

<平成 30 年度助成>

重症野菜・果物アレルギーのコンポーネント解析 —Gibberellin-regulated protein 検出・検査系の確立—

近藤 康人

(藤田医科大学 医学部 小児科)

はじめに

ここ数年果物アレルギーは増加してきている。食物アレルギー新規発症の原因食品として果物は 4～6 歳においては 1 番多く、7～19 歳においては 2 番目に多い¹⁾。果物アレルギーには口腔に局限した症状を主とする口腔症状群と、全身症状からアナフィラキシーに発展しうる重症タイプの全身症状群がある。平成 26 年に研究代表者として立ち上げた多施設共同果物アレルギーコンポーネント研究会で、全国からリンゴとモモ（特定原材料に準ずる食品）のアレルギー患者の血清を収集し解析した結果、我が国のモモ、リンゴの全身症状群に係る原因抗原は、欧米における原因抗原の代表である Lipid transfer protein (LTP) とは異なり、むしろ新規に報告された Gibberellin-regulated protein (GRP) であることを確認し報告した²⁾。またこのタンパク質は抗菌作用を有することから、モモやリンゴに限らず、種々の果物や野菜に存在してアレルゲンになりうると考えられ、我々はモモアレルギー患者が GRP を介してオレンジアナフィラキシーを発症したと思われる数症例をまとめて報告した³⁾。

しかし GRP に関するアレルゲンの評価系が未確立の状況であるため、果物や野菜のアレルゲン食品による重症アレルギー報告例は後を絶たない。今後、果物や野菜の摂取による重篤なアレルギー発症を減らすためにも重症アレルギーのマーカーである GRP の存在量を明らかにすることは急務であると考えられる。また、抗原をより安定的に大量調整するためには遺伝子組み換えによるリコンビナント GRP の作製が必須であるが、GRP は低分子量ながら S-S 結合が

多い（6 対）ため、大腸菌発現系では正しい立体構造の産物を得られない可能性が高く、酵母（*Pichia pastoris*）の分泌経路に乗せる発現系の確立を行う必要があると考えた。最後に、これらの基礎的解析の成果をもとに、様々な果物や、関連性が指摘されているヒノキ科花粉⁴⁾であるスギ花粉に対するアレルギー患者における GRP の関与について解析を行った。

方 法

1. 天然モモ GRP とリコンビナントモモ GRP の調製と ELISA

天然モモ GRP (nPru p 7) はモモ GRP に特異的なモノクローナル抗体を用いた抗体カラムにより純化した。また、モモ GRP の遺伝子配列を基にして PCR により cDNA を合成後、大腸菌でクローニングし、大腸菌と酵母において GRP を発現させた。どちらも上述の抗体カラムにより純化した。これらの抗原を ELISA プレートに固相化し（1 μ g/ml）、洗浄、ブロッキング後、10 倍希釈した血清を 4℃で一晩反応させた。翌日プレートを洗浄後、二次抗体としてビオチン標識マウス抗ヒト IgE 抗体を反応させた後、ストレプトアビジンペルオキシダーゼで発色させ、450nm の吸光度を測定した。正常コントロール（アレルギー歴のない健常者）血清の示した吸光度の平均 +10SD 標準偏差以上を陽性と定義し、天然モモ GRP と各方法で得られたリコンビナント GRP に対する患者血清の反応性を比較した。

2. サンドイッチ ELISA とリアルタイム PCR 固相抗体としてモモ以外の果物 GRP にも反応する

モノクローナル抗体、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識したモモ GRP 特異的モノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA を構築し、品種間比較と部位別に濃度測定を行った。新鮮な果物から RNA 画分を調製し、各果物の GRP 遺伝子配列に基づいて合成した 2 種のプライマーを用いてリアルタイム PCR (RT-PCR) 解析を行った。増幅のサイクル数は増幅速度の変化率の最も大きい時点で決定し、RNA 試料の 8 倍希釈が 3 サイクルのずれになることで増幅の正常性のチェックとした。なお、内部標準としてアクチンを用い、アクチンの発現量に対する比で発現量を示した。

3. 病歴からアレルゲン近縁種を推定し、その食品とモモのアレルギー症状を比較検討

果物アレルギーコンポーネント研究会で得られたアンケートからモモアレルギーを来した患者 70 名を口腔限局症状群と全身症状群に分け、アレルギーを生じた食品から頻度の多いものを抽出し、その食品に対する詳細な病歴からモモアレルギー症状と該当食品に対するアレルギー症状との関連性について比較検討した。

