

パール 19S は用量依存的な経皮感作性を示すこと、及び界面活性剤である SDS は経皮感作を促進する効果を有することが示された。この SDS の促進効果の原因としては、抗原の皮膚透過性を増大させる、あるいは皮膚の免疫系に対してアジュバントとしての作用を示すという可能性等が考えられる。また、本研究で使用したマウスを用いる経皮感作実験系は大変有用であることも示された。

グルパール 19S は小麦タンパク質であるグルテンを酸性条件で加水分解することにより製造された小麦タンパク質加水分解物である。グルパール 19S 以外の小麦タンパク質加水分解物を含有する医薬部外品等はこれまでも製造・販売されていたが、健康被害が大きな問題となることは無かった。そこで、加水分解の条件や分解の程度による皮膚感作性の違いについて検討するため、【実験 2】においては、グルテンをアルカリ性条件で加水分解し、その経皮感作性の比較検討を行った。その結果、グルテン（及び Alk0h）では、グルパール 19S よりは弱いもののある程度の感作性が見られたのに対して、Alk0.5h 及び Alk12h では感作性は見られなかった。Alk0.5h は電気泳動上はグルパール 19S とよく類似したパターンを示すが、経皮感作性は全く異なるということになり、分子量以外の要因が感作性に大きく関係していると考えられる。一般的にペプチド結合の加水分解に関して、酸性条件では可逆反応であり、逆反応が進行する可能性があるため、グルパール 19S の場合は、一旦生成したペプチド鎖がまた別のペプチド鎖と結合し、新たなアミノ酸配列が出現する可能性が考えられる。また、グルテンにはグルタミン残基が多く含まれているが、このグルタミン残基の側鎖のアミド結合が開裂してグルタミン酸残基が出現することも考えられる。一方アルカリ性条件の加水分解ではアミノ酸残基のラセミ化が起きると考えられており、これが抗原性に影響する可能性もある。今後詳細な検討が必要であろう。

また【実験 2】では、グルパール 19S 感作マウスの血中における TSLP 濃度の検討を行った。TSLP は、抗原提示細胞である樹状細胞に作用して免疫系をアレルギー発症の方向へと誘導するサイトカインであり、

アレルギー発症のマスタースイッチとも言われている。アレルギー疾患患者の病変組織で高発現していることが知られている。検討の結果、グルパール 19S を用いて経皮感作を行った群では、経時的に血中の TSLP レベルが増加することが示された。これは、グルパール 19S の経皮感作によって全身性アレルギー性応答が起きていることを明確に示す重要な知見である。

グルパール 19S は非常に多く販売された洗顔石鹸に含有されていた。本研究の【実験 1】では経皮感作における界面活性剤の効果について SDS を用いて検討したが、石鹸に多く含まれる界面活性剤としては、石鹸素地中の各種脂肪酸ナトリウム塩がある。そこで【実験 3】では、これらの脂肪酸ナトリウム塩 5 種について、グルパール 19S の経皮感作性に対する影響を検討した。Fig. 4-1 に示すように、ラウリン酸ナトリウムは炭素数 12 (C12)、ミリスチン硫酸ナトリウムは炭素数 14 (C14)、パルミチン酸ナトリウムは炭素数 16 (C16)、オレイン酸ナトリウムは炭素数 18 (1 個の不飽和結合を含む) (C18:1)、リノール酸ナトリウムは炭素数 18 (2 個の不飽和結合を含む) (C18:2) である。一方 SDS は炭素数 12 の直鎖の末端に硫酸基がありナトリウム塩となっている。検討の結果、C12 及び C18:2 を用いた場合にはある程度感作が進行し、アナフィラキシー症状も見られたが、その程度は SDS を用いた場合よりも弱かった。一方 C14、C16、C18:1 を用いた場合は、血中の抗体レベルはある程度増加したが、アナフィラキシー症状はほとんど見られなかった。C12 及び C18:2 を用いた場合の感作及び惹起後の症状は、界面活性剤を共存させなかった群 (H 群) と同程度であったことから、これら 2 種の界面活性剤の皮膚感作性促進効果については評価が難しいところである。今後再試験を行う等、更なる検討が必要である。

【実験 4】ではグルパール 19S で感作したマウスについて組織病理解析を行った。その結果、感作部位である皮膚、リンパ節、及びアナフィラキシー反応惹起後の眼瞼において炎症性の病変が見られ、そのグレードは Vehicle 群と比較して高いという結果が得られた。脾臓については、グルパール 19S 感作に

より、重量は Vehicle 群と比較して増大したが、病理像における大きな違いは見られなかった。今後、他の臓器や血液等を含めた全身的な組織病理解析を行い、グルパール 19S により感作の詳細を明らかにするべきと考える。

医薬品や医薬部外品・化粧品等の安全性試験のうち、皮膚感作性に関しては、従来モルモット皮膚を用いる Maximization test 等が用いられてきた。また近年、マウスを用いる局所リンパ節アッセイ (Local lymph node assay, LLNA) が OECD テストガイドラインに追加されたことから、わが国で医薬部外品・化粧品の安全性評価に活用されることとなった。しかし、これらの方法は低分子化学物質を対象とした遅延型アレルギー (IV 型アレルギー) に関する試験法である。タンパク質あるいはその分解物にも適用可能な即時型アレルギー (I 型アレルギー) に関する皮膚感作性試験法はまだ確立されていない。本研究で筆者らが用いたマウスを使用する経皮感作性の実験手法は、比較的短期間で I 型アレルギーによるアナフィラキシーを誘発できる有用なモデル実験系であり、再現性も良好である。そこで、この実験系を基にして、即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法 (概要) を作成した。今後種々の被検物質への適用可能性や再現性、陽性感作物質及びその用量等について、他の専門家による評価を加え、皮膚感作性試験法として確立するべく検討を進めることが必要である。

E. 結論

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、グルパール 19S の経皮感作性、感作の際の界面活性剤の影響、グルパール 19S とは異なる方法で調製した小麦タンパク質加水分解物の感作性等について検討した。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を示した。代表的な界面活性剤である SDS はグルパール 19S による経皮感作を促進したが、石鹸素地に一般的に含有される界面活性剤である脂肪酸ナトリウム塩ではこのような明らかな促進効果は見られなかった。グルパ

ール 19S とは異なるアルカリ性条件下での小麦タンパク質加水分解物は、グルパール 19S のような顕著な経皮感作性は示さなかった。また、グルパール 19S で感作したマウスの組織病理解析を行ったところ、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た。今後、本研究で得られた結果についてさらに検討を重ね、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ことにより、医薬部外品・化粧品類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。

(参考文献)

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 127 (2): 531-533.
- 2) Hsieh KY, Tsai CC, Herbert Wu CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1067-75.
- 3) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv Mice. *Allergol Int* 2006; 55: 43-48.
- 4) Wang JS, Zhao MM, Zhao QZ, Bao Y, Jiang YM. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *J Food Sci* 2007; 72(2): 103-107.
- 5) Bouchez-Mahiout I, Pecquet C, Kerre S, Snégaroff J, Raison-Peyron N, Laurière M. High Molecular Weight Entities in Industrial Wheat Protein Hydrolysates Are Immunoreactive with IgE from Allergic Patients. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 4207-4215.
- 6) Laurière M, Pecquet C, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Bayrou O, Raison-Peyron N, Vigan M. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics

can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis* 2006; 54: 283-289.

7) Laurière M, Pecquet C, Boulenc É, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Choudat D, Raison-Peyron N, Vigan M, Branlard G. Genetic differences in omega-gliadins involved in two different immediate food hypersensitivities to wheat. *Allergy* 2007; 62: 890-896.

8) Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R, Sawada J, Maitani T. Profile Analysis and Immunoglobulin E Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140: 36-42.

9) Strid J, Callrd R, Strobel S. Epicutaneous immunization converts subsequent and established antigen-specific T helper type 1 (Th1) to Th2-type responses. *Immunology* 2006; 119: 27-35

10) Strid J, Hourihane J, Kimbert I, Callrd R, Strobel S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 757-66.

11) Wang YH, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 798-806.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 2012; 67:1392-1399.

2) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R. Evaluation of Aller-

genicity of Acid-Hydrolyzed Wheat Protein Using an in vitro Elicitation Test. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 160: 259-264.

