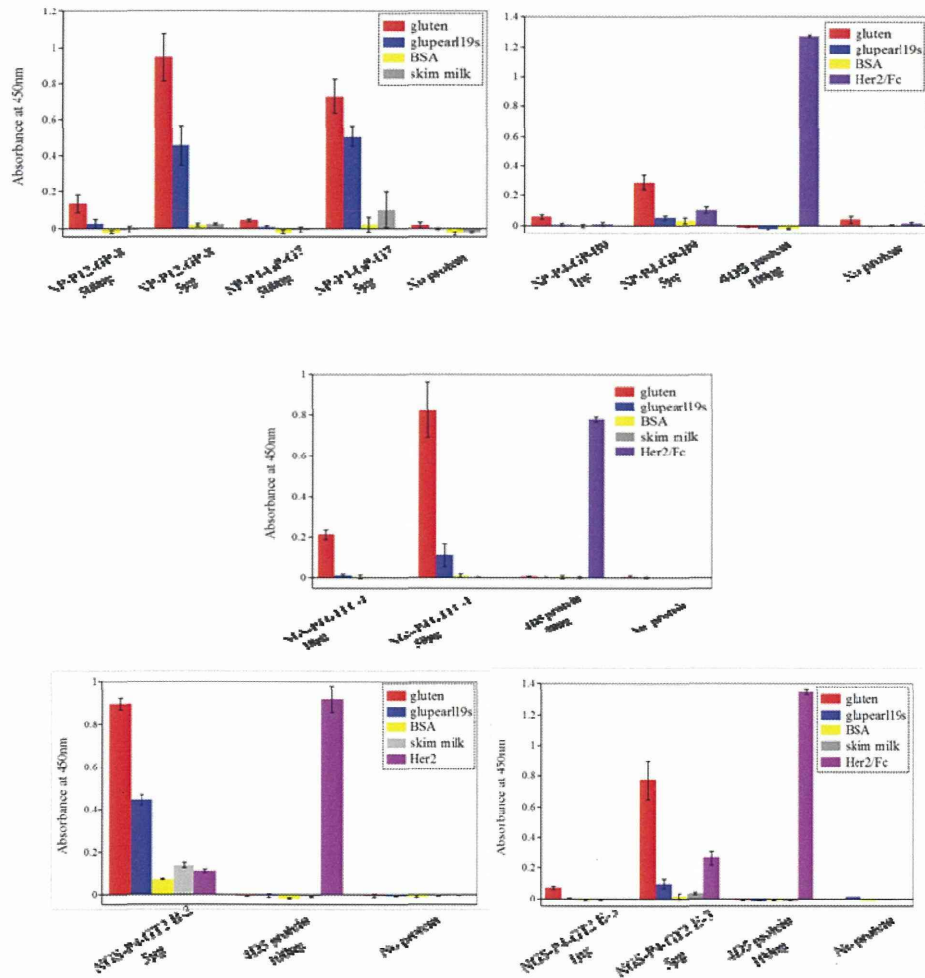


(A)



(B)

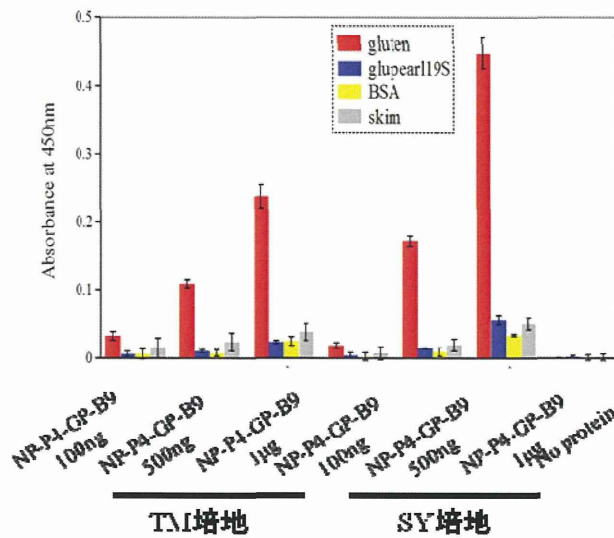


図10 図9で精製された患者P4, P12由来のIgE単鎖Fv抗体の結合特異性 (A)は大腸菌で発現されたもの(NP-P12-GP-8, NP-P4-GP-G7、NP-P4-GP-B9、NGS-P4-GT1-C、NGS-P4-GT2-B、NGS-P4-GT2-E)、(B)はBrevibacillus brevisで発現された単鎖Fv(NP-P4-GP-B9)の結合活性

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

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

研究要旨:

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な陽性対照タンパク質の候補として、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。

協力研究者

酒井信夫

(国立医薬品食品衛生研究所生化学部)

手島玲子

(国立医薬品食品衛生研究所食品部)

A. 研究目的

医薬部外品・化粧品の中には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、食品等に由来するタンパク質あるいはその分解物が配合されているものがある。薬事法上、医薬部外品等は人体に対する作用が緩和であり、その使用による健康被害が起きた場合でも、人体に対してそれ程重大な影響は与えないと考えられてきた。しかし最近、ある特定のコムギタンパク質加水分解物(グルパー

ル 19S) を含有する洗顔石鹸(茶のしずく石鹸: 医薬部外品) の使用により重篤なコムギアレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となった。この事例においては、洗顔の際に、経皮的あるいは経粘膜的(眼や鼻の粘膜を介する)に石鹸中のコムギタンパク質加水分解物が体内に吸収されて感作され、コムギを含有する食品を摂取した際にコムギに対する食物アレルギーの症状が現れたものと考えられている。本研究では、タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因がこの経皮感作性に与える影響について解析することを目的とし、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用いた検討を行っている。26 年度は、プロテアーゼにより分解を行った酵素加水分解グルテンの経皮感作性の検討、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の検討、及び、本研究において確立した経皮感作実験系を基にして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な陽性対照タンパク質の候補として、OVA の経皮感作性について検討した。

B. 研究方法

グルパール 19S 及び加水分解グルテンの懸濁液の調製

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) あるいはグルパール 19S の粉末を 100 mg/mL となるよう 1M Tris (pH 11.4) に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を作製した。経皮感作には、ストック懸濁液を PBS で 10 倍希釈し、pH を 8 付近に調整したものをを用いた。

酵素加水分解については、グルテンのストック懸濁液を中和後 PBS で希釈して 10 mg/mL としたものに、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来の加水分解酵素 (Neutrase、Sigma P1236) を添加し (最終濃度 80 μ U/mL)、50°C で 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間加熱した。所定の時間経過後、95°C で 10 分間加熱して酵素を失活させた。分解 0 時間のサンプルは、酵素を加えた後 50°C での加熱は行わず失活操作のみ行って調製した。SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した (Fig. 1A)。

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 で加熱した。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、同様に加熱した。0.5、1、3、6、9、12、24 時間加熱した後、中和して加水分解を停止させ、グルテン終濃度が 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。SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した (Fig. 1B、1C)。

マウスを用いた経皮感作実験

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌した。1 群の匹数は 5-7 匹とした。実験全体のスケジュールを Fig. 2 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間抗原懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」 (鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原懸濁液 (500 μ g protein) を浸潤させて貼付した。パッチの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4クールの感作後、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は、Day 25 に感作抗原 1 mg/100 μ L を腹腔内投与 (i. p.) して行った。i. p. 後 30 分間、マウスの直腸内体温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 1 の基準に従ってスコアリングした。惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit (SPI-BIO) にて測定した。

【実験 1】酵素加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

感作抗原及び惹起検体を Table 2 に示す。未分解グルテン (Enz 0hr)、分解は進行しているが主要なバンドは残存している 0.5 時間加水分解グルテン (Enz 0.5hr)、および加水分解が進み、SDS-PAGE で 30kDa 以上のタンパク質バンドがほぼ消失している 12 時間加水分解グルテン (Enz 12hr) を検体とした。これらの加水分解グルテンに SDS を終濃度 0.5% となるように添加し、貼付抗原とした。また、グルテン加水分解物を含まず酵素 (Neutrase) のみを含有するサンプルも調製し、同様に貼付抗原とした。

【実験 2】グルパール 19S と各種加水分解グルテ

ンとの交差反応性に関する検討

感作抗原及び惹起検体を Table 2 に示す。感作は V 群以外は全てグルパール 19S を用いて行った。SDS を終濃度 0.5% となるように添加し、貼付抗原とした。アレルギー反応の惹起には、グルパール 19S (19S 群) の他に、0.5 時間酸加水分解グルテン (19S-Acid 群)、0.5 時間アルカリ加水分解グルテン (19S-Alk 群)、0.5 時間酵素加水分解グルテン (19S-Enz 群)、及びグルテン (19S-Gluten 群) を用いた。それぞれの 0.5 時間加水分解グルテンは、分解は進んでいるが主要なタンパク質は残存し、グルパール 19S に類似した SDS-PAGE パターンを示す分解物である。

また、グルパール 19S 感作群については、血清中のペリオスチン濃度を ELISA (Mouse Periostin / OSF-2 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) により定量した。

【実験 3】卵白アルブミン (OVA) の経皮感作性に関する検討

感作抗原及び惹起検体を Table 2 に示す。OVA (Sigma A5503) は 100 mg/mL の PBS 溶液を調製し、ストック溶液とした。これを PBS で希釈し (10 mg/mL 及び 4 mg/mL、貼付時の感作抗原量としてそれぞれ 500 μ g 及び 200 μ g)、かつ SDS を添加したサンプル (終濃度 0.5%) としないサンプルを用意し、貼付抗原とした。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、V 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは Student の t 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。

(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行った。

C. 研究結果

【実験 1】酵素加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

酵素加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンを Fig. 1A に示す。本検討で用いた加水分解酵素 Neutralse は、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来のエンドプロテアーゼであり、食品加工等に汎用されている。海外におけるコムギタンパク質加水分解物に対するアレルギー発症事例に関する報告においても、コムギタンパク質の加水分解に用いられる酵素として名称が挙げられている。Fig. 1A に示すように、グルテンを酵素分解した場合、酸加水分解物であるグルパール 19S の泳動像 (広範囲のスミア状) とは異なり、それぞれのタンパク質のバンドとしての形状がほぼ保持されたまま、高分子側のタンパク質から徐々に分解されていることが示された。この SDS-PAGE パターンを基に、未分解グルテン (Enz0hr)、グルパール 19S と同様に 30-50kDa 程度のタンパク質が主になっている 0.5 時間分解物 (Enz0.5hr)、及び、ほぼ 30kDa 以下にまで分解されている 12 時間分解物 (Enz12hr) を検体とし、マウスに対する経皮感作性について検討した。なお、分解反応に用いた酵素はタンパク質量としては少量であると考えられ、Fig. 1A においてもタンパク質としてのバンドは確認できなかった (Enz のレーン、Neutralse の分子量は 55-60kDa 程度)。

Fig. 3-1 の A には血清中の抗原特異的 IgE、B には IgG1 の測定結果を示す。IgE については、19S 群、Enz0hr 群、Enz0.5hr 群、Gluten 群において V 群と比較して有意な増加が認められた (Enz12hr 群では若干の増加が見られた)。また IgG1 については、これら 4 群に加えて Enz12hr 群でも有意な増加が認められた。また、酵素加水分解物中の残存量と同量の Neutralse のみで感作を行った場合は、抗原特異的抗体産生は見られなかった (Enz only 群)。

Fig. 3-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応

の結果を示す。Aは惹起後30分間の直腸内体温の変化を示している。30分後、19S群では体温が大きく低下し(-2.7±0.8℃)、V群と比較して有意差が認められた。またGluten群でも有意な体温低下が見られた(-2.3±0.4℃)。Enz0.5hr群、Enz12hr群でも体温が低下し(-3.1±0.6℃、-1.8±0.8℃)、V群との間に有意差が認められた。一方、Enz0hr群では有意な体温低下は見られなかった。Enz only群では体温はほとんど低下しなかった。Bには惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。体温が大きく低下していた19S群、Enz0.5hr群、Enz12hr群、Gluten群では、血清中ヒスタミン濃度がV群と比較して有意に上昇していた。Enz0hr群ではやや上昇がみられたが、V群と比較して有意ではなかった。Enz only群ではヒスタミン濃度は全く上昇しなかった。Cは惹起後30分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果である。体温が大きく低下していた19S群、Enz0.5hr群、Enz12hr群、Gluten群では、それぞれ平均3.2、3.8、2.6、3.0と高いスコアであった。Enz0hr群では平均1.2と低いスコアであった。またEnz only群ではV群と同様にスコア0であった。

【実験2】グルパール19Sと各種加水分解グルテンとの交差反応性に関する検討

本実験では、V群を除く全ての群についてグルパール19Sを用いて経皮感作を行い、その後アナフィラキシー反応を惹起する際にグルパール19S以外のグルテン加水分解物(酸、アルカリ、酵素)、及び未分解グルテンを用いることにより、グルパール19Sと他の加水分解グルテンとの交差反応性を検討した。

Fig. 1B及びCには、酸及びアルカリ加水分解グルテンのSDS-PAGEパターンを示す。両パターンとも我々がこれまでに報告している泳動像と同様であり、0.5時間分解物がグルパール19Sに最も類似した広範囲のスミア状のパターンとなった。そこで、腹腔内投与には、酸、アルカリ、酵素による0.5時間加水分解グルテン、及び未分解グルテンを用いた。

Fig. 4-1のAには血清中の抗原特異的IgE、BにはIgG1の測定結果を示す。V群以外の全ての群でグルパール19Sに対する特異的IgE及びIgG1の有意な増加が認められた。

Fig. 4-2には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応の結果を示す。Aに示すように、惹起30分後、19S群では体温が大きく低下し(-3.8±0.5℃)、V群と比較して有意差が認められた。19S-Acid群、19S-Enz群、また19S-Glu群でも有意な体温低下が見られた(それぞれ-4.2±0.7℃、-3.1±0.7℃、-2.5±0.8℃)。一方19S-Alk群では体温はほとんど低下しなかった。Bには惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。体温が大きく低下していた19S及び19S-Acid群では血清中ヒスタミン濃度がV群と比較して有意に上昇していた。同じく体温低下が見られた19S-Enz群及び19S-Glu群でもやや上昇がみられたが、V群と比較して有意ではなかった。19S-Alk群ではヒスタミン濃度は全く上昇しなかった。Cは惹起後30分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果である。体温が大きく低下していた19S群、19S-Acid群、19S-Enz群、19S-Glu群では、それぞれ平均3.0、3.6、2.8、3.0と高いスコアであった。一方19S-Alk群では平均0.8と低いスコアであり、V群との間に有意差は見られなかった。

Fig. 4-3には、V群及び19S群の血清中ペリオスチンを定量した結果を示す。感作前(Day 0)、感作3週(Day 18)、感作4週(Day 23)、及び惹起後(Day 25)におけるペリオスチン濃度を比較したところ、V群では、感作期間から惹起後まで、ペリオスチン濃度に有意な変化は認められなかった。一方、19S群では最終的に感作終了後にはペリオスチン濃度が増大しており、Day 25ではDay 0の1.2倍、また、Day 25におけるV群の濃度の1.4倍であった。

【実験3】卵白アルブミン(OVA)の経皮感作性に関する検討

我々は、本研究において確立した経皮感作実験系を基に、平成24年度報告書において、即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法(概要)を提案

している。この試験法に使用可能な陽性対照タンパク質について検討するため、OVA の経皮感作性について解析した。グルパール 19S 及び加水分解グルテンによる経皮感作実験では、これらの抗原の溶解性を高めるため 0.5% SDS を添加していたが、OVA は水溶性タンパク質であるため、貼付時に 0.5% SDS を添加する群と添加しない群を設定し (Table 2)、実験を行った。

Fig. 5-1 の A には血清中の抗原特異的 IgE、B には IgG1 の測定結果を示す。IgE については、19S 群及び OVA200 群において、V 群と比較して有意な増加が認められた。OVA500S 群及び OVA500 群でもやや増加が見られたが、V 群との間に有意差は見られなかった。IgG1 については、19S 群、OVA500 群、OVA200 群において抗体濃度が大きく増大した。OVA500S 群でも有意な増加が見られた。OVA200S 群でもやや増加したが、V 群と比較して有意な差は見られなかった。

Fig. 5-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応の結果を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、19S 群では体温が大きく低下し ($-3.9 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$)、V 群と比較して有意差が認められた。OVA500 群、OVA200 群、OVA500S 群でも体温が低下し ($-5.3 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ 、 $-3.7 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 、 $-2.7 \pm 1.8^{\circ}\text{C}$)、V 群との間に有意差が認められた。一方、OVA200S 群では有意な体温低下は見られなかった。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。体温が大きく低下していた 19S 群、OVA500 群、OVA200 群では、ヒスタミン濃度が V 群と比較して有意に上昇していた。同じく体温が低下した OVA500S 群ではやや上昇がみられたが、V 群と比較して有意ではなかった。OVA200 群ではヒスタミン濃度はほとんど上昇しなかった。C は惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果である。体温低下が大きく V 群との有意差が見られた 19S 群、OVA500 群、OVA200 群、OVA500S 群では、それぞれ平均 3.7、3.3、2.7、2.9 と高いスコアであった。OVA200S 群でも平均 2.9 と高いスコアであった。

D. 考察

我々はこれまで、茶のしずく石鹼の使用とコムギ摂取によるアレルギーの因果関係を検討するため、マウスを用いた経皮感作性試験を行ってきた。その結果、マウスの皮膚にグルパール 19S を浸潤させたパッチを貼付するという操作を 4 回繰り返す (3 日/週×4 週) ことにより経皮感作が成立し、その後の抗原の腹腔内投与によりアレルギー症状 (アナフィラキシー) を惹起することが可能であることを示した。これらの研究結果は、食物由来タンパク質による感作が経皮的に起こり得るという他のグループの報告とも矛盾しないものである。

これまでに我々は、グルパール 19S と同様に酸性条件でグルテンを経時的に分解した酸加水分解グルテン、及びアルカリ加水分解グルテンの経皮感作性について検討し、どちらの場合も、グルパール 19S に類似した SDS-PAGE パターンを示す 0.5 時間加水分解物が強い経皮感作性を示すこと、ほぼ分子量 30kDa 以下にまで分解された 9 時間あるいは 12 時間加水分解物では経皮感作性が見られないことを報告している。本年度は、プロテアーゼにより分解を行った酵素加水分解グルテンの経皮感作性の検討 (【実験 1】)、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の検討 (【実験 2】) を行った。また、本研究において確立した経皮感作実験系を基にして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な陽性対照タンパク質の候補として、OVA の経皮感作性について検討した (【実験 3】)。

一般的にタンパク質の加水分解方法としては、酸加水分解、アルカリ加水分解、酵素加水分解が考えられる。【実験 1】では、*Bacillus amylo-liquefaciens* 由来のプロテアーゼである Neutrase を用いてグルテンの加水分解を行い、経皮感作性について検討した。*Bacillus amylo-liquefaciens* は α -アミラーゼ、プロテアーゼの工業的生産に利用されている好気性細菌である。

Neutrase は至適 pH 5.5-7.5、至適温度 45-55°C のエンドプロテアーゼであり、食品加工等に汎用されている。海外におけるコムギタンパク質加水分解物に対するアレルギー発症事例に関する報告においても、コムギタンパク質の加水分解に用いられる酵素として名称が挙げられているため、本実験では Neutrase をグルテン加水分解の酵素として使用した。酵素加水分解物の SDS-PAGE パターン (Fig. 1A) では、経時的に加水分解が進行し、高分子領域のバンドが徐々に消失していることが示されているが、酸あるいはアルカリ加水分解 (Fig. 1B, 1C) の場合とは異なり、広範囲のスメア状のパターンにはならず、グルテン中の個々のバンドがその形状を保持したまま徐々に薄くなっている。この結果から、酸あるいはアルカリ加水分解の場合はそれぞれのタンパク質のペプチド鎖が一斉に非常にランダムに切断されてスメア状のパターンとなるのに対し、酵素加水分解の場合は、それぞれのタンパク質がエンドペプチダーゼ活性により徐々に分解されていくことが示唆された。

12 時間酵素加水分解物 (Enz12hr) の経皮感作性に関しては、特異的抗体産生量は 0.5 時間酵素加水分解物 (Enz0.5hr) と比較してやや少なかったが (Fig. 3-1)、アナフィラキシー惹起時にはグルパール 19S や Enz0.5hr と同様に強い反応が見られた (Fig. 3-2)。これは、これまでに報告している 9 時間酸加水分解物あるいは 12 時間アルカリ加水分解物では経皮感作性がほとんど見られないという結果とは対照的である。酵素加水分解におけるペプチド鎖の切断は、酸あるいはアルカリ加水分解の場合ほどランダムではないため、加水分解が進行しても本来のエピトープ配列が切断されず残存している場合には、経皮感作性を示すのではないかと考えられる。

【実験 2】においては、グルパール 19S で経皮感作を行い、その後のアナフィラキシー惹起時に酸、アルカリ、酵素による 0.5 時間加水分解グルテンを用いることにより、グルパール 19S とこれ

らの加水分解グルテンとの交差反応性について検討した。Fig. 4-2 に示すように、酸加水分解物、酵素加水分解物、及びグルテンではグルパール 19S との強い交差反応性が見られたが、アルカリ加水分解物ではこのような強い交差反応性は見られなかった。我々は、グルパール 19S では、酸加水分解によりペプチド鎖の切断だけではなくグルタミン残基の側鎖のアミド結合も加水分解により脱アミド化され、グルタミン酸に変換されることを報告している。また、グルテン中のタンパク質の 1 種である γ -グリアジン中の PQQPFP というアミノ酸配列においてグルタミンがグルタミン酸に変換された PEEPFP というアミノ酸配列が、グルパール 19S のエピトープとして重要であることも他の研究者により報告されている。グルパール 19S と同様に酸処理により加水分解を行った酸加水分解グルテンでは、グルパール 19S と同様のエピトープが出現していると考えられる。また、グルパール 19S にはグルテン中の本来のエピトープも残存していると思われ、そのためグルテンや酵素加水分解グルテンがグルパール 19S と交差反応性を示したものと考えられる。一方、アルカリ加水分解物に関しては、我々はこれまでに、グルタミンが脱アミド化される割合が酸加水分解グルテンよりも小さいこと、サイズ排除クロマトグラフィーによる検討より、アルカリ加水分解物の方が酸加水分解物よりも高分子タンパク質の分解が速いことを報告している。従って、酸加水分解物とアルカリ加水分解物では含有されている分解産物の状態がかなり異なるため、酸加水分解物であるグルパール 19S とアルカリ加水分解物との交差反応性は低いものと考えられる。

また【実験 2】では、グルパール 19S 経皮感作時の血中のペリオスチン濃度について検討した。皮膚においてペリオスチンは、IL-4 や IL-13 等の Th2 型サイトカインにより繊維芽細胞で産生が誘導され細胞外マトリクス中に大量に分泌される。皮膚組織に沈着してアトピー性皮膚炎慢性化の原因となっていることが報告されている。我々は既に、マウスにおけるグルパール 19S の経皮感作

時に Th2 型免疫応答が起きていることを報告している。【実験 2】では、グルパール 19S 経皮感作群において血清中のペリオスチンレベルの増大が見られた (Fig. 4-3)。これは、平成 24 年度に報告したグルパール経皮感作による血清中 TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) レベルの増大とも良く相関している。TSLP は抗原提示細胞である樹状細胞に作用して免疫系をアレルギー発症の方向へと誘導するサイトカインであり、アレルギー発症のマスタースイッチとも言われている。アレルギー疾患患者の病変組織では TSLP が高発現していることが報告されている。アトピー性皮膚炎の慢性化の機序の中では、ペリオスチンがインテグリンを介してケラチノサイトからの TSLP の産生を誘導し、この TSLP がさらに Th2 型免疫応答を増強する、という経路が考えられている。本検討の結果は、グルパール 19S による経皮感作においても、アトピー性皮膚炎の場合と同様にペリオスチン/TSLP が機能している可能性を示唆している。今後、抗原感作部位におけるペリオスチン/TSLP の分布等を解析し、経皮感作のメカニズム、及びこれらのタンパク質のバイオマーカーとしての有用性を検討することが重要である。

【実験 3】においては、本研究において確立した経皮感作実験系を基に平成 24 年度に提案した即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法 (概要) にて使用可能な陽性対照タンパク質について検討するため、本実験系における OVA の経皮感作性について解析した。OVA (卵白アルブミン、ovalbumin) は分子量約 45kDa のタンパク質で卵白タンパク質の約 50% を占める。卵の代表的なアレルギータンパク質であり、多くの研究論文においてモデルアレルギーとして使用されている水溶性タンパク質であり、マウスにおいて経皮的な感作が進行することも他のグループから報告されている。これまでグルパール 19S 及び加水分解グルテンによる経皮感作実験では、主にこれらの抗原の溶解性を高める目的で貼付時に 0.5% SDS を添加していた。OVA は水溶性タンパク質であるが、貼付時の

SDS の影響について検討するため、0.5% SDS を添加する群と添加しない群を設定し実験を行った。その結果、SDS を添加せずに貼付する場合の方が、感作による抗体産生量が多く、アナフィラキシー惹起時の応答も強いことが示された。グルパール 19S 経皮感作時には、貼付時の SDS 添加により抗体産生やアナフィラキシー反応が増強されるので、溶解性が高まることにより皮膚透過性が増大する、あるいは SDS そのものが皮膚免疫系に対して何らかのアジュバント作用を示すという可能性を考えていた。しかし OVA では逆の結果が得られたので、SDS の効果はどのような抗原に対しても普遍的というわけではなく、抗原タンパク質の特性により異なることが示された。また OVA 感作時の用量としては 2 点設定したが (500 μ g、200 μ g)、これら 2 群の間では大きな差は見られなかった。今後、感作における OVA の用量依存性について検討し、経皮感作性試験における陽性対照タンパク質としての有用性についてさらに解析を進める。

E. 結論

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、プロテアーゼにより分解を行っ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 30kDa 以下までされた 12 時間酵素加水分解物でも強い経皮感作性が見られ、これまでに検討してきた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。その結果、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な陽性対照タンパク質の候補として、OVAの経皮感作性について検討したところ、我々の実験系において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。今後さらに検討を重ね、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とともに、即時型アレルギー誘発につながる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と考えらる。

(参考文献)

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 127(2): 531-533.
- 2) Hsieh KY, Tsai CC, Herbert Wu CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1067-75.
- 3) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv Mice. *Allergol Int* 2006; 55: 43-48.
- 4) Wang JS, Zhao MM, Zhao QZ, Bao Y, Jiang YM. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *J Food Sci* 2007; 72(2): 103-107.
- 5) Bouchez-Mahiout I, Pecquet C, Kerre S, Snégaroff J, Raison-Peyron N, Laurière M. High Molecular Weight Entities in Industrial Wheat Protein Hydrolysates Are Immunoreactive with IgE from Allergic Patients. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 4207-4215.
- 6) Laurière M, Pecquet C, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Bayrou O, Raison-Peyron N, Vigan M. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis* 2006; 54: 283-289.
- 7) Laurière M, Pecquet C, Boulenc É, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Choudat D, Raison-Peyron N, Vigan M, Branlard G. Genetic differences in omega-gliadins involved in two different immediate food hypersensitivities to wheat. *Allergy* 2007; 62: 890-896.
- 8) Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R, Sawada J, Maitani T. Profile Analysis and Immunoglobulin E Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140: 36-42.
- 9) Strid J, Callrd R, Strobel S. Epicutaneous immunization converts subsequent and established antigen-specific T helper type 1 (Th1) to Th2-type responses. *Immunology* 2006; 119: 27-35
- 10) Strid J, Hourihane J, Kimbert I, Callrd R, Strobel S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 757-66.
- 11) 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(11):1392-1399.
- 12) Wang YH, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 798-806.
- 13) Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Aoki S, Toda S, Inagaki N, Kurihara Y, Hayashida S, Takeuchi S, Koike K, Ono J, Noshiro H, Furue M, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin promotes chronic allergic

inflammation in response to Th2 cytokines. J Clin Invest. 2012;122(7):2590-2600.

14) 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(4):435-445.

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.

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) 安達玲子, 酒井信夫, 手島玲子. 食物アレルギーの経皮感作による即時型アレルギーモデル. 第21回日本免疫毒性学会学術年会 (2014. 9)

4) 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).

G. 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 アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0	症状なし
1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
2	活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
3	1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
5	死亡

Table 2 感作抗原及び惹起検体

実験1 酵素加水分解グルテン(1群5匹 x 7群)

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS + 0.5%SDS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
19S	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
Enz 0hr	0hr酵素加水分解グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	0hr酵素加水分解グルテン
Enz 0.5hr	0.5hr酵素加水分解グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	0.5hr酵素加水分解グルテン
Enz 12hr	12hr酵素加水分解グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	12hr酵素加水分解グルテン
Gluten	グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルテン
Enz only	酵素 + 0.5%SDS	4 µU	i.p. (8 µU)	酵素

実験2 グルバール19S(各種加水分解グルテンとの交差反応性)(1群5匹 x 6群)

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS + 0.5%SDS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
19S	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
19S-Acid	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	0.5hr酸加水分解グルテン
19S-Alk	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	0.5hrアルカリ加水分解グルテン
19S-Enz	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	0.5hr酵素分解グルテン
19S-Glu	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルテン

実験3 卵白アルブミン(OVA)(1群5-7匹 x 6群)

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS + 0.5%SDS	-	i.p. (1 mg)	OVA
19S	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
OVA500S	OVA + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	OVA
OVA500	OVA	500 µg	i.p. (1 mg)	OVA
OVA200S	OVA + 0.5%SDS	200 µg	i.p. (1 mg)	OVA
OVA200	OVA	200 µg	i.p. (1 mg)	OVA

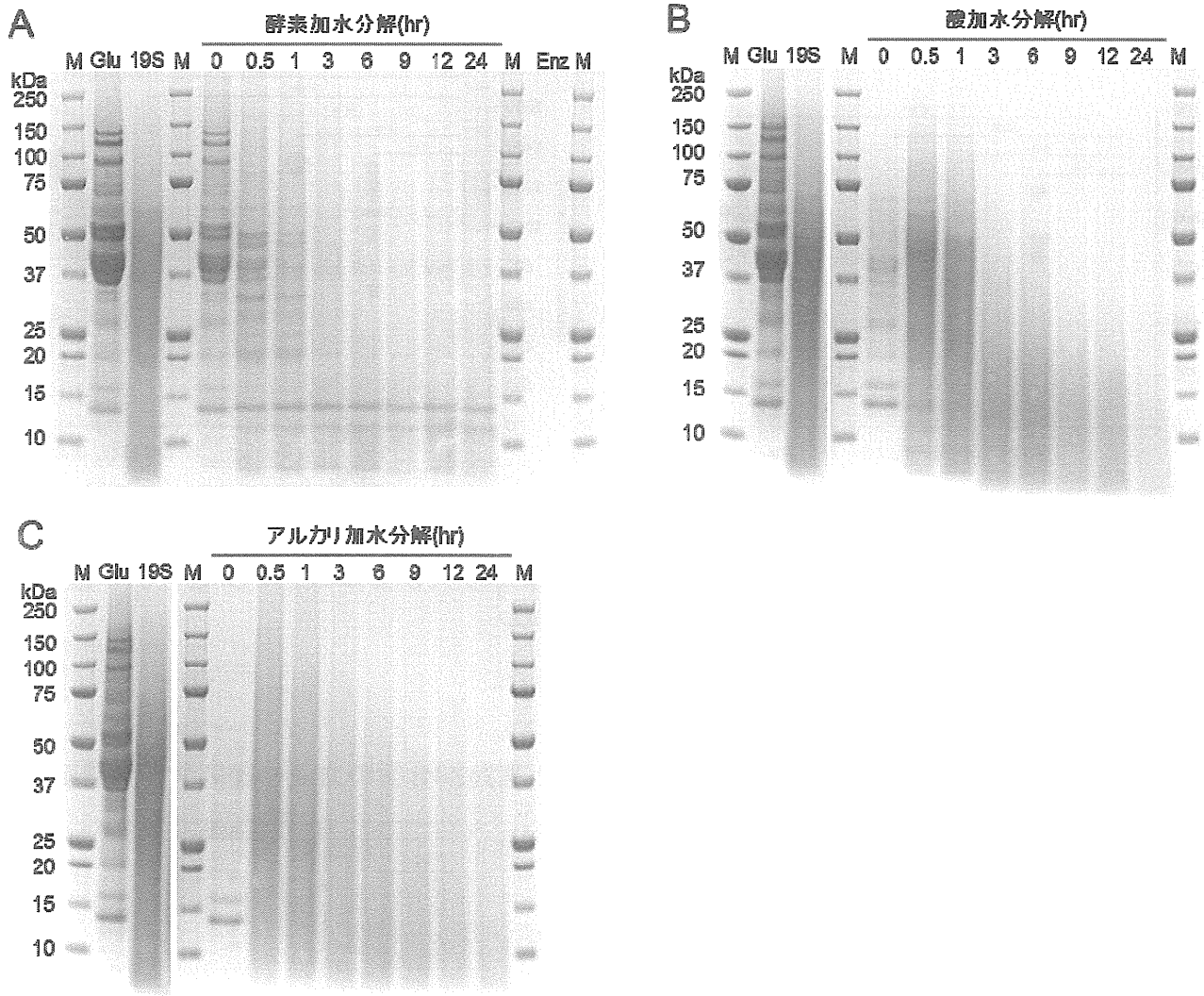


Figure 1 各加水分解グルテンのSDS-PAGE

4-12% Bis-Tris Gelの染色パターン。Glu: Gluten、19S: グルパール19S、Enz: 酵素(Neutrase)のみ。

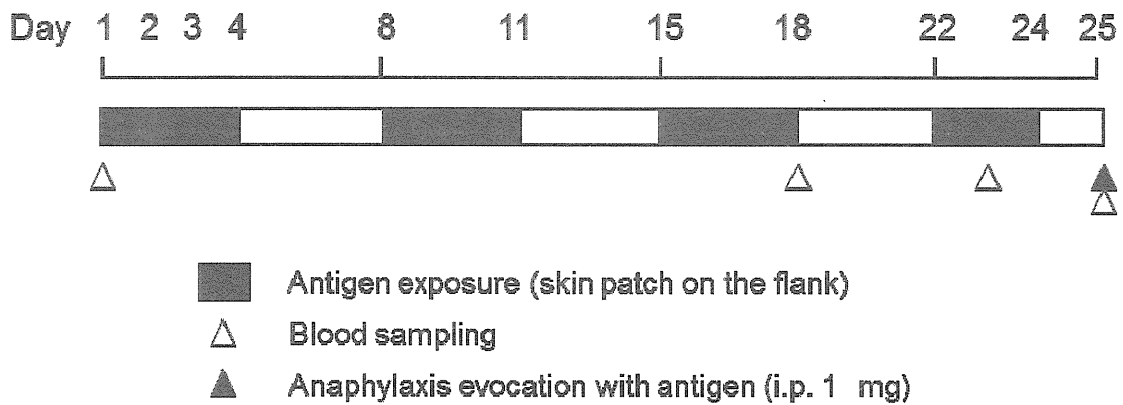
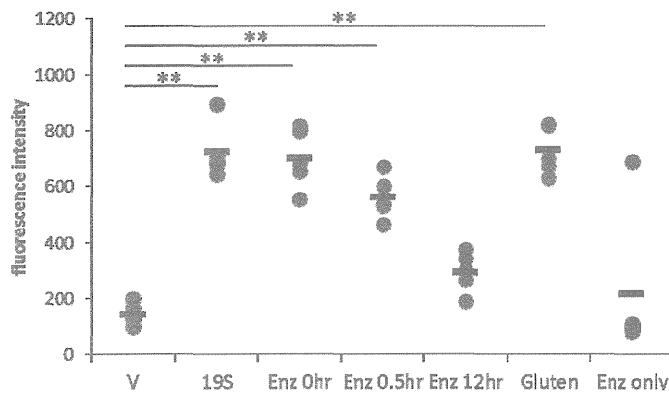


Figure 2 経皮感作試験スケジュール

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

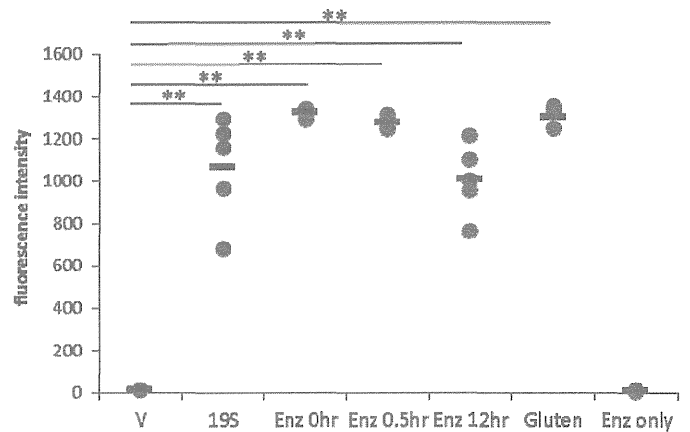
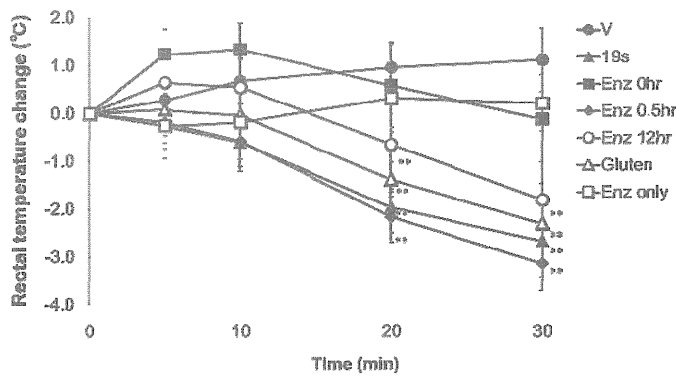
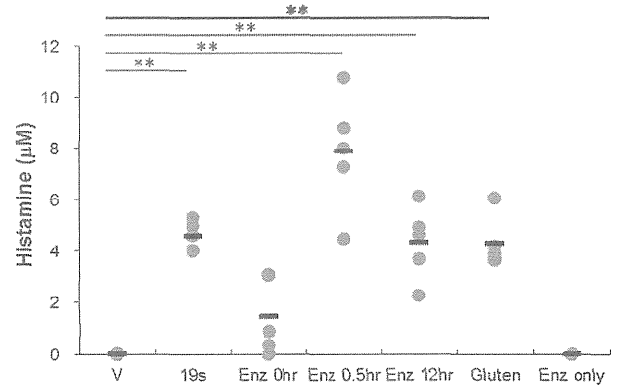


Figure 3-1 酵素加水分解グルテン経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生
各群の処理抗原についてはTable 2に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の
平均値を示す。** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group.

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

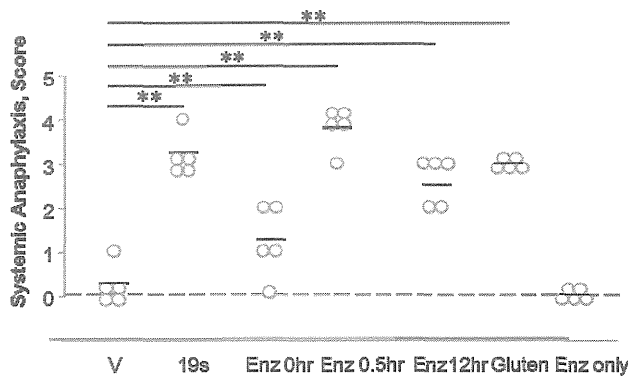
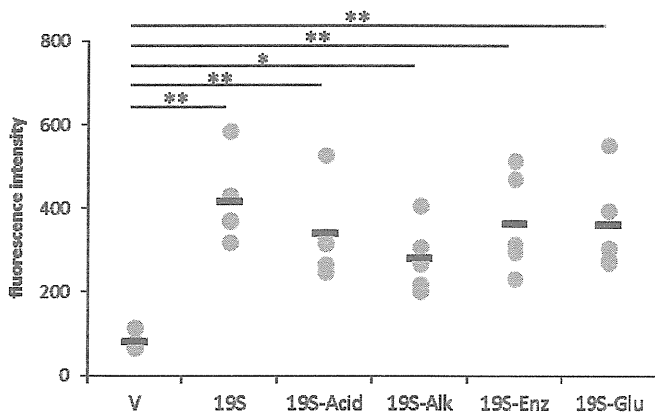


Figure 3-2 酵素加水分解グルテン経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起
A: 各群のデータをMean±S.D.で示す。B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の
平均値を示す。** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group.

A. グルパール19S特異的IgE



B. グルパール19S特異的IgG1

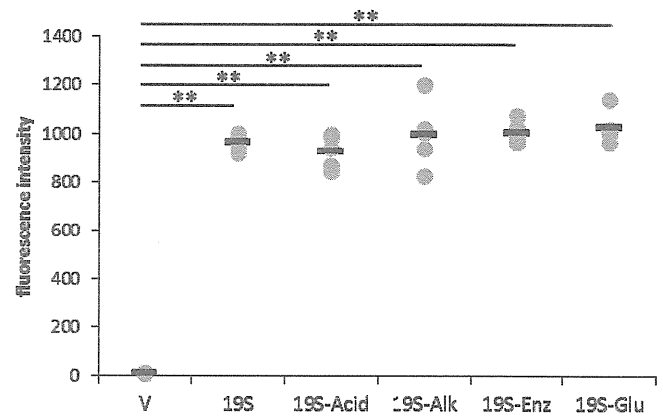
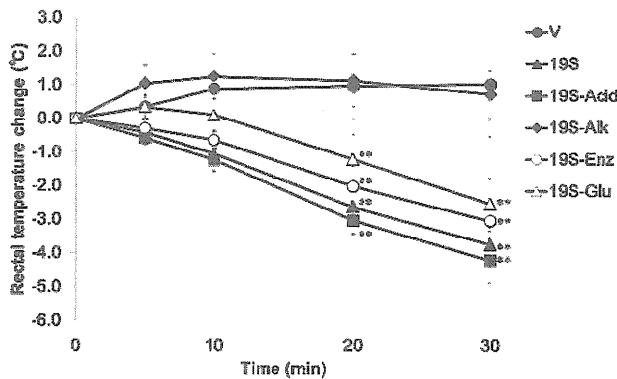


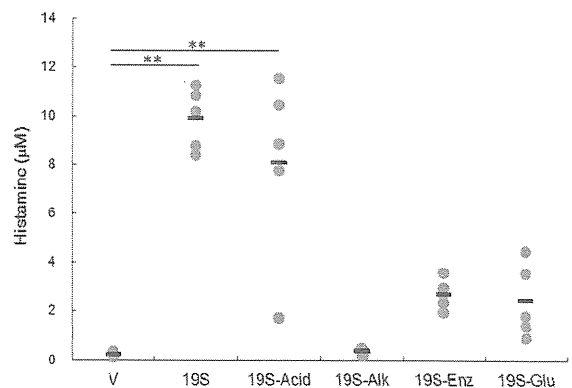
Figure 4-1 グルパール19S経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生 (各種加水分解グルテンとの交差反応性の検討)

各群の処理抗原についてはTable 2に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group.

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

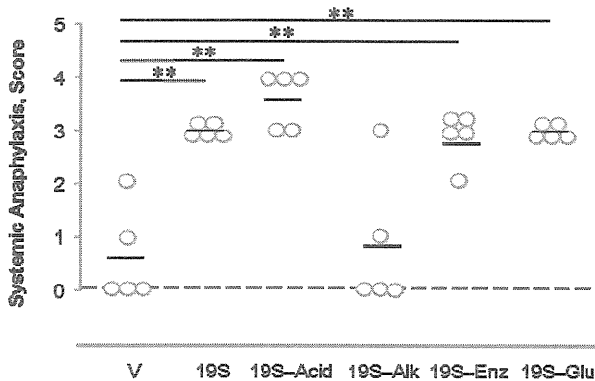


Figure 4-2 グルパール19Sと各種加水分解グルテンとの交差反応性 (アナフィラキシー反応惹起)

A: 各群のデータをMean±S.D.で示す。B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group.

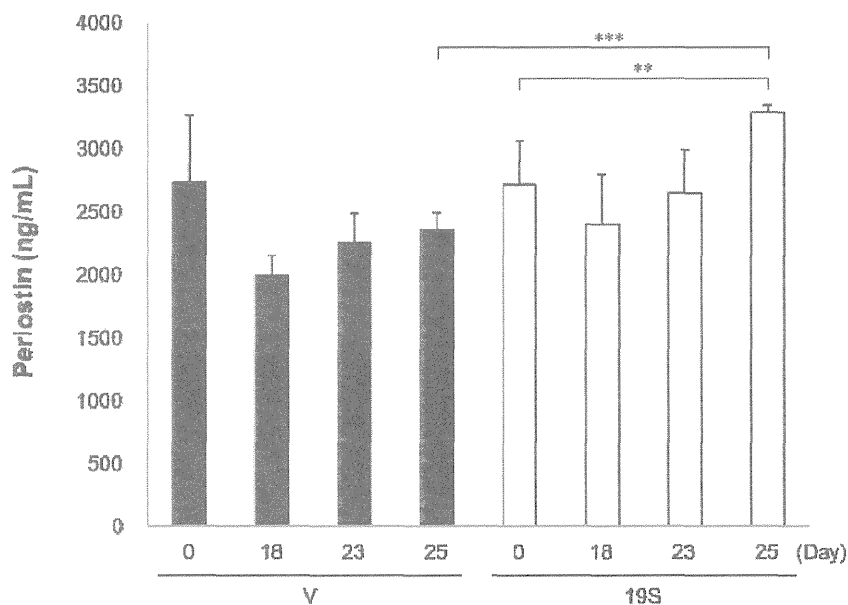
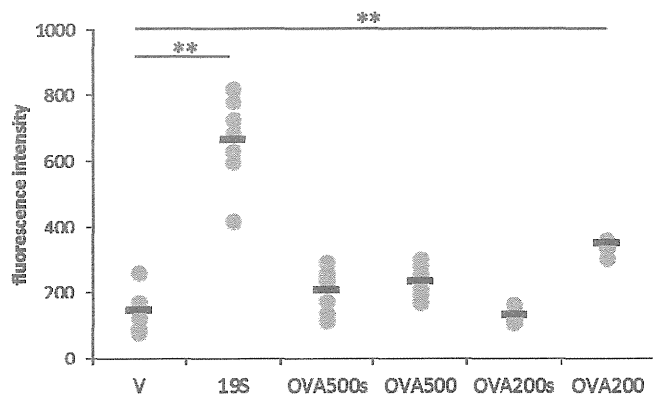


Figure 4-3 グルパール19S経皮感作マウスの血清中ペリオスチン濃度
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t-test.

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

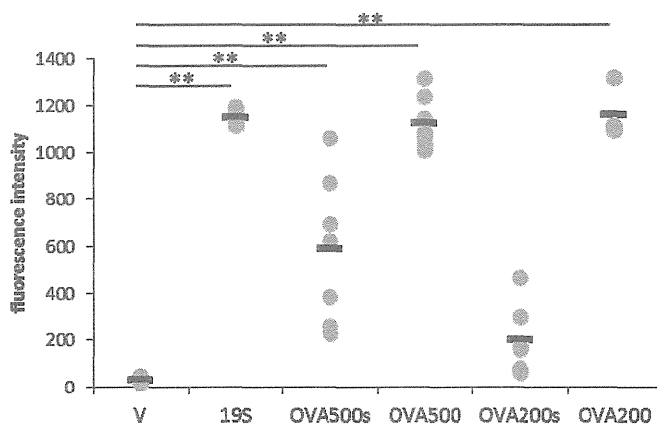
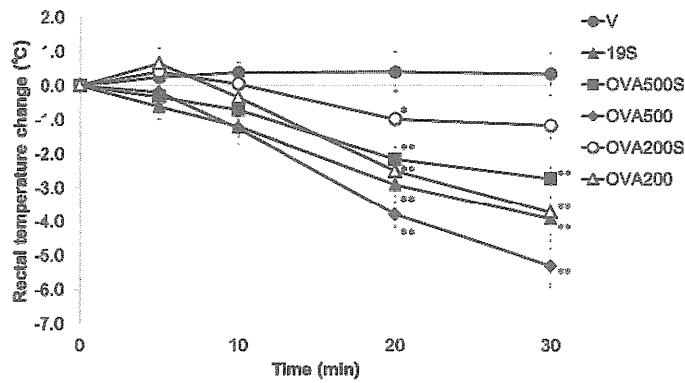


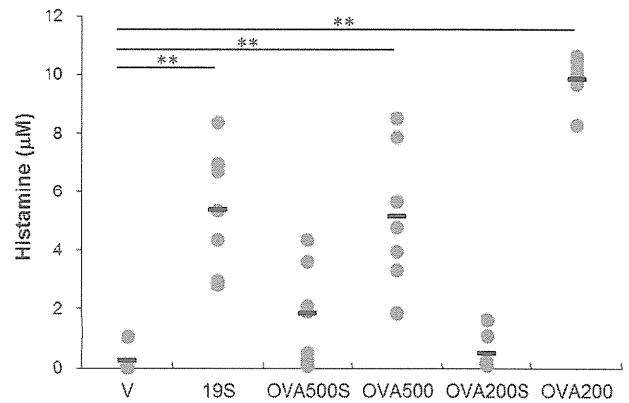
Figure 5-1 OVA経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生

各群の処理抗原についてはTable 2に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group.

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

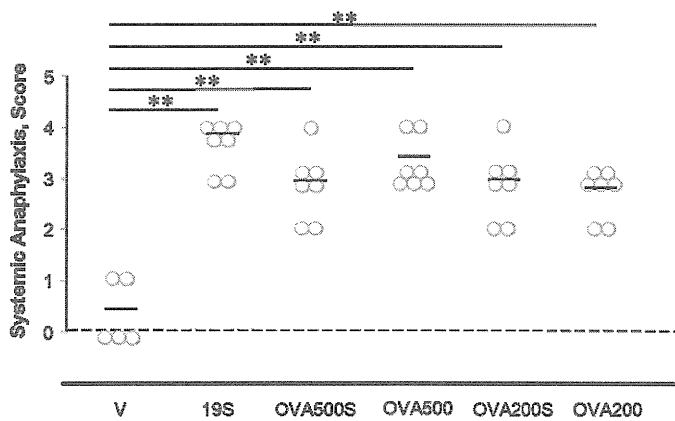


Figure 5-2 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

A: 各群のデータをMean±S.D.で示す。B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group.

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」
分担研究報告書(平成26年度)

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

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

研究要旨

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。

協力研究者

手嶋哲子(北海道文教大学人間科学部健康栄養学科)

から抽出した成分などに起因するアレルギーの国内における発症状況をアンケート調査によって把握することを目的とする。

A. 研究目的

小麦加水分解物を添加した洗顔石鹸が原因で発症する小麦アレルギーの症例が数多く報告され、大きな社会問題となった。加水分解物は小麦以外にもコラーゲンなど多くの食品を原料として製造されている。また加水分解物のほかにも、動植物から様々な成分が抽出され医薬部外品、化粧品に利用されている。これまで、小麦以外の加水分解物や動植物由来成分が原因で発症するアレルギーに関する疫学的な研究報告はほとんどないため、それらの成分が原因で起きるアレルギーの実態を把握することは、予防医学的な観点からも極めて重要である。

そこで、本研究では、国内で販売されている医薬部外品、化粧品に添加物として使用されている小麦、コラーゲン由来の加水分解物、動植物など

B. 研究方法

本研究では、平成24年度から26年度までの3カ年にわたり、食品由来の成分が添加されている化粧品や医薬部外品によって起きる食物アレルギーの現状をアンケート調査によって明らかにする。平成24年度は、国内で医薬部外品、化粧品素材として利用されている小麦加水分解物すべてについて、アレルギー発症の実態をアンケート調査によって把握し、調製方法によるアレルギー性の有無や差異を検証した。平成25年度は、コラーゲンなど小麦以外の食品を原料として製造された加水分解物を含有する医薬部外品、化粧品によるアレルギー発症の実態を同様に実施した。平成26年度は、コチニール、パパインなど動植物由来の食品成分を含有する医薬部外品、化粧品によるアレルギー

一発症の実態について平成 24、25 年度と同様の方法によって調査を実施した。対象は北海道内で開業、または医療機関に勤務している皮膚科、内科、アレルギー科、眼科、耳鼻咽喉科等を専門とする医師とした。

平成 26 年 11 月 1 日から 11 月 30 日までの期間で実施した。平成 24、25 年度と同様に、アンケート用紙の配布はメール便で行い、FAX（フリーダイヤル）で回収した。

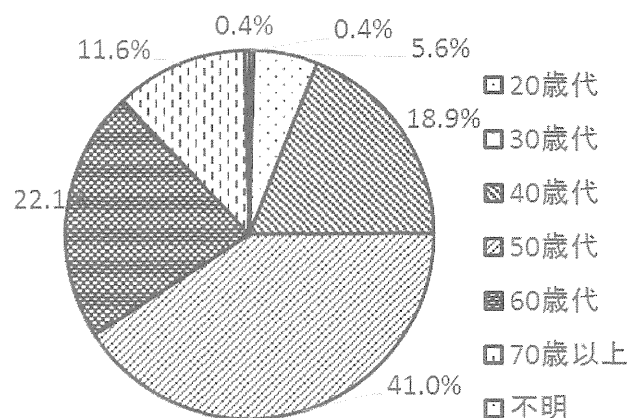


図 2. 回答者の年齢

C. 研究結果

以下にアンケート調査の集計結果を示す。

1. アンケート配布数と回収率

アンケートは 2,343 施設、4,104 名の医師に配布し、220 施設、249 名から回答を得た。回収率は施設で 9.4%、医師で 6.1%であった。

2. 回答者の性別

回答者 249 名中、男性は 215 名で 86.3%を占め、前年度と同じであった（図 1）。

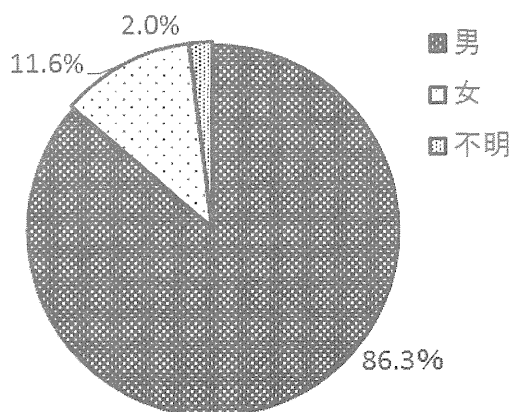


図 1. 対象者の性別

3. 回答者の年齢

回答者の年齢は、50 歳代が最も多く 41.0%を占めていた。次いで 60 歳代 (22.1%)、40 歳代 (18.9%)、70 歳以上 (11.6%)、30 歳代 (5.6%)、20 歳代 (0.4%) の順であった（図 2）。

4. 専門分野

回答した医師の専門分野を図 3 に示した。内科が 125 名 (50.2%) で最も多かった。その他で最も多かったのは外科であった（8 名）。

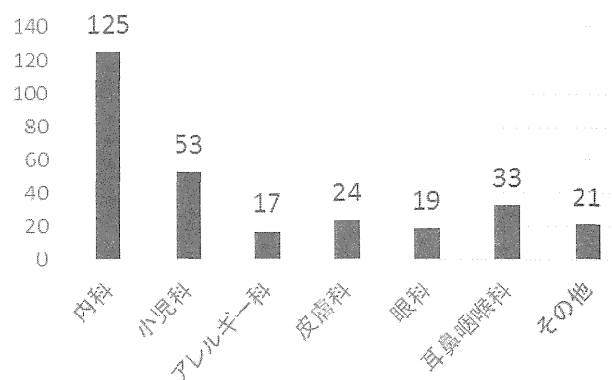


図 3. 専門分野

5. 施設区分

回答した医師が働く医療機関の施設区分を図 4 に示した。診療所、すなわち開業医が約 6 割を占めていると思われる。

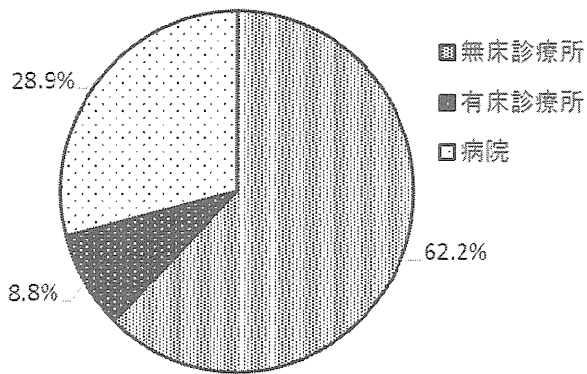


図 4. 施設区分

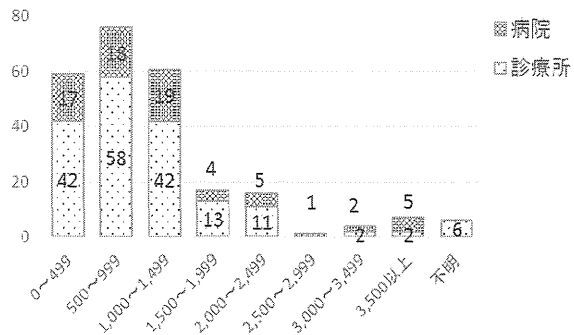


図 6. 受診者数

6. 病床数

回答した医師が勤務している医療機関の病床数は無床が 155 名 (62.2%) で最も多かったが、有床では、各区分に分散していた (図 5)。

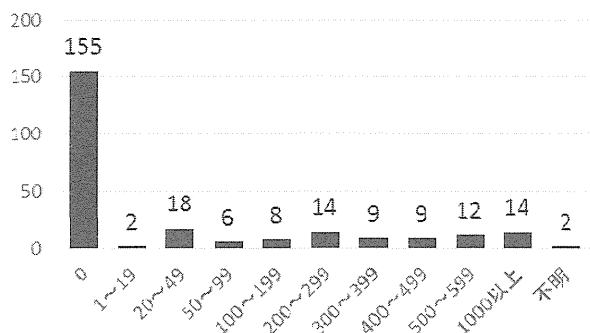


図 5. 病床数

7. 受診者数

回答した医師が勤務する医療機関における 1 か月の受診者数は、診療所、病院ともに 500~999 名が最も多く、次いで 500~999 名、0~499 名が同程度であり、これらをあわせると全体の約 8 割を占めていた (図 6)。

8. 食品由来成分使用の認知度

「茶のしずく」洗顔石鹸のように、小麦加水分解物などの食品由来の成分が化粧品や医薬部外品に添加物として使用されていることを「知っている」と回答した医師は 205 名 (82.7%) であり、大部分の医師は認知していたが、依然、化粧品や医薬部外品に食品由来の成分が添加されていることを知らないと回答した医師が 2 割程度いた。

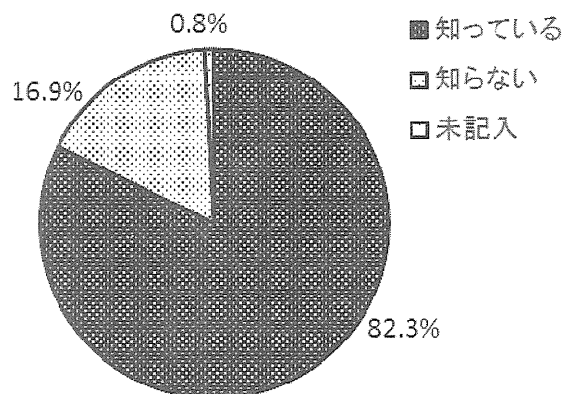


図 7. 食品由来成分使用の認知度

9. 「茶のしずく」アレルギー患者診察の有無

「茶のしずく」洗顔石鹸使用により、小麦アレルギーを発症した患者を診察した経験があると答えた医師は 22 名 (8.9%) であった。

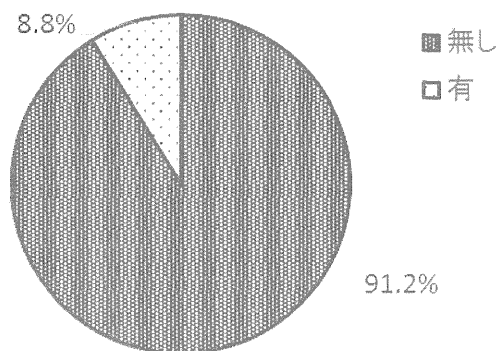


図 8. 「茶のしずく」アレルギー患者診察の有無

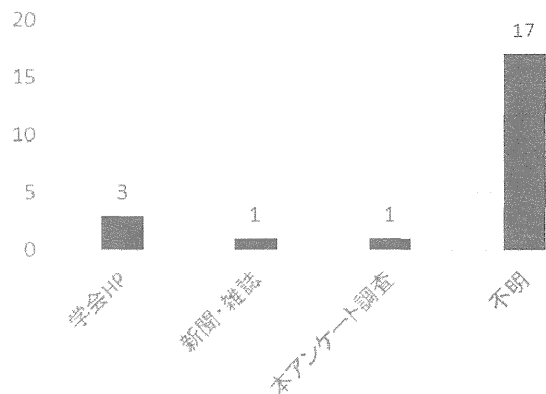


図 10. 登録制度をどのように知ったか

10. 「茶のしずく」アレルギー患者登録の有無

日本アレルギー学会特別委員会では、「茶のしずく」洗顔石鹸の使用により小麦アレルギーを発症した患者を診察した医師に、専用の登録サイトへの患者登録を依頼しているが、本調査の結果では、「茶のしずく」アレルギー患者診察経験のある医師 22 名中、「登録していない」と回答した医師は 17 名で約 77%を占めていた。(図 9)

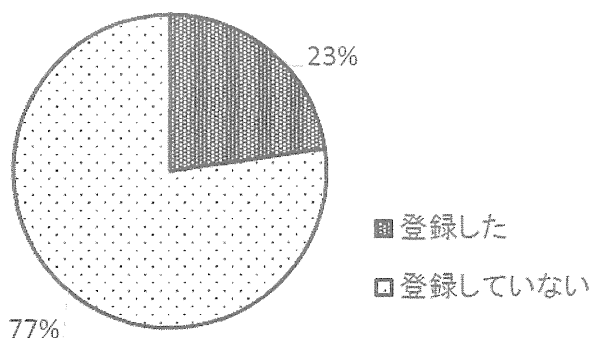


図 9. 患者の登録

患者登録をどのように知ったかについては、3 名が「学会 HP」と答えていた。また、前年度の「本アンケート調査」によって知ったと答えた医師が 1 名いた (図 10)。

11. 食品由来成分によるアレルギー発症について

食品由来成分を添加した化粧品、あるいは医薬部外品を使用して食物アレルギーを発症した症例を経験したと答えた医師は 4 名であった (図 11)。

患者の状況を表 1 に示した。いずれも、原因物質が特定できているものでは、コラーゲンが 2 例、キトサンが 1 例であった。

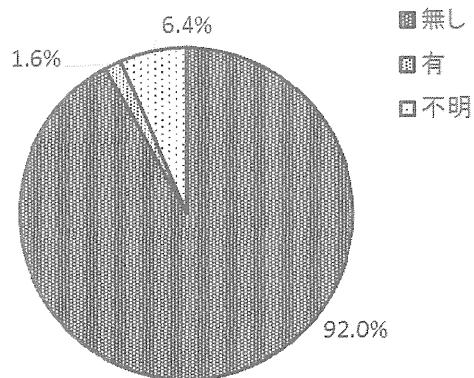


図 11. 食物由来成分症例

表 1-1. 症例数

報告番号	症例数	原因物質	件数
1	1	不明	1
2	5	コラーゲン	2
		キトサン	1
		不明	2
3	3	不明	3
4	10	不明	10