

表1.食物アレルギー症状と誘発食品

食品	蕁麻疹のみ	消化器症状	気道症状	ショック 症状
卵	49	26	24	21
乳製品	56	30	37	29
小麦	16	8	14	15
魚介類	38	3	4	1
大豆	20	4	3	1
そば	1	1	1	1
ピーナッツ	1	0	2	1
肉	15	1	1	1
果実野菜	4	2	0	1

表2 アナフィラキシー児の食物解除非解除例の

初発時RASTとIgE値

食品	n	転帰		RAST CAP	IgE U/ml
		解除	n		
牛乳	40	解除	12	2.9	270
		非解除	28	4.2	2224
卵	27	解除	14	3.3	498
		非解除	13	4	887
小麦	18	解除	11	3.1	268
		非解除	7	4.6	465

表3 除去食解除・非解除例の臨床背景

食品	転帰		ショック (プレ)	気道症状	消化器 症状	喘息 合併	抗ア剤
	解除	n					
牛乳	解除	12	2	6	7	3	7
	非解除	28	13	11	9	18	19
卵	解除	14	6	2	8	5	5
	非解除	13	5	5	6	4	3
小麦	解除	11	7	5	3	5	5
	非解除	7	5	4	1	6	6

食物アレルギーの発症機序に関する研究

— 覆面型食物アレルギーの機序について —

分担研究者 小倉 英郎 国立高知病院小児科

研究要旨：覆面型食物アレルギーの病態解明のために、341 例を対象に 708 回の経口誘発試験を行った。このうち鶏卵誘発試験陽性例 259 例について、誘発症状発現までの時間を卵白特異 IgE 抗体の有無により比較検討した。また、成人 1 例において、経口誘発試験前後でリンパ球の細胞内リンホカイン陽性細胞の比率を比較検討した。

経口誘発試験の結果、過去に即時型反応の既往のない 695 例中、23.2%に新たな即時型反応が誘発された。鶏卵誘発試験における誘発症状発現までの時間と特異 IgE 抗体の関係では、卵白特異 IgE 抗体陽性例の 53.7%に即時型反応を認め、卵白特異 IgE 抗体陰性例の 59.2%に 12 時間以後の反応を認めた。しかし、卵白特異 IgE 抗体陽性例の 32.2%に 12 時間以後の反応を認め、卵白特異 IgE 抗体陰性例の 15.2%に即時型の反応を認めた点が注目された。サイトカイン検討症例においては、誘発試験陰性（小麦）の場合は、 $IFN\gamma/IL-4$ 陽性細胞比は、負荷後に増加し、誘発試験陽性（牛乳、鶏卵）の場合は、いずれも減少した。

以上から、覆面型食物アレルギーの実態が明らかにされた。その免疫学的機序については不明の点が多いが、誘発試験陰性の場合には Th1 細胞が刺激され、誘発試験陽性の場合には Th1 および Th2 細胞が刺激される可能性が示唆されたが、結論は多数例での検討の結果を待ちたい。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は小児および成人を通じて比較的頻度の高いアレルギー性疾患である。また、近年、成人重症アトピー性皮膚炎の増加が社会問題化している。われわれは Rinkel が提唱する覆面型食物アレルギーの概念に基づいて、経口誘発試験を実施し、本症の 93.7%に一種以上の食物アレルギーが関与していることを報告した¹⁾。しかし、覆面型食物アレルギーの概念に基づいた経口誘発試験が広く普及するには至っていないため、本症のアレルゲン診断は、殆ど的確には行われていないのが現状である。この理由として、覆面型食物アレルギーの概念が難解であることおよびこの現象には何らかの免疫学的機序が関与していると考えられるが、殆ど解明されていない事があげられる。そこで、本研究においては、過敏性充進期における経口誘発試験の結果を解析し、誘発試験前後でリンパ球の細胞表面抗原およびサイトカイン陽性細胞の比較検討を試み、本症の病態に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

B. 研究対象および方法

アトピー性皮膚炎のアレルゲン診断のため経口誘発試験を実施した 341 例を対象とし、誘発陽性例における即時型反応（負荷後 2 時間以内の反応）の頻度を

年齢別に検討した。このうち鶏卵誘発試験陽性の 259 例においては、誘発症状発現までの時間を卵白特異 IgE 抗体（RAST およびプリックテスト）の有無により比較検討した。また、成人重症アトピー性皮膚炎例（20 歳女性）において、小麦、牛乳および鶏卵の誘発試験を行い、試験前後でのリンパ球表面抗原および CD4 陽性細胞中の $IFN-\gamma$ 、IL-2、IL-4 陽性細胞の比率を比較検討した。

細胞内サイトカインの検出は、PMA(50ng/ml)およびイオノマイシン (500ng/ml) で細胞を活性化し、37°C、4 時間培養後、プレフェルディン A (10 μ g/ml) を添加、サイトカインを細胞内に蓄積させた。4%ホルムアルデヒドで細胞を固定後、0.5%サポニン含有バッファー処理で、細胞膜の透過性を高めた後、細胞内サイトカインを染色し、フローサイトメトリーで蛍光強度を解析した。

（倫理面への配慮）

経口誘発試験、特異 IgE 抗体測定、プリックテストは臨床検査として、従来から、日常的に患者の了解のもとに実施している。誘発試験前後の採血については、研究の意義を説明して患者の了解を得た。

C. 研究結果

1) 経口誘発試験¹⁾

341 例に 708 回、誘発試験が実施されたが当該食物による即時型反応の既往があった 13 例を除外し、695 例で検討した。過敏性亢進期に誘発することにより、新たに即時型反応が誘発された頻度は 23.2% (161 例 / 695 例) であった。695 例の誘発試験の内訳は鶏卵 234 例、牛乳 232 例、大豆 17 例、小麦 15 例、米 3 例であった。

即時型反応が誘発される頻度は学童以上 (12.3%) よりも乳児 (25.6%) あるいは幼児 (22.6%) の方が有意に高率であった。

2) 鶏卵誘発試験陽性例における誘発症状発現までの時間と卵白特異 IgE 抗体の関係²⁾

卵白特異 IgE 陽性例の 53.7% に即時型反応を認め、卵白特異 IgE 陰性例の 59.2% に 12 時間以後の反応を認めた。しかし、卵白特異 IgE 陽性例の 32.2% に 12 時間以後の反応を認め、卵白特異 IgE 陰性例の 15.2% に即時型の反応を認めた点が注目された。

3) 誘発試験前後のリンパ球表面抗原と細胞内サイトカイン陽性細胞

サイトカイン検討症例において小麦の誘発試験 (食パン 2 枚、ソーメン、ラーメン、1 日 2 食 3 日間負荷) は陰性であったが、牛乳の誘発試験 (牛乳 200ml、ヨーグルト 200g、1 日 2 食 2 日間) では、負荷 7 時間半後から皮膚掻痒を来し、翌日、朝から顔面に湿疹が出現、浸出液を伴うようになり、陽性と判定した。また、鶏卵の誘発試験 (加熱卵 1 日 2 個、2 日間) では、翌日、朝から顔面に湿疹が出現、浸出液を伴うようになり、陽性と判定した。

CD3、CD4、CD8、CD19 陽性細胞の陽性率は経口誘発試験前後で著変を認めなかった。細胞内サイトカイン陽性細胞は、小麦誘発試験においては、IL-2、IFN γ 陽性細胞が負荷後増加する傾向があった。一方、牛乳あるいは鶏卵誘発試験においては、IL-4 陽性細胞が増加する傾向が認められた。

IFN γ /IL-4 陽性細胞比は小麦の負荷後に増加し牛乳および鶏卵の負荷後に減少した。

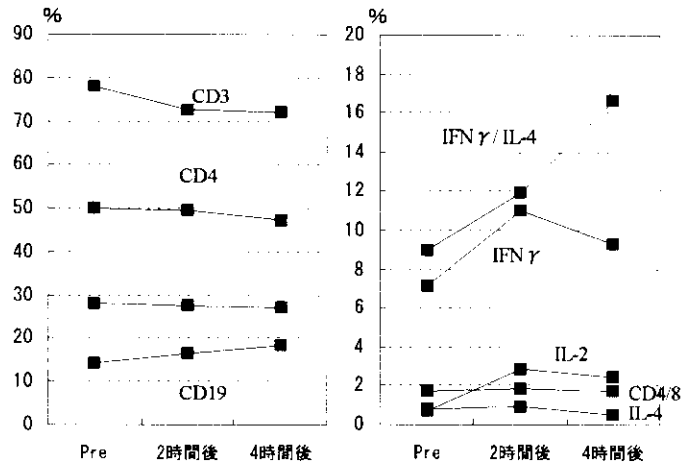


図 1 誘発試験前後のリンパ球表面抗原と細胞内サイトカイン陽性細胞 (小麦、誘発陰性)

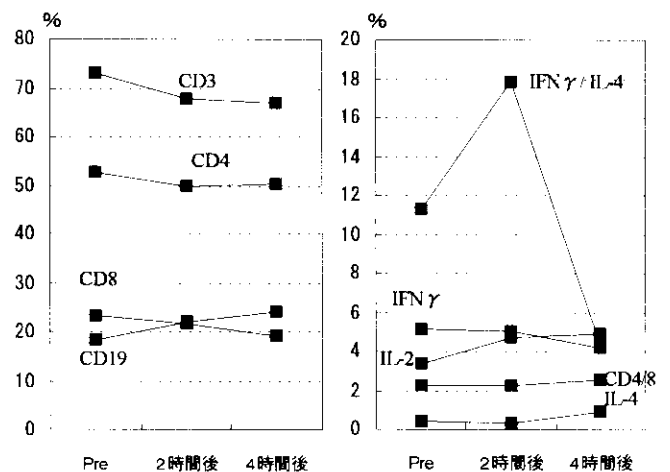


図 2 誘発試験前後のリンパ球表面抗原と細胞内サイトカイン陽性細胞 (牛乳、誘発陽性)

