

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790044  
 研究課題名（和文）多次元 HPLC システムを利用した食物アレルギー原因物質の抗原性解析  
 研究課題名（英文）Antigenic analysis of the food allergen  
 using multi-dimensional HPLC system  
 研究代表者  
 酒井 信夫 (SHINOBU SAKAI)  
 国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官  
 研究者番号：60370938

研究成果の概要：食物アレルギーを誘発する成分は、食品を構成する多種多様な成分の中でもある特定のタンパク質であると推定される。本研究では、わが国における食物アレルギーの発症率及び重篤度の高いものの中で、主要抗原が塩不溶性のため、これまでに解析の研究が進んでいない小麦、大麦、ライ麦等の穀物中の主要抗原について2次元 HPLC システムを利用したプロファイリング分析を試みた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：食物アレルギー、抗原解析、高速液体クロマトグラフィー、ウェスタンブロッティング

## 1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーを惹起する成分(食物アレルゲン)は、食品を構成する多種多様な成分の中でもある特定のタンパク質が関与していると推定される。近年のわが国における食物アレルギー有病率調査では、諸家の報告により乳児が 5-10%、学童以降が 1.3%程度と考えられ、全年齢を通して、わが国では推定 1-2%

程度の有病率であり、欧米では、フランスで 3-5%、アメリカで 3.5-4%、3 歳の 6%に既往があるとする報告がある(「食物アレルギーの診療の手引き 2005」、厚生省研究班)。また、厚生労働省は食品衛生法等の改正を行い、平成 13 年 4 月からアレルギーを起しやす食品原材料(卵、乳、小麦、えび、かに、そば、

落花生)を特定原材料とし、全ての加工食品に表示することを義務化している(食安基発第0603001号、食安監発第0603001号)。また近年、遺伝子やタンパク質のシーケンス情報が様々なデータベースに蓄積されるに従い、2次元電気泳動や質量分析といったプロテオミクス手法を用いて、研究対象となる全タンパク質を系統的かつ網羅的に解析することが可能となってきた。最近では、こうしたプロテオミクスの手法を応用したタンパク質性アレルギー群の迅速かつ網羅的な解析をアレルギーノミクスと称することが提案されている。アレルギーノミクスでは、単にアレルギー候補タンパク質を一斉に検出・同定するだけでなく、アレルギー反応の誘発原因となる動植物等に含まれるタンパク質抗原の状況や環境の変化に伴う質的・量的変動についても追跡することが可能であることから国際的にもアレルギーノミクスに関する研究が盛んに行われつつあるが、わが国では研究報告例が少ないのが現状である。

本研究では、近年のわが国における食物アレルギーの発症率及び重篤度の高いものの中で、これまでにその詳細な抗原性について検討が行われていない食品群の主要食物アレルギーについて、同食物アレルギー患者血清中のIgE抗体を探索プローブとして各種分析機器を利用して分析化学的に考究する。さらに、食物アレルギーの高次分子構造及びタンパク質化学的性質を明らかにする研究を通し、食物アレルギーの診断法開発及びその低減化を目指すことを研究の主眼としている。

## 2. 研究の目的

本研究では、わが国における食物アレルギーの発症率及び重篤度の高いものの中で、これまでにその詳細な抗原性について検討が行われていない穀物類の主要抗原について各種分析機器を利用した同定を試みる。具体的には、アレルギー素因食品より抽出した粗

タンパク画分を多次元HPLCシステムに供し、分離分画し、品種個別的なプロファイリング分析を行う。他方、アレルギーの患者血清を用いたウエスタンブロット解析により抗原特異的抗体反応を行うことで主要画分を追跡し、食物アレルギーの同定を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料及び試薬

穀物試料として、小麦(薄力粉・中力粉・強力粉の各1検体)、大麦(A及びBの2検体)、ライ麦(1検体)は、東京都内の小売店より入手した。水は日本ミリポア製のElix-UV5で調製した逆浸透水を更にMilli-Qにより、18 M $\Omega$ /cmまで精製して得られた超純水を用いた。他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。

### (2) 装置

2次元HPLC装置はGILSON社製プロテオーム2DLC解析システム(1次元LC;ポンプ:305+10WTi及び306+10WTi,紫外可視検出器:155,カラムオープン:CTO-10AC<sub>VP</sub>(島津製作所製),フラクションコレクター:233XL,2次元LC;ポンプ:305+10WTi及び306+10WTi,紫外可視検出器:155,オートサンプラー:233XL,フラクションコレクター:FC204)にインテグレートとしてEZChrom Eliteを接続したものをを用いた。

### (3) タンパク質抽出

各試料は、25 mgを精秤し、尿素抽出液(8 M urea, 40 mM Tris, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propanesulfonate(CHAPS)) 1 mLを加え、低温下、超音波抽出(30秒 x 6回)を行った。抽出液は遠心分離(10,000 x g, 20分, 4°C)した上清を孔径0.8  $\mu$ mのフィルターでろ過し、HPLC用試料液とした。

### (4) HPLCによる穀類タンパク質の定量

試料溶液の各250  $\mu$ Lにつき、以下に示す条件でプロファイル分析を行った。

①1次元分析(イオン交換クロマトグラフィー)

カラム: Resource Q (6 mL, GE Healthcare)、流速: 1.0 mL/min、移動相 A: 20 mM Tris-HCl (pH 8.6)、移動相 B: 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) + 1 M NaCl、溶出: 0-6 min, 0%B in A; 6-66 min, 0-100% B in A; 66-72 min, 100%B in A、カラム温度: RT、検出波長: 210 nm。

②2次元分析(逆相クロマトグラフィー)

カラム: WP300 C8 (5 μm, 4.6 x 250 mm, GL Sciences)、流速: 1.0 mL/min、移動相 A: 0.5% TFA、移動相 B: MeCN + 0.5% TFA、溶出: 0-4 min, 25%B in A; 4-44 min, 25-50% B in A; 44-54 min, 50-65%B in A; 54-60 min, 65%B in A、カラム温度: 40°C、検出波長: 210 nm。

(5)ウエスタンブロット解析

試料溶液は、以下に示す条件でウエスタンブロット解析を行った。

ゲル: NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen 社)、1次抗体: 小麦アレルギー患者(Class 3)血清(x 1,000)、2次抗体: HRP 標識-抗ヒト IgE 抗体(x 5,000)、基質: ECL plus (GE Healthcare 社)、検出: Chemiluminescence。

4. 研究成果

(1)小麦プロファイル分析

各穀物試料の SDS-PAGE を図 1 に、イオン交換クロマトグラムを図 2 に、逆相クロマトグラムを図 3 に示す。

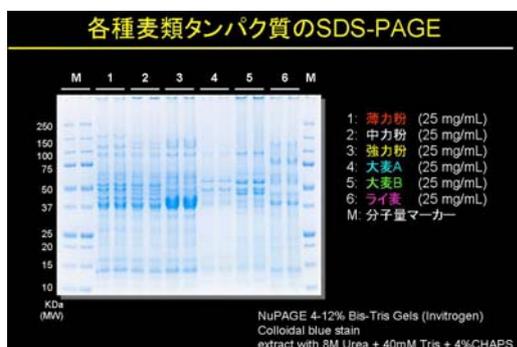


図 1 各種麦類タンパク質のSDS-PAGE

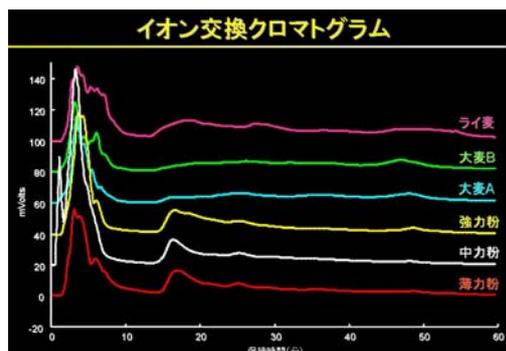


図 2 イオン交換クロマトグラム

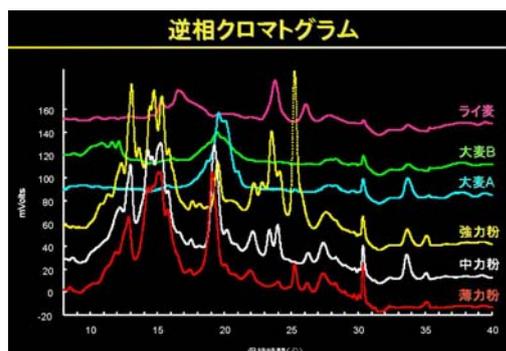


図 3 逆相クロマトグラム

小麦は薄力粉、中力粉、強力粉で異なるタンパク質組成を有し、大麦、ライ麦もそれらの品種によって異なるパターンが認められた。そこで、これらの2つの異なるクロマトグラフィーによる1次元プロファイリング分析結果を統合することにより、2次元プロファイルの作成を試みた。

(2)2次元プロファイルの作成

図 4-6 に薄力粉、中力粉、強力粉の2次元プロファイルを示す。

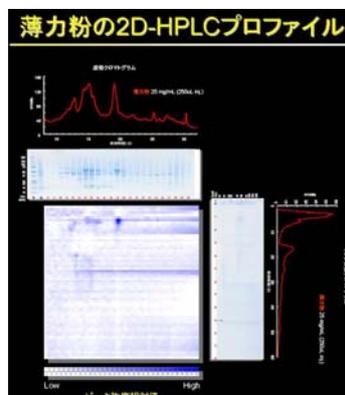


図 4 薄力粉の 2D-HPLCプロファイル

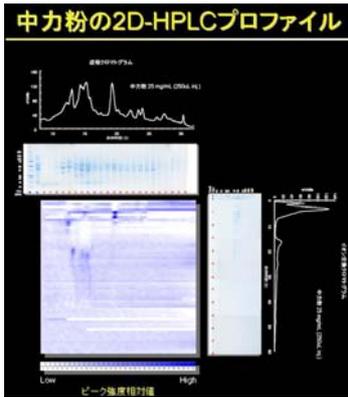


図 5 中力粉の 2D-HPLC プロファイル

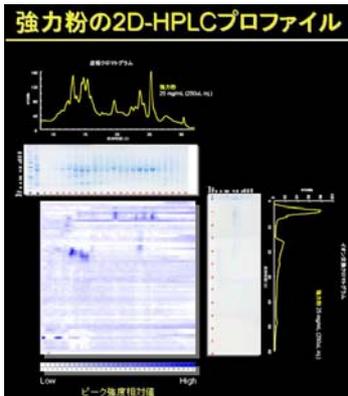


図 6 強力粉の 2D-HPLC プロファイル

1 次元分析(イオン交換クロマトグラフィー; y 軸)で 1 分毎に分画した各画分について、2 次元分析(逆相クロマトグラフィー; x 軸)を行うことによって得られたクロマトグラム  
のピーク強度は 1/4 分毎に数値化し、コンピュータの統計ソフトを用いて 3 次元に展開した(図 4-6 では、青色が濃くなるほどピーク強度が高くなり、タンパク質濃度が高くなっていることを示している)。この 2 次元プロファイルを応用することにより、様々な小麦に含まれるタンパク質の種類、性質、含量等の詳細な情報の可視化が可能となると考えられる。

### (3) ウェスタンブロット解析

小麦アレルギー患者の血清を用いたウェスタンブロット解析を行ったところ、 $\omega$ -5 gliadin、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -gliadins、低分子 albumins と考え

られるタンパク質群と血清中 IgE との間に強い結合が認められた(図 7)。

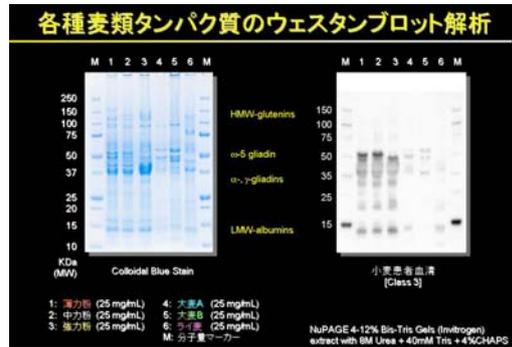


図 7 各種小麦類タンパク質のウェスタンブロット解析

今後、2 次元 HPLC プロファイル上での主要アレルゲンの同定を行うことで、品種特異的及びアレルギー患者特異的な抗原解析が可能になると考えられる。

### (4) まとめ

2 次元 HPLC システムによるタンパク質の分離は、プロテオーム解析のグローバルスタンダードである 2 次元電気泳動と比較して、分離能、再現性、操作性、迅速性及び経済性の面で格段に優れており、その汎用性も極めて高いと考えられることから、アレルゲノミクスにおける分析技術を新たに提案するものと期待される(表 1)。

"2D-PAGE" と "2D-HPLC" の比較		
	2D-PAGE	2D-HPLC
操作性	やや煩雑	簡便
分離能	ゲルのサイズ、濃度に依存	カラムと移動相の組み合わせにより高度な分離が可能
汎用性	等電点 & 分子量	カラムのバリエーションにより様々な分離パターンが可能
再現性	技術に大きく依存	極めて良好
迅速性	泳動、染色、プロテインゲル後の抗原抗体反応に長時間を要する	カラムと移動相の組み合わせにより短時間の分離が可能
定量性	正確な定量は難しい	外部標準を用いた絶対定量が可能
検出感度	蛍光検出法を用いることで高感度の検出が可能	検出器の性能に依存
経済性	ランニングコストがやや高価	ランニングコストが安価
必要となる主要機器	泳動装置、画像解析装置	HPLC システム、フラクションコレクター
タンパク質の単離	ゲルからの切り出しが必要	フラクションコレクターで分離可能
分析不可能なタンパク質	ドライトリップゲルに入りづらいもの、揮発できないもの	理論的にはゼロ
普及性	プロテオーム解析のグローバルスタンダード	???

表 1 2 次元電気泳動と 2 次元 HPLC の比較

## 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)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Shinobu SAKAI, Rieko MATSUDA, Reiko ADACHI, Hiroshi AKIYAMA, Tamio MAITANI, Yasuo OHNO, Michihiro OKA, Akihisa ABE, Kosuke SEIKI, Hiroshi ODA, Kazuo SHIOMI, Atsuo URISU, Interlaboratory Evaluation of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods, *Journal of AOAC International*, **91**, 123-129 (2008) 査読有り
- ② Shinobu SAKAI, Reiko ADACHI, Yusuke SHIBAHARA, Michihiro OKA, Akihisa ABE, Kosuke SEIKI, Hiroshi ODA, Hisashi YOSHIOKA, Kazuo SHIOMI, Atsuo URISU, Hiroshi AKIYAMA, Reiko TESHIMA, A Survey of Crustacean Soluble Proteins such as “Shrimp” and “Crab” Content in the Food Ingredients, *Japanese Journal of Food Chemistry*, **15**, 12-17 (2008) 査読有り
- ③ Shinobu SAKAI, Rieko MATSUDA, Toshiaki SUGIMOTO, Tamio MAITANI, Studies of the Nitrate Content in Vegetables and Processed Foods, *Japanese Journal of Food Chemistry*, **15**, 110-115 (2008) 査読有り
- ④ Hiroshi AKIYAMA, Shinobu SAKAI, Hiroki SAEKI, Kazuhiko WATANABE, Akira AKAZAWA, Atsuo URISU, Cross Reactivity of Allergen, *Japanese Journal of Pediatric Medicine*, **39**, 558-563 (2007) 査読なし
- ⑤ Hiroshi AKIYAMA, Shinobu SAKAI, Reiko ADACHI, Recent Trends and Future Prospects of Detection Method for Allergen in Japanese Allergy Labeling System, *Food & Food Ingredients Journal of Japan*, **212**, 1006-1015 (2007) 査読なし

[学会発表] (計7件)

- ① 酒井信夫, 穂山浩, 安達玲子, 手島玲子, 2次元HPLCシステムを利用した食物アレルギー原因物質のプロファイリング分析, 日本薬学会第129年会, 2009年3月26日, 京都
- ② Shinobu SAKAI, Reiko ADACHI, Hiroshi AKIYAMA, Atsuo URISU, Reiko TESHIMA, Interlaboratory Evaluation of Two Kinds of ELISA kits for the Determination of Soybean Protein and Walnut Protein in Processed Foods, 122<sup>nd</sup>

AOAC Annual Meeting, September 24, 2008, Dallas, USA

- ③ 酒井信夫, 食品関連成分の機能と分析に関する研究, 第14回日本食品化学学会, 2008年5月29日, 兵庫
- ④ Shinobu SAKAI, Rieko MATSUDA, Yuji SATO, Reiko ADACHI, Hiroshi AKIYAMA, Kazuo SHIOMI, Atsuo URISU, Tamio MAITANI, Yasuo OHNO, Interlaboratory Evaluation of Two Kinds of ELISA kits for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods, 121<sup>st</sup> AOAC Annual Meeting, September 18, 2007, Anaheim, USA
- ⑤ Hiroshi DOI, Haruki SHIBATA, Masahiro SHOJI, Shinobu SAKAI, Hiroshi AKIYAMA, Novel ELISA System for the Detection of Walnut Protein in Processed Foods, 121<sup>st</sup> AOAC Annual Meeting, September 18, 2007, Anaheim, USA
- ⑥ 鈴木友紀子, 水谷友海, 中村幹彦, 伊藤敦, 穂山浩, 酒井信夫, 近藤一成, 米谷民雄, 加藤重城, 秋元政信, 水晶発振子(QCM)によるオボアルブミンの検出法について, 第13回日本食品化学学会, 2007年6月1日, 東京
- ⑦ 酒井裕美子, 矢野竹男, 内山浩二, 中尾義喜, 石畑公江, 仲野茂, 山田敏広, 酒井信夫, 穂山浩, 米谷民雄, PCR法を用いた食品中のクルミの検知法について, 第13回日本食品化学学会, 2007年6月1日, 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

日本薬学会第129年会ハイライト講演  
<http://www.pharm.or.jp/hot-news/129kh/pdfs/073.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 信夫 (SHINOBU SAKAI)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官

研究者番号:60370938

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし