

## 小麦アレルゲンの抗原分析とその低アレルゲン化

池澤善郎, 高橋一夫, 菅 千東, 杉山朝美,  
小松 平, 椿 和文\*, 横田俊平\*

要約: 小麦アレルギーも、米アレルギーと同様にADの難治化に関与していることが考えられるため、小麦RAST陽性のAD患者血清を用いたIgG/IgA/IgE-イミュノプロットによる小麦抗原の分析結果より、小麦の主要抗原と考えられる塩溶性分画を除いた低アレルゲン化小麦(HW)を作製し、その臨床試験を実施した。このHWは小麦アレルギーがある難治性の多くのAD患者に有用であることから、この小麦の塩溶性分画は小麦アレルゲンの主要な抗原分画であることが示唆された。

見出し語: アトピー性皮膚炎, 難治化(重症化)因子, 小麦アレルギー, 小麦アレルゲンの抗原分析, 低アレルゲン化小麦, 低アレルゲン化食品の開発

### 〈研究目的〉

平成元年度は、アトピー性皮膚炎(AD)の診断基準を検討すると共に、その重症度、血清IgE値、環境物アレルゲンや食物アレルゲン等に対する特異的IgE抗体化(RAST値)等について統計学的に検討した<sup>1)2)</sup>。その結果、ADの重症化にはダニアレルギーと共に、主食となる米や小麦等の穀物に対するアレルギーが関与していることが示唆されたため、平成2年度は、米アレルゲンの抗原分析を行ない、その主要な抗原決定基と思われる米の塩溶性蛋白質分画を除いた低アレルゲン化米を開発し、これを用いた食事療法による臨床改善効果を報告した<sup>3)-6)</sup>。そこで、平成3年度は、ま

ず第1にAD患者の小麦RAST陽性血清を用いたIgG/IgA/IgE-イミュノプロットによる小麦アレルゲンの抗原分析を行ない、第2に、その分析結果から小麦アレルゲンの主要な抗原になると思われる蛋白質を除いた低アレルゲン化小麦(HW: hypoallergenic wheat)を作製し、第3に、これを用いたうどんによる臨床試験を実施したのでその結果を報告する。

### 〈結果と考察〉

1) 小麦RAST陽性の患者血清を用いたIgG/IgA/IgE-イミュノプロットによる小麦アレルゲンの抗原分析

今回の研究に用いた小麦抗原は、市販の小麦粉

横浜市立大学医学部付属浦舟病院皮膚科 (Dep. of dermatol., Yokohama City Uni. School of Medicine)

\* 横浜市立大学医学部小児科 (Dep. of Pediatr., Yokohama City Uni. School of Medicine)

より尿素を含むトリスクエン酸 (UTC) 緩衝液の可溶性画分として抽出した。イミュノプロット法はこれを SDS-PAGE による分画してニトロセルロース膜に転写して AD 患者血清と反応させ、特異 IgG/IgA/IgE 抗体の検出はビオチン・アビジン系を用いた 2 段階の酵素抗体法に従った。IgG のイミュノプロットでは、小麦 RAST スコアが 3 以上の AD 患者血清を用いた場合 12 から 98KD までの間に症例により各バンドの出現頻度は変わってくるが多数の濃い抗原バンド (例、12、14、16、24、29、33、36、39、40、42、45、55、70、80、98KD 等) が認められた。これに対して、対照のアトピー歴がない健康人血清を用いた場合、新生児血清ではほとんど抗原バンドが見られず、小児・成人血清では加齢と共に染色される抗原バンドの数が増える傾向が認められた。但し、その染色性は患者血清に比べるとかなり弱いものであった。AD 患者血清と対照血清についてそれぞれ各抗原バンドの出現頻度を比較すると、12、14、16、24、29KD 付近に見られる低分子の抗原バンドと 70KD 付近に見られる高分子の抗原バンドが前者においてのみ高頻度に認められた。このうち 14KD の抗原バンドに注目して小麦 RAST のスコア別にその出現率を算出すると、スコア 3 ないし 4 群、2 群、1 群、0 群の AD 患者血清では、それぞれ、83% (20/24)、68% (17/25)、40% (2/5)、11% (2/18) であり、対照の健康人血清では、0% (0/18) であった。UTC 液で抽出した小麦抗原をさらに水、1 M 食塩、70% エタノール、7 M 尿素で順次抽出し、各分画について同様の検討を行なうと、先に述べた低分子の抗原バンドはそのほとんどが水と食塩の抽出分画に認められた。次の

IgA のイミュノプロットでは、患者群と対照群の間で抗原バンドノ分布やその濃淡に基本的な違いがなく、両群が共に IgG の場合に AD 患者群だけで見られた低分子の抗原バンドを欠いていた。最後に、IgE のイミュノプロットでは、IgG や IgA のイミュノプロットで余り強く検出されなかった 33、42、45、55、80、98KD の抗原バンドが患者血清を用いた時だけ検出された。小麦抗原として食塩分画を用いると、先の抗原バンドのうち、尿素分画に属すると思われる 80、98KD が検出されなくなるかわりに、水・食塩分画に属すると思われる 12、14、24、29、40、70KD の抗原バンドが新たに検出された。以上の成績から小麦の水・食塩分画に AD の重症化に関与すると思われる主要な小麦のアレルゲン活性が存在することが示唆された<sup>7)</sup>。

## 2) 低アレルゲン化小麦 (MW) の作製

AD における小麦の主要なアレルゲン活性が水・食塩分画に存在することが示唆されたため、原料の小麦粉を数回水と食塩で洗浄した後に乾燥させた粉末を低アレルゲン化小麦 (HW) とした。HW では、確かに通常的小麦 (W or RW : regular wheat) と異なり、先に述べた水や食塩に可溶性の抗原分画が殆ど消失ないし著明に減少していることが SDS-PAGE 並びに IgG-イミュノプロットによって確認された。図 1 の左の 2 つは W と HW をそのまま、右の 3 つはそれぞれ W と HW の塩溶性分画をそのままと HW の塩溶性分画を 100 倍濃縮して、SDS-PAGE にかけたもので、HW では塩溶性分画が殆ど消失していた。図 1 で HW に認められた低分子の蛋白質バンドは、IgG-イミュノプロットで RW と異なり多くの患者血清と全く反応しないことから、主要な抗原分画でないと考えら

れた。事実、さらに、このRWとHWをコートしたプレートを用いて、ELISA法にて小麦RAST陽性のAD患者血清（特異IgE抗体）との反応性を比較すると、図2に見られるように9患者血清中の6件に50%以下の低下が認められた。

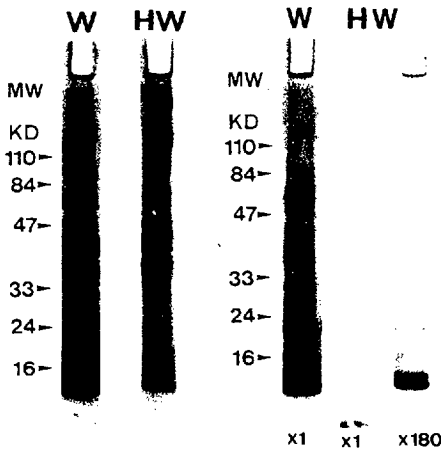


図1. W と HW の全分画と塩溶性分画の SDS-PAGE

| Sera              | RW   | HW          | HW/RW ratio** |
|-------------------|------|-------------|---------------|
| CAP85             | 0.02 | 0.00        | 0(%) ↓↓       |
| KY                | 0.75 | 0.11        | 15 ↓↓         |
| CAP76             | 0.13 | 0.02        | 15 ↓↓         |
| TM                | 0.82 | 0.15        | 18 ↓↓         |
| HR                | 0.51 | 0.12        | 24 ↓↓         |
| KT                | 0.20 | 0.08        | 40 ↓↓         |
| S t               | 0.76 | 0.66        | 87 ↓          |
| 14.5              | 0.48 | <u>0.88</u> | <u>144</u> ↑  |
| NM                | 0.77 | <u>0.84</u> | <u>108</u> ↑  |
| cf K S (HyperIgE) | 0.56 | 0.56        | 100 →         |

\* expressed as OD values in IgE-ELISA (sera:10x diluted).

\*\* expressed as a percentage.

HW/RW ratio: 0-50%:87%, 50-100%:11% (0-100%:78%), 100-150%:22%.

図2. 小麦RAST陽性患者血清とRWやHWとの反応性 (ELISA法にて)

### 3) 低アレルゲン化小麦 (HW) の臨床応用

このHWより生麺を作製して、1食分ずつ滅菌パックにして次の予備的臨床試験に用いた。対象患者は確定型の重症AD患者9例で、全例に小麦除去の効果があり、小麦による負荷試験は施行された7例全て陽性である。試験方法は、1日当たり1食 (1パックの生麺) として5~7食分与え、皮疹の悪化や新生が誘発された場合は中止した。その結果は陽性例が2例 (22%) で、陰性例は7例 (78%) であった。

#### 〈文献〉

- 1) 池澤善郎他：厚生省心身障害研究平成元年度研究報告書、pp252 - 254、1990. 3.
- 2) 宮川加奈太他：アレルギー、37: 1101 - 1110、1988.
- 3) 池澤善郎他：厚生省心身障害研究平成2年度研究報告書、pp294 - 296、1991. 3.
- 4) Watanabe, M. et al.: J. Food Science, 55 (3): 781 - 783, 1990.
- 5) Ikezawa, Z. et al.: J. Invest. Dermatol., 92: 449, 1989.
- 6) 池澤善郎他：アレルギー、40: 633 - 642、1991.
- 7) 椿 和文他：アレルギー、40: 521 - 528、1991.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:小麦アレルギーも、米アレルギーと同様にADの難治化に関与していることが考えられるため、小麦 RAST 陽性のAD患者血清を用いたIgG/IgA/IgE-イミュノプロットによる小麦抗原の分析結果より、小麦の主要抗原と考えられる塩溶性分画を除いた低アレルギー化小麦(HW)を作製し、その臨床試験を実施した。このHWは小麦アレルギーがある難治性の多くのAD患者に有用であることから、この小麦の塩溶性分画は小麦アレルギーの主要な抗原分画であることが示唆された。