

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

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 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  $2 \times 2$  分割表にまとめた。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 反応の強度と血清中 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。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。19S-EXiLE のカットオフ値を前述と同様に 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 試験も陽性的のまま変化がなかった。なお、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という結果が得られた。

### 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 との反応性の評価

## ウエスタンブロッティングによる応答性

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 のスミ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

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 0.5 h 分解物において応答性が急激に上昇し、24 h 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

### 1-1. 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

グルテンを酸加水分解して作製されたグルパール 19S は、酸加水分解の過程でタンパク質のグルタミンまたはアスパラギン残基が脱アミド化されるほか、ペプチド結合の開裂も起こるものと考えられる。そのためグルパール 19S は、グルテンのトリプシン切断で生じるペプチドピークが消失していることが予想された。解析の結果、実際に多くのペプチドのシグナル比はグルテンよりもグルパール 19S で小さく、トリプシン消化により生じるペプチドが脱アミド化もしくは切断されている可能性が考えられた。グルテンと比較して 5 倍以上のシグナル比が得られた Histone H4 は、酸性条件下で抽

出されてきた、もしくは酸加水分解によるペプチド結合の開裂に伴ってトリプシンが Access しやすくなることによってペプチドピークが生じたものと考えられた。

以上の結果から、グルパール 19S のトリプシン消化物はグルテンのトリプシン消化物と比較して、 $\gamma$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン等のアレルゲンタンパク質由来のペプチドに変化が起きていることが示唆された。

### 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

強い抗原性を有するグルパール 19S に特徴的に発現するペプチドとして、(1) グルテンの加水分解により新たに生じるペプチドであり、かつ(2) 加水分解が進行することによって抗原性が無くなった HWP (HWP 24h)においては消失しているペプチドを多変量解析により探索した。10 本のペプチドでグルパール 19S のみ十分なピーク強度が得られた。ペプチドの MS/MS 相同性検索より、HMW-グルテニンや $\alpha/\beta$ -グリアジンといったコムギアレルゲン内のグルタミンがグルタミン酸に変化した(脱アミド化)されたペプチドが同定された。脱アミド化の起こっていないペプチド由来のピークは、グルテンだけでなくグルパール 19S でも確認されていることから、これらのタンパク質の一部が脱アミド化を受けていることが示唆された。HWP 24h では、加水分解の進行に伴い脱アミド化及びペプチド結合の開裂が進んだために、グルテンの酸加水分解によって生じたペプチドのピークが消失したと考えられた。

*de novo sequencing* はデータベースによらずに MS/MS データのみから配列を予測するため、コムギのようにデータベースが完全に整備されていないものや、グルパール 19S のように酸加水分解によるペプチドへの非酵素的な修飾が考えられる場合には、有用な情報を与える。本研究では、MS/MS データから一部配列を予測し、その配列をデータベース検索することで、タンパク質を予測することが可能であった。他方、*de novo sequencing* を用いても配列が予測できなかった 4 本のペプチドについては、ピーク強度が十分なも

のもあったことから、ペプチドの特性により得られた MS/MS スペクトルが少なかったものと考えられた。

### 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 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。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に 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。

### 2-1. 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

グルパール 19S は、SEC 及び SDS-PAGE の分子量分布の測定結果から酸加水分解の程度は、HWP 0.5h (30 分処理)とほぼ同等であると考えられた。また、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。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。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。Neutrase 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 Neutrase 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するものと思われた。

### 2-2. 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からグルパール 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。なお、すでに、小麦グルテンの 0.1NHCl, 120°C, 50 分の処理で、グルタミンの 60%が脱アミド化されているという報告があり、今回の報告と近い結果となっている。酸加水分解の時間を更に延ばしてゆくと脱アミド化率も上昇した。一方、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。更に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。

### 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

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つたため、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つたが、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り、このために抗体価の低い血清の応答を調べるにはやや感度が不足する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た。

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つた ( $R=0.2026$ )。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た。

最近、横大路らにより、茶のしずく石鹼患者 IgE は脱アミド化された  $\gamma$  グリアジンに強く結合し、脱アミド化前の  $\gamma$  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した。

### 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

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つた。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つた。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、今後、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

### 1-1. 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

グルテンのトリプシン消化ペプチド由来ピークの多くが、グルパール 19S では減弱していた。グルパール 19S で減少したペプチド配列のグルタミン残基が脱アミド化されたペプチドがグルパール 19S で観察された。

### 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

強い抗原性を有する HWP に特徴的なペプチドの候補として 10 本のペプチドピークを抽出し、そのうち 4

本の配列をデータベース検索にて、2本の配列を *de novo sequencing* にて同定した。

### 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。

### 2-1. 加水分解条件が異なる HWP の分子量変化に関する検討

グルパール 19S 及び酸、アルカリ、酵素加水分解グルテン試料について SEC 及び SDS-PAGE 測定により、分子量分布の測定及び分子量分布の変化を評価した。その結果、グルテンの酸加水分解物(30分)がグルパール 19S と同等の分子量パターンを示すこと、酸及びアルカリ加水分解 HWP 共に加水分解の進行に伴って低分子化が進むこと、また酵素加水分解による HWP は酸、アルカリ加水分解と比較して、加水分解に伴う低分子化の程度が低いことが明らかになった。

### 2-2. グルテンの脱アミド化分析

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実施し、グルテンに含まれるグルタミン→グルタミン酸変換(脱アミド化)及びその割合を評価した。その結果、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。また酵素加水分解では、脱アミド化はほとんど進行しなかった。

### 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

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る。

### 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

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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 手島玲子: 経口感作の成立と消化管粘膜免疫機構, アレルギー・免疫, 19 (1), 40-44 (2012)
- 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.* 2012; 160 (3): 259-264.
- 3) 手島玲子: 加水分解小麦によるアレルギーについて, ファルマシア, 49 (2), 116-120 (2013)
- 4) 中村亮介, 手島玲子: アレルゲン特異 IgE 抗体の新しい測定方法 4.EXiLE 法, アレルギー・免疫, 20(1), 63-73 (2013)
- 5) 手島玲子: 食物アレルゲンの話, 日本小児アレルギー学会誌, 27(1), 115-119 (2013)
- 6) 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.
- 7) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. *Clinical Immunology & Allergy* 2013; 59, 598-602.

- 8) Teshima R: Food Allergen in Cosmetics, *Yakugaku Zasshi*. 2014;134(1): 33-38.
- 9) 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.
- 10) 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 & Allergology*, 2014;62:492-495.
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 手島玲子: 経皮感作のメカニズムと食物惹起のクレストーク、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌 8(4), 249-254 (2014)
- 14) Knipping K., Simons P.J., Buelens- Sleumer L.S., Cox L., den Hartog M., de Jong N., Teshima R., Garssen J., Boon L., Knippels L.M.J.: Development of  $\beta$ -lactogloblin-specific chimeric human IgE monoclonal antibodies for in vitro safety assessment of whey hydrolysates., *PLOS ONE* 9(8), e106025 (2014)
2. 学会発表
- 1) 中村里香, 中村亮介, 安達玲子, 板垣康治, 福富友馬, 手島玲子: 酸加水分解小麦のIgE結合性および惹起能の比較検討, 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2012.5)
- 2) 中村亮介, 中村里香, 安達玲子, 板垣康治, 福富友馬, 手島玲子: 酸加水分解小麦含有石鹼で感作された患者IgEの*in vitro*活性化試験による交差反応性の評価, 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2012.5)
- 3) 手島玲子: 食物アレルギーの話, 第49回小児アレルギー学会 (2012.9)
- 4) 中村里香, 中村亮介, 酒井信夫, 安達玲子, 板垣康治, 福富友馬, 手島玲子: 酸加水分解小麦含有石鹼に感作された患者血清IgE反応性の解析, 第19回日本免疫毒性学会学術大会 (2012.9)
- 5) 手島玲子: 新規食品並びにアレルギー物質の規格と検査について, 第104回日本食品衛生学会学術講演会 (2012.9)
- 6) Teshima R.; Regulation of food containing allergic ingredients in Japan. 5<sup>th</sup> international Fresenius Conference (2012. 10)
- 7) 中村亮介, 中村里香, 酒井信夫, 安達玲子, 福富友馬, 手島玲子: EXiLE法による加水分解小麦のアレルギー性における分子サイズの影響の解析, 第85回日本生化学会大会 (2012.12)
- 8) 手島玲子: 化粧品に含まれる食物アレルギー, 日本薬学会第133年会 (2013.3)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)

- 13) 酒井信夫、中村里香、齋藤由二、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)
- 14) 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重量分布・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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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).
- 22)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)
- 23)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)

#### Ⅱ. 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

( 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析 )

研究分担者 伊東祐二 鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻

研究要旨

茶のしず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 抗体ライブラリーを構築し、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。

A. 研究目的

本研究の目的は、医薬部外品・化粧品に含まれる様々な工業添加物によるアレルギーの発症原因の解明に向け、アレルギー患者から原因となる抗体を単離し、その特異性や性質を決定することで、アレルギー反応に関わる物質の網羅的抗原性の解析を行うことである。このような、疾患の直接的原因となる抗体クローンの解析は、本研究で用いる抗体ファージライブラリー技術によって初めて可能であり、より詳細な抗原性の解析が達成できる。

平成24年度では、“茶のしずく”石鹼で誘発された小麦アレルギー患者由来の血清中の IgE 抗体価を小麦タンパク質であるグルテン並びに加水分解小麦製品であるグルパール 19S を用いて調べた結果、通常的小麦アレルギー患者と異なり、グルテンだけでなくグルパール 19S にも高い結合活性を有する IgE 抗体の存在が明らかになった。そこで、グルパール 19S に対す

る IgE の特性と、グルパール 19S の感作によって生じたグルテン結合 IgE の生成機構を解明する目的で、“茶のしずく”石鹼による小麦アレルギー患者 P6 と P12 由来の IgE 抗体ライブラリーを作製し、グルテンならびにグルパール 19S に対するバイオパンニングによって、特異的な結合抗体の単離を試み、いくつかの結合クローンの単離に成功した。平成25年度では、結合クローンの単離方法の改良を行い、次世代シーケンサーを用いた網羅的配列解析による抗原結合クローンの単離に成功した。最終年度である平成26年度では、得られた抗体クローンを、単鎖 Fv 抗体として大腸菌もしくはグラム陽性菌である *Brevibacillus brevis* での発現を行い、蛋白質レベルでの加水分解小麦・小麦タンパク質との結合ならびに標的抗原の同定を試みた。

以上の結果を基に、茶のしずく石鹼中の加水分解小麦によって誘発された IgE が、食品中の小麦アレルゲンに対するアレルギー症状を引



き起こす機構を提案した。

## B. 研究方法

### 生体サンプルと材料

平成24、25年度の報告書に血液サンプルの採取並びに処理方法について記載した。

### 患者血漿を用いた ELISA 測定

平成24、25年度の報告書に記載した。

### IgE 抗体ファージライブラリーの作製並びにバイオパンニング

平成24、25年度の報告書に記載した。

### 次世代シーケンサーによる IgE 抗体の VH 領域の網羅的配列解析

平成25、26年度の報告書に記載した。

### 次世代シーケンサーによって得られた VH 配列を使った抗原特異的 VH 配列の特定解析

平成26年度の報告書に記載した。

### 次世代シーケンサーによる得られた IgE 抗体の VH の配列を持つ単鎖 Fv 遺伝子の単離

平成26年度の報告書に記載した。

### IgE の H $\epsilon$ 鎖遺伝子の確認解析

平成26年度の報告書に記載した。

### 大腸菌での単鎖 Fv の発現と分画

平成26年度の報告書に記載した。

### *Brevibacillus brevis* での単鎖 Fv の発現

平成26年度の報告書に記載した。

## C. 研究結果

### “茶のしずく”小麦アレルギー患者血漿中の抗体解析並びに通常小麦アレルギー患者との比較

“茶のしずく”小麦アレルギー患者13人 (P1-13) の血漿中の各抗体クラス別の抗体価を加水分解小麦並びにグルテンに対して評価を行うとともに、通常小麦アレルギー患者の抗体価を比較した (平成24年度報告書)。通常小麦アレルギー・茶のしずく石鹼アレルギー患者ならびに健常人 (プールを含む) で高い抗体価を示したのは、グルテンに対する IgG1 (図1A、図2A、) 並

びに IgM 抗体であり、これらは健常人、患者の区別なく小麦タンパク質 (グルテン) に対する抗体価を有しているようである。一方で、健常人と通常小麦アレルギー・茶のしずく石鹼アレルギー患者の間で違いが見られたのが、予想されたように IgE 抗体価であり (ただし健常人 H2 を除く)、これらのアレルギー疾患では、小麦タンパク質に対する IgE が病態の原因になっていることを強く示唆している。さらに、通常小麦アレルギーと茶のしずく石鹼アレルギー患者間で違いがみられるのは、グルパール 19S に対する IgE 抗体価で、茶のしずく石鹼アレルギー患者では、顕著にグルパール 19S に対する抗体価が高く、一方で、通常小麦アレルギーの患者ではグルパール 19S に対する抗体価は低かった (平成24年度報告書: 図3H)。このことは、茶のしずくアレルギー患者でのグルパール 19S に対する高い結合活性を有する IgE が、これが病態と深く関わっていることを示唆している。

しかし、グルパール 19S によって誘発された IgE そのものが直接グルテンに対する (交差) 結合活性を持つことで、小麦アレルギー症状をもたらすのか、あるいは、グルパール 19S によって誘発された IgE とグルテンに対する IgE は異なる標的抗原タンパク質・エピトープを認識する別の IgE なのかは、このような化学的処理を行った食品由来のアレルゲンに対する食物アレルギーの発症機構を明らかにする上では、重要な問題である。このことから、我々は、患者由来の IgE 抗体ライブラリーから、これらの疾患の原因となる IgE クローンの単離同定を試み、その標的抗原を含めた特異性の解析を行った。

加水分解小麦に対するアレルギー患者由来の抗体ライブラリーからの通常のバイオパンニングによる抗体ファージの単離と結合特性 平成2

4年度の報告において、グルテン (GT) 並びにグルパール 19S (GP) に対して同等の反応を有する患者 P4 と、グルテンよりもグルパール 19S に対して高い反応性を有する患者 P12 を選択し、これらの患者の血液の抹消リンパ球由来の遺伝子ソースを用いた、IgE 由来の単鎖 Fv 抗体ライブラリーを構築した (平成 24 年度報告書)。引き続き、平成 25 年度では、患者 P4 由来のライブラリーを使って、GP (グルパール 19S) に対するバイオパンニングを行うことにより、通常の ELISA によるスクリーニングから 2 種類の特異的なクローンを得た。平成 26 年度では、さらにバイオパンニングを進めた結果、昨年度の患者 P4 由来の抗体ライブラリーからの GP に対するバイオパンニングによる 2 クローン (P4-GP-B9 と P4-GP-G7) に加え、患者 P4 由来の抗体ライブラリーから GT に対するバイオパンニングにより P4-GT-B7、P4-GT-E7 の 2 クローン、さらに患者 P12 由来の抗体ライブラリーから GP に対するバイオパンニングにより P12-GP-8、P12-GP-14、P12-GP-18 の 3 クローンを得た。それらのグルテン並びにグルパール 19S に対する結合活性を調べた結果、すべてのクローンにおいて、グルテンに対し高い結合活性を示し、特に、P4-GP-B9 と P4-GP-G7 ならびに P12-GP-8、P12-GP-14、P12-GP-18 においては、グルパールに対してバイオパンニングを行ったにも関わらず、これらはグルテンに高い特異性を示す結果となった。興味深いのは、P4-GT-E7 については、グルテンに対するバイオパンニングによって得られたのにもかかわらず、グルパールに対する弱いものの反応性を示していることである。これらの通常のバイオパンニングで得られた 7 クローンのアミノ酸配列とその遺伝子型は、平成 26 年度の報告書の図 3B と 3C にまとめた。

#### 患者 P4 由来の抗体ライブラリーを用いたグルテ

ンに対するバイオパンニングによって得られた抗体 VH 配列の次世代シーケンサー (NGS) による解析

グルパールに特異的、もしくは、グルテンとグルパールに同等の結合活性を有するような抗体クローンの単離を目指していたのにもかかわらず、得られたクローンのほとんどがグルテン特異的であったため、さらなるクローンの探索を、次世代シーケンサー (NGS) を用いた方法で行った。

患者 P4 由来のライブラリーを使った GT (グルテン) に対する 1 回のバイオパンニングによって、増幅されてくる IgE 抗体の VH 配列の NGS による網羅的解析を行った結果、パンニングの操作によって、顕著に増幅が見られたクローンが見つかった。最も高いもので 33.8 倍の増幅倍率が見られ (NGS-P4-GT1)、増幅率が 2.5 倍以上のものは、全部で 88 個あった。これらの 88 個の配列について、分子系統樹を作成した結果、約 11 個 P-Z のクラスターが形成された。この中で、NGS 解析から得られた高い増幅倍率 (26.5) を示す配列 (NGS-)P4-GT2 は、患者 P4 ライブラリーからグルテンに対する通常スクリーニングによって得られた (NP-)P4-GT-B7 と配列が一致したことから、本法による抗原特異的な抗体クローンの特定の有用性が示された。

興味深いことに、同じ患者 P4 のライブラリーから GP に対するパンニング後、通常の ELISA スクリーニングによって得られた NP-P4-GP-B9、NP-P4-GP-B9 は、患者 P4 由来ライブラリーから GT (グルテン) に対するバイオパンニング後の NGS 配列解析後の系統樹において、11 個のクラスターの内、それぞれ R クラスター並びに U クラスターの中でも高い配列相同性 (>97%) を示すものが見出だされた。このことは、GP に対するパンニングで得られたものであっても、GP 特異的は配列

というわけではなく、むしろ、GT 特異的 VH 配列と近似したものであることが分かった。

**患者 P12 由来の抗体ライブラリーを用いた GP (グルパール) に対するバイオパンニングによって得られた抗体 VH 配列の次世代シーケンサー (NGS) による解析** 同様にして、患者 P12 由来のライブラリーを使ったグルパールに対するバイオパンニングによって増幅されてくる VH の配列解析を行った結果、濃縮倍率が 2.5 倍以上の配列 (51 配列) を使って分子系統樹を作成したところ、9 個のクラスターが形成された (F-N)。クラスター K に分類された NGS-P12-GP-22 ならびに NGS-P12-GP-34 は、患者 P12 由来のライブラリーから GP に対する通常スクリーニングによって得られた NP-P12-GP-18 と NP-P12-GP-8 の VH 配列と同一であり、また、GP に対する通常スクリーニングによって得られたもう一つのクローンである NP-P12-GP-14 についてもラスタ I に属することから、NGS 解析による抗体の特定手法が有用な方法であることであることを強く示している。

**NGS-P4-GT1 との NGS-P4-GT2 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 配列の再構築と再構築された単鎖 Fv 抗体クローンの結合特性** 次世代シーケンサーによって、明らかになったグルテンあるいはグローバルに対する特異的な抗体の VH 配列を基に、患者 P4 の抗体ライブラリーの遺伝子ソースから、NGS-P4-GT1 と NGS-P4-GT2 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 抗体の再構築を行った。これらの再構築を行った単鎖 Fv 遺伝子については、VH 配列は予想されたように均一に近いものであったが、VL 配列については多様性が見られた。この多様性については、平成 26 年度の報告書を参照されたい。

NGS-P4-GT1 由来の 5 種類の単鎖 Fv 抗体ファージの結合特異性は、いずれのクローンともグルテンに対する結合活性が見られたことから、これら

の単鎖 Fv 抗体においては、VH がグルテンに対する抗原認識に深く寄与しており、L 鎖の違いはあまり特異性に影響しないように見える。

NGS-P4-GT2 の VH 配列を持つ再構築された 5 種の単鎖 Fv では、NGS-P4-GT2B、D、E では結合活性が見られるのに対し、NGS-P4-GT2-A、C では、結合活性がほぼ消失していた。このことから、これらのクローンでは、グルテンに対する結合において L 鎖の依存性が高いことが示された。

**NGS-P12-GP8 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 配列の再構築によって得られた 3 種の抗体クローンの特性** 患者 P12 の抗体ライブラリーから GP に対するバイオパンニング後の次世代シーケンサーによる VH 配列解析で、互いに高い配列相同性を持つ配列を有するクラスター M より、NGS-P12-GP8 (増幅倍率: 4.5) の VH 配列を選択し、単鎖 Fv 遺伝子の再構築を行い、得られた 3 種の単鎖 Fv 抗体について結合活性を評価したところ、いずれも、結合活性が極めて弱いものであった。

以上のように、バイオパンニング後の通常のスクリーニング、並びに、NGS 解析による新たな手法を組み入れて、抗原特異的なクローンの単離を行ったが、現状のファージ抗体を使った結合アッセイでは、グルテンに対する特異性を持った抗体は得られるものの、グルパール 19S に対して特異性を持った抗体は得られていない。現状の特異性の評価で用いているファージ抗体 (バクテリオファージに提示された状態での単鎖 Fv 抗体) では、複雑なタンパク質内部に存在するエピトープの認識が難しい可能性が考えられることから、可溶性の単鎖 Fv 抗体タンパク質を用いて、特異性を検討した。

**大腸菌並びにグラム陽性菌 *Brevibacillus brevis***

での単鎖 Fvno 発現と結合活性評価 可溶性の単鎖 Fv 抗体を調製するために、大腸菌並びにグラム陽性菌である *B. brevis* での発現を試みた（平成 26 年度報告書の図 9）。大腸菌での発現が見られた NP-P12-GP-8、NP-P12-GP-18、NP-P4-GP-G7、NGS-P4-GT1C、NGS-P4-GT2B、NGS-P4-GT2E については、NTA カラムにて、単鎖 Fv 抗体の精製を行った。一方で、並行して、これらのクローンのうち、通常のバイオパンニングにより得られた 7 つのクローンについて、*B. brevis* での発現を行った結果、NP-P4-GP-B9 の 1 クローンのみで発現が見られたことから、大腸菌の場合と同じ方法にて、培養上清から精製を行った。

精製された単鎖 Fv 抗体について、グルテン並びにグルパールに対する結合活性を評価したところ、興味深いことに、抗体ファージのレベルでは、グルパールに対する特異性がわずかしかみられなかった NP-P12-GP-8 並びに NP-P4-GP-G7 が、単鎖 Fv 抗体では、グルテンへの結合活性を維持しながら、明らかにグルパールに対する結合活性が上昇していることが分かった。一方で、GT に対するバイオパンニング後の NGS 解析から得られた NGS-P4-GT1C ならびに GS-P4-GT2E 抗体については、グルテンに対してのみ高い特異性を示したものの、NGS-P4-GT2B では、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が、明らかに上昇しており、先の NP-P12-GP-8 並びに NP-P4-GP-G7 のクローンで見られた現象と類似していた。

#### D. 考察

P12-GP-8、P4-GP-G7 で見られた、抗体ファージでは見られないグルパールに対する結合活性が、単鎖 Fv 抗体（タンパク質）の場合では顕著に増加していることは、加水分解小麦によるアレルギー

一発症の原因となる IgE 抗体の生成機構を考える上では重要な結果である。患者 P4、特に P12 においては、グルパールに対する IgE 抗体価が高いため、構築した IgE 抗体ライブラリーからはグルパールに対する抗体クローンの単離が容易であると予想されたが、予想に反して、GP に対するバイオパンニングにおいて得られるファージの結合特異性は、多くはグルテンのみで、グルパールに対する結合活性は全く見られないか、小さなものであった。しかし、精製した単鎖 Fv ではグルパールに対する結合特性が顕著に上昇した。このように単鎖 Fv での特異性が変わった理由は、いくつかの理由が考えられるが（平成 26 年度の報告書の考察の項を参照）、重要なことは、本研究によって初めて、クローンレベルで、グルパールとグルテンに交差結合活性をもつ IgE の抗体の存在が明らかとなったことである。従来、酸加水分解によって生じた新たなエピトープを特異的に認識する IgE 抗体（例えば、酸加水分解反応で生じるイソペプチドやデアミ体を認識する抗体等）が産生されると考えられてきたが、少なくとも本研究で得られた抗体は、酸加水分解によって生じたグルパールのみの特異なエピトープを認識するものではなく、グルテンのエクトープを認識しながら同時にグルパールに特異なエピトープを認識するものであった。このような交差活性をもつ抗体の抗原認識がどの様になっているかを明らかにするため今後の検討が必要である。

このような分子認識の変化を説明する現象として、共通の VH 配列を持つ NGS-P4-GT2-B と NGS-P4-GT2-E の構造活性相関を見る事は有用である。これらの 2 つのクローンは、VH 領域は共通で、VL の配列のみが異なるが、前者ではグルパールに対する結合活性が高いが、後者ではグルパールに対する結合活性が極めて弱くなっている。こ

のように共通の VH を持ち、おそらくはグルテン上の同じエピトープを認識しているにも関わらず、VL の違いによってグルパール上に生じた特異なエピトープに対する結合特性が変化している。通常的小麦アレルギー患者の血清で見られる IgE は、ほぼグルテンのみを認識することが知られているが、茶のしずく石鹼による小麦アレルギーの患者の血清中の IgE は、グルパールとグルテン双方に結合活性を示した。我々の結果は、この交差結合活性が、異なるクローンの IgE によるものではなく、同一の IgE によってもたらされた可能性を強く示唆している。このような抗体の生成機構としては、B 細胞の成熟の過程で、IgM 抗体の遺伝子プールからクラススイッチによって IgE 抗体が生じる際に、加水分解小麦に特有のエピトープによって誘発された IgE が通常グルテンに対する結合活性を保持したことで、茶のしずく石鹼による小麦アレルギーが発症した可能性が推定された。

このような推論の一方で、我々のアプローチはいくつかの限界を持っていることが明らかとなった。単鎖 Fv 抗体ファージライブラリーは、VH と VL の遺伝子の人工的なシャッフルによって作製されており、これは必ずしも患者血液 B 細胞の IgE の活性を正確に反映していない可能性がある。また、単鎖 Fv 抗体という発現のフォーマットが、IgE の抗体の特性を十分に発現しているかどうかといった問題も考えられる（平成 26 年度報告書の考察の項）。

本法では、単鎖 Fv 抗体ファージライブラリーを用いて、特に、茶のしずく石鹼による小麦アレルギーの原因となる IgE 抗体の同定を目指した。最終的に得られたクローンは、グルパールとグルテンに交差活性をもつクローンと、グルテンのみ結合活性をもつクローンであり、グルパールの

みに結合活性を有する抗体クローンは得られなかった。しかし、これは、グルパールのみに特異性を有する抗体クローンの存在を否定するものではない。ファージ上に提示された単鎖 Fv 抗体では、グルパールのもつ特異的なエピトープを認識しにくいことが明らかになったことから、抗体ライブラリーから、グルパールのみに特異性を有する抗体を単離することは、困難である可能性が示唆された。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

平成 24、25、26 年度の報告書に記載の通り。

### 2. 学会発表

平成 24、25、26 年度の報告書に記載の通り。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

なし

3. その他

2. 実用新案登録

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

## 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
研究協力者	手島 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	食品部 部長
	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 里香	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部 研究員
	小川 久美子	国立医薬品食品衛生研究所	病理部 部長
	曹 永晩	国立医薬品食品衛生研究所	病理部 室長

#### 研究要旨:

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(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る。

#### 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(茶のしづく石鹸: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ている。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、コムギを原材料として使用した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て検討を行った。これまでに、①グルパール19Sの経皮感作性（用量依存性等）の検討、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の検討、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の検討、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の検討、⑥加水分解コラーゲンの経皮感作性の検討、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に関する検討を行った。

さらに、即時型アレルギーに関する経皮感作性の動物試験系については、専門家により評価され確立された方法がこれまで無かったことから、本研究を踏まえ、即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法（概要）を作成した。

## B. 研究方法

### 抗原懸濁液の調製

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)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調製した。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。多くの実験ではラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度0.5%で添加した。

グルテンの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1M水酸化ナトリウム水溶液を加えてpHを約12に調整し、0.5, 1,

2, 3, 6, 9, 12, 24, 48時間加熱した。所定の時間経過後、1N塩酸で中和して加水分解反応を停止させ、グルテン終濃度10 mg/mLとなるようにPBSにて希釈した。分解0時間のサンプルは、1M水酸化ナトリウム水溶液を予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。SDS-PAGEにより加水分解が進行したことを確認した。貼付時にはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度0.5%で添加した。

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 µU/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。貼付時にはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度0.5%で添加した。

酸加水分解については、グルテンのストック懸濁液に、pH1となるように1N塩酸を加え、100°Cで加熱した。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、1N塩酸を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。貼付時にはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度0.5%で添加した。

加水分解コラーゲン9試料(A~I)は日本化粧品工業連合会を通じて入手した。ウシ由来コラーゲン(BC; Sigma C9879)、ウシ由来ゼラチン(BG; シグマアルドリッチジャパン 12-0230-5)、魚由来コラーゲン(FC; 井原水産)、魚由来ゼラチン(FG; Sigma G7041)、ウシ由来コラーゲンペプチド酸分解品(J; 和光純薬



032-15791)、及びウシ由来コラーゲンペプチド酵素分解品(K; 和光純薬 035-15801)は試薬標準品を購入した。これらの試料は終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。貼付時にはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度 0.5%で添加した。

#### マウスを用いた経皮感作試験

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5-8匹とし、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2cm角に切り取ったものを用い、パッド部に50 µLの抗原懸濁液(多くの実験では500 µg protein)を浸潤させ剃毛部に貼付した。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日間の感作後にパッチを外し(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、抗原特異的 IgE 抗体及び 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 µL を腹腔内投与(i. p.)して行った。i. p. 後 30 分間のマウスの直腸内体温変化を測定し、アナフィラキシー症状のスコアリングを行った。惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血漿中ヒスタミンの濃度を、Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

#### **【実験 1】** グルパール 19S の経皮感作性 (用量依存性等) の検討

グルパール 19S を抗原とし、感作抗原量は 500 µg あるいは 200 µg/パッチとした。グルパール 19S の溶解度を高めるために添加する SDS について感作時の共存効果を調べるため、SDS を添加する群 (終濃度 0.5%) 及び添加しな

い群を設定した。

#### **【実験 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の検討

アルカリ加水分解物については、未分解グルテン(Alk0h)、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示した 0.5(Alk0.5h)、および加水分解が進み、SDS-PAGE で 30 kDa 以上のタンパク質バンドがほぼ消失しているもの(Alk12h)の経皮感作性を検討した。酵素加水分解物については、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 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の検討

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。

#### **【実験 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

組織病理解析を目的とし、グルパール 19S にて 1 週、3 週、4 週感作後に解剖する群、及び 4

週感作の後 i. p. 投与によりアナフィラキシー反応を惹起し、30 分後に解剖する群を設定し、実験を行った。病理解析用検体採取にあたっては、肉眼観察後、深麻酔下でマウスを屠殺解剖し、感作開始 1、3 および 4 週の群については感作部位（左側背部）皮膚、左右腋窩及び鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節を、4 週感作終了 1 日後に 19S の i. p. 投与にて惹起を行った群については、さらに脾臓および眼瞼を含む眼球も摘出した。摘出した臓器はホルマリンにて固定した。皮膚は各 3 片、リンパ節、脾臓および眼球は各 1 片を切出し、パラフィン包埋後、定法に従いヘマトキシリン・エオジン (HE) 標本を製作した。病理組織学的検討は、所見の程度によってスコアリングを行った。

#### 【実験 5】Th2 型免疫応答性サイトカインの血中濃度の検討

グルパール 19S 感作群について、感作開始前から惹起後まで経時的に採取した血清中の TSLP (Thymic stromal lymphopoietin)、及びペリオスチンの濃度を ELISA（それぞれ eBioscience 社、R&D Systems 社）により定量し、V 群との比較を行った。

#### 【実験 6】加水分解コラーゲンの経皮感作性の検討

陽性コントロールにグルパール 19S (19S) を、陰性コントロールには PBS (V) を使用した。ウシ由来コラーゲン (BC)、ウシ由来ゼラチン (BG) の試薬標準品、ウシ由来ゼラチン加水分解物 2 種 (A, B)、ブタ由来ゼラチン加水分解物 2 種 (C, D)、魚由来コラーゲン (FC)、魚由来ゼラチン (FG) の試薬標準品、ティラピア由来コラーゲン及びゼラチン加水分解物 (F, G)、サケ由来加水分解物 (H, I) を用いた。全ての感作検体には SDS を終濃度 0.5% で添加し、1 回の感作抗原量は 500  $\mu\text{g}$  protein とした。1 群の設定匹数を 5 匹として経皮感作性を評価した。

#### 【実験 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に関する検討

陽性対照タンパク質の候補として、卵白アルブミン (OVA) を用いた。OVA (Sigma A5503) の 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  $\mu\text{g}$  及び 200  $\mu\text{g}$ )、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、Dunnett の検定、Tukey の多重検定、あるいは Student の t 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

#### (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】グルパール 19S の経皮感作性（用量依存性等）の検討

グルパール 19S の経皮感作性に関して、用量依存性や界面活性剤の影響についても合わせて検討するため、グルパール 19S の用量を 500  $\mu\text{g}$  及び 200  $\mu\text{g}$  の 2 種、また、それぞれ SDS を共存させる群と共存させない群を設定し、感作及び惹起に関する比較を行った。

SDS 共存下グルパール 19S 500  $\mu\text{g}$  感作群 (HS500)、200  $\mu\text{g}$  感作群 (HS200) の両群とも、血中 IgE、IgG1 が Vehicle 群 (V) と比較して有意に増加していた。SDS 非共存下グルパール 19S 500  $\mu\text{g}$  感作群 (H500) では、IgG1 の増加は見られたが、IgE の増加は見られなかった。SDS 非共存下グルパール 19S 200  $\mu\text{g}$  感作群 (H200) では、IgE、IgG1 とも

有意な増加は見られなかった。

また、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応惹起 30 分後、HS500 群では V 群と比較して平均 4.8 度、HS200 群では 4.7 度と、体温の大きな低下が見られた。また H500 群でも 2.9 度低下しており、これらの 3 群では V 群との間に有意な差があった。一方 H200 群ではこのような有意な体温低下は見られなかった。体温が大きく低下した HS500 群、HS200 群では、惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が大きく増大していた。H500 群でも有意な増大が見られた。H200 群ではヒスタミン濃度の増大は見られなかった。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングについては、HS500 群、HS200 群では全匹 3.0 と高いスコアであり、また H500 群でも全匹 2.0 であった。一方、H200 群では平均 0.2 と低いスコアであった。

#### 【実験 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の検討

グルパール 19S はグルテンの酸加水分解物である。本研究ではグルテンのアルカリ加水分解物、及び酵素加水分解物を調製し、その経皮感作性についてグルパール 19S との比較を行った。

アルカリ加水分解の場合、加水分解 0.5 時間では、SDS-PAGE のパターンはグルパール 19S と類似しており、広範囲にスミアなパターンを示した。その後時間とともに高分子量側のバンドが消失し、低分子量側に移行した。このパターンをもとに、未分解グルテン (Alk0h)、グルパール 19S とパターンが類似している 0.5 時間分解物 (Alk0.5h)、及びほぼ 30kDa 以下にまで分解されているもの (Alk12h) を取り上げ、マウスに対する経皮感作能を検討した。

抗原特異的抗体産生に関して、19S 群、Alk0h 群、Alk0.5h 群は V 群と比較して抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体の有意な増加が認められた。一方、Alk12h 群では V 群との間に有意差は見られなかった。

抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー惹起

30 分後の直腸内体温に関しては、19S 群では体温が大きく低下し ( $4.6 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$ )、V 群と比較して有意差が認められた。Alk0h 群及び Alk0.5h 群では、19S 群には及ばないものの、それぞれ  $2.3 \pm 1.6^{\circ}\text{C}$ 、 $3.5 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$  の体温低下が観察され、V 群と比較して有意差が認められた。一方 Alk12h 群における体温低下は  $0.6 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$  であり、V 群との間に有意差は見られなかった。惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度に関しては、体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。また Alk0h 群、Alk0.5h 群においても同様に血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。Alk12h 群ではこのような大きな濃度上昇は見られず、V 群との間に有意差は認められなかった。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状スコアリングに関しては、19S 群及び Alk0.5h 群は平均 3.4 と高いスコアであった。Alk0h 群では 2.0 と中程度のスコアであった。一方 Alk12h 群では 1.4 と低いスコアであった。

本検討で用いた加水分解酵素 Neutrase 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。酵素分解物の SDS-PAGE パターンにおいては、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、SDS-PAGE においてタンパク質としてのバンドは確認できなかった。

血清中の抗原特異的抗体に関して、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 Neutrase 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)。

抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー惹起後 30 分後の直腸内体温の変化に関して、19S 群では体温が大きく低下し ( $-2.7 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ )、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 ( $-2.3 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ )。Enz0.5hr 群、Enz12hr 群でも体温が低下し ( $-3.1 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 、 $-1.8 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ )、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。惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度に関して、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。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングに関しては、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 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の検討

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、グルバ

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。

酸及びアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンに関しては、両者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メ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 (それぞれ 19S-Acid 群、19S-Alk 群、19S-Enz 群、19S-Glu 群)。

血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 については、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。

惹起抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー反応惹起 30 分後、19S 群では体温が大きく低下し ( $-3.8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ )、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  $-4.2 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ 、 $-3.1 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ 、 $-2.5 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ )。一方 19S-Alk 群では体温はほとんど低下しなかった。惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度に関しては、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。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングに関しては、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。

### 【実験 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

これまでの実験をとおして、グルパール 19S が強い経皮感作性を有することが高い再現性をもって示された。そこで、グルパール 19S 感