厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
「医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究」
分 担 研 究 報 告 書（平成25年度）

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クエ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、茶のしずく石鹸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 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もに、他の茶のしずく石鹸による小麦アレルギー患者、さらに、通常の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、次世代シークエ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 茶のしずく石鹸による小麦アレルギーを発症した患者 P4 と P12、並びに、通常の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冨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。

次世代シークエンサーによる 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。次世代シークエ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 シークエンサーMiSeq (Illumina)を用いて行った。得られたシークエ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の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鹸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-VLκ：2.1×10^7 並びに VH-VLλ：1.7×10^7）、茶のしずく患者 P12 ライブラリが、2.8×10^7（VH-VLκ：1.1×10^7 並びに VH-VLλ：1.7×10^7）、通常小麦アレルギーライブラリは、4.8×10^7（VH-VLκ：2.8×10^7 並びに VH-VLλ：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パイ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、通常の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グ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こっていることを示す。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クエンサーによる網羅的解析を試みた。

次世代シークエ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５A 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５A のクローン配列を基に分子系統樹を作製したところ、図５B 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１１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も、この次世代シークエ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６A 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５A）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６B 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。通常のパンニングで得られた P4－GT-E7 のクローン（図４）と、次世代シークエ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、次世代シークエ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４B 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５B 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の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クエ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 Biomaker, 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, Yosihisa Hagihara, Matsuda Tomonari, Seiya Inoue, Kzunori Arima and Yuji Ito, Isolation and characterization of antigen-specific VHH antibodies from immunized alpaca VHH antibody phage lbrary 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

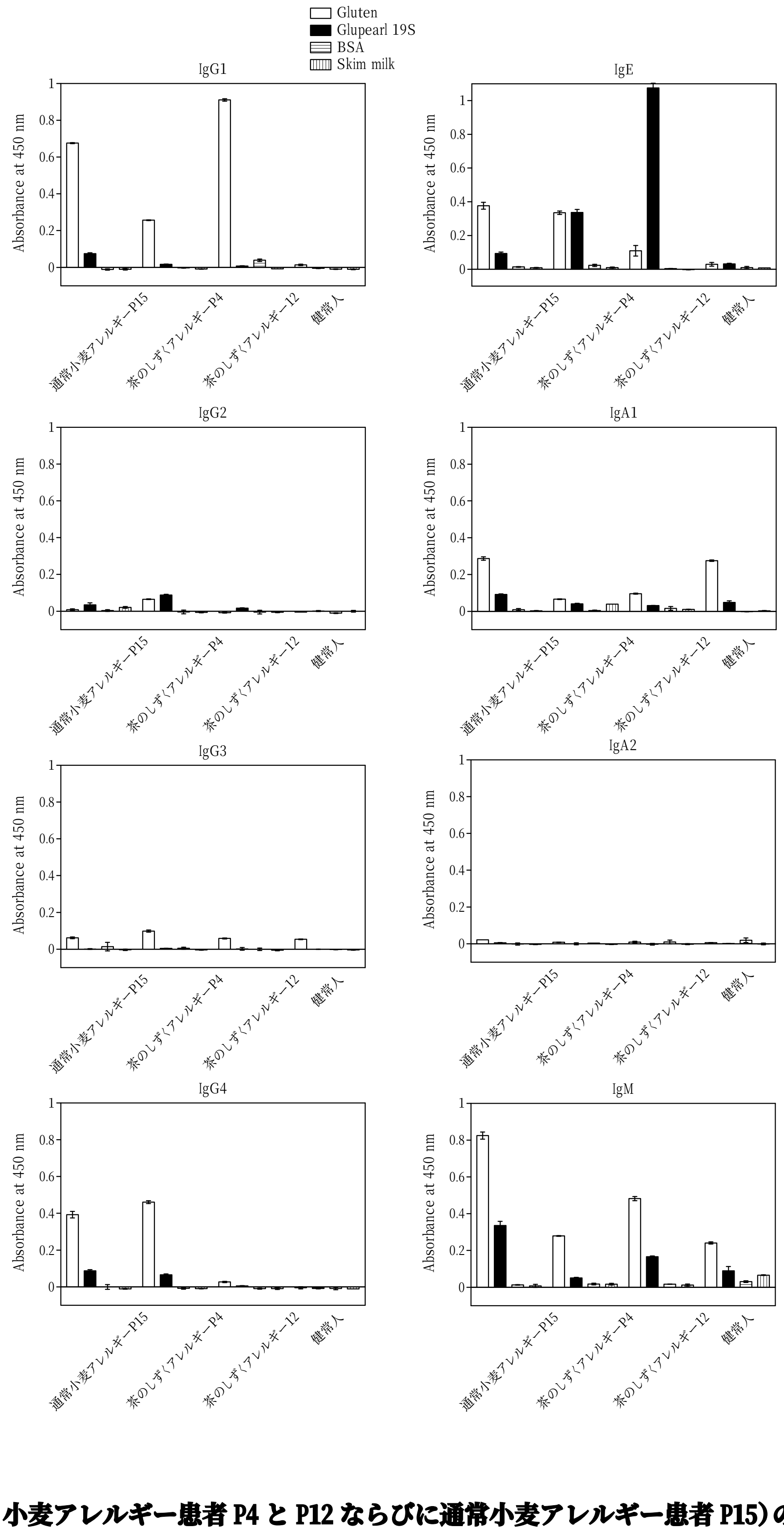


図１　茶のしずく小麦アレルギー患者 P4 と P12 ならびに通常小麦アレルギー患者 P15）の血漿中のグルテン、グルパール 19S に対するクラス別抗体価

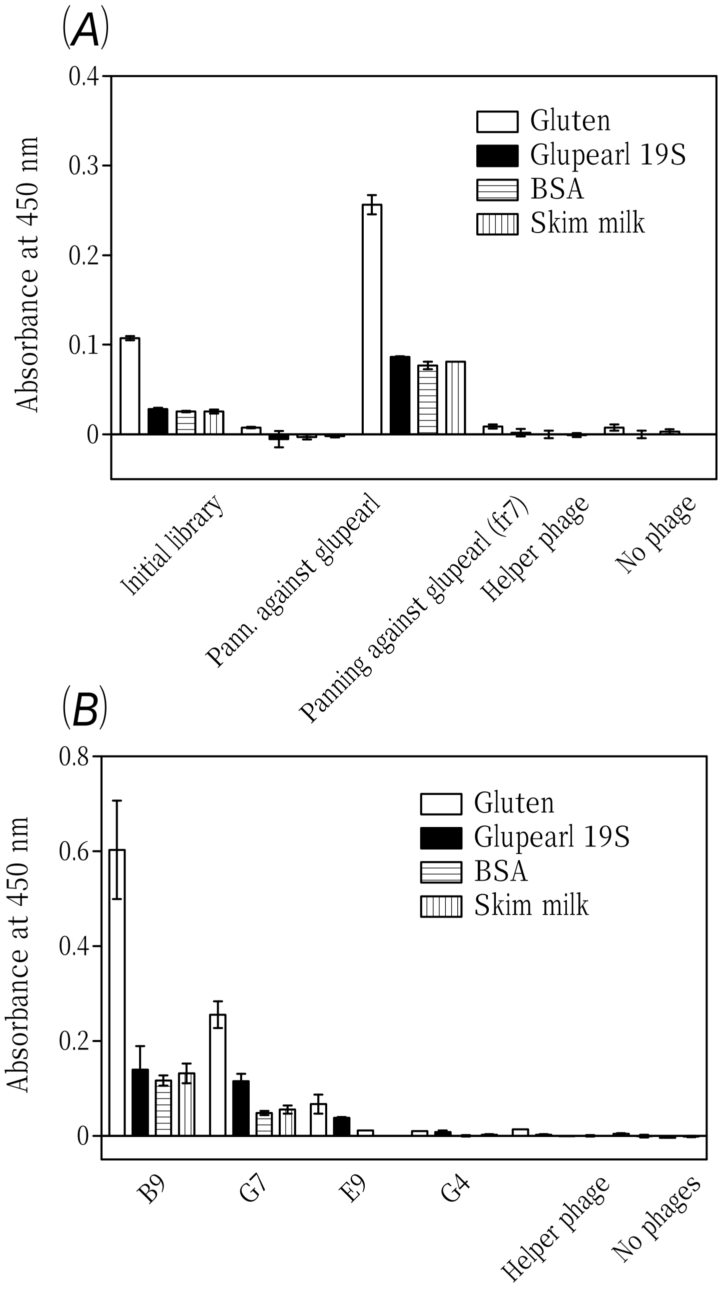
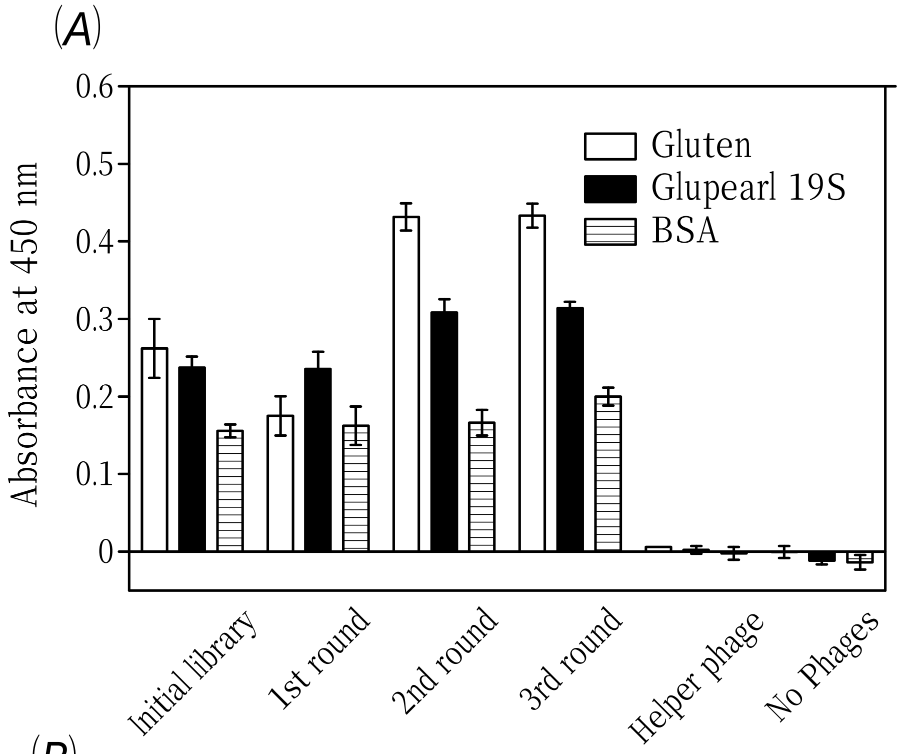


図２　茶のしずく患者P4ライブラリ単鎖Fv抗体ファージライブラリからのグルパール19Sに対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離　　(A) 患者４由来の IgE 抗体ファージライブラリからグルパール (Glup-1R) 並びにグルパール分画７ (昨年度の報告参照) に対する１回のバイオパンニングよって得られたファージ集団の ELISA による抗原結合活性、(B) グルパール (グルパール分画７) に対するバイオパンニングによって得られた３種のグルテン特異的抗体クローンの結合特性



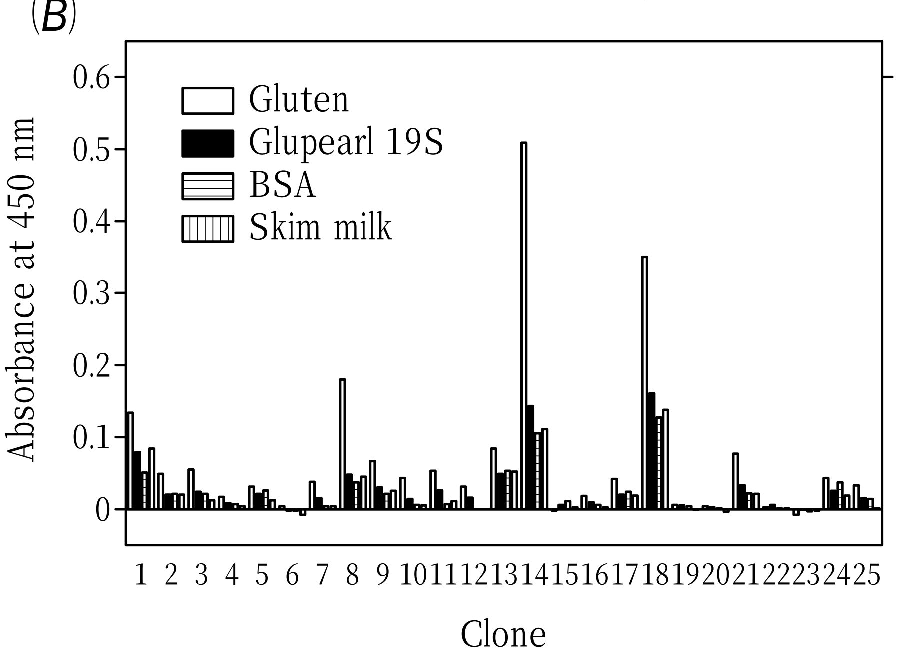


図３　茶のしずく患者 P12 ライブラリ単鎖 Fv 抗体ファージライブラリからのグルパール 19S に対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離　（A）患者 P12 由来の IgE 抗体ファージライブラリからグルパール（Glup-1R）に対する１-３回のバイオパンニングよって得られたファージ集団の ELISA による抗原結合活性、（B）グルパール（グルパール分画７）に対する２回のバイオパンニング後に得られた３種のグルテン特異的抗体クローンの結合特性

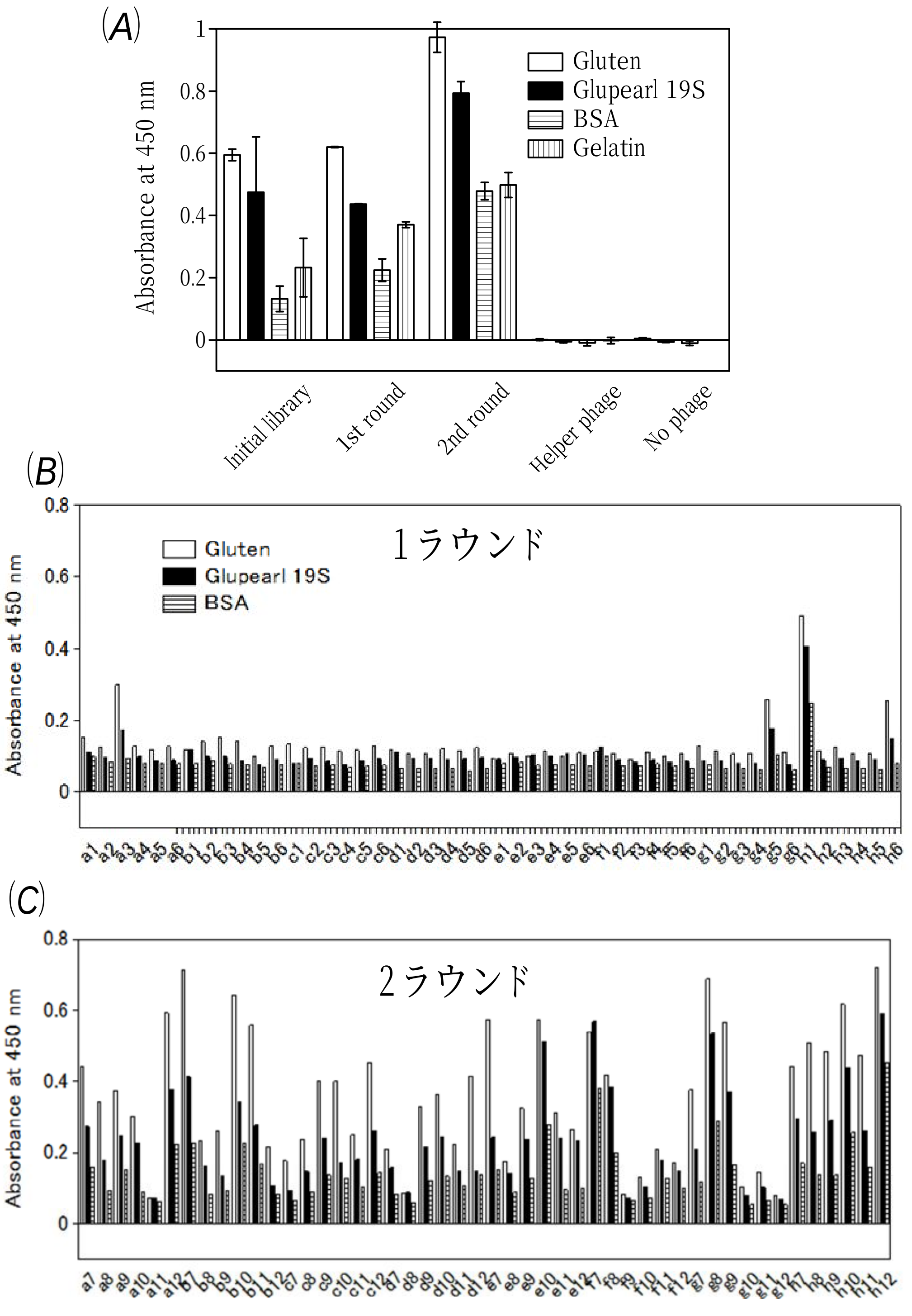


図４　茶のしずく患者P4ライブラリ単鎖Fv抗体ファージライブラリからのグルテンに対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離　（A）患者４由来の IgE 抗体ファージライブラリからグルテンに対するバイオパンニングよって得られたファージ集団の ELISA による抗原結合活性、（B）１回のバイオパンニング後のクローンの ELISA による結合スクリーニング、（C）２回のバイオパンニング後のクローンの ELISA による結合スクリーニング

(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)

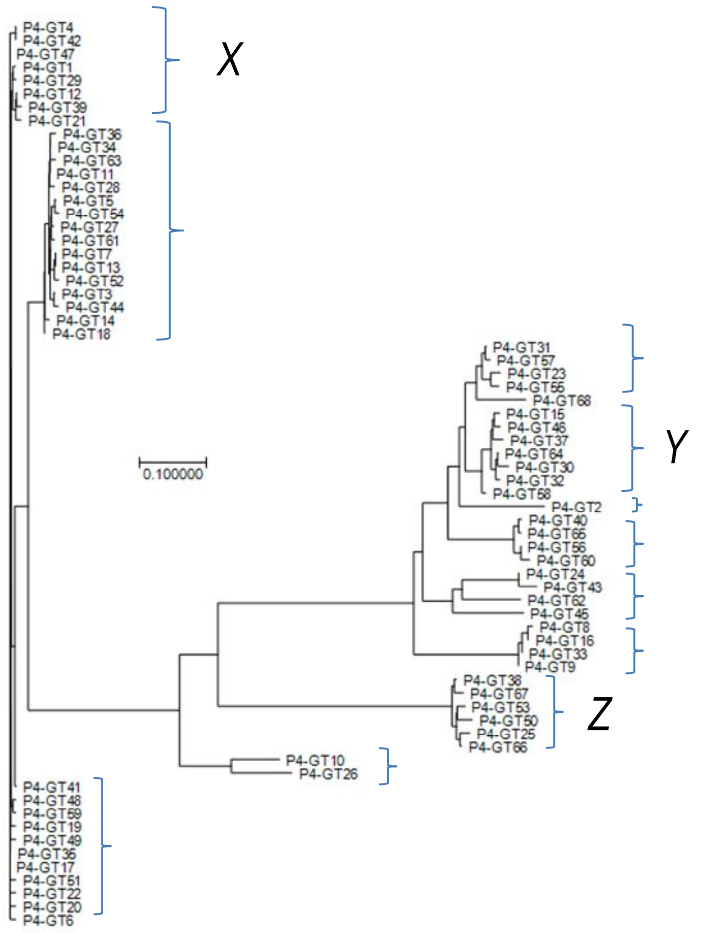


図５　次世代シークエンサーによって解析された、患者 P4 の IgE ライブラリのグルテンに対するバイオパンニングによって増幅された特異クローン　（A）患者 P4 の IgE ライブラリのバイオパンニング前後での各クローン配列の全体集団における存在率と、存在率の比から算出されたバイオパンニングによる増幅倍率。（B）増幅倍率が２．５倍以上のクローン（ID）のアミノ酸配列を基にした分子系統樹。}は、系統樹でクラスターを形成すると認められるクローンをまとめた。クラスターX,Y,Z の中の代表的なクローンのアミノ酸配列を図７に示した。

(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)

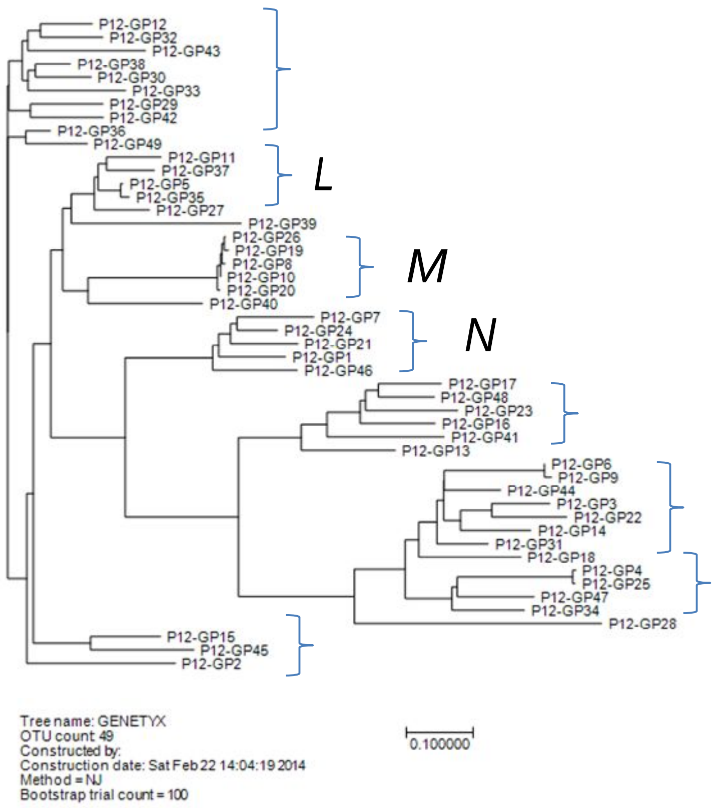


図６　次世代シークエンサーによって解析された、患者 P12 の IgE ライブラリのグルパール 19S に対するバイオパンニングによって増幅された特異クローン　（A）患者 P12 の IgE ライブラリのバイオパンニング前後での各クローン配列の全体集団における存在率と、存在率の比から算出されたバイオパンニングによる増幅倍率。（B）増幅倍率が２．５倍以上のクローン（ID）のアミノ酸配列を基にした分子系統樹。クラスターL,M,N の中の代表的なクローンのアミノ酸配列を図７に示した。

```
Xgroup-P4-GT1      1 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFSS--NPFTWVRQAPGQGLEWL 48
Xgroup-P4-GT4      1 QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKASGGPFSS--NPFTWVRQAPGQGLEWL 48
Xgroup-P4-GT21     1 QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFSS--NPFTWVRQAPGQGLEWL 48
Ygroup-P4-GT15     1 EVQLVGSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD--YAMHWVRQAPGKGLEWV 48
Ygroup-P4-GT32     1 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD--YAMHWVRQAPGKGLEWV 48
Ygroup-P4-GT37     1 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD--YAMHWVRQAPGKGLEWV 48
Zgroup-P4-GT8      1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRS--YAMSWVRQSPGKGLEWV 48
Zgroup-P4-GT9      1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRS--YAMSWVRQSPGKGLEWV 48
Zgroup-P4-GT16     1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRS--YAMSWVRQSPGKGLEWV 48
Lgroup-P12-GP6     1 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSTDYYWGWIRQPPGKGLEWI 50
Lgroup-P12-GP11    1 QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYTFTS--YGITWVRQAPGQGLEWM 48
Lgroup-P12-GP37    1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNS--YGINWVRQAPGQGLEWM 48
Mgroup-P12-GP8     1 QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYPLTE--FSMHWVRQAPGKGLEWM 48
Mgroup-P12-GP10    1 QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYPLTE--FSMHWVRQAPGKGLEWM 48
Mgroup-P12-GP20    1 QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYPLTE--FSMHWVRQAPGKGLEWM 48
Ngroup-P12-GP1     1 QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFIR--YWIGWVRQVPGKGLEWM 48
Ngroup-P12-GP7     1 QMQLVQSGAEVEKPGESLKISCKGSGYSLTN--YWIAWVRQMPGKGLEWL 48
Ngroup-P12-GP4     1 QVQLQQWGTGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSG--HYWSWIREIPGKGLDWI 48

Xgroup-P4-GT1     49 GKISPFNGIAEYAQNFQGRLTLSADNPTSTAYMELNSLRPDDTAIYYCAR 98
Xgroup-P4-GT4     49 GKISPFNGIAEYAQNFQGRLTLTADNPTSTAYMELNSLRPDDTAIYYCAR 98
Xgroup-P4-GT21    49 GKISPFNGIAEYAQNFQGRLTLSADNPTSTAYMELNSLRPDDTAIYYCAR 98
Ygroup-P4-GT15    49 SGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK 98
Ygroup-P4-GT32    49 SGISWNSGSIGYADSVKGRVTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK 98
Ygroup-P4-GT37    49 SGISWNSGSIGYADSVKGRVTICRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK 98
