

研究課題名	重症果物アレルギーの感作機序に関する研究
フリガナ	モリ ユウジ
代表者名	森 雄司
所属機関 (機関名) (役職名)	藤田医科大学 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	【学会発表】 JSA/WAO Joint Congress 2020 小児耳鼻科学会 【論文】 投稿中

#### 研究結果要約

花粉-食物アレルギー症候群 (PFAS) は、通常、新鮮な果物や野菜を食べた直後に、口や喉のかゆみを感じる症状として現れる。しかし、PFAS 患者の中には、アナフィラキシーを含む全身症状を呈する者もいる。ヨーロッパでは、ヒノキの gibberellin-regulated protein (GRP) にアレルゲン性があることが指摘されており、モモ GRP との交差反応性が認められている。スギはヒノキ科に分類され、日本ではスギ花粉が環境アレルゲンの主要な原因物質となっている。しかし、スギ花粉症患者における GRP 感作の有病率に関する研究は、これまでのところ不足している。本研究は、スギ花粉症患者における GRP 感作の有病率を検討することを目的とした。方法は春季に軽度から重度の鼻炎を発症し、スギ花粉特異的 IgE 値が 0.7 UA/mL 以上であった 52 名の患者 (中央値 10.5 歳, 範囲 5 ~65 歳, 女性 26 名) を登録した。モモ GRP は、モノクローナル抗体カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。モモ GRP に対する特異的 IgE 値は、ELISA で測定した。陰性コントロールの平均値に 3SD を加えた値以上のサンプルを陽性とした。また、重症の桃アレルギー患者 2 名の血清を陽性コントロールとした。結果。スギ花粉症患者 52 名のうち、11 名の血清がモモ GRP に陽性であった。結論 スギ花粉症患者の 20% がモモ GRP に感作されていた。

## 研究目的

花粉-食物アレルギー症候群 (PFAS) は、通常、新鮮な果物や野菜を食べた直後に、口や喉のかゆみを感じることで発症する。しかし、PFAS 患者は時にアナフィラキシーを含む全身症状を呈する (1)。最近の研究では、ホソイトスギ (*Cupressus sempervirens*) の花粉にアレルギーを持つ一部の患者の血清が、ジベレリン制御タンパク質 (GRP) と反応し、これが桃に対する重篤なアレルギーを引き起こすことが明らかになった (2)。スギはヒノキ科 (*Cupressaceae*) に属し、日本ではスギ花粉が最も一般的な環境アレルゲンとなっている (3)。スギ花粉によるアレルギー性鼻炎の患者は、トマトとの交差反応により PFAS を発症する可能性がある。スギ花粉症患者における GRP 感作の有病率や、GRP 陽性者の桃摂取時の関連症状については不明である。本研究では、スギ花粉症患者における GRP 感作の有病率を明らかにすることを目的とした。

## 研究計画及び研究手法

2018年6月から2019年12月にかけて、春季に軽度から重度のアレルギー性鼻炎で、研究参加に同意した中部地方在住のスギ花粉症外来患者 52名 (年齢中央値: 10.5歳、年齢幅: 5~65歳、女性 26名) を登録した。市販のスギ花粉特異的 IgE レベルは、ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) を用いて測定され、0.7 UA/mL 以上であった。陰性コントロールとして、食物アレルギーや花粉症のない4名の非アトピー患者の血清を、陽性コントロールとして、以前の研究に参加した重症の桃アレルギー患者2名 (P1 および P2) の血清を得た (4)。

藤田医科大学の倫理委員会は、本研究のプロトコルを承認した (承認番号: HM19-394)。参加者全員が、血清の使用について書面によるインフォームド・コンセントを得た。本研究は、ヘルシンキ宣言の原則に基づいて実施された。モノ GRP は、モノクローナル抗体カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した (4)。これを PBS に 1  $\mu$ g/mL の濃度で溶解し、得られた溶液の 100  $\mu$ L サンプルを 96 ウェルの Nunc-Immuno Plate I (Nunc; デンマーク・ロスキレ) の各ウェルに入れた。その後、プレートを 4°C で一晩インキュベートした。その後、ウェルを空にし、PBS ベースの SuperBlock Blocking Buffer を 150  $\mu$ L/well 加えた。プレートを室温 (約

