体での検証	大矢 幸弘 (国立成育医療研究センター)
	(5) ノックアウトマウスを用いた動物実験で上記因子の検証	松本健治 (国立成育医療研究センター) 斎藤博久 (国立成育医療研究センター)

4 倫理面への配慮について

本プロジェクトは、患者の血液を検体に用いることから、「食物アレルギー原因成分の蛋白チップによる迅速エピトープ解析」のタイトルで、徳島大学の臨床研究倫理審査委員会の承認を得、患者のプライバシー保護に当たっている。承認番号：3060、承認日：2013年8月26日

また、国立成育医療研究センターで取り扱う臨床試料(患者由来末梢血)については、提供者の人権および利益の保護について国立成育医療研究センター倫理委員会でも十分議論され承認を得ており(承認番号 476)、試料提供許諾の際は同意書、同意説明を十分患者および保護者に提供し、文書によるインフォームドコンセントを得て行った。また、動物実験は同研究所動物実験実施規程に基づき動物実験審査委員会の審査承認を得て実施した。動物実験に際しては、動物愛護の精神に基づき、動物の使用数を最小限にとどめると

共に、使用にあたっては苦痛を最小限にとどめるため、イソフルラン等の麻酔薬を用いた。また最終処分は中枢神経破壊、あるいは炭酸ガスにより行った。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目名：食物アレルギーと経口免疫寛容の成立機序の違いとアナフィラキシーの発生機序からみたりスク評価

1) 個別課題名：食物を介したアレルギー発症メカニズムと発症リスク評価（経口免疫寛容との違い）（研究担当者名：木戸 博（所属機関名：徳島大学））

（研究成果）これまでの研究から、生後6ヶ月時点の乳児で湿疹を伴わなかった乳児では、図1に示すように経口免疫寛容型のイムグロブリンクラススイッチとして、(IgM→IgG3→IgG1→IgG2→(IgG4), IgM→low affinity IgE, IgA)を示し、食物アレルギーの明確となる1歳でも食物アレルギーは検出されなかった。一方、乳児の発育途上で湿疹による経皮抗原感作が起きると、イムグロブリンクラススイッチのパターンは変化して、(IgM→IgG3→IgG1→high affinity IgE)を示すようになり、同時にIgG1→IgG2→IgG4へのクラススイッチは抑制され、このような場合1歳までに約半数の乳児が食物アレルギーを発症した。このように、免疫寛容型クラススイッチにlow affinity IgEとIgG2、IgG4の産生促進が、食物アレルギー発症型クラススイッチにhigh affinity IgE産生とIgG2、IgG4の産生抑制が見られた。これと類似の現象が経口減感作療法でも認められ、IgG1からIgG2、IgG4へのクラススイッチの有無と、IgE affinityの判定が、免疫寛容と食物アレルギーの発症を示唆するバイオマーカーになることが示唆された。

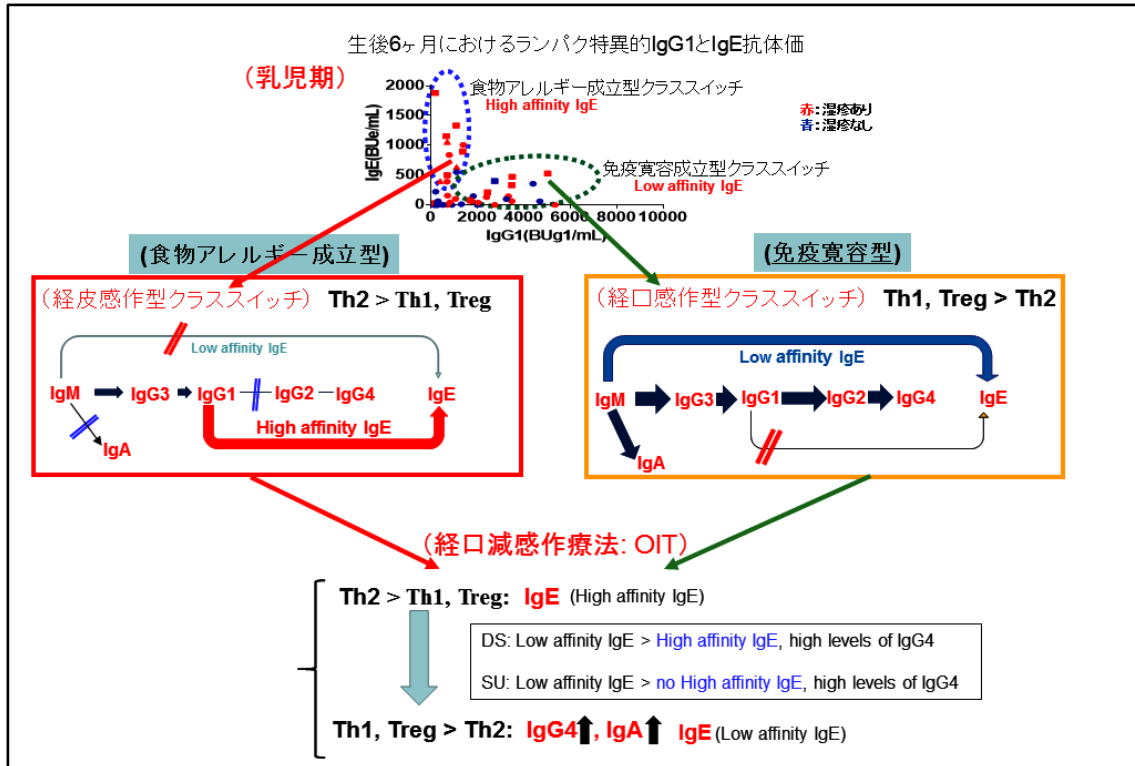


図1. イムグロブリンクラススイッチのパターンの違いと IgE affinity をバイオマーカーとする生後6ヶ月齢の乳児の免疫寛容と食物アレルギーの予測

図1で観察された食物アレルギー成立型の ovalbumin に対する IgE の IC₅₀ と、免疫寛容成立型 IgE の IC₅₀ の違いを図2Aに示す。さらに図1に示す湿疹の有無による経皮感作が IgE 値に大きな影響を示していることを図2Bに示す。

