

米, 小麦, トウモロコシ, ヒエ, アワの共通アレルギー性 と Rice Protein 16KD の関与

公立尾陽病院小児科

山田一恵

藤田保健衛生大学小児科

宇理須厚雄

名古屋掖済会病院 RI 科

駒田英勝

いながき小児科

稲垣義彰

名古屋大学小児科

山田政功

名古屋大学農学部

中村 良

名古屋大学医療技術短期大学部

鳥居新平

イネ科に属する米, 小麦, ヒエ, アワ, トウモロコシ間に共通アレルギー性が存在するか否かを検討した。Pharmacia 製 米, 小麦, トウモロコシの paper disc を用いた吸収試験では, 米, 小麦, トウモロコシ各々の間で, 50%以上の IgE 結合能の低下がみられ, 共通アレルギー性が示唆された。米, 小麦, トウモロコシ, ヒエ, アワ粉末から抽出した抗原を結合させた paper disc による RAST assay では, どの穀物間でも有意な正の相関が認められたが RP 16KD に関しては, 米, アワのみに有意な相関がみられた。RAST inhibition では米, 小麦, トウモロコシ, ヒエ, アワいずれの組み合わせでも濃度依存性に有意な抑制がみられた。

以上の結果は, これら穀物間には共通アレルギーが存在することを示す。米の主要アレルギーの1つである RP 16KD と5種類の穀物抗原との間で, 有意な RAST inhibition が得られたことから, これら5種類の穀物間の共通アレルギー性に RP 16KD 上のアレルギー活性部位が関与していることが示唆された。

Key words: absorption test — cereal grains — cross-allergenicity — RAST inhibition — rice protein 16KD

はじめに

米, 小麦, トウモロコシなどの穀物と喘息や湿疹などのアレルギー疾患の関係が注目されている。

我々は, 湿疹を有する乳児では卵白, 牛乳の RAST 陽性率は高いが¹⁾⁻³⁾, 年長児になると卵白, 牛乳よりも米, 小麦などの穀物 RAST の陽性率が高くなることから, 年長児の湿疹と穀物との間に関係があると報告した⁴⁾。また宮川らは重症アトピー性皮膚炎に米アレルギーが関与している可能性を示唆している⁵⁾⁶⁾。さらに, 米⁷⁾, 小麦⁸⁾による気管支喘息の報告もある。

日本ではこれら米, 小麦アレルギー患者の治療のためにヒエ (Japanese millet, *Panicum Crus-galli* L. var. *frumentaceum* Trin.), アワ (Italian millet,

Received: June 10, 1991

Accepted: September 19, 1991

Abbreviations: RAST radioallergosorbent test; RP 16KD rice protein 16KD; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis

Setaria italica Beanv. var. *germanica* Schrad.) が代用食として用いられることがある。

Hoffman ら⁹⁾によって米, 小麦, トウモロコシ, オート麦などイネ科植物間の交叉反応性が報告され, 我々も米, 小麦間で同様の結果³⁾を得ている。ヒエ, アワともにイネ科植物に属するので, これらの穀物と米, 小麦, トウモロコシとの間に, 交叉反応性の存在が予測される。

本論文では米, 小麦アレルギーの代用食としてヒエ, アワを用いることの妥当性を共通アレルギー性の観点から検討した。さらに, Matsuda ら¹⁰⁾によって米抗原の中で最も強い IgE 結合能をもつ蛋白として報告された rice protein 16KD (以下 RP 16KD) のこれら穀物間の交叉反応性への関与も調べた。

方法と対象

1. 吸収試験; Phadebas RAST キット

(Pharmacia AB Diagnostics) の米, 小麦, トウモロコシ paper disc を用いて吸収試験を行った。前処理として, 血清100 μ l の中へ paper disc を0から6枚入れ, 4 $^{\circ}$ C, 18時間反応させ, その血清を用いて RAST assay を RAST キットの指示書に従って行った。paper disc による吸収処理血清の count 値が paper disc の枚数と比例して低下し, 未処理血清の count 値よりも50%以上の減少がみられた場合を陽性とした。

2. 穀物抗原の抽出方法; 米, 小麦, トウモロコシ, ヒエ, アワの乾燥粉末をエーテル脱脂後, Coca 液 (NaCl: NaHCO₃: phenol: 蒸留水=5g: 2.75g: 4g: 1l) 1l あたりに100g 加え室温で48時間攪拌し, 10,000 $\times$ g 30分間遠心後, その上清を蒸留水で透析してから凍結乾燥した。ウシ血清アルブミンを標準として Bio Rad の蛋白定量キットで測定した抽出物の蛋白濃度は, 抽出抗原1mg あたり米188 μ g, 小麦145 μ g, トウモロコシ146 μ g, ヒエ194 μ g, アワ183 μ g であった。

3. RP 16KD の精製; Matsuda ら¹⁰⁾の方法で行い, 蛋白濃度は118 μ g/mg であった。

4. SDS-PAGE; 穀物抗原と RP 16KD は digestive buffer (2% SDS, 2% 2-mercaptoethanol) と同量で混合し, 4分間煮沸したあと SDS-PAGE (4% stacking and 14% separating gel) に泳動した。molecular weight standard は Bio-Rad Laboratories を使用し, 泳動後の gel は Coomassie blue R-250 で染

色した。

5. RAST assay; 抽出した抗原を, CNBr によって活性化した paper disc (直径5mm, 東洋濾紙 No. 6) に結合し RAST disc とした¹¹⁾。disc 1枚あたり蛋白量で米75 μ g, 小麦58 μ g, トウモロコシ58 μ g, ヒエ78 μ g, アワ73 μ g, RP 16KD 19 μ g, 凍結乾燥全卵80 μ g を反応させた。RAST assay は RAST キットの指示書に従って行った。なお, 各抗原に対する正常血清の% binding の平均+2標準偏差を越えた場合, RAST 陽性とした。

米, 小麦, トウモロコシに対する RAST を自家製抗原を結合させた paper disc と Pharmacia 社の RAST disc との間で比較検討を行った。米, 小麦, トウモロコシのいずれにおいても両 disc 間にそれぞれ相関係数 $r=0.73, 0.90, 0.94$ (いずれも $p<0.001$) で有意な正の相関を示した。

6. RAST inhibition; 抗原溶液の25 μ l (濃度0から20mg/ml (W/V)) と血清25 μ l を混合して4 $^{\circ}$ C, 18時間静置した後に, 自家製の paper disc を用いて RAST assay を行った。

7. 血清; 年齢は5ヵ月から17歳, 男: 女=27: 14, 41例全例アトピー性皮膚炎があり, そのうち20例に気管支喘息の合併がみられた。

吸収試験には吸収 disc, RAST disc に結合している両方の抗原に対し RAST score 2以上の血清13例, 自家製穀物抗原 disc を用いた RAST assay にはいずれかの抗原 RAST に対し陽性である血清41例を用いた。RAST inhibition で使用した血清はすべての穀物抗原に対して% binding が17%以上ならびに RP 16KD に対する% binding が10%以上であった。

8. 統計処理; Pearson の相関係数を求め $p<0.05$ を有意な相関とした。

結 果

1. 吸収試験; 縦軸に% absorption を, 横軸には吸収に用いた disc の枚数 (0~6枚) を示してある。吸収用と RAST assay 用の disc が同じ種類の時には, 全血清で吸収試験陽性であった。それに対し, 吸収用と RAST assay 用の disc が異なる時は, ほとんどの血清で吸収試験陽性であったが, 一部の血清では陰性であった。しかし, 陰性例においても1例 (吸収 disc 小麦, RAST disc 米の破線例) を除いて disc の枚数に

