

研究課題名	主要アレルゲン Mal d 1 の日本産リンゴ品種における定量および経口負荷試験結果を基にした食事指導への展開		
フリガナ	オキシマ ナオコ		
代表者名	沖嶋 直子		
所属機関（機関名） （役職名）	松本大学人間健康学部健康栄養学科准教授 専任講師		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	小池 由美 （コイケ ユミ）	長野県立こども病院 アレルギー科長	経口負荷試験、Mal d 1 定量
	小林 克彦 （コバヤシ カツヒコ）	小林耳鼻咽喉科医院	経口負荷試験
	近藤 康人 （コンドウ ヤスト）	藤田医科大学	経口負荷試験
本助成金による発表論文，学会発表	第 70 回日本アレルギー学会学術大会（ELISA のみ）		

研究結果要約

日本において、リンゴ PFAS の原因となる主要なアレルゲンコンポーネントは PR-10 に属する Mal d 1 である。研究代表者がこれまで明らかにしてきたウェスタンブロット（WB）による Mal d 1 発現量をもとに、Mal d 1 低発現リンゴと日本で生産、消費量が圧倒的に多いサンふじを用いて経口負荷試験および ELISA による定量を実施した。

市販されている抗体を用いて Mal d 1 を定量できる ELISA を構築し、WB で分析済みの試料を定量することでその性能を評価した。その結果、WB にて Mal d 1 低発現だった多くの品種では WB と ELISA の結果が相関していた。次いで経口負荷試験に用いたリンゴ品種に含まれる Mal d 1 を ELISA にて定量した。その結果、サンふじは他品種よりも高い定量値を示す傾向にあった。経口負荷試験では、Mal d 1 量の少ない品種であっても VAS では陽性だった品種があったにも関わらず、Mal d 1 量が多いサンふじでは経口負荷試験が実施できた 2 名中 1 名が陰性であった。

本研究の遂行途中に Mal d 1 量や口腔症状の起こしやすさへの Flavan-3-ols の関与が Romer M.らにより発表された。今回の結果から、Mal d 1 量が少なくても口腔症状を示す品種があったり、サンふじのように Mal d 1 量が高くても全ての被験者が症状を示したりするわけではなかった理由の一つとして考えられ、今後の検討課題となった。

研究目的

近年花粉・食物アレルギー症候群（以下 PFAS）によるバラ科果物アレルギー患者が増加している。一旦 PFAS と診断されると原因食材の除去以外に治療法はなく、その食品を好む患者にとっては食関連 QOL が低下する。また、果物の産地では消費量の低迷にもつながりかねない。欧州ではリンゴ主要アレルゲン Mal d 1 の定量や経口負荷試験結果から、PFAS を起こしにくい品種が明らかとなっているが、日本では欧州と大半の栽培品種が異なることから日本産品種のアレルゲンは不明であった。研究代表者は、これまでに長野県産リンゴ 28 品種の Mal d 1 量をウェスタンブロット(以下 WB)法により分析し、日本での生産・消費量が最も多く、PFAS を発症しやすいと考えられているサンふじと比較して、Mal d 1 量が有意に少ない品種を 14 品種見出した。

本研究では、WB 結果をもとに Mal d 1 低発現リンゴの経口負荷試験を実施するとともに、ELISA を構築して Mal d 1 低発現リンゴにおけるアレルゲンタンパク質量を定量すること、さらに、これらの結果を統合することで、リンゴ PFAS 患者が症状を示す Mal d 1 量の閾値を求め、リンゴ PFAS 患者への食事指導に活用することを目的とした。

本研究の進展により、Mal d 1 の定量結果から、経口負荷試験を行わなくても PFAS の起こしやすさを推定することができるようになる。さらに、Mal d 1 低発現リンゴ品種の情報は、リンゴの育種にも活用できることが期待される。これは、日本におけるリンゴ消費量が伸び悩む中、新たな訴

求点として「アレルギーを起こしにくいリンゴ」品種の開発にもつなげていけることが期待される。

研究計画及び研究手法

1. Mal d 1 特異的サンドイッチ ELISA の構築

Mal d 1 に対するモノクローナル抗体は販売されていなかったため、Mal d 1 と交差する市販の抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体と抗 Mal d 1 ポリクローナル抗体を組み合わせ、Mal d 1 を測定するサンドイッチ ELISA を構築した。

初めに、抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体 (BV16, Absolute Antibody, Wilton, UK) が Mal d 1 と交差することを確認するために、WB にて分析した。その結果、レコンビナント Mal d 1 (以下 rMal d 1, CUSABIO, Wuhan, China) や Mal d 1 高発現品種であるホワイトスイートの抽出液が抗 Mal d 1 ウサギポリクローナル抗体を用いて検出した結果と同様に検出できたため、交差性ありと判断した。

抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体をキャプチャー抗体に、抗 Mal d 1 ウサギポリクローナル抗体 (CUSABIO) を検出抗体に用い、HRP 標識抗ウサギ IgG (CeraCare, MA, USA)、基質は TMB (CeraCare) を用い、マイクロプレートリーダー (SH-1300Lab, コロナ電気株式会社, 茨城) にて検出した。標準品として rMal d 1 を用いてダイナミックレンジおよび測定上限および下限を求めた。各実験条件は、平均値および標準偏差、さらにそこから求められる変動係数を用い、感度良くかつ変動係数が小さくなる条件、かつ標

準品各濃度を用いた検量線を求め、MBL が無償提供している 4 パラメータロジスティック解析を行える Excel シートにて、標準品各濃度のデータを推定モデルの差異が最小となる条件を検討した。

構築した ELISA を用いて、WB にて分析済みの検体を ELISA にて定量し、WB と ELISA とで結果を比較した。詳細な方法を図 1 に示す。

2. 経口負荷試験

WB 結果から Mal d 1 が低発現であった品種のうち、2020 年度秋季に入手することができた 9 品種、およびサンふじを試料とした経口負荷試験を実施した。

試験食には、Hansen らによる二重盲検法の試料の検討結果²⁾のうち、モデル II(リンゴとキャベツを刻んでピタパンにはさんだもの)を参考として、小麦アレルギー患者でも参加できるよう、ピタパンを使わない、リンゴとキャベツのスムージーを考案した。1 品種あたり、皮と芯を除いた可食部 1 切れ相当(大きな果実であれば 8 等分、

小さ目の果実であれば 6 等分)である 25g を負荷した。そのレシピを表 1 に示す。

経口負荷試験に用いたリンゴ各品種は、長野県松本市及びその周辺地域の小売店ならびに JA 等の直売所にて 1 品種あたり 5 個以上購入し、その中から傷が少なく果皮や果肉に異常のないものを選択し、1 品種当たり 5 個を用いた。

スムージーの調理については、以下の通りであった。

リンゴは傷や果皮の異常がない部分を選んで用いて 2 cm 程度まで刻み、キャベツも同様の大きさに刻んで市販のリンゴジュース(クリアアップル, 原田乳業株式会社, 新潟)とともにブレンダー(クイジナート, パワーブレンダー, SPB-650J, Stanford, CT, USA)に固形物がなくなるまでかけ、試料を調製した。調製したスムージーは、速やかに 1 回投与量ずつ耐冷性プラスチックカップに分注し、ラップで口を覆い使用するまで-60℃で保存した。残りは ELISA 用の抽出を行うまで-80℃で保存した。なお、プラセボには加熱滅菌され Mal d 1 が失活していることを WB にて

表1 試験食のレシピならびに調製法

	プラセボ	試験食
キャベツ	55	50
リンゴ果実	0	25
加熱滅菌済みリンゴジュース	55	35
レモン果汁	2.5	2.5

吸着抗体の添加(抗Bet v 1マウスモノクローナル抗体をTris-HCl, pH 8.0 にて1 μg / mLになるよう希釈
120 μL / ウェル, 4℃, 一夜)
↓
ブロッキング(1%BSA, 200 μL / ウェル, 室温, 1時間)
↓
試料添加(100 μL / ウェル, 4℃, 一夜)
↓
洗浄5回(KPL wash solutionを1×に希釈)
↓
1次抗体添加(抗Mal d 1ウサギポリクローナル抗体, 0.8 μg / mL, 100 μL / ウェル, 室温, 1時間)
↓
洗浄5回(KPL wash solutionを1×に希釈)
↓
2次抗体添加(HRP標識抗ウサギIgG抗体, 0.25 μg / mL, 100 μL / ウェル, 室温, 1時間)
↓
洗浄5回(KPL wash solutionを1×に希釈)
↓
基質添加(TMB, 100 μL / ウェル, 室温, 15分)
↓
停止液添加(Stop sol., 100 μL / ウェル)
↓
吸光度測定(450nm)

図1 ELISAの方法

確認した市販のリンゴジュースを用いることで、食味を似せた。

試料は経口負荷試験実施前日の夜から冷蔵庫で解凍し、投与するまで氷冷するなど低温を保った。1回の試験につき3～5回の投与を行い、各回に1個以上のプラセボを混ぜて実施した。投与順は被験者によって変え、投与順や同じ被験食を投与することでの症状の有無への周囲の影響を排除した。投与間隔は30分とし、投与後25分でVASにより主観的症状の評価を、口腔内の診察と写真撮影にて客観的評価を行った。なお、申請時には松本大学で実施予定だった経口負荷試験を、安全性を期するため小林耳鼻咽喉科医院での実施に変更した。

リンゴに対して口腔症状に局限したPFASの既往のある患者を対象とした。申請時には、ImmunoCapにてMal d 1陽性、Mal d 3陰性を被験者の条件としていたが、サーモフィッシャーダイアグノスティックス社の分析サービスが受付停止をしていたことから、松本大学実施分および藤田医科大学実施分は、藤田医科大学にて分析した結果から被験者を選定し、長野県立こども病院では病歴から判断して被験者とした。

各施設で最大10名ずつ計30人の被験者を想定していたが、新型コロナ感染症の蔓延により、長野県立こども病院1名、松本大学2名、藤田医科大学1名、計4名の実施に留まった。

2019年秋季に経口負荷試験とブリックテストを行った結果、この2つの検査の間の相関性が低く、経口負荷試験陽性でもブリックテスト陰性、またはその逆となる品種が見受けられた。そこで、

被験者の負担や苦痛減のため、ブリックテストの実施を取りやめ、経口負荷試験のみに変更した。

3. 経口負荷試験に用いたリンゴ品種を試料とした Mal d 1 の ELISA による定量

項目1で構築したサンドイッチ ELISA を用いて、経口負荷試験に用いたリンゴ各品種の Mal d 1 を定量した。

試料からの Mal d 1 の抽出は、L.S.Hsieh らの方法¹⁾にて抽出した。試料2gに対し氷冷した抽出バッファー（1 mmol / L ショ糖, 2% PVPP, 2 mmol / L EDTA, 1 mmol / L Diethyldithiocarbamic acid）3mLを添加し、氷冷した状態でホモジナイザー（ULTRA-TURRAX, IKA-WERKE, Merck, Darmstadt, Germany）で果実の塊が目視できなくなるまで1～3分均一化した。次いで医療用ガーゼでろ過し、ろ液を21,100×g, 4℃, 1時間遠心分離し、上清を取った。この上清をそのまま、あるいはAmicon-Ultra10K（Merck, Darmstadt, Germany）にて10～20倍濃縮し、1.3%BSA溶液で4倍希釈してELISA定量用の試料とした。これを項目1にて示したELISAで定量した。

結果と考察

1. Mal d 1 特異的サンドイッチ ELISA の構築

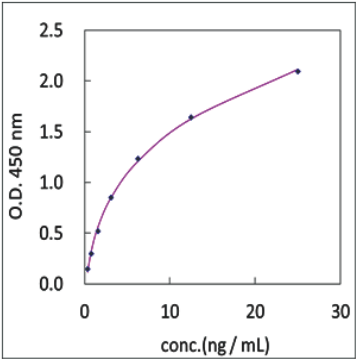
rMal d 1 の希釈系列を用いて抗体濃度、反応時間と温度を複数条件検討した。一般的なELISAキットにおいては、1日で分析が終わるよう、各反応条件を室温1時間などに設定されていることが多いが、今回の分析はで最大感度を得、かつノイズを低くすることを目的とし、サンプル添加

後の反応時間を室温1時間から6時間、4℃一夜、抗体との反応時間を室温1時間から4時間と複数条件にて検討した。

その結果、方法で示した条件（図1）で最大感度を得、かつ変動係数を最小にでき、4パラメータロジスティック解析にて各濃度の実測値とモデル値の差を最小にすることができた。標準品として SUMO-His tagged rMal d 1（CUSABIO）の希釈系列を用いて定量した結果の例を図2に示す。

続いて、この ELISA を実際の検体にて評価するため、WB で分析が終了している試料中の Mal d 1 を定量した。定量結果を図3に示すが、サンふじを対照として他品種全てが有意に低い結果となった。この結果は、WB ではジョナゴールド、こうとく、ホワイトスイートはサンふじと有意差なしの同レベルの定量値であったことと矛盾したが、WB にてサンふじと比較して有意に低かった14品種は、その順序に差異はあったが、有意に低かった中でもとくに低い範囲にあるものが

A) 検量線



B) 4パラメトリック解析結果

		Sum of Squares	0.003908
conc.	O.D.	Predicted	Squares D
25	2.097	2.114018288	0.00029
12.5	1.644	1.627078472	0.000275
6.25	1.234	1.207129868	0.000722
3.13	0.852	0.852139141	1.94E-08
1.56	0.519	0.557105008	0.001427
0.78	0.297	0.315337911	0.000324
0.39	0.149	0.119502049	0.00087

C) 標準品(n=3)の分析結果

標準品濃度 (ng / mL)	吸光度 (O.D. 450nm)		変動係数 (%)
	平均値	標準偏差	
25.000	2.097	0.026	1.218
12.500	1.644	0.063	3.812
6.250	1.234	0.012	0.955
3.125	0.852	0.015	1.705
1.563	0.519	0.018	3.557
0.781	0.297	0.014	4.591
0.391	0.149	0.006	4.082

図2 検量線の例と、その数値データ

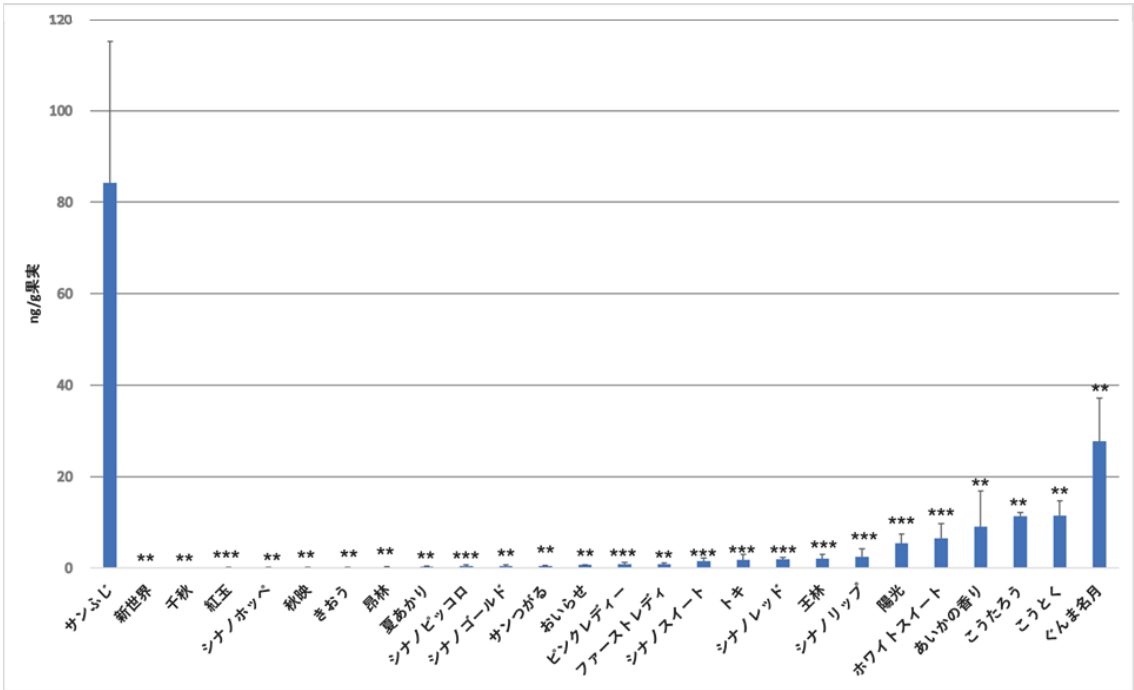


図3 既存のサンプルの定量結果

大半であった。

WB においては、Mal d 1 量の少ない検体も確実に検出できるよう、HRP の基質に ECL Prime を用い、ImageQuant LAS4000 にて High resolution にて 1 分という高感度な条件で検出していたため、サンふじの分析結果は化学発光の強度がプラトーになっていた可能性が今回 ELISA にて定量した結果から明らかとなり、今回のような結果が得られた理由の主なものであると考えられた。その他、WB では抗 Mal d 1 ウサギポリクローナル抗体 1 種で検出していたのに対し、ELISA では吸着抗体に抗 Bet v 1 マウスモノクローナル抗体を使用しており、Mal d 1 のサブタイプによりこのモノクローナル抗体との親和性に差があったため結果に差異が出た可能性も考えられた。

2. 経口負荷試験

9/15 現在で集計が終わった結果について表 2 に示す。全ての結果が出そろっているわけではないが、松本大学(小林耳鼻咽喉科医院)2 名(被験者 ID 21M-04 および 05)、長野県立こども病院

1 名(同 21C-01)の結果から、Mal d 1 高発現品種であるサンふじにおいて、VAS の結果が 0 あるいは低い結果となった。これは、2019 年度秋季に実施した結果と同様であり(経口負荷試験を実施した 6 名全員が VAS 陰性で、プリックテストは 1 名のみ陽性)、2019 年度は台風の長野県通過に伴い収穫期を早めたことによる Mal d 1 量の低減が理由であったと考えていたが、2020 年度は気候も良く熟した状態で収穫されていたと考えられたことから、それ以外の理由があることが示唆された。さらに、シナノブッチやシナノスイートのように Mal d 1 量が少ないにも関わらず全員あるいは過半数が VAS 陽性である品種もあった。

本研究遂行中に Romer らにより Flavan-3-ols が多い品種では Mal d 1 量が多くても症状が出にくいことが示され³⁾、これが、サンふじが Mal d 1 量が多いにも関わらず、経口負荷試験結果が陰性や陽性であっても VAS の数値が低かったり、Mal d 1 量が少なくても VAS 陽性者が多くなった理由であると考えられ、今後の課題となった。

表2 経口負荷試験結果および試料のMal d 1定量値

品 種		サンふじ	シナノ ブッチ	シナノ スイート	あいかの香り	紅玉
定量値 (ng/g果実)		11.80±9.77	0.33±0.03	0.48±0.11	0.63±0.42	1.96±0.07
V A S	21M-04	0	2	25	0	10
	21M-05	5	10	10	0	5
	21C-01	実験できず	3	0	0	0
品 種		千秋	王林	シナノ ゴールド	サンつがる	トキ
定量値 (ng/g果実)		1.98±0.06	1.98±0.34	2.05±0.19	3.76±1.62	9.17±5.22
V A S	21M-04	12	0	0	9	0
	21M-05	31	0	0	4	31
	21C-01	5	0	0	0	0

3. ELISA 法による、Mal d 1 の定量

上述した ELISA にて、経口負荷試験に用いたリンゴ品種の Mal d 1 を定量した結果、シナノプッチが $0.33 \pm 0.03 \text{ ng/g}$ が最小値で、サンふじの $11.8 \pm 9.77 \text{ ng/g}$ が最大であった。これまでの分析で Mal d 1 量が少ないとされていたトキに関しては、今回はサンふじと近い $9.17 \pm 5.11 \text{ ng/g}$ であったが、その理由は不明であった。

今後の発表予定

国内で開催される学会では、日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会 (2022 年 6 月頃、開催地不明)、第 76 回日本栄養・食糧学会大会 (2022 年 6 月、西宮)、第 69 回日本栄養改善学会学術総会 (2022 年 9 月、倉敷) 第 71 回日本アレルギー学会学術大会 (2022 年 10 月、東京)、第 22 回国際栄養学会議 (2022 年 12 月、東京) に、国際学会では WAC2022 (2022 年 11 月、イスタンブール) あるいは 2023 Hawaii Symposium (2023 年 5 月、ハワイ) への発表を予定している。

今後も 2021 年秋季に調製し、 -60°C で保存している検体を使い切るまでは経口負荷試験を継続し、結果を取りまとめて Allergol.Int. 他国際誌へ投稿する。

今後の研究活動について

結果と考察で示したように、Mal d 1 高発現品種であるサンふじにおいて、VAS の結果が 0 あるいは低い結果となった。これは、2019 年度秋季に実施した結果と同様であり (経口負荷試験を実施した 6 名全員が VAS 陰性で、プリックテス

トは 1 名のみ陽性)、2021 年度に経口負荷試験を実施するまでは、千曲川が決壊し長野県に多大な被害をもたらした台風 19 号の通過に伴い、収穫期を早めたことによる Mal d 1 量の低減が理由と考えられていたが、それ以外の理由があることが示唆された。

本研究遂行中の 2020 年に、Romer らにより Mal d 1 量と t flavan-3-ols 量が正の相関を示すこと、Flavan-3-ols が多い品種では Mal d 1 量が多くても口腔症状が出にくいことが明らかとなった³⁾。これが、サンふじが Mal d 1 発現量が高いにも関わらず、経口負荷試験結果が陰性や陽性であっても VAS の数値が低かったこと、シナノプッチのように Mal d 1 量は低くても被験者全員が VAS 陽性であったことの原因であると考えられ、今後 Mal d 1 だけでなく Flavan-3-ols の定量が必要であることが判明した。そこで、新たに星薬科大学教授である穂山浩先生にも本研究に参画いただき、次年度以降 Mal d 1 および Flavan-3-ols の定量、および経口負荷試験を行い、リンゴ PFAS の症状の軽重への Flavan-3-ols の関与について研究を進めていきたい。

さらに、研究期間を過ぎてしまうが、9 月末より 2 名が小林耳鼻咽喉科医院での経口負荷試験を予定している。被験食は 2020 年秋季のリンゴの収穫期に購入後速やかに調製後、 -60°C で凍結保存しており、各施設で希望者が出次第、本申請における研究期間終了後も経口負荷試験を続ける予定である。

参考文献

- 1) Hsieh LS, Moos M, and Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1995;96:960-70
- 2) Skamtrup-Hansen K, Vestergaad H, Stahl-Skov P, Khinti MS, Vieths S, Poulsen LK, Bindslev-Jensen C. Double-blind, placebo-controlled food challenge with apple. *Allergy* 2001;56:109-17
- 3) Romer M, Chebib S, Bergmann KC, Plate K, Becker S, Ludwig C, Meng C, Fisher T, Dierend W, Schwab W. Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Sci. Rep.* 2020;10:9144