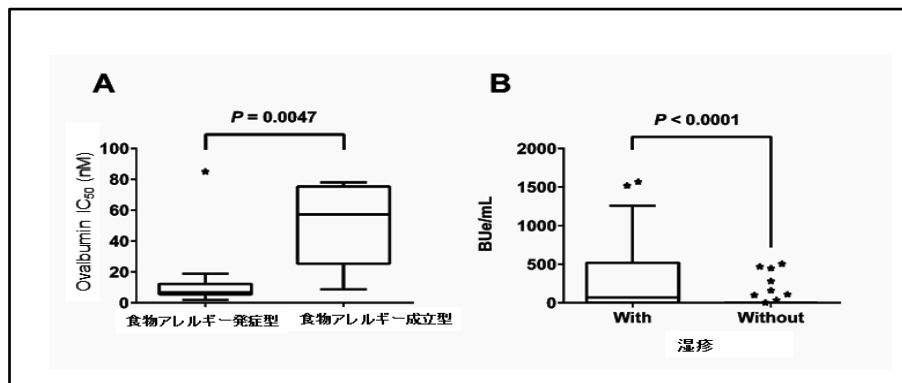


図2. 食物アレルギー成立型と免疫寛容成立型の IgE の affinity の違い(A)と、経皮感作の有無による産生される IgE レベルの違い。

(考察、今後の課題) 以上のように、食物アレルギーの発症メカニズムと発症リスク評価には、湿疹の有無、イムノグロブリンクラススイッチのパターン、抗原特異的 IgE、IgG1、IgE/IgG1 ratio、high-affinity IgE か low-affinity IgE の判定が、評価のパラメーターとして有用と推定された。今後症例数を増やして検証を進める。

2) 個別課題名：生後 6 ヶ月以後の乳児において、卵白、牛乳以外の抗原に対する経口免疫寛容群と食物アレルギー発症群のクラススイッチパターンの違いと、各種抗体の抗原親和性の違いの解析 (研究担当者名：大矢 幸弘(国立成育医療研究センター))

(研究成果) 上記のように、母乳に微量含まれる鶏卵アレルギー (通常 1 ng/mL 以下) により生後 6 ヶ月までに湿疹による経皮感作を受けると、high-affinity IgE が出現して1歳までに鶏卵食物アレルギーの発症リスクが高まる。しかし牛乳アレルギーの場合は、人工乳、混合乳の乳児では出生直後から大量の牛乳アレルギーに腸管粘膜免疫系がさらされているためか、湿疹を発症しても図1に示した 87 名のコホート研究では、牛乳アレルギーに対する high-affinity IgE は検出されず、1歳までに牛乳アレルギー患者は1名も出現しなかった。腸管免疫を介した早期の免疫記憶が、経皮感作が作動する Th2 タイプの high-affinity IgE 誘導シグナルをブロックした可能性が推定された。

また離乳食と共に、卵や牛乳以外の抗原、例えば小麦、エビ、カニ、ピーナッツ、大豆等に対する感作が想定されたが、実際には5歳の正常児 900 名のボランティアから成るアレルギーコホート調査で明らかになったように、これらのアレルギーに対する感作の陽性率は1%以下で、鶏卵、牛乳アレルギーのように初発前から継時的に追跡することは不可能であった。なおこれらのアレルギーの場合、食物アレルギーが発症、あるいは重症化してから来院するため、経口減感作療法でのクラススイッチと IgE、IgG4 等の抗原親和性の経時的追跡が可能であった。本研究の目的達成のため、研究の主力を経口減感作療法時のモニターにして、食物アレルギー発症頻度の高い鶏卵、牛乳、小麦の減感作療法で、クラス

