

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2020

課題番号：15K21479

研究課題名（和文）穀物とイネ科花粉に共通する潜在的アレルゲンの抗原性と誘発性に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the antigenicity and inducibility of potential allergens common to cereals and grass pollen

研究代表者

平野 可奈（HIRANO, Kana）

金城学院大学・生活環境学部・講師

研究者番号：00712663

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、米とイネ科花粉に共通する潜在的アレルゲンについての抗原性を明らかにするとともに、花粉症や食物アレルギーの誘発性を検討した。イネの潜在的アレルゲンタンパク質は小麦などの他の穀物にも共通して存在していたが、加熱などにより特異的な抗体との反応性が低下したことから、穀物を摂取する際の食物アレルギーを起こしにくいものであると考えられた。一方で、花粉症患者血清抗体と潜在的アレルゲンとの結合性を調べた結果、多くの患者血清と強い結合性を示したため、イネの潜在的アレルゲンも雑草や牧草などのイネ科花粉と同様に花粉症を引き起こす原因となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、アレルギーは増加傾向にあり、その発症形態も多様化している。本研究では、イネが他のイネ科雑草・牧草のように花粉症の原因となることを明らかとしたことにより、季節性の花粉症予防や治療の一助となることが期待できる。また、花粉のように呼吸粘膜などから未変性の状態で体内に取り込まれる場合は高い抗原性を持つものであっても、加熱などでその抗原性が低下したことから、穀物と花粉に共通して存在する潜在的アレルゲンは食物アレルギーを引き起こす可能性は低いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we clarified the antigenicity of potential allergens common to rice and grass pollen, and examined the inducibility of pollinosis and food allergies. Potential allergen proteins in rice were also common in other grains such as wheat. Since the reactivity of the potential allergen protein of rice with specific antibodies decreased by heating, it was considered that it is less likely to cause food allergies when ingesting grains. . On the other hand, as a result of investigating the binding property between the serum antibody of pollinosis patients and the potential allergen, the binding property was shown to be strong with the serum antibody of many patients. These potential rice allergens are thought to cause pollinosis as well as grass pollen such as weeds and grasses.

研究分野：農芸化学・食品科学

キーワード：アレルゲン 花粉 穀物

## 1. 研究開始当初の背景

近年、食物アレルギーは増加傾向にあり、その発症形態も多様化している。平成 20 年度の厚生労働省の即時型食物アレルギーの実態調査によると、日本における食物アレルギーの原因食物として、最も多いのは卵、ついで牛乳、そして小麦である(表 1)。また、幼児期以降に多いアレルギー原因食物では、小麦以外に、果物類も増えている。この原因として、近年の花粉食物アレルギー症候群の増加が大きな影響を与えていると考えられる。つまり、この果物類による食物アレルギーについては、花粉アレルギー(花粉症)の発症と強い関連性がみられる。

[表 1. 平成 20 年度即時型食物アレルギー全国モニタリング調査]

	0歳 n=678	1歳 n=248	2,3歳 n=169	4-6歳 n=85	7-19歳 n=105	20歳以上 n=90
No.1	鶏卵 55.6 %	鶏卵 41.5 %	魚卵 20.1 %	ソバ 15.3 %	果物類 21.9 %	小麦 23.3 %
No.2	牛乳 27.3 %	魚卵 14.9 %	鶏卵 16.6 %	鶏卵 14.1 %	甲殻類 17.1 %	甲殻類 22.2 %
No.3	小麦 9.6 %	牛乳 8.9 %	ピーナッツ 10.7 %	木の実類 11.8 %	小麦 15.2 %	果物類 18.9 %
No.4		ピーナッツ 8.5 %	牛乳 8.9 %	果物類 11.8 %	鶏卵 10.5 %	魚類 12.2 %

卵や牛乳による食物アレルギーは、消化管が発達した幼児期以降には完治、あるいは寛解することが多い。その一方で、米、小麦等の穀物によるアレルギーは青年、成人以降にも多く、治りにくい。このように、患者により長期の負担を強いことになる穀物アレルギーであるが、その発症および誘発の原因は、完全には明らかとされていない。その原因を明らかにするには、“食物摂取により消化管を介して感作が成立し、同食物を摂取して食物アレルギーを発症する”という従来までの食物アレルギー発症の様式だけの検討では十分とはいえない。これに加えて、花粉食物アレルギー症候群にみられるように“抗原の交差反応性に基づくアレルギーの発症”を検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

