

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野))  
分担研究報告書

**加水分解小麦アレルギーの診断基準の確立と症例集積(アレルギー学会特別委員会と連携)**

研究分担者	松永 佳世子	藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学 教授
研究協力者	矢上 晶子	藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学 准教授
	佐野 晶代	藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学 助教
	小林 束	藤田保健衛生大学 大学院医学研究科 大学院生 皮膚科学専攻
	中村 政志	藤田保健衛生大学 大学院医学研究科 研究生 皮膚科学専攻
	杉浦 伸一	名古屋大学 医学系研究科 医療システム管理学寄附講座 准教授
	佐々木 和実	(独) 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 情報解析課生体分子解析室 室長
	西嶋 桂子	(独) 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 情報解析課生体分子解析室 主査
	安宅 花子	(独) 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 情報解析課生体分子解析室 主任

**研究要旨**

**背景:** 加水分解コムギ末グルパール 19S(GP19S)含有石鹼使用による即時型コムギアレルギーの健康被害は、化粧品に含まれる加水分解タンパク質が、経皮感作食物アレルギーを発生させるリスクがあることを日本アレルギー学会において「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」を設置し、明らかにしてきた。**方法:** GP19Sによるコムギアレルギーの実態調査、全国の医療施設 255 施設、1526 例に ELISA 法を施行し検査法の確立および予後調査を実施した。また、原因抗原の解析を行った。**結果:** 実態調査では 2020 例に上る症例の登録を得た(2014 年 2 月 20 日現在)。H25 年度は 3 つの研究結果を得た。1) GP19S 経皮感作コムギアレルギーについて特異的 IgE 抗体価と臨床症状の経時的推移について全国追跡調査を行い、GP19S に対する特異的 IgE 抗体価は減少しており、コムギ摂取もおおむね可能な症例が多くなっていた。2) GP19S の抗原性は、グルテンから GP19S に至る酸加熱処理の工程以降で顕著に認められ、グルテン中の LMW-グルテニン、及び、 $\gamma$ -グリアジンが酸加熱処理によって脱アミド化され、ここで生じた新規のアミノ酸配列が GP19S のエピトープであると考えられた。**結論:** 患者登録システムにより、全国的な患者数の把握および実態調査を実施し、多くの患者は当該石鹼の使用中止後疾患が軽快化する傾向を示すことを明らかにした。グルテンの脱アミド化で生じた新規のアミノ酸配列がエピトープになると考えた。

**A. 研究目的**

「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は、今や大きな社会的問題となっており、日本アレルギー学会としては、今後学会としての責任ある立場として、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、さらには今後の同様な問題の発生防止のための調査研究実施等を行うための特別委員会を発足し、検討を行っている。本研究において、特別委員

会との連携を分担する。

## B. 研究方法

1. グルパール 19S(GP19S)経皮感作コムギアレレルギーについて特異的 IgE 抗体価の推移と臨床症状の全国追跡調査

1-1) GP19S による即時型コムギアレレルギーと考えられる症例を、医師の症例情報登録、患者問診票、および追加調査票により、全国より収集した。

1-2) 診断は日本アレルギー学会化粧品中のタンパク加水分解物に関する特別委員会の診断基準により確実例と診断できる症例を登録した。

1-3) 藤田保健衛生大学において、各施設より送付された血清を ELISA 法により GPS 特異的 IgE 抗体価を測定した。GP19S は 2013 年 11 月現在 255 施設より 1,526 例の血清送付症例があった。

1-4) 症例は施設内登録番号を付し連結可能匿名化し、個人情報管理を行った。可能な症例においては、経時的に GP19S 特異的 IgE 抗体価を測定した。

1-5) 血清送付時にコムギ、グルテン、 $\gamma$ -5 グリアジンに対する IgE 抗体価の検査結果、GP19S によるプリックテスト結果の情報を得た。これらの陽性判定率を求め比較した。