スイッチパターンと IgE 抗原親和性変化測定の有用性について解析した。

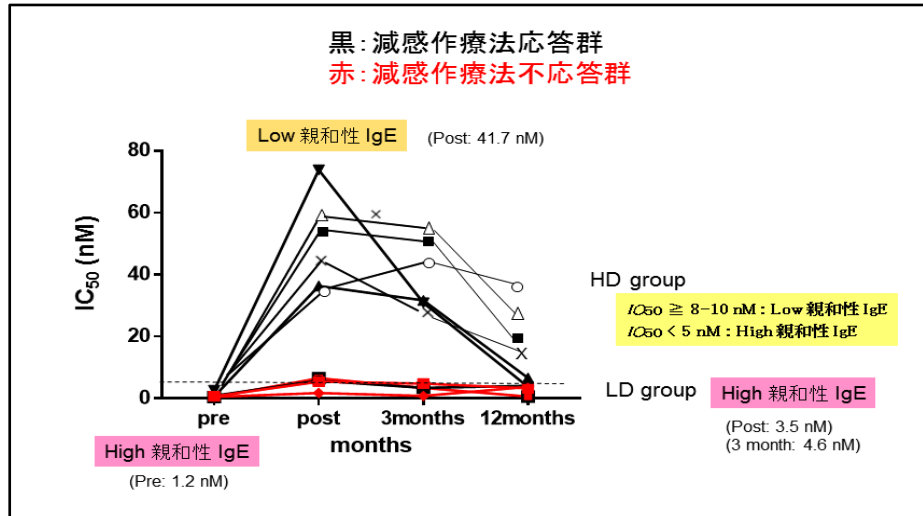


図 3. 鶏卵急速経口減感作療法に伴う OVA に対する IgE の IC₅₀ 値の経時的変化

図3 は、5-12歳の27名小児の鶏卵急速経口減感作療法に伴うIgEの抗原親和性変化追跡調査の解析結果を示す。鶏卵急速減感作療法における減感作応答例と不応答例のovalbumin(OVA)に対する抗原親和性の経時的変化を示している。応答例とは、1ヶ月入院下に加熱卵を徐々に増量して、最終的に1個の加熱卵が食べられるようになった後で、1年間自宅で加熱卵1個の摂取維持を続けた患者の経過観察結果である。不応答例は、1個の加熱卵の摂取維持ができずに完全除去食に戻った群である。鶏卵急速経口減感作療法に伴って、OVA特異的IgE値は低下の傾向を示すが、IgEの親和性を示すIC₅₀は随時変化し、経口減感作療法開始時(pre)では、IC₅₀値は全員 5 nM以下(平均値1.2 nM)を示したが、1月の急速経口減感作療法終了時(post)では、減感作応答群のIC₅₀値は41.7 nMのlow affinityを示し、減感作不応答群ではIC₅₀値が3.5 nMのhigh affinityを維持した。図には示していないが、この間に鶏卵抗原特異的IgG1、IgG4が急速に増加した。減感作応答群は維持期において、3 m まではlow affinityを保っていたが、その後は 12 m まで IC₅₀ 値は低下する傾向を示し再びhigh affinityに戻る傾向が確認された。また減感作不応答群では、high affinityがそのまま維持されていた。このような脱感作状況は寛解とは言い難く、いつアナフィラキシーが起きても不思議ではない状況と判断された。このように、経口減感作療法に伴ってIgG4が増加する際に、高親和性IgEから低親和性IgEへ変化する現象は、牛乳の経口減感作療法、小麦の経口減感作療法でも共通して確認された。

図 4 には、ミルク経口減感作療法とその維持に伴う α -casein 特異的 IgE の affinity (IC₅₀ 値) の変化を示している。減感作成功例では α -casein に対する IC₅₀ 値は high affinity から low affinity に変化し、減感作導入困難例では high affinity の持続が観察された。

減感作療法に伴う IgG4 増加時に、IgE が高親和性から低親和性に変化する機序の解明：図4に示すように、減感作に伴ってイムノグロブリンクラススイッチが変化してIgG4が増加する際に、高親和性IgEから低親和性IgEに変化する機序の解明に取り組んだ。従来IgG4は高抗原親和性を示すと言われてきたが、実際にIgG4のIC₅₀値を測定して、IgEのIC₅₀値と

比較して高親和性IgEの反応が抑制される可能性について検討した。

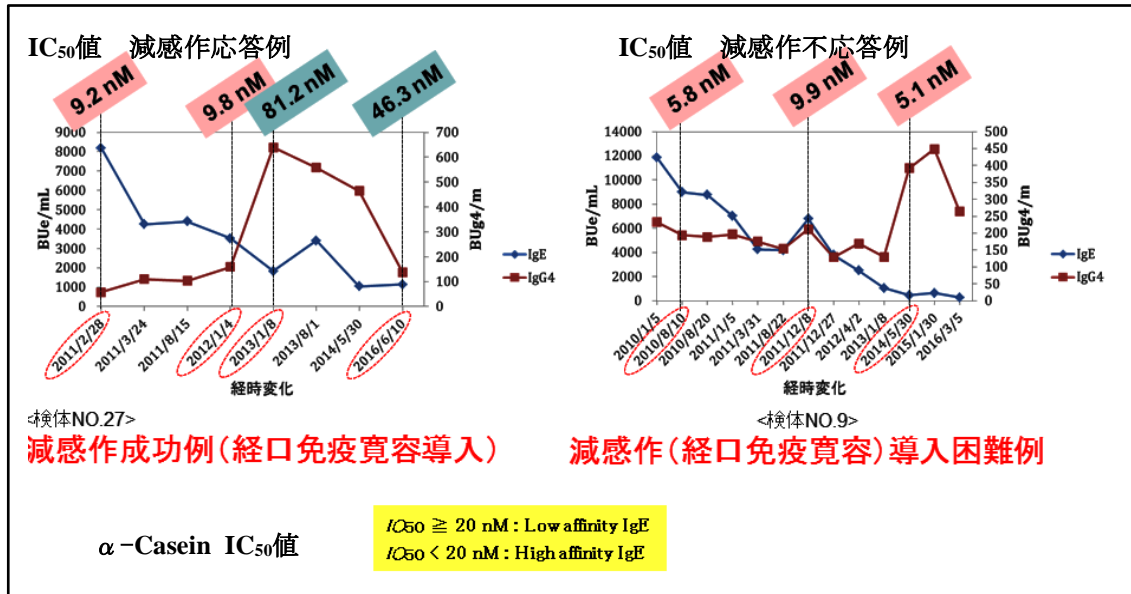


図4. ミルク経口減感作療法と維持に伴うα-casein特異的IgEのaffinity (IC₅₀値)の変化

図5に小麦の経口減感作療法に伴う高親和性IgEから低親和性IgEに変化と、その際のクラススイッチに伴って出現するIgG4、IgG1と、これらのC₅₀測定値を示している。IgG4、IgG1の抗原親和性は、高親和性IgEとほぼ同等で、濃度比においてはIgEの1,000-10,000倍を超える高濃度であることから、抗原が持つ高親和性エピトープへの結合は、高親和性IgEから高親和性IgG4に代わり、高親和性IgG4、IgG1と競合しない低親和性IgEが検出されるに至ったと推定された。しかしこの場合、高親和性IgG4、IgG1を検体から除去すれば、残存している高親和性IgEが検出されると推定される。そこで、患者検体からIgG4、IgG1を除去した後、抗原に結合するIgEが高親和性か低親和性IgEかを検討した。その結果、IgG1除去条件下のIgEのIC₅₀値が示すように、患者の血液中には高親和性IgEが残存しており、高親和性IgEが質的に変化して低親和性IgEに代わったわけではないことが判明した。

