

C.研究結果

1) OVA-IgE-tg に Th2 細胞を輸注した場合、OVA の経口投与 2~3 回目にかけて投与後 1 時間内の搔破行動の増加を認めた。搔破行動は経口投与を反復していくと徐々に減弱消失した。一方、野生型マウスでは OVA の経口抗原投与 5~6 回目から搔破行動が認められるになり、症状発現に時間的ずれが認められた。また、搔破行動は OVA-IgE-tg に比べ野生型マウスの方に強く認められた。しかし、7 回目の経口抗原投与後に分離した脾細胞の中には輸注したクロノタイプ陽性細胞はほとんど検出されなかった。脾細胞の *in vitro* での OVA の再刺激では両群のマウスにおいて有意の細胞増殖、サイトカイン産生が認められず、脾細胞には抗原特異的反応性が検出されなかった。

2) OVA とアラムで免疫し、*in vivo* で OVA 特異的 IgE 産生と Th2 細胞を誘導した場合、OVA-TCR-tg の方が野生型に比べ OVA 特異的 IgE が高値を示した。OVA の経口投与を行うと両群マウスとも投与 3 回目から即時型の下痢症状が出現した。野生型マウスでは OVA 経口投与の反復により下痢症状の増悪と活動性の低下、低体温を認めた。しかし、OVA-TCR-tg では下痢症状の出現を認めるものの程度は軽く、活動性の低下、低体温はほとんど認めなかった。さらに OVA 投与の反復により症状の軽快傾向が認められた。

D.考察

Th2 細胞を輸注した野生型マウスでの搔破行動の出現は OVA-IgE-tg の場合に比べ遅れており、症状出現までの時間的ずれには *in vivo* での輸注した Th2 細胞による OVA 特異的 IgE 産生の誘導に要する時間が影響していると考えられる。しかし、OVA-IgE-tg では OVA 特異的 IgE が高値にも関わらず、搔破行動が野生型マウスより軽度であったことから、OVA 特異的 IgE 値のみでなく、抗原特異的 IgE の認識するエピトープが症状の程度を規定する因子となることが推察される。野生型マウスでは 7 回目の抗原投与後の段階で搔破行動を依然認めるものの脾細胞中には輸注した T 細胞は検出されず、また OVA 特異的細胞増殖も認められないことから、輸注した Th2 細胞では全身性の Th2 反応を誘導するほどでなく、消化管局所のみ

応である可能性が考えられた。

OVA で免疫し *in vivo* で OVA 特異的 IgE 産生と OVA 特異的 Th2 細胞を誘導した場合には、OVA-TCR-tg で OVA 特異的 IgE 値が高値にも関わらず、症状が野生型マウスに比べ軽度であったことから、即時型アレルギー症状が抗原特異的 IgE によってのみ規定されるのではなく、T 細胞側の要因の関与が示唆された。

E.結論

食物アレルギーの症状を制御するためには単に抗原特異的 IgE を標的とするだけでなく抗原特異的 T 細胞の反応性を考慮することが必要と考えられる。抗原特異的 IgE 値が高値でも抗原特異的 T 細胞を制御することで即時型アレルギー症状を調節できる可能性が示唆される。

F.健康危険情報 特になし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Omata N, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Karasuyama H, Mayumi M. Ovalbumin-specific IgE modulates ovalbumin-specific T cell response after repetitive oral antigen administration dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (in press)
- 2) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi M, Mayumi M. The role of dendritic cells in Th1/Th2 balance: A novel therapeutic target of allergic diseases. *Allergology Int* 53:219-226(2004)
- 3) Jiang MZ, Tsukahara H, Hayakawa K, Todoroki Y, Tamura S, Ohshima Y, Hiraoka M, Mayumi M. Effects of antioxidant and NO on TNF- α -induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Respir Med* (in press)
- 4) Todoroki Y, Tsukahara H, Ohshima Y, Shukunami K, Nishijima K, Kotsuji F, Hata A, Kasuga K, Sekine K, Nakamura H, Yodoi J, Mayumi M. Concentrations of thioredoxin, a redox-regulating protein,

in umbilical cord blood and breast milk.
Free Radical Research (in press)

- 5) Jian MZ, Tsukahara H, Ohshima Y, Todoroki Y, Hiraoka M, Mayumi M Effects of antioxidant and nitric oxide on chemokine production on TNF- α -induced adhesion molecule expression and NF- κ B activation in human dermal microvascular endothelial cells. Life Sci 75:1159-1170(2004)
- 6) 大嶋勇成、Th1/Th2 バランス 小児科臨床 (in press)
- 7) 大嶋勇成 アトピー素因と内分泌攪乱物質 アレルギー科 18:387-392(2004)
- 8) 大嶋勇成 Th1/Th2 バランスにおける樹状細胞の役割 アレルギー科 18:63-69(2004)
- 9) 大嶋勇成、眞弓光文 Hygiene hypothesis ア分子呼吸器病 8:198-204(2004)
- 10) 大嶋勇成、小俣合歎子、安富素子 MCP-1 による DC2 の誘導 臨床免疫 41:706-710(2004)
- 11) 大嶋勇成、眞弓光文 アレルギー疾患の診断法と問題点 喘息 65:45-49 (2004)

