

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名

山梨大学医学部小児科学講座

職名・氏名

臨床助教・原間大輔

1 研究テーマ

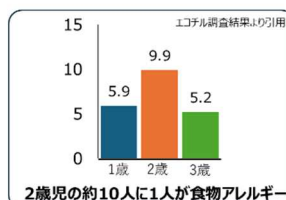
食物アレルギーに対する肥満細胞活性化試験の開発

2 研究の目的

食物アレルギーの正しい診断は容易ではない。現在、食物アレルギーの検査として広く行われている抗原特異的 IgE 抗体価測定は、必ずしも診断の精度とは一致しない。食物アレルギーの診断のゴールドスタンダードは、被疑食物を実際に食べて症状の出現の有無を判定する経口食物負荷試験だが、アナフィラキシーを含む症状出現の可能性があるため、患者負担が大きい。また、一定の専門性を有するため広く一般的に行われている検査とは言い難い。これらの現状を鑑みると、より診断性能の高い検査手段の開発が求められる。

近年、肥満細胞を用いた抗原刺激試験の手法が開発された (Mast cell activation test: MAT)。MAT は肥満細胞と患者血清を共培養することで、血清内の IgE 等の免疫グロブリンと細胞を感作させ、その上で抗原刺激を行うことで細胞表面マーカーの発現変化をフローサイトメトリーで測定し活性化を評価する。MAT はこれまでに薬剤アレルギーやハチ毒アレルギーなどに対する検査としての報告があり、検査性能としての感度・特異度も低くないことが報告されている。食物アレルギーに対しては、海外で頻度の高いピーナッツアレルギーに対する報告は散見されるものの、日本で頻度の高い卵、乳、小麦といった原因食物に対する報告は少ない、本研究は、MAT が食物アレルギーの診断や寛解の判定に有用であるかを、臨床検体を用いて明らかにすることを目的とする。

食物アレルギーを取り巻く現状



経口食物負荷試験の結果からみた、血液検査(粗抗原)の診断精度

	牛乳	鶏卵	小麦
感度	83%	97%	79%
特異度	53%	51%	38%

→感度は高いが、特異度が低い=疑陽性が多い

血液検査のみでは、約半数が誤って陽性と判断される

Celik-Bilgili S, et al. Clin Exp Allergy. 2005. 参考引用。一部改変

山梨県内の経口食物負荷試験の実施状況
*2020年の状況 食物アレルギー研究会HPより引用、改変

施設名	実施件数(年間)	
	外来	入院
山梨大学医学部	-	1-50
都留市立病院	-	1-50
富士吉田市立病院	1-50	1-50
山梨厚生病院	201-500	201-500

限られた実施施設、件数

食物経口負荷試験にかかる負担

- 身体的負担
 - ・症状出現のリスク
 - ・試験時間の確保(半日~1日)
- 心理的負担
 - ・苦手な食物を摂取する必要がある
 - ・不安や恐怖、ストレス

➡ **侵襲が低く、診断精度が高い検査が必要**

3 研究の方法

① MAT の実行可能性についての探索的研究

ヒト肥満細胞株である LAD2 を用いて、IgE 抗体による細胞の活性化と、脱顆粒が引き起こされる濃度を検証する。CD63、CD107a の発現割合で評価する。

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

② 患者検体を用いた診断性能の評価

①の系を用いて、IgE 抗体濃度をポジティブコントロール、食物アレルギー歴がなく、特異的 IgE 抗体価が検出されない健常対照者をネガティブコントロールとして、患者検体の MAT を行い、反応を評価する。

4 研究の成果

① MAT の実行可能性についての探索的研究

脱顆粒マーカーである CD63 の基礎発現をフローサイトメトリーにより確認した。FC ϵ RI を介した刺激により脱顆粒が起こるかについて、抗 FC ϵ RI 抗体である CRA1、抗 IgE 抗体を用いてフローサイトメトリーによる反応を確認したが、CD63 ならびに CD107a の発現上昇は認められなかった(図 1)。LAD2 は細胞活性が低下すると刺激による反応が低下することが知られており、培地の調整や IL-6, IL-33 の前処置による細胞活性化を検討したが反応は変わらなかった。試薬濃度の調整、刺激時間の調整など基礎的な条件検討を続けたものの、いずれも反応は乏しかった。

そこで、FC ϵ RI は発現しているものの、刺激に対する脱顆粒への反応性が乏しい、または FC ϵ RI 自体の発現が低下している、の 2 つの可能性を考慮した。前者の検討のために、別経路で肥満細胞活性化を引き起こすことを検討した。肥満細胞は MRGPRX2 受容体を発現し、FC ϵ RI 以外の経路によっても活性化、脱顆粒することが知られており、LAD2 でも MRGPRX2 を発現している。このことから MRGPRX2 アゴニストである compound48/80 を用いて活性化を確認したところ、CD63 の発現上昇は認められなかった(図 2)。FC ϵ RI の発現低下の確認のために、CD117 ならびに FC ϵ RI のフローサイトメトリーを行う予定である。

