

そばアレルギーの免疫学的解析

横浜市立大学医学部小児科学教室

高橋由利子

そばアレルギーは、そばの摂食・吸入により蕁麻疹、喘鳴、呼吸困難、アナフィラキシーショック等の即時型症状を呈する疾患で、I型アレルギー反応の関与がその発症機序とされる。今回3～34歳のそばアレルギー患者血清を用いてそば蛋白に対する免疫応答性の解析を試みた。そばIgE-RAST値のスコアが2以上の陽性であった被験者血清の比率は、患者では80%、症状は認めず検査のみ陽性のRAST陽性対照者では66.6%、RAST陰性対照者では0%であった。そば粉より抽出したそば蛋白を抗原としELISA法で測定したそば塩可溶性、塩不溶性分画に対するIgG抗体価は、患者血清・RAST陽性対照血清で有意に高値であった。IgG-イムノブロット法では、塩可溶性分画では10本、塩不溶性分画では6本のバンドが検出され、IgE-イムノブロット法では、バンドパターンが検体ごとに異なった。以上からそばアレルギー患者ではIgE抗体のみならずIgG抗体の上昇を認め、そば蛋白に対する免疫応答全般の活性化が認められた。しかし症状の発現にはその他の因子の関与も考慮する必要のあることも示唆された。

Key words: buckwheat — ELISA — food allergy — immunoblotting — type I hypersensitivity

はじめに

わが国においてそばは地方を問わず食される日常的な食品であるが、このそばに対してアレルギー反応を呈する一群の患者がいる。症状の多くは蕁麻疹、喘鳴、呼吸困難などアナフィラキシー型であり、食物アレルギーとしての側面がある一方、経気道的にそばを吸入することによっても症状が誘発される¹⁾。

そばに誘発されるこれらの症状は、主としてIgE抗体の介在するI型アレルギー反応による²⁾が、食物アレルギーの成立において、特異IgE抗体のみが単独で産生されるわけではなく、特定抗原に対する免疫系全体の反応の成立を基礎として、aberrantな反応への移行、もしくは抑制方向への反応が破綻してIgE産生へ向かうことが推定される。したがってそばアレルギー

がI型アレルギー反応であるとしても、その基礎にそば抗原に対する一連の免疫系の活性化が存在するはずである。

しかしそばアレルギーを免疫応答の側から検討した報告は少なく、抗原性の解析^{3)~7)}、少数の疫学調査⁸⁾⁹⁾およびそば抗原に対するIgE-RAST値の評価¹⁰⁾¹¹⁾があるにすぎず、包括的な免疫応答性を検討した報告はない。今回そば塩可溶性分画および不溶性分画を抽出しこれを抗原に用いて、そばアレルギー患者血清についてELISA法およびイムノブロット法によりIgG、IgE応答性およびその関連性を検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

そば摂取により即時型アレルギー症状の既往を有するそばアレルギー患者(患者血清)15名を対象とした。性別は男11名、女4名、年齢は3～34歳であった(Table)。即時型アレルギー症状の内訳は、アナフィラキシー5名、蕁麻疹4名、喘息発作+蕁麻疹2名、喘息発作+口唇腫脹1名、口唇腫脹のみ1名、悪心1名、咽頭搔痒感1名であった。対照として、そばを食しても症状を認めないが以前の検査でそばIgE-RAST検

Received: August 20, 1996

Accepted: October 25, 1996

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; DAB diaminobenzidine tetra-hydrochloride; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; IgE immunoglobulin E; IgG immunoglobulin G; kDa kilodalton; PAGE polyacrylamide gel electrophoresis; PBS phosphate-buffered saline; POD peroxidase; RAST radioallergosorbent test; SDS sodium dodecyl sulfate

Table Characteristics of patients, RAST-positive controls and RAST-negative controls

Group	Serum No.	Age (yr)	Sex	Symptoms	Total IgE (U/ml)	IgE-RAST (UA/ml)	
						Buckwheat (class)	Rice (class)
Patients n=15	1	25	Female	Anaphylactic shock	22.5	1.89(2)	<0.35(0)
	2	32	Male	Urticaria	289	<0.35(0)	<0.35(0)
	3	26	Male	Asthma, Lip swelling	59.5	<0.35(0)	<0.35(0)
	4	17	Male	Urticaria	167	6.14(3)	<0.35(0)
	5	31	Female	Anaphylactic shock	363	3.25(2)	<0.35(0)
	6	12	Female	Asthma, Urticaria	1163	7.25(3)	<0.35(0)
	7	3	Female	Urticaria	168	9.47(3)	<0.35(0)
	8	13	Male	Anaphylactic shock	1276	26.4 (4)	1.62(2)
	9	17	Male	Urticaria	178	44.9 (4)	<0.35(0)
	10	10	Male	Lip swelling	140	4.31(3)	<0.35(0)
	11	18	Male	Nausea	3072	<0.35(0)	<0.35(0)
	12	5	Male	Anaphylactic shock	734	16.2 (3)	<0.35(0)
	13	13	Male	Anaphylactic shock	104	4.37(3)	<0.35(0)
	14	34	Male	Itching of pharynx	342	1.06(2)	<0.35(0)
	15	9	Male	Asthma, Urticaria	597	5.59(3)	<0.35(0)
RAST-positive controls n=3	16	8	Male	(-)	578	16.8 (3)	13.7 (3)
	17	5	Female	(-)	1399	1.54(2)	1.31(2)
	18	6	Female	(-)	1545	0.67(1)	<0.35(0)
RAST-negative controls n=10	19	14	Female	(-)	969	0.38(1)	<0.35(0)
	20	2	Male	(-)	38.3	<0.35(0)	<0.35(0)
	21	6	Female	(-)	73.8	<0.35(0)	<0.35(0)
	22	2	Female	(-)	38.6	<0.35(0)	<0.35(0)
	23	3	Male	(-)	46.2	<0.35(0)	<0.35(0)
	24	3	Female	(-)	55.8	<0.35(0)	<0.35(0)
	25	4	Male	(-)	193	0.36(1)	<0.35(0)
	26	8	Female	(-)	149	<0.35(0)	<0.35(0)
	27	9	Male	(-)	742	<0.35(0)	<0.35(0)
	28	10	Male	(-)	104	<0.35(0)	<0.35(0)

査陽性のためそば除去を行っている3名(RAST陽性対照血清), そばIgE-RAST陰性の健康小児10名(RAST陰性対照血清)の血清を用いた。症状を有する例は発症時から, 検査のみ陽性例は検査実施時から, 全例そばの摂取は制限していた。