2.学会発表

- 1) Ohshima Y. Roles of dendritic cells in allergic inflammation; new therapeutic target for bronchial asthma. 1st Japan-China-Korea Pediatric Forum. February 4-6, 2004 Tokyo.
- 2) Omata N, Ohshima Y, Yasutomi N, Yamada A, Kararuyama H, Mayumi M. Antigen-specific IgE modulates antigen-specific T cell response after repetitive oral antigen administration: induction of oral tolerance in IgE-transgenic mice. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology October 4-7, 2004, Tokyo
- 3) Yasutomi M, Ohshima Y, Omata N, Yamada A, Mayumi M. Erythromycin differentially inhibits LPS-, or poly (I:C)-induced but not peptidoglycan-induced activation of human monocyte-derived dendritic cells. 12th International

Congress of Immunology and 4th annual conference of FOCIS 2004 July 18-22, 2004, Montreal, Canada

- 4) Baba N, Nakajima T, Kashiwakura H, Hieshima K, Ohshima Y, Shimzu H, Yoshie O, Saito H. Induction of liver and activation-regulated chemokine/CCL20 by activated human CD4+ T lymphocytes. 12th International Congress of Immunology and 4th annual conference of FOCIS 2004 July 18-22, 2004, Montreal, Canada
- 5) 大嶋勇成 シンポジウム：IgE 制御の現状と展望：アレルギーマーチと IgE 第 54 回日本アレルギー学会 2004/11/4-5 横浜
- 6) 小俣合歎子、大嶋勇成、安富素子、山田彰子、鳥山一、眞弓光文抗原特異的 IgE 存在下での経口抗原暴露に対する T 細胞反応性の変化第 41 回日本小児アレルギー学会 2004/11/27-28 東京
- 7) 小俣合歎子、大嶋勇成、安富素子、山田彰子、鳥山一、眞弓光文 T 細胞の経口免疫寛容成立に及ぼす抗原特異的 IgE の影響 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2004/5/1 前橋
- 8) 大嶋勇成 シンポジウム：アトピー素因への環境ホルモンの関与の可能性 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2004/5/1 前橋

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

食物等によるアナフィラキシーの原因物質・予後に関する研究
—アナフィラキシー誘発食品のアレルゲン性と耐性化に関する研究—

分担研究者 柴田 瑠美子 国立病院機構福岡病院 小児科医長
研究協力者 橘田 和美 食品総合研究所食品衛生対策チーム
伊藤 典之 オーム乳業株式会社商品開発チーム
中村 洋 国際農林水産業研究センター 主任研究官

研究要旨

酵素分解アレルゲン低減化小麦を用い、経口負荷試験による小麦アレルギーの過敏性を経年的に検討した。小麦食品の耐性化、非耐性化群の臨床背景では、多種食物アレルギーの程度や総IgE値には差がみられなかったが、非耐性例では経年的な特異IgE抗体の低下がみられず症状も重症であった。小麦アレルゲンの耐性化に関わる小麦蛋白解析を行った。小麦アレルギー児血清での二次元電気泳動による小麦アレルゲン蛋白は40kdに多くのバンドがあり15kdにもみられた。

A.研究目的

小麦は加熱などによる抗原性の低下がみられず日常食品中の微量のアレルゲンでアナフィラキシーを起こしやすい。小麦アレルギーの耐性化の確認には負荷試験が必要であるが、誘発率の高い小麦自体では困難なことが多い。酵素分解によるアレルゲン低減化小麦蛋白を材料とするペプチバウンドケーキ HAWC (オーム乳業) は小麦アレルゲンが30 µg/g と微量であり、経口負荷試験に用いることにより過敏性の判断に利用できることを報告してきた。今回、負荷試験後の小麦アレルギーの耐性化過程を検討し、臨床所見との関連、小麦アレルギー児のアレルゲン蛋白解析を行うことを目的とした。

B.研究方法

対象は、小麦アレルギー児 40 例。アレルゲン低減化小麦ケーキ HAWC (ペプチバウンドケーキ) による負荷試験を行い、陽性例では6ヵ月毎に再負荷し、陰性例ではさらにうどん経口負荷を行った。患者血清を用い低アレルゲン小麦および国内産主要品種のホクシンを用いたアレルゲン蛋白解析を行った。小麦アレルギー患者血清(RAST スコア3~5)を用い、イムノプロットングを行い患者血清中のIgEが認識するタンパク質を化学発光法(ECLplus)により検出した。検出されたタンパク質について分子量(MW)、等電点(pI)を二次元電気泳動像解析ソフトにより算出した。

