

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461488

研究課題名(和文) 抗原の消化管透過性から見た食物アレルギー発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of food allergy from the viewpoint of intestinal permeability of allergens

研究代表者

松尾 裕彰 (MATSUO, HIROAKI)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から、食物アレルギーの症状誘発に食物抗原の消化管吸収量に関与していることが示唆されている。しかしながら、食物抗原の消化管透過性を評価する方法は確立されていない。本研究では、LC-MS/MSを用いた食物抗原の血中濃度定量法の確立を試みた。その結果、血液中のオボアルブミンを免疫沈降により濃縮後、GGLEPINFTAADQARペプチドを測定対象としてMRM法により測定することで、卵白アレルギーの血中濃度が定量可能であることを明らかにした。この方法を利用して、抗原吸収量を評価することで、消化管抗原透過性と食物アレルギー発症との関連性を明らかにすることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have suggested that the amount of food allergen absorbed from intestinal tract is involved in the induction of allergic symptoms in patients with food allergy. However, the evaluation method of intestinal permeability of food allergens has not been fully established. In this study, we attempted to develop the method for measuring the blood concentration of an egg white allergen (ovalbumin) by LC-MS/MS. As a result, GGLEPINFTAADQAR sequence in ovalbumin was identified as a target peptide for determination of blood ovalbumin level by multiple reaction monitoring. We also found that concentration by immunoprecipitation with anti-ovalbumin antibody is needed for detection of plasma ovalbumin. Evaluation of the amount of absorbed food allergens by the measuring of the blood concentration enables us to elucidate the relationship between gut permeability and development of food allergy.

研究分野：アレルギー学、医療薬学

キーワード：食物アレルギー アレルゲン 消化管透過性 血中アレルゲン濃度

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギー患者は、近年増加傾向にある。また、学校給食における誤食によりアナフィラキシーを発症し、食物アレルギー患児が死に至ったケースが報道されるなど、社会問題となっている。急速減感作療法などの抗原特異免疫療法による治療が試みられ、一定の治療効果が得られているが、食物アレルギーの根治療法として確立されていない。したがって、食物アレルギーの発症や耐性獲得メカニズムを解明し、新たな対策を講じる必要がある。

重篤な症状を引き起こす原因食物は、鶏卵、乳製品、小麦の順に多いことが明らかにされている。我々はこれまでに、小麦アレルギーの中で、小麦摂取後の運動負荷や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の服用によりアナフィラキシーが誘発される食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) の病態解明を目的に抗原解析を実施した。その結果、小麦による FDEIA の主要抗原が 5-グリアジン、 γ -グリアジンおよび高分子量グルテニンであることを明らかにした。さらに、それらの抗原コンポーネントに対する特異 IgE 抗体の測定が小麦 FDEIA の診断に有用であることを示した。

また、小麦 FDEIA におけるアレルギー症状が、運動や NSAIDs の服用によって誘発されるメカニズムを解析し、小麦摂取後の運動負荷や NSAIDs の服用が血中の小麦抗原濃度を上昇させることを明らかにした。つまり、FDEIA のアレルギー症状の誘発に消化管から吸収された抗原量が密接に関連していることを示唆する。

これらの背景から、「通常の即時型食物アレルギー患者は、運動負荷なしで症状誘発に十分な抗原量が消化管から吸収されるのだろうか？」という疑問が生じた。この疑問を解決する目的で、小麦、鶏卵および乳製品について ELISA 法による血中抗原量の測定を試みた。小麦グリアジンは血清から 70% エタノールによる抽出操作を実施することで、ELISA で測定できたが、多量の血清が必要であるため、小児の即時型小麦アレルギー患者の血中抗原の測定は困難であった。また、鶏卵や牛乳の血中抗原の測定についても、ELISA による血中抗原濃度測定は困難であった。

近年、質量分析技術の進歩により、生体試料中のタンパク質を 10^{-18} M ~ 10^{-15} M レベルで検出できるようになった。そこで、抗原を含む血中タンパク質すべてをプロテアーゼ消化後、残存する抗原由来ペプチドを質量分析器 (LC-MS/MS) で測定することで、ELISA 法より高感度、且つ、効率的に血中抗原の定量が可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、食物アレルギーの感作相および誘発相に、食物抗原の消化管透過性の違い

