

《農芸化学奨励賞》

食物アレルギー構造の解析とそのアレルギー対応食品開発への応用



広島大学大学院生物圏科学研究科 助教授 田 辺 創 一

食物アレルギーへの早急な対応が望まれている。患者数の増加により、食品のアレルゲン表示が義務化されたことは周知のとおりである。食物アレルギーは、アレルゲンの腸管透過に始まり、体内免疫系による認識を受けて産生され肥満細胞上レセプターを介して存在する IgE 抗体が、アレルゲンにより架橋される過程を経て発症に至る。筆者は、食品科学の面からの対応として、食物ごとに異なるエピトープ構造 (IgE 抗体との結合に必要な部位) を逐一解析し、各個の低アレルゲン化食品を設計・作製するという課題をいただき、小麦アレルギーを中心として、食物アレルギー対応食品の創出を最終目標とする研究を行ってきた。さらに、その過程で、アレルゲン腸管透過を抑制する成分を見いだすなど、いくつかの基礎的な知見を得た。以下に主な成果を要約する。

1. 小麦主要アレルゲンの同定と低アレルゲン化小麦粉の開発

小麦は日本人の三大食物アレルギーの一つであり、世界的にも摂取量が多いことから、小麦アレルギーは深刻な問題となっている。

1.1 小麦主要アレルゲンの同定

小麦タンパク質を塩溶性と塩不溶性 (グルテニンとグリアジンからなる「グルテン」) とに分け、患者 IgE-ELISA を行ったところ、2/3 以上の患者が、当時アレルゲンとして研究されていなかったグルテン画分を認識することが明らかとなった。グルテン中のエピトープを明らかにするために、 α -キモトリプシ

ンを用いてグルテンの抗原性を保ったまま部分水解し、各種クロマトにより抗原性ペプチドを単離・同定した。アミノ酸配列解析の結果、SQQQ(Q)PPF の繰返しを 4 回もつ構造であり、これは低分子量グルテニン由来であることが判明した。さらに詳細に解析した結果、QQQPP 構造が IgE 結合性に必須な最小エピトープ構造であった。加えて、グリアジン中の繰返し配列 QQPFP および PQQPF も IgE 結合能を有していることを明らかにした。アレルゲンがこれらのエピトープペプチド配列を繰返し有するという事は、複数の IgE 抗体を架橋させやすいと考えられ、小麦アレルギーの構造上の特徴を具体的に示した知見である。

その他、塩溶性画分からは IgE 結合性の protein Z (後述) や多糖マンノグルカンなどを見いだした。

1.2 小麦粉の低アレルゲン化および加工製品の開発

主要エピトープ構造を破壊して小麦粉を低アレルゲン化するために、食品加工用酵素の中から最適な酵素をスクリーニングした。条件として、アレルゲン低減化能が高いことはもちろんであるが、酵素自体に抗原性がなく、かつアミラーゼ活性が低いことが望まれ、検索の結果、*Trichoderma viride* 由来セルラーゼおよび *Streptomyces griseus* 由来プロテアーゼ (アクチナーゼ) を選んだ。まず、セルラーゼ反応工程において、マンノグルカンを分解し、かつ制菌を行った。次に、アクチナーゼ反応工程において、ある程度の加工特性を温存させ、かつ後述する

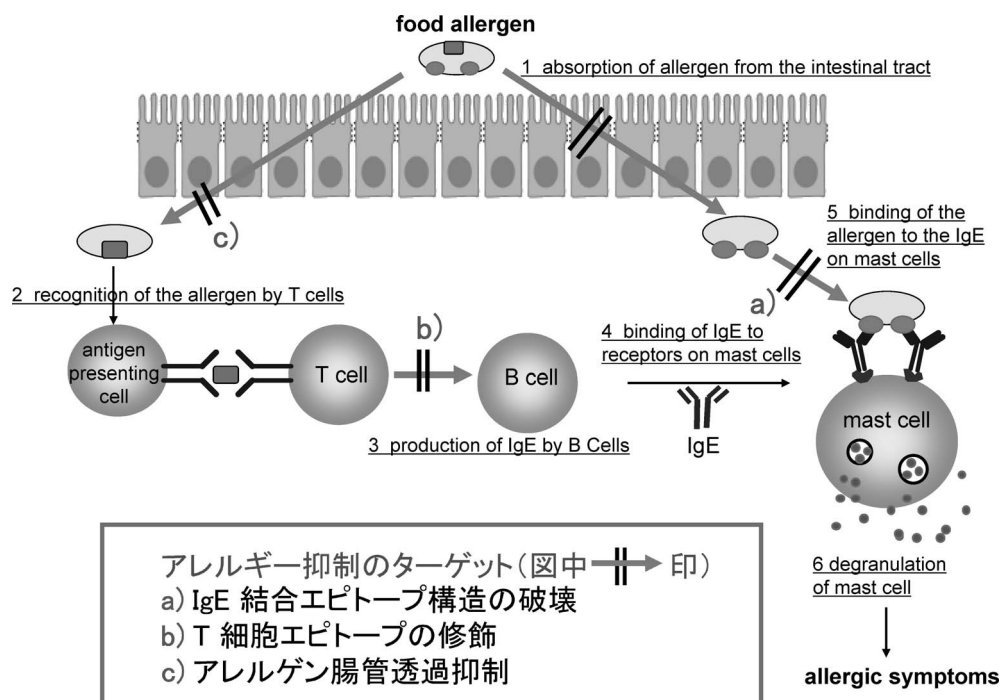


図 本研究の概要

アレルギー治療・予防作用を有するペプチド構造は温存させたまま、グルテンをはじめとするアレルゲンを十分に低減化した。

得られた低アレルゲン化小麦粉は、グルテンが分解されたためパッダー状となり、擬塑性の物性を示した。したがって、未分解の（普通）の小麦粉を扱うのと同じように加工に用いるのは不可能であった。しかし、パッダーの気体保持能、および低アレルゲン化小麦粉中に「無傷」に近い形で残っているデンプンの糊化特性を利用して、患者用食品の加工を試みた。低アレルゲン化小麦粉パッダーを蒸煮し、押し出し加工することでパスタ様の麺を作製した。これは、レトルト加工、冷凍保存、乾燥ができるので、賞味期間を長くすることが可能であった。あるいは、いくつかの材料を配合して、パン、クッキー、カップケーキなどを作製することにも成功し、食品会社により商品化され患者に提供されている。

1.3 低アレルゲン化小麦粉のアレルギー治療・予防効果

低アレルゲン化小麦粉の臨床評価の結果、患者の8割以上で長期の摂取によっても症状の誘発が認められず有効と判定された。しかも、摂取によりアレルギーが寛解し、普通の小麦粉が食べられるようになる患者が少なくないことが明らかとなった。小麦アレルギーの難治性を考えると、これらの症例は自然寛解のみでは説明が困難であり、低アレルゲン化小麦粉が治療・予防効果を有する可能性が考えられた。このことを証明するために、あらかじめグルテン感作した Brown Norway ラットに対し、可溶化グルテンを噴霧・吸入させ、グルテン特異的な気道炎症を誘導して評価系とした。低アレルゲン化小麦粉を含む飼料の投与により、気管支肺胞洗浄液中の好酸球、リンパ球、好中球数が顕著に減少し、また、血中のグルテン特異的 IgG1、IgG2a、IgE レベルの上昇を有意に抑制した。これらの免疫寛容作用は、低アレルゲン化小麦粉に含まれる T 細胞エピトープペプチドに起因すると考えられた。現在、低アレルゲン化小麦粉を摂取している患者の末梢血単核球を経時的に採取し、サイトカイン産生変動などを解析している。

一部分の重症患者は低アレルゲン化小麦粉にも反応を示した。低アレルゲン化小麦粉にわずかに残存する高分子量成分を western 解析したところ、小麦 protein Z などが責任抗原である可能性を見いだした。protein Z はプロテアーゼインヒビター活性をもつことから、低アレルゲン化に用いたプロテアーゼに耐性を示したと考えられた。患者体内においても分解を受けにくいと推察され、小麦アレルギーの難治性に関与する抗原の一つであると考えられる。今後、低減化反応の改善を重ね、重症患者における有効性を向上させたい。

2. 牛肉主要アレルゲン ウシ血清アルブミン (BSA)

牛肉アレルギー患者は BSA には反応を示すが、自身のもの（ヒト血清アルブミン、HSA）には反応しない。一方で、BSA と HSA の相同性は 76% と極めて高く、また両者の高次構造も類似している。このことから、BSA と HSA の一次配列上著しく異なる部分が患者により認識されると考え、該当部分をペプチド合成し検討した。その結果、主要な患者 IgE 結合エピトープとして EXXV モチーフ、すなわち EYAV(aa338-341)、ESKV(aa468-471)、ENFV(aa547-550)、および LILNR(aa453-457) を同定した。また、T 細胞に認識される三つの領域も見いだした。

次いで、IgE 結合能を有する HPEYAVSVLL(aa336-345) および VMENFVAF(aa545-542) に含まれる E 残基は、HSA ではともに D であることに着目し、置換ペプチド E338D および E547D の評価を行った。その結果、置換によって IgE 結合能が著しく低下したことから、患者 IgE は特にこの E 残基を認識していると結論された。加えて興味深いことに、置換ペプチドを患者末梢血単核球細胞培養系に添加して検討したところ、サイトカイン産生パターンを Th1 型に導くことが明らかとなった。これは、減感作ワクチン開発の方向性を示唆するものである。

また、関連して、ホスホグルコマンターゼ (PGM) を新規食肉アレルゲンとして同定した。PGM は BSA エピトープ EXXV と類似の配列を内部に有し、患者により BSA と交叉認識されるという興味深い知見を得た。

3. アレルゲン腸管透過抑制ペプチド

食物アレルギー発症の第一段階はアレルゲンの腸管透過であるから、これを抑制する成分について検討した。評価系には、腸管モデルとして透過性膜 (Transwell) 上に単層培養した caco-2 細胞を、アレルゲンとして FITC ラベルした卵白アルブミンを用いた。上述の低アレルゲン化小麦粉も本活性を有し、製造に用いたセルラーゼに由来する WSNSGNFVGGK が活性本体であることを見いだしたことが契機となり、幅広く市販食品の中から活性成分を探索したところ、エダムチーズなどに強い活性が認められた。エダムチーズより活性本体の単離・構造解析を行った結果、 β -カゼイン由来 DKIHFPF であることが判明した。ヒト母乳カゼイン中の相同配列 DKYPSF にも同等の活性が認められた。このことは、哺乳の意義の一つとして考えられる。すなわち、消化管機能の未成熟な乳児期に陥りやすい高分子成分の侵入を抑制する成分を乳から供給する働きである。

おわりに

上述の成果を基盤として、Th1/Th2 サイトカインバランス是正作用あるいは肥満細胞脱顆粒抑制作用をもつ食品因子の解析を行い、アレルギー対応食品開発への応用も試みている。また、冒頭のアレルゲン表示に係る対応についても、厚生労働科学研究班の一員として成果を上げている。アレルギー疾患は世界的な増加傾向が続いており、食品科学からのアプローチの必要性が衰えることはないと考えられる。今後、さらに研究を展開させ、アレルギー問題解決にわずかなりとも貢献したいと考えている。

本研究は、東京学芸大学教育学部生活科学科（前任校）において開始し、広島大学大学院生物圏科学研究科において展開したものであります。本研究を行う機会を与えていただき、開始当時から卓越したご指導とご鞭撻を賜りました前東京学芸大学教授・渡辺道子先生に心より御礼申し上げます。また、恩師である前東京大学大学院教授・荒井綜一先生（現東京農業大学教授）には、研究者としての基礎を教わり、終始温かいご指導、ご鞭撻を賜りましたこと、ここに改めて深く感謝いたします。本研究は、非常に多くの先生方と共同研究させていただくことにより得られた成果であり、北海道大学大学院教授・川端潤先生、同助教授・園山慶先生、同助教授・渡辺純先生、高崎健康福祉大学助教授・小林彰子先生、国立病院機構相模原

病院・柳原行義先生，関西医科大学病院小児科・谷内昇一郎先生，国立病院機構福岡病院・柴田瑠美子先生，国立医薬品食品衛生研究所・穂山 浩先生，イタリア Federico II 大学医学部・R. Troncone 先生をはじめとする諸先生に深く御礼申し上げます。また，学生時代よりこれまで絶え間ないご指導，激励をいただきました東京大学大学院教授・阿部啓子先生，同 清水誠先生，青山学院女子短期大学教授・谷本信也先生をはじめとする諸先生に心から御礼申し上げます。研究の推進のために，

多くの食品会社の皆様に数々の便宜を図っていただきました。また，本研究の継続にあたり，広島大学大学院教授・西村敏英先生ならびに研究室の卒業生・在学生の皆様には，多くのご助言や励ましを賜りました。深く感謝いたします。最後になりましたが，本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中四国支部長・海老原 清先生ならびにご支援を賜りました諸先生に厚く御礼申し上げます。