

ラパス貝 (Grand Keyhole Limpet) による即時型アレルギーの11例

群馬大学医学部小児科

前田昇三 森川昭廣 加藤政彦 茂木洋一

重田 誠 徳山研一 黒梅恭芳

宗像医師会病院内科

成富由司 末廣和久 草場公宏

松本協立病院小児科

蓑島宗夫

熊谷小児病院

岩田 俊

近年、あわびに似たラパス貝(*grand keyhole limpet*)が、大量に輸入され食用に供されている。我々は、この貝による即時型アレルギー反応を呈した11例を経験し、皮膚テストおよび血清学的検討を加え、さらに GKL の抗原性についても検討した。症例は、9歳～49歳、平均17.1歳で、男性8例、女性3例の計11例であり、調べられた範囲では全例気管支喘息などのアレルギー疾患の既往を有していた。GKL 摂取後の症状は、蕁麻疹、喘鳴、呼吸困難、ショックなどであり、1例は呼吸不全のため挿管し、人工呼吸を行った。その他の例は輸液、ステロイドホルモン剤、抗ヒスタミン剤などの投与で症状は軽快した。

アレルギー学的に検討しえた症例についてみると、ほとんどの症例が GKL に対してプリック反応陽性で、GKL の RAST は全症例が陽性であった。また、RAST inhibition test で、GKL はあわびや *keyhole limpet hemocyanin* に対して共通抗原性を認めた。また、GKL の抗原について、immunoblotting 法を用いて検討した結果、主要抗原は、主に分子量38Kd と80Kd の部位に存在することが示唆された。

Key words: abalone — anaphylaxis — grand keyhole limpet — IgE

はじめに

あわびに似たラパス貝は、南米チリやペルーの太平洋岸に生息しており、近年チリアわびとして大量に輸入され、食用に供されている。一般名は *grand keyhole limpet* (以下 GKL) で、学名は *Fissurella maxima* Sowerby といい、あわびと同様の形態で、腹足綱 (*Gastropoda*)、前鰓亜綱 (*Prosobranchia*)、原始腹足目 (*Archaeogastropoda*) に属し、あわびはミミガイ科 (*Haliotidae*)、GKL はスカシガイ科 (*Fissurellidae*) と、科は異なるが外見上での区別は困難である。

この貝を大量に輸入しているハワイにおいて、1986

年に57例の GKL によると思われる中毒事件が報道された¹⁾。一方、我が国においては、我々が1987年までに GKL 摂取後に蕁麻疹、呼吸困難などの即時型アレルギー症状を呈した5症例について報告したが²⁾、その後同様の報告があり(成富由司：私信)、また血清学的には未確認であるが死亡例もあった(西川 清：私信)ので、ここに現在までに把握し得た本邦の症例11例の既往歴、現病歴、皮膚反応および血清学的検討結果をまとめ、さらに GKL の抗原性についても検討を加えたので報告する。

方 法

Received: June 19, 1991

Accepted: September 2, 1991

Abbreviations: GKL *grand keyhole limpet*; KLH *keyhole limpet hemocyanin*; PRIST *paper radioimmunosorbent test*; RAST *radioallergosorbent test*

1. 抗原作成

市販の GKL、あわびおよび鰹をブレンダーで破碎し、その湿重量が10%になるように蒸留水を加え、48時間ロータリーミキサーにて攪拌し、抗原を抽出した。

抽出後、 $10000\times g$ 、30分遠心し、得られた上清を濾過し、その濾液に分液ロートで1/2量のジエチルエーテルを加え2回脱脂処理を行った。次に、分液ロートでジエチルエーテルを除去し、透析した後、凍結乾燥して粗抗原を得た。この粗抗原を随時溶解し実験に使用した。溶解後の各々の抗原液の蛋白量はウシ血清アルブミンを標準とした protein assay 法 (BIO-RAD) にて測定した。なお、鯉に関しては、症例1がアナフィラキシー発症時に GKL と同時に鯉を摂取していたため、確認のため抗原を作成した。

2. プリックテスト

プリックテストは、上記方法にてえられた凍結乾燥抗原を50%グリセリン加生理的食塩水にて溶解したものをを用いて行った。それぞれの蛋白濃度は、GKL が $490\mu\text{g/ml}$ 、あわびが 1.6mg/ml 、鯉が $380\mu\text{g/ml}$ であった。なお、プリックテストは3名の気管支喘息児と3名の健康成人についても行った。

