

Figure 2 各試料のSDS-PAGEパターン

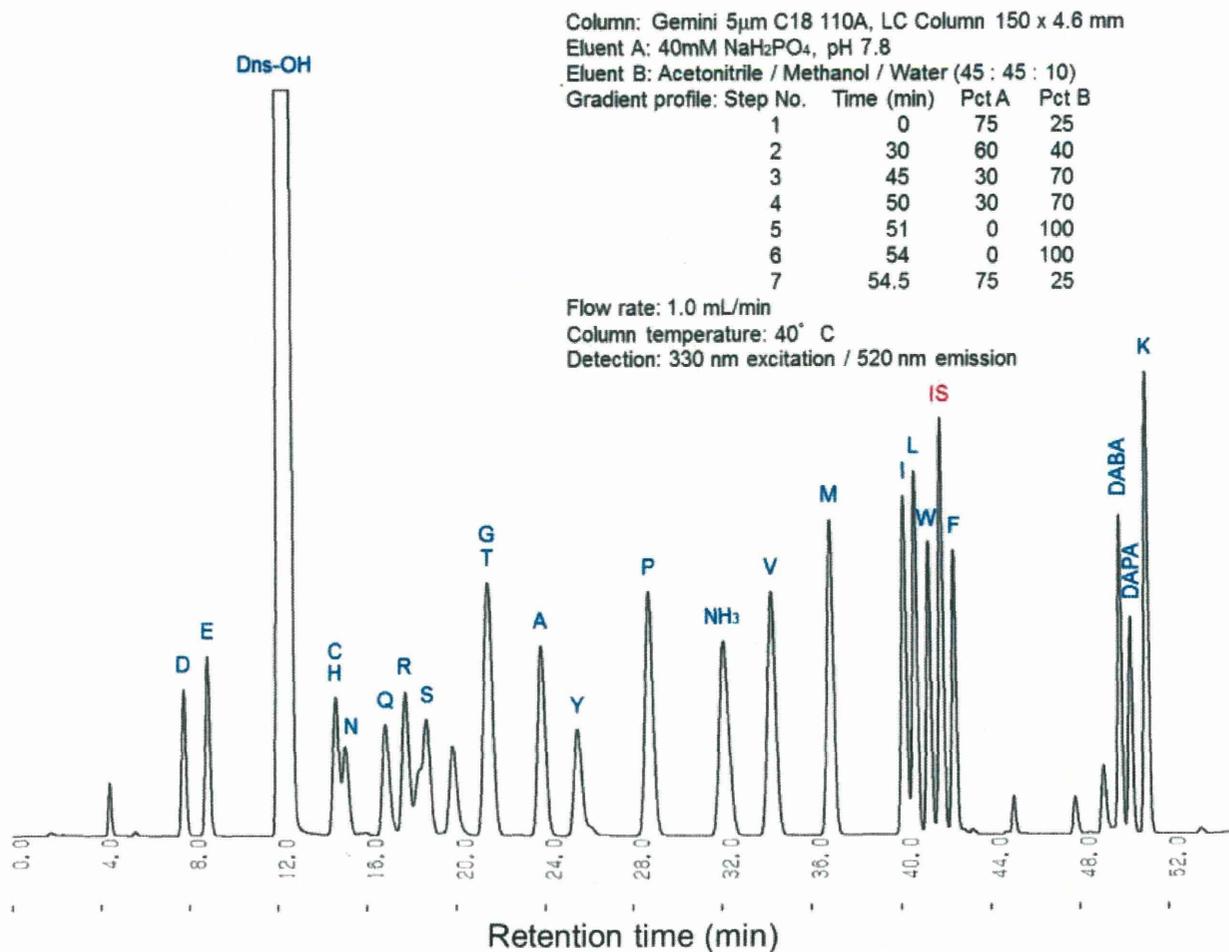


Figure 3 蛍光ラベル化アミノ酸のクロマトグラム

医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

研究分担者 伊東 祐二 鹿児島大学大学院理工学研究科 生命化学専攻 教授

研究要旨:

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。しかし、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のみを示した。この原因について考察するとともに、通常型小麦アレルギー並びに健常人との比較しながら、茶のしずく石鹼アレルギー患者由来のグルパール 19S に特異的な抗体の特性について議論した。

A. 研究目的

本研究の目的は、医薬部外品・化粧品に含まれる様々な工業添加物によるアレルギーの発症原因の解明に向け、アレルギー患者から原因となる抗体を単離し、その特異性や性質を決定することで、アレルギー反応に関わる抗体による網羅的抗原性の解析を行うことである。このような、疾患の直接的原因となる抗体クローンの解析は、本研究で用いる抗体ファージライブラリ技術によって初めて可能であり、より詳細な抗原性の解析が達成できる。

本年度は、“茶のしずく”石鹼で誘発された小麦アレルギーの原因となる抗体クローンを、小麦アレルギー患者から構築した抗体ファージライブラリを使って単離し、その特性の解析を行った。

B. 研究方法

生体サンプルと材料 茶のしずく石鹼による小麦アレルギーを発症した患者 (P1-13 : P1-13) 並びに、通常小麦アレルギー患者 (P' 14-17) の血液は、国立病院機構相模原病院の福富友馬医師のご協力により、患者本人との同意書による承諾のもと、採取された。患者血液 (10-15ml) に、2% EDTA・2Na (pH7.3) を最終濃度が 0.1%程度になるように加え、リンパ球比重液 (Wako Chemicals) 15ml を充てんした LeucoSep (50ml, Greiner) に上層し、1,000×g で遠心を行った。上層の血漿画分を一部分離回収した後、リンパ球画分をパスツールピペットにより回収し、ダルベッコ-PBS にて2回、洗浄して実験に用いた。

遠心により回収した患者由来末梢血リンパ球に 2ml の IsoPlus (Takara Bio) を加え、ホモジナイズした。これに 0.2 容量 (V/V) のク

ロホルムを加え、攪拌、遠心後、上清を回収した。上層にイソプロパノールを加えて沈殿、遠心後、沈殿物に DEPC 水を加え溶解し、全 RNA サンプルとした。患者 P1-5 のリンパ球から回収された全 RNA 量を紫外外部吸収によって評価したところ、それぞれ、16 μ g、15 μ g、26 μ g、18 μ g、22 μ g であった。

抗原であるグルテン、グルパール 19S は、国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部部長、手島玲子博士から恵与されたものを用いた。

患者血漿を用いた ELISA 測定 血漿中の抗体価の測定は以下の方法にて行った。抗原であるグルテン、グルパール 19S、15mg を PBS 15ml に溶解し、遠心分離にて不溶性成分を除いた後、上清を回収した。この溶液 50 μ l を、ELISA プレート (MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate, Nunc) のウェルに加え、1 晩、4 $^{\circ}$ C にてコートした後、1% スキムミルク (0.1% Tween を含む PBS: PBS-T 中) でブロッキングを行った。その後、患者血清を 1% スキムミルクにて 5 倍もしくは 20 倍に希釈したサンプルを 1 時間反応させ、ウェルを 1% スキムミルク (PBS-T) にて 3 回洗浄を行った (これらの操作は、結果の項、図 2、図 3 の ELISA の方法であり、図 1 の ELISA の場合には、ブロッキング並びに血漿の希釈には 0.5% BSA/PBS 溶液を用いた)。それぞれの抗体のクラスを判別、検出するために、2 次抗体として、ビオチン化した抗ヒト IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM マウス抗体 (Beckman Coulter) を反応させ、HRP 標識したストレプトアビジン (Vecter) により検出した。IgE に関しては、HRP 標識抗ヒト IgE ヤギ抗体 (Nordic Immunology) にて検出を行った。HRP 検出試薬は、TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine, Wako Chemicals) を使い、試薬添加 2-30 分後に 1N の HCl を加えることで反応を停止させ、450nm の吸光度を測定した。

IgE 抗体ファージライブラリの作製 調製した患者 4 の全 RNA (18 μ g) のうち 8 μ g を使い、SuperScript III First-strand Synthesis

System (Invitrogen) キットを用いて oligo dT (20) による逆転写反応を行った。

このようにして調製した cDNA を鋳型に、VH 遺伝子の増幅を PCR によって行った。VH 遺伝子の下流プライマーとしてヒト IgE の H 鎖 (ϵ) の CH1 領域に特異的なプライマー (5' -ggaatgtttttgcagcagcg -3') を使い、ヒト VH 遺伝子 (VH1-VH4) の上流配列プライマーのセットを用いて PCR を行うことで VH 遺伝子を増幅した。この PCR 産物を鋳型にして、制限酵素付の VH 上流と下流のプライマーセットを用いた PCR により、上流に *Sfi*I、下流に *Xho*I 配列を付加した VH 遺伝子断片を調製した。

一方、VL 遺伝子断片については、全 RNA サンプルを鋳型に、VL κ 、VL λ の上流と下流に特異的なプライマーセットを用いて、VL 遺伝子を増幅し、これを鋳型にさらに、制限酵素付のプライマーセットを用いて、上流に *Sa*I、下流に *Not*I サイトを付加した VL 遺伝子断片を調製した。

このようにして調製した VH 並びに 2 種の VL 遺伝子断片 (κ と λ 由来) は、リンカー DNA 並びに、VH 上流並びに VL 下流プライマーを用いて、Over extension PCR による連結を行い、単鎖 Fv 遺伝子を調製した。

調製した単鎖 Fv 遺伝子は、制限酵素 *Sfi*I と *Not*I で処理し、ファージミドベクター pTVKS に制限酵素サイトを用いたライゲーション反応により挿入した。得られたベクターは、エレクトロポレーションにより、大腸菌 TGI (Lucigen) に形質転換し、形質転換後の大腸菌は、その一部を用いて形質転換効率を評価した。残り的大腸菌は、2TY-AG プレートに撒き、一晩培養後、大腸菌を回収した。単鎖 Fv 抗体を提示したファージ (抗体ファージ) の調製は、プロトコールに従い、2TY-AG プレートから回収後の大腸菌に、ヘルパーファージ (M13K07) を重感染させることによって行った。

バイオパンニング ELISA 用 96 穴プレート (MaxiSorp) に、グルパール 19s もしくは、グ

ルパール 19s - 第 7 画分 (glup7、図 5 A 参照) の Abs 220=0.1 の溶液を、200 μ L/well で 2 時間コートし、PBS-T で 3 回洗浄後、0.5% BSA (400 μ L/well) にて、2 時間ブロッキングを行った。このように抗原をコートしたウェルに、VH-VL κ 並びに VH-VL λ ファージライブラリの等量混合物 (1.0 \times 10¹¹pfu/32.4 μ l +0.5%BSA 167.6 μ l) を加え、1 時間振盪した後、PBS-T にて洗浄した。これに、溶出液 (0.1 M Gly-HCl, pH2.2, 288 μ L+0.5%BSA 32 μ L) を加え、ファージを解離、回収した後、Tris-HCl (pH9.1, 22.5 μ L) にて中和した。この溶出液を、大腸菌 TG-1 に加え、30 分間放置により感染後、2TY-AG プレート上に塗布し、一晚培養し、得られた大腸菌コロニーを回収した。回収した大腸菌を培養し、ヘルパーファージ感染によって、抗体ファージを調製した。

C. 研究結果

“茶のしずく”小麦アレルギー患者血漿中の抗体解析 “茶のしずく”小麦アレルギー患者 1-5 並びに 6-13 の血漿中のクラス別の抗体価を評価した結果を図 1 並びに図 2 に示した。グルテンに対する IgG1 (図 1 A、図 2 A、) 並びに IgM 抗体 (図 1 G、図 2 G) については、患者ならびに健常人 2 (H.2)、プール血漿 (Pool) で高い抗体価を示した (健常人 1 : H.1 は、見られなかった)。ところが、グルパール 19S に対しても IgG1 抗体が患者において検出された検出されたが、本来、茶のしずく小麦アレルギーとは関係のない健常人 2 あるいはプール血漿についても、グルパール 19S に対する IgG1 が検出された (これについては後でも述べる)。一方、アレルギーの原因となる IgE に関しては、茶のしずく患者において、グルパール 19S に対する抗体価が、グルテンに対するものより相対的に高く (図 2 H)、これらのアレルギー患者では、グルパール 19S を含む茶の

しずく石鹼により誘発されたアレルギーであることを支持している。

コントロールとして、健常人 20 人のプール血漿 (Pool)、健常人 1 と 2 (H.1、H.2) の血漿を用いたが、健常人 1 (図 2 H.1) については、IgG1、IgM を含め他の抗体クラスでも、グルテン、グルパール 19S に対する抗体価は低く (ただし、唯一、グルテンに対する IgA1 の抗体価が高い傾向にあるが)、小麦アレルギーに抗体を有さない健常人であると考えられた。一方、健常人 2 については、グルテンに対しては、IgG、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE とほとんどのクラスの抗体価を示し、本来抗体を有さないと考えられたグルパール 19S に対しても、特に IgG1 については高い抗体価を示した。この健常人 2 については、アレルギー症状は出ていないため、健常人として分類した。

通常的小麦アレルギー患者血漿中の抗体価との比較解析 茶のしずく石鹼による小麦アレルギーと通常食物アレルギー患者との抗体価での比較結果を図 3 に示した。図 3 (H) に示したように、茶のしずく石鹼の患者では、グルパール 19S に対する IgE 抗体価が高いのが特徴であり、一方、通常的小麦アレルギー患者の IgE は、ほとんどグルテンにのみ反応性を示した。興味深いのは、通常的小麦アレルギー患者の IgG1 の抗体価が、グルテンだけでなく、グルパール 19S に対しても高いことである (図 3 A の P' 14, 16)。これは、先に述べた健常人 2 も同様の傾向を持つ (図 3 A の H.2)。本来、グルパール 19S に暴露されていないと考えられる通常的小麦アレルギー患者の IgG1 が、何故、グルパール 19S と反応性を示すのか現在のところ不明であるが、これらの IgG1 抗体と茶のしずく患者のグルパール 19S に対する IgE の認識抗原の違いなど今後明らかにする必要がある。健常人 2 は、グルパール 19S に対す

る IgG1 抗体を持が、グルパール 19S に対する IgE は持たないという点で、通常的小麦アレルギー患者の抗体価のパターンと類似している。その意味では、健常人 2 は、通常的小麦アレルギー患者ではないかと考えることができる。しかし、2 つの大きな違いは、健常人 2 では、グルテンに対する IgG2 (図 3B) とグルテン、グルパール 19S に対する IgG4 抗体を有している (図 3D) のに対し、通常型的小麦アレルギー患者では、グルテンに対する IgG2 は見られず (図 3B)、グルテンに対する IgG4 は一部の患者にのみ少量存在し、グルパールに対する IgG4 は患者ではほとんど存在しない (図 3D の P' 14, 15) ことである。

患者由来の抗体ファージライブラリの構築
茶のしずく石鹸による小麦アレルギー発症のメカニズムとして、グルパール 19S によって誘発された IgE が、食物として摂取したグルパールに対する交差反応性を持ったことが、一つの誘因と考えられる。このような病因となる IgE 抗体のエピトープや交差反応性の要因を明らかにすることは、食物成分由来の添加剤などの抗原性や使用時の安全面での予防を考える上で貴重な情報である。現在まで、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抗体クローンの単離を試みた。

図 4 に抗体ファージライブラリ構築の概要を示した。茶のしずく患者 4 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 (ϵ 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 (ϵ 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 κ と λ 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 (図 4 A)。さらに、得られた単鎖 Fv の両端に存在する *Sfi*I と *Not*I 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 (図 4 B)。構築したファージのライブラリサイズは、大腸菌への形質転換効率を基に、VH-VL κ 並びに VH-VL λ がそれぞれ 2.1×10^7 、 1.7×10^7 と評価された。

バイオパンニングによる抗体クローンの単離と配列解析
構築した患者 4 由来の抗体ファージライブラリを用いて、グルパール 19S 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が、特異的な濃縮は見られなかった (図 5 C 中の Glup-1R phages)。この原因として、IgE 抗体が認識するグルパール 19S のサンプル中の標的抗原が少ないことが原因ではないかと考え、グルパール 19S を分子篩クロマトグラフィーによって分画し、その中の IgE が認識する分子種分画の特定、濃縮を試みた。図 5 A に示したように、分子篩クロマトグラフィーに分画された 1 2 の画分について、患者 4 と 1 2 の血漿を用いてどの画分に IgE との高い反応性抗原があるかを ELISA にて検討した (図 5 B)。しかし、IgE の反

応性は、全体に広く分布しており、IgE が認識する抗原が特に多く存在する分画は特定できなかった。しかし、分画7において、比較的高い反応性が見られたので、この分画を用いてバイオパンニングを行った。

構築した患者4由来の抗体ファージライブラリは、図5Cに示したように、グルテンに対して高い反応性を示した(OR phages)。グルパール19Sの分画7(図5A中の分画7)のサンプルに対して1回のバイオパンニングを行ったが、得られたファージの、グルパール19Sもしくはグルパール19S-分画7に対する反応性は、ほとんど上昇せず(図5C中のG1up7-1R)、OR phagesと同様に、グルテンに対する高い反応性を保持した。

そこで、まずは、このグルテンに反応する抗体クローンをえるために、1ラウンドのバイオパンニング後のファージ(G1up7-1R)を95個クローン化し、各クローンについて、グルテンとの反応性を評価した。その結果、グルテンに特異的なクローンとして3つのクローン(B7, G7, E9)が単離された。これらのクローンの結合特異性の評価をELISAにより行った結果を図5Dに示す。

さらに、これらのクローンの抗体遺伝子の塩基配列から、単鎖Fv抗体の配列を決定した(図5E)。また、遺伝子配列を基に同定された抗体可変領域を形成するGerm line上のV, D, J (VH鎖)並びにV, J (VL鎖)遺伝子座を、表1に示す。同定された遺伝子座は、いずれも機能性遺伝子であり、今回得られた抗体のL鎖はいずれもκ鎖であった(表1)。H鎖のV遺伝子座は、B9, E9, G7の3つのクローンで、V5, V1, V3であり、互いに異なっていた(表1)。配列の特徴として、B9のクローンは、他の2つのCDR-H3が13残基であるのに対して26残基と、極めて長いCDR-H3を有していた(図5E)。

D. 考察

茶のしずく石鹼による小麦アレルギー発症の機構を分子レベルでの機構として、グルパール19Sによって誘発されたIgE由来の抗体クローンが、未処理の小麦アレルゲン、つまりグルテンにも交差活性によって、結合活性を持つことが考えられる。そのような特性を持った抗体クローンの認識するエピトープを明らかにすることができれば、安全の高い小麦添加物の処理法の開発などにも応用が可能である。

本研究では、茶のしずく小麦アレルギー患者4の血液由来の抗体ライブラリから、グルパール19Sもしくは、グルパール19Sの第7画分に対するバイオパンニングによって、このような特性を持つ抗体クローンの単離を試みたが、結果として、グルテンに対する特異性を持った抗体しか、得られなかった。グルパール19Sに対するバイオパンニングで特異的な抗体ファージの濃縮ができなかった理由として、グルパール19Sは、酸加水分解処理を経て多くの分子種を含んだ混合物になっているため、抗体クローンが認識する抗原エピトープが、相対的に少なくなっていると考えられ、そのためバイオパンニングによる濃縮効率が悪い可能性がある。このことを考慮し、グルパール19Sを分子篩クロマトグラフィーにより分画し、IgEが結合する抗原を分画を濃縮しようとしたが、実際には、患者由来のIgEは、幅広い分子量分画の抗原を認識したため(図5B)、特定の分画に標的を絞ることはできなかった。一方、グルパール19Sの第7画分に対するバイオパンニングでは、以外にも、グルテンに対する結合活性が保持された抗体ファージが得られた(図5C)。この理由は定かでないが、患者4由来の抗体ライブラリでは、グルパールに対する抗体よりもグルテンに対する抗体クローンが多くを占めている可能性も考

えられる。このため、現在、グルパール 19S に特に高い IgE 抗体価を示す患者 12 (図 2H、もしくは、図 3H) 由来の抗体ライブラリを作製し、まずはグルパール 19S に特異性を持った IgE 抗体クローンの同定を進める予定である。

健康人 2 は、グルテンに対する高い IgE 抗体が存在するにも関わらず、見かけ上アレルギーの自覚症状が出ていないことは興味深い。健康人 2 では、通常的小麦アレルギー患者の場合 (図 3 の P' 14-17) と同様に、グルテンに対する高い IgE 抗体が検出される (図 3H) が、2 つの違いは、健康人 2 は、併せて、グルテンに特異的な IgG2 と IgG4 抗体を持ち合わせている点である。これらがアレルギー症状を抑える可能性についても、今後、抗体クローンのエピトープ解析などにより検討していきたい。

図 1 において、茶のしずく患者 1-5 の抗体価を評価した際、IgG3 と IgA2 (図 1C と F) において、高いバックグラウンドの反応が見られた。これは、2 次抗体の非特異的な反応によるものであり、ブロッキング剤を BSA からスキムミルクに変えることによって、ほぼ問題は解消された (図 2C と F)。抗体ファージライブラリからバイオパンニングで得られたファージの結合活性の評価においても、比較的高いバックグラウンドが見られており、今後、パンニングの際のブロッキング剤の検討も含め、特異的な抗体濃縮の手法を改良していく必要がある。

今回のバイオパンニングは、1 回のみ行い、その後はすぐにクローン化を行った。通常バイオパンニングでは 3 - 5 回繰り返し、抗原特異的な抗体の濃縮を行うが、今回の場合、複数回濃縮を行うと非特異的な結合の上昇が見られたことから (データは示していない)、バイオパンニングは 1 回のみ抑えた。こういった問題をクリアす

るため、1 回のバイオパンニングによって濃縮される抗体クローンを、次世代シーケンサーによる網羅的解析を行うことで、特異的なクローンの同定を行う手法を開発中である。

現在得られているグルテン特異的な抗体クローンは、まずタンパク質として発現精製した後、再度、結合特異性を確認し、抗原の同定、エピトープ解析を行うことが必須である。得られた抗体の配列情報を基に構築した抗体のモデリング構造をすでに得ているが、これらの抗体構造の特徴と抗原との結合特性、さらには、病態との関連について、今後、検討を進めていきたい。

E. 結論

茶のしずく石鹸による小麦アレルギー患者 IgE 由来の抗体ファージライブラリの作製手法を確立し、実際にグルテンに結合する抗体クローンの単離に成功した。以上の結果は、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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takaaki Hatanaka, Shinji Ohzono, Mirae Park, Shogo Tsukamoto, Ryohei Sugita, Kotaro Sakamoto, Hiroyuki Ishitobi, Toshiyuki Mori, Osamu Ito, Koichi Sorajo, Kazuhisa Sugimura, Sihyun Ham, Yuji Ito, Human IgA-binding peptides selected from random peptide libraries: affinity maturation and application in IgA purification, *The Journal of biological chemistry*, **287**, 43126-43136 (2012)

- 2) 宮崎誠生, 伊東祐二, 萩原義久, ラクダ科動物由来天然起源シングルドメイン抗体 (VHH 抗体) の開発 ” 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線, 監修: 熊谷泉”, シーエムシー出版 (東京), 124-128 (2012)
 - 3) 畠中孝彰, 杉村和久, 伊東祐二, フェージライブラリによるヒト抗体特異的アフィニティペプチドの探索と抗体検出, 精製技術への応用 ” ペプチド医薬の最前線, 監修: 木曾義明・向井秀仁”, シーエムシー出版 (東京), 78-84 (2012)
 - 4) 畠中孝彰, 伊東祐二, ペプチド抗体 ” 新機能抗体開発ハンドブック～次世代抗体創製から産業への展開まで～, 監修: 浜窪隆雄, 編集委員長: 津本浩平”, シーエムシー出版 (東京), 59-64 (2012)
 - 5) 若井純子, 伊東祐二, 非抗体スカフォールドプロテインバインダー ” 新機能抗体開発ハンドブック～次世代抗体創製から産業への展開まで～, 監修: 浜窪隆雄, 編集委員長: 津本浩平”, シーエムシー出版 (東京), 184-189 (2012)
2. 学会発表
- 1) 伊東祐二, フェージディスプレイ技術による標的分子特異的抗体の設計～網羅的抗体取得に向けた手法確立の可能性～「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」, 自然科学研究機構・基礎生物学研究所共同利用共同研究・研究会 (名古屋), 2012年5月15日
 - 2) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 有馬一成, 萩原義久, 伊東祐二, アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体フェージライブラリの構築と抗原特異的抗体単離への試み, 平成24年度日本生化学会九州支部例会 (福岡), 2012年5月27日
 - 3) 今村礼奈, 木戸めぐみ, 牛飼晴美, 岡崎史香, 有馬一成, 乾明夫, 伊東祐二, 肥満症患者由来の免疫抗体ライブラリを用いた自己抗体の単離と機能解析, 平成24年度日本生化学会九州支部例会 (福岡), 2012年5月27日
 - 4) 畠中孝彰, 中島田雄一, 坂元孝太郎, 有馬一成, 伊東祐二, ヒト IgA 結合ペプチドの親和性・特異性向上アプローチ, 平成24年度日本生化学会九州支部例会 (福岡), 2012年5月27日
 - 5) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 有馬一成, 伊東祐二, アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体フェージライブラリの構築と抗原特異的抗体単離への試み, 第12回日本タンパク質科学会 (名古屋), 2012年6月21日
 - 6) 畠中孝彰, 中島田雄一, 坂元孝太郎, 有馬一成, 伊東祐二, T7 フェージディスプレイシステムを利用したヒト IgA 結合ペプチドの特異性変換, 第12回日本タンパク質科学会 (名古屋), 2012年6月21日
 - 7) 伊東祐二, フェージディスプレイ法: 農芸化学領域における応用例, 農芸化学会西日本支部会若手シンポジウム (鹿児島), 2012年9月27日
 - 8) 伊東祐二, フェージディスプレイ法: 農芸化学領域における応用例, 農芸化学会西日本支部会若手シンポジウム (鹿児島), 2012年9月27日
 - 9) 畠中孝彰, 中島田雄一, 有馬一成, 伊東祐二, T7 フェージディスプレイシステムを利用したヒト IgA 結合リガンドの特異性変換, 第49回ペプチド討論会 (鹿児島), 2012年11月7日
 - 10) 伊東祐二, フェージライブラリを基盤とした機能性ペプチド・抗体のデザイン: タンパク質・ペプチド研究の現状と展望, 第22回 WS フォーラム (福岡), 2012年11月17日
 - 11) 中島田雄一, 畠中孝彰, 北尾みどり, 大菌慎

二, 伊東治, 空處弘一, 有馬一成, 伊東祐二, T7 フェージペプチドライブラリを用いたヒト IgG 結合性ペプチドの単離と親和性増強, 第 85 回日本生化学会大会 (福岡), 2012 年 12 月 16 日

- 12) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 有馬一成, 川口博明, 川浪理沙, 萩原義久, 伊東祐二, アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体フェージライブラリから得られた抗 Her2 抗体の特性解析, 第 85 回日本生化学会大会 (福岡), 2012 年 12 月 16 日
- 13) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 肝ガン患者由来単鎖 Fv 抗体フェージライブラリを用いた Lutheran 特異的抗体の単離, 第 85 回日本生化学会大会 (福岡), 2012 年 12 月 16 日
- 14) 畠中孝彰, 中島田雄一, 有馬一成, 伊東祐二, ライブラリ技術を用いたヒト IgA 結合ペプチドのヒト・マウス間の特異性変換, 第 85 回日本生化学会大会 (福岡), 2012 年 12 月 16 日
- 15) 若井純子, 小澤拓矢, 野元花愛, 有馬一成, 伊東祐二, フェージディスプレイによるブタ抗体ライブラリの構築と評価, 第 85 回日本生化学会大会 (福岡), 2012 年 12 月 16 日
- 16) 小澤拓矢, 若井純子, 野元花愛, 有馬一成, 伊東祐二, ヒト化抗体の取得を目指したブタ抗体ライブラリの開発, 日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013 年 3 月 29 日
- 17) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 肝ガン患者由来の抗体ライブラリから得られた自己抗体の機能解析, 日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013 年 3 月 28 日
- 18) 伊東祐二, バイオ医薬品開発を支える技術としてのフェージライブラリ (ワークショップ: バイオ医薬品開発最前線とレギュラトリ

ーサイエンス), 日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013 年 3 月 30 日

G. 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

表1 バイオパンニングで得られたグルテン特異的単鎖 Fv 抗体クローンの遺伝子座の分類解析

クローン名	VH			VL	
	V	(D)	J	V	J
B9	IGHV5-a*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV3-20*01	IGKJ4*01
E9	IGHV1-18*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	HIGKV2-28*01, or IGKV2D-28*01	IGKJ1*01
G7	IGHV3-23*01	IGHD1-7*01	IGHJ5*02	IGKV1-39*01, or IGKV1D-39*01	IGKJ2*02, or IGKJ4*01, or IGKJ4*02, or IGKJ5*01

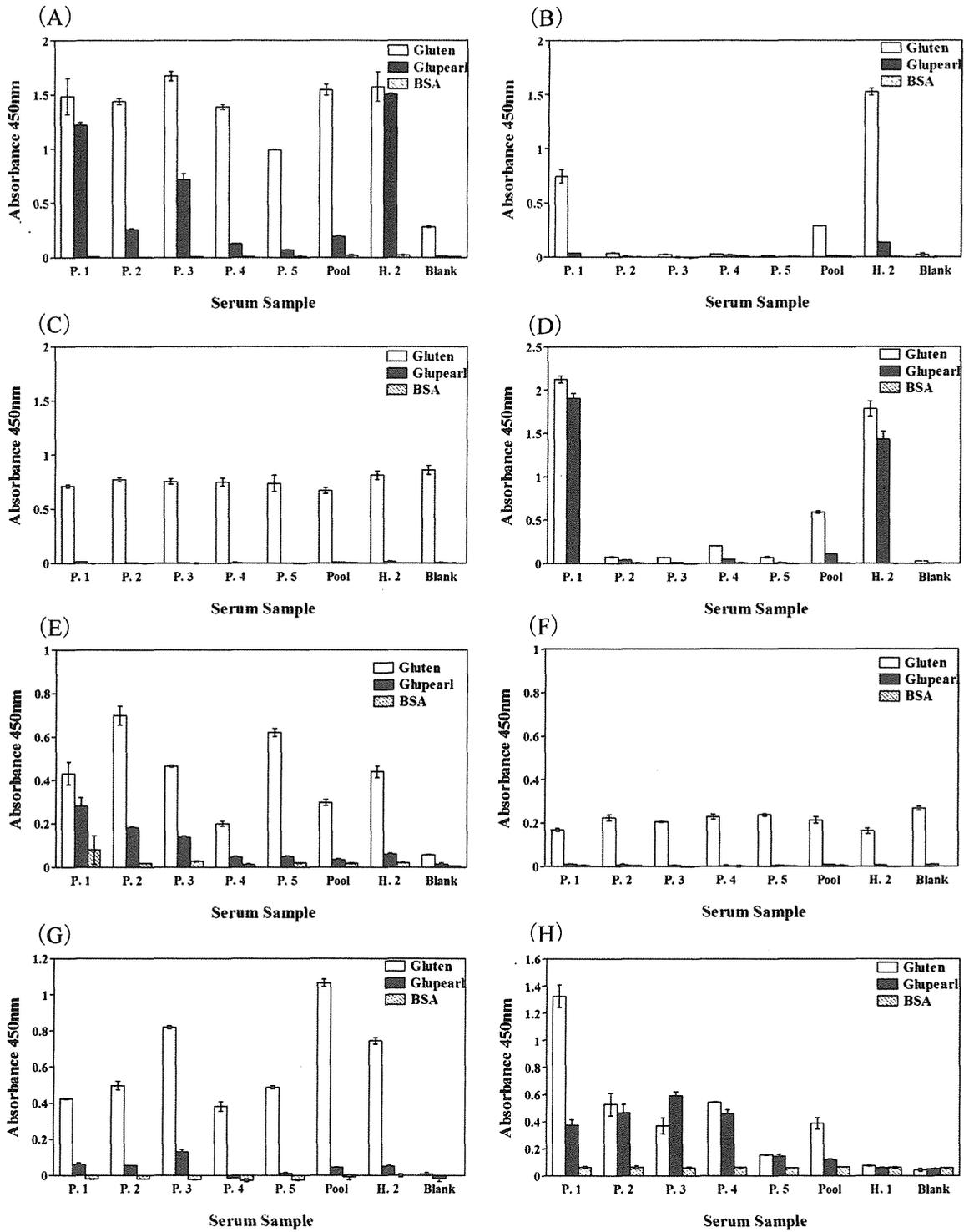


図1 茶のしずく小麦アレルギー患者1-5 (P.1-5) の血漿中のグルテン、グルパール19Sに対するクラス別抗体価 各パネルは、それぞれ A : IgG1、B : IgG2、C : IgG3、D : IgG4、E : IgA1、F : IgA2、G : IgM、H : IgE の抗体価を示す。H.1 は健常人血漿、Pool は、約 20 人の健常人由来の混合血漿を示す。

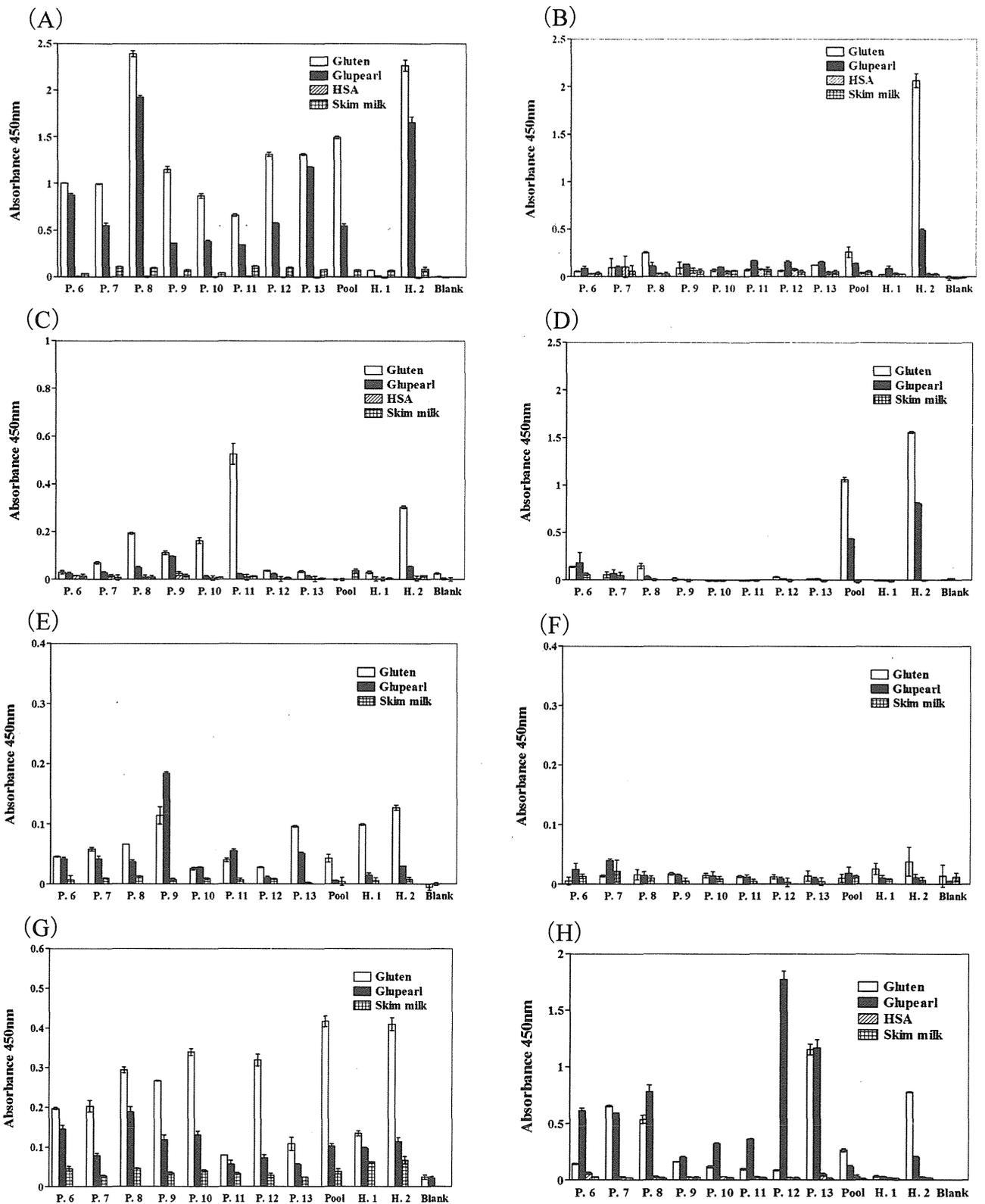


図2 茶のしずく小麦アレルギー患者6-13 (P.6-13) の血漿中のグルテン、グルパール19Sに対するクラス別抗体価 各パネルは、それぞれA: IgG1、B: IgG2、C: IgG3、D: IgG4、E: IgA1、F: IgA2、G: IgM、H: IgEの抗体価を示す。H.1は健常人血漿、Poolは、約20人の健常人由来の混合血漿を示す。H.2は、健常人として採血したが、小麦アレルギー偽陽性と考えられる(詳細は本文参照)。

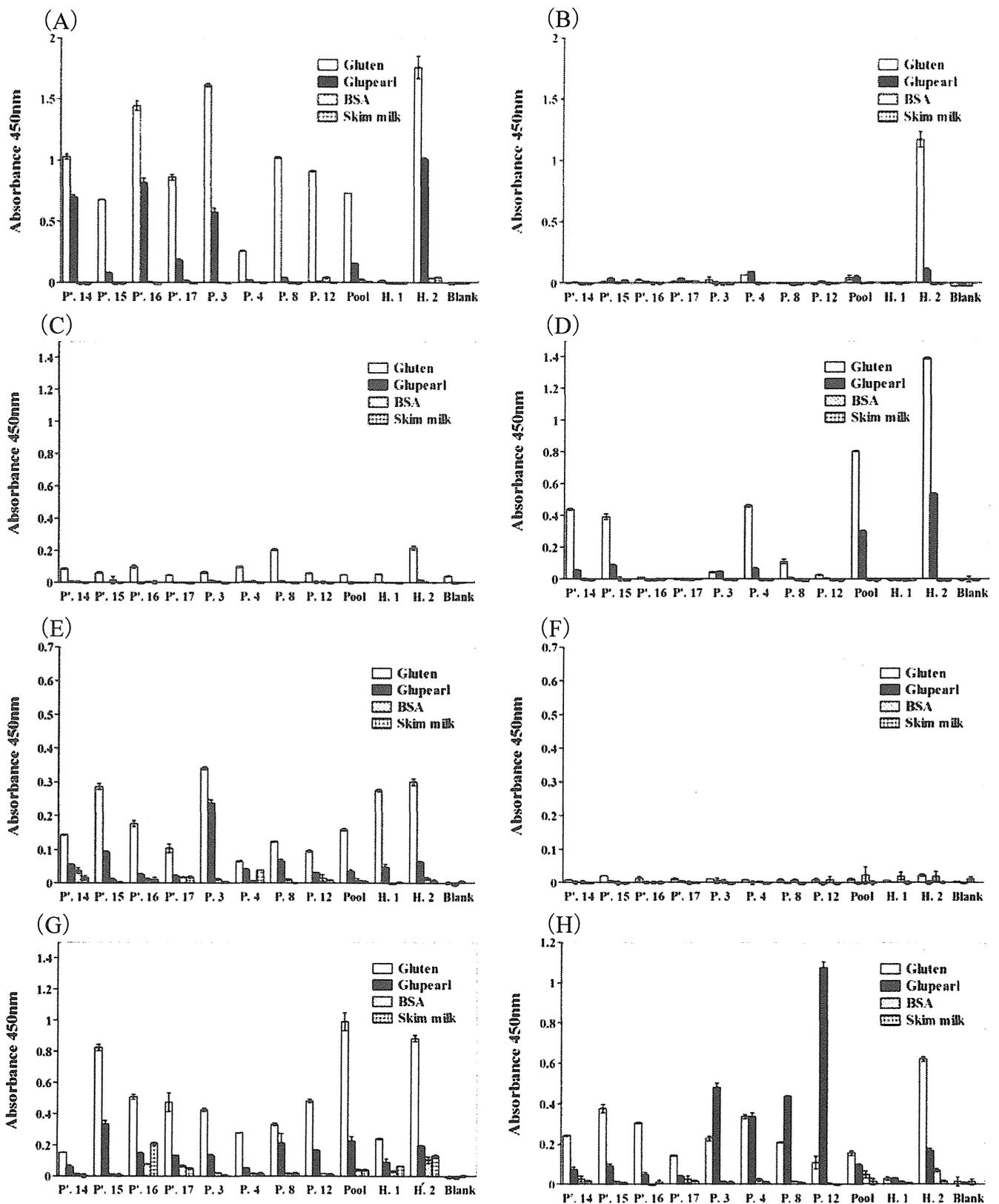
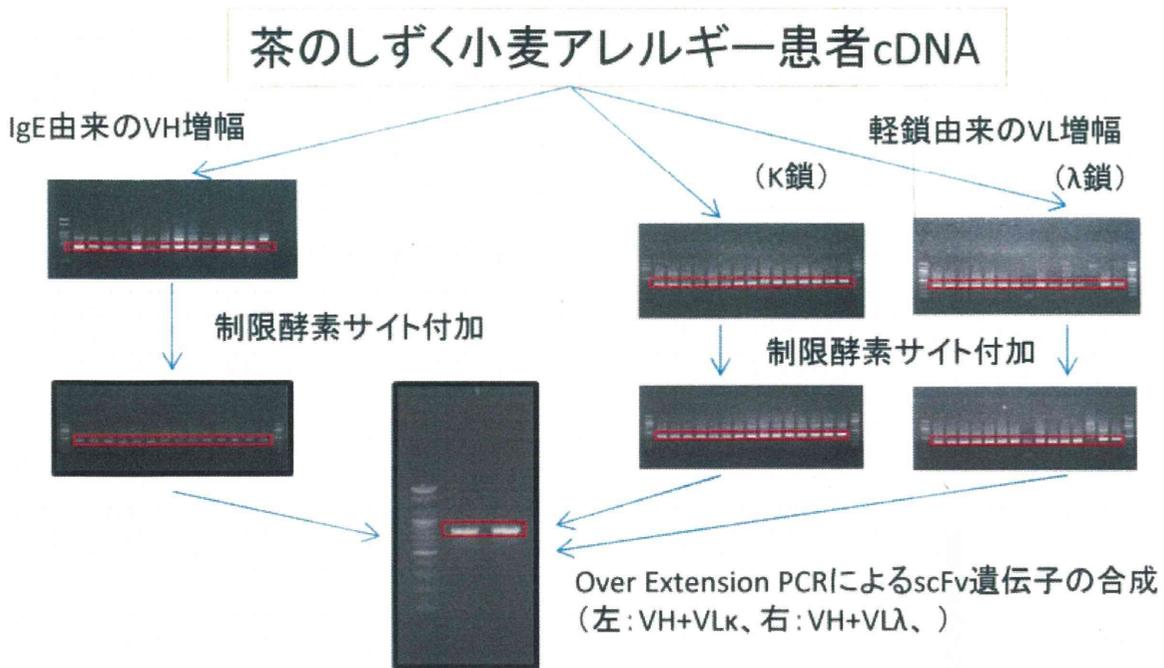


図3 通常型小麦アレルギー患者 (P' 14-17) の血漿中のグルテン、グルパール 19S に対するクラス別抗体価の比較 各パネルは、それぞれ A : IgG1、B : IgG2、C : IgG3、D : IgG4、E : IgA1、F : IgA2、G : IgM、H : IgE の抗体価を示す。P.4,8,1 は、比較のため、茶のしずく小麦アレルギー患者由来のものを用いた。H.1 は健常人血漿、Pool は、約 20 人の健常人由来の混合血漿を示す。H.2 は、健常人として採血したが、小麦アレルギー偽陽性と考えられる (詳細は本文参照)。

(A)



(B)

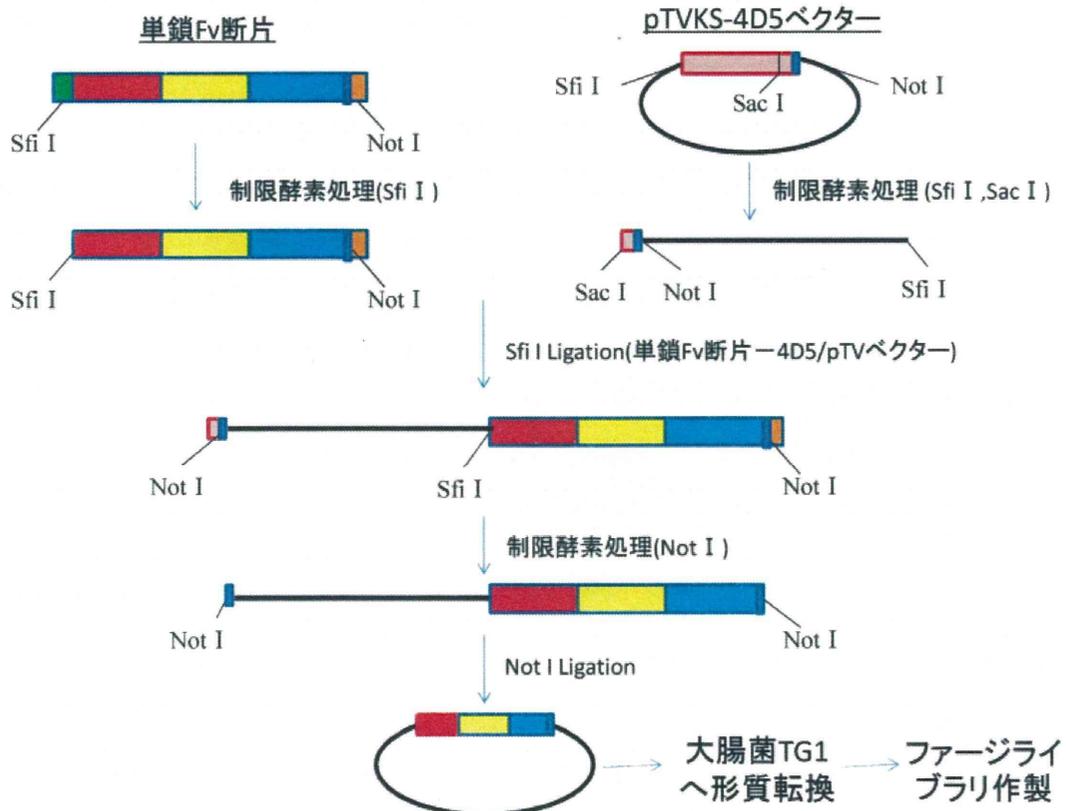


図4 単鎖Fv抗体遺伝子の増幅 (A) とファージライブラリの構築 (B) の概要 詳細は本文を参照。

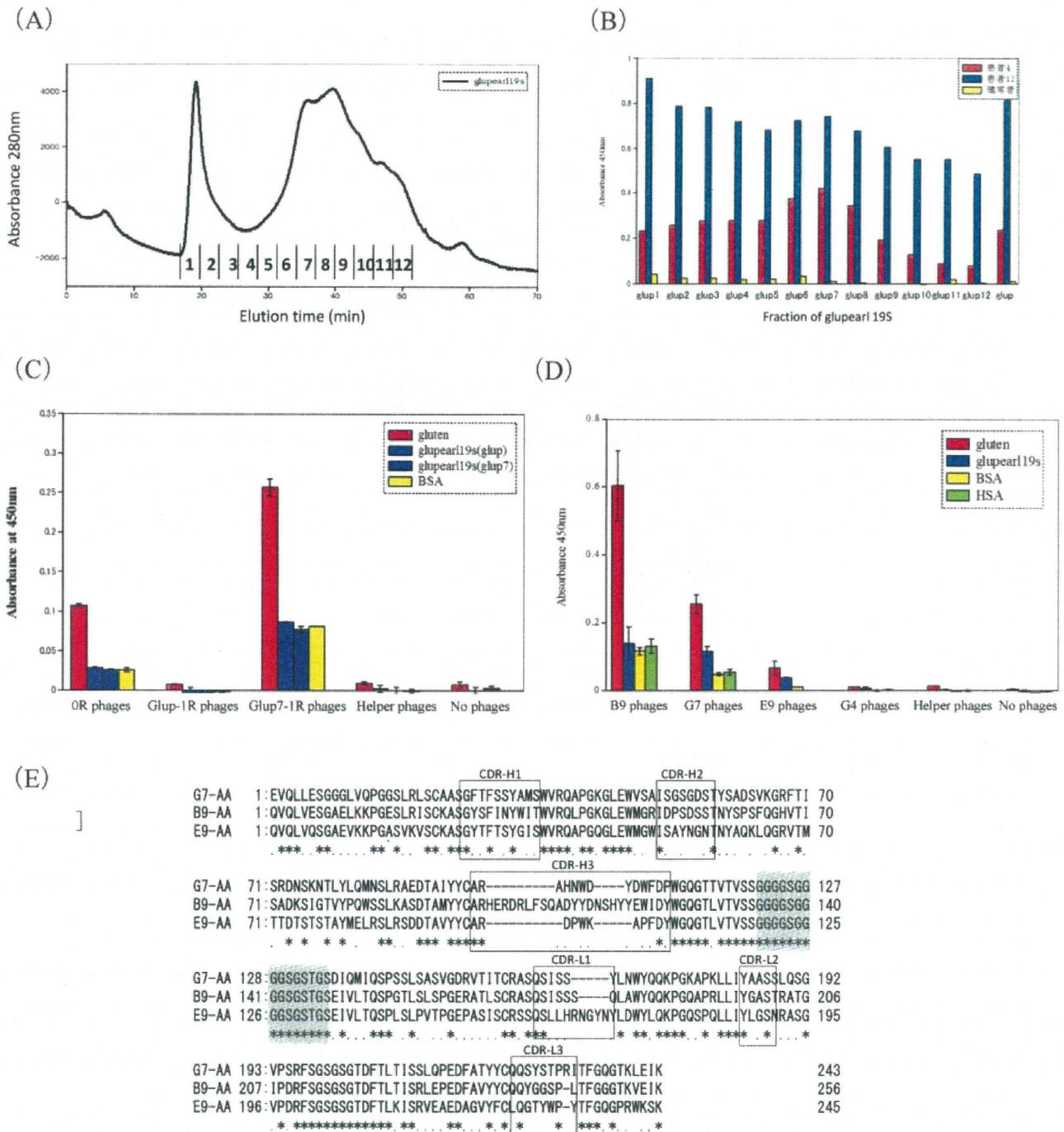


図5 単鎖 Fv 抗体ファージライブラリからの抗原特異的クローンの単離 (A) グルパール 19S の可溶性画分の分子篩クロマトグラフィー (Superdex200 カラム) による分画、(B) グルパール 19S の分画サンプル (A) に対する患者 4 と 1 2 の血漿中 IgE 抗体の反応性、(C) 患者 4 由来の IgE 抗体ファージライブラリからグルパール (Glup-1R) 並びに (A) のグルパール分画 7 (Glup7-1R) に対する 1 回のバイオパンニングによって得られたファージ集団の ELISA による抗原結合活性、(D) グルパール分画 7 (Glup7-1R) に対するバイオパンニングによって得られた 3 種のグルテン特異的抗体クローンの結合特性、(E) 3 種のグルテン特異的抗体クローンのアミノ酸配列。灰色のボックスは VH と VL をつないでいるリンカー部分を示す。

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

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

研究要旨:

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、感作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。

協力研究者

酒井信夫、中村里香、手島玲子

(国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部)

曹永晩、小川久美子

(国立医薬品食品衛生研究所病理部)

A. 研究目的

医薬部外品・化粧品の中には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、食品等に由来するタンパク質あるいはその分解物が配合されているものがある。薬事法上、医薬部外品等は人体に対する作用が緩和であり、その使用による健康被害が起きた場合でも、人体に対してそれ程重大な影響は与えないと考えられてきた。しかし最近、ある特定の小麦タンパク質加水分解物(グルパール 19S)を含有する洗顔石鹸(茶のしずく石鹸:医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となっている。この事例にお

いては、洗顔の際に、経皮的あるいは経粘膜的(眼や鼻の粘膜を介する)に石鹸中の小麦タンパク質加水分解物が体内に吸収されて感作され、小麦を使用した食品を摂取した際に小麦に対する食物アレルギーの症状が現れたものと考えられている。本研究では、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因がこの経皮感作性に与える影響について解析することを目的とし、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用い、グルパール 19S の経皮感作性、感作の際の界面活性剤の影響、グルパール 19S とは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。また、グルパール 19S 感作時のマウス皮膚及びリンパ節等に関する組織病理解析を行った。さらに、即時型アレルギーに関する経皮感作性の動物試験系については、専門家により評価され確立された方法がこれまで無かったことから、本研究を踏まえ、即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法(概要)を作成した。

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調製した。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を用いた。

グルテンのアルカリ加水分解については、グルテンのストック懸濁液に 1M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を約 12 に調整し、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、1N 塩酸で中和して加水分解反応を停止させ、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、1M 水酸化ナトリウム水溶液を予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した。

マウスを用いた経皮感作試験

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 群の匹数は 5 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「トリー」(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 μ L の抗原懸濁液(500 μ g and/or 200 μ g of protein)を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチ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 μ L を腹腔内投与(i. p.)して行った。i. p. 後 30 分間のマウスの直腸内体温変化及びアナフィラキシー症状を観察し、症状については Table 1 の基準に従っ

てスコアリングした。また、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】

感作抗原は Table 2 に、感作スケジュールは Fig. 1 に示した。感作時の界面活性剤の共存効果を調べるため、グルパール 19S を抗原とし、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を添加する群(終濃度 0.5%)及び添加しない群を設定した。感作抗原量は 500 μ g あるいは 200 μ g/パッチとした。

【実験 2】

感作抗原は Table 2 に、感作スケジュールは Fig. 1 に示した。加水分解時間を変化させたアルカリ加水分解グルテンに SDS を終濃度 0.5%となるように添加し、貼付抗原とした。未分解グルテン(A1k0h)、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示したものの(A1k0.5h)、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の(A1k12h)の経皮感作性を検討した。また、陽性対照として設定したグルパール 19S 感作群については、経時的に採取した血清中の TSLP(Thymic stromal lymphopoietin)濃度を ELISA (eBioscience 社)により定量した。

【実験 3】

感作抗原は Table 2 に、感作スケジュールは Fig. 1 に示した。石鹼素地に含有されている界面活性剤について経皮感作時の共存効果を調べるため、5 種の脂肪酸ナトリウム塩(ラウリン酸ナトリウム(C12)、ミリスチン硫酸ナトリウム(C14)、パルミチン酸ナトリウム(C16)、オレイン酸ナトリウム(C18:1)、リノール酸ナトリウム(C18:2))及び対照物質である SDS を終濃度 0.5%となるように抗原懸濁液に添加した。感作抗原量は 200 μ g/パッチとした。

【実験 4】

感作抗原は Table 2 に、感作スケジュールは Fig. 1 に示した。組織病理解析を目的とし、グルパール 19S にて 1 週、3 週、4 週感作後に解剖する群、及び 4 週感作の後 i. p. 投与によりアナフィラキシー反応を惹起し、30 分後に解剖する群を設定し、実験を行った。病理解析用検体採取にあたっては、肉眼観察後、深

麻酔下でマウスを屠殺解剖し、感作開始 1、3 および 4 週の群については感作部位（左側背部）皮膚、左右腋窩及び鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節を、4 週感作終了 1 日後に 19S の i. p. 投与にて惹起を行った群については、さらに脾臓および眼瞼を含む眼球も摘出した。摘出した臓器はホルマリンにて固定した。皮膚は各 3 片、リンパ節、脾臓および眼球は各 1 片を切出し、パラフィン包埋後、定法に従いヘマトキシリン・エオジン (HE) 標本を作製した。病理組織学的検討は、所見の程度によってスコアリングを行った。

統計解析

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 Tukey の多重検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ で有意差の程度を記した。

(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行った。

C. 研究結果

【実験 1】

グルパール 19S の経皮感作性に関して、用量依存性や界面活性剤の影響についても合わせて検討するため、グルパール 19S の用量を 500 μg 及び 200 μg の 2 種、また、それぞれ SDS を共存させる群と共存させない群を設定し、感作及び惹起に関する比較を行った。

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 500 μg 感作群 (HS500)、200 μg 感作群 (HS200) 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。SDS 非共存下グルパール 19S 500 μg 感作群 (H500) では、IgG1 の増加は見られたが、IgE の増加は見られなかった。SDS 非共存下グルパール 19S 200 μg 感作群 (H200) では、IgE、IgG1 とも有意な増加は見られなかった。

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、HS500 群では V 群と比較して平均 4.8 度、HS200 群では 4.7 度と、体温の大きな低下が見られた。また H500 群でも 2.9 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 H200 群ではこのような有意な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 HS500 群、HS200 群では血中ヒスタミン濃度が大きく増大していた。H500 群でも有意な増大が見られた。H200 群では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。HS500 群、HS200 群では全匹 3.0 と高いスコアであり、また H500 群でも全匹 2.0 であった。一方、H200 群では平均 0.2 と低いスコアであった。

【実験 2】

グルパール 19S はグルテンの酸加水分解物である。本研究ではグルテンのアルカリ加水分解物を調製し、その経皮感作性についてグルパール 19S との比較を行った。

Fig. 3-1 にはグルテンのアルカリ加水分解による SDS-PAGE パターンの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、100 kDa 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 (A1k0h)、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 (A1k0.5h)、及びほぼ 30kDa 以下にまで分解されているもの (A1k12h) を取り上げ、マウスに対する経皮感作能を検討した。

Fig. 3-2 には、感作 4 週後の感作抗原特異的抗体産

生の検討結果を示す。IgE については、グルパール 19S 群(19S)、グルテン群、及び Alk0h 群では V 群と比較して有意な増加が見られたが、Alk0.5h 群、Alk12h 群ではこのような増加は見られなかった(A)。一方 IgG1 については、全ての群で V 群と比較して有意な増加が見られた(B)。

Fig. 3-3 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 3.0 度低下した。しかし他の群では V 群と比較して有意な低下は見られなかった。惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度については、19S 群では大きく増大したが、他の群ではこのような増大は見られなかった(B)。C にはアナフィラキシー症状のスコアを示す。19S 群では平均 3.4 と高いスコアであった。グルテン群では平均 2.2、Alk0h 群では 2.0 であり、これら 3 群では V 群と比較して有意に高いスコアであった。一方 Alk0.5h 群、Alk12h 群では平均 1.0 という低いスコアであった。

Fig. 3-4 には、V 群及び 19S 群の血中 TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) 濃度の経時変化を示す。V 群では TSLP 濃度に変化は見られなかったが、19S 群では感作に伴って TSLP 濃度の増大が見られ、Day25 では Day0 の 1.4 倍となっていた。

【実験 3】

実験 1 及び 2 では、感作時に共存させる界面活性剤として SDS を用いたが、実験 3 では、一般的に石鹼素地に多く含まれている界面活性剤である脂肪酸ナトリウム 5 種を用い、経皮感作に対する影響を検討した。感作抗原は全てグルパール 19S(200 µg) とした。

Fig. 4-1 にはこの試験に用いた界面活性剤の構造を示す。ラウリン酸ナトリウム(C12)、ミリスチン硫酸ナトリウム(C14)、パルミチン酸ナトリウム(C16)はそれぞれ炭素数 12、14、16 の直鎖脂肪酸のナトリウム塩である。オレイン酸ナトリウム(C18:1)及びリノール酸ナトリウム(C18:2)は炭素数 18 の脂肪酸のナトリウム塩で、不飽和結合をそれぞれ 1 個及び 2 個含む。対照物質である SDS は炭素数 12 の炭素鎖の末端に硫酸基のナトリウム塩を有する、生化学的実験等に頻繁に用いられる代表的な界面活性剤である。

Fig. 4-2 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 は IgE、B は IgG1 についての結果である。H 群は界面活性剤なし、HS 群は SDS、HC12 群はラウリン酸ナトリウム、HC14 群はミリスチン硫酸ナトリウム、HC16 はパルミチン酸ナトリウム、HC18:1 はオレイン酸ナトリウム、HC18:2 はリノール酸ナトリウムをそれぞれ共存させた群である。H 群、HS 群、HC12 群、HC18:2 群では、V 群と比較して血中 IgE が有意に増加したが、HC14 群、HC16 群、HC18:1 群では IgE の増加は見られなかった。また、IgG1 については、HS 群で有意な増加が見られ、他の群でも増加傾向が見られたが、個体間の差が大きく、V 群との有意差は認められなかった。

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 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 6.3 度という大きな体温低下が見られた。また H 群、HC12 群、HC18:2 群でもそれぞれ 3.8 度、3.7 度、3.3 度体温が低下しており、これら 4 群では V 群との間に有意な差があった。一方 HC14 群、HC16 群、HC18:1 群ではこのような有意な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。HS 群、H 群では V 群と比較してヒスタミン濃度が有意に増大していた。HC12 群、HC14 群、HC18:2 群でも増大する傾向が見られた。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 3.4、H 群、HC12 群、HC18:2 群でもそれぞれ 2.6、3.0、3.0 と高いスコアであった。HC14 群、HC18:1 群ではそれぞれ 2.0、1.8 とやや高いスコアであり、HC16 群以外のこれらの群では V 群との間に有意差が見られた。一方 HC16 群では 1.0 という低いスコアであった。

【実験 4】

これまでの実験をとおして、グルパール 19S が強い経皮感作性を有することが高い再現性をもって示された。そこで、グルパール 19S 感作マウスについて、感作部位の皮膚、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓、及び眼瞼について組織病理解析を行った。

Fig. 5-1 には感作部位皮膚の肉眼病変、Fig. 5-2 に

は感作部位皮膚の病理組織病変、Fig. 5-3 には左腋窩リンパ節の病理組織病変、Fig. 5-4 には脾臓の病理組織病変、Fig. 5-5 には眼瞼の病理組織病変の像を示す。また Table 3 にはそれぞれの病変の所見をまとめたものを示す。

皮膚の肉眼的観察では、4 週感作後に Vehicle 群 (V[4w]) に比べグルパール 19S 投与群 (19S[4w]) で明らかな発赤、皮膚の肥厚及びびらんが認められた。病理組織学的観察では、表皮肥厚、角化亢進、基底細胞の液状変性及び炎症細胞浸潤が Vehicle 群に比べグルパール 19S 投与群で早期に高頻度で観察され、程度の増強が認められた。惹起後解剖した群では、皮膚の肉眼的及び病理組織学的病変は、両群ともに 4 週感作後より程度は低下したものの Vehicle 群 (V[ASA]) に比べグルパール 19S 投与群 (19S[ASA]) では多くの細胞浸潤が残存した。リンパ節の変化は被験物質を塗布した皮膚近傍の左腋窩リンパ節で最も強く認められた。グルパール 19S 投与群で、3 週感作後より、tingible body 並びに大型の 2 次濾胞を伴う濾胞過形成及びリンパ過形成が高頻度に認められたが、Vehicle 群ではより小型の濾胞過形成を認めるのみだった。惹起後解剖した群では、リンパ節病変の程度が増強され、その増強は Vehicle 群 (V[ASA]) に比べグルパール 19S 投与群 (19S[ASA]) でより顕著であった。

脾臓及び眼瞼に関しては、惹起後解剖した群 (V[ASA] 及び 19S[ASA]) で解析を行った。脾臓においては、V[ASA] 群、19S[ASA] 群ともに髄外造血の亢進が認められた。眼瞼については、19S[ASA] 群で肉眼的に眼瞼の浮腫が認められ、病理組織学的には肥満細胞を含む炎症性細胞の浸潤と表皮基底細胞の液状変性が認められた。

Fig. 5-6 には各群解剖時の体重及び脾臓重量を示す。体重については、Vehicle 群とグルパール 19S 投与群との間に有意差は無く、また、V[ASA] 群、19S[ASA] 群と同日解剖に供した無処置群 (Ctrl) との間でも有意差は無かった。脾臓重量については、4 週感作後、19S[4w] 群の方が V[4w] 群と比較して有意に脾臓重量が大きかった。感作後惹起した群でも、19S[ASA] 群の方が V[ASA] 群よりも大きい傾向が見ら

れたが有意差は無かった。またこの時両群とも無処置群 (Ctrl) よりも有意に大きかった。

Fig. 5-7 には各群の血清中の抗原特異的抗体についての検討結果を示す。グルパール 19S 投与群では 3 週感作以降、IgE 及び IgG1 が Vehicle 群と比較して有意に増大していた。Fig. 5-8 には、感作後惹起を行った群のアナフィラキシー応答を示す。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、19S[ASA] 群では V[ASA] 群と比較して平均 4.5 度の体温低下が見られた。B は惹起 30 分後の血中のヒスタミン濃度を示している。19S[ASA] 群では V[ASA] 群と比較してヒスタミン濃度が有意に増大していた。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。V[ASA] 群では全匹スコア 0 であったのに対し、19S[ASA] 群では平均 3.4 という高いスコアであった。これらの結果から、組織病理解析のための本実験においても、グルパール 19S による経皮感作が確かに進行していたことが確認された。

D. 考察

本研究では、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用い、グルパール 19S の経皮感作性、感作の際の界面活性剤の影響、グルパール 19S とは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、及び感作されたマウスの病理組織病変等について検討した。

【実験 1】では、グルパール 19S による経皮感作に関して、用量依存性や界面活性剤の影響についても合わせて検討を行った。その結果、界面活性剤を共存させない場合には、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。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る。以上の結果から、グル