

魚によるアレルギー性食餌性蕁麻疹の1例

(2) 白身魚と赤身魚との共通抗原性と抗原活性の比較検討

東京女子医科大学第二病院皮膚科

安田和正 平野京子

Key words: antigenic activity — cross reactivity — fish urticaria — red meat fish
— white meat fish

(受付: 8月5日, 1985)

はじめに

著者ら¹⁾は第1報で各種魚類に対する特異IgE抗体の存在を証明したアレルギー性食餌性蕁麻疹の3歳女児例を報告し、イサキ白色筋組織より分離した抗原は分子量が6000-25000のトリプシン抵抗性、熱安定な水溶性蛋白であることを明らかにした。

一方、食餌性蕁麻疹の原因に関しては、蕁麻疹研究会の報告²⁾によると、我が国では魚介類が原因の過半数を占め、特にサバ、マグロなどのいわゆる赤身魚によるものが圧倒的に多いと報告されている。

今回古川ら^{3,4)}のこんにゃく喘息の抗原に関する研究と同様の方法で赤身魚としてサバとマグロを、白身魚としてイサキとタラを用い、患者背部を用いた open patch test による end point titration test, P-K 反応による end point titration test, P-K 反応による in vivo 中和試験, IgE-ELISA および in vitro IgE-ELISA inhibition test の5方法により白身魚と赤身魚との共通抗原性と、抗原活性の比較検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 材料

1) 魚粗抗原: 新鮮なイサキ、タラ、マグロ、サバの4種類の魚を使用した。これらの魚を細切後凍結乾燥し、エーテルにて脱脂後、風乾した。Konosuら⁵⁾と同

様に重量比1:10になるよう phosphate buffered-saline (PBS: 0.015M sodium phosphate, 0.025M sodium chloride, pH 7.3) を加え、4℃で1時間攪拌後、4℃, 4400×g にて15分間遠沈し、得られた上清を0.22μmのミリポアフィルターにて濾過したものを魚粗抗原とし各種実験に1回ずつ使用できるように、Nunc plastic tube に分注後、-80℃にて凍結保存した。

2) 魚抗原液: 実験に際しては上記4種類の魚粗抗原を融解後、0.22μmのミリポアフィルターにて濾過し、それぞれの蛋白濃度の測定を、Bio-Rad protein assay kit を用い、ウシ血清アルブミンを標準物質として280nmの吸光度を測定することにより定量した。その結果イサキは $3.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 、タラは $1.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 、マグロは $5.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 、サバは $6.8 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ であった。そしてこれらをPBSにて目的に応じた濃度に希釈したものを魚抗原液として使用した。

3) 血清: 第1報¹⁾で述べた各種魚類を食べても、触れても蕁麻疹を生じる3歳女児の血清をNunc plastic tube に分注後、-80℃にて保存した。使用にあたっては融解後0.22μmのミリポアフィルターにて濾過した。コントロール血清もアレルギー素因のない健康成人10名(24-34歳)の血清を集め、上記と同様に保存し使用した。

4) paper disc: 東洋濾紙 No. 6を直径5mmの円形にしたものを使用した。

2. 方法

1) open patch test による end point titration test 患者背部の健常皮膚を使用し、4種の魚抗原液(蛋白濃度は $10^3 \mu\text{g/ml}$)の10倍希釈系列溶液0.05mlを5×5cmの範囲に均一に塗布し、15分後に膨疹を形成したものを陽性とした。

Abbreviations: ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; PBS phosphate buffered saline; P-K Prausnitz-Küstner; RAST radioallergosorbent test

2. P-K 反応による end point titration test

これら4種類の魚粗抗原による皮内反応陰性者で、アトピー性疾患の既往のない健康人背部に、患者血清を0.05ml ずつ感作した。24時間後、4種の魚抗原液(蛋白濃度は $1\mu\text{g}/\text{ml}$)の10倍希釈系列溶液を、先に感作した被動感作部位に0.02ml ずつ皮内注射して、15分後に発現した膨疹および紅斑径を測定した。そして古川ら³⁴⁾に準じて膨疹が直径10mm 以上または紅斑が20mm 以上のいずれかを満足したものを陽性とした。