2. 方法

1) そば蛋白の調整

実験に供したそば蛋白は市販のそば粉から抽出した。まず脱脂のためそば粉を5倍量のアセトン中で2時間攪拌の後, 室温にて8500×g, 10分間遠心した。沈渣を風乾したものを, そば粗抗原とした。粗抗原を6M尿素-リン酸緩衝液(U-PBS)に溶解し, 室温にて1時間攪拌後遠心し, 上清を蒸留水に対して透析し凍結乾燥した(そば全蛋白抗原)。つぎに, そば粗抗原を500mM NaCl-PBSの塩溶液に, 粗抗原:塩溶液=1:10の割合で溶解し, 1時間攪拌後遠心分離して上清と沈

渣とに分けた。上清はその後透析し凍結乾燥して「塩可溶性分画」とした。沈渣は同様の操作を2度繰り返した後, 6M U-PBSに溶解, 遠心後上清を透析, そして凍結乾燥し「塩不溶性分画」とした。実験の際には, いずれも適切な濃度に溶解した後, 4200×g, 10分間遠心, ついで径0.2μmのフィルターで濾過後使用した。また, 塩不溶性分画の溶解には, 6M尿素を含む溶液を使用した。

2) そば蛋白の蛋白量の検討

3種のそば蛋白分画について, 蛋白量を検討した。プロテインアッセイ試薬(BioRad, CA, USA)を用いマイクロプレートによるスタンダード法によった。

3) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によるそば蛋白の分析

抽出したそれぞれのそば蛋白分画に含まれる蛋白成分の検討をSDS-PAGE法により行った¹²⁾。3種の分

画を最終濃度2%となるようにSDS溶液(0.07M SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 0.01M Tris-HCl pH 8.0, 15% glycerol, 0.001% bromophenol blue) (和光純薬, 東京)に溶解し, 100°Cにて2分間加熱処理した後, 5 μ lを試料として用いた。ゲルは10/20% gradient gel (第一化学), 分子量マーカーはprestained SDS-PAGE standards, low range (BioRad), SDS-PAGE molecular weight standards, low range (Bio-Rad), 泳動用緩衝液は, 0.025M Tris-HCl, 0.19 M glycine, 3.5×10^{-3} M SDSを用いた。電気泳動は, 40mA/プレートの定電流で60分間行った。泳動後のゲルはCoomassie Brilliant Blue G-250で染色し, 脱色液中で数時間振盪した。

4) 血清総IgE値と抗原特異IgE抗体の測定

血清総IgE値はキャップIgE-FEIA (Pharmacia)にて測定し, そば, 米に対する抗原特異IgE抗体はキャップRAST-FEIA (Pharmacia)にて測定した。

5) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるそば特異抗体測定

ELISA法により血清中IgGおよびIgE量を測定した。そば抗原は, PBSに溶解し蛋白量としてIgG測定では可溶性分画は20 μ g/ml, 不溶性分画は10 μ g/ml, IgE測定では両者とも10 μ g/mlの溶液を用いた。それぞれ100 μ lずつ96穴ELISAプレート(Nunc)に入れ, 4°C, 一昼夜放置した。抗原液を廃棄後, 2% bovine serum albumin (BSA)を200 μ l/well加え, 37°Cにて1時間ブロッキングを行った。PBS-0.05% Tween 20 (Sigma)液(PBS-T)にて2回洗浄後, 希釈した血清を100 μ lずつ加え, IgG測定では37°Cで1時間, IgE測定では室温で一昼夜反応させた。血清の希釈は, IgG抗体測定では可溶性抗原については100~3200倍希釈, 不溶性抗原については50~1600倍希釈, IgE抗体測定では両者とも16~512倍希釈と1/2希釈系列を用いて測定した。PBS-Tで4回洗浄後, 二次抗体反応を行った。特異IgG抗体の測定の場合は, 2000倍希釈したペルオキシダーゼ(POD)標識ウサギ抗ヒトIgG抗体(和光)を100 μ lずつ加え, 37°Cで1時間反応させた後, PBS-Tで4回洗浄した。特異IgE抗体の測定の場合は感度を上げるため, 2000倍希釈したビオチン化ヤギ抗ヒトIgE抗体(Vector)を100 μ lずつ加え37°Cで2時間反応させ, PBS-Tで4回洗浄, 更に4000倍希釈のPOD標識ストレプトアビジン(Boehringer Mannheim)を100 μ lずつ加え37°C 1時間反応させ, PBS-Tで洗浄した。またIgE抗体測定では, 血清成分に対す

るストレプトアビジンの非特異的吸着を阻害するために, あらかじめ抗原溶液中にAvidin/Biotin Blocking Kit (Vector)のAvidin solutionとBiotin solutionを添加した後, 抗原吸着に使用した。二次抗体反応後は, 発色溶液(0.012%過酸化水素を加えた0.026%OPD)を100 μ lずつ加え, 37°Cで遮光下に発色させた。発色は2N H₂SO₄を40 μ l加えて反応停止させ, マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で吸光度(測定波長490nm)を測定した。測定はduplicateで行い, 統計処理には平均値を用いた。

6) ELISA抑制試験

IgG-ELISAの反応がそば抗原特異的であることを確認するため, ELISA抑制試験を実施した。あらかじめそば抗原を0.001~1000 μ g/wellずつ200倍希釈被検血清(100 μ l/well)に加えて37°Cで2時間反応させ, 抗体を吸収する操作を行った。吸収血清は上記のELISAと同じ方法でIgG抗体測定を行った。

7) イムノブロット(IB)法によるそば特異的抗体の検出

SDS-PAGEにより分画されたそば抗原をゲルからセミドライエレクトロブロッター(第一化学)を用いてpolyvinylidene difluoride (PVDF)膜(ミリポア)に転写した。転写は80mA/枚で約1時間行った。転写終了後, 分子量マーカーのレーンのみ切り取り, Colloidal Gold Total Protein Stain (Bio-Rad)で染色した。残りの転写膜は2%BSAで37°C90分間ブロッキングした。以下IgG抗体とIgE抗体では感度の違いにより若干検出方法が異なる。

a) IgG-イムノブロット (IgG-IB) 法

転写膜を各レーン毎に切断し, 0.2%BSA, 0.05% Tween 20を含むPBSで20倍希釈した血清2mlと37°Cで1時間反応させた。PBS-Tで洗浄後, 二次抗体は500倍希釈したPOD標識ウサギ抗ヒトIgG抗体を用い, 37°Cで1時間反応させた。発色は, 3,3-diaminobenzine tetrahydrochloride (DAB) (協和メディックス)/H₂O₂を含むTris HCl緩衝液にて37°Cで遮光して行った。発色終了後, 転写膜を蒸留水で洗浄して反応を停止させた。

b) IgE-イムノブロット (IgE-IB) 法

ブロッキングした転写膜をミニブロッター(第一化学)に装着した。血清200 μ lに0.2%BSA溶液50 μ lを加え各レーンに注入し, 室温にて一昼夜反応させた。反応終了後, ビオチン化ヤギ抗ヒトIgE抗体(500倍希釈, 37°C 2時間), POD標識ストレプトアビジン(500倍希釈, 37°C 1時間)でELISAと同様に反応させた。