4. スギ患者における GRP 陽性率の検討

当院に通院中のスギ花粉症患者および、その家族から採血とアンケートの同意が得られた者から血清を収集した。また、正常コントロールとして成人でアレルギー歴のない患者、陽性コントロールとして重篤なモモアレルギー患者 3 名を選んだ。これらの血清、純化モモ GRP を用いて、上述した ELISA を行った。正常コントロール (アレルギー歴のない健常者) 血清の示した吸光度の平均 +3SD 標準偏差以上を陽性と定義した。

結 果

1. リコンビナント GRP の作製とその評価

大腸菌、酵母で発現された GRP はどちらもモモ GRP 特異的モノクローナル抗体を用いたウエスタン解析で陽性であった。また、N 末端配列はどちらも構築した遺伝子配列から予想される正しい配列を示した。モモから精製した nPru p 7 と酵母で発現させた prPru p 7 の陽性率に有意差は認められなかったが、大腸菌で発現させた erPru p 7 は、nPru p 7、prPru p 7 に比して陽性率が低く有意差を認めた ($P < 0.05$)。(図 1)

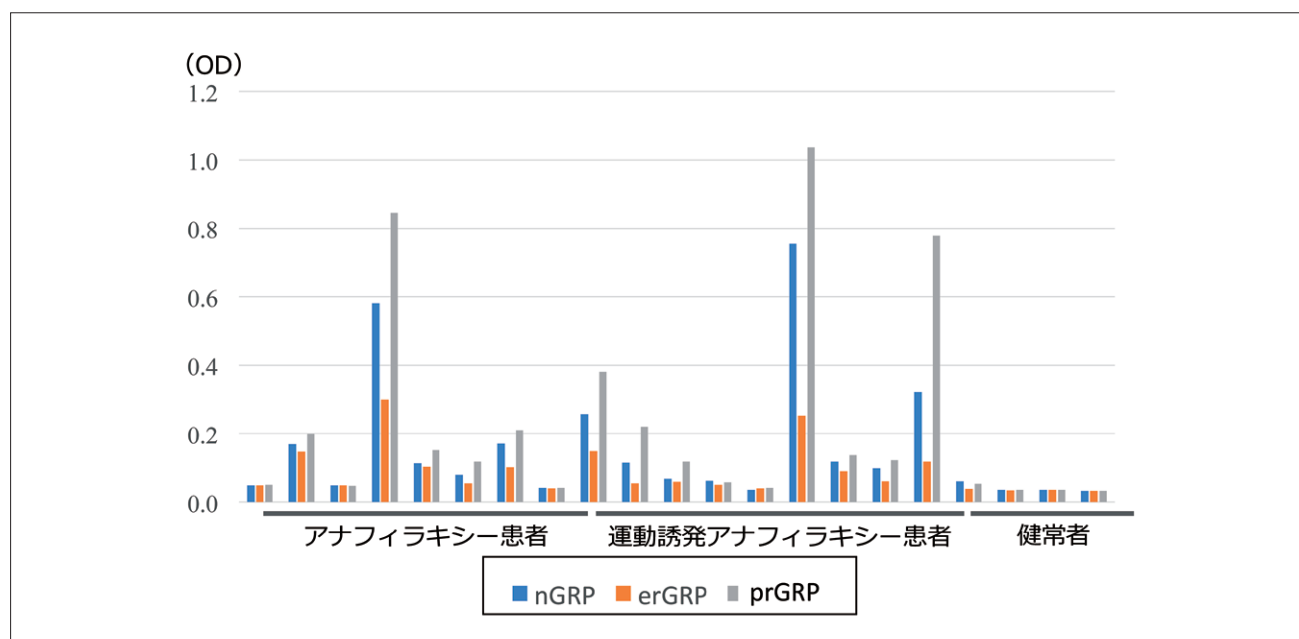


図 1 モモ抽出 GRP (nGRP) および、リコンビナントで得られた GRP (大腸菌 erGRP および酵母 prGRP) に対するモモアレルギー患者 (アナフィラキシー、運動誘発アナフィラキシー) と健常者における血清 IgE 反応の比較
大腸菌で発現させた erPru p 7 は、nPru p 7、prPru p 7 に比して陽性率が有意に低かった 文献 2 から引用改変

