

## e-Methods

### Preparation of Peach Crude Extract

Peaches (*Prunus persica*, cultivar Asama-Hakutou strain) at the commercial ripening stage were obtained from a local store. Whole peach fruits (peel and pulp) were homogenized with an extraction solution (2-mmol/L disodium ethylenediamine tetracetate, 10-mmol/L sodium N, N-diethylthiocarbamate, 3-mmol/L sodium azide, and 2% suspended solid polyvinyl pyrrolidone at a 1:1 [wt:vol] ratio).<sup>1</sup> After filtration through gauze, the homogenate was centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C. To the supernatant, cation exchange resin (Toyopearl CM 650M; TOSO, Tokyo, Japan) was added and mixed overnight at 4°C. The resin was collected by centrifugation, packed, and washed with 20-mmol/L phosphate buffer at pH 5.0 in a column. The proteins adsorbed to the resin were eluted with 0.5-mol/L sodium chloride in the same buffer as the crude extract. The protein concentration was quantified with a DC Protein Assay kit (BioRad, Bradford, United Kingdom). Crude extract was sterilized by filtration through a 0.22- $\mu$ m pore diameter membrane (Millipore, Bedford, Massachusetts) and frozen at -80°C.

### SDS-PAGE and IgE Immunoblot Analysis

Extracted proteins from peach or purified peach proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (15% [wt:vol], 10  $\mu$ g per slot) under nonreducing or reducing conditions using the electrophoresis system MiniProtean-3 (BioRad, Hercules, California) according to the method of Laemmli.<sup>2</sup> For SDS-PAGE under reducing conditions, the samples were mixed with 0.1M Tris, pH 6.8, containing 4% (wt/vol) SDS, 20% (wt/vol) glycerol, 10% (wt/vol) 2-mercaptoethanol, and 0.02% (wt/vol) bromophenol blue. The samples were denatured by heating at 100°C for 5 minutes. To ensure proper protein separation and visualization, proteins on the gel were stained with Coomassie Brilliant Blue R-350 (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut).

The proteins separated on the SDS-PAGE gel under nonreducing conditions were transferred onto an Immobilon-P polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) by semidry blotting methods. The membrane was incubated in 10mM phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.5) that contained 0.1% Tween 20 and 5% skim milk for blocking. For the immunoblotting using patient sera, 1:20 diluted sera in the same blocking buffer was used as the primary antibody, and horseradish peroxidase–labeled goat anti-human IgE (KPL, Washington, DC) was used as a second antibody. Final signal detection was performed using the ECL Western blotting detection kit (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions, and recorded onto X-ray film (Hyperfilm MP; GE Healthcare).

### Purification of Peach Peamaclein and LTP

To obtain monoclonal antibodies (mAbs) specific to peach Peamaclein or LTP, we established hybridomas essentially as described previously.<sup>3</sup> Eight-week-old, female, BALB/c mice (Nippon SLC Co, Shizuoka, Japan) were immunized by intraperitoneal injection of 50  $\mu$ g of proteins in crude extract emulsified in Freund complete adjuvant, 20  $\mu$ g in Freund incomplete adjuvant, and 10  $\mu$ g in PBS at 2-week intervals. Hybridomas that produced IgG reactive to crude extract were cloned twice with the limiting dilution method and inoculated into pristine-primed mice. Then mAbs were prepared from the ascitic fluids and purified on Protein G-Sepharose columns (GE Healthcare). The mAbs specific to peach Peamaclein and LTP were selected among them by an immunoblotting analysis with crude extract under nonreducing conditions. The animal experiments were performed under the guidelines of the Animal Experiment Committee of Kyoto Women's University following a bulletin

(No. 71, 2006) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology in Japan.

Peamaclein or LTP was purified from crude extract using a HiTrap NHS-activated HP Column coupled with each mAb, according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). The purified protein bands related to 9 kDa and 14 kDa on SDS-PAGE under nonreducing conditions were confirmed to be Peamaclein and LTP by N-terminal amino acid sequence analysis.

### N-Terminal Amino Acid Sequence Analysis

Protein bands in SDS-PAGE under no-reducing conditions were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane as described above. After staining with Coomassie Brilliant Blue, the protein bands corresponding to 9 and 14 kDa were excised and analyzed on a 476A gas-phase protein sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California), following the manufacturer's recommendations. The obtained sequences were analyzed by the Phytozome and BLAST programs to identify the proteins in the databases.

### Determination of Specific IgE by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and ImmunoCAP

Specific IgE antibody to crude extract, purified Peamaclein, or LTP was detected using enzyme-linked immunosorbent assay as described with some modifications.<sup>3</sup> The wells of a microtiter plate (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were coated with crude extract (10  $\mu$ g/mL), purified Peamaclein (2  $\mu$ g/mL in PBS), or LTP (2  $\mu$ g/mL in PBS) at 50  $\mu$ L per well.

After blocking, the individual sera (1:10 dilution with the solution containing 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Tween 20, 0.15M sodium chloride, and 10mM Tris-HCl (pH 7.4) were added at 50  $\mu$ L per well and incubated for 1 hour at 37°C. Then IgE antibodies bound to the antigen were detected using alkaline phosphatase–labeled, anti-human IgE (American Qualex, San Clemente, California), and p-nitrophenylphosphate (1 mg/mL) as the substrate. Absorbance at 405 nm was read with a microplate reader (BioRad). Control sera from 3 nonatopic individuals without food allergies were used as negative controls. Specific IgE levels greater than 0.12, 0.08, and 0.07 absorbance units (a mean  $\pm$  10 SDs absorbance of the negative control value) were considered positive for crude extract, Peamaclein, and LTP, respectively. All tests were performed in triplicate.

Serum total IgE and specific IgE levels (ImmunoCAP; Phadia, Uppsala, Sweden) for foods, including peach, pollens of alder, and recombinant allergens, such as rPru p 1, rPru p 3, and rPru p 4, were measured. The cutoff value of the assay was 0.7 kU/L as class 2.

### Statistical Analysis

Correlations between the clinical characteristics of peach allergy and sensitization to the allergens were analyzed using the Fisher exact test.  $P < .05$  was considered significant.

## eResults

### Identification of Peamaclein and LTP

Extracted proteins from peach were subjected to SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions. A single intense band at 9 kDa under reducing conditions, which was suspected to be LTP, was clearly divided into 2 bands at the molecular weights of 9 and 14 kDa under nonreducing conditions (eFig 1).

To identify these 2 protein bands they were subjected to N-terminal amino acid sequence analysis. The sequence of the 9-kDa protein band on the SDS-PAGE of crude extract under nonreducing conditions was GSXFXDSKXGVRHSKAGYTE, which corresponded to Peamaclein (accession No. P86888), registered to the World Health Organization and International Union of Immunological Societies

Allergen Nomenclature Subcommittee in October 2012. The sequence of the 14-kDa protein band was ITXGQVSSXLAPPYVVPVPG, which was found to be clearly identical to peach LTP (accession No. P81402) by a homology search performed in UniprotKB. The same sequence was obtained for Peamaclein or LTP purified on a respective immunoaffinity column (eFig. 1).

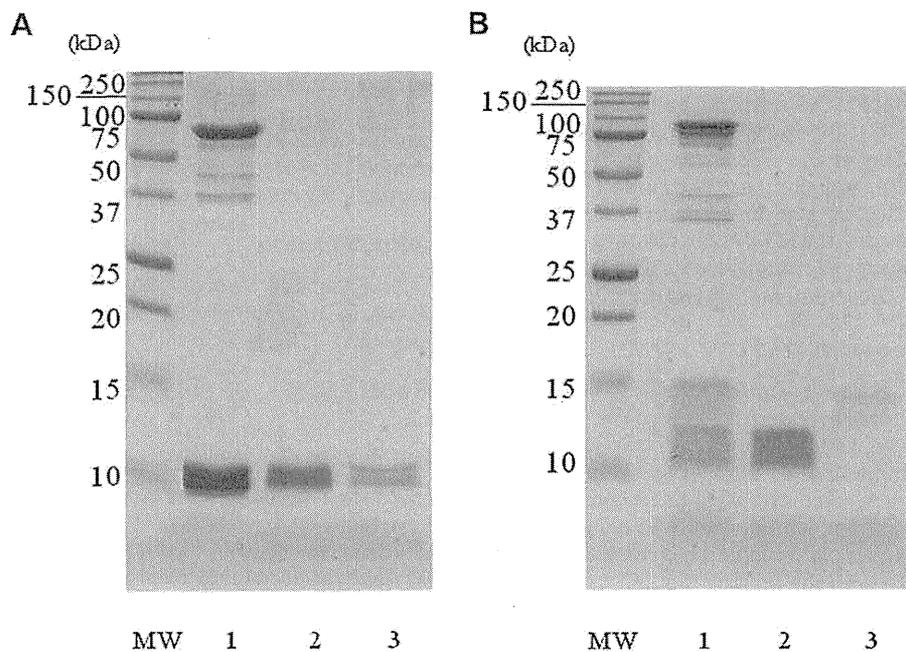
### IgE Immunoblotting

As shown in eFigure 2, in the IgE immunoblotting, the serum IgE from 21 (72.4%), 5 (17.2%), and 0 (0%) of the 29 patients who provided sufficient serum samples for experiments (except patient 3) bound to proteins in crude extract, purified Peamaclein, and LTP, respectively, whereas that from the nonatopic controls did

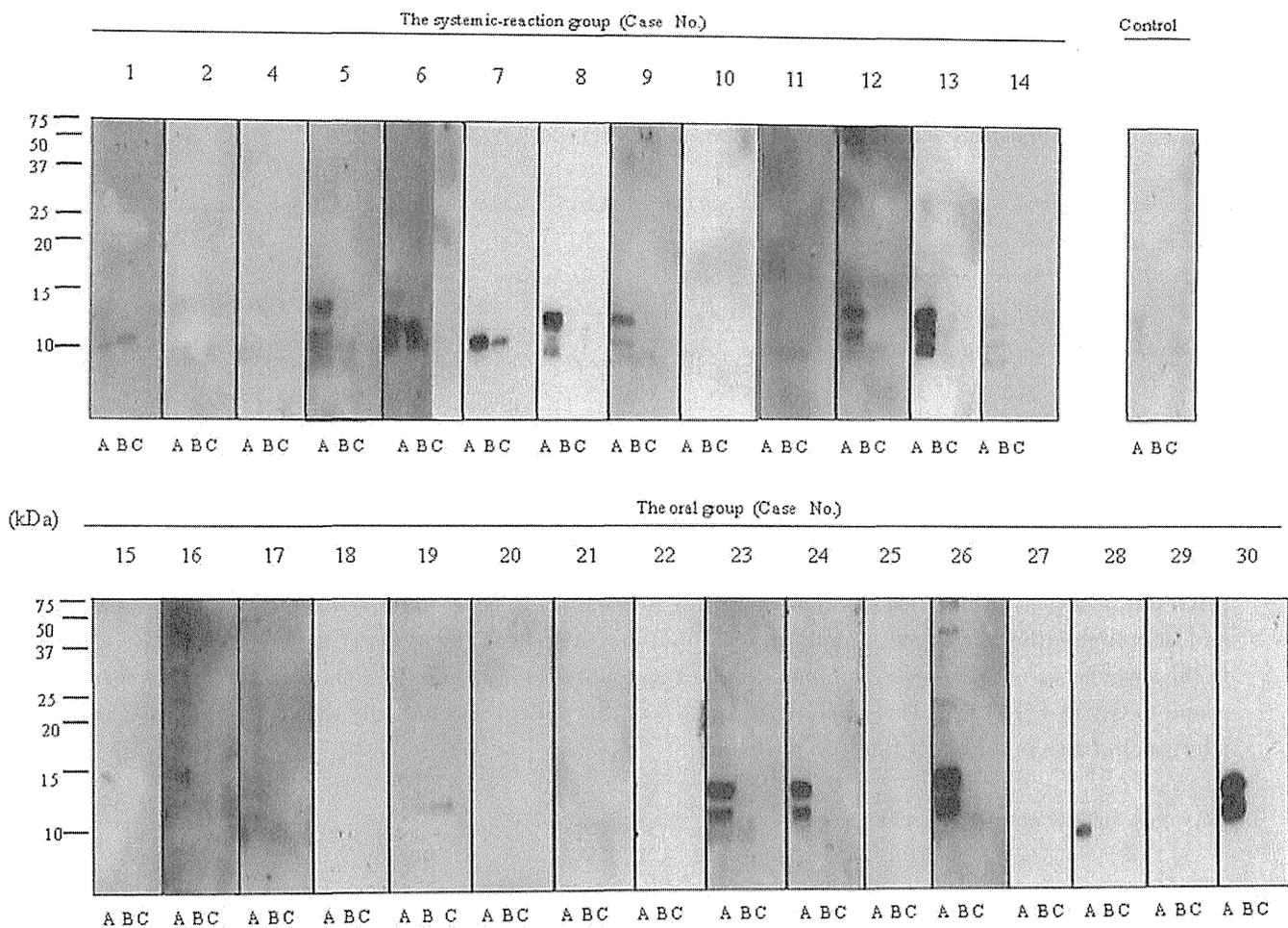
not. The IgE-binding band to Peamaclein was more frequently detected in the systemic group (6 of 13 patients [46.2%]; patients 1, 5, 6, 7, 9, and 12) than in the oral group (1 of 16 patients [6.3%]; patient 17).

### eReferences

- [1] Björkstén F, Halmepuro L, Hannuksela M, Lahti A. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*. 1980;35:671–677.
- [2] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–685.
- [3] Hirose J, Kitabatake N, Kimura A, Narita H. Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68:2490–2497.



**eFigure 1.** Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions (A) and nonreducing conditions (B). Separation of crude extract (lane 1), purified Peamaclein (lane 2), and lipid transfer protein (lane 3) from peaches. MW indicates molecular weight marker (in kilodaltons).



eFigure 2. eFigure 2IgE immunoblotting with crude extract, purified Peamaclein, and lipid transfer protein. Top, Systemic group and control results. Bottom, Oral group results.

## Analysis of Novel Soybean Sprout Allergens That Cause Food-Induced Anaphylaxis

Ryoko NAKAGAWARA<sup>1,2\*</sup>, Yasuharu ITAGAKI<sup>1,3,5</sup>, Masumi KOHNO<sup>2</sup>, Setsuko MATSUKURA<sup>2</sup>, Maki MIYAZAWA<sup>4</sup>, Kenichi KUMASAKA<sup>4</sup>, Takashi KOJIMA<sup>4</sup>, Zenro IKEZAWA<sup>1</sup> and Michiko AIHARA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Immuno-Dermatology, Yokohama City University, Graduate School of Medicine, Kanagawa, Japan

<sup>2</sup>Yokohama City University Medical Center, Kanagawa, Japan

<sup>3</sup>Department of Health and Nutrition, Hokkaido Bunkyo University, Hokkaido, Japan

<sup>4</sup>Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Kanagawa, Japan

<sup>5</sup>Kanagawa Academy of Science and Technology, Kanagawa, Japan

Received January 27, 2013; Accepted March 4, 2013

Several soybean- and soy product-based allergens have been reported. However, a full analysis of soybean sprout allergens remains to be conducted. Soybean sprout allergy is related to soy intolerance. Here we report a case of anaphylaxis induced by soybean sprouts in a 49-year-old woman. We performed a skin prick test, allergen-specific IgE identification using microarray assay (ImmunoCAP<sup>®</sup>-ISAC), SDS-PAGE, and immunoblotting for allergen analysis. The ImmunoCAP<sup>®</sup>-ISAC microarray assay detected Gly m 4 in the soybean sprout. However, immunoblotting revealed two 100-kDa protein bands that did not correspond to Gly m 4 (17 kDa). Therefore, we propose that this patient was not only sensitized to the Gly m 4 allergen, but also to the novel 100-kDa protein.

Keywords: food allergy, soybean sprout, allergen analysis, anaphylaxis

### Introduction

Soybean sprouts are the budded form of soybeans. Soybeans are thought to have arrived to Japan from China during the Heian period. It is believed that in the early stages of its propagation, the dried form of soybean sprouts was used for medical purposes. Because of its excellent nutritive value, it has been used as a vegetable for approximately the past 100 years. Soybean consumption has recently increased, and it has become a common vegetable.

Over time, many cases of food allergy have been reported, including those resulting from soybean consumption, which were reported after identification of the allergen protein. However, there are few reports on allergy resulting from soybean sprout consumption. Although soybean sprout allergy may be related to soy intolerance, there is insufficient data to confirm this.

Here, we examined a case of soybean sprout allergy and attempted to identify the allergen protein by skin prick test, allergen-specific IgE identification, and microimmunoassay.

### Materials and Methods

For this research, we were advised of any ethical issues by the university hospital and obtained written informed consent from the patient prior to initiation of the study

**Patient** A 49-year-old woman with a history of seasonal rhinoconjunctivitis experienced two episodes of severe systemic anaphylaxis, characterized by nasal and orbital pruritus, facial angioedema and dyspnea, approximately 2 min after ingesting green (immature) soybeans and soybean sprouts. Before these episodes, she had reported intraoral and periorbital pruritus immediately after consuming abura-age (fried thin tofu) and yuba (the protein film layer on the surface of heated soy milk). However, she reported no adverse reactions to bean curd or boiled mature soybeans.

**Serum samples** Serum samples were obtained from the patient and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Mixed sera samples from more than 100 healthy individuals were used as controls.

**Allergen preparations** Mature soybean cv. Hayahikari (defatted with acetone) and soybean sprouts (stems, roots, and stems plus roots) were ground, and the resulting powders (1 g each) were extracted with 0.05 mol/L Tris-HCl containing 3 mol/L NaSCN (pH 7.5) and shaken for 5 min at room temperature. The samples were centrifuged at 15,000 g for

\*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: naname1045@yahoo.co.jp

40 min, and the supernatants were stored at 4°C.

**Skin testing** All skin prick tests were performed using whole soybean, soybean sprout, and soybean products. Saline solution and histamine hydrochloride (10 mg/mL) were used as negative and positive controls, respectively. All skin tests were read at 15 min, compared with positive histamine controls, and scored (1+ = 25% of the swollen area in the histamine control; 2+ = 50%; 3+ = 100%; and 4+ = 200%).

**Allergen-specific IgE identification** Allergen-specific IgE levels against pollen, Gly m 4 (PR-10), Gly m 5 ( $\beta$ -conglycinin), Gly m 6 (glycinin), soybean, pea, and peanut were measured by the fluoroenzymatic method (CAP System, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions.

**Microarray assay** The PR-10 family antigens (Gly m 4, Aln g 1, and Bet v 1) were evaluated using a microarray assay (ImmunoCAP<sup>®</sup>-ISAC; Pharmacia Diagnostics AB) according to the manufacturer's instructions. Aln g 1 is a major allergen in the pollen of *Alnus glutinosa* (European alder), while Bet v 1 is a major allergen in the pollen of *Betula pendula* (European white birch).

**SDS-PAGE analysis** Extracts of soybean sprout stem, soybean sprout stem and root, soybean sprout root, and mature soybean (defatted) were separated by SDS-PAGE using 10% – 15% acrylamide separating gels and 4% stacking gels. All extracts were dissolved 1:1 in nonreducing sample buffer and sample buffer containing 5% 2-mercaptoethanol at 20°C without heating (the extracts were heated for 5 min at 100°C in a further experiment, as described in the Discussion section). Each allergen extract sample (15  $\mu$ L) was electrophoresed at 150 V for approximately 85 min, after which the gels were stained with Coomassie brilliant blue.

**Immunoblot analysis** Separated proteins from the allergen extracts were electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were then incubated with 5 mL of 1:10 diluted serum in incubation buffer, shaken for 1 h at 37°C, washed, and incubated with monoclonal anti-human IgE antibody (1:20,000; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for 3 h. Next, the membranes were washed and incubated with alkaline phosphatase-labeled anti-goat IgG antibody (1:20,000; Bio-Rad Laboratories) for 3 h. The membranes were washed again, treated with enhanced chemiluminescence substrate (ECL plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK), and incubated for 10 min. We used ECL<sup>™</sup> Mini-Camera to capture images (GE Healthcare UK Ltd.) and exposed the membranes for 5 min.

## Results

**Skin testing** The patient tested positive in the skin prick

test for soy milk, tofu, green soybean, and root of soybean sprout, but negative to abura-age, stem of soybean sprout, bean of soybean sprout, canned boiled soybean, soy oil, kinako (soy flour), okara (soy fiber), and fermented soy products (soy sauce, miso, and natto) (Table 1.). Notably, she tested negative for hard-type yuba in the first test and positive for soft-type yuba in the second test. It was thought that this result originated because of the denatured condition of the protein caused by heating of soy milk.

**Allergen-specific IgE identification** Specific IgE antibodies against cedar pollen, alder pollen, birch pollen, and Gly m 4 (PR-10) were detected using the CAP system, while specific IgE antibodies against Gly m 5 ( $\beta$ -conglycinin), Gly m 6 (glycinin), and soybean were not (Table 2.). The micro-

**Table 1.** Skin prick test results.

The skin prick test was administered on the forearm of the patient, and results were visualized 15 min later.

	1st	2nd (after 19 months)
Soybean milk	2+	
Tofu	2+	
Abura-age	Negative	
Green soybean	2+	2+
Yuba	Negative	2+
Soybean sprout (root)		2+
Soybean sprout (stem)		Negative
Soybean sprout (bean)		Negative
Canned boiled soybean		Negative
Soybean oil		Negative
Kinako, soybean flour		Negative
Okara, soybean filder		Negative
Soy sauce, fermented souybeans sauce	Negative	
Miso, fermented souybean paste		Negative
Natto, fermented soybean	Negative	Negative

**Table 2.** Allergen-specific IgE analysis results using the CAP system.

The patient was subjected to blood sample collection and medical examination on the initial day and 19 months later.

	(UA/mL)(class) 1st	(UA/mL)(class) 2nd (after 19 months)
Total IgE	17.0	28.0
Cedar pollen	3.00 (2)	9.22 (3)
Alder pollen	3.82 (3)	5.00 (3)
Birch pollen	7.05 (3)	7.15 (3)
Mugwort pollen	$\leq 0.34$ (0)	
Ragweed pollen	$\leq 0.34$ (0)	
Orchaerd grass pollen	$\leq 0.34$ (0)	
Gly m 4 (PR-10)	2.43 (2)	
Gly m 5 ( $\beta$ -Conglycinin)	$\leq 0.34$ (0)	
Gly m 6 (Glycinin)	$\leq 0.34$ (0)	
Soybean	$\leq 0.34$ (0)	$\leq 0.34$ (0)
Pea	$\leq 0.34$ (0)	
Peanut	$\leq 0.34$ (0)	
Almond	$\leq 0.34$ (0)	
Latex		$\leq 0.34$ (0)

array assay (ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup>) revealed that the patient exhibited a positive reaction to the PR-10 family antigens (Gly m 4, Aln g 1, and Bet v 1). The patient's total IgE level was considered as the reference value. Specific IgE antibodies against cedar pollen, alder pollen, and birch pollen levels were higher in the second test than in the first test.

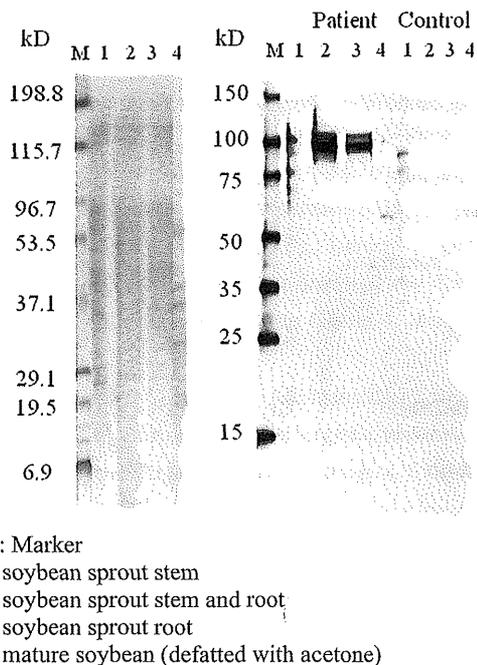
**SDS-PAGE and immunoblotting** SDS-PAGE analysis revealed bands with molecular weights of 20 – 150 kDa. The soybean sprout stem (lane 1) showed 11 bands, the stem and root (lane 2) showed 11 bands, the root (lane 3) showed 9 bands, and defatted soybean (lane 4) showed 6 bands. SDS-PAGE analysis showed multiple protein bands with molecular weights of 6 – 150 kDa for each part of the soybean sprout and mature soybean. Immunoblotting of the patient's serum indicated that the soybean sprout stem was negative, whereas the stem and root were positive for the 100-kDa protein. The root, alone, was positive for the 100-kDa protein. Therefore, the protein that existed in the root of the soybean sprout was considered to be the antigen protein (Fig. 1.).

## Discussion

As far as we know the protein (allergen) responsible for soybean sprout allergy has not been reported until now. Thus, the allergen that positively reacted in the immunoblotting method in this study is considered novel. In an earlier report, soybean sprout and soybean allergies were found to be associated. Thus, we thought it relevant to study soybean sprout and soybean allergies, because the patient in this case was positive for allergy to soybean related food.

Various types of allergic reactions have been reported in soybean-sensitized patients. Class 1 food allergy occurs by sensitization through the digestive tract and induces immediate reactions such as urticaria and anaphylaxis. Several class 1 allergens from soybeans have been identified, including  $\beta$ -conglycinin (Gly m 5), P34, an oil-body-associated protein (Gly m Bd30K), and a glycinin A3 subunit (Gly m 6; Adachi *et al.*, 2006). In addition, an immediate reaction to class 2 food allergens, which occurs through pollen-food cross-reactivity and is established after developing pollinosis, has also been observed in patients with soy allergy (Fukuda *et al.*, 2007). Recent reports have indicated that soybean and its products may also induce respiratory allergy via inhalation, as well as systemic reactions (Kosma *et al.*, 2011). Soy antigens that cause class 2 food allergies include the PR-10 family (Gly m 4), soy profilin (Gly m 3), and oleosin (Kleine-Tebbe *et al.*, 2002).

The allergenicity of soybean essentially resides in the protein fraction. Approximately 90% of soybean storage proteins are salt-soluble globulins, with the remainder being water-soluble albumins. Soy proteins can be separated into



**Fig. 1.** Results of SDS-PAGE and immunoblotting.

After electrophoresis, soybean sprout and soybean proteins were transferred to a blotting membrane and subjected to immunoblotting using patient and control sera.

four fractions, with approximate Svedberg coefficients of 2, 7, 11, and 15 S. The identification and characterization of specific proteins linked to soy allergy has been the focus of many studies (Table 3.). In 1995, Ogawa *et al.* first reported several major class 1 allergens from soybean, which included three 7 S proteins, namely Gly m Bd 30K (P34, an oil-body-associated protein; 34 kDa), Gly m Bd 68K ( $\beta$ -conglycinin  $\alpha$ -subunit; 68 kDa), and Gly m Bd 28K storage protein of the vicilin family; 28 kDa). Gly m Bd 30K showed considerable sequence similarity to the thiol proteinase of the papain family, including the allergenic thiol proteinase Der p 1 from house dust mites. However, the specific epitopes were different.

