

■ 研究課題名

免疫基礎研究に基づく食物アレルギー対策食品の画期的創成

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①食物アレルギー病因病態の遺伝子学およびタンパク質構造学的解明
免疫寛容を誘導する大豆タンパク質分解物の分析とその臨床応用（H20-21）
（◎近藤 直実／国立大学法人岐阜大学大学院医学系研究科）
- ②食物アレルギー患者の臨床像の解明および新規治療法の実践
（金子 英雄／国立大学法人岐阜大学医学部附属病院）
- ③免疫寛容を誘導する牛乳タンパク質分解物の開発および製品化
（中埜 拓／ビーンスターク・スノー株式会社）
- ④免疫寛容を誘導する大豆タンパク質分解物の開発および製品化（H17-19）
（嶋崎 康高／百福インターナショナル株式会社）

■ 研究の目的

食物アレルギーの治療法は極めて立ち後れており、原因食品を明らかにし、その食品を除去するという除去食療法しかない。本研究では、積極的に免疫寛容を誘導させ“食べて治す”画期的アレルギー対策食品の開発をめざす（図1）。牛乳または大豆アレルギー患者の臨床像、病態を明らかにし、さらにヒト白血球型抗原（HLA）—抗原ペプチド—T細胞受容体（TCR）との結合様式、T・B細胞エピトープを明らかにして、どのようなペプチド配列の組合せが食物アレルギー発症に関わるかを解明する。この知見をもとにして酵素分解によりB細胞エピトープ等を消失させ“食べて治す”（免疫寛容誘導）画期的アレルギー対策牛乳、大豆食品を創出する技術の開発に取り組み、これらの食品を応用した多種の事業の展開へつなげる。

■ 主要な成果

- ① 免疫寛容を誘導する牛乳タンパク質分解物の開発
牛乳アレルギー疾患でアレルゲン性が高いとされる牛乳タンパク質のβ-ラクトグロブリン（BLG）について、BLGのT細胞エピトープを明らかにするため、牛乳アレルギー患者からBLGに対するT細胞クローンを樹立し、HLA—ペプチド—T細胞受容体の結合様式を明らかにした（図2）。以上の結果をもとに、重篤な症状を生じるB細胞反応性の減弱ならびに免疫寛容を誘導するT細胞反応性の保持を指標として、酵素分解によるペプチド調製方法を検討した（図3）。その結果、BLGでは2種類の分解物を選択し、とくに#47分解物は、T細胞反応性を有するアミノ酸配列（コア配列、図3の枠内）の保持が確認された。これらの有望酵素分解物の分離・精製調製条件を確立し（図4）、大量調製および安全性確認を経て、臨床評価用サンプル（抗原修飾BLGペプチドパウダー）を調製した（図5,6）（図10参照）。もう一つの主要な牛乳アレルゲンであるカゼインに関しても、B細胞反応性の減弱、ならびに免疫寛容を誘導するT細胞反応性の保持を指標として分解物の調製条件を検討し、3種類の分解物を選択し評価を進めている（図7）。このなかで、T細胞反応性は保たれておりB細胞反応性が減弱しているカゼイン分解物を見出し、この分解物が免疫寛容を誘導する可能性が示された。
- ② 抗原修飾BLGの臨床試験
#47分解物は、経口摂取による臨床評価にて牛乳アレルギー疾患の寛解例が認められた。#47分解物の投与に先立ち、投与に関するプロトコルを作製した（図8）。#47分解物投与の投与前後にintact BLGの負荷を行い、BLGに対する摂取閾値の変化を検討したところ、8例中7例で閾値が上昇しており、免疫寛容が誘導されたと考えられた。#47分解物の摂取により牛乳を飲めなかった患者さんの中で、牛乳100ml以上摂取できるようになった患者さんもあり、有用

性が確認できた。その例を図9に示す。

③ 抗原修飾BLGの製品開発

#47分解物の大量調製法を確立し、ラムネ菓子やタブレットのような形状の製品（試作品）を開発した（図10）。

④ 大豆主要アレルゲンP34の大腸菌利用による作製と解析

リンパ球幼若化反応およびIgE反応で大豆アレルギーの診断に利用可能な高純度精製のリコンビナントP34(rP34)を作製した（図11）。酵素分解したrP34分解物はB細胞反応性が減弱していた。またrP34はエンドトキシンと結合する性質が認められエンドトキシン除去が必要である（図12）。