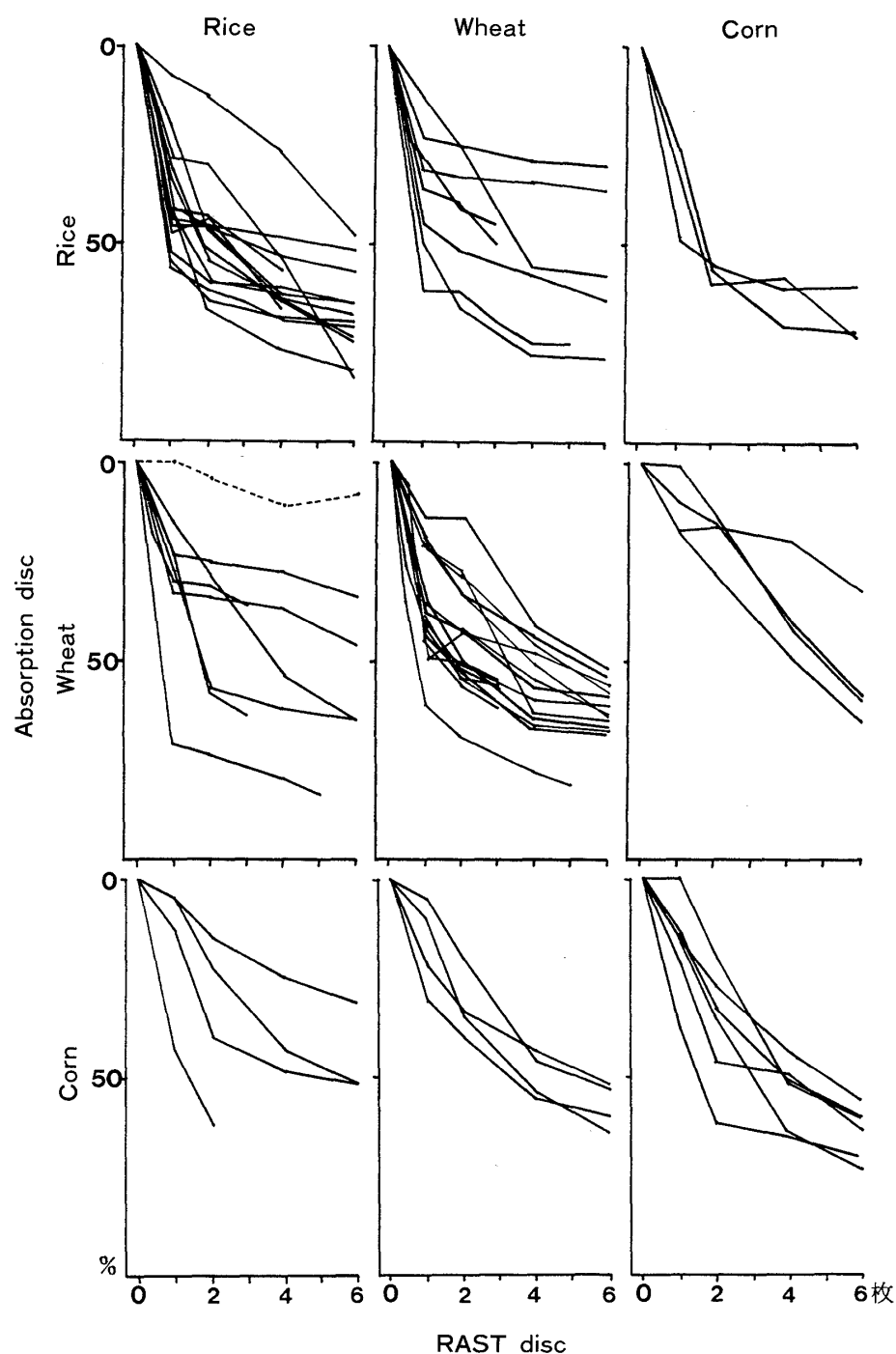


Fig. 1. Absorption test between rice, wheat and corn using Phadebas RAST discs.

比例して count 値の減少がみられた (Fig. 1).

2. SDS-PAGE ; Coca 液で抽出した穀物抗原と RP 16KD の SDS-PAGE(4% stacking gel, 14% separating gel, TEFCO) を Fig. 2 に示す. low molecular standard は Bio-Rad Laboratories を使用. 米から抽出した rice protein 16KD の band は, 小麦, ヒエ, アワ, トウモロコシに含まれていた.

