

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591621

研究課題名(和文) 血中小麦アレルゲン定量法の開発とその臨床応用

研究課題名(英文) Development of a quantification method for peripheral blood wheat allergen and its clinical application

研究代表者

松尾 裕彰 (MATSUO, HIROAKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：60346385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は消化管からのアレルゲンの吸収増加が、小麦依存性運動誘発アナフィラキシーにおける症状誘発原因の一つであることを明らかにしている。本研究では、アレルゲン特異IgE抗体で感作したラット好塩基球細胞(RBL-2H3)からのβ-ヘキソサミニダーゼ遊離を指標にした血中小麦アレルゲンの生物学的活性定量法の構築を試みた。アレルゲン特異IgEを有するラットの血清IgEで感作したRBL-2H3細胞を用いることで、血中アレルゲンの生物学的活性が測定できると示唆された。さらに、加水分解小麦含有石鹸の使用により発症したWDEIAの主要抗原がγ-グリアジンであることを明らかにし、そのIgE結合エピトープを同定した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that increase of allergen absorption is one of factors which enhance the allergic symptoms in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. In this study, we investigate the method to evaluate the allergenicity of peripheral blood food allergen by beta-hexosaminidase assay in rat basophil leukemia cells (RBL-2H3). Degranulation of RBL-2H3 cells sensitized with the sera from Brown Norway rat having allergen specific-IgE was observed, suggesting that the biological activity of allergen in the blood could be estimated by using the method. In addition, we identified gamma-gliadin as a major allergen and its IgE-binding epitope in WDEIA induced by a soap containing hydrolyzed wheat.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：食物アレルギー アレルゲン

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 (FDEIA) は、特定の食物を摂取後に運動することによりアナフィラキシーなどの重篤な症状が誘発される食物アレルギー疾患である。FDEIA は運動負荷のみならず、アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の服用によっても症状が誘発されることが知られている。本邦においては小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) が最も多く報告されている。WDEIA の根治療法は確立されておらず、治療の原則は小麦除去食療法である。小麦粉あるいはその成分であるグルテンを使用した食品は多岐にわたるため、除去食療法は患者にとって負担が大きい。そのため、正確な診断が求められている。WDEIA の検査として、抗原特異 IgE 抗体価の測定や皮膚テスト等があるが、検査感度や特異性は悪い。したがって、確定診断には小麦製品と運動を組み合わせた負荷誘発試験が必要である。しかし、WDEIA の場合、負荷試験を行っても症状が再現できないことがあり、確定診断に苦慮するケースが多いことが問題となっている。

申請者はこれまでに、検査精度を上げることを目的として原因抗原を行い、WDEIA の主要原因抗原は 5-グリアジンおよび高分子量グルテニンであること、および、それらのリコンビナントタンパク質やエトープペプチドに対する特異 IgE 検査が WDEIA の血清学的診断に有用性が高いことを明らかにした。さらに、運動負荷やアスピリンの服用により消化管障害が起こり、高分子のアレルゲンの吸収が促進されることが、症状誘発機序の一つであることを明らかにした。健常者においてもアスピリンやその他の NSAIDs の服用がグリアジンの吸収を促進した。以上のことから、WDEIA のアレルギー症状誘発には、アレルゲンの吸収が深く関与していると推測される。しかしながら、これまでの研究における血中グリアジン濃度測定に用いた抗体は、抗グリアジン抗体であるため、主要アレルゲンである 5-グリアジン以外のグリアジン類 (/ , -グリアジンなど) も同時に検出される。さらに、経口摂取した小麦蛋白質は胃酸や消化酵素により変性・分解を受けることから、ELISA 等の免疫学的手法で検出した血液中のグリアジンが、真にマスト細胞や好塩基球を活性化できる生物学的活性を有しているかどうかはよく分かっていない。

2. 研究の目的

消化管からのアレルゲンの吸収増加が、WDEIA における症状誘発原因の一つであることが明らかにされている。しかし、経口摂取後に、消化管から吸収され血中に存在している小麦アレルゲンが、マスト細胞や好塩基球を活性化できるアレルゲン活性を有しているかどうか不明である。本研究では、アレ

ルゲン特異 IgE 抗体で感作したラット好塩基球細胞 (RBL-2H3) の脱顆粒を指標にした血中小麦アレルゲンの生物学的活性定量法を構築する。また、5-グリアジンを特異的に検出するための抗体作製を目的として、リコンビナントタンパク質の大量取得を試みた。

加水分解小麦含有石鹼の使用によっても WDEIA が発症し、その原因抗原が 5-グリアジンとは異なることが報告されたため、加水分解小麦による WDEIA の原因抗原解析も実施した。

3. 研究の方法

(1)リコンビナント 5-グリアジンの大量精製 : 5-グリアジン遺伝子を pET-21(a)ベクターおよび pColdIII ベクターに組み込み、宿主大腸菌として E. coli Rosetta 株および JM109 株を使用して発現させた。目的タンパク質の発現は抗グリアジン抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。発現した 5-グリアジンは、逆相カラムクロマトグラフィー (C8) を用いて、アセトニトリルによるグラジエント溶出し分取した。

(2)IgE 感作ラットの作成 : 卵アレルギーの原因抗原であるオボアルブミン (OVA) 50 mg を Alum(10 mg) と共に Brown Norway (BN) ラットの腹腔内に投与した。投与は毎週 1 回 7 週行い、2 週毎に頸静脈より採血した。OVA 特異 IgE 抗体は ELISA 法により測定した。OVA を Phosphate buffered saline (PBS) に 10 μ g/mL になるように溶解し、96 穴プレート (MaxiSorp) に入れ固相化した。ブロックエースにてブロッキングを行い、10%ラット血清を入れて 2 時間インキュベートした。結合した IgE は、Horse radish peroxidase (HRP) 標識した抗ラット IgE 抗体 (MARE-1) および TMB 基質を用いて検出した。

(3)OVA 感作ラット血清を用いた RBL-2H3 細胞の活性化試験 : OVA を腹腔内投与することにより 8 週間感作したラットの血液を採取し、血清を分離した。RBL-2H3 を 96 穴プレートに培養し、OVA 感作ラット血清を添加し一晚培養することにより抗 OVA-IgE で感作した。細胞を洗浄後、OVA 抗原を添加し 15 分間インキュベートした。脱顆粒反応により遊離した β -ヘキソサミニダーゼの活性は 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide を基質として用い、ex 360nm, em 450 nm の蛍光を測定することにより求めた。

(4)加水分解小麦含有石鹼により発症した WDEIA の原因抗原解析 : 加水分解小麦含有石鹼により発症した WDEIA と確定診断された 32 名の患者血清を用いた。小麦粉 (農林 61 号) よりグリアジンおよびグルテニン画分を調製し、10%患者血清を用いたウエスタンブロットにより IgE 結合タンパク質を検出した。小麦グルテン構成タンパク質である

1, 2, 5-グリアジンおよび低分子量, 高分子量グルテニンのリコンビナントタンパク質を発現・精製した。これらのリコンビナントタンパク質のアレルゲン活性を、ドットプロット法による IgE の結合、および、患者好塩基球を用いたヒスタミン遊離試験により解析した。

1-グリアジンのオーバーラップペプチドを合成し、3名の患者血清を用いて IgE の結合領域を調べた。また、加水分解小麦との交叉反応性を合成ペプチドを利用して解析した。

4. 研究成果

(1) リコンビナント 5-グリアジン を pET-21(a)ベクターと Rosetta 株の組み合わせで発現させると、分解産物が生じることが分かった。そこで、pCold III ベクターを発現ベクターとして宿主大腸菌に JM109 株を使用して発現させた。この方法では分解は起こらなかったものの、収量が培養液 1L あたり数十 μg と少ないことが分かった。

(2) ELISA 法によるラット血漿中の OVA 特異 IgE 抗体価測定法を構築した。次に、OVA を BN ラットの腹腔内に投与 Alum と共に毎週 1 回投与し、2 週毎に採血し血中の OVA 特異 IgE 抗体を調べた。その結果、OVA 特異 IgE 抗体は、4 週目から上昇し 8 週目まで維持された。したがって、IgE 抗体を含む血清を得るためには、4 週以上の腹腔内投与を行えばよいことが分かった。同様の方法で、小麦グリアジンで感作できることが確認された。

(3) OVA で 8 週間感作した BN ラットから採血し、分離した血漿により RBL-2H3 細胞を感作した。培地に 1~10%ラット血清を添加して一晚培養することにより感作した RBL-2H3 細胞を、10 μg/mL の OVA 抗原で刺激した場合、脱顆粒反応を惹起するためには OVA 感作血清を 5%以上加えることが必要であることが分かった。また、ラットにアスピリンと OVA を同時投与した場合、ELISA 法で測定した血中 OVA 濃度は、~1.8 ng/mL であることから、血中抗原の生物学的活性測定を行うためには感度不足であると示唆された。今後脱顆粒反応の感度を上昇させるための条件検討が必要である。

(4) 加水分解小麦含有石鹼の使用により発症した WDEIA と確定診断された 32 名の患者血清を用いて解析を行った。小麦粉(農林 61 号)より調製したグリアジンおよびグルテニン画分を SDS-PAGE にて分離し、IgE ウエスタンプロットを行った。グリアジンおよびグルテニン画分共に IgE の結合が認められたことから、小麦不溶性タンパク質中に抗原が存在すると示唆された。そこで、リコンビナント小麦グルテン構成タンパク質(1, 2, 5-

1, 2, 5-グリアジンおよび低分子量, 高分子量グルテニン)を作製し、IgE の反応性を調べた。その結果、加水分解小麦 WDEIA では、1, 2, 5-グリアジン特異 IgE を保有する患者が多いことが分かった。各リコンビナントタンパク質で患者好塩基球を刺激し、遊離したヒスタミンを測定した結果、11 名中 8 名の患者において 1-グリアジンによるヒスタミン遊離が認められた。これらの結果から、加水分解小麦含有石鹼で経皮的に感作され発症した患者は、小麦を経口摂取した場合 1-グリアジンが主要な抗原となり発症していると考えられた。WDEIA の発症に関わる抗原として 5-グリアジンに加え 1-グリアジンの血中濃度測定も必要であることが分かった。

次に、小麦 1-グリアジン配列中の IgE 結合エピトープを解析し、QPQQPFPPQ 配列がコアエピトープであることを明らかにした。さらに、加水分解小麦ではグルタミン(Q)がグルタミン酸(E)へ加水分解されているため、エピトープの Q を E に置換したペプチドを合成し、IgE の反応を調べた結果、PEEPFP に IgE が強く結合した。このことから、加水分解小麦中の PEEPFP 配列特異 IgE が QPQQPFPPQ に交叉反応するために、加水分解されていない通常小麦を経口摂取した時に症状が誘発されると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1. 森田 栄伸, 千貫 祐子, 松尾 裕彰.【すべては経皮感作から始まる】経皮感作による小麦アレルギー. 皮膚アレルギーフロンティア. 11(3):141-4, 2013. (査読無)
2. Matsuo H, Yokooji T, Morita H, Ooi M, Urata K, Ishii K, Takahagi S, Yanase Y, Hiragun T, Mihara S, Hide M. Aspirin augments IgE-mediated histamine release from human peripheral basophils via Syk kinase activation. Allergol Int. 62(4):503-11, 2013. doi: 10.2332/allergolint.13-0A-0536. (査読有)
3. 吉田流音, 船坂陽子, 藤本和久, 長田真一, 菊地伊豆実, 原田晋, 松尾裕彰, 川名誠司. ミソプロストールとクロモグリク酸ナトリウムにより誘発が抑制されたエビによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの 1 例. 皮膚科の臨床. 55(7):883-7, 2013. (査読有)
4. Hiragun M, Ishii K, Hiragun T, Shindo H, Mihara S, Matsuo H, Hide M. The sensitivity and clinical course of patients with wheat-dependent exerc-