C.研究結果

小麦食品による誘発症状では、重症蕁麻疹、

喘鳴・発作が3割以上にみられ、HAWC 負荷試験ではこれらの出現率が低かった(表1)。HAWC による負荷試験陽性15例および陰性25例の臨床所見では、平均月齢、IgE 値、多種食物アレルギーでは差がみられなかったが、HAWC 陽性群では小麦特異IgE抗体値が高く、喘息合併が多い傾向がみられた(表2)。HAWC 負荷試験陰性群はさらに6ヵ月~1年後の再度のうどん負荷により25例中20例がうどん負荷試験陰性となり、うどん負荷試験陽性5例も6ヵ月~2年で陰性化した。HAWC 負荷陽性15例中、6ヵ月~1年後再負荷によりHAWCは10例が陰性化し、さらにその8例で後にうどん負荷も陰性化した。しかしHAWC 再負荷でも陽性の5例は、2~3年以降も負荷陽性で耐性化が見られておらず、小麦IgE抗体もCAP4~6が続いており、経年的な低下がみられなかった(図1)。

小麦アレルギー児9例における小麦蛋白の解析では、血清と反応性のあるタンパク質は主としてMW40kDa、pI8付近を中心とする一群のタンパク質とMW15kDa、pI7付近を中心とするタンパク質であった。小麦アレルギーの完全耐性化、非耐性例の経過中のアレルゲン蛋白反応に差異があるか検討中である。

D.考案

食物アレルギーでは完全除去よりも少量のアレルゲン食品を摂取することにより耐性化が促進することが期待されている。しかし小麦によるアナフィラキシーは、症状の重症例ほど負荷試験の施行が困難であり、長期間の除去になる

ことが多い。アレルギー低減化食品を用いた負荷試験は過敏性の確認に有用であり、これらの食品の摂取により耐性化が早まることが期待される。一方、低アレルギー小麦に過敏性を示し耐性化が困難な例が存在しこれらの症例は小麦 IgE 抗体高値が持続し微量の小麦でアナフィラキシーを起こしやすい群であると判断され、耐性化の機序が異なると考えられた。またこれらの耐性、非耐性については特異 IgE 抗体からの予測は困難であるとされており、アレルギー小麦蛋白の解析により持続する反応性に差異があるかはあきらかではなく、症例を増やして検討する必要がある。

E. 結語

小麦アナフィラキシーにおける耐性化の確認に HAWC による負荷試験と経過中の特異 IgE 抗体値の検査は有用である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsukahara H, Shibata R, Ohta N, et al: High levels of Urinary pentosidine, an Advanced Glycation end product, in children with acute exacerbation of atopic dermatitis; Relationship with oxidative stress. *Metabolism* 52: 1601-1605, 2003.
- 2) 柴田瑠美子 アナフィラキシー型食物アレルギー 臨床麻酔 28: 1545-1550, 2004.
- 3) 柴田瑠美子、宇理須厚雄、有田昌彦 他、食物アレルギー委員会報告 第3報 食物経口負荷試験 日本小児アレルギー学会誌 18: 217-219, 2004.
- 4) 柴田瑠美子 アトピー性皮膚炎と食物アレルギー アレルギー科 17: 542-548, 2004.
- 5) 柴田瑠美子 アレルギーの考え方と栄養指導 助産雑誌 58: 118-124, 2004.
- 6) 柴田瑠美子 アナフィラキシーへの対応 食物アレルギー研究会会誌 4: 33-37, 2004

2. 学会発表

- 1) Shibata R, Nishima S; Measurement of serum specific IgE antibodies to fish and

mollusks in children with seafood allergy. *J Allergy Clin Immunol* 116:s316-317, 2004 AAAAI 2004, 3.19-24(San Francisco)

- 2) Takahata Y, Kamiya K, Mastumoto T, Sato T, Shibata R, Morimatu F; Development of rapid and simple diagnostic kit for food allergens by immunochromatography. *J Allergy Clin Immunol* 113:s237, 2004. AAAAI 2004, 3.19-24(San Francisco)
- 3) 柴田瑠美子 アトピー性皮膚炎の治療と患者への指導：正しい食物アレルギーの指導 第21回日本難治喘息・アレルギー研究会 2004. 6.19-20、宇都宮.
- 4) 柴田瑠美子 食物アレルギーの解決されるべき課題：医療上の問題点（負荷試験、栄養指導等の保健適応、指示書等） 2004. 11.26-27、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 小麦アレルギーでの誘発症状

	蕁麻疹	重症蕁麻疹	咳	発作
小麦食品 負荷/偶発	40	11	13	13
HAWC 負荷*	15	1	3	2

*HAWC:Hypoallergenic wheat cake アレルゲン低減化小麦ケーキ

表2 アレルゲン低減化小麦負荷試験陽性、陰性の臨床背景

HAWC 負荷	例数	月齢	総IgE	小麦特異IgE		喘息	多種食物 アレルギー
				スコア	Ua/ml		
陽性	15	32±20	2787± 3942	5±1	58±34	5(33%)	15
陰性	25	30±11	2550± 7206	4±1	25±23	3(12%)	22

