

アレルギー低減化米 (AFT-R 1) の有用性と 塩不溶性米アレルギー分子の解析

1) 横浜市立大学医学部附属浦舟病院皮膚科
2) (株)アレルギーフリー・テクノロジー研究所
池澤善郎¹⁾ 椿 和文²⁾ 大砂博之¹⁾
嶋田禎祐²⁾ 茂木和之²⁾ 杉山 宏²⁾
勝俣和子²⁾ 安西弘行²⁾ 天野三郎²⁾

精白米にアルカリ溶液を作用させてアレルギーを低減化させた米 (Allergen-free Technology Laboratory Inc. -Rice 1: AFT-R 1) を作成し, その有用性を臨床試験及び血清学的に評価した. 米特異 IgE 抗体陽性の患者血清を用いたアレルギー分子の低減化評価の結果, AFT-R 1 に含まれる IgE 抗体の結合活性は, 原料米に比較して 6400 分の 1 に低減化していた. 塩可溶性抽出画分に限れば蛋白質量は 100 分の 1, アレルギーは 2 万 5 千分の 1 以下に低下していた. 米アレルギーの関与を確認したアトピー性皮膚炎患者 15 例を対象に AFT-R 1 の臨床試験を実施した結果, 14 名に有用性が確認された. AFT-R 1 の負荷により 1 例で症状の誘発が認められ, この症例の患者血清は AFT-R 1 に残存する蛋白質に対して IgE 抗体の結合活性を示すと同時にイムノブロット法により, AFT-R 1 に残存する 60 kd 分子との反応を検出した. N 末端配列の解析の結果, この 60 kd 蛋白質分子は, 米の澱粉合成酵素である ADP (UDP) グルコーススターチ・グルコシルトランスフェラーゼ (EC: 2. 4. 1. 21) と同定された.

Key words: atopic dermatitis — hypoallergenic rice — rice allergen — rice allergy

はじめに

米の摂取によりアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) の増悪が認められる症例において, 米に含まれるアレルギー分子を除去あるいは低減化した米を用いることが臨床的に有用であることが知られている¹⁾. 米に含まれるアレルギー分子として米のグロブリン分画に属する 16 kd 蛋白質分子²⁾をはじめ, 塩溶液に可溶性の複数の蛋白質が解析されている³⁾. 米からアレルギーを除去する方法として酵素処理法が開発され⁴⁾, 同処理米を用いた臨床試験では対象症例の 70

%に有効性が認められている¹⁾. また, 高压下で米を処理することによりアレルギー分子の除去が可能であり, その臨床的な有用性も報告されている⁵⁾. しかしながら, 酵素利用や高压の使用は, 製造工程が複雑で製造コストへの影響も大きいことから, より簡便な方法であると同時にさらに臨床的に有効性の高いアレルギー低減化米の開発が望まれている. 我々は米粒を低濃度のアルカリ溶液に含浸することで米に含まれるアレルギー分子を除去できることを見だし, アルカリ処理アレルギー低減化米 (AFT-R 1) を作成した. なお, 栄養学的に AFT-R 1 は原料米であるコシヒカリと比較して蛋白質量の低減化を認めるがその他, 脂質・炭水化物の含量にほとんど差を認めずエネルギー量もほぼ等しい. 本論文では AFT-R 1 の有用性評価を目的に実施した臨床試験成績, および血清学的な解析を実施した結果について報告する.

Received: September 7, 1998

Accepted: November 26, 1998

Abbreviations: AFT-R 1 Allergen-free Technology Laboratory Inc. -Rice 1; AD atopic dermatitis; BSA bovine serum albumin; CAP-RAST CAP-radioallergosorbent test; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; IgE Immunoglobulin E; kd kilodalton; PAGE polyacrylamide gel electrophoresis; PBS phosphate-buffered saline; SDS sodium dodecyl sulfate

Table 1 Clinical and serological profile of the atopic dermatitis patients with AFT-R1

No.	Sex	Age yrs	Serum IgE IU/ml	IgE-CAP-RAST to rice UA/ml	Clinical severity	Clinical effect of elimination diet	Use of Fine-Rice ^k in elimination diet	Clinical effect by feeding with regular rice
1	F	25	1300	27.3	moderate	improved	+	aggravation
2	F	29	2000	0.67	moderate	improved	+	aggravation
3	M	17	8100	2.77	severe	improved	+	aggravation
4	F	19	8900	5.88	severe	improved	+	aggravation
5	F	18	12000	51.7	severe	improved	+	aggravation
6	F	4	10000	66.8	severe	improved	+	aggravation
7	M	10	10800	98.1	severe	improved	+	aggravation
8	F	29	9200	5.23	severe	improved	+	aggravation
9	M	16	18000	38.1	severe	improved	+	aggravation
10	M	7	940	7.27	severe	improved	+	not done
11	M	2	3600	53.8	severe	improved	+	not done
12	F	21	5600	1.09	severe	improved	+	not done
13	M	3	3400	32.4	severe	improved	+	aggravation
14	F	3	7500	1.47	severe	improved	+	aggravation
15	F	16	30000	53.8	severe	improved	+	aggravation

対象・材料・方法

1) 対象患者及び患者血清

米のアレルゲン性評価のため、米に対する CAP-RAST 値が陽性の 20 例の患者血清をプールして用いた。AFT-R 1 の臨床試験対象患者は米の除去試験ないし経口負荷試験によって米アレルギーの関与が確認され、本試験に同意した 15 症例の確定型の難治性 AD 患者(男 9 例, 女 6 例)である。対象例の性別, 年齢, 全般的重症度, 米特異 CAP-RAST 値, 米除去試験, 負荷試験の結果を Table 1 に示した。米の除去試験は, まず米のみの除去を実施し, 効果を認めない症例において米・小麦等の穀類を完全除去し実施した。完全除去には代替食として低アレルゲン米であるファインライス(資生堂社製)のみを 2 週間以上の期間で摂取させることで行った。負荷試験には一般に市販の炊飯米を用いた。全例において米・小麦・雑穀類等の完全除去で臨床症状の改善を認めた。負荷試験の結果, 12 例に症状の悪化を認めた。

