

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム  
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer  
ACceleration Transformative research for Medical innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 乳幼児のアレルギー発症予防、治療効果予測のための新規バイオマーカー診断装置の開発と装置の実用性検証  
(英語) Development of a new diagnostic tool which reports biomarkers of infants for prevention and treatment of allergy, and verification of the diagnostic tool for practical use
- 研究開発担当者 (日本語) 徳島大学先端酵素学研究所、特任教授、木戸 博  
所属 役職 氏名： (英語) Institute for Enzyme Research, Tokushima University, Specially-appointed professor, Hiroshi Kido
- 実施期間： 平成28年10月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 乳幼児のアレルギー発症予防、治療効果予測のための新規バイオマーカー診断装置の開発と装置の実用性検証  
開発課題名： (英語) Development of a new diagnostic tool which reports biomarkers of infants for prevention and treatment of allergy, and verification of the diagnostic tool for practical use
- 研究開発分担者 (日本語) 応用酵素医学研究所株式会社、代表取締役、鈴木 宏一  
所属 役職 氏名： (英語) Applied Medical Enzyme Research Institute Co. Representative Director, Koichi Suzuki

## II. 成果の概要（総括研究報告）

木戸博教授、高橋悦久助教（徳島大学先端酵素学研究所）と鈴木宏一代表取締役社長（応用酵素医学研究所株式会社）はプロジェクトチームを作り、乳幼児のアレルギー発症予防、治療効果予測のための新規バイオマーカー診断装置の開発と実用性検証を実施した。

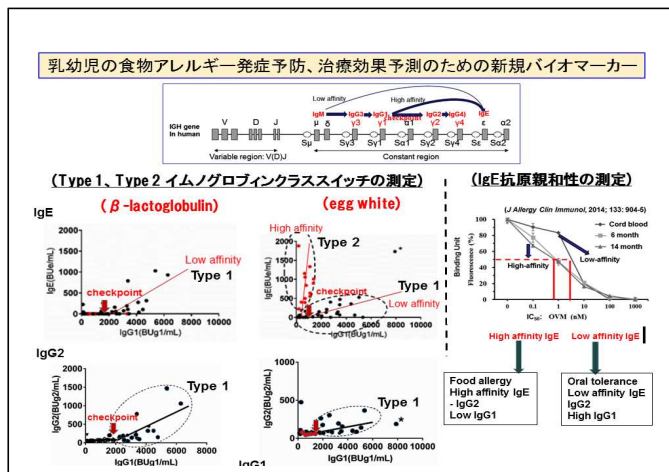
母乳、人工乳、混合乳を摂取する生後半年間の免疫系の発達は、人工乳に大量に含まれる牛乳アレルギーと、母乳中に微量含まれる卵白アレルギーの経口感作で、成熟過程に大きな違いがあることをこれまでに明らかにしてきた。アレルギー特異的各種イムノグロブリン産生は、immunoglobulin class-switching recombination ( $\mu \rightarrow \gamma 3 \rightarrow \gamma 1 \rightarrow \gamma 2 \rightarrow \gamma 4$ , と  $\gamma 1 \rightarrow \epsilon$ )の順に経時的に成熟して産生される。本プロジェクトでは、微量の血液 (10-20  $\mu$ L) で各種抗体量の測定が可能な IgSensor AMERIC を用いて、出生直後から2月毎の検査で、アレルギー特異的免疫系の成熟過程と IgE の抗原親和性を明らかにした。得られた結果を以下に示す。

①出生直後から大量の牛乳アレルギーにさらされる人工栄養と混合栄養児では、生後2ヶ月の早い時期に抗原特異的 IgG1 と IgA がピークに達し、続いて IgG2 と IgE 産生が4ヶ月目から増加するパターンを示した。早期の大量 IgG1, IgA, IgG2, IgE の出現する免疫系を Type 1 immunoglobulin subclass formation とした。一方、母乳中の微量卵白アレルギーにさらされる母乳栄養と混合栄養児では、前者に比較して卵白特異抗体の産生は、約2ヶ月遅れた緩やかな Type 1 immunoglobulin subclass formation を示し、抗原摂取量の違いによる免疫系の成熟過程に大きな違いのあることが明らかになった。(バイオマーカー: class-switching のモニタリングパターン)

②早期の Type 1 immunoglobulin subclass formation 系では、抗原特異的 IgG1 が蓄積して閾値に達した時に、 $\gamma 1$  (IgG1)  $\rightarrow$   $\epsilon$  (IgE) class-switching と  $\gamma 1$  (IgG1)  $\rightarrow$   $\gamma 12$  (IgG2) class-switching がほぼ同時に起きて、IgE と IgG2 が産生されることをこれまでに明らかにしてきた。今年度の研究では、この場合に産生される IgE が低抗原親和性と低い IgE/IgG1 比の特徴を示し、その後経口免疫寛容に進展すると推定した。一方、アレルギー摂取量が少なく、遅い Type 1 immunoglobulin subclass formation を示す場合、そのままゆっくり成熟が進むケースと、成熟過程で湿疹による経皮抗原感作を伴った場合に見られる、高い IgE 産生と高親和性 IgE を特徴とする Type 2 immunoglobulin subclass formation が明らかになった。その結果、高い IgE/IgG1 比を示し、IgG2 の産生が伴わないことから、Type 1 とは異なる class-switching パターンを示した。Type 2 に所属する乳児は、その後食物アレルギーの発症に発展すると推定した。(バイオマーカー: IgE/IgG1 比、IgG2 値測定、IgE の抗原親和性測定)

③乳児期の食物アレルギー発症を予測するバイオマーカーとして、class-switching をモニターする IgG3,

IgG1, IgG2, IgG4, IgE, IgA 測定の重要性、IgE/IgG1 比測定の重要性、IgE の抗原親和性測定の重要性が明らかになり、上記バイオマーカーを測定する装置を試作した。各種イムノグロブリンの測定では、各抗体価が同一条件で測定されることが必須で、その精度を保つための測定条件の標準化と、自動分注機を加えた測定装置の一体化と自動化が実施された。IgE の抗原親和性の測定方法では、これまでの検討方法の中から親和性を抗原濃度の IC<sub>50</sub> 値 (nM) で示す競合阻害法が、最も的確な測定法として決定した。



Prof. Hiroshi Kido, assistant Prof. Etsuhisa Takahashi at The Institute for Enzyme Research, Tokushima University and Director Koichi Suzuki at Applied Enzyme Research Co. made a project team and aimed to

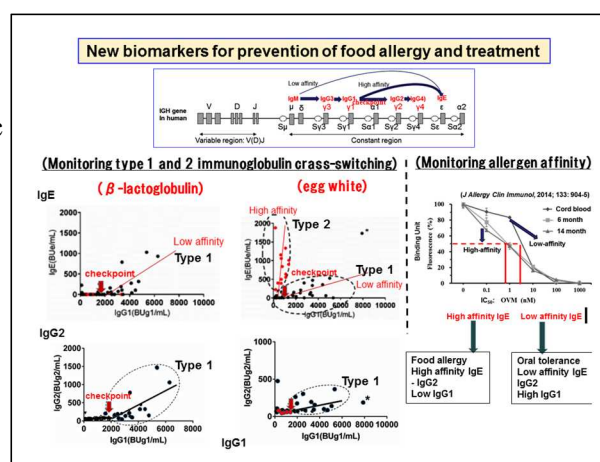
develop a new diagnostic tool which reports biomarkers of infants for prevention and treatment of allergy, and verification of the diagnostic tool for practical use.

Most people have lifelong immunological tolerance to foods, but a minority suffers food allergy. Although many foods can potentially induce IgE-mediated food allergy, allergies to hen's egg white (EW) and cow's milk (CM) are the earliest to appear common food allergies in infants at one year of age. Immunological development and food allergen sensitization from birth to 6 months might be the background of food allergy and oral tolerance.

We previously found that high amounts of CM ingestion from formula and mixed feedings and trace amounts of EW from breast and mixed feedings induced rapid and slow immunoglobulin formation associated with class-switching recombination, respectively, in early infancy and eczema predominantly modifies the latter with selective induction of high IgE and resultant allergen-specific IgE/IgG1 ratio, as biomarkers for prevention and treatment of allergy in infants. To understand the development of food allergy and its relationship with eczema during the lactation period, a trajectory study on EW- and CM-allergen specific immunoglobulin production associated with class-switching recombination from birth to 6 months of age are required. We recently developed the highly sensitive densely carboxylated protein (DCP) microarray with high antigen immobilization capacity. Following are the results obtained from October 2017 to March 2018.

DCP microarray offers the advantages of measurement various types of immunoglobulin subclasses under the same assay conditions with high sensitivity and can detect low- and high-affinity allergen-specific IgE. In addition, the DCP microarray can quantitatively measure the levels of IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IgA subclasses against allergens using small volume of serum or plasma. Feeding of formula containing high dose CM allergens induced high allergen-specific IgG1 and IgA in the early stage, and subsequently production of IgG2 and IgE (called type 1 immunoglobulin subclass formation). Breast feeding, which provides trace amounts of EW allergens, showed slow and mild type 1, but eczema in these 6-month-old infants induced EW-specific high IgE without induction of IgG2 and other immunoglobulins (called type 2 immunoglobulin subclass formation), with resultant high IgE/IgG1 ratio. In addition, allergen-specific low-affinity IgE was found in type 1, suggesting oral tolerance and high-affinity IgE in type 2, suggesting food allergy. (Proposed biomarkers: allergen specific early and slow development of type 1 immunoglobulin subclass maturation, and eczema selectively modified the latter from type 1 to type 2; low levels in allergen-specific IgE/IgG1 ratios and IgG2 formation associated with IgE as biomarkers of oral tolerance; high levels in IgE/IgG1 ratios, poor IgG2 formation and high allergen-specific IgE affinity as biomarkers in food allergy).

We developed diagnostic hardware for detection of these biomarkers, such as type 1 to type 2 immunoglobulin subclass formation associated with class-switching and allergen-specific affinity of IgE. We had established sensitive assay conditions for various types of immunoglobulin subclasses and had applied to develop automatic measuring apparatus equipped with auto-sampler. In addition, we selected allergen IC<sub>50</sub> (nM), as a biomarker for allergen-specific IgE affinity. By using these parameters, we will develop a new measuring apparatus for allergen-specific affinity of IgE.



### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2件、国際誌 1件)

1. Kawamoto N, Kamemura N, Kido H, Fukao T. Detection of ovomucoid-specific low-affinity IgE in infants and its relationship to eczema. *Pediatr Allergy Immunol.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1111/pai.12702>.
2. 木戸博. 予防と治療に役立つクラススイッチと抗原親和性を測定する高性能タンパクチップ. *アレルギーの臨床.* 2017, 37, 248-51.
3. 苛原誠, 木戸博. アレルギー疾患の診断、治療、予防に向けた新規高性能蛋白チップの臨床応用. *臨床免疫・アレルギー科.* 2016, 66, 66-72.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 乳児期におけるイムノグロブリンクラススイッチと抗原親和性の変化 一経口免疫寛容児と食物アレルギー発症児との比較一、木戸博、東海アレルギー懇話会、2017/3/11、国内.

(4) 特許出願  
該当なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム  
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer  
ACceleration Transformative research for Medical innovation
- 研究開発課題名 : (日本語) 乳幼児のアレルギー発症予防、治療効果予測のための新規バイオマーカー診断装置の開発と装置の実用性検証  
(英語) Development of a new diagnostic tool which reports biomarkers of infants for prevention and treatment of allergy, and verification of the diagnostic tool for practical use
- 研究開発担当者 (日本語) 徳島大学先端酵素学研究所、特任教授、木戸 博  
所属 役職 氏名 : (英語) Institute for Enzyme Research, Tokushima University, Specially-appointed professor, Hiroshi Kido
- 実施期間 : 平成28年10月1日 ~ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 乳幼児のアレルギー発症予防、治療効果予測のための新規バイオマーカー診断装置の開発と装置の実用性検証  
開発課題名 : (英語) Development of a new diagnostic tool which reports biomarkers of infants for prevention and treatment of allergy, and verification of the diagnostic tool for practical use
- 研究開発分担者 (日本語) 応用酵素医学研究所株式会社、代表取締役、鈴木 宏一  
所属 役職 氏名 : (英語) Applied Medical Enzyme Research Institute Co. Representative Director, Koichi Suzuki

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者（課題リーダー）：徳島大学先端酵素学研究所、特任教授、木戸 博 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）  
該当なし
  
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当なし
  
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし
  
- (4) 特許出願  
該当なし