

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580222

研究課題名（和文） アニサキスアレルゲンの探索および一括検出システムの構築

研究課題名（英文） Mapping and construction of detection system for Anisakis allergens

## 研究代表者

嶋倉 邦嘉 (SHIMAKURA KUNIYOSHI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：10226201

研究成果の概要（和文）：アニサキスアレルゲンのうち、Ani s 1、3、5、9、11、12、 $\alpha$ -キモトリプシンインヒビター、25.7kアレルゲンの8種について、発現品を用いて二次元電気泳動後のスポットを帰属した。イムノブロットィングでは患者の約85% (22/26名)、ELISAでは約70% (12/17名)がAni s 11に対して陽性を示したため、本アレルゲンは日本のアニサキスアレルギー患者にとって主要アレルゲンであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Eight Anisakis allergens (Ani s 1, 3, 5, 9, 11, 12,  $\alpha$ -chymotrypsin inhibitor and 25.7k allergen) could be assigned on a two-dimensional gel electrophoresis (2D PAGE) using recombinant allergens. About 85% (22/26) subject's IgE and about 70% (12/17) subject's IgE were reacted against Ani s 11 in immunoblotting and in ELISA, respectively, thus Ani s 11 was likely to be a major Anisakis allergen for Japanese sufferers.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：Anisakis simplex、アレルゲン、二次元電気泳動、イムノブロットィング

## 1. 研究開始当初の背景

先進諸国においてアレルギーが社会問題になっている中、食物アレルギーに悩ま

れる人も増えている。日本型食生活の特徴を反映しているかのように、我が国では魚介類を原因食物とするアレルギー患者が多い。し

かし、ある検査機関において魚類アレルギーを疑われた患者の血清を調べたところ、魚類ではなくアニサキスに対する抗体保有者と判明した例が約3割に上ったことも報告されている。つまり、日本ではアニサキスアレルギーは無視できない。これまでの研究で、アニサキスアレルギーには多様なアレルゲンが関与しており、アレルゲンの種類や数が患者間で異なっていることを把握しているが、アレルゲンの迅速な同定技術の確立は水産食品の安全性に資するだけでなく、患者の診断・治療にも重要な知見をもたらすと言える。

## 2. 研究の目的

アニサキス虫体から精製したアレルゲンまたは大腸菌を用いて発現させたリコンビナントタンパク質として得た各種アレルゲンを用いて、二次元電気泳動上の挙動を把握し、粗抽出液の二次元電気泳動の結果と照合することによりバンドの帰属を行いつつ、できるだけ多くのアレルゲンを一括して検出・同定できるシステムを構築する。確立された方法を用いて、患者毎にIgEに対する反応性をイムノブロットングによって調べて同定する。

## 3. 研究の方法

### 試料

スケトウダラ肝臓表面に被囊した状態で寄生しているアニサキス (*Anisakis simplex*) 第3期幼虫を採取し、ペプシン処理後に活発に運動する虫体を試料とした。虫体を生理食塩水または蒸留水でよく洗浄し、使用するまでは $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結保存した。

### 抽出液の調製

アニサキス湿重量に対して3倍量の0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えてホモジナイ

ズし、冷却遠心分離 (15,000rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ 、10分) を行なって得られた上清をアニサキス抽出液とした。

### タンパク質の定量

試料のタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としたLowryらの方法に従って定量した。

### 二次元電気泳動

#### 1) 一次元目電気泳動

泳動装置として Ettan IPGphor II (GE Healthcare)を用いた。アニサキス抽出液  $10\mu\text{L}$  に膨潤液 (8M尿素、2%CHAPS、0.5%IPG Buffer (GE Healthcare)、0.002%BPB、18mM DTT) を  $280\mu\text{L}$  加えたものを、2個のストリップホルダー (7cm) に  $125\mu\text{L}$  ずつ添加した。それぞれのストリップホルダーに Immobiline DryStrip (pH 3-10、7 cm (GE Healthcare)) を入れ、Immobiline DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare)  $900\mu\text{L}$  で密封した後、室温で14時間膨潤させた。膨潤後のゲルを等電点電気泳動 (IEF-PAGE) に供した。通電条件は次の通りである。300Vで45分通電後、30分間で1,000Vまで直線的勾配で電圧を上昇させ、続いて1時間20分で5,000Vまで直線的勾配で電圧を上昇させ、最終的に5,000Vで30分間通電した。

#### 2) 二次元目電気泳動

泳動装置として e-PAGEL (Model AE-6450 (ATTO)) を用いた。等電点電気泳動が終了したゲルをDTT入りSDS平衡化緩衝液 (6M尿素、30%グリセリン、2%SDS、65mM DTT、1.5M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)、0.002%BPB) に室温で40分間浸漬した。次いでゲルをヨードアセトアミド入りSDS平衡化緩衝液 (6M尿素、30%グリセリン、2%SDS、135mM ヨードアセ

トアミド、1.5M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.8)、0.002% BPB) に室温で 40 分間浸漬した。上記の処理が終了したストリップゲルを、分子量マーカーとともに 5-20%ポリアクリルアミドゲル(e-PAGEL E-D520L (ATTO))にセットし、40 mA の定電流で 85 分間泳動を行なった。

