

## 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

堀 久 枝

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

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。我々は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。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のみならず、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本の鎖が三重ヘリックスを構成している。これらの構造は動物種を越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になったことから、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1鎖および2鎖を単離精製し、また2鎖の全長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。

### 【結果および考察】

Ⅰ型コラーゲンは分子量 100kDa の 1鎖2本と 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越えて広く保存されており、ウシとヒトとの相同性は 1鎖で 98%、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になり、コラーゲンの免疫原性はも高いことが判明した。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型コラーゲンの2本の分子鎖(1鎖および2鎖)のうち2鎖に特異性があり、一次構造を認識していることが判明した。さらに2鎖の5個の組換えタンパク[(<sup>1</sup>N Gln-<sup>9</sup>N Pro/<sup>1</sup>Gly-<sup>224</sup>Leu), (<sup>213</sup>Asn-<sup>417</sup>Ala), (<sup>418</sup>Gly-<sup>662</sup>Pro), (<sup>663</sup>Val-<sup>880</sup>Glu), (<sup>897</sup>Val-<sup>1014</sup>Ser/<sup>1</sup>C Gly-<sup>15</sup>C Ala)]を作成し、その抗原性を調べたところ、すくなくとも4個所の抗原性部位が認められた。主要なエピトープはⅠにあり、そのⅠをカバーする3個の組換えタンパクを作製し、(<sup>461</sup>Pro-<sup>500</sup>Glu)の40残基に反応が認められた。さらにオーバーラップしているアミノ酸配列を除くと<sup>475</sup>Gly-<sup>500</sup>Gluの25アミノ酸残基配列中に局在することを明らかにした。

またウシ Ⅱ 型コラーゲン 2 鎖のヒトと異なるアミノ酸配列部位を考慮すると、 $\alpha 1(I)$  では  $^{271}\text{Gly}-^{300}\text{Ala}$  近傍に、 $\alpha 2(I)$  では  $^{467}\text{Leu}-^{500}\text{Glu}$  近傍にゼラチンアレルギー抗体 IgE の結合部位が局在すると推測され、上記の組み換えタンパクを用いた抗原部位の検索結果と一致した。本実験はバクテリアでの発現系であることから、前述のコラーゲン特異的なアミノ酸 (Hydroxyproline, Hydroxylysine) の水酸化とその糖付加修飾は行なわれていないにもかかわらず、組換えタンパクとアレルギー患者血清との反応性が認められた。したがって、コラーゲン特異的なアミノ酸はアレルギー反応の抗原決定部位には関与していないことを示唆しているが、詳細は動物細胞培養系にて修飾された融合タンパクを作製し、アレルギー患者血清中 IgE のエピトープを系統的に分析する系を確立する必要がある。今後アレルギー性のないコラーゲンの開発には本研究により特定されたエピトープのアミノ酸配列を参考にし、感受性の高いプロテアーゼ処理によりアレルギー性を減弱させる方法を検討中である。

なお、本研究は国立感染症研究所・坂口雅弘博士との共同研究である。