

食品低アレルゲン化法の開発による食物アレルギー治療に関する研究

分担研究者 眞弓光文 福井医科大学小児科教授

研究要旨

卵白アレルギーを中心とした食物アレルギーは大多数の乳幼児期のアトピー性皮膚炎の発症に関与している。多くの食物のアレルゲン性の維持には分子内共有結合が重要な役割を果たしており、この共有結合を還元する（-S-S-を開いて-SH にする）ことにより、消化酵素により容易に消化され、熱処理により容易に抗原性が低下するなど、食物のアレルゲン性の低下・消失が期待される。生体内に存在するレドックス制御蛋白であるチオレドキシニン（TRX）は分子内の共有結合を効率よく還元し、かつ、毒性や抗原性がないことから、TRX 処理による食物の低アレルゲン化の有無を検討した。

ヒトの TRX 遺伝子を同定し、遺伝子工学的手法により作製した TRX を用いて卵白アレルギーの主要成分であるオボムコイド（OM）を処理したところ、その分子内共有結合が還元され、ペプシン、トリプシンなどの生体内に存在する消化酵素に対する被消化能が著しく亢進した。TRX 処理され、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンで消化された OM は、TRX 未処理のものに比して、特異 IgE 抗体との結合性が 100 倍以上低下し、低アレルゲン化された。TRX 処理により、OM の熱処理による特異 IgE 抗体との結合性の低下（低アレルゲン化）も認められた。もうひとつの重要な卵白アレルゲンであるオボアルブミン（OVA）はもともと消化酵素に対する被消化能や滅処理に対する感受性が高いが、TRX 処理によりこの特性がより一層高くなり、加熱処理 30 分により、特異 IgE 抗体との結合性が完全に消失した。

TRX により、卵の低アレルゲン化が可能であることが明らかになったが、今後は、この TRX 処理卵白抗原により、卵アレルギー患者に卵抗原に対する免疫寛容を誘導できるかどうかの検討が重要である。

A. 研究目的

これまでの研究において、小児のアトピー性皮膚炎のほとんどは乳幼児期に発症し、その大部分に食物アレルギーが関与しており、食物の中でも卵が最も主要なアレルゲンであることが明らかになっている。食物アレルギーの治療法は未だ開発されておらず、食物アレルギーの患者は除去食をせざるを得ないが、除去食療法には患者の QOL の面から問題があり、食品の低アレルゲン化法の開発とそれによる食物アレルギーの治療法の開発が求められている。

一方、食物抗原がそのアレルゲン性を発揮するためには、分子内共有結合が重要な役割を果たすことが報告されており、分子内共有結合を開く（-S-S-を還元して-SH にする）ことにより、食物の低アレルゲン化が期待される。

本研究は、生体内に存在し、毒性や抗原性を考えなくて良いレドックス制御蛋白であるチオレドキシニン（TRX）を用いて食物抗原の分子内共有結合を還元することにより、食物を低アレルゲン化することが可能かどうかを検討し、食物アレルギーの治療法

を開発することを目的とする。

B. 研究方法

TRX 処理：同定したヒト TRX 遺伝子から細胞工学的的手法によりリコンビナントヒト TRX を作製し、これを用いて NTR および NADPH reductase の存在下に、卵アレルギーの主要抗原であるオボアルブミン (OVA) およびオボムコイド (OM) を処理する。その後、固相化したペプシン、トリプシン、キモトリプシンで一定時間処理する。

TRX による分子内共有結合の還元の有無の検討：TRX 処理した OVA および OM を SDS-PAGE で展開後、SH 基と特異的に結合する mBBBr を用いて染色し、の分子内共有結合の還元状態を検討する。

被消化能の検討：TRX 処理または未処理の OVA および OM を固相化ペプシン、トリプシン、キモトリプシンで一定時間処理したものを SDS-PAGE に展開し、分子量の変化から被消化能の変化を検討する。

低アレルゲン化の検討：TRX 処理または未処理の後に消化酵素処理または加熱処理された OVA および OM の低アレルゲン化の有無を、それぞれ OVA 特異 IgE 抗体 OM 特異 IgE 抗体との結合性を指標にした RAST Inhibition Assay により検討する。

C. 研究結果

(1) -SH 基と特異的に結合する mBBBr を用いた検討により、TRX 処理した OM に多数の-SH 基が存在することが示され、TRX 処理により OM の分子内共有結合が効率よく還元されることが明らかになった。

