

T25

混入率	0.1%				0.5%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	0.167	66.78	30.32	-	0.619	23.82	11.13	-
7900-96	0.134	33.65	25.46	-	0.623	24.68	13.94	-
7900-384	0.124	23.79	28.17	-	0.694	38.90	28.00	-
7000	0.090	-9.55	58.56	*	0.715	42.98	46.07	-
5700	0.138	38.25	13.63	-	0.633	26.59	19.82	-
混入率	5%				10%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	5.68	13.63	8.02	-	12.108	21.08	6.56	-
7900-96	6.13	22.68	14.49	-	11.673	16.73	20.81	-
7900-384	5.45	8.98	16.19	-	11.013	10.13	11.65	-
7000	5.99	19.72	37.14	-	9.681	-3.19	38.56	-
5700	5.14	2.81	25.63	-	10.526	5.26	18.85	-

Table 13 定量値同等性試験の結果 (T25) * P<0.05, ** P<0.01

Event176

混入率	0.1%				0.5%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	0.119	18.86	16.76	-	0.498	-0.44	5.86	-
7900-96	0.111	10.92	16.07	-	0.511	2.18	15.09	-
7900-384	0.108	7.73	20.72	-	0.484	-3.22	14.67	-
7000	0.123	22.59	18.70	-	0.515	3.01	17.57	-
5700	0.104	3.77	17.91	-	0.454	-9.30	23.92	-
混入率	5%				10%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	5.45	9.10	9.24	-	10.484	4.84	1.91	-
7900-96	5.88	17.55	5.39	-	9.341	-6.59	11.15	*
7900-384	5.16	3.18	11.78	-	9.849	-1.51	5.79	*
7000	5.37	7.33	37.88	-	9.681	-3.19	38.56	-
5700	4.68	-6.44	19.68	-	9.547	-4.53	22.12	-

Table 14 定量値同等性試験の結果 (Event 176) * P<0.05, ** P<0.01

MON810

混入率	0.1%				0.5%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	0.116	16.13	32.75	-	0.506	1.16	13.56	-
7900-96	0.130	30.14	40.85	-	0.553	10.63	20.40	-
7900-384	0.100	0.23	44.84	-	0.461	-7.85	16.55	-
7000	0.140	40.09	57.62	-	0.715	43.00	27.92	*
5700	0.167	66.87	21.39	*	0.453	-9.45	24.86	-
混入率	5%				10%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	4.41	-11.75	11.20	-	9.522	-4.78	16.31	-
7900-96	5.39	7.89	15.14	*	10.288	2.88	8.38	-
7900-384	4.46	-10.72	7.33	-	8.745	-12.55	6.06	-
7000	5.97	19.33	21.19	*	10.652	6.52	41.16	-
5700	4.00	-20.00	20.30	-	10.603	6.03	25.97	-

Table 15 定量値同等性試験の結果 (MON810) * P<0.05, ** P<0.01

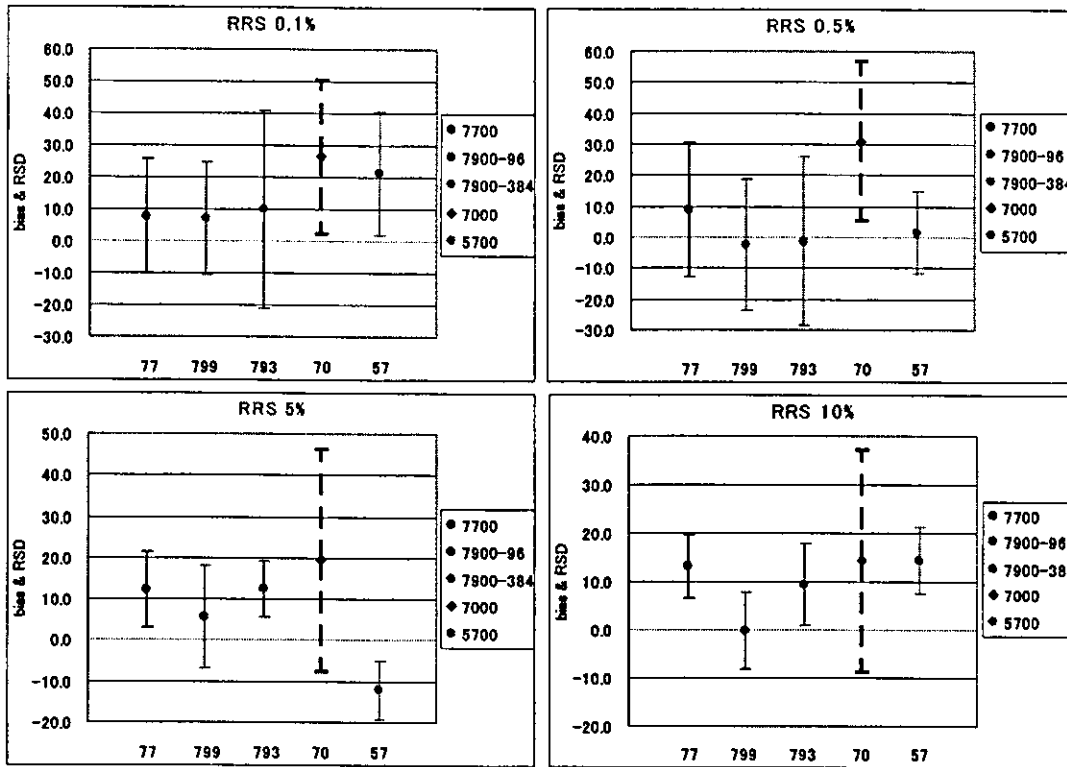


Fig. 19 各定量機種を用いて得られたバイアスと RSD (RRS)

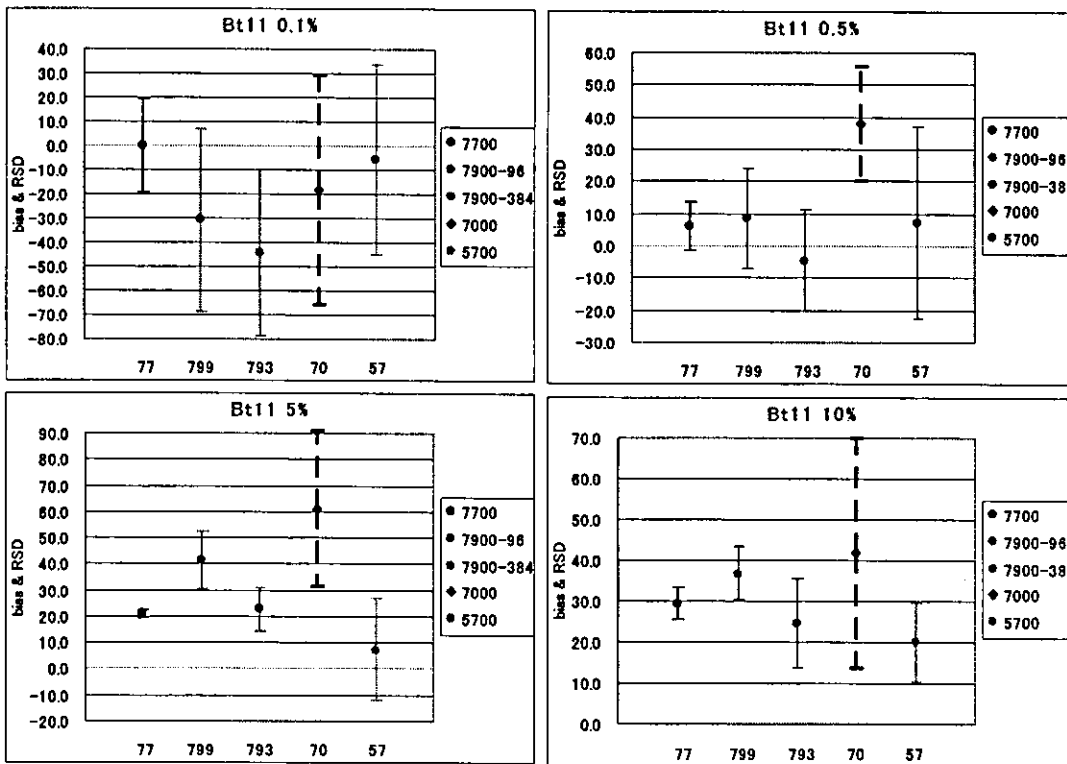


Fig. 20 各定量機種を用いて得られたバイアスと RSD (Bt11)

