

研究課題名	Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA)法を用いた食物アレルギーの新規検査法の開発		
フリガナ	マツオ ヒロアキ		
代表者名	松尾 裕彰		
所属機関 (機関名) (役職名)	国立大学法人 広島大学 病院薬剤部 教授		
共同研究者	氏 名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	千貫 祐子 (チヌキ ユウコ)	島根大学医学部 皮膚科学講座 准教授	新規検査法の臨床的検討
	高萩 俊輔 (タカハギ シュンスケ)	広島大学大学院医系科学 研究科皮膚科学 講師	新規検査法の臨床的検討
本助成金による発表論文, 学会発表	(発表論文) Koga Y, Yokooji T, Ogino R, Taogoshi T, Takahagi S, Ishii K, Chinuki Y, Morita E, Hide M, Matsuo H. A novel detection method for cross-linking of IgE-receptors by autoantibodies in chronic spontaneous urticaria. Allergol Int. 2022;71(1):94-102 (学会発表) 古賀祐基, 横大路智治, 荻野龍平, 埴越崇範, 高萩俊輔, 石井香, 千貫祐子, 森田栄伸, 秀道広, 松尾裕彰. 高親和性 IgE 受容体の架橋検出による自己免疫性蕁麻疹の新規検査法の有用性. 第 23 回ヒスタミン学会. 京都. 2022 年 1 月		

研究結果要約

現在、食物アレルギーの原因検索にはアレルゲン特異 IgE 抗体検査が広く臨床使用されているが、陽性と判定されても実際にはアレルギー症状をきたさない場合が多い。これは、症状惹起に必要な高親和性 IgE 受容体 (FcεRI 受容体) を架橋できないアレルゲン特異 IgE 抗体も検出されるためである。したがって、精度の高い食物アレルギーの検査法が求められている。本共同研究では、Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA) 法を利用して、FcεRI 受容体の架橋能を有するアレルゲンに対する特異 IgE を検出する高精度食物アレルギー検査法の確立を試みた。

FcεRI 受容体 α 鎖を標識した ALPHA ドナービーズとアクセプタービーズに小麦アレルギー患者血清を添加した後、抗ヒト IgE 抗体にて FcεRI α 鎖に結合した IgE 抗体を架橋すると、各ビーズが近接し ALPHA シグナルが得られた。この結果から、ALPHA 法により FcεRI 受容体の架橋が検出できることを明らかにした。さらに、アレルゲンに患者の IgE 抗体を予め結合させたアレルゲン-IgE 複合体を分離した後、FcεRI α 鎖標識ビーズを添加する方法により、アレルゲンによる FcεRI 受容体の架橋を検出できることを示した。今後、既存の検査法との検査精度の比較、および本検査法を利用した低アレルゲン化小麦のアレルゲン性評価を実施する。

研究目的

現在、食物アレルギーの検査として、血清中の食物アレルギー特異 IgE 抗体の測定が広く行われている¹⁾。この方法は、アレルギーを支持体に固相化し、患者血清と反応後にアレルギーに結合した特異 IgE 抗体を酵素標識 2 次抗体を用いて定量する酵素抗体法である。アレルギー症状を惹起するためには、肥満細胞や好塩基球表面でアレルギー特異 IgE 抗体が結合した 2 分子の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI 受容体) が、1 分子のアレルギーを介して架橋される必要がある。現行のアレルギー特異 IgE 抗体検査は、架橋能のないアレルギーに結合する IgE 抗体も検出されるため、偽陽性を生じることがあるなど検査精度は良くない。また、患者末梢血中の好塩基球を利用したヒスタミン遊離試験も臨床使用されているが、採血後の好塩基球の劣化が結果に影響するなどの問題がある。本研究では、Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA) 法を利用して、FcεRI 受容体の架橋を形成できるアレルギー特異 IgE 抗体の検査法を開発すること、お

よび、開発した新規検査法を応用した低アレルギー化小麦のアレルギー性を評価することを目的とした。

目的 1) ALPHA 法を利用した新規アレルギー特異 IgE 抗体検査法の構築

ALPHA 法は、ドナービーズとアクセプタービーズが 200 nm 以内に近接すると、680 nm の励起光照射により 615 nm の発光が認められる、分子間の近接を検出する方法である²⁾。肥満細胞や好塩基球の活性化に必要な FcεRI 受容体のアレルギーによる架橋を、ALPHA 法を用いて試験管内で模倣することによる新規アレルギー特異 IgE 抗体検査法を確立する (図 1)。本研究で開発する新規検査法では、FcεRI 受容体架橋能を持つ抗原に対する IgE 抗体のみを検出することが出来るため、現行法で見られる偽陽性が除外され、検査精度の飛躍的な向上が期待される。

目的 2) 低アレルギー化小麦製品の個々の患者に対するアレルギー性の評価

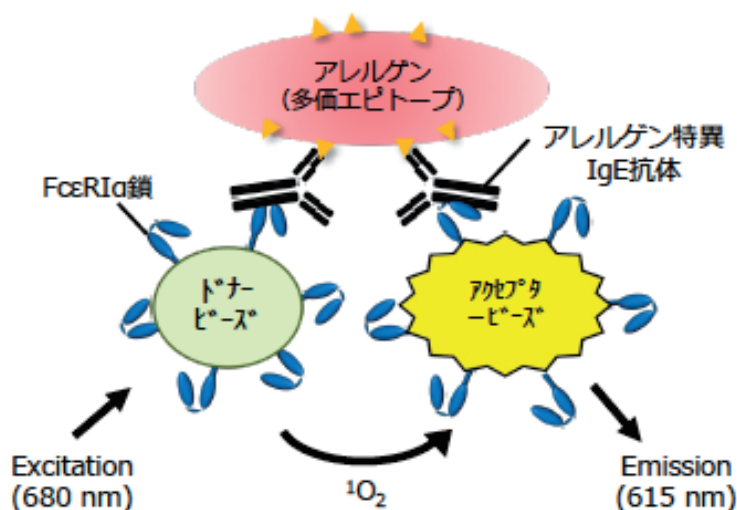


図 1. ALPHA法によるIgE受容体架橋能を有するアレルギー特異IgEの検出

重篤な症状を引き起こす小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) 患者の主要抗原は、 ω 5-グリアジンや高分子量グルテニンであるが、個々の患者でエピトープとなる部位や個数が異なることが報告されている³⁾。また、他の小麦タンパク質を原因とする WDEIA 患者も存在する。したがって、様々な技術を利用して作製された低アレルゲン化小麦製品が、患者にとって安全に摂取できるかどうかは個別に検査する必要がある。本研究で開発する ALPHA 法による検査を応用し、小麦アレルギー患者の血清を用いて、種々の低アレルゲン化小麦製品のアレルゲン性を評価する方法を確立する。これにより、患者別に安全な低アレルゲン化小麦製品を提案できるようになる。

研究計画及び研究手法

研究計画及び手法の概要

共同研究機関である島根大学医学部皮膚科および広島大学大学院医系科学研究科皮膚科学において、アレルゲン特異 IgE 抗体検査、ヒスタミン遊離試験、好塩基球活性化試験あるいは食物負荷試験により確定診断された食物アレルギー患者血清を収集する。患者血清を利用して、広島大学病院薬剤部で FcεRI α 鎖を標識した ALPHA ドナービーズおよびアクセプタービーズを用いた FcεRI 受容体架橋を検出する新しい食物アレルギー検査法を構築する。構築した新規検査法の検査感度や特異度を解析することにより既存の検査法に対する有益性を明らかにする。

さらに、小麦アレルギー患者血清を利用して

ALPHA 法により低アレルゲン化小麦製品のアレルゲン性を評価する。低アレルゲン化小麦製品として、我々の研究グループが開発した低アレルゲン小麦⁴⁾ (1BS-18 ホクシンおよび 1BS-18 ミナミノカオリ)、血清として ω 5-グリアジンが原因抗原の小麦アレルギー患者血清を用いてモデル実験を実施する。抗 ω 5-グリアジン IgE 抗体を介した受容体の架橋強度を ALPHA ビーズ発光シグナルとして検出し、低アレルゲン化小麦のアレルゲン性の低下率を評価する。

これら研究計画の内、2021 年度は ALPHA ビーズを利用してアレルゲンタンパク質による FcεRI 受容体 α 鎖の架橋を検出できることを明らかにし、低アレルゲン化小麦製品の評価に関しては、 ω 5-グリアジン欠損低アレルゲン小麦粉を取得した。

広島大学病院薬剤部

ALPHA 法を用いて、アレルゲンによる患者血清 IgE 抗体の架橋に伴う FcεRI 受容体の架橋反応を検出できるか否かを評価するために、予備実験として、アレルゲンの代わりに抗ヒト IgE 抗体により患者血清 IgE を介して FcεRI 受容体を架橋した時に、ALPHA シグナルが検出可能か否かを調べた (図 2A)。リコンビナントヒト FcεRI α 鎖を ALPHA ドナービーズおよびアクセプタービーズ (PerkinElmer 社) に標識し、両ビーズと血清を AlphaPlate™ (PerkinElmer 社) 内で混合した。その後、抗ヒト IgE 抗体 (終濃度 1 μg/mL, Dako 社) を添加し、6 時間反応後にプレートリーダー (Enspire™, PerkinElmer 社)

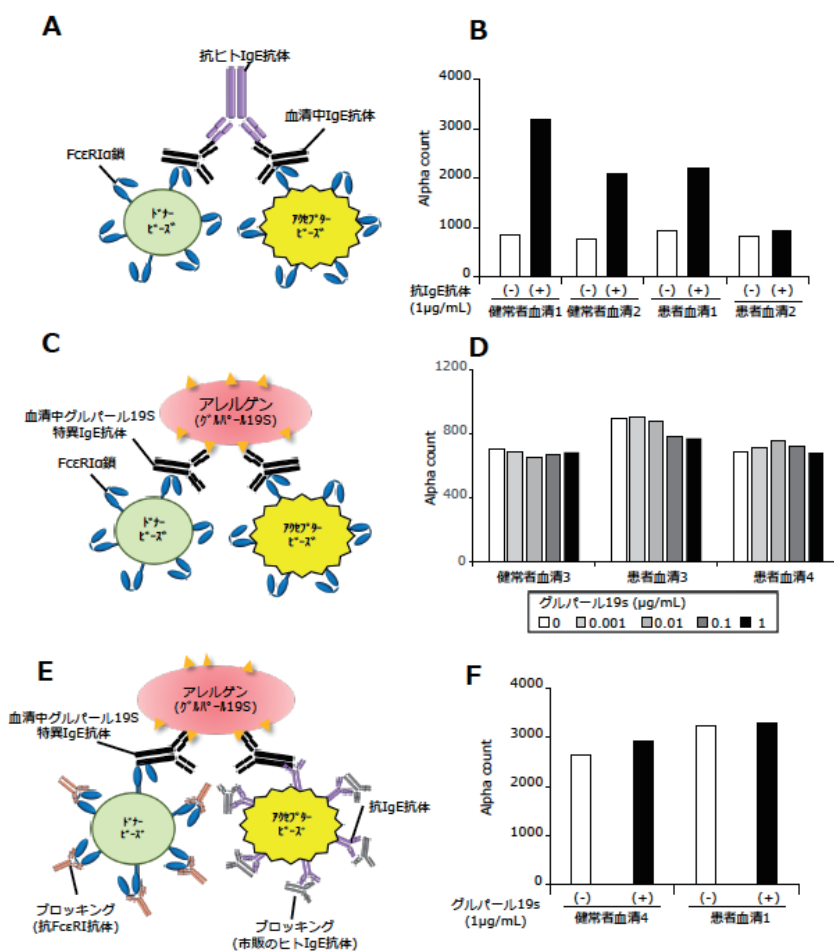


図2. ALPHA法によるIgE受容体架橋の検出結果

- A: 抗IgE抗体によるFcεRI受容体の架橋
- B: 抗IgE抗体添加6時間後のカウント
- C: グルバール19SによるFcεRI受容体の架橋 (FcεRIα鎖標識アクセプタービーズ)
- D: グルバール19S添加6時間後のカウント
- E: グルバール19SによるFcεRI受容体の架橋 (抗IgE抗体標識アクセプタービーズ)
- F: グルバール19S添加6時間後のカウント

を用いて 680 nm の励起光を照射し 615 nm の発光を測定した。混合するビーズの比率、血清濃度、反応時間等の条件検討を行った。

次に、実際のアレルゲンと患者血清を用いて FcεRI の架橋反応が検出可能か否かを評価した (図 2C)。本研究の最終目標は、ALPHA 法を用いた小麦アレルギー患者における低アレルゲン化小麦食品の適応性の評価であること、また、血清検体数が多いことから加水分解コムギ (グルバール 19S) 含有石鹼の使用により WDEIA を発症

した患者血清を用いた。AlphaPlate™ ウェル内で FcεRI α 鎖標識 ALPHA ドナービーズ、アクセプタービーズおよび患者血清を混合した後、グルバール 19S (終濃度 0.001-1 µg/mL) を添加した。室温でインキュベーションした後、発光をプレートリーダーにて測定した。しかし、この方法では架橋の検出が困難であったため、アクセプタービーズを抗ヒト IgE 抗体標識へ変更、さらに、バックグラウンドのシグナルを低下させるためにドナービーズに標識されている FcεRI α 鎖の

ブロッキング剤として抗ヒト FcεRI α 抗体 (CRA2, Bio Academia 社)、アクセプタービーズ上の抗ヒト IgE 抗体のブロッキング剤として精製ヒト IgE 抗体を使用した手順についても評価した (図 2E)。

FcεRI α 鎖標識ドナービーズや抗ヒト IgE 抗体標識アクセプタービーズを用いた方法で検討を行ったが、架橋の検出には至らなかった。そのためアレルギー-IgE 抗体複合体を濃縮するステップを導入した方法による検出を試みた。アレルギー-IgE 抗体複合体溶液に、FcεRI α 鎖標識ドナービーズおよびアクセプタービーズを添加し、インキュベーション後にプレートリーダーにて測定した。

島根大学皮膚科

島根大学医学部附属病院皮膚科を受診し、臨床症状、アレルギー特異 IgE 抗体検査、食物負荷試験、好塩基球活性化試験等により確定診断された食物アレルギー患者血清を収集した。患者の血液を採取し、現病歴から推測されたアレルギーを添加した後、Allergenicity キット (Beckman Coulter 社) を用いて、フローサイトメーターで好塩基球をゲーティングし、好塩基球表面に特異的に発現している CD203c マーカーの発現上昇を評価することにより、原因アレルギーを確定した。

また、我々の研究グループがこれまでの研究で開発した ω 5-グリアジンを欠失した低アレルギー小麦 1BS-18 ホクシンおよび 1BS-18 ミナミノカオリのアレルギー性を患者血清を用いて評価するために、島根県の中山間地域で栽培し収穫さ

れた種苗用の各低アレルギー小麦を購入し、製粉機による挽砕後、篩をかけて全粒粉を調製した。

広島大学皮膚科

広島大学病院皮膚科を受診し、臨床症状、アレルギー特異 IgE 抗体検査、食物負荷試験、ヒスタミン遊離試験等により確定診断された食物アレルギー患者血清を収集した。アレルギーを確定するためのヒスタミン遊離試験は以下の方法で実施した。食物アレルギー患者より血液を採取し、1%メチルセルロース溶液を加えて静置後、好塩基球を含む上清を分離した。好塩基球画分にアレルギーを添加し、遊離したヒスタミンを高速液体クロマトグラフィーを利用して定量した。好塩基球を破壊した溶液のヒスタミンを全量として、5%以上ヒスタミンが遊離した場合をアレルギーに対する反応が陽性であると判定した。

結果と考察

1) 患者血清の収集 (島根大学皮膚科、広島大学皮膚科学)

島根大学および広島大学皮膚科にて、小麦アレルギー患者 41 名の血清を収集した。その内訳は、通常の即時型小麦アレルギー 1 名、加水分解コムギが原因の即時型小麦アレルギー 3 名、従来型小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) 10 名、加水分解コムギが原因の WDEIA 19 名、イネ科花粉症が原因の小麦アレルギー 8 名であった。

通常の小麦アレルギー患者は、小麦製品摂取後 2 時間以内に蕁麻疹等のアレルギー症状が発症す

る。従来型 WDEIA 患者は、 ω 5-グリアジンや高分子量グルテニンが主要原因抗原であり、小麦製品接種後に運動負荷や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の服用によりアレルギー症状が誘発される³⁾。加水分解コムギが原因の WDEIA は、加水分解コムギ (グルパール 19S) 含有石鹼の使用により経皮感作され発症した WDEIA であり、グルパール 19S 特異 IgE 抗体が主に γ -グリアジンに含まれる QPQQPFPQ エピトープに交差反応することにより症状が誘発されると考えられている⁵⁾。イネ科花粉症が原因の小麦アレルギーは、花粉-食物アレルギー症候群 (PFAS) と呼ばれ、イネ科花粉タンパク質により感作され、小麦製品を摂取することによりアレルギー症状が誘発される。その原因抗原として、ペルオキシダーゼ-1 や β -グルコシダーゼが同定されている⁶⁾。

この様に、小麦アレルギーの病型により原因アレルギーが異なっていることから、本研究で構築する新規診断法の検討に利用する患者血清について、原因アレルギーおよび Fc ϵ RI 受容体を架橋できるアレルギーに対する特異 IgE 抗体を保有するか否かを明らかにしておく必要がある。そこで、これらの小麦アレルギー患者の好塩基球上の Fc ϵ RI 受容体に結合した IgE 抗体が、 ω 5-グリアジン、グルパール 19S、あるいは花粉タンパク質により架橋され好塩基球が活性化されることを、好塩基球活性化試験および好塩基球ヒスタミン遊離試験によって確認した。

本年度に 41 名の好塩基球活性化能を有するアレルギー特異 IgE 抗体を有する患者血清を収集できた。既存の特異 IgE 抗体検査との比較を行う

ためには、100 例程度必要であるため、血清の収集は引き続き実施する。

2) ALPHA 法を利用した新規アレルギー特異 IgE 検査法の構築

① 抗ヒト IgE 抗体による Fc ϵ RI 受容体架橋状態の検出 (広島大学病院薬剤部)

はじめに、Fc ϵ RI α 鎖を標識した ALPHA ビーズに血清 IgE 抗体を反応させ、アレルギーの代わりに抗ヒト IgE 抗体により IgE を架橋した時に、ALPHA シグナルが検出可能であることを確認した (図 2A)。リコンビナントヒト Fc ϵ RI α 鎖タンパク質を ALPHA 測定用ドナービーズとアクセプタービーズに標識した。両ビーズと血清をウェル内で混合した後、抗ヒト IgE 抗体を添加することにより Fc ϵ RI α 鎖を架橋し、ALPHA シグナル値を測定した。抗ヒト IgE 抗体を添加した場合の ALPHA シグナル値は健常者および患者のいずれの場合においても、未添加の ALPHA シグナル値より増加した (図 2B)。この結果から、抗ヒト IgE 抗体により受容体が架橋され、ドナーおよびアクセプタービーズが近接していることが分かり、ALPHA 法により架橋状態が検出可能であることが示された。

抗ヒト IgE 抗体による架橋検出の至適条件を調べた結果、混合液のインキュベーション時間は 6 時間、ドナービーズおよびアクセプタービーズの混合比は 1:4、添加血清の終濃度は 5%であることを明らかにした。さらに、発光強度 (ALPHA シグナル値) は、添加した抗ヒト IgE 抗体の濃度依存的に増加したことから、定量的に架橋が検出

できると示唆された。この研究結果の一部は論文報告した⁷⁾。

② アレルゲンによる FcεRI 受容体架橋状態の検出 (広島大学病院薬剤部)

次に、実際のアレルゲンと患者血清を用いて IgE 受容体の架橋状態の検出を試みた (図 2C)。本実験では、患者数が多いグルパール 19S 含有石鹼の使用により WDEIA を発症した患者血清を用いた。ウェル内にヒト FcεRI α 鎖標識 ALPHA ドナービーズおよびアクセプタービーズ、グルパール 19S で好塩基球ヒスタミン遊離活性が認められた患者血清を混合し、グルパール 19S を終濃度 0.001-1 μg/mL になるように添加し、インキュベーションした後に ALPHA シグナルを測定した。その結果、患者および健常者のいずれの場合においても、アレルゲンであるグルパール 19S 濃度の増加に伴う ALPHA シグナル値の上昇は認められなかった (図 2D)。

次に、アクセプタービーズを抗ヒト IgE 抗体で標識したものに變更し、同様の操作によりグルパール 19S による IgE 受容体の架橋の検出を試みた。その結果、グルパール 19S 非添加時のバックグラウンドのシグナル値が高く、また、グルパール 19S 添加による ALPHA シグナル値の上昇は認められなかった。バックグラウンドのシグナル値が高い原因として、患者血清中 IgE 抗体と結合していない抗ヒト IgE 抗体標識アクセプタービーズが、ドナービーズ上の FcεRI α 鎖に結合している患者血清 IgE に直接反応している可能性が考えられた。そこで、アクセプタービーズ上の抗

ヒト IgE 抗体を市販のヒト IgE 抗体でブロッキング、ドナービーズ上の FcεRI α 鎖を抗 FcεRI α 鎖抗体 (CRA2) でブロッキングした後に、グルパール 19S を添加する方法を検討した (図 2E)。しかしながら、バックグラウンドのシグナル値の低下は認められず、また、グルパール 19S 添加による ALPHA シグナルの上昇も認められなかった。ALPHA シグナルが検出できない原因として、血中の抗原特異 IgE 抗体量が少ないこと、血中に多量に存在するアルブミンやグロブリンなどのタンパク質がシグナル値の上昇を阻害すること、抗 FcεRI やヒト IgE 抗体によるブロッキングが不十分で、ビーズ同士の直接的な結合が起きていることなどが推察された。

そこでアレルゲンと IgE 抗体の複合体を分離し、血清の夾雑物質が少ない状態で架橋を形成させる方法でのシグナルの検出を試みた。この方法により、健常者とグルパール 19S 感作小麦アレルギー患者の血清を用いて予備的に解析した結果、患者血清を添加してグルパール 19S-IgE 抗体複合体と両ビーズが結合した場合にのみ、ALPHA カウントの上昇が認められた。この結果から、アレルゲン-IgE 抗体複合体を分離する操作を加えることで ALPHA 法による架橋能を有するアレルゲン特異 IgE を測定できることが示唆された。

今回の研究期間内に、計画していた既存のアレルゲン特異 IgE 抗体検査との検査精度の比較研究は実施できなかった。今後の課題として、至適測定条件の決定、グルパール 19S 以外のアレルゲンの測定系の構築、既存のアレルゲン特異 IgE

検査との精度の比較が挙げられる。

3) 低アレルゲン小麦製品のアレルゲン性評価 (広島大学病院薬剤部、島根大学皮膚科)

低アレルゲン化小麦製品は様々な方法で作成されるため、低下するアレルゲンの種類や低下率は製品によって異なる。また、小麦アレルギー患者は個々に感作されているアレルゲンが異なるため、低アレルゲン化小麦を患者が安全に摂取できるか否かは個別に評価する必要がある。本研究では ALPHA 法による特異 IgE 検出系を利用して、FcεRI 受容体の架橋能の違いによるアレルゲン性の評価を試みる。

評価する低アレルゲン小麦として、我々の研究グループが開発した ω5-グリアジン欠失小麦である 1BS-18 ホクシンおよび 1BS-18 ミナミノカオリを選択した。今回、島根県の中山間地域で種苗用に栽培し収穫された小麦を購入し、製粉機による挽砕後、篩をかけて全粒粉を調製した。ω5-グリアジンが原因抗原である従来型 WDEIA 患者血清を利用して、得られた小麦粉から抽出したタンパク質を抗原として、個々の患者の IgE 受容体架橋能を ALPHA 法にて測定する予定であったが、ALPHA 法の構築に時間を要したため、評価には至らなかった。今後、ALPHA 法による架橋検出方法を確立次第、ω5-グリアジン欠失小麦のアレルゲン性の評価を実施する。

今後の研究活動について

現行のアレルゲン特異 IgE 検査には偽陽性が多いという課題を解決するため、ALPHA 法を利用して FcεRI 受容体を架橋できるアレルゲン特

異 IgE の検出による精度の高い検査法の確立を目指して本助成研究を実施した。その結果、ALPHA 法を利用して食物アレルギー患者血清中の IgE 受容体架橋能を有するアレルゲン特異 IgE 抗体を検出できることを明らかにした。この新しい方法は、I 型アレルギーの原因となる IgE 受容体の架橋をヒトの好塩基球を使用せずに測定できること、侵襲性が少なく血清があれば検査可能であり患者にとって負担が少ないことが特徴である。今後、既存のアレルゲン特異 IgE 検査との診断的有用性を比較し、臨床診断薬として開発したい。

ALPHA 法による検査は血清と食物抽出タンパク質があれば、タンパク質が患者の IgE 受容体を架橋するか否かを簡単に測定することができる。すなわち、本検査結果は食物アレルギーの負荷試験結果の予測や、食物アレルギー患者にとって安全に摂取可能か否かの判断が難しい低アレルゲン化製品の評価に利用できる可能性が高い。特に小麦のように多種のアレルゲンを含む食品の個々の患者に対するアレルゲン性の評価は重要であるため、アレルゲン性の評価研究は今後も継続して実施する。本研究で得られた、食物アレルギー検査や低アレルゲン製品の評価方法に関する成果は、学会・論文発表を行うとともに、臨床診断薬や食品関連企業との連携により実用化を図る。

参考文献

- 1) Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T; Committee for Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy, The Japanese Society of Ped

- iatric Allergy and Clinical Immunology; Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for food allergy 2020. *Allergol Int.* 2020 Jul;69(3):370-386.
- 2) Bielefeld-Sevigny M. AlphaLISA immunoassay platform- the "no-wash" high-throughput alternative to ELISA. *Assay Drug Dev Technol.* 2009 Feb;7(1):90-2.
- 3) Morita E, Matsuo H, Chinuki Y, Takahashi H, Dahlström J, Tanaka A. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis -importance of omega-5 gliadin and HMW-gliutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis-. *Allergol Int.* 2009 Dec;58(4):493-8.
- 4) Yamada Y, Yokooji T, Ninomiya N, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Evaluation of the allergenicity of ω 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Nov 1;20:100702.
- 5) Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, Harada S, Ishii K, Hiragun M, Hide M, Matsuo H. Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int.* 2013 Dec;62(4):435-45.
- 6) Ogino R, Chinuki Y, Yokooji T, Takizawa D, Matsuo H, Morita E. Identification of peroxidase-1 and beta-glucosidase as cross-reactive wheat allergens in grass pollen-related wheat allergy. *Allergol Int.* 2021 Apr;70(2):215-222.
- 7) Koga Y, Yokooji T, Ogino R, Taogoshi T, Takahagi S, Ishii K, Chinuki Y, Morita E, Hide M, Matsuo H. A novel detection method for cross-linking of IgE-receptors by autoantibodies in chronic spontaneous urticaria. *Allergol Int.* 2022 Jan;71(1):94-102.