

平成21年6月12日現在

研究種目：若手研究スタートアップ

研究期間：2007～2008

課題番号：19800034

研究課題名（和文） 卵白L-PGDSによる食物アレルギー増悪の可能性について

研究課題名（英文） The potential of L-PGDS from egg white; inducing food allergy

研究代表者 鈴木 麻希子 (SUZUKI MAKIKO)

岡山県立大学・保健福祉学部栄養学科・助教

研究者番号：60437001

## 研究成果の概要：

鶏卵中には、アレルギー炎症に関与する prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) を合成する酵素 lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) が存在することが明らかとなっている。我々は、鶏卵中 L-PGDS が卵アレルギーに関与する可能性を明らかにすることを目的に本研究を行った。本研究で、鶏卵中には PGD<sub>2</sub> が存在することを明らかにし、鶏 L-PGDS の定量法を開発し、鶏卵白中 L-PGDS の定量を行った。今後、鶏卵白中の L-PGDS 量を基に、卵アレルギーモデルマウスを作製し、L-PGDS の影響について明らかにする。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費     | 間接経費    | 合計       |
|--------|----------|---------|----------|
| 2007年度 | 740,000  | 0       | 740,000  |
| 2008年度 | 570,000  | 171,000 | 741,000  |
| 年度     |          |         |          |
| 年度     |          |         |          |
| 年度     |          |         |          |
| 総計     | 1310,000 | 171,000 | 1481,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：鶏卵、L-PGDS, PGD<sub>2</sub>, 食物アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

卵アレルギーは、I型アレルギーとして知られるが、患者血清中特異的IgEとアレルギーとその症状の程度が矛盾することについては未だ明らかにされていない。鶏卵白中には、prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) を合成する酵素 Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) が存在することが明らかとなっている。PGD<sub>2</sub> はアレルギー炎症を惹起することが知られている。また、L-PGDS トランスジェニックマウスに喘息

を誘発させると野生型マウスと比較して、アレルギー症状の程度が悪化することが報告されている。このことから、卵白中 L-PGDS あるいは L-PGDS によって合成された PGD<sub>2</sub> がアレルギー炎症に関与する可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

卵白中の L-PGDS を精製し、その活性を測定すること、および卵白中 PGD<sub>2</sub> の存在の有無を調べ、卵アレルギー発症機

序の一つとして L-PGDS および PGD<sub>2</sub> が卵アレルギー炎症を惹起する可能性について明らかにすることを目的に行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 鶏卵中 PGD<sub>2</sub> の定量

鶏卵を卵白と卵黄に分け 0.25N 塩酸を含むエタノールで抽出を行い、これを Sep-Pack C18 を用いて粗精製を行った後、市販の EIA キットを用いて PGD<sub>2</sub> の定量を行った。

#### (2) 鶏 L-PGDS に対するモノクローナル抗体の作製

当初、鶏 L-PGDS のアミノ酸配列の情報を基にペプチドを合成し、マウスに免疫し、常法によって鶏 L-PGDS に対する抗体産生ハイブリドーマの樹立を試みたが、卵白中 L-PGDS に特異的な抗体は得られなかった。そこで、組み換え型鶏 L-PGDS 発現ベクターを大腸菌に形質転換し、発現誘導させて、組み換え型鶏 L-PGDS (rL-PGDS) を精製し、これをマウスの免疫源とした。常法によって、ハイブリドーマクローンを樹立し、得られた抗体の卵白中 L-PGDS に対する特異的反応性をウエスタンブロット法にて検討した。

#### (3) L-PGDS 定量法の開発と鶏卵白中 L-PGDS の定量

(2) で得られた抗体を用いてサンドイッチ ELISA による鶏 L-PGDS の定量法を開発した。本法を用いて、鶏卵から抽出した L-PGDS の定量を行った。

#### (4) 鶏卵白中 L-PGDS の精製

鶏卵白中の L-PGDS を精製するため、鶏卵を PBS にて溶解し、硫酸分画したサンプルを様々なクロマトグラフィーにて分画した。

#### (5) 卵アレルギーモデルマウスの作製

卵アレルギーの発症に鶏卵中の L-PGDS が関与するかを明らかにするため、rL-PGDS を用いて以下に示す 6 群に分け予備的実験を行った。

- OVA + Alum i.p. + 生理食塩水 p.o.
- OVA + Alum i.p. + OVA p.o.
- OVA + Alum i.p. + L-PGDS p.o.
- OVA + Alum i.p. + PGD<sub>2</sub> p.o.
- OVA + Alum i.p. + OVA + L-PGDS p.o.

