

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700915

研究課題名(和文) 果物・野菜による食物アレルギーと唾液中の生理活性物質との関連性の研究

研究課題名(英文) Relationship between oral allergy syndrome and bio active amine in saliva

研究代表者

新田 陽子(Nitta, Yoko)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：70403318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：食生活において果物や野菜を避けなければなくなる口腔アレルギー症候群(OAS)は、食物アレルギーの中でも増加傾向にあり、その対策が求められている。本研究では唾液中の成分で、アレルギーの化学伝達物質であるヒスタミンを質量分析機で定量する方法を確立した。OAS発症時に唾液中ヒスタミン量が変動しうることを確認した。OASの原因物質(抗原)は熱変性、消化による分解で不活性化することがあり、一般の食物アレルギーの抗原と性質が異なる。加熱によってこれらのタンパク質の性質がどのように変化するか真空CD測定で調べたところ、60℃以上で抗体と結合するとされる部分の構造が変化する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Oral allergy syndrome (OAS) is usually caused by an allergy to fresh fruits. It is defined as the symptoms of immunoglobulin (Ig) E-mediated immediate allergy localized in the oral mucosa, and the characteristics depend on the lability of the antigen. Consumption of strawberries can cause OAS, primarily because of the presence of proteins Fra a 1, Fra a 2, Fra a 3 and Fra a 4. In this study, conformational change in Fra a 1 by heating was investigated. VUVCD spectra suggested that the conformation of the IgE binding region might change by heating to 60 degree C.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：口腔アレルギー症候群 ヒスタミン 唾液 アレルゲン イチゴ

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、日本を含めた先進国で増加しており、社会問題となっている(海老澤ら、2010)。日本では厚生労働省科学研究班による調査と研究が進められており、「食物アレルギーの診療の手引き」および「食物アレルギーの栄養指導の手引き」が作成されている。その中で、特殊型の食物アレルギーと位置づけられているものの中に、「口腔アレルギー症候群(OAS)」がある。OASは、果物や野菜などで口の粘膜や口周囲の皮膚に現れるじんましんなどのアレルギー反応を指し、近年増えていることが報告されている(海老澤ら、2010)。OASは症状の現れる部位が主として口腔や咽頭部のみであり、また花粉症と併発していることが多く、OASの症状であってもOASとして認識していない場合があり、実際には軽度のものを含めるとかなりの数の人がOASを経験していると考えられている(Kurowskiら、2008)。OASを経験している人達は、アレルギーの原因食物である果物・野菜を意識的にあるいは無意識的に避けており(間口、2003)、ビタミン類などの摂取が不足している可能性がある。また、OASは成人になってから発症することもあり、好んで食べていた果物・野菜が、ある時アレルギーの原因食物になって食べられないということになれば大変な苦痛であり、QOLが大幅に低下することが考えられる。さらに、OASは従来の食物アレルギーと異なり、原因となる物質は加熱処理によって不活性化するものがあるが、OASと従来の食物アレルギーと区別していなければ、不必要に食物制限をしてしまう可能性がある。

上記のことから、OASを正確に認識し、原因となる食物を把握し、他の食物アレルギーと同じく必要最小限の食物除去を行うことが行いうことが望ましいと考える。ここで、自分がどの食べ物でOASを発症するのか、また、アレルギー反応が従来の食物アレルギーなのかOASなのかを正確に判断することが求められるが、現時点でこれらをただちに把握できる環境整備はなされていない。そこで、OASの指標となるバイオマーカーが存在すれば、OASの予測と対策および予防につなげられるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

OASの発症メカニズムは、花粉症とほぼ同じであると考えられている。花粉症では、花粉中のタンパク質がアレルギーの原因物質となり、それを吸引、接触した鼻や眼にアレルギー症状が現れる。OASでは果物・野菜中のタンパク質が口の粘膜に接触してアレルギー症状が現れる。花粉症では、アレルギーの化学伝達物質であるヒスタミンによってくしゃみなどが誘発されており、OASにおいても、ヒスタミンによってじんましんなどが誘発されると考えられる。

ヒスタミンは、生体内でアミノ酸であるヒ

スチジンから生成される生理活性アミンで、じんましんや、くしゃみを引き起こす物質として知られており、また痒みにも関与する(渡邊ら、2000)。そのため、アレルギーの治療薬として、ヒスタミンの作用を抑える目的のものが多く使用されている。アレルギー反応の際には特定の細胞中の顆粒からヒスタミンが放出されて、アレルギー発症部位でのヒスタミン量が増加する。アレルギー性鼻炎であれば鼻汁、アレルギー性結膜炎であれば涙液でのヒスタミン量に変化が現れるため、OASでは唾液中のヒスタミン量が変動することが予想される。

唾液中の成分は、近年バイオマーカーとして注目されており、唾液検査による疾患の診断にむけた研究がおこなわれている(杉本ら、2010)。これは、微量物質を高精度に定量する技術や、成分を短時間で同定する技術が進化したことが大きいと思われる。申請者はヒスタミンを様々な手法で特異的に検出し、微量分析することに取り組んできた。現在20分程度の短時間で、唾液中の濃度とされている数ng/ml程度のヒスタミンを定量できる段階にある。このことから、唾液中のヒスタミンがOASのバイオマーカーになりうるかどうかの検討を行うことを本申請の目的とした。また、OASのアレルゲンについて、加熱によってアレルゲンとしての作用を減じることができるかどうかの知見を得ることも本申請の目的とした。

3. 研究の方法

ヒスタミンの定量法としてELISA法、酵素反応法、HPLC法などがあり、唾液や涙液についてのヒスタミンの定量には、ELISA法(Kejrら、2010)やHPLC法(Vanzaら、2006)を用いた報告例があるが、いずれも感度限界よりもわずかに上の状況で検出が行われている。本研究では質量分析によるヒスタミン定量も検討する。質量分析法によるヒスタミン定量の妥当性を検討する。

LC-MS/MS分析 - ヒスタミンは、四重極型の質量分析機(API-3000, Applied Biosystems)とAgilent HP 1100 HPLC systemを用いて行った。ヒスタミンとヒスチジンの分離には、ZIC-HILICカラム(150 × 2.1 mm, 5 μm particle size)(Merck)を用いた。分析の詳細な条件は表1に示した。

唾液中のヒスタミン定量 - 唾液からのヒスタミン定量には、脱脂綿を用いて唾液を抽出し、有機溶媒と混合することによって一定の不純物を取り除いたものをサンプルとした。唾液サンプルの準備および分析用サンプルの準備は、図1に詳細を示した。

4. 研究成果

ヒスタミンの定量法として、まずHPLC法で検討した。イオン交換カラムを用いて唾液中の成分を分離し、o-フタルアルデヒドで誘導体化して蛍光検出する方法を試したが、用い

た機器では感度が低く、生体中の成分を分析するのに不向きであること、また用いたカラムではドーパミンなど他のアミンがヒスタミンと同じ時間で溶出するため、ヒスタミンを分離できていなかったことから、別の方法を試すことにした。四重極型の質量分析機を用いてヒスタミンの検出を試みた。高親水性化合物の分離分析に優れている、親水性相互作用クロマトグラフィー用カラムを用意し、アセトニトリル-ギ酸アンモニウム水溶液の系で、唾液中のヒスタミンをグラジエントモードで分析した。定量のための内部標準としてヒスタミン同位体を用いた。その結果複数の被験者の唾液中ヒスタミンを検出し定量できることを確認した。添加回収試験においては定量の正確性が確認できた。

表 1

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)- electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry (MS/MS) conditions

| HILIC conditions | |
|--------------------------------------|--|
| Column | ZIC-HILIC 150 × 2.1 mm (internal diameter) 5 μm (particle size) |
| Mobile phase A | Ammonium formate 10 mM (pH 3.0) |
| Mobile phase B | Acetonitrile |
| Gradient condition | time (min) % mobile phase B |
| | 0 87 |
| | 1 87 |
| | 14 25 |
| | 16 25 |
| | 17 87 |
| | 32 87 |
| Flow rate | 150 μl/min |
| Injection volume | 5 μl |
| Column temperature | Room temperature |
| API 3000 MS/MS conditions | |
| | histamine (MRM 112/95) |
| Polarity | ESI+ |
| Ion spray voltage (V) | 4500 |
| Nebulizer gas | 12 |
| Curtain gas | 10 |
| Temperature (°C) | 500 |
| Collision activated dissociation gas | 6 |
| Declustering potential (V) | 27 |
| Focusing potential (V) | 110 |
| Entrance potential (V) | 10.5 |
| Collision energy (V) | 20 |
| Collision cell exit potential (V) | 15 |
| MRM transition | m/z 112→95 |

リンゴによる口腔アレルギー発症時の唾液中ヒスタミン量の変化を、口腔アレルギー症候群の被験者(A)と、健常者(B)と同じ環

境の下、唾液を採取して調べた。唾液サンプルの準備と分析用サンプルの準備はそれぞれ図1と2の通りである。リンゴを食べて約10分後に被験者(A)は口腔内に違和感を感じており、そのときの唾液中ヒスタミン量が増加した(図3)。一方被験者(B)では増加しなかった(図3)。複数回同じ実験を行田ところ、ほぼ同様の結果が得られた。このことから、口腔内に違和感が生じるような環境で唾液中ヒスタミン量を調べると、(A)と(B)とで違いが現れる可能性が示唆された。今後は被験者を増やして上記の内容を繰り返し行い、一般的にみられる現象かどうかを確認する必要がある。

唾液サンプル

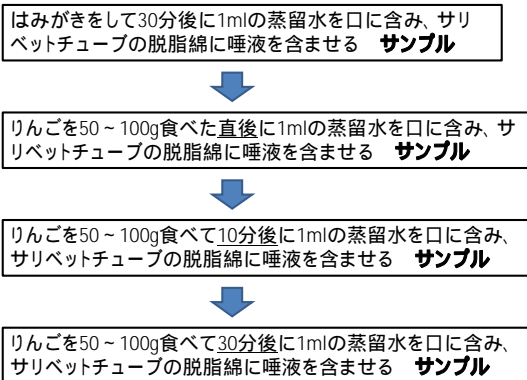


図1 唾液サンプルの作成方法

分析用サンプル

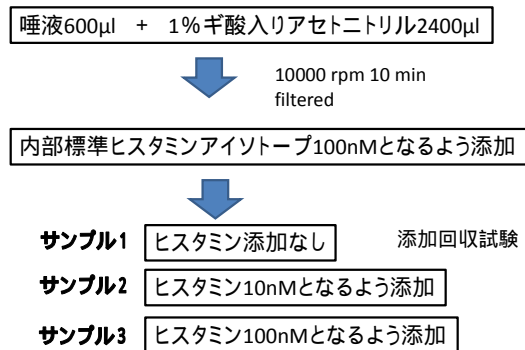


図2 分析用サンプルの作成方法

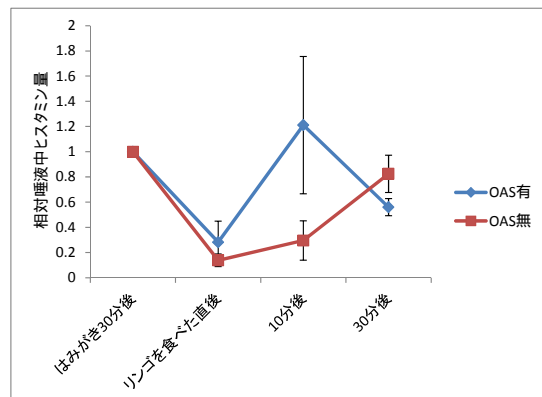


図3 唾液中ヒスタミン量の変化

口腔アレルギーの原因物質の性質を調べる目的で、イチゴのアレルゲンである Fra a 1 タンパク質について、組み換え体タンパク質の立体構造を調べた。タンパク質の精製は購入した低圧クロマトグラフィーを用いて行い、精製した試料を真空 CD で調べた。真空 CD から予測された二次構造の数や位置は、NMR ですでに決定された構造とほぼ一致していた。さらにその試料を加熱し、60 以上にしてから冷却すると、不可逆的な構造変化が見られた。その構造変化が、エピトープ付近であったことから、加熱によってアレルゲンの IgE 結合能が変化する可能性が示唆された。

OAS の発症は、生の果物や野菜が口腔内に接触したときに生じることが多く、ジャムなどの加熱した果物では生じないことがある。これは、アレルゲンが熱変性によって抗体と結合しなくなったためと考えられる。真空 CD の結果から、イチゴの OAS では、60 以上に加熱することによって、Fra a 1 タンパク質による抗原抗体反応を抑制することができる可能性を示した。そこで、生のイチゴを 60 湯浴で 1 分 (図 4 真ん中)、2 分 (図 4 左) 処理したイチゴを未処理 (図 4 右) と中身の様子を調べたところ、特に大きな変化は認められなかった。このことから、60 処理をすることによって、生に近い状態の果物を、OAS を発症することなく食することができる可能性を示すことができたとと思われる。今後は、イチゴから Fra a 1 タンパク質を取り出し、60 処理を施したサンプルと未処理のサンプルを用意し、OAS を有する人の血清と抗原抗体反応を行い、実際に 60 処理によって抗原抗体反応が抑制されるかどうかを確認する必要があると思われる。



図 4 加熱処理・未処理のイチゴ

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)

[学会発表](計 4 件)

1) Manabu Narukami, Daisuke Futsuki, Takeshi Nabe, Yoko Nitta, Hiroki Tsuruta, Kiyoshi Yamasaki, Miho Iduhara, Yuji Noguchi and Yuichi Uno
Varietal Differences in Transcript and Protein Levels of Strawberry Allergen Fra a 1

The American Society for Horticultural Science (ASHS)2013 Annual Conference 7 月 22-25 日 JW Marriott Desert Springs Palm

Desert, California United States

2) Daisuke Futsuki, Takeshi Nabe, Yoko Nitta, Hiroki Tsuruta, Kiyoshi Yamazaki, Miho Iduhara and Yuichi Uno

Comparison of IgE Binding Capacity and Expression Analysis of Strawberry Allergen Fra a 1.

The American Society for Horticultural Science (ASHS) 2013 Annual Conference 7 月 22-25 日 JW Marriott Desert Springs Palm Desert, California, United States

3) Daisuke Futsuki, Takeshi Nabe, Yoko Nitta, Hiroki Tsuruta, Kiyoshi Yamazaki, Miho Iduhara and Yuichi Uno

Analysis of IgE binding capacity and stress inducibility of strawberry allergen Fra a 1

INTERNATIONAL STRAWBERRY CONGRESS 9 月 4-6 日 2013 年 Antwerp, Belgium

4) Manabu Narukami, Daisuke Futsuki, Takeshi Nabe, Yoko Nitta, Hiroki Tsuruta, Kiyoshi Yamasaki, Miho Iduhara, Yuji Noguchi and Yuichi Uno

Comparison of transcript and protein levels of strawberry allergen Fra a 1 among different cultivars

INTERNATIONAL STRAWBERRY CONGRESS 9 月 4-6 日 2013 年 Antwerp, Belgium

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新田陽子 (Nitta Yoko)

岡山県立大学・大学院保健福祉学研究科・准教授

研究者番号 : 70403318