3. 穀物に対する RAST 値の関係 ; Table 1 は, 穀物抗原を結合させた自家製の paper disc を用いて行った米, 小麦, トウモロコシ, ヒエ, アワ, RP 16KD に対する RAST のそれぞれの関係を示す. 5 種類の穀物に対する RAST のいずれの組み合わせにおいても, $p < 0.001$ で有意な正の相関が認められた.

下段はこの 5 種類の穀物と RP 16KD の検討であ

Table 1 Relationships between RAST results for cereal grains including rice, wheat, corn, Japanese millet, Italian millet and rice protein 16KD

	Rice	Wheat	Corn	Japanese millet	Italian millet
Rice		$r=0.74$ $n=40$ $p<0.001$	$r=0.83$ $n=34$ $p<0.001$	$r=0.79$ $n=41$ $p<0.001$	$r=0.85$ $n=41$ $p<0.001$
Wheat			$r=0.87$ $n=34$ $p<0.001$	$r=0.65$ $n=40$ $p<0.001$	$r=0.71$ $n=40$ $p<0.001$
Corn				$r=0.94$ $n=34$ $p<0.001$	$r=0.98$ $n=34$ $p<0.001$
Japanese millet					$r=0.93$ $n=41$ $p<0.001$
RP 16KD	$r=0.56$ $n=31$ $0.01<p<0.001$	$r=0.26$ $n=26$ $0.1<p<0.2$	$r=0.32$ $n=21$ $0.1<p<0.2$	$r=0.35$ $n=27$ $0.05<p<0.1$	$r=0.49$ $n=27$ $0.001<p<0.01$

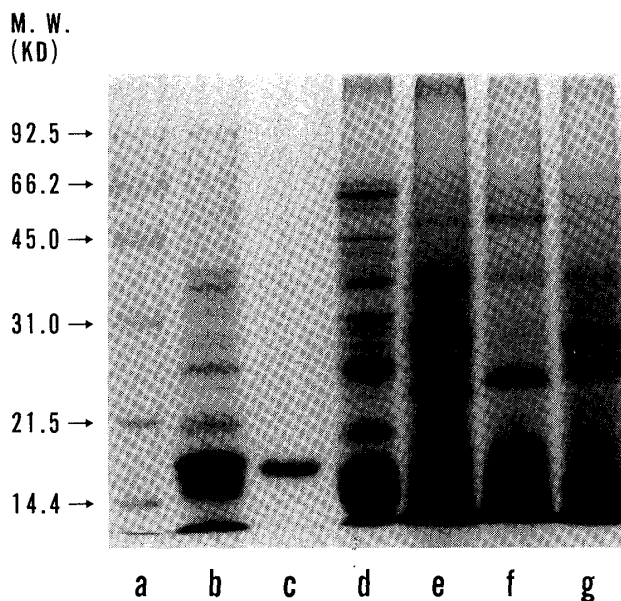


Fig. 2. SDS-PAGE. a: low molecular weight standard, b: rice, c: rice protein 16KD, d: wheat, e: Japanese millet, f: Italian millet, g: corn.

る。RAST の相関関係は RP 16KD と米ならびにアワとの間に有意な正の相関があったが、小麦やトウモロコシとの間には有意な相関はみられず、ヒエとの間には相関の傾向 ($p<0.1$) があった。

4. RAST inhibition; Fig. 3 に穀物間の RAST inhibition の結果を示す。縦に inhibitor の種類を、横に RAST disc に結合させた抗原の種類を示し、グラ

フ内の X 軸は inhibitor の濃度を、Y 軸は % inhibition を示す。inhibitor と RAST disc の抗原の種類が同じ場合にはどの抗原のときにも全例に有意な抑制が認められた。inhibitor と RAST disc が異なるどの組み合わせでも、ほとんどの血清で 50% を越す抑制がみられた。Fig. 4 は 5 種類の穀物と RP 16KD との RAST inhibition の結果である。inhibitor を各穀物抗原とし、RAST disc を RP 16KD とした場合にどの組み合わせでも、個人差はあるが % inhibition が 50% を越す有意な反応であった。inhibitor が RP 16KD で RAST disc が 5 種類の穀物の場合、50% inhibition に達しない例もあるが用量依存的な反応が認められた。

穀物間の RAST inhibition の結果が、非特異的な反応なのか否かを検討した (Fig. 5)。対象の 4 例は、凍結乾燥全卵 disc に対して % binding 25% 以上の血清である。inhibitor として凍結乾燥全卵、米、小麦、トウモロコシ、ヒエ、アワを用い、RAST disc は凍結乾燥全卵を結合した disc を使用した。inhibitor が凍結乾燥全卵のときには 4 例とも 90% 以上の抑制を示したのに対し、穀物を inhibitor として用いた場合には有意な抑制は認められなかった。このことから、自家製 disc と抗原を用いた RAST inhibition は特異的な反応と考えられた。

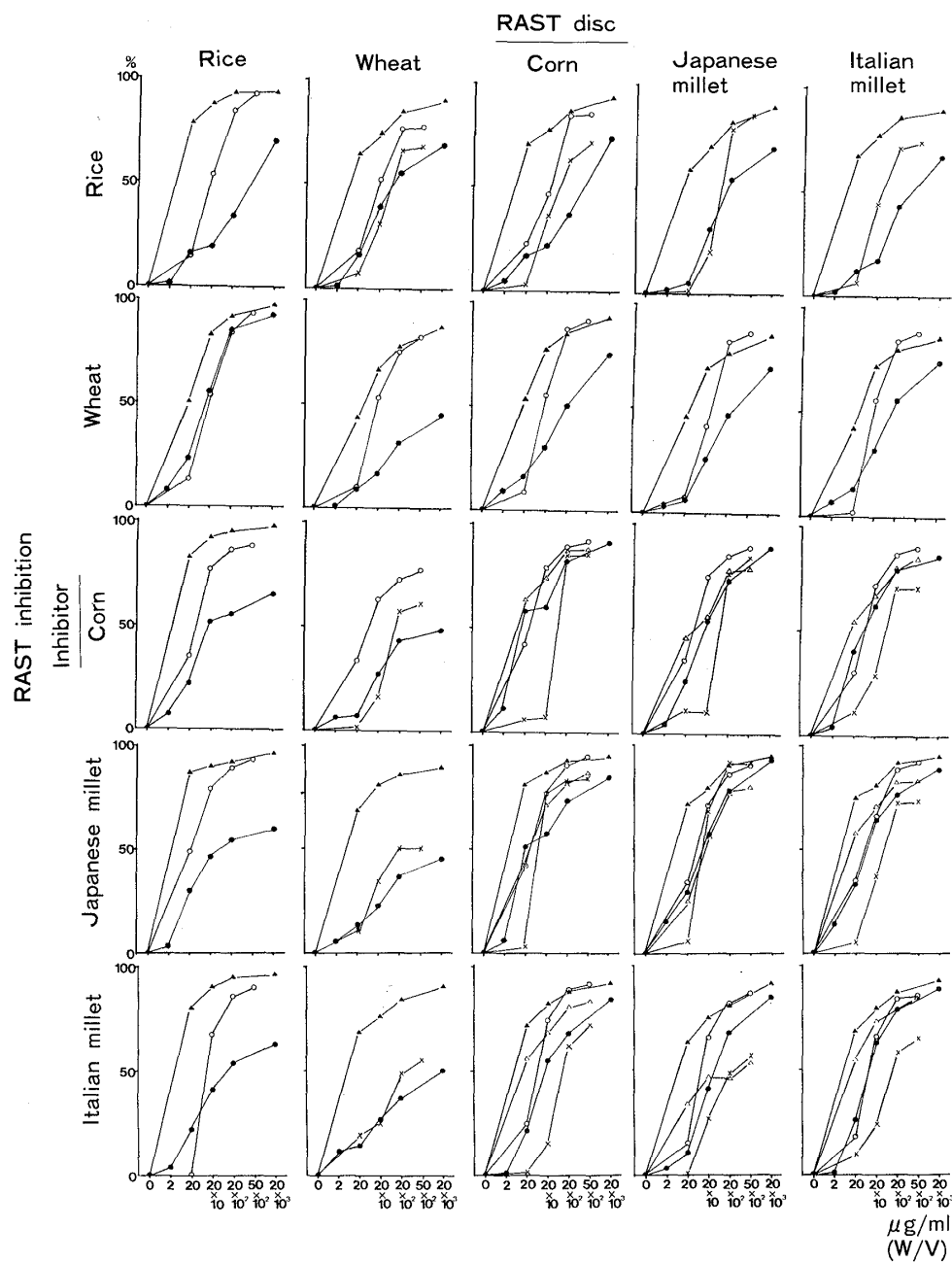


Fig. 3. RAST inhibition between cereal grain extracts.

考 察

Block ら⁸⁾により, Barker's asthma の4症例で小麦の吸入による喘息症状がライ麦や他種の麦によっても引き起こされることから穀物間の交叉性が示唆され, Hoffman ら⁹⁾によって麦間だけでなく米, トウモロコシとの間にも交叉抗原性の存在が示された。

我々は, 米, 小麦, トウモロコシ以外のイネ科の植物のうち, 食用とされるヒエ, アワとの間にも共通アレルギー性が存在することを証明した。

わが国では, 小麦あるいは米 RAST 陽性のアレルギー患者に対してヒエやアワが代用食として用いられる傾向がある。しかし, これら5種類の穀物間には交叉反応性が存在することから, ヒエ, アワを代用食として用いる場合には個々の症例におけるアレルギー性の再確認が必要である。

RP 16KD は Matsuda ら⁹⁾によって, 米抗原中で最大の IgE 結合能をもつ蛋白として報告された。さらに我々は, 36例の血清を用いた RAST assay や米 RAST 陽性患者白血球からの histamine release の検

