

図 6. ROC 曲線解析

19S による SPT に対する、(A) 19S-EXiLE、(B) Glu-EXiLE、(C) 19S-ELISA、(D) Glu-ImmunoCAP の ROC 曲線解析を行なった。曲線下面積 (AUC) およびその P 値を示す。

(A)において至適カットオフ値は 1.311、(C)においては 11.0 unit であった。

Table 1. ROC curve analysis of 19S-EXiLE, Glu-EXiLE, 19S-ELISA, and Glu-ImmunoCAP

19S-EXiLE (maximum fold)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.8328	0.9015	0.6451	0.5797
Std. Error	0.03564	0.02499	0.04973	0.04949
95% confidence interval	0.7629 to 0.9026	0.8525 to 0.9505	0.5476 to 0.7426	0.4827 to 0.6767
P value	< 0.0001	< 0.0001	0.0102	0.1141
Glu-EXiLE (maximum fold)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.5896	0.525	0.5561	0.5817
Std. Error	0.05122	0.04987	0.05652	0.04998
95% confidence interval	0.4892 to 0.6900	0.4272 to 0.6228	0.4453 to 0.6669	0.4838 to 0.6797
P value	0.1128	0.6451	0.3203	0.1051
19S-ELISA (unit)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.928	1	0.6186	0.5566
Std. Error	0.0229	0	0.05203	0.0502
95% confidence interval	0.8831 to 0.9729	1.000 to 1.000	0.5166 to 0.7206	0.4582 to 0.6550
P value	< 0.0001	< 0.0001	0.03609	0.2619
Glu-ImmunoCAP (UA/mL)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.8414	0.8448	0.672	0.5797
Std. Error	0.0439	0.03749	0.05188	0.05079
95% confidence interval	0.7553 to 0.9274	0.7713 to 0.9183	0.5703 to 0.7737	0.4801 to 0.6793
P value	< 0.0001	< 0.0001	0.002587	0.1233

Table 2. Sensitivity, specificity, PPV, and NPV

		19S-EXiLE		19S-ELISA	
		+	-	+	-
SPT	+	73	30	90	11
	-	2	34	3	31
Sensitivity		0.7087		0.8911	
Specificity		0.9444		0.9118	
PPV		0.9733		0.9677	
NPV		0.5313		0.7381	

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table 3. Spearman's rank correlation study

Compared tests :	19S-EXiLE	19S-EXiLE	Glu-EXiLE	19S-EXiLE	19S-ELISA
	19S-ELISA	Glu-EXiLE	Glu-ImCAP	Glu-ImCAP	Glu-EXiLE
Number of XY Pairs	137	139	130	130	137
Spearman R	0.8767	0.3195	0.2026	0.659	0.2284
P value (two-tailed)	<0.0001	0.0001	0.0208	<0.0001	0.0073

ImCAP, ImmunoCAP of Gluten.

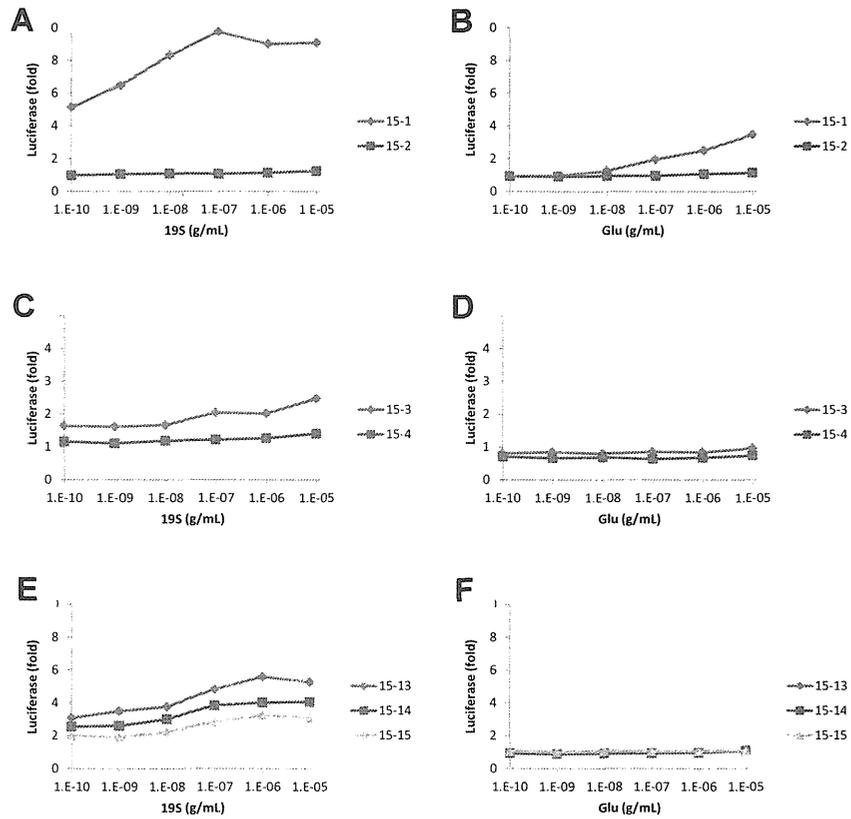


図 7. IgE 応答性の経時的変化

19S 特異的 IgE が 2 年で 8.7 unit にまで減少した subject No.1 (A, B)、減少はしたが 10 unit 以上であった subject No.3 (C, D)、ほとんど変わらなかった subject No.7 (E, F) について、19S (A, C, E) または Glu (B, D, F) により刺激を行なった。菱形→四角(→三角)の順に採血をしている。

医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

研究分担者 伊東 祐二 鹿児島大学大学院理工学研究科 生命化学専攻 教授

研究要旨:

茶のしずく小麦アレルギーの原因となる IgE 抗体の特性解析を行うため、患者由来の IgE 単鎖 Fv 抗体ライブラリを構築し、グルテンならびにグルパール 19S に対するバイオパンニングによって、疾患の原因と考えられる特異クローンの単離を行った。得られたクローンの多くは、グルテンに対する結合活性を有するものの、グルパール 19S に対する特異性は示さなかった。グルパール 19S に特異性をもつクローンが得られなかった原因として、目的の抗体遺伝子の存在率が低く、また、バイオパンニングによる濃縮効率が低いことが考えられた。そこで、バイオパンニング前後でのライブラリ中の抗体配列を次世代シーケンサーによって網羅的に解析することで、特異クローンの解析を進めた結果、複数種のグルテン、並びに、グルパール 19S に特異的な IgE 抗体の VH 配列の特定に成功した。

A. 研究目的

本研究の目的は、医薬部外品・化粧品に含まれる様々な工業添加物によるアレルギーの発症原因の解明に向け、アレルギー患者から原因となる抗体を単離し、その特異性や性質を決定することで、アレルギー反応に関わる物質の網羅的抗原性の解析を行うことである。このような、疾患の直接的な原因となる抗体クローンの解析は、本研究で用いる抗体ファージライブラリ技術によって初めて可能であり、より詳細な抗原性の解析が達成できる。

昨年度において、茶のしずく石鹼による小麦アレルギー患者 13 名の血清中の小麦加水分解物に対する抗体価の測定により、原因となるグルパール 19S に対する IgE 抗体が患者血清の中で有意に高いことを明らかにし、患者(患者 4)由来の抗体ライブラリを構築した。このライブラリを用いて、グルパール 19S に対するバイオパンニングによって、特異的抗体クローンファージの単離を行ったところ、3 種の特異的ク

ローンファージの単離に成功した。本年度は、これらのクローンの特性解析を進めるとともに、他の茶のしずく石鹼による小麦アレルギー患者、さらに、通常的小麦アレルギー患者の IgE 抗体ライブラリを作製し、アレルギーの原因となる抗体の単離を進めた。特に、次世代シーケンサー技術をファージライブラリによる抗体単離と組み合わせることにより、アレルギーの原因となる IgE クローンの網羅的な解析技術の確立を試みた。

B. 研究方法

生体サンプルと材料 茶のしずく石鹼による小麦アレルギーを発症した患者 P4 と P12、並びに、通常的小麦アレルギー患者 (P' 14-17) の血液サンプルは、昨年度の報告書に記載した様に、国立病院機構相模原病院の福富友馬医師のご協力により、患者本人との同意書による承諾のもと採取されたものを用いた。

患者血漿を用いた ELISA 測定 患者血清のグルテン並びにグルパール 19S に対する IgE 抗体価

は、昨年度の報告書に記載の方法で測定した。**IgE 抗体ファージライブラリの作製** 患者由来の IgE 抗体ライブラリの作製は、昨年度の報告書に記載の方法で構築した。

バイオパンニングによる抗体クローンの単離 グルテン、グルパール 19S に対するバイオパンニングの方法も、昨年度の報告書の記載の方法で行った。

次世代シーケンサーによる IgE 抗体の VH 領域の網羅的配列解析 構築した IgE 抗体ライブラリあるいはバイオパンニング後の抗体ライブラリからファージミド DNA を精製し、これを鋳型に VH 特異的 5' 並びに 3' プライマーを用いて、VH 遺伝子を増幅した。次世代シーケンサー用のサンプル調製は、基本的に TruSeq™ DNA Sample Preparation v2 (Illumina) のプロトコールに従って行った。先に増幅した PCR 産物の両端に、アダプター配列を付加するための PCR を行い、さらにインデックス配列を付加した P5 並びに P7 プライマーを使って PCR を行った。解析は、次世代 DNA シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて行った。得られたシーケンスデータの解析は、CLC Genomics Workbench ver5 (CLC Bio) ソフトウェアを使って行い、"Merge Overlapping Pairs" tool を使って、5' 側 3' 側の配列をつなぐことによって、全長の VH 遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

グルテン、グルパール 19S に対する患者抗体の解析 昨年度報告した“茶のしずく”小麦アレルギー患者 P4、P12、通常小麦アレルギー患者 P'15、並びに代表的な健常人の血漿中のクラス別の抗体価を評価した結果を示した (図 1)。アレルギーの原因となる IgE に関しては、茶のしずく患者並びに通常小麦アレルギー患者において、グルテンに対する抗体価が上がっているが、特に

茶のしずく患者では、グルパール 19S に対する IgE 抗体価が高いのが特徴であり、このアレルギー患者は、グルパール 19S を含む茶のしずく石鹼によりアレルギーが誘発されたことを支持している。一方、通常小麦アレルギーの患者の IgE については、グルパール 19S に対する抗体価は低く、グルテンに対する抗体のみが見られた。

抗原特異的 IgE の取得のための患者抗体ライブラリの作製 このような抗原の違いによって誘導される IgE 抗体のクローンレベルでの特異性、エピトープの違いを明らかにするため、茶のしずく患者 P4 並びに P12、通常小麦アレルギー患者の血液由来の IgE 抗体ファージライブラリを作製し、特異的な IgE クローンの単離を試みた。

昨年度の報告で、茶のしずく患者 P4 由来の IgE 抗体ライブラリを作製したが、これに引き続き、本年度では、茶のしずく患者 P12 と通常小麦アレルギー患者 4 人のプール血液サンプル由来の抗体ファージライブラリを作製した。作製した抗体ライブラリの多様性は、昨年度報告した茶のしずく患者 P4 ライブラリが、 3.8×10^7 (VH-VL κ : 2.1×10^7 並びに VH-VL λ : 1.7×10^7)、茶のしずく患者 P12 ライブラリが、 2.8×10^7 (VH-VL κ : 1.1×10^7 並びに VH-VL λ : 1.7×10^7)、通常小麦アレルギーライブラリは、 4.8×10^7 (VH-VL κ : 2.8×10^7 並びに VH-VL λ : 2.0×10^7) であった。これらのライブラリを用いて、グルテン、並びに、グルパールに対するバイオパンニングを行った。

茶のしずく患者 P4 ライブラリのグルパール 19S に対するバイオパンニングでは、B9、E9、G7 の 3 つのクローンが得られたが、これらはいずれも、グルテンに対する高い特異性を示した (図 2)。このことは、得られた 3 種のクローンは、グルパール 19S に特異的なエピトープではなく、グルテンに特異的なエピトープを認識していることを

示している。バイオパンニングによる段階でもグルテンに対する結合が優位に見えている（図4A）ことから、パンニングで、グルテンに対するクローンが優位に増幅されたことが考えられるが、何故、グルパール19Sに存在しないエピトープを認識する抗体クローンがグルパール19Sに対するパンニングで、エンリッチされるのか原因は定かでない。

次に、茶のしずくアレルギーの特徴となっているグルパール19Sに対するIgE抗体クローンの取得のため、グルテンに対するIgE抗体価が低く、グルパール19Sに極めて高いIgE抗体価を示す患者P12（図1のIgEのパネル参照）由来のライブラリを使って、グルパール19Sに対するバイオパンニングを行った。その結果、図3Aに示した様に、第1ラウンドにおいて、若干グルパール19Sに対する濃縮が確認されたが、第2、3ラウンドでは、同時にグルテンへの結合の増強が見られた。2ラウンド後の各抗体ファージクローンのEISAによる結合スクリーニングを行った。その結果、図3に示した様に、3種の特異的と思われるクローン（クローン8、14、18）が得られたが、いずれも、グルテン特異的なクローンであった。グルパール19Sに対して高いIgE抗体価を有する患者由来のライブラリにおいても、グルテンに対して特異的なクローンしか得られないのか現状では、その理由は不明である。

一方で、通常的小麦アレルギーを引き起こすグルテンに対するIgEと茶のしずくアレルギーの同じくグルテンに対するIgEとの質的な違いがあるかどうかを検討するため、患者P4ライブラリを使ってグルテンに対するパンニングを行い、特異的なクローンの取得を試みた。興味深いことに、パンニング前の最初のライブラリの段階から、グルテンあるいはグルパール19Sに対する高い結合

活性を示し、2ラウンドの後、結合活性がさらに上昇した（図4A）。そこで、1ラウンドならびに2ラウンドのバイオパンニング後のクローン化サンプルのELISAによるスクリーニングを行った（図4）。その結果、1ラウンド後では、48クローン中3クローンでグルテンもしくはグルパール19Sへの結合が見られたが、2ラウンド後では、48クローン中の40クローンで結合活性が見られた。このことは、2ラウンド後、効率よく、グルテンに対する抗体ファージの濃縮が起きていることを示す。ここで、得られたクローンのうち多くのクローンが、弱いながらもグルパール19Sへの結合活性を有していたことは注目に値する。

図2、3、4において示してきたように、患者由来のIgE抗体ライブラリから単離された抗体クローンは、スクリーニングの範囲では、標的としていたグルパール19Sに対するものではなく、グルテンに特異性を持ったクローンしか得られていない。この理由として、患者P12のような高いグルパール19Sに対するIgE抗体価を有する場合でも、グルテンに対するIgE抗体を分泌するB細胞に比べ、グルパール19Sに特異的な抗体を産生するB細胞は極めて少ないことが考えられる。そのため、ライブラリ化してグルパール19Sに対するパンニングを行ったとしても、多くの濃縮される抗体クローンが、グルテン特異的なものであり、100個程度のスクリーニングでは、見つけ出せない可能性が考えられた。そこで、グルパール19Sあるいはグルテンに対する多様な抗体クローンの取得に向け、バイオパンニングの前後で増幅してくる抗体クローンの配列の次世代シーケンサーによる網羅的解析を試みた。

次世代シーケンサーによる抗体の網羅的配列解析 今回は、患者P4のIgEライブラリを使ったグルテンに対する1回のバイオパンニング、並びに、患者P12 IgEライブラリを使ったグルパール19Sに対する同じく1回のバイオパンニ

ングによって、増幅されてくる IgE 抗体配列の解析を行った。結果を図 5 と図 6 に示す。

患者 P4 は、グルパール 19S とグルテンに対する IgE 抗体価を示す茶のしずくの小麦アレルギー患者であり、この患者からグルテンに対する IgE 抗体も通常のバイオパンニングによって複数のクローンが得られている (図 4)。図 5 A に、グルテンに対する 1 回のバイオパンニングの前後で、存在率の増加が大きかった配列クローンの上位 (増幅倍率として 2.5 倍以上) を並べた。一番大きな P4-GT1 で、33 倍以上の配列の増幅が見られ、このような増幅率の大きな配列は、グルテン特異的な配列クローンである可能性が高くなる。このような同定をより確実にするため、図 5 A のクローン配列を基に分子系統樹を作製したところ、図 5 B に示した様に、これらのクローンは、互いに高い相同性を持った 1 1 のサブグループ (クラスター) を形成することが分かった。このうち、クラスター X, Y, Z の中の代表的な配列を図 7 に示した。この X, Y, Z のクラスター内の配列は、極めて高い (98% 以上) 相同性を示し、また、H-CDR3 の配列も基本的には同じであることから、これらのクラスター内の配列の抗体は、同じ親 B 細胞由来のものであることを示している。さらに、図 4 で示した様に、患者 P4 ライブラリからグルテンに対するバイオパンニングによって得られた E7 の配列は、P4-GT2 の配列と同じであったことから、この次世代シーケンサーによる抗原特異的抗体の同定方法が、確度の高いものであることを示している。図 5 で見られるいくつかのクラスターは、異なる特異性を持つ IgE の VH クローンの存在を示しており、これら解析により、グルテンによるアレルギーの原因となる IgE の特定が期待できる。

次に、グルパール 19S に特異的な IgE クローンの特定のために、患者 P12 由来の IgE ライブラリを使って、グルパール 19S に対するパンニング前後の網羅的開裂解析を行った。その結果、グルテンに対する場合と同じように、パンニングによっ

て存在率が増幅されるクローンが見いだされた。図 6 A に示した様に、増幅倍率が 2.5 倍以上の配列クローンは、49 個であったが、グルテンの場合 (図 5 A) と異なり、増幅倍率は、最も高いもの (P12-GP1) で、6 倍程度とそれほど大きくなかった。これらのアミノ酸配列を基に作製した分子系統樹を図 6 B に示す。いくつかのクラスターの形成が見られたが、多くのクラスター内の配列間の相同性は、クラスター M を除いて、それほど高くなく、92% 程度であった。クラスター L, M, N の中の代表的な配列を、図 7 に示すが、グルテンに特異的な IgE の VH 配列として同定された X, Y, Z のグループ内の H-CDR3 がほぼ同じ配列を示すのに対し、グルパールに特異的な IgE の H-CDR3 配列は、クラスター M 以外では、変化に富むものであった。

D. 考察

倍パンニング前後でのライブラリ中の抗体の網羅的配列解析によって、2 人の患者由来の IgE ライブラリから、グルテンならびにグルパールに特異性を有する可能性を持つ、いくつかの VH 配列が同定された。バイオパンニングという抗原に対する結合特異性を保証するステップを含んでいるものの、最終的には、抗体を作製し、その特異性を証明する必要がある。通常のパニングで得られた P4-GT-E7 のクローン (図 4) と、次世代シーケンサー解析により同定された P4-GT2 (図 5) が同一であったことは、次世代シーケンサーによる配列解析が、抗原特異抗体の特定に十分使用できることを示している。図 4 B において得られているクローンのすべての配列の解析を完了しているわけではないが、少なくとも、図 5 B のクラスター解析は、10 種類以上のグルテン特異的な配列の存在を示唆しており、このような多様な IgE 抗体の構造情報は、アレルギー反応の IgE 抗体レベルでの包括的な理解に極めて重要

な情報であり、網羅的配列解析により初めて明らかになったものである。現在、VH の情報だけでなく、ペアとなって Fv 領域を構成する VL の配列情報の解析を進めている。

患者 P12 のグルパールに対して得られた IgE の VH 配列においても、いくつかのクラスターが見られた。その中で、クラスター M 内の配列は、H-CDR3 の領域を含め互いに極めて高い相同性を示すこと、この配列がグルパール 19S 特異的な IgE 抗体の可能性が最も高いと予想している。一方、その他のクラスターでは、高い相同性は見られず（90%前後）、これらの配列があまり高くない増幅倍率を示すことを考え併せると、非特異的なクローンである可能性を否定できない。しかし、別の可能性として、これらのクローンは、特異的ではあるが、抗体を発現する B 細胞の免疫応答による細胞増殖が強く起こっていないため存在率が極めて少ないことが考えられる。また、標的となるグルパール 19S は、多様なタンパク質の集団であるグルテンをさらに化学的に処理しているため、抗原のエピトープとしては極めて多様性に富んでいることから、パンニングによる濃縮もかかりにくくなっていることが考えられる。

茶のしずく患者と通常型的小麦アレルギーの患者における IgE 抗体の特性は、患者血清中のポリクローナル抗体のレベルで現在まで解析されてきた。ここで示すアプローチは、疾患の原因となる IgE の特性をクローンのレベルで解析することで、以下のようなアレルギー応答に対する疑問に対する回答が可能かもしれない。1) 一般的な小麦アレルギーと茶のしずくアレルギーでは、IgE の特性にどのような質的な違いがあるのか。2) 茶のしずくアレルギーは、グルテンとグルパール 19S に交差活性をもつ IgE の出現によってか、それとも、グルパール 19S に特異的な IgE の出現

によって、引き起こされるのか。3) そのような IgE は、どのような部位を標的とするのか。このような小麦アレルギーでの IgE の特性の違いを明らかにすることで、茶のしずく発症の機構、さらには予防に対する展開を図っていきたい。

E. 結論

IgE 抗体ライブラリを使ったバイオパンニングと組み合わされた次世代シーケンサーによる網羅的解析手法は、アレルギーの原因となる IgE 抗体配列の同定の上で、極めて有用であり、本法によって、小麦アレルギーの原因となる IgE のクローン配列が特定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukunaga, K., Hatanaka, T., Ito, Y. and Taki, M., Gp10 based-thioetherification (10NASEd-T) on a displaying library peptide of bacteriophage T7, *Molecular BioSystems*, **9**, 2988-2991 (2013)
- 2) Muraoka, J., Kamiya, N. and Ito, Y., Preparation and evaluation of cellulose-dissolving magnetic ionic liquid, *Journal of Molecular Liquids*, **182**, 76-78 (2013)
- 3) Muraoka, J., Ozawa, T., Enomoto, Y., Kiyose, N., Imamura, A., Arima, K., Nakayama, H. and Ito, Y., Selection and characterization of human serum albumin-specific porcine scFv antibodies using a phage display library, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, **33**, 42-48 (2014)
- 4) Tokunaga, Y., Azetsu, Y., Fukunaga, Y., Hatanaka T., Ito, Y. and Taki, M., Pharmacophore

Generation from a Drug-like Core Molecule Surrounded by a Library Peptide via the 10BASEd-T on Bacteriophage T7, *Molecules*, **19**, 2481-2496 (2014)

- 5) Imamura, A., Hatanaka, T., Ichizu, K., Kikuta, Y., Himeno, A. and Ito, Y., Identification of Chicken IgY-Specific Binding Peptide from Random Peptide Library and its application for IgY Affinity Purification, *Peptide Science 2013* (2014)
- 6) Imakiire, A., Nakashimada, Y., Hatanaka, T. and Ito, Y., Characterizations and Applications of Small Affinity Peptides Isolated from Disulfide-containing Random Peptide Library, *Peptide Science 2013* (2014)
- 7) Fukunaga, K., Hatanaka, T., Ito, Y., Minami, M., and Taki M., Construction of a crown ether-like supramolecular library by conjugation of genetically-encoded peptide linkers displayed on bacteriophage T7, *Chemical Communications*, accepted.

2. 学会発表

- 1) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 患者由来の抗体ファージライブラリを用いた肝癌細胞を標的とした自己抗体の単離と機能解析, 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会(佐賀), 2013 年 5 月 18~19 日
- 2) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 萩原義久, 有馬一成, 伊東祐二, アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の特性解析, 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会 (佐賀), 2013 年 5 月 18~19 日
- 3) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 患者由来の抗体ファージライブラリから得られた肝癌細胞抗原ルテランに対する自己抗体の性状解析, 第 86 回日本生化学会大会(横浜), 2013 年 9 月 11~13 日
- 4) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 有馬一成, 岸本聡, 萩原義久, 伊東祐二, アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の単離と機能解析, 第 86 回日本生化学会大会(横浜) 2013 年 9 月 11~13 日
- 5) 小澤拓矢, 若井純子, 有馬一成, 伊東祐二, ブタ抗体ファージライブラリを使った抗原特異的ヒト化抗体, 第 86 回日本生化学会大会(横浜) 2013 年 9 月 11~13 日
- 6) 宮崎誠生, 清瀬紀彦, 萩原義久, 井上聖也, 有馬一成, 伊東祐二, 抗原免疫動物から構築したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリからの抗原特異的抗体の単離と機能解析, 第 86 回日本生化学会大会(横浜) 2013 年 9 月 11~13 日
- 7) Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Hiromi Saitoh, Yurie Enomoto, Yuji Ito, Satoshi Nisizuka, Go Wakabayash, Isamu Hoshino, Hisahiro Matsubara, Takeshi Tomonaga, Development of High-Throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhous Gastric Cancer Biomarker, HUPO 12th Annual World Congress (横浜), 2013 年 9 月 14~18 日
- 8) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 肝癌患者由来の抗体ファージライブラリから得られた抗ルテラン抗体の機能解析, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(長崎), 2013 年 9 月 26~28 日
- 9) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 萩原義久, 有馬一成, 伊東祐二, Alpaca 由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の機能解析, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(長崎), 2013 年 9 月 26~28 日
- 10) 宮崎 誠生, 清瀬 紀彦, 萩原義久, 松田 知成, 井上 聖也, 有馬 一成, 伊東 祐二, 抗原免疫動物から構築したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリの特性と抗原特異的抗

体単離の研究, 第 37 回蛋白質と酵素の構造
と機能に関する九州シンポジウム(長崎),
2013 年 9 月 26~28 日

- 11) 今給黎厚志, 中島田雄一, 畠中孝彰, 伊東祐二, Characterizations and Applications of Small Affinity Peptides Isolated from Disulfide-Containing Random Peptide Library, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, 第 50 回ペプチド討論会 (大阪) 2013 年 11 月 7 日
- 12) 今村礼奈, 畠中孝彰, 市津希理、菊田朝美、姫野ありさ、伊東祐二, Identification of Chicken IgY-Specific Binding Peptide from Random Peptide Library and its application for IgY Affinity Purification, 第 50 回ペプチド討論会 (大阪) 2013 年 11 月 7 日
- 13) Nobuo Miyazaki, Norihiko Kiyose, Yoshitsa Hagihara, Matsuda Tomonari, Seiya Inoue, Kzunori Arima and Yuji Ito, Isolation and characterization of antigen-specific VHH antibodies from immunized alpaca VHH antibody phage library using Next Generation Sequencing (NGS), Antibody Engineering & Therapeutics 2013 (Huntington Beach, CA) December 08-12, 2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

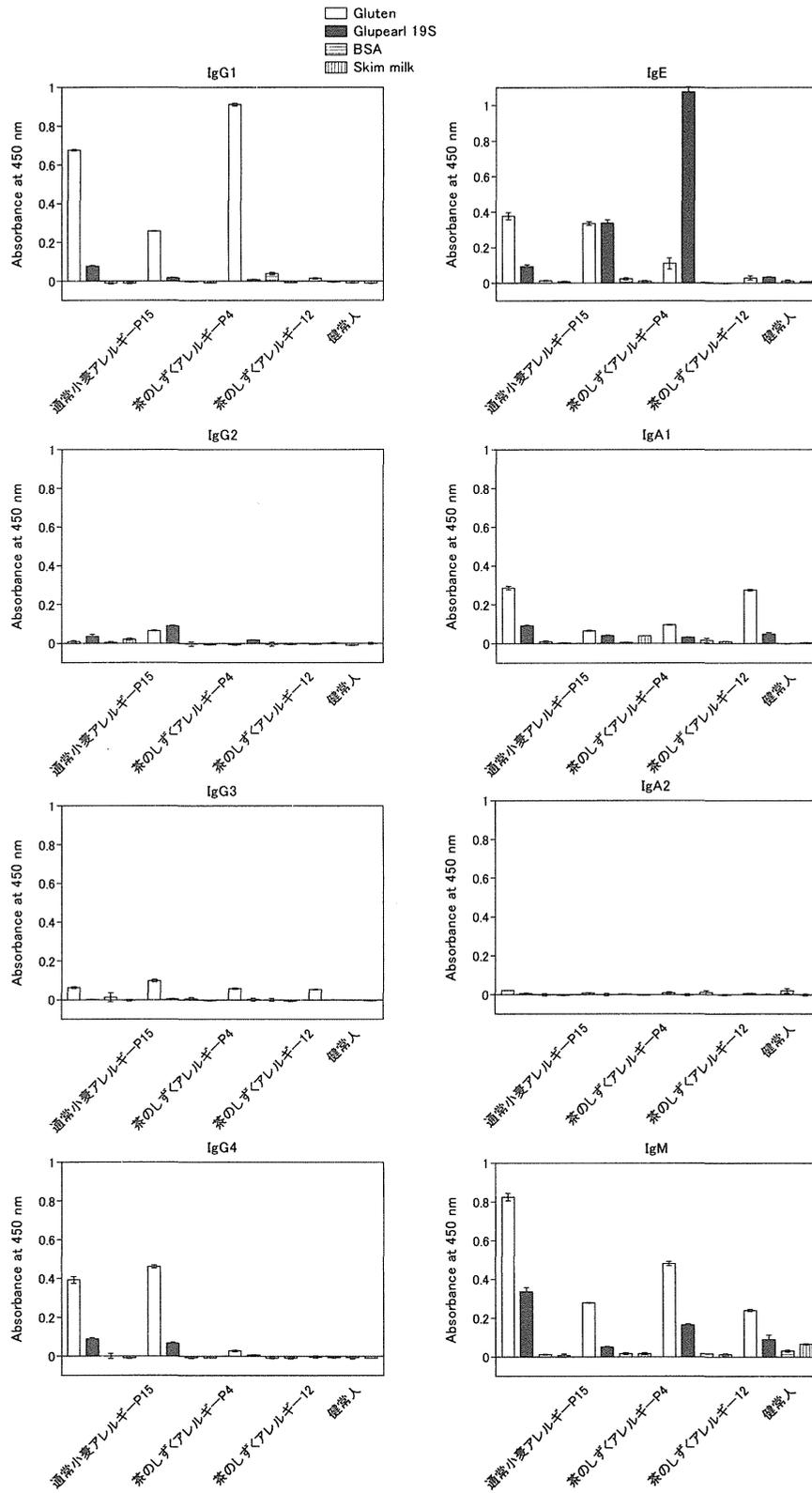


図1 茶のしずく小麦アレルギー患者P4とP12ならびに通常小麦アレルギー患者P15)の血漿中のグルテン、グルパール19Sに対するクラス別抗体価

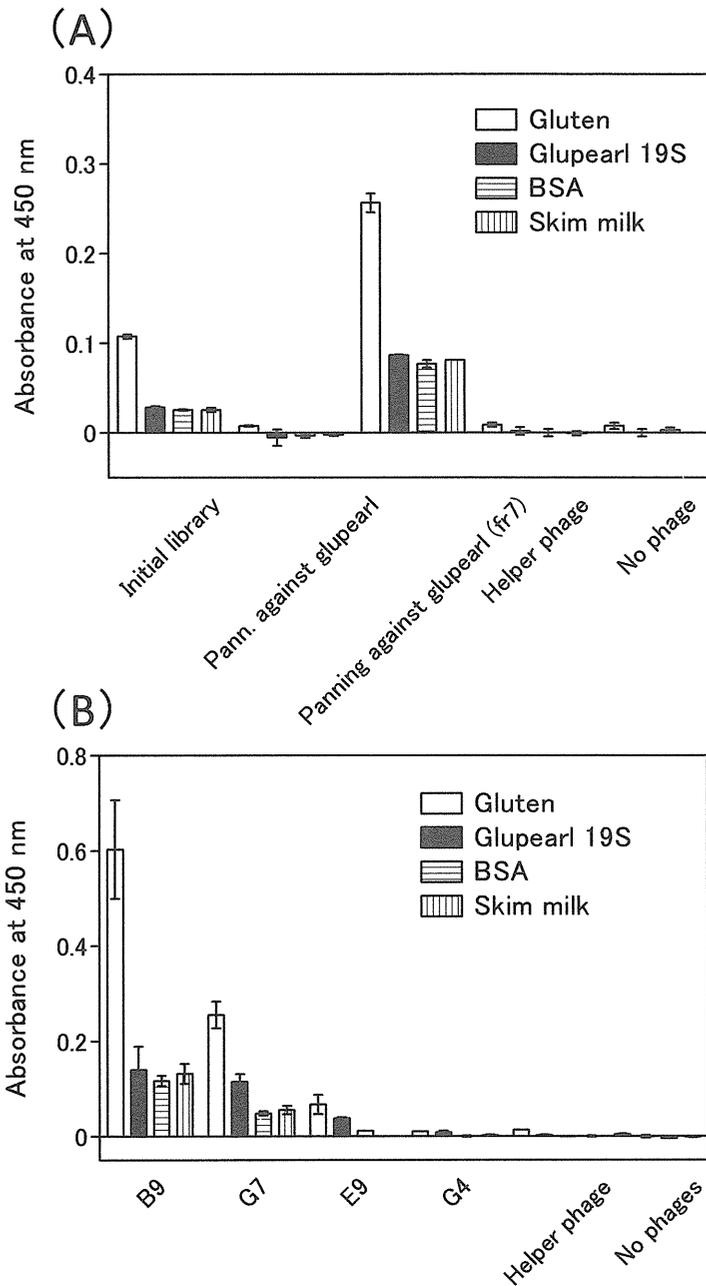


図2 茶のしずく患者P4ライブラリ単鎖Fv抗体ファージライブラリからのグルパール19Sに対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離 (A) 患者4由来のIgE抗体ファージライブラリからグルパール (Glupearl-1R) 並びにグルパール分画7 (昨年度の報告参照) に対する1回のバイオパンニングによって得られたファージ集団のELISAによる抗原結合活性、(B) グルパール (グルパール分画7) に対するバイオパンニングによって得られた3種のグルテン特異的抗体クローンの結合特性

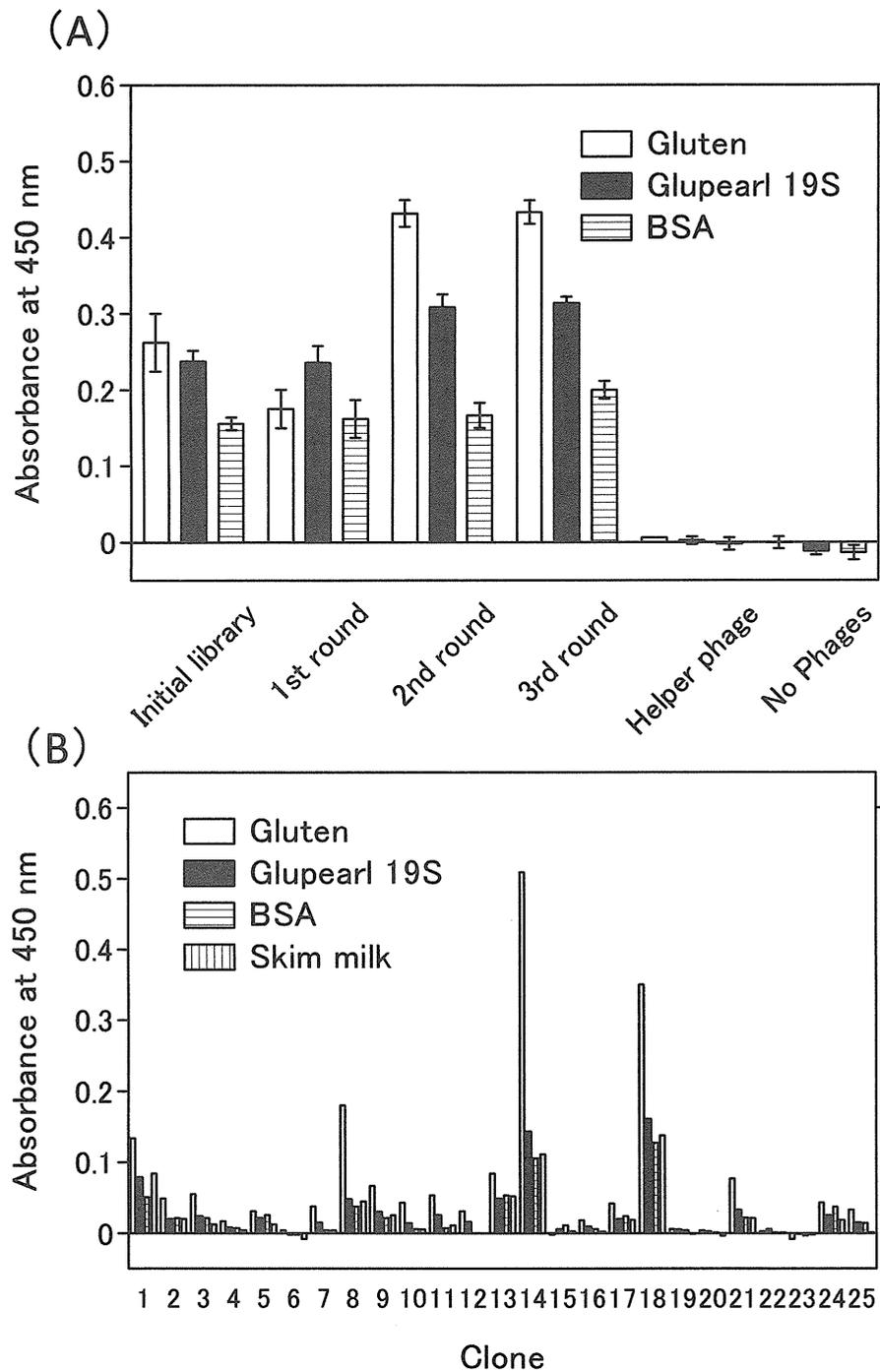


図3 茶のしずく患者 P12 ライブラリ単鎖 Fv 抗体ファージライブラリからのグルパール 19S に対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離 (A) 患者 P12 由来の IgE 抗体ファージライブラリからグルパール (Glupearl 19S) に対する 1-3 回のバイオパンニングによって得られたファージ集団の ELISA による抗原結合活性、(B) グルパール (グルパール分画 7) に対する 2 回のバイオパンニング後に得られた 3 種のグルテン特異的抗体クローンの結合特性

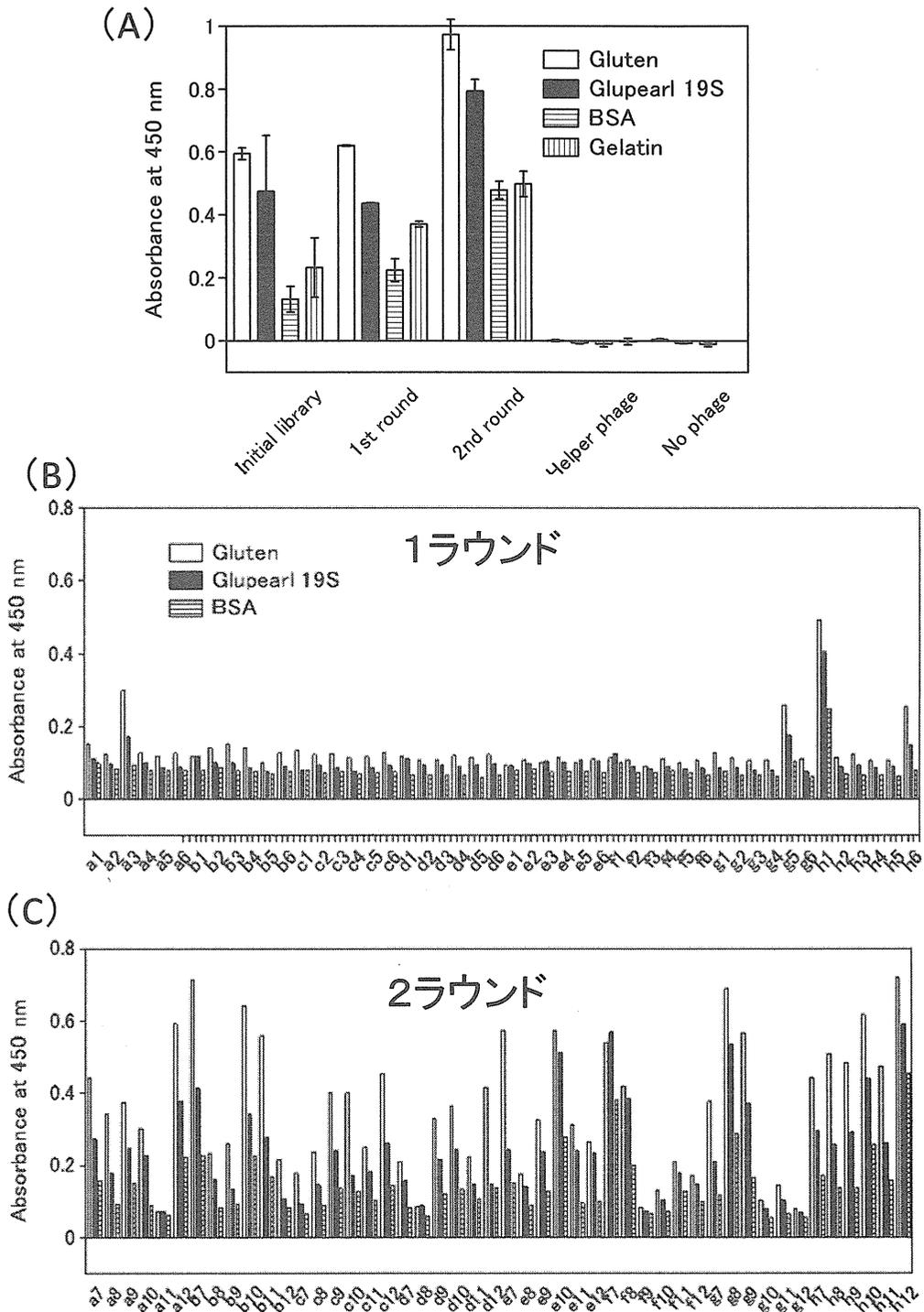


図4 茶のしずく患者P4 ライブラリ単鎖Fv抗体ファージライブラリからのグルテンに対するバイオパニングによる抗原特異的クローンの単離 (A) 患者4由来のIgE抗体ファージライブラリからグルテンに対するバイオパニングによって得られたファージ集団のELISAによる抗原結合活性、(B) 1回のバイオパニング後のクローンのELISAによる結合スクリーニング、(C) 2回のバイオパニング後のクローンのELISAによる結合スクリーニング

(A)

ID	増幅倍率	パニング前 含有率	パニング後 含有率
>P4-GT1	33.77094	0.00469	0.15828
>P4-GT2	26.53431	0.00937	0.24873
>P4-GT3	19.29768	0.00469	0.09045
>P4-GT4	19.29768	0.00469	0.09045
>P4-GT5	14.47326	0.00469	0.06783
>P4-GT6	14.47326	0.00469	0.06783
>P4-GT7	14.47326	0.00469	0.06783
>P4-GT8	13.26716	0.00937	0.12436
>P4-GT9	12.06105	0.00469	0.05653
>P4-GT10	12.06105	0.00469	0.05653
>P4-GT11	11.68994	0.06093	0.71227
>P4-GT12	10.85495	0.00937	0.10175
>P4-GT13	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT14	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT15	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT16	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT17	7.79329	0.06093	0.47484
>P4-GT18	7.23663	0.01406	0.10175
>P4-GT19	7.23663	0.00937	0.06783
>P4-GT20	7.23663	0.00937	0.06783
>P4-GT21	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT22	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT23	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT24	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT25	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT26	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT27	6.75419	0.02343	0.15828
>P4-GT28	6.43256	0.01406	0.09045
>P4-GT29	6.03053	0.00937	0.05653
>P4-GT30	6.03053	0.00937	0.05653
>P4-GT31	5.30686	0.02343	0.12436
>P4-GT32	4.82442	0.01406	0.06783
>P4-GT33	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT34	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT35	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT36	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT37	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT38	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT39	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT40	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT41	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT42	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT43	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT44	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT45	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT46	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT47	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT48	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT49	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT50	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT51	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT52	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT53	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT54	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT55	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT56	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT57	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT58	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT59	4.02035	0.01406	0.05653
>P4-GT60	4.02035	0.01406	0.05653
>P4-GT61	3.61832	0.01875	0.06783
>P4-GT62	3.61832	0.00937	0.03392
>P4-GT63	3.61832	0.00937	0.03392
>P4-GT64	3.31679	0.03750	0.12436
>P4-GT65	3.21628	0.01406	0.04522
>P4-GT66	3.01526	0.01875	0.05653
>P4-GT67	3.01526	0.01875	0.05653
>P4-GT68	2.89465	0.02343	0.06783

(B)

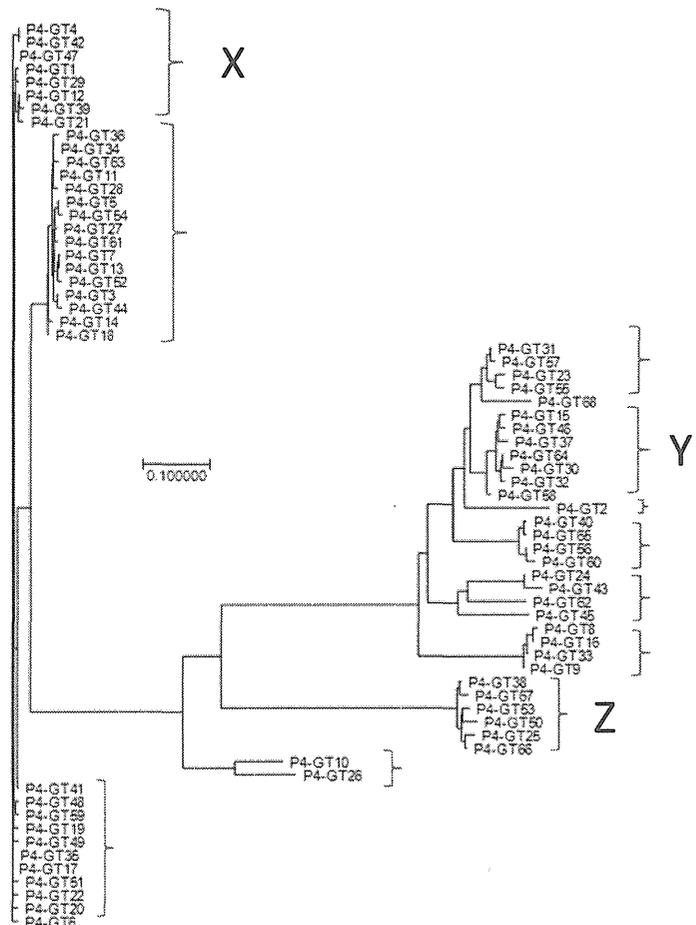
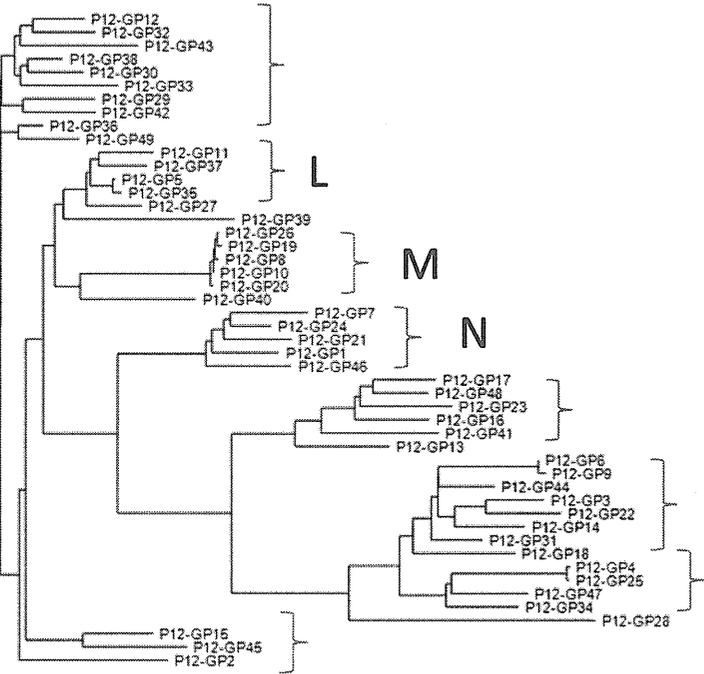


図5 次世代シーケンサーによって解析された、患者 P4 の IgE ライブラリのグルテンに対するバイオパニングによって増幅された特異クローン (A) 患者 P4 の IgE ライブラリのバイオパニング前後での各クローン配列の全体集団における存在率と、存在率の比から算出されたバイオパニングによる増幅倍率。(B) 増幅倍率が 2.5 倍以上のクローン (ID) のアミノ酸配列を基にした分子系統樹。}は、系統樹でクラスターを形成すると認められるクローンをまとめた。クラスター X, Y, Z の中の代表的なクローンのアミノ酸配列を図 7 に示した。

(A)

ID	増幅倍率	パニング前 含有率	パニング後 含有率
>P12-GP1	6.01385	0.01581	0.09509
>P12-GP2	5.26212	0.00791	0.04160
>P12-GP3	5.26212	0.00791	0.04160
>P12-GP4	5.26212	0.00791	0.04160
>P12-GP5	5.07418	0.01581	0.08023
>P12-GP6	4.88625	0.00791	0.03863
>P12-GP7	4.88625	0.00791	0.03863
>P12-GP8	4.51039	0.00791	0.03566
>P12-GP9	4.51039	0.01581	0.07132
>P12-GP10	4.25198	0.12649	0.53784
>P12-GP11	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP12	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP13	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP14	4.13452	0.01581	0.06537
>P12-GP15	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP16	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP17	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP18	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP19	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP20	3.50808	0.02372	0.08320
>P12-GP21	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP22	3.38279	0.01581	0.05349
>P12-GP23	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP24	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP25	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP26	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP27	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP28	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP29	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP30	3.25750	0.02372	0.07726
>P12-GP31	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP32	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP33	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP34	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP35	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP36	2.91296	0.03162	0.09212
>P12-GP37	2.81899	0.01581	0.04457
>P12-GP38	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP39	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP40	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP41	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP42	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP43	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP44	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP45	2.63106	0.01581	0.04160
>P12-GP46	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP47	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP48	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP49	2.50577	0.02372	0.05943

(B)



Tree name: GENETYX
 OTU count: 49
 Constructed by:
 Construction date: Sat Feb 22 14:04:19 2014
 Method: NJ
 Bootstrap trial count = 100

0.100660

図6 次世代シーケンサーによって解析された、患者P12のIgEライブラリのグルパール19Sに対するバイオパニングによって増幅された特異クローン (A) 患者P12のIgEライブラリのバイオパニング前後での各クローン配列の全体集団における存在率と、存在率の比から算出されたバイオパニングによる増幅倍率。(B) 増幅倍率が2.5倍以上のクローン(ID)のアミノ酸配列を基にした分子系統樹。クラスターL, M, Nの中の代表的なクローンのアミノ酸配列を図7に示した。

医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての 動物モデルに関する研究

研究分担者 安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨:

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール19Sと同等の感作性が認められ、加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。今後更に検討を重ね、タンパク質加水分解物による経皮感作について、感作性や影響要因の詳細に関する解析を進めることにより、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

協力研究者

酒井 信夫、中村 里香、手島 玲子
(国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部)

A. 研究目的

医薬部外品・化粧品の中には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、食品等に由来するタンパク質あるいはその分解物が配合されているものがある。薬事法上、医薬部外品等は人体に対する作用が緩和であり、その使用による健康被害が起きた場合でも、人体に対してそれ程重大な影響は与えないと考えられてきた。しかし最近、ある特定の小麦タンパク質加水分解物(グルパール19S)を含有する洗顔石鹸(茶のしずく石鹸:医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となっている。この事例においては、洗顔の際に、経皮的あるいは経粘膜的(眼や鼻の粘膜を介する)に石鹸中の小麦タンパク質加水分解物が体内に吸収されて感作され、小麦を使用した食品を摂取した際に小麦に対する食物アレルギーの症状が

現れたものと考えられている。本研究では、タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因がこの経皮感作性に与える影響について解析することを目的とし、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用い、加水分解コラーゲンの経皮感作性、及び、グルパール19Sとは異なる調製方法であるアルカリ加水分解により調製した小麦タンパク質加水分解物の感作性について検討した。

B. 研究方法

抗原懸濁液の調製

グルパール19Sは株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma G5004)およびグルパール19S粉末を100 mg/mLとなるよう1M Tris(pH 11.4)に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を作製した。経皮感作には、ストック溶液をPBSで10倍希釈し、pHを8付近に調整したものを用いた。

加水分解コラーゲン9試料(A~I)は日本化粧品工業連合会を通じて入手した。試料をTable 1に示す。ウシ由来コラーゲン(BC; Sigma C9879)、

ウシ由来ゼラチン(BG; シグマアルドリッチジャパン 12-0230-5)、魚由来コラーゲン(FC; 井原水産)、魚由来ゼラチン(FG; Sigma G7041)、ウシ由来コラーゲンペプチド酸分解品(J; 和光純薬 032-15791)、及びウシ由来コラーゲンペプチド酵素分解品(K; 和光純薬 035-15801)は試薬標準品を購入した。これらの試料は終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。Fig. 1 に加水分解コラーゲンの SDS-PAGE パターンを示す。

アルカリ加水分解グルテンについては、グルテンのストック懸濁液に 1M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を約 12 に調整し、100°C のヒートブロック上で、0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間加熱した。所定の時間経過後、1N 塩酸を加えて中和し加水分解を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。分解 0 時間のサンプルは、1M 水酸化ナトリウムを予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した。Fig. 2 にアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンを示す。

マウスを用いた経皮感作実験

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 群中の匹数は 5-8 匹とした。8 週齢時に背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より 3 日間抗原懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った(Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリー」(鳥居薬品株式会社)を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原懸濁液(500 μ g protein)を浸潤させて貼付した。パッチテスターの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3 日間の感作後にパッチを外し(Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの感作後、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応

の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg/100 μ L を腹腔内投与(i. p.)して行った。i. p. 後 30 分間、マウスの直腸内体温の測定を行った。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 2 の基準に従ってスコアリングした。惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

【実験 1-1/1-2】加水分解コラーゲンの経皮感作性に関する検討

感作抗原は Table 3 に、感作スケジュールは Fig. 3 に示す。加水分解コラーゲンの経皮感作性を評価するため、陽性コントロールにグルパール 19S(19S)を、陰性コントロールには PBS(V)を使用した。【実験 1-1】の感作検体には、19S、V に加え、ウシ由来コラーゲン(BC)、ウシ由来ゼラチン(BG)の試薬標準品、ウシ由来ゼラチン加水分解物 2 種(A, B)、ブタ由来ゼラチン加水分解物 2 種(C, D)を用いた。【実験 1-2】は 19S、V に加え、魚由来コラーゲン(FC)、魚由来ゼラチン(FG)の試薬標準品、ティラピア由来コラーゲン及びゼラチン加水分解物(F, G)、サケ由来加水分解物(H, I)を用いた。全ての感作検体にはラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度 0.5%で添加し、1 回の感作抗原量は 500 μ g protein とした。1 群の設定匹数を 5 匹として経皮感作性及びアナフィラキシー誘導能を評価した。

【実験 2】アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

感作抗原は Table 3 に、感作スケジュールは Fig. 3 に示した。グルテンのアルカリ加水分解は上述のとおりに行った。加水分解時間を変化させたアルカリ加水分解グルテンに SDS を終濃度 0.5% となるように添加し、貼付抗原とした。1 群の設定匹数を 8 匹として、未分解グルテン(A1k0h)、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示した 0.5 時間加水分解グルテン(A1k0.5h)、および加水分解が進み、SDS-PAGE で 30kDa 以上のタンパク質バンドがほぼ消失している 12 時間加水分解グルテン(A1k12h)の経皮感作性を検討した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、IBM SPSS Statistics ソフトウェアを用いて V 群を基準とした Dunnett の検定および各群間の Tukey の多重検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

マウスへの経皮感作、採血においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の利用規定に従った。本実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

【実験 1-1/1-2】加水分解コラーゲンの経皮感作性に関する検討

加水分解コラーゲンの経皮感作性について検討を行った。Fig. 4-1 には、感作 4 週後のマウス血清中の抗原特異的抗体価についての検討結果を示す。A、B はそれぞれ抗原特異的 IgE 及び IgG1 についての検討結果を示している。グルパール 19S 感作群 (19S) では昨年度の研究結果と同様に、血清中グルパール 19S 特異的 IgE、IgG1 が Vehicle 群 (V) と比較して有意に増加した (いずれも $p < 0.001$)。他方、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群 (BC, BG, FC, FG, A~D, 及び F~I) では V 群と比較して血清中抗原特異的 IgE、IgG1 の増加は認められなかった。

Fig. 4-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応の結果を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、19S 群では体温が大きく低下し ($3.1 \pm 2.2^\circ\text{C}$, $4.2 \pm 1.4^\circ\text{C}$)、V 群と比較して有意差が認められた (いずれも $p < 0.001$)。一方、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では体温低下は認められなかった。B は惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒ

スタミン濃度が大きく上昇していた。体温低下が認められなかったコラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では、ヒスタミン濃度についても上昇が認められなかった。C は惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果である。19S 群では平均 3.0 と高いスコアであったのに対し、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では平均 1.0 以下と低いスコアであった。

【実験 2】アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

本実験に供したアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンを Fig. 2 に示す。アルカリ加水分解 0.5 時間においてグルパール 19S と同等の泳動位置に広範囲のスミアなバンドが観察された。この SDS-PAGE パターンを基に、未分解グルテン (Alk0h)、0.5 時間加水分解物 (Alk0.5h) 及びほぼ 30kDa 以下にまで分解されている 12 時間加水分解物 (Alk12h) を検体とし、マウスに対する経皮感作能を検討した。

Fig. 5-1A には血清中抗原特異的 IgE、B には IgG1 の測定結果を示す。19S 群、Alk0h 群、Alk0.5h 群は V 群と比較して抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体の有意な増加が認められた (いずれも $p < 0.001$)。一方、Alk12h 群では V 群との間に有意差は見られなかった。

Fig. 5-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応の結果を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、19S 群では体温が大きく低下し ($4.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$)、V 群と比較して有意差が認められた ($p < 0.001$)。Alk0h 群及び Alk0.5h 群では、19S 群には及ばないものの、それぞれ $2.3 \pm 1.6^\circ\text{C}$ 、 $3.5 \pm 1.4^\circ\text{C}$ の体温低下が観察され、V 群と比較して有意差が認められた ($p < 0.001$)。一方 Alk12h 群における体温低下は $0.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$ であり、V 群との間に有意差は見られなかった。B は惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。また Alk0h 群、