

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461693

研究課題名(和文) 牛肉アレルギー患者で持続的に高発現される好塩基球CD203cの活性化機序の解明

研究課題名(英文) Study for a mechanism of prolonged CD203c expression-based basophil activation in the patients with red meat allergy

研究代表者

千貫 祐子 (Chinuki, Yuko)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：00294380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本邦における獣肉アレルギーの主要な原因抗原エピトープは糖鎖galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -Gal)である。我々は、獣肉アレルギー患者について好塩基球活性化試験CD203c発現定量を行ったところ、アレルギーを添加していない時でもCD203cが高発現していることを突き止めた。獣肉アレルギーの発症機序を解明する目的で、日本紅斑熱の媒介優勢種であるフタトゲチマダニの唾液腺を解析したところ、 $\alpha$ -Galの存在を証明した。このことから、マダニ咬傷によって、マダニ唾液腺中の $\alpha$ -Gal含有蛋白質に対するIgE抗体が産生されて感作が成立し、好塩基球の持続活性化が生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that patients with red meat allergy showed prolonged CD203c expression-based basophil activation even if they did not developed allergic reaction. The incidence of red meat allergy is high in Shimane prefecture, as is tick-transmitted Japanese spotted fever. Therefore, we speculated that tick bites may cause these meat allergies. The carbohydrate  $\alpha$ -Gal was detected in the salivary gland protein of *Haemaphysalis longicornis* (*H. longicornis*), the vector for Japanese spotted fever, by immunoblotting using anti- $\alpha$ -Gal antibody. *H. longicornis* salivary gland protein-specific IgE was detected in the sera of 24 of 30 patients with red meat allergies. Sensitization to tick salivary gland protein containing  $\alpha$ -Gal is possibly a major role in the prolonged CD203c expression-based basophil activation in the patients with red meat allergy.

研究分野：食物アレルギー

キーワード：獣肉アレルギー マダニ咬傷 好塩基球 CD203c発現定量  $\alpha$ -Gal

### 1. 研究開始当初の背景

本研究室が存在する島根県は、マダニが媒介するリケッチア感染症の好発地域である。この地域において、申請者らは多数の牛肉アレルギー患者を経験している。申請者らは、牛肉アレルギー患者が交差反応のために魚卵の摂取によってもアナフィラキシーを発症することを明らかにしている。このように牛肉アレルギーにおける複雑な交差反応が明らかにされてきており、今後、発症機序の解明が焦点となる。

IgE 依存性の食物アレルギーでは、好塩基球は肥満細胞とともに中心的なエフェクター細胞であり、in vitro での活性化反応は食物負荷試験に代わる臨床検査として応用できる可能性を有する。CD203c は膜型酵素である ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase3 (E-NPP3) で、高親和性 IgE 受容体刺激などによって活性化を受けると発現が増強することから、好塩基球の活性化マーカーとされている。申請者らのこれまでの研究により、牛肉アレルギー患者では末梢血中の好塩基球活性化マーカー CD203c が持続的に高発現しているにも関わらず、脱顆粒は起こさない状態であることを明らかにしている (unpublished data)。

### 2. 研究の目的

本研究は、牛肉アレルギー患者において抗原耐性を誘導し、治癒に導くことを最終目的として、本疾患で好塩基球活性化マーカー CD203c が持続的に発現増強している点に着目し、牛肉アレルギーにおける好塩基球の持続活性化の機序と病態における意義を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

牛肉アレルギー患者好塩基球の持続的活性化 (プライミング)

牛肉アレルギー患者において好塩基球活性化マーカー CD203c が持続的に発現増強していることを確認する。これらの好塩基球では抗原により脱顆粒することをヒスタミン遊離試験により確認する。

マダニ咬傷による牛肉アレルギー発症の成立機序

マダニの蛋白質を抽出し、マダニ自体が糖鎖である  $\alpha$ -Gal を有しているか否かを明らかにする。マダニ自体が  $\alpha$ -Gal を有していれば、マダニ咬傷によってヒトが  $\alpha$ -Gal に対する抗体を作ることが理解される。

