

カゼイン加水分解乳の抗原性

カゼイン加水分解乳に感作されて消化管アレルギー反応を

呈した症例における感作アレルゲンの検討

千葉大学医学部小児科

下条直樹 清水直樹 平野清美

河野陽一 新美仁男

カゼイン加水分解乳は、低抗原性でミルクアレルギーの治療に用いられる。今回我々は、ミルクアレルギーの治療乳として用いたカゼイン加水分解乳により新たに感作され、消化管アレルギーを呈した6カ月の男児を経験した。enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により本患者の血清中には、カゼイン加水分解乳に対する IgE 抗体が検出されたが、脂肪無添加のカゼイン加水分解乳に対する IgE 抗体は認められなかった。この結果を *in vivo* で確認するために、抗原の経直腸投与による直腸粘膜細胞診における好酸球および肥満細胞の出現を検討した。アミノ酸乳および脂肪無添加カゼイン加水分解乳の投与では直腸粘膜スミアに好酸球および肥満細胞は出現せず、カゼイン加水分解乳の投与により好酸球、肥満細胞数が有意に増加した。以上の結果から、本患者の消化管アレルギーの原因抗原はカゼイン加水分解中の脂肪に含まれる成分であることが強く示唆された。

Key words: casein hydrolyzed formula — IgE antibodies — fat — intestinal allergy

はじめに

カゼイン加水分解乳は抗原性が低く、しばしばミルクアレルギーの治療に用いられる。しかし、一部のミルクアレルギー患者は、カゼイン加水分解乳に対してもアレルギー反応を呈する。これは、ミルク中の蛋白に対して産生された IgE 抗体の認識する抗原決定基が加水分解乳中にも存在するためと考えられている。すなわち、これらの症例における加水分解乳に対するアレルギーは、ミルク中の蛋白によって誘導された IgE 抗体によって惹起されており、加水分解乳に固有の成分により感作を受けたものではない。今回我々は、新たにカゼイン加水分解乳により感作されて消化管アレルギーを呈したと考えられるミルクアレルギーの症例を経験した。本症例におけるカゼイン加水分解乳中の対応アレルゲンを解析したので報告する。

症 例

患者は6カ月の男児で下痢を主訴として、平成2年8月24日に千葉大学医学部小児科に入院となった。この患者の入院までの経過を Fig. 1 に示す。患者は、母乳で育てられていたが、月齢4カ月時、市販の粉ミルクを飲んだ後に嘔吐するエピソードが3回あった。そのため当科を受診し、便粘液スミア上の好酸球の著増とミルクに対する radioallergosorbent test (RAST) が陽性であることから、ミルクアレルギーが強く疑わ

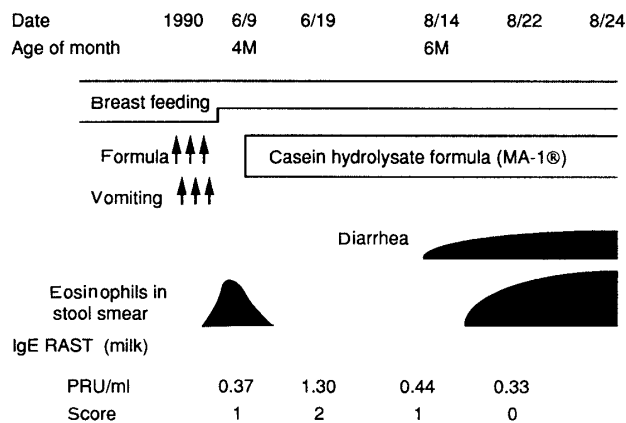


Fig. 1. Clinical course before admission.

Received: February 3, 1992

Accepted: May 13, 1992

Abbreviations: ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; PBS phosphate-buffered saline; RAST radioallergosorbent test

れた。母は妊娠中と出産後と1日400ml程の牛乳を摂取していた。家族のアレルギー歴としては、父に花粉症を認めるのみである。患者は、ミルクをカゼイン加水分解乳であるMA-1ミルク(森永乳業)に変更して消化器症状、便粘液好酸球とも消失し、ミルクに対するRAST値も低下した。しかし、MA-1を開始して2カ月経った月齢6カ月頃から特に誘因なく下痢が出現し、便粘液好酸球も再び出現してきたため精査、加療を目的に入院となった。

入院時の検査(Table 1)では、特に末梢血に好酸球数の増多はなく、CRPは陰性であった。血清総IgEは低値で、ミルクに対するRASTスコアも0となっていた。便潜血、クリニテストは陰性、病原性細菌、ウイルス抗原とも調べた範囲内では検出できず、便粘液好

酸球のみが多数認められた。

Fig. 2に入院後の経過を示す。入院後、MA-1をアミノ酸合成乳のエレンタールP(森下製薬)に変更したが、下痢の改善は認められなかった。そこで、アミノ酸乳である605Zミルク(明治乳業)に変更したところ、下痢の改善と便粘液好酸球の減少がみられた。しかし、605Zの濃度をあげるにつれ、再び下痢が増悪した。経口のDSCGを開始したが改善なく、高浸透圧性の下痢を考えて浸透圧の低い改良型605Zに変更したところ下痢は消退し、便粘液好酸球も消失した。その後、経口DSCGと改良型605Zミルクにて順調に経過している。

臨床経過ならびに検査結果から、本症例はその低抗原性にもかかわらず、新たに加水分解乳によって感作されたと考えられた。そこで、本症例におけるアレルゲンを以下のように検討した。

Table 1 Laboratory findings on admission

WBC	$9.5 \times 10^3 / \text{mm}^3$	Serology :	
baso.	1 %	CRP	<0.3 mg/dl
eosino.	2 %	IgE RIST	4.1 IU/ml
seg.	11 %	IgE RAST (milk)	
lymph.	83 %		0.33 PRU/ml
mono.	2 %		(score 0)
RBC	$449 \times 10^4 / \text{mm}^3$	Stool :	
Hb	11.7 g/dl	occult blood	negative
Ht	34.5 %	Clinitest	negative
Plt	$32.3 \times 10^4 / \text{mm}^3$	culture	negative
Chemistry : WNL		Rotavirus antigen	negative
		Adenovirus antigen	negative
		eosinophils	many

Rotavirus and adenovirus in stool was examined by commercial ELISA kit. RAST value is expressed as Phadebas RAST units (PRU)/ml.

方 法

カゼイン加水分解乳に対するIgE抗体の測定はELISA法により行った。Nunc社(Roskilde, Denmark)96穴ELISAプレートを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原で被覆し、ウェル上の残存する反応部位を0.3%ゼラチンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)によりブロックした。0.1%ゼラチン0.05%Tween20を含むPBSで1:20に希釈した患者血清を反応させ、洗浄後にアルカリフォスファターゼ標識したヤギ抗ヒトIgE抗体(KPL社, Gaithersburg, MD, USA)を加えた。洗浄後、p-nitrophenylphosphateを加えて発色させて、抗原に結合したIgE抗体を検出した。家兎抗MA-1抗体は、MA-1ミルク100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (w/v)とComplete Freund's Adjuvantの混合物(1:1)を3回、家兎の背部に免疫して作成した。

経直腸抗原負荷による直腸粘膜スミア細胞診は以下のように行った。すなわち、通常使用する濃度のミルクを1,000倍に希釈して体重10kgあたり50mlを直腸に注入し、経時的に直腸粘膜スミアを綿棒により採取した(本間ら、投稿中)。ハンセル染色により、採取したスミア上の肥満細胞数と好酸球数を算出した。これらは細胞数により0から4+までのスコアにより示した(Fig. 4の説明を参照)。

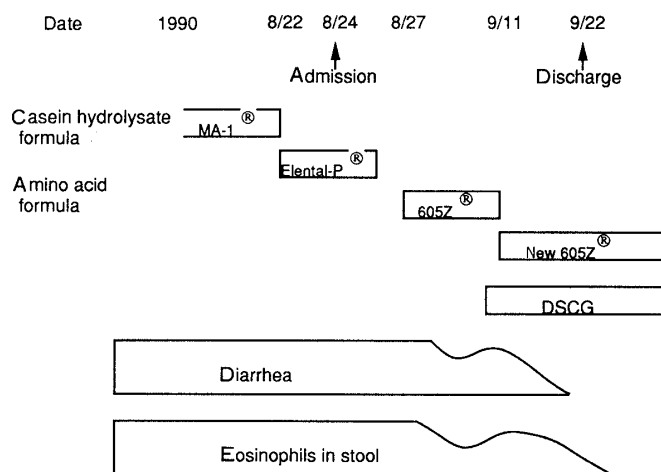


Fig. 2. Clinical course after admission.

結 果

1. MA-1に対するIgE抗体の検出とその推移(Fig. 3)

MA-1を開始した6月にはMA-1に対するIgE抗体は検出されなかったが、下痢が出現してきた8月末(MA-1を摂取して2ヵ月後)に急激にIgE抗MA-1抗体価の上昇が認められた。この抗体価は、MA-1ミルクを中止することにより速やかに低下した。

2. IgE抗体MA-1抗体の特異性

次に、本症のアレルギー反応を誘発したMA-1ミルク中の対応抗原を検討した。MA-1ミルクに含まれる蛋白成分としては、主成分であるカゼイン分解物の他に、脂肪に含まれるごく少量の蛋白成分がある。これらの蛋白成分に対する反応を検討するために、MA-1(脂肪18%)、脂肪成分をほとんど含まない脂肪無添加MA-1(脂肪0.2%)、カゼイン加水分解産物の3者に対する患者血清中のIgE抗体価をELISA法により検討した(Table 2)。対照抗体である家兔抗MA-1抗体がこれら3種の抗原に強く反応していることから、こ

れら抗原が十分にプレートに被覆されていると考えられる。この条件下で、患者血清中にはMA-1に対するIgE抗体のみが検出され、脂肪無添加MA-1およびカゼイン加水分解産物に対するIgE抗体は陰性であった。この結果は、MA-1中の脂肪に含まれる成分がアレルゲンであることを示唆する。

3. 経直腸的抗原誘発試験によるアレルゲンの同定

さらにこの結果をin vivoで確認するために、605Zミルク、脂肪無添加MA-1、MA-1を経直腸的に投与して、経時的に直腸粘膜スミアに出現した肥満細胞数と好酸球数を検討した(Fig. 4)。605Zおよび脂肪無添加MA-1による誘発では、肥満細胞のみが負荷後1~2時間にわたりスコア1とわずかに出現したのみであった。これに対して、MA-1の誘発では、肥満細胞と好酸球が誘発1時間後から4時間にわたって最大スコア4まで大量に出現した。これらのin vitroとin vivoの結果から、MA-1中の脂肪に含まれる成分がアレルゲンであることが強く示唆された。

考 察

本患児は、低抗原性であるといわれるカゼイン加水分解乳に対するアレルギー反応を呈した症例である。現在まで、カゼイン加水分解乳に対してアレルギー反応を示した症例は多くはないが、複数の施設からの報告がある^{1)~6)}。これらの報告例は、すべてミルクアレルギーを発症した患者であり、治療乳としてカゼイン加水分解乳を与えたところ、ほとんどの症例で直ちに下痢、嘔吐をはじめとするアレルギー反応が出現している。これらの患者全員にカゼイン加水分解乳の投与後にミルクに対するIgE抗体が上昇するか、または陽性となっている。これらの報告のうち、花田ら³⁾の症例のみがカゼイン加水分解乳を投与して1週間後にアレルギー症状が出現しているため、彼らは本症例がカゼイン加水分解乳により感作されたものではないかと考えた。しかし本症例では、加水分解乳開始後1週間の症状の出現と同時に、ミルクに対するRASTの陽性化とウェスタンブロッティング法によるカゼイン加水分解乳に対するIgE抗体の出現を認めている。ミルクとカゼイン加水分解乳の両者に対して同時にIgE抗体が陽性化している結果は、ミルク中の成分に対するIgE抗体がすでに微量存在しており、これが加水分解乳中に存在する同一の抗原によりブースター効果を受けた

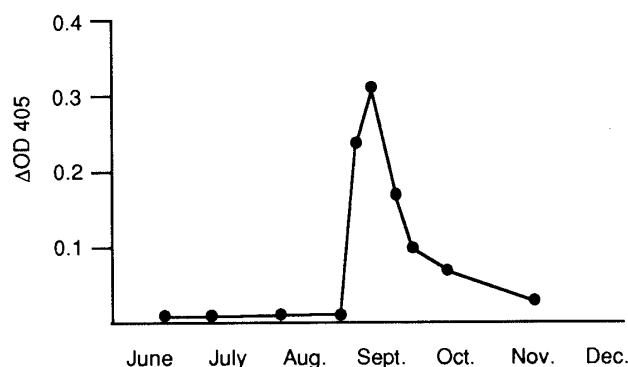


Fig. 3. Time course of IgE antibodies to MA-1. Binding activities of IgE antibodies of patient to MA-1 were shown as ΔOD_{405} (an optical density at 405nm of wells coated with antigen-that coated with 0.3% gelatin).

Table 2 Specificity of IgE antibodies to MA-1

Antigen	MA-1	Fat-free MA-1	Casein hydrolysate
Antibodies			
Patient IgE	0.126*	0.002	0.018
Rabbit anti-MA-1 IgG	1.355	1.951	0.711

*Binding activities of IgE antibodies of the patient to MA-1 and those of rabbit IgG antibodies to MA-1 were shown as ΔOD_{405} (an optical density at 405nm of wells coated with antigen-that coated with 0.3% gelatin).

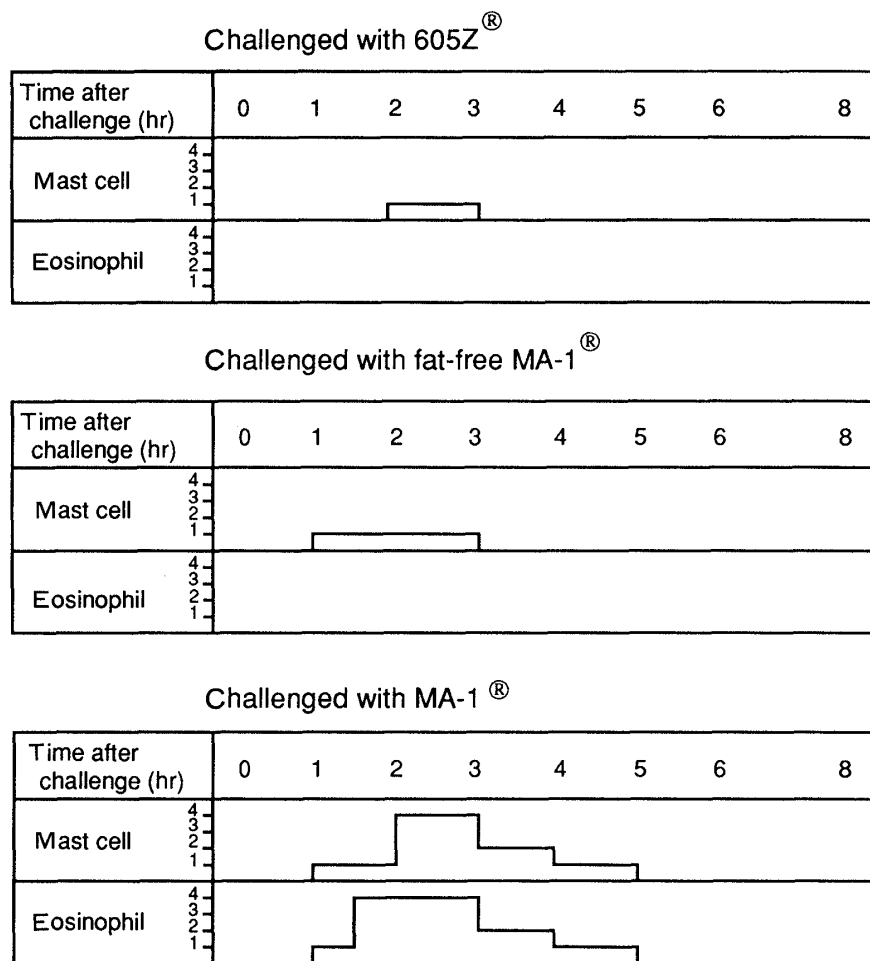


Fig. 4. Numbers of mast cells and eosinophils in rectal smear after rectal challenge with formula. Grading of mast cells and eosinophils in rectal smear is as follows. For mast cells; (on a whole slide) 0: no cells, 1+: a few cells, 2+: a few cells to 19, 3+: 20-29, 4+: >30. For eosinophils; (on a whole slide) 0: no cells, 1+: a few cells, 2+: a few cells to 19, 3+: 20-49, 4+: >50.

可能性も考えられる。このように、これらの従来の報告においては、ミルクとカゼイン加水分解乳の両者に含まれる抗原に対するアレルギー反応が惹起され、カゼイン加水分解乳による新たな感作を受けたのではないと思われる。本症例は、①カゼイン加水分解乳開始後2カ月経ってから消化管アレルギーが発症していること、②MA-1に対するIgE抗体が発症に一致して検出され、経過に伴って抗体価の推移がみられたこと、③ミルクに対するRASTが陰性化していること、などからカゼイン加水分解乳中の特異な抗原により新たに感作されて消化管アレルギーを発症したことが強く示唆される。このようなカゼイン加水分解乳自体による感作の報告は、我々の調べた限りでは認められず、本症例における対応アレルゲンの解析は大変興味あるものと思われる。

本症例では先に述べたようにミルクに対するRASTは、陰性化しており、従来の報告とは異なってミルクには含まれない成分のアレルゲンにより新たに感作されたと考えられる。加水分解された後のカゼインが抗原性を保持している報告もみられるが⁷⁾、本症例においてはカゼイン分解産物に対するIgE抗体は検出されなかった。ELISAおよび経直腸誘発後の直腸粘膜細胞診により、本疾患のアレルゲンがMA-1中の脂肪に含まれる成分であることが強く示唆された。我々は、本患者にMA-1中の脂肪のみによる誘発試験を行ってはいない。しかし、Tween20を含むPBSで洗浄したELISAプレートに結合している物質に対してIgE抗体が検出されたことなどから、脂肪自体がアレルゲンとなっていることは考えづらい。そこで、本患者におけるアレルゲンとしては、2つの可能性が考え

られる。1つは、脂肪中に含まれる微量の蛋白成分がアレルゲンとなった可能性である。他の1つは、MA-1の脂肪とカゼインペプチドからアミノカルボニル反応により生成した複合体がアレルゲンである可能性である。605ZとMA-1の脂肪組成を比較してみると、前者はサフラワー油とシソ油であり、後者はサフラワー油とヤシ油を使用している。我々は、MA-1のみに使用されているヤシ油から超音波を用いて抽出した水溶性成分をマイクロプレートに被覆して、患者血清中にこれに対して結合するIgE抗体が存在するか否かを検討したが、そのような抗体は検出できなかった（未発表）。しかしながら抽出の過程で蛋白成分がどのような修飾を受けているのかは明らかではないため、現在のところ脂肪成分中の蛋白がアレルゲンでないとは結論できない。一方、アミノカルボニル反応による生成物は蛋白と糖の間で作られることが多いが、蛋白と脂肪によっても生成されることが知られている⁸⁾。このようなアミノカルボニル反応による生成物は、普通の牛乳にも含まれていることがわかっており、カゼイン加水分解乳中にも微量ながら存在する可能性が示唆される。

先に述べたように、現在までカゼイン加水分解乳により新たに感作されてアレルギーを発症した報告はない。患児が、なぜそしていつ、カゼイン加水分解乳に感作されたかが問題となろう。患児は、特に下痢等の消化器疾患もないまま、カゼイン加水分解乳開始2ヵ月後にアレルギー性腸炎を発症している。経過を通して消化管の透過性亢進があったと考えられるのは、加水分解乳を始めた直後のみである。おそらく、この時点で患児の腸管の透過性は完全に正常化しておらず、そのため微量の蛋白成分にも感作されたことが考えられる。坂本ら²⁾は、ミルクアレルギーの患児に経口栄養を開始するにあたって、長期にわたる腸管の安静（絶食）が必要であると述べている。今後、ミルクアレルギーの治療乳として低抗原性の加水分解乳を使用するにあたって、下痢が全く改善するまで投与開始を延

すか、または遷延している場合には経口の抗アレルギー剤（経口クロモリンなど）の併用を考慮する必要がある。

脂肪無添加MA-1、カゼイン加水分解物、およびヤシ油からの超音波による抽出物を提供して頂いた森永乳業に深謝します。

文 献

- 1) 有吉允子, 竹内達生, 子安春樹, 久野保夫, 岩村春樹, 他: 難治性下痢症の1例, 小児科臨床 32, 943-947, 1979.
- 2) 坂本龍雄, 野村一史, 花田直樹, 山田政功, 林芳樹, 他: ミルク, 大豆アレルギーによると思われる乳児難治性下痢症の1例, アレルギーの臨床 7, 433-436, 1987.
- 3) 花田直樹, 菊池 哲, 兼子哲一, 吉田 京, 袴田亨, 他: 経母乳感作の関与したと思われる難治性下痢症の1男児例, 日児誌 94, 1012-1016, 1990.
- 4) Lifschitz, C.H., Hawkins, H.K., Guerra, C. and Byrd, N.: Anaphylactic shock due to cow's milk protein hypersensitivity in a breast-fed infant. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7, 141-144, 1988.
- 5) Bock, S.A.: Probable allergic reaction to casein hydrolysate formula. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 272, 1989.
- 6) Saylor, J.D. and Bahna, S.L.: Anaphylaxis to casein hydrolysate formula. *J. Pediatr.* 118, 71-74, 1991.
- 7) Seban, A., Konijn, A.M. and Freier, S.: Chemical and immunological properties of a protein hydrolysate formula. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 840-846, 1977.
- 8) 中村 良: 食品の加工と抗原性, 治療学 25, 43-46, 1991.

ALLERGY TO CASEIN HYDROLYSATE FORMULA
A Study of Sensitizing Allergen

Naoki Shimojo, Naoki Shimizu, Kiyomi Hirano, Yoichi Kohno and Hiroo Niimi
Department of Pediatrics, Chiba University School of Medicine

A six-month old baby, who had been fed for 2 months with casein hydrolysate formula (MA-1) for treatment of milk allergy, developed diarrhea. the baby's RAST score for milk was negative. IgE antibodies to MA-1 but not to MA-1 depleted of lipid (fat-free MA-1), were demonstrated by enzyme-linked immunosorbent assay (ESISA). It was confirmed by the appearance of numerous mast cells and eosinophils in a rectal smear taken after challenge with MA-1 (but not detected after challenge with fat-free MA-1) that some component in the lipid of MA-1 must be an allergen in this patinet.