一方、OVA はもともと分子内共有結合が 1 カ所しかなく、この方法では TRX 処理による-SH 基の増加は明らかではなかった。

(2) TRX 処理により OM の消化酵素に対する被消化能が亢進した。すなわち、ペプシンによって 30

分以内に完全に消化されるようになり、TRX 未処理では全く消化されないトリプシン、キモトリプシンに対しても 1 時間以内に完全に消化されるようになった。

一方、OVA ではこのような変化はあまり認められなかった。

(3) TRX 処理された OVA は消化酵素で処理された場合も処理されない場合にも、未処理の OVA を対照として比較すると、特異 IgE 抗体との結合性が低下することが、RAST inhibition 法で明らかになった。また、TRX 処理により OVA の熱処理に対する感受性が亢進し、30 分の加熱処理により OVA 特異的 IgE 抗体との結合性が完全に消失することが RAST inhibition 法で明らかになった。

一方、TRX で処理されこれらの消化酵素により消化された OM は、RAST inhibition 法で検出される特異的 IgE との結合性が TRX 未処理のものに比べて 100 倍以上減少した。また、TRX 処理された OM は加熱処理によっても未処理のものと比較して、アレルゲン性が少し低下することが、RAST inhibition 法で明らかになった。

D. 考察

TRX 処理により卵の主要アレルゲンである OVA および OM を低アレルゲン化させ得ることが示され、この方法により、安全な低アレルゲン化卵の開発が可能であることが明らかになった。また、この方法は分子内共有結合を持つ他の多くの食物アレルゲンの低アレルゲン化にも適用できると考えられた。事実、我々と連絡を取りながら研究を進めているカリフォルニア大学バークレー校の Buchanan 博士らのグループは、本法が小麦および牛乳の低アレルゲン化に有用であることを報告している。したがって、本研究はアレルギー患者でも食べられる低アレルゲン食品を提供するのに有用な方法を明らかにしたものと考えられる。

一方、本邦はリコンビナント TRX を用いているため、原稿のままでは費用がかさむ点が問題である。今後はこの方法の低コスト化の方法を開発する必要がある。

さらに、今後検討すべき課題として、TRX 処理により低アレルゲン化された食品の投与により、食物アレルギー患者にその食物に対する免疫寛容を誘導して、早期に食物アレルギーを治療することが可能かどうかを検討することがあげられる。本研究はこの治療法の開発にも展望を開くものと考えられた。

E. 結論

卵アレルゲンの主要抗原である OVA および OM は、TRX 処理により消化酵素に対する被消化能が亢進し、熱処理に対する脆弱性が増す結果、低アレルゲン化されることが判明し、TRX による食品の低アレルゲン化が可能であることが示された。また、TRX で処理された低アレルゲン化食品により、食物アレルギー患者にその食物に対する免疫寛容を誘導して、食物アレルギーを治療する新しい治療法の開発の可能性が展望された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsukahara, H., T. Ishida, and M. Mayumi. Gas-phase oxidation of nitric oxide: chemical kinetics and rate constant. *Nitric oxide: Biology and Chemistry* 3(3): 191-198, 1999.

Tsukahara, H., Y. Watanabe, M. Yasutomi, R. Kobata, S. Tamura, K. Kimura, M. Hiraoka, and M. Mayumi. Early (4-7 days of age) dexamethasone therapy for prevention of chronic lung disease in preterm infants. *Biol. Neonate* 76: 283-290, 1999.

眞弓光文. リンパ球とアレルギー反応. 特集小児の

アレルギー疾患. *小児内科*31(3): 291-294, 1999.

眞弓光文. 卵アレルギー対策による難治型アトピー性皮膚炎発症予防の可能性. 特集 治り難いアトピー性皮膚炎. *アレルギーの臨床*19(5): 27-30, 1999.

眞弓光文. 小児アレルギーとヘルパー T細胞. *日本小児アレルギー学会誌*13(2): 1-6, 1999.

山田彰子, 眞弓光文. アトピー性皮膚炎. 外来患者の素朴な疑問に答える —家庭でのケアとその指導 Q&A— *小児科*40(7): 906-914, 1999.

眞弓光文. アトピー性皮膚炎と食物アレルギー 乳幼児と成人の違い. *アレルギー・免疫* 6(10): 44-48, 1999.

眞弓光文. 低アレルゲン化食品 アトピー性皮膚炎の治療における最近の進歩. *アレルギー科* 8(3): 181-185, 1999.