3) P-K 反応による in vivo 中和試験

4種の魚抗原の共通抗原性をP-K反応を応用した中和試験により検討した。2)と同一の健康人背部に患者血清を0.05ml ずつ12箇所感作した。そして24時間後より4種の魚抗原液(蛋白濃度は、イサキ $10^{-3}\mu\text{g}/\text{ml}$ 、タラ $10^{-2}\mu\text{g}/\text{ml}$ 、マグロ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、サバ $10\mu\text{g}/\text{ml}$)0.02ml を、それぞれ3箇所ずつ先に感作してある被動感作部位に24時間ごとに4回皮内注射した。そして全ての被動感作部位の膨疹および紅斑が陰性であることを確認し、さらに24時間後に今度はそれぞれ別の同じ蛋白濃度の魚抗原液0.02ml を皮内注射して、生じた膨疹および紅斑径を測定した。そして2)と同様に膨疹が直径10mm 以上または紅斑が20mm 以上のいずれかを満足したものを陽性とした。

4) Phadezym RAST による特異 IgE 抗体の測定

cyanogen bromide による paper disc の活性化、paper disc と4種の魚抗原との結合、作製したアレルゲン disc の洗浄および保存は、宮本ら⁶⁾の方法に準じておこなった。すなわち4種の魚抗原液(蛋白濃度は $10^3\mu\text{g}/\text{ml}$)5ml 中に100枚の paper disc と4℃、24時間振盪後、残液中の蛋白濃度を280nm の吸光度を測定することにより定量し、paper disc に結合したと考えられる蛋白量を間接的に測定した。その結果、4種の魚アレルゲン disc 1枚は、約 $1.0\mu\text{g}$ の魚蛋白と結合した。このようにして作製したアレルゲン disc を使用し、特異 IgE 抗体の測定を Pharmacia 社製 Phadezym RAST kit による ELISA 法でおこなった。測定方法は説明書記載の通りおこない、吸光度は日立製 100-40型分光光度計で、波長420nm の吸光度を測定した。反応はすべて duplicate でおこない、その平均値を算出し、同時に Pharmacia 社製の Reference 試薬で得られた数値と比較し、class 4から class 0までの class 分けをした。また negative control としてはアレルギー素因のない健康人10名の血清を使用し、同様に吸光度を測定した。

5) 白身魚の disc を使用した in vitro IgE-ELISA inhibition test

4)で作製した4種のアレルゲン disc のうち、白身魚のイサキとタラを使用した。inhibition は Hoffman ら⁷⁾の方法と同様に、inhibitory antigen である4種類の魚抗原液(蛋白濃度は $10^3\mu\text{g}/\text{ml}$)を incubation buffer(0.9%NaCl, 0.05M phosphate buffer, 0.3% bovine serum albumin, 0.05% NaN_3 , 0.1% Tween 20, pH 7.4)にて10倍希釈した系列を作製し、その100 μl と患者血清20 μl を polystyrene tube に入れ、30分間室温にて放置後、一晚冷室内に静置した。その後イサキおよびタラを結合した paper disc を1枚ずつ加え、4)と同様に IgE-ELISA をおこなった。実験はすべて duplicate でおこない、その平均値をそれぞれの吸光度とした。inhibitory antigen のかわりに incubation buffer を使用して IgE-ELISA inhibition test と同様の操作をおこなって得た吸光度を control の吸光度として、

$$\frac{(\text{control の吸光度}) - (\text{抗原液を加えたときの吸光度})}{\text{control の吸光度}} \times 100\%$$

の式にて、それぞれ inhibitory antigen の希釈系列の抑制率(%)を計算した。そして、その結果を片対数グラフを用いて示し、50% inhibition に達したものを disc のサカナ抗原と共通抗原性があるものと判断した。

結 果

1) open patch test による end point titration test: Table 1に示したように白身魚のイサキとタラはその end point が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、赤身魚のマグロとサバは $10^3\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。以上の結果より白身魚は赤身魚に比べ、1000倍の抗原活性があることがわかった。

2) P-K 反応による end point titration test: Table 2に示したように白身魚のイサキはその end point が $10^{-4}\mu\text{g}/\text{ml}$ 、タラは $10^{-3}\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、赤身魚のマグロは $10^{-1}\mu\text{g}/\text{ml}$ 、サバは $1\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。以上の結果よりイサキはタラの10倍、マグロの1000倍、サバの10000倍の抗原活性があることがわかった。

3) P-K 反応を応用した in vivo 中和試験: 反応はすべて注射部位でいずれも陰性であり、これら4種の魚間には共通抗原性の存在が示唆された。

Table 1 Comparative open patch test using four fish antigens

Antigens	Antigen concentration($\mu\text{g/ml}$)				
	10^3	10^2	10	1	10^{-1}
Grunt	+	+	+	+	-
Cod	+	+	+	+	-
Tuna	+	-	-	-	-
Mackerel	+	-	-	-	-

+ : Positive.