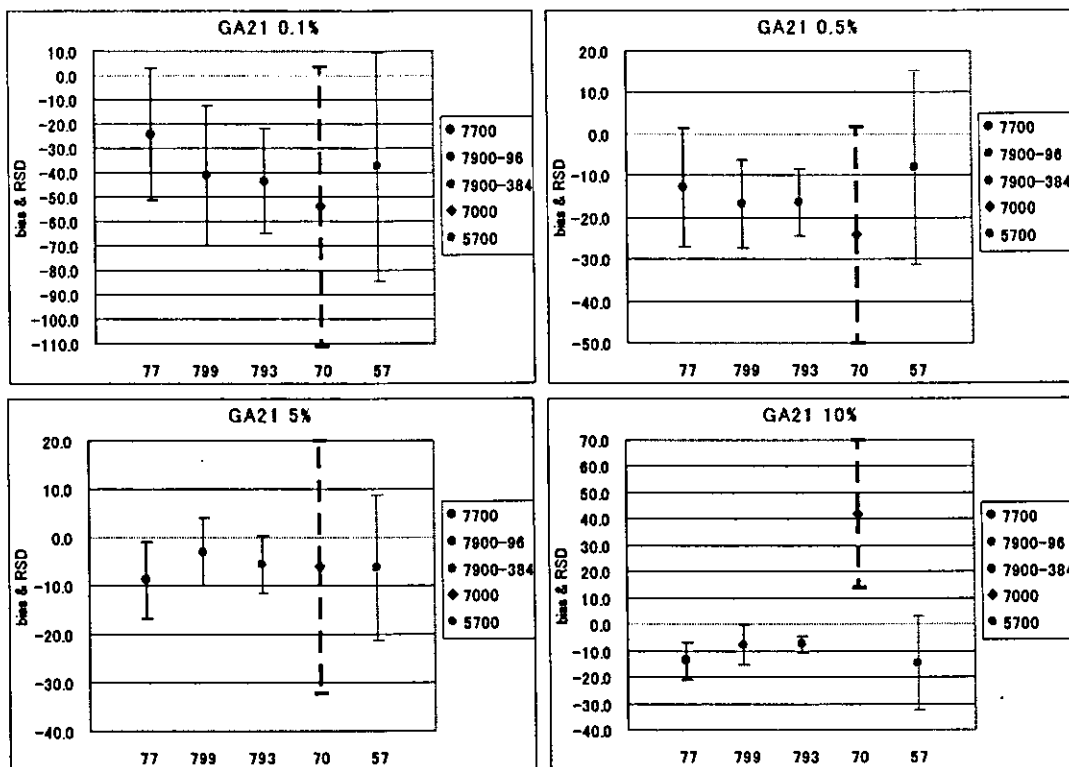


Fig. 21 各定量機種を用いて得られたバイアスと RSD (GA21)

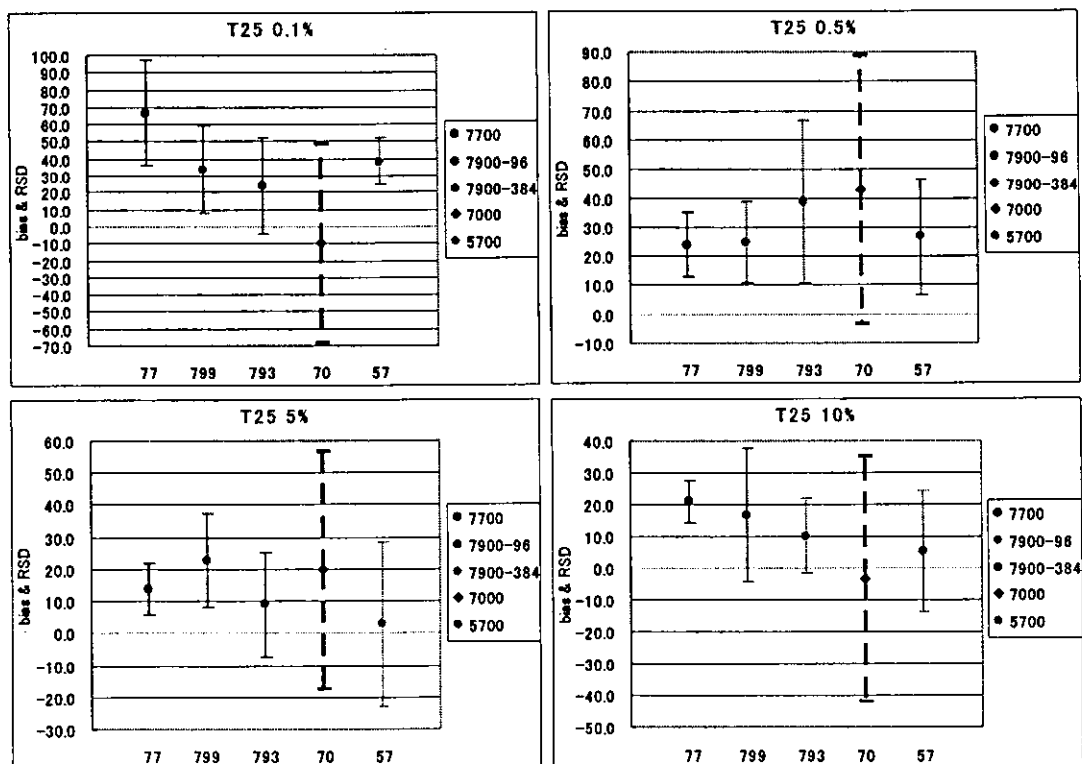


Fig. 22 各定量機種を用いて得られたバイアスと RSD (T25)

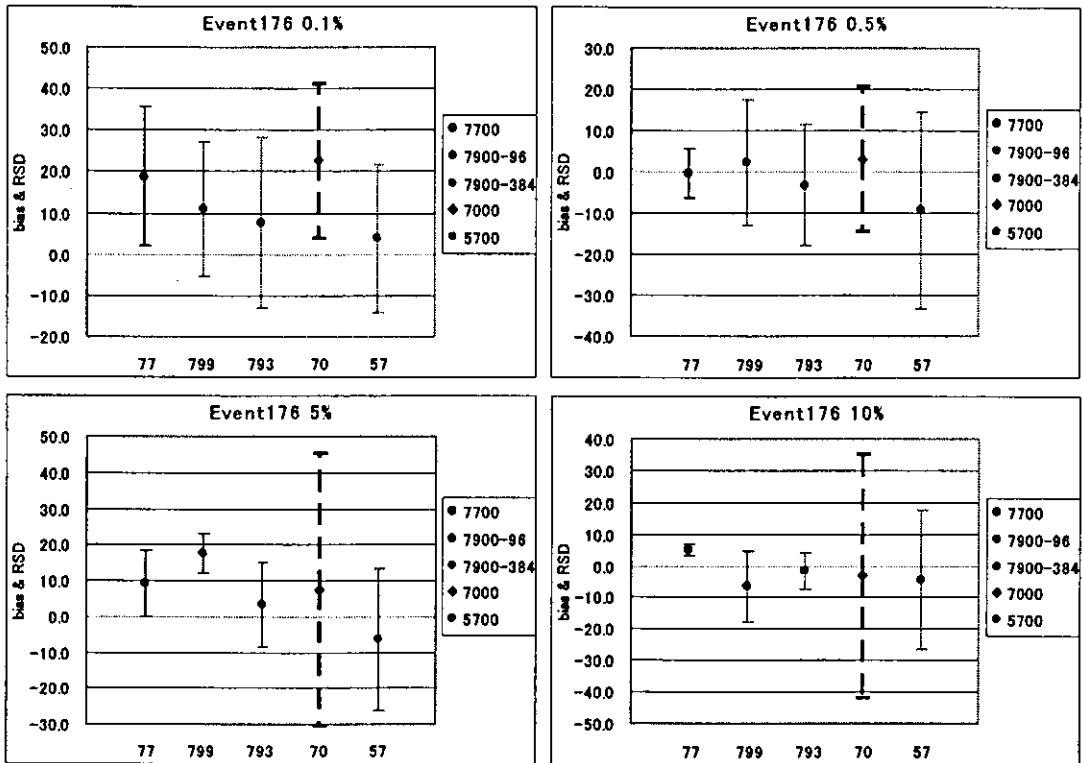


Fig. 23 各定量機種を用いて得られたバイアスと RSD (Event176)

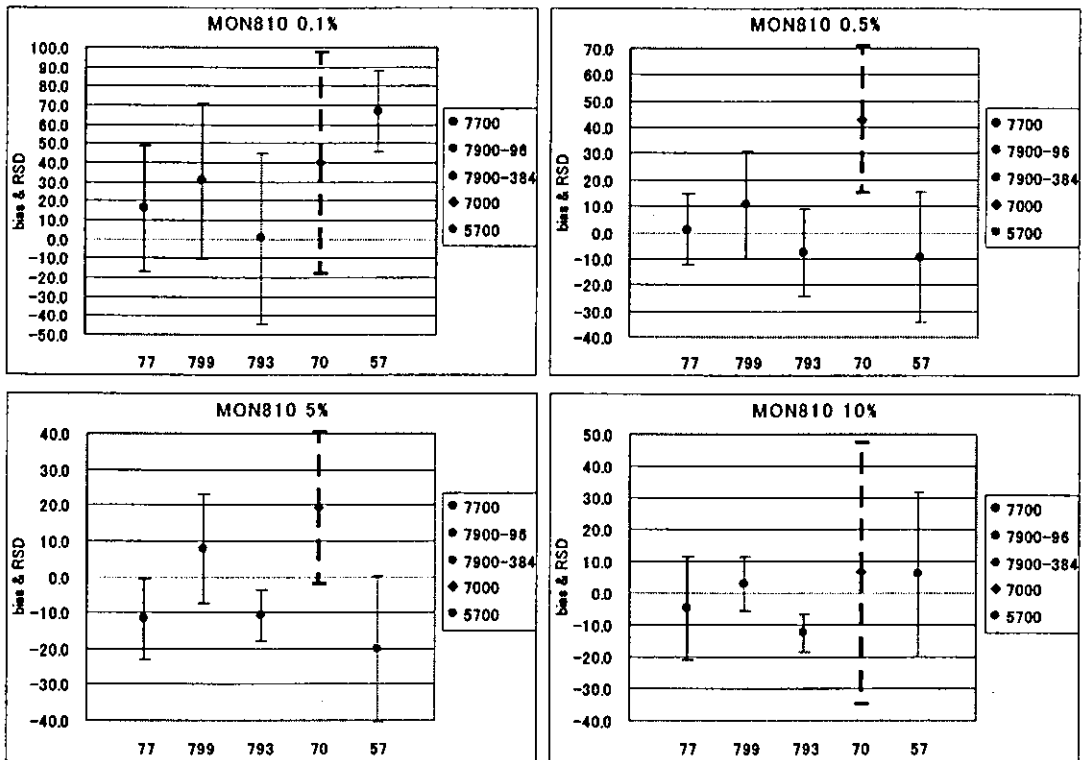


Fig. 24 各定量機種を用いて得られたバイアスと RSD (MON810)