In Europe and the USA, since soybeans are seldom eaten, most reports deal with class 2 soy allergy. The soybean hull was identified as a source of aeroallergens that caused soy-induced epidemic asthma, and the hull components responsible for respiratory allergies were identified as Gly m 1 (Gly m 1.0101, 4.2 kDa; Gly m 1.0102, 3.9 kDa) and Gly m 2, both of which belong to a lipid-transfer family of allergens. A partial N-terminal sequence of Gly m 2 exhibited 71% homology with a storage protein from cowpea and 64% homology with a disease-response protein from green pea. Nevertheless, these low molecular weight soybean hull aeroallergens were not found to be responsible for the occupational asthma caused by soy flour in bakers. Gly m 3, which is a 14.1-kDa soy profilin, was found to be homologous to

**Table 3.** A list of allergy-associated soybean proteins (allergens) The detected allergens in this study were compared to previously reported soybean allergens.

IgE-binding proteins	Allergen nomenclature	Molecular weight (kDa)	Family	Food allergy class	Note
B-Conglycinin	Gly m 5	68 ( $\alpha$ subunit) 66 ( $\alpha'$ subunit) 50 ( $\beta$ subunit)	Major storage protein 7S globulin Saccharide binding protein	1	
Glycinin A3subunit	Gly m 6	43	Major storage protein 11S globulin	1	
P34	Gly m Bd30k	30 (SDS-PAGE:34)	Maturing seed vacuolar thiol protease	1	
Gly m Bd28kD	Gly m Bd28k	28	Vicilin family (storage protein)	1	
Oleosin	Not assigned	23 – 24	Oilbody binding protein	2	
Trypsin inhibitor	Gly m TI	18 – 20	Protease inhibitor	1	
SAM22	Gly m 4 (IUIS)*	16.8	Bet v 1 homolog PR-10 family	2	This case
Profilin	Gly m 3 (IUIS)	14.1	Profilin (actin adapting protein)	2	
Unknown	Gly m 2 (IUIS)	8	Storage protein	Hull allergen	
Unknown	Gly m 1 .0101 Gly m 1 .0102	4.2 3.9	Lipid transfer protein	Hull allergen	
2S albumin	Not assigned	9 (large subunit) 5 (small subunit)	Storage protein (proramine super family)	Unknown	
NEW?		100		?	This case

\*IUIS:International union of Immunological Societies official allergen nomenclature.

Bet v 2, a birch pollen allergen with a sequence identity of 73%, and 11 other plant profilins with a 69 to 88% identity. Gly m 4 is a 16.8-kDa PR-10 SAM22 (starvation-associated message 22) protein from soybean, which has a sequence identity of 50% with Bet v 1 (a major allergen in birch pollen). Severe anaphylactic reactions have been reported in birch pollinotics after ingestion of soy protein isolates. For example, Kleine-Tebbe *et al.* (2002) reported that 85% of such patients had specific IgE antibodies against SAM22. More recently, Mittag *et al.* (2004) revealed that 96% of patients who reacted to Bet v 1 were also positive for Gly m 4-specific IgE. These reports confirmed that Gly m 4 is the major soy allergen for patients allergic to birch pollen and that soybean is an additional birch pollen-related allergenic food. Further, Moriyama *et al.* (2005) reported that a 23 – 24-kDa soy protein was the allergen responsible for oral allergy syndrome and anaphylaxis to soy milk, and they identified the allergenic soy protein as oleosin, which exists in the lipid membrane of soybean cells.

We propose that our patient had a class 2 food allergy because she experienced seasonal rhinoconjunctivitis for a prolonged period and subsequently showed signs of food allergy. Her food allergy symptoms initially manifested as pollinosis, including nasal and orbital pruritus, and she also developed systemic reactions. Moreover, the patient was

positive for serum-specific IgE antibodies against cedar pollen, alder pollen, birch pollen, and Gly m 4. The specific IgE levels against cedar and alder pollen were higher in the second test than in the first test, probably because the first test was conducted in winter, while the second test was conducted in spring. We propose that the patient was first sensitized to pollen allergens of the PR-10 family and later developed an allergy to soy products because of their similar allergenic proteins. However, immunoblotting detected only 100-kDa protein bands that did not correspond to Gly m 4. Therefore, we believe that this patient was also sensitized to another allergenic protein that had a molecular weight of 100 kDa. Indeed, it is very rare to detect such a high-weight allergen, as 100-kDa allergens have only been reported in Hymenoptera venom Api m 5, black abalone (*Haliotis discus discus*), papaya (*Carica papaya*) pollen, and buckwheat seed. However, *C. papaya* is not available in Japan, and this patient was able to consume *H. discus discus* without any allergic symptoms. The patient had never been stung by a bee; therefore, it is unlikely that she was sensitized to these allergens before she reacted to soybean sprouts. Importantly, the protein detected herein has not been previously reported; therefore, we present the possibility of a new soybean sprout allergen. Nevertheless, it remains unclear whether sensitization to this protein was caused by cutaneous or oral exposure.

We believe that Gly m 4 was not detected by immunoblotting because of the low level of IgE specific to Gly m 4. We performed immunoblotting to test the patient's serum IgE levels against soybean sprout extract that had been heated for 5 min at 100°C and against raw soybean sprout parts (stems, beans, and roots). The patient's serum IgE antibodies reacted only with the raw soybean sprout root, suggesting that the allergenic protein denatured when exposed to heat and is contained only in the root. We attempted to purify and identify the 100-kDa protein by chromatography and electrophoresis; however, we have not yet succeeded. In our future work, we will attempt to purify and identify this newly discovered allergen.

**Acknowledgments** This study was partly supported by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (No. 2159471).

## References

- Adachi, A., Moriyama, T., Shimizu, H. and Horikawa, T. (2006). Variety of soybean allergens and their relationships with various clinical subtypes of soybean allergy. *J. Dermatoallergol.*, **14**, 64-72.
- Adachi, A., Horikawa, T., Shimizu, H., Sarayama, Y., Ogawa, T., Sjolander, S., Tanaka, A. and Moriyama, T. (2008). Soybean  $\beta$ -conglycinin as the main allergen in a patient with food dependent exercise-induced anaphylaxis by tofu: food processing alters pepsin resistance. *Clin. Exp. Allergy*, **39**, 167-173.
- Crowell, D., Miliyakal, E., Russell, D. and Amasino, R. (1992). Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 459-466.
- Fukuda, K., Ochiai, T., Aikawa, M., Togo, K., Tomita, Y. and Moriyama, T. (2007). Oral allergy syndrome to soybean concomitant with birch pollen allergy: Clinical investigation and analysis of cross-reactive antigen. *J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, **1**, 124-130.
- Harada S., Nakamura A., Matsumaga A., Iijima M., Yoshizaki Y., Saito K., Adachi A. and Moriyama T. (2007). Three cases of soy milk allergy. *J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, **1**, 31-38.
- Holzhauser, T., Wackermann, O., Ballmer-Weber, B., Bindslev-Jensen, C., Scibilia, J., Perono-Garoffo, L., Utsumi, S., Poulsen, L. and Vieths S. (2009). Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 ( $\beta$ -conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **123**, 452-458.
- Iijima, S., Moriyama, T. and Ogawa, T. (2005). A case of anaphylaxis due to soy milk; trial of detection of IgE-binding soybean proteins. *J. Environ. Dermatol.*, **12**, 184-191.
- Kleine-Tebbe, J., Wangorsch, A., Vogel, L., Crowell, D., Hausteiner, U. and Vieths S. (2002). Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **110**, 797-804.
- Kosma, P., Sjölander, S., Landgren, E., Borres, M. and Hedlin, G. (2011). Severe reactions after the intake of soy drink in birch pollen-allergic children sensitized to Gly m 4. *Acta. Paediatr.*, **100**, 305-306.
- L'Hocine, L.I. and Boye, J. (2007). Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **47**, 127-143.
- Mittag, D., Vieths, S., Vogel, L., Becker, W., Rihs, H., Helbling, A., Wuthrich, B. and Ballmer-Weber B. (2004). Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: Clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **113**, 148-154.
- Morita, H., Kaneko, H., Ohnishi, H., Kondo, M., Matsui, E., Fukao, T. and Kondo, N. (2008). Analysis of antigenic proteins that trigger allergies and immunologic tolerance. *Nihon Syouni Arerugi Gakkaishi*, **22**, 233-238.
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Nishikawa, K. and Kitamura, K. (1995).  $\alpha$ -Subunit of  $\beta$ -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 831-833.
- Ogawa, T., Samoto, M. and Takahashi, K. (2000). Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **46**, 271-279.
- Rihs, H.P., Chen, Z., Rueff, F., Peterson, A., Rozynek, P., Heimann, H. and Baur, X. (1999). IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 1293-1301.
- Rodrigo, M., Morell, F., Helm, R., Swanson, M., Greife, A., Anto, J., Sunyer, J. and Reed C. (1990). Identification and partial characterization of the soybean-dust allergens involved in the Barcelona asthma epidemic. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **85**, 778-84.
- Sugano M. (2006). Is soybean oil allergenic? *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **59**, 313-321.
- Yagami, A., Inaba, Y., Kuno, Y., Tanaka, A., Sjolander, S., Saito, H. and Matsunaga, K. (2009). Two cases of pollen-food allergy syndrome to soy milk diagnosed by skin prick test, specific serum immunoglobulin E and microarray analysis. *J. Dermatol.*, **36**, 50-55.

# (旧)茶のしずく石鹸によるアレルギー

松永 佳世子<sup>1)</sup> 矢上 晶子<sup>2)</sup> 中村 政志<sup>2)</sup> 佐野 晶代<sup>2)</sup> 小林 東<sup>2)</sup>

## はじめに

近年、加水分解コムギ末(グルパール 19S)を含む(旧)茶のしずく石鹸で洗顔することによって、グルパール 19S が経皮的・経粘膜的に吸収され、コムギアレルギーのなかった人にグルパール 19S に対する IgE 抗体を作らせ、これと交差反応するコムギ摂取時にアナフィラキシー反応を起こす重大な問題が生じた<sup>1-3)</sup>。

本稿では疫学調査結果、診断基準、確定診断に必要な検査の1つである ELISA 法と、予後や発症のメカニズムについて概説する。最後に、このアレルギーが発症した背景としての、化粧品の安

全性の問題を考察する。

## (旧)茶のしずく石鹸と そのアレルギーの特異性

(旧)茶のしずく石鹸はグリチルリチン酸ジカリウムを有効成分として、その他の成分に泡立ちをよくする加水分解コムギ末と表示された加水分解コムギ(グルパール 19S)を含む医薬部外品である薬用石鹸として、2004年3月から2010年9月まで6年7か月、466万7,000名に合計4,650万8,000個販売された人気の商品であった(図1)。加水分解コムギ末は、化粧品原料として従来汎用されていたが、これまでにグルパール 19S 以外の加水分



医薬部外品



泡立ちが非常によい

有効成分：グリチルリチン酸 2 K

その他の成分：石けん用素地、茶エキス-1、オウゴンエキス、カモミラエキス-1、アロエエキス-2、黒砂糖、ユキノシタエキス、ホホバ油、シア脂、ベントナイト、水解コムギ末、グリセリン、ファンゴ、ヒドロキシエタンジホスホン酸 4 Na、フェノキシエタノール、黄酸化 Fe、群青、香料、BG

2004/03

2010/09/26

2010/12/07

2011/6/19

グルパール 19 S (片山化学工業研究所)

プロモイス WG-SP (成和化成)

加水分解シルク液 ▶

現在は加水分解タンパク質は含んでいない

図1 茶のしずく石鹸

1) まつなが かよこ：藤田保健衛生大学医学部皮膚科学教授 連絡先：☎ 470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪 1-98  
2) やがみ あきこ、なかむら まさし、さの あきよ、こばやし つかね：藤田保健衛生大学医学部皮膚科学

表1 茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギ(グルパール19S)による即時型コムギアレルギーの診断基準

【確実例】

以下の1, 2, 3をすべて満たす。

1. 加水分解コムギ(グルパール19S)を含有する茶のしずく石鹼等を使用したことがある。
2. 以下のうち少なくとも一つの臨床症状があった。
  - 2-1) 加水分解コムギ(グルパール19S)を含有する茶のしずく石鹼等を使用して数分後から30分以内に、痒み、眼瞼浮腫、鼻汁、膨疹などが出現した。
  - 2-2) コムギ製品摂取後4時間以内に痒み、膨疹、眼瞼浮腫、鼻汁、呼吸困難、悪心、嘔吐、腹痛、下痢、血圧低下などの全身症状がでた。
3. 以下の検査で少なくとも一つ陽性を示す。
  - 3-1) グルパール19S 0.1% 溶液、あるいは、それより薄い溶液でプリックテストが陽性を示す。
  - 3-2) ドットプロット、ELISA、ウエスタンブロットなどの免疫学的方法により、血液中にグルパール19Sに対する特異的IgE抗体が存在することを証明できる。
  - 3-3) グルパール19Sを抗原とした好塩基球活性化試験が陽性である。

【否定できる基準】

4. グルパール19S 0.1% 溶液でプリックテスト陰性

【疑い例】

1, 2を満たすが3を満たさない場合は疑い例となる。

※ただし1, 2を満たすが3を満たさない場合でも、血液特異的IgE抗体価検査やプリックテストでコムギまたはグルテンに対する感作が証明され、かつω5グリアジンに対する過敏性がないか、コムギおよびグルテンに対する過敏症よりも低い場合は強く疑われる例としてよい。

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作成(2011.10.11)

解コムギ末でこのような大規模な有害事例の報告はない。この石鹼を使用した時に、顔面の接触蕁麻疹の症状がない人が3割程度存在し、全身性のコムギアレルギーが突然前触れなく生じることも、原因が石鹼であることをわかりにくくする一因であった。

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」の設置

日本アレルギー学会は、本件に関する患者向け、医療従事者向け、一般国民向けの正確な情報提供を行うとともに、診療可能施設についての適切な選定と情報提供、さらには今後同様の問題の発生を防止するための調査研究実施などを行う特別委員会「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」を2011年7月に設置した。筆者は委員長を拝命し活動してきた。

加水分解コムギ(グルパール19S)による即時型コムギアレルギーの診断基準

特別委員会では、2011年10月に「茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギ(グルパール

19S)による即時型コムギアレルギーの診断基準」を策定した(表1)。

その要点は、以下の3つをすべて満たすことである。

- 1) 茶のしずく石鹼使用歴
- 2) 臨床症状：接触蕁麻疹、コムギ製品摂取後の即時型アレルギー
- 3) プリックテスト、ELISA(グルパール19S)、好塩基球活性化試験が陽性などの検査所見

ただし、この基準では過去のアレルギーを否定することはできない。疑い例としては、使用歴と臨床症状を満たすが、検査をしていない場合である。ただし、その場合でも、血液特異的IgE抗体価検査やプリックテストでコムギまたはグルテンに対する感作が証明され、かつω5グリアジンに対する過敏性がないか、コムギおよびグルテンに対する過敏症よりも低い場合は強く疑われる例としてよい。

「茶のしずく石鹼等によるコムギアレルギー情報サイト」の疫学調査からわかったこと

この調査は、厚生労働科学研究費補助金(医薬

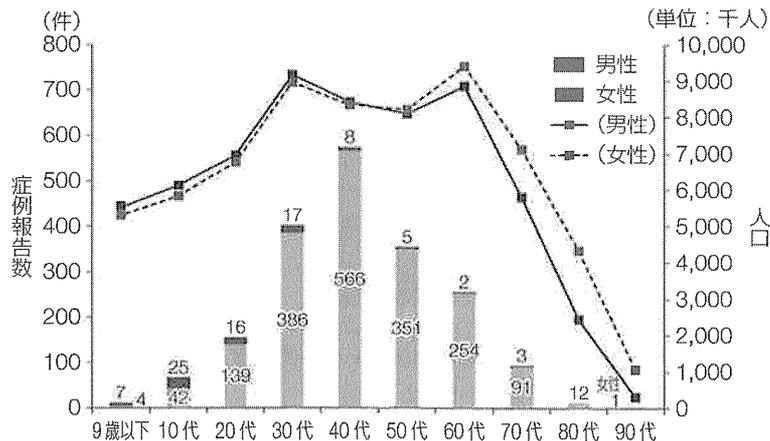


図2 年齢階級・性別の症例数と人口(2013.7.20集計)

※人口は、資料「年齢5歳階級別人口」(総務省統計局)の平成22年次データより引用

品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)により行っている疫学調査研究である。報告する調査の母集団は、全国の医師からオンラインで登録された症例と、ファクスで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(委員長 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 松永佳世子)宛てに登録された症例のうち、本特別委員会の診断基準(表1)を満たす確実例とした。

### 1. 確実症例はどのくらいいるのか?

全国47都道府県の247施設より、1,929名の確実例が登録された。女性1,846例(95.7%)、男性83例(4.3%)であった。年齢は1歳男児から93歳女性までで、40代にピークがあった(図2)。

### 2. 都道府県別に確実症例はどのくらいいるのか?

図3には都道府県別の当該石鹸の販売個数を背景に示した、都道府県別症例数を示す。第1位・福岡県249例、第2位・北海道116例、第3位・東京都113例、第4位・大阪府109例、第5位・広島県105例、第6位・愛知県98例であった。

### 3. 患者問診票からわかったこと

「茶のしずく石鹸等によるコムギアレルギー情報サイト」の2013年5月8日までの患者問診票744例の統計結果から抜粋する。

#### 1) 症例の石鹸使用開始年

2004年に10例であったが、徐々に増え、2009年に186例とピークになり、2010年92例、2011年4例となっている。石鹸の平均使用個数は18.6個であった。

#### 2) 石鹸使用部位とコムギ摂取後のアレルギー症状

70%は洗顔後に接触蕁麻疹症状を発症し、コムギ摂取後に全身性即時型アレルギー症状を発症していた。28%は洗顔後に皮膚の症状は特になく、コムギ摂取後に全身症状だけを発症していた。2%は洗顔後に症状があるが、コムギ摂取では症状を認めなかった。

#### 3) 洗顔後の症状

洗顔後の症状は眼瞼の腫脹、麻疹、痒みが多くみられたが、呼吸困難、ショック症状を来した症例はなかった。

#### 4) コムギ摂取後の症状

コムギ摂取後の症状は、アナフィラキシーショック26%、ショック症状はないが呼吸困難・嘔吐や下痢を生じた症例が29%あり、合計55%がアナフィラキシー症状を起こしていた。アナフィラキシー以外の蕁麻疹・眼の腫れ・鼻閉・鼻水・痒みなどは44%でみられた(図4)。