発色はIgG-IB法と同じくDABを用い、蒸留水で洗浄して反応を停止させた。

8) 統計処理

t検定(両側検定)とPearsonの相関係数を用い危険率0.05以下を有意差ありとした。なお血清総IgE値とIgE-RAST値は対数変換した後統計処理を行った。

結 果

1) 精製そば蛋白の組成分析

そば粉から調整したそば蛋白を、全蛋白、塩可溶性蛋白、塩不溶性蛋白の三分画に分け、それぞれの蛋白組成をSDS-PAGE法により分析した(Fig. 1)。全蛋白では多数のバンドが検出され、他方、塩可溶性分画は分子量14~107KDa間に13本(14, 16, 19, 21, 28, 33, 36, 39, 44, 48, 80, 90, 107KDa)、塩不溶性分画は14~87KDa間に8本(14, 16, 19, 28, 31, 39, 54, 87KDa)のバンドが認められた。また全蛋白の組成は、塩可溶性分画と塩不溶性分画とを合わせたものであった。

つぎに精製そば蛋白各分画に含まれる蛋白量をプロテイン・アッセイ法にて検討した。塩可溶性分画乾燥粉末10mg当たりの蛋白濃度は5mg、塩不溶性分画乾燥粉末10mg当たりの蛋白濃度は2.5mgであった。し

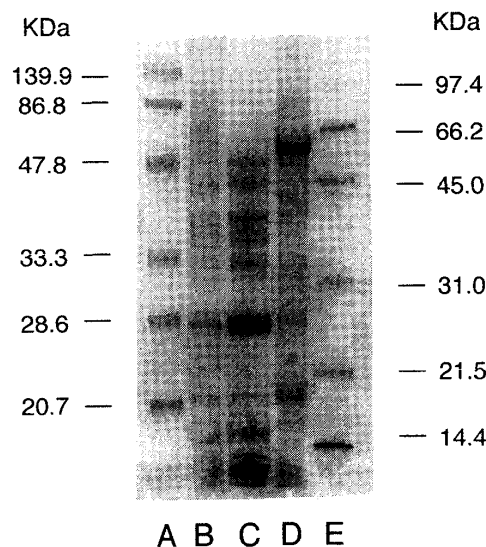


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of buckwheat proteins.

Lane A, E: molecular weight marker polypeptides. Lane B: whole fraction. Lane C: salt-soluble fraction. Lane D: salt-insoluble fraction.

たがって精製そば蛋白には蛋白以外の成分が含まれることが示唆された。

2) 検体血清の総IgE値とそば特異IgE-RAST値の測定

患者血清15検体, RAST陽性対照血清3検体, RAST陰性対照血清10検体について、総IgE値、そば特異IgE-RAST値を同時測定した。Tableに示したように総IgE値は、患者血清では22.5~3072U/ml(平均288U/ml)、RAST陽性対照血清では578~1545U/ml(平均1071U/ml)、RAST陰性対照血清では104~969U/ml(平均120U/ml)に分布し、総IgE値は患者血清およびRAST陽性対照血清ではRAST陰性対照血清に対し有意に($p < 0.01$)高値であった。そばIgE-RAST値については、スコア2以上は患者血清で12検体(80%)、RAST陽性対照血清で3検体中2検体(66.6%)であったが、RAST陰性対照血清では全検体陰性であった。

米IgE-RAST値について同様に検討したところ、患者血清1検体およびRAST陽性対照血清2検体(そばRAST陽性の2名と同一)のみでRASTスコア2以上の陽性であった。

今回患者15名中3名でそば特異IgE-RAST値が陰性であった。この3名はそば摂取後にそれぞれ蕁麻疹、

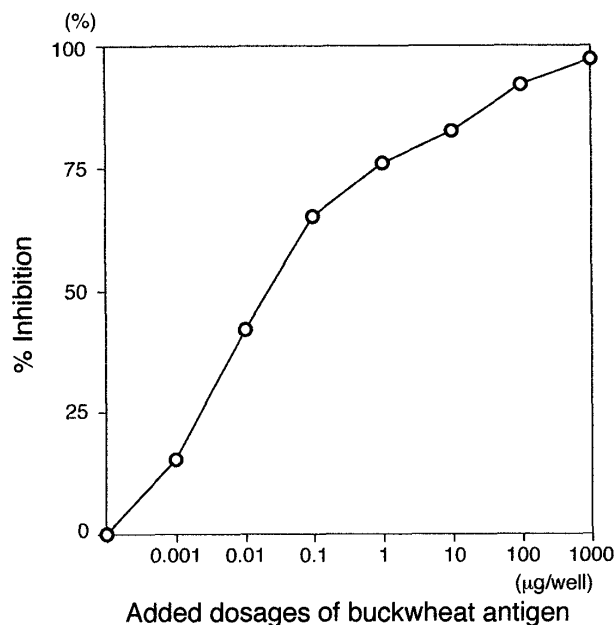


Fig. 2. Inhibition test of buckwheat specific ELISA system.

Buckwheat specific IgG-binding was determined by ELISA after the addition of buckwheat at the indicated concentration.

喘息発作+口唇腫脹, 悪心といった即時型の症状を呈していた. そばアレルギーが特異 IgE 抗体のみでなく, その他の因子が関与した反応も存在することが示唆された.

3) そば特異 IgG 抗体の検討

次に ELISA 法を用いてそば特異 IgG 抗体の検出を試みた.

今回用いた IgG-ELISA 法の抗原特異性を吸収試験により検定した. 抗体陽性血清に種々の濃度のそば抗原を添加しその後 ELISA 法にて血清中の残遺そば特異 IgG 抗体を測定した. その結果, 血清に加えるそば抗原の濃度依存性に反応抑制が観察され, この測定系がそば特異 IgG 抗体を検出していることが確認された (Fig. 2).

検体血清中のそば特異 IgG 抗体の検出にあたり, まずそば塩可溶性分画を抗原として用いた. この結果, 患者血清における特異 IgG 抗体価はいずれの血清希釈においても RAST 陰性対照血清に比べ高値であった. 血清200倍希釈における吸光度(測定波長490nm)は, 患者血清で平均 0.973 ± 0.440 , RAST 陽性対照血清で平均 1.050 ± 0.055 , RAST 陰性対照血清で平均 0.354 ± 0.186 であり, そば特異 IgG 抗体は患者および RAST 陽性対照血清で有意に ($p < 0.01$) 高値であった

(Fig. 3). なお, 低値ながら RAST 陰性対照血清中にも, そば IgG が検出された.

