

<平成25年度助成>

交差反応性・抗原量・形態に着目した 新たな食物アレルギー *in vitro* 評価法の開発

秋山 晴代¹⁾・中村 亮介²⁾・福富 友馬³⁾・栗原 和幸⁴⁾
中野 泰子⁵⁾・根来 孝治⁵⁾・宮澤 真紀¹⁾

¹⁾神奈川県衛生研究所 理化学部、²⁾国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部、

³⁾国立病院機構相模原病院 臨床研究センター、⁴⁾神奈川県立こども医療センター アレルギー科、

⁵⁾昭和大学薬学部 遺伝解析薬学教室)

緒 言

口腔アレルギー症候群 (OAS) とは口腔粘膜に限局したIgE抗体を介した即時型アレルギー症状のことで、クラス2食物アレルギーに分類され、主要な原因食品として生野菜や果物が知られている^{1,2)}。OAS患者の多くはシラカバやイネ科などの花粉症を有しており、シラカバ花粉症では40～50%が、イネ科花粉症だと20%がOASを合併している。

OASの診断には血中特異的IgE抗体価 (CAP-FEIA法)のほか、prick-prick testの結果を参考にすが、用いるクラス2食物アレルギーの原因食材 (野菜や果物) は、アレルゲン性が不安定なものが多いという問題点がある。*in vitro* 検査法であるCAP-FEIA法は、簡便・安価・高感度であり、種々の抗原を固定出来るが、その過程で不安定な抗原は壊れてしまうため、conformationが変化したものを測定することは出来ない。一方、最も有用な免疫学的検査法としてprick-prick test (*in vivo*) があるが³⁾、患者が持参した野菜や果物を穿刺した針を、実際に患者に穿刺して反応をみる試験であるため、患者負担が大きく、さらにスループットが低い。

そこで、近年開発されたI型アレルギー試験法EXiLE (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression) 法を検討し、*in vitro* OAS試験法として有用かどうかを評価することにした。EXiLE

法は、ヒトFcεRIを発現させたラット培養マスト細胞株 (RS-ATL8) の転写因子 (NF-AT) 活性化をルシフェラーゼアッセイにより検出する方法であり、感度・特異度が高く、より臨床に近い形でFcεRIの架橋によるマスト細胞活性化測定を行うことが出来る^{4,5)}。さらに、用いる患者検体は-80℃で保存の利く血清でよく、固相と液相がCAP法などと逆であることから、粗抽出液の測定も可能という利点がある。通常、アレルギーの*in vitro* 検査法は精製抗原を用いて行うのが一般的であるが、prick-prick testは新鮮な野菜や果物を用いて行うこと、さらに検査の度に野菜や果物のすりおろし液を作製するのは手がかかることから、本研究ではまず、野菜・果物由来の全食物抗原の抽出液作製を検討した。さらに、加熱処理した食材もしくは加工品抽出物を用いてEXiLE法を行い、患者が摂取可能な食品の量と加工法を推測した。

方 法

食材からの抽出液作製

トマトを縦に4等分し、-80℃で1日以上保存した。20mMリン酸緩衝液 (PB) (pH6.8) に protease inhibitor cocktail (PI) (cOmplete, Roche Diagnostics K.K.) を加え、抽出液を作製した。水冷したフードプロセッサーに、凍結したトマトと等量の抽出液を加え、トマトを粉碎した。シャーベット状のトマトを4℃、7500rpmで60分遠心後、上清を分取し、さらに4℃、15,000rpmで30分遠

心した。上清は使用するまで-80℃で保存した。このほか、4等分したトマトをフードプロセッサーにかけ、ただちにEXiLE法を行うトマトすりおろし液も作製した。

リンゴを縦に8等分し、芯を取り除いて皮と果肉に分けた。皮はただちに液体窒素で凍らせ、-80℃で1日以上保存した。果肉は0.5cm幅にスライスし、液体窒素で処理した後、-80℃で保存した。凍結したリンゴ皮もしくは果肉に氷冷した抽出液(PB+PI)を等量加え、氷冷フードプロセッサーにかけた。トマト抽出法と同様に遠心後、上清を-80℃で保存した。このほか、8等分したリンゴをフードプロセッサーにかけ、ただちにEXiLE法を行うリンゴすりおろし液も作製した。

