

5. 小麦アレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患

島根大学医学部皮膚科学講座

高橋 仁 森田 栄伸

Key words: Food-dependent exercise-induced anaphylaxis — High molecular weight glutenin
— ω -5 gliadin

はじめに

食物アレルギーは、食物摂取によって起こる生体に不利な反応の中で、免疫学的機序によるものと定義される¹⁾。食物抗原とIgEの結合による肥満細胞の活性化が引き金となり、活性化した肥満細胞や好塩基球から遊離される種々のケミカルメディエーターによって引き起こされる組織の浮腫や血圧低下がその基本病態である。

食物アレルギーの臨床病型は、乳児期にみられる「食物アレルギーが関与するアトピー性皮膚炎」、乳児期から成人期にみられる「即時型症状」、学童期から成人期にみられる「食物依存性運動誘発アナフィラキシー (food-dependent exercise-induced anaphylaxis: FDEIA)」や口腔アレルギー症候群に分類される¹⁾。小麦の吸入によって喘息やアレルギー性鼻炎が誘発される患者は、製粉業者や製パン業者等の小麦を扱う職業従事者に多く、Baker's Asthmaと呼ばれる。また、小麦への接触により、即時型症状を呈する小麦接触性蕁麻疹も存在する。即時型食物アレルギーにおいて、小児期に多い原因食品は鶏卵、乳製品、小麦の順

で、小麦は7%を占める。一方、成人では小麦は15%と高頻度である¹⁾。FDEIAの国内報告例の解析によると、その原因食品の頻度は小麦が圧倒的に高く、57%を占める²⁾³⁾(図1)。特に、成人では85%の症例で小麦が原因となっている。本稿では、小麦アレルゲンのうち、小麦が原因となるFDEIAの主要な抗原として同定された ω -5 グリアジンと高分子量グルテニンの性質とこれらのタンパク質を利用した診断について述べる。

小麦タンパク質の構成

小麦を構成するタンパク質は、小麦粉の中の約10%を占め、図2に示すように、塩に対する溶解性によって、塩可溶性、及び、塩不溶性タンパク質の2つに大別される。塩可溶性タンパク質は小麦タンパク質の約15%を占め、水および塩溶液に可溶なアルブミンと塩溶液に可溶なグロブリンに分けられる。塩不溶性タンパク質のグルテンは主要な貯蔵タンパク質であり、小麦タンパク質の約85%を占める。グルテンは水に難溶性で、アルコールに対する溶解性によりグリアジン、グルテニンに分類される⁴⁾。

利益相反 (conflict of interest) に関する開示: 著者全員は本論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

IMMUNOBIOLOGY OF WHEAT ALLERGEN AND ALLERGIC DISEASE

Hitoshi Takahashi and Eishin Morita

Department of Dermatology, Shimane University Faculty of Medicine

Abbreviations: IgE "immunoglobulin E", FDEIA "food-dependent exercise-induced anaphylaxis", NSAID "nonsteroidal antiinflammatory drug"

高橋 仁, 森田栄伸: 島根大学医学部皮膚科 [〒693-8501 出雲市塩冶町 89-1]

E-mail: tkh4@med.shimane-u.ac.jp

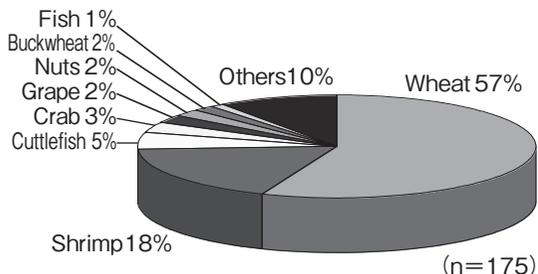


図 1. FDEIA における原因食品の割合 (文献 2 より引用).

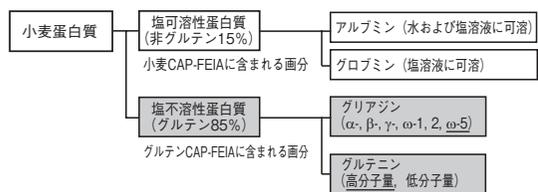


図 2. 小麦タンパク質の構成 (文献 4 より引用).