1-6) コムギ摂取時の臨床症状の有無を確認できた症例 116 例について、コムギ摂取による最も重症な臨床症状と最終再診時点のコムギ摂取による症状を比較した。臨床症状の重症度は、レベル 1：目の周りの痒み・腫れ、鼻水、レベル 2：全身の蕁麻疹、レベル 3：呼吸困難、下痢・嘔吐、レベル 4：血圧低下、意識消失(ショック)とした。

2. GP19S の抗原性の解析

2-1) 製造工程、及びその工程中サンプルを、片山化学工業研究所より入手した。各製造工程サンプルと血清中 IgE 抗体の反応を ELISA 法、及び Western Blotting 法により評価した。

2-2) 各試料をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に供した。

2-3) 各試料を SDS-PAGE で分離し、ゲル内トリプシン消化後、質量分析装置 (LC/MS/MS) に供し、アミノ酸配列を分析した。グルテン構成タンパク質の、 $\gamma$ -グリアジン、 $\beta$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニンについての、含有比、及び、グルタミンからグルタミン酸への変換率について評価した。

## (倫理面への配慮)

本研究は、藤田保健衛生大学倫理委員会にて承認を受けて実施した(倫理審査委員会承認番号 11 - 210)。

## C. 結果

1. GP19S 経皮感作コムギアレレルギーについて特異的 IgE 抗体価の推移と臨床症状の全国追跡調査

1-1) 2014 年 2 月までの確実症例全国調査の結果、女性 2,020 例 (96%)、男性 87 例(4%)、平均 45.8 歳 (1 歳男児~93 歳女性) が登録された。30~60 代の女性に多かった。

1-2) 全国都道府県別登録数では福岡県 296 例、北海道 123 例、東京都 123 例、大阪府 118 例、広島県 109 例であった。福井県が 3 例と最も低かった。

1-3) GP19S は 2013 年 11 月現在 255 施設より 1,526 例に施行できた。プリックテスト陽性、陰性と ELISA 法の陽性、疑陽性、陰性の比較の結果は以下の通りであった。プリックテストの陽性 886 例中 ELISA 法陽性は 642 例 (72.4%)、疑陽性 78 例を入れた 720 例 (81.3%) であり、ELISA 法陽性の 771 例中プリックテスト陽性は 642 例(83.3%)であった。

1-4) GP19S、コムギ、グルテン、 $\gamma$ -5 グリアジンに対する特異 IgE 抗体がすべて施行された GP19S によるコムギアレレルギー症例の 597 検体の陽性判定率は GP19S が 76%、と最も高く、コムギ 43%、グルテン 48%、 $\gamma$ -5 グリア

ジンは6%であった。

1-5) 経過の追えた404例(1246検体)の初回検査より経時的な特異的IgE抗体の価の推移を示した。減少傾向の悪い72例(17.8%)を除き多くの症例で抗体は減少していた。

1-6) コムギ摂取時の臨床症状の有無を確認できた症例116例について、コムギ摂取による最も重症な臨床症状と最終再診時点のコムギ摂取による症状では、当初レベル3,4の症例が、摂取時症状がない、あるいは、目が腫れるなどの軽度の症状に移行していることが判明した。

## 2.GP19Sの抗原性の解析

### 2-1) 製造工程中サンプルの抗原性評価

ELISAの結果、酸添加後、95℃に加熱した段階で従来の小麦アレルギー患者(CO-WDEIA)の血清中IgE抗体の反応はほぼ消失し、当該疾患患者(HWP-IWA)の反応が顕著になった。

### 2-2) SDS-PAGEの結果

酸添加直後の分解、95℃に加熱した際のスメア状分布などが確認されるとともに、中性での可溶性が増すなどの物性変化も確認された。Western Blottingの結果、(酸添加後)95℃に加熱した時点において、CO-WDEIAの反応性が大きく減弱するとともに、HWP-IWAにおいて低分子量から高分子量に分布する特徴的な反応が確認された。

### 2-3)各サンプルのサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量分布の評価

酸添加直後、加熱時、中和時に特に大きな変化が生じ、2-1の実験において抗原性が顕著に増した段階にて、高分子量側に新たなピークの誕生が確認された。

### 2-4)アミノ酸配列の分析

初期原料であるグルテンで多く存在するHMW-グルテニンは酸添加直後に即座に減少し、工程を経る毎にLMW-グルテニンの存在比が多くなっていった。また、上記実験にて新たに生じたピークについても、LMW-グルテニンが多く検出された。

2-5)酸添加後、高温に加熱することでグルテンからグルタミン酸への変換率は増加した。

## D. 考察

1. GP19Sによる即時型コムギアレルギー症例は2014年2月の時点で2107例となり、登録症例の増加は、少なくなっている。本症は女性が96%と圧倒的に多く、また、年齢も30~60歳代に多くなっていた。出荷石鹼個数と報告症例数をみるとなお、登録されていない症例もあることが推測される。

本症の診断にはGP19S 0.1%溶液にブリックテスト陽性であることを診断基準に明記した。このブリックテストが最も感度が高い。コムギを摂取できていてもブリックテストは陽性の症例もあるために、コムギ製品の摂取可否をブリックテストでは判定しがたい。これには、好塩基球活性化試験、グルテニンに対する特異抗体価がより有用であるとの、日本アレルギー特別委員会での報告もあり、今後の検討を要する点である。GP19Sの抗体は多くの症例で減少しており、やがて陰性化することが推測される。

また、コムギ摂取時の惹起症状も軽症となっており、症状の出現しない症例の数も多く認められた。

2. 加水分解コムギは、医薬部外品・化粧品品の汎用原料である。これまでにグルパール19S以外での甚大な副作用事例は無く、この抗原を詳細に解析することは、安全な医薬部外品・化粧品成分の規格設定において非常に重要であると考えられる。よって本研究では、グルパール19Sの製造工程サンプルの抗原性とタンパク質組成の特徴についての検討を行った。

グルパール19Sはグルテンに酸を添加し、加熱、pH4での等電点沈殿、中和、フリーズドライ、を主な工程としている。ELISA法、及びWestern Blotting法による血清中IgE抗体の

反応性評価から、塩酸添加後に 95 に加熱する工程で当該疾患に関する抗原が誕生すること、その際に CO-WDEIA の抗原は消失することが分かった。

また、SDS-PAGE の結果から、酸加熱処理の工程を経ることで、スメア状を呈する様な分子量分布、pH4 で不溶・中性で可溶という元来のグルテンから大きな物性の変化が起きていることも確認された。これらの結果から、グルパール 19S の抗原は、この物性変化に寄与した部分であると考えられた。

サイズ排除クロマトグラフィーの結果は、当該疾患に関する抗原の誕生と同時に、超巨大分子の形成を示していた。その成分は、LMW-グルテニンがリッチな、元来のグルテンとは大きく異なる組成であり、約 50%のグルタミンがグルタミン酸に変化したものであった。一方で、SDS-PAGE の結果では、超巨大分子の存在が認められず、グルタミン酸への変化によって生じた電荷が作用点となった、電気的な結合による巨大分子様凝集体であると考えられた。よって、グルパール 19S の主要抗原は LMW-グルテニンの脱アミド化物であると考えられた。

S. Denery-Papini らは、食品添加物の加水分解コムギで生じたアレルギーについて、 $\gamma$ -グリアジンの繰り返し配列の脱アミド化が原因であったことを報告している。グルパール 19S 中の  $\gamma$ -グリアジンの検出率が決して低いものでは無い事も考慮すると、 $\gamma$ -グリアジンについても検討が必要であると考えられる。