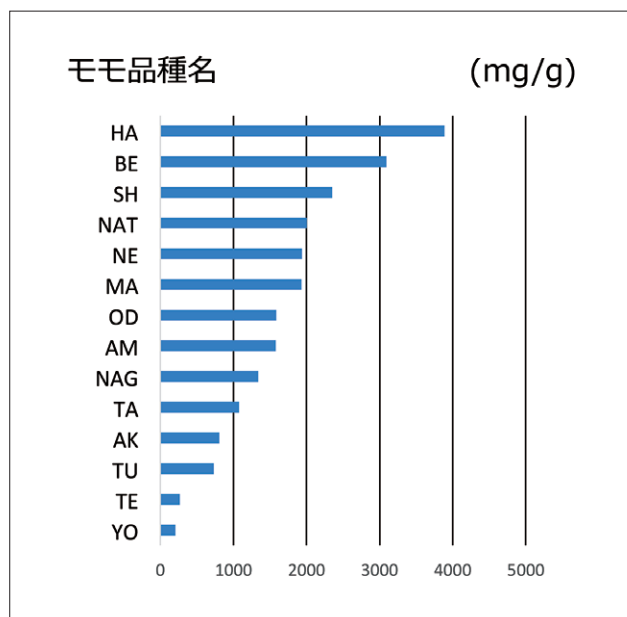


図2 サンドイッチ ELISA によるモモ GRP 量の品種間比較
品種間によって濃度が大きく異なっていた

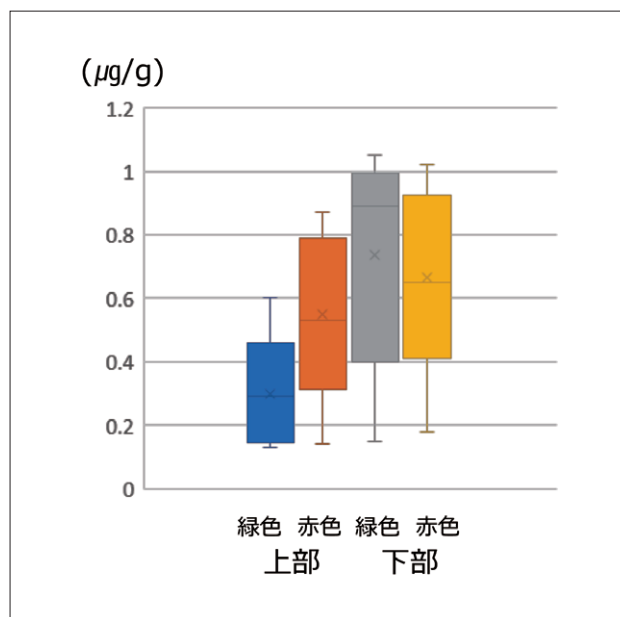


図3 モモ部位別 GRP 定量
モモは下部（萼から遠い）ほど濃度が濃く、また、表面が緑色から赤色に熟している部位で濃度が濃くなる

2. GRP の存在量と発現量の解析

サンドイッチ ELISA の結果、品種によっては 10 倍ほど濃度が異なる（図 2）こと、モモ GRP は熟すにつれて濃度が増加すること、また部位別ではモモの下部が高濃度であることが分かった（図 3）。同様の結果は PT-PCR でも確認でき、存在量と発現量が相関することが判明した。今回用いたサンドイッチ ELISA はモモ特異的であるため、モモ GRP の評価しかできない。しかし、RT-PCR を導入すること

によって、遺伝子配列のわかっているモモ以外の果物・野菜の GRP 発現量すなわち存在量を推定することが可能となる。リアルタイム PCR の結果、モモでの発現量が一番高く、以下ブドウ、ウメ、ナシ、イチゴ、リンゴ、トマトの順に低くなることが判明した。ただし、上述したように用いた品種、個体、部位などによるばらつきが考えられ、今後の検討が必要である。（図 4）

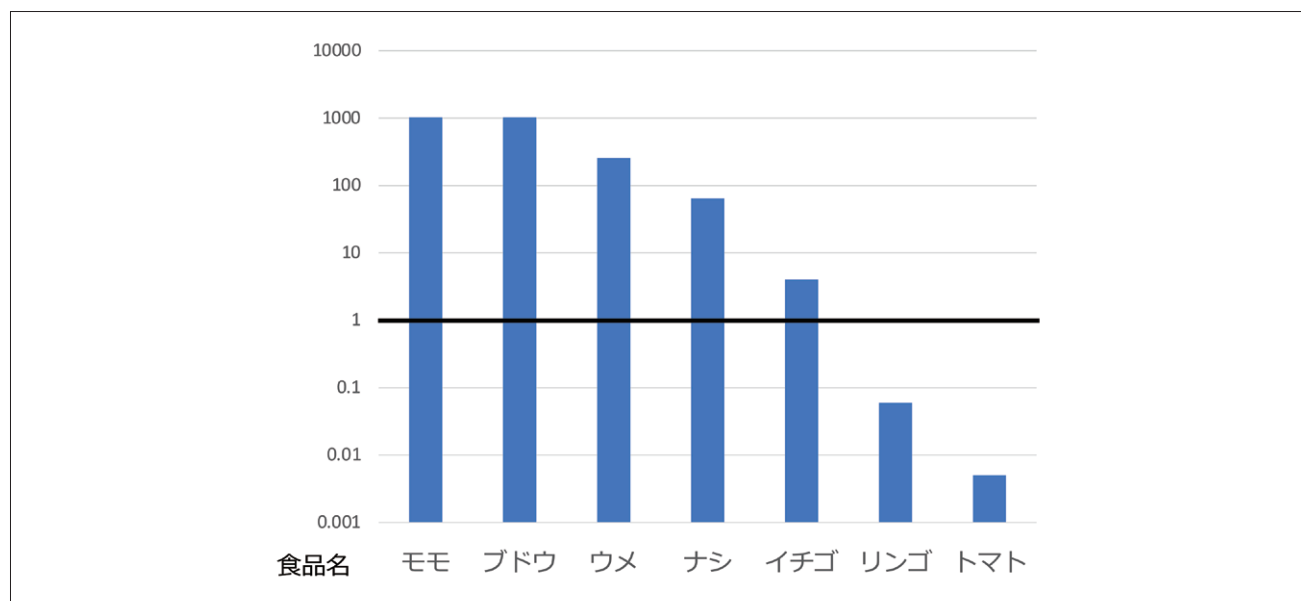


図4 リアルタイム PCR による種類別完熟果肉あたりの GRP 量の比較
モモでの発現量が一番高く、以下ブドウ、ウメ、ナシ、イチゴ、リンゴ、トマトの順に低くなることが判明した
(Actin を 1 としたときの発現量比)

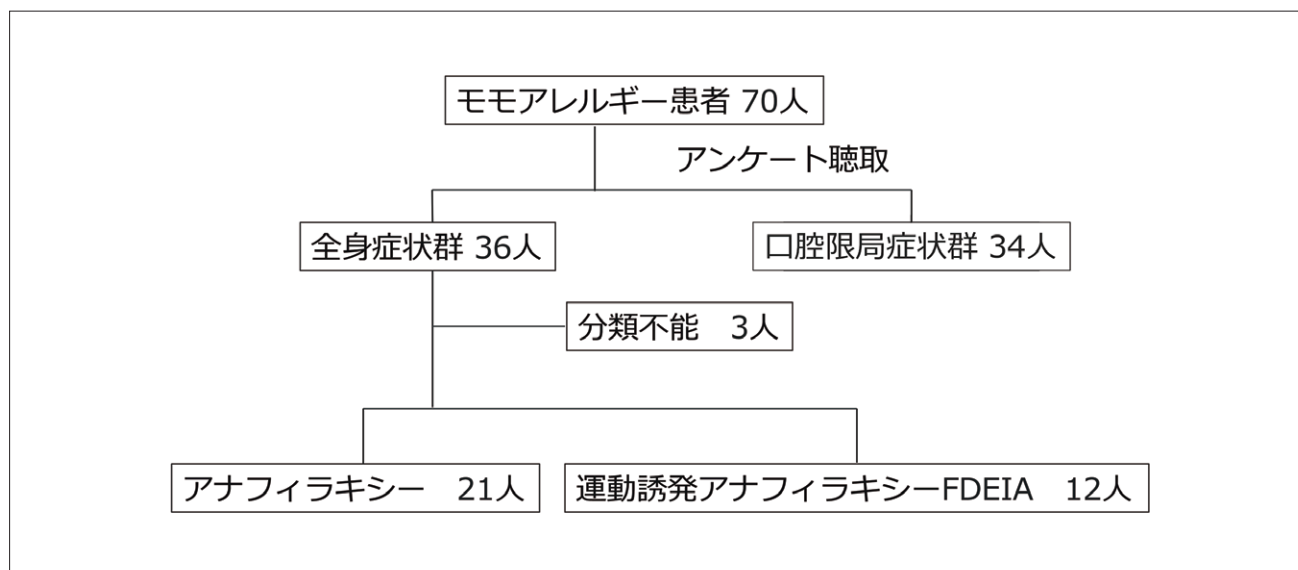


図5 詳細な病歴に基づいたモモアレルギー患者の臨床病型別の内訳

3. 病歴から推定した近縁種食品におけるモモアレルギー症状との比較

モモアレルギーの全身症状群と口腔限局症状群の症例数のチャートを図5に示す。また、これら両群間に年齢および鼻炎の合併率には差はみられなかった。唯一の違いはカバノキ科花粉症の合併率が有意差をもって口腔限局症状群に多かったのみである。口腔限局症状群にはバラ科食物を中心とした複数の果物にアレルギーを合併する症例が多かったのに対し、従来、単独感作の割合が高いと報告されている

果物アレルギー全身症状群でも⁵⁾モモの場合はリンゴ、サクランボと種々の野菜に対するアレルギーの合併が多くみられた⁶⁾(図6)。

次に、モモ全身症状群に合併したアレルギーを来した単独食品として最も頻度が高かったリンゴに着目し、リンゴに対する詳細な病歴からモモとのアレルギー症状の関連性について比較した。モモ全身症状群では、リンゴアレルギーを有する者は約4割で、リンゴの病型の内訳は口腔限局症状と全身症状が半々であった(図7)。更にモモアナフィラキシー症

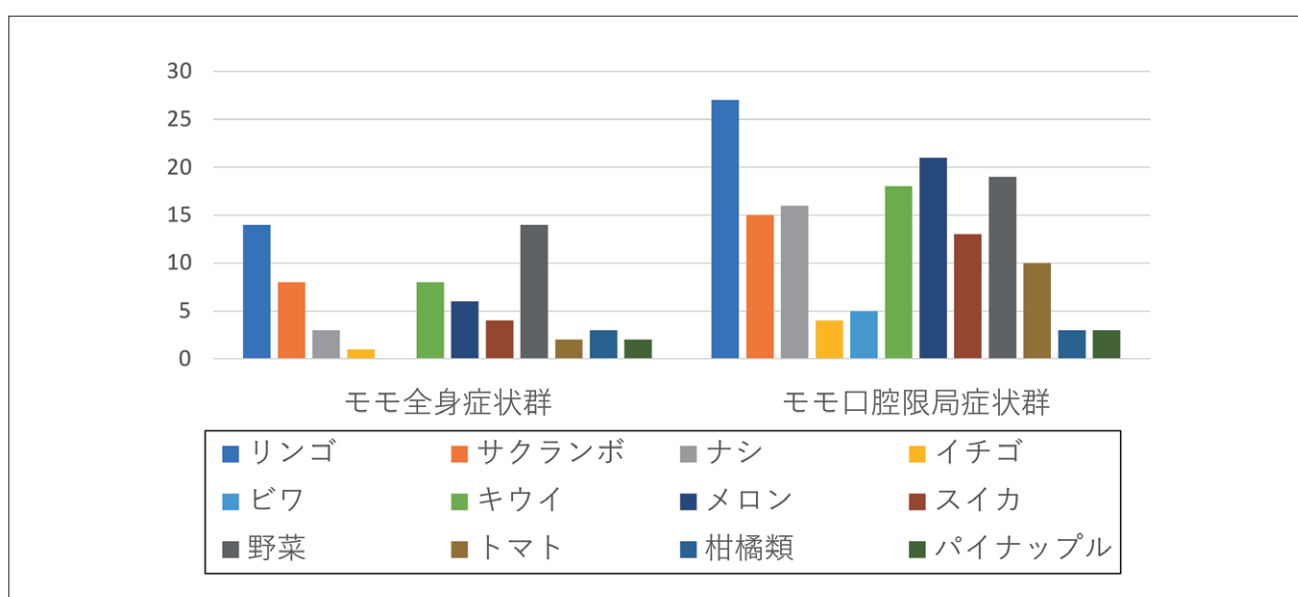


図6 病歴に基づいたモモアレルギー各症状群に合併した果物によるアレルギー
口腔限局症状群にはバラ科食物を中心とした複数の果物にアレルギーを合併する症例が多かったのに対し、果物アレルギー全身症状群ではリンゴもしくは野菜アレルギーの合併が多くみられた

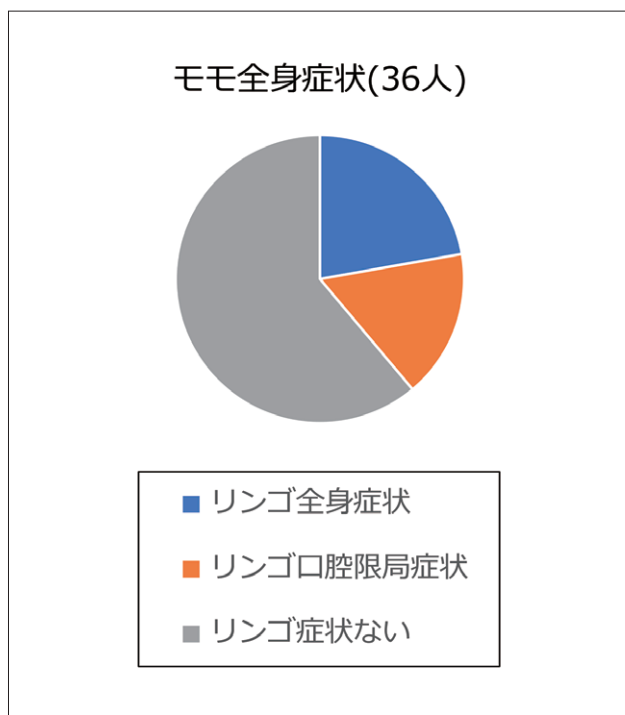


図7 モモアレルギー全身症状群に合併したリンゴアレルギーの病型

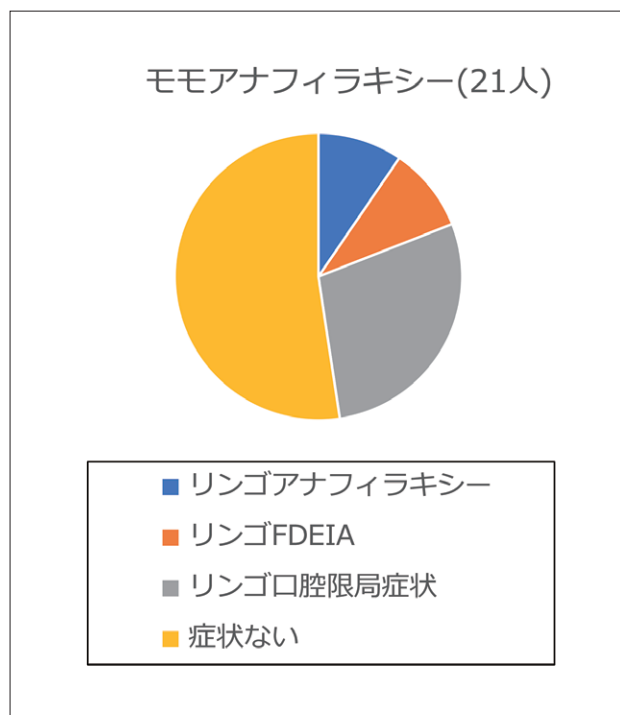


図8 モモアナフィラキシーに合併したリンゴアレルギーの病型

状に合併するリンゴの症状について着目した結果も、リンゴ摂取時に半数は症状を有さず、症状を有しても大半がより軽症の口腔限局症状で、残りの20%がアナフィラキシーであったが、アナフィラキシー症状の半数は運動をしなければ症状を有さない運動誘発アナフィラキシーであった⁶⁾。(図8)

4. スギ花粉症患者における GRP 陽性率の検討

スギ花粉症患者の内訳は小児から成人の軽症から中等症の花粉症患者 52 名で、患者群の 20%がモモ GRP に陽性反応を示した。これら患者にモモアレルギー症状について問診したところ多くは摂取ができていたが、中には口腔症状を訴える患者や、他の多くのバラ科果物に口腔症状を主体としたアレルギーを起こしている結果から、果物を一切除去している患者が存在していた。

考 察

1. リコンビナント GRP の作製とその評価

GRP は約 80 個のアミノ酸からなる低分子タンパク質であるにも関わらず、12 個のシステインを持ち、

これらが6対のSS結合で繋がっている。したがって、今回我々が本研究で使用したモモ GRP に特異的なモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISAにおいても還元した GRP を認識しなかったことから、GRP はかなり強固で特徴的な高次構造を形成していることが予想される。本研究で得られた患者 IgE と GRP の反応性が $erPru\ p\ 7 < nPru\ p\ 7 = prPru\ p\ 7$ であったという結果は、「大腸菌発現系では発現タンパク質がインクルージョンボディへの蓄積により正しい SS 結合による天然の高次構造を構築にくいのに対し、酵母系では分泌タンパク質として発現させているので天然の高次構造を取りやすい」という予想と一致した。今後、リコンビナント抗原の作製にあたって重要な知見と考えられる。ただし、GRP が感染防御タンパク質としての機能を有しているためか、発現量が少なく、産生クローンも不安定という印象があり、今後の改良が待たれる。また、通常アレルギー解析における抗原同定のために行われるウエスタンブロッティングも非還元で行う必要性が示唆された。

リコンビナント技術により品種、季節などに関係なく均質な抗原を安定して供給可能となることか

ら、天然に近い構造をもったリコンビナント抗原がグローバルスタンダードとして利用されることを期待している。

2. GRP の存在量と発現量の解析

現在、食物アレルギーの診断には患者ファクターとして特異的 IgE の濃度が用いられているが、食品ファクターとしてアレルゲンの量の把握も重要である。卵・乳などの主要アレルギー食品ではコンポーネントの組成がほぼ揃っているうえ主要タンパク質であることが多いので、アレルゲンの摂取量の把握が容易であり、プリックテストにおいて試料の個体差は生じにくい。しかし本研究で明らかにされた GRP は、品種差が大きく、熟度に依存し、部位で違う、など個体差が大きい。このようなアレルゲンでは、摂取量が不明なうえにプリックテストの結果に大きなばらつきが生じることが予想される。従って、重要なコンポーネントに関しては適正なアレルゲン定量系の確立、特に植物抗原では個々の植物特異的な定量系と交差反応性を考慮した定量系の確立が必要となるであろう。また、果物・野菜アレルギーのプリックテストは標準抗原を用いて行うことが必要と思われる。

3. 病歴から推定した近縁種食品におけるモモアレルギー症状との比較

モモアレルギー口腔限局症状群にはバラ科食物を中心とした複数の果物にアレルギーを合併する症例が多かった。この背景として Bet v 1 ホモログやプロフィリンの関与が考えられた。一方、果物アレルギー全身症状群ではリンゴやサクランボの合併が多くみられた。全身症状の群には GRP の関与が考えられるが図 4 での GRP 量の結果と相同しないところがある。この理由については、果物側の要因として季節を問わず入手可能なリンゴが上位にきた可能性がある。また患者側の要因として嗜好の問題があげられる。例えば、或る果物でアレルギー症状が出ると、患者は果物全般を避ける傾向がある。特にアナフィラキシーのような重度のアレルギー症状を起こ

した患者では病歴摂取時にその傾向が強いと感じた。また他の食品と比べて果物は避けていても栄養的な問題を起こさないことも影響していると考えられる。その他に GRP のエпитオプの相違による可能性も考え、今後はその点に焦点をあてた解析を予定している。

次に、リンゴアレルギー症状との関連性の比較で、モモが全身症状であるにもかかわらずリンゴを摂取できるのが半数あり、しかも摂取時に口腔症状に限局する例が半数に認められたのも、リンゴの GRP がモモに比して少ないことが原因と考えられた。更に、モモアナフィラキシー群に絞って検討した結果でも、リンゴ摂取時に半数は無症状で、アナフィラキシー症状を有する例は 2 割あるが、その半数は運動負荷をかけなければ症状を有さない運動誘発アナフィラキシーであったことも、モモに比してリンゴの GRP 濃度が低いことに起因すると考えられた。

