

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10003

研究課題名(和文) エビ依存性運動誘発アナフィラキシーの原因抗原解析と診断・発症予防への応用

研究課題名(英文) Identification of allergens for shrimp-dependent exercise-induced anaphylaxis and their application for diagnosis and prophylaxis

研究代表者

松尾 裕彰 (Hiroaki, Matsuo)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：60346385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： エビによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー(FDEIA)の現行の検査法の感度は悪い。本研究では、エビFDEIA患者の原因抗原を明らかにし、精製抗原を利用した精度の高い診断法の開発を試みた。バナメイエビ、ブラックタイガー、クルマエビ、タイショウエビより可溶性タンパク質を抽出し、患者血清IgEが結合するタンパク質を解析した結果、fructose 1,6-bisphosphonate aldolase (FBA)、およびNesprin-1 homologを新規原因抗原として同定した。さらに、患者の各抗原特異IgE抗体保有率は、それぞれ9.5%および19%であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エビ摂取と運動負荷によってエビFDEIAと確定診断された患者血清を用いて抗原解析を実施し、通常の即時型エビアレルギーの原因抗原であるトロポミオシン、筋形質カルシウム結合タンパク質、アルギニンキナーゼ、トロポニンC、ミオシン軽鎖、ヘモシアニンとは異なるFDEIAに特異的な新規抗原を明らかにした。今後、これらの抗原を組み合わせることで精度の高いin vitro診断法が確立されると、患者にとって危険な負荷試験の実施を回避できる。さらに、同定した抗原を用いたエビFDEIAの予防や治療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)： Sensitivity of the present inspection method for diagnosis of food-dependent exercise-induced anaphylaxis (FDEIA) caused by shrimp is insufficient. In this study, we identified causative allergens and tried to development accurate method to diagnose the shrimp FDEIA.

Soluble proteins from 4 species of shrimp (*L. vannamei*, *P. monodon*, *F. chinensis* and *M. japonicus*) were extracted and IgE-binding proteins were searched. As the result, we identified fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA) having 40 kDa molecular weight and Nesprin-1 homolog having 70 kDa as allergens for shrimp FDEIA. It was also revealed that 9.5% and 19% patients had specific IgE antibodies to FBA and Nesprin-1, respectively.

研究分野：食物アレルギー

キーワード：食物アレルギー エビ 抗原 FDEIA

1. 研究開始当初の背景

食物依存性運動誘発アナフィラキシー (food-dependent exercise-induced anaphylaxis: FDEIA) とは、原因食物の摂取後に運動負荷またはアスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬の服用が加わるにより比較的重篤なアレルギー症状が誘発される食物アレルギーである。我が国における FDEIA の原因食物は、小麦 (56%)、エビ (18%) の順に多い。FDEIA では軽度の蕁麻疹から重篤なアナフィラキシーショックまで様々な症状が誘発される。FDEIA の根治療法は確立されておらず、通常食物アレルギーと同様に主たる治療は除去食療法である。他方、不必要な除去食は患者にとって負担となるため、正確に診断することが重要である。現在 FDEIA を確定診断するためには、原因食物の摂取と運動負荷あるいはアスピリンの服用を組み合わせた負荷試験が必須である。しかし、負荷試験においてアナフィラキシーが誘発される場合があり、患者にとって危険な検査である。したがって、危険な負荷試験を回避するためにより安全で精度の高い抗原特異的 IgE 抗体価測定による検査法の開発が望まれている。

