

研究課題の概要

研究課題名	遺伝子組換え食品等のアレルゲン性・腸管免疫影響のインビトロ評価系の開発
主任研究者	手島 玲子
所属機関	国立医薬品食品衛生研究所
研究成果の概要	本研究は、新規産生タンパク質等のアレルゲン性・免疫影響のインビトロ評価系の開発を行おうとする研究で、免疫過程を感作、惹起、アジュバントに分けた評価法の作成を計画し、評価対象として、新規産生タンパク質、組換え乳酸菌等を用いた。結果として、感作過程は、パイエル板を用いる評価系で、IL17が有用なバイオマーカーになることが示された。また、惹起過程の、アレルゲンチップを用いた研究では、そばアレルゲン、遺伝子組換え食品中の除草剤耐性用酵素、害虫毒素について、測定条件が確立し患者血清への応用を行った。さらに、好塩基球細胞を用いた研究では、ヒトIgE受容体を導入した培養ラット好塩基球細胞の活性化の評価系(EXILE法)の特許出願、論文発表を行い、受動ヒト好塩基球活性化を指標とする評価法にも見通しをつけることができた。アジュバント活性の測定においては、Caco-2細胞、M細胞、樹状細胞を用いる評価系の開発が終了した。

評価所見	遺伝子組換え食品で最も問題となるアレルゲン生成について綿密に研究が行われた。食品のアレルゲン性を感作、惹起、アジュバントの3つの面からそれぞれ研究を進め、最終的に統合して考察した結果であり、遺伝子組換え食品等の免疫への影響に関する評価手法開発として適切な研究手法であったと評価できる。開発された手法は、遺伝子組換え食品のリスク評価の他、幅広い分野への活用も期待される。
評価結果	目標以上の成果があった。

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	遺伝子組換え食品等のアレルギー性・腸管免疫影響のインビトロ評価系の開発
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所 氏名：手島 玲子（研究課題番号：0708）

本研究は、新規産生タンパク質等のアレルギー性・免疫影響のインビトロ評価系の開発を行おうとする研究で、免疫過程を感作、惹起、アジュバントに分けた評価法の作成を計画し、評価対象として、新規産生タンパク質、組換え乳酸菌等を用いた。結果として、感作過程は、パイエル板を用いる評価系で、IL17 が有用なバイオマーカーになることが示され、惹起過程の、アレルギーチップを用いた研究では、そばアレルギー、遺伝子組換え食品中の除草剤耐性用酵素、害虫毒素について、測定条件が確立し患者血清への応用を行った。また、好塩基球細胞を用いた研究では、ヒト IgE 受容体を導入した培養ラット好塩基球細胞の活性化の評価系(EXILE 法)の特許出願、論文発表を行い、受動ヒト好塩基球活性化を指標とする評価法にも見通しをつけることができ、アジュバント活性の測定において、Caco-2 細胞、M 細胞、樹状細胞を用いる評価系の開発が終了した。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	遺伝子組換え食品等のアレルギー性・腸管免疫影響のインビトロ評価系の開発 (研究期間：平成19年度～21年度)
主任研究者名	所属： 国立医薬品食品衛生研究所 氏名： 手島 玲子(研究課題番号：0708)

1. 研究の概要

(目的) 食品の免疫影響に関する評価は、従来ほとんど行われておらず、組換え植物を対象としたアレルゲン性評価が、バイオインフォマティクス、物理化学的安定性試験の第1段の評価として行われているのが現状で、これから開発されてくることが予想される組換え微生物、あるいは免疫に直接かかわる機能を持つ食品も加味したアレルゲン性並びに免疫影響評価法の開発が急がれている状況にある。これらの状況に鑑み、本研究では、新規産生タンパク質等のアレルゲン性・免疫影響の *in vitro* 評価系の開発を行うために、免疫成立にいたる過程を感作、惹起、アジュバント活性 3 つにわけ、それぞれについて評価系を開発し、評価対象として、新規産生タンパク質、組換え乳酸菌等を用いることにより、遺伝子組換え食品等のアレルゲン性・腸管免疫予測の信頼性の高い評価手法の開発をめざすことを目的とした。

(方法) (i)感作過程は、パイエル板を、(ii)惹起過程（既知アレルゲンとの交差反応性）は、(a)アレルゲンチップ並びに(b)好塩基球細胞を、(iii)アジュバント活性は、(a)腸管上皮細胞と(b)樹状細胞を評価系のターゲットとし、感作過程は手島が協力研究者として食品薬品安全センター新藤智子研究員の協力を得て行い、惹起過程は木戸博分担研究者(徳島大学疾患酵素学研究センター教授)、宇理須厚雄分担研究者（藤田保健衛生大学医学部小児科教授）、手島が、アジュバント活性は、亀山浩分担研究者（国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部室長）、五十君静信分担研究者(国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部室長)が担当する(図 1、図 2)。

図1 研究の目的

新規タンパク質等のアレルゲン性・免疫影響のin vitro評価系開発

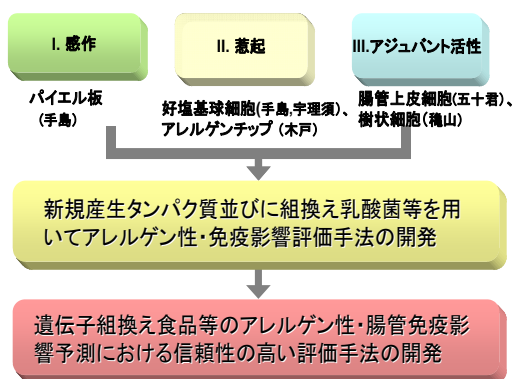
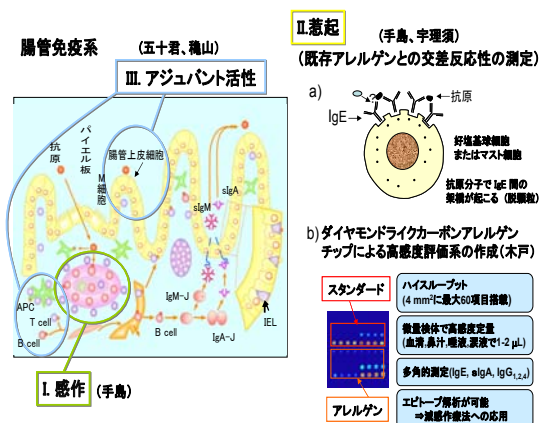


図2 本研究の概要



以下、個別の研究内容を示す。(i) 感作過程の評価法としては、未感作のマウスパイエル板を用いて食物タンパク質のアレルゲン性を検出するための *in vitro* の実験系の検討を行う。BALB/c マウス小腸のパイエル板細胞と、食物タンパク質存在下で培養し、BrdU の取り込みによる細胞増殖活性等を測定してタンパク質の反応性の評価を行う。(ii) 惹起過程の評価法としての(a)アレルゲンチップを用いる方法では、高密度に集積した反応基を持つカルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)を用い、抗原蛋白の高密度搭載を可能にし

たハイスループットタンパク質チップの開発に取り組む。抗原としては、遺伝子組換え食品中に含まれる新規産生タンパク質である除草剤耐性用酵素と害虫抵抗性タンパク質、新規そばアレルゲンを用い、DLC チップへの固定化法を検討し、次いでアレルギー患者血清中 IgE 抗体との反応性を検討する。(b)好塩基球細胞を用いる方法では、高度にヒト IgE 受容体を発現したラット好塩基球細胞(RBL-SX38)に、レポーター遺伝子(pNFAT-LUC)の導入を行い、ヒト IgE 受容体の架橋形成に伴う細胞の活性化を NFAT による転写活性化を指標にモニターするための方法を検討する。さらに、ヒト患者好塩基球細胞を用い、活性化マーカーCD203c等の発現を指標に IgE 受容体の架橋形成に伴う細胞の活性化を検出する方法、さらには、ボランティアの好塩基球に患者血清を感作させる受動好塩基球活性化試験の開発を行う。(iii) アジュバント活性の評価としての、(a)腸管上皮細胞を用いる系では、腸管上皮細胞である Caco-2 細胞等を用い、組換え乳酸菌を用いて、乳酸菌単独の場合の免疫影響との比較を行う。(b)樹状細胞を用いる系では、培養ヒト樹状細胞を用い、タンパク質とアジュバントを共存させ培養し、次いでリンパ球を加えて共存培養し、活性化されるリンパ球の種類からアジュバント活性を評価するシステムの開発を行った。

(成果)(i)感作過程：平成 19 年度は、細胞増殖活性を指標としたパイエル板細胞の反応性によって、添加した蛋白質の食物アレルゲン性が識別されるかを検討した。平成 20 年度は、パイエル板細胞培養系ではインビボで添加した蛋白質の食物アレルゲン性によって、細胞増殖活性が異なることから、抗原提示細胞から情報を受け取る T 細胞の分化に着目し、蛋白質の食物アレルゲン性を識別する生体反応に由来するより特異的なマーカーを検索した。平成 21 年度は、食品中蛋白質の多くは消化分解されて食物アレルゲン性を低下あるいは消失すると考えられる。そこで人工胃液(SGF)で消化した蛋白質をパイエル板細胞培養系において、消化の影響を含めた食物アレルゲン性の評価が可能かを検討した。

(ii)惹起過程 (a)アレルゲンチップを用いる方法：平成 19 年度は、疎水性と非特異的蛋白質吸着性を示す除草剤耐性用酵素と害虫抵抗性蛋白質を可溶化して、(DLC)蛋白チップに搭載する最適条件の検討と、(DLC)蛋白チップ上でアレルギーの原因となる IgE 抗体を高感度に検出するために必要な、低バックグラウンド化のためのブロッキング剤の検討を行った。平成 20 年度は、除草剤耐性用酵素、害虫抵抗性蛋白質、ソバ抗原のチップ搭載最適条件を確立し、人工的に抗体誘導を起こさせたウサギ血清と、試験的にヒトの血液で、IgE 抗体、IgA 抗体、IgG 抗体の検出を試みた。平成 21 年度は、確立したシステムを用いて、食物アレルギーで病院を訪れた患者の血液を使って、遺伝子組み換え蛋白質の除草剤耐性用酵素と害虫抵抗性蛋白質に対する抗体保有者の検索を開始した。

(ii)-b 好塩基球細胞を用いる方法：平成 19 年度は、ヒト型 IgE 受容体 α 、 β 、 γ 鎖を安定に発現する RBL-SX38 細胞について、転写因子 NFAT 依存的なルシフェラーゼのレポータープラスミドを一過性発現系により導入し、細胞の IgE 受容体を介する活性化に伴う発現誘導が観察された。ヒト好塩基球細胞を用いる研究では、全血を用いた好塩基球活性化試験の標準化を行い、好塩基球活性化試験の閾値と CAP-RAST のクラスとに相関が見られ ($r=0.510$)、閾値による判定が妥当との結果を得た。平成 20 年度は、RBL-SX38 細胞に NFAT 依存的なルシフェラーゼのレポーター遺伝子を安定的に導入し、目的とした安定発現株を得、RS-ATL8 細胞と命名した。同細胞を用い、抗ヒト IgE 抗体による刺激だけでなく、アレルギー患者血清とそのアレルゲンによる刺激や、遺伝子組み換え作物に含まれるタンパク質の潜在的アレルゲン性の解析を行ない、その有用性を確認した。ヒト好塩基球細胞を用いる研究では、受動感作好塩基球活性化試験を確立し、全血法好塩基球活性化試験と比較した。全血法に比べ受動法で活性化の検出感度が低い点を改良する目的で好塩基球活性化マーカーとして、CD203c と CD63 の併用を検討した。平成 21 年度は、平成 20 年度に樹立した RS-ATL8 細胞の測定系の最適化を行い、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression の頭文字より EXILE 法と命名するとともに、アレルギー患者の臨

床症状と連関する方法であるかどうかを卵白やトマトアレルギー患者血清を用いて確認した。ヒト好塩基球細胞を用いる研究では、交叉反応性の検討のための吸収試験を確立し、トマトの口腔アレルギー症候群の原因として、スギ花粉との交叉反応性が疑われる 3 症例を対象に、アレルゲンによる吸収後の受動好塩基球活性化試験を行った。うち 2 例(case1,3)ではトマトによる好塩基球の活性化がスギアレルゲンにより完全に吸収されることから、スギ花粉とトマトとの交叉反応性を示す IgE 抗体はスギ花粉症とトマト OAS の病因になっている、臨床的に意義のある抗体であることを証明した。

(iii) アジュバント活性：平成 19 年度は、ヒト腸管上皮細胞への影響を評価する系について検討を行った。ヒト腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた評価系の構築に関しては、単層培養した Caco-2 細胞の培養系を用いて培養条件、分化によるタイトジャンクション形成などを検討し、サイトカイン（特に IL-8）の産生を指標にする in vitro ヒト腸管上皮評価系を構築した。また、ヒト樹状細胞を用いた in vitro の食品タンパク質のアジュバント活性評価法を構築した。平成 20 年度は、ヒト腸管内の抗原の取り込みに係わる M 細胞モデル系の構築を行った。Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel 細胞とヒトパーキットリンパ腫由来 Raji B 細胞を共存培養することにより、in vitro ヒト M 細胞モデル系を作出した。また、培養ヒト樹状細胞と培養ヒト単核白血球細胞と共培養し、食品アレルゲンタンパク質とアジュバントを共存させ、アレルゲンタンパク質の抗原提示能の増強を指標にアジュバント活性を評価するシステムの開発を行った。平成 21 年度は、in vitro ヒト M 細胞モデル系を用いて、モデル組換え大腸菌及び乳酸菌の M 細胞モデルでの取り込みを評価した。モデル組換え体として、病原菌エルシニアの M 細胞への侵入因子の一つである膜タンパク質インベysin を発現する大腸菌及び乳酸菌組換え体を新たに作出し、実証的なデータを示した。また、培養ヒト樹状細胞にアジュバント物質を添加により感作後、異質ドナーのヒト CD4⁺T 細胞と共培養し、抗原提示能を評価するための in vitro の食品タンパク質のアジュバント活性評価法を検討し、感作時に LPS を添加すると、Th1 あるいは Th17 細胞への分化を促進すること、forskolin を添加すると、Th2 細胞への分化を促進することが示され、本培養系がアジュバント活性の評価に有用であることが示唆された。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

1) 平成 19 年度研究成果の概要

① 平成 19 年度研究の目的

本研究では、新規産生タンパク質等のアレルゲン性・免疫影響の in vitro 評価系の開発を行うために、免疫成立にいたる過程を感作、惹起、アジュバント活性 3 つにわけ、それぞれについて評価系を開発し、評価対象として、新規産生タンパク質、組換え乳酸菌等を用いることにより、遺伝子組換え食品等のアレルゲン性・腸管免疫予測の信頼性の高い評価手法の開発をめざすことを目的とするが、平成 19 年度においては、それぞれの評価系の作成に着手し、問題点、改良点を明らかにすることを目的とした。

以下、研究項目毎の目的を記す。

(i) 感作過程：細胞増殖活性を指標としたパイエル板細胞の反応性によって、添加したタンパク質の食物アレルゲン性が識別されるかを検討した。

(ii) 惹起過程：a) アレルゲンを高感度で迅速に検出するシステムとして、高密度に集積した反応基を持つカルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)を用い、抗原蛋白の高密度搭載を可能にしたハイスループット蛋白チップの開発に取り組んだ。具体的には、

① 遺伝子組み換え食品中に含まれる 2 種類の除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT と、4 種類の害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F について、各々の 15-50 f

moles (1 nl) をカルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)に共有結合させて、定量的に搭載する基盤技術の検討を行った。さらに、② 強い食物アレルギー反応を引き起こす新規ソバアレルゲンを搭載する蛋白チップをリード技術とした検出システムの開発のため、大腸菌で作成したリコンビナントソバアレルゲン BWp16WT 抗原とその比較対照のための市販のソバアレルゲン（複数の抗原を含む抽出物）を DLC へ搭載する技術開発と、そばアレルギー患者血清を用いたアレルゲン同定システムの開発を遂行した

b) ヒト高親和性 IgE 受容体 ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) の α 鎖および β または γ 鎖を安定的に発現する培養マスト細胞株 (RBL-hEla-2B12、RBL-SX38) について、ヒト血清中 IgE により感作され、特異的抗原の添加によりレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) を発現する系としての応用可能性を検討する。また、ヒト好塩基球細胞を用いる系では、臨床的に意義のある IgE を検出する方法として受動感作後による活性化検出系を開発する。

(iii) アジュバント活性：ヒト腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた評価系の構築に関しては、単層培養した Caco-2 細胞の培養系を用いて培養条件、分化によるタイトジャンクション形成などを検討し、サイトカイン（特に IL-8）の産生を指標にする in vitro ヒト腸管上皮評価系を構築する。また、ヒト樹状細胞の培養系に食品アレルゲンタンパク質と既知のアジュバント活性を持つ物質を共存培養し抗原提示能を評価する系を確立する。

② 平成 19 年度研究の方法

以下、研究項目毎に研究方法を記す。

(i) 感作過程：3～13 週齢の雌性 BALB/c マウスからパイエル板を採取し、コラゲナーゼ処理により細胞を分離した。1 ウェルあたり、10%FBS、50 μM メルカプトエタノール、100 IU/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 培地に浮遊させた細胞 2×10^5 個に各種タンパク質 200 μg を添加し、5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ で培養した。5～7 日目に 1 ウェルあたり、2 nmol の 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を添加し、細胞に取り込まれた BrdU を ELISA で測定した。タンパク質を添加して培養した細胞に取り込まれた BrdU 量を非添加時の量で除した刺激係数 (S.I.) で細胞増殖活性を評価した。食物アレルゲン性蛋白質として、卵白アルブミン (OVA)、 β -ラクトグロブリン (LG)、 α -カゼイン (CS)、およびそば粉抽出液 (BW; モリナガ FASPEK そば測定キットにてそば粉抗原濃度を調整) を用いた。一方、非食物アレルゲン性蛋白質としてペプシン (PEP) および 3-Phospho-D-glycerate carboxylyase (Rubisco; RB) を用いた。

(ii) 惹起過程：a) 抗原材料として用いた遺伝子組み換え蛋白質は、除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT の 2 種と、害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F の 4 種、強い食物アレルギー反応を引き起こす新規ソバアレルゲン rBWp16WT 抗原は、いずれも大腸菌で作成したリコンビナント蛋白質を用いて検討した。

b) ヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 鎖を安定に発現する RBL-hEla-2B12 細胞、および α 、 β 、 γ 鎖を安定に発現する RBL-SX38 細胞について、脱顆粒および β またはレポータープラスミドの一過性発現系により活性化を検出する。ヒト好塩基球活性化試験の FITC 標識した CRTH2 抗体、PE 標識した CD203c 抗体、PC7 標識した CD3 抗体を用いるフローサイトメトリー法の最適化、受動好塩基球活性化試験の PH4.0 の乳酸バッファーによる自己 IgE の剥離、患者血清による再感作手法の予備検討を行った。

(iii) アジュバント活性：ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞の単層培養による評価系については、小型ウェルを用いた実験系を用いて、サルモネラ鞭毛抗原提示乳酸菌のアジュバント活性を IL-8 サイトカイン産生から評価した。ヒト樹状細胞を用いる系では、アジュバント物質としてコレラトキシン (CT)、食品抗原タンパク質としてオボアルブミン (OVA) を用いた。IL-6 や IL-8 等の 15 項目の培養上清中サイトカイン測定と HLA と CD86/80 の細胞表面抗原マーカーを解析した。

③ 平成 19 年度研究の成果（結果、考察、結論）

以下、研究項目毎に研究成果を記す。

(i) 感作過程 : 8 週齢のマウス 3 匹から採取したパイエル板細胞にそれぞれ OVA あるいは PEP 50、100 および 200 μg を添加して 7 日間培養し、細胞増殖活性を調べた。蛋白質の添加量の増加に伴って、PEP より OVA 添加時の S.I. が上昇する傾向が認められ、食物アレルギー性蛋白質はパイエル板細胞の増殖活性を上昇させると考えられた。異なる週齢のマウス 3 匹から採取したパイエル板細胞にそれぞれ OVA あるいはペプシン 200 μg を添加し、7 日間培養、細胞増殖活性を調べた。3 から 8 週齢では週齢の増加に伴って、S.I. が高くなる傾向が認められたが、13 週齢のパイエル板細胞の S.I. は低下した。また、6 週齢のマウスのパイエル板細胞において PEP と OVA 添加時の差が最も大きくなった。8 週齢のマウス 6 匹から採取したパイエル板細胞にそれぞれ OVA、LG、CS、BW、PEP および RB 200 μg を添加して 7 日間培養し、細胞増殖活性を調べた。食物アレルギー性蛋白質の OVA、LG、および BW は非食物アレルギー性蛋白質の PEP および RB に比べて有意に S.I. が上昇した。食物アレルギー性蛋白質の CS では S.I. の上昇は認められなかったが、これはパイエル板を採取したマウスはカゼインを含む飼料中で飼育していたため、インビボで免疫寛容が成立していたことが原因と考えられた。マウスのパイエル板細胞培養系は添加した蛋白質の食物アレルギー性によって異なる細胞増殖活性を示したことから、蛋白質の食物アレルギー性評価系として利用できる可能性が示唆された。

(ii) 惹起過程 : a) 遺伝子組み換え食品中の除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT と害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F のカルボキシル化 DLC チップへ定量的な搭載技術は確立できた。しかし、中でも除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS の場合は、2 次抗体が非特異的に結合して測定感度を下げている事が明らかとなり、今後解決すべき問題点が明らかとなった。またリコンビナントソバアレルギー BWp16WT 抗原とその比較対照として用いた市販のソバアレルギーは、共にカルボキシル化 DLC チップへの定量的搭載が可能であることが明らかになった。なお、ソバ抗原と害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F では、非特異的吸着性も低く、最適搭載条件がほぼ決定されたが、除草剤耐性用酵素の CP4-EPSPS, PAT については、非特異的吸着性が高くさらなる検討を要した。b) RBL-hEla-2B12 細胞および RBL-SX38 細胞のいずれも、ヒト IgE による感作と抗ヒト IgE 抗体による $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 架橋刺激により脱顆粒が観察された。RBL-SX38 細胞については、転写因子 NFAT 依存的なルシフェラーゼのレポータープラスミドを導入し、その発現誘導が観察された。ヒト好塩基球細胞を用いる系では、全血を用いた好塩基球活性化試験の標準化を行い、好塩基球活性化試験の閾値と CAP-RAST のクラスとに相関が見られ ($r=0.510$)、閾値による判定が妥当との結果を得た。受動感作好塩基球活性化試験の検討では、ドナー好塩基球からの IgE 剥離に課題を残した。

(iii) アジュバント活性 : ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞の単層培養にサルモネラ鞭毛抗原提示乳酸菌と共存培養すると、可溶性のサルモネラ鞭毛抗原を単独で作用させた時よりも高い IL-8 産生能をもつことが確認された。細菌の表面に固定化された状態が、一種のアジュバント効果を有している可能性が示された。また、別途マウスを用いた感作実験から、サルモネラ抗原提示乳酸菌の場合、可溶性抗原の場合に比べ、Th2 型でなく Th1 型の抗体産生が強く誘導される結果が得られ、細菌の表面に固定化された状態が、Th1 型のアジュバント効果を有している可能性も示された。ヒト樹状細胞を用いた系では、CT と OVA 共存下で IL-1 β 、IL-13、G-CSF、IL-10、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-8、TNF- α が OVA のみに比べ産生が増加した。特に炎症性サイトカイン・ケモカインである IL-6、IL-8 及び MCP-1 の産生が有意に増加した。また CT と OVA 共存下で抗原提示の補助刺激分子である CD86/80 の発現が OVA のみに比べ増加した。化学物質の持つアジュバント活性を炎症性サイトカイン・ケモカインの産生増強を指標にした評価系に応用できると考えられた。さらに、活性化されるリンパ球のポピュレーションの情報を得るには、その後リンパ球との培養も必要と思われた。

2) 平成20年度研究成果の概要

平成20年度においては、平成19年度に着手したそれぞれの評価系の改良を行うとともに、実際の評価対象物質を用いた評価を開始した。以下、項目毎の目的を示す。

① 平成20年度研究の目的

(i) 感作過程：パイエル板細胞培養系ではインビボで添加した蛋白質の食物アレルギー性によって、細胞増殖活性が異なることから、抗原提示細胞から情報を受け取るT細胞の分化に着目し、蛋白質の食物アレルギー性を識別する生体反応に由来するより特異的なマーカーを検索した。

(ii) 惹起過程：a) 平成20年度は、平成19年度の研究で非特異的吸着性が高く問題となっていた除草剤耐性用酵素のCP4-EPSPS, PATのチップへの搭載条件の検討を行い検定可能にする。さらに出来たシステムの性能評価を行うため、動物に遺伝子組み換えタンパク質を投与して、アレルギー状態にしたモデル動物を作成し、その血液を用いてチップの性能評価に取り組む。これらの成果を基に、試験的に人の血液を用いた計測を開始する。

b) RBL-SX38細胞にNFAT依存的なルシフェラーゼのレポーター遺伝子を安定的に導入し、より簡便で再現性の高い試験系を確立する。ヒト好塩基球細胞を用いる系では、受動感作好塩基球活性化試験を確立する。

(iii) アジュバント活性：Caco-2細胞または、C2BBel細胞を分化させた後、ヒトB細胞由来のRaji細胞を共培養することにより、*in vitro*のM細胞モデル作成を行い、組換え乳酸菌の取り込みに関する評価を行う。また、培養ヒト樹状細胞と培養ヒト単核白血球細胞と共培養し、食品アレルギータンパク質とアジュバントを共存させ、アレルギータンパク質の抗原提示能の増強を指標にアジュバント活性を評価するシステムの開発を行う。

② 平成20年度研究の方法

(i) 感作過程：6週齢のマウス8匹から採取したパイエル板細胞にそれぞれOVAあるいはPEP 200 µgを添加して5日間培養し、培養上清中のサイトカインをBio-Plex (Bio-Rad) mouse cytokine 23-Plex Kitで調べた。T細胞の分化の指標はそれぞれTh1はIL-2およびIFN-γ、Th2はIL-4およびIL-5、制御性T細胞(Treg)はIL-10、Th17細胞はIL-17とした。また、培養2～6日に、細胞増殖活性および培養上清中のIL-17およびIL-6濃度をELISAで測定した。同様にRBあるいはLG 200 µgを添加して5日間培養し、培養上清中のIL-17濃度を測定した。

(ii) 惹起過程：a) 抗原材料は、平成19年度と同じものを用いた。また、除草剤耐性用酵素CP4-EPSPS, PATを免疫してできた抗体をチップの性能評価に用いた。一方、ソバアレルギーの患者血清のIgE抗体を用いて、出来上がったチップの性能評価を同時に行った。試験的に検定した患者血液については、インフォームドコンセントの得られた患者から血液を採取して使用した。

b) 抗生物質ハイグロマイシンへの耐性獲得を指標にレポーター遺伝子が安定導入された細胞を選択し、限界希釈法によりクローンを樹立する。また、この細胞を用いたアッセイ系を確立する。前年度、ドナー好塩基球からのIgE剥離に課題を残したヒト好塩基球細胞を用いる系では、ドナー好塩基球からのIgE剥離の方法の検討、新たな好塩基球活性化マーカーCD63の導入を行う。

(iii) アジュバント活性：エルシニアのM細胞への侵入因子の一つである膜蛋白質インベシンを細胞表面に発現する乳酸菌の作出、*in vitro*のM細胞モデル作成を行い、組換え乳酸菌の取り込みについて検討を行う。また、培養ヒト樹状細胞を用いる系では、培養ヒト単核白血球細胞と共培養系を、モデルアジュバント物質としてLPSを用い、食品抗原タンパク質としてオボアルブミン(OVA)のペプチド(323-339)を用いて検討した。

③ 平成20年度研究の成果(結果、考察、結論)

(i) 感作過程:マウスパイエル板初代培養系を用いて、種々のタンパク質との培養を行う

ことによる種々のサイトカインの測定結果から、食物アレルギー性タンパク質の卵白アルブミン、ラクトグロブリンで、培養4日目以降、IL17の産生が顕著に増加され、また培養初期にはIL-6の産生されることからバイエル板での感作の成立にTh17の活性化の起きること、これらサイトカインがバイオマーカーとなり得る可能性が示唆され、バイエル板初代培養系はタンパク質の食物アレルギー性を検出するための評価方法として有用であることが示された。

(ii) 惹起過程:a)遺伝子組み換え食品中に含まれる除草剤耐性用酵素CP4-EPSPS, PATと、害虫抵抗性蛋白質Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F、強い食物アレルギー反応を引き起こすソバアレルゲンrBWp16WT抗原のチップ搭載条件がほぼ固まり、IgE, IgG, IgAの高感度測定が可能となった。また、穀物に対してアレルギー症状のある患者血液42検体中に、除草剤耐性用酵素PATに対して低濃度であるが、IgE抗体を持つ患者を1名見出した。なお、後述するが、検出された除草剤耐性用酵素PATに対する特異的IgE抗体は、好塩基球培養細胞を用いる活性化(EXILE法)試験では陽性を示さなかった。CP4-EPSPSに対する有意なIgE抗体価を示した例は、調べた患者血液42検体中には見られなかった。なお、開発したアレルゲン診断チップの性能を、客観的に評価する例として、チップに搭載したソバアレルゲンに対するIgE抗体価では、通常のアレルギー検査で用いられているCAP-RASTの感度を数倍上回り、しかも検出に必要な血清は1/40の微量(1 µL)を実現することができた。

b) 目的とした安定発現株が得られ、RS-ATL8細胞と命名した。同細胞を用い、抗ヒトIgE抗体による刺激だけでなく、アレルギー患者血清とそのアレルゲンによる刺激や、遺伝子組み換え作物に含まれるタンパク質の潜在的アレルゲン性の解析を行ない、その有用性を確認した。ヒト好塩基球細胞を用いる系の、受動好塩基球活性化試験の検討では、血球ドナーのIgEは剥離可能であること、受動感作は、37℃30分では不十分で、4℃overnightあるいはこれに37℃30分を追加したもので、活性化が認められることが示されたが、受動感作は閾値は全血法より低くなる傾向を示した。また、新たな好塩基球活性化マーカーCD63の導入は、活性化による蛍光輝度増強が、CD203cより大きい利点があった。

(iii)アジュバント活性：腸管上皮細胞を用いる系では、Caco-2細胞または、C2BBel細胞を分化させた後、ヒトB細胞由来のRaji細胞を共培養することにより作成した*in vitro*のM細胞モデル系を用いて、新たに作成したエルシニアのM細胞への侵入因子の一つである膜蛋白質インベシンを細胞表面に発現する乳酸菌の取り込みに関する評価が可能であることが示された。さらに安定なM細胞モデルを構築している。ヒト樹状細胞を用いる評価系では、食品タンパク質ペプチドとアジュバント物質の添加により感作後、培養ヒト単核白血球細胞と共培養し、*in vitro*のアジュバント活性評価法を構築した。最終培養上清の多項目サイトカイン測定では、培養樹状細胞のOVA peptide感作時にLPSを添加すると、OVA peptide感作のみに比べて、IL-1β、IL-13、IL-5、IL-17、G-CSF、IFN-γ、IL-6、TNF-α等のサイトカインの産生が増加した。これらの結果は、LPSによる樹状細胞への影響によるものと考えられた。T細胞分化指標の転写因子のmRNAの定量では、Th2の分化指標であるGATA3のmRNAをリアルタイムPCRで測定したところ、LPSを添加すると、Th2細胞への分化を抑制することが示唆された。以上、アジュバント活性を調べるための樹状細胞とリンパ球の共存培養系の構築を行うことができた。

3) 平成21年度研究成果の詳細

平成21年度においては、平成20年度までに作成した評価法の実用性についてさらに検討を行う。以下、項目毎の目的を示す。

① 平成21年度研究の目的

(i) 感作過程：食品中蛋白質の多くは消化分解されて食物アレルゲン性を低下あるいは消失す

ると考えられる。そこで人工胃液(SGF)で消化した蛋白質をパイエル板細胞培養系において、消化の影響を含めた食物アレルギー性の評価が可能かを検討した。

(ii) 惹起過程: a) 平成 20 年度までに開発した遺伝子組み換え食品中の除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT と害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F、ソバアレルギー rBWp16WT 抗原の検出システムの改良を行うとともに、測定するアレルギー患者血清数を拡大し、さらに IgE 以外の IgA, IgG 抗体の測定系を検討する。

b) 前年度までに樹立した RS-ATL8 細胞を用いた新規 *in vitro* アレルギー試験法の詳細なプロトコルを開発し、簡便かつ高感度な新規アレルギー試験法として確立し、食の安全性評価に貢献できる新規ツールとしての可能性を探索する。具体的には、RS-ATL8 細胞の細胞播種密度、血清の至適希釈倍率、血清感作のタイミングおよび時間、抗原刺激のタイミングおよび時間、ルシフェラーゼ基質液、データ解析法、カットオフ値等について解析を重ね、至適条件によるプロトコルを確立する。また、熱処理などの加工に伴うアレルギー性の変化を簡便に定量する手法としての応用を検討する。なお、本試験法は、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression の頭文字より「EXiLE 法」と命名した。

さらに、遺伝子組み換え作物に含まれる害虫抵抗性毒素タンパク質である Cry1Ac について、徳島大学において本タンパク質にわずかながら結合する IgE を持つアレルギー患者血清が 2 検体同定されたため、この結合が IgE および FcεRI を架橋しマスト細胞を活性化する能力があるかどうかについて、本試験法により解析を行なう。最後に、藤田保健衛生大学において解析が進んでいたスギ花粉抗原とトマト抗原について交差反応性が疑われていた患者血清について、本試験法による解析を行なう。ヒト好塩基球細胞を用いる方法では、交叉反応性の検討のための吸収試験を確立し、トマトの口腔アレルギー症候群の原因として、スギ花粉との交叉反応性が疑われる 3 症例を対象に、アレルギーによる吸収後の受動好塩基球活性化試験を行う。

(iii) アジュバント活性: 腸管上皮細胞を用いる系では、安定した *in vitro* M 細胞モデルの実験系を確立し、組換え乳酸菌の取込み活性を測定する。ヒト樹状細胞を用いる系では、培養ヒト樹状細胞にアジュバント物質の添加により感作後、異質ドナーのヒト CD4⁺T 細胞と共培養し、抗原提示能を評価するための *in vitro* の食品タンパク質のアジュバント活性評価法を検討する。

② 平成 21 年度研究の方法

(i) 感作過程: OVA および西洋ワサビペルオキシダーゼ(HP)それぞれ 25 mg/mL 溶液 1 容量に SGF(3.8 mg pepsin/0.2% NaCl pH2, 5 mL)19 容量を加え、37℃で 6 あるいは 16 時間加温して蛋白質を消化した。200 mM 炭酸ナトリウム溶液 1/40 容量を加えて中和した後、それぞれ消化前の蛋白質濃度が 10mg/mL になる液量まで限外濾過(分子量 3000)で反応液を濃縮した。対照としてそれぞれの蛋白質溶液に 200 mM 炭酸ナトリウム溶液を加えた後、SGFを加えたものを同様に調製し、6 週齢のマウス 8 匹から採取したパイエル板細胞に添加して 4 日間培養後、細胞増殖活性および培養上清中の IL-6、IL-17 濃度を測定した。また、パイエル板細胞に添加した試料中の蛋白質の消化の状態を SDS 電気泳動で調べた。

(ii) 惹起過程: a) 抗原材料として用いた遺伝子組み換え蛋白質は、除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT の 2 種と、害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F の 4 種、強い食物アレルギー反応を引き起こす新規ソバアレルギー rBWp16WT 抗原は、いずれも大腸菌で作成したリコンビナント蛋白質を用いて検討した。除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT を免疫してできた動物抗体をチップの性能評価に用いた。一方、ソバアレルギーの患者血清の IgE 抗体を用いて、出来上がったチップの性能評価を行った。試験的に検定した患者血液については、インフォームドコンセントの得られた患者から血液を採取して使用した。また、抗原特異的 IgA, IgG 抗体の検出系を新たに作成して検討した。

b) RS-ATL8 細胞は、1.2 mg/ml geneticin と 200 µg/ml hygromycin (Invitrogen) を添加

した 10% FCS を含む MEM 培地 (Invitrogen) により培養した。これを 5×10^4 cells/50 μ l/well の細胞密度でクリアボトム白色 96 ウェルプレートに播種した。3 時間後、10% FCS を含む MEM 培地で最終濃度 100 倍に希釈した患者血清を添加し、37°C、5% CO₂ インキュベータ中で一晩感作した。滅菌 PBS で 1 回洗浄後、10% FCS を含む MEM 培地に溶解した各種抗原または陽性対照としての抗ヒト IgE 抗体 (1 μ g/ml) 50 μ l を加えて刺激を行ない、3 時間 CO₂ インキュベータ中に静置した。ルシフェラーゼの発現量は、上記培養液中にホモジニアス系基質液 ONE-Glo (Promega) を 50 μ l/well 加え、室温で 5 分間静置した後の発光量をルミノメーター EnVision (PerkinElmer) により測定した。発光量は刺激前のバックグラウンド発光に対する相対比として表し、2 倍を以て活性化のカットオフ値とした。脱顆粒反応の測定については、患者血清による感作までの工程は上記と同様に行なった。PIPES バッファー (10 mM PIPES, 139 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml glucose, pH 7.4) により細胞を 1 回洗浄し、PIPES バッファーに溶解した抗原または抗ヒト IgE 抗体 50 μ l により 37°C で 30 分間刺激した。上清を回収後、50 μ l の 0.2% Triton X-100 により細胞を破碎し、これを回収した。それぞれ 10 μ l を用い、上清中および細胞内に残った β -hexosaminidase の活性を、0.1 M Citric acid (pH 4.5) に溶解した 100 μ M 4-methylumbelliferyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside を基質として 37°C で 30 分反応させ 0.25 mM glycine (pH 10) で反応停止後の 355 nm 励起時の 460 nm の蛍光として測定した (Thermo Scientific)。脱顆粒量は細胞内外に存在した酵素のうち細胞外に放出された酵素のパーセンテージとして表すが、特にルシフェラーゼ発現との比較の際には、同様に刺激前のバックグラウンド脱顆粒量を 1 とした場合の相対比として表し、2 倍をカットオフ値とした。スギ花粉とトマトの交差反応性を調べるため、様々な濃度のスギ花粉抗原またはトマト抗原を結合したビーズにより患者血清中の特異的 IgE を吸着除去した血清について、スギ花粉抗原またはトマト抗原で RS-ATL8 細胞を刺激した場合のルシフェラーゼ応答の減弱を調べた。

ヒト好塩基球を用いる方法では、スギ花粉との交叉反応性が疑われる 3 症例を対象に、アレルゲンによる吸収後の受動好塩基球活性化試験を行った。

(iii) アジュバント活性: 腸管上皮細胞を用いる系では、安定した *in vitro* M 細胞モデルの実験系を確立するために、C2BBel 細胞と Raji 細胞の共存時間等の最適化を行った。また、組換え乳酸菌の取り込みの評価のため、HeLa 細胞の単層培養系を用いる実験系もあわせて検討した。ヒト樹状細胞の系では、モデルアジュバンドと共に培養した後、異質ドナーのヒト CD4+T 細胞を共培養し、活性化される T 細胞の解析を行った。

③ 平成 21 年度研究成果の概要

(i) 感作過程: SGF 16 時間処理後の OVA 試料には SGF 中のペプシン由来のバンドの他に、僅かに未消化の OVA 由来のバンドが検出された。SGF 処理の有無によって細胞増殖活性に変化はなく、IL-6 および IL-17 濃度は低下傾向にあるもののバラツキも大きく、有意な差は検出されなかった。一方、SGF 16 時間処理した HP では沈殿が析出したことから、溶解性に変化の見られない SGF 6 時間処理した HP をパイエル板細胞培養系へ添加した。HP は SGF 6 時間処理で未消化物のバンドは検出されなくなった。対照に比べて SGF 処理後の HP の細胞増殖活性は逆に上昇したが、IL-6 および IL-17 濃度は有意に低下した。食物アレルゲン性の OVA は長時間の SGF 消化後もパイエル板細胞の反応性を残していたが、HP は短時間の SGF 消化によって特異的マーカーである IL-6 や IL-17 では反応性の低下が検出されたことから、パイエル板細胞培養系はインビトロでの消化過程を含めた評価系となり得ると考えられた。

(ii) 惹起過程: a)最終的に決定した抗原搭載条件で、主要食物抗原 (卵、牛乳、小麦、大豆、そば) に対してアレルギー陽性患者血清の測定を行った (n=28+2 健康人 volunteer)。害虫抵抗性タンパクの Cry1Ac、除草剤耐性酵素の CP4-EPSPS, PAT は Sample dilution buffer でも高いレベルの非特異的反応が確認された為、Blank 補正により Dilution buffer

での response を差し引いて評価した。遺伝子組換えタンパク抗原に対して陽性患者血清の存在が確認されていない為、便宜上 Cut off 値を定量下限(LLOQ)×2 と設定した。結果として、特異的 IgE 抗体レベルが Cut off 値より高値を示した患者血清は、害虫抵抗性タンパクで 3 例/30 例、除草剤耐性酵素については 0 例/30 例であった。Cut off 値の設定が妥当な値であるかは今後の判断として、Cut off 値を比較的大きく超えた Cry1Ac IgE 陽性 2 例について EXILE 法による確定診断を行うことにした。

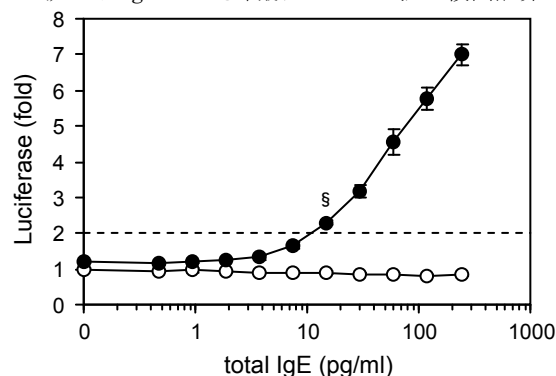
b)-1 EXILE 法について ①至適条件の検討：前年度までに樹立した測定系の高感度化および簡便化を図るため、次の各項目について検討を重ね、試験系の至適化を行なった。A) 細胞播種密度 (2.5×10^4 cells/50 μ l/well または 5×10^4 cells/50 μ l/well)、B) 血清の至適希釈倍率 (3~2187 倍)、C) 血清感作のタイミング (播種と同時にまたは播種から 3 時間後)、D) 感作時間 (3 時間または一晩)、E) 抗原刺激のタイミング (感作終了時にそのまま、または PBS で洗浄後)、F) 刺激時間 (2~6 時間)、G) ルシフェラーゼ基質液 (グロータイプ 3 種、フラッシュタイプ 1 種)、H) データ解析法 (Calcein-AM の蛍光によるノーマライズ、または刺激前を 1 とする相対比)。結果の詳細は省くが、最終的には②で示した各条件の組合せが最良であると考えられ、以後の実験にはこれらを用いることとした。

②EXiLE 法の検出限界について：IgE 濃度既知の健常人血清を段階希釈して RS-ATL8 細胞を感作し、これを 1 μ g/ml の抗ヒト IgE 抗体により刺激した際のルシフェラーゼ発現を調べた (図 3)。血清無感作かつ無刺激時のバックグラウンドレベルのルシフェラーゼ発現量を 1 とし、仮にその 2 倍をカットオフ値と設定すると、15 pg/ml (0.006 IU/ml) の IgE による Fc ϵ RI 架橋を検出できたことになる。2 倍をカットオフ値と設定したのはこのように恣意的であったが、後に述べる理由により、その値は妥当性が非常に高いと思われる。

③卵白アレルギー患者血清と卵白抗原に

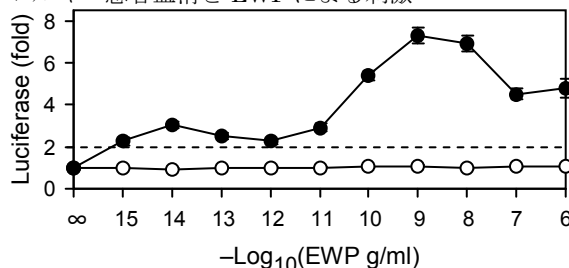
よる応答：次に、血清中卵白特異的 IgE が >100 U/ml、総 IgE が 12700 IU/ml である卵白アレルギー患者の血清により RS-ATL8 細胞を感作し、様々な濃度の卵白アレルゲン(EWP)により刺激した際のルシフェラーゼ発現を調べた (図 4)。すると、少なくとも 1 fg/ml の EWP による Fc ϵ RI 架橋を検出できることが分かった。

図 3. 抗ヒト IgE による刺激と EXiLE 法の検出限界



健常人血清を段階希釈して RS-ATL8 細胞を一晩感作し、1 および 0 μ g/ml の抗ヒト IgE で 3 時間刺激した (●および○)。IgE 未感作無刺激時の発現の 2 倍をカットオフ値とした (点線)。§で示した点は IgE 15 pg/ml (0.006 IU/ml) に相当する。

図 4. 卵白アレルギー患者血清と EWP による刺激



100 倍希釈した卵白アレルギー患者血清により RS-ATL8 細胞を感作し、培地に希釈した EWP により 37℃で 3 時間刺激したときのルシフェラーゼ発現。抗原刺激あり (●) および刺激なし (○)。点線はカットオフ値。少なくとも 1 fg/ml の EWP でカットオフ値を超える応答を示している。

④ CAP-RAST 法および脱顆粒測定法との比較: 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院の宇理須厚雄教授らより提供された、卵白アレルギーが疑われる患者の血清を用い、通常の臨床試験で用いられている CAP-RAST 法、RS-ATL8 細胞を用いた脱顆粒測定法、および EXiLE 法の三者を比較した。なお、これらの患者については、宇理須教授らにより食物アレルギーの確定診断法である食物負荷試験 (OFC) が行なわれ、その結果が全て判明している。OFC は患者に負担を強いるため、試験を行なわずとも陽性判定が強く予想される、CAP-RAST クラスが 6 (特異的 IgE が 100 U_A/ml 以上) の患者については通常行なわないこと、および、クラス 0 (同 0.34 U_A/ml 未満) の患者については特異的 IgE の測定手法である脱顆粒測定や EXiLE 法を行なってもすべて陰性となることが明らかであることから、ここでは CAP-RAST クラスが 1 から 5 の患者 24 名についてのみ述べることにした。クラス 1 の患者が一例も含まれないのは、偶然サンプリングに含まれなかったことによる。

Table 1 に、上記の試験結果をまとめた。脱顆粒および EXiLE については、1~1000 ng/ml の EWP で刺激した場合の応答の最大値が刺激前のバックグラウンドレベルの 2 倍の応答を超えた場合に陽性と判定している。また、カットオフ値を超えた数値については太字で表した。

Table 1. CAP-RAST 法、脱顆粒測定法および EXiLE 法の OFC との相関

Serum	OFC +/-	Total IgE (IU/ml)	CAP-RAST		Degranulation (fold) by EWP (ng/ml)							EXiLE (fold) by EWP (ng/ml)					
			(U _A /ml)	class +/-	1	10	100	1000	Max +/-	1	10	100	1000	Max +/-			
#86	+	1394	93.2	5 +	2.9	2.9	4.1	3.3	4.1	+	2.3	3.4	3.4	5.2	5.2	+	
#79	+	1922	76.8	5 +	1.6	3.7	5.1	8.5	8.5	+	2.3	3.4	4.5	3.5	4.5	+	
#77	+	1273	68.6	5 +	1.9	2.0	3.0	4.0	4.0	+	4.1	8.8	9.5	7.5	9.5	+	
#78	+	844	48.3	4 +	1.1	4.3	6.1	6.0	6.1	+	4.8	8.3	8.4	8.6	8.6	+	
#80	+	381	35.1	4 +	0.9	2.1	3.0	3.4	3.4	+	1.5	3.0	3.9	5.0	5.0	+	
#74	+	2663	29.9	4 +	1.0	2.8	2.6	3.2	3.2	+	4.0	3.3	4.5	4.8	4.8	+	
#90	+	12323	25.6	4 +	2.2	2.2	4.8	3.1	4.8	+	1.5	2.5	2.8	2.8	2.8	+	
#87	+	215	21.4	4 +	1.5	1.0	1.1	1.9	1.9	-	1.4	1.5	1.8	1.9	1.9	-	
#91	+	1067	18.0	4 +	0.5	0.6	1.2	0.7	1.2	-	1.4	2.1	2.5	2.7	2.7	+	
#88	+	177	14.5	3 +	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	-	1.5	2.4	2.8	2.8	2.8	+	
#84	+	331	13.2	3 +	1.6	1.4	2.2	1.1	2.2	+	1.5	1.7	2.3	1.9	2.3	+	
#93	+	930	9.90	3 +	0.7	0.7	1.4	1.3	1.4	-	1.6	2.7	3.1	3.0	3.1	+	
#83	+	772	8.98	3 +	0.6	1.1	0.8	0.6	1.1	-	1.3	1.7	2.5	3.2	3.2	+	
#89	+	922	6.69	3 +	1.2	1.4	1.9	1.8	1.9	-	1.3	2.2	2.5	2.8	2.8	+	
#85	+	619	5.57	3 +	0.9	1.0	1.3	1.1	1.3	-	1.6	2.5	3.4	3.1	3.4	+	
#81	+	795	4.54	3 +	2.4	3.8	3.5	3.8	3.8	+	1.5	2.2	1.8	2.7	2.7	+	
#76	+	509	3.91	3 +	1.1	1.2	1.4	0.5	1.4	-	1.4	1.7	2.0	2.2	2.2	+	
#94	+	653	2.99	2 +	1.9	1.5	1.3	1.5	1.9	-	1.3	1.3	1.5	1.3	1.5	-	
#73	-	7339	33.4	4 +	0.9	2.6	4.6	3.9	4.6	+	1.8	2.2	2.2	1.9	2.2	+	
#67	-	22600	4.46	3 +	0.5	0.7	0.7	0.7	1.0	-	1.0	1.2	1.4	1.6	1.6	-	
#82	-	1470	3.45	2 +	0.8	1.0	1.3	1.0	1.3	-	1.2	1.2	1.5	1.4	1.5	-	
#95	-	578	2.03	2 +	0.8	0.8	1.1	1.2	1.2	-	0.9	1.2	1.2	1.5	1.5	-	
#75	-	1006	1.17	2 +	1.5	1.4	1.8	1.2	1.8	-	0.8	0.9	0.9	1.0	1.0	-	
#100	-	5356	0.89	2 +	0.8	0.8	0.9	0.9	1.2	-	0.9	1.3	1.5	1.4	1.5	-	

卵白アレルギーが疑われた 24 名の患者について、OFC の他、血清中総 IgE 及び卵白特異的 IgE 測定 (CAP-RAST 法)、RS-ATL8 細胞を用いた脱顆粒測定、および EXiLE 法を行なった。脱顆粒法と EXiLE 法は 2 回の試験の平均を示した。脱顆粒は細胞全体の酵素量に対する上清中に放出された酵素の割合を定量し、刺激前の放出量を 1 とした。EXiLE 法は、刺激前のルシフェラーゼ発現量を 1 とした。いずれの場合も 2.0 を細胞活性化のカットオフ値として採用し、これを超えた数値を太字で示している。

CAP-RAST 法では、通常クラス 2 (特異的 IgE が 0.70 U_A/ml) 以上を陽性と判定するため、ここでもその慣例に従うと、Table 1 に挙げた 24 検体は、6 例の OFC 陰性検体も含まれているにもかかわらず、すべて卵白特異的 IgE 陽性と判定されてしまうことになる。その一方、マスト細胞の脱顆粒に基づく判定では、6 例の陰性検体中 5 例を正しく陰性と判定することができている。しかし、逆に OFC 陽性の 18 検体については、うち 9 例を誤って陰性と判定してしまう。これはおそらく、脱顆粒法の感度不足に起因するものと思われる。一方、EXiLE 法では、陽性検体については 18 例中 16 例、陰性検体については 6 例中 5 例

を正しく判定できた。OFC との相関も最も高く、Fisher の正確確率検定で $P = 0.0027$ と極めて高い一致性を示す。ちなみに、脱顆粒法と OFC の相関は $P = 0.1711$ である。

この高い一致性は、当初恣意的に設定されたバックグラウンドの 2 倍というカットオフ値が極めて妥当であり、信頼の置ける数値であることを示している。なお、偽陽性と判定された #73 の血清については、卵白抗原を加熱処理 (95℃、15 分間) することにより EXiLE の反応性が失われた。実際の OFC は加熱全卵を用いていたことから、本患者の IgE は生の卵白には存在するが加熱した全卵では失活する卵白成分エピトープを認識する可能性があると思われる。また、ここでは示さなかったが、CAP-RAST クラスが 0 の 6 例については、OFC、脱顆粒法、EXiLE 法すべて陰性であることを確認している。以上により、マスト細胞の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 架橋に基づく活性化を感度良く検出する EXiLE 法が、確定診断法である OFC と非常に良く相関する *in vitro* 試験法として機能することが示唆された。

⑤EXiLE 法を用いた遺伝子組み換えタンパク質の潜在的アレルギー性の解析：徳島大学の木戸 博教授により提供された、遺伝子組み換え作物に含まれる害虫抵抗性毒素タンパク質 Cry1Ac に結合性のある IgE を持つアレルギー患者血清 2 検体について、本 IgE と Cry1Ac との結合がマスト細胞の活性化を惹起することができるかどうか、EXiLE 法を用いて解析した。これらの患者血清は、木戸教授らによる Cry1Ac 固定ダイヤモンドライクカーボン (DLC) チップを用いたハイスループットスクリーニングにより同定された (詳細は本報告書 12 ページを参照)。用いた患者血清は Table 2 に示した 3 種類である。

Table 2. EXiLE 法により解析した Cry1Ac 結合性 IgE を含む血清

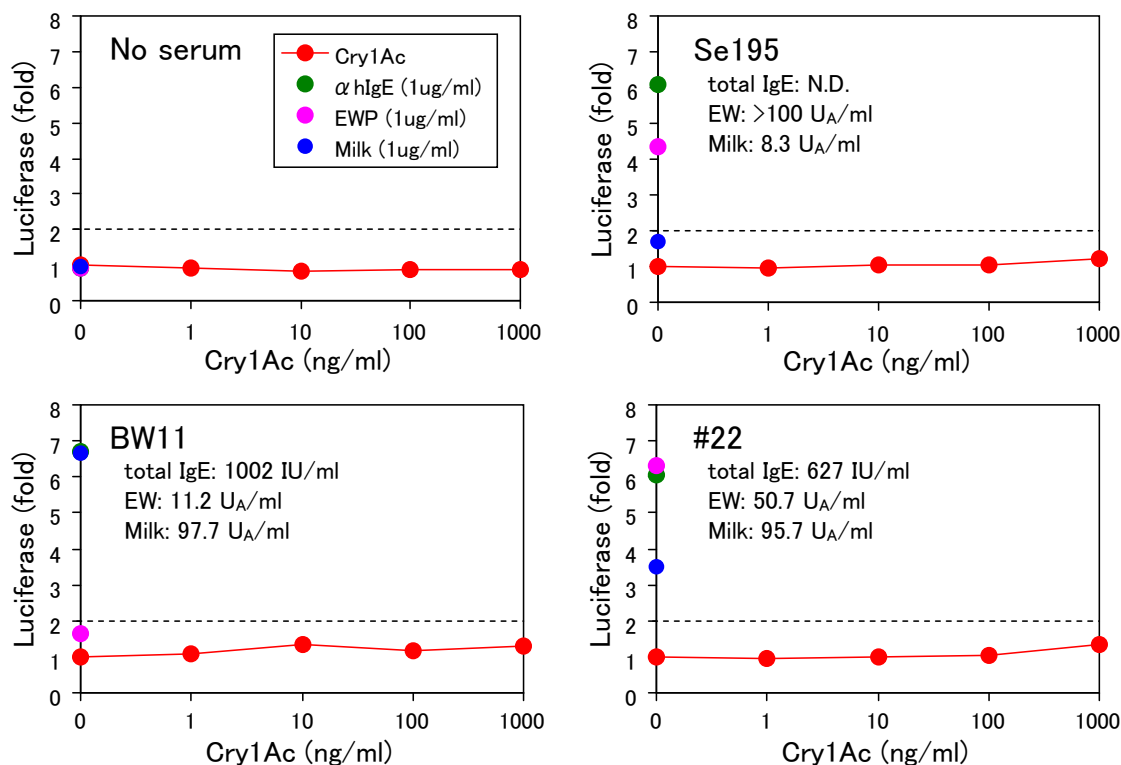
Serum	Total IgE (IU/ml)	Egg white IgE (U _A /ml)	Milk IgE (U _A /ml)	Cry1Ac DLC
Se195	n.d.	>100	8.3	647.5
BW11	1002	11.2	97.7	382.8
#22	627	50.7	95.7	n.d.

Total IgE は UniCAP で、卵白および牛乳特異的 IgE については CAP-RAST 法で測定した。Cry1Ac 特異的 IgE は、木戸教授らにより DLC チップにより測定された。n.d., not determined.

このうち、患者血清 Se195 および BW11 が木戸教授の下で同定された Cry1Ac 結合性 IgE を含む検体である。#22 の血清については、前二者の血清がともに卵白および牛乳に対する特異的 IgE を含んでいたため、これらを陽性対照とした場合、陽性対照抗原が真に応答することを示すための陽性対照用血清として用いた。各血清は 100 倍希釈にて使用し、Cry1Ac は木戸教授らが DLC チップに使用したものと同一のロットを 0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml にて、卵白抗原、牛乳抗原、および抗ヒト IgE 抗体は 1 $\mu\text{g/ml}$ にて刺激を行なった。図 5 に結果を示すが、陽性対照として用いた卵白および牛乳抗原はカットオフ値以上の応答が認められたが、Cry1Ac については、少なくともこの濃度範囲においては全検体ともカットオフ値以上の応答は見られなかった。よって、これらの患者血清に含まれる IgE は、その感作経路は不明であるが、Cry1Ac とは結合したとしても、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の架橋を介するマスト細胞の活性化を誘導する能力はないと考えられ、アレルギー性が懸念される段階ではないと思われた。本事例のような、遺伝子組み換えタンパク質のアレルギー性に関する試験等は、倫理的な問題や試験数の制約などから *in vivo* での試験を実施することは難しい。しかし、簡便かつ高感度で知られる血清中特異的 IgE の生化学的試験では、ハイスループットなスクリーニングが可能である一方で、上述した通り、組み換えタンパク質と結合する IgE を検出できたとしても、それがマスト細胞の活性化を惹起できるかどうかについての情報を得ることはできない。本研究で示された、DLC チップを用いたハイスループットスクリーニングとマスト細胞の活性化をエンドポイントとする EXiLE 法との組合せは、新しい *in*

vitro 試験法が食の安心安全確保に貢献できる一つの有力な可能性を示したと思われる。

図 5. EXiLE 試験による Cry1Ac 結合性 IgE を含む患者血清のマスト細胞活性化能の解析



100 倍に希釈した患者血清 Se195, BW11, #22 (卵白と牛乳に関する陽性対照) で RS-ATL8 細胞を一晩感作し、10%FCS を含む MEM 培地に溶解した Cry1Ac, anti-human IgE, egg white protein (EWP), milk により 3 時間刺激した。ルシフェラーゼ発現量は刺激前を 1 とし、2 倍をカットオフ値とした。本試験で用いた濃度範囲 (1~1000 ng/ml) においては、Cry1Ac はマスト細胞株を活性化しなかった。

⑥ EXiLE 法を用いたスギ花粉抗原とトマト抗原の交差反応性の解析：スギ花粉およびトマトのアレルゲンに対する IgE が陽性の 2 名の患者 A (total IgE, 808 IU/ml; スギ花粉 IgE, >100 U_A/ml; トマト IgE, 7.77 U_A/ml) および I (total IgE, 10900 IU/ml; スギ花粉 IgE, 79.15 U_A/ml; トマト IgE, 20.3 U_A/ml) の血清について、Table 3 に示す吸着処理により抗原特異的に結合する IgE をスピンドウンし除去した試料を藤田保健衛生大学より提供された。

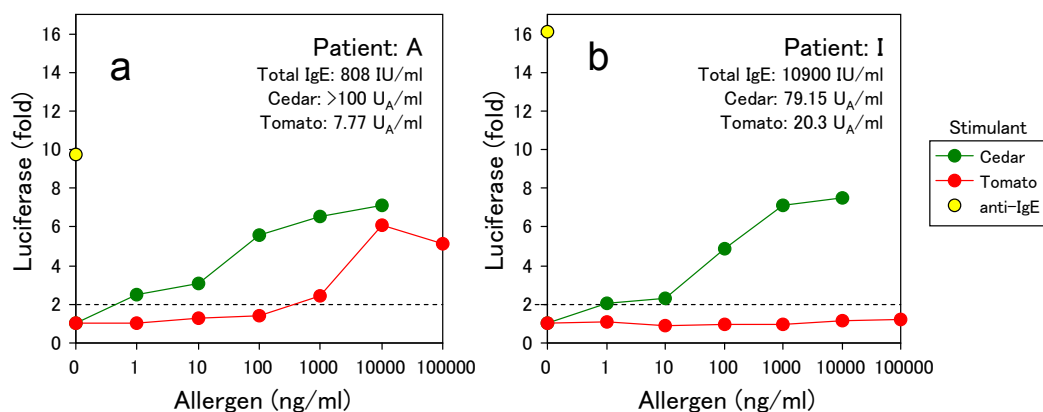
まず、本システムにおけるこれら患者血清を用いた際のスギ花粉抗原およびトマト抗原の至適濃度を求めた。100 倍希釈した A または I の血清 (未処理血清) により RS-ATL8 細胞を感作し、1, 10, 100, 1000, 10000 ng/ml のスギ花粉抗原、1, 10, 100, 1000, 10000, 100000 ng/ml のトマト抗原、または 1 μ g/ml の anti-IgE により刺激した。図 6 に示すように、A および I のいずれの患者血清を用いても、1 ng/ml 以上のスギ花粉抗原添加により、本システムのカットオフポイントである 2.0 を超える応答が観察され、濃度依存的にその値は増加した。一方、トマト抗原に対しては患者 A では 1 μ g/ml 以上で応答し、10 μ g/ml でピークを迎えたが (図 6a)、患者 I では少なくともこの濃度範囲においては全く応答しなかった (図 6b)。

Table 3. スギ花粉抗原およびトマト抗原に対する IgE が陽性であった患者血清 A および I と抗原結合ビーズによる両血清中 IgE の吸着処理

血清	処理内容
A, I	未処理
A0, I0	Null-Bead による非特異的吸着
A1, I1	スギ花粉抗原 1000 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A2, I2	スギ花粉抗原 100 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A3, I3	スギ花粉抗原 10 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A4, I4	スギ花粉抗原 1 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A5, I5	スギ花粉抗原 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A6, I6	トマト抗原 10000 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A7, I7	トマト抗原 1000 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A8, I8	トマト抗原 100 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着
A9, I9	トマト抗原 10 $\mu\text{g/ml}$ 結合ビーズによる吸着

これらの結果と、藤田保健衛生大学における好塩基球活性化試験の刺激条件ではトマト抗原はスギ花粉抗原の 10 倍の濃度を用いていたことを考慮し、次に、様々な濃度のスギ花粉

図 6. 両患者血清と様々な濃度のスギ花粉およびトマト抗原を用いた EXiLE 試験

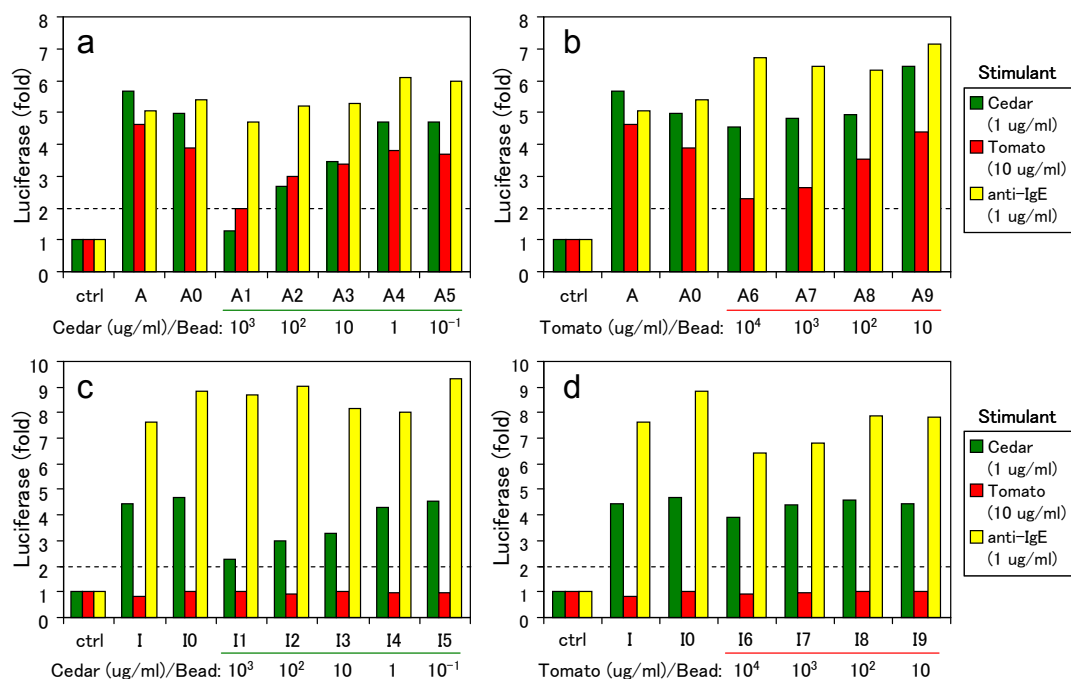


(a) 患者 A; (b) 患者 I。カットオフ値を破線で示した。患者 A はスギ花粉およびトマトのいずれにも応答し、患者 I はスギ花粉のみに応答してトマトには応答しないことが分かる。

またはトマトの抗原を結合したビーズによりこれらの抗原と特異的に結合する IgE を除去した患者血清を用いて、10 $\mu\text{g/ml}$ のトマト抗原および 1 $\mu\text{g/ml}$ のスギ花粉抗原で刺激して EXiLE 試験を行なった。患者 A についてスギ花粉抗原結合ビーズにより吸着処理を行った血清を用い、これを 1 $\mu\text{g/ml}$ のスギ花粉抗原、10 $\mu\text{g/ml}$ のトマト抗原、および 1 $\mu\text{g/ml}$ の anti-IgE により刺激したところ、スギ花粉抗原およびトマト抗原いずれの刺激によっても、吸着に用いたスギ花粉の濃度依存的にルシフェラーゼ発現の減少が認められた (図 7 a)。患者 A の血清をトマト抗原で吸着処理した場合 (図 7b) は、トマト抗原への応答の濃度依存的な減弱が認められ、かつ高濃度のトマト抗原吸着処理時では、スギ花粉抗原に対する応答もごくわずかながら減弱する傾向にあった。

患者 I について同様のことを行なったものが 図 7c およ 7d である。患者 I はトマト抗原には応答せず、スギ花粉抗原については全ての条件でカットオフ値を超える応答を示した。

図 7. スギ花粉およびトマト抗原結合ビーズによる IgE 吸着試験

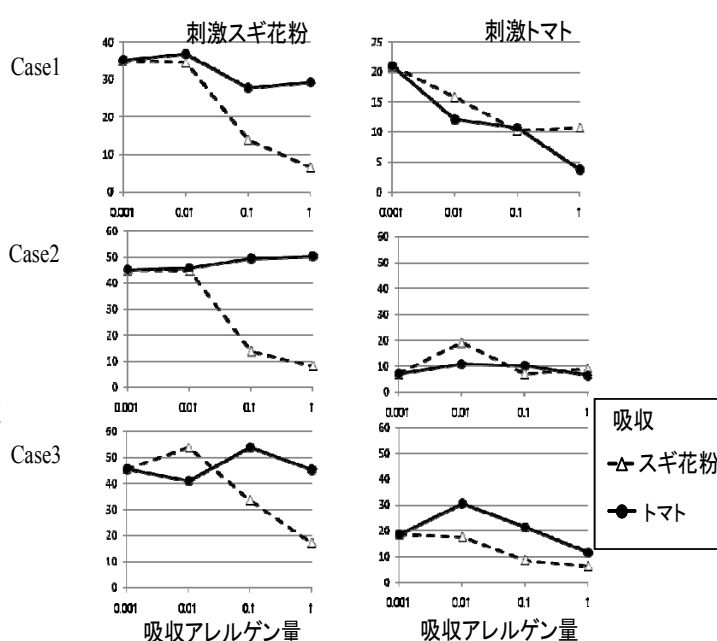


100 倍希釈した各種血清により RS-ATL8 細胞を一晩感作し、スギ花粉抗原 (1 $\mu\text{g/ml}$)、トマト抗原 (10 $\mu\text{g/ml}$)、および anti-IgE (1 $\mu\text{g/ml}$) により刺激した。(a, b) 患者 A; (c, d) 患者 I。カットオフ値を破線で示した。

スギ花粉抗原結合ビーズで IgE を吸着した場合はスギ花粉抗原への応答の減弱が認められたが (図 7c)、トマト抗原で吸着処理した場合のスギ抗原への応答の減弱は認められなかった (図 7d)。これらの結果を総合すると、患者 A の血清にはスギおよびトマトの抗原と交差し、かつマスト細胞活性化能を有する IgE が存在するが、患者 I の血清 IgE はスギのみに応答し、トマト抗原に結合する IgE はマスト細胞活性化能を持たず、スギとも交差しなないと考えられる。本試験の結果は、下記に示す藤田保健衛生大学で実施された受動感作ヒト好塩基球活性化試験の結果とよく相関し、お互いを補い合う手法として今後発展していくことが期待された。

b)-2 ヒト好塩基球細胞を用いる方法. 図8 吸収試験による交叉反応性の検討

交叉反応性の検討のための吸収試験を確立し、トマトの口腔アレルギー症候群の原因として、スギ花粉との交叉反応性が疑われる 3 症例を対象に、アレルギーによる吸収後の受動好塩基球活性化試験を行った。うち 2 例(case1,3)ではトマトによる好塩基球の活性化がスギアレルゲンにより完全に吸収されることから、スギ花粉とトマトとに交叉反応性を示す IgE 抗体はスギ花粉症とトマト OAS の病因になっている、臨床的に意義のある抗体であることを証明した(図 8)。残る 1 例(Case2)では、トマトアレルゲンによる好塩基球の活性化が見られず、トマト特異的 IgE は CDC など 1 価のアレルゲンに対して交叉反応性を示しているものと考えられた。なお、図 7 の患者 A は、図 8 の case 1



に、患者 I は、case 2 に相当する。

(iii)-1 アジュバント活性：腸管上皮細胞を用いる評価系。①共培養による評価—以下に示すように共培養条件の最適化を行った。Caco-2 細胞を分化させた後、Raji 細胞を加えると抵抗値は急速に低下し、試験系は良好な状態を維持できる期間は短かった (図 9)。そこで、Caco-2 細胞のサブクローンである C2BBE1 細胞を用いて検討を行ったところ、Raji 細胞添加後も比較的長期にわたり安定的に維持できることがわかった。共培養の実験は以後、このサブクローンを使うことにした。

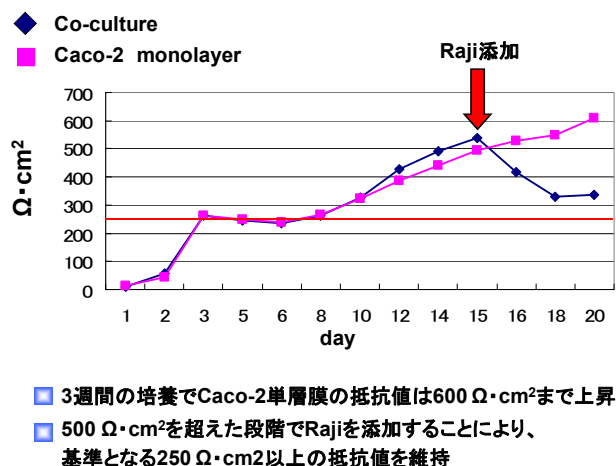
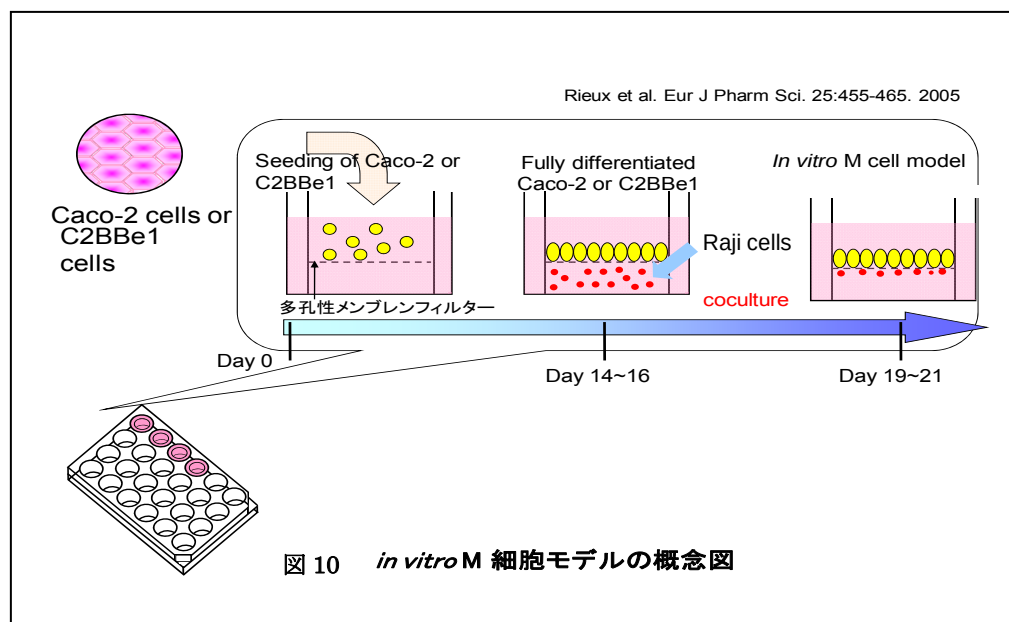


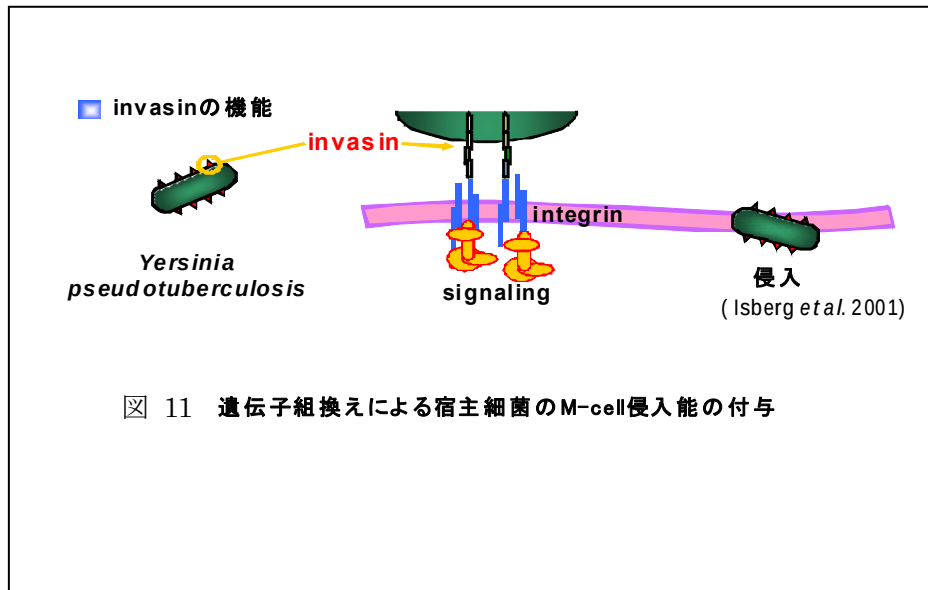
図 9 Caco-2/Rajiの共培養によるタイトジャンクションへの影響

また、C2BBE1 細胞をメンブレンフィルター上に播種し、2週間程度かけて分化させタイトジャンクションを安定化し、2週間後に Raji 細胞をメンブレンフィルター株に加え培養することにより、約 1 週間程度で Model M cell 共培養系が安定することが判明した。図 10 にその培養条件を示す。

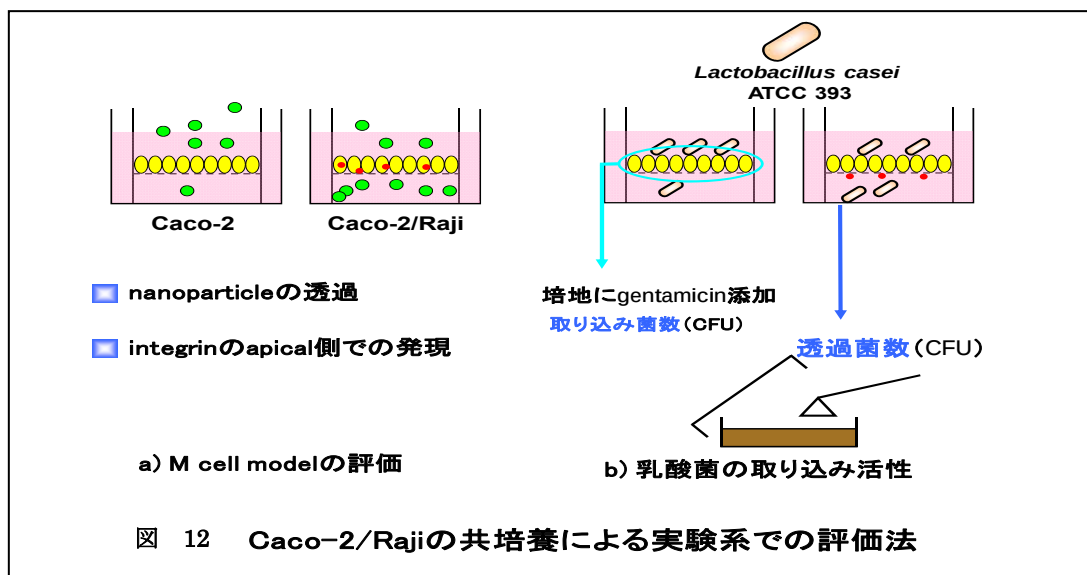


c

②組換え乳酸菌の model M cell への取り込みの評価；組換え乳酸菌としては、エルシニアの M 細胞侵入因子の一つである膜蛋白質インベysin を細胞表面に発現する組換え体を作成した。インベysin の作用の概念図を図 11 に示す。



マウスの個体レベルの実験により、エルシニアのM細胞侵入因子の一つである膜蛋白質インベインシンを細胞表面に発現する組換え体では宿主細菌に比べ、M細胞からの取り込みが増強されることが知られている。そこで、このような遺伝子組換え大腸菌及び乳酸菌を作出した。ついで、評価する組換え体をCaco-2/Rajiの共培養による細胞系が安定したところで加え、図12のように組換え乳酸菌の取り込みについて調べた。単層培養及び共培養した細胞に、組換え乳酸菌を 10^8 CFU/well 加え 37°C , 180分後に、メンブランを透過した菌数により取り込み活性を評価した。



単層、共培養 M細胞モデルを用いた組換え乳酸菌の取り込み評価方法とその結果を図13に示した。単層では、10回の繰り返し実験で1~2回のみ取り込みが示されるのに対し、共培養実験系では、組換え乳酸菌はM細胞モデルで安定的に透過することが確認された。この実験系は、ヒト腸管M細胞からの抗原取り込みの評価として有用と思われる。

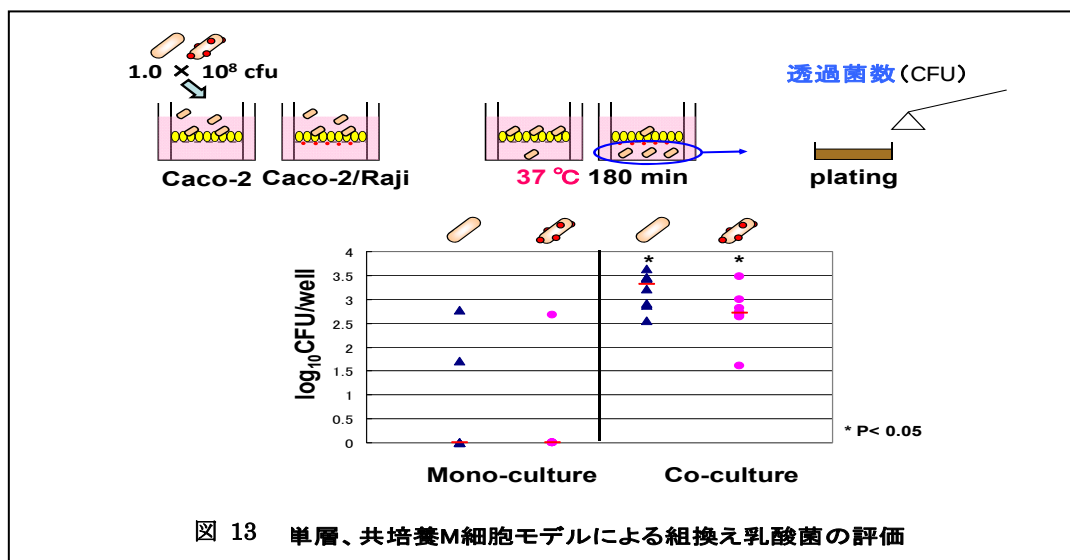


図 13 単層、共培養M細胞モデルによる組換え乳酸菌の評価

(iii)-2 アジュバント活性：ヒト樹状細胞を用いる評価系-- ヒト樹状細胞を、食物アレルギー並びにアジュバントである LPS, forskolin を加えて培養し、次いでリンパ球を加えて共存培養したところ、感作時に LPS を添加すると、Th1 あるいは Th17 細胞への分化を促進すること、forskolin を添加すると、Th2 細胞への分化を促進することが示され、本培養系がアジュバント活性の評価に有用であることが示唆された。

4) 3 年間の研究成果のまとめ

1. 研究全体の成果

①全体の研究目的

食品の免疫影響に関する評価は、従来ほとんど行われておらず、組換え植物を対象としたアレルギー性評価が、バイオインフォマティクス、物理化学的安定性試験の第 1 段の評価として行われているのが現状で、これから開発されてくることが予想される組換え微生物、あるいは免疫に直接かかわる機能を持つ食品も加味したアレルギー性並びに免疫影響評価法の開発が急がれている状況にある。これらの状況に鑑み、本研究では、新規産生タンパク質等のアレルギー性・免疫影響の *in vitro* 評価系の開発を行うために、免疫成立にいたる過程を感作、惹起、アジュバント活性 3 つにわけ、それぞれについて評価系を開発し、評価対象として、新規産生タンパク質、組換え乳酸菌等を用いることにより、遺伝子組換え食品等のアレルギー性・腸管免疫予測の信頼性の高い評価手法の開発をめざすことを目的とした。

②全体の研究方法

感作過程は、パイエル板を、惹起過程（既知アレルギーとの交差反応性）は、アレルギーチップ並びに好塩基球細胞を、アジュバント活性は、腸管上皮細胞と樹状細胞を評価系のターゲットとし、感作過程は手島が、惹起過程は木戸、宇理須、手島が、アジュバント活性は、穂山、五十君が担当した。以下、個別の研究方法を示す。

感作過程の評価法としては、未感作のマウスパイエル板を用いて食物タンパク質のアレルギー性を検出するための *in vitro* の実験系の検討を行った。培養系に用いる細胞は、6 週齢雌の BALB/c マウス小腸のパイエル板から採取したものをを用い、200 μg のタンパク質存在下で 7 日間培養し、各種サイトカインの放出を測定しタンパク質の反応性を評価した。IL-17 の産生が、食物アレルギー性タンパク質 2 種で顕著に増加し、バイオマーカーになり得ることが確認された。

惹起過程の評価法としてのアレルゲンを高感度で迅速に検出するためのアレルゲンチップを用いる方法では、高密度に集積した反応基を持つカルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)を用い、抗原蛋白の高密度搭載を可能にしたハイスループットタンパク質チップの開発に取り組んだ。具体的には、①遺伝子組換え食品タンパク質を搭載し、そのアレルゲン性を検定する技術開発、②強い食物アレルギー反応を引き起こすそばアレルゲンを搭載するタンパク質チップを、リード技術とした検出システムの開発に取り組んだ。また、食物アレルギー患者の血液を用いたハイスループットタンパク質チップの反応システムへの応用を検討して、その基盤技術を確立する。惹起過程のもう一つの評価法である好塩基球細胞を用いる方法では、高度にヒト IgE 受容体を発現したラット好塩基球細胞(RBL-SX38)に、レポーター遺伝子(pNFAT-LUC)の導入を行い、ヒト IgE 受容体の架橋形成に伴う細胞の活性化を NFAT による転写活性化を指標にモニターするための安定発現株を確立した。この細胞系に、種々の患者血清を作用させ、臨床症状を反映した方法であるかどうかを検討するとともに、消化液で処理をしたアレルゲンを反応させることで、体内でのアレルゲンの物理的変化にも対応し得る評価系であるかどうかの検討も行った。また、経口負荷試験陽性の卵白患者血清を用いて、臨床症状との連関についても検討を行った。さらに、ボランティアの好塩基球細胞を用いる受動感作試験により、活性化マーカー CD203c, CD63 の発現を指標に IgE 受容体の架橋形成に伴う細胞の活性化を検出する方法の開発を行った。受動感作試験では、トマト患者血清を用いて、スギとトマトの交差反応性の確認に用いられる系であるかどうかの確認も行った。

アジュバント活性の評価としての、腸管上皮細胞の培養系としては、腸管上皮細胞である Caco-2 細胞等を用い、サルモネラのフラジェリンタンパク質を菌体表面に提示した組換え乳酸菌を用いて、乳酸菌単独の場合の免疫影響との比較をサイトカイン IL-8 の産生を指標に行った。さらに、Caco-2 細胞をヒト免疫細胞由来の Raji 細胞と共培養することにより *in vitro* の M 細胞モデル作成を行い、遺伝子組換え微生物(菌体表面に invasin を提示させた微生物)と対象株の取り込まれ方の違いについて検討を行った。さらに、ヒト樹状細胞並びにリンパ球との共存培養系を構築し、アレルゲンとモデルアジュバント共存下でのリンパ球活性化を、また、異質ドナーの CD4 陽性 T 細胞と共存培養することによるリンパ球活性化を、サイトカイン産生、mRNA の変動からモニターし、食品成分の持つアジュバント活性を評価するシステムを開発した。

③全体の成果

本研究は、新規産生タンパク質等のアレルゲン性・免疫影響の *in vitro* 評価系について、感作、惹起、アジュバント活性の 3 項目にわけて開発を行うことを目的にしているが、以下それぞれの項目につき、成果の概要を記す。

(i) 感作過程の評価法

マウスパイエル板初代培養系を用いて、種々のタンパク質との培養を行った後の種々のサイトカインの測定結果から、食物アレルギー性タンパク質の卵白アルブミン、ラクトグロブリンで、培養 4 日目以降、IL17 の産生が顕著に増加され、また培養初期には IL-6 の産生されることからパイエル板での感作の成立に Th17 の活性化の起きること、これらサイトカインがバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

(ii) 惹起過程の評価方法

(a) アレルゲンチップの開発

アレルゲンを高感度で迅速に検出するシステムとして、高密度に集積した反応基を持つカルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)を用い、抗原タンパク質の高密度搭載を可能にしたハイスループットタンパク質チップの開発に取り組んだ。具体的には、①遺伝子組み換え食品中に含まれる 2 種類の除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT と、4 種類の害虫抵抗性タンパク質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F について、各々の 15-50 f moles

(1 nl) をカルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)に共有結合させて、定量的に搭載する基盤技術の検討を行った。対象としての陽性アレルゲンとしては、チップにそばアレルゲンを搭載した。さらに、そば、ダイズ等のアレルギー患者血清を用いた試験を行い、アレルゲン同定システムの開発研究を遂行した。陽性対象として行ったそばアレルゲンに対する IgE 抗体価の測定では、通常のアレルギー検査で用いられている CAP-RAST の感度を数倍上回り、しかも検出に必要な血清は 1/40 の微量 (I μ L)を実現することができた。

(b) 好塩基球細胞の活性化を指標とする評価手法の開発

①pNFAT-LUC 導入 RBL-SX38 細胞：pNFAT-LUC を安定に導入した RBL-SX38 細胞株を樹立し、卵白アレルギー患者血清と特異抗原による IgE 受容体架橋形成による細胞の活性化の解析から、IgE 抗体として約 50pg/ml まで、検出可能であることが判明し、患者血清中抗原特異的 IgE 抗体の測定に際して、感度の面で、また、ハイスループット性の面で実用可能である系であることが判明した。さらに、卵白の経口惹起でアレルギー症状を示す患者の血清で細胞を感作した時には、抗原惹起による細胞の活性化がみられたが、臨床症状を示さない患者の血清を用いた時は、細胞の活性化がみられないことが判明し、臨床的に意味のある IgE を測定できる系として有用であると思われた。また、卵白アレルゲンであるオボムコイドに陽性の IgE 抗体を持つ患者血清で細胞を感作した場合、惹起抗原として、オボムコイドばかりでなくオボムコイドの人工胃液消化抵抗性フラグメントを用いても細胞の活性化を起こすが判明した。本細胞系はアレルゲンの生体での消化も考慮にいった評価も可能な系であると思われた。なお、本細胞系では、レポーター分子としてルシフェラーゼを用いることで、発光性基質の利用が可能となり感度の大きな上昇を図ることができ、血清数 μ l での測定が可能となった。この系を EXILE 系と名付けた。また、卵白経口負荷試験陽性の患者血清を用いて、この系の適用性について検討を行ったところ、症状を有する患者血清を用いた場合の EXILE 系の陽性率が極めて高いことが示され、本評価系の臨床症状を反映しうる評価系としての有用性が示された。

② ヒト好塩基球細胞の活性化を指標とする評価手法の開発：新規食物蛋白と食物アレルギー患者血清中の特異的 IgE との反応を検出する *in vitro* の検査法を確立する目的で CD203c を用いた好塩基球活性化試験の全血法と受動法の比較検討を行うとともに、同じく好塩基球の活性化マーカーである CD63 の有用性について検討した。方法としては、卵白除去食療法中の鶏卵アレルギー患者および卵白が摂取可能な非鶏卵アレルギー対照を対象とした。好塩基球活性化試験は、採血後 24 時間以内の対象者全血に、10 倍希釈液を作成した卵白アレルゲン、抗 IgE 抗体 (陽性コントロール)、PBS(陰性コントロール)を添加後 15 分 37°C インキュベートした。洗浄後、FITC 標識した CRTH 2 抗体、PE 標識した CD203 c 抗体、PC7 標識した CD3 抗体で染色し FACSCalibur にて解析した。CRTH2 が陽性となる、T 細胞、好酸球、好塩基球のうち T 細胞は CD3 で、好酸球は側方散乱から判別し、好塩基球分画の CD203 c 陽性細胞数を測定した。CD63 の検討は、他の抗体と同時に APC 標識 CD63 を添加して行った。受動好塩基球活性化試験は、ボランティア全血を洗浄後、PH4.0 の乳酸バッファーにて自己 IgE を剥離し、患者血清にて 4°C overnight 再感作したのち、上記の如く好塩基球活性化試験を行った。結果として、受動好塩基球活性化試験の検討では、血球ドナーの IgE は剥離可能であること、受動感作は、37°C 30 分では不十分で、4°C overnight あるいはこれに 37°C 30 分を追加したもので、活性化が認められることが示された。

しかしながら、受動好塩基球活性化試験と全血法好塩基球活性化試験との比較では、希釈域値で $r=0.807$ 、近似曲線 $y = 0.6696x + 0.2641$ で、全血法より域値が低くなる傾向を示した。新たな好塩基球活性化マーカー CD63 の導入は、好塩基球活性化に伴う CD63 抗原の活性化による蛍光輝度増強が、CD203 c より大きいという利点を有していたが、両者の最高陽性%は $r=0.9444164$ と強い相関を示し、併用の優越性は大きくはなかった。

(iii) アジュバント活性の評価方法

(a) 腸管上皮細胞 Caco-2 細胞等を用いる評価系

モデルとしての 1 つは、組換え乳酸菌は、*Lactobacillus casei* ATCC393 株に、サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定化して発現させた遺伝子組換え乳酸菌を用いた。ヒト由来の腸管上皮細胞である Caco-2 細胞を小型のウェルに培養し分化させた後、タイトジャンクション形成を確認し、モデル組換え体を加えると、Caco-2 細胞から、炎症性サイトカインである IL-8 が産生されることを確認した。この実験系は、遺伝子組換え細菌などの微生物の腸管上皮細胞への影響を評価するモデルとなると思われる。また、二つ目のモデルとして、エルシニアの M 細胞への侵入因子の一つである膜蛋白質インベysin を細胞表面に発現する乳酸菌を作出した。Caco-2 細胞または、C2BBel 細胞を分化させた後、ヒト B 細胞由来の Raji 細胞を共培養することにより、*in vitro* の M 細胞モデル作成を行い、この乳酸菌を用いることで、組換え乳酸菌の取り込みに関する評価が可能であることを示した。また、乳酸菌取り込み試験に HeLa 細胞が有用であることもあわせて示すことができた。

(b) ヒト樹状細胞を用いる評価系

培養ヒト樹状細胞に食品タンパク質ペプチドとアジュバント物質を添加により感作後、培養ヒト単核白血球細胞と共培養し、*in vitro* の食品タンパク質のアジュバント活性評価法を構築した。モデルアジュバント物質として LPS を使い、食品抗原タンパク質としてオボアルブミン (OVA) のペプチド (323-339) を用いた。最終培養上清の多項目サイトカイン測定では、培養樹状細胞の OVA peptide 感作時に LPS を添加すると、OVA peptide 感作のみに比べて、IL-1 β 、IL-13、IL-5、IL-17、G-CSF、IFN- γ 、IL-6、TNF- α 等のサイトカインの産生が増加した。T リンパ球の表面抗原解析では、LPS 添加により CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺細胞の分化を促進した。これらの結果は、LPS による樹状細胞への影響によるものと考えられた。T 細胞分化指標の転写因子の mRNA の定量では、Th2 の分化指標である GATA3 の mRNA をリアルタイム PCR で測定したところ、樹状細胞の感作時に加え、単核白血球細胞の共培養時にも OVA peptide と共に培養した群が、無添加の対照群に比べ、GATA3 の増加の傾向が示唆された。このことは、感作時および単核白血球細胞の共培養時にも OVA peptide が共存した方が、Th2 細胞への分化を促進することが示唆された。一方、LPS を添加すると、Th2 細胞への分化を抑制することが示唆された。さらに、ヒト樹状細胞を LPS, forskolin を加えて培養し、次いで異質リンパ球を加えて共存培養したところ、感作時に LPS を添加すると、Th1 あるいは Th17 細胞への分化を促進すること、forskolin を添加すると、Th2 細胞への分化を促進することが示された。以上、アジュバント活性を調べるための樹状細胞とリンパ球の共存培養系の構築を行うことができた。

2. 各分担研究の成果

1) 分担研究課題「感作過程の評価法」について

① 研究目的

遺伝子組換え食品等ではこれまで摂取されたことのない蛋白質が発現あるいは生成する可能性があるため、新規蛋白質の腸管免疫系における感作能を調べることが重要である。蛋白質の食物アレルギー性を評価するバイオアッセイには、IgE 抗体との結合やヒスタミンの遊離反応など食物アレルギーの発症機序が利用されてきた。しかし、食物アレルギーでは感作成立後の効果期に比べて誘導期における知見が乏しいことから、感作誘導機序を利用した食物アレルギー性の評価系は確立されていない。腸管免疫系の中でパイエル板は蛋白質を生体に取り込む機能を持つ M 細胞、抗原提示細胞やリンパ球が集積している器官である。我々が開発した食物アレルギーモデル動物では、インビボで感作を誘導する蛋白質としない蛋白質とではパイエル板細胞の反応性が異なることから、蛋白質の食物アレルギー性の認識にパイエル板細胞群が関与している可能性が示唆された。そこで、パイエル板細胞初代培養系を用いて蛋白質の腸管免疫における感作能を調

べるインビトロ評価系の開発を試みた。

②研究方法

3～13 週齢の雌性 BALB/c マウスからパイエル板を採取し、コラゲナーゼ処理により細胞を分離した。1 ウェルあたり、10%FBS、50 μ M メルカプトエタノール、100 IU/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 培地に浮遊させた細胞 2×10^5 個に各種蛋白質 200 μ g を添加し、5%CO₂、37℃で培養した。5～7 日目に 1 ウェルあたり、2 nmol の 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を添加し、細胞に取り込まれた BrdUをELISAで測定した。蛋白質を添加して培養した細胞に取り込まれた BrdU 量を非添加時の量で除した刺激係数(S.I.)で細胞増殖活性を評価した。食物アレルギー性蛋白質として、卵白アルブミン(OVA)、 β -ラクトグロブリン(LG)、 α -カゼイン(CS)、およびそば粉抽出液(BW; モリナガ FASPEK そば測定キットにてそば粉抗原濃度を調整)を用いた。一方、非食物アレルギー性蛋白質としてペプシン(PEP)および 3-Phospho-D-glycerate carboxy-lyase (Rubisco; RB)を用いた。

6 週齢のマウス 8 匹から採取したパイエル板細胞にそれぞれ OVA あるいは PEP 200 μ g を添加して 5 日間培養し、培養上清中のサイトカインを Bio-Plex (Bio-Rad) mouse cytokine 23-Plex Kit で調べた。T細胞の分化の指標はそれぞれ Th 1は IL-2および IFN- γ 、Th 2は IL-4および IL-5、制御性 T細胞(Treg)は IL-10、Th 17 細胞は IL-17 とした。また、培養 2～6 日に、細胞増殖活性および培養上清中の IL-17 および IL-6 濃度を ELISA で測定した。同様に RB あるいは LG 200 μ g を添加して 5 日間培養し、培養上清中の IL-17 濃度を測定した。

OVA および西洋ワサビペルオキシダーゼ(HP)それぞれ 25 mg/mL 溶液 1 容量に SGF(3.8 mg pepsin/0.2% NaCl pH2, 5 mL) 19 容量を加え、37℃で 6 あるいは 16 時間加温して蛋白質を消化した。200 mM 炭酸ナトリウム溶液 1/40 容量を加えて中和した後、それぞれ消化前の蛋白質濃度が 10mg/mL になる液量まで限外濾過(分子量 3000)で反応液を濃縮した。対照としてそれぞれの蛋白質溶液に 200 mM 炭酸ナトリウム溶液を加えた後、SGF を加えたものを同様に調製し、6 週齢のマウス 8 匹から採取したパイエル板細胞に添加して 4 日間培養後、細胞増殖活性および培養上清中の IL-6、IL-17 濃度を測定した。また、パイエル板細胞に添加した試料中の蛋白質の消化の状態を SDS 電気泳動で調べた。

③成果

8 週齢のマウス 3 匹から採取したパイエル板細胞にそれぞれ OVA あるいは PEP 50、100 および 200 μ g を添加して 7 日間培養し、細胞増殖活性を調べた。図 14 に示したように、蛋白質の添加量の増加に伴って、PEP より OVA 添加時の S.I.が上昇する傾向が認められ、食物アレルギー性蛋白質はパイエル板細胞の増殖活性を上昇させると考えられた。異なる週齢のマウス 3 匹から採取したパイエル板細胞にそれぞれ OVA あるいはペプシン 200 μ g を添加し、7 日間培養、細胞増殖活性を調べた。図 15 に示したように、3 から 8 週齢では週齢の増加に伴って、S.I.が高くなる傾向が認められたが、13 週齢のパイエル板細胞の S.I.は低下した。また、6 週齢のマウスのパイエル板細胞において PEP と OVA 添加時の差が最も大きくなった。

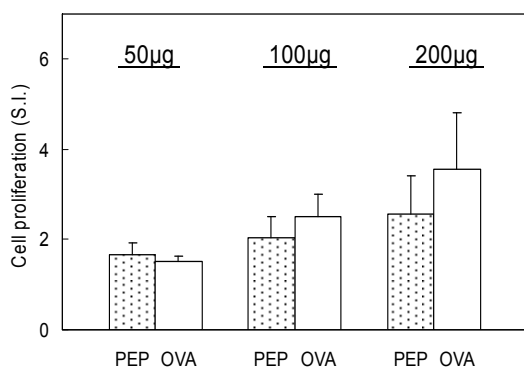


図 14 パイエル板細胞増殖活性に及ぼす蛋白質添加量の影響

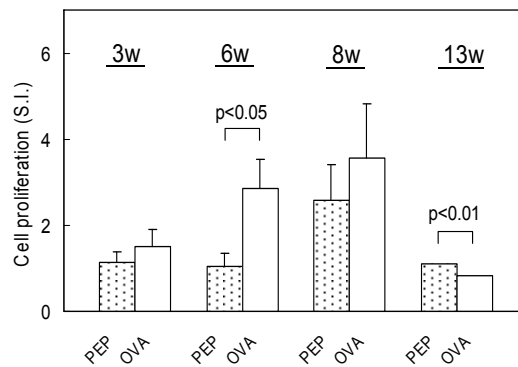


図 15 パイエル板細胞増殖活性に及ぼすマウス週齢の影響

8 週齢のマウス 6 匹から採取した採取したパイエル板細胞にそれぞれ OVA、LG、CS、BW、PEP および RB 200 μ g を添加して 7 日間培養し、細胞増殖活性を調べた。図 16 に示したように、食物アレルギー性蛋白質の OVA、LG、および BW は非食物アレルギー性蛋白質の PEP および RB に比べて有意に S.I.が上昇した。食物アレルギー性蛋白質の CS では S.I.の上昇は認められなかったが、これはパイエル板を採取したマウスはカゼインを含む飼料中で飼育していたため、インビボで免疫寛容が成立していたことが原因と考えられた。

マウスのパイエル板細胞培養系は添加した蛋白質の食物アレルギー性によって異なる細胞増殖活性を示したことから、蛋白質の食物アレルギー性評価系として利用できる可能性が示唆された。

蛋白質を添加して 5 日間培養したパイエル板細胞培養上清中では、培地のみに比べて PEP 添加で IFN- γ および IL-4 濃度の低下、OVA 添加で IL-2 および IL-17 濃度の上昇が認められた。さらに、IL-17 は PEP に比べて OVA 添加によって有意に培養上清中濃度が上昇し(表 4)、食物アレルギー性蛋白質の添加によって Th17 細胞が誘導されていることが示唆された。培養上清中の IL-17 濃度は非食物アレルギーの RB 添加では上昇せず、食物アレルギーの LG では上昇したことから(図 17)、添加蛋白質の食物アレルギー性に反応して変動する特異的なマーカーとなると考えられた。さらに、Th-17 細胞を誘導するサイトカインである IL-6 濃度を調べたところ、細胞増殖活性に差が検出されない培養初期にすでに添加蛋白質した蛋白質の食物アレルギー性による差の検出が可能であった(図 18)。

マウスのパイエル板細胞培養系への食物アレルギー性蛋白質の添加によって、蛋白質を捕食する抗原提示細胞が刺激されて IL-6 を分泌し、培地中のウシ胎児血清に豊富に含まれている TGF- β とともにナイーブな T 細胞を Th17 細胞に分化させたものと考えられた。パイエル板細胞培養系において IL-6 と IL-17 はより特異的な食物アレルギー性識別マーカーとして利用し得ることが示唆された。

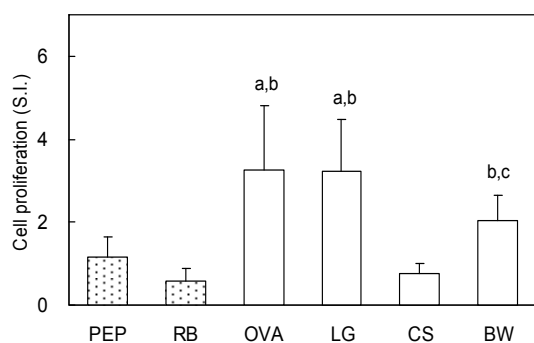


図 16 パイエル板細胞増殖に及ぼす蛋白質の食物アレルギー性の影響

a: $p < 0.01$ vs. PEP
b: $p < 0.01$ vs. RB
c: $p < 0.05$ vs. PEP

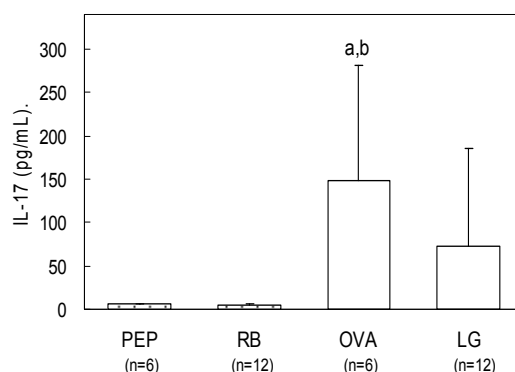


図 17 パイエル板細胞培養上清中IL-17濃度に及ぼす添加蛋白質の食物アレルギー性の影響

a: $p < 0.05$ vs. PEP
b: $p < 0.05$ vs. RB

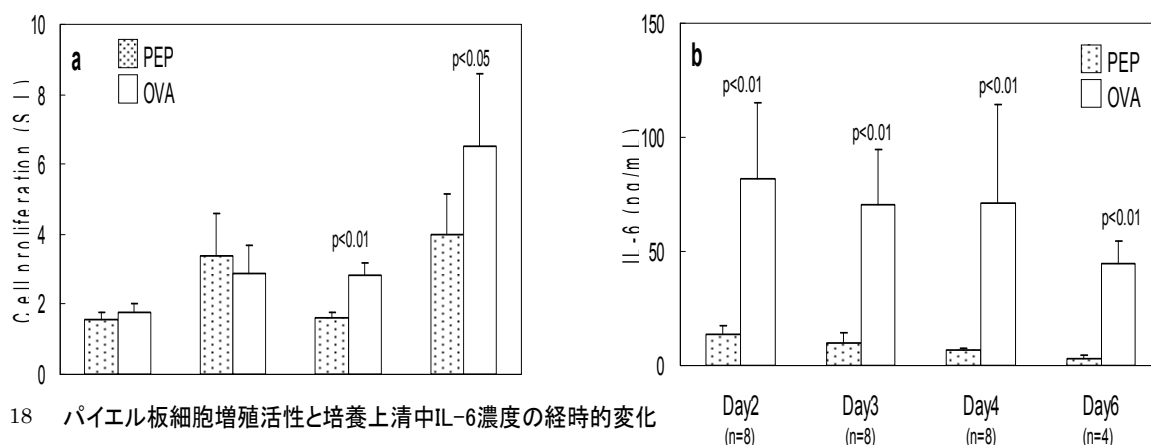


図 18 パイエル板細胞増殖活性と培養上清中IL-6濃度の経時的変化

a: 細胞増殖活性

b: 培養上清中IL-6濃度

表 4 パイエル板細胞培養上清中サイトカイン濃度

Cytokine (pg/mL)	Medium	PEP	OVA
IL-2	11.0 ± 4.2	15.8 ± 7.9	29.4 ± 18.5 ^b
IFN- γ	3.8 ± 0.6	1.6 ± 1.4 ^a	< 0.93 ± 1.0 ^a
IL-4	6.8 ± 0.3	6.0 ± 0.3 ^a	6.4 ± 1.8
IL-5	5.4 ± 1.3	5.5 ± 0.9	5.2 ± 0.9
IL-10	< 0.25 ± 0.2	< 0.6 ± 0.5	< 2.5 ± 1.5 ^b
IL-17	2.1 ± 0.1	2.7 ± 1.4	43.9 ± 43.2 ^{b,c}

a: p < 0.01, vs Medium b: p < 0.05, vs Medium c: p < 0.05, vs PEP

SGF 16 時間処理後の OVA 試料には SGF 中のペプシン由来のバンドの他に、僅かに未消化の OVA 由来のバンドが検出された。SGF 処理の有無によって細胞増殖活性に変化はなく、IL-6 および IL-17 濃度は低下傾向にあるもののバラツキも大きく、有意な差は検出されなかった。一方、SGF 16 時間処理した HP では沈殿が析出したことから、溶解性に変化の見られない SGF 6 時間処理した HP をパイエル板細胞培養系へ添加した。HP は SGF 6 時間処理で未消化物のバンドは検出されなくなった。対照に比べて SGF 処理後の HP の細胞増殖活性は逆に上昇したが、IL-6 および IL-17 濃度は有意に低下した。

食物アレルギー性の OVA は長時間の SGF 消化後もパイエル板細胞の反応性を残していたが、HP は短時間の SGF 消化によって特異的マーカーである IL-6 や IL-17 では反応性の低下が検出されたことから、パイエル板細胞培養系はインビトロでの消化過程を含めた評価系となり得ると考えられた。

2) 分担研究課題「アレルギーチップの開発」について

① 研究目的

多くの遺伝子組み換え食品中に含まれる除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT と害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F に対する抗体が体内で産生されているかを、a) 微量な血清 (1 マイクロリットル)、b) 高感度測定、c) ハイスループット、に測定する方法を開発する。

② 研究方法

遺伝子組換え蛋白質としては、遺伝子組み換え食品中に最も頻繁に使用している除草剤耐性用酵素と害虫抵抗性蛋白質を、大腸菌にリコンビナント蛋白質として作成した精製

標品を用いた。アレルギーチップは、カルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)蛋白チップを用いた。(DLC)蛋白チップは、これまでに知られている蛋白チップの中では、最も高密度に抗原蛋白質をチップに濃縮固定できることから、a)微量な血清(1マイクロリッター)、b)高感度測定、c)ハイスループット、の3つの特色を持つ(図19)。なお、このシステムを評価するため、陽性コントロールとしてソバ抗原を用いてシステム開発の実用化研究を行った。

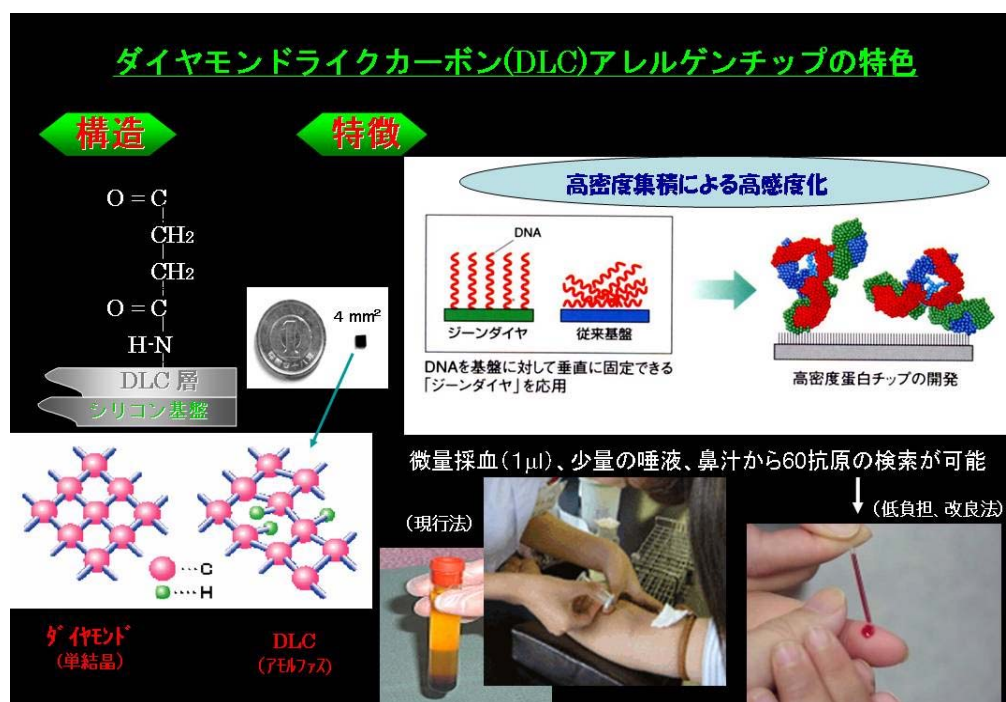


図19 DLC蛋白チップによるアレルギー搭載の原理

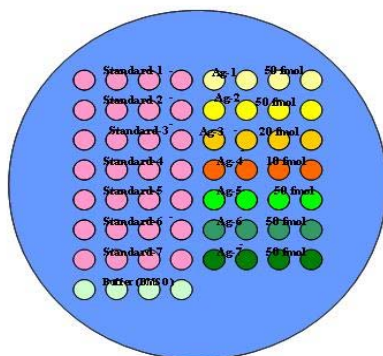
③成果

平成19年度、遺伝子組み換え食品中の除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT と害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F のカルボキシル化 DLC チップへ定量的な搭載技術は確立できた。しかし、中でも除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS の場合は、2次抗体が非特異的に結合して測定感度を下げている事が明らかとなり、今後解決すべき問題点が明らかとなった。またリコンビナントソバアレルゲン OrBWp16WT 抗原とその比較対照として用いた市販のソバアレルゲンは、共にカルボキシル化 DLC チップへの定量的搭載が可能であることが明らかになった。図20にチップへの搭載例を示すが、ソバ抗原と害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F では、非特異的吸着性も低く、最適搭載条件がほぼ決定されたが、除草剤耐性用酵素の CP4-EPSPS, PAT については、非特異的吸着性が高くさらなる検討を要することが判明した。

Table アレルゲン

分類	Name	kDa	包装	溶媒	保存	
遺伝子組換え食品に 用いられている 新規産生タンパク質	除草剤耐性用酵素	CP4-EPSPS	47	200 μg/200 μL× 5	20 mM Tris-HCl(pH 8.0)	冷凍
		PAT	25	2.5 mg/500 μL	50 mM Tris-HCl(pH 9.5)	
	害虫抵抗性タンパク質	Cry3Bb1	70	80 μg/200 μL× 2	PBS	冷蔵
		Cry1Ac	130	10~80 μg/500 μL		
		Cry1Ab		Tris, 0.1% BSA pH 7.4	冷凍	
		Cry1F				
		そばアレルゲン	rBWP16WT	16	1 mg/ 500 μL	PBS

Spotting layout



Standard	(IU/mL)
Std-1	39.1
Std-2	78.1
Std-3	156.3
Std-4	312.5
Std-5	625.0
Std-6	1250.0
Std-7	2500.0

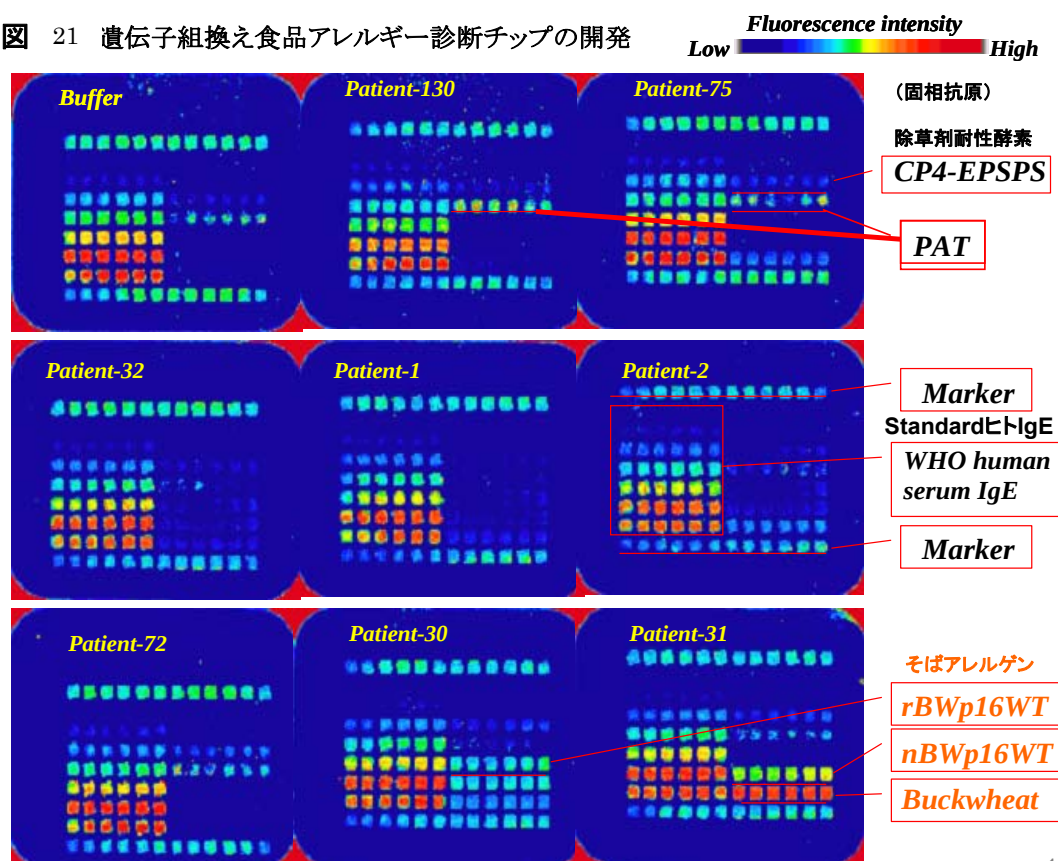
Allergen

Ag-1:CP4-EPSPS Dialysis, 30% DMSO in PBS
 Ag-2:PAT Dialysis, 30% DMSO in PBS
 Ag-3:Cry3Bb1Dialysis, 30% DMSO in PBS
 Ag-4:Cry1Ac Dialysis, 30% DMSO in PBS
 Ag-5:rBWp16WT Dialysis, 30% DMSO in PBS
 Ag-6:rBWp16WT Original, 30% DMSO in PBS
 Ag-7:Sionogi BW Original, 30% DMSO in PBS

図 20 DLC チップへ搭載した各種リコンビナント抗原のレイアウト

平成 20 年度において、(a) 遺伝子組み換え食品中に含まれる除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT と、害虫抵抗性蛋白質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F、強い食物アレルギー反応を引き起こすソバアレルゲン OrBWp16WT 抗原のチップ搭載条件がほぼ固まり、IgE, IgG、IgA の高感度測定が可能となった。(b) 穀物に対してアレルギー症状のある患者血液 42 検体中に、除草剤耐性用酵素 PAT に対して低濃度であるが、IgE 抗体を持つ患者を 1 名見出した。なお、後述するが、検出された除草剤耐性用酵素 PAT に対する特異的 IgE 抗体は、好塩基球培養細胞を用いる活性化 (EXILE 法) 試験では陽性を示さなかった。CP4-EPSPS の対する有意な IgE 抗体価を示した例は、調べた患者血液 42 検体中には見られなかった。

図 21 遺伝子組換え食品アレルギー診断チップの開発



1

図 22 遺伝子組み換え除草剤耐性蛋白質、そばアレルギーに対するIgE抗体保有者の検索

Sample		Measured concentration of IgE (EBU/mL)					CAP/RAST score					
		CP4-EPSPS	PAT	rBWp16WT	nBWp16WT	Buckwheat	Buckwheat	Egg white	Milk	Soybean	Rice	Wheat
Patient	178	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	11.64		4	5	4		
	111	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.32		3	3	3		
	117	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	16.33		5	5	3	4	4
	130	5.00 >	78.54	5.00 >	5.00 >	5.24		5	3	3	2	3
	75	5.00 >	13.44	5.00 >	5.00 >	16.57		4	2	2		
	78	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >		0	1	2	2	2
	81	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	9.25		4	2	2		2
	103	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >		1	2	2	2	2
	104	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >		2	2	2	0	2
	107	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	21.11		2	2	2		
	114	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >		2	2	2		
	134	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.01		3	1	2		2
	138	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >		1	2	2	2	2
	141	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.22		0	1	2		
	179	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	98.91		3	3	2		
	64	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >		3	0	1		
	72	6.82	5.75	5.00 >	5.00 >	5.00 >		3	0	1	0	0
	76	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	11.25		3	0	1		
	88	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	6.39		2	1	1	1	1
	16	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	2					
	17	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	10.06	2					
	18	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	2					
	19	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	9.06	3					
	20	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	10.72	3					
	21	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	13.83	3					
	22	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	3					
	23	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	3					
	24	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	7.06	3					
	25	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	17.25	3					
	26	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	28.85	3					
	27	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	28.66	3					
	28	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	16.24	4					
	29	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	15.49	5					
30	5.00 >	5.00 >	36.30	37.35	24.01	4						
31	7.18	5.00 >	5.00 >	80.61	224.05	5						
32	5.00 >	5.00 >	8.86	10.04	10.25	3						
1	5.00 >	5.00 >	5.15	8.37	11.42	3						
2	5.00 >	5.00 >	5.00 >	8.31	24.05	3						
3	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.20	3						
13	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	3						
15	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	3						
Normal	1	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >						
	2	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >						
	3	5.00 >	5.00 >	5.00 >	5.00 >	11.41						

Measured concentration of IgE (EBU/mL)=Measured concentration(Binding unit/spot)/apply volume(μL) × Dilution ratio
Bold :Measured concentration of IgE (EBU/mL) > 20.00

なお、開発したアレルゲン診断チップの性能を、客観的に評価する例として、チップに搭載したソバアレルゲンに対する IgE 抗体価では、通常のアレルギー検査で用いられている CAP-RAST の感度を数倍上回り、しかも検出に必要な血清は 1/40 の微量 (I μ L) を実現することができた。

平成 21 年度は、最終的に決定した抗原搭載条件で、主要食物抗原 (卵、牛乳、小麦、大豆、そば) に対してアレルギー陽性患者血清の測定を行った (n=28+2 健康人 volunteer)。害虫抵抗性タンパクの Cry1Ac、除草剤耐性酵素の CP4-EPSPS、PAT は Sample dilution buffer でも高いレベルの非特異的反応が確認された為、Blank 補正により Dilution buffer での response を差し引いて評価した。遺伝子組換えタンパク抗原に対して陽性患者血清の存在が確認されていない為、便宜上 Cut off 値を定量下限 (LLOQ) $\times 2$ と設定した。結果として、特異的 IgE 抗体レベルが Cut off 値より高値を示した患者血清は、害虫抵抗性タンパクで 3 例/30 例、除草剤耐性酵素については 0 例/30 例であった。Cut off 値の設定が妥当な値であるかは今後の判断として、Cut off 値を比較的大きく超えた Cry1Ac IgE 陽性 2 例について EXILE 法による確定診断を行うことにした。

3)-1 分担研究課題「好塩基球細胞の活性化を指標とする評価手法の開発-1: EXILE 法」

①研究目的

食物アレルギーは、日々栄養として摂取しなくてはならない食物中に患者にとってのアレルゲンが存在することが大きなジレンマとなっている。患者の多くは乳幼児であり、その大部分は加齢と共に寛解することから、アレルゲン除去療法が治療の基本となる。その際に重要なことは、患者にとっての正しいアレルゲンを調べるアレルギー試験法の信頼性である (Table 5)。

アレルギー試験の感度は、過少でも過大でも問題がある。感度が低すぎると本来のアレルゲンの見落としにつながることは言うまでもないが、逆に感度が高すぎると、本来食べられるはずの食物をアレルゲンであると誤って判定してしまうことになる (偽陽性)。すると、本来不要のはずの食物除去を実施することにより、患者やその家族の生活の質に著しい悪影響が及ぶのみならず、特に患者が乳幼児である場合、摂取できる食物の偏りにより、身体の健全な発育にも影響が及びかねない。

Table 5. 各種食物アレルギー試験法の特徴

分類	試験法	原理	長所と短所
in vivo	食物負荷試験 (OFC)	患者に実際に候補食物を食べさせる。	長) 確定診断法、短) 患者に負担大、実施可能施設が限定。
	スキンプリックテスト (SPT)	皮膚に少量のアレルゲンを注入する。	長) 高感度、簡便、短) 患者に負担、偽陽性が多い。
ex vivo	好塩基球活性化試験 (BAT)	患者の末梢血から好塩基球を採取して体外で刺激する。	長) 高信頼性、安全、短) 全血は長期保存不可。
in vitro	CAP-RAST 法	担体に固定したアレルゲンに結合した血清中 IgE を二次抗体で検出する	長) 簡便、安価、高感度、事実上の標準法、短) 偽陽性が非常に多い。

食物アレルギーの確定診断法は、患者に直接疑われるアレルゲンを含む食物を食べさせる経口負荷試験 (OFC) である。しかし、この方法は信頼度は最高であるが、患者をアナフィラキシーの危険に晒すことになり、0 歳以下の乳児や体調の優れない患者などには実施できず、また、十分に経験を積んだ専門医が入院可能な設備のある施設で行なう必要があることから、十分に普及しているとはいいがたい。

現在臨床的に広く用いられているアレルギー試験法は、CAP-RAST 法に代表される免疫化学的手法で、樹脂に固定したアレルゲンに患者血清を作用させ、アレルゲンに結合した IgE

を二次抗体を用いて定量する方法である。この手法は、簡便かつ高感度のアレルゲン特異的 IgE を検出できるために事実上の標準法となっているが、比較的偽陽性が多いことが問題として知られている。

その理由の一つとして、アレルギー反応を引き起こすマスト細胞の活性化は、高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に結合した IgE が多価の抗原により架橋されることにより惹起されるが、アレルゲン 1 分子あたりの IgE エピトープが単価である場合、この分子は IgE の架橋を誘導することができないが、免疫化学的手法では多価の場合と区別することができないということが考えられており、具体的にそのような例として、糖鎖エピトープ (CCD) 等があることが知られている。また、アレルゲンと IgE 抗体の親和性が低い場合もマスト細胞を活性化できないことが知られている。

一方、患者の末梢血を採取して、自身の IgE で能動的に感作された好塩基球をアレルゲンで刺激した際のヒスタミン放出量を測定する体外 (ex vivo) 試験が開発され、臨床的にも広く用いられているが、同試験は全血を使用するため保存が利かず、現在追跡中の患者についてしか実施できないという問題がある。

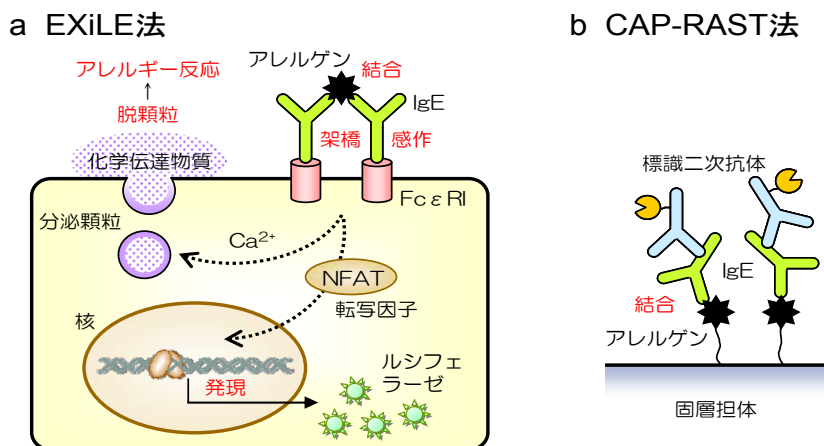
遺伝子組換え (GM) 作物の潜在的アレルゲン性を調べるため、アレルギー患者血清を用いた ELISA やウェスタンブロット等が行なわれることがあるが、この場合も上記と同様の問題を含んでいる。すなわち、これらの手法によりたとえ患者血清中 IgE と結合する新規タンパク質が同定されたとしても、両者の結合がマスト細胞の活性化に結びつくとは限らない。IgE 抗体との結合が疑われた場合、スキンプリック試験等を行えば、その食物がアレルゲンであるかどうかの判断を下すことができるが、患者に負担をしいる in vivo 試験は、その患者にとって倫理的な問題があり、実施が困難である場合が多い。

前述の ex vivo での好塩基球活性化試験を用いることができれば、血清試験で観察された IgE と結合する新規タンパク質が IgE 受容体を架橋し好塩基球やマスト細胞を活性化する能力があるかどうかを調べることも可能と思われるが、全血を必要とする同試験は現在追跡中の患者でなければ実施できないため、保存の利く患者血清を用いることができ、かつマスト細胞の活性化を指標とする簡便な in vitro アレルギー試験法の開発が望まれていた。

In vitro 細胞試験法として培養ヒトマスト細胞株を患者血清により受動感作し、これをアレルゲンで刺激した際の活性化を測定できれば、より信頼性の高いアレルギー試験法の開発につながることを期待される。しかし、ヒト血清中 IgE で感作および刺激を行なうことのできるヒトの培養マスト細胞株は、受容体の発現量が少なかったり、細胞の増殖速度が低かったりなど、あまり優れたものが知られていない。

そこで本研究では、ラットの培養マスト細胞株である RBL-2H3 にヒト IgE 受容体遺伝子を安定的に導入した RBL-SX38 細胞を元に、転写因子 NFAT の活性化によってレポーター遺伝子であるルシフェラーゼを発現するように改変した新しい細胞株を作製し、簡便かつ高感度で培養マスト細胞の活性化を検出することのできる手法を開発し、その信頼性を詳細に解析した上で、新規タンパク質等の潜在的アレルゲン性試験の解析を行い、食の安全に貢献することを目的とした (図 23)。

図 23. EXiLE 法の模式図



(a) 本研究で開発した RS-ATL8 細胞とその活性化模式図。ラット培養マスト細胞株 RBL-2H3 細胞にヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を安定発現させた RBL-SX38 細胞に、さらに転写因子 NFAT の活性化によりルシフェラーゼの発現が誘導されるレポーター遺伝子を導入した。マスト細胞の活性化は、IgE による感作、IgE とアレルギーとの結合、そして $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の架橋の 3 ステップが揃うことにより惹起される。このとき誘導されるルシフェラーゼ発現を、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression の頭文字より「EXiLE」と呼び、本試験法を「EXiLE 法」と命名した。(b) CAP-RAST 法に代表される、免疫化学的なアレルギー試験法の原理図。固層に結合した担体に血清中 IgE を結合させ、これを標識二次抗体により検出する。ここでは、IgE とアレルギーとの結合のみを検出している。

②研究方法

ヒト $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の α 、 β 、 γ 鎖を安定に発現する RBL-SX38 細胞に、転写因子 NFAT の活性化によりレポーター遺伝子ルシフェラーゼの発現が誘導される遺伝子を Lipofectamine2000 (Invitrogen) により導入し、抗生物質ハイグロマイシンへの耐性獲得を指標に本レポーター遺伝子が安定導入された細胞を選択し、限界希釈法によりクローンを複数種樹立した。このうち、PMA (フォールボルエステル) とイオノフォアへの刺激に対して最も強い応答を示した細胞株を RS-ATL8 細胞と命名した。

RS-ATL8 細胞は、1.2 mg/ml geneticin と 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromycin (Invitrogen) を添加した 10% FCS を含む MEM 培地 (Invitrogen) により培養した。これを 5×10^4 cells/50 μl /well の細胞密度でクリアボトム白色 96 ウェルプレートに播種した。3 時間後、10% FCS を含む MEM 培地で最終濃度 100 倍に希釈した患者血清を添加し、37°C、5% CO_2 インキュベータ中で一晩感作した。滅菌 PBS で 1 回洗浄後、10% FCS を含む MEM 培地に溶解した各種抗原または陽性対照としての抗ヒト IgE 抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl を加えて刺激を行ない、3 時間 CO_2 インキュベータ中に静置した。ルシフェラーゼの発現量は、上記培養液中にホモジニアス系基質液 ONE-Glo (Promega) を 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、室温で 5 分間静置した後の発光量をルミノメーター EnVision (PerkinElmer) により測定した。発光量は刺激前のバックグラウンド発光に対する相対比として表し、2 倍を以て活性化のカットオフ値とした。

脱顆粒反応の測定については、患者血清による感作までの工程は上記と同様に行なった。PIPES バッファー (10 mM PIPES, 139 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0.6 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml glucose, pH 7.4) により細胞を 1 回洗浄し、PIPES バッファーに溶解した抗原または抗ヒト IgE 抗体 50 μl により 37°C で 30 分間刺激した。上清を回収後、50 μl の 0.2% Triton X-100 により細胞を破碎し、これを回収した。それぞれ 10 μl を用い、上清中および細胞内に残った β -hexosaminidase の活性を、0.1 M Citric acid (pH 4.5) に溶解した 100 μM 4-Methylumbelliferyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside を基質として 37°C で 30 分反応させ 0.25 mM glycine (pH 10) で反応停止後の 355 nm 励

起時の 460 nm の蛍光として測定した (Thermo Scientific)。脱顆粒量は細胞内外に存在した酵素のうち細胞外に放出された酵素のパーセンテージとして表すが、特にルシフェラーゼ発現との比較の際には、同様に刺激前のバックグラウンド脱顆粒量を 1 とした場合の相対比として表し、2 倍をカットオフ値とした。

③研究の成果

③- 1) 本試験法の検出限界

IgE の多価アレルゲンあるいは抗ヒト IgE 抗体との結合によって実現される $Fc\epsilon RI$ の架橋を引き金として惹起されるルシフェラーゼ発現を、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression の頭文字から「EXiLE」と呼び、本試験法を「EXiLE 法」と命名することとした。平成 21 年度研究の成果②において述べた通り、カットオフ値をバックグラウンドレベルの 2 倍と設定した場合、EXiLE 法の検出限界は 15 pg/ml (0.006 IU/ml) とまとまった。この数値は本試験法が極めて高感度に、 $Fc\epsilon RI$ に結合することでマスト細胞を感作した状態の IgE を検出していることを示している。

また、培地で 100 倍希釈した卵白アレルギー患者血清 (卵白特異的 IgE, >100 UA/ml、総 IgE, 12700 IU/ml) により RS-ATL8 細胞を感作して卵白抽出抗原 (EWP) により刺激したところ、少なくとも 1 fg/ml の EWP によりカットオフ値以上の応答が観察された (平成 21 年度研究の成果③)。このことは、EXiLE 法が極めて微量のタンパク質性抗原を認識できることを示している。

③- 2) EXiLE 法と食物負荷試験との相関

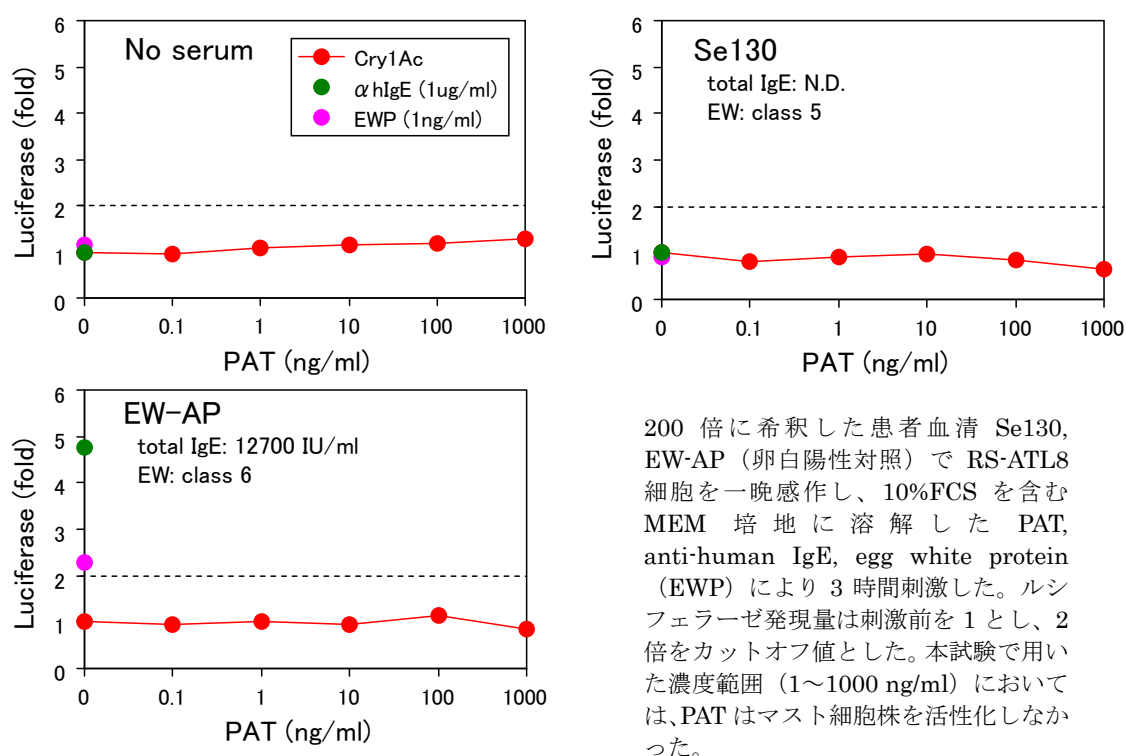
食物アレルギーの確定診断法である食物負荷試験 (OFC) を実施した卵白へのアレルギーが疑われる患者 24 名について、EXiLE 法、脱顆粒測定法、および CAP-RAST 法による判定を行い、それぞれの OFC との相関を調べた (平成 21 年度研究の成果 ④)。

その結果、EXiLE 法および脱顆粒測定法は、OFC に対してそれぞれ $P = 0.0027$ および $P = 0.1711$ (Fisher の正確確率検定) という相関を示し、EXiLE 法の高い信頼性が裏付けられた。CAP-RAST 法においては、OFC 陰性検体のすべてにおいて陽性 (クラス 2 以上) の判定を示したため、 P 値を求めることができなかった。しかし、判定を厳しく取り、クラス 3 以上を陽性と判定すれば、 $P = 0.0065$ となることから、CAP-RAST 法の感度が高すぎるためにアレルギー症状とは直接関係のしない微量の IgE まで検出してしまっている可能性も考えられる。

③- 3) GM タンパク質 PAT 反応性 IgE のマスト細胞活性化能の解析

平成 20 年度末に、本研究班の徳島大学の木戸博教授より、ダイヤモンドライクカーボン (DLC) タンパク質チップを用いたスクリーニングの結果、遺伝子組み換え (GM) 作物に使用されている除草剤グルホシネート耐性遺伝子 phosphinotricin acetyl transferase (PAT) に結合する IgE を含むアレルギー患者血清が 1 検体報告された (Se130)。前述の通り、IgE とアレルゲンは、結合するだけでは必ずしもアレルギー反応を惹起できるとは限らないため、EXiLE 法により両者の結合がマスト細胞の活性化に結びつくかどうかについて解析を行った。

図 24. EXiLE 試験による PAT 結合性 IgE を含む患者血清のマスト細胞活性化能の解析



実験手法は、前述の平成 21 年度研究成果⑤に詳しく記述した。図 24 に結果を示す通り、PAT 結合性陽性とされた Se130 の血清は、本試験で用いた濃度範囲 (0.1~1000 ng/ml) では PAT と共にマスト細胞を活性化することはなかった。一方で、本患者は卵白に対しても CAP-RAST でクラス 5 の特異的 IgE を有するとされるにもかかわらず、1 ng/ml の卵白抽出抗原 (EWP) に対しては応答しなかった。さらに、陽性対照であるはずの抗ヒト IgE 抗体刺激に対しても応答しなかった。これらのいずれの刺激も、陽性対照として用いた卵白アレルギー患者血清 (EW-AP) の場合は正しくカットオフ値を超える応答を示していることから、本患者血清 Se130 中の IgE は、DLC チップ上における抗ヒト IgE 二次抗体への反応性は残しているものの、マスト細胞の Fc ϵ RI に結合して感作する能力をすでに失っていることが示唆された。

IgE は熱により失活しやすく、特に抗原結合部位である Fab 部よりも受容体結合部位である Fc 部の方がより熱に弱いことが知られている。本血清試料がどのような過程により Fc ϵ RI の感作能を失ったかは定かではないが、抗原である PAT が非常に疎水性の高いタンパク質であることを考え合わせると、DLC チップで観察された IgE と PAT との非特異的結合は、何らかの形で変性した IgE が PAT と疎水的に結合したものであった可能性が考えられた。

前述した通り、平成 21 年度研究においては、同様の試験系により害虫毒素タンパク質 Cry1Ac と患者血清とによる EXiLE 試験を行なったが、こちらも結果は陰性であった。しかし、PAT の場合とは異なり、この場合の患者血清中 IgE は変性しておらず、同一血清を用いた他のアレルゲン (卵白および牛乳) や抗ヒト IgE 抗体への応答は正常に観察された。いずれの場合も、EXiLE 試験はマスト細胞の活性化を指標としているため、IgE による感作、アレルゲンとの結合、そして Fc ϵ RI の架橋の 3 ステップ全てを検出していることになり、これが従来の IgE とアレルゲンとの結合のみを指標とする in vitro アレルギー試験と大きく異なる特徴であるといえよう。なお、この特長を活かせば、スギ花粉とトマトの両

者に結合する IgE を持つ患者のうち、交差反応性を示す患者とそうでない患者を見分けることもできることが示唆されている（平成 21 年度研究の成果⑥）。

④今後のリスク評価への貢献、リスク評価との関係

GM 作物に代表される新開発食品は今後様々な種類の新製品が開発されてくるであろうが、その潜在的アレルギー性に関するリスク評価の目的で *in silico* 以外の評価試験としては、*in vitro* で患者血清中 IgE 抗体を用いて、既存のアレルゲンとの交差性を主とした試験が必要になることがある。その場合には、ELISA による IgE 結合試験、また ELISA 阻害試験が用いられることになるが、スキンプリックテスト等の *in vivo* 試験を行うことは難しく、より、*in vivo* に近い情報の得られる *in vitro* での細胞活性化試験系の開発が望まれていた。

今回開発した、EXiLE 法は長期保存可能な血清を使用しながらも、従来の *in vitro* 試験法とは異なり、培養マスト細胞の活性化を測定できるというメリットがある。その信頼性は非常に高く、食物アレルギーの確定診断法である OFC の結果とも高い相関を示すことが示されている。以上より、GM タンパク質等の潜在的アレルギー性を *in vitro* で評価する際に、DLC チップ等のハイスループットスクリーニング技術により IgE 結合性をファーストスクリーニングを行ない、その中で IgE 結合性が認められた検体について、EXiLE 法を用いたマスト細胞の活性化能を解析するセカンドスクリーニングにより精査する、2 段階の体制が有用と思われる。

3)-2 分担研究課題「好塩基球細胞の活性化を指標とする評価手法の開発-2: 受動感作ヒト好塩基球法」

①研究目的

食物アレルギー発症に果たすアレルゲン特異的 IgE の役割は大きいですが、アレルゲンと IgE との結合自体が発症を惹起するのではなく、マスト細胞や好塩基球の高親和性 IgE レセプターに結合する IgE がアレルゲンにより架橋されて生じるこれらの細胞の活性化や脱顆粒の結果、アレルギー反応が起きるものである。したがって、食品のアレルゲン性は厳密には IgE 結合能ではなく、IgE を介したマスト細胞や好塩基球の活性化を指標に判定されねばならないことになる。こうした臨床的に意義のある IgE を検出する目的で、IgE を介する好塩基球の活性化を、活性化マーカー CD203c の発現を指標に検出する方法が導入された。しかし、この検査法は採血直後の患者好塩基球が必要なため、組み換え食品のアレルゲン性を検討する目的には、非現実的である。そのため、常時利用可能なボランティアの好塩基球に患者血清を感作させる受動感作好塩基球活性化試験の開発が望まれる。こちらの方法であれば、目的とするアレルゲンに対する特異的 IgE 抗体高値の患者血清を冷凍保存しておけば、いつでも検討できるようになる。

本研究では、臨床的に意義のある IgE を検出する方法としての受動感作後の好塩基球活性化検出系を開発するとともに、その新たな利用法として吸収試験を用いた交叉反応性の検討を試みた。

②研究方法

好塩基球活性化試験は、採血後 24 時間以内の対象者全血に、10 倍希釈列を作成した卵白アレルゲン、抗 IgE 抗体（陽性コントロール）、PBS（陰性コントロール）を添加後 15 分 37℃インキュベートした。洗浄後、FITC 標識した CRTH2 抗体、PE 標識した CD203c 抗体、PC7 標識した CD3 抗体、APC 標識した CD63 で染色し FACSCalibur にて解析した。受動好塩基球活性化試験は、ボランティア全血を洗浄後、PH4.0 の乳酸バッファーにて自己 IgE を剥離し、患者血清にて再感作したのち、上記の如く好塩基球活性化試験を行った。交叉反応性の検討のための吸収試験では、アレルゲンを吸着させたセファロースビーズと血清を 3 時間混和したのち、受動感作好塩基球活性化試験を行った。

③成果

平成 19 年度は全血を用いた好塩基球活性化試験の標準化を行い、好塩基球活性化試験の閾値と CAP-RAST のクラスとに相関が見られ ($r=0.510$)、閾値による判定が妥当との結果を得た。受動感作好塩基球活性化試験の検討では、ドナー好塩基球からの IgE 剥離に課題を残した。

平成 20 年度は、受動感作好塩基球活性化試験を確立し、全血法好塩基球活性化試験と比較して、最高陽性%で $r=0.678$ と相関が認められるものの、近似曲線は $y = 0.3613x + 8.6237$ と、全血法より最高陽性%が低値を示し、希釈域値でも $r=0.807$ 近似曲線 $y = 0.6696x + 0.2641$ で、全血法より域値が低くなる傾向を示した (図 25)。また、全血法に比べ受動法で活性化の検出感度が低い点を改良する目的で、新たな好塩基球活性化マーカー CD63 の検討を行った。CD63 抗原の活性化による蛍光輝度増強は、CD203c より大きく、好塩基球活性化の検出法として期待されたが、両者の最高陽性%は $r=0.9444164$ と強い相関を示し、併用の優越性は示し得なかった。

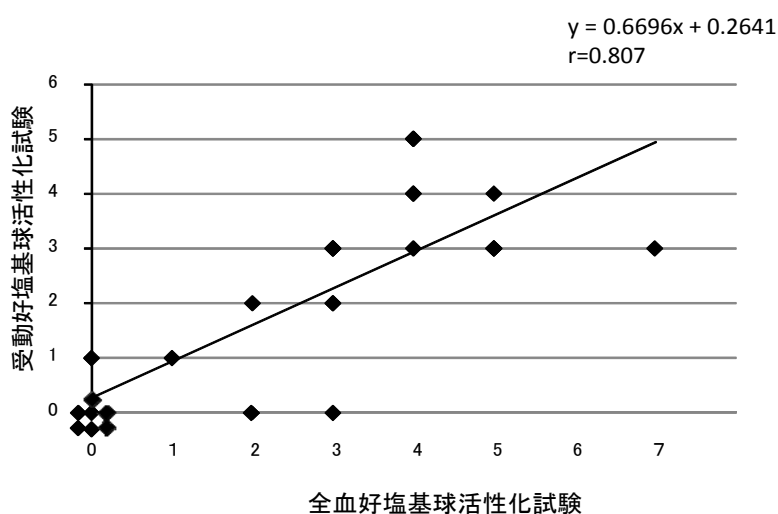


図 25 全血と受動好塩基球活性化試験の相関 (希釈閾値)

平成 21 年度は、交叉反応性の検討のための吸収試験を確立し、トマトの口腔アレルギー症候群の原因として、スギ花粉との交叉反応性が疑われる 3 症例を対象に、アレルギーによる吸収後の受動好塩基球活性化試験を行った。うち 2 例 (case1,3) ではトマトによる好塩基球の活性化がスギアレルゲンにより完全に吸収されることから、スギ花粉とトマトとに交叉反応性を示す IgE 抗体はスギ花粉症とトマト OAS の病因になっている、臨床的に意義のある抗体であることを証明した (平成 21 年度の成果の項目に記載済み)。残る 1 例 (Case2) では、トマトアレルゲンによる好塩基球の活性化が見られず、トマト特異的 IgE は CDC など 1 価のアレルゲンに対して交叉反応性を示しているものと考えられた。

結論として、臨床的に意義のある IgE を検出する方法としての受動感作後の好塩基球活性化検出系を開発し、その新たな利用法として吸収試験の有用性を示すことができた。

4) 分担研究課題「腸管上皮細胞を用いる評価系の開発」

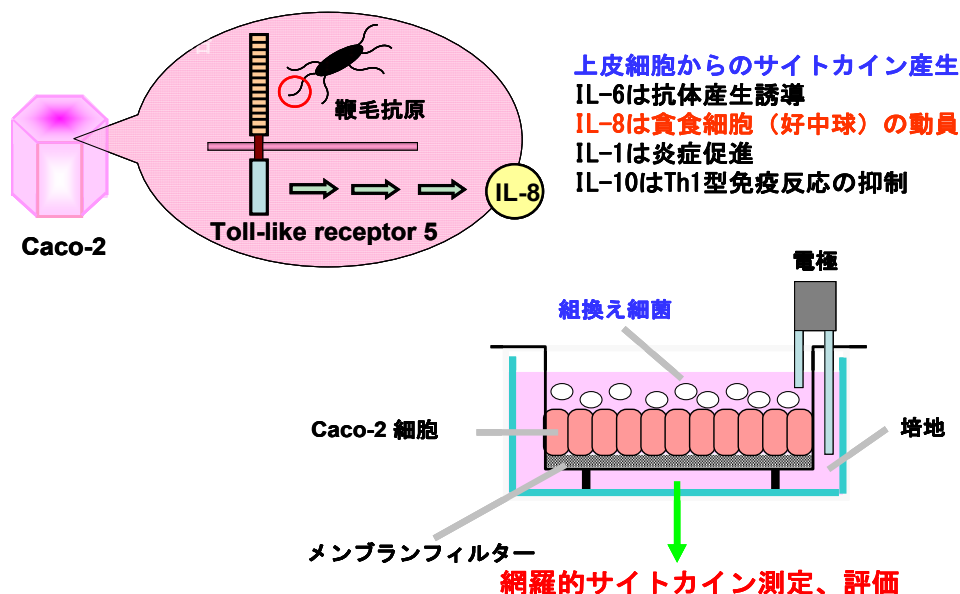
①研究目的

アジュバント活性の評価法として、ヒト腸管上皮細胞への影響を評価する系について検討した。具体的には、免疫系への刺激の初期段階である腸管からの抗原取り込みに関する評価法として、*in vitro* のヒト腸管上皮細胞への影響を評価する系を検討し、実用的な評価法を提案する。その評価法を用いてモデル組換え微生物に関する実証的なデータを明らかにすることを目的とした。

②研究方法

ヒト腸管の単層培養による *in vitro* 評価系である Caco-2 細胞を用いた評価法を検討した。ヒト腸管上皮細胞の単層培養による評価系については、論文的には図 26 に示すような実験系を用いて、例えばサルモネラ鞭毛の TLR5 を介する IL-8 誘導性を評価する論文が報告されている。この実験系についてまず試験系を検討し確立した。一方、単層の評価系は、単純で実行性は高いが、腸管の抗原提示に係わる試験系としては充分とはいえないという考え方から、共培養による M 細胞モデル実験系が検討され、既に論文として報告されている。

図 26 ヒト腸管上皮由来Caco-2細胞を用いた免疫刺激評価系の構築



その概略は、平成 20 年度の方法の項目に示した。この系では、2 種類の細胞を共培養することにより、単層の Caco-2 細胞と比べ、M 細胞マーカータンパク質の発現がみられ、さらに抗原取り込み活性が上昇すると報告されており、より生体に近い M 細胞実験系が期待される。実際にはまだ研究レベルであり、試験を行うには細かな条件設定が重要であると思われ、この実験系がどの程度実用性があるか評価することにした。

③成果

(i) Caco-2 単層培養による評価系

この系では、抵抗値を測定することにより Caco-2 細胞の状況を判断できた。初期の播種細胞数を低めにするにより、Caco-2 細胞の分化はおよそ 2 週間弱で実用レベルに達し、その後タイトジャンクションは良好に保たれた。初期の播種細胞数が高いと抵抗値の低下が早めに起こり、試験系は安定しない傾向があった。

(ii) 共培養による評価系

Caco-2 細胞を分化させた後、Raji 細胞を加えると抵抗値は急速に低下し、試験系は良好な状態を維持できる期間は短い。そこで、Caco-2 細胞のサブクローンである C2BBel1 細胞を用いて検討を行ったところ、Raji 細胞添加後も比較的長期にわたり安定的に維持できることがわかった。共培養の実験は以後、このサブクローンを使うことにした。

(iii) *in vitro* M 細胞モデルの実験系

検討結果から、C2BBel1 細胞をメンブレンフィルター上に播種し、2 週間程度かけて分化させタイトジャンクションを安定化する。2 週間後に Raji 細胞をメンブレンフィルター株に加え培養することにより、約 1 週間程度で共培養系が安定することが判明した。

(iv) HeLa 細胞による組換え大腸菌及び乳酸菌の取り込みの評価

病原菌エルシニアの M 細胞への侵入因子の一つである膜タンパク質インベysinを発現する大腸菌及び乳酸菌組換え体を新たに作出し、この組換え大腸菌及び組換え乳酸菌を、図 8 に示す方法で、Hera 細胞の単層モデル評価系で評価した。大腸菌及び乳酸菌へのインベysin発現によりいずれも細胞への取り込みがそれぞれ約 10000 倍、10 倍程度増加した。

(v) Caco-2/Raji の共培養による実験系での評価法

細胞系が安定したところで、評価する組換え体などを加え、取り込みについて調べた。単層培養及び共培養した細胞に、組換え乳酸菌を 10^8 CFU/well 加え 37°C 180 分後に、メンブランを透過した菌数により取り込み活性を評価した。

(vi) 単層、共培養 M 細胞モデルによる組換え乳酸菌の評価

単層、共培養 M 細胞モデルを用いた組換え乳酸菌の取り込み評価方法とその結果を図 10 に示した。単層では、10 回の繰り返し実験で 1~2 回のみ取り込みが示されるのに対し、共培養実験系では、組換え乳酸菌は M 細胞モデルで安定的に透過することが確認された。この実験系は、ヒト腸管 M 細胞からの抗原取り込みの評価として有用と思われる。

5) 分担研究課題「ヒト樹状細胞を用いる評価系の開発」

①研究目的

新規産生タンパク質等のアレルゲン性を予測するに際し、アジュバント活性も含めた影響に関してヒト樹状細胞を用いて、簡便で、信頼性の高い *in vitro* 評価系を構築することを目的とする。

②研究方法

平成 19 年度は、アジュバント物質としてコレラトキシン(CT)、食品抗原タンパク質としてオボアルブミン(OVA)を用いた。IL-6 や IL-8 等の 15 項目の培養上清中サイトカイン測定と HLA と CD86/80 の細胞表面抗原マーカーを解析した。

平成 20 年度は、培養ヒト樹状細胞と培養ヒト単核白血球細胞と共培養し、食品アレルゲンタンパク質とアジュバントを共存させ、アレルゲンタンパク質の抗原提示能の増強を指標にアジュバント活性を評価するシステムの開発を行った。

平成 21 年度は、培養ヒト樹状細胞にアジュバント物質を添加により感作後、異質ドナーのヒト CD4⁺T 細胞と共培養し、抗原提示能を評価するための *in vitro* の食品タンパク質のアジュバント活性評価法を検討した。

③成果

平成 19 年度は、ヒト樹状細胞を用いた *in vitro* の食品タンパク質のアジュバント活性評価法を構築した。CT と OVA 共存下で IL-1 β 、IL-13、G-CSF、IL-10、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-8、TNF- α が OVA のみに比べ産生が増加した。特に炎症性サイトカイン・ケモカインである IL-6、IL-8 及び MCP-1 の産生が有意に増加した。また CT と OVA 共存下で抗原提示の補助刺激分子である CD86/80 の発現が OVA のみに比べ増加した。組換えタンパク質をアジュバント活性を炎症性サイトカイン・ケモカインの産生増強を評価系として応用できると考えられた。アジュバントの抗原提示能を評価する系としては、その後リンパ球との培養が必要と思われた。

平成 20 年度は、培養ヒト樹状細胞に食品タンパク質ペプチドとアジュバント物質を添加により感作後、培養ヒト単核白血球細胞と共培養し、*in vitro* の食品タンパク質のアジュバント活性評価法を構築した。最終培養上清の多項目サイトカイン測定では、培養樹状細胞の OVA peptide 感作時に LPS を添加すると、OVA peptide 感作のみに比べて、IL-1 β 、IL-13、IL-5、IL-17、G-CSF、IFN- γ 、IL-6、TNF- α 等のサイトカインの産生が増加した。T リンパ球の表面抗原解析では、LPS 添加により CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺細胞の分化を促進した。これらの結果は、LPS による樹状細胞への影響によるものと考えられた。T 細胞分化指標

の転写因子の mRNA の定量では、Th2 の分化指標である GATA3 の mRNA をリアルタイム PCR で測定したところ、樹状細胞の感作時に加え、単核白血球細胞の共培養時にも OVA peptide と共に培養した群が、無添加の対照群に比べ、GATA3 の増加の傾向が示唆された。このことは、感作時および単核白血球細胞の共培養時にも OVA peptide が共存した方が、Th2 細胞への分化を促進することが示唆された。一方、LPS を添加すると、Th2 細胞への分化を抑制することが示唆された。抗原提示能に関するアジュバント活性を調べるための樹状細胞とリンパ球の共存培養系の構築を行うことができた。しかし再現性が悪いことが判明した。これはドナーが既に有している CD45RO⁺T 細胞の影響と考えられた。

平成 21 年度は、モデルアジュバント物質として LPS と forskolin を用いた。Th1 アジュバントと知られている LPS 添加では、共培養の CD4⁺T 細胞からの IL-12、IL-13、IFN- γ 、TNF- α の産生を増加させる傾向を示した (図 27)。T 細胞分化指標の転写因子の mRNA の定量では、Th1、Th17 の転写因子である T-bet、ROR γ t の mRNA の発現が用量依存的に増加した (図 2)。Th2 アジュバントとしられている Forskolin 添加では、共培養の CD4⁺T 細胞からの IL-4、IL-6、GM-CSF の産生を増加させる傾向を示し (図 27)、mRNA の定量では、Th2 の転写因子である GATA3 の発現が用量依存的に増加した (図 28)。このことは、感作時に forskolin に添加すると Th2 細胞への分化を促進することが示唆された。一方、感作時に LPS を添加すると、Th1 あるいは Th17 細胞への分化を抑制することが示唆された。現在、確立した系を用いて、組換え CryIAc のアジュバント活性を評価している。この評価技術は、遺伝子組換え食品や新開発食品の今後のアレルギー、免疫影響評価に適用できるばかりでなく、広くアレルギーの予防にも応用可能な有効な評価系であると考えられた。

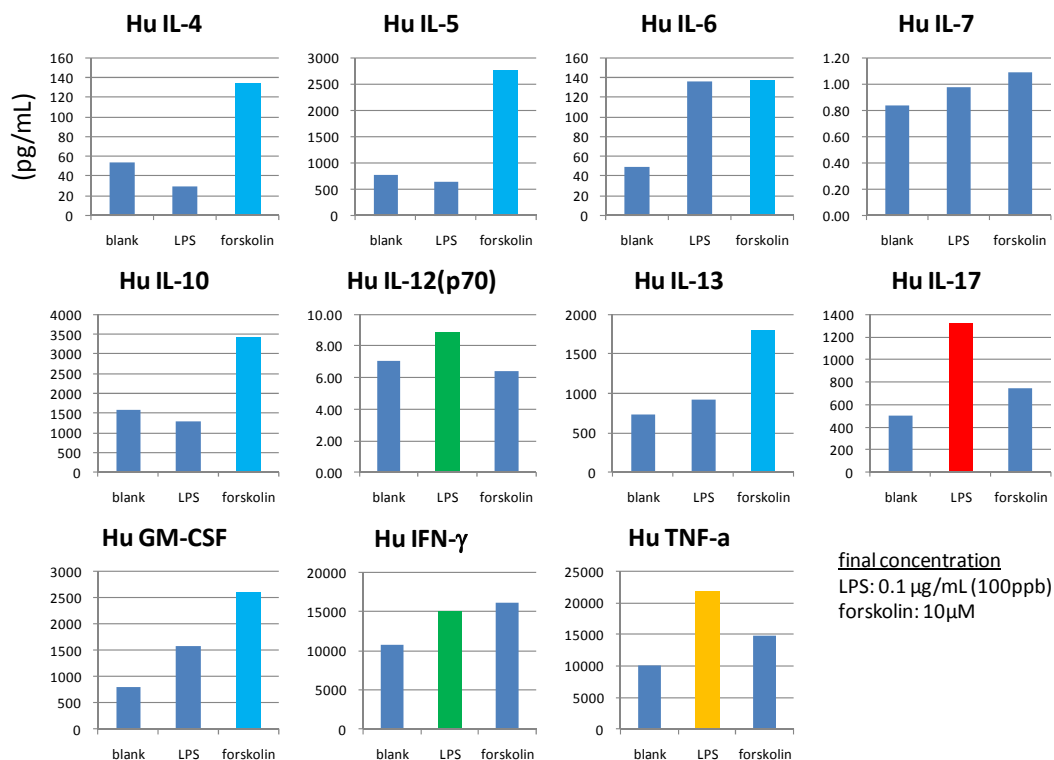


図 27 共培養 CD4⁺T 細胞の CD3 抗体刺激後の産生されたサイトカイン産生

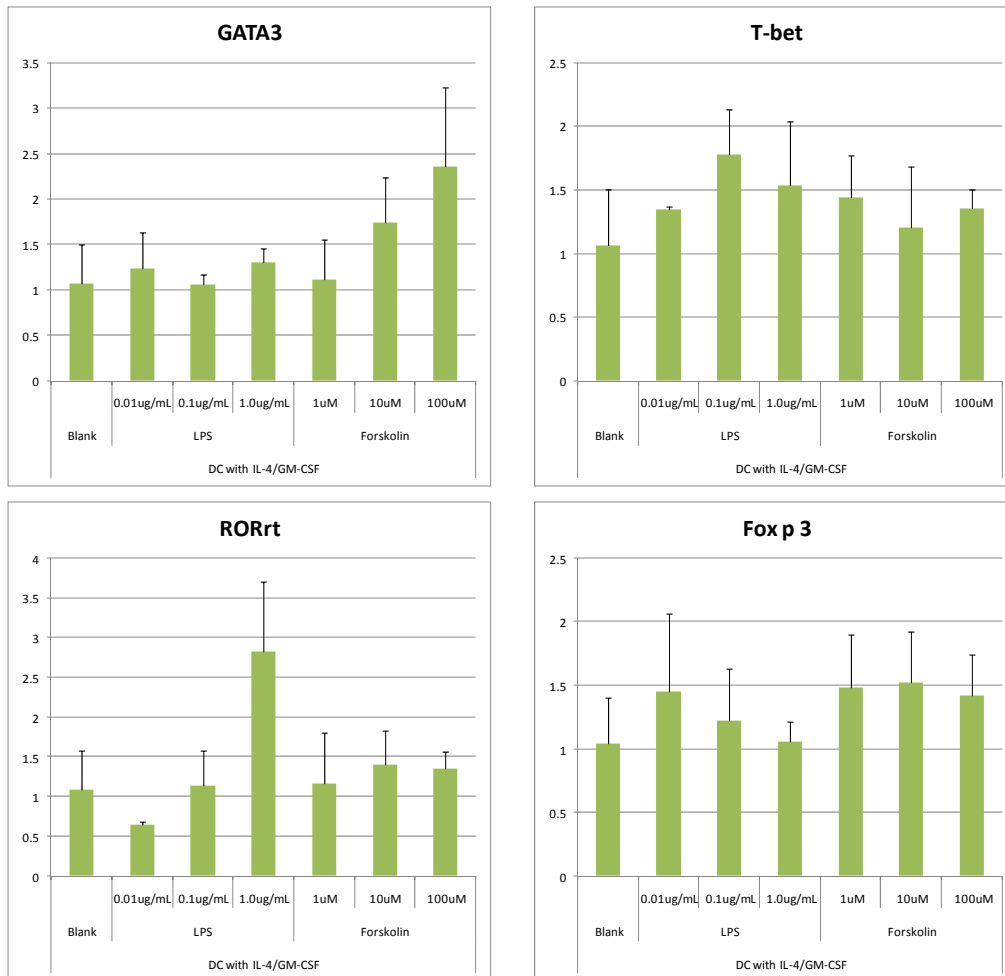


図 28 共培養 CD4⁺T 細胞の mRNA 分析

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト(論文は、添付すること。)

1. Ryosuke Nakamura, Yoshimi Uchida, Masakazu Higuchi, Rika Nakamura, Ikuo Tsuge, Atsuo Urisu, and Reiko Teshima: More convenient, more sensitive cell-based allergy test by means of luciferase expression after IgE-crosslinking on the cultured mast cells. *Allergy* (2010) in press
2. Ryosuke Nakamura, Yoshimi Uchida, Masakazu Higuchi and Reiko Teshima: Development of a novel allergy test using a cultured mast cell line. *ImmunoTox Letter* 14:12-13 (2009)
3. Rie Satoh, Satoru Koyano, Kayoko Takagi, Rika Nakamura, Reiko Teshima: Identification of an IgE-binding epitope of a major buckwheat allergen, BWp16, by spot assay and mimotope screening. *Int.Arch. Allergy Immunol.* (2010) in press
4. Yasuto Kondo and Atsuo Urisu: Oral allergy syndrome. *Allergology International* 58, 485-491 (2009)
5. Akinobu Kajikawa, Kazuya Masuda, Mitsunori Katoh and Shizunobu Igimi: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clin Vaccine Immunol.* 17, 43-48 (2010)
6. Akinobu Kajikawa and Shizunobu Igimi: Reduction of tumor necrosis factor alpha-inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* via expression of Salmonella OmpC. *Appl Environ Microbiol.* 75, 2727-2734 (2009)
7. Akinobu Kajikawa, Eiko Ichikawa and Shizunobu Igimi: Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 375-382 (2010)
8. Akinobu Kajikawa and Shizunobu Igimi: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine*, (2010) in press

(3) 特許及び特許出願の数と概要

1件 ・ 「I型アレルギーの検査方法」 特願 2009-168530

(内容: I型アレルギーの検査方法に関する、詳しくは、被験物質が被験者に対するアレルゲンであるか否かを検査する方法、被験者におけるI型アレルギーのリスクを評価する方法、被験者におけるIgE量を測定する方法ならびにI型アレルギーに影響を与える物質をスクリーニングする方法に関するもの)

(4) その他(各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

第16回日本免疫毒性学会学術大会年会賞(2009.8): 「培養細胞を用いた新しいアレルギー検査法の開発」 中村亮介、内田好海、樋口雅一、手島玲子

3 今後の問題点等

感作の評価系のパイエル板初代培養系は、タンパク質のアレルゲン性の評価に有用であると思われ、Th17の活性化が重要であることが示された意義は大きい。さらに多くのタンパク質のアレルゲン性についてこの評価系が応用されることが望まれる。

惹起の評価系の、アレルゲンチップに関しては、そばアレルゲン、遺伝子組換え食品中の除草剤耐性用酵素 CP4-EPSPS, PAT 並びに害虫抵抗性タンパク質 Cry3Bb1, Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F の検出システム開発を行うことができ、患者血清中特異的 IgE 抗体を微量で測定する一次試験としての方法がほぼ確立した。さらに、好塩基球細胞を用いる系では、EXILE 法と名付けた pNFAT-LUC 導入 RBL-SX38 細胞の安定細胞株の樹立ができ、患者血清を用いて意味のある IgE 抗体を測定できる評価系であることが確認され、アレルゲンチップによる一次試験で特異的 IgE 抗体陽性が疑われた血清の二次試験としての有用性が示された。今後、EXILE 試験の他機関バリデーション試験も進め、広く使われる方法として普及していくことが望まれる。

アジュバントの評価系では、Caco-2 細胞等と Raji 細胞の共存による M 細胞を用いたモデルの実験系を構築し、取り込み活性を指標に組換え乳酸菌の機能評価を行うことができた。今後この評価系他機関とのバリデーションも必要になってくると思われる。また、樹状細胞を用いる系で、リンパ球との共存培養系を構築でき、アジュバントにより活性化される T 細胞群の同定も可能になってきた。新規タンパク質のアジュバント活性の評価への応用が期待される。