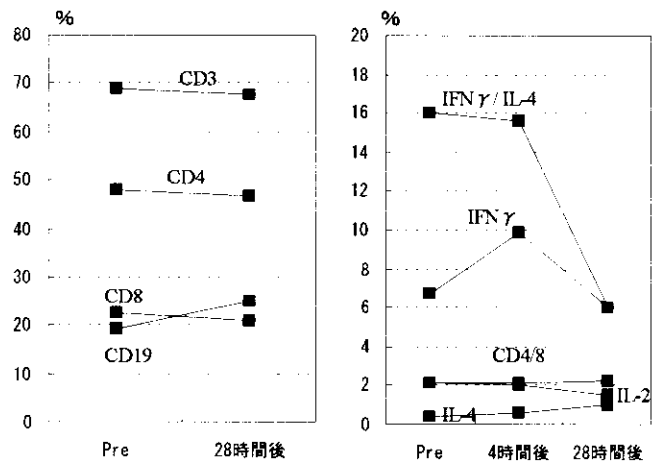


図 3 誘発試験前後のリンパ球表面抗原と細胞内サイトカイン陽性細胞 (鶏卵、誘発陽性)

E. 結論

過敏性亢進期の存在を新たな即時型反応の誘発を指標として検討したが、即時型反応の既往のない症例は過敏性亢進期の誘発によって初めて非即時型の誘発症状を呈したと考えられる。したがって、過去に即時型反応の既往のあった 13 例を含めた 708 例で検討すると、その内の 695 例(98.2%)が過敏性亢進期の誘発試験により、初めて食物アレルギーが診断できたということになる。この数字はそのまま、食物の関与したアトピー性皮膚炎における覆面型食物アレルギーの頻度を示すものといえるであろう。

鶏卵誘発試験陽性例における誘発症状発現までの時間と卵白特異 IgE 抗体の有無に関する検討から、卵白特異 IgE 抗体陽性例の 32.2%に 12 時間以後の反応を認め、卵白特異 IgE 抗体陰性例の 15.2%に即時型の反応を認める事が明らかにされた。食物アレルギー、特に覆面型食物アレルギーを IgE 依存性の反応のみで、説明できないことは当然と考えられるが、単純にリンパ球依存性の反応でこの説明を補完することもできないと考えられた。

負荷前後のサイトカイン陽性細胞の検討から誘発試験陰性の場合には Th1 細胞が刺激され、誘発試験陽性の場合には Th1 および Th2 細胞が刺激される可能性が示唆されたが、結論は多数例での検討の結果を待ちたい。

フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカインの検出は、細胞外に分泌されたサイトカインを測定している訳ではないが、個々の細胞のサイトカインを同定できるので、少数細胞が分泌するサイトカインを検出できる利点がある。PMA 等で細胞を活性化しているので、血中の産生細胞の分布の変化を見ていると考えるのが一般的であるが、実際に観察してみると、蛍光強度の高い細胞や低い細胞まで、様々の細胞が含まれており、その解釈についても今後の検討が必要であろう。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 文献

- 1) 小倉 英郎、小倉 由紀子：アトピー性皮膚炎と覆面型食物アレルギー。アレルギーの臨床。15：254-257, 1995.
- 2) 小倉英郎、小倉由紀子：経口誘発試験とアトピー

性皮膚炎。アトピー性皮膚炎のコンセンサスステートメント、第 6 回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム記録集、飯倉洋治、西岡 清編, pp842-846, 医科学出版社、東京、1994.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

食物アレルギーの成人発症のメカニズムに関する研究

- 1.アトピー性皮膚炎患者における抗真菌剤内服療法の効果と食物 RAST の低下について
- 2.神奈川における oral allergy syndrome の検討

分担研究者 池澤 善郎 横浜市立大学医学部附属病院皮膚科教授

1.アトピー性皮膚炎患者における抗真菌剤内服療法の効果と食物 RAST の低下について

研究要旨

成人アトピー性皮膚炎患者において、抗真菌剤内服療法を施行したところ、治療開始 6 ヶ月後における皮疹が改善または著名改善を呈した率は、非内服群の 44.4%に対して内服群は 83.1%と有意に改善した。同様に、血清総 IgE 値、血清 LDH 値およびカンジダ・小麦・米・大豆・卵白の RAST 値のいずれも、内服後有意に低下し、カンジダアレルギーが食物アレルギーに関与していることが明らかになった。

A.研究目的

糖分やアルコールの取り過ぎ、抗生剤やステロイド剤の頻回投与などにより誘導される腸管内のカンジダ増殖が、腸管粘膜障害・腸内細菌叢の異常・カンジダの産生毒素の働きなどを介して、多重食物感作や免疫変調を引き起こして種々の皮膚・神経・消化器症状が生じるとするイーストコネクション説(Crook,1984)が提唱され、成人アトピー性皮膚炎患者においても関与が指摘されている。私達の以前の検討においても、抗真菌剤の内服療法が、アトピー性皮膚炎の改善効果を示すと共に、Crook が作製したイーストコネクションを疑わせる患者を検索するための食生活・抗生剤使用歴などについてのアンケートを行いイーストコネクション指数を算定し、抗真菌剤内服療法の臨床効果や便カンジダ分離培養成績とその指数との関連を検討することにより、改善例や分離培養陽性例は無効例や陰性例に比し指数が高い傾向が認められた。また、カンジダと米や小麦などの穀物の RAST 値は相互に相関せず、両抗原の間に強い交差反応はないと考えられるが、カンジダの RAST 値は重症例ほど高くなる傾向があり、特に穀物 RAST が陽性である重症例ではカンジダ RAST の高値例が多いことが判明している。同様に、穀物の RAST 陽性率よりも、カンジダの陽性率の方が高率であり、穀物 RAST が陽性であれば、多くはカンジダ RAST も陽性となること、および、卵白・牛乳・大豆・小麦・米の RAST クラス値の合計値とダニやカンジダ RAST 値との関連を検討すると、その合計値の増加に伴いカンジダ RAST 値は、ダニ RAST 値と異なり有意に上昇した。したがって、カンジダが食物アレルギーとより関連する傾向があるように思われた。そのため、消化管内のカンジダの増殖を、抗真菌剤の内服を行い抑制することにより、アトピー性皮膚炎の状態が軽快するか、また食物に対する IgE 抗体の反応性が変化するかについて下記の検討を施行した。

B.研究方法

非腸管吸収型ポリエン系経口抗真菌剤であるアンフォテリシン B による治療効果を 125 名のアトピー性皮膚炎患者を対象に解析した。投与患者は、環境整備や食生活を含めたライフスタイルの改善、出来る範囲でのアレルゲン回避、スキンケア、ステロイド外用剤を含む皮膚外用療法など通常の治療を施行しても難治性であった症例である。平均年齢 19.8±1 歳、平均罹患年数 13.6±9 年、当科による 3 段階による重症度分類では、中等症 28%、重症 72%、臨床型としては成人アトピー性皮膚炎に特徴的である顔面上背部上胸部型が 96.8%となっていた。アンフォテリシン B 錠を 1 日 300~600mg 経口投与し、3 ヶ月から 6 ヶ月にわたって経過観察した。なお、抗真菌剤が他の腸内常在真菌叢への影響を考慮して、整腸薬と総合ビタミン剤を併用した。開始前の治療は同様に施行し、かつ消化管のカンジダ増殖を促すとされる糖分を含む食物やアルコール飲料の過剰摂取を避けるようにし、パンのイーストの成分であるマンナンはカンジダの 46-48kd と共通抗原性があるため、イーストを含む食物も出来る範囲で減らすように指導した。治療効果は、皮膚症状と自覚症状をもとに評価し、その結果を使用ステロイド外用剤に対する減量効果、血清 LDH 値、血清総 IgE 値、各種 CAP-RAST 値の変化によって検討した。対照は、アンフォテリシン B を投与していないアトピー性皮膚炎患者 55 人とした。

(倫理面への配慮)

口頭にて説明の上、同意を得た。

C.研究結果

対照群と比較して、年齢、罹患年数、重症度、臨床型、血清総 IgE 値、カンジダ・ダニ・牛乳・卵白・大豆・米・小麦の CAP-RAST 値、糞便のカンジダ分離培養陽性率に有意差は認められなかった。治療開始 3 ヶ月後において、皮疹が改善または著名改善を呈した比率(改善率)は、非内服群の 36.4%に対してアンフォテリシン B 内