眞弓光文. アレルギー. 特集 診断基準と治療の基本 —最近の進歩—. *小児科臨床*52(12): 2216-2224, 1999.

眞弓光文. 小児アトピー性皮膚炎の免疫学的機序. 特集 小児のアトピー性皮膚炎. *小児科診療*63(1): 7-11, 2000.

眞弓光文, 大嶋勇成, 秦 大資. アレルギーと生体応答. 生体応答学の新展開 別冊・医学のあゆみ p159-163, 1999. 淀井淳司編集. 医歯薬出版株式会社

眞弓光文. アトピー性皮膚炎が先か喘息が先か. 皮膚科診療プラクティス 6 アトピー性皮膚炎 診療のストラテジー p139, 1999. 古江増隆, 宮地良樹, 瀧川雅浩 編集. 文光堂

眞弓光文他. 日本学校保健会児童生徒の健康状態サ

ーベイランス委員会アトピー性皮膚炎小委員会分担
執筆。学校生活におけるアトピー性皮膚炎Q&A。総
53頁。1999年3月。財団法人 日本学校保健会発行

2. 学会発表

松井猛彦、眞弓光文。喘息における寛解と治癒。第
36回日本小児アレルギー学会。1999. 10. 14-15.
千葉。

名倉 宏、眞弓光文。腸管免疫と食物アレルギー。
第49回日本アレルギー学会総会。1999. 10. 18-
20. 千葉。

眞弓光文。Allergy and Thioredoxin. 免疫アレル
ギーとRedox Biology. 第29回日本免疫学会総
会・学術集会 テクニカルセミナー。1999. 12. 1-3.
京都。

環境抗原からみたアトピー性皮膚炎の治療法の確立と評価
—酵母様真菌 *Malassezia furfur* の抗原分析と抗真菌薬療法の効果に関する研究—

分担研究者 秋山一男

国立相模原病院臨床研究部長

研究要旨

好脂質性皮膚常在酵母様真菌である *Malassezia furfur* (*M. furfur*) は、アトピー性皮膚炎の発症あるいは増悪に関わるアレルゲンとして注目されている。*M. furfur* (TIMM2782) の菌体可溶性分画を硫酸塩析、イオン交換、ゲルろ過、メタルキレート各クロマトグラフィを組み合わせるにより得た2種類のアレルゲン、MF1、MF2を用いて解析を行った。SDS-PAGEにおけるMF1、MF2の分子量は、還元条件下では21K、20K、非還元条件下では40K、40Kであり、等電点はそれぞれ4.7、4.8であった。これら精製抗原を用いた気管支喘息及びアトピー性皮膚炎患者における皮膚反応、血中IgE抗体、末梢白血球ヒスタミン遊離反応の結果、MF1、MF2は確かに *M. furfur* のアレルゲンであるが、*M. furfur* にはMF1、MF2以外にもこれらと同等あるいはそれ以上に主要なアレルゲンの存在が示唆された。MF1、MF2はWHO/IUIS Allergen Nomenclature SubcommitteeによりそれぞれMal f 2、Mal f 3として登録された。

A. 研究目的

好脂質性皮膚常在酵母様真菌である *Malassezia furfur* (*M. furfur*) は、アトピー性皮膚炎の発症あるいは増悪に関わるアレルゲンとして注目されている。これまでに我々は、身体各部位からの培養検査による *M. furfur* の皮膚常在真菌としての確認及び皮内反応、血中 *M. furfur* 特異的IgE、IgG抗体価の測定を実施し、腸管内常在真菌である *Candida albicans* に対する反応との違いを検索してきた。真菌は非常に多くの抗原成分を有するため、病態発症に関わる抗原を特定することは容易ではない。しかし病態機序の解明さらには将来の免疫療法の標的抗原を特定するためにも病因抗原の精製、分析は重要である。また治療に難渋することの少なくないアトピー性皮膚炎の治療法の選択の幅を広げるためにもアトピー性皮膚炎の病態に関わる真菌の役割の解明及び真菌を標的とした抗真菌薬による治療法の是非についての研究は重要である。

B. 研究方法

1. アレルゲンの精製、単離：*M. furfur* (TIMM2782) の菌体可溶性分画を硫酸塩析、イオン交換、ゲルろ過、メタルキレート各クロマトグラフィを組み合わせるにより得た2種類のアレルゲン、MF1、MF2を用いて解析を行った。SDS-PAGEにおけるMF1、MF2の分子量は、還元条件下では21K、20K、非還元条件下では40K、40Kであり、等電点はそれぞれ4.7、4.8であった。
2. 遺伝子クローニング：*M. furfur* (TIMM2782) をYNB培地で培養し、totalRNA及びゲノムDNAを精製し

た。アレルゲンタンパク質のN末端アミノ酸配列解析の結果に基づいてPCR用プライマーを合成し、totalRNAをテンプレートとしてRT-PCRを行いcDNAの断片を得た。この断片をプローブとして用いてcDNA及びゲノムDNAライブラリーよりcDNA全長とゲノムDNAを得て、これらの塩基配列を決定した。

3. アレルゲン活性の検討：気管支喘息及びアトピー性皮膚炎患者を対象として皮内テスト、RAST、洗浄白血球からのヒスタミン遊離試験によって *M. furfur* 粗抗原との比較のもとにMF1、MF2のアレルゲン活性を調べた。
4. 気管支喘息患者住居の室内及び寝具から掃除機により塵を一定条件で採集した。MF1の定量はウサギポリクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体を用いるサンドイッチELISA法で行い、塵は1:10(W/V)で抽出した上清をMF1定量のための資料とした。培養の為には塵を滅菌水で1:10となるように混濁し平板培地上にまいた。また寝具表面に滅菌テープを一度貼り、剥して平板培地上に置いた。培地はPDA、M40Y、Dixon寒天培地を用い25℃1週間培養後コロニー数を算定した。
5. MF1のB細胞エピトープについての検討を行うためにMF1で免疫したA/Jマウスの脾臓細胞とミロマ細胞の細胞融合を行い、常法に従いmAbを得た。33種類のoverlapping peptideをペーパーディスクにカップリングし、mAbが認識するエピトープを解析した。また患者血清中のIgE抗体との反応性も検討した。

C. 研究結果

1. *M. furfur* 粗抗原に対するRASTが陽性の患者64例の中で、MF1、MF2に対するRAST陽性例はそれぞれ46

例 (71.9%)、45例 (70.3%) であった (Fig.1)。一方、MF1, MF2 (1ug/ml) による皮内テストの陽性率は非常に低く、粗抗原 (100ug/ml) による皮内テストが陽性の54例のうち、MF1は13例 (24.1%)、MF2は4例 (7.4%) のみが陽性であった。MF1, MF2 によるヒスタミン遊離は症例ごとで大きく異なり、MF1, MF2 の一方、あるいは両方に高い感受性を有している例は少数であった。以上から、MF1, MF2 は確かに *M. furfur* のアレルゲンであるが、*M. furfur* には MF1, MF2 以外にもこれらと同等あるいはそれ以上に主要なアレルゲンの存在が示唆された。

2. 気管支喘息患者住居の室内及び寝具から掃除機により採集した塵からのMF1の定量はサンドイッチELISA法により 1ng/g dust 以上の測定が可能であり、寝具由来の塵24検体中16検体に 87.1 ~ 1.1ng/g dust のMF1が検出された。テープ法による寝具表面の *M. furfur* の培養成績は24検体中10検体が陽性であった。24検体中MF1と培養成績の結果が一致していた検体は陽性8検体、陰性6検体で合計14検体 (58%) であった。

3. MF1のmAbが3種類 (mAb37, 51, 56) 得られた。このうちmAb51とmAb56は同じエピトープを認識していた。また overlapping peptide を用いての検討では、mAb37は peptide の p21-35 に、mAb51 (56) は p121-135 と p126-140 に反応した。一方患者血清中のIgE抗体は p21-35 と p156-170 に反応した。

4. MF1のcDNAは534bpのORFを有し、177aaをコードしていた。推定される分子量は19.2kDであり、SDS-PAGEより得られた分子量とほぼ一致した。N末端アミノ酸配列解析の結果とcDNAから予想されるアミノ酸配列のN末端は一致していた。cDNAとの比較によりゲノムDNAは2カ所のイントロンがあることが明らかになった (Fig.2)。MF1とMF2の間には51%のhomologyがあった (Fig.3)。既知のタンパク質との相同性の検索を行ったところ、MF1は *Candida boidinii* の peroxisomal membrane protein (PMP) 20A 及び Asp f3 とアミノ酸配列上各々 37%, 38% の相同性があった (fig.4)。またMF2は同様、各々 39%, 38% の相同性が認められた。従ってMF1, MF2は *M. furfur* のPMPであることが示唆された。

5. MF1, MF2はWHO/IUIS Allergen Nomenclature SubcommitteeによりそれぞれMal f 2, Mal f 3として登録された。

D. 考察とE. 結論

M. furfur の major allergen として Mal f 2, Mal f 3 が精製、単離され、そのクローニングがなされるとともに

B細胞エピトープの解析、アトピー性皮膚炎患者におけるアレルゲン性について種々検討された。これら major allergen はアトピー性皮膚炎患者において血中IgE抗体との反応性としての位置づけであり、アトピー性皮膚炎の病態に直接関わっているか否かは、今後のさらなる検討が必要である。また治療に際して皮膚常在真菌である *M. furfur* の根絶をめざした抗真菌薬療法の是非について現在検討中であるが、常在菌叢の生理的意義が必ずしも解明されていない現在においては、今後の免疫療法開発のためにも発症に関わる抗原エピトープの解析は重要である。

研究協力者 安枝 浩 (国立相模原病院臨床研究部)、齋藤明美 (国立相模原病院臨床研究部)、高橋一夫 (国立相模原病院臨床研究部・皮膚科)、松倉節子 (国立相模原病院臨床研究部・皮膚科)、杉本真純 (国立相模原病院臨床研究部・皮膚科)、内田勝久 (帝京大学医真菌センター)、山口英世 (帝京大学医真菌センター)、竹迫一任 (宝酒造バイオ研究所)、大西佳美 (宝酒造バイオ研究所)、黒田正伸 (宝酒造バイオ研究所)

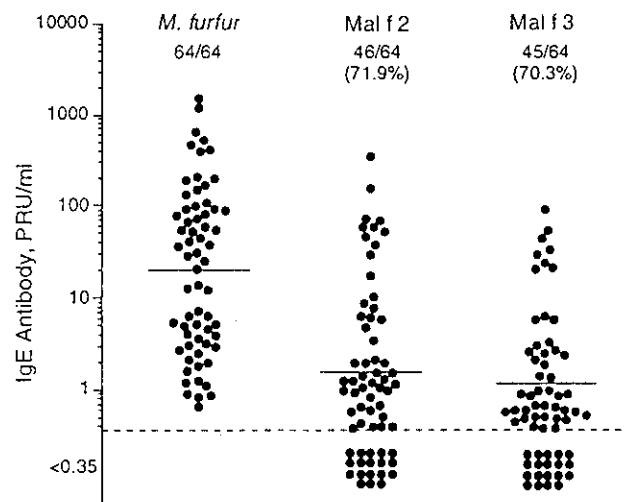


Fig. 1

Fig. 2

```

AGACAGCAGGACATGGTTTGTAGAAGCACAAATTCGGGTAGCTGGCCCTGAAGCGGATATC -200
GCTGAGAAATTCACITTTCCCCCGCTGACGGCCAGACCCCGAAGCTGTCGGGAATTACCA -140
AGCAAATGCACGTGACGTTTGTGGAGGCTCGGGGATPATCAGCCACGTATCAGTGAGCC -80
GAGCACCAGGCTGGCTTCGGCTGGCTGCATATAAAGCCGGTGGCCGCTCAGACGCTTC -20
ATCTCCACGACAATCATATGCTGCTGGTgtaggtaccggaagtgaacgcatgctgacc 41
1      M P G      intron 1
atcagGATCTACTGCTACTGCCAAGGGTAACGAGATCCCCGACACCCCTCATGGGCTACA 101
4      D P T A T A K G N E I P D T L M G Y
TCCCTGGACCCCGGAGCTCGACTCGGGTGAGGTGTGTGGTATCCCCACACCTTCAAGA 161
22     I P W T P E L D S G E V C G I P T T F K
CCCGGACGAGTGCAAGGGCAAGAAGGTTGTGATTGTCTCGATCCCGGTGCCTACACCC 221
42     T R D E W K G K K V V I V S I P G A Y T
CCATCTGCCACCAGCAGCACATCCCCCGCTTGTGAAGCGTGTGGATGAGCTCAAGGCCA 281
62     P I C H Q Q H I P P L V K R V D E L K A
AGGGTGTGACGCGGTGTACGTTCATTCGGTCGAACGACCCCTTCGTCATGGgtatgtact 341
82     K G V D A V Y V I A S N D P F V M
gctdgtcattttctttatgtaaccgacagCTGCCTGGGCAACTTCAACAACGCCAAGG 401
99     intron 2      A A W G N F N N A K
ACAAGGTCGCTTTTCCACCAGACATTGACCTGGCCCTTCACCAAGGCTCTCGCGCAGCA 461
109    D K V V F A T D I D L A F S K A L G A T
TCGACCTGAGCGCCAAGCACITTTGGTGAGCGCACGGCCCGCTACGCTCTGATCATGACG 521
129    I D L S A K H F G E R T A R Y A L I I D
ACAACAAGATTGTGACITTTGCTTCGGACGAGGGCCACACTGGCAAGCTCCAGAAGCGGT 581
149    D N K I V D F A S D E G D T G K L Q N A
CGATCCACACGATCTCCACCAAGGCTTAAATGGCCGATGTGCGTGTGTGACCACTACC 641
169    S I D T I L T K V *
TAAAGGTCCTAGAGTTCCAAGTCAAGTCGTAATTTTTTTTTTACAGGATGGTGTGTA 701
CTGCCACCTGCCTTTGAGCAAGGCGTGCAG 732

```

Fig. 3

```

Mal f 2  MPGDPATAK  GNEIPDTLMG  YIPWTFELDS  GEVCGIPTTF  40
Mal f 3  -----EI  GSTIPNATFA  YVPYSPELED  HKVCGMPTSF
          * * * * *      * * * * *      * * * * *
Mal f 2  KTRDEWKGKK  VVIVSIPGAY  TPICHQQHHP  PLVKRVDELK  80
Mal f 3  QSHERWKGKK  VVIVAVPGAF  TPTCTANHVP  PVVEKIQLK
          * * * * *      * * * * *      * * * * *
Mal f 2  ARGVDVYVI  ASNDPFVMAA  WGNFNNAKDK  VVFATDIDL  120
Mal f 3  SKGVDEVVVI  SANDPFVLSA  WGITTEHAKDN  LTFAQDVNCE
          * * * * *      * * * * *      * * * * *
Mal f 2  FSKALGATID  LSAKHFGERT  ARYALIIDDN  KIVDFASDEG  160
Mal f 3  FSKHFNATLD  LSSKGMGLRT  ARYALIANDL  KVEYFGYDEG
          * * * * *      * * * * *      * * * * *
Mal f 2  DTGKLQNASI  DTILTKV  177
Mal f 3  EP--KQSSA  ATVLSKL
          * * * * *

```

Fig. 4

```

Mal f 2  1 MPGDPATAK  GNEIP-DTLM  GYIPWTFELD  SGEVCGIPTT  FKTRDEWKGK  49
PMP20A  1 MAPIK----R  GDRFPPTDDV  YYIP-----  --PEGGEPGP  LELSKFVKTK  38
Asp f 3  1 MSGLKA----  GDSFPSDVVF  SYIPWSEDKG  EITACGIPIN  YNASKEWADK  46
          * * * * *      * * * * *      * * * * *
Mal f 2  50 KVIVSIPGA  YTPICHQQHI  PPLVKRVDEL  KAGVDVAVV  IASNDPFVMA  99
PMP20A  39 KFVVSVPGA  FTTPCTEQHL  PGYIKNLPRI  LSKGVDFVLV  ISQNDPFVLK  88
Asp f 3  47 KVILFALPGA  FTPVCSARHV  PEYIEKLPEI  RAKGVDDVAV  LAYNDAYVMS  96
          * * * * *      * * * * *      * * * * *
Mal f 2  100 AWGN-FNNAK  -DKVVFATDI  DLAFSKALGA  TIDLSAKHFG  ERTARYALII  147
PMP20A  89 GWKKELGAAD  AKKLVFVSDP  NLKLTKKLGS  TIDLSAIGLG  TRSGRLALIV  138
Asp f 3  97 AWGK-ANQVT  GDDILFLSDP  DARFSKISGW  ADE-----E  GRTKRYALVI  139
          * * * * *      * * * * *
Mal f 2  148 DDNKIVDFAS  DEGDTGKLQN  ASIDTILTKV  177
PMP20A  139 NRSgiveyaa  IENG-GEVDV  STAQKIIAKL  167
Asp f 3  140 DHGKIT-YAA  LEPAKNHLEF  SSAETVLKHL  168
          * * * * *

```