

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

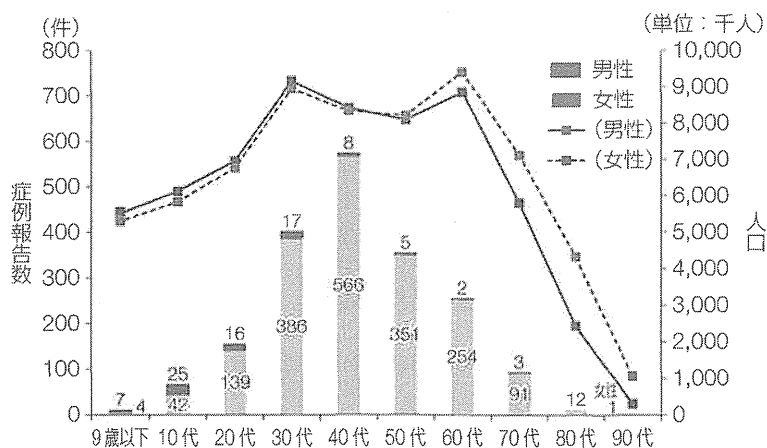


図2 年齢階級・性別の症例数と人口(2013.7.20集計)

※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)。

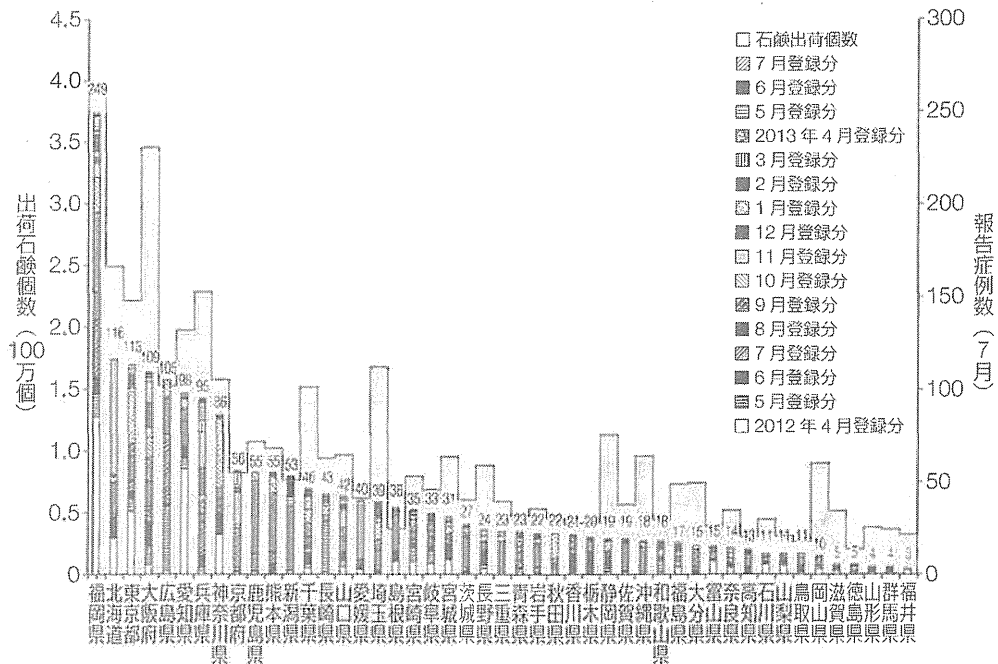


図3 都道府県別報告症例数(2013.7.20集計)

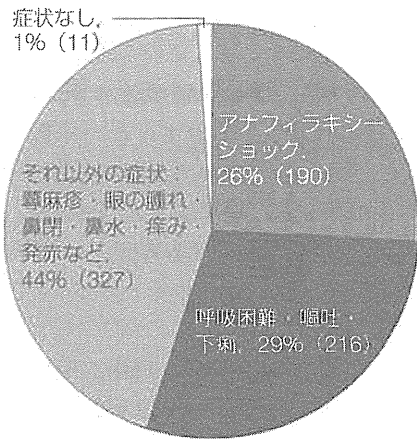


図4 コムギ摂取後の症状

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

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

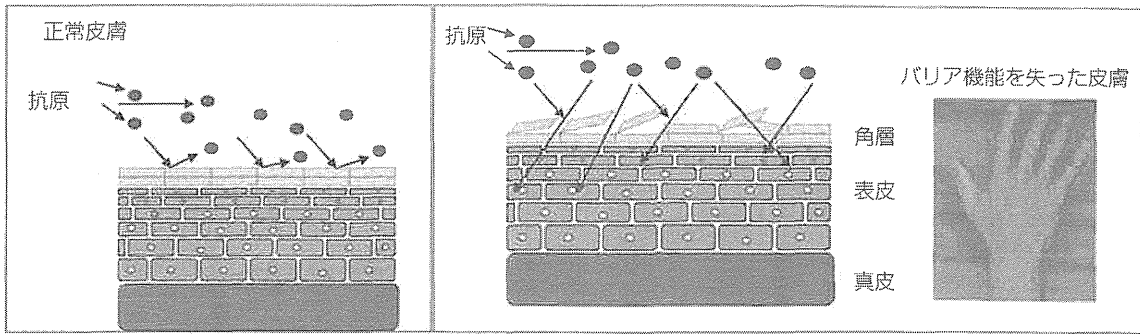
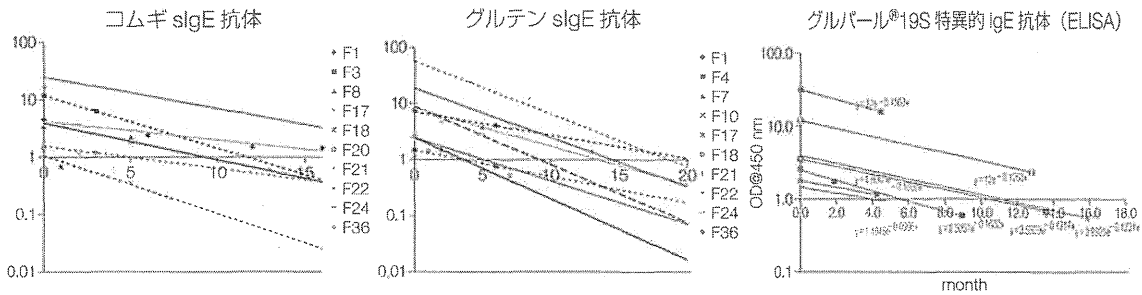


図5 食物アレルギーは経皮感作から起こる

コムギ、グルテン特異 IgE 抗体は減少傾向がみられる



平均半減期は約 5.1 か月

図6 特異 IgE 抗体の経時変化

石鹸の使用を中止することにより、確かに臨床的にも検査値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、コムギ製品を摂食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 100 g 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)茶のしずく石鹸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)茶のしずく石鹸の使用中止から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

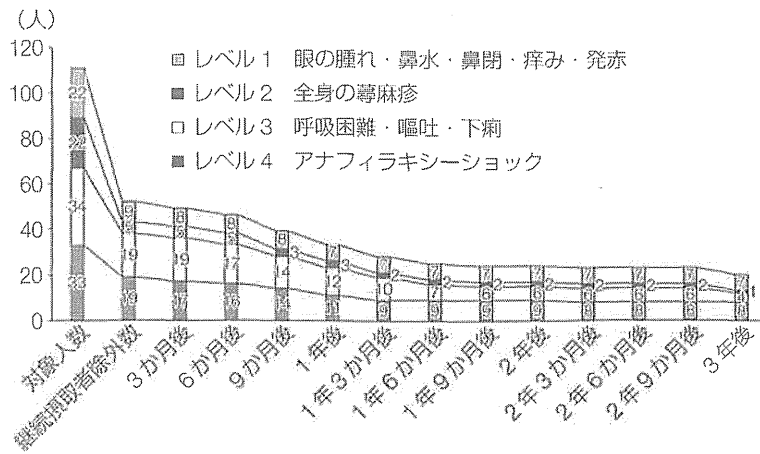


図7 石鹼の使用中止からコムギ摂取再開までの期間
使用中から3年間経過を逾えた111例におけるコムギを摂取していない人数の推移

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⁴⁾。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⁵⁾。

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^{6,7)}、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⁸⁾。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

化粧品に含まれる食物アレルゲン

手島 玲子

Food Allergen in Cosmetics

Reiko Teshima

National Institute of Health Sciences, Division of Foods; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

(Received July 27, 2013)

In Japan, two patients who had been primary sensitized to hydrolyzed wheat protein (HWP) present in facial soap and subsequently experienced wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis (WDEIA) after the ingestion of normal wheat products were reported in 2009 as first cases. Since that report, more than 1900 patients with such an allergy have been reported (through June 20, 2013) from various institutes all around Japan. Importantly, the majority of the patients used the same facial soap (Cha no Shizuku[®]) containing acid-hydrolyzed wheat protein (acid-HWP). The commercial acid-HWP contained in the facial soap (Glupearl 19S[®], average molecular weight of 30–50 kDa) was produced from gluten after partial hydrolysis with hydrogen chloride at 95°C for 40 minutes. In this presentation, I would like to summarize the mechanism of the induction of immediate hypersensitivity by HWP which has been reported by us and other European groups.

