

# オレンジアレルギー患者血清を用いた 柑橘類の交差抗原性の検討

高松伸枝・近藤康人<sup>1</sup>・柘植郁哉<sup>1</sup>・中島陽一  
成瀬徳彦<sup>1</sup>・田中健一<sup>1</sup>・犬尾千聡・林 毅<sup>2</sup>  
宇理須厚雄<sup>1</sup>・吉川哲史

(藤田保健衛生大学医学部・小児科学教室)

(<sup>1</sup>藤田保健衛生大学・坂文種報徳會病院・小児科)

(<sup>2</sup>別府大学・食物栄養科学部)

## 1. 緒 言

柑橘類は国内外で広く生産され、バナナに次いで消費量国内第2位の果物である。柑橘類の植物学的分類は、ムクロジ目 (*Sapindales*) ミカン科 (*Rutaceae*) ミカン属 (*Citrus*) に属しており、ミカン属にはバレンシアやネーブルなどのオレンジ類 (*Citrus sinensis*)、温州ミカン (*Citrus unshiu*) などのミカン類、グレープフルーツ類 (*Citrus × paradisi*)、レモン、ユズなどの香酸柑橘類、ハッサクなどの雑柑類がある。

現在、食品衛生法に規定された加工食品のアレルゲン表示では、オレンジ類は表示推奨品目に指定されているが、ミカン類やグレープフルーツ類は対象外となっている。これらは近縁の果物であるため交差反応を生ずる可能性があるが、検討された報告はみられない。今回はオレンジアレルギー患者血清を用いて、オレンジと他の柑橘類間の交差抗原性を検討した。

## 2. 研究方法

### A. 対象患者

Oral allergy syndrome (以下 OAS と略す) 患者 5 例はすべて女性であり、年齢は 9 歳から 14 歳(中央値 11 歳)であった。全例オレンジ摂取による明らかなアレルギー症状誘発の既往があり、オレンジ特異的 IgE 抗体価 (ImmunoCAP, Thermo Scientific, Uppsala, Sweden) も陽性であった。

新鮮なバレンシアオレンジを用いた舌下投与試験では、すべての症例で陽性を確認した。

本研究のプロトコルは藤田保健衛生大学医学部疫学・臨床研究倫理審査委員会の審査 (10-216) を経て、全患者に書面による informed consent を得た。

### B. 血中抗原特異的 IgE 抗体価、皮膚プリック試験 (以下 SPT と略す)

血中抗原特異的 IgE 抗体価は、オレンジの他、グレープフルーツを測定した。SPT は生の柑橘類 (バレンシアオレンジ、温州ミカン、グレープフルーツ) を用いた。陰性 control は生理食塩水、陽性 control は 10mg/ml 二塩酸ヒスタミン液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いた。試料は前腕屈側に PRICK-LANCETTER (Ewo Care AB, Gislaved, Sweden) を使用して皮膚に単刺し、15 分後に判定を行った。判定は膨疹の長径と短径の平均を陽性 control と比較し、陽性 control と同等は 3+, 同等より大きい場合は 4+, 陽性 control の 2 分の 1 以上から同等未満を 2+, 陰性 control と同等以上陽性 control の 2 分の 1 未満は 1+ とし、2+ 以上を陽性とした。なお、患者 control としてオレンジアレルギーのない 2 例に試験を施行し、陰性であることを確認した。

### C. 抗原抽出

柑橘類として、バレンシアオレンジ、温州ミカン、グレープフルーツを用いた。抗原の抽出はこれらの生果肉を使用し、flavedo (外皮) と種を除いた部分から抽出した。果実を粉碎後、sucrose buffer (1M sucrose, 2% (wt/vol) poly vinyl polypyrrolidone, 2 mM Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetra acetic acid disodium salt dehydrate, 10mM sodium N, N-diethyl dithio carbamate trihydrate) と 1 : 5 で混合し、4 °C over night で攪拌し、pH8.0 に調整後、遠心分離し、ろ過した上清をサンプルとした。サンプル中のタンパク定量は、牛血清アルブミンを標準とした Bradford 法<sup>2</sup>

及び PIERCE BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて測定した。

**D. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), immunoblot, immunoblot inhibition**

バレンシアオレンジ抽出液の SDS-PAGE は、NuPAGE SDS-PAGE Gel System (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) を用いた。抽出抗原 (0.3mg protein) を SDS-PAGE (200v, 50min) にて分離し、im-

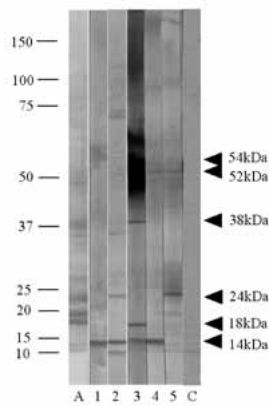


図1 バレンシアオレンジ (*Citrus sinensis*) と患者血清 (症例 1-5) の immunoblot A (Amide black), C (control)

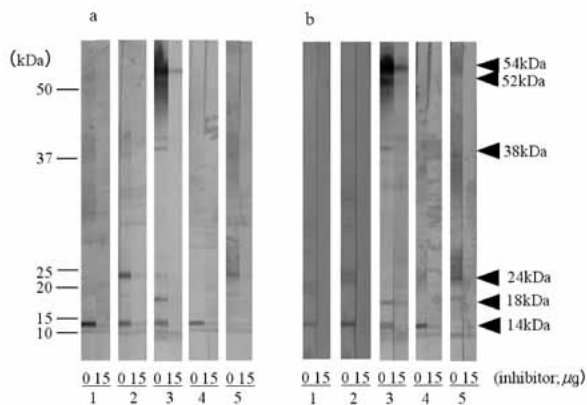


図2 バレンシアオレンジ (*Citrus sinensis*) と他柑橘類による immunoblot inhibition (症例 1-5)  
a : inhibitor : 温州ミカン (*Citrus unshiu*),  
b : inhibitor : グレープフルーツ (*Citrus paradisi*)

munoblot 法 (250mA, 60min) にて PVDF 膜 (Immobilon, 0.45 $\mu$ m, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) へ転写した。その後希釈した血清 (1 : 30 dilution in B114 buffer (PBS containing 0.1% BRIJ, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) と反応させた後、goat-anti human IgE antibody (1 : 2000 dilution, KPL, Gaithersburg, MD, USA) を加え室温で 3 時間静置した。発色は BCIP/NBT substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA) を用いた。陰性 control は、臍帯血清を用いた。

Immunoblot inhibition は、上記と同様の方法でバレンシアオレンジ抗原を転写した PVDF 膜に抽出したグレープフルーツ、温州ミカン、と患者血清 20 $\mu$ l をあらかじめ混合させた溶液で反応させ、immunoblot と同様に検出を行った。

**3. 実験結果**

オレンジ、グレープフルーツに対する IgE 抗体価は全員陽性であった。SPT では、バレンシアオレンジ及び温州ミカンでは実施した 5 名全員陽性で、グレープフルーツでは実施した 4 名全員が陽性を示した (表 1)。

バレンシアオレンジを抗原とした immunoblot では 14, 18, 24, 38, 52, 54kDa のタンパク質がバンド IgE 結合能を示した (図 1)。14kDa バンドに反応した患者は、5 名中の 4 症例であった。また 18kDa バンドには 1 名 (症例 3)、24kDa バンドには 2 名 (症例 2, 5)、38kDa バンドには 1 名 (症例 3) が反応した。52kDa と 54kDa のバンドには症例 3 が強い反応を呈した。

これら IgE 結合バンドは、陰性 control 血清を用いた immunoblot では染まらないことに加え、バレンシアオレンジ抗原を inhibitor として用いた immunoblot inhibition では抑制がみられ、かつ異なる抗原 (ヒノキ花粉) による immunoblot inhibition では抑制がみられなかったことから、上記バレンシアオレンジタンパク質の IgE 結合能は特異的な反応であることが確認された。

表 1 患者背景と検査結果

症例	年齢	性別			ImmunoCAP® (UA/ml)		皮膚試験 (SPT)		
			症状	舌下投与試験	オレンジ	グレープフルーツ	バレンシアオレンジ ( <i>Citrus sinensis</i> )	温州ミカン ( <i>Citrus unshiu</i> )	グレープフルーツ ( <i>Citrus paradisi</i> )
1	12	F	OAS	○	7.3	24.5	2+	3+	2+
2	14	F	OAS	○	1.21	8.86	2+	2+	-
3	9	F	OAS	○	0.7	1.53	2+	2+	2+
4	11	F	OAS	○	2.59	9.72	2+	2+	2+
5	11	F	OAS	○	2.79	3.59	2+	2+	2+

OAS = 口腔アレルギー症候群

次に、バレンシアオレンジ抗原に対するIgE結合能を検討する系に、温州ミカン抗原及びグレープフルーツ抗原をinhibitorとして加えるimmunoblot inhibitionを施行した(図2)。バレンシアオレンジの14, 18, 24, 38, 52, 54kDaのバンドに対するIgE結合は温州ミカン抗原及びグレープフルーツ抗原によって抑制された。

#### 4. 考 察

今回検討したオレンジOAS患者のグレープフルーツIgE抗体価について検討したところ、全員陽性を示した。温州ミカンに関してはIgE抗体の測定キットがなく実施できなかったが、温州ミカン、グレープフルーツによるSPTにおいても、グレープフルーツが実施できなかった1例を除いて全員が陽性を示した。

次に、バレンシアオレンジ中のIgE結合proteinの検討をImmunoblotによって行った結果、6本のproteinバンドが検出された。これらの中で主要なアレルゲンである14-kDa proteinは、分子量からprofilinと推測された<sup>3,4</sup>。さらに我々が作成した組み換えprofilinを用いたimmunoblot inhibitionで抑制されたことから、profilinと同定できた(現在投稿中)。24-kDaタンパク質は分子量(23~24kDa)<sup>3,5</sup>ならびにN末端アミノ酸配列からCit s 1(GLP: Germin-like proteins)分子であると推測された(現在投稿中)。

これらのバレンシアオレンジタンパク質に対するIgE結合は、温州ミカンおよびグレープフルーツ抗原をinhibitorとしたimmunoblot inhibitionで抑制がみられた。以上のことから、バレンシアオレンジと温州ミカン及びグレープフルーツの間に共通抗原性が示された。

これらの結果からオレンジ類に対するアレルギーを有する患者は、ミカン類やグレープフルーツ類に対して症状を誘発する可能性があり、オレンジ類だけではなく、ミカン類やグレープフルーツ類もアレルゲン表示対象食品とする見直しの必要性が示唆された。

#### 5. 結 論

オレンジ類と、他の柑橘類(ミカン類、グレープフルーツ類)との間に交差抗原性が証明された。現行の食品衛生法で定められた加工食品のアレルゲン表示では、柑橘類ではオレンジ類のみが推奨品目に指定されているが、他の柑橘類も表示対象とすべきか、見直す必要があると示唆された。

#### 謝 辞

患者血清を提供頂きました大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター亀田 誠先生、高岡有理先生、愛媛生協病院有田孝司先生、ならびに懇切なるご指導を頂きました藤田保健衛生大学医学部勅使河原深雪氏に深謝申し上げます。この研究の一部は、JSPS 科研費25350170の助成を受けた。

#### 文 献

- 1) Hsieh LS, Moos M Jr, and Lin Y: Characterization of apple 18 and 31 kDa allergens by micro sequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 1995; 96(6 Pt 1): 960-970.
- 2) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- 3) Crespo JF, Retzek M, Foetisch K, Sierra-Maestro E, Cid-Sanchez AB, Pascual CY, Conti A, Feliu A, Rodriguez J, Vieths S, and Scheurer S: Germin-like protein Cit s 1 and profilin Cit s 2 are major allergens in orange (*Citrus sinensis*) fruits. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50: 282-290.
- 4) López-Torrejón G, Ibáñez MD, Ahrazem O, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, Barber D, and Salcedo G: Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. *Allergy.* 2005; 60: 1424-1429.
- 5) Ahrazem O, Ibáñez MD, López-Torrejón G, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, Barber D, and Salcedo G: Orange germin-like glycoprotein Cit s 1: an equivocal allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2006; 139: 96-103.

(平成27年9月9日受理)