(考察、今後の課題) 脱感作状態の患者では、時にアナフィラキシーを起こすことが知られているが、以上の結果が示すように、脱感作状態では高親和性IgEが低親和性IgEに代わったわけではなく残存しているために、アナフィラキシーのリスクを伴うことが初めて明らかになった。このように、経口減感作療法の経過観察、治療効果の判定に、イムノグロブリンクラススイッチの解析とIgE、IgG4の抗原親和性解析の重要性が確認された。今後症例数を増やして検証を進める。

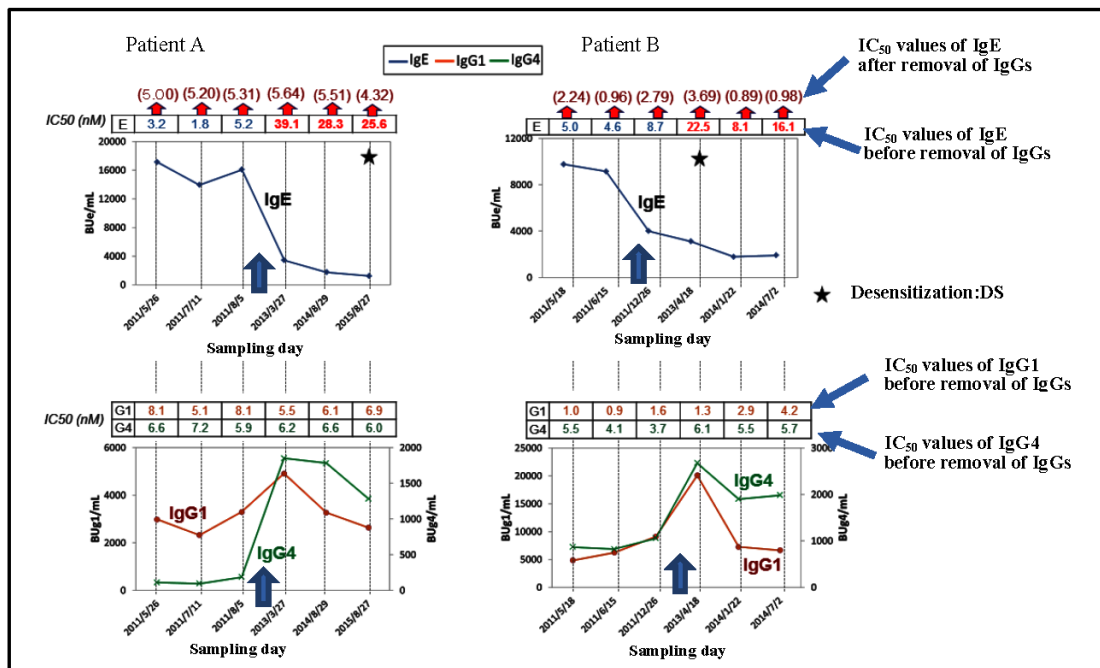


図5. 小麦経口減感作療法に伴う gliadin 特異的 IgE、IgG4、IgG1 の抗原親和性と、IgG4、IgG1 除去に伴う IgE の抗原親和性変化

3) 動物モデルを用いた、クラススイッチ調節や、low affinity IgE産生の調節因子、制御因子、制御性T細胞 (Treg) 関与の解析。(主任研究者、徳島大学 木戸博が担当)

(研究成果) これまでに、経皮感作食物アレルギーモデルマウスについての報告はあるが、ほとんどの場合感作の判定に抗原の腹腔内注射によるアナフィラキシーの誘発、具体的には直腸温低下で判定している。しかし抗原の腹腔内注射は、ヒトで発症する食物抗原の経口摂取による腸管免疫を介したアナフィラキシーのモデルではなく、腸管免疫系を直接介することの無い血液内抗原投与に当たり、ヒトの重症食物アレルギーモデル系とは言い難い。これまでに報告のあった経口抗原投与方法によるアナフィラキシー誘発の場合、直腸温低下は極めて軽微で定量性も低いため、やむを得ず抗原の腹腔内注射によるアナフィラキシー誘発系に頼らざるを得なかった。本研究ではこの問題を解決して、経皮抗原感作と経口アレルギー投与によるアナフィラキシー誘発の最適条件を見出し、高感度の評価システムの開発に成功した。今後このシステムを用いて、クラススイッチや、low affinity IgE 産生に関与する調節因子、制御性 T 細胞 (Treg) 等の解析が進むと期待している。

図6に結果を示す。経皮抗原感作方法には、スクラッチ法やテープピーリング法、界面活性剤塗布法などがあるが、界面活性剤の SDS 処理後にアレルギーを塗布する感作法が最も効果的であることが明らかになった。この方法で、アレルギー 1 mg を 1 日 1 回、週 5 回の頻度で 2 週間塗布を続けることで、アレルギー特異的 IgG1、IgG2a、IgE が誘導され、感作が完成した。その後 1 週間後に、アレルギー 20 mg の経口投与によりアナフィラキシーを誘発するが、この場合直腸温低下は

これまでの報告のように、如く僅かの 0.5-1.0°C 程度で効果のバラツキも大きく、判定しにくい。この問題に対して我々は、アスピリン(ASA) をアレルゲン投与 30 分前に経口投与することで、アナフィラキシー誘発反応が増幅され、再現性に優れた結果を得ることを見出し、最適評価条件を確立した。