⑤ 免疫寛容を誘導する大豆タンパク質分解物の開発

大豆のある分解物にP34の消失を確認した。大豆アレルギー患者のうち、この大豆分解物によりリンパ球幼若化反応が誘導される者がみられたことから、この分解物が免疫寛容を誘導する可能性が示された。

■ 公表した主な特許と論文

① 経口免疫寛容を誘導するペプチド組成物及びその製造方法

（特開：2008-195618、出願人：ビーンスターク・スノー（株）、国立大学法人岐阜大学）

② Kaneko, H., *et al.*, The response of bovine beta-lactoglobulin-specific T-cell clones to single amino acid substitutions of T-cell core epitope. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19, 592-598 (2008)

③ Ohnishi, H., *et al.*, Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, 10260-10265 (2009)

■ 今後の展開方向

①BLG以外の牛乳の主要なアレルゲンであるカゼインについても、同様な方法で免疫寛容を誘導するカゼイン分解物の作製を進め、BLG分解物とカゼイン分解物を混合して摂取することで、牛乳アレルギーをより寛解に誘導することが可能な素材・製品作りを進め、さらなる特許出願を目指す。#47分解物に関しては大量生産の方法が確立していることから、臨床応用が可能であり、業界での多種の製品化を検討する。

②大豆分解物を用いての臨床応用を行うと同時に、大豆分解物を用いた食材の開発と商品化を多種の業界と提携しすすめていく。

■ 問い合わせ先

①本研究全般、高純度精製リコンビナントP34開発、大豆分解物食材開発 … 岐阜大学大学院医学研究科小児病態学（058-230-6000）

