

201427019A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等規制調和・評価研究事業

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26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27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	9
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	43
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	59
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	71
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	77
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	87
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	97
五十嵐 良明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	109

## 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

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

生活衛生化学部部長

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による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、フェ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、さらには患者の予後の調査については、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た。

## C. 研究結果 及び D. 考察

### [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

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、(1)経皮感作性を有する加水分解コムギ（HWP）のスクリーニング用抗体を作製し、その有用性を評価した。また、(2)酵素加水分解によるHWPを調製し、それらの分子プロファイリングを行い、酸及びアルカリ加水分解によるHWPとの比較を行った。更に、(3)グルパール19S患者血清と各種HWPとの応答性(交差反応性)を評価した。

(1)では、グルパール19Sに特徴的に認められるペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロッティング及び阻害ELISAによりその特異性・交差性を評価し、抗原性を示す加水分解コムギをスクリーニングする際に有用であることを明らかにした。(2)では、酵素加水分解によるHWPは酸及びアルカリ加水分解

による HWP と比較して、分解反応が特異的かつ速やかで、加水分解の進行に伴う低分子化、脱アミド化の程度が低いことを明らかにした。(3)では、グルパール 19S 患者血清中 IgE は、酸加水分解による HWP の高分子領域にのみ結合し、アルカリ及び酵素加水分解による HWP には結合しないことを明らかにした。

#### [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考えられる IgE 抗体の特性解析を行うため、患者 IgE 由来の単鎖 Fv 抗体ライブラリから、グルテンならびにグルパール 19S に対する特異抗体の単離を、バイオパンニングと次世代シーケンサーを組み合わせた方法により試みた結果、主としてグルテンに対する複数種の抗体ファージの取得に成功した。これらの大腸菌並びにグラム陽性菌 *Brevibacillus brevis* による単鎖 Fv 抗体の発現を行い、抗原特異性、エピトープ解析を行った結果、これらの抗体のいくつかは、グルテンに対する結合活性を維持しながらも、抗体ファージでは見られなかったグルパールに対する結合活性を上昇させていた。これらの結果は、茶のしずく石鹼による小麦アレルギー患者由来の IgE 抗体クローンの中に、グルテンとグルパールに交差結合活性を示す抗体が存在することを明らかにしており、このような交差反応性を示す抗体による小麦アレルギー発症の機構が推定された。

#### [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、プロテアーゼを用いて分解した酵素加水分解グルテンの経皮感作性を検討した。その結果、0.5 時間加水分解物だけではなく、SDS-PAGE 上でグルテンの主要なバンドがほぼ消失した 12 時間酵素加水分解物でも強い経皮感作性が見られ、酸あるいはアルカリ加水分解物の場合とは残存する抗原性が異なることが示された。また、グルパール 19S と酸、アルカリ、酵素加水分解グルテンとの交差反応性について検討した結果、酸及び酵素加水分解グルテンはグルパール 19S との強い交差反応性を示すのに対し、アルカリ加水分解グルテンはほとんど交差反応性を示さなかったことから、含有されている加水分解産物の特性が大きく異なるものと考えられた。さらに、即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法を確立する場合に必要となる陽性対照タンパク質の候補として、卵白アルブミン (OVA) の経皮感作性について検討したところ、本実験系において OVA による経皮感作が進行し、その後の腹腔内投与によりアナフィラキシーが惹起されることが示された。今後、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とともに、即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法の確立を目指し、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

#### [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、平成 26 年度は、市販されている化粧品、医薬部外品の添加物として使用されている食品由来成分（たとえばコラーゲン、はちみつ、コチニール、米ぬかなど）が原因と

考えられる食物アレルギー発症事例に関する調査を実施した。アンケートは 4,104 名の医師に配布し、249 名から回答が得られ回収率は 6.1%であった。食品由来成分を添加している化粧品、医薬部外品について、原因が特定できているものとしては、コラーゲンが 2 件、キトサンで 1 件の発症例が確認された。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、国民へ直接、あるいは間接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

文献的調査によって、医薬部外品による接触皮膚炎やアレルギー症状などの健康被害の実態を明らかにすることを目的とした。方法：医薬部外品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調査した。内服薬は 2014 年、外用製品は 2013-2014 年の文献を調査し、昨年度までの報告に追加した。結果：内服薬による副作用報告は、2014 年に本邦の文献ではトラネキサム酸による 1 例、海外では acetaminophen による 2 例の薬疹の報告を認めた。2004 年-2014 年には海外での acetaminophen による 3 例のアナフィラキシーやリン酸リボフラビンナトリウム(ビタミン B2)による 1 例のアナフィラキシーショックの報告を認めた。また漢方に用いられる生薬による薬疹や甘草によるアナフィラキシーの報告を認めた。外用製品では、2013-2014 年に本邦で新たに rhododendrol による脱色素斑の報告を 39 例認

め、海外では、methylisothiazolinone による接触性皮膚炎の報告が 26149 例と増加していた。

2007-2014 年には、本邦での外用製品では、加水分解小麦含有石鹼による蕁麻疹やアナフィラキシーの報告が 114 例と最も多く認められた。考察：一般的に安全と捉えられやすい医薬部外品によるアナフィラキシーや接触皮膚炎の報告例があることが判明した。医薬部外品に関する注意事項については、医療関係者だけでなく、薬局や理美容師、一般消費者に対しても周知していく必要がある。

#### [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

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コムギ(グルパール 19S®, GP19S)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。

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。石鹼使用中止後 5 年を経過しても、略治に至っていないものの割合は 50%を超えていた。略治の予測因子として、初診時に小麦アレルギー症状として呼吸器症状を有していないこと、初診時年齢が 40 歳未満、初診時のグルテンやグルパール 19S に対する特異的 IgE 抗体価が低いことが挙げられた。

特異的 IgE 抗体価の経年変化も評価した。概ね石鹼使用後の経過日数が長くなるにつれて抗体価は低下してゆく傾向にあったが、観察期間終了時に略治していない症例(難治例)は抗体

価の低下が略治症例（改善例）に比べて緩徐である可能性も示された。

#### [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

近年、加水分解コムギ、グルパール 19S を含有した石鹸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。平成 26 年度も GP19S 経皮感作コムギアレルギーについて全国追跡調査を継続したが、2014 年後半に、症例の新たな登録はなくなり 2014 年 10 月に登録を終了とした。その結果、确实症例数は 2,111 例であった。継続調査している症例の GP19S に対する特異的 IgE 抗体価も減少していた。藤田保健衛生大学で経験した 53 例の症例について詳細を検討した結果、ELISA 法による GP19S 抗体価とプリックテスト最低惹起濃度は有意な負の相関を示した。そして、ELISA 法による GP19S 抗体価は重症度と有意な相関を示した。