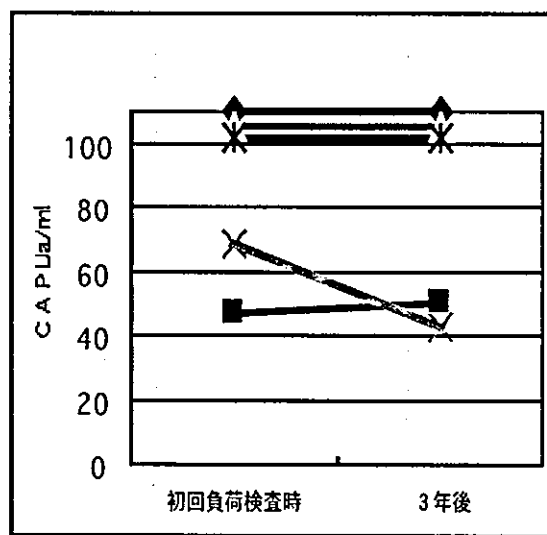
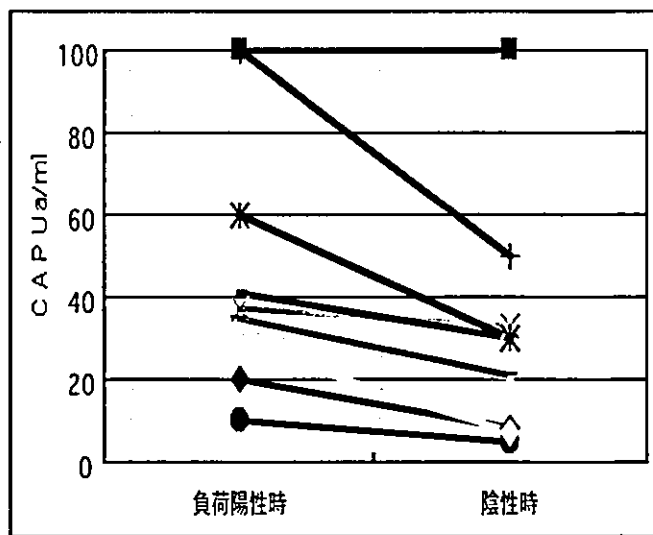


図1 HAWC 負荷試験陽性 15 例の耐性、非耐性化時の小麦特異 IgE 抗体

食物アレルギーの抗原解析及びその低減化に関する研究

分担研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部
研究協力者	塩見 一雄	東京海洋大学海洋科学部海洋食品科学科
	佐伯 宏樹	北海道大学大学院水産科学研究科
	森山 達哉	京都大学大学院農学研究科
	吉岡 靖雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部
	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨 甲殻類・軟体動物：甲殻類および軟体動物のアレルゲンは、欧米の患者だけでなく日本の患者においてもトロポミオシンであることが判明した。甲殻類トロポミオシン特異的抗体の作製に成功し、甲殻類トロポミオシンの特異的検知法への応用が期待された。寄生虫：アニサキス新規アレルゲンを同定し、そのリコンビナント体がアニサキスアレルギーの診断・治療に応用可能であることが示唆された。海産無脊椎動物：スルメイカ・トロポミオシンはメイラード反応の進行に伴って、イカ・アレルギー患者血清中の特異 IgE に対する反応性が低減した。従来知見と併せて考察すると、メイラード反応が海産無脊椎動物トロポミオシンのアレルゲン性におよぼす影響は生物種によって著しく異なることが示唆された。果物：チェリー、スイカ、バナナに反応する患者血清を用いて、チェリーの 30kDa のタンパク質を Thaumatin like protein (Pru a 2)、スイカの 60kDa のタンパク質 (Cit 1 Bd 60K) をヒートショックプロテイン 60 (HSP60) と同定した。また、チェリーの Thaumatin like protein はメロンの 30kDa 付近の IgE 結合タンパク質と交差反応性があることが判明した。更に、新規バナナアレルゲンも同定した。そば：加熱処理によりアレルゲンが変化することが示唆された。

A. 研究目的

重篤なアナフィラキシー症状を呈した食品中のアレルゲン誘発物質を特定すると共に、それら誘発物質の低減化を目的とする。

B. 研究方法

1) 甲殻類・軟体動物：①甲殻類のフジツボ類 2 種 (フジツボ、カメノテ)、オキアミ類 2 種 (ナンキョクオキアミ、ツノナシオキアミ)、エビ類 5 種 (ウシエビ、シラエビ、テナガエビ、ホッコクアカエビ、ボタンエビ)、カニ類 7 種 (アサヒガニ、ズワイガニ、ケガニ、タイワンガザミ、サワガニ、タラバガニ、イバラガニ)、軟体動物の多板類 1 種 (ヒザラガイ)、巻貝 2 種 (バテイラ、テングニシ)、二枚貝 4 種 (アカガイ、トリガイ、バカガイ、アサリ) の筋肉 (アサリは軟体部) から加熱抽出液を調製し、ELISA に供して IgE 反応性を調べた。更に、甲殻類 10 種、軟体動物 5 種の加熱抽出液については、患者血清を用いたイムノプロットティングによりアレルゲンを検索した。②アメリカンロブスターの尾肉から部分精製したトロポミオシン (TM) を BALB/c マウスに免疫し、常法によりモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体と各種甲殻類および軟体動物 TM との反応性はイムノプロットティングにより調べた。

2) 寄生虫：アニサキスから構築した cDNA 発現ライブラリーをアニサキスアレルギー患者の血清 IgE との反応性を指標にスクリーニングし、アレルゲンをコードする cDNA を単離した。得られた cDNA の塩基配列および演繹アミノ酸配列を解析した。更に、アレルゲンを大腸菌で発現し、リコンビナントアレルゲンの IgE 反応性を ELISA で調べた。

