

1. 研究開始当初の背景

(1)全体構想

研究代表者等は、食物過敏症の一種である「魚卵アレルギー」の全体像の解明を試みている。これまでに、魚卵中のアレルゲンの探索と IgE エピトープの特定、魚卵間での交差性成立要因の解明、卵成熟とアレルギー発症の関連、魚卵アレルゲンの消化吸收動態などの研究を行ってきた。これらを踏まえて本申請研究では、「さらなるエピトープ情報の収集」と「食の安全に寄与するアレルゲン検知系の開発」を目指した。

(2)関連研究の動向

日本では過去 10 年間、食物アレルギーに関する疫学研究が活発に行われ、魚卵アレルギーの存在が注目された(厚労省調査:海老沢ら 2006、神奈川県衛生研:板垣ら 2004 など)。現在、イクラ(シロザケ卵)は「アレルゲン表示制度:食品表示法」における表示推奨品目となり、魚卵アレルギーに対する関心が払われている。

しかし、他の主要な食物アレルギーと比較すると、魚卵アレルギーに関する報告は少ない。研究代表者らの研究以外では、症例報告を除けば、鶏卵と魚卵間のアレルゲン交差性に関する知見(Kondoら 2005、市川ら 2007)が報告されている程度であり、アレルゲンタンパク質の構造や性質に関する研究は存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食品等に含まれる魚卵の主要アレルゲンタンパク質である β' -component (β' -c) を対象とした定量検知系の構築である。

シロザケ卵に限定した定量的検知系は既に当研究グループによって開発されたが(Food Chemistry, in press)、今回の系には新たに以下の二つの性質を付与することを目指した:第一は、対象とする魚種を限定せず、より広範囲の魚種の β' -c に対する定量能力である。これはイクラ、タラコ、シシャモ、カレイ卵のような喫食機会の多い各種魚卵間で IgE 交差性存在する事実を踏まえたものである。食物への魚卵アレルゲンの混入を監視するためには、各魚卵を対象とした検知系が必要となるが、これらすべてを単一の検知系で定量検出できれば、食の安全管理における負担の軽減が期待できる。第二は、アレルギー患者の血液を用いることなく、アレルゲン性に関する議論を可能とすることである。従来、タンパク質のアレルゲン性について議論する際には、患者の血液中に存在する IgE との反応性を調べることが多い。しかしこの手法は、患者の血液が希少で、取得や使用に制限があるため、使用可能な場合は限られている。それゆえ、ヒトの血液を用いずにアレルゲン性の議論を可能とする手法は、食物アレルギー研究全般に大きく貢献する。

3. 研究の方法

(1)抗体の作製

β' -c 上に存在する IgE エピトープ、または魚種間で構造類似性が高い部位を模した合成ペプチドを調製し、これを動物に免疫することで、各部位を認識する抗体を作製した。検知系構築の基本とする β' -c には、構造と IgE エピトープが判明しているシロザケ β' -c を選択した。すなわち、シロザケ β' -c の 5 カ所の IgE エピトープ部位に結合する抗体(a-Ep1~5)と他魚種の β' -c と一次構造の類似性が高い部位 4 カ所に結合する抗体(a-Hp1~4)の計 9 種類を作製した。

(2)抗体の特性調査

作製した上記抗体群と各種魚卵の β' -c およびそのペプシン・トリプシン消化物間の反応性を、ELISA およびイムノブロッティングによって調査し、各種抗体の反応特性を調べた。供試抗原は、入手のし易さや喫食機会等を考慮して選択した 3 魚種(シロザケ、アサバカレイ、カペリン)の β' -c を用い、それらに対する a-Ep 群と a-Hp 群の反応性について検討した。また、各魚卵の β' -c をペプシンとトリプシンで消化し、抗原構造の変化に伴う各抗体との反応性の変化を調査した。