がどの程度影響しているのかを明らかにすることを最終目的として、LC-MS/MS を用いた血中食物抗原定量法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) プロダクトイオンスキャン法 (MRM 法) による抗原定量に用いるトランジションの探索

抗原タンパク質を 8 M 尿素を含有する 50 mM トリス塩酸バッファーに溶解後、20 mM ジチオスレイトールを添加し 60 °C で 60 分間インキュベートした。40 mM ヨードアセトアミドを加え室温で 30 分間インキュベートすることによりアルキル化処理を行った。次にトリプシンまたはキモトリプシンを加えて 37 °C で 20 時間消化した後、溶液を凍結乾燥した。1% ギ酸溶液にて再溶解し、C18 column (Pierce® or MonoSpin™) を用いて脱塩処理した。得られたペプチド断片を 50% アセトニトリル/5% ギ酸バッファーに溶解させた。この試料を nanoLC-MS/MS システム (LC: Eksigent nanoLC 425、MS: TripleTOF5600+、AB Sciex) にて分析した。得られたフラグメントペプチドイオンデータを Skyline Software (version 3.5, MacCoss Lab Software) にて解析し、最適 collision energy を予測した。

(2) MRM 法による卵白 OVA の定量

ラット血漿 20 μ L に OVA 10 ng を添加した試料を前述と同様の方法でトリプシン処理した後、LC-MS/MS 装置を用いて選択したプレカーサーイオンをターゲットとして MRM 法により測定した。

定量するためにカルボキシ末端に存在するアルギニンを安定同位体 (^{13}C および ^{15}N) 標識したペプチド (GGLEPINFQTAADQAR) 合成し、100 pg を OVA 測定試料に内部標準として添加した。この試料を同様の方法で前処理した後に MRM 法により解析し、目的プレカーサーイオンのピーク面積を求めた。OVA 由来のペプチドと内部標準ペプチドのピーク面積比から、試料中の OVA 濃度を算出した。

(3) 免疫沈降を用いた血症中 OVA の濃縮

ラット血漿に特定の濃度となるように OVA を添加し、超純水を加え 2 倍希釈した。抗 OVA 抗体 (GeneTex) を共有結合させた磁性ビーズ (Dynabeads M-280 Tosylactivated) をこの溶液に加え、4 °C にて 18 時間インキュベートした。ビーズを洗浄後、グリシン塩酸バッファー (pH 2.5) を加え、抗 OVA 抗体に結合した OVA を抽出した。抽出液を中和後、前述した方法でアルキル化およびトリプシン消化した。得られたペプチドを脱塩後、MRM 法にて目的のプロダクトイオンのピーク面積を測定した。

(4) ラット血漿中 OVA 濃度の定量

雄性 SD ラット (175 g) に 100 mg の OVA を経口投与した後、1 時間後に腹部下大静脈から採血し血漿を得た。得られた血漿から OVA を免疫沈降により濃縮後、MRM 法により

OVA 濃度を求めた。

4. 研究成果

(1) MRM 法による抗原定量に用いるトランジションの探索

卵白抗原である OVA、小麦抗原である 5-グリアジンおよび β -グリアジンについて測定対象となるトランジションの探索を行った。OVA に特異的で定量性の認められるトランジションを探索するため、50, 100, 500 μ g/ml の濃度の OVA をトリプシン消化したペプチドについてスキャン測定を行い、ピーク面積の直線性とピーク形状を評価した。それらの結果と論文報告データを考慮し、6 種 [DILNQITKPNQVYFSLSLR(3+), GGLEPINFTAADQAR(2+), ISQAVHAAHAEINEAGR(3+, 4+), ELINQVWESQTNGIIR(2+), LTEWTSSNVMEER(2+), GGLEPINFTAADQAR(2+), ISQAVHAAHAEINEAGR(4+)] のプレカーサーイオンを選出した。さらに Skyline Software を用いて最適 collision energy を予測した。

次に、各プレカーサーイオンに対して最適 collision energy を設定し MRM 法にてプロダクトイオンを測定した。6 つのプレカーサーイオンのうち GGLEPINFTAADQAR(2+) が、最も再現性良く OVA 濃度とピーク面積が相関した。また、この配列には卵アレルギー患者で同定されている IgE エピトープ配列 YRGGLEPINFの一部を含んでいることから、ヒト血清中に存在する可能性が高いと考え、血中 OVA 測定のターゲットとして本ペプチドを選出した。