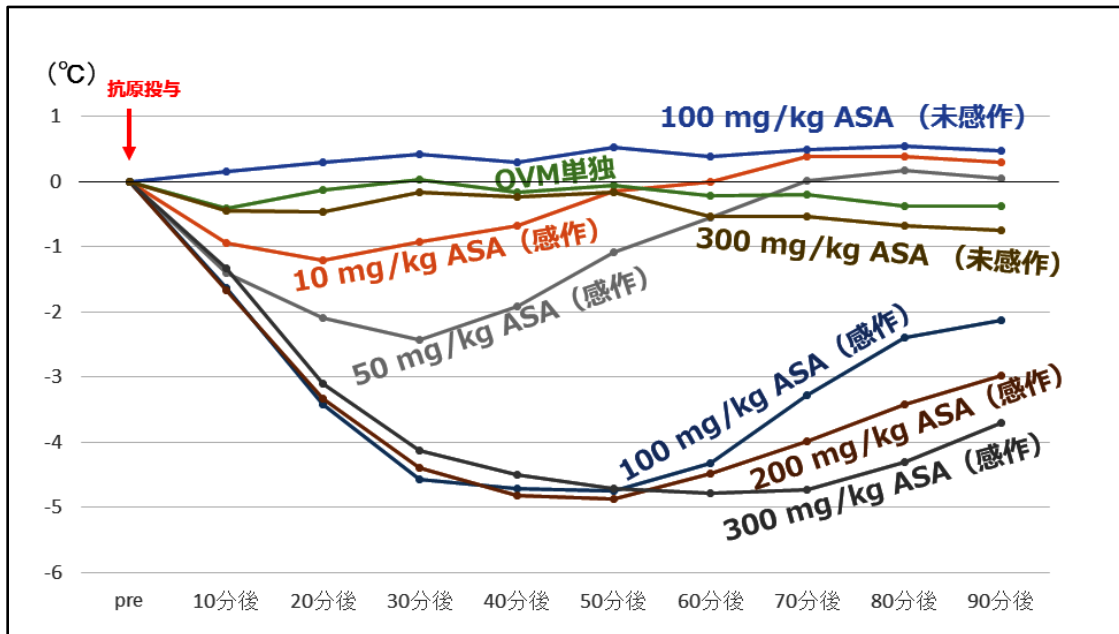


図 6. アナフィラキシー増感剤の ASA の最適濃度検討試験

10-300 mg/Kg 体重量の ASA の濃度変化の中では、100 mg の ASA でピークに近い安定した直腸温低下が再現性良く得られた。なお、未感作マウスに 300 mg/Kg の ASA を経口投与した場合、副反応として軽度の直腸温低下が見られた。以上の結果から、アナフィラキシー増感剤としての ASA の最適濃度は 100 mg/Kg とした。鶏卵抗原の ovalubmin (OVM) 抗原の場合、図 6 に示すように、ASA 経口投与無しの直腸温低下に比べて、ASA 100 mg/Kg で直腸温低下は約 10 倍増幅された。なお ASA によるアナフィラキシー増感効率は、アレルゲンの種類に依存している。従来ミルクアレルギーの主要アレルゲンとされている casein の経皮感作アレルギーモデルマウスの報告はほとんど無く、casein の経口摂取によるアナフィラキシー発症の評価系に関する報告が無いように、直腸温低下は検出されにくく、そのため腹腔内に 1 mg の casein を投与することで、3-4 度の直腸温低下を引き起こす実験系のみが使用されていた。casein は上記のように経口摂取では直腸温低下が殆んど認められないが、経口摂取によるアナフィラキシー誘発条件として、ASA 100 mg/Kg で増感することで、casein でも 2-3 度の直腸温低下することを我々は見出した。今後このシステムを用いることで、IgE 産生に関与する調節因子、制御性 T 細胞 (Treg) 等の解析が進むと期待している。

(考察、今後の課題) 以上のように、アレルゲンの経皮感作条件、これまでに報告のなかったアレルゲン経口摂取のアナフィラキシー増幅法を初めて明らかにした。特に casein のように、アレルゲン単独の経口投与で直腸温低下の見られない場合には ASA の前投与は有効と考えられた。今後、この評価系を論文として発表して国際的な評価を受ける。またこのシ

システムを用いて、クラススイッチに関与するサイトカインや、その他制御性 T 細胞 (Treg) を含む生体因子の関与の作用機序解析を進める。

2 研究項目名：食物アレルギーによるアナフィラキシーの発症機序の解明

1) 個別課題名：抗原提示細胞内での抗原タンパク消化に関わる因子を解析。(研究担当者名：松本 健治、斎藤 博久 (所属機関名：国立成育医療研究センター))

研究内容：これまでの検討から、食品自体が単独で抗原提示細胞を活性化することはほぼ無いと考えている。であれば、食品自体が抗原提示細胞の食胞内での食品タンパクの消化に影響を与えるかが次の焦点となる。実際に卵タンパクの中で抗原性が高い ovomucoid には protease inhibitor 活性がある事が知られている。そこで、本研究では抗原提示細胞の食胞内イベントを検討できる実験系を創出することを目的として、各種サイトカインが抗原提示細胞食胞内の消化酵素活性と pH にどのように関与しているかを *in vitro* の実験系で検討した。

研究方法：単球細胞株である THP-1 を *in vitro* で樹状細胞様に分化させて作成した細胞 (mDC) に、各種サイトカインを添加して、抗原分子の分解にかかわる分子群 (プロテアーゼ) の遺伝子発現と、酵素活性、食胞内 pH に与える影響について検討した。

研究成果：mDC を 1 ng/ml TSLP で 5 時間刺激すると Cathepsin S の活性が約 25%、Cathepsin E の活性が約 20%低下することを見いだした。また、同刺激で Cathepsin S の mRNA は約 40%増加するが Cathepsin E は約 30%低下した。この活性低下への食胞内の pH の関与を検討するため、蛍光 Probe を用いて pH を測定したが、TSLP 刺激前後で有意な変動は認められなかった。

