

論文内容要旨

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

主指導教員：松尾 裕彰教授

(広島大学病院 病院薬剤学)

副指導教員：森川 則文教授

(医系科学研究科 臨床薬物治療学)

副指導教員：横大路 智治准教授

(医系科学研究科 薬物療法開発学)

秋本 栞里

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景・目的】

食物依存性運動誘発アナフィラキシー（FDEIA）は、原因食物を摂取した後の運動負荷により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の特殊型である。FDEIA の検査法に血清中の抗原特異 IgE 抗体価を測定する血清学的検査がある。本検査法は、簡便かつ安全な検査法であるが、エビによる FDEIA を診断する際に偽陽性や偽陰性を生じることがある。本検査の陽性的中率が低い要因として、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。近年、抗原コンポーネントを利用した血清学的検査である **component-resolved diagnostics** が、食物アレルギーの検査精度を向上させたと報告されている。食物アレルギーの抗原は病型によって異なることが報告されている。現在、即時型エビアレルギーの原因抗原は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などが同定されているが、エビによる FDEIA の原因抗原は同定されていない。このような背景から、本研究では、エビ FDEIA の血清学的検査の精度を向上させることを目的に、エビ FDEIA 患者の原因抗原を同定し、その精製を試みた。

【方法】

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 FDEIA 患者血清と 2 名の健常者血清を用いた。4 種の食用エビ（バナメイエビ、ブラックタイガー、タイシヨウエビ及びクルマエビ）のむき身を 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) でホモジナイズし、遠心分離後の上清を Tris 可溶性画分、沈殿を不溶性画分とした。分画したタンパク質と患者血清中 IgE 抗体との反応は **western blot** 法で解析した。また、Tris 可溶性画分を二次元電気泳動で分離し、IgE 抗体が結合したタンパク質を質量分析法で同定した。さらに、同定した抗原を硫酸アンモニウム分別沈殿と各種クロマトグラフィーで精製した。

【結果・考察】

Western blot 解析の結果、4 名中 3 名の患者血清がバナメイエビ Tris 可溶性画分中の 43 kDa タンパク質、1 名が 70 kDa タンパク質と結合した。一方、4 名の患者血清はいずれも Tris 不溶性タンパク質と反応しなかった。同法にて、4 種のエビ可溶性画分と患者血清との反応を解析した結果、患者血清と 70 kDa タンパク質との反応は 4 種のエビ間で同程度であったが、43kDa タンパク質との反応はバナメイエビで最も強かった。患者 IgE 抗体が特異的に結合したバナメイエビのタンパク質を同定するため、Tris 可溶性画分を二次元電気泳動で分離した後、western blot 法で IgE 結合タンパク質を検出した。その結果、患者 IgE 抗体は 70 kDa で等電点 pI 6 のタンパク質と 43 kDa で pI 7.2、7.6 及び 7.9 のタンパク質に結合した。質量分析法でそれぞれのタンパク質を解析した結果、70 kDa のタンパク質は fast muscle P75 protein の相同体 (P75 homologue)、40 kDa のタンパク質は全て fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) と同定された。以上の結果より、エビ FDEIA 患者の IgE 抗体が結合するバナメイエビの P75 homologue と FBPA が、エビ FDEIA の新規抗原であることが示唆された。次に、バナメイエ

ビより P75 homologue と FBPA を精製した。Tris 可溶性画分を硫酸アンモニウム分別沈殿法で濃縮・分離した結果、40–60%及び 20–40%の硫酸アンモニウム沈殿画分に P75 homologue と FBPA がそれぞれ濃縮された。40–60%画分を逆相クロマトグラフィーでさらに精製した結果、純度の高い P75 homologue を得ることができた。また、20–40%画分を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で順に精製した結果、純度の高い FBPA を得ることができた。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で、バナメイエビの Tris 可溶性画分から P75 homologue と FBPA を精製することに成功した。精製した P75 homologue 及び FBPA に対するエビ FDEIA 患者 IgE 抗体の結合を western blot 法で確認した結果、P75 homologue の陽性率は 12.5% (8 名中 1 名)、FBPA は 37.5% (8 名中 3 名) であった。また、健常者や即時型エビアレルギー患者の血清では反応が認められなかった。以上の結果から、P75 homologue と FBPA はエビ FDEIA 患者の特異的な抗原であることを明らかにした。

【結論】

本研究では、エビによる FDEIA の抗原として P75 homologue と FBPA を同定した。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法を組み合わせる方法でバナメイエビより両タンパク質を精製する方法を確立した。本研究の結果より、純度の高い精製抗原を用いることで FDEIA の診断の精度の向上が見込まれるとともに、減感作療法への応用が期待できる。