Key words—hydrolyzed wheat protein; exercise-induced anaphylaxis; facial soap; food allergen; cosmetics

1. はじめに

いわゆる薬用化粧品として流通している医薬部外品や化粧品（以下「医薬部外品等」という）には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、小麦、米、コラーゲン、果実といった食品由来の成分や、絹由来の成分が使用されている。薬事法上、医薬部外品及び化粧品は、人体に対する作用が緩和なものとされており、その主たる作用のみでなく、使用によって生ずる健康被害についても、人体に対して大きな影響は及ぼさないものと考えられてきていた。

しかしながら、近年、加水分解コムギ (hydrolyzed wheat protein; HWP) を含む医薬部外品（茶のしづく石鹸）等使用者による食物依存性運動誘発性アレルギー等の全身性アレルギーの発症など、重大な健康被害が多数報告されており、保健衛生上の重大な課題となっている。この小麦加水分解物による健康被害については、現在のところ、ある特定

の小麦加水分解物が原因であると考えられている。

本総説では、まず加水分解コムギに注目し、その製造工程の違いによって生じる物性の変化、アレルギー反応の惹起性について、細胞モデル並びに動物モデルを用いる生体反応の解析について概説し、食物タンパク質の経皮等腸管外感作の概要についても概説してみたい。

2. 化粧品等に含まれる加水分解小麦によるアレルギー発症事例の歴史的経緯

化粧品等に使用されていた加水分解コムギ (HWP) による即時型アレルギーを引き起こす最初の事例は、ヨーロッパより報告された。Table 1 に、その歴史的経緯を示すが、2006年にフランス INRA 研究所の Lauriere らにより、加水分解コムギに対する接触蕁麻疹症例の一部で、食物含有加水分解コムギで重篤な経口アレルギーが引き起こされた症例が報告された。³⁾ その後、加水分解コムギを含む食品（保存食、ハム、レバーパテ等）の経口摂取によるアレルギー発症例が数例報告されている。^{9,10)} これらの症例は、通常の小麦は問題なく摂取できるとされている。これらの報告の筆者らはこの病態を immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat pro-

The author declares no conflict of interest.

国立医薬品食品衛生研究所食品部（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1）

e-mail: rteshima@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム S29-103 で発表した内容を中心に記述したものである。

Table 1. Hydrolyzed Wheat Proteins (HWP) Allergy in Europe and Japan

Case report	Reference
(Europe)	
• Contact urticaria from cosmetics containing HWP have been reported from European countries since 2000.	Sanchez-Perez J. <i>et al.</i> , <i>Contact Dermatitis</i> , 42, 360 (2000) ¹⁾
• Severe immediate hypersensitivity to HWP contained in cosmetics was first reported in 2006.	Varjonen E. <i>et al.</i> , <i>Allergy</i> , 55, 294 (2000) ²⁾
(Japan)	
• Immediate hypersensitivity to HWP contained in a soap 'Cha-no-shizuku: Drops of tea' was first reported in 2009.	Lauriere M. <i>et al.</i> , <i>Contact Dermatitis</i> , 54, 283 (2006) ³⁾
• Since then, many cases have been reported.	Fukutomi Y. <i>et al.</i> , <i>Jpn. J. Allergol.</i> , 58, 1325 (2009) ⁴⁾
	Sugiura M. <i>et al.</i> , <i>Jpn. J. Dermatol.</i> , 120, 675 (2010) ⁵⁾
	Chinuki Y. <i>et al.</i> , <i>Jpn. J. Dermatol.</i> , 120, 2421 (2010) ⁶⁾
	Chinuki Y. <i>et al.</i> , <i>Contact Dermatitis</i> , 65, 55 (2011) ⁷⁾
	Fukutomi Y. <i>et al.</i> , <i>J. Allergy Clin. Immunol.</i> , 127, 531 (2011) ⁸⁾

tein (IHHP) と称している。一方、日本における初めての発症事例は、Table 1にも示すが、2009年にアレルギー学会で報告された2事例⁴⁾である。いずれもHWPを含有する悠香(福岡)の茶のしずく石鹸(以下「(旧)茶のしずく石鹸」と表記)を約2年間使用し、皮膚のかゆみを経験していた患者で、パンを食した後に、食物依存性運動誘発アナフィラキシー(wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis; WDEIA)を発症した事例で、1名はテニスをしていて15分後に目のかゆみが始まり、続いて顔面の発赤・膨張、全身の発赤・膨張、その後の血圧低下、腹痛等、アナフィラキシーを発症し、もう1名は、自転車に乗ったところ、5、6分後に、手のかゆみが始まり、続いて鼻づまり、全身の発赤・膨張・腹痛等、アナフィラキシーを発症している。その後も、多くの類似症例が報告されたため、2010年10月15日に、厚生労働省より、「加水分解小麦末を含有する医薬部外品・化粧品の使用上の注意事項について」という注意喚起が出された。それは、1.加水分解小麦末を含有する医薬部外品・化粧品については、「小麦成分が含まれていること」、「使用中に異常があった場合は利用を控えること」、「容器又は外箱に記載すること」、2.製品の使用者で全身性アレルギーを発症した症例が報告された場合には、製造販売業者は医薬品医療機器総合機構に速やかに報告するとともに、情報収集と報告を行うこと。その際、製品に「眼、鼻等の粘膜への使用を避けるとともに、異常があらわれた場合は速やかに医師に相談すること」という注意事項を記載するこ

と、という内容であった。その後も症例数が増えたため、2011年5月20日に悠香が小麦加水分解物含有石鹸「(旧)茶のしずく石鹸」(2010年12月7日以前の販売分)の自主回収を行うことが厚生労働省から報道関係者へ発表された。また日本アレルギー学会でも2011年7月に特別委員会「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」が設置され、情報収集と分析、原因の解明研究、予後の調査などが行われることとなり、情報収集と分析については、厚生労働科学研究費「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」(H24-医薬-指定-014)の中で現在も継続的に行われている。具体的には、2012年3月に「茶のしずく石鹸等による小麦アレルギー情報サイト」(http://www.jsaweb.jp/modules/news_topics/index.php?page=article&storyid=114)を日本アレルギー学会のホームページ内に立ち上げ、医師による登録による症例の把握を開始し、3年間1月毎の報告を継続して行っている。

3. アレルギー発症患者数に関する状況の把握並びに事後の経過観察について

2013年6月20日現在、上述の「茶のしずく石鹸等による小麦アレルギー情報サイト」に寄せられている医師からの登録による情報は1923件で、内訳は、女性1840例(95.7%)、男性83例(4.3%)で、年齢は1才男児から93才女性まで、幅広く広がり、40代にピークがあった。また、都道府県別では、第1位福岡県248例、第2位北海道116例、第3位東京都111例、第4位大阪府109例、第5位広島県

105例となっている。なお、まだ登録が済んでいない症例もあると思われるが、月別登録数は、2012年8月をピークに減少しており、特に2013年5月以降の月別症例登録数は50症例を下回っており、既に大部分の症例は登録されているものと思われる。なお、悠香から厚労省に報告されている顧客からの診断書などにより得られた2011年5月20日-2013年4月19日の間の症例数は2851件〔特別委員会診断基準(2011.10.11作成)による確実例1435件〕となっている。

また、2012年5月10日までに上記「情報サイト」に寄せられた患者問診票254例の統計結果から、石鹼を使用開始した年は、2004年に3例、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例となっている。石鹼を使用中止した年としては、症例の多くは、2010年及び2011年となっている。症状が発症した年は、2005年に1例、2006年に6例、2007年8例、2008年36例、2009年52例、2010年73例となっている。厚労省の通達後の2011年に発症した症例も58例、2012年に2例認められている。一人あたり使用した石鹼の数は、平均15.6個であり、一日の使用回数は、平均1.7回であった。なお、(旧)茶のしずく石鹼小麦アレルギーは、通常型の運動誘発性小麦アレルギー〔Conventional-WDEIA (CO-WDEIA)〕とは違う次のような5点の特徴を有している。すなわち、1) 茶のしずく石鹼の使用が小麦アレルギー症状発症に先行する、2) 圧倒的に女性に多い；男女比は約1：19で、年齢では20代から60代に多く、40代にピークがあった。美白効果という口コミにより、女性が薬用石鹼として洗顔に使用していたことに起因すると思われる、3) 小麦摂取後のアナフィラキシーの初期症状として、ほぼ全例で、眼瞼浮腫、顔面の膨疹、痒み、鼻水などの症状を呈する。通常型のWDEIAでは、全身の痒みと膨疹を発症するのに比べて、大きな特徴を持っている。4) 運動依存性が通常型と比べて低い；通常型のWDEIAでは、相当量の運動負荷をかけなければ症状はあらわれないが、(旧)茶のしずく石鹼小麦アレルギーの症状は買い物や家事などの軽度の運動で生じたり、明らかな運動負荷がなくとも症状が誘発されることがある、5) 通常型のWDEIAでは、小麦成分

の中の ω -5グリアジンに対するIgE抗体陽性の患者が8割程度であるが、(旧)茶のしずく石鹼小麦アレルギー患者では、その割合は、10%程度と極めて低い、の5点である。

