

鶏卵白即時型過敏反応に関与するペプシン処理鶏卵白 オボムコイドのfragmentについての検討

安藤 仁 志¹⁾
森田 豊²⁾
矢崎 雄彦¹⁾

宇理 須 厚 雄¹⁾
和田 映 子¹⁾
山田 一 恵³⁾

徳田 玲 子¹⁾
近藤 康 人¹⁾
松田 幹⁴⁾

藤田保健衛生大学医学部小児科¹⁾, 刈谷総合病院小児科²⁾

山田医院³⁾, 名古屋大学大学院生命農学研究科⁴⁾

key words : オボムコイド, 鶏卵アレルギー, ドメイン 3, 特異的IgE抗体

要 旨

ペプシン処理オボムコイド(以下OM)をゲルろ過法ならびに逆相HPLC法で精製し, IgE結合能をもつfragmentを決定し, さらにそのfragmentに含まれるペプチドのN末端アミノ酸配列を決定した. 対象はOMの特異的IgE抗体高値の患児15名. これらの患児に二重盲検法による卵白経口負荷試験を行い即時型過敏反応(以下IHR)陽性群と陰性群に分けた. ゲルろ過法で精製されたfragmentに対するIgE結合能は, IHR陽性群でfraction 23, 38が有意に高値であった. その中でfraction 23をさらに逆相HPLC法で精製しIgE結合能を検討した. IgE結合能はfraction eに見られた. さらにこのfraction eに含まれるペプチドのN末端アミノ酸配列を決定した所, OMの134残基目(valine)から始まるドメイン3と同定された. 以上からIHRに関与するIgEエпитープの1つはOMのドメイン3に存在する事が示唆された.

はじめに

鶏卵白は, 乳幼児期の食物アレルギーの最も頻度が高い原因アレルゲンの1つである¹⁾. オボムコイド(以下OM)は鶏卵白の10%を占める主要アレルゲンである²⁾. 筆者ら³⁾は卵白特異的IgE抗体陽性患者を対象として凍結乾燥卵白経口負荷試験と卵白成分別特異的IgE抗体との関連を検討した結果, 即時型過敏反応(以下IHR)陽性群は陰性群に比しOM特異的IgE抗体価が有意に高値であったが, 他の成分に対するIgE値には有意な差はなかったと報告した. しかし, OM特異的IgE抗体価が高値でも, 負荷試験陽性群と陰性群との間にはIgE値に重複する症例が多数存在していた.

さらに, OM特異的IgE抗体高値の患者を対象とし, 消化酵素処理OMをinhibitorとしたRAST inhibitionによる検討では, ペプシン処理OMに対するIgE抗体の結合能はIHR陽性者が陰性者よりも有意に高値であった. この結果はペプシン処理によっても残存しているOMに存在するエпитープが卵白過敏症に大きく関与していることを意味している.

筆者らは, 凍結乾燥卵白経口負荷試験によるIHRに関与するエпитープは, OM上のペプシンに対して安定な部分ではないかと考え, ペプシン処理OMをゲルろ過法ならびに逆相高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)法で精製した後, IgE結合能をもつfragmentを決定し, さらにそのfragmentに含まれるペプチド断片のN末端アミノ酸配列を決定した.

対象ならびに方法

a. 対象

OMに対する特異的IgE抗体高値の患児15名を対象とした(表1). カットオフ値としては0歳から10歳の

Abbreviations : HPLC ; high-performance liquid chromatography, HSA ; human serum albumin, IHR ; immediate hypersensitive reactions, Ig ; immunoglobulin, OM ; ovomucoid, PBS ; Phosphate buffered saline, RAST ; radioallergosorbent test, SD ; standard deviation

鶏卵アレルギーは認められないが何らかのアレルギー疾患をもった患児20人のOM特異的IgE値(%binding)の平均+2標準偏差(以下SD)である1.9%を用いた。さらに凍結乾燥卵白による経口負荷試験を二重盲検法で施行し、IHR陽性8名と陰性7名に分けた。コントロールは、卵白特異的IgE抗体(Pharmacia CAP-FEIA)クラス0でアレルギー疾患をもたない児8名(年齢の平均±SD=3.5±1.5歳, 男児4例, 女児4例)とした。

対象の平均年齢±SDは陽性群, 陰性群それぞれ2.5±2.1歳, 4.7±2.0歳で有意差はなかった。また, 卵白およびOMに対するIgE値は, 負荷試験陽性群と陰性群との間で有意差は認めなかった。

b. 凍結乾燥卵白経口負荷試験

森田ら⁴⁾の方法に従って二重盲検法にて実施した。

c. OMの精製

新鮮鶏卵(ホワイトレグホン)より, 卵白を分離し, Waheed & Salahuddinら⁵⁾の方法に従い, トリクロロ酢酸による分別沈殿法とSP-Sephadex C-50カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによりOMを分離精製した。

d. OMのペプシン処理

20mgのOMを蒸留水10mlに溶かしたものを2.0Nの

HClでpH2に調整した。その後1mgのペプシン(ブタ胃粘膜由来, Sigma Chemical Co.) (3200-4500 unit/mg)を加え25℃, 60分処理した後, 0.2NのNaOHでpH7-8に調整しペプシンを失活させた⁶⁾。

e. OMのペプシン分解fragmentの精製

ペプシン処理OM(20mg)を, Phosphate buffered saline(以下PBS)で平衡化したBio Gel P-30カラム(2 X 90cm, Fine)(Bio Rad Co.)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。各fragmentについて280nmにおける吸光度を分光光度計(U-2001スペクトロフォトメーター, 日立)で測定した。IgE結合能が高値であったfraction 23を, さらにC18カラム(0.5 X 15cm)を装着したHPLC装置(880-PUU 2 ポンプ高圧グラジエントシステム, 日本分光)による逆相HPLC法を用いて精製した。HPLCにおける送液速度は1 ml/minとして, 溶媒にはA液: 0.1% trifluoroacetic acid(アミノ酸配列分析用)(和光純薬)とB液: 0.1% TFA溶液/60% acetonitrile(CH 3 CN; 高速液体クロマトグラフィー用)(和光純薬)を用いた。なおこれらの溶媒の調製には無蛍光水(同仁化学)を用いた。A液で平衡化した後サンプル(fraction 23)を0.45 μmのfilterを通した後50 μl注入し, 30分かけてacetonitrileの濃度を0%から60%

Table 1. 対象

	卵白即時型反応陽性	卵白即時型反応陰性	P
症例数	8例	7例	
年齢(M±SD)	2.5±2.1 歳	4.7±2.0 歳	0.15*
性別(男:女)	5:3	5:2	0.99**
血清総 IgE(IU/ml) (M-SD~M+SD)	818.0 (810.4~825.6)	925.5 (914.3~936.9)	0.50*
卵白特異的 IgE (%binding) (M-SD~M+SD)	34.7% (33.2~36.2)	22.9% (20.9~24.9)	0.55*
卵白オボムコイド 特異的 IgE(%binding) (M-SD~M+SD)	27.5% (25.0~29.7)	14.8% (12.4~17.2)	0.36*

M: 平均, SD: 標準偏差, P: 危険率

*unpaired t test, **Fisherの直接確率法

P<0.05: significant

に直線的に上昇させた。さらにUVモニター (UVIDEC-100V, 日本分光) を用い280nmでの吸光度測定して, タンパク質, ペプチドの溶出をモニターし, そのピークを分取した。

f. IgE 結合能の測定⁷⁾

0.1M sodium carbonate buffer (Ph9.5) にタンパク質濃度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解したゲルろ過法で得られたfractionを96-wellの塩化ビニルプレート (ELISA用プレートE) (Sumitomo Bakelite Co. Ltd) に50 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し, 4℃で一晩静置した。0.05% Tween20含有pH7.2 PBS (以下PBS-Tween) で1 well 当たり100 μl 加え4回洗浄後, 0.1M sodium carbonate buffer (pH9.5) に溶解した2% human serum albumin (以下HSA) (Sigma Chemical Co.) 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ でblocking処理を37℃で1時間行った。ついでPBS-Tweenで4回洗浄した後, 患者血清を50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え, 室温で12時間反応させた。その後PBS-Tweenで4回洗浄, ^{125}I -抗ヒトIgE抗体 (44.4KBq/ml) (Dainabot K.K.) を50 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し, 室温で12時間静置し反応させた。最後にPBS-Tweenで4回洗浄し, 各wellを分離後, γ -counter (Packard Co. Ltd.) で ^{125}I の放射線量を測定した。実測値をwellに加えた ^{125}I の総放射線量で割り, この値を百分率で表して%bindingとした。また%bindingがコントロールの平均+2SD以上の場合特異的IgE抗体高値とした。ゲルろ過法で得られたfraction 23をさらに逆相HPLC法で精製した後, そのfractionを同様にIgE