- : Negative.

Table 2 Comparative P-K test using four fish antigens

	Antigen concentration($\mu\text{g/ml}$)					
	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Grunt	+	+	+	+	+	-
Cod	+	+	+	+	-	-
Tuna	+	+	-	-	-	-
Mackerel	+	-	-	-	-	-

+ : Positive.

- : Negative.

4) Phadezym RAST による特異 IgE 抗体の測定:

これら4種のサカナ抗原を結合したアレルゲン disc による IgE-ELISA では、患者血清の吸光度は白身魚のイサキが0.477, タラが0.420, 赤身魚のマグロが0.092, サバが0.069であり、これらの数値と Reference 試薬で得られた数値との比較では、イサキとタラは class 3, マグロは class 2, サバは class 1 であり、白身魚に強い抗原活性があることがわかった。また negative control として用いた健常人10名の血清を使用した際の吸光度の平均値はイサキ0.030, タラ0.033, マグロ0.026, サバ0.038で、いずれの血清も class 0 であった。

5) 白身魚の disc を使用した in vitro IgE-ELISA inhibition test: 抑制率を計算し、その結果を片対数グラフを用いて Fig. 1, Fig. 2 に示した。すなわち Fig. 1 のようにイサキ disc を使用した際に4種の魚抗原はすべて50% inhibition に達し、その蛋白量は、患者血清 $20\mu\text{l}$ に対して白身魚のイサキは $1.3 \times 10^{-1} \mu\text{g}$, タラは $3.0 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ であり、赤身魚のマグロは $3.6 \times 10 \mu\text{g}$, サバは $8.0 \times 10 \mu\text{g}$ であった。次に Fig. 2 のようにタラ disc を使用した際にもすべて50% inhibition に達し、その蛋白量は白身魚のイサキは $1.2 \times 10^{-1} \mu\text{g}$, タラは

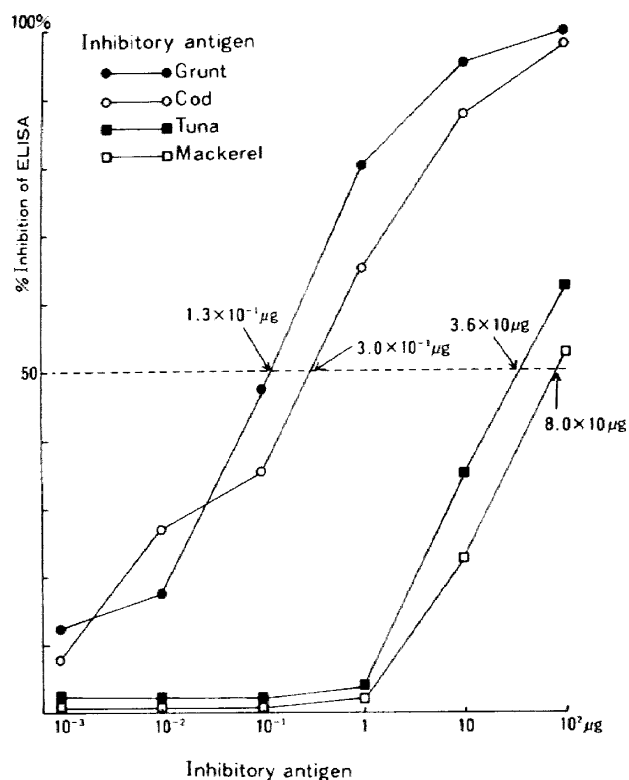


Fig. 1. The in vitro IgE-ELISA inhibition test which was performed using grunt discs.

