

A. 研究目的

1) 食物アレルギーの誘発量の決定

これまで牛乳・鶏卵アレルギーにおいて症状が誘発される微量の摂取量に関する検討はなされていない。そこで牛乳および、鶏卵アレルギー患者での経口負荷試験の安全性を図る目的で、牛乳あるいは鶏卵アレルギー患者の 95% (95%陽性値) あるいは 90% (90%陽性値) をカバーする閾値を検討した。

2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明

加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明を小麦アレルギー患者に経口負荷試験を行って、その安全性を確認した。

3) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

事例の場面ごとでの対策マニュアルを作成するため、これまで収集した食物アレルギー健康被害事例を解析し、解析に基づいたアンケートを再構成した。

4) アレルギー物質含有食品交換表 (交換表) の作成

アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表 (交換表) の使用方法を検討する目的で、経口負荷試験から求めた推定安全ゾーンを設定し、この値をもとに安全に摂取できるための完全係数について検討した。

B. 研究方法

1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定に関する研究

牛乳経口負荷試験で準備した負荷試験用食品は、牛乳 100 μ l (0.1ml) (乳タンパク質 3,333 μ g) を 200ml のジュースに溶した牛乳微量負荷試験用もの (A と略す) と牛乳 (B と略す) 100ml で、牛乳微量負荷試験は 30 分ごとに、以下の 1-5 の順に増量し初日は終了とした。() 内は相当する乳タンパク質含量を示す。

1. A 0.6ml (乳タンパク質 10 μ g)、
2. A 1.5ml (乳タンパク質 25 μ g)、
3. A 15 ml (乳タンパク質 250 μ g)、
4. B 0.05ml (乳タンパク質 1,666.5 μ g)、
5. B 0.1ml (乳タンパク質 3,333 μ g)

これら微量負荷試験が陰性であった場合に、牛乳普通量負荷試験を以下の 1-4 の順に 30 分ごとに実施した。

1. B 0.1ml (乳タンパク質 3,333 μ g)、

2. B 1ml (乳タンパク質 33,330 μ g)、
3. B 10ml (乳タンパク質 33,300 μ g=333mg)
4. B 89ml (乳タンパク質 2,963.7mg)

次に、加熱 (90°C、15 分) 鶏卵経口負荷試験で準備した食品は以下に示す A と B 液である。90°C15 分加熱全卵 (卵タンパク質 875mg) を 100ml のジュースに溶かし、そのうちの 0.1ml (卵タンパク 875 μ g) を 50ml のジュースに溶かした A 液と、90°C15 分加熱全卵 (卵タンパク質 875mg) を 50ml のジュースに溶かした B 液で、加熱 (90°C 15 分) 微量負荷試験は 30 分ごとに以下の 1-5 の順に増量し初日は終了とした。() 内は相当する乳タンパク質含量を示す。

- 1、A 0.1 ml (卵タンパク質 1.75 μ g)、
- 2、A 1.0 ml (卵タンパク質 17.5 μ g)、
- 3、A 10 ml (卵タンパク質 175 μ g)、
- 4、A 30 ml (卵タンパク質 525 μ g=0.525mg)

これら微量負荷試験が陰性であった場合に、加熱 (90°C15 分) 鶏卵負荷試験を以下の 1-4 の順に 30 分ごとに実施した (普通量経口負荷試験)。

- 1、B 0.1 ml (卵タンパク 1,750 μ g=1.75mg)、
- 2、B 1.0 ml (卵タンパク 17,500 μ g=17.5mg)、
- 3、B 10 ml (卵タンパク 175,000 μ g=175mg)、
- 4、B 38.9 ml (卵タンパク 680,750 μ g = 680.75mg)

2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明

小麦アレルギーを疑う患児 45 名 (男児 29 名、女児 16 名、平均年齢 3.51 歳) に対し、1 日目として加水分解小麦 1g を漸増法で経口負荷試験を施行し、2 日目は加水分解小麦が陰性であった患者に対し、うどん (50~100g) を用いて小麦経口負荷試験を施行した。

3) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に関する研究

以前我々は食物アレルギーを有する患者の家族を対象に食物アレルギー事例アンケートを取り、それぞれの事例を場面ごとに検討した。その結果、主な発生場所は自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの 5 つのグループに分けられ、その原因は各グループに共通する部分が多いと感じられた。今回は各場面での共通した原因に関する詳細な情報を拾い出すためのアンケートを作成

した。

4) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成と安全係数の検討

日本全国で販売されている約 100 種類の加工食品の卵、牛乳、小麦、大豆、落花生のアレルゲンタンパク含有量を FASTKIT エライザ ver. II (日本ハム) で測定し、そのうち分類できる食品群ごとにわけ、表に示す 80 種類を分類し、表を作成した (表 1、2)。内訳はクッキー・ビスケットが 12 種類、卵ボーロが 9 種類、食パンが 20 種類、菓子パン類が 24 種類、ハム・ソーセージ類が 15 種類である。

牛乳および鶏卵経口負荷試験の結果から推定安全量 (積算) を求め、この値から推定安全ゾーンを決めた。この推定安全ゾーンを参考にして、1/1,000 から 1/10 の安全係数をかけたレベルの加工食品を患者に摂取してもらいその安全性を検討した。

C. 研究結果

1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定に関する研究

牛乳経口負荷試験の結果と牛乳特異的 IgE の結果を図 1 に示す。IgE 値がクラス 2 から負荷試験陽性者が出発し、クラス 3 以上になるにつれ陽性率が高くなった。

次に、これら牛乳および加熱鶏卵経口負荷試験陽性者を対象にそれぞれの 90% および 95% 陽性になる値について検討した (図 2)。牛乳陽性患者 72 名を対象にして、これらの患者の 90% をカバーする値 (90% 陽性値) や 95% をカバーする値 (95% 陽性値) を求めた結果、それぞれ、1951.5 μ g (牛乳 0.06mL)、285 μ g (牛乳 0.009mL) であった。

加熱鶏卵陽性患者 95 名を対象に求めた 90%、95% 陽性値はそれぞれ 719.3 μ g (1/1250 個)、194.5 μ g (1/4500 個) であった (図 3)。最小誘発牛乳タンパク質量は 10 μ g (0.0003mL)、加熱鶏卵タンパク質量は 1.75 μ g (1/500,000 個) であった。牛乳経口負荷試験では 0.1ml 未満の投与で約 14% の患者が陽性となった。加熱鶏卵 (90°C、15 分) では 1/500 個未満で約 20% の患者が陽性となった。

2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明

加水分解小麦の摂取で陽性だった患児は、男児

9 名、女児 3 名で、加水分解小麦陰性、小麦負荷試験陽性の患児は男児 4 名、女児 9 名で、この結果から、小麦アレルギーの患児 25 名のうち加水分解小麦陽性患児は 12 名 (48%) であった。

3) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に関する研究

これまで食物アレルギーを有する患者の家族を対象に事例アンケートの結果解析に基づき、場面ごとにアンケートを再構成した。

4) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成と安全係数の検討

牛乳および加熱鶏卵による経口負荷試験の結果から推定安全量を求め、この値から交換表を基に推定安全ゾーンを決定した。この安全ゾーンに 1/1,000 から 1/10 の安全係数をかけたレベルの加工食品の摂取における症状誘発率について検討した結果 (表 3、4)、牛乳は安全係数 1/10 で 25%、1/100 で 0%、1/1000 で 0%、加熱卵は 1/100 では 28%、1/1000 で 0%、まとめて検討した結果 1/10 では 25%、1/100 では 18% で誘発症状がみられた (図 4)。

D. 考察

1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定に関する研究

牛乳や鶏卵アレルギー患者の 90% をカバーする値 (90% 陽性値) や 95% をカバーする値 (95% 陽性値) をみると、ほとんどの患者が 10 μ g を超える量で症状が惹起されることが判明した。しかし、ごく一部の患者は非常に微量でも症状が惹起され、最小誘発量を決定することには限界があることも判明した。