グリアジンとグルテニンの性質

グリアジン分子の多くはモノマーで存在し、生化学的性質によって α/β -、 γ -、 ω -グリアジンに分類できる⁵⁾。 α/β -、及び、 γ -グリアジンと比較して、 ω -グリアジンは長いリピートドメインと短いC末端ドメインから構成され、全領域にわたりシステイン残基をもたない⁵⁾⁻⁷⁾(図 3)。更に、高速液体クロマトグラフィーなどの生化学的手法による分離と、アミノ酸配列、アミノ酸組成、分子量の違いに基づき、 ω -グリアジンは ω -5 と ω -1,2 グリアジンに分けられる⁵⁾。 α/β -及び γ -グリアジンはグルテンの 60% を占めるのに対し、 ω -5 及び ω -1,2 グリアジンは、それぞれ 5% 前後である⁵⁾⁽⁸⁾(表 1)。

グルテンは、低分子量、高分子量グルテンに分けられ、それぞれのグルテンに対する含有量は 20%、及び、10% である⁵⁾⁽⁸⁾(表 1)。高分子量グルテンには、分子量 83-88kDa の x 型、及び、67-74kDa の y 型が存在する⁵⁾。それぞれの高分子量グルテンの両末端領域にはシステイン残基が存在し、高分子量、及び、低分子量グルテン間でのジスルフィド結合が形成される(図 4)。この巨

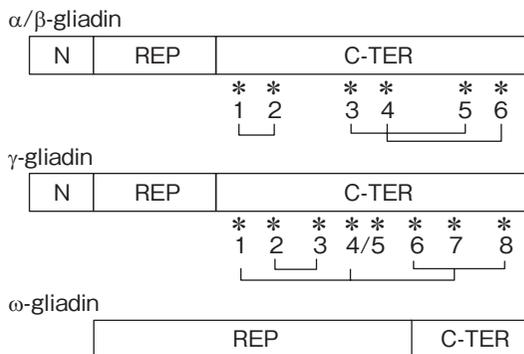


図 3. グリアジンタンパク質のドメイン構造
N : N 末端ドメイン, REP : リピートドメイン,
C-TER : C 末端ドメイン, * : システイン残基
(文献 6 より引用).

大なポリマー状分子は難水溶性である。その分子量は天然の状態では約 500kDa から 10000kDa に及び、グルテンに特有な粘弾性を与える⁵⁾⁽⁹⁾⁻¹³⁾。

小麦が原因となる FDEIA における ω -5 グリアジンと高分子量グルテン

食物アレルギーの診断には、血清中抗原特異的 IgE の検出が行われ、国内では、CAP-FEIA 法が広く用いられている。現在の小麦 CAP-FEIA の抗原には塩可溶性タンパク質が用いられ、また、グルテン CAP-FEIA の抗原にはグルテンタンパク質が用いられている。しかし、小麦が原因となる FDEIA 患者におけるこれらの陽性率は低く、診断における感度は不十分であった²⁾。

松尾らは、誘発試験により小麦が原因の FDEIA と確定診断された 15 例の患者血清を用いて、小麦アレルゲンの抗原解析を行った。その結果、患者血清中抗原特異的 IgE によって強く認識されたタンパク質は、患者の 12 例で ω -5 グリアジンであり、また、残りの 3 例で高分子量グルテンであった¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。また、これらのタンパク質に存在する IgE 結合エピトープは ω -5 グリアジンでは QxxPQQQ、高分子量グルテンでは QQPGQxQ、及び、QxSGQxQ (x は任意のアミノ酸)であることを明らかにした¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。これらのエピトープ配列は、それぞれのタンパク質に繰り返し

表1 グルテンに含まれる主要なタンパク質の分子量及びその存在率(文献5)

Type	MW × 10 ⁻³	Proportions* (%)
ω-5 gliadins	49-55	3-6
ω-1, 2 gliadins	39-44	4-7
α/β gliadins	28-35	28-33
γ gliadins	31-35	23-31
x-type HMW glutenins	83-88	4-9
y-type HMW glutenins	67-74	3-4
LMW glutenins	32-39	19-25

* According to total gluten proteins

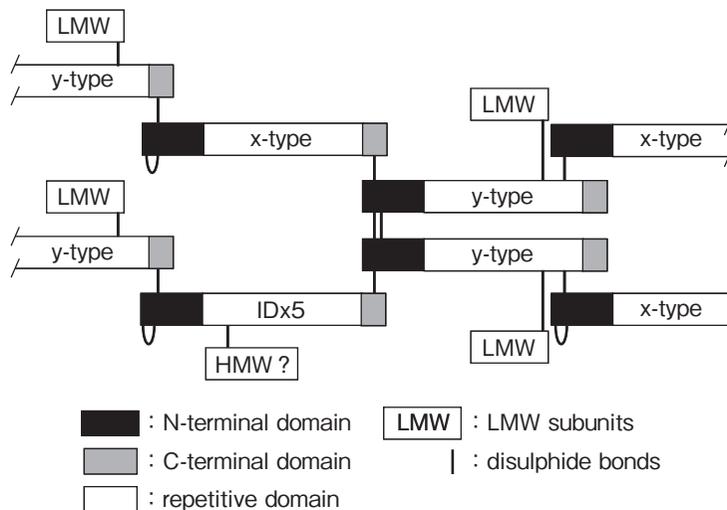


図4. グルテンによって形成されるポリマー分子のモデル (文献13より引用).

存在する。また、これらのエピトープ配列を含む合成ペプチドを抗原としたCAP-FEIA法は、従来の小麦タンパクCAPやグルテンCAPよりも感度・特異度において著しく向上した¹⁵⁾。更に、大腸菌発現系にて作製したC末端領域のリコンビナントω-5グリアジンと小麦から精製した天然型のタンパク質と比較して、同程度の抗原性を有することが患者血清を用いたウエスタンブロッティング(図5)、及び、阻害試験によって確認された¹⁶⁾。

小麦が原因となるFDEIAの診断におけるリコンビナント抗原の有用性

リコンビナントω-5グリアジンを抗原としたCAP-FEIAを作成し、従来の抗原を用いたCAP-FEIAと比較した(図6)。誘発試験にて確定診断された小麦によるFDEIA患者50名を検討した結果、従来の小麦、グルテンでの陽性率はそれぞれ、44%、48%であったが、エピトープ配列を含む2種類の合成ペプチドに対する陽性率はそれぞれ、76%と12%であった。また、リコンビナント

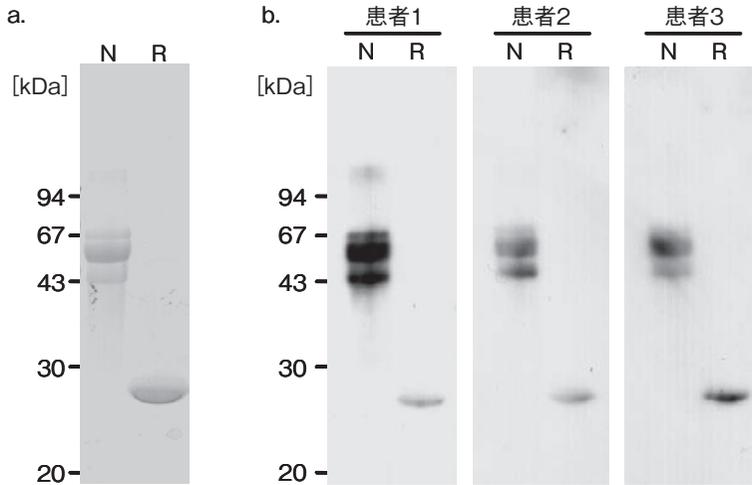


図5. ω -5 グリアジンに対する患者血清中抗原特異的 IgE の反応性。小麦から精製した ω -5 グリアジン (N), 及び, リコンビナント ω -5 グリアジン (R) を SDS-PAGE に供し (a), 患者血清を用いたウエスタンブロッティングを行った (b)。 (文献4より引用)

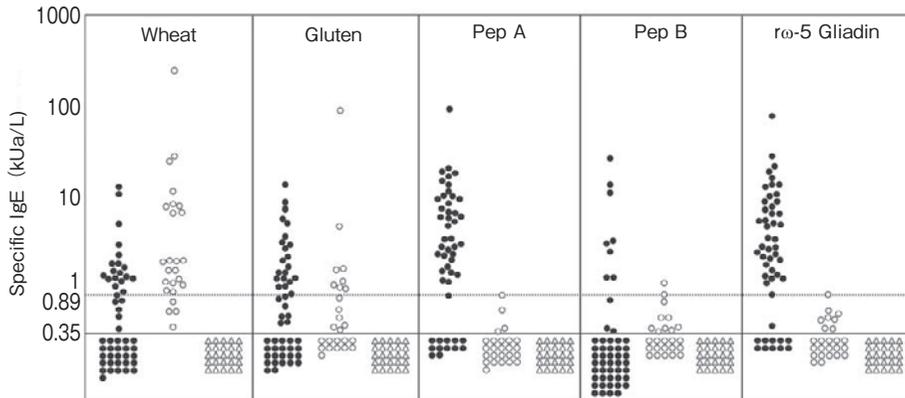


図6. 小麦, グルテン, エピトープペプチド, リコンビナント ω -5 グリアジンに対する特異的 IgE 抗体価 (文献17より引用)。

Pep A: ω -5 グリアジンに対するエピトープペプチド, Pep B: 高分子量グルテニンに対するエピトープペプチド, ●:小麦が原因となる FDEIA 患者 (50名), △: 健常人 (25名), ○:小麦あるいはグルテン特異的 IgE に陽性を示すが, 小麦摂取にてアレルギー症状を示さないアトピー性皮膚炎患者 (25名)

ω -5 グリアジンを抗原とした場合, エピトープペプチドを用いた場合よりも陽性率は上昇し, 82%を示した。一方, 小麦摂取にてアレルギー症状を呈さないアトピー性皮膚炎患者 30名において, 小麦, 及び, グルテンに対する陽性率は, それぞれ,

100%, 33%であったが, リコンビナント ω -5 グリアジンに対しては, 非特異的な反応が減少し, 10%が陽性となった¹⁷⁾(表2)。

また, 即時型小麦アレルギー患者7名を検討した結果, 陽性率は小麦71%, グルテン43%であっ

表2 CAP-FEIA 法による小麦関連の抗原特異的 IgE の陽性率 (%)*

対象	小麦	グルテン	ω -5 グリアジン に対するエピ トープペプチド	高分子量グルテニ ンに対するエピ トープペプチド	リコンビナント ω -5 グリアジン
健常人 (25 名)	0	0	0	0	0
小麦が原因となる FDEIA 患者 (50 名)	44	48	76	12	82
アトピー性皮膚炎患者** (30 名)	100	33	3	7	10
小麦アレルギー患者 (7 名)	71	43	86	29	86
小麦接触蕁麻疹患者 (7 名)	100	43	0	0	0

*CAP-FEIA のカットオフ値: 0.70kUa/L

**小麦あるいはグルテン特異的 IgE に陽性を示すが、小麦摂取にてアレルギー症状を示さないアトピー性皮膚炎患者 (文献 4 から引用)

たが、リコンビナント ω -5 グリアジンでは 86% を示し、リコンビナント ω -5 グリアジンは即時型小麦アレルギー患者でも主要な抗原であることが示唆された。一方、小麦接触蕁麻疹患者 7 名では、小麦 100%、グルテン 43% であったが、リコンビナント ω -5 グリアジンに対しては 0% を示し、リコンビナント ω -5 グリアジンは小麦接触蕁麻疹患者に対する診断には適さないことが示された⁴⁾ (表 2)。

松尾らは小麦、グルテン、 ω -5 グリアジンに対するエピトープペプチド、高分子量グルテンに対するエピトープペプチド、及び、リコンビナント ω -5 グリアジンを抗原とした CAP-FEIA 法の診断能に関して、受診者動作特性曲線を用いて解析した¹⁷⁾。その結果、リコンビナント ω -5 グリアジンを用いた場合が最も診断精度が高く、カットオフ値 0.89kUa/L とした場合、その感度は 78%、特異度は 96% を示した。これらの結果、リコンビナント ω -5 グリアジンは小麦が原因となる FDEIA の診断に非常に有用であることが明らかとなった¹⁷⁾。一方、負荷試験により小麦が原因となる FDEIA と確定診断されたにもかかわらず、 ω -5 グリアジン、及び、高分子量グルテンに対する IgE を持たない患者が少数ながら存在する。このような患者の一部は γ グリアジン、低分子量グルテンが抗原となり得ることが最近報告された¹⁸⁾。

運動負荷試験における血中抗原量の評価

FDEIA は原因食物の摂取に加え、運動などの

二次的要因が関与する。これは、腸管からの抗原吸収が運動負荷によって増強されることを示唆している²⁾。そこで、松尾らはグリアジンを特異的に検出できる高感度 ELISA を用いて、小麦が原因となる FDEIA 患者に対し、誘発試験時の血中グリアジン濃度を経時的に測定した¹⁹⁾²⁰⁾。誘発試験を行った解析例を図 7 に示す。その結果、小麦のみの負荷の場合、血中グリアジン濃度は検出限界以下となった。一方、小麦摂取と運動負荷を組み合わせ、なお且つ、症状が出現した場合では、症状の出現に先行して血中グリアジン濃度が上昇する事が明らかとなった²⁰⁾ (図 7)。この結果は、運動負荷によって何らかの機序で未消化の抗原の吸収が促進され、体内で IgE と反応して症状を誘発しているとの考えを支持するものである²⁰⁾²⁾。

また、アスピリンなどの NSAID の内服と原因食品の摂取との組み合わせによって、症状が誘発されることが知られている^{21)~23)}。その機序として、腸管上皮から血中への抗原の取り込みの促進、抗原による IgE の架橋とマスト細胞の活性化の促進が考えられる。そこで、この機序を検証するため、アスピリンの服用と小麦負荷によって症状が誘発された患者での血中グリアジン濃度を測定したところ、症状が誘発された時に血中グリアジン濃度が上昇していることが明らかとなった²⁰⁾ (図 7)。この結果は、運動と同様に、アスピリン負荷は腸管における抗原吸収の促進作用を有していることを示唆している。

FDEIA の確定診断には食物負荷試験が行われ

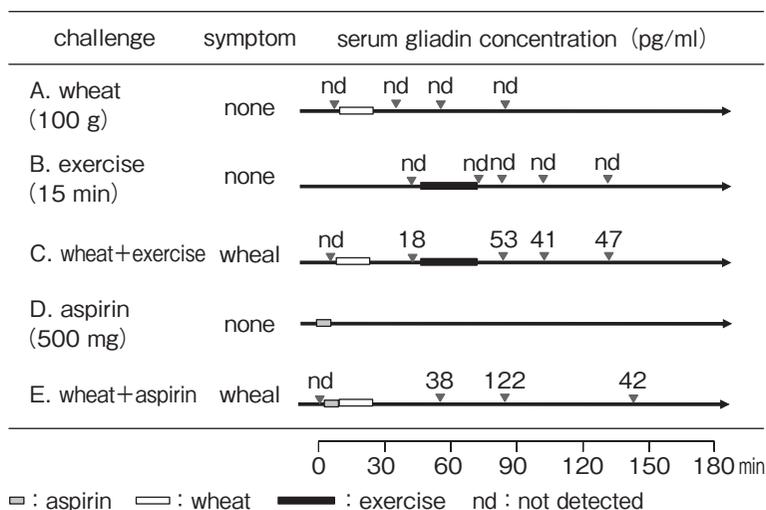


図7. 小麦が原因となるFDEIA患者の誘発試験時における血中グリアジン濃度の変化(文献2より引用).

ているが、実際にはその再現性は高くはない。その理由として、食物と運動負荷の組み合わせや、患者の体調も影響すると考えられる。食物摂取と運動負荷の組み合わせによって症状が誘発されればFDEIAと診断できるが、症状が誘発されない場合、除外診断できない。そこで、誘発試験時に血中グリアジン濃度を測定することで、実施した負荷試験が十分に行われたかを判定することが可能となる。もし、症状が誘発されない場合、血中グリアジン濃度の上昇が認められなければ、負荷試験として不十分と判定でき、条件を変更して再試験をすべきである。一方、血中グリアジン濃度が十分に上昇しているにもかかわらず症状が誘発されなければ、小麦が原因でないと判定できることになる。

おわりに

食物アレルギーの診断には、原因食品に含まれる原因アレルゲンの特徴を把握した上で、疑わしい疾患に対応した検査法を適用することが必要である。小麦が原因となるFDEIAの診断において、リコンビナント ω -5グリアジンを用いたCAP- ω FEIA法は、従来の小麦、及び、グルテンCAP- ω FEIA法よりも感度と特異度に優れていることが

明らかにされた。このことは食物抗原特異的IgEの測定においては、抗原を同定解析することで、アレルギーの診断精度を高めることができることを示しており、今後幅広い食物での研究が期待される。

文 献

- 1) 海老澤元宏. 食物アレルギーへの対応について—厚生労働科学研究班による「食物アレルギーの診療の手引き2005」. アレルギー 2006; 55: 107-14.
- 2) Morita E, Kunie K, Matsuo H. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 2007; 47: 109-17.
- 3) Harada S, Horikawa T, Ichihashi M. A study of food-dependent exercise-induced anaphylaxis by analyzing the Japanese cases reported in the literature. *Jpn J Allergol* 2000; 49: 1066-73.
- 4) 河野邦江, 松尾裕彰, 高橋 仁, 千貫祐子, 新原寛之, 森田栄伸. 小麦アレルギーと ω -5グリアジン. アレルギーの臨床 2008; 28(8): 638-43.
- 5) Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 2007; 24: 115-9.
- 6) Ferranti P, Mamone G, Picariello G, Addeo F.

- Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *J Mass Spectrom* 2007; 42: 1531-48.
- 7) Grosch W, Wieser H. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *J Cereal Sci* 1999; 29: 1-16.
 - 8) Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl* 1996; 412 (85 Suppl): 3-9.
 - 9) Keck B, Köhler P, Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten: cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion. *Z Lebensm Unters Forsch* 1995; 200: 432-9.
 - 10) Köhler P, Belitz HD, Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten: isolation of a cystine peptide from glutenin. *Z Lebensm Unters Forsch* 1991; 192 (3): 234-9.
 - 11) Köhler P, Belitz HD, Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from gamma-gliadins. *Z Lebensm Unters Forsch* 1993; 196: 239-47.
 - 12) Tao HP, Adalsteins AE, Kasarda DD. Intermolecular disulfide bonds link specific high-molecular-weight glutenin subunits in wheat endosperm. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1159: 13-21.
 - 13) Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 357 (1418): 133-42.
 - 14) Matsuo H, Kohno K, Niihara H, Morita E. Specific IgE determination to epitope peptides of omega-5 gliadin and high molecular weight glutenin subunit is a useful tool for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Immunol* 2005; 175 (12): 8116-22.
 - 15) Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, et al. Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem* 2004; 279: 12135-40.
 - 16) Matsuo H, Kohno K, Morita E. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS J* 2005; 272: 4431-8.
 - 17) Matsuo H, Dahlström J, Tanaka A, Kohno K, Takahashi H, Furumura M, et al. Sensitivity and specificity of recombinant omega-5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy* 2008; 63: 233-6.
 - 18) Kohno K, Matsuo H, Shimizu H, Tanaka A, Furumura M, Takahashi H, et al. Antigen analysis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis (subsequent report). *J Environ Dermatol Cutan Allergol* 2008; 2: 154-9.
 - 19) 森田栄伸, 河野邦江, 松尾裕彰. 食物依存性運動誘発アナフィラキシーの運動負荷試験. *臨床皮膚科* 2008; 62: 64-7.
 - 20) Matsuo H, Morimoto K, Akaki T, Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T, et al. Exercise and aspirin increase levels of circulating gliadin peptides in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 461-6.
 - 21) Dohi M, Suko M, Sugiyama H, Yamashita N, Tadokoro K, Juji F, et al. Food-dependent, exercise-induced anaphylaxis: a study on 11 Japanese cases. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87 (1 Pt 1): 34-40.
 - 22) Harada S, Horikawa T, Ashida M, Kamo T, Nishioka E, Ichihashi M. Aspirin enhances the induction of type I allergic symptoms when combined with food and exercise in patients with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Br J Dermatol* 2001; 145: 336-9.
 - 23) Aihara M, Miyazawa M, Osuna H, Tsubaki K, Ikebe T, Aihara Y, et al. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: influence of concurrent aspirin administration on skin testing and provocation. *Br J Dermatol* 2002; 146: 466-72.

＝小麦アレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患に関する問題

5-1. 小麦アレルギーに関し、正しいのはどれか.

- a 負荷試験で症状が誘発されない場合、除外診断できる
- b 小麦アレルギーの抗原は全て高分子量グルテニンである
- c ω -5 グリアジン CAP-FEIA は小麦接触性蕁麻疹の診断に有用である
- d 成人の FDEIA において、その原因食品の 57% は小麦である
- e 小児期の即時型食物アレルギーで最も多い原因食品は小麦である

5-2. 小麦アレルギーに関し、正しいのはどれか.

- a 全ての小麦タンパク質は水に対して可溶である
- b 本邦における成人の FDEIA において、エビは最も頻度の高い原因食品である
- c 小麦が原因となる FDEIA 患者において、小麦、及び、グルテンを抗原とした CAP-FEIA 法の陽性率はそれぞれ 90% 以上である
- d 小麦が原因となる FDEIA において、誘発試験時の血中グリアジン濃度の測定は、実施した負荷試験の判定に有用である
- e 誘発試験の再現性は非常に高い

＝専門医のためのアレルギー学講座問題の解答

「5. 小麦アレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患：高橋 仁・森田栄伸」

- 5-1. 正解 d
 - 5-2. 正解 d
-
-