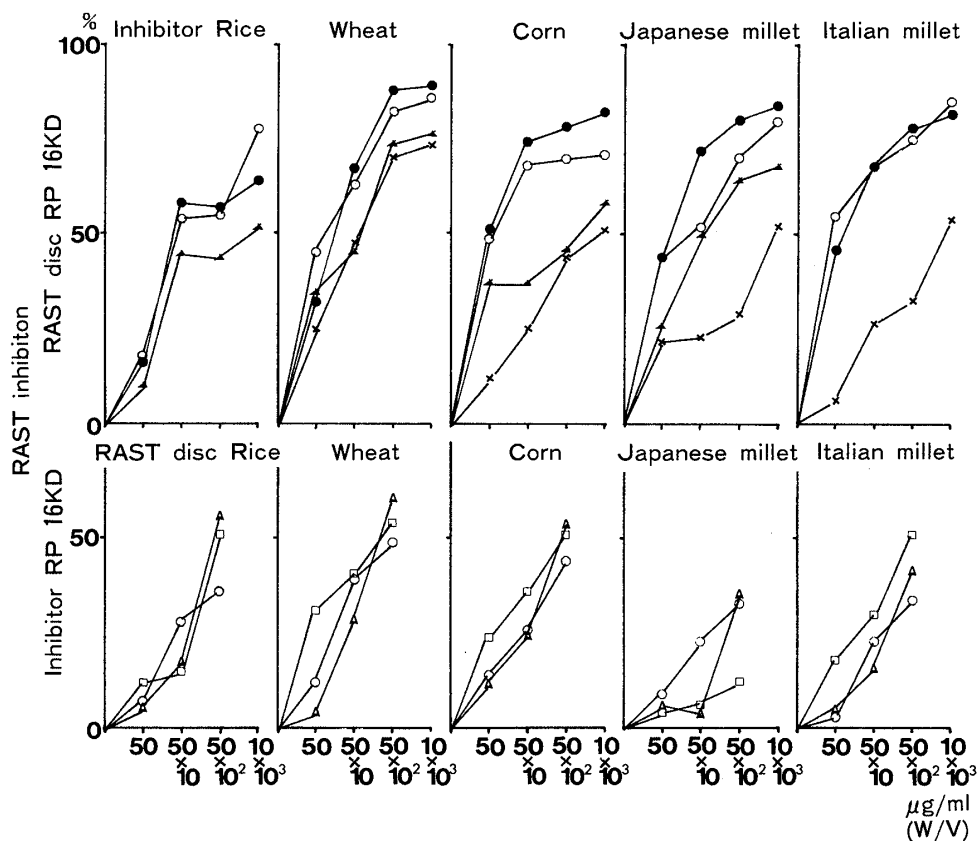


Fig. 4. RAST inhibition between cereal grain extracts and rice protein 16KD.

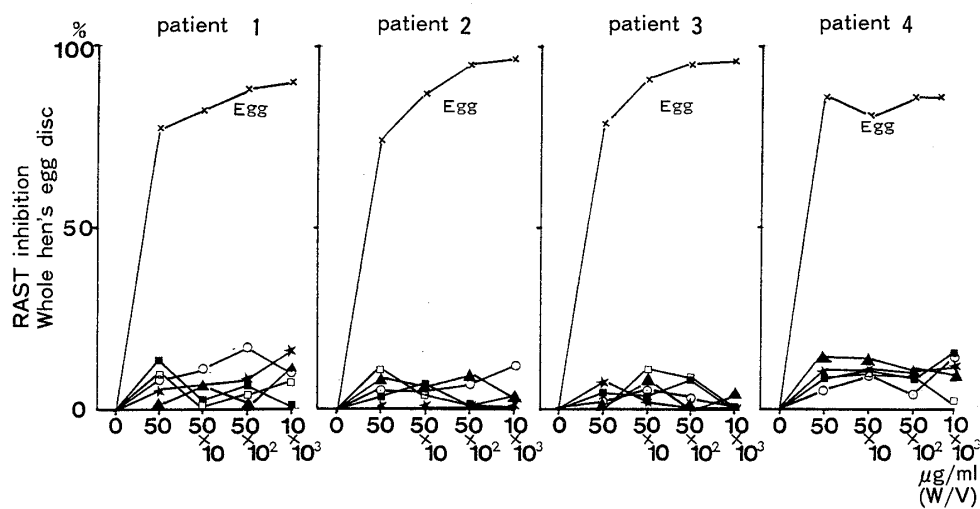


Fig. 5. RAST inhibition between whole hen's egg and cereal grain extracts.

RAST disc; whole hen's egg

Inhibitor; egg×, rice▲, wheat○, corn★, Japanese millet■, Italian millet□

討から、米の major allergen の 1 つであることを報告した¹²⁾。

今回、RP 16KD が 5 種類のイネ科穀物間の共通アレルギー性に関与するか否かを検討した。RAST inhibi-

tion の結果から RP 16KD 上の IgE 結合部位と類似の構造が、小麦、トウモロコシ、ヒエ、アワ抗原中の成分にも含まれていることが示された。しかし RP 16KD と他の穀物に対する RAST の比較の結果で小麦、トウ

モロコシとは相関しなかったことから、小麦、トウモロコシの成分中には RP 16KD と類似構造をもった成分以外に、これより強い IgE 結合能をもった成分が存在すると推測された。RP 16KD 以外の米蛋白質抗原にもこれらイネ科穀物間の共通アレルゲン性に関与する抗原が存在することを示している。いずれにしても、RP 16KD 上の IgE 結合部位と類似する構造がイネ科植物の間に広く分布することが推測された。今後は類似構造部位のアミノ酸配列やアレルギー活性、IgE 結合能の検討が必要である。