平成16年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

新規タンパク質のアレルギー性評価に関する調査研究
分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部室長

研究要旨 平成16年度は、(1)アレルゲン予測の解析法の検討、(2)食物アレルギー動物モデルの開発、(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分解性試験、(4)血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性について検討を行った。具体的には、(1)アレルゲン予測の解析法では、(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法 -アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討を行い、エピトープになりやすいアミノ酸の分布が存在することが示唆された。(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の立ち上げを行なった。ADFSでは、独自に調査した結果も含めエピトープ既知のアレルゲン42種、エピトープ配列数306種を搭載した。(2)食物アレルギー動物モデルの開発では、マウスを用いる経口感作の方法について数種のアレルゲン(卵白アルブミン、ラクトグロブリン、ウシ血清アルブミン)、非アレルゲン物質(ペプシン)を用いて、BALB/cマウスに投与時の溶媒の差違について検討を行った。アレルゲンの溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、経口での感作、経口での惹起が可能であった。(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分解性試験では、GMとうもろこし(Mon810, Bt11)を用いて新規産生タンパク質(Cry1Ab)の人工胃液による分解の程度をウェスタンブロット法にて検討し、精製品を用いる場合と同様、ほぼ1分以内に消失することを確認した。(4)血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性については、新たに29検体の食物アレルギー患者血清を用いて、PAT, CP4-EPSPS, Cry1Abに対するIgE抗体の産生をELISA法で検討したが、いずれの抗原に対する抗体産生も認められなかった。

協力研究者

澤田純一、中島治、中村亮介 (国立医薬品食品衛生研究所)

美宅成樹(名古屋大学工学部)

宇理須厚雄 (藤田学園大学坂文種報徳会病院)

河野陽一 (千葉大学医学部)

金澤由基子 (食品薬品安全センター泰野研究所)

A. 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝

子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。安全性評価の国際的動向としては、1999年から2003年にかけて、コーデックス(Codex)食品規格委員会(国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)では、バイオ食品特別部会が設置され、バイオ食品について必要な基準、指針あるいは勧告を策定することとなり、2002年3月に横浜

で開催された第3回特別部会で採択された「組換え DNA 植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン案」¹⁾はステップ8に、進められ、この中で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付され議論されている。主な評価項目は、(1)新規産生タンパク質と、既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性（特にペプシン抵抗性）並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清または標的患者血清を用いる新規産生タンパク質に対する IgE 抗体の存在の有無のスクリーニングがあげられ、検討項目として、動物モデルの使用の推奨等が述べられている。このガイドライン案は、平成15年7月にローマで開催された Codex 総会で、遺伝子組換え食品の安全性評価のガイドライン(ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03_34e.pdf)として採択されている。組換え食品及び食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになり、食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植)の安全性評価基準が平成16年1月に作定された。

本分担研究では、アレルゲン性の評価方法の一層の検討・開発等を目的として、(1)アレルゲン予測の解析法の検討、(2)動物を用いるアレルゲン性の検討、(3)新規産生タンパク質及び食物アレルゲンの人工胃腸液による分解性の検討、(4)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討の4点をとりあげ、研究を進めている。(1)のアレルゲン予測の解析法の検討では、(i)既知のアレルゲンとの相同性の比較方法 -アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討、(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味したアレルゲンデータベースの立ち上げを行なった。(2)の動物を用いるアレルゲン性の検討では、マウスを用いる経口感作の方法について数種のアレルゲン、非アレルゲン物質を用いて、数種の系統の差違、及び投与時の溶媒の差違について検討を行い、経口感作の効率の高い感作法について検討を行った。また、ILSI-HESI (the Allergy and Immunology Institute of the International Life Science

Institute) 主催の動物モデルの国際的 validation 試験に参画し、各研究室で共通の抗原（食物アレルゲンとして知られているタンパク質2種(ピーナッツアレルゲン (Arah2), β -ラクトグロブリン(BLG))と、食物アレルゲンとして知られていないタンパク質2種 (RUBISCO, Potato acid phosphatase)を用いて、各研究室特有の方法での感作を行い、データを収集し、よい経口感作モデル動物を探索するという研究に着手した。(3)新規産生タンパク質及び食物アレルゲンの人工胃腸液による分解性の検討では、GMとうもろこしを用いて新規産生タンパク質の人工胃液による分解の程度をウェスタンブロット法にて検討し、精製品を用いる場合との比較検討を行った。(4)の患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討については、昨年同様、すでに承認されている組換え食品のフォローアップ的研究として、協力医療機関より提供された食物アレルギー患者血清中の除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS), 害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9c)タンパク質及び除草剤グルホシネート(ホスフィノスリシン)抵抗性蛋白質(PAT)に対するIgE抗体の有無の検討を、ELISA法及びウェスタンブロット法で行った。Cry1Ab抗原については、今年度、新たに可溶性の抗原を大量に調整するための大腸菌での発現系を導入した。

B. 研究方法

(1) アレルゲン予測の解析法

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討-アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討

遺伝子組み換え技術により導入された新規導入タンパク質のアレルゲン性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することを可能にすることを目的として、以下、アレルゲンに特徴的な部分配列を予測するための方法を検討した。バイオインフォマティクスの手法では、大量かつ質の高いデータセットを用意し、それに基づいて分類・予測のアルゴリズムを開発する。しかし、アレルゲンの予測では、いくつかの非常に難しい問題に直面する。

第1に、分かっているアレルゲンのエピトープ配列が非常に少なく、データベースからの配列類似性の解析がほとんど不可能である。第2に、アレルゲンタンパク質と非アレルゲンタンパク質については、かなりの数知られているので、そこからアレルゲンに特異的な配列を探索するための仕組みを考えねばならない。しかし、単純なモチーフはなく、そのためのアルゴリズムも前例がない。第3に、さらに難しい問題として、アレルゲンと結合する抗体が1種類ならば考えやすいが、疎水性セグメントと結合するものから、親水的なセグメントに結合するものまで、大きなバラエティがあるらしいということがある。これらの困難を克服するために、ここではいくつかの工夫を行った。

まず、解析法を検討するためのデータセットは2段階で用意した。表1に示したとおり、わかっているエピトープ配列は非常に少ない。これは最終的なチェックのために用いることにした。大量のエピトープ候補配列を抽出するには、アレルゲンタンパク質と非アレルゲンタンパク質の全配列を比較することによって、排他的な断片配列を抽出した。それを用いて、分断された2つの組み合わせ配列で排他的なものをすべて列挙し、それをアレルゲンのエピトープ候補配列とした。そして、その配列のまわりのアミノ酸分布を調べた。それによって得られた分布の例が図1である。中心には頻度が高いが、数残基ずれたところには少ないアミノ酸(例えば、Gly、Lys)と、それとは反転した分布を示すアミノ酸(例えば、Cys、Met)があった。いずれにしてもエピトープに特徴的なアミノ酸の分布が存在しているらしいということが示された。

そこでこのエピトープに特徴的なアミノ酸のプロペンシティを利用して、候補の断片配列を解析した結果、アレルゲンエピトープらしい配列を濃縮することができるようになった。図2は、このアミノ酸のプロペンシティを用いて、エピトープらしさのスコアを作り、すべての排他的な配列に対してスコアを求めたヒストグラムである。このスコアの高い配列はエピトープらしいということが期待される。しかし、これらはまだエピトープでない配列が多

く含まれていると考えられ、現段階では精度の高い予測が難しい。そこでこのプロペンシティからさらに各種の物性量の分布を求め、エピトープと抗体の結合の特徴を調べた。そのために、計算したのが図3の各種物性量のプロファイルである。図2におけるスコアの高いアミノ酸配列を取り、それらの断片を中心4残基、両端6残基を2領域ずつの物性の平均値を計算した。物性としては、疎水性、両親媒性インデックス A-index、A'-index、電荷、プロリン・グリシンの数、セリン・スレオニンの数、芳香族残基の数をを用いた。これに近い物性分布を持つアミノ酸断片は抗体と結合しやすいと考え、主成分分析を行った。

(ii) 新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の構築について

データは原則としてすべて2004年3月の時点で収集・解析した。なお、エピトープ情報については、2005年3月現在のデータを入力した。アレルゲンの一次配列データは、List of Allergens in Swiss-Prot²⁾、Allergen Nomenclature³⁾、The Biotechnology Information for Food Safety Database⁴⁾より収集し、IDが重複するものを除いた。IDの優先順位は、SwissProt、Pir、TrEMBL、GenBank/GenPeptの順とした。登録されている配列データがcDNAの場合、TrEMBLにより対応するアミノ酸配列を取得した。各アレルゲンのアノテーション情報(動物種・一般名・注釈等)はSDAP - Structural Database of Allergenic Proteins⁵⁾から収集し、同サイトが提供する「Source」属性を、8種のカテゴリ(花粉・ダニ・動物・カビ・昆虫・食物・ラテックス・その他)に再編成した。また、下記に示す11のキーワードによりEntrez PubMed内を検索し、エピトープ情報を含む文献を抽出し、精読の後SDAPのエピトープ情報に追加した。

IgE-Binding、Epitope、Identification、Immunoglobulin E、Epitope Mapping、Sequence、Analysis、Peptide、Recognition、IgE-epitopes、Linear
データベースの作成には、Solaris9プラットフォームにおいてMySQL(Ver. 4.0)を用いた。アミノ酸配列に基づくアレルゲンタンパク質の検索(Protein Search)にはprotein-protein BLAST(blatp; Ver. 2.2.10)を、エピトープ配列

内の検索 (Epitope Search) には BLAST Search for short, nearly exact matches を用いた。FAO/WHO が提唱⁵⁾するタンパク質のアレルゲン性予測法は、Hileman らの方法⁶⁾を一部改変したものをを用いた。すなわち、FASTA アラインメントプログラム (Ver. 33t08d4) によりクエリ (問い合わせ) タンパク質の全長を既知アレルゲンと比較し、結果アラインメント中の overlap アミノ酸長 (およびその一致率) と連続一致アミノ酸長をそれぞれ異なる閾値で判定するというものである。

(2) 食物アレルギー動物モデルの開発

(i) BALB/cマウスの経口感作、経口惹起の条件検討

(実験 1) 試験には7週齢の雌性 BALB/c マウスを用いた。感作には、リノール酸/レシチン (4:1) 混合液溶媒対照群 (LL)、リノール酸/レシチン混合液を溶媒とした卵白アルブミン (OVA) 群 (OVA/LL)、 β -ラクトグロブリン (LG) 群 (LG/LL) およびウシ血清アルブミン (BSA) 群 (BSA/LL) を設定した。各抗原 1 mg/匹を生理食塩液とリノール酸/レシチン (4:1) との等量混合液を溶媒として、5回/週の頻度で経口投与して感作した。また、感作投与群、溶媒対照群とも2回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (0.2 mg/匹) を腹腔内投与した。惹起は各抗原を 100 mg/匹の割合で経口投与して行い、アナフィラキシー症状の有無の観察および血清中の特異抗体価を指標としてアレルギーの成立を確認した。全身性アナフィラキシー症状は、無症状を 0、立毛や鼻こすりを 1、吐き気を 2、努力呼吸やチアノーゼ、下痢を 3、痙攣、死亡 (24 時間以内) を 4 としてスコアをつけて発症の頻度と強度を評価した。試験条件として惹起時の溶媒 (卵黄レシチン (EL) と大豆レシチン (SL))、感作開始時週齢 (3 週齢と 7 週齢)、感作期間延長の影響 (3 週間と 4 週間) および複数の抗原種 (OVA, LG, BSA) の反応性を検討した。また、一部の動物については、惹起 1 週間後に採取した脾臓のリンパ球を培養し、IFN- γ および IL-4 の産生を調べ、Th1/Th2 バランスについて検討した。

(実験 2) 試験には7週齢の雌性 BALB/c マウスを用いた。感作にはペプシン (PP) を、溶媒には [リノール酸/大豆レシチン (4:1) 混合液] を用いた。低用量群では、1 匹あたり 0.4 mg、高用量群では 1 mg を

それぞれ生理食塩液とリノール酸/レシチン (4:1) との等量混合液を溶媒として、5回/週の頻度で経口投与して感作した。いずれも2回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) を 0.2 mg/匹の割合で腹腔内に (高用量群) あるいは 0.3 mg/匹の割合で経口投与 (低用量群) した。惹起では 4 mg/匹 (0.4 mg 経口感作、SA 経口投与群)、100 mg/匹 (1 mg 経口感作、SA 腹腔内投与群) の抗原を経口投与し、アナフィラキシー症状を指標としてアレルギーの成立を確認した。

(ii) BALB/cマウスにおける各種タンパク質腹腔内投与による影響

ILSI-HESI が主催する動物モデル検討のための validation 試験に参画し、各種動物に共通タンパク質を腹腔内投与し、アレルギー性 (アレルゲンか非アレルゲンか) の判定が可能かどうかの評価を行った。

動物種として BALB/c マウス (7 週齢、メス) を用い、腹腔内投与する精製タンパクとして以下の 6 種を用いた。アレルゲンとして、Ara h2 (peanut) (ILSI からの供与)、 β -lactoglobulin (cow's milk)、OVA の計 3 種。非アレルゲンとして Rubisco (ILSI からの供与)、PEP carboxylase (corn)、Potato acid phosphatase (PAP) の計 3 種である。いずれもアジュバントあり (25 μ g protein-1 mg Alum/200 μ L)、なし (25 μ g protein /200 μ L) の両方で検討を行い、10 日おきに 4 回腹腔内投与した。対照群には生理食塩水を投与した。評価法は任意だったので、(i) 抗原特異的抗体価測定 (ELISA)、(ii) PCA 反応、(iii) ASA 誘導後の血清中ヒスタミン濃度測定、(iv) ASA 誘導に伴う体温低下測定、(v) 脾臓細胞産生サイトカイン濃度、(vi) 脾臓細胞リンパ球ポピュレーション解析により行った。具体的には、3 及び 4 回目の投与後に眼底採血をして血清を採取し、ELISA 法を用いて血清中抗原特異的 IgG1、IgE、及び IgA 抗体価測定を行い感作の成立を確認した。40 日後に抗原の腹腔内投与 (1 mg) により能動的全身性アナフィラキシー (ASA) を誘導し、直腸の体温変化を 1 分毎 10 分間経時的に測定した。その後、全採血をして血清中ヒスタミン濃度をポストカラム HPLC 法により測定し、同じ血清を PCA 反応に用いた。さらに脾臓を摘出し、 5×10^6 cells/mL の脾臓細胞を抗原共

存下 (100 µg/mL) 24 穴プレート上で 37°C、72 時間培養し、培養上清中に含まれるサイトカイン (IL-4、IL-5、及び IFN-γ) 濃度を ELISA キットを用いて測定した。又、フローサイトメトリー (FCM) により脾臓細胞リンパ球サブセット解析を行った。

(3) 新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討

人工胃液 (SGF) による分解性試験は、USP 23 に従って行った⁹⁾。各種組換えトウモロコシの粗タンパク質溶液を終濃度 1.5 mg/mL になるように 2.5 x SGF (0.8% pepsin-0.075 mol/L NaCl-0.2 mol/L HCl pH1.2) に加えた (タンパク質:pepsin=1:2)。水浴中で 37°C にてインキュベートし、一定時間後 (0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60 min) 65 µL ずつ採取し、200 mM Na₂CO₃ (22.5 µL) で中和した。5x Laemmli buffer (22.5 µL) と混和後 (total 110 µL)、5 min 煮沸しそれを SDS-PAGE のサンプルとした (≥ 75 µg (protein content)/ 50 µL (lane))。それぞれのサンプルは 8% ポリアクリルアミドゲルに負荷し、20 mA の低電流で泳動した。電気泳動後、タンパク質を 0.22 µm ニトロセルロース膜に 37 mA の定電流で 18 時間転写した。0.5% casein-PBS (pH7.1) でブロッキング後、1 次抗体としてウサギ抗 rCry1Ab ポリクローナル抗体または Dr. Walschus から供与されたマウスモノクローナル抗体 (1/500) に浸し、室温で 2 時間インキュベートした。膜を 0.05% Tween-20 を含む PBS で洗い、1000 倍希釈の HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体、または HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG ポリクローナル抗体に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、基質溶液 (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus #NEL104 (PerkinElmer Life Sciences) に浸し化学発光させ、Cry1Ab のバンドをデンシトメーターにより解析した。

(4) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

食物アレルギー患者血清中の新規産生タンパク質 (CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9C または PAT (phosphinothrin acetyltransferase)) に対する IgE 抗体の存在の有無を ELISA 法、ウェスタンブロット法にて検討した。具体的には、CP4-EPSPS 抗原としては、CP4-EPSPS 遺伝子を組み込んだ大腸菌

の培養上清を、Cry1Ab 抗原としては、Btk 菌から、結晶毒素として単離したものの、または、Bt11 トウモロコシに導入されている Cry1Ab 遺伝子を増幅させて、大腸菌に組み込んでから精製したものを、Cry9C, PAT 抗原としては、Aventis 社より供与された精製品を用いた。ELISA 法は、抗原を結合させた 96 穴プレートに種々の食物アレルギー患者血清と反応させ、酵素標識抗ヒト IgE 抗体を反応させ、次いで基質を加え、基質の発色から、抗原に特異的に反応する IgE 抗体の有無を検討した。基質としては主に TMB (Tetramethylbenzidine) を用いた。ウェスタンブロット法は SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にてタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写し、種々の食物アレルギー患者血清と反応させ、コニカイムノステインによる発色から、これらタンパク質に特異的に反応する IgE 抗体の存在の有無を検討した。

C. 研究結果および考察

(1) アレルゲン予測の解析法

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討

図 2 に示したアミノ酸断片は、アレルゲンタンパク質と非アレルゲンタンパク質同士で排他的な配列となっているばかりではなく、エピトープらしいアミノ酸の特徴を持っている。ここからエピトープを抽出する計算上の仕組みとして、エピトープらしさを示す物性の分布を用いて、さらに主成分分析の手法による新たな判別スコアを計算した。ただしここで気をつけなければならないことは、実際のエピトープには、かなり疎水性の高い断片から非常に親水的な断片まで存在していて、抗体側もいくつか分類されるはずだということである。そこで、図 2 にプロットしたアミノ酸断片をその中心部分の疎水性で分類し、それぞれを主成分分析にかけた。その結果、アレルゲンタンパク質からの断片の中に、飛びぬけてスコアの高い断片が存在していることが分かった。これはエピトープに対応していると期待される。このようなアミノ酸配列の物性を基づいたエピトープ探索の試みははじめてのものであり、どのくらいの精度で予測可能かは今後の研究

に待たねばならない。しかし、ここまでの研究ではっきりしたことは、エピトープとなる断片には、物理的な性質としてもかなりはっきりした特徴があるらしいということである。しかも、それは一つの物性量で特徴付けられるようなものではなく、いくつかの物性量の組み合わせとしてエピトープ・抗体結合が起こっていることを示している。今後の研究の方向としては、エピトープが分かっている断片が実際にこの方法でも高いスコアを与えるか、予測システムとして用いたとき、どのくらいの精度を与えるか、非アレルゲンでもエピトープ様の配列は存在するが、それはアレルゲンのエピトープと物性量によって判別可能かというようなことを明らかにしなければならないと考えている。

(ii) アレルゲンデータベース(ADFS)の構築について

重複のないアレルゲンの一次配列データとして 730 種のエンタリを得、データ精査の後、ウェブブラウザで検索できるデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) として公開した (<http://mpj-srs.nihs.go.jp/allergen/>)。図 4a はその検索画面である。様々な検索手法がグラフィカルにレイアウトされ、初見ユーザにも戸惑うことなく操作できるよう考慮されてある。個々のアレルゲンに関する詳細な情報は別ウインドウに表示される(図 4b)。詳細データ表示画面からは、UniProt、GenBank、PDB、Entrez PubMed へのリンクが適宜貼ってあり、必要に応じて外部のデータベースを参照することができる。また、エピトープ既知のアレルゲンの場合、エピトープ配列を元に ADFS 内あるいは UniProt 内を検索し、交差反応性の疑いがあるタンパク質を検索することができる。

今回の調査ではエピトープ情報に関する 32 種の論文が見つかり、32 種のアレルゲン (Ana o 1.0101, Ana o 1.0102, Ana o 2, Asp f 1, Asp f 3, Ber e 1, Bla g 7, Blo t 10, Blo t 11, Bos d 6, Bos d 8, Cry j 2, Fag e 1, G2a, Gal d 1, Gal d 2, Hel a 2, Hev b 6.02, Jug r 1, Jun a 1, Tri a 19, Par j 1, Par j 2, Pen a 1, Pen ch 13, Pen ch 18, Pen n 18, Phl p 13, Phl p 5.0102, Pru av 1, Pru p 3, および Ses i 2) に対し、計 201 種のエピトープを追加することができた。これにより、エピトープが一つ以上明らかになった登録アレルゲンの数は 43

種になった。また、立体構造が分かっているアレルゲンは 157 種存在した。これらエピトープおよび立体構造が分かっているアレルゲンの情報は、ADFS の Keyword Search より知ることができる。

ユーザは、自分の興味あるアミノ酸配列と相同性のあるアレルゲンを BLAST アルゴリズムにより高速に検索することができる (Protein Search)。この際の E-value や Matrix などのオプションはユーザが任意に設定できる。また、特にエピトープ配列に限っての検索は、Epitope Search により行なう。Epitope Search では E-value および Matrix の初期値を短いアミノ酸配列に最適化してあり、4 残基からなるエピトープも検索することができる。

タンパク質のアレルゲン性予測については、FAO/WHO が次のような手法を提唱している。1) シグナル配列を除いたクエリタンパク質を N 末端側から 80 残基(またはそれ以上)のアミノ酸ウインドウで順に区切ってゆき、FASTA アライメントプログラムにより既知アレルゲンとの比較を行ない、35%以上のアミノ酸が一致する場合、あるいは 2) クエリタンパク質の 6~8 残基の連続するアミノ酸が既知アレルゲンと完全一致する場合にアレルゲン性が疑われる、とするものである。しかし、上記方法はウインドウ単位に細分化されたクエリ配列を大量に処理する必要があり、よいパフォーマンスが期待できない。そこで ADFS の FAO/WHO 法としては、Hileman らの方法の改変法を用いた。すなわち、まずクエリ配列の全長を FASTA アライメントにより既知アレルゲンとの相同性比較を行ない、1) 両者において overlap しているとみなされたアミノ酸長が 80 残基以上に達し、かつその 35%以上のアミノ酸が一致する場合、あるいは 2) 連続して完全一致した最大アミノ酸長が 6~8 残基以上に達した場合に「陽性」と判定される。いずれの手法においても、1) はタンパク質の比較的大きな構造の類似性を調べるもので、2) は局所的な一致をみるものである。ユーザはこれらのパラメータおよび E-value を任意に変更し、クエリタンパク質のアレルゲン性を予測するとともに、類似する既知アレルゲンに関する情報を容易に得ることができる。

以上の ADFS の機能をまとめると、図 2 のようになる。

大規模な公的データベースである SwissProt、Pir、GenPept/GenBank にはそれぞれ 593 種、

348 種、668 種の互いに重複するアレルゲンが登録されていたが、ADFS はこれらを統合し、730 種のエン트리としてまとめた。これは、アミノ酸配列比較に基づくアレルゲン性の予測に関し、非常に有用な情報を提供できるデータベースが構築できたといえよう。また、既存のアレルゲンデータベースは一般にキーワード検索やアミノ酸配列検索における柔軟性が低く、また検索結果の表示が複雑で分かりにくいなどといった問題があったが、ADFS においてはこれらのインターフェースを洗練させ、直感的な操作を可能にした。特に BLAST アルゴリズムによる配列検索は有用で、4 残基からなる短いエピトープ配列も検索することができた。3 残基からなるエピトープについては検索できないことが分かったが、このような短すぎるエピトープは Asp f 2 の ¹³⁸HWR¹⁴⁰ のみであり、全体としての検索のパフォーマンスは非常に高いといえよう。また、今回新たに 32 種のアレルゲンに対してエピトープ情報を付加することができ、ADFS に登録されたエピトープ既知のアレルゲンは 42 種、エピトープの配列数は 306 種に達した。これは、アレルゲンエピトープに関するデータベースとしては現時点 (2005 年 3 月) で世界最大のものである。エピトープ情報はアレルゲンの交差反応性を予測する上で極めて重要であり、バイオテクノロジー応用食品に含まれる新規タンパク質等のアレルゲン性を評価する上で、ADFS は非常に重要な役割を果たすことができると思われる。アレルゲン性予測に関しては、Hileman らの FAO/WHO 法を改変し、高いパフォーマンスの予測を可能とした。FAO/WHO の方法と本法ではアミノ酸のウインドウに関する取扱いが異なるため、まれに結果が相違する場合がある。多くのタンパク質は分子内に機能的・構造的にまとまったドメイン構造を持つが、ドメインの大きさは様々であり、一概には決められない。FASTA アラインメントにより類似性の高い領域を自動的に抽出する本法は、ウインドウサイズを初めから 80 残基等に固定してアラインメントを行なう FAO/WHO の方法に比べ、より自然にドメイン構造等の類似性を調べられることが期待された。タンパク質の大きな立体構造の類似性を比較するという評価基準のそもそもの目的に鑑みれば、本法は十分な妥当性を持つと思われる。しかし、より高いパフォーマンスのアレルゲン性予測手法の開発が望まれていることもまた

事実である。2003 年に発表された Stadler らによる Motif-based 法⁷⁾は、従来の予測法に比べ格段のパフォーマンスの向上が認められており、ADFS においては同法に基づくアレルゲン性予測のインターフェースを現在開発中である。定期的なデータのアップデートと Motif-based 予測インターフェースの確立とにより、ADFS は世界で最も洗練されたアレルゲンデータベースの一つとなることが期待される。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

(i) BALB/cマウスの経口感作、経口惹起の条件検討

(実験 1) 惹起時の溶媒について感作投与時と同一溶媒 (卵黄レシチン)、感作投与時とレシチンの種類を変えた溶媒 (大豆レシチン) および生理食塩液を比較したところ、いずれの溶媒でも惹起が可能であった (図 6)。感作と惹起でレシチンの種類を変えた場合、対照群の反応を抑制し、かつ被験物質の反応性は維持されることが確認され、レシチンの種類を変えることによって、相対的に反応性が高くなることが示された。感作開始時週齢について 3 週齢と 7 週齢を比較したところ、いずれの週齢でも感作を成立させることが可能であったが、7 週齢の方が全身性アナフィラキシー症状および抗 OVA IgG1 抗体価ともに高値を示した。3 週齢の動物にさらに 1 週間感作を続けた場合、7 週齢でみられた反応と同等の反応が認められた (図 7)。

LG および BSA について惹起時のアナフィラキシー症状の頻度や強弱および抗体価を OVA と比較した結果、いずれも OVA より高い反応性が得られた (図 8)。また、LG と BSA を比較すると、BSA の方が反応性の高い傾向が認められた。

感作期間を 4 週間に延長したところ、3 週間に比べてアナフィラキシー症状は強くなる傾向が認められ、特に症状の強かった BSA 群では血清中に特異的 IgG1 抗体に加えて特異的 IgE 抗体が認められた (図 9, 10)。惹起 1 週間後に採取した脾臓のリンパ球では、培養液中への抗原の添加によって IFN- γ の産生は減少し、IL-4 の産生は増加する傾向にあり、T リンパ球の Th1/Th2 バランスが Th2 優位に傾いていることが示された (図 11)。

(実験 2) 3 週間の感作終了後に大量に被験

物質を経口投与した場合、低用量感作群では、媒体対照群と PP 感作群でアナフィラキシー症状がほとんど認められなかったのに対し、OVA 感作群では弱いアナフィラキシー症状が過半数で観察された。高用量投与群では、溶媒対照群と OVA 感作群でいずれも明らかなアナフィラキシー症状が認められた。PP 感作群では低用量、高用量のどちらの感作群でも、繰り返し惹起を行ってもアナフィラキシー症状はほとんど認められなかった (表 2)。

以上、我々の開発した食物アレルギーモデルは、経口で感作し、経口で惹起することにより、人で認められる消化管を標的としたアレルギー反応と同様の反応を誘導するモデルと考えられる。アレルギーの溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与するこの系では、3 週間という短期間の投与により、特異的 IgG1 抗体の産生を誘導する。今年度の条件検討では、惹起は感作に用いた卵黄レシチンだけでなく、大豆レシチンを用いても可能であったことから、感作と惹起時の溶媒を変えることで、溶媒対照群に認められるレシチン中の共雑タンパク質に起因すると考えられる鼻こすりなどの軽度のアナフィラキシー症状を減少させることが可能となった。また、腸管バリアが未成熟の 3 週齢の動物では反応が強く出ることが期待されたが、実際には反応は成熟動物である 7 週齢の反応に比べて弱かった。これは腸管バリアが未成熟で物理的にアレルギーが透過しやすくなることよりも、免疫系が未成熟であることが反応に大きく影響することが示唆された。反応の弱かった 3 週齢の動物においても感作期間を 1 週間延長することで 7 週齢の動物と同等の反応性が得られることが示された。アレルギーとして今まで OVA を用いてきたが、ラクトグロブリンやウシ血清アルブミンでも OVA と同等以上の反応性が得られることが確認され、多くの食品中アレルギーの検出が可能であると考えられた。また、感作回数を増やすことで反応性が高まり、特異的 IgE 血清中の検出が可能となったことから、本試験系は、動物を用いたアレルギー性の評価に有用であると考えられた。一方、本試験系におけるアレルギー状態は、サイトカインバランスの変化から全身の免疫

系へも影響を与えるものであることが示唆された。In vitro の試験系において、食物アレルギーにならないと言われているペプシンについて、本感作方法を適用し、惹起したところ、ペプシンは感作を重ねてもアナフィラキシー症状はほとんど認められなかった。本食物アレルギーモデルでは、リノール酸、レシチンを溶媒とするため、ほとんどのたんぱく質がアレルギーとして認識されるのではないかと予想していたが、in vitro の試験結果と一致して、アレルギーとして反応しないタンパク質が存在することが明らかとなったことから、今後、アレルギーと非アレルギーを区別する試験方法としても利用可能であると考えた。

(ii) BALB/c マウスにおける各種タンパク質腹腔内投与による影響

i) 抗原特異的抗体価測定をしたところ、BALB/c マウスへの腹腔内投与では、Alum と共に投与することで、非アレルギーと言われているタンパク質 (Rubisco, PAP, PEP) であっても抗原特異的 IgG1 抗体価が顕著に上昇することが分かった (それぞれ titer=30000 以上) (図 12)。ii) 抗原の腹腔内惹起後に血清中ヒスタミン濃度測定をしたところ、タンパク単独投与のもので比較すると、非アレルギーではほとんど変化がないのに対し、アレルギー (β -lac, OVA) では非常に高いヒスタミン濃度の上昇が見られた (図 13)。iii) 抗原の腹腔内惹起後に体温測定をしたところ、アジュバントの有無に関わらずアレルギー (β -lac, OVA) で急激な体温低下がおり ASA の誘導が認められた。同様に非アレルギーの PAP でも体温低下が見られたが、Rubisco では対照群に比べ大きな変化が見られなかった。

以上より、アジュバントの有無に関わらず、また、非アレルギー、アレルギーに関わらず BALB/c マウスに抗原を腹腔内投与すると、ELLISA 法での抗原特異的抗体価の上昇が見られる傾向が得られた。一方、抗原惹起後の血清中ヒスタミン濃度や体温低下は、アレルギー感作群で顕著であった。このことは、抗原特異的抗体の親和性に起因する可能性も考えられた。従って、アレルギーとしての強さを考慮するためには、抗原特異的抗体産生と共に、実際に動物でアレルギー症状が惹起されるかど

うかという生物学的活性測定もあわせて行なう必要性が示唆された。

(3) 新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討

ウサギ抗rCry1Ab抗血清、またはマウス抗Cry1Abモノクローナル抗体を用いることで、組換えトウモロコシ中に含有される分子量約70 kDaのCry1Abタンパク質を検出することに成功した。また、Mon810及びBt11中に含まれるCry1Abタンパク質は、0.5分まででほぼ100% SGFに分解されることが分かった。これは以前のデータで、東亜合成から供与されたCry1Abが0.5分までに90%以上分解されるという結果と、ほぼ一致した。

(4) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

遺伝子組換え食品のアレルゲン性を予知する上で、患者血清との交差反応性は重要なファクターである。我々は2004年に国内で採取された29名の食物アレルギー患者血清を用いて、新規蛋白質との反応性の調査を行った。最初に新規蛋白質(CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9c, PAT)を固相とするELISA法を行い、陽性が疑われるものについて、血清と反応させ、ウサギ抗ヒトIgE抗体、酵素標識抗ウサギ抗体を順に反応させ、ウエスタンブロット法にて確認を行った。

今回用いた血清は、いずれもELISA法で陰性(正常者の平均値+5SDを超える吸光度を示さない)との結果が得られた。

D. 結論

(1) アレルゲン予測の解析法では、

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法—アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討を行い、エピトープになりやすいアミノ酸の分布が存在することが示唆された。

(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の立ち上げを行なった。ADFSでは、独自に調査した結果も含めエピトープ既知のアレルゲン42種、エピトープ配列数306種を搭載し、任意のアミノ酸配列の

ADFS内アレルゲン並びにエピトープの検索を可能とする機能をもたせた。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討では、BALB/cマウス用いる経口感作の方法について検討を行い、溶媒に溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、経口での感作、経口での惹起が可能であった。

(3) 人工胃腸液による分解性の検討では、GMとうもろこし(Mon810, Bt11)を用いて新規産生タンパク質(Cry1Ab)の人工胃液による分解の程度をウエスタンブロット法にて検討し、精製品を用いる場合と同様、ほぼ1分以内に消失することを確認した。

(4) 患者血清を用いる研究では、国内食物アレルギー患者血清29種について、除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS)、グリホシネート抵抗性タンパク質(PAT)及び害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9c)タンパク質に対するIgE抗体の有無の検討を、ELISA法及びウエスタンブロット法で検討したが、陽性の血清はみられなかった。

E. 参考文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/codex/codex.html>
- 2) <http://www.expasy.org/cgi-bin/lists?allergen.txt>
- 3) <http://www.allergen.org/>
- 4) <http://www.iit.edu/~sgendel/fa.htm>
- 5) <http://fermi.utmb.edu/SDAP/>
- 6) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. (2001) <http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/allergygm.pdf>
- 7) Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, Hefle SL. (2002) *Int Arch Allergy Immunol.* 128:280-91.
- 8) Stadler MB, Stadler BM. (2003) *FASEB J.* 17:1141-
- 9) Board of Trustees(ed.). Test solutions, pp2053 in *the United States Pharmacopeia 23, The National Formulary 18.* United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, M.D. (1995)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takagi K., R. Teshima, H Okunuki et al. Kinetic Analysis of Pepsin Digestion of

Chicken Egg White Ovomuroid and Allergenic Potential of Pepsin Fragments. Int. Arch Allergy Immunol. 136,23-32, 2005
2). Thomas K., Teshima, R. et al, A Multi-Laboratory Evaluation of a Common *In Vitro* Pepsin Digestion Assay Protocol Used in Assessing the Safety of Novel Proteins. Regulatory Toxicol. Pharmacol. 39, 87-98 (2004)

3) Okunuki H, Teshima R, Sato Y, Nakamura R, Akiyama H, Maitani T and Sawada J, The hyperresponsiveness of W/W^v mice to oral sensitization is associated with a decrease in TCR $\gamma\delta$ -T cells. Biol. Pharm. Bull. (in press)

4) 手島玲子、奥貫晴代、食物アレルギーの動物モデル アレルギーの臨床 319(7), 29-33 (2004)

5) 手島玲子、組換え DNA 食品の安全性 食品衛生研究 54(6), 11-16 (2004)

6) 澤田純一、手島玲子、遺伝子組換え食品と食の安全 医学のあゆみ 211(8), 805-808 (2004)

2.学会発表

1) 第11回免疫毒性学会学術大会「経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(3)」新藤智子、金澤由基子、斎藤義明、臼見憲司、古谷真美、小島幸一、手島玲子 (2004.9)

4) 第54回日本アレルギー学会総会「W/W^vマウスにおける CpG ODN・OVA 経口感作による影響について」手島玲子、奥貫晴代、澤田純一 (2004.11)

5) 日本薬学会第124年会「組換え食品中の新規蛋白質と患者血清の反応性評価法に関する研究」高木加代子、奥貫晴代、手島玲子、澤田純一 (2004.3)

6) 日本薬学会第124年会「W/W^vマウスにおける CpG oligodeoxynucleotide OVA 経口感作による影響」奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、澤田純一 (2004.3)

7) 第77回日本生化学会大会「The effect of reconstitution with bone marrow cells on oral sensitization of W/W^v mice with ovalbumin」奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、穂山浩、米谷民雄、澤田純一 (2004.10)

8) 日本薬学会第125年会「BALB/c マウスにおける CpG-ODN・OVA 経鼻投与の効果」奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、穂山浩、米谷民雄、澤田純一 (2005.3)

9) 10th International Congress of Toxicology,

In vitro digestive stability evaluation, Teshima R. (2004.7)

10) ILSI HESI International Bioinformatics Workshop, Improvement of ELISA method for antigen-specific IgE in human sera. Teshima R (2005.2)

表 1. 解析に用いたアレルゲンのデータベース

	アミノ酸配列数	データセット	
エピトープ配列	57	SDAP	http://fermi.utmb.edu/SDAP/ ,
		CSL Allergen Database	http://allergen.csl.gov.uk/ ,
		PROTALL	http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/protall/
アレルゲンタンパク質	663	Allermatch	http://www.allermatch.org/
非アレルゲンタンパク質	539	A. Zorzet, et al. <i>In Silico Biology</i> 2, 0048(2002)	※3

※1 実際のタンパク質データのアミノ酸配列に一致したエピトープ配列のみを採用

※2 一残基変異のデータは除いた

※3 Prediction of food protein allergenicity: a bioinformatic learning systems approach. より、Fragmentの記載のあるものを除去し、また冗長性(配列相同性100%)を除いた

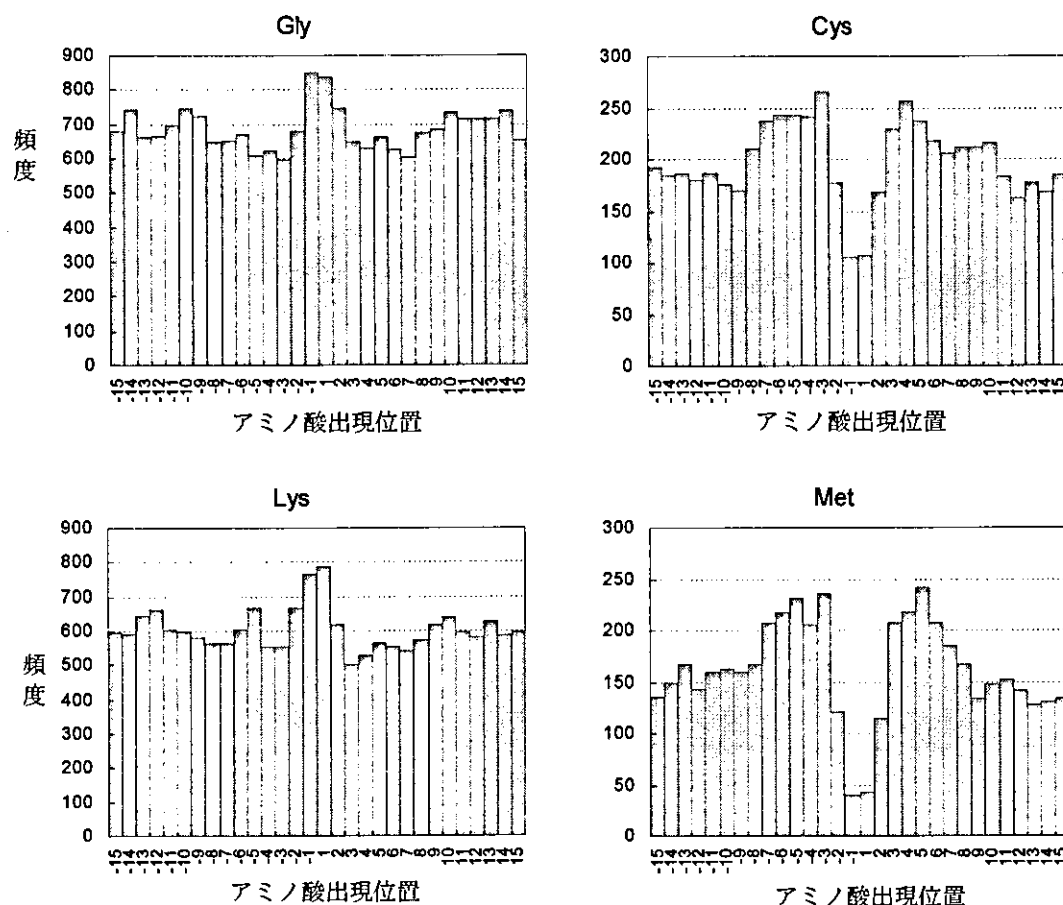


図 1. エピトープ候補付近の各アミノ酸の分布

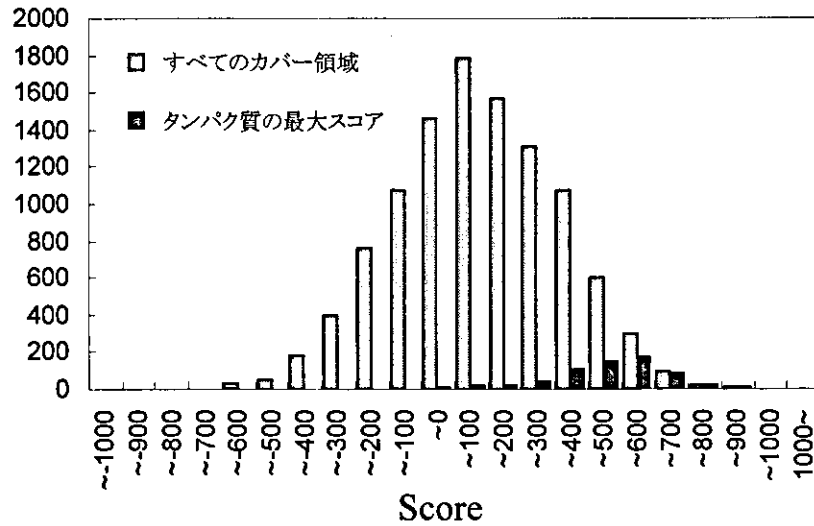


図2. アミノ酸のプロペンシティに基づくエピトープ候補のスコア。このデータセットの中にはまだエピトープでない配列が多く含まれている。

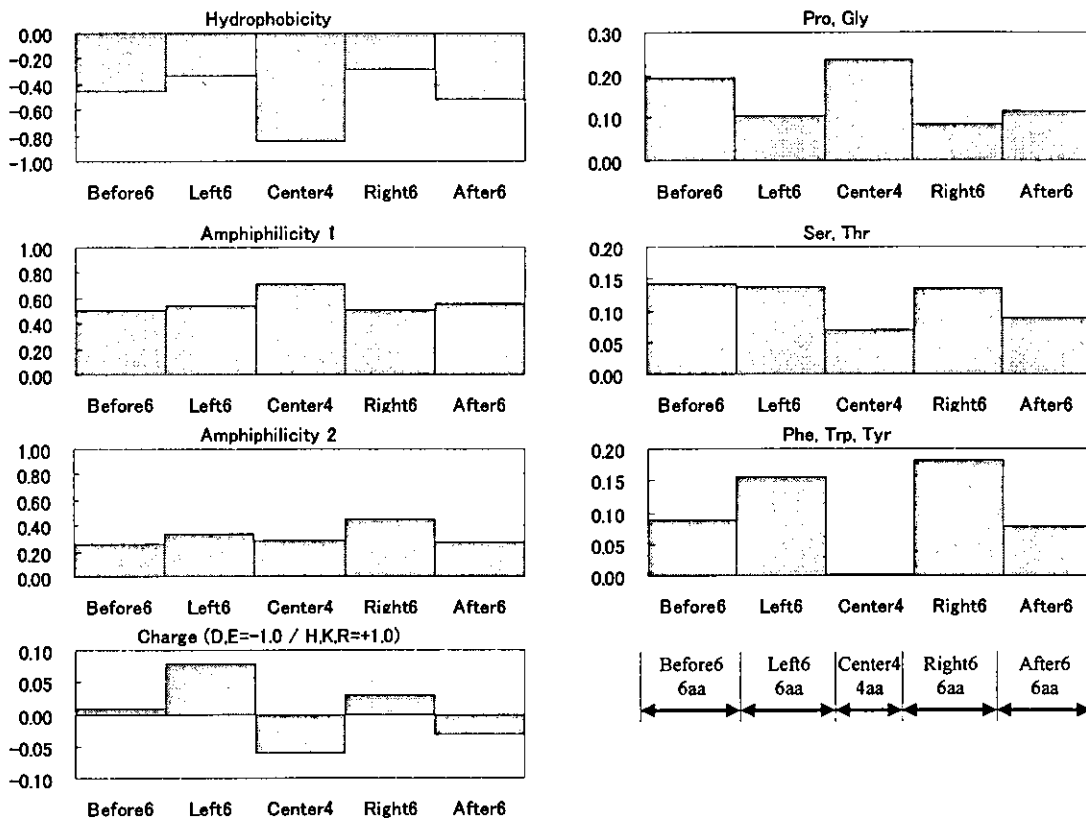


図3. 物性に基づくエピトープ候補スコアを計算するための各種物性のプロファイル：左上から、疎水性、両親媒性インデックス A-index、A'-index、電荷、プロリン・グリシンの数、セリン・スレオニンの数、芳香族残基の数。

a)