4. 小麦加水分解物の物性、アレルギー反応の感作性及び惹起性に関する研究について

多くのアレルギー症状を引き起こした悠香の(旧)茶のしずく石鹼に含まれていた加水分解小麦であるグルパール19Sは、酸性条件下(pH 0.5-1.2)、高温(95°C)で40分間部分加水分解したものであった。小麦のグルテン(gluten)とグルパール(glupearl)19Sの構成タンパク質をSDS電気泳動で分子量で分離し、タンパク染色を行うと、グルテンの場合、分子量15-60 kDaにかけて、分子量の特定できる複数のタンパク質が帯状に染まるのが観察されるが、グルパール19Sの場合、30-50 kDaにかけて、タンパク質がスミア状に染まるのが、特徴的であった。(旧)茶のしずく石鹼小麦アレルギー患者は、グルパール19Sに対する即時型アレルギー反応を引き起こすため、血清中には、グルパール19S特異的IgE抗体が存在するが、特異的IgE抗体の存在は、ドットブロット法等で確認することができる。^{8,11)}また、グルパール19Sを電気泳動後、ウェスタンブロットを行い、患者のIgE抗体を反応させることによって、グルパール19S中のIgE抗体と反応するタンパク質を特定することができるが、比較的高分子のタンパク質(30-50 kDa)に結合すること、このグルパール19S中のIgE結合タンパク質は、未分解グルテン中のIgE結合タンパク質とは分子量のうえでもいくぶん異なることが、相模原病院の福富らの論文⁸⁾でも示されている。これは、酸部分加水分解によって、タンパク質の低分子化が引き起こされる一方で、一部のペプチドにおいて凝集体ができて、この凝集体がエピトープの密度が高いために、感作性、惹起能ともに高いと考えることができる。同じような報告はフランスのLauriereらやBouchez-Mahioutらのグループからもされている。^{10,12)}これらのグループが抗原性の解析に用いているヒト患者血清は、化粧品等に含まれるHWPで感作されてWDEIAを発症した患者由来のもので、これらの患者は、経皮又は経眼による感作ルートの可能性が最も高いと考えられている。

われわれは、より抗原性の低い食物タンパク質由

来成分が化粧品、並びに医薬部外品の原料となるような加工方法、濃度、使用方法の提唱を大きな目的とし、研究を行っているが、動物及び細胞モデルを用いた加水分解小麦の感作性並びに惹起能に関する研究の一端を紹介したい。動物実験では、グルパール 19S と未分解のグルテンとの感作性の違いを、マウスを用いた経皮感作試験で比較を行い、¹³⁾ 細胞モデルを用いた研究では、われわれが独自に開発したヒト型マスト細胞を用いる *in vitro* 惹起試験 (IgE crosslinking-induced luciferase expression method; EXiLE 法) により、グルパール 19S とグルテン、及び酸加水分解が進んだグルテンの惹起能について検討を行った。¹¹⁾ 前者の動物の経皮感作の研究では、小麦由来タンパク質をマウス背部皮膚に、3 日/週で、3-4 週間、界面活性剤とともに貼付することによって、抗原特異的 IgE 抗体が産生されること、すなわち、Th2 型の免疫反応が起きていること、グルパール 19S の方がグルテンより、感作に引き続く全身性のアナフィラキシーを起こし易い性質を有していることを観察している。¹³⁾ 後者の細胞を用いた研究では、グルテンを 0.1 N 塩酸中、100 °C で、処理時間を種々変えて加水分解を行い、継続的な抗原性の変化を検討し、0.5-1 時間で惹起能が上昇することを観察した。¹¹⁾ 現在、酸加水分解以外の加水分解処理を行ったグルテンの感作性、また、界面活性剤の感作性への影響についても更なる解析を行っている。

ついで、(旧) 茶のしずく石鹼小麦アレルギー発症のメカニズム、特にグルパール 19S の抗原決定基 (エピトープ) についての現時点での知見を以下に示す。まだ詳細は明らかになっていないが、従来の小麦タンパク質に存在する抗原決定基 (例えば、HWP を腹腔内感作を行ったマウスの血清中の IgE 抗体が、未処理の γ -グリアジンと反応することが示されている)¹⁴⁾ に加えて、酸分解により新たな抗原決定基が出現した可能性 (例えば、 γ -又は ω -2 グリアジンの共通のエピトープである QPQQPFPPQ 中のグルタミンが酸処理によって脱アミド化し、グルタミン酸になった QPEEPFPE に強い IgE 結合活性があることが示されている)¹⁵⁾ が考えられる。したがって、HWP 患者の IgE 抗体のエピトープは、通常型の WDEIA では、主要なアレルゲンと報告されている ω -5 グリアジンとは、違うタンパク質

に存在すると考えられる。なお、現在までに、疫学研究の結果とも合わせて、(旧) 茶のしずく石鹼に関しては、アレルギーを新たに発症させるリスクがあると判断できるが、他の石鹼に関しても、(旧) 茶のしずく石鹼に使われていたのと同じグルパール 19S という加水分解小麦を用いた石鹼の場合に症例が観察されている。これらは、既に (旧) 茶のしずく石鹼と同様、回収が行われており、他の加水分解小麦を用いた石鹼での全身性のアレルギー症例は観察されていないので、グルパール 19S 以外の加水分解小麦については現時点では、リスクはほとんどないと判断できると思われる。なおわれわれは、グルテンの脱アミド化と抗原性の変化に関しても現在検討中であるが、HWP 患者 IgE 抗体は、未処理グルテンやその消化断片にはほとんど応答しなかったが、tissue transglutaminase (tTG) で処理したグルテンは、処理後 30 分で顕著な EXiLE 応答を誘導した。人工胃液や腸液による消化断片についても tTG 処理は IgE 応答性を増加させた。しかし、小児の CO-WDEIIA 患者由来の IgE 抗体との反応性は処理前後でほとんど変化がなかった。ウェスタンブロットによると、HWP 患者 IgE 抗体は tTG 処理グルテンに対し高分子量のスミアな結合パターンを示し、グルテンの脱アミド化が示唆された。抗原結合ビーズを用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 抑制試験の結果も HWP 患者 IgE 抗体とグルパール 19S の結合性が、tTG 処理グルテンにより抑制されることより、グルパール 19S と tTG 処理グルテンとの交差反応性が支持された。本結果は、経口摂取した小麦グルテンが小腸吸収後に tTG により脱アミド化されることでグルパール 19S と交差反応するエピトープを生じる可能性を示唆している。グルパール 19S 特異的 IgE 抗体が高値の HWP 患者は、たとえ石鹼使用の中断によりグルテン特異的 IgE 量が減少しても、依然として小麦の摂食には十分な注意を要することを意味するものと思われる。なお、同様の研究として、グルテンの tTG 処理により、 ω -5 グリアジンに対してアレルギー反応を有する CO-WDEIA の患者において、 ω -5 グリアジンの抗原性が上昇するとの報告は、Palosuo らのグループによりなされている。¹⁶⁾

5. 動物モデルを用いる食物タンパク質の経皮感作の事例報告について

食物等の経口摂取による免疫応答においては、gut-associated lymphoid tissue (GALT) に、外来物質が捕えられ、ここで、感作の成立が決定するが、一方で、経口感作では、通常、腸内常在菌叢や食物抗原などの「無害」と考えられる抗原に対する全身性、局所性の過度の炎症反応を抑える経口免疫寛容が存在する。経口感作は、免疫寛容とのバランスにおいて成立するものである。したがって、動物（通常マウスを用いることが多い）での経口感作を成立させるためには、コレラトキシン等のアジュバントを必要とする場合が多いが、経皮感作においては、アジュバントを必要としないで感作の引き起こされる例が数例報告されている。以下、具体的な例を2例紹介する。

一例目は、ヘーゼルナッツより抽出したタンパク質の例であるが、BALB/c マウスの背中にタンパク質を3日塗布し、その4日後に再度塗布を開始し6週間続けて経皮感作を行い、その後アレルゲンを経口的に投与し、アナフィラキシーが惹起された例である。¹⁷⁾ この例では、経口投与による感作により、抗原特異的 IgE 抗体産生がみられること、感作動物の脾細胞の *in vitro* での抗原再感作により Th2 型のサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) の産生、転写因子 GATA3 の発現の上昇がみられることより、Th2 型のリンパ球の活性化の起きていることが示されている。二例目は、ピーナッツより抽出したタンパク質の例であるが、ヘーゼルナッツタンパク質の場合と同様の経皮感作研究を行った結果、^{18,19)} IL-4 産生及び抗原特異的 IgE 抗体の上昇が観察されている。これら研究においては、マウスの背部の毛を剃った後に、テープストリッピングで角質のバリア傷害を起こさせた後、タンパク質の塗布を行っているが、久保ら²⁰⁾の報告にあるように、角質バリア傷害により、真皮層表面のタイトジャンクション部で樹状突起を伸ばした抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞にとらえられるか、ケラチノサイトに情報が提供されることにより、Th2 型のリンパ球の活性化が優位に行われているものと思われる。

6. 成人における食物タンパク質の経皮等腸管外感作の事例報告について

成人では花粉など環境アレルゲンへの曝露と感作

が、食物アレルギー発症の原因になっていることはよく知られている。²¹⁾ 経皮経粘膜感作ルートにより発症する成人の経口食物アレルギーの具体例を以下に示す。最も多い症例は、pollen-food allergy syndrome (PFAS) で、これまでよく研究されてきた病態として、カバノキ科花粉症患者におけるバラ科果物を中心とする果物野菜アレルギーが知られている。この病態は、カバノキ科花粉の主要アレルゲンである pathogenesis-related protein 10 (PR10) [植物生体防御タンパク質の1つ (Bet v 1 など)] に経気道的・粘膜的に感作され、それと交差抗原性の高い PR-10 を含有した果物野菜摂取時に、特に口腔、咽喉頭に限局する接触性蕁麻疹 [口腔アレルギー症候群 (oral allergy syndrome; OAS)] を特徴とする即時型アレルギー症状をきたす病態である。そのほか、交差反応性を原因とする症例として、Mugwort-food-spice allergy syndrome, Latex-fruit allergy syndrome (ラテックフルーツ症候群) などの病態も経皮経粘膜的なアレルゲン感作が原因となり発症した経口食物アレルギーの一例である。また、そば殻の枕の使用による経気道感作に関係して発症する経口ソバアレルギーや、ダニのトロポミオシンと甲殻類のそれとの交差反応性も知られている。また、モモの lipid transfer protein (LTP) に対する感作も一部の症例では、モモの皮に存在する LTP に対する接触性感作により引き起こされているという報告もある。²²⁾

このように数多くの病態が、腸管外感作をきっかけにして食物アレルギーを発症しており、成人における腸管外感作が成人の経口食物アレルギーの発症において重大な役割を担っているものと考えられている。

7. おわりに

(旧) 茶のしずく石鹼によるアレルギー症例は、(旧) 茶のしずく石鹼の使用の中止により、経口小麦アレルギーの病態が改善に向かう症例が多いことがわかってきており、この知見は、発症原因の明確な認識と、原因抗原曝露のコントロールにより、食物アレルギーの予後が改善できる可能性があることが示されたものである。経皮経粘膜的な食物アレルゲンへの曝露により食物アレルギーを発症する病態・症例は、(旧) 茶のしずくアレルギー以外でも少なからず存在する。したがって、食物アレルギー

が環境アレルゲンへの曝露・感作の結果として発症するという意識を、もし食物アレルギーを発症した患者で、食物アレルゲン環境曝露の可能性があれば、曝露に対する予防策を講じることの重要性、経皮経粘膜的な食物アレルゲン環境曝露が引き起こされ得るかを動物実験で確かめることの重要性、また、食物アレルゲンの物理的処理に伴う感作性の変化を調べることの重要性が、今回の事例で示されたものとする。なお、小麦タンパク質は、グルタミンを分子内に多く含むという特徴があり、タンパク質の物理的処理に伴う感作性の変化を考慮するうえで、それぞれのタンパク質を構成するアミノ酸についても考慮することも重要であるものと思われる。

また、近年の天然素材ブームによる天然物由来成分の化粧品・ヘアケア製品への添加が、成人の食物アレルギーの有病率の増加に関与している可能性が危惧されるため、今後も食物アレルゲンとして知られているタンパク質、またその加水分解物の化粧品等への使用に関しては十分な注意を払う必要があると思われる。

謝辞 この総説に記載した研究は、厚生労働科学研究補助金で行っています。

REFERENCES

- 1) Sanchez-Perez J., Sanz T., Garcia-Diez A., *Contact Dermatitis*, **42**, 360 (2000).
- 2) Varjonen E., Petman L., Mäkinen-Kiljunen S., *Allergy*, **55**, 294-296 (2000).
- 3) Lauriere M., Pecquet C., Bouchez-Mahiout I., Snegaroff J., Bayrou O., Raison-Peyron N., Vigan M., *Contact Dermatitis*, **54**, 283-289 (2006).
- 4) Fukutomi Y., Taniguchi M., Tatsuno K., Tanimoto E., Sekiya K., Saito A., Yasueda H., Nakazawa T., Hasegawa M., Akiyama K., *Jpn. J. Allergol.*, **58**, 1325 (2009).
- 5) Sugiura M., Sugiura K., *Jpn. J. Dermatol.*, **120**, 675 (2010).
- 6) Chinuki Y., Sakieda K., Kaneko S., Nakamura C., Murata S., Sumikawa Y., Niihara H., Yoshida Y., Tohgi K., Morita E., *Jpn. J. Dermatol.*, **120**, 2421-2425 (2010).
- 7) Chinuki Y., Kaneko S., Sakieda K., Murata S., Yoshida Y., Morita E., *Contact Dermatitis*, **65**, 55-57 (2011).
- 8) Fukutomi Y., Itagaki Y., Taniguchi M., Saito A., Yasueda H., Nakazawa T., Hasegawa M., Nakamura H., Akiyama K., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 531-533 (2011).
- 9) Snegaroff J., Bouchez-Mahiout I., Pecquet C., Branlard G., Lauriere M., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **139**, 201-208 (2006).
- 10) Lauriere M., Pecquet C., Boulenc E., Bouchez-Mahiout I., Snegaroff J., Raison-Peyron N., Vigan M., Branlard G., *Allergy*, **62**, 890-896 (2007).
- 11) Nakamura R., Nakamura R., Adachi R., Itagaki Y., Fukutomi Y., Teshima R., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **160**, 259-264 (2013).
- 12) Bouchez-Mahiout I., Pecquet C., Kerre S., Snegaroff J., Raison-Peyron N., Lauriere M., *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4207-4215 (2010).
- 13) Adachi R., Nakamura R., Sakai S., Fukutomi Y., Teshima R., *Allergy*, **67**, 1392-1399 (2012).
- 14) Denery-Papini S., Bodinier M., Larré C., Brossard C., Pineau F., Triballeau S., Pietri M., Battais F., Mothes T., Paty E., Moneret-Vautrin D. A., *Allergy*, **67**, 1023-1032 (2012).
- 15) Gourbeyre P., Denery-Papini S., Larré C., Gaudin J. C., Brossard C., Bodinier M., *Mol. Nutr. Food Res.*, **56**, 336-344 (2012).
- 16) Palosuo K., Varjonen E., Nurkkala J., Kalkkinen N., Harvima R., Reunala T., Alenius H., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**, 1386-1392 (2003).
- 17) Birmingham N. P., Parvataneni S., Hassan H. M., Harkema J., Samineni S., Navuluri L., Kelly C. J., Gangur V., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **144**, 203-210 (2007).
- 18) Strid J., Hourihane J., Kimber I., Callard R., Strobel S., *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 757-766 (2005).
- 19) Strid J., Callard R., Strobel S., *Immunology*, **119**, 27-35 (2006).
- 20) Kubo A., Nagao K., Amagai M., *J. Clin. Invest.*, **122**, 440-447 (2012).
- 21) Asero R., Antonicelli L., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **154**, 6-14 (2011).
- 22) Asero R., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **154**, 345-348 (2011).

特集II

グルパール19Sによる皮膚感作コムギアレルギー

抗原性を有する加水分解コムギの分子プロファイリング*

酒井信夫** 安達玲子**
 中村亮介** 菊地博之**
 渡邊敬浩** 佐々木和実***
 西嶋桂子*** 安宅花子***
 最上(西巻)知子** 手島玲子**

Key Words : hydrolyzed wheat protein (HWP), food allergy (FA), molecular profile

はじめに

特定の洗顔石鹸に含まれる加水分解コムギ (hydrolyzed wheat protein ; HWP) であるグルパール19S (Glp19S) による即時型アレルギーの症例は、第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2009年10月) においてはじめて報告された¹⁾。現在、日本アレルギー学会の「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」を中心として、HWPによるアレルギーの情報収集と分析、原因の解明研究、予後の調査が行われており、これまでに患者数として通算2,169人の確実事例が報告されている (2014年8月20日現在)²⁾。また、厚生労働省では、HWPによるアレルギー発症事故を受け、平成22年10月15日付医薬品食品局 安全対策課長/審査管理課長通知により、加水分解コムギ末を含有する医薬部外品および化粧品の使用に関して注意喚起を行っている³⁾。

HWPは、医薬部外品原料規格2006には「加水分解コムギ末」として収載され、「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

ある。本品を定量するとき、窒素 (N : 14.01) 8.0~18.0% を含む。」と定義され、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分、定量法が規定されている⁴⁾。HWPによるアレルギーの原因物質である Glp19S は、製造業者による品質管理上、医薬部外品原料規格の各基準に適合していたが、現在は市場に流通していない。著者らは、医薬部外品原料の安全性確保を目的とし、分解条件の異なる酸加水分解コムギ (acid-HWPs) を調製し、それらの分子プロファイルおよび経皮感作性を、同じく酸加水分解処理により調製されたことの報告されている Glp19S と比較したので概説する。

acid-HWPsの分子プロファイリング

コムギグルテンを 100 mg/ml の濃度で 1 M トリス緩衝液に懸濁させ、室温下で終夜静置し、ストック懸濁液を調製した。このストック懸濁液に 0.1N 塩酸を加え 100℃ で加熱し、酸加水分解した。酸加水分解反応は経時的 (0~24h) に中和によって停止させ、酸加水分解時間の異なる終濃度 10 mg/ml の acid-HWP 8 試料 (0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24h-acid-HWP) を調製した。これら acid-HWPs の SDS-PAGE 後のタンパク質の CBB 染色像を図 1 に示すが、酸加水分解の進行に伴う低分子化が確認され、0.5h-acid-HWP は、Glp19S

* Molecular profile analysis of allergenic hydrolyzed wheat protein.

** Shinobu SAKAI, Ph.D., Reiko ADACHI, Ph.D., Ryosuke NAKAMURA, Ph.D., Hiroyuki KIKUCHI, Ph.D., Takahiro WATANABE, Ph.D., Tomoko NISHIMAKI-MOGAMI, Ph.D. & Reiko TESHIMA, Ph.D.: 国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1) ; National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, JAPAN

*** Kazumi SASAKI, Keiko NISHIJIMA & Hanako ATAKU : 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター

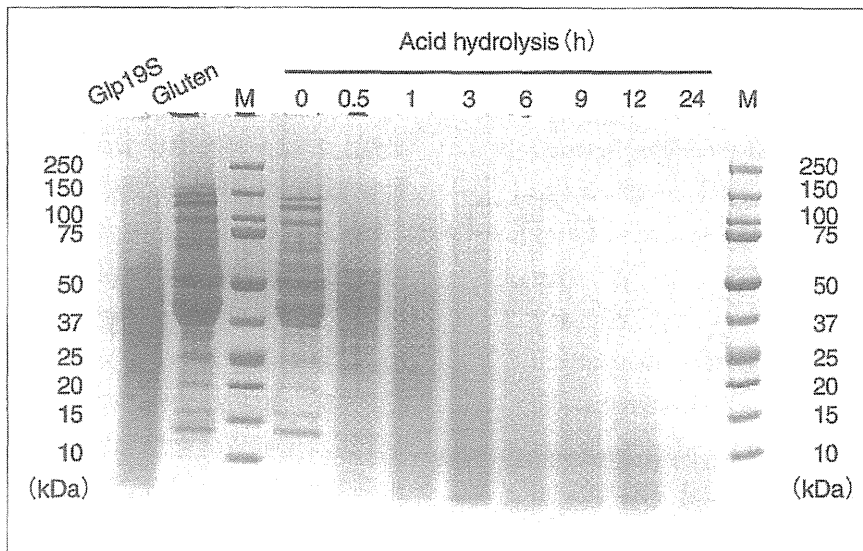


図1 酸加水分解コムギのSDS-PAGE後のタンパク質染色像
 Glp19Sは、40~70 kDaを中心とするスミアなバンドを示した。また、acid-HWPsの分子量は加水分解の進行に伴って低分子側にシフトし、0.5h-acid-HWPはGlp19Sと同様の泳動パターンを示した。(M：分子量マーカー)

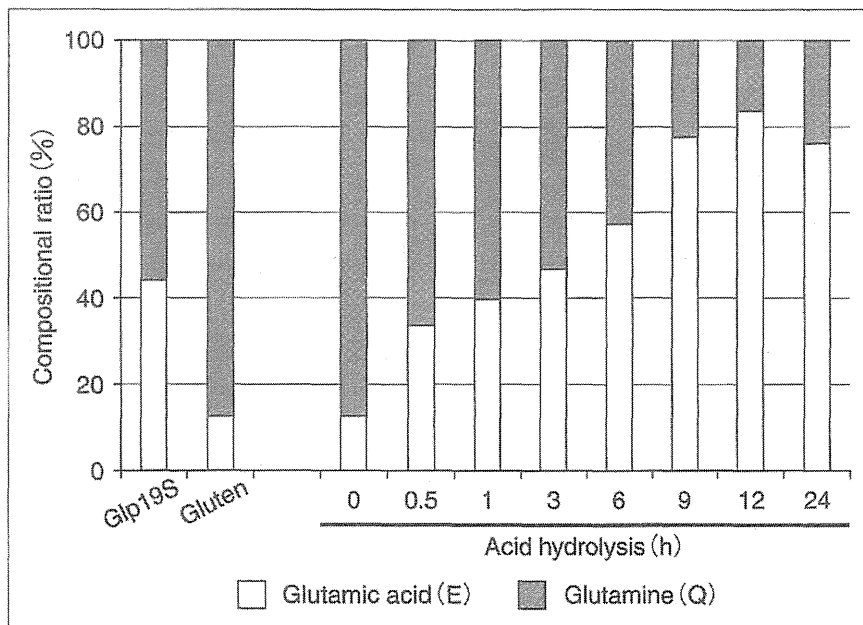


図2 蛍光プレラベル化HPLC法を用いた酸加水分解コムギのグルタミンおよびグルタミン酸の組成分析
 蛍光プレラベル化HPLC法により、分子中に含まれるグルタミン(Q)とグルタミン酸(E)の組成比を定量した。グルテン(Gluten)に含まれるグルタミン酸の組成比は12.8%であったのに対し、Glp19Sでは44.3%であった。

と同様の40~70 kDaを中心とするスミアなバンドを示した。また、サイズ排除クロマトグラフィーにより各acid-HWPの分子量分布を測定した結果、0.5h-acid-HWPとGlp19Sの溶出パターンは、SDS-PAGEの結果と同様の類似性を示した。さらに、分子量既知の標準品との比較から、各acid-

HWPの分子量分布を測定したところ、酸加水分解6h後には主要な分解物の分子量が約10 kDaを下回ることが明らかになった。

他方、これまでの国内外におけるHWPの研究により、グルテン分子中のグルタミン残基の脱アミド化が抗原性の増強に大きく寄与していること

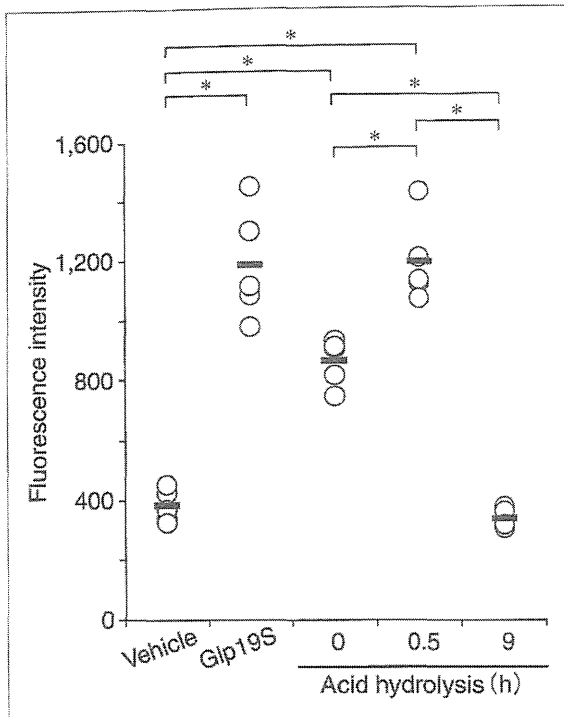


図3 酸加水分解コムギの経皮感作による抗原特異的IgE抗体産生

Glp19Sおよび0h-/0.5h-/9h-acid-HWPの4回目の経皮感作後のマウス血清中の抗原特異的IgE抗体をELISA法により測定した結果を示す。○はマウス各個体の測定値、バーは各群の平均値を示す。* $P < 0.01$ by Tukey's test.

が明らかになっている^{5)~8)}。そこで、ホフマン転位(カルボン酸アミドの脱炭酸反応)を応用した蛍光プレラベル化HPLC法⁹⁾により、グルテン、Glp19S、および調製したacid-HWPs中のグルタミンおよびグルタミン酸量を分析し、組成比を算出した。その結果、グルタミン酸の組成比は、Glp19Sの原料であるグルテンでは12.8%であったのに対し、Glp19Sでは44.3%と増加していた。このことから、Glp19Sの製造過程における酸加水分解によってグルテン分子中のグルタミン残基の脱アミド化が生じていることが確認された。また、調製したacid-HWPsに関しては、酸加水分解の進行に伴って経時的に脱アミド化が進行し、酸加水分解9h後にグルタミン酸の組成比は77.6%となり、この時点でほぼプラトーに達することが確認された(図2)。脱アミド化した酸加水分解物の分子プロファイリングは、LC-MS/MSを用いた定量的プロテオーム解析によっても実施したが、両者の結果はよく一致した(データ示さず)。

Acid-HWPsの経皮感作性試験

アレルギー性タンパク質の経皮感作性の評価法に関しては、食物アレルギータンパク質を用いた動物実験がこれまでに報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。著者らは、医薬部外品・化粧品の原料として使用される食物タンパク質由来成分の抗原性が低減される加工方法、濃度、使用方法の提唱を大きな目的とし、実験動物を用いた経皮感作性の評価系を構築した¹²⁾¹³⁾。Balb/cマウスの背部を剃毛し、セロハンテープで角質層を剥離した後、皮膚アレルギーテスト用閉塞パッチを用いて、0.5%ラウリル硫酸ナトリウムを含む抗原溶液50 μ l(感作抗原の溶質量として500 μ g)をマウス皮膚に貼付した。抗原溶液を3日間連続貼付した後、4日間休止するというサイクルを4回繰り返して経皮感作を行い、血清中抗原特異的抗体産生によりGlp19SおよびHWPの経皮感作性を評価した。調製したacid-HWPsに関しては、0h-/0.5h-/9h-acid-HWPを抗原として動物実験に供した。図3には、4回目の経皮感作後に採血した血清中抗原特異的immunoglobulin (Ig)E抗体産生量を、各感作抗原を固相化したenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)の結果(蛍光強度)として示す。得られた測定結果をTukey法により検定した結果、Glp19S経皮感作群のIgEレベルは陰性コントロール(Vehicle群)と比較して有意であった。また、0.5h-acid-HWP経皮感作群の血清中抗原特異的IgEレベルは、Glp19S群と同様に、陰性コントロールと比較して有意であった。一方、9h-acid-HWP経皮感作群において、抗原特異的IgE抗体産生は認められなかった。経皮感作成立後に、感作に用いた抗原の腹腔投与による能動的全身性アナフィラキシー試験を行った。アナフィラキシー誘導後の体温低下の平均値は、Glp19S経皮感作群が3.8°Cであったのに対し、0.5h-acid-HWP経皮感作群では3.3°Cであった。他方、加水分解がさらに進行し、IgE抗体産生が認められなかった9h-acid-HWP経皮感作群においては、顕著な体温低下は認められず、アナフィラキシーは惹起されなかった(データ示さず)。

おわりに

著者らは、グルテンの経時的酸加水分解物(acid-

HWPs)を調製し、それらの分子プロファイリングおよび経皮感作性について検討した。0.5h-acid HWPは、Glp19Sに類似した分子プロファイルを示し、Glp19Sと同等の経皮感作性を示すことが明らかになった。一方、より加水分解が進行し、低分子化された9h-acid-HWPでは、経皮感作性は認められなかった。これらの結果より、HWPにおいては加水分解の程度がその抗原性に影響を及ぼし、分子量分布が安全性評価の指標の一つとなりうることが示唆された。現在、国立医薬品食品衛生研究所および医薬品医療機器総合機構では、同様な事例の再発防止に向け、「加水分解コムギ末」の医薬部外品原料規格の修正案を準備し、レギュラトリーサイエンスに立脚した公衆衛生上の安全性確保のための対応を推進している。

文 献

- 1) 福富友馬, 谷口正実, 龍野清香, ほか. 洗顔石鹸中の加水分解小麦に対する経皮経粘膜感作が発症原因として疑われた成人小麦アナフィラキシーの4例. アレルギー 2009 ; 58 : 1325.
- 2) 茶のしずく石鹸等による小麦アレルギー情報サイト. URL : <http://jsall-web.sharepoint.com/Pages/default.aspx>.
- 3) 厚生労働省医薬食品局安全対策課長/審査管理課長通知「加水分解コムギ末を含有する医薬部外品・化粧品の使用上の注意事項等について」(平成22年10月15日 薬食安発1015第2号及び薬食審査発1015第13号).
- 4) 厚生労働省医薬食品局長通知「医薬部外品原料規格2006について」(平成18年3月31日 薬食発第0331030号)別添「医薬部外品原料規格2006」.
- 5) Gourbeyre P, Denery-Papini S, Larré C, et al. Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. *Mol Nutr Food Res* 2012 ; 56 : 336.
- 6) Denery-Papini S, Bodinier M, Larré C, et al. Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat : specific epitopes linked to deamidation. *Allergy* 2012 ; 67 : 1023.
- 7) Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, et al. Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int* 2013 ; 62 : 435.
- 8) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, et al. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2013 ; 132 : 1436.
- 9) Kuhn KS, Stehle P, Fürst P. Quantitative analyses of glutamine in peptides and proteins. *J Agric Food Chem* 1996 ; 44 : 1808.
- 10) Hsieh KY, Tsai CC, Herbert CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2003 ; 33 : 1067.
- 11) Birmingham NP, Parvataneni S, Hassan HM, 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.
- 12) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, et al. Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten. *Allergy* 2012 ; 67 : 1392.
- 13) 安達玲子, 中村里香, 酒井信夫, 手島玲子. 加水分解タンパク質の経皮感作能. 臨床免疫・アレルギー科 2013 ; 59 : 598.

* * *

Epidemiological link between wheat allergy and exposure to hydrolyzed wheat protein in facial soap

Y. Fukutomi¹, M. Taniguchi¹, H. Nakamura² & K. Akiyama¹¹Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Sagamihara National Hospital, Sagamihara, Kanagawa; ²Department of Environmental and Preventive Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa, Ishikawa, Japan

To cite this article: Fukutomi Y, Taniguchi M, Nakamura H, Akiyama K. Epidemiological link between wheat allergy and exposure to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *Allergy* 2014; **69**: 1405–1411.

Keywords

adult food allergy; hydrolyzed wheat protein; protein hydrolysates; risk factors; wheat allergy.

Correspondence

Yuma Fukutomi, MD, PhD, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Sagamihara National Hospital, 18-1 Sakuradai, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-0392, Japan.
Tel.: +81-42-742-8311
Fax: +81-42-742-7990
E-mail: y-fukutomi@sagamihara-hosp.gr.jp

Accepted for publication 4 July 2014

DOI:10.1111/all.12481

Edited by: Antonella Muraro

Abstract

Background: Recent studies have highlighted the importance of extra-intestinal routes of sensitization to food-related allergens as the cause of epidemics of food allergy. Instances of Japanese women developing food allergy to wheat after exposure to hydrolyzed wheat protein (HWP) present in facial soap have been reported. However, the epidemiologic impact of these ingredients as a cause of food allergy has not been well studied.

Methods: To clarify the epidemiological relationship between food allergy to wheat and contact exposure to HWP, a case-control study of Japanese women aged 20–54 years with self-reported wheat allergy (WA) (cases, $n = 157$) and age-matched control subjects without WA (controls, $n = 449$) was performed using a large-scale Web-based research panel. Subjects answered a Web-based questionnaire regarding the use of skin and hair care products, as well as other possible risk factors.

Results: Current use of an HWP-containing facial soap (Cha no Shizuku; Yuka) was significantly associated with an increased risk of WA (adjusted odds ratio, 2.6; 95% confidence interval, 1.2–5.7; frequencies of current use in cases and controls; 11% and 6%, respectively). Use of Cha no Shizuku was more common in subjects with more recent-onset WA, implying that this soap may have contributed to the recent epidemic of WA.

Conclusions: An epidemiological relationship between WA and contact exposure to HWP has been documented. This study implicates a possible role of contact exposure to food-derived protein hydrolysates as a risk factor for the development of food allergy manifesting itself as anaphylaxis.

The burden of food allergy is an emerging public health problem worldwide (1, 2). The prevalence of adult-onset food allergy as well as childhood allergy has increased in recent decades (3). However, little is known about the cause of this increase, especially in adults. Recently, some studies have highlighted the importance of an extra-intestinal route of sensitization to food-related allergens, that is, environmental allergens, as the cause of food allergy (4–6). Birch pollen-related food

allergy (7–9) and latex-fruit allergy syndrome (10, 11) are well-studied and characterized examples of this.

Reflecting the worldwide trend toward the use of 'natural materials' as ingredients of skin and hair care products including facial soaps, body soaps, cosmetics, shampoo, hair treatments and hair conditioner, food-derived protein hydrolysates is becoming increasingly commonly used as moisturizers or emulsifiers. Considering the potential importance of the extra-intestinal route of sensitization, it can be hypothesized that skin and/or rhinoconjunctival exposure to these ingredients may be a cause of the development of food allergy (12–16). However, epidemiological evidence supporting this hypothesis has been limited so far.

In late 2010, a small number of cases of Japanese women with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis (WDEIA)

Abbreviations

AD, atopic dermatitis; AR, allergic rhinitis; BA, bronchial asthma; CIs, confidence intervals; HWP, hydrolyzed wheat protein; OR, odds ratio; WA, wheat allergy; WDEIA, wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis.

associated with skin and/or rhinoconjunctival contact exposure to hydrolyzed wheat protein (HWP) in facial soap were reported (17, 18). After the publication of these papers, numerous similar cases have been reported from various institutions in Japan (19–23). This suggests that primary sensitization to HWP contained in skin and hair care products resulting in the development of food allergy to wheat may be relatively common in Japanese women. It is hypothesized that HWP contained in these products might be contributing to the epidemic of wheat allergy (WA) in women.

The aim of this study was to elucidate the epidemiological link between WA and exposure to HWP contained in skin and hair care products. Because WA is relatively rare in the general population, a case–control design was chosen. We used a large-scale Web-based research panel to recruit wheat-allergic patients and age-matched controls. The use of skin and hair care products containing HWP was compared between the cases and controls.

Methods

Study design

A case–control study of Japanese women aged 20–54 years was performed. Both wheat-allergic subjects (cases) and control subjects were selected from the population living in Japan, which was obtained using a large-scale Web-based

research panel. Characteristics of the studied Internet research monitor population are shown in the Supporting information. The ethics committee of Sagamihara National Hospital approved the study protocol (No. 7 in 2010).

Web-based survey

Figure 1 shows the protocol for the Web-based survey. First, the research company sent e-mails inviting participation in the screening survey. These were sent to an age-stratified random sample of subjects in the research panel between January 14 and January 25, 2011. No further invitations were sent once 200 000 responses had been obtained. The Web-based screening questionnaire consisted of five questions regarding WA (Q1–Q5, shown in the Appendix S1). Subjects (hereafter, cases) were considered as having self-reported WA if they met the following three criteria: (i) affirmative response to Q1, ‘Do you experience any allergic symptoms after eating certain foods?’; (ii) indicating ‘wheat’ in the response to Q2, ‘Which of the foods listed below are you allergic to?’; and (iii) indicating <2 h in their response to Q3, ‘How many hours after eating wheat do your allergic symptoms appear?’. Three times as many age-matched controls were also chosen from subjects who denied food allergy in Q1. Consequently, e-mail of invitations to the secondary survey was sent to 328 cases and 984 controls.

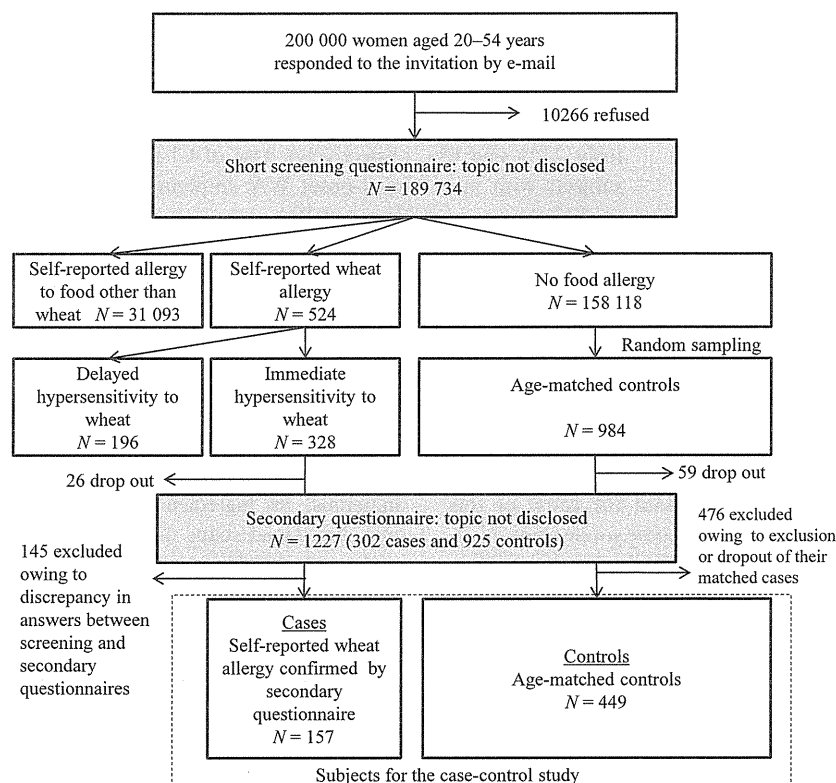


Figure 1 Protocol of Web-based survey.

The first e-mail inviting participation in the secondary survey was sent on January 28, 2011, and reminders were sent up to three times until we received answers. The secondary survey ended on February 7, 2011. The secondary questionnaire contained detailed questions regarding WA, allergic diseases other than food allergy, and use of skin and hair care products. To ensure the validity of the answers in the screening questionnaire, the secondary questionnaire included the same questions as Q1 and Q2 of the former and in addition the question 'At what age did you become allergic to wheat?', which was almost the same as Q5 of the screening questionnaire. Of the 328 cases to whom an invitation to the secondary survey was sent, 302 responded (for a response rate of 92%). We excluded 145 cases that showed discrepancies between the answers to these three questions in the screening and secondary questionnaires. Finally, data from 157 cases and 449 matched controls could be analyzed here.

Questions in the secondary questionnaire

The secondary questionnaire included questions about the use of soap, shampoo, hair treatment and conditioner, and cosmetics. All the popular brands of skin and hair care products in Japan were listed on the questionnaire, and subjects were asked to indicate which product they were 'currently using' or 'have used before' in the past 5 years. If the currently used brand was not listed, subjects were asked to provide the name of the brand they were using. If subjects gave an affirmative response for current or past use of the HWP-containing facial soap 'Cha no Shizuku' (Yuka, Fukuoka, Japan), the causal brand in most of the cases reported (17, 21), additional questions were posed on when they started to use and when they discontinued use of this brand and whether they experienced allergic symptoms after contact with the soap.

The questionnaire also included questions about possible risk factors associated with WA, namely smoking status, weight, height, allergic rhinitis (AR), atopic dermatitis (AD), and bronchial asthma (BA) comorbidities. Cases with WA were also asked whether their allergic symptoms were induced or exacerbated by exercise, whether they had been diagnosed as having WDEIA by their doctor, the frequency of WA episodes over the last 12 months, how much wheat product they consumed, and the type of symptoms induced by wheat ingestion.

Statistical analysis

The collected data were analyzed using SPSS ver. 21.0 (IBM, Tokyo, Japan). Descriptive statistics were used to characterize the cases and control subjects. Conditional logistic regression was used to compare the demographics of cases and controls and determine adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CIs) for the association between use of skin and hair care product and risk of WA.

The chi-square test and Fisher's exact test were used to determine whether distributions of categorical variables significantly differed from each other. Trend analysis was tested with the use of SPSS CROSSTAB command's linear-by-linear

association test. A *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Characteristics of cases and controls

Demographic characteristics of 157 subjects with self-reported WA and the age-matched controls are shown in Table 1. Cases were significantly more likely to have AR, BA, and AD than control subjects. In 85% of the cases, the onset of WA was in adolescence or adulthood and 52% had their WA diagnosed by a doctor.

Table 1 Demographic characteristics of cases with self-reported WA and their age-matched control subjects

	Cases (<i>n</i> = 157)	Control subjects (<i>n</i> = 449)	<i>P</i> - value
Gender (=female), <i>n</i> (%)	157 (100)	449 (100)	N.A.
Age, years, mean \pm SD	35.2 \pm 7.9	35.3 \pm 7.8	N.A.
Allergic diseases, <i>n</i> (%)			
Allergic rhinitis	119 (76)	226 (50)	<0.001
Asthma	37 (24)	23 (5)	<0.001
Atopic dermatitis	58 (37)	56 (12)	<0.001
Smoking status, <i>n</i> (%)			
Non-smoker	117 (75)	326 (73)	0.164
Past smoker	13 (8)	62 (14)	
Current smoker	27 (17)	61 (14)	
Body mass index, kg/m ² , mean \pm SD	21.6 \pm 3.6	21.0 \pm 3.2	0.067
Presentation of WA			
Onset age >12 years, <i>n</i> (%)	133 (85)	–	
WA diagnosed by doctor, <i>n</i> (%)	81 (52)	–	
Exacerbation of WA symptoms by exercise, <i>n</i> (%)	67 (43)	–	
WDEIA diagnosed by doctor, <i>n</i> (%)	31 (20)	–	
Frequency of episodes of WA during the last 12 months, <i>n</i> (%)			
0	28 (18)	–	
1–2	46 (29)	–	
3–5	37 (24)	–	
6–10	16 (10)	–	
11–	30 (19)	–	
How much wheat have you eaten recently?			
No wheat	13 (8)	–	
A small amount of wheat	45 (29)	–	
A usual amount of wheat	90 (57)	–	
Avoid eating only before exercise	9 (6)	–	

WA, wheat allergy; WDEIA, wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis; N.A., not assessed.

Use of skin and hair care products as risk factors for WA

Frequencies of the use of different skin and hair care products are shown in Table 2. All brands which were currently used by more than 3% of the cases are shown in the table and were analyzed. Because comorbid allergic diseases were associated with the use of some brands of skin and hair care products (data not shown), statistical analysis of the association between the use of these products and risk of WA was performed after adjustment for AR, BA, and AD. The

Table 2 Frequency of current use of each skin and hair care product and associations with self-reported wheat allergy

Name of brand*	No. of current users (%)		Adjusted OR† (95%CI)	P-value
	Cases (n = 157)	Controls (n = 449)		
Facial soaps and body soaps				
K.B.	31 (19.7)	118 (26.3)	0.7 (0.4–1.1)	0.111
U.D.	18 (11.5)	60 (13.4)	0.8 (0.4–1.5)	0.506
Cha no Shizuku‡	17 (10.8)	26 (5.8)	2.6 (1.2–5.6)	0.014
G.C.	15 (9.6)	56 (12.5)	0.9 (0.5–1.9)	0.866
D.C.	10 (6.4)	16 (3.6)	2.2 (0.2–23.1)	0.519
U.L.	5 (3.2)	11 (2.4)	1.2 (0.4–3.7)	0.817
Shampoo				
U.L.	19 (12.1)	70 (15.6)	1.1 (0.8–1.5)	0.607
P.P.	13 (8.3)	67 (14.9)	0.7 (0.3–1.3)	0.207
S.W.‡	13 (8.3)	17 (3.8)	1.8 (0.8–4.3)	0.184
S.R.	10 (6.4)	34 (7.6)	0.8 (0.4–1.8)	0.577
C.I.‡	8 (5.1)	24 (5.3)	1.2 (0.5–3.0)	0.736
P.H.	8 (5.1)	21 (4.7)	1.3 (0.5–3.4)	0.542
S.G.	5 (3.2)	12 (2.7)	1.6 (0.5–5.1)	0.416
Hair treatment				
U.L.	17 (10.8)	66 (14.7)	0.9 (0.5–1.7)	0.755
P.P.	16 (10.2)	73 (16.3)	0.8 (0.4–1.4)	0.392
S.W.‡	12 (7.6)	17 (3.8)	1.5 (0.6–3.6)	0.416
S.R.	9 (5.7)	32 (7.1)	0.8 (0.4–1.9)	0.678
P.H.	8 (5.1)	21 (4.7)	1.5 (0.6–3.7)	0.430
C.I.‡	7 (4.5)	28 (6.2)	0.9 (0.4–2.3)	0.844
K.E.	6 (3.8)	23 (5.1)	0.5 (0.2–1.5)	0.246
K.A.	6 (3.8)	23 (5.1)	0.6 (0.2–1.6)	0.295
S.G.	5 (3.2)	11 (2.4)	1.6 (0.5–5.2)	0.404
P.V.	5 (3.2)	9 (2.0)	1.1 (0.3–4.6)	0.844
Cosmetics				
R.H.	18 (11.5)	62 (13.8)	0.8 (0.4–1.5)	0.531
D.S.‡	17 (10.8)	28 (6.2)	1.7 (0.8–3.7)	0.136
D.C.	12 (7.6)	34 (7.6)	1.2 (0.6–2.5)	0.610
F.N.	8 (5.1)	16 (3.6)	1.0 (0.4–2.6)	0.996
O.R.	7 (4.5)	24 (5.3)	0.8 (0.3–2.0)	0.581
S.E.	7 (4.5)	16 (3.6)	0.9 (0.3–2.8)	0.903
A.L.	5 (3.2)	10 (2.2)	1.3 (0.4–4.7)	0.667

OR, odds ratio.

*Names of brands other than 'Cha no Shizuku' (Yuka) are indicated by their initials.

†Adjusted for allergic rhinitis, atopic dermatitis, and asthma.

‡Some products of this brand contain hydrolyzed wheat protein.

frequency of cases currently using the HWP-containing soap, 'Cha no Shizuku', was 11%, significantly higher than in control subjects (5%, $P = 0.014$), with an adjusted OR of 2.6 (95% CIs, 1.2–5.6). As shown in Table 2, some other brands also contained HWP. However, use of no other brand showed a statistically significant association with WA. To compare the risk of WA between users of 'Cha no Shizuku' soap and users of other HWP-containing products, we performed an unconditional multivariate logistic regression analysis after adjustment for AR, BA, and AD and after limiting the subjects to those who were currently using any of the HWP-containing brands listed in Table 2. When compared with the use of other HWP-containing brands, use of 'Cha no Shizuku' was associated with an increased risk of WA with an adjusted OR of 2.3 (95%CI, 0.94–5.56) (data not shown). However, this difference did not reach statistical significance ($P = 0.07$).

Associations between the use of 'Cha no Shizuku' and WA were also evaluated using different exposure parameters. The subjects were divided into three groups according to their history of product use as follows: (i) subjects who were currently using the product (current users), (ii) those who had used it before but not currently (past users), and (iii) those who had never used it (never users). We found that only current use was associated with WA with an OR of 2.6 (1.2–5.7) (Table 3, model 1). Subjects were then divided into four groups according to the duration of use of the product. It can be seen that the duration of use ≥ 2 years was associated with an increased risk of WA with an OR of 4.2 (1.6–10.7) (Table 3, model 2). In an analysis of all subjects who had ever used the soap (current or past users), current users were more likely to have used it for ≥ 2 years ($P = 0.005$).

Of the 29 subjects who had ever used the soap (current or past users) in the allergic group, seven experienced itchiness of the face and/or eyes, sneezing, a runny nose, or

Table 3 Association between use of the facial soap 'Cha no Shizuku' containing HWP and self-reported wheat allergy

Facial soap containing HWP, 'Cha no Shizuku'	Cases (n = 157) No. (%)	Controls (n = 449) No. (%)	Adjusted OR* (95% CI)
Model 1			
History of use			
Never used	128 (82)	383 (85)	1
Ever used	12 (8)	40 (9)	1.0 (0.4–2.1)
Currently using	17 (11)	26 (6)	2.6 (1.2–5.7)
Model 2			
Duration of use			
Never used	128 (82)	383 (85)	1
<1 year	12 (8)	41 (9)	0.9 (0.4–2.1)
1 year	4 (3)	14 (3)	1.0 (0.3–3.5)
≥ 2 years	13 (8)	11 (2)	4.2 (1.6–10.7)

OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval; HWP, hydrolyzed wheat protein.

*Adjusted for allergic rhinitis, atopic dermatitis, and asthma.

swelling of the eyelids after using it (24%). This was significantly higher than in the control group (5%, 3/66) ($P = 0.008$).

Presentation of WA in relation to the use of 'Cha no Shizuku'

To further elucidate the relationship between the use of the soap and WA, we assessed associations between history of use and the presentation of WA. Figure 2 shows the frequency of current users and past users relative to the time of onset of WA. Frequencies of current users were higher in more recent-onset WA (P for trend = 0.002), suggesting that the use of the soap is associated with the recent epidemic of WA. Compared with the frequency of current users in the controls, a significantly higher frequency was observed only in cases who had developed WA within the last 4 years ($P = 0.001$). This might be explained by the fact that this facial soap started to be sold in 2004, namely 7 years before this study.

Associations between history of soap use and presentation with WA are shown in Table 4. Current use of the soap was associated with doctor-diagnosed WA. Although the overall frequency of diagnosed WA was 52%, it was as high as 76% among the current users. Additionally, eye and nose symptoms after wheat ingestion were more common among current users than never users, and about half of the current users were also diagnosed as having WDEIA by their doctor. These presentations of WA were compatible with those of

cases who were clinically diagnosed as suffering from WDEIA induced by this soap (17, 21).

Discussion

This Web-based case-control study explored epidemiological relationships between the use of the HWP-containing facial soap 'Cha no Shizuku' and risk of WA. Current use of the soap was significantly associated with increased risk of WA with an adjusted OR of 2.6. Additionally, current use of this soap was more common in cases with more recent-onset WA, implying that it may have contributed to the recent epidemic of WA. To the best of our knowledge, this is the first study that shows the epidemiological impact of contact exposure to food-derived protein in skin and hair care products on the epidemic of adult-onset food allergy.

'Cha no Shizuku' was a popular facial soap in Japan. The company (Yuka) sold more than 40 million bars to more than 4 million customers up to 2010. This product contained an acid-HWP named Glupearl 19S (Katayama Chemical, Inc, Osaka, Japan) included for its moisturizing effect and emulsification function. The soap started to be sold in 2004, and sales increased with time. A minority of allergists and dermatologists began to become aware of the potential role of HWP in this soap as an inducer of WA in 2009–2010. However, this was not recognized by the general allergist and the public until the company started a voluntary recall of the HWP-containing soap on May 25, 2011. After the voluntary recall, the allergy problem induced by this soap was publicized by the media and in the meantime has grown to be recognized as a major public health problem in Japan. Therefore, the current study was performed before the general recognition of the allergy problem. In October 2011, the Japanese Society of Allergology (JSA) determined the diagnostic criteria for the immediate WA induced by exposure to Glupearl 19S contained in this soap (21). To date, more than 2000 patients meeting these criteria have been reported to the JSA.

Among the skin and hair care products containing HWP, a statistically significant association with WA was observed only for 'Cha no Shizuku' soap. The reason for this cannot be determined from the present study. Differences in the amount of HWP in the different products may explain this, because 'Cha no Shizuku' contained the relatively high level of 0.3% of HWP. Another possibility may relate to the high volume of sales of this soap, resulting in a sufficient sample size for reliable statistical analysis. One more explanation may relate to the difference in biochemical properties between Glupearl 19S and the HWPs in other products. HWPs produced by different companies have been used in skin and hair care products in Japan. A strong sensitizing capacity of Glupearl 19S has been shown in animal models, although not in a direct comparison with other HWPs (24). Glupearl 19S contains higher molecular weight proteins, which may increase its allergenicity (25, 26). More recently, studies have shown that the deamidation of glutamine residues in gluten by acid-heat treatment also contributes to the

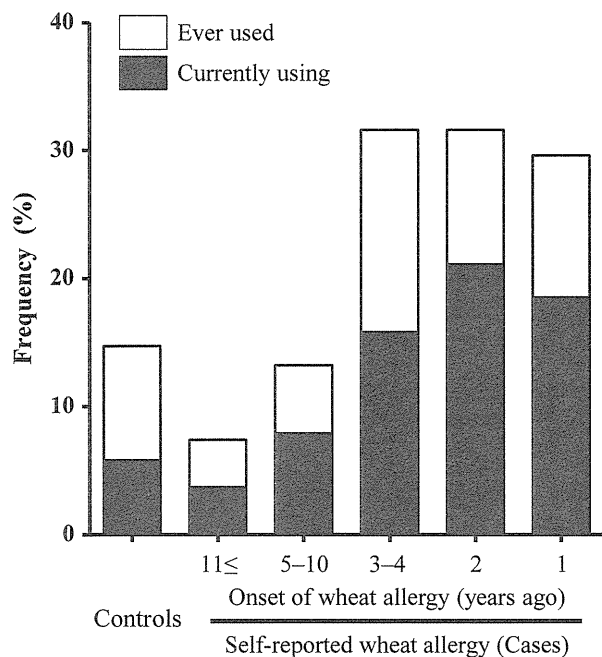


Figure 2 Frequencies of subjects who were currently using or had ever used the facial soap 'Cha no Shizuku' containing hydrolyzed wheat protein according to time of onset of wheat allergy.