

氏 名	ひろ せ じゅん こ 廣 瀬 潤 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1476 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Polymorphism of a major food allergen, ovomucoid and its immunological evaluation (主要食物アレルゲン、オボムコイドの多形構造と免疫学的評価)
論文調査委員	(主 査) 教 授 北 畠 直 文 教 授 廣 瀬 正 明 教 授 吉 川 正 明

論 文 内 容 の 要 旨

鶏卵は栄養性、加工性に優れた食品であるが、乳幼児の食物アレルギーの原因食品の第一位にあげられ、卵白タンパク質の約10%を占める分子量 28kDa の糖タンパク質オボムコイド (OM) が最も強力なアレルゲンといわれている。本研究では、OM に対するモノクローナル抗体を作製し、それらを用いて、OM の熱変性、糖鎖、存在形態による多形現象を明らかにするとともに、その評価系を確立し、食物アレルギーとの関連に考察を加えている。

第 1 章では熱変性状態によるオボムコイドの多形について検討を行っている。食物アレルゲンの評価においては、ほとんどの食品が加熱されているにもかかわらず、加熱変性についてはあまり考慮されていなかった。そこで、実際に18名の卵アレルギー患者血清中の IgE 解析を行い、2 名が未変性 OM よりも加熱した OM により強く反応することを明らかにした。これによって熱変性状態を考慮してアレルゲンを評価することの重要性を提示している。OM に対する 4 種類のモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、その中の mAb 5C は未変性 OM 特異的、mAb 6H は熱変性 OM 特異的抗体であり、他の抗体である mAb 7D は OM の糖鎖を認識し、未変性・熱変性状態を同等に認識する抗体であることを明らかにしている。また、mAb 2H は ELISA プレートに固相化された OM のみを認識する抗体であることを明らかにしている。次に、固相に mAb 7D、二次抗体にそれぞれのビオチニル化抗体を用いることにより、熱変性のみ、未変性のみ、あるいは熱変性状態に関係なく総 OM を定量できる 3 種のサンドイッチ ELISA 系の確立に成功している。特にこの総 OM 定量系は、食品表示のような食品中の総量が問題となるアレルゲン定量に適した定量系と考えられる。さらに、これらの性質のよくわかっていないモノクローナル抗体を一定量混ぜ合わせて二次抗体として使う混合モノクローナル抗体定量系 (オリゴクローナル系) を作製し、先述の ELISA の高感度化を試みた結果、mAb 5C、6H、7D の 3 抗体を混ぜ合わせたオリゴクローナル系では、mAb 7D 単独系よりも約100倍の高感度化が達成された。これは現在ポリクローナル抗体で作製されている厚生労働省の定めたアレルゲン定量系に匹敵し、その上、熱変性状態をも考慮できる方法である。また、一次抗体に用いた mAb 7D は SDS や 2-メルカプトエタノールのような変性剤耐性であるため、これらの薬剤を使って抽出効率を上げ、より正確な定量にも成功している。現在、食品表示の世界標準化という観点から、高感度で安定した特異性を持った抗体を多量に供給することのできるアレルゲン定量系の確立が急務となっている。今回作製したモノクローナル抗体を用いたオリゴクローナル定量系や変性剤を使った抽出法の導入が問題解決の一助となりうる可能性を示した。

第 2 章では OM 糖鎖による多形について述べている。OM の糖鎖認識抗体である mAb 7D は、OM 以外に 2 種類の卵白タンパク質を認識した。1 つは OM タイプの糖鎖を有するオボフラボプロテインであった。他の 1 つは内部配列を 2 ヶ所決定した結果、これまで cDNA から存在が予測されていたオボアルブミンと 57% のアミノ酸配列相同性のあるオボアルブミン-Y であることが判明した。また化学的に脱糖したオボアルブミン-Y は、脱糖 OM と同様に mAb 7D で認識されなくなる。これらのことから、オボアルブミン-Y が一次配列はオボアルブミンファミリー、糖鎖はオボムコイドタイプであるオボアルブミン・オボムコイド・ハイブリッドタンパク質であると結論づけている。卵白主要アレルゲンとして、OM

とオボアルブミンの両者が挙げられているが、このオボアルブミン-Yを含めてアレルゲン性を考慮する必要性が示された。

第3章においては、OMの存在形態による多形について研究を進めている。母乳中に母親が摂取した食品タンパク質が存在することは既に報告されていたが、その形態や乳児の食物アレルギーとの関連はこれまでほとんど分かっていなかった。上記のモノクローナル抗体を用いて母乳中のOMを解析し、分子量28kDaのOMが450kDaと高分子化して存在しており、それは母親が分泌する分泌型IgAとの免疫複合体(IC)であることを明らかにした。また、この現象はOMのみならず、他の食品タンパク質(卵、牛乳、小麦、落花生、そば)でもみられた。乳児の卵アレルギーと母乳中の免疫複合体の関係をみると、臨床診断指標であるRAST値が低く、アレルギー症状のない乳児が摂取している母乳中にも免疫複合体が存在した。これらの結果から、母親の摂取したタンパク質が母乳中に免疫複合体として存在していることは一般的な現象であり、乳児のアレルギー発症の直接的原因ではないことを明らかにした。一方、IgA免疫複合体は腸管粘膜免疫系において、積極的にIgAを産生させることが報告されている。したがって、母乳中に存在する食品タンパク質の免疫複合体は、乳児の腸管免疫系の発達促進作用、すなわちアレルギー予防のワクチン様の作用をもつ可能性を提示した。

論文審査の結果の要旨

鶏卵は栄養価が高く、加工性に富んだ優れた食品であるが、一方で乳幼児の食物アレルゲンの第一位にあげられている。鶏卵タンパク質オボムコイドは、卵白タンパク質の約10%を占める糖タンパク質で、最も強力なアレルゲンであるとされている。しかしながら、これまでオボムコイドの熱変性状態を識別可能な高感度定量系が開発されておらず、加工食品中のオボムコイドの正確な定量が可能ではなかった。また、これまで遺伝子から存在が予測されていたオボアルブミン-Yの実体についても不明であった。本研究では様々なモノクローナル抗体を調製して、これらの問題解決を図ったものである。また、オボムコイドをはじめとして、母親の摂取した食品タンパク質が母乳中に分泌について不明な点が多々存在したが、本研究ではオボムコイドが分泌型IgAとの免疫複合体を作って存在していることを明らかにしている。さらに免疫複合体形成の抗原特異性、摂食による食品タンパク質特異的IgAの誘導を明らかにしている。評価すべき点は、以下の通りである。

- (1) 鶏卵タンパク質オボムコイドに対するモノクローナル抗体を4種作製し、熱変性状態を識別可能な高感度ELISA系を確立した。
- (2) このELISAの改良法としてオリゴクローナル法、変性剤を用いた抽出法を提示した。
- (3) これまで遺伝子から存在が予測されていたオボアルブミン-Yがオボムコイドタイプの糖鎖を有するハイブリッドタンパク質であることを示した。
- (4) オボムコイドをはじめとして、母親の摂取した食品タンパク質が母乳中に分泌型IgAとの免疫複合体を作って存在していることを示し、その存在は乳児のアレルギー発症の直接的な原因にはならないことを明らかにした。

以上のように本論文は主要食物アレルゲン、オボムコイドの多形構造と免疫学的評価について詳細な検討を行い、多くの新知見をもたらしたもので、これらの成果は食環境学、応用構造生物学、食品生理機能学の分野に寄与するところが大いである。よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年2月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。