

研究ノート

落花生主要アレルゲンタンパク質のマウスにおける抗原性

八巻 幸二\*, 高橋 陽子

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門  
〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

**Allergenicity of major allergenic peanut proteins on Balb/c mice**

Kohji Yamaki\* and Yoko Takahashi

Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,  
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

**Abstract**

Using the simple purification method of the peanut antigenic proteins which we have developed before, we purified three kinds of allergenic protein from a peanut species and investigated the antigenicity against each protein and cross reactivity with the Balb/c mouse by alum immunization. Ara h1, Ara h2 and Ara h3, which was three kinds of major allergen, were injected in the abdominal cavity of the mouse with aluminum hydroxide gel for immunization. Two weeks later, blood was collected by cardiac puncture, the serum was measured antibody titer by enzyme linked immunosorbent assay. As a result, Ara h1 and h3 antibodies were increased more than Ara h2 antibody in IgG1 and IgG2a subclasses. It is reported that this Ara h2 shows a serious allergic symptom with the allergen of the peanut in human. However, there are increased antibody titer on h1 and h3 in this experiments with using the alum adjuvant. and it seems that it is important for the immunity model of the mouse to establish mouse allergic model of peanut allergens. In addition, it is suggested that the possibility of different antigenicity from human allergy disease to mouse allergic model.

Key words: peanut allergen, Ara h1, Ara h2, Ara h3, antibody titer

食品アレルギー特に落花生のアレルギーは、欧米では多数観察され社会問題となっている<sup>1)</sup>。特に幼児において罹患率が高く、重篤な場合アナフィラキシーショックを誘発し、命の危険性もあり得る病態である。

そのためこれまで様々な免疫療法が試みられてきている<sup>2-4)</sup>。日本においても、近年食の欧米化が進み増加傾向が確認される。食品成分表示でもアレルギー表示が義務づけられている。アレルゲンタンパク質である

---

\* 連絡先 (Corresponding author), [kyamaki@affrc.go.jp](mailto:kyamaki@affrc.go.jp)

Ara h は現在 1 から 11 まで番号が付けられ報告されている<sup>5)</sup>。主要なアレルゲンとして h1, h2, h3 が重要と考えられており, h1 は分子量 64kDa の 7S グロブリンの貯蔵タンパク質である。アレルギー患者の 90% 以上で抗体を確認されており, 最初に発見されたものである。h2 は分子量 16.7-18kDa で 2S アルブミン型のタンパク質で, アレルギー患者の 90% 以上で確認されている。また h3 は分子量 60kDa の 11S グロブリンのタンパク質でアレルギー患者の 50% に抗体が確認される。特に h2 はアレルギーの重篤性に関与していると考えられている<sup>6)</sup>。我々は, 以前にこの主要な落花生のアレルゲンタンパク質 Ara h1, h2, h3 の簡易精製法を開発した<sup>7)</sup>。この方法は硫酸分画と限外濾過法を組合せて, 効率良く精製できる方法である。これまで, 個々の Ara h の機能に関しても研究が行われているが, それらは, h1 と h2 のアレルゲンとなる強さとしての抗原性の差違の報告が主体であり<sup>8)</sup>, その免疫することによって抗体ができる免疫原性の報告はほとんどない。すなわち免疫モデル作成に関する報告がほとんどない。そこで精製した Ara h1, Ara h2, Ara h3 を用いて, 免疫実験を行い, 抗体価を測定し比較試験を行った。

## 実験材料および方法

### 1. 使用した抗原タンパク質

アレルゲンタンパク質を精製するために, 市販の生落花生を用いた。抗原の精製法は以前に開発した簡易精製法<sup>7)</sup>を用いて行った。概略すると, 外皮と薄皮を除いた落花生をグラインダーで粉碎し, エーテル脱脂を行って, 粗精製タンパク質を得た。リン酸バッファーに溶解させた抗原液を硫酸アンモニウムで塩析を行い, 各分画から限外濾過ユニットを使用して, Ara h1, h2, h3 の各分画を精製した。また抗体価測定のため, マウスの免疫グロブリン測定キット, IgG1, IgG2a, IgE (Bethyl 社, TX, USA) を用いた。

### 2. 動物および飼育

Balb/c 雄性マウス (日本チャールズリバー社, 横浜) を 5 週齢で購入し 1 週間予備飼育後, 免疫実験に用いた。飼育は室温 24-25℃, 湿度 40-60%, 8:00-20:00 昼の環境下で行った。また動物実験は農研機構規則で定められた飼育環境と食品研究部門細則に従って, 食品研究部門動物実験委員会の承認の下に行われた。

### 3. 免疫実験

予備飼育後, 精製した Ara h1, h2, h3 を生理食塩水に溶解し, 水酸化アルミニウム (2 mg/mL) と等量混合し, 抗原量 1.0 mg/mL の液をマウスの腹腔内に 0.1 mL 投与して初回免疫とした。一週間後, 同量の抗原液を再度投与した。この 1 週間後に心臓採血により血液を採取した。採取した血液は, 凝固させた後, 10000 rpm, 10 min, 15℃ で遠心分離後, 血清を採取した。採取した血清は, 免疫グロブリンの測定キットで IgG1, IgG2a, IgE のサブクラスごと EIA キットで抗体価を測定した。IgG1 と IgG2a は希釈度対吸光度曲線を作成して, 最大吸光度の 50% となる希釈度を力価として表現した。すなわち血清を 4 段階に希釈し, 2 次抗体と反応させ, 基質添加し発色させる。希釈度-吸光度曲線を作成し最大吸光度の半分の値を示す希釈度を求め, その希釈度を, 2 を底とする対数として求めてその力価とする (図 1)。IgE の場合, 力価が小さいため一定量の血清を使用した時の吸光度を抗体価として用いた。

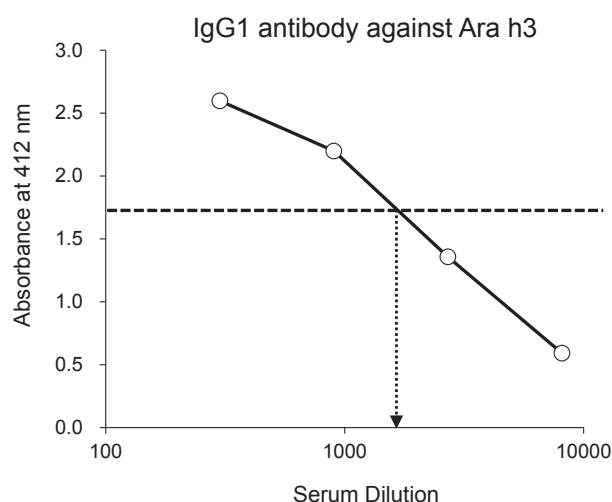


図 1. 抗体価計算方法

血清を 4 段階に希釈し, 96 穴プレート上に求める抗原 (h1, h2, h3) を一定量コーティングして, 希釈血清サンプルを添加する。次に 2 次抗体すなわち求める免疫グロブリンのクラスに対する抗体を反応させ, 基質を添加して発色させる。希釈度に対して吸光度をプロットして, 希釈度-吸光度曲線を作成する。最大希釈度とバックグラウンドの吸光度の平均値を 50% の値として, この値を示す希釈度を求め, その希釈度を, 2 を底とする対数として求めてその試料の力価とする。

## 実験結果および考察

### 1. IgG1 の抗体価

予備的な実験で, IgG2b, IgG2c, IgG3 も行ったが, これらの抗体は微量なタイプであるためほとんど検出できなかった. そのため, IgG1, IgG2a, IgE の3つのサブタイプに絞って測定した. IgG1 の抗体価を測定した結果を図2に示した.