2) AFT-R 1 の調製方法

原料米としては市販のコシヒカリ(新潟産)を用いた。調製は既報⁶⁾に従い実施した。すなわち, 米 2.5 kg

に 5 倍量の 100 mM 水酸化ナトリウム水溶液(食品添加物)を加えて, 2 時間処理し中和後, 流水にて 24 時間米を洗浄して, pH 6.8 の AFT-R 1 を得た。処理米を 50℃ にて乾燥させ, 細菌検査後に 500 g ずつ袋詰めし, 患者へ配布した。

3) 米抽出画分の調製

処理米に含まれる蛋白質成分及び処理米のアレルゲン性を評価するため, 含まれる塩可溶性蛋白質及び塩不溶性の蛋白質の抽出を実施した。米を粉碎後, 5 倍量の 500 mM・NaCl を含む PBS を加え 1 時間攪拌抽出後, 遠心分離を行い, 上清を塩可溶性抽出画分とした。また, 遠心分離した後の沈殿に 10 倍量の 8 M 尿素と 1% SDS を含む PBS を加え 1 時間攪拌抽出後, 遠心分離にて得た上清を塩不溶性抽出画分とした。また, 米の粉碎物に 20 倍量の 8 M 尿素と 1% SDS を含む PBS を直接加え 1 時間攪拌抽出したものを全抽出画分とした。調製には全て特級試薬(和光純薬工業社製)を用いた。

4) 蛋白質量の測定

4-1: 全蛋白質量, 塩不溶性蛋白質量の測定

米に含まれる全蛋白質量及び塩不溶性蛋白質量はケ

ルダール法にて全窒素量を測定し、蛋白質量に変換することで求めた。窒素—蛋白質変換係数は、5.95を用いた。なお、ケルダール値の測定と同時に試料の水分量を測定し、全蛋白質量は試料を無水物として比較した。

全蛋白質量の測定では米を粉砕しそのまま試料とした。塩不溶性蛋白質量の測定には、塩可溶性蛋白質を除去した原料米（以下原料米）と AFT-R 1 を試料として用いた。すなわち 10 倍量の 500 mM・NaCl を含む PBS を加え 2 回抽出を行い、続いて 10 倍量の蒸留水を加え 2 回洗浄することで塩可溶性蛋白質を除去した後、凍結乾燥してケルダール測定用の試料とした。

4-2: 塩可溶性蛋白質量の測定

米に含まれる塩可溶性蛋白質量は Bradford の方法⁷⁾により測定した。試薬はバイオラッド・プロテインアッセイ (BIO-RAD 社製) を使用した。原料米と AFT-R 1 を粉砕し、5 倍量の 500 mM・NaCl を含む PBS を加え 1 時間攪拌抽出後、遠心分離を行い、上清に含まれる蛋白質量を測定した。牛血清 γ グロブリン (BIO-RAD 社製) を蛋白質測定標準液として検量線 (1430~11.2 μ g/ml) を作成し測定に用いた。なお、蛋白定量と同時に試料の水分量を測定し、試料を無水物に換算した値で比較した。

5) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) による蛋白分析

米抽出画分の SDS-PAGE 解析は、Laemmli の方法⁸⁾に従って行った。ゲルはアクリルアミド濃度 10~20 % のグラジエントミニゲル (第一化学薬品社製) を使用した。分子量マーカーとして第一マーカー (第一化学薬品社製) を用いた。泳動後のゲルは銀染色キットワコー (和光純薬社製) にて染色した。SDS-PAGE 用のサンプルは、抽出画分を SDS 化試薬 (第一化学薬品社製) と混合して、沸騰させた湯せんにて 2 分間加熱後、ゲルにアプライした。染色された蛋白質バンドの強さをデンスシトグラフ AE-6900 型 (アトー社製) で測定し比較した。各バンドの分子量は分子量マーカーの移動度より算出した。なお、各バンドの分子量は添付資料に記載の数値を用いた。

6) IgE-enzyme linked immunosorbent assay (IgE-ELISA)

米抽出画分を抗原とした IgE-ELISA は、既報⁹⁾に従って実施した。測定はすべて duplicate で行いその平均を求めた。なお、卵白・牛乳・米・小麦・大豆特

異 IgE 抗体価が陰性で総 IgE 値が 3200 IU/ml の患者血清を対照血清として用い、490 nm で測定したプール患者血清の O.D. 値から対照血清のそれを差し引いた値を IgE-ELISA 値とし、0.030 以上を陽性とした。

7) IgE-イムノプロット法による米アレルギー分子の検出

AFT-R 1 の塩不溶性画分を抗原とした IgE-イムノプロットは、既報¹⁰⁾に従って実施した。なお、分子量マーカーとしてビオチン化標識 SDS-PAGE スタンダード Low (BIO-RAD 社製) を用いた。染色された蛋白質バンドの移動度をデンスシトグラフ AE-6900 型 (アトー社製) で測定し、分子量マーカーの移動度から分子量を算出した。なお、各バンドの分子量は添付資料に記載の数値を用いた。

8) N 末端アミノ配列の決定

臨床試験に使用した AFT-R 1 の塩不溶性蛋白質を SDS-PAGE で分離後、シーケンス用 PVDF 膜 (ミリポア社製) に転写した。0.1% の Coomassie Brilliant Blue R-250 を溶解させた蒸留水を用いて転写膜を染色し、蛋白質バンドを確認して切り出し、プロテインシーケンサー・Model 492 (パーキンエルマー社製) にアプライし、N 末端のアミノ酸配列の解析を実施した。

9) AFT-R 1 の臨床試験

今回の臨床試験に用いられた AFT-R 1 の乾燥米粒は、成人の場合は 1 食 100 g として 30 食分 (約 10 日間分) の 3 kg を手渡し、全て摂取してもらい皮膚症状を含む全般的な臨床症状を観察した。尚、皮疹の悪化や新生が見られ、臨床的に症状の悪化が認められた場合は、その時点で試験を中止した。

結 果

1) 原料米と AFT-R 1 に含まれる蛋白質量の測定結果

まず、米に含まれる全窒素量をケルダール法にて測定し総蛋白質量と塩可溶性抽出画分を除去した後に残存する蛋白質量を算出した。また、塩可溶性抽出画分に含まれる蛋白質量 (塩可溶性蛋白質量) を Bradford の方法にて測定し、それらの結果をあわせて試料とした米 1 g に含まれる蛋白質量として Table 2 に示した。ケルダール法による原料米の総蛋白質量は 60.5

Table 2 Protein content in an alkali treated rice, AFT-R1 and a regular rice, Koshihikari

	Protein content (mg/rice lg)	
	AFT-R1	Koshihikari
Total proteins *	40	60.5
Salt soluble proteins **	0.103	10.1
Salt insoluble proteins *	40.2	48.1

* The total proteins and the salt insoluble proteins were determined by Kjeldahl method.

** The salt soluble proteins were determined by Bradford's method.

mg/g, AFT-R1 の総蛋白質量は 40 mg/g であり, アルカリ処理によって米に含まれる蛋白質の 34% が除去されていることがわかった. また塩不溶性蛋白質量は, 原料米で 48.1 mg/g, AFT-R1 は 40.2 mg/g であり, AFT-R1 の全蛋白質量と塩不溶性蛋白質量がほぼ一致する結果であった. また, アルカリ処理によって塩可溶性蛋白質のみならず塩不溶性蛋白質の 16.4% が低減化されていることがわかった. 米に含まれる塩可溶性蛋白質量は, 原料米で 10.1 mg/g, AFT-R1 は 0.103 mg/g であり, AFT-R1 は原料米に含まれる塩可溶性蛋白質の 99% が除去されていることがわかった.

2) 原料米と AFT-R1 に含まれる蛋白質成分の解析結果

次に, AFT-R1 と原料米から抽出した蛋白質を SDS-PAGE により分離し, デンシトメーターにて分離パターンの解析及び各蛋白質バンドの強さを測定し, AFT-R1 と原料米の比較を行った. 塩可溶性抽出画分及び塩不溶性抽出画分に含まれる蛋白質成分の SDS-PAGE の結果を Fig. 1 a に示した. レーン M は分子量マーカー, レーン 1 は原料米の塩可溶性抽出画分, レーン 2 は AFT-R1 の塩可溶性抽出画分, レーン 3 は原料米の塩不溶性抽出画分, レーン 4 は AFT-R1 の塩不溶性抽出画分である. SDS-PAGE の結果, AFT-R1 の塩可溶性抽出画分 (1:5 抽出物) では蛋白質バンドを全く認めなかった (Fig. 1 a のレーン 2). そこで, 塩可溶性抽出画分を濃縮して蛋白質濃度を調整し, 原料米の塩可溶性抽出画分と比較した. 蛋白質量で 15 µg を SDS-PAGE した. その結果を Fig. 1 b に示した. レーン M は分子量マーカー, レーン 1 は原料米の塩可溶性抽出画分, レーン 2 は AFT-R1 の塩可溶性抽出画分の濃縮物である. AFT-R1 の塩可溶性抽出画分の濃縮物

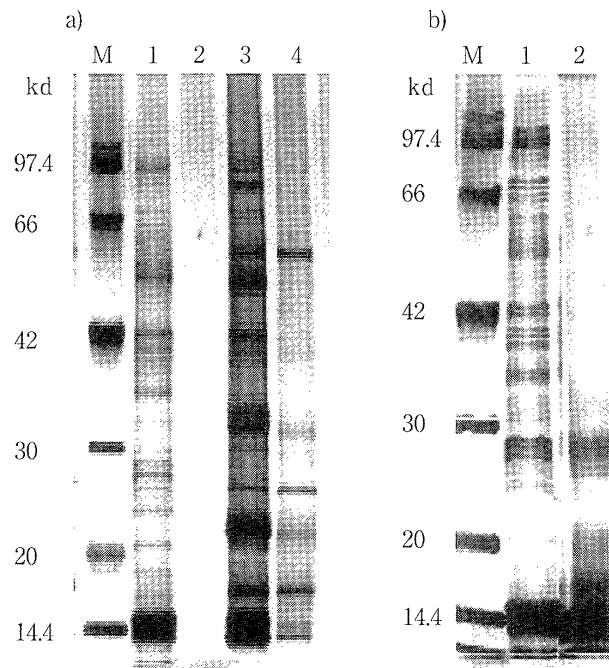


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the rice proteins extracted.

a) The salt soluble rice proteins were extracted from a polished rice grain, Koshihikari, and an alkali treated rice grain, AFT-R1 using the salt solution containing 0.5 M NaCl for an extraction of the salt soluble proteins, and followed by using the solution containing 8 M urea and 1% SDS for the salt insoluble proteins.

Lane M: Molecular weight marker, phospholylase-b (97.4 kD), albumin (66 kD), aldolase (42 kD), carbonic anhydrase (30 kD), trypsin inhibitor (20 kD), lysozyme (14.4 kD). Lane 1: The salt soluble fraction from Koshihikari, Lane 2: The salt soluble fraction from AFT-R1, Lane 3: The salt insoluble fraction from Koshihikari, Lane 4: The salt insoluble fraction from AFT-R1.

b) The salt soluble proteins from AFT-R1 were concentrated and applied for SDS-PAGE to compare with the proteins from Koshihikari.

Lane 1: The salt soluble proteins from Koshihikari, Lane 2: The salt soluble proteins of 100 fold concentrated from AFT-R1.

は, 原料米と比較して高分子量の蛋白質バンドが検出されない結果であった (Fig. 1 b のレーン 2). 塩不溶性抽出画分においても原料米と比較して検出されるバンドが減少していることが判った. Fig. 1 の SDS-PAGE の結果をデンシトメーターで測定し, その結果を Fig. 2 に示した. 原料米の塩可溶性抽出画分 (Fig. 1 a の

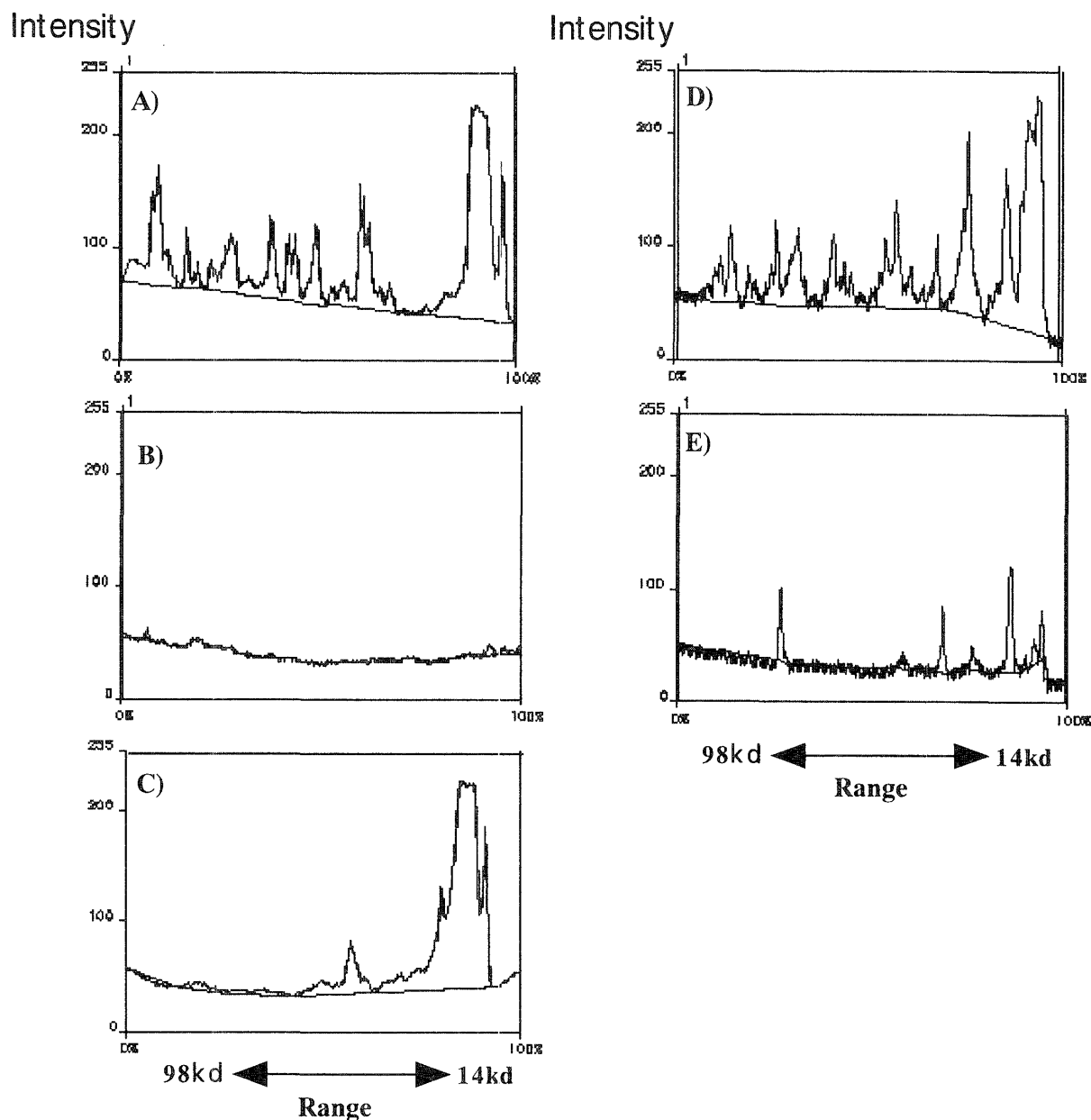


Fig. 2. Densitometric analysis of SDS-PAGE pattern of the rice proteins in extracts.

A) : The salt soluble fraction extracted from a rice grain, Koshihikari (Fig.1 a, lane 1). B) : The salt soluble fraction extracted from an alkali treated rice grain, AFT-R1 (Fig.1 a, lane 2). C) : The proteins concentrated of the salt soluble fraction from AFT-R1 (Fig.1 b, lane 2). D) : The salt insoluble fraction extracted from a rice grain, Koshihikari (Fig.1 a, lane 3). E) : The salt insoluble fraction extracted from an alkali treated rice grain, AFT-R1 (Fig.1 a, lane 4).

