

低アレルゲン化大豆加工食品提供患者の正確なスクリーニング法の構築

小川 正^{*1}・森山達哉¹・太田展生²・福井貴也³

¹京都大学大学院農学研究科 ²おおた小児科アレルギー科クリニック ³福山臨床検査センター

Development of Practical Method for Screening Patients Allergic to Soybean

Tadashi OGAWA¹, Tatsuya MORIYAMA¹, Nobuo OTA² and Takaya FUKUI³

¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011 ²Ota Pediatrics and Allergy Clinic, Takamatsu 761-0101 ³Fukuyama Medical Laboratory Co., Ltd., Hukuyama 720-0831

ABSTRACT

In previous report (*Soy Protein Research, Japan* **4**, 45-51 2001), we demonstrated that the allergic patients sensitized by plant food stuffs such as soybean have specific IgE antibodies recognizing asparagine-N linked oligo-mannose type glycan moieties of Man₃GluNAc₂ backbone with β 1-2 xylose branch or β 1-2 xylose and α 1-3 fucose branches. Sera of these patients showed high cross-reactivity among various plant food stuffs by radioallergosolvent test (RAST). Accordingly, these patients often gave false positive diagnostic results about various plant food stuffs that do not elicit any allergic symptoms. In order to avoid these false positive RAST diagnoses, especially in case of soybean allergic patients, we tried to develop the improved RAST procedure using a blocking technique of glycan moieties of glyco-proteins immobilized on the allergen screening discs applied to RAST automatic analyses. The improved method demonstrated that the RAST scores of some patients allergic to plant food stuffs are markedly decreased by blocking sugar moieties of glyco-proteins. On the other hand, about half of patients examined did not show significant changes in RAST scores even though using improved method, indicating that they are true patients against tested foodstuffs and can serve as test challengers for an assessment of the hypoallergenic processed foods. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 68-72, 2002.

Key words: soybean allergy, food allergy, radioallergosolvent test (RAST), glycan moiety, glyco-protein, hypoallergenic soybean products

日本人の食生活を支える基本食材である大豆および

大豆加工食品からのたん白質の摂取量は、1人1日当たり約10 g前後と推定され、ほぼ同程度摂取する米、小麦とともに主要たん白質食材となっている。従って、

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

大豆アレルギー患者もたん白質摂取量に依存して多いのが日本人における食物アレルギーの特徴である。我々は産・官・学の共同プロジェクトにより、これら大豆アレルギー患者の健全な食生活の確保を目的に、患者が安心して利用可能な低アレルゲン大豆加工食品の開発を行ってきた¹⁾。これらの食品は、大豆アレルギーと診断された約8割の患者が、アレルギー症状を惹起することなく利用できることをチャレンジテストによって確認した。次のステップとして、これらの低アレルゲン大豆加工食品を的確に患者に無駄なく提供するための、患者のスクリーニング法の構築が必要となる。現在、食物アレルギーを診断する方法として患者に負担のかからない非侵襲性のラヂオアレルゴソルベントテスト (radioallergosorbent test: RAST) 法が汎用されている。しかしながら、この方法で得られた陽性の判定がしばしば他の検定法であるスクラッチテストなどの直接法では陰性と判定されるなど、矛盾する結果を与えることが指摘されている。我々はこの原因の解明を目的に研究を行ってきたが、その理由の一つとして、多くの患者が糖たん白質の糖鎖を認識するIgE抗体を保有していること、および糖鎖認識IgE抗体はアレルギー症状の惹起に関与していない可能性を示唆する証拠を得てきた。もし、糖鎖が共通アレルゲンとなって交差反応に関与しているとする、植物性食品素材に含まれる糖たん白質の糖鎖構造は相同性が高いため、糖鎖を持つたん白質はすべて共通抗原としてこのIgE抗体と結合し、RAST法では陽性として誤った診断結果を与えることになる。この現象は、オリーブ花粉症に関する研究においても指摘されている²⁾。高いRASTスコアを示すにも関わらず症状が一致しない現象を、糖鎖抗体がモノバレントであることにより肥満細胞上のIgE抗体間に架橋が起こらないことにより、最終段階のケミカルメディエーターが遊離されないことによると仮定している。事実、RAST陽性患者がプリックテストなど直接抗原を皮膚に接触させてその反応を観察する検査法では陰性を示す例がしばしば見いだされることからこの説が支持されている。本研究では、もし糖鎖認識抗体が直接アレルギー症状の惹起に関与していない場合、RASTの結果に与える糖鎖認識抗体の影響を排除することにより、真のアレルギー食品を判定できないかを検討するとともに、RAST法における真のアレルギー患者のスクリーニング、診断を精密化することを試みた。

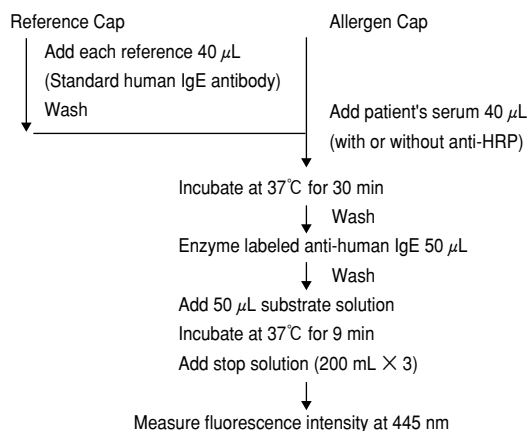
方 法

患者血清

本研究において使用した血清は、病院外来において受診し、アレルギー疾患と判定された後、治療を開始した患者を対象に医師によるインフォームドコンセントを実施後、協力を得られた患者より提供を受けたものである。通常のRAST法によるアレルギー食品のスクリーニング、診断を行うと同時に本研究の目的である糖鎖ブロックによるRAST法の実験に使用した。

RAST法

アレルギー食品のスクリーニングは原理として患者血清を用いるサンドイッチ法に基づくフルオロエッセイ (FEIA system) を採用したCap-RAST法 (従来のペーパーディスク法を用いるRAST法に基本的には同じであるが、抗体結合性のより広い表面積を有するスポンジキャップを用いる点で改良された方法) を基本とするUni-CAP1000型全自動分析装置 (Pharmacia製) を用い、Pharmacia社のマニュアルに従って実施した。食品のスクリーニングは多孔質スポンジに標的食品の全抽出たん白質を固定化したアレルゲンキャップ (Pharmacia製) を使用した。標準的な測定操作法をScheme 1に示した。IgEの測定にはPharmacia製キットを使用した。二次抗体として β -ガラクトシダーゼ標識マウス抗ヒトIgEモノクローナル抗体を使用し、酵素反応基質4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシドの分解産物の蛍光強度をもとに、ヒトIgE抗体レファレンスキャップを用いて作製した標準曲線 (Fig. 1) より、IgE量を国際単位 (IU; 1 IU=2 ng of IgE) で算出した。蛍光強度 (国際単位) とアレルギー性の判定 (クラス評価) の為の相



Scheme 1. Cap-RAST procedure.

関はTable 1 の通りであり，クラス 2 以上を与える食品に対してアレルギー陽性と判定し，RASTスコアとしてその強さを診断結果する。

ウサギ抗西洋ワサビペルオキシダーゼIgG抗体 (anti-HRP)

ウサギ抗西洋ワサビペルオキシダーゼIgGポリクローナル抗体はSigma Chemical Co., (St.Louis, USA) より購入した。Anti-HRPには西洋ワサビペルオキシダーゼの糖鎖（植物に広く分布する共通構造を持つアスパラギン-N結合オリゴマンノース型糖鎖（ β 1 $\rightarrow$ 2 キシロース分枝あるいは α 1 $\rightarrow$ 3 フコース分枝を含む，Fig. 2 参照））を特異的に認識する抗体を含むことが証明されている³⁾。

糖鎖阻害RAST法

Scheme 1 のCap-RAST法において，アレルギーキャップを患者血清で処理する段階で，患者血清に予め過剰のanti-HRP抗体を添加し，拮抗的にアレルギーキャップ上の糖たん白質糖鎖をブロックする状態でRAST操作を行う。この方法で得られたRAST値を通常のRAST値と比較し，その差より糖鎖認識IgE抗体の割合を算出する（操作はScheme 1 参照）。

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) およびイムノブロット

各種食品素材抽出液のたん白質はSDS-PAGEにて分離後，ニトロセルロース膜上に転写し，患者血清により免疫染色した後，HRP-標識ウサギ抗ヒトIgG抗体を用いてECL法により検出した⁴⁾。一方，同時に分離したたん白質を転写後，あらかじめanti-HRPにて処理し，糖鎖をブロックして免疫染色し，患者血清中の糖鎖認識IgE抗体の影響を比較解析した。

結果と考察

食物アレルギー患者のスクリーニングと患者の履歴

小児科外来を訪問して治療を受けている食物アレルギーを疑われている患者のうち，インフォームドコンセントを実施し協力の得られた12人の患者血清を用いて確認された患者（平均年齢 5 歳）の履歴（RASTの

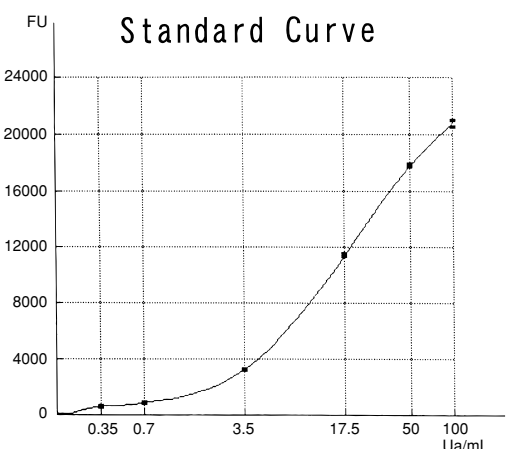


Fig. 1. RAST standard curve. FU, fluorescence unit (arbitrary unit); Ua, one Ua (IU)/mL means 2 ng of IgE antibodies in one mL of patient's serum.

Table 1. Reference of RAST Score

IgE	Score	Diagnose
< A	0	—
A = 0.3 IU/mL	1	±
B = 0.7 IU/mL	2	+
C = 3.5 IU/mL	3	+
D = 17.5 IU/mL	4	+
E = 50.0 IU/mL	5	+
F = 100.0 IU/mL	6	+

* 1 IU = 2 ng of IgE antibodies.

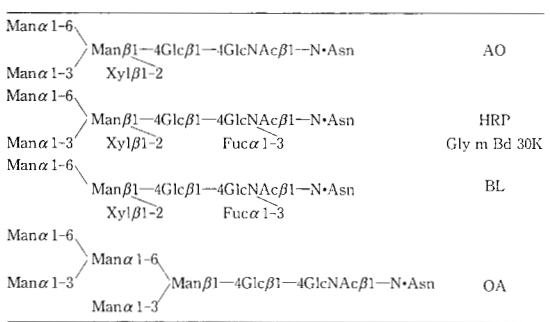


Fig. 2. Structure of asparagine-N linked glycan moieties. AO, ascorbate oxidase; HRP, horse radish peroxidase; BL, bromeline; OA, ovalbumin.

Table 2. RAST values of food allergic patients (Ua/mL)

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Soybean	1.04/0.92	1.42/0.73	0.34/0.34	6.80/6.25	1.05/0.98	44.5/1.10	7.68/7.28	5.95/1.35	6.75/5.40	39.8/34.2	98.3/39.0	2.65/0.95
Wheat	1.00/0.80	2.28/1.30	0.90/0.89	25.1/21.6	2.73/2.33	70.6/3.50	4.36/3.73	8.30/1.60	46.3/34.2	2.15/1.80	100/25.7	—
Rice	1.63/1.40	1.99/1.13	0.34/0.34	9.11/6.72	0.92/0.75	72.0/7.75	1.22/0.59	—	—	—	—	—
Peanuts	1.36/1.07	1.70/1.11	0.34/0.34	4.75/4.16	5.15/4.46	—	—	—	—	—	—	—
Potato	1.61/1.44	1.36/0.70	0.34/0.34	8.82/8.13	0.34/0.34	64.2/6.75	—	6.05/1.25	3.53/1.20	—	—	2.50/1.00

* Values mean RAST/RAST with anti-HRP (IU/mL).