EXiLE法

最適化した抽出条件で作製したリンゴまたはトマト抽出液のほか、シラカバ花粉(Biostir Inc.)、チモシーアレルゲンエキス(Torii Pharmaceutical Co.)を抗原として用いた。クリアボトム白色プレート(BD falcon 353377)にRS-ATL8細胞を播種し(5.0x10⁴cells/50μl/well)、OASを発症しているチモシー/シラカバ花粉症患者の血清1/100量を添加して一晚感作した。PBSで細胞を洗浄後(BioTec, MW-96AR)、各種抗原希釈溶液または抗ヒトIgE抗体を添加して(50μL/well)、37℃で3時間刺激後、ホモジニアス系ルシフェラーゼ基質液(Promega, ONEGlo)を加えて化学発光を測定した。

結 果

1. EXiLE法を用いた花粉症患者血清のトマト/リンゴ抽出液との応答性評価

Table 1に示すように、本研究では、精製抗原を用いたCAP法でイネ科 and/or シラカバ花粉症と判明しており、かつprick-prick testによりトマト and/or リンゴのOAS合併が判明している患者血清を用いた。イネ科及びシラカバ花粉に関してはEXiLE法においても1μg/mLの抗原刺激で、CAP法とほぼ同様の応答を確認した(いずれもカットオフ値1.5)。

トマトOAS患者血清4例(1, 4, 5, 6)を用いて、EXiLE法を行ったところ、市販のトマトアレルゲンエキスの抗原刺激では、4例中2例でわずかに応答が見られた(Fig.1A)(いずれもカットオフ値1.5)。Prick-prick testでは新鮮な野菜や果物を用いることから、市販のトマトを丸ごとすりおろしてEXiLE法を行ったところ、全ての患者血清で上昇が認められた(Fig.1B)。また、同じトマトであっても、品種や季節によってアレルゲン性が異なる可能性があること、検査のために毎回すりおろし液を作製するのは*in vitro*試験として不完全であることから、トマトのリン酸緩衝液抽出液を作製してEXiLE法を行った(Fig.1C)。その結果、無刺激時のコントロールに比べ高いルシフェラーゼ活性を誘導し、prick-prick testと同様の陽性結果が得られた。さらに、重度のトマトアレルギー患者は加熱調理したトマト料理でもアレ

Table 1 患者情報

Patient	Sex	Allergy	total IgE	ImmunoCAP(U _A /mL)		EXiLE(fold)		SPT(mm)		
			(IU/ml)	Bet v 1 (birch)	Phl p 12 (grass pollen)	birch pollen	timothy (Torii)	apple	tomato	histamine
1	M	apple/tomato	1510	64.5	16.6	6.2	7.4	6	5	4
2	F	apple	436	59.3	0.10>	3	2.4	4	NA	5
3	F	apple	387	20.5	0.10>	3.7	1.2	2	NA	4
4	F	tomato	886	56.7	15.5	4.8	8.9	0	4	5
5	F	apple/tomato	893	>100	1.95	3.1	3.8	8	5	6.5
6	F	tomato	328	0.09	2.21	1.2	2.3	NA	4	5.5

アレルギー症状が出現するため、トマト加工品としてトマトジュース(100℃, 1分以上の加熱処理済み)を用い、EXiLE法を行った(Fig.1D)。その結果、Fig.1Cで特に値の高かった患者血清(1及び4)