### 4. 研究成果

牛肉アレルギー患者では、患者好塩基球に陰性コントロールの PBS を添加しただけでも、CD203c 発現量の増強が認められた (図 1)。つまり、アレルゲンが添加されていない定常状態でも、既に CD203c が高発現しているこ

とが示唆された。

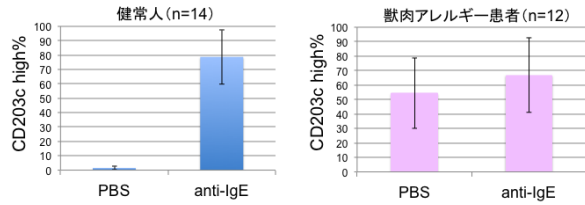
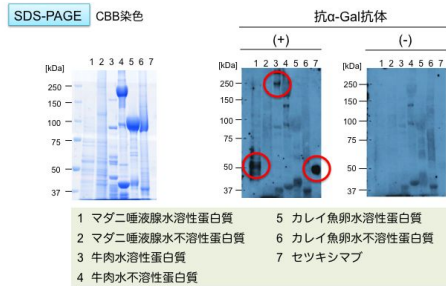


図1. 獣肉アレルギー患者における好塩基球活性化マーカー CD203c 発現量

牛肉アレルギー患者の多くが、マダニの媒介するリケッチア感染症である日本紅斑熱の好発地域に居住していたが、日本紅斑熱発症の既往のある患者はいなかった。

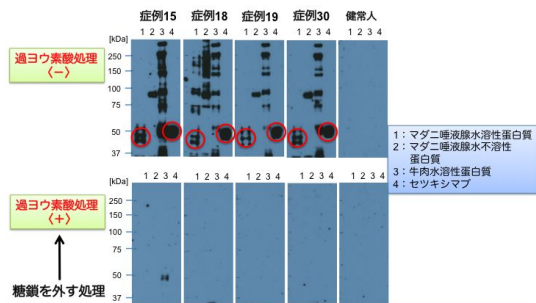
本法における牛肉アレルギー発症原因としてのマダニ咬傷の関与を解析する目的で、我々は日本紅斑熱の媒介優勢種であるフタトゲチマダニの成ダニを入手し、フタトゲチマダニ虫体から蛋白質を抽出し、抗  $\alpha$ -Gal 抗体を用いて、フタトゲチマダニの虫体中に  $\alpha$ -Gal が存在するか否かをウェスタンブロット法にて確認したが、 $\alpha$ -Gal の証明は出来なかった。そこで、フタトゲチマダニ成ダニから唾液腺のみを取り出して  $\alpha$ -Gal を検索したところ、唾液腺中に  $\alpha$ -Gal の存在を証明することが出来た (図 2)。



フタトゲチマダニ成ダニの唾液腺から抽出した蛋白質中に  $\alpha$ -Gal が存在した。

図2 抗  $\alpha$ -gal 抗体を用いたマダニ唾液腺のウェスタンブロット法 ( $\alpha$ -Gal の検出)

さらに、牛肉アレルギー患者血清中 IgE のフタトゲチマダニ唾液腺可溶性、不溶性蛋白質への反応をウェスタンブロット法にて解析したところ、患者血清中 IgE はフタトゲチマダニ唾液腺可溶性蛋白質に結合した (図 3)。



マダニ咬傷により、マダニ唾液腺中の  $\alpha$ -gal を含む糖鎖含有蛋白質に対する IgE が産生され、牛肉アレルギーやセツキシマアレルギーが発症する可能性がある。

図3 牛肉アレルギー患者血清中 IgE を用いたウェスタンブロット法 (患者血清 IgE のマダニ唾液腺可溶性蛋白質への反応と糖鎖の関与)

さらにこの反応は、過ヨウ素酸処理を施すことによって消失したことから、患者血清中 IgE が糖鎖を認識していることが判明した。つまり、フタトゲチマダニに咬まれることによって、マダニ唾液腺中の  $\alpha$ -Gal 含有蛋白質に対する IgE 抗体が産生され、何らかの機序で好塩基球の持続活性化が生じ、牛肉アレルギーが発症し得ることが確認出来た。

