

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461663

研究課題名(和文)重症モモアレルギーのアレルゲン解析と検査法の確立

研究課題名(英文)Analysis of allergens related to severe reactions peach allergy

研究代表者

猪又 直子 (INOMATA, Naoko)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20347313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：モモアレルギーの重症マーカーアレルゲンはPru p 7 (Gibberellin-regulated protein: GRP、Peamaclein)であることが示唆された。Pru p 7感作の予測因子は、顔面浮腫(特に眼瞼浮腫)、喉頭絞扼感などの臨床症状と、口腔アレルギー症候群に関連する花粉感作がないことであった。またPru p 7に対するアレルギー検査法としてELISAによるIgE抗体測定法と好塩基球活性化試験の2種を確立した。さらにGRPは他の果物アレルギーの重症化にも関与することを明らかにするとともに、梅GRP (Pru m 7)とオレンジGRP (Cit s 7)を同定して国際登録を果たした。

研究成果の概要(英文)：We found that gibberellin-regulated protein (GRP), Pru p 7, could be a marker associated with systemic reactions in peach allergy in Japan. Along with the absence of co-sensitization to pollens related to pollen-food allergy syndrome (PFAS), facial edema, especially eyelid edema, and laryngeal tightness after the ingestion of peaches could be a predictive factor for Pru p 7 sensitization. We established two allergic tests, the specific IgE measurement and the basophil activation test using Pru p 7. The prevalence of GRP sensitization was high in fruit allergy patients except for patients with PFAS. GRP sensitized patients might have allergies to multiple fruits and may show peculiar characteristics such as facial swelling and cofactor dependence. The partial sequence of amino acids in Japanese apricot and orange GRPs have been submitted to WHO-IUIS nomenclature Subcommittee, which assigned the designation of Pru m 7 and Cit s 7 as new Japanese apricot and orange allergens, respectively.

研究分野：アレルギー

キーワード：モモアレルギー ジベレリン制御タンパク peamaclein 交差反応 アナフィラキシー 果物アレルギー
- Pru p 7 Pru m 7

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

近年、花粉症の増加とともに、口腔アレルギー症候群(Oral allergy syndrome:OAS)という食物アレルギーの一型に注目が集まっている。これまで、OAS 研究はヨーロッパがリードしてきたため、アレルギー検査は、ヨーロッパの知見に基づいて行われてきた。しかし、我々は、本邦のOASの実態を解析する過程で、日本の重症果物アレルギーの抱える課題に気付き、本研究を計画するに至った。まず、我々は、OASの実態を明らかにするため、2006年に、横浜在住のOAS症例63例(2000-2005)原因食物を解析したところ、原因食品は1位がリンゴ、2位がモモとキウイであることが明らかになった(猪又直子ほか：アレルギー-56：1276-1284, 2007)。OASは、近年増加する花粉症との関連が深く、花粉抗原との交差反応性により発症することが想定されたため、カバノキ花粉であるハンノキ花粉やシラカンバ花粉、その主要抗原Bet v 1やBet v 2に対する特異的IgE抗体の陽性率を調べ、上位食品によるOAS発症との関連を確認した。その結果、リンゴやモモは、カバノキ科花粉感作と有意な相関がみられ、リンゴやモモのOASの多くは、カバノキ科花粉に感作されたことが原因である可能性が示唆された(守田垂希子, 猪又直子ほか：アレルギー-57(2)：138-146, 2008.、Maeda N, Inomata N, et al. Ann Allergy Asthma Immunol.;104(3):205-10, 2010)。花粉との交差反応で生じるOAS(別名、花粉-食物アレルギー症候群 pollen-food allergy syndrome:PFAS)は、一般に軽微な口腔症状しか現れず、軽症とされているが、モモOAS症例の一部には、カバノキ科花粉の感作がなく、アナフィラキシーに至る重症例が潜在することをつきとめた。興味深いことに、このような重症例は、一般に頻用されるアレルギー検査法の一つ、ImmunoCAPではスクリーニングできないことも判明した。すなわち、モモアレルギー重症例では、モモや、ヨーロッパのモモアレルギーの重症マーカーと称される、Pru p 3に対するIgEがImmunoCAPで検出されない(前田修子, 猪又直子ほか：アレルギー-58:140-7, 2009, Asero R, et al.: Allergy. 2002; 57: 900-906.)。したがって、このような本邦の現状では、有用なスクリーニング法がないために、重症例が適切に診断されない恐れがある。そこで、本邦の重症モモアレルギー患者を適切にスクリーニングするための検査法の確立が急務と考え、本邦の重症マーカーを特定することを試みることとした。我々は、日本産モモ(浅間白鷗)から独自に精製したピマクレイン Peamclein(Pru p 7, 別名 Gibberellin regulated protein:GRP)が、本邦の新規アレルギーであることを報告し(Inomata N et al.: European Academy of Allergy Clinical Immunology-WAO, 2013, 猪又直子ほか：ア

レルギー-62:423, 2013, Tuppo L: Clin Exp Allergy 43:128-40, 2013.)重要マーカーの候補と考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究成果をもとに、以下の3つを本研究の目的とした。

モモアレルギーにおける重症マーカーアレルギーの選定

モモアレルギー(小児・成人を含む)の重症例の関与するアレルギーコンポーネントを同定する。本研究では、現在コンポーネント検査が可能なrPru p 1(Bet v 1関連タンパク質)、rPru p 3(脂質輸送蛋白質)、rPru p 4(プロフィリン)と、新規アレルギーPru p 7(Gibberellin-regulated protein:GRP)について、重症マーカーアレルギーであるか、比較検討する。

マーカーアレルギー感作と相関がみられる臨床的特徴の同定

重症マーカーアレルギーとして選定されたアレルギーが引き起こす臨床的特徴を明らかにする。そのために、マーカーアレルギー感作と相関がみられる臨床的特徴を統計学的に解析する。

重症マーカーアレルギーのアレルギー検査の確立。

重症マーカーアレルギーのスクリーニング検査法を確立するため、2種類の検査を作製し比較検討する。具体的には、重症マーカーアレルギーを抗原とした特異的IgEの抗体測定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA))と好塩基球活性化試験を作製し、両者を比較し、アレルギー検査法としての有用性を評価する。

3. 研究の方法

症例集積

当院に通院中のモモアレルギー症例の臨床データを集計し、全身症状を伴う重症例と軽症例に分ける。

アレルギーコンポーネント特異的IgE測定

Pru p 1, Pru p 3, Pru p 4, Pru p 7の4種の特異的IgE測定を行い、2群の感作率を比較する。rPru p 1, rPru p 3, rPru p 4に対する特異的IgE測定は、ImmunoCAP法(ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて検査する。Pru p 7に対する特異的IgE測定は、当科で精製したnative Pru p 7(nPru p 7)を用い、ELISAによる測定系を作製した。nPru p 7の精製は、イオン交換クロマトグラフィーを用いる。

重症マーカーアレルギーの同定

4種のモモアレルギーコンポーネントの感作率を、重症例と軽症例で比較検討する。

重症マーカー感作と臨床的特徴の相関に関する統計学的解析

モモアレルギーコンポーネントのうち、Pru p 1, Pru p 3, Pru p 4, Pru p 7感作(特異的IgE抗体陽性)と相関のある臨床的特徴を明

らかにするために、統計学的解析を行う。

スクリーニング検査法の比較

重症マーカーアレルゲンを抗原として用いる好塩基球活性化試験（CD203c 活性化）を Allergenicity Kit（Beckman Coulter, Brea, CA, USA）を用いて確立する。ELISA による特異的 IgE 抗体測定法と好塩基球活性化試験の結果を比較する。

4. 研究成果

重症マーカーアレルゲンの同定

当院モモアレルギー症例 50 例（M:F= 14:36, 年齢 31.8 歳）を集計した。このうち 19 例が全身症状を有する重症群、残り 31 例は主に口腔症状を主体とした軽症群とした。

重症マーカーアレルゲンに関する解析では、まず、既知のモモアレルゲンコンポーネント 3 種について IgE 反応性を調べた。Pru p 1（Bet v 1 関連タンパク質）、Pru p 3（脂質輸送蛋白質）、Pru p 4（プロフィリン）に対する反応性について ImmunoCAP 法を用いて調べたところ、全身症状を伴う症例 19 例は rPru p 1、rPru p 3、rPru p 4 には各々 15.8%、5.3%、5.3%、口腔症状のみの症例 31 例では各々 87.1%、6.5%、38.7% の陽性率であった。統計学的解析では、rPru p 1 と rPru p 4 は、口腔症状のみの軽症と有意な相関がみられた（ $P<0.001$, $P<0.001$ ）。が、rPru p 3 は重症度との相関はみられなかった。nPru p 7 では、全身症状との相関をみとめた。

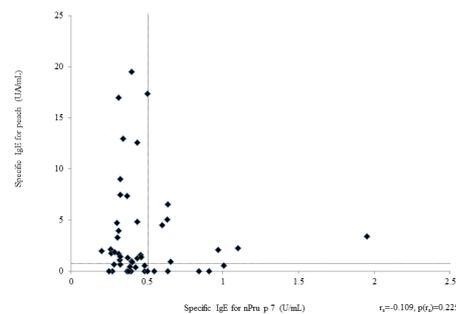
重症マーカーアレルゲン Pru p 7 感作を予測する因子

Pru p 7 感作と相関がみられた臨床症状は、喉頭絞扼感（ $p<0.01$ ）、眼球結膜充血（ $p<0.05$ ）、顔面浮腫（ $p<0.05$ ）、全身性蕁麻疹（ $p<0.05$ ）と相関であった。顔面浮腫については、特に眼瞼浮腫は高い相関をみとめた。これらは、PFAS でみられる臨床症状とは大きく異なるため、これらの臨床症状は、重症例を予測するための重要な因子と考えられる。また、軽症群に比べ、重症群ではカバノキ科花粉（ハンノキやシラカンバ花粉）感作率が極めて低いことから、この点も予測因子の 1 つと考えられる。

また、Pru p 7 感作の特徴として、多種果物アレルギーを合併すること、運動や解熱鎮痛薬が二次的要因となる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの臨床型をとる場合があることも明らかになった。本研究で見出した、Pru p 7 感作の予測因子は、重症モモアレルギーの早期診断、他種果物アレルギー合併の推定に役立つものと期待される。

既知のモモアレルギー検査と Pru p 7 特異的 IgE 測定の相関について

一般にモモアレルギーの検査と頻用される、モモ粗抗原に対する特異的 IgE 抗体価（ImmunoCAP）と、本測定系による Pru p 7 特異的 IgE 抗体価の相関について、Spearman's rank correlation coefficient を用いて、統計学的解析を行った。その結果、両者には相関はみとめられなかった。したがって、Pru p 7 感作のスクリーニングに、ImmunoCAP 法によるモモ特異的 IgE 測定は代用できないことが示唆された。



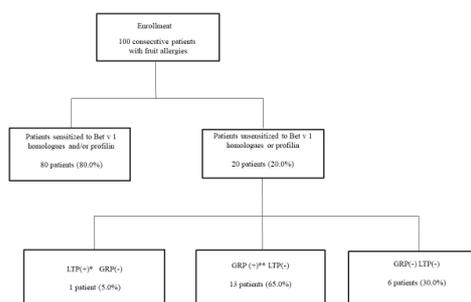
2種類のスクリーニング法の比較

native Pru p 7 を抗原とした好塩基球活性化試験（CD203c 活性化）を確立し、ELISA 法との比較検討を行った。モモアレルギー 12 例を対象に実施した。好塩基球活性化試験では、12 例中 6 例で native Pru p 7 に対する CD203c 活性の上昇が確認された。その 6 例中 5 例は、native Pru p 7 に対する特異的 IgE 抗体測定も陽性であった。一方、好塩基球活性化試験が陰性となった 6 例全例で、native Pru p 7 特異的 IgE 抗体が陰性であった。陽性率は、好塩基球活性化試験で 41.7%、特異的 IgE 抗

体測定で 50% と好塩基球活性化試験の方が低かった。陰性率は、好塩基球活性化試験で 58.3%、特異的 IgE 抗体測定で 50% であった。2 つの検査系の陽性一致率は 83.3%、陰性一致率は 100% であった。以上より、両測定系の結果には相関がみられる可能性がある。今後症例をさらに蓄積し、両者の相関、及び有用性に関する比較検討が必要と考えた。

重症の果物アレルギーのスクリーニングへの応用

重症モモアレルギーの解析にて、モモ以外の果物アレルギーにも GRP が関与する可能性を見出した。そこで、果物アレルギーにおける Pru p 7 感作率を調べ、感作例の臨床的特徴を解析した。当科通院中の果物アレルギー 100 例のうち 13 例 (13%) は、Pru p 7 特異的 IgE は陽性であった。Pru p 7 感作がみられる症例の原因食品は、モモ (92.3%)、梅 (61.5%)、オレンジ (46.2%) の順に多かった。10/13 例は原因果物が多種に及んだ頻度の高い症状は顔面の浮腫、喉頭絞扼感であり重症例が多かった。また運動やアスピリン内服などの二次的要因の関与も示唆され、診断が難しいケースが多く含まれていた。これまで、果物アレルギーにおいて、花粉 食物アレルギー症候群以外のアレルゲンや機序について十分に解析されていなかったため、本研究成果は果物アレルギーの診断効率の向上に寄与するものと考えられる。