牛乳経口負荷試験では 0.1ml 未満の投与で約 14% の患者が陽性となった。加熱鶏卵 (90°C、15 分) では 1/500 個未満で約 20% の患者が陽性となった。この結果から、経口負荷試験の安全性を確保するためには微量からの負荷試験を行った方がよい患者が比較的多いことが示された。今後、微量経口負荷試験で陽性となる患者の特徴を明らかにする必要がある。また、経口免疫療法では、負荷試験が陽性となる閾値を明らかにしないと、治療の開始量を定めることができない。このような閾値を求める経口負荷試験では、初回投与量として微量から開始する必要がある。

2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明

加水分解小麦負荷試験の結果、小麦アレルギーの患児のうち 48%が陽性であったことから、加水分解小麦のアレルゲン性は残存していることが判明した。小麦アレルギー患者が加水分解小麦を摂取できるかどうかは経口負荷試験が必要であることが判明した。

3) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に関する研究

これまで食物アレルギーを有する患者の家族を対象に事例アンケートの結果解析に基づき、場面ごとにアンケートを再構成した。今後は電子媒体などを利用し、患者に自由に記入してもらい再度回収・解析し、各場面ごとでの対策マニュアルを作成する。

4) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成と安全係数の検討

一定の安全係数をかければ、牛乳アレルギーや鶏卵アレルギー患者でも安全に食べることができるアレルギー物質含有加工食品が見つかることが証明された。その際、安全に摂取できる加工食品を見つけつる際、アレルギー物質含有量に基づく食品交換表は有用である。また、この信頼性が高い交換表の作成は、これまで世界をリードして日本で開発されたアレルギー物質の検知法(公定法)によるところが大きい。

E. 結論

牛乳や鶏卵アレルギー患者のほとんどの患者は $10\mu\text{g}$ を超える量で症状が惹起されることが判明した。しかし、ごく一部の患者は $10\mu\text{g}$ 以下の非常に微量でも症状が惹起され、最小誘発量を決定することには限界があることも判明した。

加水分解小麦のアレルゲン性は残存していることが判明した。

新たに、食物アレルギー事例アンケートを再構成した。

閾値を求めることができる経口負荷試験の結果とアレルギー物質含有量に基づく食品交換表をリンクすることによって、牛乳や鶏卵に対してアレルギーがある患者でも安全に食べることができる加工食品を見つけることが可能であることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Benhamou AH, Caubet JC, Eigenmann PA, Nowak-Węgrzyn A, Marcos CP, Reche M, Urisu A. State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy*. 2010;65:283-289.
- 2) Kondo Y, Urisu A. Oral allergy syndrome. *Allergol Int*. 2009; 58:485-491.
- 3) Kondo Y, Nakajima Y, Komatsubara R, Kato M, Hirata N, Matuyama H, Kakami M, Tsuge I, Ohya Y, Urisu A. Short-term efficacy of tacrolimus ointment and impact on quality of life. *Pediatr Int*. 2009 ;51:385-389.
- 4) Kondo Y, Ahn J, Komatsubara R, Terada A, Yasuda T, Tsuge I, Urisu A. Comparison of allergenic properties of salmon (*Oncorhynchus nerka*) between landlocked and anadromous species. *Allergol Int*. 2009;58:295-299.
- 5) Ito K, Urisu A. Diagnosis of food allergy based on oral food challenge test. *Allergol Int* 2009;58: 467-474.

2. 学会発表

- 1) 安 在根、近藤康人、柘植郁哉、成瀬徳彦、鈴木聖子、小松原亮、安藤仁志、安田俊隆、宇理須厚雄、ウニアレルゲン解析の試み. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 平成 21 年 6 月 5 日 6 日.
- 2) 宇理須厚雄, 食物アレルギー経口負荷試験の標準化. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 平成 21 年 6 月 5 日 6 日.
- 3) 安藤仁志、成瀬徳彦、安 在根、小松原亮、鈴木聖子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、鶏卵アレルギーにおける Ovomucoïd 特異的 IgE 抗体測定の有用性. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 平成 21 年 6 月 5 日 6 日.
- 4) 鈴木聖子、成瀬徳彦、小松原亮、平田典子、宇理須厚雄、安 在根、湯川牧子、近藤康人、

柘植郁哉, アレルギー物質含有量に基づいた加工食品交換表による食品指導の試み. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 平成 21 年 6 月 5 日 6 日.

- 5) 鈴木聖子、成瀬徳彦、小松原亮、平田典子、安藤仁志、宇理須厚雄、安 在根、湯川牧子、近藤康人、柘植郁哉、森下直樹、松本貴之、アレルギー物質含有量に基づいた加工食品交換表による食品指導の試み. 第 59 回, 日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 平成 21 年 10 月 29 日-31 日.
- 6) 小松原亮、成瀬徳彦、平田典子、鈴木聖子、安藤仁志、宇理須厚雄、安 在根、湯川牧子、近藤康人、柘植郁哉, 牛乳アレルギー児に対する牛乳経口負荷試験における最小陽性誘発量の検討. 第 46 回, 日本小児アレルギー学会, 福岡, 平成 21 年 12 月 5 日、6 日.
- 7) 鈴木聖子、成瀬徳彦、小松原亮、平田典子、安藤仁志、宇理須厚雄、安 在根、湯川牧子、近藤康人、柘植郁哉、も森下直樹、松本貴之、アレルギー物質含有量に基づいた加工食品交換表による食品指導の試み. 第 46 回, 日本小児アレルギー学会, 福岡, 平成 21 年 12 月 5 日、6 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 アレルギー物質鶏卵含有濃度食品交換表

1個あたり

レベル	パン	クッキーなど焼菓子	ハム、ウインナー
8	メロンパン類		
7	ほとんどの菓子パン	ほとんどの菓子	こ〇は●●ロースハム
6	レーズンバター ●●●	ムーン●●●クッキー	こ〇は〇〇ベーコン
5		プチ●●●クッキー か〇ちゃ●●●、にんじん●●●	北海道●●●クリー〇〇チュー
4	超〇醇〇ーズン	国産卵黄●●●●ぼうろ おにぎり〇〇〇い	
3	チョコ●●●ス〇ック		
2			森●●りロースハム
1		うすしお〇〇ソ〇〇せんべい プチ●●●ビ〇ケット	
0	超〇 ●の〇ぐみ 食パン他多数あり	ハイレ●● ビ〇〇	こ〇は●●ロース〇ハム ●●●リンクス、●●●リンクス

表2 アレルギー物質牛乳含有濃度食品交換表

1個あたり

レベル	mg/個・枚	パン	クッキーなど焼菓子	ハム、ウインナー
8	≥1,000	メロンパン類		
7	<1,000	ほとんどのパン 菓子パン		こ〇は●●ロースハム
6	<100	●醇 北〇道●●●ブ レッド 超〇醇		こ〇は〇〇ベーコン ●●●リン〇ス ●●●リン〇ス
5	<10	カ〇●パン	プチ●●●クッキー は〇〇ての●●● 他	切れ〇〇り●●●ウイン ナー
4	<1.0	超〇 ●のめぐ み	プ〇ク●●●ビスケット は〇〇ての●●● カルシウムぼうろ	
3	<0.1		ムーン●●●クッキー プチ●●●クッキー	
2	<0.01		お〇〇●せんべい	森●●りロースハム
1	<0.001		う〇しお●●●ソフ〇せんべい	
0	感度以下		か〇ちゃ●●● に〇じん●●●	これは●●ロース〇ハム ●●●プレ〇〇ムベーコン

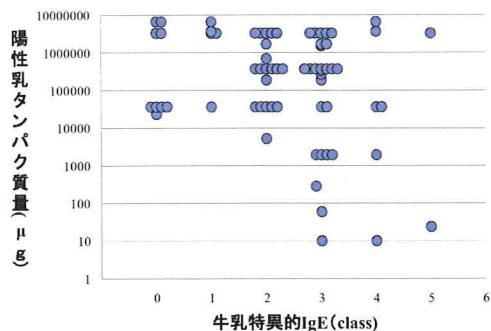


図1 陽性乳タンパク質量と牛乳特異的IgEの関係

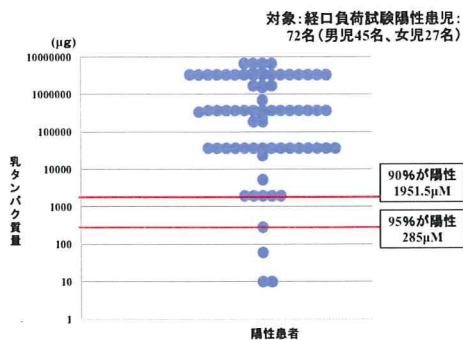


図2 牛乳負荷試験陽性患者の陽性乳タンパク質量

対象: 加熱卵経口負荷試験陽性例: 152名中95名 (男児60名、女児35名、平均年齢4.94歳)

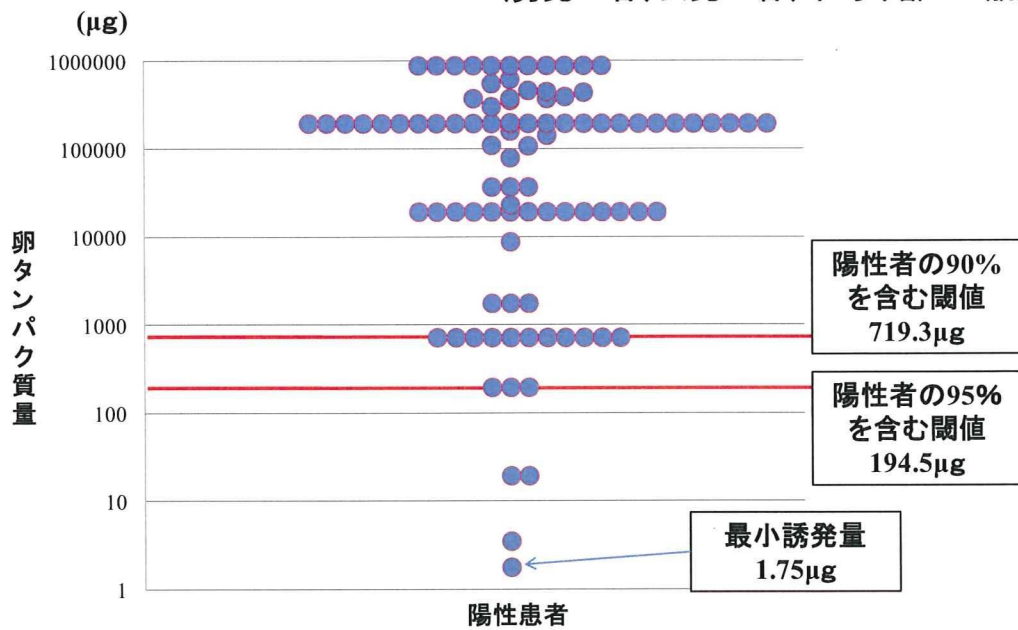


図3 加熱鶏卵負荷試験陽性患者の陽性卵タンパク質量

表3 牛乳負荷試験から求めた安全推定量
 に対して行った加工食品試食の結果

症例	年齢	性	推定 安全量	推定 乳蛋白 含有量	推定 安全 ゾーン	試食 食品 レベル	乳蛋白 含有量 1個相当	症状
①	7歳	F	1.1ml	37mg	L6	L5	2.2mg	-
②	8歳	M	1.1ml	37mg	L6	L5	2.2mg	-
②	8歳	M	1.1ml	37mg	L6	L5	4.4mg	口内 違和感
③	5歳	M	1.1ml	37mg	L6	L5	1.9mg	-
④	3歳	M	1.1ml	37mg	L6	L4	0.5mg	-
⑤	3歳	M	1.1ml	37mg	L6	L4	0.5mg	-
⑥	6歳	M	11.1ml	370mg	L7	L5	4.2mg	-
⑥	6歳	M	11.1ml	370mg	L7	L5	8.4mg	-
⑦	7歳	F	11.1ml	370mg	L7	L4	0.5mg	-
⑥	6歳	M	11.1ml	370mg	L7	L4	0.5mg	-

表4 加熱鶏卵負荷試験から求めた安全推定量
 に対して行った加工食品試食の結果

症例	年齢	推定 安全量	推定 卵蛋白 含有量	推定 安全 ゾーン	試食 食品 レベル	試食鶏 卵蛋白 含有量	症状
①	2歳	11.1ml	1110mg	L8	L6	45mg	顔面 発疹
②	7歳	0.1ml	10mg	L6	L4	0.4mg	-
③	2歳	11.1ml	1100mg	L8	L6	24mg	-
④	4歳	1.1ml	110mg	L7	L5	1mg	-
⑩	5歳	0.1ml	10mg	L6	L4	0.2mg	-
⑩	5歳	0.1ml	10mg	L6	L4	0.4mg	口内 違和感
⑫	8歳	1.1ml	110mg	L7	L5	1mg	-
⑤	8歳	62ml	6200mg	L8	L5	5.5mg	-
⑥	4歳	1.1ml	110mg	L7	L4	0.4mg	-
⑦	1歳	11.1ml	1100mg	L8	L5	4.2mg	-
⑧	2歳	1.1ml	110mg	L7	L4	0.6mg	-
⑨	10歳	1.1ml	110mg	L7	L4	0.4mg	-
⑩	5歳	1.1ml	110mg	L7	L4	0.4mg	-
③	2歳	11.1ml	1100mg	L8	L5	8mg	-
⑪	5歳	0.1ml	10ml	L6	L3	0.09mg	-
⑫	8歳	1.1ml	110mg	L7	L4	0.2mg	-

乳を含む加工食品群

安全係数	陽性／例数
10分の1	1 / 4
100分の1	0 / 4
1000分の1	0 / 2

卵を含む加工食品群

安全係数	陽性／例数
100分の1	2 / 7
1000分の1	0 / 9

上記まとめたの検討

安全係数	陰性／例数	陽性率
10分の1	1 / 4	25%
100分の1	2 / 11	18%
1000分の1	0 / 11	0%

図4 試食結果のまとめ

食物アレルギー分析の臨床診断への応用に関する研究

分担研究者 伊藤 浩明（あいち小児保健医療総合センター アレルギー科）
研究協力者
漢人 直之 あいち小児保健医療総合センター アレルギー科
武田 将典 あいち小児保健医療総合センター アレルギー科

研究要旨

特異的 IgE 抗体検査による食物アレルギーの診断精度向上を目的として、小麦及び大豆をテーマとした検討を行った。ImmunoCAP の米ディスクを用いた吸収試験によって、血清から米を認識する抗体を 90%以上吸収した後に小麦 IgE 抗体を測定すると、小麦アレルギー患者 10 例では抗体価の吸収が平均 19.2%に留まったのに対し、小麦感作のみで小麦アレルギーの既往がない患者血清では 100%吸収が得られた。つまり、小麦感作のみの患者は米と強く交差反応する成分を認識する IgE 抗体を持っており、それを簡便な臨床検査で検出することが可能であった。次に、大豆アレルギーの血清診断を目指して、主要な貯蔵蛋白である Gly m5、Gly m6 特異的 IgE 抗体を測定した。いずれも大豆アレルギー患者 22 例全員で陽性であり、抗体価は大豆特異的 IgE と強く相関したが、大豆 IgE 抗体測定以上の診断精度は得られなかった。

A. 研究目的

食物アレルギーの診断に、アレルゲン特異的 IgE 抗体測定が広く用いられている。この検査法は診断感度が比較的良好であるものの、検査が陽性であっても摂取後のアレルギー症状を認めない患者が多く存在する、すなわち診断特異性に問題がある。本研究は、特異的 IgE 抗体検査をより有効に臨床応用するための評価法や、アレルゲン成分（コンポーネント）特異的 IgE 抗体検査を開発することにより、食物アレルギーの診断精度を向上させることを目的とした。