4. スギ花粉症患者における GRP 陽性率の検討

日本人口の 1/3 ~ 1/2 が罹患しているとされるスギ花粉症の約 2 割が、モモ GRP にも感作を有することは意外であった。今回は正常コントロールの平均 +3SD 以上を陽性基準としていたことから、改めて陽性者に病歴を確認したところ、+10SD 以上を除くほとんどの患者は摂取ができていた。しかし、我々の以前の研究では +3SD を超える例で運動負荷時にアナフィラキシーを有していた例も存在しており、そのようなリスクを回避するためにも、GRP 測定は有用であると考えられる。

結 論

今回の研究においてアレルギーが疑われる患者だけでなく花粉症患者における GRP 抗体測定の意義を明らかにすることができた。また、今後の食物アレルギーの診断・治療・予防には従来の患者側の要因 (IgE 量) だけではなく、抗原側の要因 (安定供給、交差性、存在量など) も考慮する必要があることを示すことができた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆さまに心より感謝致します。また、本研究の遂行にあたり多大なご協力をいただいた、学校法人大和学園 京都栄養医療専門学校 管理栄養士科の成田宏史先生に深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) 日本小児アレルギー学会. 食物アレルギー診療ガイドライン 2016. 協和企画. 2018.
- 2) Mori Y, Okazaki F, Inuo C, Yamaguchi Y, Masuda S, Sugiura S, Fukuie T, Nagao M, Tsuge I, Yosikawa T, Yagami A, Matsunaga K, Fujisawa T, Ito K, Narita H, Kondo Y. Evaluation of serum IgE in peach-allergic patients with systemic reaction by using recombinant Pru p 7(gibberellin-regulated protein). *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018; 46: 482-90.
- 3) 高松伸枝, 近藤康人, 高田聡, 成田宏史, 岡崎史子, 森雄司, 伊藤浩明, 徳田玲子, 柘植郁哉, 宇理須厚雄. 柑橘類による食物依存性運動誘発アナフィラキシー患者のモモ交差反応性. *日本小児アレルギー学会誌* 2016; 30: 453.
- 4) Tuppo L, Alessandri C, Giangrieco I, Ciancamerla M, Rafaianni C, Tamburrini M, et al. Isolation of cypress gibberellin-regulated protein: Analysis of its structural features and IgE binding competition with homologous allergens. *Mol Immunol* 2019; 114: 189-95.
- 5) 加藤泰輔, 田嶋直哉, 北村勝誠, 高里良宏, 田島巖, 小野学, 田上和憲, 酒井一徳, 古田朋子, 杉浦至郎, 伊藤浩明. 小児果物アレルギー患者の口腔症状と全身症状に関する検討. *アレルギー* 2018; 67: 129-138.
- 6) 森雄司, 岡本薫, 川井学, 山脇一夫, 中島陽一, 柘植郁哉, 近藤康人. モモアレルギー患児における、臨床像と合併する原因食品の関係. *アレルギー* 2018; 67: 579.

Establishment of GRP detection and preparation of a measurement system for anti – GRP antibody, to provide protection from severe vegetable and fruit allergies

Yasuto KONDO

Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine

The incidence of fruit and vegetable allergies have been increasing in recent years. In a previous study, we confirmed that the causative allergen associated with severe symptoms for peach in Japan was a newly-reported gibberellin-regulated protein (GRP), rather than lipid-transfer protein (LTP), which is known to be the main causative allergen in the Mediterranean region. The purpose of this study is to clarify the abundance of GRP in various foods, and to prepare a measurement system for the anti-GRP antibody, to assist in the detection of patients who are at risk for severe allergies.

Based on our results, it was found that *P. pastoris* is superior to *E. coli* as an expression system for the production of large quantities of soluble, biologically active GRP. It was also found that GRP content displays large differences among various foods, depending on both maturity and sections of a plant. Since there are many cases of apple allergies among peach allergy patients, we compared the allergy symptoms between the two. As a result, it was found that apple allergy symptoms were mild or asymptomatic compared to those of peach, which was consistent with the fact that the GRP content in apples, as determined by real-time PCR or sandwich ELISA, was less than that in peaches. Finally, it was revealed that peach GRP sensitization was observed in about one fifth of those with Japanese cedar pollinosis.

We believe that the measurement of GRP-IgE antibody is meaningful to avoid the risk of developing allergies.