梅 GRP の同定 : Pru m 7

上記の研究から、モモ以外の果物に GRP が存在し、重症化に関与しているもの推察されたため、果物 GRP アレルギーの中で、モモに次

いで、2 番目に多い梅について、GRP の同定を試みた。ウエスタンブロット法にて果肉中に GRP が存在することが判明したため、精製を行った。N 末端アミノ酸解析を施行し、梅 GRP と同定した (GSSFCDKSKCGVRCGSKAGYQERCLKYCGICCEKCHCVPSGTYGNKDEPCYRDLKNSKGNPKCP)。また質量分析 (MALDI-TOF mass spectrometry) にて、分子量は 6896.5Da であった。

さらに、モモ Pru p 7 と梅 Pru m 7 は、ELISA 阻害試験にて交差反応を起こすことを証明した。

梅 GRP を、Pru m 7 として、アレルゲン国際登録した。 (The World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO-IUIS) nomenclature)

オレンジ GRP の同定 : Cit s 7

モモと梅は、生物分類学上、同じバラ科に属すが、果物アレルギーの研究結果では、オレンジアレルギーを合併する例もみられた。そこで、オレンジ中の GRP を同定し精製を行った。N 末端アミノ酸解析を施行し、オレンジ GRP と同定した

(GSDFCDSKCAVRCGSKAGREDRCLKYCGICCDKCHCVPSGTYGHKDEPCYRDLKNSKGNPKCP)。また質量分析 (MALDI-TOF mass spectrometry) にて、分子量は 6941.6 Da であった。このオレンジ GRP はモモ Pru p 7 や梅 Pru m 7 と交差反応を生じることを、ELISA 阻害試験にて証明した。**オレンジ GRP を、「Cit s 7」として、アレルゲン国際登録した。**

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)

Inomata N, Nagashima M, Hakuta A, Aihara M: Food allergy preceded by contact urticarial due to the same food : involvement of epicutaneous sensitization in food allergy. Allergol Int, 64:73-78, 2015. (査読有)

Inomata N, Miyakawa M, Aihara M: Eyelid

edema as a predictive factor for sensitization to Pru p 7 in peach allergy. J Dermatol, 43(8):900-905, 2016. (査読有)

Hotta A, Inomata N, Tanegasima T, Oda K, Inoue Y, Aihara M: A case of food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to peach with Pru p 7 sensitization. J Dermatol. 43:222-223, 2016. (査読有)

Inomata N, Miyakawa M, Aihara M: High prevalence of sensitization to gibberellin-regulated protein (peamaclein) in fruit allergies with negative immunoglobulin E reactivity to Bet v 1 homologs and profilin: Clinical pattern, causative fruits and cofactor effect of gibberellin-regulated protein allergy. J Dermatol, 44:735-741, 2017. (査読有)

Inomata N, Miyakawa M, Aihara M: Gibberellin-regulated protein in Japanese apricot is an allergen cross-reactive to Pru p 7. Immunity, Inflammation and Disease, 5:469-479, 2017. (査読有)

Katayama M, Inomata N, Inagawa N, Fukuro S, Aihara M: A case of contact urticaria syndrome stage 3 after honey ingestion, induced by epicutaneous sensitization during skin care with honey. Contact Dermatitis, 74:189-191, 2015. (査読有)

Ototake Y, Inomata N, Sano S, Takahashi S, Aihara M: A case of an anaphylactic reaction due to oats in granora. Allergol Int, 64(4): 386-387, 2015. (査読有)

〔雑誌論文〕(計8件)

猪又直子: 花粉症の实地診療 第一線の内科医が日常診療で最善を尽くすために
セミナー 10. 口腔アレルギー症候群とその対処法. Medical Practice, 4: 639-644, 2015. (査読無)

猪又直子『小児食物アレルギー診療 update』主なアレルギーへの対応 - 治療と指導 「口腔アレルギー症候群」小児科 55:769-779, 2014. (査読無)

猪又直子: 特集: アレルギー疾患におけるアレルギー再考 II. アレルギー診断と対応. 食物アレルギー 学童・思春期・成人 小児科診療 77:1305-1313, 2014. (査読無)

猪又直子: 「蕁麻疹の最新知見」

VII. 蕁麻疹と食物アレルギー・口腔アレルギー症候群との関連(成人例を中心に)「桃アレルギーと peamaclein」アレルギーの臨床 2017年 37:17-21. (査読無)

猪又直子: 「日本発アレルギー研究最新情報」I. 食物アレルギー・薬物アレルギー 「経皮感作による食物アレルギー: 成人例の特徴」『小児科診療』第79巻10号 診断と治療社 1291-1296. (査読無)

猪又直子: 臨床皮膚科増刊号 コラム 待望の新規アレルギー: Gibberellin-regulated protein (peamaclein) 71:130, 2017. (査読無)

猪又直子: アレルギー性疾患 12. 食物アレルギー (17) 口腔アレルギー症候群. 別冊日本臨床 免疫症候群(第2版) その他の免疫疾患を含めて, 400-405, 2016. (査読無)

猪又直子: 特集 食物アレルギーの最前線 花粉・食物アレルギー症候群. 喘息・アレルギー, 29:27-33, 2016. (査読無)
〔学会発表〕(計12件)

Inomata N, Aihara M: Identification of orange Peamaclein as a new allergen in orange allergy EAACI Congress 2015, Barcelona, Spain, 2015, 6.7.

Inomata N, Miyakawa M, Hotta A, Aihara M: Identification of Japanese Apricot Peamaclein As a New Allergen Related to Food-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Due to Japanese Apricot: Cross-Reactivity to Pru p 7. 2016 AAAAI Annual Meeting, Los Angeles, California, 2016, 3.7.

Inomata N, Miyakawa M, Aihara M: High prevalence of peamaclein sensitization in

fruit allergy with negative IgE reactivity to Bet v 1 homologues and profiling. EAACI Congress 2016, Vienna, 2016,6,12.

Inomata N, Miyakawa M, Aihara M : Evaluation of basophil activation test in diagnosing allergy to peach gibberellin-regulated protein (GRP), Pru p 7. The 2017 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting (AAAAI), Atlanta, 2017,3,5.

猪又直子, 堀田亜紗, 小田香世子, 本庄勉, 相原道子 : バラ科果物による食物依存性運動誘発アナフィラキシーのアレルゲンコンポーネント解析 : Peamaclein を含めて . 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2015,5,27.

猪又直子, 堀田亜紗, 宮川まみ, 本庄勉, 相原道子 : アブストラクト賞講演 1 アレルギー・色素異常 モモアレルギー-52 例のアレルゲンコンポーネント解析 : Peamaclein (Pru p 7) を含めて . 第 114 回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2015,5,30.

猪又直子, 宮川まみ, 堀田亜紗, 小田香世子, 相原道子 : 梅 Peamaclein homologue: 梅による食物依存性運動誘発アナフィラキシーの原因抗原の同定 . 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016,6,17.

猪又直子, 宮川まみ, 相原道子 : Cit s 7, orange gibberellin-regulated protein : オレンジアレルギーにおける新規アレルゲンの同定 . 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 東京, 2016,11,6.

猪又直子 : シンポジウム 9 IgE 報告 50 周年記念シンポジウム IgE と食物アレルギー - 経皮感作による食物アレルギー . 第 80 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 横浜, 2017,2,12.

猪又直子 : 教育講演 45 果物アレルギー診断の最前線 . 第 116 回日本皮膚科学会総会, 仙台, 2017,6,4.

猪又直子, 宮川まみ, 堀田亜紗, 相原道子 : ミニシンポジウム

Gibberellin-regulated protein に属す, モモ Pru p 7 とウメ Pru m 7 の間の交差抗原性に関する解析 . 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017,6,16.

猪又直子 : 食物アレルギー (成人の診療のキーポイント) 第 4 回総合アレルギー講習会, 横浜, 2017,12,16

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

梅 GRP (Pru m 7) のアレルゲン国際登録 :

<http://allergen.org/viewallergen.php?aid=886>

オレンジ GRP (Cit s 7) のアレルゲン国際登録 : <http://allergen.org/viewallergen.php?aid=875>

European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Abstract award (Oral abstract session) 受賞

Inomata N, Aihara M : Identification of orange Peamaclein as a new allergen in orange allergy EAACI Congress 2015, Barcelona, Spain, 2015,6,7.

第 114 回日本皮膚科学会総会アブストラクト賞受賞

猪又直子, 堀田亜紗, 宮川まみ, 本庄勉, 相原道子 : アブストラクト賞講演 1 アレルギー・色素異常 モモアレルギー-52 例のアレルゲンコンポーネント解析 : Peamaclein (Pru p 7) を含めて . 第 114 回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2015,5,30.

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
猪又直子 (INOMATA, Naoko)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号 : 20347313
(2) 研究分担者
宮川まみ (MIYAKAWA, Mami)
横浜市立大学・附属病院・指導診療医
研究者番号 : 40707650
相原道子 (AIHARA, Michiko)
横浜市立大学・医学部研究科・教授
研究者番号 : 90231753
(3) 連携研究者なし
(4) 研究協力者なし