3. 総 IgE 抗体及び特異 IgE 抗体の測定

血清総 IgE は、Phadebas IgE PRIST kit (Pharmacia 社) を用いて測定した。

特異 IgE 抗体は、上記方法にて抽出作成した抗原を、宮本や Ceska の方法³⁾⁴⁾に従い disc に結合させ、その disc を用いて RAST 法にて測定した。すなわち cyanogen bromide で活性化した直径6mmの paper disc (東洋濾紙 No. 6) に、各々の抗原を加え、coupling させ、次にこの disc に患者血清 $50\mu\text{l}$ を加え3時間 incubate した後、洗浄し、 ^{125}I anti-IgE と18時間 incubate した。再び洗浄後、paper disc に結合した radioactivity をガンマカウンター (Aloka 社製, auto well system, JDC-755) で測定した。判定は、RAST キット付属の標準血清および標準 disc を用いた場合のカウント数から RAST score 0, 1, 2, 3, 4 で表示した (Phadebas RAST kit, Pharmacia 社)。

4. RAST inhibition test

RAST inhibition test は、作成した抗原を dilution buffer (0.05M phosphate buffer, 0.9% NaCl, 0.3% bovine serum albumin, 0.05% NaN_3 , 0.1% Tween 20, pH 7.4) にて $500\mu\text{g}$ より10倍の希釈系列で希釈し、それぞれを同量の患者血清と混合し 37°C 、3時間 incubate し、GKL の disc に上記混合液 $50\mu\text{l}$ を加え、以後 RAST 法と同様の操作を行った。なお、コントロールとしては抗原液の代わりに dilution buffer のみを使用し、そのカウントをもとに抑制率を計算し、%で表示した。また、これらの実験は全て duplicate で行い、そ

1. SDS-PAGE

sample + sample buffer (2ME, SDS)
 95°C , 5min

8% SDS-PAGE mini gel (TEFCO)
electrophoresis 18 mA

2. Transfer to nitrocellulose membrane

180mA, 1hr

3. Immunochemical staining

patient's serum ($\times 2$)

incubation

24hr, at room temperature

HRP conjugated goat anti-human

IgE antibody ($\times 1000$)

incubation

6hr, at room temperature

substrate: 4-chloro-1-naphthole

Fig. 1. Flow sheet for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting.

の平均値を求めた。

5. Immunoblotting

GKL の抗原活性については、immunoblotting 法にて検討した (Fig. 1)。すなわち、作成した GKL の抗原を、sample buffer (0.5M Tris/HCl, 2 mercaptoethanol, 0.05% BPB, pH 6.8) で希釈し、 95°C 、5分間煮沸後、TEFCO 社製 8% SDS-PAGE mini を用いて 18mA にて電気泳動した。つづいて泳動された蛋白を、ゲルからニトロセルロース膜に 180mA、1時間で転写し、blocking buffer (3%ゼラチン Tris buffer) でブロッキング処理した後、抗体 buffer (1%ゼラチン, Tris buffer) にて2倍に希釈した患者血清を加え、室温にて24時間 incubate した。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体 (DAKO 社) を加え、室温にて6時間 incubate し、再び洗浄後、4-chloro-1-naphthole を substrate とした発色液にて発色させた (イミュンブロットアッセイキット, BIO-RAD)。なお、分子量を求めるため低分子域スタンダード (LMW kit E, Pharmacia 社製) を用いた。

症 例

症例の背景は (Table 1) のごとくである。症例は3歳~49歳、平均17.1歳で、男性8例、女性3例の計11例であった。これらの症例のなかには、兄弟が1組、親子が2組含まれている。また調べられた範囲では、

Table 1 Background of patients

Case(No)	Age	Sex	Present and past history
1	11	F	BA, AD
2	9	M	AD
3	11	M	BA
4	27	M	BA, AR, AD
5	3	M	BA, AR, urticaria
6	18	M	AR, AD
7	49	F	AR
8	7	M	BA, AR
9	7	M	?
10	34	M	BA, urticaria
11	12	F	BA, AR

