

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590171

研究課題名(和文)食物アレルギーの物理的処理に伴う抗原性の変化の解析並びに高感度検出法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the allergenicity change of structurally modified food allergens and development of highly sensitive detection method

研究代表者

手島 玲子 (Teshima, Reiko)

国立医薬品食品衛生研究所・食品部・部長

研究者番号：50132882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)小麦グルテンの塩酸(0.1N HCl), 100℃, 30分処理で、一部タンパク質の分子量の増加及び脱アミド化が観察され、BALB/cマウスを用いた皮膚感作性試験での皮膚感作能の増加も観察された。(2)小麦グルテンのトランスグルタミナーゼ処理により、加水分解小麦(HWP)患者血清中IgE抗体との反応性の上昇が観察された。(3)旧)茶のしずく石鹼に含有されていたHWP(グルパール19S)に特異的なエピトープ(QPEEPFPE)に対するマウス単クローン抗体を用いてHWP特異的な測定系を開発した。

研究成果の概要(英文)：We newly obtained following three results in our studies: (1) Increase of IgE production from percutaneous sensitization of BALB/c mice, increase of deamidation of glutamine and increase of molecular weight of some component proteins of wheat gluten after 30-minutes of 0.1N hydrochloric acid, (2) Increase of reactivity of acid-hydrolyzed wheat protein(HWP) Glupearl 19S-sensitized patient's IgE to tissue transglutaminase-treated wheat gluten, (3) Development of specific detection method of acid-HWP with monoclonal antibody to specific epitope(QPEEPFPE) of Glupearl 19S.

研究分野：免疫生化学

キーワード：食物アレルギー 小麦グルテン 酸加水分解 経皮感作 交差反応

## 1. 研究開始当初の背景

食物等の経口摂取による免疫応答においては、腸管系に存在する粘膜免疫系に、外来物質が捕えられ、ここで、感作の成立が決定する。食物アレルギーの発症機作に関して、経口による腸管粘膜免疫系を介する感作に加えて、経皮による感作により免疫が成立する場合のあることが報告されてきていた。経皮による感作では、Th2型のリンパ球の活性化がTh1型に比べ強く引き起こされることが報告されており、成人の食物アレルギーを考える上で重要となってきた。申請者らは、食物アレルギーの発症機構の経口感作モデルマウスを用いての解析、並びにソバ等の食物アレルギーの分子生物学的解析を、それまでに手がけており、機能生化学的研究の基盤をもとに、食物アレルギーの酸加水分解等の物理的处理に伴う抗原性の変化のプロテオーム手法を用いた網羅的解析、培養細胞を用いた惹起能に関する研究、マウスを用いた経皮感作メカニズムを解析する準備は整っていた。

## 2. 研究の目的

平成21年より、日本において、酸加水分解した小麦成分(HWP, グルパール 19S)を含む石鹼(旧)茶のしずく石鹼)を使用したヒトにおいて、接触皮膚炎、並びに小麦を食した時に呼吸困難などの全身の症状を呈したという報告が多くなされ、その原因解明が急がれているところであった。しかし、加水分解を行ったことによる新しい抗原性が獲得されたのか等、不明の点が多かった。本研究では、以下の3点の研究を行うことを目的とする。すなわち、(1)食物タンパク質の加水分解物の抗原性の変化についてマウス経皮感作モデルを用いて *in vivo* で解析するとともに、培養細胞を用いて、惹起能の違いについて *in vitro* で解析を行う。(2)小麦グルテンのトランスグルタミナーゼ処理により、加水分解小麦(HWP)患者血清中 IgE 抗体との反応性の解析を行う。(3)小麦酸加水分解末に特異的に存在するペプチドについて網羅的に検討し、それらに対する抗体を用いて、特定の加水分解処理を受けたグルテンの検査法を検討する。の3点である。

## 3. 研究の方法

### (1) 小麦グルテンの加水分解並びに感作性、惹起能の解析

小麦グルテンの酸加水分解処理;グルテンの酸加水分解には、0.1N 塩酸中にストック懸濁液を 1 mg/ml となるよう加え、100 のヒ

ートブロック上で 0.5、1、3、6、9、12、24 時間加熱した。所定の時間経過後、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。加水分解の程度は、SDS-PAGE(15-25%ゲル)でタンパク質を分離後、CBB 染色にて確認した。旧茶のしずく石鹼に含まれていたグルパール 19S (Glu19S) は、片山化学工業株式会社より入手した。

マウスを用いた経皮感作試験; BALB/c マウスを用い、背面片側を剃毛し、翌日セロテープにて皮膚表面を傷つけた後、3 日間 HWP 懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った。HWP 懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50  $\mu$ l の抗原溶液 (500  $\mu$ g of protein, 1%) を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチテスター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/ IgG1/ IgG2a 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  $\mu$ l 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およびアナフィラキシー症状を観察し、基準に従ってスコアリングした。また、惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血清中のヒスタミン濃度等を、ELISA Kit にて測定した。ヒト化マスト細胞を用いた *in vitro* アレルギー反応惹起試験; ヒト化マスト細胞として、ヒト Fc  $\epsilon$  RI 遺伝子および転写因子 NF- $\kappa$ B の制御下に Luciferase を発現するレポーター遺伝子を安定的に導入したラット培養マスト細胞株 (RS-ATL8 細胞) を用いた (EXiLE 法)。同細胞を 96 ウェルプレートに  $5 \times 10^4$  cells/50  $\mu$ l ずつ播種し、100 倍希釈した HWP 感作または従来型的小麦アレルギー患者血清を添加して終夜培養した。滅菌 PBS によりウェルを洗浄後、10%の非働化ウシ胎児血清を含む MEM 培地に懸濁した各 HWP (100 ng/ml) 抗原溶液で 3 h 細胞を刺激し、One- GLO™ (Promega) を添加して発光量を En- Vision (PerkinElmer) により測定した。細胞の活性化は、抗原未刺激時の発光量を 1 とする相対値で表し、2 倍をカットオフとした。

### (2) 小麦グルテンの消化酵素並びにトランスグルタミナーゼ処理

小麦グルテンは消化酵素(人工胃液および

人工腸液)により消化の場合は、0.2 mg/ml NaCl-HCl (pH1.2) 溶液中でグルテンをブタペプシン(Sigma)により 37 で1時間処理し、続いてpHを8.0に調整後、ブタパンクレアチン(Sigma)により 37 でさらに1時間処理した。いずれもグルテン：酵素=100：1とした。反応終了後、90、5分間の加熱により酵素を失活させた。トランスグルタミナーゼ処理は、10分の1量のモルモット組織トランスグルタミナーゼ(tTG; Sigma)を加え、37で一晩反応した。

### (3)小麦酸加水分解末に特異的に存在するペプチドの解析：

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。タンパク質40 µgをトリプシン消化に供し、LC-MSによるショットガン解析後、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を行った。ペプチドピークの比較定量解析には、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)を行った。得られたGlu19S特異的ペプチド1種を選び、このペプチドに対するポリクローナル抗体を作成した。また、フランスのINRA研究所より<sup>1)</sup>、患者血清との網羅的イムノスポット法で検索した19S特異的ペプチド(QPEEPFPE)に対する抗体を入手し、上記ペプチドに対する抗体と比較した。

## 4. 研究成果

### (1)小麦グルテンの酸加水分解に伴う感受性、惹起能の解析

感受性：グルテンを0.1N塩酸中で100加水分解したところ、0.5hr加水分解物はグルパール19Sと同様にSDS電気泳動で分離した際に<70 kDaに広くスミアなパターンを示した。48時間まで加水分解の時間を変化させたところ、時間の経過に伴い高分子量側のバンドが消失し、主なバンドが低分子量側に移行した。未分解グルテン(A0hr)、グルパール19SとSDS電気泳動パターンが似ている酸加水分解グルテン(A0.5hr)、および<30kDaにまで分解されているもの(A9hr)をマウス

に経皮感作した。その結果、A0hr群とA0.5hr群はV群と比較して抗原特異的IgE抗体の産生量が有意に高く、i.p.惹起30分後の血漿中ヒスタミン濃度もV群と比較して増大していたが、A0.5hr群のみV群との差が有意であった。

惹起性：ドットプロット等で確認された酸加水分解グルテンと血清中IgEの結合がマスト細胞を活性化し、アレルギー反応を惹起し得るのかについて、ヒト型マスト細胞(RS-ATL8細胞)を用いた*in vitro*惹起試験(EXiLE test)により検討した。HWP型の血清であるSerum #1および2では、分解前のグルテンで刺激した時よりも酸加水分解グルテンで刺激した際のルシフェラーゼ応答が増大し、その後応答は減弱に転じたが、それぞれ少なくとも24hおよび6h酸加水分解したグルテンでもカットオフレベル以上のマスト細胞活性化を誘導した(Fig. 1)。一方、

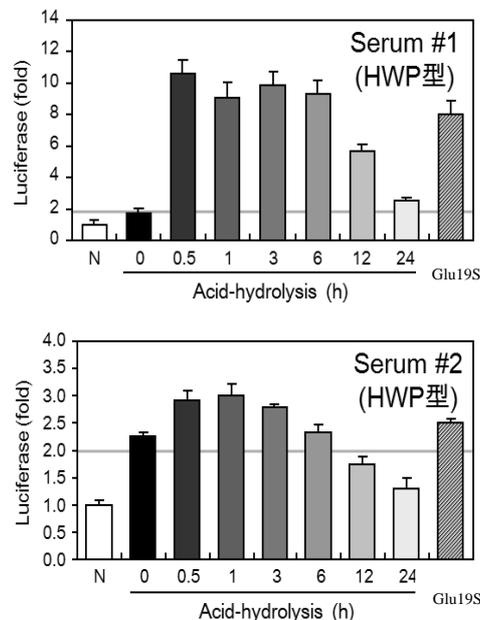


Fig.1 酸加水分解コムギによるHWP患者血清結合ヒト化マスト(RS-ATL8)細胞の*in vitro*惹起試験

従来型の小児小麦アレルギー患者血清(#3,4)では、いずれの場合も未分解のグルテン(0h)で細胞を刺激した際のルシフェラーゼ活性が最も高く、酸加水分解の経時変化に伴い活性は単調に減弱し、酸加水分解6h後にはカットオフレベルを下回った。

### (2)小麦グルテンのトランスグルタミナーゼ処理に伴う惹起能の増加について

EXiLE法により、未処理グルテン、消化処理グルテン、tTG処理グルテン、および消化後にtTG処理を施したグルテンのIgE架橋活性を調べたところ、HWP患者IgEで感作した

RS-ATL8 細胞はグルテンや消化処理グルテンにはほとんど応答性を示さなかったのに対し、tTG 処理グルテン (tTG-Glu) に対しては著しい応答性を示した。tTG による処理時間は、30 分間ですでに顕著な応答を示した。また、消化したグルテンをその後 tTG 処理した場合も、明瞭な応答が観察された。

### (3) 酸加水分解小麦グルテン特異的検出法について

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。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。

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、2 本のペプチドピーク (#1 及び #5: HMW glutenin subunit) の同定に至り、この #1 のペプチド (REYEQEPVVC) に対する抗体を作成し、ELISA 法での測定系を構築した。また、#1 のペプチドの対照として、ペプチド (RQYEQQPVC) に対する抗体も作成し、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両抗体の併用が有用であることを明らかにした。

さらに、酸加水分解コムギの グリアジン中のエピトープ (QPEEPFPE) に対する抗体を用いる Western blot による検出法が酸加水分解コムギを検出するうえで有用であることも示すことができた。

以上、小麦グルテンを加熱条件下、30 分程度の部分酸加水分解処理を行うと、グルテンタンパク質は分解が進み低分子化が引き起こされる一方で、一部のペプチドにおいて凝集等で高分子化体が生成すること、一方、酸処理により経時的に進むグルタミンの脱アミド化も確認された。これらのことにより、この部分酸加水分解された小麦グルテンは、脱アミドによる、もとのグルテンとは異なる新しいエピトープの出現、並びに凝集等による高分子化体の存在により、感作性、惹起能ともに上昇しているものと思われた。なお、アルカリ及び酵素による加水分解では、部分加水分解による凝集等による高分子化は観察されなかった。

#### (参考文献)

1) Denery-Papini S, Bodinier M, Larré C. et. al.: Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific

epitopes linked to deamidation, *Allergy*, 67, 1023-1032 (2012).

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

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) 査読有

DOI: 10.2332/allergolint.13-0A-061

Teshima R. Food Allergen in Cosmetics. *Yakugaku Zasshi*, 134, 33-38 (2014) 査読有

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. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 132, 1436-1438 (2013) 査読有

DOI: 10.1016/j.jaci.2013.07.017

Adachi R., Nakamura R., Sakai S., Fukutomi Y., Teshima R., Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten. *Allergy*, 67, 1392-1399 (2012) 査読有

DOI: 10.1111/all.12018

Nakamura R., Nakamura R., Adachi R., Itgaki Y., Fukutomi Y., Teshima R., Evaluation of allergenicity of acid-hydrolyzed wheat protein using an in vitro elicitation test. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 160, 259-264 (2012) 査読有

DOI: 10.1159/000341671

[学会発表](計 29 件)

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(2014.5.9) 京都市

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, 2014.5.22 (東京都江東区)

安達玲子, 酒井信夫, 手島玲子、食物アレルギーの経皮感作による即時型アレルギーモデル. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会 2014.9.12 (徳島市)

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, 2014.10.10 (Dublin)

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 (2014.12.20) 横浜市

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 2013.3.2(横浜市)

[図書](計 2 件)

手島玲子、第 1 篇第 5 章経皮感作が関与する食物アレルギー 「食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発」総ページ数 299 第一出版 (2014)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

手島 玲子 (TESHIMA REIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・食品部・部長  
研究者番号：50132882

### (2)研究分担者

中村亮介 (NAKAMURA RHYOSUKE)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号：50333357