

研究課題名	小麦アレルゲンを欠損したパンコムギ系統の実用化に向けた調査		
フリガナ	エンドウ タカン		
代表者名	遠藤 隆		
所属機関 (機関名) (役職名)	龍谷大学農学部植物生命科学科 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	森田栄新 (モリタエイシン)	島根大学医学部	アレルゲン欠損系統の免疫学的および臨床研究
	新田康二 (ニッタコウジ)	島根県中山間地域研究センター	アレルゲン欠損系統の島根県中山間地域での栽培および加工
本助成金による発表論文, 学会発表	学会発表 新田 康二, 帯刀 一美, 河野 邦江, 千貫 裕子, 塩飽 邦憲, 森田 栄伸, 竹中 祥太郎, 遠藤 隆. 「小麦アレルゲンを欠損したパンコムギ系統の実用化に向けた調査」. 第242回日本作物学会講演会(龍谷大学瀬田キャンパス・2016年9月10日) (講演会 優秀発表賞 受賞)		

## 研究結果要約

小麦は、鶏卵、牛乳とともに「食物の3大アレルゲン」の一つである。小麦アレルギーは、グルテンの成分である $\omega$ -5グリアジンが主要抗原となっている。我々は $\omega$ -5グリアジン遺伝子座を欠失した実験系統を見出し、それに日本のパンコムギ品種ホクシンを5回交配して1BS-18ホクシン系統を育成した。本研究では、1BS-18系統について、収穫量や製パン特性を純系品種と比較し、さらに、免疫学的および臨床研究を行った。島根県中山間地域研究センターでの露地、及び瀬田でのハウス内栽培では、1BS-18は純系と比較して、収量はそれぞれ94%と67%と低下した。この主要な原因は、1BS-18の蒴に不裂開するものが多く不稔性が高くなったためであった。播種時期を変えた試験栽培は、播種時期を早めることによって1BS-18ホクシンの収量を改善できる可能性を示した。また、1BS-18の製パン性は純系に比べて遜色のないものであった。1BS-18のアレルゲン性について、 $\omega$ -5グリアジンのエピトープ抗体を用いたウエスタンブロット法および高速液体クロマトグラフィー法、及び動物実験を用いて評価した。1BS-18ホクシン由来のグルテンは患者血清と全く反応せず、1BS-18由来のグルテンを摂取したモルモットは、市販グルテンを摂取したモルモットと比較して、有意にアレルギースコアが低く、1BS-18のアレルゲン性が低いことが示された。

## 研究目的

小麦アレルギーの治療法は確立されておらず、唯一の予防法は原因となるグルテンを含む食品を摂取しないことである。いわゆるグルテンフリーの食品・メニューが普及しているとはいえ、小麦粉はほとんどの食品や料理に含まれているので、小麦アレルギー患者は極めて不便な食生活を余儀なくされている。小麦アレルギーは、グルテンの成分であるグリアジンが主要な抗原となっており、各種のグリアジンの中でも、 $\omega-5$ グリアジンが小麦アレルギーの主要抗原である<sup>1)</sup>。 $\omega-5$ グリアジンをコードする遺伝子は1B染色体の末端に座乗する。 $\omega-5$ グリアジン遺伝子座を含む最も小さく欠失を持つ実験系統を<sup>2)</sup>、日本のパンコムギ品種ホクシンに戻し交配して、 $\omega-5$ グリアジン遺伝子座を欠失したホクシンのアレルゲン欠損系統1B-18を育成した。

本研究では、この1B-18系統を異なる地域と異なる栽培条件で栽培して、稔性や収量の調査を行い、最適な栽培条件を明らかにすること、収穫した1B-18系統小麦を製粉してパンやうどんに加工して、その特性を既存品種の製パン性・製麺性と比較して1B-18系統栽培特性を明らかにすることを目的とした。更には、1B-18系統小麦の免疫学および臨床研究を行うこと、具体的には、1B-18のアレルゲン性について、モルモットを用いた動物実験により評価を行うことを目的とした。

本研究により1B-18系統が、収量や加工性の観点から、実用品種になり得るかどうかの判定、アレルギー反応を低減するなどの生体内における1B-18のアレルゲン性に関して基礎的知見の獲得が期待される。1B-18系統が期待