これまでの穀物アレルギーにおける先行研究では、従来の食物アレルギー発症様式に基づいて、穀物に存在する抗原を中心として研究が進められている<sup>1)</sup>。本研究は、穀物のみならず花粉においても存在し、さらに免疫交差反応性を示すイネのタンパク質を潜在のアレルゲンとし、イネ以外の穀物(種子)および各種イネ科花粉における存在や、その抗原性を評価することとした。実際には、花粉とイネ種子(米)の抗原性をアレルギー患者の血清の反応性を調べることで、イネの潜在のアレルゲンが花粉アレルギーや食物アレルギーを起こすかを明らかにすることとした。さらに、摂取した際のアレルギー誘発性を評価するために、イネの潜在のアレルゲンの穀物間での免疫交差反応性や、調理後の抗原性を調べることで、穀物アレルギー発症原因として花粉抗原が関与するかを明らかとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

## (1) 穀物およびイネ科花粉と潜在のアレルゲンとの免疫交差反応性

潜在のアレルゲンと同様のタンパク質がイネ以外の穀物にも存在し、穀物間において交差反応性を示すものであるかを明らかにするために、イネと同じイネ科の穀物であるコムギとトウモロコシに同様なタンパク質が存在するかを解析した。まず、コムギとトウモロコシの塩溶性タンパク質抽出液を調製し、SDS-PAGE にてタンパク質を分離した。その後、イネの潜在のアレルゲンに対する特異的抗体を用いて免疫プロットを行った。

さらに、花粉アレルギーの発症原因となっているスギ、ヒノキ、ブタクサ、イネ科雑草・牧草のカモガヤ、ホソムギ、チモシーなどの各種花粉とイネの潜在のアレルゲンの交差反応性を解析した。各種花粉からタンパク質を抽出し、穀物での解析と同様に SDS-PAGE によるタンパク質を分離とイネ潜在のアレルゲンに対する特異的抗体を用いて免疫プロットを行った。

## (2) 潜在のアレルゲンの抗原性の解析

潜在のアレルゲンの種子および花粉における抗原性を解析するために、食物アレルギーおよびイネ科の雑草・牧草花粉症の患者血清を用いて、潜在のアレルゲンへの血清 IgE 抗体の反応性を解析することとした。穀物における抗原性の解析では、潜在のアレルゲンの組換えタンパク質を用いて、食物アレルギー患者の血清 IgE との反応性を ELISA により調べた。さらに、潜在のアレルゲンに対して反応性を示す食物アレルギー患者血清と米、コムギおよびトウモロコシタンパク質抽出液を混合した上で、上記の IgE-ELISA 試験(ELISA 阻害試験)を行うことで、穀物間での IgE 血清による免疫交差反応性を調べた。

花粉における抗原性の解析では、イネおよび雑草・牧草花粉(カモガヤ、ホソムギ、チモシー)のタンパク質に対して、雑草・牧草花粉症患者血清を用いた IgE 免疫プロットおよび IgE-ELISA による解析を行った。また、同様に花粉症患者血清を用いて、潜在のアレルゲンの組換えタンパク質との反応性を、IgE 免疫プロットおよび IgE-ELISA によって解析した。

### (3) 加熱および発酵によるイネ潜在的アレルゲンの抗原性への影響評価

穀物が摂取される際の潜在的アレルゲンの抗原性を調べるために、穀物を加熱処理した後の潜在的アレルゲンへの抗体反応性を解析した。米、コムギ、トウモロコシについて加熱処理(100℃, 10分間, 20分, 40分)を行った。コントロールとして、未加熱のこれらの穀物を用いて、加熱前後のタンパク質を抽出し、潜在的アレルゲンの特異的抗体を用いたELISA解析により、それぞれの試料に対する反応性を比較した。さらに、米を原料とした加工食品中での抗原性についても解析することとした。炊飯後の飯以外に、コメを原料とした発酵食品である甘酒やその原料である麹を用いて、潜在的アレルゲンと米の主要アレルゲンの特異的抗体を用いた免疫ブロット解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 穀物およびイネ科花粉と潜在的アレルゲンとの免疫交差反応性