BA: bronchial asthma AD: atopic dermatitis
AR: allergic rhinitis

全例既往歴としてアレルギー疾患を有しており、気管支喘息が7例、アレルギー性鼻炎が6例、アトピー性皮膚炎が4例、蕁麻疹が2例にみられた(重複例あり)。

症 状

各症例の GKL 摂取後の症状については、おもに蕁麻疹、喘鳴、呼吸困難などが認められた (Table 2)。症状はほとんどが GKL 摂取後 5 分から 30 分で出現しており、特に蕁麻疹および血管性浮腫は 11 例中 8 例にみられている。また喘鳴あるいは呼吸困難も 8 例にみられ、特に 1 例目は呼吸不全のため挿管し、人工呼吸を行い、かろうじて救命しえた。また、6 例目もショック症状を認めたが、輸液、抗ヒスタミン剤、ステロイド剤等の投与で軽快した。その他の症例も輸液、抗ヒスタミン剤などの投与により症状は軽快している。

結 果

1. プリックテスト (Table 3)

施行しえた 9 例中 7 例において、GKL に対してプリック反応陽性を示し、1 例は疑陽性、1 例は陰性であった。なお、気管支喘息児および健康成人におけるプリックテストは陰性であった。

2. 血清総 IgE

測定しえた 8 例の総 IgE 値は、131IU/ml から 1100 IU/ml、平均 553.6IU/ml であり、全例高値を示した。

Table 2 Signs and symptoms

Case(No)	Symptomes
1	shock, urticaria, respiratory failure
2	urticaria
3	urticaria, dyspnea
4	urticaria, chill, dizziness, dyspnea
5	wheezing, angioedema, eye injection
6	shock, dyspnea
7	urticaria, dyspnea
8	dyspnea, general fatigue
9	vomiting
10	urticaria, angioedema
11	urticaria, dyspnea

Table 3 Laboratory findings

Case (No)	Prick skin test(GKL)	Total IgE (IU/ml)	RAST	
			GKL	Abalone
1	+	1,100	4+	2+
2	+	n.d	3+	2+
3	+	272	2+	2+
4	-	n.d	3+	2+
5	+	131	2+	2+
6	+	900	3+	2+
7	n.d	239	1+	2+
8	±	776	2+	3+
9	n.d	n.d	2+	2+
10	+	211	n.d	n.d
11	+	800	4+	4+

3. 特異 IgE 抗体

測定しえた 10 例の GKL に対する特異 IgE 抗体は全例陽性で、特に症状の強かった症例 1 では、RAST score は 4 であった。また同時に施行したあわびに対する特異 IgE 抗体も全例陽性を示したが、GKL に比較してあわびの RAST score は低い傾向を示した。

4. RAST inhibition test

GKL の disc を用いた RAST inhibition test の結果 (Fig. 2) は、症例 1 と 2 のプール血清について、GKL、あわびおよび keyhole limpet hemocyanin (以下 KLH) は、容量依存的に抑制を認め、50% inhibition に要する GKL の抗原量は 40 μ g で、あわびおよび KLH の抗原量は 140~150 μ g であった。しかし、同時に施行した鯉による RAST inhibition test ではまったく抑制は認められなかった。以上より GKL とあわびおよび KLH は共通抗原性があることが確認された。

5. Immunoblotting (Fig. 3)

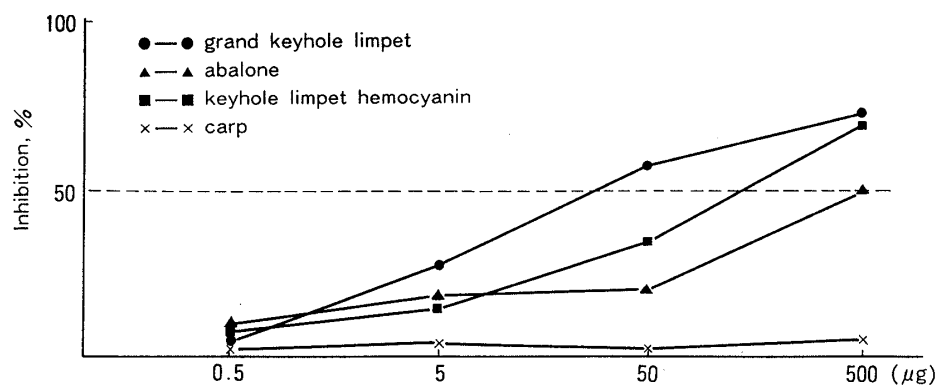


Fig. 2. Inhibition of GKL RAST with GKL, KLH, abalone and carp extracts. The sera were from 2 patients with positive RAST to GKL.