## 5. 主な発表論文

(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 11 件)

1. Chinuki Y, Ishiwata K, Yamaji K, Takahashi H, Morita E. Haemaphysalis longicornis tick bites are a possible cause of red meat allergy in Japan. *Allergy* 71, 2016, 421-425. (査読有り) doi: 10.1111/all.12804.
2. Yokooji T, Okamura Y, Chinuki Y, Morita E, Harada S, Hiragun M, Hide M, Matsuo H. Prevalences of specific IgE to wheat gliadin components in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergol Int* 64, 2015, 156-161. (査読有り) doi: 10.1016/j.alit.2014.11.003.
3. Nakamura M, Yagami A, Hara K, Sano A, Kobayashi T, Aihara M, Hide M, Chinuki Y, Morita E, Teshima R, Matsunaga K. A new reliable method for detecting specific IgE antibodies in the patients with immediate type wheat allergy due to hydrolyzed wheat protein: correlation of its titer and clinical severity. *Allergol Int* 63, 2014, 243-249. (査読有り) doi: 10.2332/allergolint.13-0A-0618.
4. Iseki C, Kawanami T, Tsunoda T, Chinuki Y, Kato T. Chronic headaches and sleepiness caused by facial soap (containing hydrolyzed wheat proteins)-induced wheat allergy. *Intern Med* 53, 2014, 151-154. (査読有り)
5. Takahashi H, Chinuki Y, Tanaka A, Morita E. Laminin  $\alpha$ -1 and collagen  $\alpha$ -1(VI) chain are galactose- $\alpha$ -1,3-galactose-bound allergens in beef. *Allergy* 69, 2014, 199-207. (査読有り) doi: 10.1111/all.12302.
6. 千貫祐子, 伊藤和行, 武田真紀子, 竹内薫, 高橋仁, 森田栄伸. セツキシマブによるアナフィラキシーショックの 4 例  $\alpha$ -gal 特異的 IgE 検出による回避の可能性. *日皮会誌*. 124: 179-183, 2014.

(査読有り)

7. Chinuki Y, Takahashi H, Dekio I, Kaneko S, Tokuda R, Nagao M, Fujisawa T, Morita E. Higher allergenicity of high molecular weight hydrolysed wheat protein in cosmetics for percutaneous sensitization. *Contact Dermatitis* 68, 2013, 86-93. (査読有り) doi: 10.1111/j.1600-0536.2012.02168.x.
8. 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, 2013, 229-238. (査読有り) doi: 10.2332/allergolint.12-0A-0495.
9. Morita E, Chinuki Y, Takahashi H. Recent advances of in vitro tests for the diagnosis of food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 71, 2013, 155-159. (査読無し) doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.010.
10. 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, 2013, 435-45. (査読有り) doi: 10.2332/allergolint.13-0A-0561.
11. 千貫祐子, 高橋仁, 森田栄伸. 牛肉アレルギー患者 20 例の臨床的および血清学的解析. *日皮会誌*. 123: 1807-1814, 2013. (査読有り)

[学会発表](計 12 件)

1. Chinuki Y, Morita E. Red Meat Allergy and Its Clinical Diversity. The 23<sup>rd</sup> World Congress of Dermatology, Vancouver, CANADA. (June 9, 2015)
2. 千貫祐子, 森田栄伸. アレルギー性蕁麻疹 ~ Molecular Allergology 時代に向かって ~. 第 114 回日本皮膚科学会総会. (2015/5/31)パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. 千貫祐子, 伊藤和行, 高橋仁, 森田栄伸. 頭頸部癌患者 90 名における  $\alpha$ -gal 関連抗原特異的 IgE の検索とセツキシマブによるアナフィラキシー回避の試み. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会. (2015/5/28)グランドプリンスホテル新