次に塩不溶性蛋白分画を抗原として同様に IgG 抗体の検出を行ったところ, 患者血清は平均 0.440 ± 0.404 , RAST 陽性対照血清は平均 0.764 ± 0.280 , RAST 陰性対照血清は平均 0.147 ± 0.053 であった(血清200倍希釈). RAST 陰性対照血清と比較して, 患者血清 ($p < 0.05$) および RAST 陽性対照血清 ($p < 0.01$) で有意に高値であった (Fig. 4).

次にそば特異 IgG 抗体価とそば IgE-RAST 値との関連を検討した. 塩可溶性分画に対する IgG 値と IgE-RAST 値との間に相関係数 $r = 0.623$ で, また塩不溶性分画でも $r = 0.535$ で正の相関を認めた (Fig. 5). 塩可溶性分画に対する IgG 値と塩不溶性分画に対する IgG 値では $r = 0.690$ で正の相関を認めた (Fig. 6).

4) ELISA 法によるそば特異 IgE 抗体の測定

ELISA 法を用いてそば特異 IgE 抗体を測定するため, 二次抗体にビオチン化抗ヒト IgE 抗体を用いるアビジン-ビオチン系を加える高感度測定系を確立した. この結果, 可溶性そば抗原に対して IgE 抗体が検出されたのは3血清(血清番号8, 9, 16), また不溶性そば抗原に対して IgE 抗体が検出されたのも3血清, 両者は同じ血清であった. そば IgE-RAST 値との比較を

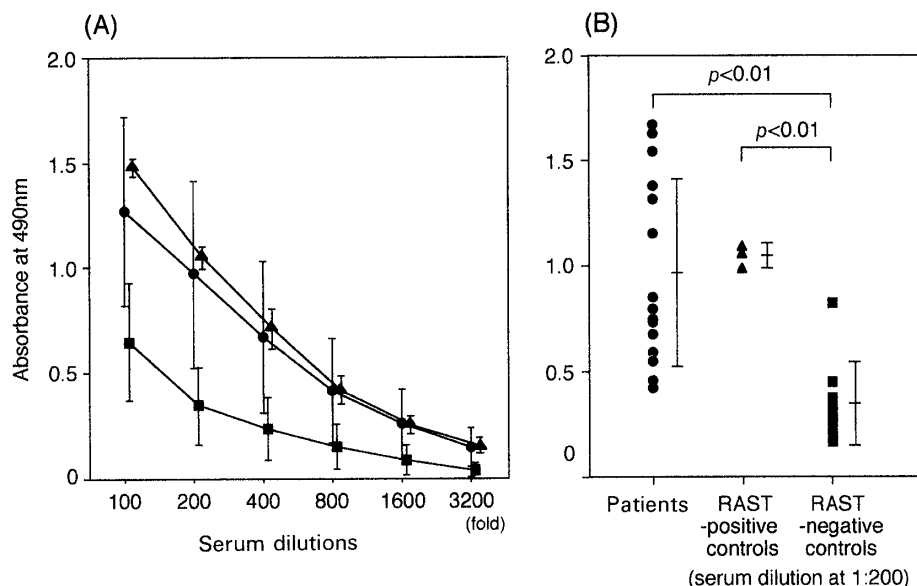


Fig. 3. IgG-ELISA values to buckwheat salt-soluble fraction.

(A) Titration curves. Each curve represents the mean reactivity of IgG antibody in sera from 3 groups by IgG-ELISA. [●: patients, ▲: RAST-positive controls, ■: RAST-negative controls]. Bars represent mean $\pm$ standard deviation. (B) Each datum shows IgG-ELISA values at 1:200 dilution of each serum from 3 groups.

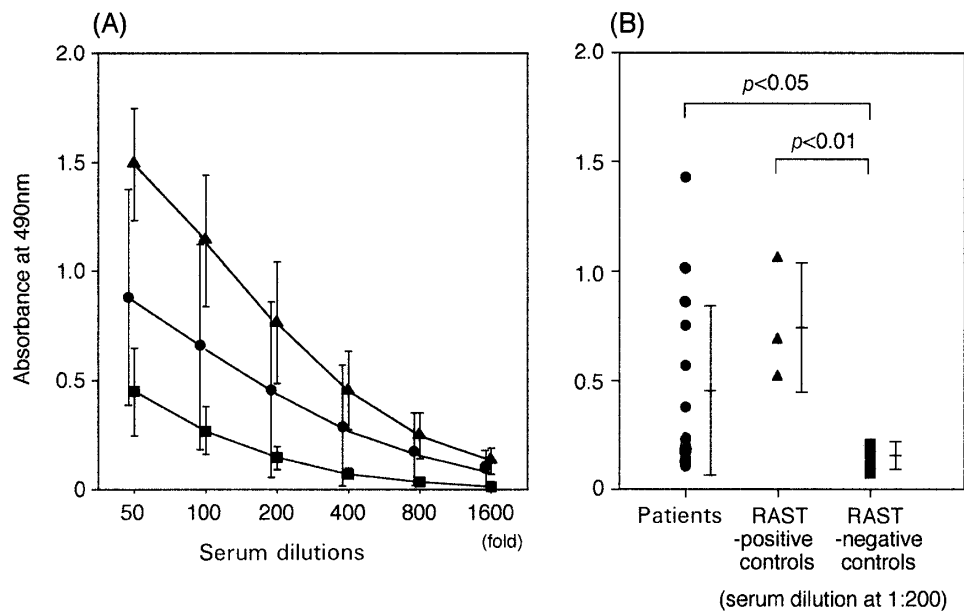


Fig. 4. IgG-ELISA values to buckwheat salt-insoluble fraction.

(A) Titration curves. Each curve represents the mean reactivity of IgG antibody in sera from 3 groups by IgG-ELISA. [●: patients, ▲: RAST-positive controls, ■: RAST-negative controls]. Bars represent mean $\pm$ standard deviation. (B) Each datum shows IgG-ELISA values at 1:200 dilution of each serum from 3 groups.

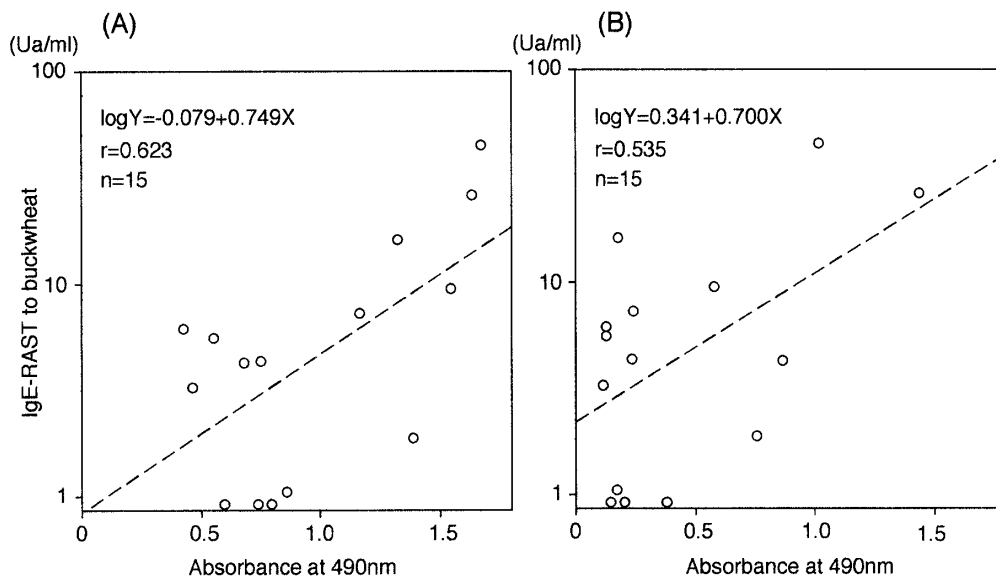


Fig. 5. Relationship between IgE-RAST and IgG-ELISA values to buckwheat in sera from patients.

A: IgG-ELISA to salt-soluble fraction. B: IgG-ELISA to salt-insoluble fraction.

行ったところ、この3血清はいずれもIgE-RAST値が16.8UA/ml以上の高値血清であった。すなわちELISA法は、高感度なアビジン-ビオチン系を導入してもIgE-RAST法よりは感度が劣っており、今回の検

討では、そばIgE-RAST値が高値である3名でのみそば特異IgE抗体が検出されたにすぎなかった。

5) IB法による抗体認識蛋白・ペプチドの検出

そば塩可溶性分画、塩不溶性分画のいずれも多種の

蛋白、ペプチドを含有していることが SDS-PAGE 法により明らかになった (Fig. 1). そこで, ELISA 法で検出された IgG 抗体および IgE 抗体が認識する蛋白、ペプチドを IB 法で解析した.

患者血清を用い塩可溶性分画を抗原とした IgG-IB

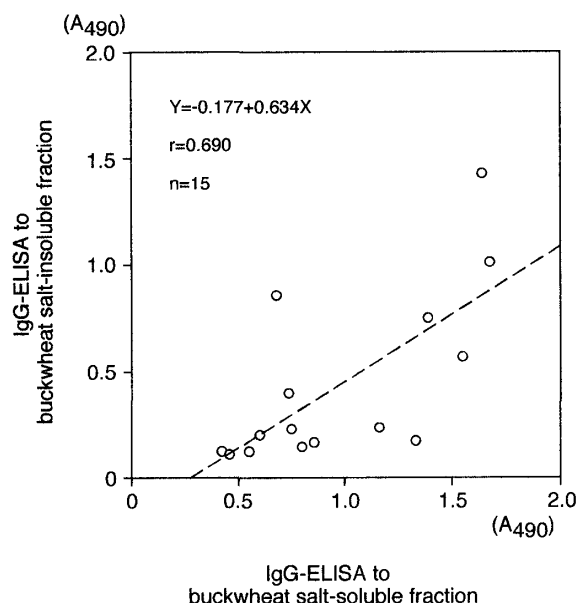


Fig. 6. Relationship between IgG-ELISA values to buckwheat salt-soluble fraction and IgG-ELISA values to buckwheat salt-insoluble fraction in patients.

法では, 分子量14~107KDa の範囲内に10本のバンド (14, 16, 19, 21, 28, 33, 44, 48, 80, 107KDa に相当する分画と反応) が検出され (Fig. 7), 塩不溶性分画を抗原とした IgG-IB 法では分子量16~87KDa の範囲内に6本のバンド (16, 19, 28, 31, 54, 87KDa に相当する分画と反応) が検出された (Fig. 8). それぞれの蛋白分画の SDS-PAGE の結果と比較すると, いずれの患者血清でも SDS-PAGE で蛋白の存在する位置にバンドが検出されたが, 蛋白量が微量である位置には必ずしも明瞭なバンドは認められず, 蛋白量の多い部分に高濃度のバンドが検出される傾向があった.

RAST 陰性対照血清を用いた IgG-IB 法による検索では, 検体ごとに数本のバンドが検出されたが, いずれのバンドも基本的には患者血清で認められた分子量位置にあった. しかしそれぞれのバンドの濃度は著しく低く, 抗体量は少ないことを示唆していた.

そば特異 IgE-RAST 高値であった血清を用い, IgE-IB 法により認識抗原の検出を行った.

IgG-IB 法同様, いずれも多数のバンドが検出されたが, その中で濃く染色されるバンドのパターンは検体ごとに異なっていた (Fig. 9). IgG-IB 法で検出された以外の部位には, バンドは検出されなかった.

6) そば特異 IgG-, IgE-抗体価と臨床症状

患者は全てそば摂取によりアナフィラキシーを含む即時型症状を呈した. その症状別の抗体価を検討した

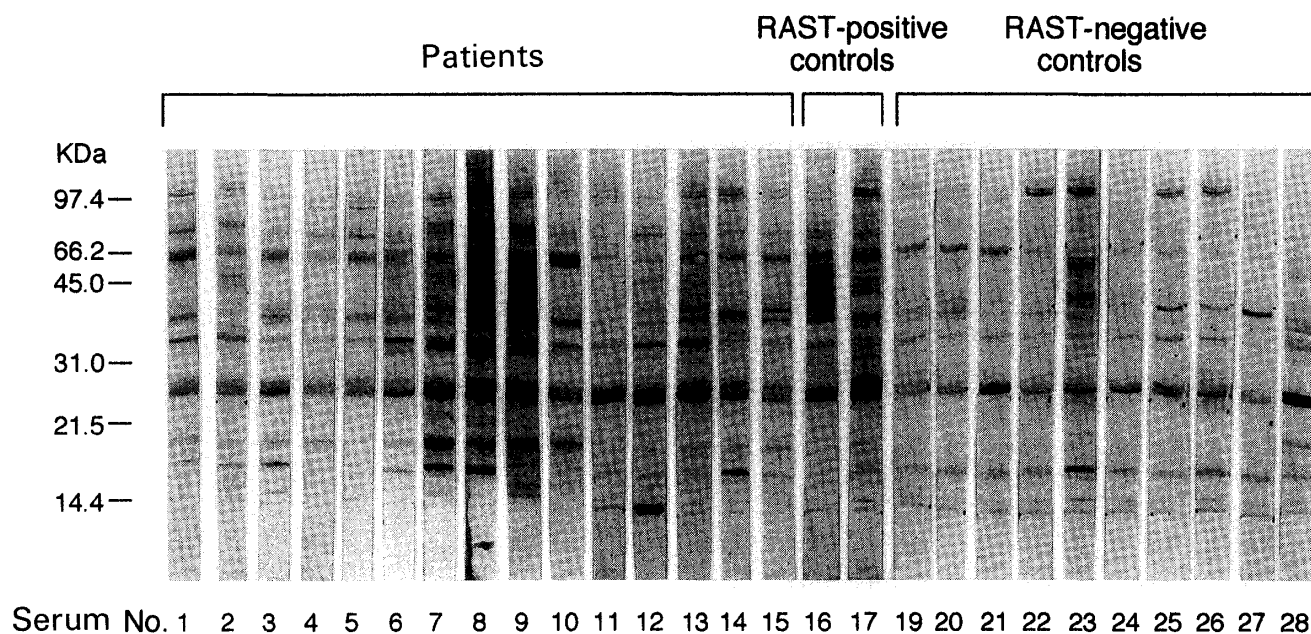


Fig. 7. Immunoblotting analysis of IgG antibodies in patients' sera against buckwheat salt-soluble fraction.

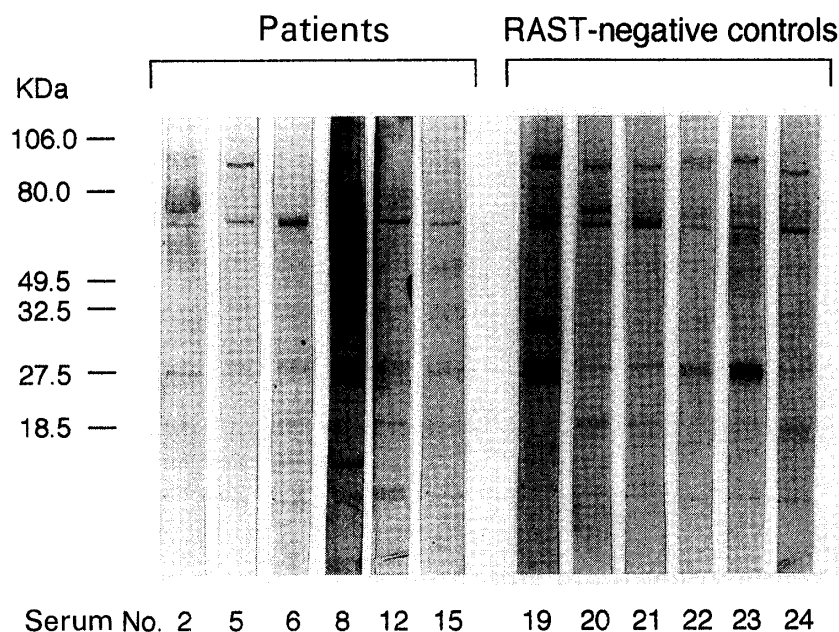


Fig. 8. Immunoblotting analysis of IgG antibodies in patients' sera against buckwheat salt-insoluble fraction.

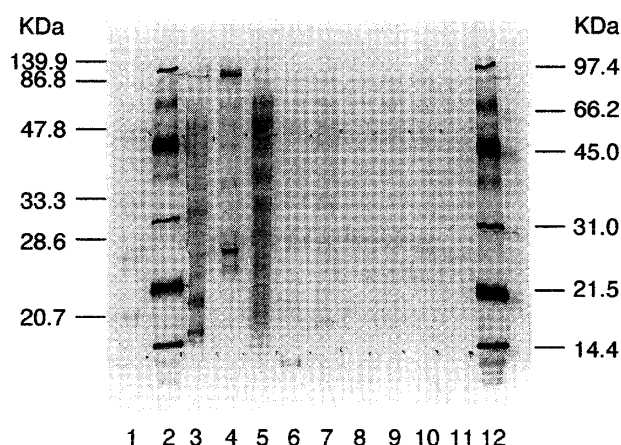


Fig. 9. Immunoblotting analysis of IgE antibodies in patients' sera against buckwheat salt-soluble fraction.

Lane 1, 2, 12: molecular weight marker polypeptides. Lane 3, 5~7: patients (serum No. 8, 9, 12, 15). Lane 4: RAST-positive controls (serum No. 16). Lane 8, 9: RAST-negative controls. Lane 10, 11: serum free.

考 察

そば蛋白を抽出し塩可溶性分画、塩不溶性分画に分け、それぞれを抗原として患者血清中のIgGおよびIgE そば特異的抗体を測定することにより、そばアレルギー患者の抗体レベルでの免疫応答性を検討し、さらにアレルギー症状との関連性を検討した。

臨床症状を有する患者血清ではいずれの蛋白分画に対するIgG抗体もRAST陰性対照血清に比べて著しく高値であった。またそば特異IgG値とIgE-RAST値との間に相関係数 $r=0.623$ で相関が認められたことから、そばアレルギーはI型アレルギー反応が関与し、その基礎にそば抗原に対する一連の免疫応答の亢進状態が存在することが示唆された。

ところで患者の中には、そば摂取により即時型の症状が出現するにも拘わらずそばIgE-RAST値が陰性の症例が3名あり、この3名ではそばIgG抗体価は、他の患者と同様に高値であった。すなわちIgE-RASTで固相化されている抗原以外のそば抗原に対するIgE抗体の応答、またはI型アレルギーが関与しない免疫応答が症状発現に関わっている可能性があることを示唆していた。

そば蛋白は、塩可溶性分画、塩不溶性分画に分けられそれぞれの蛋白は異なるが、患者血清、RAST陽性対照血清ともにそれぞれの分画についてIgG抗体は

ところ、そば特異IgG抗体では可溶性・不溶性とも、症状との関連に一定の傾向は認められなかった (Fig. 10)。また、そば特異IgE-RAST値は、アナフィラキシー症状を呈する患者は全てスコア2以上の陽性であった (Fig. 11)。

