

201427019B

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24-26年度 総合研究報告書

(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 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 …… 1 1  
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 …… 2 7  
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 …… 3 5  
安達 玲子
4. 医薬部外品等の国内アレルギー発症のアンケート調査 …… 5 1  
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 …… 6 9  
海老澤 元宏
6. 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 …… 7 7  
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 …… 8 1  
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 …… 9 1  
五十嵐 良明

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 9 7  
研究成果別刷り

## 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 食品部部长

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  
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、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、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

### [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、酸加水分解小麦(HWP, グルパール 19S)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探索・同定を目的とし、(i) LC-MS/MSによるショットガン解析及び多変量解析を行いHWP(グルパール 19S)に特徴的に発現するペプチドの同定並びにペプチドに対するポリクローナル抗体の作成、スクリーニングへの応用に関する検討を行い、(ii)加水分解条件が異なるHWP(酸、アルカリ及び酵素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、(iii)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 (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。

具体的には、(i)では、HWP (グルパール 19S) に特徴的に発現するペプチド 6 種を同定し、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ペプチドをもとにポリクローナル抗体を作成し、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。(ii)では、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小麦グルテンタンパク質の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。また、抗原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となった。(iii)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

茶のしづく小麦アレルギーの発症機構の解明をめざし、患者血清中の IgE の評価とともに、病態の原因と考えられる IgE 抗体の特性解析を試みた。患者 IgE 由来の単鎖 Fv 抗体ライブラリ

一を構築し、グルテンならびにグルパール 19S に対する特異抗体を、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。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、茶のしづ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初めて明らかにしており、このような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

コムギタンパク質加水分解物グルパール 19S を含有する洗顔石鹼 (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たことを受け、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用いて、種々のコムギタンパク質加水分解物、及びその他のタンパク質の経皮感性等に関して検討した。その結果、グルパール 19S が用量依存的に経皮感作性を示すこと、グルパール 19S (グルテンの酸加水分解物) とは調製法が異なるグルテンのアルカリ加水分解物や酵素加水分解物の場合も経皮感作性が見られること、酸及び酵素による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いこと等を示してきた。一方、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結果、経皮感作性は見られなかった。また、本実験系を基にして「即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法（概要）」（別紙）を作成し、OVA が陽性対照タンパク質として使用可能であることを示した。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

平成 24 年度から 26 年度までの 3 カ年にわたり、小麦を代表として、様々な食品を原料として製造される加水分解物、および動植物由来の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。その結果、「茶のしずく」洗顔石鹸で使用されている小麦加水分解物（グルパール 19S）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は確認できなかった。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。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。

本研究の結果から、アレルギー以外の分野を専門とする医師、開業医などへの情報発信についても、より効果的に行う必要性が示唆された。また、食品成分を化粧品、医薬部外品の素材として製造する業者や、最終製品に使用する業者に対して、成分表示も含めて適切な製造方法を提示、指導することが重要であると思われる。さらに、国民に対しては、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、直接、あるいは間接的に情報を正確にわかりやすく伝える必要があると考えられる。

#### [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

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 2004～2014 年、外用製品は 2007～2014 年の文献を調査した。結果：内服薬による副作用報告は、本邦ではウコンによる薬疹 5 例が最も多く、漢方に用いられる麻黄、茴香（ウイキョウ）、縮砂（シュクシャ）による薬疹の報告や、甘草によるアナフィラキシーの報告を 1 例認めた。総合感冒薬に含まれる成分ではトラネキサム酸による薬疹、海外では acetaminophen による薬疹や 3 例のアナフィラキシーの報告を認めた。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の報告を1例ずつ認めた。外用製品では、本邦では加水分解小麦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。また、近年、本邦では rhododendrol、海外では methylisothiazolinone による接触皮膚炎の報告が増加していた。考察：一般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

茶のしずく石鹸®(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®)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、石鹸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。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。概ね石鹸使用後の経過日数が長くなると抗体価は低下傾向にあったが、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が

示された。

石鹸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が、石鹸中止後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