レーン1) のデンストメーター測定結果を Fig. 2 A, AFT-R1 の塩可溶性抽出画分 (Fig. 1 a のレーン2) を Fig. 2 B, AFT-R1 の塩可溶性抽出画分濃縮物 (Fig. 1 b のレーン2) を Fig. 2 C とし比較した. 原料米は, 分子量 14~98 kD にわたり 29 のバンドを認めるが

AFT-R1 では蛋白質バンドを認めなかった (Fig. 2 A, B). AFT-R1 の塩可溶性抽出画分濃縮物は, 原料米のそれと蛋白質量を合わせたにも関わらず, SDS-PAGE パターンは大きく異なり, 30 kD 以上の蛋白質バンドは検出されず, 代わりに 14~15 kD 付近のバンドが強

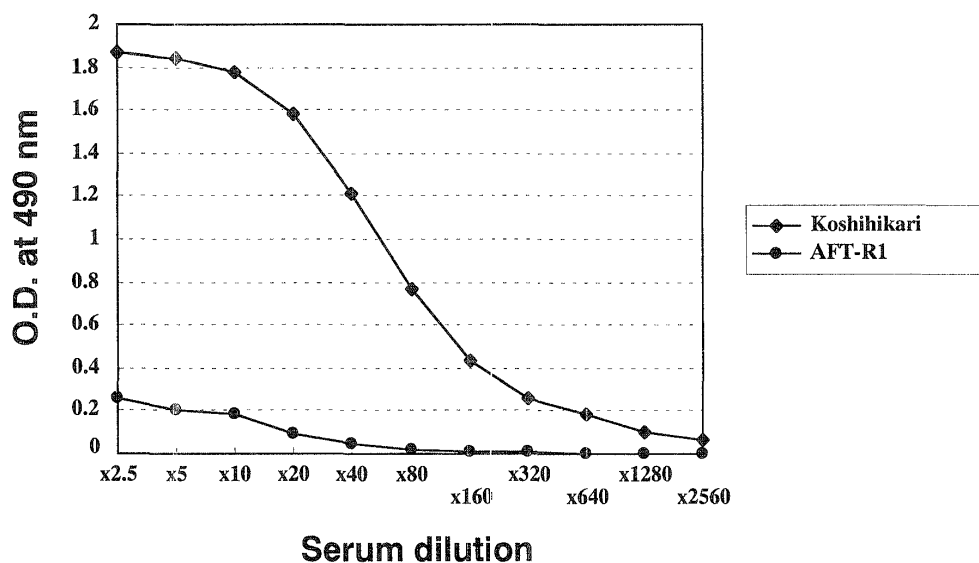


Fig. 3. Comparison of IgE binding activity between the whole extracts from the alkali treated rice grain, AFT-R 1 and its original one, Koshihikari.

く検出される結果であった。次に塩不溶性抽出画分の SDS-PAGE の結果をデンストメーターで測定し、原料米 (Fig. 1 a のレーン 3) の測定結果を Fig. 2 D, AFT-R 1 (Fig. 1 a のレーン 4) の測定結果を Fig. 2 E とした。塩不溶性抽出画分では、原料米において分子量 14~98 kd にわたり 14 のバンドを認めるが (Fig. 2 D), AFT-R 1 はその中で 8 成分のみ検出され、その中でも 3 成分が強く検出されるにすぎなかった (Fig. 2 E)。

3) 原料米と AFT-R 1 を用いた IgE-ELISA の結果

全抽出画分及び塩可溶性抽出画分を抗原として IgE-ELISA を実施し、490 nm で測定した O.D. 値を比較した。まず、10 倍、100 倍、1000 倍に PBS で希釈し全抽出画分を抗原として、IgE-ELISA を実施したところ、原料米では、どの抗原希釈度においても同様の IgE-ELISA 値が得られた。AFT-R 1 では 10 倍に希釈した全抽出画分において IgE-ELISA 値が最も高値を示したことから、原料米は 1000 倍希釈物を AFT-R 1 は 10 倍希釈物を抗原として血清希釈を 2.5 倍~2560 倍として IgE-ELISA を実施し両者を比較した。その結果を Fig. 3 に示した。原料米の場合、プール血清の 640 倍希釈度において O.D. 値は 0.189, AFT-R 1 ではプール血清の 10 倍希釈度において O.D. 値は 0.188 と一致した。従って、抗原希釈において 100 倍、プール患者血清の希釈において 64 倍の差が認められ、原料米と AFT-R 1 の間に IgE 抗体結合活性として 6400 倍の差が存在すると算出された。次に塩可溶性抽出画分を抗

原として、IgE-ELISA を実施したところ、原料米では 100 倍希釈物にて 1.657 と高値を示した。一方、AFT-R 1 の塩可溶性抽出画分をそのまま抗原としても O.D. 値は 0.001 と陰性を示した。そこで次に濃縮した AFT-R 1 の塩可溶性抽出画分を抗原として IgE-ELISA を実施した。Fig. 3 で示した全抽出画分の場合と同様にプール血清を用いた希釈曲線を作成したところ、原料米では、プール血清の 1280 倍希釈度において O.D. 値は 0.048, AFT-R 1 から得た濃縮物では、プール血清の 5 倍希釈において O.D. 値は 0.052 とほぼ同値を示した。従って、米に含まれる抗原量において 100 倍、プール患者血清の希釈において 256 倍の差が認められ、原料米と AFT-R 1 の間に IgE 抗体の結合活性として 25600 倍の差が存在すると算出した。

4) AFT-R 1 の臨床試験成績と AFT-R 1 に対する血清学的評価の結果

(対象・材料・方法)のところで述べたように米の除去試験ないし経口負荷試験にて米アレルギーの関与が確認された AD 患者 15 例を対象とした AFT-R 1 の臨床試験の成績を Table 3 に示した。臨床試験の結果、15 例中 8 例は AFT-R 1 の 3 kg 投与により皮膚症状の著明改善を、4 例において改善を認めた。2 例はファインライスの投与により皮膚症状の改善が認められ、この皮疹の軽快状態は AFT-R 1 の臨床試験中も引き続き維持された。対象例中の 1 例は、AFT-R 1 の臨床試験開始 4 日目より痒みを伴って皮疹が悪化したため、試

Table 3 Evaluation of AFT-R1 in the clinical trial

No.	Clinical effect by AFT-R1	Usefulness of AFT-R1
1	improved	useful
2	improved	useful
3	improved	useful
4	not worsened *	useful
5	improved	useful
6	not worsened *	useful
7	remarkably improved	very useful
8	remarkably improved	useful
9	remarkably improved	useful
10	remarkably improved	useful
11	remarkably improved	useful
12	remarkably improved	useful
13	remarkably improved	useful
14	remarkably improved	useful
15	worsened	not useful

not worsened *: Improvement induced by elimination diet of rice was maintained after AFT-R1.

験を中止した。以上から、AFT-R1の摂取により皮疹の改善が認められた12例、ファインライス投与時と同程度に症状が維持された2例の合計14例においてAFT-R1は有用であり、残り1例は明らかな悪化が認められ有用ではないと判定された。

5) AFT-R1の臨床試験対象患者血清を用いたAFT-R1に対する血清学的評価の結果

今回の臨床試験対象15例の中で採血が許された13例についてIgE-ELISAを実施し、その結果をTable 4に示した。原料米の全抽出画分およびAFT-R1の塩可溶性抽出画分と全抽出画分に対するIgE-ELISA値を血清の10倍希釈液を用いて測定し比較した。13例全例で原料米の全抽出画分に対するIgE値を認め(0.057~1.856)、AFT-R1から得た塩可溶性抽出画分に対するIgE-ELISA値は陰性(0.001)を示した。AFT-R1より得た全抽出画分に対するIgE-ELISAの結果、AFT-R1が有効であった12例のAD患者血清では、7例で陰性であった。5例においてIgE-ELISA値として0.416~0.054を認めたが原料米の全抽出画分に比較すると低値を示した。AFT-R1の摂取により症状の増悪を認めた1例の血清では、Table 4に示したように

Table 4 Result of IgE-ELISA to extracts from AFT-R1 and regular rice

No.	IgE-ELISA (O.D. values at 490nm)		
	Whole fraction	Salt soluble fraction	Whole fraction
	from regular rice	from an alkali treated rice grain, AFT-R1	
1	0.224	0.001	0.001
2	not tested *	not tested *	not tested *
3	0.118	0.001	0.001
4	0.075	0.001	0.001
5	0.545	0.001	0.094
6	0.976	0.001	0.001
7	1.201	0.001	0.282
8	0.057	0.001	0.001
9	0.691	0.001	0.054
10	0.113	0.001	0.001
11	1.856	0.001	0.416
12	0.021	0.001	0.001
13	0.662	0.001	0.144
14	not tested *	not tested *	not tested *
15	1.245	0.001	0.436

not tested *: The test could not be performed because of not to allow of using the blood.

AFT-R1の全抽出画分に対するIgE-ELISA値は0.436であり、原料米の全抽出画分に比較すると低値を示した。

さらにAFT-R1に残存する蛋白質の中で如何なる蛋白質バンドが患者血清と反応しているかを明らかにするため、AFT-R1を抗原としたIgE-イムノプロットを実施した。臨床試験を実施した9症例の血清にてイムノプロット解析を行うことができ、その結果をFig. 4に示した。AFT-R1の摂取によって増悪が認められた症例において60 kdのバンドとの反応が検出された。

6) AFT-R1に残存する60 kd分子のN末端アミノ酸配列の決定

AFT-R1に残存する60 kd分子を同定する目的で同分子を単離してN末端アミノ酸配列の決定を行った。N末端の17残基を決定しその結果をFig. 5に示した。ホモロジー検索の結果、同定した17残基のアミ

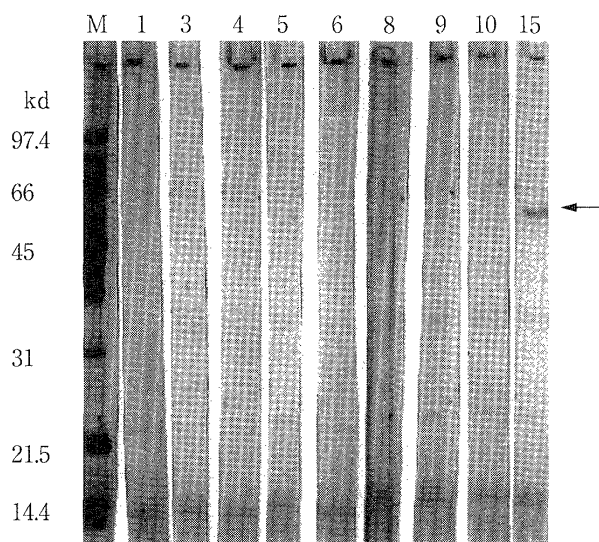


Fig. 4. Detection of the IgE antibody binding protein band in the whole fraction from AFT-R 1 using sera from the patients.

Immunoblotting analysis were performed with 9 sera from the patients in this clinical trial. The line number in this immunoblotting study correspond to the number of the sera from AD patients in table 4. Lane M; molecular weight marker phospholylase-B (97.4 kd), albumin (66 kd), ovalbumin (45 kd), carbonic anhydrase (31 kd), trypsin inhibitor (21.5 kd), lysozyme (14.4 kd). The 60 kd protein band could be detected as of having IgE binding activity, and marked the place with an arrow.

ノ酸配列は、日本 DNA データバンク (DDBJ) のアミノ酸配列データベースに登録されている JQ 0703 すなわち米に含まれる ADP (UDP) グルコースースターチ・グルコシルトランスフェラーゼの配列と一致することがわかった。

考 察

精白米に酵素溶液を含浸処理することは、米粒に含まれるアレルゲン分子の除去に有効であり、米に含まれるアルブミン分画の蛋白質と共にグロブリン分画の蛋白質も 90% 以上が除去できる¹⁾。その結果、酵素処理米の総蛋白質量は 4.2% にまで低減化されている。しかしながら、臨床試験の結果、有効性は対象患者の 7 割であり、酵素処理米に未だアレルゲン分子が残存することが示唆されている¹⁾。我々は、酵素処理米に比較してより有効性が高く、しかも簡便な操作でアレ

The N-terminal amino acid sequence determined

ATGAGMNVV FVGAEMAP

JQ0703 ····ATGAGMNVV FVGAEMAP····

The amino acid sequence of ADP(UDP)-Glucose -starch glycosyl transferase(Waxy protein) from *O.sativa*(EC 2.4.1.21) precursor 609 AA residues, mature 532 AA residues

Fig. 5. Determination of N-terminal amino acid sequences of the 60 kd protein in the salt insoluble fraction.

ルゲンを低減化する方法の開発を目的に米アレルゲンの低減化方法を検討した。その結果、米粒をアルカリ溶液に含浸することでアレルゲン分子を除去できることを見だし、アルカリ処理アレルゲン低減化米 (AFT-R 1) を作成した。現在のところ、アレルゲンの低減化度の測定に関して規定された方法はない。そこで患者血清を用いた IgE 抗体の結合能を IgE-ELISA 値として測定して評価することを試みた。すなわち、AFT-R 1 に対する IgE 抗体の結合能を原料米のそれと血清の希釈で比較すること、さらに AFT-R 1 と原料米の蛋白質の量的な差の両面を併せてアレルゲン活性の低減化度とした。患者血清と反応する米蛋白質分子についてイムノプロットにて解析すると、複数の分子と異なる強さで反応し、血清毎にアレルゲンとの反応性が異なっていた²⁾³⁾。そこで 20 例の米特異 IgE 抗体陽性の患者血清を混合し、プール血清として評価に用いた。その結果、AFT-R 1 に含まれるアレルゲンは原料米に比較して 6400 分の 1 に (Fig. 3)、塩可溶性画分に限れば、AFT-R 1 に含まれるのは原料米の 1% 程度であり (Table 2)、アレルゲン活性は 2 万 5 千分の 1 以下に低減化されていると算出された。また、AFT-R 1 に残存する塩可溶性抽出画分は、濃縮物を解析したところ、原料米のそれとバンド・パターンが異なり (Fig. 2, Fig. 3)、アルカリ処理によって量・質の両面で低減化が実施出来ていることが判った。

食物アレルギーの診断は、近年、double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC) によって客観的に診断されることが望ましいとされるが、非即時型の米アレルギーについては、その実施が困難なため、今回はオープンで米の除去と経口負荷試験によって観察される臨床効果に基づいて診断した。そして、

米アレルギーの関与があると確認された AD 患者における臨床試験において、AFT-R 1 は、15 例中 14 例に有効であり、有効率 93% との結果を得た。その一方、AFT-R 1 の投与試験の結果と対象患者血清を用いた IgE-ELISA の結果は、AFT-R 1 に IgE 抗体と結合する分子が残存していることも示していた。事実、塩不溶性の蛋白質分子の中にアレルギーとして働く分子が存在することは、酵素処理米の臨床試験結果からも示唆されており、今回、我々は、その 1 つとして 60 kd 分子を同定した (Fig. 4)。60 kd 分子の N 末端アミノ酸配列を解析し、AFT-R 1 に残存する 60 kd アレルギー分子の N 末端 17 残基のアミノ酸配列が ADP (UDP) グルコースースターチ・グルコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列と一致することを見出した¹²⁾。同分子は、澱粉合成酵素の 1 種であり、2 分子のグルコース分子を脱水反応により連結する反応を触媒する酵素である。通常、穀類に多量に含まれており澱粉の合成に重要な役割を果たしている。酵素自身は塩溶液中に可溶性であるが、同酵素は合成された澱粉粒中に埋没しており、その多くは澱粉と結合して存在し、きわめて抽出されにくい蛋白質分子として知られている¹³⁾。従って、アルカリ処理によっても米粒から外へ抽出されず、米粒中に残存するものと推測する。AFT-R 1 の臨床試験で増悪が認められた患者の血清において IgE 抗体との結合能で 60 kd 分子が検出されたが、この症例において 60 kd 分子が症状誘発の責任アレルギーであるか否かは現時点では明らかでない。しかし、同分子は、穀類間に広く分布している酵素であり、分子量も近似しており、アミノ酸配列の相同性も高く、穀類間の交差抗原性の一翼を担っている可能性が示唆される。例えば、トウモロコシ¹⁴⁾・ジャガイモ¹⁵⁾の澱粉合成酵素は 60 kd、小麦は 67.7 kd¹⁶⁾、えんどう豆は 58 kd¹⁷⁾、アマランスは 68 kd¹⁸⁾であると報告されている。各穀類から単離精製された澱粉合成酵素のアミノ酸配列および遺伝子配列を比較すると、その相同性は米・小麦・トウモロコシ・ジャガイモ・キャッサバ間は 80% 以上¹⁹⁾といずれも高い値であることが報告されている。今回の検討の結果、澱粉合成酵素の 1 つである 60 kd 分子が IgE 抗体との結合活性を保持していることを明らかにできた (塩可溶性抽出画分に比較すれば弱い)。しかしながらこの 60 kd 分子が塩不溶性の米アレルギーとして、塩可溶性の米アレルギーを除去したアレルギー低減化米に無効の AD 患者においてどの位の頻度で関与しているか、また単に AD 患者

血清中にどの程度の頻度で特異 IgE 抗体が検出されるかという問題は、改めて評価を要する課題であり、現在ヒスタミン遊離試験あるいは皮膚テストを加えて検討している。

文 献

- 1) 池澤善郎, 池部敏市, 小倉英郎, 小田嶋博, 黒坂文武, 他: アトピー性皮膚炎に対する低アレルギー米 (HRS-1) の臨床効果. アレルギー **40**, 633-642, 1991.
- 2) Urisu, A., Yamada, K., Matsuda, S., Yasaki, H., Yamada, M., et al.: 16-kilodalton rice protein is one of the major allergens in rice grain extract and responsible for cross-allergenicity between cereal grains in the poaceae families. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **96**, 244-252, 1991.
- 3) 嶋田禎祐, 天野三郎: 米アレルギーとその低減化研究. “低アレルギー食品の開発と展望”, シーエムシー出版, pp. 145-151, 1995.
- 4) Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirao, T., et al.: Production of hypoallergenic rice by enzymatic decomposition of constituent proteins. *J. Food Sci.* **55**, 781-783, 1990.
- 5) 笹川秋彦: 低アレルギー無菌化包装米飯について, 第 25 回研究会記録集, 新潟アレルギー研究会誌 **11**, 11-14, 1994.
- 6) 鈴木一昭, 嶋田禎祐, 椿 和文, 菊池一憲: アレルギー低減化米の製造方法. 日本国特許庁 公開特許公報 特開平 7-115920, 1995.
- 7) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254, 1976.
- 8) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**, 681-685, 1970.
- 9) 池澤善郎, 椿 和文, 横田俊平: アトピー性皮膚炎におけるアレルギー低減化小麦粉 (HAW-A 1) の有用性とその臨床効果の血清学的解析. アレルギー **43**, 679-688, 1994.
- 10) 椿 和文, 高橋由利子, 相原雄幸, 松山秀介, 池澤善郎, 他: アトピー性皮膚炎患者血清を用いた小麦の塩不溶性分画に対する IgE 抗体の検出. アレルギー **44**, 134-142, 1995.
- 11) 池澤善郎: 日本における重症アトピー性皮膚炎の発症・増悪因子に関する研究. 日本リディアオリ協会元年度年報, pp. 41-60, 1989.
- 12) Okagaki, R.J.: Nucleotide sequence of a long cDNA from the rice waxy gene. *Plant Mol. Biol.*

- 19, 513–516, 1992.
- 13) Macdonald, F.D. and Preiss, J. : Partial purification and characterization of granule-bound starch synthase from normal and waxy maize. *Plant Physiol.* **78**, 849–852, 1985.
 - 14) Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N. : Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* **35**, 225–233, 1983.
 - 15) Vos-Scheperkeuter, G.H., Boer, W., Visser, R.G.F., Feensta, W.J. and Witholt, B. : Identification of granule-bound starch synthase in potato tubers. *Plant Physiol.* **82**, 411–416, 1986.
 - 16) Clark, J.R., Robertson, M. and Ainsworth, C.C. : Nucleotide sequence of wheat (*Triticum aestivum* L.) cDNA clone encoding the waxy protein. *Plant Mol. Biol.* **16**, 1099–1101, 1991.
 - 17) Dry, I., Smith, A.M., Edwards, E., Bhattacharya, M., Dunn, P., et al. : Characterization of cDNA encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato. *Plant J.* **2**, 193–202, 1992.
 - 18) Konishi, Y., Nojima, H., Okuno, K., Asaoka, M. and Fuwa, H. : Characterization of starch granules from waxy, non waxy and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1965–1971, 1985.
 - 19) Salehuzzaman, S., Jacobsen, E. and Visser R.G.F. : Isolation and characterization of cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. *Plant. Mol. Biol.* **23**, 947–962, 1993.

USEFULNESS OF HYPOALLERGENIC RICE (AFT-R 1) AND ANALYSIS OF THE SALT INSOLUBLE RICE ALLERGEN MOLECULE

Zenro Ikezawa*, Kazufumi Tsubaki**, Hiroyuki Osuna*, Teiyu Shimada**,
Kazuyuki Moteki**, Hiromu Sugiyama**, Kazuko Katumata**,
Hiroyuki Anzai** and Saburo Amano**

*Department of Dermatology, Urafune Hospital, Yokohama City University School of medicine

**Allergen-free Technology Laboratory Inc.

An involvement of rice allergy in development and exacerbation of recalcitrant atopic dermatitis (AD) has been suggested in some cases, and it has been also known that elimination diet of rice results in improvement of AD and reduction of the doses of steroid ointment and anti-allergic drugs used for the treatment. We prepared the hypoallergenic rice grain, AFT-R 1 (Allergen-free Technology Lab. Inc. -Rice 1), with alkali treatment from the rice material, Koshihikari, which is popular in Japan. Its usefulness was evaluated clinically and serologically. The serological study with IgE-ELISA showed that the major allergic protein were remarkably reduced to less than 1/6400 of them in the AFT-R 1. Then it was applied to the clinical trial, and evaluated as useful by the clinical effect in 14 (93%) out of 15 patients, who were diagnosed to have rice allergy by the elimination (in 15 cases) and ingestion (in 12 cases) of the regular rice. The serum taken from the patient, whom the AFT-R 1 was evaluated as unuseful in the clinical trial, was shown to have IgE antibodies reactive to the remaining protein in AFT-R 1 by IgE-ELISA, and the 60 kD protein band was detected as an IgE-binding component of AFT-R 1 by IgE-immunoblotting with the same serum. This 60 kD rice protein was identified as ADP (UDP)-glucose-starch glycosyl transferase (EC : 2.4.1.21) by N-terminal amino acid analysis. These results indicated that AFT-R 1 is very useful as a substitute of rice in many AD patients with rice allergy, although IgE-binding component such as the 60 kD protein is remaining in one.