4. 研究成果

(1)シロザケ β' -c に対する供試抗体の反応性

①ELISA による検討

作製した抗体群をシロザケ β' -c とその消化物を抗原とする ELISA に供試した。結果を図 1 に示す。

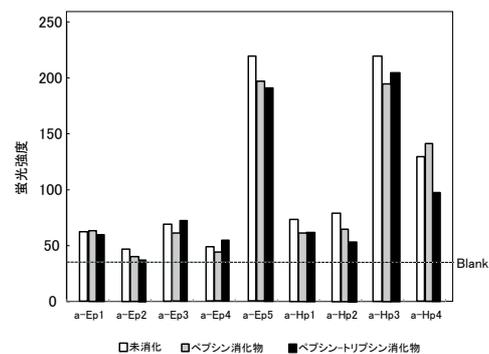


図1 シロザケ β' -cに対するa-Epおよびa-Hpの反応性(ELISA)

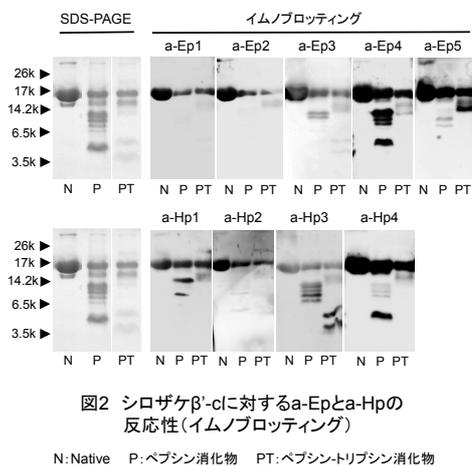
まず、未消化の β' -c を対象とした場合、全ての供試抗体が反応したが、その反応強度には抗体ごとに大きな差があった。特に a-Ep5、a-Hp3、a-Hp4 で強い反応が確認できたが、他の抗体の反応性は大きく劣っていた。

次に、シロザケ β' -c のペプシン消化物、およびペプシン消化後さらにトリプシン消化した同 β' -c の反応性は、各抗体が二つの群に分けられた。第一群は、a-Ep2、a-Ep5、a-Hp2 のように抗原の酵素消化によって反応性が低下する抗体である。これらの抗体はペプシン消化からさらにトリプシン消化を経るこ

とによって反応性が低下した。これに対して第二群は、 β^2 -c 酵素消化させても反応性が低下しない抗体である。特に、a-Ep3、a-Ep4 や a-Hp3、a-Hp4 はペプシン消化、またはその後のトリプシン消化によって反応性が上昇した。

② イムノブロットングによる検討

①と同様の抗原を用いたイムノブロットングの結果を図2に示す。



まず、いずれの抗体においても未消化の β^2 -c に対する明確な反応性が確認できた。また、定量性の低いイムノブロットングの知見ではあるが、ELISA での反応性が大きかった a-Ep5 の反応の強さが、他の抗体と大差なかった。さらに ELISA において強い反応強度を示した a-Hp3 は、イムノブロットングでは他の抗体よりも反応が弱かった。

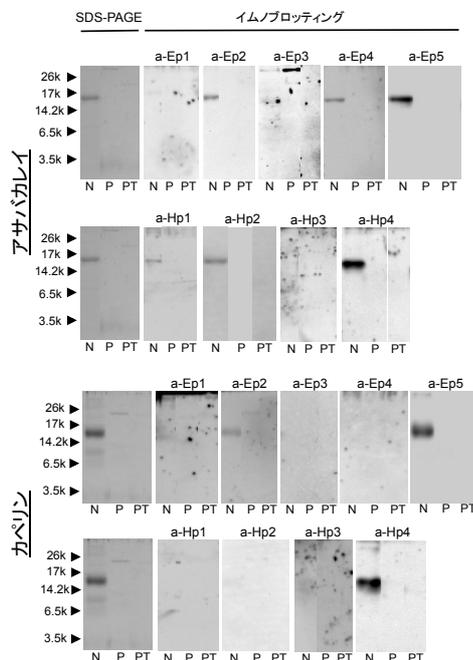
上記の現象は、 β^2 -c がイムノブロットング時に SDS と 2Me 処理を受けたことによって、その高次構造が大きく変化し、その結果、各抗体の反応性に差が生じたものと判断した。すなわち、イムノブロットングでの反応性が ELISA よりも強まった a-Ep1 と a-Ep2 が結合する部位は、 β^2 -c の構造変化によって立体障害が消失するなどして、抗体と結合し易い状態になり、逆に a-Hp3 の結合部位は、他の部位が干渉するなどして抗体が結合し難い状態になったと推測される。