### 3) IgE イムノブロッキング

セミドライ式ブロッキング装置(AE-6677P、(ATTO))を用いて、二次元目の電気泳動が終了したゲルから PVDF 膜へ 128mA で 30 分通電することにより転写した。転写膜は 10%スキムミルク-PBS に一晩浸漬してブロッキングを行なった後、Tween20-PBS を用いて、37°Cで 10 分間ずつ 3 回振とうして洗浄した(以下の洗浄操作はすべて同様に行なった)。一次抗体として 1:250 に希釈したヒト血清を 37°Cで 1 時間反応させた後、洗浄してから 1:10,000 に希釈した HRP ヤギ抗ヒト IgE 抗体を 37°Cで 1 時間反応させた。分子量マーカーは適宜希釈したストレプトタクチンに 37°Cで 1 時間浸漬した。洗浄後の転写膜に対し ECL Plus Western Blotting Detection Reagents における化学発光を ECL Mini-Camera (GE Healthcare) を用いて検出した。

### 4) ELISA

当研究室の常法によって蛍光 ELISA を行なった。既に所有している rAni s 11 を 1 $\mu$ g/mL に調製し、96 ウェルマイクロタイタープレート(蛍光測定用黒色プレート H、住友ベークライト)に分注して 37°Cで 2 時間固相化した。次いで、1%BSA-PBS で 2 時間ブロッキングを行い、一次抗体としてアニサキス陽性患者血清 17 名分とコントロールとして 5 名の健常者のプール血清を、1:250 に希釈して用いた。

二次抗体には  $\beta$ -galactosidase 標識ヤギ抗ヒト IgE (1:1,000) を用いて 37°Cで 1 時間インキュベートを行った。次いで蛍光基質を加え 37°Cで 20 時間インキュベートし、停止液を加えて励起波長 367 nm、蛍光波長 453 nm における蛍光強度を測定した。コントロール血清の平均値に 2 倍の標準偏差を加えた値を超えた場合を陽性とした。

### 4. 研究成果

二次元電気泳動上で最も多くのバンドを一括して、かつ再現性よく検出するために、抽出条件、ゲルの種類、一次元目および二次元目の泳動条件などを種々検討した結果、方法に記した条件が最も良いとの見解に達した。二次元電気泳動後、CBB で染色したゲル上に認められたスポットとデータベースに登録されたアレルゲンおよびアレルゲンであると考えられているタンパク質の等電点および分子量から、本条件で検出されるアレルゲンを類推した。

既往の研究で、当研究室には Ani s 1~Ani s 12、 $\alpha$ -キモトリプシンインヒビターおよび 25.7k アレルゲンのリコンビナント品を備えている。これらを単独あるいは複数用いて二次元電気泳動に供し、粗抽出液より得られた二次元電気泳動後のゲル中のスポットとの位置を確認した。その結果、Ani s 1、3、5、9、11、12、 $\alpha$ -キモトリプシンインヒビターおよび 25.7k アレルゲンの計 8 種のアレルゲンを帰属することができた(図 1)。

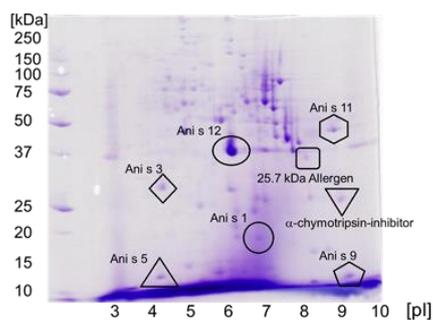


図 1. 本研究で帰属できたアレルゲン

26名のアニサキスアレルギー患者および10名の健常者血清(プール血清)を用いて本二次元電気泳動後にPVDF膜に転写したタンパク質に対するイムブロットティングを実施したところ、4名を除く患者全員がrAni s 11に対して陽性反応を示し、その22名中15名はrAni s 11に対してのみ陽性を示した。対象として用いた健常者のプール血中IgEに対しては、アニサキス中のどの成分にも陽性反応を示さなかった。血清の残量などの都合上、イムブロットティングを実施したすべての患者に対するELISAを実施できなかったが、ELISAにおいては17名中12名の患者血清でrAni s 11に対する陽性反応が認められた(図2)。イムブロットティングおよびELISA両者の結果から、Ani s 11は日本のアニサキスアレルギー患者にとって主要かつ重要なアレルゲンである可能性が示唆された。

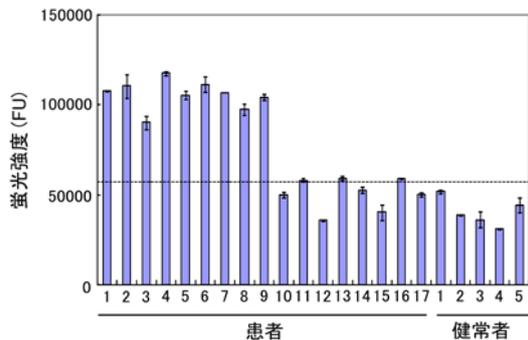


図2. rAni s 11とヒト血中IgEのELISAにおける反応性

Ani s 11とともにAni s 5にも陽性だった患者は5名おり、このうちの2名はAni s 9にも反応陽性であった。また、Ani s 11には陰性だが、Ani s 12のみに陽性を示した患者は1名、Ani s 11とともに未同定のスポットに陽性反応を示した患者が2名、イムブロットティングでは陽性スポットが認められなかった患者は3名だった。

## 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)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

嶋倉 邦嘉 (SHIMAKURA KUNIYOSHI)

研究者番号： 10226201

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：