

機関番号：84407

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790602

研究課題名（和文） 口腔アレルギー症候群におけるアレルゲン定量法の確立

研究課題名（英文） Development of a quantitative assay for the allergen of oral allergy syndrome.

研究代表者

清田 恭平（KIYOTA KYOHEI）

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：10516743

研究成果の概要（和文）：

本研究では、口腔アレルギー症候群の主な原因物質の一つであるプロフィリンに対する抗体を3種類作製し、これらの抗体を用いてアレルゲン定量系の構築を検討した。その結果、直接法 ELISA では良好な直線性をもつ検量線が得られ、キュウリとトマトに含まれるプロフィリンの濃度測定がそれぞれ可能であった。一方、サンドイッチ ELISA の構築においては検出感度が低かったため、高感度化が今後の検討課題となった。食品中のアレルゲン含有量に関する情報は、消費者が適切な食品選択を行う際の指標として重要であり、口腔アレルギー症候群の発症予防対策に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I have produced three types of antibodies to recognize profilin, which is one of the major allergens of oral allergy syndrome, and have tried to develop a quantitative ELISA to measure profilin using these antibodies. As a result, in direct ELISA, the linearity of the standard curve was good and it was possible to quantify profilin concentrations in cucumber and tomato. On the other hand, in sandwich ELISA, the detection sensitivity was not enough. Thus, it is necessary to develop a high sensitive ELISA in the next study. The information of allergen content in food is important for selecting foods by consumers and would be useful in preventing the onset of oral allergy syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：口腔アレルギー症候群、アレルゲン、抗体、ELISA

1. 研究開始当初の背景

口腔アレルギー症候群（Oral Allergy

Syndrome、以下 OAS）は、1 型（即時型）アレルギーに分類され、食物の摂取により誘発

される口腔および周辺部の即時型アレルギー反応の総称である。一般的な症状は、口腔を中心とした粘膜組織の腫脹やかゆみであるが、食後の激しい運動などを引き金として重篤なアナフィラキシー症状（食物依存性運動誘発アナフィラキシー）に発展する危険性がある。したがって、食後に激しい運動を行う機会の多い児童では、OAS 発症因子の軽減対策が特に重要である。

OAS の主な原因物質の一つとして、真核生物において高度に保存され、アクチン結合性タンパク質であるプロフィリンが挙げられる。このうち、OAS の原因となるのは植物由来のプロフィリンであり、その高い相同性のため、トマトやオレンジ、メロンなど 20 種類以上の野菜果実が OAS の原因食品となる。特に、プロフィリンは OAS とシラカバ花粉症において共通の抗原となることが報告されている。このプロフィリンの交差反応性により、OAS 患者数はシラカバ花粉症患者数の増加に伴って近年増加傾向にある。また、食後に口腔部や咽喉部などの違和感を訴えた原因不明の食品苦情事例が医療機関をはじめ、保健所等の行政機関にも多数報告されている。これらの事例の一部においては、OAS の関連が指摘されており、今後も OAS を原因とする食品苦情事例数は増加することが予想される。

他のアレルギー疾患と同様に、OAS の根治治療法は未だに確立されていないため、アレルゲンの除去による予防が極めて重要な役割を果たしている。したがって、プロフィリン摂取量を制御することは OAS の基本的な対策として非常に有効であると考えられる。

しかしながら、現在までに食品中の OAS 原因物質の定量法に関する報告数は非常に少なく、OAS 対策は十分であるとはいえない。一方で、「特定原材料」7 品目および一部の「特定原材料に準ずるもの」については、検査方法が既に消費者庁により公示されている。

以上のことから、健康危害の発生予防対策として OAS 原因物質であるプロフィリンの定量法の確立が急務とされている。

食品中のアレルギー発症原因物質の有無に関する情報は、将来適切な行政的対応を講ずる際の判断材料として役立つものである。また、患者をはじめ、消費者が適切な食品選択を行う際の指標となる情報の提供にも役立つものと考えられる。

2. 研究の目的

現在公示されている食品中のアレルギー物質の検査方法は、定量法である ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) によるスクリーニング検査と定性法である PCR またはウェスタンブロッティングによる確認検査で構成されている。本研究はスクリー

ング検査方法の位置付けとして、OAS の主な原因物質である野菜果実中のプロフィリンを指標とした迅速簡便、高感度なサンドイッチ ELISA を確立するため、以下 2 点を目的とした。

(1) 食品由来のプロフィリンを認識する抗体は市販されていないため、サンドイッチ ELISA の構築に必要な免疫動物の異なる 2 種類以上の抗プロフィリン抗体を作製する。

(2) 抗プロフィリン抗体を用いたサンドイッチ ELISA あるいは直接法 ELISA を構築する。通知法である食品中のアレルギー物質の検査方法 (ELISA キット) の検出下限値はほとんどが 1 ng/mL である。本研究においても、検出下限値が 1 ng/mL に近づくよう ELISA の高感度化を目指す。ELISA の構築後、その測定対象範囲を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、免疫動物の異なる 3 種類の抗プロフィリン抗体を作製し、得られた抗体の有用性を個別に直接法 ELISA により評価した。これらの抗体を用いてサンドイッチ ELISA の構築を検討した。

(1) 抗プロフィリン抗体の作製

①ウサギポリクローナル抗体の作製

野菜果実由来のプロフィリンにおける共通アミノ酸配列を選定し、その合成ペプチドをウサギに計 5 回免疫した後、全採血を行った。得られた血清をアフィニティー精製し、ペプチド抗体を得た。

②マウスモノクローナル抗体の作製

リコンビナントシラカバプロフィリン (以下、Bet v 2) を免疫抗原として BALB/c マウス (メス、7 週齢) に腹腔内投与し、計 5 回免疫を行った。抗体価の上昇を確認後、オレンジ由来タンパク質抽出液に対して高い抗体価が認められたマウスにおいて、最終免疫を行った。脾臓摘出後、脾臓細胞とミエロマ細胞を融合し、得られたハイブリドーマクローンはプリスタンを投与したマウスの腹腔内に接種し、その腹水を採取した。腹水は硫酸沈澱後、プロテイン A により精製を行った。精製した抗体の一部はビオチン化を行った。

③ラットポリクローナル抗体の作製

Poly-L-proline を用いたアフィニティーカラムにより、オレンジ由来タンパク質抽出溶液からプロフィリン (以下、Cit s 2) を溶出した。脱塩処理後、凍結乾燥を行い、免疫抗原として用いた。Bet v 2 と Cit s 2 の混合物を免疫抗原として Wister ラット (メス、9 週齢) に腹腔内投与して計 4 回免疫を

行った後、全採血を行った。得られた抗血清は、前述のモノクローナル抗体作製時と同様に精製を行った。精製した抗体の一部はビオチン化を行った。

(2) ELISA 構築の検討

サンドイッチ ELISA において、捕捉抗体あるいは一次抗体として (1) で得られた抗体を用いて、より高感度となる抗体の組合せを検討した。

4. 研究成果

研究代表者は、まずプロフィリンのそれぞれ異なるペプチド配列を認識するペプチド抗体を 2 種類作製し、サンドイッチ ELISA の構築を検討したが、十分な検出感度を得られなかった。そこで、次にマウスモノクローナル抗体を作製し、ペプチド抗体と組み合わせてサンドイッチ ELISA の構築を検討した。モノクローナル抗体は、オレンジ、トマト、モヤシ、イチゴ、チェリー、リンゴ、バナナ、メロン、モモの 9 種類の野菜果実のうち、オレンジとトマトにおいて特に高い反応性を示した。モノクローナル抗体の作製においては、十分な抗体価が得られず免疫のやり直しを行ったため作製終了まで 10 ヶ月以上要した。モノクローナル抗体の反応性から、「特定原材料に準ずるもの」に指定され、OAS 原因食材として重要なオレンジに由来するプロフィリンの検出を目指すこととした。しかしながら、モノクローナル抗体とペプチド抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA においても十分な検出感度を得られなかった。そのため、オレンジからプロフィリン (Cit s 2) をアフィニティー精製し、これを免疫抗原としてラットポリクローナル抗体を作製し、研究最終年度を終了した。作製した全ての抗体は、本研究の標的ではない動物性食品由来のプロフィリンに対し、交差反応をほとんど示さなかった。今後、得られた 3 種類の抗プロフィリン抗体を組み合わせてサンドイッチ ELISA の構築を検討する予定である。サンドイッチ ELISA の構築が困難な場合は、直接法 ELISA の系によるプロフィリンの定量を試み、研究を展開する予定である。

また、作製した抗プロフィリン抗体はすべて直接法 ELISA に適用可能であることを既に確認した。図 1 に、Bet v 2 を標準物質として、ペプチド抗体を用いた直接法 ELISA における検量線を示した。検量線は、62.5~1000 ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた。表 1 に、ペプチド抗体を用いた直接法 ELISA によるキュウリとトマトのプロフィリンの定量結果を示した。トマトと比較して、キュウリに含まれるプロフィリン濃度は 4 倍以上高いことが示唆された。

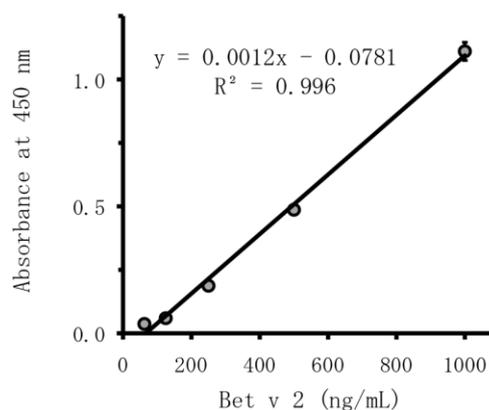


図 1 ペプチド抗体を用いた直接法 ELISA における検量線

表 1 キュウリとトマトに含まれるプロフィリンの定量結果

	プロフィリン濃度 (µg/g)
キュウリ	297
トマト	74

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 清田恭平、吉光真人、北川幹也、阿久津和彦、尾花裕孝：果実におけるタンパク質検出方法の検討、第 100 回日本食品衛生学会学術講演会要旨集、163、熊本市、2010 年 9 月 17 日
- ② 清田恭平、吉光真人、阿久津和彦、尾花裕孝：野菜果実に含まれるアレルゲンの網羅的検出、日本薬学会第 130 年会 CD 要旨集、岡山市、2010 年 3 月 30 日
- ③ 清田恭平、吉光真人、阿久津和彦、尾花裕孝：野菜果実に含まれるアレルギー物質の検出は可能か、第 46 回全国衛生化学技術協議会年会講演集、90-91、盛岡市、2009 年 11 月 13 日
- ④ 清田恭平、吉光真人、北川幹也、阿久津和彦、尾花裕孝：ペプチド抗体を用いた野菜果実由来アレルギー物質検出法の検討、第 98 回日本食品衛生学会学術講演会要旨集、69、函館市、2009 年 10 月 9 日

〔その他〕(計2件)

①招待講演

清田恭平：食品に含まれるアレルギー物質の検査方法について、大阪公衆衛生協会講演会、クレオ大阪中央、大阪市、2011年1月26日

②ホームページ

<http://www.iph.pref.osaka.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清田 恭平 (KIYOTA KYOHEI)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：10516743