3) 海産無脊椎動物：スルメイカの体側筋及びホタテガイ貝柱から TM を精製し、10 mM リボース (生体内レベル) と混合することでメイラード反応を進行させた。TM のアレルゲン性に及ぼすメイラード反応の影響を、貝およびイカアレルギー患者の血清を用いたドットプロットティングと競争 ELISA により判断した。

4) 果物：スイカ、チェリー、バナナに対してアレルギー反応 (OAS 等) を起す患者血清を用いて、チェリー、スイカ、バナナ中に含まれるアレルゲンの検索・同定を試みた。抽出タンパク質を SDS-PAGE した後、患者血清にてイムノプロットティングを行い、IgE 抗体により認識される成分をアレルゲンの候補として検索した。これらの候補分子に関しては種々のクロマトグラフィーを用いて分離精製し、同定を行った。免疫交差性の確認実験では、精製されたタンパク質にて血清を前処理する方法 (競合イムノブ

ロット法)を用いた。

5) そば: 加熱処理によるアレルギー性変化を検討する為、そば加熱抽出液(5倍量の水を加えてホモジナイズ後、100度、60分間加熱、遠心分離により調製)、非加熱抽出液を調製し、SDS-PAGEの後、患者血清にてイムノプロットティングを行い、IgE抗体により認識されるアレルギー候補物質の変化を検討した。

C. 研究結果

1) 甲殻類・軟体動物: ①調べた甲殻類・軟体動物は、種類により強弱はあるが全て甲殻類アレルギー患者の血清IgEと陽性反応を示した。また一部をイムノプロットティングに供したが、共通して35-40kDa付近のタンパク質(TM)に陽性反応が認められた。②アメリカンロブスターのfast muscle TMに対するモノクローナル抗体を作製することができた。反応性の強かった2種類のモノクローナル抗体(2A7H6および5G5E1)のうち、2A7H6抗体は甲殻類(ウシエビ、コウライエビ、ズワイガニ、ケガニ、アメリカンロブスター)及び軟体動物(クロアワビを除くスルメイカ、マダコ、カキ)のTMと反応したが、5G5E1抗体は甲殻類TMに対して特異的であった。

2) 寄生虫: cDNAライブラリーの抗体スクリーニングによりアニサキスアレルギーをコードするcDNAを単離し、塩基配列および演繹アミノ酸配列から既報のアレルギーとは異なる新規アレルギーであることを示した。本アレルギーは、GPGP(V/D)(V/DS(G/A/V)(S/D)Gの繰り返し構造を持つアミノ酸266残基から成る塩基性タンパク質で、吸虫クロノーチス・シネンシスの抗原タンパク質と38%の配列相同性を示した。大腸菌で発現したリコンビナントアレルギーは、アニサキスアレルギー患者35人中10人と反応した。

3) 海産無脊椎動物: ドットプロットティングによると、スルメイカTMはリボースとの反応が進行するに伴って、患者血清中の特異IgEに対する反応性が低下した。またTM中リジン残基の70%が反応すると、競争ELISAにおける50%阻害濃度が7倍増加した。一方、これらメイラード反応をおこしたTMは、健常者血清とは全く反応を示さなかった。リボースとの反応を続けても、TM中のリジン修飾率は63%を上限に変化しなかったが、その後もアレルギー性の低下は継続した。また同時にペプシン、キモトリプシンによるTMの消化パターンが大きく変化した。これらの結果は、メイラード反応の進行

に伴うTMエピトープ部位の構造変化を示唆している。

4) 果物: 各果物タンパク抽出液をSDS-PAGE、イムノプロットで解析したところ、チェリーでは、患者血清が30kDa付近のタンパク質を特異的に認識した。このタンパク質をシーケンストしたところ、N末配列はチェリーのThaumatococcus like proteinと完全に一致した。スイカでは、患者血清が複数のタンパク質バンドを特異的に認識した。その中で特に結合が強かった、60kDaの分子量のタンパク質を精製・同定したところ、このタンパク質はカボチャなどのHSP60と高い相同性を示した。PR-Pの交差反応性に注目し、チェリー、メロンで検証したところ、チェリー、メロンにおいて30kDa付近のアレルギーの交差反応性を確認した。バナナでは、数多くの蛋白質バンドが患者血清により認識された。特に結合の強かった分子量100kDaの蛋白質を精製・同定したところ、新規アレルギーの可能性が示唆された。

5) そば: 加熱処理によりSDS-PAGEでのバンドパターンに大きな変化が認められた。また、患者血清を用いたイムノプロット解析においても、非加熱・加熱処理抽出液では異なる蛋白質バンドを認識したことから、加熱処理で患者血清により認識されるアレルギーが変化したことが示唆された。

D. 考察

1) 甲殻類・軟体動物: ①甲殻類・軟体動物は種によらずアレルギー性を示し、主要アレルギーはTMと考えられた。②5G5E1抗体は甲殻類TMを特異的に認識すると判断された。