②酵素分解BLG臨床治験 … 岐阜大学医学部附属病院小児科（058-230-6000）

③酵素分解BLG、カゼイン製品開発 … ビーンスターク・スノー株式会社（049-242-8138）

■ 研究成果の具体的図表

“食べて治す”という新しい独創的発想

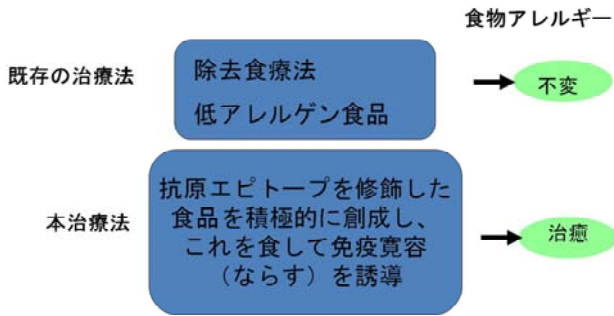


図1 本治療法と既存の治療法の相違

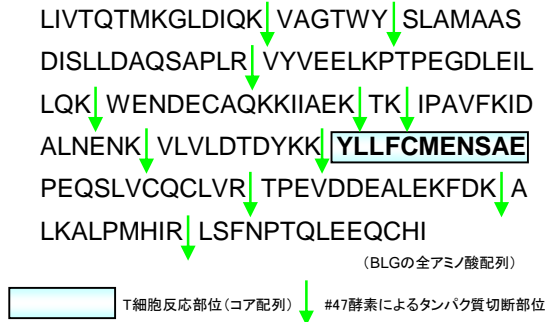


図3 #47酵素によるBLGの分解

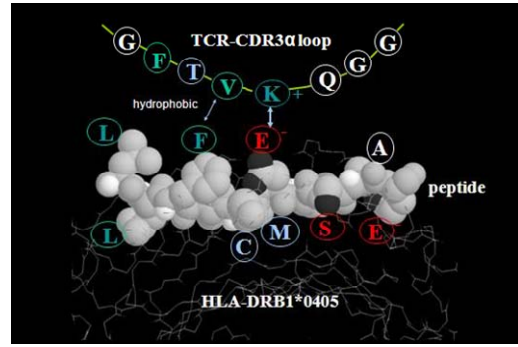


図2 HLA—BLG peptide—T細胞受容体との結合様式

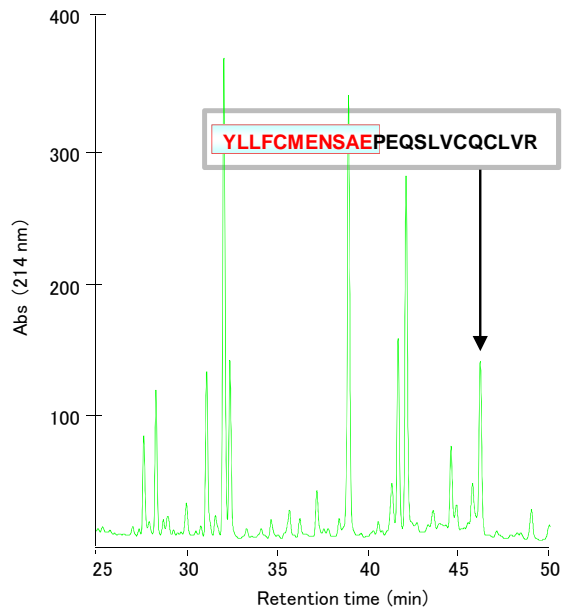


図4 #47分解物の逆相HPLCクロマトグラム

RT46min付近のピークにコア配列を含むペプチドが同定された

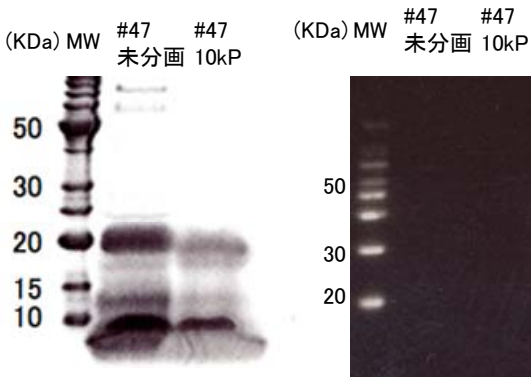


図5 #47分解物の患者血清IgE Western blot

左: #47分解物のSDS/PAGE (CBB染色)
右: 牛乳アレルギー患者(RAST score 6)の血清IgEを使用したWestern blot
CBBでは#47分解物のペプチドの存在が確認できるが、IgE Western blotでは検出できない。

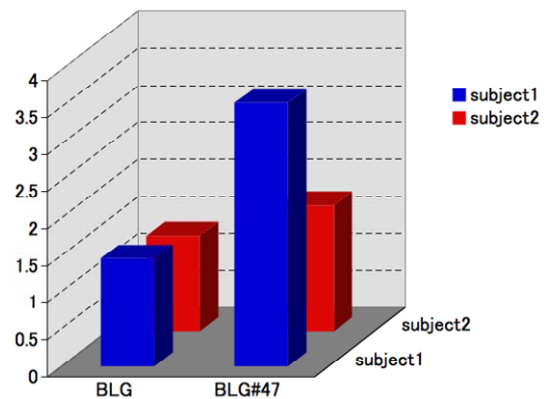


図6 #47分解物を使用したリンパ球幼若化反応 (LST)

Intact BLGとBLG分解ペプチド(#47分解物)に対して、LSTで陽性反応を示す牛乳アレルギー患者が存在する。

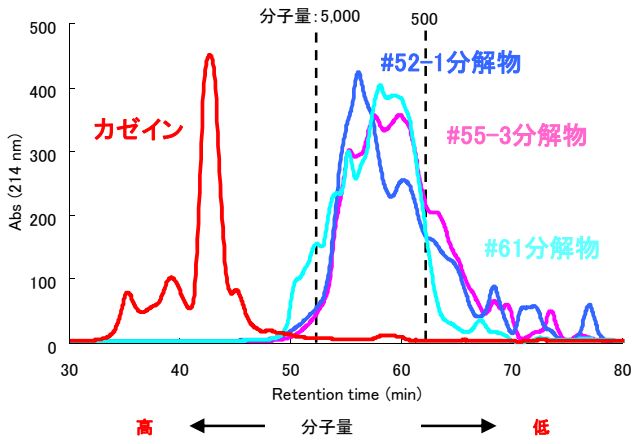
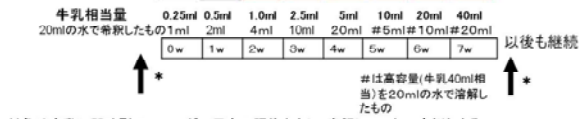


図7 各カゼイン分解物の分子量分布

BLG#47分解物経口免疫寛容誘導プロトコル



- 対象は牛乳に即時型のアレルギー反応の既往を有し、寛解してない症例とする。
- 投与前に書面でインフォームドコンセントを得る。
- * BLG負荷試験を行なう。牛乳40ml相当のBLGパウダーを20mlの水に溶解し、15分おきに1ml→2ml→4ml→8ml→(5ml)の順に増量し、total 40mlのBLG負荷を行なう。(0) (15分) (30分) (45分) (60分) 最終投与後1時間観察。
- *2回(3回)の採血を行なう(矢印)。
- *末梢血一般、血液像、IgE、RAST (牛乳、 α -ラクトグロブリン、BLG、カゼイン、卵白)
- *Th1/Th2、CD4/CD25の測定
- *BLG#47分解物を水20ml/外薬では注射用蒸留水で希釈したものを1mlの摂取(牛乳0.25ml相当BLG)から開始する。
- *毎日、規定量を午前中にのんでいただく。
- *1週間毎に負荷する量を増量する。
- *最終的に牛乳40mlに相当するBLG#47分解物を摂取していただく。
- *プロトコル終了後、再度BLG負荷試験を行う。
- *BLGが摂取できた場合は牛乳の負荷試験を行う。

図8 #47分解物の投与プロトコル

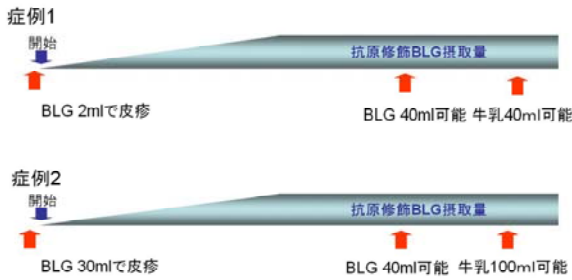


図9 #47分解物の摂取による牛乳アレルギー寛解症例



図10 #47分解物の製品化(試作品)

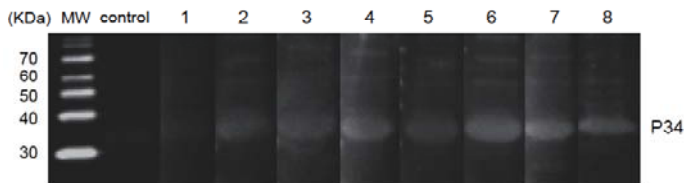
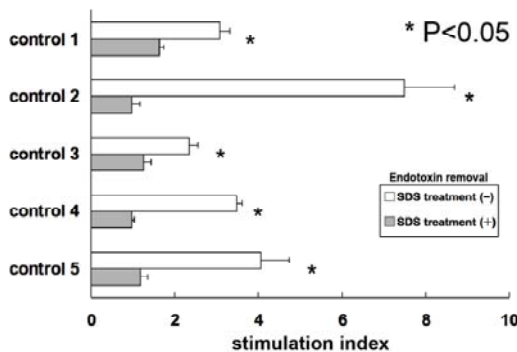
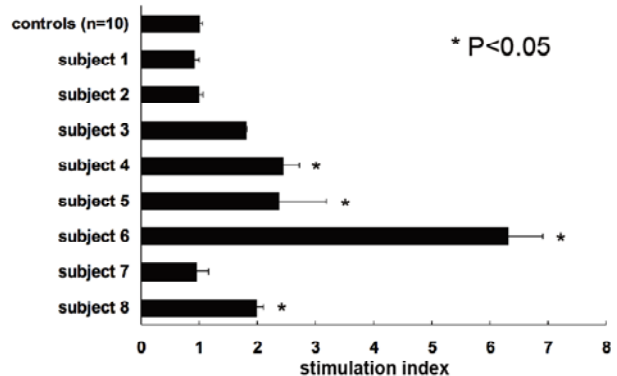


図11 rP34を使用した大豆アレルギー患者血清IgE Westernblot

rP34を使用したヒト血清IgE Westernblot例
8名の大豆アレルギー患者の血清IgEは、精製したrP34と反応を示した。



【エンドトキシン除去・非除去の影響】



【エンドトキシン除去rP34を使用した大豆アレルギー患者リンパ球幼若化反応】

図12 rP34を使用したリンパ球幼若化反応(LST)