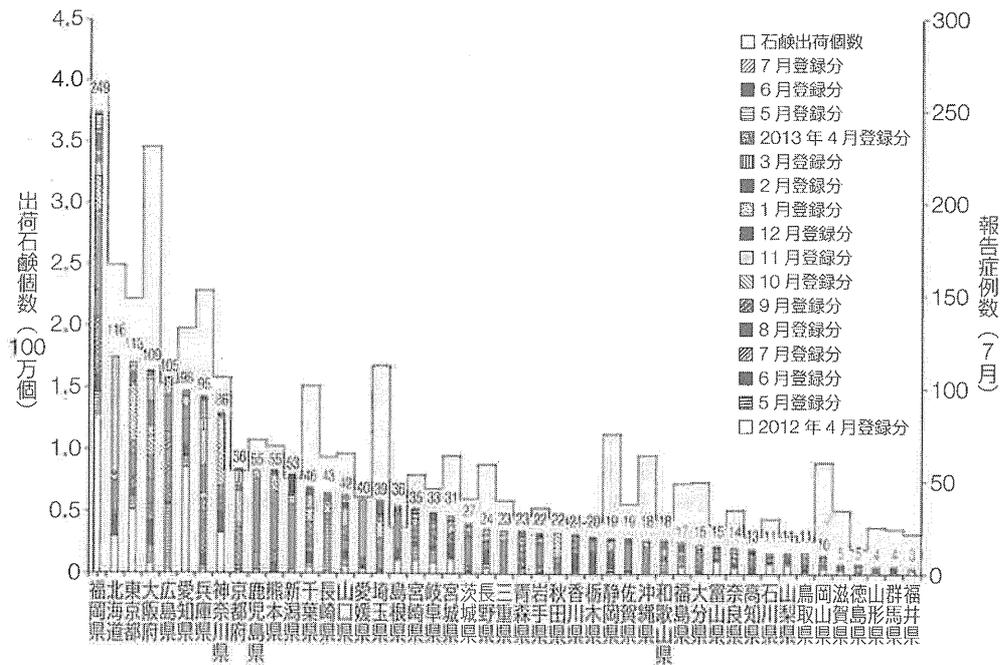


図3 都道府県別報告症例数(2013.7.20 集計)

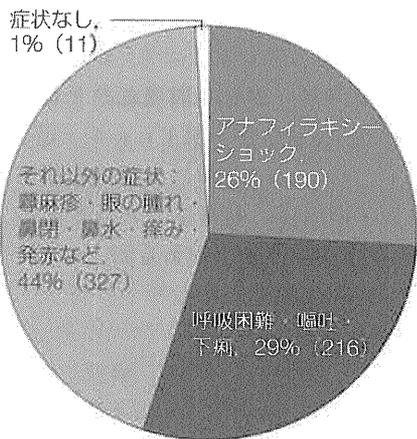


図4 コムギ摂取後の症状

疫学的方法により、血液中にグルパール 19S に対する特異的 IgE 抗体が存在することを証明できる。

特別委員会で施行しているグルパール 19S に対する特異 IgE 抗体の ELISA 法検査については、特別委員会委員の 5 施設でのバリデーションが終了している。

現在までに、藤田保健衛生大学症例 122 例でのブリックテストとの相関性は高く、定量的でハイスループット(同時に多数のサンプルを反応・処理できること)な診断方法が構築できたと判断している。

### （旧）茶のしずく石鹼コムギアレルギー発症機序の考察

（旧）茶のしずく石鹼は皮膚を清潔にすることが目的の製品であり、界面活性剤を含む。この中に泡立ちをよくし保湿効果を持つグルパール 19S という加水分解コムギ末が 0.3% 含有されていた。この石鹼で繰り返し入念に洗顔することで、抗原

### グルパール 19S に対する血中特異 IgE 抗体を検出する ELISA 法

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法は、試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられる方法である。免

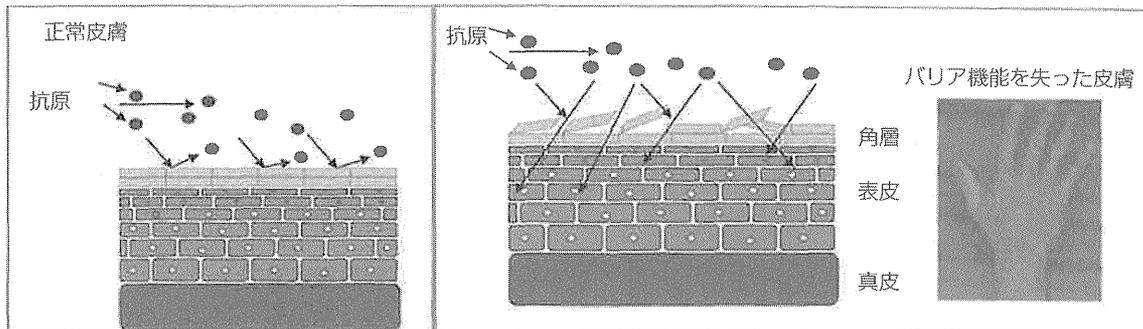


図5 食物アレルギーは経皮感作から起こる

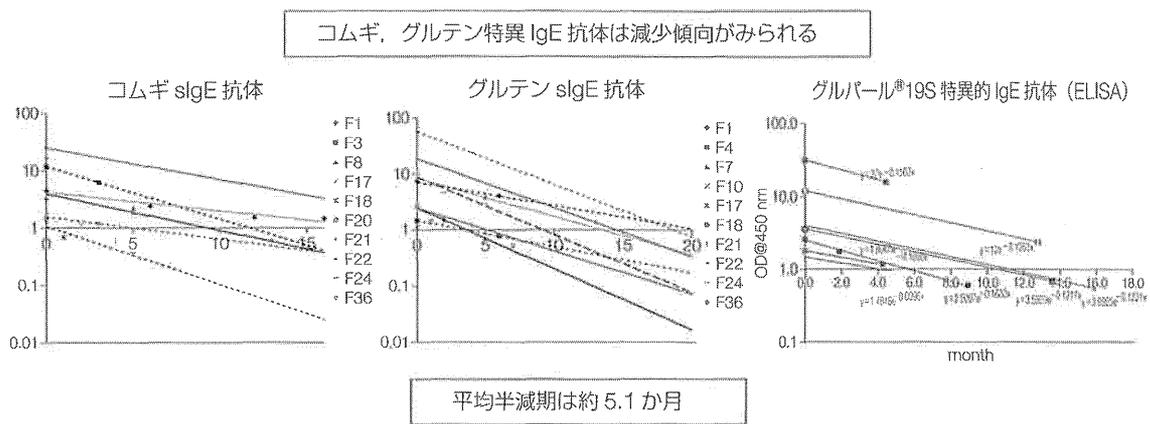


図6 特異 IgE 抗体の経時変化

石鹼の使用を中止することにより、確かに臨床的にも検査的にも反応性が低下してきている症例が多い。しかし、症状が続くことや、グルバール 19S の特異 IgE 抗体の値が低下しない症例もある。

が毎日少しずつ経皮的に、また経粘膜的に吸収され、抗原提示細胞によって抗原がリンパ球に提示され、感作特異 IgE 抗体を産生し、これが肥満細胞の表面に結合してアレルギー症状の準備状況をつくったと考えられる。特異 IgE 抗体を産生し続けた個体では、やがて、コムギ製品を摂取すると全身性のアレルギー症状を発症するようになった。抗体の産生は局所で起こると考えられ、そのためにコムギアレルギーの症状は眼周囲の痒み、蕁麻疹、腫脹などで始まっている(図5)。

経皮的に吸収されるグルバール 19S の抗原量と、パンやうどんなどで1度に 100g を超える量を摂取する食品中で交差反応を起こす抗原量では、後者のほうが圧倒的に多いと考えられる。

## || (旧)茶のしずく石鹼コムギアレルギーの予後

本症の予後については、少しずつ調査・研究が進んできた。筆者らの検討でも、グルテン、コムギに対する特異 IgE 抗体はほぼ全例で減少し、ELISA 法で経過を追ったグルバール 19S に対する抗体は 5.1 か月で半減している(図6)。

(旧)茶のしずく石鹼の使用中止から3年間を経過した 111 例の予後調査では、症状の重症度にかかわらず、3年後には 83% の症例がコムギを摂取し生活していることがわかった(図7)。ただし、グルバール 19S と類似した加水分解タンパク質を含む食品を摂取した場合の安全性について

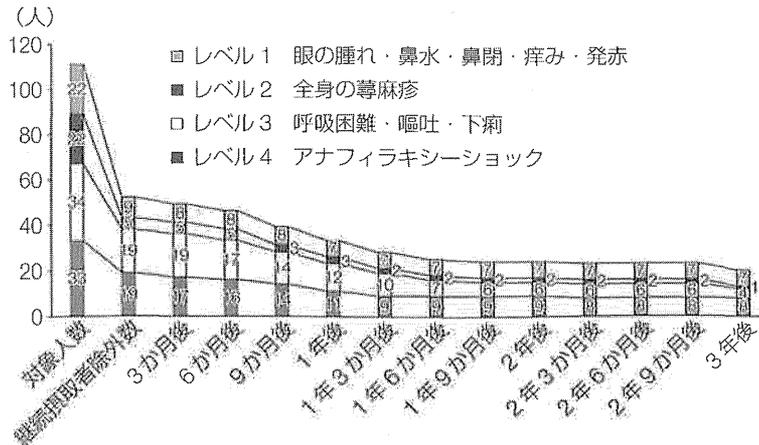


図7 石鹸の使用中止からコムギ摂取再開までの期間  
使用中から3年間経過を追えた111例におけるコムギを摂取していない人数の推移

は、まだ確認できていない。

### 食物アレルギーは経皮感作から起こる

近年、食物アレルギーは経口感作ではなく経皮感作により起こる、という考えが注目されている<sup>4)</sup>。マウスでの実験では、擦過した皮膚へピーナッツを曝露することによって特異的IgE抗体が産生されるという報告があり、これは食物アレルギーが経皮感作で起こる可能性を示唆している<sup>5)</sup>。

化粧品の安全性について「食べ物に含まれるから安全」、「天然成分だから安全」という謳い文句を聞く。しかし、今回の事例は、皮膚から吸収されたコムギ由来の加水分解タンパク質が経皮・経粘膜吸収されることによって、コムギに交差反応するIgE抗体を産生させ、コムギ摂取で重篤な即時型アレルギーを発症させることを示した。

化粧品や医薬部外品(薬用化粧品)の製造販売前に、化粧品成分の即時型アレルギーの試験は必要項目には入っておらず<sup>6,7)</sup>、さらに欧州では、2009年から化粧品成分に対する動物実験禁止、および動物実験を用いて開発された化粧品の販売禁止が適用され、2013年よりその拡大が予定されている<sup>8)</sup>。経皮感作による即時型アレルギーについては、動物実験もまだ十分確立されていない

状況であり、もちろん代替法もない。このような状況下で、化粧品の安全性を確保するには、今回の事例から多くのことを学び、安全性を確保する市販前の試験法の標準化と、市販後に化粧品の有害事象を早期に把握するシステムの構築が急がれる。日常、誰もが使用する化粧品の安全性は重要な課題である。

### 文献

- 1) Fukutomi Y, et al: Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* **127**: 531-533, 2011
- 2) Chinuki Y, et al: A case of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolysed wheat protein in a soap. *Contact Dermatitis* **65**: 55-57, 2011
- 3) Hiragun M, et al: The sensitivity and clinical course of patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *Arerugi* **60**: 1630-1640, 2011
- 4) Lack G: Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* **121**: 1331-1336, 2008
- 5) Strid J, et al: Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* **35**: 757-766, 2005
- 6) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2011-12. 薬事日報社, 2011
- 7) 日本化粧品工業連合会編: 化粧品の安全性評価に関する指針 2008. 薬事日報社, 2008
- 8) 小島肇夫: 動物実験代替法における国際協調. *日薬理誌* **138**: 103-107, 2011

### Ⅲ. 加水分解コムギ含有石鹼による コムギアレルギーの疫学と社会的意義

Yagami Akiko

Matsunaga Kayoko

矢上 晶子\*1)

松永佳世子\*2)

\*藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 <sup>1)</sup> 准教授 <sup>2)</sup> 教授

#### Summary

近年本邦において、ある特定の加水分解コムギ末を含有した石鹼を使用した者が小麦摂取による即時型アレルギーを呈する症例が急増した。本疾患は、加水分解コムギ末（グルパール19S）を含む（旧）茶のしずく石鹼（（株）悠香）で洗顔することによって、グルパール19Sが経皮・経粘膜的に吸収され、それまでコムギアレルギーのなかった人にグルパール19Sに対する特異IgE抗体を産生し、これと交差反応する小麦摂取時にアナフィラキシー等の即時型アレルギーを引き起した。この一連の事象は、“経皮・経粘膜的に感作された食物アレルギー”として注目されるのみでなく、化粧品における即時型アレルギーの安全性評価の確立が急務であることを我々に気づかせた。今後、社会的な取り組みが進み、化粧品の安全性が確保されることを期待したい。

#### Key Words

加水分解コムギ末／コムギアレルギー／経皮経粘膜感作／疫学調査

#### はじめに

加水分解コムギ末とは、主に小麦不溶性蛋白質のグルテンを酵素や酸、アルカリで分解したものであるが、この処理によって乳化性や保湿性が顕著に増すことから、本邦に限らず化粧品に多用されてきた。近年本邦において、ある特定の加水分解コムギ末を含有した石鹼を使用した者が小麦摂取による即時型アレルギーを呈する症例が急増した<sup>1), 2)</sup>。これは、加水分解コムギ末（グルパール19S）を含む（旧）茶のしずく石鹼（（株）悠香）で洗顔することによって、グルパール19Sが経皮・経粘膜的に吸収され、コムギアレルギーのな

かった人にグルパール19Sに対する特異IgE抗体が産生され、これと交差反応する小麦摂取時にアナフィラキシー等の即時型アレルギーを引き起こされることとなった。

本稿では、（旧）茶のしずく石鹼により誘発された即時型アレルギーの疫学調査を行ってきた、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」で得られた情報を報告する。本稿における内容は、日本アレルギー学会の以下のウェブサイトに掲載されており、これらの情報は毎月更新されているので参照されたい（2012年12月時点〔[http://www.jsaweb.jp/modules/news\\_topics/index.php](http://www.jsaweb.jp/modules/news_topics/index.php)〕）。

### Ⅲ. 加水分解コムギ含有石鹼によるコムギアレルギーの疫学と社会的意義

#### I. 「茶のしずく石鹼」

問題となった加水分解コムギ末であるグルパール19Sは、2004年3月から2010年9月26日までに製造された(旧)茶のしずく石鹼に含有されていた。その後はグルパール19Sに代わり、同年12月7日までプロモイス、12月8日から2011年6月19日まで加水分解シルクが配合されていた。同年6月20日以後は、加水分解物は除去された(現)茶のしずく石鹼が販売されている。なお、グルパール19Sを含有した製品は4,650万8千個が延べ466万7千人に販売された。本製品の販売は登録制になっているため、これらの情報を把握することが可能であった。

#### II. 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」

日本アレルギー学会は、大きな社会的問題となった「茶のしずく石鹼」による皮膚アレルギーおよび小麦関連アレルギー疾患発症に関して、本件に対しての患者向け、医療従事者向け、一般国民向けに正確な情報提供を行うとともに、診療可能施設についての適切な選定と情報提供、さらには今後の同様な問題の発生防止のための調査研究の実施等を行うため2011年7月4日に本特別委員会を設置した(表1)。

表1 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

	氏名	所属
委員長	松永 佳世子	藤田保健衛生大学医学部 皮膚科
委員	相原 道子	横浜市立大学附属病院 皮膚科
	池澤 善郎	国際医療福祉大学熱海病院 皮膚科
	板垣 康治	北海道文教大学 人間科学部健康栄養学科
	宇理須 厚雄	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院 小児科
	加藤 善一郎	岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学講座(小児科)
	岸川 禮子	(独) 国立病院機構福岡病院 臨床研究部内科
	澤 充	日本大学医学部 視覚科学系眼科学分野
	杉浦 伸一	名古屋大学 医療システム管理学寄附講座
	田中 宏幸	岐阜薬科大学 機能分子学大講座薬理学研究室
	千貫 祐子	島根大学医学部 皮膚科
	手島 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
	秀 道広	広島大学大学院医歯薬保健学研究科 皮膚科学
	福島 敦樹	高知大学医学部 眼科
	福富 友馬	(独) 国立病院機構相模原病院 内科
	森田 栄伸	島根大学医学部 皮膚科
	矢上 晶子	藤田保健衛生大学医学部 皮膚科

(2012/12/7 現在)

日本アレルギー学会では、正確な情報提供を行うべく、特別委員会を設置した。その構成メンバーを示す。

([http://www.jsaweb.jp/modules/news\\_topics/index.php](http://www.jsaweb.jp/modules/news_topics/index.php) より)

表2 茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギ(グルパール19S)による即時型コムギアレルギーの診断基準

【確実例】

以下の1, 2, 3をすべて満たす。

1. 加水分解コムギ(グルパール19S)を含有する茶のしずく石鹼等を使用したことがある。
2. 加水分解コムギ(グルパール19S)を含有する茶のしずく石鹼等を使用して、以下のうち少なくとも一つの臨床症状があった。
  - 2-1. 接触蕁麻疹(使用後数分後から30分以内に痒み, 眼瞼浮腫, 鼻汁, 膨疹など)が出現した。
  - 2-1. 小麦製品摂取後4時間以内に痒み, 膨疹, 眼瞼浮腫, 鼻汁, 呼吸困難, 悪心, 嘔吐, 腹痛, 下痢, 血圧低下などの全身症状がでた。
3. 以下の検査で少なくとも一つ陽性を示す。
  - 3-1. グルパール19S 0.1%溶液, あるいは, それより薄い溶液でプリックテストが陽性を示す。
  - 3-2. ドットプロット, ELISA, ウエスタンブロットなどの免疫学的方法により, 血液中にグルパール19Sに対する特異的IgE抗体が存在することを証明できる。
  - 3-3. グルパール19Sを抗原とした好塩基球活性化試験が陽性である。

