

20/229033A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

# 成人独自のアナフィラキシーの 実態と病態に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福富 友馬

平成25(2013)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

成人独自のアナフィラキシーの実態と病態に関する研究

福 富 友 馬 …………… 1

### II. 分担研究報告書

1. 加水分解小麦関連経口小麦アレルギーに関する普及啓発活動と  
診療体制確立に関する研究

福 富 友 馬 …………… 9

2. 加水分解小麦の感作性・惹起性に関する研究

手 島 玲 子 …………… 11

3. 食物タンパク質由来化粧品添加物の抗原解析

板 垣 康 治 …………… 27

4. 加水分解小麦のアレルゲン性に関する研究

千 貫 祐 子 …………… 31

5. お茶のしずく石鹼使用後発症した食物依存性運動誘発アナフィラ  
キシーを含むコムギ食物アレルギー患者の経過観察  
—初診時より1年以上経過した症例の転帰—

岸 川 禮 子 …………… 35

6. 一般集団における自己申告の小麦アレルギー集団に対する  
クラスター解析

東 朋 美 …………… 39

7. 成人薬剤アレルギーの危険因子に関する疫学的検討

谷 口 正 実 …………… 43

8. ハンノキ花粉症と関連した大豆食品によるクラス2食物アレルギーの  
6例の検討

相 原 道 子 …………… 51

9. 成人果物野菜アレルギー患者の感作アレルゲンプロファイル

福 富 友 馬 …………… 55

10. 末梢血好塩基球 CD203c 発現誘導を用いた鶏卵負荷試験の  
重症度予測に関する研究

海 老 澤 元 宏 …………… 57

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

…………… 61

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業))  
総括研究報告書

成人独自のアナフィラキシーの実態と病態に関する研究

研究代表者	福 富 友 馬	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療薬開発研究室長
研究分担者	相 原 道 子	横浜市立大医学研究科環境免疫病態皮膚科学 教授
	板 垣 康 治	北海道文教大学人間科学部健康栄養学科 教授
	海老澤元宏	国立病院機構相模原病院臨床研究センターアレルギー性疾患研究部長
	岸 川 禮 子	独立行政法人国立病院機構福岡病院アレルギー科医長
	谷 口 正 実	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 病態総合研究部部長
	千 貫 祐 子	島根大学医学部皮膚科学教室 助教
	手 島 玲 子	国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 部長
	東 朋 美	金沢大学医薬保健研究域医学系・環境衛生学・公衆衛生学 助教
研究協力者	秋 山 一 男	国立病院機構相模原病院 院長
	池 澤 善 郎	国際医療福祉大学熱海病院
	古 川 福 実	和歌山県立医科大学 医学部皮膚科学 教授
	松永佳世子	藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学 教授
	森 田 栄 伸	島根大学医学部皮膚科学教室 教授
	田 中 宏 幸	岐阜薬科大学 機能分子学大講座 薬理学研究室
	安 達 玲 子	国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 室長
	中 村 亮 介	国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 主任研究官
	酒 井 信 夫	国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 主任研究官
	中 村 里 香	国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 研究員
	松 倉 節 子	横浜市立大学市民総合医療センター皮膚科 講師
	河 野 真 純	横浜市立大学市民総合医療センター皮膚科 診療医
	杉 山 晃 子	国立病院機構福岡病院 医師
	西 江 温 子	国立病院機構福岡病院 医長
	石 松 明 子	国立病院機構福岡病院 医師
	嶋 田 精 輝	国立病院機構福岡病院 運動療法士
	下 田 照 文	国立病院機構福岡病院 臨床研究部長
	小 田 嶋 博	国立病院機構福岡病院 副院長
	岩 永 知 秋	国立病院機構福岡病院 院長
	佐藤さくら	国立病院機構相模原病院臨床研究センターアレルギー性疾患研究部
	柴 田 夕 夏	国立病院機構相模原病院
	南 崇 史	国立病院機構相模原病院臨床研究センター
	齋 藤 明 美	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療薬開発研究室
	安 枝 浩	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療薬開発研究室

#### 研究要旨：

成人の食物アレルギーやアナフィラキシーは小児のそれと大きくその臨床像と病態が異なるにも関わらず、その病態に関しては十分に検討されてきていない。成人においても食物アレルギーなどが稀でないことを考えると、成人独特の病態にもっと多くの関心が払われるべきである。

今年度は、社会問題になっている加水分解小麦に対するアレルギーの実態把握と病態解明と同時に、その他の小児・成人の食物アレルギーに関する臨床研究、成人の薬剤アレルギーに関する疫学研究を行った。

加水分解小麦への経皮経粘膜感作によって発症した小麦アレルギー（主に（旧）茶のしずく石鹼による小麦アレルギー）に関して、本研究班で明らかになったことを要約すると以下のとおりである。

- 1) 当該疾患による小麦アレルギーは、小麦の経口摂取により発症した小麦アレルギーと臨床像が大きく異なる（H23 年度成果）。
- 2) 臨床的観察から、当該疾患の患者の大部分が加水分解小麦を含有する「（旧）茶のしずく石鹼」を使用していた（H23 年度成果）。
- 3) この石鹼の使用と小麦アレルギーの流行の疫学的な関係も証明された（H23 年度成果）。
- 4) この石鹼に含有されていたグルパール 19S という加水分解小麦は、天然の小麦にはない独自の抗原性を有している（H23 年度成果）。この抗原性には加水分解小麦の分子量が大きく関与しており、グルテンの脱アミド化が関与していることが推察される（H24 年度成果）。
- 5) グルパール 19S は、天然小麦に比べて経皮的な感作能力が高い（H24 年度成果）。
- 6) 当該疾患は石鹼の使用の中止（加水分解小麦への暴露の消失）により、病態が改善傾向に向かう患者が多いが、現状では完治している症例は稀である（H24 年度成果）。

来年度は、グルテンの脱アミド化による感作性に関する知見、共存する界面活性剤の感作性に与える修飾効果、脱アミド化したエピトープによるエピトープ解析を行ってゆく予定である。

果物野菜アレルギーに関しては、PR-10 タンパクへの感作の重要性が再確認された。今後は、PR-10 の次に重要なプロフィリン感作の臨床的意義について検討する必要があると考えている。また、これらの知見は、上述の化粧品関連食物アレルギーと合わせて、成人食物アレルギーの発症において腸管外感作ルートに特に留意しなければいけないことを示していると考察する。

薬剤アレルギーの危険因子も明らかになった。今回の検討では薬剤アレルギーの危険因子として肥満が上がってきており、薬剤アレルギーにも生活習慣病的因子が関与している可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

アナフィラキシーは、最重症型の致死性の即時型アレルギー反応であり、死の恐怖と隣り合わせで日常生活を送る患者のみならず、患者を抱える社会に対しても重大な負担を強いる原因となっている疾患である。

成人の食物アレルギーやアナフィラキシーは小児のそれと大きくその臨床像と病態が異なるにも関わらず、その病態に関しては十分に検討されてきていない。成人においても食物アレルギーなどが稀でないことを考えると、成人独特の病態にもっと多くの関心が払われるべきである。さらに、成人の食物アレルギーやアナフィラキシーは、成人の一般人口のアトピー

体質を持つものの割合の増加に従って、その有病率が今後増加してくることが推測される。小児の食物アレルギーと同様に、今後は、成人の食物アレルギーも今よりもっと大きな社会的インパクトを持ってくるようになると考えられる。

これまで多くの研究が、花粉など吸入性抗原に対する、経気道粘膜の感作が、成人の食物アレルギーの発症原因として非常に重要であることを示してきている。最近になって私たちは美容石鹼中の加水分解小麦に対する接触性感作により発症した小麦アレルギーの大流行を経験した。この事件は結果的に、成人における食物アレルギーの腸管以外の感作ルートの重

要性を再認識させるものとなってしまった。さらに、この疾患は、我々が何気なく使用している化粧品・医薬部外品など含有される食物タンパク質由来の添加物が、我々のアナフィラキシーの発症やその流行に関与している可能性を示唆しており、公衆衛生上の重大な問題であると考えている。

今年度は、社会問題になっている加水分解小麦に対するアレルギーの実態把握と病態解明と同時に、その他の小児・成人の食物アレルギーに関する臨床研究、成人の薬剤アレルギーに関する疫学研究を行った。

## B. 研究方法

<加水分解小麦含有洗顔石鹸関連の小麦アレルギーに関する普及啓発活動、診療体制整備>

① 福富（研究代表者）らは、インターネット上に情報ページを立ち上げることにより、一般市民、医療従事者を対象に、加水分解小麦の経皮経粘膜感作による小麦アレルギーという疾患・病態に関する正しい情報の普及啓発活動を行った。

<加水分解小麦関連小麦アレルギーの病態解明>

② 手島（国立医薬品食品衛生研究所）らは、動物実験モデルにおいて、加水分解小麦の感作能を評価した。さらに *in vitro* 惹起試験（EXiLE 法）を用いて、加水分解小麦の惹起能を検討した。

③ 板垣（北海道文教大学）らは、ウエスタンブロッティング、クロマトグラフィ、グルテンの酵素分解と逆相クロマトグラフィによるペプチドマッピングにより、加水分解小麦の抗原性に関して検討した。

④ 千貫（島根大学）らは、各種の加水分解小麦を対象に、ウエスタンブロット法、患者好塩基球活性化マーカーCD203c 発現測定によりアレルギー性の違いについて検討した。

<加水分解小麦関連小麦アレルギーの臨床的検討>

⑤ 岸川（福岡病院）らは加水分解小麦関連経口小麦アレルギー症例の、長期予後に関して検討した。

<食物・薬剤アレルギーの疫学調査>

⑥ 東（金沢大学）らインターネットを介して、

小麦アレルギーの大規模疫学調査を行い、調査結果の妥当性に関して検討した。

⑦ 谷口（相模原病院）らは、インターネットを介して薬剤アレルギーの疫学調査を行い、薬剤アレルギーの危険因子解析を行った。

<成人果物野菜アレルギーの感作プロファイル解析>

⑧ 相原（横浜市立大学）らは、成人大豆アレルギー患者の感作プロファイル解析を行った。

⑨ 福富（研究代表者）らは、成人果物野菜アレルギー患者の感作プロファイル解析を行った。

<末梢血好塩基球 CD203c 発現誘導による食物アレルギーの診断>

⑩ 海老澤（相模原病院）らは、小児鶏卵アレルギー患者の抗原刺激時の末梢血好塩基球 CD203c 発現量の測定が鶏卵負荷試験の重症度予測に有用かどうかを検討した。

（倫理面への配慮）

研究対象となる患者、特に検体提供者となる患者に対しては十分な説明と同意の上（文書説明と文書同意）遂行した。

実験動物に関しては動物愛護上の配慮を十分に行った。すべての研究過程や結果において匿名化を行い、個人情報の保護に十分配慮した。

## C. 研究結果

① 迅速な情報ページの立ち上げにより、効果的な普及啓発活動を行うことができた。

② マウス経皮感作実験から、グルパール 19S はグルテンと比較して強い経皮感作能を有することが示された（Allergy 2012）。また、患者血清を利用した検討でもグルパール 19S や酸加水分解したグルテンはグルテンに比べ惹起能が高いことが示された（IAAI 2012）。

③ 加水分解小麦アレルギー患者の血清を用いた検討により、イオン交換樹脂処理により部分脱アミド化したグルテンは、native のグルテンに比べて抗原性が高いことが示された。このことにより、グルテンのアミノ酸配列の脱アミド化がグルパール 19S の新規の抗原性に関わっている可能性が示唆された。

④ 酸分解の高分子量の加水分解小麦が高い抗原性を有していることが明らかになり、不完全な分解もしくは処理中の再重合による高分子量の蛋白質から構成される加水分解小麦がアレルギーの発症の原因で

あることが示唆された。

- ⑤ 加水分解小麦への経皮感作によって発症した小麦アレルギー症例は、石鹼中止後症状は軽快傾向にあるが、約2年の経過では完治していない実態が明らかになった。
- ⑥ 自己申告による小麦アレルギー患者の小麦による誘発症状に対する回答パターンによるクラスター解析により、自己申告による小麦アレルギーの約半数以上が実際はかなり小麦を日常的に摂取している実態が明らかになった。また、茶のしずく石鹼により発症したと思われる症状が強いクラスターも存在することが明らかになった（投稿準備中）。
- ⑦ 薬剤アレルギーの危険因子として、喘息、鼻炎、食物アレルギーなどのアトピー素因のみならず肥満も重要であることが明らかになった（投稿準備中）。
- ⑧ 成人大豆アレルギーにおける Gly m 4 感作の重要性が明らかになった。さらにその他のアレルゲンタンパクの関与が疑われる症例も存在することが明らかになった。
- ⑨ 成人果物野菜アレルギーに対する ISAC による感作プロファイル解析により、全体の70%の症例は PR-10 に、30%の症例は profilin に感作され、この二つが果物野菜アレルギーの2大重要アレルゲンコンポーネントであることが明らかになった（投稿準備中）。
- ⑩ サブオプティマルの濃度における卵白および OVM 刺激による好塩基球 CD203c 発現量の測定は鶏卵負荷試験による全身症状誘発の予測に有用であることが示唆された。

#### D. 考察

加水分解小麦への経皮経粘膜感作によって発症した小麦アレルギー（主に（旧）茶のしずく石鹼による小麦アレルギー）に関して、本研究で明らかになったことを要約すると以下のとおりである。

- 1) 当該疾患による小麦アレルギーは、小麦の経口摂取により発症した小麦アレルギーと臨床像が大きく異なる（H23年度成果）。
- 2) 臨床的観察から、当該疾患の患者の大部分が加水分解小麦を含有する「（旧）茶のしずく石鹼」を使用していた（H23年度成果）。
- 3) この石鹼の使用と小麦アレルギーの流行の疫学的な関係も証明された（H23年度成果）。
- 4) この石鹼に含有されていたグルパール 19S という加水分解小麦は、天然の小麦にはな

い独自の抗原性を有している（H23年度成果）。この抗原性には加水分解小麦の分子量が大きく関与しており、グルテンの脱アミド化が関与していることが推察される（H24年度成果）。5) グルパール 19S は、天然小麦に比べて経皮的な感作能力が高い（H24年度成果）。6) 当該疾患は石鹼の使用の中止（加水分解小麦への暴露の消失）により、病態が改善傾向に向かう患者が多いが、現状では完治している症例は稀である（H24年度成果）。

来年度は、グルテンの脱アミド化による感作性に関する知見、共存する界面活性剤の感作性に与える修飾効果、脱アミド化したエピトープによるエピトープ解析を行ってゆく予定である。

果物野菜アレルギーに関しては、PR-10 タンパクへの感作の重要性が再確認された。今後は、PR-10 の次に重要なプロフィリン感作の臨床的意義について検討する必要があると考えている。また、これらの知見は、上述の化粧品関連食物アレルギーと合わせて、成人食物アレルギーの発症において腸管外感作ルートに特に留意しなければいけないことを示していると考察する。

薬剤アレルギーの危険因子も明らかになった。今回の検討では薬剤アレルギーの危険因子として肥満が上がってきており、薬剤アレルギーにも生活習慣病的因子が関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

今年度は、現在社会問題になっている加水分解小麦に対するアレルギーの実態把握と病態解明、さらには正確な情報の普及啓発活動を最重要課題とし、研究を進めてきた。来年度以降も加水分解小麦アレルギーに関する知見を早急に集積し、その結果を行政に還元、一般市民に普及啓発してゆくとともに、その他の原因による成人アナフィラキシーの実態解明、病態解明に関する研究を進めてゆく。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sekiya K, Fukutomi Y, Nakazawa T, Taniguchi M, Akiyama K. Delayed anaphylactic reaction to mammalian meat. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012; 22(6): 446-7.
- 2) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R. Evaluation of Allergenicity of Acid-Hydrolyzed Wheat Protein Using an in vitro Elicitation Test. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012 Oct 17; 160(3): 259-264.
- 3) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R. Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten. *Allergy.* 2012 Sep 21.
- 4) Mitsui C, Taniguchi M, Fukutomi Y, Saito A, Kawakami Y, Mori A, Akiyama K. Non Occupational Chronic Hypersensitivity Pneumonitis due to *Aspergillus fumigatus* on Leaky Walls. *Allergol Int.* 2012 Sep;61(3):501-2.
- 5) Konno S, Hizawa N, Fukutomi Y, Taniguchi M, Kawagishi Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Akasawa A, Akiyama K, Nishimura M. The prevalence of rhinitis and its association with smoking and obesity in a nationwide survey of Japanese adults. *Allergy.* 2012 May;67(5):653-60.
- 6) Fukutomi Y, Sjölander S, Nakazawa T, Borres P M, Ishii T, Nakayama S, Tanaka S, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakamura H, Akiyama K. Clinical relevance of IgE to rGly m 4 in diagnosis of adult soybean allergy: *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Mar; 129 (3): 860-863. E3
- 7) Sekiya K, Taniguchi M, Fukutomi Y, Mitsui C, Tanimoto H, Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Hasegawa M, Akiyama K. Persistent airflow obstruction in young adult asthma patients. *Allergol Int.* 2012 Mar;61(1):143-8. Epub 2011 Dec 25.
- 8) Fukutomi Y, Kawakami Y, Taniguchi M, Saito A, Fukuda A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Allergenicity and Cross-Reactivity of Booklice (*Liposcelis bostrichophila*): A Common Household Insect Pest in Japan.: *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;157(4):339-348.
- 9) Fukutomi Y, Taniguchi M, Tsuburai T, Tanimoto H, Oshikata C, Ono E, Sekiya K, Higashi N, Mori A, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Obesity and aspirin intolerance are risk factors for difficult-to-treat asthma in Japanese non-atopic women: *Clin Exp Allergy.* 2012 May; 42 (5): 738-746
- 10) Fukutomi Y, Taniguchi M, Nakamura H, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Akasawa A, Akiyama K. Association between Body Mass Index and Asthma among Japanese Adults: Risk within the Normal Weight Range: *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;157(3):281-287.



11) Higashi N, Mita H, Yamaguchi H, Fukutomi Y, Akiyama K, Taniguchi M. Urinary tetranor-PGDM concentrations in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis; J Allergy Clin Immunol. 2012 Feb;129 (2): 557-559

12) Tanaka T, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Fukutomi Y, Shibata A, Sugimoto N, Hatta K, Eboshida A, Konoshita T, Nakamura H. The Differences in the Involvements of Loci of Promoter Region and Ile50Val in Interleukin-4 Receptor  $\alpha$  Chain Gene between Atopic Dermatitis and Japanese Cedar Pollinosis; Allergol Int. 2012 Mar; 61 (1): 57-63

13) 福富友馬 食物関連化粧品添加成分により発症する経口食物アレルギー; 臨床免疫・アレルギー科 2012 58(1): 57-6

14) 福富友馬、谷口正実、秋山一男. 喘息亜型と難治化因子: 国内外の疫学研究からの知見; IgE practice 2012 15, 21-24

15) 福富友馬. 化粧品に含まれる食物アレルギーによる経皮感作; Visual Dermatology 2012 11 (3): 284-286

16) 福富友馬 谷口正実 秋山一男. 喘息亜型とのかかわりからみた難治性喘息; 呼吸器内科 2012 21(1) 61-68

17) 福富友馬 秋山一男. ブナ目 (カバノキ科・ブナ科) 花粉症 -スギに隠れた花粉症-; Pharma Media 2012 30(2); 83-87

18) 福富友馬. 成人の食物アレルギー -発症の本当の原因は食物とは限らない-; 日本醫事新報 2012 4580; 86-87

19) 福富友馬. ハチおよびその他の昆虫アレ

ルギー アレルギー・リウマチ膠原病診療 最新ガイドライン p121-124 2012 2012/4/11 (総合医学社 東京)

## 2. 学会発表

1) Yuma Fukutomi<sup>1</sup>, Masami Taniguchi, Akira Akasawa, Kazuo Akiyama. Association between asthma symptoms and severity of allergic rhinitis determined on the basis of ARIA classification: An internet-based survey; European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) congress 2012.6.17 Geneva, Switzerland (ポスター発表)

2) Yuma Fukutomi<sup>1</sup>, Masami Taniguchi, Hiroyuki Nakamura, Kazuo Akiyama. Epidemiological link between wheat allergy and exposure to hydrolyzed wheat protein in skin and hair care products: European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) congress 2012.6.18 Geneva, Switzerland (ポスター発表)

3) 福富友馬 手島玲子 松永佳世子 板垣康治 谷口正実 秋山一男. グルパール 19 S で感作された加水分解小麦アレルギー患者におけるその他の加水分解小麦への感作状況: 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5.12 大阪 (一般演題)

4) 福富友馬 南崇史 谷口正実 秋山一男. 通常の成人小麦アレルギーと加水分解小麦への経皮経粘膜感作により発症した小麦アレルギー患者の臨床像と臨床経過の差異: 第 66 回国立病院総合医学界 2012.11.16 神戸 (一般演題)

5) 福富友馬 谷口正実 粒来崇博 谷本英則 押方智也子 小野恵美子 関谷潔史 東憲孝 森晶夫 長谷川眞紀 秋山一男. 成人喘息の難治化因子: 非アトピー型女性喘息における肥満とアスピリン不耐症: 第 66 回国立病院総合医学界 2012.11.17 神戸 (一般演題)

6) 福富友馬 谷口正実 秋山一男. 肥満と喘息: 第 22 回 国際喘息学会日本・北アジア部会 2012.7.7 福岡 (シンポジウム)

7) 福富友馬. 花粉症と P F A S における ImmunoCAP ISAC の使用経験: 第 3 回 Molleculer Allergology ワークショップ 2012.1.29 東京 (シンポジウム)

8) 福富友馬. アレルギー性鼻炎と喘息の疫学的な関係: 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012.4.21 神戸 (イブニングシンポジウム)

9) 福富友馬. (旧)茶のしずく石けんによる小麦アレルギー問題からの教訓: 第 43 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会 2012.6.15 東京(講演)

10) 福富友馬 川上裕司 谷口正実 斎藤明美 福田安住 安枝 浩 中澤卓也 長谷川真紀 秋山一男. 室内塵中に最も普遍的に認められる微小昆虫・ヒラタチャタテの吸入性抗原としての独自性と交差性: 第 37 回 KRC 神奈川呼吸カンファレンス 2012.7.27 横浜 (シンポジウム)

#### 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

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業))  
分担研究報告書

加水分解小麦関連経口小麦アレルギーに関する普及啓発活動と診療体制確立に関する研究

研究代表者 福 富 友 馬 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断治療薬開発研究室長  
研究協力者 秋 山 一 男 国立病院機構相模原病院臨床研究センター長  
相 原 道 子 横浜市立大医学研究科環境免疫病態皮膚科学 教授  
池 澤 善 郎 国際医療福祉大学熱海病院  
岸 川 禮 子 国立病院機構福岡病院 アレルギー科医長  
千 貫 祐 子 島根大学医学部皮膚科学教室 助教  
古 川 福 実 和歌山県立医科大学 医学部皮膚科学 教授  
松 永 佳 世 子 藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学 教授  
森 田 栄 伸 島根大学医学部皮膚科学教室 教授

研究要旨：

本研究班設立当初から加水分解小麦関連の小麦アレルギーの問題は、本研究班で解決すべき最重要課題であったが、2011年に入ってから当該疾患が全国のアレルギー専門施設から多数報告されるようになり、同年5月20日に「(旧)茶のしずく石鹼」(悠香)の自主回収が決定してから、この問題が急速に社会問題化した。一般市民と医療機関へのこの問題に関する正確な情報の早急な普及啓発活動と、診療体制の確立が必要となり、緊急でこの問題に対処するための情報ページをリウマチ・アレルギー情報センターのホームページ内に設立すべく準備を開始した。本研究は、日本アレルギー学会、日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会のバックアップのもとに行った。

我々研究班と両学会の有志の先生方のご協力により、緊急に情報ページを設立し、2011年6月8日にホームページを公開できた。同時に日本アレルギー学会、日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会を介して、両学会・学会員に対して、当該疾患の診療への協力を募った。

迅速な情報ページの立ち上げによる、この問題に関する正確な情報の普及啓発効果は非常に大きかったと考えた。

A. 研究目的

本研究班設立当初から加水分解小麦関連の小麦アレルギーの問題は、本研究班で解決すべき最重要課題であったが、2011年に入ってから当該疾患が全国のアレルギー専門施設から多数報告されるようになり、5月20日に「(旧)茶のしずく石鹼」(悠香)の自主回収が決定してから、この問題が急速に社会問題化した。一般市民と医療機関へのこの問題に関する正確な情報の早急な普及啓発活動と、診療体制の確立が必要となり、緊急でこの問題に対処するための情報ページをリウマチ・アレルギー情報センターのホームページ内に設立すべく準備を開始した。本研究は、日本アレルギー学会、日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会のバックアップのもとに行った。

B. 研究方法

我々研究班と両学会の有志の先生方により、緊急に以下の内容からなる情報ページを設立した。

日本アレルギー学会、日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会を介して、両学会・学会員に対して、

当該疾患の診療への協力を募った。

(倫理面への配慮)

本研究は、情報公開のみをその目的としており、個別の患者の臨床情報や検体の採取を必要としなかった。

C. 研究結果

以下のような内容の情報ページの立ち上げを、2011年6月8日に行うことができた。当該研究成果は現在も以下のホームページアドレスにて一般に公開されている

<http://www.allergy.go.jp/allergy/flour/index.html>

小麦加水分解物含有石鹼「茶のしずく」を使用したことにより発症する  
小麦アレルギーに関する情報センター

当該ホームページは以下の 4 つのセクションからなる。

### 1."茶のしずく石鹼"を使用したことにより発症する小麦アレルギーについての FAQ (一般の方向け)

このセクションでは、一般の方を対象に、茶のしずく石鹼を使用して小麦アレルギーが発症する機序に関して、現在までの研究・検討で明らかになった知見に基づき、わかりやすく記載した。

### 2."茶のしずく石鹼"を使用したことにより発症する小麦アレルギーについて疾患概念と診断の目安 (医療従事者向け)

このセクションでは、主に医療従事者を対象に当該石鹼の使用により発症した経口小麦アレルギーと、経口的な小麦タンパクの感作によって発症したと思われる小麦アレルギー一症例について、その病態の違いと鑑別の方法を中心に記載した。

### 3.全国の"茶のしずく石鹼"を使用したことにより発症する小麦アレルギー診療可能施設

このセクションでは、当該疾患の診療可能施設の一覧を公開した。日本アレルギー学会、日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会を介して、両学会・学会員に対して、当該疾患の診療への協力を募った。

### 4."茶のしずく石鹼"を使用したことにより発症する小麦アレルギーと診断された患者さんへ

このセクションでは、当該疾患の患者に対す

る日常生活の注意点に関してわかりやすく記載した。

### D. 考察

本情報ページの迅速な立ち上げは、一般市民と医療従事者のこの問題に関する正確な情報の普及啓発に大きく寄与したと考えられる。我々の情報ページの立ち上げは、2011年7月からの日本アレルギー学会の“化粧品中のタンパク加水分解物の安全性に関する特別委員会”の活動への橋渡しの重要な役割があったと考えている。

### E. 結論

迅速な情報ページの立ち上げによる、この問題に関する正確な情報の普及啓発効果は非常に大きかったと考えた。

### F. 健康危険情報

総括研究報告書参照のこと

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

総括研究報告書

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表 参照のこと

##### 2. 学会発表

総括研究報告書

#### G 研究発表

##### 2 学会発表 参照のこと

### 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

## 加水分解小麦の感作性・惹起性に関する研究

研究分担者	手島玲子	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部	部長
研究協力者	安達玲子	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部	第3室室長
	中村亮介	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部	主任研究官
	酒井信夫	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部	主任研究官
	中村里香	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部	研究員

### 研究要旨：

近年、加水分解小麦 (HWP) を含有する洗顔石鹸の長期使用により小麦アレルギーを発症する事例が数多く報告され、社会的に大きな問題となっている。本研究では、昨年度より、マウスを使用する経皮感作試験系を構築し、この試験系を用いて、茶のしずく石鹸に含有されていた加水分解小麦タンパク質であるグルパール 19S 及び関連物質の経皮感作性について検討を進めてきた。本年度は、引き続きこの試験系を用い、グルパール 19S とその原料であるグルテンの経皮感作性の比較、加水分解がグルテンの経皮感作性に与える影響等について、更なる検討を行った。その結果、グルパール 19S が強い経皮感作性を有する点について再現性のある結果が得られ、本試験系の有用性が示された。また、グルテンの加水分解がある程度進行した状態では経皮感作性が増大し、さらに加水分解が進行すると経皮感作性は消失することが示された。

また、HWP の交叉惹起能の検討として、酸加水分解時間の異なる HWP を用いて HWP 感作および従来型の小児小麦アレルギー患者 (PedWA) 血清による *in vitro* ヒト化マスト細胞活性化 (EXiLE) 試験を行ったところ、HWP 感作血清では酸加水分解によりグルテンの惹起能が増大し、酸加水分解が進んでもその惹起能は減弱しにくい傾向にあったが、PedWA 患者血清では、グルテンの酸加水分解の処理時間に応じて惹起能は速やかに減弱した。また、限外ろ過膜を用い、各種 HWP を非変性下でサイズ分画し、それぞれの画分の IgE 応答性を EXiLE 法により解析したところ、分画分子量 3kDa 以下の画分には IgE 反応性を誘導する能力がないことが示された。

### A. 研究目的

近年、加水分解小麦 (HWP) を含有する洗顔石鹸 (茶のしずく：株式会社悠香販売) の長期使用により、小麦製品を摂取した際にアレルギー症状を呈する事例が数多く報告されている。日本アレルギー学会特別委員会の疫学調査における平成 25 年 1 月 20 日現在の症例登録数は 1,769 例に達している。これらの患者には重篤な症例も多く、社会的に大きな問題となっている。洗顔石鹸の成分により感作される経路としては、皮膚から吸収される経皮感作、あるいは目や鼻の粘膜から吸収される経粘膜感作が考えられる。

私共のグループでは、「成人独自のアナフィラキシーの実態と病態に関する研究」の基礎部門の中で、より抗原性の低い食物タンパク質由来の化粧品、並びに医薬部外品の加工方法、濃度、使用方法の提唱をすることを大きな目的とし、平成 24 年度は、平成 23 年度に続き、動物、細胞モデルを用いる加水分解小麦の感作性並びに惹起能に関する研究を担当した。茶のしずくに含まれていた小麦酸加水分解物であるグルパール 19S を用いてマウスを用いる経皮感作試験の手法を確立すること、グルパール

19S とその原料であるグルテンの経皮感作性の比較、グルパール 19S 以外の加水分解小麦タンパク質の経皮感作性の検討、並びにグルテンの酸加水分解の経時変化による感作能の変化の検討を行うことを第一の目標として、また、ヒト化マスト細胞を用いる *in vitro* 惹起試験を用いて、グルパール 19S 並びに酸加水分解の経時変化による惹起能の変化の検討、並びに惹起能を持つ分子サイズについても検討することを第二の目標とした。

### B. 研究方法

#### 抗原懸濁液の調製

グルパール 19S は片山化学工業株式会社より入手した。グルテン (Sigma G5004) およびグルパール 19S 粉末を 100 mg/mL となるよう 1M Tris (pH 11.4) に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を作製した。経皮感作にはストック懸濁液を PBS で 10 倍希釈し、pH を 8 付近に調整したものを用いた。

グルテンの酸加水分解については、(i) 動物実験用には、グルテンのストック懸濁液に、グルテン終濃度 40 mg/mL かつ pH1 となるように

1N 塩酸を加え、100°Cのヒートブロック上で、0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 48 時間加熱した。所定の時間経過後、1.5N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和し加水分解反応を停止した後、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。分解 0 時間のサンプルは、1N 塩酸を予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を 40 mg/mL 加え、加熱は行わずに調製した。(ii)細胞試験用には、グルテンの酸加水分解には、0.1N 塩酸中にストック懸濁液を 1 mg/ml となるよう加え、100°Cのヒートブロック上で 0.5、1、3、6、9、12、24、48 時間加熱した。所定の時間経過後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液で中和し、加水分解反応を停止した。0 時間の試料は、0.1 N 塩酸を予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を 1 mg/ml となるよう加え、加熱は行わなかった。

加水分解の進行は、10-20%または、15-25% アクリルアミドゲル (D.R.C.株式会社) を用いた SDS 電気泳動により確認した。

#### 加水分解小麦 (HWP) 懸濁液の限外ろ過による簡易分画

前述のごとく作製した酸加水分解 HWP およびグルパール 19S (0.5mg/ml) を、限外ろ過スピンカラム (Microcon/Amicon Ultra, ミリポア) を用いて、分画分子量 10kDa または 3kDa で高分子量側 (HMW) と低分子量側 (LMW) とに分画し、それぞれ元の容量までメスアップした。このとき、分画後の各種 HWP の濃度は、便宜上分画前の HWP 相当量として表すこととした。

#### マウスを用いた経皮感作実験

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 群中の匹数は 5-10 匹とし、8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間抗原懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリエ」(鳥居薬品株式会社)を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50  $\mu$ L の抗原懸濁液 (500  $\mu$ g of protein) を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチテスターの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3 日間の感作後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの感作後、抗原特異的 IgE 抗体及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg/100  $\mu$ L を腹腔内投与 (i.p) して行っ

た。i.p. 後 30 分間、マウスの直腸内体温変化の測定を行った。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 1 の基準に従ってスコアリングした。惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血漿中ヒスタミンの濃度を、Histamine EIA Kit (SPI-BIO) にて測定した。

#### 【実験 1】

感作抗原を Table 2 に、感作スケジュールを Fig. 1 に示す。1 群の匹数を 8 匹として、グルパール 19S 及びグルテンの経皮感作性について検討を行った。また、感作時の界面活性剤の共存効果を調べるため、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を終濃度 0.5% となるように抗原懸濁液に添加する群も設定した。

#### 【実験 2】

感作抗原を Table 2 に、感作スケジュールを Fig. 1 に示す。前年度の研究において比較的強い感作性を示したアルカリ加水分解小麦タンパク質である HWP-D (日本化粧品工業連合会を通して入手) について、1 群の匹数を 10 匹とし、経皮感作性を確認するための再試験を行った。

#### 【実験 3】

感作抗原を Table 2 に、感作スケジュールを Fig. 1 に示す。分解時間を変化させた酸加水分解グルテンを抗原とし、経皮感作性について検討した。グルテンの酸加水分解は上述のとおりに行った。中和した懸濁液に SDS を終濃度 0.5% となるように添加し、貼付抗原とした。1 群の匹数を 5 匹として、未分解グルテン (A0h)、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示したもの (A0.5h)、および加水分解が進み、SDS-PAGE で 30 kDa 以上のタンパク質バンドがほぼ消失しているもの (A9h) を抗原として選択した。

#### 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

ヒト化マスト細胞として、転写因子 NF-AT の制御下にホタルルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子およびヒト Fc $\epsilon$ RI 遺伝子を安定的に導入したラット培養マスト細胞株 (RS-ATL8 細胞) を用いた<sup>6,7)</sup>。同細胞をクリアボトム白色 96 ウェルプレートに 5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/50  $\mu$ l ずつ播種し、100 倍希釈した HWP 感作、小児小麦食物アレルギー患者 (PedWA) または従来型の運動誘発性小麦アレルギー患者 (CO-WDEIA) 血清を添加して終夜培養した。細胞洗浄機 (Tecan HydroSpeed) を用いて PBS によりウェルを 3 回洗浄後、10% の非働化ウシ胎児血清を含む MEM 培地に懸濁した各 HWP 抗原溶液により 37°C インキュベータ中で 3 時間細胞を刺激

し、ホモジニアス型基質液 One-GLO™ (Promega) を添加して発光量をルミノメータ EnVision (PerkinElmer) により測定した。測定は duplicate で行ない、細胞の活性化は、抗原未刺激時の発光量を 1 とする相対値で表した。

#### 統計解析

(i) 動物データは Microsoft Excel により集計し、IBM SPSS Statistics ソフトウェアを用いて、V 群を基準とした Dunnett の検定および各群間の Tukey の多重検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

(ii) 細胞実験におけるルシフェラーゼ発現の変化は、健常人血清をネガティブコントロールとする発光量の相対変化を Steel 法により解析した。

#### (倫理面への配慮)

マウスへの経皮感作、採血においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の利用規定に従った。本実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得てから行った。

### C. 研究結果

#### (a) マウスを用いた経皮感作試験

##### 【実験 1】

グルパール 19S 及びグルテンについて、経皮感作性、及び感作時の界面活性剤(SDS)の効果について検討を行った。

Fig.2-1 には、感作 4 週後のマウス血清中の抗原特異的抗体についての検討結果を示す。A、B はそれぞれグルパール 19S 特異的な IgE 及び IgG1 についての検討結果を示している。SDS 共存下グルパール 19S 感作群(HS)、グルパール 19S のみの群(H)の両群とも、血中 IgE、IgG1 が Vehicle 群(V)と比較して有意に増加していた。また C、D はそれぞれグルテン特異的な IgE 及び IgG1 についての検討結果を示している。SDS 共存下グルテン感作群(GS)では V 群と比較して血中 IgE、IgG1 が有意に増加した。グルテンのみの群(G)では IgG1 のみ有意な増加が見られた。また、GS 群でもグルパール 19S に対する有意な反応性が見られること(A、B)、HS 群及び H 群でもグルテンに対する有意な反応性が見られること(C、D)から、グルパール 19S とグルテンの間には交差反応性があることが示された。

Fig.2-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応惹起後の応答を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。

30 分後、HS 群では V 群と比較して平均 3.5 度、H 群では 2.7 度と、体温の大きな低下が見られた。また GS 群でも 2.1 度低下しており、これらの 3 群では V 群との間に有意な差があった。一方 G 群では体温低下は見られなかった。B は惹起 30 分後の血中のヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した H 群では血中ヒスタミン濃度が大きく増大していた。しかし、体温低下が最も大きかった HS 群では、ヒスタミン濃度の増大は見られなかった(この点に関しては後述する)。GS 群及び G 群では、顕著なヒスタミン濃度の増大は見られなかった。C は惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果である。HS 群では平均 3.25 と高いスコアであり、また H 群でも平均 2.25 であった。一方、GS 群では 1.0、G 群では 0.5 と低いスコアであった。

##### 【実験 2】

23 年度において検討したグルパール 19S 以外の加水分解小麦タンパク質のうち、HWP-D について再試験を行った。

Fig.3-1 には、感作 4 週後の抗原特異的抗体産生の検討結果を示す。グルパール 19S 群(19S)、HWP-D 群ともに、4 週間の経皮感作により血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 の顕著な増加が見られた。

Fig.3-2 には、惹起後 30 分間の体温変化(A)、アナフィラキシー症状のスコアリング(C)、及び 30 分後の血中ヒスタミン濃度(B)を示す。体温低下については、19S 群では V 群と比較して平均 2.5 度、HWP-D 群では平均 2.2 度と、大きな体温低下が見られた(A)。惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度は、19S 群、HWP-D 群ともに、V 群と比較して大きく増大していた(B)。アナフィラキシー症状のスコアリングについても、19S 群では平均 3.0、HWP-D 群では平均 2.8 という高いスコアであった(C)。A、B、C のいずれでも、19S 群と HWP-D 群は同程度の結果を示した。

Fig.3-1 では、感作 4 週後の血中で、それぞれの感作抗原に特異的な IgE 及び IgG1 が増加したことを示した。そこで、それぞれの感作抗原に対して産生された抗体が、もう一方の抗原に対してどの程度の反応性を有するかという点に関して、同様に ELISA を用いて検討した。結果を Fig.3-3 に示す。A はグルパール 19S を ELISA の固相抗原とした場合、B は HWP-D を固相抗原とした場合の結果である。A では、Fig.3-1 との場合と同じくグルパール 19S 群で反応性が見られているが、HWP-D 群でも同様に反応性が見られ、V 群との間に有意な差があった。B の場合も、HWP-D 群のみでなく、グルパール 19S 群でも反応性が見られ、やはり



V群との間に有意な差があった。これらの結果から、グルパール19SとHWP-Dの間には交差反応性があることが示された。

#### 【実験3】

グルパール19Sと同様のグルテン酸加水分解物を調製し、その経皮感作性について検討した。

Fig.4-1にはグルテンの加水分解によるSDS-PAGEパターンを経時的な変化を示す。加水分解0.5時間では、SDS-PAGEのパターンはグルパール19Sと類似しており、70kDa以下に広くスミアなパターンを示した。その後時間とともに高分子量側のバンドが消失し、低分子量側に移行した。このパターンをもとに、未分解グルテン(A0h)、グルパール19Sとパターンが類似している0.5時間分解物(A0.5h)、及びほぼ30kDa以下にまで分解されているもの(A9h)を取り上げ、マウスに対する経皮感作性を検討した。

Fig.4-2には、感作4週後の抗原特異的抗体産生の検討結果を示す。IgEについては、グルパール19S群(19S)だけでなく、A0.5h群でも抗原特異的IgEの増加が見られた(A)。またIgG1については、19S群、A0.5h群に加えてA0h群でも増加が見られた(B)。

Fig.4-3には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応惹起後の応答を示す。Aに示すように、惹起30分後、19S群ではV群と比較して平均4.8度低下した。A0.5h群でも4.4度と大きな低下が見られた。一方A0h群では1.2度、A9h群では1.8度であり、V群との間に有意な差は見られなかった。惹起30分後の血中ヒスタミン濃度については、19S群で大きく増大した他、A0.5h群でも有意な増大が見られた(B)。Cにはアナフィラキシー症状のスコアを示す。19S群、A0.5h群はともに平均3.0と高いスコアであったが、A0h群、A9h群はともに1.6とやや低いスコアであった。

#### (b) ヒト化マスト細胞を用いた *in vitro* 惹起試験

##### (i) 酸加水分解グルテンの SDS 電気泳動による分子量変化の解析

酸加水分解グルテンを15-25% SDS 電気泳動により解析したところ、未分解グルテンでは30-40kDa付近を中心に多くのバンドが観察されたが、加水分解が始まると低分子(数kDa)から高分子(数百kDa)までブロードに分布し、その後時間の経過とともに平均分子量は小さくなった(Fig. 5-1A; 昨年度報告済み)。分解12時間後の時点では、ほぼすべてが10kDa以下の見かけの分子量を示した。ただし、SDS電気泳動における泳動度は、一般に単位重量あ

たりに結合する SDS の重量(負電荷)が等しいことを前提としていることに注意を要する<sup>8)</sup>。

##### (ii) 各種小麦アレルギー患者血清を用いた酸加水分解グルテンへの IgE 反応性の解析

上記のごとく加水分解したグルテンおよびグルパール19Sについて、各種の小麦アレルギー患者血清およびヒト化マスト細胞株を用いてIgEの反応性を解析した<sup>4)</sup>。具体的には、健常人8名、グルパール19S感作患者(HWP)10名、小児小麦食物アレルギー患者(PedWA)8名、成人通常型小麦依存性運動誘発アナフィラキシー患者(CO-WDEIA)9名である。これらの患者血清を100倍希釈してRS-ATL8細胞を一晩感作し、洗浄後、100ng/mlの0, 1, 6, 12時間加水分解した酸加水分解HWPおよびグルパール19Sにより37°Cで3時間刺激を行なった。すると、Fig. 5-1Bに示したような応答を示した。すなわち、HWP患者では分解前のグルテンには応答しないが、分解後のグルテンには顕著に反応し、その後時間とともに反応性が減弱した。グルパール19Sにも強く反応した。一方、PedWA患者では、分解前のグルテンに最も強く反応し、分解の時間に応じて反応性が減弱した。グルパール19Sにも反応した。そして、CO-WDEIA患者では、分解前のグルテンに弱い反応性が認められたが、HWPには全く反応しなかった。

##### (iii) 限外ろ過を用いた各種 HWP の分子量と IgE 反応性との関係の解析

上述した通り、酸加水分解HWPおよびグルパール19Sの見かけの分子量は数kDaから数百kDaまで幅広く分布する(Fig. 5-1A)。一般に、加水分解が進行すると、抗原の分子量が低下し、マスト細胞上のIgEを架橋することができなくなると考えられている<sup>9)</sup>。そこで、グルパール19Sを10kDaおよび3kDaの分画分子量を持つ限外ろ過スピンカラムにより連続的に分画し、どの画分にHWP患者血清IgEとの反応性があるかをEXiLE法により調べた。

Fig. 5-2に示した通り、このHWP患者(42歳女性)のIgEはわずか10fg/mlのグルパール19Sにもバックグラウンドの2倍以上の応答を示した。10kDa以上の画分の反応性は、グルパール19S全体の反応性と大差がなかった。一方、3-10kDaの画分では、活性化に必要な抗原濃度は分画前に比べて大幅に増加した。そして、3kDa未満の画分は、全く反応しなかった。なお、ここで示した濃度は、すべて分画前のグルパール19Sに換算した値であることに注意されたい。

次に、同じ患者血清を用い、0, 1, 6, 12時間酸処理したグルテンをそれぞれ3kDaおよび

10kDa で分画したところ、未分解グルテンでは応答性はなく、分解後に現れた IgE 応答性は、分解時間の経過とともに減少していった (Fig. 5-3)。このとき、グルパール 19S と同様に、3kDa 以下の画分には応答性が認められなかった。

#### D. 考察

##### (a) マウスを用いた経皮感作試験

本研究では、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検討するため、昨年度よりマウスを用いた経皮感作試験を行ってきた。その結果、マウスの皮膚にグルパール 19S を浸潤させたパッチを貼付するという感作を 3-4 回 (3-4 週) 繰り返すことにより感作を成立させ、抗原の腹腔内投与によりアレルギー症状 (アナフィラキシー) を誘発することが可能であることを示した。これらの結果は、食物由来タンパク質による感作が経皮的に起こりうるという他のグループの報告とも矛盾しない<sup>10-12)</sup>。本年度は、昨年度行った検討に関して、1 群あたりのマウス匹数を増やしたより信頼性の高い系での再試験、また、昨年の試験結果に新たな結果を加えることにより試験内容を充実させるための試験等を行った。

グルパール 19S 及びグルテンについては、昨年度 1 群 5 匹で検討を行い、グルパール 19S 及びグルテンが経皮感作能を有すること、及び界面活性剤の共存により感作が促進されること等を示した。今回の【実験 1】では、1 群のマウス匹数を 8 匹に設定し、より信頼性の高い実験条件で再試験を行った。その結果、グルパール 19S が明らかな経皮感作能を有し、感作後の腹腔内投与により強いアナフィラキシー症状を誘発すること、グルテンでは SDS 共存下で感作が進行するが、アナフィラキシー症状の程度はグルパール 19S と比較して弱いことを示した。これらの結果は昨年の試験結果とほぼ同様であり、本試験系がタンパク質の経皮感作能を検討する上で非常に有用な系であることが明らかとなった。また、Fig.2-1 に示すように、グルパール 19S とグルテンの間には交差反応性があるという興味深い結果を得ることもできた。SDS については感作を促進する効果が見られたが、この原因としては、抗原であるタンパク質の皮膚透過性を増大させる、あるいは皮膚の免疫系に対してアジュバントとしての作用を示すという可能性が考えられる。Fig.2-2 では、HS 群について、顕著な体温低下やアナフィラキシー症状が見られているにも関わらず、血中ヒスタミン濃度が低いと

いう結果となった。この理由は明らかではないが、1 つの仮説として、感作が非常に順調に進行した場合、感作過程の後半では経皮的惹起がある程度起こり、肥満細胞からのヒスタミン遊離が緩やかに進行しているため、最終的な惹起時に血中ヒスタミン濃度があまり増大しないという可能性が考えられる。

23 年度においては、グルパール 19S 以外の加水分解小麦についても経皮感作性に関するスクリーニング的な検討を行ったが、その中で、アルカリ処理による加水分解小麦タンパク質である HWP-D はグルパール 19S よりやや弱いながらも感作性を示すという結果が得られた。本年度の【実験 2】では、HWP-D の経皮感作能について明確にするため、1 群のマウス匹数を 10 匹に設定し、より信頼性の高い実験条件で再試験を行った。その結果、特異的抗体産生、腹腔内投与惹起後のアナフィラキシー症状ともに、HWP-D はグルパール 19S とほぼ同等の作用を示し、経皮感作能を有することが明らかとなった。また、Fig.3-3 に示すように、両者の間には交差反応性が見られた。

グルパール 19S はグルテンを酸性条件下加熱することによって調製された加水分解物である。そこで【実験 3】では、同様の方法でグルテンの酸加水分解を行い、分解時間を変えることにより分解の程度の異なる分解物を調製し、その経皮感作性について検討した。その結果、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示す 0.5 時間分解物(A0.5h)はグルパールとほぼ同等の感作性及びアナフィラキシー誘発性を示したのに対し、未分解グルテン(A0h)及び分解が進んだ 9 時間分解物(A9h)では弱かった。この結果から、酸加水分解がある程度進行したグルパール 19S あるいは A0.5h は、原料であるグルテンよりも高い感作性を有すること、また、より分解が進んだ A9h はそれ程高い感作性を有していないことが示された。グルパール 19S や A0.5h では、加水分解により構造がやや変化し、通常グルテンではエピトープとはならない配列がエピトープとなることにより、高い抗原性を獲得するのではないかと考えられる。

##### (b) ヒト化マスト細胞を用いた in vitro 惹起試験

SDS 電気泳動によると、酸と加熱により加水分解したグルテンは、見かけの分子量が数 kDa から数百 kDa まで非常に広く分布するようにみえた (Fig. 5-1A)。しかし、前述の通り、SDS 電気泳動における泳動度は、必ずしも実際の分子量を反映しないおそれがある。具体的には、タンパク質の表面電荷に大きな変化が起これば、負に帯電した SDS 分子のタンパク質

への結合量が増え、結果として泳動度の違いとして観察される例がしばしばある<sup>13)</sup>。

タンパク質を酸の存在下で加熱したときに起こる反応としては、ペプチド結合の開裂のほか、グルタミンやアスパラギン残基の脱アミド化がある<sup>14)</sup>。グルテンはグルタミンを非常に多く含むタンパク質であるため、グルタミン残基の脱アミド化が起こりグルタミン酸残基へと変化すれば、多くの負電荷を持つことになる。これにより SDS 分子が結合しにくくなり、泳動度すなわち見かけの分子量に変化が起こる可能性が考えられる。従って、非変性下での分子量(分子サイズ)を知ることも重要である。

今回、限外ろ過膜を用い、各種 HWP を SDS を加えない非変性下で簡便にサイズ分画し、それぞれの画分の IgE 反応性を EXiLE 法により解析した。その結果、グルパール 19S、酸加水分解グルテンのいずれも、分画分子量 3kDa 以下の画分には IgE 反応性を誘導する能力がないことが示された (Figs. 5-2, 5-3B)。加水分解が進行し、ペプチド結合主鎖の開裂が進むことにより、抗原分子が IgE の架橋を十分に誘導することができなくなったためとみられる。SDS 電気泳動の結果を見るかぎり、見かけ上 3kDa 以下のペプチドは加水分解の経過とともに増えてくるが、本結果は IgE 反応性の結果と矛盾しなかった。限外ろ過スピンカラムによるサイズ分画と EXiLE 法はともに非変性下で実施できるため、両者を組み合わせることにより、より生理的な条件に近い形で IgE 反応性を指標とした抗原の分子サイズの解析が可能になると思われた。

## E. 結論

昨年度検討を開始したマウス経皮感作試験系を用い、グルパール 19S を中心に検討を行った。その結果、グルパール 19S が強い経皮感作性を有する点について再現性のある結果が得られ、本試験系の有用性が示された。その他の加水分解小麦タンパク質の 1 種である HWP-D についても経皮感作性が見られ、またグルパール 19S との間に交差反応性があることも示された。また、グルテン酸加水分解物を用いた試験より、加水分解がある程度進行した状態では経皮感作性が増大し、さらに加水分解が進行すると経皮感作性は消失することが示された。また、茶のしずく患者血清を用いた *in vitro* 惹起試験においても、グルパール 19S はグルテンに比べ高い惹起能を有し、分子量 3000 以上の比較的高分子のタンパク質に存在するエピトープが惹起に関係していることが示唆された。

(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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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 Oct;65(10):1266-73
- 7) Nakamura R, Ishiwatari A, Higuchi M, Uchida Y, Nakamura R, Kawakami H, Urisu A, Teshima R. Evaluation of the luciferase assay-based *in vitro* elicitation test for serum IgE. *Allergol Int.* 2012 Sep;61(3):431-7
- 8) Reynolds JA, Tanford C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970 Jul;66(3):1002-7.
- 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) Hsieh KY, Tsai CC, Herbert Wu CH, Lin

RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1067-75.

11) 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

12) 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.

13) Matagne A, Joris B, Frère JM. Anomalous behaviour of a protein during SDS/PAGE corrected by chemical modification of carboxylic groups. *Biochem J*. 1991 Dec 1;280 (Pt 2):553-6.

14) Wright HT. Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1991;26(1):1-52

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R. Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten. *Allergy* 2012; 67:1392-1399.

2) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R. Evaluation of Allergenicity of Acid-Hydrolyzed Wheat Protein Using an in vitro Elicitation Test. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 160: 259-264.

3) 手島玲子: 加水分解小麦によるアレルギーについて、*ファルマシア* 2013; 49(2); 116-120

##### 2. 学会発表

1) 安達玲子、中村里香、酒井信夫、福富友馬、手島玲子、加水分解小麦による経皮感作に関するマウスモデル実験系を用いた検討 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2012.5)

2) 中村里香、中村亮介、安達玲子、板垣康治、福富友馬、手島玲子、酸加水分解小麦のIgE結合性および惹起能の比較検討 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2012.5)

3) 中村亮介、中村里香、安達玲子、板垣康治、松永佳世子、福富友馬、手島玲子、酸加水分解

小麦含有石鹼で感作された患者IgEのin vitro活性化試験による交差反応性の評価 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2012.5)

4) 中村里香、中村亮介、酒井信夫、安達玲子、板垣康治、福富友馬、手島玲子、酸加水分解小麦含有石鹼に感作された患者血清IgE反応性の解析 第19回日本免疫毒性学会学術大会 (2012.9)

5) 安達玲子、中村里香、酒井信夫、福富友馬、手島玲子 各種加水分解小麦の経皮感作能に関するマウスモデル実験系を用いた比較検討 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2012.11-12)

6) 北野高道、山下弘高、安達玲子、手島玲子、福富友馬、松永佳世子、稲垣直樹、田中宏幸 加水分解小麦末による全身感作マウスに及ぼす抗原経口負荷の影響 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2012.11-12)

7) 中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、福富友馬、手島玲子 EXiLE法による加水分解小麦のアレルゲン性における分子サイズの影響の解析 第85回日本生化学会大会 (2012.12)

8) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R. Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice. 52<sup>nd</sup> Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo (2013. 3)

#### 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