で、高いルシフェラーゼ活性上昇が見られた。

次にリンゴOAS患者血清(1, 2, 3, 5)を用いて、EXiLE法を行ったところ、市販のリンゴアレルギーエキスを用いた抗原刺激では、応答はほとんど

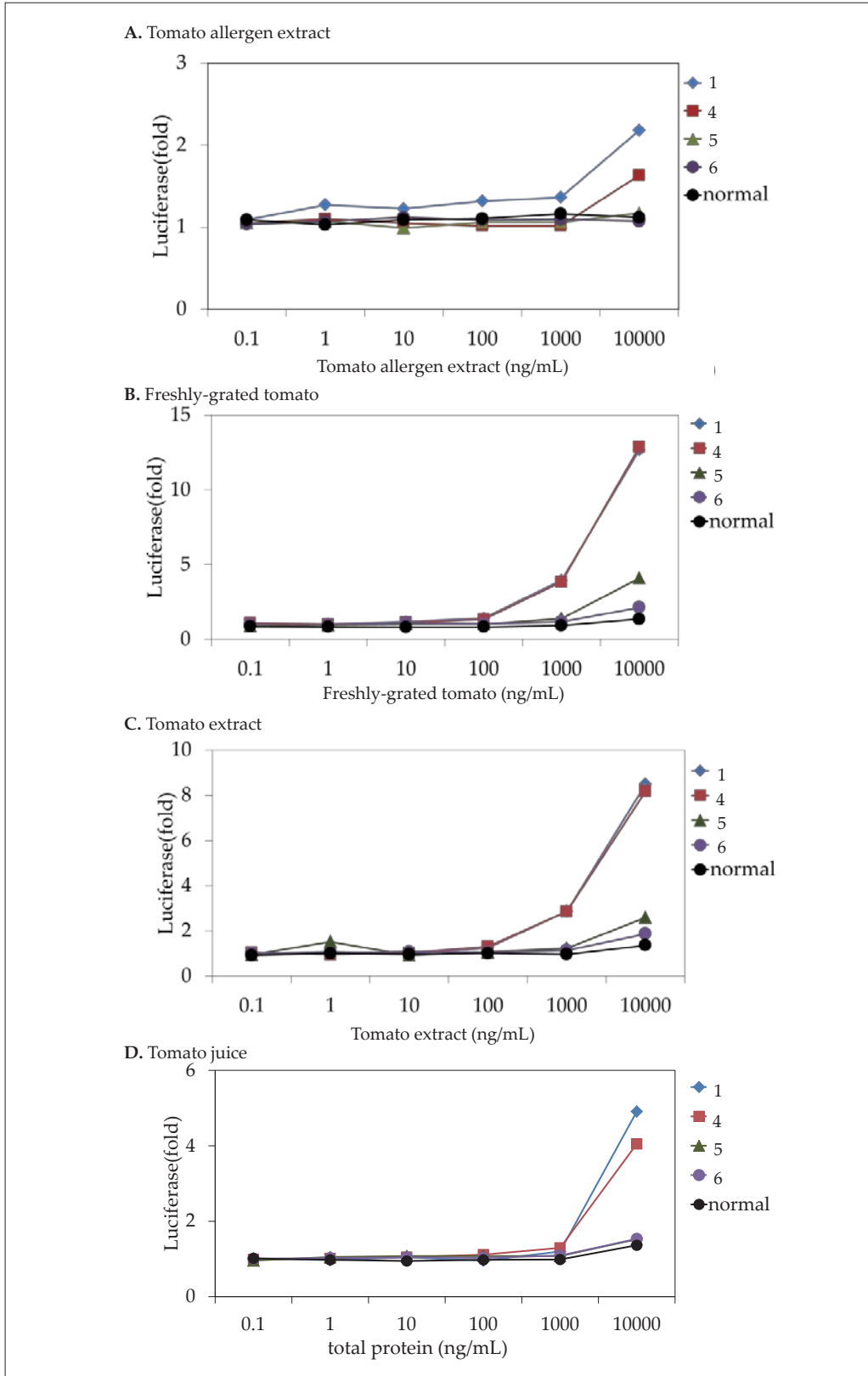


Fig. 1 EXiLE法を用いた各種トマト抽出液との応答性

見られなかった (Fig.2A)。リンゴをすりおろしてEXiLE法を行ったところ、4例中3例で上昇が認められた (Fig.2B)。さらに、最適化した条件でリンゴ皮抽出液を作製し、患者血清との反応性をみたところ、すりおろし液と同様の陽性結果が得られた (Fig.2C)。リンゴ果肉では応答は見られなかった (data not shown)。

