

表3 略治の予測因子（調整されたハザード比（95%信頼区間））：多変量コックス回帰分析

	Model 1		Model 2	
	Adjusted HR (95%CI)	P value	Adjusted HR (95%CI)	P value
小麦アレルギー症状：安静時誘発のエピソードあり	0.48 (0.16-1.41)	0.180	0.47 (0.16-1.39)	0.174
小麦アレルギー症状（最も重篤な時）				
皮膚症状あり	0.44 (0.15-1.33)	0.139	0.44 (0.15-1.33)	0.145
呼吸器症状あり	0.14 (0.04-0.53)	0.004	0.12 (0.03-0.45)	0.002
初診までの小麦によるアナフィラキシーが3回以上	0.61 (0.17-2.20)	0.452	0.69 (0.19-2.48)	0.564
初診時年齢 40歳以上	0.20 (0.06-0.69)	0.010	0.21 (0.06-0.69)	0.010
Log グルテン-IgE	0.32 (0.12-0.08)	0.028	-	
Log グルパール 19S-IgE			0.38 (0.15-0.94)	0.037

Model 1, 2ともに 発症から初診までの経過日数で調整

図2 予測因子の有無による Kaplan-Meier 曲線

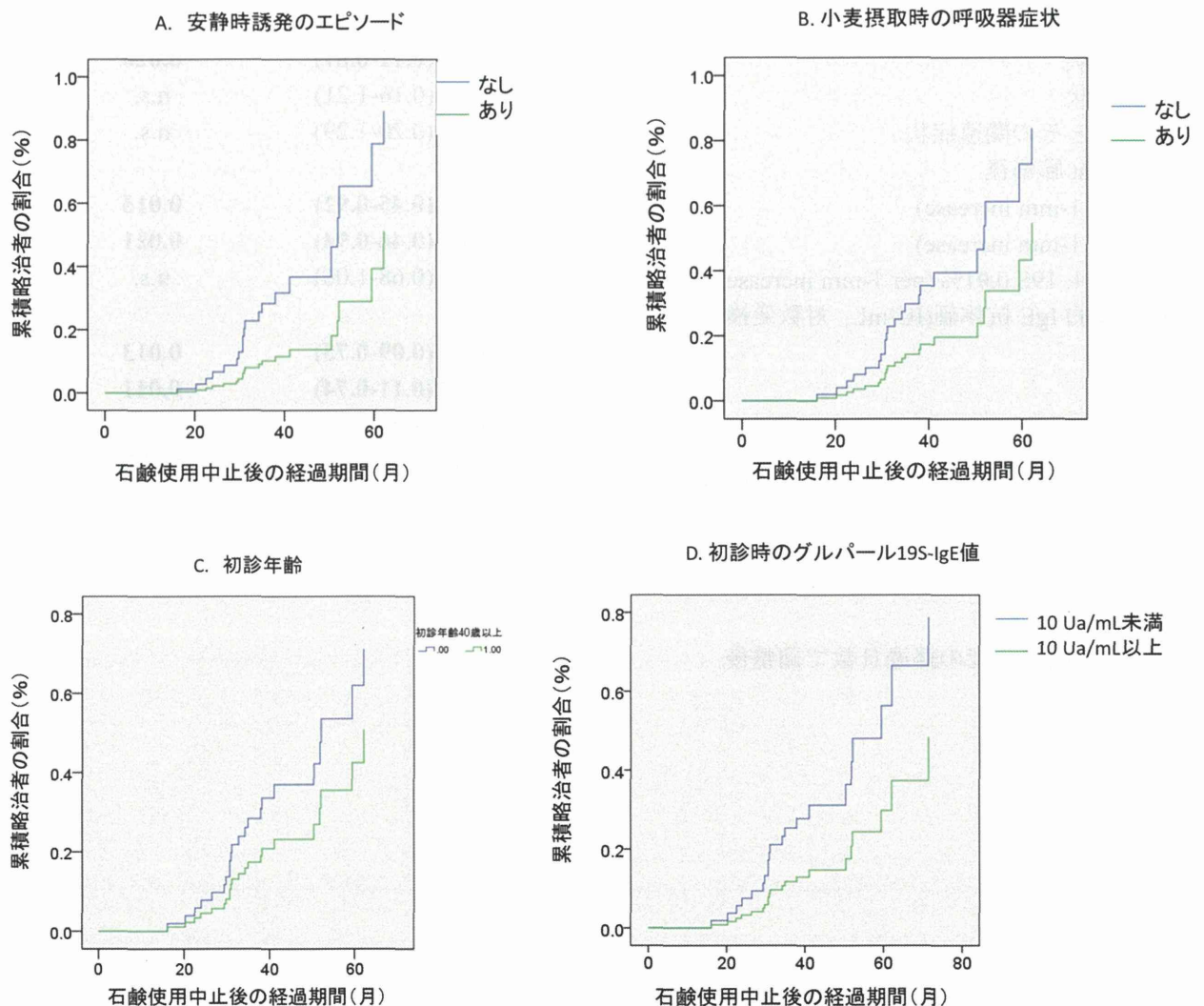


図3 特異的 IgE 抗体価 (Ua/mL) の経年変化

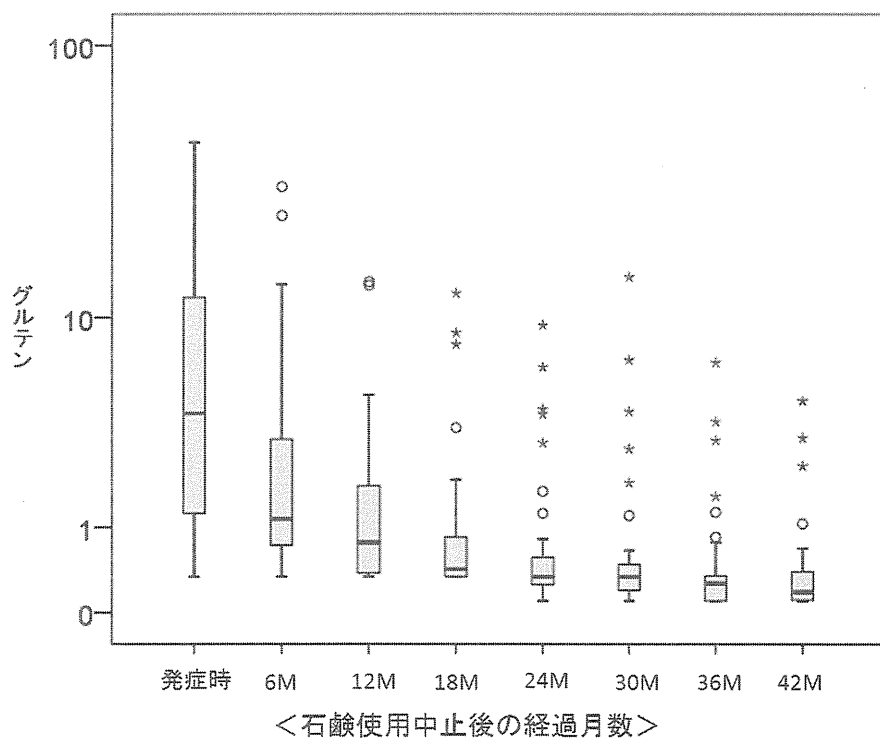
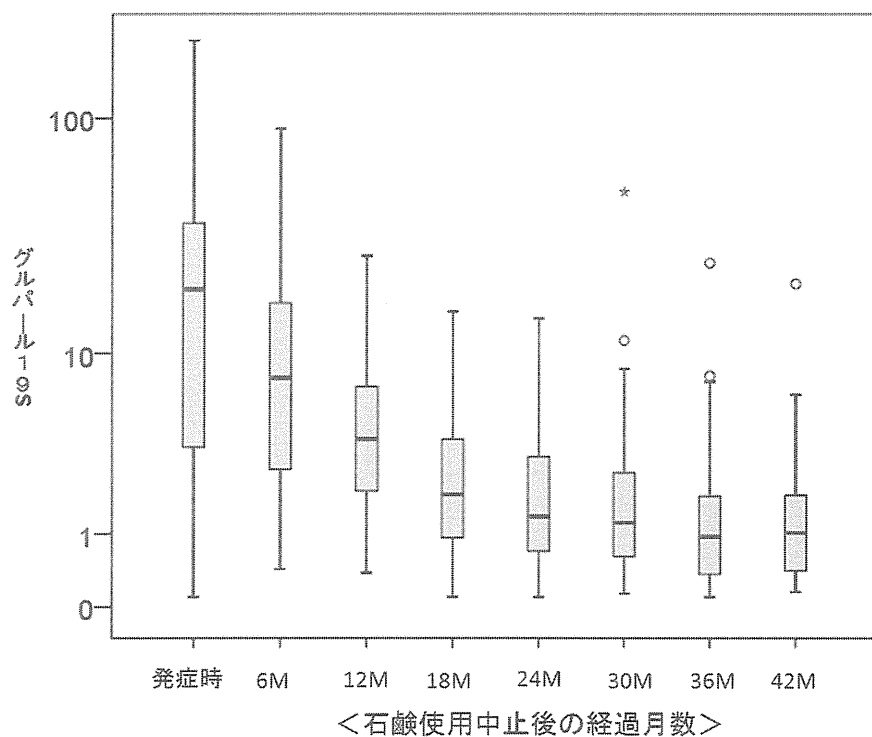
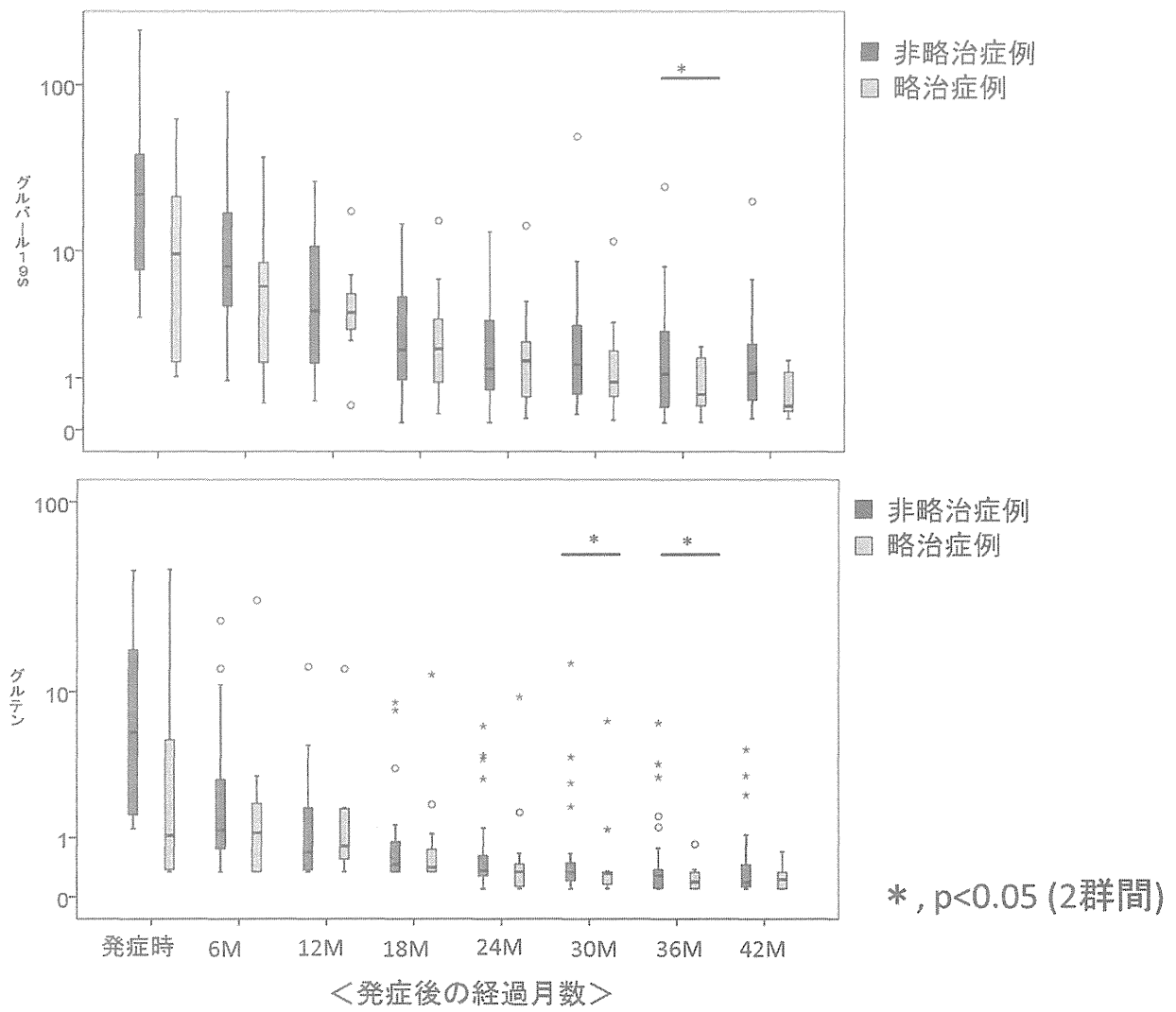


図4. 観察期間終了時の小麦摂取状況別に見た、特異的 IgE 抗体価の経年変化



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 26 年度)

医薬部外品等によるアレルギー発症例の診断法に関する研究

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

研究要旨：

H26 年度は 4 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全国追跡調査を継続し症例の新たな登録はなくなり 2014 年 10 月に登録を終了とした。その結果、確定症例数は 2,111 例であった。継続調査している症例の GP19S に対する特異的 IgE 抗体価も減少していた。2) 藤田保健衛生大学で経験した 53 例の症例について詳細を検討した結果、ELISA 法による GP19S 抗体価とプリックテスト最低惹起濃度は有意な負の相関を示した。そして、ELISA 法による GP19S 抗体価は重症度と有意な相関を示した。3) 化粧品に含まれるタンパク質成分で、経皮感作食物アレルギーの原因として疫学調査で症例数の多かったコチニール色素の抗原について検討した。疫学調査で収集した症例を中心に 7 例を対象に、コチニール原虫より蛋白質を抽出、2 次元電気泳動法で分離し、Western Blot 法で血清中 IgE 抗体と反応する蛋白質を特定した。その蛋白質を質量分析により解析した。その結果、比較的共通したものは CC38K であったが、他の蛋白質にのみ反応する症例もあった。本疾患の抗原は虫由来の蛋白質と考えられた。CC38K だけで説明できない症例もあるが 2D-WB 法であれば検査可能と考えられた。4) 加水分解コムギ末以外の化粧品に含まれるタンパク質について経皮感作食物アレルギーを発生した症例を継続調査した。原因タンパク質としてエステティシャンとして施術に使用していた全身ローションに含まれた大豆成分が確認された。

協力研究者

杉浦 伸一

協力研究者

名古屋大学大学院医学系研究科

矢上 晶子

附属病院教育研究支援センター

藤田保健衛生大学 医学部

特任研究部門 医療行政学 特任准教授

皮膚科学 准教授

佐野 晶代

佐々木和実

藤田保健衛生大学 医学部

独立行政法人 製品評価技術基盤機構

皮膚科学 助教

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

小林 東

西嶋 桂子

藤田保健衛生大学 医学部

独立行政法人 製品評価技術基盤機構

皮膚科学 助教

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

中村 政志

安宅 花子

藤田保健衛生大学 大学院

独立行政法人 製品評価技術基盤機構

医学研究科 研究生 皮膚科学専攻

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

A. 研究目的

近年、加水分解コムギ、グルパール 19S (GP19S) を含有した石鹸使用者に即時型のコムギアレルギー患者が多発し、症例の約半数がコムギ製品摂取後にアナフィラキシー症状を示す重症例であったことから、おおきな社会問題となった。この事例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示した。また、GP19S 以外の加水分解コムギならびにその他のタンパク質も経皮感作食物アレルギーを起し得ることが我々の緊急疫学調査 (H24-特別-指定-027; 代表研究者: 松永佳世子; 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) で明らかになった。

本年度は、以下の 4 つを研究目的とした。

- (1) GP19S による即時型コムギアレルギーの全国実態調査の最終報告を行うとともに、GP19S 特異 IgE 抗体の推移を報告する。
- (2) GP19S による即時型コムギアレルギーの診断方法として、ELISA 法とプリックテストの有用性と相関性を藤田保健衛生大学病院の 53 例を対象に検討した。
- (3) コチニール色素による症例が複数確認され 38kDa の蛋白質 (CC38K) が抗原として報告されているが、未だ不明点が多い。よって、プロテオミクス手法による網羅的な抗原解析を行った。
- (4) 全身用ローションに含まれた大豆成分による経皮感作食物アレルギーの症例の診断と抗原解析方法を検討した。

B. 研究方法

(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⁾。

(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。

(2) GP19S による即時型コムギアレルギーを疑った症例 122 例について、プリックテストと ELISA 法による特異 IgE 抗体による検査を行った²⁾。その中で診断基準により確定診断した 53 例について臨床症状と検査値の相関性を検討した。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。

(3) コチニール色素による経皮感作食物アレルギー症例の抗原解析

緊急疫学調査で収集した症例を中心に 7 例を対象とした。コチニール原虫より蛋白質を抽出、2 次元電気泳動法 (2D) で分離し、Western Blot 法 (WB) で血清中 IgE 抗体と反応する蛋白質を特定した。その蛋白質を質量分析により解析した。

(4) 当科で大豆の食物アレルギー症例について、経皮感作食物アレルギーの可能性を疑い、使用していた化粧品の成分を確認し、プリックテストを行い、原料の提供を企業に依頼し、プリックテストと 2D-WB で血清中 IgE 抗体と反応する蛋白質を特定した。その蛋白質を質量分析により解析した。

(5) 倫理面への配慮

本研究は、藤田保健衛生大学疫学・臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った。すなわち、ヘルシンキ宣言に準拠し、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除に配慮し、研究の内容について研究者から説明を行い書面での同意 (インフォームド・コンセント) を得て行った。

C. 研究結果

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

(1)-1. 全国追跡調査を継続し症例の新たな登録はなくなり2014年10月に登録を終了とした。2014年10月20日時点、確実例は2,111例であった

(図1)。女性2025例(95.9%)、男性86例(4.1%)であった。年齢は1歳(男児)から93歳(女性)、平均45.8歳で、多くは20代から60代の女性でした。

(1)-2. 登録患者の都道府県別陽性症例数は、福岡県がトップで311例、次いで東京都125例、北海道124例、大阪府123例、第5位は広島県110例であった(図2)。登録は最近はほとんど無くなっている(図3)。

(1)-3. 最終症例の問診結果を図3-7および表1、2に示す。

(1)-4. 確実例177例の経過では、GP19Sに対する抗体は多くの症例で減少している(図8)。参考までに厚生労働科学研究「生命予後に関わる重篤な食物アレルギーの実態調査・新規治療法の開発及び治療指針の策定」森田栄伸研究代表者のGP10による即時型コムギアレルギーの予後調査の結果を図9に示す。3か月間制限なく生活しコムギ摂取しても症状のでない略治状態になる検定中央値は63.3か月であった²。

(2) 藤田保健衛生大学で経験した53例の症例について詳細を検討した結果、ELISA法によるGP19S抗体価は重症度と有意な相関を示した(図10)。

(3) 化粧品に含まれるタンパク質成分で、経皮感作食物アレルギーの原因として疫学調査で症例数の多かったコチニール色素の抗原について検討した。疫学調査で収集した症例を中心に7例(表3)を対象にした。その結果、比較的共通したものはCC38Kであったが、他の蛋白質にのみ反応する症例もあった(図11,12)。

(4) 加水分解コムギ末以外の化粧品に含まれるタンパク質について経皮感作食物アレルギーを発生した症例を継続調査した。原因タンパク質としてエステティシャンとして施術に使用していた

全身ローションに含まれた大豆成分が確認された(図13-15)。

D. 考察

GP19Sによるコムギアレルギー症例は全国調査で最終的に2,111名登録されており、実際の症例の大部分が集積されたと推定される。患者の予後については、研究代表者 森田栄伸の研究班(H24-難治等(免)一般-005)によるGP19S即時型コムギアレルギーの予後調査の結果が報告されており、日常の生活で制限なくコムギ摂取しても即時型症状のでない略治となる中央値は65.3か月であるとの結果が得られている。多くの症例がコムギ摂取可能になってきており、約4年半で半数が略治となることが期待できる。しかし、抗体が下がらず、症状の再燃をみる症例があり、現在もその治療方法の開発が待たれるところである。

GP19Sによる即時型コムギアレルギーの診断にはプリックテストとELISA法によるGP19S抗体測定が有用であり、コムギ摂取可能か否かについては、好塩基球活性化試験、およびコムギ負荷試験などがより確実な試験といえる。さらに抗原の解析は、本研究班でもすでに多くがなされているが、今後は他の加水分解タンパク質の経皮感作性の予知とリスク回避に有用な検査法が求められる。

化粧品に使用されている蛋白成分の色素、コチニールの共通抗原の一つはCC38Kであったが、他の蛋白質にのみ反応する症例もあり今後の検討が必要と考える。また、大豆成分の含有された化粧水に職業上毎日手で触れていたアトピー性皮膚炎の症例が、経皮感作による大豆の食物アレルギーを発症した症例を経験した。症例の数は多くはないが、このような症例が潜在している可能性があり、今後とも研究を継続していく必要がある。これらの個々の症例の診断と、その抗原解析には

製品や成分のブリックテストと、2D-WB および質量分析が有用と考えられた。

E. 結論

- 1) GP19S による即時型コムギアレルギーは原因抗原の接触回避により、回復している。
- 2) 経皮感作食物アレルギーの症例の診断にはブリックテスト、ELISA 法、2D-WB が有用である。
- 3) GP19S 以外のタンパク質成分による経皮感作食物アレルギーの症例は、多くはないと推測される。
- 4) 食品成分を化粧品に使用する場合のリスク評価、安全性評価の方法をさらに研究し、再度、GP19S による即時型コムギアレルギーのような多数例の健康被害を出してはならない。

参考文献

1. 茶のしずく石鹸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(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)
http://www.fa.kyorin.co.jp/jsa/jsa_0528_09.pdf
2. 千貫祐子, 河野邦江, 高橋 仁, 塩飽邦憲, 森田栄伸: 加水分解コムギアレルギー疫学データまとめ、研究代表者: 森田栄伸 平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(免疫アレルギー疾患等実用化研究分野)生命予後に関わる重篤な食物アレルギーの実態調査・新規治療法の開発及び治療指針の策定(H24-難治等(免)-一般-005)

F. 研究発表

1. 論文発表
1. 松永佳世子. ロドデノール誘発性脱色素斑. 皮膚病診療. 2015;37(1):6-13
2. Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K,

- Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kagohashi Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K. Guide for medical professionals (i.e. dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol*. 2015;42:113-128.
3. Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K and Inoue D. Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27(5):754-63.
4. 松永佳世子. 化粧品による皮膚障害. 現代医学. 2014;62(1): 101 -105.
5. Tatebayashi M, Oiso N, Wada T, Suzuki K, Matsunaga K and Kawada A. Possible allergic contact dermatitis with reticulate postinflammatory pigmentation caused by hydroquinone. *J Dermatol*. 2014;41(7):669-670.
6. 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.
7. Horita K, Tanoue C, Yasoshima M, Ohtani T, Matsunaga K. Study of the usefulness of patch testing and use test to predict the safety of commercial topical drugs. *J Dermatol*. 2014;41(6):505-13.
8. 青山裕美, 伊藤明子, 鈴木加余子, 鈴木民夫, 種村篤, 錦織千佳子, 伊藤雅章, 片山一朗, 杉浦伸一, 松永佳世子. ロドデノール誘発性脱色素斑症例における一次全国疫学調査結果. 日皮会誌. 2014;124(11):2095-2109.

9. Kasamatsu S, Hachiya A, Nakamura S, Yasuda Y, Fujimori T, Takano K, Moriwaki S, Hase T, Suzuki T, Matsunaga K. Depigmentation caused by application of the active brightening material, rhododendrol, is related to tyrosinase activity at a certain threshold. *J Dermatol Sci.* 2014;76(1):16-24.
 10. Kuroda Y, Takahashi Y, Sakaguchi H, Matsunaga K, Suzuki T. Depigmentation of the skin induced by 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol is spontaneously re-pigmented in brown and black guinea pigs. *J Toxicol Sci.* 2014;39(4):615-23.
 11. Yagami A, Suzuki K, Morita Y, Iwata Y, Sano A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis caused by 3-o-ethyl-L-ascorbic acid (vitamin C ethyl). *Contact Dermatitis.* 2014;70(6):376-7.
 12. 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).
2. 学会発表
- <国内学会>
1. 松永佳世子. 女性医師支援を進める実践プログラム. 第64回日本泌尿器学会中部総会. アクトシティ浜松. 2014.10.17-10.19. 静岡.
 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. 矢上晶子, 鈴木加余子, 佐野晶代, 森田雄介, 小林東, 岩田洋平, 松永佳世子. 別々の美白化粧品によりアレルギー性接触皮膚炎と脱色素斑を含有した一例. 第269回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬(株)名古屋支店. 2014.9.21. 愛知.
 4. 伊藤紫, 村手和歌子, 佐々木良輔, 鈴木加余子, 松永佳世子. CPKの著明な高値を認めたマムシ咬症の1例. 第269回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬(株)名古屋支店. 2014.9.21. 愛知.
 5. 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. 都市センターホテル. 2014.11.22. 東京.
 6. 佐野晶代, 矢上晶子, 山北高志, 小林東, 岩田洋平, 有馬豪, 鈴木加余子, 山田雅啓, 松永佳世子. 最近経験したラテックスアレルギーの3例. ラテックスアレルギー・OASフォーラム2014, 第19回日本ラテックスアレルギー研究会. 一橋大学一橋講堂. 2014.7.27. 東京.
 7. 松永佳世子, 鈴木加余子, 矢上晶子, 秋田浩孝, 佐野晶代, 田中紅. ロドデノール誘発性脱色素斑111例と他の美白剤等による脱色素斑が疑われた21例の臨床像と治療経過. 第32回日本美容皮膚科学会学術大会. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート. 2014.7.12-7.13. 千葉.
 8. 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.
 9. 鈴木加余子, 伊藤紫, 西和歌子, 佐々木良輔, 佐野晶代, 矢上晶子, 松永佳世子. 当院ICUで入院治療を要したアナフィラキシー患者(小児例を除く)のまとめ. 第268回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬名古屋支店. 2014.6.8. 愛知.
 10. 齋藤健太, 矢上晶子, 山北高志, 佐野晶代, 小林東, 沼田茂樹, 安藤亜紀, 松永佳世子. 経費感作による魚アレルギーの1例. 第268回日本皮膚科学会東海地方会. 大正製薬名古屋支店. 2014.6.8. 愛知.
 11. 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.

12. 松永佳世子. 加水分解コムギ含有石鹼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.
13. 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.
14. 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の経時的变化. 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. 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.
2. Goncalo M, Matsunaga K. 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. Barcelona. 2014.6.25-6-28. Spain.
3. 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.
4. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
記載事項なし。
2. 実用新案登録
記載事項なし。
3. その他
記載事項なし。

年齢・性別 確実症例数 2014.10.20

年齢	性別		合計
	F	M	
3歳以下	3	8	11
10代	53	26	79
20代	149	16	165
30代	472	17	489
40代	815	9	824
50代	385	5	390
60代	282	2	284
70代	192	5	197
80代	12	0	12
90代	0	1	1
合計	2025	89	2111

男生 4.1% 最年長 1歳男児
女生 95.9% 最年少 96歳女生

平均 45.8歳

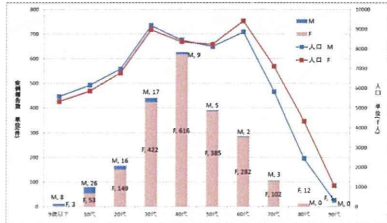


図 1. GP19S による即時型コムギアレルギー全国疫学調査 2014. 10. 20 2, 111 例の年齢、性別 分布

都道府県別 確実症例数 2014.10.20

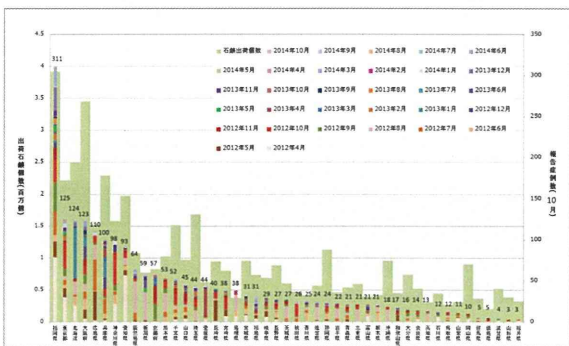


図 2. GP19S による即時型コムギアレルギーの全国都道府県別症例数

症例報告数推移 2014.10.20

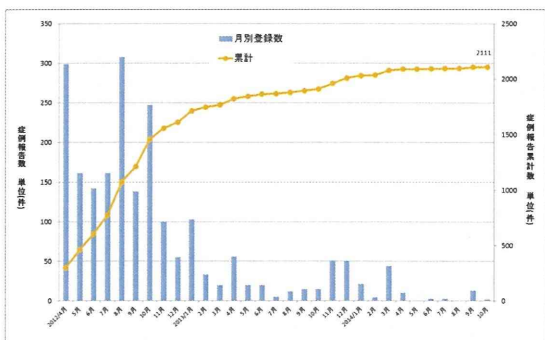


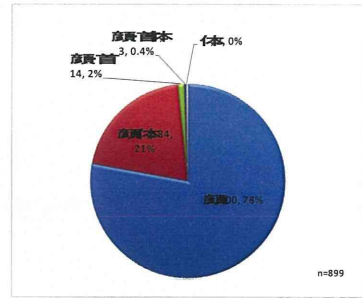
図 3. 登録症例の経時的変化

使用状況

使用開始年	使用回数	使用回数 合計
2004	10	0.5~9 249
2005	65	10~19 131
2006	127	20~29 41
2007	170	30~39 63
2008	184	40~49 19
2009	229	50~59 16
2010	97	60~69 8
2011	7	70~79 2
2012	899	80~89 3
		90~99 0
		100以上 6
		不明 361
合計		899

使用開始7年	使用回数
2008	1
2007	9
2006	29
2005	88
2010	276
2011	446
2012	41
2013	1
不明	13
合計	899

症状出現年	使用回数
2004	1
2005	2
2006	24
2007	64
2008	108
2009	222
2010	292
2011	151
2012	27
2013	1
不明	7
合計	899



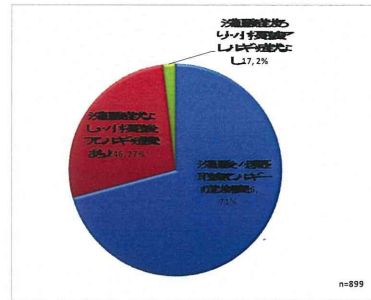
2014年10月20日現在

図 4. 旧茶のしずく石鹸の使用状況

症状

洗顔後・小麦摂取後アレルギー症状あり	636
洗顔後症状なし・小麦摂取後アレルギー症状あり	246
洗顔後症状あり・小麦摂取後アレルギー症状なし	17
合計	899

症状グラフ

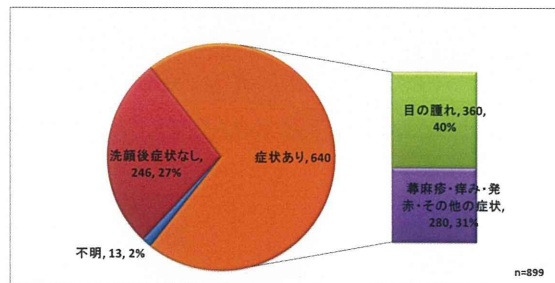


2014年10月20日現在

図 5. GP19S による即時型コムギアレルギーの症状；小麦摂取後と GP19S 含有石鹸洗顔後の症状の有無

洗顔中もしくは洗顔後の使用部位の皮膚症状

洗顔時の皮膚症状グラフ



2014年10月20日現在

図 6. GP19S 含有石鹸洗顔時・洗顔後の症状

小麦摂取後の症状

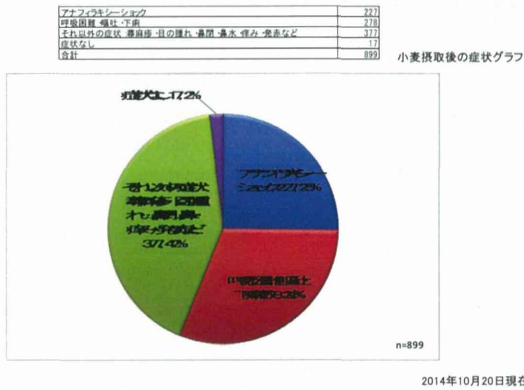


図 7. 小麦摂取後の臨床症状の重症度別頻度

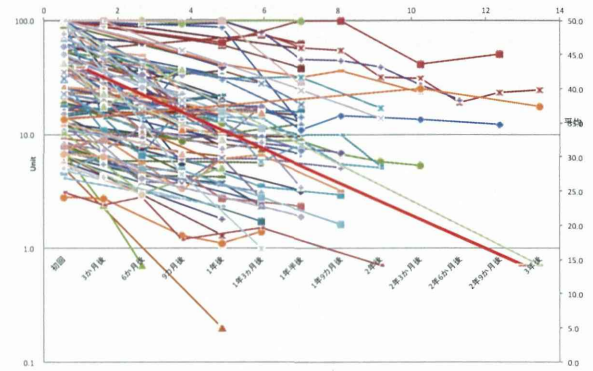


図 8. GP19S による即時型コムギアレルギー患者における特異 IgE 抗体の経時的変化 (対象: 確実例 177 症例)

小麦摂取後の症状

症状	回答数 (%)
眼瞼の腫脹	694 (77.8%)
痒み	278 (30.9%)
蕁麻疹	537 (59.7%)
発赤	344 (38.3%)
呼吸困難	385 (38.3%)
アナフィラキシー	227 (25.3%)
鼻水	117 (13.0%)
鼻閉	95 (10.6%)
下痢	148 (16.5%)
吐き気	122 (13.6%)
嘔吐	103 (11.5%)
症状なし	17 (1.9%)
アンケート回答数	899 (100%)

2014年10月20日現在

表 1. 小麦摂取後の症状別発現頻度

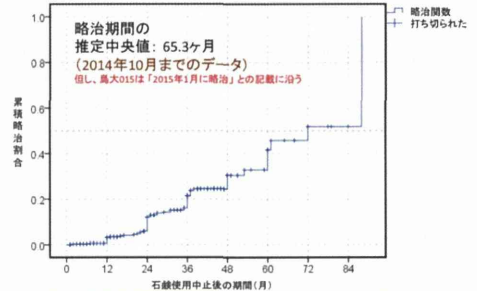
アレルギー疾患の既往

合併疾患	症例数 (%)
アトピー性皮膚炎	107 (11.9%)
花粉症・アレルギー性鼻炎	297 (33.0%)
蕁麻疹	42 (4.7%)
かぶれ(接触皮膚炎)	8 (0.9%)
その他	34 (3.8%)
詳細記入なし・合併症ありと答える	8 (0.9%)
アレルギー疾患合併あり	488 (54.3%)
アレルギー疾患の合併なし	411 (45.7%)
全回答数	899(100%)

2014年10月20日現在

表 2. GP19S による即時型コムギアレルギー患者のその他のアレルギー疾患の既往・合併頻度

2-1. Kaplan-Meier法を用いた略治曲線



石鹼使用中止後の期間(月)	0	12	24	36	48	60	72
累積略治割合 (%)	0	3.1	12.2	21.4	30.5	41.6	51.8
Number at risk	350	316	256	173	63	23	9

厚生労働科学研究費補助金
「生命予後に関わる重篤な食物アレルギーの実態調査・新規治療法の開発及び治療指針の策定」より

図 9. GP10 による即時型コムギアレルギーの予後調査 厚生労働科学研究「生命予後に関わる重篤な食物アレルギーの実態調査・新規治療法の開発及び治療指針の策定」より提供・引用

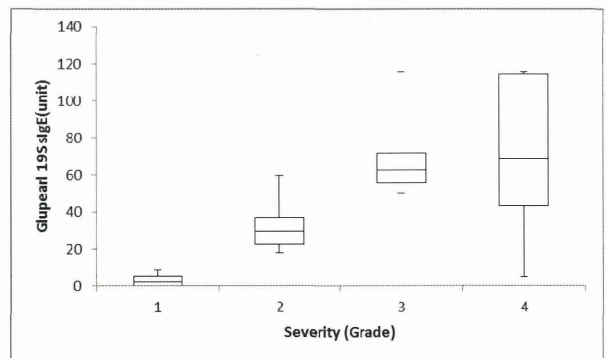


図 10. 特異 igE 抗体と臨床重症度レベルは相関した (p=0.001)。

コチニール色素アレルギーの抗原解析

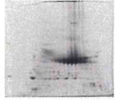
【化粧品中のタンパク質等の安全性に関する緊急疫学調査】
厚生労働科学研究費補助金、厚生労働科学特別研究事業(第24-特別-指定-027)
により集積された症例を中心に検討を行った

登録施設名	年齢	性別	主な症状	原因	SPT	slgE	Immunoblot (kDa)	血清No
NHU相模原病院	37	F	アナフィラキシー	コチニール	陽性	Class0	ND	-
藤田保健衛生大	48	F	食後の顔面腫脹	赤ワイン	陽性	Class0	ND	CA-2
はらだ皮膚科クリニック	49	F	アナフィラキシー	フランス製赤色マカロン	陽性	ND	38, 54, 30-32	CA-6
	33	F	アナフィラキシー	フランス製赤色マカロン	陽性	ND	38, 54, 30-32	CA-6
	29	F	アナフィラキシー (論文症例)	ドイツソーセージ ロジューズ	陽性	ND	38	CA-7
三井病院	32	F	アナフィラキシー	アイシャドー 魚肉ソーセージ	陽性	Class2	陽性	CA-1
大分大学	41	F	アナフィラキシー	バスタ(ペーコン)・カマボコ 口紅(アズビシ(不承認))	陽性	ND	ND	-
	70	F	口唇腫脹	イチゴジュース	陽性	Class0	ND	CA-4
	29	F	アナフィラキシー (再発)	魚肉ソーセージ・カンパリ	2009年陽性 2013年ND	Class2 Class0	39-44 ND	CA-3① CA-3②
帝京大学	39	F	アナフィラキシー (再発) (論文症例)	栄養飲料	ND	class4	ND (BATでカルモニン陽性)	CA-8

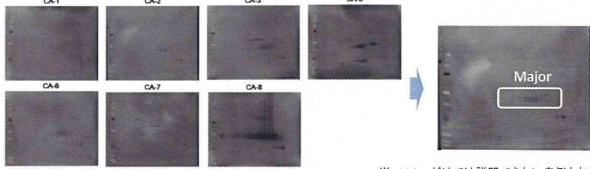
表 3. コチニール色素アレルギー10例のまとめ

プロテオミクス手法(2D Western Blot + MS/MS)による網羅的抗原解析

- ① コチニールエンジムシからタンパク質を抽出
- ② 2D-PAGE ⇒ PVDF膜に転写



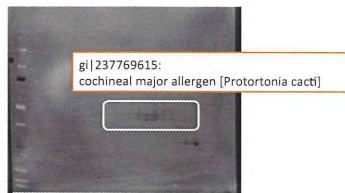
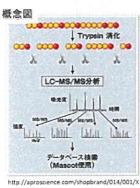
- ③ 患者血清を曝露し、IgE抗体を検出



※ Major だけでは説明できない症例もある

図 11. プロテオミクスによる網羅的解析方法

- ④ タンパク質抗原の同定 (MS/MS・データベースサーチ)



<まとめ>

- 多くの症例で共通した抗原は、既報告にあるCC38Kであった。
- gi|237769615: cochineal major allergen [Protortonia cacti] = CC38K
- ただし、CC38Kを抗原としない症例もあることが分かったことから、CC38K以外の抗原同定も必要と考えられ、現在検討を進めている。

図 12. 多くの症例で共通した抗原は CC38K であった。

大豆成分を含有した化粧品により経皮的に感作された大豆アレルギー



症例: 30歳 女性
初診日: 2011年7月
主訴: 蕁麻疹
既往歴: アトピー性皮膚炎
食物アレルギー歴なし
2004年 エステシャンとして就業を開始。当初はエステで用いる化粧品を使用しても症状はなかった。
2009年 手指に難治性の皮疹が出現するようになった。
その後、豆乳や大豆を含有する食品の摂取後、口唇や咽頭の痒みが出た。
2011年 豆乳・大豆製品摂取後に、全身蕁麻疹、呼吸困難などが出現するようになった。



特異的抗体 (CAP/FEIA)

項目	結果
大豆	陽性
大豆卵白	陽性
大豆球蛋白	陽性
大豆糖蛋白	陽性
大豆凝集素	陽性
大豆トリカゼイン	陽性
大豆アミノ酸	陽性
大豆脂肪酸	陽性
大豆ステロール	陽性
大豆糖質	陽性
大豆タンパク質	陽性
大豆脂質	陽性
大豆ミネラル	陽性
大豆ビタミン	陽性
大豆酵素	陽性
大豆色素	陽性
大豆香料	陽性
大豆防腐剤	陽性
大豆界面活性剤	陽性
大豆乳化剤	陽性
大豆安定剤	陽性
大豆増粘剤	陽性
大豆増量剤	陽性
大豆着色剤	陽性
大豆香料	陽性
大豆防腐剤	陽性
大豆界面活性剤	陽性
大豆乳化剤	陽性
大豆安定剤	陽性
大豆増粘剤	陽性
大豆増量剤	陽性
大豆着色剤	陽性

アレルギー検査結果 (ELISA)

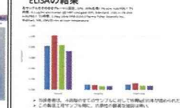
項目	結果
大豆	陽性
大豆卵白	陽性
大豆球蛋白	陽性
大豆糖蛋白	陽性
大豆凝集素	陽性
大豆トリカゼイン	陽性
大豆アミノ酸	陽性
大豆脂肪酸	陽性
大豆ステロール	陽性
大豆糖質	陽性
大豆タンパク質	陽性
大豆脂質	陽性
大豆ミネラル	陽性
大豆ビタミン	陽性
大豆酵素	陽性
大豆色素	陽性
大豆香料	陽性
大豆防腐剤	陽性
大豆界面活性剤	陽性
大豆乳化剤	陽性
大豆安定剤	陽性
大豆増粘剤	陽性
大豆増量剤	陽性
大豆着色剤	陽性

大豆特異的IgE値が陽性。患者が使用し、ブリックテストで陽性になった化粧品には大豆成分が入っていた。

化粧品製造工程別成分を用いた SDS-PAGE



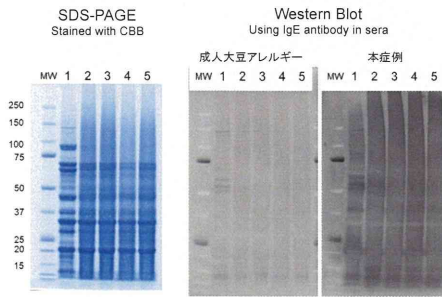
製造工程別成分を用いた ELISAの結果



当該化粧品の製造工程別の原料成分を用いた血清学的検討より化粧品中に含まれたタンパク質(大豆成分)に対するIgE抗体が関与した即時型アレルギーと診断した。

図 13. 大豆成分を含有した化粧品により経皮的に感作された大豆アレルギー症例

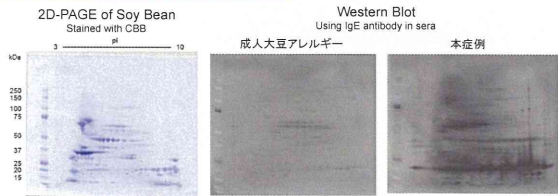
化粧品の製造工程別成分を用いた免疫プロット



lane1: Molecular weight; MW. Lane 1: protein extracted from soybean
Lane 2-5: sample 2: 乳酸菌添加後の豆乳成分、lane 3: 乳酸配合後の成分
Lane 4: エタノール配合後の成分、lane5: 化粧品製品

図 14. 化粧品の製造工程別成分を用いた免疫プロット

大豆タンパク質に対する免疫プロット



<まとめ>

- 本症例は、大豆と豆乳化粧品に含有される多くのタンパク質を抗原として認識していた。
- 従来の成人の大豆アレルギー患者とは異なる抗原認識の様であった。
- 現在、抗原の同定を行っている。

図 15. 大豆タンパク質に対する免疫プロット

医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

研究分担者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長

研究要旨：

昨年度、加水分解コムギ末の規格を質量分子量 10000 以下の割合が一定量以上のものとし、サイズ排除クロマトグラフィーによって確認する試験法案を策定した。今年度はまず、本試験がタンパク質専用でなく化学物質用 HPLC で実施可能かどうか、試験法開発機関以外でも実施可能かどうか検討した。その結果、試薬の規格や名称等の修正が指摘されたものの、おおむね提案試験法は妥当と評価された。しかしながら試料溶液の溶媒由来のピークがクロマトグラム形状と分布量分布率に影響を及ぼすことがわかったため、試料溶液の調製法について再検討し、改定案ではクロマトグラムへの影響をなくすることができた。種々の加水分解コムギ末及び加水分解コムギたん白液を試験した結果、動物試験でアレルギー性が疑われた原料以外はいずれも当初の分子量分布の規格値以上の値を示した。欧米では平均分子量や最大分子量を制限する意見が出されており、現状の原料の試験結果を踏まえ、安全側に立って分子量分布の規格値を変更することを提案した。本規格の導入は、加水分解コムギ末の安全性確保のため有用と考える。

協力研究者

秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

A. 研究目的

化粧品あるいは医薬部外品は人体に対する作用が緩和なものとされ、小麦、米といった植物由来成分が保湿成分として配合されている。近年、洗顔石けんの使用者にアナフィラキシーショックという重大な健康被害が発生し、ある特定の加水分解コムギ末が原因物質であることが明らかになった。本例は小麦のような食品成分が経皮、経粘膜的に感作するという事で大きな問題となった。しかし加水分解コムギ末すべてに問題があるわけではなく、今回は製造法の変更によって強いアレルギー性物質が生成したことが理由とわかった。加水分解コムギ末は医薬部外品原料規格に記載されているが、品質規格の改定が必要と

された。

本研究は、研究班で明らかになった研究結果をもとにして、加水分解コムギ末の医薬部外品原料規格案を策定することを目的とした。原材料グルテンの加水分解時間を種々変更して調製した試料の感作性試験が実施された。酸加水分解で一旦高分子量化し強い感作性が表われるが、分解時間を長くなるにつれ低分子量化し、マウスに感作を誘導しなくなった。このことから、昨年度加水分解コムギ末は約 10000 以下の分子量が一定量以上の割合となることを求める規格とし、これをサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって確認する試験法案を策定した。今年度は、試験に使用するカラムの供給に問題が出たため、代替カラムで同様の試験が可能かどうか確認した。次に、本試験がタンパク質専用でなく化学物質用 HPLC で実施可能かどうかを複数機関で検討し、本規格と試験法の妥当性を評価した。さらに、問

題点としてあがった試験操作については対応策を検討し、改定案を示した。

B. 研究方法

1. 試験法案の追試

昨年度策定した試験法案を各機関に示し、所有する装置で試験してもらい、結果及び文案の問題点等を報告させた。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、島津製作所製液体クロマトグラフ LC-20 システムまたは Nexera システムを用いて行った。検出器は SPD-M20A 型フォトダイオードアレイ検出器及び SPD-20A 型 UV 検出器を用いた。システム制御及びデータ解析は島津製作所製 LabSolution またはサーモフィッシャーサイエンティフィック社製 Xcalibur ソフトウェアを用いて行った。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に用いるカラムは GE 社 Superdex 200 Increase 10/30GL (1.0×30 cm, 粒径 8.6 μm) を用いた。分子量概算に用いる校正曲線を作成するため、各分子量のタンパク質 (チログロブリン、グルタミン酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、エノラーゼ、ミオキナーゼ、チトクロム c、アプロチニン、アンギオテンシン II) の混合液を調製し測定した。各種加水分解コムギ末試料について試験を行い、チトクロム c 以降の保持時間のピーク面積比を求めた。

2. 試験溶液調製法の検討

グルパール 19S の試料溶液を各方法で調製し、0.22 μm のメンブランフィルターでろ過、あるいは 10000 rpm で 5 分間遠心した上清を分析した。各試料溶液についてクロマトグラムの全ピーク面積、チトクロム c の保持時間以降のピーク面積、及び溶媒由来ピーク面積を測定した。確立した条件で各種加水分解コムギ末及び加水分解コムギたん白液を分析した。

C. 研究結果

1. 試験法案の追試による妥当性評価

国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 (機

関 A) 及び日本化粧品工業連合会 (機関 B) で追試験を実施した。

加水分解コムギ末は 1 g で 3~5 mL の容量にもなり、提示された溶媒液量では溶解させにくいと意見があった。試料溶液の濃度は保つよう採取試料量を減少させることにした。グルパール 19S の試料溶液は不溶物が多く、遠心しても濁りが取れなかった。0.45 μm のメンブランフィルターでは濁りが取れず 0.22 μm フィルターでのろ過が必要であった。しかし完全な澄明液にはならなかった (図 1)。

粒径が 8.6 μm の担体カラムでグルパール 19S を分析したとき、13 μm のときとクロマトグラム形状は変わらず、分離度の向上は認められなかった (図 2)。システム適合性試験に用いるアデニル酸キナーゼは、ミオキナーゼの名称が一般的との報告があった。規格案のカラムの理論段数は大きすぎるとの意見があった。分子量マーカーとして数種のタンパク質標準品の混合物が市販されているが、各物質の濃度が試験法案とは異なり使用できないことになるので改善してほしいとの意見があった。分子量 669000 のサイログロブリンから 6500 のアプロチンの間に分子量とピーク保持時間との間に直線関係が成立したが、分子量 1046 のアンギオテンシン II はこの直線から外れた (図 3)。

グルパール 19S については、チトクロム c 以降の分子量約 10000 以下のピーク面積の全分子のピーク面積に対する割合は 10%程度であり、開発機関で測定された数値とほぼ同一の数値であった。これ以外の加水分解コムギ末 2 種のクロマトグラムの形状はグルパール 19S とは大きく異なり、分子量 10000 以下の割合はいずれの機関とも 80%以上であった (表 1)。

以上のように、一部の文案等の修正が必要であるが、本試験は妥当と評価された。

2. 試験溶液の調製法の検討

当初案の 1 mol/L トリス緩衝液とリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液の混合液を SEC に注入すると、27 分付近にピークが出現した (図 4)。

水及びリン酸塩緩衝液でも小さいピークが現れた。移動相と同じ組成と pH になるように調製した溶液（新溶媒）ではピークはほとんど認めなかった。それぞれの溶媒由来のピーク面積値を図 5 に示した。

試料溶液の調製法として以下の方法（改定案）をとった。試料 0.1 g をとり、0.02 mol/L トリス試液 5 mL を加えてよく振り混ぜた。粉末試料の場合は 16 時間静置した後、液体試料の場合はすぐに酸性 0.02 mol/L トリス・塩化ナトリウム試液 5 mL を加えて混合し、メンブランフィルターろ過したものを試料溶液とした。グルパール 19S の場合、改定案（新溶媒）で調製した 10 mg/ml の溶液の全ピーク面積は当初案でのそれとほとんど変わらなかった（図 6）。分子量 10000 以下の分子のピーク面積は新溶媒の方が少なかった。一方移動相に溶解したときは、当初案あるいは改定案で調製した場合と比べてピーク面積値は小さかった。調製液の不溶物や濁りは遠心、メンブランフィルターでろ過して除いたが、ピーク面積値に影響することはなかった。当初案の溶媒由来ピークは全ピーク面積の 5% 程度、チトクロム c 以降のピーク面積の 53% に相当し（図 7）、溶媒ピークの占める面積は試料濃度が薄くなるほど大きくなった。新溶媒のピークは全ピーク面積の 0.1% 未満、チトクロム c 以降の面積に対しても 1% 強と、当初案より小さかった。

加水分解コムギ末について、当初案及び改定案で調製した試料溶液のクロマトグラムを図 8 に示した。当初案で肩のように認められるピークは改定案で認めなくなった。今回試験した加水分解コムギ末及び加水分解コムギたん白液について、チトクロム c 保持時間以降のピーク面積の全ピーク面積に対する比率を表 2 に示した。表 1 と比べると、いずれの試料の数値とも低下した。グルパール 19S に関しては 6% 程度の減少で、この減少分は当初案溶媒由来ピーク分に近い値であった。動物試験で感作性が認められなかった Prom 及び AGP はそれぞれ 97.9%、77.5% であった。加水分解コムギたん白液についてはいずれ

も 95% 以上の値を示した。

D. 考察

タンパク質を分析する場合はタンパク質専用のクロマトグラフィーシステムで行うのが一般的である。試験法開発時は GE 社タンパク質用液体クロマトグラフを用いた。本システムは 280/254 nm の単波長 UV 検出器が標準で、提案した 210 nm で検出するには別にフィルターを購入することが必要で、多波長検出器は高価である。そこで化学分析用 LC システムを用いて検査が可能か調べた。HPLC の配管はステンレス製で、カラムチャンバー等で温度制御し、UV または PDA 検出器を用いて分析した。2 機関で得られたクロマトグラム形状及び標準物質のピーク保持時間等は開発機関のそれらとほとんど一致しており、本試験が化学分析用 LC システムで実施可能なことがわかった。

試験法の開発時に用いたカラムは近日中に製造販売が中止となり、担体の粒径を 13 μm から 8.6 μm にして分離度を向上したものが代替品であるとの情報を製造会社から得た。代替カラムを用いてグルパール 19S を分析したところクロマトグラム形状は変わらなかった（図 2）。カラムについては代替品も用いることができると考え、規格案の粒径を 8~13 μm と広げることにした。カラムの分画範囲は球状タンパク質として分子量 600000~10000 とされているが、サイログロブリン（分子量 669000）からアプロチン（分子量 6500）の間で直線性が認められた（図 3）。1000 程度の分子量の分子になると直線から外れるが、分子量の大きい順に溶出し、分子量 10000 以下の分子の割合を求めるには問題ないと思われる。なお、システム適合性では 3 種のタンパク質の分離度から求めることとしているが、多くの分子量標準品を混合した市販品があることから、これを用いたシステム性能検査ができるよう記載を修正した。

トリス緩衝液で溶解するときの試料の量が多すぎるとの意見に対し、希釈後の濃度は適正と考

えられるため、試料採取量を1 gから0.1 gとし、濃度は10 mg/mLとなるよう液量を調整した。機関Aから保持時間27分付近にピークが常に出現しているとの報告がされた。試料濃度が薄くなるにつれ、分子量10000以下のピーク面積へのこの溶媒分の上積み率が大きくなった(図7)。本ピークは試料溶液と移動相との組成が異なることが原因と考えた。試料を移動相に溶解するとピークは出現しなくなったが(図4)、移動相に対する溶解性は良くないように思われ、ピーク面積値はやや少なくなった(図6)。タンパク質はアルカリ性溶液への溶解性が良いとされ、当初案も最初はpH 11.4の1 mol/L トリス緩衝液で溶解するとしていた。改定に当たってもアルカリ性溶媒で溶解することとし、希釈した後、移動相と同組成になるような条件を検討した。結果、液性の異なるトリス試液を用いて溶解、希釈することにした。当初案で移動相1 LをpH7.4に調整するのに必要な塩酸量は約1.5 mLであったことから、希釈試液にこの量の塩酸を加えた。改定案の調製法により溶媒由来ピークはほとんど検出されなくなり、正確な分子量分布の測定が可能になった。また、移動相の塩酸添加についても、pHを調整から具体的な量を記載することにした。

2014年6月、米国Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panelは、これまでの加水分解コムギ末の感作性に関する各種試験結果をもとに安全性を評価した。分子量10000以上の高分子量ポリペプチドは感作誘導し、3000 Da以下では感作された患者に惹起を起こさないことから、化粧品に用いる加水分解コムギ末は質量平均分子量3500 Da以下であるなら安全と結論した。欧州Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)は同様の文献資料をもとに、加水分解コムギ末の感作性に関して加水分解物のペプチドの最大分子量が3.5 kDaであるとき安全と意見を示した。なお報告書にはこれらの分子量分布や平均分子量を求めるための試験法は示されていない。

規格案は、高分子量のタンパク質等分子をでき

るだけ少なくするよう試験法に基づいた値、10000以下の割合が60%とする案を示してきた。感作性が認められたグルパール19Sの10000以下の分子の比率は6.3%、動物試験で感作性が認められなかったProm及びAGPはそれぞれ97.9%、77.5%と当初規格値を満たした。加水分解コムギたん白液についてはいずれも95%以上であった(表2)。このように、実際の製品は高比率のものが使われており、CIRやSCCSの意見と同等性を保つことが重要であること、より安全側に立つこととして、新たに分子量10000以下の割合が80%とする改定案を示した。その場合AGPは不適合となるが、クロマトグラムからCIRやSCCSの意見に合うかどうか不明であり、この値は妥当と判断した。今回のSEC条件は3000~3500の分子量のものを中心に分析するようになっていないが、Prom等のクロマトグラムでピークトップはチトクロムcより後ろにあり、平均分子量は数千に相当すると思われた。したがって分子量10000以下の分子量の比率を80%とする規格案はCIRやSCCSの求める意見と大きく差はないと考えられる。

以上の結果を基に、加水分解コムギ末規格の分子量分布測定のための試料溶液調製部分を以下のように改定する。

加水分解コムギ末(案201501)

基原

本品は、コムギ *Triticum aestivum* Linné (Gramineae)の種子を加水分解して得られる水溶性成分の乾燥粉末で、80%以上が質量分子量10000以下である。本品は、定量するとき、窒素(N:14.01) 8.0~18.0%を含む。

分子量分布 本品は次の方法により測定するとき、全分子の80%以上が分子量10000以下である。

本品 0.1 g をとり、加水分解コムギ末用 0.02 mol/L トリス試液 5 mL を加えて振り混ぜた後、16時間静置する。これに加水分解コムギ末用酸性 0.02 mol/L トリス・塩化ナトリウム試液 5 mL

を加えて振り混ぜた後、メンブレンフィルター (0.22 μm) でろ過したものを試料溶液とする。別に、チトクロム c 1 mg を移動相 1 mL に溶かし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20 μL ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行うとき、試料溶液において、チトクロム c の保持時間以降に認められるピーク面積は、試料条件の面積測定範囲に認められるピークの合計面積の 80%以上 である。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210 nm）

カラム：内径 10 mm，長さ 30 cm のガラス管に 8~13 μm の液体クロマトグラフィー用高度架橋アガロースーデキストランゲルを充填する。

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相：トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.42 g 及び塩化ナトリウム 11.7 g に水 1000 mL を加えて溶かし、塩酸 1.5 mL を加える。

流量：毎分 0.75 mL

面積測定範囲：試料注入後から 40 分の範囲
システム適合性

システムの性能：アプロチニン，チトクロム c 及びミオキナーゼそれぞれ 0.2 mg を移動相 1 mL に溶かし，システム性能用試料溶液とする。システム性能用試料溶液 20 μL につき，上記の条件で操作するとき，ミオキナーゼ，チトクロム c 及びアプロチニンの順に溶出し，それぞれの分離度は 1.5 以上である。

システムの再現性：標準溶液 20 μL につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，チトクロム c のピーク面積の相対標準偏差は 2.0% 以下である。

新たに設定する試薬、試薬液等

・チトクロム c

分子量マーカーとして用いられるもの。ウマまたはウシ由来タンパク質。分子量約 12000。

・ミオキナーゼ，酵母由来

分子量約 32000。

・アプロチニン，ウシ肺由来

分子量約 6500。

・高度架橋アガロースーデキストランゲル，液体クロマトグラフィー用

液体クロマトグラフィー用に製造したもの。分子量 10000~600000 のタンパク質が分離できるもの。

・0.02 mol/L トリス試液，加水分解コムギ末用

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 1.21 g に水を加えて溶かし，500 mL とする。

・酸性 0.02 mol/L トリス・塩化ナトリウム試液，加水分解コムギ末用

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 1.21 g 及び塩化ナトリウム 11.7 g に水 500 mL を加えて溶かし，塩酸 1.5 mL を加える。

E. 結論

加水分解コムギ末の分子量分布を測定するためのサイズ排除クロマトグラフィーを評価した。本試験はタンパク質専用でなくとも化学物質用 HPLC で実施可能であり、複数機関で妥当性が確認された。試料溶液の溶媒組成がクロマトグラムと分布量分布比率に影響を及ぼす現象が認められたことから、試料溶液の調製法について検討した。改定案を用いて種々の加水分解コムギ末原料を試験した結果、これまでどおり分子量 10000 以下の分子量の比率を定めることによって、アレルギー性に対する安全性が確保されると考えられた。欧米では試験法は不明であるが平均分子量やより低分子量にする意見を示しており、今後これらとの同等性について確認する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

(a) 溶解直後

グルバール19S Prom AGP

(b) 16時間静置、遠心上清

グルバール19S Prom AGP

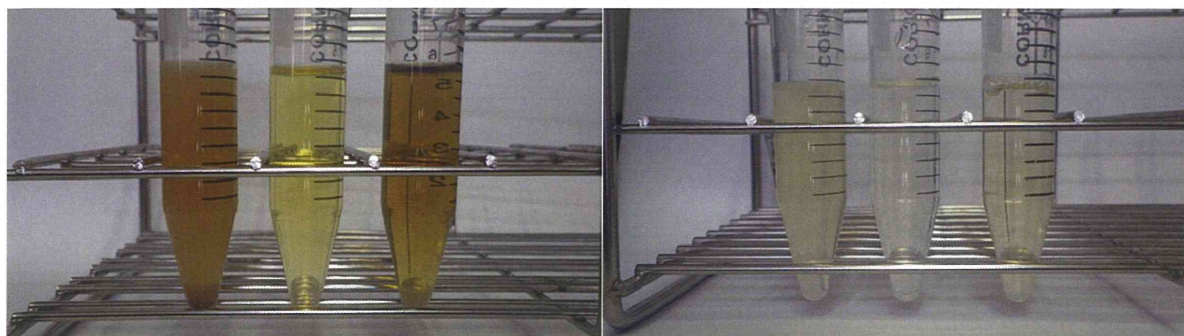


図1. 各種加水分解コムギ末溶解液の状態

(a) トリス緩衝液に溶解 (1 mg/mL), (b) (a)で16時間室温静置した後、3000 rpm で5分間遠心.

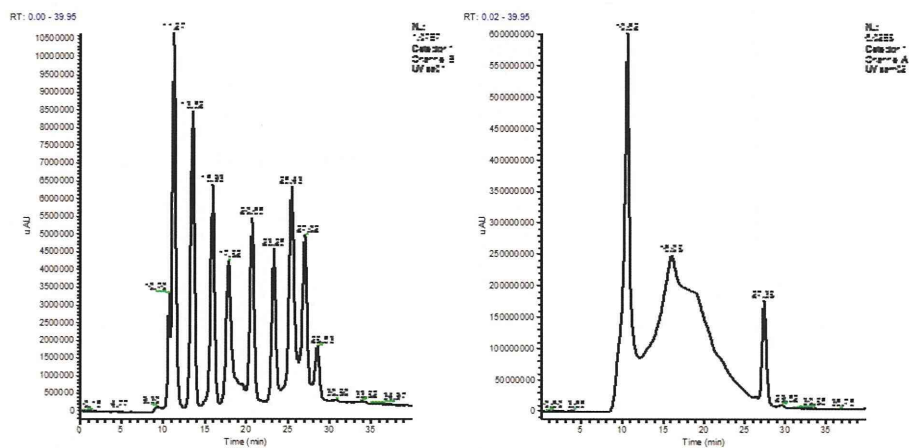


図2. 各種タンパク質標準物質及びグルバール19Sのクロマトグラム

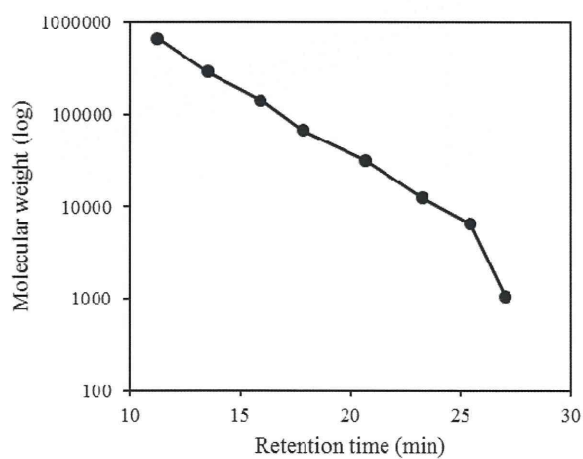


図3. タンパク質分子量と保持時間との関係

表 1. 当初案溶媒で調製した加水分解コムギ末溶液のチトクロムcの保持時間以降に現れるピーク面積の全ピーク面積に対する割合

試料	ピーク面積値 (機関A)		面積% (チトクロムc以降 / 全面積)		
	全面積	チトクロムc以降	機関A	機関B	開発機関
グルパール19S	140572600637	18472470784	13.1	18.6	8.8
Prom	128434057853	127213514226	99.0	98.4	98.8
AGP	148018638414	122062889731	82.5	86.5	95.1

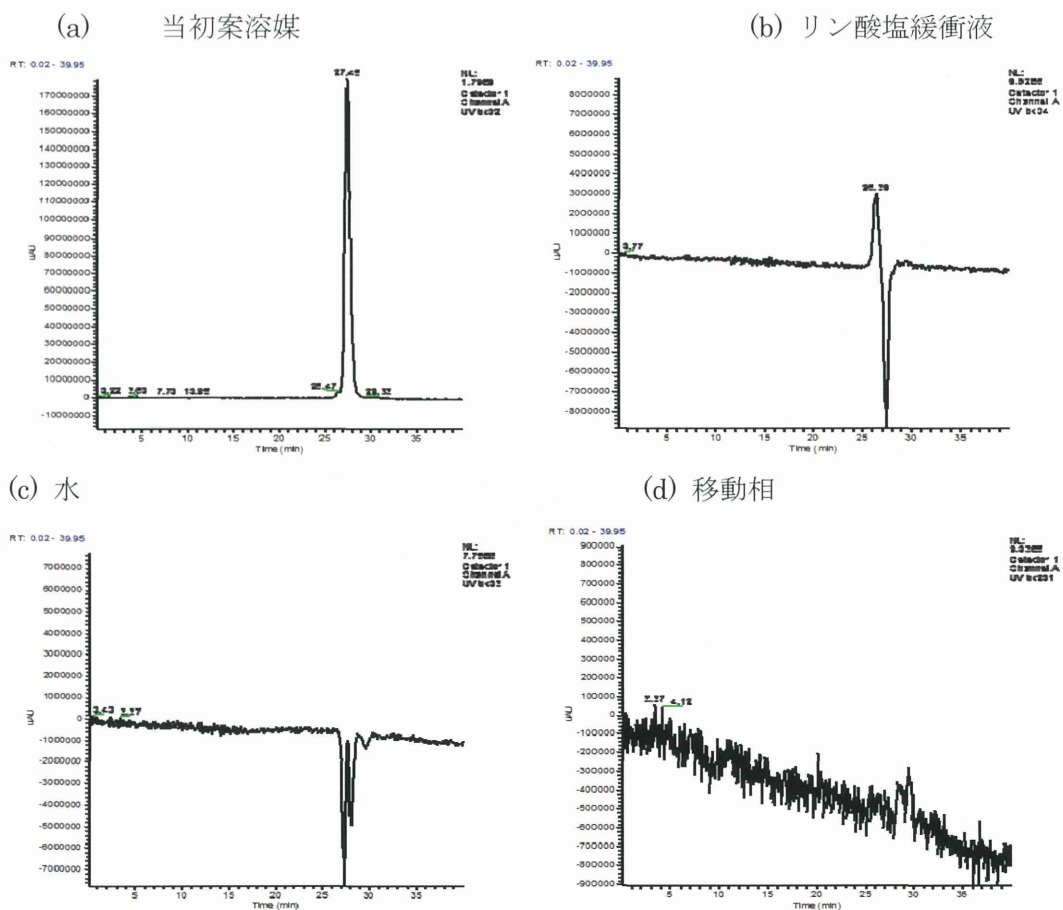


図 4. 各溶媒を注入したときの SEC クロマトグラム