

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)特異的な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/alinorm03/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、平成17年度は、(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)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討の3点を取りあげ、研究を進めた。

(1) アレルゲン予測の解析法の検討では、(i)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、既知の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、(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、更新を行なった。(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。(3)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

ことから、本研究では色々な質のデータを利用することを考えた。

表 1 に示したとおり、エピトープがわかっているアレルゲン (57)、エピトープは分かっていないアレルゲン (663)、非アレルゲン (539)、さらに立体構造が分かっているアレルゲンとして杉花粉のアレルゲン (Jun a 3, PDB:1KUR) を用いた。アミノ酸配列の類似性が高いタンパク質ペアは立体構造的にも機能的にも似ているということが分かっているため、そのような類似タンパク質を多く含むデータセットを用いると、偏った規則性が導かれる可能性が高い。従って、エピトープの分かっていないデータに関しては類似性 30% 以上のデータに対しては、代表的な配列を一つだけデータセットに採用するようにした。

第 1 の方法は、エピトープの分かっていない大量のデータの解析は、エピトープの推定をしなければならぬので、アレルゲンと非アレルゲンのアミノ酸配列の比較により、排他的な配列のデータセットを作った。そして、アミノ酸配列の中でのアレルゲンの排他的な断片配列と、非アレルゲンの排他的な断片配列の割合を計算し、その比を指標としたときに判別が可能かどうかを検討した。

第 2 の方法は、さらに排他的なアミノ酸断片における物性の分布を統計的に検討した。図 1 は、グリシン、システイン、リジン、メチオニンの分布である。横軸は、排他的配列の中心の付近における配列位置である。グリシンやリジンが多く見られる一方で、システインやメチオニンは少ないことが分かる。また、ピークの両脇には谷が、谷の両脇にはピークがあることが分かる。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のである。そこでこのエピトープの候補に特徴的なアミノ酸のプロペンシティを利用して、アレルゲンエピトープらしい配列を濃縮する。

第 3 の方法は、アレルゲンの立体構造については、非常に大きな情報を含んでいるので、そのアミノ酸配列を詳細に検討した。物性を粗視化 (7 残基の平均) してアミノ酸配列に対するプロットを計算した。図 2 はアミノ酸配列に対する疎水性インデックス、電荷の粗視化プロットと、二次構造

ブレーカーの位置を示したものである。プロットに色付けした部分はエピトープの部分である。エピトープ領域の中心付近にはブレーカーが存在していることも明確に分かる。さらに、一番下のカラムは 5 残基の配列でヒトゲノムからのアミノ酸配列に存在しない部分を色付けしたものである。これらの物性のプロットに関して、電荷の分布やブレーカーの位置など特徴を捕まえ、予測の試みを行った。

(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 2005 年 7 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 9 月現在のデータを入力した。ADFS ではアレルゲンに関するデータは SDAP²⁾ (Structural Database of Allergenic Proteins)、List of Allergens in Swiss-Prot³⁾、IUIS⁴⁾ (Allergen Nomenclature)、BIFS⁵⁾ (The Biotechnology Information for Food Safety Database) 等既存データベースより収集している。これらについては web 公開後、個々の既存データベースがアップデートされたのに伴って、本データベースも新しい情報を取り込む作業を行った。ADFS の特徴である IgE エピトープ配列情報は既存データベースのうち SDAP にのみ掲載されているが、既知エピトープ配列との相同性検索ツールを充実したものとするためにはさらにエピトープ情報を拡充する必要があった。情報源は 1 次資料 (論文) を集めて抽出する方法しかないため Entrez PubMed による論文の検索、収集、査読を行った。

ADFS 公開当初のデータは SDAP のエピトープデータ (2002 年アップデート分まで) を利用し、それ以後 2004 年 3 月までに発表された論文のみ CTC-LS で収集・査読し、エピトープ配列情報を拾い出す作業を行なった結果得られたものである。論文収集は、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するという方法を用い、22 報分のデータを ADFS に収載した。

(IgE-Binding, Epitope, Identification, Immunoglobulin E, Epitope Mapping, Sequence, Analysis, Peptide, Recognition,

IgE-epitopes, Linear)

その後、2度にわたり(2005年3月、2005年7月)、同様の方法で論文を検索し、合わせて15報分のデータを追加した。

今回さらに、立体的エピトープのマッピングデータの発表されているアレルゲンについては ADFS からそれらの論文へリンクできるようにする作業をおこなった。その過程で、配列型エピトープについてもかなり記載漏れが見つかり、立体的エピトープの論文と合わせて2002年以前の配列型エピトープデータについても収集・査読作業を行なった。立体的エピトープについては上記11のキーワードのうち1次配列を示す単語の代わりに conformational or structural or discontinuous or three-dimensional を用いた。ヒットした論文の PubMed ID を取り出し、重複および記載済みの情報を差し引くと、138報の論文が抽出され、それらの要旨、本文等を査読した。その結果、立体的エピトープの情報を取り込む論文17報、未収録の配列型エピトープ情報を追加する論文27報分のデータを ADFS に収録することとし、アップデート作業を行った。現在、ADFS に収録されているアレルゲン数は1280であり、その内、配列型エピトープ情報の付加されているアレルゲン数は74である。

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 Proteins²¹⁾ 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。

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 (blastp; 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⁶⁾するタンパク質のアレルゲン性予測法は、Hileman らの方法⁷⁾を一部改変したものを用いた。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。Stadler らの motif-based 法⁸⁾では、既知のアレルゲン配列から MEME を用いてモチーフを抽出し、プロファイルを作成する。抽出されたプロファイルに適合しないアレルゲンについてはシーケンスとして別に抽出する。そのプロファイルとシーケンスをもとに、未知アミノ酸配列に関してアレルゲン性を予測する方法である。Stadler らの発表当時(2003年)には、52のモチーフと135のシーケンスが抽出されており、精度95.5%でクエリ蛋白質がアレルゲンであることを予測できるとされた。既知アレルゲンが追加されているため、この数は変動し、本研究では2005年9月で、67のモチーフと214のシーケンスが得られている。

(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) 実験には7週齢の雌性 BALB/c マウスを用いた。感作には、生理食塩液を媒体とした OVA 群(OVA/S)、リノール酸/レシチン混合液(LL)を媒体とした OVA 群(OVA/LL)、SA を併用した OVA/S 群(SA/OVA/S)および OVA/LL 群(SA/OVA/LL)を設定した。いずれの群も OVA 1 mg/匹を2回/週の頻度で経口投与し、SA 併用群には加えて SA (0.3 mg/匹)を2回/週の頻度で経口投与して3週間感作した。初回感作および2.5週目の感作後30分に血液を採取し、血清中の OVA 濃度を測定した。感作3週間後に感作と同じ溶媒を用いて OVA 40 mg/匹の割合で大量経口投与して惹起し、アナフィラキシー症状の有無の観察を指標としてアレルギーの成立を確認した。さらに1回目の惹起の2週間後に、無処置(Naive)を加えた全ての群に、生理食塩液を媒体として OVA を40 mg/匹の割合で経口投与し、2回目の経口惹起を行った。投与30分後に血液を採取して血清中の OVA 濃度を測定すると共に、腸管の一部を採取して残存する総 IgA および IgG1 抗体量を ELISA で測定した。

(実験2) 実験には OVA を抗原とした SA/OVA/LL および PEP を抗原とした SA/PEP/LL を設定し、実験1と同じ条件で感作し、3週間後に惹起してアレルギーの成立を確認した。また、実験1と同様に、抗原投与時の蛋白質の血清中への移行や腸管の残存

抗体量を調べた。加えて、2 回目の惹起時およびその1週間後に非惹起感作動物から採取したパイエル板のリンパ球を培養し、IgA およびIgG1濃度、IFN- γ 、IL-12、IL-10およびIL-4の産生を調べた。非抗原投与群(SA/LL)を加え、非惹起感作動物からは脾臓も採取し、同様の測定を行った。