Component resolved diagnosis (CRD) は、精製した個々の抗原コンポーネントに対する特異 IgE を測定し、感作抗原パターンと抗体価から原因食物や交叉反応を予測する食物アレルギーの診断方法であり、IgE を介した即時型アレルギーの血清学的診断精度を向上させることが明らかにされている¹⁾。これまでに、我々は FDEIA の検査精度の向上を目的として小麦 FDEIA の抗原解析を行い、小麦 5-グリアジンおよび高分子量グルテニンを原因抗原として同定した²⁾。また、加水分解コムギ含有石鹸の使用により経皮感作され発症した FDEIA の主要原因抗原が 5-グリアジンであることを明らかにした³⁾。さらに、リコンビナント 5-グリアジン、5-グリアジンおよび高分子量グルテニンを利用した CRD が、FDEIA を含む小麦アレルギーの診断や除去食解除の判断において有益な情報となることを明らかにした⁴⁾。一方、FDEIA 患者の 18% の原因食物であるエビについては、即時型アレルギー患者の抗原解析により、トロポミオシン、筋形質カルシウム結合タンパク質、アルギニンキナーゼ、トロポニン C およびミオシン軽鎖などが原因抗原として同定されている⁵⁾。しかしながら、エビ FDEIA の原因抗原解析はほとんど行われておらず、詳細は不明である。

2. 研究の目的

エビによる FDEIA を診断するために行われる食物運動負荷試験の感度は低く、確定診断に至らないことも多い。また、現在臨床で使用されている血清中のエビ抗原特異 IgE 抗体価検査についても、偽陰性を示すケースが散見される。そこで本研究では、エビ抗原コンポーネントを利用した CRD による精度の高いエビ FDEIA の診断法の開発を目的として、エビ FDEIA 患者の原因抗原を同定し、精製抗原を用いて特異 IgE 抗体の保有率を解析した。

3. 研究の方法

(1) エビ FDEIA の原因抗原の同定

バナメイエビ、ブラックタイガー、クルマエビ、およびタイショウエビのむき身 10 g に 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) 15 mL を加えホモジナイズした。この溶液を遠心分離して上清をエビ可溶性タンパク質画分として回収した。沈殿に 8 M Urea と 4% (w/v) CHAPS を含む 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) 2.5 mL を加え不溶性エビタンパク質を抽出した。各タンパク質画分を SDS-PAGE または 2 次元電気泳動にて分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。転写後の膜を 5% (w/v) スキムミルクでブロッキングし、10% (v/v) 患者血清または健常者血清を含む 5% (w/v) スキムミルクと一晩 4℃ でインキュベートをした。マウス抗ヒト IgE 抗体 (Phadia) および HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signalling) を反応させた後、Western Lightning® Ultra (Perkin Elmer) を用いて特異的に結合した IgE 抗体を検出した。

2 次元電気泳動にて分離後 CBB 染色し、目的タンパク質を切り出した。ゲル内のタンパク質を 20 mM dithiothreitol を用いて還元処理し、40 mM iodoacetamide を用いてアルキル化した。次にトリプシン溶液を加えて 37℃ で 20 時間のゲル内消化処理をした後、nanoLC-MS/MS system (Eksigent nanoLC 425, TripleTOF5600+, AB Sciex) にて測定し、得られた結果を Skyline Software (version 3.5, MacCoss Lab Software) にて解析した。

(2) Fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA) および Nesprin-1 homolog の精製

可溶性タンパク質より硫酸アンモニウム分別沈殿、各種クロマトグラフィー (イオン交換クロマトグラフィーカラム、疎水性クロマトグラフィーカラム、逆相クロマトグラフィーカラム) による分離条件を検討した。各クロマトグラフィー画分中の目的抗原は、患者血清を用いた western blot 法により検出した。

(3) 精製抗原特異 IgE 抗体の解析

精製した FBA および Nesprin-1 homolog を SDS-PAGE で分離後、エビ FDEIA と診断された患者 21 名の血清を用いた western blot 法により抗原特異 IgE 抗体を解析した。

4. 研究成果

(1) エビ FDEIA の原因抗原の同定

本邦で食されているクルマエビ属のクルマエビ、ブラックタイガー、バナメイエビおよびタイショウエビの可溶性タンパク質を SDS-PAGE により分離し、エビ FDEIA 患者血清を用いて IgE 結合タンパク質を western blot 法により解析した。その結果、4 種全てのエビにおいて 70 kDa および 40 kDa のタンパク質に結合が認められた (Fig. 1)。しかしながら、健常者血清においても弱い結合が認められたため、これらのタンパク質を同定・精製した後、再確認が必要であると考えられた。また、不溶性タンパク質の解析も同時に行ったが、70 kDa および 40 kDa タンパク質以外に IgE の結合は認められなかったため、原因抗原は可溶性画分で検出された 70 kDa および 40 kDa のタンパク質であると示唆された。バナメイエビの 40 kDa タンパク質に強い IgE の結合が認められたため、以降の実験にはバナメイエビより抽出したタンパク質を用いることにした。

