

研究課題名	魚アレルギー免疫療法を見据えた複合的低アレルゲン化コンポーネントの開発		
フリガナ	マツナガ カヨコ		
代表者名	松永 佳世子		
所属機関 (機関名) (役職名)	藤田医科大学 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	田中宏幸(タナカヒロユキ)	岐阜薬科大学・准教授	モデルマウスの作製
	大野敏(オオノサトシ)	岐阜大学・准教授	蛋白質の調製
本助成金による発表論文、学会発表	第 67 回日本アレルギー学会学術大会、日本薬学会第 139 年会、および第 1 回日本アレルギー学会東海地方会にて発表した (共同研究者：田中宏幸)。 第 68 回日本アレルギー学会学術大会および第 135 回日本薬理学会近畿部会にて発表 (共同研究者：田中宏幸)。および海外誌への論文投稿を予定している。		

研究結果要約

背景：魚アレルギーは免疫学的寛解が成立しにくいアレルギーの一つであり、新規治療法の創製が切望されている。

目的：アレルギー症状の誘発を極力抑えた免疫療法剤を創製するために、魚アレルギーマウスの作製、目的遺伝子改変技術を利用した低アレルゲン化コンポーネントの合成、ならびに低アレルゲン化コンポーネントに対する IgE 反応性を評価する。

結果：ヒトが摂取しうる蛋白質成分を多く含有した生魚身、加熱魚身、コラーゲン画分の 3 種を調製し、従来の腹腔内感作に加えて経皮感作モデルを新たに構築した。総 IgE 値や脾細胞による IL-13 産生量を測定した結果、コラーゲンを腹腔内感作させた場合に高値であったが、経皮感作では生魚身を塗布した場合に高値であった。粗抽出物による経口惹起試験を実施した結果、感作試験時に比べ総 IgE 値がさらに上昇した。原核生物により作製されたアレルゲンコンポーネントの ELISA の結果、エノラーゼやパルブアルブミンに対して IgE が顕著に反応した。これらパルブアルブミンに対して強い反応を示す群の血清を用いて、低アレルゲン化パルブアルブミンの ELISA を実施した結果、IgE 反応性が著しく減少した。

結論：実際の魚アレルギー症例の発症機序に近似した魚アレルギーモデルマウスを構築し、コンポーネントや低アレルゲン化コンポーネントの作製系を確立した。今後は、特定された他の蛋白質の変異型を順次作製し、その組み合わせによる最適な免疫療法剤を創製する。

研究目的

【背景】魚アレルギーは、食物アレルギーにおける新規発症例で上位を占め、小児より成人に多いのが特徴である¹⁾。特に、寿司職人など鮮魚を扱った特殊な環境下での職業性アレルギーが複数例報告され、これらは経皮感作によって発症したと考えられる²⁾。魚アレルギーの最大の特徴は、1種類の魚で感作が成立した場合でも他魚種にも類似した蛋白質が含まれていることから、様々な魚種で交差反応が生じアレルギーを引き起こす可能性がある。そのため、摂取により発症する魚種の回避指導や、負荷試験により摂取可能な魚種を確認する必要があり、魚食文化が浸透した日本において魚アレルギー発症は患者のQOLを低下させる。

魚アレルギーの免疫療法研究は、主要アレルゲンであるパルブアルブミンを用いたSCITの臨床研究が第二相まで完了している³⁾。当該研究の興味深い点として、魚のパルブアルブミンそのままの状態ではアレルゲン性を有しているため、IgEエピトープ領域をアレルゲン性のないアミノ酸に置換した、つまり低アレルゲン化パルブアルブミンを使用している点にあり、効能・安全性や今後の動向に注目したい⁴⁾。

これまで、当講座ではプロテオミクス手法によるアレルゲンコンポーネントを探索し、予想に反して多くの新規コンポーネントを特定した(特許出願済)^{5,6)}。この成果から、魚アレルギー症例は1種の蛋白質だけでなく、複数の蛋白質により感作・発症している可能性が示唆された。そこで、

すでに特定された抗原やIgEエピトープ解析によって得られた抗原情報をもとに低アレルゲン化コンポーネントの作製系を確立し、これらを複合的に用いた免疫療法剤開発の着想に至った。

【意義】アレルギー症状の誘発を極力抑え、かつ効率的な寛容状態へ誘導させる免疫療法を確立させることにより、患者のリスク低減や患者QOL向上につながる。また、免疫療法を実施する医療従事者への医療現場での負担軽減にも寄与すると考える。

【研究目的】魚アレルギーマウスを用いて、複合的低アレルゲン化コンポーネント免疫療法剤の基盤研究を開始する。つまり、1)魚アレルギーモデルマウスを作製してコンポーネントを特定し、2)コンポーネント改変に伴う低アレルゲン化を構築し、3)低アレルゲン化コンポーネントのIgE反応性を評価することを目的とする。これらを達成することで、最終的にはアレルギー症状の誘発を極力抑えた免疫療法剤を創製する。

研究計画及び研究手法

魚粗抽出物の作製

魚種について、魚アレルギーの中で発症の割合が高く、かつ、NCBIにおける遺伝子登録数の多い銀鮭(*Oncorhynchus kisutch*)を選択した。粗抽出物については銀鮭の生魚身、加熱魚身、コラーゲン画分の3種を作製した。

生魚身：生魚 100 g に対し氷冷した超純水 500mL を添加し、ホモジェナイザーにて 15 分間氷上で破碎した。次に、破碎した溶液をガーゼで

ろ過して水溶液を回収した。その後、1,000×g、4℃、10分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。

加熱魚身: 生魚 100 g に対し 95 度 30 分加熱処理した。その後、氷冷した超純水 500mL を添加し、ホモジェナイザーにて 15 分間氷上で破碎した。次に、破碎した溶液をガーゼでろ過して水溶液を回収した。その後、1,000×g、4℃、10分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。