【否定できる基準】

4. グルパール19S 0.1%溶液でプリックテスト陰性

【疑い例】

- 1, 2を満たすが3を満たさない場合は疑い例となる。

ただし, 1, 2を満たすが3を満たさない場合でも, 血液特異的IgE抗体価検査やプリックテストでコムギまたはグルテンに対する感作が証明され, かつω5グリアジンに対する過敏性がないか, コムギおよびグルテンに対する過敏症よりも低い場合は強く疑われる例としてよい。

【備考】免疫学的方法による診断は「日本アレルギー学会 化粧品中のタンパク分解物の安全性に関する特別委員会」まで連絡ください(hifuka1@fujita-hu.ac.jp 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学講座内 担当秘書 渡邊)

表1で紹介した委員会で, 加水分解コムギ(グルパール19S)による即時型コムギアレルギーの診断基準を作成した。

(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作成)

### III. 茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギ(グルパール19S)による即時型コムギアレルギーの診断基準

本委員会が作成した診断基準は表2のごとくである。

### IV. 「茶のしずく石鹼による小麦アレルギー情報サイト」を用いた疫学調査の方法

この疫学調査は, 加水分解蛋白含有化粧品の障害実態の把握, および茶のしずく石鹼の障害実態

の把握を目的に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)により行っている研究である。ウェブサイト上に症例登録サイトを作成し, 厚生労働省に症例を報告し, 今回のシステムに登録を承諾された施設が調査協力施設となり登録を開始した。本登録のシステムは2012年3月12日に公開され, 症例の登録は, 診療した医師からの登録とした(図1, 2)。登録した医師は自分のデータのみ確認, 追加, 変更でき, 管理者のみが全体を把握できるシステムでセキュリティは確保されている。

### III. 加水分解コムギ含有石鹼によるコムギアレルギーの疫学と社会的意義

The screenshot shows a web-based registration form for 'Tea's Not' (茶のしずく) allergy symptoms. The form is titled '茶のしずく症例登録票' (Tea's Not Case Registration Form). It contains several sections:

- 医師情報 (Doctor Information):** Fields for doctor name, hospital name, and email address.
- 患者情報 (Patient Information):** Fields for patient name, phone number, postal code, address, age, sex, and date of birth.
- 茶のしずく石鹼によるアレルギー症状を主病に発症した年月 (Year and month of onset of allergy symptoms due to Tea's Not alkali):** A dropdown menu.
- 使用したグローバル195を含む石鹼などの商品名 (Product names including Global 195 and other alkalis used):** A text input field.
- 症状 (Symptoms):** Checkboxes for 'Symptoms mainly in the mouth after rinsing' and 'Allergy symptoms due to wheat product ingestion'.
- 検査情報 (Test Information):** A table for blood test results, including 'Wheat IgE (U/ml)' and 'Global 195'.

図1 茶のしずく症例登録票

ウェブサイト上に症例登録サイトを作成した。診療した医師が登録する。

([http://www.jsaweb.jp/modules/news\\_topics/index.php](http://www.jsaweb.jp/modules/news_topics/index.php) より)

以下に現在までの調査結果を述べる。

#### 1. 登録症例数

2012年11月20日時点で確実例は1,617例だった。女性1,549例(95.8%)、男性68例(4.2%)である(図3)。年齢は1歳(男児)から93歳(女性)、平均45.6歳で、多くは20歳代から60歳代の女性だった。登録患者の都道府県別陽性症例数は、福岡県がトップで152例、次いで広島県95例、第3位は愛知県83例、第4位は東京都64例だった(図4)。

#### 2. 石鹼使用状況

##### 1) 石鹼使用開始年

2004年に3例だったが、2005年に22例、2006年29例、2007年34例と徐々に増加し、

2008年64例、2009年60例とピークになり、2010年33例、2011年1例となった。

##### 2) 石鹼使用中止年

症例の多くは2010年および2011年で石鹼使用を中止しており、これらは『小麦加水分解物を含む医薬部外品・化粧品による全身性アレルギーの発症について(2010年10月15日厚生労働省 医薬食品局安全対策課)』、および『小麦加水分解物含有石鹼「茶のしずく石鹼」の自主回収について(2011年5月20日厚生労働省 医薬食品局安全対策課)』が公開された時期に一致していた。

##### 3) 症状が発生した年

2005年に1例、2006年に6例、2007年に8例、2008年に36例、2009年に52例、2010年



### Ⅲ. 加水分解コムギ含有石鹼によるコムギアレルギーの疫学と社会的意義

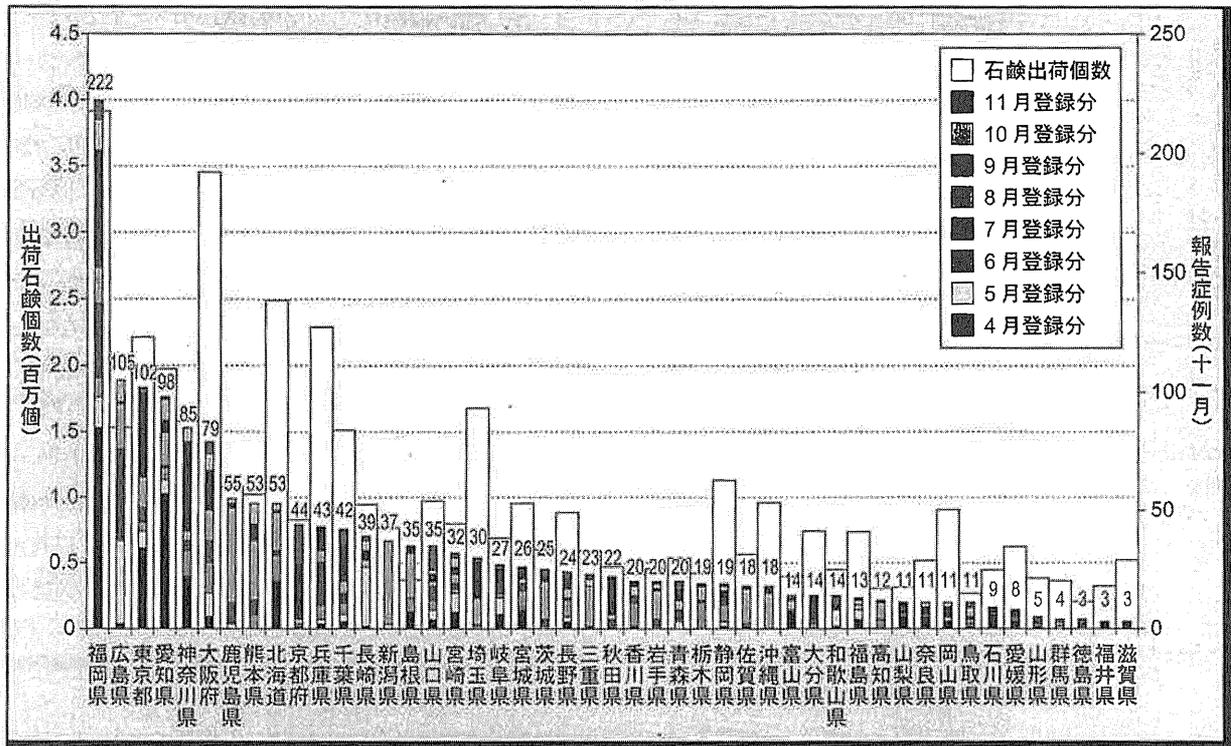


図4 都道府県別報告症例数および石鹼出荷個数 (2012.11.20 集計)

福岡県が最も多く152例、次いで広島県95例、愛知県83例、東京都64例と続いた。

([http://www.jsaweb.jp/modules/news\\_topics/index.php](http://www.jsaweb.jp/modules/news_topics/index.php) より)

には73例が発症していた。厚労省の通達後の2011年に発症した症例も58例、2012年にも2例認められていた。

#### 4) 1人当たり使用した石鹼の数

10個が最も多く23例、20個が22例だった。最少1個、最多70個、平均15.6個だった。

#### 5) 1日の使用回数

1回74例、2回114例、3回13例、4回4例で平均1.7回だった。

#### 6) 石鹼の使用部位

ほとんどの人は洗顔に使用していた(図5)。顔だけ64%、顔と体17%、顔と首2%、顔・腕・手1%。体だけはなかった。

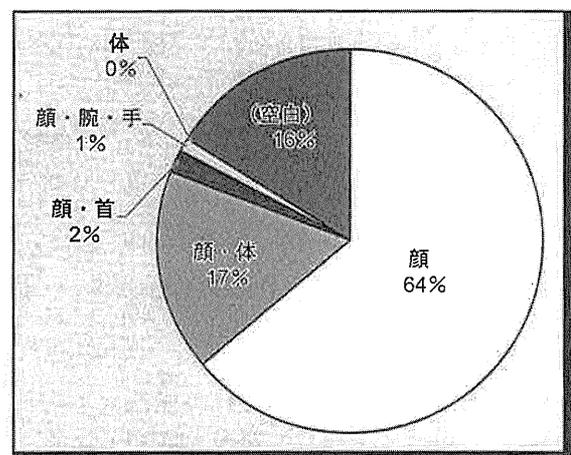


図5 石鹼の使用部位

顔のみの使用が最も多く64%であった。体のみの使用はなかった。

([http://www.jsaweb.jp/modules/news\\_topics/index.php](http://www.jsaweb.jp/modules/news_topics/index.php) より)