服群は 53.6%と有意に($p<0.01$)改善し、開始 6 カ月後における改善率は、非内服群の 44.4%に対してアンフォテリシン B 内服群は 83.1%と同様に有意に($p<0.01$)改善した。その結果、内服群の最終的な有用性は、非常に有用が 20%、有用が 36.8%、軽度有用が 16%となり、有用以上が 56.8%、軽度有用以上が 72.8%と高い評価が得られた。このような評価が得られるまでの平均投薬期間は、非常に有用が約 1.8 カ月、有用が約 3.1 カ月、軽度有用が約 3.1 カ月、無効が約 3.1 カ月であった。有用以上と判断された患者では、皮膚症状の軽快に伴い、外用ステロイドの顔面使用からの離脱が可能となり、全体の使用量およびステロイドの強さのランクが低下した。治療前後における変化率を算出すると、血清総 IgE 値(変化率-24%)、血清 LDH 値(-20%)、およびダニ(+20%)と牛乳(-22%)を除いたカンジダ(-31%)・小麦(-38%)・米(-53%)・大豆(-45%)・卵白(-21%)の RAST 値のいずれも、内服後には統計的に有意に低下した。無効例と改善例の検査値や食事療法の実施率を比較検討すると、無効例は改善例に比べて、ダニの RAST 値が有意に高く($p<0.05$)、逆に、改善例は無効例に比べて、食事療法の実施率が有意に高い($p<0.05$)ことが認められた。

D. 考察および E. 結論

今回の検討において、難治性成人アトピー性皮膚炎患者において、抗真菌療法を施行することにより、皮疹の軽快が認められた。また、腸

管内カンジダに対する IgE 抗体を獲得するためによって引き起こされる可能性がある、食物抗原に対する反応性においても、治療により概ね軽快する事が判明した。牛乳においては統計的に有意な低下は認められなかったが、低下率では卵白・血清 LDH 値と同程度であった。ダニの抗体価は減少しなかった上に、無効例におけるダニの RAST 値は改善例に比べて統計的に有意に高い結果であった。したがって抗真菌内服療法は、ダニ対策を軸とした住環境対策などの基本が十分に実行出来ているという条件のもとで施行すべきと思われた。また改善例は、無効例に比べて食事療法の実施率が有意に高く、この治療で良い臨床効果を得るためには、カンジダの発育を促す食物の糖分やイースト関連食品を控え、原因となる食物アレルゲンの除去に心がけることが必要であると考えられた。今後は食物やカンジダ刺激による末梢血リンパ球のサイトカイン産生を測定し、関与を調査したい。

F.健康危険情報 無し

G.研究発表

2.学会発表

- 1) Ikezawa Z, Kondo M, Okajima M, Nishimura Y, Sugimoto M: Cross-over trial of oral anti-fungal drug itraconazole on refractory atopic dermatitis. International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Sydney 15-20 October,

H.知的財産権の出願・登録状況 無し

2.神奈川における oral allergy syndrome の検討

研究要旨

新しい概念の食物アレルギーである **oral allergy syndrome** について検討した。花粉との交差性が強くいわれているように地域差が見られ、シラカンバの自生していない神奈川ではリンゴより、メロン・モモ・キウイの順に高率にみられた。しかし、シラカンバと同じカバノキ科であるハンノキは自生しており、バラ科の食物などはハンノキとの交差性により出現した可能性が類推された。

A. 研究目的

近年では、成人の食物アレルギーの中で、oral allergy syndrome(OAS)が一番高頻度に出現する疾患であると欧米では言われている。また、OAS は花粉との関連が指摘されており、北海道や神戸芦屋地方では、北欧と同様にシラカンバによる交差性より、リンゴなどのバラ科食物のアレルギーが多いことは明らかとなっている。そこで、シラカンバの自生していない関東地方における実態調査を施行した。

B. 研究方法

当科外来において口腔アレルギー症状を認める方は、申し出てもらい、問診から誘発食物を推定した。また、一部の症例にはプリックテスト

・RAST の測定を施行した。

(倫理面への配慮)

口頭にて説明の上、同意を得た。

C. 研究結果

68 症例が問診により OAS と診断された。平均年齢は 25 歳、男 20 名・女 48 名であった。そのうち既往も含めたアトピー性皮膚炎の合併例は 61 例であり、罹患中の重症度は軽症 18 例・中等症 13 例・重症 26 例と重症例に多くは見られたが、重症例の通院割合も高い。誘発食品数は 1~23 食品で平均 5 食品であった。アトピー性皮膚炎の重症度と誘発食品数には、重症例ほど食品数が多いというような関係は特に認められなかった。誘発食品で一番高頻度に見られた

食品は、メロンの29例であり、ついでモモの27例、キウイ26例、リンゴ19例、パイナップル18例、梨17例、スイカ15例、バナナ12例、トマト10例、ピワ9例、サクランボ9例といった順であった。口腔症状のみの症例は38例56%であり、アナフィラキシー症状は9名に認められた。latex-fruits 症候群として関与が指摘されているラテックスアレルギーを確認できたのは4例であった。OASの平均発症年齢は17歳であり、10歳代が一番多く見られた。ブリックテストを施行しえた症例では、モモ・キウイ・リンゴ・ナシ・スイカはほぼ90%以上が陽性を示した。しかし、メロン・パイナップルは60%台と低値であった。一方、RASTは、リンゴ・パイナップル・ナシでは90%以上が陽性を示したが、メロン・モモ・キウイでは40%台と低値であった。樹木・雑草花粉のRAST陽性率は、スギ:92%、シラカンバ:73%、カモガヤ:73%、ヨモギ:74%、ブタクサ:79%とすべてに対し高率にみられた。

D. 考察およびE. 結論

OASの診断は問診のみでも割と診断がつきやすいといわれているが、IgE抗体の証明がなされなかった場合は、刺激による口腔症状が出現している可能性も考慮しなければならない。本検討においても、メロン・パイナップルの皮膚テストの陽性率が低かった理由の一つには、IgEを介したOASではなく、刺激により口腔掻痒感が出現していた可能性もある。RASTにおいては、食物によっては陽性率が低く、諸家の報告の通り、OASの診断にはブリックテストの有効性が高いことが示唆された。関東地方においては、シラカンバは自生しておらず、リンゴなどのバラ科食物のOASは、シラカンバと同じカバノキ科に属するハンノキ(関東地方にも多い)に感作されて出現した可能性が高いと考えられた。また、シラカンバの自生していない南欧で高頻度に認められるメロンが、今回の検討においても一番多く見られ、カモガヤなどのイネ科花粉やブタクサとの交差性により出現した可能性が、交差性の報告から類推された。今後は花粉・果物の抑制試験による交叉性の確認等を検討したい。

F. 健康危険情報 無し

G. 研究発表

2.学会発表

1) 当科によるOASの検討。大砂博之、山本美穂、池澤善郎。日本ラテックスアレルギー研究会誌 4、96-101、2001

H. 知的財産権の出願・登録状況 無し

食物アレルギーをはじめとするアレルギー疾患の病因遺伝子・病態の解明

分担研究者 近藤 直実 岐阜大学医学部小児科・教授

研究要旨 食物アレルギーをはじめとするアレルギー疾患における抗原特異性発現機序について検討した。牛乳アレルギーに関して検討したところ、抗原提示分子 (HLA class II) は単一でないが、集積性が認められた。T細胞受容体 (CDR3) のアミノ酸配列には類似の性質が認められたが、一次構造上の相同性は認められなかった。抗原には認識されやすい部位 (抗原決定基) が存在した。アレルギーにおける抗原特異性を規定する第一の因子は抗原提示分子であり、T細胞は二次的に関与すると考えられる。

研究協力者

伊上良輔 (岐阜大学医学部小児科)

坂口平馬 (岐阜大学医学部小児科)

鈴木清高 (岐阜大学医学部小児科)

A. 研究目的

食物アレルギー等のアレルギー疾患における抗原特異性を決定づける遺伝子を明らかにし病態を解明するために、牛乳アレルギーに着目して検討を行った。牛乳の主要抗原である β -lactoglobulin (BLG) を特異的に認識する T 細胞株 (TCL) および T 細胞クローン (TCC) を樹立した。抗原認識部位 (図 1) において、抗原提示分子と抗原 peptide が形成する MHC-peptide 複合体、さらにこれを認識する T 細胞レセプター (TCR) の解析を行い、アレルギーにおける抗原特異性の成立機序を明らかにすることを目的とした。

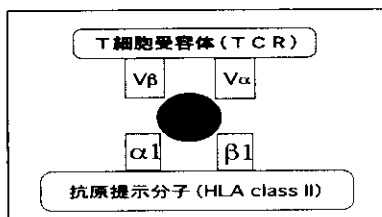


図 1 抗原認識部位

B. 研究方法

牛乳アレルギー患者 20 例を対象とした。すべてに対して HLA DNA typing を行い、このうちの 5 例から 6 株の BLG 特異的 TCC を樹立した。ペプチド合成機 (島津) を用いて BLG アミノ酸配列に従い 22 個のオーバーラッピングペプチドを合成し抗原として用いた。すべての合成ペプチドは HPLC により精製した。

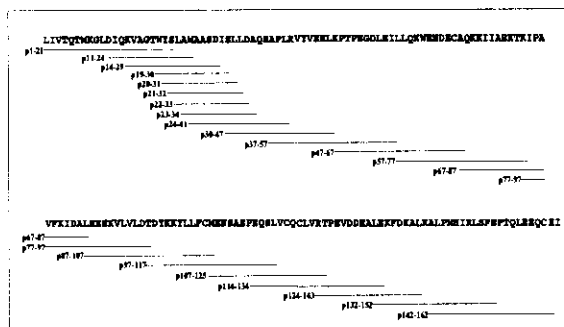


図 2 BLG overlapping peptides の作成デザイン

患者末梢血単核球 (PBMC) を BLG 抗原と共培養し、抗原ペプチドパルスした irradiated auto PBMC を feeder としてサイトカイン (IL-2、IL-4) を添加して feeding を行い、BLG 特異的 TCL を樹立、限界稀釈法により BLG 特異的 TCC を樹立、TCC により認識される peptide 断片を同定した。BLGp97-117 を N 末端および C 末端から短く切断した truncated peptide