25°C) で 1 時間インキュベートした後、200  $\mu$  L/well の PBS-Tween20 溶液で well を洗浄した。その後、SuperBlock Blocking Buffer で 1 : 4 の比率で希釈した患者血清とコントロール血清を加え、プレートを 4°C で一晩インキュベートした。洗浄後、100  $\mu$  L/well のマウス抗ヒト IgE-ビオチン溶液 (1:1,000 ; Southern Biotechnology Associates ; Birmingham, AL) を添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。さらに洗浄後、3,3',5,5' -テトラメチルベンジジン溶液を 100  $\mu$  L/well 加え、遮光下、室温で 30 分インキュベートしました。100  $\mu$  L/well の 1M 塩酸を用いて反応を停止させ 450 nm で吸光度を測定した。ネガティブコントロールの平均値よりも 3SD 以上大きい値を陽性とした。

当初はスギ花粉 GRP を抽出し使用する予定でいたが、期限内に抽出することができなかった。

## 結果と考察

スギ花粉症患者 52 名のうち、11 名 (21%) がモモ GRP 陽性であった。

我々の研究における感作率は、南フランスのヒノキ花粉症患者における感作率 37% を報告した S n chal らの報告よりも若干低かった(5)。前述の 11 名の患者に電話調査を行ったところ、桃を含む果物を食べて口腔内症状が出たことがある人が 2 名、桃を食べても無症状の人が 7 名、桃を食べたことがない人が 2 名であった。桃の GRP に最も強い反応を示した患者は、他の果物を食べた後に重篤な口腔症状を経験したため、桃を食べようとしなかった。2 人の陽性対照者は重度の全身性桃アレルギー症状を示し、過去の研究 (4) では吸光度が平均値よりも 3SD 以上大きかった代表的な患者であったことから、今回、桃 GRP に感作された 11 人の患者は全身性の反応を起こす可能性がある。しかし、実際には、GRP に感作していても、桃を摂取した後の症状は、ないか軽度であり、全身反応を起こした患者はいなかった。以前の研究(4)では、花粉症とは関係なく、重症の桃アレルギー患者を選んでいた。しかし、本研究では、桃アレルギーとは関係なく、スギ花粉症の患者に焦点を当てた。感作経路の違いによる桃アレルギーの重症度の違いは、このような選択基準の違いによるものと考えられる。医師は、花粉、野菜、果物に含まれる特定の GRP に対する患者の血清の交差反応性を調べる必要がある。今回の研究では、感作率が限られた施設の少数の人に基づいていること、

果物アレルギーの有無が食物負荷試験ではなく電話調査で判定されていることなど、いくつかの限界がある。

残された課題としては、治療に関しては、スギ舌下免疫療法治療薬内にスギ GRP が検出されれば、治療の可能性がみえてくる。

本研究結果を、査読付き国際雑誌へ論文投稿中である。

### 今後の研究活動について

スギ花粉 GRP の抽出が課題である。スギ GRP を抽出し抗体を作成することができれば、モモ重症果物アレルギー患者への治療が、スギ花粉症舌下免疫療法治療薬によってできる可能性がある。さらに検討を進めていきたい。

### 参考文献

- (1) Ehrenberg AE, Klingebiel C, Östling J, Larsson H, Mattsson L, Vitte J, et al. Characterization of a 7 kDa pollen allergen belonging to the gibberellin-regulated protein family from three Cupressaceae species. *Clin Exp Allergy*. 2020 June;50(8):964-72.
- (2) Tuppo L, Alessandri C, Giangrieco I, Ciancamerla M, Rafaianni C, Tamburrini M, et al. Isolation of cypress gibberellin-regulated protein: Analysis of its structural features and IgE binding competition with homologous allergens. *Mol Immunol*. 2019 Oct;114:189-95.
- (3) Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: The national affliction. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Mar;133(3):632-9.e5.
- (4) Mori Y, Okazaki F, Inuo C, Yamaguchi Y, Masuda S, Sugiura S, et al. Evaluation of serum IgE in peach-allergic patients with systemic reaction by using recombinant Pru p 7 (gibberellin-regulated protein). *Allergol Immunopathol*. 2018 Sept-Oct;46(5):482-90.
- (5) Sénéchal H, Šantrůček J, Melčová M, Svoboda P, Zídková J, Charpin D, et al. A new allergen family involved in pollen food-associated syndrome: Snakin/gibberellin-regulated proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jan;141(1):411-4.e4.

以上