次に、 β^2 -c の消化物に対する各抗体の反応を見ると、わずかに残存する未消化物に対する反応性には変化が認められないものの、①で第一群に分類された a-Ep2 や a-Hp2 では消化断片に対する反応が見られず、第二群であった a-Ep3、a-Ep4、a-Hp3 および a-Hp4 では消化断片に対する明確な反応が見られた。以上の結果は、a-Ep2 と a-Hp2 の結合部位が、酵素消化によって消失したことを示している。これに対して、a-Ep3、a-Ep4、a-Hp3 および a-Hp4 の結合部位は、酵素消化の栄養を受けておらず、さらに断片化に伴う立体障害の消失などに起因して、抗体の結合が容易な状態に変化したと推測される。

(2) アサバカレイおよびカペリン β^2 -c に対する反応性

① 未消化 β^2 -c への反応性

各抗体をアサバカレイとカペリンの β^2 -c を用いたイムノブロットングに供試した結果を図3に示す。



まず、未消化のアサバカレイ β^2 -c に対して、a-Ep2、a-Ep4、a-Ep5、a-Hp1、a-Hp2 および a-Hp4 は明確な反応を示した。同様にカペリン β^2 -c に対して a-Ep2、a-Ep5 と a-Hp4 が反応した。次に、両魚種の β^2 -c と明確に反応した a-Ep5 と a-Hp4 をシロザケ、アサバカレイ、カペリンの β^2 -c を抗原とした ELISA に供試した。

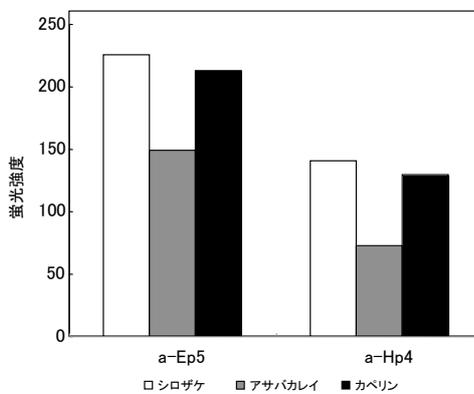


図4 アサバカレイとカペリン β^2 -cに対するa-Ep5、a-Hp4の反応性(ELISA)

結果を図4に示すが、a-Ep5 と a-Hp4 は共に供試した 3 魚種に対して反応性を示したが、

その値は魚種ごとに異なっており、特にアサバカレイ β' -c に対する反応強度が他の2魚種の β' -c に対するよりも弱かった。この結果は、ターゲットとした β' -c 上の抗体結合部位の周辺構造が異なっていることを示唆している。すなわち、魚種間で構造類性の高い部位に結合する抗体 (a-Hp) を用いて ELISA を構築しても、さまざまな魚種の β' -c に対する反応性が異なり、定量的同等性が得られないことが明らかとなった。

② β' -c 消化物への反応性

図3では、調製した全抗体の各 β' -c 消化物に対する反応性も合わせて検討した。これにより、いずれの抗体においても消化断片に対する反応性は確認できなかった。これは、SDS-PAGE が示すように、アサバカレイとカペリンの β' -c がシロザケ β' -c のような消化耐性をもたず、その結果、ペプシン・トリプシンによってペプチドレベルにまで低分子化し、反応部位が消失 (あるいは欠損) したことが原因と思われる。そして、この消化耐性の相違が、シロザケ β' -c で見られたような消化に伴う a-Ep、群と a-Hp 群における反応性の上昇を示さなかった理由と判断した。

