

そば主要アレルゲンの Immunoblotting 法による検討

藤田保健衛生大学病院小児科

近藤康人 宇理須厚雄 和田映子

鶴田光敏 矢崎雄彦

公立尾陽病院小児科

山田一恵

厚生連昭和病院小児科

増田 進

刈谷総合病院小児科

森田 豊

そば過敏症は、そばの摂取によって、ショック、喘鳴、呼吸困難、喉頭浮腫、蕁麻疹、腹痛、嘔吐等の即時型アレルギー症状を呈し、その機序として I 型アレルギーの関与が言われている。筆者らはそば特異的 IgE 抗体陽性者の血清を用い、immunoblotting 法、radioallergosorbent test (以下 RAST) 法、RAST inhibition 法を行い、そば主要アレルゲンの同定を試みた。immunoblotting 法で 50% 以上の患者の IgE 抗体と結合能を示したバンドの分子量は、67~70kD, 26kD, 24kD であり、24kD のバンド(以下 BW24KD) が最も陽性率が高かった。RAST 法では、そば特異的 IgE 抗体陽性患者 41 名中 35 名 (約 85%) が BW24KD に対しても陽性を示し、そば抗原と BW24KD に対する %binding の間には正の相関 ($\text{Log} Y = 0.929 \text{Log} X - 0.689$, $r = 0.92$, $p < 0.001$) がみられた。また、RAST inhibition 法では、そばと BW24KD 間で 50% 以上の抑制がみられた。以上から BW24KD はそばの主要アレルゲンの 1 つであると考えられた。

また BW24KD は、分子量の異なる何種類かの蛋白質と heterodimer を形成していると示唆された。

Key words: buckwheat allergy — buckwheat major allergen — BW24KD — immunoblotting

はじめに

そば過敏症は Smith¹⁾によって、1909年初めて“buckwheat-poisoning”という表現で報告された。わが国では、1942年田中²⁾が、そば過敏症の患者に皮膚反応、経口負荷試験を行い、その結果、本症は抗原抗体反応に起因するアレルギー疾患であると報告している。

そば過敏症は、そば抗原を吸入あるいは摂取するこ

とによって、喘息発作、鼻炎、蕁麻疹、胃腸症状、結膜充血などの多様な症状と、時にショック死をもきたす疾患であり³⁾⁴⁾、また、そば抗原の摂取が微量であっても症状が引き起こされると報告されている⁵⁾。この機序として、IgE 抗体が関与しているという考えが有力である³⁾⁴⁾⁶⁾。

柳原⁶⁾は、そば過敏症を惹起する主要な抗原成分として、推定分子量 100kD 以上、約 50kD、約 17kD の 3 種の抗原活性成分を示し、このうちの約 17kD の抗原が最も強い皮膚反応を惹起すると報告している。一方、Yano ら⁷⁾は分子量 8~9kD の成分が最も IgE 結合能が強かったと報告している。以上のごとく、そばの主要アレルゲンに関する報告は少なく、未だ一定の結論が得られていない。

我々はそば特異的 IgE 抗体陽性者の血清を用い、immunoblotting 法、radioallergosorbent test (以下 RAST) 法、RAST inhibition 法を行い、そばの主要

Received: August 10, 1992

Accepted: October 20, 1992

Abbreviations: BW24KD buckwheat 24kD protein; HSA human serum albumin; Ig immunoglobulin; 2-ME 2-mercaptoethanol; NC nitrocellulose; PBS-Tween Phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20; RAST radioallergosorbent test; 2SD 2 standard deviation; TBS Tris buffered saline

アレルゲンの同定を試みた。その結果、分子量24kDの蛋白質が主要アレルゲンの1つであると判明し、その興味ある構造についても報告を加える。

対象ならびに方法

1. そば粗抗原

そば粉をエーテル脱脂後、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、10000×g, 30分間遠心後、その上清を蒸留水で透析し、凍結乾燥した。Bradford⁸⁾の方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準として、Bio Radの蛋白質定量キットで抽出物の蛋白質濃度を測定したところ、抽出抗原1mgあたり175μgであった。