考察：食胞内の分解酵素の活性低下が、抗原分子の分解低下、大きな抗原分子の T 細胞への呈示を介して、high affinity IgE 産生に繋がる可能性があると考えている。今回の実験系で、食胞内の分解酵素の活性自体を測定する事は可能となったが、酵素活性を制御する機序 (mRNA、pH など) の同定には至らなかった。

今後の課題：今後は high affinity IgE を誘導する食品を mDC に添加して、食胞内の分解酵素の活性や pH を検討したいと考えている。

2) 個別課題名：抗原提示細胞の活性化と Th2 細胞の分化誘導に関わる機序を解明する。(研究担当者名：松本 健治、斎藤 博久 (所属機関名：国立成育医療研究センター))

研究内容：食物アレルギーの主な感作経路である湿疹局所で発現するサイトカインが、抗原提示細胞活性化分子 (CD80/86、MHC II など) の発現に与える影響を検討した。

研究方法：湿疹局所に発現し、抗原提示細胞を活性化して Naïve T 細胞を Th2 細胞へ分化誘導するとされているサイトカインは現時点では IL-33、TSLP であることから、これらのサイトカインで THP-1 を *in vitro* で樹状細胞様に分化させて作成した抗原提示細胞を刺激し、副刺激分子群の発現を検討した。

研究成果：TSLP で mDC を刺激したが、副刺激分子 (CD86) や HLA-DR の発現に変動は認められなかった。

考察：試験管内で単核細胞株から mDC を誘導する際に用いたサイトカインによって、すでに活性化刺激が入ってしまっており、TSLP 刺激ではさらなる副刺激分子の発現が誘導されなかったと考えられる。

今後の課題：培養細胞株を用いた解析の限界であり、平成 29 年度の評価委員会で指摘された「重点ポイントを絞って研究を進める」に従い、平成 30 年度には追加の解析を行わなかった。

3) 個別課題名：B 細胞の SHM に関与する因子を解明する。(研究担当者名：松本健治、齋藤 博久 (所属機関名：国立成育医療研究センター))

研究内容：リンパ節の胚中心での B 細胞における SHM は Affinity の高い抗体を産生するための重要な仕組みである。SHM の誘導に必須な酵素である activation induced cytidine deaminase (AICDA) がどのような制御を受けているかを明らかにするために、各種サイトカインが AICDA の発現に与える影響について検討した。

研究方法： B 細胞株 KARPAS-1106P を各種サイトカインで刺激後、AICDA の発現を qPCR にて定量した。

研究成果：各種サイトカインの刺激では IL-4 が AICDA の mRNA 発現を増強することを見いだした。また、KARPAS-1106P は TSLP 受容体を高発現しており、1 ng/ml TSLP で刺激 1 時間後に AICDA の mRNA 発現が約 50%増加することを見いだした。

考察： IgE の産生刺激である IL-4 は IgE へのクラススイッチだけでなく Affinity maturation にも関与する可能性を示唆している。また、経皮感作の局所で高発現する TSLP は抗原提示細胞だけでなく直接 B 細胞に作用して Affinity maturation やクラススイッチを誘導し、high affinity IgE 抗体の産生に寄与する可能性が示唆された。

今後の課題： TSLP が AICDA を誘導する機序を詳細に検討し、論文化を目指す。

4) 個別課題名：SHM が IgG および IgE クラスで誘導されているかを臨床検体での検証。(研究担当者名：松本 健治、大矢 幸弘 (所属機関名：国立成育医療研究センター))

研究内容： Affinity maturation とクラススイッチは同一の酵素 (AICDA) によって誘導される。IgE 抗体の affinity は、IgG を産生する過程で maturation して IgE へクラススイッチするのか、IgE へクラススイッチしてから maturation するのかが不明であった。そこで、IgE 抗体と IgG 抗体の affinity を臨床検体 (抗原負荷試験で確定診断した食物アレルギー児の血清約 60 名) を用いて測定することで SHM の関与を解析する。

研究方法： IgE 抗体と IgG 抗体の affinity の状態を臨床検体 (抗原負荷試験で確定診断した食物アレルギー児の血清、特にアナフィラキシーを起こした血清を含む) を用いて測定して、SHM の関与を解析する。すなわち、高親和性の IgE 抗体を有する患者はすべて高親和性の IgG 抗体を有するかどうかの検討によって、高親和性 IgE が直接クラススイッチで誘導されるのか、高親和性 IgG 抗体が出来た後にクラススイッチによって IgE 抗体が産生されるのか、を明らかにする。

研究成果： 経口負荷試験でアナフィラキシーを呈した児と、呈さなかった児の IgE 抗体の affinity を検討中。

考察：ヒトの IgE の Affinity maturation が、IgG の段階で Affinity maturation してから class switch するのか、IgE の段階で Affinity maturation するのかを検証する。

今後の課題：間もなく結果が得られると想定している。

5) 個別課題名：ノックアウトマウスを用いた動物実験で上記因子の検証。(研究担当者名：松本 健治、斎藤 博久 (所属機関名：国立成育医療研究センター))

研究内容：従来、食物アレルギーのモデルマウスは、腹腔内に alum と共に抗原を投与して感作する系がほとんどであったが、実際に食物アレルギーを発症する児の 90% にアトピー性皮膚炎/湿疹が存在することから、経皮感作による食物アレルギーモデルの樹立と感作機序の解析が必要であった。今回は、週齢の異なるマウスを用いて、抗原投与時の体温低下や抗原特異的 IgE 抗体価、感作機序に關与する因子の解析を行った。

