

ゼラチンによるアレルギー反応のエピトープ解析と安全なゼラチンの開発

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 成人疾患研究部門 分子病態分野

堀 久 枝

Anaphylactic reactions to measles, mumps and rubella vaccines and the combined measles-mumps-rubella (MMR) vaccines have been suggested to be caused by allergy containing bovine gelatin in the vaccines as a stabilizer. Since gelatin can be derived from collagen molecules present in all multicellular animals, it has long been believed to be nonimmunogenic and thought to be weakly allergic in human. Therefore, gelatin has been widely used as a stabilizer in vaccines. The present study was designed to investigate the reactivity of IgE in bovine gelatin-sensitive children to gelatins from various animals by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The IgE in the children reacted to mammalian gelatins including kangaroo and mouse gelatins, to which they had little or no exposure as a food or a vaccine stabilizer. Most of the children who displayed sensitivity may be due primarily to the antigenic cross-reactivity between mammalian gelatins.

Gelatin, obtained from bone and skin, consists mainly of denatured type I collagen, which is composed of two $\alpha 1$ and one $\alpha 2$ chains. Furthermore, the study was designed to elucidate the IgE reactivity to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen in gelatin-sensitive children. Purified $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen were obtained by separation of column chromatography. All serum samples which were reacted with bovine type I collagen showed positive reaction to $\alpha 2$ chain. In our previous study, we reported that homology (98%) between $\alpha 1$ chains of human and bovine type I collagen is higher than homology (93%) between $\alpha 2$ chains of them. These homology data might suggest that the $\alpha 2$ chain has higher allergenicity than the $\alpha 1$ chain. To analyze IgE-binding sites of $\alpha 2$ chain, recombinant proteins covering 100 kDa collagenous domain of $\alpha 2$ chain were expressed by pRSET vector. One of five recombinant proteins located in central portion of collagenous domain showed strong reactivity for patients sera. To further determine epitope, several small recombinant proteins covering the central collagenous domain were prepared. The 4 kDa recombinant protein spanning from ⁴⁶¹Pro to ⁵⁰⁰Glu was shown cross-reactivity to patients sera but the protein from ⁴³¹Ala to ⁴⁷⁵Gly was not shown. Taken together these data, a major epitope in the $\alpha 2$ chain of bovine type I collagen was suggested to locate in 25 amino acid residues with ⁴⁷⁵Gly to ⁵⁰⁰Glu.

In the future, our analyzed data of IgE-binding epitope in the $\alpha 2$ chain of bovine type I collagen may become tool for developing a gelatin which has no or low allergenicity to humans

1. 緒 言

近年小児において麻疹、ムンプス、風疹ワクチン接種後、副反応としてアナフィラキシーを起こす例があり、卵成分がアレルギーの原因と考えられてきた。これまでこのアナフィラキシーの原因アレルゲンがワクチン添加物として含まれるゼラチンであることを明かにしてきた^{1,2)}。このゼラチンはコラーゲンの変性物であり、主にウシコラーゲンがその由来となっている。コラーゲンは現在ワクチンの添加剤みならず、他の薬剤の安定化剤および止血用膜などの医薬品、美容形成用剤および化粧品、またゼリーとしての食料品など、生活密着した用途に広がっている。一方コラーゲンは人体の全タンパク量の1/3を占め、特徴的な(Gly-Pro-X)の繰り返し配列をしており、3本の α 鎖が3重ヘリックスを構成している。これらの構造は動物種を

こえて広く保存されていることから、これまで、コラーゲンの免疫原性は非常に低いと考えられてきた。しかしワクチン添加剤中のウシゼラチンがアレルギー原因物質であることが明らかとなったことから、本研究はウシコラーゲンに代わる種特異性の低いコラーゲンの開発を目的とし、種々の動物由来コラーゲンとの反応性を検討した。さらにI型コラーゲンの抗原性の検索を行うため、構成鎖 $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖を単離精製し、また $\alpha 2$ 鎖をカバーする組み換えタンパクを作成し、抗原部位の局在を明らかにした。ゼラチンは優れた安定性と安価で多量供給できることから、さらに需要は拡大するものと推測される。今後安全なゼラチンを開発するために、エピトープ分解除去の方法の確立を予定している。

2. 実 験

2.1 試 料

安定剤としてゼラチンを含んでいるワクチン接種後、アナフィラキシーを含む即時型アレルギー反応を惹起した小児15例から得られた血清およびゼラチン含有の菓子(グミ)を食べた後即時型アレルギー反応を惹起した小児1例から得られた血清。