2. 学会発表

1) 安達玲子、中村里香、酒井信夫、福富友馬、手島玲子、加水分解小麦による経皮感作に関するマウスモデル実験系を用いた検討 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)

3) 中村亮介、中村里香、安達玲子、板垣康治、松永佳世子、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)

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) 安達玲子、中村里香、酒井信夫、福富友馬、手島玲子 各種加水分解小麦の経皮感作能に関するマウスモデル実験系を用いた比較検討 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2012.11-12)

6) 北野高道、山下弘高、安達玲子、手島玲子、福富友馬、松永佳世子、稲垣直樹、田中宏幸 加水分解小麦末による全身感作マウスに及ぼす抗原経口負荷の影響 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2012.11-12)

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ゲン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) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R. Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice. Society of Toxicology 52nd Annual Meeting and ToxExpo (2013.3)

H. 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

Table 1. アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0	症状なし
1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
2	活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
3	1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
5	死亡

Table 2. 感作抗原

実験1 (1群5匹 x 5群)

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS + 0.5%SDS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HS500	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
H500	グルバール19S	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HS200	グルバール19S + 0.5%SDS	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
H200	グルバール19S	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S

実験2 (1群5匹 x 6群)

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS + 0.5%SDS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
19S	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
Alk0h	0hアルカリ加水分解グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	0hアルカリ加水分解グルテン
Alk0.5h	0.5hアルカリ加水分解グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	0.5hアルカリ加水分解グルテン
Alk12h	9hアルカリ加水分解グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	12hアルカリ加水分解グルテン
Gluten	グルテン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルテン

実験3 (1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
H	グルバール19S	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HS	グルバール19S + 0.5%SDS	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HC12	グルバール19S + 0.5%ラウリン酸Na	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HC14	グルバール19S + 0.5%ミリスチン酸Na	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HC16	グルバール19S + 0.5%パルミチン酸Na	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HC18:1	グルバール19S + 0.5%オレイン酸Na	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
HC18:2	グルバール19S + 0.5%リノール酸Na	200 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S

実験4 (1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V[1W]	PBS	-	-	-
V[3W]	PBS	-	-	-
V[4W]	PBS	-	-	-
V[ASA]	PBS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
19S[1W]	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	-	-
19S[3W]	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	-	-
19S[4W]	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	-	-
19S[ASA]	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S

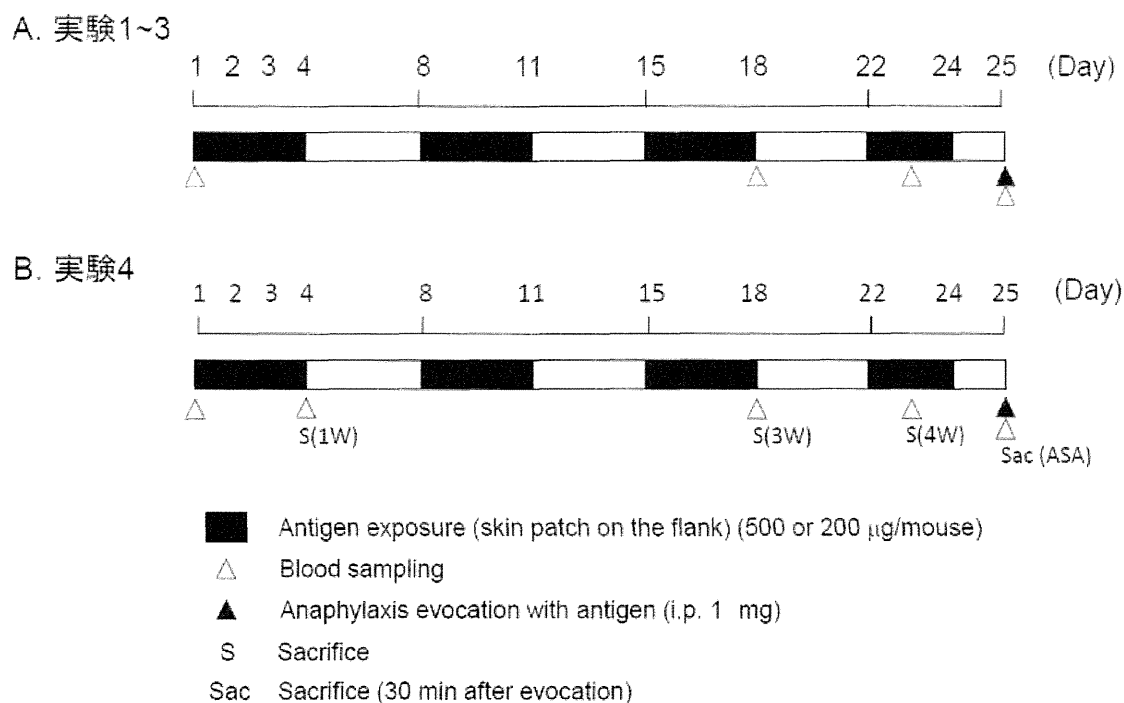


Figure 1. 経皮感作試験スケジュール

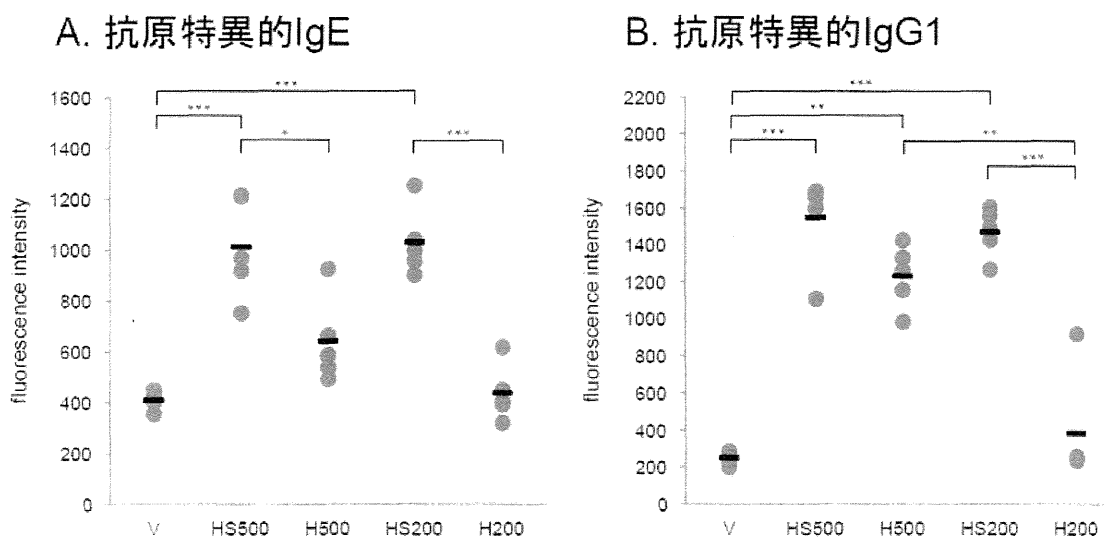
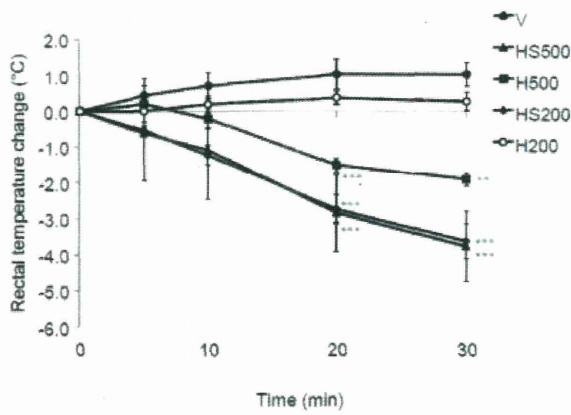


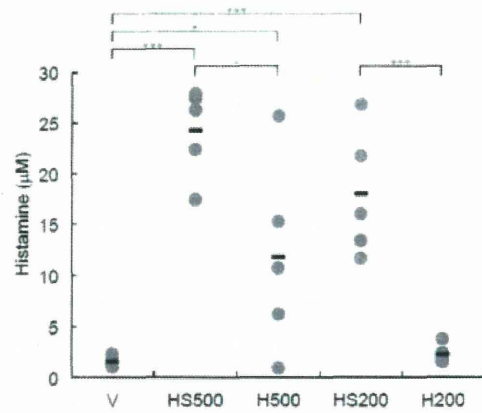
Figure 2-1 経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生

各群の処理抗原についてはTable2に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血漿中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

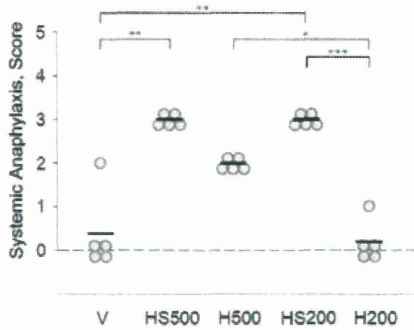


Figure 2-2 グルパール19S経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

A:各群の体温データをMean±S.D.で示す。B, C:ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