を合成し T cell epitope の core sequence を同定した。抗 HLA mAb および allo PBMC を用いて抗原提示分子を同定した。TCC より RNA を抽出し、TCR α 鎖と β 鎖の specific primer を用いて RT-PCR を行い、TCR usage (V α , V β , J α , J β) を決定した。

C. 研究結果

5 例の患者より 6 個の BLG 特異的 TCC を樹立した。4 例が HLA class DRB1*0405 を有し、HLA class DRB1*0405 は 6 クローン中 4 つで抗原提示分子であった (図 3)。それぞれの TCC が認識するペプチド断片は BLGp30-47、BLGp97-117、BLGp142-162 の 3 つであった (図 3)。BLGp97-117 は 4 つの TCC に認識されており major epitope と考えられた (図 3)。

clone	Tcell epitope	antigen presenting molecule
YA4	BLGp97-117	DRB1*0405
AH5	BLGp97-117	DRB1*0405
HA5.7	BLGp97-117	DRB1*0405
HA3.1	BLGp30-47	DRB1*0405
IR1.9	BLGp142-162	DRB1*1401
PK9.3	BLGp97-117	DQB1*0601

図 3 BLG-specific TCC により認識される T cell epitope と抗原提示分子

BLGp97-117 の truncated peptide を用いた検討の結果、BLGp101-112 (KYLFCMENSAAE) が core と考えられた。TCR usage には heterogeneity が認められ、特に同一の p97-117 を認識する TCR においてさえも単一の一次構造を有していなかった (図 4)。しかし HLA class II 分子により提示されたペプチド断片と直接 interact する CDR3 α (complementarity determining region3) には特徴的なアミノ酸配列がみられた (図 4)。 α 鎖の CDR3 α は 'NKL'QKV' と呼ばれる正に荷電したアミノ酸 (K) を中心にアミド基をもったもの (N, Q)、疎水基 (L, V) で構成されていた。さらにその N 末端に 'G' が豊富

に存在していた。

clone	V α	J α	CDR3 α	V β	J β	CDR3 β
YA4	V α 13.1	J α 43	GLYNNNDMR	V β 12.2	J β 1.2	SVSSNYGYT
AH5	V α 2	J α 4	NINGGATNKLI	V β 13	J β 2.7	SGRRTNSYEQY
HA5.7	V α 1	J α 13	VGVSGGYQKVT	V β 5.1	J β 1.1	LNGQGNTAEAF
HA3.1	V α 2	J α 13	DLSGGYQKVT	V β 7.1	J β 2.7	HVRVDEQY
IR1.9	V α 9.1	J α 21	PPYFNKFKY	V β 13.1	J β 1.4	EPRTGNEKLF
PK9.3	V α 4	J α 10	LLPPHGAGGKLT	V β 2	J β 2.7	VALGASGGAGAYEQY

図 4 BLG-specific TCC の TCR usage と CDR3 アミノ酸配列

TCR usage と CDR3 アミノ酸配列に相同性が認められなかったことから、抗原特異性を決定づける主因子として HLA class II 分子の優位な関与が疑われた。このため、健康人 33 名と牛乳アレルギー群 20 名の DRB1*0405 保有率を比較した (図 5)。牛乳アレルギー群では高い保有率を認めたが有意差はなかった。しかし、牛乳アレルギー群について、BLG-specific TCC 樹立患者群と非樹立患者群では明らかに保有率の有意差が認められ (図 5)、BLG 抗原の認識において DRB1*0405 が強く関わっていると考えられた。

	牛乳アレルギー群	非牛乳アレルギー群
n	20	33
DRB1*0405	6	4
保有率	30.0%	12.1%
p=0.11 > 0.05		
	TCC樹立群	TCC非樹立群
n	7	14
DRB1*0405	5	1
保有率	71.4%	7.7%
p=0.0065 < 0.05		

図 5 牛乳アレルギーおよび BLG-specific TCC 樹立に関わる DRB1*0405 の役割

D. 考察

抗原特異性により特徴づけられるアレルギー疾患の発症機序解明には、抗原、抗原提示分子 (HLA class II 分子)、TCR それぞれの多型性とこれらの組み合わせによって生ずる分子間結合の解析が必要である。

抗原からみると BLGp97-117 が種々の TCC に認識されており、その中でも BLGp101-112(KYLLFCMENSAE)の部分が major epitope と考えられた。抗原提示分子からみると DRB1*0405 が多く機能していた。一方、TCR usage には heterogeneity がみられた。しかし HLA class 分子により提示されたペプチド断片と直接 interact する CDR3 には特徴的なアミノ酸配列が存在した。epitope 内の負に荷電した'E'と CDR3 内の正に荷電した'K'が水性の環境で引き合い、それぞれの荷電したアミノ酸近傍の疎水基同士が疎水結合で両者の結合強度を増していると推測された。また CDR3 の N 末端に存在した'G'が J region の frame の'G'とともに両側からこの結合基に flexibility を与えることにより構造的に結合を支持していると考えられた。しかしこの特徴的アミノ酸配列は J segment gene に code された領域であり、J region の usage をみても unique なものではなかった。今後は抗原特異性に関与する factor として HLA class 分子、特に DRB1*0405 を中心に T cell epitope および TCR との結合を構造生物学的に検討を進める必要がある。以上に述べたような TCR と HLA-peptide 複合体の構造および結合に関する解析はアレルギー疾患の病因病態解明における key point と考えられる。

E. 結論

- 1) 抗原提示分子 (HLA class II) は単一でないが、集積性が認められた。
- 2) T細胞受容体 (CDR3) のアミノ酸配列には類似の性質が認められたが、構造上の相同性は認められなかった。
- 3) 抗原には認識されやすい部位 (抗原決定基) が存在した。

抗原決定基と結合する抗原提示分子(HLA class II) が抗原特異性を決定づける主因子であり、TCR は HLA-peptide complex の存在下で二次的にアレルギー発症に関与すると考えられる。単一と考えられるアレルギー疾患においても複数の抗原の関与が考えられるため、抗原認識機構の解析にはそれぞれの原因抗原を明らかにした上で、抗原それぞれに対する詳細な分析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) R.Inoue, S.Matsushita, H.Kaneko, S.Shinoda, H.Sakaguchi, Y.Nishimura, N.Kondo. Identification of β -lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T cells from the patients with milk allergy. Clin Exp Allergy, in press.

2. 学会発表

(1) 伊上良輔、坂口平馬、近藤直実、松下 祥、西村泰治：抗原提示細胞とT細胞の結合様式がアレルギー病態における抗原特異性を決定する。日本小児科学会総会（第103回）（2000年4月15日、和歌山）

(2) 伊上良輔、坂口平馬、鈴木清高、金子英雄、深尾敏幸、松井永子、加藤善一郎、寺本貴英、渡辺みづほ、青木美奈子、近藤直実：シンポジウム：アレルギーの発症に関与する遺伝子 — 抗原特異性に関わる遺伝子を含めて —。日本小児アレルギー学会（第37回）（2000年11月4日、前橋）

原因食品中アレルギー誘発物質の解明に関する研究

分担研究者	豊田 正武	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
研究協力者	高畑能久、森松文毅	日本ハム株式会社中央研究所
	田辺 創一	広島大学生物生産学部
	宇理須厚雄	藤田保健衛生大学医学部小児科
	松田 幹	名古屋大学大学院生命農学研究科
	小川 正	京都大学食糧科学研究所
	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食肉：牛肉では 67kDa、鶏肉では 41、39kDa 成分が患者 IgE 抗体と反応し、それぞれ、ウシ血清アルブミン (BSA)、グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ (FBPA) と同定された。**小麦**：小麦粉の水溶性画分から新規多糖 (マンノグルカン) を単離した。マンノグルカンの構成糖はグルコースとマンノース (組成比 4.4 : 1) であった。**果実**：トマト果実主要アレルゲンは PG2A、 β -fructofuranosidase、superoxide dismutase の 4 つであった。これらのタンパク質のうち SOD 以外のタンパク質は成熟するにつれてその濃度が増加することが示された。**穀類**：コメ 33kDa アレルゲンと免疫交叉性を示すタンパク質を他の穀物種子中に検出し、それらの cDNA をクローニングした。さらに組換えタンパク質を調製して免疫交叉性を確認した。**その他**：ソバ及びクリ患者のアレルゲンとして新規なレグミン様貯蔵タンパク質の酸性サブユニット (24kDa) を、また、ニンジンにおいてシクロフィリン (20kDa) を、ジャガイモよりシラカバ花粉アレルゲン Bet v 1 と交叉する PR-10 (RNase-like protein; 18kDa) 及びパタチンを同定した。また、大豆アレルギー患者血清より、Asn-N 結合型糖鎖認識 IgE 抗体を同定した。

A. 研究目的

食物アレルギーを惹起する成分は食品を構成する多種多様な成分の中でもある特定の成分が関与していると推定される。本研究では、食物アレルギーを誘発する食品成分を患者血清中の IgE 抗体をプローブとして、IgE 結合性成分を検索・同定し、その分子構造・タンパク質化学的性質を解明すると共に、食品間の交叉反応性 (相同性) を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