通りの栽培特性と低アレルゲン性を示せば、日本でも増えている小麦アレルギー患者には、食生活の質の向上をもたらす福音となるであろうし、乳幼児にとっては、コムギアレルギーの予防になることが期待される。さらには、全国的・世界的にアレルゲン欠損パンコムギ品種の普及が期待される。

## 研究計画及び研究手法

当初の計画と実施した内容は以下の通りである。

### 当初計画

(1) ホクシンのアレルゲン欠損系統と純系品種を、滋賀県瀬田の水田地域（龍谷大学農学部）の圃場とビニールハウス内で、播種時期を変えて栽培する。稔性と収穫量の調査をして、アレルゲン欠損系統の最適栽培条件を明らかにする。

(2) アレルゲン欠損系統と純系品種を、島根県の中山間地域（島根県中山間地域センター）の圃場とビニールハウスで栽培する。稔性と収穫量の調査をして、アレルゲン欠損系統と純系系統の収穫量の比較を行う。ビニールハウス内での栽培は、他品種との自然交雑を極力無くするため、アレルゲン欠損系統の実用化に当たって、加工適正やアレルゲン性の試験のため及び生産のための種子を大量に増殖するためである。

(3) 圃場で栽培するアレルゲン欠損系統と純系品種の間の自然交雑率を、染色体調査およびPCRにより調査する。これにより、実際の栽培で自然交雑を避けるための、他品種との安全な隔離距離を明らかにする。

(4) 収穫したアレルゲン欠損系統をパンやうどん

んに加工して、製パン性と製麺性を調査する。これにより、アレルギー欠損系統が実用的な品種となり得るかどうかを確認する。

(5) アレルギー欠損系統のアレルギー性を、 $\omega$ -5 グリアジン抗体を用いて免疫学的に調査すると共に、実際の患者を対象とした臨床試験を行う。

#### 実施内容

(1) 水田転換畑（無施肥）で1BS-18と純系をそれぞれ8反復で栽培した（1反復0.25 a, 栽培密度 60 cm x 20 cm 3粒播種）。ビニールハウス（化成肥料チッソ・リン酸・カリ各6 kg/10 a）で1BS-18と純系をそれぞれ6反復で栽培した（24 個体/1反復0.5 m<sup>2</sup>）。

(2) 露地栽培（化成肥料チッソ・リン酸・カリ各6 kg/10 a）では、1BS-18ホクシンをH27年11月4日播種区（以下、露地早い区）、11月17日播種区（以下、露地対照区）、11月30日播種区（以下、露地遅い区）に播種時期を分けた。また、対照区と同日に純系ホクシン（以下、純系ホクシン区）も播種した。栽培密度は8.3本/m<sup>2</sup>（条間60cm×株間20cm）で3粒播種とした。各区ではそれぞれの出穂期、生育（稈長、穂長、穂数）、収量、穂の稔性を調査した。また、収穫後はホクシンを除く各区のデオキシニバレノール（以下、DON）及びニバレノール（以下、NIV）の成分分析をおこなった。

ハウス栽培（化成肥料チッソ・リン酸・カリ各6 kg/10 a）では、1BS-18ホクシンをH27年12月1日播種区（以下、ハウス早い区）、12月15日播種区（以下、ハウス対照区）、12月

25日播種区（以下、ハウス遅い区）に播種時期を分けた。栽培密度は露地と同様のものに設定した。露地栽培と同様の調査をおこなった。ただし、DON及びNIV分析はハウス早い区、ハウス対照区、ハウス遅い区の3区を混合して分析した。

(3) 1BS-18と純系間の自然交雑を、20個体について染色体観察を行った。PCRでの調査のため、1BS-18にだけ欠損しているPCRマーカー（プライマー :5' AAGTGAGCAATAGTAAACACAAATCAAAC 3'/5' CGTTACATTATGCTCCATTGACTAACAACGATG 3'）の開発を行った。しかし、計画した1BS-18と純系間の自然交雑率のPCRによる大規模調査は計画通りには実施できなかった。

(4) 製パン性試験ではハウス内で収穫した1BS-18ホクシン（ハウス早い区、ハウス対照区、ハウス遅い区を混合）を全粒粉にしたものと、純系ホクシンを全粒粉にしたもの、市販の強力粉（レッドキューブ）の3つに対し、比容積（cm<sup>3</sup>/g）を測定した。機器は市販のZOJIRUSHI BB-KW10型を用いた。

(5) 実験系統1BS-18のアレルギー性評価を、モルモットを実験動物として感作および負荷試験を行い、市販グルテンとの比較を行うことにより1BS-18系統の感作能を評価した。モルモット10匹を1グループとして2群準備し、1群には16時間絶食後に1BS-18系統由来のグルテン感作液（40 mg/mL, 20 mL/kg）を、もう1群には市販グルテン感作液（40 mg/mL, 20 mL/kg）を10日間連続投与した。その後、14日目まで、あるいは、グループの半数のモルモットがアレルギー症状を呈する（後述するアレル

ギースコアが1以上となる)まで感作液の投与を継続した(下図 a)。

感作に際しては、グルテン感作液投与の1時間前に炭酸水素ナトリウム溶液(7%, 20 mL/kg)を投与して胃酸を中和した後、グルテンによる感作の効率を高めるためにアスピリンの代謝産物であるサリチル酸溶液(10 mg/mL, 0.5%メチルセルロースに溶解, 20 mL/kg)を前投与した。なお、アレルギー症状のスコアリングは既報文献を参考にして、無症状0点、鼻こすり(搔

痒行動)および立毛1点、発赤症状および下痢2点、努力性呼吸およびチアノーゼ3点、死亡4点として合計スコアを用いた(下図 b)3)。なお、本検討では、実際の患者を対象とした臨床試験を行う前に、動物実験による基礎的評価を行った。当初目的としていた実際の患者を対象とした臨床試験については、島根大学医の倫理委員会を通過した段階であり、今後の課題として行う予定である。

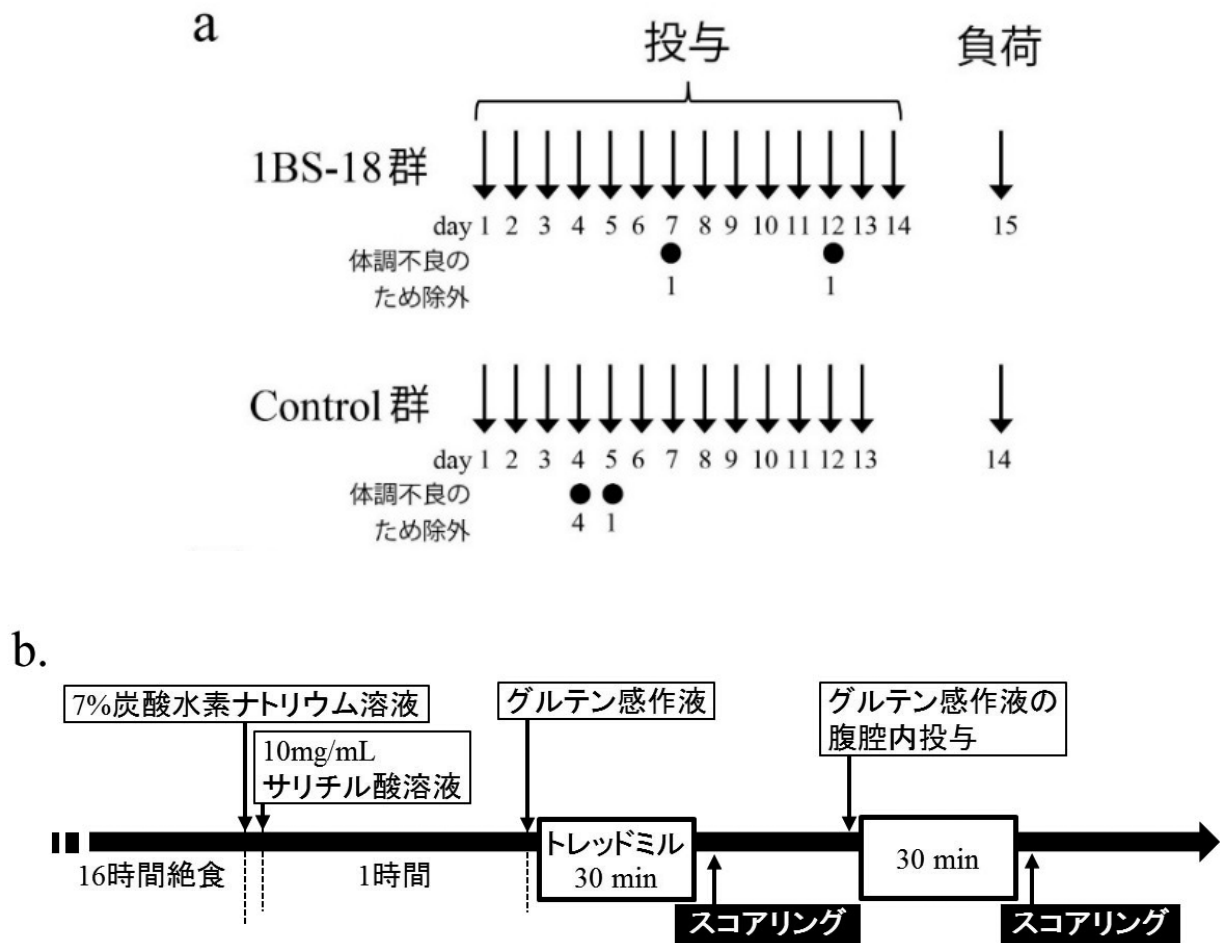


図1. 1BS-18由来のグルテンおよび市販グルテン感作液を用いた感作および負荷試験。

## 結果と考察

### ホクシン IBS-18 をホクシン純系と比較した結果 (島根・露地と瀬田・ハウス)

- ・ 稈長は統計的に有意な差はなく、穂長、穂数に有意な差があった。この差は、IBS-18 染色体の末端欠失の 1 効果もあるが、実験系統の遺伝的背景がホクシンに完全に置き換わっていないことも影響していると思われる。
- ・ 稈性は、島根・露地で 8.0% 低下し ( $P = 0.105964$ )、瀬田・ハウスで 16.2% 低下した ( $P = 0.000066$ )。ホクシン IBS-18 を人為交配するとほぼ 100% の着粒であることから、稈性の低下は葯の高頻度の不裂開が原因と考えられる。
- ・ 収量は、島根・露地で 9 kg/10a 低下し ( $P = 0.63$ )、瀬田・ハウスで 195 kg/10a 低下した ( $P = 0.005871$ )。稈性の低下が収量の低下に反映したと考えられる。

### ホクシン IBS-18 の収量を播種時期により比較した結果 (島根・露地/ハウス)

- ・ 島根・露地での 11 月 4 日播種は、11 月 30 日播種に比べて 89 kg/10a (85%) 多かった ( $P = 0.000015$ )。これは、冬季までの生育期間と全体の生育期間の長期化が、穂長、穂数、千粒重の増加に寄与したためと考えられる。
- ・ 島根・ハウスでの 12 月 1 日播種は、12 月 25 日播種にくらべて収量に差はなかった ( $P = 0.465715$ )。これは、12 月 1 日が既に低温になっており早く播種した効果が無かったためと考えられる。

### 実験系統 IBS-18 のアレルゲン性評価

- ・ IBS-18 由来グルテン感作群は、14 日目まで

アレルギー症状の出現はなく、15 日目に小麦運動負荷を行うも症状出現に至らなかったが、グルテン感作液の腹腔内投与によりアレルギー症状が出現した (アレルギースコア = 0.4, 表参照)。

- ・ 市販グルテン感作群は 13 日目に全例がスコア 1 以上のアレルギー症状を呈し、14 日目に行った小麦運動負荷によりアレルギー症状がみられたが、運動によるアレルギー症状の増強は見られなかった (アレルギースコア = 1.4, 表参照)。また、グルテン感作液の腹腔内投与によりアレルギー症状が増強した (アレルギースコア = 4.4, 表参照)。
- ・ 感作期間中に市販グルテン感作グループでは 10 匹の実験動物のうち 5 匹が実験開始後 5 日以内に瀕死状態となり、IBS-18 系統グルテン感作グループでは 2 匹が 12 日以内に瀕死状態となったために安楽死処分を行った。解剖の結果これらモルモットでは消化管の障害が見られ、サリチル酸の前投与による消化管障害に加えて、感作時に投与したグルテンの量が多量であった事が体調不良の原因と考えられた。
- ・ モルモットにおいて、IBS-18 系統由来グルテン感作群は市販グルテン感作群よりアレルギースコアが有意に低く、IBS-18 系統の感作能が低いことが示された。モルモットの IgE 抗体に対する特異抗体試薬が存在しないため、本検討では感作成立の指標となる小麦関連項目 (小麦, グルテン,  $\omega$ -5 gliadin) 特異的 IgE の上昇は確認し得なかった。
- ・ しかし、市販グルテンおよび IBS-18 系統由来グルテンの腹腔内投与によりアレルギー症

状の出現が確認されたことは、感作成立の一つの指標と考えられる。また、感作過程において、市販グルテン投与群は、1BS-18 系統由来のグルテン投与群に比して体調不良個体が多かったことから、1BS-18 系統由来のグルテンはよりアレルギー性が低いことが示唆された。

- ・動物実験により、in vitro のみならず in vivo の検討においても、1BS-18 のアレルギー性が低いという基礎的知見が示された。

### 本助成研究で、所期の結果は得られた

1BS-18 ホクシン系統は、栽培試験の結果若干の不稔性による収量低下があるものの栽培方法により不稔性は改善できそうであること、動物を用いた試験ではアレルギー原性が低下していることが示されたので、1BS-18 が低アレルギー

化コムギの実用品種として有望であるという、所期の結果は得られた。

### 助成期間後に残された課題

1BS-18 ホクシン系統の真の実用化には、大規模栽培（ヘクタール単位）をして工場製粉による上質小麦粉を使った品質試験をする必要がある。また、1BS-18 のアレルギー原性の評価については、実際の患者を対象とした臨床試験を行う必要がある。

### 学会や論文発表等

これまでの途中結果はすでに学会発表している。時間がかかるかも知れないが、更なる結果が得られれば、学会や論文で発表する。また、市民講演会のような場では積極的に発表した。

表．感作時および負荷試験時のモルモットのアレルギースコア

動物番号	感作時のスコア (点数および日数)	負荷試験時のスコア (点数)	
		グルテン+トレッドミル	腹腔内投与
市販グルテンを感作したグループ			
1	1 (1 on day 13)	1 (1)	4 (1+3)
5	1 (1 on day 13)	1 (1)	4 (1+3)
7	3 (1+2 on day 13)	3 (1+2)	6 (1+2+3)
8	1 (1 on day 13)	1 (1)	4 (1+3)
9	1 (1 on day 13)	1 (1)	4 (1+3)
平均±偏差	1.4 ± 0.9	1.4 ± 0.9	4.4 ± 0.9
1BS-18 由来のグルテンを感作したグループ			
3	0 (day 14)	0	0
4	0 (day 14)	0	1 (1)
5	0 (day 14)	0	0
6	0 (day 14)	0	1 (1)
7	0 (day 14)	0	1 (1)
8	0 (day 14)	0	0
9	0 (day 14)	0	0
10	0 (day 14)	0	0
平均±偏差	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0.4 ± 0.5

Note) アレルギースコアは、感作時および負荷試験時ともに 1BS-18 由来のグルテンを感作したグループで有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ ).

## 今後の研究活動について

### 本助成研究の結果、さらに進める必要のある研究

1BS-18 ホクシン系統が実用品種になり得る結果が得られたので、いろいろな地域での栽培とさまざまな用途に対応するため、栽培方法の改良と1BS-18 染色体を異なる品種（パン用、春播き等）に導入する研究が必要である。

動物実験により、*in vitro* のみならず *in vivo* の検討においても、1BS-18 のアレルゲン性が低いという基礎的知見が示されたので、実際の患者を対象とした臨床試験を行う研究が必要である。

### 今後の研究活動

低アレルゲン化コムギ品種を日本とヨーロッパの春播きコムギ品種で育成するために、1BS-18 染色体導入のための交配と選抜を継続している。

患者を対象とした臨床試験については、島根大学医の倫理委員会を通過した段階であり、今後の課題として行う予定である。

### 参考文献

- 1) Morita E, Matsuo H, Mihara S, Morimoto K, Savage AWJ, Tatham AS. Fast  $\omega$ -gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci.* 2003 Nov;33(2):99-104.
- 2) Endo TR, Gill BS. The deletion lines of common wheat. *J. Heredity.* 1996 July;87(4):295-307.
- 3) Cueto-Sola M, Bailon E, Utrilla P, Rodríguez-Ruiz J, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J, Comalada M. Active colitis exacerbates immune response to internalized food antigens in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;162(3):214-24.