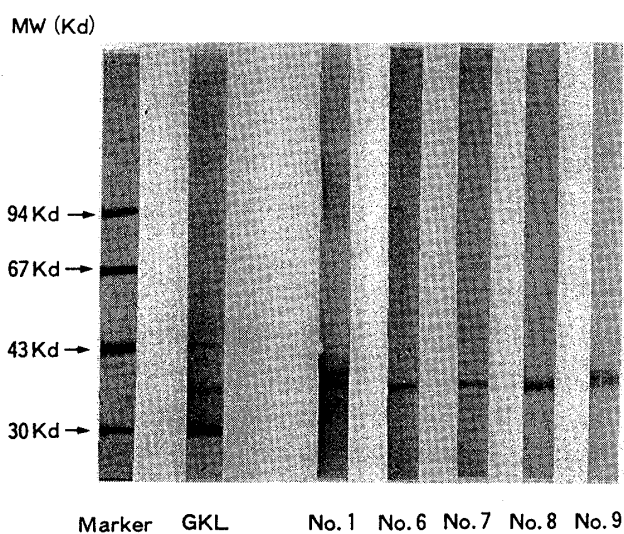


Fig. 3. Fractionation of GKL extract by SDS-PAGE and identification of IgE-binding components of GKL extract by immunoblotting.

No. 1~9; patients sera

MW markers 94Kd; phosphorylase b, 67Kd; bovine serum albumin, 43Kd; ovalbumin, 30Kd; carbonic anhydrase.

immunoblotting 法を用いた抗原活性の検討では、電気泳動後における BCB (Brilliant Coomassie Blue) の染色では、GKL の蛋白は12本のバンドとして染まり、IgE 抗体はその内の1本~6本のバンドに結合した。特に分子量38Kd 前後のバンドは、施行した5例の患者血清全てに陽性となり、80Kd 前後のバンドも陽性率が高かった。また RAST score が高い患者ほど陽性のバンド数が多く、染色の程度も強かった。

考 案

貝による adverse reaction の報告は散見されるが、多くの場合は細菌やウイルス、またはサキシトキシンのような貝毒^{5)~7)}によるもので、胃腸障害が主要症状であり、アナフィラキシーの報告⁸⁾は稀である。あわびによる adverse reaction としては、その肝臓を摂取後光線過敏症を示した例が報告⁹⁾されているが、特にあわびによるアレルギー反応としては、わずかに Clarke の報告¹⁰⁾があるのみである。Clarke の報告によれば、患者はあわびを採取する漁師と、あわび工場の労働者の親で、症状はともに枯草熱症状を呈していた。本邦では GKL やあわびによる即時型アレルギー反応の報告はみられなかったが、我々が第38回アレルギー学会でラパス貝によるアレルギーの4症例を報告した後、各地より同様の症例の報告がみられ、今回11例目となった。また、十字らが、GKL による食餌依存性運動誘発アナフィラキシーの1症例を報告¹¹⁾しており、今後とも増加する可能性が考えられる。1986年のハワイにおける GKL の中毒事件¹⁾では、中毒とアレルギーの両面から検討されたが、その原因は明らかにはならなかった。ただし、この貝にはヒスタミンやグルタミンソーダが含まれていなかったことが確認されたことから、含有するヒスタミンによる直接反応やグルタミンソーダによる adverse reaction ではないことが明らかとなった¹²⁾。今回の我々の検討では、いずれの症例も、その臨床症状、摂取後から発症までの時間、ブリックテスト、RAST の結果より即時型アレルギーによるものと考えられた。またこの種の貝は免疫学の実験に用いる KLH の原料としても知られており¹³⁾、RAST inhibition test の結果より GKL は KLH と共通抗原

性があることが確認された。また, immunoblotting から, GKL の抗原性を有する蛋白の分子量としては, 38 Kd 前後が主で, 次に80Kd 前後が陽性率が高く, これらが主要抗原であると考えられた。しかし, 患者により IgE が結合する蛋白が異なり一様ではなく, 患者による抗原認識の多様性が示唆された。

近年, 流通の拡大により外国から様々な食品が大量に輸入され, また食品添加物も多岐に渡り, 農薬など, 食物に関する問題は山積みとなっている。さらに気管支喘息などのアレルギー疾患も増加しており, 今までに報告されていなかった食物によるアナフィラキシーを含めた adverse reaction の可能性を考慮する必要性がでてきた。今回経験したラパス貝 (GKL) は, あわびと同様原始的の巻貝で, あわびに比べ殻長は少々小さいが, 味・歯ざわりがあわびと似ていて, 近年安いあわびとして輸入されており, 寿司食などの流行にともない, 年々その量は増加しつつある。今後は, 特に感作原性のある KLH と共通抗原性を有する GKL については, アレルギー疾患の既往のある患者には, その摂取について十分な注意が必要であろう。

文 献

- 1) The Honolulu Advertiser, Tuesday, December 16, 1986. Jade brand shellfish in recall here. A-6.
- 2) Morikawa, A., Kato, M., Tokuyama, K., Kuroume, T., Minoshima, M. and Iwata, S.: Anaphylaxis to grand keyhole limpet (Abalone like shellfish) and abalone. *Ann. Allergy* (in press).
- 3) 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, 584-593, 1973.
- 4) Ceska, M., Eriksson, R. and Varga, J.: Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 1-9, 1972.
- 5) 熊沢教真: 腸炎ビブリオと汽水産貝類の相互作用. *Modan Media* 34, 352-360, 1988.
- 6) 安本 健: 生物トキシンの分子構造と活性発現機構, 下痢性貝毒. *最新医学* 43, 1172-1177, 1988.
- 7) Acres, J. and Gray, J.: Paralytic shellfish poisoning. *Canadian Med. J.* 119, 1195, 1978.
- 8) 平泉泰久, 近藤富雄, 安田寛二, 西田 隆, 藤井秀比古: つぶ貝によるアナフィラキシーショックの 1 例. *アレルギーの臨床* 9, 44-45, 1989.
- 9) Hashimoto, Y., Naito, K. and Tsutsumi, J.: Photosensitization of animal by the viscera of abalone, *Haliotis* Spp. *Bull. Jap. Socio. Sci. Fisheries.* 26, 1216, 1960.
- 10) Clarke, P.S.: Immediate respiratory hypersensitivity to abalone. *Med. J. Australia* 30, 623, 1979.
- 11) 十字文子, 高嶋宏哉, 須甲松伸, 土肥 真, 高石敏明, 他: 巻貝が関与した食餌依存性運動誘発アナフィラキシー. *アレルギー* 39, 1515-1522, 1990.
- 12) Hokama, Y.: Allergic-like illness associated with consuming baby abalone like shellfish. Report of Hawaii State, Department of Health (DOH), January, 1987.
- 13) Osborne, D.P. and Katz, D.H.: Antigen-induced deoxyribonucleic acid synthesis in mouse lymphocytes. *J. Immunol.* 111, 1164-1175, 1973.

11 CASES OF ANAPHYLAXIS CAUSED BY GRAND KEYHOLE LIMPET (ABALONE LIKE SHELLFISH)

Shozo Maeda, Akihiro Morikawa, Masahiko Kato, Yoichi Motegi, Makoto Shigeta,
Kenichi Tokuyama and Takayoshi Kuroume

Department of Pediatrics, Gunma University School of Medicine

Yuji Naritomi, Kazuhisa Suehiro and Kimihiro Kusaba
Department of Medicine, Munakata Ishikai Hospital

Muneo Minoshima
Department of Pediatrics, Matsumoto Kyoritsu Hospital

Shun Iwata
Kumagaya Children's Hospital

We reported 11 cases of patients who developed moderate to severe anaphylactic reactions induced by the ingestion of grand keyhole limpet (GKL) and abalone.

Specific IgE-mediated hypersensitivity to these shellfish was demonstrated by history, skin prick test, RAST and immunoblotting. The RAST inhibition technique revealed crossantigenicity between GKL, abalone and keyhole limpet hemocyanin. By immunoblotting analysis, the major antigens of GKL are shown in the MW range of about 38 Kd and 80 Kd.