

ていたが、non-GM (2year)と同程度の発現量であった。したがって、成長ホルモン遺伝子導入に伴い、これらのアレルゲン発現量は増加しないか、増加量は自然に起こりうる範囲内であると考えられる。

以上より、成長ホルモン遺伝子導入によりアレルゲンは量的に顕著な増加を示さなかった。遺伝子組換えにより、アレルゲンが翻訳後修飾などの変化を受けると、アレルゲン性に影響を与える可能性がある。そこで次に、遺伝子組換えによるparvalbuminの質的变化を確認した。2次元展開したアマゴ抽出サンプルをCy5 (総タンパク質) およびECL (mouse anti-frog parvalbumin抗体) で2重染色した結果、non-GM、GMアマゴ共に分子量約12kD、pI4.5-5.1付近に、2つのスポットが検出された(図5)。non-GM (2year)およびGM (1year)では図5aと同様に、non-GM (1year)に比べparvalbuminの発現量が減少していた。遺伝子組換え、非組換え魚間でparvalbuminのpIに大きな変化が見られなかったことから、成長ホルモン遺伝子導入によるparvalbuminの質的变化はほとんど無いものと考えられた。現在、parvalbumin以外のアレルゲンの質的变化についても検討の準備を進めている。

(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) 1回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は陽性対照としたOVA群でも0.67と低く、十分に感作が成立していなかった。2回目の惹起時にはOVA群のスコア平均は2.67と上昇し、モデル系自体の感作が成立していることを認めた。AM (non-GM) 群のスコア平均3.17に対してGAM(GM)群のスコア平均は0.83であり、GAM群のアナフィラキシー症状はAM群より低かった(図6)。血清中の抗原特異的IgG1抗体をイムノプロットングで調べたところ、AM群もGAM群も各群6匹全てのマウスに抗原特異的IgG1抗体が検出された(図7)。

(実験2) 全身性免疫の指標とした脾臓の細胞と同様に、抗原の経口投与16時間後のパイエル板のCD11c<sup>+</sup> およびCD4<sup>+</sup>細胞の割合はいずれの群間にも差は認められなかった

(図8)。OVA投与群(OVA/S、SA/OVA/S、OVA/LL およびSA/OVA/LL) のパイエル板細胞の増殖活性には、媒体の違いによる差、SA併用の有無による差は認められなかった。

しかし、SA/OVA/LLの増殖活性はSA/PEP/LLに比べて有意に高く、明らかな差が認められた(図9a)。全身性免疫の指標とした脾臓の細胞ではいずれの群においても増殖活性は同程度であった(図9b)。パイエル板細胞の培養上清中のIFN- $\gamma$ とIL-4の変動にTh2優位を示す変化は認められなかった(図9c,d)。また、OVA投与群のIFN- $\gamma$ 濃度に媒体の違いによる差、SA併用の有無による差は認められなかったが、SA/OVA/LLのIFN- $\gamma$ 濃度はSA/PEP/LLに比べて高く、細胞増殖活性と同様の傾向を示した(図9c)。無処置動物のパイエル板細胞においても、in vitroのOVAの添加による増殖活性はPEPの添加に比べて有意に高く、IFN- $\gamma$ 濃度も細胞増殖活性と同様の傾向を示した。

以上、我々の開発した動物モデルを用いて、遺伝子組換えおよび非組換えアマゴのアレルギー性を比較した。PBS抽出液中のアマゴ蛋白質は凍結および解凍によって沈殿したため、水酸化ナトリウム溶液を添加して懸濁した後、LLと混合した。溶媒対照、陰性対照PEPおよび陽性対照OVA群にも同量の水酸化ナトリウム溶液を加えることによって、各群の条件を統一した。2回目の惹起時には、PEPおよび溶媒対照群に対してOVA群のアナフィラキシー症状のスコア平均の上昇が認められ、この動物モデルで食物アレルギーが成立していることを確認した。GAM群のスコア平均はAM群より低く、PEPおよび溶媒対照群と同等であったが、これは蛋白質自体の溶解性が影響したものと考えられた。GAM試料はAM試料に比べて解凍時の不溶物が多く、水酸化ナトリウム溶液の添加時の懸濁度も強かった。惹起は大量の抗原を投与した後30分間の症状を観察するため、速やかに抗原が吸収される必要がある。GAM試料は不溶性部分が多かったため、動物への吸収が不十分であったと考えられた。動物モデルにおいてアレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体は、GAM群の全例に検出されていたことから、GAM群も感作は成立していたと考えられた。血清中の抗原特異的IgG1抗体は、検出の頻度および抗体濃度にGAMとAM群の間に差は認められなかったことから、遺伝子組換えおよび非組換えアマゴのアレルギー性は同等であると考えられた。

我々の開発した動物モデルの成立には、感作時にLLを媒体とすること、SAを併用すること、

アレルギー性の蛋白質を用いることの3つのファクターが揃うことが必要である。これまでに、経口投与した抗原が腸管を通じて血中へ移行する際は、媒体の違いによる差、SA併用の有無による差および抗原のアレルギー性の違いによる差はないことを確認した。そこで、腸管での抗原の取り込みの主要なルートであり、経口投与した抗原が最初に認識されると考えられるパイエル板細胞に与える3つのファクターの影響を調べた。動物に各条件で抗原を経口投与した16時間後のパイエル板では、抗原提示細胞の増加や反応性のT細胞数の変化は認められなかった。次いで、*in vitro*で抗原の非存在下および存在下で培養したところ、OVA投与群 (OVA/S、SA/OVA/S、OVA/LLおよびSA/OVA/LL) から採取したパイエル板細胞で、増殖活性およびIFN- $\gamma$ の放出が上昇した。一方、PEP投与群 (SA/PEP/LL) から採取したパイエル板細胞は、*in vitro*でPEPを添加しても増殖活性およびIFN- $\gamma$ の放出は上昇しなかった。従って、本動物モデルにおいてアレルギー性蛋白質であるOVAでは感作が成立し、非アレルギー性蛋白質であるPEPでは感作が成立しないという現象は、パイエル板細胞による抗原認識の差が一つの原因であると考えられた。さらに、無処置の動物のパイエル板の反応性を確認したところ、経口感作した動物から採取したパイエル板と同様の反応性を示した。従って、パイエル板細胞は感作投与の有無に関わらず、蛋白質のアレルギー性を認識する可能性が考えられた。また、本動物モデルの感作成立の初期過程において、パイエル板が関与していることが確認された。

### (3) 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

方法の項目で示した各ユニーク断片の中心の周り前後 10 残基のアミノ酸分布を見たところ、いくつかのアミノ酸について図 10A に示すような特徴的な分布が見られた。図 10B は、各アミノ酸の強度を示したヒストグラムである。正の値を持ったアミノ酸は図 10A の形、負の値を持ったアミノ酸は上下反転した分布を持っており、ゼロのアミノ酸はこのような分布を持たないものである。実際はこの分布が一定の分布が重なっているが、特徴的な部分だけを抽出したのが図 10 である。図 10A の分布を示すアミノ酸は、A、G、D、E、

K である。また、それと反転した分布のアミノ酸は、F、C、M、W、Y、P、H であり、このような特徴を持たないアミノ酸は、I、V、L、T、S である。それぞれアミノ酸としても特徴的であるが、特に反転した分布で芳香族の大きな側鎖のすべてがここに分類されているのが注目すべきである。これらのアミノ酸の分布についての意味はまだ不明であるが、図 10 を一種のインデックス (アレルゲンユニーク断片インデックス: AUF インデックス) として、各アミノ酸配列のプロットを作ることができる (ここではユニーク断片プロットと呼ぶことにする)。図 11 はユニーク断片プロットの一例である。プロットのピークは、図 10 の分布に合致するアミノ酸配列を示しており、谷は図 10 の分布の反転した形をしている配列を示している。図 11 を観察して分かることは、二次構造の端がよくプロットのピークとかなり良く合致しているということである。

以上のようなユニーク断片の特徴はアレルゲンのエピトープが持つべき特徴とよくあっているように見える。第 1 に、ユニーク断片として得られた領域は、それを抽出するプロセスから見て立体構造を考慮していないので、必ずしもタンパク質の表面であるという必然性はない。しかし、実際に得られたアミノ酸配列の断片は二次構造の端付近に見られるので、これらはタンパク質の表面に当たっている。ただし、ユニーク断片のピークはほぼ 10 数残基に 1 つずつ見られるので、これらのすべてがアレルゲンのエピトープに関係しているとは考えにくい。第 2 に、アレルゲンはヒトの免疫システムで認識を受けていて、ヒトのタンパク質には見られない断片 (アレルゲンでないタンパク質には見られない断片) が、免疫システムによって外来のものと認識されることである。ここで抽出したのもユニークな断片であり、意味合いとしては似た断片である必要はなく、2 つの領域で一つの認識部位を形成している場合について、ちゃんと対応できるようにする必要がある。

以上のアレルゲン予測システム開発の考え方をまとめて流れ図として示したのが、図 3 である。この流れ図では、左右 2 つの流れがある。左に流れは、アレルゲンに特徴的なユニークセグメントを抽出し、AUF インデックスを定義する。右の流れでは、左の流れで作

られたインデックスを用いて、任意のアミノ酸配列に対して AUF インデックスプロットを作成する。そこで得られるピーク付近にアレルゲンエピトープに関係しているということが期待され、そのアルゴリズムを開発する。今までの研究によって、アレルゲンと非アレルゲンのデータセットを準備し、それに含まれるすべてのアミノ酸配列を比較した。そこからユニークセグメントを抽出し、その付近の断片に見られる核アミノ酸の分布を調べ、中心がピークになるようなユニバーサル分布を得ることができた。そして、そのユニバーサル分布に対して強度をかけた分布となるので、その強度を各アミノ酸のインデックス (AUF インデックス) として定義できた。さらに、AUF インデックスのプロットを抽出することで、それとアレルゲンエピトープとの相関を調べる準備が整ったというのが現在の段階である。

アレルゲンユニーク断片インデックス (AUF インデックス) のプロットのピークがどのような特徴を持っているかということについては、そのようなピークは二次構造の端に近いところに存在していることが確認された。さらに詳細に解析してみると、 $\alpha$ ヘリックスではその端から少し内側 (二次構造側) に入ったところにピークがあることが多い。また、 $\beta$ シートの場合は、二次構造の外側に多く見られる。そういう二次構造による特徴はあるが、アレルゲンのエピトープは二次構造に関する特異性はない。一つの考え方として、あるセグメントがアレルゲンのエピトープになるには、さらに広い領域で高分子としての柔軟性が必要なのではないかという知見が得られており、今後、ユニーク断片を軸にさらに詳細に検討していく予定である。

(ii) アレルゲンデータベース (ADFS) の構築について

ADFS (<http://allergen.nih.go.jp/> ADFS/) ではアレルゲンに関するデータは 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。アレルゲンデータは、2006

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 1,366 個 (アミノ酸配列数にして 1,053 本) のアレルゲンデータを収集した。また、前回のエピトープ情報としての立体的 (conformational) エピトープの情報を取り込む論文 17 報、未収載の配列型 (linear) エピトープ情報を追加する論文 27 報分に加え、今回 7 報分のエピトープデータを ADFS に収録することとし、何らかのエピトープ情報の付加されているアレルゲン数は 82 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ゲン Cry j 1 の linear epitope も掲載されている。

また、立体構造が分かっているアレルゲンは 139 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よう検索機能を持たせている。

前回、アレルゲン性予測法の機能として、Hileman らの方法の改変法による FAO/WHO 法に加え、Stadler らの motif-based 法<sup>8)</sup>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、多くのアレルゲン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、ADFS では 2006 年 9 月で、1,053 のアレルゲンアミノ酸配列より 71 のモチーフと 250 のシーケンスが得られている。

以上の ADFS の機能を更新部を中心にまとめると以下ようになる。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ゲンの中から重複しているエントリをまとめ、1,366 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。また、今回、前回の32種に加え8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数は、82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(2007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。また、今回、6残基以上の連続一致を示す配列を検索するword matchの機能も新たに追加した。

さらに、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らによる方法に基づいて構築したMotif-based法<sup>8)</sup>に用いるデータのアップデートも行った。今回のアレルゲン並びにエピトープ情報の更新を行ったことで、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位置づけられると思われる。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っている。平成18年度にADFSに新たに導入したエピトープ情報を表2に示す。

#### D. 結論

- (1) 成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごを用いたアレルゲン性試験  
遺伝子組換え、非組換えアマゴの抽出タン

パク質と魚アレルギー患者血清との反応性には、顕著な変化はみられなかった。広く魚のアレルゲンとして知られるparvalbuminは、遺伝子組換えにより量的・質的に変化しないと考えられた。2次元電気泳動を用いたアレルゲノーム解析により、アマゴのアレルゲンとして、parvalbumin、triose-phosphate dehydrogenase (TPI)、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)が同定された。患者血清と強く反応するアマゴ中のアレルゲンは、41kDタンパク質および140kDタンパク質であると考えられた。

#### (2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

BALB/cマウスを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。本動物モデルは組換え蛋白質のアレルギー惹起性の変化の有無を調べるために有効であることが、GMあまご、nonGMあまごを用いた研究から示された。また、消化管を主要な反応の場とする本動物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もつながると考えられた。

#### (3) 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—既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスを用いたアレルゲンエピトープ予測法の検討を開始した。

(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82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であるFAO/WHO法とMotif-base法の整備を行った。

#### E. 参考文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/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/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-

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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)  
 2) 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<sup>v</sup> Mice *Allergol. International* 55: 43-48 (2006)  
 3) Nakajima O., Teshima R., Takagi K., Okunuki H., Sawada J., ELISA method for monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified corn. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47, 90-95 (2007)  
 4) Koyano S., Takagi K., Teshima R., Sawada J., Molecular cloning of cDNA, recombinant protein expression and characterization of a buckwheat 16-kDa major allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 140, 73-81 (2006)

### 2. 学会発表

- 1) 朝川直行、手島玲子、美宅成樹：アレルゲンタンパク質の頻出する配列領域の特徴、第7回日本蛋白質科学会年会(2007.5)  
 2) 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(5)、第13回免疫毒性学会(2006.9)  
 3) 中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：改訂版アレルゲンデータベース ADFS(Allergen Database for Food Safety)について、日本薬学会第127年会(2007..3)  
 4) 中村里香、手島玲子、佐藤里絵、澤田純一、名古屋博之、遺伝子組換えアマゴの安全性研

- 究—アレルゲン性について、日本薬学会第127年会(2007.3)  
 5) 中島治、手島玲子、高木加代子、奥貫晴代、澤田純一、組換え食品中の Cry1Ab と食物アレルギー患者血清との反応性評価の研究、日本薬学会第127年会(2007.3)  
 6) 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、ソバアレルゲン BWp16 の解析、日本薬学会第127年会(2007.3)  
 7) 手島玲子、奥貫晴代、中村亮介、澤田純一、オボムコイド(OVM)のマウス経口感作への油脂の影響について、日本薬学会第127年会(2007.3)  
 8) 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、ソバ主要アレルゲン BWp16 の解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム(2006.12)  
 9) 手島玲子 児矢野聡 中村里香 中村亮介 佐藤里絵 高木加代子 澤田純一、そば 16kDa アレルゲンの組換えタンパク質の調製と免疫学的特性の検討、第56回日本アレルギー学会秋季学術大会(2006.11)

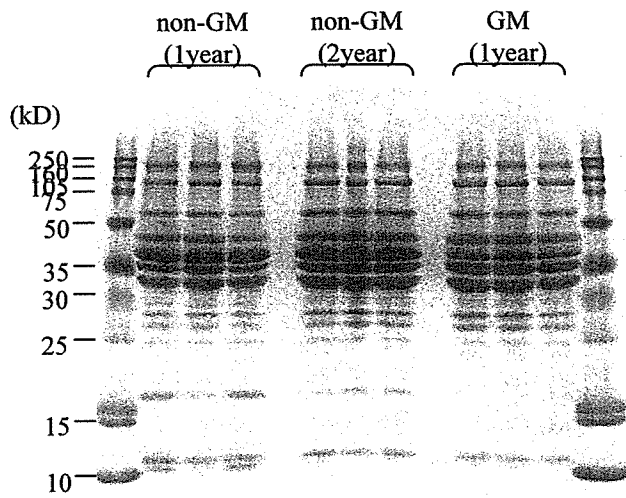


図1 GM, non-GMアマゴ抽出物のCBB染色パターン

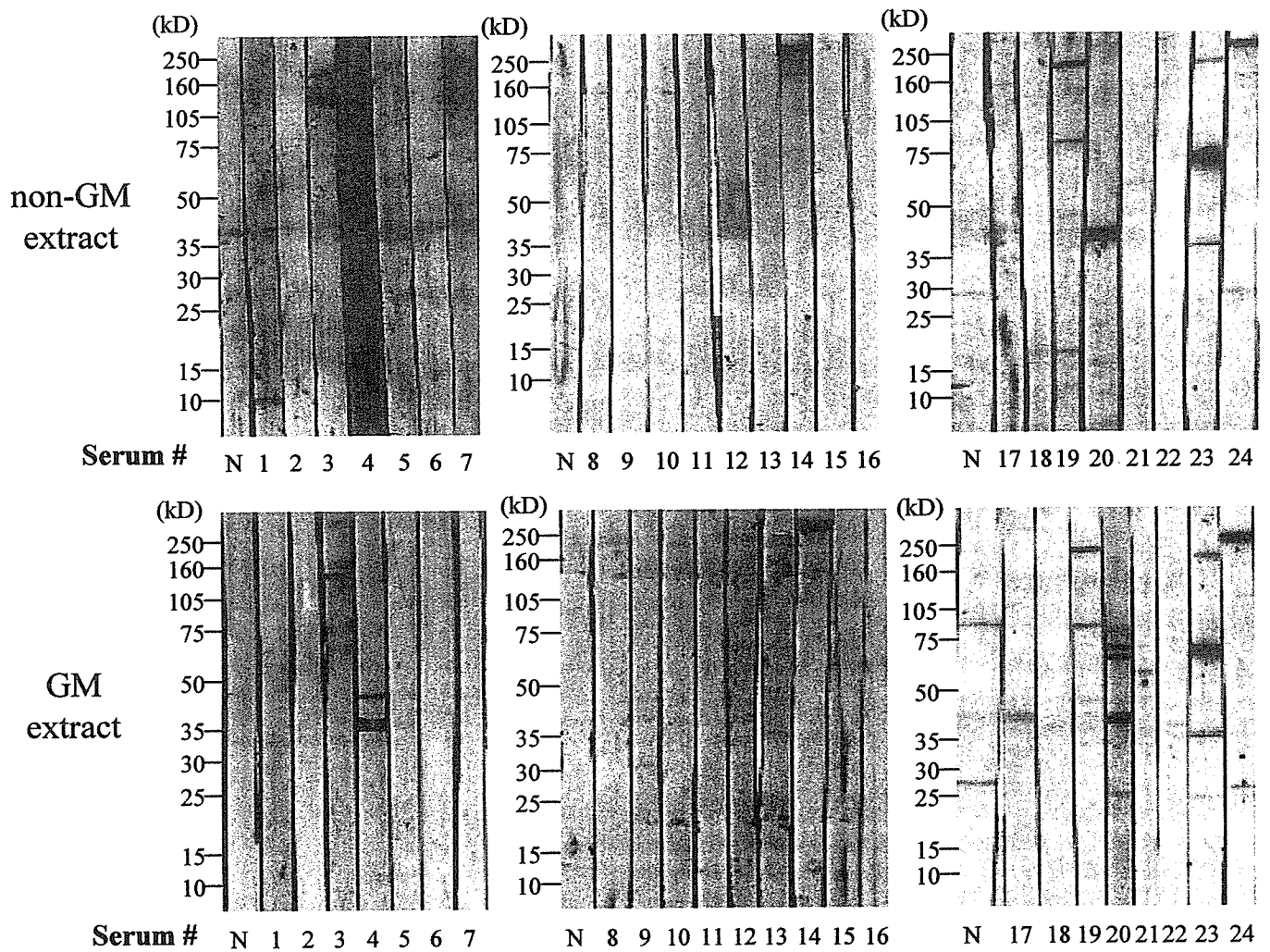


図2 GM, non-GMアマゴ抽出物と魚アレルギー患者血清との反応性の比較

表1 実験に用いた魚アレルギー患者血清情報

serum #	Major diagnosis	fish specific IgE score	Total IgE	IgG	Eosinophil	Age Sex	Specific IgE score of major allergen
1	food allergy, atopic dermatitis	salmon 0.48	141	708	87.6	0 F	milk 1.42/egg white 10.9/yolk 6.51/peanut 0.72/soybean 0.47/wheat 4.14/mite(1)/mite(2)/housedust <0.34(1)/shrimp, crab <0.34/squid, octopus <0.34
2	atopic dermatitis, food allergy	salmon <0.34	205	431	1069	0 M	milk 0.73/egg white 6.46/peanuts <0.34/soybean 1.15/wheat 4.8/rice <0.34/yolk 1.44/gelatin <0.34/ovomucoid <0.34/Dermatophagoides farinae, housedust <0.34(1)
3	food allergy	salmon (4)	14230	ND	WBC 3930 (Eos.30%)	4 F	house dust mite (6)/cat (6)/egg white (2)/wheat (4)/rice (4)/milk (2)/buckwheat (4)
4	food allergy, atopic dermatitis (serious)	mackerel >100(6)/sardine 63.2(5)/flatfish 51.7(5)/salmon 7.61(3)	9325	ND	WBC 10300 (Eos.2%)	M	rice 26.2(4)/tomato 19.6(4)/spinach 3.61(3)/carrot 3.05(2)/potato 11.9(3)/chicken 21.6(4)/egg white >100(6)/milk >100(6)/wheat >100(6)/sesame >100(6)/peanut >100(6)/casein >100(6)/dog 34.1(4)/buckwheat 18(4)/cat 6.94(3)
5		codfish (2)/trevally (2)/sardine (2)/tuna (2)/salmon (2)					egg white (6)/milk (4)/wheat (6)/rice (5)/soybean (6)/poak (2)/beef (2)/chicken (3)
6		tuna 0.6/salmon 0.9	31				mite 3.1/sesame 16.4/peas 12.5/peanut 15.6/soybean 14.9/シロコメ16.2/hazelnut 15/almond 14.1/ 9.5/shrimp 3.3/tomato 13.6/pork 0.7/beef 0.4/carrot 16.4/orange 13.2/potato 16.4/coconut 12.3/blue mussel 1.9/wheat 14.3/strawberry 15.8/yeast 0.9/garlic 17/onion 17.5/apple 14.4/rye 15.1/barley 15.8/oat 16.7/corn 15.3/rice 16.8/grass pollen <17/HD 1.9/tree, weed pollen 10-20/ etc.
7		codfish 0.7/tuna 0.4/salmon 0.7					egg white 1.5/sesame 11.8/peas 6.9/peanut 12.2/soybean 10.2/シロコメ11.9/hazelnut 8.4/almond 9.5/crumb 5/sh 3.7/tomato 12.2/pork 0.5/beef 0.4/carrot 11.8/orange 9.4/potato 12.7/coconut 6.3/blue mussel 5.5/wheat 13.5/strawberry 10.3/yeast 0.8/garlic 47.2/onion 13.5/apple 8.9/rye 11.5/barley 12.4/oat 10.7/yolk 0.8/corn 9.9/chicken 0.5/rice 11.8/insect 1-11/tree, weed pollen 11-21/ etc.
8		codfish 6.59/ salmon 4.51/ trout 6.41					
9		codfish 5.87/ salmon 10.1/ trout 9.67					
10		codfish 10.6/ salmon 18.5					
11		codfish 7.4/ salmon 8.37/ trout 9.12					
12		codfish 16.7/ trout 26.8					
13		codfish 1.99/ salmon 2.36					
14		codfish 3.1					
15		codfish 1.4/ salmon 1.4					
16		codfish 3.53/ trout 23.9					
17	food allergy, atopic dermatitis	cod 15.1/ tuna 12.5/ salmon 17.9/ mackerel 20.9/ Japanese horse mackerel 28.6/sardine 23.1/	17500 →942	1170	1570		melon 0.88/ peanut 1.8/ crab 26.9/ shrimp 23.2/ wheat 3.57/ rice 1.64/ mussel 9.0/ buckwheat 4.87/ tomato 1.48/ carrot 1.9/ garlic 2.2/ onion 1.94/ squid 14.4/ octopus 14.8/ milk 1.15/ egg white 1.21/ soybean 1.5/ beef 0.62/ pork<0.34/ chicken 3.77
18	atopic dermatitis	tuna 20.5/ salmon 42.4/	22400	1180	3125 (WBC 12500, Eosi 25.0%)	7 M	Dermatophagoides farinae 99.9/ house dust 99.9/ cat dander 99.9/ dog dander 99.9/ timothy 44.5/ sweet vernal grass 35.6/ weed 14.1/ mugwort 18.0/ cedar 99.9/ penicillium 14.3/ Cladosporium 11.2/ candida 8.96/ Alternaria 10.3/ Aspergillus 7.06/ wheat 6.36/ soybean 23.8/ rice 15.5/ shrimp 99.9/ crab 99.9/ cheddar 13.0/ milk 10.3/ beef 32.1/ chicken 15.1/ egg white
19	food allergy, asthma, immediate reaction	cod 4.46	231	ND	WBC 7000 (Eosi 6.6%)	3 M	crab 12.5/ shrimp 14.4
20	food allergy, atopic dermatitis	mackerel 0.6	22810	ND	2450 (Eosi 21%)	13 M	egg white 2.11/ milk 3.14/ rice 63.9/ soybean 51.7/ buckwheat 19.9/ wheat 22.0/ kiwi 13.2/
21	atopic dermatitis, food allergy	mackerel 0.99/ Japanese horse mackerel 4.99	934	ND	620 (Eosi 7%)	2 F	Dermatophagoides pteronyssinus 1.29/ egg white 66.3/ buckwheat 4.58/ ovomucoid(6)
22	combined atopic dermatitis, food allergy	tuna 4.77	596	ND	10900 (Eosi 20%)	5 M	egg white 25.0/ ovomucoid 20.8/ wheat 1.21/ rice 1.37/ sesame 5.95/ buckwheat 1.61/ shrimp 24.7/ crab 24.3
23	atopic dermatitis, food allergy	mackerel(2)/ Japanese horse mackerel(2)	949.4	ND	8900 (Eosi 3%)	1 M	cat dander(4)/ egg white(6)/ milk(3)/ wheat(3)/ sesame(2)/ soybean(3)/ spinach(1)/ cedar, dog dander, beef, banana(0)
24		fish 5-19	2374				mite ~50/ dander 17-100</ fungi 3-33/ pollen 23-86/ alder 49/ ragweed 6-15
25		sardine 3	>5000				penicillin 2/ chicken serum albumin 28/ chicken wing 11/ brewer's yeast 4/ yeast 7/ sweet potato 8/ lamb 30/ chicken 18/ oat 7/ cheese 3/ mushroom 2/ bee 1-3/cockroach 100/ ant 23/ mosquito 100/ parasite 39/ moth 82/ eumycetes 2-100/ A.niger 9.7/ A.oryzae 36.7
26		cod 1.5					egg white 19.8/ peanut 14.5/ soybean 68.1/ milk 13.2/ wheat 54.4/ garlic 12.4/ yolk 82.1

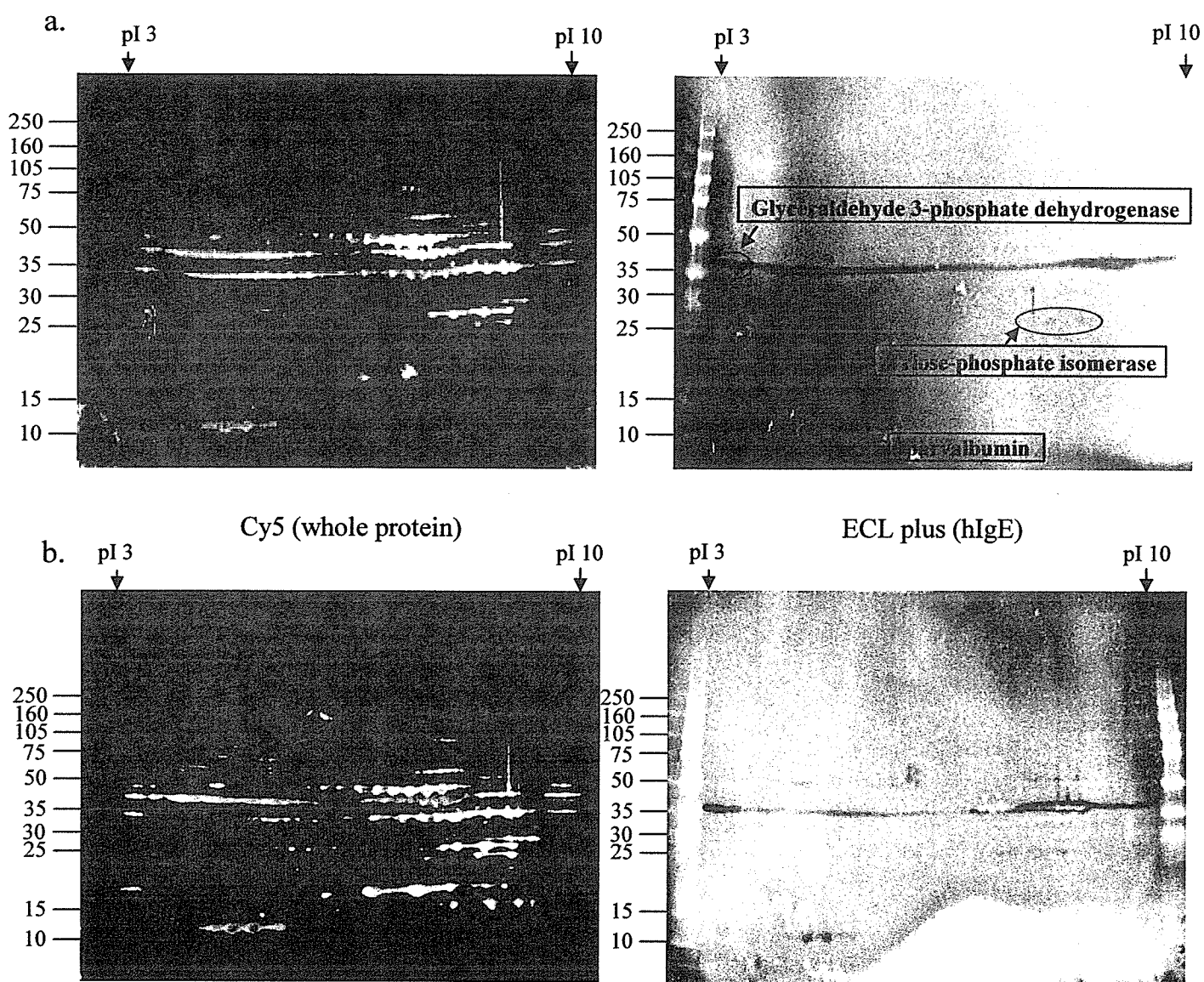


図3 2次元電気泳動を用いたアレルゲノーム解析

a. non-GM (1year)

b. GM (1year)



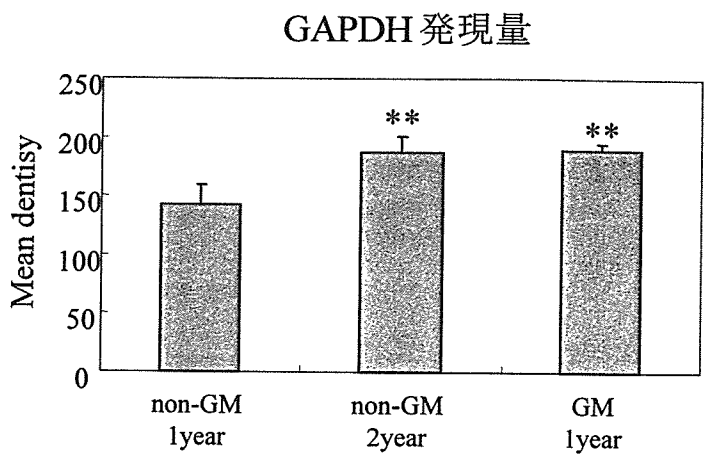
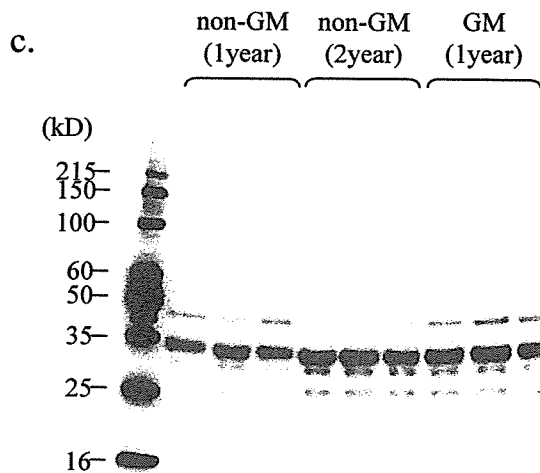
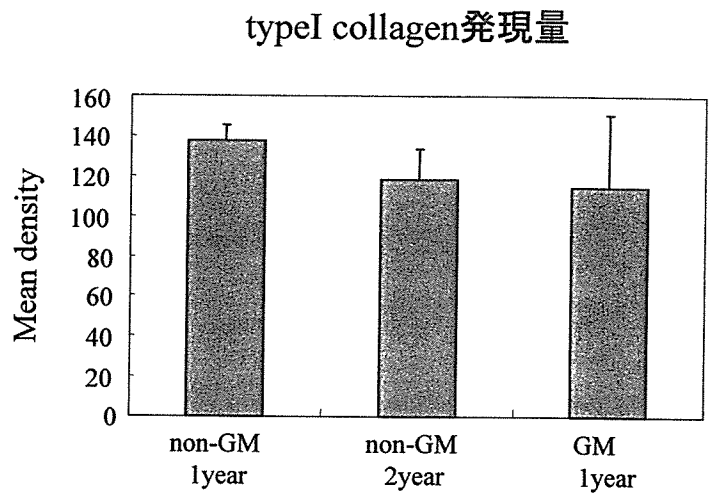
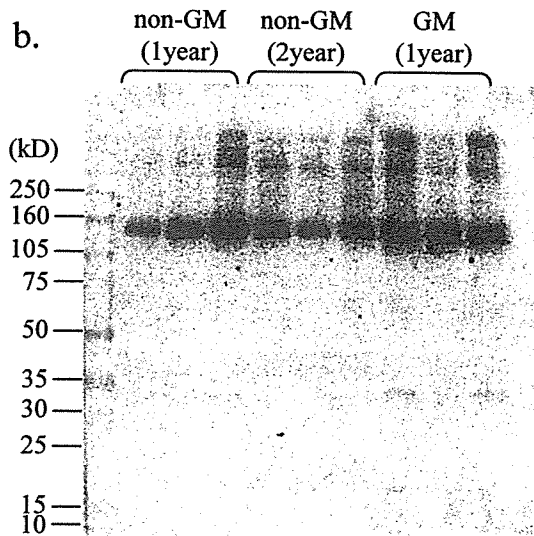
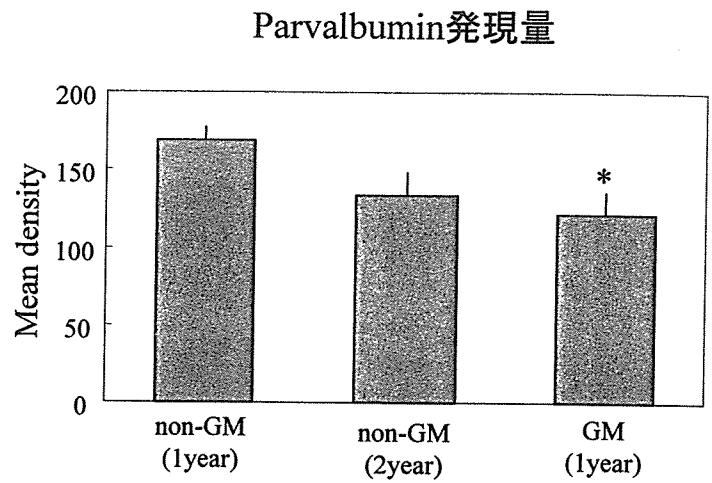
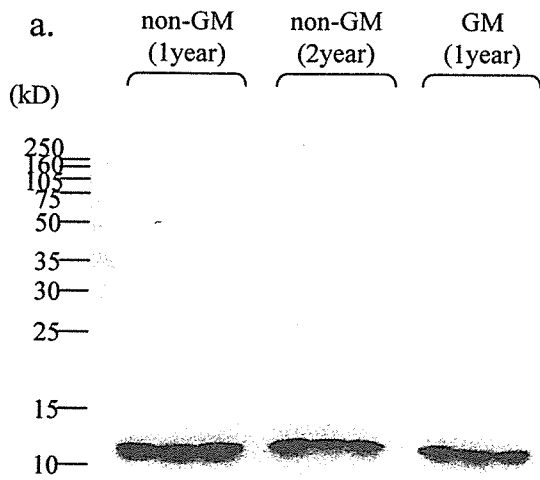


図4 non-GM,GMアマゴ間のアレルゲン発現量比較

- a. parvalbumin (12kD)
- b. Fish typeI collagen (140kD)
- c. GAPDH

\* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.05$  compared to non-GM (1year)

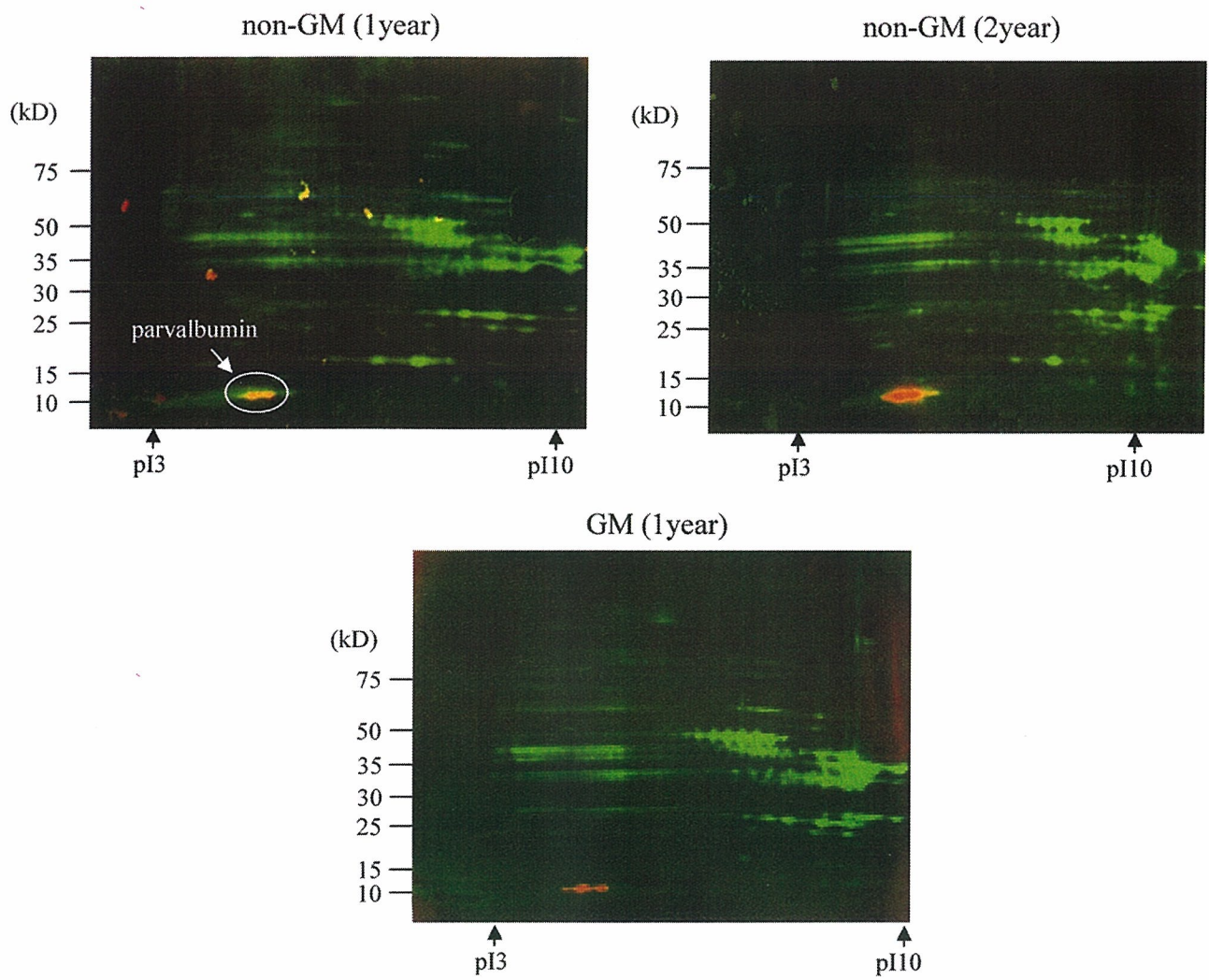
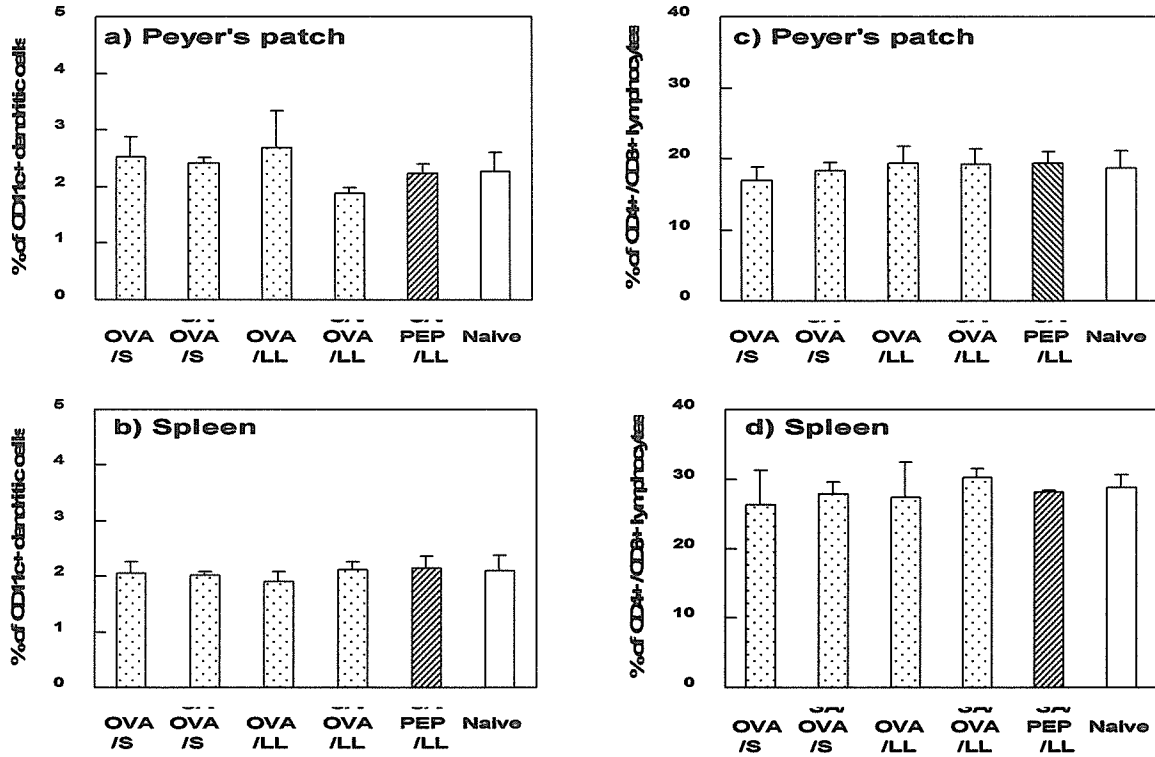


図5 遺伝子組換えによるparvalbuminの質的変化

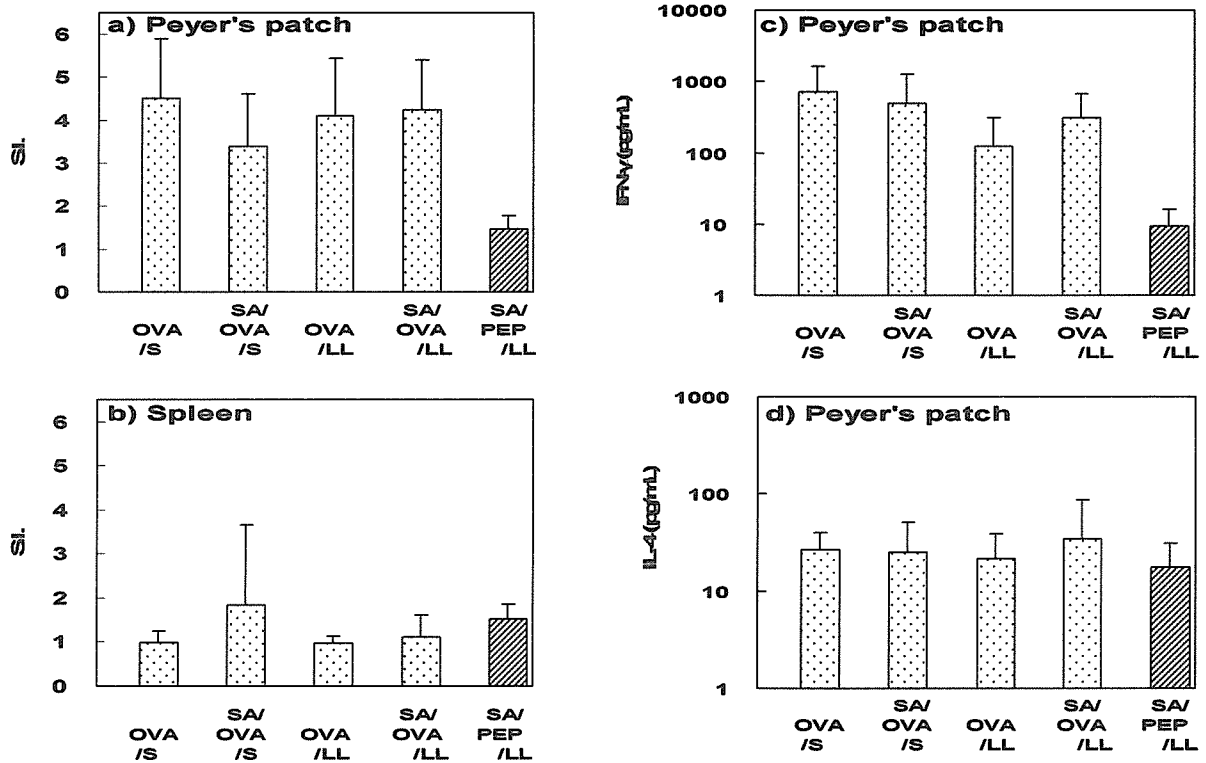
Green; Cy5

Red; ECL plus (mouse anti-frog parvalbumin, 1:2000)





8 Cell population of immune cells in Peyer's patch or spleen



9 Lymphocyte proliferation and cytokine levels in Peyer's patch or spleen from the mice orally administered with OVA or PEP

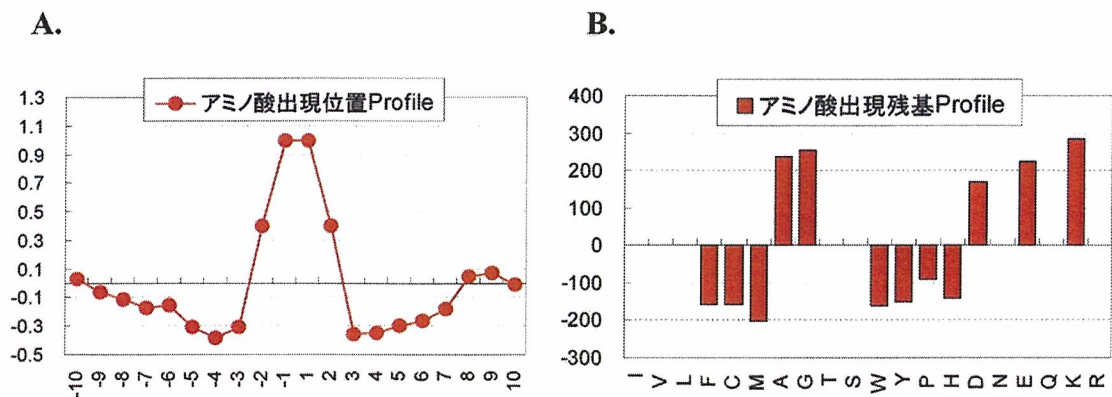


図 10. アレルゲンのユニーク配列に特徴的なアミノ酸の分布。A:特徴的な部分だけを抽出したユニバーサル分布、B:各アミノ酸の分布の強度。

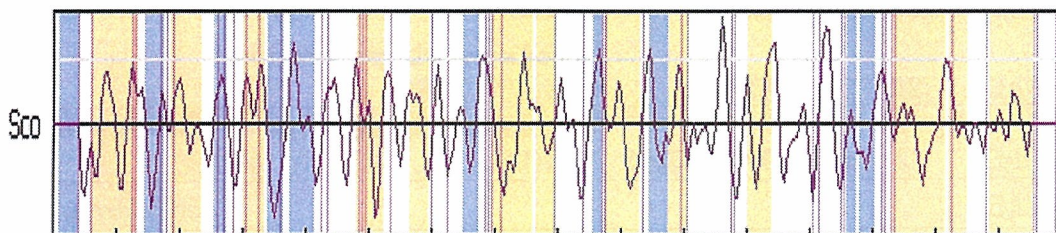


図11.  $\alpha/\beta$ 型の水溶性タンパク質のユニーク断片プロットの例。色の帯は、オレンジが $\alpha$ ヘリックス、水色が $\beta$ シートを示している。またグラフはユニーク断片プロットであり、ピークは図1のような分布によく合うアミノ酸の配列を示している。ピークは二次構造の端に近いことが多いということが分かる。

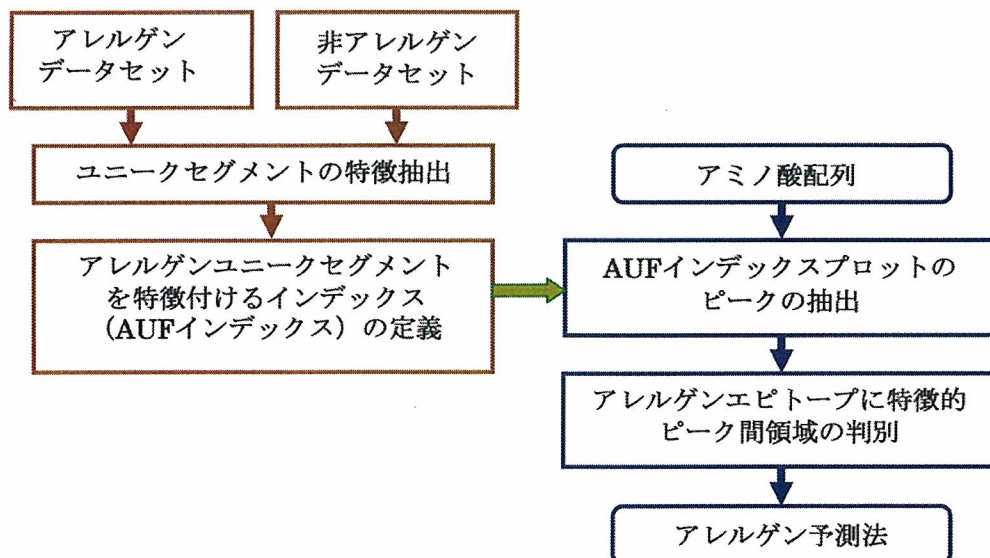


図12. アレルゲンユニーク断片のインデックスを用いたアレルゲン予測法開発の考え方 (流れ図)

表2 ADFSに追加記載したエピトープ情報

Allergen	N	Type	start	end	Sequence	Description	Method	Ctype*
Pen a 1	1	I	43	55	VHNLQKRMQQLLEN	critical amino acids are marked in bold (46L, 53L)	SPOT-method, combinatorial-substitution analysis	L
	2	IgE	89	101	ALNRRIGLLEEDLE	critical amino acids are marked in bold (95L)		L
	3	IgE	133	141	R	critical amino acids are marked in bold (136S)		L
	4	IgE	144	151	RSLSDDEERM	critical amino acids are marked in bold (145E)		L
	5	IgE	187	201	LENQLKEA	critical amino acids are marked in bold (191V, 199V)		L
	6	IgE	249	260	ESKIVELEEEELRWV	critical amino acids are marked in bold (255R, 260L)		L
	7	IgE	266	273	G	critical amino acids are marked in bold (269S)		L
	8	IgE	273	281	KYKSITDE	critical amino acids are marked in bold (277T, 278F)		L
Ole e 1	1	IgE	131	142	ELDQTFSEL	critical amino acids are marked in bold (137K, 138L, 139G, 141Y, 142P)	SPOT-method	L
Gad c 1	1	IgE					phage display	C
Mal d 1.0108	1	IgE					sequential mutagenesis analysis	C
Bet v 1a	1	IgE				Cross-reactive to (Ara h 8, Gly m 4, Pru av-1)-sensitive patients' IgE	phage display	C
Gly m 4	1	IgE				Cross-reactive to (Bet v 1a)-sensitive patients' IgE	phage display	C
Ara h 8	1	IgE				Cross-reactive to (Bet v 1a)-sensitive patients' IgE	phage display	C
Pru av 1	1	IgE				Cross-reactive to (Bet v 1a)-sensitive patients' IgE	phage display	C
Jun a 1	1	IgE	92	104	IFSQNMNIKMKMP	Cross-reactive to Japanese cedar (Cry j 1)-sensitive patients' IgE	SPOT-method	L
	2	IgE	239	250	AFNQFGPNAGQR	Cross-reactive to Japanese cedar (Cry j 1)-sensitive patients' IgE		L
	3	IgE	251	258	MPRARYGL			L
	4	IgE	317	329	WRSTRDAFINGAY	Cross-reactive to Japanese cedar (Cry j 1)-sensitive patients' IgE		L
Tri a F038	1	IgE			QQPGQ		SPOT-method	L
	2	IgE			QQPGQQQQ			L
	3	IgE			QQSGQQQ			L

\* L; linear epitope  
C; conformational epitope

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Horiuchi, H., Furusawa, S. Matsuda, H..	Maintenance of chicken embryonic stem cells in vitro.	Turksen, K	Methods in Molecular Biology	Humana Press	Totowa	2006	17-34

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Toyota, A., Akiyama, H., et al.	Rapid quantification methods for genetically modified maize contents using genomic DNAs pretreated by sonication and restriction endonuclease digestion for a capillary-type real-time PCR system with a plasmid reference standard.	Biosci. Biotechnol. Biochem.	70	2965-2973	2006
Watanabe, T., Tokishita, S., et al.	Development and Evaluation of Event-specific Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Bt10 Maize.	J. Agric. Food Chem.	55	1274-1279	2007
Nakayama, T., Kurosawa, Y., et al.	Circumventing air bubbles in microfluidic systems and quantitative continuous-flow PCR applications.	Anal. Bioanal. Chem.	385	1327-1333	2006
Corbisier, PH., Broothaerts, W., et al	Towards metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. Part A- the effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt176 corn by real-time PCR.	J. Agrc. Food Chem.	in press		2007
Akiyama, H, Watanabe, T., et al.	A Detection Method of CryIAC Protein for Identifying Genetically Modified Rice using the Lateral Flow Test Assay.	J. Food Hyg. Soc. Japan.	47	111-114	2006
Yamaguchi, A., Shimizu, K. et al.	Detection Method of Genetically Modified Papaya using duplex PCR.	J. Food Hyg. Soc. Japan.	47	146-150	2006
Yamashita, Y., Tategaki, A., Ogawa, M., Horiuchi, H. et al.	Effect of novel monoclonal antibodies on LIF-induced signaling in chicken blastodermal cells.	Dev. Comp. Immunol.	30	513-522	2006
堀内浩幸, 山下裕輔, 西田憲正 他	ニワトリにおける抗体エンジニアリングとトランスジェニックテクノロジー	FFIジャーナル	211	948-955	2006
Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S and Amano F.	An anti- <i>Salmonella</i> antibody prevents the <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella.	Bioscience & Microflora.	25	117-119	2006
五十君静信	これからのプロバイオティクス: 遺伝子組換え微生物の利用と安全性	アレルギーの臨床	26巻10月号 (No.351)	855-860	2006
Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ, Yamamoto S, Igimi S.	Intragastric immunization with recombinant <i>Lactobacillus casei</i> expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis.	Vaccine	in press		2007

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takagi K., Teshima R., Nakajima O., Okunuki H., Sawada J.	Improved ELISA method for screening human anti-gen- specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods	Regul. Toxicol. Pharmacol.	44	182-188	2006
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 <sup>v</sup> Mice	Allergol. International	55	43-48	2006
Nakajima O., Teshima R., Takagi K., Okunuki H., Sawada J.	ELISA method for monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified corn.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	47	90-95	2007
Koyano S., Takagi K., Teshima R., Sawada J.,	Molecular cloning of cDNA, recombinant protein expression and characterization of a buckwheat 16-kDa major allergen.	Int. Arch. Allergy Immunol.	140	73-81	2006