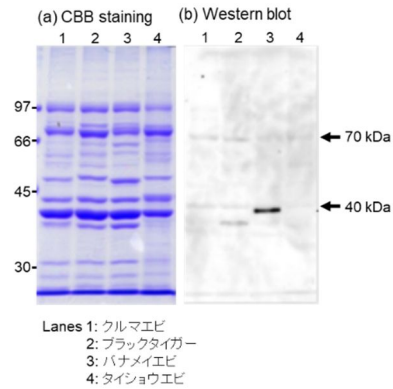


Fig. 1 エビ可溶性タンパク質に対する FDEIA 患者血清 IgE の反応

(2) FBA および Nesprin-1 homolog の精製法の検討

FBA および Nesprin-1 homolog の精製条件を検討した結果、以下の方法で精製できることを明らかにした。FBA の精製：エビ可溶性タンパク質より 40 - 60% 硫酸アンモニウム沈殿を分画する。得られた沈殿を 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した後、透析を行い、超遠心分離により沈殿を除去する。得られた上清を HPLC [カラム: Resource Q, 移動相: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), NaCl 濃度勾配: 0 M → 0.5 M] にかける。目的タンパク質を含む画分に 2M 硫酸アンモニウム水溶液を加え、HiTrap™ Butyl FF カラムにかけ、Elution buffer [1, 0.75, 0.5, 0.25, 0 M 硫酸アンモニウム含有 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)]にて、ステップワイス溶出する。Nesprin-1 ホモログの精製：エビ可溶性タンパク質より 20 - 40% 硫酸アンモニウム沈殿を分画する。得られた沈殿を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した後、透析を行う。透析後の溶液を 30% アセトニトリル含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈する。この溶液を HPLC [カラム: YMC-Pack C4, 移動相: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), アセトニトリル濃度勾配: 30% → 70%] にかけて分画する。各精製ステップで得られたタンパク質の SDS-PAGE を Fig. 2 に示した。

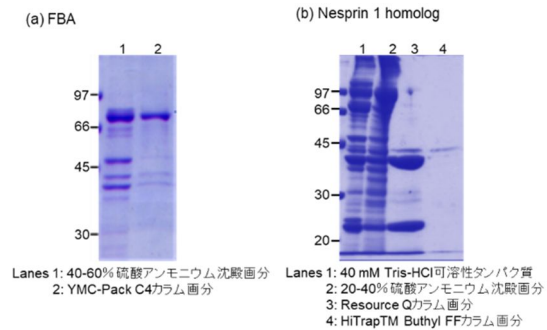


Fig. 2 各精製ステップにおけるタンパク質の SDS-PAGE 解析

(3) 精製抗原特異 IgE 抗体の解析

今回同定した 2 種の抗原に対する IgE 抗体の保有率を精製抗原を利用した western blot 法により解析した。21 名のエビ FDEIA 患者血清を用いて解析した結果、Nesprin-1 homolog については、19% (No. 6, 7, 14, 19) の患者でバンドが検出された (Fig. 3a)。また、FBA については、9.5% (No. 15, 16) の患者で IgE 抗体の結合が認められた (Fig. 3b)。以上の結果から、今回同定した FBA および Nesprin-1 homolog をエビアレルギー検査における抗原コンポーネントに加えることで、FDEIA を含むエビアレルギーの検査感度が向上すると示唆された。