Allergen Database for Food Safety

Allergen Search: Keyword Search

登録エピトープの数 既知立体構造の数

Result : 39 Page 1 of 3 << prev 1 2 3 next >>

Allergen No.	Allergen Scientific Name	Taxonomy Name	Species Common	Category	Epitope	Structure	Description
11	Alt a 1	Alternaria alternata	-	fungus	?	-	
52	Ara h 1	Arachis hypogaea	peanut	food	21	1	vicilin
73	Ara h 2	Arachis hypogaea	peanut	food	10	-	conglutin
83	Ara h 3	Arachis hypogaea	peanut	food	4	-	elycinin
98	Asp f 1	Aspergillus fumigatus	-	fungus	13	7	mitogillin
111	Asp f 2	Aspergillus fumigatus	-	fungus	9	-	
120	Asp f 3	Aspergillus fumigatus	-	fungus	7	1	peroxisomal protein
136	Asp f 13	Aspergillus fumigatus	-	fungus	5	-	alkaline serine protease
235	Blo t 10	Blattella germanica	mite	mite	1	-	tropomyosin
251	Bos d 6	Bos domesticus	domestic cattle	food	2	1	serum albumin
252	Bos d 8	Bos domesticus	domestic cattle	food	18	-	caseins

b)

Search Result: Detail Information

- Allergen-Scientific Name: Bos d 6
- Taxonomy Name: Bos domesticus
- Species-Common Name: domestic cattle
- Category: FOOD
- Allergen Description: serum albumin
- Sequence: GenBank GeneID: 2190337, UniProt accNo: P02769
- Epitope:

Epitope	BLAST Search	Start	End	Type	Structure	description
1. LSLILNRLC	epitope / Protein	451	459	IgE	Linear	
2. HPEYAVSVLL	epitope / Protein	336	345	IgE	Linear	
- Structure: PDB ID: 1E7B
- Reference (PMID: 12054661):

Title: Some human B and T cell epitopes of bovine serum albumin, the major beef allergen.
 Author: Tanabe S, Kobayashi Y, Takahata Y, Morimatsu F, Shibata R, Nishimura T.
 Journal: Biochem Biophys Res Commun. 2002 May 24;293(5):1348-53.

図4

ADFS の検索画面と詳細データ表示画面

a) 検索画面。キーワード検索によりエピトープ情報を持つアレルゲンを表示させた例。左側には様々な検索・解析ツールがグラフィカルにレイアウトされている。

b) 詳細データ表示画面。例としてaの「Bos d 6」をクリックするとこのような別ウインドウが開く。アレルゲンの動物種や一般名、カテゴリ、エピトープ配列などが表示されるとともに、一次配列 (GenBank/UniProt)、立体構造 (PDB)、文献 (PubMed) へのリンクが示される。

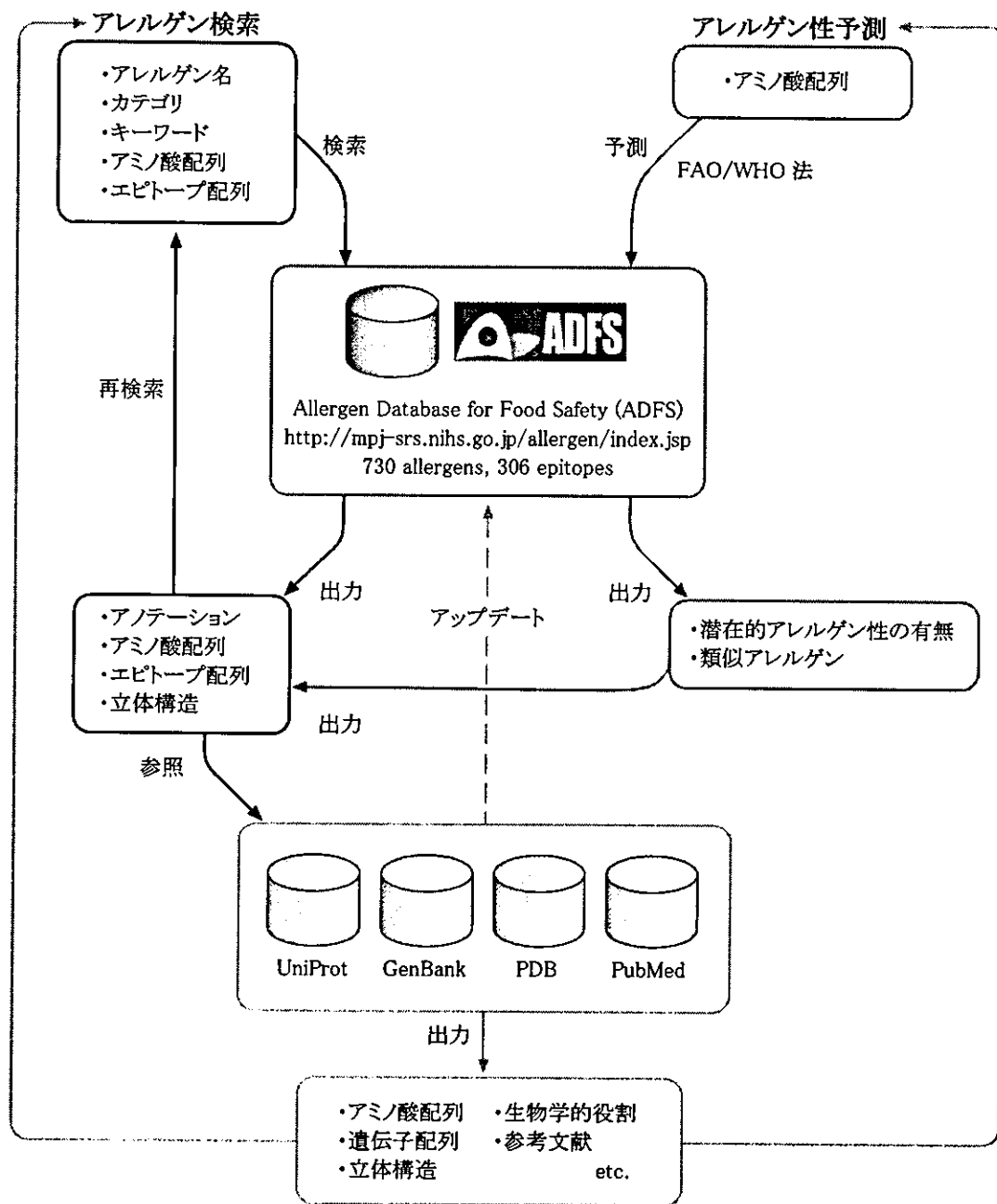
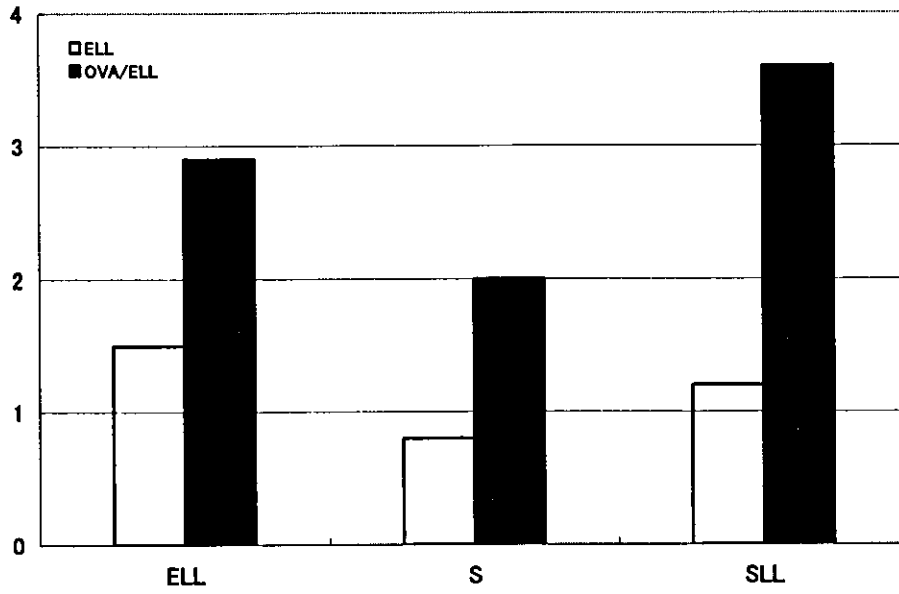


図5

ADFS の概念図。本データベースは、キーワードやアミノ酸配列など様々なクエリによりアレルギーを検索する機能と、FAO/WHO の改変法に基づくアレルギー性予測機能からなる。得られた出力結果は、再度 ADFS 内を検索したりリンクにより外部データベースを参照したりすることができる。

スコア平均

図6 惹起時の溶媒の一全身アナフィラキシー症状



抗体価

図7 感作開始時週齢の検討

スコア平均