次に、超純水に溶解した OVA を MRM 測定法で測定した結果、10 ng/mL の OVA 濃度においても GGLEPINFTAADQAR(2+) 由来のプロダクトイオンのピークが検出できることが示された。卵白 2 mL/kg をヒトに経口負荷した後の血清中 OVA 濃度を ELISA 法で解析した報告によると、血中 OVA 濃度は 5-100 ng/mL である。したがって、本方法では 1 mL の血液があれば、OVA 濃度を測定できると推測された。

一方、小麦 5-グリアジンおよび β -グリアジンも同様の方法で解析を実施した。トリプシンを用いた時にはプレカーサーイオンピークが得られなかったため、キモトリプシンに変更してさらに解析を実施した。その結果、 β -グリアジンについては、3 つのトランジション候補ペプチドを選出した。5-グリアジンについては、解析中である。

(2) 免疫沈降法による血中 OVA の濃縮方法の検討

血中 OVA の定量はラット血漿を利用して検討した。はじめに、超純水で 2 倍希釈したラット血漿に OVA を 1000 ng/mL になるように添加した試料を測定した。その結果、OVA 由来のペプチドピークは全く検出されなかった。本実験で使用した OVA 濃度 (1000 ng/mL) は、ヒト血中で報告されている 5-100 ng/mL よりも高濃度であるにもかかわらず検出さ

れなかったことから、試料中に含まれる血漿由来の夾雑物を除去する必要があると考えられた。

そこで OVA を濃縮・精製するために、抗 OVA 抗体を利用した免疫沈降法を試みた。トシル基活性化磁性ビーズに抗 OVA 抗体を固定したものを作製した。また、50%ラット血漿 1 mL に OVA を 0-100 ng 添加した試料を準備した。これは、文献で報告されているヒト血清中 OVA 濃度 (0-200 ng/mL) に相当する。この試料に抗 OVA 抗体磁性ビーズを添加し、免疫沈降処理を行い、MRM 測定した結果、夾雑物由来のペプチドピークが低下し OVA に特異的なプレカーサーイオンピークが検出された。この結果から、免疫沈降法で血漿中 OVA を濃縮できることが明らかとなった。

(3) OVA 経口投与ラット血漿中 OVA 濃度の測定

卵アレルギー患者に対する食物経口負荷試験では、卵 1~2 個が負荷される。この負荷量を参考にラットに対する OVA の経口負荷量を 100 mg/body と設定した。OVA を経口負荷した後 1 時間後に採血し、調製した血漿から抗 OVA 抗体を利用した免疫沈降により OVA を濃縮した。この試料中の OVA を MRM 測定法により解析した結果、OVA を投与していないコントロールラット血漿よりも明らかに高い OVA 特異的プレカーサーイオンピークが検出された。このことから、前処理に免疫沈降を加えることにより、経口投与後のラット血漿中 OVA 濃度を測定できることが明らかになった。

次に、LC-MS/MS への試料注入誤差を補正するため、C-末端のアルギニン残基を安定同位体標識したペプチド GGLEPINFTAADQAR を合成した。これを内部標準物質としてトリプシン消化後の試料に 100 pg 添加し、イオンピーク面積の測定を行った。プロダクトイオンピーク面積の面積比より濃度を算出した結果、0-150 ng/mL の範囲で良好な直線性を示すことが明らかとなった。この検量線を用いて、経口投与後の血漿中 OVA 濃度を求めた結果、その濃度は 213 ng/mL であった。

本研究では、血漿から免疫沈降法による濃縮した OVA を MRM 法により測定することで、血中 OVA を定量することが可能であることを明らかにした。今後ヒト血清中の OVA を測定できることを示すと同時に、消化管の抗原透過性の評価系を確立することができれば、抗原吸収と食物アレルギー発症の関連性の詳細な解析が実施できると期待される。

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 11 件)

