

〔速 報〕

小麦アレルゲンとパイナップル由来酵素ブロメラインの交叉反応性

東京学芸大学生生活科学科食物学研究室

田辺創一 手崎彰子 渡辺道子

国立相模原病院臨床研究部

柳原行義

小麦アレルギー患者はグルテン感受性と水溶性画分感受性に分けられた。このうち、水溶性画分感受性の患者のみ、パイナップル由来酵素 bromelain を IgE-binding epitope として交叉認識した。bromelain は papain など他の SH 酵素との相同性が高いことから、小麦アレルギー患者はさまざまな SH 酵素を epitope として認識する可能性が示唆された。

Key words: bromelain — cross reactivity — glycochain — wheat allergen

緒 言

報告する。

食物アレルギー患者数は年々増加しており、近年、卵、牛乳、大豆の3大アレルゲンだけでなく、米や小麦などの穀物に起因するアトピー性皮膚炎に難治例が多く、その増加が注目されている¹⁾。食物アレルギーの治療には除去食が効果的であるが、患者はその食品を摂取できないことになる。この問題の解決のため、著者らは、低アレルゲン米²⁾⁻⁵⁾および低アレルゲン小麦粉⁶⁾を開発してきた。

小麦アレルギー患者の多くはグルテンに感受性を示した⁶⁾ことに着目し、著者ら⁷⁾⁸⁾は、グルテンから主要なアレルゲン性フラグメントを単離し、(S-Q-Q-Q-(Q)-P-P-F)₄と構造決定した。この構造はパイナップル由来酵素である bromelain により容易に分解された。小麦グルテン感受性の患者血清を用いる IgE-ELISA により⁹⁾、bromelain 処理粉のアレルゲン性は検出限界以下にまで低下していることが確認された。さらに、低アレルゲン化小麦粉作製の実用的工程を確立し、それを用いた製パン条件を明らかにした⁹⁾。

本研究では、bromelain 処理による低アレルゲン化小麦粉を、グルテン感受性患者以外に水溶性画分感受性患者にも適用可能か否かを IgE-ELISA により判定した。その結果、水溶性画分感受性患者は bromelain をも抗原として認識する可能性が示唆されたので、小麦水溶性抗原と bromelain との交叉反応性について

方 法

小麦粉の分画

小麦粉10gに水100mlを加え、30分間攪拌後、5000×gで20分間遠心分離した。上清を凍結乾燥し、得られた粉末を水溶性画分とした。グルテンはグルテンボールとして調製した。

患者血清

小麦アレルギーによるアトピー性皮膚炎と診断された患者¹⁰⁾6名(Table 1A, Bでは患者A~Fと表記し、同じアルファベットのものとは同一患者を示す)の血清をアッセイに供した。全員の患者から、口頭により、インフォームド・コンセントを得た。

bromelain 処理粉

薄力粉(クレオパトラ, 昭和産業)に対粉1%の bromelain (製品名 bromelin, 1030Tyr units/mg, 和光純薬)を作用させ、既法⁹⁾に従って低アレルゲン化小麦粉を作製した。

bromelain の精製

上述の bromelain を Murachi¹¹⁾の方法に準じて SH 基アフィニティークロマトおよび逆相 HPLC により精製した。bromelain 500mg を Thiopropyl-Sephrose 6B (Pharmacia) カラム (1×30cm) に供した。非吸着画分を1mM EDTA・0.1M NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 135ml で溶出させた後、吸着画分を1mM EDTA・20mM dithiothreitol を含む

Received: June 6, 1997

Accepted: October 20, 1997

0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 180ml で溶出した。クロマト時の流速は54ml/時、温度は4°Cとした。溶出画分を透析後、凍結乾燥し、ODS カラム (Polymer C18, YMC) を接続した HPLC でさらに精製した。条件は、移動相、0.1%TFA-メタノールのグラジエント (30~80%)；流速、1ml/分；温度、22°C；検出、UV 225nm とした。メインピークを分取し、リクロマトを行い、精製 bromelain とした。これを Laemmli の方法 (1970) に従って、10~20%濃度勾配のポリアクリルアミドゲル (第一化学) を用いて電気泳動を行った。泳動後、クーマシーブリリアントブルー (R-250, Sigma) で染色した。

IgE-ELISA

被験試量を4M urea-0.1M Tris HCl 緩衝液 (UTH 緩衝液, pH 7) に100 μ g protein/ml 濃度となるように溶解し、抗原として96穴プレート (Corning) にコートした。患者血清を PBS で5~25倍に希釈し、1次抗体とした。対照として健常人の血清を用いた。2次抗体としてビオチン化ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (Kirkegaard & Perry Lab.), 標識抗体として streptavidin-peroxidase conjugate (Boehringer Mannheim), 発色試薬として *o*-phenylenediamine (和光純薬) を用いた。その他は常法¹³⁾に従って行った。感受性は back-

ground (健常人の血清における値 (常に<0.01であった)) を差し引いた490nm の吸光値で示した (Table 1)。測定は duplicate で行った。

IgE-ELISA inhibition 法による交叉反応性の検討

小麦粉水溶性抗原あるいは bromelain を UTH 緩衝液に1mg/ml 濃度となるように溶解し、抗原として96穴プレートにコートした。患者 C, D, E, F のプール血清に inhibitor (終濃度: 0, 1, 10, 100, 1000 μ g/ml) を加え、25°C 1時間 preincubate した。小麦粉水溶性抗原をコートしたのものに対しては inhibitor として bromelain を添加したものを、bromelain をコートしたのものに対しては inhibitor として小麦粉水溶性抗原を添加したものを1次抗体とし、残存した IgE 抗体価を前述と同様の ELISA 法により測定した。結果は、inhibitor 無添加のときの吸光値を1として表わした。ホモロジー検索

Fast Homology Search CDS プログラム (GenBank) を用いて行った。

結果および考察

IgE-ELISA により、被験患者を i) グルテンに感受性を示す、ii) 水溶性画分に感受性を示す、iii) 両者ともに感受性を示すの3群に分けた。その結果、Table 1A に示すように、i) が2名 (A, B), ii) が3名 (C, D, E), iii) が1名 (F) と判定された。次に、各患者の血清を用いて bromelain 処理粉のアレルゲン性を測定した。その結果、Table 1B に示すように、グルテン感受性の2名 (A, B) では ELISA 値が検出限界以下であったが、水溶性画分感受性の2名 (D, E) および両者感受性の1名 (F) では高値を示し、しかも、原料小麦粉よりもアレルゲン性が高いと判定された。本邦でパイナップルアレルギーの症例は報告されていない。しかし、安全性の見地から bromelain 処理粉を水溶性画分抗原に感受性を示す患者に適用するのは好ましくないと結論し、bromelain 処理粉に含まれる bromelain そのものがアレルゲン性を有する可能性について検証した。

bromelain をアフエニティクロマトおよび逆相 HPLC により精製し、SDS-PAGE で精製度の確認を行った (Fig. 1A, bromelain に特徴的な2本のバンドが得られた⁹⁾)。精製 bromelain のアレルゲン性を測定したところ、小麦粉水溶性画分に感受性を示す患者で

Table 1

(A) Sensitivities of patients for water-soluble and gluten fractions

Patients	OD _{490nm}	
	Water-soluble	Gluten
A	0.07	0.42
B	0.04	0.41
C	0.31	0.06
D	0.22	0.03
E	0.15	0.05
F	0.25	0.14

(B) Sensitivity of patients for intact wheat flour, the bromelain-treated flour, and bromelain

Patients	OD _{490nm}		
	Wheat flour	Bromelain-treated flour	Bromelain
A	0.24	<0.02	<0.02
B	0.25	<0.02	<0.02
C	0.20	0.11	0.04
D	0.20	0.25	0.16
E	0.19	0.37	0.65
F	0.21	0.58	1.26

(A)



(B)

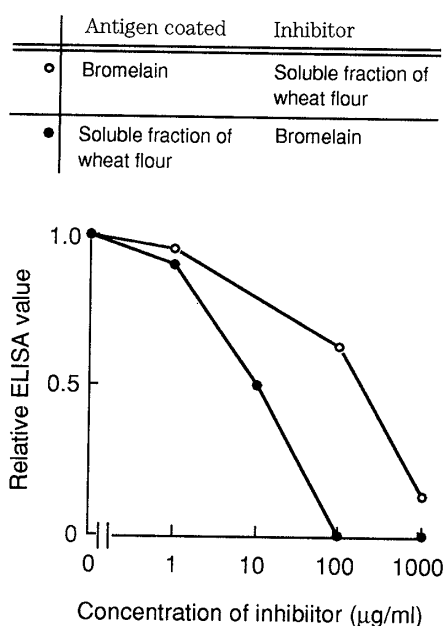


Fig. 1. (A) SDS-PAGE analysis of the purified bromelain. A mixture of rabbit muscle phosphor-ylase b (MW 97k), bovine serum albumin (MW 67 k), ovalbumin (MW 43k), bovine carbonic anhy-drase (MW 31k), soybean trypsin inhibitor (MW 22 k) and hen's egg lysozyme (MW 14k) was used as the molecular-weight markers. (B) IgE-ELISA inhibition analysis of bromelain and soluble frac-tion of wheat flour to confirm the crossreaction between these two antigens.

のみ、アレルゲン性が認められた (Table 1B). さらに、小麦粉水溶性抗原と bromelain の交叉反応性を明らかにするために、両者の IgE-ELISA inhibition 試験を小麦粉水溶性画分に感受性を示す患者血清を用いて行った. Fig. 1B に示したように、血清 IgE 抗体と小麦粉水溶性抗原との結合は bromelain により阻害され、同様に、血清 IgE 抗体と bromelain との結合は小麦粉

水溶性抗原により阻害された. 一方、血清 IgE 抗体と bromelain との結合はグルテンによって阻害されなかつた. さらに、健常人の血清では阻害がかからないことも確認された. 従って、小麦粉水溶性抗原と bromelain の交叉反応性が証明された.

次に、既知の小麦水溶性アレルゲンである α -amylase inhibitor と bromelain との間に相同性があるか否かをホモロジー検索プログラムで調べた. その結果、 α -amylase inhibitor と bromelain との間に相同性は認められなかつた. 従って、これまでに報告されていないアミノ酸配列が IgE-binding epitope となっているものと考えられた. また、パイナップルアレルギーの症例がないことから、この IgE-binding epitope は消化酵素により容易に分解されるとも考えられる. しかし、全身状態が悪く消化機能が低下している場合などでは、bromelain がアレルゲンとなる可能性がある. さらに、bromelain は papain など他の SH 酵素との相同性が高いことを考えると、小麦アレルギー患者が bromelain を抗原として交叉認識するという知見は重要な意味をもつ.

bromelain の糖鎖構造がアレルゲン性を示す可能性も考えられる. 最近、オリーブ花粉アレルギー患者において、bromelain をはじめとするタンパク質中の oligomannose 型糖鎖構造がアレルゲンとなり得ることが報告された¹⁴⁾. 小麦粉においても、水溶性アレルゲンは α -amylase inhibitor などのタンパク質に限定されないと予想されることから、bromelain 中の糖鎖構造についてのさらに詳細な検討が必要と考えられる.

結 論

小麦アレルギー患者をグルテン感受性と水溶性画分感受性に分けたとき、水溶性画分感受性の患者のみ、bromelain を IgE-binding epitope として交叉認識した.

文 献

- 1) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣義彰, 稲本 真, 駒田英勝, 他: アトピー性皮膚炎患者における食餌性アレルゲンの検討. 小児科臨床 38, 2545-2560, 1985.
- 2) 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.
- 3) Watanabe, M., Yoshizawa, T., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Abe, K., et al.: Quality improvement and evaluation of hypoallergenic rice grains. *J. Food Sci.* **55**, 1105-1107, 1990.
 - 4) Watanabe, M.: Hypoallergenic rice as a physiologically functional food. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 125-128, 1993.
 - 5) Swinbanks, D. and O'Brien, J.: Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature* **364**, 180, 1993.
 - 6) Tanabe, S. and Watanabe, M.: Enzymatic treatment of wheat flour to regulate wheat-sensitive allergy and the fabrication of hypoallergenic wheat products. *Recent Research Developments in Agricultural & Biological Chemistry* **1**, 83-99, 1997.
 - 7) Watanabe, M., Tanabe, S., Suzuki, T., Ikezawa, Z. and Arai, S.: Primary structure of an allergenic peptide occurring in the chymotryptic hydrolysate of gluten. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1596-1597, 1995.
 - 8) Tanabe, S., Arai, S., Yanagihara, Y., Mita, H., Takahashi, K., et al.: A major wheat allergen has a Gln-Gln-Gln-Pro-Pro motif identified as an IgE-binding epitope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 290-293, 1996.
 - 9) Tanabe, S., Arai, S. and Watanabe, M.: Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1269-1272, 1996.
 - 10) Tanabe, S., Tesaki, S., Yanagihara, Y., Mita, H., Takahashi, K., et al.: Inhibition of basophil histamine release by a haptenic peptide mixture prepared by chymotryptic hydrolysis of wheat flour. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 492-495, 1996.
 - 11) Murachi, T.: Bromelain enzymes. *Methods Enzymol.* **45**, 475-485, 1976.
 - 12) Walsh, B.J. and Howden, M.E.: Epitope mapping of allergens for rapid localization of continuous allergenic determinants. *Methods Enzymol.* **203**, 301-311, 1991.
 - 13) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
 - 14) Batanero, E., Villalba, M., Monsalve, R.I. and Rodriguez, R.: Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: Evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 1264-1271, 1996.

CROSS-REACTIVITY BETWEEN BROMELAIN AND SOLUBLE FRACTION FROM WHEAT FLOUR

Soichi Tanabe, Shoko Tesaki and Michiko Watanabe

Food Science Laboratory, Faculty of Education, Tokyo Gakuji University

Yukiyoshi Yanagihara

Clinical Research Center for Allergy, National Sagamihara Hospital

It is revealed that patients allergic to a water-soluble fraction from wheat flour were sensitive to pineapple enzyme, bromelain. Since bromelain has a high similarity to other SH-proteases such as papain, it may imply that the patients may recognize varieties of other SH-proteases as the epitope.