2. EXiLE法を用いたトマト抽出液の加熱処理によるアレルギー性の評価

一般的にOASを誘発する原因アレルゲンは熱に弱いことが知られているため、神奈川県産の各種トマト抽出液を加熱処理し、EXiLEの応答性が変化するかどうか検討した。

Fig.3に示す各種トマトより抽出液を作製し、

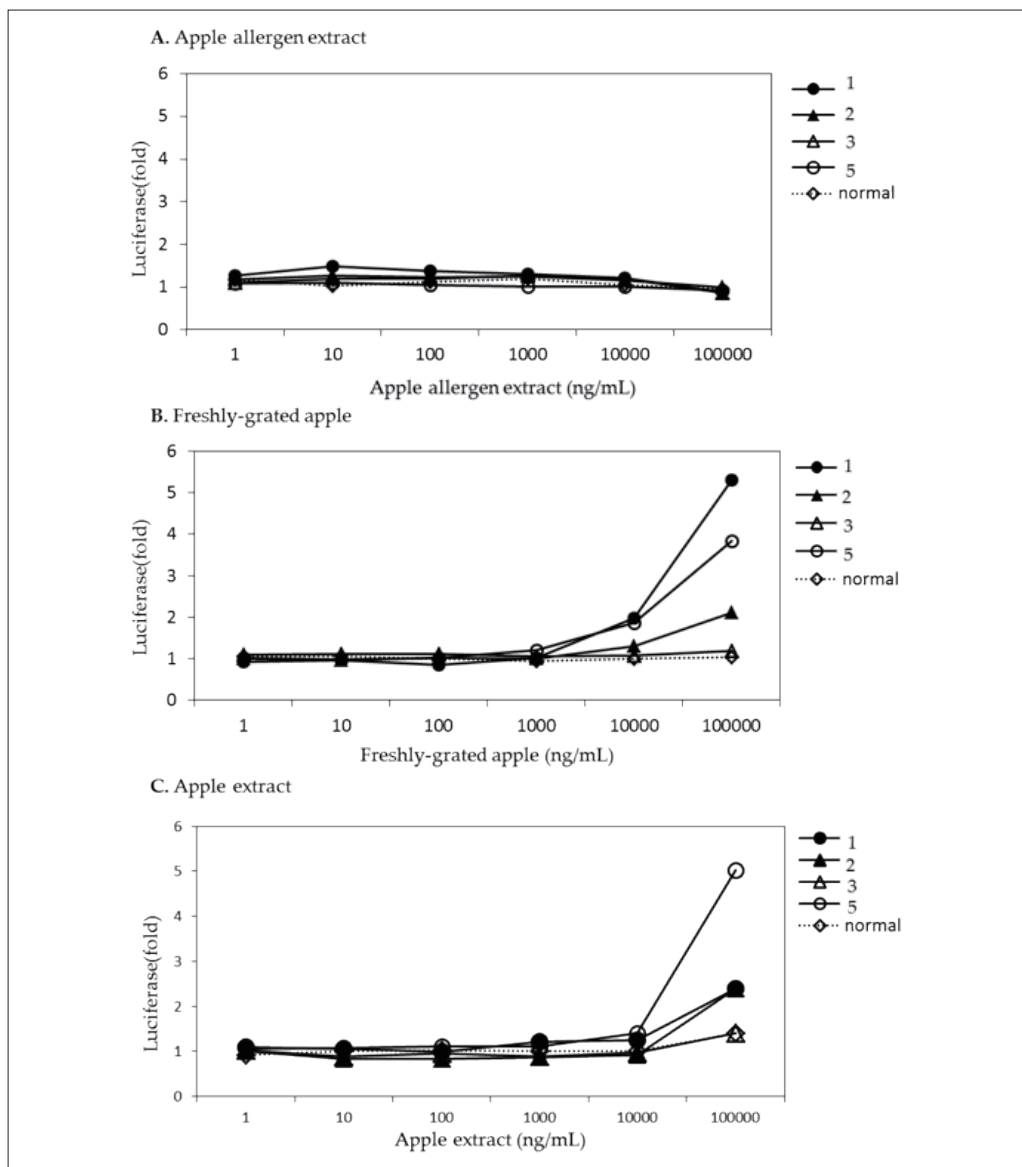


Fig. 2 EXiLE法を用いた各種リンゴ抽出液との応答性

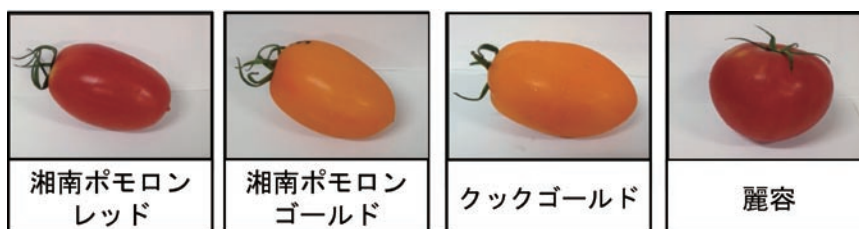


Fig. 3 多品種の神奈川県産トマト

加熱処理後、EXiLE法に供したところ、経時的にルシフェラーゼ活性が低下し、いずれのトマトも加熱処理5分程度で応答がみられなくなった (Fig.4)。

次に、生トマトを実際に加熱調理しても、同様の結果が得られるかどうか検討した。湘南ポモロンレッドのヘタを取り、4等分して、180℃で予

熱しておいたオーブンレンジで一定時間 (5, 10, 15分) 加熱して焼きトマトを作製し、EXiLE法を行ったところ、Fig.5 に示すように、5～10分間の加熱によりルシフェラーゼ活性の低下が認められた。同様に、煮トマトに関しては5～10分間でアレルギー性の低下が認められた (Fig.6)。