2) 寄生虫: cDNAクローニングにより同定されたアニサキスアレルギーは新規アレルギーで、リコンビナント体はIgE結合能を十分に保持していると考えられた。

3) 海産無脊椎動物: イカTMで観察された競争ELISAにおける阻害濃度の増加は、患者血清中のIgE結合量の減少を示しており、メイラード反応の進行によってスルメイカTMのアレルギー性が軽減する可能性が示唆された。この結果は、先に報告したホタテガイの場合(メイラード反応の進行に伴ってアレルギー性が増大)とは全く逆の結果であった。すなわち、メイラード反応が海産無脊椎動物TMのアレルギー性に及ぼす影響が、生物種によって著しく異なる事が示された。今後は、実際の製造過程で起きるメイラード反応の影響を解析するとともに、各種生物分類群ごとにこの現象を確認すること

で、加工過程におけるアレルギー性変化の実態を明らかにする。また、メイラード反応による TM の IgE 結合能の変化は、単にリジン残基のブロックによって生じた現象ではなく、TM の構造変化に起因するので、メイラード反応が TM のアレルギー性におよぼす影響の分子メカニズムを検討する必要がある。

4) 果物：チェリーの 30kDa の分子量のタンパク質 (Thaumatococcus protein) は、PR-5 に属するチェリーアレルギー Pru a 2 としてすでに報告されていた。スイカの 60kDa の分子量のタンパク質 (Cit 1 Bd 60K) は、様々な HSP60 と高い相同性を示したことから、スイカの HSP60 であると考えられる。HSP は熱刺激により発現が誘導されることから、一種のストレス誘発性タンパク質と考えられる。よって、この HSP60 は新規の PR ファミリーである可能性が示唆された。また、チェリーとメロンの 30kDa 付近の分子量のタンパク質は免疫交差性があることが確認された。チェリーの 30kDa の分子量のタンパク質は PR-5 であることから、メロンの 30kDa 付近の分子量のタンパク質はメロンの PR-5 である可能性が示唆された。バナナ新規アレルギーの交差反応性などに関しては現在検討中である。

5) そばアレルギーは加熱処理により変化することが示唆された。現在、精製及び同定を進めている。

E. 結論

1) 甲殻類・軟体動物：①甲殻類および軟体動物のアレルギーは、欧米の患者だけでなく日本の患者においても TM である。②5G5E1 抗体は甲殻類 TM の特異的検知法への応用が期待できる。

2) 寄生虫：アニサキス新規アレルギーのリコンビナント体は、アニサキスアレルギーの診断・治療に応用可能である。

3) 海産無脊椎動物：スルメイカ筋肉の主要アレルギーである TM は、還元糖類 (単糖) とメイラード反応を起こすと、アレルギー性が低下することを確認。これは貝類 TM と全く正反対の影響であった。

4) 果物：フルーツアレルギー患者血清を用いて、チェリーアレルギー Pru a 2、スイカアレルギー Cit 1 Bd 60K、バナナアレルギーを同定した。チェリーとメロンの 30kDa 付近のタンパク質 (Thaumatococcus protein) の免疫交差性を確認した。

5) そば：加熱処理によりアレルギーが変化する

ることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Shimakura, H. Miura, K. Ikeda, S. Ishizaki, Y. Nagashima, T. Shirai, S. Kasuya and K. Shiomi: Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135, 69-75 (2004)
- 2) Y. Hamada, H. Tanaka, A. Sato, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Expression and evaluation of IgE-binding capacity of recombinant Pacific mackerel parvalbumin. *Allergol. Int.* 53, 271-278 (2004)
- 3) Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: Reactivity of IgE in fish-allergic patients to α - and β -parvalbumins purified from the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Fish. Sci.* 70, 1137-1143 (2004)
- 4) Ying Lu, T. Ohshima, H. Ushio and K. Shiomi: Preparation and characterization of monoclonal antibody against abalone allergen tropomyosin. *Hybridoma and Hybridomics* 23, 357-361 (2004)
- 5) K. Shimakura, Y. Tonomura, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion. *Food Chem.* 91, 247-253 (2005)
- 6) A. Nakamura, K. Watanabe, T. Ojima, H. Saeki: Effect of Maillard reaction on allergenicity of Scallop Tropomyosin 投稿中
- 7) H. Akiyama, S. Sakai, R. J. Linhardt, Y. Goda, T. Toida, T. Maitani: Chondroitin Sulfate Structure Impacts its Immunological Effects on Murine Splenocytes Sensitized with Ovalbumin. *Biochemical J.* 302, 269-278 2004
- 8) 滝山浩、松田りえこ、米谷民雄. 主要アレルギーとアレルギー検知法小児科診 7, 43-49 2004
- 9) 滝山浩、吉岡靖雄、松田りえ子、米谷民雄. 免疫 4 食物アレルギー 「食物アレルギー」最新医学者 最新医学別冊 45-56 2005
- 10) 中尾朱美、真子俊博、藤本喬、滝山浩、米谷民雄 学校給食食品中の特定原材料「卵」の検出に関する研究 *Japanese J. Food. Chem.*, 11, 75-80 2004