2. そば24kD蛋白質 (以下 BW24KD) の抽出

そば凍乾末を2-mercaptoethanol (以下2-ME) 含有 digestion buffer (0.1M Tris, 10% SDS, sucrose, 0.1% brom phenol blue) で処理し、SDS-PAGE mini (90mm×82mm×1.5mm, 14% gel, TEF Co.) を用いて電気泳動を行った。その後、Coomassie 染色し、分子量24kDのバンドを切り出し、Maxyield-NP (AE6580型, Atto K.K.) を用いて電気的に抽出した。抽出した蛋白質は、Desalizer-I (AE-6590型, Atto K.K.) を用い、蒸留水で2晩透析し、その後4倍量の-20℃のアセトンを加え、一晚-20℃に静置した。次に1000×g, 30分遠心し、上清を捨て、ペレットに2mlの上記アセトンを加え、同条件で遠心後、再び上清を捨て乾燥した。最終的に抽出された蛋白質はSDS-PAGE (14% gel) で、単一バンドであることを確認した (Fig. 1)。

3. 分子量約72kD, 68kD, 58kDに相当する蛋白質の抽出

そば凍乾末を2-MEを含まない digestion buffer で処理した後、SDS-PAGE (8% gel) で電気泳動を行った。その後 Coomassie 染色し、相当するバンドを切り出し、以下、上記2と同様の方法で各蛋白質を抽出した。近接する蛋白質間の混入を減少させるため、抽出した各蛋白質を蒸留水で溶解し、SDS-PAGE による電気泳動からアセトン処理までを2度繰り返した。最終的に抽出された各蛋白質を2-ME 未処理と2-ME 処理とにわけ、電気泳動を行い、BW24KDを含むそば蛋白質の構造について検討した。

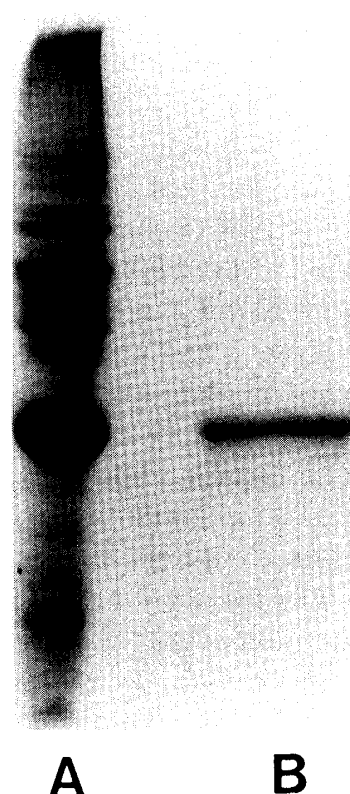


Fig. 1. SDS-PAGE (4% stacking gel, 14% of separating gel) of buckwheat 125μg (A) and BW24 KD 5μg (B).

Samples were reduced with 2-mercaptoethanol. The gel was stained with Coomassie blue R-250.

4. immunoblotting 法⁹⁾

そば抗原をSDS-PAGE (14% gel) で分画し、nitrocellulose (以下 NC) 膜 (Schleicher & Schuell) へ電気的に転写した。転写後 NC 膜を5mm 幅に切断し、それぞれを2% bovine serum albumin, 50% glycerol, 1% Tween 20を加えた pH 7.4 Tris buffered saline (以下 TBS) で blocking 処理を行った。洗浄後、そば特異的 IgE 抗体陽性血清と室温で一晩反応させて、再度洗浄し、¹²⁵I-抗ヒト IgE 抗体 (Dainabot K.K.) を室温で8時間反応させた。洗浄後、X-OMAT AR (Kodak Co.) を用いて autoradiography を行った。コントロールとして臍帯血清と仔ウシ血清を用いた。

5. RAST

0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.8) に溶解したそば抗原液 (250μg/ml), BW24KD 抗原液 (25μg/ml), 卵白抗原液 (250μg/ml) を、96-well の塩化ビニールプレート (ELISA 用プレート E. Sumitomo Bachelite Co., Ltd.) に50μl/well ずつ分注し、4℃で一