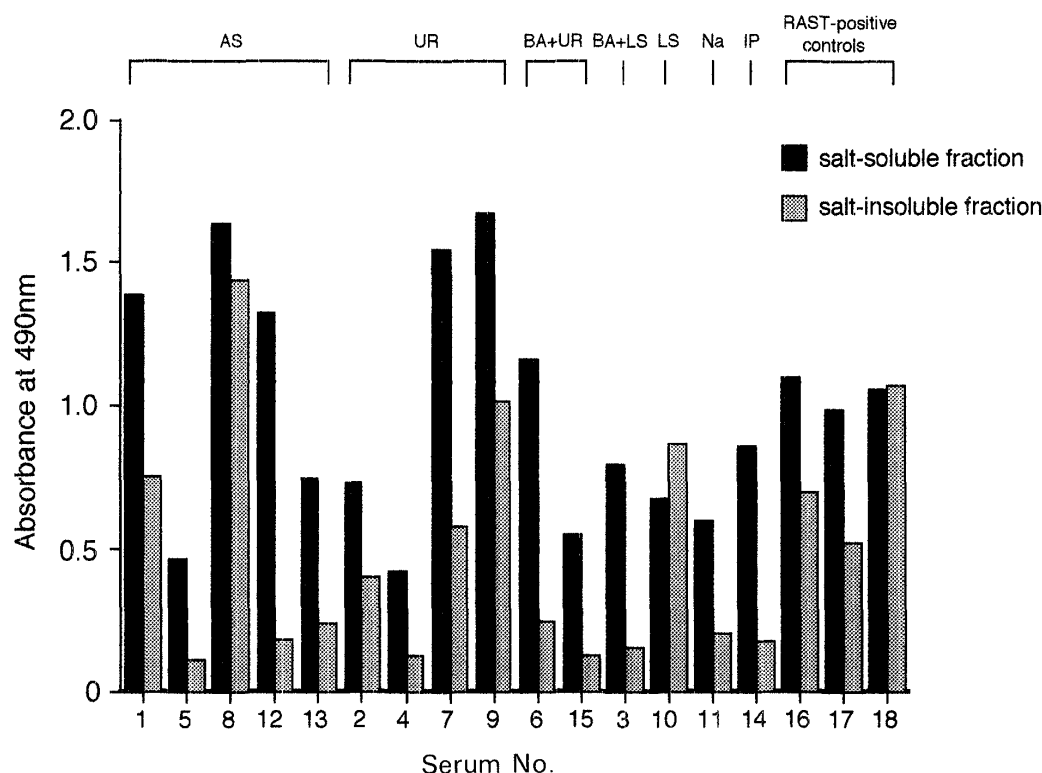


Fig. 10. Comparison between IgG-ELISA values to buckwheat protein and symptoms.

AS: anaphylactic shock, UR: urticaria, BA: bronchial asthma, LS: lip swelling, Na: nausea, IP: itching of pharynx.

(class)						
IgE-RAST score to buckwheat	4	1	1			
	3	2	2		1	1
	2	2		2	1	1
	1					1
	0		1	1	1	
Symptoms		AS	UR	BA	others	(-)
Incidence of positive RAST (%)		100.0	75.0	66.7	66.7	66.7

Fig. 11. Comparison between buckwheat-specific IgE-RAST scores and symptoms.

The numerical values are the number of patients.

AS: anaphylactic shock, UR: urticaria, BA: bronchial asthma.

高値であり、患者血清と RAST 陽性対照血清との間にそば抗原分画の認識に差はなかった。すなわち患者血清と RAST 陽性対照血清との相違は IgG, IgE 応答からは区別ができず、また認識する抗原の差異も存在しないので、症状発現に関与する別な要因を想定する必要がある。

今回の検討では、Fig. 10, 11 に示したようにそば特異 IgG, IgE 抗体価と症状との間に一定の傾向は認められなかった。症状は全て即時型アレルギーの症状であり、それが激烈な場合はアナフィラキシーショックとして現れ、軽度の場合は口唇腫脹等のみを呈すると考えれば、症状の重症度の違いは免疫応答性の差というより、発症時の曝露抗原量の問題に関わる部分があるかもしれない。

今回対象としたいずれの患者も即時型のアレルギー反応を経験しており、その年齢は 3～34 歳に分布し、アレルギー反応を経験後はそば除去を行っていた。すなわち抗原感作後に増強感作は行われていないにも拘わらず高年齢に至るまで、そば特異 IgG および IgE 抗体は高値が持続していた。そばアレルギーは一度発症

すると年余を経ても消失しないことがこれまでも指摘されている⁸⁾¹³⁾が、増強感作がないのになぜ抗体が高値維持されるのかは興味深い問題である。最近鳥居らのグループは、そばそのものによる増強感作がなくとも他の穀物（米）に含まれる共通抗原により増強感作が絶えず行われている可能性を示唆した¹⁰⁾¹¹⁾。しかし米との共通抗原に対する抗体は症状の誘発には関与しないとの報告もあり¹¹⁾、長期間そば除去後にそば摂取で症状が出現する現象の説明にはならない。

そば抗原は SDS-PAGE により分画すると、多数の蛋白、ペプチドから構成されていたが、免疫応答、症状発現に関与する抗原蛋白に違いがあるか否かを IgG-IB 法により検討した。そばアレルギー患者血清では、塩可溶性分画については10本のバンドが、塩不溶性分画については6本のバンドが検出され、複数のそば蛋白が抗原活性を有していることが明らかになった。また RAST 陰性対照血清でもバンドが検出されたが、その分子量的位置は患者血清に認められた位置に含まれ、かつ抗体量は微量であった。以上からそば特異 IgG 抗体の認識する抗原は本質的には患者血清と対照血清では相違はなく、両者の相違は抗体量の差であると考えられた。すなわち患者では相対的に多量の抗原に免疫系が曝露されているか、あるいは微量の抗原に対して過剰の免疫応答が惹起されるかのいずれかの可能性が指摘できる。患者は症状発現後、そば除去を行うことが通例であることを考慮すると、後者、すなわち患者においてそば抗原に対する免疫応答性の亢進が示唆される。また IgE-IB 法を試みたところ、興味深いことに抗体により認識される抗原は血清により異なること、さらにそのバンドは IgG-IB 法で得られた分子量のバンドに限られることなどの結果を得た。すなわちそば特異 IgE は、そば IgG 産生へ commit した免疫反応系のうち特定のもののみが選択されて IgE 産生へと転換することが示唆され、そばアレルギーのうち IgE の関与する I 型アレルギーの克服にはこの選択性の機構の解明が重要であろう。また特異抗原に対する抗体の応答性は特定の HLA 遺伝子産物が関与しているとの報告もあり¹⁴⁾、免疫応答性およびアレルギーの発現を生体反応の側から解析することも必要であろう。

そばアレルギーの主要アレルゲンを同定することは脱アレルギーの治療にも重要な課題である。今回 IgG-、IgE-IB 法の両者に共通して分子量約28KDa のバンドを認めたが、もともと蛋白量として多い部分で