結合能を検討した。

g. 統計処理

IgE値(%binding)は対数変換してから統計処理した。統計処理はunpaired t testあるいはFisherの直接確率法で行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

a. ゲル濾過fractionに対するIgE結合能

Fig 1は, Bio Gel P 30カラムを用いたゲルろ過法で精製したペプシン処理OMのfractionを示す。縦軸は吸光度 (280nm) で, 横軸はfraction numberを示す。このfractionの中で, fraction 10, 16, 19, 23, 26, 30, 32, 34, 38, 42の10個のfractionについてIgE結合能を検討した。

Fig 2にペプシン処理OMのゲル濾過法によるfractionに対するIgE結合能を示す。上段の散布図は, 凍結乾燥卵白経口負荷試験にてIHR陽性群, 下段はIHR陰性群を示す。グラフの縦軸はIgE結合能(%binding)で, 横軸はfraction numberを示す。横線はコントロール群のIgE結合能の平均+2SDの値を示す。fraction 10, 16, 19, 23, 26, 30, 32, 34, 38, 42のそれぞれの値は0.3, 0.37, 0.31, 0.44, 0.48, 0.61, 0.35, 0.23, 0.22, 0.26であった。これらの結果から, IHR陽性群ではfraction 19, 23, 26, 30, 38に対して他のfractionに比してIgE結合能が高い血清が認められた。またIHR陽性群のfraction 23と38に対するIgE結合能がコントロール群に比較して有意に

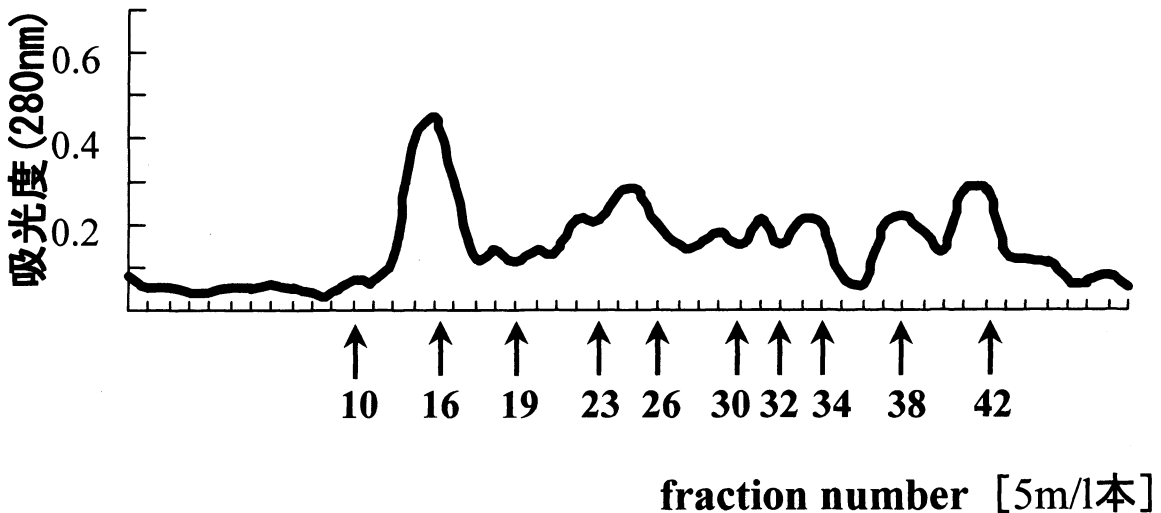


Fig. 1. ペプシン処理した卵白オボムコイドをゲル濾過法で精製したfragment
1mgのペプシンで処理した卵白オボムコイドをBio Gel P 30 (2×90cm, Fine)でゲルろ過法用い精製した

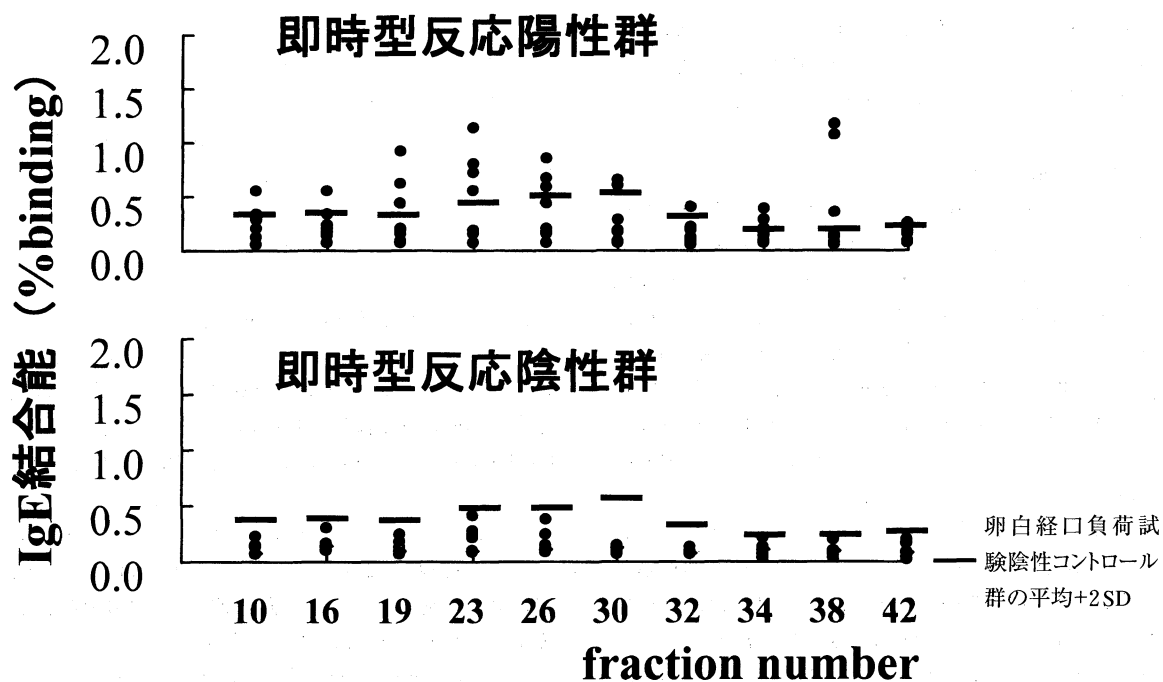


Fig. 2. ゲル濾過法で精製したfragmentに対するIgE結合能

IgE結合能は、 ^{125} I抗ヒトIgE抗体を用いて測定した

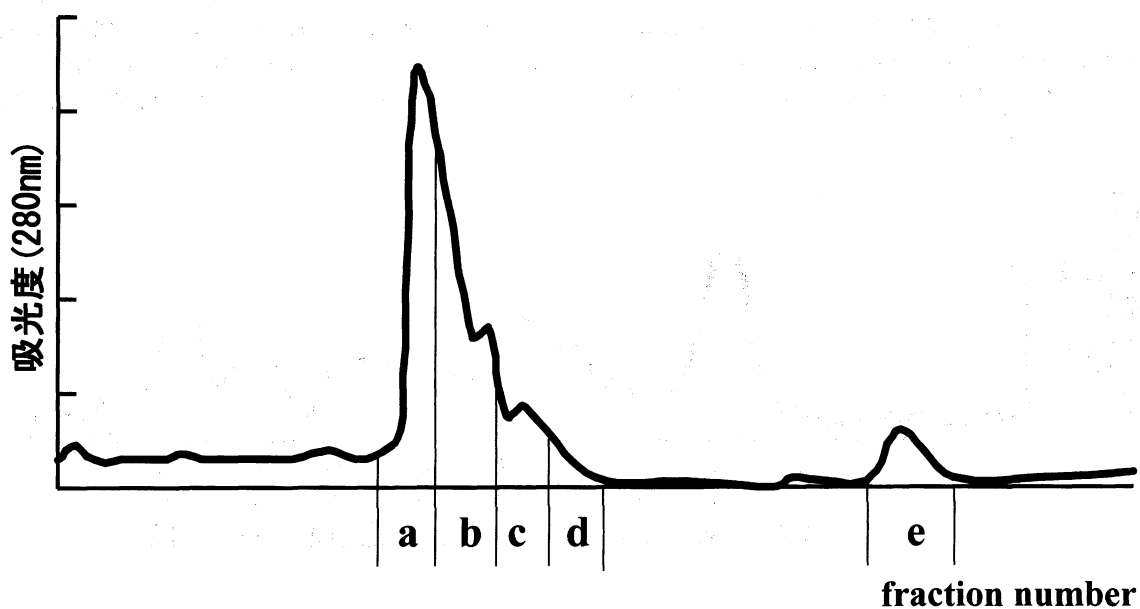


Fig. 3. fraction 23を逆相HPLC法で精製したfragment

fraction. 23をC18カラム (0.5×15cm) で装着したHPLC逆相クロマトグラフィーを用いて精製した

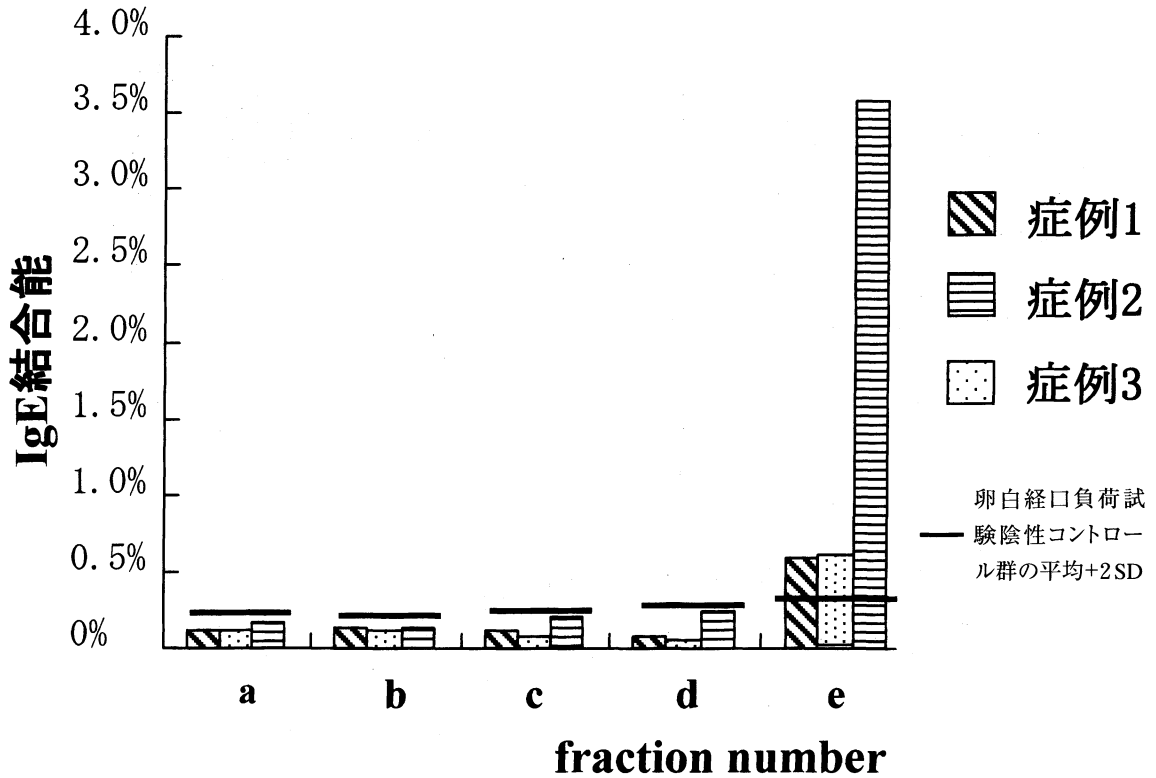


Fig. 4. 逆相HPLC法で精製したfragmentのIgE結合能

高値であった。このことから、これらのfractionに含まれるOMペプチドにIHRに関与するエピトープが存在すると考え、最も多数の患者が高値を示したfraction 23を逆相HPLC法でさらに精製した。

b. fraction 23の逆相HPLC法で精製したfractionに対するIgE結合能

Fig 3 にfraction 23を逆相HPLC法で精製したグラフを示す。fraction a, b, c, dのところで最初の大きなピークが認められ、fraction eで最後の1つのピークが見られた。Fig 4 にfraction 23に対してIgE結合能が高値の3症例の血清を用いて各fractionに対するIgE結合能を測定した結果を示す。縦軸がIgE結合能(%binding)で、横軸はfraction numberを示す。3症例とも最後のピークであるfraction eにIgE結合能を示した。

c. fraction eに含まれるペプチド断片のN末端アミノ酸配列

fraction eに含まれるペプチド断片のN末端アミノ酸配列はV S V D X S E Y P K の9残基が決定できた。OMの1次構造と比較するとOMの134残基目(valine)

からはじまるペプチド断片であり、第3ドメインに由来することが判明した。(Fig. 5)

考 察

鶏卵白中には20種類以上の蛋白が含まれ、その中でOM、オボアルブミン、コンアルブミン、リゾチームが主要アレルゲンとされている²⁾。Bleuminkら⁸⁾やBernhisel-Broadbentら⁹⁾は、卵白の中でOMが最も主要なアレルゲンであると報告している。またUrisuら¹⁰⁾は卵白経口負荷試験を行ってIHRが陽性であった38名に対し加熱卵白経口負荷試験を行い21名がIHR陰性になり、さらに陽性であった17例に対して加熱脱OM卵白負荷試験を行い16例(94.1%)がIHR陰性であったと報告している。和田ら¹¹⁾は加熱脱OMが低アレルゲン化されている事を皮膚テスト(パッチテスト、ブリックテスト)で証明している。山田ら³⁾はまた卵白経口負荷試験でIHRが陽性であった症例ではOM特異的IgE抗体価が高値であったと報告している。

tion 38については、検討していないためこのfractionがドメイン3に由来するものかどうか判定はできない。またfraction 23に反応しなかった症例については1)ドメイン1または2にもIHRに関与するエピトープが存在する、2)ドメイン3の中でペプシンにより切断される部分にエピトープが存在するなどの可能性があると考えられた。

一方IHR陰性群の患者は、ペプシン処理卵白オボムコイドのfractionすべてにおいてIgE結合能が認められなかったことからIHR陰性群の患者が認識しているエピトープは、ペプシンにより容易に切断される部位を認識している可能性が考えられた。

また今回の検討だけではOMの1次構造にIgEが反応しているのか、高次構造を認識しているのか明らかではない。さらにドメイン3には1本のN-結合型糖鎖がありこれらが重要との報告¹⁷⁾もある。今後の検討課題である。

なおこの研究の要旨は第8回日本アレルギー学会春季臨床大会(横浜)、第46回日本アレルギー学会総会(宇都宮)で発表した。

研究助成して頂きました生研機構基礎研究推進事業に感謝いたします。

文 献

- 1) Sampson, H. A., McCaskill, C. C. : Food hypersensitivity and atopic dermatitis-Evaluation of 113 atient. :J. Pediatr., 107,669 - 675,1985.
- 2) Hoffman, D. R. : Immunochemical idenfication of the allergens in egg white. J. Allergy Clin.Immunol. : 71, 481 - 486, 1983.
- 3) 山田一恵, 宇理須厚雄, 近藤康人, 八木映子, 稲垣義彰, 駒田英勝, 山田政功, 鳥居新平 : 卵白経口摂取による即時型過敏反応と卵白成分に対するIgE結合能. アレルギー 43, 1201 - 1209, 1994.
- 4) 森田豊, 宇理須厚雄, 八木映子, 近藤康人, 鶴田光敏, 矢崎雄彦, 山田一恵, 坂口騰 : 卵白凍結乾燥粉末を用いた卵白経口負荷試験による卵白過敏症の検討. 日児誌 100, 7 - 12, 1996.
- 5) Waheed, A., Salhuddin, A. : Isolation and characterization of a variant of ovomucoid. : Biochem. J. 47, 139 - 144, 1975.
- 6) Matsuda, T., Watanabe, K., Nakamura, R. : Immunochemical and physical properties of peptic digested ovomucoid. : J. Agric. Food Chem. 31, 942 - 946, 1983.
- 7) 近藤康人, 宇理須厚雄, 和田映子, 鶴田光敏, 矢崎雄彦, 山田一恵, 増田進, 森田豊 : そば主要アレルゲンのImmunoblotting法による検討.アレルギー 42, 142 - 148, 1993
- 8) Bleumink, E., Young, E. : Studies on the atopic allergen in hen`s egg. II. Further characterization of the skin reactive fraction in egg-white immunoelectrophoretic studies. : Int. Arch. Allergy. : 40, 72 - 88, 1971.
- 9) Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H. M., Dinizis, R. Z., Sampson, H. A. : Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compaired with ovalbumin(Gal d I) in children with egg allergy and mice.: J.Allergy Clin. Immunol., 93, 1047 - 1059, 1994.
- 10) Urisu, A., Ando, H., Morita, Y., Wada, E., Yasaki, T., Yamada, K., Komada, K., Torii, S., Goto,M., Wakamatsu, T. : Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white.: J. Allergy Clin. Immunol., 100, 171-176, 1997.
- 11) 和田映子, 宇理須厚雄, 安藤仁志, 森田豊, 矢崎雄彦, 山田一恵, 後藤雅広, 若松利男 : 低アレルゲン化卵白の開発-加熱脱ovomucoid卵白のアレルゲン活性の検討-. アレルギー 46, 1007 - 1012, 1997.
- 12) Matsuda, T., Watanabe, K. and Nakamura, R. : Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. : Biochim. Biophys. Acta 707 (1), 121 - 128,1982.
- 13) Kato, I., Kohr, W. J. and Lakowski, M. Jr. : Evolusion of an ovomucoid.:In ,^{*}, Proc. 11th FEBS Meeting : Regulatory Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors, ^{*}, Perganom Press,Oxford. 197 - 206, 1978.
- 14) Matsuda,T., Watanabe,K. and Nakamura,R. : Antigenicity of Chicken Ovomucoid Domains I and III. : Agric. Biol. Chem. 47, 1823 - 1827, 1983.
- 15) Konishi, Y., Kurisaki, J., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. : Localization of Allergenic Reactive Site on Hen Ovomucoid. : Agric. Biol. Chem. 46, 305 - 307, 1982.
- 16) Cooke, S. K., and Sampson, H. A. : Allergenic properties of ovomucoid in man.:J. Immunol. : 159 (4) , 2026 - 2032, 1997.
- 17) Matsuda, T., Nakamura, R., Nakashima, I., Hasegawa,

Y., Shimokata, K. : Human IgE antibody to the carbohydrate-containing third domain of chicken ovomucoid. :

Biochem. & Biophys. Res. Commun. 129 (2), 505 – 510, 1985.

DETERMINATION OF OVOMUCOID FRACTION INCLUDING IgE-EPITOPES
WHICH ARE INVOLVED IN HEN EGG HYPERSENSITIVITY.

Hitoshi Ando, Atsuo Urisu, Reiko Tokuda, Eiko Wada,
Yasuto Kondo, Yutaka Morita¹⁾, Takehiko Yasaki, Kazue Yamada²⁾, Tsukasa Matsuda³⁾

Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine

¹⁾Department of Pediatrics, Kariya General Hospital

²⁾Yamada Clinics

*³⁾Department of Applied Molecular Graduate School of Bioagricultural Sciences
Nagoya University*

After resolution of pepsin-treated ovomucoid (OM) with gel filtration and reverse phase HPLC, we determined the OM fractions which showed IgE-binding activity by means of direct radioallergosorbent assay (RAST) using polyvinyl 96-well plate. Fifteen subjects with high IgE antibody titers to OM were divided into two groups with positive (n=8) and negative (n=7) results to double-blinded placebo-controlled food challenge with freeze-dried egg white antigens. The sera from positive challenge group showed significantly high IgE-binding activity to fraction No.23 and No.38 from gel filtration (Bio Gel P-30 column), however those from negative group showed significant binding to none of fractions. No.23 fraction which was recognized most frequently by patients' sera was subjected to further analysis with reverse phase HPLC (C18 column). No. 18 fraction showed binding activity to IgE antibodies from patients with positive challenge results. N-terminal amino acid sequence of the fraction No.18 corresponded to the peptide which began with No.134 of amino acid residues of OM. In conclusion this peptide was derived from the third domain of OM and may have an important role in egg-white hypersensitivity.

(Accepted : May 12, 1998)