第 1 のテーマとして、即時型小麦アレルギーに対する、小麦特異的 IgE 抗体検査の診断精度向上を目指した評価法を検討した。

即時型小麦アレルギー患者は、臨床的に米と交差反応することが極めて稀で、小麦特異的 IgE 抗体価は米特異的 IgE 抗体価よりも高値をとる傾向がある。一方小麦 IgE 抗体陽性であっても小麦アレルギー症状を認めない患者（以下、小麦感作群）では、小麦と米の IgE 抗体価が近似していることが多い。このことから、小麦アレルギー患者の特異的 IgE 抗体は、小麦に特有のアレルゲン成分又はエピトープを認識し、小麦感作群の IgE 抗体は米と交差抗原性を持つ部分を認識していることが仮定される。

この仮説を検証するために、小麦特異的 IgE 抗体測定に対して、臨床現場の範囲で実施可能な方法で米アレルゲンによる吸収試験を試みた。

第 2 のテーマとして、大豆のアレルゲンコンポーネント特異的 IgE 抗体検査を評価して、より診断精度の高い検査法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

テーマ 1 小麦アレルギー

小麦アレルギー患者、小麦感作群、及び小麦アレルギーの既往があるが耐性獲得した患者（以下、小麦耐性群）の血清を用いて、ImmunoCAP を用いた吸収試験の予備的な検討を行った。米抗原の吸収には、米 ImmunoCAP からアレルゲンを固相化したディスクだけを取り出して、患者血清とインキュベーションすることとした（ImmunoCAP 吸収試験）。

具体的には、患者血清を ImmunoCAP 希釈液で 5 倍程度に希釈し、米 IgE 抗体価が 50UA/ml 以下の血清 30ml あたり、米ディスクを 1 個相当入れて室温で overnight 振倒した後に、ディスクを取り除いた血清を用いて小麦 ImmunoCAP を測定した。米アレルゲンが吸収されたことを確認するために、同じ検体で米 ImmunoCAP も測定した。同様に

希釈して吸収操作を行わない血清の IgE 抗体価と比較して、吸収率を算出した。

吸収率は、特異的 IgE 抗体価(UA/ml)を用いて (1-吸収後 IgE/吸収前 IgE) x100 % として算出した。測定値<0.35は0として扱った。

テーマ2 大豆アレルゲン

対象は、国立病院機構相模原病院及びあいち小児保健医療総合センターにおいて、主として大豆経口負荷試験で確定診断された大豆アレルギー患者33名と、アレルギー症状を認めない大豆感作群41名の血清を用いた。大豆アレルギーの重症度を軽症(局所的な皮膚又は粘膜症状のみ)と重症(全身性の皮膚症状・呼吸器/消化器症状)に区分した(表1)。

大豆の代表的な貯蔵蛋白アレルゲンである Gly m5 (b-conglycinin, 7S globulin)、Gly m6 (glycinin, 11S globulin)を単離精製して ImmunoCAP を作成し(Phadia KK., Uppsala, Sweden)、臨床で使用されている大豆粗抗原(f14)と同時に特異的 IgE 抗体価を測定した。

表1. 大豆アレルギー検討対象者の内訳

Patient Characteristics	Symptomatic		Non-symptomatic
	n=33		
Gender	Male/Female 20/13		32/9
Age	median(range) years 2.3 (0.7-16.3)		2.0 (0.6-10.3)
Total IgE level	median(range) IU/L 1282 (29-22300)		900 (15-15360)
IgE to soy extract (f14)	median (range) kU/L 15.5 (0.36-92)		3.6 (0.54-77.3)
Diagnosis of soy allergy	Oral food challenge History		29 22 4 19
Graded symptoms	Severe/mild*		14/19
Symptoms after challenge or intake (severe/mild)	Skin Mucosal Respiratory Gastrointestinal Anaphylaxis		11/19 5/3 12/0 3/0 3/0

*Severe: Skin/Respiratory/GI symptoms
Mild: Isolated skin and/or mucosal symptoms

C. 研究結果

テーマ1

この方法による米 IgE 抗体の吸収率は、米 IgE 抗体価 0.7UA/ml 以上の血清 12 検体で平均 91.5 ± 18.7% (5倍希釈後の抗体価が 0.59→0.39であった1検体を除くと 96.7 ± 4.7%) であり、7検体で100%の吸収率(吸収後の測定値が<0.35UA/ml)が確認された(表2)。

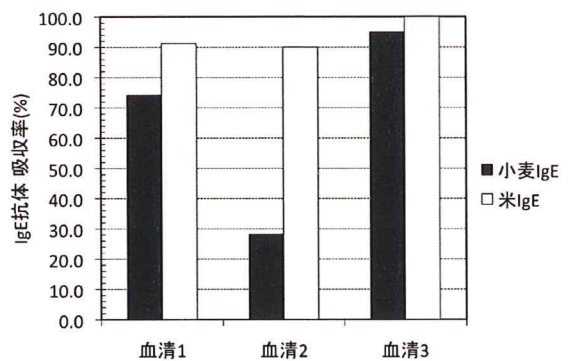
小麦アレルギー患者10例では、小麦 IgE は米ディスクによって平均 19.2 ± 6.7%吸収された。一方、小麦アレルギーの既往はあるが耐性獲得した血清(血清1、2)では、吸収率 74.1%及び 28.2%、小麦アレルギーの既往がない血清3では100%の

吸収が確認された(図1)。

表2. 米キャップによる吸収試験結果一覧

No	特異的IgE (UA/ml)			米(希釈)		吸収率 (%)	小麦(希釈)		吸収率 (%)	米/小麦 IgE比
	小麦	ω5	米	pre	post		pre	post		
血清1	46.6	0.82	42.4	14.8	1.3	91.2	16.9	4.37	74.1	91.0
血清2	32	0.73	36.3	9.21	0.92	90.0	8.88	6.38	28.2	113.4
血清3	30.1	0.38	31.2	7.47	<0.35	100.0	6.84	<0.35	100.0	103.7
WA1	100	65.2	31.7	10.8	1.25	88.4	77	57.2	25.7	31.7
WA2	87.2	1.49	0.35	0.34	<0.35	100.0	19.8	17.2	13.1	0.4
WA3	100	3.04	1.2	0.59	0.39	33.9	23.3	19.6	15.9	1.2
WA4	49.5	0.45	1.45	0.56	<0.35	100.0	12.9	10.8	16.3	2.9
WA5	100	15.8	7.24	2.39	<0.35	100.0	54.8	50.1	8.6	7.2
WA6	63	15.4	25.1	8.22	0.45	94.5	17.4	13.2	24.1	39.8
WA7	35	19.4	2.44	0.49	<0.35	100.0	7.76	6.41	17.4	7.0
WA8	20.4	7.54	0.6	0.34	<0.35	100.0	4.75	3.45	27.4	2.9
WA9	100	72.1	14.2	4.42	<0.35	100.0	67.5	57.1	15.4	14.2
WA10	87.7	7.41	10.6	2.49	<0.35	100.0	27.7	19.9	28.2	12.1

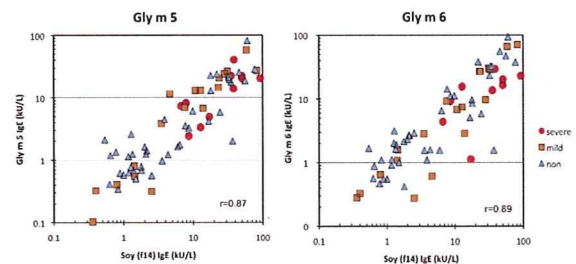
図1 米ディスクによる吸収試験結果



テーマ2

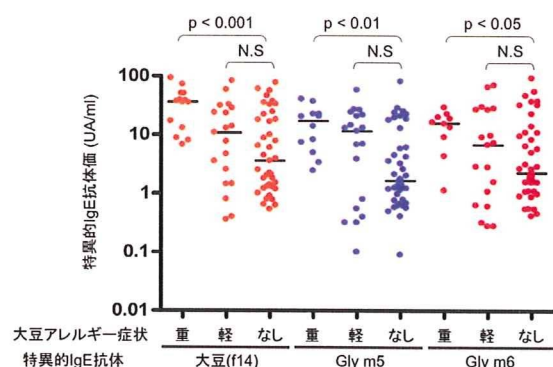
Gly m5 及び Gly m6 特異的 IgE 抗体は、大豆アレルギー患者全例で検出され、いずれも大豆(f14)特異的 IgE 抗体価と強い相関関係を認めた(図2)。