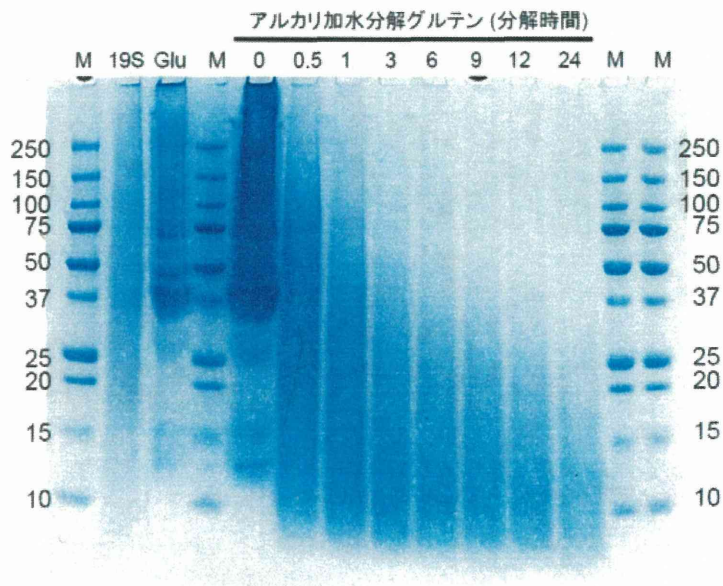


Figure 3-1 アルカリ加水分解グルテンのSDS-PAGE 10-20%ポリアクリルアミドゲルの染色パターン

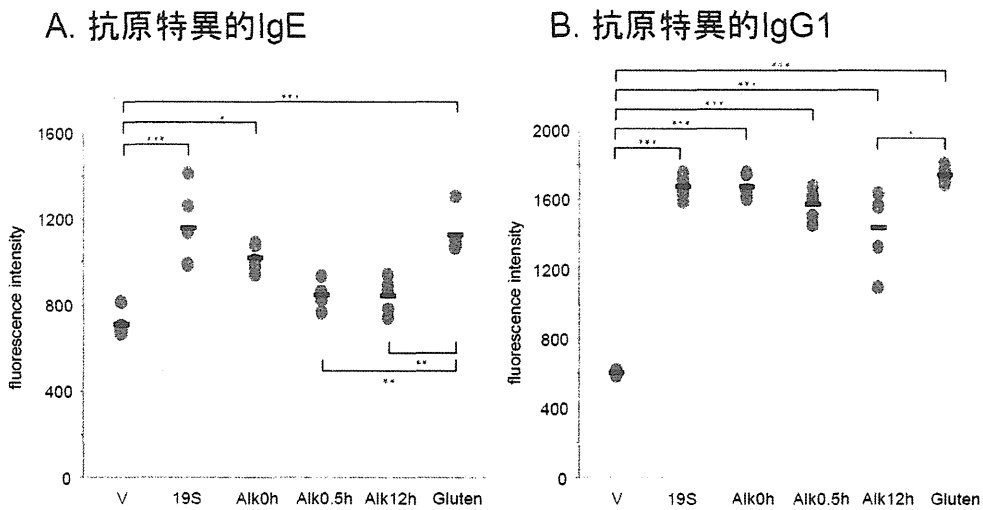
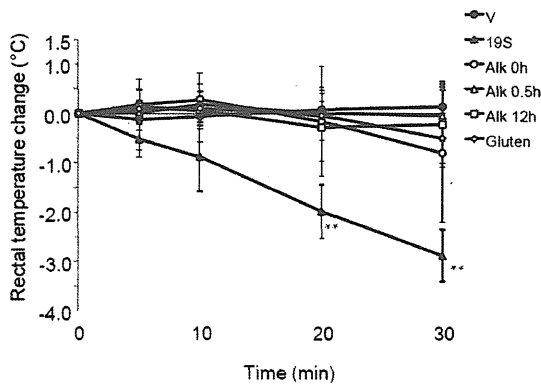


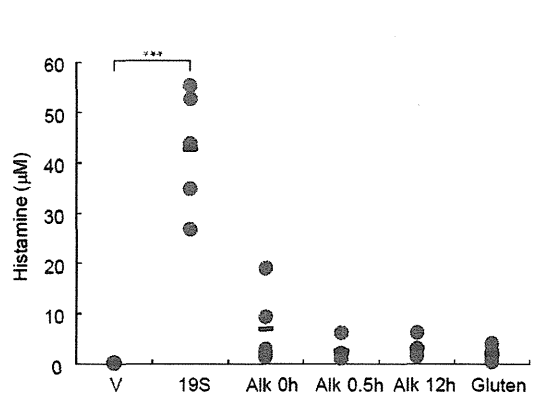
Figure 3-2 経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生

各群の処理抗原についてはTable2に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血漿中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

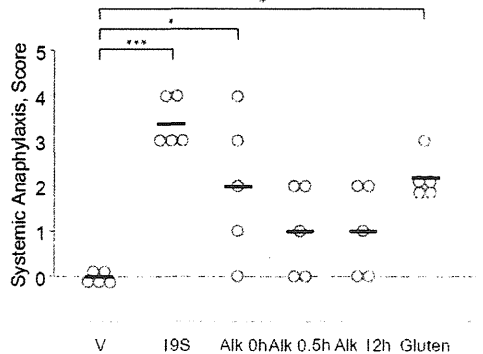


Figure 3-3 グルパール19Sおよびアルカリ加水分解グルテン経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

A:各群の体温データをMean±S.D.で示す。B, C:ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

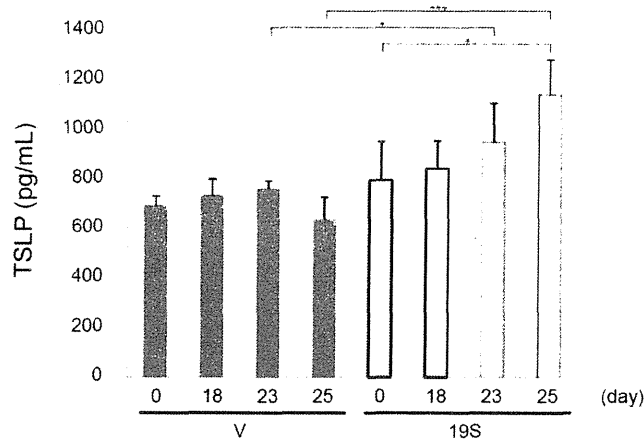


Figure 3-4 グルパール19S経皮感作マウスの血清中TSLP濃度
感作スケジュールについてはFig.1に示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

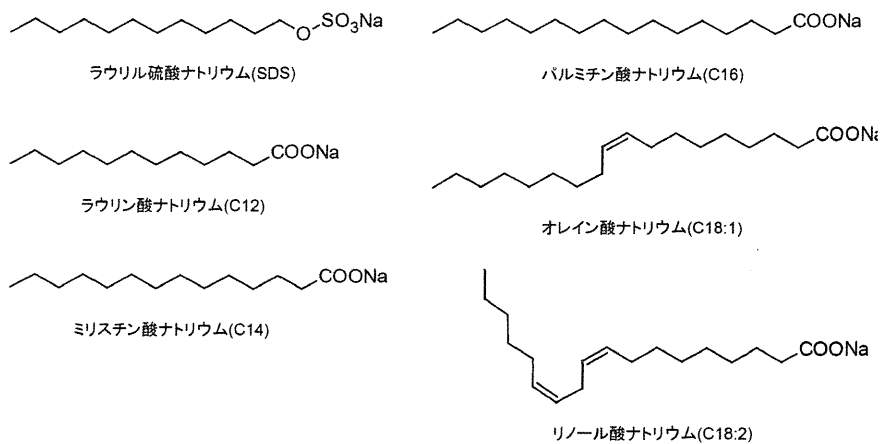


Figure 4-1 石けん素地中の界面活性剤及びSDSの構造

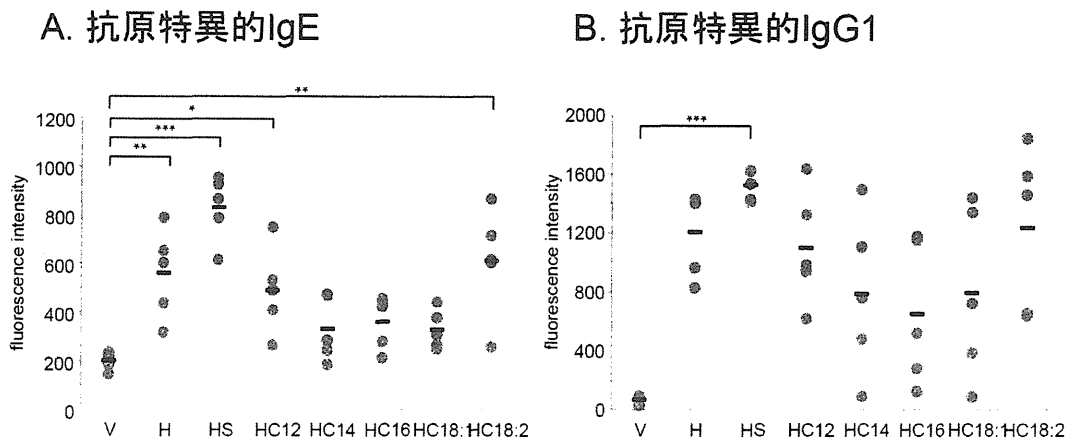
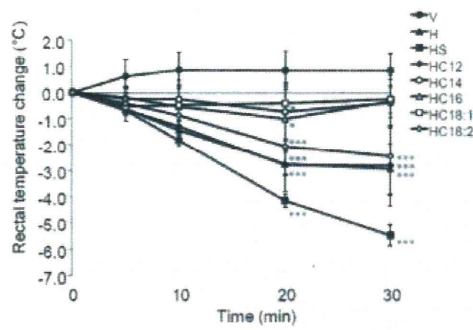
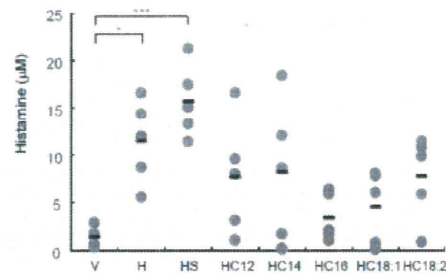


Figure 4-2 経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生
各群の処理抗原についてはTable2に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血漿中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

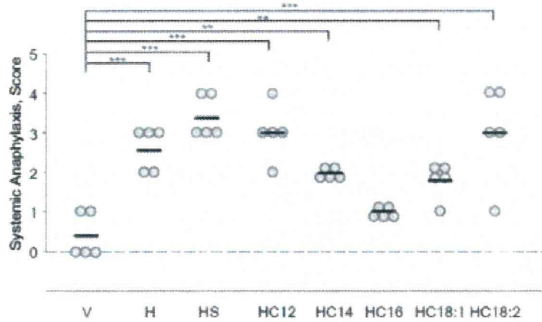


Figure 4-3 各種界面活性剤添加グルパール19S経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起
 A: 各群の体温データをMean±S.D.で示す。B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

無処置群
(Ctrl)

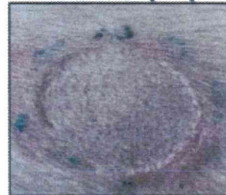


Vehicle投与群

1週感作後[1w]



3週感作後[3w]



4週感作後[4w]



惹起後・解剖時[ASA]



グルパール19S投与群

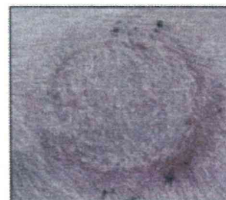


Figure 5-1 マウス皮膚(背面左側)の肉眼病変

感作スケジュールについてはFig.1に示す。V(1W, 3W, 4W, ASA)群、19S(1W, 3W, 4W, ASA)群、及び無処置群の皮膚を示す。濃紺の線は抗原貼付部位を示すマーカである。

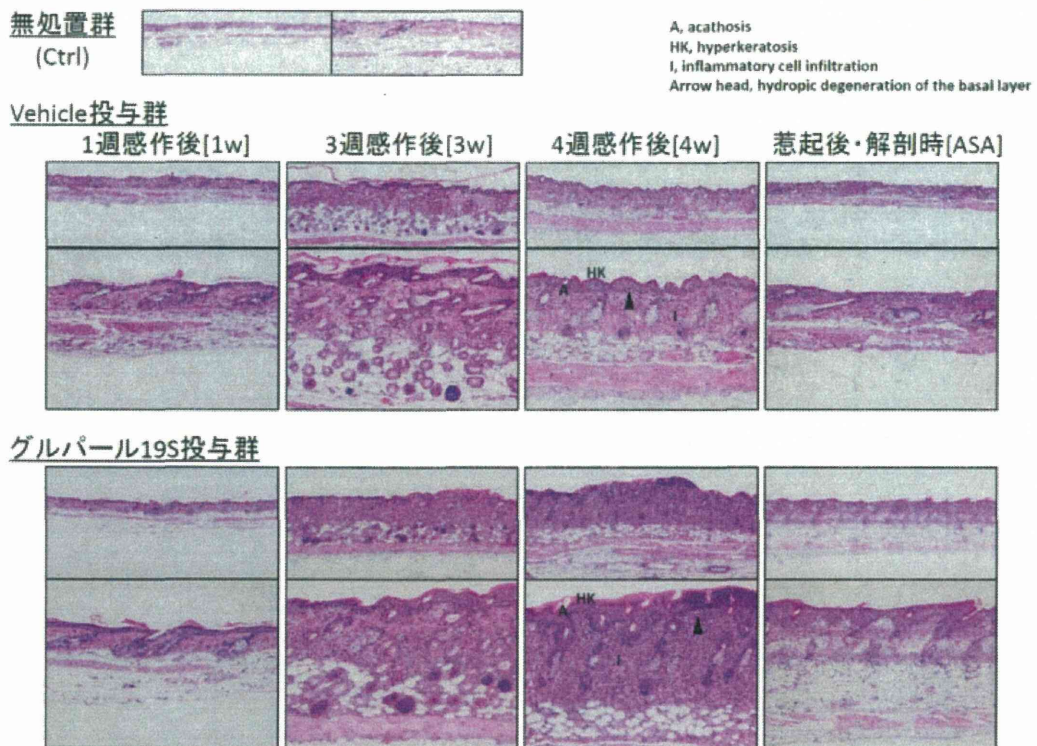


Figure 5-2 マウス皮膚の病理組織病変

V(1W, 3W, 4W, ASA)群、19S(1W, 3W, 4W, ASA)群、及び無処置群の抗原貼付部位皮膚断面像を示す。A, acathosis; HK, hyperkeratosis; I, inflammatory cell infiltration; Arrow head, hydropic degeneration of the basal layer

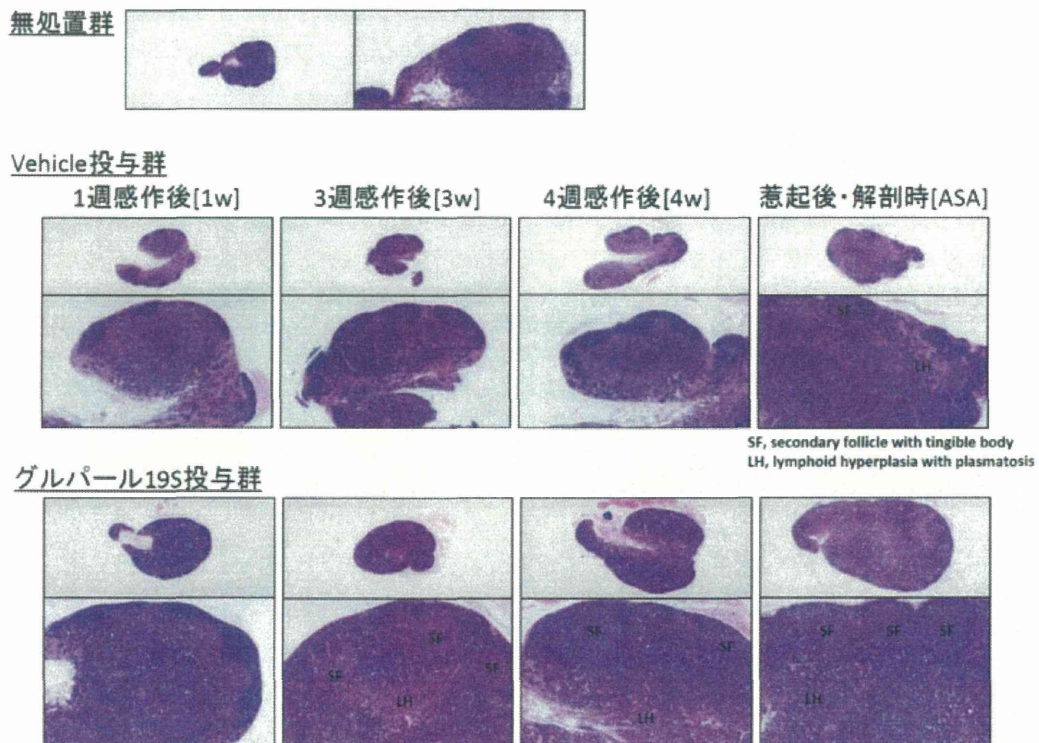


Figure 5-3 マウスリンパ節(左腋窩)の病理組織病変

V(1W, 3W, 4W, ASA)群、19S(1W, 3W, 4W, ASA)群、及び無処置群の左腋窩リンパ節の断面像を示す。SF, secondary follicle with tingible body; LH, lymphoid hyperplasia with plasmatisation

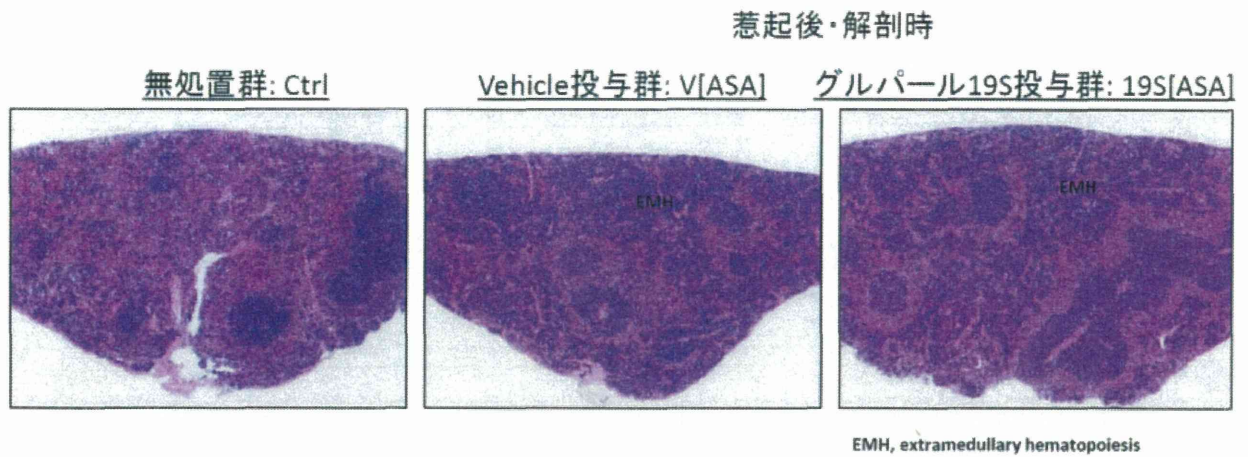
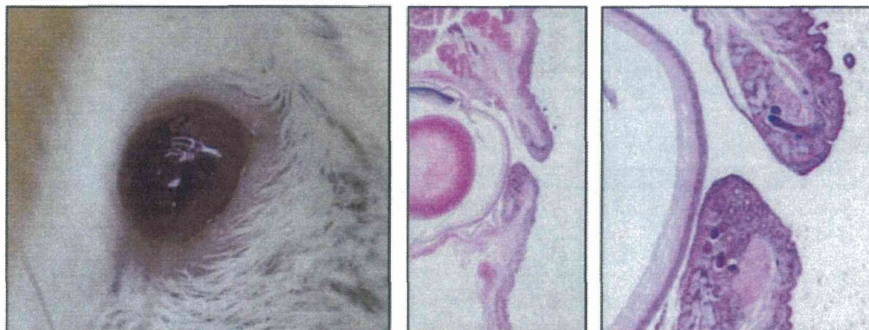


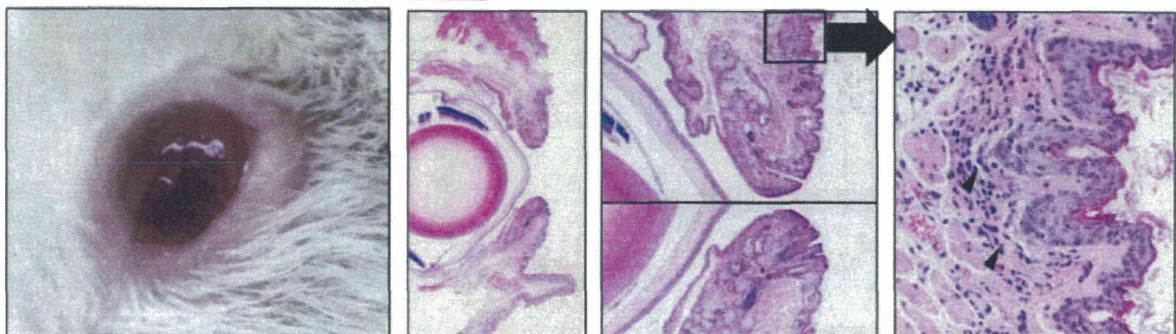
Figure 5-4 マウス脾臓の病理組織病変

V[ASA]群、19S[ASA]群、及び無処置群の脾臓(惹起30分後)の断面像を示す。
EMH, extramedullary hematopoiesis

Vehicle投与群: V[ASA]



グルパール19S投与群: 19S[ASA]



Arrow head, inflammatory cell infiltration and hydropic degeneration of the basal layer

Figure 5-5 マウス眼瞼の病理組織病変

V[ASA]群、19S[ASA]群、及び無処置群の眼瞼(惹起30分後)の写真及び断面像を示す。
Arrow head, inflammatory cell infiltration and hydropic degeneration of the basal layer

Histopathology of skin, lymph node, spleen and eyelid

Treatment	Group name & Sacrifice point (day)	No. of animals	Skin				Lymph node (left axillar)		Spleen	Eyelid
			Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration	Hyperplastic follicle	Lymphoid hyperplasia	Extramedullary hematopoiesis	Inflammation
			Grade	+/++/+++	+/++/+++	+/++/+++	+/++/+++	+/++/+++	+/++/+++	+
Control	Ctrl; 25	2	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0
Vehicle (SDS)	V[1w]; 4	5	1/0/0	2/3/0	5/0/0	5/0/0	0/0/0	0/0/0	NE	NE
	V[3w]; 18	5	1/0/0	3/1/0	3/0/0	5/0/0	2/0/0	1/0/0	NE	NE
	V[4w]; 24	5	4/1/0	3/2/0	5/0/0	5/0/0	4/0/0	2/0/0	NE	NE
	V[ASA]; 25	5	3/1/0	2/3/0	4/1/0	4/1/0	5/0/0	0/2/0	5	2/0/0
Glupearl 19S	19S[1w]; 4	5	0/0/0	1/1/3	3/0/0	5/0/0	0/0/0	1/0/0	NE	NE
	19S[3w]; 18	5	2/3/0	0/0/5	0/4/1	1/4/0	1/4/0	2/1/0	NE	NE
	19S[4w]; 24	5	2/2/1	0/0/5	0/2/3	0/0/5	1/4/0	0/2/0	NE	NE
	19S[ASA]; 25	5	4/1/0	0/4/1	0/4/1	0/5/0	0/2/3	2/1/2	5	0/2/2

NE, not examined

Grading standards

Grade	Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration	Hyperplastic follicle	Lymphoid hyperplasia	Extramedullary hematopoiesis	Subcutaneous edema
+: mild	4層以上の有棘細胞層1-3箇所	びまん性角化亢進	隣接した3個以上の細胞による病変1-20箇所	炎症細胞が真皮に散在性に浸潤	Lymphoblastのみ又はtingible bodyを伴う小型のsecondary follicle	2mm以上又はplasmacytosis有り	×、無し	好中球中心の炎症細胞浸潤
++: moderate	4-6箇所	びまん性角化亢進有棘細胞2層以上の高さ、皮脂腺1個分以上の幅を示す限局性角化亢進1-2箇所	21-40箇所	炎症細胞が真皮にびまん性浸潤又は皮下組織に散在性に浸潤	Tingible bodyを伴う大型のsecondary follicle	2mm以上及びplasmacytosis有り又は4mm以上	○、有り	肥満細胞を含んだ炎症細胞浸潤
+++: severe	7箇所以上	3箇所以上	41箇所以上	炎症細胞が皮下組織にびまん性浸潤し、充満	Secondary follicle 10個以上	4mm以上及びplasmacytosis有り		炎症細胞浸潤による基底膜液状変性

Table 3. 病理組織病変の所見

上表には各病変のグレード別のマウス個体数を、下表には各グレードの所見内容を示す。

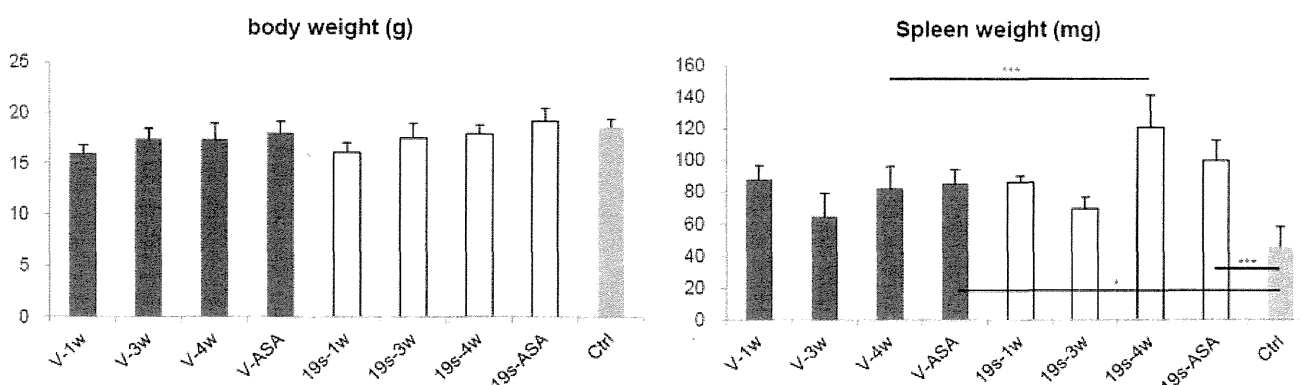
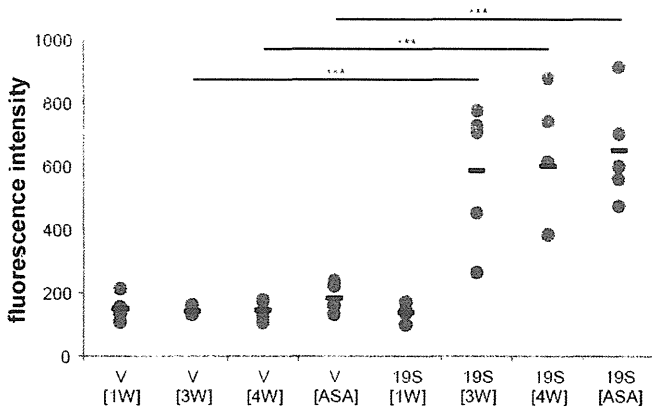


Figure 5-6 解剖時の個体重量及び脾臓重量

感作スケジュールについてはFig.1に示す。無処置群(Ctrl)はDay25にV[ASA]群、19S[ASA]群と同時に解剖に供した。

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

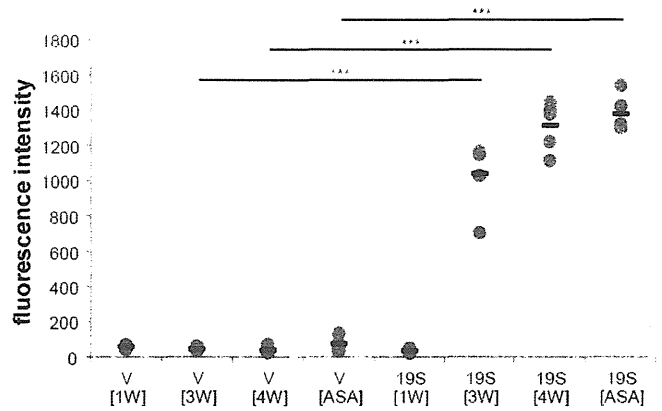
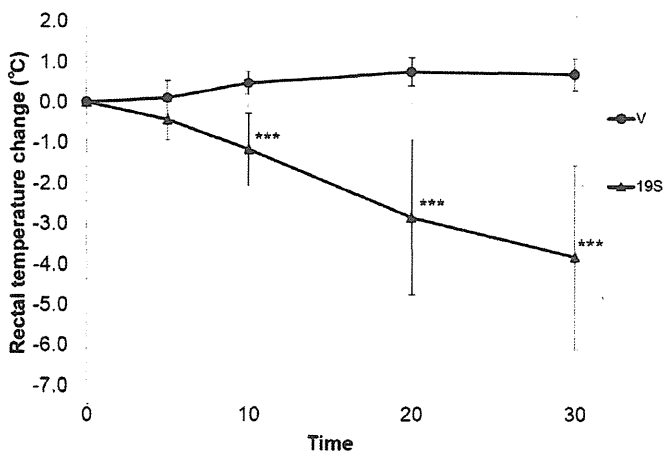


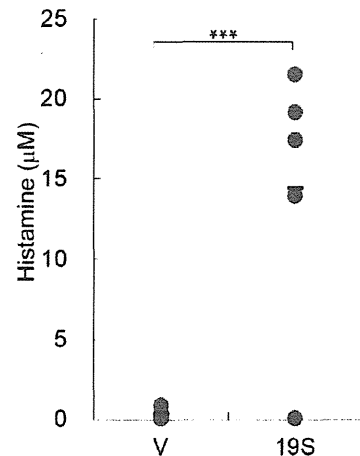
Figure 5-7 経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生

感作スケジュールについてはFig.1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
*** $p < 0.001$

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血漿中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

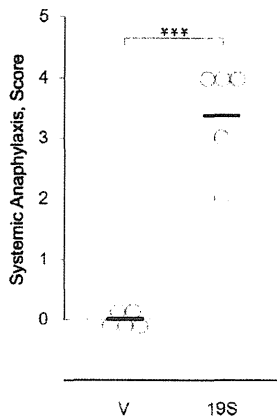


Figure 5-8 グルパール19S経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

A:各群の体温データをMean±S.D.で示す。B, C:ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*** $p < 0.001$

(別紙)

即時型アレルギー誘発経皮感作性試験法 (概要)

I. 本ガイドライン案について

本ガイドライン案は、タンパク質及び加水分解等何らかの修飾を受けたタンパク質を対象として、即時型アレルギーを誘発する経皮感作性について検討するための試験法の案として作成したものである。今後、種々の対象検体に関する本試験法の結果と既報の知見との比較や、複数機関による妥当性検証等、更なる検討が必要である。

II. 試験実施要項

- 1 動物：原則として BALB/c マウスを用いる。
- 2 動物数：スクリーニング試験としては原則として 1 群 5 匹以上とする。確認用再試験としては原則として 1 群 8 匹以上とする。
- 3 試験群：原則として被検物質感作群、陽性対照感作群（注 1）、対照群（注 2）を設ける。
- 4 試験手順
 - 1) 感作
 - (1) 予め剃毛した動物の背部片側皮膚（約 2×2cm）に対してセロハンテープを用いてテープストリッピングを 10 回行う。0.5%ラウリル硫酸ナトリウムを含有する試料（被検物質、陽性感作物質、または基剤の溶液）を閉塞パッチにて 72 時間貼付する（Day1-4）（注 3）。
 - (2) 上記貼付を 96 時間休止をはさみながらさらに 3 回繰り返す（Day8-11、Day15-18、Day22-25）。
 - 2) 抗体産生確認
Day1、Day18、Day23 に採血し、感作抗原に対する特異的抗体（IgE 及び IgG1）の産生を ELISA にて確認する。
 - 3) 惹起（Day25）
被検物質または陽性感作物質 1 mg（10 mg/mL 溶液を 100 μL）を腹腔内投与する（注 4）。30 分間、直腸温の測定及びアナフィラキシー症状のスコアリングを行う（注 5）。30 分後に採血し、血中のヒスタミン濃度を測定する。
 - 4) 評価
上記 2) 及び 3) について、被検物質感作群と陽性対照感作群の結果を総合的に比較検討し、被検物質の感作性について判断する。

(注)

- 注 1：陽性感作物質としては、小麦グルテンを pH1、100℃で 30 分間加水分解した後中和したもの等を用いる。
注 2：対照群としては基剤処置動物を用いる。
注 3：通常、50 μL の用量を用いる。陽性感作物質の濃度は 10 mg/mL を用いる。溶液あるいは懸濁液を用いる。
注 4：対照群には陽性感作物質を投与する。
注 5：スコアリングは既報の方法を参考にして行う。

スコアの例を下記に示す。

スコア 0	症状なし
スコア 1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
スコア 2	活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
スコア 3	1 分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
スコア 4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、痙攣
スコア 5	死亡

(スコアリングについての参考文献)

1. Birmingham NP, Parvataneni S, Hassan HMA, Harkema J, Samineni S, Navuluri L et al. An adjuvant-free mouse model of tree nut allergy using hazelnut as a model tree nut. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;144:203–210.
2. Mathias CB, Hobson SA, Garcia-Lioret M, Lawson G, Poddighe D, Freyschmidt EJ et al. IgE-mediated systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:795–805.
3. Zhang T, Pan W, Takebe M, Schofield B, Sampson H, Li XM. Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of Th1 and Th2 responses. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1808–1818.

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(平成24年度)

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

研究分担者 板垣 康治 北海道文教大学人間科学部 健康栄養学科 教授

研究要旨:

北海道内の医療機関に勤務する医師、および開業医を対象として、「茶のしずく」アレルギーも含め、小麦加水分解物が添加された化粧品、医薬部外品によるアレルギー発症に関するアンケート調査を実施した。アンケートは4079名の医師に配布し、360名から回答が得られ回収率は8.8%であった。「茶のしずく石鹸等による小麦アレルギー情報サイト」へ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。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。

協力研究者

手嶋 哲子 北海道文教大学人間科学部
健康栄養学科

岡崎 光洋 北海道薬科大学社会薬学系
医薬情報解析学分野

A. 研究目的

現在、小麦加水分解物を添加した洗顔石鹸が原因で発症する小麦アレルギーの症例が数多く報告されており、大きな社会問題となっている。加水分解物は小麦以外にもコラーゲンなど多くの食品を原料として製造されている。また加水分解物のほかにも、動植物から様々な成分が抽出され医薬部外品、化粧品に利用されている。これまで、小麦以外の加水分解物や動植物由来成分が原因で発症するアレルギーに関する疫学的な研究報告はほとんどないため、それらの成分が原因で起きるアレルギーの実態を把握することは、予防医学的な観点からも極めて重要である。

そこで、本研究では、国内で販売されている医薬部外品、化粧品に添加物として使用されている小麦、コラーゲン由来の加水分解物、動植物など

から抽出した成分などに起因するアレルギーの国内における発症状況をアンケート調査によって把握することを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、平成24年度から26年度までの3カ年にわたり、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する。平成24年度は、国内で医薬部外品、化粧品素材として利用されている小麦加水分解物すべてについて、アレルギー発症の実態をアンケート調査によって把握し、調製方法によるアレルギー性の有無や差異を検証する。平成25年度は、コラーゲンなど小麦以外の加水分解物を含有する医薬部外品、化粧品によるアレルギー発症の実態を、平成26年度(最終年度)は、コチニール、パパインなど動植物由来の食品成分を含有する医薬部外品、化粧品によるアレルギー発症の実態について平成24年度と同様の方法によって把握する。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。調査期間は平成 25 年 1 月 26 日から 2 月 15 日までとした。アンケート用紙の配布はメール便で行い、FAX（フリーダイヤル）で回収した。

C. 研究結果

以下にアンケート調査の集計結果を示す。

1. アンケート配布数と回収率

アンケートは 2,336 施設、4,079 名の医師に配布し、290 施設、360 名から回答を得た。回収率は施設で 12.4%、医師で 8.8%であった。

2. 回答者の性別

回答者 360 名中、男性は 304 名で 84.4%を占めていた（図 1）。

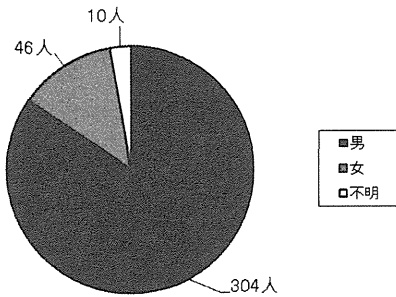


図 1. 回答者の性別

3. 回答者の年齢

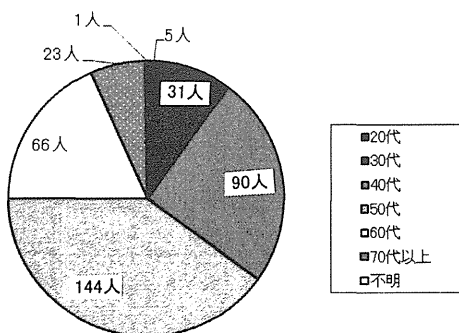


図 2. 回答者の年齢

回答者の年齢は、50 歳代が最も多く 40.0%を占

めていた。次いで 40 歳代 (25.0%)、60 歳代 (18.3%)、30 歳代 (8.6%)、70 歳代 (6.4%)、20 歳代 (1.3%) の順であった（図 2）。

4. 専門分野

回答した医師の専門分野を図 3 に示した。内科が 155 名 (43.0%) で最も多かった。

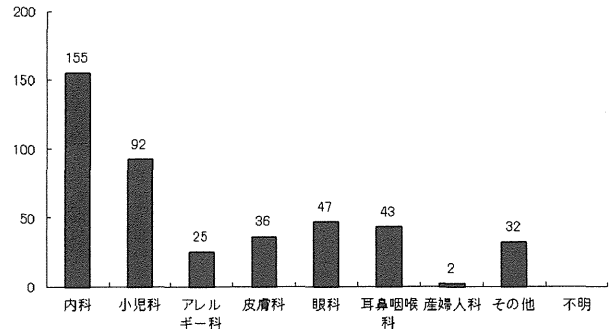


図 3. 専門分野

5. 施設区分

回答した医師が働く医療機関の施設区分を図 4 に示した。診療所、すなわち開業医が約 7 割を占めていると思われる。

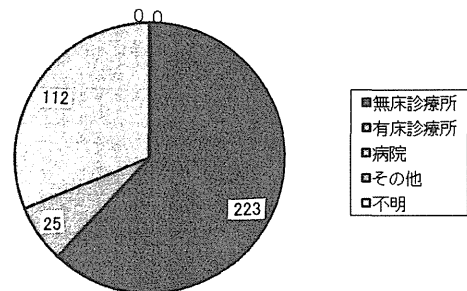


図 4. 施設区分

6. 病床数

回答した医師が勤務している医療機関の病床数は無床が 223 名 (61.9%) と最も多かったが、有床では、200 床以上が 23.1%を占めていた（図 5）。

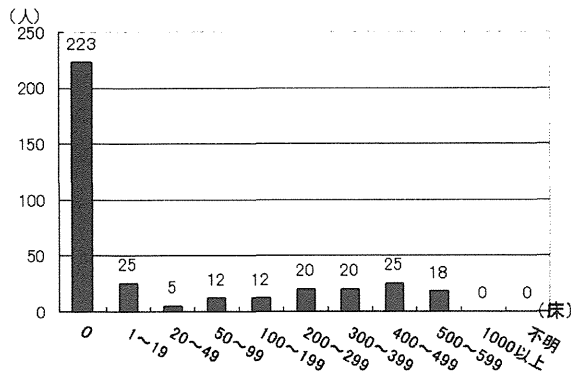


図5. 病床数

7. 受診者数

回答した医師が勤務する医療機関における1か月の受診者数は、診療所、病院ともに1,000~1499名が最も多く、次に多い500~999名を合わせると全体の約5割を占めていた(図6)。

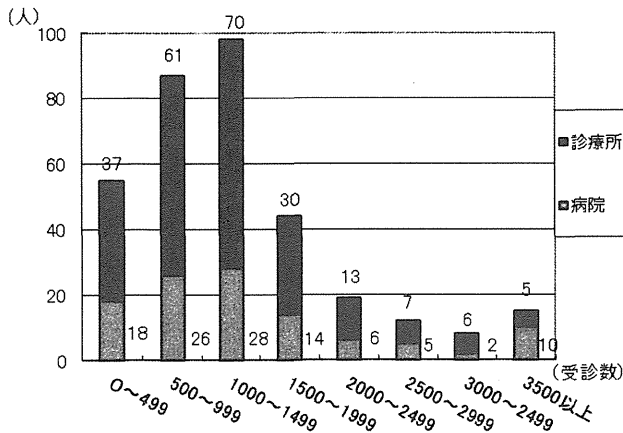


図6. 受診者数

8. 食品由来成分使用の認知度

「茶のしずく」洗顔石鹸のように、小麦加水分解物などの食品由来の成分が化粧品や医薬部外品に添加物として使用されていることを「知っている」と回答した医師は302名(84%)であり、大部分の医師は認知していた一方で、化粧品や医薬部外品に食品由来の成分が添加されているこ

とを知らない医師もいることが明らかとなった(図7)。

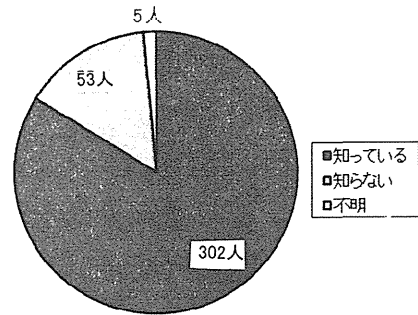


図7. 食品由来成分使用の認知度

9. 「茶のしずく」アレルギー患者診察の有無

「茶のしずく」洗顔石鹸使用により、小麦アレルギーを発症した患者を診察した経験があると答えた医師は37名(10.3%)であった。すなわち、およそ10人に1人の割合で、「茶のしずく」洗顔石鹸による小麦アレルギー患者を診察していることが明らかとなった。なお、患者総数は137名であった。開業医で50名の「茶のしずく」アレルギー患者を診察している例もあった。

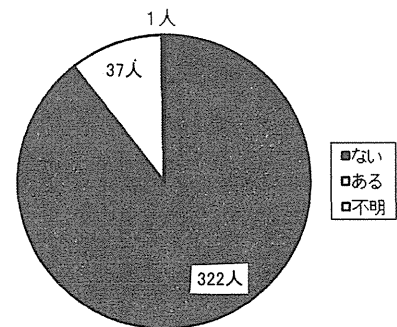


図8. 「茶のしずく」アレルギー患者診察の有無

10. 「茶のしずく」アレルギー患者登録の有無

日本アレルギー学会特別委員会では、「茶のしずく」洗顔石鹸の使用により小麦アレルギーを発症した患者を診察した医師に、専用の登録サイト

への患者登録を依頼しているが、本調査の結果では、「茶のしずく」アレルギー患者診察経験のある医師 37 名中、「登録していない」と回答した医師は 28 名で 76% を占めていることが明らかとなった。（図 9）

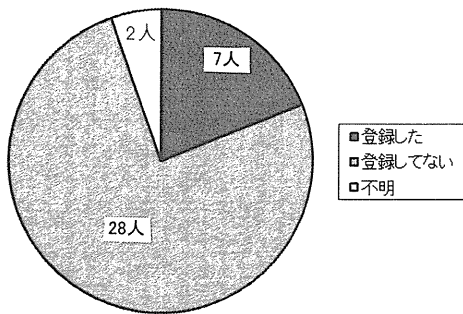


図 9. 患者の登録について

患者登録をしなかった理由については、28 人中、16 名が登録することを「知らなかった」と答えていた。次いで「忙しかった」と回答した医師が 3 名いたほか、「患者が希望しなかった」「患者の同意を得られなかった」「初期の症例であったため、カルテ番号の確認ができなかった」「他院へ紹介したため」などが理由として挙げられていた（図 10）。

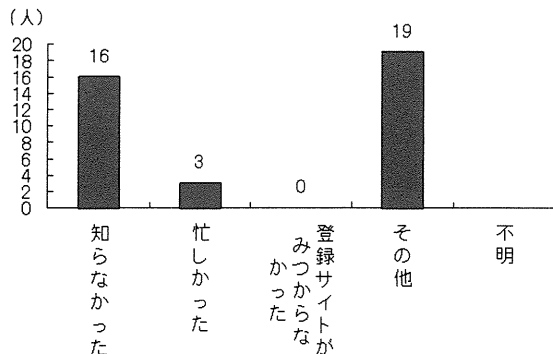


図 10. 患者登録をしなかった理由について

11. 「茶のしずく」以外の小麦加水分解物によるアレルギー発症について

「茶のしずく」洗顔石鹸以外の、小麦加水分解物添加化粧品、あるいは医薬部外品を使用して小麦アレルギーを発症した症例は認められなかった（図 11）。

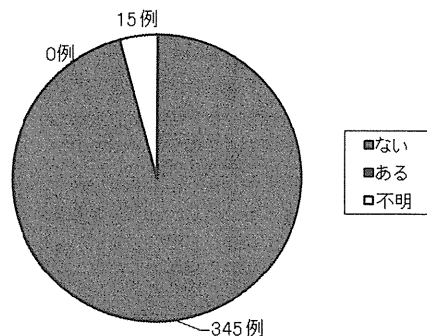


図 11. 「茶のしずく」以外の小麦分解物症例

12. 「茶のしずく」の使用期間について

「茶のしずく」の使用期間については、大部分の医師が回答していなかったため不明である（図 12）。

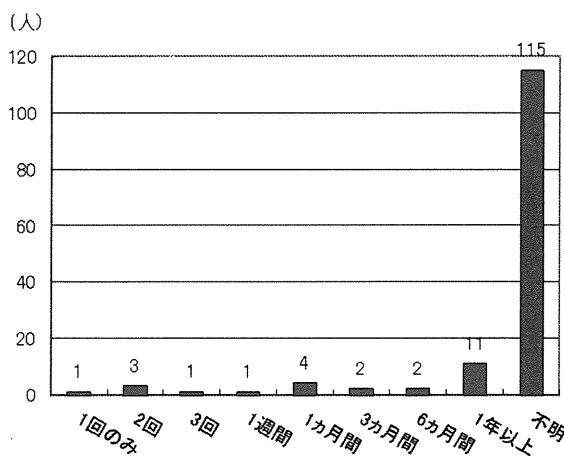


図 12. 「茶のしずく」使用期間

13. 患者の性別

患者の性別については、83 名が女性、3 名が男性、不明が 54 名であった（図 13）。

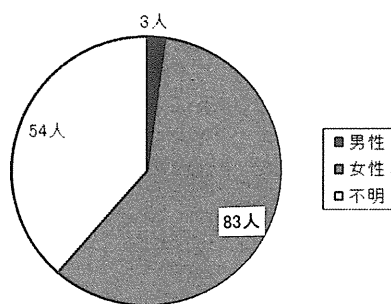


図 13. 患者の性別

14. 患者の年齢

患者の年齢に関して、女性では、30歳代が最も多く（21名）、次いで40歳代（16名）、50歳代（16名）、60歳代（9名）、10歳代（6名）の順であった（図 15）。ちなみに男性は、0～9歳が2名、20歳代が1名であった（表 1）。

表 1. 患者の年齢

(人)

年齢 性別	0～9	10～19	20～29	30～39	40～49	50～59	60～69	不明
男性	2	0	1	0	0	0	0	0
女性	0	6	12	21	16	16	9	57
総数	2	6	13	21	16	16	9	57

15. 発症部位について

発症部位については、顔（67名）、眼（55名）、鼻（44名）が多く、全体の 68.6%を占めていた（図 14）。

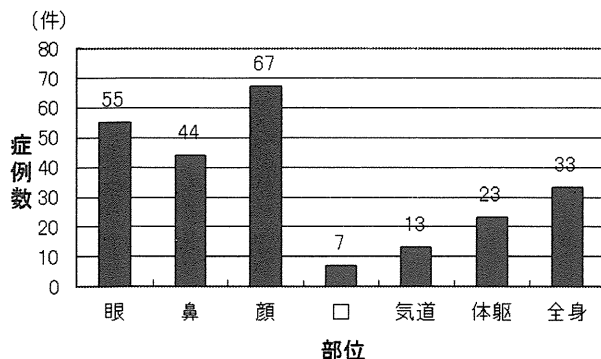


図 14. 発症部位

16. アレルギー疾患の有無について

「茶のしずく」洗顔石鹸を使用して小麦アレルギーを発症する以前のアレルギー疾患の既往歴について質問した結果、「ある」と回答した医師は 13 名（図 15）で、アレルギー疾患の内訳は、アトピー性皮膚炎（4 名）、食物アレルギー（3 名）、花粉症（3 名）、喘息（2 名）であった（図 16）。

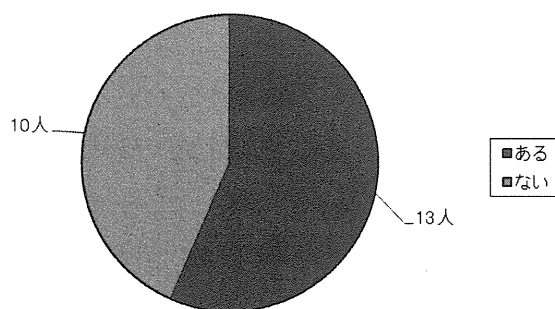


図 15. その他のアレルギーの有無

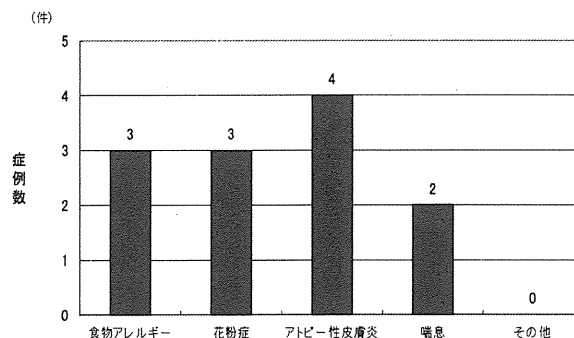


図 16. アレルギー疾患名

17. その他

化粧品や医薬部外品に添加されている食品由来成分について意見を聞いたところ、「あまりに多くの成分が添加されているので、何がかぶれやアレルギーの原因であるのか特定するのが難しいケースがみられる」、「我々医師にも啓発活動