2. 学会発表

- 1) 嶋倉邦嘉、仲田寛樹、長島裕二、塩見一雄：甲殻類および軟体動物のイムノブロッティングによるアレルギーの検索、平成 16 年度日本水産学会大会
- 2) 元山かん奈、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄：頭足類トロポミオシンのアレルギー性および cDNA クローニング、平成 16 年度日本水産学会大会
- 3) 佐藤綾子、濱田友貴、田中洋行、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄：バルブアルブミンのアミノ酸配列および含量に基づく魚類血合筋と普通筋のアレルギー性評価、第 6 回日本アレルギー学会春季臨床大会
- 4) 小林征洋、池田 薫、嶋倉邦嘉、石崎松一郎、長島裕二、塩見一雄：アニサキス新規アレルギーの cDNA クローニングおよび大腸菌における発現、第 54 回日本アレルギー学会総会
- 5) 中村 厚ら：還元糖および TNBS 修飾による TM のアレルギー性変化、平成 16 年度日本水産学会春季大会 (2004)。
- 6) A. Nakamura, H. Saeki: Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *International symposium on Fisheries Science and Technology for the academic exchange between Japan and Korea* (2004).
- 7) 小川正、亀山寛子、中西景子、松本弓子、小南優、森山達哉：果物・野菜類中の食物アレルギーの探索と同定、第 58 回日本栄養・食糧学会大会 (仙台, 2004 年 5 月)。
- 8) 小南優、森山達哉、小川正、河田照雄：フルーツアレルギー患者血清 IgE が認識するフルーツアレルギーの単離と同定、第 43 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (滋賀, 2004 年 10 月)。
- 9) 滝山 浩：アレルギーの抗原解析及びその低減化に関する研究、食物アレルギー研究会 (東京, 2004 年 1 月)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの抗原解析・交叉反応性に関する研究

分担研究者 赤澤 晃 国立成育医療センター 総合診療部小児期診療科医長
研究協力者

神谷太郎	国立成育医療センター総合診療部小児期診療科医員
田中和子	同研究所免疫アレルギー研究部アレルギー研究室研究員
松本健治	同研究所免疫アレルギー研究部アレルギー研究室長
青田明子	同第1専門診療部アレルギー科 明石真幸 同第1専門診療部アレルギー科
石井徹仁	同総合診療部小児期診療科 大矢幸弘 同第1専門診療部アレルギー科医長
河原秀俊	同総合診療部小児期診療科 斎藤暁美 同第1専門診療部アレルギー科
須田友子	同第1専門診療部アレルギー科 成田雅美 同第1専門診療部アレルギー科
野村伊知郎	同第1専門診療部アレルギー科 二村昌樹 同第1専門診療部アレルギー科

研究要旨

法定5品目、奨励19品目の原材料表示がはじまったが、さまざまな問題があり解決していかなくてはならない。これまで、分担研究として食物間の交叉反応性について検討をおこない、鶏卵と魚卵、魚卵と魚肉、イモ類の交差抗原性に関して報告し、食物アレルギー患者が自らのアレルギーに対する交差反応性について認識して原材料表示を利用することの必要性を検討してきた。今年度は、簡便な測定法の開発とイクラ、ピーナツに関する交差抗原性について検討した。

A.研究目的

食品間には、その発生学的近縁性からアレルギー蛋白質のアミノ酸配列の相同性が存在する。このため異なる食品間でも交叉反応性が存在している。食物アレルギーのある人が、特定の食品に関してアレルギーがあることがわかりそれを除去するように食生活に気をつけていてもその食品と交叉反応性を有する食品を摂取した場合にアレルギー反応を起こす可能性がある。食品間の交叉反応性を知ることにより交叉反応によるアレルギー反応を防ぐことが可能である。

平成13年に施行された「遺伝子組み換え食品及びアレルギー物質を含む食品に関する表示」に関する法律において表示義務5品目と表示推奨19品目が定められた。これまでの研究で、鶏卵とイクラ、イクラと他の魚卵、魚肉、落花生と他の種実類、ヤマイモとジャガイモ、サツマイモの交叉反応性の症例を検討してきた。本研究では交叉反応性の頻度を明らかにすることで摂取者により安全な表示を提供できることを目的とする。

B.研究方法

交叉反応性の有無の頻度を算出するために各調査項目別に一定数患者から研究実施の説明同意のもとに採血を実施する。各項目の予定数は以下のとおりである。

1. 対象患者数

(1) 鶏卵アレルギー患者

①イクラ IgE 抗体の陽性率の検討

鶏卵白、鶏卵黄 IgE 抗体測定と同時にイクラ IgE 抗体の測定を行う。対象患者数：100名

②イクラとの交叉反応性の検討

鶏卵とイクラ IgE 抗体が共に陽性の場合に、inhibition ELISA 試験で交叉反応性を測定する。対象患者数：20名以上

(2) イクラアレルギー患者

①タラコ、カズノコとの交叉反応性の検討

イクラ IgE 抗体陽性の人々のタラコ、カズノコ IgE 抗体の陽性率を測定し、陽性血清での inhibition ELISA 試験での交叉反応性を測定する。対象患者数：20名以上