結果)をTable 2に示した。アレルギー判定用食品素材として大豆、コムギ、米、ピーナッツ、ジャガイモを用いた。また、実際に測定に共した食品数は提供された患者血清の量に依存するためすべての患者について一定していない。これらRASTの結果と問診による実際のアレルギー発症食品とは必ずしも一致しない。

患者血清中の糖鎖認識IgE抗体の存在

Fig. 3は患者血清による標準糖たん白質のイムノブロットの結果を示している。前報⁵⁾で明らかにしたように、本患者は大豆アレルギーと診断され主要アレルゲン、Gly m Bd 30Kを認識するIgE抗体を保有している。これらの標準たん白質はアスパラギン-N結合(キシロースあるいはフコース分枝を有する)オリゴマンノース型糖鎖を有し、これらに特異的な抗体、anti-HRPによって認識される。患者血清およびanti-HRPによる糖たん白質のブロットの結果は、コントロールとして用いたオボアルブミン(フコースやキシロース分枝を有しないオリゴマンノース糖鎖保有)以外すべての糖たん白質を認識するIgE抗体を持つことが示されている。また、anti-HRP処理後のブロットの結果は、Gly m Bd 30Kに対するブロットの染色像が極端に薄くなり、他の標準植物性糖たん白質は染色されず、完全に阻害を受けている。前報⁵⁾で示したように、Gly m Bd 30K認識抗体の内、70%が糖鎖認識抗体で残りの30%がたん白質ペプチド鎖認識抗体であることを明らかにしている。この結果より明かなように、糖たん白質の染色バンド像がanti-HRP処理による糖鎖ブロックによって減弱することは、原理的にはRASTやELISAの結果をも反映するものであり、糖鎖とその特異抗体の存在がRASTに与える影響の大きさを示唆している。

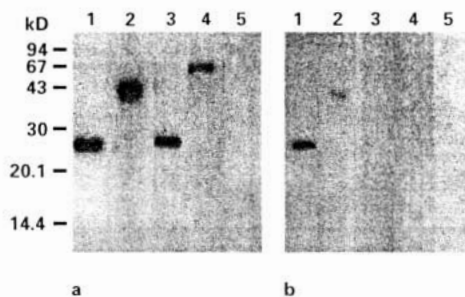


Fig. 3. Immunoblotting of glyco-proteins with patient's serum. a, Immunoblot with patient's serum; b, Immunoblot with patient's serum after anti-HRP treatment. Lane 1, Gly m Bd 28K; lane 2, horse radish peroxidase; lane 3, bromeline; lane 4, ascorbate oxidase; lane 5, ovalbumin.

糖鎖ブロック (anti-HRP処理) によるRAST

患者血清によるRASTスクリーニングの操作に、anti-HRP処理を施して糖鎖をブロックした時のRASTの結果を、通常RASTの結果と比較してTable 2に示した。Anti-HRP非処理と処理後のRAST値を比較し、阻害率 $[(\text{RAST値} - \text{anti-HRP RAST値}) / \text{RAST値}] \times 100$ (%)を算出した。糖鎖のブロック処理なしのRAST値の低下は、もし糖鎖抗原がアレルギーの臨床症状の惹起に関与していないとすると、RASTによるアレルギー食品の評価においてかなりfalse positiveの診断結果を与えていることが考えられる。Fig. 4には種々の食品に対して行ったRASTに対するantiHRPの阻害率を患者別に示した。これらの結果から判断できることは、患者によって食品別の阻害率がほぼ一定している特徴がある。また、患者は阻害率の高いグループと低いグ

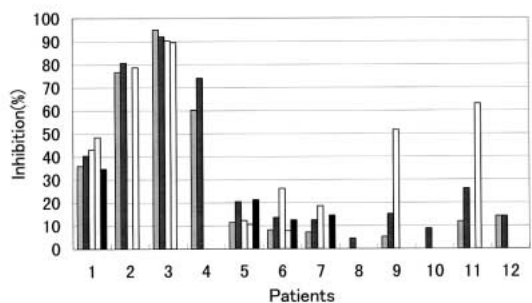


Fig. 4. Effect of anti-HRP treatment on RAST. No. 1-12, Food allergic patients with atopic dermatitis. Columns in the figure (represent on each patient) show following plant foods; soybean, wheat, rice, potato, and peanuts, respectively, from left to right. Inhibition values are presented as $[(\text{RAST value} - \text{RAST value with anti-HRP treatment}) / \text{RAST value}] \times 100$.