加水分解コムギ末グルパール19S(GP19S)による即時型コムギアレルギーの健康被害は、化粧品に含まれる加水分解タンパク質が、経皮感作食物アレルギーを発生させるリスクがあることを示した。1) GP19S 経皮感作コムギアレルギー例は2014年10月に登録を終了とした。确实症例数は2,111例、継続調査している症例のGP19Sに対する特異的IgE抗体価は減少していた。2) 藤田保健衛生大学53例の検討結果は、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。3) GP19Sの抗原性は、グルテンからGP19Sに至る酸加熱処理の工程以降で顕著に認められ、グルテン中のLMW-グルテニン、及び、γ-グリアジンが酸加熱処理によって脱アミド化され、ここで生じた新規のアミノ酸配列がGP19Sのエピトープであると考えられた。4) 化粧品のタンパク質成分のコチニール色素のアレルギーと、大豆成分による経皮感作食物アレルギー症例が確認された。

#### [VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

加水分解コムギ末を原料として配合した洗顔石けんの使用者に発症したアナフィラキシーショックは、原料の製造方法を変更したことから強いアレルギー性物質ができたためとわかった。この事例は、これまで想定されていなかったタンパク質の経皮曝露による感作として問題となった。本研究は、医薬部外品成分等の安全性確保のため、医薬部外品等に用いられるタンパク質由来成分の規格に関して調査を行い、特に加水分解コムギ末の成分規格並びに試験法策定に向け検討した。小麦またはコムギの名がつく成分を抽出した。加水分解コムギ末、加水分解コムギたん白液等はタンパク質もしくはペプチド及びアミノ酸を本質とし、窒素定量法が規定されていた。確認試験としてニンヒドリン反応を用いるアミノ酸の検出があるが、タンパク質としての定量法は規定されていなかった。小麦粉酵素分解粉末に対してのみ、純度試験としてプロテアーゼの非混入の確認が求められていた。よってこれら原料による健康被害の再発及び未然防止には、新規規格試験法の設定が必要と考えられた。分担研究者による研究結果、グルテンを短時間加水分解したものは一時的に分子量が増加し強い感作性を示すこと、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、加水分解コムギ末に分子量分布のような物性に関する規格が有用と考えられた。試験法としてはサイズ排除クロマトグラフィーを用い、分子量 10,000 以下のものが一定量以上含まれることを確認することとした。本試験が一般的な HPLC システムで実施可能かどうか、多くの機関で実施可能かどうか検討し、おおむね妥当と評価された。当初

案で指摘された試料溶液の溶媒による影響についても改定案で解決した。種々の加水分解コムギ末及び加水分解コムギタンパク液を試験した結果、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設定した分子量分布の規格値を上回ったが、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、安全側に立った規格値に変更した改定案を策定した。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られる。

## E. 結論

### [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

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。

グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討では、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、茶のしず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、グルテンに対する交差結合活性を持つことによって、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

本研究では、マウスを用いた経皮感作モデル実験系を使用し、①グルパール 19S の経皮感作性(用量依存性等)、②グルパール 19S とは異なる方法(アルカリ分解、酵素分解)で調製したコムギタンパク質加水分解物の経皮感作性、③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、④グルパール 19S 感作時のマウス皮膚及びリンパ節等に関する組織病理解析、⑤Th2 型免疫応答性サイトカインの血中濃度、⑥加水分解コラーゲンの経皮感作性、⑦即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法のための陽性対照タンパク質 等に関する検討を行った。その結果、グルパール 19S が用量依存的に経皮感作性を示すこと、アルカリ加水分解の場合は 0.5 時

間アルカリ加水分解グルテンではグルパール 19S と同等の感作性が認められ、その後のアルカリ加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱すること、酵素加水分解の場合は 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ること、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いこと等を示してきた。グルパール 19S で感作したマウスの皮膚、リンパ節、及びアナフィラキシー反応惹起後の眼瞼では炎症性組織病変が観察されること、グルパール 19S 感作マウスの血中では TSLP やペリオスチンのような Th2 型サイトカインの濃度が増大していることも示した。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ることが示された。本実験系を基にして、「即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法(概要)」(別紙)を作成し、OVA が陽性対照タンパク質として使用可能であることを示した。

今後さらに検討を重ね、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

・「茶のしずく石鹼等による小麦アレルギー情報サイト」への患者登録している医師の割合は、

北海道では低いことが明らかとなった。

- ・「茶のしずく」洗顔石鹸で使用されている小麦加水分解物（グルパール 19S）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は確認できなかった。

- ・小麦加水分解物以外の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。

- ・アレルギー以外の分野を専門とする医師、開業医などへの情報発信を、より効果的に行う必要性が示唆された。

- ・食品成分を化粧品、医薬部外品の素材として製造する業者や、最終製品に使用する業者に対して、成分表示も含めて適切な製造方法を提示、指導することが重要である。

- ・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。

また、アナフィラキシーの報告が多い染毛剤については、更なる調査を行うことが望ましい。

#### [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、石鹸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。石鹸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、石鹸中止後 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

石鹸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プリックテスト、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

医薬部外品原料規格から加水分解成分を抽出し、コムギ由来成分の規格を調べた。窒素定量法が採用されているがタンパク質に関する規格や試験法はなかった。加水分解コムギ末は、製造工程中の原材料の加水分解処理により一時的に分子量が増加し強い感作性を示すこと、加水分解時間を長くすると分子量が減少し約 10000 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、分子量分布に関する物性の規格が有用と考えられた。試験法は、サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量約12000 のチトクロムc以下の分子量のものが一定量以上含まれることを確認する案を策定した。本試験は一般的な HPLC システムで多くの機関で実施可能であったことから、おおむね妥当と評価された。種々の加水分解コムギ末及び加水分解コムギタンパク液を試験した。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規格値以上の値を示したが、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、より安全側に立った規格値の改定案を策定した。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られる。

#### 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」  
総合研究報告書(平成24～26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、アレルギー症状等を引き起こす可能性が指摘されている。近年、酸加水分解小麦(HWP, グルパール 19S)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探索・同定を目的とし、(i) LC-MS/MSによるショットガン解析及び多変量解析を行い HWP(グルパール 19S)に特徴的に発現するペプチドの同定並びにペプチドに対するポリクローナル抗体の作成、スクリーニングへの応用に関する検討を行い、(ii)加水分解条件が異なる HWP(酸、アルカリ及び酵素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、(iii)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(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。具体的には、(i)では、HWP(グルパール 19S)に特徴的に発現するペプチド6種を同定し、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ペプチドをもとにポリクローナル抗体を作成し、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。(ii)では、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小麦グルテンタンパク質の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。また、抗原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となった。(iii)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。

これらの分析科学的データと皮膚感作性試験等の研究結果をもとに、加水分解小麦末の物性を医薬部外品・化粧品の原材料の規格へ反映させる準備を進めている。

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

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

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

藪島 由二 国立医薬品食品衛生研究所  
医療機器部 室長



渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所

食品部 室長

菊地博之 国立医薬品食品衛生研究所

食品部 主任研究官

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、(i) LC-MS/MSによるショットガンプロテオミクス及び多変量解析を行い、HWP(グルパール19S)に特徴的に発現するペプチドの同定並びにペプチドに対するポリクローナル抗体の作成、経皮感作性を有するHWPのスクリーニングへの応用に関する検討を行った。また、(ii)加水分解条件が異なるHWP(酸、アルカリ及び酵素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並びにアミノ酸の脱アミド化を中心に分析化学的に評価を行った。更に、(iii) (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、

EXiLE (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

### 1-1. ショットガンMS解析による、グルパール19Sとグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

#### 試料

グルパール19Sは、片山化学工業株式会社より入手した。グルテン (Sigma, G5004) 及びグルパール19S粉末に乾燥重量で100 mg/mLとなるよう1M Tris (pH11.4)を加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を調製した。

グルテン及びグルパール19Sのストック懸濁液にPBSを加えて終濃度を1 mg/mLとし、10倍量の氷冷メタノール中で終夜タンパク質を沈殿させた。沈殿物を洗浄後、2D-Quant Kit (GE Healthcare)を用いてタンパク質量を定量し、その40 µgをトリプシン消化に供した。DTTで還元、ヨードアセトアミドでSH基のカルボキシメチル化を行った後、Trypsin Gold, Protease MAX (Promega)を加えて37°Cで終夜インキュベートした。10% TFAを終濃度0.5%となるよう加えて酵素反応を停止し、得られたペプチドをバリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 µL)にて脱塩し、0.1% TFA含有2%アセトニトリルに再溶解した。

#### 装置

##### ・ 質量分析計

Thermo Scientific 社製リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ Orbitrap XL

測定前に Tyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。

##### ・ Nano-LC

HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を装備した ADVANCE nano UPLC (AMR)

##### ・ トラップカートリッジ

CERI 社製 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 µm, 12 nm)

##### ・ 分析用逆相カラム

CERI 社製 L-column Micro (L-C18, 0.1 x 150 mm,

3  $\mu\text{m}$ , 12 nm)

#### LC-MS/MS 条件

イオン源には Captive Ion Spray システムを使用し、試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 kV) により行った。MS スペクトルは FT analyser (分解能 30,000, 測定質量範囲  $m/z$  300-1,400, Lock mass = フタル酸ジエチルヘキシル及びシロキサン, Profile mode) により取得し、XCalibur data dependent mode により、スキャンにおけるイオン強度の高い 3 種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。

測定時間は 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒(0.1%ギ酸含有 2% アセトニトリル)と B 溶媒(100%アセトニトリル)を使用した。流速は 300 nL/min とし、サンプル注入 (1.0  $\mu\text{g}$ ) はオートサンプラーを使用して行った。1 分析あたりの溶出時間は 150 分とし、サンプル注入後、0-40% B/125 min  $\rightarrow$  40-55% B/130 min  $\rightarrow$  55-100% B/135 min  $\rightarrow$  100% B/145 min  $\rightarrow$  0% B/160 min のグラジエントプログラムで溶出した。次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。測定の繰り返し数は  $n=2$  とした。

#### ショットガン解析

グルテン及びグルパール 19S のデータは各 2 回ずつ取得し、全データを i-RUBY ソフトウェア(メディカル・プロテオスコープ) にアップロードし、Mascot/UniProt/NCBI nr (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、MS/MS スペクトル相同性に基づくピークマッチングと保持時間補正を行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

### 1-2. 多変量解析による、グルパール 19S 特徴的なペプチドの探索

#### 試料

グルテン、グルパール 19S、及びグルパール 19S よ

りもさらに酸加水分解を進行させた自家調製 HWP (HWP 24h) を用いた。酸加水分解は、0.1N 塩酸中にグルテンストック懸濁液を終濃度 1 mg/mL となるよう加え、100°C のヒートブロック上で 24 時間加熱した。その後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液で中和し、加水分解反応を停止した。LC-MS に供するサンプルの調製は、1-1 と同様に行った。

#### 装置

1-1 と同様。

#### LC-MS/MS 条件

1-1 と同様。ただし、測定の繰り返し数は  $n=1$  とした。

#### ペプチドピークの比較定量解析

取得した MS データをプロテオーム定量解析ソフトウェア Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamycs) にアップロードし、Swiss-Prot (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、MS/MS スペクトル相同性に基づくピークマッチングと保持時間補正を行い、各ペプチドピークのシグナル強度を比較した。タンパク質同定には Proteome Discoverer ソフトウェア (Thermo Scientific) を使用した Mascot 検索 (NCBI nr データベース, Taxonomy; Green plants) も行った。

#### de novo sequencing によるペプチド配列の推定

de novo sequencing には PEAKS Studio v6.0 (インフォコム) を使用した。消化酵素を "None" に設定してアミノ酸配列の推定を行った。TLC (Total Local Confidence) >60% 以上のスコア値を示したアミノ酸配列を信頼度の高いデータと判断し、その配列を protein-protein BLAST (blastp) 検索 (Taxonomy; Green plants) に供した。

### 1-3. 経皮感作性を有する 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選択

1-2 で得られた 19S に特異的な 6 種のペプチドのうち、ペプチドイオンの検出回数の最も高かったペプチドを選択した。

#### 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、ウェスタンブロットティング及び阻害 ELISA により確認した。

#### ウェスタンブロットティング

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トティングを行った。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。

### 2-1. 加水分解条件が異なる HWP 小麦の分子量変化に関する検討

#### 試料

グルテン酸加水分解物については、1-2 と同様に自家調製した。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、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 Neutrase®(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、Neutrase 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。Neutrase は、endonuclease であり、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。

#### 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

#### 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。

### 2-2. グルテンの脱アミド化分析

#### 蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化誘導体の分析

グルテン総タンパク質の脱アミド化分析に関して、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。脱アミド化の評価対象とするタンパク質としては、L-アラニル-L-グルタミン、β-ラクトグロブリン、グルパール 19S を用いた。

#### [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-hydroxyl succinimidyl carbamate)で誘導体化した。

#### [HPLC 測定条件]

カラム: AccQ・Tag(粒径 4.0  $\mu\text{m}$ 、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

#### 網羅的プロテオーム解析法及び定量的プロテオーム解析法を用いたグルテンの脱アミド化分析

2-1 で調製した試料について、網羅的プロテオーム解析を実施し、グルテンの脱アミド化反応について解析した。

#### [分析前処理]

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  $\mu\text{L}$  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。

#### 3-1. グルバール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討 -19S-ELISA 法との比較検討

##### 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、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  $\mu$ g/mL geneticin、200  $\mu$ 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°Cの 5% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L/well 播種し、37°Cの 5% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L/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  $\mu$ 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なわない条件を 1.0 とした場合の相対値として表した。

## 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  $\mu$ g/mL とした。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 曲線解析を行った。症例の陰陽性の判定は、①19S による SPT、②19S-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<sub>A</sub>/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。

## 3-2 グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討-HWP 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。

### 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。

## EXiLE 法

3-1 と同様の方法で行った。

## 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。

## C. 研究結果

### 1-1. ショットガン MS 解析による、グルパール 19S とグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

i-RUBY により発現比較結果が得られたタンパク質総数は 5074 であり、そのうちコムギ属 (*Triticum*) に候補を絞った結果、954 のタンパク質変動を同定する

に至った。

これら候補タンパク質のうち、604 の発現がグルテン・グルパール 19S 間で2倍以上異なることが明らかとなった。シグナル比とタンパク質数の関係を Table 1 に示した。グルテンと比較して、グルパール 19S におけるシグナル比が 1/5 であったタンパク質数は、重複を除き 111 であり、これらは $\gamma$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン等のタンパク質であった。

一方、グルテンと比較して、グルパール 19S におけるシグナル比が 5 倍以上であったタンパク質数は重複を除きわずか 5 であり、主なタンパク質としては Histone H4 であった。残りの 4 つは定量に用いたペプチドの本数が 1 本であったため信頼度の高いデータとして取り扱わなかった。

## 1-2. 多変量解析による、グルパール 19S 特徴的なペプチドの探索

グルパール 19S のように抗原性を有する HWP に特徴的なペプチドを同定することを目的として、グルテン、グルパール 19S、及び酸加水分解が進んだ HWP (HWP 24h) から得られるペプチドの MS データを比較し、グルパール 19S に特徴的に発現するペプチドを多変量解析により探索した。

Progenesis LC-MS ソフトウェアを用いて 3 サンプル間の MS<sup>1</sup> のピーク強度を比較した。観測された 32,749 本のピークのうち、グルテンと HWP 24h のピーク強度がグルパール 19S のピーク強度の 1%未満である 179 本のピークを抽出し、さらに保持時間が 90 分未満の消化物であり、ペプチド由来と考えられる 10 本をグルパール 19S に特徴的なペプチドとして絞り込んだ。

Progenesis LC-MS 上で Mascot 検索(データベース: Swiss-Prot, Taxonomy: Green plants)を行うことで、2 本のペプチドピーク(#6: Puroindoline A 及び#8:  $\alpha/\beta$ -gliadin clone PW1215)を同定した。また、Proteome Discoverer ソフトウェアを用いた Mascot 検索(データベース: NCBI nr, Taxonomy: Green plants) から、更に 2 本のペプチドピーク (#1 及び#5: HMW glutenin subunit)の同定に至った。残り 6 本の候補ピ

ークについては MS/MS データを用いて、PEAKS Studio ソフトウェアにて *de novo* sequencing を行った。TLC (Total local confidence)スコア 60%以上を信頼度の高いデータと判断し、2 本のペプチド配列 (#3 及び#9) を予測するに至った。この予測配列を protein-protein BLAST (blastp)検索に供することにより、コムギ属 (*Triticum*) のタンパク質の部分配列(#3: NADP-dependent malic enzyme 1 及び#9: WIR1)がヒットした。残りの 4 本のピーク(#1, #2, #7, 及び#10)は MS/MS の情報が少なく、TLC スコア 60%の信頼度においてペプチド配列を予測することができなかった。

## 1-3. 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が、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。1-2 に示したショットガンプロテオミクスにより、グルパール 19S に特徴的な 6 つのペプチドの中で、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、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。

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。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。

## 2-1. 加水分解条件が異なる HWP 小麦の分子量変化に関する検討

### サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析

酸加水分解及びアルカリ加水分解グルテンの分子量についてサイズ排除クロマトグラフィーで解析を行った。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 までは継続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。

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、酸及びアルカリ加水分解より速いと推測された。

#### 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。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で分解 1h 後にはほぼ終了するものと思われた。

## 2-2. グルテンの脱アミド化分析

### 蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化誘導体の分析

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は良好であった。酸加水分解グルテンの脱アミド化を検討し、経時的に脱アミド化の起きていることが確認された。

### 網羅的プロテオーム解析法及び定量的プロテオーム解析法を用いたグルテンの脱アミド化分析

網羅的プロテオーム解析の結果、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -、 $\omega$ -2、 $\omega$ -5-グリアジン及び LMW-、HMW-グルテニン等のタンパク質由来のペプチドが 14,000 本以上(Ions score>30, rank all)検出された。また、塩酸処理で想定されるグルタミン-グルタミン酸変換(Gln→Glu)及びアスパラギン-アスパラギン酸変換(Asn→Asp)された修飾ペプチドも多く検出された。 $\gamma$ -グリアジンにはトリプシン消

化による切断部位がほとんど存在せず、予想されるペプチド分子量がかなり大きいため、LC/MS での検出が困難であると想定されたが、塩酸処理による加水分解によってランダムな位置で切断されたペプチド断片が検出されたため、ほぼ全領域を網羅することが可能であった。

定量的プロテオーム解析により、塩酸処理によるグルタミン及びアスパラギンの脱アミド化割合について解析した。定量的プロテオーム解析には、量的に多いペプチドイオンほど検出される頻度(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たため、今回の解析では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。本定量結果より、グルパール 19S(GLU19S)では脱アミド化が約 50%進んでいると推測された。また、塩酸処理より加水分解時間が長くなるに従って、グルタミンからグルタミン酸及びアスパラギンからアスパラギン酸への脱アミド化が進み、加水分解時間 6 時間(HWP 6h)を超過すると脱アミド化割合が一定になることが示された。また、グルタミン及びアスパラギンはそれぞれ同様の脱アミド化割合を示す傾向が示された。グルパール 19S と酸加水分解時間 30 分(HWP 0.5h)の HWP がほぼ同一の脱アミド化割合を示した。また、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。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。

## 3-1. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討 -19S-ELISA 法との比較検討

### 代表的な EXiLE 応答