## E. 結論

### 1. GP19S 経皮感作コムギアレルギーについて

特異的 IgE 抗体価と臨床症状の経時的推移について全国追跡調査を行い、GP19S に対する特異的 IgE 抗体価は減少しており、コムギ摂取もおおむね可能な症例が多くなっていた。

### 2. GP19S の抗原性は、グルテンから GP19S に

至る酸加熱処理の工程以降で顕著に認められ、グルテン中の LMW-グルテニン、及び、 $\gamma$ -グリアジンが酸加熱処理によって脱アミド化され、ここで生じた新規のアミノ酸配列が GP19S のエピトープであると考えられた。

## F. 研究発表

### (1) 論文発表

1. 松永佳世子、矢上晶子、中村政志、佐野晶代、小林束：(旧)茶のしずくによる石鹼アレルギー。公衆衛生。2013;77:801-806.
2. 矢上晶子、松永佳世子：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。アレルギー・免疫。2013;20:224-232.
3. 古田加奈子、伊佐見真実子、矢上晶子、鶴田京子、田中紅、美浦麻衣子、廣川景子、亀山梨奈、稲葉弥寿子、鈴木加余子、松永佳世子：化粧品パッチテスト 2009 年のまとめ。J Environ Dermatol Cutan Allergol.2013;7:34-43.
4. 西村 景子、矢上晶子、佐野晶代、古田 加奈子、伊佐見 真実子、松永佳世子：化粧品パッチテスト 2010 年のまとめ。J Environ Dermatol Cutan Allergol. 2013;10:78-86.

### (2) 学会発表

#### 2-1) 国際学会

1. Matsunaga K; Occupational contact dermatitis in Asia-Pacific. 12th ASIA-PASIFIC Environmental and Occupational Dermatology Symposium (APEODS). 2013: 10. 21-22. Yogyakarta, Indonesia.
2. Matsunaga K, Yagami A, Nakamura M: Safety information about hydrolyzed wheat proteins from Japan. CIR Expert Panel Meeting, Washington D.C., March 17, 2014.

#### 2-2) 国内学会

1. 合原みち、矢上晶子、森田雄介、佐々木良輔、鈴木加余子、中村節子、稲垣とよみ、赤松眞木、橋本隆、松永佳世子。連鎖販売による会員制化粧品シリーズによる接触皮膚炎の検討。第 112 回日本皮膚科学会総会。2013.6.14-16. 神奈川。
2. 安藤亜紀、矢上晶子、佐野晶代、高橋正幸、沼田茂樹、岩田洋平、有馬豪、松永佳世子。コチニール色素によるアナフィラキシーの 1 例。第

- 264 回日本皮膚科学会東海地方会. 2013.6.23. 愛知.
3. 松永佳世子. 美肌を目的とした食品成分の利用における安全性と効果の実際. 第 13 回日本抗加齢医学会総会. 2013.6.29. 神奈川.
  4. 松永佳世子. アレルギー性疾患等. 第 37 回日本小児皮膚科学会. 2013.7.14. 東京
  5. 矢上晶子, 松永佳世子. 食物アレルギーの最新情報. 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 2013.11.2-3. 名古屋.
  6. 松永佳世子. グルパール 19S による経皮感作コムギアレルギー全国疫学調査結果からみえてきたこと. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30. 東京.
  7. 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. 加水分解コムギによる経皮感作マウスに及ぼす抗原経口負荷の影響. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30. 東京.
  8. 中村政志, 矢上晶子, 相原道子、森田栄伸、秀道広、手島玲子、松永佳世子. ELISA 法によるグルパール 19S 特異 IgE 抗体評価の有用性評価. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30. 東京.
  9. 佐野晶代, 矢上晶子, 小林束, 中村政志, 有馬豪、岩田洋平、松永佳世子. 加水分解コムギ含有石鹼によるコムギアレルギー 57 例の予後調査. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30. 東京.
  10. 矢上晶子, 松永佳世子, 杉浦伸一. 化粧品中のタンパク質等の安全性に関する緊急疫学調査. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30 東京.
  11. 中村政志, 矢上晶子, 佐野晶代, 佐々木和実, 西嶋桂子, 安宅花子, 松永佳世子. 加水分解コムギ含有石鹼により生じた即時型コムギアレルギーの抗原解析. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30. 東京.
  12. 中村亮介, 中村政志, 矢上晶子, 酒井信夫、中村里香、安達玲子、齋藤嘉朗、相原道子、秀道広、千貫祐子、森田栄伸、松永佳世子、手島玲子. 加水分解コムギ感作血清中 IgE の EXILE 法による検出とその有用性評価. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30. 東京.
  13. 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. 加水分解コムギにより経皮感作マウスに及ぼす抗原経口負荷の影響. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.28-30. 東京
  14. 松永佳世子. グルパール 19S による経皮感作コムギアレルギー全国疫学調査結果からみえてきたこと. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29-12.1. 石川.
  15. 合原みち、矢上晶子、森田雄介、佐々木良輔、鈴木加余子、中村節子、稲垣とよみ、赤町眞木、橋本隆、松永佳世子. 連鎖販売による会員制化粧品シリーズによる接触皮膚炎の検討. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29-12.1. 石川.
  16. 鈴木加余子、高橋正幸、森田雄介、田中紅、佐野晶代、岩田洋平、有馬豪、矢上晶子、松永佳世子. 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを施行した症例 2012 年のまとめ. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29-12.1. 石川.
  17. 中村政志, 矢上晶子, 相原道子、森田栄伸、秀道広、手島玲子、松永佳世子. ELISA 法によるグルパール 19S 特異 IgE 抗体評価を施行した全症例のまとめ. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29-12.1. 石川.
  18. 佐々木和実, 西嶋桂子, 安宅花子, 中村政志, 矢上晶子, 佐野晶代, 松永佳世子. 加水分解コムギグルパール 19S の製造工程中試料の分子量分布変化と脱アミド化の確認. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29-12.1. 石川.
  19. 矢上晶子, 松永佳世子, 杉浦伸一. 化粧品中のタンパク質等の安全性に関する緊急疫学調査. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29-12.1. 石川.
  20. 松永佳世子. パッチテストで確定できたアレルギー性接触皮膚炎 2012 年度の疫学調査結果. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29-12.1. 石川.
  21. 矢上晶子, 鈴木加余子、中村政志, 佐野晶代、岩田洋平、小林束、有馬豪、松永佳世子. 経皮感作に基づく魚類 (Parvalbumin) と豆類 (Phaseolin) による食物アレルギー. 第 266 回日本皮膚科学会東海地方会. 2013.12.8. 愛知.

## 2-3) 講演会

1. 松永佳世子. 成人発症の食物アレルギー：旧茶のしずく石鹸使用者のコムギアレルギーから学んだこと. エピペン Web シンポジウム. 2013.6.7.東京.
2. 松永佳世子. 接触皮膚炎を楽しく診るコツ. 長野県中北信皮膚科女性の会. 2013.7.20.長野県.
3. 松永佳世子. 食物アレルギーの New face：経皮感作・経粘膜感作食物アレルギー. 第18回那須ティーチイン学術集会. 2013.7.27.東京.
4. 松永佳世子. 接触皮膚炎を楽しく診るコツ. 第8回東京感染症アレルギーフォーラム. 2013.7.11.東京.
5. 松永佳世子. 経皮感作による食物アレルギー. 第13回皮膚疾患治療セミナー. 2013.9.12.愛知.
6. 松永佳世子. パッチテスト・プリックテストのすすめ. 秋田県皮膚科談話会. 2013.9.28.秋田.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## H. 健康危険情報

化粧品に含まれた加水分解コムギにより2107例の全身性の即時型コムギアレルギーが発症したことは重大な健康危険情報である。