

201328026A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
総合研究事業

医薬部外品・化粧品に含有される成分の
安全性確保に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書
(H24－医薬－指定－014)

研究代表者 手島 玲子

平成26年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究 …… 1
手島 玲子

II. 分担研究報告書

1. 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究 …… 7
手島 玲子
2. 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析 …… 23
伊東 祐二
3. 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての
動物モデルに関する研究 …… 37
安達 玲子
4. 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査 …… 51
板垣 康治
5. 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査 …… 61
海老澤 元宏
6. 医薬部外品等の国内のアレルギー発症の事例調査並びに事後の
経過観察 …… 65
福富 友馬
7. 医薬部外品等によるアレルギー発症例の診断法に関する研究 …… 73
松永 佳世子
8. 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討 …… 83
五十嵐 良明

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 89

医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究

研究代表者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長

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

研究分担者

安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部 室長
板垣 康治 北海道文教大学人間科学部
健康栄養学科 教授
五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部 部長
伊東 祐二 鹿児島大学理工学研究科
生命化学専攻課程 教授
海老澤 元宏 国立病院機構相模原病院
臨床研究センター 部長
福富 友馬 国立病院機構相模原病院
臨床研究センター
診断・治療薬開発研究室 室長
松永 佳世子 藤田保健衛生大学医学部
皮膚科学 教授

A. 研究目的

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

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

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

本研究では、まず小麦加水分解物に注目し、その製造工程の違いによって生じるアレルギー反応の惹起性について、動物モデルによる生体反応の解析と、ファージディスプレイ法による網羅的抗原性解析等を実施し検討を行う。ここから得られた成果を基に、現行の成分規格の改定の検討を

行い、医薬部外品等の安全性の確保を目指す。

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

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

B. 研究方法

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

C. 研究結果 及び D. 考察

[I] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

医薬部外品・化粧品には米や小麦などの食品を原材料とするものがあるが、これらのうち特定の

食品にアレルギーを持つ患者が当該食品を原材料とする医薬部外品・化粧品等を使用した場合に、アレルギー症状等を引き起こす可能性が指摘されている。近年、加水分解小麦（HWP）を含有する洗顔石鹸の長期使用により小麦アレルギーを発症する事例が数多く報告され、社会的に大きな問題となった。本研究では、HWP に特徴的に発現するタンパク質の物性に関する研究を行うことを目的とし、(i)加水分解条件が異なる HWP(酸加水分解及びアルカリ加水分解小麦グルテン)を調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価を行い、(ii)茶のしずく石鹸に使われていた酸加水分解小麦(HWP, グルパール 19S) と 139 例の茶のしずく(HWP)患者血清で感作されたヒト化マスト (RS-ATL8) 細胞を用いて、EXiLE 法にて細胞の活性化を促すかどうかの検討を行い、診断に使用できるかどうかの評価を行った。

(i)では、HWP の医薬部外品・化粧品の原材料の規格基準策定も指向し、HWP のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析による分子量測定、及び定量的プロテオーム解析を用いた脱アミド化分析を行った。その結果、分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められ、脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。(ii)では、19S-EXiLE 法と 19S-ELISA 法の比較を ROC 曲線を用いて行ったところ、EXiLE 法は、感度は、ELISA 法より低い、特異度は高く、確定診断に用いることのできる試験であることが示された。

[II] 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

茶のしずく小麦アレルギーの原因となる IgE 抗体の特性解析を行うため、患者由来の IgE 単鎖 Fv 抗体ライブラリを構築し、グルテンならびにグルパール 19S に対するバイオパンニングによって、疾患の原因と考えられる特異クローンの単離を行った。

得られたクローンの多くは、グルテンに対する結合活性を有するものの、グルパール 19S に対する特異性は示さなかった。グルパール 19S に特異性をもつクローンが得られなかった原因として、目的の抗体遺伝子の存在率が低く、また、バイオパンニングによる濃縮効率が低いことが考えられた。そこで、バイオパンニング前後でのライブラリ中の抗体配列を次世代シーケンサーによって網羅的に解析することで、特異クローンの解析を進めた結果、複数種のグルテン、並びに、グルパール 19S に特異的な IgE 抗体の VH 配列の特定に成功した。

このような小麦アレルギーでの IgE の特性の違いを明らかにすることで、茶のしずく発症の機構、さらには予防に対する展開を図っていくことが可能と思われる。

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

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5 時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール 19S と同等の感作性が認められ、加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。今後更に検討を重ね、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により、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積できると思われる。

[IV] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査

北海道内の医療機関に勤務する医師、および開業医を対象として、小麦以外の加水分解物が添加された化粧品、医薬部外品によるアレルギー発症に関するアンケート調査を実施した。アンケートは 3995 名の医師に配布し、278 名から回答が得ら

れ回収率は 7.0%であった。小麦以外の小麦加水分解物を添加している化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例については、3 名の医師が症例を経験していた。原因物質などの特定はできなかった。発症例については、アナフィラキシーなど重症化の可能性も示唆された。

食品由来であっても、化粧品や医薬部外品に使用される場合には、アレルギー発症のリスクがあることを、医師を介して、あるいは、国民へ直接、効果的に情報を伝えることが重要であると思われる。

[V] 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査

医薬部外品のうち内服薬による健康被害に関して文献的調査を行うことを目的とした。方法: 医薬部外品のうち内服薬によるアレルギー発症事例について、本邦および諸外国における報告事例を過去 10 年(2004~2013 年)にわたり調査を行った。結果: 医薬部外品のうち内服薬による副作用報告は本邦においてウコンによる薬疹 4 例の報告が最も多かった。また、漢方に用いられる生薬では、麻黄、茴香(ウイキョウ)、縮砂(シュクシャ)による薬疹でそれぞれ 1 例、甘草によるアナフィラキシーで 1 例の報告を認めた。ビタミンでは、フルスルチアミン(ビタミン B1)による薬疹で 1 例、リン酸リボフラビンナトリウム(ビタミン B2)によるアナフィラキシーショックで 1 例の報告を認めた。諸外国では acetaminophen による蕁麻疹 13 例、アナフィラキシー 3 例の報告が最も多かった。考察: 医薬部外品のうち内服薬による健康被害の報告は少ないが、比較的安全と考えられている成分でも健康被害を起こすことがあり、一層注意喚起が必要であると思われる。

[VI] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症事例調査並びに事後の経過観察

茶のしずく石鹼®(悠香)の使用によりその添加成分である加水分解小麦(グルパール 19S®)に経皮経粘膜感作されることによって発症した経口小麦アレルギーの症例の、発症の事後の経過に

ついて明らかにするために観察研究を行った。

本年度は生存時間分析 (Survival analysis) のモデルにより、石鹼使用中止後の経過期間と小麦アレルギー症状との関係について検討した。石鹼使用中止からの時間が経過するほど、略治状態まで改善する患者の割合が増加している傾向が示されているが、石鹼中止後 4-5 年を経過しても略治に至っているものは半数に達していない。現在、略治に至っていない者の臨床症状が、今後間違いなく改善して行くのかどうかも明らかでなく、これらの患者に関しては今後も注意深い経過観察が必要であると考えられた。

[VII] 医薬部外品等によるアレルギー発症例の診断法に関する研究

近年、加水分解コムギ、グルパール 19S を含有した石鹼使用者に小麦アレルギー患者が多発し、社会問題化した。症例の約半数は、小麦製品摂取後にアナフィラキシー症状を示す重症例であった。分担研究者は日本アレルギー学会「化粧品中のタンパク加水分解物の安全性に関する特別委員会」委員長として、全国の症例の疫学調査を行い ELISA 法による特異 IgE 抗体の測定を施行した。その結果、2014 年 2 月 20 日時点、確実例は 2107 例で、女性 2020 例 (95.9%)、男性 87 例 (4.1%) であった。年齢は 1 歳 (男児) から 93 歳 (女性)、平均 45.8 歳で、多くは 20 代から 60 代の女性であった。登録患者の都道府県別陽性症例数は、福岡県が第 1 位で 296 例、次いで北海道 123 例、東京都 123 例、第 4 位は大阪府 118 例、広島県 109 例であった。登録数は 2012 年 8 月をピークに徐々に減少しているが、出荷石鹼個数と報告症例数をみるとなお、登録されていない症例もあることが推測される。

化粧品に含まれた加水分解蛋白による全身性の食物アレルギーは、加水分解コムギ以外にも起こり得る。分担研究者の施設では、化粧品に含まれた豆乳成分や、加水分解卵白などによる全身性の食物アレルギー症例を経験している。化粧品中のグルパール 19S 以外の小麦由来成分またはその他のタンパク成分によるアレルギーに関す

る緊急疫学調査も実施し、その後の詳細な症例情報の平成 26 年 3 月時点における登録数は、19 以外の加水分解コムギ末における健康被害が疑われる症例は 3 例、コムギタンパク質以外の化粧品に含まれる成分における健康被害が疑われる症例は 10 例であった。

[VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

特定の洗顔石けんの使用者に、小麦摂取による即時型アレルギーを発症する症例が増加し、大きな社会問題となった。本アレルギーは、石鹼に配合されていたグルパール 19S という成分によって引き起こされた事がわかった。グルパール 19S は、医薬部外品原料規格で加水分解コムギ末として収載されており、製品にもその名称で記載される。製造会社によると、現在の医薬部外品原料規格の試験法で規定される品質に関して逸脱はなかったという。他の分担研究者による昨年度までの研究で、加水分解コムギ末の製造法によって強いアレルギー性物質が生成するような物性変化が生じていることがわかった。小麦のような食品成分が経皮、経粘膜的に感作すること自体、想定されなかったことではあるが、現状の規格ではこのような健康障害を防止できなかったことが明らかになった。本研究では、加水分解コムギ末によるこのような健康被害の再発防止のため、これまでの研究班の結果をもとに、医薬部外品原料規格の改訂案を策定することとした。原材料グルテンの加水分解により短時間で一時的に分子量が増加し強い感作性を引き起こすこと、加水分解時間を長くすると分子量が減少し約 10,000 以下になったものでは感作性が認められなかったことから、この分子量をもとにした品質規格とその試験法を追加することとした。サイズ排除クロマトグラフィーを試験法として、分子量約 12,000 のチトクロム C を指標に、これ以下の分子量のものが一定量以上含まれることとした規格と試験法案を追加することを提案した。

E. 結論

[I] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

加水分解条件が異なる HWP として、酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンを調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価した。分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められた。脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。

また、19S-EXiLE 法を用いた研究に関しては、19S-ELISA 法に対して特異度では優れることが判明した。19S-EXiLE 法は、抗体の濃度検査だけではなく、抗体の機能の測定も行えることに特徴があり、ヒト好塩基球活性化試験 (BAT) と同様に用いることも可能であると思われ、BAT と本試験の比較を行うことも重要と思われた。

[II] 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

IgE 抗体ライブラリを使ったバイオパンニングと組み合わせられた次世代シーケンサーによる網羅的解析手法は、アレルギーの原因となる IgE 抗体配列の同定の上で、極めて有用であり、本法によって、小麦アレルギーの原因となる IgE のクローン配列が特定された。

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

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5 時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール 19S と同等の感作性が認められ、加水分解の進行

(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。

[IV] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査

・小麦以外の食品由来の加水分解物を添加している化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例は確認されたが、非常に少なかった。しかし、発症した場合、アナフィラキシーなど重症化する可能性があるため、注意が必要である。

・食品由来であっても、化粧品や医薬部外品に使用される場合には、アレルギー発症のリスクがあることを医師を介して、あるいは、国民へ直接、効果的に情報を伝えることが重要である。

[V] 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査

医薬部外品のうち内用剤は、外用剤と比べて健康被害の報告は少なかった。しかし、比較的安全と考えられている成分でも健康被害を起こすことがあり、一層注意喚起することが必要である。

[VI] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症事例調査並びに事後の経過観察

小麦加水分解物 (HWP)-WDEIA 群は、その小麦アレルギー感作ルートを反映して、眼瞼腫脹や鼻炎症状、顔面の腫脹など顔面や粘膜のアレルギー症状を認める症例が大半であった。また、通常的小麦アレルギー (CO-WDEIA) 群では ω -5 グリアジン-IgE 抗体価の経年変化は認められなかったが、HWP-WDEIA 群においては石鹼使用中止後、全例において小麦、グルテン特異的 IgE 抗体価の減少傾向を認めた。ただし、症状改善の程度に個人差が存在することも同時に示唆され、今後の長期にわたる経過観察が必要であることが示された。

[VII] 医薬部外品等によるアレルギー発症例の診断法に関する研究

石鹼に含まれた加水分解コムギのグルパール 19S による即時型コムギアレルギーは全国で 2107 例の登録があった。登録数は 2012 年 8 月をピー

クに徐々に減少しているが、まだ、登録されていない症例もあることが推測された。

化粧品中のグルパール 19S 以外の小麦由来成分またはその他のタンパク成分によるアレルギーに関する調査も実施している。

[VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

加水分解コムギ末による健康被害の再発防止のため、これまでの研究の結果をもとにして、医薬部外品原料規格の改訂案を策定した。原材料グルテンの加水分解により短時間で一時的に分子量が増加し強い感作性を引き起こすこと、加水分解時間を長くすると分子量が減少し、感作性が認められなかったことから、分子量をもとにした品質規格とその試験法を追加することとした。定量性のあるサイズ排除クロマトグラフィーを試験法とし、分子量約 12,000 のチトクロム C を指標に、これ以下の分子量のものが一定量以上含まれるとする規格及び試験法を追加することを提案ができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

H. 知的財産権の登録

なし

医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長

研究要旨:

医薬部外品・化粧品には米や小麦などの食品を原材料とするものがあるが、これらのうち特定の食品にアレルギーを持つ患者が当該食品を原材料とする医薬部外品・化粧品等を使用した場合に、アレルギー症状等を引き起こす可能性が指摘されている。近年、加水分解小麦(HWP)を含有する洗顔石鹸の長期使用により小麦アレルギーを発症する事例が数多く報告され、社会的に大きな問題となった。本研究では、HWPに特徴的に発現するタンパク質の物性に関する研究を行うことを目的とし、(i)加水分解条件が異なるHWP(酸加水分解及びアルカリ加水分解小麦グルテン)を調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価を行い、(ii)茶のしずく石鹸に使われていた酸加水分解小麦(HWP, グルパール19S)と139例の茶のしずく(HWP)患者血清で感作されたヒト化マスト(RS-ATL8)細胞を用いて、EXiLE法にて細胞の活性化を促すかどうかの検討を行い、診断に使用できるかどうかの評価を行った。

(i)では、HWPの医薬部外品・化粧品の原材料の規格基準策定も指向し、HWPのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析による分子量測定、及び定量的プロテオーム解析を用いた脱アミド化分析を行った。その結果、分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められ、脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。(ii)では、19S-EXiLE法と19S-ELISA法の比較をROC曲線を用いて行ったところ、EXiLE法は、感度は、ELISA法より低い、特異度は高く、確定診断に用いることのできる試験であることが示された。

協力研究者	佐々木和実 (独)製品評価技術基盤機構
安達玲子 国立医薬品食品衛生研究所	バイオテクノロジーセンター 室長
代謝生化学部 室長	西嶋桂子 (独)製品評価技術基盤機構
中村亮介 国立医薬品食品衛生研究所	バイオテクノロジーセンター 主任
医薬安全科学部 室長	安宅花子 (独)製品評価技術基盤機構
渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所	バイオテクノロジーセンター 主査
食品部 室長	
酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所	A. 研究目的
代謝生化学部 主任研究官	近年、加水分解小麦(HWP)を含有する医薬部外品・化粧品の長期使用において、小麦含有食品を摂取後に運動して全身性アレルギーである「アナフィラキシーショック」を発症した事例が数多く報告され、大きな社会問題となっている。現在、本課題研究に
菊地博之 国立医薬品食品衛生研究所	
食品部 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	

参画する医療機関・研究機関が中心となって原因究明が進められているが、HWP の重篤なアレルギー反応機構の詳細については未だ不明な部分も多く、医薬部外品・化粧品の原材料としての HWP の規格基準を策定し、その品質及び安全性を確保することが望まれている。

本研究では、小麦グルテンの加水分解物である HWP に特徴的に発現するタンパク質の物性に関する研究を行うことを目的とし、(i)加水分解条件が異なる HWP(酸加水分解及びアルカリ加水分解小麦グルテン)を調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分子量分布、脱アミド化を指標に評価を行い、(ii)茶のしずく石鹼に使われていた酸加水分解小麦(HWP, グルパール 19S) と 139 例の茶のしずく(HWP)患者血清で感作されたヒト化マスト(RS-ATL8)細胞を用いて、EXiLEI (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression) 法にて細胞の活性化を促すかどうかの検討を行い、診断に使用できるかどうかの評価を行った。

B. 研究方法

1. 加水分解条件が異なる HWP の物性に及ぼす影響の分析化学的解析

(1) 試料

グルパール 19S は株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma G5004)及びグルパール 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。酸加水分解については、グルテンのストック懸濁液に、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。他方、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、pH12 となるように 1M 水酸化ナトリウムを加え、100°C のヒートブロック上で加熱した。酸加水分解及びアルカリ加水分解は、0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間加熱した後、中和し加水分解を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS で希釈した。分解 0 時間のサンプルは、予め中和した溶液中にグルテンストック懸

濁液を加え、加熱を行わずに調製した。

(2) 分子量の測定

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

SDS-PAGE は、4-12%Bis-Tris ゲル、MES SDS バッファーを用い各試料 20 µg を電気泳動した後、コロイドブルーでタンパク質を染色した。

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析

グルテン、グルパール 19S、酸加水分解グルテン(0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h)、アルカリ加水分解グルテン(0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h)について、各試料を下記測定条件で分析し、加水分解による経時的な分子量変化を測定した。

[測定条件]

カラム: GE Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)

移動相: Tris-HCl (pH7.4), 0.2M NaCl

流速: 0.75 mL/min

カラム温度: RT

検出波長: UV 210 nm

(3) タンパク質の脱アミド化の分析

定量的プロテオーム解析法を用いた脱アミド化分析

酸及びアルカリ加水分解物の 0h, 0.5h, 1h, 9h, 12h 試料の SDS-PAGE ゲルレーン を 10 分割し、各切片をゲル内酵素消化装置(Proprep, Genomic Solutions)で洗浄・ジチオトレイトール(DTT)による還元・ヨードアセトアミドによるアルキル化・トリプシンによる消化を行った。得られたペプチド溶出液を減圧乾燥機で乾燥した。乾燥させた試料をサンプル溶解液(0.1% ギ酸, 2% アセトニトリル, 98%水) 20 µL に溶かし、1 分間以上振とう後、1 時間以上静置し測定用試料とした。

[測定条件]

•HPLC

オートサンプラー: HTC PAL (CTC Analytics)

高速液体クロマトグラフ: Paradigm MS4 (Michrom)

BioResources)

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

・MS

質量分析計: イオントラップ型質量分析計 LTQ XL
(Thermo Fisher Scientific)

・LC/MS/MS 測定は、濃縮・脱塩用カラムによりペプチドの濃縮及び脱塩を行い、逆相 C18 カラムにより分離し、ナノエレクトロスプレーイオン化(nanoESI)法により溶出したペプチド断片をイオン化し、質量分析計へ導入し、MS 及び MS/MS スペクトルデータを取得した。各サンプルは繰り返し 4 回測定を行った。LC/MS/MS 測定の結果は、タンパク質同定ソフトウェア MASCOT(Matrix Science)を用い、下記のデータベースに対して検索を行った。公共データベース UniProt から“wheat” and (“gliadin” or “glutenin”)をキーワードに抽出された配列をデータベースとした。設定修飾は加水分解処理で想定される脱アミド化反応、グルタミンからグルタミン酸への変換(Q→E)と、アスパラギンからアスパラギン酸への変換(N→D)を追加した。酵素消化条件は、消化酵素を指定しない(None)条件とした。MASCOT 検索結果のうち、Ions score が 35 以上で rank top であるペプチドを有効とした。脱アミド化率の算出のため、定量的プロテオーム解析を実施した。解析方法は、量が多いものほど検出できる確率が高いという統計的概念を利用した非標識定量法を用い、修飾部位及び種類別のペプチドイオン検出回数を指標とした。脱アミド化には Q→E と N→D の 2 種が存在するが、グルテンはグルタミンの方がアスパラギンよりはるかに多く含まれているため、Q→E をもって脱アミド化とした。

蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化分析

グルテン総タンパク質の脱アミド化分析に関しては、前年度の検討条件より簡便、迅速、高感度化を試みた。タンパク質中に含まれるグルタミン及びアスパラギン残基について、ビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼン(BTI)試薬を用いたホフマン転位により脱炭酸反応を行い、塩酸加水分解後に生成したアミ

ノ酸を AccQ-Tag 法で蛍光ラベル化し、下記の測定条件において HPLC を用いて分析を行った。

[ホフマン転位反応]

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

(AQC, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)で誘導体化した。

[HPLC 測定条件]

カラム: AccQ-Tag(粒径 4.0 μm、内径 3.9 mm×長さ 150 mm)

移動相 A: 12.5 mM リン酸緩衝液(pH 6.3)-アセトニトリル(100:1, v/v)

移動相 B: 12.5 mM リン酸緩衝液(pH 6.3)-アセトニトリル(70:30, v/v)

グラジエント溶出: 0→2%B (0→0.5 min), 2→4%B (0.5→7 min), 4→12%B (7→18 min), 12→31%B (18→26 min), 31→37%B (26→35 min), 37%B (35→55 min), 37→100%B (55→56 min), 100%B (56→65 min)

流速: 1.0 mL/min

カラム温度: 37°C

蛍光検出: 励起 250 nm / 蛍光 395 nm

2. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

患者血清

藤田保健衛生大学より供与されたのべ 139 検体の患者血清について解析を行なった。検体は 19S-ELISA による抗体価¹⁾、skin prick test (SPT)、および小麦製品摂取時の症状により 15 群に群分けされている。さらに、経時的に採血と ELISA による評価ができていた症例が 8 例あり、これらについては 19S

の抗体価が 10 unit 以上減少した群 (5 例) と変わらなかった群 (3 例) とに分けた。血清は使用直前まで -80°C のディープフリーザーに保存した。

細胞

RS-ATL8 細胞は、10% の非働化ウシ胎児血清 (FCS; ニッスイ) と $500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ geneticin、 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin B、penicillin/streptomycin を添加した MEM 培地 (Gibco) を用い、一週間に一度 1:20 で継代しつつ、 37°C の 5% CO_2 インキュベーター中で維持した²⁻⁵⁾。

EXiLE 法

サブコンフルエントの RS-ATL8 細胞をセルスクレイパーで採取し、培地で 1.0×10^6 cells/mL に調整した。ここに患者血清を 1/100 量加え、クリアボトム 96 well 白色プレート (PerkinElmer ViewPlate) に 5×10^4 cells/50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 播種し、 37°C の 5% CO_2 インキュベーター中で一晩 (20 時間) 感作した。翌日、HydroSpeed (Tecan) を用いて PBS により細胞を穏やかに 3 回洗浄し、ただちに培地に希釈した抗原溶液を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加して 37°C で 3 時間インキュベートした。プレートを常温に戻し、基質液 ONE-Glo (Promega) を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加した後、ルミノメータ EnVision (PerkinElmer) により発光を測定した。EXiLE の応答性は、各ウェルからブランクを差し引いた後、duplicate の平均値について、感作のみ行ない刺激を行なわない条件を 1.0 とした場合の相対値として表した²⁻⁵⁾。

抗原溶液

EXiLE 法で用いた抗原溶液は、グルパール 19S (片山化学工業より供与) および小麦グルテン (以後『Glu』; Sigma) を用いた。無菌 PBS により $1\ \text{mg}/\text{mL}$ のストック懸濁液を作製し、細胞培養に用いるものと同様の培地で順次希釈して、 $100\ \text{pg}/\text{mL} \sim 10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ とした^{2,5)}。また、陽性対照として、 $100\ \text{ng}/\text{mL}$ のヤギ抗ヒト IgE 抗体 (Bethyl) を用いた。

ROC 曲線解析

上記の濃度範囲で刺激した際の最大の EXiLE 応答を用い、GraphPad Prism により ROC 曲線解析を行

なった。症例の陰陽性の判定は、① 19S による SPT、② 19S-ELISA (カットオフ値 3 unit)、③ 小麦製品摂取時のアナフィラキシーの有無、④ 同じく呼吸困難の有無、によって分類した。また、19S-ELISA の unit および Glu 特異的 IgE (ImmunoCAP) の濃度 (U_A/mL) についても、同様に ROC 曲線解析を行なった。19S の EXiLE 応答と ELISA については、ROC 曲線上の対角線から最も遠い点より至適カットオフ値を求め、 2×2 分割表を作成し、感度・特異度・陽性一致率・陰性一致率を求めた。

統計処理

19S および Glu による EXiLE 応答、19S-ELISA、Glu 特異的 IgE については、スピアマンの順位相関係数を求め、相関を調べた。

C. 研究結果

1. 加水分解条件が異なる HWP の物性に及ぼす影響の分析化学的解析

(1) 分子量の測定

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

酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE を図 1 に示す。酸加水分解物の分子量は、経時的に低分子化し、0.5h 加水分解物がグルパール 19S と最も類似した泳動パターンを示した。他方、アルカリ加水分解物においても、酸分解物と同様に経時的に低分子化し、0.5h 加水分解物がグルパール 19S と最も類似したパターンを示したが、酸加水分解物と比較して 12h 以降においても 20-10kDa のスミアなバンドを認めた。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析

酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンのサイズ排除クロマトグラムを図 2 に示す。グルパール 19S の SEC 分析の結果より、分子量マーカー 669,000 以上を頂点とする鋭いピークをフラクション A、分子量マーカー 6,500~669,000 を範囲とする幅広いピークをフラクション B とした。グルパール 19S はフラクション A が顕著に認められ、フラクション B は分布領

域 5,000~700,000 で中心分子量は 200,000 であった。酸加水分解グルテンでは、フラクション A は 0.5~3h まで顕著に認められ、6~24h ではほとんど見られなくなった。フラクション B は 0.5h で分布領域 5,000~700,000(頂点 200,000)から 24h の分布領域 3,000~10,000(頂点 7,000)まで、領域と頂点位置ともに反応時間とともに低分子側へシフトした。他方、アルカリ加水分解では、フラクション A はすべての試料においてほとんど認められなかった。フラクション B はアルカリ加水分解開始後すぐに、分布領域 2,000~40,000(頂点 10,000)の低分子まで分解され、0.5~3h までは継時的な低分子化が見られるが、それ以降はほとんど変化が認められなかった。

(2) タンパク質の脱アミド化の分析

定量的プロテオーム解析法を用いた脱アミド化分析

検出されたペプチド全体のグルタミンのイオン検出数に占める脱アミド化されたグルタミンのイオン検出数の割合を脱アミド化率として図 3 に示す。酸加水分解グルテンに関しては加水分解時間が長くなるに伴って脱アミド化が進行し、分解時間 9h を経過すると脱アミド化率が 80%程度のプラトーに達することが示された。分解時間 1h において脱アミド化率が 45%であり、グルパール 19S の脱アミド化率(48%)とはほぼ同等であった。また、アルカリ加水分解物については、加水分解時間が長くなるに従って脱アミド化の進行が認められたものの、酸加水分解物と比較して変化は緩やかであり、分解時間 12h における脱アミド化率は 45%であった。

蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化分析

AccQ-Tag 法で誘導体化したアミノ酸標準品を HPLC で分析し、システム適合性(性能及び再現性)を確認した。ホフマン転位によって脱炭酸されたグルタミン残基のジアミノ酪酸誘導体への変換効率、及び気相による簡易加水分解の条件を検討し、次年度の研究において、酸及びアルカリ加水分解グルテンの脱アミド化の定量的評価を行う予定である。

2. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

代表的な EXiLE 応答

各検体とも、抗ヒト IgE 抗体による刺激では、2 倍以上のルシフェラーゼ発現を示した。図 5 に代表的な EXiLE 応答を示す。なお、カットオフ値は、後に述べる ROC 曲線解析の結果より、1.311 とした。抗原として 19S と Glu を用いたが、139 例中、(A) 両抗原に反応するものが 15 例、(B) 19S にのみ反応するものが 60 例、(C) Glu にのみ反応するものが 7 例、および (D) いずれにも反応しないものが 57 例となった。(B) で示すように、EXiLE 応答はしばしば逆 U 字型の応答曲線を示すため、これらの濃度範囲における最大の応答を以降の解析に用いた。

ROC 曲線解析

19S または Glu で刺激した際の EXiLE 応答、19S の ELISA、および Glu の ImmunoCAP の各数値が 19S による SPT 結果(+/-)を正しく予測できるかどうかについて、ROC 曲線解析を行なった(図 6)。その結果、19S-EXiLE の曲線下面積(AUC)は 0.8328、 $P < 0.0001$ と、優れた診断的有用性を示した。しかし、最もパフォーマンスが高かったのは 19S による ELISA であった(AUC=0.9280)。また、SPT 以外に、19S-ELISA の有無(カットオフ値 3 unit)、小麦製品摂取時アナフィラキシーの有無、および小麦製品摂取時呼吸困難の有無について、前掲 4 種の試験の ROC 曲線解析を行なった結果を、Table 1 にまとめた。19S 特異的 IgE の有無については、当然ながら 19S-ELISA との相関は AUC=1 となるが、次に相関が高かったのは 19S-EXiLE であった(AUC=0.9015)。アナフィラキシーの発現については、Glu-ImmunoCAP (AUC= 0.672) と、Glu-EXiLE (AUC=0.6451)、19S-ELISA (AUC=0.6186) が $P < 0.05$ のやや強い相関を示したが、呼吸困難の発現についてはいずれのパラメータも有意な相関はなく、診断的有用性は認められなかった。Glu-EXiLE はいずれのクライテリオンとも相関せず、HWP への感作の診断としては適用できないことが示された。

感度・特異度・陽性一致率(PPV)・陰性一致率(NPV)

図 6A の 19S-EXiLE の SPT に対する ROC 曲線において、対角線から最も遠い曲線上の点から診断パフォーマンスが最大となる至適カットオフ値を求めたところ、1.311 (fold) であった。同様に、19S-ELISA (図 6B) について求めると、11.0 (unit) であった。これらを至適カットオフとして 19S に関する EXiLE 法および ELISA 法の結果を 2×2 分割表にまとめると、Table 2 のようになる。なお、ELISA の結果に空欄があるため、両試験の総数は一致しない。この結果から、19S による SPT の陽性/陰性結果を予測するにあたって、EXiLE 法は ELISA 法に比べて特異度はやや高いが (0.9444 > 0.9118)、感度は劣っている (0.7087 < 0.8911) ことが示唆された。

EXiLE 応答の強度と血清中 IgE レベルの相関

EXiLE や ELISA、ImmunoCAP のパラメータ間の相関についてスピアマンの順位相関係数を求めると、19S-EXiLE と 19S-ELISA は非常に高い相関 ($R=0.8767$) を示すことがわかった (Table 3)。一方、Glu に関しては、ROC 曲線解析の結果からも予想される通り、Glu-ImmunoCAP と Glu-EXiLE の相関は低かった ($R=0.2026$)。

経時的に採血した血清 IgE による EXiLE 法

EXiLE 法は、好塩基球活性化試験と同様に、IgE の架橋を調べることができるという特徴を持つが、前者は保存血清を用いた後方視的研究に適用することができるが、後者はできないという違いがある。そこで、経時的な採血と ELISA による 19S 特異的 IgE 抗体価測定ができた 8 例について、EXiLE 法による解析を行なった。8 例はすべて女性で、年齢は 25 歳から 68 歳であった。このうち、追跡中に 19S 特異的抗体が ELISA で 10 unit 以上減少したものが 5 名、大きな変化がなかったものが 3 名であった (data not shown)。19S-EXiLE のカットオフ値を Table 2 の時と同様に 1.311 とすると、抗体価が減少した 5 例のうち、最終的に 19S-ELISA が 10 unit 以下にまで減少した 3 例 (subject No.1, 3, 5) については、EXiLE 試験の結果も陰性となった。一方、抗体価が減少しなかった 3 例については、3 例とも EXiLE 試験も陽性のまま変化が

なかった。図 7A-B に大きく抗体価が減少し 19S-ELISA が 10 unit 以下になった例として subject No.1 を、図 7C-D に減少はしたが 10 unit 以下にはならなかった例として subject No.2 を、そして抗体価に変化がなかった例として subject No.6 を Fig. 3E-F に示した。Subject No.1 の変化は非常に顕著で、19S および Glu とともに反応が陰性化した (図 7A-B)。Subject No.2 では、IgE 減少後も 19S-EXiLE の最大応答は 1.414 (> 1.311) であり、陰性化していない (図 7C)。これは、19S 特異的 IgE が 10 unit 以上の検体に限れば EXiLE 試験の判定と SPT 結果がよく対応するようになるという結果と矛盾しない。一方、半年間で 3 回の採血を行なった subject No.7 では、19S の抗体価にはほとんど変化がなかったにもかかわらず、EXiLE 応答は時間とともに減弱していた (図 7E)。ただし、カットオフ値を下回ったわけではなかった。

D. 考察

1. 加水分解条件が異なる HWP の物性に及ぼす影響の分析化学的解析

(1) 分子量の測定

一般的なアレルゲンタンパク質の抗原性を考慮する際に、抗体産生を誘導する抗原の分子量は 10,000 以上であることが知られている。そこで、10,000 に近い分子量マーカー 12,400 である Cytochrome C の溶出時間 (23.5min) を基点とし、「分子量の大きい領域 (Cytochrome C より早く出現するピークエリアの合計)」と「分子量の小さい領域 (Cytochrome C より遅く出現するピークエリアの合計)」の面積比を算出した (図 4)。酸加水分解物、アルカリ加水分解物ともに、加水分解の進行に伴い「分子量の小さい領域」が占める割合が高くなり、反応終了時 (24 時間) に酸加水分解物は 81.1%、アルカリ加水分解物は 67.6% となった。マウスを用いた経皮感作性試験の結果と併せて勘案し、経皮感作性を示さない加水分解コムギの規格基準を策定する際に、SEC のデータは有用であると考えられた。

(2) タンパク質の脱アミド化の分析

グルパール 19S 及び感作性を示す酸加水分解グルテン(0.5h 分解)の脱アミド化率は 50%程度であった。アルカリ加水分解では、分解時間が長くなるに従って脱アミド化の進行が認められたものの、脱アミド化の割合の変化は酸加水分解と比較して緩やかであった。酸及びアルカリ加水分解グルテンの抗原性に関する知見を集約し、「分子量」と「脱アミド化率」の2つ異なる物性を評価することで、抗原性を評価することが可能であると考えられた。

アミノ酸分析ではプレカラム誘導体化 HPLC 法が多く用いられ、誘導体化試薬としては、AQC、OPA(o-phthaldehyde)、ダンシルクロライド、PITC(phenylisothiocyanate)などが汎用されている。これらの中でも、AQCを用いる誘導体化法は、ワンポット、数秒間の反応で誘導体化反応が完了し、極めて安定性の高い蛍光誘導体化物を生成することが可能である。また、他の方法に比べ副反応も起こりにくく、高感度で簡便、迅速なアミノ酸分析を行うことができることから、AQC 誘導体化を用いたグルテン総タンパク質の脱アミド化分析法の構築を目指す。

2. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

本研究では、新しい *in vitro* アレルギー試験法である「EXiLE 法」が、19S への感作を証明するための手法としてどの程度有用性があるかについて、従来法の ELISA 法と比較しつつ解析した。

ROC 曲線解析によると、19S-EXiLE のパフォーマンスは AUC=0.8328 で、至適カットオフ値(1.311)における感度は 0.7087、特異度は 0.9444 であった。それぞれ 0.8911 と 0.9118 であった ELISA 法と比較すると、EXiLE 法は高特異度試験であり、陽性結果をもって確定診断することは可能であるが、陰性結果については偽陰性の可能性を排除できなかったため、除外診断に用いることは難しいと思われる。特に 19S 特異的 IgE が低値の血清において EXiLE 法の成績がよくなかったが、EXiLE 法の標準的なプロトコルでは、補体による細胞傷害性を避けるため、ヒト血清を 100 倍に希釈して用いる必用があり、このために抗体

価の低い血清の応答を調べるにはやや感度が不足するのであろうと推察された。実際、19S-ELISA により測定した 19S 特異的 IgE が 10 unit 以上の検体に限れば、EXiLE 法の感度は 0.8046(70/87)に増加し、40 unit 以上では 0.9792(47/48)に達することからもそれが伺える(data not shown)。

EXiLE 応答の強度と血清中 IgE レベルについては、19S については高い相関($R=0.8767$)が認められたが、Glu に関しては相関は非常に低いことがわかった($R=0.2026$)。むしろ 19S-EXiLE との相関の方が高く($R=0.659$)、この事実は、ImmunoCAP で測定される「Glu 特異的 IgE」の大半は、Glu そのものではほとんど架橋されず、19S をより強く認識している可能性を示唆するものと思われる。

最近、横大路ら⁶⁾により、茶のしずく石鹸患者 IgE は脱アミド化された γ グリアジンに強く結合し、脱アミド化前の γ グリアジンにも弱く交差反応できることが示されたが、このことは本研究結果の知見とよく合致する。

E. 結論

1. 加水分解条件が異なる HWP の物性に及ぼす影響の分析化学的解析

加水分解条件が異なる HWP として、酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンを調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価した。分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められた。脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。

2. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

19S-EXiLE 法は 19S-ELISA 法に対して特異度ではやや優るものの感度では劣っており、簡便さやコストの面からも、スクリーニング法としては ELISA を用いる方が適切であろうと思われた。しかし、19S-EXiLE

法の特徴を考えれば、抗体の濃度検査だけではなく、抗体の機能の測定も行えることに特徴があり、ヒト好塩基球活性化試験(BAT)と同様に用いることも可能であると思われ、BAT と本試験の比較を行なうことも重要と思われる。

(参考文献)

- 1) Nakamura M, Yagami A, Hara K, Sano A, Kobayashi T, Aihara M, Hide M, Chinuki Y, Morita E, Teshima R, Matsunaga K. A new reliable method for detecting specific IgE antibodies in the patients with immediate type wheat allergy due to hydrolyzed wheat protein: Correlation of its titer and clinical severity. *Allergol Int* (in press).
- 2) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R. Evaluation of allergenicity of acid-hydrolyzed wheat protein using an in vitro elicitation test. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;160:259-64.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013; 132; 1436-1438.
- 2) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. *Clinical Immunology & Allergology* 2013; 59, 598-602.
- 3) 手島玲子:食物アレルゲンの話、日本小児アレルギー学会誌, 27(1), 15-19 (2013)
- 4) Teshima R: Food Allergen in Cosmetics, *Yakugaku Zasshi*. 2014;134(1): 33-38.
- 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.

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、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患者血清IgEはトランスグルタミナーゼ処理小麦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) 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)
- 5) 酒井信夫、中村里香、齋島由二、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)
- 6) 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・接触皮膚炎学会総会学術大会 (2013. 11)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

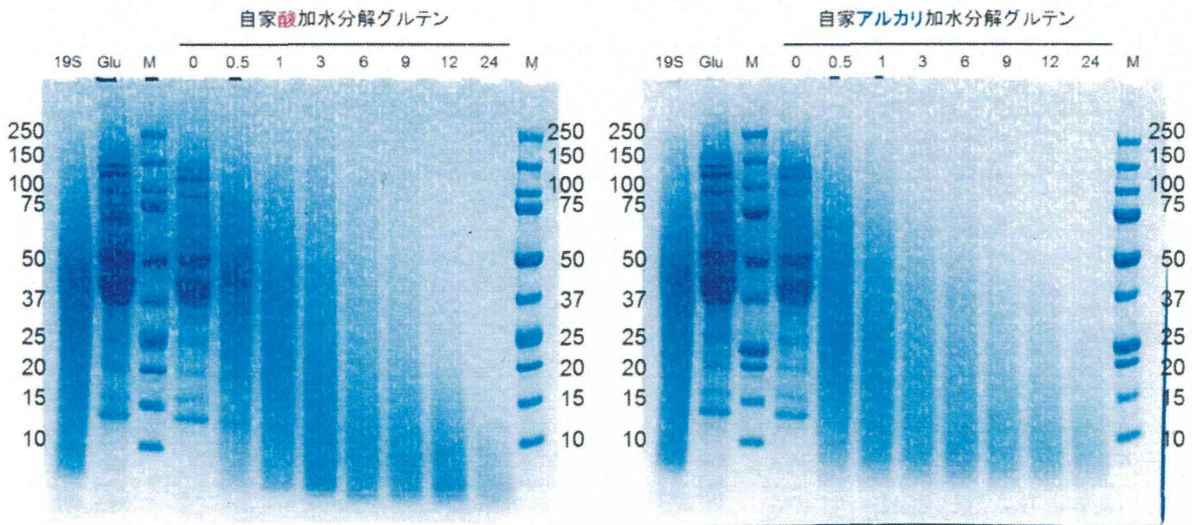


図1 酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンのSDS-PAGE

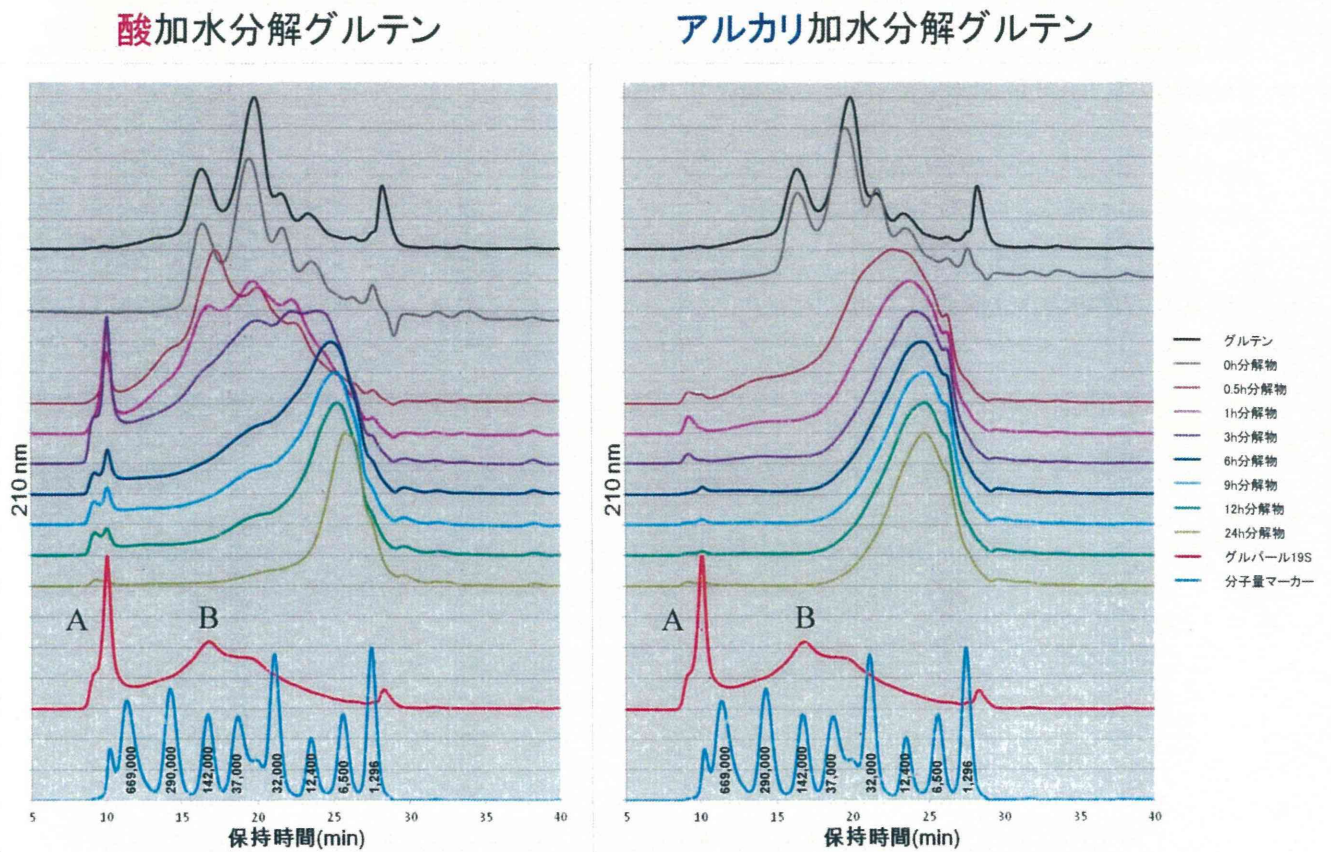


図2 酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンのサイズ排除クロマトグラム

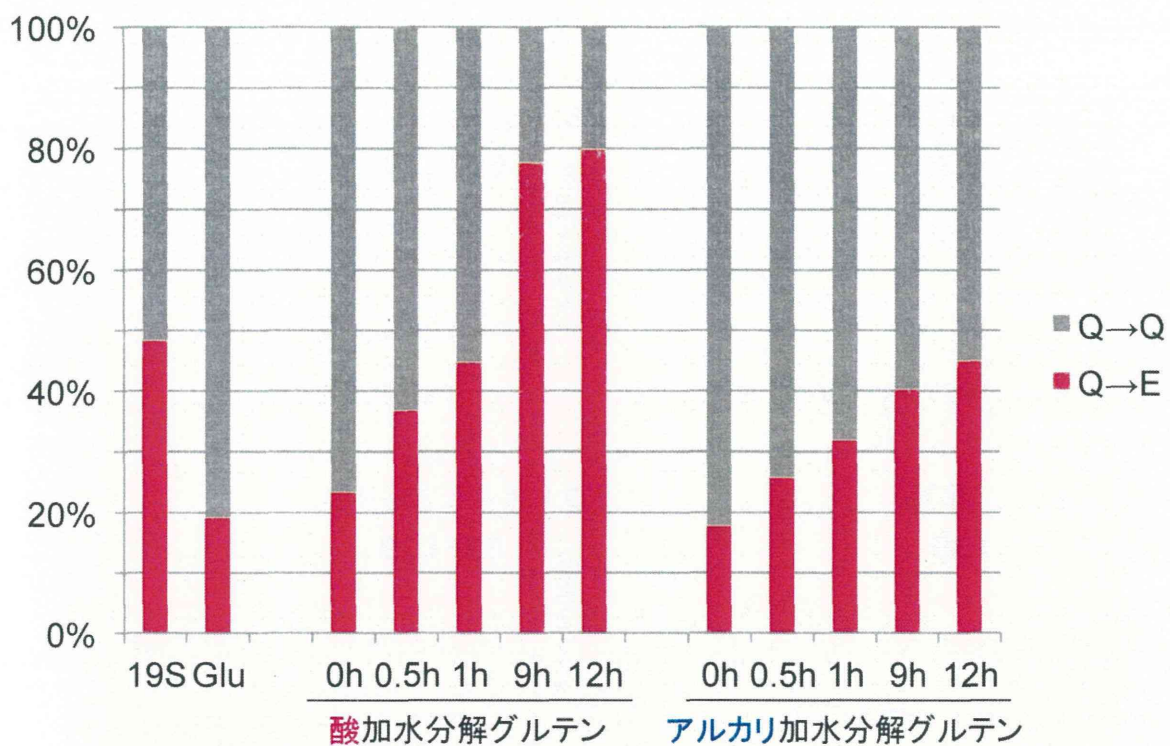


図3 検出ペプチド中のグルタミンの脱アミド化率

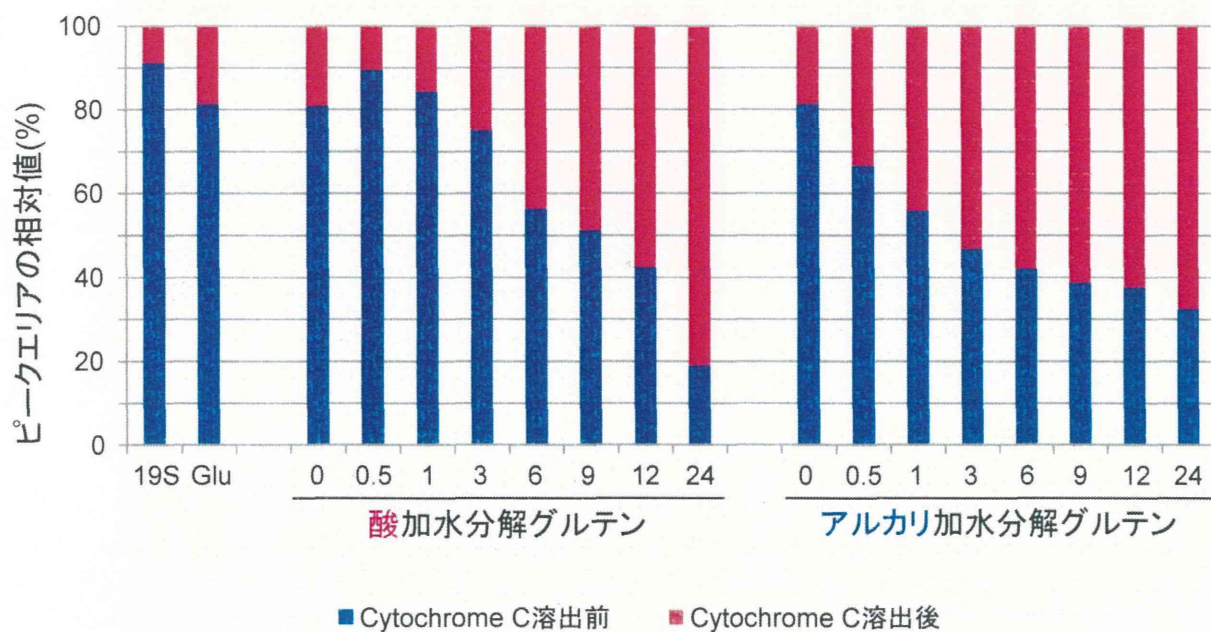


図4 加水分解の進行によるSECピークエリアの推移

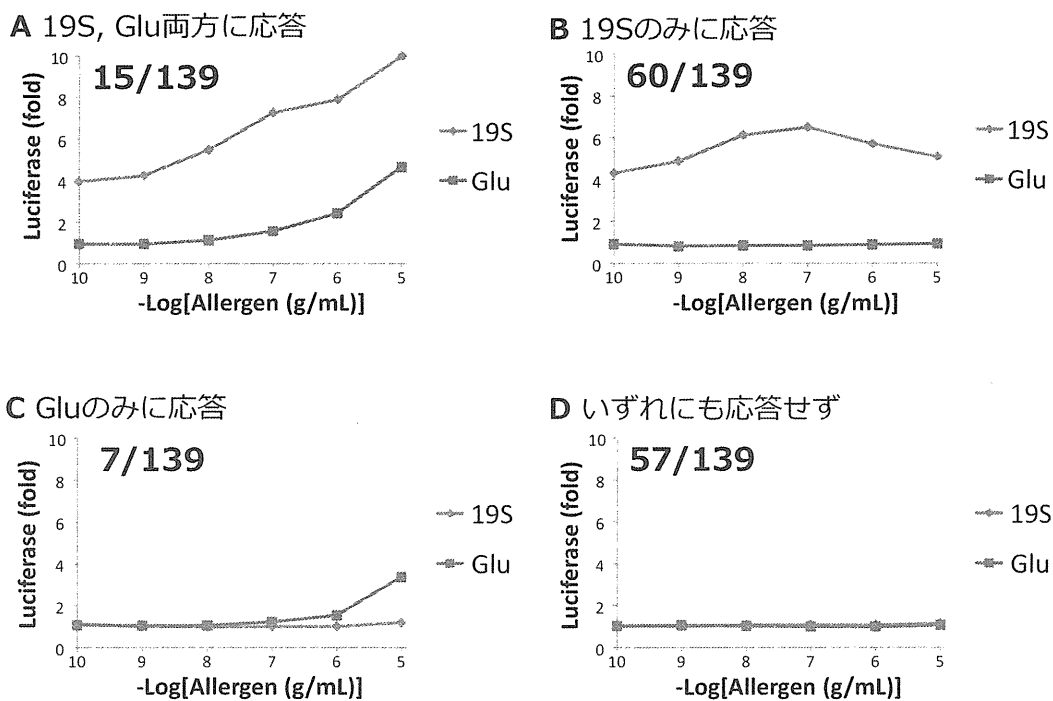


図5. 代表的な EXiLE 応答パターン

100倍希釈した患者血清によりRS-ATL8細胞を一晩感作し、100 pg/mL~10 µg/mLの19SまたはGluにより3時間刺激した。応答は、培地のみを加えたコントロールを1.0とした場合の相対値で示す。応答は、19SとGlu両方に応答するもの(A)、19Sにのみ応答するもの(B)、Gluにのみ応答するもの(C)、および両方に応答しないもの(D)に分類できる。