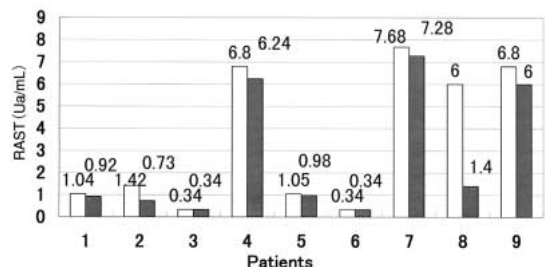


Fig. 5. Effect of anti-HRP treatment on soybean RAST. No. 1-12; food allergic patients with atopic dermatitis. Open and closed columns (represent on each patient) show normal RAST value and RAST value with anti-HRP treatment, respectively. RAST value (one IU/mL) means 2 ng of IgE antibodies occurring in one mL of patient's serum.

グループに2群に大別される。しかし、一方阻害率の低いグループの中に、たとえば、患者9の米や患者11のジャガイモにおいて阻害率が極端に高い食品が混じっているのが観察される。これらは、阻害後のRASTスコアは極端に低下し、真のアレルギー食品としては疑問なものである。特に患者9は米において阻害後のスコアが2から1の範囲（陰性）に低下していることは、本来この食品のRASTスコアがfalse positiveすなわち偽陽性で臨床症状には関与しない食品素材であったことを示すものである。また、RAST阻害率が高いグループにおける糖鎖抗体の影響は大きく、通常

RASTの検査値で診断された特定食品によるアレルギー症状の予測は、かなり過大評価されていることを示唆している。Fig. 5に大豆に対するRASTおよびanti-HRP処理RAST値を示した。患者8が示すようにanti-HRP処理によるRASTスコアの極端な減少は、本来RASTの結果から大豆アレルギーと診断された患者の中には、見かけ上過大に評価されている患者のいる可能性を強く示唆している。RAST高値の患者においては、さらにプリックテストや除去食による判定などを組み合わせた正確な判定が必要であろう。

要 約

低アレルゲン化大豆加工食品を提供するにあたり、真の大豆アレルギー患者をスクリーニングする方法を構築するため、問題となる糖たん白質の糖鎖のRASTに及ぼす影響を解析した。その結果、RAST値に大きな影響を与えているグループとほとんど影響しない二つのグループに分かれた。大豆アレルギー患者をはじめとして、血中に糖鎖認識IgE抗体を保有する患者のRAST阻害率は、大きく二つのグループに分類される。60~90%の阻害率を与えるグループの患者の各食品に出されたRASTスコアにおいて、スコアレベルを1~2単位減じることになり、患者によっては、陽性から擬陽性あるいは陰性に評価を修正しうる場合も有り、かなりの過大評価がなされている可能性を示唆した。阻害率の低い患者は、実際のアレルギー食品を判定しているものと考えられ、糖鎖阻害RAST法をうまく運用すれば、かなりの患者において過剰な除去食治療の弊害を回避出来る可能性を示した。

文 献

- 1) Ogawa T, Samoto M and Takahashi K (2000) : Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J Nutr Sci Vitaminol*, **46**, 271-279.
- 2) Batanero E, Villalba M, Monsalve RI and Rodriguez R (1996) : Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and underrelated glyco-proteins: Evidence of an epitope in the glycan moiety in the allergen. *J Allergy Clin Immunol*, **97**, 1264-1271.
- 3) Hiemori H, Bando N, Ogawa T, Shimada H, Tsuji H, Yamanishi R and Terao J (2000) : Occurrence of IgE antibody-recognizing N-Linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28K. *Int Arch Allergy Immunol*, **122**, 238-245.
- 4) Samoto M, Fukuda Y, Takahashi K, Tabuchi K, Hiemori M, Tsuji H, Ogawa T and Kawamura K (1997) : Substantially complete removal of three major soybean allergenic proteins (Gly m Bd 30k, Gly m Bd 28K and α -subunit of β -conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. *Biosci Biotech Biochem*, **61**, 2148-2150.
- 5) 小川 正, 森山達哉, 藤田千鶴子, 富田響子 (2001) : 大豆たん白質糖鎖特異的IgE抗体の存在と植物性食品の交叉反応性. 大豆たん白質研究, **4**, 45-51.