食肉：食肉アレルギー患者血清は、牛肉・鶏肉キャップクラス 2 以上 (特異的 IgE 抗体 $>0.7\text{UA/ml}$) を示した 10 例を用いた。牛肉及び鶏肉抽出液は、脂肪を除去した牛腿肉と鶏胸肉に各々 5 倍量のリン酸緩衝液-生理食塩水 (PBS、pH7.2) を加えてホモジナイズした後、7300g、30 分間遠心分離して得られた上清を透析、凍結乾燥後、PBS に溶解させて調製した。これらの抽出液を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写してイムノブロッティングに供した。**小麦**：小麦アレルギー患者 2 名の血清を国際バイオ (株) より入手した。多糖アレルゲンの IgE 結合性を確認す

るために多糖を ELISA プレートにコートしてアッセイを行う方法を用いた。小麦粉の水溶性画分を DEAE-セルロースカラムクロマト、ConA-アフィニティークロマト、ゲルろ過 HPLC により、得られたピークの IgE 結合性を ELISA により調べ、活性のあった分子量約 5 万の成分を得た。**果実**：トマト果実抗原を SDS-PAGE で電気泳動し、PVDF 膜に転写後、主要アレルゲンバンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列を決定し、さらに、相同性検索からタンパク質の同定を行った。成熟度が異なる 4 段階のトマト果実から抗原を抽出し、総タンパク質濃度を一定にして SDS-PAGE を行い、銀染色し、主要アレルゲンの濃度を比較した。**穀類**：コメ 33kDa アレルゲンに対する抗血清を作成し、電気泳動・免疫ブロット法により穀物 (コメ、コムギ、トウモロコシ) 種子中の免疫交叉性を示すタンパク質を解析した。**その他**：食品素材より抽出したタンパク質は、SDS-PAGE により分離後、ニトロセルロース膜上に転写し、患者血清により免疫染色する。染色された成分を、種々のクロマトグラフィーを駆使して単離し、再度 2 次元

電気泳動を行った後、N-末端配列を解析する。コンピューターホモロジー検索を行い、既知タンパク質との比較・同定した。相同タンパク質及び食品素材間の免疫交叉性を判定した。

(倫理面への配慮)本研究に供した患者血清は、本研究の目的と内容を提供者が理解した上で提供されたものであり、文書によるインフォームドコンセントが得られている。研究遂行にあたっては個人情報漏洩防止に配慮し、提供者に不利益が生じないように注意している。従って、倫理面の問題は無いものと考えられる。

C.研究結果

食肉: 食肉アレルギー患者の IgE 抗体と特異的に結合するタンパク質を検出するため牛肉及び鶏肉抽出液に対するイムノブロッティングを行った結果、牛肉では 1 本、鶏肉では 3 本のバンドが認められ、推定分子量は 67kDa、41kDa 及び 39kDa であった。これらのバンドを特定するため N 末端側アミノ酸配列を分析し、ホモロジー検索した。その結果、67kDa 成分は BSA、41kDa 成分はニワトリ A 型 FBPA、39kDa 成分はニワトリ GAPDH の N 末端側アミノ酸配列と 15 残基全てが一致した。**小麦:** 単離した多糖の主構成糖はグルコースとマンノース (組成比 4.4 : 1) であった。また、顕微 IR より、アミノ酸などの多糖以外の構成成分は殆ど存在しないことが示唆された。NMR 解析より、グルコースのアノマー炭素の大部分は β 型であることが示唆された。**果実:** 1、末端アミノ酸配列の相同性検索からトマト果実タンパク質の中で、主要アレルギーは polygalacturonase (PG2A)、 β -fructofuranosidase、superoxide dismutase (SOD)、pectinesterase の 4 つであった。2、銀染色によって SOD 以外の 3 つのタンパク質は成熟に伴い増加していることが示された。**穀類:** コメ (ジャポニカ、インディカ、赤米)、コムギ、オオムギ、オートムギ、イタリアンライグラス、トウモロコシの種子から可溶性タンパク質を抽出し、コメ 33kDa アレルゲンに対する特異抗血清を用いて電気泳動・免疫ブロット解析を行った結果、いずれの穀物タンパク質中からも約 33kDa のバンドが検出されコメ 33kDa アレルゲンと免疫交叉性を示すタンパク質の存在が示唆された。そこで、これらの cDNA を獲得するために、コムギとトウモロコシの登熟期種子 mRNA を用いて完全長 cDNA を単離し塩基配列を決定した結果、

コメ 33kDa アレルゲンと高い類似性が見られた。さらにこれらの cDNA を大腸菌で発現させて調製したコムギおよびトウモロコシ組換えタンパク質はいずれもコメ 33kDa アレルゲンと免疫交叉性を示した。**その他:** (1) ソバ及びクリに陽性を示す患者の血清と反応するアレルゲンとして、11S レグミン様タンパク質に由来する酸性サブユニット (24kDa) を新規なアレルゲンとして同定した。(2) 広く植物性食品素材に反応する患者の血清を用いて、ニンジンから新規アレルゲンとしてシクロフィリン (20kDa) を同定した。(3) ジャガイモよりシラカバ花粉症惹起アレルゲン Bet v 1 と相同でかつ交叉性のある PR-10(RNase-like protein; 18kDa) を同定し、パタチンを既知アレルゲンと特定した。(4) 大豆アレルゲンを認識する IgE 抗体に Asn-N 結合糖鎖をエピトープとするものを同定した。

D.考察

食肉: 本研究では、食肉アレルギー患者の特異 IgE 抗体と結合する牛肉及び鶏肉タンパク質が BSA、FBPA 及び GAPDH であることを同定し、これらが食肉アレルギーである可能性を強く示唆した。**小麦:** これまでにマンノグルカンの存在を明確に証明したのは本報告が初めてである。**果実:** immunoblot 法で同定したトマト果実主要アレルギーは、SOD 除いて成熟にかかわるタンパク質であることが分かり、成熟するにつれてアレルギー性が増すことを証明することができた。**穀類:** コメ 33kDa アレルゲンが代謝系の酵素であったことからハウスキーピング様の役割を持ち他の植物にも広く存在すると推定したが、予想通り、調べた全ての穀物種子に相同タンパク質が存在し免疫交叉性を示すことが明らかとなった。**その他:** ニンジンに反応するアレルギー患者血清は他食品のシクロフィリン分子と交叉しなかった。感作率は患者間で約 15% であった。

E.結論

食肉: 牛肉と鶏肉の主要アレルギーは、それぞれ BSA と、GAPDH、FBPA である可能性が強く示された。**小麦:** 小麦粉の水溶性画分から新規多糖アレルギー (マンノグルカン) を単離した。小麦粉の吸入などにより体内に侵入した多糖アレルギーは長期間蓄積し、小麦アレルギーの難治性に関与していると予想された。**果実:** トマト果実主要抗原は PG2A、 β -fructofuranosidase、

SOD の4つであった。これらのタンパク質のうち SOD 以外のタンパク質は成熟するにつれてその濃度が増加することが示され、成熟トマトの方が未熟トマトよりもアレルギー性が高いという過去の報告をアレルギー量の面から裏付けることができた。穀類：コメアレルギーにおける主要アレルギーと構造的に類似し免疫交叉性を示すタンパク質がコムギおよびトウモロコシにも存在することが確認された。それらの cDNA をクローニングし、さらに組換えタンパク質を調製して免疫交叉性を確認した。その他：現在のところ十分なデータは蓄積されていないが、アレルギーとなりうるタンパク質成分は、植物性食品素材において特定のグループを形成している可能性を示唆している。