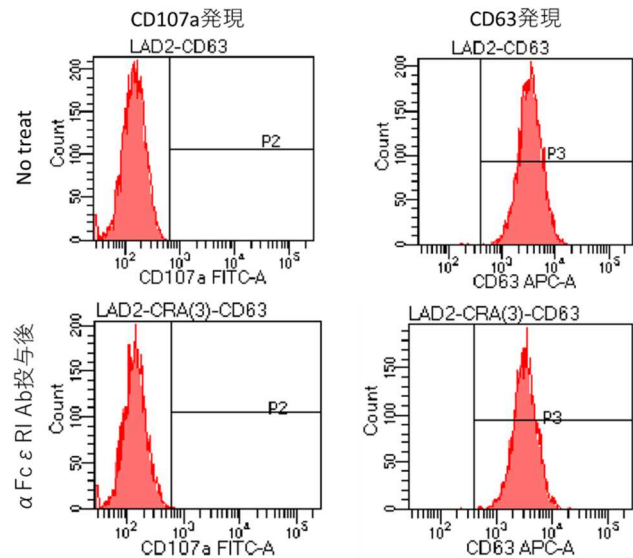


図 1 細胞株の CD63,CD107a 発現状況

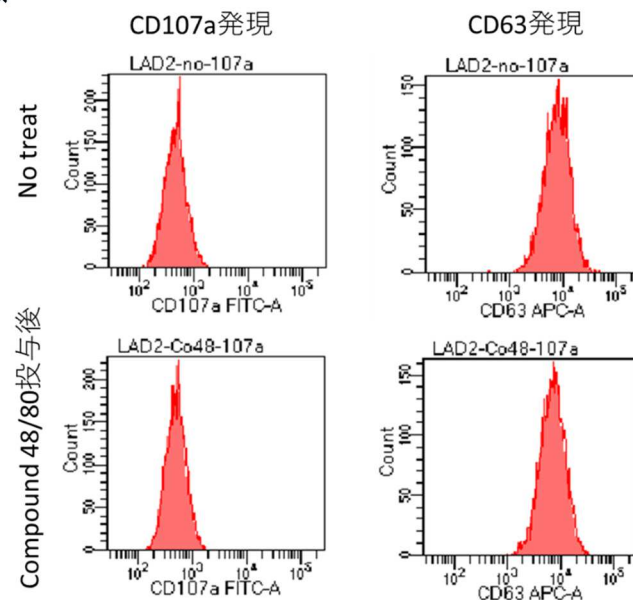


図 2 Compound48/80 投与後の反応

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

② 患者検体を用いた診断性能の評価

患者状態を評価する目的で標準化され妥当性が検証された質問票 (ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood、ADCT: Atopic Dermatitis Control Tool、POEM: Patient Oriented Eczema Measure、FAQLQ10-J: Japanese version of the Food Allergy Quality of Life Questionnaire 10)、並びに現在の食物の摂取状況を聴取するオリジナルの質問票を組みあわせ作成した。質問票の状況取得に当たっては、電子媒体を用いた情報取得系を確立し、タブレットを用いた情報取得が可能な状態となった。上記を用いた患者情報の取得に並びに血液検体の取得に関して、山梨大学の倫理委員会による審査を申請中である。

5 今後の展望

① MAT の実行可能性についての探索的研究

試薬を含めた評価系の見直しを図っている。現時点では LAD2 の FC ϵ RI の発現状況を確認中であり、FC ϵ RI の発現が低下している場合には系自体が正常に働かない可能性がある。すでに compound48/80 による MRGPRX2 での脱顆粒反応も乏しいことを確認しており、FC ϵ RI の発現が著しく低下している、または確認できないには、異なる肥満細胞株 (LUVA, Hoxb8 等) での反応を検討する。

あるいは、フローサイトメトリーによる反応が見られなかったためトリプターゼ等の活性化により放出される生理活性物質の測定は行わなかったが、表面マーカーで捉えられない変化が起こっているかについては追加で評価を行う予定である。

② 患者検体を用いた診断性能の評価

倫理審査を通過し、①の評価系の確保ができた段階で臨床情報の取得、並びに患者検体を用いた MAT 評価を開始していく予定。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

- ・学会発表・学術論文を通じて学術的な発信を行う。広報を通じたプレスリリースも併用する。
- ・新聞、テレビ、ラジオなどのメディアを通じて、新規評価法の成果発表を行う。
- ・アレルギーに関する市民公開講座などを開催し、一般的な食物アレルギーに対する啓蒙活動を行うとともに、その一部で結果の公表も行う。

留意事項

① 3枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。