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。化粧品に含まれるタンパク質成分で、経皮感作食物アレルギーの原因として疫学調査で症例数の多かったコチニール色素の抗原について検討した。疫学調査で収集した症例を中心に 7 例を対象に、コチニール原虫より蛋白質を抽出、2 次元電気泳動法で分離し、Western Blot 法で血清中 IgE 抗体と反応する蛋白質を特

定(2D-WB 法)した。その蛋白質を質量分析により解析した。その結果、比較的共通したものは CC38K であったが、他の蛋白質にのみ反応する症例もあった。本疾患の抗原は虫由来の蛋白質と考えられた。CC38K だけで説明できない症例もあるが 2D-WB 法であれば検査可能と考えられた。さらに、加水分解コムギ末以外の化粧品に含まれるタンパク質について経皮感作食物アレルギーを発生した症例を継続調査した。原因タンパク質としてエステティシャンとして施術に使用していた全身ローションに含まれた大豆成分が確認された。

#### [VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

昨年度、加水分解コムギ末の規格を質量分子量 10000 以下の割合が一定量以上のものとし、サイズ排除クロマトグラフィーによって確認する試験法案を策定した。今年度はまず、本試験がタンパク質専用でなく化学物質用 HPLC で実施可能かどうか、試験法開発機関以外でも実施可能かどうか検討した。その結果、試薬の規格や名称等の修正が指摘されたものの、おおむね提案試験法は妥当と評価された。しかしながら試料溶液の溶媒由来のピークがクロマトグラム形状と分布量分布率に影響を及ぼすことがわかったため、試料溶液の調製法について再検討し、改定案ではクロマトグラムへの影響をなくすることができた。種々の加水分解コムギ末及び加水分解コムギたん白液を試験した結果、動物試験でアレルギー性が疑われた原料以外はいずれも当初の分子量分布の規格値以上の値を示した。欧米では平均分子量や最大分子量を制限する意見が出されており、現状の原料の試験結果を踏まえ、安全側に立って分子量分布の規格値を変更することを提案した。本規格

の導入は、加水分解コムギ末の安全性確保のため有用と考える。

## 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

グルパール 19S に特徴的に認められるペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロッティング及び阻害 ELISA によりその特異性・交差性を評価し、抗原性を示す加水分解コムギをスクリーニングする際に有用であることを明らかにした。また、酵素加水分解による HWP は酸及びアルカリ加水分解による HWP と比較して、分解反応が特異的かつ速やかで、加水分解の進行に伴う低分子化、脱アミド化の程度が低いことが明らかになった。さらに、グルパール 19S 患者血清中 IgE は、酸加水分解による HWP の高分子領域にのみ結合し、アルカリ及び酵素加水分解による HWP には結合しないことが明らかになった。

### [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 抗体ライブラリーを使ったバイオパンニングと次世代シーケンサーによる網羅的解析手法を使って、茶のしづく石鹼による小麦アレルギーの原因となる IgE 由来の単鎖 Fv 抗体の単離に成功した。得られた抗体クローンの特徴は、グルパールとグルテン双方に交差結合活性を示すものであり、このことから、グルパールによって誘発された IgE 抗体が、小麦アレルギーを引き起こす機構が推定された。

### [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、酵素加水分解グルテンの経皮感作性を検討した。その結果、0.5 時間加水分解物だけではなく、12 時間酵素加水分解物でも強い経皮感作性が見られた。また、グルパール 19S と酸、アルカリ、酵素加水分解グルテンとの交差反応性について検討した結果、酸及び酵素による 0.5 時間加水分解グルテンはグルパール 19S との強い交差反応性を示すのに対し、0.5 時間アルカリ加水分解グルテンはほとんど交差反応性を示さなかった。さらに、マウス経皮感作試験の陽性タンパク質の候補として、卵白アルブミン(OVA)が有用であることが示され、本試験法の即時型アレルギー誘発につながる経皮感作性試験法としての有用性が示された。

### [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

・食品由来の成分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、コラーゲン、キトサンの 3 例が確認された。症状として、アナフィラキシーなどが回答として得られており、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国民へ直接、あるいは間接的に、かつ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

医薬部外品に対する文献的調査を行うこと



によって、一般的に安全と考えられている医薬部外品によるアナフィラキシーや接触皮膚炎の報告例があることが判明した。

周知が望まれる事項については、医療関係者だけでなく、薬局や理美容師、一般消費者に対しても広く注意喚起をしていく必要がある。

#### [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

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える。

#### [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 (GP19S) による即時型コムギアレルギーは全国で 2014 年 10 月までに、2111 例の登録があったが、GP19S による即時型コムギアレルギーは原因抗原の接触回避により、回復していることが示された。また、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から、GP19S 以外のタンパク質成分による経皮感作食物アレルギーの症例は多くはないと推測された。さらに、経皮感作食物アレルギーの症例の診断には

ブリックテスト、ELISA 法、二次元電気泳動及びウェスタンブロット (2D-WB) 法が有用であることが示された。

今後も、食品成分を化粧品に使用する場合のリスク評価、安全性評価の方法をさらに研究し、再度、GP19S による即時型コムギアレルギーのような多数例の健康被害を出してはならないと思われる。

#### [VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

加水分解コムギ末の分子量分布を測定するためのサイズ排除クロマトグラフィーを評価した。本試験はタンパク質専用でなくとも化学物質用 HPLC で実施可能であり、複数機関で妥当性が確認された。試料溶液の溶媒組成がクロマトグラムと分布量分布比率に影響を及ぼす現象が認められたことから、試料溶液の調製法について検討した。改定案を用いて種々の加水分解コムギ末原料を試験した結果、これまでどおり分子量 10,000 以下の分子量の比率を定めることによって、アレルギー性に対する安全性が確保されると考えられた。欧米では試験法は不明であるが平均分子量やより低分子量にする意見を示しており、今後これらとの同等性について確認する必要がある。

#### 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

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
「医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究」  
分担研究報告書(平成26年度)

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、アレルギーを引き起こす可能性が指摘されている。本研究では、医薬部外品原料の安全性確保を目的とし、医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究を行った。今年度は、(1)経皮感作性を有する加水分解コムギ(HWP)のスクリーニング用抗体を作製し、その有用性を評価した。また、(2)酵素加水分解による HWP を調製し、それらの分子プロファイリングを行い、酸及びアルカリ加水分解による HWP との比較を行った。更に、(3)グルパール 19S 患者血清と各種 HWP との応答性(交差反応性)を評価した。

(1)では、グルパール 19S に特徴的に認められるペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロットイング及び阻害 ELISA によりその特異性・交差性を評価し、抗原性を示す加水分解コムギをスクリーニングする際に有用であることを明らかにした。(2)では、酵素加水分解による HWP は酸及びアルカリ加水分解による HWP と比較して、分解反応が特異的かつ速やかで、加水分解の進行に伴う低分子化、脱アミド化の程度が低いことを明らかにした。(3)では、グルパール 19S 患者血清中 IgE は、酸加水分解による HWP の高分子領域にのみ結合し、アルカリ及び酵素加水分解による HWP には結合しないことを明らかにした。

協力研究者

安達玲子 国立医薬品食品衛生研究所  
生化学部 室長  
酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所  
生化学部 主任研究官  
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  
福富友馬 (独)国立病院機構相模原病院  
臨床研究センター 室長  
佐々木和実 (独)製品評価技術基盤機構  
バイオ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  
バイオテクノロジーセンター 主査  
安宅花子 (独)製品評価技術基盤機構  
バイオテクノロジーセンター 主任

A. 研究目的

近年、加水分解コムギ(HWP)を含有する医薬部外品・化粧品の長期使用において、小麦含有製品を摂取後に運動して全身性のアレルギーである「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、本研究課題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 に特徴的にみられ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、(1) 経皮感作性を有する HWP のスクリーニング用抗体を作製し、その有用性を評価した。また、(2) 酵素加水分解による HWP を調製し、それらの分子プロファイリングを行い、酸及びアルカリ加水分解による HWP との比較を行った。更に、(3) グルパール 19S 患者血清中 IgE と各種 HWP との応答性(交差反応性)をウェスタンブロッティングと EXiLE(IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression)法により評価した。

## B. 研究方法

### 各種 HWP 試料の調製

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)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。

酸加水分解は、グルテンのストック懸濁液に、pH<2 となるように 1MHCl を加え、100°Cのヒートブロック上で加熱した。アルカリ加水分解は、グルテンのストック懸濁液に、pH > 13 となるように 1MNaOH 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。酵素加水分解は、グルテンのストック懸濁液を 1M HCl で中和した後、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来の中性プロテアーゼである Neutralse®(Novozymes, 8mU/g)を基質の 1/100 容量を加え、50°Cのヒートブロック上で加熱した。酵素加水分解は、0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間加熱した後、95°C、10 分間の加熱により酵素を失活させて加水分解を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL の酵素加水分解物を調製した。分解 0 時間のサンプルは、Neutralse を加えた後、直ちに 95°C、10 分間の加熱により酵素を失活させた。Neutralse は、ランダムな切断によりタンパク

質を低分子化する目的で工業的に多く用いられている酵素の一つである。

### (1) 経皮作性を有する HWP のスクリーニング用抗体の作製

#### グルパール 19S に特徴的なペプチドの同定

ショットガンプロテオミクスにより取得したペプチドの MS データを多変量解析により比較し、グルパール 19S にのみ特徴的に検出されるペプチドの同定を行った。実験方法の詳細は本研究課題平成 24 年度総括・分担研究報告書に記載されたとおりである。

#### ポリクローナル抗体の作製

ニュージーランドホワイトラビットに抗原を完全フロイントアジュバントと共に 6 回免疫した後全血を採取し、IgG 精製してポリクローナル抗体を作製した。抗体の特異性及び交差性は、ウェスタンブロッティング及び阻害 ELISA により確認した。

#### ウェスタンブロッティング

酸加水分解による HWP (0-24h 分解物)について、作製したポリクローナル抗体によるウェスタンブロッティングを行った。ポジティブコントロールにはグルテン及びグルパール 19S を用いた。

### (2) 酵素加水分解による HWP の分子プロファイリング

#### 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、コロイダル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、酸加水分解による HWP (0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h)、アルカリ加水分解による HWP (0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h)及び酵素加水分解による HWP (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 もしくは GE Superdex 200 increase 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

定量的プロテオーム解析法を用いた脱アミド化分析

酸加水分解、アルカリ加水分解及び酵素加水分解による HWP の 0, 0.5, 1, 9, 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  $\mu$ L 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。

**(3) グルパール 19S 患者血清と各種 HWP との応答性の評価**

茶のしずく石鹼の患者血清

茶のしずく石鹼の患者血清は、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。血清の採取及び研究用試料としての使用に関しては、同病院及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 1 に示す。

ウェスタンブロッティング

酸加水分解、アルカリ加水分解、及び酵素加水分解による HWP について、茶のしずく石鹼患者血清を 1 次抗体としたウェスタンブロッティングを行った。ポジティブコントロールとしてはグル



パール 19S を用いた。

### 培養細胞

ラット培養マスト細胞株 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%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中で維持した。

### 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  $1.0 \times 10^6$  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  $5 \times 10^4$  cells/50  $\mu\text{L}/\text{well}$  播種し、37°C の 5%  $\text{CO}_2$  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、ただちに培地で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。

### 統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、IBM SPSS Statistics ソフトウェアを用いて、各 HWP 0h 分解物の応答を基準とした Dunnett の検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。なお、図中には \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  で有意差の程度を示した。

## C. 研究結果

### (1) 経皮感作性を有する HWP のスクリーニング用抗体の作製

経皮感作性を有する HWP を認識する抗体を作

製することを目的とし、グルパール 19S に対する抗体の作製を試みた。ニュージーランドホワイトラビットに、グルパール 19S を完全フロイントアジュバントと共に 6 回免疫し、得た抗血清を IgG 分画化したポリクローナル抗体について、グルパール 19S を固相化した ELISA で検定したところ、良好な抗体価を得た。作製したポリクローナル抗体をウェスタンブロットティングで評価したところ、グルパール 19S に対する抗体はグルテンとの交差性を示し、その特異性が乏しいことが明らかになった(データ示さず)。

そこで、グルパール 19S にのみ特徴的に観察されるペプチドを同定し、そのアミノ酸配列を認識する抗体の作製に着手した。ショットガンプロテオミクスにより、グルパール 19S、グルテン、及び抗原性の減弱した酸加水分解による HWP(24h 分解物)の多変量解析を行い、Table 2 に示す 6 つのペプチドを同定した(平成 24 年度報告書)。これらの中で、ペプチドイオンの検出回数が最も高かった「QYEQQPVVPSK」は、高分子グルテニンサブユニットのアミノ酸 64-74 であり、グルパール 19S においては、下線を付した 2 箇所のグルタミン(Q)がグルタミン酸(E)に脱アミド化修飾されていた。そこで、この脱アミド化修飾部位を含む配列のうち、抗体価の上昇が期待される 10 アミノ酸を選定し、かつ、2 種の抗体の交差を避けるため、連続した 5 アミノ酸が一致しないように配列設計したペプチドを合成し、キャリアタンパク(KLH: スカシ貝ヘモシアニン)に結合させ免疫抗原として常法に従い抗体を作製した。以降、グルテン中に存在するネイティブ配列(RQYEQQPVVVC)に対する抗体を Q ペプチド抗体、グルパール 19S にのみ観察される脱アミド化配列(REYEQEPVVVC)に対する抗体を E ペプチド抗体と略す。

Figure 1 には、Q ペプチド抗体及び E ペプチド抗体の抗体価の検定結果を示す。免疫抗原のペプチドを固相化した ELISA で評価した結果、Q ペプチド抗体及び E ペプチド抗体ともに良好な抗体価を得た。次に、ELISA の固相化抗原を置換させた

ところ、両者は交差性を示すものの、Q ペプチド抗体の抗体価は顕著に低下(26,394→3,336)し、その特異性が高いことが示唆された。他方、E ペプチド抗体においては抗体価の低下は弱く(11,875→7,595)、Q ペプチド抗体と比較して、その特異性が低いことが示唆された。

更に、グルテン及びグルパール 19S を固相化した ELISA に、阻害剤として Q ペプチド及び E ペプチドを用いて 2 種の抗体の特異性の検定を行った。結果を Figure 2 に示す。

阻害剤を添加しない状態(inhibitor: 0 ng/mL)において、Q ペプチド抗体はグルテンに対して結合を示したが、グルパール 19S への結合能は相対的に弱く、阻害剤の濃度を上げて阻害がかからなかった。他方、E ペプチド抗体は、阻害剤を添加しない状態(inhibitor: 0 ng/mL)において、グルテンにもグルパール 19S にも同等の結合能を示し、いずれのパターンにおいても濃度依存的な阻害がかかることが明らかになった。

阻害剤の差異による結合能の比較において、グルテン固相 ELISA では、Q ペプチド抗体は E ペプチドでは阻害がかかりにくい(IC<sub>50</sub>: >10<sup>6</sup> ng/mL)ものの、免疫抗原である Q ペプチドにおいては濃度依存的な阻害が認められた(IC<sub>50</sub>: 697 ng/mL)。他方、E ペプチド抗体は、グルテン固相 ELISA とグルパール 19S 固相 ELISA の両方で、免疫抗原である E ペプチドで同等の阻害が認められた(グルテン固相 ELISA の IC<sub>50</sub>: 127 ng/mL、グルパール 19S 固相 ELISA の IC<sub>50</sub>: 143 ng/mL)。

また、固相化抗原の差異による結合能の比較において、E ペプチド抗体は、グルテンにもグルパール 19S にも、同等の阻害がかかることから、E ペプチド抗体を用いてグルテンとグルパール 19S とを識別することが難しいことが示唆された。

2 種の抗体についてウェスタンブロッティングを行った結果、上述の検定結果を裏付けるように、Q ペプチド抗体は、グルテンに結合するが、グルパール 19S 及び経皮感作性を有する加水分解コムギ(0.5-1h 加水分解物)には結合しないこと、他方、E ペプチド抗体は、グルテン、グルパール 19S の

両方に結合し、更に経皮感作性を有する加水分解コムギにも結合し、経皮感作性の減弱した 3h 以降の加水分解コムギには結合しないことが明らかになった (Figure 3)。

## (2) 酵素加水分解による HWP の分子プロファイリング

### SDS-PAGE 分析

酸加水分解、アルカリ加水分解、及び酵素加水分解による HWP の SDS-PAGE パターンを Figure 4 に示す。酸加水分解及びアルカリ加水分解による HWP が全体的にスミアなバンドを呈したのに対し、酵素加水分解による HWP では全ての試料において 50 kDa 以下の低分子領域に明瞭なバンドが観察された。バンドのパターンは、0-0.5h で大きく変化したが、それ以降の変化は少なかった。酵素加水分解では反応開始後、すぐに切断部位特異的な分解が始まり、その反応速度は非常に速やかに分解 1h 後にはほぼ終了した。

### SEC 分析

酸加水分解、アルカリ加水分解、及び酵素加水分解による HWP のサイズ排除クロマトグラムを Figure 5 に示す。

酵素加水分解による HWP においては、グルパール 19S や酸加水分解による HWP に特徴的にみられる Thyroglobulin の分子量 669,000 以上を頂点とする鋭いピークは観察されず、凝集体の形成は生じてないと考えられた。また、酵素加水分解による HWP は、0.5h 分解物において分子量約 20,000 と約 10,000 の 2 つの溶出ピークを形成した。2 つのピークのうち、分子量約 20,000 のピークは 0.5-24h においても継続的に維持されており、酵素加水分解では切断部分に特異性があると考えられた。一方、分子量約 10,000 のピークは、0.5-6h において分子量約 7,000 まで低分子側へ移動した。また、酵素加水分解による HWP は、0.5h 分解物において分子量約 40,000 以上がほぼベースラインまで下がり、酵素加水分解の速度は、平成 25 年度に実施したアルカリ加水分解より速いと推測

された。平成 25 年度に実施したアルカリ加水分解は、酸加水分解より分解が速いと推測されるため、酵素加水分解の反応速度が、試験を実施した中で最も速いと考えられた。

### 定量的プロテオーム解析法を用いた脱アミド化分析

酸加水分解、アルカリ加水分解、及び酵素加水分解による HWP における検出ペプチド中の総グルタミン数に対する脱アミド化されたグルタミン数の割合を脱アミド化率として Figure 6 に示す。

酵素加水分解による HWP の脱アミド化率は、全ての試料で約 20%と一定であった。この値は原料グルテンと同等であることから、酵素加水分解では酸加水分解及びアルカリ加水分解とは異なり、分子中グルタミンの脱アミド化修飾は生じていないと考えられた。

### **(3) グルパール 19S 患者血清と各種 HWP との応答性の評価**

#### ウェスタンブロッティングによる応答性

Figure 7 には、酸加水分解、アルカリ加水分解、及び酵素加水分解による HWP に対する茶のしずく石鹸患者血清を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。

P1-P3 の全ての患者血清において、酸加水分解による HWP の 0.5-1h 分解物に IgE が結合した。この 40-70 kDa を中心とするタンパク質は、グルパール 19S のスメアなバンドと同様の結合パターンであった。他方、アルカリ加水分解及び酵素加水分解による HWP と患者血清中の IgE は、明確な結合が認められなかった。

#### EXiLE 法による応答性

Figure 8 には、茶のしずく石鹸患者血清を用いた各種 HWP の EXiLE 応答パターンを示す。

まず、P1 の患者血清を用いて、グルパール 19S とグルテンの濃度依存的な応答を評価し、明確なルシフェラーゼ発現量が認められる抗原濃度を  $10^{-7}$  g/mL に決定した。

次に、P1-P3 の血清を用いて各種 HWP の応答性を測定したところ、全ての患者血清において、酸加水分解による HWP に IgE が強く反応した。酸加水分解による HWP の 0.5h 分解物において応答性が急激に上昇し、24h 分解物においてもカットオフレベル(抗原未刺激時の発光量の 2 倍値)以上のマスト細胞活性化を誘導する応答パターンは、これまでの報告と良く一致している。他方、アルカリ加水分解及び酵素加水分解による HWP に対しては、ポジティブコントロールとしてのグルパール 19S や酸加水分解による HWP と比較して、明確な応答性を示さなかった。

### **D. 考察**

#### **(1) 経皮感作性を有する HWP のスクリーニング用抗体の作製**

経皮感作性を有する HWP を認識する抗体を作製することを目的とし、グルパール 19S を免疫抗原としたポリクローナル抗体を作製したが、この抗体はグルテンとの交差性を示した。この結果は、グルパール 19S がグルテンの部分的な分解物であり、作製した抗体にはネイティブなグルテンのコンポーネントに対する抗体が混在している結果と考えられた。次に、グルパール 19S にのみ特徴的に観察されるペプチドを識別する 2 種の抗体を作製し、それら抗体の有用性を評価したところ、①Q ペプチド抗体は、グルテンに結合するが、グルパール 19S 及び経皮感作性を有する加水分解コムギには結合しないこと②E ペプチド抗体は、グルテン、グルパール 19S の両方に結合し、更に経皮感作性を有する酸加水分解による HWP(0.5-1h)にも結合し、経皮感作性の減弱した 3h 以降の加水分解コムギに対しては結合しないことが明らかになった (Figure 3)。本研究において作製した 2 種の抗体を、経皮感作性を有する加水分解コムギのスクリーニング分析に適用するためには、「E ペプチド抗体に結合するが Q ペプチド抗体には結合しない」という分析法を構築する必要がある。これには、E ペプチド抗体を用いて免疫沈降した後 Q ペプチド抗体を用いて判別する共免疫沈

降法や、Q ペプチド抗体結合担体の素通り画分を E ペプチド抗体で検出するアフィニティークロマトグラフィー等に応用することが可能であると考えられた。

## (2) 酵素加水分解による HWP の分子プロファイリング

酸加水分解、アルカリ加水分解、及び酵素加水分解による HWP の合計 24 試料について、SDS-PAGE と SEC により分子量のプロファイル分析を行った。平成 25 年度までに報告した酸加水分解及びアルカリ加水分解による HWP が全体的にスミアなバンドを呈したのに対し、本年度新たに調製した酵素加水分解による HWP は、SDS-PAGE において全ての分解物(0-24h)の低分子領域に明瞭なバンドが観察された (Figure 4)。また、酵素加水分解による HWP は、SEC 分析においても酸加水分解及びアルカリ加水分解による HWP のブロードな溶出パターンとは大きく異なり、分子量約 20,000 と約 10,000 の 2 つの溶出ピークを形成した (Figure 5)。Neutrane はエンド型プロテアーゼで、ランダムな切断によりタンパク質を低分子化する目的で工業的に利用されることが知られる。小麦グルテンの加水分解において Neutrane は、反応開始後すぐに切断部位特異的な分解が始まり、その反応速度は非常に速やかで、反応開始 1h 以降は経時的なパターンの変化は示されず、加水分解は概ね終了した。また、定量的プロテオーム解析法を用いた脱アミド化修飾の分析においても、酸加水分解及びアルカリ加水分解による HWP は、加水分解の進行に伴うグルタミンの脱アミド化修飾が認められたのに対し、酵素加水分解による HWP は、分子中グルタミンの脱アミド化修飾は全く生じていなかった。

平成 24 年及び平成 25 年度の研究成果として、加水分解コムギの抗原性(経皮感作性・惹起能)に関しては、「分子量」と「脱アミド化修飾によるネオエピトープ形成」が重要であることが明らかになってきた。酵素加水分解による HWP は、脱アミド化修飾を生じないが、高分子のタンパク質が

残存している。医薬部外品原料の加水分解コムギ末に関しても、酵素分解物が市場に多く流通していることから、それらの経皮感作性についても詳細な検討を行うことが重要であると考えられ、本研究課題の分担研究の一つである「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」において実施した。

## (3) グルパール 19S 患者血清と各種 HWP との応答性の評価

酸加水分解、アルカリ加水分解、及び酵素加水分解により調製した HWP に対する茶のしずく石鹼患者血清の応答性について、ウェスタンブロットティングと EXiLE 法により評価した。

P1-P3 の全ての患者血清中の IgE は、グルパール 19S と同様に、酸加水分解による HWP の 0.5-1h 分解物の 40-70 kDa を中心とするタンパク質に強く結合した。他方、アルカリ加水分解及び酵素加水分解による HWP に対しては、患者血清中の IgE は、明確な結合が認められなかった (Figure 7)。これらの結果から、グルパール 19S で感作され、コムギアレルギーを発症した患者の IgE 抗体が認識するエピトープは、酸加水分解による HWP の調製過程で分子中に特異的に生成されるものであり、アルカリ加水分解及び酵素加水分解による HWP の分子中には生じていないと考えられる。また、EXiLE 法により、グルパール 19S で感作された患者血清中 IgE の交差性を評価したところ、全ての患者において、酸加水分解による HWP に対しては強く応答したが、アルカリ加水分解及び酵素加水分解による HWP に対しては、ポジティブコントロールとしてのグルパール 19S や酸加水分解による HWP と比較して、明確な応答性を示さなかった (Figure 8)。①未分解グルテン(0h)と比較して、酸加水分解による HWP (0.5-1 h)の応答性が急激に増大する。②アルカリ加水分解及び酵素加水分解による HWP は、茶のしずく石鹼患者血清中 IgE と交差しないという結果は、ウェスタンブロットティングと EXiLE 法で良く一致した。



ある特定の加水分解による HWP で感作された個体が、別の加水分解方法によって調製された HWP を抗原として認識するかどうかに関しては未だ明らかにされていない。今後、*in vitro* における経皮感作性試験等の研究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更に集積していくことが重要であると考えられた。

## E. 結論

(1) グルパール 19S に特徴的に認められるペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロットティング及び阻害 ELISA によりその特異性・交差性を評価し、抗原性を示す加水分解コムギをスクリーニングする際に有用であることを明らかにした。

(2) 酵素加水分解による HWP は酸及びアルカリ加水分解による HWP と比較して、分解反応が特異的かつ速やかで、加水分解の進行に伴う低分子化、脱アミド化の程度が低いことが明らかになった。

(3) グルパール 19S 患者血清中 IgE は、酸加水分解による HWP の高分子領域にのみ結合し、アルカリ及び酵素加水分解による HWP には結合しないことが明らかになった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sakai S, Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Teshima R. Allergy of Hydrolyzed Wheat Protein via Cutaneous Sensitization. *Kagaku To Seibutsu*, 2014;52:431-437.

2) Sakai S, Adachi R, Nakamura R, Kikuchi H, Watanabe T, Sasaki K, Nishijima K, Ataku H, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Molecular Profile Analysis of Allergenic Hydrolyzed Wheat Protein. *Clinical Immunology & Allergy*, 2014;62:492-495.

3) 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.*, 63, 243-249 (2014)

4) 手島玲子：環境物質と免疫毒性、国立医薬品食品衛生研究所報告第 132 号, 47-56 (2014)

5) 手島玲子：経皮感作のメカニズムと食物惹起のクロストーク、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌 8(4), 249-254 (2014)

### 2. 学会発表

1) 酒井信夫, 安達玲子, 木村美恵, 菊地博之, 渡邊敬浩, 佐々木和実, 西嶋桂子, 安宅花子, 福富友馬, 最上知子, 手島玲子. 抗原性を呈する加水分解コムギの分子プロファイリング. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2014. 5)

2) 酒井信夫, 安達玲子, 最上知子, 手島玲子. 経皮感作性を有する加水分解コムギのスクリーニング用抗体について. 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会 (2014.5)

3) Sakai S, Nakamura R, Adachi R, Fukutomi Y, Saito Y, Mogami T, Teshima R. Experimental Assessments of the Cross-reactivity of IgE from Patients Sensitized with Acid-Hydrolysed Wheat Protein in a Cosmetic Soap. *Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2014* (2014.10).

4) 手島玲子：食品の安全と評価科学，第 20 回日本食品化学学会学術大会 (2014.5)

5) 手島玲子：食物アレルギー管理「管理に結びつく基礎的情報」日本アレルギー学会第 1 回総合アレルギー講習会(2014.12)

## 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

Table 1 茶のしずく石鹸患者血清のプロファイル

	Age	Gender	Total IgE (IU/mL)	Wheat-specific IgE (U <sub>A</sub> /mL)	Gluten-specific IgE (U <sub>A</sub> /mL)	ω-5 Gliadin-specific IgE (U <sub>A</sub> /mL)
<i>P1</i>	41	F	285	21.8	36.2	7.01
<i>P2</i>	42	F	4050	23.4	31.4	2.06
<i>P3</i>	45	F	3170	14.6	24.2	<0.35
<i>NC</i>	-	-	99	-	-	-

*P1-3*; subjects with GIp19S-induced wheat allergy. *NC*: serum from nonatopic healthy subject as a negative control.

Table 2 グルパール19Sに特徴的に観察されるペプチド

No.	<i>m/z</i> (Da)	Normalized abundance			Identification method	Sequence	Description (Accession)
		GIp19S	Gluten	HWP24h			
1	652.82	50,890	191	297	MS/MS ion search	<b>Q</b> YEQ <b>Q</b> PVVPSK	high molecular weight glutenin subunit [ <i>Triticum aestivum</i> ] (gi: 162415987)
2	500.76	37,989	9	309	<i>de novo</i> sequencing	TMYKP <b>V</b> VY	NADP-dependent malic enzyme 1 [ <i>Triticum aestivum</i> ] (ABY25986.1) 638 MYTPV 642 192 PVVY 195
3	486.30	32,003	176	134	MS/MS ion search	LVA <b>V</b> S <b>Q</b> VVR	high molecular weight glutenin subunit y [ <i>Triticum aestivum</i> ] (gi: 14329763)
4	763.80	27,374	120	194	MS/MS ion search	<b>G</b> GC <b>Q</b> ELLG <b>E</b> CCSR	Puroindoline-A OS= <i>Triticum aestivum</i> GN=PINA PE=1 SV=2 - [PUIA_WHEAT] (P33432)
5	513.80	5,804	2	0	MS/MS ion search	NLAL <b>Q</b> TLPR NLAL <b>Q</b> TLPR	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT] (P04726)
6	446.25	2,964	0	0	<i>de novo</i> sequencing	Y <b>R</b> CY <b>A</b> FR	WIR1 [ <i>Triticum aestivum</i> ] (CAA61018.1) 70 YRCY 73 126 RCYAFR 131

アミノ酸修飾部位(**Q**, **N**: 脱アミド化, **C**: カルバミドメチル化)を太字で示す。  
Nakamura R., et al., *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **131**, 50-7 (2013)

