

依存的な増加がみられ、すべての群で V 群との差が有意であった (Fig. 5B)。

惹起 30 分後にマウスの脾臓を摘出して、脾臓細胞を惹起抗原 100 ng/ml で 3 日間再刺激し、培養上清中の Th1/Th2 サイトカイン量を測定したところ、IL-4, IL-5, IL-10 などの Th2 サイトカインは、HS100 群と HS500 群で V 群と比較して有意に産生量が増加していた (Fig. 6A-C)。Th1 サイトカインである IL-2 は HS500 群で有意な減少を示し、IFN- γ は HS20、HS100、HS500 すべての群で有意に産生量が低下した (Fig. 6D, E)。

【実験 2】

グルテンを 0.1N 塩酸中で 100°C 加水分解したところ、0.5 hr 加水分解物はグルパール 19S と同様に SDS 電気泳動で分離した際に <70 kDa に広くスメアなパターンを示した。48 時間まで加水分解の時間を変化させたところ、時間の経過に伴い高分子量側のバンドが消失し、主なバンドが低分子量側に移行した (Fig. 7A)。未分解グルテン (A0hr)、グルパール 19S と SDS 電気泳動パターンが似ている酸加水分解グルテン (A0.5hr)、および <30kDa にまで分解されているもの (A9hr) をマウスに経皮感作した。その結果、A0hr 群と A0.5hr 群は V 群と比較して抗原特異的抗体の産生量が有意に高く、i.p. 惹起 30 分後の血漿中ヒスタミン濃度も V 群と比較して増大していたが、A0.5hr 群のみ V 群との差が有意であった (Fig. 7B-D)。

【実験 3】

続いて、国内で使用されている他社製品各種 HWP とグルパール 19S との感作能を比較した。グルパール 19S、グルパール 9000、プロモイス WG-SP (株式会社成和化成)、および入手した HWP12 種の SDS 電気泳動パターン

を Fig. 8 に示した。そのうち、マウス経皮感作に用いた HWP の情報を Table 2 に示した。グルパール 9000 はメインのバンドがグルパール 19S と比べてやや低分子量側にシフトしたものの、全体的に広い分子量の分布を示した。加水分解にアルカリを用いた HWP-D も、広い分子量の分布を示した。その他、HWP-A および E は 6 kDa 以下にメインのバンドがみられるものの、10 kDa 以上にも若干のバンドがみられた。プロモイスを含む残りの 10 種の HWP では、10 kDa 以上にタンパク質のバンドはみられなかった。

3 クールの経皮感作では IgE 抗体価の上昇やアナフィラキシー症状に個体差がみられたため、本実験では Fig. 9 に示したスケジュールにて、4 クールの経皮感作を実施し、12 種の HWP の感作能を比較した。その結果、グルパール 19S、グルパール 9000、HWP-D の 3 種で抗原特異的 IgE 抗体の産生がみられ、V 群との差が有意であった (Fig. 10)。しかし、i.p. 惹起後の体温低下はグルパール 19S とグルパール 9000 を感作した群にのみでみられた (Fig. 11)。i.p. 惹起後のマウスの行動を観察し、アナフィラキシー症状を Table 3 に従ってスコアリングしたところ、グルパール 9000 (3.0 ± 0.70) はグルパール 19S (2.9 ± 0.03) とほぼ同スコアであり、続いてスコアが高かった群は HWP-D (2.4 ± 0.55) であった。HWP-A は 1.6 ± 0.89 であり、V 群と比較するとその差は有意であった (Fig. 12)。また、惹起後の血中ヒスタミン濃度もグルパール 9000 がグルパール 19S と同程度、HWP-D はグルパール 19S と比較すると低いが、V 群と比較すると有意に高く、他の HWP は V 群との差が有意ではなかった (Fig. 13)。

患者血清を用いたドットプロットおよび Western blot

in vitro 実験に用いた酸加水分解グルテンは、小スケールのグルテン (1 mg) から作製した。経時変化させた酸加水分解グルテンの SDS 電気泳動パターンは Fig. 14 に示した。

まず、HWP 感作 WDEIA 患者血清と従来型の小麦アレルギー患者血清を用いて Western blot を行い、グルパール 19S とグルテン、経時変化させた酸加水分解グルテンとの IgE 結合タンパク質パターンを比較した。その結果、HWP 型の血清ではグルパール 19S の高分子量側 (50 kDa 付近) に強い反応を示し、その反応は酸加水分解の経時変化に伴い減弱するものの、6h 処理後にも反応性が残存していた (Fig. 15A)。一方、従来型の血清では、グルテンに最も強く反応し、酸加水分解を 0.5h および 1h 行ったグルテンの高分子量側には反応を示したものの、経時変化に伴い反応は速やかに消失した (Fig. 15B)。

Western blot では、プロットの条件により高分子量側と低分子量側のタンパク質との反応を同時に検討することが難しいため、酸加水分解グルテンをメンブレンにスポットし、ドットプロットを行った。その結果、HWP 型の Serum#1 では酸加水分解 6h まで、#2 では酸加水分解 3h まで反応がみられるが、従来型の Serum#3 および #4 では、未分解グルテン (0h) に最も強い反応がみられ、酸加水分解 1h 後までは反応が残存していたものの、3h では反応が消失していた (Fig. 16)。

ヒト化マスト細胞を用いた *in vitro* アレルギー反応惹起試験

FcεRI を介したマスト細胞の活性化には、IgE と抗原が結合するだけでなく、抗原分子上

の多価のエピトープを介して、複数の IgE の架橋を形成することが必要である。一方、ドットプロットなどの免疫化学的手法は、抗原エピトープの価数を知ることはできない。そこで、ドットプロット等で確認された酸加水分解グルテンと血清中 IgE の結合がマスト細胞を活性化し、アレルギー反応を惹起し得るのかについて、ヒト型マスト細胞 (RS-ATL8 細胞) を用いた *in vitro* 惹起試験 (EXiLE test) により検討した。RS-ATL8 細胞を 100 倍希釈した HWP 型および従来型の小麦アレルギー患者血清により感作し、培地に懸濁した酸加水分解グルテンの抗原溶液により 3h 細胞を刺激し、そのルシフェラーゼ発現量を比較した。HWP 型の血清である Serum #1 および #2 では、分解前のグルテンで刺激した時よりも酸加水分解グルテンで刺激した際のルシフェラーゼ応答が増大し、その後応答は減弱に転じたが、それぞれ少なくとも 24h および 6h 酸加水分解したグルテンでもカットオフレベル以上のマスト細胞活性化を誘導した。(Fig. 17)。一方、従来型の血清 (#3,4) では、いずれの場合も未分解のグルテン (0h) で細胞を刺激した際のルシフェラーゼ活性が最も高く、酸加水分解の経時変化に伴い活性は単調に減弱し、酸加水分解 6h 後にはカットオフレベルを下回った。

D. 考察

マウスを用いた経皮感作試験

本年度はまず、茶のしずく石鹼の使用と小麦摂取によるアレルギー発症との因果関係をしらべるため、マウスを用いたグルパール 19S の経皮感作試験法の確立を試みた。

オボアルブミンやナッツ類タンパク質をマ

ウスの皮膚に貼付 (3-7 日/週×3-6 週間) することにより感作した例がこれまでに報告されている。そこで、同様の感作スケジュールでグルパール 19S の経皮感作の成立について検討した。感作の成立には、血中抗原特異的抗体の産生と i.p. 投与によるアナフィラキシー症状の惹起を指標とするのが適当であると考えた。

本実験では、0.5% の SDS を添加したグルパール 19S を 500 µg/匹で、週 3 日間の貼付を 3 クール繰り返すことで、グルパール 19S 特異的抗体の産生および、i.p. 投与によるアナフィラキシー反応を惹起することができた (Figs. 2, 3)。SDS を添加していない群 (H) では抗原特異的抗体の産生もアナフィラキシー反応の惹起もみられず、経皮感作の成立には SDS の存在が欠かせないことが示された。SDS を添加したグルテンを貼付した群においても抗原特異的抗体の産生および惹起後の血中ヒスタミン濃度上昇がみられたことから、経皮感作は成立していたものと考えられた。グルパール 19S を貼付した群ではグルテン特異的抗体の産生が顕著ではなかったことから、本実験系ではグルパール 19S 経皮感作マウスが産生する抗体はグルテンと交叉するものの、交叉性は低いと考えられた。既報^{10, 11)}では、経皮感作の 1 週間前に抗原で i.p. 感作をしておくことで経皮感作が成立しやすいとの報告があったため、【実験 1】では経皮感作のみを行う群と、i.p. 感作と経皮感作の併用群を設定した。しかしながら本実験系では、グルパール 19S 感作群、グルテン感作群ともに i.p. 感作の併用による抗原感作の増強はみられなかった。また、グルパール 19S の経皮感作は貼付抗原の用量依存的であり、アナフィラキシー反応で経皮感作能を判断する上では、1 回量を 500 µg 貼付することが望ま

しいと考えられた (Figs. 4, 5)。さらに、脾臓細胞再刺激による Th1/Th2 サイトカイン産生量の測定により、グルパール 19S 経皮感作マウスでは、Th2 型の免疫反応が起こっていると考えられた (Fig. 6)。

さらに、加水分解小麦の経皮感作性を追究していくため、グルパール 19S と同様に酸を用いた加水分解により酸加水分解グルテンの調製を試み、その経皮感作性を検討した。その結果、SDS 電気泳動パターンにおいて、グルパール 19S と似たパターンを示す A0.5hr を作製することができた。A0.5hr を経皮感作したマウスでは、グルパール 19S と同じく抗原特異的抗体の産生およびアナフィラキシー反応がみられた (Fig. 6)。さらに長時間の酸加水分解を行い、SDS 電気泳動パターン上で 30 kDa 以上のタンパク質がみられなくなった A9hr では、経皮感作が成立しなかった。

【実験 3】では、国内に流通しているグルパール 19S 以外の HWP の経皮感作性を検討するため、11 種の HWP をマウスに貼付して経皮感作を行った。加水分解方法や SDS 電気泳動での分子量パターンの異なる HWP を比較すると、加水分解に酸を用いているグルパール 19S とグルパール 9000 はほぼ同程度の感作性が示された。加水分解にアルカリを用いた HWP-D では、SDS 電気泳動パターンは高分子量側に広く分布していてグルパール 19S とパターンが似ているものの、抗原特異的抗体の産生、アナフィラキシー反応による体温低下、アナフィラキシー症状スコア、血中ヒスタミン濃度の上昇のいずれもグルパール 19S よりも低い結果であった (Figs. 9-12)。この結果から、加水分解の諸条件が感作性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。また、アナフィラキシ

一反応もしくは血中ヒスタミン濃度上昇がみられた HWP-A、HWP-D はいずれも SDS 電気泳動において、6 kDa 以上のバンドを呈しており、HWP の経皮感作にはタンパク質の平均分子量が関係している可能性も示唆された。

本年度の研究ではグルパール 19S と同程度の経皮感作性を示した HWP グルパール 9000 のみであったが、グルパール 9000 は食品添加物として用いられており、医薬部外品あるいは化粧品の添加物と同様に経皮感作が起こり、小麦摂取によるアレルギーを引き起こすとは現実的には考えにくい。しかし、グルパール 19S ほど強くはないものの、国内で使用されている HWP の中には経皮感作を起こしうるものがあることが明らかとなり、今後の規制についてさらに詳しい検討が必要である。

患者血清を用いた免疫生化学的試験および *in vitro* アレルギー反応惹起試験

グルパール 19S で感作され、小麦アレルギーを発症した患者血清中の IgE と HWP の反応性を検討するため、分解時間を様々に変化させた酸加水分解グルテンとグルパール 19S について、ドットブロット等の免疫生化学的試験により IgE 結合性を調べるとともに、そのアレルギー反応惹起能をしらべる *in vitro* マスト細胞活性化試験を行った。両者の結果は良く一致しており、HWP 感作血清では未分解グルテン (0h) に比べて、酸加水分解によりグルテンの惹起能が増大しており、酸加水分解が進んでも (6h) その惹起能は減弱しにくい傾向にあった。一方、従来型小麦アレルギー患者血清では、未分解グルテンに対する反応性が最も高く、酸加水分解が進むにつれて単調かつ速やかに惹起能が消失した (Fig. 15-17)。これらの結

果から、HWP 感作小麦アレルギー患者は従来型の小麦アレルギー患者とは異なる IgE エピトープを有しており、未分解グルテンには存在していなかったエピトープが新たに出現した可能性が考えられた。前述の通り、IgE を介するマスト細胞の活性化には、抗原分子上に複数のエピトープが存在し、IgE の架橋を形成することが必要とされているため、ここで生じた新規エピトープは、加水分解グルテン分子上に機能的な形で少なくとも 2 箇所以上存在することが示唆される。また、酸加水分解が進んで SDS 電気泳動パターンで低分子量側にシフトしたものでも、HWP 感作小麦アレルギー患者血清ではアレルギー反応が惹起されたことから、新規エピトープは熱及び酸に耐性であると考えられた。しかし、どのようなメカニズムによりこのような新規エピトープが生成したかについては、今後の研究が必要と思われる。

E. 結論

マウス経皮感作試験から、酸加水分解小麦グルパール 19S は界面活性剤共存下で強い感作性を有することが示された。同様の感作性はグルパール 9000 でも観察され、酸加水分解により生じた高分子タンパクが高い抗原性を有することが示唆された。なお、加水分解が進み、より低分子のタンパク質が主体になった場合でも、惹起能は有していることから、表示による処理方法等の情報の提供が重要であると考えられる。

(参考文献)

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 127 (2): 531-533.
- 2) Hsieh KY, Tsai CC, Herbert Wu CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1067-75.
- 3) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W^v Mice. *Allergol Int* 2006; 55: 43-48.
- 4) Wang JS, Zhao MM, Zhao QZ, Bao Y, Jiang YM. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *J Food Sci* 2007; 72(2): 103-107.
- 5) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R. A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy* 2010 ;65(10):1266-73.
- 6) Bouchez-Mahiout I, Pecquet C, Kerre S, Snégaroff J, Raison-Peyron N, Laurière M. High Molecular Weight Entities in Industrial Wheat Protein Hydrolysates Are Immunoreactive with IgE from Allergic Patients. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 4207-4215.
- 7) Laurière M, Pecquet C, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Bayrou O, Raison-Peyron N, Vigan M. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis* 2006; 54: 283-289.
- 8) Laurière M, Pecquet C, Boulenc É, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Choudat D, Raison-Peyron N, Vigan M, Branlard G. Genetic differences in omega-gliadins involved in two different immediate food hypersensitivities to wheat. *Allergy* 2007; 62: 890-896.
- 9) Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R, Sawada J, Maitani T. Profile Analysis and Immunoglobulin E Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140: 36-42.
- 10) Strid J, Callrd R, Strobel S. Epicutaneous immunization converts subsequent and established antigen-specific T helper type 1 (Th1) to Th2-type responses. *Immunology* 2006; 119: 27-35
- 11) Strid J, Hourihane J, Kimbert I, Callrd

R, Strobel S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005; **35**: 757-66.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

手島玲子:経口感作の成立と消化管粘膜免疫機構, アレルギー・免疫 19(1), 40-44 (2012)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1 【実験1】 感作方法

群	抗原	感作方法
V	PBS	経皮
HS i	グルパール19S + 0.5% SDS	i.p.* + 経皮
HS	グルパール19S + 0.5% SDS	経皮
H	グルパール19S	経皮
GS i	グルテン + 0.5% SDS	i.p.* + 経皮
GS	グルテン + 0.5% SDS	経皮
G	グルテン	経皮

* i. p.時には0.5% SDS不含のものを使用した

Table 2 【実験3】 感作抗原

群	抗原	加水分解法	平均分子量
V	PBS	-	-
19S	グルパール19S	酸	-
9000	グルパール9000	酸/アルカリ	-
Prom	プロモイスWG-SP	アルカリ/酵素	数100
HWP-A	食品添加物用	酵素	-
HWP-B	化粧品用	酵素	3000
HWP-C	化粧品用	酵素	- (最大分子量約80000)
HWP-D	化粧品用	アルカリ	100,000
HWP-E	化粧品用	酵素	3500
HWP-F	化粧品用	酵素	1000
HWP-G	食品添加物用	酸	-
HWP-H	食品添加物用	酵素	-

Table 3 アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0	症状なし
1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
2	活動低下、呼吸が速くなる、1匹だけ離れている、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
3	1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
5	死亡

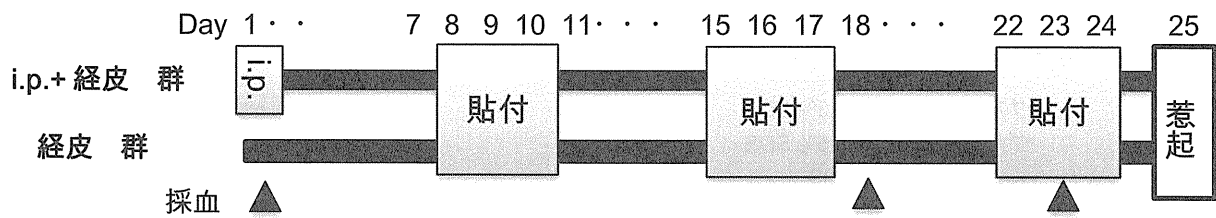
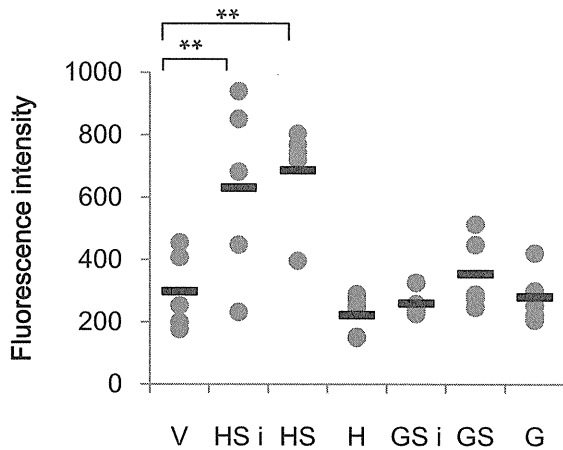
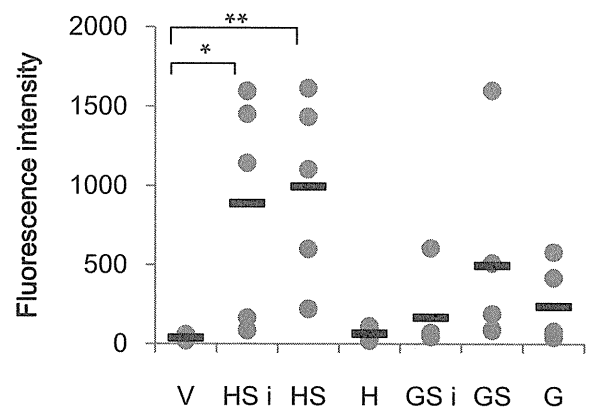


Fig. 1 グルパール19Sおよびグルテン経皮感作スケジュール【実験1・2】

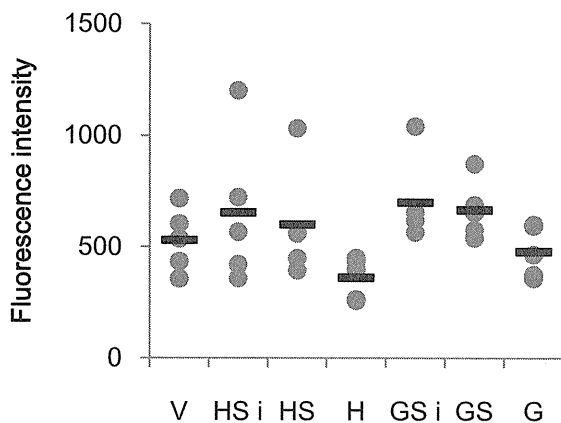
A. IgE (HWP)



B. IgG1 (HWP)



C. IgE (グルテン)



D. IgG1 (グルテン)

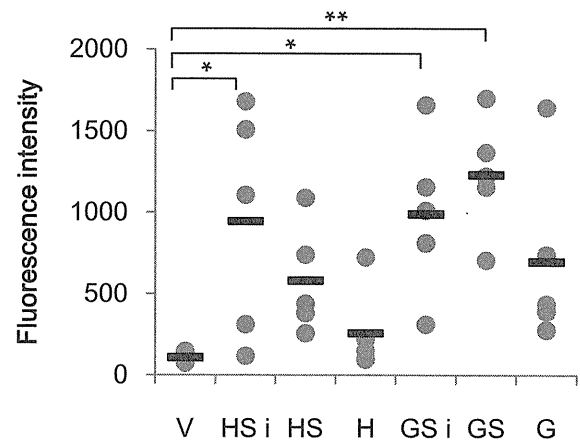


Fig. 2 グルパール19Sおよびグルテン経皮感作後の抗原特異的抗体産生

グルパール19Sおよびグルテンを経皮感作し、Day 23における血清中の抗原特異的抗体産生量をELISAにより測定した。A: HWP特異的IgE、B: HWP特異的IgG1、C: グルテン特異的IgE、D: グルテン特異的IgG1

V群: PBS、HS i群: グルパール19S (SDS+) i.p. + 経皮感作、HS群: グルパール19S (SDS+) 経皮感作、H群: グルパール19S経皮感作、GS i群: グルテン(SDS+) i.p. + 経皮感作、GS群: グルテン(SDS+) 経皮感作、G群: グルテン経皮感作。

ドットはマウス個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett test vs. V group

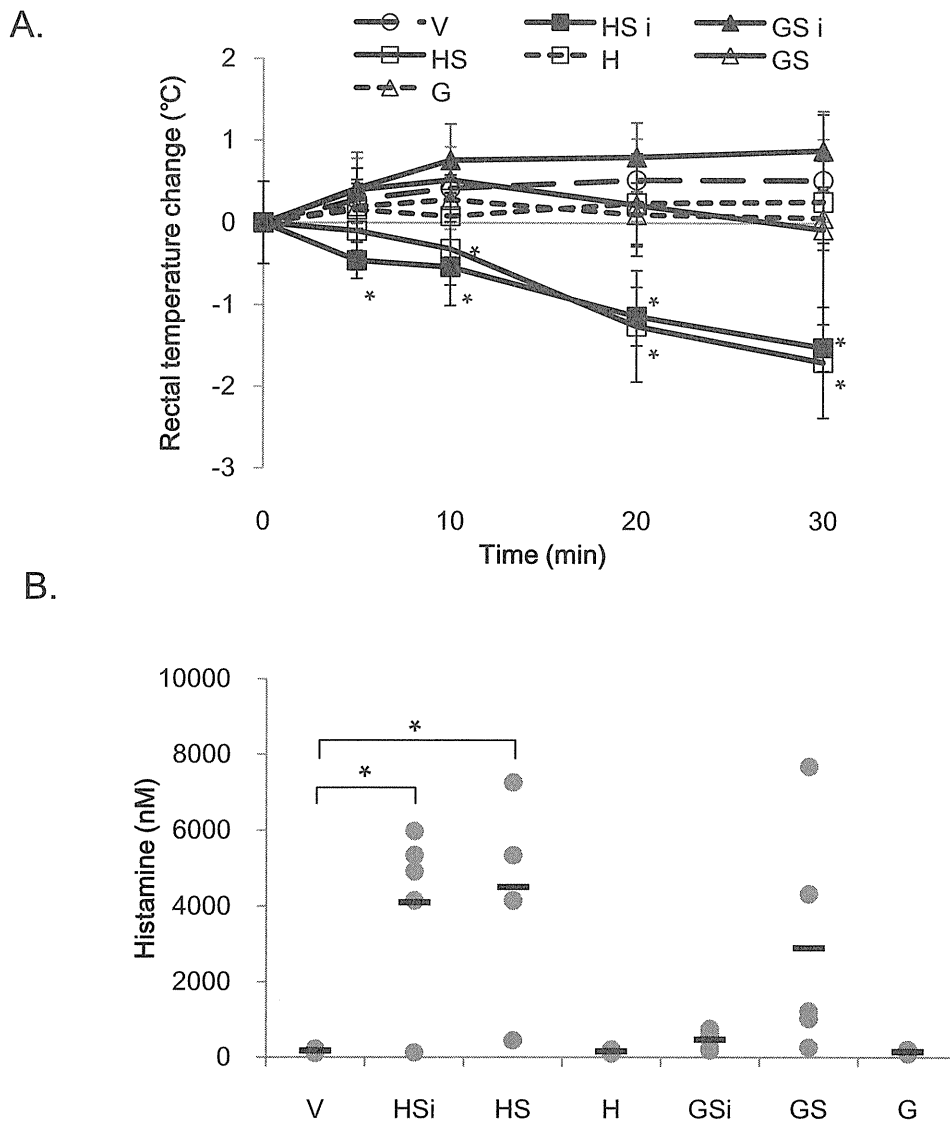
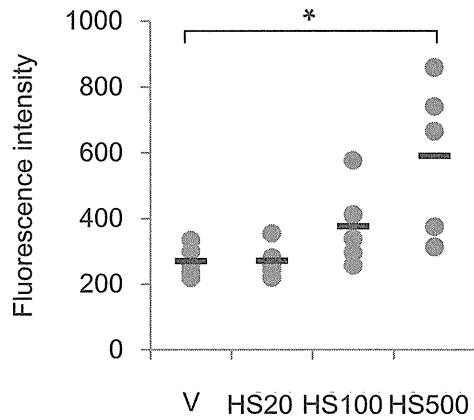


Fig. 3 グルパール19Sおよびグルテン経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

グルパール19Sおよびグルテンを経皮感作したマウスに、抗原1 mgをi.p.してアナフィラキシー反応を惹起した。(A:)惹起後30分間の体温変動を示した。データはMean±S.D.を示す。(B.) 惹起30分後に血液を採取し、Histamine EIA Kit (SPI-BIO) により血中ヒスタミン濃度を測定した。ドットはマウス個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
* $p < 0.05$ by Dunnett test vs. V group

A. IgE



B. IgG1

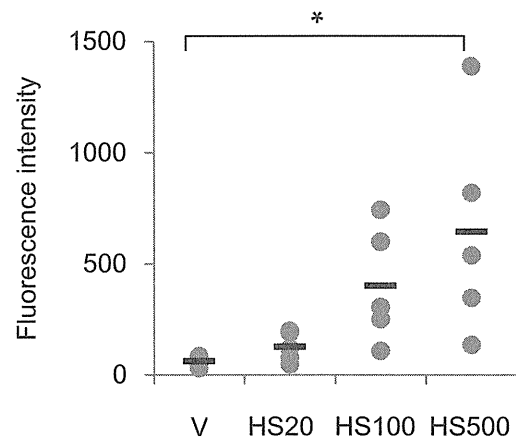


Fig. 4 グルパール19S経皮感作の用量依存性 (HWP特異的抗体産生)

グルパール19S経皮感作を20 (HS20), 100 (HS100), 500 (HS500) $\mu\text{g}/\text{回}$ で行い、血清中のHWP特異的抗体産生量をELISAにより測定した。A: HWP特異的IgE、B: HWP特異的IgG1
ドットはマウス個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

* $p < 0.05$ by Dunnett test vs. V group

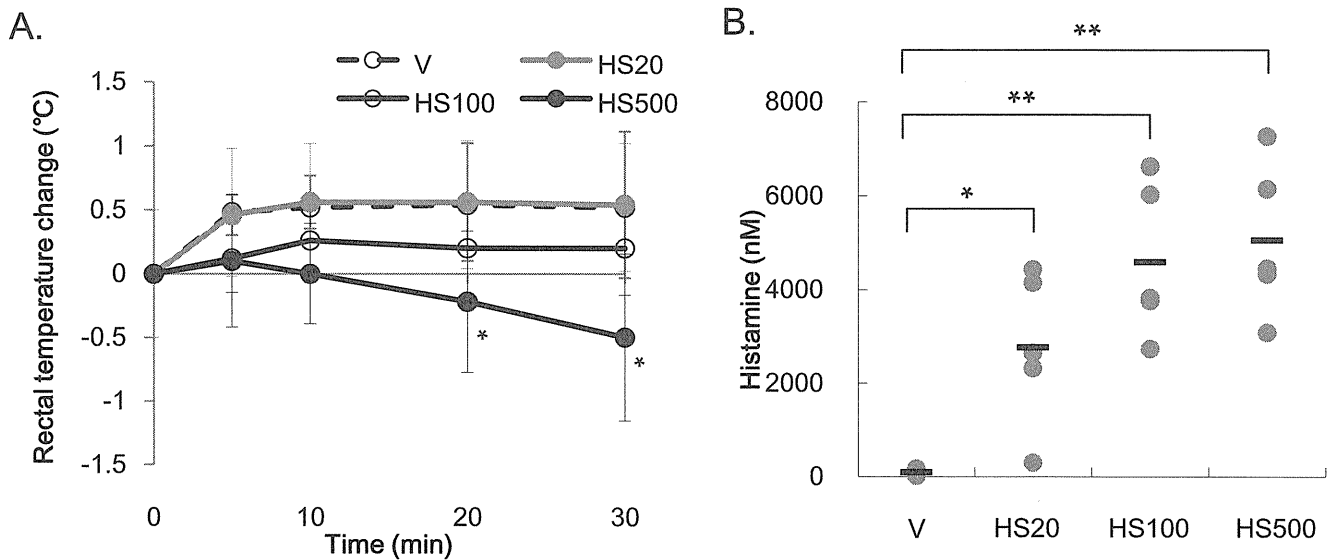


Fig. 5 グルパール19S経皮感作の用量依存性 (アナフィラキシー反応)

グルパール19Sおよびグルテンを経皮感作したマウスに、抗原1 mgをi.p.してアナフィラキシー反応を惹起した。(A:)惹起後30分間の体温変動を示した。データはMean \pm S.D.を示す。(B:) 惹起30分後に血液を採取し、Histamine EIA Kit (SPI-BIO) により血中ヒスタミン濃度を測定した。ドットはマウス個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett test vs. V group

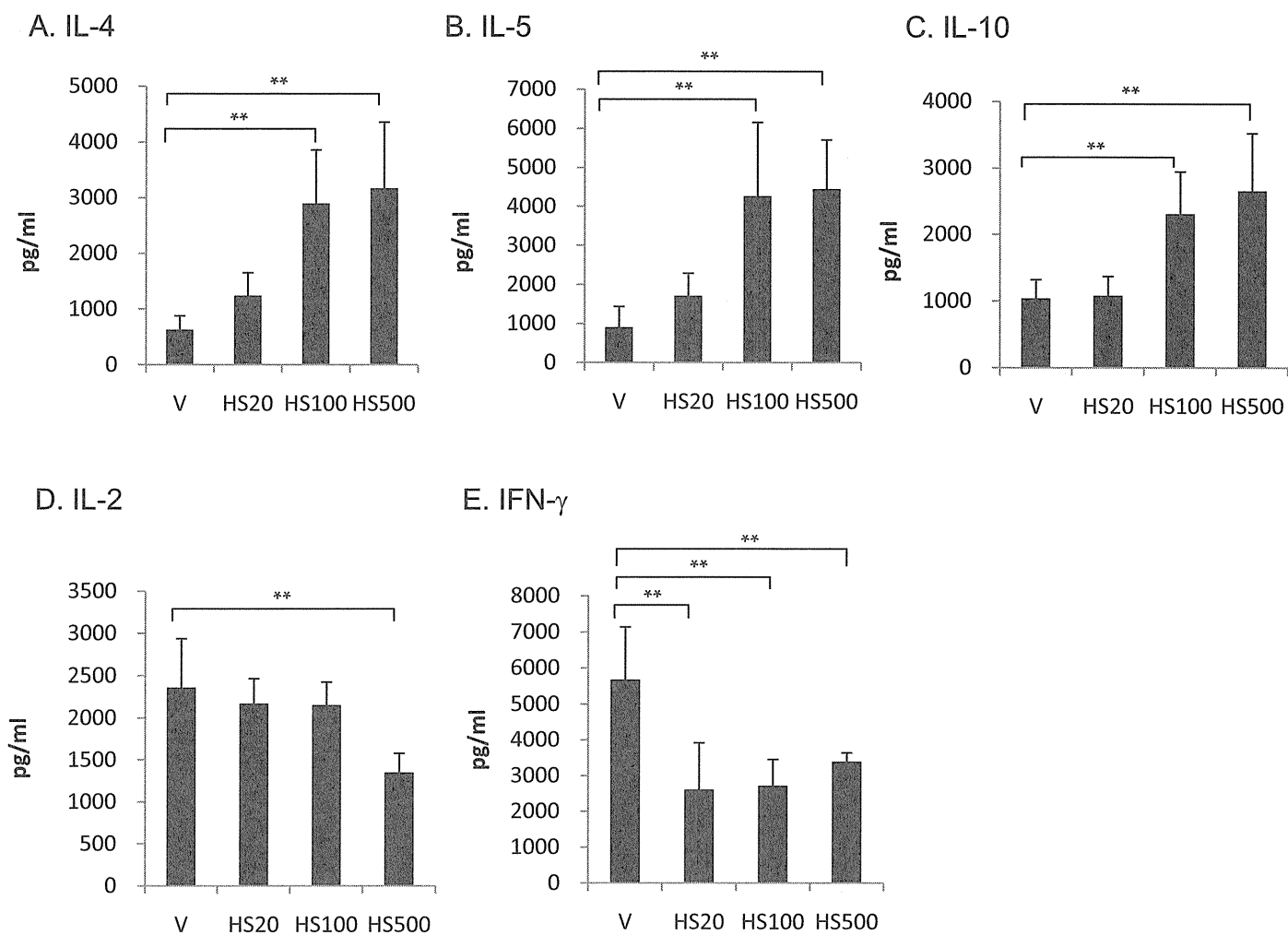
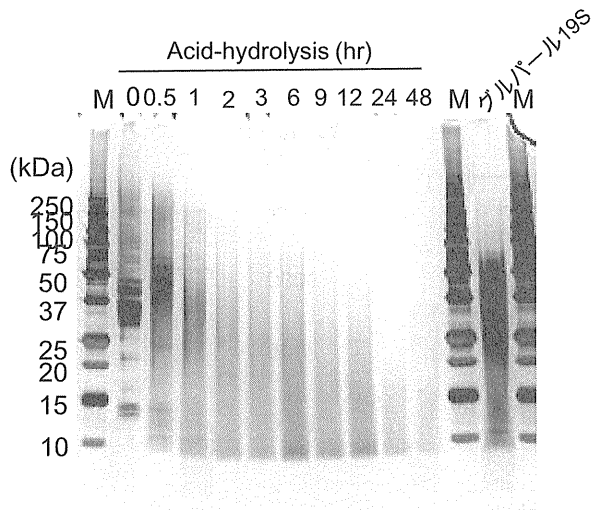


Fig. 6 グルパール19S経皮感作の用量依存性 (脾臓細胞からのサイトカイン産生)

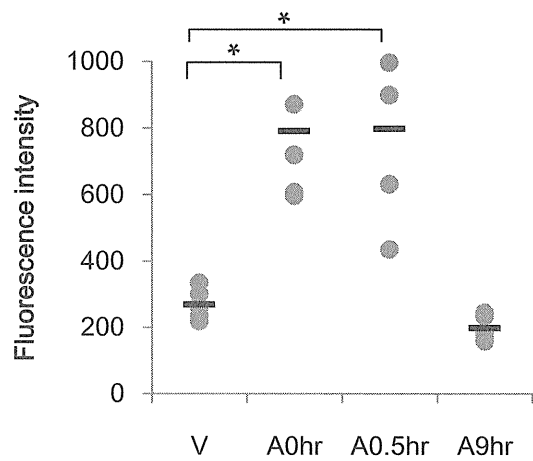
グルパール19Sおよびグルテンを経皮感作したマウスより脾臓細胞を採取し、100 ng/mlの抗原で3日間再刺激した。培養上清中のサイトカイン量は、Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1/Th2 Panel (Bio-Rad)にて測定した。バーは各群のMean±S.D.を示す。

** $p < 0.01$ by Dunnett test vs. V group

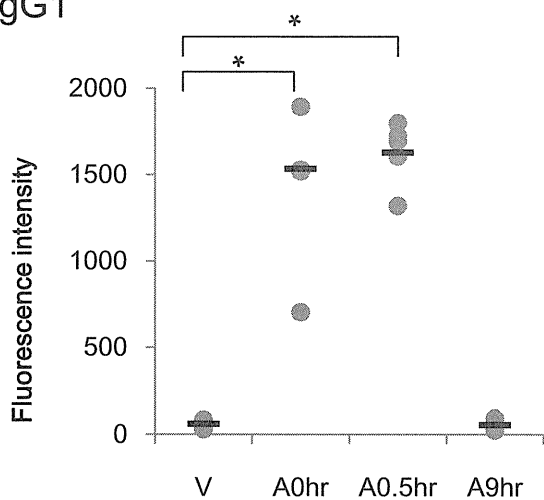
A. Silver stain



B. IgE



C. IgG1



D. histamine

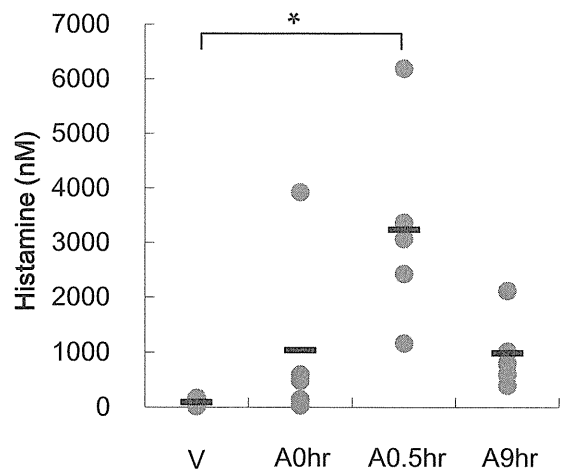


Fig. 7 酸加水分解コムギ経皮感作マウスの特異的抗体産生・惹起後血漿中ヒスタミン

1N HCl中、100°Cで酸加水分解したグルテンをマウスに経皮感作し、酸加水分解が進んだグルテンの感作性を比較した。A: 酸加水分解グルテンのSDS-PAGE分離銀染色パターン (10-20% acrylamide gel)、B: HWP特異的IgE、C: HWP特異的IgG1、D: i.p.惹起30分後の血漿中ヒスタミン濃度。ドットはマウス個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

* $p < 0.05$ by Dunnett test vs. V group

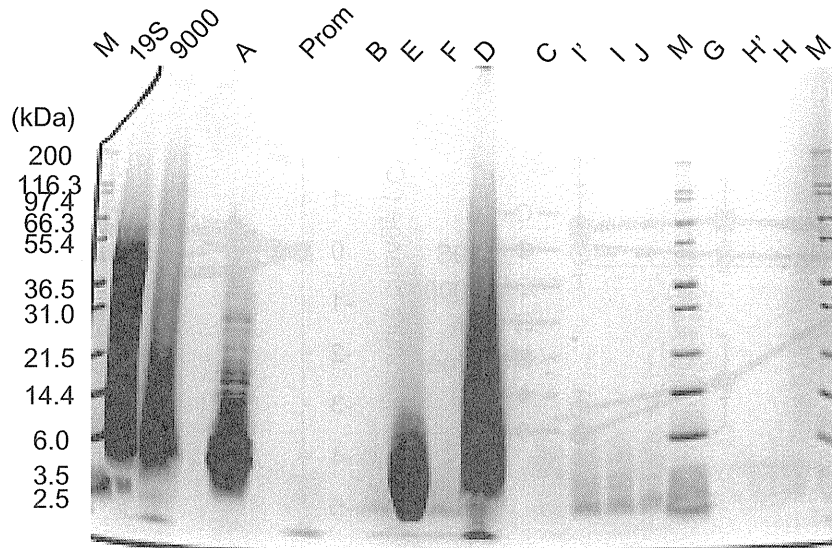


Fig. 8 他社製加水分解コムギSDS電気泳動CBB染色パターン
40 mgの各種HWPを15-25% acrylamide gel中で分離した後、CBBで染色した。

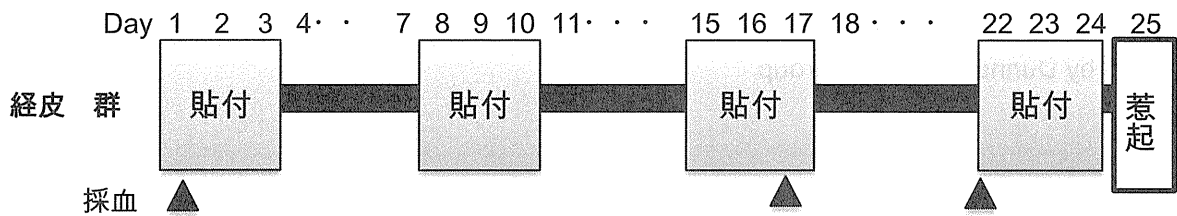


Fig. 9 他社製加水分解コムギ経皮感作試験スケジュール【実験3】

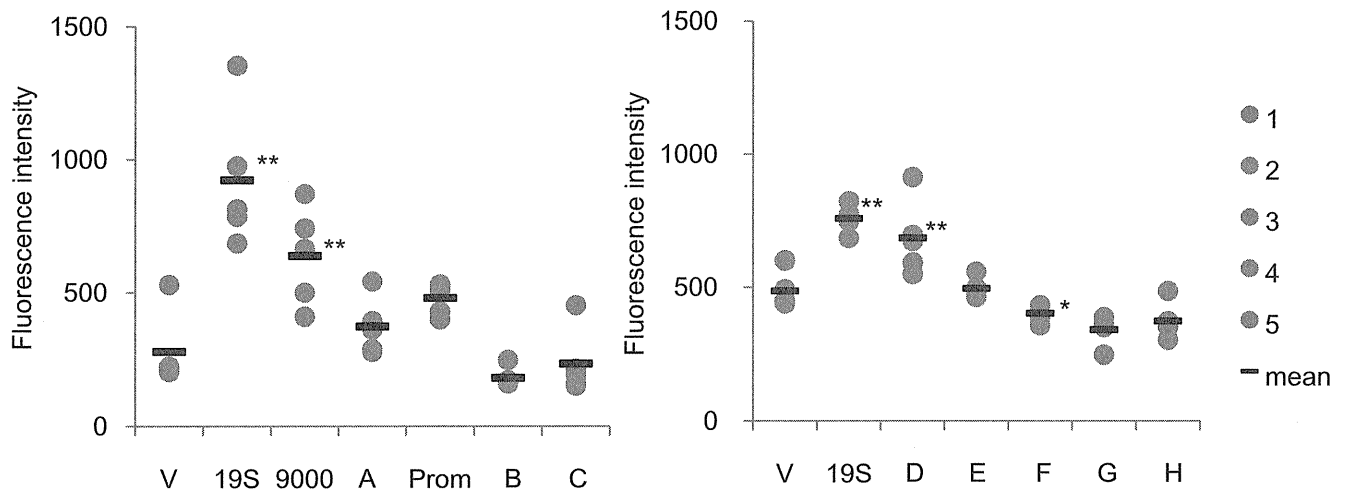


Fig. 10 他社製加水分解コムギ経皮感作マウスのHWP特異的IgE抗体産生

他社製加水分解コムギ (A, Prom, B, C, D, E, F, G H)を経皮感作したマウスの、Day 23におけるHWP特異的IgE抗体価をELISAにより測定した。19S:グルパール19S、9000:グルパール9000、Prom:プロモイス、A-H:他社製加水分解コムギ
ドットはマウス個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett test vs. V group

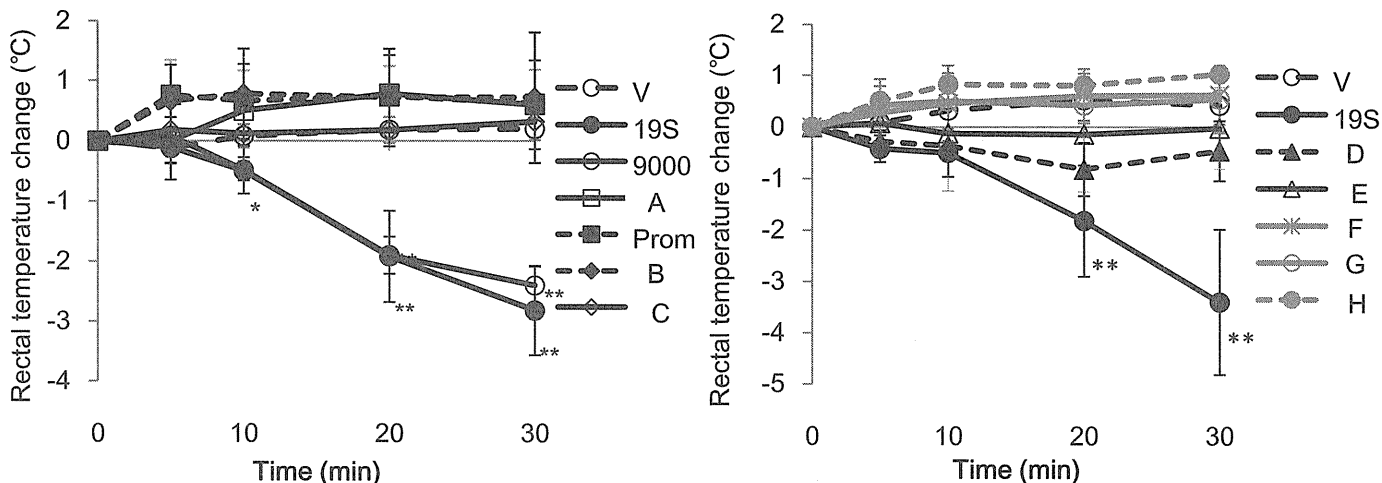


Fig. 11 他社製加水分解コムギ経皮感作マウスのアナフィラキシー反応による体温低下

グルパール19Sおよび他社製加水分解コムギを経皮感作したマウスに、抗原1 mgをi.p.してアナフィラキシー反応を惹起、惹起後30分間の体温変動を示した。データはMean±S.D.を示す。
* $p < 0.05$ by Dunnett test vs. V group

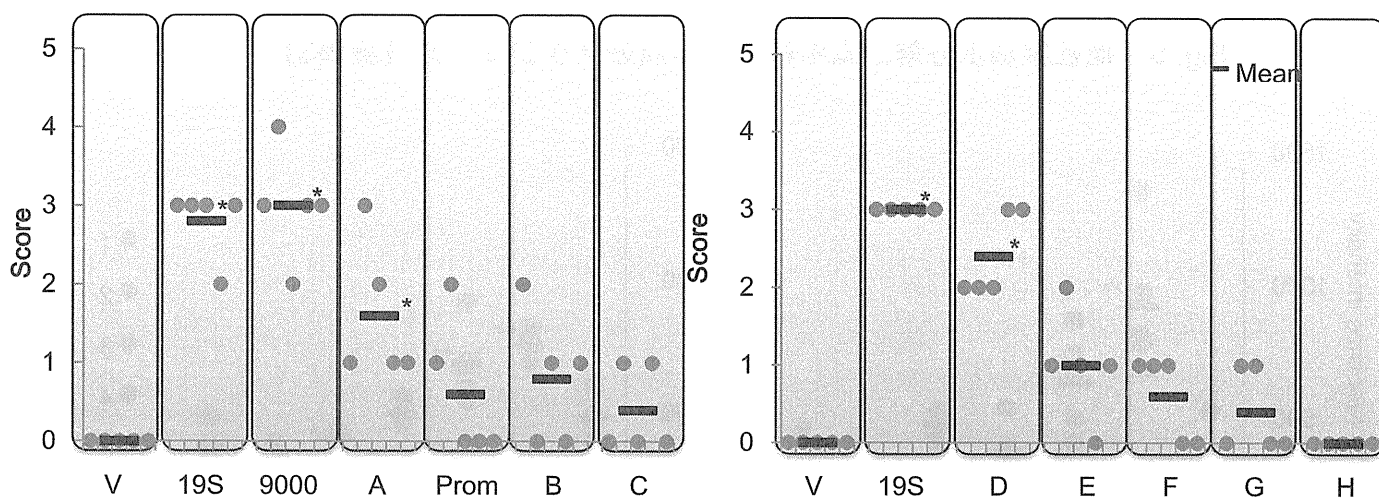


Fig. 12 他社製加水分解コムギ経皮感作マウスのアナフィラキシー症状スコアリング

グルパール19Sおよび他社製加水分解コムギを経皮感作したマウスに、抗原1 mgをi.p.した後30分間のアナフィラキシー症状をTable 3に従ってスコアリングした。ドットは各マウスのデータを、バーはMeanを示す。
* $p < 0.05$ by Wilcoxon test with Bonferroni correlation

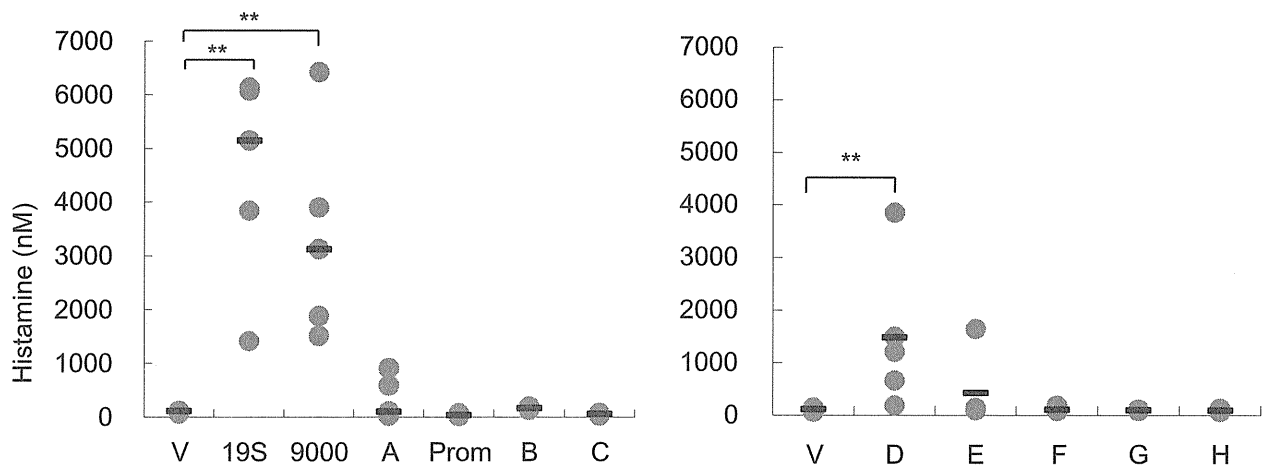


Fig. 13 他社製加水分解コムギ経皮感作マウスの血漿中ヒスタミン濃度測定

グルパール19Sおよび他社製加水分解コムギを経皮感作したマウスに、抗原1 mgをi.p.した30分後の血漿中ヒスタミンを測定した。ドットは各マウスのデータを、バーはMeanを示す。

** $p < 0.01$ by Dunnett test vs. V group

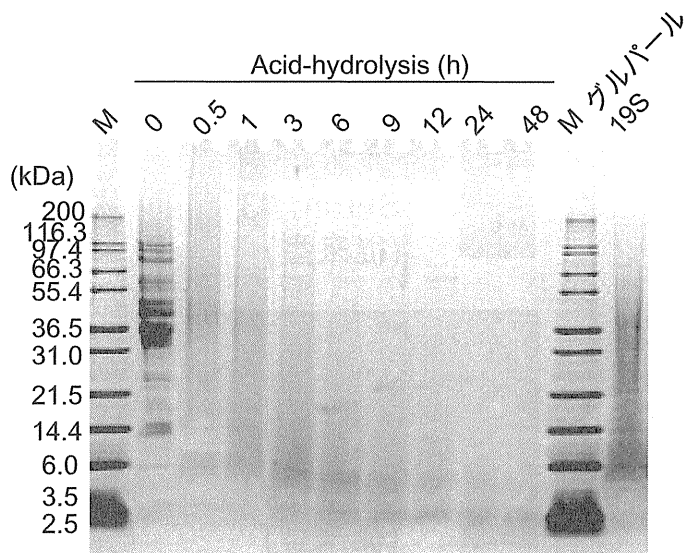
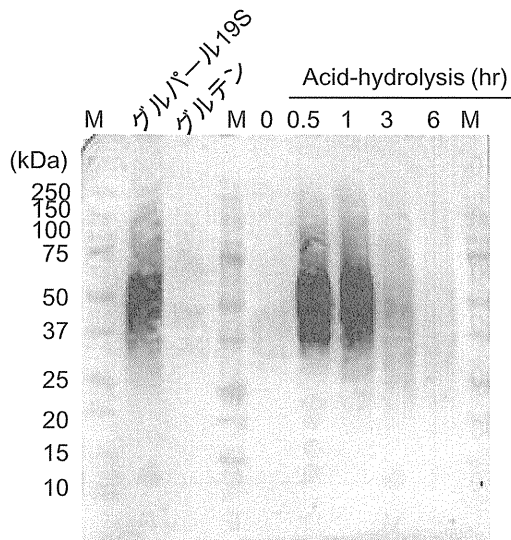


Fig. 14 グルテンの酸加水分解

グルテンを0.1N塩酸中で100°C加水分解し、SDS-PAGEで分離したパターン(10-20% acrylamide gel)。銀染色パターンを示す。

A. Serum#1 (HWP型)



B. Serum#3 (従来型)

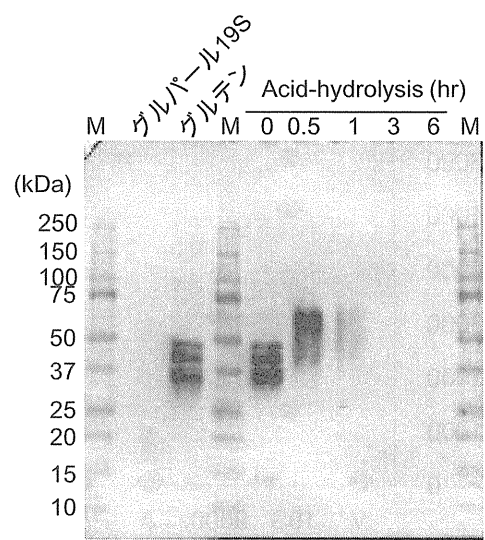


Fig. 15 HWP感作WDEIA患者血清および従来型の小麦アレルギー患者血清を用いたWestern blot

グルパール19Sおよび酸加水分解グルテンをSDS-PAGEにて分離した後ニトロセルロース膜に電氣的に転写し、HWP感作WDEIA患者血清 (Serum #1, 10倍希釈)および従来型の小麦アレルギー患者血清 (Serum #3, 5倍希釈)と4°Cで終夜インキュベートし、IgE結合タンパク質をHRP発色反応で検出した。M, Molecular weight marker

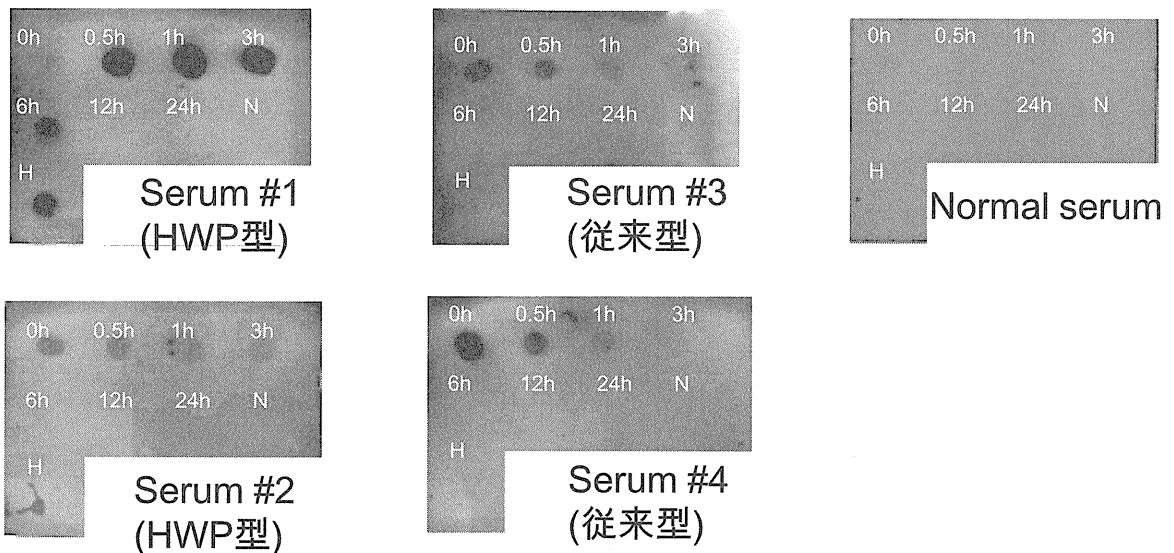


Fig. 16 酸加水分解グルテンのドットプロット

酸加水分解時間を変化させたグルテン (0h-24h) およびグルパール19S (H) をニトロセルロース膜にプロットし、5-10倍希釈したグルパール19S感作WDEIA患者血清 (Serum#1, 2)および従来型の小麦アレルギー患者血清 (Serum#3, 4) と終夜4°Cでインキュベートした。IgEと抗原の結合はHRP発色反応で検出した。N, negative control (PBS); H, HWP1

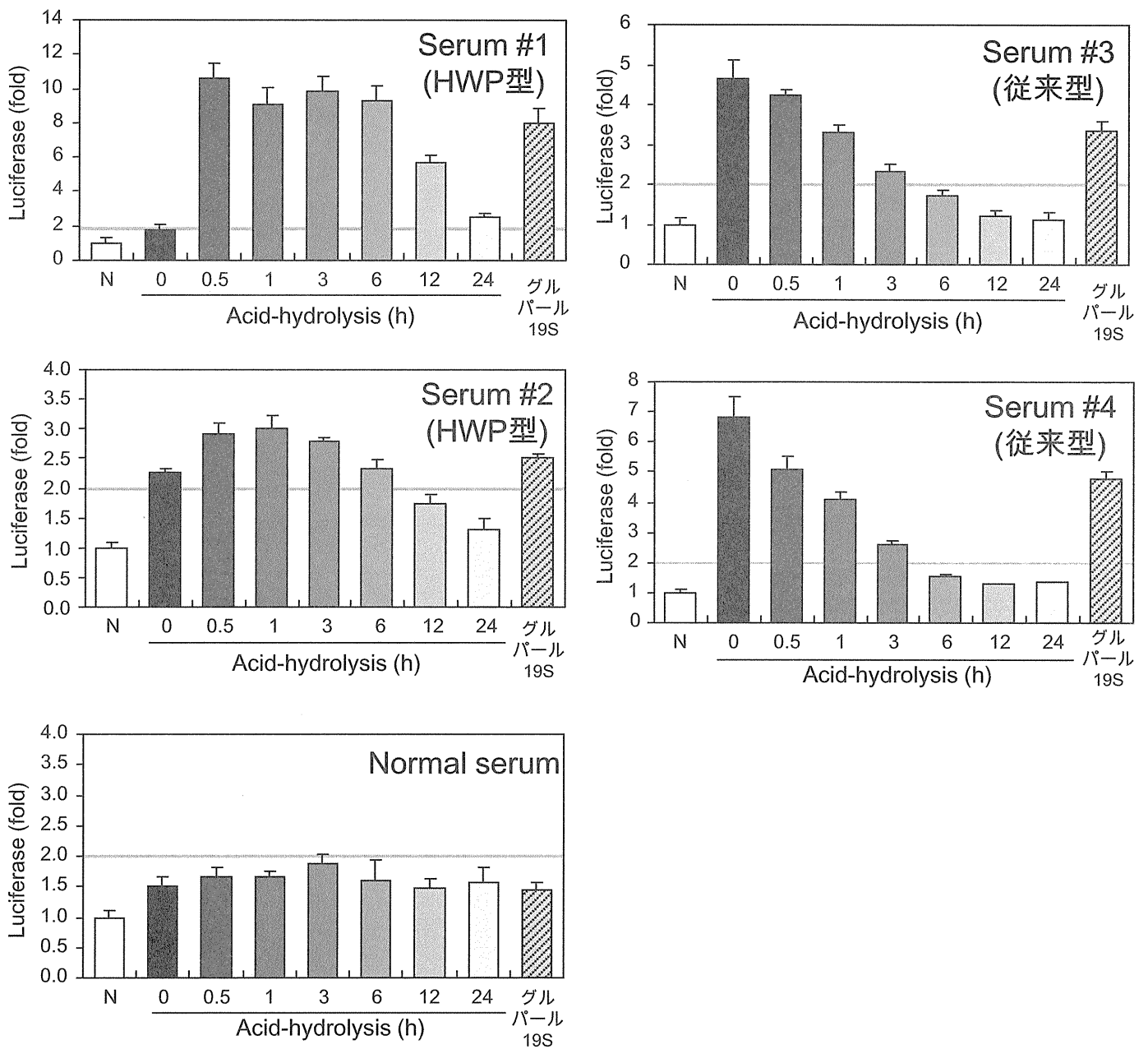


Fig. 17 酸加水分解グルテンの*in vitro*アレルギー惹起試験 (EXiLE test)

グルパール19S感作WDEIA患者血清 (Serum#1, 2)および従来型の小麦アレルギー患者血清 (Serum#3, 4) を100倍希釈し、RS-ATL8細胞を終夜感作し、翌日グルパール19Sおよび様々な時間酸加水分解させたグルテン100 ng/mlで3時間刺激した。ルシフェラーゼ基質 (One-glo)を添加し、ルシフェリン発光量を未刺激時 (N) を1とした相対値をグラフに示した正常血清 (Normal serum) のルシフェリン発光量がすべて抗原未刺激時の2倍以下であったことから、2倍をカットオフとした (グレーの線)。バーはそれぞれ、Mean±S.D. (n=4)を示す。

食物タンパク質由来化粧品添加物の抗原解析

研究分担者 板垣 康治 北海道文教大学人間科学部健康栄養学科 教授

研究要旨：

小麦加水分解物を添加した化粧品・医薬部外品が原因で発症した小麦アレルギー症例に関して、その抗原の解析を試みた。その結果、SDS-PAGEの結果より、低分子から高分子まで幅広く分子量分布していること、またウエスタンブロッティングの結果、スメア状を呈したことから、酸加水分解により生成したペプチドのアルギニン、グルタミン残基の脱アミド化のほかに、アミノカルボニル反応などにより、さらに修飾、変性を受けて新たな抗原が生成している可能性が示唆された。CM化グルテンをトリプシン消化し、逆相クロマトグラフィによりペプチドマッピング後、得られた分画を患者血清を用いたELISAによって反応性を調べた結果、高い反応性を示す分画を特定できた。今後、抗原となっている小麦タンパク質の特定と、エピトープ解析、さらに抗原ペプチドが酸加水分解によって、どのような修飾、変性を受けているのかについて明らかにする。

A. 研究目的

現在、様々な食品成分が、長年の食経験に基づき安全性が担保されているとの認識で多くの化粧品、医薬部外品に添加されている。また、食品そのものが美容目的で使用される場合もある。しかしながら、その安全性が確認されているのは、あくまでも経口的に摂取した場合においてであり、経皮的な安全性については検証されていない。実際に、これまでも、パパイヤ由来のたんぱく質分解酵素が添加された化粧水やキュウリパックによるアレルギー発症例などが報告されている。キュウリパックの症例では、通常のキュウリアレルギー症例とは異なるアレルゲンの存在が示唆されている。そのような中で起きた小麦加水分解物が添加された洗顔石鹸が原因の小麦アレルギー症例については、患者数も多く、症状もアナフィラキシーを伴う重症例が多いため大きな社会問題となっている。そこで、本研究では、成人食物ア

ナフィラキシーの典型的モデルとなる病態として、化粧品・医薬部外品中の食物由来添加物の代表であるタンパク加水分解物への接触性アレルギーが原因となり発症した食物アレルギーに焦点をあて、当該症例の抗原解析を行うことにより、通常食物アレルギーにおける抗原との違いや抗原になりうる条件などを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 抗原の物理化学的性質の把握

SDS-PAGE、患者血清を用いたウエスタンブロッティングなどにより抗原となっているタンパク質（ペプチド）の分子量をはじめ、基本的な物理化学的性質について把握する。

2. 抗原の分離・精製

化粧品・医薬部外品として使用されている当

該小麦加水分解物を、カルボキシメチル(CM)化後、逆相クロマトグラフィーによってペプチドマッピングおよび分画する。ついで、患者血清を用いたELISAによって陽性画分を特定する。

(倫理面への配慮)

使用した患者血清は、コード化して医療機関より提供されており、患者を特定できないように配慮されている。

C. 研究結果

1. 抗原の物理化学的性質の把握

1) 小麦加水分解物のSDS-PAGE

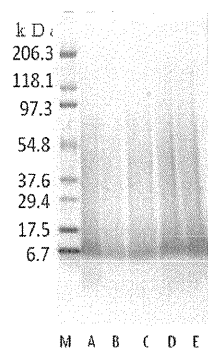
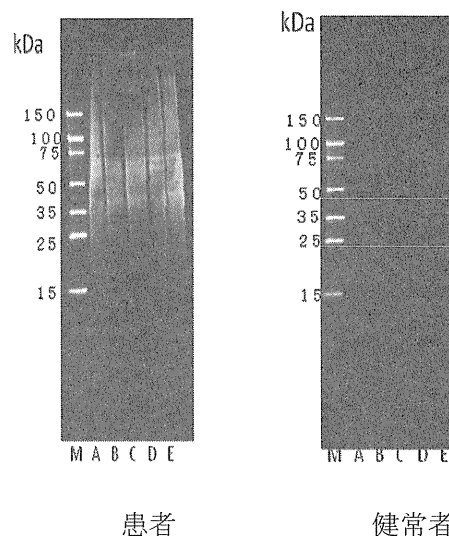


図1. 小麦加水分解物のSDS-PAGE

5種類の抽出用溶液(A; 10mMリン酸緩衝液、pH7.0、B; 1M塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液、pH7.0、C; 3Mチオシアン酸ナトリウムを含む0.05Mトリス-HCl緩衝液、pH7.5、D; 4%SDS、E; 7M尿素、2Mチオ尿素を含む40mMトリス-HCl緩衝液、pH7.5)を用いて小麦加水分解物(グルパール19S)を抽出した。ついで常法に従ってSDS-PAGEを行った。その結果、抽出方法による差異は認められず、比較的高分子から低分子領域まで幅広くスメ

ア状の泳動パターンを示した。とくに6.7kD付近は濃く染色されていた(図1)。



A⇒10mMPB(pH7,0)
B⇒10mM PB containing 1M NaCl
C⇒0,05M Tris-HCL containing 3M NaSCN(pH7,5)
D⇒4%SDS
E⇒40mM Tris-7M Urea+2M Thio Urea(pH7.5)

図2. 小麦加水分解物のウェスタンブロッティング

SDS-PAGE後、ウェスタンブロッティングを実施したところ、SDS-PAGEの染色結果と比較して、高分子領域に強く陽性反応が認められた(図2)。

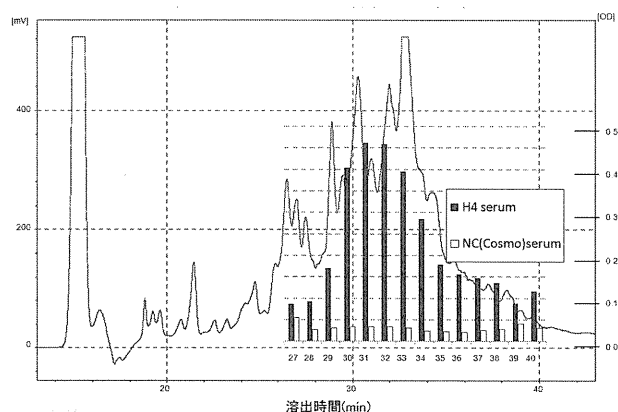


図3. CM化グルテンのトリプシン消化物逆相クロマトグラフィおよび画分のELISA結果

小麦加水分解物（グルパール19S）のSDS-PAGEの結果では、スメア状となり、抗原を分離することは困難であると考え、グルテンをCM化した後、トリプシンを用いて加水分解を行った。ついで、逆相クロマトグラフィによってペプチドマッピングを実施したところ、複数のピークが得られ、分画後、患者血清を用いてELISAを行った。図3に示したように、分画番号30、31をピークとした陽性反応が認められた。

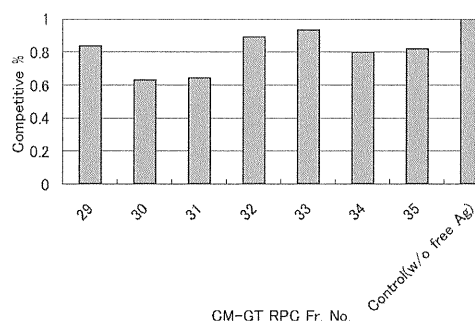


図4. トリプシン消化グルテンのグルパール19Sに対する競合ELISA結果

阻害活性が認められたことから、分画番号30、31には、グルパール19Sに共通するエピトープが存在していることが示唆された。

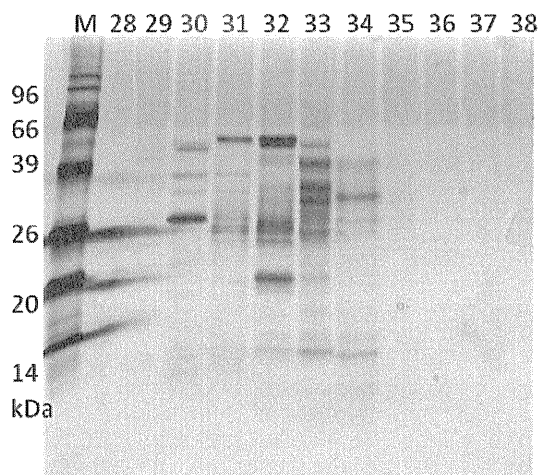


図5. 小麦加水分解物（グルパール19S）の逆相クロマトグラフィによる画分のSDS-PAGE

逆相クロマトグラフィにより得られた画分について、患者血清を用いたELISAによってその反応性を調べた結果、最も強く陽性反応が認められた分画番号30、31の泳動パターンを比較したところ、30kD付近に、共通するバンドが2本認められた。

D. 考察

SDS-PAGEの結果より、当該小麦加水分解物（グルパール19S）の分子量は低分子（分子量約6kD程度）から高分子（分子量約90kD程度）まで幅広く分布していること、また、ウェスタンブロッティングの結果より、20kD～150kD以上の領域に対して反応が認められた。また、泳動、ウェスタンブロッティングともにスメア状を呈しており、単純に、小麦タンパク質が加水分解されて生成するペプチドの集合ではないことが想定された。すなわち、加熱、酸加水分解により、グルタミンおよびアスパラギン、グルタミン等のアミノ酸は脱アミド化され、アスパラギン酸、グルタミン酸に変換される。また、共存する糖とのアミノカルボニル（マーラード）反応などによって生成したペプチドが修飾を受けるなどによって新たな抗原が生じている可能性が考えられる。

グルテンをCM化後、トリプシン消化により低分子化を図り、逆相クロマトグラフィによってペプチドマッピングを実施した結果、複数のピークが得られ、分画後、患者血清を用いて各画分に対する反応性を調べたところ、分画番号30、31をピークとする強い陽性反応が認められた。分画番号30、31について、SDS-PAGEで泳動パターンを調べたところ、