

鶏卵即時型過敏反応における卵白 ovomucoid domain 3 特異的IgE抗体価の診断的意義

安藤 仁 志¹⁾ 徳 田 玲 子¹⁾ 森 田 豊²⁾
和田 映 子¹⁾ 近 藤 康 人¹⁾ 宇理須 厚 雄¹⁾
山 田 一 恵³⁾ 松 田 幹⁴⁾
藤田保健衛生大学医学部小児科¹⁾, 刈谷総合病院小児科²⁾
山田医院³⁾, 名古屋大学大学院生命農学研究科⁴⁾

key word : ovomucoid, domain 3, 鶏卵アレルギー, 特異的IgE抗体, 即時型過敏反応

要 旨

ovomucoid (OM), ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme及びOMのthird domain with carbohydrate chain (D3CHO), third domain without carbohydrate chain (D3) の特異的IgE抗体価を測定し, その臨床的意義を検討した. 対象は卵白に対する特異的IgE抗体高値の患児32名. これらの患児に二重盲検法による卵白経口負荷試験を行い即時型過敏反応 (IHR) 陽性群と陰性群に分け検討した. 卵白成分の中でOM特異的IgE抗体価は, IHR陽性群が陰性群に比し高値の傾向にあった ($p<0.1$). またsensitivity, specificity, accuracyは89.5%, 30.7%, 65.6%で他の成分に比し良好であった. 一方, D3CHO, D3の特異的IgE抗体価では, IHR陽性群が陰性群に比し有意に高値であった ($p<0.01$). sensitivity, specificity, accuracy はD3CHOでそれぞれ89.5%, 92.3%, 90.6%, D3では94.7%, 69.2%, 84.4%でOMに比し良好であった. 以上からD3CHO, D3に対するIgE抗体価を測定することは, 卵白によるIHRの診断に卵白や他の卵白成分特異的IgE抗体価よりも有用であることが示唆された.

はじめに

鶏卵は乳幼児期にみられる食物アレルギーの最も頻度が高い原因食物の1つである¹⁾.

また鶏卵アレルギーにおける即時型過敏反応 (以下 IHR) はIgE抗体が強く関与していると考えられている²⁾. しかしながら, 卵白に対する特異的IgE抗体が高値にもかかわらずIHR陰性の症例も存在している.

これらの症例は, 過剰な除去食療法が行われている可能性がある. 鶏卵アレルギーの診断には二重盲検法による経口負荷試験を行うのが最も確実な方法とされている³⁾.

最近, 卵白の成分の中でovomucoid (以下 OM) は熱だけではなく消化酵素にも安定で主要アレルゲンの中でも特に注目されている⁴⁾. 筆者らもpepsin処理OMペプチドを検討し, 鶏卵IHRに関与するエピトープの1部がOMのdomain 3に存在する事を報告した⁵⁾.

今回, 筆者らは, 卵白の成分であるOM, ovalbumin (以下 OA), ovotransferrin (以下 OT), lysozyme (以下 Ly) 及びOMのdomain 3に対するIgE抗体価を測定しその診断における意義を検討した.

対象と方法

a. 対 象

卵白に対する特異的IgE抗体高値 (paper disk法) の患児32名 (アトピー性皮膚炎 21例, アトピー性皮膚炎+気管支喘息 8例, 蕁麻疹 3例) とアレルギー

Abbreviations : D3 ; third domain without carbohydrate chain, D3CHO ; third domain with carbohydrate chain, HPLC ; high-performance liquid chromatography, IHR ; immediate hypersensitive reactions, Ly ; lysozyme, OA ; ovalbumin, OM ; ovomucoid, OT ; ovotransferrin, PBS ; phosphate buffered saline, RAST ; radioallergosorbent test, SDS-PAGE ; sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