研究方法：1、3、8 および 24 週齢の Balb/c マウスの背部を剃毛・脱毛してテープストリップングによる組織破壊を惹起して湿疹を模した部位に、卵白アルブミン (OVA) を 3 日間/週、3 週間付着させて経皮的な感作を誘導する系を樹立した。

研究成果：感作後に腹腔内に OVA を投与したところ、体温低下が認められた。この体温低下、OVA 特異的 IgE 抗体価、脾細胞の抗原特異的な Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) 産生、抗原曝露部位における FITC 色素の皮膚取り込みはすべて、皮膚局所での IL-33 の発現に關連しており、IL-33 の発現は年齢依存的に、年長のマウスほど高かった。

考察：このマウスの OVA 特異的な血清 IgE 値は腹腔内感作に比して有意に少ないことから、経皮感作では high affinity IgE が産生されている可能性が示唆された。

今後の課題：このマウスの血清中の IgE 抗体の affinity について検討を行い、IL-33 が Affinity maturation に關与するかどうかを検証する。なお、平成 29 年度の評価委員会で指摘された「重点ポイントを絞って研究を進める」に従い、平成 30 年度にノックアウトマウスの新たな作成は行わなかった。

3 当初計画からの変更点

該当なし。

4 研究全体の成果、考察及び結論

木戸等が担当した「食物アレルギーと経口免疫寛容の成立機序の違いとアナフィラキシーの発症機序からみたリスク評価」では、授乳期の経皮感作を誘因とするアレルゲン特異的 high-affinity IgE の産生と未熟なイムノグロブリンクラススイッチの進展が食物アレルギーの発症に關与し、良く進んだイムノグロブリンクラススイッチと low-affinity IgE の産生が経口免疫寛容の成立に關与すると示唆された。このことから、イムノグロブリンクラススイッチパターンのモニターと IgE の抗原親和性の解析が食物アレルギーのリスク評価に重要であることが明らかになった。また経口免疫療法中の脱感作状態で経験するアナフィラキシーの発症機序が明確になった。具体的には、経口免疫療法により患者の high-affinity IgE は、low-affinity IgE に変化するが、こ

れは high-affinity IgE とほぼ同等の IC₅₀ 値を持つ high-affinity IgG4 が出現するため、見かけ上 high-affinity IgE が検出できなくなったため、患者血液の IgG4/IgG1 を取り除くと、再び high-affinity IgE が検出されることから、これがアナフィラキシーの原因として働く可能性が明確になった。以上の結果は、食物アレルギーの発症と経口免疫寛容の成立に関する本質的な機序であることから、今後さらに多くの症例で確認して行く必要がある。

一方、松本等が担当した「食物アレルギーによるアナフィラキシーの発症機序の解明」では、一部の食品でなぜアナフィラキシーが誘導されやすいのかを検証するため、抗原特異的な IgE 抗体の Affinity が高い患者でアナフィラキシーが起こりやすく、一部の食品では Affinity が高くなりやすい、との仮説を多方面から検証すると共に、Affinity maturation に関与すると考えられる因子の検討が行われた。現時点では一部の食品では Affinity が高くなることの原因を直接証明は出来ていない。しかし、食品ごとの抗原提示細胞の食胞内の分解酵素の活性等を測定する系や、マウスの経皮感作による食物アレルギーモデルを樹立した。今後はこれらの系を用いて、上記仮説の検証をさらに行うと共に、新たに見いだした事実の論文化に努める。

なお、平成 29 年度中間評価のコメントに従い、(2) 抗原提示細胞の活性化と Th2 細胞の分化誘導に関わる機序の解明は、検討を中止した。また、同様に (5) ノックアウトマウスを用いた動物実験の上記因子の検証 (モデルマウスの作成) についても追加の検討を中止した。

III 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

1. Irahara M, Shinahara W, Sugimoto M, Ogawa Y, Shitukawa K, Kubota K, Yang L, **Ohya Y**, Saito H, Kagami S, Arisawa K, **Kido H**. Trajectories of class-switching-related egg and cow's milk allergen-specific immunoglobulin isotype formation and its modification by eczema with low- and high-affinity immunoglobulin E during early infancy. © Immun Inflamm Dis. 2019;7: 74-85. doi:10.1002/iid.3.245
2. **Matsumoto K**, Mori R, Miyazaki C, **Ohya Y**, **Saito H**. Are both early egg introduction and eczema treatment necessary for primary prevention of egg allergy? © *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:1997-2001.

2 本研究を基にした学会発表の実績

1. **木戸博**. 新規測定法が切り開くアレルギーの新パラダイムと展望. 第35回日本小児臨床アレルギー学会. 2018/7/28. 福岡
2. **Kido H**. Different modes of immunoglobulin class-switching from allergen-specific IgG1 to low and high affinity IgE in the development of oral tolerance

- and food allergy. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会 2018/6/22-24. 東京
3. **木戸博**. 苛原誠. 品原和加子. 香美祥二. 乳児期の経口免疫寛容と食物アレルギー発症の判定に有用なイムノグロブリンクラススイッチパターンの違いと IgE の高抗原親和性、低抗原親和性 IgE. 第 90 回日本生化学会大. 2017/12/9. 京都
 4. **木戸博**. 苛原誠. 品原和加子. 杉本真弓, 香美祥二. 生後 6 ヶ月までの母乳栄養と人工乳栄養児の抗原摂取量の違いを背景とした湿疹誘発 IgE クラススイッチパターンの違い. 第 54 回日本小児アレルギー学会学術大会. 2017/11/18. 宇都宮
 5. **Kido H**, Irahara M, Sasaki Y. Differential immunoglobulin class switching in the productions of allergen-specific low and high affinity IgE in the development of pediatric food allergy. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会. 2017/6/18. 東京
 6. 苛原誠, 佐々木陽平, 品原和加子, 杉本真弓, 香美祥二, **木戸博**. 乳児期におけるイムノグロブリンクラススイッチの進展と抗原親和性. 2017/6/16. 東京
- 3 特許及び特許出願の数と概要
該当なし。
- 4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）
1. **木戸 博** 優秀演題賞. 第 54 回日本小児アレルギー学会学術大会. 2017/11/19.
 2. **Kido H**. Best Presentation award. Japanese Society of Allergology. 2017/6/16-18.