②サケとの交叉反応性の検討

イクラ IgE 抗体陽性の人々のサケ IgE 抗体の陽性率を測定し、陽性血清での inhibition ELISA 試験での交叉反応性を測定する。対象患者数：20名以上

(3) 落花生アレルギー患者

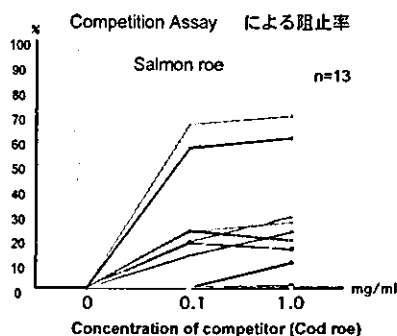
①アーモンド、カシューナッツ特異 IgE 抗体陽性率の検討

落花生 IgE 抗体測定と同時に、アーモンド、カシューナッツ IgE 抗体の測定をおこなう。対象患者数：100名

②アーモンド、カシューナッツとの交差抗原性の検討

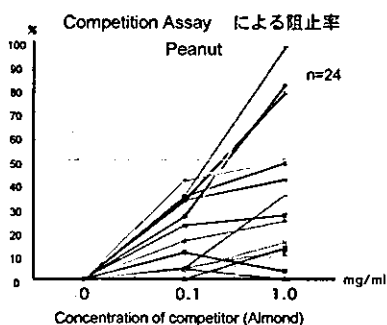
落花生とアーモンドあるいは、落花生とカシュー

イクラ IgE 抗体陽性患者血清でタラコとは 13 例中 2 例で交叉反応性を認めた。



(3) ピーナツ陽性の患者の IgE 抗体交叉抗原性の検討

ピーナツとアーモンドの交叉反応性を検討したところ、17 例中 6 例で交叉反応性を認めた。



D. 考察

鶏卵・イクラ間に交叉反応性は認めず、種を超えての交叉反応性の可能性はないことが示唆された。この結果を踏まえ、鶏卵に対しアレルギーのある患者にそれだけでイクラを制限することの必要性はすくないと考えられる。

一方、イクラ・タラコ間、ピーナツ・アーモンド間において交叉反応性を認める症例がある割合で存在することが分かった。このことは、魚卵間・種子間において交叉反応性が存在し、それぞれの食品にアレルギーがある場合、同種のものを摂取する場合にアレルギー反応がでる可能性を指導する必要がある。また、その可能性も含めた食品の表示を考慮することも必要と考える。

しかしながら今回の検討では、症例数が少なく現段階ではその頻度を十分検討するには足りない。今後はさらに症例数を検討する必要がある。また、今回は IgE 抗体陽性患者のみを対象としており、実際の交叉反応性を示す食品の摂取による症状の有無も検討する必要がある。

E. 結論

交叉抗原性に関しては、IgE 抗体レベルでの阻止試験(competition assay)により頻度を調査したものはない。日本人での交叉反応性の発現頻度を調査することは、適切な食品表示を行う上で重要である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 赤澤 晃、田中和子：食物アレルギーにおける食物抗原の交叉反応性の意義。アレルギーの臨床 24(7): 526-530, 2004.
- 2) 赤澤 晃、神谷太郎：食物アレルギー 食物抗原の交叉抗原性。小児科診療 67(7): 1071-1074, 2004.
- 3) 赤澤 晃：ラテックス・フルーツ症候群。日本内科学会雑誌 93(10): 2149-2152, 2004.
- 4) 赤澤 晃：ラテックスアレルギー。Medico 35(2): 84-88, 2004.
- 5) 赤澤 晃：ラテックスアレルギー。ドクターサロン 48(3): 22-26, 2004.
- 6) 赤澤 晃：アレルギーを識る—ラテックス。鼻アレルギーフロンティア 4(2): 44-50, 2004.
- 7) 赤澤 晃：ラテックスアレルギーの動向と今後の展望。皮膚アレルギーフロンティア 2(3): 163-167, 2004.
- 8) 赤澤 晃：ラテックスアレルギー。Topics in Atopy 3(3): 43, 2004.

2. 学会発表

- 1) 赤司賢一、赤司真幸、成田雅美、須田友子、野村伊知郎、大矢幸弘、赤澤 晃：ラテックス特異的 IgE 抗体陽性例の臨床的検討。第 107 回日本小児科学会学術集会、岡山、2004.
- 2) 小宮明子、川上綾子、鈴木真穂、岡崎優子、関谷 剛、飯倉元保、山田弘和、山口正雄、三崎義堅、赤澤 晃、平井浩一、山本一彦：ラテックスを抗原とするアナフィラキシー：自験例での検討。第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会、前橋、2004.
- 3) 田中和子、松本健治、赤澤 晃、斎藤博久：アレルギー物質を含む食品表示の乳における牛乳、山羊乳、めん羊乳の交差抗原性の検討。第 54 回日本アレルギー学会総会、横浜、2004.
- 4) 明石真幸、小嶋なみ子、大矢幸弘、赤澤 晃：医療機関におけるラテックスアレルギーに対策に関するアンケート調査。第 54 回日本アレルギー学会総会、横浜、2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし