

201235045A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス  
総合研究事業

医薬部外品・化粧品に含有される成分の  
安全性確保に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書  
(H24-医薬-指定-014)

研究代表者 手島 玲子

平成25年3月

# 目次

I. 総括研究報告書	
医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究 ……	1
手島 玲子	
II. 分担研究報告書	
1. 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究 ……	9
手島 玲子	
2. 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析 ……	21
伊東 祐二	
3. 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての 動物モデルに関する研究 ……	35
安達 玲子	
4. 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査 ……	55
板垣 康治	
5. 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査 ……	67
海老澤 元宏	
6. 医薬部外品等の国内のアレルギー発症の事例調査並びに事後の 経過観察 ……	73
福富 友馬	
7. 医薬部外品等によるアレルギー発症例の診断法に関する研究 ……	83
松永 佳世子	
8. 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討 ……	95
五十嵐 良明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	101

## 医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究

研究代表者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

### 研究要旨：

医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究を遂行するために、1 主任研究者、7 分担研究者を中心として、10 機関にわたる研究グループを組織した。1) 動物モデルを用いたアレルギー性の解析、2) 医薬部外品等に含まれる成分の物性並びに網羅的抗原性の解析、3) 国内外のアレルギー事例の調査並びに事後の経過観察、4) 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討に関する研究を行った。

### 研究分担者

安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所  
代謝生化学部 室長  
板垣 康治 北海道文教大学人間科学部  
健康栄養学科 教授  
五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部 部長  
伊東 祐二 鹿児島大学理工学研究科  
生命化学専攻課程 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 部長  
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・治療薬開発研究室室長  
松永 佳世子 藤田保健衛生大学医学部  
皮膚科学 教授

### A. 研究目的

いわゆる薬用化粧品として流通している医薬部外品や化粧品(以下「医薬部外品等」という。)には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、小麦、米、コラーゲン、果実といった食品由来の成分や、絹由来の成分が使用されている。薬事法上、医薬部外品及び化粧品は、人体に対する作用が緩和なものされており、その主たる作用のみでなく、使用によって生ずる健康被害についても、人体に対して大きな影響は及ぼさないものと考えられてきていた。

しかしながら、近年、小麦加水分解物(HWP)を含む医薬部外品(茶のしずく石鹸)等使用者による食物依存性運動誘発性アレルギー等の全身性アレルギーの発症など、重大な健康被害が多数報告されており、保健衛生上の重大な課題となっている。この小麦加水分解物による健康被害については、現在のところ、ある特定の小麦加水分解物が原因であると考えられている。

医薬部外品等においては、その原料の成分規格は医薬部外品原料規格などに準拠し、品質の確保が行われている。ただし、注意しなければならない点としては、問題となっている小麦加水分解物(茶のしずく石鹸に使われていたグルパール19S)においても、他の小麦加水分解物とは製造工程が異なり、グルテンを高温(95℃)で40分間の条件で、部分酸加水分解したものであるものの、最終的には既存の成分規格には適合したものとして流通し、使用されていたことである。すなわち、成分規格には適合していても、製造工程の違いによって重篤なアレルギー反応を惹起するような製品が流通する可能性があるということである。

本研究では、まず小麦加水分解物に注目し、その製造工程の違いによって生じるアレルギー反応の惹起性について、動物モデルによる生体反応の解析と、ファージディスプレイ法及びショットガンMS法による網羅的抗原性解析等を実施し検

討を行う。

また、小麦同様、他の原材料による健康被害の発生も予想されることから、国内外の健康被害の状況を調査の上、小麦加水分解物で得られた知見を基に、アレルギー反応の誘起性や成分規格の改定についての検討を行う。

医薬部外品等ではこれまで重大な健康被害が発生することは考えられていなかったため、詳細な研究は行われておらず、本研究による原因の解析とそれによる成分規格の改善については、医薬部外品等の安全性を高める観点から必要な研究である。

## B. 研究方法

医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究並びに総括を手島研究代表者が担当し、医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての動物モデルに関する研究を安達班員が担当し、医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析を伊東班員が担当し、医薬部外品等の国内のアレルギー発症の事例調査並びに事後の経過観察を福富班員が担当し、医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査を板垣班員が、医薬部外品等の国内外のアレルギー発症事例の文献調査を海老澤班員が担当し、医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討を五十嵐班員が担当し、医薬部外品等によるアレルギー発症例の調査と診断法に関する研究を松永班員が担当した。また、医薬部外品成分等によるアレルギーの実態調査については、北海道薬科大学と共同研究を行い、札幌薬剤師会の協力を得た。また、加水分解小麦のゲルクロマトグラフィー等を用いる物性解析で、製品評価技術基盤機構の協力を得、動物モデルを用いる研究の病理解析では、国立医薬品食品衛生研究所病理部の協力を得た。

## C. 研究結果 及び D. 考察

### [1] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

加水分解小麦 (HWP (Hydrolized Wheat Pro-

tein)) に特徴的に発現するタンパク質の探索・同定を目的とし、LC-MS/MSによるショットガン解析及び多変量解析を行った。更に、HWPの品質・物性に関する分析化学的なプロファイリング等を行った。以下その結果を示す。 (i) 多変量解析によるグルパール19S (茶のしずくに含有されていた小麦加水分解物) 特徴的なペプチドの探索：グルテン、グルパール19S、及び酸加水分解が進んだHWP (HWP 24h, 0.1NHC1で100℃, 24時間処理) から得られるトリプシン消化ペプチドのMSデータを比較し、グルパール19Sに特徴的に発現するペプチドを多変量解析により探索した。Progenesis LC-MSソフトウェアを用いて3サンプル間のMSのピーク強度を比較した。観測された32,749本のピークのうち、グルテンとHWP 24hのピーク強度がグルパール19Sのピーク強度の1%未満である179本のピークを抽出し、さらに保持時間が90分未満の消化物であり、ペプチド由来と考えられる10本をグルパール19Sに特徴的なペプチドとして絞り込んだ。そのうち4本の配列をデータベース検索にて、2本の配列をde novo sequencingにて同定した。 (ii) 加水分解小麦の品質・物性に関する検討：グルパール19S及び酸加水分解グルテン試料 (HWP 0.5h~HWP 24h) についてGE Superdex 200x1を用いるサイズ排除(分子篩)クロマトグラフィー (SEC) 及びSDS-PAGEにより、分子量分布の測定を行った。その結果、グルテンの酸加水分解物 (30分処理, HWP 0.5h) がグルパール19Sと同等の分子量パターンを示すことが明らかになった。また、酸加水分解処理時間が長くなるに従って分子量は低下し、3時間 (HWP 3h) 以上の処理で、それより短い処理時間のものに比べ大きくパターンが異なり、ピーク位置の低分子側へのシフトが顕著となった。なお、別途行ったマウス経皮感作試験において、グルパール19S, HWP 0.5hには感作能があるが、HWP9hには感作能がないという結果が得られており、酸加水分解グルテンの場合、タンパク質の分子量が感作性に関与することが示唆された。 (iii) グルテンの脱アミド化分析：ホフマン転位によるグルタミンの

脱炭酸反応を利用した蛍光プレラベル化HPLCによる脱アミド化分析法を提案した。更に、酸加水分解グルテン試料について、網羅的プロテオーム解析法及び定量的プロテオーム解析法を実施し、グルテンに含まれるグルタミン→グルタミン酸変換及びその割合を評価した。その結果、グルテンでのグルタミン酸含量が15%程度であるのに比してグルパール19Sでは、グルタミン酸が50%程度に増加し、酸加水分解によるグルタミン→グルタミン酸の変化(脱アミド化)が顕著に進むことが確認された。

## [II] 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

茶のしずく石鹼による小麦アレルギー発症のメカニズムの解明に向けて、茶のしずく石鹼小麦アレルギー患者並びに、通常型小麦アレルギー患者血漿中の抗体価の測定を行った。その結果、小麦タンパク質グルテンに対するIgG1、IgM、IgE抗体に加え、特に、茶のしずく石鹼小麦アレルギー患者では、グルテン酸加水処理物であるグルパール19Sに対するIgEが高く検出された。これまで、患者の血清中のIgE抗体を用いた交差反応性の研究はされてきたが、クローンレベルでの研究は行われていない。そこで、患者由来の血液リンパ球の抗体遺伝子から構築された抗体ファージライブラリを用いて、アレルギーの原因となるIgE抗体クローンの単離を試みた。

具体的には、茶のしずく患者の血液リンパ球から、全RNAを精製し、これを基に、cDNAを合成した。アレルギーの原因となる抗体クローンを単離するため、VH遺伝子の増幅の際に、IgEの重鎖( $\epsilon$ 鎖)に特異的なDNAプライマーを用いてVH領域を含むIgE抗体重鎖( $\epsilon$ 鎖)遺伝子を増幅し、次に両端部に制限酵素付加のための2次PCRを行い、VH遺伝子を調製した。一方、VLに関しては、通常の方法、すなわち、VL $\kappa$ と $\lambda$ 鎖に特異的なプライマーのセットで、VL遺伝子を増幅し、次に両端部に制限酵素付加のための2次PCRを行い、VL遺伝子を調製した。このようにし

て調製したVHとVL遺伝子は、GSリンカー配列をコードするリンカーDNAとともに、Over extension PCRによって、アセンブリし、単鎖Fv遺伝子を調製した。さらに、得られた単鎖Fvの両端に存在するSfiIとNotI制限酵素サイトを用い、ファージミドベクターpTVKSに導入した。調製したベクターはエレクトロポレーションにより、大腸菌TG1に形質転換した後、ヘルパーファージM13K07の重感染により、単鎖Fv抗体を表面に提示したバクテリオファージ：抗体ファージのライブラリを構築した。

構築した茶のしずく患者由来の抗体ファージライブラリを用いて、グルパール19Sの分子篩分画7に対するバイオパンニングによって、特異的クローンの単離を試みたところ、3つのクローンの単離に成功した。ただし、これらのクローンは、グルパール19Sの画分に対してバイオパンニングを行ったにも関わらず、グルテンに対する特異性が高いという特徴があった。

## [III] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての動物モデルに関する研究

小麦タンパク質酸加水分解物であるグルパール19Sについて、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用い、その用量に依存した経皮感作性、界面活性剤の影響、異なる方法で調製した小麦タンパク質加水分解物の感作性等について検討した。以下、その結果を示す。(i)グルパール19Sの用量依存性では、200  $\mu$ gまたは500  $\mu$ gのグルパール19Sを50  $\mu$ lに溶解させ、経皮感作用に用いた。界面活性剤を共存させない群(H200群、H500群)では、血中のIgE及びIgG1レベル、惹起後の体温低下、アナフィラキシー症状スコア、血中ヒスタミン濃度という4種の指標の全てにおいて、感作時のグルパール19Sの用量依存性が見られた。一方、感作時に0.5% SDSを共存させた場合には、抗体レベル及び惹起後の反応の全てにおいて、SDSによる促進効果が見られた。この時、HS500群とHS200群との間にほとんど差が無く、

グルパール 19S の用量依存性が見られなかったのは、SDS の感作促進効果が大きかったためと考えられ、グルパール 19S は用量依存的な経皮感作性を示すこと、及び界面活性剤である SDS は経皮感作を促進する効果を有することが示された。(ii) 加水分解の条件や分解の程度による皮膚感作性の違いについて検討するため、グルテンをアルカリ性条件 0-12 時間 (Alk 0h- Alk12h) で加水分解し、その経皮感作性の比較検討を行った。その結果、グルテン (及び Alk0h) では、グルパール 19S より弱いもののある程度の感作性が見られたのに対して、Alk0.5h 及び Alk12h では感作性は見られなかった。Alk0.5h は電気泳動上はグルパール 19S とよく類似したパターンを示すが、経皮感作性は全く異なるということになり、分子量以外の要因 (アミノ酸の修飾のされ方の違い等) も感作性に関係していることが考えられた。また、グルパール 19S 感作マウスの血中における TSLP 濃度の検討を行った結果、グルパール 19S を用いて経皮感作を行った群では、経時的に血中の TSLP レベルが増加することが示された。(iii) 脂肪酸ナトリウム塩 5 種について、グルパール 19S の経皮感作性に対する影響を検討した。ラウリン酸ナトリウムは炭素数 12 (C12)、ミリスチン硫酸ナトリウムは炭素数 14 (C14)、パルミチン酸ナトリウムは炭素数 16 (C16)、オレイン酸ナトリウムは炭素数 18 (1 個の不飽和結合を含む) (C18:1)、リノール酸ナトリウムは炭素数 18 (2 個の不飽和結合を含む) (C18:2) である。一方 SDS は炭素数 12 の直鎖の末端に硫酸基がありナトリウム塩となっている。検討の結果、C12 及び C18:2 を用いた場合にはある程度感作が進行し、アナフィラキシー症状も見られたが、その程度は SDS を用いた場合よりも弱かった。一方、C14、C16、C18:1 を用いた場合は、血中の抗体レベルはある程度増加したが、アナフィラキシー症状はほとんど見られなかった。(iv) グルパール 19S で感作したマウスについて組織病理解析を行ったところ、感作部位である皮膚、リンパ節、及びアナフィラキシー反応惹起後の眼瞼において炎症性の病変が見られ、

そのグレードは Vehicle 群と比較して高いという結果が得られた。脾臓については、グルパール 19S 感作により、重量は Vehicle 群と比較して増大したが、病理像における大きな違いは見られなかった。

#### [IV] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査

北海道内の医療機関に勤務する医師、および開業医を対象として、「茶のしずく」アレルギーも含め、小麦加水分解物が添加された化粧品、医薬部外品によるアレルギー発症に関するアンケート調査を実施した。アンケートは 4079 名の医師に配布し、360 名から回答が得られ回収率は 8.8% であった。茶のしずく石鹸使用により、小麦アレルギーを発症した患者を診察した経験があると答えた医師は 37 名 (10.3%) で、その中で「茶のしずく石鹸等による小麦アレルギー情報サイト」への患者登録していない医師が 28 名 (76%) で、そのうち 16 名が、登録することを知らなかったと回答した。なお、「茶のしずく」洗顔石鹸で使用されている小麦加水分解物 (グルパール 19S) 以外の小麦加水分解物を添加している化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例は確認できなかった。アレルギー以外の分野を専門とする医師、開業医などへの情報発信を、より効果的に行う必要性が示唆された。食品成分を化粧品、医薬部外品の素材として製造する業者や、最終製品に使用する業者に対して、成分表示も含めて適切な製造方法を提示、指導することが重要であると思われた。

#### [V] 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査

医薬部外品・化粧品によるアレルギー発症事例について、本邦および諸外国における報告事例を過去 5 年 (2007~2012 年) にわたり調査を行ったところ、医薬部外品の副作用報告は本邦においては加水分解小麦 71 例による蕁麻疹やアナフィラキシーの報告が最も多かった。その他、p-Phenylenediamine (染毛剤) 21 例、Solvent

Yellow33(色素) 12 例などによる接触性皮膚炎の報告があった。諸外国においては Methylisothiazolinone(抗殺菌作用) 4303 例、Nickel Sulfate 2817 例、Fragrance mix1(香料) 1906 例などによる接触性皮膚炎の報告があった。また、栗・牛乳等の食物成分が含まれた製品の使用により、アナフィラキシーを発症した症例が本邦だけでなく諸外国も合わせ数例報告されていた。国内外から医薬部外品や化粧品の含有物質による健康被害が報告されており、引き続き注意喚起することが必要であると思われた。

#### [VI] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症事例調査並びに事後の経過観察

茶のしずく石鹸®(悠香)の使用によりその添加成分である加水分解小麦(グルパール19S®)に経皮経粘膜感作されることによって発症した経口小麦アレルギーの症例(以下 HWP-WDEIA)の、発症の事後の経過について明らかにするために観察研究を行った。

HWP-WDEIA の全例(n=28)で小麦、グルテン、グルパール19S 特異的 IgE 抗体価の減少傾向を認め、小麦摂取状況も、統計学的にみると経年的な改善の傾向を認めた。しかし、現状で 36%の症例が運動の組み合わせの有無に関わらず、小麦を一切摂取できていない実態も明らかになった。同時に個々の症例の経過を観察すると臨床症状の改善に乏しい症例も存在し、長期予後に個人差も存在することが窺い知れた。今後さらに長期の観察を行い、HWP-WDEIA 群の臨床症状の長期予後に関して、詳細な検討と評価をしてゆく必要があると思われた。

#### [VII] 医薬部外品等によるアレルギー発症例の診断法に関する研究

近年、加水分解コムギ、グルパール19S を含有した石鹸使用者に小麦アレルギー患者が多発し、社会問題化した。症例の約半数は、小麦製品摂取後にアナフィラキシー症状を示す重症例であった。分担研究者は日本アレルギー学会「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」委員長として、全国の症例の疫学調査を行い ELISA 法による特異 IgE 抗体の測定を施行した。その結果、2013 年 2 月 20 日時点、確実例は 1808 例で、女性 1733 例(95.9%)、男性 75 例(4.1%)であった。年齢は 1 歳(男児)から 93 歳(女性)、平均 45.7 歳で、多くは 20 代から 60 代の女性であった。登録患者の都道府県別陽性症例数は、福岡県が第 1 位で 237 例、次いで北海道 116 例、第 3 位は東京都 108 例、第 4 位は広島県 105 例であった。登録数は 2012 年 8 月をピークに徐々に減少している。当該石鹸が製造されていた福岡県で症例数が最も多く、販売個数を背景に症例登録数を見ると、まだ、登録されていない症例が存在すると思われる。しかし、登録数は徐々に減少しており、まだ登録されていない症例は、おそらく 200 例程度になると思われる。

また、石鹸中止後の経過を医師にアンケートして回収できた 111 例の結果から、石鹸使用中止後 6 か月では 60%、3 年では 80%の症例がコムギを摂取していた。さらに研究分担者所属の施設で経過観察、ELISA 法による抗体検査を行うことのできた 10 例の症例では、コムギ、グルテン、グルパール19S に対する特異 IgE 抗体価は約 5.1 か月で半減していることが示された。

化粧品に含まれた加水分解蛋白による全身性の食物アレルギーは、加水分解コムギ以外にも起こり得る。研究分担者所属の施設では、化粧品に含まれた豆乳成分や、加水分解卵白などによる全身性の食物アレルギー症例を経験している。現在、化粧品中のグルパール19S 以外的小麦由来成分またはその他のタンパク成分によるアレルギーに関する緊急疫学調査を実施しており、その結果を受けて、平成 25 年度には、本研究において、詳細な検討を行う予定である。

#### [VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

小麦加水分解物を成分として含む洗顔石けんを使用した人に発生したアナフィラキシーシ

ックは、製造工程において、強いアレルギー性を引き起こすような物質ができたためと考えられている。小麦加水分解物は医薬部外品原料規格に記載されているが、小麦は食物アレルギーとしても知られている。化粧品や医薬部外品成分には同様にアレルギーを起こすような食物あるいは植物由来タンパク質があり、これまで想定されなかった経皮暴露による感作と健康被害の発生も予想される。本研究では、医薬部外品成分等の安全性確保を目指すことを目的として、医薬部外品等に用いられるタンパク質由来成分の規格に関して調査を行い、健康被害の状況を基にした規格試験法、並びに成分規格の改訂に向けた検討を行う。小麦を由来として製造され、「小麦」または「コムギ」の記載がある医薬部外品成分を抽出した。加水分解コムギたん白液、加水分解コムギ末、小麦粉酵素分解粉末は成分本質がタンパク質もしくはペプチド、アミノ酸であり窒素を含む有機物であることから、窒素定量法による濃度が規定されていた。確認試験ではニンヒドリン反応を用いるアミノ酸とタンパク質の含有を検出が規定されているが、タンパク質の定量法とその含量については規定されていなかった。更に、ほとんどの成分において不純物の限度値を規定する純度試験は重金属とヒ素に対して確認され、小麦粉酵素分解粉末成分についてのみ製造に使用する分解酵素プロテアーゼが混入していないことを吸光度から確認することが求められていた。タンパク質由来成分の規格試験法の設定には十分な検討が必要であると思われる。

## E. 結論

### [1] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

小麦酸加水分解物(HWP)に特徴的に発現するタンパク質の探索・同定を目的とし、LC-MS/MSによるショットガン解析及び多変量解析を行った。更に、HWPの品質・物性に関する分析科学的なプロファイリング等を行った。その結果、HWPに特徴的に発現するペプチド6種を同定し、また、抗原

性の指標と考えられるタンパク質の脱アミド化を評価する分析法を考案した。さらに小麦タンパク質のゲルクロマトグラフィーによる解析から、小麦酸加水分解物においては、分子量が感作性に関与することが示された。

### [II] 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

茶のしずく石鹼による小麦アレルギー発症のメカニズムの解明に向けて、茶のしずく石鹼小麦アレルギー患者並びに、通常型の小麦アレルギー患者血漿中の抗体価の測定を行った。その結果、小麦タンパク質グルテンに対するIgG1、IgM、IgE抗体に加え、特に、茶のしずく石鹼小麦アレルギー患者では、グルテン酸加水処理物であるグルパール19Sに対するIgEが高く検出された。これらのIgE抗体のクローンレベルでの解析を可能にするため、茶のしずく石鹼小麦アレルギー患者由来の単鎖Fv抗体ファージライブラリを構築し、特異的な結合抗体の単離を試みたところ、3つのクローンの単離に成功した。今後、患者由来抗体のクローンレベルでの特性解析を可能にすることから、IgE抗体のエピトープとアレルギー発症との関連の解明が期待できると思われる。

### [III] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての動物モデルに関する研究

小麦タンパク質加水分解物であるグルパール19Sについて、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用い、その経皮感作性、界面活性剤の影響、異なる方法で調製した小麦タンパク質加水分解物の感作性等について検討した。その結果、グルパール19Sが用量依存的に経皮感作性を示すこと、界面活性剤の1種であるSDSが経皮感作を促進することを示した。グルパール19Sとは異なりアルカリ性条件下で調製した小麦タンパク質加水分解物は顕著な経皮感作性は示さなかった。グルパール19S感作マウスの組織病理解析を行ったところ、皮膚、リンパ節、及びアナフィラキシー反応惹起後の眼瞼では炎症性組織病変が観察された。今後、本研究で得られた結果についてさら

に検討を重ね、タンパク質加水分解物による経皮感作について、感受性や影響要因の詳細に関する解析を進めることが必要である。

#### [IV] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査

北海道内の医療機関に勤務する医師、および開業医を対象として、「茶のしずく」アレルギーも含め、小麦加水分解物が添加された化粧品、医薬部外品によるアレルギー発症に関するアンケート調査を実施した。その結果、「茶のしずく石鹼等による小麦アレルギー情報サイト」への患者登録している医師の割合は、北海道では低いことが明らかとなり、グルパール 19S 以外の小麦加水分解物を添加している化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例は確認できなかった。さらに、アレルギー以外の分野を専門とする医師、開業医などへの情報発信を、より効果的に行う必要性が示唆され、食品成分を化粧品、医薬部外品の素材として製造する業者や、最終製品に使用する業者に対して、成分表示も含めて適切な製造方法を提示、指導することが重要であることが示された。

#### [V] 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査

人体に影響を及ぼす化合物やアレルゲンを含む医薬部外品・化粧品が国内外で製造されており、医中誌、PubMed の検索によって、これらによる健康被害の実態が明らかになった。天然成分は比較的安全に使用できるというイメージをもたれることが多いが、「茶のしずく石鹼(小麦加水分解物含有石鹼)」や今回報告した事例を考慮すると、必ずしも安全ではないことが判明した。また、これら食物含有医薬部外品、化粧品を使用する以前から当該アレルゲンに対する食物アレルギーを有する患者に対しては引き続き注意喚起することが必要であると思われた。

#### [VI] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症事例調査並びに事後の経過観察

小麦加水分解物(HWP)-WDEIA 群は、その小麦アレルゲン感作ルートを反映して、眼瞼腫脹や鼻炎症状、顔面の腫脹など顔面や粘膜のアレルギー症

状を認める症例が大半であった。また、通常の小麦アレルギー(CO-WDEIA)群では $\omega$ -5 グリアジン-IgE 抗体価の経年変化は認められなかったが、HWP-WDEIA 群においては石鹼使用中止後、全例において小麦、グルテン特異的 IgE 抗体価の減少傾向を認めた。ただし、症状改善の程度に個人差が存在することも同時に示唆され、今後の長期にわたる経過観察が必要であることが示された。

#### [VII] 医薬部外品等によるアレルギー発症例の診断法に関する研究

石鹼に含まれた加水分解コムギ グルパール 19S による即時型コムギアレルギーは全国で 1808 例の登録があったが、石鹼の使用を中止することによって、特異 IgE 抗体は減少しており、コムギ摂取可能になる症例が多いことが明らかになった。

#### [VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

医薬部外品原料規格 2006 及び追補を調査し、タンパク質を成分本質とするもの及びタンパク質の残存混入が疑われる成分を抽出した。このうち、植物由来加水分解物及び小麦由来成分について規格設定の現状を調べた。窒素定量法を採用しているものがほとんどであり、原因となったタンパク質に対する試験法の設定は行われていなかった。タンパク質由来成分の規格試験法の設定には十分な検討が必要であると思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

#### H. 知的財産権の登録

なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

「医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究」

分担研究報告書(平成24年度)

## 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

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

### 研究要旨:

医薬部外品・化粧品には米や小麦などの食品を原材料とするものがあるが、これらのうち特定の食品にアレルギーを持つ患者が当該食品を原材料とする医薬部外品・化粧品等を使用した場合に、アレルギー症状等を引き起こす可能性が指摘されている。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た。本研究では、HWPに特徴的に発現するタンパク質の探索・同定を目的とし、LC-MS/MSによるショットガン解析及び多変量解析を行った。更に、医薬部外品・化粧品の原材料の規格基準策定を指向したHWPの品質・物性に関する分析科学的なプロファイリング等を行った。その結果、HWPに特徴的に発現するペプチド6種を同定し、また、抗原性の指標と考えられるタンパク質の脱アミド化を評価する分析法を考案した。さらに小麦タンパク質のゲルクロマトグラフィーによる解析から、分子量が感作性に関与することが示された。これらの分析科学的データと皮膚感作性試験等の研究結果を総合的に評価し、医薬部外品・化粧品の原材料の規格基準を策定することが急務であると考えられる。

### 協力研究者

安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所  
代謝生化学部 室長

葩島 由二 国立医薬品食品衛生研究所  
医療機器部 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

佐々木和実 (独)製品評価技術基盤機構  
バイオテクノロジーセンター 専門官

西嶋 桂子 (独)製品評価技術基盤機構  
バイオテクノロジーセンター 主任

安宅 花子 (独)製品評価技術基盤機構  
バイオテクノロジーセンター 主任

板垣 康治 北韓道文科大学 人間科学部  
健康栄養学科 教授

### A. 研究目的

近年、加水分解小麦(HWP)を含有する医薬部外品・化粧品の長期使用において、小麦含有食品を摂取後に運動して全身性アレルギーである「アナフィラキシーショック」を発症した事例が数多く報告され、大きな社会問題となっている。現在、本課題研究に参画する医療機関・研究機関が中心となって原因究明が進められているが、HWPの重篤なアレルギー反応機構の詳細については未だ不明な部分も多く、医薬部外品・化粧品の原材料としてのHWPの規格基準を策定し、その品質及び安全性を確保することが望まれている。

本研究では、小麦グルテンの加水分解物であるHWPに特徴的に発現するタンパク質を探索・同定することを目的とし、LC-MS/MSによるショットガンプロテオミクス及び多変量解析を行った。更に、医薬部外品・化粧品の原材料の規格基準策定を指向したサイズ排除クロマトグラフィー、ポリ

アクリルアミド電気泳動等による HWP のプロファイリング分析を行った。更に、抗原性の一つの指標と考えられるタンパク質の脱アミド化を評価する分析法を考案し、HWP の品質・物性に関する分析科学的な検討を行った。

## B. 研究方法

### 1-1. ショットガン MS 解析による、グルパール 19S とグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

#### 試料

HWPには、片山化学工業株式会社より入手したグルパール 19S を用いた。グルテン (Sigma) 及びグルパール 19S 粉末に乾燥重量で 100 mg/mL となるよう 1M Tris (pH11.4) を加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を調製した。

グルテン及びグルパール 19S のストック懸濁液に PBS を加えて終濃度を 1 mg/mL とし、10 倍量の氷冷メタノール中で終夜タンパク質を沈殿させた。沈殿物を洗浄後、2D-Quant Kit (GE Healthcare) を用いてタンパク質量を定量し、その 40 µg をトリプシン消化に供した。DTT で還元、ヨードアセトアミドで SH 基のカルボキシメチル化を行った後、Trypsin Gold, Protease MAX (Promega) を加えて 37°C で終夜インキュベートした。10% TFA を終濃度 0.5% となるよう加えて酵素反応を停止し、得られたペプチドをバリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 µL) にて脱塩し、0.1 % TFA 含有 2% アセトニトリルに再溶解した。

#### 装置

##### ・ 質量分析計

Thermo Scientific 社製リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ Orbitrap XL

測定前に Tyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.) を用いてチューニング及び質量校正を行った。

##### ・ Nano-LC

HTC-PAL オートサンプラー(CTC Analytics) を

装備した ADVANCE nano UPLC (AMR)

##### ・ トラップカートリッジ

CERI 社製 L-Trap

(0.3 x 5 mm, L-C18, 5 µm, 12 nm)

##### ・ 分析用逆相カラム

CERI 社製 L-column Micro

(L-C18, 0.1 x 150 mm, 3 µm, 12 nm)

#### LC-MS/MS 条件

イオン源には Captive Ion Spray システムを使用し、試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 kV) により行った。MS スペクトルは FT analyser (分解能 30,000, 測定質量範囲 m/z 300-1,400, Lock mass = フタル酸ジエチルヘキシル及びシロキサン, Profile mode) により取得し、XCalibur data dependent mode により、スキャンにおけるイオン強度の高い 3 種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。

測定時間は 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒(0.1%ギ酸含有 2%アセトニトリル)と B 溶媒(100%アセトニトリル)を使用した。流速は 300 nL/min とし、サンプル注入 (1.0 µg) はオートサンプラーを使用して行った。1 分析あたりの溶出時間は 150 分とし、サンプル注入後、0-40% B/125 min → 40-55% B/130 min → 55-100% B/135 min → 100% B/145 min → 0% B/160 min のグラジエントプログラムで溶出した。次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。測定の繰り返し数は n=2 とした。

#### ショットガン解析

グルテン及びグルパール 19S のデータは各 2 回ずつ取得し、全データを i-RUBY ソフトウェア(メディカル・プロテオスコープ) にアップロードし、

Mascot/UniProt/NCBI nr (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、MS/MS スペクトル相同性に基づくピークマッチングと保持時間補正を行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

## 1-2. 多変量解析による、グルパール 19S 特徴的なペプチドの探索

### 試料

グルテン、グルパール 19S、及びグルパール 19S よりもさらに酸加水分解を進行させた自家調製 HWP (HWP 24h) を用いた。酸加水分解は、0.1N 塩酸中にグルテンストック懸濁液を終濃度 1 mg/mL となるよう加え、100°C のヒートブロック上で 24 時間加熱した。その後、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。LC-MS に供するサンプルの調製は、1-1 と同様に行った。

### 装置

1-1 と同様。

### LC-MS/MS 条件

1-1 と同様。ただし、測定の繰り返し数は  $n=1$  とした。

### ペプチドピークの比較定量解析

取得した MS データをプロテオーム定量解析ソフトウェア Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamycs) にアップロードし、Swiss-Prot (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、MS/MS スペクトル相同性に基づくピークマッチングと保持時間補正を行い、各ペプチドピークのシグナル強度を比較した。タンパク質同定には Proteome Discoverer ソフトウェア (Thermo Scientific) を使用した Mascot 検索 (NCBI nr データベース, Taxonomy; Green plants) も行った。

### de novo sequencing によるペプチド配列の推定

de novo sequencing には PEAKS Studio v6.0 (インフ

オコム) を使用した。消化酵素を "None" に設定してアミノ酸配列の推定を行った。TLC (Total Local Confidence) >60% 以上のスコア値を示したアミノ酸配列を信頼度の高いデータと判断し、その配列を protein-protein BLAST (blastp) 検索 (Taxonomy; Green plants) に供した。

## 2-1. 加水分解小麦の品質・物性に関する検討 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析

グルテン、グルパール 19S、及び 1-2 と同様に自家調製した酸加水分解グルテン (HWP 0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h) について、各試料を SEC により分析し、塩酸加水分解による経時的な分子量変化を測定した。

### 測定条件

カラム: GE Superdex 200 10/300 GL

移動相: Tris-HCl (pH7.3), 0.2M NaCl

流速: 0.75 mL/min

カラム温度: RT

検出波長: UV 280 nm

## ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析

SDS-PAGE は、10% アクリルアミドゲル、トリシンバッファーを用い各試料 200  $\mu$ g を電気泳動した。

## 2-2. グルテンの脱アミド化分析

### 蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化誘導体の分析

タンパク質中に含まれるグルタミン及びアスパラギン残基について、ビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼン (BTI) 試薬を用いたホフマン転位により脱炭酸反応を行い、塩酸加水分解後に生成したアミノ酸をダンシルクロライドで蛍光ラベル化し、下記の測定条件において HPLC を用いて分析を行った。脱アミド化の評価対象とするタンパク質としては、L-アラニル-L-グルタミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、グルパール 19S

を用いた。

#### [ホフマン転位反応]

タンパク質 1 mg に対して 40 mg の BTI 試薬をアセトニトリルに溶解し、ピリジン塩存在下 50°C、4 時間加熱してグルタミン及びアスパラギン残基の脱炭酸反応を行った。反応後、溶媒を真空乾燥し、BTI 試薬をクロロホルムで抽出除去した試料を水に再溶解し、等量の 6N 塩酸を加え 100°C で終夜加水分解反応を行った。

#### [HPLC 測定条件]

カラム: Gemini 5mm C18 110A, LC Column 150 x 4.6 mm

移動相 A: 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.8

移動相 B: アセトニトリル/メタノール/水 (45:45:10)

グラジエント溶出: 25→40%B (0→30 min), 40→70%B (30→45 min), 70%B (45→50 min), 70→100%B (50→51 min), 100%B (51→54 min)

流速: 1.0 mL/min

カラム温度: 40°C

蛍光検出: 励起 330 nm / 蛍光 520 nm

#### 網羅的プロテオーム解析法及び定量的プロテオーム解析法を用いたグルテンの脱アミド化分析

##### ・ 試料

2-1 で調製した試料について、網羅的プロテオーム解析を実施し、グルテンの脱アミド化反応について解析した。

##### ・ 分析前処理

各試料の SDS-PAGE ゲルレーン を 13 分割し、ゲル内酵素消化装置 (Proprep, Genomic solution) で以下の処理を行った。ABC(25mM 炭酸水素アンモニウム)とアセトニトリルで洗浄し、DTT で還元、ヨードアセトアミドでアルキル化し、更に ABC とアセトニトリルで洗浄した。乾燥したゲル切片にトリプシンを添加し、37°C で 4 時間消化した。得られたペプチド溶出液を LC バイアルに移し、減圧乾燥機で乾燥した。

##### ・ 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)測定

乾燥させた試料をサンプル溶解液(0.1%ギ酸, 2%アセトニトリル, 98%水)20 µL に再溶解し、1 分間以上振とうした後、1 時間以上静置し、下記装置により LC-MS/MS 測定を行った。

オートサンプラー部: HTC PAL (CTC Analytics)

高速液体クロマトグラフ: Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

インターフェース部: ADVANCE Nano Spray Source (Michrom BioResources)

質量分析計部: リニアイオントラップ質量分析計 LTQ XL (Thermo Scientific)

LC/MS/MS 測定は、濃縮・脱塩用カラムによりペプチドの濃縮及び脱塩を行い、逆相 C18 カラムにより分離し、ナノエレクトロスプレーイオン化(nano ESI)法により溶出したペプチド断片をイオン化し、質量分析計へ導入し、MS 及び MS/MS スペクトルデータを取得した。各サンプルは繰り返し 4 回測定を行った。

##### ・ 検索用データベース

公共データベース UniProt より、"wheat" and ("gliadine" or "glutenin")をキーワードに抽出したデータに対して検索した。検索ソフトは MASCOT (Matrix Science)を用いた。修飾には塩酸処理で想定される脱アミド化条件にはグルタミン(Gln)→グルタミン酸(Glu), アスパラギン(Asn)→アスパラギン酸(Asp)を候補とし Enzyme は"none"に設定した。

## C. 研究結果

### 1-1. ショットガン MS 解析による、グルパール 19S とグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

i-RUBY により発現比較結果が得られたタンパク質総数は 5074 であり、そのうちコムギ属 (*Triticum*) に候補を絞った結果、954 のタンパク質変動を同定するに至った。

これら候補タンパク質のうち、604 の発現がグルテン・グルパール 19S 間で 2 倍以上異なることが明らかとなった。シグナル比とタンパク質数の関係を Table 1

に示した。グルテンと比較して、グルパール 19S におけるシグナル比が 1/5 であったタンパク質数は、重複を除き 111 であり、これらは $\gamma$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン等のタンパク質であった。

一方、グルテンと比較して、グルパール 19S におけるシグナル比が 5 倍以上であったタンパク質数は重複を除きわずか 5 であり、主なタンパク質としては Histone H4 であった。残りの 4 つは定量に用いたペプチドの本数が 1 本であったため信頼度の高いデータとして取り扱わなかった。

## 1-2. 多変量解析による、グルパール 19S 特徴的なペプチドの探索

グルパール 19S のように抗原性を有する HWP に特徴的なペプチドを同定することを目的として、グルテン、グルパール 19S、及び酸加水分解が進んだ HWP (HWP 24h) から得られるペプチドの MS データを比較し、グルパール 19S に特徴的に発現するペプチドを多変量解析により探索した。

Progenesis LC-MS ソフトウェアを用いて 3 サンプル間の MS<sup>1</sup> のピーク強度を比較した。観測された 32,749 本のピークのうち、グルテンと HWP 24h のピーク強度がグルパール 19S のピーク強度の 1% 未満である 179 本のピークを抽出し、さらに保持時間が 90 分未満の消化物であり、ペプチド由来と考えられる 10 本をグルパール 19S に特徴的なペプチドとして絞り込んだ (Table 2)。

Progenesis LC-MS 上で Mascot 検索(データベース: Swiss-Prot, Taxonomy: Green plants)を行うことで、2 本のペプチドピーク(#6: Puroindoline A 及び#8:  $\alpha/\beta$ -gliadin clone PW1215)を同定した。また、Proteome Discoverer ソフトウェアを用いた Mascot 検索(データベース: NCBI nr, Taxonomy: Green plants) から、更に 2 本のペプチドピーク (#1 及び#5: HMW glutenin subunit)の同定に至った。

残り 6 本の候補ピークについては MS/MS データを用いて、PEAKS Studio ソフトウェアにて *de novo* sequencing を行った。TLC (Total local confidence)スコ

ア 60%以上を信頼度の高いデータと判断し、2 本のペプチド配列 (#3 及び#9) を予測するに至った。この予測配列を protein-protein BLAST (blastp)検索に供することにより、コムギ属(*Triticum*)のタンパク質の部分配列(#3: NADP-dependent malic enzyme 1 及び#9: WIR1)がヒットした (Table 3)。残りの 4 本のピーク (#1, #2, #7, 及び#10)は MS/MS の情報が少なく、TLC スコア 60%の信頼度においてペプチド配列を予測することができなかった。

## 2-1. 加水分解小麦の品質・物性に関する検討 サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析

グルパール 19S は、保持時間 10-12 分にかけて溶出される分子量の大きなピークが検出された(Figure 1)。このピークを分画し、SDS-PAGE を行ったところ、タンパク質は広範囲の分子量領域で検出されたことから、このブロードなピークはペプチドの凝集体であり、カラムに吸着せずに、素通りで溶出したものと想定された。分子量既知の標準タンパク質を用いた検量線より、グルパール 19S は分子量 243 kDa から 7.1 kDa(保持時間 15-25 分)の広い範囲に分布していることが示された。

グルテン酸加水分解物(HWP 0.5h~HWP 24h)の溶出パターンより、加水分解処理時間が長くなるに従って分子量は低下し、3 時間(HWP 3h)以上の処理で、それより短い処理時間のものに比べ大きくパターンが異なり、ピーク位置の低分子側へのシフトが顕著となった。また、グルパール 19S で見られたペプチドの凝集体は、グルテンにおいては見られず、HWP サンプルに出現していることから、塩酸処理により生成すると考えられた。

## ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド ゲル電気泳動(SDS-PAGE)分析

グルテン、グルパール 19S、及び自家調製した酸加水分解グルテン(HWP 0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h) の SDS-PAGE パターンを Figure 2 に示す。HWP 0.5h~HWP 24h の泳動パターンから、塩酸

処理時間が長くなるに従って分子量が低下することが示された。グルパール 19S と HWP 0.5h~HWP 24h のグルテン酸加水分解物を比較すると HWP 0.5h (30 分処理) がほぼ同様の泳動パターンを示した。

## 2-2. グルテンの脱アミド化分析

### 蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化誘導体の分析

ダンシルクロライドによって蛍光ラベル化した 23 アミノ酸標準品のクロマトグラムを Figure 3 に、L-アラニル-L-グルタミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、グルパール 19S の脱アミド化誘導体の分析結果を Figure 4 に示す。

ホフマン転位により、脱炭酸されたグルタミン残基 (Q; 保持時間 16.8 分) はジアミノ酪酸誘導体 (DABA; 保持時間 50.3 分) に変換されていることが示された。次年度の研究においては、本分析条件を応用して、グルテン酸加水分解物の経時的な脱アミド化について定量分析を行う予定である。

### 網羅的プロテオーム解析法及び定量的プロテオーム解析法を用いたグルテンの脱アミド化分析

網羅的プロテオーム解析の結果、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -、 $\omega$ -2、 $\omega$ -5-グリアジン及び LMW-, HMW-グルテニン等のタンパク質由来のペプチドが 14,000 本以上 (Ions score > 30, rank all) 検出された。また、塩酸処理で想定されるグルタミン-グルタミン酸変換 (Gln  $\rightarrow$  Glu) 及びアスパラギン-アスパラギン酸変換 (Asn  $\rightarrow$  Asp) された修飾ペプチドも多く検出された。本分析の一例として、P08453  $\gamma$ -グリアジンアミノ酸配列に対して、検出された全ペプチドの配置図を Figure 5 に示す。 $\gamma$ -グリアジンにはトリプシン消化による切断部位がほとんど存在せず、予想されるペプチド分子量がかなり大きいため、LC/MS での検出が困難であると想定されたが、塩酸処理による加水分解によってランダムな位置で切断されたペプチド断片が検出されたため、ほぼ全領域を網羅することが可能であった。

定量的プロテオーム解析により、塩酸処理によるグルタミン及びアスパラギンの脱アミド化割合について

解析した。定量的プロテオーム解析には、量的に多いペプチドイオンほど検出される頻度(確率)が高いという統計的概念を利用した非標識定量法を用いたため、今回の解析では修飾部位及び種類別のペプチドイオン検出回数を指標とした。

検出されたペプチド全体のグルタミン及びアスパラギンのイオン検出回数及びグルタミンからグルタミン酸及びアスパラギンからアスパラギン酸へ脱アミド化されたイオンの検出回数の割合(%)を Figure 6 に示す。

本定量結果より、グルパール 19S (GLU19S) では脱アミド化が約 50% 進んでいると推測された。

また、塩酸処理より加水分解時間が長くなるに従って、グルタミンからグルタミン酸及びアスパラギンからアスパラギン酸への脱アミド化が進み、加水分解時間 6 時間 (HWP 6h) を超過すると脱アミド化割合が一定になることが示された。また、グルタミン及びアスパラギンはそれぞれ同様の脱アミド化割合を示す傾向が示された。グルパール 19S と酸加水分解時間 30 分 (HWP 0.5h) の HWP がほぼ同一の脱アミド化割合を示した。

また、加水分解及び酵素消化によって切断された部分からの距離により脱アミド化割合が異なる可能性があるため、ペプチドの両端と内部の脱アミド化割合について解析を行ったが、全体の脱アミド化割合と同様の傾向を示した。そのため、塩酸加水分解及び酵素消化による切断部位とグルタミンの脱アミド化割合には明確な傾向が無いことが推察された。

## D. 考察

### 1-1. ショットガン MS 解析による、グルパール 19S とグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテンを酸加水分解して作製されたグルパール 19S は、酸加水分解の過程でタンパク質のグルタミンまたはアスパラギン残基が脱アミド化されるほか、ペプチド結合の開裂も起こるものと考えられる。そのためグルパール 19S は、グルテンのトリプシン切断で生じるペプチドピークが消失していることが予想された。

解析の結果、実際に多くのペプチドのシグナル比はグルテンよりもグルパール 19S で小さく、トリプシン消化により生じるペプチドが脱アミド化もしくは切断されている可能性が考えられた。グルテンと比較して 5 倍以上のシグナル比が得られた Histone H4 は、酸性条件下で抽出されてきた、もしくは酸加水分解によるペプチド結合の開裂に伴ってトリプシンが Access しやすくなることによってペプチドピークが生じたものと考えられた。

以上の結果から、グルパール 19S のトリプシン消化物はグルテンのトリプシン消化物と比較して、 $\gamma$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン等のアレルゲンタンパク質由来のペプチドに変化が起きていることが示唆された。

## 1-2. 多変量解析による、グルパール 19S 特徴的なペプチドの探索

強い抗原性を有するグルパール 19S に特徴的に発現するペプチドとして、(1) グルテンの加水分解により新たに生じるペプチドであり、かつ(2) 加水分解が進行することによって抗原性が無くなった HWP (HWP 24h)においては消失しているペプチドを多変量解析により探索した。Table 2 に示した 10 本のペプチドピークはいずれもグルパール 19S でのみ十分なピーク強度が得られた。ペプチドの MS/MS 相同性検索より、HMW-グルテニンや $\alpha/\beta$ -グリアジンといったコムギアレルゲン内のグルタミンがグルタミン酸に変化した(脱アミド化)されたペプチドが同定された。脱アミド化の起こっていないペプチド由来のピークは、グルテンだけでなくグルパール 19S でも確認されていることから、これらのタンパク質の一部が脱アミド化を受けていることが示唆された。HWP 24h では、加水分解の進行に伴い脱アミド化及びペプチド結合の開裂が進んだために、グルテンの酸加水分解によって生じたペプチドのピークが消失したと考えられた。

*de novo sequencing* はデータベースによらずに MS/MS データのみから配列を予測するため、コムギのようにデータベースが完全に整備されていないも

のや、グルパール 19S のように酸加水分解によるペプチドへの非酵素的な修飾が考えられる場合には、有用な情報を与える。本研究では、MS/MS データから一部配列を予測し、その配列をデータベース検索することで、タンパク質を予測することが可能であった。他方、*de novo sequencing* を用いても配列が予測できなかった 4 本のペプチドについては、ピーク強度が十分なものもあったことから、ペプチドの特性により得られた MS/MS スペクトルが少なかったものと考えられた。

本研究では、グルパール 19S に特徴的なペプチドとして 10 本の候補ペプチドを抽出した。これらのペプチドが抗原性を示す HWP のマーカーとなることを確認するためには、*in vivo* による皮膚感作性試験等との整合性を十分に検討した上で、加水分解条件(方法や時間)の異なる HWP を用いた確認試験を行う必要があると考えられた。

## 2-1. 加水分解小麦の品質・物性に関する検討

グルパール 19S は、SEC 及び SDS-PAGE の分子量分布の測定結果から酸加水分解の程度は、HWP 0.5h (30 分処理)とほぼ同等であると考えられた。また、網羅的プロテオーム解析の結果からグルタミン-グルタミン酸変換が 50%程度あると考えられた。なお、参考文献(1)では、小麦グルテンの 0.1NHCl, 120°C, 50 分の処理で、グルタミンの 60%が脱アミド化されているという報告があり、今回の報告と近い結果となっている。同時に SEC の結果においては、グルパール 19S は分子量の非常に大きなペプチドの凝集体が検出された。

これらの結果から、グルパール 19S ではグルテンの塩酸加水分解処理によりグルタミン $\rightarrow$ グルタミン酸の脱アミド化が生じ、グルテンの物性が大きく変化し、特に水への親和性の向上が感作性発現に関与しているものと推察された。

## 2-2. グルテンの脱アミド化分析

近年、グルテン加水分解物において脱アミド化が

進行し、「QPQQPFQ」配列及びそのグルタミン→グルタミン酸変換物が抗原エピトープになりうるという報告がされている(参考文献(2))。「QPQQPFQ」配列は、Figure 7 に示すように、小麦の主要アレルゲンである $\gamma$ -グリアジン、 $\omega$ 2-グリアジンに多く含まれている。グルテンを原材料とするグルパール 19S に関しても、塩酸処理により含有する $\gamma$ -グリアジン、 $\omega$ 2-グリアジンのグルタミン→グルタミン酸変換が進行していると推定されることから、「QPQQPFQ」配列及びその脱アミド体が、HWP のアレルギー反応の有力なエピトープの候補となりえるかについて詳細な検討を進める予定である。

## E. 結論

### 1-1. ショットガン MS 解析による、グルパール 19S とグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテンのトリプシン消化ペプチド由来ピークの多くが、グルパール 19S では減弱していた。グルパール 19S で減少したペプチド配列のグルタミン残基が脱アミド化されたペプチドがグルパール 19S で観察された。

### 1-2. 多変量解析による、グルパール 19S 特徴的なペプチドの探索

強い抗原性を有する HWP に特徴的なペプチドの候補として 10 本のペプチドピークを抽出し、そのうち 4 本の配列をデータベース検索にて、2 本の配列を *de novo sequencing* にて同定した。

### 2-1. 加水分解小麦の品質・物性に関する検討

グルパール 19S 及び酸加水分解グルテン試料について SEC 及び SDS-PAGE 測定により、分子量分布の測定及び分子量分布の変化を評価した。その結果、グルテンの酸加水分解物(30 分)がグルパール 19S と同等の分子量パターンを示すことが明らかになった。

### 2-2. グルテンの脱アミド化分析

Hofmann 転位によるグルタミンの脱炭酸反応を利用した蛍光プレラベル化 HPLC による脱アミド化分析法を提案した。更に、酸加水分解グルテン試料について、網羅的プロテオーム解析法及び定量的プロテオーム解析法を実施し、グルテンに含まれるグルタミン→グルタミン酸変換及びその割合を評価した。

(参考文献)

- (1) 松富直利他: 脱アミド化グルテンの食品機能特性、日本農芸化学会誌 55(10), 983-989 (1981)
- (2) Denery-Papini *et al.* 'Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation', *Allergy*, 67,1023-1032 (2012)

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 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) 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 (3): 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, 49 (2), 116-120 (2013)
- (4) 中村亮介、手島玲子: アレルゲン特異 IgE 抗体の新しい測定方法 4.EXiLE 法、アレルギー・免疫, 20(1), 63-73 (2013)
- (5) 手島玲子: 食物アレルゲンの話、日本小児アレルギー学会誌, 2013 (in press)

### 2. 学会発表

- (1) 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)
- (2) 中村亮介, 中村里香, 安達玲子, 板垣康治, 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)
- (3) 手島玲子:食物アレルゲンの話, 第 49 回小児アレルギー学会(2012.9)
- (4) 中村里香, 中村亮介, 酒井信夫, 安達玲子, 板垣康治,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) 手島玲子:新規食品並びにアレルギー物質の規格と検査について, 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会(2012.9)
- (6) Teshima R.; Regulation of food containing allergic ingredients in Japan. 5<sup>th</sup> international Fresenius Conference (2012. 10)
- (7) 中村亮介, 中村里香, 酒井信夫, 安達玲子, 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) 手島玲子:化粧品に含まれる食物アレルゲン, 日本薬学会第 133 年会 (2013.3)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

Table 1 多変量解析結果

グルバー / グルテン (シグナル比)		タンパク質数	
n<0.2		111	加水分解によって顕著に消失したタンパク質
0.2<n<0.5		114	
2<n<5		8	
5<n		5	加水分解によって顕著に増加したタンパク質

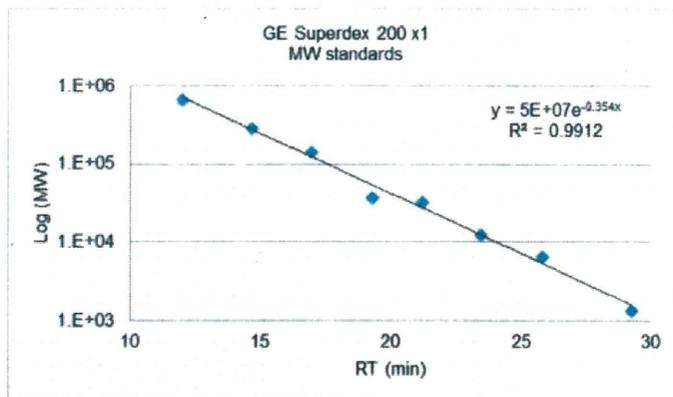
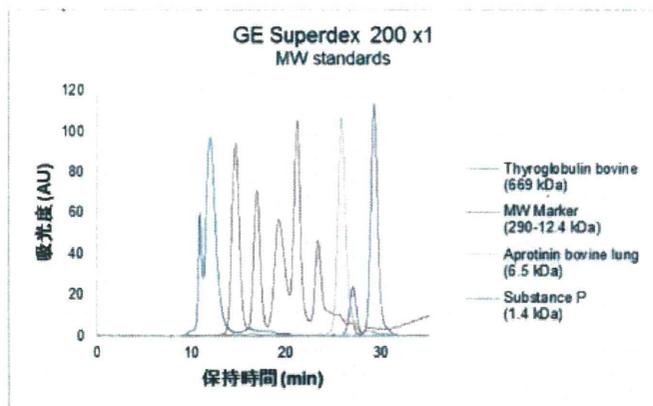
Table 2 グルバー (19S) に特徴的なペプチドの抽出

peptide No.	m/z [Da]	charge	RT [min]	Normalized abundance		
				19S	Acid24h	Gluten
1	652.821	2	32.59	50890	297	191
2	652.821	2	34.24	45905	220	285
3	500.759	2	56.88	37989	309	9
4	324.121	2	50.77	32961	97	275
5	486.297	2	45.97	32003	134	176
6	763.804	2	40.89	27374	194	120
7	566.723	2	32.95	8217	30	17
8	513.800	2	53.25	5804	0	2
9	518.250	2	53.16	5119	0	50
10	446.245	2	88.20	2964	0	0

Table 3 グルバーに特徴的なペプチド配列の同定結果

peptide No.	method	Sequence	Ion Score	$\Delta$ M [ppm]	Accession	Description
2	-	not identified				
3	<i>de novo</i> sequencing	TMYKPVVY	65		ABY25986.1	NADP-dependent malic enzyme 1 [Triticum aestivum] 638 MYTPV 642 192 PVVY 195
4	-	not identified				
5	MS/MS ion search	LVAVSQVVR	33	-1.16	14329763	high molecular weight glutenin subunit y [Triticum aestivum]
6	MS/MS ion search	GGCQELLGECCSR	47	-1.75	P33432	Puroindoline-A OS=Triticum aestivum GN=PINA PE=1 SV=2 - [PUJA_WHEAT]
7	-	not identified				
8	MS/MS ion search	NLALQTLPR	41	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
		NLALQTLPR	25	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
9	<i>de novo</i> sequencing	YRCYAFR	70		CAA61018.1	WIR1 [Triticum aestivum] 70 YRCY 73 126 RYAFR 131
10	-	not identified				

赤字は修飾を受けた残基 ( Q, N: deamidation, C: carbamidomethylation)を示す



	RT [min]	MW
1 Thyroglobulin bovine	11.99	669,000
2 Glutamate dehydrogenase	14.64	290,000
3 Lactate hydrogenase	16.95	142,000
4 Enolase	19.25	37,000
5 Adenylate kinase	21.19	32,000
6 Cytochrome c	23.43	12,400
7 Aprotinin bovine lung	25.8	6,500
8 Substance P	29.25	1,348

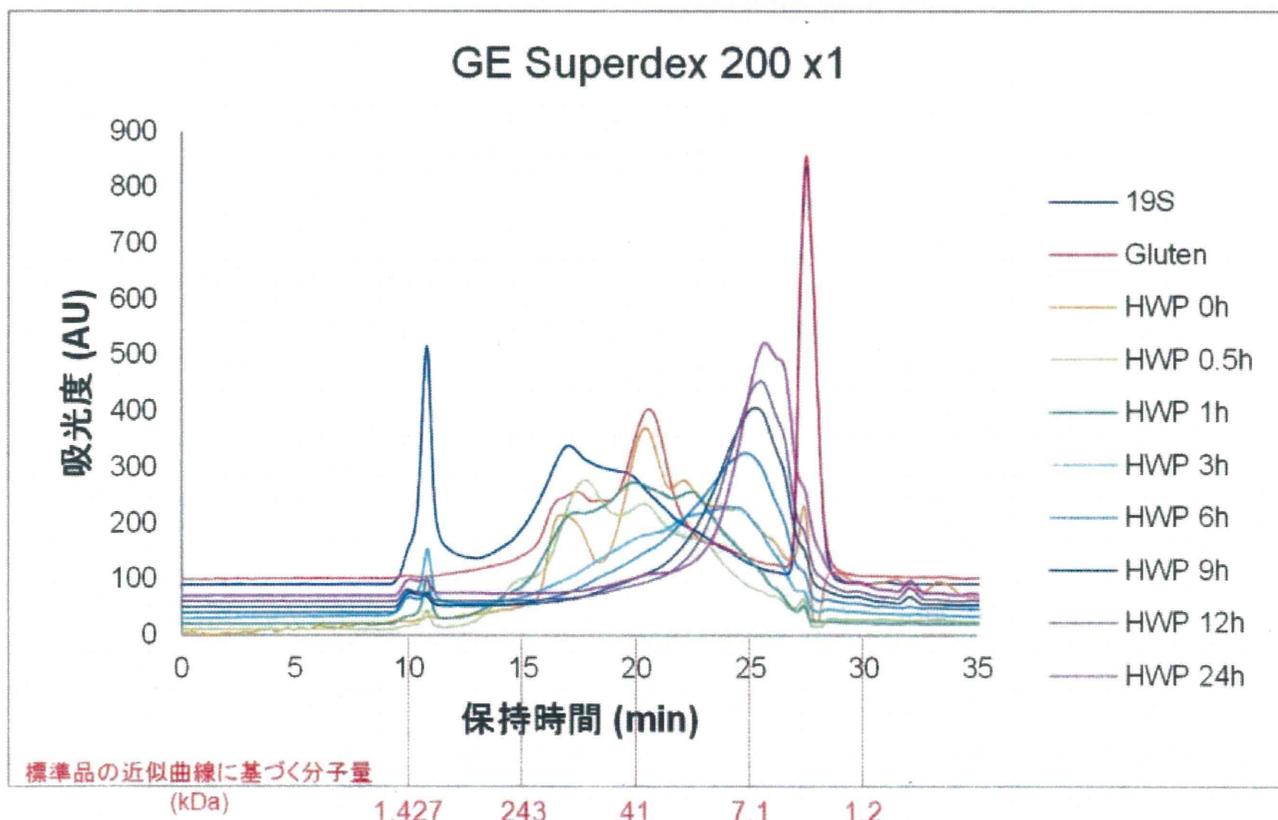


Figure 1 各試料のサイズ排除クロマトグラム