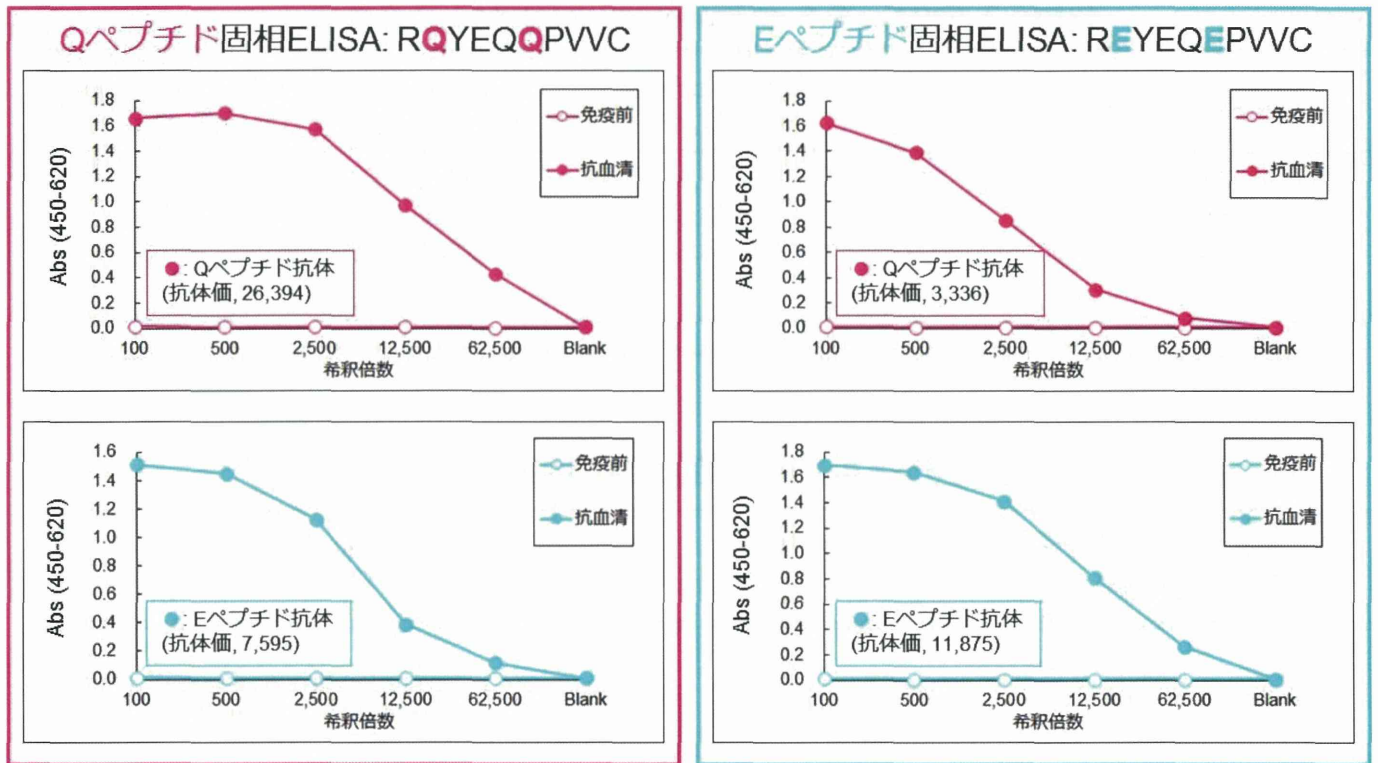


Figure 1 Qペプチド抗体及びEペプチド抗体の検定

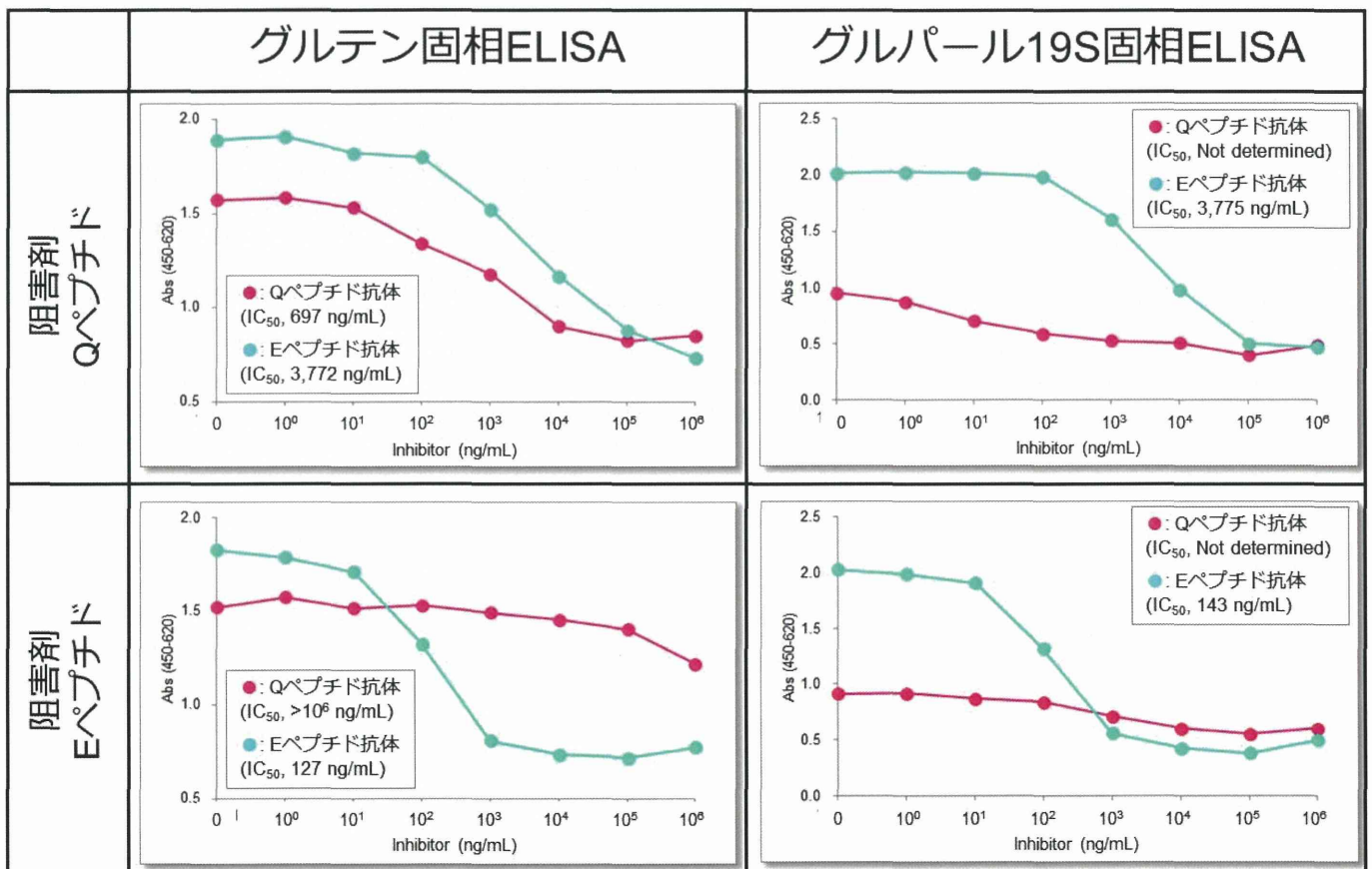
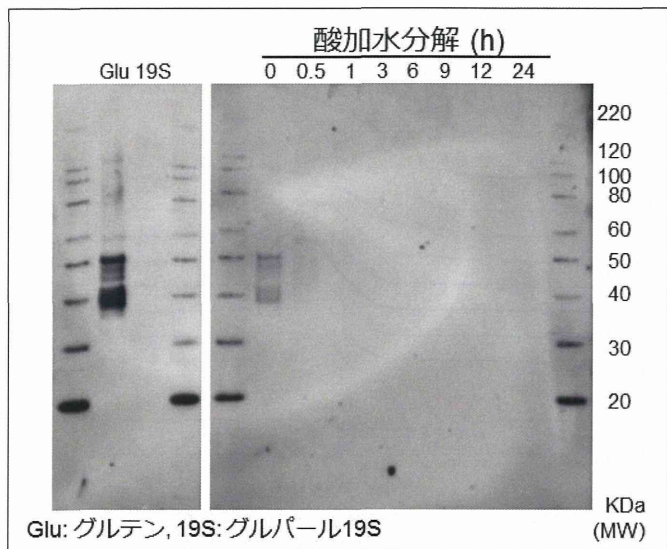
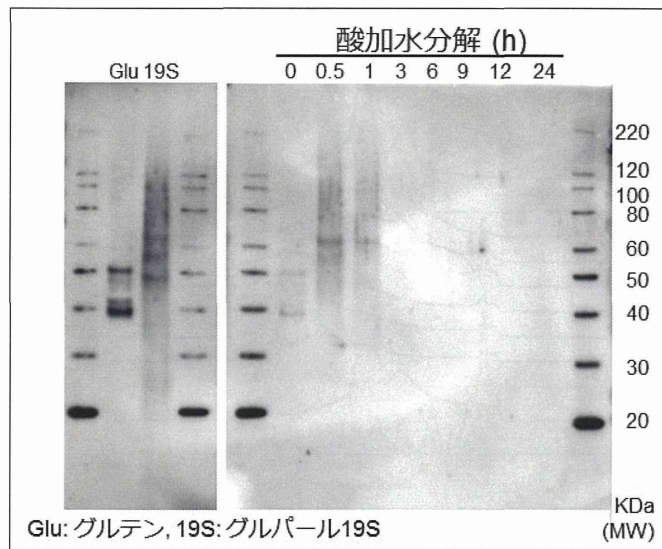


Figure 2 阻害ELISAによる特異性の検定



### Qペプチド抗体

1<sup>st</sup> Abs: 1 mg/mL IgG  
2<sup>nd</sup> Abs: anti-rabbit IgG-HRP



### Eペプチド抗体

1<sup>st</sup> Abs: 1 mg/mL IgG  
2<sup>nd</sup> Abs: anti-rabbit IgG-HRP

Figure 3 ウェスタンブロットティングによる評価

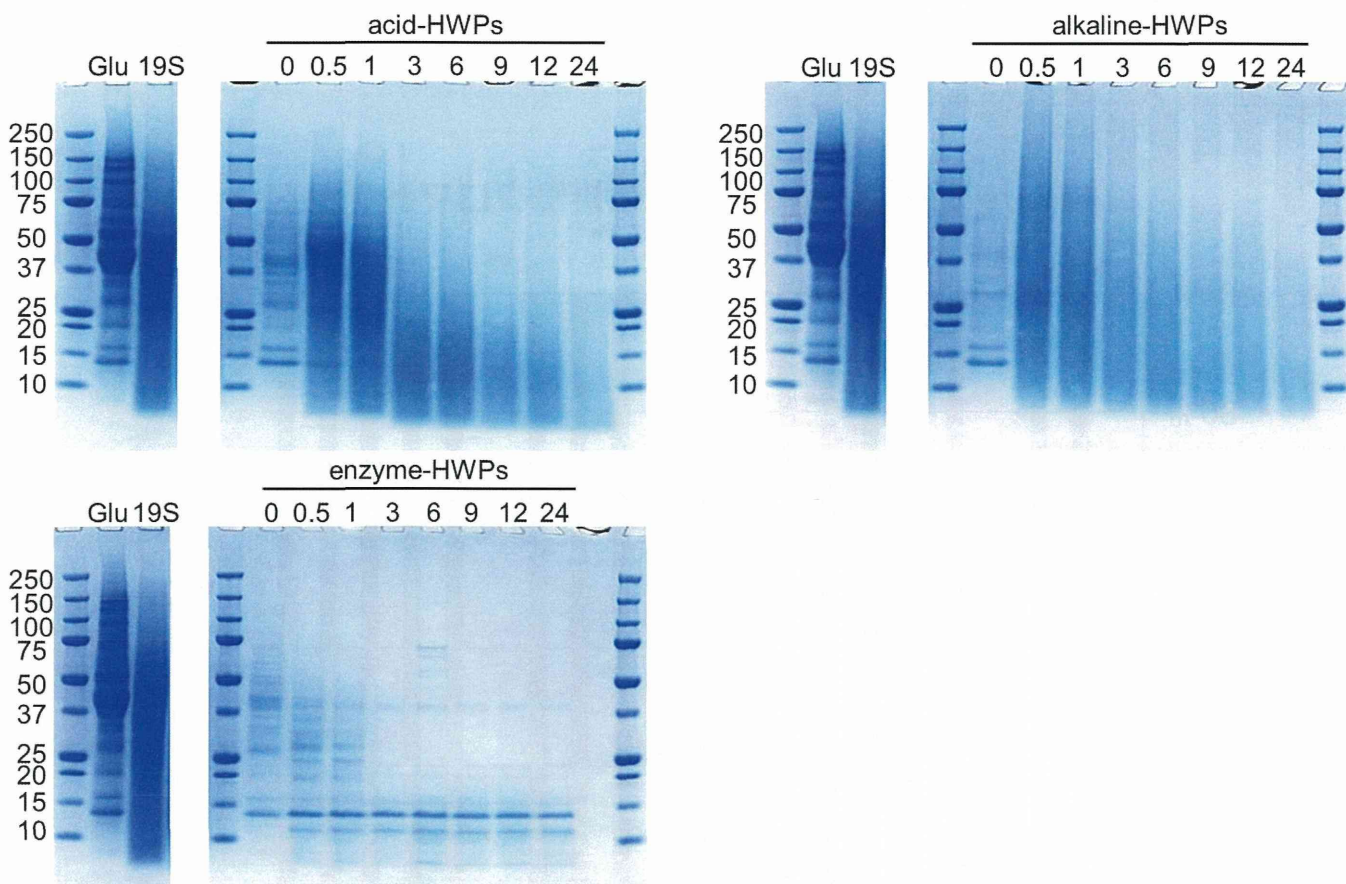


Figure 4 各種HWPsのSDS-PAGEパターン