

ニッポンハム食の未来財団 2019 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	工場内におけるアレルギー感作評価が可能なペプチドビーズを用いた簡易検査法の開発
フリガナ	ウスイ ケンジ
代表者名	臼井 健二
所属機関 (機関名) (役職名)	甲南大学フロンティアサイエンス学部 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	[学会発表] 「官能基指示薬とペプチド固定化マイクロビーズを用いた皮膚感作性検出システムの確立」日本動物実験代替法学会第 32 回大会, つくば市 (2019.11.20-22) 他 3 件 [論文発表] "Development of a chromophore-solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) for assessing skin sensitization in vitro", <i>Analyst</i>, 2020, 145, 3211-3216 ※中裏表紙掲載 "Synthesis of Peptide-Immobilized Magnetic Beads, and Peptide Reactivity Assay for Assessing Skin Sensitization Utilizing Chromophore", <i>Processes</i>, 2020, 8, 1257

研究結果要約

食の安全が重要視されている現在、工場内における生産機器、容器、食品添加物、食品開発段階の材料などによるアレルギー発症や、アレルギー悪化リスクの防止は、開発・生産において重大課題となる。開発・生産におけるアレルギー感作試験においては、動物実験に頼らざるを得ないのが現状であるが、倫理的観点、コスト、簡便さなどから動物実験代替法が求められつつある。皮膚感作性試験代替法の一つである、DPRA 法 は食品開発・生産分野においても極めて有効な手法であると考

えられる。しかしながら、油性物質などの難水溶性物質を評価できない、操作が煩雑などの問題点も多い。そこで我々はこれまで、分光技術とペプチド工学技術を融合させた様々な物質、物体の簡便な感作性試験法（C-SPRA 法）の構築を行ってきた。本助成研究では、未だ基礎的なシーズである本感作性試験法を食品業界に幅広く適用できる汎用性の高い手法へと発展させることを目指した。具体的には、より簡便な方法として磁性ビーズを用いた本手法の改良法の確立、微量吸光測定によるさらなる高効率手法の検討、本システムの工場内使用へ向けた研究を行うための具体的な計画立案を行った。今後は、企業や他分野研究者と共同し、実際の器材、部品を使った付着物の回収、濃縮、測定手法の確立、ロボットによる自動化を行い、実用化・商品化・適用範囲の拡大をさらに進めていきたい。

研究目的

食の安全が大きく叫ばれている現在、工場内における生産機器、容器、食品添加物、食品開発段階の材料などによるアレルギー発症や、アレルギー悪化リスクの防止は、開発・生産において極めて重大な課題となる。開発・生産段階におけるアレルギー感作試験においては、実際に人への負荷テストは現実的ではなく、動物実験に頼らざるを得ないのが現状である¹⁾。しかしながら、近年、倫理的観点、コスト、簡便さなどから動物実験や臨床試験に頼らない試験方法が求められつつある。一般的に食品のアレルギー感作試験においても皮膚テストが主に用いられていることから、皮膚感作性試験代替法の一つである、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) は食品開発・生産分野においても極めて有効な手法であると考えられる^{2,3)}。DPRA は生体内の感作反応を模倣し、ペプチドと被験物質とを反応させた後に HPLC を用いて未反応ペプチドを測定し、その減少率から感作性を予測する試験法である（図 1 a）。DPRA は現状の動物実験代替法の中でも有効な手法の一つではあるが、純物質でないと評価できない、その中でも油性物質などの難水溶性物質を評価できない、操作が煩雑、効率性が悪い、HPLC での検出が難しいなどの問題点も多い（図 1 bc）。こうした背景のもと、我々はこれまで、分光技術とペプチド工学技術を融合させた様々な物質、物体の簡便な感作性試験法（C-SPRA(Chromophore-Solid Peptide Reactivity Assay)法）の構築を行ってきた^{4,5)}。C-

SPRA 法は DPRA 法を基礎としているものの、従来からの懸念であった、混合物や化学物質以外のバルクの物体、非水溶性・疎水性の物質、界面活性剤などの両親媒性物質などの全ての試験が可能となる、試験検体の守備範囲が大きく広がる方法であり、また操作方法も簡便となる手法である（図 2）。具体的には、DPRA で使用する試験用ペプチドを、有機溶媒中、水中どちらにも、なじむビーズ上に固定する。これにより感作性試験が様々な溶媒中で可能となる。さらに NH_2 基・ SH 基指示薬を組み合わせることで、分光法で検出が可能な極めて簡便な試験法の開発を目指した（図 3）。本法が開発できれば日本の食品業界のみならず、世界においてもスタンダードとなる有力な手法となることが期待できる。

本助成研究では、基礎的なシーズである本感作性試験法を食品業界に幅広く適用できる汎用性の高い手法へと発展させることを目指した。具体的には、より簡便な方法として磁性ビーズを用いた本手法の改良法の確立、微量吸光測定によるさらなる高効率手法の検討、本システムの工場内使用へ向けた研究を遂行するための具体的な計画立案を行った。

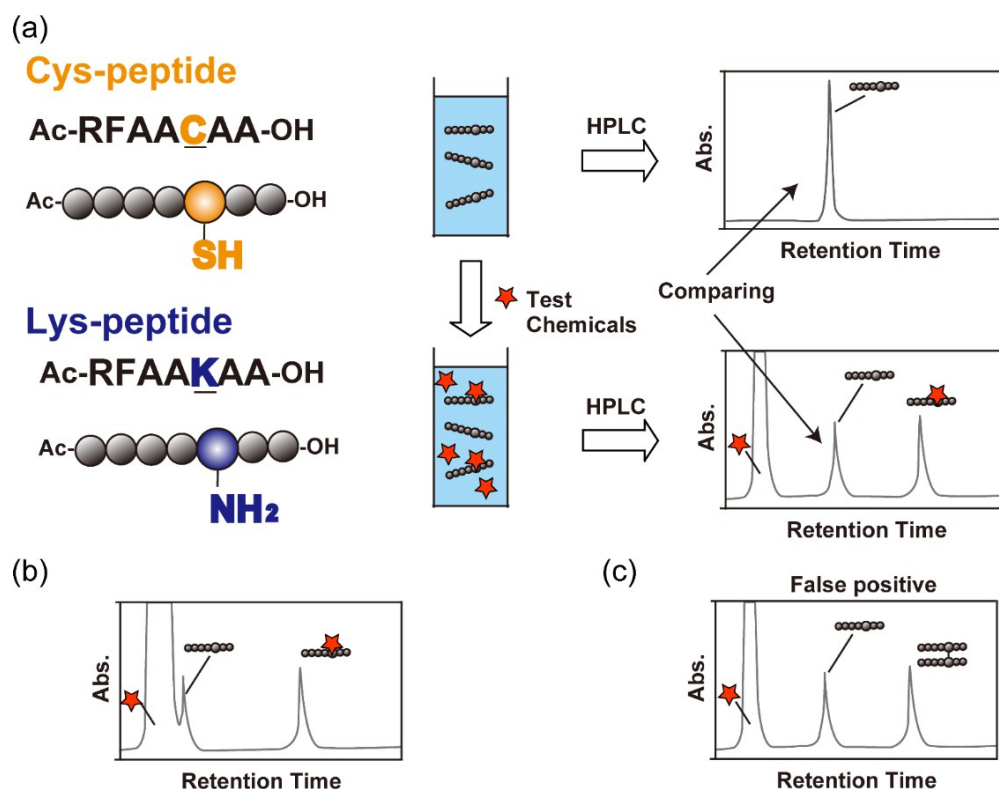
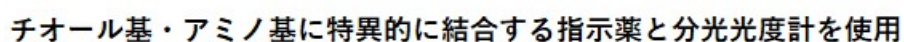


図 1 (a) DPRA 法の概要。(b) HPLC での検出が難しい例。ペプチドのピークが検定物質の大きい

水系溶媒にも有機溶媒にも馴染むペプチド固定化樹脂とペプチド合成用カラムを使用



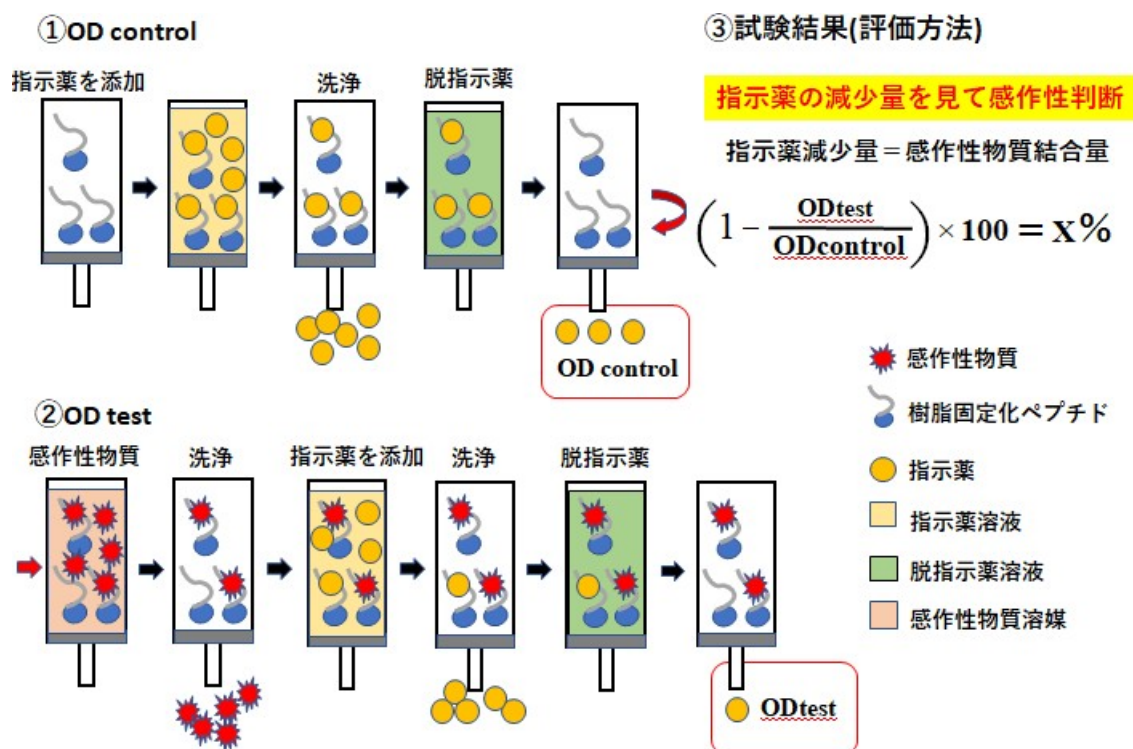


図3 樹脂ビーズを用いた C-SPRA 法の操作方法。

研究計画及び研究手法

< 実験計画 >

1. ペプチド配列の検討と磁性ビーズへのペプチドの配置・・・DPRA で用いるペプチド配列は、化粧品を主に想定した配列であり、本課題に適しているとは限らないため、配列の変更を行った。
具体的には、高純度にペプチドを磁性ビーズ上に合成でき、かつ、比較的アミノ酸残基の少ない配列を検討した。申請者の過去のペプチド工学のノウハウを駆使して検討を行った。
2. 指示薬の選択と感作性試験・・・本課題の目的に適した色素を検討した。具体的には、我々が直近で構築した吸光法を採用し、磁性ビーズ上で条件を変えることにより、結合と遊離が可能な色素の選択を行った。その後モデルの感作性物質数種を用いて試験を行った。
3. 高効率測定に向けた本法の改良・・・高効率に測定できるよう、微量サンプルでの測定、並列的な多種類サンプルでの測定などの測定法の最適化を行った。

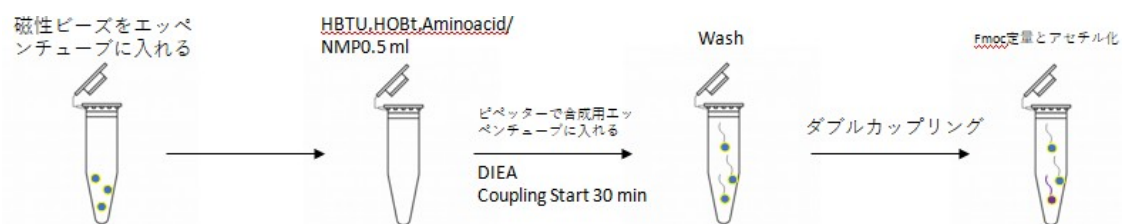
4. 本システムの工場内使用へ向けた検討・・・実際の生産機器部品、容器、食品材料を念頭に感作性試験法の改良、操作法の検討を行った。

<研究手法>

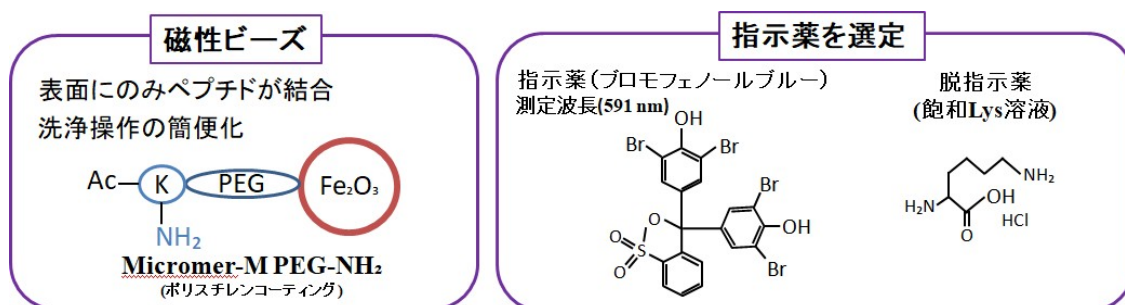
磁性ビーズは Micromer-M PEG-NH₂(micromod 社)を使用した。磁性ビーズでのペプチド合成は、Fmoc 固相合成法⁶⁾を基に、HBTU-HOBt 法(アミノ酸 200 eq./HBTU 200 eq./HOBt 200 eq./DIEA 400 eq., 30 分間)で行った。

本研究では、親水・疎水両溶媒になじむ磁性ビーズ固定化ペプチドと NH₂ 基・SH 基指示薬を組み合わせることで、様々な物質・混合物・物体の評価を可能とし、分光法で検出が可能な極めて簡便な試験法の開発を目指した。例えば難水溶性の試験物質を有機溶媒中に溶かしこみ、そこにペプチドビーズを投与すれば、ビーズに固定したペプチドが試験物質と容易に接触できるようになる。これにより感作性試験が可能となり、感作性試験終了後は、1.5mL チューブ専用のマグネットホルダーを用いて、ビーズをとどめることで、試験溶液を除去することができる。その後、検出には NH₂ 基・SH 基指示薬を用い、ビーズ中の未反応ペプチドの NH₂ 基・SH 基を、吸光度や蛍光強度などの分光法によって測定することにより、感作性を確認する(図4)。こうすることにより、HPLC を用いる必要がなく、たいていの工場・研究開発施設で用いられている分光光度計やプレートリーダーを用いることで高効率な検出が可能となる。

(a)



(b)



(c)

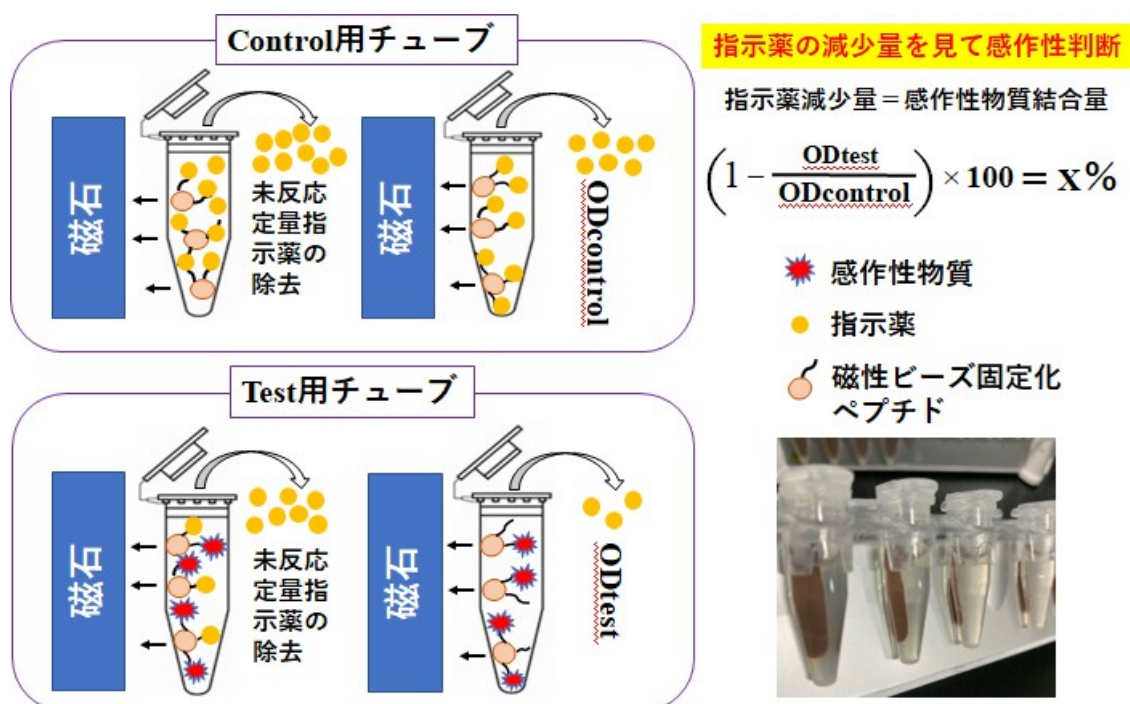


図4 (a) 磁性ビーズ上でのペプチド合成のプロトコル。(b) 使用したビーズ、指示薬(色素)脱指示薬など。(c) 磁性ビーズを用いた C-SPRA 法の操作方法。

結果と考察

1. ペプチド配列の検討と磁性ビーズへのペプチドの配置

磁性ビーズへのペプチドの固定化は、主に遊離ペプチドを得た後、クリック反応、マレイミド反応などで固定化することが一般である^{7,8)}。しかしながら工場内などで汎用性のあるビーズを供給するためには、試薬の価格や、反応の競合などを考慮に入れなければならない。当研究室ではこれまで、ビーズに直接、ペプチド合成を行うことによるペプチド固定化固相担体の作製を試みている。磁性ビーズは、安定分散する溶媒に制限があり、通常の Fmoc 固相合成で用いられる、DMF や NMP といった一般的な非プロトン性極性溶媒は使用できない。そこで、DMSO を用いた Fmoc 固相合成法の確立をまず目指すことにした。さらに磁性ビーズは酸耐性も低いことから、脱保護を温和にできる Fmoc-Cys(Mtt)-OH、Fmoc-Lys(Mtt)-OH をモノマーとして使用することにした。Mtt(methyltrityl)基は、1%TFA という弱酸で脱保護が可能である⁹⁾ (図 4 a)。

使用したペプチド配列は磁性ビーズ上での合成を極力簡便にするために、N 末端はアセチル化させた Cys 1 残基、あるいは Lys 1 残基のみを採用することにした。なお DPRA の改良法である ADRA¹⁰⁻¹²⁾は 1 残基アミノ酸のみで感作性試験が実現できていることから、本法においても十分、感作性試験が可能であると期待できる。

合成法などの最適化を行った結果、目的とする Ac-Cys-beads と Ac-Lys-beads の合成には成功したが、その後、Ac-Cys-beads は Cys のチオール基で磁性ビーズが還元されている結果が示唆されてしまい、残念ながら磁性ビーズの感作性試験では Ac-Lys-beads のみでの適用を考えることとなった。

2. 指示薬の選択と感作性試験

まずは樹脂ビーズでの C-SPRA 法での色素の選定を研究期間内で行った。Lys のアミノ基の指示薬であるピクリン酸を色素として用い、1%NaOH で結合した色素を遊離する方法で、うまくいき、2020 年 3 月に論文がアクセプトされた⁵⁾。磁性ビーズでは、脱指示薬としてかなり温和な条件である、飽和 Lys 水溶液(100 mM)を用いることができる、アミノ基定量指示薬として知られて

いるブロモフェノールブルーを選択した（図 4 b）。

感作性試験では、強感作性物質、中感作性物質、弱感作性物質、ネガティブコントロール、各 1 – 3 種類の物質の測定を行いながら操作方法の確立を行った（図 4 c）。測定の結果、磁性ビーズを用いる方が樹脂ビーズを用いるよりも再現性の良い結果が得られた。また従来法では測定することが難しかった疎水性の高い物質や、弱感作性物質について簡便な測定が可能であった。以上においても 2020 年 10 月に論文がアクセプトされ発行されている¹³⁾。

3. 高効率測定に向けた本法の改良

高効率に測定できるよう、微量サンプルでの測定、並列的な多種類サンプルでの測定などの測定法の最適化を行った。具体的には、96-well プレートを用いてのプレートリーダー（コロナ吸光マイクロプレートリーダー MTP-310、日立ハイテクノロジーズ）による測定や 1 uL で測定が可能な微量分光光度計（NanoDrop One, サーマフィッシャー）による測定が可能であった。さらに微量かつ並列的な測定のために、384-well プレートの底が透明な吸光測定用プレートの検討も企業との共同研究を通じて行った。さらにロボットによる自動測定の検討に向けて、ロボット工学専門の研究者と共同研究も始めた。

4. 本システムの工場内使用へ向けた検討

実際の生産機器部品、容器、食品材料を念頭に感作性試験法の改良、操作法の検討を行った。まず、企業との共同研究を通じて部品や器材からの付着物の回収方法を検討した。添加剤などの少ない、容器、袋に部品や器材を入れ、溶出用液を投入して、溶出後回収する方法や、樹脂ペプチドを用いることでその溶出用液から感作性物質を濃縮する方法などを検討した。また、溶出用液には医療機器の感作性試験プロトコルなどを参考に食用油などの溶媒を用いることを計画している。以上より具体的な計画がまとまったので、2020 年度から実際に研究を始めていくことを計画している。

5. 学会や論文発表等の予定

3.や 4.の一部については論文を投稿予定である。また、日本動物実験代替法学会第 33 回大会などの国内学会で発表予定である。

今後の研究活動について

本助成研究によって基本的なビーズを用いた測定手法が確立できた。またそれを用いた応用研究も 2020 年度から始められる段階となった。具体的には、実際の器材、部品を使った付着物の回収、濃縮、測定手法の確立、それら測定・解析のロボットによる自動化、企業との共同研究によるこれらシステムの商品化が挙げられる。さらにアレルギー感作性の作用機序の解析、食品業界のニーズへの具体的対応なども行えるよう、食品科学の研究者との共同研究も始めている。以上より、本助成研究により、基礎的なシーズであった本感作性試験法を食品業界に幅広く適用できる汎用性の高い手法へと発展させることができた。今後は、企業、他分野研究者と共同し、実用化・商品化・適用範囲の拡大をさらに進めていきたい。

参考文献

- 1) Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC. Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. Food Chem. Toxicol. 1986 Jun-Jul;24(6-7):585-6.
- 2) Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicol. Sci. 2004 Oct;81(2): 332-3.
- 3) Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. Toxicol. Sci. 2007 Jun;97(2):417-27.
- 4) Miyazaki H, Hamada Y, Takaishi H, Minamino Y, Ikeda H, Mekata H, Takaishi M, Yamashita K, Usui K. Development of a chromophore-solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) for assessing skin sensitization in vitro. Analyst 2020 May;145(9):3211-6.
- 5) 臼井健二, 宮崎洋, 南野祐槻, 濱田芳男, 山下邦彦. 第 6 節 ペプチド固定化樹脂を用いた皮膚感

作性試験法の開発. 皮膚の安全性・有用性評価法 2018 May;88-95.

- 6) Chan WC, White PD. Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach, Oxford University Press, New York, 2000 Mar.
- 7) 臼井健二, 南野祐槻, 宮崎洋, 横田晋一郎, 山下邦彦, 瀧田芳男. マイクロビーズ固定化ペプチドを用いたバイオ計測デバイスの開発. 医療・診断をささえるペプチド科学 2017 Oct;298-305.
- 8) Tomizaki K-y, Usui K, Mihara H. Protein-detecting microarrays: Current accomplishments and requirements. ChemBioChem 2005 May;6(5):782-99.
- 9) Usui K, Takahashi M, Nokihara K, Mihara H. Peptide arrays with designed alpha-helical structures for characterization of proteins from FRET fingerprint patterns. Mol. Divers. 2004 Sep;8(3):209-18.
- 10) Fujita M, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T. Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2014 Jul-Aug;70(1):94-105.
- 11) Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T, Fujita M. A novel in chemico method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions. J. Appl. Toxicol. 2015 Nov;35(11):1348-60.
- 12) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H, Kasahara T. Cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay. J. Appl. Toxicol. 2019 Feb;39(2):191-208.
- 13) Miyazaki H, Takaishi H, Ikeda H, Ariumi H, Hamada Y, Yamashita K, Usui K. Synthesis of peptide-immobilized magnetic beads, and peptide reactivity assay for assessing skin sensitization utilizing chromophore. Processes 2020 Oct;8(10):1257.

以上