あること、また対照血清でも同部位にバンドを認めることより、現時点ではそばアレルギーの主要アレルゲンとは断定できない。

そばの主要アレルゲンの検索はこれまでも試みられている。柳原らは、そば蛋白の水溶性分画中から、主要アレルゲン成分は分子量約17KDa の抗原 C に存在することを報告している³⁾。また中西らは、抗原性のあるそば蛋白は分子量約14～73KDa にわたり複数存在するが、主要アレルゲンは柳原らの同定した推定分子量17KDa の抗原 C とおそらく同一のものと同定した⁴⁾。また額田らは、Sephadex G-50 でそば蛋白を分画し推定分子量14KDa、HPLC で20KDa 付近に抗原活性を認めた⁵⁾。他方 Yano et al. は、脱脂したそば成分から3種の分画を得た。3分画ともそばアレルギー患者血清中の IgE 抗体と反応し熱に安定で、うち1種は trypsin inhibitor 活性を有していたと報告している⁶⁾。今回の検討では抗原活性蛋白は複数存在し、とくに IgE 抗体の認識する抗原は症例により異なり共通アレルゲンは見いだし難かったことは、これらの報告と異なる点であるが、最近近藤らは、IgE-IB 法により約11本のバンドを検出し、その中でそば蛋白を構成する種々の蛋白に S-S 結合している基本的な蛋白である24KDa 蛋白の存在を指摘した⁷⁾。アレルゲンとなるペプチドが、分子量の異なる何種類かの蛋白と heterodimer を形成しているとの考え方は今後の検索の方向を示唆していると思われる。

そばアレルギーは、即時型症状を呈し、経口的にも経気道的にも感作され、そば除去にもかかわらず長年にわたって継続するという点で、アレルギー疾患の中でもきわめて特異的な位置を占める病態である。また他の食物アレルギー、例えば卵や牛乳アレルギーでは、即時型の他にアトピー性皮膚炎等の遅発型の症状を呈するが¹⁵⁾、そばアレルギーはその殆どが即時型であり症状の点からも興味深い疾患である。今回抗体産生という観点からそばアレルギーを検討し、抗体量の増加に現れる免疫応答の増強あるいは抑制の破綻を認めた。今後その免疫応答の変調がどのような機序で生じてくるのか、検討することが必要である。

結 語

そばアレルギー患者血清ではそば可溶性および不溶性分画に対する IgG, IgE 抗体ともに RAST 陰性対照

血清に比較し高値で、そば蛋白に対する免疫応答系全体の活性化が認められた。しかし症状の発現にはその他の因子の関与も考慮する必要のあることも示唆された。また、その抗体はある特定の蛋白・ペプチドに反応するものではなく、そば蛋白全体に対して産生亢進を呈した。このような免疫反応亢進の機序解析がそばアレルギーの病態解明に重要な意義をもつものと考えられた。

ご指導ご校閲いただきました横浜市立大学小児科学教室松山秀介教授に深謝いたします。また数々のご指導をいただきました横田俊平講師、相原雄幸講師に心より感謝いたします。また有益な助言を戴きました神奈川県立こども医療センター栗原和幸先生、横浜市アレルギーセンター勝呂宏先生、旭電化工業基礎研究所椿 和文博士、ファルマシアバイオシステムズの皆様に深謝致します。

文 献

- 1) 中村 晋, 室久敏三郎: 気管支喘息の研究 第5報 そばアレルギーについて. アレルギー 19, 702-717, 1970.
- 2) 中村 晋, 山口道也, 大石光雄, 葉山 隆: そばアレルギー症の研究 第1報 そばアレルギー症の症例について. アレルギー 23, 548-553, 1974.
- 3) 榊原行義, 油井泰雄: そばの抗原分析について. アレルギー 27, 153-154, 1978.
- 4) 中西和夫, 長谷川好規, 安田行信, 戸谷康信, 下方 薫: 新しい抗原分析法—Blot 法の紹介とソバ抗原の分析について. アレルギーの臨床 6, 468-469, 1986.
- 5) 額田純子, 皆川陽美, 茂野 淑, 安田和正, 平野京子: そばアレルギー症の1例—そば粉抗原の精製と多抗原感作に関する検討—. 日皮会誌 97, 1551-1554, 1987.
- 6) 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.
- 7) 近藤康人, 宇理須厚雄, 和田映子, 鶴田光俊, 矢崎雄彦, 他: そば主要アレルゲンのImmunoblotting 法による検討. アレルギー 42, 142-148, 1993.
- 8) 中村 晋: 職業性喘息の長期予後調査成績. アレルギー 39, 12-20, 1990.
- 9) 中村 晋, 山口道也: そばアレルギー症の研究 第2報 そばアレルギー症に関する全国調査成績. アレルギー 23, 554-560, 1974.
- 10) 和田映子, 宇理須厚雄, 近藤康人, 堀場史也, 鶴田光敏, 他: そばIgE-RAST 陽性者におけるそば即時型アレルギー症状の有無と米IgE-RAST との関係. アレルギー 40, 1493-1499, 1991.
- 11) 山田一恵, 宇理須厚雄, 近藤康人, 和田映子, 駒田英勝, 他: そばと米の特異的IgE 抗体陽性者におけるそば即時型過敏症状とそば・米間のIgE 抗体に対する交叉反応部位の認識との関係. アレルギー 42, 1600-1609, 1993.
- 12) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- 13) 中村 晋: そばアレルギーにおける shock そして死. アレルギーの臨床 10, 728-733, 1992.
- 14) Marsh, D.G., Hsu, S.H., Roebber, M., Ehrlich-Kautzky, E., Freidhoff, L.R., et al.: HLA-Dw2: A genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5 I. Response resulting primarily from natural antigenic exposure. *J. Exp. Med.* 155, 1439-1451, 1982.
- 15) Jones, S.M. and Sampson, H.A.: The role of allergens in atopic dermatitis. *Clin. Rev. Allergy* 11, 471-490, 1993.

ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSES IN BUCKWHEAT ALLERGY

Yuriko Takahashi

Department of Pediatrics, Yokohama City University School of Medicine

Hypersensitivity resulting from the ingestion or inhalation of buckwheat allergen causes immediate manifestation of symptoms including urticaria, wheezing, dyspnea, anaphylactic shock, which is considered to be IgE-mediated type I hypersensitivity. Using sera of patients with buckwheat allergy the immuno-reactivity to purified buckwheat protein was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting method. The incidence of positive RAST value to buckwheat was 80% in the patients and 66.6% in the RAST-positive controls, whereas the RAST-negative controls showed all negative. The sera of both patients and RAST-positive controls showed significantly higher levels of specific IgG antibodies against salt-soluble and salt-insoluble fractions of buckwheat protein than the RAST-negative controls. By means of IgG-immunoblotting analysis, ten polypeptide bands of salt-soluble fraction and six polypeptides bands of salt-insoluble fraction were detected in all sera of the patients. In contrast, the patterns of IgE-immunoblots varied depending on the sera used. Taken together, the immune activation to buckwheat protein in patients with buckwheat allergy is not restricted to IgE antibody formation but extends to other immunoglobulin class, IgG, which indicating that the overall immune activation to buckwheat protein may be the basic characteristics of buckwheat allergy. Additionally, other factor is necessary for the manifestation of symptoms.