晩静置した。0.05% Tween 20を含む pH 7.2の Phosphate buffered saline (以下 PBS-Tween) で3回洗浄 (100 μ l/well) 後、0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.8) に溶解した2% human serum albumin (以下 HSA, Sigma Co.) 100 μ l/well で blocking 処理を3時間行った。ついで PBS-Tween により3回洗浄した後、PBS-Tween で2倍に希釈した患者血清50 μ l/well を加え、室温で12時間反応させた。その後、PBS-Tween で4回洗浄し、¹²⁵I-抗ヒト IgE 抗体(Dainabot K.K.)を50 μ l/well ずつ分注し、室温に12時間静置して反応させた。最後に PBS-Tween で4回洗浄し、各 well を分離後、 γ -counter (Packard Co. Ltd.) で¹²⁵I の放射線量を測定した。実測値を well に加えた¹²⁵I の総放射線量で割り、この値を百分率で表して%binding とした。また、%binding が正常コントロール血清群の平均値の2 standard deviation (以下2SD) よりも大きい場合、すなわち、そば>0.046, BW24KD>0.027, 卵白>0.090を RAST 陽性と判定した。

6. RAST inhibition test

前述の RAST 法で血清を反応させる際に、PBS-Tween で溶解した2.5, 25, 250, 2500 μ g/ml の濃度のそば抗原液、同じ濃度の卵白抗原液、そして0.25, 2.5, 25, 250 μ g/ml の濃度の BW24KD 抗原液を、inhibitor として25 μ l/well ずつ注入し、さらに患者血清25 μ l/well を加え、以下 RAST 法と同様の手技により実施した。RAST 抑制率は、抗原を添加しなかった場合の% binding と、抗原を添加した場合の% binding の差を前者で徐し、百分率に換算して求めた。また、得られた数値を片対数グラフにプロットし、50%抑制に必要な抗原量を求めた。

7. 血清

immunoblotting 法では、そば特異的 IgE 抗体陽性患者15例の血清を用いた。

RAST 法で使用したそば特異的 IgE 抗体陽性患者の血清 (41例) の内訳は (Table 1), 男27例, 女14例からなり、年齢は3歳から36歳 (平均年齢13.3歳) であった。これらの患者のそばによる即時型反応については、症状陽性群17例, 症状陰性群15例, 不明群9例であった。対照として、そば特異的 IgE 抗体陰性患者で、喘息, アトピー性皮膚炎, アレルギー性鼻炎またはアレルギー性結膜炎のうちいずれか1つを持つものを疾患コントロール群 (13例, 男5例, 女8例, 平均年齢17.3歳), アレルギー性疾患の既往歴のないものを正常コントロール群 (9例, 男5例, 女4例, 平均年齢19.6歳) として用いた。これらコントロール群とそば特異的 IgE 抗体陽性患者群の年齢差, 性差については、統計上有意差は認められなかった。

RAST inhibition test で用いた血清は、そば特異的 IgE 抗体陽性血清5例と、卵白特異的 IgE 抗体陽性血清3例であり、このうち1例 (K.I.) はそば, 卵白の両者に陽性であった。

8. 統計処理

STAX 98を用いて t 検定 (両側検定), χ^2 検定, または Fisher の直接確率計算によって行い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

1. immunoblotting 法 (Fig. 2, Table 2)

Table 1 Background of subjects and IgE-RAST values to buckwheat, BW24KD and egg white

Subjects	IHR* ¹	No.	Sex M/F	Age(year) Mean $\pm$ SD	IgE-RAST		
					Buckwheat Positive(%)	BW24KD Positive(%)	Egg White Positive(%)
Patients* ²	Positive	17	13/4		17(100)	16(94.1)	5(29.4)
	Negative	15	11/4		15(100)	13(86.7)	8(53.3)
	Unknown	9	3/6		9(100)	6(66.7)	2(22.2)
	Total	41	27/14	13.3 $\pm$ 8.7	41(100)	35(85.4)	15(36.6)
Disease controls* ³	Negative	13	5/8	17.3 $\pm$ 10.9	0(0.0)	0(0.0)	4(30.8)
Nonatopic controls	Negative	9	5/4	19.6 $\pm$ 9.9	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

