

【実験 5】

日本化粧品工業連合会や各メーカーより入手した 10 種類の HWP を抗原として用い (0.5%SDS 共存下)、その経皮感作性を 19S と比較した。

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。

(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。

患者血清

茶のしずく石鹸の 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geneticin、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

ウエスタンブロットティング

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、茶のしずく石鹸患者血清によるウエスタンブロットティングを行なった。ポジティブコントロールとしては GIp19S を用いた。

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 (EXiLE 法)

RS-ATL8 細胞を用いた EXiLE 法は、既報に準じた。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 (ヒト化マスト細胞として、転写因子 NF- κ B 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 ϵ RI 遺伝子を安定的に導入したラット培養マスト細胞株) をクリアボトム白色 96 ウェルプレート (PerkinElmer) に 5×10^4 cells/50 μl /well で播種し、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) 血清を添加して一晩培養後、細胞洗浄機 (Tecan HydroSpeed) を用いて PBS によりウェルを 3 回洗浄した。後、10% の非働化ウシ胎児血清を含む MEM 培地に懸濁した HWP 等抗原溶液により 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-GLOTM (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。

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、GIp19S) 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 GIp19S 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、Inhibition % として表した。

Glu-C による分解試験

200 μg のグルテン、tTG-Glu および GIp19S 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。

C. 研究結果

(a) マウスを用いた経皮感作試験

【実験 1】

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。

SDS 共存下 19S 感作群(HS)、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。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 19S に対する有意な反応性が見られること、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から、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。

感作 4 週後の抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応惹起においては、惹起 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。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。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。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングについては、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】

グルパール 19S 貼付 1 回量を 500 µg (HS500), 100 µg (HS100), 20 µg (HS20) とした群間で、用量依存性を検討した。感作後のグルパール 19S 特異的 IgE 抗体および IgG1 抗体の産生は、20 µg, 100 µg, 500 µg と用量依存的に増大し、HS500 群では V 群と比較した際に有意な差を示した。また、i.p.投与によるアナフィラキシー反応惹起においては、HS20 群では V 群と同様に体温低下は見られなかったが、HS100 群、HS500 群では用量依存的な体温の低下がみられた。惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度についても、用量依存的な増加がみられ、すべての群で V 群との差が有意であった。

惹起 30 分後にマウスの脾臓を摘出して、脾臓細胞を惹起抗原 100 ng/mL で 3 日間再刺激し、培養上清中の Th1/Th2 サイトカイン量を

測定したところ、IL-4, IL-5, IL-10 などの Th2 サイトカインは、HS100 群と HS500 群で V 群と比較して有意に産生量が増加していた。Th1 サイトカインである IL-2 は HS500 群で有意な減少を示し、IFN-γ は HS20, HS100, HS500 すべての群で有意に産生量が低下した。

【実験 3】

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。

加水分解 0.5 時間では、SDS-PAGE のパターンは 19S と類似しており、70 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(A0h)、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能を検討した。

感作 4 週後の抗原特異的抗体産生では、IgE については、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。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。

抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応惹起においては、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。アナフィラキシー症状のスコアについては、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。

【実験 4】

経皮感作 4 週間(Day 23)の血清における抗原特異的 IgE に加え、Total IgE についても感作の指標として評価した。19S 群、A0.5h 群では、V 群と比較して、抗原特異的 IgE 抗及び Total IgE 抗体の有意な増大が認められた。他方、A0h 群では、抗原特異的 IgE、Total IgE とも V 群との有意差は見られなかった。

【実験 5】

他社の HWP 製品 10 種の経皮感作性について検討し 19S と比較した。その結果、19S と同じく SDS-PAGE において広い範囲の分子量分布を示した 2 種の HWP(酸加水分解物、及びアルカリ加水分解物)で、抗原特異的 IgE 抗体の産生、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー惹起後の体温低下、症状スコア、血中ヒスタミン濃度が、19S と同程度に認められ、V 群との有意差が見られた。

(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

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

(ii) 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 まで幅広く分布した。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。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。

HWP 患者 (42 歳女性) の IgE はわずか 10 fg/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 以上の画分の応答性は、グルパール 19S 全体の応答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。また、3kDa 未満の画分は、全く応答しなかった。なお、刺激に用いた濃度は、すべて分画前のグルパール 19S に換算した値を用いた。

次に、同じ HWP 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。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。

(iii) 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。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。すべての患者血清および健康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。健康人 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。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知られている。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。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。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。

D. 考察

(a) マウスを用いた経皮感作試験

本研究では、茶のしずく石鹸の使用によるコムギアレルギー発症について検証するため、マウスを用いた経皮感作試験を行った。これまでに、オボアルブミンやナッツ類タンパク質をマウスの皮膚に貼付 (3-7 日/週×3-6 週間) することにより感作した例が報告されている。そこで、同様の感作スケジュールで 19S の経皮感作の成立について検討した。その結果、【実験 1】のように、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 19S と比較して弱いことを示した。これらの結果は、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を示すものである。また、19S とグルテンとの間には交差反応性があるという興味深い結果も得られた。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。

【実験 2】では、19S の経皮感作は貼付抗原の用量に依存することが確認された。また、脾臓細胞抗原再刺激による Th1/Th2 サイトカイン産生量の測定により、19S 経皮感作マウスでは、Th2 型の免疫反応が起こっていることが示された。

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、19S と同様の SDS-PAGE パターンを示す 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、A0h 及び分解が進んだ 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 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。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。

【実験 4】では、血清中の Total IgE が、これまで抗原性(感作性)の指標としていた抗原特異的 IgE 抗体と同様に感作の評価因子になり得るかどうか検討を行った。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 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、Total IgE は抗原特異的 IgE 抗体と同様に経皮感作性の指標となることが示された。

【実験 5】では、19S 以外の HWP 製品の経皮感作性を検討するため、10 種の HWP をマウスに貼付して経皮感作を行った。19S と同じく SDS-PAGE において広い範囲の分子量分布を示した 2 種の HWP(酸加水分解物、及びアルカリ加水分解物)において、19S とほぼ同等の経皮感作性及びアナフィラキシー症状惹起性が見られた。この結果から、分子量分布が経皮感作性において重要な因子の 1 つであることが明らかとなった。今後は、HWP の使用に関する規制を考える上で、さらに詳細な検討が必要であろう。

(b) ヒト化マスト細胞を用いた *in vitro* 惹起試験 (i) グルテンの酸加水分解処理による影響

HWP 感作血清では未分解グルテン (0h) に比べて、酸加水分解によりグルテンの惹起能が増大しており、酸加水分解が進んでも (6h) その惹起能は減弱しにくい傾向にあった。一方、従来型小麦アレルギー (PedWA) 患者血清では、未分解グルテンに対する反応性が最も高く、酸加水分解が進むにつれて単調かつ速やかに惹起能が消失した。これらの結果から、HWP 感作小麦アレルギー患者は PedWA 患者とは異なる IgE エピトープを有しており、未分解グルテンには存在していなかったエピトープが新たに出現した可能性が考えられた。IgE を介するマスト細胞の活性化には、抗原分子上に複数のエピトープが存在し、IgE の架橋を形成できることが必要とされているため、ここで生じた新規エピトープは、加水分解グルテン分子上に機能的な形で少なくとも 2 箇所以上存在す

ることが示唆される。また、酸加水分解が進んで SDS 電気泳動パターンで低分子量側にシフトしたもので、HWP 感作小麦アレルギー患者血清ではアレルギー反応が惹起されたことから、新規エピトープは熱及び酸に耐性であると考えられた。しかし、どのようなメカニズムによりこのような新規エピトープが生成したかについては、今後の研究が必要と思われる。

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。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に、グルタミンやアスパラギン残基の脱アミド化がある。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。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。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。

(ii) グルテンの酵素処理による影響

HWP 患者 IgE は未処理グルテンとはわずかにしか反応しなかったが、Glp19S とは顕著な反応性を示した。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。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、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。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、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ため、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

マウス経皮感作試験系を用い、19S を中心に検討を行った。その結果、19S が用量依存的に強い経皮感作性を有することが明らかとなり、本試験系の有用性が示された。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。

経皮感作後の HWP 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、19S と同じく広い範囲の分子量分布を

示す他の HWP 製品においても 19S とほぼ同等の経皮感作性が見られ、分子量分布が経皮感作性における重要な因子の 1 つであることが示された。

茶のしずく (HWP) 患者血清を用いた *in vitro* 惹起試験からは、加水分解が進み、より低分子のタンパク質が主体になった場合でも、惹起能は有しており、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。また、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 に匹敵する応答性の認められることも確認した。従って、表示による加水分解処理方法等の情報の提供も重要であると考えられた。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013; **132**: 1436-1438.
- 5) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. *Clinical Immunology & Allergology* 2013; **59**, 598-602.
- 6) Teshima R: Food Allergen in Cosmetics, *Yakugaku Zasshi*. 2014;**134**(1): 33-38.
- 7) 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)

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、酸加水分解コムギ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、酸加水分解コムギの 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、酸加水分解コムギ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、酸加水分解コムギ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 各種加水分解コムギ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 加水分解コムギ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 法による加水分解コムギ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. 52nd Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo (2013. 3)
- 9) 安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、コムギ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)
- 10) 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、コムギ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コムギと同様の 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)
- 11) 中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、

齋藤嘉朗、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)

12) 曹永晚、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)

13) 酒井信夫、中村里香、齋藤由二、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、加水分解コムギ(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)

14) 佐々木和実、西嶋桂子、安宅花子、酒井信夫、手島玲子、コムギ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)

15) 中村亮介、中村政志、矢上晶子、酒井信夫、中村里香、安達玲子、齋藤嘉朗、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)

16) 手島玲子、中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、加水分解コムギによるコムギ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)

17) 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)

18) 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)

19) 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)

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

食物タンパク質由来化粧品添加物の抗原解析

研究分担者 板垣 康治 北海道文教大学人間科学部健康栄養学科 教授
研究協力者 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

研究要旨：

小麦加水分解物を添加した化粧品・医薬部外品が原因で発症した小麦アレルギー症例に関して、その抗原の解析を試みた。その結果、以下の可能性が示唆された。当該小麦タンパク加水分解物の中に存在する抗原は単一物質ではなく、低分子から高分子領域まで広く分布している。本症例における抗原は、単純な小麦タンパク質の加水分解物ではなく、脱アミド化などによる修飾を受けて変性している。グルパール 19S は、グルテンに含まれるグルタミンの一部が脱アミド化されグルタミンに変換されている。既報で示されている γ -グリアジン、 ω 2-グリアジン共通のアミノ酸配列をエピトープに持つ。MALDI-TOF/TOF による抗原解析の結果より、 γ -グリアジンのほかに、新たに LMW-グルテニンが抗原の候補として挙げられる。グリアジン分画の酸加熱加水分解、およびペプシン処理後の患者血清に対する反応性を比較した結果より、加水分解率は、約 60%、脱アミド化率は、ほぼ 100%において、患者血清との反応性が最も高くなったことから、一定の長さで、かつほぼ完全にグルタミンがグルタミン酸に変化したペプチドがエピトープになっている。

A. 研究目的

現在、様々な食品成分が、長年の食経験に基づき安全性が担保されているとの認識で洗顔石鹸をはじめとする医薬部外品、化粧品等の添加物として利用されている。小麦加水分解物を洗顔石鹸などへの添加は、起泡性の付与や維持に効果があるとされている。また、食品そのものが美容目的で使用される場合もある。しかしながら、その安全性が確認されているのは、あくまでも経口的に摂取した場合においてであり、経皮的な安全性については、十分には検証されていない。実際に、これまでも、パパイヤ由来のたんぱく質分解酵素が添加された化粧水やキュウリパックによるアレルギー発症例などが報告されている。そこで、本研究では、成人における食物アナフィラキシーの典型的モデルとなる病態として、化粧品・医薬部外品中の食物由来添加物の代表であるタンパク加水分解物への接触性アレルギーが原因となり発症した食物アレルギーに焦点をあてる。当該症例の抗原解析を行うことにより、通常食物アレルギーにおける抗原との違いや抗原になりうる条件、さらに、変性などによってあらたな抗原が生成している可能性についても検証することにより、化粧品や医薬部外品に使用しても安全な小麦加水分解物を調製するための処理条件を検討することを目的とする。

平成 23 年度は、抗原の物理化学的性質の把握、平成 24 年度は、既報で報告されている

γ -グリアジン、 ω 2-グリアジン共通のアミノ酸配列に存在するグルタミンをグルタミン酸に置換したペプチドを合成して、「茶のしずく」洗顔石鹸による小麦アレルギー患者血清との反応性を調べた。平成 25 年度は、V8 プロテアーゼ処理したグルテンの MALDI-TOF/TOF による抗原解析、およびグリアジン分画の酸加熱加水分解、およびペプシン処理後の患者血清に対する反応性の比較を実施した。

B. 研究方法

1. 抗原の物理化学的性質の把握

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

2. 抗原の分離・精製

化粧品・医薬部外品として使用されている当該小麦加水分解物を、カルボキシメチル (CM) 化後、逆相クロマトグラフィーによってペプチドマッピングおよび分画する。ついで、患者血清を用いた ELISA によって陽性画分を特定する。

3. 合成ペプチドと患者血清との反応性

既報に報告されている既知の小麦アレルゲンエピトープペプチド (QPQQPFPQ)、およびグルテンが酸加熱加水分解によって部分的な脱アミド化されていることを想定して、グル

タミンをグルタミン酸に置換したペプチド (QPEEPFPE) を合成して、患者血清との反応性を阻害 ELISA により調べた。

4. グルテンおよびグルパール 19S の酵素処理

トリプシン、V8 プロテアーゼを用いてグルパール 19S を処理後、ゲルろ過により溶出パターンを比較した。なお、トリプシンは、膵液に含まれる消化酵素の一種で、塩基性のアミノ酸 (リジン、アルギニン) のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解する。一方、V8 プロテアーゼは、微生物由来で、アスパラギン酸とグルタミン酸のカルボキシル側を特異的に加水分解する。炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH7.8) あるいは酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.0) 中では、グルタミン酸のカルボキシル基側のみを切断する。リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.8) 中では、グルタミン酸のカルボキシル基側だけではなく、アスパラギン酸のカルボキシル基側も切断する。グルタミンやアスパラギンは切断しない。グルテンはグルタミンを多く (約 40%) 含む。酸加熱加水分解によって脱アミド化が起きるとグルテン中のグルタミンの一部はグルタミン酸に変換されていることが考えられ、V8 プロテアーゼにより積極的に切断され、低分子化が進むことが予測される。処理後の試料は、SDS-PAGE およびゲルろ過 (G3000SW XL、TOSOH) により評価した。

5. MALDI-TOF/TOF による抗原解析

グルテンを V8 プロテアーゼにより処理後、SDS-PAGE、さらに患者血清を用いてウエスタンブロットングを実施し、陽性バンドを特定した。ついで、該当する部位を in gel digestion により消化後、MALDI-TOF/TOF により抗原解析を行った。

6. グリアジン分画の酸加熱加水分解、およびペプシン処理後の患者血清に対する反応性の比較

グリアジンの調製：グルテンから 70%エタノールによりグリアジンを抽出後、凍結乾燥した。酸加熱加水分解：調製したグリアジンに 6N 塩酸を加え 100°C にて加熱加水分解して、経時的 (0、1、3、5、10、15、30、60 分間) にサンプリングし、2 N NaOH を 6 ml 添加することで中和し放冷した。なお、0 分では塩酸の代わりに純水 2 ml を添加した。

ペプシン処理：小麦グリアジンを 17 mM クエン酸 5%エタノール Buffer に 6 mg/ml の濃度で溶解し、ペプシン (ブタ胃由来 5600units/mg) を試料に対して 1% になるように添加した。0、1、3、5、10、15、30、60 分間 37°C で反応させた後、100°C で 10 分間加熱

し、ペプシンを失活させ、氷冷後、1 N NaOH で中和した。なお、0 分では加熱済みペプシンを添加した。

加水分解率は、塩酸処理後中和したグリアジン 0.5 ml に、0.4 M トリクロロ酢酸 (TCA) 0.5 ml を添加し、タンパク質を沈殿させた。遠心分離後、上清を 350 ml 分取し、0.2 M NaOH を 350 ml 添加し中和した。また、0 分の試料 0.5 ml に純水 0.5 ml を加えたものを、全タンパク質とした。TCA 可溶性画分および全タンパク質画分中のタンパク質濃度を Folin-Lowry 法で測定し、下記の式を用いて加水分解率を算出した。

加水分解率 (%) = TCA 可溶画分のタンパク質濃度 / 全タンパク質濃度 × 100

脱アミド化率は、塩酸処理後中和したグリアジンを 0.4 mm のフィルターを用いて濾過後、インドフェノール法により、脱アミド化して遊離したアンモニウム量を測定し、下記の式を用いて脱アミド化率を求めた。

脱アミド化率 (%) = 試料の遊離 NH₄⁺量 / 完全加水分解試料の遊離 NH₄⁺量 × 100

阻害 ELISA は、70%エタノールグリアジンを 1 mg/ml になるように溶解し、ELISA プレートに 100 μl/well 加え、4°C で一晩静置し固定した。そのプレートを TPBS で 4 回洗浄後、2% BSA 含有 TPBS を 200 μl/well 加え 1 時間 37°C でブロッキングした。次に、TPBS で 4 回洗浄後、加水分解したグリアジンを 2 mg/150 ml と患者血清プール (500 倍希釈) 300 ml を混和し、1 時間反応させたものを 100 μl/well 加え、1 時間 37°C で反応させた。次に、TPBS で 5 回洗浄後、二次抗体として抗ヒト IgE ヤギ抗体 (1000 倍希釈) を 100 μl/well 添加し、37°C 2 時間反応させた。さらに TPBS で 5 回洗浄後、HRP-ストレプトアビジン (500 倍希釈) を 100 μl/well 添加し、20 分室温 (25°C) で反応させた。TPBS で 5 回洗浄後、基質である o-フェニレンジアミン溶液を 100 μl/well 加え、20 分間暗所で反応させた。その後 2 N 硫酸を 100 μl/well 添加し反応停止させ、490 nm で吸光度を測定した。阻害率は、下記の式を用いて算出した。

6. 合成ペプチドと患者血清との反応性

既報に報告されている既知の小麦アレルゲンエピトープペプチド (QPQQPFPQ)、およびグルテンが酸加熱加水分解によって部分的な脱アミド化されていることを想定して、グルタミンをグルタミン酸に置換したペプチド (QPEEPFPE) を合成して、患者血清との反

応性を阻害 ELISA により調べた。

7. グルテンおよびグルパール 19S 酵素処理

トリプシン、V8 プロテアーゼを用いてグルパール 19S を処理後、ゲルろ過により溶出パターンを比較した。なお、トリプシンは、腓液に含まれる消化酵素の一種で、塩基性のアミノ酸（リジン、アルギニン）のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解する。一方、V8 プロテアーゼは、微生物由来で、アスパラギン酸とグルタミン酸のカルボキシル側を特異的に加水分解する。炭酸水素アンモニウム緩衝液（pH7.8）あるいは酢酸アンモニウム緩衝液（pH4.0）中では、グルタミン酸のカルボキシル基側のみを切断する。リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.8）中では、グルタミン酸のカルボキシル基側だけではなく、アスパラギン酸のカルボキシル基側も切断する。グルタミンやアスパラギンは切断しない。グルテンはグルタミンを多く（約 40%）含む。酸加熱加水分解によって脱アミド化が起きるとグルテン中のグルタミンの一部はグルタミン酸に変換されていることが考えられ、V8 プロテアーゼにより積極的に切断され、低分子化が進むことが予測される。処理後の試料は、SDS-PAGE およびゲルろ過（G3000SW XL、TOSOH）により評価した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

1. 抗原の物理化学的性質の把握

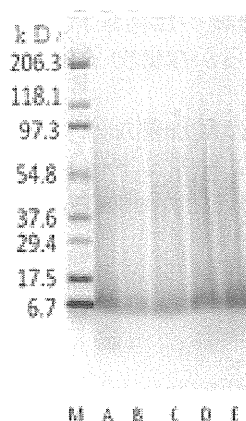


図 1. 小麦加水分解物の SDS-PAGE

5 種類の抽出用溶液（A ; 10mM リン酸緩衝液、pH7.0、B ; 1M 塩化ナトリウムを含む 10mM リン酸緩衝液、pH7.0、C ; 3M チオシアン酸ナトリウムを含む 0.05M トリス - HCl 緩衝液、pH7.5、D ; 4% SDS、E ; 7M 尿素、

2M チオ尿素を含む 40mM トリス - HCl 緩衝液、pH7.5）を用いて小麦加水分解物（グルパール 19S）を抽出した。ついで常法に従って SDS-PAGE を行った。その結果、抽出方法による差異は認められず、比較的高分子から低分子領域まで幅広くスメア状の泳動パターンを示した。とくに 6.7kD 付近は濃く染色されていた（図 1）。

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

小麦加水分解物（グルパール 19S）の SDS-PAGE の結果では、スメア状となり、抗原を分離することは困難であると考え、グルテンをカルボキシメチル化した後、トリプシンを用いて加水分解を行った。ついで、逆相クロマトグラフィによってペプチドマッピングを実施したところ、複数のピークが得られ、分画後、患者血清を用いて ELISA を行った。図 3 に示したように、分画番号 30、31 をピークとした陽性反応が認められた。分画番号 29~35 までについて、グルパール 19S に対する阻害 ELISA を行ったところ、分画番号 30、31 に阻害活性が認められたことから、グルパール 19S に共通するエピトープが存在していることが示唆された（図 4）。

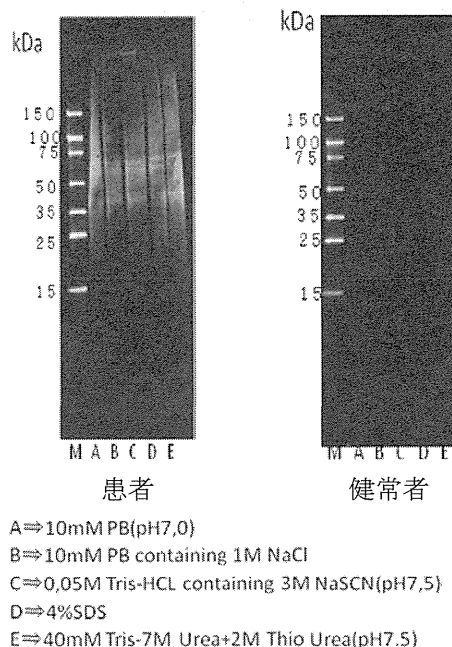


図 2. 小麦加水分解物のウエスタンブロッティング

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

ドが2本認められた (図5)。

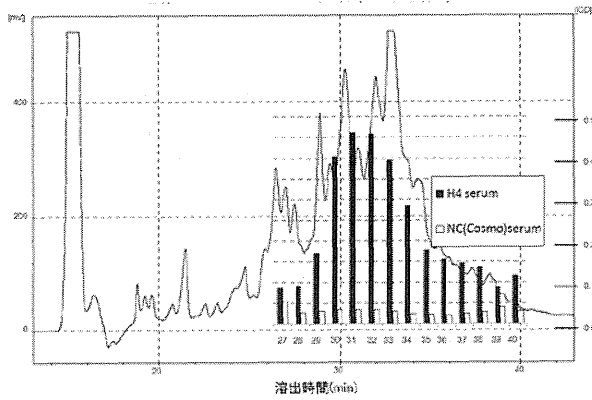


図3. CM化グルテンのトリプシン消化物逆相クロマトグラフィおよび画分のELISA結果

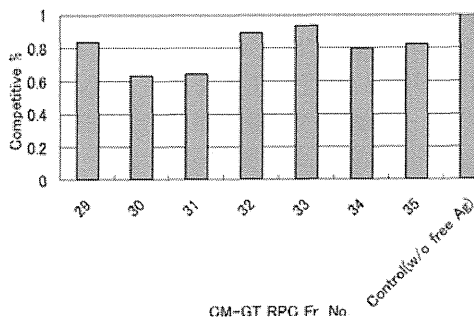


図4. トリプシン消化グルテンのグルパール19Sに対する競合ELISA結果

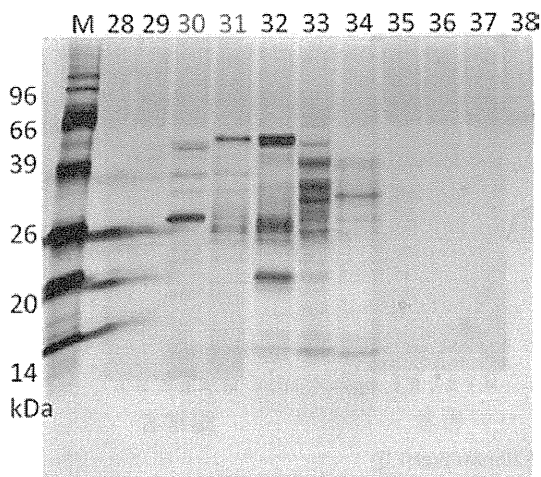


図5. 小麦加水分解物 (グルパール19S) の逆相クロマトグラフィによる画分のSDS-PAGE

2. 合成ペプチドと患者血清との反応性

合成ペプチド QPQQPFPPQ、QPEEPPFPE ともに、詳細に患者血清との反応条件等の検討を行ったところ、プレートの洗浄などの操作条件を変更することによってグルタミンをグルタミン酸に置換したペプチドにおいてグルパール19Sと同等の反応性を認め、最大で約50%の阻害活性を示した (図6、7)。V8で加水分解

したグルパール19Sでは、V8で処理する前と比較して阻害率の低下が認められた。

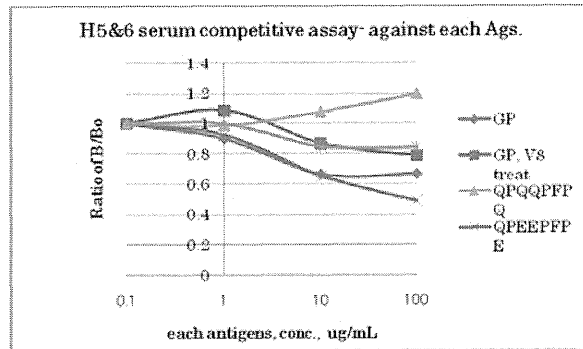


図6. 合成ペプチドを用いた阻害ELISA
GP: グルパール19S

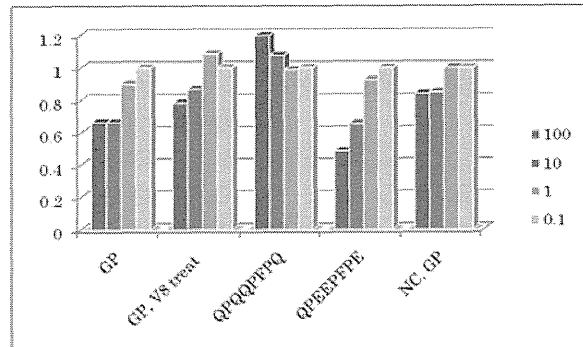


図7. 合成ペプチドを用いた阻害ELISA
(図1を棒グラフで示した)

3. グルテンおよびグルパール19Sの酵素処理
グルパール19SをV8プロテアーゼで加水分解した場合、トリプシンと比較して、より顕著な低分子化が認められた。一方、グルテンについては、V8プロテアーゼ、トリプシン処理ともに、積極的な低分子化は見られなかった (図8)。V8プロテアーゼ処理したグルパール19Sをゲルろ過により分子量分布を調べた結果、V8プロテアーゼ処理により、明らかな低分子化が確認された (図9、10、11)。

この結果より、グルテンは酸加熱加水分解によりグルタミンが部分的に脱アミド化されグルタミンに変換されていることが示唆された。

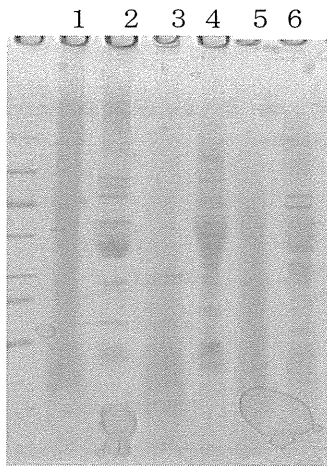


図 8. グルテンおよびグルパール 19S のプロテアーゼ処理 (SDS-PAGE)
 1; グルパール 19S (GP)
 2; グルテン (GT)
 3; GP, V8 digest 24hrs
 4; GT, V8 digest, 24hrs
 5; GP, Trypsin digest 24hrs
 6; GT, Trypsin digest 24hrs

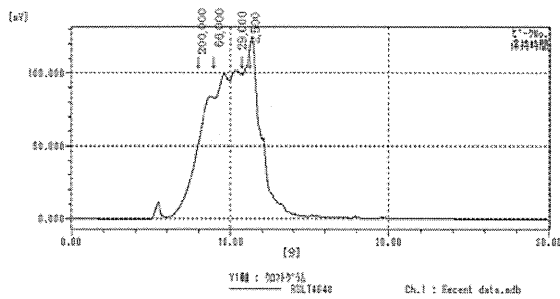


図 9. グルパール 19S のプロテアーゼ処理 (トリプシン)

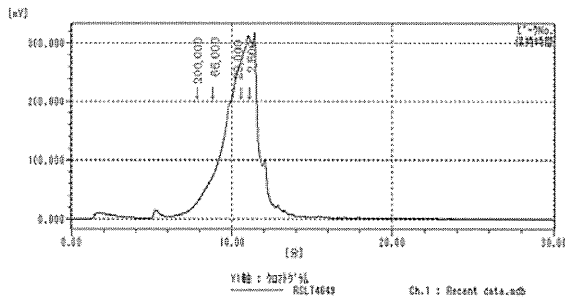


図 10. グルパール 19S のプロテアーゼ処理 (V8 プロテアーゼ)

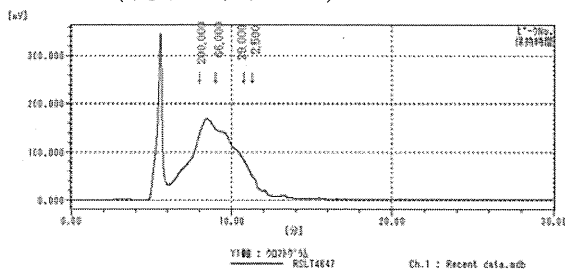


図 11. グルパール 19S のプロテアーゼ処理 (未処理)

4. MALDI-TOF/TOF による抗原解析

SDS-PAGE 後、患者血清を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、矢印のバンドに対して患者血清が反応したため、矢印のバンドを切り出し、常法に従って、トリプシンを用いて 37°C、over night で in gel digestion を実施した。得られた試料を MALDI-TOF/TOF にて分析した。ついで、推定されたアミノ酸配列を Mascot Search を用いて解析した結果、 γ -グリアジン、および LMW-グルテニンが抗原の候補として挙げられた (図 12、13)。

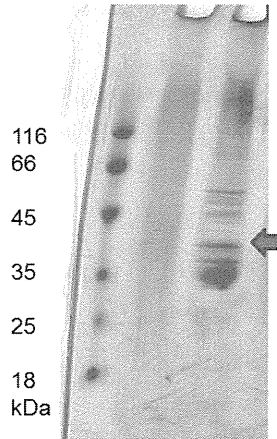


図 12. V8 プロテアーゼ後のグルパール 19S、グルテンの SDS-PAGE

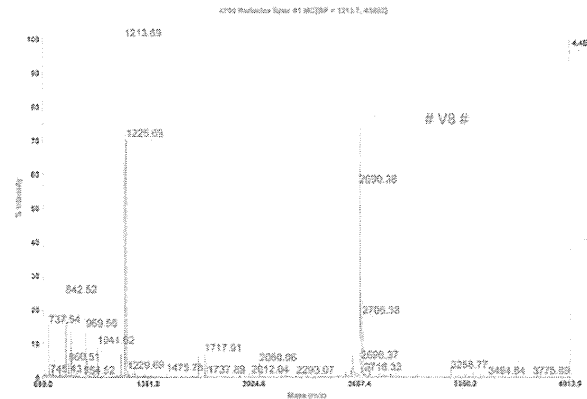


図 13. MALDI-TOF/TOF スペクトル像

5. グリアジン分画の酸加熱加水分解、およびペプシン処理後の患者血清に対する反応性の比較

加水分解率も脱アミド化率も、塩酸処理時間の増加と共に増加した。脱アミド化率は 10 分で 100%となった (図 14)。

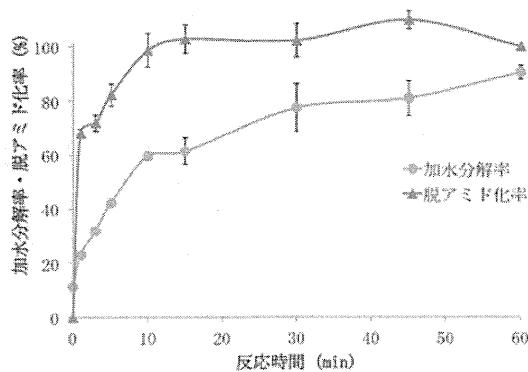


図 14. 塩酸処理による加水分解率および脱アミド化率

患者血清との反応性は、塩酸処理時間の増加とともに増加し、反応 15 分以降は低下した (図 15)。

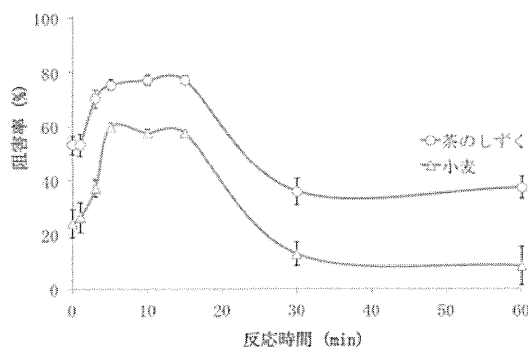


図 15. 塩酸処理グリアジンの患者血清に対する反応性

一方、ペプシン処理試料については、加水分解率は、ペプシン処理時間の増加と共に増加し、15 分でほぼ変化しなくなった。脱アミド化は、ペプシン処理時間が長くなってほとんど起こらなかった (図 16)。患者血清との反応性も、ペプシン処理 1 分で低下し、その後若干増加したものの、ペプシン処理時間の増加と共に反応性は低下した (図 17)。

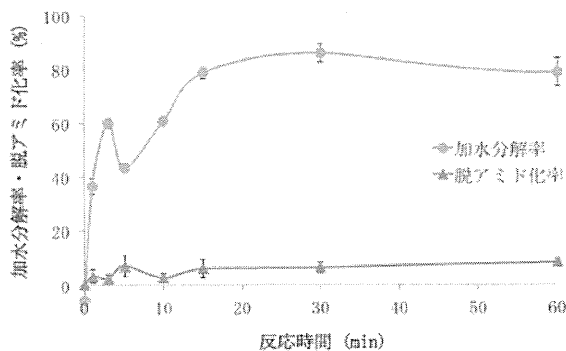


図 16. ペプシン処理による加水分解率および脱アミド化率

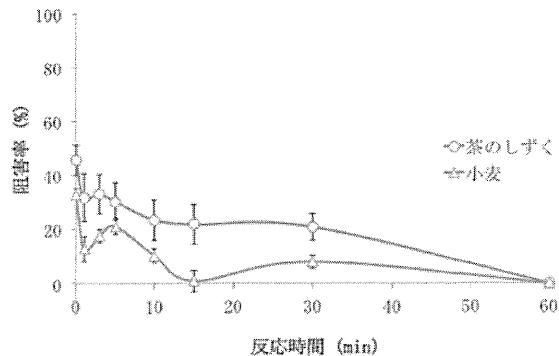


図 17. ペプシン処理グリアジンの患者血清に対する反応性

D. 考察

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

グルテンを CM 化後、トリプシン消化により低分子化を図り、逆相クロマトグラフィによってペプチドマッピングを実施した結果、複数のピークが得られ、分画後、患者血清を用いて各分画に対する反応性を調べたところ、30kD 付近に抗原が存在している可能性が示唆された。

グルパール 19S を、タンパク質のグルタミン酸残基を特異的に加水分解する V8 プロテアーゼ処理したところ、顕著な低分子化が確認された。その結果より、グルパール 19S はグルテン中に存在するグルタミンの一部が脱アミド化されグルタミン酸に変換されていることが考えられた。また、既報で報告されている γ -グリアジン、 ω 2-グリアジン共通のアミノ酸配列に存在するグルタミンをグルタミン酸に置換したペプチドを合成して、「茶のしずく」洗顔石鹸による小麦アレルギー患者血清との反応性を調べた。その結果、グルパール 19S に匹敵する程度の反応性を示したことから、

「茶のしずく」洗顔石鹸によるアレルギーでは、分子中に含まれるグルタミンの一部が脱アミド化した小麦タンパク質が新たなアレルゲンとなっていることが推定された。

MALDI-TOF/TOF による抗原解析から、既報により報告されているγ-グリアジンのほかに、新たに LMW-グルテニンも抗原としての可能性が示唆された。

小麦グリアジンを塩酸で処理した場合には、処理時間 5 分で反応性が増加し、15 分以降は反応性が減少した。塩酸処理では、加水分解、脱アミド化が起こり、また、タンパク質の変性も起こる。処理 5 分で一旦、患者血清との反応性が増加したのは、タンパク質の変性と加水分解により、エピトープが表面に露出したためと考えられる。その後、処理時間が進むにつれて反応性が低下したのは、加水分解の進行により、エピトープが分解されたことが考えられる。小麦グリアジンをペプシンで処理した場合には、茶のしずく患者血清、小麦アレルギー患者血清共に、ペプシン処理 1 分で低下し、その後若干増加したものの、ペプシン処理時間の増加と共に反応性は低下した。処理 3~5 分で一旦、患者血清との反応性が若干増加したのは、タンパク質の変性と加水分解により、構造がやや開き、内部のエピトープが露出したためと推察される。その後、処理時間が進むにつれて反応性が低下したのは、塩酸の場合と同様に、加水分解の進行により、エピトープが分解されたためと考えられる。

E. 結論

・当該小麦タンパク加水分解物の中に存在する抗原は単一物質ではなく、低分子から高分子領域まで広く分布している。

・本症例における抗原は、単純な小麦タンパク質の加水分解物ではなく、脱アミド化などによる修飾を受けて変性している可能性が示唆された。

・グルパール 19S は、グルテンに含まれるグルタミンの一部が脱アミド化されグルタミンに変換されていることが示唆された。

・既報で示されているγ-グリアジン、ω2-グリアジン共通のアミノ酸配列に存在するグルタミンをグルタミン酸に置換したペプチドに対して「茶のしずく」アレルギー患者血清も反応した。

・MALDI-TOF/TOF による抗原解析の結果より、γ-グリアジンのほかに、新たに LMW-グルテニンが抗原の候補として挙げられた。

・グリアジン分画の酸加熱加水分解、およびペプシン処理後の患者血清に対する反応性を比較した結果より、加水分解率は、約 60%、脱

アミド化率は、ほぼ 100%において、患者血清との反応性が最も高くなったことから、一定の長さで、かつほぼ完全にグルタミンがグルタミン酸に変化したペプチドがエピトープになっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

交差反応によるアレルギーに関する研究

研究分担者 千貫 祐子 島根大学医学部皮膚科 講師

研究要旨：

近年、本邦において石鹼中の加水分解コムギで経皮感作されて経口摂取した小麦蛋白質との交差反応によって小麦依存性運動誘発アナフィラキシーを発症したと思われる患者が多発した。今後の食品や化粧品の安全性を確保するために、加水分解コムギのアレルゲン性について検討を行い、高分子量の蛋白質から成る加水分解コムギが高いアレルゲン性を示すと考えられた。また、牛肉アレルギーについて、主要なアレルゲンが抗癌剤のセツキシマブと同様に糖鎖 galactose- α -1, 3-galactose であることが知られている。島根大学医学部附属病院皮膚科で経験した牛肉アレルギー患者の牛肉特異的 IgE 値を測定したところ、セツキシマブ特異的 IgE 値と正の相関関係を認めた。

A. 研究目的

研究(1)

加水分解コムギは、主に小麦不溶性蛋白質のグルテンを酸や酵素で処理して部分的に分解したもので、処理方法によっては保湿性や粘弾性を持つために、化粧品や食品の添加剤として利用されている。近年、本邦において加水分解コムギを含有した石鹼が発売され、女性を中心に広く用いられた。その結果、石鹼中の加水分解コムギ (HWP-A) に経皮または経粘膜的に感作され、後に経口摂取した小麦蛋白質との交差反応によって小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis: WDEIA) を発症したと思われる患者が多発した。今後の食品や化粧品の安全性を確保するために、なぜ、今回の石鹼含有加水分解コムギ (HWP-A) が特に高いアレルゲン性を有したのか、について検討する必要があると考えた。本研究では、石鹼に含有されていた加水分解コムギを含む、本邦で入手可能であった計 6 種類の加水分解コムギ (HWP-B~F) 各々のアレルゲン性を検証することを目的とした。

研究(2)

セツキシマブは上皮細胞増殖因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) を標的とする免疫グロブリン (Immunoglobulin; Ig) G1 サブクラスのヒト/マウスキメラ型モノクローナル抗体で、頭頸部癌と結腸・直腸癌に対して使用されている。2008年、Chungらは、米国においてセツキシマブによるアナフィラキシーが米国東南部に多発し、その主要原因がマウス抗体に由来する galactose- α -1, 3-galactose (α -gal) に対する抗糖鎖 IgE 抗体であることを報告した。2009年

になり、Comminsらは、獣肉アレルギーの主要抗原もセツキシマブアレルギーと同様に α -gal であることを報告した。

我々はこれまで、島根県に在住する多くの牛肉アレルギー患者を経験し、その抗原解析結果を報告してきた。我々の経験した患者で過去に抗癌剤のセツキシマブを投与されていた患者はいなかったが、本邦においてもセツキシマブは頭頸部癌や大腸癌の治療薬として広く用いられており、今後のセツキシマブによるアナフィラキシー発症を予防するためにも、本邦における牛肉アレルギー患者の臨床的背景を明らかにし、セツキシマブアレルギーとの関連を検討する必要があると考えた。

B. 研究方法

研究(1)

【対象】加水分解コムギに経皮感作され WDEIA を発症した事を確認し得た 5 名の女性患者 (年齢; 44~54 歳) を対象とした。

【方法】①加水分解コムギの準備 (各製造会社、販売会社などからの取り寄せ)

HWP-A: 酸分解型加水分解コムギ (石鹼に含有されていたもの)

HWP-B: 酸分解型加水分解コムギ

HWP-C: 詳細不明加水分解コムギ

HWP-D: 酵素分解型加水分解コムギ

HWP-E: 酵素分解型加水分解コムギ

HWP-F: 酸・アルカリ分解、酵素処理加水分解コムギ

②ウェスタンブロット: 5 名の患者血清を用いてウェスタンブロットを施行し、6 種類 (A~F) の加水分解コムギへの反応性を検討した。

③好塩基球 CD203c 発現定量: 5 名の患者全血を用いて、6 種類 (A~F) の加水分解コムギに

よる好塩基球活性化マーカーCD203c 発現の定量を行った。

④ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量分布測定:6種類(A~F)の加水分解コムギについて、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量分布の測定を行った。

研究(2)

2005年2月から2011年10月までに島根大学医学部附属病院皮膚科を受診した牛肉アレルギー患者20例を対象とした。牛肉アレルギーの診断は、牛肉摂取後に蕁麻疹などの即時型アレルギー症状を複数回経験し、血清中牛肉特異的IgEが検出された場合とした。患者年齢は37歳~88歳で、平均67.1歳であった。男女比は男性14名、女性6名であった。牛肉、豚肉、鶏肉、イヌ皮膚特異的IgEをCAP-FEIA法(サーモフィッシュャーサイエンティフィック社)にて測定した。また、セツキシマブ特異的IgEについては、ビオチン化したセツキシマブをストレプトアビジンイムノキャップに固相化したものを用いて測定した。

C. 研究結果

研究(1)

1. 患者血清中IgEは加水分解コムギの高分子量の蛋白質に強く反応する傾向があった。
2. 6種類の加水分解コムギをゲル濾過クロマトグラフィーで解析した結果、HWP-A、B以外の加水分解コムギには高分子量の蛋白質がほとんど含まれていなかった。
3. 患者好塩基球活性化マーカーCD203cは高分子量の蛋白質を含む加水分解コムギ(HWP-AとHWP-B)によって有意に発現増強した。

研究(2)

牛肉アレルギー患者20例全例に、CAP-FEIA法で豚肉特異的IgEが検出された。全例で牛肉特異的IgE値が豚肉特異的IgE値より高値であった。測定し得た全例で、鶏肉特異的IgEは検出されなかった。また、20例中17例にイヌ皮膚特異的IgEが検出された。調べ得た19例全例に、過去にセツキシマブを投与されたことがないにも関わらず、セツキシマブ特異的IgEが検出された。さらに、牛肉特異的IgE値とセツキシマブ特異的IgE値には有意な正の相関関係が認められた($p<0.05$, Spearmanの相関係数)。

D. 考察

研究(1)

HWP-AとHWP-Bは、本来の小麦構成蛋白質よりも大きい分子量の蛋白質を含んでいた。両者とも酸分解された製品であるが、不完全な

分解によるものと考えられた。

研究(2)

我々が検索した牛肉アレルギー患者でも、米国での報告と同様に全例で豚肉特異的IgEが検出された。さらに、過去にセツキシマブを投与されたことがないにも関わらず、セツキシマブ特異的IgEが全例で検出され、牛肉特異的IgE値とセツキシマブ特異的IgE値には、有意な正の相関関係が認められた。このことより、本邦症例においても牛肉アレルギーの主要な原因抗原は α -galであり、豚肉、セツキシマブとも交差反応し得ることが推察された。

E. 結論

研究(1)

不完全な分解あるいは処理中の再重合による高分子量の蛋白質から成る加水分解コムギが高いアレルギー性を示すと考えられる。

研究(2)

本研究の結果より、セツキシマブを投与する前に牛肉特異的IgEを検査することによって、 α -galが原因となるセツキシマブアレルギーを予測出来る可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 千貫祐子, 伊藤和行, 武田真紀子, 他: セツキシマブによるアナフィラキシーショックの4例. 日皮会誌. 124: 179-183, 2014
2. 千貫祐子, 高橋仁, 森田栄伸: セツキシマブと α -gal IgE. アレルギー・免疫. 20: 1838-1842, 2013
3. 千貫祐子, 森田栄伸: 加水分解小麦による小麦アレルギー. Derma. 205: 53-59, 2013
4. 千貫祐子, 森田栄伸: 加水分解コムギ含有石鹼による全身性小麦アレルギー. アレルギー・免疫. 20: 884-891, 2013
5. 千貫祐子, 森田栄伸: 食物アレルギーに対する低アレルギー食とオマリズマブの試み. 日皮会誌. 123: 2603-2605, 2013
6. 千貫祐子, 森田栄伸: 抗EGFR抗体製剤等による副作用~多様なアレルギー反応~. 日皮会誌. 123: 2693-2695, 2013
7. 千貫祐子, 高橋仁, 森田栄伸: 牛肉アレルギー患者20例の臨床的および血清学的解析. 日皮会誌. 123: 1807-1814, 2013.
8. 松木真吾, 千貫祐子, 新原寛之, 他: 診断に好塩基球活性化マーカーCD203cが有用であった豆乳アナフィラキシーの1例. 75: 496-498, 2013
9. Takahashi H, Chinuki Y, Tanaka A, et

- al: Laminin γ -1 and collagen α -1 (VI) chain are galactose- α -1,3-galactose-bound allergens in beef. *Allergy*. 69: 199-207, 2014.
10. Morita E, Chinuki Y, Takahashi H: Recent advances of in vitro tests for the diagnosis of food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci*. 71: 155-159, 2013.
 11. Kohno K, Matsuo H, Takahashi H, Niihara H, Chinuki Y, et al: Serum gliadin monitoring extracts patients with false negative results in challenge tests for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergol Int*. 62: 229-238, 2013.
 12. Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, et al: Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int*. 62: 435-445, 2013.
 13. 千貫祐子: 肉アレルギー (α -gal). 症例を通して学ぶ食物アレルギーのすべて. 224-225, 海老澤元宏編, 2013.
 14. 千貫祐子, 森田栄伸: 皮膚即時型アレルギー疾患の診断に必要な基礎知識. *日皮会誌*. 123: 2219-2225, 2013.
 15. 足立厚子, 田中昭, 千貫祐子, 他: エビアレルギーにおける 70kDa 蛋白質の新規アレルゲンとしての可能性について. *アレルギー*. 62: 960-967, 2013.
 16. 千貫祐子, 高橋仁, 森田栄伸: がん治療薬と食物アレルギー. *静脈経腸栄養*. 28: 615-618, 2013
 17. 角田孝彦, 吉澤秀華, 千貫祐子: 小麦アレルギー9 例の小麦特異的 IgE と皮内テストの検討. *皮膚科の臨床*. 54: 841-844, 2012.
 18. 相澤貴之, 角田孝彦, 日高高徳, 千貫祐子: お茶石鹼により感作された小麦アレルギーの 13 例. *山形済生館医誌*. 37: 64-67, 2012.
 19. 山本祐理子, 服部淳子, 峠岡理沙, 益田浩司, 千貫祐子, 他: 茶のしずく石鹼以外の加水分解小麦含有石鹼を使用していた患者にみられた小麦アレルギーの 1 例. *臨床皮膚科*. 66: 940-943, 2012.
 20. 土井直考, 稲葉 豊, 金澤伸雄, 古川福実, 千貫祐子, 他: 石鹼含有加水分解小麦と ω -5 グリアジン双方に血中 IgE の結合を認めた小麦依存性運動誘発性アナフィラキシーの 1 例. *J Environ Dermatol Cutan Allergol*. 6: 427-432, 2012.
 21. 角田孝彦, 千貫祐子, 伊藤義彦, 他: お茶石鹼中の加水分解小麦に感作がみられた小麦アレルギーの 6 例. *アレルギーの臨床*. 32: 162-165, 2012.
 22. 千貫祐子, 森田栄伸: 加水分解小麦成分入り化粧品による眼瞼浮腫. *Visual Dermatology*. 12: 140-141, 2013.
 23. 千貫祐子, 松尾裕彰, 高橋 仁, 他: 小麦アレルギーの主要アレルゲンの同定. *臨床免疫・アレルギー科*. 58: 63-71, 2012
 24. 森田栄伸, 千貫祐子, 高橋 仁: 「茶のしずく石鹼」による WDEIA. *Visual Dermatology*. 11: 280-283, 2012.
 25. 千貫祐子, 森田栄伸: 旧「茶のしずく石鹼」中の加水分解小麦により感作された FDEIA. *臨床皮膚科*. 66: 8-11, 2012.
 26. 千貫祐子: 加水分解小麦による FDEIA. *皮膚アレルギーフロンティア* 10: 52-54, 2012
 27. 森田栄伸, 千貫祐子: 茶のしずく石鹼による小麦アレルギー. *皮膚と美容*. 144: 63-66, 2012.
 28. 千貫祐子: 食物依存性運動誘発アナフィラキシー診断と生活指導. *MB Derma*. 194: 35-42, 2012.
 29. 千貫祐子, 森田栄伸: 食物アレルギーと経皮膚感作—加水分解小麦含有石鹼を含めて—. *小児内科*. 44: 2015-2018, 2012.
 30. 千貫祐子, 森田栄伸: CD203c 測定の実際と蕁麻疹診療における位置づけ. *アレルギー・免疫*. 20: 234-235, 2013.
2. 学会発表
 1. 千貫祐子, 石渡賢治, 高橋仁, 他: 牛肉アレルギー発症におけるマダニ咬傷の関与, 第 25 回日本アレルギー学会春季学術大会, 横浜市, 2013.
 2. 千貫祐子, 石渡賢治, 高橋仁, 他: 牛肉アレルギー発症におけるマダニ咬傷の関与, 第 112 回日本皮膚科学会総会, 横浜市, 2013.
 3. 千貫祐子, 石渡賢治, 高橋仁, 他: 牛肉アレルギー患者 28 例の発症原因と交差反応に関する検討, 第 77 回日本皮膚科学会東部支部学術大会, さいたま市, 2013.
 4. 千貫祐子, 石渡賢治, 高橋仁, 他: 牛肉アレルギーの発症原因と交差反応性に関する検討 (続報), 第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 鹿児島市, 2013.
 5. Chinuki Y, Kaneko S, Dekio I, et al: CD203c expression-based basophil activation test is useful in the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced

anaphylaxis. 42nd Annual ESDR Meeting. Venice, 2012.

6. 千貫祐子：食物アレルギーの診断における好塩基球活性化マーカーCD203cの有用性. 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 シンポジウム3, 北佐久郡, 2012.
7. 千貫祐子, 松尾裕彰, 新原邦江, 他：リコンビナント小麦蛋白特異的 IgE 測定の有用性. 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 ミニシンポジウム, 北佐久郡, 2012.
8. 千貫祐子, 金子 栄, 出来尾 格, 他：石鹼中の加水分解小麦で感作され小麦依存性運動誘発アナフィラキシーを発症した12例の解析. 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2011年度 JEDCA 最優秀論文賞 受賞講演, 北佐久郡, 2012.
9. 田中 文, 糸井沙織, 寺尾美香, 松井佐起, 谷 守, 花房崇明, 井川 健, 片山一郎, 千貫祐子, 他：茶のしずく使用後に発症したWDEIAとOASを合併した1例：石鹼のInflammasome 刺激作用の検討, 第111回日本皮膚科学会総会, 京都市, 2012.
10. 足立厚子, 西岡美南, 福田佳奈子, 一角直行, 佐々木祥人, 下浦真人, 井口佳代, 上田正登, 千貫祐子, 他：加水分解小麦入り石鹼による感作が推測される, ω -5 グリアジン特異 IgE 陽性の小麦依存性 FDEIA3 例, 第111回日本皮膚科学会総会, 京都市, 2012.
11. 千貫祐子, 金子 栄, 高橋 仁, 他：加水分解小麦型 WDEIA の予後, 第111回日本皮膚科学会総会, 京都市, 2012.
12. 足立厚子, 西岡美南, 福田佳奈子, 一角直行, 佐々木祥人, 千貫祐子, 他：加水分解小麦含有石鹼に起因する小麦アレルギーと通常的小麦アレルギー, 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 北佐久郡, 2012.
13. 杉山晃子, 岸川禮子, 西江温子, 下田照文, 岩永知秋, 西間三馨, 嶋田清隆, 古江増隆, 田辺創一, 千貫祐子, 他：加水分解コムギにより生じたWDEIAにおける負荷検査の結果と有用性, 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪市, 2012.
14. 徳田玲子, 長尾みづほ, 杉本真弓, 細木興亜, 千貫祐子, 他：加水分解小麦末含有石鹼使用者に生じた小麦アレルギーにおける好塩基球活性化マーカーCD203c 検査の意義, 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪市, 2012.

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

研究分担者 岸川 禮子 国立病院機構福岡病院アレルギー科医長
研究協力者 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
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

研究要旨:

2008年頃からコムギアレルギー歴が今までなかった使用者がコムギアレルギーやコムギ食品依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) を主訴として NHO 福岡病院を受診するようになった。受診患者の転帰を調査し今後の治療・予防に役立てる。2008年症例報告した例の転帰を調査した。30歳代の女性が多く、症状は洗顔使用時の眼瞼浮腫、鼻炎・結膜炎、接触皮膚炎、蕁麻疹、アナフィラキシーショックなど多彩な症状が小麦食品摂取後に誘発され、石鹼中止にて症状は軽快するが、誘発症状は続き、薬剤を使用しながらあるいは小麦食品摂取と運動を調整しながら工夫して日常生活を送っていることが分かった。軽症化しているが完治例は非常に少なく、経過観察が必要である。

受診患者は 200 名以上となり、診断基準を満足して加水分解コムギによる即時型コムギアレルギーと確実に診断された例は 142 例、疑いが約 20 例でこの疑い例は石鹼使用歴と症状はあるが、検査所見を満たさない症例であった。

これらの 142 名に 2013 年 5 月にアンケート調査を行った結果、成人発症のコムギアレルギーの多くは日常の食生活で不自由を感じている。その結果をもとに講習会を 8 月に開催した。講習会に参加した患者 36 名に対して SF36 質問調査を行った。小麦アレルギーの患者はコントロールの慢性喘息患者とほぼ同じ結果で、社会的な生活機能が国民標準及び喘息患者より強く制限されていることが示された。これは小麦摂取制限により極度の生活規制があることが原因と考えられた。成人発症の小麦アレルギー患者は社会活動が著しく低下している。今後これらの対策を考え、また経過観察を要する。

A. 研究目的

加水分解コムギ入りの美容石鹼(お茶のしずく石鹼)を購入し、定期的に洗顔して数か月～数年後の 2008 年頃からコムギアレルギー歴が今までなかった使用者がコムギアレルギーやコムギ食品依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) を主訴として NHO 福岡病院を受診するようになった。受診患者の転帰を調査し、成人発症のコムギアレルギー患者の日常生活への影響を検討し、今後の治療に役立てる。

B. 研究方法

1. 前期調査

対象は 2008 年 5 月から 2011 年 9 月までに当院を受診して上記疾患と診断された症例についてカルテよりレトロスペクティブに調査した。上記疾患と診断された 36 例について 2012 年 9 月 26 日に経過・自己管理についてのアンケート調査

表を郵送して調査した。質問の内容は 1) 今も症状があるかどうか、2) ある場合、コムギ食品摂取についての質問、3) 使用している薬剤、4) 症状がない場合、小麦食品の回避状況、5) 薬剤の使用状況、6) 症状ありの場合の症状の種類、7) 病院受診状況の 7 問である。返信用封筒を同封し、2012 年 10 月末までの約 1 か月間に返信された 24 症例について解析した。

2. 後期調査

1) 当院で診断された加水分解コムギによる小麦アレルギー患者 142 名に 2013 年 5 月アンケートを郵送し、6 月末までに回収された調査表を検討した。2) その結果をもとに講習会を 8 月に開催した。3) 講習会に参加した患者 36 名に対して質問調査を行った。SF36v2TM 日

本語版マニュアルを用いて、身体機能、日常役割機能、身体の痛み、全体的健康観、活力、社会生活機能、日常生活機能（精神）、心の健康項目で全体の国民標準値と比較・評価を行った。2007年日本国民標準値と定期通院中の喘息患者で2013年9月から11月に受診した症状が安定している患者で講習会出席者36名の性別を同じくし、出席者年齢の±3歳の患者をコントロールとした。

（倫理面への配慮）

本研究は当院倫理規定委員会に審査を受け、承認された。また問診表調査を行うにあたり、個人の同意を得て、ヘルシンキ宣言にしたがって調査を行った。

C. 研究結果

1. 前期調査—加水分解コムギ入り石鹼使用にてアレルギー症状を発症した症例の特徴—

アンケート調査を郵送した36例中回収された調査用紙は24名、回収率67%であった。

男性1名女性23名で平均年齢 36.8 ± 10.5 歳（17～56歳）で当院初診時よりアンケート調査までの期間は2年以上が13名（54%）で、平均 23.8 ± 9.5 か月（12～52か月）であった。初診時の主訴はアナフィラキシー7名（29%）、小麦依存性運動誘発アナフィラキシー9名（38%）、蕁麻疹4名（17%）、眼瞼浮腫/鼻症状2名（8%）、小麦食物アレルギー1名（4%）、アレルギー検査希望1名（4%）であった。質問の回答では今現在も症状があるが17名（71%）で、なし7名（29%）であった。どんな症状が出現したかの回答では、無回答の1名を除いて16名中眼瞼腫脹8名（50%）、鼻症状7名（44%）、じんましん4名（25%）、アナフィラキシー2名（13%）、全身倦怠感2名（13%）、吐気1名（6%）、喘鳴・咳痰2名（13%）など重複して症状が見られた。

さらに薬剤の使用頻度は、なし6名（25%）、薬剤使用ありが18名（75%）で、使用薬剤は18名中17名（94%）抗アレルギー薬、セレスタミン®などの合剤を含むステロイド薬4名（22%）、MDI 1名（6%）であった。またエピペン®を準備している症例が1名（6%）であった。病院受診についての質問の回答は、受診なし3名（13%）、ほぼ定期に受診が14名（58%）、受診したいが時間がなく不定期や受診なしが7名（29%）を占めた。

小麦食品の摂取状況は、全的に回避している5名（21%）、全く気にせず摂取している1名（4%）で、時間や量を工夫して摂取しているが18名（75%）と最も多く見られた。

2. 後期調査—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—

1) アンケート調査結果

当院を受診して加水分解コムギによる即時型コムギアレルギー患者142名に2013年5月に調査用紙を郵送し、1か月以内に58名（回収率41%）が返送された。これらの58名は「現在コムギ食品を摂取している」が39名（67%）であった。これらの患者のコムギ食品摂取と中止年数との関係は経過年数が1年未満で4例中3例が再開始、1～2年の22例中10例、2～3年では18例中8例、3～4年では7例中3であった。現在摂取している例の今までの自己摂取量と比較すると相対的に50%以下の量を摂取している例が56%で、摂取後の症状の有無を見ると現在も症状ありが62%で、痒み、眼瞼腫脹が最も多く、鼻症状（くしゃみ）の頻度が次いでいた。薬剤（抗アレルギー薬内服）の使用者は58名中常に内服24名（41%）、症状のあるときのみ使用7名（12%）、使用なし21名（36%）であった。コムギ摂取者で薬剤使用なしが20名（34.5%）、薬剤使用しながらコムギ摂取が20名（34.5%）を示した。さらに日常生活で困ることは、外食ができない43%、旅行・冠婚葬祭などの行事時に困る13%であった。講習会開催希望は26名（45%）で、