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
研究項目 1 (徳島大学先端酵素学研究所、木戸 博) (1) 食物を介したアレルギー発症メカニズムと発症リスク評価(経口免疫寛容との違い)	5	生後 6 ヶ月の乳児期において、1 歳までに免疫寛容が達成されるが、食物アレルギーが発症するかを、イムノグロブリンクラススイッチパターンと、IgE に対するアレルギー親和性で判断できるところまでを明らかにして、目標を達成した。
(2) 生後 6 ヶ月以後の乳児において、卵白、牛乳以外の抗原に対する経口免疫寛容群と食物アレルギー発症群のクラススイッチパターンの違いと、各種抗体の抗原親和性の違いの解析	4	生後 6 ヶ月以後の乳児の、卵白、牛乳以外の抗原に対する食物アレルギー発症、免疫寛容の経過を追う目標は、発症頻度が 1%以下である事と、発症してからでないことと来院しないことから、経過を追うことはできなかった。しかしその代わりに、発症患者への経口減感作療法で、クラススイッチパターン解析と抗原親和性解析の重要性が明確に証明され、目的の達成に貢献した。即ち、経口減感作療法における食物アレルギーの治癒課程に、低親和性 IgE が関与することが証明された。
(3) 動物モデルを用いた、クラススイッチ調節や、low affinity IgE 産生の調節因子、制御因子、制御性 T 細胞 (Treg) 関与の解析。	3	ヒトとマウスの免疫系の違いから、ヒトで見られた低親和性 IgE、高親和性 IgE、IgG4、IgG2 に該当するマウス抗体の同定、制御因子の解析が進んでいない。可能な限りヒトに近いマウスのアレルギー評価システムの開発に取り組んでおり、ヒトでは考えられない腹腔内へのアレルギー注射によるアナフィラキシー誘発システムに代わって、経口アレルギー摂取でもアナフィラキシーによる直腸温低下を感度良く検出する経口増感剤を発見して、安定した評価系を確立した。今後、マウスの正確なアレルギー評価が進むと期待される。

研究項目 2 (国立成育医療研究センター、松本健治) (1) 抗原提示細胞内での抗原タンパク消化に関わる因子の解析	4	抗原提示細胞の食胞内の酵素活性や pH、各種プロテアーゼの mRNA の発現を測定する系を樹立したが、酵素活性を制御する機序の解明には至っていない。しかし、この系は今後食物抗原が食胞内の蛋白分解に与える影響を検討する系となる可能性がある。
(2) 抗原提示細胞の活性化と Th2 細胞の分化誘導に関わる機序の解明	2	試験管内での抗原提示細胞の分化誘導段階で、すでに抗原提示細胞の活性化が誘導されており、機序の解明は困難が予測された。平成 29 年度中間評価のコメントに従い、その後の検討を中止した。
(3) B 細胞の SHM に関与する因子を解明	4	SHM に関与するサイトカインは余り知られていなかったことから、今回の検討で high affinity IgE を産生する機序の一端が明らかとなることが期待される
(4) 臨床検体での SHM が IgG および IgE クラスで誘導されているかの検証	3	経口負荷試験でアナフィラキシーを呈した児と、呈さなかった児約 60 名の血清を徳島大学に送付して IgE 抗体の affinity を検討中。
(5) ノックアウトマウスを用いた動物実験の上記因子の検証	4	経皮感作によって high affinity IgE を産生する実験系を確立した。このマウスモデルの経皮感作は年齢の高いマウスほど顕著であり、その機序として皮膚局所における IL-33 が関与する事を見いだした。論文化済み。但し、ノックアウトマウスを用いた実験は、平成 29 年度中間評価のコメントに従い、中止した。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	当初研究計画は概ね順調に進展しており、今後繋がる成果を得ている。低抗原親和性 IgE が、経口免疫寛容に繋がるバイオマーカーとしての発見は、今後国際的に評価されると期待している。なお、一部の研究項目では、臨床検体の収集に時間がかかり解析が遅れている項目が出てしまった。

<p>(2) 研究成果の有用性</p>	<p>4</p>	<p>1. 食物アレルギーの発症、免疫寛容成立に、それぞれに特徴的なイムノグロブリンクラススイッチと高抗原親和性 IgE、低抗原親和性 IgE が関与していることが見いだされ、食物アレルギーのリスク管理に有益と推定している。</p> <p>2. 重症食物アレルギー患者を対象とした経口免疫療法においても、治癒に至る途中経過では、高抗原親和性 IgE から低抗原親和性 IgE への変換が起きることが判明して、食物アレルギー患者のリスク管理に有益と推定している。</p> <p>3. 抗原提示細胞の食胞内での蛋白分解酵素活性などを測定する系を確立した。この系は今後、食物抗原自体の分解されにくさを検討する実験系として利用できる可能性があり、有益と考える。</p> <p>4. 経口アレルゲン負荷による食物アレルギーの重症度を高感度に再現性良く評価する食物アレルギーモデルマウス系を確立することに成功した。この成果は、今後世界で広く使用されると期待している。</p>
<p>総合コメント</p> <p>研究計画は概ね順調に進んでおり、中には世界に先駆けて見出した低抗原親和性 IgE が、経口免疫寛容の成立にかかわっていることを明らかにするなど、今後の食物アレルギーのリスク管理に有益な情報をもたらしている。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。