(3)まとめ

a-Ep 群と a-Hp 群のいずれにおいても、その β' -c に対する反応性の強弱が魚種間で異なるため、これらの抗体の使用では、本研究でめざした「広範囲の魚種を対象とした β' -c の定量的な検知系の構築」はできないと判断した。ただし、a-Ep5 と a-Hp4 のように、供試した全ての魚種に対して反応する抗体が得られたので、これらを用いると定性的な検知系 (ELISA) の構築が可能と判断した。

一方、シロザケ β' -c に関しては、SDS 処理に伴う構造変化や酵素消化による影響が、作製した抗体ごとに異なることを見いだした。この結果は、構造変化から受ける抗体結合能への影響が、IgE エピトープごとに異なることを示すと共に、a-Ep や a-Hp の反応を調べるだけで、シロザケ β' -c の構造変化について推測可能であることを示している。すなわち、食品加工や貯蔵過程で、シロザケ β' -c に対する a-Ep5 の反応性が上昇すれば、酵素消化に類する一次構造の変化や周辺構造の崩壊が示唆されるし、また、a-Hp3 の反応性が低下していれば、比較的大きな高次構造変化が IgE エピトープ近傍に起こった可能性が推測できる。また、これらの知見を応用すれば、アレルギータンパク質の構造変化が IgE エピトープの反応性に及ぼす影響について検証可能な ELISA 系の構築が可能となる。これらは、ポリクローナル抗体である患者血液中の IgE を用いた免疫学的手法では得られない情報であり、a-Ep と a-Hp の特筆すべき長所である。

a-Ep や a-Hp の使用によって得られるアレルギータンパク質の特性に関する情報は、例

えば加工処理による食品の低アレルギー化を目指す場合に、効果的・効率的な IgE エピトープの処理 (マスキング) 法の確立に寄与すると期待できる。

また、従来、実験動物に抗原タンパク質を経口投与する手法を用いた消化吸収性の研究がおこなわれてきた。しかし、それらは抗原の吸収量に関する議論が主であり、吸収された抗原のアレルギー性の変化に関する報告はみあたらない。これは生体に取り込まれたタンパク質の単離や分析が困難であることが原因であると考えられる。しかし、a-Ep や a-Hp を用いた免疫学的手法であれば、共存成分の除去や目的タンパク質の濃縮などの前処理の手間を大幅に軽減した上で、生体内の抗原の状態をアレルギーの部位ごとに追跡することが可能となる。それゆえ、本研究の成果は、抗原タンパク質の生体内挙動の観察においても有益なツールを提供しうると判断した。

以上の成果は、IgE エピトープを認識するペプチド群の活用が、食物アレルギーの構造変化を研究する際の新しいツールとなり得ることを示唆している。

(4)今後の展望

今回用いた抗体作製の実験的戦略の汎用性について検討するため、魚卵以外の食物アレルギーにおいても a-Ep や a-Hp を作製する。また、動物を用いた抗原タンパク質の消化吸収実験への適応など、a-Ep と a-Hp の活用方も合わせて検討していく。

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0件)

[学会発表] (計1件)

発表者：清水裕、平松尚志、佐伯宏樹
題目：魚卵アレルギーの IgE 反応性変化を調べるツールとしての抗ペプチド抗体の有用性

学会名：第68回日本栄養・食糧学会大会

発表日：2014.05.31

発表場所：酪農学園大学 (北海道江別市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 宏樹 (Saeki Hiroki)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：90250505,

(2) 研究分担者

清水 裕 (Shimizu Yutaka)
北海道大学・大学院水産科学研究院
・技術専門職員
研究者番号：00374629,

平松 尚志 (Hiramatsu Naoshi)
北海道大学・大学院水産科学研究院
・准教授
研究者番号：10443920,

原 彰彦 (Hara Akihiko)
北海道大学・-
・名誉教授
研究者番号：40091483,

(3) 連携研究者

なし