

の差は、ほぼ同一であった (P=0.99, OR=1.002, 95%CI = 0.68-1.47, Kono et al, Allergy, 2014)。

3. その他  
記載事項なし

#### D. 考察

フィラグリン機能喪失変異との関連が認められないことから、全く未知の食物アレルギー関連遺伝子が同定される可能性がある。

#### E. 結論

GP19S により重篤な小麦アレルギーを発症した患者のゲノムを使用して、フィラグリン機能喪失変異との関連解析を行ったが、関連は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

記載事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

記載事項なし

##### 2. 学会発表

1. 野口恵美子. 次世代シーケンサーとアレルギー疾患：どのように使えるのか？ (シンポジウム) . 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014 年 5 月. 東京.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

記載事項なし

##### 2. 実用新案登録

記載事項なし

## 経皮感作による重篤な小麦アレルギーの病態解明ならびに予防法の確立

担当責任者 玉利 真由美 理化学研究所 統合生命医科学研究センター  
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム チームリーダー

### 研究要旨

旧茶のしずく石鹼に含まれた小麦の加水分解産物であるグルパール 19S による食物アレルギーは重篤なアナフィラキシーを起こすこともあり問題となっている。石鹼の使用によりグルパール 19S 抗原に感作されており、発症機序として経皮・粘膜感作が重要と考えられている。本研究はグルパール 19S による食物アレルギーの遺伝要因を明らかにすることにより、科学的な病態解明を行うことを目的とする。近年、アレルギー疾患において大規模なゲノムワイド関連解析(GWAS)が行われ、それらの遺伝要因が明らかとなってきている。皮膚のバリア機能異常を特徴とするアトピー性皮膚炎においても 19ヶ所の関連領域が同定されている。本年度はグルパール 19S による食物アレルギー患者 471 名、コントロール 7971 名について、これまで報告されたアトピー性皮膚炎に関連する 19 領域のうち、日本人でも多型性が認められる 17 領域、22 個の遺伝子多型について関連解析を行なった。その結果、いずれの多型ともグルパール 19S による食物アレルギー発症との有意な関連は認められなかった。現在、ゲノムワイド関連解析を行っている。

### A. 研究目的

近年、アレルギー疾患において大規模な GWAS が行われ、それらの遺伝要因が明らかとなってきている。本研究はグルパール 19S による食物アレルギー患者において、その発症に関わる遺伝要因を明らかにすることを目的とする。アトピー性皮膚炎はバリア機能の異常が特徴であるが、本年度はアトピー性皮膚炎の GWAS により同定された遺伝要因が疾患感受性と関連するか検討した。

### B. 研究方法

患者 471 名、コントロール 7971 名について、これまで報告されたアトピー性皮膚炎に関連する 17 領域、22ヶ所 (FLG; rs6587673,

rs6696556, ILRL1; rs13015714, GLB1; rs6780220, CCDC80; rs12634229, TMEM232; rs7701890, rs9326801, IL13; rs1295686, rs2023823, MHC; rs176095, CARD11; rs4722404, ZNF365; rs10995251, NLRP10; rs878860, OVOL1; rs479844, rs593982, C11orf30; rs7927894, rs11236809, CLEC16A; rs2041733, ZNF652; rs16948048, ACTL9; rs4804075, CYP24A1; rs16999165, RTEL1; rs6010620) の遺伝子多型について関連解析を行なった。タイピングはインベーター法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解

析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

### C. 研究結果

18ヶ所の遺伝子多型とグルパール19Sによる食物アレルギーの発症との間に有意な関連を認めなかった ( $P=0.069\sim0.989$ )。

### D. 考察

アトピー性皮膚炎は皮膚のバリア障害を特徴とするアレルギー疾患であるが、GWASで同定されたアトピー性皮膚炎の遺伝要因と本疾患との間に有意な関連は認められなかった。これまでのグルパール19Sによる食物アレルギーの疫学調査の結果からもアトピー性皮膚炎は本疾患発症のリスクとはされていない。今回、遺伝要因の側面からの検討においても強い関連は認められなかった。

現在、グルパール19Sによる食物アレルギー患者469名、コントロール3285名についてIllumina OmniExpress Exome v1.2 Chipによりゲノムワイド関連解析を行っている。

### E. 結論

グルパール19Sによる食物アレルギーとGWASで同定された18ヶ所のアトピー性皮膚炎の疾患リスクアレルとの間に有意な関連は認められなかった。ゲノムワイド関連解析については現在解析中である。

### F. 健康危険情報

記載事項なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Park HW, Dahlin A, Tse S, Duan QL, Schuemann B, Martinez FD, Peters SP, Szeffler SJ, Lima JJ, Kubo M, Tamari M, Tantisira KG. Genetic predictors associated with improvement of asthma symptoms in response to inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:664-669.
2. Hayashi M, Hirota T, Saeki H, Nakagawa H, Ishiuchi Y, Matsuzaki H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Tamari M. Genetic polymorphism in the TRAF3IP2 gene is associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci.* 2014;73:264-5.
3. Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, Litonjua A, Peters SP, Lima J, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Qiu W, Weiss ST, Tantisira K. Inhaled corticosteroid treatment modulates ZNF432 gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:723-728.
4. Tanaka S, Hirota T, Kamiyo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung functions of Japanese patients with chronic rhinosinusitis who underwent endoscopic sinus surgery. *Allergol Int.* 2014;63:27-35.

5. Tamari M, Saeki H, Hayashi M, Umezawa Y, Ito T, Fukuchi O, Nobeyama Y, Yanaba K, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Fujieda S, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Hirota T. An association study of 36 psoriasis susceptibility loci for psoriasis vulgaris and atopic dermatitis in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2014;76:156-7.
6. Izuhara Y, Matsumoto H, Kanemitsu Y, Izuhara K, Tohda Y, Horiguchi T, Kita H, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. GLCCI1 variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids. *Allergy*. 2014;69:668-73.
7. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genomewide association study identifies HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:1327-34.
8. Tanaka S, Tamari M, Nakayama T, Ishii H, Hatsushika K, Hayashi A, Watanabe H, Kanai M, Osano M, Yonaga T, Tomita K, Fujieda S, Sakuma Y, Shiono O, Ishitoya

J, Masuyama K, Hirota T. Synergistic suppression of poly(I:C)-induced CCL3 by a corticosteroid and a long acting  $\beta 2$  agonist in nasal epithelial cells. *Allergol Int*. 2014 in pres.

## 英文総説

Tamari M, Hirota T. Genome-wide association studies of atopic dermatitis. *J Dermatology*. 2014;41:213-20.

## 日本語総説

1. 玉利真由美、広田朝光 アレルギー疾患の  
実地診療 セミナー アレルギー疾患の  
整理・臨床研究の現状と展望—一般実地医  
家の理解と日常診療の向上のために 「ア  
レルギー疾患の遺伝子解析—現状と展望」  
*Medical Practice* 31(2), 221-224,  
2014.
2. 広田 朝光, 玉利 真由美 エピジェネテ  
ィクスからみたアレルギー疾患の発症予  
防と治療の可能性 *アレルギー・免疫*  
21(12), 88-95, 2014.
3. 広田朝光, 中山次久, 玉利真由美 メイン  
テーマ: ヒト免疫学の新機軸、アレルギー  
疾患のゲノム解析 *医学のあゆみ*  
252(1), 25-31, 2015 (医歯薬出版株式会  
社)

## 2. 学会発表

1. アレルギー疾患におけるゲノムワイド関  
連解析, 第79回日本インターフェロン・  
サイトカイン学会学術集会 シンポジウム  
アレルギー・喘息とサイトカインシグナル  
2014, 札幌 北海道. 玉利真由美

2. アレルギー疾患のメカニズム - 遺伝子と環境のクロストーク-, 第31回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会教育講演2014, 名古屋 愛知. 玉利真由美
3. Genome-Wide Association Studies of Allergic Diseases, The 24th Congress of Interasma Japan / North Asia 2014, 名古屋 愛知. Mayumi Tamari

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
記載事項なし
2. 実用新案登録  
記載事項なし
3. その他  
記載事項なし

## 加水分解小麦アレルギー病態解明・治療開発にむけたタンパク構造解析に関する研究

担当責任者 加藤善一郎 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 教授

### 研究要旨

アレルギーエピトープとHLA立体構造解析による新たな治療法の確立を目指すことが本研究課題の目的であるが、特に、アレルギーである加水分解小麦タンパクの解析及び構造解析が重要な課題である。これらのペプチドによる免疫寛容誘導による治療は、症状が軽快しない難治例患者に対する有効な治療法となる可能性があり、今後の新規治療法の確立にむけて、B細胞エピトープの構造、T細胞エピトープの構造解析における応用可能性を検討した。その結果より、加水分解小麦タンパクにおけるアレルギー反応の成立・増強に関わるメカニズムとして、繰り返し配列周辺のT細胞エピトープを患者HLAが認識できる立体構造をもつこと、さらに、脱アミド化により、自然に存在する食物タンパク由来ペプチドとは異なる結合様式を介して、免疫反応を増強している可能性が示唆された。今後、エピトープの構造解析を進めることで、治療法確立に繋がる知見を得ることができると考えられ、構造解析が重要な役割を果たすことが期待される。

### 共同研究者

川本 典生 岐阜大学大学院医学系研究科  
小児病態学

誘導可能で、かつ、ペプチドであることからアナフィラキシー等の副反応は誘発しづらいと予想される。

これらのペプチドによる免疫寛容誘導による治療は、症状が軽快しない難治例患者に対する有効な治療法となる可能性があり、今後の新規治療法の確立にむけて、B細胞エピトープの構造、T細胞エピトープの構造解析における応用可能性を検討することを目的とした。

### A. 研究目的

これまで、加水分解小麦タンパクによる被害の調査研究及びメカニズム解明などが進んできている。一方で、原因タンパクであるグルパール 19S の IgE 結合エピトープが報告されているが T 細胞エピトープ解析についてはいまだなされていない。獲得免疫が成立する上で、T 細胞エピトープは必須であり、分子メカニズムの解明が重要と考えられる。また、このような T 細胞エピトープとなるペプチドは T 細胞性の免疫寛容 (アナジー) を

### B. 研究方法

#### B 細胞エピトープ解析

これまでに報告されているエピトープの結果を踏まえ、 $\gamma$  グリアジン内に存在するエ

ピトープの共通性等、及び潜在的エピトープモチーフについて、配列解析から検討した。

#### HLA 構造解析技術の確立

これまでに報告された他の食物アレルギーに関する知見を踏まえ、T細胞エピトープ解析の結果から、HLA立体構造とエピトープペプチドとの複合体解析技術の検討を行った。

#### 脱アミド化ペプチドの構造解析

食物由来抗原が引き起こす疾病としてセリアック病があるが、セリアック病において、これまでに報告のある疾病に関連したHLAと脱アミド化されたエピトープペプチドとの複合体構造から、脱アミド化の与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

### C. 研究結果

#### B細胞エピトープ解析

先行文献により解析されたB細胞エピトープ(QPQQPFPQ)については、異なった患者血清にて様々な程度で認識されており、さらに、脱アミド化によりその結合が増強されることが判明している。今回の検討では、上記のコア配列以外にも異なった種類の配列が認識されていることを確認した。それらのエピトープでは、必ずしも患者における共通性は見いだされない場合もあるが、コア配列に準じて保存された配列を認識している可能性が示唆された。さらに、不完全モチーフにおける検討にて、特に、P5のアミノ酸配列の変化により、その認識が

変化することが認められた。また、B細胞エピトープについては、繰り返し配列の多いγグリアジンタンパクの前半に多く存在しており、T細胞エピトープについても類似したモチーフを利用している可能性が示唆された。

#### HLA 構造解析技術の確立

Protein Data Bankに登録されたHLA立体構造データベースを利用してHLAタンパク単体の構造モデルを作成する技術に加え、認識ペプチドとの複合体モデル構造の解析に関する技術開発を行った。また、関連する立体構造決定技術の開発と実際のタンパク発現・結晶化等の技術開発を併行して行い、複合体解析の方法を確立することができた。結果として、HLAとペプチド2者複合体の解析にくわえ、T細胞レセプターの構造との3者複合体解析が重要と考えられた。

#### 脱アミド化ペプチドの構造解析

セリアック病に関連したHLAと脱アミド化されたエピトープペプチドとの複合体構造解析を行った結果、B細胞エピトープだけでなく、T細胞エピトープの反応が著明に増強されるメカニズムとして、HLAと脱アミド化ペプチド間において、水素結合から、イオン結合への変化が生じることにより、結合が著明に増強し、結果として反応が増強すると考えられた。

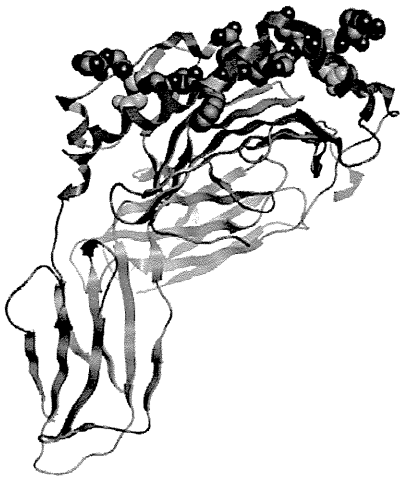


図 1：脱アミド化された $\gamma$ グリアジンペプチドと HLA の複合体立体構造

#### D. 考察

以上の結果より、加水分解小麦タンパクにおけるアレルギー反応の成立・増強に関わるメカニズムとして、繰り返し配列周辺の T 細胞エпитープを患者 HLA が認識できる立体構造をもつこと、さらに、脱アミド化により、自然に存在する食物タンパク由来ペプチドとは異なる結合様式を介して、免疫反応を増強している可能性が示唆された。

#### E. 結論

今後、エピトープの構造解析を進めることで、治療法確立に繋がる知見を得ることができると考えられ、構造解析が重要な役割を果たすことが期待される。

#### F. 健康危険情報

記載事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun* 5:5340 2014.
2. Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Mol Immunol* 58:1 66-76 2014.
3. Kimura T, Tsutsumi N, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Kondo N, Shirakawa M, Kato Z, Tochio H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extracellular complexes. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70:Pt 10 1351-1356 2014.

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

記載事項なし

##### 2. 実用新案登録

記載事項なし

##### 3. その他

記載事項なし



### III. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

経皮感作による重篤な小麦アレルギーの病態解明ならびに予防法の確立  
藤田保健衛生大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Antigen in Glupearl 19S were developed by acid-hear treatment.	Nakamura M, Yagami A, Matsunaga K.	American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Houston, USA	2015. 2. 20-24,	国外
Clinical analysis of immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat proteins in soap.	Yagami A, Suzuki K, Nakamura M, Sano A, Arima M, Iwata Y, Kobayashi T, Hara K, Matsunaga K.	American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Houston, USA	2015. 2. 20-24,	国外
Contact dermatitis in Asia- The Japanese experience. Focus session "Contact dermatitis, a global approach. Which is the status in different parts of the world".	Matsunaga K	12th Congress of the European Society of Contact Dermatitis (ESCD). Barcelona, Spain	2014. 6. 25-6-28,	国外
What we can learn and share about contact allergens from this session.	Matsunaga K.	EADC 2014 3rd Eastern Asia Dermatology Congress, International convention center Jeju. Korea.	2014. 9. 24-26.	国外
小麦依存性運動誘発アナフィラキシー37例の臨床経過と小麦関連IgEの経時的変化.	佐野晶代, 矢上晶子, 小林東, 中村政志, 有馬豪, 岩田洋平, 松永佳世子.	第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 国立京都国際会館. 京都.	2014. 5. 9-5. 11.	国内
経皮感作による食物アレルギーの病態と治療.	矢上晶子, 松永佳世子.	第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 国立京都国際会館. 京都.	2014. 5. 9-5. 11.	国内
加水分解コムギ含有石鹼とロドデノール含有化粧品に学ぶ職業アレルギーの新たな課題.	松永佳世子	第87回日本産業衛生学会. 岡山コンベンションセンター. 岡山.	2014. 05. 23.	国内

グルパール19S経皮感作による全身性コムギアレルギーの全国調査小児例35例の疫学調査と免疫学的検査結果のまとめ.	松永佳世子, 矢上晶子, 中村政志, 佐野晶代, 小林東.	第38回日本小児皮膚科学会. セルリアンタワー東急ホテル. 東京.	2014. 7. 5-7. 6.	国内
産官学連携「化粧品等皮膚安全性症例情報ネット」.	松永佳世子	第44回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 学術大会. 都市センターホテル. 東京.	2014. 11. 22.	国内
最近経験したラテックスアレルギーの3例.	佐野晶代, 矢上晶子, 山北高志, 小林東, 岩田洋平, 有馬豪, 鈴木加余子, 山田雅啓, 松永佳世子.	ラテックスアレルギー・OASフォーラム2014, 第19回日本ラテックスアレルギー研究会. 一橋大学一橋講堂. 東京.	2014. 7. 27.	国内
ロドデノール誘発性脱色素斑111例と他の美白剤等による脱色素斑が疑われた21例の臨床像と治療経過.	松永佳世子, 鈴木加余子, 矢上晶子, 秋田浩孝, 佐野晶代, 田中紅.	第32回日本美容皮膚科学会学術大会. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート. 千葉.	2014. 7. 12-7. 13.	国内
皮膚科医から見た化粧品安全性の現状と安全性確保のための提案.	松永佳世子.	日本香粧品学会. 第39回教育セミナー. ヤクルトホール. 東京.	2014. 10. 17.	国内
別々の美白化粧品によりアレルギー性接触皮膚炎と脱色素斑を含有した一例.	矢上晶子, 鈴木加余子, 佐野晶代, 森田雄介, 小林東, 岩田洋平, 松永佳世子.	第269回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬(株)名古屋支店. 愛知.	2014. 9. 21.	国内
当院ICUで入院治療を要したアナフィラキシー患者(小児例を除く)のまとめ.	鈴木加余子, 伊藤紫, 西和歌子, 佐々木良輔, 佐野晶代, 矢上晶子, 松永佳世子.	第268回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬名古屋支店. 愛知.	2014. 6. 8.	国内
経皮感作による魚アレルギーの1例.	齋藤健太, 矢上晶子, 山北高志, 佐野晶代, 小林東, 沼田茂樹, 安藤亜紀, 松永佳世子.	第268回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬名古屋支店. 愛知.	2014. 6. 8.	国内
香粧品における最近の健康被害例と課題.	松永佳世子.	第39回日本香粧品学会. 有楽町朝日ホール. 東京.	2014. 6. 5-6.	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
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.	Nakamura M, Yagami A, Hara K, Sano A, Kobayashi T, Aihara M, Hide M, Chinuki Y, Morita E, Teshima R, Matsunaga K.	Allergol Int. 63(2):243-9.	2014	国外
Guide for medical professionals (i.e. dermatologists) for the management of Rho-dodenol-induced leukoderma.	Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kagohashi Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K.	J Dermatol. 42:113-128.	2015	国外
Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism.	Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K and Inoue D	Pigment Cell Melanoma Res. 27(5):754-63.	2014	国外
Possible allergic contact dermatitis with reticulate postinflammatory pigmentation caused by hydroquinone.	Tatebayashi M, Oiso N, Wada T, Suzuki K, Matsunaga K and Kawada A.	J Dermatol. 41(7):669-670.	2014	国外
Study of the usefulness of patch testing and use test to predict the safety of commercial topical drugs.	Horita K, Tanoue C, Yasoshima M, Ohtani T, Matsunaga K.	J Dermatol. 41(6):505-13.	2014	国外
Depigmentation caused by application of the active brightening material, rhodo-dendrol, is related to tyrosinase activity at a certain threshold.	Kasamatsu S, Hachiya A, Nakamura S, Yasuda Y, Fujimori T, Takano K, Moriwaki S, Hase T, Suzuki T, Matsunaga K.	J Dermatol Sci. 76(1):16-24.	2014	国外

Depigmentation of the skin induced by 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol is spontaneously re-pigmented in brown and black guinea pigs.	Kuroda Y, Takahashi Y, Sakaguchi H, Matsunaga K, Suzuki T.	J Toxicol Sci. 39(4):615-23.	2014	国外
Allergic contact dermatitis caused by 3-o-ethyl-L-ascorbic acid (vitamin C ethyl).	Yagami A, Suzuki K, Morita Y, Iwata Y, Sano A, Matsunaga K.	Contact Dermatitis. 70(6):376-7.	2014	国外
ロドデノール誘発性脱色素斑.	松永佳世子	皮膚病診療. 37(1):6-13	2015	国内
化粧品による皮膚障害	松永佳世子	現代医学. 62(1):101-105.	2014	国内
ロドデノール誘発性脱色素斑症例における一次全国疫学調査結果	青山裕美, 伊藤明子, 鈴木加余子, 鈴木民夫, 種村篤, 錦織千佳子, 伊藤雅章, 片山一朗, 杉浦伸一, 松永佳世子.	日皮会誌. 124(11):2095-2109.	2014	国内
皮膚のアレルギーのトピックス.	矢上 晶子, 松永 佳世子.	皮膚と美容. 46(2).	2014	国内
藤田保健衛生大学病院における2006~2010年の職業性接触皮膚炎の38例のまとめ	森田 雄介, 矢上 晶子, 伊佐見真実子, 西村 景子, 佐野 晶代, 鈴木加余子, 松永佳世子	J Environ Dermatol Cutan Allergol, 8(2):80-87	2014	国内
Japanese standard allergen seriesにおけるゴム関連アレルギーmix陽性21例の臨床的検討	森田 雄介, 矢上 晶子, 鈴木加余子, 佐野 晶代, 松永佳世子	J Environ Dermatol Cutan Allergol, 8 (J Environ Dermatol Cutan Allergol, 8(3):167-174, 20143):167-174	2014	国内
化粧品パッチテスト2011年のまとめ	西 和歌子, 矢上 晶子, 西村 景子, 佐野 晶代, 安部 正通, 高橋 正幸, 松永佳世子	J Environ Dermatol Cutan Allergol, 8(4):255-263	2014	国内

様式第19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「経皮感作による重篤な小麦アレルギーの病態解明ならびに予防法の確立」

機関名 筑波大学 医学医療系

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
次世代シーケンサーとアレルギー疾患：どのように使えるのか？（シンポジウム）	野口恵美子	第26回日本アレルギー学会春季臨床大会	2014	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別

様式第19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「経皮感作による重篤な小麦アレルギーの病態解明ならびに予防法の確立」

機関名 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18.	Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z.	Nat Commun 5:5340	2014	国外
Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes.	Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N.	Mol Immunol 58:1 66-76	2014	国外
Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extracellular complexes.	Kimura T, Tsutsumi N, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Kondo N, Shirakawa M, Kato Z, Tochio H.	Acta Crystallogr F Struct Biol Commun 70:Pt 10 1351-1356	2014	国外

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



# 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

Masashi Nakamura<sup>1,2</sup>, Akiko Yagami<sup>1</sup>, Kazuhiro Hara<sup>2</sup>, Akiyo Sano<sup>1</sup>, Tsukane Kobayashi<sup>1</sup>, Michiko Aihara<sup>3</sup>, Michihiro Hide<sup>4</sup>, Yuko Chinuki<sup>5</sup>, Eishin Morita<sup>5</sup>, Reiko Teshima<sup>6</sup> and Kayoko Matsunaga<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Background:** Immediate-type wheat allergy caused by a specific hydrolyzed wheat protein (HWP-IWA), Glupearl 19S (GP19S), typically develops food-dependent exercise-induced anaphylaxis (FDEIA), but is different from conventional FDEIA, or simple wheat allergy in many aspects. The skin prick test (SPT) is considered to be the most effective method for diagnosis of HWP-IWA. As SPT is a relatively qualitative method, we developed quantitative and high-throughput test method for HWP-IWA.

**Methods:** An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based GP19S-specific IgE assay was tested using sera from 14 HWP-IWA and five conventional wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis (CO-WDEIA) patients, as well as five healthy subjects. Then a validation study at five different institutions was carried out using sera from 10 HWP-IWA and five CO-WDEIA patients, as well as five healthy subjects different from the previous studies.

**Results:** The mean unit values converted from measured absorbance of ELISA were 68.3, 1.3 and 1.1 respectively. Furthermore, the validation study revealed reproducible results across all five institutions, with the standard deviation (SD) being 0.3-0.4 for the healthy group, 0.2-0.6 for the CO-WDEIA group, and 3.8-9.6 for HWP-IWA group except for one case. One case of HWP-IWA was excluded from analysis due to the high SD of 53.3 units, indicating that samples with a unit value > 100.0 will affect inter-laboratory reproducibility.

**Conclusions:** Our findings suggest that the ELISA-based GP19S-specific IgE assay can be used to test HWP-IWA using venous blood samples, except for those with a unit value > 100.0.

## KEY WORDS

enzyme-linked immunosorbent assay, Glupearl 19S, hydrolyzed wheat protein, immediate-type wheat allergy, test method

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Fujita Health University School of Medicine, <sup>2</sup>General Research and Development Institute, Hoya Co., Ltd., Aichi, <sup>3</sup>Department of Environmental-Immunodermatology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Kanagawa, <sup>4</sup>Department of Dermatology, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, <sup>5</sup>Department of Dermatology, Shimane University Faculty of Medicine, Shimane and <sup>6</sup>National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan.

Conflict of interest: MH received honoraria and research funding

from Sanofi, GlaxoSmithKline, Tanabe-Mitsubishi. Other authors have no conflict of interest.

Correspondence: Kayoko Matsunaga, MD, PhD, Department of Dermatology, Fujita Health University School of Medicine, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan.

Email: kamatsu@fujita-hu.ac.jp

Received 20 August 2013. Accepted for publication 15 December 2013.

©2014 Japanese Society of Allergology

## INTRODUCTION

Many cases of Immediate-type allergy after wheat intake have been observed in Japanese consumers using cosmetics that contain hydrolyzed wheat protein (HWP), HWP-IWA, who had used "Cha no Shizuku" soap (sold by Yuuka, Fukuoka, Japan) that contained Glupearl 19S (GP19S), a substance manufactured by Katayama Chemical Industries, Osaka, Japan. HWP-IWA patients, but not conventional wheat allergy patients, react to GP19S. Therefore, GP19S hypersensitivity is essential for diagnosis of HWP-IWA.<sup>1,2</sup>

HWP is a cosmetic ingredient specified in the Japanese Standards of Quasi-drug Ingredients, and which is a collective term for water-soluble materials that are produced by hydrolyzing wheat gluteins with acid, alkali, enzymes or other substances. Cases of HWP allergy have been reported in Western nations; notably, cases are fewer and less severe than those in Japan.<sup>3-6</sup> In order to address the problem of HWP allergy, the "Special Committee for the Safety of Protein Hydrolysates in Cosmetics" was organized by the Japanese Society of Allergology to study the epidemiology, pathogenesis, and establish diagnostic criteria, among other activities.

HWP-IWA is different from conventional wheat allergy. In contrast to the onset of conventional wheat allergy in children, HWP-related allergy arise in adults with a history of cosmetic use.<sup>7</sup> Although both conventional and HWP-related wheat allergy in adults can cause wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis (WDEIA), unlike conventional WDEIA (CO-WDEIA), HWP-IWA is not mediated by  $\omega$ -5 gliadin.<sup>8</sup>

Currently, the skin prick test (SPT) by GP19S is considered the most useful method in diagnosing HWP-IWA.<sup>7</sup> It would be advantageous to develop a quantitative, high-throughput method for the laboratory diagnosis of HWP-IWA that gives consistent results across different institutions. For this purpose, we evaluated the utility of GP19S-specific IgE antibody detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of HWP-IWA using sera from healthy individuals and from patients with CO-WDEIA or HWP-IWA. Five institutions were involved in this study to assess the reliability of this method.

## METHODS

### SUBJECTS

The HWP-IWA group consisted of 24 patients diagnosed with immediate-type wheat allergy induced by GP19S according to the diagnostic criteria by Special Committee for the Safety of Protein Hydrolysates in Cosmetics; CO-WDEIA group consisted of 10 patients with conventional WDEIA; and the healthy control group consisted of 10 individuals without wheat allergy (Table 1, 2). HWP-IWA patient 1 to 14, CO-WDEIA patient and healthy control 1 to 5 were used

for utility evaluation of ELISA-based GP19S-specific IgE assay. HWP-IWA patient 15 to 24, CO-WDEIA patient and healthy control 6 to 10 were used for validation this method. Patients 1 to 14 in the HWP-IWA group were classified into the following four grades of severity based on symptoms after wheat ingestion: grade 1, eyelid swelling, symptoms limited to the face and nasal mucosa; grade 2, generalized urticaria in addition to grade 1 symptoms; grade 3, systemic symptoms (e.g. dyspnea, diarrhea) in addition to dermal swelling; and grade 4, anaphylactic shock. The presence of specific serum IgE was determined using ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Sweden). Sensitivity to GP19S was evaluated using SPT.

### ELISA-BASED GP19S-SPECIFIC IgE ASSAY

GP19S (Katayama Chemical Industries) at 1 mg/ml dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) was centrifuged and the supernatant was recovered (GP19S solution). Next, 100  $\mu$ l of GP19S solution was added to each well of a Nunc MaxiSorp flat bottom 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the plate was sealed and left overnight at 4°C. The plate was blocked with 1% skim milk/PBS with 0.1% Tween 20 (PBS-T) for 1 hour at room temperature, after which 100  $\mu$ l patients' sera diluted to 20% in 1% skim milk/PBS-T were added to the wells, followed by a further incubation for 1 hour at room temperature. The plate was then washed with 1% skim milk/PBS-T. A total of 100  $\mu$ l of 0.1  $\mu$ g/ml anti-human IgE-HRP conjugate (KPL, Gaithersburg, MD, USA) in 1% skim milk/PBS-T was added to the wells, and the plate was incubated for 1 hour at room temperature. The plate was washed, and the colorimetric reaction was developed by adding 1-Step Ultra TMB-ELISA (Thermo Fisher Scientific) and incubated for 15 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was measured by multi-plate optic densitometers, VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), with a wavelength of 450 nm.

### CONVERSION OF ABSORBANCE INTO "UNIT" VALUES

Serum taken from HWP-IWA patient 5 was chosen as the standard. Serial dilution was performed using 1% skim milk/PBS-T, starting at 40 times dilution, with subsequent doubling of the dilution factor up to 5120 times dilution. The GP19S-specific IgE ELISA was performed as described above. To create a curve for the conversion of absorbance values to "unit" values, the absorbance of the 40 times-diluted serum was defined as that corresponding to 100.0 units, with the absorbance of the 80 times-diluted serum as 50.0 units, and that of the 640 times-diluted serum as 6.3 units, and so forth, such that the absorbance at each dilution factor corresponds to a "unit" value. For each

**Table 1** Clinical characteristics of the patients with HWP-IWA

ID	Age	Sex	Past allergic history	Severity	CAP-FEIA						GP19S
					wheat-sIgE (UA/mL)	(Class)	gluten-sIgE (UA/mL)	(Class)	$\omega$ -5 gliadin-sIgE (UA/mL)	(Class)	Threshold for positive prick reaction (%)
HWP-IWA 1	47	F	Pollinosis	4	4.52	3	7.16	3	0.34>	0	0.001
HWP-IWA 2	38	F	Pollinosis, Graves disease	4	4.1	3	4.71	3	0.34>	0	0.0001
HWP-IWA 3	43	F	Non	4	2.21	2	1.94	2	0.34>	0	0.01
HWP-IWA 4	18	F	Atopic dermatitis, Asthma, Pollinosis	4	2.28	2	5.37	3	0.71	2	0.01
HWP-IWA 5	45	F	Atopic dermatitis (Child- hood), Rhinitis, Pollinosis	4	25.1	4	57.3	5	0.68	1	0.001
HWP-IWA 6	61	F	Pollinosis	3	0.72	2	0.98	2	0.34>	0	0.001
HWP-IWA 7	62	F	Non	4	4.44	3	6.41	3	0.34>	0	0.001
HWP-IWA 8	33	F	Pollinosis	3	<0.35	0	<0.35	0	0.34>	0	0.01
HWP-IWA 9	44	F	Non	3	0.35	1	0.73	2	0.34>	0	0.001
HWP-IWA 10	49	F	Rhinitis	2	1.08	2	1.53	2	0.34>	0	0.001
HWP-IWA 11	43	F	Non	3	3.6	3	7.89	3	1.29	2	0.001
HWP-IWA 12	37	F	Non	2	0.67	1	1.41	2	0.34>	0	0.001
HWP-IWA 13	63	F	Contact dermatitis	1	<0.35	0	0.56	1	0.34>	0	0.01
HWP-IWA 14	30	F	Rhinitis, Pollinosis, Metal allergy	1	0.45	1	0.75	2	0.34>	0	0.10

sIgE, specific IgE.

Severity: 1: eyelid swelling, symptoms limited to face and nasal mucosa; 2: generalized urticaria besides Stage 1 symptoms; 3: general symptoms in addition to dermal disorders (diarrhea, dyspnea, etc.); 4: anaphylactic shock.

GP19S Skin prick test : GP19S was diluted to 100  $\mu$ g/ml in sterile physiologic saline (PS) and then made into solutions at concentration from 0.00001% to 0.1%. Reactions were read at 15 min, a wheal at least half the size of that caused by histamine dihydrochloride (10 mg/ml) or 3 mm was considered a positive reaction.

serum, a "unit" value was obtained from the measured absorbance with 5 times-diluted serum samples according to this curve.

### CORRELATION BETWEEN LABORATORY VALUES AND CLINICAL SEVERITY

Pearson's correlation coefficient (Pearson's product-moment correlation coefficient, represented by the letter  $r$ ), between grades of severity and the following test values were calculated: wheat-specific IgE (UA/mL), gluten-specific IgE (UA/mL),  $\omega$ -5 gliadin-specific IgE (UA/mL), GP19S SPT positive concentration (%), and GP19S-specific IgE (unit).

### VALIDATION STUDY OF THE ELISA-BASED GP19S-SPECIFIC IgE ASSAY AT FIVE INSTITUTIONS

In order to validate and determine the inter-laboratory reproducibility of the ELISA-based GP19S-specific IgE Assay, the method was performed at five institutions affiliated with members of the Special Committee for the Safety of Protein Hydrolysates in Cosmetics. A manual was compiled and distributed prior to the study to ensure common understanding of the technique and to allow discussion of uncertainties. All participating institutions used the same re-

agents and consumables that were prepared by members of Fujita Health University School of Medicine. The microplate reader for absorbance detection and other laboratory equipment were prepared by each institution. ELISA was performed using sera from 10 HWP-IWA and five CO-WDEIA patients, as well as five healthy subjects. Each sample was tested in duplicates to obtain absorbance and unit values. The absorbance and unit values obtained by all five institutions were examined to determine the validity of the test conditions. The standard deviation (SD) of absorbance and unit values was calculated to assess inter-laboratory reproducibility.

### ETHICAL CONSIDERATION

This study was approved by the Ethics Committee of Fujita Health University (No. 11-210). Venous blood samples were collected with patients' informed consent.

### RESULTS

#### ELISA-BASED GP19S-SPECIFIC IgE ASSAY

The range of measured absorbance was 0.01-0.09 optic density (OD) (mean, 0.04 OD) for the healthy control group ( $n = 5$ ), 0.00-0.11 OD (mean, 0.05 OD) for the CO-WDEIA group ( $n = 5$ ), and 0.21-3.92 OD

**Table 2** Laboratory findings of the sera from patients and controls in the validation study

ID	Total IgE (U/ml)	CAP-FEIA						GP19S Skin prick test
		wheat-sIgE		gluten-sIgE		ω-5 gliadin-sIgE		
		(UA/mL)	(Class)	(UA/mL)	(Class)	(UA/mL)	(Class)	
Healthy 6	8.16	0.34>	0	0.34>	0	0.34>	0	Negative
Healthy 7	138	0.34>	0	0.34>	0	0.34>	0	Negative
Healthy 8	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Healthy 9	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Healthy 10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CO-WDEIA 6	NT	0.57	1	2.65	2	0.34>	0	Negative
CO-WDEIA 7	NT	2.37	2	1.19	2	9.73	3	Negative
CO-WDEIA 8	148	0.46	1	2.51	2	13.3	3	Negative
CO-WDEIA 9	NT	3.36	3	1.48	2	NT	NT	Negative
CO-WDEIA 10	NT	0.55	1	3.85	3	9.39	3	Negative
HWP-IWA 15	3650	8.91	3	NT	NT	NT	NT	Positive
HWP-IWA 16	36	0.34>	0	0.39	1	0.34>	0	Positive
HWP-IWA 17	101	0.85	2	2.91	2	0.34>	0	NT
HWP-IWA 18	285	0.77	2	1.84	2	0.34>	0	Positive
HWP-IWA 19	82	4.25	3	7.18	3	0.34>	0	Positive
HWP-IWA 20	738	13.1	3	24.3	4	0.34>	0	Positive
HWP-IWA 21	148	4.44	3	6.41	3	0.34>	0	Positive
HWP-IWA 22	442	0.54	1	1.23	2	0.34>	0	Positive
HWP-IWA 23	2343	3.55	3	4.27	3	0.34>	0	Positive
HWP-IWA 24	67	0.4	1	0.6	1	0.34>	0	Positive

NT, Not tested; sIgE, specific IgE.

Skin prick test: Reactions were read at 15 min, a wheal at least half the size of that caused by histamine dihydrochloride (10 mg/ml) or 3 mm was considered a positive reaction.

(mean, 2.10 OD) for the HWP-IWA group ( $n = 14$ ). The absorbance values of the healthy and CO-WDEIA groups were relatively low and no marked difference was observed between the two groups. On the other hand, a wide range of absorbance values were observed in the HWP-IWA group, and were markedly different from those in the healthy and CO-WDEIA groups (Table 3).

#### CONVERSION OF ABSORBANCE INTO "UNIT" VALUES

Serial dilution of the serum sample resulted in a decrease in the measured absorbance, producing a standard curve. After assigning arbitrary "unit" values to the measured absorbance at each dilution factor, the following unit values were obtained from the measured absorbance: a range of 0.2-2.1 (mean, 1.1) for the healthy group, 0.0-2.5 (mean, 1.3) for the CO-WDEIA group, and 5.2-115.5 (mean, 59.5) for the HWP-IWA group (Table 3).

#### CORRELATION BETWEEN LABORATORY VALUES AND CLINICAL SEVERITY

The correlation coefficients of clinical severity and wheat-, gluten- and ω-5 gliadin-specific IgE antibodies were 0.43, 0.36 and 0.24, respectively. The correlation

coefficient of clinical severity and GP19S SPT positive concentration was -0.53, which is high enough for quantitative diagnosis of HWP-IWA, but not high enough to indicate a correlation with severity. The correlation coefficient of severity and GP19S-specific IgE was 0.76, which was higher than all other parameters (Table 4).

#### VALIDATION STUDY OF ELISA-BASED GP19S-SPECIFIC IgE ASSAY AT FIVE INSTITUTIONS

The results for GP19S-specific IgE were obtained by each institution. Notably, the absorbance and unit values were low in the healthy and CO-WDEIA groups but high in the HWP-IWA group across all institutions. All samples were tested in duplicates and similar absorbance and unit values were obtained. The respective SD for absorbance and unit values were 0.02-0.05 OD and 0.3-0.4 in the healthy group, and 0.03-0.04 OD and 0.2-0.6 in the CO-WDEIA group. In the HWP-IWA group, the SD ranged from 0.19-0.31 OD and 3.8-9.6 for HWP-IWA 16-24, and it was as high as 0.93 OD and 53.3 for HWP-IWA 15. It was observed that the SD became higher as the GP19S-specific IgE level increased. We consider that a high inter-laboratory reproducibility is achieved only when the "unit" value is below 100.0 (Table 5).