

細胞機能検査によるアレルギー・免疫疾患診断法の確立

研究代表者：大嶋 勇成（医学部 講師）

電話：0776-61-3111、メールアドレス：yohshima@fukui-u.ac.jp

共同研究者：安富 素子（医学部 助教）

概 要	アレルギー性疾患の診断にはIgEの測定が用いられるが、病型によってはIgEが検出できず負荷試験が必要なものがある。負荷試験は重篤な反応を惹起する危険があるため、負荷試験に代わる安全な体外診断法の開発が求められる。そこで、IgEの陽性率が低く、その病態に不明な点が多い新生児ミルクアレルギーを対象疾患とし、抗原特異的リンパ球増殖反応とサイトカイン産生能測定法の標準化とその診断的有用性について基礎的検討を行った。その結果、ミルクアレルギー患者では一般調乳による刺激で増殖反応を認め、治増殖反応の有無により治療用ミルクの種類を選択できることが期待された。
関連キーワード	新生児ミルクアレルギー、リンパ球増殖試験、サイトカイン、IgE

研究の背景

アレルギー性疾患は病型によって、IgE依存性の病態が主なものと、IgE非依存性の細胞性免疫反応が主なもの、両者の関与が考えられるものが存在する。IgE非依存性の病態が主と考えられる病型では、通常臨床現場で行われる血清中IgE検査やスクラッチテスト、プリックテストは陰性のことが多く診断に有用でないことから、診断には抗原負荷試験が必要となる。しかし、抗原負荷試験は、重篤なアレルギー反応を惹起する危険性があるだけでなく、負荷試験として投与された抗原に対し新たに感作が成立し、本来は原因でなかった抗原が新たな原因抗原となる可能性も指摘されている。そこで、IgE非依存性のアレルギー疾患の診断として負荷試験の代わりとなる体外診断法の確立が望まれる。

近年、新生児期に嘔吐や下痢、血便といった消化器症状を主とする特殊な食物アレルギーの報告例が増加し、注目を集めている。多くの症例はミルクが原因となっており、中には母親が摂取した乳製品や大豆製品のため母乳を飲むことで症状が誘発される場合もある。年長児の牛乳アレルギーと異なり、牛乳特異的IgEが陽性となることはほとんどなく、その病態には不明の点が多い。診断には便中好酸球を証明することが行われるが、原因抗原の同定には利用できない。そのため原因抗原の検索として負荷試験が行われているが、対象患者が未熟児のこともあり、負荷試験によりショック様の状態に陥ることもあり、危険性が高いことが問題となっている。

研究の目的

抗原特異的IgEが検出されない新生児期の消化器症状を主体とする食物アレルギーの診断として負荷試験に代わる体外診断法の確立を目的とする。

原因抗原が乳製品の新生児ミルクアレルギーの場合には、治療として低アレルゲン化ミルクを使用することになる。しかし、低アレルゲン化ミルクは低アレルゲン化の程度が強いほど、味が悪く、長期使用で一部の栄養素が不足しがちとなり、価格も高いことが問題となる。そのため、治療目的

として患者ごとにどの程度まで低アレルゲン化されたミルクを使用する必要があるかを判定することが求められる。本研究では単に原因抗原を決定するだけでなく、患者が実際に摂取可能な低アレルゲン化ミルクを選択する上でも有用となる検査法を考える。また、新生児ミルクアレルギーの場合、便中好酸球が陽性となることから、Th2細胞の関与が推定されているが、その病態はほとんど解明されていない。そこで、どのような抗原特異的

免疫応答が起きているかを解析するためにサイト

カイン産生パターンの測定を試みる。

研究の成果

1) 抗原特異的リンパ球増殖試験の条件設定のための基礎的検討

通常のリンパ球増殖試験では培養液に牛胎児血清を添加したものを用いるが、新生児ミルクアレルギーの場合、牛由来の蛋白成分に反応する可能性もあることから無血清培地 AIM-V 培地を使用した。増殖反応の検出には、放射性廃棄物がでないようにするため MTT アッセイの変法を用いた。

刺激抗原としては、牛乳の主要アレルゲンとされるβ-ラクトグロブリンやカゼインが用いられることが多いが、これらはあくまでも IgE 依存性の疾患の場合の主要抗原であり、新生児ミルクアレルギーの主要原因抗原であるかは結論がでていない。また、治療用ミルクを決定する上でその結果を利用することができないため、あえて、ミルクそのものを刺激に用いた。

抗原に混入してくるエンドトキシンが非特異的増殖反応の原因となる問題点が指摘されているが、エンドトキシンフリーの抗原蛋白は市販されておらず、完全にエンドトキシンフリーの状態では抗原提示細胞の抗原処理機構が活性化されないため、抗原ペプチドを使用することが必要となる。しかし、患者ごとに T 細胞の認識エピトープが異なる可能性もあることから、抗原ペプチドを刺激に用いることは診断の感度が低くなると考えられる。

対象患者が未熟児の場合もあるため、採血量が制限される結果、培養に使用可能な細胞数が限られるため、サイトカイン測定は BD Cytometric Bead Array で行った。また、サイトカインが検出可能で、MTT アッセイでの無刺激のバックグラウンド値を落とすため培養期間は 4 日間とした。

2) ミルクアレルギー患者への診断応用例

症例 1: 病原性大腸菌と MRSA 感染を契機に発症

したミルクアレルギー。加水分解乳摂取で血便、ショック症状を呈したため、中心静脈栄養で絶食後、アミノ酸乳で哺乳再開。症例 2: 血便のため絶食、加水分解乳で哺乳再開することが可能だった。細胞増殖反応が無刺激と同程度の場合には刺激に用いてミルクは哺乳可能であることが示唆された。便中好酸球を反映してミルク刺激で IL-5 が産生されるが、症例によっては TNF-α や INF-γ の産生も認めた。TNF-α や INF-γ は腸管粘膜の透過性を増強することが知られており、Th2 反応以外これら炎症性サイトカインや Th1 サイトカインも病態に関与していることが示唆された。

刺激	細胞増殖	TNF-α	IL-4	IL-5	IL-10	IL-2	INF-γ
症例 1							
なし	0.10	<20	<20	<20	<20	<20	<20
普通ミルク	0.34	170	<20	320	<20	189	792
加水分解乳	0.21	<20	<20	122	<20	131	347
アミノ酸乳	0.09	<20	<20	39	<20	48.7	41
症例 2							
なし	0.03	<20	<20	<20	<20	<20	128
普通ミルク	0.09	39.7	<20	98	<20	<20	1151
加水分解乳	0.04	<20	<20	<20	<20	<20	268
アミノ酸乳	0.04	<20	<20	<20	<20	<20	<20

新生児ミルクアレルギー患者は、経過とともに、乳製品摂取が可能となる。実際、アミノ酸乳以外摂取不能な新生児ミルクアレルギー患者のミルク特異的細胞増殖反応を経時的に測定すると加水分解乳に引き続き普通ミルクに対する特異的増殖反応消失する。この反応消失に合い前後して加水分解乳に引き乳製品一般の摂取が可能になることが観察された。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

本研究で用いた、細胞培養、サイトカイン測定法で得られた結果の一部は、

1) 岡崎新太郎 他 可逆性脳梁膨大部病変を有する脳炎・脳症 (MERS) を合併した急性巣状細菌性腎炎の 1 男児例 第 41 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2009/11/13,14 福井

2) 岡崎新太郎 他発熱を初発症状とした食道胃接合部原発悪性黒色腫の女児例 第 295 回日本小児

科学会北陸地方会 2009/3/金沢
として学会発表した。

「本研究に関わる発表論文」

Omata N, Ohshima Y, Yamada A, Yasutomi M, Tokuriki S, Mayumi M A case of milk-protein-induced enterocolitis associated with enterotoxigenic E coli and MRSA infections. Eur J Pediatr 167:683-684(2008)