図2 Gly m5/m6 特異的 IgE 抗体価と大豆 IgE の相関



大豆アレルギー群と大豆感作群の間には、大豆及び Gly m5 特異的 IgE には有意な抗体価の差を認めた(p<0.01)が、Gly m6 では抗体価の差を検出できなかった。重症者はいずれも大豆感作群よりも有意に高い抗体価を示したが、重症者と軽症者の抗体価は大豆のみで有意な差(p<0.01)を認めた(図3)。

図3 大豆アレルギーの重症度と Gly m5/m6 及び大豆 IgE 抗体価



D. 考察

食物アレルギーの診断として、食物経口負荷試験を含めて摂取時の誘発症状を確認することが必須であることは言うまでもない。しかし、食物経口負荷試験はアナフィラキシーを誘発するリスクが不可避であり、現代の医療体制の諸事情も含めて、患者のニーズを満たすだけ普及することは困難である。従って、特異的 IgE 抗体価の評価法を検討して、臨床検査による診断精度を向上させることは非常に重要な課題といえる。

そのポイントは、アレルゲンの交差抗原性と、食品のアレルゲン分析の見解に基づいて、実際の臨床症状に関与しているアレルゲン成分を検出することである。その手段として、患者血清から臨床症状を引き起こさないアレルゲン成分を吸収した後に特異的 IgE 抗体を測定する方法と、食品中の主要なアレルゲンコンポーネントを選択して検査に用いることが考えられる。後者の代表は、小麦アレルギーの診断における ω -5 グリアジン特異的 IgE 抗体測定であるが、この検査法だけでは診断感度が低下するという欠点が避けられないことがわかっている。

本研究では、小麦アレルゲンを対象として、臨床現場でも簡便な手段として利用できる ImmunoCAP を用いた吸収試験に関する予備的な検討を行った。ImmunoCAP のディスクには、理論上 40 mL の血清に含まれる特異抗体を吸収するのに十分な抗原が固相化されている。今回の結果では、米 IgE 抗体価がクラス 4 以下の血清 30 mL あたり 1 枚の米ディスクを用いた吸収試験で、血清中の米 IgE 抗体を十分吸収できることが確認された。

小麦アレルギー患者血清では、米による吸収で

小麦特異的 IgE 抗体価の低下率は 20% 以下であったのに対し、小麦アレルギーの既往がない患者血清 1 例では 100% の吸収が確認された。今後は、症例数をさらに増やして小麦アレルギーの既往がない小麦感作血清や、小麦アレルギーの耐性獲得後の血清を検討する予定である。

大豆アレルギーは、特異的 IgE 抗体価と臨床診断の相関が悪く、単離精製した大豆コンポーネントを用いた特異的 IgE 抗体検査で診断精度の向上を目指した。その結果、代表的な大豆の貯蔵蛋白である Gly m5/m6 が主要なアレルゲン成分であることは確認できたが、残念ながら診断精度の向上には結びつかなかった。その理由の一つとして、今回精製したコンポーネントには、アレルギー症状を引き起こさない IgE 抗体エピトープとなる糖鎖構造 (Cross-reacting carbohydrate determinant, CCD) が含まれている可能性が考えられる。CCD の関与を回避する一つの手段はリコンビナント蛋白の利用であるが、Gly m6 は 5 つのサブユニットで四次構造をとる蛋白であり、我々のプレリミナリーな検討では、それぞれのリコンビナント蛋白を用いると IgE 抗体の検出率が低下してしまう。

この場合でも、CCD を認識する抗体成分を吸収した血清を用いて、大豆又はそのコンポーネントに対する抗体価を測定することで、診断精度の向上が図れる可能性があり、来年度以降の検討課題としたい。

さらに、大豆の Gly m5 と Gly m6 と、それに相当するピーナッツ主要アレルゲン Ara h1 及び Ara h2/h3 との関連に着目して、これら豆類アレルゲンの診断精度向上も検討していきたい。

E. 結論

ImmunoCAP を用いた吸収試験は簡便で安定したデータが得られ、各種の臨床応用が可能であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 佐合真紀、浅野みどり、伊藤浩明、二村昌樹、杉浦太一 食物アレルギー児の母親の食生活管理の現状と負担の関係. 日本小児難治喘息・アレ

- ルギー疾患学会誌 7(1), 21-27, 2009.
- 2) Komei Ito, Atsuo Urisu. Diagnosis of food allergy based on oral food challenge test. Allergology International 58, 467-474, 2009.
 - 3) 二村昌樹、伊藤浩明、有田昌彦、宇理須厚. アレルギー専門医による食物経口負荷試験の実施状況. 日本小児アレルギー学会誌 23(3), 279-286, 2009.
 - 4) 伊藤浩明. 食物アレルギー診療のエンドポイント. アレルギー 58(12), 1557-1567, 2009.
 - 5) 伊藤浩明. 血中抗原特異的 IgE 抗体測定の実状と今後の課題. 日本小児アレルギー学会 24(1), 9-16, 2010.

2. 学会発表

- 1) 大野敦子、尾辻健太、平山美香、漢人直之、伊藤浩明. 当科のエピペン処方外来のまとめ. 第 45 回中部日本小児科学会. 名古屋, 2009, 8 月.
- 2) 伊藤浩明、漢人直之、平山美香、尾辻健太、二村昌樹、坂本龍雄. 遷延する重症牛乳アレルギー児に対する経口免疫療法の試み. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 秋田, 2009, 10 月.
- 3) 漢人直之、二村昌樹、尾辻健太、平山美香、伊藤浩明. 食物アレルギー児の成長発育に関するアンケート調査. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 秋田, 2009, 10 月.
- 4) 尾辻健太、平山美香、二村昌樹、伊藤浩明. 当院におけるピーナッツ・ナッツ類経口負荷試験の検討. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 秋田, 2009, 10 月.
- 5) 大野敦子、尾辻健太、平山美香、漢人直之、伊藤浩明. 食物経口負荷試験でアドレナリン筋肉注射を使用した 4 症例. 第 247 回日本小児科学会東海地方会. 岐阜, 2009, 11 月.
- 6) 尾辻健太、平山美香、二村昌樹、伊藤浩明. 当院における魚、大豆、甲殻類、ゴマ、ソバ、肉、果物などの経口負荷試験に関する検討. 第 46 回日本小児アレルギー学会. 福岡, 2009, 12 月.
- 7) 伊藤浩明. 血中抗原特異的 IgE 抗体測定の実状と今後の課題. 第 46 回日本小児アレルギー学会シンポジウム. 福岡, 2009, 12 月.
- 8) 伊藤浩明. 食物負荷試験陽性例の判断基準とその後の指導方法. 第 10 回食物アレルギー研究会. 東京, 2010, 2 月.