- ise-induced anaphylaxis sensitized to hydrolyzed wheat protein in facial soap - secondary publication. *Allergol Int.* 62(3):351-8, 2013. doi: 10.2332/allergolint.13-0A-0553. (査読有)
5. 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.* 62(4):435-45, 2013. doi: 10.2332/allergolint.13-0A-0561. (査読有)
 6. Yokooji T, Hamura K, Matsuo H. Intestinal absorption of lysozyme, an egg-white allergen, in rats: Kinetics and effect of NSAIDs. *Biochem Biophys Res Commun.* 438(1):61-5, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.024. (査読有)
 7. Kohno K, Matsuo H, Takahashi H, Niihara H, Chinuki Y, Kaneko S, Honjoh T, Horikawa T, Mihara S, Morita E. Serum gliadin monitoring extracts patients with false negative results in challenge tests for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergol Int.* 62(2):229-38, 2013. doi: 10.2332/allergolint.12-0A-0495. (査読有)
 8. 伊藤倫子, 飯島茂子, 松尾裕彰. 洗顔石鹸中の加水分解小麦で感作され運動負荷試験にて再現しえた小麦依存性運動誘発アナフィラキシー. *皮膚科の臨床.* 54(13): 1879-83, 2012. (査読有)
 9. Ishii K, Hiragun M, Matsuo H, Hiragun T, Hide M. Remission of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis after the cessation of hydrolysed wheat-containing soap usage. *Acta Derm Venereol.* 92(5):490-1, 2012. doi: 10.2340/00015555-1321. (査読有)
 10. Takahashi H, Matsuo H, Chinuki Y, Kohno K, Tanaka A, Maruyama N, Morita E. Recombinant high molecular weight-glutenin subunit-specific IgE detection is useful in identifying wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis complementary to recombinant ω -5 gliadin-specific IgE test. *Clin Exp Allergy.* 42(8):1293-8, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.04039.x.(査読有)
 11. 平郡真記子, 石井香, 平郡隆明, 信藤肇, 三原祥嗣, 松尾裕彰, 秀道広. 茶のしずく以外の加水分解コムギ含有石けん使用後に発症した小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの1例. *アレルギー.* 60(12): 1646-47, 2011. (査読有)
 12. 平郡真記子, 石井香, 平郡隆明, 信藤肇, 三原祥嗣, 松尾裕彰, 秀道広: 加水分解コムギ含有石鹸の使用後に発症した小麦依存性運動誘発アナフィラキシーとその経過について. *アレルギー.* 60(12): 1630-40, 2011. (査読有)
 13. Tohgi K, Kohno K, Takahashi H, Matsuo H, Nakayama S, Morita E. Usability of Fag e 2 ImmunoCAP in the diagnosis of buckwheat allergy. *Arch Dermatol Res.* 303(9):635-42, 2011. doi: 10.1007/s00403-011-1142-z. (査読有)
 14. 原田晋, 和田康夫, 松尾裕彰: 寒冷下のみ症状が発現した小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの1例. *皮膚科の臨床.* 53(1): 97-100, 2011. (査読有)
- [学会発表](計16件)
1. 松尾裕彰, 横大路智治, 羽村光. ラット消化管における卵白リゾチーム吸収に及ぼす非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の影響. 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013年11月29日-12月1日. 金沢市
 2. 徳田玲子, 長尾みづほ, 貝沼圭吾, 松田幹, 横大路智治, 松尾裕彰, 藤澤隆夫. 小児の即時型小麦アレルギーにおける原因抗原の解析. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013年11月28-30日. 東京
 3. 横大路智治, 羽村光, 松尾裕彰. 非ステロイド性抗炎症薬による食物アレルギーの吸収増加機構の解明. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013年11月28-30日. 東京
 4. 横大路智治, 羽村光, 松尾裕彰. 非ステロイド性抗炎症薬の服用による食物アレルギーの吸収増加機構の解明. 膜シンポジウム2013. 2013年11月7-8日. 京都市
 5. 横大路智治, 栗原早紀, 千貴祐子, 原田晋, 高橋仁, 森田栄伸, 石井香, 平郡真記子, 秀道広, 松尾裕彰. 加水分解小麦感作による小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの原因抗原の解析. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013年5月11-12日. 横浜市
 6. 横大路智治, 羽村光, 巖原美穂, 松尾裕彰. 非ステロイド性抗炎症薬の服用による食物アレルギーの吸収増加機構の解明. 日本膜学会第35年会. 2013年5月20-21日. 東京
 7. Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Harada S, Takahashi H, Morita E, Ishii K, Hiragun M, Hide M and Matsuo H. Characterization of the Causative Allergens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Proteins in Facial Soap. 2013 American Academy of

Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting, 2013 Feb 22-26. San Antonio, Texas, USA

8. 松山梓、横大路智治、高橋仁、森田栄伸、松尾裕彰 . 小麦水溶性アレルゲンの大腸菌における可溶性発現 . 日本皮膚科学会第 124 回山陰・第 20 回島根合同開催地方会 . 2012 年 7 月 22 日 . 米子市
9. 干谷奈穂、松岡亮介、金澤典子、福永淳、錦織千佳子、高嶋基嗣、松尾裕彰 . 加水分解小麦により感作された小麦依存性運動誘発アナフィラキシーとの鑑別を要した Baker 's Asthma の 1 例 . 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 . 2012 年 7 月 13-15 日 . 軽井沢市
10. 千貫祐子、松尾裕彰、新原邦江、高橋仁、田中昭、森田栄伸 . リコンビナント小麦蛋白質特異 IgE 測定の有用性 . 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 . 2012 年 7 月 13-15 日 . 軽井沢市
11. 平郡真記子、石井香、平郡隆明、信藤肇、三原祥嗣、秀道広、松尾裕彰 . 茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギ (グルパール 19S) による即時型コムギアレルギー患者における anti-IgE およびグルパール 19S 刺激でのヒスタミン遊離率の継月的変化について . 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 . 2012 年 7 月 13-15 日 . 軽井沢市
12. 松尾裕彰 . Molecular allergology を利用した食物アレルギー解析 . 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 . 2012 年 7 月 13-15 日 . 軽井沢市
13. 横大路智治、村上朋子、栗原早紀、千貫祐子、原田晋、高橋仁、森田栄伸、松尾裕彰 . 加水分解小麦感作による小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの原因抗原解析 . 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 . 2012 年 5 月 12-13 日 . 大阪市
14. 平郡 真記子、石井 香、平郡 隆明、信藤 肇、三原 祥嗣、秀 道広、松尾 裕彰 . 茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギによる即時型コムギアレルギー 広島大学病院受診者の特徴と動向 2011 . 日本皮膚科学会 130 回広島地方会 . 2012 年 3 月 4 日 . 広島市
15. 村上朋子、千貫祐子、高橋仁、森田栄伸、松尾裕彰 : リコンビナント小麦グルテン構成タンパク質の作製と小麦アレルギー診断への応用 . 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . 2011 年 11 月 10-12 日 . 東京
16. 伊藤倫子、飯島茂子、松尾裕彰 : 石鹼中の加水分解小麦で感作され、運動負荷試験にて再現しえた小麦依存性運動誘発アナフィラキシー . 第 41 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 . 2011 年 7 月 16-17 日 . 甲府市

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 裕彰 (MATSUO HIROAKI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号 : 6 0 3 4 6 3 8 5

(2) 研究分担者

三原 祥嗣 (MIHARA SHOJI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号 : 9 0 3 2 5 1 6 8

(H23 ~ H24)

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :