

ヒトの鶏卵アレルギーに対する 新規アレルゲン蛋白質の検出

曾川 一幸 講師

麻布大学 生命・環境科学部 臨床検査技術学科 生化学研究室

Kazuyuki Sogawa Assistant Professor.

School of Life and Environmental Science, Department of Medical Technology

<背景・目的>

- 食物アレルギー患者はこの40年で約10倍に増加しており、新規に発症する原因食物の頻度は年齢別に大きく異なる。0歳から6歳までは、鶏卵が一番多い食物アレルギー原因食品である。
- 鶏卵は栄養価が高く良質なタンパク質を持つため、動物性のタンパク質の供給源としては一般的な食材である。我が国のみならず世界的にみても、最も食物アレルギーの発症頻度が高い食品である。
- 鶏卵アレルゲンは、卵白でOvomucoid (Gal d 1)、Ovalbumin (Gal d 2)、Ovotransferrin (Gal d 3)、Lysozyme (Gal d 4)、卵黄でSerum albumin (Gal d 5)、Vitellogenin-1 (Gal d 6)が報告されている。臨床現場において、鶏卵特異的IgEの数値結果と臨床症状とが合わないことがしばしば遭遇する。
- 鶏卵アレルギー患者血清を用いて、新規アレルゲンタンパク質の探索・同定を目的とする。

年齢別原因食物

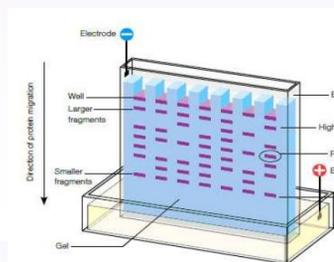
年齢群	0歳	1歳	2,3歳	4~6歳	7~19歳	20歳以上	合計
症例数	1270	699	594	454	499	366	3882
第1位	鶏卵 62.1%	鶏卵 44.6%	鶏卵 30.1%	鶏卵 23.3%	甲殻類 16.0%	甲殻類 18.0%	鶏卵 38.3%
第2位	牛乳 20.1%	牛乳 15.9%	牛乳 19.7%	牛乳 18.5%	鶏卵 15.2%	小麦 14.8%	牛乳 15.9%
第3位	小麦 7.1%	小麦 7.0%	小麦 7.7%	甲殻類 9.0%	そば 10.8%	果物類 12.8%	小麦 8.0%
第4位		魚卵 6.7%	ピーナッツ 5.2%	果物類 8.8%	小麦 9.6%	魚類 11.2%	甲殻類 6.2%
第5位			甲殻類 5.1%	ピーナッツ 6.2%	果物類 9.0%	そば 7.1%	果物類 6.0%
第6位				そば 5.9%	牛乳 8.2%	鶏卵 6.6%	そば 4.6%
第7位				小麦 5.3%	魚類 7.4%		魚類 4.4%

各年齢群において5%以上占めるものを記載している。

(食物アレルギーの診療の手引き2014より引用)

<研究の流れ>

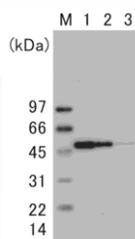
卵白・卵黄
タンパク質抽出



SDS-PAGE



LC-MS/MS

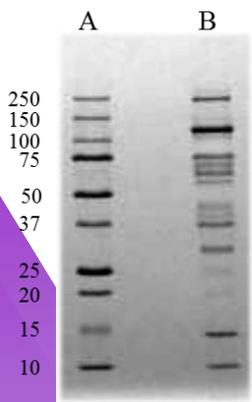


ウェスタンブロット法

アレルゲンコンポーネント
同定

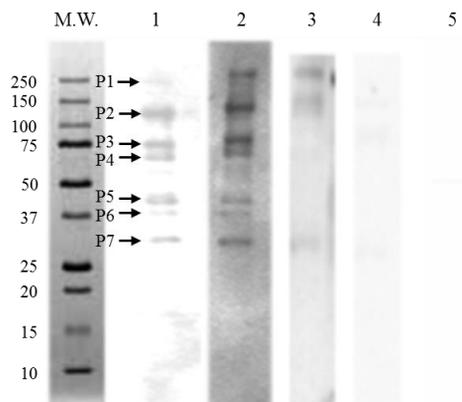
アレルゲンコンポーネント
探索

鶏卵卵黄タンパク質抽出液のSDS-PAGE像



SDS-PAGE (4-20%) profile of the crude egg yolk extracts under reducing and denaturing conditions.
Lane 1: Molecular weight marker in kDa.
Lane 2: Crude egg yolk extract.
The proteins were stained with CBB.

鶏卵卵黄アレルゲンコンポーネントの探索



Western blotting conducted using patients' sera against crude egg yolk extracts.
Lane 1-3: Western blotting of crude egg yolk extracts with sera of individual egg allergic patients 1-3.
Lane 4-5: Western blotting of crude egg yolk extracts with sera of individual sesame allergic patients 1-2.
M.W.: Molecular weight marker in kDa.

同定結果

Protein band No.	Approximate M.W. on SDS-PAGE (kDa)	Database accession No.	Identity	M.W	Score	Sequence coverage (%)
P1	250	P02845	Vitellogenin II	204808	950	18
P2	127	P02845	Vitellogenin II	204808	1030	21
P3	75	F1NV02	Apolipoprotein B	523357	1611	20
P4	63	P19121	Chicken serum albumin (α -livetin)	69918	1764	46
P5	44	P87498	Vitellogenin I (YGP42)	210498	2795	14
P6	37	P02845	Vitellogenin I	210498	4262	12
P7	30	P02845	Vitellogenin II	204808	13083	12

鶏卵卵黄アレルギー患者におけるYGP40の反応性

Patient No.	Age (years)	Sex	YGP40 reaction	Patient No.	Age (years)	Sex	YGP40 reaction
E1	6	male	+	E28	4	male	-
E2	2	male	+	E29	1	female	+
E3	1	male	+	E30	8	female	-
E4	6	male	-	E31	10	female	+
E5	4	male	-	E32	8	male	+
E6	4	male	+	E33	12	male	-
E7	4	male	+	E34	3	male	-
E8	2	female	-	E35	7	female	-
E9	2	male	-	E36	3	male	+
E10	5	male	-	E37	4	male	-
E11	9	female	+	E38	7	male	-
E12	5	female	-	E39	3	female	+
E13	11	female	+	E40	4	male	-
E14	2	female	-	E41	4	male	-
E15	11	male	-	E42	5	male	+
E16	6	female	+	E43	5	male	-
E17	6	male	-	E44	2	female	-
E18	2	male	+	E45	3	male	+
E19	11	male	+	E46	12	female	+
E20	9	male	-	E47	6	male	-
E21	9	male	+	E48	12	male	-
E22	8	male	+	E49	8	male	-
E23	12	male	-	E50	9	female	+
E24	6	female	-	E51	7	female	-
E25	12	male	+	E52	8	male	-
E26	4	female	-	E53	8	female	-
E27	3	female	-	S1	8	male	-
				S2	8	female	-

E: Hen's egg yolk allergy.
S: Sesame allergy

Vitellogenin II

Signal peptide	1 - 15	15	Potential
Chain	16 - 1850	1835	Vitellogenin-2
Chain	16 - 1111	1096	Lipovitellin-1
Chain	1112 - 1328	217	Phosvitin
Chain	1329 - 1566	238	Lipovitellin-2
Chain	1567 - 1850	284	YGP40

UniProtKBより

<今後の予定>

- YGP40のエピトープ部位解析
- YGP40の機能解析
- ELISAを構築する

Foods - Egg & fowl				
Product		Code	Size	Art. No. Barcode
Chicken	Gallus spp.	183	16	14-4185-01 428
Egg		1245	10	14-4828-01 825
Egg white		71	16	14-4111-01 381
Egg yolk		775	16	14-4184-01 427
Turkey meat	Meleagris gallopavo	1284	10	14-4818-01 817
Allergen components				
nGal d 1 Ovomucoid, Egg		1233	10	14-4805-01 604
nGal d 2 Ovalbumin, Egg		1232	10	14-4804-01 603
nGal d 3 Conalbumin, Egg		1323	10	14-5222-01 C18