

卵アレルギー患者血清による IgE 結合卵白抗原の検索

—ニワトリ, ウズラ, アヒル卵の主要タンパク質について—

高橋 享子*, 鎌田 陽子*, 寺田 慎子*, 大室 和代**

(*武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科, **宝塚第一病院小児科)

IgE-binding proteins of egg white using the sera with egg allergy

—Major proteins in egg whites of hen, quail and duck—

Kyoko Takahashi*, Yoko Kamada*, Chikako Terada* and Kazuyo Ohmuro**

**Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

***Dai-Ichi Hospital. Takarazuka, 665-0832, Japan*

IgE binding antigen of the major proteins in egg white, which is hen(H), quail(Q) and duck(D) was determined using the sera of patients with egg allergy. The major proteins of egg white were ovotransferrin(OT), ovomucoid(OI), ovalbumin(OA), ovomucoid(OM) and lysozyme(LY). The age of egg allergy patients used in this present study were 3 years 4 months-old to 4 months-old(RAST 2~6). After SDS-PAGE analysis of egg whites, Western-blotting and enzyme-immunoassay was examined using the serum of 33 patients with egg allergy. The positive blots of IgE binding proteins were ranked score 1~5 by positive color. The blots from score 2 to score 5 were positive of IgE binding. The positive percent of IgE blotting to hen OM was shown to have higher positive percent relatively to the other major proteins with the serum of 33 patients. And, on the sera of RAST 3 and RAST 4~6, ratio of IgE binding to hen OM indicated high positive percent. Therefore, from this study, these findings suppose that hen OM is the most important allergen of egg white proteins.

緒言

卵は、近年、大きな問題となっている食物アレルギーの主要な原因食物の一つとしても知られている¹⁾²⁾。平成8年度³⁾、および平成9年度⁴⁾に全国的に行われた「食物アレルギーに関する研究」においても食物アレルギーの原因食品の第1位に鶏卵が挙げられた。とくに、卵アレルギーは乳幼児に多く、その治療の多くは、除去食が中心となり、成長時期の乳幼児の食生活にも大きな影響を及ぼしている。

卵白中タンパク質のアレルゲンは、卵アレルギー患者血清のIgE抗体との反応性を指標にして、オ

ボアルブミン、オボムコイドが主要なアレルゲンであると報告されている⁵⁾⁶⁾⁷⁾。しかし、鶏卵以外の他の鳥類の卵白やその卵白中の主要なタンパク質についてのアレルゲン性の報告はほとんど認められない。

本研究では、最もよく食用として用いられている鶏卵、食用として市販されているウズラ卵、アヒル卵のそれぞれの卵白中の主要タンパク質に対して、乳幼児の卵アレルギー患者血清とのIgE免疫反応性から卵白アレルゲンの検索とその特異性について検討した。

実験方法

1. 供試料

市販鶏卵(Hen;H), うずら卵(Quail;Q), あひる卵(Duck;D)の卵黄と卵白を分離後, 卵白溶液を9倍量のイオン交換水で希釈後, 均一溶液にしたものをSDS電気泳動実験に供した.

2. 対象(患者血清)

小児科外来において, 卵アレルギーと診断された乳幼児患者の血清をアッセイに供した. 患者は, 4カ月児から3歳4カ月児までの卵アレルギー児33名で, 保護者から口頭によりインフォームドコンセントを得た. 卵アレルギー値のRAST 2~6で3群に分類した. RAST2の10名の患者をRAST2群(平均年齢1歳4カ月), RAST3の12名の患者をRAST3群(平均年齢1歳7カ月), RAST4~6の患者11名をRAST4~6群(平均年齢1歳7カ月)とした. 尚, 卵アレルギー児33名は, 卵完全除去食治療または, 卵一次加工品は摂食許可された治療食中であった.

3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

1%SDSを含む15%アクリルアミドゲルを下層に, 4.5%ゲルを上層に用い, Laemmli⁸⁾の方法に従って泳動した. 泳動用試料は, 供試料をさらに30倍に希釈したものを5 μ l用い20mAで. 泳動を行った. 染色は0.25%Coomassie Brilliant Blue R250(CBB)を用いた. 脱色は5%メタノール/7%酢酸を用いた. 尚, 卵白主要タンパク質の分子量は, 低分子量測定キット(Phosphorylase b, MW94,000; Bovine serum albumin, MW67,000; Ovalbumin, MW 43,000; Carbonic anhydrase, MW30,000; Soybean trypsin inhibitor, MW20,100; α -Lactalbumin, MW 14,400: Pharmacia 社製)を用いて測定した.

4. 免疫ブロッティング

SDS-PAGEで分離したタンパク質を, Towbinらの方法⁹⁾によりニトロセルロース膜に転写した. 転写膜はTBS Buffer(Tris-HCl buffer containing 0.5M NaCl pH7.5)で3回, 振とう・洗浄後, 3%BSAを含むTBS Bufferで1時間振とうし, タンパク質未結合部位をブロックした. 次に, 膜をポリエチレンの袋に入れ, その中に一次抗体として, PB(0.02M Phosphate Buffer pH 7.2)で5倍希釈した患者血清を0.5ml入れた後, 気泡を抜いてシーリン

グをし, 室温で17~18時間放置した. 一次抗体との反応後, 十分にTBS-Tween Buffer(TBS containing 0.05% Tween 20)で洗浄後, 二次抗体として, 1000倍希釈したBiotin conjugate anti-human IgE(American Qualex, USA)0.5 mlを加え室温で振とう反応を2時間行った. 次に, 膜を十分にTBS-Tween Bufferで洗浄後, 1000倍希釈したHRP-conjugate Avidin(DAKO, Denmark)0.5 mlを加え室温, 2時間振とう反応を行った. 再び十分に洗浄後, HRP発色キット(BioRAD, USA)で基質反応を5~20分に行い, バンドが十分に確認ができたらいオン交換水で反応を止めた.

5. 判定

判定は, 肉眼的に見える希薄なバンドをscore1, 明らかにバンドが確認できる濃度をscore2~5の4段階に分類して2以上を陽性とした. 尚, score判定は, 2人以上がそれぞれ行い, その平均scoreを最終結果とした.

実験結果

1. 鳥類卵白タンパク質のSDS-PAGE

鶏(H), うずら(Q), あひる(D)卵白を実験方法に基づき調製した試料のSDS-PAGEのバンドから, Fig. 1. に示すように主要タンパク質は, 高分子側からオボトランスフェリン(OT, MW 77,000), オボインヒビター(OI, MW 49,000), オボアルブミ

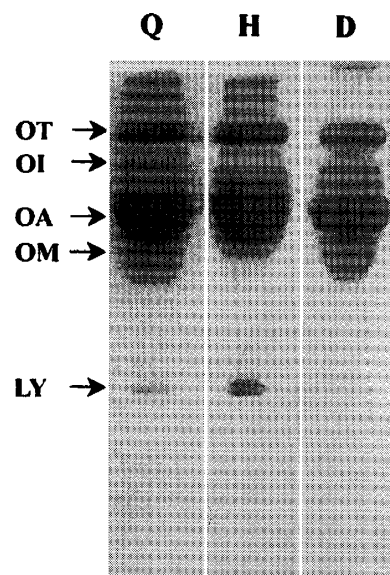


Fig. 1. SDS-PAGE of egg whites in quail, hen and duck. Q:egg white of quail, H:egg white of hen, D:egg white of duck.

ン(OA, MW45,000), オボムコイド(OM, MW 28,000), リゾチーム(LY, MW 14,300)が明らかに確認できた。これらの主要タンパク質に対する IgE 結合についての結果は次に示す。

2. 免疫プロットングの陽性反応

SDS-PAGE で分離した主要な卵白タンパク質に対する患者血清の IgE 反応の判定例を示すと, RAST 4 の患者(No. 20)では, H-OA に対して score4, H-OM に対しては score5 の陽性反応と判定した(Fig. 2-A)。RAST 6 の患者(No. 5)では, Q, H, D のいずれにも強く反応を示した。H については, H-OT, H-OI, H-OA, H-OM そして H-LY とも score 5 の陽性反応と判定した(Fig. 2-B)。これらの方法と同様に, 卵白主要タンパク質に対する RAST2~6 の 33 名の IgE 免疫反応判定を行い Table 1. に示した。Table 1. の結果から, RAST 2 群の患者では, Q, D の OT, OI, OA の陽性 score は低く, H, Q, D の OM, LY については, score2 以上の陽性判定が認められた。RAST4 群では, Q, D の卵白より H のタンパク質に対して高い score を示し, 特に H-OA, H-OM に高い score が認められた。RAST 6 の 2 名の患者では, H, Q, D のどの卵白に対しても, また, すべての主要タンパク質にも高い score が判定された。卵の種類で比較すると, ニワトリ卵白の主要タンパク質はウズラ, アヒルの主要卵白タンパク質より, いずれの RAST 群においても高い score を示した。

3. 各アレルギー群における IgE 陽性率

RAST2~6 群のアレルギー患者 33 名の主要タンパク質に対する陽性率, RAST3 群 12 名, RAST4~

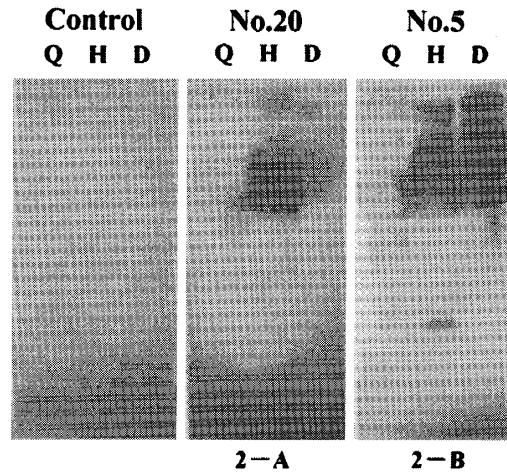


Fig. 2. IgE immunoblots to the major proteins of egg whites in quail, hen and duck. Q:egg white of quail, H:egg white of hen, D:egg white of duck.

6 群 11 名の主要タンパク質に対する陽性反応率をそれぞれ示した(Fig. 3.~Fig. 5.)。

RAST2~6 群 33 名では, 卵白主要タンパク質の中で, H-OM の陽性率が最も高く 45% の割合で反応を示した(Fig. 3.)。また, ウズラ, アヒル卵白の主要なタンパク質には陽性率が低くとも, いずれにも陽性を示した。3 種の卵白とも OM に対する陽性率が最も高い値を示した。

RAST3 群では, H-OM に対して 70% の高い陽性率が示されたが, H の OM を除いた他主要タンパク質に対しては, IgE 反応の陽性率は低く, OM と異なった反応率を示した(Fig. 4.)。また, RAST3 群も RAST2~6 と同様に, H, Q, D のどの

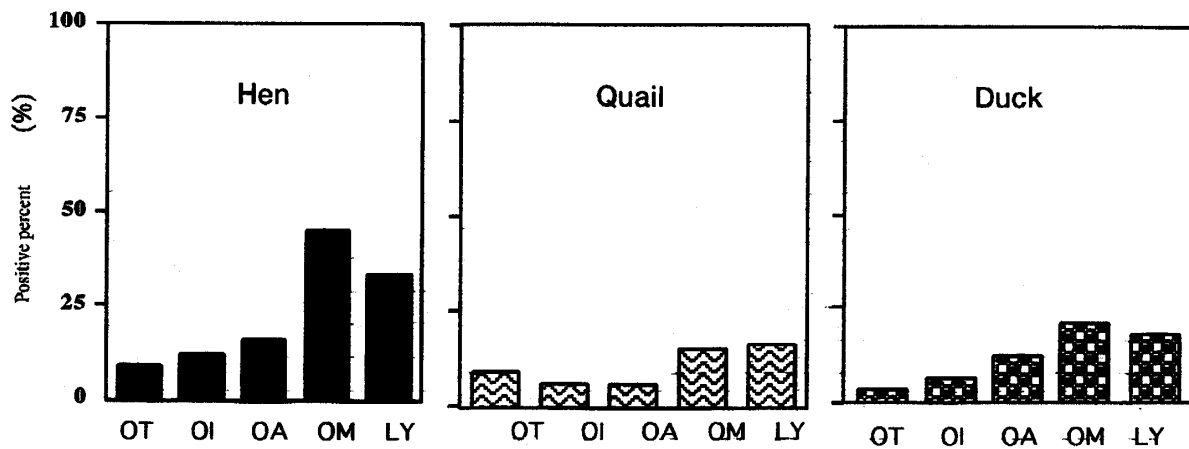


Fig. 3. Positive percent of IgE immunoblots to major proteins of egg white using the serum from egg-Rast 2~6 patients(33 children).

Table 1. Score of IgE immunoblots to proteins of egg whites in serums with food allergy

患者NO	年齢	性別	RAST(卵)	RIST(IU/ml)	H-OT	H-OI	H-OA	H-OM	H-LY	Q-OT	Q-OI	Q-OA	Q-OM	Q-LY	D-OT	D-OI	D-OA	D-OM	D-LY
4	1歳6ヶ月	女	2	356.4	1			1	3	1		1		2	1		1		
8	1歳3ヶ月	女	2	44.4		3	1	2			3		3						3
25	11ヶ月	男	2	39.7					3					4					1
26	3歳	男	2	122.8					2					3					1
28	2歳8ヶ月	男	2	N.D			1	1	2					3					1
29	2歳1ヶ月	男	2	N.D				4						4					3
46	1歳7ヶ月	男	2	349.3				2					1						
49	6ヶ月	女	2	41.8			1						1					1	
56	4ヶ月	男	2	31.3										1					
58	1歳	男	2	76.2				2						1					
1	1歳10ヶ月	女	3	810.5			2								1				2
2	2歳11ヶ月	男	3	771	1	1				1	1								4
3	6ヶ月	女	3	77	1		1	3	2					1	1			1	3
7	11ヶ月	女	3	83				5									4		
32	3歳	女	3	526.7			3	1						1					1
40	2歳2ヶ月	男	3	616.9			2	1											
43	1歳1ヶ月	女	3	70.8			2	3						1					2
47	3歳4ヶ月	女	3	504.4			2	3					1						2
50	1歳7ヶ月	男	3	358.8			2						1						
57	2歳7ヶ月	女	3	N.D				1											
60	6ヶ月	女	3	207.2	1		2												
63	4ヶ月	男	3	N.D			3						2						2
9	2歳8ヶ月	男	4	1017		3		4		3			4			3			4
13	2歳11ヶ月	女	4	531.5			1		1					1					
18	1歳2ヶ月	女	4	329.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
20	1歳9ヶ月	男	4	123.7	3		4	5	1	1	1	1	1	1	1		1		
37	2歳	男	4	1184	1			4		1		2		1	1		2		2
42	11ヶ月	女	4	192.8		2						1							1
54	2歳4ヶ月	男	4	117.7	1			3		1	1					1			1
64	4ヶ月	男	4	359.2	2		1		1	1		1		1	1		3		1
51	5ヶ月	女	5	N.D	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1				
5	2歳	女	6	3566.5	5	5	5	3	5	3	3	5	5	2	5	5	5	5	4
53	2歳	男	6	4508	1	1	2	5	3	1	1		3	1	1	1	1	1	4

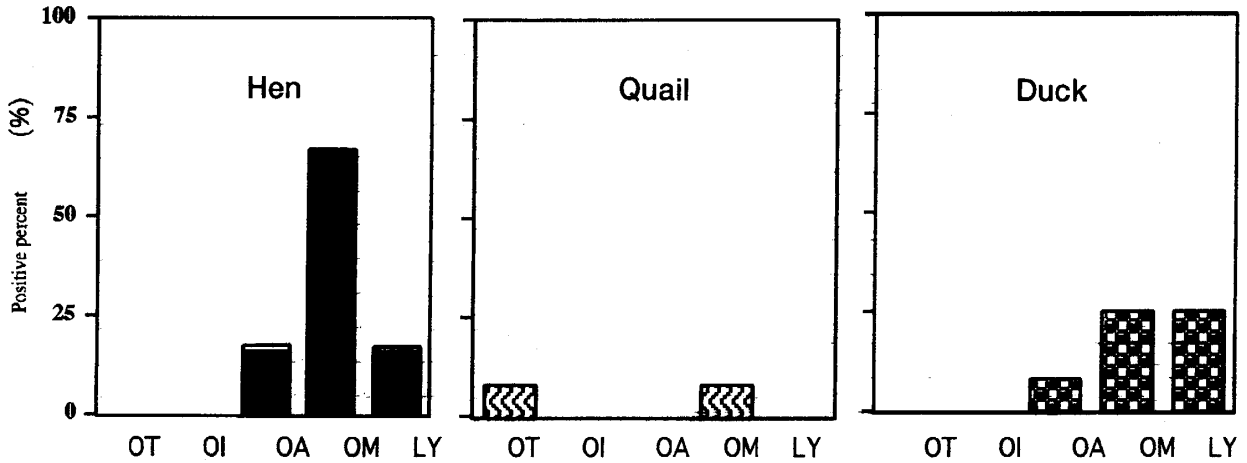


Fig. 4. Positive percent of IgE immunoblots to major proteins of egg white using the serum from egg-Rast 3 patients(12 children).

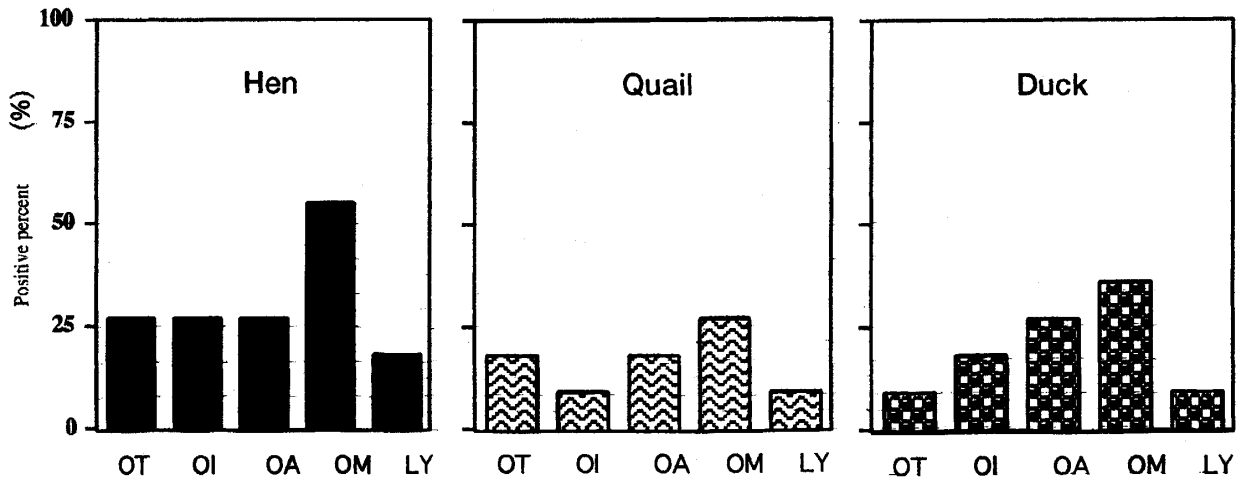


Fig. 5. Positive percent of IgE immunoblots to major proteins of egg white using the serum from egg-Rast 4~6 patients(11 children).

卵白においても OM のみに陽性反応を示した。この群では、ウズラの OA には、全く陽性反応が認められなかった。

最もアレルギー値が高い RAST4~6 群では、H、Q や D のいずれの主要卵白タンパク質に対しても陽性反応が認められた。特に H-OM については、他の主要タンパク質より高い陽性率を示した (Fig. 5.)。また、Q や D の卵白においても、OM に対する陽性反応率が最も高い値を示した。

考 察

インフォームドコンセントが得られた 4 ヶ月児から 3 歳 4 ヶ月の乳幼児 33 名の卵アレルギー患者による卵白主要タンパク質のアレルゲン検索を行った。その結果、ニワトリ、ウズラ、アヒル卵白の主要タンパク質に対する卵アレルギー乳幼児血清による

IgE 反応は、Table 1. に示すように、アレルギー値 RAST に比例して score も高い値を示した。特に、RAST 3 以上では、H-OM に対する陽性 score が高く、H-OM に対する特異性が高いことが判明した。また RAST4~6 群の患者血清については、ニワトリ、ウズラ、アヒル卵の主要なタンパク質にも、ほとんど陽性反応を示した。また、Fig. 5. の結果から、RAST4~6 群の 11 名は、ニワトリ卵白のみではなく、ウズラ、アヒル卵白にも免疫反応を示していることから、ウズラ、アヒル卵白に対しては、免疫交叉性を示しているとも考えられた。

いずれの RAST 群においても、H-OM に対して最も IgE 特異性が高いことが明らかとなり、ニワトリ卵白 OM は、主要卵白タンパク質の中で最もアレルゲン性が高いと推定された。またウズラ、アヒルの主要タンパク質に対しては、特異的に結合し

ているとも考えられるが、一患者の血清中に10種類以上もの特異的な anti 卵白抗原 IgE が存在するとは考えられないことより、免疫交叉的に陽性反応が示されているものと考えられた。

本研究より、卵アレルギー患者血清中の IgE 抗体による主要卵白タンパク質の抗原結合性は、個人差などによる要因で、抗原の特異性を明らかにすることは困難であった。しかし、33名の卵アレルギー患児については、ニワトリ OM は約 50~73% の陽性率で最も高い IgE 結合アレルゲンであったことより、卵白主要タンパク質の中で最もアレルゲン性の高いタンパク質であることが推定された。

要 約

卵アレルギー発症の要因であるアレルゲン検索を患者血清による IgE 結合性より検討した。ニワトリ、ウズラ、アヒルの卵それぞれを用い、患者血清についてはインフォームドコンセントが得られた患者の血清を用いた。卵白中の OT, OI, OA, OM, LY に対して、immunoblots の免疫測定法を用いて、乳幼児の卵アレルギー患者血清との IgE 免疫反応性から卵白アレルゲンの検索とその特異性について検討した。

本研究結果から、卵アレルギー患者血清中の IgE 抗体による抗原結合性は、個人差などによる要因で特定の特異的抗原を明確にすることは出来なかった。しかし、本実験に供した 33名の卵アレルギー患児については、H-OM は卵白アレルゲンとして約 50~73% の陽性率を示し、主要タンパク質の中で最もアレルゲン性の高いタンパク質であった。

文 献

- 1) Bock S.A. and Atkins M., *J. Pediatr.*, **117**, 561-567(1990)
- 2) Sampson H.A. and McCaskill C.C., *J. Pediatr*, **107**, 669-675(1985)
- 3) 飯倉洋治「食物アレルギー対策検討委員会:平成8年度報告」厚生省, 東京
- 4) 飯倉洋治「食物アレルギー対策検討委員会:平成9年度報告」厚生省, 東京
- 5) Langeland T., *J. Pediatr.*, **107**, 669-675 (1983)
- 6) Holen E. and Elsayed S., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **91**, 136-141(1990)
- 7) Bleumink E. and Young E., *Int. Arch. Al-*

lergy., **35**, 1-19(1969)

- 8) Laemmli, U.K., *Nature*, **227**, 680-685(1970)
- 9) Towbin H., Steehelin T. and Gordon J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979)