サブクラス IgG1 では, h1 と h2 免疫の場合, 抗体の力価は 14 程度あり, 最も多く産生された. また h1 で免疫した場合同時に h3 の力価も上昇し, 10 程度の値が測定された. それに対して, h3 で免疫した場合, h3 の力価のみが強く観察され, h1 の力価は上昇しなかった. このことは, 抗原 h3 がその特異性が高く, 交差反応性が少ない性質を有する可能性が示唆された. また, h2 の場合力価も低く抗体が産生されない場合も観察され, 抗原として作用の弱いタンパク質である可能性がある.

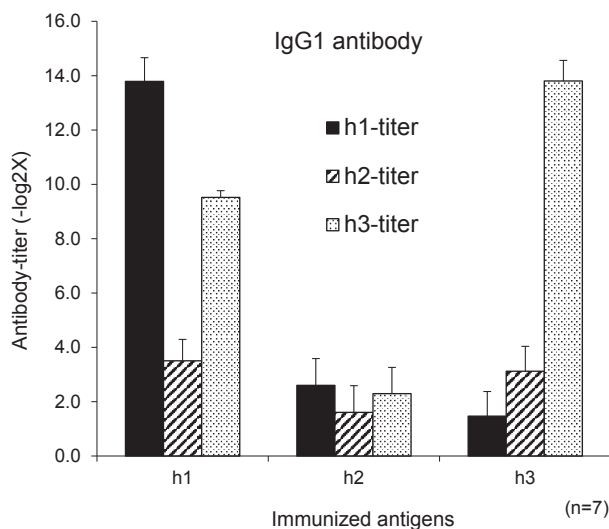


図2 IgG1 サブクラスの各種抗体価

Balb/c マウスは Ara h1, h2, h3 で腹腔内注射により免疫された. ブースター処置後, 2 週間後に血液を採血し, その血清をマウス IgG1 抗体測定キットで抗体価を測定した. 抗体価は希釈度と吸光度曲線から, 吸光度の半分となる希釈度から力価として求めた.

### 2. IgG2a サブクラスの抗体価

IgG2a サブクラスの抗体価を測定した結果を図3に示した. IgG2a サブクラスの抗体価の場合, h1 と h3 での産生が大きかったが, 力価では IgG1 と比較して 8 前後であり, 低いものであった. しかし, IgG1 の場合とは逆に h3 での交差性が認められ, すなわち h1 で免疫しても h3 の抗体の産生は認められず, h3 で免疫すると h1 の抗体価が産生された. また h2 で免疫した場合, 力価は弱いほとんど交差性はなく, h2 の抗体のみの産生が確認された. 以上の結果から IgG2a サブクラス抗体は, その特異性が高い性質の抗体をつくることが示唆された.

### 3. IgE クラスの抗体価

IgE クラスの抗体は, 産生量は少ないが食物アレルギーではその病態に関与していることは明らかになっているため, 測定する必要がある. そこで, 希釈による吸光度曲線を作成するほど抗体価が強くないため, IgG タイプでの測定の様に抗体力価を測定できないので, 一定の血清量での吸光度で表した. その結果を

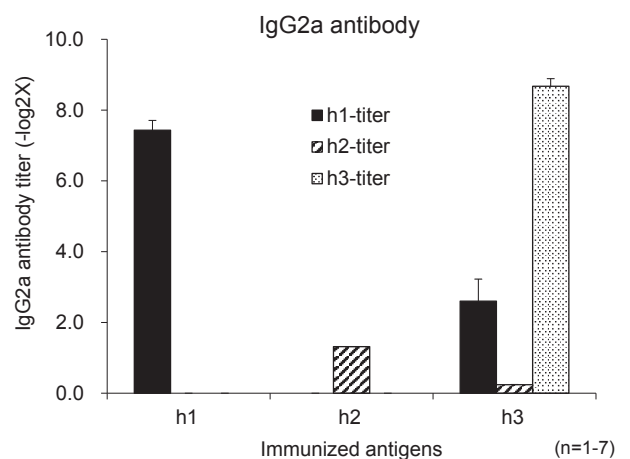


図3 IgG2a サブクラスの各種抗体価

Balb/c マウスは Ara h1, h2, h3 で腹腔内注射により免疫され, 2 週間後にその血清をマウス IgG2a 抗体測定キットで抗体価を測定した. IgG1 と同様に抗体価は希釈度と吸光度曲線から, 吸光度の半分となる希釈度から力価として求めた. IgG2a では, 一部の抗体価で測定不能の部分があったので, その箇所はグラフを省略している.

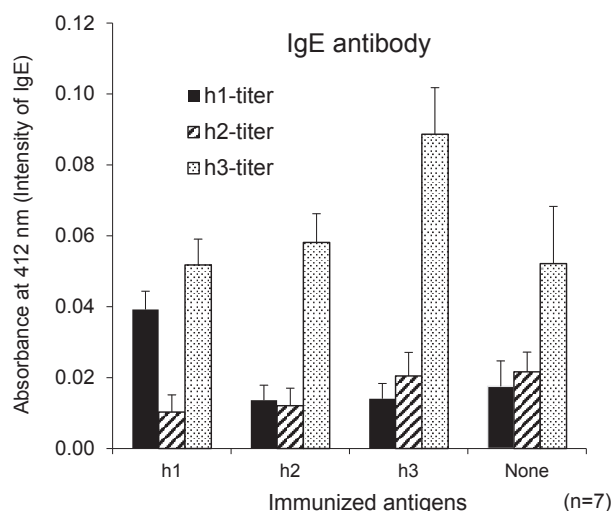


図4 IgEクラスの各種抗体価

Balb/c マウスは Ara h1, h2, h3 で腹腔内注射により免疫され、2週間後にその血清をマウス IgE 抗体測定キットで抗体価を測定した。E 抗体の場合、力価が小さいため、通常の測定が不可能であり、一定濃度に反応した吸光度を力価として求めた。

図4に示した。その結果、h3免疫の抗体強度が最も高く現れた。h1での免疫では抗体産生は他のアレルゲンと比較し明らかに成立しているが、その強度は強くはなかった。h3に対するIgE抗体は他のアレルゲン血清や無免疫血清でも出現する可能性が示唆され、このことは自然に誘発される抗体との関連性が示唆される。

## まとめ

落花生アレルゲンで免疫すると産生される抗体のクラスは、IgG1>IgG2a>IgEの順であり、その他のクラスは微量であった。アレルゲンタンパク質では、h3の抗体産生誘導が強く、その特異性も高いと考えられる。その次にh1であるが、このh1は交差性をもっているため、h3の抗体価を上昇させる可能性がある。h1とh3のアミノ酸相同性は計算値で15.7%であり、3つ連続したアミノ酸配列は1箇所しかなく、その他は2つの連続のみである。このように同じエピトープはないと考えられることより、この交差抗体価の上昇は他の要因があると推定される。またヒトにおいて、重篤な病態を示すアレルゲンとして、h2が注目されている<sup>6)</sup>が、通常の免疫操作で抗体価の産生が他のアレルゲンと比較し誘導されなかったことから、重篤なアレルギを誘発するには、他の要因、例えば感作条件や遺

伝的背景などが重要な役割をする可能性があるとし唆された。Brown Norway ラットで、腹腔内と経口によるアレルギーモデルの報告では、h1とh3のIgG2aサブクラスの抗体価が、h2のそれより高いという報告があり<sup>9)</sup>、この結果と類似している。コレラ毒素アジュバントとして、Balb/c マウスで経口感作モデルを作成した報告<sup>10)</sup>では、同様のIgG1, IgG2a, IgEの抗体価の上昇が確認されていることより、経口感作モデルにも、一部類似している。また簡単なアレルギーモデルとして落花生のh3タンパク質を使って、モデル化することが可能であるが、ヒトの重篤アレルギーモデルとしては異なるものであると考えられる。h2タンパク質を使って、アジュバントを工夫することによって、マウスでもヒトの重篤アレルギーモデルを作成する可能性が示唆された。アジュバントとしての他の食品等の組合せや遺伝背景を考慮した遺伝子操作マウスの活用など、ヒトで想定される経口感作によるアレルギーの発症に近い形態を想定してモデル作成することが可能となる。また抗原の違いで産生される抗体クラスが異なることが明らかになり、この結果をモデルに応用して、メカニズム解析することも可能性である。

## 要約

新規に開発した落花生抗原タンパク質の簡易精製法を用いて、落花生から3種のアレルゲンタンパク質を精製し、Balb/c マウスでの抗原性を検討した。3種の主要アレルゲンであるAra h1, Ara h2, Ara h3を水酸化アルミニウムゲルと共にマウスの腹腔内に投与して免疫した。2週間後、心臓採血により血液を採取して血清を得、酵素免疫測定法で抗体価を測定した。その結果Ara h1とAra h3での抗体価産生が多く、Ara h2では産生がほとんど検出されなかった。ヒトにおいて落花生のアレルゲンでは、このAra h2が重篤な症状を示すと報告されているが、マウスでの水酸化アルミニウムアジュバント免疫でh1とh3に対する抗体が多く産生され、マウスの免疫モデルではh1とh3が重要であると思われる。またヒトとマウスで抗原性が異なる可能性が示唆され、今後モデル実験ではこのことに注意する必要がある。

## 謝辞

試料提供、精製等でご援助頂いたソントンホールディングス(株)増山啓吾氏に深謝いたします。

## 参考文献

- 1 ) Husain, Z. and Schwartz, R.A. (2012). Peanut allergy: an increasingly common life-threatening disorder. *J. Am. Acad. Dermatol.* **66**, 136-143.
- 2 ) White, B.L., Shi, X., Burk, C.M., Kulis, M., Burks, A.W., Sanders, T.H., and Davis, J.P. (2014). Strategies to mitigate peanut allergy: production, processing, utilization, and immunotherapy considerations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **5**, 155-176.
- 3 ) Lee, T.H., Chan, J., Lau, V.W., Lee, W.L., Lau, P.C., and Lo, M.H. (2014). Immunotherapy for peanut allergy. *Hong Kong Med. J.* **20**, 325-330.
- 4 ) Greenhawt, M. (2015). The Learning Early About Peanut Allergy Study: The Benefits of Early Peanut Introduction, and a New Horizon in Fighting the Food Allergy Epidemic. *Pediatr. Clin. North Am.* **62**, 1509-1521.
- 5 ) Sáiz, J., Montealegre, C., Marina, M.L., and García-Ruiz, C. (2013). Peanut allergens: an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **53**, 722-737.
- 6 ) Koppelman, S.J., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A.C., and Knol, E.F. (2004). Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin. Exp. Allergy*, **34**, 583-590.
- 7 ) Masuyama, K., Yamamoto, K., Ito, K., Kitagawa, E., and Yamaki, K. (2014). Simplified Methods for Purification of Peanut Allergenic Proteins: Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3. *Food Sci. Tech. Res.*, **20**, 875-881.
- 8 ) de Jong, E.C., Van Zijverden, M., Spanhaak, S., Koppelman, S.J., Pellegrom, H., and Penninks, A.H. (1998). Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin. Exp. Allergy*. **28**, 743-751.
- 9 ) de Jonge, J.D., Knippels, L.M., Ezendam, J., Odink, J., Penninks, A.H., and van Loveren, H. (2007). The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats. *Methods*. **41**, 99-111.
- 10 ) Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Créminon, C., and Wal, J.M. (2005). Peanut- and cow' s milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, **60**, 658-664.