1. 松尾裕彰・食物抗原：最近の進歩 1. 小麦アレルゲン・アレルギー・免疫・

- 2017;24(1):66-73. 査読無 .
2. Fujimoto W, Fukuda M, Yokooji T, Yamamoto T, Tanaka A, Matsuo H. Anaphylaxis provoked by ingestion of hydrolyzed fish collagen probably induced by epicutaneous sensitization. *Allergol Int.* 2016;65(4):474-6. 査読有 .
 3. Kohno K, Takahashi H, Endo TR, Matsuo H, Shiwaku K, Morita E. Characterization of a hypoallergenic wheat line lacking -5 gliadin. *Allergol Int.* 2016;65(4):400-5. 査読有 .
 4. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int.* 2015;64(4):332-43. 査読有 .
 5. Yokooji T, Matsuo H. Sodium cromoglycate prevents exacerbation of IgE-mediated food-allergic reaction induced by aspirin in a rat model of egg allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;167(3):193-202. 査読有 .
 6. Iijima S, Ito M, Makabe K, Murakami Y, Yokooji T, Matsuo H. Case of food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to Japanese apricot and peach: Detection of causative antigens. *J Dermatol.* 2015;42(9):916-7. 査読有 .
 7. Brockow K, Kneissl D, Valentini L, Zelger O, Grosber M, Kugler C, Werich M, Darsow U, Matsuo H, Morita E, Ring J. Using a gluten oral food challenge protocol to improve diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(4):977-84. 査読有 .
 8. Yokooji T, Okamura Y, Chinuki Y, Morita E, Susumu H, 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. 査読有 .
 9. 干谷奈穂, 福永淳, 下浦典子, 錦織千佳子, 松岡亮介, 高嶋基嗣, 松尾裕彰. 加水分解コムギによる経皮感作型 WDEIA との鑑別を要した接触蕁麻疹症状を併発した Baker's asthma の 1 例. *J Environ Dermatol Cutan Allergol.* 2015;9(2):110-5. 査読有 .
 10. 松尾裕彰. 小麦アレルギー. *日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌*. 2015;13(1):37-41. 査読無 .
 11. Yokooji T, Nouma H, Matsuo H. Characterization of ovalbumin absorption pathways in the rat intestine, including the effects of aspirin. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(8):1359-65. 査読有 .
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. 荻野龍平, 大本亜沙妃, 横大路智治, 埜越崇範, 松尾裕彰. 質量分析法による卵白アレルギー定量法の開発. 日本皮膚科学会第 132 回山陰・第 28 回島根合同開催地方会. 2017 年 3 月 5 日. 出雲市 .
 2. 山本崇弘, 横大路智治, 福田光希子, 田中昭, 藤本巨, 松尾裕彰. コラーゲンアレルギーの原因抗原解析. 日本薬学会第 136 回年会, 2016 年 3 月 26-29 日. 横浜市 .
 3. 荻野龍平, 大本亜沙妃, 横大路智治, 松尾裕彰. 質量分析法による血清中アレルギー定量法の開発. 日本皮膚科学会第 130 回山陰・第 26 回島根合同開催地方会. 2016 年 2 月 28 日. 出雲市 .
 4. 二宮直紀, 羽村光, 横大路智治, 松尾裕彰. 小麦グリアジンの消化管吸収特性とアスピリンによる吸収増加機構の解明. 膜シンポジウム 2015 2015 年 11 月 25-26 日. 神戸市 .
 5. 福田光希子, 横大路智治, 山本崇弘, 田中昭, 松尾裕彰, 藤本巨. 経皮感作による発症が推測された魚由来コラーゲンペプチドによるアナフィラキシー. 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2015 年 11 月 20-22 日. 松江市 .
 6. 樋口絢子, 千貫裕子, 高橋仁, 森田栄伸, 横大路智治, 松尾裕彰. エビによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) の 70 kDa 抗原の同定と解析. 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2015 年 11 月 20-22 日. 松江市 .
 7. 神谷菜, 秋本菜里, 千貫祐子, 高橋仁, 森田栄伸, 横大路智治, 松尾裕彰. エビによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) の 40 kDa 抗原の精製法の検討. 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2015 年 11 月 20-22 日. 松江市 .
 8. 農間仁美, 羽村光, 横大路智治, 松尾裕彰. 抗 IgE 結合エピトープ抗体を用いた血清中小麦グリアジンコンポーネントの定量法の確立. 第 54 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. 2015 年 10 月 31 日-11 月 1 日. 高知市 .
 9. 早瀬佑紀, 平野太暉, 横大路智治, 松尾裕彰. 小麦グルテン感作における酸加水分解処理および感作経路の影響. 第 54 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. 2015 年 10 月 31 日-11 月 1 日. 高知市 .
 10. Yokooji T, Hirano T, Matsuo H. Aspirin facilitates the intestinal absorption and oral sensitization of food allergens in rats. XXXIV World Allergy

- Congress. Seoul, Korea, 2015, OCT 14-17.
11. Matsuo H. Identification of shrimp allergens . World Congress of Dermatology 23th. Vancouver ,Canada, 2015, June 8-13.
 12. 中川朋子, 田中昭, 酒井一徳, 林直史, 佐藤有沙, 佐々木溪円, 松井照明, 杉浦至郎, 漢人直之, 伊藤浩明, 横大路智治, 松尾裕彰. 小児の小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの原因コンポーネント . 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 . 2015 年 5 月 26-28 日 . 東京 .
 13. 松尾裕彰, 平野太暉, 横大路智治 . アスピリンによる食物抗原吸収増加が感作に及ぼす影響 .第 64 回日本アレルギー学会学術大会 . 2015 年 5 月 26-28 日 . 東京 .
 14. 横大路智治, 羽村光, 松尾裕彰 .小麦グリアジンの消化管吸収特性とアスピリンの影響解析 .第 64 回日本アレルギー学会学術大会 . 2015 年 5 月 26-28 日 . 東京 .
 15. 徳田玲子, 長尾みづほ, 森田栄伸, 横大路智治, 松尾裕彰, 松田幹, 藤澤隆夫 . 小麦アレルギー急速減感作療法と自然寛解の好塩基球活性化マーカーCD203c測定による抗原反応性の経年解析 .第 64 回日本アレルギー学会学術大会 . 2015 年 5 月 26-28 日 . 東京 .
 16. 横大路智治, 松尾裕彰 . 食物抗原の吸収とアレルギー症状の発症におよぼすアスピリンとクロモグリク酸の影響解析 . 日本膜学会第 37 年会 . 2015 年 5 月 14-15 日 . 東京 .
 17. 横大路智治, 農間仁美, 松尾裕彰 . 卵白アルブミンの消化管吸収機構とアスピリンの影響解析 . 膜シンポジウム 2014 . 2014 年 11 月 26-27 日 . 神戸市 .
 18. 飯島 茂子, 伊藤 倫子, 真壁 郁, 村上佳大, 横大路 智治, 松尾 裕彰 . 梅干しによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの 1 例 . 第 44 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 . 2014 年 11 月 21-23 日 . 仙台市 .
 19. 羽村光, 横大路智治, 松尾裕彰 . 小麦グリアジンの消化管吸収に及ぼすアスピリンの影響 . 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中四国支部学術大会 . 2014 年 11 月 8-9 日 . 広島市 .
 20. 平野大暉, 横大路智治, 松尾裕彰 . 卵白アルブミン感作に及ぼすアスピリンの影響 . 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中四国支部学術大会 . 2014 年 11 月 8-9 日 . 広島市 .
 21. 早瀬佑紀, 平野太暉, 農間仁美, 横大路智治, 松尾裕彰 . 小麦グルテン感作における加水分解処理と感作経路の影響 . 日本皮膚科学会第 128 回山陰・第 24 回島根合同地方会 . 2014 年 8 月 30-31 日 . 松江市 .
 22. 横大路智治, 農間仁美, 松尾裕彰 . 卵白

アルブミンの消化管吸収機構の解明とアスピリンによる吸収増加機構の解明 . 日本膜学会第 36 年会 . 2014 年 5 月 12-13 日 . 東京都 .

23. 松尾裕彰 . 食品のプロが語る食物アレルギー - 小麦アレルギー - . 第 31 回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 . 2014 年 6 月 28-29 日 . 名古屋市 .

〔図書〕(計 1 件)

1. 松尾裕彰, 横大路智治 . 食物アレルギーのすべて-基礎から臨床・社会的対応まで - . 伊藤浩明 編, II 食物アレルギー, 小麦・ソバ・穀物 . 医学書出版 . 診断と治療社 . pp100-109, 2016 年 10 月 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松尾 裕彰 (MATSUO HIROAKI)
広島大学・病院・教授
研究者番号 : 6 0 3 4 6 3 8 5

(2)連携研究者

森田 栄伸 (MORITA EISHIN)
島根大学医学部・教授
研究者番号 : 9 0 1 8 2 2 3 7