

ペプチドアレイを用いた 食物アレルギー高精度診断法の開発

研究開発の概要

アレルギー疾患は近年増加の一途をたどり、食物アレルギーでは乳児の10%に達する。アレルギー疾患では、原因となる抗原からの回避が症状の緩和や治療において基本となるが、現行のタンパク質レベルでの抗原特異的抗体 (IgE) 検査は偽陽性が多く、回避すべき抗原の判断が難しい。

花粉や食品由来のタンパク質などによる即時型のアレルギー反応は、アレルゲンが肥満細胞や好塩基球などに結合したアレルゲン特異的IgE抗体を架橋することで反応がはじまる。次に、活性化されたこれらの細胞が迅速に様々な化学伝達物質を産生することで、周辺組織のアレルギー炎症が誘導される。脱顆粒が起こるためには、少なくとも2か所以上のIgE結合サイトが単一のアレルゲンに存在することが必要である。したがって、アレルギー反応を惹起する上で有効な生体内の抗体エピトープをペプチドアレイにより解析することで、アレルギー症状に関連する抗体を特定することが可能となり、偽陽性に対する問題点を解消できると考えられる。

本研究では、ペプチドアレイを用いたアレルギー疾患の病態モニタリングシステムの開発を目標とする。抗原タンパク質のアミノ酸配列を網羅的に配置したペプチドアレイを作製することにより、抗原内のどこに抗体が結合するかを解析する抗体認識部位 (エピトープ) 解析デバイスを構築し、少量の血液による正診率の高い検査法を開発する。患者の血清又は血漿を用いて、IgE抗体エピトープを解析した。

新規性・独創性

ペプチドアレイを用いた抗体エピトープ解析デバイスを構築し、食物アレルギーの臨床検体の解析を行う点。患者の生体内で産生される抗体の認識部位は個々人で異なり、加齢とともに症状も変化することから、アレルギー症状との関連性を明らかにすることで、治療指標を提供する。

応用

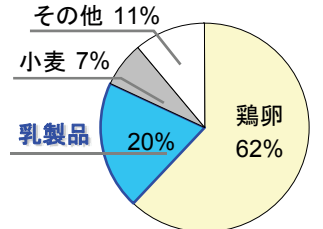
アレルギー疾患、自己免疫疾患など。その他、抗体エピトープの探索だけでなくペプチドとの結合性を調べることが有用な対象に適用できる。

企業への期待

自動解析システムの作製、適用例の拡大など。

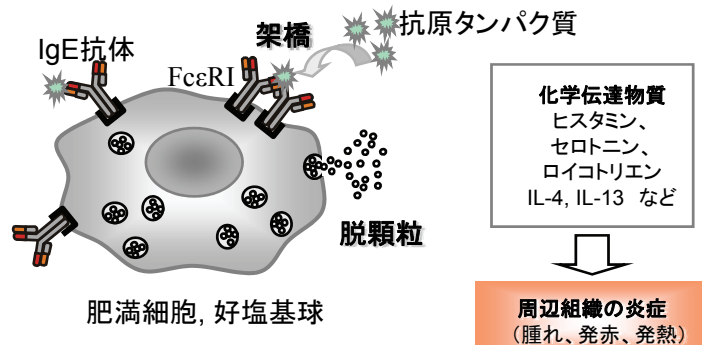
食物アレルギーの現状

- 乳児の有病率は10%、全体で1-2%程度。
- 乳児では原因食物が鶏卵、乳製品、小麦で約90%を占める。
- 成長とともに、その80%は自然治癒する。



(n=3882)
平成14、17年度厚生労働科学白書より

即時型アレルギーの反応機構



ペプチドアレイの作製

化学合成によるペプチドライブラリーの作製

タンパク質のアミノ酸配列



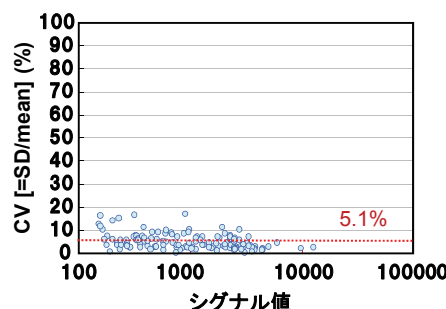
スポットティングアレイの顕微鏡写真

ペプチド1
ペプチド2
ペプチド3
...

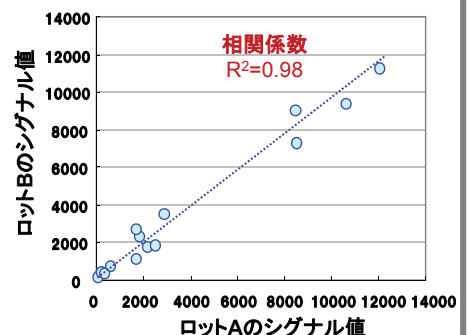
ピエゾ素子を用いた微小液滴下法による高集密ガラスアレイ作製

ペプチドアレイを用いた解析の安定性 ~アレルギー検体解析~

各ペプチドにおける変動係数



アレイ製造ロット間のデータ相関



製造ロットの異なるアレイに対し、同一患者血清で解析し、シグナル値を比較した。

ペプチドアレイを用いた 食物アレルギー高精度診断法の開発

研究開発の概要

先進国を中心に、食物アレルギーの患者数が増加している。現行のタンパク質レベルでの抗原特異的IgE抗体検査は偽陽性が多く、抗原の特定が難しい。確定診断法としては、実際にアレルギーの原因となる食物を投与する負荷試験が行われているが、アナフィラキシーショックに至る危険があり、安易には実施できない。そこで、ペプチドアレイを用い、患者血清中に含まれる特異的IgE抗体のエピトープ解析に基づいたアレルギー検査法の確立を目指した。また、アレルギー反応には、アレルゲン特異的IgEだけでなく、IgGも関連することが知られている。特に、免疫療法では特異的IgG4抗体値の上昇がみられることが明らかとなっている。

そこで、牛乳の主要抗原となるタンパク質6種のアミノ酸配列を網羅的に配置したペプチドアレイを作製した。合成ペプチドは、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、 α S1-カゼイン、 α S2-カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインのアミノ酸配列に基づき、16残基ペプチドを固相合成後、精製したものをを用いた。各ペプチドをピエゾ素子微小液滴吐出法により、DNAマイクロアレイスポットティング用の実機を使い、アレイ状に固定化した。このアレイに患者血清を反応させ、蛍光標識抗IgE抗体、及び抗IgG4抗体により同時検出した。

愛知県内の病院を受診した患者を解析した結果、陽性検体に多く結合するが陰性検体には結合がみられないペプチドが複数見出された。また、陽性患者と陰性患者の結合パターンを識別でき、正診率84%で解析できた。また、アレルギー反応には、アレルゲン特異的IgEだけでなくIgGも関連することが知られている。

新規性・独創性

ペプチドアレイを用いた抗体エピトープ解析デバイスを構築し、食物アレルギーの臨床検体の解析を行う点。患者の生体内で産生される抗体の認識部位は個々人で異なり、加齢とともに症状も変化することから、アレルギー症状との関連性を明らかにすることで、治療指標を提供する。

応用

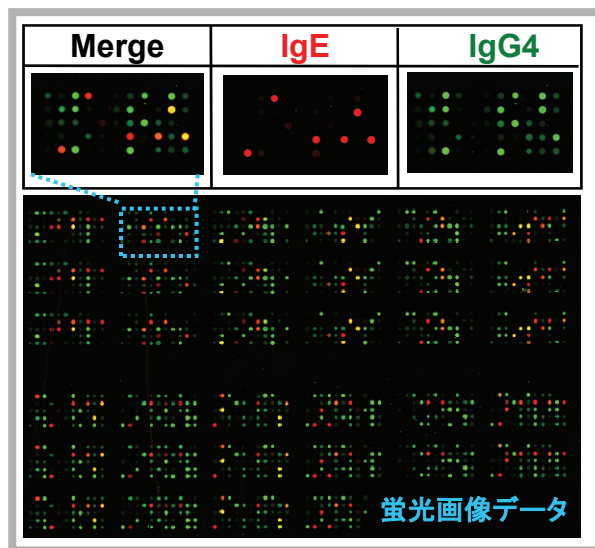
アレルゲン部位の特定によるアレルギー病態の把握。

企業への期待

自動解析システムの作製、適用例の拡大など。

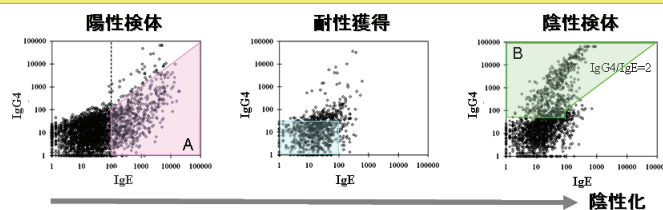
ペプチドアレイ

～DNAアレイとタンパク質アレイをつなぐ大量解析可能なツール～



ミルクアレルギー患者血清中のIgEおよびIgG4抗体の認識部位の同時検出を行った。

各患者群のIgE, IgG4結合パターン¹⁾



陰性化の過程 ... 患者1人の時系列データ

年齢	アレルギー状態	Milk CAP IgE (U _A /ml)	ペプチドスポット数	
			領域A	領域B
3ヶ月	陽性	10.8	25	5
5ヶ月	"	5.28	18	1
9ヶ月	"	3.49	13	0
1歳6ヶ月	耐性獲得	0.71	2	9

1. Peptides, 30, 1840-1847 (2009)

IgEおよびIgG4シグナル強度を比較した結果、陽性検体群ではIgE高結合スポットが多く、陰性群ではIgE結合量は弱まり、IgG4高結合スポット数が多くなった。患者の時系列データを解析したところ、アレルギー陰性化の過程でIgE、IgG4結合パターンが変化することが示唆された。