E.健康危険情報

特になし

G.論文

1.論文発表

- 1) Y. takahata, J. Kurisaki, K. Mizumachi, R. Shibata, T. Shigehisa, F. Morimatsu :IgE-natibody specificities of the patients allergic to meat products, *Animal Science Journal*, 71:494-500, 2000
- 2) 高畑能久、栗崎純一、水町功子、森松文毅：アレルギー患者 IgE 抗体が結合する鶏肉タンパク質の同定：日本家禽学会誌,37:228-233, 2000
- 3) Isolation and Characterization of a Novel Polysaccharide As a Possible Allergen Occurring in Wheat Flour Tanabe S., Watanabe J., Oyama K., Fukushi E., Kawabata J., Arai S., Nakajima T., and Watanabe M. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64: 1675-1680, 2000.
- 4) Novel Method for Producing Hypoallergenic Wheat Flour by Enzymatic Fragmentation of the Constituent Allergens and Its Application to Food Processing Watanabe M, Watanabe J, Sonoyama K, and Tanabe S. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64: 2663-2667, 2000.
- 5) Consumption of Hypoallergenic Flour Prevents Gluten-induced Airway Inflammation in Brown Norway Rats Watanabe J, Tanabe S., Watanabe M, Kasai T, and Sonoyama K submitted
- 6) The inhibition of ovalbumin uptake by the hypoallergenic wheat flour in Caco-2 cells Watanabe J, Tanabe S., Sonoyama K and Watanabe M. in preparation
- 7) 徳田玲子、近藤康人、川口博史、各務美智子、宇理須厚雄、浅野喜造；トマト果実による口腔アレルギー症候群患者におけるトマト果実とスギ花粉の共通アレルギー性の検討。小児科臨床,54,25-30,2001.
- 8) 徳田玲子、近藤康人、川口博史、各務美智子、宇理須厚雄；Immunoblot 法によるトマト果実主要アレルギーの同定、日小児アレルギー会誌,14,4,491-497,2000.
- 9) Yamada K, Urisu A, Kakami M, et al, IgE-binding activity to enzyme-digested ovomucoid distinguishes between patients with contact urticaria to egg with and without overt symptoms on ingestion. *Allergy*, 55:565-569, 2000
- 10) Kato, Y., Watanabe, H., and Matsuda, T. "Ovomucoid rendered insoluble by heating with wheat gluten but not with milk casein" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 198-201 (2000)
- 11) Kato, T., Katayama, A., Matsubara, S., Oumi, Y. and Matsuda, T. "Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure" *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3124-3129 (2000)
- 12) Izumi, H., Kondo, S., Kasho, H., Matsuda, T. and Nakamura, R. "Decrease in rice allergenic proteins of polished rice grains by incubating with amiso solution" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2248-2251 (2000)
- 13) I. Ikeda, T. Ogawa, and T. Ono: Tofu-Induced urticarial contact dermatitis, *Arch. Dermatol.* 136, 127-128 (2000)
- 14) M. Hiemori, N. Bando, T. Ogawa, H. Shimada, H. Tsuji, R. Yamanishi, and J. Terao: Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen Gly m Bd 28K, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122, 238-245 (2000)
- 15) T. Ogawa, M. Samaoto, and K. Takahashi : Soybean allergen and hypoallergenic soybean products, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 46 (6) 46,271- 279(2000)
- 16) C. Fujita, T. Moriyama, and T. Ogawa : Identification of cyclophilin as an IgE-binding protein in carrot, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122, in press
- 17) 小川正、森山達哉、藤田千鶴子、上杉太郎：シリンゴライド（大豆特異的感染病原体産生エリシター）結合たん白質としての Gly m Bd 30K の未知機能の解明とアレルギー性の関係について、大豆たん白質研究 3, 67-72 (2000)
- 18) 小川正：食品アレルギーとその低減化に関する最近の話題、食品と開発 35, 18-21 (2000)
- 19) 小川正：食物アレルギーと大豆アレルギー—低アレルギー化大豆食品の開発—、醸協 95, 328-335 (2000)
- 20) 小川正：生涯保健事業の体系化—食品保健—、日本医師会雑誌、123, 152-153 (2000)

2. 学会発表

- 1) R. Shibata, Y. takahata, F. Morimatsu, J. Kurisaki, S. Nishima : Identification of antigenicity and clinical reactivity to heat-treated chicken and beef in meat allergic children, Proceedings of XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Sydney, Australia, 15-20 October 2000
- 2) 低アレルギー化小麦粉によるアレルギーの腸管透過抑制効果 渡辺道子, 渡辺純, 田辺創一, 福士江里, 園山慶, 川端潤 日農化学会 2001 年度大会 (京都)
- 3) エダムチーズに含まれるアレルギー腸管透過抑制ペプチド 田辺創一, 渡辺純, 福士江里, 園山慶, 川端潤, 渡辺道子 日農化学会 2001 年度大会 (京都)
- 4) 小澤慶子, 松田 幹, 加藤保子 : 低アレルギー化全卵の調製法の開発とアレルギー患者血清を用いたアレルギー活性の評価、第 5 4 回栄養・食糧学会大会一般講演 (講演要旨集 p S18, 2C-10p) 2000
- 5) 草加一帆, 矢野博己, 松田 幹, 加藤保子 : オポアルブミンの経口投与と急性運動負荷によるアレルギー症状誘発の検討、第 5 4 回栄養・食糧学会大会一般講演 (講演要旨集 p S18, 2C-13p) 2000
- 6) 松田 幹, 市場愛子, 青木直人, 宇理須厚雄 : ニワトリ、ウズラ、アヒル卵オボムコイドのアレルギー交叉反応性—PCA テスト、RAST、皮膚ブリックテストによる評価—、第 5 4 回栄養・食糧学会大会一般講演 (講演要旨集 p S18, 2C-16p) 2000.
- 7) 松田 幹 : 食物の低アレルギー化—アレルギーの除去及び不活性化、日農化学会 2001 年度大会シンポジウム講演 (SY-8-4) 2001.
- 8) 藤田千鶴子他 : IgE 結合性ニンジン 20kDa タンパク質の単離と同定、日農化学会 2000 年度大会 (2000)
- 9) 上杉太郎他 : クリ 24kDa IgE 結合性タンパク質の同定及びその性質、第 5 4 回栄養・食糧学会大会 (2000)
- 10) 食物アレルギー患者血清中の大豆アレルギー Gly m Bd 28k 糖鎖結合性 IgE 抗体の存在、第 5 4 回栄養・食糧学会大会 (2000)
- 11) 河井良太他 : 食品タンパク質のアレルギー性評価モデルシステムの構築、第 5 4 回栄養・食糧学会大会(2000)
- 12) 河井良太他 : 食品タンパク質のアレルギー性評価モデルシステムの構築、第 5 4 回栄養・食糧学会大会 (2000)
- 13) T. Ogawa, M. Samoto, and K. Takahashi : Development of hypoallergenic soybean products-strategy for the reduction of allergenicity of soybean-, Proceedings of The 3rd International soybean Processing and Utilization Conference, 165-168, Dawn of the Innovative Era for Soybeans, Oct 15-20 (2000) Tsukuba, Japan
- 14) T. Ogawa, T. Moriyama, C. Fujita, K. Tomita (2000): Improvement of RAST diagnostics using anti-glycan antibody, Proceedings of The 2000 international Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA-Dec 14-19. (2000)

食物アレルギーから見た発症機序の解明に関する研究

分担研究者 赤澤 晃 国立小児病院アレルギー科医長

研究要旨 食品には多数の蛋白アレルギーが含まれ特定の食品間では交叉抗原性を示す場合と種名が似ているが全く独立してアレルギーを呈する場合がある。食物アレルギー患者は鶏卵アレルギーがあると魚卵アレルギーも同様に反応すると考えているが必ずしも交叉抗原性を示すものではなかった。

A. 研究目的

食品には、多数の蛋白質が含まれ、その蛋白質のあるアミノ酸配列に対して特異 IgE 抗体が産生されることにより即時型アレルギー反応がおこる。特異 IgE 抗体を産生しやすいアミノ酸配列は一つの蛋白質中に何カ所も存在し、特に多くの特異 IgE 抗体を産生しやすい蛋白質を主要アレルギーと呼んでいる。主要アレルギーとなる蛋白質は、近縁植物、動物間で構造が類似していることがあり、そのアミノ酸配列も保存されていてしばしば特異 IgE 抗体が交叉反応性を示すことがある。

臨床的には、特定の食品にアレルギー反応が現れた場合に、その近縁食品に対しても同様にアレルギー症状を起こす場合、あるいは全く独立しておこす場合がある。こうした交叉反応性をおこしやすい食品、そうでない食品を明らかにすることで不必要な食物制限、食品表示をなくし、また交叉抗原性の危険性についても喚起することができる。

B. 研究方法

(1)魚卵アレルギー

臨床的によく経験するのが、鶏卵のアレルギーであるが、鶏卵にアレルギーがあると魚の卵にもアレルギーがあると思ひこみ

除去を行う場合がある。鶏卵と魚卵に交叉抗原性があるかないかを検討した。

- ① 0～6歳までの74名のアトピー性皮膚炎 and/or 気管支喘息患者の卵白特異 IgE 抗体と卵黄特異 IgE 抗体、イクラ特異 IgE 抗体を ELISA 法で測定した。
- ② サケ特異 IgE 抗体陽性患者 10名のイクラ特異 IgE 抗体の測定 (ELISA 法)
- ③ イクラ特異 IgE 抗体に対する inhibition immunoblot により特定アレルギーの交叉反応性の検討を行った。

(2)芋アレルギー

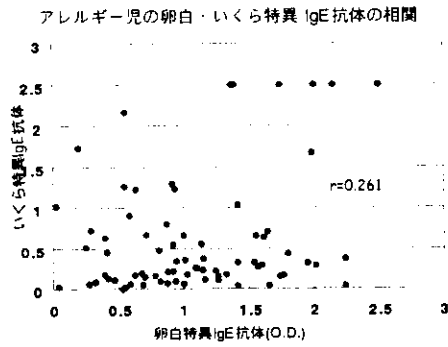
ジャガイモ、サツマイモは離乳早期から与える食品であるが、ヤマイモ、サトイモではしばしば蕁麻疹を経験することが、これイモ類の交叉抗原性について inhibition immunoblot 法で検討を行った。

(倫理面への配慮)

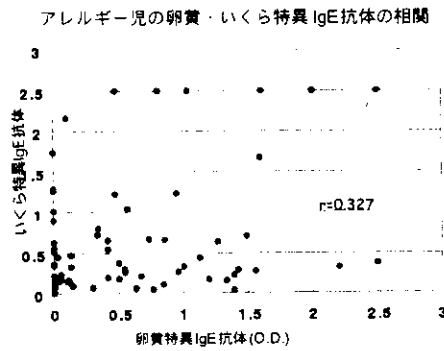
患者からの血清提供は、通常の外來診察時に診断的に施行する一般アレルギー検索と同時に、各種アレルギーに対する特異 IgE 抗体を測定し、その結果を実際の食事指導に反映することを了承してもらい実施している。