- 9) Otsuji K, Hirayama M, Kando N, Ito K, Muto T, Sakamoto T. Introduction of allergenic food after positive oral food challenge test. AAAAI 2010, New Orleans, 2010, 2 月.
- 10) Ito K, Ebisawa M, Sato S, Sjolander S, Borres M. Specific IgE to Gly m 5 and Gly m 6 in children with soybean allergy in Japan. AAAAI 2010, New Orleans, 2010, 2 月.
- 11) Sjolander S, Bernhardsson F, Brostedt P, Borres M, Tanaka A, Ito K, Ebisawa M, Utsumi S, Poorafshar M. High IgE Reactivity to subunit G5 from the soybean legumin allergen Gly m 6 in sera from soy allergic Japanese children. AAAAI 2010, New Orleans, 2010, 2 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造およびクロアワビに見 いだされた新規アレルゲンの精製・同定

研究分担者 塩見 一雄 東京海洋大学食品生産科学科
研究協力者 石崎 松一郎 東京海洋大学食品生産科学科

研究要旨

甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造：3 種甲殻類（ブラックタイガー、クルマエビおよびズワイガニ）の SCP をコードする全長 cDNA をクローニングし、塩基配列解析により全アミノ酸配列（いずれも 192 残基）を決定した。ブラックタイガーとクルマエビの SCP はお互いに 96.3% と高い配列相同性を示した。また、ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP が α 鎖と β 鎖より成るか不明であるが、コウライエビ SCP の α 鎖とは 91-94%、 β 鎖とは約 80% の相同性を示し、 α 鎖と非常に類似していた。ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP はザリガニ類 SCP とは約 80%、ズワイガニ SCP とは約 87% の相同性を、ズワイガニ SCP は他の甲殻類 SCP と 85-90% の相同性を示すというように、各種甲殻類の SCP はお互いに類似していた。一方、甲殻類と軟体動物（貝類）の SCP との間の相同性はわずか 10-21% で、非常に低かった。クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定：クロアワビに検出された 100 kDa の新規アレルゲンを、塩溶性タンパク質画分から硫酸塩析（10-20% 飽和）およびヒドロキシアパタイト HPLC により精製し、部分アミノ酸配列分析によりパラミオシンであることを明らかにした。患者血清を用いた ELISA では、患者 18 人中 16 人がクロアワビトロポミオシンに反応し、またトロポミオシンに反応した患者はすべてクロアワビパラミオシンにも反応した。イムノブロッティングにより、IgE 陽性反応を示すパラミオシンは軟体動物にかなり広く分布すると推定された。さらに、阻害イムノブロッティングおよび阻害 ELISA により、パラミオシンはトロポミオシンと抗原交差性を示すという非常に興味深い事実が判明した。

A. 研究目的

甲殻類および軟体動物の主要アレルゲンは共通してトロポミオシンであることが知られている。しかし近年、甲殻類の新しいアレルゲンとして、アルギニンキナーゼ、sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) およびミオシン軽鎖が次々に同定された。このうち SCP は筆者らが見いだしたアレルゲンであるが、イムノブロッティングおよび阻害イムノブロッティングの結果から、エビ類（とくにクルマエビ類）の SCP の IgE 反応性は強くかつお互いに抗原交差性を示すが、カニ類および軟体動物の SCP の IgE 反応

性は陰性または非常に弱いと考えられた。本研究では、SCP の IgE 反応性を分子レベルで理解するための基礎情報として、3 種甲殻類（ブラックタイガー、クルマエビ、ズワイガニ）の SCP の一次構造を cDNA クローニング法により解析した。一方、軟体動物のアレルゲンとしてはトロポミオシン以外には報告例がない。しかし、筆者らの予備的なイムノブロッティング実験において、クロアワビに 100 kDa の新規アレルゲンの存在が認められた。そこで本研究では、クロアワビから 100 kDa アレルゲンを精製して同定すること、100 kDa アレルゲンの性状や軟体動物における分布を明ら

かにすることも目的とした。

B. 研究方法

1) 甲殻類 SCP の一次構造

cDNA ライブラリーの作製：生きているブラックタイガーおよびクルマエビから尾肉を、生きているズワイガニから脚肉を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて total RNA を抽出した。total RNA から mRNA Purification Kit (GE Healthcare) を用いて mRNA を精製し、さらに Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて Marathon cDNA ライブラリーを作製した。Marathon cDNA ライブラリーは以下の cDNA クローニング実験のテンプレートとして用いた。

ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP をコードする cDNA のクローニング：ブラックタイガー SCP については、すでにわかっている部分アミノ酸配列データをもとに degenerate リバースプライマー (bla-r) を設計し、アダプタープライマー (AP1) と組み合わせで 5' RACE を行った。PCR 増幅産物は pT7Blue-2 T-Vector (Novagen) にサブクローニング後、塩基配列を解析した。次いで、5' RACE により明らかになった塩基配列から設計した遺伝子特異的フォワードプライマー (bla-gsp-f) と AP1 プライマーを用いて 3' RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。クルマエビ SCP についても、同じ戦略で 5' RACE および 3' RACE を行い、コードする全長 cDNA の塩基配列を解析した。

ズワイガニの SCP をコードする cDNA のクローニング：ズワイガニについては、既報の甲殻類 3 種 (コウライエビ *Fenneropenaeus orientalis*、ザリガニ類 *Pontastacus leptodactylus*、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii*) の SCP のアミノ酸配列および本研究で解析したブラックタイガー SCP のアミノ酸配列から保存性の高い領域を選び、その領域について塩基配列情報のあるブラックタイガーとアメリカザリガニの塩基配列をもとに 2 つのプライマー (crab-f および crab-r) を設計した。これら 2 種類のプライマーとアダプタープライマーとを組み合わせで RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。

2) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

精製方法：クロアワビの筋肉 (5 g) を液体窒素を用いて凍結粉砕後、20 mL の 0.5 mM

Cys-0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加えてホモジナイズした。ホモジネイトを遠心分離し、得られた上清を水溶性タンパク質画分とした。沈殿に 20 mL の同じ溶媒を加えて再度ホモジナイズし、遠心分離で得られた上清を除去した。沈殿には 25 mL の 5 mM ジチオスレイトール-0.9 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、4 °C で 14 h 激しく振とうした。ここに MgCl₂ および ATP がそれぞれ終濃度で 1 mM になるように添加し、さらに 1 h 振とうした。これを超遠心分離 (117,000 x g) に供し、得られた上清を塩溶性タンパク質画分とした。塩溶性タンパク質画分に対し硫酸塩析を行い、飽和度 10-20% における沈殿を Bio-Scale CHT2-I カラム (0.7 x 5.2 cm) を用いたハイドロキシアパタイト HPLC に供した。カラムはリン酸緩衝液 (pH 6.8) の濃度勾配 (0.01-0.24 M, 30 min) により、流速 1 mL/min で溶出した。

アミノ酸配列分析：精製した 100 kDa アレルゲン (150 µg) を 0.5 mL の 4 M 尿素-1 mM EDTA-0.02 M ethanolamine-0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、1.5 µg のリシルエンドペプチダーゼを添加して 37 °C で 18 h 消化した。酵素消化物を TSKgel ODS-120T カラム (0.46 x 25 cm) を用いた逆相 HPLC に供し、0.1% トリフルオロ酢酸溶液中のアセトニトリルの直線的濃度勾配 (0-70%, 120 min) により流速 1 mL/min で溶出した。溶出液の 220 nm における吸光値を UV 検出器で連続的に測定し、各ピークに対応する溶出液を分取した。分取した溶出液を乾固後、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を分析した。

SDS-PAGE：SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (GE Healthcare) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (GE Healthcare) を使用した。試料は 0.2 M ジチオスレイトール-4% SDS-8 M 尿素-0.125 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、70 °C、10 min 加熱して変性後、泳動に供した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Precision plus protein standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

ELISA および阻害 ELISA：クロアワビから精製した 100 kDa アレルゲン (パラミオシン) およびトロポミオシンの IgE 反応性を、患者血清を用いた蛍光 ELISA により検討した。精製品溶液 (1 µg/mL) 50 µL を用いて 96 ウェル平底プレート

(ELISA用プレートHタイプ;住友ベークライト)に固相化後、患者血清(1:200希釈)50 µL、β-galactosidase 標識ヤギ抗ヒト IgE 溶液(1:1000希釈)50 µLと順次反応させた。次いで、0.01% 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside-1 mM MgCl₂-0.01 M リン酸緩衝液(pH 7.0)50 µLを添加して酵素反応を行い、励起波長367 nm、蛍光波長453 nmで蛍光強度を測定した。阻害ELISAでは、患者血清(1:100希釈)に等量の阻害剤(パラミオシンまたはトロポミオシン)溶液(0.002-20 µg/mL)を添加して37 °C、2 h反応後、一次抗体として用いた。