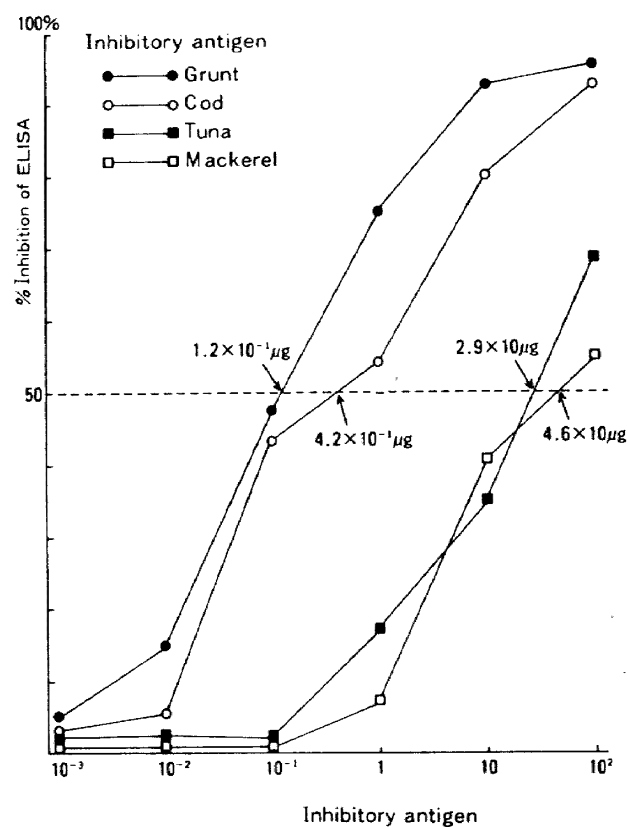


Fig. 2. The in vitro IgE-ELISA inhibition test which was performed using cod discs.

$4.2 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ であり、赤身魚のマグロは $2.9 \times 10 \mu\text{g}$, サバは $4.6 \times 10 \mu\text{g}$ であった。

以上の結果より、白身魚と赤身魚との間に共通抗原性の存在が示唆され、また 50% inhibition を示した蛋白量を比較すると赤身魚は白身魚の 100 倍以上の蛋白量が必要であることがわかった。

総括および考察

わが国の多施設集計報告²⁾によると、魚介類による食餌性蕁麻疹は、サバ、マグロ、サンマ、カツオ、イワシなどの赤身魚によるものが圧倒的に多いとのことであるが、この報告は単に患者の訴えを集計したもので、再現性を確認したものがないので信頼性は乏しい。一般には魚による蕁麻疹は非常に珍しいものである。

著者ら¹⁾は、第 1 報で魚によるアレルギー性食餌性蕁麻疹の 3 歳女児例を報告した。またその際 18 目 82 種の魚すべてが、患者の健常皮膚への open patch test 陽性を示し、また IgE-RAST にてタラが score 3、マグロが score 2 を示していた。以上のことより、18 目 82 種の魚間には共通抗原が存在し、白身魚であるタラが、赤身魚のマグロに比べ強い抗原活性があるのではないかと考えた。

今回の実験に使用した 4 種類の魚は新鮮な生のもので、フェノールなどの防腐剤を添加することなく、Konosu ら⁵⁾と同様に PBS にて抽出後、凍結保存した。これらの魚粗抗原は、融解するとかなりの沈殿物を生じてくるため、ミリポアフィルターにて濾過した。

濾過後の魚抗原液は冷蔵庫中で 1 週間は肉眼的に沈殿物を生じないが、それ以上の日数では沈殿物が生じてくる。このように、生魚の抗原蛋白の分離精製は非常にむずかしく、Hoffman ら⁶⁾のエビ抗原や OKa & Jyo ら⁹⁾⁻¹²⁾のホヤ抗原の分離精製と同様に、魚を加熱処理後に分離・精製することも将来検討すべきであろう。

これらの 4 種類の魚抗原液を使用した抗原活性の比較検討では、白身魚のイサキとタラは、赤身魚のマグロとサバより非常に強い抗原活性があった。

次に 4 種類の魚抗原液の共通抗原性の検討では、in vivo 中和試験は完全に成立した。しかし in vitro IgE-ELISA inhibition test では抗原活性の弱いマグロとサバの disc は、control の吸光度が低値となるため、抗原液を加えた時の吸光度との差がほとんどなく、抑制率のバラツキが大となり、今回使用しなかった。白身

魚のイサキとタラの 2 種類の disc を使用した際には、4 種類の魚抗原液の 50% inhibition に達する蛋白量には白身魚と赤身魚には 100 倍近い差があるが、すべて 50% inhibition に達したことより、これら 4 種類の魚間には共通抗原が存在するものと考えた。白身魚と赤身魚の 50% inhibition に達する蛋白量の差が、major allergen の蛋白量または若干の構造の違いを示すものなのか、別の minor allergen の存在を示すものかについては不明である。

共通抗原性を検討する際には、油井ら¹³⁾が指摘しているように、抗原は精製され、活性が同程度のものを用いて比較すべきである。その例として、魚抗原では Elsayed & Aas ら¹⁴⁾のタラより分離精製された Allergen M と、トリプシンで加水分解して得られる TM₁、TM₂ との共通抗原性の検討があげられる。しかし、このタラを除いては、魚抗原の分離精製や共通抗原性についてはほとんど行われていないのが実状である。