C. 研究結果

①卵白特異 IgE 抗体とイクラ特異 IgE 抗体の相関

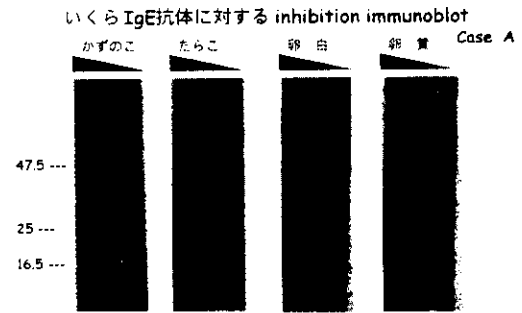


②卵黄特異 IgE 抗体とイクラ特異 IgE 抗体の相関



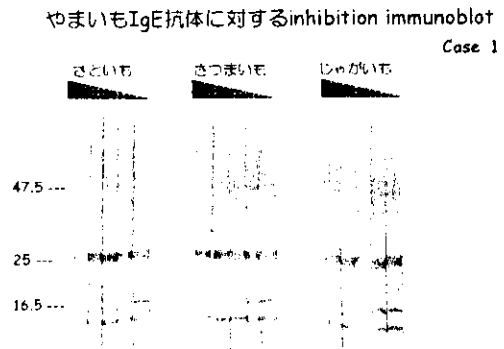
卵白特異 IgE 抗体とイクラ特異 IgE 抗体、卵黄特異 IgE 抗体とイクラ特異 IgE 抗体の相関係数はともに低く、一方のみ陽性の患者、両者ともに陽性の患者が存在する。このうち両者に陽性の患者血清で inhibition immunoblot を施行した。

③イクラ IgE 抗体に対する inhibition immunoblot



濃度を図の右から左にあげた場合、イクラに対して、卵白、卵黄ともに蛋白質バンドが変化していない。一方、魚卵であるカズノコ、タラコでは、濃度依存性に蛋白質バンドが消えていくのが観察された。

④イモアレルギーの交叉抗原性



ヤマモアレルギー患者血清に対するサトイモ、サツマイモ、ジャガイモアレルギーによる inhibition immunoblot では濃度依存性に蛋白質バンドの消失が観察された。

D. 考察

食物アレルギーの中で鶏卵は、小児で最も頻度の高い食品であるが、多くの患者は、鶏卵アレルギーがあるとイクラをはじめ魚卵も同じものと思いこみ制限をする場合が

多い、頻度調査では、卵白とイクラ、卵黄とイクラの両者に特異 IgE 抗体を持つ患者は存在するが、今回調べた患者では交叉抗原性は認められなかった。全例に検討を行っていないが両者に交叉抗原性を呈する症例はそれほど多くないと予想される。

ジャガイモ、サツマイモは離乳食として多用されていて、サトイモ、ヤマイモアレルギーに比べてジャガイモアレルギーは頻度は低い。サトイモ、ジャガイモは、離乳早期から与えることは少ないが一旦アレルギー症状が出てしまうと交叉反応性で、ジャガイモ、サツマイモにも反応するようになることも示唆された。

E. 結論

食品には、種名が似ているために交叉反応性があると一般的に思われているものもあり適切な除去が行われていないことがある。食物間の交叉抗原性を調べることは食品表示や食物制限指導に有益である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Matsuda K, Katsunuma T, Iikura Y, Saito H, Akasawa A: Adreno-cortical function in patients with severe atopic dermatitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85:35-39, 2000.
- ② 赤澤晃: 全身性アレルギー疾患 ラテックスアレルギー *Medicina* 37(2):283-285,2000
- ③ 赤澤晃, 坂口直哉, 河原秀俊, 飯倉洋治: 小児気管支喘息に対する luticasone propionate 連用式吸入用散剤 (SN411MD) の臨床評価 アレルギー

ー・免疫 7(5): 107-123, 2000.

- ④ 赤澤晃: アレルギー 小児気管支喘息 小児科 31(8):1212-1213, 2000.
 - ⑤ 赤澤晃: 特集アレルギー疾患—最近注目されているアレルギー疾患 薬局 vol.51, No.10:100-103,2000.10
- #### 2. 論文発表
- ① Akasawa A, Tanaka K, Katsunuma T, Saito H: Characteristics of patients registered from multi-facilities with latex allergy in Japan. 56th Annual Meeting of American Academy of Allergy & Immunology, San Diego, CA. USA. Mar.3-8, 2000.
 - ② 赤澤晃: ラテックスアレルギー交叉抗原性 (シンポジウム) 日本小児アレルギー学会 前橋 (森川昭廣) 2000.11.3-4
 - ③ 赤澤晃: 小児気管支喘息における抗炎症薬の使い方「抗アレルギー薬」(イブニングシンポジウム) 第50回日本アレルギー学会総会 横浜 (北村 諭) 2000.11.30-12.2

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 福井医科大学医学部小児科教授

研究要旨：生体内レドックス制御蛋白であるチオレドキシシンにより、卵の主要抗原であるオボムコイド、オボアルブミンの分子内ジスルフィド結合の還元切断処理を行うと、消化酵素による易消化性と加熱処理への感受性が増強し、そのアレルゲン性が低下した。チオレドキシシン処理は卵白アレルゲンのみならず分子内共有結合を有する他の食物抗原の低アレルゲン化への応用と共に、傾向免疫寛容の誘導による早期の食物アレルギー治療への応用も期待される。

A. 研究目的：近年、乳幼児のアトピー性皮膚炎をはじめとする食物アレルギーの増加と重症化が社会的に問題となってきた。食物アレルギーの治療としては原因食物の除去が基本となるが、一方で、多種類にわたる長期の厳格な食物除去は患児の身体面のみならず心理面での成長発育の弊害となる。そこで、食物アレルギー患者でも摂取可能な代替食品、食品低アレルゲン化法の開発が重要となる。

食物抗原の多くは分子内に S—S 結合 (intramolecular disulfide bond) を有しており、この結合が抗原蛋白の立体構造の安定化や加熱、消化酵素に対する抵抗性に関係している。従って、食物抗原分子内の S—S 結合を切断することにより、加熱調理や消化酵素に対する感受性が増加し、立体構造を認識する IgE 抗体への結合性が低下・消失することが期待され、この方法により小麦、牛乳の低アレルゲン化が図れると報告されている。

一方、わが国における乳児の食物アレルギーの原因抗原としては、卵白の頻度が最も高い。また、卵アレルギーによる乳児のアトピー性皮膚炎患者では、早期から厳格な卵除去を行うと、その後のダニアレルギーの獲得や気管支喘息の発症を抑制できることが報告されている。従って、卵アレルギーへの対策は、その後のアトピー性疾患の進展という観点からも重要である。しかし現在のところ、ミルクアレルギーに使用される低アレルゲンベプチドミルクに相当するような低アレルゲン化卵の開発は十分に達成されていない。そこで、我々は卵白アレルゲン蛋白の分子内共有結合を還元することによる卵の低アレルゲン化処理法の開発を計画した。

B. 研究方法：アレルギー患者が摂取する食物抗原分子内の S—S 結合を切断する還元処理には、還元剤自身のアレルゲン性、毒性を考慮する必要がある。そこで、我々は、これらの点を考慮する必要のない生体内の生理的レドックス制御

蛋白であるチオレドキシシン (TRX) の強力な還元能に着目し、卵の主要アレルゲンであるオボムコイド (OVM) とオボアルブミン (OVA) を標的蛋白として TRX による還元処理を行った。還元処理による分子内共有結合の変化は、-SH 基に結合する蛍光色素 monobromobimane (mBBr) の取り込みにより確認した。

食物アレルギーの原因抗原は一般に消化酵素による分解を受けにくく、特に OVM はトリプシン、キモトリプシンでは全く消化されない。そこで OM や OVA に TRX 前処理を加え、固相化した消化酵素による分解を行い、OVM や OVA の分解の程度を SDS-PAGE により検討した。

TRX 処理と消化酵素による分解後の抗原性の変化は、卵白アレルギー患者血清のうち OVM 及び OVA 特異 IgE が高値を示すものを用い、IgE RAST inhibition 法により評価した。卵アレルギー患者により OVM や OVA に対する認識エпитープが異なる可能性があることや患者個人のプライバシー保護のため被検血清はプールしたものを用いた。IgE RAST inhibition 法は、TRX 処理などを行った OVM や OVA の段階希釈したものをプール血清とあらかじめ混合し、プール血清中の OVM 及び OVA 特異 IgE と反応させた後、血清中に非結合状態で残存している特異 IgE を CAP-RAST 法で測定し、処理抗原添加による CAP-RAST 値の測定阻害率を求めた。また抗原性の低下は無処理の抗原または処理を加えた抗原により CAP-RAST 値の 50% 阻害を示す抗原濃度を比較することで行った。

食物抗原蛋白は、調理による加熱処理によって変性を受け、抗原性が低下することが知られている。そこで、加熱処理による抗原性の変化に TRX 前処理が影響するかどうかを検討するため、TRX 前処理を行ったものを行わなかったものに熱処理を加え、抗原性の変化を同じく IgE RAST inhibition 法により測定した。

研究結果：

TRX による還元処理後の mBBR の取込みは OVM において顕著に認められ、分子内 S—S 結合を 9 個有する OVM の方が 1 個のみの OVA より効率的に TRX 処理の影響を受けた。