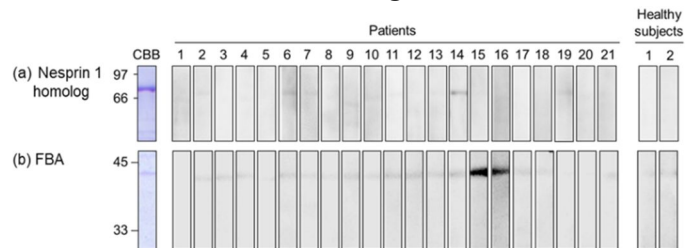


Fig. 3 Western blot 法による抗原特異 IgE 抗体の検出

< 引用文献 >

- 1) Borres MP, Maruyama N, Sato S, Ebisawa M. Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy. *Allergol Int.* 2016;65(4):378-87.
- 2) Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, Ikezawa Z, Kaneko S, Kohno K, Dekio S: Identification of the IgE-binding epitope in ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12135-40.
- 3) Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, Harada S, Ishii K, Hiragun M, Hide M, Matsuo H. Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int.* 2013;62(4):435-45
- 4) Yokooji T, Okamura Y, Chinuki Y, Morita E, Susumu H, Hiragun M, Hiragun M, Hide M, Matsuo H. Prevalences of specific IgE to wheat gliadin components in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergol Int.* 2015;64(2):206-8.
- 5) Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int.* 2015;64(4):332-43.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokooji Tomoharu, Nouma Hitomi, Ogino Ryohei, Taogoshi Takanori, Morita Eishin, Matsuo Hiroaki	4. 巻 68
2. 論文標題 Quantification of the 5- and -gliadin content in wheat flour and rat plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay using antibodies specific to their IgE-binding epitopes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 112 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 田中 賀治代、和泉 秀彦、横大路 智治、松尾 裕彰、伊藤 浩明、蟹江 悠紀、内藤 宙大、鈴木 美沙、榎村 春江、田上 和憲、酒井 一徳、古田 朋子、山田 千佳子	4. 巻 66
2. 論文標題 加工食品における小麦タンパク質の不溶化とアレルギー性の変化について	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アレルギー	6. 最初と最後の頁 222 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.15036/arerugi.66.222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 飯島 茂子、津田 毅彦、森山 達哉、荻野 龍平、横大路 智治、松尾 裕彰	4. 巻 11
2. 論文標題 水溶性アルブミン画分に原因抗原の存在が疑われたスパゲッティ依存性運動誘発アナフィラキシーの1例	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌	6. 最初と最後の頁 259 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.18934/jedca.11.3_259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Hiroshi, Inami Maiko, Hamaguchi Yasuhito, Takehara Kazuhiko, Akimoto Shiori, Yokooji Tomoharu, Matsuo Hiroaki, Matsushita Takashi	4. 巻 45
2. 論文標題 Food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to shrimp associated with 43 kDa, a new antigen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 366 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋本菜里, 横大路智治, 松永千裕, 前原宏樹, 荻野龍平, 千貫祐子, 森田栄伸, 松尾裕彰
2. 発表標題 エビ依存性運動誘発アナフィラキシー検査法の開発のためのアレルゲンコンポーネントの精製
3. 学会等名 日本皮膚科学会第136回参院・第32回島根合同開催地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野龍平, 大本亜沙妃, 横大路智治, 埜越崇範, 森田栄伸, 松尾裕彰
2. 発表標題 質量分析装置を用いた血漿中抗原濃度測定法の開発
3. 学会等名 第66回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大本亜沙妃, 荻野龍平, 横大路智治, 埜越崇範, 松尾裕彰
2. 発表標題 質量分析法による血漿中小麦グリアジン定量法の開発
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本崇弘, 横大路智治, 埜越崇範, 松尾裕彰
2. 発表標題 魚由来コラーゲンアレルギーの原因抗原の精製
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 滝沢大吾, 荻野龍平, 横大路智治, 埜越崇範, 千貫裕子, 森田栄伸, 松尾裕彰
2. 発表標題 イネ科花粉に感作された小麦アレルギー患者の抗原の同定
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横大路 智治 (YOKOJJI Tomoharu) (70389120)	広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授 (15401)	
連携研究者	森田 栄伸 (MORITA Eishin) (90182237)	島根大学・医学部・教授 (15201)	