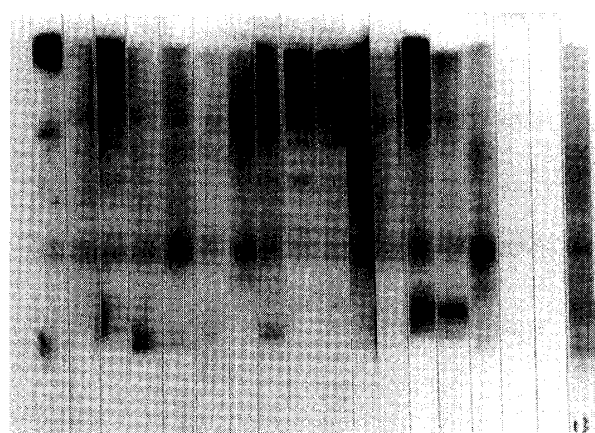
* 1 Immediate hypersensitive reactions to buckwheat ingestion.

* 2 Allergic subjects with positive IgE-RAST values to buckwheat.

* 3 Allergic subjects with negative IgE-RAST values to buckwheat.

Table 2 IgE-binding activity of buckwheat proteins transferred on nitrocellulose membrane from SDS-PAGE

Buckwheat protein (kD)	Patients' sera															Percentage of positive (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
100			○		○				○	○						26.7
67-70		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		86.7
58	○									○						13.3
48-50					○										○	13.3
40-44			○				○	○	○	○						33.3
38																0.0
34																0.0
31																0.0
26	○	○	○	○	○		○	○					○			53.3
24	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	100.0
20															○	6.7
15-16										○			○	○		20.0
14				○				○								13.3
13.5				○												7.7



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Fig. 2. Immunoblotting analysis of buckwheat proteins with IgE-binding activity. 1~15=patients' sera with positive RAST for buckwheat; 16=cord blood serum; 17=fetal calf serum; 18=amido black stain.

約11本のバンドがそば特異的 IgE 抗体陽性患者 (15例) 血清中の IgE 抗体と反応した。これらの中で、50%以上の患者 IgE 抗体と結合能を示したバンドは、それぞれ分子量67~70kD(86.7%), 26kD(53.3%), 24kD(100%)であり、24kDのバンドは最も陽性率が高かつ

た。67kDから70kDの間のバンドに関しては、バンド間が近接しているため、どのバンドが反応しているのか判定困難であった。コントロールである臍帯血清と仔ウシ血清では反応はみられなかった。

2. RAST 法

そば特異的 IgE 抗体陽性患者41名中35名(約85%)がBW24KDに対しても陽性を示した (Table 1)。またそば特異的 IgE 抗体陽性患者群において、そば抗原とBW24KDに対する% bindingの間には正の相関 ($\text{Log}Y=0.929\text{Log}X-0.689$, $r=0.92$, $p<0.001$) がみられた。一方、そば抗原と卵白抗原、あるいはBW24KDと卵白抗原の間には有意な相関はみられなかった (Fig. 3)。

3. RAST inhibition test

Table 3に各抗原間での50% inhibitionに必要な抗原量を示す。同一抗原間(そばとそば, BW24KDとBW24KD, 卵白と卵白), そば抗原とBW24KD抗原間で用量依存性に反応し、しかも50%以上の抑制がみられた。そば抗原と卵白抗原間, BW24KD抗原と卵白抗原間では50%以上の抑制はみられなかった。

4. SDS-PAGE

そば蛋白質を、2-MEを含まない digestion buffer で処理した場合 (Fig. 4-B) と、2-MEを含む digestion

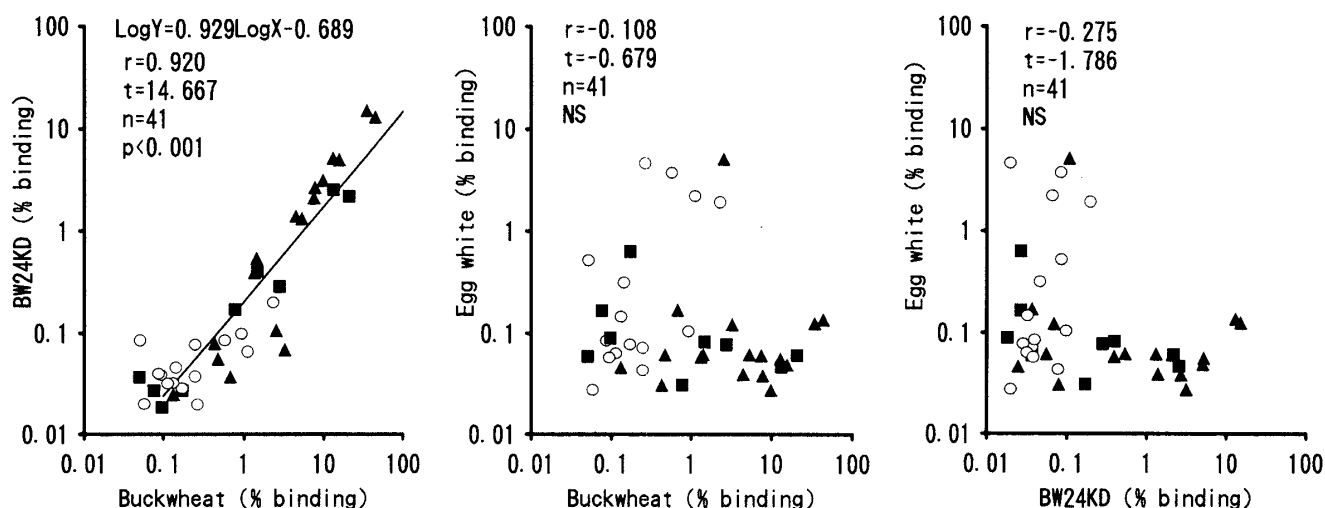


Fig. 3. Relationship between IgE-RAST value for buckwheat, BW24KD, and egg white using sera from subjects with positive IgE-RAST values to buckwheat.

▲ : Subjects with immediate hypersensitive reactions (IHR) to buckwheat ingestion. ○ : Subjects without IHR to buckwheat ingestion. ■ : Subjects with unknown symptoms of IHR. NS : Not significant.

Table 3 Concentration of inhibitor needed to produce 50% RAST inhibition

Plate	Serum	Inhibitor ($\mu\text{g/ml}$)		
		Buckwheat	BW24KD	Egg white
Buckwheat	M. E	44.00	190.00	>2500
	Y. T	1.75	6.40	>2500
	H. K	1.50	0.62	>2500
	S. M	1.55	1.40	>2500
	K. I	12.00	>250	>2500
BW24KD	M. E	11.00	7.50	>2500
	Y. T	1.50	1.40	>2500
	H. K	1.35	1.60	>2500
	S. M	1.30	1.40	>2500
Egg white	K. I	>2500	>250	2.50
	S. T	>2500	>250	1.50
	K. H	>2500	>250	6.20

buffer で処理を行った場合 (Fig. 4-F) とで, SDS-PAGE のバンドのパターンが異なっていた. 2-ME 未処理のそばの電気泳動のパターンは, 分子量約50kD から75kD にバンドが集中しており, 24kD のバンドは見あたらなかった. そこで, 24kD がいずれの蛋白質から由来するかを調べるために, 2-ME 未処理のそばの, 分子量約50kD より75kD に分布する比較的太いバンド3本を電気的に抽出し, それぞれの分子量を測定すると, 約72kD (Fig. 4-C), 68kD (Fig. 4-D), 58kD (Fig. 4-E) であった. このうち58kD 付近のものは,

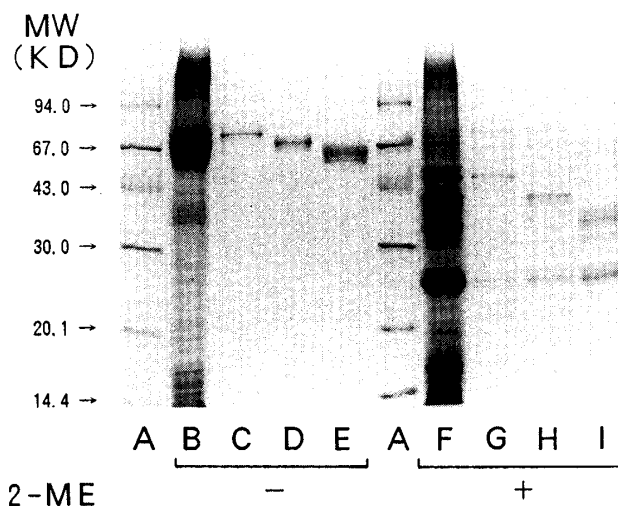


Fig. 4. SDS-PAGE (4% stacking gel, 14% of separating gel) using digestion buffer with or without 2-mercaptoethanol.

low molecular standard (A), buckwheat (B, F), 72kD (C, G), 68kD (D, H) and approximately 58kD (E, I).

やや幅広いバンドとして認められた. これらの蛋白質を2-ME 処理して電気泳動を行うと, 約72kD の蛋白質からは24kD と48kD (Fig. 4-G) が, 約68kD の蛋白質からは24kD と44kD (Fig. 4-H) が, 約58kD 付近の蛋白質からは24kD と主に34kD (Fig. 4-I) が得られ, いずれの蛋白質からでも BW24KD が得られた.

考 察

そば粉から Coca 抽出したそば抗原を出発材料として、そば抗原中の IgE 結合能を持った抗原を検討した結果、immunoblotting 法では、分子量約67~70kD、26kD、24kD のバンドが50%以上の患者血清と反応し、この中で BW24KD は全例の患者血清と結合した。また RAST 法で、そば抗原に対する IgE-RAST 陽性者の約85%が BW24KD にも陽性であり、さらに、正の相関関係を示していた。RAST inhibition の結果、そば抗原と BW24KD との間には50%以上の抑制がかかり、コントロールとして用いた卵白との間には有意な抑制はかからなかった。以上から、BW24KD は、そば抗原の主要アレルゲンの1つと判明した。

そばの主要アレルゲンに関する報告は、Yano ら⁷⁾が、8~9kD の蛋白質が IgE 抗体と最も強く結合すると報告している。我々は、そば粉からそば抗原を Coca 抽出した後、蒸留水で透析を行っているので、8~9kD の蛋白質は透析外液へ消失している。低分子の IgE 結合能を有する物質に関しては、さらに検討が必要である。

柳原⁶⁾は各種のカラムクロマトグラフィーを用いて、そば抗原を分画した結果、そばには3種のアレルゲン活性成分があり、それぞれの推定分子量は100kD 以上、約50kD、約17kD で、このうちの約17kD のそば蛋白質が最も強い皮膚反応を惹起すると報告している。

BW24KD が、柳原の報告した3つのアレルゲン活性成分の中に入っていない理由として、筆者らは電気泳動をする際に2-ME を含む digestion buffer を用いて処理をしており、BW24KD は、S-S 結合で他の蛋白質と結合している可能性が示唆された。そこで筆者らはそば抗原を2-ME を含まない digestion buffer で処理を行い SDS-PAGE で電気泳動を行ってみたところ、24kD のバンドは消失し、代わりに約50kD から75kD のバンドが濃厚となった。以上から BW24KD はポリマーの一部と考えられた。

次に、2-ME 未処理の約50kD から75kD の主なバンド3本を抽出し、それぞれを2-ME 処理して電気泳動を行った結果、いずれのバンドからでも BW24KD が得られた。これら3バンドには BW24KD 以外に分子量の異なる成分が含まれており、BW24KD とこれらの蛋白質の分子量の和がちょうど50kD から75kD になることから、BW24KD は分子量の異なる蛋白質と結

合し、2量体を形成していることが示唆された。分子量50kD から75kD の中の50kD 付近の蛋白質が、柳原の報告した分子量約50kD の蛋白質に相当するものと考えられる。なお、Table 2 より、BW24KD と heterodimer を形成する各蛋白質の IgE 結合能をみると、34kD は 0%、44kD は33.3%、48kD は13.3%で、BW24KD よりも陽性率は低かった。このことから、これらの heterodimer の主な IgE 結合能は、BW24KD に存在すると判明した。

そば過敏症状と BW24KD の関係については、そば経口摂取による即時型症状の有無で分けた場合、症状陽性群は BW24KD に対する%binding の値が高く (Fig. 3)、これらのことから、BW24KD はそばの即時型反応を惹起する蛋白質である可能性が示唆された。しかし、確定的な結論を得るためには、さらにこれらの生物学的活性をみていく必要がある。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜りました藤田保健衛生大学総合医科学研究所分子生物学研究部門葛谷博磁教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Smith, H.L.: Buckwheat-poisoning; with report of a case in man. *Arch. Intern. Med.* 3, 350-359, 1909.
- 2) 田中隆人: 食事性アレルギーに就いて. 九大医報 16, 69-74, 1942.
- 3) Nakamura, S., Yamaguchi, M., Oishi, M. and Hayama, T.: Studies on the buckwheat allergose report 1: On the cases with the buckwheat allergose. *Allerg. Immunol.* 20/21, 449-456, 1974/1975.
- 4) Nakamura, S. and Yamaguchi, M.: Studies on the buckwheat allergose report 2: Clinical investigation on 169 cases with the buckwheat allergose gathered from the whole country of Japan. *Allerg. Immunol.* 20/21, 457-465, 1974/1975.
- 5) Horesh, A.J.: Buckwheat sensitivity in children. *Ann. Allergy* 30, 685-689, 1972.
- 6) 柳原行義: ソバ過敏症. 感染症 10, 184-188, 1980.
- 7) Yano, M., Nakamura, R., Hayakawa, S. and Torii, S.: Purification and properties of allergenic proteins in buckwheat seeds. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2387-2392, 1989.

- 8) 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.
- 9) Urisu, A., Yamada, K., Kondo, Y., Masuda, S., Wada, E., 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 family. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 96, 244-252, 1991.

ALLERGEN ANALYSIS OF BUCKWHEAT BY THE IMMUNOBLOTTING METHOD

Yasuto Kondo, Atsuo Urisu, Eiko Wada, Mitsutoshi Tsuruta and Takehiko Yasaki

Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine

Kazue Yamada

Department of Pediatrics, Biyou Hospital

Susumu Masuda

Department of Pediatrics, Showa Hospital

Yutaka Morita

Department of Pediatrics, Kariya General Hospital

Inhalation or ingestion of very small amounts of buckwheat allergen can initiate severe symptoms including wheezing, rhinorrhea, urticaria, vomiting and anaphylactic shock in patients with hypersensitivity against buckwheat. However, few studies of the immunological properties of buckwheat allergen have been made. The aim of the present investigation was to analyze the allergen in buckwheat antigen using the immunoblotting method, radioallergosorbent test (RAST) and RAST inhibition assay. Buckwheat 24 kilodalton protein (BW24KD) was shown by immunoblotting analysis to be the most frequently recognized allergenic component, binding to IgE antibodies from 100% of the patients' sera. There was a significant positive correlation ($p < 0.001$) between % bindings for BW24KD and buckwheat. In the RAST inhibition assay using patients' sera which showed positive IgE antibodies to buckwheat and BW24KD, there was effective inhibition in a dose-dependent manner between inhibition in a dose-dependent manner between BW24KD and buckwheat. These data indicated that BW24KD was a major allergen in buckwheat antigens. The experiments of SDS-PAGE using digestion buffer with or without 2-mercaptoethanol suggested that BW24KD was a component of heterodimer and the paired components had different molecular weights.