コムギとトウモロコシのタンパク質抽出液をSDS-PAGEにて分離し、イネの潜在的アレルゲンに対する特異的抗体を用いた免疫ブロットを行った結果、コムギおよびトウモロコシのタンパク質においてもイネと同様な分子量に反応が見られた。このことから、これらの穀物にも潜在的アレルゲンのホモログタンパク質が存在することが明らかとなった。

各種花粉のタンパク質においても同様に、SDS-PAGEによる分離と特異的抗体を用いた免疫ブロットを行った結果、イネ科雑草・牧草においては同様な分子量に反応がみられた。さらに、スギやヒノキ、ブタクサなどの他の科の花粉においても、異なった分子量ではあるが、交差反応性を示すタンパク質の存在が確認された。

### (2) 潜在的アレルゲンの抗原性の解析

潜在的アレルゲンの組換えタンパク質を用いて、食物アレルギー患者の血清IgEとの反応性をELISAにより調べた結果、約50%以上の患者血清において反応性が見られた。さらに、この反応性を示したアレルギー患者血清とコムギおよびトウモロコシタンパク質抽出液を混合してELISA試験を行った結果、潜在的アレルゲンに対するアレルギー血清IgE抗体の反応性は、コムギおよびトウモロコシによって阻害された。この結果より、イネの潜在的アレルゲンはコムギおよびトウモロコシにおいて免疫交差反応性をもつと考えられた。

イネおよび雑草・牧草花粉のタンパク質を抽出し、雑草・牧草花粉症患者血清によるIgE免疫ブロットを行った結果、イネの花粉も雑草・牧草花粉と同程度の反応性が見られた。花粉症患者血清を用いて、潜在的アレルゲンの組換えタンパク質に対する反応性を、IgE免疫ブロットおよびIgE-ELISAによって解析した結果、全ての患者血清において反応性がみられた。これらの結果をまとめると、潜在的アレルゲンおよびイネ花粉への患者血清の反応性については、強い相関性が見られた。一方で、潜在的アレルゲンおよび食物アレルギー患者血清との反応性については、そのような相関はみられなかった。この結果より、潜在的アレルゲンは食物アレルギーの原因抗原になる可能性は少ないが、花粉アレルギーを引き起こす抗原となりうることを示唆された。

### (3) 穀物加熱調理後の潜在的アレルゲンの抗原性の解析

加熱処理後の試料と未加熱の試料に対する抗体反応性を比較した結果、米、コムギ、トウモロコシの全ての加熱後のタンパク質抽出液において、コントロールと比較して反応性がほとんどみられなくなった。そして、米の加工食品として、甘酒およびその原料の麹の免疫ブロット解析の結果、炊飯後あるいは麹において反応が見られた主要アレルゲンについても、甘酒においてはほとんど反応がみられなくなった。以上のことから、麹菌による発酵によって、米に含まれるほとんどのアレルゲンはその抗原性を失うと考えられた。

## <引用文献>

1) Nakase et al. *J. Agric. food Chem.* 1996, Usui et al. *J. Biol. Chem.* 2001, Matsuo et al. *J. Biol. Chem.* 2004)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kana Hirano, Shingo Hino, Kenzi Oshima, Daita Nadano, Atsuo Urisu, Fumio Takaiwa, Tsukasa Matsuda	4. 巻 80
2. 論文標題 Evaluation of Allergenic Potential for Rice Seed Protein Components Utilizing Rice-Proteome and Allergen Databases in Combination with IgE-binding of Recombinant Proteins	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bioscience, biotechnology, and biochemistry	6. 最初と最後の頁 564-573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2015.1116927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平野 可奈, 窪田 慎, 松田 幹	4. 巻 21
2. 論文標題 難消化性オリゴ糖・多糖の摂取と腸管免疫機能	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ルミナコイド研究	6. 最初と最後の頁 57-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------