TRX 処理は OVM のペプシンに対する被消化能を亢進させ完全分解に要する時間を 1/5 に短縮した。さらに未処理では消化作用を示さないトリプシン、キモトリプシンによっても、1 時間以内に完全に消化された。抗原性に関しては、TRX 前処理のみでは OVM の抗原性の低下は弱いものの、TRX 処理に加えトリプシン処理を行った場合には、無処理の OVM に比べ抗原性を 100 倍以上減少させた。一方、OVA は TRX 前処理を加えてもその被消化性に大きな差が見られなかったが、抗原性は低下傾向を示した。

加熱処理に対する影響は、TRX 処理により OVA の熱処理に対する感受性が亢進し、TRX 前処理を加えた OVA は TRX 未処理の OVA に比べ短時間の熱処理により完全にその抗原性を消失した。OVM は、従来報告されているように熱処理による抗原性の低下はわずかであり、TRX 前処理により更に抗原性は低下するもののその作用は弱いと考えられた。

表 TRX 処理による OVA と OVM の抗原性の変化

	未処理	ペプシン 処理	トリプシ ン処理	加熱処 理
OVA				
TRX 未処理		↓	↓→	↓
TRX 処理	↓	↓↓↓	↓	↓↓↓
OVM				
TRX 未処理		→	→	↓→
TRX 処理	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓

D. 考察：TRX 処理は、単独では卵の主要アレルゲンである OVA, OM の IgE 結合性の減弱効果は弱いものの、熱処理や消化酵素への感受性を増大させて IgE 結合性を強力に減弱させることから、卵製品に加熱や消化酵素処理を加える場合により効率良く低アレルゲン化が達成できる補助手段として有用と考えられた。

また、TRX 処理は卵製品摂取後の消化を促進することで抗原性を保持した形での消化管からの吸収量を減らせると考えられることから、逆に消化管からの吸収時点でアレルギー反応誘発閾値を考えた場合、閾値以下となる卵の総摂取可能量を増やすことが可能と考えられ、経口免疫寛容誘導への適用の可能性が示唆された。

E. 結論：TRX 処理は卵の低アレルゲン化の一手段と成り得ると考えられた。さらに本法は分

子内共有結合を有する他の食物抗原の低アレルゲン化への応用と経口免疫寛容誘導による食物アレルギー治療への応用が期待された。

F. 健康危険情報：本研究で用いた TRX NADPH, チオレドキシシンリダクターゼはすべてヒトを含め生物界に普遍的に存在するものでり、健康への危険性はないと考えられる。

G. 研究発表
論文発表

1. Ueno, H., S. Masuda, K. Katamura, M. Mayumi, S. Koyasu. ZAP-70 is required for calcium mobilization but is dispensable for mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily activation induced via CD2 in human T cells. *Eur.J. Immunol.* 30: 78-86, 2000.
2. Tsukahara, H., M. Hiraoka, R. Kobata, I. Hata, Y. Ohshima, M. Z. Jiang, E. Noiri, and M. Mayumi. Increased oxidative stress in rats with chronic nitric oxide depletion: measurement of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion. *Redox rep.* 5(1): 23-28, 2000.
3. Tsukahara, H., E. Noiri, M. Z. Jiang, M. Hiraoka, and M. Mayumi. Role of nitric oxide in human pulmonary microvascular endothelial cell adhesion. *Life Sci.* 67: 1-11, 2000.
4. Tsukahara, H., M. Z. Jiang, R. Kobota, Y. Osaka, M. Hiraoka, and M. Mayumi. Endogenous nitric oxide formation in term and preterm newborns. *発達腎研究会誌* 8(1): 15-19, 2000.
5. 藤沢和郎、大嶋勇成、眞弓光文。母親が使用した塩化リゾチーム外用剤により卵白アレルギー反応を呈した乳児例。アレルギーの臨床 258: 68-70, 2000.
6. 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.
7. 大嶋勇成、眞弓光文。食物アレルギーの免疫療法の展望。特集食物アレルギー2000。小児科臨床 53(4): 617-621, 2000.
8. 大嶋勇成、眞弓光文。アレルギー性疾患の発症前診断 - 出生前診断の必要性と可能性 -。特集 小児気管支喘息のライフスタイル。喘息 13(3): 21-26, 2000.
9. 眞弓光文。食物アレルギーとアトピー性疾患。兵庫県医師会医学雑誌 43(1): 16-19,

- 2000.
10. 眞弓光文. アトピー性疾患. 特集・小児における現代病の対策と治療. 医薬ジャーナル 36(12): 3338-3341, 2000.
 11. 大嶋勇成, 山田彰子, 眞弓光文. 気道アレルギーの予防: アトピー性皮膚炎から喘息へ. 日本小児アレルギー学会誌 13 (1): 73-77, 2000
 12. 大嶋勇成, 眞弓光文. 樹状細胞とOX40/OX40L. Surgery Frontier 7:191-194, 2000
 13. Yamada A, Ohshima Y, Tsukahara H, Hiraoka M, Kimura I, Kawamitsu T, Kimura K, Mayumi M. Two cases of anaphylactic reaction to gelatin induced by chloral hydrate suppository. *Pediatr Int* (in press)
- 学会発表
1. 眞弓光文. 免疫学から見たアトピー性皮膚炎. 第101回日本小児科学会学術集会. 1998. 5. 17. 米子
 2. 眞弓光文. 食物アレルギーとアトピー性疾患. 第33回兵庫県医師会学術セミナー. 2000. 1. 23. 神戸
 3. 眞弓光文. 小児アトピー性疾患の病態と治療. 第8回佐賀県アレルギー講習会. 2000. 2. 4. 佐賀
 4. 眞弓光文. 小児アレルギー疾患の病態と発症予測・予防の可能性. 第34回群馬小児喘息研究会. 2000. 5. 23. 前橋
 5. 眞弓光文. 小児気管支喘息の early intervention. 第36回静岡小児アレルギー研究会. 2000.6. 24. 静岡
 6. 眞弓光文. 小児アトピー性疾患の病態と治療. 第17回新潟小児免疫・アレルギー研究会. 2000. 9. 9. 新潟
 7. 柳原行義, 眞弓光文. IgEをめぐる基礎と臨床. 第50回日本アレルギー学会総会. 2000. 12. 2. 横浜
 8. Mayumi, M., Y. Ohshima, H. Ysukahara, M. Hiraoka, H. Nakamura, J. Yodoi, S. Ito, K. Katamura, and Y. Matsuo. Reduction of intramolecular disulfide bonds of ovomucoid and ovalbumin by thioredoxin modulates their digestibility and allergenicity. 17th International Congress of Allergology and Clinical Immunology. October, 2000. Sydney, Australia
 9. 轟夕起子, 川谷正男, 木村宏輝, 山田彰子, 大嶋勇成, 眞弓光文. 大腸ファイバー

にて経過を観察しえた新生児ミルクアレルギーの3例 第12回日本アレルギー学会春季大会. 2000.4.20 博多

10. 山田彰子, 大嶋勇成, 木村郁子, 川満徹, 木村宏輝, 眞弓光文. 抱水クロラール座薬でアナフィラキシー症状を呈したゼラチンアレルギーの2例 第12回日本アレルギー学会春季大会. 2000. 博多
11. 大嶋勇成, 山田彰子, 安富素子, 小俣合歓子, 藤澤和朗, 眞弓光文. 臍帯血CD4+T細胞によるIL-13産生とアトピー性疾患発症との関係. 第27回北陸アレルギー懇話会 2000. 11.25 金沢
12. 大嶋勇成, 山田彰子, 安富素子, 小俣合歓子, 藤澤和朗, 眞弓光文. 臍帯血CD4陽性T細胞のサイトカイン産生能とアレルギー性疾患発症との関係. 第50回日本アレルギー学会総会 2000. 12. 2. 横浜
13. 大嶋勇成, 山田彰子, 安富素子, 小俣合歓子, 藤澤和朗, 眞弓光文. 臍帯血CD4陽性T細胞のサイトカイン産生能とアレルギー家族歴との関係. 第50回日本アレルギー学会総会 2000. 12. 2. 横浜

著書

1. 大嶋勇成, 眞弓光文. 食物アレルギーによる皮膚症状. 皮膚科診療プラクティス9 やさしい小児皮膚科学 p44-48, 2000. 斉藤隆三, 宮地良樹, 瀧川雅浩 編集. 文光堂
2. 眞弓光文. アレルギー疾患. 標準小児科学第4版 p259-267, 2000年. 前川喜平, 辻 芳郎 監修. 医学書院
3. 眞弓光文. 食物と小児皮膚疾患. 食物アレルギー, 食物制限と栄養, 給食など. 小児の皮膚疾患生活指導マニュアル p24-29, 2000年. 宮地良樹, 森川昭廣 編集. 診断と治療社
4. 眞弓光文. 食物アレルギーのメカニズム. 食物アレルギー. アトピー性皮膚炎コンセンサスアップデート p123-130, 2000年. 宮地良樹, 永倉俊和 編集. メディカルレビュー社
5. 大嶋勇成, 眞弓光文. 小児喘息の他のアレルギー疾患合併例の検討. Clinical Case Oriented/気管支喘息 p226-230, 2000年 足立満, 飯倉洋治, 佐野靖之, 高橋清 編集. メディカルレビュー社

H.知的財産権の出願登録状況: 実施していない