白身魚と赤身魚との相違について考えてみると、白身魚というのは白色筋 (white muscle) を多く含む魚であり、赤身魚というのは白身魚より赤色筋 (red muscle) を含有する割合が多い魚といえる。生化学的¹⁵⁾には、この白色筋というのは、脊椎動物の骨格筋で、比較的白い色をした筋肉のことをいい、ミオグロビン (筋肉ヘモグロビンを指し、分子量約 1.7 万の単量体で、1 分子当たりプロトヘム 1 個を含む) の含量や、ミトコンドリアの大きさや数が赤色筋に比べて少ないことが特色である。白色筋は収縮速度が速く、収縮器官の筋原線維が発達し速筋 (fast muscle) とも呼ばれ、ミオシンの L 鎖組成も赤色筋のそれと異なり、ATP アーゼ活性も高い。骨格筋の大部分は白色筋であるが、呼吸筋、飛行性鳥類の胸筋および心筋は赤色筋である。

筋肉内の蛋白質の構成比は、50% が筋原線維 (actin, myosin, actomyosin)、26% が筋漿の蛋白質、8% が筋鞘、筋膜のコラーゲンなど残りの部分はミトコンドリアと小胞体などの膜成分である。ここで筋漿というのは筋形質とも呼ばれ、筋細胞中の細胞液で無形成分であり今回我々が用いている 4 種の魚抗原は Elsayed & Aas ら¹⁴⁾と同様に筋漿の水溶性の蛋白質である。この筋漿の蛋白質のうち大部分 (筋肉蛋白質の 24%) は解糖系を主体とする可溶性酵素であって、残り約 2% は筋肉内における酸素の伝達、貯蔵をおこなうミオグロビンである。そこで今回の実験結果から抗原蛋白について考えてみると、白身魚の方が赤身魚より非常に強い抗原活性があることから、ミオグロビンは否定的で

解糖系を主体とする可溶性酵素が最も有力な抗原蛋白と考えられる。

次に他の脊椎動物と魚の白色筋より分離した筋漿蛋白との相違については Konosu ら⁵⁾の大変興味ある報告がある。彼らはコイの白色筋由来の水溶性蛋白質から3つの主要ピークを分離精製した。分子量は9000-13000, アミノ酸組成中トリプトファンとメチオニンを含まず、約15%という大量のフェニールアラニンを含み、チロジン、システニン、プロリン、アルギニン、ヒスチジンが1分子当たりたかだか1つ認められるにすぎないことを示した。またこれらの蛋白質はカエルやヒラメ、カレイ、タラの水溶性蛋白質にもかなりの量が認められるが、コイの赤色筋ではごくわずかの量しか存在せず、ウサギには認められない。すなわち、これらの蛋白質は動物学的に限定した範囲でのみ見出され、魚類の白色筋と両生類に特異的にみられると述べている。本症例についてもこの点につき検討し、魚類以外にも両生類、爬虫類にはかなり大量の水溶性抗原蛋白が存在したが、無類類、板鰓類、鳥類、哺乳類には存在しなかった¹⁰⁾。今後、イサキの精製抗原を用いて今回と同様の実験方法で魚類の白色筋と両生類、爬虫類との共通抗原性を検討するつもりである。

最後に、今回使用した試験法で open patch test は P-K 反応の皮内注射による惹起に比べ、その感度が約1/10000であることもわかった。したがって、抗原検索法において利用される皮膚テストで、健常皮膚に施行される open patch test は、魚抗原のような皮膚を容易に通過する抗原に対して、苦痛の少ない、安全かつ最も特異性にすぐれた方法といえる。

いずれにしても今回我々が検討したのは1症例についてのみであり、今後同様の症例の追試がまたれる。

まとめ

魚によるアレルギー性食餌性蕁麻疹の3歳女児における open patch test ならびに同女児の血清による諸種の反応を用いて白身魚(イサキとタラ)と赤身魚(マダラとサバ)の PBS 抽出抗原について、共通抗原性と抗原活性を比較検討した。その結果、白身魚が赤身魚よりも強い抗原活性を示したが、両者間には共通抗原性が認められた。

本論文の要旨は、第34回日本アレルギー学会総会において発表した。

稿を終るにあたり、ご校閲いただきました東京女子医科大学医工研石島正之先生に深謝いたします。また本実験に協力していただいた永澤敏光、秋山 西、岩瀬哲朗君に感謝いたします。

文 献

- 1) 安田和正, 平野京子: 食餌性蕁麻疹のアレルギー学的研究 (1) サカナによるアレルギー性食餌性蕁麻疹. アレルギー 33, 1016-1024, 1984.
- 2) 大島良雄, 石崎 達: 「蕁麻疹研究会」中間報告. (1) 蕁麻疹に関する臨床集計成績. アレルギー 13, 299-308, 1964.
- 3) 古川 充, 中沢次夫, 小林節雄, 佐藤久美子: こんにゃく喘息の抗原に関する研究 第1編 15% polyacrylamide gel electrophoresis による精製. アレルギー 28, 40-47, 1979.
- 4) 古川 充: こんにゃく喘息の抗原に関する研究 第2編 radioallergosorbent test および Prausnitz-Küstner 反応を用いた抗原活性の比較検討. アレルギー 29, 41-47, 1980.
- 5) Konosu, S., Hamoir, G. and Pechère, J.F.: Carp myogen of white and red muscle. Properties and amino acid composition of the main low-molecular-weight components of white muscle. *Biochem. J.* 96, 98-112, 1965.
- 6) 宮本昭正, 真野健次, 伊藤幸治, 富谷百合子, 堀内淑彦: paper disc を用いての radioallergosorbent test (RAST) に関する研究. アレルギー 22, 581-594, 1973.
- 7) Hoffman, D.P. and Shipman, W.H.: Allergens in bee venom. I. Separation and identification of the major allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 58, 551-562, 1976.
- 8) Hoffman, D.R., Day, E.D. Jr. and Miller, J.S.: The major heat stable allergen of shrimp. *Ann. Allergy* 47, 17-22, 1981.
- 9) 城 智彦, 菊地博通, 浜口美博, 折田良造, 河本寛次, 岡 智, 兼久秀典, 勝谷 隆, 大塚 正, 佐藤静一: ホヤ喘息におけるホヤ抗原成分の化学的精製. アレルギー 19, 788-793, 1970.
- 10) 城 智彦, 河本寛次, 坪井信次, 勝谷 隆, 大塚 正, 岡 智: 気管支喘息における感作と減感作の機序に関する研究. アレルギー 23, 464-474, 1974.
- 11) Oka, S. and Jyo, T.: Radioimmunoassay of sea-squirt antigens. *Jpn. J. Allergol.* 26, 76-84, 1977.
- 12) Oka, S., Takeda, S. and Jyo, T.: Chemical

- composition of the presumed antigenic determinant in sea-squirt antigens. *Jpn. J. Allergol.* 26, 421-430, 1977.
- 13) 油井泰雄, 清水章治, 柳原行義, 信太隆夫: キク科花粉間における共通抗原性の検討(1報), *アレルギー* 26, 817-826, 1977.
- 14) Elsayed, S., Aas, K., Sletten, K. and Johansson, S.G.O.: Tryptic cleavage of homogenous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments. *Immunochemistry* 9, 647-661, 1972.
- 15) 今堀和友, 山川民夫: 生化学辞典, 東京化学同人, 東京, pp. 332, 334, 693, 946, 1238, 1984.
- 16) 安田和正, 平野京子: サカナによる接触蕁麻疹. 抗原物質の比較動物学的近似性. *アレルギー* 33, 735-735(抄録), 1984.

A CASE OF ALLERGIC FOOD URTICARIA DUE TO FISH

(2) Cross Reactivity and Antigenic Activity of White and Red Meat Fish Antigens

Kazumasa Yasuda and Kyoko Hirano

Department of Dermatology, Tokyo Women's Medical College Daini Hospital

PBS-extracted fish antigens were examined for cross reactivity and antigenic activity in a 3-year-old girl with multi-allergic fish urticaria and by open patch test and in vitro tests using the serum of this patient. Four fishes were used as materials; grunt and cod as white meat fish and tuna and mackerel as red meat fish.

1. The antigenic activity of the white meat fish was 1000 times stronger than that of the red meat fish, when determined by the end-point titration test using the open patch test.
2. The end-point titration test using the P-K reaction showed that the antigenic activity of grunt was 10 times of that of cod, 1000 times of that of tuna, and 10000 times of that of mackerel.
3. The IgE-ELISA revealed that the white meat of grunt and cod was class 3 and that the red meat of tuna and mackerel was class 2 and class 1 respectively.
4. The in vivo neutralization test using the P-K reaction and the in vitro IgE-ELISA inhibition test suggested that white meat and red meat fish had cross antigenicity.