

研究課題名	プロテオミクス的手法を用いた魚アレルギーの新規診断マーカーの確立
フリガナ	ナガイ アキヨ
代表者名	永井 晶代
所属機関（機関名） （役職名）	藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 講師
本助成金による発表論文，学会発表	未定

研究結果要約

魚アレルギー患者の一般的な症状は経口摂取による全身蕁麻疹で、時にアナフィラキシーなどの重篤なケースに陥る。現在の魚アレルギー検査法は、魚を用いた皮膚テストや魚抽出物に対する特異 IgE 抗体測定が一般的であるが、臨床情報と一致しない症例も少なくない。また、魚の主要アレルゲンで有名なパルブアルブミンは、様々な魚種間で広く保存されており、かつ高い配列類似性を有する 1) ことから、患者血清の交差反応が問題視されている。それ故、各魚種を鋭敏に見分ける新規診断マーカーが切望されている。

本研究では改良型二次元電気泳動法（2D-PAGE）・タンデム型質量分析装置（LC/MS/MS）を用いたプロテオミクス的手法により、各魚種特異的なアレルゲン蛋白質を同定することを目的とし行った。免疫プロットのおよび二次元電気泳動の結果、110kDa 付近のスポットが非常に強く発色していた。そこから数種類の蛋白質が同定され、この中に新規アレルゲンがある可能性が示唆された。今後、今回同定された蛋白質が原因アレルゲンか否かを検証するために、蛋白固相化 ELISA による確認実験を行い、また複数の魚アレルギー患者血清で確認し新規診断マーカーとしての有用性を確認したい。

研究目的

魚類は、成人食物アレルギーにおける新規発症例で第 2 位、原因食品別で第 3 位と上位を占めている 2)。成人前後に突如として発症する背景に、職業暴露、食の欧米化による若者の魚離れなどが指摘されている。魚アレルギー患者の一般的な症状は経口摂取による全身蕁麻疹で、時にアナフィラキシーなどの重篤なケースに陥る。

現在の魚アレルギー検査法は、魚を用いた皮膚テストや魚抽出物に対する特異 IgE 抗体測定が一般的であるが、臨床情報と一致しない症例も少なくない。この主な原因として、抽出物中の主要アレルゲンの交差反応、各魚種に含まれるアレルゲン量の差、非アレルゲン成分の大量混入による診断精度の低下が考えられる。魚の主要アレルゲンで有名なパルブアルブミンは、様々な魚種間で広く保存されており、かつ高い配列類似性を有する 1)ことから、患者血清の交差反応が問題視されている 3)。それ故、各魚種を鋭敏に見分ける新規診断マーカーが切望されている。

代表者は当該課題を克服するために、改良型二次元電気泳動法 (2D-PAGE)・タンデム型質量分析装置 (LC/MS/MS) を用いたプロテオミクス的手法により、各魚種特異的なアレルゲン蛋白質を同定する。さらに患者数を増やして蛋白質固相化 ELISA による確認実験を行い、新規診断マーカーとしての有用性を検証する。

研究計画及び研究手法

研究の方法

尿素抽出して得られた魚身の総蛋白質を 2D-PAGE により分離した。2D-PAGE と患者血清を用いて Western blotting を行い、HRP 標識抗ヒト IgE 抗体により特異的スポットを検出した。さらに、発色部位に相当するスポットを切り取り、ペプチダーゼ処理により蛋白質を分解し LC/MS/MS にて同定した。同定蛋白質がアレルゲンか否かをさらに検証するため、同定蛋白質を別に作製し、プレートに固相化して血清 ELISA 法を実施する。

結果と考察

結果：

寿司を摂取後に即時型アレルギー症状を生じ、皮膚テストで多種類の魚類に対して陽性反応を得た患者の血清を用いて検討を行った。

魚アレルギーではパルブアルブミンやコラーゲンが原因抗原として知られており 1,4)、パルブアルブミンは約 13kDa、コラーゲンは約 120kDa である。

自験例の免疫プロットの結果、パルブアルブミンへの反応は弱く、110kDa 付近に強いバンドを認めたため、新規の蛋白質に感作されている可能性が考えられた。

そこで、患者血清を用いて二次元電気泳動を行ったところ、やはり 110kDa 付近のスポットが非常に強く発色しており、数種類の蛋白質が同定され、この中に新規アレルゲンがある可能性が示唆された。

(免疫ブロットおよび二次元電気泳動の結果図は未発表データのため、公表に際し割愛させていただきました。)

今後の課題：

今後は、同定蛋白質がアレルゲンか否かを検証するために、同定蛋白質を別に作製し、プレートに固相化して血清 ELISA 法を実施することが必要である。さらに複数の患者で同様の確認実験を行い、新規診断マーカーとしての有用性を検証していく。

今後の研究活動について

今後は、今回同定された蛋白質がアレルゲンか否かを検証するために、同定蛋白質を別に作製し、プレートに固相化して血清 ELISA 法を実施し、さらに複数の魚アレルギー患者の血清でも確認していく。

参考文献

- 1) Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, et al. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4576-84
- 2) 厚生労働化学研究班.食物アレルギーの診療の手引き 2014
- 3) Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, Hordvik I, Endresen C. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Dec;116(6):1314-20.
- 4) 近藤康人：魚肉アレルギー. アレルギーの臨床. 2008 28(8) : 619-624

以上