(ii) 各種マウスにおける Ovomucoid-W/O emulsion 経口投与による影響

これまでの研究から、BALB/c、B10A、NC/Nga、WBB6F1-W/W^v (以下 W/W^v) マウス等にモデル抗原として卵白アルブミン(OVA) 0.1もしくは1.0 mgを9週間連日経口投与したところ、アジュバントを用いることなく抗原感作が成立し、能動的全身性アナフィラキシー(ASA)を誘導することが分かっている。特にc-kit遺伝子に突然変異を持つW/W^vマウス(マスト細胞欠損マウス)は他のマウス種に比べ非常に高い抗原特異的IgG1抗体価を示すことから、食物アレルギー動物モデルとして有用だと考えられた。そこで、W/W^vマウスが経口感作動物モデルとして有用かどうかのさらなる確認をするため、OVA以外の他の食物抗原(Ovomucoid (OVM) 及び β -lactoglobulin (β -lac))を用いて経口投与を行い、感作の程度について調べたところ、OVM投与群ではOVAや β -lac投与群に見られたような大きな抗原特異的抗体価の上昇が見られなかった。通常我々が摂取する食物は、加熱、加工処理されていることが多く、本来の形態のまま摂取されることは少ない。感作の成立の原因には、摂取する抗原量や抗原に曝露される頻度の違いのほか、食品に含まれる抗原以外の成分による影響も考えられる。これまでマウスに食物抗原を経口投与する際、生理食塩水に溶解したものを与えていた。しかし今回は、より現実的な評価を行うため、食品に通常相当量含まれる油脂に着目し、W/W^vマウス及びBALB/cマウスにOVM-W/O emulsionの経口投与を行い、感作の程度について調べた。

まず、タンパク質と混合する油脂として、長鎖脂肪酸を多く含む大豆油(soybean oil)と中鎖脂肪酸(炭素数8-10の飽和脂肪酸)を多く含むヤシ油(coconut oil)の2種類の油脂を選択した。これら油脂に等量のOVM/saline(20 mg/mL)を加え、超音波処理

(5分を3回)後、マウス一匹につき100 μ L (1.0 mg OVM) を経口投与することとした(water : oil = 1 : 1)。W/W^v及びBALB/cマウス(7週令、雌)をそれぞれ7匹ずつ6群に分け、OVM-W/O emulsion (soybeanまたはcoconut oil)を9週間連日強制経口投与した。対照群には生理食塩水またはそれぞれの油脂を投与した。投与開始より4及び9週間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。9週間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BALB/cマウスに関しては血清中ヒスタミン濃度をポストカラムHPLC法により測定した。さらに脾臓を摘出し、 5×10^6 cells/mLの脾臓細胞をOVM共存下(100 μ g/mL)24穴プレート上で37 $^{\circ}$ C、72時間培養し、培養上清に含まれるサイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10、IL-2、及びIFN- γ)濃度をELISAキットを用いて測定した。又、小腸よりパイエル板及び小腸上皮細胞間リンパ球(IELs)を分離採取し、フローサイトメトリー(FCM)によりリンパ球サブセット解析を行った。

(3)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、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

大量のアレルゲンと非アレルゲンのデータに対して、排他的な配列のペアがどのくらいの割合でアミノ酸配列をカバーしているかという値を計算した。その指標をアレルゲンと非アレルゲンで2次元プロットとした結果が図3である。指標の値は閾値によるが非アレルゲン側の排他的配列の方が大きなカバー率を示していることが分かる。しかし、少ないがアレルゲン側が大きなカバー率を示しているタンパク質がある。その中には実際にアレルゲンが濃縮されていることが分かった。図4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。このスコアの低い配列ではエピトープらしいということが期待される。つまり、これによってエピトープの高精度予測までには到っていないが、その割合を高めることはできていると考えられる。別の方法と併用することによって、さらにエピトープ予測を向上させる可能性が示された。

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5の各種物性量のプロファイルである。図4におけるスコアの低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。

図4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4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低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じ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。立体構造が分かっているアレルゲンについても、検討すべきことがいくつかある。エピトープは実際にタンパク質の外側に位置しているが、それは二次構造ブレーカーとの相関が高い。これもスクリーニングの因子として用いることができると考えられる。本研究によって、様々な物性を中心としたアレルゲンエピトープの特徴を抽出することができた。今後それらを組み

合わせて、より精度の高いアレルギー予測を追求していくことができると期待される。

(ii) アレルギーデータベース(ADFS)の構築について

ADFS (<http://allergen.nihs.go.jp/> ADFS/)ではアレルギーに関するデータは SDAP・Structural Database of Allergenic Proteins、List of Allergens in Swiss-Prot、Allergen Nomenclature、The Biotechnology Information for Food Safety Database 等既存データベースより収集している。これらについては web 公開(2005 年 4 月)後、個々の既存データベースがアップデートされたのに伴って、本データベースも新しい情報を取り込む作業を行った。アレルギーデータは、2005 年 7 月の時点で収集し、データベース間で重複しているエントリをまとめ、最終的に 1,286 個(アミノ酸配列数にして 1,019 本)のアレルギーデータを収集した。また、今回、エピトープ情報として、立体的(comformational)エピトープの情報を取り込む論文 17 報、未掲載の配列型(linear)エピトープ情報を追加する論文 27 報分のデータを ADFS に掲載することとし、何らかのエピトープ情報の付加されているアレルギー数は 74 となった。これは、我々が知る限り世界でも最大のエピトープデータベースである。なお、この中には、私共が spot assay 法を用いてエピトープ解析を行なった日本スギアレルギー Cry j 1 の linear epitope も掲載されている(発表論文 3)。

また、立体構造が分かっているアレルギーは 110 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ギーの情報は、ADFS の Keyword Search より知ることができるように検索機能を持たせている。

さらに、今回、アレルギー予測法の機能として、Hileman らの方法の改良法による FAO/WHO 法に加え、新たに、Stadler らの motif-based 法⁸⁾も導入した。一般にモチーフ検索はペアワイズ検索より検出感度や精度が高いことが知られているが、この原理に着目し、多くのアレルギーに共通なモチーフを抽出し、これにより相同性検索を行なうのが、Stadler らによる Motif-based 法である。既知のアレルギー

配列から MEME を用いてモチーフを抽出し、プロファイルを作成する。抽出されたプロファイルに適合しないアレルギーについてはシーケンスとして別に抽出する。そのプロファイルとシーケンスをもとに、未知アミノ酸配列に関してアレルギー性を予測する方法である。Stadler らの発表当時(2003 年)には、52 のモチーフと 135 のシーケンスが抽出されており、精度 95.5%でクエリ蛋白質がアレルギーであることを予測できるとされた。既知アレルギーが追加されているため、この数は変動し、ADFS では 2005 年 9 月で、1,019 のアレルギーアミノ酸配列より 67 のモチーフと 214 のシーケンスが得られている。

以上の ADFS の機能をまとめると以下になる。大規模な公的データベースである SwissProt、SDAP、IUIS、BIFS に掲載されているアレルギーの中から重複しているエントリをまとめ、1,286 種とした。これは、アミノ酸配列比較に基づくアレルギー性の予測に関し、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、既存のアレルギー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 種のアレルギー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ギー数は、74 種に達した。これは、アレルギーエピトープに関するデータベースとしては現時点(2006 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ギー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ギー性を評価する上で、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。

アレルギー予測に関しては、Hileman らの FAO/WHO 法を改良し、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。

また、より高いパフォーマンスのアレルゲン性予測手法として 2003 年に発表された Stadler らによる Motif-based 法⁸⁾による予測のインターフェイスの開発も行なった。今回のデータのアップデートと Motif-based 予測インターフェイスの確立により、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ったと思われる。今後とも、定期的なデータのアップデートが必要であると思われる。なお、現在、ADFS の about this site に英文版でデータベースの説明を行なっているが、About this site の構成について表 3 に示す。

(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) 感作前の動物および感作がほぼ成立している感作開始後 2.5 週の時期に、感作と同じ媒体を用いて OVA 1mg を経口投与して血清中に移行した OVA 濃度を測定した結果、感作前および感作後とも OVA/S vs. OVA/LL、SA/OVA/S vs. SA/OVA/LL、OVA/S vs. SA/OVA/S および OVA/LL vs. SA/OVA/LL の間に有意な差は認められなかった (図 6a および 6b)。なお、感作 3 週間後の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、OVA/S 0.33、SA/OVA/S 0.83 に対し OVA/LL 4.83、および SA/OVA/LL 6.17 であり、OVA/LL および SA/OVA/LL で高く、これら 2 群で感作が成立していることを確認した。さらに感作成立確認後、全ての群に生理食塩液を媒体として OVA 40 mg を大量経口投与して血清中の OVA 濃度を測定した結果、血清中に検出される OVA 量は、OVA/S や SA/OVA/S 群に対して OVA/LL および

SA/OVA/LL 群で低い個体が多かった (図 7a)。一方、腸管に残存する IgG1/IgA 抗体比 (百分率) は、Naive、OVA/S および SA/OVA/S 群に比べて OVA/LL および SA/OVA/LL 群に高い個体が認められた (図 7b)。

(実験 2) 感作前後の動物に抗原 1mg を経口投与して血清中に移行した抗原濃度を測定した結果、感作前および感作後とも OVA および PEP の間に差は認められなかった (図 8a および 8b)。なお、感作 3 週間後に惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、SA/OVA/LL 6.17、および SA/PEP/LL 2.00 であり、SA/OVA/LL で感作が成立していることを確認した。さらに感作成立確認後、両群に生理食塩液を媒体として抗原 40 mg を大量経口投与して血清中の抗原濃度を測定した結果、血清中に検出された抗原量は、SA/OVA/LL と SA/PEP/LL は同等であった (図 8c)。一方、腸管に残存する IgG1/IgA 抗体比 (百分率) は、SA/PEP/LL に対して SA/OVA/LL で高い傾向が認められた (図 8d)。

惹起時および非惹起感作動物から採取したパイエル板のリンパ球を培養し、IgA、IgG1 および サイトカインの産生を調べた結果、IgA および IgG1 の産生とも SA/OVA/LL および SA/PEP/LL の間に差は認められなかった (図 9a および 9b)。また、いずれの群においてもサイトカインは検出できなかった。非惹起感作動物から採取したパイエル板および脾臓細胞を *in vitro* で抗原刺激を行った時の IgA および IgG1 増加率 (SI) を調べた結果、パイエル板においては SA/OVA/LL および SA/PEP/LL とも刺激による増加は認められなかった (図 10a)。一方、脾臓細胞においては SA/OVA/LL で IgA および IgG1 産生とも増加したのに対して、SA/PEP/LL では増加は認められなかった (図 10b)。また、この反応において、SA/OVA/LL では SA/LL に比べて、IFN- γ および IL-12 の低下、IL-4 および IL-10 の増加傾向が認められた。SA/PEP/LL では、抗原添加によるサイトカインの上昇は認められなかった (表 3)。

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である。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、SA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抗体の産生を誘導し、惹起によるアナフィラキシー症状を呈する。本年は、本実験モデルの発症機序について検討する目的で、抗原蛋白質の腸管透過における媒体およびSAの作用を調べた。また、OVAと非食物アレルゲンとして知られているペプシンによる反応性を比較することによってさらに検討を加えた。

感作前後の動物において抗原の血中移行へ与える媒体の影響を検討したところ、生理食塩液とリノール酸とレシチン混合液での投与後の血清中 OVA 濃度に差は認められなかった。また、いずれの媒体においても SA の有無による差も認められなかった。従って、感作の成立においてリノール酸とレシチン混合液媒体は、抗原の吸収率を上げることにより感作を誘導しているわけではないことが明らかとなった。また、本モデルの開発に当たって我々は、SA による腸管粘膜透過性の亢進作用を期待して SA の併用を導入したが、少なくとも抗原投与 30 分後という抗原の吸収初期では SA の効果はないことも示された。

一方、アレルギーの発症によって感作の成立を確認した動物では、アレルギー状態にない動物に比べて、大量抗原投与時の抗原の血清中への移行が抑制される傾向が認められた。この時、Naive、OVA/S および SA/OVA/S 群に比べて OVA/LL および SA/OVA/LL 群に、腸管に残存する IgG1/IgA 抗体比(百分率)が高い個体が認められたことから、感作の成立した動物においては IgG1 が腸管へ収束し、アレルギー反応を惹起している可能性が考えられた。

食物アレルゲンの OVA と非アレルゲンの PEP の比較によって、さらに発症機序を検討した。抗原蛋白質を経口投与した後の血清中への抗体の移行は、OVA と PEP の間に差は認められなかったことから、両者の反応性の違いは蛋白質の種類による腸管の透過性の差ではないことが明らかとなった。また、大量抗原投与時の抗原の血清中への移行では PEP 感作群 SA/PEP/LL は、SA/OVA/LL と同様の動きを示したにもかかわらず、腸管の IgG1 の高い動物は認められないことから、腸

管に IgG1 が収束しない要因がアレルギー反応を惹起しないことに関与している可能性が考えられた。

惹起時および非惹起時の動物から、腸管での IgA 産生器官といわれるパイエル板の細胞を採取して培養し、上清中の IgA および IgG1 産生量を比較したが、OVA と PEP の間に差は認められなかった。また、非惹起時の動物から採取したパイエル板および脾臓細胞を *in vitro* で刺激した時の反応を比較したところ、パイエル板では刺激による反応は OVA にも PEP にも認められなかったが、脾臓細胞では OVA にのみに反応が認められた。OVA ではサイトカインの動向から Th2 誘導の情報が腸管から離れた組織まで伝達されていて、これが全身性のアレルギー反応を誘発していると考えられた。

以上の結果から、本モデルのアレルギー発症機序を解明することは食物アレルギーの発症機構の解明につながると考えられた。

(ii) 各種マウスにおける Ovomuroid-W/O emulsion 経口投与による影響

BALB/c マウスへの OVM-W/O emulsion の 9 週間連日経口投与により、それぞれの対照群に比べ血清中抗原特異的 IgG1 抗体価の上昇傾向が見られた (OVM-soybean oil では 4 匹/7 匹(titer=4948 ±12249)、OVM-coconut oil では 5 匹/7 匹(titer=10959 ±19347)) (表 5, 図 12)。しかし、いずれも個体差が大きく有意差が出るまでには至らなかった。これに対し OVM 単独投与群では全く変化が見られていない (0 匹/6 匹)(<50)。また、抗原特異的 IgE 抗体価は OVM-coconut oil 投与群で一匹のみ顕著に上昇したが、他のマウスでは大きな変化が認められなかった。W/W^v マウスでは、IgG1 抗体価の有意な上昇が見られ (OVM-soybean oil では 6 匹/7 匹(titer=18520 ±21124)、OVM-coconut oil では 7 匹/7 匹(titer=14295 ±15794))、IgE 抗体価も上昇した (表 4, 図 11)。これに対し OVM 単独投与群では全く変化が見られていない (0 匹/6 匹)(<50)。emulsion 感作群の抗体価を見ると、BALB/c マウスに比べ W/W^v マウス

で顕著に上昇しており、W/W^v マウスの経口感作による高感受性を確認出来た。脾臓細胞から産生されるサイトカイン濃度の測定においては、OVM-W/O emulsion を投与した BALB/c マウスで、Th2 型サイトカイン(IL-4、IL-5)の産生上昇が見られ、特に OVM-coconut oil 投与群で顕著だった(図 14-A,B)。また、Th1 型サイトカインのうち IL-2 には変化が認められなかったが、IFN- γ の濃度が OVM 単独投与群に比べ上昇していた(図 14-C)。一方、OVM 単独投与群では対照群と同様に大きな変化は見られなかった。また W/W^v マウスでは、emulsion 投与群で Th2 型サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10) の産生上昇が見られた(図 13-A,B)。IFN- γ の濃度もそれぞれの対照群に比べ上昇していた(図 13-C)。対して、OVM 単独投与群では対照群と同様に大きな変化が見られなかった。BALB/c マウス、及び W/W^v マウスの emulsion 投与群で Th1、特に Th2 型サイトカインの濃度上昇が見られたことから、油脂はアジュバント様作用を持つことが示唆された。次に、経口投与後に BALB/c マウスへ抗原の腹腔内惹起をしたところ、OVM-W/O emulsion 投与群で急激な体温低下が見られた。これに対し OVM 単独投与群では対照群と同様に大きな変化が見られず、ASA の誘導は起こらなかった。さらに抗原の腹腔内惹起をして 10 分後、全採血して血清中ヒスタミン濃度を測定したところ、個体差はあるが OVM-W/O emulsion 投与群で顕著な濃度上昇が見られ、ここでも ASA の誘導が確認された。W/W^v マウスでも同様に、emulsion 投与群で有意な体温低下が見られ、ASA の誘導が認められた。マウスの腸管、十二指腸から回腸までを切り出しパイエル板、及び IELs を分離精製して FCM により各臓器のリンパ球サブセット構成を調べたところ、BALB/c マウスの脾臓細胞では抗原投与群と対照群の間に大きな変化は認められなかった。W/W^v マウスでは、OVM-W/O emulsion 投与群で B 細胞の割合が減少し、T 細胞の増加が見られた。同様に W/W^v マウスの FCM 解析を行ったところ、OVM-coconut oil 投与群のパイエル板で IA^b+細胞の割合が上昇傾向にあった。さらに IELs では、対照群に比べ OVM-W/O emulsion 投与群で

TCR $\alpha\beta$ CD4+T 細胞の割合が減少した。これに対して腸管に特異的な CD8 $\alpha\alpha$ +T 細胞が上昇傾向を示し、抗原投与により T 細胞のサブポピュレーションに変化が起こることが分かった。

以上のことから、抗原-油脂 emulsion の経口投与により、抗原単独では成し得なかった感作の成立がおこること、W/W^v マウスに比べ経口感作が難しい BALB/c マウスにおいても、抗原-油脂 emulsion であれば感作が成立することが分かった。さらに、油脂はアジュバント様作用を持つことが示唆され、今回の実験では特に中鎖脂肪酸(炭素数 8-10 の飽和脂肪酸)を多く含む油脂(coconut oil)でその作用が強い傾向にあると思われた(BALB/c マウス)。

(3) 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 2005 年に国内で採取された 36 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+5 SD を超える吸光度を示さない)との結果が得られた。

なお、本実験で用いた ELISA 法は、患者血清と ELISA 固相抗原の間で起きる非特異的結合を避けるために 1M NaCl を加えた洗浄操作を加えている(発表論文 4)。

さらに、今年度は、ELISA に用いた Cry1Ab 抗原について、可溶性抗原として大腸菌に発現させる条件を詳細に検討したので、以下、この発現方法について記す。

IPTG を使用して組換えタンパクの発現誘導を行わない方法として、最近登場した Overnight Express Autoinduction System 1 (Novagen) を試してみた。ベクターには、組換えタンパクにヒスチジンタグを融合させる pET-16b と pET-23b (いずれも Novagen)、GST タグを連結させる pGEX-6P-1 (アマシャムバイオサイエン

ス)と pET-41a (Novagen) を使用して比較を行った。培養温度を変えてみたところ 20°C で二晩培養すると、pGEX-6P-1 と pET-41a を用いたときに生産される組換えタンパクのかなりの部分が水溶性になった。これは、低温で大腸菌を培養してゆっくりと組換えタンパクを生産させて、しかも水溶性の高い GST をタグとして CryIA b に付加させることで水溶性の組換えタンパクが発現できた。さらに、シャペロンを大量発現する大腸菌 pTf16/BL21 を宿主として用い、ベクターとして pCold 1 を選択した場合に水溶性 Cry1Ab の回収が良好となった。ELISA の抗原として、ベクター pCold 1, 大腸菌 pTf16/BL21 で作製した Cry1Ab 抗原を用いることで、良好な結果が得られた。なお、新たに安全性の確認された GM とうもろこしに組み込まれている害虫毒素 Cry3Bb1, Cry1F についても、それぞれの cDNA のクローニングを MON863, 1507 ゲノム DNA から行ない、大腸菌でのタンパク質発現のための準備を進めている。

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、立体構造も加味したエピトープ部位の解析を行い、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) の更新を行なった。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74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。また、アレルゲン予測手法として、FAO/WHO法に加え、Motif-base手法も導入した。

(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。また、油脂との

emulsionでも感作能のあがることが、示された。

(3)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36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法及びウェ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/idenshi/codex/codex.html>
- 2) <http://fermi.utmb.edu/SDAP/>
- 3) <http://www.expasy.org/cgi-bin/lists?allergen.txt>
- 4) <http://www.allergen.org/>
- 5) <http://www.iit.edu/~sgendel/fa.htm>
- 6) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. (2001) http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/allergy_gm.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-

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) 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 TCRγδ-T cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 584-590, 2005
- 3) Takagi K., Teshima R., Sawada J., Determination of Human Linear IgE Epitopes of Japanese Cedar Allergen Cry j 1: *Biol. Pharm. Bull.* 28(8) 1496-1499 (2005)
- 4) Takagi K., Teshima R., Nakajima O., Okunuki H., Sawada J., Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in

genetically modified foods: Regul. Toxicol. Pharmacol.44, 182-188 (2006)

5). Nakamura R., Teshima R. Takagi K. and Sawada, J. Development of allergen database for food safety (ADFS): as integrated database to search allergens and predict allergenicity. Bull. Natl. Inst. Health Sci. 123, 32-36 (2005)

6). 手島玲子、長尾拓：バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する基本的考え方。応用薬理69, 43-46 (2005)

7) 手島玲子、澤田純一：遺伝子組換え作物の食品としての安全性、遺伝, 60, 41-45 (2006)

8) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H., Maitani T. and Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W^v Mice Allergol. International 55: 43-48 (2006)

2. 学会発表

- 1) 児矢野聡、高木加代子、手島玲子、澤田純一：そば 16-kDa アレルゲンの組換えタンパク質の調製及びアレルギー患者血清との反応性について、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 2) 朝川直行、手島玲子、美宅成樹：物理化学的性質に注目したアレルゲンエピトープ候補の抽出法、第 5 回日本蛋白質科学会年会(2005.6)
- 3). 手島玲子、奥貫晴代、中村亮介、穠山浩、米谷民雄、澤田純一:W/W^v マウスの卵白アルブミン (OVA) 経口投与による ASA 誘導ならびに PAF の作用について、第 6 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム (2005.7)
- 4). 新藤智子、金澤由基子、古谷真美、田面喜之、小島幸一、手島玲子：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(4)、第 12 回免疫毒性学会 (2005.9)
- 5). 中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：食物アレルゲンの予測とバイオインフォマティクスーアレルゲンデータベースの構築と利用ー、第 12 回免疫毒性学会 (2005.9)
- 6). 手島玲子、長尾拓：バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する基本的考え方、

第 8 回食品薬学シンポジウム (2005.11)

7) 手島玲子：遺伝子組換え食品の活用とその問題点ーこれからの展望ー、第 9 回日本病態栄養学会年次学術集会(2006.1)

8) 中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：アレルゲンデータベース ADFS の構築、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)

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	※1
		CSL Allergen Database	
アレルゲンタンパク質	663	PROTALL	※2
		Allermatch	
非アレルゲンタンパク質	539	A. Zorzet, et al. <i>In Sillico 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

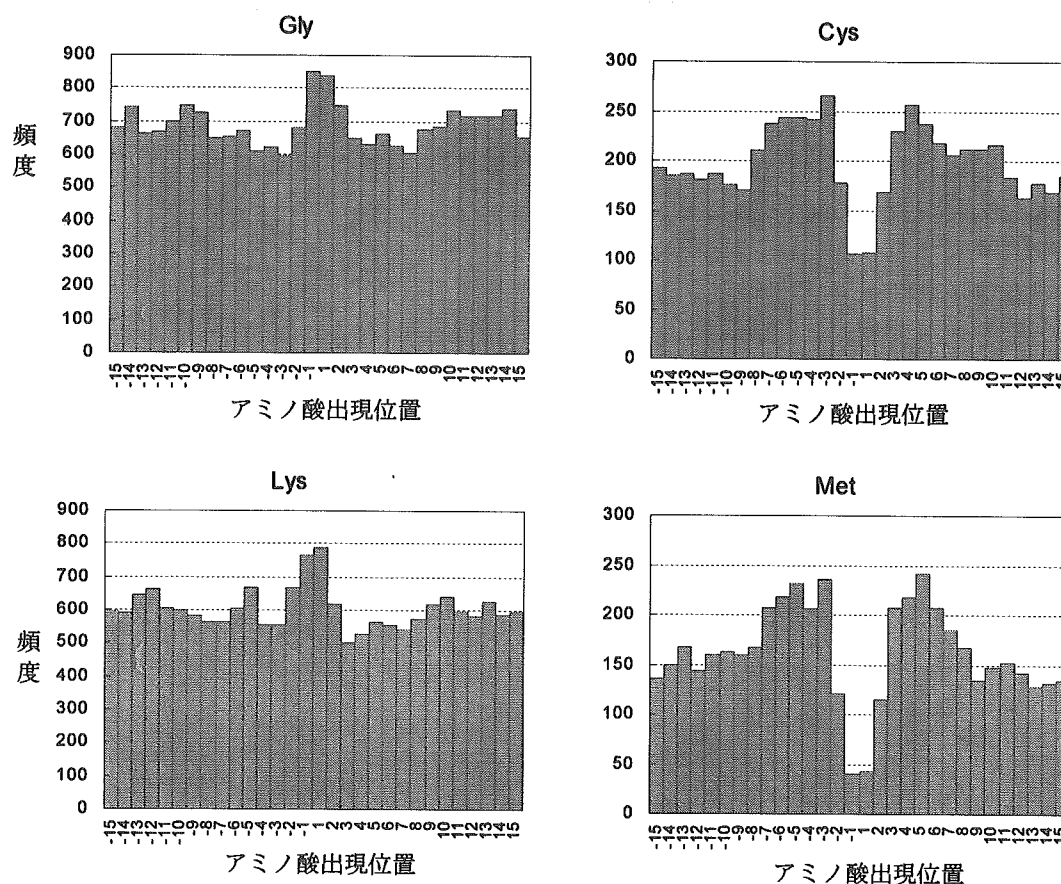
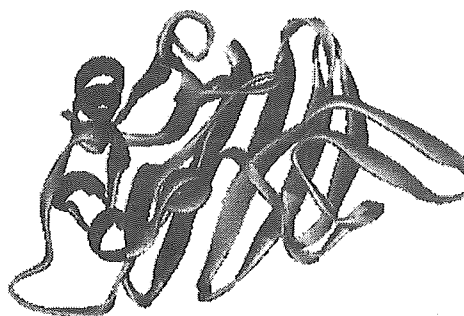


図 1. エピトープ候補付近の各アミノ酸の分布

P81295 al_Jun_a_3 [NoSignal] LENGTH: 199

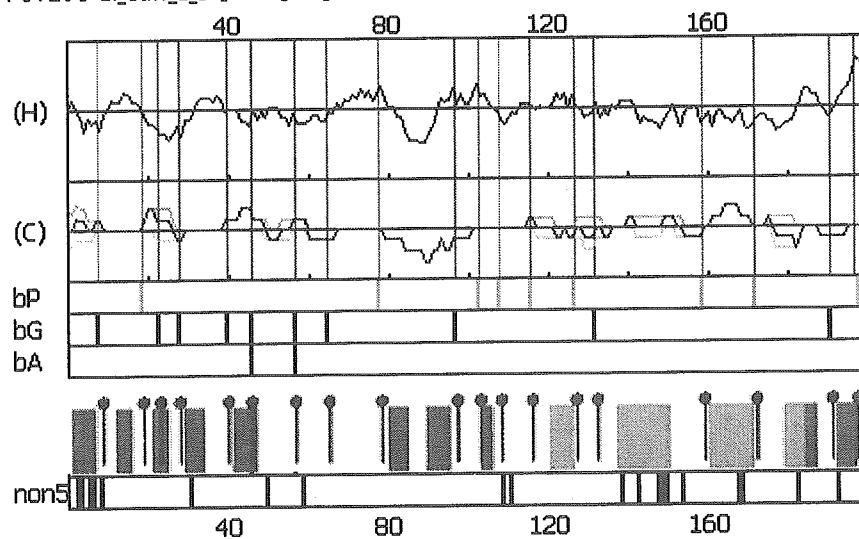


図 2. エピトープが分かっているアレルゲンの物性分布のプロット

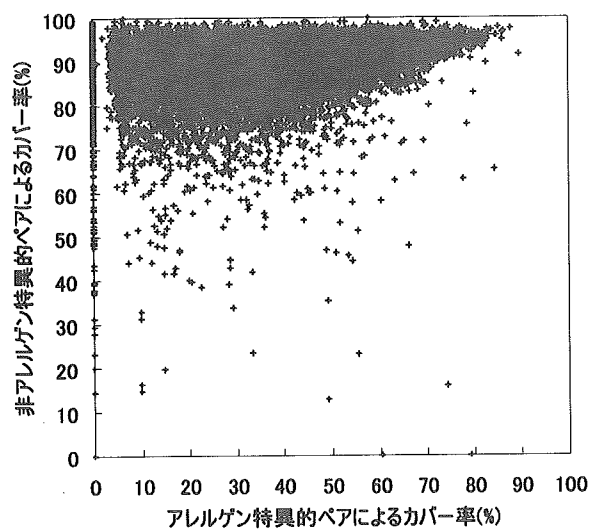


図 3. 排他的配列断片のカバー率による解析。

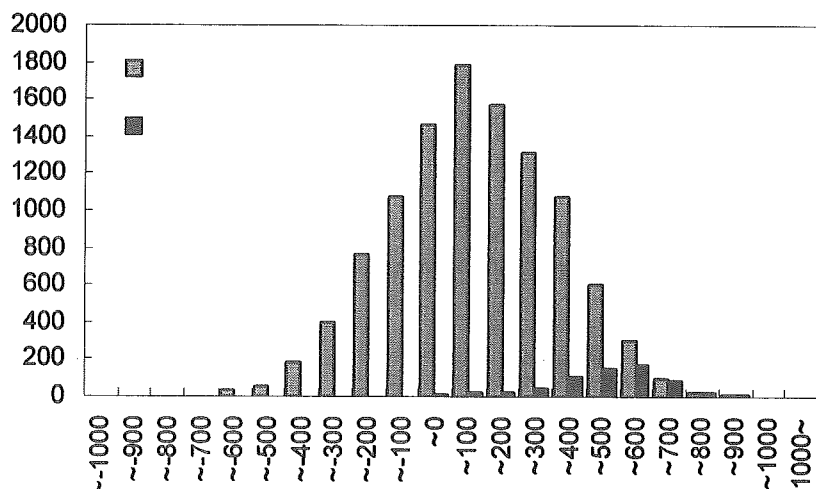
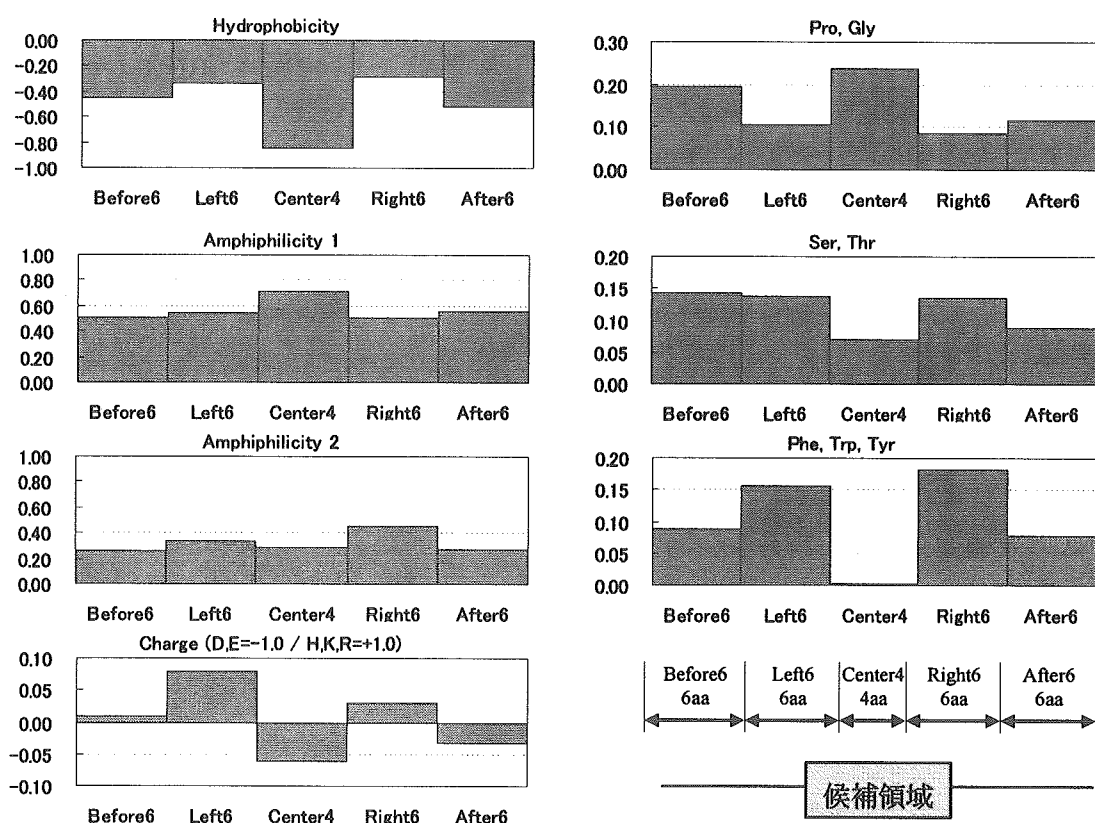


図4. アミノ酸のプロペンシティに基づくエпитープ候補のスコア。このデータセットの中にはまだエピトープでない配列が多く含まれている。



※Hydrophobicity: Kyte and Doolittle (1982)
 Amphiphilicity: Mitaku, et al. (2002)

図5. 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。

表3 ADFS(Allergen database for food safety) の登録内容を示すabout this siteの説明項目

-
- 1) The Purpose of This Site
 - 2) Who Are We
 - 3) Privacy Policy
 - 4) Data Collection
 - 4-1) Criteria for Allergen Addition to ADFS
 - 4-2) Epitope
 - 5) Allergen Data
 - 5-1) Allergen Names
 - 5-2) Categories
 - 5-3) Sequences
 - 5-4) Structure Informations
 - 5-5) Domain Informations
 - 5-6) Epitope Informations
 - 5-7) To search related allergens_
 - 6) Search tools
 - 6-1) Name Search
 - 6-2) Category Search
 - 6-3) Keyword Search
 - 6-4) Sequence Search (Protein Search)
 - 6-5) Sequence Search (Epitope Search)
 - 7) Allergenicity Prediction
 - 7-1) FAO/WHO method
 - 7-2) Motif-based method
 - 8) Acknowledgement
-

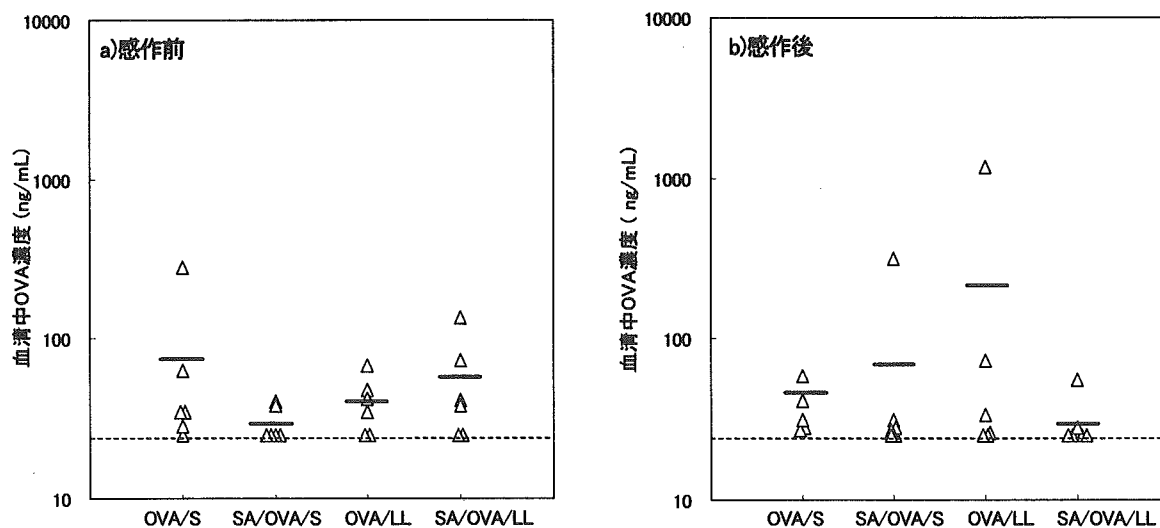


図6 経口投与30分後における血清中OVA血清中濃度
破線は検出限界濃度

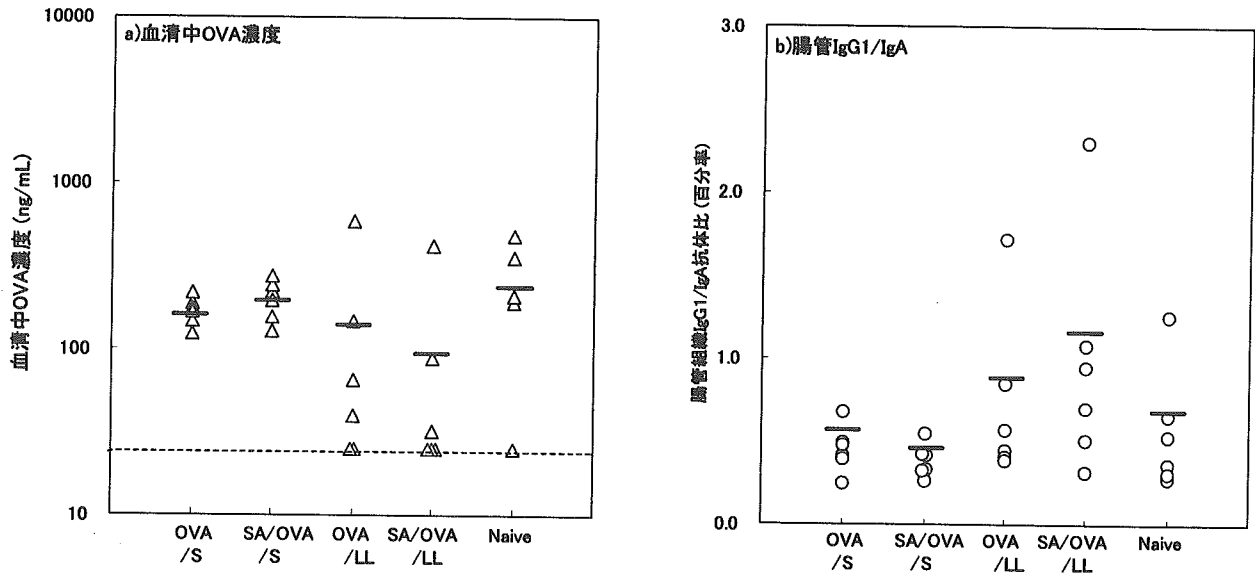


図7 感作後の動物における経口投与 30 分後の血清中 OVA 濃度および腸管組織の IgG1/IgA 比

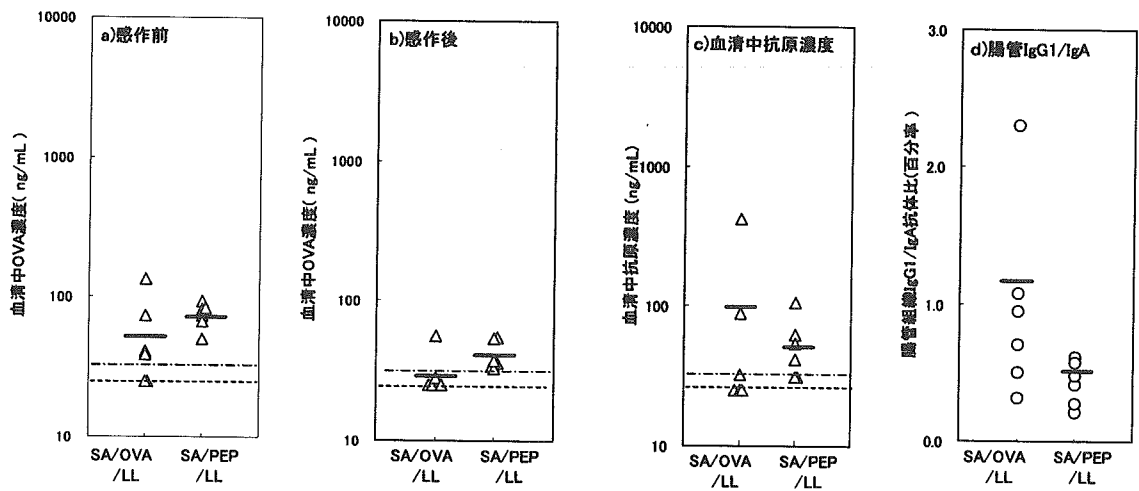


図8 腸管吸収における OVA とペプシンの比較

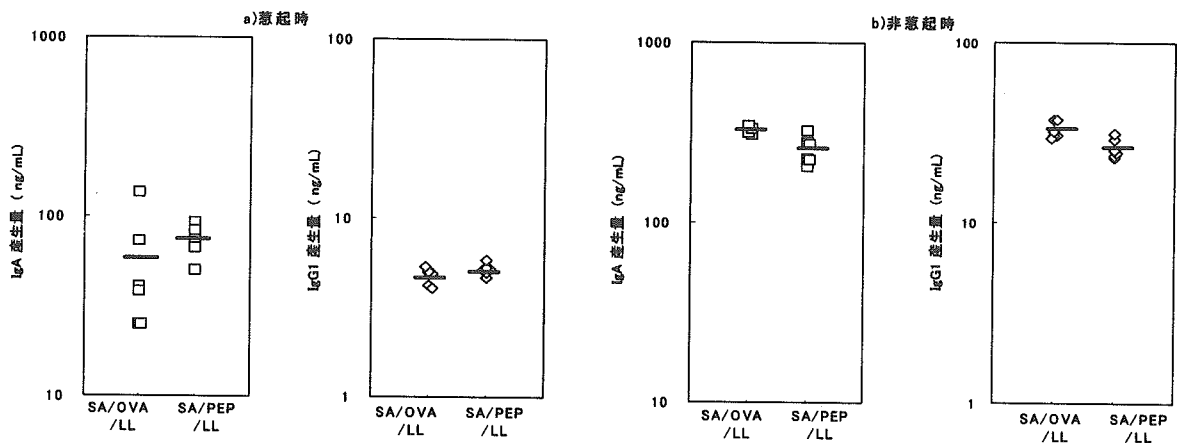


図9 パイエル板細胞培養時の抗体産生における OVA とペプシンの比較

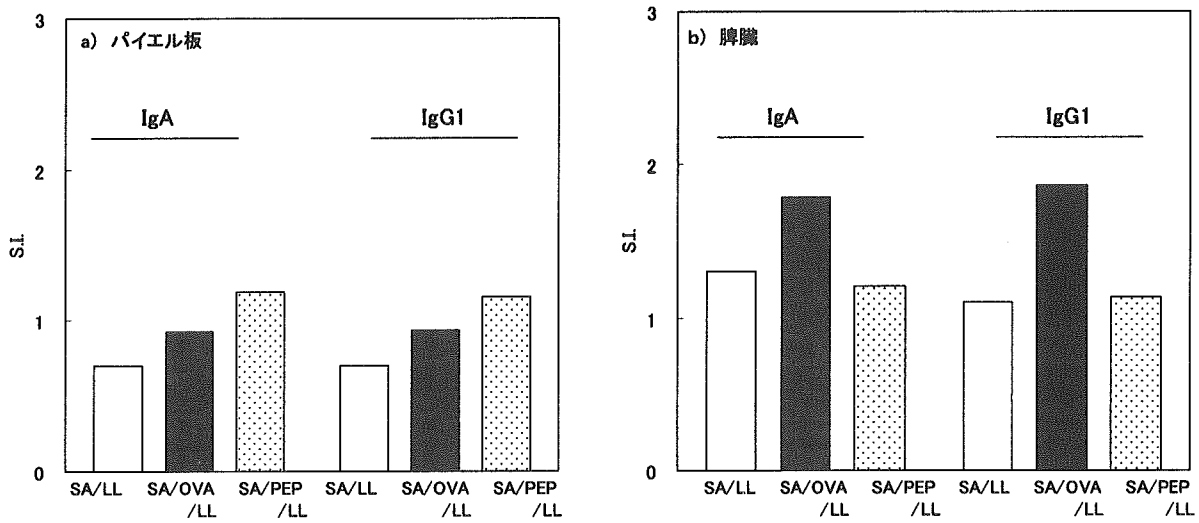


図10 パイエル板および脾臓細胞培養の in vitro 抗原刺激時抗体産生における OVA とペプシンの比較

表 3 培養上清中のサイトカイン濃度

感作投与群	cell のみ				antigen 添加				
	IFN- γ	IL-4	IL-10	IL-12	IFN- γ	IL-4	IL-10	IL-12	
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	
SA/LL	mean	< 10	< 2	3	20	115	1	5	54
	\pm S.D.			\pm 1	\pm 9	\pm 109		\pm 1	\pm 17
SA/OVA/LL	mean	< 10	2	3	15	63	11	24	36
	\pm S.D.			\pm 1	\pm 2	\pm 56	\pm 6	\pm 20	\pm 4
SA/PEP/LL	mean	< 10	9	< 2	12	< 10	5	4	21
	\pm S.D.				\pm 5		\pm 3	\pm 1	\pm 6

表 4 OVM-specific antibody titer of W/W^v mice

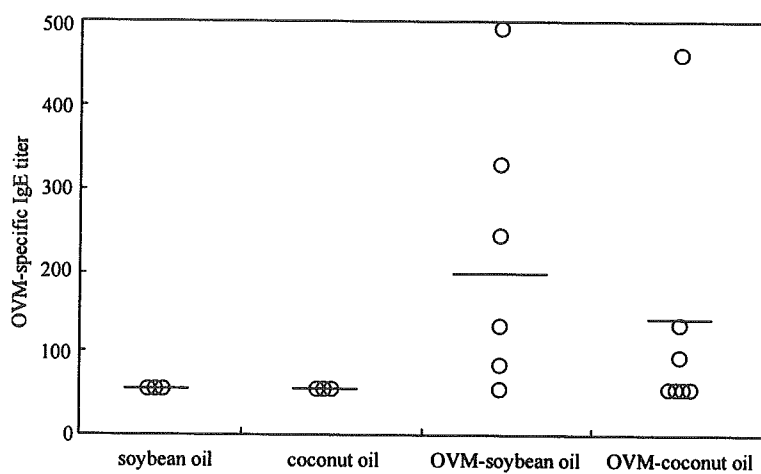
OVA-specific antibody	ELISA titer			
	soybean oil	coconut oil	OVM-soybean oil	OVM-coconut oil
IgG1	<50	<50	18520±21124 ^{a)} *	14295±15794*
IgE	<50	<50	192±172	131±165

a) Mean ± SD, N=7

* Significant difference from the control at p< 0.05

☒ 11 W/W^v mice

A. IgE



B. IgG1

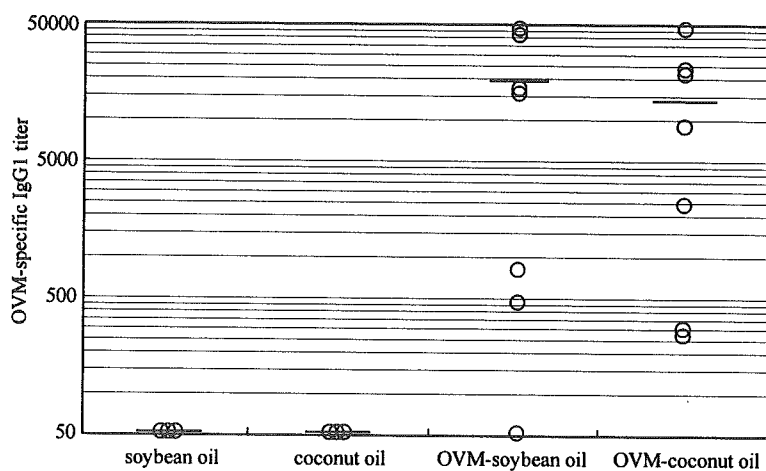


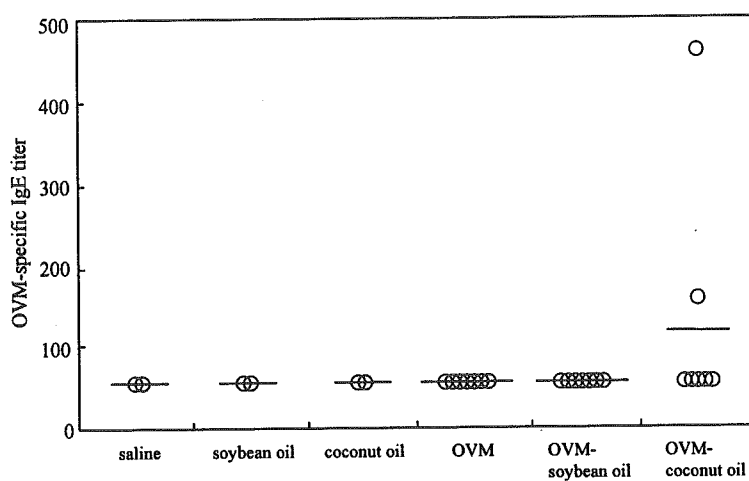
表 5 OVM-specific antibody titer of BALB/c mice

OVA-specific antibody	ELISA titer					
	saline	soybean oil	coconut oil	OVM	OVM-soybean oil	OVM-coconut oil
IgG1	<50	<50	<50	<50	4948±12249	10959±19347
IgE	<50	<50	<50	<50	<50	124±157

a) Mean ± SD, N=7

图 12 BALB/c mice

A. IgE



B. IgG1

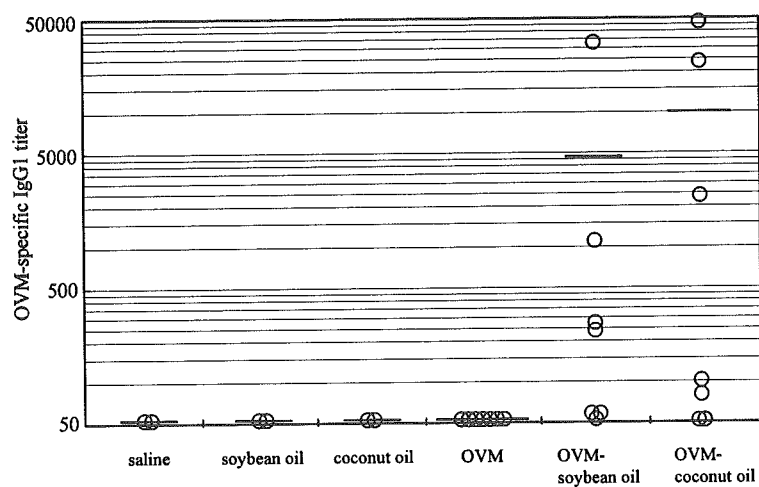
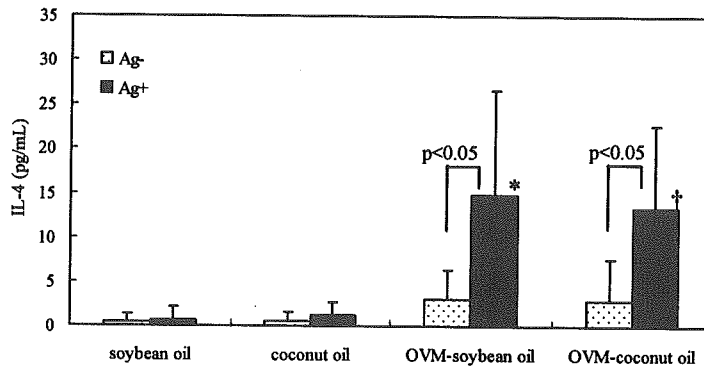
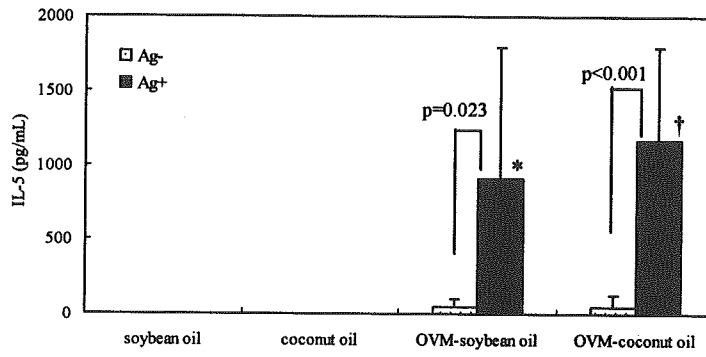


図 13 W/W^v mice における脾臓細胞培養上清中サイトカイン濃度

A. IL-4



B. IL-5



*Significant difference from the soybean oil-treated group at $p < 0.05$

†Significant difference from the coconut oil-treated group at $p < 0.01$

C. IFN- γ