イムノブロットングおよび阻害イムノブロットング:6種軟体動物(クロアワビ、サザエ、ムラサキイガイ、ホタテガイ、スルメイカ、マダコ)の筋肉をそれぞれ液体窒素で凍結粉碎後、4倍量の0.9 M KCl-0.01 M リン酸緩衝液(pH 6.8)を加えてホモジナイズした。ホモジネイトをそのまま遠心分離して得た上清を非加熱抽出液、ホモジネイトを沸騰浴中で10 min加熱してから遠心分離して得た上清を加熱抽出液とした。抽出液をSDS-PAGE後、タンパク質をPVDF膜に転写した。PVDF膜はブロッキング後、患者血清または健康者血清(1:200希釈)と、次いでHRP標識ヤギ抗ヒトIgE抗体(1:5000希釈;Kirkegaard & Perry Laboratories)と反応させた。最後にECL Plus Western Blotting Reagents(GE Healthcare)を用いて検出した。阻害イムノブロットングでは、患者血清(1:100希釈)に等量の阻害剤(パラミオシンまたはトロポミオシン)溶液(20 µg/mL)を添加して37 °C、2 h反応後、一次抗体として用いた。

C. 研究結果

1) 甲殻類 SCP の一次構造

RACE法により、3種甲殻類(ブラックタイガー、クルマエビおよびズワイガニ)のSCPをコードする全長cDNAをクローニングし、塩基配列解析により全アミノ酸配列(いずれも192残基)を決定することができた。コウライエビのSCPはα鎖とβ鎖の2種類のサブユニットが報告されているが、本研究で取り上げた3種甲殻類のSCPについては1種類のクローンしか得られなかった。3種甲殻類SCPのアミノ酸配列を、コウライエビ、ザリガニ類*P. leptodactylus*、アメリカザリガニ、ホタテガイおよびチョウセンハマグリ(クロアワビ)のSCPと

並べて図1に、お互いのアミノ酸配列相同率を表1に示す。

ブラックタイガーとクルマエビのSCPはお互いに96.3%と高い配列相同性を示した。また、ブラックタイガーおよびクルマエビのSCPがα鎖とβ鎖より成るか不明であるが、コウライエビSCPのα鎖とは91-94%、β鎖とは約80%の相同性を示し、α鎖と非常に類似していた。ブラックタイガーおよびクルマエビのSCPはザリガニ類SCPとは約80%、ズワイガニSCPとは約87%の相同性を、ズワイガニSCPは他の甲殻類SCPと85-90%の相同性を示すというように、各種甲殻類のSCPはお互いに類似していた。一方、甲殻類と軟体動物(貝類)のSCPとの間の相同性はわずか10-21%で、非常に低かった。

2) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

100 kDaアレルゲンは大部分が塩溶性タンパク質画分に回収されたので、塩溶性の筋肉タンパク質の1成分と考えられた。塩溶性タンパク質画分から、硫酸塩析(10-20%飽和沈殿)およびBio-Scale CHT2-Iカラムを用いたヒドロキシアパタイトHPLCにより100 kDaアレルゲンを精製した。ヒドロキシアパタイトHPLCでは、100 kDaアレルゲンはretention time 23.8 minの左右対称のピークに溶出された(図2A)。こうして得られた100 kDaアレルゲンは、SDS-PAGE分析により純度は高いと判断された(図2B)。

精製した100 kDaアレルゲンをリシルエンドペプチダーゼで消化後、逆相HPLCにより多数のペプチド断片が単離された。このうち任意に4つの断片(ペプチド1-4)を選択し、アミノ酸配列を分析した。配列データをBLASTで検索したところ、ペプチド1、2、3、4はムラサキイガイパラミオシン(DDBJ/EMBL/GenBankのaccession No.はAB16070)の121-135、147-158、203-214、825-836の領域とそれぞれ対応していた(図3)。ペプチド3はムラサキイガイパラミオシンの203-214の領域と完全に一致し、ほかのペプチドもムラサキイガイパラミオシンの対応する領域と比べて1-4残基しか変異がみられなかった。これらの結果から、100 kDaアレルゲンはクロアワビのパラミオシンであると結論した。

クロアワビから精製したパラミオシン(100 kDaアレルゲン)およびトロポミオシンのIgE反応性を、18人の甲殻類アレルギー患者の血清を

を用いた蛍光 ELISA で調べた。CAP-RAST により、患者 18 人中 5 人は軟体動物に対してもアレルギーを示すと診断されているが、その他の患者の軟体動物に対する反応性は不明であった。しかし、トロポミオシンは甲殻類および軟体動物において交差性を示す共通のアレルゲンであることに対応して、クロアワビトロポミオシンに対する陽性反応は 16 人もの多くの患者で認められた (図 4)。さらに興味深いことに、トロポミオシンに陽性反応を示した 16 人の患者はすべてクロアワビのパラミオシンに対しても反応した。

6 種軟体動物の非加熱抽出液を SDS-PAGE で分析すると、いずれの抽出液にも 37 kDa および 100 kDa のタンパク質が認められた (図 5A)。37 kDa タンパク質 (トロポミオシン) は種類によらず、100 kDa タンパク質 (パラミオシン) は少なくとも 4 種 (クロアワビ、サザエ、ムラサキイガイ、マダコ) で IgE 反応は陽性であった (図 5B)。加熱抽出液の場合、トロポミオシンは 6 種に明瞭にみられ、IgE 陽性反応を示した (図 6)。しかし、SDS-PAGE およびイムノブロットングのいずれにおいても、パラミオシンは検出されなかった。

患者血清を予めクロアワビパラミオシンとインキュベートすると、軟体動物パラミオシンとの反応は完全に消失し、さらにトロポミオシンとの反応も消失または減少した (図 5C)。また、患者血清を予めクロアワビトロポミオシンとインキュベートした場合、軟体動物トロポミオシンとの反応だけでなく軟体動物パラミオシンとの反応も完全に消失した。パラミオシンとトロポミオシンの間の抗原交差性を、さらに阻害 ELISA でも検討した。図 7 に示すように、患者血清とパラミオシンとの反応および患者血清とトロポミオシンとの反応は、いずれもトロポミオシンおよびパラミオシンによって阻害された。阻害の程度は、いずれにおいてもトロポミオシンの方がかなり強かった。

D. 考察

1) 甲殻類 SCP の一次構造

甲殻類 SCP のアミノ酸配列はお互いに 80% 以上の高い配列相同性を示すこと、甲殻類 SCP と軟体動物 SCP との間の配列相同性は 10-21% と非常に低いことが判明した。筆者らが行ったイムノブロットングおよび阻害イムノブロットング実験の結果から、エビ類 (とくにクルマエビ類) の

SCP の IgE 反応性は強くかつお互いに抗原交差性を示すが、カニ類および軟体動物の SCP の IgE 反応性は陰性または非常に弱いと考えられた。確かに、3 種クルマエビ科 (ブラックタイガー、クルマエビおよびコウライエビ) の SCP は、お互いのアミノ酸配列相同性は 90% 以上であるし (コウライエビの場合、主要なサブユニットされている α 鎖の配列に基づく)、ザリガニ類の SCP との間でも高い配列相同性 (約 80%) がみられるので、抗原交差性を示すことは理解できる。また、軟体動物 SCP の IgE 反応性は陰性であることは、甲殻類 SCP のアミノ酸配列とは著しく異なっていることで説明できる。しかし、IgE 反応性が陰性と判断されたズワイガニ SCP の場合、そのアミノ酸配列はエビ類 SCP と非常に類似していた (85-90%)。他のカニ類の SCP のアミノ酸配列は今のところ不明であるが、少なくともズワイガニ SCP はカニ類 SCP 同様に IgE 反応性を示すと考えられる。以前のイムノブロットングでカニ類 SCP の IgE 反応性がみられなかったのは、カニ類における SCP 含量が低いためであったと推定される。いずれにしても今後は、エビ類 SCP の IgE 結合エピトープを解析することがまず望まれる。それとあわせて、甲殻類 (とくにカニ類) SCP の配列データの蓄積、甲殻類における SCP 含量の測定も必要である。

2) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

クロアワビから精製した 100 kDa アレルゲンは、リシルエンドペプチダーゼ分解で得られたペプチド断片のアミノ酸配列分析結果から、パラミオシンであることが判明した。甲殻類ではトロポミオシンのほかに、アルギニンキナーゼ、SCP およびミオシン軽鎖もアレルゲンであることが最近次々に報告されている。軟体動物の場合、トロポミオシン以外のアレルゲンの同定例はない。その意味で、パラミオシンは軟体動物の第 2 のアレルゲンである。

パラミオシンとは患者 18 人中 16 人が反応するので、トロポミオシン同様に主要アレルゲンであると判断された。また、非加熱抽出液を用いたイムノブロットングの結果は、パラミオシンはクロアワビ特有のアレルゲンではなく、少なくとも数種軟体動物の間で交差性を示すアレルゲンであることを示している。それにも関わらず、これまでの軟体動物アレルゲンに関する研究におい

ては見落とされてきた。これまでの研究では、沸騰水で加熱調理した試料のホモジネイトから調製した加熱抽出液、または生試料のホモジネイトを加熱して調製した加熱抽出液が用いられてきた。トロポミオシンは耐熱性であるので、イムノブロッティングにより加熱抽出液中でも容易に検出できるし、クロマトグラフィーによって加熱抽出液から容易に精製できる。それに対してパラミオシンは、本研究で明らかにしたように加熱に対しては不安定で変性不溶化する。そのため、もっぱら加熱抽出液を用いてきたこれまでの研究では見落とされたと考えられる。

パラミオシンは無脊椎動物特有のタンパク質で、すでにダニやアニサキスではアレルゲンの一つとして同定されている。パラミオシンはかなり易熱性であるので(変性不溶化してもアレルゲン性は変化しない可能性もあるが)、加熱調理した軟体動物によるアレルギーにはトロポミオシンほど寄与していないと予想される。しかし、生食の習慣があるわが国では軽視できないかもしれない。また、パラミオシンは、軟体動物を扱っている労働者における接触アレルギーや軟体動物摂取による口腔アレルギー症候群に関与することは十分に考えられる。軟体動物に起因するアレルギー症状を考える際には、今後はトロポミオシンとともにパラミオシンも念頭においておく必要がある。

阻害イムノブロッティングおよび阻害 ELISA により、パラミオシンとトロポミオシンの間の抗原交差性が証明された。この非常に興味深い現象を分子レベルで説明するためには、クロアワビのパラミオシンとトロポミオシン(データは示さないが、両タンパク質の一次構造はすでに解析済みである)の IgE 結合エピトープを解析し、比較することが必要である。また、各種無脊椎動物のパラミオシンの IgE 反応性と一次構造に関する知見の集積も望まれる。

E. 結論

1) 甲殻類 SCP の一次構造

3 種甲殻類(ブラックタイガー、クルマエビ、ズワイガニ)のアミノ酸配列(いずれも 192 残基)を cDNA クローニングにより解析した。甲殻類 SCP のアミノ酸配列はお互いに 80%以上の相同性を示すが、軟体動物 SCP との相同性は非常に低い(10-21%)。

2) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

クロアワビに見いだされた 100 kDa の新規アレルゲンを精製し、部分アミノ酸配列分析によりパラミオシンと同定した。パラミオシンはトロポミオシン同様に主要アレルゲンで、トロポミオシンに次ぐ軟体動物第 2 のアレルゲンでもある。また、パラミオシンとトロポミオシンの間には抗原交差性が認められる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Emoto, S. Ishizaki and K. Shiomi: Tropomyosins in gastropods and bivalves: identification as major allergens and amino acid sequence features. *Food Chem.*, 114, 634-641 (2009)
- 2) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畝尾規子, 阿部晃久, 大橋英治, 塩見一雄: 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法に適した抽出方法の開発. *食衛誌*, 50, 153-159 (2009)
- 3) 繁平有希, 猪又直子, 中河原怜子, 大川智子, 澤城晴名, 中村和子, 小林征洋, 塩見一雄, 池澤善郎: スルメイカの塩辛摂取後に発症したアニサキスアレルギーの 1 例: 精製及び組み換えアレルゲンをを用いたアレルゲン解析を含めて. *アレルギー*, 59, 55-60 (2010)
- 4) 塩見一雄: 「えび」, 「かに」のアレルギー表示の義務化. *日水誌*, 75, 495-499 (2009)

2. 学会発表

- 1) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畝尾規子, 阿部晃久, 大橋英治, 塩見一雄: 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検出法に適した抽出法について. 第 97 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009 年 5 月, 東京)
- 2) Z. Hong, H. Ushio and K. Shiomi: Method of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology 2009* (2009 年 8 月, 上海)
- 3) 張 虹, 潮 秀樹, 塩見一雄: 無脊椎動物主要アレルゲントロポミオシンのモノクローナル抗体作製及び応用. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月, 盛岡)

- 4) 鈴木 翠, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄:
クロアワビのパラミオシン: トロポミオシン
との IgE 反応交差性および一次構造解析. 平成
21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月,
盛岡)
- 5) 鈴木 翠, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄:
クロアワビパラミオシンの大腸菌における発
現および組み換えパラミオシンの IgE 反応性.
平成 22 年度日本水産学会春季大会 (2010 年 3
月, 藤沢)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 甲殻類および軟体動物のSCPのアミノ酸配列相同率 (%)

	ブラック タイガー	クルマエビ	コウライエビ			ザリガニ類	アメリカ ザリガニ	ズワイ ガニ	ホタテ ガイ	チョウセン ハマグリ
			α -B鎖	α -A鎖	β 鎖					
ブラック タイガー	100	96.3	94.2	94.2	79.6	80.7	80.7	87.5	15.2	21.2
クルマエビ		100	90.6	90.6	79.6	80.7	80.7	87	16.9	21.2
コウライ エビ	α -B鎖		100	97.8	82.8	79.6	79.6	86.5	15.8	19.7
	α -A鎖			100	78.9	78.9	78.9	84.9	13.5	17.8
	β 鎖				100	81.7	81.7	86.5	14.6	18.9
ザリガニ類						100	92.7	89.1	15.8	20.6
アメリカ ザリガニ							100	87.5	10.7	20.6
ズワイガニ								100	11.5	14.1
ホタテガイ									100	52.5
チョウセン ハマグリ										100

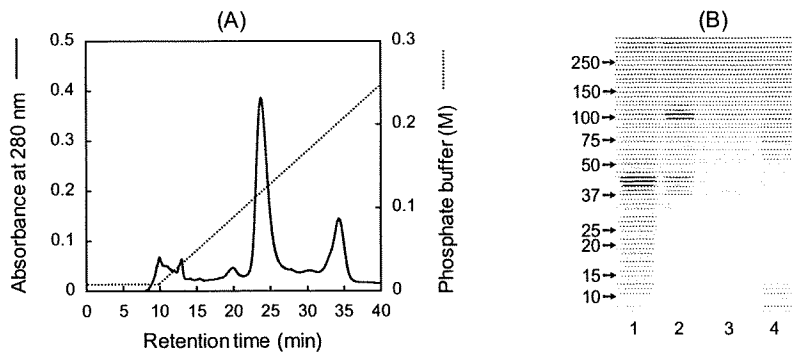


図2 クロアワビからの100kDaアレルゲンのヒドロキシアパタイトHPLCによる精製(A)およびSDS-PAGEによる純度検定(B). (A) 試料, 塩溶性タンパク質画分の硫酸塩析沈殿(10-20%飽和); カラム, Bio-Scale CHT2-I (0.7 x 5.2 cm); 溶出, 0.01-0.24 Mリン酸緩衝液(pH 6.8)の直線的濃度勾配; 流速, 1 mL/min. (B) 試料: レーン1, 水溶性タンパク質画分; レーン2, 塩溶性タンパク質画分; レーン3, 硫酸塩析沈殿(10-20%飽和); レーン4, 精製標品.