

201322042A

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 免疫アレルギー研究分野)

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福富 友馬

平成26(2014)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 7

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 25

4. 加水分解コムギによる即時型コムギアレルギー患者の経過と
日常生活への影響

岸 川 禮 子 29

5. 加水分解小麦含有石鹼使用後に発症した小麦アレルギー症例の
臨床経過についての検討

相 原 道 子 35

6. 成人食物アレルギーの病態特異的な危険因子:Population-based study

東 朋 美 39

7. 成人薬剤アナフィラキシーの有病率

谷 口 正 実 41

8. 牛肉アレルギーとセツキシマブアレルギーの交差反応に関する研究

千 貫 祐 子 45

9. カバノキ科花粉症関連成人果物野菜アレルギー患者における
感作アレルゲンプロファイル

福 富 友 馬 49

10. 血清トリプターゼ(DBPCFC 前)を用いた牛乳アナフィラキシー
誘発予測に関する研究

海 老 澤 元 宏 51

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 55

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 免疫アレルギー研究分野))
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	横浜市立大学大学院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	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	講師
	手 島 玲 子	国立医薬品食品衛生研究所	食品部 部長
	東 朋 美	金沢大学医薬保健研究域医学系	環境生体分子応答学 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
	松 倉 節 子	横浜市立大学附属市民総合医療センター	皮膚科 講師
	中 村 和 子	横浜市立大学附属市民総合医療センター	皮膚科 助教
	熊谷日登美	日本大学生物資源科学部生命化学科	教授
	佐 藤 里 絵	農研機構 食品総合研究所	食品分析研究領域 成分解析ユニット 主任研究員
	杉 山 晃 子	国立病院機構福岡病院皮膚科	医師
	下 田 照 文	国立病院機構福岡病院臨床研究部	部長
	西 江 温 子	国立病院機構福岡病院皮膚科	
	岩 永 知 秋	国立病院機構福岡病院	院長
	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	医薬安全科学部 第3室室長
	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
	中 村 裕 之	金沢大学医薬保健研究域医学系	環境生態医学・公衆衛生学 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
	佐藤さくら	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 病因病態研究室長
	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。

本研究班は、社会問題になっている加水分解コムギに対するアレルギーの実態把握と病態解明と同時に、その他の成人の食物アレルギー病態に関する臨床研究、成人の食物・薬剤アレルギーに関する疫学研究を行い、成人における独自のアナフィラキシーの病態を明らかにすることを目標とする。

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コムギを含有する「（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 という加水分解コムギは、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）。さらにこの抗原性にはグルテンの脱アミド化と加水分解小麦の分子量が大きく関与している（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) 経口小麦アレルギー症状の惹起には、体内の酵素 tissue transglutaminase による経口摂取されたグルテンの脱アミド化も関与している（H25年度成果）。
- 7) 当該疾患は石鹼の使用の中止（加水分解コムギへの暴露の消失）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）。さらに臨床症状の予後は必ずしも IgE 抗体価の推移のみでは説明できない（H25年度成果）。
- 8) 当該疾患患者は「他との付き合い減少」により、QOL が著明に低下している（H25年度成果）

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。インターネットの疫学研究の結果からも、花粉症による経鼻粘膜的な花粉アレルギー暴露が、発症の危険因子であることが確認された。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。

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、経気道粘膜的感作が、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。

本研究班は、社会問題になっている加水分解コムギに対するアレルギーの実態把握と病態解明と同時に、その他の成人の食物アレルギー病態に関する臨床研究、成人の食物・薬剤アレルギーに関する疫学研究を行い、成人における独自のアナフィラキシーの病態を明らかにすることを目標とする。

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、加水分解コムギ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。

<加水分解コムギ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。さらに小麦グルテンの経口摂取後の消化酵素やその他修飾による抗原性の変化に関して、独自に開発した細胞を用いる *in vitro* 惹起試験を用いて検討した。

③ 板垣（北海道文教大学）らは、ウエスタンブロッティング、陽性バンドの *in gel digestion* により消化後 MALDI-TOF/TOF により抗原解析を行った。また、グリアジンの加熱加水分解によって、経時的な加水分解率、脱アミド化率、IgE 反応性を調べた。

<加水分解コムギアレルギーの臨床的検討>

④ 岸川（福岡病院）らは加水分解コムギアレルギー症例 58 例に対してアンケート調査を行い、患者の QOL を評価した。

⑤ 相原（横浜市立大学）らは、加水分解小麦アレルギー 12 例の臨床経過、IgE 抗体価の推移に関して詳細に検討した。

<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、食物アレルギーの疫学調査を行い、その危険因

子解析を行った。

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、薬剤アナフィラキシーの有病率を算出した。

<成人食物アレルギーの各種病態のアレルゲン解析>

⑧ 千貫（島根大学）らは、牛肉アレルギー患者 20 名においてセツキシマブ特異的 IgE 抗体価測定を行い、 α -gal による交差反応性の有無を評価した。

⑨ 福富（研究代表者）らは、成人カバノキ科花粉関連果物野菜アレルギー患者 55 例を対象に感作アレルゲンプロファイル解析を行った。

<食物アレルギー病態における Baseline の血清トリプターゼ値の意義>

⑩ 海老澤（相模原病院）らは、小児牛乳アレルギー患者の DBPCFC による負荷試験結果と、負荷試験前の血清トリプターゼの関係を検討した。

（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を得た。

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、さらに強い Th2 型の免疫反応を惹起することを明らかにした。また、小麦グルテンが経口摂取されたあと、体内の Tissue transglutaminase という酵素により脱アミド化を受けることによって強い IgE 反応性を獲得することが明らかになった。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。

③ MALDI-TOF/TOF により抗原解析し、 γ -グリアジン、LMW-グルテニンが原因アレルゲンとして推定された。グルテンの酸加熱処理による経時的な抗原性の変化が明らかになった。

④ 加水分解コムギアレルギー患者は「他とのつきあいの減少」を介して、その QOL が著しく低下していることが示された。

- ⑤ 加水分解コムギアレルギーの臨床経過は必ずしも IgE 抗体価のみでは説明できず、臨床症状と抗体価の推移が一致しない症例も認められた。
- ⑥ 自己申告による甲殻類アレルギー、果物アレルギー、魚アレルギーの有病率はそれぞれ、2.7, 1.8, 1.7%であり、これら 3 種が 3 大原因食物であった。それらの危険因子としてアレルギー性鼻炎の重要性が示唆された。
- ⑦ 薬剤アナフィラキシーの有病率は 1%程度あることが推測され、薬剤アナフィラキシーの疫学的なインパクトの大きさが明らかになった。
- ⑧ 牛肉アレルギー患者 20 例全例で、セツキシマブに対する特異的 IgE 抗体価の上昇を認め、牛肉特異的 IgE 抗体価とも相関を認めた。セツキシマブアレルギーの予測因子としての牛肉特異的 IgE 抗体価測定の有用性が示唆された。
- ⑨ マイクロアレイによる IgE 感作プロファイル解析により、PR-10 感作の由来がカバノキ科花粉であることが確認され、臨床症状が花粉 PR-10 と食物 PR-10 の交差反応性で説明できることが示された。
- ⑩ 負荷試験前の血清トリプターゼ高値はより重篤な食物アレルギー症状と関連していた。

D. 考察

加水分解コムギ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コムギを含有する「（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 という加水分解コムギは、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）。さらにこの抗原性にはグルテンの脱アミド化と加水分解小麦の分子量が大きく関与している（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) 経口小麦アレルギー症状の惹起には、体内の酵素 tissue transglutaminase による経口摂取されたグルテンの脱アミド化も関与している（H25 年度成果）。

7) 当該疾患は石鹼の使用の中止（加水分解コムギへの暴露の消失）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）。さらに臨床症状の予後は必ずしも IgE 抗体価の推移のみでは説明できない（H25 年度成果）。

8) 当該疾患患者は「他との付き合い減少」により、QOL が著明に低下している（H25 年度成果）

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。インターネットの疫学研究の結果からも、花粉症による経鼻粘膜的な花粉アレルギー暴露が、発症の危険因子であることが確認された。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。

E. 結論

現在社会問題になっている加水分解コムギ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。本研究班の成果により、当該疾患の病態に関する多くのことが明らかになった。

さらに、この病態以外にも成人独特の発症機序による食物アレルギー病態が多く存在する実態が明らかになった。特に、アレルギー性鼻炎関連の食物アレルギーの発症が疫学的にインパクトが大きい。成人の食物アレルギー発症予防として、経粘膜的もしくは経皮的な環境アレルギー暴露ルートの遮断が最も重要であることが本研究班の成果から示唆されている。これらの成果は成人食物アレルギー発症予防のための行政計画の学問的な根拠として貢献できると考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi K, Taniguchi M, Fukutomi Y, Sekiya K, Watai K, Mitsui C, Tanimoto H, Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Minoguchi K, Nakajima H, Akiyama K. Oral Mite Anaphylaxis Caused by Mite-Contaminated Okonomiyaki/Pancake-Mix in Japan: 8 Case Reports and a Review of 28 Reported Cases. *Allergol Int.* in press
- 2) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Dec;132(6):1436-1438.e4.
- 3) Sekiya K, Taniguchi M, Fukutomi Y, Watai K, Minami T, Hayashi H, Ito J, Tanimoto H, Oshikata C, Tsurikisawa N, Tsuburai T, Hasegawa M, Akiyama K. Age-Specific Characteristics of Inpatients with Severe Asthma Exacerbation. *Allergol Int.* 2013 Jun 25.
- 4) Nakazawa T, Khan AF, Yasueda H, Saito A, Fukutomi Y, Takai T, Zaman K, Yunus M, Takeuchi H, Iwata T, Akiyama K. Immunization of rabbits with nematode *Ascaris lumbricoides* antigens induces antibodies cross-reactive to house dust mite *Dermatophagoides farinae* antigens. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(1):145-50.
- 5) 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.* 2013;160(3):259-64.
- 6) 福富友馬. (旧) 茶のしずく石鹼による小麦アレルギー問題からの教訓. *職業・環境アレルギー誌* 20 (2) p1-11 2013
- 7) 福富友馬, 谷口正実. 難治性喘息の概念・定義・疫学 *呼吸器内科* 23 (2), p123-129, 2013
- 8) 秋山一男, 福富友馬. ハウスダストの構成アレルゲン アレルギー・免疫 20 (3), p86-93, 2013
- 9) 福富友馬, 谷口正実, 秋山一男. 喘息発症・難治化リスクとしての肥満 IgE practice 7(1), p21-24 2013
- 10) 福富友馬. 食品とアレルギー. *JAFAN* 33 (4) p231-249 2013

2. 学会発表

- 1) 福富友馬. 茶のしずく石けんによる小麦アレルギーの総括. 第13回 食物アレルギー研究会. 特別プログラム 2013.1.27. 東京
- 2) 福富友馬. 内科アレルギー科医師がみるアナフィラキシーの実態と対策. 第25回アレルギー学会 春季臨床大会. イブニングシンポジウム 2013.5.11 横浜
- 3) 福富友馬. 加水分解コムギアレルギー: 最新の知見. 第50回日本小児アレルギー学会 シンポジウム 2013/10/19 横浜
- 4) 福富友馬. 成人の吸入性アレルギー・食物アレルギーにおけるアレルゲンコンポーネン

ト解析: 第 63 回 日本アレルギー学会秋季学
術大会. シンポジウム 2013.11.29. 東京

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 免疫アレルギー研究分野))
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 横浜市立大学大学院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 講師
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)茶のしずく石鹸(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)茶のしずく石鹸(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 食品部 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 医薬安全科学部 第3室室長
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、一昨年度より、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た検討を行った。旧茶のしずく石鹸の 1%(w/v)石鹸液を本試験系に適用したところ、おそらく皮膚貼付検体中のグルパール 19S 含量が少なかったためと考えられるが、感作性は確認されなかった。今後、実際の石鹸の使用実態に合わせた感作期間の延長等の検討がさらに必要と思われる。また、経皮感作後の加水分解コムギタンパク質に対する血中 IgE 抗体について検討したところ、抗原特異的 IgE 抗体だけではなく Total IgE に関しても、感作性の指標として有用であることが示された。

また、HWP の交叉惹起能の検討として、消化酵素、並びに小腸の粘膜固有層に存在する組織トランスグルタミナーゼ (tTG) 処理したグルテンを用いて検討を行った。その結果、グルテンを胃酸や消化酵素で処理するのみでは HWP 患者 IgE との反応性はやや低下するのみであったが、tTG により処理したところ、グルテンの脱アミド化が誘導され、Glp19S に匹敵する応答性が認められた。tTG はセリアック病の病態に深く関与するグリアジンの脱アミド化酵素として知られており、同様に脱アミド化を受けている Glp19S との交差反応性 IgE エピトープの生成に tTG が関与している可能性が示唆された。

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 26 年 1 月 20 日現在の症例登録数は 2,102 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 25 年度は、平成 23,24 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。マウスを用いる経皮感作性試験の手法を確立し、旧茶のしずく石鹸水溶液による経皮感作に関する検討、ならびにグルパール 19S の経皮感作性の指標として抗原特異的 IgE 及び Total IgE の比較検討を行うことを第一の目標とした。さらに、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、並びにグルテンの酸加水分解に伴う感作能上昇の原因の探索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、摂食したコムギグルテンが体内で何らかの代謝を受けることにより新たな IgE エピトープが生じ、Glp19S との交差反応性を獲得する可能性について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加熱した。0.5 時間後、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。旧茶のしずく石鹼水溶液は、製品を 1%(w/v)の濃度になるように超純水に溶解させて調製した。

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「トリイ」(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 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 日間休ませるといった操作を 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。Total IgE 抗体は Mouse IgE ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience)を用いて測定した。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、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。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】 旧茶のしずく石鹼水溶液の経皮感作

感作抗原を Table 2 に、感作スケジュール

を Fig. 1 に示す。旧茶のしずく石鹼感作群 (Soap 群)は感作検体として 1%水溶液を調製し、グルパール 19S 感作群(19S 群)と抗原溶液の溶質量を 500 μ g に統一した。グルパール 19S については前年度の検討と同様に、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度 0.5% となるように抗原溶液に添加した。1 群の匹数を 5-6 匹として経皮感作性及びアナフィラキシー誘導能を評価した。

【実験 2-1】 Total IgE / 抗原特異的 IgE

【実験 2-2】 Total IgE / 抗原特異的 IgE

感作抗原を Table 2 に、感作スケジュールを Fig. 1 に示した。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 4 週間後(Day 23)における抗原特異的 IgE 及び Total IgE を感作性の指標として評価した。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 群の設定匹数を 5 匹として、0 時間加水分解(未分解)グルテン(A0h)、及び、前年度の研究においてグルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターン、経皮感作性を示した 0.5 時間加水分解グルテン(A0.5h)を抗原として選択した。また、グルパール 19S の IgE 抗体産生能の再現性を確認するため、実験 2-1 及び 2-2 はそれぞれ独立して行った

(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。

(統計解析)

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。

患者血清

茶のしずく石鹼の HWP 患者血清は、患者への説明と同意に基づき、国立病院機構相模原病院により採取された。また、小児のコムギ食物アレルギー患者 (PedWA) 血清については、同様に藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院にて採取された。いずれも、各医療機関および国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理委員会の承認を得た。血清の詳細を Table 3 に示す。

細胞培養

ラット培養マスト細胞株 RS-ATL8 細胞²⁾の

培養は、既報^{1,3)}の通りに行なった。すなわち、非働化したウシ胎児血清 10%を含む MEM 培地に Gluta MAX、ペニシリン・ストレプトマイシン、500 µg/ml geneticin、200 µg/ml hygromycin B を加えた培地により、37°C の 5% CO₂ インキュベータ中で培養した。

グルテンの酵素処理

コムギグルテンは Sigma より購入した。Palosuo らの手法⁴⁾を参考に、これを人工胃液および人工腸液により消化した。すなわち、0.2 mg/ml NaCl (pH1.2) 溶液中でグルテンをブタペプシン (Sigma) により 37°C で 1 時間処理し、続いて pH を 8.0 に調整後、ブタパンクレアチン (Sigma) により 37°C でさらに 1 時間処理した。いずれもグルテン：酵素=100：1 とした。90°C、5 分間の加熱により酵素を失活させ、10 分の 1 量のモルモット組織トランスグルタミナーゼ (tTG; Sigma) を加え、37°C で一晩インキュベートした。

ウエスタンブロッティング

未処理グルテン、消化処理グルテン、tTG 処理グルテン、および消化後に tTG 処理を施したグルテンについて、茶のしずく石鹼患者血清によるウエスタンブロッティングを行なった。ポジティブコントロールとしては Glp19S を用いた。

EXiLE 法

RS-ATL8 細胞を用いた EXiLE 法は、既報^{1,3)}に準じた。すなわち、培地で 100 倍希釈した患者血清により感作した RS-ATL8 細胞をクリアボトム白色 96 ウェルプレート (PerkinElmer) に 5×10⁴cells/50µl/well で播種し、一晩培養後、洗浄の後抗原を添加、37°C の CO₂ インキュベータに 3 時間静置後にルシフェラーゼ発現量を ONE-Glo (Promega) により測定した。ルシフェラーゼ発現量は、抗原刺激なしの際の発光量と刺激時の発光量との比として表した。

ELISA による交差反応性試験

血清中 IgE の交差反応性を調べるため、抗原を結合したビーズによる IgE の吸収試験を行なった。抗原 (グルテン、tTG 処理グルテン； tTG-Glu、Glp19S) を 0.5-µm Fluoresbrite (Polysciences,) にメーカーのプロトコルに従い結合させ、BSA によりブロッキングした。0.1% の BSA によりを含む PBS により患者血清を 50 倍に希釈し、このビーズと室温で 2 時間反応させ、上清を回収した。別途、tTG-Glu および Glp19S を固相化したマイクロプレートを用いて、ELISA により IgE の結合性を評価した。抗原の交差

性は、次式により Inhibition % として表した。

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{ABS}_{\text{BSA}} - \text{ABS}_{\text{Sample}}}{\text{ABS}_{\text{BSA}} - \text{ABS}_{\text{NoSerum}}} \times 100$$

ここで、ABS_{BSA}、ABS_{Sample}、および ABS_{NoSerum} は、それぞれコントロールの BSA ビーズ処理血清、抗原コートビーズ処理血清、および血清なし時の 450nm の吸光度を指す。

Glu-C による分解試験

200µg のグルテン、tTG-Glu および Glp19S を、25 mM NH₄HCO₃、0.8 M urea、5 mM dithiothreitol 中で 60°C、20 分間加熱した。これを 15mM iodoacetamide により室温で 15 分間処理した後、Glu-C (Promega) を 1:50 で添加して 37°C で一晩インキュベートした。

ヒト化マスト細胞を用いた in vitro アレルギー一反応惹起試験

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 FcεRI 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^{6,7)}。同細胞をクリアボトム白色 96 ウェルプレートに 5×10⁴cells/50µl 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% の非働化した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。

C. 研究結果

(a) マウスを用いた経皮感作試験

【実験 1】 旧茶のしずく石鹼水溶液の経皮感作

旧茶のしずく石鹼水溶液の経皮感作性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価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 IgE 及び IgG1 についての検討結果を示している。グルパール 19S 感作群(19S)では昨年度の研究結果と同様に、

血清中グルパール 19S 特異的 IgE、IgG1 が Vehicle 群(V)と比較して有意に増加した。他方、旧茶のしずく石鹼水溶液感作群(Soap)では V 群と比較して血清中グルパール 19S 特異的 IgE、IgG1 の増加は認められなかった。

Fig. 2-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー(能動的全身性アナフィラキシー)試験の結果を示す。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 群では体温が大きく低下し(-3.7°C)、V 群と比較して有意差が認められた。他方 Soap 群では体温低下は認められなかった。B は惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。これに対して Soap 群では、ヒスタミン濃度についても上昇が認められなかった。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結果である。19S 群は平均 2.6 と高いスコアであったのに対し、Soap 群は平均 0.8 と低いスコアであった。

【実験 2-1】 Total IgE / 抗原特異的 IgE

【実験 2-2】 Total IgE / 抗原特異的 IgE

前年度の研究結果より、0.5 時間酸加水分解グルテン(A0.5h)は、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示し、グルパール 19S と同等の強い経皮感作性を示すことが明らかになっている。今年度は、経皮感作 4 週後(Day 23)の血清における抗原特異的 IgE 及び Total IgE を感作性の指標として評価した。グルパール 19S の IgE 抗体産生能の再現性を確認するため、実験 2-1 及び 2-2 はそれぞれ独立して行った。Fig. 3A には血清中抗原特異的 IgE、B には血清中 Total IgE の測定結果を示す。実験 2-1 において 19S 群、A0.5h 群は V 群と比較して抗原特異的 IgE 抗体価の有意な上昇が認められた。他方、分解時間 0 時間の未分解グルテン(A0h)群は上昇傾向が認められるものの、統計学的な有意差を示さなかった。B に示す Total IgE の定量においても抗原特異的 IgE と同様のパターンを示し、19S 群、A0.5h 群は V 群と比較して Total IgE 抗体の有意な上昇が認められた一方で、A0h 群では統計学的な有意差は見られなかった。実験 2-2 において 19S 群は血清中抗原特異的 IgE、血清中 Total IgE 共に V 群と比較して有意な上昇が認められ、独立した実験間における再現性が確認された。

(b) ヒト化マスト細胞を用いた *in vitro* 惹起試験

グルテンの酵素処理による影響

EXiLE 法により、未処理グルテン、消化処理

グルテン、tTG 処理グルテン、および消化後に tTG 処理を施したグルテンの IgE 架橋活性を調べたところ、HWP 患者 IgE で感作した RS-ATL8 細胞はグルテンや消化処理グルテンにはほとんど応答性を示さなかったのに対し、tTG 処理グルテン (tTG-Glu) に対しては著しい応答性を示した (Fig. 4A)。データは示していないが、tTG による処理時間は、30 分間ですでに顕著な応答を示した。また、消化したグルテンをその後 tTG 処理した場合も、明瞭な応答が観察された。一方、小児のコムギ食物アレルギー患者 (PedWA) 血清で感作した場合は、これらの抗原すべてに対し、応答性が認められた (Fig. 4B)。すべての患者血清および健常人血清についてグルテン、tTG-Glu、Glp19S への応答性を試験したところ、PedWA 血清 IgE はすべての抗原に対して同程度の応答を示したが、HWP 患者 IgE では tTG-Glu および Glp19S への応答性はグルテンへの応答性よりも有意に高かった (Fig. 4C)。健常人 IgE はいずれの抗原にも応答しなかった。

各種グルテンの IgE 結合性

ウエスタンブロッティングにより、上記と同様の抗原に対する HWP 患者 IgE の結合性を調べたところ、tTG-Glu や消化処理後に tTG 処理を施したグルテンでは、Glp19S と同様に、高分子量領域にスミア状の結合性が認められた (Fig. 5)。無処理および消化処理グルテンでは IgE の結合性は弱いかほとんど認められず、EXiLE 法の結果を支持した。

グルテンの脱アミド化の測定

グルテンの酸と加熱による加水分解時には、平行して多くの副反応が起こりうる。中でも、グルテン中に豊富に存在するグルタミン残基がランダムに脱アミド化され、グルタミン酸残基へと変化する反応がよく知られている⁹⁾。そこで、各種酵素処理グルテンにおいても同様の脱アミド化反応が起こっているかどうかを調べた。Glu-C は、タンパク質中のグルタミン酸残基の C 末端側を切断するエンドペプチダーゼであり、もしタンパク質が豊富にグルタミン酸を含むならば、その断片はごく小さな分子サイズとなることが予想される。Fig. 6 に示した通り、tTG-Glu や Glp19S はグルテンに比べて高分子量領域にスミア状の成分が認められるが、Glu-C による消化に伴い、これらの成分はほぼ消失した。

tTG-Glu と Glp19S の交差反応性

抗原結合ビーズを用いて患者血清中 IgE を免疫沈降することにより、tTG-Glu と Glp19S の IgE エピトープが交差反応するかどうかを調べた。Fig. 7A に示す通り、Glp19S

を固相化した ELISA プレートへの HWP 患者 IgE の結合性は、Glp19S 自身はもちろん、tTG-Glu によってもある程度抑制されたが、グルテンではほとんど変化がなく、これら三者の抗原性には有意な差が認められた ($P < 0.05$, Friedman test)。一方、PedWA 患者 IgE は、これらのいずれもが高い抑制活性を示した。tTG-Glu を固相化した場合も同様で、HWP 患者 IgE は tTG-Glu および Glp19S のいずれによっても抑制を受け、グルテンは中程度の活性を示した (Fig. 7B)。

D. 考察

(a) マウスを用いた経皮感作試験

我々はこれまでに、茶のしずく石鹼の使用とコムギ摂取によるアレルギーの因果関係を検討するため、マウスを用いた経皮感作性試験を行ってきた。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経皮感作を成立させ、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。これらの研究結果は、食物由来タンパク質による感作が経皮的に起こり得るという他のグループの報告とも矛盾しない。

本年度は、【実験 1】において、実際に洗顔石鹼によるコムギアレルギーの事故原因となったグルパール 19S を含有する旧茶のしずく石鹼(株式会社悠香)の 1%(w/v)水溶液を経皮感作試験に供した。感作性の指標として抗原特異的抗体産生を評価した結果、本動物実験モデルにおいては、旧茶のしずく石鹼 1%(w/v)水溶液では経皮感作は成立せず、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシーも誘導されなかった。旧茶のしずく石鹼 1%水溶液の経皮感作群において、貼付溶液中の石鹼溶質は 500 μg である。旧茶のしずく石鹼中のグルパール 19S 含量が 0.3%であるため、1回の感作量としてはグルパール 19S として 1.5 μg と換算される。陽性対照としてのグルパール 19S 群の 1回の感作量は 500 μg であることから、原因抗原の量的な差が結果に反映されたものと考えられる。旧茶のしずく石鹼によりコムギアレルギーを発症した患者は長期間継続して石鹼を使用していたことから、本実験系においても長期間抗原貼付を続けることにより感作が成立する可能性があると考えられる。また、これまで経皮的感作経路について評価してきたが、今後は眼や鼻の粘膜を介した感作経路についても検討を進めることが重要であろう。

【実験 2-1/2-2】では、「血清中 Total IgE」

が、これまで抗原性(感作性)の指標としていた「血清中抗原特異的 IgE 抗体価」と同様に感作成立の評価因子になり得るかどうか検討を行った。実験には陽性対照としてのグルパール 19S に加え、昨年度の研究においてグルパール 19S と同等の感作性が認められた 0.5 時間酸加水分解グルテン(A0.5h)を用いた。実験 2-1 においてグルパール 19S 群、A0.5h 群は V 群と比較して抗原特異的 IgE 抗体価と同様に Total IgE の有意な上昇が認められた。他方、経皮感作性を認めなかった分解時間 0 時間の未分解グルテン(A0h)群については、抗原特異的 IgE、Total IgE 共に V 群との間に統計学的な有意差を示さなかった。これらの結果より、血清中抗原特異的 IgE 抗体価のみならず、血清中 Total IgE に関しても経皮感作性の指標となることが示唆された。また、グルパール 19S の Total IgE 抗体産生能の再現性を確認するため、実験 2-2 を独立して行ったところ、グルパール 19S 感作群において抗原特異的 IgE、Total IgE 共に上昇し、V 群との間に統計学的な有意差を認め、実験間の再現性が示された。他方、グルテン感作群(Gluten)に関しては、抗原特異的 IgE が上昇したものの、Total IgE に関しては上昇を認めなかった。Th2 タイプの T 細胞活性化能がグルパール 19S の方がグルテンより高い可能性が考えられた。

(b) ヒト化マスト細胞を用いた in vitro 惹起試験

グルテンの酵素処理による影響

以前の報告と同様に HWP 患者 IgE は未処理グルテンとはわずかししか反応しなかったが、Glp19S とは顕著な反応性を示した (Fig. 4A, Fig. 5)。一方、胃酸と同様の pH1.2 下でペプシンを作用させ、その後パンクレチンでさらに消化処理を行なったグルテンについては、IgE の反応性は、結合性・架橋活性ともに、むしろ減弱した。これは、グルテンを胃酸や消化酵素により処理しても、HWP 患者 IgE と反応するエピトープは生じないことを示唆している。しかし、グルテンを tTG で処理したところ、非常に明瞭な IgE の結合性および架橋活性が認められた。消化後の断片についても同様であった。

tTG は transglutaminase 2 とも呼ばれ、全身に広く分布するトランスグルタミナーゼのアイソタイプである。この酵素は、特にセリアック病の病態に深く関与していることでよく知られている⁹⁾。セリアック病は、コムギグリアジンが消化・吸収後に tTG により脱アミド化を受け、これを特異抗原とする HLA DQ2/DQ8 陽性 T 細胞が活性化される

ことにより誘発される自己免疫疾患である。tTGによりグルテンタンパク質の脱アミド化が誘導され (Fig. 6)、その成分の大半は高分子量領域にスミア上に分布し、HWP患者IgEが結合する成分の分子量分布と一致したこと (Fig.5) は、tTGによる脱アミド化が生体内でのIgEエピトープの生成に関与していることを示唆している。

一方、最近横大路らは、 γ グリアジン中のグルタミンが脱アミド化された配列がHWP患者IgEのエピトープとなっていることを報告した⁸⁾。彼らの発見したIgEは脱アミド化前の γ グリアジンとも結合するが、その交差反応性は弱いことも述べられている。このことは、HWP患者のコムギ摂食によるアレルギーの発症メカニズムの一部は、脱アミド化された γ グリアジンを中心とする抗原により感作された患者IgEが、脱アミド化を受けていない γ グリアジンと交差反応するというモデルにより説明できる可能性を示唆している。しかし、100名以上の患者血清を用いた我々の未発表データによれば、HWP患者のグルテンIgE抗体価とグルテンによるIgE架橋活性は全く相関せず、未処理グルテンに応答する患者は20%に満たないことから、HWP患者のコムギ摂食によるアレルギー発症メカニズムのすべてを γ グリアジンの交差反応性で説明することは難しいと思われる。

今回我々が発見した通り、体内のtTGにより (γ グリアジンを含む) グルテンが脱アミド化され、Glp19Sと交差するIgEエピトープを生じさせるならば、横大路らの結果をうまく説明できると思われた。さらに、HWP患者のコムギ摂食によるアレルギーの発症に、tTGという新たな因子が関与しているならば、この因子の活性や遺伝子多型などの解析が本病態の解明に結びつくことが期待される。

E. 結論

23、24年度に引き続き、マウス経皮感作試験系を用いて、加水分解コムギタンパク質による経皮感作に関する検討を行った。旧茶のしずく石鹼の1%(w/v)石鹼液を本試験系に適用したところ、感作性は見られなかった。これは皮膚貼付検体中のグルパール19S含量が少なかったためと考えられ、今後、実際の石鹼の使用実態に合わせた感作期間の延長等の検討が必要である。また、経皮感作後の加水分解コムギタンパク質に対する血中IgE抗体について検討したところ、抗原特異的IgE抗体だけではなくTotal IgEに関しても、

感作性の指標として有用であることが示された。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、グルテンのtTG処理により、グルテンの脱アミド化が誘導され、Glp19Sに匹敵する応答性が認められた。

(参考文献)

- 1) 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* 2013;160:259-64.
- 2) 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;65:1266-73.
- 3) 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;61:431-7.
- 4) Palosuo K, Varjonen E, Nurkkala J, Kalkkinen N, Harvima R, Reunala T, Alenius H. Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of ω -5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1386-92.
- 5) Yildiz F, editor. *Advances in food biochemistry*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009.
- 6) Caja S, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cell Mol Immunol* 2011; 8:103-9.
- 7) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 1436-8.
- 8) Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, Harada S, Ishii K, Hiragun M, Hide M, Matsuo H. Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int* 2013;62:435-45.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein- sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **132**:1436-8.
- 2) Teshima R: Food Allergen in Cosmetics, *Yakugaku Zasshi*. 2014;**134**(1): 33-38.
- 3) 手島玲子：食物アレルギーの話，日本小児アレルギー学会，**27**(1)，15-19 (2013)
- 4) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. *Clinical Immunology & Allergology* 2013; **59**, 598-602.

2. 学会発表

- 1) 安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小麦タンパク質経皮感作能への酸加水分解の効果に関するマウスモデル実験系を用いた検討 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013.5)
- 2) 中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子。小麦グルテンはトランスグルタミナーゼ処理により酸加水分解小麦と同様の IgE 反応性を獲得する。第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013.5)
- 3) 中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、斎藤嘉朗、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子。酸加水分解コムギ特異的的患者血清 IgE はトランスグルタミナーゼ処理コムギグルテンと交差反応する。第20回日本免疫毒性学会学術大会 (2013.9)
- 4) 中村亮介、中村政志、矢上晶子、酒井信夫、中村里香、安達玲子、斎藤嘉朗、相原道子、秀道広、千貫祐子、森田栄伸、松永佳世子、手島玲子。加水分解コムギ感作血清中 IgE の EXiLE 法による検出とその有用性評価。第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013.11)
- 5) 曹永晩、安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小川久美子、BALB/c マウスにおける酸加水分解コムギタンパク質による経皮感作に関する免疫学的及び病理組織学的解析 第20回日本免疫毒性学会学術大会 (2013.9)

6) 酒井信夫、中村里香、薮島由二、福井千恵、鈴木孝昌、中村亮介、蜂須賀暁子、安達玲子、手島玲子、加水分解小麦(グルパール19S)に特異的に発現するペプチドの探索及び同定 第50回全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11)

7) 佐々木和実、西嶋桂子、安宅花子、酒井信夫、手島玲子、小麦グルテンの酸加水分解時間による分子量分布・脱アミド化率の変化 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総合学術大会 (2013.11)

8) 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 加水分解コムギによる経皮感作マウスに及ぼす抗原経口負荷の影響 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013.11)

9) 手島玲子、中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子。加水分解小麦による小麦アレルギー発症の基礎的検討 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013.11)

10) 手島玲子。経皮感作のメカニズムと食物感作のクロストーク 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総合学術大会 (2013.12)

11) Sakai S, Adachi R, Nakamura R, Kimura Y, Nakamura R, Sasaki K, Nishijima K, Ataku, H, Fukutomi Y, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Molecular profile analysis of allergenic acid hydrolyzed wheat protein. 53rd Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo (2014.3)

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