Zgroup-P4-GT8     49 SGISDTGGRTFYADAVKGRFTSCRDNSKNTLYLQLKSLRDDDAAVYYCAK 98
Zgroup-P4-GT9     49 SGISDTGGRTFYADAVKGRFTSSRDNSKNTLYLQLKSLRDDDAAVYYCAK 98
Zgroup-P4-GT16    49 SGISDTGGRTFYADAVKGRFTSSRDNSKNTLYLQLKSLRDDDAAVYYCAK 98
Lgroup-P12-GP6    51 GIIY-ISGTTYYNPSLQSRVTISLHASKNQVSLKLNSVIAADTAIYYCA- 98
Lgroup-P12-GP11   49 GWISPYNGDTNYAQTLQGRVTMTTDTSTSTAYMDLRSLKSDDTAVYYCAR 98
Lgroup-P12-GP37   49 GWISGYNGDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR 98
Mgroup-P12-GP8    49 GGFDAEDGETKYAQTLQGRVTMSEDTSTDTAYMELRSLRSEDTAVYYCTT 98
Mgroup-P12-GP10   49 GGFDAEDGETKYAQTLQGRVTMTEDTSTDTAYMELRSLRSEDTAVYYCTT 98
Mgroup-P12-GP20   49 GGFDAEDGETKYAQTLQGRVTMTEDTSTDTAYMELRSLRSEDTAVYYCTT 98
Ngroup-P12-GP1    49 GIIYPDDSDSRYSPPFQGQVTISADKSISTANLQWSSLKASDTALYYCAR 98
Ngroup-P12-GP7    49 GVIYPGDSDTKYSPSFQGQVSISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR 98
Ngroup-P12-GP4    49 GEIN-ERGSTNYNPSLSSRVIISVDTSKNQFSMKLTSVTVADTAVYYCAR 97

Xgroup-P4-GT1     99 --PSHSRGYGRTFDYWGQGTLVTVSS                         122
Xgroup-P4-GT4     99 --PSHSRGYGRTFDYWGQGTLVTVSS                         122
Xgroup-P4-GT21    99 --PSHSRGYGRTFDYWGQGTLVTVSS                         122
Ygroup-P4-GT15    99 D-----LSLIY----WGQGTLVTVSS                         115
Ygroup-P4-GT32    99 D-----LSLIY----WGQGTLVTVSS                         115
Ygroup-P4-GT37    99 D-----LSLIY----WGQGTLVTVSS                         115
Zgroup-P4-GT8     99 DR---GSSLPWYFDLWGRGTLVTVSS                         121
Zgroup-P4-GT9     99 DR---GSSLPWYFDLWGRGTLVTVSS                         121
Zgroup-P4-GT16    99 DR---GSSLPWYFDLWGRGTLVTVSS                         121
Lgroup-P12-GP6    99 GMPYTSSWYRFVFDPWGQGTLVTVSS                         124
Lgroup-P12-GP11   99 -GGWGSGRFSGWFDPWGQGTLVTVSS                         123
Lgroup-P12-GP37   99 NGGYNYGAALQHFQHWGQGTLVTVSS                         124
Mgroup-P12-GP8    99 ADYYDSSGPPG--DYWGQGTLVTVSS                         122
Mgroup-P12-GP10   99 ADYYDSSGPPG--DYWGQGTLVTVSS                         122
Mgroup-P12-GP20   99 ADYYESSGPPG--DYWGQGTLVTVSS                         122
Ngroup-P12-GP1    99 ----RSGT--GTVDYWGQGTLVTVSS                         118
Ngroup-P12-GP7    99 ----VSSSWWGALDYWGHGTLVTVSS                         120
Ngroup-P12-GP4    98 GRPIIGVNW---FDPWGQGTLVTVSS                         120
                     <----------------->
                           H-CDR3
```

図７　次世代シークエンス解析より明らかになったグルテン（グループ X,Y,Z）並びにグルパール 19S（グループ L,M,N）特異的な IgE 抗体候補クローンの配列　図５、６における X,Y,Z,L,M,N のクラスターの中から３つを選び、アラインメントした結果を記した。