疾患を持たない健常小児8名を対象とした。卵白特異的IgE抗体価高値のカットオフ値としては、何らかのアレルギー疾患をもっているが鶏卵アレルギー症状を認めない患児20人（アトピー性皮膚炎 13例、アトピー性皮膚炎＋気管支喘息 5例、気管支喘息 2例）（0歳から10歳）の卵白特異的IgE値（%binding）の平均＋2標準偏差（以下 SD）である。1.9%を用いた⁶⁾。卵白特異的IgE抗体価高値の32名の年齢の平均＋2SDの値は1.7歳±1.4歳、血清総IgE値の平均は951 IU/ml、卵白特異的IgE抗体価は、21.5%であった。なおこれらの症例は全例、Pharmacia CAP-FEIAで測定した卵白特異的IgE抗体価はクラス3以上であった。

さらに凍結乾燥卵白による経口負荷試験を二重盲検法で施行し、IHR陽性群、陰性群に分け検討を行った。

コントロールは、卵白特異的IgE抗体（Pharmacia CAP-FEIA）クラス0でアレルギー疾患をもたない児8名（年齢の平均±SD＝1.7±1.5歳、男児4例、女児4例）とした。

b. 凍結乾燥卵白経口負荷試験

森田ら⁶⁾の方法に従って二重盲検法にて実施した。

c. 卵白ならびに卵白成分に対する特異的IgE抗体価の測定

抗原は、卵白（キューピー株式会社研究所から供与）、OM（キューピー株式会社研究所から供与）、OA（名古屋大学農学部中村教授から供与）、OT（和光純薬工業）、Ly（エーザイ製薬）を用いた。

卵白ならびに卵白成分をcoupling buffer（0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH8.3）で1mg/mlに溶解し、cyanogen bromideで活性化したpaper disk（直径5mm 東洋濾紙No.6）100枚（paper disk 1枚あたり100μgの抗原量）と4℃で一晩反応させた。反応終了後、glycineで4時間、室温でブロックし、さらに、遊離の抗原をcoupling bufferと0.1M酢酸バッファー（pH4.0）で交互に洗浄して除去し、radioallergosorbent test（以下、RAST）diskとして用いた。

特異的IgE抗体価の測定は、作製したRAST diskに患児血清を50μlを添加し室温で一晩静置した。

その後 0.05% Tween20 含有 pH7.2 phosphate buffered saline（以下 PBS-Tween）で4回洗浄し、¹²⁵I-抗ヒトIgE抗体（44.4KBq/ml）（Dainabot K. K.）を50μl添加、室温で一晩静置し反応させた。

その後paper diskをPBS-Tweenで4回洗浄した後、

結合した¹²⁵Iをγカウンター（Packard Co. Ltd）で計測した。¹²⁵I 総カウントに対する各検体のpaper diskについている¹²⁵Iのカウント数の割合（%binding）を求め、特異IgE抗体価とした。%bindingがコントロールの平均＋2SD以上の場合に特異的IgE抗体価高値とした。

d. OM domain3の精製^{7) 8)}

OM（50mg）を2%蟻酸（NH₄HCO₃）（和光純薬）1mlに溶解し、*Staphylococcus aureus* V8 protease（SIGMA-ALDRICH Fine Chemicals）0.5mgを加え37℃で6時間反応させた。反応終了後酵素分解OMを5%蟻酸で平衡化したBio Gel P-10（2X90cm）（BIO-RAD Laboratories）に添加し、同蟻酸溶液で溶出して分画し、さらにC18カラム（0.5X15cm）（Biofine RPC-PO, 日本分光）を装着した high-performance liquid chromatography（以下 HPLC）装置（880-PUU2ポンプ高圧グラジエントシステム, 日本分光）による逆相HPLC法を用いてthird domain without carbohydrate chain（以下 D3）とthird domain with carbohydrate chain（以下 D3CHO）を分離した。D3とD3CHOはSDS-PAGEでsingle bandであることを確認した。

e. OM domain3に対するIgE抗体価の測定⁹⁾

0.1M sodium carbonate buffer（pH9.5）にタンパク濃度10μg/mlとなるように溶解したD3CHOとD3をそれぞれ96-wellの塩化ビニールプレート（ELISA用プレートE）（Sumitomo Bakelite Co., Ltd）に50μl/wellずつ分注し、4℃で一晩静置し反応させた。PBS-Tween（1well当たり100μl）で4回洗浄後、0.1M sodium carbonate buffer（pH9.8）に溶解した2% human serum albumin（以下、HSA）（Sigma Chemical Co.）100μlを各wellに添加し37℃で1時間blocking処理を行った。ついでPBS-Tweenで4回洗浄した後、患者血清を50μl/wellずつ加え、室温で12時間反応させた。その後PBS-Tweenで4回洗浄、¹²⁵I-抗ヒトIgE抗体（44.4KBq/ml）（Dainabot K. K.）を50μl/wellずつ分注し、室温で12時間静置し反応させた。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がコントロールの平均＋2SD以上の場合に特異的IgE抗体高値とした。

f. 統計処理

統計処理は, unpaired t test, Fisherの直接確率法, χ^2 検定で行い $P<0.05$ を有意差ありとした. また特異的IgE抗体は対数変換した後, 統計処理を行った.

OM, D3CHO, D3の診断的意義を検討するため, 鶏卵アレルギーを持たないアレルギー疾患児の特異的IgE抗体の平均 $\pm 2SD$ (OM : 1.9%, D3CHO : 0.16%, D3 : 2.0%) で高値群と正常群とに分け, 経口負荷試験の結果を基準としてsensitivity (感受性), specificity (特異性), accuracy (一致率) を求めた.

結 果

卵白経口負荷試験の結果, IHR陽性19名と陰性13名に分け検討を行った. IHR陰性群の中で, 非即時型過敏反応を認めた症例はなかった. 平均年齢 $\pm SD$ は陽性群, 陰性群それぞれ 1.5 ± 1.2 歳, 1.9 ± 1.6 歳で両群間に有意差はなかった. 卵白に対する特異的IgE抗体価にも, 負荷試験陽性群と陰性群との間で有意差は認めなかった (Table 1).

a. 卵白成分に対するIgE抗体価

OM, OA, OT, Lyに対する特異的IgE抗体価 (% binding) の平均は, IHR陽性群でそれぞれ12.6%, 15.9%, 7.9%, 2.5%, IHR陰性群は6.3%, 12.6%, 5%, 3.2%であった (Fig. 1). これらの値を対数変換した後 unpaired t testで統計処理した結果, OMでIHR陽性群がIHR陰性群に比しIgE抗体価が高値の傾向 ($p<0.1$) が認められた. OMのsensitivity, specificity, accuracy はそれぞれ89.5%, 30.7%, 65.6%であった (Table 2).

b. OM domain 3に対するIgE抗体価

D3CHOとD3に対する特異的IgE抗体価 (%binding) の平均はIHR陽性群でそれぞれ0.25%, 0.5%, IHR陰性群で0.13%, 0.2%であった (Fig. 2). これらの値を対数変換した後, unpaired t testで統計処理したところ, D3CHO, D3ともにIHR陽性群が陰性群に比しIgE抗体価が有意に高かった ($p<0.01$).

sensitivity, specificity, accuracyは, D3CHOでそれぞれ89.5%, 92.3%, 90.6%, D3で94.7%, 69.2%, 84.4%とsensitivity, specificity, accuracyともOMに比し良好であった (Table 2).

Table 1. 対象患児32名の免疫学的背景

	即時型過敏反応陽性	即時型過敏反応陰性
症例数	19例	13例
年齢 (M $\pm$ SD)	1.5 $\pm$ 1.2歳	1.9 $\pm$ 1.6歳
性別 (男 : 女)	13 : 6	6 : 7
血清総IgE(IU/ml) (平均 $\pm$ SD) (範囲)	916 $\pm$ 809 (83 $\sim$ 7860)	984 $\pm$ 1919 (93 $\sim$ 12300)
卵白特異IgE (%binding) (平均 $\pm$ SD) (範囲)	20.0 $\pm$ 11.3 (4.1 $\sim$ 68.2)	22.9 $\pm$ 11.3 (3.2 $\sim$ 48.8)

SD : 標準偏差, P : 危険率

$p<0.05$: significant * : unpaired t test, ** : χ^2 検定

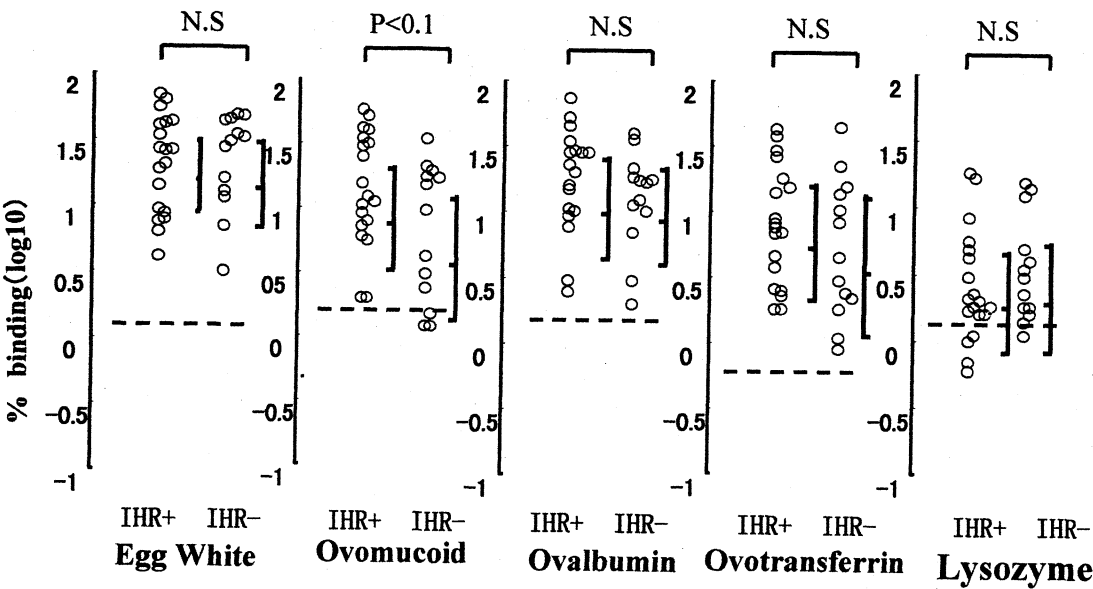


Fig. 1. 卵白ならびに卵白各成分に対するIgE抗体価 (%binding)

IHR : immediate hypersensitive reactions
unpaired t test ; p<0.05 : significant
error bar ; 平均+2SD ----- 非アトピーコントロールのM+2SD

Table 2. ovomucoid, 及びovomucoid domain 3に対する特異的IgE抗体価の診断的意義

		IHR+	IHR-	
OM	M+2SD<	17	9	sensitivity = 89.5% (17/19) specificity = 30.8% (4/13) accuracy = 65.6% (21/32)
	M+2SD≥	2	4	
D3CHO	M+2SD<	17	1	sensitivity = 89.5% (17/19) specificity = 92.3% (12/13) accuracy = 90.6% (29/32)
	M+2SD≥	2	12	
D3	M+2SD<	18	4	sensitivity = 94.7% (18/19) specificity = 69.2% (9/13) accuracy = 84.4% (27/32)
	M+2SD≥	1	9	

IHR: immediate hypersensitive reactions OM: ovomucoid D3CHO: third domain with carbohydrate chain
M+2SD: コントロールの特異的IgE抗体価の平均+2×標準偏差 D3: third domain without carbohydrate chain

Sensitivity(感受性): IHR陽性群の中で各特異的IgE抗体高値の症例数/IHR陽性群の症例数×100
Specificity(特異性): IHR陰性群の中で各特異的IgE抗体低値の症例数/IHR陰性群の症例数×100
Accuracy(一致率): IHR陽性群の中で各特異的IgE抗体高値の症例数+IHR陰性群の中で各特異的IgE抗体低値の症例数/全症例数

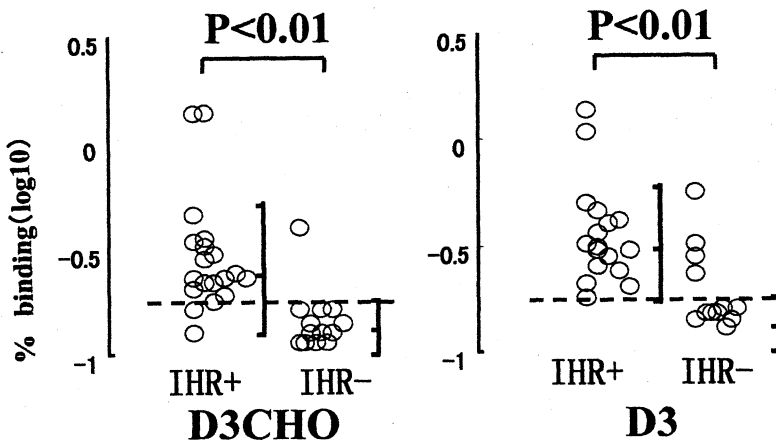


Fig. 2 Ovomucoid domain3に対する特異的IgE抗体価 (%binding)

IHR : immediate hypersensitive reactions

unpaired t test ; $p < 0.05$: significant

D3CHO : third domain with carbohydrate chain,

D3 ; third domain without carbohydrate chain

非アトピーコントロールのM+2SD

error bar ; 平均 $\pm$ 2SD

考 察

鶏卵アレルギーの症状は、症状の出現時間によりIHRと非即時型過敏反応に分けられる。森田ら⁶⁾は、鶏卵アレルギー患児に対して卵白凍結乾燥粉末による経口負荷試験を行いIHR単独陽性が42.2%と最も多く、非即時型過敏反応陽性者のなかで88%が即時型、非即時型両者陽性のdual typeであり非即時型単独は稀であると報告している。

以上から今回、筆者らは鶏卵IHRにおける卵白、及び卵白の成分であるOM、OA、OT、Ly、及びD3CHO、D3に対する特異的IgE抗体価の診断的意義について検討した。

山田ら¹⁰⁾は、卵白の成分別の特異的IgE抗体価を測定しOMの特異的IgE抗体価においてIHR陽性群が陰性群に比し高かったと報告している。筆者らの検討でも、OM特異的IgE抗体価はIHR陽性群が陰性群に比し高い傾向にあった。しかし、IHR陰性群でもOM特異的IgE抗体価が高値の症例が多数存在した。

しかしながら、OM domain 3でみると、sensitivity, specificity, accuracyは、D3CHOで89.5%, 92.3%, 90.6%, D3で94.7%, 69.2%, 84.4%であり、OM特異的IgE抗体価よりも良好であり、OM domain 3に対するIgE

抗体価を測定することは鶏卵白IHRの診断に有用であると考えられた。

また、この結果はOMのD3、及びD3CHOに鶏卵白IHRに関与する重要なエピトープが存在する事を示唆している。

OMは、他の成分に比し熱に安定で消化酵素にも比較的安定である¹¹⁾¹²⁾。また分子量で28,000の糖蛋白で186のアミノ酸からなり、3つのdomainから構成される¹²⁾。domain 1, 2には、それぞれ2本のN-結合型糖鎖が付加されており、domain 3には、1本のN-結合型糖鎖が付加されている。自然の状態、domain 3はN-結合型糖鎖のある分子(D3CHO)とない分子(D3)がおおよそ半分ずつ混在する¹³⁾。

今回の検討では、経口負荷試験陰性にもかかわらず、特異的IgE抗体価が高い症例がD3の方で数例存在した。またD3CHOの方がD3より経口負荷試験の結果と一致した。

鶏卵に対するoral toleranceを起こす機序として、分泌型IgAの増加、T cellアレルギー、抗原特異的 suppressor T cellの刺激、消化酵素の成熟などが示唆されている¹⁴⁾。

鶏卵アレルギー患児においてBernhisel-Broadbentら¹⁵⁾は、OM特異的IgE抗体価が低値ほどアウトグロー

が早期であると述べている。

また、山田ら¹⁶⁾は、OM特異的IgE抗体価高値の症例を対象として、pepsin処理卵白OMに対するIgE結合能をRAST inhibitionで測定し、アウトグロウした症例は、しなかった症例に比し有意にIgE結合能が低値であったと報告している。筆者ら⁵⁾はpepsin処理OMペプチドを検討し鶏卵IHRに関与するエピトープの1部がOMのdomain 3に存在する事を報告した。以上から、OM domain 3特異的IgE抗体価を測定する事により鶏卵白IHRのアウトグロウを予測できる可能性がある。

Cookeら¹⁷⁾は、OM特異的IgE抗体高値の症例の血清を用いた検討でOMのIgEエピトープはOMの中で5ヶ所あると報告している。今回の検討では、domain 3のみを検討しておりdomain 1, 2については検討していない。他のdomainにもIHRに関与するエピトープが存在する可能性があり、今後検討を要する。

本論文の要旨は、第10回日本アレルギー学会春季臨床大会（名古屋）で発表した。

御校閲して頂いた藤田保健衛生大学医学部小児科教授浅野喜造先生に深謝致します。

文 献

- 1) Bock, S.A. and Atkinson, F.M. : Patterns of food hypersensitivity during 16 years of double-blind placebo-controlled food challenges. *J. Pediatr.* 117, 561-567, 1990.
- 2) Metcalf, D. D. : Food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 749-762, 1984.
- 3) 我妻義則, 向山徳子, 市川邦男, 宇理須厚雄, 森田 豊, 中村凱治, 飯倉洋治, 佐々木聖, 森川昭廣 : 卵アレルギー児に対する卵白凍結乾燥粉末を含む試験用食物による経口誘発試験の試み. *日小ア誌* 10, 482-490, 1996.
- 4) Urisu, A., Ando, H., Morita, Y., Wada, E., Yasaki, T., Yamada, K., Komada, K., Torii, S., Goto, M. and Wakamatsu, T. : Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 171-176, 1997.
- 5) 安藤仁志, 宇理須厚雄, 徳田玲子, 森田 豊, 和田映子, 近藤康人, 矢崎雄彦, 山田一恵, 松田幹 : 鶏卵白即時型過敏反応に関与するペプシン処理鶏卵白オボムコイドのfragmentについての検討. *日小ア誌* 印刷中.
- 6) 森田 豊, 宇理須厚雄, 八木映子, 近藤康人, 鶴田光敏, 矢崎雄彦, 山田一恵, 坂口 騰 : 卵白凍結乾燥粉末を用いた卵白経口負荷試験による卵白過敏症の検討. *日児誌* 100, 7-12, 1996.
- 7) Kato, I., Schrode, J., Wilson, K. A. and Laskowski, M., Jr. : "Proteides of Biological Fluids" Pergamon Press, Oxford, New York 23, 235-243, 1976.
- 8) Watanabe, K., Matsuda, T. and Sato, Y. : The secondary structure of ovomucoid and its domains as studied by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* 667, 242-250, 1981.
- 9) 近藤康人, 宇理須厚雄, 和田映子, 鶴田光敏, 矢崎雄彦, 山田一恵, 増田 進, 森田 豊 : 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.
- 10) 山田一恵, 宇理須厚雄, 近藤康人, 八木映子, 稲垣義彰, 駒田英勝, 山田政功, 鳥居新平 : 卵白経口摂取による即時型過敏反応と卵白成分に対するIgE結合能. *アレルギー* 43, 1201-1209, 1994.
- 11) 本間季里, 青柳正彦, 斉藤公幸, 西牟田敏之, 杉本和夫, 角尾 肇, 新美人男, 河野陽一 : IgGおよびIgE抗体に認識される卵白アルブミン, オボムコイドの抗原構造についての検討. *アレルギー* 40, 1167-1175, 1991.
- 12) Matsuda, T., Watanabe, K. and Nakamura, R. : Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochim. Biophys. Acta* 707, 121-128, 1982.
- 13) Kato, I. Kohr, W. J. and Lakowski, M. Jr : Evolution of an ovomucoid. : "In Proc. 11th FEBS Meeting : Regulatory Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors," Pergamon Press, Oxford. 197-206, 1978.
- 14) Kemeny, D. M., Price, J. F., Richardson, V, Richards, D. and Lessof, M. H. : The IgE and IgG subclass antibody response to foods in babies during the first year of life and their relationship to feeding regimen and the development of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87, 229-234, 1991.
- 15) Bernhisel-Broadbent, J. Dintzis, H. M., Dinizis, R. Z. and Sampson, H. A. : Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal dIII) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy

- and mice. J. Allergy Clin. Immunol. 93, 1047–1059, 1994.
- 16) 山田一恵, 徳田玲子, 安藤仁志, 森田 豊, 和田映子, 近藤康人, 宇理須厚雄, 鳥居新平: 鶏卵アレルギーの予後と pepsin 処理 ovomucoid に対する IgE 結合能. アレルギー 46, 889, 1997.
- 17) Cooke, S. K., Sampson, H. A : Allergenic properties of ovomucoid in man. : J. Immunol., 159 (4), 2026–2032, 1997

Evaluation of specific IgE for ovomucoid domain3 is useful for a diagnosis of hen's egg hypersensitivity.

Hitoshi Ando, Atsuo Urisu, Reiko Tokuda, Eiko Wada, Yasuto Kondo,
Yutaka Morita¹⁾, Kazue Yamada²⁾, Tsukasa Matsuda³⁾

Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine

¹⁾ *Department of Pediatrics, Kariya General Hospital*

²⁾ *Yamada Clinics,*

³⁾ *Department of Applied Molecular Biosciences Graduate School of Bioagricultural Sciences Nagoya University*

We assessed the clinical significance of specific IgE antibodies for ovomucoid (OM), ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme and OM third domain with (D3 CHO) or without carbohydrate chain (D3) in hen's egg hypersensitivity. Thirty-two subjects with high IgE antibody titers for egg white were divided into two groups of positive (n=19) and negative (n=13) immediate hypersensitive reactions to double-blinded placebo-controlled food challenges with freeze-dried egg white antigens. The positive challenge group showed a tendency ($p<0.1$) toward higher specific IgE antibody for OM than the negative challenge group. The sensitivity, specificity and accuracy for a diagnostic power of specific IgE antibody titers to OM were 89.5%, 30.7% and 65.6%, respectively. These results were better than those of the other egg white components.

Specific IgE antibodies for OM domain 3 with or without CHO was statistically higher in positive IHR group than in negative IHR group. The sensitivity, specificity and accuracy were 89.5%, 92.3% and 90.6%, respectively, for D3 CHO and 94.7%, 69.2%, and 84.4%, respectively, for D3. These results indicate that specific IgE antibodies for D3 with or without CHO give more useful diagnostic tools in hen's egg hypersensitivity compared with OM and other egg white components.