

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591671

研究課題名(和文)加水分解コムギにより発症した経口小麦アレルギーの病態の解明および診断技術の確立

研究課題名(英文)Elucidation of pathologic conditions and establishment of the diagnostic methods in hydrolyzed wheat protein (Glupearl: GP19S)- induced immediate-type wheat allergy.

研究代表者

松永 佳世子 (MATSUNAGA, Kayoko)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：80131192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、グルパール19S(GP19S)を含む特定の洗顔石鹸の使用者に新規な即時型コムギアレルギー患者が大規模に発生し、社会問題化した。本研究では、最初に、GP19S特異IgE抗体を指標とした検査法を構築した。これは、重症度を反映し、予後評価にも有用と考えられた。また、患者血清IgE抗体を用いた免疫学手法により、小麦グルテンやGP19Sの製造工程サンプル、GP19S以外の加水分解コムギ(HWP)との結合性を評価し、GP19S特異IgE抗体のグルテンへの交叉反応が症状誘発機序であること、GP19Sの抗原性は酸加熱処理の工程で生じたこと、一部の他HWPIにも類似抗原が含まれること、を特定した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the pathologic conditions and to establish the diagnostic methods in hydrolyzed wheat protein- induced immediate-type wheat allergy (HWP-IWA). Our findings show that the ELISA-based GP19S specific IgE assay is a useful quantitative and high throughput method for the diagnosis. Using ELISA, skin prick test and Western blotting, we elucidated that patients who developed an allergy to GP19S also had cross-reactivity to some other HWPs. This suggested that other HWPs might contain the epitope sequences in GP19S. On the other hands, the GP19S antigen was thought to be generated after gluten was exposed to hydrochloric acid and heated to 95 °C. The heating time was long enough to initiate deamidation but too short to initiate a change in molecular weight, and precipitation at the isoelectric point resulted in an increase in antigen concentration.

研究分野：アレルギー疾患研究

キーワード：加水分解コムギ グルパール19S 即時型コムギアレルギー 特異IgE抗体 検査法 抗原解析 交叉反応性 予後因子の探索

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦において、ある特定の加水分解コムギ（グルパール 19S）を含有した洗顔石鹸（(旧) 茶のしずく石鹸）の使用者に即時型コムギアレルギーを発症した例が爆発的に増加し、社会問題となった。加水分解小麦とは、小麦不溶性蛋白のグルテンを酵素や酸で処理したものであり、その処理によって乳化性や保湿性を有するようになるため、本邦に限らず広く化粧品に添加されてきたものである。研究開始当初、化粧品中の加水分解コムギによる有害事象は、接触蕁麻疹が散見される程度であった。

当該症例のほぼ 100%は、当該石鹸の使用前にコムギアレルギーの既往は無く、従来から知られる成人のコムギアレルギー（コムギ依存性運動誘アナフィラキシー：WDEIA）とは明らかにその症状が異なったことから、新規な即時型コムギアレルギーと考えられた。当時、検査法は手探り状態であり、迅速な確立が望まれていた。

2. 研究の目的

最初に、(旧) 茶のしずく石鹸に含有された加水分解コムギ（グルパール 19S）により発症した即時型コムギアレルギーの精度の高い検査法の確立を目的とした。ここで言う精度とは、感度、特異度に加え、潜在的案重篤度や予後の評価も可能である、まさに臨床現場で有用であることを指す。

次に、グルパール 19S とコムギアレルギーの関係性について、また、具体的なタンパク質抗原についての解明を目的とした。

さらに、現在様々な加水分解コムギが化粧品に使用されている実態を考慮し、グルパール 19S と他の加水分解コムギにおける交差反応性の解明についても目的とした。

3. 研究の方法

(1) 患者抽出・臨床型別分類・検体収集

(旧) 茶のしずく石鹸の使用歴、症状、現病歴などを問診し、当該疾患を疑われた症例に対し皮膚テスト等を施行した。日本アレルギー学会「化粧品中のタンパク加水分解物の安全性に関する特別委員会」が制定した診断基準を満たす症例を確実例とし、臨床型別分類を行った。同意が得られた場合に限り、皮膚テストを実施し血清サンプルを得た。

(2) ELISA 法によるグルパール 19S 特異 IgE 抗体検査

グルパール 19S を PBS に溶解し、ELISA プレートに固定した。ブロッキング後、希釈した患者血清サンプルを添加・静置した後、再度洗浄し、HRP 融合抗ヒト IgE 抗体溶液を添加した。洗浄した後、HRP 基質を添加し、その発色の程度を吸光度計にて測定した。

(3) 各種検査値と臨床症状や重症度との相関解析

石鹸接触部位や小麦摂取後の臨床症状や一般的な抗原（コムギ、グルテン、 ω 原（グリアジン））特異 IgE 測定、ELISA 法によるグルパール 19S 特異 IgE 抗体値を相互に比較し、構築した検査法の有用性について検討した。

(4) 患者予後予測因子の探索

確定診断を下した症例に対し、定期的な問診、皮膚テスト、血清学的検討を行い、経時的な抗原特異的 IgE 抗体の推移、治療方法の効果の評価、等を検証した。

(5) 原因タンパク質の解析

・食餌性抗原の解析

小麦グルテンを二次元電気泳動により分離し、メンブレンに転写した。血清サンプルの希釈物を暴露し、洗浄後、HRP 結合抗ヒト IgE 抗体溶液を暴露した。HRP 基質を添加し、その蛍光をスキャナーで検出した。その後、質量分析による同定を試みた。

・接触性抗原の解析

グルパール 19S の製造工程サンプルを原料メーカーより入手し、ELISA 法や Western Blot 法にて患者 IgE 抗体との結合性を評価した。

・食餌性抗原と接触性抗原の関連分析

それぞれで得た知見を相互比較し、感作と誘発の関係性について考察した。

(6) グルパール 19S 以外の加水分解コムギへの交差反応性評価

当該患者の血清中 IgE 抗体と各種加水分解コムギとの結合性を ELISA 法や Western Blot 法にて評価するとともに、皮膚テストも施行し、グルパール 19S に感作した後、他の加水分解コムギに交叉反応しうるかを確認した。

4. 研究成果

(1) 臨床的有用性の高い検査方法の確立

当該疾患の検査法として、“ELISA 法によるグルパール 19S 特異 IgE 抗体検査”を確立した。試験間誤差を無くすため、標準検体との相対値を unit として定義した。多検体にて検討した結果、判定基準を 3unit 未満が陰性、3unit 以上 5unit 未満が疑陽性、5unit 以上が陽性と、設定できた。

上記で確立した検査法、及び一般的な体外診断薬 ImmunoCAP® (グルテン、コムギ、ω グルグルアジン) について、当該疾患の検出率や重症度と比較した結果、いずれの検査値よりも感度や特異度が高く、重症度との相関性も高かった。また、当該疾患の検査法としては、グルパール 19S のブリックテストが最も感度が高いと考えられたが、抗原曝露のリスクが無い (体外検査法であること) を考慮すれば、本研究にて構築した検査法の有用性は非常に高いものと考えられた。

本検査法の確立に関して、日本アレルギー学会や日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会などで発表するとともに、国際誌 (Allergology International) へ投稿し、

Editorial に取り上げられた。

(2) 患者予後はグルパール 19S 特異 IgE 抗体により評価できる

この検査法を用い、2015/3/27 現在、当施設にて 505 検体 (同一患者の経過観察分含む) を検査した。当該石鹸使用時にはグルパール 19S 特異 IgE 抗体の上昇が確認されたが、石鹸の使用中止によりほぼ全ての症例で抗体価の減少が見られた。この結果は、特別委員会にて行われた疫学調査結果、当該石鹸の使用中止により経時的に症状が軽快化する、という結果とも一致しており、本検査法が予後評価にも有効であることが確認された。

(3) 原因タンパク質の解析

2D Western Blot の手法により、当該患者の血清中 IgE 抗体が、小麦グルテン中の γ 体グリアジンと反応することが確認された。それ以外のタンパク質にも IgE 抗体が結合したものはあったが、同定には至っていない。グルパール 19S は、その製造工程の中で、酸加熱処理の段階で抗原性を獲得することが確認できた。

以上より、グルテンの酸加熱処理により生じたタンパク質抗原に対する抗体が産生し、その抗体が天然の小麦タンパク質と交叉的に反応したことが、症状誘発の機序であると考えられた。

現在でも多種多様な加水分解コムギが化粧品に含有されていることを考慮し、国際学会 (ESCD、AAAAI) にて発表した。

(4) 当該患者はグルパール 19S 以外の一部の加水分解コムギに交叉反応する

当該患者の血清中 IgE 抗体は、グルパール 19S 以外で化粧品に使用されている加水分解コムギの一部にも反応することが、免疫学的検討、及び皮膚テストにより確認された。

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 3 件)

1. 松永佳世子. 化粧品による皮膚障害. 現代医学. 2014;62(1): 101 -105. 査読無.

2. 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. 2014;63(2):243-9. 査読有.

3. 矢上 晶子, 松永 佳世子. 皮膚のアレルギーのトピックス. 皮膚と美容. 2014;46(2):55-59. 査読無.

[学会発表] (計 11 件)

<国内学会>

1. 松永佳世子. 産官学連携「化粧品等皮膚安全性症例情報ネット」. 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. 仙台国際センター. 2014.11.22. 東京.

2. 松永佳世子. 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. 日本化粧品学会. 第39回教育セミナー. ヤクルトホール. 2014.10.17. 東京.

3. 松永佳世子, 矢上晶子, 中村政志, 佐野晶代, 小林東. 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. 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. 2014.7.5-7.6. 東京.

4. 松永佳世子. 化粧品における最近の健康被害例と課題. 第39回日本化粧品学会. 有楽町朝日ホール. 2014.6.5-6. 東京.

5. 松永佳世子. 加水分解コムギ含有石鹸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. 第87回日本産業衛生学会. 岡山コンベンションセンター. 2014.05.23. 岡山.

6. 矢上晶子, 松永佳世子. 経皮感作による食物アレルギーの病態と治療. 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. 2014.5.9-5.11. 京都.

7. 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. 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. 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. 2014.5.9-5.11. 京都.

<国際学会>

1. Yagami A, Suzuki K, Nakamura M, Sano A, Arima M, Iwata Y, Kobayashi T, Hara K, Matsunaga K. Clinical analysis of immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat proteins in soap. American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Feb. 20-24, 2015. George R. Brown Convention Center.

2. Nakamura M, Yagami A, Matsunaga K. Antigen in Glupearl 19S were developed by acid-heat treatment. American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Feb. 20-24, 2015. George R. Brown Convention Center.

3. Matsunaga K. What we can learn and share about contact allergens from this session. EADC 2014 3rd Eastern Asia Dermatology Congress, International Convention Center Jeju. 2014.9.24-26. Korea.

4. Matsunaga K. Contact dermatitis in Asia- The Japanese experience. Focus session "Contact dermatitis, a global approach. Which is the status in different parts of the world". 12th Congress of the European Society of Contact Dermatitis (ESCD). Palau de Congressos de Catalunya. 2014.6.25-6-28. Barcelona, Spain.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 佳世子 (MATSUNAGA, Kayoko)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号 : 8 0 1 3 1 1 9 2

研究者番号 :

(2) 研究分担者

矢上 晶子 (YAGAMI, Akiko)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号 : 9 0 3 6 7 6 9 9

佐野 晶代 (SANO, Akiyo)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号 : 2 0 6 2 5 9 8 3

中村 政志 (NAKAMURA, Masashi)

藤田保健衛生大学大学院 医学研究科・
研究生

研究者番号 : 3 0 4 4 9 4 6 7