

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

安達玲子 国立医薬品食品衛生研究所

代謝生化学部 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 室長

渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所

食品部 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

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

佐々木和実 (独)製品評価技術基盤機構

ハイテクノロジーセンター 室長

西嶋桂子 (独)製品評価技術基盤機構

ハイテクノロジーセンター 主任

安宅花子 (独)製品評価技術基盤機構

ハイテクノロジーセンター 主査

A. 研究目的

近年、加水分解小麦(HWP)を含有する医薬部外品・化粧品の長期使用において、小麦含有食品を摂取後に運動して全身性アレルギーである「アナフィラキシーショック」を発症した事例が数多く報告され、大きな社会問題となっている。現在、本課題研究に

参画する医療機関・研究機関が中心となって原因究明が進められているが、HWPの重篤なアレルギー反応機構の詳細については未だ不明な部分も多く、医薬部外品・化粧品原材料としての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)茶のしづ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例の茶のしづく(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℃、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℃ 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

蛍光検出: 励起 250 nm / 蛍光 395 nm

2. グルバール 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 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 μ g/mL geneticin、200 μ g/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 の 5% CO₂ 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 μ L/well 播種し、37 の 5% CO₂ 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 μ L/well 添加して 37 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 μ L/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 mg/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 pg/mL ~ 10 μ g/mL とした^{2,5)}。また、陽性対照として、100 ng/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、19S による SPT、19S-ELISA(カットオフ値 3 unit)、小麦製品摂取時のアナフィラキシーの有無、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)両抗原に回答するものが 15 例、(B)19S にのみ回答するものが 60 例、(C)Glu にのみ回答するものが 7 例、および (D)いずれにも回答しないものが 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要があるため、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⁹⁾により、茶のしずく石鹸患者 IgE は脱アミド化された グリアジンに強く結合し、脱アミド化前の 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:食物アレルギーの話、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