

博士論文

エビによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー
の抗原解析

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

病院薬剤学研究室

平成 29 年度入学 秋本 栞里

主指導教員 松尾 裕彰

目次

序論.....	1
本論.....	7
1. エビによる FDEIA 患者血清中 IgE 抗体に結合するタンパク質の同定.....	7
1-1. 背景と目的.....	7
1-2. 患者データ.....	8
1-3. 結果.....	8
1-4. 考察.....	9
2. 4 種のエビタンパク質に対する患者 IgE 抗体の結合解析.....	12
2-1. 背景と目的.....	12
2-2. 結果.....	13
2-3. 考察.....	13
3. 質量分析法を用いた患者血清中 IgE 結合タンパク質の同定.....	16
3-1. 背景と目的.....	16
3-2. 結果.....	17
3-3. 考察.....	18
4. P75 homologue および FBPA の精製.....	20
4-1. 背景と目的.....	20
4-2. 結果.....	21
4-3. 考察.....	26
5. 精製 P75 homologue および FBPA と患者血清 IgE 抗体との結合解析.....	28
5-1. 背景と目的.....	28
5-2. 結果.....	28
5-3. 考察.....	28
結論.....	31
実験方法.....	32
参考文献.....	38
論文目録.....	43

略語一覽

2-ME	2-mercaptoethanol
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CHAPS	3-(3-cholamidepropyl) dimethylammonio-1-propanesulphonate
CRD	component resolved diagnosis
CV	column volume
Da	Dalton
DTT	dithiothreitol
FBPA	fructose 1,6-bisphosphate aldolase
FDEIA	food-dependent exercise-induced anaphylaxis
FEIA	fluorescence enzyme immunoassay
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IgE	immunoglobulin E
IL	interleukin
LMW	low-molecular weight
MS	mass spectrometry
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
pH	potential Hydrogen, power of Hydrogen
QOL	quality of life
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tween-20	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UV	ultra violet

序論

食物アレルギーとは「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義されている [1]。食物アレルギーの発症に関与する免疫学的機序には、Immunoglobulin-E (IgE) 抗体が関与する IgE 依存性反応と T 細胞が関与する IgE 非依存性（細胞障害性）反応がある。IgE 依存性反応には、食物アレルギーの関与する乳児アトピー性皮膚炎や即時型食物アレルギー、口腔アレルギー症候群や食物依存性運動誘発アナフィラキシー（food-dependent exercise-induced anaphylaxis, FDEIA）などの特殊型があり、IgE 非依存性反応には、新生児期や乳児期に嘔吐や下痢が認められる新生児・乳児消化管アレルギーがある。このうち、即時型食物アレルギーは最も頻度の高い病型である。IgE 依存性の食物アレルギーは、Coombs と Gell のアレルギー分類で I 型アレルギーに相当する。I 型アレルギー反応では、皮膚や気道、消化管などを介して体内に侵入した抗原の一部がマクロファージやランゲルハンス細胞などの抗原提示細胞によって、ナイーブ T 細胞に提示される。抗原提示を受けたナイーブ T 細胞は 2 型ヘルパー T 細胞（Th2）へと分化し、インターロイキン-4（IL-4）や IL-13 などのサイトカインを産生する。これらのサイトカインの刺激を受け、B 細胞は抗原特異 IgE 抗体を産生する形質細胞へ分化する。産生された IgE 抗体はマスト細胞の膜表面上に発現する高親和性 IgE 受容体（FcεRI）と結合する。この状態を抗原への感作という。感作が成立した後、再び体内に侵入した食物抗原は、マスト細胞の膜表面上に結合した 2 分子以上の抗原特異 IgE 抗体を架橋するように結合する。IgE の架橋形成に伴い、マスト細胞の膜構造が変化し、細胞内への Ca²⁺の流入が起き、マスト細胞が活性化して脱顆粒が惹起される。細胞外に放出された顆粒には、ヒスタミンやロイコトリエンなどの様々な化学伝達物質が含まれている。これらの化学伝達物質は様々な組織に特有の反応性を示し、全身の蕁麻疹や浮腫、血圧低下などを伴うアナフィラキシーなどの重篤なアレルギー症状を呈する [1]。

FDEIA は、即時型と同様に IgE 依存性の反応によって、蕁麻疹や呼吸器症状、致死的なアナフィラキシー症状などが惹起される食物アレルギーである。即時型食物アレルギーの症状が原因食物を摂取した後、2 時間以内に惹起されるのに対し、FDEIA の症状は原因食物の摂取のみ、または運動負荷のみでは惹起されず、原因食物を摂取した後に運動負荷がかかることで症状が惹起される。

症状が出現するまでの運動負荷時間は 10–50 分と報告されている [2]。FDEIA の発症要因となった運動には、球技やランニングなどの負荷が大きい種目の報告が多いが、散歩などの軽度の運動でも症状が惹起された症例報告もあり、FDEIA の発症頻度や重篤度は運動の強度だけでは説明ができない [3]。また、運動負荷の他にも、アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の服用が FDEIA 症状の誘発因子として報告されている [4]。運動負荷や NSAIDs の服用による FDEIA 症状の発症機序については、これらの誘発因子が消化管からの抗原タンパク質の吸収量を増加させること [5] や、アスピリンがマスト細胞や好塩基球におけるヒスタミンの遊離を促進することなどが報告されている [6]。Manabe らが横浜市の中학생を対象に行った調査では、FDEIA の罹患率は 0.018% であり、そのうちの 78.6% は 9 歳以降で発症していたと報告している [7]。さらに、小学生での有病率は 0.0046%、高校生では 0.0086% との報告があり、FDEIA の多くは学童期以降に発症し、寛解しにくいことが知られている [3]。また、本邦における FDEIA の原因食物は、小麦が 57% と最も多く、次いでエビ (18%) が多いことが報告されている (Fig. 1) [4]。

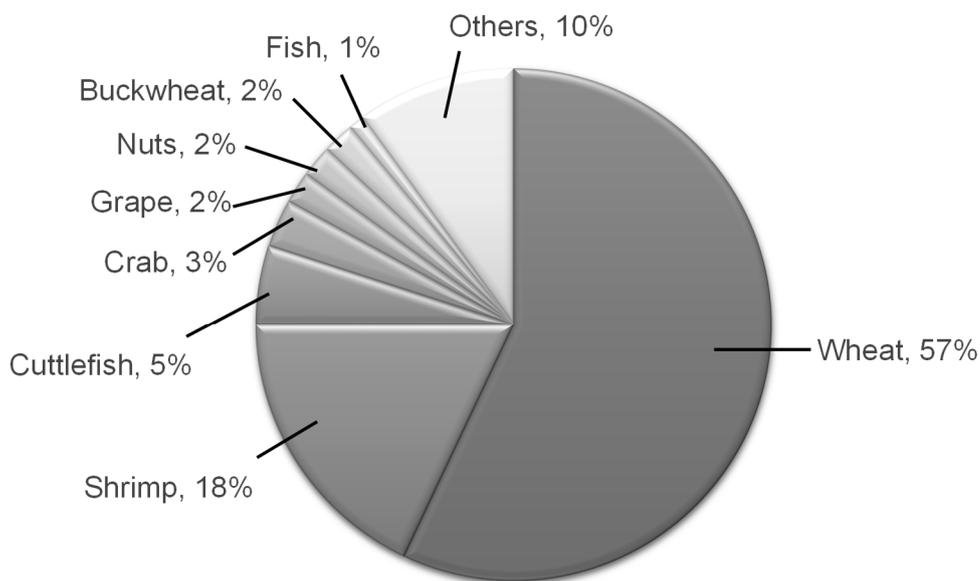


Fig. 1. Frequency of causative foods in Japanese patients with FDEIA

FDEIA の根治療法は、他の食物アレルギーと同様に確立されておらず、患者は原因食物の摂取を制限する除去食療法や食後の運動を制限する方法により発症を予防することが一般的である。しかし、これらの予防法は患者や家族に対して大きな負担となる。したがって、FDEIA の診断を正確に行い、不必要な除去食療法や運動制限を避けることが患者の生活の質 (QOL) を維持する上で重

要である。現在、FDEIA の検査として、食物運動負荷試験や血清学的検査法、皮膚プリックテストなどが実施されている。食物運動負荷試験は、問診から原因と推定される食物を患者に経口摂取してもらい、運動負荷やNSAIDsの服用を行った際にアナフィラキシー症状が惹起されるか否かを判定する検査法である。本検査法は、蕁麻疹などの FDEIA 症状を直接確認することができるため、確定診断に用いられる。一方、本検査法は試験中にアナフィラキシーを発症する危険性があることが問題である。例えば、Asaumi らは、食物運動負荷試験において症状が現れた 30 名の患者のうち、6 名の患者 (20%) でアドレナリンの投与を必要とする重篤なアナフィラキシーを呈したと報告している [8]。また、本検査法は食物の摂取量や運動負荷量が症状の誘発に不十分である場合に真の FDEIA 患者でも症状が誘発されない、すなわち偽陰性を示す可能性があることも問題点として挙げられる。血清中の抗原特異 IgE 抗体価を測定する血清学的検査や抗原を皮内に接種して接種部位のアレルギー反応の有無を判定する皮膚プリックテストは、食物運動負荷試験よりも簡便かつ安全性の高い *in vitro* の検査法である。特に臨床においては、蛍光酵素免疫測定法 (FEIA) を原理とした CAP-FEIA 法 (ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) による血清学的検査が実施されている。しかし、本検査法は原因食物や病型により診断精度が大きく異なり、感度や特異度が低い場合には偽陽性や偽陰性を生じる場合がある。例えば、Thalayasingam らは、CAP-FEIA 法でエビタンパク質特異 IgE 抗体価を測定した場合、エビアレルギーの検出感度が 62%、特異度が 50% と低い値であったことを報告している [9]。また、Adachi らは、即時型エビアレルギー患者に対して、エビタンパク質特異 IgE 抗体価を測定した場合の陽性的中率が 66.7% (12/18) であったのに対し、エビ FDEIA 患者に対する陽性的中率は 40% (2/5) と低値であったことを報告している [10]。検査結果が偽陰性を示した場合、患者は原因食物を摂取することでアナフィラキシー症状を呈する危険性が高い。また、偽陽性を示した場合、患者は不必要な原因食物の除去食療法を行うことで QOL の低下を引き起こす。したがって、FDEIA の検査精度を向上させることは、食物アレルギーの診療における重要な課題である。

エビによる FDEIA 患者に対する血清学的検査法の陽性的中率が低い要因として、検査に用いる抗原としてエビ粗抽出タンパク質が使用されていることが考えられる。粗抽出タンパク質には、アレルギー症状を発症する真の原因抗原タンパク質だけでなく、IgE 抗体は結合するがアレルギー症

状を誘発しないタンパク質も含まれている。近年、粗抽出タンパク質中の抗原タンパク質コンポーネントを利用した抗原特異 IgE 抗体検査法 (component-resolved diagnostics, CRD) が、小麦や鶏卵、牛乳など様々な食物アレルギーの検査精度を向上させたことが報告されている (Fig. 2) [11–14]。

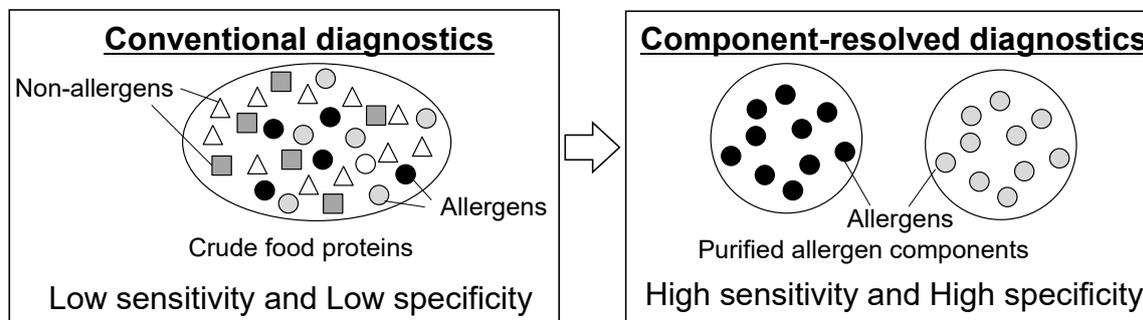


Fig. 2. Schematic representations of conventional (left) and component-resolved diagnostics (right).

Matsuo らは、小麦 FDEIA の主要原因抗原として、不溶性タンパク質である ω 5-グリアジンや高分子量グルテニンを同定している [15]。これらの抗原は、従来報告されていた即時型小麦アレルギーやパン屋の職人喘息、小麦接触皮膚炎の抗原であるプロフィリンや α -アミラーゼインヒビターなどの可溶性タンパク質と異なる (Table 1) [16]。また、同氏らは、小麦 FDEIA の診断に対する小麦粗抽出タンパク質の特異 IgE 抗体価検査の陽性的中率は 41.0%であったのに対し、 ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価検査の陽性的中率は 82.0%であったと報告している [11]。さらに、Takahashi らは、 ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価と高分子量グルテニン特異 IgE 抗体価検査を組み合わせる方法により、小麦タンパク質に対する特異 IgE 抗体価測定之感度 (35.4%) よりも高い感度 (93.8%) を

Table 1. Causative allergens for immediate-type allergy and FDEIA for wheat.

Immediate-type allergy	FDEIA
α -amylase inhibitors	ω 5-gliadin
gliadin class	γ -gliadin
glutenin class	high molecular weight-glutenin subunits
non-specific lipid transfer protein-1	
peroxidase	
profilin	
serpin, etc.	

得ることができたと報告している [12]。これらの報告は、同じ食物を原因とするアレルギーであっても病型間で抗原が異なること、純度の高いコンポーネントを用いることで診断精度を改善することが可能であることを示すものである。

これまでに、即時型エビアレルギーの原因抗原として、トロポミオシンやアルギニンキナーゼ、筋形質カルシウム結合タンパク質、ミオシン軽鎖などが同定されている (Table 2) [16]。これらのタンパク質は、いずれもバナメイエビ (*Litopenaeus vannamei*) やブラックタイガー (*Penaeus monodon*) など本邦で流通している食用エビに対するアレルギー患者でも同定されていることから、即時型エビアレルギーの主要抗原と考えられる。一方、近年、ヘモシアニンやトロポニン C、トリオースリン酸イソメラーゼも新規抗原として同定されているが、バナメイエビやブラックタイガーなどの主要な食用エビに対するアレルギー患者で確認されていないことから、マイナーな抗原であると考えられている [16, 17]。

Table 2. Causative allergens for immediate-type allergy and FDEIA for shrimp.

Immediate-type allergy	FDEIA
arginine kinase	not identified
hemocyanin	
myosin light chain	
sarcoplasmic calcium-binding protein	
triosephosphate isomerase	
tropomyosin	
troponin C, etc.	

Adachi らは、エビ FDEIA 患者に対して、トロポミオシン特異 IgE 抗体価の測定を行った結果、その陽性的中率は 0% (0/5) であったと報告している [10]。このことから、エビによる FDEIA の抗原も小麦と同様に即時型エビアレルギーの抗原と異なることが示唆されている。しかしながら、エビによる FDEIA の原因抗原はまだ同定されていない。このような背景から、エビによる FDEIA の血清学的検査の精度を向上させるためには、エビによる FDEIA の原因抗原を同定し、その精製タンパク質を用いた検査法を構築する必要があると考える。本研究では、エビによる FDEIA の検

査精度の向上を目的として、エビによる FDEIA 患者の血清中 IgE 抗体と結合するタンパク質を同定し、精製することを試みた。

本論

1. エビによる FDEIA 患者血清中 IgE 抗体に結合するタンパク質の同定

1-1. 背景と目的

甲殻類は節足動物門・甲殻亜門を形成する動物群であり、多くの種が食用として世界中で消費されている (Fig. 3) [18]。一方、甲殻類は即時型食物アレルギーや FDEIA の主要な原因食物である。本邦において、甲殻類に対する即時型食物アレルギーの有病率は 3.4% と報告されており、甲殻類は青年期 (7-19 歳) に認められた即時型食物アレルギーの原因食物として最も頻度が高い [1]。さらに、エビやカニを含む甲殻類に対する FDEIA の有病率は小麦に次いで 2 番目に多いことが報告されている [3]。甲殻類による食物アレルギーのうち、エビアレルギーは最も多く研究されている。エビは、甲殻類のうち軟甲綱 (*Malacostraca*)・十脚目 (*Decapoda*) に属し、短尾下目 (*Brachyura*) と異尾下目 (*Anomura*) を除く種の総称である。本邦では、ブラックタイガーやバナメイエビ、タイショウエビ (*Fenneropenaeus chinensis*)、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) などのエビが主に食用として消費されている。これらの 4 種はいずれも十脚目クルマエビ科 (*Penaeidae*) に属するエ

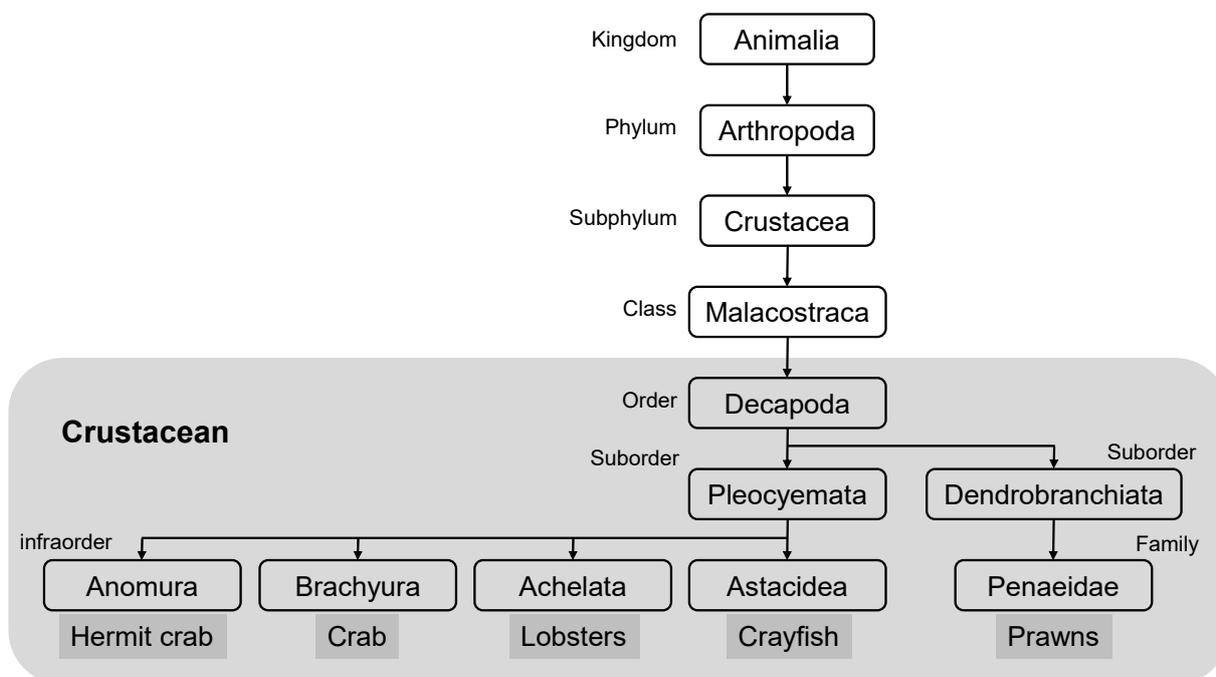


Fig. 3. Taxonomic tree of crustacean

ビであり、互いに分類学上近い種である。

序論で述べたように、FDEIA の発症には抗原特異 IgE 抗体が深く関与している。したがって、FDEIA 患者の血清中 IgE 抗体を用いた免疫ブロット解析により、アレルギー症状を惹起する原因抗原の候補となるタンパク質を検出することができる。IgE 抗体が結合する抗原領域は IgE エピトープと呼ばれる。IgE エピトープには、タンパク質中の連続するアミノ酸配列（一次構造）を認識する連続性エピトープと、タンパク質の高次構造によって近接したアミノ酸を認識する構造的エピトープがある。一般的にドデシル硫酸ナトリウム（SDS）などの界面活性剤や 2-メルカプトエタノールなどの還元剤を添加することでタンパク質を変性させると構造的エピトープは失われる。そのため、SDS-PAGE 後に western blot 解析を行うことで、連続性エピトープを有する抗原を検出することができる。また、界面活性剤や還元剤を使用しないドットブロット解析や native-PAGE 後に western blot 解析を行う方法により構造的エピトープを有する抗原を検出することができる。

本研究の対象患者は、現病歴と食物運動負荷試験で、バナメイエビとブラックタイガーを摂取した時に症状を呈している。本実験では、バナメイエビより Tris 可溶性タンパク質と不溶性タンパク質を抽出し、エビによる FDEIA 患者 8 名のうち 4 名の血清を用いて、血清中の IgE 抗体と結合するタンパク質を SDS-PAGE 後に western blot 法で解析した。

1-2. 患者データ

本実験では、エビを摂取し運動を行った際にアナフィラキシーを生じた病歴を有する 8 名の患者血清を用いた。患者の年齢、性別、臨床症状および検査データを Table 3 に示す。本症例におけるエビ粗抽出物を用いた ImmunoCAP エビによる特異 IgE 抗体検査は 8 名中 3 名で陽性を示した。また、ImmunoCAP トロポミオシン検査は、施行した 3 名中 1 名で陽性を示した。なお、コントロールには、エビアレルギーの症状を呈しない 2 名の健常者血清を用いた。

1-3. 結果

バナメイエビより Tris 可溶性画分と Tris 不溶性画分をそれぞれ分画した。それぞれの画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離した後、各画分中のタンパク質に対する患者 4 名（患者番号

Table 3. Clinical characteristics of patients with shrimp-FDEIA.

No.	Age (years)	Gender	Symptoms	Provocation Test	Total IgE (IU/mL)	Specific IgE (Ua/mL)		
						shrimp	crab	tropomyosin
1	17	F	D, U, C	Positive	1,552	1.13	1.13	ND
2	16	M	U, P	Positive	1,210	<0.35	3.99	ND
3	45	M	H, U, S	Negative	4,468	11.4	12.4	ND
4	13	F	H, U, D	Positive	568	<0.35	<0.35	ND
5	18	F	A	Positive	4	<0.35	<0.35	ND
6	14	F	U	ND	97	<0.35	<0.35	<0.35
7	24	F	U	ND	61	<0.35	<0.35	<0.35
8	28	M	D, AP, U	ND	848	2.82	ND	2.35

Serum IgE reactivity to shrimp and crab proteins was analyzed by CAP-FEIA. M, male; F, female; ND, not determined. D, dyspnea; U, urticaria; C, cough; P, pruritus; H, headache; S, shock; A, anaphylaxis; AP, abdominal pain.

nos. 1–4) より得た血清中 IgE 抗体の結合を western blot 法で確認した。その結果、4 名中 3 名 (nos. 1–3) の患者血清で Tris 可溶性画分の 43 kDa タンパク質に IgE の結合が認められた (Fig. 4)。また、患者 no.1 の血清中 IgE 抗体は Tris 可溶性画分中の 70 kDa タンパク質とも結合した。一方、4 名の患者血清中 IgE 抗体はいずれも Tris 不溶性タンパク質と反応しなかった。さらに、健常者血清はいずれのエビタンパク質画分とも反応しなかった。以上の結果から、Tris 可溶性画分中の 70 kDa および 43 kDa タンパク質がエビによる FDEIA 患者の抗原である可能性が示唆された。

1-4. 考察

本実験では、エビによる FDEIA 患者の血清中 IgE 抗体が Tris 可溶性タンパク質の 70 kDa および 43 kDa のタンパク質に結合することを示した。Adachi らは、エビ FDEIA 患者 5 名全員の IgE 抗体がブラックタイガーより抽出した可溶性タンパク質中の 70 kDa タンパク質と結合したことを報告している [10]。この報告は、本実験で得られた 70 kDa タンパク質がエビによる FDEIA の抗原で

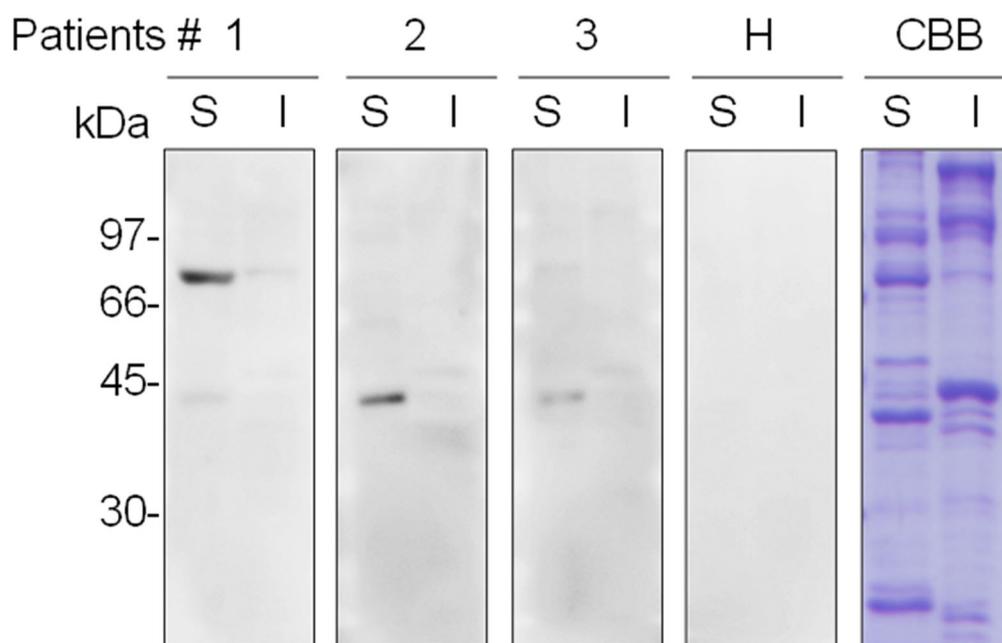


Fig. 4. Immunoblot analysis of Tris-soluble and Tris-insoluble shrimp proteins from *L. vannamei*. Samples of the Tris-soluble (S) and Tris-insoluble (I) fractions (10 μ g protein) were separated by SDS-PAGE and either stained with CBB or immunoblotted using a 1:10 dilution of sera from shrimp-FDEIA patients nos. 1–4 or a healthy subject (H).

あるという結果を支持するものである。一方、43 kDa タンパク質がエビによる FDEIA の抗原であることを示した報告はない。さらに、本実験で患者 IgE 抗体の結合が認められた 70 kDa および 43 kDa の分子量は、これまでに報告されている即時型エビアレルギーの抗原の分子量と異なっていた (Table 4) [16, 17]。これらの抗原のうち、70 kDa タンパク質と分子量が近似しているヘモシアニン (75 kDa) は、SDS-PAGE 上の近接した位置にバンドが確認される。しかし、予備的検討にて、ヘモシアニンを多く含むリンパ液より抽出したタンパク質とエビ FDEIA 患者の血清との反応を western blot 法で解析した結果、患者 IgE 抗体との結合は認められなかった (data not shown)。したがって、本実験で IgE 抗体の結合が認められた 70 kDa タンパク質はヘモシアニンとは異なるタンパク質であると考えた。また、即時型エビアレルゲンの主要抗原であるトロポミオニンについては、本実験で解析した 4 名の患者 (nos. 1–4) で IgE 抗体の結合が認められていないこと、および 3 名中 2 名の患者 (nos. 6, 7) でトロポミオニンに対する特異 IgE 抗体の検査が陰性を示したことから、エビによる FDEIA の主要抗原の候補から除外できると考えた。以上の結果より、本実験でエ

ビ FDEIA 患者の IgE 抗体が結合するバナメイエビの 70 kDa および 43 kDa の Tris 可溶性タンパク質は、エビによる FDEIA の新規抗原であることが示唆された。

Table 4. Shrimp allergens and their molecular weight reported in patients with immediate-type of shrimp allergy.

Allergens	Molecular weight (kDa)
arginine kinase	40
hemocyanin	75
myosin light chain	18–20
sarcoplasmic calcium-binding protein	20
triosephosphate isomerase	28
tropomyosin	37
troponin C	20

2.4 種のエビタンパク質に対する患者 IgE 抗体の結合解析

2-1. 背景と目的

エビアレルギーを呈する患者は、同科に属するエビ以外にも、カニなど別の亜目に属する種や腹足綱（アワビやカタツムリなど）、二枚貝綱（カキ、ムール貝、ホタテ貝など）および頭足綱（タコやイカなど）などの軟体動物門に属する種に対しても交差反応を示すことがある [18]。これまでに、多くの研究者が甲殻類の抗原コンポーネントにおける交差抗原性について報告している。例えば、エビ即時型アレルギーの主要抗原であるトロポミオシンは、ヨシエビやバナメイエビなど多くの食用種で同定されている [16]。Ruethers らは、トロポミオシンのアミノ酸配列は甲殻類間で 88-100%の相同性を有しており、互いに交差反応性を示すことを報告している [18]。また、トロポミオシンは軟体動物類に対するアレルギーの抗原としても同定されており、軟体動物類と甲殻類のトロポミオシンには交差反応性が確認されている [19]。さらに、トロポミオシンは甲殻類と同様に節足動物に分類されるダニ類やゴキブリ類の抗原としても同定されており、甲殻類とこれらの種間での交差反応性も報告されている [20-22]。アルギニンキナーゼは、ブラックタイガーやバナメイエビの抗原として同定されているが、イイダコやダニ類、ゴキブリ類の抗原としても同定されており、甲殻類のアルギニンキナーゼとの交差抗原性も報告されている [18, 23-25]。一方、筋形質カルシウム結合タンパク質は、バナメイエビとブラックタイガーなど甲殻類間でのみ交差反応性を示すことが報告されている [26, 27]。

エビアレルギー症状の惹起に種特異性が認められた症例も報告されている。ブラックタイガーとオニテナガエビで経口負荷試験を行ったエビアレルギー患者 68 名のうち、12 名はブラックタイガーの場合に、16 名はオニテナガエビの場合にのみ症状が惹起された [28]。さらに、血清学的検査で汎用される ImmunoCAP には、2012 年 6 月までエビ粗抽出物にタラバエビ科のホッコクアカエビが使用されていた。しかし、2012 年 7 月より検査精度の向上を目的として、従来のホッコクアカエビに加えて、クルマエビ科のアカエビやブラックタイガー、シバエビの粗抽出物が加えられている [10]。Adachi らは、改良後のエビ抽出物を用いた ImmunoCAP によるエビアレルギー患者における IgE 抗体の検出率（66.7%）が、改良前のエビ抽出物を用いた ImmunoCAP による検出率（58.1%）

よりも高いことを報告している [10]。これらの報告は、抗原に対する IgE 抗体の反応性が試験に用いるエビの種によって異なることを示唆するものである。このような背景から、エビ種間での IgE 抗体の反応性を確認することは、血清学的検査の精度を向上させる上で重要であると考えられる。

本研究で解析した患者は、バナメイエビやブラックタイガーを摂取した際に FDEIA を発症した病歴を有している。また、血清学的検査において、エビだけでなくカニに対する特異 IgE 抗体を有している患者も含まれている (Table 3)。そこで本実験では、本邦で主要な食用エビであり、同じクルマエビ科に属するバナメイエビ、ブラックタイガー、クルマエビ、およびタイショウエビの 4 種のエビより Tris 可溶性画分を抽出し、患者血清 IgE 抗体との反応を western blot 法で解析した。

2-2. 結果

バナメイエビと同様に、ブラックタイガー、タイショウエビ、およびクルマエビのむき身から Tris 可溶性画分を抽出した。得られた Tris 可溶性画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、4 種のエビ間で泳動像に大きな違いは認められなかった (Fig. 5)。次に、4 種のエビ Tris 可溶性画分を SDS-PAGE で泳動した後、43 kD および 70 kDa のタンパク質に対する患者血清 IgE 抗体との反応性を western blot 法で解析した。その結果、患者 no. 1 の血清 IgE 抗体は 4 種すべてのエビにおいて、健常者血清よりも強く 70 kDa タンパク質と結合した。一方、患者 no. 2 の血清では、バナメイエビ由来の 43 kDa タンパク質にのみ強い IgE の結合が認められ、他の 3 種のエビより抽出した 43 kDa タンパク質に対する IgE の結合は健常者と同程度の弱い結合であった。以上の結果から、以降の解析には、バナメイエビ由来の Tris 可溶性画分を用いた。

2-3. 考察

本実験では、本邦で流通している 4 種類の食用エビの Tris 可溶性タンパク質に対するエビ FDEIA 患者 IgE の反応の違いを western blot 法で解析した。その結果、患者 no. 1 の血清は、健常者血清と比較して、4 種すべてのエビに由来する 70 kDa のタンパク質と強い結合を示した。この結果から、FDEIA 患者 IgE 抗体が結合する 70 kDa のタンパク質はトロポミオシンと同様に甲殻類間で交差反応性を示す抗原であると推察した。トロポミオシンは甲殻類間だけでなく、ダニ類やゴキブリ

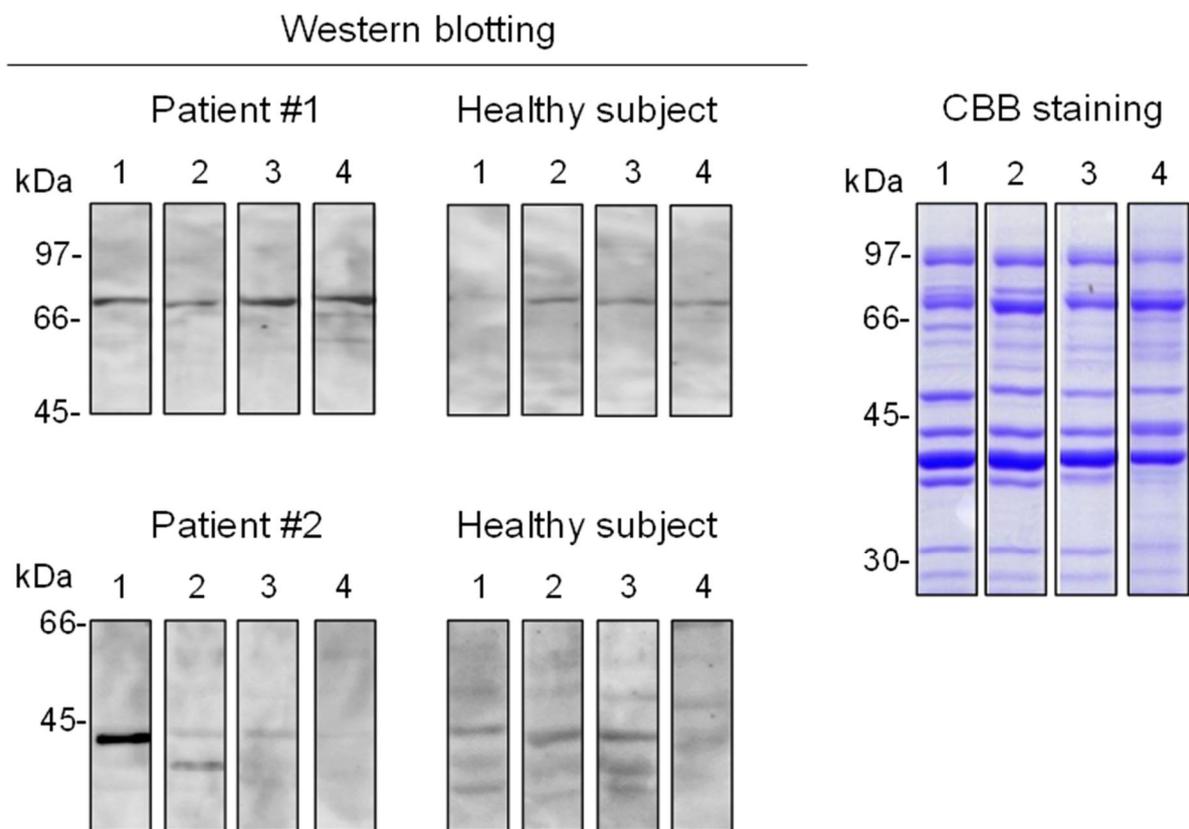


Fig. 5. Immunoblot analysis of Tris-soluble shrimp proteins from two shrimp and two prawn species. Samples of the Tris-soluble fraction (10 μ g) from *L. vannamei*, *P. monodon*, *M. japonicus*, and *F. chinensis* (lanes 1, 2, 3, and 4, respectively) were separated by SDS-PAGE and stained with CBB or immunoblotted with 1:10 dilutions of sera from two shrimp-FDEIA patients (patient no. 1 for 70-kDa protein and no. 2 for 43-kDa protein). Each blot was cropped from the same membrane and rearranged.

リ類などの節足動物間でも交差反応を示すことが報告されている [20, 21]。本実験では、エビ以外の反応を確認していないため、他の節足動物間でも交差反応を示すか否かについては、今後さらに解析が必要であると考えられる。

患者 no. 2 の血清はバナメイエビより抽出した 43 kDa のタンパク質にのみ強い IgE 抗体の結合を認め、他の 3 種のエビより抽出した 43 kDa のタンパク質に対する IgE 抗体の結合は健常者と同程度の弱いものであった。この結果は、本実験で解析した患者 no. 2 はバナメイエビによって主に感作された可能性を示唆するものである。エビアレルギー患者は、摂取したエビの種に関係なく症状を呈することが多い。一方、Jirapongsananuruk らは、ブラックタイガーやオニテナガエビの摂取時にのみ特異的に症状を呈したエビアレルギー患者の症例を報告している [28]。また、メキシコホワイトエビやメキシコブラウンエビのように同じウシエビ属に分類される近い種においても、摂取

した種に特異的なアレルギー症状を呈した患者の症例が報告されている [29]。これらの報告は、摂取する種に特異性が認められるエビアレルギーの症例もあることを示している。交差反応性を示す症例と種特異性を示す症例について、その原因の詳細な解析は報告されていないが、原因抗原の交差反応性の有無が特異性の有無に関与するものと推察する。

3. 質量分析法を用いた患者血清中 IgE 結合タンパク質の同定

3-1. 背景と目的

ここまでの実験で、バナメイエビより抽出した Tris 可溶性画分中の 70 kDa および 43 kDa のタンパク質がエビによる FDEIA 患者の抗原である可能性を示した。次に、プロテオミクス解析を用いて、両タンパク質の同定を試みた。

抗原タンパク質を同定する方法として、western blot 解析で IgE 抗体の結合が確認されたタンパク質のバンドを泳動後のゲルから切り出し、ゲル中に含まれるタンパク質を同定する方法がある。しかし、粗抽出物中には多くのタンパク質が混在しており、SDS-PAGE による分離のみでは近似した分子量を有するタンパク質を十分に分離できない場合がある。この場合、切り出したゲル中には複数のタンパク質が混在し、IgE 抗体と結合したタンパク質を後述する手法で同定することは困難である。この問題を解決するために、試料中に含まれる目的タンパク質をクロマトグラフィーなどで精製する方法や、等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動を行うことで、抽出タンパク質と夾雑タンパク質を分離する方法などがある。

切り出したゲル中に含まれるタンパク質を同定する方法には、タンパク質分子の N-末端からエドマン分解によりアミノ酸を一つ一つ順番に切断し、化学分析により 6-15 アミノ酸の配列を同定するプロテインシーケンサーを用いる方法や、タンパク質分子を特定のアミノ酸配列部分を切断するトリプシンなどの酵素で断片にした後、質量分析装置 (MS) によりそれぞれの断片の質量電荷比 (m/z) を測定し、実際の結果とデータベース上の推測を照合しデータベース上で検索することでタンパク質を同定するペプチドマスフィンガープリンティング法などがある。本研究では、等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動後に western blot 解析を行い、患者血清中 IgE 抗体と結合したスポットを切り出した。また、ペプチドマスフィンガープリンティング法の原理に基づいて、タンパク質の特定部位をトリプシンで切断し、MALDI-TOF MS (AB SCIEX TOF/TOF 5800 system, AB SCIEX, Framingham, MA, USA) を用いて質量分析を行った。得られた m/z 値より MASCOT 解析にて、タンパク質を同定した

3-2. 結果

IgE 結合タンパク質を同定するために、バナメイエビの Tris 可溶性タンパク質を二次元電気泳動により分離した後、患者 no.1 の血清を用いて western blot 法で IgE 結合タンパク質を検出した。その結果、70 kDa で等電点 pI6 付近のタンパク質 (spot 1)、43 kDa で pI7.2 (spot 2)、pI7.6 (spot 3) および pI7.9 (spot 4) のタンパク質に患者 IgE 抗体の結合が認められた (Fig. 6)。

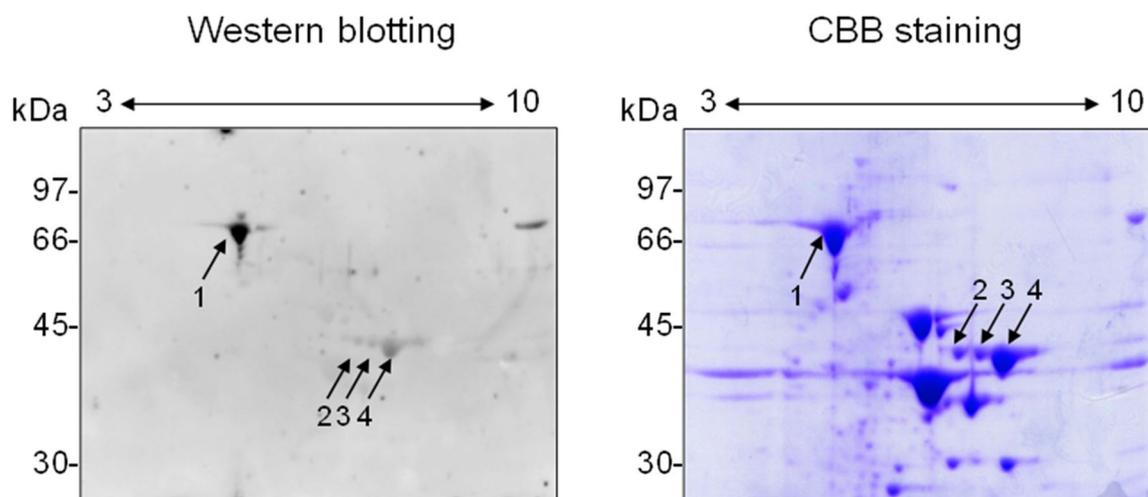


Fig. 6. 2D-PAGE and immunoblot analysis of two putative allergens from *L. vannamei*. Samples of the Tris-soluble protein fraction (100 μ g) were separated by 2D-PAGE and either stained with CBB or immunoblotted with a 1:10 dilution of serum from shrimp-FDEIA patient no. 1. Arrows indicate the dominant IgE-binding proteins.

IgE 抗体の結合が認められたスポットを切り出し、トリプシンでゲル内消化後、質量分析法で解析した。さらに質量分析にて検出された m/z 値を MASCOT software で解析した。タンパク質のアミノ酸配列は、バナメイエビの cDNA シークエンス (accession no. FE099401) から変換し、Blast-N を用いて相同性を確認した。Spot 1 について解析した結果、70 kDa のタンパク質は昆虫の一種であるコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) の muscle-specific protein 300 (accession no. EFA10673) およびオオアリ (*Camponotus floridanus*) の Nesprin-1 (accession no. EFN65250) と相同性の高いタンパク質であることが示された。また、文献調査にて両タンパク質は名称が異なるものの、同様の生理活性を有するタンパク質であることがわかった [30]。さらに、同定した Nesprin-1 には、バナメイエビの Nesprin-1 like protein (accession no. ROT70123) のアミノ酸 249–478 と 100% の相同性を持つ 230 のアミノ酸配列が含まれていた。Nesprin-1 like protein と相同性の高い甲殻類のタンパク質

をデータベースで検索した結果、Nepsrin-1 like protein の 106–196 のアミノ酸がアメリカンロブスター (*Homarus americanus*) の fast muscle P75 protein (accession no. AY302591) の一部のアミノ酸配列と 80.0%の相同性を有することが分かった。したがって、エビによる FDEIA 患者の IgE 抗体が結合する 70 kDa タンパク質は fast muscle P75 protein の相同体 (P75 homologue) であると同定された。同様に spots 2–4 についても質量分析を行った結果、カバー率 25%以上の相同性の高いアミノ酸配列は全てバナメイエビ由来のタンパク質であった。また、spots 2–4 はすべて同一のタンパク質であり、fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBPA, accession no. MK840979) のアミノ酸配列と相同性が高いことを確認した。以上の結果から、エビによる FDEIA 患者の IgE 抗体が結合する 43 kDa タンパク質は FBPA であると同定された。

3-3. 考察

本実験では、バナメイエビの Tris 可溶性画分を二次元電気泳動で分離した後、エビによる FDEIA 患者の IgE 抗体が結合したスポットを質量分析で解析した。その結果、患者の IgE 抗体が結合する 70 kDa タンパク質を P75 homologue、43 kDa タンパク質を FBPA とそれぞれ同定した。

Fast muscle P75 protein はアメリカンロブスターやスナガニなどの甲殻類でミオシン重鎖やトロポニン I、トロポニン T と同様に筋繊維タンパク質として同定されているが、その機能はわかっていない [31, 32]。筋繊維タンパク質は抗原としての報告が多く、トロポミオシンやミオシン重鎖、トロポニン I は即時型エビアレルギーの原因抗原として同定されている [16, 18, 33]。しかしながら、P75 homologue は抗原としての報告がなく、本研究が P75 homologue をエビによる FDEIA の抗原として同定した最初の報告である。

FBPA はフルクトース 1,6-ビスリン酸をジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸に変換する解糖系の可逆的酵素である (Fig. 7)。そのため、エビを含む多くの生物種が FBPA を有している。2009 年にアマゴマスの FBPA が最初に抗原として報告されて以降 [34]、FBPA は魚類だけでなく蚊 (*Forcipomyia taiwana*) [35] や、アニサキス (*Anisakis simplex*) [36]、真菌 (*Curvularia pallescens*) [37]、キャッサバ (*Manihot esculenta*) [38] などの抗原としても同定されている。さらに、2014 年に Gamez らが、ナミクダヒゲエビ (*Solenocera melanthero*) の FBPA をエビアレルギーの原因

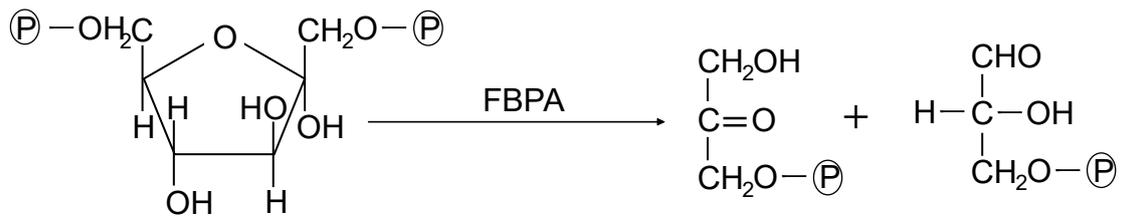


Fig. 7. Conversion of fructose 1,6-bisphosphate to glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate by FBPA

抗原として報告している [39]。しかしながら、FBPA が FDEIA の抗原であることを示した報告はなく、本研究が FBPA をエビによる FDEIA の抗原として同定した初めての報告である。

2 の実験で、4 種のエビ由来の抗原に対する患者 IgE 抗体の反応性は、P75 homologue と FBPA で異なっていた (Fig. 5)。すなわち、本実験で使用した 4 種のエビ由来の P75 homologue に対する患者 IgE 抗体の結合はいずれの種においても強く、FBPA に対する患者 IgE 抗体の結合はバナマイエビでのみ強かった。現在、4 種のエビにおける fast muscle P75 protein のアミノ酸配列は報告されていないため、これらの種間で fast muscle P75 protein がどの程度の相同性を有しているのかを明らかにすることはできないが、IgE エピトープのアミノ酸配列の相同性が高いと推察した。一方、データベースに登録のあるバナマイエビとタイショウエビの FBPA について、アミノ酸配列の相同性を Blast-p で解析した結果、両種間の相同性は 97.5% であった。また、同解析にて、バナマイエビの FBPA とブラックタイガーの FBPA like protein との相同性は 95% であった。これらの相同性はいずれも高い値であり、FBPA の種特異的な IgE 結合をタンパク質全体の相同性で説明することはできなかった。現在、FBPA の種特異的な IgE 結合性の要因として、エビ種間における IgE エピトープ配列の相同性が低い可能性を考えている。本実験では、FBPA の IgE エピトープ配列を明らかにしておらず、エビ種間におけるエピトープ配列の相同性を解析できていない。この仮説を立証するために、今後 IgE エピトープを同定し、相同性を解析する必要がある。また、本研究では、P75 homologue と FBPA のエビ種間での IgE 抗体の結合性について、各 1 名ずつの患者血清を使用した解析した。エビ種間における抗原の交差反応性については患者数を増やした解析が必要であると考えられる。

4. P75 homologue および FBPA の精製

4-1. 背景と目的

ここまでの実験で、エビによる FDEIA 患者の IgE 抗体が結合するバナメイエビの 70 kDa および 43 kDa の Tris 可溶性タンパク質を、それぞれ P75 homologue および FBPA と同定した。序論で述べたように、エビによる FDEIA 患者に対する血清中抗原特異 IgE 抗体価の検査は感度と特異度が低く、検査精度は高くない。その要因には、エビの粗抽出タンパク質が検査に使用されていることが考えられる。したがって、CAP-FEIA 法に精製した P75 homologue や FBPA を用いる CRD を行うことで検査精度を向上させることができると期待した。精製タンパク質を得る方法として、目的タンパク質を保有する種からネイティブなタンパク質を分取する方法や、大腸菌や培養細胞などを用いて、リコンビナントタンパク質を作製する方法がある。本研究で同定したバナメイエビ由来の P75 homologue については塩基配列が報告されておらず、迅速なクローニングを行うことが困難であった。また、大腸菌などの微生物を利用して作製したリコンビナントタンパク質では、糖鎖修飾が起これば、ネイティブタンパク質の性質を反映しない可能性も考えられた。したがって、本実験では、エビの Tris 可溶性タンパク質からネイティブ抗原タンパク質を分取する方法を選択した。

患者血清中 IgE 抗体は、解析に用いた 4 種類のエビのうち、バナメイエビの P75 homologue と FBPA に対して強い結合を示した (Fig. 5)。さらに予備的検討において、タイ産とインド産のバナメイエビを用いて産地の違いによる FBPA と患者 IgE 抗体の結合性の違いを解析した。その結果、SDS-PAGE の泳動像に大きな差は認められなかったが、患者血清 IgE 抗体はインド産よりもタイ産のバナメイエビ FBPA に対して、強い結合性を示した (data not shown)。これらの結果から、タイ産バナメイエビの Tris 可溶性画分を両タンパク質の分取に使用した。

タンパク質の精製法には、アセトンや硫酸アンモニウムを用いた分別沈殿法やクロマトグラフィーなどがある。硫酸アンモニウム分別沈殿法は、高濃度の塩類存在下でタンパク質の溶解度を減少させ、沈殿を生じさせる塩析の原理を用いたタンパク質の濃縮法である。硫酸アンモニウムの濃度を変えることで、タンパク質の電荷特性に応じて、目的タンパク質を分離・濃縮することができる。硫酸アンモニウムは水への溶解度が高く、濃縮の対象となるタンパク質を変性させる作用が小さいことや、安価であること、操作が簡便であることなどの理由からタンパク質の濃縮に汎用され

る。一方、単独の精製では精製効率が悪く、高い純度を有するタンパク質を得ることが困難であった。

クロマトグラフィーとは、様々な物理化学的性質を有した担体を利用して、物質のもつ物理化学的性質の違いにより分離・精製を行う方法である。クロマトグラフィーには、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどがある。中でも、イオン交換クロマトグラフィーや疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーは比較的操作が簡便かつ安価な方法であるため、タンパク質の精製に汎用される。

イオン交換クロマトグラフィーは、電荷特性をもった担体を利用し、タンパク質の持つ電荷特性に応じて分離する手法である。本法は、簡便な操作法で大量の試料を迅速に精製することができるため、精製の初期から最終精製までの全工程で使用される。疎水性相互作用クロマトグラフィーは、タンパク質分子表面の疎水性の違いに基づいて分離精製を行う手法である。疎水性の高い固定相に結合したタンパク質の疎水性を低下させることで移動相に溶出するため、疎水性が低いタンパク質から順に溶出する。本法は、固定相へのタンパク質分子の吸着を高塩濃度の条件下で行うため、硫酸アンモニウム沈殿法やイオン交換クロマトグラフィーに続いて精製を行う際に適している。担体に導入された疎水性リガンドの密度が低いため、逆相クロマトグラフィーよりも生体分子の生理活性を維持した温和な条件で精製することができるなどの利点もある。逆相クロマトグラフィーは、分配クロマトグラフィーの1つであり、移動相に極性の高い溶媒、固定相に極性の低いリガンドを使用する分離法である。本法では、疎水性が高いタンパク質ほどカラムに保持される時間が長く、溶出が遅くなる。本実験では、硫酸アンモニウム分別沈殿法と各種クロマトグラフィーを組み合わせる手法により、バナメイエビの Tris 可溶性画分から P75 homologue と FBPA の精製を試みた。

4-2. 結果

最初に、硫酸アンモニウム分別沈殿法により P75 homologue と FBPA の濃縮・分離を行った。Tris 可溶性タンパク質に硫酸アンモニウムを 20, 40, 60%飽和濃度になるように順次添加し、沈殿画分を得た。得られた画分をそれぞれ SDS-PAGE で分離した結果、硫酸アンモニウムの濃度によっ

てバンドパターンに違いが認められた (Fig. 8)。さらに各画分中の 70 kDa 付近と 43 kDa 付近のタンパク質に対する IgE 抗体の反応性をそれぞれ患者 no. 1 の血清を用いて、western blot 法で確認した。その結果、P75 homologue は 40–60%硫酸アンモニウム沈殿画分中、FBPA は 20–40%硫酸アンモニウム沈殿画分中のタンパク質に強い IgE の結合が認められた (Fig. 8)。この結果から、P75 homologue の精製には硫酸アンモニウム沈殿 0–40%画分を除去した 40–60%沈殿画分、FBPA の精製には硫酸アンモニウム沈殿 0–20%画分を除去した 20–40%沈殿画分を使用することにした。

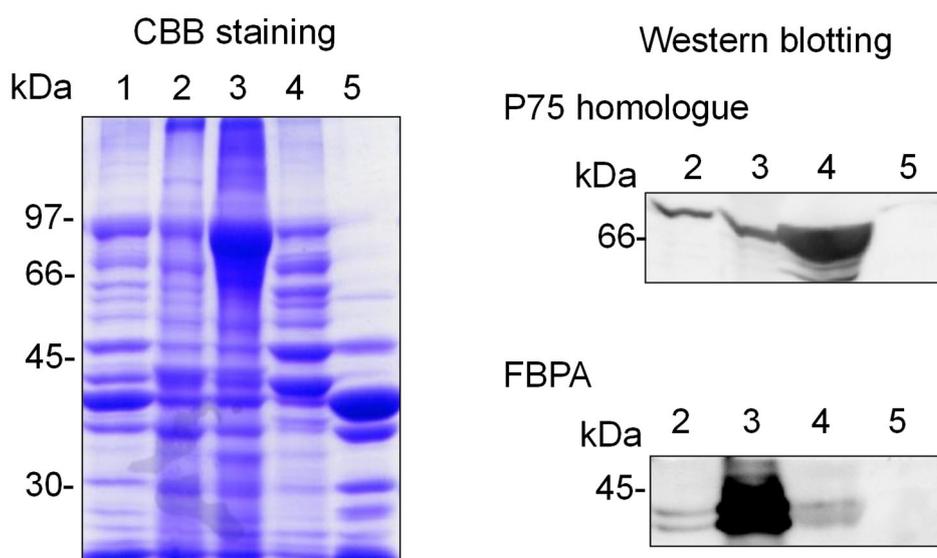


Fig. 8. Purification of P75 homologue and FBPA proteins from *L. vannamei* by ammonium sulfate precipitation. Samples of the Tris-soluble fractions (lane 1), 0–20% (lane 2), 20–40% (lane 3), 40–60% (lane 4) and >60% ammonium sulfate precipitates were separated by SDS-PAGE and either stained with CBB or immunoblotted using a 1:10 dilution of serum from shrimp-FDEIA patient no. 1.

続いて、逆相クロマトグラフィーによる P75 homologue の精製を試みた。逆相クロマトグラフィーに用いるカラムは、リガンドの炭素鎖の数や細孔径の大きさの違いにより化合物の分離特性が異なる。また、分子量の大きい試料には細孔径の大きいカラムを、分子量の小さい試料には細孔径の小さいカラムを用いるのが一般的である。YMC 社が提供しているカラムのリガンドと細孔径の最適値およびタンパク質の分子量との関係性の情報によると、P75 homologue の分子量 (70 kDa) を分取するために最適な担体の官能基は C4、細孔径は 30 nm の YMC-Pack C4 カラムであった。P75 homologue を含む硫酸アンモニウム沈殿 40–60%画分を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) [カラム: YMC-Pack C4 カラム, 移動相: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), アセトニトリル濃度勾配: 開始

(30%) → 終了 (70%)、流速: 0.5 mL/min] にかけて画分を 2.0 mL ずつ分取した。得られた画分を SDS-PAGE で解析した結果、約 45–65%のアセトニトリルを含む画分 8–12 で P75 homologue と同じ 70 kDa の単一なバンドが確認できた (Fig. 9)。さらに、得られた単一のバンドが P75 homologue であることを確認するため、患者 no.1 の血清を用いて western blot 法で解析した。その結果、同画分 8–12 で患者血清 IgE 抗体との強い結合が確認できた。

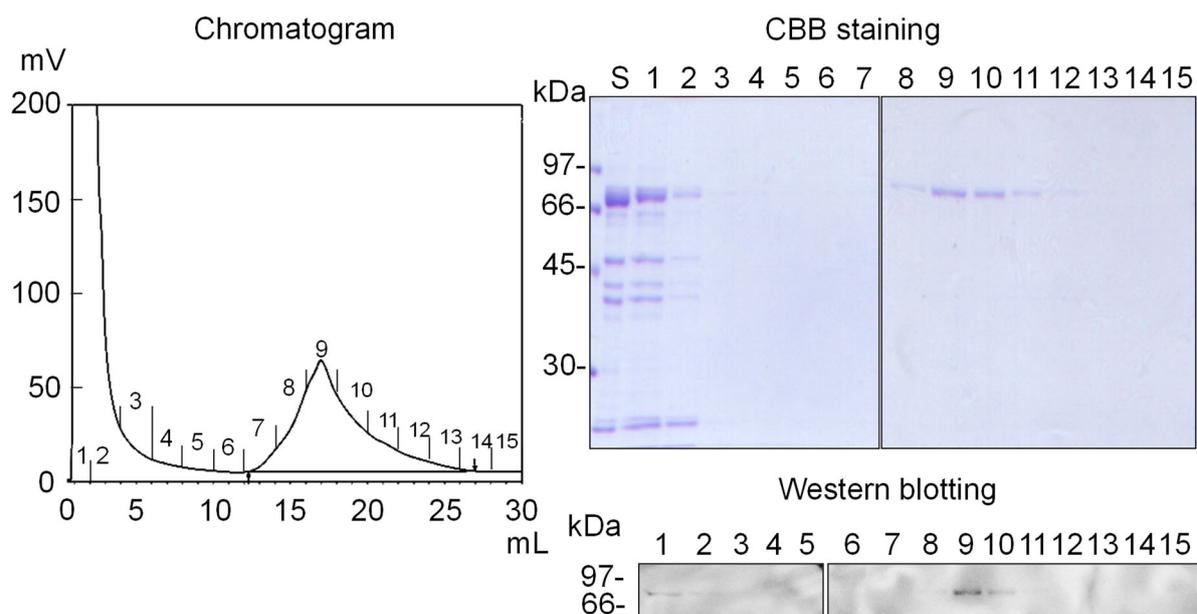


Fig. 9. Purification of P75 homologue from *L. vannamei* by ammonium sulfate precipitation followed by reversed-phase chromatography. Samples of fractions were separated by SDS-PAGE and either stained with CBB or immunoblotted using a 1:10 dilution of serum from shrimp-FDEIA patient no. 1. Lane S, 40–60% ammonium sulfate precipitate. Lane numbers in SDS-PAGE and western blot analysis were same as fraction numbers in chromatogram.

最後に、陰イオンクロマトグラフィーと疎水性相互作用クロマトグラフィーによる FBPA の精製を試みた。FBPA を含む硫酸アンモニウム沈殿 20–40%画分を 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し、HPLC [カラム: Resource Q, 移動相: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), NaCl 濃度勾配: 開始 (0 M) → 終了 (0.5 M), 流速: 2 mL/min] にかけて画分を分取した。得られた画分を SDS-PAGE で分離し、患者 no. 1 の血清を用いて western blot 法で解析した。その結果、約 0.15–0.3 M NaCl を含む同画分 5–9 で患者血清 IgE 抗体との強い結合が確認できた (Fig. 10)。一方、CBB 染色で各画分に含まれるタンパク質を確認した結果、FBPA 以外にも複数のタンパク質が検出された。この結果から、陰イオン交換クロマトグラフィーのみでは FBPA の精製が不十分であると考えた。また、CBB で濃く染色され

ている画分 8-9 と比較して、薄い染色像を示した画分 5-7 が患者 IgE 抗体との強い結合を示した。この結果から、画分 8-9 では FBPA と近い分子量の夾雑タンパク質が含まれている可能性を考えた。より純度をあげるために、画分 5-7 のみを疎水性相互作用クロマトグラフィーに用いて、さらに精製した。

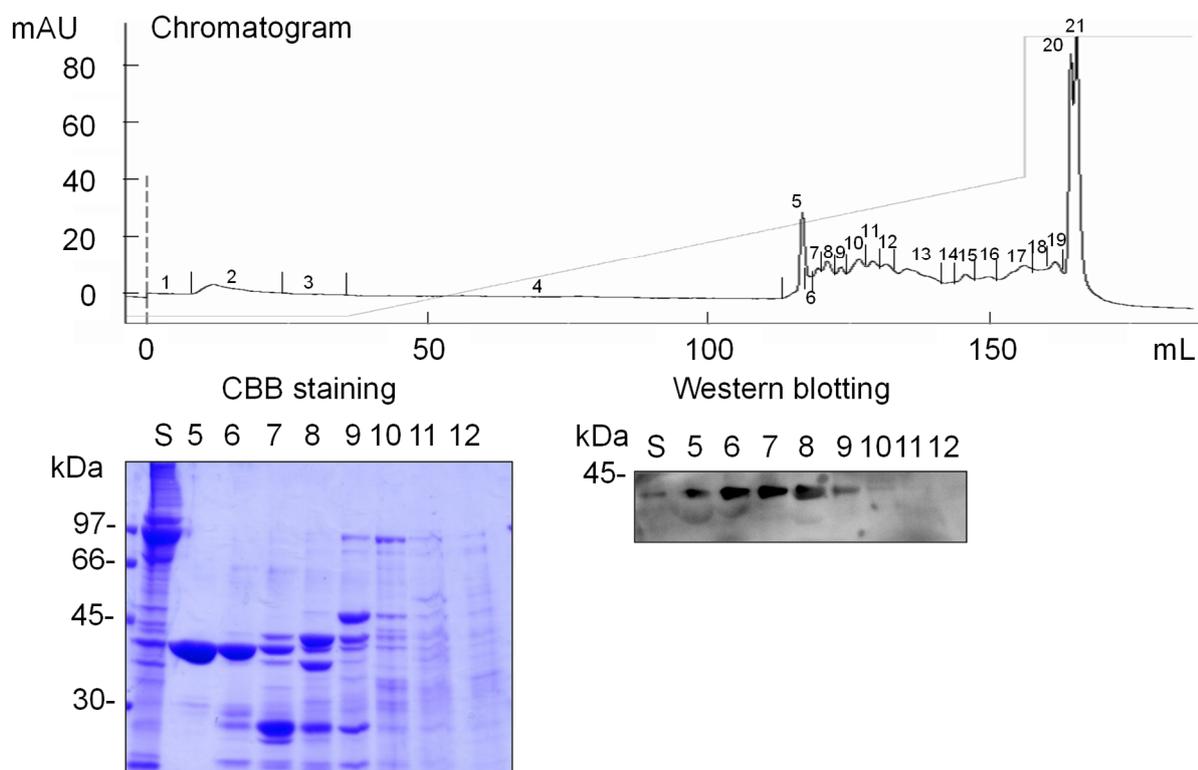


Fig. 10. Purification of FBPA from *L. vannamei* by anion-exchange chromatography following ammonium sulfate precipitation. Samples of fractions were separated by SDS-PAGE and either stained with CBB or immunoblotted using a 1:10 dilution of serum from shrimp-FDEIA patient no. 1. Lane S, 20-40% ammonium sulfate precipitate. Lane numbers in SDS-PAGE and western blot analysis were same as fraction numbers in chromatogram.

陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製で得られた画分 5-7 をまとめて、1 M 硫酸アンモニウムの濃度とした。この溶液を疎水性相互作用クロマトグラフィーカラム (HiTrap Butyl FF) を用いて、stepwise 法 [1 M→0 M 硫酸アンモニウム (0.25 M 間隔) 含有 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)] で分画した。得られた画分を SDS-PAGE で分離して CBB 染色を行った結果、0.75 および 0.5 M 硫酸アンモニウムを含む画分で FBPA と同じ 43 kDa のバンドが検出された (Fig. 11)。得られたバンドが FBPA であることを確認するため、患者 no.1 の血清を用いて western blot 法で解析した結果、同画分中に患者 IgE の強い結合が認められた。

最終的に、Fig. 12 に示す手順により精製を行った結果、純度の高い P75 homologue と FBPA を得ることに成功した。

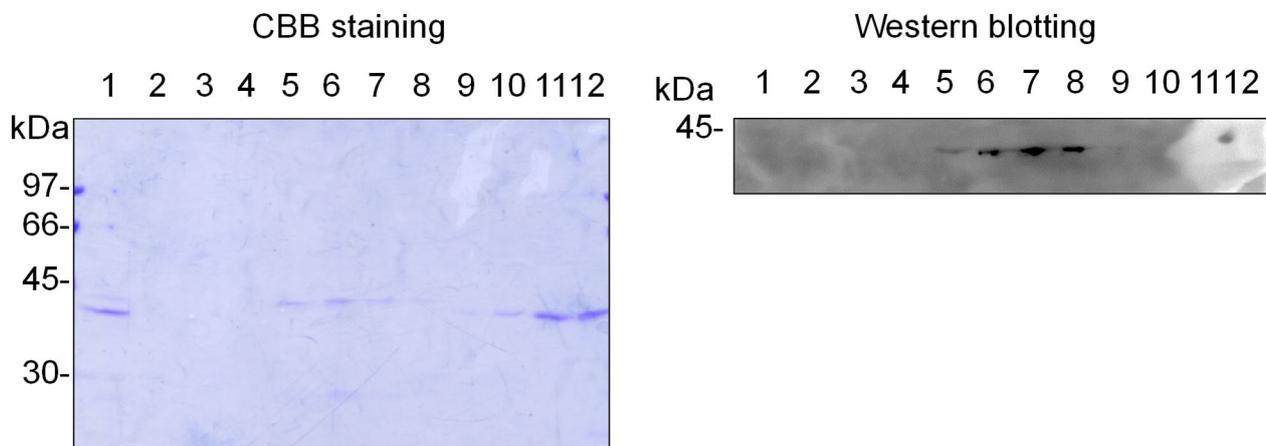


Fig. 11. Purification of FBPA from *L. vannamei* by hydrophobic interaction chromatography following anion-exchange chromatography. The fractionates obtained by anion-exchange chromatography (lane 1) were further fractionated by stepwise elution using a hydrophobic interaction column in a 0.25-M interval of ammonium sulfate for 0.75 M (lane 2, flow through; lanes 3 and 4, wash out; lanes 5 and 6, 0.75 M; lanes 7 and 8, 0.5 M; lanes 9 and 10, 0.25 M and lanes 11 and 12, 0 M). Samples of fractions were separated by SDS-PAGE and either stained with CBB or immunoblotted using a 1:10 dilution of serum from shrimp-FDEIA patient no. 1.

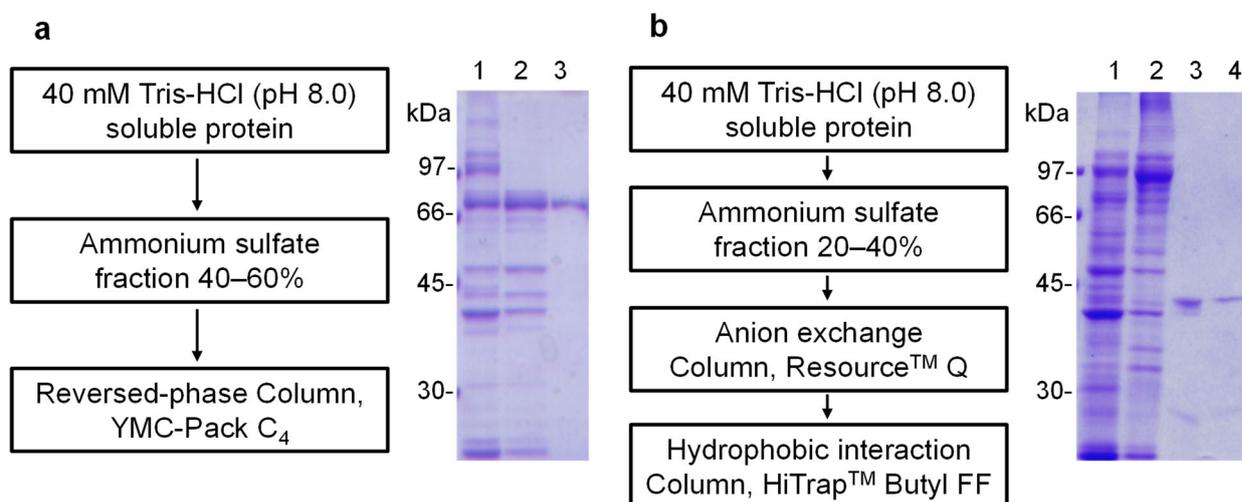


Fig. 12. Purification of P75 homologue and FBPA proteins from *L. vannamei*. (a) CBB staining of a 70-kDa protein in the whole Tris-soluble fraction (lane 1), the 40–60% ammonium sulfate precipitate (lane 2), and reversed-phase HPLC fraction (lane 3). (b) CBB staining of a 43-kDa protein in the whole Tris-soluble fraction (lane 1), 20–40% ammonium sulfate precipitate (lane 2), anion-exchange chromatography fraction (lane 3), and hydrophobic interaction chromatography fraction (lane 4).

4-3. 考察

本実験では、バナメイエビの Tris 可溶性タンパク質より P75 homologue と FBPA を精製することを試みた。最初に硫酸アンモニウム分別沈殿法を行った結果、P75 homologue と FBPA は硫酸アンモニウム沈殿の 40–60%画分と 20–40%画分にそれぞれ濃縮された。一方、硫酸アンモニウム分別沈殿法のみでは両タンパク質ともに精製が不十分であったため、両画分をさらに各種クロマトグラフィーで精製した。

予備的検討で、Butyl FF カラムを用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーと DEAE FF カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせる方法により P75 homologue の精製を試みた。しかしながら、これらのクロマトグラフィーでは、純度の高い P75 homologue を得ることはできなかった。その要因として、疎水性相互作用クロマトグラフィーで溶出した画分中に残存した硫酸アンモニウムが陰イオン交換クロマトグラフィーの分離を阻害した可能性を考えた。この考えが正しければ、残存した硫酸アンモニウムを透析などで除去する方法により両クロマトグラフィーによる精製が可能であると考えた。しかし、透析を行った場合、P75 homologue が透析膜に吸着して回収量が著しく減少した。したがって、疎水性相互作用クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせた精製法では、十分な純度と収量を得ることが困難であると考え、本実験では逆相クロマトグラフィーによる精製を行った。硫酸アンモニウム分別沈殿後の試料を逆相クロマトグラフィーで分画した結果、ワンステップで純度の高い P75 homologue を得ることができた (Fig. 9)。

次に FBPA を精製するために、硫酸アンモニウム 20–40%画分を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水性相互作用クロマトグラフィーを行った。陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果、0.15–0.3 M の NaCl を含む画分で FBPA の溶出が確認できた (Fig. 10)。一方、CBB 染色にて FBPA 以外のタンパク質も多く含まれていることが明らかになったため、さらに精製をする必要があると考え、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる FBPA の精製を試みた。Western blot 法による解析の結果、0.75–0.5 M の硫酸アンモニウムを含む画分に純度の高い FBPA を確認することができた (Fig. 11)。

以上の結果から、硫酸アンモニウム分別沈殿法と各種クロマトグラフィーを組み合わせる方法

により、純度の高い P75 homologue と FBPA を得ることができた (Fig. 12)。しかし、タンパク定量の結果、得られた P75 homologue と FBPA の収量は、エビのむき身 1kg からそれぞれ 160 mg および 5.2 mg と共に極めて低かった。今後、CAP-FEIA 法による血清学的検査に両タンパク質を用いる場合には、より大きなサイズの分取カラムを使用し、抽出に用いるエビの量を多くして収量を上げる必要がある。

5. 精製 P75 homologue および FBPA と患者血清 IgE 抗体との結合解析

5-1. 背景と目的

ここまでの実験により、P75 homologue と FBPA はエビによる FDEIA の新規抗原であることを示した。また、硫酸アンモニウム分別沈殿法と各種クロマトグラフィーを組み合わせる方法により、バナメイエビより P75 homologue と FBPA の精製に成功した。一方、精製した抗原に対する患者 IgE 抗体の結合は 1 名の患者 (no. 1) 血清のみでしか確認していない。本実験では、精製した P75 homologue と FBPA に対する 8 名の患者血清中 IgE 抗体の結合を western blot 法で解析した。また、食物アレルギーの病型により両抗原に対する患者 IgE 抗体の結合が異なるか否か、すなわち両抗原がエビによる FDEIA に特異的な抗原か否かを評価するために、8 名のエビによる FDEIA 患者と 2 名の健常者、13 名の即時型エビアレルギー患者の血清を用いて western blot 法で解析した。

5-2. 結果

精製した P75 homologue と FBPA に対するエビによる FDEIA 患者血清 IgE 抗体の結合を western blot 法で解析した結果、P75 homologue に対しては患者 8 名中 1 名 (no. 1)、FBPA に対しては 8 名中 3 名 (nos. 1-3) の患者 IgE が結合した (Fig. 13)。したがって、エビによる FDEIA 患者における P75 homologue および FBPA に対する IgE 抗体の検出率は、それぞれ 12.5% および 37.5% と算出された (Fig. 13)。一方、2 名の健常者や 13 名の即時型エビアレルギー患者血清を用いて同様の解析を行った結果、いずれの群においても P75 homologue および FBPA に対する特異 IgE 抗体の結合は認められなかった。なお、Fig. 13 には即時型エビアレルギー患者 2 名分のデータのみを記した。以上の結果から、P75 homologue と FBPA はエビによる FDEIA に特異的な抗原であることを明らかにした。

5-3. 考察

本実験では、精製した P75 homologue と FBPA に対するエビによる FDEIA 患者 IgE の検出率を western blot 法で解析した。その結果、P75 homologue または FBPA のいずれかに対して IgE の結合が認められた患者は 37.5% であった。すなわち、62.5% の患者は両タンパク質に対して陰性を示し

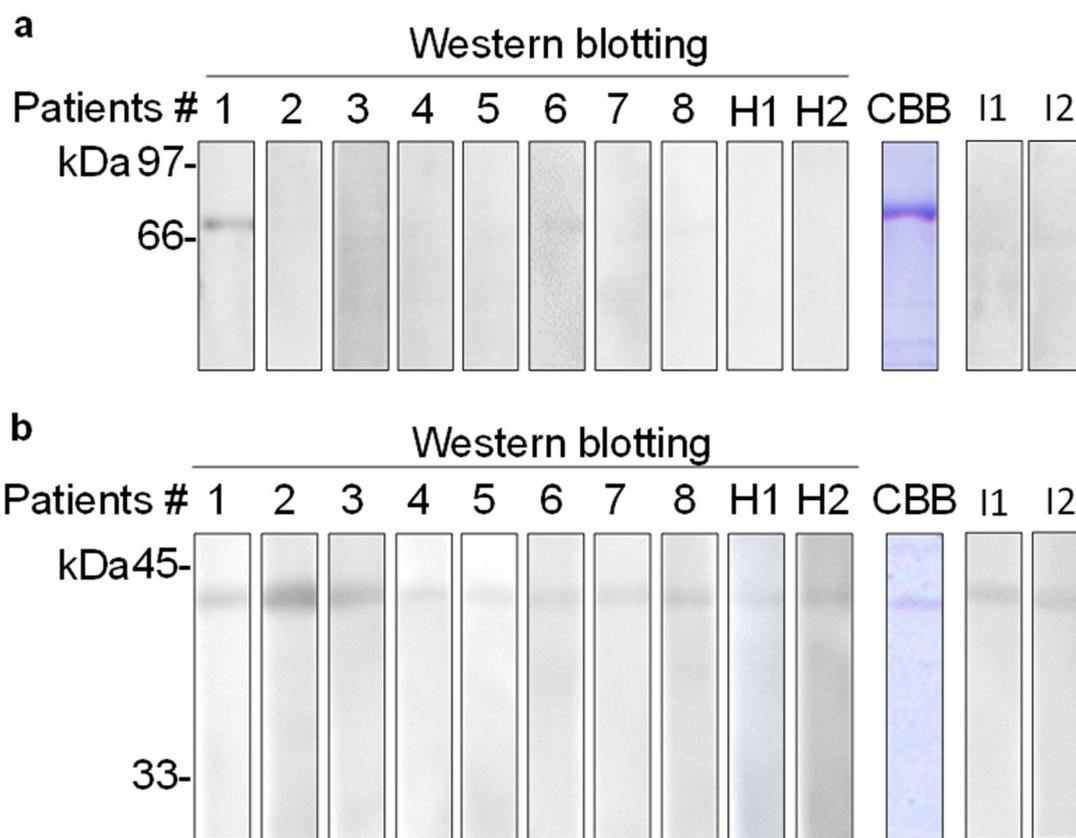


Fig. 13. Immunoblot analysis of P75 homologue and FBPA proteins isolated from *L. vannamei*. Samples of purified native P75 homologue (a, 0.24 µg) and FBPA (b, 1.2 µg) were subjected to SDS-PAGE and either stained with CBB or immunoblotted with 1:10 dilutions of sera from shrimp-FDEIA patient nos. 1–8, healthy subjects (H1 and H2) and patients with immediate-type shrimp allergy (I1 and I2).

た。この要因は不明であるが、本研究の対象とした患者が 1) FBPA や P75 homologue とは異なる抗原に感作されている、2) バナメイエビ以外のエビ種に感作している、3) IgE 抗体価が低く、western blot 法では検出できなかったなどの可能性が考えられる。2) の種特異性については、メキシコホワイトエビやメキシコブラウンエビのように同じウシエビ属に分類される近い種においてもエビアレルギーの種特異性が報告されている [29]。また、ImmunoCAP を使用したエビ特異 IgE 抗体価の測定は、エビの粗抽出物に使用するエビを 1 種類から 4 種類に増やすことで、エビアレルギーにおける検出率が 58.1%から 66.7%へ向上したことが報告されている [10]。さらに、本研究で患者 no. 2 の血清は、バナメイエビ由来の FBPA にのみ強い IgE の結合を認め、他の 3 種のエビより抽出した FBPA に対する IgE の結合は健常者と同程度の弱い結合であったという結果を得ている (Fig. 5)。本研究では、患者 no. 2 以外の患者血清を用いてエビ種間での FBPA に対する IgE 結合性の違いを解析していないため、全ての患者 IgE 抗体に種特異性が認められるか否かは不明である。したがっ

て、FBPA に対する IgE 抗体の結合における種特異性については、今後さらに患者数を増やして解析する必要がある。また、抗原に対する IgE 結合性の種特異性を少なくするため、エビ抗原特異 IgE 抗体の検出率を解析する場合には、複数種より抽出した同一抗原を混ぜて解析する必要があると考えた。

近年、加熱によりタンパク質の抗原性が変化する可能性も指摘されている。本邦のエビアレルギー患者においては、加熱品で症状が誘発された人が最も多く、その次に加熱品・生ともに症状が誘発された患者が多かったと報告されている [40]。また、皮膚プリックテストおよび負荷試験にて、生エビより加熱したエビに強いアレルギー症状が見られたことが報告されている [41]。これらの報告は、加熱によりタンパク質の抗原性が変化する可能性、もしくは加熱により生エビでは見られない新たな抗原タンパク質が出現した可能性を示唆するものである。本研究では生エビから抽出したタンパク質を使って解析を行っているため、加熱による抗原性への影響については今後さらなる解析が必要である。

結論

エビは成人の即時型食物アレルギーや FDEIA において頻度が高い原因食物である。現在、FDEIA の検査法として、食物運動負荷試験や血清学的検査が実施されている。血清中の抗原特異 IgE 抗体価を測定する血清学的検査は食物運動負荷試験よりも簡便かつ安全な検査法である。しかし、エビによる FDEIA の診断における本検査法の感度や特異度は低く、しばしば偽陽性や偽陰性を生じることが問題である。血清中抗原特異 IgE 抗体価の測定によるエビ FDEIA の陽性的中率が低い要因として、エビ由来の粗抽出タンパク質が抗原として試験に使用されていることが考えられる。近年、粗抽出タンパク質を構成するタンパク質コンポーネントを利用した抗原特異 IgE 抗体検査法である CRD が、食物アレルギーの検査精度を向上させたことが報告されている。これまでにエビによる即時型食物アレルギーの原因抗原として、トロポミオシンや筋形質カルシウム結合タンパク質、アルギニンキナーゼ、ミオシン軽鎖などのタンパク質が同定されている。一方、エビによる FDEIA の原因抗原は同定されていない。本研究ではエビによる FDEIA の検査精度の向上を目的として、エビによる FDEIA 患者の血清中 IgE と結合するタンパク質の同定と精製を試みた。その結果、以下の知見を得た。

1. エビによる FDEIA 患者に特異的な新規抗原として、P75 homologue と FBPA を同定した。
2. 硫酸アンモニウム分別沈殿法と逆相クロマトグラフィーを組み合わせる方法により、バナメイエビの可溶性画分から P75 homologue、硫酸アンモニウム分別沈殿法と陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーを組み合わせる方法により FBPA をそれぞれ精製することが可能になった。

近年、食物アレルギーの根治療法として、経口減感作療法などの研究が行われている。しかしながら、減感作療法に天然食物由来の粗抽出物を用いた場合、治療効果が低下することやアナフィラキシーを惹起する危険性があり治療が失敗に終わることがある。このように、精製抗原は食物アレルギーの診断精度の改善だけでなく、治療法の改善にも有用である。

本研究の成果が、エビ FDEIA の診断精度の向上と治療法の開発の一助となることを期待する。

実験方法

1. 使用したエビ

本実験で使用した4種類のエビ（バナメイエビ、ブラックタイガー、タイショウエビ、クルマエビ）は、いずれも商業的に販売しているものを入手した。

2. 使用した患者血清

エビを摂取し運動をした際にアナフィラキシーを生じる症状を繰り返した病歴をもとに、エビ FDEIA と診断された8名の患者血清を使用した。食物運動負荷試験は、過去の報告 [5] に従って、ブラックタイガーまたはバナメイエビを用いる方法で行った。本試験は、エビの摂取のみ、運動負荷のみ、アスピリンの服用のみ、もしくはそれらを組み合わせた方法で実施した。負荷試験を実施した患者は全員、エビの摂取のみ、運動負荷のみ、またはアスピリンの服用のみでは症状を発症しなかった。一方、5名中4名の患者が、エビの摂取後の運動負荷とアスピリンの服用を組み合わせた場合に、蕁麻疹、掻痒、または呼吸困難などのアレルギー症状を呈した。ネガティブコントロールとして、食物アレルギーの症状がない2名の健常者血清を使用した。血清は実験に使用するまで -80°C で保存した。患者の臨床所見を Table 3 に示した。本研究は、ヘルシンキ宣言および現在の日本の法規制に準拠し、広島大学の倫理審査委員会（承認番号 E-580）によって承認された。すべての患者に研究内容を説明し、書面によるインフォームドコンセントを得た。18歳未満の患者については、親もしくは法定後見人からインフォームドコンセントを得た。

3. エビタンパク質の抽出

4種のエビのむき身 10 g をそれぞれ 50 mL の遠沈管に量り取り、はさみで細かくミンチにした。これに氷冷した 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) 15 mL を加えて、ホモジナイザー (IKA T18 basic ULTRA-TURRAX, IKA, Baden-Württemberg, Germany) を用いて、氷上でホモジナイズした。この溶液を 4°C 、13,200 g で 20 分間遠心分離して上清を回収した。沈殿に再び 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) 15 mL を加え、同様に処理し、得られた上清を先ほど回収した上清と合わせ、Tris 可溶性タンパク質とした。

また、沈殿に 6% SDS, 10% 2-メルカプトエタノール (ME) , 20% グリセロールおよび 0.02% ブロモフェノールブルー (BPB) を含む 130 mM Tris-HCl 緩衝液を加えて、よく混和した後、沸騰水浴上で 5 分間加熱した。その後、この試料を室温、13,200 g で 10 分間遠心分離し、その上清を Tris 不溶性タンパク質とした。

4. Bradford 法によるタンパク質の定量

試料溶液を適宜希釈し、それらの各溶液 20 μ L を 1.5 mL チューブに移した。そこへ 5 倍希釈した Protein Assay Solution (Bio-Rad Laboratories) を 1 mL 加えた。十分に攪拌した後、室温で 5 分間静置した。96 well プレートに検体 200 μ L を分注し、紫外・可視分光光度計 (MULTISKAN GO 2300, Thermo Fisher Scientific) を用いて 1 時間以内に 595 nm の吸光度を測定した。あらかじめウシ血清アルブミン (BSA) 標準液を用いて作成した検量線から、試料中のタンパク質濃度を算出した。

5. エビ抗原タンパク質の精製

5-1. 硫酸アンモニウム分別沈殿法

バナメイエビ Tris 可溶性画分約 25 mL に 20%となるように徐々に硫酸アンモニウムを加え十分に攪拌した後、4°C で 15 分間静置した。4°C、16,600g で 30 分間遠心し、上清と沈殿に分けた。得られた上清にさらに 40%となるように徐々に硫酸アンモニウムを加え同様の操作を行い、上清と沈殿に分けた。得られた上清にさらに 60%となるように徐々に硫酸アンモニウムを加え同様の操作を行い、上清と沈殿に分けた。硫酸アンモニウム沈殿をそれぞれ 3% SDS、5% 2-ME、10% グリセロールおよび 0.01% BPB を含む 65 mM Tris-HCl に溶解し、電気泳動に使用した。各沈殿画分中に含まれる抗原タンパク質は患者 (no. 1) の血清を用いた western blot 法で検出した。

5-2. P75 homologue の精製

5-1 の操作で得られた 40–60%硫酸アンモニウム沈殿を 40 mM Tris-HCl (pH 7.0) に再懸濁し、4°C、13,200 g で 5 分間遠心分離した。得られた上清を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析した後、アセトニトリルを 30%含むように 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈したものを試料とし

た。試料中の P75 homologue を YMC-Pack C₄ カラム (10 μm, 30 nm, 100mm×4.6mm; YMC, Kyoto, Japan) を用いた逆相クロマトグラフィーにより分離した。試料 500 μL を HPLC (ポンプ: LC-20AT, デガッサー: DGU-20A3, カラムオープン: CTO-20AC, フォトダイオードアレイ検出器: SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) に注入し、以下に示す条件で分離を行い、2.0 mL ごとに溶出液を分取した。溶出液を SDS-PAGE にて分離し、CBB 染色および western blot 法により P75 homologue を確認した。

【分離条件】

移動相 A: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)

移動相 B: アセトニトリル

グラジエント: 開始 30%移動相 B (5 CV)

溶出 30%移動相 B → 70%移動相 B (17 CV)

洗浄 70%移動相 B

流速: 0.5 mL/min

検出波長: 280 nm

5-3. FBPA の精製

5-1 の操作で得られた 20–40%硫酸アンモニウム沈殿を 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) に再懸濁した。この試料を 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析した後、4°C、83,000 g で 10 分間遠心分離した。得られた上清中の FBPA を Resource Q カラム (1 mL, 0.64 × 3 cm; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。試料 5 mL を HPLC (AKTA FPLC system, GE Healthcare) に注入し、以下に示す条件で分離を行い、ピークごとに溶出液を分取した。溶出液を SDS-PAGE にて分離し、CBB 染色および western blot 法により FBPA を確認した。

【分離条件】

移動相 A: 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)

移動相 B: 1 M NaCl 含有 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)

グラジエント: 開始 0%移動相 B (10 CV)

溶出 0%移動相 B → 50%移動相 B (30 CV)

洗浄 100%移動相 B (5 CV)

流速: 2 mL/min

検出波長: 280 nm

陰イオン交換クロマトグラフィーで得られた FBPA を含む試料を HiTrap Butyl FF カラム (1 mL, 0.7 × 2.5 cm, GE Healthcare) を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーによりさらに精製した。陰イオン交換クロマトグラフィーで得られた FBPA を含む画分に 2 M 硫酸アンモニウム含有 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) を等量加えて、1 M 硫酸アンモニウム含有 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液を調製した。この試料を 4°C、13,200 g で 5 分間遠心分離し、得られた上清をカラムに通じた。カラムを超純水で洗浄後、1 M 硫酸アンモニウムを含む 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) から順に、0.25 M ずつ低濃度にした硫酸アンモニウム含有 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mL で 0 M まで 2 回ずつ溶出した。溶出液を SDS-PAGE にて分離し、CBB 染色および western blot 法により FBPA を確認した。

6. SDS-PAGE によるタンパク質の分離

試料に 9.0% SDS, 15% 2-ME, 30% グリセロールおよび 0.03% BPB を含む 195 mM Tris-HCl 緩衝液もしくは、それを超純水で 3 倍に希釈した溶液 (sample buffer) を必要量添加し、攪拌後に沸騰水浴上で 5 分間加熱した。その後、試料を室温、12,000 g で 5 分間遠心し、得られた上清を泳動試料とした。分子量マーカーには、LMW Maker kit for SDS Electrophoresis (M.W. Range 14,400–94,000, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) および Pre-stained Protein Makers (nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いた。10%ポリアクリルアミドゲルを作成し、12 cm×10.2 cm 泳動プレートのミニスラブ電気泳動装置 (AE-6500 型ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽, ATTO, Tokyo, Japan) を用いて行った。泳動は、ゲル 1 枚当たり濃縮ゲル部分を定電流 20 mA、分離ゲル部分を定電流 40 mA で行った。SDS-PAGE 終了後、ゲルを固定液中で 10 分間振盪し、タンパク質をゲルに固定させた。続いて、CBB 染色液中で 30 分間振盪し染色した。染色後、脱色液中でバックグラウンドの染色が抜けるまで脱色

した。

7. Western blot 法を用いた患者 IgE 結合性の解析

エビ Tris 可溶性および不溶性タンパク質 (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜 (BioTrace NT Nitrocellulose Transfer Membranes, PALL, Port Washington, NY, USA) に 25 V、1 時間かけて転写した。多数患者血清 IgE と精製抗原との反応を解析する実験では、P75 homologue (0.24 $\mu\text{g}/\text{lane}$) および FBPA (1.2 $\mu\text{g}/\text{lane}$) を SDS-PAGE で分離した。転写後の膜を 0.1% Tween-20 を含む Tris 緩衝生理食塩水 (TBS-T, pH 7.6) 中の 5% スキムミルクで 2 時間ブロッキングし、TBS-T で室温にて 10 分間ずつ 3 回洗浄した。ブロッキング後の膜を 5% スキムミルクで 10% に希釈した患者および健常者血清とともにハイブリダイゼーションバッグに入れて 4°C で一晩インキュベーションした。その後、膜を TBS-T で 3 回洗浄した (TBS-T による 10 分間の振盪洗浄を 1 回、5 分間の振盪洗浄を 2 回)。洗浄後の膜を TBS-T で 10 倍希釈したマウス抗ヒト IgE モノクローナル抗体溶液 (ImmunoCAP Specific IgE Conjugate 400, Thermo Fisher Scientific) 中で室温にて 1 時間振盪した。振盪後の膜を TBS-T で洗浄し、TBS-T で 1000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体溶液 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 中で、室温にて 1 時間振盪した。再び膜を TBS-T で洗浄した後、膜上に Western Lightning Ultra (Parker Elmer, Waltham, MA, USA) を、満遍なく載せ、1 分間反応させた後、LAS-4000 mini (GE healthcare) で膜上の IgE 抗体と結合したタンパク質を検出した。また必要に応じ、検出した後のニトロセルロース膜を CBB で染色した。画像解析には、Image Quant TL ソフトウェア (GE Healthcare) を用いた。

8. 二次元電気泳動を用いたタンパク質の分離

バナメイエビの Tris 可溶性画分 100 μg に 10% の濃度となるようにトリクロロ酢酸 (TCA) を添加して、十分に攪拌した後、-20°C で 1 時間静置した。その後、4°C、15,000 g で 10 分間遠心分離し、上清を除いた。得られた沈殿に氷冷したアセトンを添加して、十分に攪拌した後、-20°C で再び 1 時間静置した。静置後、4°C、15,000 g で 10 分間遠心分離した後、上清を除き、風乾させた。得られた沈殿を 8 M 尿素, 2% CHAPS, 50 mM ジチオスレイトール (DTT) , 0.2% Bio-Lyte 3/10

ampholytes および 0.001% BPB を含む膨潤バッファー (ReadyPrep Rehydration buffer, Bio-Rad Laboratories) 125 μ L に溶解し、試料とした。二次元電気泳動は、Matsuo らの報告と同様に行った [42]。一次元目の等電点電気泳動には、長さ 7 cm の ReadyStrip IPG Strip (pH 勾配 3–10) (以下 IPG ストリップ, Bio-Rad Laboratories) を用い、等電点電気泳動装置には Protean IEF cell (Bio-Rad Laboratories) を使用した。試料 125 μ L を Protean IEF Focusing tray のレーンにアプライし、IPG ストリップをセットした後、12 時間再水和処理した。その後、20°C で 10,000 V-hours にて等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG ストリップを 6 M 尿素, 2% SDS, 0.357 M Tris-HCl (pH 8.8) , 20% グリセロール, および 2% DTT を含む平衡化バッファーの中に入れ、10 分間の振盪を 3 回繰り返した。二次元目は、IPG ストリップを 10%ポリアクリルアミドゲル上に置き、6 の操作と同様に SDS-PAGE を行った。IgE 結合タンパク質の検出は、7 の操作と同様に行った。

9. 質量分析法による抗原タンパク質の同定

質量分析による抗原タンパク質の同定は、Takahashi ら [43] の報告をもとに行った。Tris 可溶性タンパク質を二次元電気泳動にて分離し、CBB 染色と western blot 法で患者 IgE が結合するタンパク質スポットを確認した。次に、目的タンパク質を含むスポットを手術用メスで切り出し、ヨードアセトアミドによるアルキル化とトリプシンによる消化をそれぞれ行った。質量分析は、MALDI-TOF MS (AB SCIEX TOF/TOF 5800 system, AB SCIEX) の reflectron mode で行った。データ処理には、Data Explorer software ver. 4.10 (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) を用いた。MS/MS イオン検索では、ケラチンやトリプシンなどの夾雑物のピークリストを除外した後、解析で得られた質量電荷比のリストを MASCOT データベース検索エンジン (Matrix Science, London, UK) を使用して、米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のタンパク質データベースにて検索した。

参考文献

- 1) Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T. Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergol Int.* 2017;66: 248–264.
- 2) Scherf KA, Brockow K, Biedermann T, Koehler P, Wieser H. Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.* 2016;46: 10–20.
- 3) Aihara Y. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Arerugi.* 2007;56: 451–456.
- 4) Morita E, Kunie K, Matsuo H. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci.* 2007;47: 109–117.
- 5) Matsuo H, Morimoto K, Akaki T, Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T, Niihara H, Hide M, Morita E. Exercise and aspirin increase levels of circulating gliadin peptides in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.* 2005;35: 461–466.
- 6) Matsuo H, Yokooji T, Morita H, Ooi M, Urata K, Ishii K, Takahagi S, Yanase Y, Hiragun T, Mihara S, Hide M. Aspirin augments IgE-mediated histamine release from human peripheral basophils via Syk kinase activation. *Allergol Int.* 2013; 62: 503–511.
- 7) Manabe T, Oku N, Aihara Y. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis among junior high school students: a 14-year epidemiological comparison. *Allergol Int.* 2015; 64: 285–286.
- 8) Asaumi T, Yanagida N, Sato S, Shukuya A, Nishino M, Ebisawa M. Provocation tests for the diagnosis of food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27: 44–49.
- 9) Thalayasingam M, Gerez IFA, Yap GC, Llanora GV, Chia IP, Chua L, Lee CJA, Ta LDH, Cheng YK, Thong BYH, Tang CY, Van Bever HPS, Shek LP, Curotto de Lafaille MA, Lee BW. Clinical and immunochemical profiles of food challenge proven or anaphylactic shrimp allergy in tropical Singapore. *Clin Exp Allergy.* 2015;45: 687–697.
- 10) Adachi A, Tanaka A, Chinuki Y, Morita E. Identification of 70 kDa shrimp protein as a possible new allergen for shrimp allergy. *Arerugi.* 2013;62: 960–967.
- 11) Matsuo H, Dahlström J, Tanaka A, Kohno K, Takahashi H, Furumura M, Morita E. Sensitivity and specificity of recombinant omega-5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-

- dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy*. 2008;63: 233–236.
- 12) Takahashi H, Matsuo H, Chinuki Y, Kohno K, Tanaka A, Maruyama N, Morita E. Recombinant high molecular weight-glutenin subunit-specific IgE detection is useful in identifying wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis complementary to recombinant omega-5 gliadin-specific IgE test. *Clin Exp Allergy*. 2012;42: 1293–1298.
 - 13) Senouf AHB, Borres MP, Eigenmann PA. Native and denatured egg white protein IgE tests discriminate hen's egg allergic from egg-tolerant children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2015;26: 12–17.
 - 14) Ito K, Futamura M, Movérare R, Tanaka A, Kawabe T, Sakamoto T, Borres MP. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clin Mol Allergy*. 2012;10: 1.
 - 15) Matsuo H, Kohno K, Niihara H, Morita E. Specific IgE determination to epitope peptides of omega-5 gliadin and high molecular weight glutenin subunit is a useful tool for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Immunol*. 2005;175: 8116–8122.
 - 16) Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int*. 2015;64: 332–343.
 - 17) Faber MA, Pascal M, Kharbouchi OEI, Sabato V, Hagendorens MM, Decuyper II, Bridts CH, Ebo DG. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy*. 2017;72: 842–848.
 - 18) Ruethers T, Taki AC, Johnston EB, Nugraha R, Le TTK, Kalic T, McLean TR, Kamath SD, Lopata AL. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens. *Mol Immunol*. 2018;100: 28–57.
 - 19) Goetz DW, Whisman BA. Occupational asthma in a seafood restaurant worker: cross-reactivity of shrimp and scallops. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;85: 461–466.
 - 20) Leung PS, Chow WK, Duffey S, Kwan HS, Gershwin ME, Chu KE. IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98: 954–961.
 - 21) Purohit A, Shao J, Degreef JM, Leeuwen Av, van Ree R, Pauli G, de Blay F. Role of tropomyosin as a cross-reacting allergen in sensitization to cockroach in patients from Martinique (French Caribbean island) with a respiratory allergy to mite and a food allergy to crab and shrimp. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*.

2007;39: 85–88.

- 22) Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular Basis of Arthropod Cross-Reactivity: IgE-Binding Cross-Reactive Epitopes of Shrimp, House Dust Mite and Cockroach Tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129: 38–48.
- 23) Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol.* 2003;170: 445–453.
- 24) García-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;144: 23–28.
- 25) Shen HW, Cao MJ, Cai QF, Ruan MM, Mao HY, Su WJ, Liu GM. Purification, cloning, and immunological characterization of arginine kinase, a novel allergen of *Octopus fangsiao*. *J Agric Food Chem.* 2012;60: 2190–2199.
- 26) Wang CX, Huang JF, Xiang JJ, Sun YF, Lv S, Guo J. Mass spectrometry identification and immune cross-reactivity of a minor shrimp allergen-sarcoplasmic calcium binding protein from *Litopenaeus vannamei*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2012;28: 811–814.
- 27) Leung NYH, Wai CYY, Shu S, Wang J, Kenny TP, Chu KH, Leung PSC. Current Immunological and Molecular Biological Perspectives on Seafood Allergy: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;46: 180–1197.
- 28) Jirapongsananuruk O, Sripramong C, Pacharn P, Udompunterak S, Chinratanapisit S, Piboonpocanun S, Visitsunthorn N, Vichyanond P. Specific allergy to *Penaeus monodon* (seawater shrimp) or *Macrobrachium rosenbergii* (freshwater shrimp) in shrimp-allergic children. *Clin Exp Allergy.* 2008;38: 1038–1047.
- 29) Morgan JE, O'Neil CE, Daul CB, Lehrer SB. Species-specific shrimp allergens: RAST and RAST-inhibition studies. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;83: 1112–1117.
- 30) Zhang Q, Ragnauth C, Greener MJ, Shanahan CM, Roberts RG. The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics.* 2002;80: 473–481.
- 31) Medler S, Mykles DL. Analysis of myofibrillar proteins and transcripts in adult skeletal muscles of the

- American lobster *Homarus americanus*: variable expression of myosins, actin and troponins in fast, slow-twitch and slow-tonic fibres. *J. Exp. Biol.* 2003;206: 3557–3567.
- 32) Perry MJ, Tait J, Hu J, White SC, Medler S. Skeletal muscle fiber types in the ghost crab, *Ocypode quadrata*: implications for running performance. *J. Exp. Biol.* 2009;212: 673–683.
- 33) Khanaruksombat S, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Phiriyangkul P. Identification of a novel allergen from muscle and various organs in banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2014;113: 301–306.
- 34) Nakamura R, Satoh R, Nakajima Y, Kawasaki N, Yamaguchi T, Sawada J, Nagoya H, Teshima R. Comparative study of GH-transgenic and non-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) allergenicity and proteomic analysis of amago salmon allergens. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2009;55: 300–308.
- 35) Chen YH, Lee MF, Lan JL, Chen CS, Wang HL, Hwang GY, Wu CH. Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwana* (biting midge): clinical analysis and identification of major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens. *Allergy.* 2005;60: 1518–1523.
- 36) López I, Pardo MA. A phage display system for the identification of novel *Anisakis simplex* antigens. *J. Immunol. Methods.* 2011;373: 247–251.
- 37) Dey D, Saha B, Sircar G, Ghosal K, Bhattacharya SG. Mass spectrometry-based identification of allergens from *Curvularia pallescens*, a prevalent aerospore in India. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1864: 869–879.
- 38) Santos KS, Galvao CE, Gadermaier G, Resende VMF, Martins CdO, Misumi DS, Yang AC, Ferreira F, Palma MS, Kalil J, Castro FFM. Allergic reactions to manioc (*Manihot esculenta* Crantz): identification of novel allergens with potential involvement in latex-fruit syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;128: 1367–1369.
- 39) Gámez C, Zafra MP, Boquete M, Sanz V, Mazzeo C, Ibáñez MD, García SS, Sastre J, Pozo Vd. New shrimp IgE-binding proteins involved in mite-seafood cross-reactivity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58: 1915–1925.
- 40) Tomikawa M, Suzuki N, Urisu A, Tsuburai T, Ito S, Shibata R, Ito K, Ebisawa M. Characteristics of shrimp

allergy from childhood to adulthood in Japan. *Alerugi*. 2006;55: 1536–1542.

- 41) Tonomura K, Fujimoto R, Okuda Y, Iba N, Sakamoto S, Kosugi E, Kishida H, Matsuo H, Kataoka Y. A CASE OF FOOD-DEPENDENT EXERCISE-INDUCED ANAPHYLAXIS BY SHRIMP: FRUCTOSE 1, 6- BISPHTHOSPHATE ALDOLASE IS SUPPOSED AS CAUSATIVE COMPONENT DESPITE NEGATIVE ALLERGEN-SPECIFIC IGE TEST (IMMUNOCAP®). *Alerugi*. 2019;68: 48–53.
- 42) Matsuo H, Uemura M., Yorozuya M, Adachi A, Morita E. Identification of IgE-reactive proteins in patients with wheat protein contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 2010;63: 23–30.
- 43) Takahashi H, Chinuki Y, Tanaka A, Morita E. Laminin γ -1 and collagen α -1 (VI) chain are galactose- α -1,3-galactose-bound allergens in beef. *Allergy*. 2014;69: 199–207.

論文目録

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

1. Shiori Akimoto, Tomoharu Yokooji, Ryohei Ogino, Yuko Chinuki, Takanori Taogoshi, Atsuko Adachi, Eishin Morita, Hiroaki Matsuo. Identification of allergens for food-dependent exercise-induced anaphylaxis to shrimp. *Sci Rep.* 2021;11(1):5400.
2. Hiroshi Kimura, Maiko Inami, Yasuhito Hamaguchi, Kazuhiko Takehara, Shiori Akimoto, Tomoharu Yokooji, Hiroaki Matsuo, Takashi Matsushita. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to shrimp associated with 43 kDa, a new antigen. *J Dermatol.* 2018;45(3):366–367.

謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、終始丁寧な御指導と御助言を賜りました広島大学病院薬剤部 松尾 裕彰 教授に心より感謝の意を表します。

また、本研究において多大なる御指導を頂き、学位論文の作成にあたり、有益な御助言と御校閲を頂きました広島大学大学院医系科学研究科 横大路 智治 准教授、広島大学病院薬剤部 埴越崇範 助教に深く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御助言と御校閲を頂きました広島大学大学院医系科学研究科 森川 則文 教授、同研究科 小澤 孝一郎 教授、同研究科 古武 弥一郎 教授、同研究科 湯元 良子 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の進行に当たり、多大なる御協力を頂きました病院薬剤学研究室の先輩方、同級生、後輩の皆様心より感謝いたします。

また、学生生活において、お世話になった皆様に心より御礼申し上げますと共に、常に温かく見守り、私を励まし支えてくださった夫、娘、両親に心より感謝いたします。

令和3年9月

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科

病院薬剤学研究室

秋本 栞里