

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450187

研究課題名(和文) 経皮感作しうる食品タンパク質のアレルゲン性評価

研究課題名(英文) Evaluation of allergenicity of food proteins sensitized from dermal.

研究代表者

森山 達哉 (MORIYAMA, Tatsuya)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60239704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚からの食品抗原が侵入し、体内で特異的なIgE抗体の産生を検出する実験系の構築に成功した。この確立された評価系を用いて、大豆などの食品サンプルをマウス皮膚に塗布し、どのような大豆タンパク質に対する抗体が産生されたのか検討した。その結果、Gly m5と呼ばれる大豆アレルゲンに対して抗体が産生された。マウスを用いて、経皮感作を評価しうる系を構築し、大豆や果物などの食品を塗布することで特異的なIgE抗体が産生された。

研究成果の概要(英文)：Evaluation of allergenicity of food proteins sensitized from dermal was performed. The experimental system that food antigen invaded from skin was established using mice animal model. IgE antibody against subjected food protein was detected in serum. As food sample applied, soybean extract was applied to mouse skin using this established evaluation system, and it was considered an antibody to what kind of protein of soybeans was produced. As a result, an antibody was produced to the allergen of soybeans called Gly m5.

研究分野：食品分子機能学

キーワード：アレルギー 経皮感作 食物アレルギー 大豆

1. 研究開始当初の背景

(1) 食物アレルギーは、何らかの経路でアレルゲンが体内に侵入し、アレルゲンに対するIgE抗体が産生され(感作という)その後同じものを経口摂取した際に発症(惹起という)する。近年、食物アレルギーの発症機序に多様性があることが明らかとなってきた。いわゆるクラス1食物アレルギーでは、原因食品を経口摂取し、消化管から未消化の状態では吸収されて免疫系に作用しIgE抗体が産生され、再度同じ食品を摂取した際に発症する。一方、クラス2食物アレルギーでは、花粉症で花粉アレルゲンに対してIgE抗体が産生されたのち、花粉アレルゲンと構造が似ている野菜・果物・穀類などのアレルゲン分子の摂取によって引き起こされる。そのほかに、ごく最近、石けん中に含まれる小麦分解物が経皮的に侵入し、IgE抗体を産生し(経皮感作)その後小麦を摂取した際にアナフィラキシーが発症した症例が多数報告され、大きな社会問題となった。海外でも、乳児の食物アレルギーにおいて、食品の経皮感作が関与する可能性を示す研究報告が増加している。このように、食物アレルギーは、多様な感作経路が存在する可能性が認識されつつある。

(2) 申請者らはこれまでに、研究用の抗原調製・提供やデータ解析などを介して多くの食物アレルギーの症例において、関与するアレルゲンの探索やリスク変動解析などを行い、花粉抗原との類似タンパク質なども含む幅広い食物タンパク質がアレルゲンとして関与しうることや、経皮感作が疑われるような症例などを報告してきた。経皮感作の例としては、石けんや化粧品などに含まれる食品成分による感作疑いや、調理の際に接触する食品成分(米のとぎ汁など)からの感作が疑われる例などである。また、これらの症状を引き起こすアレルゲンレベルは農作物の品種や加工法、調理法、栽培方法などによって変

動することも明らかになりつつある。

経口感作によるクラス1食物アレルギーの場合のアレルゲン性評価方法としては消化抵抗性や腸管免疫系での感作能、免疫寛容への影響など、さまざまな評価モデル系が考案され研究されている。花粉抗原との交差反応性を基盤とするクラス2食物アレルギーの場合も、花粉アレルゲンとの構造類似性やIgE結合交差性などの評価基準にてアレルゲン性を評価しうる。しかしながら経皮感作に関しては、そのモデル動物系や培養細胞系もほとんどなく、アレルゲン性の評価基準としうる原理原則も不明であるため、どのような食品タンパク質が経皮感作されやすいのかというアレルゲン性評価方法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、マウスや培養細胞系を用いて経皮感作のモデル系を確立し、石けんや化粧品などに配合されることの多い植物性食品素材(大豆、果物等)に含まれるタンパク質成分のうち、どのような食品タンパク質分子が経皮感作されやすいのかということを確認したモデル系を用いて検証する。

経皮感作に関してはごく最近の知見であるため、そのモデル系の確立はいまだ十分なされていない。また、経皮感作されやすいタンパク質の網羅的解析は報告例がなく、それゆえ経皮感作されやすいタンパク質としての特性は全く不明である。従って、経皮感作系での食品タンパク質のアレルゲン性評価方法確立は新規であり、経皮感作という新しい概念から、どのような食品タンパク質が経皮感作されやすいのか検討した研究はほとんど見当たらず、本研究がその先駆けとなりうる。さらに申請者はこれまでに、大豆やコメなどの主要な農作物におけるアレルゲンについて探索し、主要農作物のアレルゲンを網羅的に得、その抗体を作製することにより

その変動要因を解析してきた。これらの研究で作製した抗体は、今回の研究でもアレルギーの経皮感作をモニターするために有益であり貴重な研究ツールとなる。従って研究をスムーズに進めることが可能である。

(2) また、経皮感作されやすい抗原の加工方法や、経皮感作を抑制する成分の探索などの研究へと発展する研究内容であることから、安全な化粧品・食品の加工方法や経皮感作のリスクを抑制するような成分などの研究へと応用することも期待できる。さらにこれら経皮感作を起こすアレルギータンパク質は、どのような処理や加工等で、どのように変動するかという点についても検討を加える。

3 . 研究の方法

免疫応答性の高いマウスである Balb/c マウスの背中を剃毛し、経皮感作されやすくするために物理的処理（テープ処理など）を行い、皮膚の透過性を高める処置を施す。その後、大豆や果物（サクランボ）、などのタンパク質溶液を界面活性剤（SDS）などの免疫補助剤（アジュバント効果を期待）存在下、皮膚に貼り付けまたは塗布した。経時的にマウスから部分採血し、血清中の IgE 抗体価の上昇を検討する。うまく抗体価が上昇したら、採血し、塗布した食品タンパク質に対する IgE イムノプロットティングを行い、塗布した食品タンパク質中のどのタンパク質を認識する IgE 抗体が産生されたのか検討する。方法としては、1 次元電気泳動によるイムノプロットティングを行い、サンプル塗布したマウス血清中の IgE でのみ検出される特異的なタンパク質バンドの有無を確認した。また、なお、経皮感作後、抗原タンパク質を経口投与し、アレルギー反応が惹起されるかどうかについても検討する。アレルギー反応の惹起は直腸温度の急激な低下等の指標によって

判断した。

4 . 研究成果

(1) 本研究では、食品タンパク質抗原の経皮感作について、どのような食品タンパク質が経皮感作されやすいのかという点や、経皮感作のメカニズムなどをマウスを用いて明らかにすることを目的としている。食品タンパク質としては、植物性食品タンパク質を主たる研究対象としている。皮膚バリアを壊したマウスの皮膚に大豆抽出液をハケで塗布することにより、パッチを貼る方法より高頻度で経皮感作を成立させることが出来た。また血清中の IgE、IgG 値もこれまでの方法よりも安定して高く、実験系として大きく改良することができた。

(2) 大豆抽出液をマウス皮膚に塗布し、経皮感作を引き起こしたところ、大豆タンパク質に対する IgE が高値となったことから、経皮的に大豆タンパク質が認識され、特異的な IgE 抗体が産生されたことが明らかとなった。そこで大豆中のどのようなタンパク質に対する IgE 抗体が産生されたのか、単離された主要アレルギータンパク質を用いたウエスタンブロットティングや ELISA にて検証したところ、7S グロブリン（ β -コングリシニン：Gly m5）に対する抗体が産生したことが明らかとなった。しかし、単離して尿素にて変性させた 7S グロブリン（ β -コングリシニン：Gly m5）を塗布した場合には、抗体の産生は見られなかった。また、その他の主要な大豆アレルギータンパク質として知られている Gly m3 や Gly m4、Gly m6、Gly mBd30K、などに対する特異的な IgE 抗体は産生されなかった。さらに、経口的に大豆タンパク質を摂取していると、経皮感作は抑制された。これは経口免疫寛容が作動したと考えられた。このような経皮感作する大豆のアレルギータンパク質は、味噌などの発酵食品では分解・低減化していることが

示され、これらの素材では感作能リスクは低いことが示唆された。その他、経皮感作しうる植物汎アレルギーとして、サクランボのソーマチンライクプロテインが考えられた。さらにこれらの汎アレルギーの変動解析も行い、これらの汎アレルギーは植物がカビ被害を受けた時に増加することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

山本美里、何 陽、財満信宏、森山達哉、炎症・アレルギーに関わるレジスチンの変動解析、アレルギーの臨床、査読有、2015, 35(14), 58-61 .

和田宏章、矢野えりか、末森祐輔、財満信宏、森山達哉、大豆アレルギー Gly m 4 の検出による各種大豆加工食品の OAS リスク評価、アレルギーの臨床、査読有、2015, 35(12), 64-67.

三口志穂、矢野えりか、末森祐輔、財満信宏、森山達哉、カビ被害による農作物汎アレルギー (PR-10, PR-5, プロフィリン) の変動解析、アレルギーの臨床、査読有、2015, 35 (9), 64-67.

Yagami A, Suzuki K, Sano A, Iwata Y, Arima M, Moriyama T, Matsunaga K, Immediate allergy due to raw garlic (*Allium sativum*L.) The Journal of Dermatology, 査読有、2015, 42(10), 1026-1027.

森山達哉、イムノプロット法によるアレルギーの解析方法, MB Derma. 増刊号, 査読無、2015, 「日常皮膚診療に役立つアレルギー百科」 pp. 28-32,

Moriyama T, Diversity of Food Allergy, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 61 (Suppl.), 査読有、2015, S106-108, 2015-05.

Inomata N, Okazaki F, Moriyama T, Nomura Y, Yamaguchi Y, Honjoh T, Kawamura Y, Narita H, Aihara M ,(2014) Identification of peamaclein

as a marker allergen related to systemic reactions in peach allergy, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 査読有、2014, 112, 175-177.

Iijima S, Tsunoda T, Moriyama T, Three Cases of oral allergy syndrome due to walnut: detection of IgE-binding walnut proteins. *Journal of environmental dermatology and cutaneous allergology* , 査読有、2014, 8(2), 95-102.

Zaima N, Yoshimura Y, Kawamura Y, Moriyama T. Distribution of lysophosphatidylcholine in endosperm of *Oryza sativa* rice. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 査読有、2014, 28,1515-1520.

森山達哉、食品素材のアレルギーリスク、*食品の包装*, 査読無、2014、Vol .46, No.1, p.32-38 .

森山達哉、植物性食品による食物アレルギーとアレルギー、*Sesame Newsletter* , 査読無、2014、No.28, p.16-18.

Moriyama T, YanoE, Suemori Y, Nakano K, Zaima N, and Kawamura Y. Evaluation of Hypoallergenicity of Various Miso Pastes Manufactured in Japan. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* 、査読有、2013, 59,462-469.

〔学会発表〕(計 11 件)

村上浩規、小川祥平、和田宏章、末森祐輔、矢野えりか、財満信宏、森山達哉 「経皮感作し得る大豆タンパク質の特性解析」日本食品科学工学会 第 62 回大会 (講演番号 3Ip8) 2015 年 8 月 29 日、京都大学 (京都府・京都市)
森山達哉：食物アレルギーの多様性とリスク変動解析、日本食品科学工学会 第 62 回大会シンポジウム、2015 年 8 月 28 日、京都大学 (京都府・京都市)。
森山達哉：食物アレルギーの原因抗原解析とリスク変動解析、第 10 回 東京皮膚疾患フォーラム、2015 年 7 月 16 日、ザ・ランドマークスクエア TOKYO (東京都・港区)。

森山達哉：花粉症に関連する新しいタイプの食物アレルギー、市民公開講座「第7回ひと・健康・未来シンポジウム2015福岡」食物アレルギーの最新情報」2015年7月4日、ホテルニューオータニ博多（福岡県・福岡市）。

Tatsuya Moriyama : Diversity of food allergy, (Organizer and speaker)

ACN2015 Symposium 32, (How can we fight against food allergy?), 12th Asian Congress of Nutrition, May 16, 2015, PACIFICO Yokohama, (Kanagawa, Japan).

森山達哉、“花粉症に関連する新しいタイプの食物アレルギー”ひと・健康・未来研究財団 第5回市民公開講座（招待講演）2015年2月28日、メルパルク名古屋（愛知県・名古屋市）

森山達哉、“花粉症に関連する新しい食物アレルギーとその発症リスク変動”NPO 食の安全と安心を科学する会(SFSS) 食の安全と安心フォーラム（招待講演）2014年11月28日、グランフロント大阪（大阪府・大阪市）

三口志穂、矢野喜裕、矢野えりか、末森祐輔、鶴澤有希、財満信宏、小川正、森山達哉、農作物の収穫後処理による汎アレルギーの変動解析、第53回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2014年10月25日、京都府立大学（京都府・京都市）

森山達哉、“穀類による食物アレルギー：大豆アレルギーを中心に”第29回ゴマ科学会大会招待講演（招待講演）2014年10月4日、近畿大学（大阪府・東大阪市）

森山達哉、“クラス2食物アレルギーの現状とそのリスク変動解析”日本食品免疫学会(JAFI)第7回シンポジウム（東京）招待講演）2014年6月30日、（東京大学（東京都・文京区）

足立厚子、森山達哉、成人における大豆アレルギー追加報告14例のまとめ、第26回日本アレルギー学会春季臨床大会2014年5月10日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕(計 4 件)

森山達哉、シーエムシー出版、食物アレルギーの現状と多様性、(森山達哉、穂山浩 監修「食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発」)、2015年3月2日発行、2015, p.1-8.

森山達哉、シーエムシー出版、クラス2食物アレルギーリスクの変動と低減化” (森山達哉、穂山浩 監修「食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発」)、2015年3月2日発行、2015, p.264-269.

森山達哉、共立出版、食物アレルギー、「健康栄養学 - 健康科学としての栄養生理化学(第2版)」(小田裕昭・加藤久典・関泰一郎編)2014年10月10日発行、2014, p.262-269.

森山達哉、シーエムシー出版、大豆アレルギーと大豆アレルゲン(家森幸男 監修、「大豆の栄養と機能性」)、2014年8月29日発行、2014, p.176-182.

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 達哉 (MORIYAMA, Tatsuya)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60239704