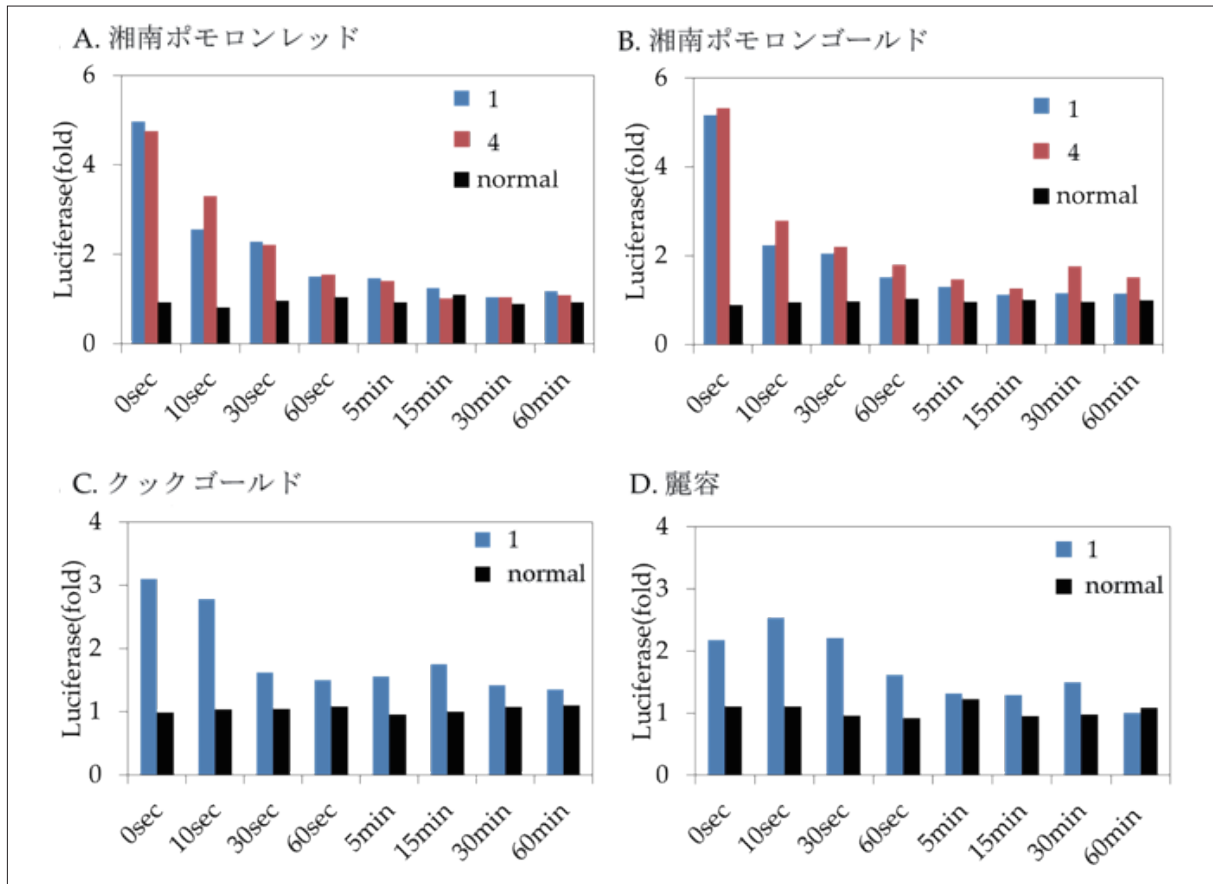


Fig. 4 加熱処理による影響

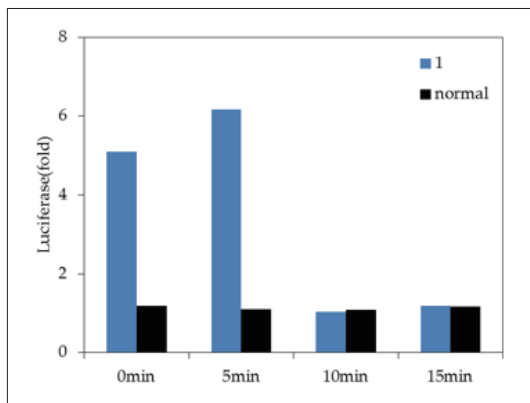


Fig. 5 焼きトマト

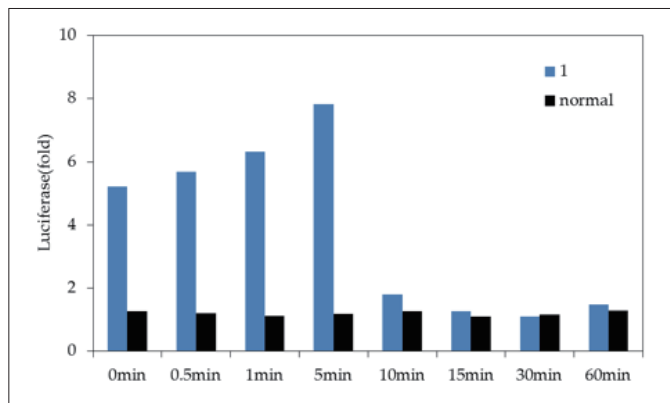


Fig. 6 煮トマト

考 察

本研究ではまず、生野菜・果物の抽出液についてEXiLE法で測定可能かどうか検討した。OASの代表的食材は野菜・果物であるが、特に日本国内でスギ花粉やイネ科花粉と交差反応性が報告されているトマト⁶⁾、と、シラカバ花粉に対する交差反応性報告例が最も多く、熱・酵素に不安定なリンゴをターゲットとした。

Fig.1A及びFig.2Aで示すように、特にリンゴに関しては市販のアレルゲンスクラッチエキスではほとんど反応が認められなかった。本エキスは原料を50%グリセリン食塩溶液で抽出した、2-8℃で保存可能な溶液であり(添付文書より)、ロット差はあると思われるが、OAS患者血清を用いたEXiLE法では適していないことが示唆された。次にprick-prick testは新鮮な野菜や果物を用いて行うことから、同じように新鮮なトマト及びリンゴを用いてすりおろし液を作製し、直ちにEXiLE法に供した。その結果、トマトのすりおろし液では問題ないが(Fig.1B)、No.3の患者は、リンゴのすりおろし液に対してルシフェラーゼ発現が認められなかった(Fig.2B)。そこで、操作は出来るだけ手早く4℃を保持するよう心掛け、リンゴ抽出に関しては、細断したらすぐに液体窒素で凍らせた後、破碎処理をすることとした。リンゴ、トマトとも、抽出効率の一番高い抽出溶媒はpH6.8のリン酸緩衝液だった。抽出液を加えて食材を破碎後、4℃で1時間rotateする抽出行程を入れていたが、トマトでは抽出時間なしのものと変わらず、リンゴではかえって抽出効率が1/10程度まで落ちたことから、抽出時間は必要ないものと判断した。なお、抽出液は-80℃で長期保存可能であった。Fig.1Cに示すように、最適化条件で調製したトマト抽出液で刺激してEXiLE法を行ったところ、全ての患者でカットオフ値1.5を超える応答が観察された。特

にNo.1及びNo.4の患者で高いルシフェラーゼ活性を示したことは、イネ科花粉の精製抗原Phl p12を用いたImmunoCAPの結果(Table 1)と良く相関しているものと示唆された。リンゴ抽出液を用いたEXiLEでは、No.5>No.1>No.2の順でルシフェラーゼ活性が見られたが、すりおろし液同様、prick-prick testで弱陽性(2mm)を示したNo.3患者血清では応答が認められなかった(Fig.2C)。リンゴ抽出液作製の際の検討でも、抽出時間が長いと抽出効率が悪くなったことから、RS-ATL8細胞を37℃で3時間刺激するEXiLE検査の最中も、リンゴ抽出液中の抗原の劣化が起こっていることが示唆され、応答性の低下はリンゴ抗原の不安定性によるものと考えられた。

また、加熱処理したトマト抽出液もしくは調理トマト(焼きトマト/煮トマト)抽出液を用いてEXiLE法を行ったところ、いずれの品種においても経時的にルシフェラーゼ活性が低下することが示され(Fig.4~6)、患者が摂取可能な食品の量と加工法を推測するにあたり、本法が有効であることが示唆された。

以上のことから、EXiLE法では、保存可能な患者血清と、失活しない抗原抽出・保存法の組み合わせにより、血液採取のみでthroughput性高く、原因抗原や交差反応抗原の探索が可能になることが示され、EXiLE法が*in vitro* OAS試験法として有用であることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Amlot PL, *et al. Clin Allergy*, 17, 33-42(1987)
- 2) Ortolani C, *et al. Ann Allergy*, 61, 47-52(1988)
- 3) Ortolani C, *et al. J Allergy Clin Immunol*, 83, 683-690(1989)

- 4) Nakamura R, *et al. Allergol Int*, **61**, 431-437(2012)
- 5) Nakamura R, *et al. Int Arch Allergy Immunol*, **160**, 259-264(2013)
- 6) Kondo Y, *et al. Clin Exp Allergy*, **32**, 590-594(2002)

Novel *in vitro* test for oral allergy syndrome using the EXiLE method

Haruyo Akiyama¹⁾, Ryosuke Nakamura²⁾, Yuma Fukutomi³⁾,
Kazuyuki Kurihara⁴⁾, Yasuko Nakano⁵⁾, Takaharu Negoro⁵⁾, Maki Miyazawa¹⁾

¹⁾Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ²⁾National Institute of Health Sciences

³⁾Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Sagami National Hospital

⁴⁾Kanagawa Children's Medical Center, ⁵⁾Showa University School of Pharmacy

[Objectives] Pollinosis patients are considered to suffer from oral allergy syndrome (OAS). Prick-prick test is the most effective *in vivo* immunological test to detect OAS. However, this test sometimes gives false-negative results for patients with apparent positive symptoms, probably because of unstable allergenicity of vegetables and fruits. CAP-FEIA test, a simple *in vitro* test that detects antigen-specific IgE antibodies, also gives false-negative results. In this report, the utility of the IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) Test, a recently-developed *in vitro* test for type I allergy, were evaluated using simply prepared extracts of fruits.

[Methods] Extracts of apples or tomatoes and allergenic extracts from Torii Pharmaceuticals were used as antigens. Sera from patients who contract both pollinosis and OAS against apples or tomatoes were obtained with written consent. RS-ATL8 cells were sensitized with 1:100 diluted patients' sera overnight. After washing, the cells were stimulated with 1–1000 ng/mL of antigens or anti-human IgE Ab at 37°C for 3h. Luciferase activity were assayed.

[Results] No immunological response was obtained from cells stimulated with a commercial allergenic extract of apples or tomatoes as is the case in CAP tests. On the other hand, grated fruits and PBS-based extracts were judged positive as in prick-prick tests because stimulation of sensitized cells induced 5–10-fold luciferase activity compared to mock-stimulated cells. Processed tomato (juice) gave similar results.

[Discussions] It was shown that the EXiLE method can determine allergen-specific IgE level using simply prepared food samples as well as purified antigens.