文 献

- 1) 馬場 実：食物抗原の検索。現代医療 16, 759-763, 1984.
- 2) 堀場史也, 宇野須厚雄：母親が摂取した食物によるアレルギー。小児科 30, 927-931, 1989.
- 3) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣義彰, 山田政功, 鳥居新平：アトピー性皮膚炎における穀物アレルゲンに関する検討。日児誌 91, 888-895, 1987.
- 4) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣義彰, 駒田英勝, 山田政功, 鳥居新平：アトピー性皮膚炎における食餌性アレルゲンの検討。小児科臨床 38, 2543-2552, 1985.
- 5) 宮川加奈太, 平井義雄, 宮川淳子, 杉山朝美, 小松平, 他：アトピー性皮膚炎患児における診断基準項目, 年齢分布, 重症度, IgE-RAST, 血清 IgE 値の統計的解析—重症アトピー性皮膚炎患児における米アレルギーの果たす役割。アレルギー 37, 1101-1110, 1988.
- 6) 小松 平, 池澤善郎：穀物アレルギーとアトピー性皮膚炎。小児科 30, 939-945, 1989.
- 7) Wraith, D.G., Merrett, J., Roth, A., Yaman, L. and Merrett, T.G.: Recognition of food allergic patients and their allergens by the RAST technique and clinical investigation. *Clin. Allergy* 9, 75-36, 1979.
- 8) Block, G., Tse, K.S., Kijek, K., Chan, H. and Chan-Yeung, M.: Bakers asthma. *Clin. Allergy* 14, 177-185, 1984.
- 9) Hoffman, D.R.: The specificities of human IgE antibodies combining with cereal grains. *Immunochimistry* 12, 535-538, 1975.
- 10) Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R. and Torii, S.: Purification and properties of an allergenic protein in rice grain. *Agric. Biol. Chem.* 52, 1465-1470, 1988.
- 11) 伊藤幸治：IgE の測定法と RAST。新内科学大系 58, 332-333, 1976.
- 12) 増田 進, 尾崎隆男, 宇理須厚雄, 和田映子, 近藤康人, 他：16KD rice protein のヒト白血球からのヒスタミン遊離能の検討。アレルギー 39, 1243, 1990.

THE INVOLVEMENT OF RICE PROTEIN 16KD IN CROSS-ALLERGENICITY BETWEEN ANTIGENS
IN RICE, WHEAT, CORN, JAPANESE MILLET, ITALIAN MILLET

Kazue Yamada

Biyoh Public Hospital

Atsuo Urisu

Department of Pediatrics Fujita Health University School of Medicine

Hidekatsu Komada

Nagoya Ekisaikai Hospital

Yoshiaki Inagaki

Inagaki Clinic

Masanori Yamada

Department of Pediatrics, Nagoya University School of Medicine

Ryo Nakamura

Department of Agriculture, Nagoya University

Shinpei Torii

Department of Pediatrics College of Medical Technology, Nagoya University School of Medicine

Cross-reactivity between rice, wheat, corn, Japanese millet and Italian millet in *Poaceae* family were studied by absorption test, radioallergosorbent test (RAST), and RAST inhibition assay. In absorption test using Phadebas RAST discs, more than 50% absorption of IgE antibodies was observed between rice, wheat and corn. There were significant correlations of RAST values for cereal grains including rice, wheat, corn, Japanese millet and Italian millet. RAST inhibition assay between every combinations of these cereals showed dose-dependent decrease in IgE-binding. These data indicated cross-reactivity with IgE antibodies between the five cereals in *Poaceae* family. RAST values for RP16KD significantly correlated with those for Italian millet as well as rice but not with those for corn and wheat. There was a trend of positive correlation between RAST values for RP16KD and Japanese millet. In RAST inhibition assay using sera with positive RAST for these five cereal grains and RP16KD, RP16KD inhibited IgE-binding to these all cereal discs in dose-dependent manner. Similarly, all of five cereal grain extracts showed an effective diminution in IgE-binding to RP16KD disc. These results indicated possible participation of IgE-binding structure on RP16KD in cross-reactivity between these cereal grains in *Poaceae* family.