コラーゲン画分: Hamada らの文献を参照してコラーゲンを抽出した⁷⁾。加熱魚身と同手法により水溶性部分を回収した。その後、15,000×g、4℃、15分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。

魚アレルギーマウスモデルを用いた感作試験

「魚粗抽出物の作製」の項にて作製した 3 種の粗抽出物を用いて感作試験の前検討を実施した。感作経路については、摂取食物からの感作および生魚との接触による感作を鑑み、腹腔内、ならびに経皮による感作を選択した。その結果、腹腔内感作においては加熱魚身とコラーゲン画分に対する効率的な感作が認められた。一方で、経皮感作においては生魚身とコラーゲン画分に対して効率的な感作が認められた。以上の結果より、当該試験では 3 種の粗抽出物の中から、効率的に感作が成立した 2 種を用いて以下の試験を実施した。

腹腔内感作モデル: 抗原として、加熱魚身、およびコラーゲン画分を用いた。50 μg/0.5 mL/匹となるように水酸化アルミニウムゲル (1 mg/0.5

mL/匹) と共に PBS に懸濁させた。これらの粗抽出物溶液を 0 日目および 12 日目に BALB/c マウスの腹腔内に投与した。次いで、22 日目にマウスを屠殺し脾臓を採取した後、96 穴プレートに脾細胞を播種し、粗抽出物溶液および concanavalin A (以下、Con A) で脾細胞を刺激した。粗抽出物溶液の添加濃度については終濃度が 100 μg/mL となるように、また、Con A は終濃度が 5 μg/mL となるようにそれぞれ添加した。粗抽出物溶液添加 72 時間後に脾細胞培養上清を回収し、IL-13 産生量を ELISA にて測定した。さらに、感作前および感作後に血清を回収し、血清中総 IgE 値を ELISA にて測定した。

経皮感作モデル: 抗原として、コラーゲン画分および生魚身粗抽出物溶液を用いて 100 μg/20 μL/匹となるように PBS に溶解させた。これらの粗抽出物溶液をフィンチャンバーに滴下し、マウス背部皮膚に貼付する操作を、週 1 回計 4 回繰り返して実施した。フィンチャンバーの最終貼付 1 週間後に脾臓を回収し、腹腔内感作の際と同様に、細胞播種および抗原刺激を実施した。また、IL-13 産生量ならびに血清中総 IgE 値の測定も同時に実施した。

魚アレルギーマウスモデルを用いた症状誘発試験 (経口惹起試験)

感作については「魚アレルギーマウスモデルを用いた感作試験」の項と同法で実施した。経口惹起に用いる粗抽出物については、腹腔内感作ではコラーゲン画分、または加熱魚身を、また、経皮

感作ではコラーゲン画分、または生魚身を用いた。各粗抽出物溶液は 30 mg/0.2 mL/匹となるように PBS に懸濁させた。また、aspirin については、4 mg/0.2 mL/匹 (200 mg/kg) となるように 0.5% carboxymethyl cellulose-Na (CMC-Na) 溶液に溶解させた。経口惹起の際には、各マウスを 1 時間馴化させた後に、直腸温を測定し、次いで、CMC-Na 溶液もしくは aspirin 溶液を経口ゾンデにより胃内投与した。その 30 分後、PBS もしくは各粗抽出物溶液を胃内投与し、さらにその 1 時間後に直腸温を測定した。

また、感作前、感作後および経口惹起後に血清を回収し、血清中総 IgE 値を ELISA にて測定した。

原核生物を用いた蛋白質作製

各種抗原に対し原核生物を用いた蛋白質発現系を構築した。

発現用プラスミドベクターの作製: 各種アレルゲンコンポーネント遺伝子は人工遺伝子作製サービス、GeneArt™ (Thermo Fisher Scientific) により作製した。大腸菌発現系で用いるプラスミドベクターの作製においては、村上らにより報告されたシームレスクローニング法により、これら各種アレルゲンコンポーネント遺伝子を大腸菌発現用ベクター (pET-21a(+), Merck Millipore-Novagen) に挿入した⁸⁾。なお、大腸菌発現系では目的蛋白質の C 末端側に精製を容易にするためにヒスチジンタグが融合されるように設計した。一方、ブレビバチルス菌発現用ベクターはタカラ

バイオより市販されている pNCM02 を用いた。なお、ブレビバチルス菌発現系でも、目的蛋白質の N 末端側に精製を容易にするためにヒスチジンタグが融合されるように設計した。

大腸菌での発現と精製: 作製したプラスミドベクターを大腸菌に加え形質転換し、抗生物質を含む LB 寒天培地にて培養した。翌日、抗生物質を含む LB 培地へ植菌し 37°C で培養し、濁度 (OD600) が 0.6 を超えたら isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (FUJIFILM) を加え発現誘導を行い、さらに室温で一晩培養した。培養した菌体は遠心操作により回収した。次に、菌体を超音波破碎し、遠心した上清を菌体抽出液とした。回収した菌体抽出液より、固定化金属アフィニティカラム樹脂、Ni-NTA agarose (FUJIFILM) を用いて目的蛋白質を精製した。

回収した溶液の一部を SDS-PAGE により分離し、CBB-R250 にて染色を行い、精製の確認を行った。また目的蛋白質を含む溶液の一部は限外濾過フィルターユニット Amicon Ultra (Merck Millipore) で濃縮し、液体窒素で凍結後保存した。回収した蛋白質の濃度は、紫外吸収もしくは BCA 法を利用して定量した。

ブレビバチルス菌での発現と精製

作製したプラスミドベクターを用い、キット添付手順に従い形質転換し、抗生物質を含む MT 寒天培地にて培養した。翌日、プレート上のコロニーを突き、抗生物質を含む 2SY 培地に植菌し、24 時間 30°C で培養した。培養開始 24 時間後に培養

液を遠心操作により培養上清を得た。その後、SDS-PAGE もしくは WIDE RANGE Gel Preparation Buffer (4×) for PAGE (ナカライテスク) を用いた電気泳動により分離し、培地への分泌発現状況を確認した。回収した培養上清シリンジフィルター (33 mm マイレクス 0.22 μ m) に通し、Ni-NTA agarose (FUJIFILM) を用いて目的蛋白質を精製した。また目的蛋白質を含む溶液の一部は Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices (Thermo Fisher Scientific) を用いて透析した。

回収した蛋白質の濃度は、紫外吸収もしくは BCA 法を利用して定量した。

変異型パルブアルブミン発現用プラスミドベクターの作製

パルブアルブミン遺伝子を組込んだ各種発現用ベクターを鋳型に、クイックチェンジ法により 51 残基目と 90 残基目のアスパラギン酸をアラニンへそれぞれ置換した D51A、D90A 変異型、ならびに 51、90 両残基を置換した D51/90A 変異型のパルブアルブミンを作製した^{9,10)}。アミノ酸置換の確認は DNA シーケンサーを実施し、DNA の塩基配列をもって確認した。

エンドトキシン量の測定

ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) を利用し、キット添付の手順に従った。

マウス血清を用いた各種蛋白質の ELISA

2 μ g/mL となるように蛋白質を PBS で希釈し、384 プレートへ一晩 4°C で静置し固相化した。翌日、溶液を除去して PBS-T (0.05%) 洗浄後、Pierce Protein Free (Thermo Fisher Scientific) で 1 時間室温ブロッキングを行った。血清は各群 6 匹のマウス血清を混和させたプール血清を用いた。洗浄後、Can Get Signal 1 (TOYOBO) で希釈した 5% マウス血清を添加して 1 時間室温で振とうして反応した。洗浄後、Can Get Signal 2 (TOYOBO) で希釈したビオチン化ヤギ抗マウス IgE 抗体 (1:4,000、Bio-Rad) を添加して 1 時間室温で振とうして反応した。洗浄後、PBS-T (0.05%) で希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (1:2,500、Dako) を添加して 1 時間室温で振とうして反応した。洗浄後、TMB 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を添加して 15 分間室温で振とうして発色後、2N の H₂SO₄ 溶液で反応停止し、EnSpire™ (Bio-Rad) にて 450nm で測定した。

低アレルゲン化パルブアルブミンの ELISA については、野生型パルブアルブミン、51 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換したもの、90 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換したもの、ならびに、51 と 90 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換したもの、の計 4 種を用いた。血清については、腹腔内にコラーゲンで感作・経口惹起させた群、生魚身で経皮感作・コラーゲン + aspirin 経口惹起させた群を用いてマウスの血清による ELISA 同様の試験系を実施した。

電気泳動

粗抽出物の蛋白質、大腸菌により作製されたりンコンビナント蛋白質の確認には Laemmli の方法¹¹⁾による SDS-PAGE により確認した。

質量分析装置を用いた蛋白質の特定

蛋白質の特定にはタンデム型高速液体クロマトグラフ質量分析計システム (TripleTOF®6600、ABSCIEX) を用いて、Shimojo らの論文を参考にしして実施した⁵⁾。

結果と考察

魚粗抽出物の作製

電気泳動の結果と質量分析装置により特定した各蛋白質を図 1 に示す。

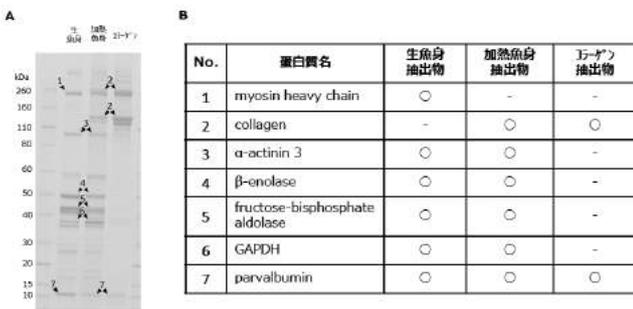


図 1. 動物実験に用いた粗抽出物の電気泳動パターンと主要なアレルゲンコンポーネント粗抽出物の電気泳動ゲル (A) と各抽出物に含まれる主要なアレルゲンコンポーネント (B)。魚アレルギー症例で特定できたアレルゲンコンポーネントを (○) で示す。

銀鮭の生魚身、加熱魚身を電気泳動した結果、低分子量域から約 110kDa までは両抽出物に含まれる蛋白質は同一であった。一方で、110kDa 以上の領域では異なる蛋白質が特定され、生魚身の高分子領域にはミオシン重鎖が、また、加熱魚身ではコラーゲンが特定された。これら調製した粗抽出物は実際の生魚身や加熱魚身に含まれる蛋白

質の含有数や量と比べて非常に近似した組成であった。アレルギー症例の中には複数のコンポーネントに感作されて発症する症例がいるため⁶⁾、このように実際に含まれる蛋白質組成の粗抽出物を用いたモデル動物作製は極めて重要である。

一方、コラーゲン感作による魚アレルギー発症が近年報告されており、コラーゲン分子の重要性が再認識されている。そこで、Hamada らが確立した魚身からのコラーゲン単離方法⁶⁾を参考とし、加熱魚身から得られるコラーゲン画分を 3 つ目の粗抽出物として作製した。その結果、若干のバルブアルブミンの混入は確認されたものの、精製度の高いコラーゲンを抽出した。

魚粗抽出物を用いた感作性試験・総 IgE・IL-13 の結果

コラーゲン画分と加熱魚身の粗抽出物溶液を用いて腹腔内感作を実施した結果、両粗抽出物において血清中総 IgE 値が上昇した (図 2)。

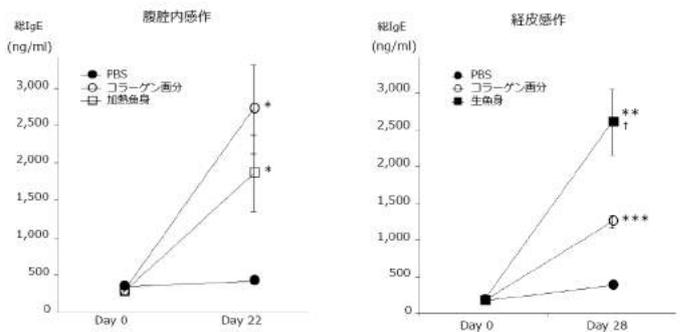


図 2. 血清中総 IgE 値
N=6. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 (vs PBS: Student's t-test or Aspin-Welch t-test)
† p < 0.05 (vs. コラーゲン画分: Aspin-Welch t-test)

感作においては、特にコラーゲン画分で感作した場合が最も高値であった。一方、コラーゲン画分と生魚身の粗抽出物を用いて経皮感作を実施した結果、両粗抽出物において血清中総 IgE 値が

上昇したが、特に生魚身の粗抽出物溶液で感作した場合が最も高値であった。脾細胞による IL-13 産生量について測定した結果、感作に用いた粗抽出物溶液で脾細胞を再刺激した際に、顕著に上昇した(図 3)。

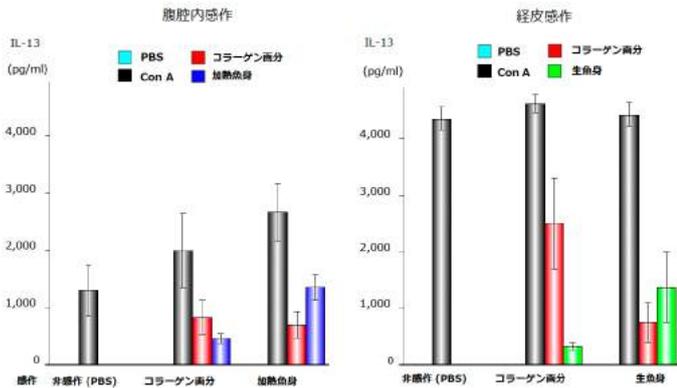


図 3. 脾細胞から産生されたIL-13の測定
Concanavalin A; Con A. N=6. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 (vs. PBS: Student's t-test or Aspin-Welch t-test), †p < 0.05 (vs. コラーゲン画分: Aspin-Welch t-test)

両感作の結果から、腹腔内感作モデルではコラーゲン画分により、また、経皮感作モデルでは生魚身により血清中総 IgE 値が高値を示した。すなわち、感作経路の違いにより反応抗原が異なる可能性が示唆された。IL-13 については、感作経路によらず、感作に用いた粗抽出物で脾細胞の再刺激により応答することが観察された。

寿司職人など鮮魚を扱う業務に従事している中で、生魚身を素手で接触することで繰り返し抗原に暴露されて発症する職業性魚アレルギーが問題になっている。今回の実験結果の中で、生魚身で経皮感作させたマウスはこの感作機序に近似したモデルであることが示唆され、抗原と感作に関する発症形態の機序の解明に役立つモデルと期待している。

魚粗抽出物を用いた経口惹起試験・総 IgE・体温低下の結果

図 4A-C についてはコラーゲン画分(図 4B)、ならびに加熱魚身(図 4C)の粗抽出物で腹腔内感作したマウスにおいて、両粗抽出物をそれぞれ反復的に経口投与し惹起試験を実施し、マウスの血清中総 IgE 値を測定した。さらに、各抽出物に対し、aspirin の併用群を設け、aspirin によるアレルギー反応の増強の可能性を検討した。図 4B において、PBS 群と比較してコラーゲン画分で腹腔内感作させた場合、コラーゲン画分の経口惹起+ aspirin 併用群が有意な高値を示した。さらに、図 4C において、加熱魚身による腹腔内感作させた場合においても同様にコラーゲン画分の経口惹起+ aspirin 併用群が有意な高値を示した。

図 4D-F についてはコラーゲン画分(図 4E)、ならびに生魚身(図 4F)の粗抽出物で経皮感作したマウスにおいて、両粗抽出物をそれぞれ反復的に経口投与し惹起試験を実施した。その結果、図 4E においてコラーゲン画分で経皮感作させた場合、生魚身の経口惹起+ aspirin 併用群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起+ aspirin 併用群は有意な高値を示した。さらに、図 4F において、生魚身で経皮感作させた場合、生魚身の経口惹起+ aspirin 併用群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起+ aspirin 併用群に加え、生魚身の経口惹起群でも有意な高値を示した。

次に、経口投与最終回後における直腸温を測定した(図 5)。

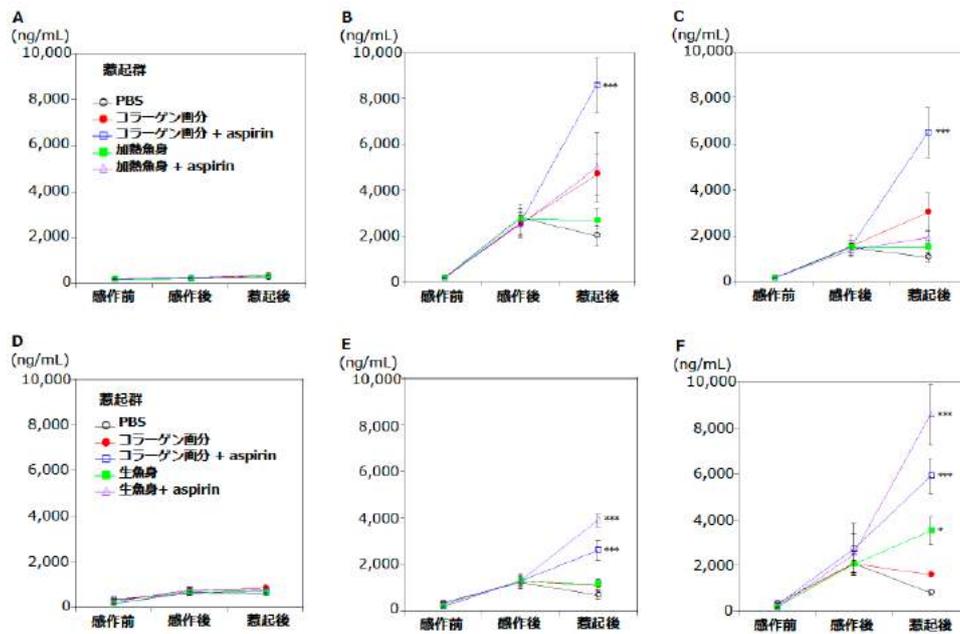


図 4. 腹腔内感作、経皮感作後の経口惹起試験を実施したマウス血清中総 IgE 値
腹腔内感作 (A-C)、経皮感作 (D-F)、PBS 投与 (A,D)、コラーゲン画分感作 (B,E)、加熱魚身感作 (C)、生魚身感作 (F)。
N = 6. *p < 0.05, ***p < 0.001 (vs. PBS: Dunnett's test)

まず、コラーゲン画分、ならびに加熱魚身を用いて腹腔内感作、経口惹起させた群の直腸温を測定した。その結果、図 5A において、コラーゲン画分による腹腔内感作群の中で、コラーゲン画分の経口惹起群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群が PBS 群と比較して有意に直腸温低下を示した。また、加熱魚身による腹腔内感作の中で、コラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群も同様に直腸温低下が認められたが、一方で、加熱魚身の経口惹起した全群では有意な差がみられなかった。

次に、コラーゲン画分、ならびに生魚身を用いて経皮感作、経口惹起させた群の直腸温を測定した。その結果、図 5B において、生魚身による経皮感作群の中でコラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群と生魚身の経口惹起+aspirin 併用群において有意な直腸温低下が認められた。一方、コラーゲン画分で経皮感作させたマウスにお

いて、コラーゲン画分、または生魚身を反復的に経口投与したが、顕著な差はみられなかった。

経口惹起試験の結果から、腹腔内感作モデルではコラーゲン画分の感作+コラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用投与により、また、経皮感作モデルでは生魚身の感作・生魚身の経口惹起+aspirin 併用投与により直腸温低下を示した。すなわち、両粗抽出物に関しては、感作させた物質を経口的に投与することで重篤な体温低下を引き起こす可能性が示唆された。一方、加熱魚身による腹腔内感作モデルの中で、コラーゲン画分の

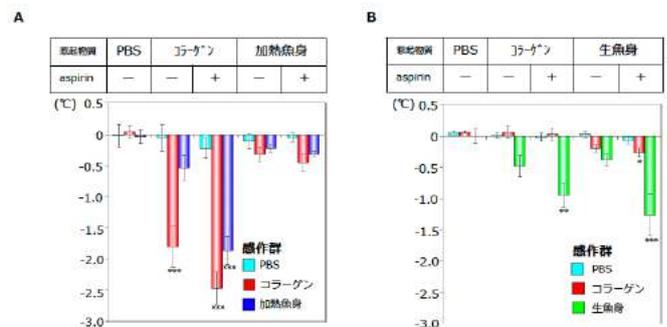


図 5. 経口惹起試験後の直腸温測定
腹腔内感作 (A)、経皮感作 (B)。N = 6. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (vs. PBS 惹起: Dunnett's test)

経口惹起+aspirin 併用投与によって顕著な体温低下が認められた。これについて図 1 より加熱魚身の粗抽出物にはコラーゲンが含まれており、おそらくこのコラーゲンに対する著しい免疫応答が発生したものと推察される。ただ、コラーゲン単体投与では有意な差が認められなかったことを踏まえると、aspirin による生体内へのコラーゲン取り込みの増加により高い抗原性を獲得し、結果的に直腸温低下を引き起こしたものと考えられる。

原核生物を用いた蛋白質発現系の構築

発現・精製・エンドトキシン測定

原核生物発現系により銀鮭由来リコンビナントパルブアルブミン(以下、r パルブアルブミン)、リコンビナントβ-エノラーゼ(以下、rβ-エノラーゼ)を作製した。例としてブレヴィバチルス菌発現系により産生し、24 時間培養した 2SY 培地(図 6A) から Ni-NTA agarose で r パルブアルブミンを精製した結果、1 回のカラム操作で培地上清中由来の他蛋白質の含有もなく、非常に精製度の高い蛋白質が単離された(図 6B)。当該行程をもとに rβ-エノラーゼも同様に調製した(図 6C)。

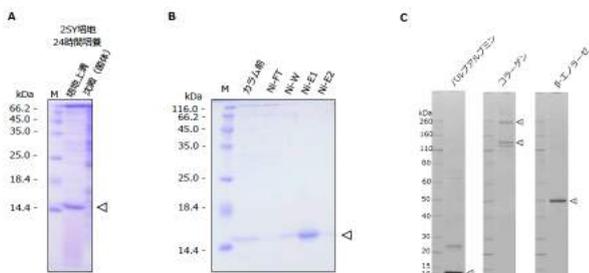


図6. リコンビナント蛋白質、抽出蛋白質の電気泳動パターン
培地上清中のパルブアルブミン (A)、精製行程中のパルブアルブミン (B)、リコンビナントパルブアルブミン、銀鮭より抽出したコラーゲン画分、リコンビナントβ-エノラーゼの電気泳動パターン (C)。各蛋白質に相当する部分を(△)で示す。マーカー: M, 培地上清添加後の薬通り画分: Ni-F, 洗浄画分: Ni-W, 溶出画分: Ni-E1, -E2。

コラーゲンに関しては、構成されるアミノ酸の中でプロリンがヒドロキシプロリンに修飾されていることが知られているが、原核生物ではプロリンのヒドロキシ化は不可能であるため、銀鮭から抽出したコラーゲン (n コラーゲン) を採用した(図 6C)。

またパルブアルブミンに関しては、低アレルゲン化コンポーネントのモデルとして、IgE エピトープ領域のアミノ酸残基を置換した変異型 (D51/90A, D51A, D90A) 3 種を作製し、マウスの IgE 反応性を検証した(図 7)。

調製したアレルゲンコンポーネントを動物実験などへ利用する際、発熱などの生体反応や各試験の偽陽性を示すエンドトキシンの混入が危惧されるが、ブレヴィバチルス菌はグラム陽性菌であり、大腸菌とは異なりエンドトキシンを持たない。実際にエンドトキシン活性を測定したところ、蛋白質 1 mg あたり大腸菌発現系では 368 エンドトキシンユニット (EU)、ブレヴィバチルス菌発現系では 3 EU と、ブレヴィバチルス菌発現系を用いた方が低値となった。このことは動物実験での利用などを考慮した際、ブレヴィバチルス菌発現系が有用であることを示唆している。

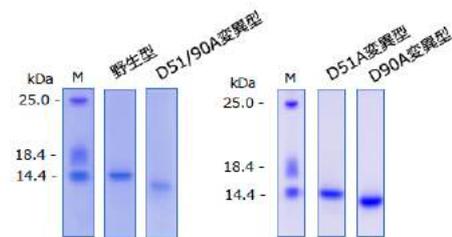


図 7. 野生型と変異型のリコンビナントパルブアルブミンの電気泳動パターン

一方で、ブレヴィバチルス菌によってエンドトキシンの対策を実施しているが、それだけでは不十分であることがわかってきた。エンドトキシンを産生するグラム陰性菌は至る所に常在しており、実験室の中ではシンクなど水回りに多く存在していることが知られている。そのため、器具や調製した試薬中にも微量のエンドトキシンが含まれている可能性も否定できない。その対策として、エンドトキシンフリーの純水やディスポの器具を準備する必要がある。

経口惹起試験マウス血清を用いた蛋白質のELISA

経口惹起試験を実施したマウスのプール血清を用いて r パルブアルブミン、n コラーゲン、r β -エノラーゼの ELISA を実施した (図 8)。

腹腔内感作群の中で、コラーゲン画分で感作+コラーゲン画分の経口惹起群において、aspirin

投与の有無に関係なく r パルブアルブミンと r β -エノラーゼに対する IgE 反応性が最も高値を示した。さらに、r β -エノラーゼに関しては、加熱魚身で感作+コラーゲン画分の経口惹起群においても高値を示した。一方、経皮感作群の中で、生魚身で感作させ生魚身の経口惹起群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起群において、aspirin 投与の有無に関係なく r β -エノラーゼに対する IgE 反応性が最も高値を示した。パルブアルブミンに対する IgE については、同様の 2 群において aspirin を併用投与した群の方が併用していない群に比べ高値を示した。n コラーゲンに対する IgE 反応性については上述の 2 蛋白質と比較し、両感作群において顕著な差はみられなかった。

まず特筆すべき点として、感作試験のみ実施したマウスの血清を用いて各蛋白質の ELISA を実施したが (データ非公表) 有意な差が認められなかったのに対し、経口惹起試験を実施した場合で

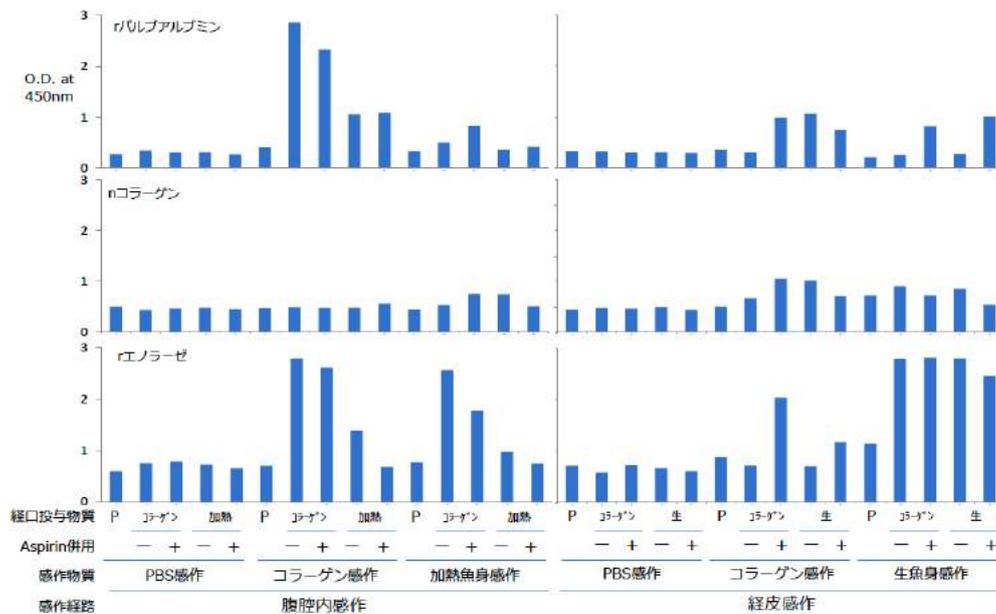


図 8. 惹起試験後の血清による 3 蛋白質の ELISA
 各群 (n=6) のプール血清を用いて実施。P: PBS感作群、コラーゲン: コラーゲン画分、加熱: 加熱魚身、生: 生魚身

は各抗原に対して IgE が反応した。その中で、腹腔内・経皮による両感作において $r\beta$ -エノラーゼに対する IgE が顕著に反応していた。魚アレルゲンの中でパルブアルブミンやコラーゲンはよく知られているが、エノラーゼに関する報告は数例のみである^{12,13)}。各粗抽出物内のエノラーゼ含有量を図1の電気泳動の結果で確認すると、生魚身や加熱魚身には多く含まれているが、コラーゲン画分にはほとんど含まれていなかった。それでもコラーゲン画分の投与によって $r\beta$ -エノラーゼに対して IgE が反応した理由については、微量のエノラーゼでも継続的な惹起によって高い抗原性を獲得した可能性が示唆された。他のコンポーネントを含め今後詳細な解析が必要である。

一方、パルブアルブミンについてはコラーゲン画分による腹腔内感作・経口惹起させた群で顕著に反応している結果であった。これについても同じく図1より、コラーゲン画分内にはコラーゲン以外にもパルブアルブミン分子が含まれていることがわかるが、当モデル作製法ではパルブアルブミンの方がコラーゲンよりもアレルゲンとして成立しやすい可能性が示唆された。また、生魚身で経皮感作させた aspirin 併用の2群では併用していない群に比べパルブアルブミンに対して顕著に反応した結果が得られている。Aspirin は消化管の抗原取り込みの吸収を促進させ抗原性の上昇や症状誘発に関与することが知られているが、aspirin によってパルブアルブミンの抗原性が高くなったことは非常に興味深く、臨床でも同様の事例があるか確認する必要がある。n コ

ラーゲンの ELISA の低反応性については加熱魚身から抽出されたものを利用しており、抽出物からの単離による抗原性の担保について詳細に調査する必要がある。

マウスを用いて感作・惹起させた実験系で血清学的検討を実施する場合、IgE に加えて IgG1 の存在も考慮に入れる必要がある。血清中 IgG1 の濃度は IgE の数百～数千倍といわれ、ELISA などを実施する場合には IgG1 による競合阻害の可能性を視野に入れ ELISA の系を構築する必要がある。

経口惹起試験マウス血清を用いた低アレルゲン化パルブアルブミンの ELISA

パルブアルブミンの抗原性に関わるアミノ酸残基をアラニンに置換した変異型 r パルブアルブミンを作製し、ELISA により各マウス IgE の反応性を測定し低アレルゲン性を検証した(図9)。パルブアルブミンに対して IgE が顕著に反応する2群を抽出し、各マウスの IgE を測定した結果、腹腔内・経皮感作ともに野生型 r パルブアルブミンに対する反応性に対し、変異型 r パルブアルブミンの方が低下していた。特に、51 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換した D51A の変異型においては著しく反応が低下した。D51/90A 変異型についてもほぼ同様の結果が得られ、D51A に依存していることが示唆された。一方、D90A に関してはマウスによって IgE 反応性が下がるものと下がらないものの両方が確認された。各群6匹から構成されているが、感作惹起後に野生型パル

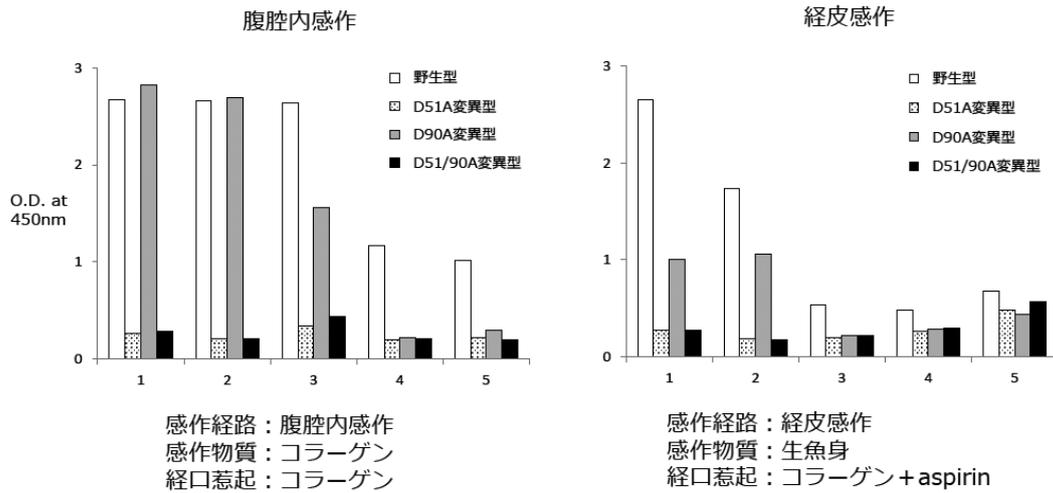


図 9. 惹起試験後の血清を用いた低アレルゲン化バルブアルブミンのIgE反応性
 パルブアルブミンに対するIgE反応性が認められた各マウス血清を用いて野生型パルブアルブミンと変異型パルブアルブミンに対するIgE反応性を検証し低アレルゲン化を確認。D51A変異型：51残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型パルブアルブミン、D90A変異型：90残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換、D51/90A変異型：51、90残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換

パルブアルブミンに反応しなかったマウスが各群 1 匹存在していたため当マウスの結果は除外した。

パルブアルブミンは、様々な魚種間で交差反応性が高く、特にカルシウムイオン結合領域においてアミノ酸類似性が高いことから、同領域が主要な IgE エピトープと考えられている。また、同領域に変異を入れたコイ由来パルブアルブミンにおいて、マウスモデルを用いた実験では IgE 反応性が著しく低下したことが報告されている¹⁰⁾。今回、当報告を参考に変異型 r パルブアルブミンを作製し同様の結果が得られたことから、今後、エノラーゼ含め、すでにヒト症例の抗原解析により特定した様々なアレルゲンコンポーネントに対し、同様の手法で低アレルゲン化を実施し、免疫療法剤の原薬候補を選定していきたい。

計画に追加して行ったこと

アラスタット 3g Allergy®はビオチン化した粗抽出物などを抗原とし、患者血清とストレプトア

ビジン結合固相化ビーズを混合する。この測定手法においては、スポンジやマイクロプレートウェルなどの固相反応と比較して立体障害が最小限になり、また球形のビーズが液相中で回転することにより抗原を認識する確率が高くなると考えられている^{14,15)}。これらを踏まえ、本研究で取り上げたアレルゲンコンポーネントについて、ビオチン化蛋白質の作製を可能にする Avitag 技術を検討した。Avitag はアミノ酸配列として GLNDIFEAQKIEWHE をもち、このリシン残基に大腸菌内に含まれる酵素反応によりビオチンが付加される。このため、発現操作を行うだけで、ビオチン化されたアレルゲンコンポーネントが作製可能となる¹⁶⁾。

残された課題及び発表予定

動物モデルの課題：今回の検討では、腹腔内感作を用いて全身感作のマウスモデルの作製を試みた。しかしながら、臨床において、腹腔内感作

モデルは応用しづらく、摂取食物からの感作を鑑みるには、経口投与による全身感作モデルを作製するのが好ましい。そのため、今後はコレラトキシンを用いた経口感作マウスモデルの作製を試みる必要がある。また、今後、アレルギー抑制試験の実施を想定しているが、その際にはフローサイトメーターによる制御性 T 細胞の population を確認する必要があるが、そのためには、マウスの免疫細胞系の活性化を確認する必要があり、細胞増殖試験を現在検討している。

蛋白質発現系の課題：ブレビバチルス菌発現系で産生したパルブアルブミンの回収量は、培地 100mL あたりで計算した場合、大腸菌発現系と比べると非常に少ないことがわかった。これについては今後、最大 10L までの培地で培養可能なジャーファーマンタを利用し、発現条件の最適化などにより解決したい。また、ブレビバチルス菌発現系では、 $r\beta$ -エノラーゼの培地上清へ分泌されなかった。今回は市販されている pNCM02 を利用したが、今後プロモーターや分泌シグナルの検討により高産生される条件を検討していきたい。

抗原解析：今回、3 種のアレルゲンコンポーネントに対し研究を進めてきたが、魚アレルギー症例で特定した全てのコンポーネントに対して実施できていない。抗原性について課題の残る n コラーゲンも含め抗原・エピトープ解析を実施予定である。また ELISA については特異的 IgE を検出できるような系を構築し、精度の高い結果を提供し、動物実験との対比が必要である。

今回得られた成果の一部は、既に日本薬学会第

139 年会および第 1 回日本アレルギー学会東海地方会にて発表した。今後、第 68 回日本アレルギー学会学術大会および第 135 回日本薬理学会近畿部会では経口惹起の成績を加えて発表する予定である。

今後の研究活動について

前述したように、今回作製した魚アレルギーモデルマウスにおいて、アレルギー症状の誘発を確認できた。しかしながら、臨床における摂取食品からの感作を鑑みた経口感作のマウスモデルを作製する必要があると考え、コレラトキシンおよび抗原を併用する経口感作モデルを確立したい。今後、これらモデル系を用いて低アレルゲン化したコンポーネントを複数作製して投与し、症状抑制に関する研究を遂行する予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、臨床医として「患者にとって有益な免疫療法剤とは何か？」を常に意識した上で、得られた研究結果に対し共同研究者とともに議論してきた。患者にとって本当の意味での有益な免疫療法剤を提供するために、臨床と基礎がより一層密に連携して本研究を継続していく。

参考文献

- 1) 食物アレルギーの診療の手引き, 2017
- 2) Leung NY, Wai CY, Shu S, et al. Current immunological and molecular biological perspectives on seafood allergy: a comprehensive review. *Clinic Rev*

- Allergy Immunol. 2014 Jun; 46(3): 180-97.
- 3) Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Poulsen LK, et al. FAST: towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. Clin Transl Allergy. 2012 Mar 9; 2(1): 5.
- 4) Swoboda I, Balic N, Klug C, et al. A general strategy for the generation of hypoallergenic molecules for the immunotherapy of fish allergy. J Allergy Clin Immunol 2013 Oct; 132(4): 979-81.
- 5) Shimojo N, Yagami A, Nakamura M, et al. Occupational fish allergy caused by percutaneous sensitization with α -actinin-3. 2017 May; 76(5): 322-323.
- 6) Yagami A, Suzuki K, Nakamura M, et al. Occupational food allergy due to parvalbumin and phaseolin induced by epicutaneous sensitization. Allergol Int. 2015 Jul; 64(3): 287-8.
- 7) Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. et al. Identification of collagen as a new fish allergen. Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Feb; 65(2): 285-91.
- 8) Taniguchi N, Nakayama S, Kawakami T, et al. Patch cloning method for multiple site-directed and saturation mutagenesis. BMC Biotechnol. 2013 Oct 29; 13:91.
- 9) Kubota H, Kobayashi A, Kobayashi Y, et al. Reduction in IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by heat treatment. FISHERIES SCIENCE 2008; 74: 411-417
- 10) Freidl R, Gstoettner A, Baranyi U, et al. Blocking antibodies induced by immunization with a hypoallergenic parvalbumin mutant reduce allergic symptoms in a mouse model of fish allergy. J Allergy Clin Immunol. 2017 Jun; 139(6): 1897-1905.
- 11) Laemmli UK. Nature. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970 Aug 15; 227(5259): 680-5.
- 12) Kuehn A, Hilger C, Lehnert-Weber C, et al. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. Clin Exp Allergy. 2013 Jul; 43(7): 811-22.
- 13) Liu R, Krishnan HB, Xue W, et al. Characterization of allergens isolated from the freshwater fish blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). J Agric Food Chem. 2011 Jan 12; 59(1):

- 458-63.
- 14) 小田嶋博, アレルゲン特異 IgE 抗体の新しい測定方法 2. アラスタット 3gAllergy. アレルギー・免疫, 2013, 20: 46-54
- 15) 山川祥一郎, 奥田裕子, et al. アレルゲン特異 IgE 抗体測定キット「シーメンス・アラスタット IgE II (アラスタット 3g)」の特徴と有用性について. 生物試料分析, 2014 37, 4: 264-269
- 16) Verma V, Kaur C, Grover P et al. Biotin-tagged proteins: Reagents for efficient ELISA-based serodiagnosis and phage display-based affinity selection. PLoS One. 2018 Jan 23; 13(1): e0191315