- OVA + Alum i.p. + OVA + PGD<sub>2</sub> p.o.

### 4. 研究成果

#### (1) 鶏卵中 PGD<sub>2</sub> の定量

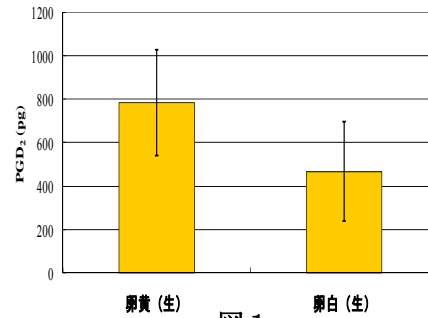


図 1

我々は、初めて鶏卵中の PGD<sub>2</sub> を定量した。卵 1 個 (50g) 中の PGD<sub>2</sub> は卵白に 468 ± 229 pg, 卵黄に 786 ± 243 pg であることが明らかとなった (図 1)。

#### (2) 鶏 L-PGDS に対するモノクローナル抗体の作製

組み換え型鶏 L-PGDS をマウスに免疫し、常法によって 4 種のハイブリドーマクローン (5E, 12F, 3B, 2A) を樹立し、鶏 L-PGDS に対するモノクローナル抗体の作製 (これまで鶏に対する L-PGDS 抗体は市販されておらず、我々が初めて作製した) を行った。作製した抗体の軽鎖および重鎖は、4 種とも k および r1 であった。また、作製した抗体は鶏卵白中の天然型 L-PGDS と特異的に反応することが、ウエスタンブロットによって明らかとなった (図 2)。

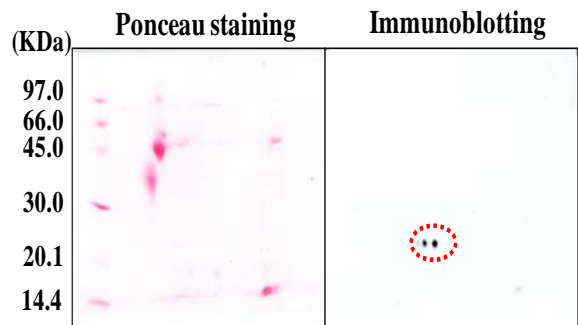


図 2

鶏 L-PGDS に対する抗体はこれまで市販されておらず、国内外を含め、我々が初めて作製したことになる。

#### (3) 抗 L-PGDS 抗体を用いたサンドイッチ ELISA による鶏 L-PGDS の定量法の開発と卵白中 L-PGDS の定量

作製したモノクローナル抗体 2 種を

用いてサンドイッチ ELISA による鶏 L-PGDS の定量法を検討した。様々な組み合わせで検討した結果を表 1 に示す。

表 1

|     | Biotinylated antibody   |                         |            |                         |
|-----|-------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
|     | 5E                      | 3B                      | 12F        | 2A                      |
| 5E  | 1.9/30 min<br>0.6/8 min | 2.2/30 min              | 0.1/50 min | 0.3/8 min<br>0.2/50 min |
| 3B  |                         | 1.4/30 min<br>0.5/8 min | 0.1/50 min | 0.3/8 min               |
| 12F | 0.7/8 min               | 0.8/8 min               | 0.1/8 min  | 0.2/8 min               |
| 2A  | 0.3/8 min               | 0.3/8 min               |            |                         |

■ rL-PGDS 80 ng/well, ■ 40 ng/well  
Absorbance at 490 nm/time of substrate reaction

その結果、特異性と定量性に最も優れた組み合わせは 12F, 5E であった。図 3 はその検量線を示す。

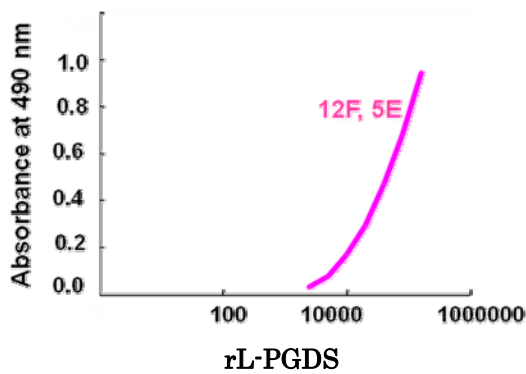


図 3

これによって、初めて鶏 L-PGDS の定量が可能となった。また、本法によって鶏卵白中 L-PGDS を定量した。

#### (4) 鶏卵白中 L-PGDS の精製

当初、ハイドロキシアパタイトおよび DEAE Sepharose を担体とするカラムを用いて粗精製を試みたが、主要タンパクと分けることができず、好ましい結果が得られなかった。しかしながら、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、主要なタンパクをある程度除去し、L-PGDS のバンドがうっすらとではあるが、ポンソー染色で確認できるまで割合を上げることができた。図 4 は硫安分画したサンプルを疎水性相互作用クロマトグラフィー添加し、十分に洗浄した後得られたクロマト図である。吸光度の上昇が見られたフラクション No. 41~60 について、限外ろ過膜を用いて濃縮した後、ウエスタンブロットを行っ

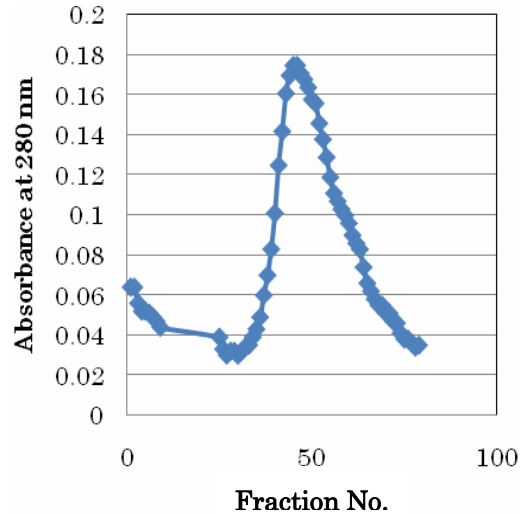
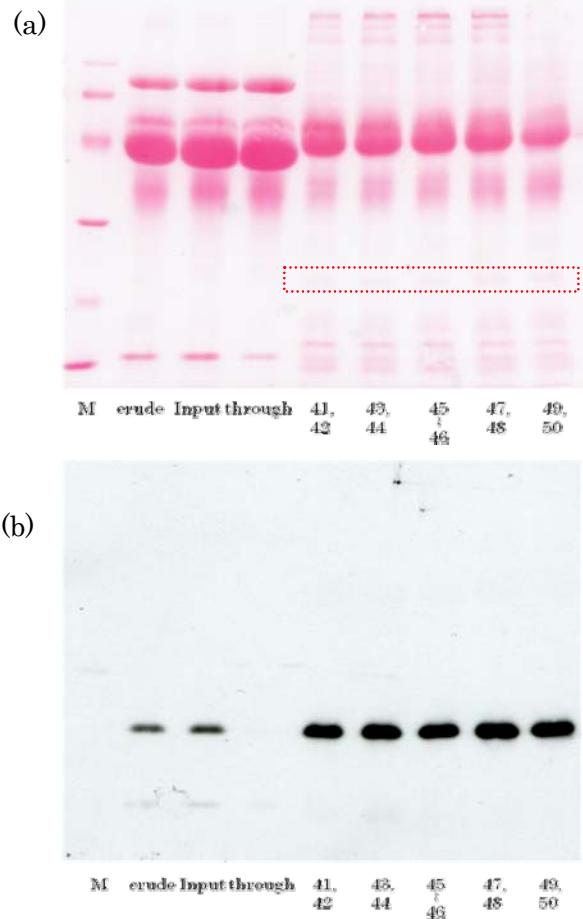


図 4

た。

図 5 の(a), (c)はポンソー染色図、(b), (d)はイムノブロット図である。いずれのレーンもサンプルのタンパク量は 20  $\mu$ g である。(a), (c)から疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分画された No.41~60 のフラクションでは、crude 卵白や硫安分画したサンプルでは見られなかった L-PGDS と考えられるバンドが見られ、このバンドが L-PGDS であることが(c), (d)から確認された。このことから、本条件は卵白からの