Epitope analysis of gelatin allergy and development of low-allergic gelatin

Hisae Hori

Department of Molecular Pathogenesis, Division of Adult Diseases, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

2.2 ウシ I 型コラーゲンおよび各種動物由来コラーゲンの作成

I 型コラーゲンはウシ皮膚真皮層を細切後 0.5M 酢酸で抽出し、食塩沈殿法にて精製した。各種動物由来コラーゲンも同様に皮膚組織から 0.5M 酢酸またはペプシン消化で抽出後上記と同様に単離精製した³⁾。

2.3 ウシ I 型 $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖の調製

ウシ皮膚よりペプシン消化で可溶化し、食塩分別法で精製した I 型コラーゲンから、Piez らの CM (カルボキシメチル) クロマトグラフィー分離法にて各鎖を単離した⁴⁾。 $\alpha 2$ 鎖はさらにアミノ酸特異的な分解 (CNBr によるメチオニンの分解、リジルエンドペプチダーゼ) を行い、抗原性の変化を検討した。

2.4 ウシ I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の組み換えタンパクの作製

アレルギー患者血清中のエピトープを系統的に分析するためにウシ I 型 $\alpha 2$ 鎖 cDNA⁵⁾ より、Fig. 3 に示した数種の組み換えタンパクに対応する cDNA フラグメント (200 アミノ酸残基) を作製した。バクテリア発現ベクター (pRSET、His-Tag) に組み込み、融合タンパクを作製し、ニッケル吸着カラムで精製した。

2.5 ゼラチン特異的 IgE 抗体との反応

上記ウシおよび各種動物由来コラーゲン、ウシ $\alpha 2$ 鎖、組み換えタンパクに対する IgE 抗体の測定はマイクロプレートに抗原 (10 μ g/mL) をコートし、アレルギー患者血清 (1:10 希釈) と蛍光 ELISA にて行った。

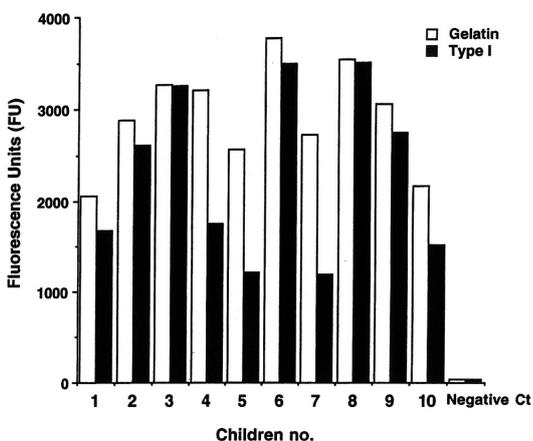


Fig.1 IgE reactivity to bovine gelatin and denatured type I collagen. Each child's serum was diluted to approximately 1 Ua/mL as level of specific IgE to gelatin.

3. 結果

3.1 ゼラチン中のアレルギー抗原の同定

ゼラチン特異的 IgE 抗体の測定は共同研究者阪口雅弘博士の開発した蛍光 ELISA を用い¹⁾、ワクチン接種後アナフィラキシーを起こした患者血清と熱変性コラーゲンをを用い反応性を調べた。

3.1.1 市販ゼラチンと精製コラーゲンに対する反応性の検討

ワクチンに添加されている市販ゼラチンのアレルギー性の有無を確認する目的で精製コラーゲンとの反応性を比較検討した。ウシ皮膚由来精製コラーゲンを加熱変性後 ELISA にて反応性を調べた。10 例の患者血清 IgE はワクチン含有のゼラチンと同様にウシ I 型コラーゲンに強い反応性を示した (Fig. 1)。

3.1.2 ゼラチンアレルギー反応の種特異性の検索

ゼラチンによるアレルギー性の種特異性について検索する目的で 6 種の哺乳動物、鳥類、両生類、魚類、頭足類などの皮膚よりコラーゲンを抽出精製し、上記と同様に各種動物コラーゲンを加熱変性後 ELISA にて反応性を調べた (Table 1)。ウシコラーゲンに対する反応性と比較するとブタ等の哺乳類由来のコラーゲンに幅広い交差反応性を認められたが、これまで摂取されたことの無いマウス、カンガルーのコラーゲンにも反応することから、ウシコラーゲンによるアレルギー反応は動物種を越えて共通の抗原決定基に由来することが推測された。一方、これまでに多く摂取されているニワトリのコラーゲンとは低い反応性を示し種特異性反応が認められた。またサカナコラーゲン単独で陽性

Table 1 Reactivity of anti-gelatin IgE to gelatin from various animals.

Gelatin	Child no.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bovine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Porcine	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	±	-
Kangaroo	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	±	-
Guinea-pig	+++	++	+++	++	++	+	±	-	++	+
Rat	+++	++	+++	++	+	±	±	±	±	-
Mouse	+++	+++	+++	++	+	±	±	±	-	-
Chick	±	+	-	-	-	-	±	-	+	-
Tadpole	+	±	-	-	+	±	±	-	±	±
Codfish	+++	+	-	-	+	±	±	-	±	-
Salmon	+++	±	±	-	-	+	±	-	+	-
Shark	±	±	-	±	-	-	-	-	+	-
Octopus	±	±	-	+	±	-	±	-	-	-
Ascaris	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-

The results are expressed as a percentage of the binding of IgE to each recombinant proteins compared with that to bovine type I collagen: , +++ \geq 75%, 75%>++ \geq 50%, 50%>+ \geq 25%, 25%>± \geq 5%, -<5%

を示す例も認められたが、その後の研究の結果、いわゆるサカナアレルギーの患者血清では類似のサカナコラーゲンと反応するもののウシゼラチンとは反応しないことが明らかとなった⁶⁾。

3.1.3 I型コラーゲン構成鎖のアレルゲン性について

コラーゲンは十数種の型が知られているが、抽出時に混入する可能性のあるII型コラーゲンからV型コラーゲンに対する反応性を調べたところ、I型コラーゲンに特異的であった。したがってこのアレルギー反応がII型からV型コラーゲンの混在による可能性は低いと考えられた。そこでI型コラーゲン構成鎖の $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖を単離精製し、それぞれの反応性を調べたところ、ヒトとのホモロジーが98%の $\alpha 1$ 鎖とは全く交差性は認められず、 $\alpha 2$ 鎖(ホモロジー93%)に特異的であることが明らかになった(Fig. 2)。エピトープはウシ $\alpha 2$ 鎖の特定部位に局在すると考えられ、さらに詳細な抗原部位を特定するために、組み換えタンパ

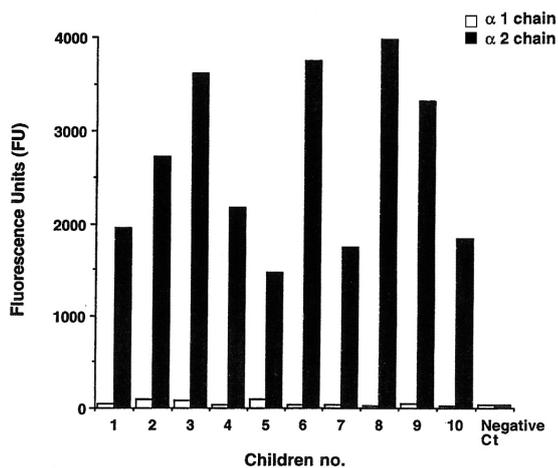


Fig.2 IgE reactivity to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen. Each child's serum was diluted to approximately 1 Ua/mL as level of specific IgE to gelatin.

クを作成し同定を行った。

3.2 ウシI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖組み換えタンパクによる抗原性部位の検出

ウシI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖のアミノ酸配列はこれまで部分配列の報告であったため、ウシ大動脈由来のcDNAライブラリーより全cDNAをクローニングし、全アミノ酸配列を明かにした⁵⁾。そのウシI型 $\alpha 2$ 鎖cDNAを鋳型として200アミノ酸配列に相当するcDNAフラグメントを作製し、発現ベクターに組み込み融合タンパクを作製した(Fig. 3)。

3.2.1 ウシ $\alpha 2$ 鎖をカバーする5個の組み換えタンパクとの反応性

$\alpha 2$ 鎖のヘリックス構造部位に相当する100kDa(約1000アミノ酸残基)に対応する5個の組み換えタンパク、I(1N Gln- 9N Pro/ 1 Gly- 224 Leu)、II(213 Asn- 417 Ala)、III(418 Gly- 662 Pro)、IV(663 Val- 880 Glu)、V(879 Val- 1014 Ser/ 1C Gly- 15C Ala)を用いて患者血清との反応性を検索した(Table 2)。患者血清16例中14例がIIIに、6例がIIに、3例がIV、1例がVに陽性反応を示し、抗原部位は複数あることが示唆されたが、主要なエピトープはヘリックス構造中央部III(418 Gly- 662 Pro)にあると判明した。

3.2.2 主要エピトープの局在部位の解明

さらに組み換えタンパクIII(418 Gly- 662 Pro)について3つの部位、III a(418 Gly- 510 Ala)、III b(491Leu-588Pro)、III c(572 Leu- 675 Ser)に対応するcDNAフラグメントを作成し、融合蛋白を発現、精製した。これら組み換えタンパクに対する反応性を調べたところ、III(418 Gly- 662 Pro)に陽性の14検体はすべてIII aに反応し、抗原部位は 418 Gly- 510 Alaの93残基に局在することが明らかになった(Fig. 4)。ただし1症例no.4においてIII bにも反応性

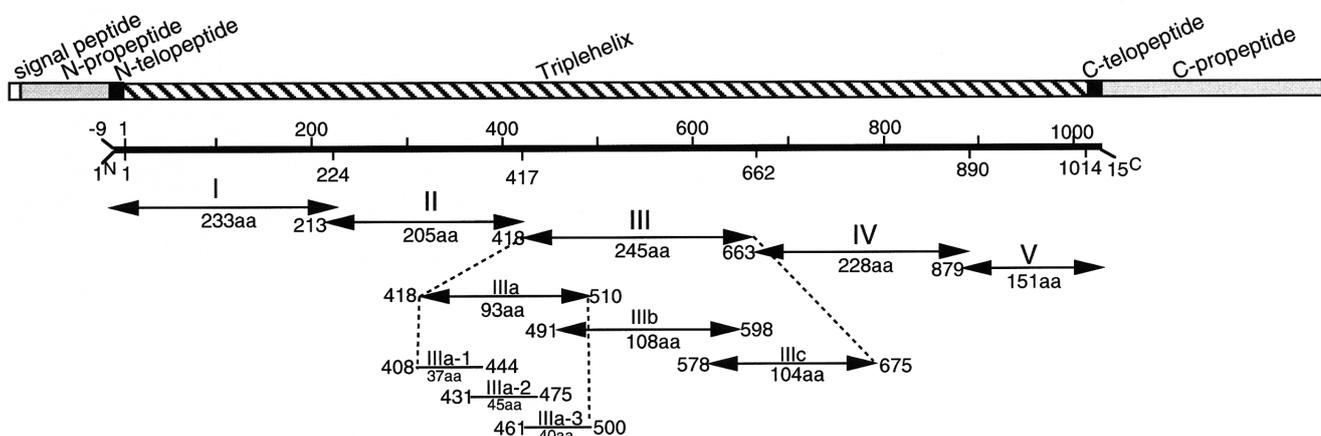


Fig.3 A schematic representation of the collagen $\alpha 2(I)$ chain and its recombinant proteins. Recombinant proteins I, II, III, IV, III a, III b, III c and III a-1 to a-3 are prepared from bacterial expression vector pRSET.

がみとめられた。さらにⅢ a 中の抗原の局在を検索するためにⅢ a-1 (⁴⁰⁸Lys - ⁴⁴⁴Gly)、Ⅲ a-2 (⁴³¹Ala - ⁴⁷⁵Gly) およびⅢ a-3 (⁴⁶¹Pro - ⁵⁰⁰Glu) を作成し、その反応性を調べたところ、Ⅲ a-3 に明らかな反応性が認められた (Fig. 5)。これらのタンパクを CNBr 分解、lysylendopeptidase 処理しても抗原性に変化は認められないことから、メチオニンおよびリジン残基は抗原部位に含まれないと推測された。

4. 考察

I 型コラーゲンは特徴的な (Gly-Pro-X) の繰り返し配列をしている分子量 100kDa の $\alpha 1$ 鎖 2 本と $\alpha 2$ 鎖 1 本が

三重ヘリックスを構成しており、コラーゲンに特異的なアミノ酸である Hydroxyproline, Hydroxylysine は、コラーゲンの高次構造の安定化に寄与している。これらの構造は動物種をこえて広く保存されており、ウシとヒトとの相同性は $\alpha 1$ 鎖で 98%、 $\alpha 2$ 鎖で 93% と高く、コラーゲンの免疫原性は非常に低いと考えられてきた。しかし、近年コラーゲンのヘリックス構造を認識し、種特異性を示すモノクローナル抗体のエピトープが明らかとなり、コラーゲンも免疫原性は高いことがわかった⁷⁾。今回ゼラチンアレルギーの抗原物質がウシ I 型コラーゲンであり哺乳動物のコラーゲンと共通の抗原性を保持していること、さらに I 型コラ

Table 2 Reactivity of anti-gelatin IgE to recombinant proteins for $\alpha 2$ chain of bovine type I collagen.

Child no.	Type I collagen (FU)	Recombinant proteins of $\alpha 2$ chain				
		I 1N-224	II 213-417	III 418-662	IV 663-890	V 879-15C
1	2600	-	-	+	++	-
2	1019	-	+++	++	-	-
3	2800	-	-	+++	-	±
4	1773	-	±	+++	-	±
5	868	-	±	+++	-	±
6	2116	-	-	+++	±	±
7	772	-	+++	±	+	+++
8	1494	-	-	+++	-	-
9	814	-	+	+	-	-
10	2179	-	++	-	-	-
11	834	-	-	+++	+	-
12	1947	-	-	+	±	-
13	1833	-	-	+++	-	-
14	1152	-	+	+	±	±
15	2455	-	±	+++	-	-
16	1820	-	+	+	+	±

The results are expressed as a percentage of the binding of IgE to each recombinant proteins compared with that to bovine type I collagen: +++ \geq 75%, ++ \geq 50%, + \geq 25%, ± \geq 5%, - <5%

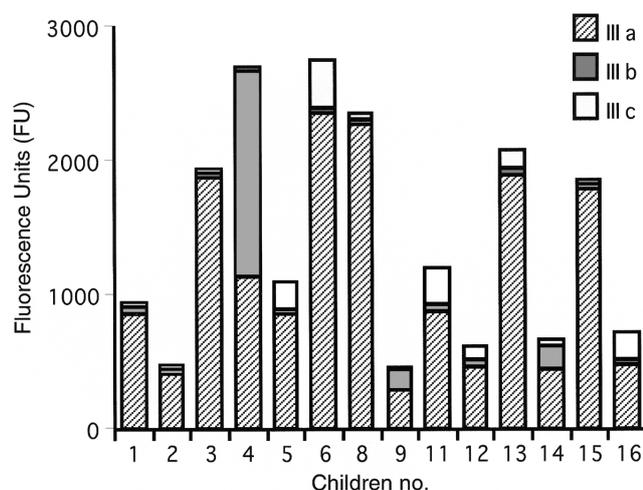


Fig.4 Reactivity of the sera from children with systemic allergic reaction to recombinant proteins of ⁴¹⁸Gly to ⁶⁷⁵Ser in bovine $\alpha 2$ (I) chain. III a, ⁴¹⁸Gly - ⁵¹⁰Ala; III b, ⁴⁹¹Leu - ⁵⁹⁸Pro; III c, ⁵⁷⁸Leu - ⁶⁷⁵Ser

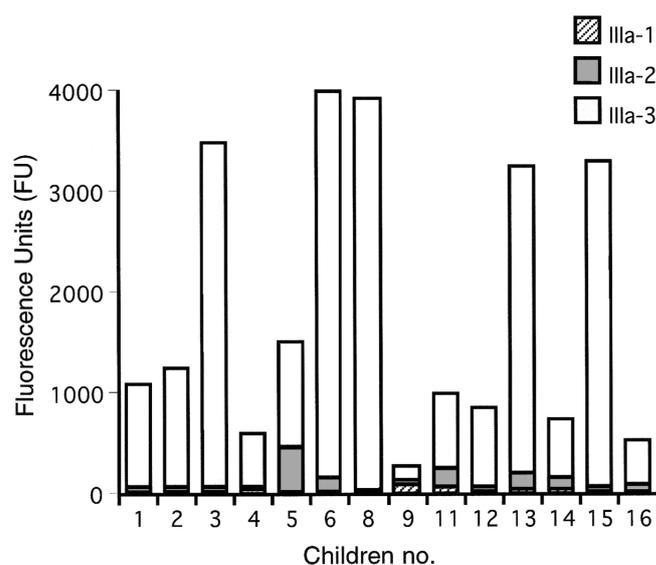


Fig.5 Reactivity of the sera from children with systemic allergic reaction to recombinant proteins of ⁴⁰⁸Leu to ⁵⁰⁰Glu in bovine $\alpha 2$ (I) chain. III a-1, ⁴⁰⁸Lys - ⁴⁴⁴Gly; III a-2, ⁴³¹Ala - ⁴⁷⁵Gly; III c: ⁴⁶¹Pro - ⁵⁰⁰Glu

- Ikezawa Z, Inouye S: IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 579-584, 2000
- 7) Hori H., Keene D. R., Sakai L. Y., et al: Repeated helical epitopes of defined amino acid sequence in human type III collagen identified by monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*, 29, 759-770, 1992.
- 8) Sakaguchi M., Hori H., Ebihara T., et al: Reactivity of the IgE in bovine gelatin-sensitive children to gelatins from various animals. *Immunology* 96, 286-290, 1999.
- 9) Sakaguchi M., Hori H., Hattori S., et al: IgE reactivity to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, 695-699, 1999.