- 高輪(東京都港区)
4. 千貫祐子, 鶴沼香奈, 森田栄伸. セツキシマブ投与時のアナフィラキシーショックによる死亡例の解析. 第64回日本アレルギー学会学術大会.(2015/5/27) グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
  5. 森田栄伸, 千貫祐子. マダニと食物アレルギー~糖鎖エピトープの多彩な交差反応~. 第64回日本アレルギー学会学術大会.(2015/5/26) グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
  6. 千貫祐子, 河野邦江, 福富友馬, 秀道広, 松永佳世子, 岸川禮子, 相原道子, 横関博雄, 堀川達弥, 足立厚子, 片山一朗, 高橋 仁, 塩飽邦憲, 森田栄伸. グルパール 19S 感作による即時型小麦アレルギー患者 350 名の予後調査結果. 第64回日本アレルギー学会学術大会.(2015/5/26) グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
  7. 千貫祐子, 伊藤和行, 武田真紀子, 竹内薫, 小田直治, 高橋 仁, 森田栄伸: 頭頸部癌患者 64 名における -Gal 関連抗原特異的 IgE 保有率とセツキシマブによるアナフィラキシー回避の試み. 第66回日本皮膚科学会西部支部学術大会.(2014/11/8) アルファあなぶきホール(香川県高松市)
  8. 千貫祐子, 石渡賢治, 高橋 仁, 森田栄伸: 獣肉アレルギー30例の発症原因と血液型の関与, 交差反応性に関する解析. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会.(2014/5/9) 国立京都国際会館(京都府京都市)
  9. Morita E, Chinuki Y, Takahashi H, Takeda M, Takeuchi K, Ito K: Galactose-1,3-galactose(-gal)-specific IgE test is highly useful for predicting Cetuximab-induced Anaphylaxis. 6th Drug Hypersensitivity Meeting. Switzerland, Bern, April 9-12, 2014
  10. 千貫祐子, 石橋賢治, 高橋 仁, 森田栄伸: 牛肉アレルギーの発症原因と交差反応性に関する検討(続報). 第65回日本皮膚科学会西部支部学術大会.(2013/11/9) かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
  11. 千貫祐子, 石渡賢治, 高橋 仁, 森田栄伸: 牛肉アレルギー患者 28 例の発症原因と交差反応に関する検討. 第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会.(2013/9/21) 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
  12. 千貫祐子, 石渡賢治, 高橋 仁, 森田栄伸: 牛肉アレルギー発症におけるマダニ咬傷の関与. 第112回日本皮膚科学会総会.(2013/6/15) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計7件)

1. 千貫祐子, 森田栄伸: 蕁麻疹, 血管性浮腫. 膠原病・リウマチ・アレルギー研修ノート. 診断と治療社. Pp493-495, 2016
2. 千貫祐子, 森田栄伸: セツキシマブと -Gal IgE. 医薬ジャーナル社. Pp146-151, 2016
3. 千貫祐子, 森田栄伸: 食物依存性運動誘発アナフィラキシー(FDEIA)診断の決め手. メディカルレビュー社. Pp60-61, 2014
4. 千貫祐子: 食物アレルギー. 今日の治療方針 2014年版. 山口 徹, 北原光夫 監修, 福井次矢, 高木 誠, 小室一成 総編集. 医学書院. pp765-766, 2014
5. 千貫祐子: じん麻疹. 今日の治療方針 2013年版. 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢 総編集. 医学書院. pp1034-1035, 2013
6. 千貫祐子, 森田栄伸: 食物依存性運動誘発アナフィラキシーの病態・診断・検査. 蕁麻疹・血管性浮腫 パーフェクトマスター. 秀道広 専門編集, 古江増隆 総編集. 中山書店. pp189-194, 2013
7. 千貫祐子: 肉アレルギー(-gal). 症例を通じて学ぶ 年代別食物アレルギーのすべて. 海老澤元宏 編. 南山堂. pp224-225, 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 千貫 祐子(CHINUKI YUUKO)  
 島根大学・医学部・講師  
 研究者番号: 00294380

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：