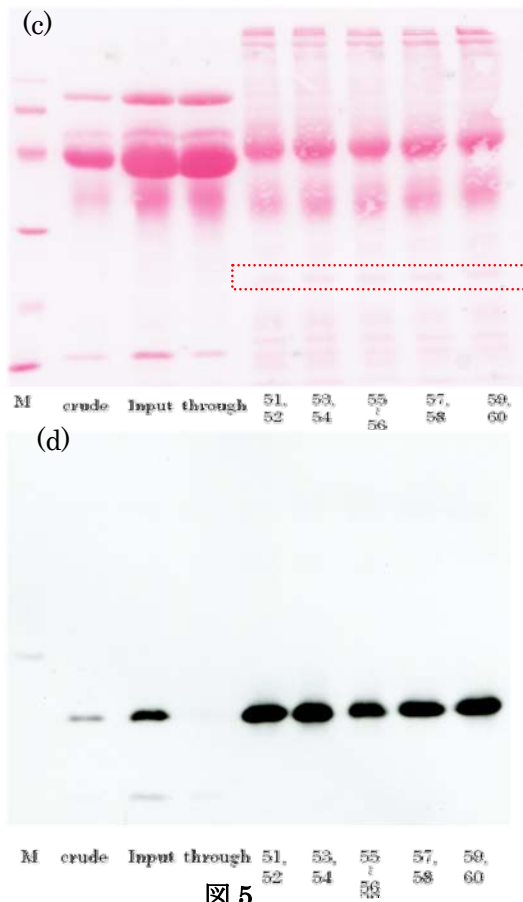


図 5

L-PGDS の精製の第 1 段階として適していると考えられた。

今後、さらに精製を進めていく予定である。

(5) 卵アレルギーモデルマウスの作製

卵白から天然型 L-PGDS を精製した後、すぐに卵アレルギーモデルマウスが作製できるよう rL-PGDS を用いて、投与スケジュールや評価系の検討を行った。2 報の文献を参考にした結果、1 報の投与スケジュールで、経口投与時に L-PGDS を単独投与した際に OVA 特異的 IgE の上昇が見られた (図 6)。予備実験で N 数も少ないため、有意差は出せないが、L-PGDS が特異的 IgE 値に何らかの影響があることも考

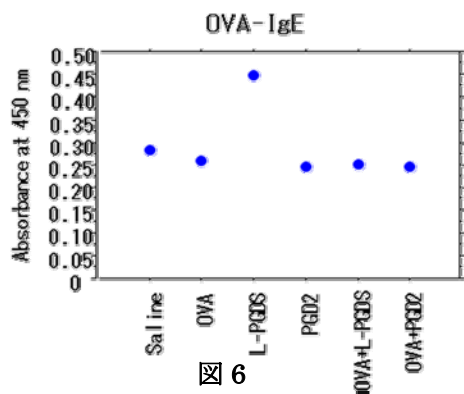


図 6

えられる。

今後、卵白からの L-PGDS の精製を進め、天然型 L-PGDS を用いた検討を行う。また、経口投与のスケジュールによって初期感作時と発症時における役割の違いについて詳細に検討を行う。小腸の炎症の比較も HE 染色による検討を行っており (図 7)、さらに検討を進めて鶏卵中 L-PGDS と PGD<sub>2</sub> が卵アレルギー発症に関与する可能性を明らかにする。

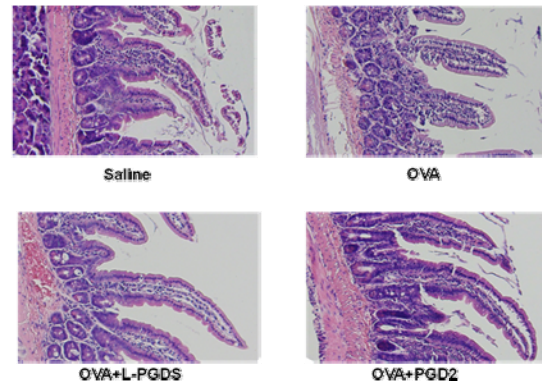


図 7

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 2 件)

- (1) 鈴木麻希子 鶏 lipocalin-type prostaglandin D synthase に対するモノクローナル抗体の作製とその利用 第 63 回日本・栄養食糧学会 平成 20 年 5 月 20 日～22 日 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール
- (2) 鈴木麻希子 卵アレルギー発症機構 -non-IgE 型食物アレルギーが関与する可能性- 第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 平成 20 年 5 月 2 日～4 日 女子栄養大学

6. 研究組織

(1)研究代表者  
鈴木 麻希子

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし